

# 4-羟基-2'-硝基二苯胺对水生生物急性毒性效应的研究

刘红玲, 孙媛媛, 于红霞, 王晓蓉

(南京大学环境学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘要:** 采用静态生物急性试验的方法, 研究了4-羟基-2'-硝基二苯胺对2个营养级别的水生生物(大型溞、斑马鱼和红鲫鱼)的急性毒性效应。结果表明, 大型溞的幼溞接触不同浓度的毒性, 活动会受到抑制, 甚至死亡, 48 h的 $EC_{50}$ 为 $1.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 对斑马鱼和红鲫鱼也有明显的毒性作用, 其96 h的 $LC_{50}$ 分别为 $4.04$ 和 $5.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在2个营养级别的受试生物中, 大型溞对该毒物的敏感性比斑马鱼和红鲫鱼强。根据化学物质对鱼类和溞类的毒性评价标准, 4-羟基-2'-硝基二苯胺属于中等毒性的化合物。

**关键词:** 4-羟基-2'-硝基二苯胺; 水生生物; 急性毒性

**中图分类号:** S481.9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2043(2004)03-0467-04

## Acute Toxicity Effect of 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine on Aquatic Organisms

LIU Hong-ling, SUN Yuan-yuan, YU Hong-xia, WANG Xiao-rong

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** The acute toxicity of 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine to *Daphnia magna*, Zebra fish (*Brachydanio rerio*) and gold fish (*Carassius Auratus*) were studied, and safety assessment was also made in the aquatic ecosystem. 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine remarkably restrained the mobilization of *Daphnia magna*, even causing them death, and  $EC_{50}$  value for *D. magna* at 48 h was  $1.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The chemical also had the toxicity effect on Zebra fish and gold fish, and  $LC_{50}$  values for them at 96 h were  $4.04$  and  $5.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Based on these  $E(L)C_{50}$  values, 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine belonged to moderately toxic chemicals to aquatic organisms. Compared with Zebra fish and gold fish, *Daphnia magna* showed more sensitive to 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine.

**Keywords:** 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine; aquatic organisms; acute toxicity

苯胺类化合物是偶氮类染料、除草剂、杀虫剂、药物等合成的中间体, 在农业生产中, 又是除草剂、杀虫剂的降解产物, 作为中间体在化学工业、医药制备、农药生产以及纺织、印染等行业中用途很广。随着工业的不断发展, 对其需求量也日益增加。这些化合物多属有害物质, 随工业废水、农业径流水、生活污水流入水体, 对水生生物的生长、发育和繁殖构成威胁, 而且

对人体健康有潜在的危害。大型溞和鱼是水生生态系统的重要组成部分, 尤其鱼类还是人类食物的主要来源之一。因此, 为了评价该类化合物对水生生态系统的影响, 研究该类化合物对大型溞和鱼等水生生物的毒性具有重要的现实意义<sup>[1-3]</sup>。

本研究的化合物为4-羟基-2'-硝基二苯胺, 它是染发剂的一种成分<sup>[4]</sup>, 生产过程中出现的泄漏或废水排放, 以及日常使用过程中产生的生活污水, 常常会进入地表水。这种化合物对哺乳类动物大鼠的急性毒性很弱<sup>[4]</sup>, 但当它存在于水体中被水生生物富集后是否产生毒性效应, 至今尚未见报道。因此, 本研究将大型溞、斑马鱼和红鲫鱼暴露于4-羟基-2'-硝

收稿日期: 2003-10-03

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(20370010)

作者简介: 刘红玲(1976—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 助理工程师, 研究方向为有机污染物的水生生物毒性效应研究。

E-mail: lhl1268@sina.com.cn

联系人: 于红霞, E-mail: hongxiayu01@hotmail.com

基二苯胺水溶液中,目的是观察该物质对水生生物的急性毒性效应,同时对其环境安全性进行初步评估。

本研究的结果在一定程度上可以弥补该化合物水生生物毒性数据的不足,为将来对这类物质制定完善的环境影响评价标准并对其进行风险管理提供毒理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 化合物

选用的是4-羟基-2'-硝基二苯胺,橙红色晶体,分子式为 $C_{12}H_{10}N_2O_3$ ,分子量为230,分析纯。商品名为:HC Orange No. 1(CAS No. 54381-08-07)。其结构组成见图1。

