

文章编号 1000-5013(2003) 01-0044-04

酚类对大型蚤的急性毒性及 QSAR 研究

于瑞莲¹ 赵元慧^④ 胡恭任¹(¹ 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011; ^④ 东北师范大学环境科学系, 吉林 长春 130024)

摘要 在不同 pH 值下, 测定 11 种苯酚类化合物对大型蚤 (*Daphnia Magna*) 24 h 的半数活动抑制浓度 IC₅₀. 应用 3 种理化参数 log*P*, TSA 和 p*K*_a, 对毒性数据进行定量构效相关 (QSAR) 研究. 在此基础上, 初步探讨苯酚类化合物的毒性机制.

关键词 苯酚类化合物, 大型蚤, IC₅₀, pH 值, QSAR, 毒性机制

中图分类号 O 625.31⁺2 X 17 Q 959.223⁺.3

文献标识码 A

定量构效相关 (QSAR) 研究, 是进行有毒化学品环境风险性评价的重要手段之一. 利用 QSAR 方法可对化学品的生物活性和环境行为进行预测, 并筛选出具有潜在危害的化学品, 从而节省大量的毒性试验工作及昂贵费用. 苯酚类在水中离子态和非离子态 (分子态) 有两种存在形态. 虽然这两种形态均可被生物体吸收, 但分子态被吸收的速度要比离子态大得多. 因此, Blum 和 Speece 认为^[1], 有机物对生物的毒性贡献主要是分子态所致, 分子态所占比例越大, 对生物的毒性越大. 苯酚类化合物在水中的电离程度受水环境 pH 值的影响. 因此, pH 值成为影响苯酚类化合物对水生生物毒性的因素之一. 本文将以大型蚤为试验生物, 测定不同 pH 值 (6. 0, 7. 8, 9. 0) 条件下, 苯酚类化合物对大型蚤的毒性, 并选用适当的物化参数对化合物进行 QSAR 研究. 在此基础上, 初步探讨化合物的毒性机制.

1 实验部分

1.1 实验材料

大型蚤 (*Daphnia Magna*), 由中国预防医学科学院环境卫生与卫生工程研究所提供. 在自然光照 ((25 ± 2) °C, 14 h 光/10 h 暗) 的条件下进行培养, 饲以绿藻. 绿藻的培养参见文献 [2]. 选用 6 ~ 24 h 的健康幼蚤进行毒性实验, 实验过程中不喂食. 11 种苯酚类均为分析纯. 化合物的贮备液用绿藻培养液^[3]定容到棕色容量瓶中, 均配在其水中饱和溶解度以下. log*P* 大于 4 的化合物先用 1. 0 mL 丙酮助溶, 难溶的化合物用超声波清洗机溶解后定容. 实验用水为脱氯自来水, 实验期间水温为 18 ~ 25 °C.

1.2 化合物的理化参数

收稿日期 2002-08-09 作者简介 于瑞莲(1970-), 女, 讲师

基金项目 华侨大学科研基金资助项目(02HZZ01) Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

正辛醇/水的分配系数 $\log P$ 由 ClogP 程序计算得到, 分子表面积 TSA 通过计算机 Nemes 程序计算获得, 电离常数项 pK_a 由计算机 Miqsar 程序算得. 化合物的理化参数, 如表 1 所示.

表 1 苯酚类化合物的理化参数

化合物	$\log P$	pK_a	TSA
苯 酚	1.47	9.92	1.207
邻甲基苯酚	1.95	10.26	1.387
间甲基苯酚	1.96	10.05	1.392
对甲基苯酚	1.94	10.23	1.398
邻硝基苯酚	1.79	6.80	1.482
间硝基苯酚	2.00	8.27	1.505
2,4-二硝基苯酚	1.67	4.03	1.798
2,4-二氯苯酚	3.06	7.87	1.476
2,4,6-三氯苯酚	3.69	6.36	1.576
五氯苯酚	5.12	4.70	1.788
间苯二酚	0.80	9.33	1.345

1.3 大型蚤半数活动抑制浓度 IC_{50} 的测定

根据空白预实验, 大型蚤在 pH 值为 6.0 ~ 9.0 之间能正常生存. 因此, 选定 pH 值为 6.0, 7.8, 9.0 为 3 个不同的 pH 条件. 根据预实验, 按等对数间距取一系列不同体积的储备液于 50 mL 具塞比色管中. 然后, 用绿藻培养液稀释至刻度, 用 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 值分别为 6.0, 7.8 或 9.0. 每个化合物在不同 pH 值下设置 5 个浓度点和 1 个空白对照, 每个点作 3 个平行试验. 每个比色管中放 10 个同龄且健康的幼蚤, 观察并记录其 24 h 活动被抑制的数目. 将浓度对数和水蚤死亡数进行回归分析, 求出 24 h 的 IC_{50} 值, 结果如表 2 所示. 实验过程中, 试液的溶解氧达到饱和时的 60% 以上, 且对照管中死亡数为 0 时, 结果才视为有效. 统计分析使用 Statgraphics 程序.

