

羟基多溴联苯醚 (3'-OH-BDE-7) 的大鼠体外肝代谢研究

赖永权¹ 陈学国^{1,2} 蔡宗苇^{1*}

(1 香港浸会大学化学系, 香港特别行政区; 2 中国刑事警察学院法医系, 沈阳, 110854)

摘 要 本文利用液相色谱-质谱联用技术, 建立了羟基多溴联苯醚 3'-OH-BDE-7 在 S.D. 大鼠肝匀浆中的体外代谢研究方法. 实验结果表明, 3'-OH-BDE-7 的主要代谢产物为 2,4-二溴苯酚和二羟基多溴联苯醚 (dOH-PBDEs), 并且其在温孵 30 min 时代谢转化率为 90%. 3'-OH-BDE-7 的代谢研究为其它羟基多溴联苯醚的相应研究提供了信息, 其代谢行为也对更好地理解 PBDEs 和 OH-PBDEs 的毒理和动力学具有一定意义.

关键词 多溴联苯醚 (PBDEs), 羟基多溴联苯醚 (OH-PBDEs), 体外代谢, 液相色谱-质谱.

多溴联苯醚 (PBDEs) 作为一种重要的溴代阻燃剂已经被广泛应用于各种工业和生活消费品中, 在产品中的含量可高达 30%^[1]. 由于 PBDEs 并不是通过化学键与产品中的聚合物基质相结合, 因此容易在产品使用过程中释放出来. PBDEs 作为阻燃剂给人们提供了生命安全保障, 但同时也给环境和人类健康带来了威胁, 目前 PBDEs 已经成为全球性的环境污染物之一. 2009 年的《斯德哥尔摩公约》已经将工业生产中使用五溴联苯醚和八溴联苯醚产品列为持久性有机污染物 (POPs).

羟基多溴联苯醚 (OH-PBDEs) 是最近备受关注的具有内分泌干扰性质的酚类化合物, OH-PBDEs 具有和 PBDEs 相似的化学结构, 但是它的生物毒性效应比 PBDEs 更大^[2]. 目前, 关于 OH-PBDEs 的来源还没有被完全证实, 大多数报道认为 OH-PBDEs 来源主要有两个途径: (1) 动物或人体内 PBDEs 的代谢产生, 因为在一些野生动物^[3-4] 和实验室内暴露于 PBDEs 后的动物体内有检测到 OH-PBDEs^[5-6]. 此外, 在城市废弃物处理站工作和生活的人血清中也检测到 OH-PBDEs^[7]. 动物和人体内的 OH-PBDEs 可能是 PBDEs 通过酶催化氧化形成的一相代谢产物. (2) 海绵动物、被囊动物和海藻等海洋生物体内自然产生, 因为这些生物体内并没有检测到 PBDEs 存在^[8,9]. 与 PBDEs 类似, OH-PBDEs 的主要毒副作用是内分泌干扰, 如干扰甲状腺激素体内平衡、干扰甾类的产生以及毒害神经元作用等. 相对于 BDE-47, OH-PBDEs 与运甲状腺素蛋白结合能力要好好几个数量级; 而且, 6-OH-BDE-47 干扰 Ca^{2+} 体内平衡和神经递质释放能力也比 BDE-47 强^[10]. 此外, Qiu 等^[11] 在怀孕妇女及新生婴儿体内检测到了 OH-PBDEs, 而且母体血清中 6-OH-BDE-47 的浓度明显高于新生儿脐带血清中的浓度, 这表明 OH-PBDEs 可以通过哺乳动物的胎盘传给下一代.

根据文献报道, 在动物和人体内可以检测到 PBDEs 的代谢产物 OH-PBDEs^[12-15], 这说明 OH-PBDEs 在体内具有一定的持久性. 因此, 考虑到其毒性效应, 研究 OH-PBDEs 的体外代谢行为对理解 OH-PBDEs 在体内富集和转化具有重要的意义. 此外, 本文阐述的 OH-PBDEs 代谢机理将有助于更加全面的评价 PBDEs 和 OH-PBDEs 在生物体内的代谢行为和毒性效应.

