

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.06.2016092802

马萍,程飞,李慧珍,等.聚二甲基硅氧烷被动加标法在水毒性测试中的应用:现状与进展[J].环境化学,2017,36(6):1177-1188.

MA Ping, CHENG Fei, LI Huizhen, et al. PDMS-based passive dosing method and its application in aquatic toxicity tests: Status and perspectives [J]. Environmental Chemistry 2017, 36(6): 1177-1188.

聚二甲基硅氧烷被动加标法在水毒性测试中的应用:现状与进展*

马萍^{1,2,3} 程飞^{1,2,3} 李慧珍² 游静^{2**}

(1. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室,广州,510640; 2. 暨南大学环境学院,广东省环境污染与健康重点实验室,广州市环境暴露与健康重点实验室,广州,510632; 3. 中国科学院大学,北京,100049)

摘 要 被动加标(Passive dosing)可维持水中疏水性化合物的恒定浓度,利于准确测定化合物的溶解度、分配系数和毒性效应.相对于传统的主动加标,被动加标可及时补充由于壁吸附、挥发、光解、水解、生物吸收等因素引起的受试化合物损失,维持测试体系中化合物浓度的稳定,增强数据的准确性.聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)是最常用的加标介质,有良好的生物相容性,已成功用于多种化合物的细胞和生物个体毒性测试.然而在被动加标的发展中也遇到系列瓶颈问题.PDMS被动加标的应用局限于中等疏水性的化合物($\lg K_{ow} = 3-6$),如多环芳烃(PAHs)和部分多氯联苯(PCBs),却极少用于高疏水性化合物($\lg K_{ow} > 6$);主要用于小体系、短时间实验,而与环境更相关的大体系、长时间暴露的应用尚待研究;缺乏定量方法,难以估算测试体系中PDMS对化合物损失的补偿能力;被动加标方法缺乏标准化.因此,未来发展需加强研究化合物从PDMS释放与水体浓度补充的关联,在理论研究基础上完善被动加标技术规范,发展适用于大体系、长时间暴露的被动加标方法.此外,通过被动加标方法有效地结合原位采样与实验室毒性测试,利于在生态风险评估中综合考虑污染物生物可利用性的影响.

关键词 聚二甲基硅氧烷,被动加标,毒性测试,效应导向分析,疏水性有机化合物.

PDMS-based passive dosing method and its application in aquatic toxicity tests: Status and perspectives

MA Ping^{1,2,3} CHENG Fei^{1,2,3} LI Huizhen² YOU Jing^{2**}

(1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510640, China; 2. School of Environment, Guangzhou Key Laboratory of Environmental Exposure and Health, and Guangdong Key Laboratory of Environmental Pollution and Health, Jinan University, Guangzhou, 510632, China; 3. University of Chinese Academy of Science, Beijing, 100049, China)

Abstract: Passive dosing has been used to maintain constant concentrations of hydrophobic organic compounds in water, resulting in more accurate measurements of their solubility, partitioning coefficients and adverse effects. Compared with traditional active dosing, passive dosing is advantageous in compensating the loss of chemicals in water due to glassware adsorption, volatilization, photolysis, hydrolysis, and organism uptake etc. As a result, more constant water concentrations and more accurate measurements can be achieved. Polydimethylsiloxane (PDMS) is

2016年9月28日收稿(Received: September 28, 2016).

* 国家自然科学基金(41473106, 41503091)和广东省自然科学基金(2015A030310219, 2016A030312009)资助.

Supported by the National Science Foundation of China (41473106, 41503091) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030310219, 2016A030312009).

** 通讯联系人, E-mail: youjing@jnu.edu.cn

Corresponding author, E-mail: youjing@jnu.edu.cn

the most commonly used material for passive dosing. With high biocompatibility, PDMS has been successfully used for dosing various compounds into water, yet the application of the method has some limitations. So far, passive dosing has been mainly used for chemicals with $\lg K_{OW}$ ranging from 3 to 6, such as polycyclic aromatic hydrocarbons and some polychlorinated biphenyls. On the other hand, its application for highly hydrophobic compounds with $\lg K_{OW}$ values over 6 was limited. Most studies using passive dosing were conducted in small testing systems with short exposure time, although long term testing in large systems is more environmentally relevant. Moreover, there is no method for quantifying the capacity of PDMS to buffer chemical loss in water, neither the standard guide for using passive dosing methods. Therefore, future development of passive dosing methods should consider the following aspects, including more studies on the relationship between release of chemicals from PDMS and their compensation in water, improving standard guides on the application of passive dosing on the basis of theoretical research, and establishing new methods for long-term and large-system testing. In addition, incorporating in situ sampling and laboratory toxicity testing by using passive sampling and passive dosing simultaneously would help to take bioavailability into consideration in ecological risk assessment.

Keywords: PDMS, passive dosing, bioassay, effect-directed analysis, hydrophobic organic compound.

开展污染物水生生态风险评价,往往需要进行水毒性测试,疏水性化合物在水体中溶解度低,容易损失,导致水体暴露浓度持续降低,影响毒性评价准确性^[1].被动加标技术引入如同化合物的“源”的聚合物材料,及时补充水体中损失的疏水性化合物,维持其浓度稳定,为水毒性测试实验提供新的加标方法^[2].本文首先对被动加标技术进行简介,然后探讨其在测试疏水性化合物的理化性质和毒性效应中的应用,其中着重讨论该方法在体内生物实验和体外细胞实验中的应用,并总结了现行被动加标技术存在的问题及可能解决方法,为水毒性测试中被动加标方法的发展提供参考.

1 被动加标技术的简介(Introduction of passive dosing methods)

准确测定污染物的理化参数和毒性直接影响风险评价结果,通常在水体测试体系中以少量有机溶剂为载体加标有机污染物.该方法较适合亲水性化合物,而疏水性化合物则可能通过壁吸附、挥发、降解等损失^[1],导致水浓度显著变化,毒性测试结果不确定性高.为解决这一问题,1999年 Mayer等^[2]提出采用被动加标(Passive dosing)来维持水中污染物浓度恒定.最早用于被动加标的材料为十八烷基硅胶^[2],此后半透膜装置(SPMD)^[3]、聚乙烯(PE)^[4]、聚二甲基硅氧烷(PDMS)都被尝试用作被动加标材料.其中,PDMS因生物相容性好、渗透性强、传质系数小^[5]、吸收作用机理较为明确^[6-7]、可塑性强等优势,应用最广泛.目前已商品化的PDMS材料有纤维^[8]、O型圈式^[9]和膜式^[10],此外由于PDMS可塑性强,还可根据需要涂制成不同形状,如固化在血清瓶底^[11-12],或者涂膜在磁力搅拌子^[13]和96孔板中^[9].

