

# 全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 及其替代品对两栖类胚胎的发育毒性

任东凯<sup>1,2</sup>, 苏红巧<sup>2</sup>, 刘芃岩<sup>1</sup>, 韦荣国<sup>2</sup>, 秦占芬<sup>2,\*</sup>

1. 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002

2. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学和生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

**摘要:** 用非洲爪蟾胚胎致畸实验和黑斑蛙胚胎发育毒性实验, 比较研究了 PFOS 及其 4 种替代品对两栖动物胚胎的发育毒性。结果发现, 用调聚法合成的织物三防整理剂和 50% 的全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂同 PFOS 一样对非洲爪蟾胚胎有明显毒性, 且织物三防整理剂和表面活性剂的毒性强于 PFOS; 电解氟化法合成的 C4 织物及 C6 织物三防整理剂(以下简称 C4 及 C6 织物三防整理剂)对非洲爪蟾胚胎没有明显毒性。与非洲爪蟾不同, PFOS 和 4 种替代品对黑斑蛙胚胎没有明显毒性。结果显示, 从生物安全性的角度分析, C4 和 C6 织物三防整理剂可作为 PFOS 的替代品使用, 而织物三防整理剂和表面活性剂的毒性比 PFOS 大, 作为 PFOS 替代品使用需要慎重考虑。

**关键词:** PFOS; 替代品; 非洲爪蟾; 黑斑蛙; 发育毒性

文章编号: 1673-5897(2012)5-561-04 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Developmental Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Its Substitutes to Amphibian Embryos

Ren Dongkai<sup>1,2</sup>, Su Hongqiao<sup>2</sup>, Liu Pengyan<sup>1</sup>, Wei Rongguo<sup>2</sup>, Qin Zhanfen<sup>2,\*</sup>

1. College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China

2. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 30 June 2012 accepted 8 September 2012

**Abstract:** In this study, the developmental toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its four substitutes on *Xenopus laevis* embryos and *Rana nigromaculata* embryos studied comparatively. It was found that tri-fabric finishing agent synthesized using telomerization method (tri-fabric finishing agent) and 50% perfluorobutyl organic ammonium salt cationic surfactant (50% cationic surfactants) as well as PFOS had obvious toxicity to *X. laevis* embryos. Moreover, the toxicity of tri-fabric finishing agent and 50% cationic surfactant was significantly higher than that of PFOS. C4 and C6 tri-proof finishing agent (C4 and C6) synthesized by electrolysis fluorination method were not toxic to *X. laevis* embryos. To *R. nigromaculata* embryos, PFOS and four substitutes had no obvious toxicity. In term of biological safety, these results show that C4 and C6 might be used as the substitutes for PFOS, while tri-fabric finishing agent and 50% cationic surfactant should be considered carefully.

**Keywords:** PFOS; substitutes; *Xenopus laevis*; *Rana nigromaculata*; developmental toxicity

收稿日期: 2012-06-30 录用日期: 2012-09-08

基金项目 “863”计划课题(2010AA 065105) 和环保公益专项(201109048)

作者简介: 任东凯(1985-), 男, 硕士; 研究方向: 毒理学; E-mail: rwxrdk@126.com;

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: qinzhanchen@rcees.ac.cn

全氟辛烷磺酸盐(PFOS)因为具有疏油疏水的特性,被广泛用于民用和工业产品生产的多个领域,如纺织品、皮革、地毯、纸、涂料、消防泡沫、影像材料和航空液压油等产品中都含有PFOS<sup>[1-2]</sup>。在生产和使用过程中,PFOS会释放到环境中,目前发现各种环境介质都有PFOS的存在,是最难降解的污染物之一<sup>[3-4]</sup>。同时PFOS还被发现能在生物体中蓄积,并可对肝脏、神经和免疫等系统造成一定的损伤<sup>[5-6]</sup>。鉴于PFOS具有POPs的这些特征,2009年,PFOS被列入《关于持久性有机污染物(POPs)的斯德哥尔摩公约》,成为受控POPs之一。为应对公约对PFOS的限制,急需开发性能优良和生物安全性高的新产品以替代PFOS的作用。

