

食品包装材料中有害物质双酚 A 二缩水甘油醚 体外代谢研究

丁利, 龚强, 朱绍华, 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** 通过模拟体内代谢, 对双酚 A 二缩水甘油醚(BADGE)的体外基本代谢情况进行研究。**方法** 采用肝微粒体、肝 S9 2 种体外代谢试剂, 通过模拟体内肝脏代谢, 对 BADGE 的代谢行为及其代谢产物进行研究。通过代谢试剂浓度及代谢时间条件的优化, 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)作为检测手段对 BADGE 的体外代谢产物进行分析确证。**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, 在肝 S9 及肝微粒体 2 种体外代谢试剂的作用下, BADGE 发生显著的代谢反应。**结论** 本研究与传统的动物试验相比, 节约了时间、精力, 对食品包装材料的毒理学研究和安全性评价有重要的推动作用。

关键词: 双酚 A 二缩水甘油醚; 高效液相色谱-串联质谱法; 体外代谢; 肝微粒体; 肝 S9; 食品包装材料

In vitro metabolic study of bisphenol A diglycidyl ether in food contact materials

DING Li, GONG Qiang, ZHU Shao-Hua, 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 investigate the *in vitro* metabolism of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) 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. The metabolic products of BADGE were analyzed and verified by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Results** The best incubation time was 60 min, and the most suitable reagent concentration was 0.5 mg/mL. BADGE was converted significantly under the action of *in vitro* metabolism reagent of liver S9 and microsome. **Conclusion** The study is simple and has the advantages of shorter reaction time and energy compared with the traditional animal experiments, and it has an important role in promoting the toxicology research and safety evaluation of food packaging materials.

KEY WORDS: bisphenol A diglycidyl ether; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *in vitro* metabolism; liver microsome; liver S9; food contact materials

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, 研究员, 主要研究方向为食品安全及检验检疫安全。E-mail: Wanglb1@126.com

*Corresponding author: WANG Li-Bing, Researcher, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: Wanglb1@126.com

1 引言

食品包装作为现代食品工业及生活产品的最后一道工序, 被称为“特殊的食品添加剂”。各国政府对食品包装材料的安全性以及由食品包装材料导致的食物安全问题都给予了高度关注, 对食品包装材料中有害物质^[1]和其迁移^[2]的研究也越来越多, 然而对这些污染物在人体中的代谢研究的还不多。双酚 A 二缩水甘油醚(BADGE)是缩水甘油醚家族成员之一, 20 世纪 40 年代之后, 缩水甘油醚类物质被广泛应用作环氧树脂聚合的基础材料。为提高食品的储藏期和防腐性, 食品用金属容器内壁一般涂有环氧树脂涂料, 以防止内容物与金属直接接触。其中 BADGE 会在食品接触材料的加工和储藏过程中向内容物迁移, 造成污染。BADGE 对人体健康危害报道较多的是致敏反应^[3-5]。有报道称 BADGE 是一种环境激素, 又称外源性内分泌干扰物^[6], 即使摄入量极低也会给人类健康造成危害, 并且会危及生态环境^[7]。Olea 等^[8]的体外研究表明, BADGE 的雌二醇受体结合能力很低。BADGE 的外源激素活性究竟是其它本身还是在体内可能代谢成双酚 A(BPA)后干扰内分泌功能一直是人们的研究热点。Hanaoka 等^[9]通过调查研究处理环氧树脂的工人发现, BADGE 在体内能够生成双酚 A (BPA)。食品加工、储运过程中 BADGE 会形成水合物, 氯代物等衍生物^[10]。那么 BADGE 的内分泌干扰作用到底是它本身的作用, 还是它的代谢产物的作用? 目前还没有相关的代谢研究报道。

药物及有害物质的代谢常常通过体外模拟肝脏环境进行, 从而节约时间, 简化过程。将肝组织匀浆, 14000 r/min 条件下离心后, 上清液称之为肝 S9。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)和其它的一些氧化酶和脱氢酶, 如负责酒精代谢的乙酸脱氢酶等等。S9 进一步离心, 沉淀部分就是肝微粒体, 主要含有负责药物代谢的 CYP450 药物代谢酶。目前这两种物质被广泛用于药物及有害物质的体外代谢实验研究^[11]。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测手段, 采用肝 S9 及肝微粒体 2 种代谢试剂, 对 BADGE 体外代谢行为及其代谢产物进行研究。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