被动加标包括负载(Load)和释放(Release)两个过程.负载是将化合物加载到PDMS等材料上的过程,可在PDMS聚合前或后进行.在制备PDMS聚合物前,将化合物加入聚合物前体,充分搅拌后制膜,膜固化后化合物均匀分布于PDMS中.Kwon等用该方法测定了氯苯和多环芳烃的PDMS-水分配系数^[14]及其在水中的溶解度^[11].另一方面,制备PDMS聚合物后再负载化合物的方法更常用.因为甲醇对疏水性化合物溶解性较好、对膜的溶胀性小且易溶于水,易于后期水洗去除,所以是最常用的负载溶剂.该方法将PDMS聚合物浸泡在污染物的甲醇溶液中,化合物分配载入PDMS,优点是平衡后甲醇和PDMS之间的分配系数可知($K_{MeOH/PDMS} = C_{MeOH}/C_{PDMS}$),故可通过调节甲醇中化合物浓度得到所需的PDMS浓度,进一步在后续释放过程中调控水溶液浓度($K_{PDMS/W} = C_{PDMS}/C_W$)^[15].由于甲醇对多数化合物有较好溶解能力,该方法负载效率有限.改进方法将PDMS置于化合物的甲醇溶液中,并不断向体系中加入水迫使疏水性化合物进入PDMS,提高负载效率,一般可达80%以上^[16].

释放是化合物从PDMS解吸到水中的过程,可采用静态和动态两种方式.静态法是将载有化合物的

PDMS 置于水中, 静置状态下达到解吸平衡后进行实验^[17]. 动态法通过搅拌加速解吸, 缩短平衡时间, 但不改变平衡终点^[15]. 疏水性化合物在 PDMS 和水之间的传质受水的扩散界面层厚度影响, 搅拌可以促进解吸速率, 缩短平衡时间. 较短的平衡时间, 使得 PDMS 上化合物可快速释放到水中, 以补充由于挥发、光解、水解等消耗的污染物, 维持水中污染物浓度的恒定. 目前, 动态法应用较为广泛.

2 被动加标技术的应用 (Application of passive dosing methods)

被动加标主要用于测定疏水性化合物的理化参数(如溶解度和分配系数)和毒性效应. 实验准确测定高疏水性化合物的溶解度非常困难, 数据误差巨大, 文献报道同一化合物的溶解度存在数量级差异, 如 Mackay 等^[18]发现文献中的苯并[a]芘的溶解度值从 0.000038—0.0061 mg·L⁻¹不等. 直接加标的情况下, 瓶壁吸附等造成的污染物损失、载体有机溶剂的干扰、测量超低浓度污染物的困难等因素, 都可能引起结果偏差, 而使用被动加标可提高数据准确性. Kwon 等^[11]用被动加标测定了疏水性有机物的溶解度, 首先计算化合物在水中达到溶解度时 PDMS 膜中化合物的对应量, 进而在制备 PDMS 膜时在聚合物前体中加入高于该量的化合物, 最后在膜与水达到解吸平衡后测定污染物的溶解度. 因为被动加标不使用有机溶剂, 避免了有机溶剂导致的化合物增溶和溶解度高估问题. Kwon 等^[11]对比了被动加标方法和经济合作与发展组织(OECD)推荐的柱发生法(Generator column method)测定溶解度的结果, 发现对低疏水性化合物, 二者基本一致, 但是对高疏水性化合物, 被动加标法更准确, 而柱发生法可能高估溶解度. 另外, 柱发生法设备复杂, 工作量大^[19], 因此被动加标法测定有机物的溶解度有更大优势.

被动加标法也可用于测定疏水性化合物的分配系数. 类似于被动采样, 被动加标法测定化合物的 PDMS-水分配系数($K_{\text{PDMS/W}}$)时, 分别测定平衡时膜和水中浓度(C_{PDMS} 和 C_{W}), 并通过其比例得到 $K_{\text{PDMS/W}}$ ^[15]. 在被动加标中 PDMS 释放的化合物可有效补充由于壁吸附和挥发等引起的污染物损失, 使水中污染物浓度测定更准确. 然而高疏水性化合物($\lg K_{\text{ow}} > 6$)在 PDMS 与水之间达到平衡耗时长, 如高氯代 PCBs 的平衡时间为 40 d^[20], 导致水中污染物损失难以及时补充, 测定存在较大误差, $K_{\text{PDMS/W}}$ 计算不准确. 近期, Kwon 等^[14]在自制微体系中短时间内测定高疏水性化合物的 $K_{\text{PDMS/W}}$, 该方法以载有化合物的 PDMS 膜作为供体, 另一张空白膜作为受体, 两张膜之间加入少量水, 其中供体膜和水传质过程的限速步为水和膜扩散界面层, 通过快速搅拌减小扩散界面层厚度, 缩短平衡时间, 使污染物在供体膜、受体膜和膜间水三相之间达到平衡, 然后分析受体膜浓度获得污染物从膜解吸的速率常数, 估算水中污染物浓度, 实现高疏水性化合物的 $K_{\text{PDMS/W}}$ 的测定.

除了污染物的理化性质测定, 在毒性测试(体外细胞毒性测试和体内生物测试, 表 1 和表 2 中维持测试体系中化合物浓度恒定是被动加标方法最主要的应用^[15, 21-22]), 也是本文重点阐述部分. 有机物毒性测试一般采用溶剂加标, 但该方法存在多种弊端, 如引入有机溶剂可能对受试生物产生不良影响, 也可能对化合物起到增溶效果, 引起化合物浓度高于其水中溶解度的现象^[42]. 同时, 溶剂加标得到的只是瞬时浓度, 随暴露时间增加, 体系中化合物浓度由于壁吸附、挥发、光解、水解、生物吸收等因素不断下降^[1]. 反之, 如图 1 所示, 被动加标可避免在测试体系中引入有机溶剂, 而载有化合物的 PDMS 膜在水体中作为“源”, 向水体释放目标物, 维持测试浓度恒定, 获得更准确的毒性数据. 以下分别讨论在体外细胞测试和体内生物测试中被动加标技术的应用.

2.1 体外细胞测试中应用

被动加标在体外细胞测试中主要用于维持体系中污染物浓度恒定, 表 1 列出已开展的被动加标技术在多种细胞系中的应用. Smith 等^[25]最早将 PDMS 被动加标方法用于体外细胞测试, 验证了该方法在多环芳烃细胞测试中的可行性, 为后续实验提供参考. 他们将载有 10 种 PAHs ($\lg K_{\text{ow}} = 3.33—6.43$) 的 O 型圈式 PDMS 放置于多孔板中, 待化合物释放到测试溶液中后开展细胞实验, 研究了不同的 PAHs 在其溶解度时对人体细胞的活性氧形成和细胞分泌单核细胞趋化和激活因子的影响, 发现 PAHs 的毒性效应与其沸点直接相关. 在这个实验中, 被动加标有效地补充细胞实验中孔板吸附、挥发等造成的 PAHs 损失.