表 2 苯酚类对大型蚤毒性 ($-\log IC_{50}$) 数据的测定值和拟合值

化合物	pH= 6.0			pH= 7.8			pH= 9.0		
	测定值	拟合值	残差	测定值	拟合值	残差	测定值	拟合值	残差
苯 酚	3.52	3.38	0.14	3.37	3.33	0.04	3.27	3.24	0.03
邻甲基苯酚	3.81	3.78	0.03	3.68	3.69	- 0.01	3.60	3.61	- 0.01
间甲基苯酚	3.66	3.82	- 0.16	3.57	3.72	- 0.15	3.52	3.63	- 0.11
对甲基苯酚	3.81	3.79	0.02	3.72	3.69	0.03	3.64	3.63	0.01
邻硝基苯酚	3.76	4.31	- 0.55	3.64	4.05	- 0.41	3.51	3.82	0.31
间硝基苯酚	3.75	4.23	- 0.48	3.71	4.02	- 0.31	3.53	3.86	- 0.33
2,4-二硝基苯酚	5.18	5.01	0.17	4.68	4.56	0.12	4.49	4.33	0.16
2,4-二氯苯酚	4.88	4.81	0.07	4.75	4.53	0.22	4.68	4.13	0.55
2,4,6-三氯苯酚	5.42	5.48	- 0.06	5.05	5.08	- 0.03	4.23	4.49	- 0.26
五氯苯酚	6.94	6.70	0.24	6.20	6.11	0.09	5.28	5.24	0.04
间苯二酚	3.85	3.27	0.58	3.59	3.19	0.40	3.50	3.27	0.23

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 值下苯酚类化合物对大型蚤的毒性及 pH 值对其毒性的影响

表 2 列出不同 pH 条件下, 所测的 11 个苯酚类化合物对大型蚤的急性毒性值 ($-\log IC_{50}$). 从表中可以看出, 苯酚类化合物的毒性随 pH 值的升高而减小. 溶液中的 pH 值越低, 苯酚类化合物的电离程度越差, 非离子态所占的比例也越大, 分子越容易穿过生物膜到达机体靶位, 因而毒性越强.

2.2 苯酚类化合物的 QSAR 研究

QSAR 模型用于研究化合物生物活性(在环境化学中指化合物的毒性)与表征其结构特征的理化参数之间的关系, 已被广泛应用到水环境化学、毒理学的研究方面. Hansch^[6]认为, 有机物的生物活性与分子的疏水性、立体效应、电子效应呈良好的相关性. 分子的疏水性、立体效应可分别用正辛醇/水的分配系数 $\log P$ 和分子表面积 TSA 来体现. 对于有机酸碱, 文 [4~6] 指出, 分子的电子效应可用电离常数项 pK_a 来体现. pK_a 反映分子的释质子能力, pK_a 越大, 释质子能力越弱, 表明亲核性越强; 相反, pK_a 越小, 释质子能力越大, 表明亲电性越强. 因此, 在有机酸碱的 QSAR 研究中, 通常可在 $\log P$ 的基础上引入 TSA 和 pK_a 进行联合描述, 以使 QSAR 回归效果更佳. 对于苯酚类化合物, 将表 1 所列 $\log P$, TSA 和 pK_a 与表 2 所列实测毒性数据进行多元回归, 得到式 (1) ~ 式 (3) 方程. (1) 当 pH = 6.0 时, 有

$$\left. \begin{aligned} -\log IC_{50} &= 2.75 + 0.523 \log P + 1.10 TSA - 0.148 pK_a, \\ n &= 11, s = 0.381, R^2 = 0.912, \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

(2) 当 pH = 7.8 时, 有

$$\left. \begin{aligned} -\log IC_{50} &= 2.53 + 0.474 \log P + 0.91 TSA - 0.101 pK_a, \\ n &= 11, s = 0.269, R^2 = 0.935, \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

(3) 当 pH = 9.0 时, 有

$$\left. \begin{aligned} -\log IC_{50} &= 1.54 + 0.275 \log P + 1.38 TSA - 0.036 pK_a, \\ n &= 11, s = 0.311, R^2 = 0.835. \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

