

文章编号 1000-5013(2005)02-0195-04

苯胺类化合物对发光菌的毒性及定量构效

于瑞莲 胡恭任

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要 测定 13 种苯胺类化合物, 研究在 pH 值为 5.0, 7.0, 9.0 时对发光菌的急性毒性(15 min EC_{50})。应用两种理化参数 $\log P$ 和 pK_a , 对毒性数据进行定量构效关系(QSARs)研究, 探讨苯胺类化合物的毒性机制。结果表明, 苯胺类化合物对发光菌的毒性随 pH 值的升高而增大, 这与不同 pH 值下苯胺类化合物的电离程度有关。在相同 pH 值下, 苯胺类化合物的毒性随取代基团的种类、个数及取代位置而不同。苯胺类化合物属于极性麻醉化合物, 其对发光菌的毒性以亲电性为主, 毒性可用 $\log P$ 和 pK_a 来联合描述。

关键词 苯胺类化合物, 发光菌, 15 min EC_{50} , QSAR, 毒性机制

中图分类号 X 171.5; O 625.63

文献标识码 A

发光细菌法是 70 年代后期发展起来的一种新的生物毒性检测方法^[1], 与传统的生物检测方法(如鱼、蚤)相比, 该法具有快速、简便、灵敏、廉价和应用广泛等特点。化合物对发光菌的毒性, 与对其它生物的毒性数据有一定的相关性^[2,3]。因此, 该方法对有毒化学品的筛选和评价具有重要意义, 也可为研究化合物对其它生物的毒性提供基础数据。苯胺类化合物在水中有离子态和非离子态(分子态)两种存在形态, 虽然两种形态均可对生物产生毒性, 但分子态的毒性贡献更大些。因此, Blum 和 Speece^[4]认为, 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。有关苯胺类化合物对水生生物的毒性, 前人已作了一些研究^[1~3,5], 但有关其在不同 pH 值下的毒性研究报道很少。本文将发光菌为试验生物, 测定不同 pH 值下, 13 个苯胺类化合物的生物毒性, 并选用适当的物化参数对化合物进行定量构效相关(QSAR)研究。在此基础上, 进一步探讨苯胺类化合物的毒性机制。

1 实验部分

1.1 实验材料

发光菌冻干粉由中科院南京土壤所微生物室提供。发光菌的复苏、培养方法参见文献[6]。

1.2 试剂与仪器

13 种苯胺类化合物均为分析纯。化合物的标准溶液用质量分数为 0.03 的 NaCl 溶液配制, 用超声波清洗机溶解后定容到棕色容量瓶中。LS-B-50L 型高压灭菌锅(上海医用核子仪器厂), THZ-82 型恒温振荡器(江苏太仓医疗器械厂), pH-3C 型酸度计(上海第二分析仪器厂), CHJ-1 型磁力恒温搅拌器(上海南汇电讯器材厂), DXY-2 型生物毒性测试仪(中科院南京土壤所), TCQ-250 超声清洗机(北京医疗设备二厂)。

1.3 化合物的理化参数

正辛醇/水分配系数 $\log P$ 由 ClogP 程序计算得到, 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。

1.4 发光菌半数发光抑制浓度 15 min EC_{50} 的测定

根据空白预实验, 发光菌在 pH 值为 5.0 ~ 9.0 之间, 其发光强度已不受影响, 因此选 5.0, 7.0, 9.0

收稿日期 2004-09-22

作者简介 于瑞莲(1970-), 女, 讲师, 主要从事环境科学与环境工程的研究。E-mail: grhu@hqu.edu.cn

基金项目 华侨大学科研基金资助项目(02HZR01)

表 1 苯胺类化合物的理化参数

化合物	log P	p K _a	化合物	log P	p K _a	化合物	log P	p K _a
苯胺	0.90	4.58	2,4-二硝基苯胺	1.72	- 4.00	2,3-二氯苯胺	2.86	1.58
间甲基苯胺	1.40	4.75	邻氯苯胺	1.90	2.65	间溴苯胺	2.10	3.46
邻硝基苯胺	1.85	- 0.37	间氯苯胺	1.88	3.51	2,4,6-三溴苯胺	3.94	- 0.14
间硝基苯胺	1.37	2.45	2,4-二氯苯胺	2.91	1.96			
对硝基苯胺	1.39	0.95	2,5-二氯苯胺	2.92	1.58			