表 1 被动加标在体外细胞实验中的应用

Table 1 Application of passive dosing for *in vitro* cell testing

受试细胞 Test cell	目标物 Compound	PDMS 用量 PDMS mass	PDMS 形状 PDMS shape	实验体积 Test volume	实验周期 Test time	毒性终点 Endpoint	实验结论 Conclusion	文献 Reference
虹鳟鱼腮细胞系和肝细胞系 Rainbow trout gill cell line/liver cell line	苯并[a]芘、1,2-二氯苯、1,2,4-三氯苯	27.6 mg	圆片	1.7 mL	96 h	细胞的代谢活性、细胞膜完整性、溶酶体膜的完整性、细胞色素 P450 酶的活性	被动加标可在 72 h 内维持水浓度稳定,被动加标所得半数效应浓度较传统主动加标方法低 1.3—7.0 倍,被动加标更敏感(将被动加标用于细胞系)	[22]
大鼠肝细胞系 Rat liver cell line	苯并[k]荧蒽	10—100 μ L	薄片	2.0 mL	24 h	荧光素酶活性	首次将被动加标用于转移小鼠实验,也是可用于贴壁细胞实验为数不多的加标方法之一	[23]
重组大鼠肝癌细胞 Recombinant rat hepatoma (H4IIE) cells	二噁英类似物	2 mg	圆片	1.0 mL	72 h	芳香烃受体活性	将被动加标用于化学激活荧光表达实验,扩大了被动加标应用范围	[24]
人体细胞(A549 细胞、THP-1 细胞) Human A549 cell and THP-1 cell	10 种多环芳烃	231 mg	O 型环	1.0 mL	>72 h	活性氧形成、细胞分泌单核细胞趋化和激活因子	被动加标可以补充细胞实验中孔板吸附和挥发等造成的损失。	[25]
肾上腺细胞 H295R cells	8 种多氯联苯 5 种多氯联苯醚 3 种有机氯	193 mg	圆片	1.25 mL	48 h	类固醇类激素的产生	体外模拟人体中 POPs 含量进行细胞实验,发现人体中现有的 POPs 水平会干扰肾上腺细胞中类固醇类化合物的产生	[26]
人支气管上皮细胞 Human bronchial epithelial cells	9 种多环芳烃	231 mg	O 型环	1.0 mL	48 h	细胞的免疫调节反应	在维持系统内浓度恒定的情况下,可用体外细胞实验检测化合物对细胞的免疫调节反应	[27]
细菌 Bacteria	6 种多环芳烃	171 μ L	O 型环	1.0 mL	2 h	诱变比例	被动加标结果较主动加标更为敏感(3—33 倍)	[28]
细菌 Bacteria	10 种多环芳烃	231 mg	O 型环	0.26 mL	48 h	PAHs 的诱变活性	被动加标解决了沙门氏菌诱变实验中由于瓶壁吸附、生物吸收等导致的疏水性化合物浓度下降的现象,恒定的实验浓度为研究生物转化提供可能,扩大了沙门氏菌诱变实验的应用范围	[29]
发光细菌 <i>Vibrio fischeri</i>	荧蒽、苯并[a]芘、危、非	11.6 mg	圆片	0.5 mL	0.5 h	发光抑制	对比被动加标和主动加标半数抑制浓度(EC50),被动加标所得结果更敏感,证明维持水中浓度恒定的重要性。	[30]
少动鞘氨醇单胞菌 Bacterium, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	非、荧蒽	231 mg	O 型环	1.0 mL	31.7 h	降解产物 CO ₂ 的生成量	被动加标可以维持小体系生物转化实验中化合物浓度稳定(有生物降解)	[9]

表 2 被动加标在体内生物毒性测试中的应用
Table 2 Application of passive dosing for *in vivo* toxicity testing

模式生物 Test organism	目标物 Compound	PDMS 用量 PDMS mass	PDMS 形状 PDMS shape	实验体积 Test volume	实验周期 Test time	毒性终点 Endpoint	实验结论 Conclusion	文献 Reference
绿藻 Green algae	8 种多环芳烃	0.65 g	O 型环	130 mL	72 h	生长抑制	对比被动加标和主动加标情况下 PAHs 对生物的毒性,发现主动加标实验结果不准确	[31]
栅藻 Green algae <i>Scenedesmus vacuolatus</i>	沉积物萃取物	沉积物等效质量的 PDMS	O 型环	2.0 mL	24 h	增殖抑制	被动加标用于效应导向分析中,寻找主要致毒污染物,发现三氯生是沉积物主要致毒污染物,而非主动加标发现的 PAHs	[32]
海洋硅藻 <i>P. tricornutum</i>	野外沉积物萃取物	1.75 g	条状	50 mL	72 h	硅藻的生长抑制	原位被动采样和实验室被动加标相结合来评价毒污染物的生态毒性	[33]
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	邻苯二甲酸丁基基酯	1.726 g	管状	1.5 mL	24 h	急性致死率	被动加标可维持水急性毒性实验中化合物浓度在 24 h 内稳定	[21]
丰年虾 <i>Artemia franciscana</i>	野外沉积物萃取物中的 7 种多环芳烃	500 mg	固化在瓶底	5.0 mL	72 h	存活率	将被动加标应用于海水时应考虑盐析效应,该沉积物中 PAHs 对丰年虾无毒性效应	[34]
甲壳动物 Crustacean	8 种多环芳烃	0.91 g	O 型环	20 mL	7 d	繁殖	对比被动加标和主动加标情况下 PAHs 对生物的毒性,发现主动加标实验结果不准确	[31]
底栖片脚类生物 Benthic amphipods	11 PAHs	5.0 g	固化在广口瓶底	60 mL	15 d	致死率	被动加标用于研究几种化合物的复合毒性效应	[35]
大型蚤 <i>D. magna</i>	10 种多环芳烃	500 mg	固化在瓶底	10 mL	48 h	大型蚤不动	搅动可以加速 PDMS-水之间达到平衡,被动加标可用于小体系生物实验	[15]
斑马鱼、大型蚤、丽鱼科鱼 Zebrafish, <i>D. magna</i> , and cichlids	非、蒽、荧蒽、芘	15 g	固化在瓶底	1000 mL	16 d	生物积累量	捕食会增加生物对疏水性化合物的吸收速率,但是不改变平衡时生物积累量	[17]
斑马鱼胚胎 Zebrafish embryo	10 种多环芳烃	500 mg	固化在瓶底	5.0 mL	48 h	死亡率	PDMS 对鱼胚胎的孵化无影响,被动加标为研究疏水性化合物的毒性效应提供了经济可行的方法	[36]
斑马鱼胚胎 Zebrafish embryo	非	0.22 g	O 型环	2.0 mL	120 h	致死率、鱼鳞的膨胀	PDMS 对受试生物无毒性,被动加标可以提供一系列浓度梯度的水溶液,为后续实验提供基础	[37]
日本青鳉鱼胚胎 Japanese medaka embryo	葱烯	3.6—6.0 mg	薄膜	15 mL	17 d	胚胎青囊病的半数效应浓度	与静态和半静态实验相比,被动加标所得半数效应浓度更为准确	[38]
斑马鱼幼鱼 Larval zebrafish	非	3.0 g	O 型环	300 mL 流动换水系统	30 d	死亡率、生长长度	被动加标和流动换水系统结合,可以维持水中 HOCs 浓度较长时间稳定	[39]
弹尾虫 Springtails	非	500 mg	固化在瓶底	10 mL 空气	7 d	存活率	被动加标可控制水浓度恒定,发现非和干旱对弹尾虫的毒性与非暴露水平有关,在高浓度时为协同作用,低浓度时为独立作用	[40]
土壤弹尾目昆虫 Springtails	非	—	固化在瓶底	20 mL	7 d	存活率、含水率	非和干旱均会诱导热休克蛋白的转录,为相加作用	[41]

