取代苯化合物对发光菌急性毒性的测定及预测

魏东斌¹,翟丽华²,董春宏¹,胡洪营¹(1.清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点 联合实验室 北京 100084; 2.郑州大学环境与水利学院,郑州 450062)

摘要:测定了 17 种取代苯系列化合物对发光菌的急性毒性,初步探讨了苯环上不同取代基类型和取代位置对毒性的影响.同时,计算了理化意义明确的量子化学猫述符和线性溶剂化自由能参数,运用定量结构-活性相关方法解析了化合物毒性与其结构间的关系.结果表明,该组化合物对发光菌的毒性与其分子体积(或面积)间呈显著正相关关系,经检验,预测方程稳健、可靠,可用于预测与其结构相似化合物的毒性.本文选择了 27 种化合物,根据方程预测它们对发光菌的毒性,结果理想.

关键词:取代苯化合物;发光菌;急性毒性;定量结构;活性相关关系;Microtox 中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2002)增刊-05-0001

Determination and Prediction of Acute Toxicity of Substituted Benzenes to

Photobacterium phosphoreum

Wei Dongbin¹, Zhai Lihua², Dong Chunhong¹, Hu Hongying¹(1. ESPC key joint laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. School of Environment and Water Conservancy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002)

Abstract : The acute toxicities of 17 substituted benzenes to *Photobacterium phosphoreum* were measured, and the effects of substituted groups and positions on toxicities were discussed roughly. The molecular structural descriptors, such as quantum chemical parameters and linear solvation energy parameters, were calculated, and relationships between toxicities of tested compounds and their molecular structural descriptors were developed by using quantitative structure-activity relationship (QSAR) technique. The results indicated that there was a significant positive proportion between toxicity and intrinsic volume or area of compound molecules, and the equations were robust enough through Jacknife test. The obtained equation was satisfying to predict 27 compounds with similar structure as selected ones.

Keywords :substituted benzenes compounds; Photobacterium phosphoreum; acute toxicity; QSAR; Microtox

环境中有毒污染物的种类和数量日益增 多,给生态环境造成巨大威胁,如何评价这些污 染物对环境的毒性影响越来越为人们所关注. 在众多有机物中,芳香族化合物及其衍生物占 有重要地位^[1],它们是很多石化和化工工业的 原料和产品,种类繁多,且毒性较大,若对它们 一一评价,显然是不可能的.定量结构-活性相 关(QSARs)研究为此问题的解决开辟了新思 路^[2].从化合物的结构出发,研究分子结构与其 性质或活性之间的定量关系,据此,可以根据化 合物的结构,或借助已知特性预测其它性质或 活性^[3,4].在分子结构的描述方面,量子化学描 述符和线性溶剂化能参数因其显著的优越性而 被广泛应用^[5,6].但随方程中描述符个数的增

7

加,参数间自相关现象突出,会使方程不再稳健^[7].

发光细菌系低等微生物,位于食物链低营养级,因其独特的生理特性与现代光电检测技术的完美结合而备受关注,用它作为毒性评价指示生物,具有方便、灵敏、经济,与其它毒性数据有较好相关性等诸多优点^[8,9].

本文测定 17 个取代苯系列化合物对发光 菌急性毒性,定性、定量解析数据,筛选出具有 明确理化意义的结构描述符,构建稳健的毒性

基金项目:国家重点基础研究专项 G1999045711;留学回国人员科研启动项目;中国博士后基金项目

作者简介:魏东斌(1972~),男,博士,主要从事污染生态化学 方面的研究. 联系人:胡洪营

模型,推测可能的致毒机理,并选择结构相似的 化合物对所得模型的预测能力进行验证.

1 材料与方法

1.1 材料

分析纯,用3%氯化钠溶液配成储备液.明亮发 L⁻¹),用-1gEC₅₀表示,数据列于表1. 光杆菌冻干粉(T₃变种)购自中国科学院南京 1.3 结构描述符的计算

土壤所.

1.2 菌种的培养和毒性测试

菌种的复苏、培养以及毒性测定均参照标 准方法操作^[10].求出发光菌招对发光率为 50 % 本研究所测 17 个取代苯系列化合物均为 时所对应的化合物浓度,即 EC₅₀值(单位 mol ·

