

基于肝微粒体和肝 S9 成分的食品接触材料中 五氯苯酚体外代谢分析

龚强, 丁利, 朱绍华, 成婧, 焦艳娜, 付善良, 王利兵*

(湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室,
长沙 410004)

摘要: **目的** 通过体外代谢方法, 研究五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)的代谢情况。**方法** 采用肝微粒体和肝 S9 成分 2 种体外代谢试剂模拟体内代谢模式, 通过优化代谢反应条件, 建立 PCP、四氯苯醌(Cl₄BQ)2 种目标物的气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测方法, 对 PCP 进行体外代谢研究分析。**结果** 体外代谢分析的最佳反应条件为代谢试剂浓度 0.75 mg/mL、代谢反应时间 4 h。**结论** 在最优反应条件下分析比较 2 种试剂对 PCP 的代谢情况, 验证了 PCP 的代谢产物为 Cl₄BQ, 且在肝微粒体和肝 S9 成分中的代谢没有显著差异。

关键词: 五氯苯酚; 四氯苯醌; 肝微粒体; 肝 S9 成分; 气相色谱-质谱联用法; 体外代谢

Metabolic study of pentachlorophenol in food contact materials by liver microsome and liver S9 fraction

GONG Qiang, DING Li, ZHU Shao-Hua, CHENG Jing, JIAO Yan-Na, FU Shan-Liang, WANG Li-Bing*

(Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing,
Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the metabolite of pentachlorophenol (PCP) through simulating metabolism *in vivo*. **Methods** Liver microsomes and liver S9 fraction were used as two kinds of *in vitro* metabolism reagents to simulate *in vivo* metabolic pattern. The method for the determination of PCP and tetrachloro-1,4-benzoquinone (Cl₄BQ) was established by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) through optimizing the metabolic reaction conditions, and then *in vitro* metabolism of PCP was analyzed. **Results** The best metabolic reagent concentration was 0.75 mg/mL, and the most suitable reaction time was 4 h. **Conclusion** The two reagents of PCP metabolism under the optimal reaction conditions were compared, Cl₄BQ was validated to be the metabolite of PCP, and there was no significant difference between the metabolism composition of liver microsomes and liver S9 fraction.

KEY WORDS: pentachlorophenol; tetrachloro-1,4-benzoquinone; liver microsome; liver S9 fraction; gas chromatography-mass spectrometry; metabolism *in vitro*

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD29B05)

Fund: Supported by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD29B05)

*通讯作者: 王利兵, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全。E-mail: wanglb0419@126.com

*Corresponding author: WANG Li-Bing, Ph.D, Researcher, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: wanglb0419@126.com

1 引 言

五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)是一种主要用于纺织品、木制品等食品接触材料的防腐剂,五氯苯酚可用于棉花和羊毛等天然纤维的储存、运输,印花浆料防腐防霉的稳定剂,木材防腐、防治朽木菌,还可用作除草剂等。但是由于其大量使用和不恰当处理,导致了土壤和水资源的污染,已成为一种不可忽视的环境污染物,包括我国在内的许多国家都将其列入优先污染物和持久性有机污染物黑名单^[1-3]。大量试验表明,五氯苯酚具有生物毒性,会造成动物畸形和癌变,可富集在人体内,且其自然降解非常缓慢。进入体内的五氯苯酚可长时间蓄积于肺、肝、肾脏及脂肪组织中,产生毒性,对人体具有致畸和致癌性,干扰内分泌、影响免疫功能及阻碍生殖发育等^[4,5]。有报道称 PCP 在体内能代谢成四氯苯醌(tetrachloro-1,4-benzoquinone; Cl₄BQ),后者在体内与 DNA 结合形成大量的 DNA 加合物,从而破坏 DNA,能够提高细胞癌变率,与 PCP 的潜在致癌作用密切相关^[6]。

