

高效液相色谱-大气压化学电离串联质谱法研究 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮体外模拟代谢作用

范腾蛟, 赵丽娇, 张 然, 钟儒刚

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124)

摘要:烟草特异亚硝胺 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)是一种存在于烟草烟气及烟草制品中的强致癌物,其致癌机理是通过细胞色素 P450 酶的代谢活化生成活泼亲电试剂,导致 DNA 损伤,因此,建立 NNK 体外模拟代谢产物的定量分析方法对于研究烟草致癌物具有重要意义。本实验利用高效液相色谱-大气压化学电离串联质谱法(HPLC-APCI-MS/MS)对 NNK 代谢产物 4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(HPB)进行定量分析。使用选择反应扫描(SRM)模式监测了 HPB 和内标[3,3,4,4-D₄]HPB,分析方法在 0.2~400 nmol/L 范围内线性关系良好,线性相关系数 $R^2=0.9999$,检出限(LOD)为 0.025 nmol/L (S/N=3),定量限(LOQ)为 0.05 nmol/L (S/N=10)。方法的日内和日间准确度为 96.6%~101.8%,回收率为 98.1%~102.6%。所建立的 NNK 体外模拟代谢模型可用于烟草特异亚硝胺代谢活化分子机制的研究,为定量分析吸烟致癌相关生物标志物奠定基础。

关键词:4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK);4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(HPB);体外模拟代谢;高效液相色谱-大气压化学电离串联质谱法(HPLC-APCI-MS/MS)

中图分类号:O 657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2014)06-0495-07

doi:10.7538/zpxb.youxian.2014.0038

Study on In vitro Simulation of the Metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Using HPLC-APCI-MS/MS

FAN Teng-jiao, ZHAO Li-jiao, ZHANG Ran, ZHONG Ru-gang

(Beijing Key Laboratory of Environmental & Viral Oncology, College of Life Science & Bioengineering,
Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) is a potent carcinogen present in tobacco products and tobacco smoke. The carcinogenic mechanism of NNK is involved in the DNA damage induced by the active electrophiles

收稿日期:2013-11-25;修回日期:2014-03-24

基金项目:国家自然科学基金(21277001);北京市科技新星计划项目(2009B08);北京市教委科技计划项目(KZ201110005003)资助

作者简介:范腾蛟(1988~),女(汉族),北京人,硕士研究生,生物化学与分子生物学专业。E-mail: fantengjiao@emails.bjut.edu.cn

通信作者:赵丽娇(1979~),女(汉族),山东潍坊人,博士,副教授,从事癌症防治及生物标志物研究。E-mail: zhaolijiao@bjut.edu.cn

网络出版时间:2014-08-20;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7538/zpxb.youxian.2014.0038.html>

generated from the metabolic activation of NNK catalyzed by cytochrome P450. It is significant to establish an *in vitro* metabolism model of NNK and the quantitation method for the investigation of tobacco carcinogens metabolites. In this work, the NNK metabolite of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB) was quantitatively analyzed by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS). Selective reaction monitoring (SRM) was employed for determining HPB and the internal standard [3,3,4,4-D₄]HPB simultaneously. The method shows good linearity within 0.2—400 nmol/L with the correlation coefficient (R^2) 0.999 9. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) are 0.025 nmol/L ($S/N=3$) and 0.05 nmol/L ($S/N=10$), respectively. The inter-day and intra-day accuracy range from 96.6% to 101.8%, and the recovery is 98.1%—102.6%. The *in vitro* metabolism model of NNK can be used to elucidate the molecular mechanism of the metabolic activation of tobacco-specific nitrosamine. This work laid a foundation for the quantification of biomarkers for tobacco carcinogenesis.