	Table 1 The holecular structural descriptors, observed - $1gEC_{50}$ values and predicted results								
	化合物 -	- $lgEC_{50}/mol L$ - 1		(d) [- 1gEC ₅₀ / mol L			
编号		实验值	预测值	编亏	化合物	实验值	预测		
1	Benzene ¹⁾	2.05	2.35	23	3-chlorophenol	3.96	3. :		
2	Toluene ¹⁾	3.20	3.03	24	4-chlorophenol	4.48	3. :		
3	o-xylene ¹⁾	3.45	3.39	25	2,3-dichlorophenol	4.52	4.		
4	m-xylene ¹⁾	3.44	3.51	26	2,4-dichlorophenol	4.47	4.3		
5	p-xylene ¹⁾	3.53	3.54	27	2,5-dichlorophenol	4.24	4.3		
6	4-chlorotoluene	3.88	3.81	28	2,6-dichlorophenol	4.09	4.3		
7	Chlorobenzene ¹⁾	3.30	3.21	29	Nitrobenzene ¹⁾	3.30	3.4		
8	o-dichlorobenzene ¹⁾	3.78	3.91	30	o-dinitrobenzene ²⁾	6.03	4.2		
9	m-dichlorobenzene ¹⁾	3.74	4.04	31	m-dinitrobenzene ²⁾	4.93	4. 5		
10	p-dichlorobenzene ¹⁾	4.15	4.07	32	p-dinitrobenzene ²⁾	5.84	4. 5		
11	1,2,3-trichlorobenzene	4.54	4.60	33	2-nitroaniline	3.71	3.9		
12	1,2,4-trichlorobenzene ¹⁾	4.91	4.75	34	3-nitroaniline	3.77	3.9		
13	Aniline ¹⁾	3.12	2.96	35	4-nitroaniline	3.70	3.9		
14	o-diaminobenzene ¹⁾	3.45	3.40	36	2-nitrophenol	3.53	3.7		
15	m-diaminobenzene ¹⁾	3.93	3.42	37	3-nitrophenol	3.34	3.8		
16	p-diaminobenzene ¹⁾	3.47	3.62	38	4-nitrophenol	4.05	3.8		
17	2-chloroaniline	3.91	3.70	39	2-nitro-chlorobenzene	3.97	4.1		
18	3-chloroaniline	3.96	3.77	40	3-nitro-chlorobenzene	4.05	4.2		
19	4-chloroaniline	3.57	3.81	41	4-nitro-chlorobenzene	3.94	4.2		
20	Phenol ¹⁾	2.96	2.75	42	2-nitrotoluene	3.91	3.9		
21	m-dihydroxy-benzene ¹⁾	3.00	3.07	43	3-nitrotoluene	3.74	4. (
22	2-chlorophenol	4.14	3.54	44	4-nitrotoluene	3.90	4. (

表1 化合物的毒性数据、结构描述符以及预测结果

1) 训练集中包括的化合物

2) 未包括在预测集中的化合物,其它未标记化合物均属于预测集,毒性数据取自文献[3,16]

量子化学描述符用 MOPAC97^[11]软件的 AM1 算法^[12] 计算,线性溶剂化能参数根据 Hickey 等人的方法估算^[13].

所有统计分析均在 SPSS 软件上实现 (Ver. 10.0),方程中参数间的共线性用变异膨 胀因子(VIF)评价^[4].

2 结果与讨论

2.1 实验结果的定性描述

本研究所选择的 17 个受试化合物,主要是 含1个和2个取代基的苯衍生物.就单取代的 化合物而言,包括苯胺、苯酚、甲苯、氯苯、硝基 苯等,其毒性大小顺序为:硝基苯 氯苯 > 甲苯 >苯胺>苯酚>苯,可以推测,这些相应取代基 的毒性贡献顺序为: --NO₂ > --Cl > --CH₃ > --NH₂ > --OH > --H,值得 -- 提的是,这 -- 顺序 不仅与其本征体积大小顺序基本--致[13].还与 取代基吸电子效应的强弱顺序一致^[14].因此, 可以初步推测该类化合物对发光菌的毒性可能 与其立体效应和静电效应有较大关系. 二取代 的受试化合物中,每个化合物中的2个取代基 是相同的,只是取代位置不同,其毒性都比相应 单取代化合物的毒性大.比较相同取代位置、不 同取代基化合物间的毒性,有以下规律:对二氯 苯 > 对二甲苯 > 对苯二胺,邻二取代和间二取 代的化合物也有同样的顺序,即— $Cl > -CH_3 >$ --NH2;比较相同取代基、不同取代位置化合物 间的毒性有以下规律:对二氯苯 > 邻二氯苯 > 间二氯苯,二甲苯和苯二胺也有同样的顺序.比 较结果也基本符合上述规律,即对二取代>邻 二取代 > 间二取代.

从化合物的结构考虑,它们都含有相同的 母体苯环,只是苯环上取代基类型和位置不同, 可见,取代基的不同特性是造成化合物毒性差 异的根本原因.为进一步从理论上探讨该组化 合物对发光菌的毒性机制、定量研究化合物的 结构与毒性间的关系,将理化意义明确的量子 化学参数和线性溶剂化能参数联合,进行建模 研究,以期获得较好的预测模型.