API 4000 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统公司), 配有岛津高效液相色谱仪; 高速离心机(Sigma 2-16P, 德国 Sigma 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); PBS 缓冲液; 水为超纯水(美国 Millipore 超纯水仪制备)。双酚 A(BPA)标准品(纯度纯度 99%)、双酚 A 二缩水甘油醚(BADGE)、双酚 A(2, 3-二羟丙基)甘油醚(BADGE·H₂O)、双酚 A(3-氯-2-羟丙基)甘油醚(BADGE·HCl)、双酚 A(3-氯-2-羟丙基)(2,3-二羟丙基)醚(BADGE·H₂O·HCl) (纯度纯度 95%, 美国 Sigma 公司)。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 方 法

分别准确称取 4 种标准品(BPA, BADGE·H₂O·HCl, BADGE·H₂O, BADGE·HCl)10.0 mg, 用甲醇定容至 10 mL, 配成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液, 4 °C 冷藏避光保存; BADGE 配制成 10.0 mg/mL 的标准储备溶液。取上述标准储备液, 用甲醇配成 100 μg/mL 的中间标准溶液, 4 °C 冷藏避光储存。取适量储备液, 用甲醇定容配成浓度为 1.0 μg/mL 的标准工作液。

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 BADGE 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 HPLC-MS/MS 检测。BADGE 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的分析研究。

2.4 色谱条件和质谱条件

2.4.1 BPA 检测条件

色谱柱: Agilent Eclipse AAA 色谱柱(4.6 mm×

150 mm, 3.5 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 流动相: 乙腈和 0.02% 氨水溶液; 进样量: 10 μL ; 流速: 恒流 0.5 mL/min; 总时间: 8 min。

质谱离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 负离子扫描; 雾化气(Gas1): 413 kPa(60.00 psi); 辅助气(Gas2): 448 kPa(65.00 psi); 离子喷雾电压(IS): -4500.00 V; 气帘气(Cur): 137 kPa(20.00 psi); 离子化温度(TEM): 500 $^{\circ}\text{C}$; 检测方式: 多反应监测扫描模式(MRM)。

2.4.2 BADGE 及其衍生物检测条件

色谱柱: Waters 5C₁₈-MS II (2.0 mm \times 150 mm, 2.5 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 流动相: 甲醇(A)和含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 醋酸铵溶液(B), 流速: 0.25 mL/min; 梯度洗脱程序: 初始时 50%B, 0~10 min, 50%B-5%B; 10~18 min, 50%B。

质谱离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 雾化气(Gas1): 413 kPa(60.00 psi); 辅助气(Gas2): 448 kPa(65.00 psi); 离子喷雾电压(IS): 5000.00 V; 气帘气(Cur): 137 kPa(20.00 psi); 离子化温度(TEM): 500 $^{\circ}\text{C}$; 检测方式: 多反应监测扫描模式(MRM)。

3 结果与分析

3.1 代谢反应条件的优化

体外代谢反应是模拟肝细胞代谢环境, 代谢反应体系中有机试剂的含量最好控制在 1%以内。主要影响因素是体外代谢试剂肝微粒体、肝 S9 浓度以及代谢反应时间^[12-14]。为了将反应条件最大程度的优化, 我们从试剂浓度、反应时间两方面对体外代谢反应进行了优化。优化结果表明: 当代谢试剂浓度为 0.5 mg/mL 时, 随着反应时间的增加 BADGE 代谢量基本上呈线性增加; 当反应时间超过 60 min 后, 反应进入平台期, 即代谢量变化不大(图 1a)。当代谢反应时间为 60 min, 随着代谢试剂浓度的增加, BADGE 代谢量呈线性增加; 当试剂浓度超过 0.5 mg/mL 后, 代谢量的变化增加不大(图 1b)。因此, 代谢的最佳条件: 代谢反应时间 60 min; 体外代谢试剂浓度 0.5 mg/mL。选择最佳反应条件对 BADGE 进行体外代谢实验, 采用 BADGE、BPA 2 种 HPLC-MS/MS 检测方法对代谢产物进行检测, 以确定其代谢产物。