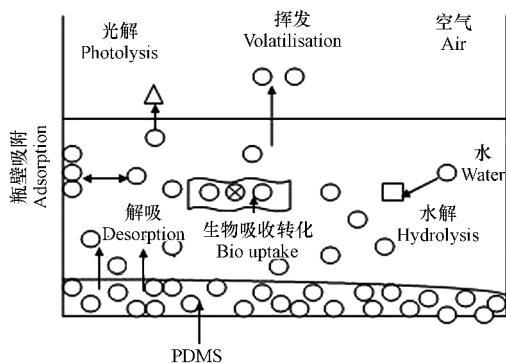


图 1 被动加标体系中化合物损失与补充途径^[43]

Fig.1 Pathways for the loss and compensation of chemicals in a passive dosing system^[43]

在进一步的研究中,他们对比主动和被动加标的差异性.Smith 等^[30]用 PDMS 膜片为被动加标材料,研究了 5 种 PAHs 对发光菌发光抑制的影响,发现被动加标和主动加标获得的毒性数据显著不同,如被动加标测试中发光菌对蒎和菲的敏感性分别是主动加标的 3.4 和 12.4 倍.Kramer 等^[22]研究了 3 种 PAHs 对虹鳟鱼的腮和肝细胞系的毒性效应,比较了被动和主动加标的结果,获得与 Smith 等^[30]类似的结论,即被动加标所得到的半数效应浓度值(EC50) 较主动加标方法低 1.3—7.0 倍.Escher 等^[24]将被动加标应用于萤光素酶(CAFLUX) 实验,利用基因技术改造大鼠肝癌细胞株,其芳香烃受体被激活通过萤光素酶表达,对二噁英类似物有强敏感性.结果显示,对低疏水性化合物,被动与主动加标法所得 EC50 无明显差异,但对高疏水性化合物,被动加标更准确.这主要是因为主动加标的暴露过程中,测试溶液中污染物浓度不断下降,而计算 EC50 仍用初始浓度,导致 EC50 结果偏高,毒性效应被低估(图 2).

PDMS 被动加标方法开展的毒性测试也逐步扩展到健康领域的研究,使用人体细胞进行测试.Allan 等^[44]分析了人体植入硅胶中持久性有机污染物(POPs, 包括 8 种多氯联苯、5 种多溴联苯醚和 3 种有机氯农药) 的浓度水平,发现人体内 POPs 水平与年龄正相关,他们进一步将原位被动采样和被动加标细胞毒性测试结合,从分子水平上探讨环境污染物对人体健康的影响^[44].在此基础上,Gilbert 等^[26]进一步研究了上述化合物对人体肾上腺细胞的影响,通过载入一定浓度的污染物在 PDMS 膜上,模拟人体中 POPs 水平,通过被动加标的方法用体外细胞实验评价了人体内 POPs 水平对肾上腺细胞的影响,结果说明人体内已有 POPs 水平会干扰肾上腺细胞中类固醇类化合物的产生.开展人体原位被动采样十分困难,更可行的方法为通过血液、尿液或者其他环境介质中获得的人体浓度,而后选取合适的细胞株,以被动加标的方案开展生物测试.Oostingh 等^[27]用被动加标方法评价了 9 种 PAHs 在其最大溶解度时对人支气管上皮细胞免疫调节反应的影响.

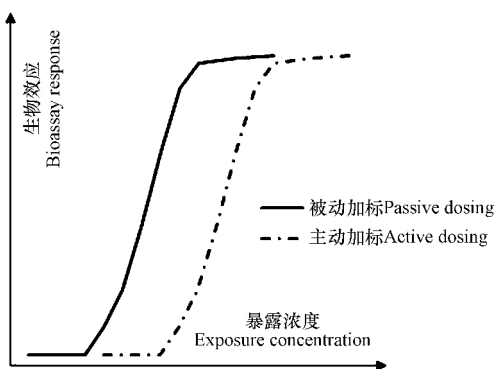


图 2 主动加标与被动加标毒性效应曲线对比^[30]

Fig.2 A comparison of dose-response curves between active and passive dosing methods^[30]

随着实验技术的逐步完善,PDMS 被动加标用于细胞测试之外,也用于细菌实验^[23, 28](表 1).Smith 等^[29]将被动加标用于沙门氏菌诱变实验,研究 10 种 PAHs 在其最大溶解度时对沙门氏菌的诱变活性,

并且同时对比了主动加标结果,发现主动加标体系中,由于有机溶剂的增溶效果,水溶液中苯并[a]芘的浓度超过其溶解度,且测试体系中实际浓度与理论浓度相差较大,剂量效应曲线与被动加标差别较大。在被动加标测试中,载有化合物的 O 型环 PDMS 可及时补充实验中由于瓶壁吸附、生物吸收等导致的疏水性化合物浓度下降,实验结果精密度高、重复性较好。此外,被动加标技术也用于研究细菌对菲和荧蒹的降解^[9]。该方法可维持相对稳定的水浓度,为研究细菌的生物降解提供了新方法。另外,有机物可在水环境中降解,从而影响母体化合物的毒性效应,而疏水性化合物水浓度的不稳定,进一步限制了其生物转化的研究。研究生物转化最直接的方法是测定体系中母体化合物的消耗量或转化产物的生成量,溶剂主动加标时体系中母体化合物浓度可能因多种因素影响出现显著下降,使得研究化合物的生物转化遇到困难。被动加标方法可及时补充消耗的污染物,维持水中自由溶解态浓度恒定^[9],为研究生物转化提供可靠方法。Smith 等^[9]用被动加标方法成功研究了少动鞘氨醇单胞菌对菲和荧蒹的生物转化速率。

整体而言,PDMS 被动加标在体外细胞测试应用中主要集中在短时间(0.5—96 h)和小体系(0.26—1.7 mL),目前已有的研究基本集中在 PAHs 上。被动加标的主要目的是及时补充损失的污染物,保持恒定水浓度,为后续实验提供可能。此外 PDMS 被动加标方法中膜和水之间遵循平衡分配定律,在体积小、浓度低的情况下,污染物的水浓度难以测定的情况下,可通过 PDMS 膜浓度和 $K_{PDMS/W}$ 间接估算水浓度。

2.2 体内生物测试中的应用

被动加标也被用于个体生物毒性测试(表 2)。除了与体外细胞实验类似,被动加标被用于 PAHs 等已知化合物的毒性测试外,体内生物测试的目标物还扩大到包括野外沉积物萃取物。