1 实验部分

1.1 试剂

3'-OH-BDE-7 由香港城市大学 Dr. Michael H. W. Lam 提供. OH-PBDEs 储备标准液用 DMSO 配制, 浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2,4-dibromophenol, 3,5-dibromophenol 和 2,6-dibromophenol 购自 Sigma 公司 (美国); 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH) 购自 Oriental Yeast Co (日本). DMSO 购自 AJAX Chemicals (澳大利亚). 甲醇和乙腈购自 Tedia 公司 (美国); 纯净水经 Milli-Q 水处理系统 (Millipore, USA) 纯化.

2010 年 8 月 25 日收稿.

* 通讯联系人, Tel: (0852) 34115985, E-mail: zwca@hkbu.edu.hk

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 仪器与实验条件

HPLC-MS条件 液相色谱-电喷雾离子阱质谱系统由 HP 1100 液相色谱仪 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, 美国) 和 Esquire 4000 离子阱质谱仪 (Brunner-Fransen, Bremen, 德国) 组成; 色谱柱为 Waters Symmetry C8 柱 (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 5 mmol L⁻¹ 乙酸铵-甲酸缓冲溶液 (pH 4.5), 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱液的起始组成为 60% B, 在 0—0.5 min 维持 60% B, 0.5—8 min 内线性增加至 90% B, 在该条件下维持 8 min, 流速为 0.15 mL min⁻¹; 进样量为 10 μL, 质谱条件为电喷雾离子化源 (ESI), 负离子方式检测, 全离子扫描模式, 扫描范围 100—800 Da, 电喷雾气 (N₂) 温度为 300 °C, 流量为 10 L min⁻¹; 源内碰撞诱导解离气为氦气; MS 通过利用总离子流控制单元 (ICC) 自动调整积分时间实现。

UPLC-MS条件 ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱-质谱仪 (美国 WATERS 公司), BEH C18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm; 美国 WATERS 公司); 流动相: A 为二次水, B 为乙腈; 梯度洗脱液起始组成为 15% B, 在 0—0.5 min 维持 15% B, 0.5—6.0 min 内线性增加至 95% B, 在该条件下维持 2 min, 流速: 0.4 mL min⁻¹; 进样量: 10 μL, 质谱检测采用 APC I (-)-SIR 模式对选定母离子 ([M-H]⁻) 分别进行扫描。毛细管电压: 3.3 kV; 样品锥孔电压: 30 V; 源温: 118 °C; 脱溶剂温度: 500 °C; 脱溶剂气流量: 650 L h⁻¹; 锥孔气流量: 20 L h⁻¹。

1.3 肝匀浆的制备

动物实验是依据香港《动物 (实验管制) 规例》进行的。雄性 S.D. 大鼠 (体重 200 g 左右, 6 周) 从香港中文大学动物中心购买, 在湿度和温度可控制的动物房适应 1 周, 自由进水进食, 动物房灯光按 12 h 方式自动交替开关。一周后, S.D. 大鼠被处死, 迅速取出肝脏, 用冰冷的生理盐水清洗并称重, 肝脏剪成小块后, 加入 4 倍重量的冰冷磷酸缓冲液 (pH = 7.4, 200 mmol L⁻¹) 后匀浆。匀浆后的肝脏组织在 4 °C 和 9000 g 条件下离心 20 min, 所得上层溶液即为本实验所用的肝匀浆。肝匀浆蛋白浓度和细胞色素 P450 含量分别用考马斯亮蓝法和分光光度法测定。蛋白浓度为 25.00 mg mL⁻¹, 细胞色素 P450 含量为 0.117 mmol mg⁻¹ protein。

1.4 体外代谢与样品处理过程

1.5 mL 的离心管中分别加入 95 μL 磷酸缓冲液, 100 μL 肝匀浆和 5 μL OH-PBDEs, OH-PBDEs 的最终浓度为 100 μmol L⁻¹。反应溶液经振荡器混合均匀后, 先在 37 °C 的摇床水浴中预孵 5 min, 然后再加入 NADPH (最终浓度为 1 mmol L⁻¹) 启动反应。反应 70 min 后, 加入 500 μL 的甲醇终止反应。空白实验中, 除了没有加入 NADPH, 其它操作与条件同上。

此外, 本实验考察 3'-OH-BDE-7 和代谢产物随温孵时间关系的变化。取 500 μL 肝匀浆, 加入 10 μL 3'-OH-BDE-7 后, 加入 490 μL 磷酸缓冲液, 3'-OH-BDE-7 最终浓度为 20 μmol L⁻¹。反应溶液先在 37 °C 水浴中预孵 5 min, 然后加入 NADPH (最终浓度为 1 mmol L⁻¹) 启动反应, 反应 2.5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min 后, 分别取出 50 μL 反应液, 加入 150 μL 甲醇终止反应。

