

纳米富勒烯(nC_{60})的生态毒性效应^{*}

晏晓敏 石宝友 王东升 汤鸿霄^{**}

(中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室 北京 100085)

摘 要 随着纳米技术的飞速发展,纳米材料的应用日趋广泛。同时,纳米材料的大规模生产和应用对人体健康与生态环境可能产生的安全风险也引起了人们的普遍关注。富勒烯是应用最广泛的纳米材料之一,在水中能形成稳定的水溶性纳米颗粒,进而增大其在环境中的迁移性与生物暴露几率。然而目前对纳米富勒烯(nC_{60})的环境和毒性效应还知之甚少。本文综合评述了水溶性 nC_{60} 纳米颗粒的制备、稳定机制、在环境中的迁移特性及其与环境中污染物的相互作用,并着重阐述了 nC_{60} 可能产生的生物毒性效应。分析表明, nC_{60} 的生物毒性效应主要与 nC_{60} 的表面化学特性和颗粒大小有关,同时环境介质也影响 nC_{60} 的毒性。最后讨论了 nC_{60} 生态环境效应研究中应加强的若干方面。

关键词 富勒烯 纳米材料 纳米毒理学 生态毒性

中图分类号: X171.5; TB383 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2008)02/3-0422-07

The Eco-Toxic Aspects of Aqueous Nano- C_{60} Fullerenes

Yan Xiaomin Shi Baoyou Wang Dongsheng Tang Hongxiao^{**}

(Skate Key Laboratory for Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract With the rapid development of nanotechnology, many kinds of nanomaterials are widely used in industrial products, drug delivery, cosmetics etc. The likelihood of exposure to nanomaterials is increasing and the concerns about the human health and environmental risks of nanomaterials are raised in the world. Stable fullerenes nanoparticles (nC_{60}) can be formed in water when fullerenes are released into aquatic environment, which increase the transport and potential ecological effects of fullerenes. However, the current knowledge on the environmental effects associated with nC_{60} is limited. The formation, stabilization-aggregation, and transport of nC_{60} are critically reviewed. The interaction of nC_{60} with environmental pollutants and its eco-toxicity to organisms are also discussed. Emphasis is put on the possible eco-toxicity of nC_{60} to different levels of organisms including cells, bacteria, invertebrates and fishes resulted from the exposure to nC_{60} . Present literatures suggest that the toxicity of nC_{60} mainly depends on its surface chemistry, particle sizes and environmental conditions. Suggestions about the future research on eco-toxicity of nC_{60} are also addressed.

Key words fullerenes; nanomaterials; nanotoxicology; eco-toxicity

1 引言

纳米技术的迅速发展正对人类的生产和生活带来巨大变化,目前已有超过 350 余种纳米材料产品

见于市场^[1]。然而对于工程纳米材料(engineered nanomaterials)对人体健康和环境可能带来的潜在影响方面的研究尚处于起步阶段,但已引起各国的高度重视。欧美等国家相继发布了多个关于纳米材料

收稿: 2007 年 4 月, 收修改稿: 2007 年 6 月

* 国家自然科学基金重点项目(No. 20537020)资助

** 通讯联系人 e-mail: tanghx@mail. rcees. ac. cn

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

潜在影响的报告^[2-4]。从 2003 年起,众多科学家陆续在 *Science*、*Nature* 等重要期刊上,从纳米毒理学(nanotoxicology)研究的倡导、研究战略、经费支持等方面发表了多篇导向性文章^[5-13]。专门探讨纳米毒理学的期刊——*Nanotoxicology* 也于 2007 年创刊发行。Oberdorster 等^[14]将纳米毒理学定义为“研究工程纳米装置和纳米结构对活体生物效应的科学”。

富勒烯 C_{60} (fullerene) 自从 1985 年首次由 Kroto 等^[15]发现,及随后 Krätschmer 等^[16]采用石墨电弧法制备出大量 C_{60} 后,由于其对称空心笼状三维芳香结构而具有独特的物理化学特性^[17, 18],成为当前广泛研究的一种新型纳米材料,领域涉及物理化学、材料和生物学等。日本 Frontier 公司预计到 2007 年其 C_{60} 生产将达 300t^[19]。大量 C_{60} 的生产和使用将对人体健康和生态环境产生潜在风险。

C_{60} 由于强疏水性,几乎不溶于水^[17],也不溶或微溶于多数极性溶剂^[20],其应用受到一定限制。对 C_{60} 进行表面共价修饰^[21, 22]或与大分子如 γ -CyD^[23]、PVP^[24]等通过电荷转移形成复合物,可以增加其水溶性。这些可溶性富勒烯衍生物主要应用于生物学等领域,本文对此不做重点讨论。除此之外,溶剂替换^[25]、长期搅拌^[26]及研磨^[27]也能制备水分散稳定的富勒烯聚集体(记为 nC_{60}),其特点是未对 C_{60} 进行表面修饰,特别是水搅拌制备和研磨制备的 nC_{60} 更大程度地模拟了 C_{60} 在天然水环境中的可能分散机制。因此研究 nC_{60} 的生态环境效应对 C_{60} 的安全使用和处置等具有指导意义。