2.2.1 急性毒性测试

Smith 等^[15]最早将 PDMS 被动加标法用于体内生物实验,测定了萘和菲对大型蚤的 EC_{50} 值,并发现所得结果低于早期数据库中的数值,说明被动加标可避免主动加标测试中毒性被低估的问题。此后,PDMS 被动加标方法被用于不同实验体系,例如急性毒性实验中,Seiler 等^[36-37]用被动加标研究 PAHs 对斑马鱼胚胎致死率和胚胎凝结的影响,发现 PDMS 膜自身对斑马鱼胚胎无毒性,该方法可维持恒定的水浓度,为研究化合物对斑马鱼胚胎的毒性机制提供了一种新的可靠方法。Kwon 等^[21]用被动加标法获得水中稳定的邻苯二甲酸丁基酯浓度,并测定该化合物对秀丽隐杆线虫的急性致死率。Bragin 等^[31]比较主动和被动加标测定 8 种 PAHs 对绿藻毒性,发现主动加标结果存在较大误差。考虑盐析效应后,被动加标也可应用于海水介质中毒性测试。Rojo-Nieto 等^[34]将被动加标用于海水测试体系中,评价了野外沉积物中 PAHs 对丰年虾的毒性效应,这一研究将被动加标应用范围扩大到海洋环境中。Claessens 等^[33]将原位被动采样和实验室被动加标相结合,在实验室评估了野外海洋沉积物的生态毒性。

2.2.2 慢性毒性测试

慢性毒性测试在评价污染物的毒性效应时具有重要意义,但实验周期长。使用传统的主动加标,疏水性化合物浓度往往随暴露时间延长而显著降低,使得开展疏水性化合物的慢性毒性测定遇到很大挑战,而被动加标方法可部分缓解慢性毒性实验中化合物浓度降低的问题。Kiparissis 等^[38]分别用静态、半静态、被动加标的方法研究萘对日本青鳉鱼胚胎的毒性效应,实验周期为 17 d,以胚胎青囊病 EC_{50} 为毒性终点,发现被动加标法所得 EC_{50} 最低,而静态、半静态方法所得 EC_{50} 值均超过萘在水中的溶解度。这是因为溶剂增加了水中化合物的溶解度。Butler 等^[39]用被动加标结合流动换水系统开展了 30 d 的菲对斑马鱼幼鱼的生长及死亡的影响研究,成功将被动加标用于大体系长时间生物实验,拓宽了被动加标应用范围,这也是迄今为止被动加标方法在水毒理实验中暴露时间最长的测试。被动加标方法在慢性毒性实验中应用案例较少,主要是慢性毒性实验中化合物损耗较多,补充较困难,与流动换水系统结合解决了这一困扰,为后续长时间大体系生物测试提供新思路。然而,PDMS 被动加标方法在慢性毒性实验中应用的化合物局限于特定范围的 PAHs($\lg K_{ow} = 3-6$),对其他化合物的应用有待开展。

被动加标被用于土壤生物的慢性毒性测试。Holmstrup 等^[41]用被动加标研究菲和干燥胁迫的情况下,弹尾虫在 7 d 实验周期内的生理和分子反应的影响,发现菲和干燥在诱导热休克蛋白转录方面的联合作用机制为相加。Mayer 等^[45]在气相中应用被动加标,通过 PDMS 膜与空气的平衡,得到恒定的空气浓度,研究 10 种 PAHs 对弹跳虫致死率的影响。该研究首次将被动加标用于气体中,扩大了被动加标的

应用范围,也为气相介质中疏水性化合物加标提供新方法。

被动加标方法在体内生物测试中应用还包括研究疏水性化合物的生物积累时,维持体系中恒定的自由溶解态浓度,并及时补充由于生物积累降低的部分^[46]。Ter Laak 等^[46]用被动加标维持水中浓度恒定,对比了夹杂带丝蚓和固相微萃取纤维对芘和苯并[b]荧蒽的积累,成功将被动加标用于生物积累实验。Xia 等^[17]用被动加标方法研究摄食对生物积累的影响,模拟化合物在食物链中的传递,发现摄食会加快生物对疏水性化合物的吸收速率,但是不改变平衡时生物积累量,该实验体系较大(1 L)、实验周期较长(16 d),为将被动加标用于长时间大体积暴露实验提供参考。

2.3 效应导向分析(Effect-directed analysis, EDA) 中的应用

效应导向分析法将化学分析与生物毒性效应测试相结合,以毒性测试结果指导引起毒性效应物质的分离与鉴定,最终确定样品的毒性效应和主要致毒有机物^[47]。EDA 方法主要分为污染物的萃取、分离、毒性测试、毒性确认等 4 个步骤^[48],目前常用耗竭式萃取方法获得全沉积物浓度,通过液相色谱将沉积物萃取物分为不同组分,而后通过溶剂加标方法将各组分加入到生物毒性测试体系中,对表现出毒性效应的组分进一步分离和毒性测试,最终找到主要致毒有机污染物,再通过标准样品进行毒性确认。

目前,限制 EDA 方法应用的主要问题是缺少可行的萃取和加标方法。常用的耗竭式萃取和溶剂加标方法带来很多不确定性,如 Schmitt 等^[49]用 EDA 方法评价全沉积物萃取物对淡水螺的毒性,发现全沉积物溶剂萃取方法会高估污染物对淡水螺的毒性效应。这些说明有必要将生物可利用性引入到 EDA 实验中。Brack 等^[50]建议用生物可利用性浓度代替全沉积物浓度进行 EDA 实验,所得结果可以更准确反映沉积物对生物的毒性,从而更准确鉴定主要致毒物质。同时,有研究者^[51]将被动加标方法和效应导向分析结合,通过液相色谱将沉积物萃取物分为不同组分,载入到 PDMS 膜上,通过被动加标将污染物释放到测试体系中,模拟沉积物向水体释放污染物过程,探究不同组分对生物的影响,寻找主要致毒污染物。该结果与传统溶剂加标(二甲基亚砜, DMSO)的结果对比,二者均发现一些极性化合物,例如三氯生可能是致毒污染物。主动溶剂加标还筛选出非极性的 PAHs,反之,被动加标测试中 PAHs 对毒性效应无显著贡献,这也说明主动加标可能高估这类污染物的毒性。在主动加标情况下,体外细胞实验中测试溶液中的血清蛋白和较强吸附作用的塑料孔壁对化合物的吸附,以及体内生物测试中沉积物颗粒或者食物都可能对毒性评估造成偏差^[52]。因此,将考虑生物可利用性的萃取方法(如被动采样)与考虑平衡分配的被动加标结合^[50],寻找主要致毒污染物,是被动加标在 EDA 中应用的一个趋势。目前被动加标在 EDA 中的运用基本局限在烃类和 PAHs^[32],而实际环境中污染物种类繁多,对一些平衡时间过长的化合物相对适用性较弱^[53]。EDA 中使用被动加标,为保证在整个实验期间化合物在 PDMS 等聚合物中无显著损失,该聚合物对测试化合物的亲和能力应该至少 10 倍于一般溶剂^[54],这需要有必要进一步优化 PDMS 吸附材料自身的物性参数和构型。

3 PDMS 被动加标存在的问题及解决方法(Challenges of passive dosing methods and the solutions)

表 3 对比了两种加标方法的优缺点。主动加标操作简单,所得结果便于与数据库中数值对比,但是主动加标适合极性化合物,对非极性化合物适用性差,且引入有机溶剂可能引起化合物在水中溶解度增大以及对生物产生毒性效应。另一方面,被动加标可避免在实验体系引入有机溶剂,作为化合物的源的 PDMS 可塑性强、生物相容性好、吸收作用机理明晰,适用于不同实验体系。此外,直接测定痕量水浓度较难的情况下,还可通过 PDMS 膜浓度和 $K_{\text{PDMS/W}}$ 间接估算水浓度。如表 3 所示,被动加标也存在一定缺点,如该方法化合物的应用范围较窄,主要适用于中等疏水性化合物,局限于小体积、短时间实验。此外,对 PDMS 中污染物释放机制的研究不足。