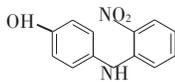


图1 结构式

Figure 1 Chemical formula for HC Orange No. 1

### 1.2 化合物的稳定性

为了研究该化合物在整个试验过程中的稳定性,将一定浓度的水溶液放在玻璃缸中封好口,缓慢曝气,每隔12 h取10 mL水样,将一周之内取来的14个水样进行液相色谱检测。仪器型号:HP1100;分析条件:C18色谱柱,流动相为甲醇:水=70:30,流速是 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,检测器是DAD,检测波长为234 nm。

### 1.3 试验生物

#### 1.3.1 大型溞(*Daphnia magna*)

大型溞为实验室连续培养3代以上的单克隆品系,在曝气24 h以上的自来水中培养,温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C} \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,做试验的前1 d挑粗怀卵的大型溞放入已配好的稀释水中。待母溞产出足够的幼溞后,选取12 h之内游动活泼的幼溞以待试验之用<sup>[5-7]</sup>。

#### 1.3.2 斑马鱼(*Brachydanio rerio*)

斑马鱼平均体长 $(30 \pm 5) \text{ mm}$ ,体重 $(0.3 \pm 0.1) \text{ g}$ ,选自同一驯养池中规格大小一致的幼鱼。试验前该鱼群处于试验环境条件下,在连续曝气的水中驯养3

周。试验前24 h停止喂饲。驯养期间死亡率不超过10%,无明显的疾病和肉眼可见的畸形<sup>[7-9]</sup>。

#### 1.3.3 红鲫鱼(*Carassius Auratus*)

以幼龄红鲫鱼为试验用鱼,购自南京市乌龙潭花鸟市场,其平均体长为9 cm,体重为 $(34.7 \pm 1.9) \text{ g}$ 。试验前将红鲫鱼驯养1周,驯养期间其死亡率低于5%,鱼健康活泼,无外观畸形。试验前1 d不喂食,随机选取个体差异不大、健康活泼的红鲫鱼用于试验<sup>[10]</sup>。

### 1.4 试验方法

参照《国家环境保护局化学品测试准则》的方法进行试验<sup>[11-13]</sup>。大型溞试验时用曝气除氯自来水将储备液稀释成试验所需浓度,斑马鱼试验时用稀释水(表1)将储备液稀释成试验所需浓度,红鲫鱼试验时用曝气除氯自来水将储备液稀释成试验所需浓度。各试验水溶液中的甲醇浓度不超过0.3%。

表1 1 000 mL 稀释水中各组分的含量和硬度

Table 1 Contents and rigidities of the components in 1 000 mL dilution water

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KCl	$\text{NaHCO}_3$	pH	硬度
123.25 g	294 g	5.75 g	64.75 g	7.8	250 dH

根据预备试验结果设置9个浓度梯度(表2)。整个试验都设一个对照组(空白对照)。大型溞每个浓度设4个平行试验,每个小烧杯中20 mL溶液,移入5只幼溞。斑马鱼设9个浓度组,3个平行试验,在1 L的烧杯中每一浓度放5尾鱼。红鲫鱼按确定9个试验浓度梯度,在玻璃缸中加入30 L配好的试验溶液,每缸8条鱼,3个平行试验。

#### 1.4.1 大型溞急性抑制试验

大型溞急性毒性试验参照文献[14]的方法进行。试验终点以大型溞48 h和72 h半数活动抑制浓度( $\text{EC}_{50}$ )表示。试验对照的不活动大型溞数应少于10%,不得有死亡。最后根据美国环境保护局TSK(Trimmed Spearman-Kärber Method)程序(版本1.5)计算48 h和72 h的 $\text{EC}_{50}$ 。

#### 1.4.2 鱼类急性毒性试验

鱼类急性毒性试验参照文献[15]的方法进行。每天至少测定一次各试验液的溶解氧、pH和温度。如

表2 急性毒性试验浓度选择

Table 2 Concentrations of the chemical for acute toxicity test

名称	浓度梯度选择/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$									对照	观察时间/h
大型溞	0.6	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0	0.0	72
斑马鱼	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	5.4	6.0	7.0	8.0	0.0	96
红鲫鱼	1.0	4.0	5.0	6.0	6.4	7.0	8.0	10.0	15.0	0.0	96

