

食品接触材料中芘的体外代谢模拟分析

朱绍华, 龚强, 丁利, 焦艳娜, 付善良, 成婧, 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** 模拟体内代谢条件, 分析芘的体外基本代谢情况。 **方法** 采用肝微粒体及肝 S9 成分 2 种代谢试剂, 体外模拟了肝脏代谢条件, 对代谢试剂浓度及代谢时间条件进行优化, 采用气相色谱-质谱(GC-MS)法检测芘和羟基芘, 比较分析 2 种代谢试剂对 PYR 的代谢情况。 **结果** 体外代谢最佳孵化时间为 60 min, 最佳体外代谢试剂浓度为 0.5 mg/mL。 **结论** PYR 在肝微粒体代谢试剂中无明显代谢反应发生, 在肝 S9 成分的作用下, 代谢生成羟基芘, 推断参与 PYR 代谢的主要为二相酶类。

关键词: 芘; 羟基芘; 气相色谱-质谱法; 体外代谢; 肝微粒体; 肝 S9 成分

In vitro metabolic simulation analysis of pyrene in food contact materials

ZHU Shao-Hua, GONG Qiang, DING Li, JIAO Yan-Na, FU Shan-Liang, CHENG Jing, 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 investigate the metabolism of pyrene (PYR) in rat liver microsome and S9 *in vitro* by simulating *in vivo* metabolic conditions. **Methods** The conditions of *in vitro* metabolic reaction including the concentration of liver microsome and S9 and reaction time were optimized. PYR and hydroxypyrene (OHP) were detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the metabolic effect of two kinds of reagents was compared. **Results** The best incubation time was 60 min, and the most suitable reagent concentration *in vitro* was 0.5 mg/mL. **Conclusion** PYR has no metabolism in liver microsome. In the role of liver S9 fraction, PYR can transform to OHP, and phase 2 enzymes is mainly participant in PYR metabolism.

KEY WORDS: pyrene; hydroxypyrene; gas chromatography-mass spectrometry; *in vitro* metabolism; liver microsome; liver S9 fraction

1 引言

多环芳烃(PAHs)是一类普遍存在的持久性有机污染物, 主要来源于煤、烟草、石油、木材等有机物

的热解和不完全燃烧。PAHs 广泛分布于环境中, 任何有有机物加工、废弃、燃烧或使用的地方都有可能产生多环芳烃^[1-3], 多种 PAHs 具有潜在的致癌作用^[4-6]。芘(pyrene, PYR)是非致癌性多环芳烃, 是常见

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, 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

PAHs的一种,含量约占PAHs的2%~10%^[7],可直接氧化成芘醌。PYR可用于染料、合成树脂、分散性染料和工程塑料等的生产;酰化后可制还原染料艳橙GR及其他多种染料,还可用于制造杀虫剂、增塑剂等。而这些产品常常用作食品包装材料,从而危害人类身体健康。长期接触PYR,可见头痛、乏力、睡眠不佳、易兴奋、食欲减退、白细胞增加、血沉增速等^[8]。

羟基芘(hydroxypyrene, OHP)是芘在哺乳动物体内主要的代谢产物^[9,10]。荷兰研究人员Jongeneelen等^[11]最先发表尿中OHP的分析方法,并推荐将其作为人体环境暴露PAHs的生物标志物。随后,许多研究者用OHP来评价人体暴露各种PAHs混合物如煤焦油、吸烟、炭烤牛肉以及不同的工作环境下对人体健康影响的风险^[12,13]。

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S9两种。肝S9是将肝组织匀浆后,经14000 r/min离心所得的上清液,含有生物转化一相反应所需的P450酶类和二相代谢酶(如葡萄糖酸转移酶、甲基转移酶、硫酸转移酶、乙酰基转移酶等)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药物代谢酶和极少量的二相酶^[14,15]。本研究采用肝微粒体及肝S9 2种代谢试剂,在体外模拟肝脏代谢条件,采用气相色谱-质谱法(GC-MS)分析比较2种代谢试剂对PYR的代谢作用,对PYR的体外代谢进行初步研究,以期进一步分析芘危害人体健康的主要代谢成分。

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仪器有限公司);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Mettler公司);-80℃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);乙醇为分析纯。大鼠肝S9、肝微粒体、NADHP再生系统(溶液A、溶液B)(北京汇智泰康公司)。芘、羟基芘标准品均购自Dr. S. Ehernstorfer公司,纯度大于99%。