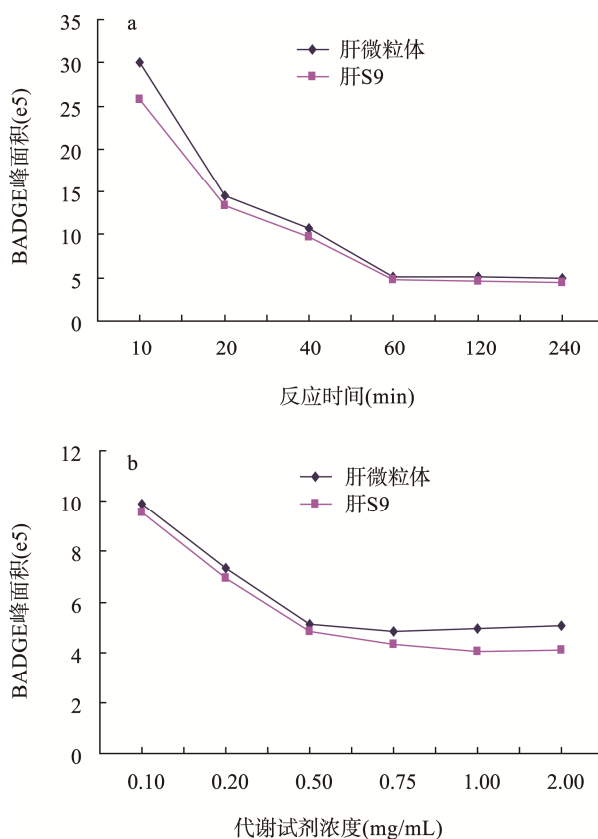


图 1 体外代谢反应条件优化

Fig. 1 Optimization of the *in vitro* metabolic reaction conditions

a: 反应时间与 BADGE 峰面积变化, b: 代谢试剂浓度与 BADGE 峰面积变化

a: Effect of the reaction time on the peak area of BADGE, b: Effect of the concentration of reagents on the peak area of BADGE

3.2 BADGE 检测方法检测代谢产物结果

BADGE 及其衍生物的分子离子峰、子离子峰及相应去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等质谱参数参照吴新华等^[12]文献, 见表 1。采用 BADGE 及其衍生物液相及质谱分析方法检测经肝 S9、肝微粒体代谢后的 BADGE(图 2)。对照组 BADGE 峰面积为 3.97×10^7 , 肝 S9、肝微粒体组峰面积分别为: 4.84×10^5 、 5.14×10^5 。可见经两种代谢试剂代谢后的 BADGE 响应显著降低。说明在肝 S9 及肝微粒体的作用下, BADGE 产生了较大程度的代谢。代谢产物未检测到 BADGE·H₂O、BADGE·HCl、BADGE·H₂O·HCl 三种 BADGE 的衍生物。图 2c、2d 中均可见一响应较高的峰。其保留时间与 BADGE 的 3 种衍生物都不相同, 可见代谢产物为 3 种物质之外的某种物质, 但具体代谢产物的定性定量确证未能完成, 有待进一步研究。

表 1 多反应检测扫描模式检测 BADGE 及其衍生物部分质谱参数
Table 1 Some parameters of multiple reaction monitoring detection

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压(v)	碰撞能量(eV)
BADGE	358.4	135.5*, 161.3, 107.1	57	40, 28, 62
BADGE·H ₂ O	376.5	161.3*, 107.4	55	30, 60
BADGE·HCl	394.1	191.2*, 161.3	55	20, 25
BADGE·H ₂ O·HCl	412.2	381.5*, 135.3	76	23, 48

