

用生物模拟采样技术模拟研究不同取代氯酚在 金鱼(*Crassius auratus*)体内的富集和降解*

王子健 王 毅

(中国科学院生态环境研究中心环境水化学国家重点实验室 北京 100085)

提 要 在实验室控制条件的流动体系中,研究了九种典型氯酚类化合物在半渗透膜生物模拟采样器件(SPMD)和金鱼体内的富集动力学过程.基于氯酚污染物在 SPMD 中的生物浓缩和在鱼体脂肪中生物富集的差别,研究了氯酚污染物在生物体内的降解性和降解作用的结构/效应关系.结果表明氯酚类污染物在 SPMD 中的浓缩作用和鱼体中的富集作用非常相似.氯酚类化合物的生物降解性随氯取代基数量增加而降低,并与氯取代基的位置有关.

关键词 生物模拟技术 生物降解 氯酚 金鱼

分类号 X503.225

能够模拟生物从水体中富集污染物,或生物模拟采样技术已经成为当前环境监测技术研发的一个重点.生物模拟采样技术的一个典型代表是三油酸酯(triolein)半渗透膜采样器(SPMD),是将鱼体内的一种典型中性脂封装在一个半渗透膜内,允许水相污染物跨膜在内侧脂相富集,原理和生物富集过程相似^[1].生物模拟采样技术可以代替生物监测,可以作为生物毒性或标记物研究的有效富集手段.另一方面,生物模拟采样技术不能模拟污染物在生物体内的降解过程,因此和同期进行的生物富集实验结果进行比较,可以研究污染物在生物体内降解的结构/效应关系.

1 研究方法

1.1 富集动力学实验

将 3 个 80L 玻璃水族箱分别设置为实验池、对照池和清水池.用 1 台大流量蠕动泵(20mL/min)和 1 台小流量蠕动泵(1mL/min)按照一定比例将经过活性炭净化的自来水和高浓度的目标化合物溶液混合后引入实验池,将相同流量的清水直接引入对照池.在 70L 处设溢流孔,使池中水体积保持恒定,出水经活性炭净化后排放.

在实验池内目标化合物浓度达到平衡后,投加 40 个 SPMD 采样器(2.5×140mm,膜平均厚度 40-45μm,内涂 20μl 三油酸酯)和 40 尾金鱼(平均体长 9.5±2.3cm,体重 7.9±2.7g,类脂含量(湿重)2.37±0.72%).在对照池投入 15 个 SPMD 和 15 尾金鱼.

实验期间控制水温 20℃,pH 值调整为 6.0,以保持氯酚类化合物为中性形态.实验持续 10d,养鱼池上压玻璃板,减少目标物挥发损失,并避免阳光直接照射发生光解.每 48h 从实验

* 国家自然科学基金(40071073)和中国科学院方向项目(KZCX2-410)资助项目.

收稿日期:2001-06-05,收到修改稿日期:2001-08-10.王子健,男,1953年生,研究员.E-mail:wangzj@mail.rcees.ac.cn)

池中平行采 3 个 25mL 水样, 3 尾鱼和 3 个 SPMD 采样器, 从对照池中分别取 1 尾鱼和 1 个 SPMD 采样器. 实验期间共进行了 12 次采样, 分别为 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192 和 240h.

1.2 样品前处理

所用的有机溶剂均经过反复提纯, SPMD 采样器的制作和净化见文献 [2]. 所采集的水样用 2mL 环己烷萃取, 取出的 SPMD 置于锥形瓶中, 以 50mL 环己烷/个 SPMD 的比例加入溶剂, 先在水中超声萃取 30min, 再置阴暗处 13℃ 下透析 48h. 称取约 10g 鱼肉样品与等量无水硫酸钠混合, 研成干粉末. 称取 20g, 装填入玻璃样品管, 底层铺玻璃纤维. 以 60mL 的环己烷、丙酮、石油醚 (1:1:1) 为提取液, 先浸泡 12h, 然后开始索氏提取, 在 70℃ 回流 12h 后停止. 上述提取液转入 K.D 浓缩器, 在小流量高纯氮气下吹至 1mL, 加载到硅胶柱上净化, 收集流出液再次置于 K.D 浓缩器内, 在小流量高纯氮气下吹至 1mL 用于分析.