肝微粒体与肝 S9 成分是 2 种常用的体外代谢试剂,可以用来进行药物或者有毒有害物质的模拟代谢研究。肝 S9 含有肝的重要酶系,其中包括负责药物代谢的 CYP450 药物代谢酶和二相酶(如葡萄糖醛酸转移酶、硫酸转移酶)和其他的一些氧化酶和脱氢酶,如负责酒精代谢的乙酸脱氢酶等。与肝 S9 不同,肝微粒体主要含有负责药物代谢的 CYP450 药物代谢酶^[7-10]。本研究在前期建立 PCP、Cl₄BQ 的气相色谱-质谱联用(GC-MS)检测方法的基础上,采用肝微粒体及肝 S9 2 种代谢试剂,对 PCP 进行体外代谢研究,验证 PCP 是否能够代谢产生 Cl₄BQ,并比较分析 2 种代谢试剂对 PCP 的代谢作用。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 6890N GC/5975C MSD 气相色谱-质谱联用仪(配有电子轰击 EI 离子源及 G1701DA Version D.02.00 数据处理工作站,美国 Agilent 公司);涡旋混匀器(Vortex Genie3,美国 SI 公司);超声波振荡器(KQ-250E,美国舒美公司);水浴锅(WNB,德国 Memmert 公司);-80 °C 深低温冰箱(Forma 700,美国 Thermo 公司)。

甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 Merck 公司);0.1 mol/L 磷酸钾缓冲溶液(pH 7.4);水为超纯水(美国 Millipore 超纯水仪制备);乙醇等试剂为分析纯。肝 S9、肝微粒体、NADHP Regenerating System(溶液 A、溶液 B)(北京汇智泰康公司)。

2.2 标准溶液配制

五氯苯酚(PCP)、四氯苯醌(Cl₄BQ)购自 Dr. S. Ehernstorfer 公司,纯度大于 99%。取上述标准品,用乙醇配成 10.0 mg/mL 的标准储存溶液,4 °C 冷藏避光储存。取适量储备液,用乙醇稀释成浓度为 100.0 μg/mL 的中间标准工作液,4 °C 冷藏避光储存。准确量取适量中间标准工作液,分别配制成不同浓度系列的标准工作溶液,现用现配。

2.3 体外代谢实验

将 50 μL 溶液 A,10 μL 溶液 B,440 μL 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液混匀,配成代谢所需要的孵育体系。加入 10.0 mg/mL PCP 5 μL,37 °C 水浴中预热 5 min,分别加入肝 S9、肝微粒体(浓度为 0.5 mg/mL)。轻轻混匀后,37 °C 水浴中反应 60 min。加入等体积 4 °C 预冷的甲醇终止反应,14000 r/min 离心 5 min,上清过 0.45 μm 滤膜,进 GC-MS 检测。PCP 代谢实验分为 3 组:空白对照组(不加代谢试剂);肝 S9 组;肝微粒体组。分别进行不同代谢试剂浓度及不同代谢反应时间代谢条件优化。

2.4 方 法

2.4.1 色谱条件

色谱柱:VF-5MS 石英毛细柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);升温程序:70 °C 保持 1 min,以 5 °C/min 升至 100 °C,再以 30 °C/min 升至 280 °C,保持 10 min;载气(He)流速 1.0 mL/min,进样量 1 μL;不分流进样。

2.4.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源;电子能量 70 eV;传输线温度 250 °C;离子源温度 280 °C;选择离子监测(SIM)模式。溶剂延迟时间 4 min。检测离子 PCP 为:264, 266, 268;Cl₄BQ 为:87, 209, 246;定量离子分别为:87, 266。

