

## 飲用水中酚類化合物之分析及 多氯酚導致 DNA 鏈斷裂之研究

王應然\*，林仁混

### 摘 要

針對自然水及飲用水中的酚類化合物，使用檢體中直接乙醯化的技術並以氣相層析質譜儀之選擇性離子偵測法（GC/MS-SIM）做為分析工具，水中酚類化合物濃度僅須每公升含有數 ng 即可被偵測。此分析方法的優點在於具有較佳的回收率及較低的基質干擾。實際分析台灣四個自來水廠的酚類化合物含量其濃度在每公升含 12~312ng 之間。

在眾多的酚類化合物中，2,4,6-三氯酚，2,3,4,6-四氯酚及五氯酚已被證實為致癌物質。利用小白鼠胚胎纖維母細胞（C3H10T1/2）以 DNA 沈澱試驗檢測此類多氯酚在肝臟活化系統存在或不存在時對 DNA 的損害程度，發現這三種多氯酚在肝臟活化系統存在時可引起 C3H10T1/2 細胞內少量單股 DNA 的斷裂。當以五氯酚的代謝產物四氯對苯二酚做同樣的測試時發現不需要肝臟活化系統的存在即可造成明顯的單股 DNA 斷裂。此結果顯示，當評估此類多氯酚的致癌潛能時，其代謝產物須列入考慮。由多氯酚的代謝產物造成之 DNA 鏈的斷裂可能在致癌過程中扮演重要的角色。

---

\*康寧護理專科學校兼任教師

## 前 言

飲用水水質標準因生活品質之提高及基於人體健康之考量，各先進國家均訂有明確之法規予以規範，且適時的檢討與修定。在 1974 年美國公共健康部門 (USPHS) 正式通過安全飲用水法案，將有機污染物 (Organic contaminants) 納入水質標準中，其包括工業排放的合成有機化合物及加氯消毒產物，而酚類化合物乃其管制的水質項目之一。

酚類 (phenols) 為苯及其縮核的氫氧衍生物，所包含的種類很多，其中酚、二氯酚、三氯酚、五氯酚、氯甲酚、二甲酚及硝基酚等均為美國環保署列入 129 種優先管制的毒性污染物名單中，其主要污染物為煤礦開採、石油煉製、煉焦工業。而其他如化學工廠，農藥製造廠、橡膠、樹脂、纖維加工廠等皆含有不同程度酚類物質之廢水排出。在日常生活中酚類之用途亦很廣泛，如苯環上之氫原子被三個以下之氯原子取代之氯酚類 (chlorophenols) 常用於合成許多殺蟲劑。2,4,6-三氯酚 (2,4,6-trichlorophenol) 常作為殺菌劑 (fungicide)、除草劑 (herbicide) 及落葉劑 (defoliant)。五氯酚 (pentachlorophenol) 常用作木材防腐劑及冷卻水塔之殺菌劑。2,3,4,6-四氯酚 (2,3,4,6-tetrachlorophenol) 常用作殺菌劑、防腐劑、木材及皮革防腐劑。四氯二甲酚 (4-chloro-2-methyl-phenol) 用於製造殺草劑 (Baird et al. 1977; Dunlop et al. 1976; Keith 1976)。由於其廣泛的用途，故不論在工業廢水、家庭污水、自然水甚至飲用水中均有酚類化合物的存在。

水中之酚類化合物當濃度超過  $5 \mu\text{g/L}$  時即可與氯反應生成氯酚，除不易分解外且會在水域中之食物鏈蓄積。飲用水的加氯消毒過程中若有氯酚產生則會有不良的味道而造成飲水問題 (Chriswell et al. 1975; Franson 1992)，而當氯與酚反應形成氯酚化合物時若有溴離子存在則亦會有溴酚類化合物的產生 (Sweetman and Simmons 1980; Watanabe et al. 1984)。酚類化合物為毒性物質，且在自然界中不易分解，對人體所造成的急毒性包括嘔吐、痙攣、虛脫及肝腎障礙等。其毒性機制乃因此類化合物為呼吸作用中氧化磷酸化過程中的去偶合劑 (uncoupler of oxidative phosphorylation) 會造成細胞呼吸作用無法順利進行 (Shang-Zhi and Duffield 1984)。酚類的毒性常隨著氯化程度的增加而上升，含三個氯以上之氯酚已被證實為致癌性物質 (carcinogen) (DeMarini et al. 1990)，其中 2,4,6-三氯酚會引起老鼠之淋巴瘤 (lymphomas)、白血病 (leukemias) 及肝臟腫瘤 (hepatocellular carcinomas)。五氯酚會引起小白鼠之肝臟腫瘤及腺體瘤 (adenomas)。而對人體而言，因職業關係而長期暴露於 2,3,4,6-四氯酚及五氯酚等氯酚化合物之下與人類之組織肉瘤 (soft tissue sarcoma)，惡性淋巴瘤 (malignant lymphoma) 及白血病均有所關連 (Reviewed in DeMarini et al. 1990)。

雖然從動物實驗中我們已得到足夠的證據顯示這些多氯酚均為致癌物質，但其致癌之分子機轉 (molecular mechanisms of carcinogenesis) 仍未完全明瞭。大部分的氯酚化合物在安姆氏測試中 (Ames test) 均無法使沙門氏菌 (*Salmonella*) 產生回滾突變 (reverse mutation) (Galloway et al. 1987; Haworth et al. 1983)。許多的多氯酚亦無法在哺乳動物細胞致突變測試中有正面的結果。亦即它們不能使 V79 細胞內突變的次黃嘌呤轉磷酸核糖基酵素 (hypoxanthine guaninephosphoribosyltransferase) 基因回滾成正常基因 (Jansson and Jansson 1986)。這些多氯酚的致癌可能機制乃是我們所欲研究的目標。有報告指出，五氯酚在老鼠肝臟萃取液 (S<sub>9</sub>) 的存在下會氧化成四氯對苯二酚 (tetrachlorohydroquinone)，且會在有氧狀態下繼續氧化成四氯半對苯二酚自由基 (tetrachloro-p-benzosemiquinone radical)。這些自由基有可能會導致染色體的錯亂 (chromosomal aberration) 及 DNA 的損傷 (Carstens C-P et al. 1990)。

