

三丁基锡在水-脂质体间的分配行为

戴树桂, 王玉秋, 孙红文, 李书霞, 曹仲宏(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071, E-mail: sgdai@public.tpt.tj.cn)

摘要:测定了不同酸度条件下三丁基锡(TBT)的正辛醇-水分配系数,并用卵磷脂自行制备脂质体代替正辛醇研究了TBT在人工合成生物膜-水间的分配行为.结果表明TBT在正辛醇和脂膜中的分配均随pH的增大而增大.但将二者进行比较,发现在 $pH > pK_a$ 时,TBT在二者中的分配比很接近,此时是疏水性TBT_{OH}占优势;但在低pH下,TBT⁺是主要存在形态,其在脂膜中的分配量要大于在正辛醇中的分配量,说明此时用正辛醇来模拟三丁基锡在生物膜中的分配是不合适的.对离子型有机金属化合物来说,用人工合成生物膜代替有机相来描述有机污染物进入生物膜的趋势和途径更为合理有效.

关键词:三丁基锡;正辛醇-水分配系数;脂质体;pH

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2002)04-05-0097

Distribution of Tributyltin Between Water and Liposome

Dai Shugui, Wang Yuqiu, Sun Hongwen, Li Shuxia, Cao Zhonghong(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China E-mail:sgdai@public.tpt.tj.cn)

Abstract:Distribution of the tributyltin (TBT) between egg-phosphatidylcholine membranes (liposome) and water under different pH and a comparison between the partition of TBT into lipid membranes and into octanol were studied. The distribution of this compound into both lipid membranes and octanol increased with pH. The major difference was that at lower pH, where ionized TBT dominated distribution was greater into lipid membranes compared to that of octanol. At high pH, where TBT predominates as neutral species, the distribution ratios were very similar in the octanol and the liposome-water system. These differences can be attributed to the properties of the bi membrane. The results indicated that the liposome-water partition model appears to be a better molecular descriptor for ionogenic organic compounds.

Key words:tributyltin; octanol-water; partition coefficient; liposome; pH

利用脂质体作为生物膜的简单模型用于生命科学及药物科学方面研究已被广泛采用^[1,2],用于环境科学研究在近几年才有报道^[3].传统上利用污染物的正辛醇-水分配系数来评价其进入生物体的趋势,但这对于离子型有机污染物及金属有机化合物并不十分合适.因为生物体膜不同于正辛醇,它既含有亲水层又包含亲脂层,同时还存在阴阳离子端,所以利用人工合成的生物膜研究离子型有机污染物进入生物体的趋势和机理比 K_{ow} 更具客观性.对这一技术应用的典型例子是瑞士的Beate等人利用人工合成脂膜研究了取代酚类化合物在水-生物间的分配行为^[3].结果表明,利用人工合成的脂膜来描述有机污染物进入生物膜的趋势和途径更为合理有效.

有机锡是一类有机金属化合物,海洋环境中的有机锡化合物主要来源于作为船舶防油污漆活性添加剂的三丁基锡(TBT)和三苯基锡(TPT),这2种物质对真菌、藻类和软体动物具有特殊的毒性作用^[4,5].利用人工生物膜技术评价有机锡进入生物体的情况还未见报道,本文测定了不同酸度条件下TBT在脂膜-水相间的分配行为,并与所测得的 K_{ow} 值进行比较,取得了很有意义的实验结果.

1 材料与方法

1.1 实验材料

三丁基氯化锡(TBTCl)为Aldrich Company

提供.用无水乙醇溶解定容,配制 Sn 1000 mg/L 的标准储备液,另外还用为水饱和的正辛醇配制含 Sn 分别为 1000 mg/L 和 100 mg/L 的 TBTCI 标准溶液,置冰箱中于 4℃ 以下保存备用.

蛋黄卵磷脂(BR):上海奥博星生物技术有限责任公司.

生物膜支持液组成:氯化钾(0.03 mol/L)、磷酸二氢钾(0.002 mol/L)、硼酸(0.0005 mol/L)和柠檬酸钾(0.002 mol/L).

自制 1.0 mol/L 的戊基溴化镁格氏试剂.

1.2 仪器设备

GC-FPD 分析系统:M600D 韩国 Yong Lin Comp.