2 nC_{60} 的制备方法及其物理化学特性

2.1 nC_{60} 的制备方法

nC_{60} 的 3 种制备方法中,水中长期搅拌法(记为 Aqu/ nC_{60})和研磨法(不添加任何辅助剂)制备的 nC_{60} 用于毒理学研究能真正体现 C_{60} 进入环境后的生态效应。而目前关于 nC_{60} 的生态环境效应的文献中,主要是采用溶剂替换法制备 nC_{60} ,即先将 C_{60} 溶解到一种或几种溶解度相对大的有机溶剂中,如四氢呋喃(THF)^[28]和甲苯^[29],再将水加到此溶液中,通过旋转蒸发或超声去除有机溶剂,过滤后得到 nC_{60} 。但溶剂替换法存在有机溶剂残留^[30-32],从而对这类 nC_{60} 的毒性数据解释也存在不同看法。虽然有些研究者报道了残留溶剂对毒性的可能影响,但至今为止,残留有机溶剂对 nC_{60} 毒性效应的影响机制仍不清楚。

2.2 nC_{60} 的物理化学特性

2.2.1 nC_{60} 的颗粒粒度与形貌分析

颗粒大小和形状是毒性实验中的重要参数。常用的粒度测定方法有动态光散射(dynamic light scattering)和电镜观察,此外激光衍射(laser diffraction)、微分运动分析(differential mobility analysis)和冲击法(impaction methods)等也可用于颗粒粒度分析^[33, 34]。

动态光散射可以直接得到颗粒在实验体系中的粒度分布,但不能得到颗粒的形貌。电镜观察(如常用的 SEM、TEM、AFM)则可观察颗粒的大小、形貌和组成等;通过大量影像采集和统计计算也能进行粒度分析,AFM 还能给出颗粒的三维图。但是在电镜观察样品制备过程中,由于溶剂挥发过程中颗粒可能发生聚集,其结果难以真正代表颗粒在液相中的分布。因此,颗粒的粒度分析最好多种方法联合使用。

nC_{60} 颗粒形状多样,随制备方法不同而有所差别。采用 SEM、TEM 等观察有六边形、球形、长方形及不规则形态,颗粒呈聚集态,颗粒粒度范围在数十纳米到几百纳米之间^[25]。 nC_{60} 在常温极低离子强度时具有高稳定性,也不受 pH 值(pH 值 1—10)和加热影响,可稳定保存数月甚至几年以上^[27, 29]。然而目前关于 nC_{60} 粒度形貌分析的文献大多只对制备时的 nC_{60} 样品进行分析,较少观察 nC_{60} 在毒性实验中的形貌变化。由于高离子强度的介质和生物的影响, nC_{60} 粒径可能变大,而这将影响 nC_{60} 的毒性实验结果。因此,至少需要表征 nC_{60} 在毒性实验前和暴露实验中的粒度和形貌,更高层次的是能表征 nC_{60} 与生物相互作用时的状态,分析 nC_{60} 在细胞、组织和器官中的粒度分布和形态。

2.2.2 nC_{60} 的表面化学特性

颗粒的溶解平衡、催化特性、结构、表面电荷及类型、与溶液中分子的表面吸附/脱附、介电常数等是颗粒表面化学特性的重要参数^[33, 35]。其中表面电荷不仅是影响纳米颗粒稳定的重要因素之一,也影响纳米颗粒与生物分子和生物表面磷脂双膜的表面接触及进一步渗入。颗粒的表面电荷一般难以直接测量,但颗粒在电场中迁移时的电荷可以通过流动电位仪或 Zeta 电位仪测定^[36]。颗粒的表面化学结构可以通过一系列的光谱仪器分析,如 UV-vis、Raman、FTIR、XPS 和 NMR 等,通过颗粒的表面化学结构还可分析颗粒的表面活性和表面电荷等。

nC_{60} 的 UV-vis 吸收光谱特征不同于 C_{60} 分子在溶剂中的吸收光谱^[25]。这显示 nC_{60} 的表面化学特性与 C_{60} 分子有所不同。 nC_{60} 不能直接被甲苯萃取, 但加入电解质如 NaCl、Mg(ClO₄)₂ 或冰醋酸^[37], 则可被甲苯萃取, 萃取后 C_{60} 的 UV-vis 光谱特性与 C_{60} 直接溶解于甲苯的相似^[28]。Raman 光谱和 IR 光谱显示 nC_{60} 同时具有胶体态和固态结构的光谱特征^[38]。采用 ¹³C NMR^[27,31]、XRD^[27] 和 HPLC^[28,31] 等手段都表明 nC_{60} 中 60 个碳原子是等价的。这都表明 nC_{60} 的形成并不是由于表面氧化形成亲水基团。 ξ -电位显示 nC_{60} 颗粒表面带负电荷, 范围从 -13.5 mV 到 -50 mV^[25,27,39], 电位滴定计算 nC_{60} 的 pK_a 值在 3—4 之间^[40,41]。那么强疏水性的 C_{60} 在水中没有分散剂是如何形成表面带负电荷的 nC_{60} , 进而通过静电排斥力在水中形成稳定颗粒?