3 结果与分析

3.1 检测条件的优化

以 PCP 和 Cl₄BQ 混合标准溶液为分析物,采用

直接进样、全扫描(scan)检测方式,比较了DB-1701P、DB-35MS和VF-5MS3种类型石英毛细柱对PCP和Cl₄BQ分离效果及色谱峰形的影响。VF-5MS型柱对2种目标物的分离效果最佳,且色谱峰形较好,因此选择作为分离柱。通过对进样口温度、柱温箱初始温度和程序升温条件的进一步优化,得到2.4.1中的色谱条件。在2.4.1所述的分离条件下,Cl₄BQ、PCP的峰形、分离度、目标峰保留时间均较为理想。Cl₄BQ保留时间为11.739 min,PCP的保留时间是11.216 min,PCP与Cl₄BQ混合物标准谱图见图2a所示。通过scan质谱图分别选出PCP和Cl₄BQ的质谱特征离子(Cl₄BQ的全扫描谱图见图1),建立SIM检测方法。选择离子丰度最强的 m/z 87、209、246作为Cl₄BQ的特征离子峰;PCP的特征离子为:264、266、268。

3.2 PCP代谢反应及其代谢产物研究

体外代谢反应是模拟肝细胞代谢环境,对药物或者有毒有害物质进行的模拟代谢研究。常用的试剂有肝微粒体和肝S9 2种。肝S9是将肝组织匀浆后,经14000 r/min离心所得的上清,含有生物转化一相反应所需的P450酶类和二相代谢酶(如葡萄糖醛酸转移酶,甲基转移酶,硫酸转移酶,乙酰基转移酶等),而微粒体中主要含P450酶和极少量的二相酶。因此,在本试验中,在肝S9和微粒体2种代谢试剂的浓度为0.5 mg/mL、代谢反应时间为60 min的体外代谢反

应条件下,对PCP进行代谢反应研究。同时为避免有机试剂的影响,代谢反应体系中有有机试剂的含量控制在1%以内。由于代谢过程中使用的PCP浓度较高,因此不用乙酸酐衍生,直接进样分析。

分别对PCP代谢反应后的对照组、肝微粒体组、肝S9组分别进行检测研究。检测结果见图2。图2b、c、d分别是PCP代谢实验对照组、肝微粒体组和肝S9组的选择离子色谱图。由图可以看出,微粒体组、肝S9组均可见明显Cl₄BQ色谱峰(图2c,图2d)。而对照组中未见相应Cl₄BQ色谱峰(图2b)。由此可见,在肝微粒体和肝S9作用下,PCP在体外发生代谢反应生成Cl₄BQ。

3.3 代谢反应条件的优化

影响体外代谢反应的主要因素是试剂肝微粒体、肝S9浓度以及代谢反应时间^[7-10]。为了将反应条件最大程度的优化,我们从试剂浓度、反应时间2方面对体外代谢反应进行了优化。优化结果表明:代谢试剂浓度为0.1~0.75 mg/mL时,Cl₄BQ的生成量与代谢试剂浓度呈正相关的线性关系;浓度为0.75~2.0 mg/mL范围时,Cl₄BQ的生成量没有明显变化(图3a)。代谢反应时间低于4 h时,随着反应时间的增加,Cl₄BQ的生成量呈线性增加;时间大于4 h后,Cl₄BQ的量基本保持不变,反应进入平台期(图3b)。因此,确定代谢的最佳条件为:体外代谢试剂浓度0.75 mg/mL;代谢反应时间4 h。