Key words: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK); 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB); *in vitro* simulation of metabolism; high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS)

烟草特异亚硝胺(tobacco specific nitrosamine, TSNA)是烟草产品中特有的一类致癌物,由尼古丁和相关生物碱经亚硝化产生,可诱发肺癌、食管癌、口腔癌、鼻腔癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌等多种癌症^[1-2]。目前已发现的 TSNA 主要有 7 种,其结构示于图

1。其中 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)对啮齿类动物具有较强的致癌性,被国际癌症研究所(IARC)列为 A1 组致癌物质^[3-4]。NNK 在细胞色素 P450 (CYP450)的作用下发生代谢活化,生成活泼亲电试剂,导致 DNA 损伤从而诱发癌症。

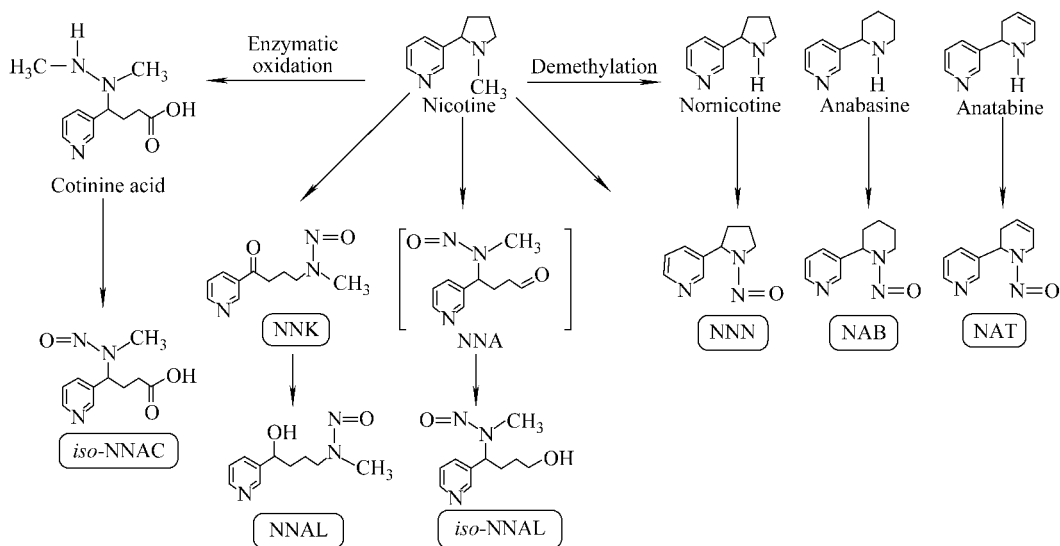


图 1 烟草特异亚硝胺的结构以及烟草生物碱前体

Fig. 1 Structures of TSNA and precursors of tobacco alkaloid

CYP450 催化下的 α -羟基化反应是 NNK 致癌的重要代谢途径之一。NNK 是非对称亚硝胺:有两条 α -羟基化反应代谢途径,即 α -甲基羟基化反应途径(pathway A)和 α -亚甲基羟基化反应途径(pathway B),其代谢机理示于图 2。途径 A 是发生在啮齿类动物肺中的主要反应形式,可直接代谢产生 4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(HPB),代谢中间体(1)可与 DNA 发生吡啶基氧代丁基化作用,生成释放 HPB 的 DNA 加合物,或者与血红蛋白结合生成释放 HPB 的血红蛋白加合物^[5]。途径 B 可直接代谢产生醛酮和甲基重氮氢氧化物(2),后者可与 DNA 反应生成甲基 DNA 加合物。研究表明,在人体中不同亚型 CYP450 催化 NNK 的 α -羟基化反应效率为 $2A13 > 2B6 > 2A6 > 1A2 \sim 1A1 > 2D6 \sim 2E1 \sim 3A4$ ^[4]。CYP2A13 在 NNK 的 α -羟基化反应中较其他亚型具有更重要的作用,且在呼吸道组织中的催化效率更高^[6-7],而 CYP2A6 在肝组织中的催化效率较其他组织高^[8-9],这使得 NNK 代谢具有一定的器官特异性。此外,NNK 代谢还具有种族特异性,例如同样是在肝中的 α -亚甲基羟基化反应,主导大鼠体内 NNK 代谢的是 1A2、2B1 和 3A 三种亚型的 P450,而主导人体内代谢的则是 2A6 和 3A4 两种亚型的 P450^[8,10]。