一些研究显示PFOS具有发育毒性。Shi等<sup>[7]</sup>报道PFOS影响斑马鱼胚胎发育,改变相关基因的表达。Zhang等<sup>[8]</sup>发现PFOS暴露导致斑马鱼发育畸形,包括脊柱弯曲和脑坏死等。非洲爪蟾胚胎致畸试验(frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*, FETAX)是一种简便、快速检测发育毒性和致畸性的方法<sup>[9]</sup>,该方法以模型动物非洲爪蟾的胚胎为材料,中囊胚期至原肠胚初期的胚胎暴露测试物96 h,观察胚胎的死亡和畸形情况,以研究受试物的致死性、致畸性以及对其生长的影响。FETAX适用于对单一化学物质、混合物和环境样品的检测,已广泛用于检测各种化学品或环境样品<sup>[10]</sup>。

本研究用FETAX方法比较研究PFOS和4种替代品的发育毒性,并用我国本土两栖动物种黑斑蛙胚胎发育毒性实验做补充验证,以评价替代品的生物安全性及作为PFOS替代品的合理性。

## 1 材料和方法(Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

仪器:体式显微镜(COIC公司),脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),两栖动物诱导繁育设备(本实验室研发)。

试剂:potassium perfluorooctane sulfonate (CAS NO. 2795-39-3, 纯度98%, Matrix Scientific, 美国),人绒毛膜促性腺激素(HCG, 烟台北方制药有限公司),注射用促黄体素释放激素A<sub>3</sub> (LHRH-A<sub>3</sub>, 宁波第二激素厂),L-半胱氨酸(北京索莱宝科技有限公司),Hepes(Sigma, 美国),胎牛血清(HyClone, 美国),硫酸庆大霉素(北京赛驰生物科技有限公司),KCl、NaCl、CaCl<sub>2</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、NaOH、HCl等化学试剂为国产分析纯试剂,购自北京化学

试剂公司。

供试药剂:50%的全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂(以下简称表面活性剂)、用调聚法合成的织物三防整理剂(含固率23.7%)、用电解氟化法合成的C4及C6织物三防整理剂由中国某化工厂提供。

### 1.2 实验材料

#### 1.2.1 非洲爪蟾

本实验室饲养的非洲爪蟾成年雌蛙和雄蛙,分养于盛有去氯自来水的玻璃缸中,水温(22±2)℃,明暗光周期为12 h:12 h。成蛙喂食配制饲料(猪肝:玉米粉:大豆粉60%:30%:10%),1周2次,喂食2 h后重新换水。

将雄性爪蟾用MS-222麻醉,解剖,取出精巢,放在Testes培养基(47.0 mL的1x Ringers溶液中加入2.5 mL的胎牛血清和0.5 mL的50 mg·mL<sup>-1</sup>的硫酸庆大霉素)中,4℃保存以备授精。

雌蛙皮下注射HCG(以0.8%的生理盐水配制)300~500 IU。大概12 h后开始产卵,将卵收集在150 mm的培养皿中,吸出多余液体。取适量大小的精巢溶解于0.3 mL的Ringers溶液(6.6 g NaCl, 0.15 g KCl, 0.15 g CaCl<sub>2</sub>, 0.05 g NaHCO<sub>3</sub>溶解至1 L蒸馏水中,pH 7.2~7.4)中,使精子释放出来。立即将精子和卵混合,放置3~5 min后,加入0.1x MMR溶液(0.5844 g NaCl, 0.0149 g KCl, 0.012 g MgSO<sub>4</sub>, 0.0294 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和0.1192 g Hepes溶解至1 L蒸馏水中,pH 7.2~7.4),静置30 min左右,受精好的胚胎将会翻转,黑色的动物极朝上。

用2% (w/v)的L-半胱氨酸(2.0 g L-半胱氨酸溶解至100 mL蒸馏水里,pH 7.8~8.1)脱膜,3~4 min后,先用除氯水洗3次,然后用0.1x MMR洗2次,胚胎最后放置在0.1x MMR溶液里,1 h后开始分裂成2个细胞。

体式显微镜下观察胚胎,选择发育正常的中囊胚期至原肠胚早期<sup>[11]</sup>的胚胎进行暴露实验。

#### 1.2.2 黑斑蛙

黑斑蛙:成蛙取自生态中心昌平养殖场,饲养在实验室水陆两栖的玻璃缸中。水温(22±2)℃,明暗光周期为12 h:12 h。成蛙每天喂食添加蛋黄和胡萝卜的面包虫。1周换2次水。