酚，單取代及雙取代之氯酚較不易引起細胞癌化作用乃與細胞內的酵素特異性有關，其對三個氯以上之氯酚有較高的特異性 (specificity)，因而易經由代謝活化產生毒性之產物。單及雙取代之氯酚雖不易引起癌化作用，但被皮膚吸收或吸入，攝取均具有毒性。酚類化學結構的鄰位效應 (ortho effect) 對氯酚毒性為一負面影響，此與氯酚和酵素間的化學鍵結有關。所以在單氯酚中，間位 (meta-) 及對位 (para-) 取代基所造成之毒性高於鄰位取代基。

酚類化合物為半揮發性之毒性有機物質，其在一般淨水場的淨水過程中，不但不易去除且可能因氯化作用而產生毒性更强之氯酚化合物。依 80 年度之環境法令中，水污染防治法之水體分類及水質標準第四條規定：甲類河、川、湖、潭、庫之水質標準，酚類之最大容許量為 0.001mg/L。此為總酚含量，並未針對個別酚類訂定管理標準，而不同酚類化合物之毒性差異頗大，故對於飲用水及其水源中所含之酚類化合物確認有助於瞭解飲用水加氯消毒的影響及推測污染的可能來源。

一般較為學者所採用之分析方法為使用高效能液相層析儀 (HPLC)，氣相層析儀 (HPGC) 及氣相層析質譜儀 (GC/MS) 來區別個別酚類之含量。酚類化合物衍生化後再進行分析乃最常被使用的方式。水樣中之酚類化合物直接與乙酸酐 (Acetic anhydride) 反應形成酯類衍生物後，經過萃取濃縮，再以 GC/MS 分析乃本研究所採用之方法 (Coutts et al. 1979)。在所有的酚類化合物中，2,4,6-三氯酚，2,3,4,6-四氯酚及五氯酚以及這三種多氯酚的鹽類化合物被大量使用做為防腐劑及殺菌劑 (Shang-Zhi and Duffield 1984)。由於其廣泛的用途及已被證實可在動物實驗中導致癌症，故多氯酚的致癌機制成為許多科學家研究的方向。在細菌及哺乳細胞的致突變試驗中，這些多氯酚均沒有明顯的致突變性，所以我們從 DNA 斷裂的方向去研究其致癌的基因毒性 (genotoxicity)。

許多分析方法均可被用來測試 DNA 鏈的斷裂，在 1988 年 Olive 發展出一種較簡單的偵測方法，僅須要一台桌上型離心機 (bench-top centrifuge) 及閃爍計數器 (scintillation counter) 即可在短時間內達到所須的偵測靈敏度。其原理乃是利用高離子濃度 (KCl) 及陰離子清潔劑 (SDS) 存在下，將細胞打破，在低速離心下，DNA 會與蛋白質結合而沈澱下來，當 DNA 沒有受到損害斷裂時，所有的 DNA 都將隨蛋白質被離心下來。當 DNA 受到不管是放射線或化學物質造成斷裂時，破裂的 DNA 在低速離心時並不隨蛋白質一起沈降而留在上清液中。用放射性氚標定的胸腺嘧啶 ( $[^3\text{H}]$ thymidine) incorporate 到細胞的 DNA 中，再計算上清液與沈澱物的放射強度即可測量 DNA 斷裂的程度 (Kohn et al. 1976; Olive 1988; Rydberg 1975)。

另一項檢測 DNA 斷裂方法乃利用質體 pBR322 的 DNA，當超螺旋之 DNA 發生單股斷裂時，其形狀會改變成線性狀之 DNA，這兩種不同的型態可用 non-denature agarose gel electrophoresis 來區分。

## 材料和實驗方法

氣相層析質譜儀 (HP5890GC, HP5971 MS-Comp)

電子撞擊 (Electron Impact) 式之質譜儀當作檢測器。超高純氦氣當載行氣體。儀器操作條件：每次操作前以自動校正系統 (Auto tune) 校對內部參數。分流器 (splitter) 設定於注射後 45 秒時打開。注射部 250°C，檢測部 280°C。管柱起始溫度 60°C 保持 4 分鐘。第一段升溫程式終溫為 100°C，保持 2 分鐘，每分鐘上升 4°C。第二段升溫程式終溫為 160°C 保持 5 分鐘，每分鐘上升 10°C。氣相層析儀管柱 30m×0.323mm (內徑) 熔合二氧化矽毛細層析管柱，塗覆 DB-1 (Methylsilicon)，薄膜厚度 0.25  $\mu\text{m}$ 。(J & W Scientific)。載行氣體流速 30 cm/min (ECDGC)。管柱壓力 (Head pressure) 3 Psi。