2.2 标准溶液配制

取上述芘、羟基芘标准品,用乙醇配成10.0 mg/mL的标准储存溶液,4℃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℃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5 μL 10.0 mg/mL芘,37℃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℃水浴中反应60 min。加入等体积4℃预冷的甲醇终止反应,14000 r/min离心5 min,上清液过0.45 μm滤膜,进GC-MS检测。芘代谢实验分为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代谢时间的条件优化。

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:80℃保持1 min,以5℃/min升至100℃,再以20℃/min升至280℃,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℃;离子源温度280℃;选择离子监测(SIM)模式。溶剂延迟时间4 min。质量扫描范围50~500 u。检测结果的分析以计算机NIST谱库检索结果和人工谱图解析相结合的手段确定。

3 结果与分析

3.1 色谱和质谱条件优化

在全扫描模式下,调整色谱条件,质量浓度为10 μg/mL的芘和羟基芘的标准品进样分析,确定最优的升温程序:80℃保持1 min,以5℃/min升至100℃,再以20℃/min升至280℃,保持10 min;载

气: 高纯氦气, 流速 1.0 mL/min; 不分流进样。采用此升温程序, 茈和羟基茈有很好的响应和尖锐的峰形, 同时保证了杂质的完全流出。依据全扫描结果设定茈的特征扫描离子为 202、101, 保留时间为 12.58 min, 代谢产物羟基茈为 189、218, 保留时间为 13.82 min。因此, 可以结合特征离子峰和保留时间进行定性分析。

3.2 PYR 代谢反应及其代谢产物的检测

采用代谢试剂浓度为 0.5 mg/mL、代谢反应时间为 60 min 的体外代谢反应条件对 PRY 进行代谢反应。代谢反应体系中有机试剂的含量最好控制在 1% 以内。茈和羟基茈的检测采用优化好的色谱及质谱条件, 2 种物质同时检测的 GC-MS 方法。分别对茈代谢反应的对照组、肝微粒体组、肝 S9 组进行检测。检测结果见图 1。图 1a 为 1 $\mu\text{g/mL}$ 茈与羟基茈混合标准品色谱图, 茈的保留时间是 11.58 min, 羟基茈的保留时间是 13.82 min。图 1b、c、d 分别是茈代谢实验对照组、肝 S9 和肝微粒体组的选择离子色谱图。其中肝 S9 组可见明显羟基茈色谱峰(图 1c), 微粒体组未见羟基茈色谱峰(图 1d)。而对照组中未见相应羟基茈色谱峰(图 1b)。由此可见, 茈仅在肝 S9 作用下, 才能够发生体外代谢反应生成羟基茈。因此推断参与

茈代谢的主要为二相代谢酶类。

3.3 代谢反应条件的优化

3.3.1 孵育时间对代谢反应的影响

影响体外代谢反应的主要因素是试剂肝微粒体、肝 S9 浓度以及孵育时间。固定体外其他孵育条件, 观察不同孵育时间对茈代谢的影响, 结果见图 2, 实验结果表明: 代谢试剂为肝 S9 时, 茈随着时间的增加, 不断减少, 代谢生成羟基茈, 在 60 min 时达到最大反应速度, 以后随着孵育时间的增加, 茈的浓度变化不明显, 因此选择 60 min 为最佳孵化时间。当代谢试剂为肝微粒体时, 随着孵育时间的延长, 茈的浓度基本没有变化, 没有羟基茈代谢生成。

3.3.2 代谢试剂浓度对代谢反应的影响

固定体外其他孵育条件, 选择肝 S9 为代谢试剂时, 发现茈在肝 S9 浓度为 0.5~2.0 mg/mL 范围内, 随着代谢试剂浓度的增加, 茈的浓度逐渐减少, 生成的羟基茈呈线性增加; 当浓度超过 0.5 mg/mL 后, 羟基茈的生成量基本保持不变(图 3)。因此, 肝 S9 的浓度选择 0.5 mg/mL。当代谢试剂为肝微粒体时, 随着肝微粒体浓度的逐渐增大, 茈的浓度基本没有变化, 没有羟基茈代谢生成。