果需要,进行曝气以保证溶解氧的浓度大于  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为防止饵料影响,试验期间不喂食。斑马鱼试验时,溶液在  $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温,  $\text{pH} 6.8 \sim 7.2$ , 光暗比 14 h: 10 h。红鲫鱼试验温度  $18.8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.3 \sim 7.4$ , 光暗比 12 h: 12 h, 每 24 h 更换一半试验溶液,对试验溶液实行微量曝气。观察 24, 48, 72, 96 h 死亡数。以浓度的常用对数为横坐标,死亡率的概率单位为纵坐标,求出 48, 72 和 96 h 半致死浓度 ( $\text{LC}_{50}$ )<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物稳定性试验

《国家环境保护局化学品测试准则》<sup>[11]</sup> 规定了水生生物急性毒性试验的质量控制要求:对于鱼类和溞类急性毒性试验,要求对照组死亡率  $\leq 10\%$ , 水中溶解氧含量  $\text{DO} \geq 60\%$  饱和值, 试验最少设置 5 个浓度组,同时,还要求受试毒物在试验结束时的损失不超过 20%。因此我们以零时刻的水样实际测试结果作为初始浓度,算出其挥发百分率和时间的关系(图 2)。测定结果表明,一周内的受试毒物损失没有超过 20%,说明该化合物稳定性较好。

### 2.2 急性毒性效应研究

表 3 4-羟基-2'-硝基二苯胺的大型溞、斑马鱼和红鲫鱼的急性毒性值

Table 3 Acute toxicity values of 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine to the three kinds of aquatic organisms

染毒时间 /h	大型溞 $\text{EC}_{50}$ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	置信区间 95% / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	斑马鱼 $\text{LC}_{50}$ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	置信区间 95% / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	红鲫鱼 $\text{LC}_{50}$ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	置信区间 95% / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
48	1.54	1.27 ~ 1.86	5.39	5.18 ~ 5.61	7.52	7.35 ~ 7.69
72	1.55	1.33 ~ 1.80	4.51	4.03 ~ 5.05	6.08	5.06 ~ 6.55
96	—	—	4.04	3.61 ~ 4.52	5.37	4.92 ~ 5.87

型溞对 4-羟基-2'-硝基二苯胺最敏感,斑马鱼次之,红鲫鱼的敏感性最差。因此,为了控制该类化合物生产废水的排放,保护水生生态系统,宜采用敏感的大型溞对废水的排放进行生物监控。

### 2.3 安全性评价

有关化学品对生物毒性的安全性评价,国内尚未有统一的标准。本文在关于 3 种水生生物的水环境安全性评价研究中,采用了国家环境保护局的新化学物质危害评估准则中的危害分级标准<sup>[13]</sup>和中国科学院水生生物研究所的毒性等级标准<sup>[14]</sup>(表 4),确定了污染物对 3 种水生生物的危害等级(表 5)。

尽管有研究表明它对哺乳类动物的危害很小,但是通过 4-羟基-2'-硝基二苯胺对大型溞、斑马鱼和红鲫鱼这 3 种水生生物的急性毒性试验,表明 4-羟基-2'-硝基二苯胺还是属于中等毒性的物质,对

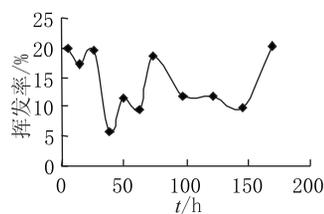


图 2 4-羟基-2'-硝基二苯胺挥发百分率-时间的关系  
Figure 2 Relationship between evaporation percentage and time of 4-Hydroxy-2'-Nitrodiphenylamine

在自然生态环境中,溞和鱼构成了一条重要的水生食物链。有毒化学品使用后部分进入水体中,势必对溞和鱼这 2 种水生生物造成危害。表 3 列出了上面研究 4-羟基-2'-硝基二苯胺对大型溞、斑马鱼和红鲫鱼的急性毒性值。

从表 3 可以看出,无论是大型溞、斑马鱼和红鲫鱼,随着暴露时间的延长,化合物的毒性越来越明显,这表明化合物对生物体的毒性大小受污染物在体内积累量的影响,也有可能是在生物体内 4-羟基-2'-硝基二苯胺代谢成活性更强的毒物。当然,这种推测还有待于今后的代谢机理的研究来证实。