经甲醇沉淀蛋白的各反应溶液在 4 °C 和 14000 g 条件下离心 20 min, 收集上清液供 LC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 体外代谢产物的鉴定

首先对 3'-OH-BDE-7 的体外代谢产物进行了结构分析。图 1 所示为 3'-OH-BDE-7 及其代谢物的色谱图和二级质谱图。从图 1-B 可以看出, 3'-OH-BDE-7 的体外代谢实验产生两个代谢产物 M1 和 M2, 二者色谱保留时间均小于 3'-OH-BDE-7, 分子量相同而且比 3'-OH-BDE-7 大 16。由此可见, M1 和 M2 是同分异构体, 可能是 3'-OH-BDE-7 的羟基化代谢物。从图 1-C 和 1-D 可以看出: M1 和 M2 都可以产生两个碎片离子 m/z 278.6 ([3'-OH-BDE-7 + OH-B]⁻), 证实了 3'-OH-BDE-7 的羟基化代谢物的测定。此外, 这两个代谢产物还能产生质荷比为 250.8 (248.6 为其同位素峰) 的碎片离子 [C₆H₃B₂O]⁻, 这说明两个代谢产物 dOH-BDE 的两个羟基在同一个芳香环上。图 2 为 3'-OH-BDE-7 及其体外代谢物的 UPLC-APCI (-) MS 色谱图。从图 2 可以看出, 除了两个 dOH-BDE 代谢产物外, 还检测到另外一个分子量为

252的代谢产物 M1 通过比较 2,4-二溴苯酚、2,6-二溴苯酚、3,5-二溴苯酚和 M1 的色谱保留时间和质谱图, M1 鉴定为 2,4-二溴苯酚.

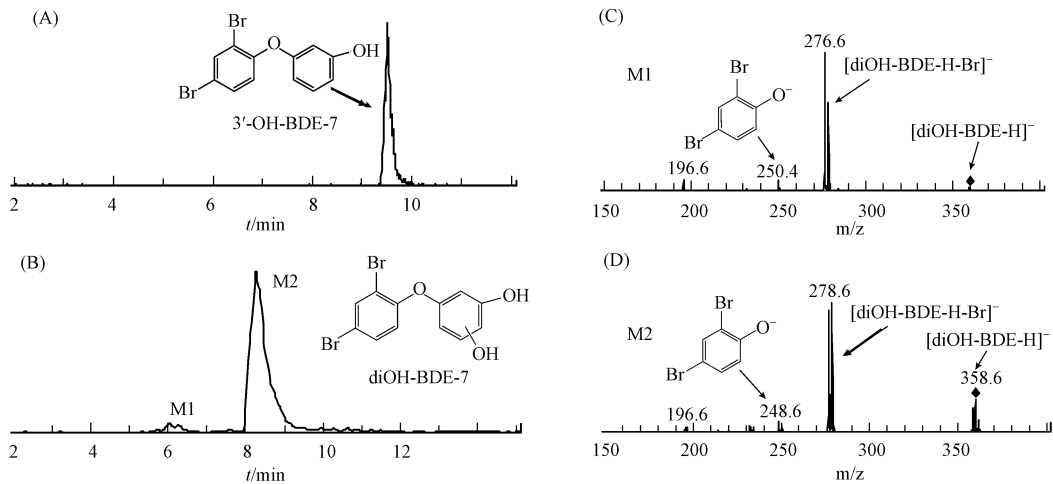


图 1 3'-OH-BDE-7体外代谢后的 HPLC-ESI(-)-MS 色谱图 (A, B)和代谢产物的二级质谱图 (C, D)
Fig 1 HPLC-ESI(-)-MS chromatogram of 3'-OH-BDE-7 (A) and its metabolites (B) as well as typical M S M S spectra of metabolites M 1 (C) and M 2 (D)

2.2 温孵时间对 3'-OH-BDE-7 体外代谢的影响

图 3 为 3'-OH-BDE-7 及其代谢物随温孵时间的变化图. 从图 3 中可以看出, 3'-OH-BDE-7 浓度随着温孵时间的增加而减小, 当反应到 30m in 时, 降解率达到 90%. 两个羟基代谢产物 dOH-BDE 在反应开始时都随着反应时间迅速增加, 羟基代谢物 M2 和羟基代谢物 M3 分别在 10m in 和 15m in 左右达到峰值后又开始缓慢下降. 这说明 dOH-PBDEs 还可以进一步被代谢分解. 然而, 代谢产物 2,4-二溴苯酚却随着温孵时间的逐渐增加, 在反应 30m in 左右时达到平衡位置.