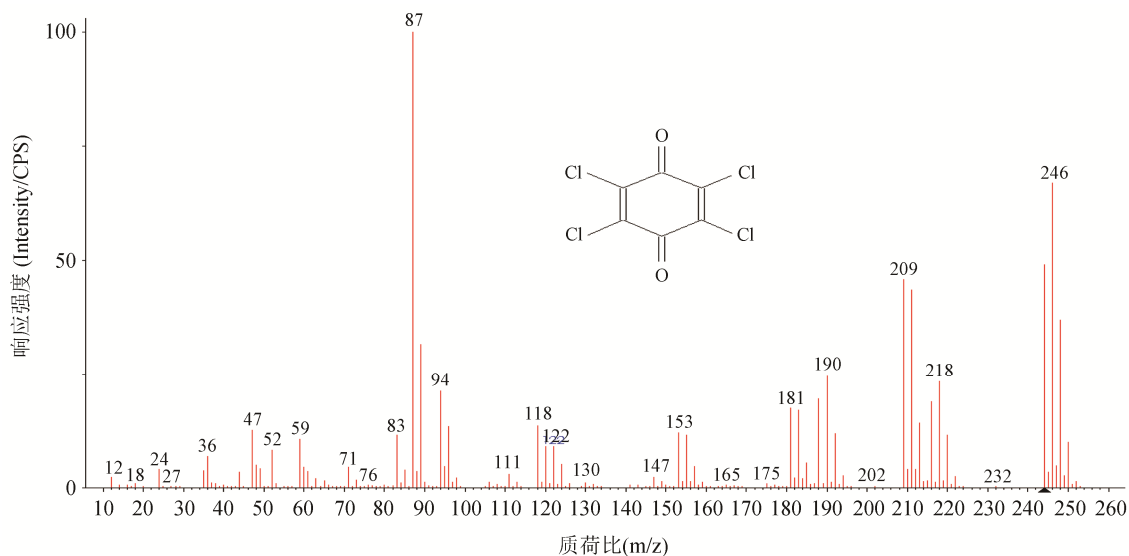


图1 四氯苯醌的EI全扫描质谱图

Fig. 1 EI mass scan spectrum of Cl₄BQ

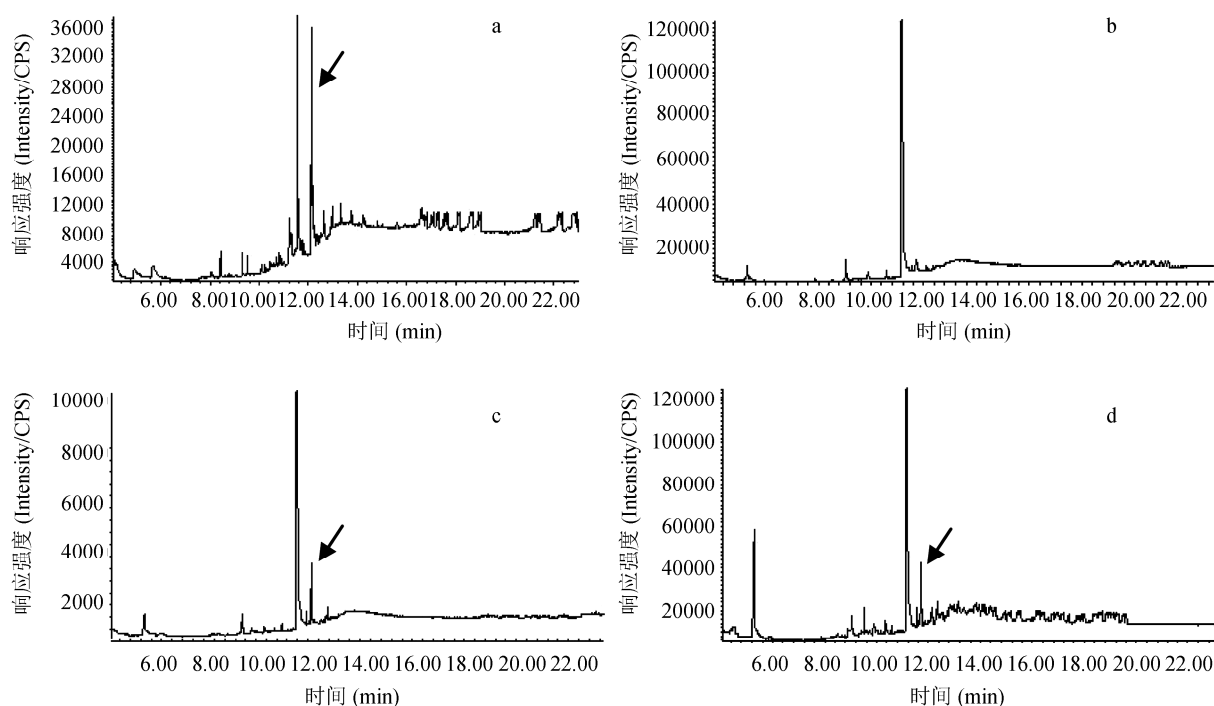


图 2 PCP 代谢色谱图

Fig. 2 Chromatograms of PCP metabolism

a: 1 µg/mL PCP 与 Cl₄BQ 混合物; b: 对照组(未加代谢试剂); c: 肝微粒体组(浓度 0.5 mg/mL); d: 肝 S9 成分组(浓度 0.5 mg/mL); 图中箭头所示为 Cl₄BQ 色谱峰
a: 1 µg/mL mixture of PCP and Cl₄BQ; b: control group (without metabolic reagent); c: Liver microsomes (0.5 mg/mL); d: Liver S9 (0.5 mg/mL)

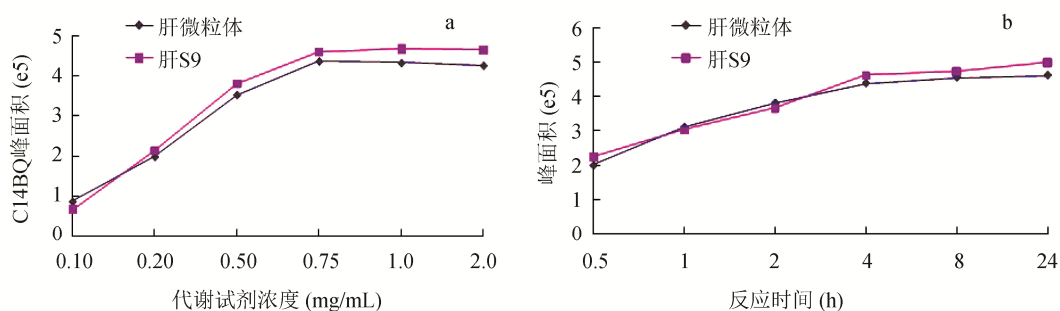


图 3 体外代谢反应条件优化结果图

Fig. 3 Optimization of metabolic conditions *in vitro*

a: 代谢试剂浓度与 Cl₄BQ 峰面积变化图; b: 代谢反应时间与 Cl₄BQ 峰面积变化图(代谢试剂浓度为 0.5 mg/mL)

A: Effect of the metabolic reagent concentration on the peak area of Cl₄BQ, B: Effect of the reaction time on the peak area of Cl₄BQ (metabolic reagent concentrations 0.5 mg/mL)

3.4 肝微粒体与肝 S9 代谢效果的比较分析

与肝 S9 相比较, 肝微粒体含有更为丰富的细胞色素 P450 酶, 这一类酶主要参与药物及有害物质在体内的氧化还原反应, 从而使作用对象的水溶性增强, 进入生物转化代谢过程。在代谢试剂浓度为 0.75

mg/mL、代谢时间为 4 h 条件下, 选择 4 种底物浓度: 20、50、100、200 µg/mL 进行代谢反应。比较分析肝微粒体、肝 S9 2 种代谢试剂对 PCP 体外代谢的差别。2 种代谢试剂代谢作用后, 生成的 Cl₄BQ 峰面积通过单因素方差分析比较 $P > 0.05$, 两者对于 PCP 的代谢作用没有显著差异(见图 4)。原因可能是对 PCP