酚類化合物乙醯化衍生物之分析

於 800ml 之水樣中加入 80mg 之硫代硫酸鈉，3ml 50%之硫酸及 50ml 之二氯甲烷，貯存於 4°C 之冰箱。在所保存之 800ml 水樣中加入 7ml 30%的氫氧化鈉、輕輕搖晃並轉置於 1 公升之分液漏斗中。劇烈振盪 2 分鐘，靜置棄置有機層。加入 7ml 的乙酸酐並振盪約 20 秒使反應完成。再加入 4ml 正己烷振盪 2 分鐘以萃取乙醯化衍生物。收集正己烷使其通過無水硫酸鈉之管柱，再以氮氣吹至 1ml 或 0.3ml 以供分析。

鼠肝微粒體酵素之製備 (Rat liver microsomes)

為了誘發鼠肝內的細胞色素氧化鈣(cytochrome P-450 oxidase) 及細胞色素還原鈣(cytochrome P-450 reductase)，大白鼠 (male wistar rates) 體重 150~200 克，購自國立台灣大學醫學院，打入 phenobarbital (75 mg/kg of body weight) 及 hydrocortisone (50 mg/kg of body weight) 連續二天，每八小時打一次。鼠肝在 1.14% KCl 及 10mM EDTA 溶液中均質化以 JA-20 rotor 10000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液以 KCl，EDTA 溶液補回原體積，再以 J2-21M/E rotor 40000 rpm 離心 60 分鐘。離心後以 0.25M sucrose 洗一次並稀釋，於-80°C保存。

#### 細胞培養

C3H10T1/2 為 C3H 老鼠胚胎的纖維母細胞。用 Basal Medium Eagle 培養，外加 10% 加熱處理的胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)。為了預防細菌污染，medium 過濾後再加 penicillin 和 streptomycin (100 U/mL) 每五天換 medium 一次，每十天 subculture 一次。若要保持細胞的正常性，必須在 late-log phase 時作 sbuculture，不可使其進入 stationary phase。另外，在種細胞時，數目為每平方公分種  $2 \times 10^3$  個 cells；長滿後細胞密度為  $2.9 \sim 3.8 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。C3H10T1/2 做實驗時，必須在 7~15 代之間，才算是正常狀態。細胞養在充分潮濕 37°C 恆溫並給 5% CO<sub>2</sub> 的 incubator 中。

#### DNA 沈澱試驗 (DNA precipitation assay)

此實驗方法採用 Oliver (Olive 1988) 所發表之文章經修改而成。詳細步驟如下：將  $2 \times 10^5$  個細胞種於 6-well plate，隔夜培養使細胞附著於培養皿上。以含有  $0.05 \mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H] thymidine 之新鮮培養基再培養 36 小時，使 [<sup>3</sup>H] thymidine 能併入細胞的 genomic DNA 內。移去培養基，用 PBS 洗二次再加入含不同濃度待測之化學物質的培養基（不含牛血清）處理 30~40 分鐘。處理完後，加入 300  $\mu\text{l}$  lysis buffer (10mM Tris, 10mM EDTA, 0.05M NaOH, 2% SDS, pH 12.4) 及 300  $\mu\text{l}$  120 mM KCl，在 65°C 水浴中加熱 10 分鐘。取 400  $\mu\text{l}$  放入 Eppendorf tube 內並置於冰上 5 分鐘，此時 DNA-protein K-SDS complex 形成，可在低速離心時沈澱下來。在 10°C 下離心 10 分鐘，轉速 3500 rpm。上清液倒入閃爍計數瓶，並加入 400  $\mu\text{l}$  之 0.05M HCl 及 3ml Hydrofluor liquid scintillation fluid。下沈物 (pellet) 以 800  $\mu\text{l}$  65°C 的水溶解之，並倒入閃爍計數瓶內。同樣加入 3ml 之 Hydrofluor liquid scintillation fluid。以閃爍計數器 (Beckman liquid scintillation counter) 測各樣品之放射強度。沈澱下來的 DNA 百分比計算方式為在 pellet 的放射強度除以 pellet 加上 supernatant 的放射強度再乘以 100。

## 多氯酚及四氯對苯二酚處理 DNA 質體試驗

質體 DNA pBR322 來自大腸桿菌 (*Escherichia coli* strain RRI)。質體 DNA 溶於 20mM Tris-HCl buffer, pH=7.4 及 25  $\mu$ M 之硫酸銅溶液中, 加入 5mM 之 2,4,6-三氯酚, 2,3,4,6-四氯酚, 五氯酚及各種不同濃度的四氯對苯二酚在 37°C 下反應二小時。反應後以 non-denature 之 agarose gel electrophoresis 作分析。其步驟如下: 以 0.24 克之 agarose 溶於 30ml 之 1×TBE buffer (0.8%) 微波爐加熱 1 分鐘 (補回減少之水量)。加入 5  $\lambda$  EtBr 混合均勻倒入壓克力模板, 置於水平儀上, 靜置 30 分鐘待乾, 置入電泳槽。取 1  $\lambda$  之樣品 (2~4  $\mu$ g DNA) 加入 1  $\lambda$  之 6× loading buffer, 4  $\lambda$  之水混合均勻, 置入電泳槽內分析。(120 Volt, 30~40 分鐘)

## 結果與討論

酚類的乙酰化衍生物中仍直接在水樣中進行反應 (In-situ acetylation), 其步驟為將保存在 pH<2 及加入硫代硫酸鈉去除餘氯之水樣先以 30% 之氫氧化鈉調整至 pH>12, 以二氯甲烷將屬於中性及鹼性之有機物萃取丟棄以達淨化效果, 再加入乙酸酐至水樣中與酚類反應而以少量的正己烷萃取, 經去水及濃縮後進行分析。不同酚類乙酰化後在 GC/MS 的質譜圖除了同分異構物外均有所不同, 以選擇性離子偵測法可去除雜質的干擾。以此法分析所得之標準層析圖譜列於圖 1, 其相對滯留時間列於表 1。在 23 種可有效分離之酚類中 3-Bromophenol, 2,4-Dichlorophenol, 4-Bromo-2-chlorophenol 分別與 4-Bromophenol, 2,5-Dichlorophenol, 3-Nitrophenol 具有相同的滯留時間, 故無法對這三種酚類進行分析。依此分析方法, 以 800ml 之水樣濃縮至 0.3ml 後分析所得之各種酚類之選擇性離子及在自然水與淨水的相對回收率列於表 1。