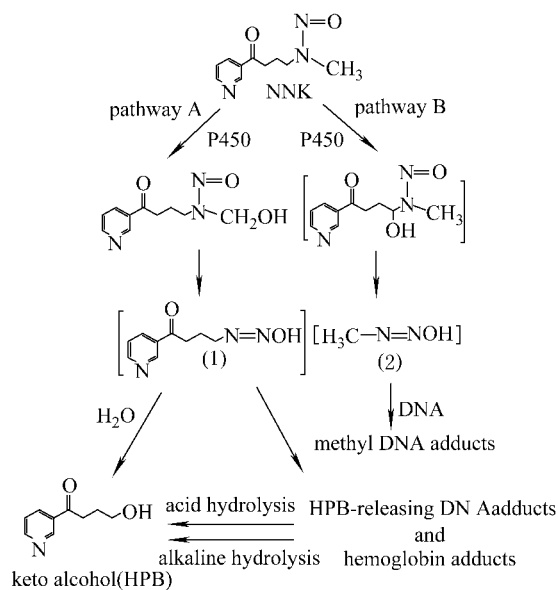


图 2 CPY450 催化下的 NNK 代谢机理

Fig. 2 Metabolic mechanism of NNK catalyzed by cytochrome P450

目前已有大量关于 NNK 代谢产物测定的相关报道。Mullett 等^[11]利用自动固相微萃取-高效液相色谱(HPLC)技术检测了 NNK 及其代谢产物 HPB。Lee 等^[12]使用高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-ESI-MS)法检测了 A/J 小鼠尿液中 HPB 等 5 种 NNK 代谢物。Chiang 等^[13]使用 HPLC/MS 法检测了经 NNK 处理的 A549 和 H1437 细胞中 NNK、NNAL(4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁醇)和 HPB 的含量,结果表明在细胞中表达 CYP2A13 和 CYP2A6 可明显增强 NNK 的代谢。Lang 等^[14]利用亲水色谱-串联质谱法测定了兔血液中 NNK 及其代谢物 HPB 和 NNAL 等 8 种化合物,发现 α -亚甲基羟基化反应是 NNK 在兔体内发生 α -羟基化反应的主要途径。以上研究表明,HPB 可以作为一种标志物应用于 NNK 体内代谢活化并致癌的相关研究。

体外模拟代谢是研究外源化学物质体内代谢机制和代谢活性常用的实验方法。Wang 等^[15]和 Sturla 等^[16]用 4-(乙酰基甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNKOAc)模拟 NNK 代谢产物,测定了其导致的 DNA 加合物,结果表明,NNK-DNA 加合物能够释放 HPB,HPB 可以作为 NNK 导致 DNA 损伤的生物标志物。本研究采用高效液相色谱-大气压化学电离串联质谱(HPLC-APCI-MS/MS)法对 NNK 体外模拟代谢产物进行定量分析,旨在为 TSNA 致癌生物标志物的相关研究提供可靠的实验方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

TSQ Quantum 高效液相色谱-质谱联用仪:美国 Thermo 公司产品;Z-323K 型高速离心机:德国 Hermle 公司产品;BS-210S 电子分析天平:德国 Sartorius 公司产品;PALL 超纯水装置:美国 Pall 公司产品。

NNK、HPB、[3, 3, 4, 4-D₄]-HPB:加拿大 Toronto Research Chemicals 公司产品;大鼠肝微粒体:齐氏生物科技有限公司产品;葡萄糖-6-磷酸二钠盐、还原型辅酶 II 四钠盐:百灵威(J&K Chemical)公司产品;乙腈、甲醇(色谱纯)、乙酸铵:美国 Sigma 公司产品;Microcon YM-30 微孔离心过滤器:美国 Millipore 公司产

品;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯):天津市福晨化学试剂厂产品;氯化钾、氯化镁(分析纯):北京化工厂产品;三羟甲基氨基甲烷(Tris,分析纯):北京鼎国生物技术有限公司产品。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C18 反相色谱柱(2.1 m×150 mm×5 μm);柱温 25 °C;流动相为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(A)和乙腈(B),流速 0.2 mL/min;检测波长 230 nm(二级管阵列检测器);梯度洗脱程序:0~5 min、98%A,5~15 min、98%~80%A,15~20 min、80%~75%A,20~25 min、75%~80%A,25~35 min、80%~98%A,35~45 min、98%A;进样量 25 μL。