为 3 个不同的 pH 值条件. 吸取培养好的 1 mL 菌液于含有 200 mL 质量分数为 0.03 的 NaCl 溶液中, 磁力搅拌该稀释菌液备用. 根据预实验, 在每个 pH 值下按等对数间距用标准溶液和质量分数为 0.03 的 NaCl 溶液配制 5 个浓度组, 各吸取 2 mL 于磨口具塞圆形测试管中(直径 1.2 cm, 高 5 cm), 用 2 mL 质量分数为 0.03 的 NaCl 溶液作空白对照. 每个浓度组作 3 个平行. 用微量可调移液管迅速吸取 0.5 mL 稀菌液于各测试管中, 加塞, 上下振摇 10 次, 去塞. 在 15 min 下用生物毒性测试仪测定发光强度, 计算发光率(发光率 = 样品发光强度/ 对照发光强度). 对发光率和化合物浓度对数进行回归分析, 直线内插法求出 15 min- EC₅₀ 值(使发光抑制为对照的 50 % 化合物浓度), 结果如表 2 所示. 表中拟合值 a, b, c 分别节 2.4 的应用方程(3), (4), (5). 实验过程中室温为 (17 ± 2) °C, 统计分析使用 Statgraphics 程序.

表 2 苯胺类对发光菌毒性的测定值和拟合值

化合物	pH = 5.0			pH = 7.0			pH = 9.0		
	测定值	拟合值 a	残差	测定值	拟合值 b	残差	测定值	拟合值 c	残差
苯胺	2.41	2.57	- 0.13	2.53	2.62	- 0.09	2.57	2.68	- 0.11
间甲基苯胺	2.97	2.75	0.22	3.03	2.80	0.23	3.03	2.85	0.18
邻硝基苯胺	3.51	3.81	- 0.30	3.54	3.84	- 0.30	3.70	3.93	- 0.23
间硝基苯胺	2.94	3.13	- 0.19	3.00	3.17	- 0.17	3.01	3.24	- 0.23
对硝基苯胺	3.73	3.39	0.34	3.78	3.43	0.35	3.86	3.52	0.34
2,4-二硝基苯胺	4.43	4.37	0.06	4.45	4.39	0.06	4.56	4.52	0.04
邻氯苯胺	3.45	3.31	0.14	3.52	3.36	0.16	3.54	3.42	0.12
间氯苯胺	2.90	3.16	- 0.26	2.92	3.20	- 0.28	2.96	3.26	- 0.30
2,4-二氯苯胺	3.86	3.85	0.01	3.96	3.89	0.07	4.09	3.94	0.15
2,5-二氯苯胺	4.16	3.92	0.24	4.18	3.96	0.22	4.24	4.01	0.23
2,3-二氯苯胺	3.76	3.90	- 0.14	3.76	3.94	- 0.18	3.83	3.99	- 0.16
间溴苯胺	3.30	3.26	0.04	3.39	3.30	0.09	3.43	3.35	0.08
2,4,6-三溴苯胺	4.60	4.64	- 0.04	4.61	4.67	- 0.06	4.60	4.72	- 0.12

2 结果与讨论

2.1 相同 pH 值条件下苯胺类化合物对发光菌的毒性

由表 2 可以看出, 在相同 pH 值条件下, 所测苯胺类化合物的芳环上不论是有强吸电子取代基(- X, - NO₂), 或者有给电子取代基(- R), 均会使苯胺类化合物的毒性(以 - lg EC₅₀ 表示)增大. 这与苯胺类化合物的致毒机制有关. 苯胺类化合物属极性麻醉(麻醉型)化合物^[4], 既具亲电性, 又具亲核性^[7]. 在相同 pH 值条件下, 若环上有强吸电子取代基, 会使亲电作用加强; 若环上有给电子取代基, 可使亲核作用加强. 因而两类取代基均会使其毒性增加. 当取代基种类相同时, 毒性随取代基个数的增多而增强, 如二氯苯胺 > 一氯苯胺, 二硝基苯胺 > 单硝基苯胺等; 当取代基种类和个数均相同时, 毒性还与取代位置有关, 对、邻位取代 > 间位取代. 这与文献[5]的研究结果是一致的.

