

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20110801001

王春艳, 陈浩, Kuen Benjamin Wu, 等. 溶解性有机碳的主要组成对青鳉鱼铜急性毒性的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 629-633

Wang C Y, Chen H, Kuen B W, et al. Influence of Dissolved Organic Carbon Composition on Prediction of Copper Toxicity to Medaka by Biotic Ligand Model [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 629-633 (in Chinese)

## 溶解性有机碳组成对生物配体模型预测 Cu 毒性的影响

王春艳<sup>1,2</sup>, 陈浩<sup>2</sup>, Kuen Benjamin Wu<sup>3</sup>, 郑丙辉<sup>2,\*</sup>, 安立会<sup>2</sup>

1. 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430072

2. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012

3. 美国 HydroQual 环境咨询有限公司, 美国 新泽西, 07430

**摘要:** 为揭示溶解性有机碳(DOC)的组成对生物配体模型(BLM)预测铜的生物毒性准确性的影响, 研究了不同浓度黄腐酸(FA)、腐殖酸(HA)和两者不同浓度比例混合物影响铜对青鳉急性毒性。结果表明: 在相同水质条件下, 黄腐酸或腐殖酸浓度增加时, 铜对青鳉的 LC<sub>50</sub> 均增加; 两者共存时, 当腐殖酸质量百分比从 10% 增至 90% 时, 铜对青鳉的 LC<sub>50</sub> 也增加。当天然水中 DOC 的组成不确定时, 可假设 HA 和 FA 的组成比例为 1:1, 此时 BLM 预测铜对青鳉的 LC<sub>50</sub> 的偏差最小。

**关键词:** 溶解性有机碳; 黄腐酸; 腐殖酸; 生物配体模型; 铜; 青鳉

文章编号: 1673-5897(2013)4-623-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Influence of Dissolved Organic Carbon Composition on Prediction of Copper Toxicity to Medaka by Biotic Ligand Model

Wang Chunyan<sup>1,2</sup>, Chen Hao<sup>2</sup>, Kuen Benjamin Wu<sup>3</sup>, Zheng Binghui<sup>2,\*</sup>, An Lihui<sup>2</sup>

1. School of Resource and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

3. Hydro Qual Incorporation, New Jersey, USA, 07430

Received 1 August 2011 accepted 24 September 2011

**Abstract:** To study the influence of the composition of dissolved organic carbon (DOC) on predicting the uncertainty of copper toxicity by the biotic ligand model (BLM), three sets of toxic bioassays were performed to study the influences of humic acid (HA) and fulvic acid (FA) at different concentrations, and various mixtures of both HA and FA on copper acute toxicity to medaka. The results indicated that LC<sub>50</sub> of copper to medaka increased with the concentration of HA or FA increasing in same water. As the weight percent of HA added from 10% to 90% when HA and FA in the same water, LC<sub>50</sub> of copper to medaka also increased. To natural waters with unknown DOC compositions, when the ratio of HA and FA was assumed to be 1:1, the predicted LC<sub>50</sub> by BLM would be optimized.

收稿日期: 2011-08-01 录用日期: 2011-09-24

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07528)

作者简介: 王春艳(1976-), 女, 博士, 研究方向为流域水环境管理, E-mail: chen.lan00000@163.com;

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhengbh@cras.org.cn

**Keywords:** DOC; fulvic acid; humic acid; biotic ligand model; copper; medaka

生物配体模型(biotic ligand model,简称BLM)是一种用于预测环境中金属生物毒性的机理性模型,能够在较宽的水质范围内取得较好的预测效果<sup>[1]</sup>。当前,美国环保局已对生物配体模型进行了评估,并推荐将生物配体模型用于淡水系统中铜标准的制定。在欧洲,欧盟也在考虑把生物配体模型用于制定水质纲要等方面<sup>[2]</sup>。在BLM中,溶解性有机质对于金属形态和生物有效性起着关键作用<sup>[3-6]</sup>。在实际操作过程中,水体溶解性有机质的浓度通常以溶解性有机碳(DOC)表示。DOC含量是BLM中一个重要的水质输入参数,但对其组成并未做限定。环境中DOC成分复杂,其主要贡献者是溶解性腐殖质。溶解性腐殖质按其成分组成可分为2类:黄腐酸(FA)和腐殖酸(HA)。由于在很多天然水体中黄腐酸对DOC的贡献占主要地位,BLM简单地假定90%的DOC来自黄腐酸,而10%来自腐殖酸。但是,黄腐酸和腐殖酸的比例在不同水体中可能会有明显差异,DOC组成的变化可能会对BLM预测的准确性产生影响。笔者先期采用BLM研究了天然水体中金属铜对青鳉的急性毒性,取得了较好的结果<sup>[7]</sup>。但是未考虑DOC组成的变化对水体中铜对青鳉急性毒性的影响。本研究考察了黄腐酸、腐殖酸及其混合物对水中铜对青鳉急性毒性的影响,以评估BLM在不同DOC组成条件下预测铜急性毒性的准确性。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 实验溶液的配制