1.3 目标化合物分析和质量控制

本实验的 9 种目标化合物中英文名称见表 1. 定量分析中采用单个化合物配制混合标准, 使用 Shimadzu LC-10AD 高效液相色谱仪, RPC₁₈ 柱 (5 μ m, LiChroCART), 配 SPD-M10A 二级管阵列紫外/可见检测器 (210nm) 分析, 用混合的单个标准外标法, 根据峰面积进行定量. 流动相采用甲醇/水/乙酸 (体积比 50:50:0.4), 流速 1mL/min.

整个样品处理和分析过程的数据质量经加标测定 ($n = 8$) 来确定, 九种氯酚化合物在各样品处理过程中的回收率和变异系数分别为 SPMD, 63% - 75% ($C_V < 10\%$); 金鱼, 59% - 70% ($C_V < 15\%$); 水样, 93% - 104%. 本文所给出的数据均经过回收率校正, 其中鱼体内目标化合物浓度用鱼脂肪含量归一化.

2 实验结果与讨论

氯酚化合物属中等疏水性污染物, 在极低浓度下 (0.65 - 40 μ g/L) 就具有强烈的刺激性嗅觉和味觉, 对水质影响很大 [2, 3]. 已经证实氯酚化合物对软体动物、鱼和哺乳动物均产生急性毒性, 通常氯化度较高的酚, 其毒性也较高, 部分甚至在三致实验中呈阳性. 因此, 氯酚化合物一直是各国优先控制污染物黑名单上的化学品. 九种氯酚的名称 (英文名), 分子量 (MW), 酸解离常数 (pK_a), 辛醇/水分配系数对数值 ($\log K_{ow}$), 实验期间流动曝露体系中各污染物的浓度 (C_w) 见表 1.

表 1 氯酚目标化合物的有关参数及在实验水中浓度

Tab. 1 Chemical properties and concentrations of chlorophenols in testing waters

化合物	MW	pK_a	$\log K_{ow}$	C_w (μ g/L)*
2-氯酚 (2-chlorophenol)	128.5	8.52	2.16	34.7 \pm 6.1
4-氯酚 (4-chlorophenol)	128.5	9.37	2.42	25.7 \pm 3.7
2,3-二氯酚 (2,3-dichlorophenol)	163.0	7.76	3.09	33.0 \pm 11.6
2,4-二氯酚 (2,4-dichlorophenol)	163.0	8.09	3.17	23.5 \pm 6.3
3,4-二氯酚 (3,4-dichlorophenol)	163.0	8.68	3.38	20.9 \pm 8.4
3,5-二氯酚 (3,5-dichlorophenol)	163.0	8.27	3.55	16.3 \pm 2.4
2,4,6-三氯酚 (2,4,6-trichlorophenol)	197.5	6.21	3.66	3.3 \pm 2.8
2,3,5-三氯酚 (2,3,5-trichlorophenol)	197.5	6.43	3.55	1.6 \pm 0.8
3,4,5-三氯酚 (3,4,5-trichlorophenol)	197.5	7.81	4.28	0.9 \pm 0.1

* 表中浓度数据为实验周期 6 次采样分析结果的平均值和标准差.

在不同采样时间分析得到的 SPMD 和金鱼体内氯酚含量变化数据(本文未给出)表明,中等疏水性的氯酚化合物在 SPMD 和金鱼体内的富集分别在 12 和 24h 后基本达到平衡.富集动力学曲线由一个快速上升过程和一个逐渐减慢并基本恒定的部分构成,表明 SPMD 或金鱼对氯酚类化合物的富集动力学均符合双区富集模型,可以用以下动力学方程描述:

$$C_L = C_W \cdot K_L \cdot (1 - e^{-k_{\mu} \cdot t}) \quad (1)$$

式中, C_L 代表 SPMD 或鱼脂中目标化合物的浓度, K_L 代表目标化合物在 SPMD(用 $K_{L,SPMD}$ 表示)或鱼脂和水之间的平衡分配常数(经常定义为生物浓缩因子, BCF), k_{μ} 代表富集速率常数, t 为富集时间.使用统计软件 SPSS(6.0 版本),用最小平方算法对实验数据作线性拟合($r^2 = 0.75 - 0.89$),得到 K_L 估算值,在 SPMD 中误差范围低于 15%,在金鱼中低于 18%.24h 后基本达到平衡后,在平衡假设下估算得到 SPMD 的 $K_{L,SPMD}$ 在 17 - 3113 之间,金鱼体内 BCF 在 39 - 2387 之间(表 2).