对 nC_{60} 表面电荷来源, 主要有以下几种形成机制。(1) C_{60} 与 H₂O 接触, 部分 C_{60} 发生氧化反应, 生成极少部分极性基团, 成为两亲 C_{60} , 这些两亲 C_{60} 将 C_{60} 包裹在中心, 形成稳定的 nC_{60} ^[31]。但 ¹³C NMR 和 HPLC 都未能检测出 C_{60} 的氧化产物, 此观点缺乏实验支持。(2) nC_{60} 的表面电荷来自吸附的 OH⁻, 或在界面上发生水解反应^[25]。然而 nC_{60} 的形成过程中, 体系的 pH 值并没有发现明显的改变, 在不同的 pH 值 (pH = 5.6 和 pH = 10.4) 下, 形成的 nC_{60} 所带电荷相似^[41]。而且 C_{60} 也可在极性有机溶剂中形成稳定的负电荷纳米颗粒^[42]。因此这不可能是 nC_{60} 表面电荷的唯一来源。(3) C_{60} 由于分子结构中的三维离域共轭 π 键, 具有高的电子亲和力 (2.6—2.8 eV), 是强的电子受体, 而固体 C_{60} 又能不可逆吸附水分子, 形成亲水界面^[43], 水中的氧作为电子供体, 与 C_{60} 通过电荷转移形成电子供体-受体复合物 (electron donor-acceptor complexes)^[25,27,40,41], 进而在表面形成水化壳, 形成稳定的颗粒。Ludwig 等^[44] 根据理论计算, 也表明分散到水中的 C_{60} 的表面负电荷不是来源于吸附 OH⁻, 而是水的氧原子与 C_{60} 之间发生电荷转移。根据 ¹³C NMR 和 HPLC 等实验结果, 这种机制更合理。电荷转移模式还可以用来解释多次洗涤 THF/ nC_{60} (采用 THF 溶剂替换法制备), 去除残留的 THF, 能降低 ξ -电位^[25], 以及 C_{60} 在极性有机溶剂中形成纳米颗粒^[42]。尽管对于 nC_{60} 表面电荷来源的解释广为接受的是电荷转移模式, 但对于 C_{60} 与 H₂O 之间的确切作用力及由此对 nC_{60} 表面化学特性的

影响尚不清楚。

与 nC_{60} 的粒度形貌表征类似, 目前 nC_{60} 的化学表征大多数只对制备的样品进行分析。 nC_{60} 还可能与环境中的污染物、生物大分子作用, 或在实验/生理介质下表面化学特征发生变化, 这些变化将如何影响 nC_{60} 的生物效应也是进一步需要研究的内容。

3 nC_{60} 的环境行为

C_{60} 无论是以宏观固体颗粒形式还是溶解在有机溶剂中进入天然水体后, 经过长期水力混合, 都可能形成高度分散的纳米颗粒, 进而在环境系统中迁移。 nC_{60} 在土壤/沉积物和水体中的迁移受多种环境因素的影响, 如土壤/沉积物和水体特性, 同时也受 nC_{60} 本身的物化特性如颗粒大小、聚集状态、表面电荷和表面包被等影响。

自然界广泛存在的矿物质和土壤/沉积物能有效地降低 nC_{60} 在环境中迁移性。Lecoanet 等^[46,47] 对比几种纳米材料 (富勒烯醇、单壁碳纳米管、二氧化硅、氧化铝、 nC_{60}) 在球形玻璃介质中的迁移, 发现 nC_{60} 的迁移性最低, 50% 的 nC_{60} 被玻璃珠截留。Cheng 等^[48] 发现低流速 (0.38 m/d) 下 nC_{60} 在含有机碳 0.27% 的土壤中的迁移性较低, 而在水流扰动下, 被吸附的 nC_{60} 又能释放到水中。可见 nC_{60} 在地下水中的迁移性比较小, 但在水环境条件受到扰动时, nC_{60} 有可能重新进入水体。此外, 天然环境中广泛存在的腐殖质也可能会影响 nC_{60} 的迁移。

通过颗粒之间的静电和水化壳排斥作用而稳定分散于水中的 nC_{60} , 可以通过凝聚絮凝脱稳。各种价态的无机阳离子电解质脱稳 nC_{60} 符合 Schulze-Hardy 规则^[49] 和经典的 DLVO 理论^[50]; 有机电解质也能絮凝 nC_{60} , 絮凝效果与有机电解质的电荷和分子结构相关, 如阳离子表面活性剂对 nC_{60} 的临界絮凝浓度 (critical coagulation concentration) 随阳离子的疏水性和表面活性增加而减小^[49]。脱稳聚集的 nC_{60} 大多不可逆, 但在高 pH 值下也能再次分裂为纳米颗粒^[51]。 nC_{60} 的脱稳聚集可能影响其毒性水平, 这是因为聚集体分配到细胞膜内和在生物体内的分布将会受到阻碍。

nC_{60} 纳米颗粒具有大的比表面积, 可以吸附环境中的污染物。Cheng 等^[26,32,48] 发现 nC_{60} 具有类似于土壤有机碳一样吸附萘和 1,2-二氯苯有机污染物