3.1 PDMS 被动加标应用范围窄

目前已报道的被动加标的应用主要局限于中等疏水性的化合物($\lg K_{\text{OW}} = 3-6$),如 PAHs 和部分 PCBs,对高疏水性化合物的应用稀少^[10, 43, 45]。被动加标应用范围多局限于塑料微孔板、血清瓶等较小的实验体系^[25, 45, 55],在更具环境价值的大体系实验中应用较少;应用对象主要是细胞或体积较小的生物^[21, 37-38],而鱼类等更具价值的大型生物应用较少。目前常见报道多局限于急性毒性实验,慢性毒性实验中报道较少。在短时间小体系实验中,化合物由于挥发、瓶壁吸附等损失量较少,PDMS 膜解吸化合物

的量足够及时补充损失的量;但是在大体系统验中,瓶壁吸附、挥发的量较大,可能存在解吸速度和污染物在水相中的传质速度较慢无法及时补充的情况.尤其是对一些解吸速度较慢,但是降解速度较快的化合物,这是被动加标应用于大体系统长时间生物实验时遇到的问题.

表 3 被动加标和主动加标优缺点对比

Table 3 Advantages and disadvantages of passive dosing and active dosing methods

	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
被动加标 Passive dosing	解吸速率快,及时补充体系中消耗部分污染物,维持恒定水浓度,获取更准确的毒性测试数据	应用多局限于小体积短时间实验,对更具环境价值的大体积实验应用较少
	PDMS 可塑性强、生物相容性好、对化合物作用机理为吸收	仅适用于中等疏水性化合物,在高疏水性化合物中应用较少
	应用范围广,适用于各种实验体系	缓冲能力未定量
	是被动采样的逆过程,可以和原位被动采样结合	用于大体积生物实验时需与流动换水装置结合,装置复杂
	水中浓度不易直接测定时,可通过平衡分配系数间接得到水浓度	
主动加标 Active dosing	以有机溶剂作为载体将化合物引入实验体系,操作简单	有机溶剂会引起化合物在水中溶解度增大
	主动加标数据较多,所得结果可以与数据库中对比	对极性化合物适用性较好,疏水性化合物趋向脱离水体,水中浓度不稳定,结果不可信

另一方面,PDMS 用于疏水性化合物生物效应研究时,由于生物实验需在静置条件下完成,实验过程中无法通过搅拌促进 PDMS 膜的释放,也可能出现 PDMS 解吸较慢,无法及时补充生物消耗部分污染物,导致水中污染物自由溶解态浓度显著下降.这种情况下,仅靠被动加标方法无法维持水中浓度恒定,可将被动加标和流动换水系统结合.以预加载了目标化合物的 PDMS 膜于流动换水系统进样口,水流通过 PDMS 膜得到高浓度目标化合物的水溶液,通过逐级稀释得到不同浓度梯度化合物. Adolfsson-Erici 等^[56]用被动加标结合流动换水系统在大体系统验中维持了毒死蜱、p,p'-滴滴涕等 9 种化合物长时间浓度恒定,实验中用商品化的硅胶集成管为核心体系,通过循环泵来实现水在硅胶集成管和实验体系之间的循环,维持水中浓度恒定.这一方法的实质是通过硅胶集成管增加化合物在体系中与水平衡的 PDMS 的量,通过循环泵实现水流在 PDMS 集成管中循环,促进 PDMS 膜中化合物解吸,从而增加解吸下来化合物量,维持水中浓度恒定,在该装置中毒死蜱浓度 8 d 内维持稳定.与流动换水系统的结合,为维持水体中有机氯、有机磷类化合物浓度提供新方法,扩大了被动加标的应用范围,也是被动加标用于大体系统、长时间生物实验的一种解决方案.

3.2 PDMS 缓冲能力(Buffering capacity) 尚未定量

目前没有适合的方法定量 PDMS 缓冲能力,这是被动加标的另一问题,无统一标准规范不同化合物中 PDMS 与水的合适比例,尤其在大实验体系中,存在大量的挥发和瓶壁吸附.若使用的 PDMS 量低于理论需求量,导致 PDMS 解吸量低于体系中损失量,体系中化合物浓度下降.鉴于此,研究者在实验时均使用过量的 PDMS 和加标化合物,不仅增加实验成本,还产生剩余化合物处理问题.因此,准确定量 PDMS 缓冲能力具有重要意义.

在沉积物和生物介质中,疏水性化合物的吸附相主要是沉积物有机碳和生物体脂肪, Li 等^[57]发现化合物的 PDMS-沉积物有机碳分配系数($K_{OC/PDMS}$)和 PDMS-脂肪分配系数($K_{LIP/PDMS}$)为定值,与化合物的疏水性无关.在沉积物有机碳中: $\lg K_{PDMS/W} = \lg K_{OW} - 0.87$, $\lg K_{OC} = \lg K_{OW} - 0.55$, $K_{OC/PDMS} = 2$; 在生物体脂肪中: $\lg K_{LIP/W} = \lg K_{OW} + 0.14$, $\lg K_{PDMS/W} = \lg K_{OW} - 0.87$, $K_{LIP/PDMS} = 10$.即可用沉积物有机碳等效质量的 PDMS 或者生物体脂肪等效质量的 PDMS 进行实验,更好地模拟环境中化合物浓度. Bandow 等^[32]用沉积物有机碳等效质量的 PDMS 进行 EDA 实验,选择合适量 PDMS,为寻找环境中主要致毒污染物提供合适方法.

4 总结与展望(Conclusions and perspectives)

目前,我国淡水环境受到多类有机化合物污染^[58],将环境中化合物转移至受试生物体内常遇到困难,最直接的方法为原位生物测试,但是这一方法受采样条件、受试生物特性、环境中化合物浓度等条件限制,适用性较窄。PDMS 是一种良好的仿生萃取材料,PDMS 被动采样过程可模拟生物对化合物的吸收,且 PDMS 被动采样方法设备简单、价格低廉,目前已成功应用于水体、大气、沉积物、生物、人体中。将被动采样萃取的化合物转移至生物测试体系中常用的方法为有机溶剂萃取和被动加标方法。有机溶剂萃取法会引入有机溶剂到测试体系中^[59]。另外,溶剂萃取作为耗竭式萃取将被动采样获得的所有化合物萃取出,加标进入生物测试体系后会导致化合物比例改变,对疏水性高的化合物有增强效果^[60]。而与被动加标相结合的方法则通过平衡分配原理将萃取化合物转移至测试体系中^[33]。由于被动加标为被动采样逆过程,所得浓度可以真实有效地模拟野外环境中浓度,准确评价污染物的生态毒性。另外,通过原位被动采样获得环境中生物可利用浓度,再利用被动加标将富集在 PDMS 中的污染物释放到水体,模拟野外环境中真实浓度,用于生物毒性实验。这一方法应用范围广,适用于被动采样适用的各种介质,如水体、沉积物、生物体。Gilbert 等^[26]用被动采样获得人体内 POPs 浓度,而后通过被动加标研究对人体肾上腺细胞的影响。Claessens 等^[33]将此方法用于海洋沉积物中,成功评估了海洋污染物对硅藻的生长抑制作用。这一方法也存在一定弊端,仅对一定 K_{ow} 范围内($\lg K_{ow} = 3-6$) 化合物适用,对高疏水性化合物,被动采样在预计时间内无法达到平衡,对低疏水性化合物,化合物在被动加标时可能会发生降解,无法反映沉积物中真实情况,并且在环境中浓度较低的情况下,被动加标方法不敏感。