表 2 氯酚化合物在 SPMD 或鱼脂和水之间的分配系数

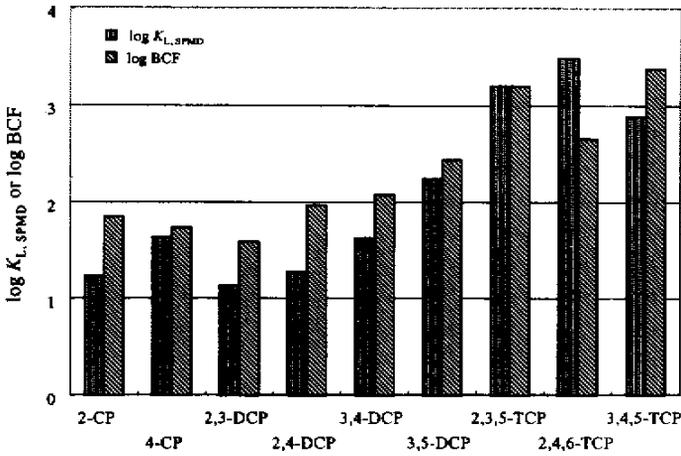
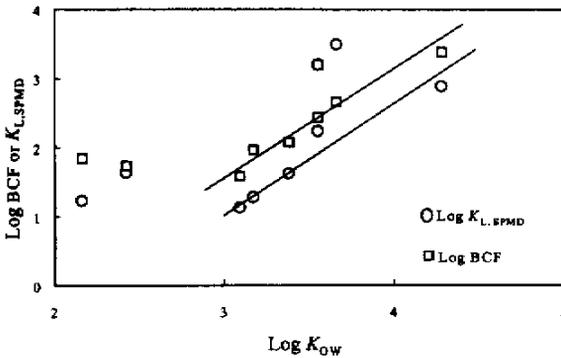
Tab.2 Partitioning coefficients of chlorophenols between SPMD and water and between fish lipid and water

目标化合物	SPMD		金鱼	
	$K_{L,SPMD}$	$C_V(\%)$	BCF	$C_V(\%)$
2-氯酚(2-chlorophenol)	16.8	11.3	71.5	5.2
4-氯酚(4-chlorophenol)	43.5	14.8	54.9	14.7
2,3-二氯酚(2,3-dichlorophenol)	13.7	10.1	39.0	4.1
2,4-二氯酚(2,4-dichlorophenol)	18.9	13.5	93.6	5.2
3,4-二氯酚(3,4-dichlorophenol)	42.8	8.2	121.1	6.9
3,5-二氯酚(3,5-dichlorophenol)	173.4	6.1	276.6	17.8
2,4,6-三氯酚(2,4,6-trichlorophenol)	3113	5.2	464.2	16.2
2,3,5-三氯酚(2,3,5-trichlorophenol)	1590	12.8	1580	12.3
3,4,5-三氯酚(3,4,5-trichlorophenol)	783.6	14.9	2387	4.4

将实验得到的 $K_{L,SPMD}$ 和 BCF 对数值进行了比较(图 1),结果显示两者之间存在明显相关性,可以认为氯酚化合物在 SPMD 中的富集同样符合亲脂性分配原理,与该类化合物在鱼体中的富集规律相似,因此可以认为 SPMD 具有显著的生物模拟特征.

图 1 和表 2 同时还显示 $K_{L,SPMD}$ 和 BCF 值均随氯取代基数目或辛醇/水分配系数的增加而逐步升高.如果不考虑图 1 中单氯取代的氯酚,则在 $\log K_{ow}$ 和 $\log K_{L,SPMD}$ 或 $\log BCF$ 之间存在显著线性关系($\log K_{L,SPMD} = 1.72 \log K_{ow} - 3.81$, $R^2 = 0.507$; $\log BCF = 1.46 \log K_{ow} - 2.66$, $R^2 = 0.761$)如图 2 所示.