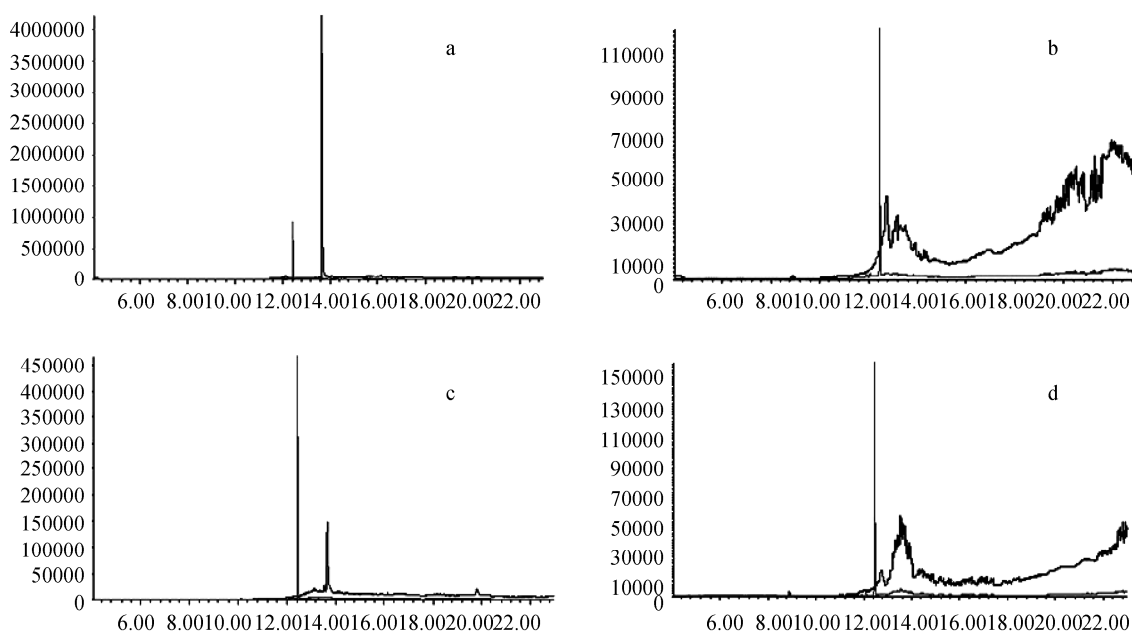


图 1 PYR 代谢色谱图

Fig. 1 Chromatograms of PYR metabolism

a: 1 $\mu\text{g/mL}$ PYR 与 OHP 混合物; b: 对照组(未加代谢试剂); c: 肝 S9 组(浓度 0.5 mg/mL); d: 肝微粒体组(浓度 0.5 mg/mL)
a: 1 $\mu\text{g/mL}$ mixture of PYR and OHP; b: control group (without metabolic reagent); c: liver S9 (0.5 mg/mL); d: liver microsome (0.5 mg/mL)

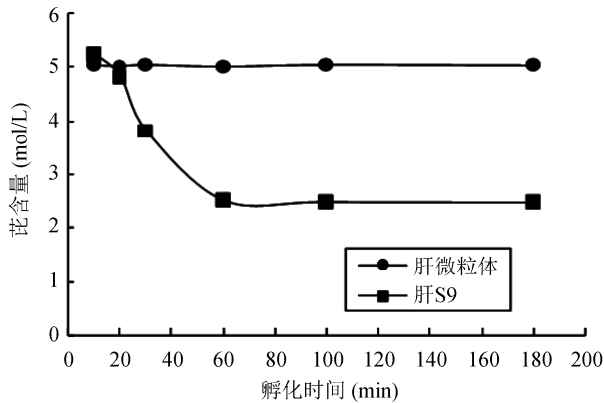


图2 孵育时间对代谢反应的影响

Fig. 2 Influence of incubation time on the metabolism

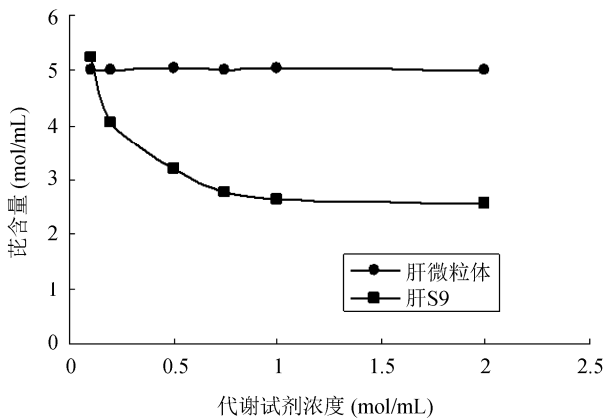


图3 代谢浓度对代谢反应的影响

Fig. 3 Influence of reagent concentration on the metabolism

4 结论

基于GC-MS检测方法,通过肝S9成分及肝微粒体2种体外代谢试剂模拟体内代谢情况分析,结果显示芘发生代谢。在肝S9成分的作用下,芘代谢生成了羟基芘,参与代谢的主要为二相酶类。为进一步深入研究芘代谢作用提供了体外模拟代谢基础。