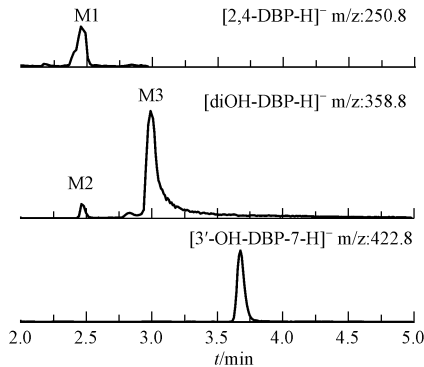


图 2 3'-OH-BDE-7 及其代谢产物的 UPLC-APCI(-)-MS 色谱图

Fig 2 UPLC-APCI(-)-MS chromatogram of 3'-OH-BDE-7 and its metabolites

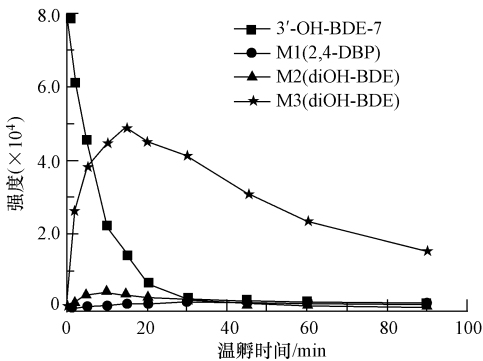


图 3 3'-OH-BDE-7 及其代谢产物与温孵时间的关系

Fig 3 Concentrations of 3'-OH-BDE-7 and its metabolites (2,4-DBP and two diOH-BDE isomers) as a function of incubation time

2.3 体外代谢机理分析

根据以上实验结果表明, 3'-OH-BDE-7 主要形成溴代苯酚和 dOH-BDE 两种代谢产物, 图 4 为其代谢途径. 虽然以往的相关文献也报道了 PBDEs 在 S. D. 人的肝微粒体中能产生 dOH-BDE^[14], 但是并没有对芳香环上羟基化的具体位置进一步讨论. 本实验鉴定的两个同分异构体代谢物 dOH-BDE 都能产生碎片离子 [C₆H₃Br₂O]⁻, 表明新引入的羟基和原来的羟基在同一个芳香环上. 这可能是因为溴取代基的空间位阻和吸电子效应阻碍了其所在芳香环的羟基化反应. 此外, 代谢产物 dOH-BDE 在体内很容易被氧化成毒性很高的醌类化合物. 这些醌类化合物一方面能够与 DNA 和蛋白质的活性位点结合使其

发生病变, 另一方面还能进一步产生活性自由基导致 DNA 和蛋白质的氧化^[16].