以此分析方法對都會地區之飲用水源進行定量分析所得之結果列於表 2。分析對象包括台北地區淨水廠之原水、淨水。六堵水廠之原水、淨水。高雄澄清湖淨水廠之原水、淨水。在澄清湖淨水廠中之原水來源除湖水外亦包含高屏溪水, 故高屏溪之原水及淨水亦列為分析對象。

每一個分析的水樣中, phenol 的量都很高, 但在此仍需將之視為無法定量, 原因在於 phenol 大量出現在試劑水中。一般在定量分析時訊號值需大於兩倍的空白值, 就因為 phenol 的空白值太高而導致定量的困難。若不考慮其空白值, 亦即假設可以經由多次蒸餾或其它方式得到完全不含 phenol 之試劑水, 則出現在各水源中之 phenol 濃度以 2-chlorophenol 之檢量曲線來推估可達 250 ng/l 以上。



DeMarini 等人在 1990 年曾報告過(DeMarini et al. 1990)，五氯酚，大多數的三氯酚及四氯酚在鼠肝活化酵素 (S9) 存在下具有誘導大腸桿菌內之前噬菌體 (prophage) 的能力，亦即這些多氯酚化合物能引起大腸桿菌之 DNA 鏈的斷裂，此項實驗證明多氯酚在活體外 (In Vitro) 具有基因毒性 (genotoxic)。雖然多氯酚可引起大腸桿菌之 DNA 損害，這並不意味著在哺乳動物細胞 (mammalian cells) 中亦會有相同的結果，因為哺乳動物細胞的 DNA 與核蛋白緊密結合，且細胞內有較完善的防禦系統 (cellular defense systems)。為了證明這一點我們以鼠胚胎纖維母細胞 (C3H10T1/2) 為對象，用 DNA 沉澱試驗方法檢測 2,4,6-三氯酚，2,3,4,6-四氯酚及五氯酚是否具有在哺乳動物細胞中打斷 DNA 的能力。如圖 10 所示，這三種多氯酚當鼠肝微粒體活化酵素 (microsomal enzymes) 不存在時均無法造成細胞內 DNA 的單股斷裂，當多氯酚的濃度超過  $250 \mu\text{M}$  時即會有毒性產生。假如有鼠肝微粒體活化酵素存在時 (2mg microsomal protein 加上 0.5 mg NADPH)，2,4,6-三氯酚及 2,3,4,6-四氯酚可造成微弱的 DNA 單股斷裂效應，五氯酚亦可且較明顯(圖 2)。加藥處理過程中均使用不含胎牛血清之培養基以避免不必要的干擾產生。細胞 DNA 斷裂的背景值 (basal level) 當有鼠肝微粒體酵素存在時是沒有這些酵素的兩倍之多 (圖 2 及 3)，此現象可能是由鼠肝微粒體酵素造成，因有報告指出(Cohen and Cederbaum 1979)，這些酵素具有產生氫氧自由基 (hydroxyl radicals) 的能力。由上述之實驗顯示，多氯酚的活化代謝產物可能是其造成細胞 DNA 單股斷裂的原因。

為了更加證實此點，我們以五氯酚的主要代謝產物四氯對苯二酚來處理質體 DNA pBR322，如圖 4 所示，隨著濃度的升高，四氯對苯二酚可破壞質體 DNA 的超螺旋結構而多氯酚本身即使在高濃度亦無此效應。質體 DNA 的立體結構當有 DNA 的斷裂產生時，會由 supercoiled form 變成 Relaxed circular form，這兩種不同型態的 DNA 可在 non-denatured agarose gel electrophoresis 中區分出來。同樣的四氯對苯二酚亦以 DNA 沉澱試驗在沒有鼠肝微粒體酵素存在下測其是否具有打斷哺乳動物細胞 DNA 的能力，由圖 3 所示，隨著劑量的增加，可以看出有明顯的 DNA 單股斷裂產生。

四氯對苯二酚引起哺乳動物細胞內 DNA 單股的斷裂其機制至少有一部分須歸因於 hydroxyl radicals 的產生。有報告指出(Carstens et al. 1990)，四氯對苯二酚可經由自發性的氧化還原反應而產生四氯半對苯二酚自由基 (tetrachloro-p-benzosemiquinone radical) 及 tetrachloro-p-benzoquinone，此過程稱為氧化還原循環 (redox cycling)。在此循環中，會有超氧化物 (superoxide radicals) 產生。此種超氧化物可經由歧化作用 (dismutation) 形成過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )，當有鐵離子或銅離子 (ferrous or cuperous ions) 存在下，過氧化氫即會被催化產生 hydroxyl radicals(Aruma et al. 1991; Meneghini 1988)。由上述的實驗知道五氯酚的代謝產物較其本身具有更强的毒性，所以在研究由五氯酚所導致之癌症產