腐殖酸(钠盐,工业用)购自美国Sigma-Aldrich公司,黄腐酸(工业用)购自上海通微生物技术有限公司,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(分析纯)、MgSO<sub>4</sub>(分析纯)、NaHCO<sub>3</sub>(优级纯)、KCl(分析纯)和CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(分析纯)购自北京化学试剂二厂或天津市津科精细化工研究所,实验用水参照(GB/T 6682—1992)分析实验室用水规格。

将腐殖酸和黄腐酸分别溶于水,充分搅拌,放置24 h并过孔径为0.45 μm的滤膜,配制成腐殖酸和黄腐酸母液。DOC通过总有机碳(TOC)分析仪(TOC-V,日本岛津公司)测定。实验中发现,本研究所用腐殖酸和黄腐酸的有机碳的质量百分含量非常接近,均约为40%。这样实验室配水的DOC浓度可通过溶解的腐殖酸和黄腐酸的浓度来间接

比较。

分别配制黄腐酸溶液、腐殖酸溶液及它们的混合溶液,黄腐酸和腐殖酸的浓度系列均为1、3、5、7和9 mg·L<sup>-1</sup>,混合溶液总浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>,其中黄腐酸和腐殖酸的质量比例为9:1、7:3、5:5、3:7和1:9。溶液中阳离子Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>的浓度为10.0、6.00、1.77和3.04 mg·L<sup>-1</sup>,阴离子Cl<sup>-</sup>和SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>浓度为20.5和24.0 mg·L<sup>-1</sup>。标准稀释水配制好后,在(23±1)℃下曝氧气24 h,保证溶液中含有足够的溶解氧。将标准稀释水用于稀释铜标准溶液,配制出不同浓度的铜溶液,溶液在20℃放置2 d以达到平衡状态。标准稀释水中人为加入的离子浓度远大于腐殖酸和黄腐酸中的Cu<sup>2+</sup>(>100倍)、Ca<sup>2+</sup>(>100倍)、Mg<sup>2+</sup>(>100倍)、K<sup>+</sup>(>100倍)和Na<sup>+</sup>(>6倍)等金属杂质离子的浓度,故金属杂质离子对实验的影响可忽略。

### 1.2 生物急性毒性实验

实验方法参照实验鱼毒理测试标准方法<sup>[8]</sup>。实验用鱼为成年青鳉(体长(30±5) mm,体质量(0.3±0.1)g)实验前在连续曝气的标准稀释水中至少驯养7 d,驯养时的水质条件和照明条件与实验时的条件一致。实验前24 h停止喂饲,每天清除粪便及食物残渣。驯养期间死亡率不超过10%。

在预实验确定合适的铜浓度系列后开展正式实验:将1.3425 g的CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O溶于500 mL去离子水中,以Cu计算的溶液浓度为1 g·L<sup>-1</sup>。在7个盛有4 L标准稀释水的鱼缸中分别加入适量CuCl<sub>2</sub>溶液,配制成预实验确定的铜浓度实验溶液,每个溶液均做2个平行,具体浓度(以Cu计)见表1。每组实验均做不加铜的空白对照实验。用尼龙编织的小孔抄网从驯养鱼群中随机选取8尾鱼放入每个实验容器中,所有鱼在30 min内转移完毕。在实验过程中,实验溶液无需强制曝气,温度波动范围不得超过±1℃,保持在(23±1)℃,pH波动范围不得超过±0.2。实验周期为96 h,实验结束时,若空白对照实验中青鳉鱼无死亡,则认为实验结果有效。实验开始后3~6 h内随时观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率,其后于24、48、72和96 h观察并记录受试鱼的中毒症状及死亡率,及时清除死鱼。死鱼的判断标准为用玻璃棒轻触鱼的尾部,没有反应即认为死亡。