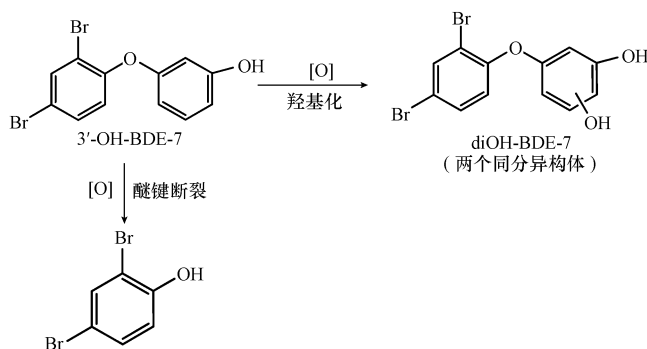


图 4 3'-OH-BDE-7 体外代谢途径

Fig 4 Proposed scheme for the *in vitro* metabolism of 3'-OH-BDE-7

3 结论

溴代苯酚和 diOH-PBDEs 是 OH-PBDEs 的主要代谢产物. 根据本实验的结果, diOH-PBDEs 可能是 PBDEs 通过两步羟基化形成的一相代谢产物. 此外, diOH-PBDEs 代谢产物在体内还可能被氧化产生醌类化合物, 从而导致对人体和动物产生进一步毒害作用. 据文献报道的体外和体内代谢实验结果表明溴代苯酚和 OH-PBDEs 是 PBDEs 的主要代谢产物, 因此, 研究 OH-PBDEs 的直接代谢行为对更好理解 PBDEs 和 OH-PBDEs 的毒理和动力学有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Meerts I A T M, Letcher R J, Hoving S, et al. *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109 (4): 399-407
- [2] Qiu X H, Mercado-Feliciano M, Bigsby R M, et al. Measurement of polybrominated diphenyl ethers and metabolites in mouse plasma after exposure to a commercial pentabromodiphenyl ether mixture[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115 (7): 1052-1058
- [3] Marsh G, Athanasiadou M, Bergman A, et al. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38 (1): 10-18
- [4] Mahvam A, Marsh G, Kautsky L, et al. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39 (9): 2990-2997
- [5] Mahberg T, Athanasiadou M, Marsh G, et al. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39 (14): 5342-5348
- [6] Qiu X H, Mercado-Feliciano M, Bigsby R M, et al. Measurement of polybrominated diphenyl ethers and metabolites in mouse plasma after exposure to a commercial pentabromodiphenyl ether mixture[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115 (7): 1052-1058
- [7] Athanasiadou M, Cuadra S N, Marsh G, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in young humans from Managua, Nicaragua[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116 (3): 400-408
- [8] Bowden B F, Towerzy L, Junk P C. A new brominated diphenyl ether from the marine sponge *Dysidea herbacea*[J]. *Australian Journal of Chemistry*, 2000, 53 (4): 299-301
- [9] Fu X O, Schmitz E J, Govindan M, et al. Enzyme inhibitors: new and known polybrominated phenols and diphenyl ethers from 4 indo-pacific dysidea sponges[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58 (9): 1384-1391
- [10] Dingemans M M L, de Groot A, van Keef R G D M, et al. Hydroxylation increases the neurotoxic potential of BDE-47 to affect exocytosis and calcium homeostasis in PC12 cells[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116 (5): 637-643
- [11] Qiu X H, Bigsby R M, Hites R A. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2009, 117 (1): 93-98
- [12] Marsh G, Athanasiadou M, Athanasiadis I, et al. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats[J]. *Chemosphere*, 2006, 63 (4): 690-697
- [13] Hakk H, Huwe J, Low M, et al. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats[J]. *Xenobiotica*, 2006, 36 (1): 79-94
- [14] Lupton S J, McGarrigle B P, Olson J R, et al. Human liver microsomal mediated metabolism of brominated diphenyl ethers 47, 99, and

153 and identification of their major metabolites[J]. Chemical Research in Toxicology, 2009, 22 (11): 1802-1809

[15] Yu Z Q, Zheng K W, Ren G F, et al. Identification of hydroxylated octa- and nona-bromodiphenyl ethers in human serum from electronic waste dismantling workers[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (10): 3979-3985

[16] Bolton J L, Trush M A, Penning T M, et al. Role of quinones in toxicology[J]. Chemical Research in Toxicology, 2000, 13 (3): 135-160

IN VITRO METABOLISM STUDY OF 3'-OH-2, 4-dBDE-7
IN RAT LIVER S9 FRACTION

IAI Yongquan¹ CHEN Xueguo^{1, 2} CAI Zongwei¹

(1. Department of Chemistry, Hong Kong Baptist University, Hong Kong SAR, China
2. Department of Forensic Medicine, China Criminal Police University, Shenyang, China)

ABSTRACT

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are an important class of brominated flame retardants that have been widely used in industrial and consumer products. PBDEs have become worldwide environmental pollutants because of the bioaccumulation, long-distance transportation and potential biological toxicities. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) are a relatively new group of phenolic compounds that have attracted particular interest due to their endocrine disrupting potency. OH-PBDEs are similar to PBDEs in chemical structure, but were reported to show stronger biological effects. In this study, we investigated *in vitro* metabolic behaviors of selected 3'-OH-BDE-7 in rat liver S9 fraction. The obtained results indicated that 2, 4-dibromophenol and dOH-PBDEs were the major metabolites of OH-PBDEs. It's worth noting that the hydroquinone like metabolites might pose a potential health risk to human and wild animals.

Keywords polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs), *in vitro* metabolism, LC-MS.