操作条件:色谱柱为毛细管柱 HP-5,采用程序升温,无分流进样.载气为高纯氮(纯度 99.999%),载气流量为 20 mL/min,进样口温度为 250℃.FPD 检测器温度为 225℃,干涉滤光片中心波长为 611 nm,燃气为氢气(流量 120 mL/min)和空气(流量 100 mL/min),衰减为 3.

1.3 标准工作曲线的绘制

取 7 个 125 mL 的分液漏斗,各加入 100 mL 蒸馏水和 10 g 优级纯氯化钠,溶解.分别加入 10 mg/L 的标准溶液 0.00、0.05、0.10、0.30、0.50、0.80、1.00 mL,摇匀.再各加入 1.5 mL 48% 的氢溴酸,调 pH=1.然后各加入 0.1% 萘酚酞-苯溶液 5 mL,振荡萃取.分出有机相置于 25 mL 比色管中,各加入 1.5 mL 1 mol/L 的戊基溴化镁格氏试剂进行烷基化衍生,放置过夜使其反应完全.用 0.5 mol/L 的硫酸破坏过量的格氏试剂,放置分层后取出有机相,室温下通 N₂ 浓缩到 1 mL,用 GC-FPD 取 1.0 μL 进样分析测定.

1.4 不同 pH 条件下 TBT 正辛醇-水分配系数的测定

有机化合物的正辛醇-水分配系数定义为在平衡状态下,该化合物在正辛醇和水相中浓度的比值.测定方法有摇瓶法、产生柱法和 HPLC 法,本实验采用第 1 种方法.

溶剂的预饱和:室温下,取 200 mL 重蒸正

辛醇和 200 mL 蒸馏水于锥形瓶中,置于振荡器中振荡 24 h,使其相互饱和,静置分层后,两相分离保存备用.量取 TBTCI 标样溶于一定体积为水饱和的正辛醇中,定容、摇匀,配置 1000 mg/L 和 100 mg/L 的 TBT 标准溶液.

不同 pH 值下 TBT 分配系数的测定:用稀盐酸和氢氧化钠将正辛醇饱和过的水调 pH 值分别为 3.11、4.09、5.07、6.14、6.77、7.46、8.05,取正辛醇标液 2 mL 分别置于 2 浓度组(每组 7 个上述 pH)100 mL 锥形瓶中,加入不同 pH 值的水相各 25 mL,每组的每个 pH 值做 2 个平行样.置于振荡器中振荡,恒温在 25℃,振荡 4h(事先测定的平衡时间),静置 4h 后,用滴管小心吸去有机相,用移液管移取 10 mL 水相用 0.1% 萘酚酞-苯萃取,以后步骤与标准工作曲线操作相同.

计算方法:正辛醇-水分配系数是在平衡态下化合物在正辛醇与水相中的浓度比.

$$\text{即: } K_{ow} = c/c_w \quad (1)$$

$$\text{或: } K_{ow} = \frac{c_0 V_0 - c_w V_w}{c_w V_0} \quad (2)$$

式中, K_{ow} 为分配系数,常以 $\lg K_{ow}$ 来表示; c 为达到平衡时有机化合物在正辛醇相中的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); c_w 为达到平衡时有机化合物在水相中的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); c_0 为有机化合物在正辛醇相中的初始浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); V_0 为正辛醇相的体积 (mL); V_w : 水相的体积 (mL).

1.5 不同 pH 条件下 TBT 在水-人工合成生物膜间的分配行为

脂质体(liposome)制备一般采用超声波振荡法、乙醚蒸发法、去污剂透析法、冰冻干燥法和冻融法等.本实验采用冻融法制备单层大脂质体,具体方法参见文献[7]:称取 10 mg 左右的蛋黄卵磷脂于 50 mL 的磨口具塞圆底烧瓶中,加入 2 mL 氯仿,在旋转蒸发器上抽真空旋转蒸发 20 min,将氯仿蒸干,则卵磷脂在烧瓶壁上形成薄薄的脂质层,然后加入不同 pH 值的生物膜支持液 20 mL,充入部分氮气防止脂质被氧化,塞上塞子,将烧瓶置于摇床上振荡,直至所有的脂质从玻璃壁上进入到缓冲溶液中,此

时是振荡法获得的多层大脂质体. 然后加入 0.01 mL 1000 mg/L 的 TBTCI 标准溶液. 此样品在液氮中冷冻 1 min, 室温下融化, 重复 3 次, 以促进 TBT 和脂膜间的分配平衡. 水的冷冻将脂膜打破, 而在室温融化中得以重组形成单层大脂质体. 脂膜的性质在这一过程中未受到损伤.