表 1 正式实验溶液中的铜浓度

Table 1 Concentrations of Cu in series test solutions

实验溶液名称	Cu <sup>2+</sup> /(μg·L <sup>-1</sup> )					
	20	30	40	50	60	70
1.00 mg·L <sup>-1</sup> 的黄腐酸溶液	20	30	40	50	60	70
3.00 mg·L <sup>-1</sup> 的黄腐酸溶液	30	60	90	120	150	180
5.00 mg·L <sup>-1</sup> 的黄腐酸溶液	20	40	60	80	100	120
7.00 mg·L <sup>-1</sup> 的黄腐酸溶液	25	50	75	100	125	150
9.00 mg·L <sup>-1</sup> 的黄腐酸溶液	30	60	90	120	150	180
1.00 mg·L <sup>-1</sup> 的腐殖酸溶液	30	60	90	120	150	180
3.00 mg·L <sup>-1</sup> 的腐殖酸溶液	30	60	90	120	150	180
5.00 mg·L <sup>-1</sup> 的腐殖酸溶液	30	60	90	120	150	180
7.00 mg·L <sup>-1</sup> 的腐殖酸溶液	40	80	120	160	200	240
9.00 mg·L <sup>-1</sup> 的腐殖酸溶液	40	80	120	160	200	240
腐殖酸占 10% 的混合溶液	50	100	150	200	250	300
腐殖酸占 30% 的混合溶液	50	100	150	200	250	300
腐殖酸占 50% 的混合溶液	50	100	150	200	250	300
腐殖酸占 70% 的混合溶液	50	100	150	200	250	300
腐殖酸占 90% 的混合溶液	50	100	150	200	250	300

1.3 数据处理

采用 SPSS 13.0 数理统计软件处理生物急性毒性实验数据,得到 Cu 对青鳉的 96 h-LC<sub>50</sub>。

2 结果 (Results)

2.1 不同浓度的黄腐酸、腐殖酸对 Cu 生物急性毒性的影响

表 2、表 3 展示了不同浓度黄腐酸、腐殖酸对 Cu 生物急性毒性的影响。可知,当其他离子浓度不变,而黄腐酸或腐殖酸浓度增加时,Cu 对青鳉的 96 h-LC<sub>50</sub> 也逐渐增加。当黄腐酸浓度从 1 mg·L<sup>-1</sup> 上升到 9 mg·L<sup>-1</sup> 时,铜对青鳉的 96 h-LC<sub>50</sub> 从 49.6 μg·L<sup>-1</sup> 升高到 117.2 μg·L<sup>-1</sup>。当腐殖酸浓度从 1 mg·L<sup>-1</sup> 上升到 9 mg·L<sup>-1</sup> 时,铜对青鳉的 96 h-LC<sub>50</sub> 从 56.1 μg·L<sup>-1</sup> 升高到 202.3 μg·L<sup>-1</sup>。

表 2 不同浓度黄腐酸(FA)溶液中铜对青鳉的 LC<sub>50</sub>

Table 2 LC<sub>50</sub> of Cu to medaka in solutions with series concentrations of fulvic acid (FA)

参数	FA/(mg·L <sup>-1</sup> )				
	1.00	3.00	5.00	7.00	9.00
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	50.4	60.4	74.6	88.5	113.9
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	43.9~56.7	42.3~74.4	61.5~92.7	74.7~100.9	96.47~129.4
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	48.9	71.1	72.2	82.1	120.4
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	42.5~55.2	52.8~85.6	59.4~84.0	65.0~98.3	101.9~138.1
平均值 LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	49.6	65.7	73.4	85.3	117.2

表 3 不同浓度腐植酸(HA)溶液中铜对青鳉的 LC<sub>50</sub>

Table 3 LC<sub>50</sub> of Cu to medaka in solutions with series concentrations of humic acid (HA)

参数	HA/(mg·L <sup>-1</sup> )				
	1.00	3.00	5.00	7.00	9.00
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	54.30	92.47	126.5	145.8	203.0
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	37.2~67.3	74.9~106.0	109.7~140.5	121.2~167.5	175.0~242.1
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	57.8	96.2	123.9	151.6	201.6
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	39.5~71.0	78.7~109.8	107.6~140.9	131.8~171.5	173.6~241.8
平均值 LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	56.1	94.3	125.2	148.7	202.3