成年雌雄蛙各注射2.5 μg LHRH-A<sub>3</sub>(以0.8%的生理盐水配制),放入两栖动物诱导繁育设备中,诱导抱对产卵。

用10 cm×20 cm整理盒收集受精卵,用2%

(w/v)的 L-半胱氨酸(2.0 g L-半胱氨酸溶解至 100 mL 蒸馏水里, pH 7.8 ~ 8.1)脱膜。脱膜在脱色摇床上进行。脱膜过程分两次: 第 1 次持续 15 ~ 20 min, 至卵团分离成单个的受精卵; 用除氯水冲洗 3 次后加入 2% L-半胱氨酸第 2 次脱膜, 大约持续 10 ~ 15 min, 至受精卵外层膜脱落后, 用除氯水漂洗 5 次以上, 倒入 150 mm 培养皿中。

体式显微镜下观察胚胎, 选择发育正常的中囊胚期至原肠胚早期的胚胎<sup>[12]</sup>进行暴露实验。

### 1.3 半静态暴露

将发育正常的中囊胚期至原肠胚早期的非洲爪蟾或黑斑蛙胚胎, 随机移入直径 60 mm 的培养皿中。PFOS 和 4 种替代品用除氯自来水配制成为系列浓度, 设置空白对照组。每个处理设 2 个平行皿, 每个培养皿中放入 25 个胚胎, 10 mL 暴露溶液。每隔 24 h 换液, 死亡胚胎及时取出, 记录胚胎死亡数。96 h 后停止暴露, 将所有胚胎在 3% 的福尔马林中固定, 体式显微镜观察形态, 记录每个暴露组胚胎的死亡数, 畸形数, 测量胚胎体长(头-尾长度)。

### 1.4 统计分析

详细登记每个培养皿中胚胎的死亡、畸形和生长情况。用概率分析(Probit analysis)计算 LC<sub>50</sub> 和 EC<sub>50</sub>。数据分析使用 SPSS 16.0 版本(IBM, USA)进行统计。胚胎体长数据在 p = 0.05 水平, 用 T-检验确定。

## 2 结果(Results)

PFOS 和 4 种替代品对非洲爪蟾胚胎的半致死浓度 LC<sub>50</sub> 和半致死畸浓度 EC<sub>50</sub> 如表 1 所示: 10 ~ 40 mg·L<sup>-1</sup> 的浓度范围内, C4 和 C6 织物三防整理剂不导致非洲爪蟾胚胎死亡和畸形。所有测试浓度的 PFOS 均可导致非洲爪蟾胚胎明显的死亡和畸形, 96 h 的 LC<sub>50</sub> 和 EC<sub>50</sub> 分别为 51 和 108 mg·L<sup>-1</sup>。织物

表 1 PFOS 和 4 种替代品对非洲爪蟾胚胎的半致死浓度 LC<sub>50</sub> 和半致死畸浓度 EC<sub>50</sub>

Table 1 LC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> of PFOS and four substitutes to *Xenopus laevis* embryos

名称	浓度范围	48h-LC <sub>50</sub>	48h-EC <sub>50</sub>	96h-LC <sub>50</sub>	96h-EC <sub>50</sub>
PFOS	35 ~ 100	—	—	51	108
织物三防整理剂	10 ~ 40	9	—	—	—
阳离子 表面活性剂	10 ~ 40	—	—	43	18
C6 织物三防整理剂	10 ~ 40	无死亡	无畸形	无死亡	无畸形
C4 织物三防整理剂	10 ~ 40	无死亡	无畸形	无死亡	无畸形

三防整理剂和表面活性剂对非洲爪蟾胚胎也有明显

的毒性。织物三防整理剂在 48 h 内就导致大部分或全部胚胎死亡(图 1), 表面活性剂 96 h 的 LC<sub>50</sub> 和 EC<sub>50</sub> 分别为 43 和 18 mg·L<sup>-1</sup>, 显示织物三防整理剂和表面活性剂的毒性比 PFOS 更强。