2.2 模型的建立及评价

一般认为,化学品进入生物体后,如不考虑 代谢作用,其生物效应是疏水性、静电效应和立 体效应的线性函数^[15].在众多结构描述符中, 量子化学参数容易获得、理化意义明确,有利于 揭示化学品的致毒机理.为了避免参数间可能 存在共线性现象,本文首先用偏相关分析法考 查被选参数,筛选共线性低、独立性高的参数, 用多元逐步回归分析法构建 lgEC₅₀的预测方程 (1):

 $- \lg EC_{50} = - 0.106 + 0.079 S_{VDW} + 0.219 E_{HOMO}$ (1)

N = 17, $R_{\rm adj}^2 = 0.919$,

S = 0.165, F = 92.33, p < 0.0001

式中, N 代表样本数, R_{adj}^2 是经过自由度校正的 复相关系数, S 是方程的标准偏差, F 是 F-检 验值, p 为显著性水平.

方程(1)具有高的相关系数 R_{adj}^2 ,能很好拟 合 17 个取代苯系列化合物的 lgEC₅₀值.但方程 中只包括静电效应和立体效应的描述符,说明 该类化合物对发光菌的致毒过程主要与这 2 个 效应有关. Hansch 等认为疏水性也是影响生物 效应的因素之一,但方程(1)并未反映出这一 点.故单独考查 lgEC₅₀和正辛醇/水分配系数 lg Kow间的相关性:

-
$$\lg EC_{50} = 3.024 + 0.189 \lg K_{OW}$$
 (2)
 $N = 17, R_{adi}^2 = 0.218,$

S = 0.532, F = 4.18, p = 0.059

结果表明 lgEC₅₀和 lg K_{OW}间相关性较弱, 即疏水效应对致毒过程的影响较小.这可能主 要是因为,发光菌系单细胞微生物,脂肪含量 低,化学品对它的毒性效应与化合物本身的疏 水性/亲脂性关系不大,而化合物的活性中心与 生物体内酶的相互作用显得更为重要.另外,也 有可能是由于这些化合物对发光菌的致毒机理 不同^[16].

从方程(1)中入选的参数看,分子的范德华 面积 S_{VDW} ,主要表征了分子的大小尺寸等特 性, S_{VDW} 的显著性 r检验值为 13.58.最高占据 分子轨道能 E_{HOMO} ,则主要反映化合物与生物 靶分子间作用过程中传递质子(或电子)的倾 向,其显著性 r检验值为 2.82.可以看出,化合 物的毒性主要与分子的大小尺寸成正比,即分 子的面积越大,其毒性也越大.这一结果与 Wilson等人的研究结果一致^[17],他们研究 40 多 个化合物的毒性发现,体积是最重要的毒性影 响因素.在 Sixt 等人的研究中,从 80 个发光菌 毒性数据中删除个别的几个,体积参数对毒性 的贡献则会明显上升,成为最重要的参数^[16]. 化合物分子的体积(或面积)越大,在溶剂水中 排开水形成与其匹配的窝穴需要更大的能量, 因此这些化合物更容易分配进入细胞内部.另 外,从受试化合物的取代基来看,吸电子取代基 的体积一般比供电子取代基的体积大,分子体 积也相对较大,因此,含吸电子取代基的化合 物、苯环上的电子云密度较低、而取代基上的电 子云密度较大,这有利于化合物与生物靶分子 间亲电反应的发生, 盆有供电子取代基的化合 物则正好相反.化合物的最高占据分子轨道能 EHOMO与毒性成正比, EHOMO 越高,最外层电子 的活性越高,越容易与生物靶分子发生电子传 递作用,使化合物的毒性增大,由此可以推测, 该组化合物对发光菌的急性毒性作用可能主要 是反应性毒性.

经检验,方程(1)的参数间无严重共线性, S_{VDW} 与 E_{HOMO} 间的自相关系数为 0.250,变异 膨胀因子 VIF 为 1.393,方程显著,毒性拟合结 果如图 1 所示.为检验方程(1)的稳健性,用修 正的 Jacknife 法^[4],表 2 列出了检验时 R_{adj}^2 和 *S* 的变化,可见,方程比较稳健.