2.2 不同浓度比例的黄腐酸和腐殖酸对 Cu 生物急性毒性的影响

表 4 展示了不同浓度比例的黄腐酸、腐殖酸混合溶液对 Cu 生物急性毒性的影响。可知,当水溶液中其他离子浓度不变,黄腐酸和腐殖酸总浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>,腐殖酸质量百分比从 10% 上升到 90% 时,铜对青鳉的 96 h-LC<sub>50</sub> 从 113.8 μg·L<sup>-1</sup> 升高到 219.4 μg·L<sup>-1</sup>。为探讨黄腐酸和腐殖酸共存时的相互作用对铜毒性影响的程度,将表 2、表 3 实验结果简单叠加,即得到腐殖酸/(腐殖酸+黄腐酸)为 10%、30%、50%、70% 和 90% 时,96 h-LC<sub>50</sub> 值则分别对应为 173.3(56.1+117.2)、179.6(94.3+85.3)、198.6(125.2+73.4)、214.4(147.7+65.7) 和 251.9(202.3+49.6) μg·L<sup>-1</sup>。

表 4 不同比例组成的 FA、HA 混合溶液中铜对青鳉的 LC<sub>50</sub>

Table 4 LC<sub>50</sub> of Cu to medaka in mixture solutions with series concentrations of HA and FA

参数	HA/(HA+FA)/%				
	10	30	50	70	90
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	110.7	154.1	168.9	169.2	216.2
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	85.0~138.4	124.8~176.7	144.3~193.0	142.7~194.9	187.6~241.4
LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	117.0	160.3	163.1	175.0	222.6
95%置信区间/ (μg·L <sup>-1</sup> )	93.5~143.0	131.2~183.0	137.3~187.4	149.6~200.4	195.4~247.3
平均值 LC <sub>50</sub> /(μg·L <sup>-1</sup> )	113.8	157.2	166.0	172.1	219.4

3 讨论 (Discussion)

表 2 和表 3 结果表明,在相同水质条件下,黄腐酸或腐殖酸浓度增加时,铜对青鳉的 LC<sub>50</sub> 均增加。但在相同浓度的腐殖酸溶液里,铜对青鳉的 LC<sub>50</sub> 要

比相同浓度的黄腐酸溶液中大,表明相同浓度的腐殖酸溶液里铜对青鳉的毒性效应要小于相同浓度的黄腐酸,说明腐殖酸对铜的配合作用要强于黄腐酸。

在BLM中假定10%DOC来自腐殖酸或者假定90%DOC来自腐殖酸(即两个极端),预测值误差不会大于2倍( $219.4/113.8=1.9$ ),这同文献中广泛报导的BLM有较好的预测能力(即误差小于2倍)是一致的<sup>[3,5,9-11]</sup>。当黄腐酸与腐殖酸的质量比例从9:1变化到1:9时,如果两者在溶液中不存在毒性效应的相互影响,那么混合物的 $LC_{50}$ 应该在两者单独作用的 $LC_{50}$ 的加和范围内,应为 $173.3\sim 251.9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而实验结果表明,两者共同作用时, $LC_{50}$ 的变化范围为 $113.8\sim 219.4\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当黄腐酸和腐殖酸共同存在时,铜对青鳉的毒性效应小于两者单独存在时铜对青鳉的毒性效应,可见黄腐酸、腐殖酸共同存在时有一定的拮抗作用。

由表4可知,当腐殖酸质量百分比从10%增加到90%时,铜对青鳉的 $LC_{50}$ 也增加,但从10%到30%和从70%到90% $LC_{50}$ 增加较快,从30%到70% $LC_{50}$ 增加较慢。对于某一水体,如果DOC主要来自腐殖酸和黄腐酸,由于腐殖酸和黄腐酸的含量和种类难以确定,当假设50%的DOC分别来自腐殖酸和黄腐酸时,BLM预测的铜对青鳉的 $LC_{50}$ 和实验所得的 $LC_{50}$ 之间的差异倍数是比较小的( $219.4/166.0=1.3<$ 差异倍数 $<166.0/113.8=1.5$ ,即差异倍数在1.3和1.5之间)。这个假设可能比现有BLM所采纳的腐殖酸和黄腐酸对DOC贡献的比例(1:9)的假设更“安全”。