脂质体是一个有形态特征的微型小体. 一般在 10×40 倍的显微镜下就能看到. 因此, 将制备好的脂质体滴到载玻片上, 在显微镜下观察, 能看到颗粒比较均匀的圆形或椭圆形的小

体, 即为脂质体, 实际上是充满缓冲液的脂泡. 本实验用磷钨酸负染色, 电子显微镜下观察了多层大脂质体、单层巨大脂质体. 加 TBT 的单层巨大脂质体等的图象(见图 1). 此后要将脂膜与水相分离, 测定水中剩余 TBT 的量, 用于计算 TBT 在两相中分配比. 本实验用孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 和 $0.2 \mu\text{m}$ 的滤膜顺序过滤来将脂膜从溶液中分离. 过滤后的水相用苯萃取, 其余步骤同前. 由于在实验过程中尤其是滤膜过滤时可能会有 TBT 的损失, 所以每个样品都同时做了

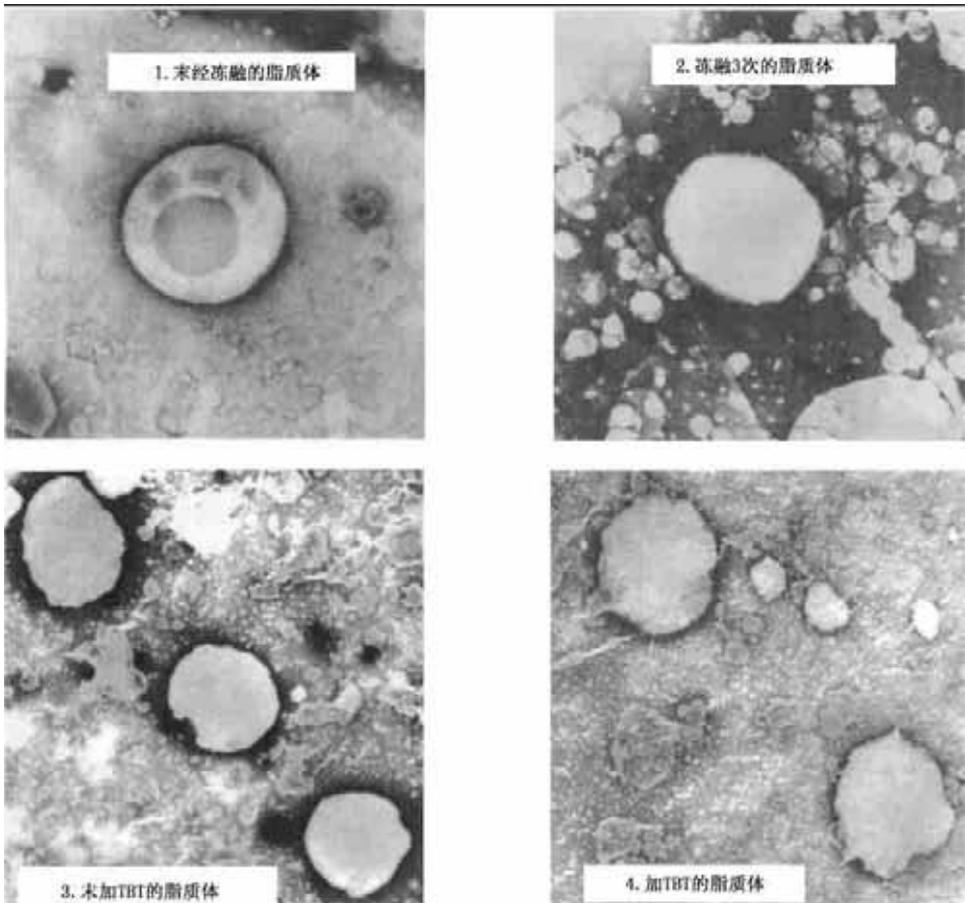


图 1 电镜照片

Fig.1 EM photograph

空白对照样.

计算方法: 与正辛醇-水分配系数算法相似, 用 D_{mw} 来表示 TBT 在脂膜-水间的分配比.

$$D_{mw} (\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}) = c_m / c_w = \frac{c_{\text{ref}} - c_w}{c_w [m]}$$

式中, c_m 为 TBT 在脂膜中的浓度 ($\mu\text{g/g}$); c_w :

测试样水相中 TBT 的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); c_{ref} 为对照样水相中 TBT 的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); $[m]$: 脂质的浓度(g/mL).