生過程中，由其代謝產物四氯對苯二酚所造成 DNA 鏈斷裂的損害必定也扮演一個重要的角色。

## 結 論

- 一、對於環境污染物質的偵測一般均採用美國環保署出版之 EPA Series Methods 內所使用之方法，但飲用水中酚類化合物之分析法並未列入該書中，表示此分析法尚未經過嚴格的評估，各實驗室對於何種分析方法最好還未達成共識。本實驗以各種不同的酚類化合物進行分析，除了 2-methyl-4,6-dinitrophenol，2,4-Dinitrophenol 二種酚及具有相同滯留時間的三種酚類外，一次可同時分析 23 種不同的酚類化合物，其中包含許多同分異構物如 2-Chlorophenol 與 4-Chlorophenol，2,4-Dichlorophenol 與 2,6-Dichlorophenol 及多種 trichlorophenol 均可有效的區別，故可盡量涵蓋可能出現在飲用水中的酚類。都會區之飲用水源中出現之酚類化合物包括酚，硝基酚及多種不同的氯酚，共 11 種，其中在六堵之水源中就有 6 種之多。而在六堵之原水及澄清湖之淨水中有五氯酚出現，但其量均低。
- 二、五氯酚的代謝產物四氯對苯二酚可經由氧化還原循環 (redox cycling) 產生自由基而造成 DNA 的損害，同樣的過程亦可能存在於 2,4,6-三氯酚及 2,3,4,6-四氯酚的代謝反應中。經由鼠肝活化酵素 (S9) 的作用，2,4,6-三氯酚可藉著對位的去氯化反應及氫氧化反應 (dechlorination and hydroxylation in the para-position) 產生 2,6-二氯對苯二酚 (2,6-dichlorohydroquinone) (Juhl et al. 1989)。在鼠肝微粒體酵素存在下，亦有報告指出 (Besten et al. 1989)，2,3,4,6-四氯酚可進一步形成鄰苯二酚。因此多氯酚造成基因毒性的機制可能牽涉可確認這些個別多氯酚的活化酵素。經由這些酵素，多氯酚代謝成氯苯二酚，再經氧化還原循環產生自由基，造成對 DNA 之氧化性傷害。氯酚類化合物會表現不同的基因毒性，乃因該類化合物所含氯原子之多寡及在苯環上分布位置不同所致，此特性亦是影響活化酵素確認其受質之重要因素。
- 三、在此研究中自然水及淨水所測得各種酚類化合物的濃度不足以導致基因毒性，但已有報告指出 (Paasivirta et al. 1980) 這些氯酚類化合物可在水中食物鏈蓄積。評估環境中酚類化合物的濃度可幫助了解此類化合物進入食物鏈的量並衡量人類平均每日攝取量 (Hattermer-Frey and Travis 1989)。本研究顯示 DNA 沈澱試驗可用於篩選各種可能導致基因毒性之潛在化學物質。



## REFERENCES

1. Alfieri A, Crawford G, Ahmad I (1989) One-step sample preparation technique for broad spectrum gas chromatographic/mass spectrometric determination of organic priority pollutants in water. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:760-765
2. Aruma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991) Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273:601-604
3. Baird RB, Carmona LG, Jenkins RL (1977) The direct-injection GLC analysis of xylenols in industrial wastewaters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17:764
4. Besten CD, Peters MMCG, Bladeren PJV (1989) The metabolism of pentachlorobenzene by rat liver microsomes: the nature of the reactive intermediates formed. *Biochem. Biophys. Res.* 163:1275-1281
5. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
6. Carstens C-P, Blum JK, Witte I (1990) The role of hydroxyl radicals in tetrachlorohydroquinone induced DNA strand break formation in PM2 DNA and human fibroblasts. *Chem-Biol Interact.* 74:305-314
7. Chriswell CD, Chang RC, Fritz IS (1975) Chromatographic determination of phenols in water. *Anal. Chem.* 47:1325-1329
8. Cohen G, Cederbaum AI (1979) Chemical evidence for production of hydroxyl radicals during microsomal electron transfer. *Science.* 204: 66-68
9. Coutts RT, Hargreaves EE, Pasutto FM (1979) Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. *J. Chromatogr.* 179:291-299
10. DeMarini DM, Brooks HG, Parkes DG (1990) Induction of prophage Lambda by chlorophenols. *Environ. Mol. Mutagen.* 15:1-9
11. Dignam JD, Strobil HW (1977) NADPH-Cytochrome P-450 reductase from rat liver: Purification by affinity chromatography and characterization. *Biochem.* 16:1116-1123
12. Dunlop WJ, Shew DC, Scalf MR, Cosby RL, Robertson MJ (1976) Identification

- and analysis of organic pollutants in water. In: Keith LH. Ann Arbor Sci, Ann Arbor, Mich. Ch. 27, P.453
13. Franson MAH (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 th edition, Part 500, American Public Health Association, Washington, DC.
  14. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Dus S Rimpo J, Marjolin BH, Resnick MA, Anderson B, Zeiger E (1987) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. Environ Mol Mutagen. 10:1-175
  15. Hattemer-Frey HA, Travis CC (1989) Pentachlorophenol: Environmental partitioning and human exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18:482-489
  16. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E (1983) Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 5:3-142
  17. Hileman B (1982) The chlorination question. Environ. Sci. Technol. 16:15A-8A
  18. Jansson K, Jansson V (1986) Inability of chlorophenols to induce 6-thioguanine-resistant mutants in V79 Chinese hamster cells. Mutat. Res. 171:165-168
  19. Juhl U, Blum K, Witte I (1989) The in vitro metabolites of 2,4,6-Trichlorophenol and their DNA strand breaking properties. Chem-Biol Interact. 69:333-344
  20. Keith LH (1976) Identification and analysis of organic pollutants in water. In: Keith LH. Ann Arbor Sci, Ann Arbor, Mich. Ch.36 P.671
  21. Kohn KW, Erickson LC, Ewig RA, Friedman CA. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochemistry 15:4629-4636
  22. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  23. Martins EA.L, Chubatsu LS, Meneghini R (1991) Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. Mutat Res. 250:95-101
  24. Meneghini R (1988) Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. Mutat. Res. 195:215-230
  25. Olive PL (1988) DNA precipitation assay : a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environ Mol Mutagen. 11:487-495
  26. Paasivirta J, Sarkka J, Leskijarvi, Roos A (1980) Transportation and enrichment of