代谢起主要作用的除 P450 外, 有其他的氧化还原酶类, 有待进一步分析探讨。

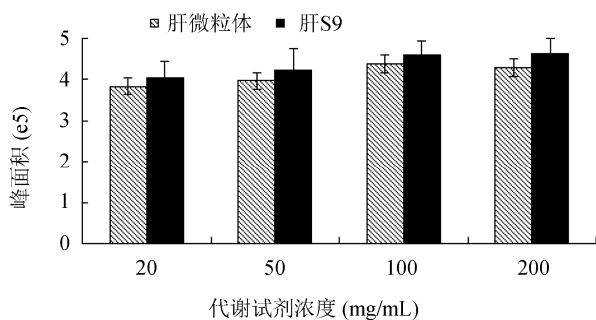


图4 2种代谢试剂对不同浓度PCP代谢比较图

Fig. 4 Metabolic effect of PCP by 2 kinds of reagents

4 结论

本文研究了针对食品接触材料中的有毒有害物质五氯苯酚, 基于肝微粒体和肝 S9 成分的体外代谢活性作用, 模拟体内代谢情况对五氯苯酚进行了代谢情况分析。通过优化检测条件, 分别建立了五氯苯酚和四氯苯醌的气相色谱-质谱检测方法; 通过优化代谢试剂浓度、底物浓度以及相互作用时间等代谢条件, 确定体外代谢分析的最佳反应条件为代谢试剂浓度 0.75 mg/mL、代谢反应时间 4 h。建立了五氯苯酚的肝 S9 成分及肝微粒体体外代谢模型。实验验证了五氯苯酚在体外可以进行充分的代谢反应, 产物为四氯苯醌。分析比较证实肝微粒体和肝 S9 成分对 PCP 的代谢作用没有显著差异。

参考文献

- [1] 许文青, 樊柏林, 陈明, 等. 五氯苯酚和五氯苯酚钠毒性作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(6): 596-600. Xu WQ, Fan BL, Chen M, *et al.* Progress in toxicity of pentachlorophenol and sodium pentachlorophenol [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2011, 25(6): 596-600.
- [2] 张蕊媛, 杨竞, 刘欣. 五氯苯酚的生态毒性效应及其遗传毒性[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(3): 296-302. Zhang RY, Yang J, Liu X. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of pentachlorophenol [J]. Asian J Ecotoxicol, 2011, 6(3): 296-302.
- [3] 张蕊媛, 雷磊, 刘欣. 环境内分泌干扰物五氯苯酚的毒性评价研究进展[J]. 环境科学导刊, 2010, 29(2): 5-8. Zhang RY, Lei L, Liu X. Advance on study of toxicity assessment of pentachlorophenol as environmental endocrine interferent [J]. Environ Sci Surv, 2010, 29(2): 5-8.
- [4] Zhao X, Pang X, Chai SW. Developing a qPCR method to quantify AhR-PCP-DNA complex for detection of environmental trace-level PCP [J]. Ecotoxicology, 2011, 20(5): 1148-1153.
- [5] Xu H, Zhang X, Zhan J. Ination of pentachlorophenol at carbon nanotubes modified electrode incorporated with beta-cyclodextrin [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10(11): 7654-7657.
- [6] Vaidyanathan VG, Villalta PW, Sturla SJ. Nucleobase-dependent reactivity of a quinone metabolite of pentachlorophenol [J]. Chem Res Toxicol. 2007, 20(6): 913-919.
- [7] Jhajra S, Singh S. Identification of stable and reactive metabolite(s) of nelfinavir in human liver microsomes and rCYP3A4 [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 118: 214-227.
- [8] Mukai Y, Senda A, Toda T. The role of CYP2C8 and CYP2C9 Genotypes in losartan- dependent inhibition of paclitaxel metabolism in human liver microsomes [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015, doi: 10.1111/bcpt.12520. [Epub ahead of print]
- [9] Lassila T, Rousu T, Mattila S, *et al.* Formation of GSH-trapped reactive metabolites in human liver microsomes, S9 fraction, HepaRG-cells, and human hepatocytes[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 115: 345-51.
- [10] Yoshihara S, Mizutare T, Makishima M, *et al.* Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency [J]. Toxicol Sci. 2004, 78(1): 50-59.
- [11] 付善良, 丁利, 肖家勇, 等. 加速溶剂萃取-GC-MS 法检测食品接触材料--纸、纸板、木材和木制品中的 6 种氯酚类物质残留[J]. 包装工程, 2011, 15: 48-53. Fu SL, Ding L, Xiao JY, *et al.* Determination of 6 chlorophenols in paper, paperboard, wood and wood products used as food contact materials by accelerated solvent extraction and GC-MS [J]. Packag Eng, 2011, 15: 48-53.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



龚强, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全。
E-mail: 39235213@qq.com



王利兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全与检验检疫安全。
E-mail: wanglb1@126.com