综上所述,被动加标在环境领域中应用主要包括测定疏水性化合物理化性质和疏水性化合物生物效应。疏水性化合物理化性质主要包括化合物在水中的溶解度和 PDMS-水分配系数。测试的疏水性化合物的毒性效应主要包括体外细胞实验和体内生物实验,在测试过程中维持水中浓度恒定。此外,被动加标也用于研究疏水性化合物的生物转化和生物积累,并在效应导向分析中鉴别主要致毒污染物。最后,被动加标可和被动采样结合,评价污染物的毒性效应。但是,被动加标方法也存在一些缺点,如主要适用中等疏水性的化合物($\lg K_{ow} = 3-6$)、PDMS 缓冲能力尚未定量、大体积长时间生物实验时需要与流动换水系统结合才能实现。被动加标目前局限于小体系短时间的细胞、生物实验,而大体系长时间的测试是其发展一个趋势;同时,结合被动采样和被动加标,便于实现原位采样分析,也是其发展的趋势。

参考文献(References)

- [1] SCHREIBER R, ALTENBURGER R, PASCHKE A et al. How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(8): 1676-1682.
- [2] MAYER P, WERNING J, TOLLS J, et al. Establishing and controlling dissolved concentrations of hydrophobic organics by partitioning from a solid phase[J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(13): 2284-2290.
- [3] HEINIS L J, HIGHLAND T L, MOUNT D R. Method for testing the aquatic toxicity of sediment extracts for use in identifying organic toxicants in sediments[J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(23): 6256-6262.
- [4] PERRON M M, BURGESS R M, HO K T et al. Development and evaluation of reverse polyethylene samplers for marine phase II whole-sediment toxicity identification evaluations[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(4): 749-758.
- [5] KWON J H, WUETHRICH T, MAYER P et al. Development of a dynamic delivery method for in vitro bioassays[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(1): 83-90.
- [6] MAYER P, TOLLS J, HERMENS J L et al. Peer reviewed: Equilibrium sampling devices[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(9): 184A-191A.
- [7] MAYER P, VAES W H, HERMENS J L. Absorption of hydrophobic compounds into the poly(dimethylsiloxane) coating of solid-phase microextraction fibers: High partition coefficients and fluorescence microscopy images[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(3): 459-464.
- [8] OUYANG G, PAWLISZYN J. SPME in environmental analysis[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2006, 386(4): 1059-1073.
- [9] SMITH K E, REIN A, TRAPP S et al. Dynamic passive dosing for studying the biotransformation of hydrophobic organic chemicals: Microbial degradation as an example[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(9): 4852-4860.
- [10] TER LAAK T L, BUSSER F J, HERMENS J L. Poly(dimethylsiloxane) as passive sampler material for hydrophobic chemicals: Effect of chemical properties and sampler characteristics on partitioning and equilibration times[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3859-3866.
- [11] KWON H C, KWON J H. Measuring aqueous solubility in the presence of small cosolvent volume fractions by passive dosing[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(22): 12550-12556.

- [12] ZHAO J , WANG Z , GHOSH S , et al. Phenanthrene binding by humic acid-protein complexes as studied by passive dosing technique [J]. *Environmental Pollution* , 2014 , 184: 145-153.
- [13] JAHNKE A , MAYER P. Do complex matrices modify the sorptive properties of polydimethylsiloxane (PDMS) for non-polar organic chemicals? [J]. *Journal of Chromatography A* , 2010 , 1217(29) : 4765-4770.
- [14] KWON J H , WUETHRICH T , MAYER P , et al. Dynamic permeation method to determine partition coefficients of highly hydrophobic chemicals between poly(dimethylsiloxane) and water [J]. *Analytical Chemistry* 2007 , 79(17) : 6816-6822.
- [15] SMITH KEC , DOM N , BLUST R , et al. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing [J]. *Aquatic Toxicology* , 2010 , 98(1) : 15-24.
- [16] 祁红学, 李慧珍, 游静. 被动加标在水生生态风险评价中的应用——以多氯联苯分配系数的测定为例 [J]. *生态毒理学报* 2015 , 10(2) : 45-55.
QI H X , LI H Z , YOU J. Application of passive dosing methodology in aquatic ecological risk assessment: A case study of measuring partition coefficients of polychlorinated biphenyls [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2015 , 10(2) : 45-55 (in Chinese) .
- [17] XIA X , LI H , YANG Z , et al. How does predation affect the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in aquatic organisms? [J]. *Environmental Science and Technology* , 2015 , 49(8) : 4911-4920.
- [18] MACKAY D , SHIU W Y , MA K C , et al. Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals [M]. Boca Raton: CRC press , 2006: 804-810.
- [19] BILLINGTON J W , HUANG G L , SZETO F , et al. Preparation of aqueous solutions of sparingly soluble organic substances: I. Singlecomponent systems [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 1988 , 7(2) : 117-124.
- [20] YANG Z Y , ZENG E Y , XIA H , et al. Application of a static solid-phase microextraction procedure combined with liquid-liquid extraction to determine poly (dimethyl) siloxane-water partition coefficients for selected polychlorinated biphenyls [J]. *Journal of Chromatography A* , 2006 , 1116(1) : 240-247.
- [21] KWON H C , ROH J Y , LIM D , et al. Maintaining the constant exposure condition for an acute *Caenorhabditis elegans* mortality test using passive dosing [J]. *Environmental Health and Toxicology* , 2011 , 26. <http://dx.doi.org/10.5620/eht.2011.26.e2011015>.
- [22] KRAMER N I , BUSSE F J , OOSTERWIJK M T , et al. Development of a partition-controlled dosing system for cell assays [J]. *Chemical Research in Toxicology* , 2010 , 23(11) : 1806-1814.
- [23] BOOIJ P , LAMOREE M H , LEONARDS P E , et al. Development of a polydimethylsiloxane film-based passive dosing method in the in vitro DR-CALUX[®] assay [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 2011 , 30(4) : 898-904.
- [24] ESCHER B I , MEWBURN B , HERMENS J L , et al. Understanding and controlling bioavailability: Passive dosing of persistent organic pollutants into recombinant cell bioassays [C]. *Dioxin 2012 conference* , Cairns Australia 2012: 27-31.
- [25] SMITH KEC , OOSTINGH G J , MAYER P. Passive dosing for producing defined and constant exposure of hydrophobic organic compounds during in vitro toxicity tests [J]. *Chemical Research in Toxicology* , 2010 , 23(1) : 55-65.
- [26] GILBERT D , MAYER P , PEDERSEN M , et al. Endocrine activity of persistent organic pollutants accumulated in human silicone implants—dosing *in vitro* assays by partitioning from silicone [J]. *Environment International* 2015 , 84: 107-114.
- [27] OOSTINGH G J , SMITH K E , TISCHLER U , et al. Differential immunomodulatory responses to nine polycyclic aromatic hydrocarbons applied by passive dosing [J]. *Toxicology in Vitro* , 2015 , 29(2) : 345-351.
- [28] BOUGEARD C , GALLAMPOIS C , BRACK W. Passive dosing: An approach to control mutagen exposure in the Ames fluctuation test [J]. *Chemosphere* , 2011 , 83(4) : 409-414.
- [29] SMITH K E , HERINGA M B , UYTEWAAL M , et al. The dosing determines mutagenicity of hydrophobic compounds in the Ames II assay with metabolic transformation: Passive dosing versus solvent spiking [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 2013 , 750(1) : 12-18.
- [30] SMITH K E , JEONG Y , KIM J. Passive dosing versus solvent spiking for controlling and maintaining hydrophobic organic compound exposure in the Microtox[®] assay [J]. *Chemosphere* , 2015 , 139: 174-180.
- [31] BRAGIN G E , PARKERTON T F , REDMAN A D , et al. Chronic toxicity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons to algae and crustaceans using passive dosing [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016 , DOI: 10.1002/etc.3479.
- [32] BANDOW N , ALTENBURGER R , STRECK G , et al. Effect-directed analysis of contaminated sediments with partition-based dosing using green algae cell multiplication inhibition [J]. *Environmental Science and Technology* 2009 , 43(19) : 7343-7349.
- [33] CLAESSENS M , MONTEYNE E , WILLE K , et al. Passive sampling reversed: Coupling passive field sampling with passive lab dosing to assess the ecotoxicity of mixtures present in the marine environment [J]. *Marine Pollution Bulletin* , 2015 , 93(1) : 9-19.
- [34] ROJO-NIETO E , SMITH K E , PERALES J , et al. Recreating the seawater mixture composition of HOCs in toxicity tests with *Artemia franciscana* by passive dosing [J]. *Aquatic Toxicology* , 2012 , 120: 27-34.
- [35] ENGRAFF M , SOLERE C , SMITH K E , et al. Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity [J]. *Aquatic Toxicology* , 2011 , 102(3) : 142-149.
- [36] SEILER T B , BEST N , FERNQVIST M M , et al. PAH toxicity at aqueous solubility in the fish embryo test with *Danio rerio* using passive dosing [J]. *Chemosphere* , 2014 , 112: 77-84.