- chlorinated phenolic compounds in different aquatic food chain. *Chemosphere* 9:441-456
27. Roy D, Liehr JG (1988) Temporary decrease in renal quinone reductase activity induced by chronic administration of estradiol to male syrian hamsters. *J. Biol. Chem.* 263:3646-3651
  28. Rydberg B (1975) The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat Res.* 61:274-287
  29. Shang-Zhi S, Duffield AM (1984) Negative ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry of some derivatives of tri-, tetra-, and pentachlorophenols. *J. Chromatogr.* 284:157-165
  30. Sithole BB, Williams DT (1986) Determination of halogenated phenols in raw and potable water by selected ion gas chromatography-mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69:466-473
  31. Sweetman JA, Simmons MS (1980) The production of bromophenols resulting from the chlornation of waters containing bromide ion and phenol. *Water Res.* 14:287-290
  32. Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R (1984) Brominated phenol production from the chlorination of wastewater containing bromide ions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33:395-399
  33. Witte I, Juhl U, Butte W (1985) DNA-damaging properties and cytotoxicity in human fibroblasts of tetrachlorohydroquinone, a pentachlorophenol metabolite. *Mutat. Res.* 145:71-75

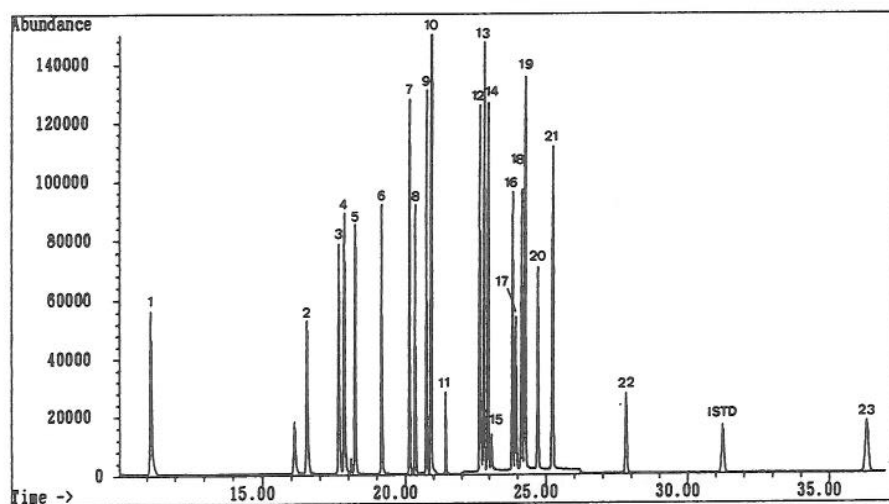
**Table 1.** Relative retention time, selected ions, and relative recoveries of 23 selected phenol acetates

| Phenol acetate         | RRT <sup>a</sup> | GC/MS<br>Selected<br>ions | Relative recoveries <sup>b</sup> (%) of phenols from fortified<br>samples (n = 3) after correction for blanks |         |               |         |
|------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|---------|
|                        |                  |                           | Natural water                                                                                                 |         | Treated water |         |
|                        |                  |                           | 1 ppb                                                                                                         | 0.1 ppb | 1 ppb         | 0.1 ppb |
| 1 <sup>c</sup> Phenol  | 3.06             | 94/136                    | 101.3                                                                                                         | 96.5    | 94.7          | 96.2    |
| 2 2-Chloro             | 4.55             | 128/170                   | 94.6                                                                                                          | 100.3   | 98.2          | 92.6    |
| 3 3-Chloro             | 4.86             | 128/170                   | 98.9                                                                                                          | 102.2   | 106.5         | 94.8    |
| 4 4-Chloro             | 4.92             | 128/170                   | 105.2                                                                                                         | 100.8   | 92.3          | 96.5    |
| 5 2,4-Dimethyl         | 5.02             | 122/107                   | 92.1                                                                                                          | 98.6    | 96.3          | 98.6    |
| 6 2-Bromo              | 5.28             | 172/174                   | 98.6                                                                                                          | 94.7    | 95.1          | 96.6    |
| 7 3-Bromo              | 5.54             | 172/174                   | 100.5                                                                                                         | 98.2    | 91.2          | 93.7    |
| 8 2,6-Dichloro         | 5.60             | 162/204                   | 103.6                                                                                                         | 96.8    | 101.4         | 99.3    |
| 9 4-Chloro-3-methyl    | 5.71             | 184/186                   | 93.8                                                                                                          | 94.5    | 97.2          | 100.3   |
| 10 2,4-Dichloro        | 5.76             | 162/164                   | 94.1                                                                                                          | 101.3   | 104.5         | 108.7   |
| 11 2-Nitro             | 5.90             | 139/181                   | 88.4                                                                                                          | 91.4    | 87.6          | 85.6    |
| 12 2-Bromo-4-chloro    | 6.23             | 206/208                   | 94.2                                                                                                          | 91.5    | 97.8          | 94.5    |
| 13 4-Bromo-2-chloro    | 6.27             | 206/208                   | 97.6                                                                                                          | 94.8    | 93.2          | 90.6    |
| 14 2,4,6-Trichloro     | 6.32             | 196/198                   | 106.3                                                                                                         | 104.9   | 103.9         | 98.7    |
| 15 4-Nitro             | 6.35             | 139/181                   | 86.2                                                                                                          | 90.3    | 89.8          | 92.3    |
| 16 2,3,6-Trichloro     | 6.56             | 196/198                   | 102.5                                                                                                         | 103.2   | 99.2          | 102.5   |
| 17 2,6-Dibromo         | 6.59             | 250/252                   | 91.7                                                                                                          | 96.7    | 93.6          | 92.9    |
| 18 2,3,5-Trichloro     | 6.64             | 196/198                   | 89.3                                                                                                          | 91.8    | 94.1          | 97.8    |
| 19 2,4,5-Trichloro     | 6.68             | 196/198                   | 106.8                                                                                                         | 103.5   | 100.9         | 98.6    |
| 20 2,4-Dibromo         | 6.80             | 252/254                   | 95.3                                                                                                          | 99.2    | 96.2          | 99.3    |
| 21 2,3,4-Trichloro     | 6.94             | 196/198                   | 98.2                                                                                                          | 96.7    | 92.5          | 96.8    |
| 22 2,3,4,6-Tetrachloro | 7.65             | 232/274                   | 90.8                                                                                                          | 93.5    | 95.2          | 99.4    |
| 23 Pentachloro         | 10.0             | 264/266                   | 98.6                                                                                                          | 101.3   | 96.7          | 93.8    |