2 结果与讨论

2.1 丁基锡的标准工作曲线

3 种丁基锡的标准工作曲线如图 2 所示(3 次实验平均值), 结果表明用 GC-FPD 系统测定丁基锡有良好的分辨率和灵敏度及线性关系.

2.2 不同 pH 下 TBT 的正辛醇-水分配系数(K_{ow})

及脂膜-水分配系数(D_{mw})

结果见表 1 和图 3, 电镜照片见图 1.

表 1 不同 pH 下 TBT 的正辛醇-水分配系数 (3 次实验平均值)

Table 1 Partition ratios of TBT in octanol-water under different pH

| pH | 3.11 | 4.09 | 5.07 | 6.14 | 6.77 | 7.46 | 8.05 |
|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| K_{ow} | 852.4 | 1720.4 | 2159.2 | 3935.3 | 6526.6 | 7063.0 | 7661.0 |
| $\lg K_{ow}$ | 2.93 | 3.24 | 3.33 | 3.59 | 3.81 | 3.85 | 3.88 |

表 2 不同 pH 值下三丁基锡在脂膜-水间的分配系数 (3 次实验平均值)

Table 2 Distribution ratios of TBT in liposome-water with different pH

| pH | 2.19 | 3.27 | 4.52 | 6.01 | 6.97 | 7.20 | 8.19 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| D_{mw} | 3401.11 | 3846.62 | 4609.77 | 5298.85 | 6381.12 | 7105.88 | 7569.45 |
| $\lg D_{mw}$ | 3.53 | 3.59 | 3.66 | 3.72 | 3.80 | 3.85 | 3.88 |

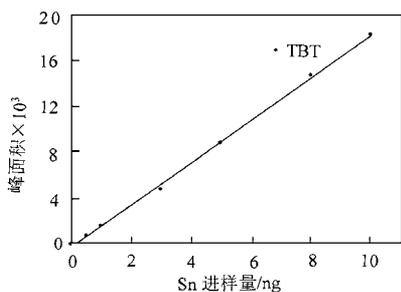


图 2 丁基锡的标准工作曲线

Fig. 2 Response plot of TBT content

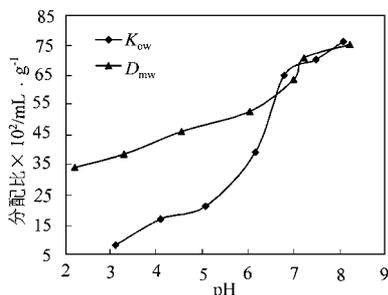


图 3 不同 pH 下 TBT 在脂膜-水间的分配与在正辛醇-水的分配比较

Fig. 3 Comparison between the partition of TBT into lipid membranes and into octanol-water under different pH

从上述结果可得出以下结论:

(1) 电镜照片 1 是未经过冻融处理过程的脂膜, 照片 2 为经冻融 3 次后的脂膜, 放大倍数

均为 14 500 倍. 可以看到前者是双层大脂质体, 后者为单层大脂质体, 说明冻融过程使得双层膜重组为单层膜. 二者的大小相似, 粒径约为 $1.38\mu\text{m}$, 脂膜基本上呈圆形, 边界分明. 本实验采用是第 2 种脂膜, 即经冷冻 3 次获得的单层大脂质体. 电镜照片 3 为未加 TBT 的脂膜, 照片 4 为加过 TBT 后的脂膜. 可以看到二者在大小和外形上没有什么差别, 说明在这种实验条件和浓度下 TBT 在膜上的分配没有使膜受到损伤.

(2) 从表 1、2 和图 3 可以看出三丁基锡在正辛醇-水和在脂膜-水间的分配受酸度的影响很大, 随 pH 的增大 TBT 在正辛醇和脂膜分配量都增大, K_{ow} 和 D_{mw} 随之增大, 二者的趋势是一致的. TBT 进入水环境后其水解反应与水中的 pH 值有很大的关系^[8]:



(水解常数 $\text{p}K_a = 6.51$)

$\text{pH} < \text{p}K_a = 6.51$ 时, TBT 的存在形态主要为 TBT^+ , 这些单价的有机金属离子亲水性较强, 因此在正辛醇和脂膜中的分配量就少, 相应的 K_{ow} 、 D_{mw} 就小; 当 $\text{pH} > \text{p}K_a = 6.51$ 时, TBT 在水中的存在形式主要为 TBT 和一小部分 TBTCl 中性分子, 这种水合物具有较强的亲脂

性,因而在有机相中的分配量大,相应的 K_{ow} 、 D_{mw} 值就大.这样的结果说明, pH 值是影响 TBT 疏水性的一个重要因素, pH 值的增大有利于 TBT 从水环境向有机体的迁移,从而使其对水生生物的毒性和生物可利用性随之增大.