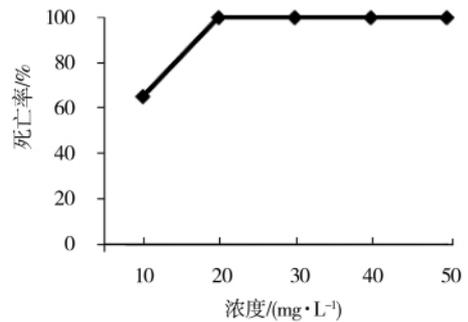


图 1 不同浓度的织物三防整理剂对非洲爪蟾胚胎的死亡率

Fig. 1 48 h mortality of tri-fabric finishing agent with various concentrations to *Xenopus laevis* embryos

黑斑蛙胚胎暴露实验中, PFOS、C6 和 C4 织物三防整理剂液和表面活性剂在 20 ~ 100 mg·L<sup>-1</sup> 浓度范围内未引起胚胎的死亡和畸形, 仅表面活性剂在最高浓度下表现出抑制胚胎生长的作用(图 2)。织物三防整理剂(13 ~ 70 mg·L<sup>-1</sup>)对黑斑蛙胚胎也没有明显毒性。

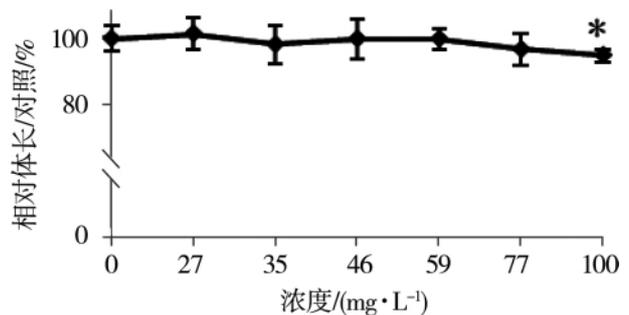


图 2 不同浓度的 50% 阳离子表面活性剂对黑斑蛙胚胎体长的影响

Fig. 2 Effect of 50% cationic surfactant on body length of *Rana nigromaculata* embryos

## 3 讨论(Discussion)

有文献显示高剂量 PFOS 具有胚胎发育毒性。开发替代品的一个重要原则是性能更好和毒性更低, 并且在保证应用价值的同时能够满足生态安全的要求。本研究中 PFOS 对非洲爪蟾胚胎表现出明显的致死性和致畸性。替代品织物三防整理剂和表

面活性剂同 PFOS 一样对非洲爪蟾胚胎有明显毒性,且织物三防整理剂和表面活性剂的毒性强于 PFOS 毒性。所以从生物安全性的角度分析,织物三防整理剂和表面活性剂的毒性比 PFOS 更大,不能作为 PFOS 替代品使用。C4 和 C6 织物三防整理剂对非洲爪蟾和黑斑蛙胚胎没有明显的毒性,可以考虑作为 PFOS 的替代品使用。

**通讯作者简介:** 秦占芬(1971—),女,环境科学博士,副研究员,主要研究方向为毒理学。

#### 参考文献:

- [1] Paul A G, Jones K C, Sweetman A J. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2): 386 – 392
- [2] Lindstrom A B, Strynar M J, Libelo E L. Polyfluorinated compounds: Past, present, and future [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(19): 7954 – 7961
- [3] Houde M, De Silva A O, Muir D C, et al. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: An updated review [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(19): 7962 – 7973
- [4] Hekster F M, Laane R W, de Voogt P. Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substances [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 179: 99 – 121
- [5] D'Hollander W, de Voogt P, De Coen W, et al. Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 208: 179 – 215
- [6] Lau C, Butenhoff J L, Rogers J M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(2): 231 – 241
- [7] Shi X, Du Y, Lam P K, et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 230(1): 23 – 32
- [8] Zhang L, Li Y Y, Chen T, et al. Abnormal development of motor neurons in perfluorooctane sulfonate exposed zebrafish embryos [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(4): 643 – 652
- [9] American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM E1439-98 Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX) [S]. Philadelphia: Annual Book of ASTM Standards, 2004
- [10] Fort D J, McLaughlin D W, Rogers R L, et al. Evaluation of the developmental toxicities of ethanol, acetaldehyde, and thioacetamide using FETAX [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2003, 26(1): 23 – 34
- [11] Nieuwkoop P D, Faber J. Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin) [M]. Amsterdam: North-Holland Publishing, 1956: 163 – 188
- [12] Gosner K L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification [J]. *Herpetologica*, 1960, 16(3): 183 – 190