1.2.2 质谱条件 大气压化学电离源,正离子检测模式;放电电流 4.0 μA;雾化器温度 450 °C;鞘气(N₂)压力 138 kPa;辅气(N₂)压力 35 kPa;离子传输毛细管温度 270 °C;导管入口补偿电压 60 V;碰撞压力 0.2 Pa;碰撞能量 20 V;碰撞诱导解析能量 5 V;质谱定量分析采用选择反应扫描模式(SRM),对 m/z 166→106 和 m/z 170→106 离子通道进行监测。

1.3 NNK 体外代谢实验

向 5 支玻璃反应管中分别加入 300 μL 10% 大鼠肝微粒体工作液(含 30 μL 大鼠肝微粒体原液),180 μL 浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4),6 μL 浓度为 1.65 mol/L 的 KCl 溶液,6 μL 浓度为 0.4 mol/L 的 MgCl₂ 溶液,30 μL 浓度为 0.05 mol/L 的葡萄糖-6-磷酸二钠盐溶液,48 μL 浓度为 0.025 mol/L 的还原型辅酶 II 四钠盐溶液),于 37 °C 预热 20 min。将其中一只反应管内的溶液作为空白对照样品,向另外 4 只反应管中分别加入 1 400 μL NNK 溶液,用 Tris-HCl 溶液(10 mmol/L,pH 7.4)定容至 10 mL,使 NNK 的浓度分别为 0.01、0.1、1、10 mmol/L。各反应管中 D₄-HPB 内标物的浓度为 100 nmol/L,于 37 °C 反应 12 h,每小时分别从 5 支反应管中取出 200 μL 反应混合液,置于 -20 °C 保存。待所有反应完毕后,将反应混合液用 YM-30 离心过滤器过滤,待 HPLC-APCI-MS/MS 分析。

1.4 标准溶液的配制

配制浓度分别为 0.2、0.8、2、8、20、80、200、400 nmol/L 的 HPB 标准溶液,内标物 D₄-HPB 的浓度为 100 nmol/L。以 HPB 和 D₄-HPB 的浓度比为横坐标,HPB 和 D₄-HPB 的峰面积比为纵坐标,绘制标准曲线。

1.5 方法学验证

配制浓度分别为 0.8、4、20、40 nmol/L 的 HPB 标准溶液(D₄-HPB 内标浓度为 100 nmol/L),在拟定分析条件下,一天内进样测定 6 次,得到日内准确度和相对标准偏差;上述样品分别在 3 日内测定 18 次,得到日间精密度和相对标准偏差。向空白对照样品中分别加入 HPB 标准溶液,经过与待测样品相同的处理过程后,在拟定条件下进行分析,并计算加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 方法的灵敏度和准确性

HPB 和 D₄-HPB 标准品的质谱图及碎裂机理示于图 3,其主要碎片离子峰均为 m/z 106。采用 SRM 正离子模式监测 HPB 的 m/z 166→106 和 D₄-HPB 的 m/z 170→106 离子通道,所得离子流图示于图 4,其中 HPB 和 D₄-HPB 的保留时间分别为 19.84 min 和 19.81 min。将 HPB 和 D₄-HPB 的 SRM 峰面积比对其浓度比作图,得到的标准曲线示于图 5。结果表明,HPB 在浓度为 0.2~400 nmol/L 范围内,HPB 和 D₄-HPB 的浓度比与 SRM 峰面积比的线性关系良好,线性相关系数 $R^2=0.9999$ 。方法准确度和精密度的测定结果列于表 1。由表 1 可知,方法的日内和日间准确度分别为 97.2%~101.8%和 96.6~101.1%;日内和日间相对标准偏差均为 1.1%~3.2%。向空白对照样品中加入不同浓度的 HPB 标准溶液,按与待测样品相同的步骤进行处理和分析,测得方法的加标回收率为 98%~103%,详细数据列于表 2。在拟定的分析条件下,以 3 倍信噪比(S/N)测得的 HPB 检出限(LOD)为 0.025 nmol/L,以 10 倍信噪比测得的 HPB 定量限(LOQ)为 0.05 nmol/L。以上结果表明,本方法的灵敏度和准确性均能满足 NNK 代谢物的定量分析。