(3)除去(2)中提到的 K_{ow} 和 D_{mw} 的相同之处外,可以从图 3 中看到二者还存在很大的不同,TBT 在脂膜-水间的分配随 pH 的增长曲线比在正辛醇-水间的分配曲线平缓得多.在 $pH > pK_a$ 时,中性形态物是主要存在形式,此时可以看到 D_{mw} 与 K_{ow} 值很接近,说明对于中性形态 TBT 来说, K_{ow} 可以用来有效地模拟其在生物膜中的分配行为;但是,随着 pH 值的减小,离子态的 TBT 在脂质体上的分配要远远大于在正辛醇上的分配, D_{mw} 和 K_{ow} 的差值越来越大,在 $pH=3.27$ 时 D_{mw} 比 $pH=3.11$ 时的 K_{ow} 大 3.5 倍.这些数据表明,在 $pH < pK_a$ 时,用正辛醇来模拟 TBT 在生物膜中的分配是不合适的.

总之,TBT 在脂膜-水间的分配与在正辛醇-水间分配的主要差异在于离子态有机锡在二者中的分配程度不同.离子态 TBT 在脂膜中较强的分配行为说明,除了因自由能的变化引起疏水性分配外,还有一种很重要的分配来自于与膜中的阴离子部分产生静电相互作用,从而使得带正电荷的 TBT 在膜中的分配量增大;另一种可能是离子和分子的大小也是影响化合物在膜中分配的因素,也许离子态 TBT 的大小适合于穿透生物膜,所以虽然它是亲水性的离子,但仍有相当一部分分配在了膜上.可见脂膜中既有亲水层又有疏水层及带电荷的阴阳离子,而且分配过程既有基于浓度梯度的扩散又有疏

水性及电性的结合,这些都是正辛醇无法模拟的.

3 结论

本文研究了不同酸度条件下 TBT 在正辛醇-水和人工合成生物膜-水间的分配行为,并将二者进行比较,结果表明, $pH > pK_a$ 时,疏水性 TBT-OH 在二者中的分配比很接近,但在低 pH 下,TBT⁺ 在脂膜中的分配量要大于在正辛醇中的分配量,说明 TBT 在膜中的分配不仅仅是疏水性分配过程,还受分配离子大小的影响,而且可能还存在电性结合作用,这些都远非正辛醇所能模拟.当然,化合物在生物膜中的分配是一个十分复杂的过程,其机理还有待进一步研究.

参考文献:

- 1 New R R C, Ed. *Liposomes*. Oxford, U. K: Oxford University Press, 1990. 1 ~ 98.
- 2 Keller B C. *Liposomes in nutrition*. *Trend Food Sci. Tech.*, 2001, **12**: 25 ~ 31.
- 3 Beate I E, Rene P S. Partitioning of Substituted Phenols in Liposome-Water, Biomembrane-Water and Octanol-Water Systems. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**: 260 ~ 270.
- 4 Blunden S J, Chapman A. *Organometallic Compounds in the Environment*. Essex, UK: Longman, 1986. 117 ~ 159.
- 5 Langhlin R B Jr, Linden O. Tributyltin Contemporary Environmental Issues. *AMBIO*, 1987, **16**: 252.
- 6 Fent K. *Ecotoxicology of Organotin Compounds*. *Crit. Rev. Tox.*, 1996, **26**(1): 1 ~ 117.
- 7 Smejtek P, Wang S. Distribution of Hydrophobic Ionizable Xenobiotics between Water and Lipid Membranes: Pentachlorophenol and Pentachlorophenate. A Comparison with Octanol-Water Partition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, **25**: 394 ~ 404.
- 8 Fent K, Looser P W. Bioaccumulation and Bioavailability of Tributyltin Chloride: Influence of pH and Humic Acids. *Wat. Res.*, 1995, **20**(7): 1631 ~ 1637.