的能力, 污染物除在 nC_{60} 的外表面吸附, 还可通过中孔毛细管冷凝、微孔扭曲或渗透到 C_{60} 晶体内部。然而关于 nC_{60} 与污染物所形成复合体系的生物毒性效应研究尚未开展, 复合体系可能既体现 nC_{60} 的纳米毒性效应, 又体现被吸附污染物本身的毒性效应, 或能产生其他综合效应。

4 nC_{60} 的生物效应

富勒烯及其衍生物能与引起细胞损伤的活性氧(如 HO^\cdot 和 $O_2^{\cdot-}$) 反应, 充当“自由基的海绵”, 使细胞免受自由基损伤, 被认为具有很好的生物医学应用前景^[53-55]。纯 C_{60} 也不对细胞产生毒性效应^[56, 57]。然而 Oberdörster 于 2004 年首次在美国 ACS 会议上指出纳米颗粒 THF/ nC_{60} 对水生生物大型蚤 (*D. magna*) 和黑鲈鱼 (largemouth bass) 产生毒性效应, 引起人们对纳米材料和 C_{60} 毒性的广泛关注。

4.1 nC_{60} 的细胞毒性 (cytotoxicity)

有研究表明 nC_{60} 产生的细胞毒性与 C_{60} 的表面化学特性有关。Sayes 等^[58] 采用人肝癌细胞 (HepG2) 和人真皮纤维原细胞 (HDF) 比较 THF/ nC_{60} 、 C_3 (C_{60} 的羧酸类衍生物)、 $Na_2^{+3} [C_{60}O_{7-9}(OH)_{12-15}]^{(2-3)-}$ 、 $C_{60}(OH)_{24}$ 等不同表面化学特性的水溶性 C_{60} 的细胞毒性。结果显示, C_3 、 $Na_2^{+3} [C_{60}O_{7-9}(OH)_{12-15}]^{(2-3)-}$ 的 LC_{50} 都大于 10 000 ppb, 则 $C_{60}(OH)_{24}$ 不显细胞毒性, 而 THF/ nC_{60} 的 LC_{50} 低至 20 ppb, 毒性远大于其他 3 种水溶性 C_{60} 衍生物。Isakovic 等^[59] 采用小鼠纤维肉瘤细胞线 (L929)、大鼠神经胶质瘤细胞线 (C6) 和人神经胶质瘤细胞线 (U251) 也观察到 THF/ nC_{60} 对细胞毒性的 LC_{50} 为 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$, 而 $C_{60}(OH)_n$ 的 LC_{50} 为 $800-1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$, 显示 THF/ nC_{60} 细胞毒性大于表面多羟基衍生的 $C_{60}(OH)_n$ 。然而 THF/ nC_{60} 的细胞毒性也可能与 nC_{60} 制备中残留的 THF 有关。Isakovic 等^[60] 进一步发现 THF/ nC_{60} 经 γ 射线照射 3 h 后, 在浓度达 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时也不产生细胞毒性, 也未观察到产生活性氧及激活细胞体内与应激相关的 ERK 酶, 且经 γ 射线照射的 THF/ nC_{60} 还能保护细胞免受由原 THF/ nC_{60} 或过氧化氢产生的氧化应激 (oxidative stress)。他们对此的解释是 γ 射线分解 THF/ nC_{60} 中残留的 THF, 同时也使 nC_{60} 表面发生氧化, 在表面生成羟基或羧酸类衍生物, 改变了 nC_{60} 的表面化学特性。然而至今仍不清楚 C_{60} 的表面化学是如何影响其生物效应的。

离体 (*in vitro*) 实验表明 nC_{60} 还能损伤 DNA, 产生遗传毒性 (genotoxicity)。Dhawan 等^[39] 采用人体淋巴细胞通过单槽凝胶电泳 (彗星实验) 研究两种纳米富勒烯 Aqu/ nC_{60} (粒径 169.1 nm, ξ -电位 -22.64 mV) 和 EtOH/ nC_{60} (乙醇体系制备, 粒径 153.3 nm, ξ -电位 -34.77 mV) 的遗传毒性, 发现 nC_{60} 的遗传毒性效应与浓度具有强相关性。Aqu/ nC_{60} 的最低观察效应浓度 (lowest observed effect concentration) 为 $2.2 \mu\text{g}/\text{L}$, EtOH/ nC_{60} 为 $4.2 \mu\text{g}/\text{L}$ 。Aqu/ nC_{60} 的遗传毒性大于 EtOH/ nC_{60} 。这可能与乙醇和 C_{60} 之间更大的电荷转移, 增加表面羟基有关。另外, 表面负电荷颗粒与负电荷细胞表面之间存在静电斥力能阻碍颗粒与细胞的接触, EtOH/ nC_{60} 的毒性效应也可能是由于其相对低的表面负电位。然而由于此实验只采用了一种细胞, Aqu/ nC_{60} 的遗传毒性更有待于采用其他不同细胞确证, 也不清楚 Aqu/ nC_{60} 是否对活体 (*in vivo*) 产生遗传毒性。