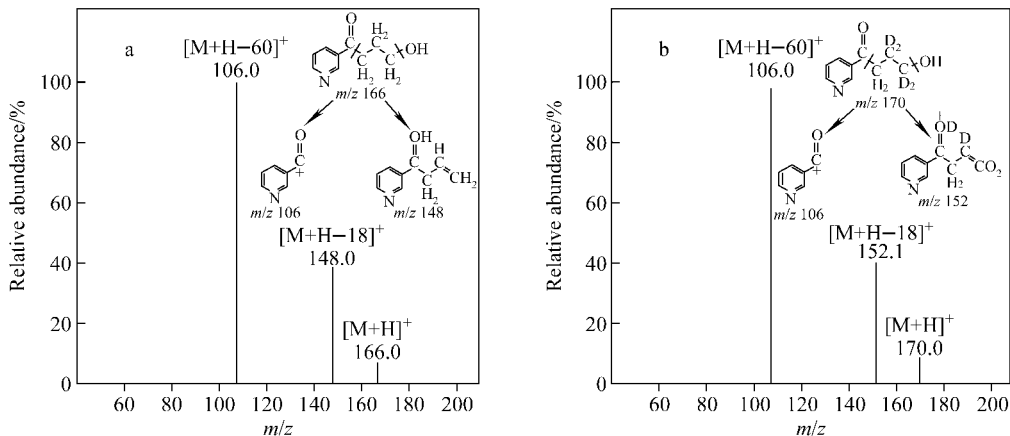


图 3 HPB (a)和 D₄-HPB (b)的二级质谱全扫描图

Fig. 3 MS² full scan spectra for HPB (a) and D₄-HPB (b)

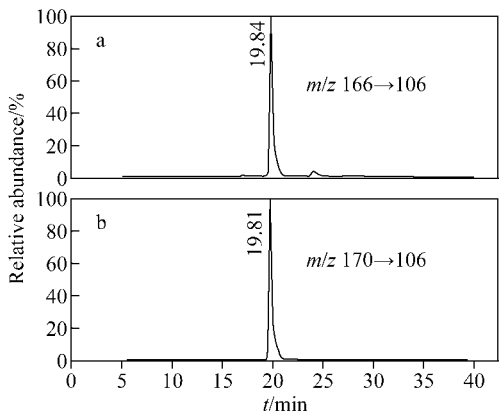


图 4 HPB 标准样品 (a)和 D₄-HPB 内标 (b)的 SRM 离子流图

Fig. 4 SRM chromatograms for HPB standard (a) and D₄-HPB internal standard (b)

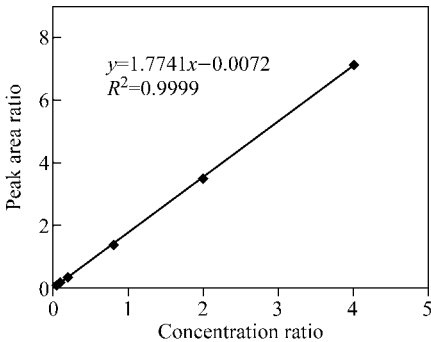


图 5 HPB 和 D₄-HPB 的 SRM 峰面积比对其浓度比作图的标准曲线

Fig. 5 Calibration curve of HPB constructed by plotting SRM peak area ratio between HPB and D₄-HPB versus their concentration ratio

表 1 HPB 测定方法准确度和精密度的结果

Table 1 Precision and accuracy of the supposed method for HPB

样品浓度/ (nmol/L)	日内准确度和相对标准偏差 (n=6)		日间准确度和相对标准偏差 (n=18)	
	相对标准偏差 RSD/%	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%	回收率/%
0.8	3.0	101.8	3.1	98.0
4	1.1	97.2	1.1	96.6
20	3.2	99.4	3.2	99.9
40	3.0	101.1	3.0	101.1