- [37] VERGAUWEN L, SCHMIDT S N, STINCKENS E *et al.* A high throughput passive dosing format for the fish embryo acute toxicity test [J]. *Chemosphere*, 2015, 139: 9–17.
- [38] KIPARISSIS Y, AKHTAR P, HODSON P V *et al.* Partition-controlled delivery of toxicants: A novel *in vivo* approach for embryo toxicity testing [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(10): 2262–2266.
- [39] BUTLER J D, PARKERTON T F, LETINSKI D J *et al.* A novel passive dosing system for determining the toxicity of phenanthrene to early life stages of zebrafish [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 463: 952–958.
- [40] SCHMIDT S N, HOLMSTRUP M, DAMGAARD C *et al.* Simultaneous control of phenanthrene and drought by dual exposure system: The degree of synergistic interactions in springtails was exposure dependent [J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(16): 9737–9744.
- [41] HOLMSTRUP M, SLOTSBO S, SCHMIDT S N *et al.* Physiological and molecular responses of springtails exposed to phenanthrene and drought [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 184: 370–376.
- [42] SESE B T, GRANT A, REID B J. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2009, 72(19): 1168–1180.
- [43] BROWN R S, AKHTAR P, ÅKERMAN J *et al.* Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly (dimethylsiloxane) (PDMS) films [J]. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(20): 4097–4102.
- [44] ALLAN I J, B K K, KRINGSTAD A *et al.* Should silicone prostheses be considered for specimen banking? A pilot study into their use for human biomonitoring [J]. *Environment International*, 2013, 59: 462–468.
- [45] MAYER P, HOLMSTRUP M. Passive dosing of soil invertebrates with polycyclic aromatic hydrocarbons: Limited chemical activity explains toxicity cutoff [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(19): 7516–7521.
- [46] TER LAAK T L, TER BEKKE M A, HERMENS J L. Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(19): 7212–7217.
- [47] BRACK W. Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(3): 397–407.
- [48] BRACK W, SCHMITT-JANSEN M, MACHALA M *et al.* How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390(8): 1959–1973.
- [49] SCHMITT C, VOGT C, MACHALA M *et al.* Sediment contact test with *Potamopyrgus antipodarum* in effect-directed analyses—Challenges and opportunities [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(8): 1398–1404.
- [50] BRACK W, BADOW N, SCHWAB K *et al.* Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(5): 543–549.
- [51] BADOW N, ALTENBURGER R, LUBCKE-VON VAREL U *et al.* Partitioning-based dosing: An approach to include bioavailability in the effect-directed analysis of contaminated sediment samples [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(10): 3891–3896.
- [52] FISCHER F, BOHM L, HOSS S *et al.* Passive dosing in chronic toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 50(17): 9708–9716.
- [53] BRACK W, AIT-AISSA S, BURGESS R M *et al.* Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments—an in-depth overview [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 544: 1073–1118.
- [54] BRACK W, BURGESS R M. Considerations for incorporating bioavailability in effect-directed analysis and toxicity identification evaluation // Effect-directed analysis of complex environmental contamination [M]. Springer, 2011: 41–68.
- [55] BIRCH H, GOULIARMOU V, LÜTZHØFT H C T *et al.* Passive dosing to determine the speciation of hydrophobic organic chemicals in aqueous samples [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(3): 1142–1146.
- [56] ADOLFSSON-ERICI M, ÅKERMAN G, JAHNKE A *et al.* A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests [J]. *Chemosphere*, 2012, 86(6): 593–599.
- [57] LI JY, TANG JYM, JIN L *et al.* Understanding bioavailability and toxicity of sediment-associated contaminants by combining passive sampling with *in vitro* bioassays in an urban river catchment [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32(12): 2888–2896.
- [58] 员晓燕 杨玉义 李庆孝 等. 中国淡水环境中典型持久性有机污染物 (POPs) 的污染现状与分布特征 [J]. *环境化学*, 2013, 32(11): 2072–2081.
- YUAN X Y, YANG Y Y, LI Q X *et al.* Present situation and distribution characteristics of persistent organic pollutants in freshwater in China [J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(11): 2072–2081 (in Chinese) .
- [59] JAHNKE A, MAYER P, SCHAFFER S *et al.* Strategies for transferring mixtures of organic contaminants from aquatic environments into bioassays [J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 50(11): 5424–5431.
- [60] JAHNKE A, WITT G, SCHÄFFER S *et al.* Combining passive sampling with toxicological characterization of complex mixtures of pollutants from the aquatic environment [M]. *Advance in Biochemistry Engineering and Biotechnology*, 2015: 1–37.