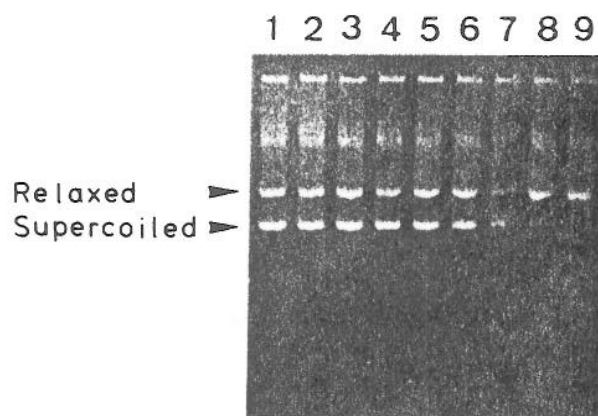
<sup>a</sup> Retention time relative to pentachlorophenol acetate (RRT = 10.00) = 36.29 min on 30 m × 0.32 mm id DB-1 column<sup>b</sup> Mean of the 3 replicate samples<sup>c</sup> The number order of phenol acetate is the same with the peak number shown in Figure 1**Table 2.** Content of different phenol concentrations in natural and treated water

| City <sup>b</sup> | Water type           | Phenol          | Substituted phenols (ng/L) <sup>a</sup> |          |          |             |             |          |           |          |           |          |
|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------------|----------|----------|-------------|-------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
|                   |                      |                 | 4-Cl <sup>c</sup>                       | 2,4-DiCl | 2,6-DiCl | 2,4,6-TriCl | 2,4,5-TriCl | 2-Nitro  | 4-Cl-3-Me | 2,4-DiBr | 4-Br-2-Cl | Penta-Cl |
| 1.                | Natural <sup>d</sup> | NQ <sup>f</sup> | ND <sup>g</sup>                         | ND       | ND       | ND          | ND          | ND       | ND        | 21 ± 4   | ND        | ND       |
|                   | Treated <sup>e</sup> | NQ              | ND                                      | ND       | ND       | 16 ± 6      | ND          | ND       | ND        | ND       | ND        | ND       |
| 2.                | Natural              | 268 ± 47        | 38 ± 6                                  | 21 ± 5   | ND       | 32 ± 8      | ND          | ND       | ND        | ND       | ND        | 42 ± 4   |
|                   | Treated              | 314 ± 28        | 12 ± 3                                  | ND       | ND       | 26 ± 5      | ND          | ND       | 18 ± 5    | ND       | ND        | ND       |
| 3.                | Natural              | NQ              | ND                                      | ND       | 18 ± 4   | ND          | ND          | ND       | ND        | ND       | ND        | ND       |
|                   | Treated              | NQ              | 16 ± 2                                  | ND       | ND       | ND          | ND          | 140 ± 28 | ND        | ND       | 62 ± 18   | ND       |
| 4.                | Natural              | NQ              | ND                                      | 28 ± 3   | ND       | ND          | ND          | 91 ± 22  | ND        | ND       | ND        | ND       |
|                   | Treated              | NQ              | ND                                      | ND       | ND       | ND          | 28 ± 7      | 112 ± 8  | ND        | ND       | ND        | 26 ± 6   |

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation; two ions for each of duplicate samples<sup>b</sup> Four cities in Taiwan. 1: Taipei, 2: Chilung, 3: Pingtung, 4: Kaohsiung<sup>c</sup> 4-Cl: 4-chlorophenol, 2,4-DiCl: 2,4-dichlorophenol, 2,6-DiCl: 2,6-dichlorophenol, 2,4,6,-trichlorophenol, 2,4,5-TriCl: 2,4,5-trichlorophenol, 2-Nitro: 2-nitrophenol, 4-Cl-3-Me: 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-DiBr: 2,4-dibromophenol, 4-Br-2-Cl: 4-bromo-2-chlorophenol, Penta-Cl: pentachlorophenol<sup>d</sup> Natural water: untreated water sample collected from water treatment plant<sup>e</sup> Treated water: treated water sample collected from water treatment plant<sup>f</sup> Not quantified; phenol peak present but less than twice blank value<sup>g</sup> Not detected