2.2 pH 值对苯胺类化合物在水环境中存在形态的影响

对于苯胺类化合物(RNH₂), 在水溶液中存在如下电离平衡

$$\left. \begin{aligned} \text{RNH}_2 + \text{H}_2\text{O} &= \text{RNH}_3^+ + \text{OH}^- \\ K_b &= \frac{[\text{RNH}_3^+][\text{OH}^-]_w}{[\text{RNH}_2]} \end{aligned} \right\} \quad (1)$$
$$\frac{[\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_2] + [\text{RNH}_3^+]} = \frac{1}{1 + K_b/[\text{OH}^-]}$$

$$= \frac{1}{1 + 10^{pOH - pK_b}} = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

(2)

在上式中, K_b 为碱离解常数,且 $pK_b = 14 - pK_a$, $pOH = 14 - pH$; $[RNH_2]$ 为苯胺类分子态浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); $[RNH_3^+]$ 为苯胺类离子态浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 由化合物的 pK_a 值(表 1)和式(2),可计算出苯胺类化合物在不同 pH 值水溶液中分子态浓度占总浓度的百分数,如表 3 所示. 从表中可见, pH 值在 5.0 ~ 9.0 之间,所测定的苯胺类化合物在水环境中主要以分子态形式存在.

表 3 不同 pH 值下苯胺类化合物分子态浓度占总浓度的百分数 (%)

化合物	$pH=5.0$	$pH=7.0$	$pH=9.0$	化合物	$pH=5.0$	$pH=7.0$	$pH=9.0$
苯胺	72.45	99.62	100.00	间氯苯胺	96.87	99.97	100.00
间甲基苯胺	64.01	99.44	99.99	2,4-二氯苯胺	99.91	100.00	100.00
邻硝基苯胺	100.00	100.00	100.00	2,5-二氯苯胺	929.96	100.00	100.00
间硝基苯胺	99.72	100.00	100.00	2,3-二氯苯胺	99.96	100.00	100.00
对硝基苯胺	99.99	100.00	100.00	间溴苯胺	97.20	99.97	100.00
2,4-二硝基苯胺	100.00	100.00	100.00	2,4,6-三溴苯胺	100.00	100.00	100.00
邻氯苯胺	99.56	100.00	100.00				

2.3 不同 pH 值条件下苯胺类化合物对发光菌的毒性

从表 2 可以看出,苯胺类化合物对发光菌的毒性随 pH 值的升高而呈增大趋势. Blum 等^[4]指出,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,对生物的毒性越强. pH 值越大,胺的电离程度越小,非离子态所占的比例越大,因而毒性也越大. 在实验所选定的 pH 值范围(5.0 ~ 9.0)内,除苯胺和间甲基苯胺外,所测试的其它胺类化合物主要以分子态形式出现(表 3). 因此, pH 值对它们的毒性影响并不十分显著. 苯胺和间甲基苯胺虽然在 pH 值为 5.0 和 7.0 时,其分子态所占比例变化相对较大,但 pH 值对它们的毒性影响也不很显著. 这可能是由于发光菌是单细胞生物,细胞膜对离子进入细胞的阻碍作用较小的缘故.

2.4 苯胺类化合物的 QSARs 研究

Jaworska^[8]指出,有机物的生物活性与分子的疏水性、电子效应呈良好的相关性. 分子的疏水性可用正辛醇/水分配系数 $\log P$ 来体现. 对于有机酸碱,分子的电子效应可用电离常数项 pK_a 来体现^[9~11]. 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 pK_a 进行联合描述,以使 QSAR 回归效果更佳. 对于苯胺类化合物,将表 1 所列 $\log P$ 和 pK_a 与表 2 所列毒性数据进行多元回归可得到 3 个方程. (1) 当 $pH=5.0$ 时, $n=13$, $s=0.217$, $R^2=0.903$, 则

$$- \log EC_{50} = 2.97 + 0.417 \log P - 0.170 pK_a.$$

(3)

(2) 当 $pH=7.0$ 时, $n=13$, $s=0.232$, $R^2=0.889$, 则

$$- \log EC_{50} = 3.01 + 0.417 \log P - 0.167 pK_a.$$

(4)

(3) 当 $pH=9.0$ 时, $n=13$, $s=0.223$, $R^2=0.898$, 则

$$- \log EC_{50} = 3.14 + 0.395 \log P - 0.176 pK_a.$$

(5)

根据以上 3 个方程,不同 pH 值下苯胺类化合物对发光菌的急性毒性拟合值,与实测值吻合较好. 说明可以应用上述 3 个方程,预测苯胺类化合物对发光菌的急性毒性. 方程还表明,毒性与 $\log P$ 成正比,而与 pK_a 成反比. 说明苯胺类化合物对发光菌的毒性与疏水性成正比,其致毒机理以亲电性为主.