Table 2	Summary of results of Jacknife tests						
删除个数	回归次数	平均 R ² #	平均 S				
(<10% of N)		1 · J · rauj					
1	17	0.919	0.165				
2	25	0.920	0.165				
平均值		0.919	0.165				

表 2 方程(1)的 Jacknife 检验结果

为了进一步确证该组化合物对发光菌的毒 性机制,将线性溶剂化能参数与量子化学参数 相结合,构建预测方程(3):

 $- lgEC_{50} = - 1.341 + 7.539 V_{I} - 1.757CCR$ (3)

N = 17, $R_{adj}^2 = 0.911$,

S = 0.174, *F* = 82.25, *p* < 0.0001 式中,*V*₁为分子的本征体积,表征分子的体积 大小,CCR为分子的芯-芯排斥能,主要表征化 合物与生物靶分子之间静电作用的强弱,参数 V₁和 CCR 的显著性 *t* 检验值分别为 11.58 和 - 5.06.方程(3)中入选参数与方程(1)的参数 所表达的信息基本一致,而且立体效应对毒性 的贡献远远大于静电效应的贡献.这一结果更 有力地揭示了毒性机制.



图1 受试化合物的拟合结果





图 2 41 个选择化合物的预测结果



为了验证方程(1)的预测能力,本文选择了 27 个与受试化合物结构相似的化合物,其发光 菌毒性数据引自文献[3,16],用方程(1)预测它 们的毒性.由于 3 个二硝基苯的毒性明显高于 其它化合物,在预测中偏差较大,这主要是硝基 苯类化合物的致毒机理不同所致.其它化合物 的预测值与实验值也列于表 1,拟合曲线如图 2 所示.可以看出,除 4-氯苯酚的预测值在 95 % 置信限以外,其它化合物的预测残差都相对较 小,说明方程(1)具有较高的预测能力.在 Sixt 等人的研究中^[16],将 4-氯苯酚对发光菌的毒性 归结为弱酸性解偶联作用.

3 结论

(1)该组化合物的取代基对发光菌的毒性
 有重要影响,取代基对毒性贡献大小顺序为:
 —NO₂ > —Cl > —CH₃ > —NH₂ > —OH.

(2) 通过逐步多元回归分析发现,该组化合物分子的体积与毒性呈显著的正相关关系.

(3)所得方程稳健,意义明确,用于预测其 它结构相似化合物的毒性,结果满意。

参考文献:

- 1 王华东.水环境污染概论,北京:北京师范大学出版社, 1984. 337~370.
- 2 Blum DJ, Speece RE. Determining chemical toxicity to aquatic species. Environ. Sci. Technol., 1990, 24(3): 284 ~ 293.
- 3 王连生,韩朔睽.有机污染化学进展.北京:化学工业出版 社,1998.329~335.
- 4 Wei DB, Zhang AQ, Han SK, Wang LS. Progressive study and robustness test of QSAR model based on quantum chemical parameters for predicting BCF of selected polychlorinated organic compounds. Chemosphere, 2001, 44(6): 1421 ~ 1428.
- 5 Lu GH, Yuan X, Zhao YH. QSAR study on the toxicity of substituted benzenes to the algae. Chemosphere, 2001, 44 (2): 437 ~ 440.
- 6 Yang H, Yu HX, Huang QG, Wang LS. Quantitative structure toxicity relationships for fluorine-contained aromatics to *Photobacterium phosphoreum*. Chemosphere, 1997,

35(11): 2657 ~ 2663.

- 7 Wei DB, Zhang AQ, Wei ZB, Han SK, Wang LS. A case study of logistic QSAR modeling methods and robustness. Ecotoxicol. Environ. Safe, 2002, 52 (2): 143 ~ 149.
- 8 Dezwart D, Slooff W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. Aquat. Toxicol., 1983,4(2):129~183.
- 9 顾宗濂.发光细菌法检测水土环境毒性的进展和评价.环 境科学与技术,1987,2:2~6.
- 10 南京大学环科系环境生物教研室.环境生物实验技术与 方法.南京:南京大学出版社,1989.145~151.
- 11 Cambridgesoft Co., CS MOPAC 97, 1997.
- Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP. The development and use of quantum mechanical molecular models.
 AM1. A new general purpose quantum mechanical molecular model. J. Am. Chem. Soc., 1985, 107:3902 ~ 3909.
- 13 Hickey JP, Passino-Reader DR. Linear solvation energy relationships: "Rules of Thumb "for estimation of variable values. Environ. Sci. Technol., 1991, 25 (10): 1753 ~ 1760.
- 14 梁世懿,成本诚.高等有机化学.北京:高等教育出版社, 1993.29~40.
- 15 Hansch C, Leo A. Exploring QSAR: Fundamentals and applications in chemistry and biology. American Chemical Society, Washington DC, 1995.
- 16 Sixt S, Altschah J, Bruggemann J. Quantitative structure toxicity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors, Chemosphere. 1995, 30 (12): 2397 ~ 2414.
- 17 Wilson L Y, Famini GR. Using theoretical descriptors in quantitative structure- activity relationships some toxicological indexes. J. Med. Chem., 1991, 34(5): 1668 ~ 1674.