氯酚的生物降解性与其结构有密切关系.随着氯原子取代基数目增加,氯酚疏水性逐渐增强.因此,三氯酚的生物富集比单氯或二氯酚要强得多.从表 1 数据也可以看出,随着氯取代数增加,化合物亲脂性增强.一般而言,亲脂性强的化合物生物更难降解.图 1 中,氯酚类化合物的 BCF 与 $\log K_{L,SPMD}$ 相比,在 SPMD 中较高度度的富集,可以解释为氯酚化合物在鱼体内有一定程度的生物降解.随着氯取代基数目增加,二者之间差距的逐渐减小,说明上述氯酚化合物在金鱼体内的生物降解程度随氯取代基数量增加而降低.

图1 不同取代氯酚的 $K_{L,SPMD}$ 和 BCF 对数值的比较Fig. 1 Comparison of $K_{L,SPMD}$ and BCF for different chlorophenols图2 多氯取代氯酚的 $K_{L,SPMD}$ 或 BCF 与 K_{OW} 对数值之间的相关性Fig. 2 Linear regression between $\log K_{L,SPMD}$ or $\log BCF$ and $\log K_{OW}$ for multi-substituted chlorophenols

氯取代基的位置对氯酚亲脂性和生物降解性也有明显的影响,由于芳环上取代的氯是一个吸电子基团,氯取代基离羟基越近,氯酚的酸性的增加越显著,而间位氯原子对其亲脂性的影响大于邻位及对位取代基这类化合物的两重性,使它们的极性高度地依赖于环境的 pH。pH 低于 pK_a 时,它们主要以分子态存在,容易在 SPMD 脂相富集;pH 高时,它们呈现酚盐的形式更加亲水。因此不同取代二氯酚中, $\log pK_a$, $\log K_{ow}$ 和 $\log BCF$ 同步增加(图 1),SPMD ($\log K_{L,SPMD}$) 准确模拟了这一现象。一般而言,间位氯取代酚的抗生物降解能力最强,表现为 $K_{L,SPMD}$ 和 BCF 之间的差距较小(表 2)。但是在多个氯原子取代时,多个氯原子在相邻位置的取代会导致化合物结构稳定性更加降低,因此容易降解。利用 SPMD 富集和同期进行的鱼体富集实验,因此可以比较污染物生物降解性的结构/效应关系。

参 考 文 献

- 1 Huckins J N , Manuweera G K , Petty J , *et al.* Lipid containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water. *Environ Sci Technol* , 1993 , **27** 2489 – 2496
- 2 王 毅 , 王春霞 , 王子健. 被动式采样及半渗透膜装置在环境中的应用及展望. *环境导报* , 1997 2 : 1 – 5
- 3 Hanai T , Hubert J. Prediction of retention time of phenols in lipid chromatography. *J High Resolution Chromatography and Chromatography Communications* , 1983 , **6** 20 – 26
- 4 Xie T M , Dyrssen D. Simultaneously determination of partition coefficients and acidity constants of chlorinated phenols and gualacols by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* , 1984 , **160** 21 – 30
- 5 Xie T M , Hulthe B , Folestad S. Determination of partition coefficients of chlorophenols , guaiacols and catechols by Shake-Flask GC and HPLC. *Chemosphere* , 1984 , **13** 445 – 460

Bioaccumulation and Biodegradation of Chlorophenols in Semi-permeable Membrane Biomimetic Sampling Device and in Golden Fish (*Crassius auratus*)

WANG Zijian WANG Yi

(SKLEAC , Research Center for Eco-Environmental Sciences , Beijing 100085 , P. R. China)

Abstract

Bioaccumulation kinetics of 9 chlorophenols in semi-permeable membrane biomimetic sampling device and in fish was studied under controlled laboratory flowing-through conditions. Based on the difference between bioconcentration process in SPMD and bioaccumulation process of chlorophenols in fish , the degradation and the structure/effects relationship of degradation of chlorophenols in fish was examined. The results showed that the chlorophenols under testing could be concentrated by SPMD in a similar way as it was concentrated by fish lipid. The biodegradability of chlorophenols decreased with increase of substitutions of chlorine atoms and is closely related to the position of chlorine substitution in the ring of benzene.

Key Words Biomimetic sampling , biodegradation , chlorophenols , Golden fish