nC_{60} 的细胞毒性机制可能与其产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 有关。Sayes 等^[58, 61] 采用 iodophenol 法和 xanthine/xanthine oxidase 反应两种方法测得 THF/ nC_{60} 在非细胞体系中能产生 $O_2^{\cdot-}$; 在细胞毒性实验体系中采用 TBA 法 (thiobarbituric) 测得细胞内与过氧化有关的丙二酸二醛含量增多, 表明细胞发生脂过氧化损伤, 采用 C11-BODIPY⁸¹¹⁵⁹¹ (分子探针) 也在线监测到细胞发生脂过氧化。细胞膜脂的过氧化损伤通过大分子的荧光右旋糖苷能进入 THF/ nC_{60} 细胞体内而不能进入正常细胞体内得到证实, 如图 1 所示。Isakovic 等^[60] 同样观察到 THF/ nC_{60} 产生 ROS 并不需要细胞存在, 其对细胞产生的死亡机制是细胞坏死 (necrosis)。此外, 加入抗氧化剂物质如 NAC^[59]、抗坏血酸^[61] 也能降低 THF/

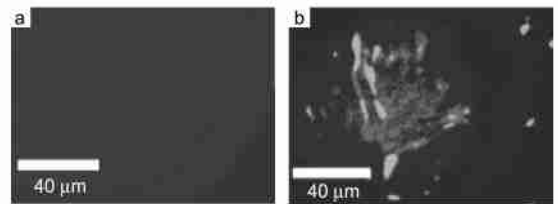


图 1 荧光右旋糖苷进入 nC_{60} 处理的细胞: 荧光右旋糖苷 (500 000 kDa) 加入 (a) 正常健康细胞; (b) 暴露于 10 ppm THF/ nC_{60} 细胞^[61]

Fig. 1 Dextran fluorescein (500 000 kDa) was added to (a) normal healthy cells and (b) cells dose with 10 ppm nC_{60} ^[61]

nC_{60} 的细胞毒性。这都表明 THF/ nC_{60} 的毒性机制是其产生 ROS,且不依赖于生物体的存在,但 THF/ nC_{60} 为何能产生 ROS 则不清楚。Dhawan 等^[39]也认为 nC_{60} 遗传毒性机制的首要条件是 nC_{60} 产生 ROS,引起细胞质膜破坏,从而自由基、分子 C_{60} 和 nC_{60} 胶体得以进入细胞内部。但 Aqu/ nC_{60} 能否产生 ROS 尚没有实验证实。由于 Aqu/ nC_{60} 是 C_{60} 在环境中最有可能是稳定的分散形式,研究 Aqu/ nC_{60} 能否产生 ROS 对 C_{60} 的生态风险评价更具意义。

然而也有研究表明 nC_{60} 并不产生细胞毒性。Scrivens 等^[62]采用甲苯、THF、丙酮、水等溶剂转移替换法得到的水溶性 nC_{60} 虽然能被人体角化细胞摄取,但 C_{60} 浓度在 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} - 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,却不影响细胞增殖。Gharbi 等^[63]将羧甲基纤维素分散稳定的 C_{60} 颗粒注入大鼠体内,在剂量 2 g/kg 时,发现 C_{60} 虽然能在肝脏中富集,但并不影响肝细胞活性,相反还能保护肝脏免受 CCl_4 产生的自由基的损伤。Levi 等^[64]也发现 Son/ nC_{60} (C_{60} 预先溶于甲苯,加入水中超声去除甲苯而得)在浓度 $27.4 \mu\text{g/ml}$ 时未对 MCF10A 和 HepG2 细胞产生毒性。

4.2 nC_{60} 对微生物的影响

微生物对生态平衡起重要作用,然而有研究表明 nC_{60} 能抑制微生物生长。Fortner 等^[65,66]发现 THF/ nC_{60} 在浓度大于 4 mg/L 时能降低大肠杆菌 (*E. coli*)和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)的好氧呼吸速率,对这两种细菌的最低抑制浓度 (MIC)分别为 $0.5 - 1 \text{ mg/L}$ 和 $1.5 - 3.0 \text{ mg/L}$,其毒性大于百草枯 (paraquat)和苯。Lyon 等^[67]进一步对比 THF/ nC_{60} 、Son/ nC_{60} 、Aqu/ nC_{60} 对 *B. subtilis*的毒性,发现 THF/ nC_{60} 的毒性最强,其 MIC 为 0.09 mg/L ,Son/ nC_{60} 和 Aqu/ nC_{60} 的 MIC 在 $0.5 - 0.95 \text{ mg/L}$ 之间。虽然文献 [66]与 [67]的数据有所不同,但都表明一旦大量使用的 C_{60} 进入环境后,对生态平衡将产生潜在影响。

nC_{60} 颗粒的大小也影响其毒性效应,颗粒越小,与生物接触性越大,也越有可能进入生物体内。Lyon 等^[67]通过离心分离得到不同粒径分布的 nC_{60} 颗粒,发现小颗粒的 nC_{60} 对 *B. subtilis*的毒性大于大颗粒的毒性,但与比表面积的增加不成比例。此外,由于毒性实验体系介质或生物生理介质的影响, nC_{60} 可能发生聚集,进而降低 nC_{60} 的生物毒性效应,如高盐介质下 nC_{60} 对 *B. subtilis*不产生毒性影响^[66]。因此,在 nC_{60} 毒性实验中,需注明颗粒的尺