根据以上 3 个方程, 不同 pH 值下苯酚类化合物对大型蚤的急性毒性拟合值, 如表 2 所示. 从表中可以看出, 所测酚类化合物的拟合值与实测值吻合较好. 这说明可以应用上述 3 个方程, 进行酚类对大型蚤的急性毒性预测. 同时它还表明, 苯酚类化合物属于极性麻醉(麻醉 II 型)化合物, 毒性超过基本毒性(Baseline Toxicity)^[1]. 生物中毒可分为两个过程, 首先是有机物分子透过生物膜进入机体内, 其次是有机物分子与机体内“靶位”(如蛋白酶、DNA 等)发生作用. 对于有机酸碱, 这两个过程可分别用化合物的亲脂性参数($\log P$), 以及分子的立体效应参数(TSA)和电子效应参数(pK_a)来描述. 苯酚类化合物对大型蚤的急性毒性随其 $\log P$ 和 TSA 的增大而增大, 随 pK_a 的增大而减小. 对于 TSA 和 pK_a 相近的酚, $\log P$ 越大, 表明亲脂性越强, 分子越易穿过生物膜到达机体内部, 毒性相对越大. 如果 $\log P$ 和 pK_a 相近, TSA 越大, 毒性越强. 这与 Abemethy^[7]提出的“体积理论”是一致的. 即溶解的毒物可使神经细胞膜的双层磷脂层的体积膨胀, 而对机体产生毒性. $\log P$ 和 TSA 相近时, pK_a 越小, 表明分子的释质子能力越大, 亲电能力越大, 毒性也越大. 这说明苯酚类化合物的毒性机制, 可能是以亲电作用为主(如苯酚类的 $-\text{OH}$ 与机体蛋白酶的 $-\text{NH}_2$ 形成氢键^[8]). 以上 QSAR 模型物理意义较明确,

为进一步探讨苯酚类化合物的生物中毒机理奠定了理论基础.

3 结束语

(1) 在不同 pH 值(6.0, 7.8, 9.0)下, 测定了 11 种苯酚类化合物对大型蚤的 24 h 的半数活动抑制浓度 IC_{50} . 苯酚类化合物对大型蚤的毒性受水环境 pH 值的影响, 其毒性随 pH 值的升高而减小. (2) 本文选取 $\log P$, TSA 和 pK_a 3 个理化参数来联合描述苯酚类化合物对大型蚤毒性的 QSAR, 拟合效果令人满意. 且而, 各参数均可通过有关程序直接计算获得. (3) 苯酚类化合物属于极性麻醉(麻醉 II 型)化合物, 对大型蚤的急性毒性随其 $\log P$ 和 TSA 的增大而增大, 随 pK_a 的增大而减小.

参 考 文 献

- 1 Blum D J W, Speece R E. Determining chemical toxicity to aquatic species: The use of QSARs and surrogate organisms[J]. Environ. Sci. Technol., 1990, 24(3): 284 ~ 293
- 2 周永欣. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989. 31 ~ 47
- 3 永田亲义. 药物结构与活性的关系[M]. 徐景达译. 北京: 科学出版社, 1987. 26 ~ 28
- 4 Kaiser K L E. Comparison of fish toxicity screening data and QSAR predictions for 48 anilines derivatives [J]. QSAR in Environmental Toxicology, 1987, (11): 231 ~ 250
- 5 Mekenyan O G, Veith G D. Relationships between descriptors for hydrophobicity and softy electrophilicity in predicting toxicity[J]. SAR and QSAR in Environmental Research, 1993, (1): 335 ~ 344
- 6 Zhao Yuanhui, Yuan Xing. Quantitative structure-activity relationships of organic acids and bases[J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1996, (57): 242 ~ 249
- 7 Abernethy S G, Mackay D, McCarty L S. Volume fraction correlation for narcosis in aquatic organisms: The key role of partitioning[J]. Environmental Toxicity and Chemistry, 1988, (7): 469 ~ 481
- 8 Kishino T, Kobayashi K. Acute toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols in fish[J]. Wat. Res., 1996, 30(2): 387 ~ 392
- 9 Kishino T, Kobayashi K. Studies on the mechanism of toxicity of chlorophenols found in fish through quantitative structure-activity relationships[J]. Wat. Res., 1996, 30(2): 393 ~ 399

Acute Toxicity of Phenol Chemicals to *Daphnia Magna* at Different pH Values and the QSAR Study

Yu Ruilian¹ Zhao Yuanhui^④ Hu Gongren¹

(¹ College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou, China;

④ Dept. of Environ. Sci., Northeast Normal Univ., 130024, Changchun, China)

Abstract The toxicity of 11 kinds of phenol chemicals to *Daphnia Magna* at pH 6.0, 7.8 and 9.0 are reflected by measuring the concentration for inhibiting the activities of half of them during 24 hours, or IC_{50} for short. The study of quantitative structure-activity relationships, or QSAR for short, is made on toxicity data by applying 3 kinds of physicochemical parameters $\log P$, TSA and pK_a . On this basis, an initial inquiry is made into the mechanism of toxicity of phenol chemicals.

Keywords phenol chemicals, *Daphnia Magna*, IC_{50} , pH value, QSAR, mechanism of toxicity