*定量离子对

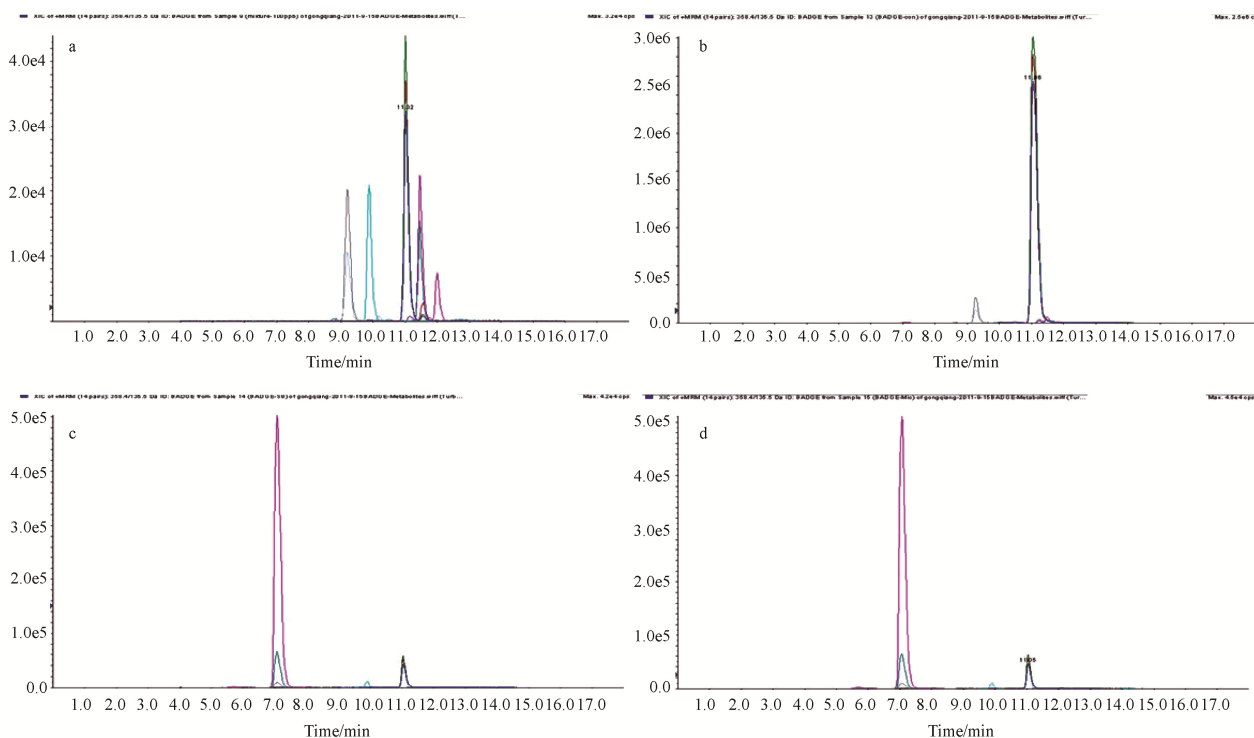


图 2 BADGE 代谢产物 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of BADGE and the metabolic products
a: BADGE 及 3 种衍生物 MRM 色谱图; b: 对照组; c: 肝微粒体组; d: 肝 S9 组
a: BADGE and three derivatives; b: control group; c: microsomes group; d: S9 group

3.3 BPA 检测方法检测代谢产物结果

BPA 的 HPLC-MS/MS 检测方法参见吴新华等^[13]文献。BPA 的选择离子对为: 227.2/212.2; 227.2/133.1。采用 BPA 的 HPLC-MS/MS 检测方法对 BADGE 代谢产物进行检测。图 3a 为 BPA 标准品 MRM 色谱峰, 保留时间为 3.95 min, 212.2 与 133.1 两种子离子的丰度比约为 2:1。经代谢试剂作用后的 BADGE 在 2.97 min 有一洗脱峰, 保留时间与 BPA 标准品不一致, 说明该物质不是 BPA。与对照组相比, 肝 S9 及肝微粒体组洗

脱峰响应增强幅度高达 2 个数量级。说明 BADGE 在肝 S9 及微粒体的作用下, 产生了显著的代谢。

4 结 论

在肝 S9 及肝微粒体 2 种体外代谢试剂的作用下, 食品包装材料中有害物质 BADGE 发生显著的代谢反应, 与传统的动物实验相比, 节约了时间、精力, 对食品包装材料的毒理学研究和安全性评价无疑有着巨大的推动作用。