寸大小,尤其是在实验体系中的粒度大小。

然而也有研究指出 nC_{60} 对微生物并不产生毒性。Deguchi 等^[71]发现不加分散剂研磨制备的 nC_{60} (平均粒径 147 nm)在浓度高达 $5 \mu\text{g/ml}$ 时,也不抑制 *E. coli*的生长。这与文献 [67]中 Aqu/ nC_{60} (平均粒径 74.9 nm)能抑制 *B. subtilis*生长不同。这两种方法制备的 nC_{60} 都不含任何分散剂,被认为具有类似的表面化学特性,其对细菌的影响差异可能与颗粒大小和使用的细菌种类不同有关。

4.3 nC_{60} 对无脊椎动物的影响

大型蚤是水生生物食物链的重要环节,对水生生态系统平衡起重要作用。一些研究表明 nC_{60} 能对大型蚤产生急慢性毒性。Lovem 等^[68]对比 THF/ nC_{60} 和 Son/ nC_{60} (直接将 C_{60} 超声分散)对大型蚤的 48 h 急性毒性,结果发现 THF/ nC_{60} 的 LC_{50} 为 0.46 mg/L ,Son/ nC_{60} 的 LC_{50} 为 7.9 mg/L 。THF/ nC_{60} 对大型蚤也产生亚急性毒性效应,使大型蚤的运动能力明显减弱,进而可能影响其捕食行为。Oberdörster 等^[69,70]也观察到 Aqu/ nC_{60} 能引起大型蚤死亡,但即使在浓度高达 35 mg/L 时,大型蚤的死亡率也小于 50% 。然而在 Aqu/ nC_{60} 浓度低至 2.5 mg/L 时,在暴露前期发现大型蚤繁殖率下降,这可能在种群水平上影响大型蚤,进而影响整个水生生态系统。

nC_{60} 对无脊椎动物的影响也与选用的物种有关。Oberdörster 等^[69]发现 Aqu/ nC_{60} 对甲壳类淡水底栖生物 *Hyalella azteca* (最高浓度 7 mg/L)和海洋桡角类底栖生物 *Copepods* (最高浓度 22.5 mg/L)并不产生急慢性毒性效应。

4.4 nC_{60} 对脊椎动物的影响

nC_{60} 中还能对处于水环境中食物链顶端的鱼产生毒性效应。Oberdörster^[71]将黑鲈幼鱼放于 0.5 mg/L THF/ nC_{60} 中进行 48 h 急性暴露,发现 THF/ nC_{60} 尽管未引起黑鲈死亡,但黑鲈大脑中明显发生了脂质过氧化损伤,而鳃部和肝脏尽管没有发现过氧化现象,但具有抗氧化活性的谷胱甘肽下降,同时肝中基因表达发生了改变。Oberdörster 认为 nC_{60} 可能是直接通过嗅神经到达脑部而产生大脑过氧化损伤。但 nC_{60} 能否穿过生命系统的血脑屏障进入大脑目前尚缺乏实验证据。

由于该研究中制备 nC_{60} 时采用了被广泛认为毒性来源的 THF,为了排除 THF 对毒性的影响, Oberdörster 等^[70]随后研究了 THF/ nC_{60} 和 Aqu/ nC_{60} 对

成年雄性黑头呆鱼 (fathead minnows, FHM) 的可能影响。在 0.5 mg/L 剂量下, 暴露在 THF/ nC_{60} 组的 FHM 在 6—18 h 100% 死亡, 而 Aqu/ nC_{60} 组的 FHM 在 48 h 后未观察到明显的生理反应。这表明 THF 的使用能明显增加 nC_{60} 的毒性。尽管 Aqu/ nC_{60} 对 FHM 不产生急性毒性, FHM 的大脑和鳃部脂过氧化物 (LPO) 却也同样增多, 也显著激发了肝脏中与代谢 C_{60} 或修复 LPO 有关的 P450 CYP2 家族同工酶的表达。他们还发现暴露于 Aqu/ nC_{60} 的 FHM 肝脏中过氧化物酶体脂质转运蛋白 PMP70 明显降低, 但不影响日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 PMP70^[69]。这些结果表明尽管 Aqu/ nC_{60} 的毒性小于 THF/ nC_{60} , 但 Aqu/ nC_{60} 同样可能对鱼产生活性氧物质而对鱼产生损伤。

4.5 讨论

从上述 nC_{60} 的生物毒性效应可以看出, 尽管 nC_{60} 在生物体内可能的摄取、分布、代谢和排泄等途径尚不清楚, nC_{60} 能在不同生物水平上产生毒性效应。其中 nC_{60} 的制备方法对毒性影响很大, 不同制备方法得到的 nC_{60} 由于具有不同的粒径大小和表面化学特性而具有不同的生物毒性效应, 采用 THF 制备的 nC_{60} 毒性最大。Gharbi^[63] 和 Andrievsky 等^[72] 认为 C_{60} 本身没有毒性, 各种 nC_{60} 的毒性是由于 C_{60} 与溶剂水、THF 等发生电荷转移生成的复合物产生的, 并认为黑鲈幼鱼的大脑氧化损伤^[71] 来自残留的 THF。然而 THF/ nC_{60} 中残留 THF 浓度不足以导致文献中的生物毒性^[60], THF/ nC_{60} 的毒性可能是 THF 或分解产物与 C_{60} 的协同作用, 具体机制仍不清楚。