**Fig 1.** Representative chromatogram of standard mixture of acetylated phenol and 22 substituted phenols monitored by GC-MS in SIM mode on a 30 m DB-1 column. See Table for peak identification



**Fig. 4.** Detection of strand breaks in polychlorinated phenols- and tetrachlorohydroquinone-treated plasmid DNA under non-denaturing conditions. About 0.8  $\mu$ g of pBR322 DNA was treated with 5 mM of polychlorinated phenols and various concentrations of tetrachlorohydroquinone in the presence of 25  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  at 37°C for 2 h (pH = 7.4) ; lane 1, untreated DNA; lane 2, 5 mM 2,4,6-trichlorophenol; lane 3, 5 mM 2,3,4,6-tetrachlorophenol; lane 4, 5 mM pentachlorophenol; lane 5, 0.05 mM TCHQ; lane 6, 0.1 mM TCHQ; lane 7, 0.15 mM TCHQ; lane 8, 0.2 mM TCHQ; lane 9, 0.5 mM TCHQ

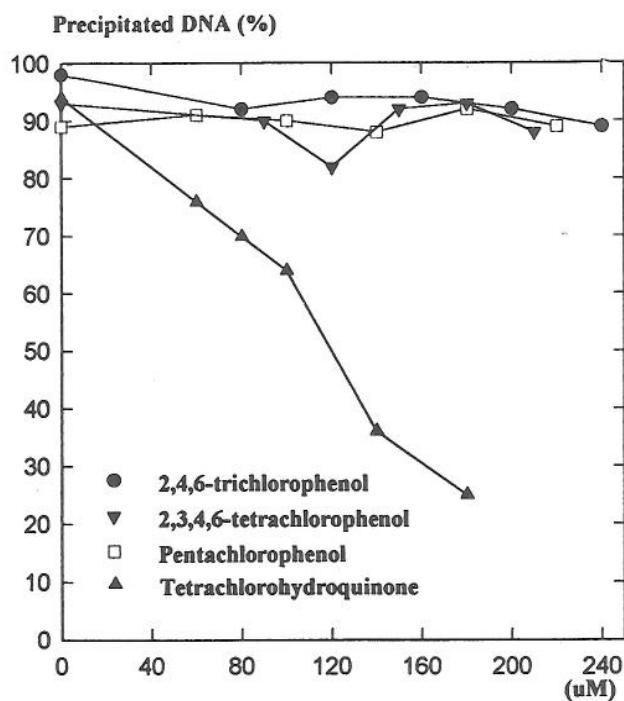


Fig. 2. DNA precipitation assay without microsomal enzymes to determine single-strand breaks produced by 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, pentachlorophenol, and tetrachlorohydroquinone

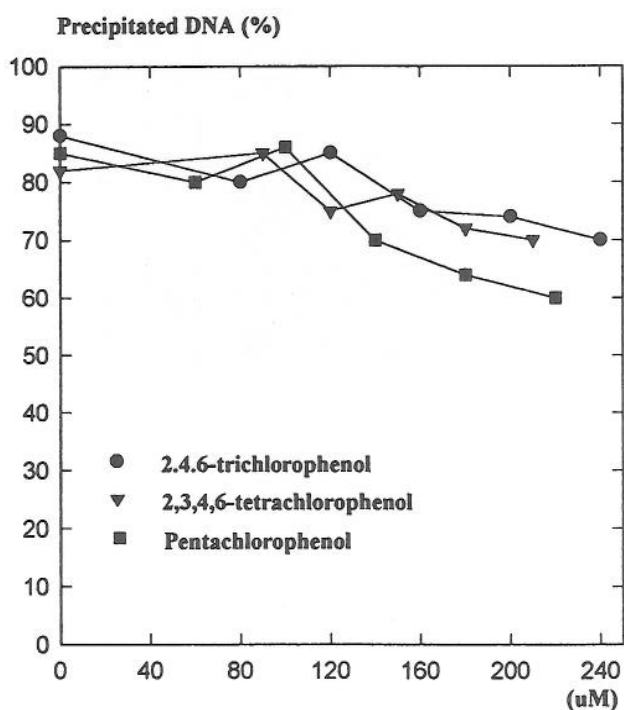


Fig. 3. DNA precipitation assay with microsomal enzymes to determine single-strand breaks produced by 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, and pentachlorophenol



Yen-Zan Wang\*

## ABSTRACT

Gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring (GC/MS-SIM) method were used to analyze 23 selected phenols in natural and drinking waters by an in situ acetylation technique. This method was suitable for determining phenol concentrations at the ng/L level because of less background interference and better recoveries. The application range for all these phenols was from 0.01 or 0.04 to 10  $\mu$ g/L, using a 800 ml water sample. The levels of trace phenols in four Taiwan water treatment plants were in the range of 12-213 ng/L.

The polychlorinated phenols, namely 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, and pentachlorophenol, were evaluated for their ability to induce deoxyribonucleic acid (DNA) damage using a DNA precipitation assay employing mouse embryonic fibroblast cells (C3H10T1/2) with or without a liver microsomal activation system. These agents exhibited a weak positive response when microsomal activation enzymes were present in this assay. When the tetrachlorohydroquinone, a toxic metabolite of pentachlorophenol, was measured by the same method without the activation system, a significant and dose-dependent DNA damage was found. This result indicates that in the evaluation of the carcinogenic potential of these agents, their corresponding metabolites should be taken into consideration. DNA strand breakage caused by these active metabolites may play an important role in the tumorigenic process of polychlorinated phenols.

---

\*Lecturer, Kang-Ning Junior College of Nursing