表 2 HPB 在空白溶液中的加标回收率

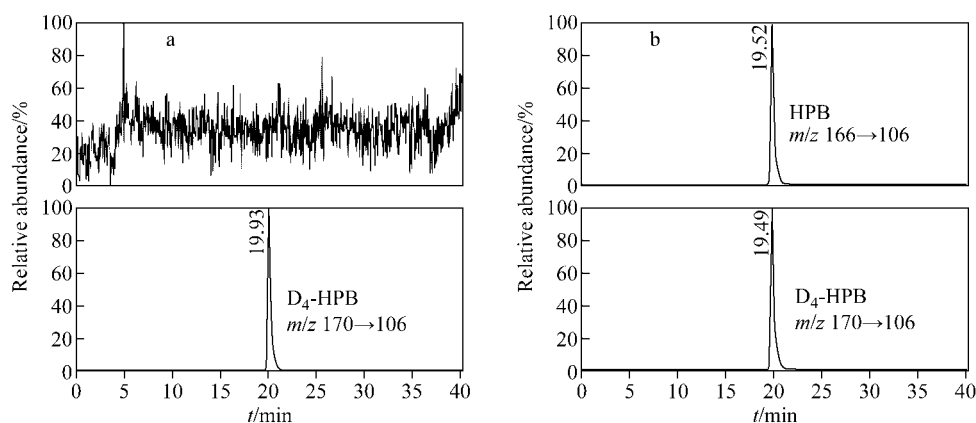
Table 2 Recovies of HPB in the blank sample

加标浓度/(nmol/L)	测定浓度/(nmol/L) (n=3)	相对标准偏差/%	回收率/%
0.8	0.79	2.6	99.0
4	3.92	1.3	98.1
20	20.53	3.7	102.6
40	39.93	2.5	99.9

2.2 体外模拟 NNK 代谢产物 HPB 的测定

空白对照组和模拟代谢组中 HPB 的 SRM 离子流图示于图 6。图 6a 中 m/z 170 $\rightarrow$ 106 离子通道在 19.93 min 出峰,而 m/z 166 $\rightarrow$ 106 离子通道在此时没有信号,表明空白对照组中没有 HPB;而图 6b 显示,模拟代谢组中有明显的 HPB 谱峰,说明该方法的专属性良好。在体外模拟代谢条件下,不同浓度 NNK 代谢物的测定结果示于图 7,可以看出,代谢产物 HPB 的浓度随 NNK 浓度的增加和反应时间的延长而逐渐上升。在反应前 2 h,NNK 浓度为 0.01 mmol/L 和 0.1 mmol/L 的反应体系中,代谢物 HPB 的生成量逐渐上升,但增长趋势缓慢;NNK 浓度

为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的反应体系中,HPB 浓度随反应时间的延长而显著上升,9 h 后上升速率逐渐减缓。Richter 等^[17]对 NNK 在仓鼠、大鼠、小鼠及人类肺组织中的代谢反应动力学进行了研究,发现人肺组织中的主要代谢产物是 HPB;而且 NNK 在人肺中代谢的主要产物和动力学特征与啮齿类动物有显著差异,表明 NNK 的代谢机制与不同亚型 P450 的参与有关。与动物实验相比,本研究所建立的 NNK 体外模拟代谢体系为阐明不同物种、不同器官中各类型 P450 催化下 NNK 代谢及其反应动力学之间的差异提供了一种更加简单、直接,而且具有高灵敏度和专属性的研究方法。



注:图 6b 为 HPB 和 D₄-HPB 在 NNK 浓度为 1mmol/L 下反应 6 h 的离子流图

图 6 空白对照组(a)和体外代谢组(b)中 HPB 和 D₄-HPB 的 SRM 离子流图

Fig. 6 SRM chromatograms for HPB and D₄-HPB of the blank group(a) and the in vitro simulation group(b)