目前对 nC_{60} 的毒性机制在很大程度上也是推测, 其真正的毒性机制仍不十分清楚。 nC_{60} 毒性大小也难以简单根据颗粒的大小、形状、表面电荷解释, 究其原因主要是对 nC_{60} 的形成机制、 nC_{60} 的表面化学特性尚不明确。

尽管将 THF/ nC_{60} 的毒性数据用于评价 C_{60} 的生态影响值得怀疑, 但 C_{60} 在水中搅拌生成的 nC_{60} 仍能对不同生物水平产生毒性效应。然而目前 C_{60} 的处理处置指导原则仍是根据炭黑制定, 这个指导原则能否应用于 C_{60} 仍需重新审定。因此, 不管 C_{60} 本身毒性如何, 其进入环境后形成的 nC_{60} 将对生态产生潜在影响。当前获得的关于 nC_{60} 对生态影响的数据尽管有限, 但对 C_{60} 的生态风险评价仍很有意义。

5 展望

C_{60} 作为新型的碳材料, 在工业上有巨大的应用

前景。但 C_{60} 进入环境中后, 能形成水溶性 nC_{60} , 对生态环境存在潜在影响。对此, 应加强 nC_{60} 的以下几个方面的研究。

(1) 深入研究 nC_{60} 表面物理化学特性, 明确 nC_{60} 表面电荷来源。

(2) 深入研究 nC_{60} 在环境中的迁移和转化, 建立 nC_{60} 在多介质和水体间的分配模型, 并研究环境条件对 nC_{60} 毒性的影响, 研究 nC_{60} 与环境污染形成复合体系时的毒性。另外还需加强 nC_{60} 在环境中可能的生物蓄积和食物链传递的研究。

(3) 明确 nC_{60} 的毒性产生机制, 进而阐述各种方法制备的 nC_{60} 的毒性差异。建立 nC_{60} 对水环境和土壤中关键生物种群 (包括微生物、无脊椎动物、脊椎动物等) 的毒理动力学机制, 寻找合适的表征 nC_{60} 生物毒性的生物标记物。

参考文献

- [1] Editorial. Nat. Nanotechnol., 2006 1(3): 151—151
- [2] Swiss Reinsurance Company (Swiss). Nanotechnology—Small Matters. Many Unknowns. 2004. [2007-06-22]. <http://www.swissre.com>
- [3] Health and Safety Executive (UK). Nanomaterials a Risk to Health at Work? 2004 (October). [2007-06-22]. <http://www.hsl.gov.uk>
- [4] UK Government Research (UK). Characterising the Potential Risks Posed by Engineered Nanoparticles. Progress Report, 2006 (October). [2007-06-22]. <http://www.defra.gov.uk>
- [5] Brunfel G. Nature, 2003, 424(17): 246—248
- [6] Colvin V L. Nat. Biotechnol., 2003, 21(10): 1166—1170
- [7] Service R F. Science, 2003, 300(11): 243—243
- [8] Service R F. Science, 2005, 310(9): 1609—1609
- [9] Service R F. Science, 2006, 314(6): 45—45
- [10] Stone V, Donaldson K. Nat. Nanotechnol., 2006, 1(1): 23—24
- [11] Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Science, 2006, 311(3): 622—627
- [12] Maynard A D, Aitken R J, Butz T, et al. Nature, 2006, 444(16): 267—289
- [13] 汪冰(Wang B), 丰伟悦(Feng W Y), 赵宇亮(Zhao Y L)等. 中国科学(B) (Science in China Series B: Chemistry), 2005, 35(1): 1—10
- [14] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Environ. Health Persp., 2005, 113(7): 823—839
- [15] Kroto H W, Heath J R, O'Brien S C, et al. Nature, 1985, 318(14): 162—163
- [16] Krätschmer W, Lamb L D, Fostiropoulos K, et al. Nature, 1990, 347(27): 354—358
- [17] Nakamura E, Isobe H. Accounts Chem. Res., 2003, 36(11): 807—815