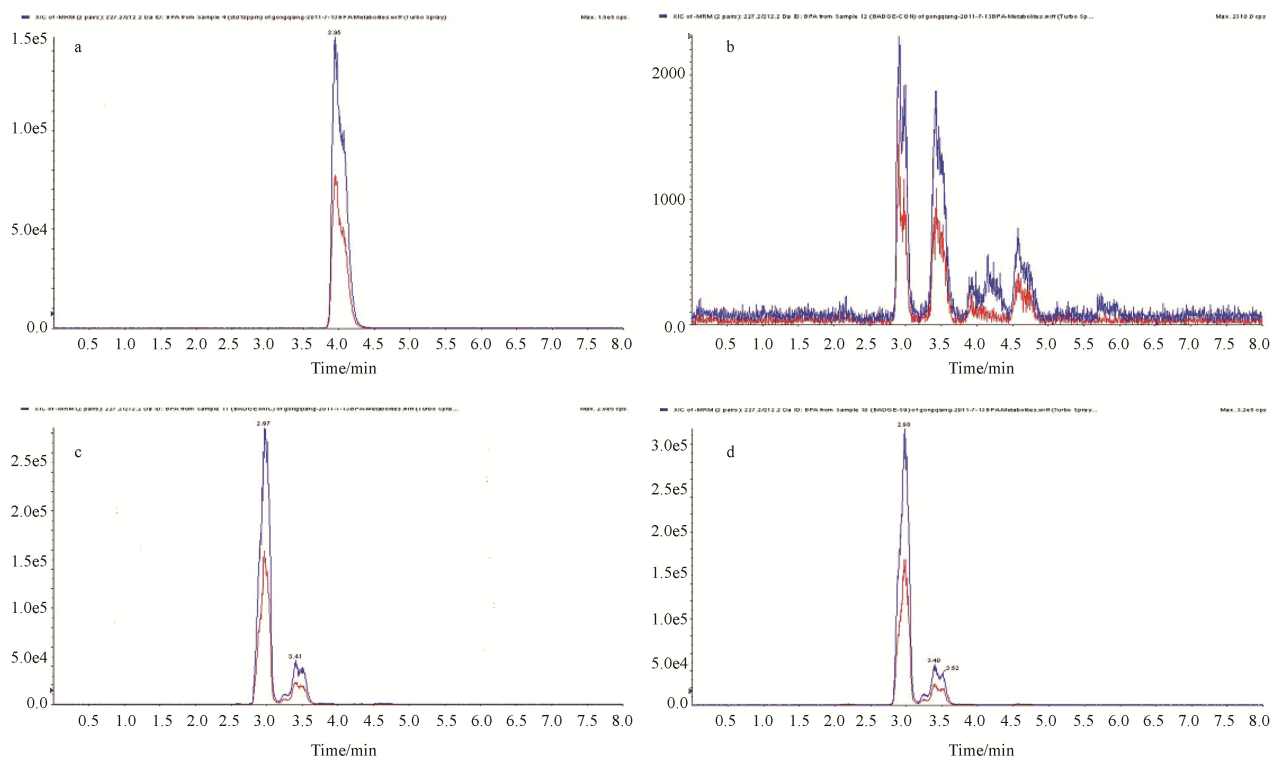


图 3 BPA 代谢产物 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of BPA and the metabolic products

a: BPA b: 对照组; c: 肝微粒体组; d: 肝 S9 组

a: BPA; b: control group; c: microsomes group; d: S9 group

参考文献

- [1] 黄崇杏, 王志伟, 王双飞. 纸质食品包装材料中的残留污染物[J]. 包装工程, 2007, 28(7): 12-15.
Huang CX, Wang ZW, Wang SF. Residual contaminants in paper food packaging materials [J]. Packag Eng, 2007, 28(7): 12-15.
- [2] 王志伟, 黄秀玲, 胡长鹰. 多类型食品包装材料的迁移研究[J]. 包装工程, 2008, 29(10), 1-7.
Wang ZW, Huang XL, Hu CY. Study on Migration of Different Type Food Contact Materials [J]. Packag Eng. 2008, 29(10): 1-7.
- [3] Kanerva L, Jolanki R, Tupasela O, et al. Immediate and delayed allergy from epoxy resins based on diglycidyl ether of bisphenol A [J]. Scand J Work Environ Health 1991, 17: 208-215.
- [4] Jolanki R, Kanerva L, Estlander T. Allergic patch test reaction to diglycidyl ether of bisphenol A in hardened nail base and top coat [J]. Contact Dermatitis. 1996, 35: 246-247.
- [5] Kanerva L. Occupational allergic contact dermatitis from epoxy resin in a dental nurse with primary sensitization during cyclosporine treatment [J]. Acta Derm Venereol. 1996, 76: 89-90.
- [6] Kanerva L, Estlander T, Keskinen H, et al. Occupational allergic airborne contact dermatitis and delayed bronchial asthma from epoxy resin revealed by bronchial provocation test [J]. Eur J Dermatol. 2000, 10: 475-477.
- [7] Aimaiti A, Wufuer M, Wang Y H, et al. Can bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) administration prevent steroid-induced femoral head osteonecrosis in the early stage [J]. Med Hypotheses. 2011, 77(2): 282-285.
- [8] Gallart H, Moyano E, Galceran MT, et al. Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their derivatives in canned food and beverages [J]. J Chromatogr A. 2011, 18(12): 1603-1610.
- [9] Gallart H, Moyano E, Galceran MT, et al. Multiple-stage mass spectrometry analysis of bisphenol A diglycidyl ether, bisphenol F diglycidyl ether and their derivatives [J]. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010, 24(23): 3469-3477.
- [10] Olea N, Pulgar R, Perez P, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry [J]. Environ Health Perspect. 1996, 104: 298-305.
- [11] Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, et al. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to

- bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents [J]. *Occup Environ Med.* 2002, 59(9): 625–628.
- [12] 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.
- [13] Yoshihara 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.
- [14] 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.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



丁 利, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: dingli0824@126.com



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: wanglb1@163.com