参考文献

- [1] 于林杰. 多环芳烃对环境的污染分析研究[J]. 环境科学与管理, 2014, 3(7): 73-75.
Yu LJ. Analysis on environmental pollution characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Environ Sci Manage, 2014, 3(7): 73-75.
- [2] Li S, Tao Y, Yao S, *et al.* Distribution, sources, and risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from 28 lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River region, China [J]. Environ Sci Pollut Res Int. 2015, 6: 1-14.
- [3] Ghiasvand AR, Pirdadeh-Beiranvand M. Cooling/heating-assisted headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils [J]. Anal Chim Acta, 2015, 900: 56-66.
- [4] Stefaniuk M, Oleszczuk P. The total and freely dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons content in residues from biogas production [J]. Environ Pollut. 2015, 208(Pt B): 787-95
- [5] Wang GZ, Cheng X, Zhou B, *et al.* The chemokine CXCL13 in lung cancers associated with environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution [J]. Elife, 2015, 13: 1-40.
- [6] Oliveira M, Slezakova K, Delerue-Matos C, *et al.* Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor air of preschool environments (3-5 years old children) [J]. Environ Pollut, 2015, 208(Pt B):382-94.
- [7] David P, Dauphin-Villemant C, Mesneau A, *et al.* Molecular approach to aquatic environmental bioreporting: differential response to environmental inducers of cytochrome P450 monooxygenase genes in the detritivorous subalpine planktonic Crustacea, *Daphnia pulex* [J]. Mol Ecol, 2003, 12(9): 2473-81.
- [8] Giessing AM, Lund T. Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide in tissue of marine polychaete *Nereis diversicolor* by liquid chromatography/ion trap multiple mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16(16): 1521-5.
- [9] Jongeneelen FJ, Anzion RB, Scheepers PT, *et al.* 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments [J]. Ann Occup Hyg, 1988, 32(1): 35-43.
- [10] Jongeneelen FJ. A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Toxicol Lett, 2014, 231(2): 239-48.
- [11] Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Bos RP, *et al.* Excretion of 3-hydroxy- benzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene [J]. J Appl Toxicol, 1985, 5(5): 277-82.
- [12] Ikenaka Y, Eun H, Ishizaka M, *et al.* Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, *Daphnia magna* [J]. Aquat Toxicol, 2006, 80(2): 158-65.
- [13] Kim YD, Todoroki H, Oyama T, *et al.* Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene

[J]. Environ Res, 2004, 94(3): 262-6.

[14] Li C, Surapaneni S, Zeng Q, *et al.* Identification of a novel in vitro metabonate from liver microsomal incubations [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(6):901-905.

[15] Yorshiara S, Makishima M, Suzuki N, *et al.* Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction [J]. Toxicol Sci. 2001, 62(2): 221-227.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



朱绍华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全及食品包装安全。
E-mail: ishaohua@foxmail.com



王利兵, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全及检验检疫安全。
E-mail: Wanglb@126.com

“食药菌”专题征稿函

我国发现和利用食用菌已有数千年的历史, 其中大型真菌作为药物使用也至少有 2500 年的历史。食用菌营养丰富, 优质蛋白质含量较高, 含有人体所需的 8 种必需氨基酸, 其中赖氨酸和亮氨酸的含量尤为丰富。另外, 食用菌还含有多种活性多糖、微量元素等功能性物质, 具有特殊的保健功能。药用菌也具有良好的药理活性, 具有调节免疫力, 增强记忆力, 延缓衰老, 减少心脑血管疾病发生等功效, 应用十分广泛。随着人们对食药菌营养价值的认可, 对食药菌产品的消费需求也不断增加, 因此食药菌食品具有很高的开发价值。

我国食药菌年产量占世界总产量的 75% 以上, 其总产值在我国种植业中排名第六位, 主要栽培种类有 70~80 种, 形成商品的有 50 种, 具有一定生产规模的有 20 种以上。总产量年均复合增长率约为 12.40%, 总产值年复合增长率约为 17.01%。鉴于此, 本刊特别策划了“**食药菌**”专题, 由中国工程院院士、中国吉林农业大学食药菌专家**李玉教授**担任专题主编, **李教授**为原中国菌物学会理事长, 中国食用菌协会副会长, 国际药用菌学会理事长, 食药菌教育部工程研究中心首席科学家, 国家食用菌产业技术体系岗位科学家兼资源收集与繁殖利用功能实验室主任。围绕“**食药菌的化学组成、理化性质、保鲜贮藏、食药菌中有害物质检测、食药菌的深加工、食药菌营养特性的研究、食药菌功能特性的研究、食药菌标准与体系等**或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2016 年 2 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及**李玉教授**特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部