- [18] Giacalone F, Martin N. *Chem. Rev.*, 2006 106(12): 5136—5190
- [19] Meneely G. [2007-06-22]. <http://www.samlltimes.com/articles/article-display.cfm?article-id=269050&p=109>
- [20] Ruoff R S, Tse D S, Malhotra R, et al. *J. Phys. Chem.*, 1993 97(13): 3379—3383
- [21] Ashcroft J M, Tsybolski D A, Wilson L J, et al. *Chem. Commun.*, 2006 3004—3006
- [22] Iwamoto Y, Yamakoshi Y. *Chem. Commun.*, 2006 4805—4807
- [23] Yoshida Z, Takekuma H, Takekuma S, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1994 33: 1597—1599
- [24] Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(42): 12803—12809
- [25] Brant J A, Labille J, Bottero J Y, et al. *Langmuir*, 2006, 22(8): 3878—3885
- [26] Cheng X K, Kan A T, Tomson M B. *J. Chem. Eng. Data* 2004, 49(3): 675—683
- [27] Deguchi S, Mukai S, Tsudome M, et al. *Adv. Mater.*, 2006 18: 729—732
- [28] Deguchi S, Alargova R G, Tsuji K. *Langmuir*, 2001, 17(19): 6013—6017
- [29] Andrievsky G V, Kosevich M V, Vovk O M, et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 12(21): 1281—1282
- [30] Skokan E V, Privalov V I, Arkhangelski I V, et al. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103(12): 2050—2053
- [31] Fortner J D, Lyon D Y, Sayes C M, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2005 39(11): 4307—4316
- [32] Cheng X K, Kan A T, Tomson M B. *J. Nanopart. Res.*, 2005 7: 555—567
- [33] Powers K W, Brown S C, Roberts S M, et al. *Toxicol. Sci.*, 2006, 90(2): 296—303
- [34] Powers K W, Palazuelos M, Roberts S M, et al. *Nanotoxicology* 2007, 1(1): 42—51
- [35] Karakoti A S, Hench L L, Seal S. *JOM*, 2006 58(7): 77—82
- [36] Gregory J. *Particles in Water Properties and Processes*. London: Taylor and Francis, 2006. 58—62
- [37] Xia X R, Monteiro-Riviere N A, Riviere J E. *J. Chromatogr. A* 2006, 1129: 216—222
- [38] Schaff P, Risch K, Prylutsky Y I, et al. *Carbon* 2004, 42: 1203—1206
- [39] Dhawan A, Taurozi J S, Tarabara V V, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2006 40(23): 7394—7401
- [40] Andrievsky G V, Klochkov V K, Borzuyh A B, et al. *Chem. Phys. Lett.*, 2002, 364: 8—17
- [41] Brant J, Lecoanet H, Wiesner M, et al. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39(17): 6343—6351
- [42] Alargova R G, Deguchi S, Tsuji K. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123(43): 10460—10467
- [43] Labille J, Brant J, Vilčič R, et al. *Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct.*, 2006 14: 307—314
- [44] Ludwig R, Appellagen A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 811—815
- [45] Rudalevige T, Francis A H, Zand R. *J. Phys. Chem. A*, 1998 102(48): 9797—9802
- [46] Lecoanet H F, Wiesner M R. *Environ. Sci. Technol.*, 2004, 38(16): 4377—4382
- [47] Lecoanet H F, Bottero J Y, Wiesner M R. *Environ. Sci. Technol.*, 2004, 38(19): 5164—5169
- [48] Cheng X K, Kan A T, Tomson M B. *J. Mater. Res.*, 2005, 20(12): 3244—3254
- [49] Mchedlov-Petrosyan N O, Klochkov V K, Andrievsky G V. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1997, 93(24): 4343—4346
- [50] Brant J, Lecoanet H, Wiesner M R. *J. Nanopart. Res.*, 2005, 7: 545—553
- [51] Chen K L, Elimelech M. *Langmuir*, 2006, 22(26): 10994—11001
- [52] Cheng X K, Kan A T, Tomson M B. *J. Nanopart. Res.*, 2005, 7: 555—567
- [53] Dugan L L, Turetsky D M, Du C, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 9434—9439
- [54] Lin A M Y, Chyi B Y, Ho L T, et al. *J. Neurochem.*, 1999, 72: 1634—1640
- [55] Bosi S, Ros T D, Prato M, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38: 913—923
- [56] Jia G, Wang H F, Zhao Y L, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(5): 1378—1383
- [57] Fiorito S, Serafino A, Andreola F, et al. *Carbon*, 2006, 44: 1100—1105
- [58] Sayes C M, Fortner J D, Colvin V L, et al. *Nano Lett.*, 2004, 4(10): 1881—1887
- [59] Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, et al. *Toxicol. Sci.*, 2006, 91(1): 173—183
- [60] Isakovic A, Markovic Z, Trajkovic V, et al. *Biomaterials* 2006, 27: 5049—5058
- [61] Sayes C M, Gobin A M, West J L, et al. *Biomaterials* 2005, 26: 7587—7595
- [62] Scrivens W A, Tour J M, Creek K E, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116(10): 4517—4518
- [63] Gharbi N, Pressac M, Moussa F, et al. *Nano Lett.*, 2005, 5(12): 2578—2585
- [64] Levi N, Hantgan R R, Prasad G L, et al. *J. Nanobiotech.*, 2006, 4: 14—14
- [65] Fortner J D, Lyon D Y, Hughes J B, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(11): 4307—4316
- [66] Lyon D Y, Fortner J D, Sayes C M, et al. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005 24(11): 2757—2762
- [67] Lyon D Y, Adams L K, Alvarez P J J, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40(14): 4360—4366
- [68] Lovren S B, Klaper R. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2006, 25(4): 1132—1137
- [69] Oberdörster E, Zhu S Q, Blickey T M, et al. *Carbon* 2006, 44: 1112—1120
- [70] Zhu S Q, Oberdörster E, Haasch M L. *Mar. Environ. Res.*, 2006, 62: S5—S9
- [71] Oberdörster E. *Environ. Health Persp.*, 2004, 112(10): 1058—1062
- [72] Andrievsky G, Klochkov V, Derevyanchenko L. *Fuller. Nanotub. Car. Nanostruct.*, 2005, 13: 363—376