另外,从这些水生生物的急性毒性数据来看,大

表 4 化学物质对鱼类和溞类的毒性等级评价标准

Table 4 Evaluating and grading Criteria for chemicals toxicity to Daphnia magna and fish

毒性等级	鱼类 $\text{LC}_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	溞类 $\text{EC}_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
极毒	—	<0.1
高毒	<1.0	0.1 ~ 1.0
中毒	1.0 ~ 10.0	1.0 ~ 10.0
低毒	> 10.0	10.0 ~ 100.0
微毒	—	> 100.0

水生生物有一定的危害性,应该加强对其监管和评价。这项研究填补了 4-羟基-2'-硝基二苯胺的水生生物毒性资料的短缺,为制定安全的环境影响评价浓度并对其进行适当的风险评价和管理提供科学依据。

## 3 结论

(1) 4-羟基-2'-硝基二苯胺是稳定性较好的

表5 受试化合物对3种水生生物的安全性评价

Table 5 Safety evaluations for the tested chemical to the three kinds of aquatic organisms

水生生物	大型溞	斑马鱼	红鲫鱼
最敏感终点 E(L)C <sub>50</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	1.54	4.04	5.37
危害水平	中	中	中

化合物,对水生生物属于中等毒性的物质。

(2) 在2个营养级别的受试生物中,大型溞对该毒物具有较好的敏感性,斑马鱼次之,红鲫鱼的敏感性最差。

(3) 大型溞和鱼的急性毒性可以用作评价化学品或水体环境安全性的一个快速有效的初级筛选手段,但如要对化学品或环境水体进行全面的安全性评价,还必须考虑慢性毒性、其他生物毒性指标,以及化合物降解与富集指标的数据。

#### 参考文献:

- [1] Sun XB, Wu GJ, Chen JP, 等. Toxic effect of detergents on *Daphnia magna*[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), 2000, 24(3): 296 - 297.
- [2] Wu GJ, Sun XB, Chen JP. Toxic effect of detergents on fish[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), 2000, 24(4): 396 - 397.
- [3] 武海明, 李斌, 吴琼, 等. 二硝基甲苯的毒性研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 2000, 14(3): 178 - 179.
- [4] Monice Zondlo Fiume. Final Report on The Safety Assessment of HC

- ORANGE NO. 1[J]. *International Journal of Toxicology*, 1998, 17 (Suppl. 4): 21 - 37.
- [5] Joseph E, et al. Acute and Chronic Toxicity of Some Chlorinated Benzenes and Tetrachloroethylene to *Daphnia magna*. *Arch Environ. Contam[J]. Toxicology*, 1983, 12(6): 679 - 684.
- [6] Stephenson R R, et al. Chronic Toxicity Tests with *Daphnia magna*[J]. *Environ Poll*, 1984, 36: 95 - 107.
- [7] PHA/AWWA/WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15<sup>th</sup> Edition, New York, 1980.
- [8] 吕会成. 鱼类实验动物的开发与研究概况[J]. *上海实验动物科学*, 1992, 12: 75 - 76.
- [9] 吴端生, 王宗保. 鱼类实验动物开发与应用研究的现状及展望[J]. *中国实验动物学杂志*, 2000, 10: 103 - 109.
- [10] 吴端生, 郑家铨, 刘冬娥, 等. 红鲫鱼实验动物生物学特性的研究[J]. *中国实验动物学杂志*, 1997, 7: 79 - 81.
- [11] 国家环境保护局. 化学品测试准则[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990.
- [12] OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals OECD, 1993.
- [13] 国家环境保护局. 化学农药环境安全评价试验准则[M]. 北京: 国家环境保护局, 1989. 1 - 25.
- [14] GB/T13266—91, 水质—物质对溞类(大型溞)急性毒性测定方法[S].
- [15] GB/T13266—91, 水质—物质对淡水鱼急性毒性测定方法[S].
- [16] 张毓琪, 陈叙龙. 境生物毒理学[M]. 西安: 陕西旅游出版社, 1993.
- [17] 庄德辉, 李值生. 浮选药剂对溞类的毒性研究[J]. *水生生物学报*, 1989, 13(3): 240 - 249.