在真实的天然水体中,除了腐殖质,有部分DOC还可能来源于非腐殖质的有机物,但这部分有机物对金属的络和活性有可能很弱。不少研究者已意识到这个问题,他们在研究天然水体金属络合的过程中,认为DOC中有部分是有金属络和活性的。为了能用简单实用的络合模型来拟合实验数据,他们将这部分有活性的DOC简单地归结为黄腐酸,即活性黄腐酸。Dwane和Tipping<sup>[12]</sup>研究发现,在一些自然水样的铜滴定实验中,假设当40%~80%的DOC来自活性黄腐酸(能够络合金属铜),而其余的DOC不具有络和能力时,测定的和计算的自由铜离子活度值吻合性最好。Cabaniss等<sup>[13]</sup>和McKnight等<sup>[14]</sup>也建议,在没有更好的DOC界定方法时,假定50%的DOC对金属络合有贡献,而且来自活性黄腐酸,能够最全面地预测铜与有机质形成

的复合物种类及其形态。根据这个假设,De Schampelaere等<sup>[15]</sup>在研究中,准确地预测所研究地表水中铜对大型溞(*Daphnia magna*)的48h- $LC_{50}$ 值(预测值与观察值的比值均小于2)。然而,由于生活废水和工业污水的大量排放源中含有高度络合能力的有机污染物分子,如乙二胺四乙酸(EDTA)进入天然水体中。EDTA既不是腐殖酸,也不是黄腐酸,却可强烈地络合重金属。对这类受污水体,如何适宜地界定BLM中的DOC组成比例以准确预测金属的毒性是一个值得研究的课题。

综上所述,本研究发现溶解性有机碳的组成对水中铜对青鳉的急性毒性影响不大。在现有的BLM模型中,假定90%的DOC来自黄腐酸,10%来自腐殖酸,是可接受的。假定DOC中黄腐酸和腐殖酸均为50%时,BLM模型预测的准确性最好。

通讯作者简介:郑丙辉(1963—),男,浙江天台人,研究员,博导,主要从事河流、河口及海岸带环境研究,发表学术论文100余篇。

#### 参考文献:

- [1] Niyogi S, Wood C M. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 6177-6192
- [2] 黄圣彪. 水环境中铜形态与其生物有效性/毒性关系及其预测模型研究[D]. 北京:中国科学院研究生院, 2003: 17
- [3] Huang S B. Measurement and prediction in the toxic/bioavailable concentration of copper in natural water [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2003: 17 (in Chinese)
- [4] Di Toro D M, Allen H E, Bergman J S, et al. The biotic ligand model: A computational approach for assessing the ecological effects of metals in aquatic systems [R]. New York: International Copper Association, Environmental Program, 2000
- [5] Di Toro D M, Allen H E, Bergman H L, et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals; I. Technical basis [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(10): 2383-2396
- [6] Santore R C, Di Toro D M, Paquin P R, et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals; 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(10): 2397-2402

- [ 6 ] US EPA. Integrated Approach to Assessing the Bio-availability and Toxicity of Metals in Surface Waters and Sediments, a Report to the EPA Science Advisory Board [R]. Washington, DC: Office of Research and Development, USEPA, 1999
- [ 7 ] Wang C Y, Chen H, Wu K B, et al. Application of the biotic ligand model to predict copper acute toxicity to medaka fish in typical China rivers [J]. Water Science and Technology, 2011, 64(6): 1277—1283
- [ 8 ] 国家环境保护局. GB/T 13267—1991 水质 — 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法[S]. 北京: 国家质量监督检验检疫总局, 2002  
National Environmental Protection Bureau of the People's Republic of China, GB/T 13267—91. Water quality — Determination of the acute toxicity of substance to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* namilton—Buchanan) [S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the Peoples Republic of China, 2002 (in Chinese)
- [ 9 ] Ryan A C, Tomasso J R, Klaine S J. Influence of pH, hardness, dissolved organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters; Implications for the biotic ligand model [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(8): 1663—1670
- [10] De Schamphelaere K A C, Janssen C R. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(1): 48—54
- [11] US EPA. 2007 Updated Aquatic Life Copper Criteria [R/OL] [http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/copper/2007\\_index.cfm](http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/copper/2007_index.cfm)
- [12] Dwane G C, Tipping E. Testing a humic speciation model by titration of copper—amended natural waters [J]. Environment International, 1998, 24(5—6): 609—616
- [13] Cabaniss S E, Shuman M S. Copper binding by dissolved organic matter; II. Variation in type and source of organic matter [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1988, 52(1): 185—193
- [14] McKnight D M, Feder G, Thurman E M, et al. Complexation of copper by aquatic humic substances from different environments [J]. Science of the Total Environment, 1983, 28(1-3): 65—76
- [15] De Schamphelaere K A, Heijerick D G, Janssen C R. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2002, 133(1—2): 243—258 ◆