3 结束语

(1) 测定了 13 种苯胺类化合物在不同 pH 值下,其对发光菌的半数发光抑制浓度 15 min- EC_{50} . 相同 pH 值下,当取代基种类相同时,毒性随取代基个数增加而增大;当取代基种类和个数均相同时,毒性与取代基位置有关,且对、邻位取代大于间位取代. 苯胺类化合物的毒性随水环境 pH 值的升高而呈增大趋势. 在 pH 值在 5.0 ~ 9.0 之间,所测试的胺类化合物毒性随 pH 值的变化并不十分显著. (2) 苯胺类化合物对发光菌的致毒机理,以亲电性为主. 本文用两个理化参数 $\log P$ 和 pK_a 来联合描述苯胺类化合物对发光菌毒性的 QSARs,拟合效果令人满意,且各参数均可通过有关程序直接计算获得.

参 考 文 献

- 1 Blum D J W, Speece R E. Quantitative structure-activity relationships for chemicals toxicity to environmental bacteria[J]. *Ecotoxi. Env. Saf.*, 1991, 22:198 ~ 224
- 2 Zhao Yuanhui, He Yibing, Wang Liansheng. Predicting toxicities of substituted aromatic hydrocarbons to fish by toxicities to *Daphnia magna* or *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1995, 51: 191 ~ 195
- 3 Zhao Yuanhui, Wang Liansheng, Gao Heng, et al. Quantitative structure-activity relationships between toxicity of organic chemicals to fish and to *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Chemosphere*, 1993, 26(11): 1 971 ~ 1 979
- 4 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
- 5 黄庆国,赵元慧,张爱茜等. 取代芳烃化合物对水生生物的急性毒性与其分子轨道能级的定量关系[J]. *科学通报*, 1995, 40(4): 351 ~ 353
- 6 于瑞莲,胡恭任. 不同 pH 下有机酸碱对发光菌的急性毒性[J]. *重庆环境科学*, 2003, 25(10): 12 ~ 14
- 7 Veith G, Mekenyan O G. A QSAR approach for estimating the aquatic toxicity of soft electrophiles[J]. *Quant. Struct. Act. Relat.*, 1993, 12: 349 ~ 356
- 8 Jaworska J S, Schultz T W. Mechanism-based comparisons of acute toxicities elicited by industrial organic chemicals in procaryotic and eucaryotic systems[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 29: 200 ~ 213
- 9 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
- 10 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
- 11 Zhao Yuanhui, Yuan Xing. Quantitative structure-activity relationships of organic acids and bases[J]. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1996, 57: 242 ~ 249

Toxicity of Anilines to *Photobacterium phosphoreum* and the Quantitative Structure-Activity Relationship

Yu Ruilian Hu Congren

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

Abstract The acute toxicity of 13 anilines to *Photobacterium phosphoreum* at different pH (pH 5.0, 7.0 and 9.0) are determined by taking 15 min- EC_{50} as indicator which means the concentration value causing a 50 % inhibition of bio-luminescence after 15 minutes. The quantitative structure-activity relationship is studied by applying two physico-chemical parameters $\log P$ and pK_a . The mechanism of toxicity of anilines to *Photobacterium phosphoreum* is also investigated. The results show that the toxicity of anilines to *Photobacterium phosphoreum* increases with the rise of pH. This phenomenon is relevant to the ionization degree of anilines at different pH. At the same pH, the toxicity of anilines is differing with the variety, the number and the substitution position of substituent group. Anilines belong to polar narcotic compounds. Its toxicity to *Photobacterium phosphoreum* is mainly electrophilic. The toxicity can be described by $\log P$ in combination with pK_a .

Keywords anilines, *Photobacterium phosphoreum*, 15 min- EC_{50} , quantitative structure-activity relationship, mechanism of toxicity