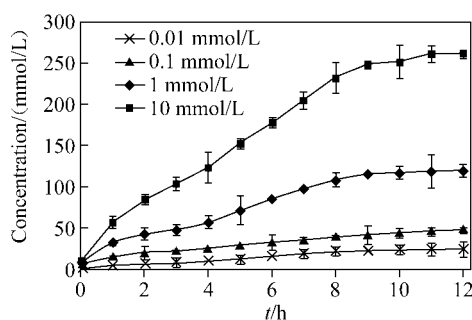


图 7 不同浓度 NNK 代谢产物 HPB 的浓度变化

Fig. 7 Concentration of HPB metabolized from different concentrations of NNK

3 结论

本研究建立了 NNK 的体外模拟代谢模型,利用 HPLC-APCI-MS/MS 法对不同浓度 NNK

经体外模拟代谢生成的产物 HPB 进行了定量分析。结果表明,大鼠肝微粒体中的 P450 能够将反应体系中的 NNK 代谢为 HPB,且 HPB 浓度随 NNK 浓度的增加和反应时间的延长而上升。该体外模拟代谢体系可用于探讨不同亚型 P450 催化下的烟草特异亚硝胺代谢活化的反应动力学研究,以阐明其代谢作用的分子机制,并为烟草特异亚硝胺致癌生物标志物的相关研究提供可靠的定量分析方法。

参考文献:

- [1] HECHT S S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *n*-nitrosamines [J]. Chemical Research in Toxicology, 1998, 11(6): 559-603.
- [2] HECHT S S. Tobacco carcinogens, their biomar-

- kers and tobacco-induced cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(10): 733-744.
- [3] IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Tobacco habits other than smoking; Betel quid and areca nut chewing and some related nitrosamines [R]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1985, 37: 1-268.
- [4] IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Smokeless tobacco and some tobacco-specific *n*-nitrosamines [R]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2007, 89: 1-592.
- [5] HECHT S S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91(14): 1 194-1 210.
- [6] SU T, BAO Z P, ZHANG Q Y, et al. Human cytochrome P450 CYP2A13: Predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone [J]. *Cancer Research*, 2000, 60(18): 5 074-5 079.
- [7] JALAS J R, DING X X, MURPHY S E. Comparative metabolism of the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol by rat cytochrome P450 2A3 and human cytochrome P450 2A13 [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, 31(10): 1 199-1 202.
- [8] PATTEN C J, SMITH T J, MURPHY S E, et al. Kinetic analysis of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by heterologously expressed human P450 enzymes and the effect of P450-specific chemical inhibitors on this activation in human liver microsomes [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 333(1): 127-138.
- [9] MESSINA E S, TYNDALE R F, SELLERS E M. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997, 282(3): 1 608-1 614.
- [10] SMITH T J, GUO Z, HONG J Y, et al. Kinetics and enzyme involvement in the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in microsomes of rat lung and nasal-mucosa [J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(8): 1 409-1 414.
- [11] MULLETT W M, LEVSEN K, BORLAK J, et al. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC for the determination of *n*-nitrosamines in cell cultures [J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(7): 1 695-1 701.
- [12] LEE H L, WANG C Y, LIN S, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tobacco-specific nitrosamine NNK and its five metabolites [J]. *Talanta*, 2007, 73(1): 76-80.
- [13] CHIANG H C, WANG C Y, LEE H L, et al. Metabolic effects of CYP2A6 and CYP2A13 on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced gene mutation-A mammalian cell-based mutagenesis approach [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 253(2): 145-152.
- [14] LANG H L, WANG S, ZHANG Q D, et al. Simultaneous determination of NNK and its seven metabolites in rabbit blood by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(6): 2 083-2 089.
- [15] WANG M Y, CHENG G, STURLA S J, et al. Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, 16(5): 616-626.
- [16] STURLA S J, SCOTT J, LAO Y B, et al. Mass spectrometric analysis of relative levels of pyridyloxobutylation adducts formed in the reaction of DNA with a chemically activated form of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18(6): 1 048-1 055.
- [17] RICHTER E, ENGL J, FRIESENEGGER S, et al. Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in lung tissue from mouse, rat, hamster, and man [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, 22(6): 1 008-1 017.