

文章编号: 1000-5862(2014)04-0362-05

离子液体 $[C_{12}mim]Cl$ 对大鳞副泥鳅的毒性效应

杜启艳, 王琼琼, 南平, 常重杰*

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 以离子液体 1-十二烷基-3-甲基氯化咪唑 $[C_{12}mim]Cl$ 为诱变剂, 以大鳞副泥鳅为受试动物, 采用急性毒性、遗传毒性及生理毒性试验, 研究了离子液体 $[C_{12}mim]Cl$ 对水生生物的生物毒性作用。急性实验表明 $[C_{12}mim]Cl$ 对大鳞副泥鳅有明显的毒性, 其对大鳞副泥鳅 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 45.83 和 $36.82\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 的 SC 为 $7.13\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 微核实验表明: 染毒后, 随着时间和 $[C_{12}mim]Cl$ 浓度的增加, 大鳞副泥鳅红细胞的微核率与对照组相比均显著升高; 生化实验表明: 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 在同一浓度不同时间的处理组中, 两酶的活性是先降低后升高。在同一时间不同浓度的处理组中, 两酶随处理浓度的升高, 活性降低。 $[C_{12}mim]Cl$ 对大鳞副泥鳅具有显著的遗传毒性和生化毒性效应。

关键词: 大鳞副泥鳅 $[C_{12}mim]Cl$; 急性毒性; 遗传毒性; 生化毒性

中图分类号: S 948

文献标志码: A

0 引言

离子液体是一种完全由阴阳离子所组成的盐, 它在室温或接近室温条件下呈现液态。其中, 有机阳离子包括咪唑、吡啶、季铵和季磷等; 无机阴离子包括 PF_6^- , BF_4^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 等。离子液体是一种新型的绿色溶剂, 对许多无机盐和有机物具有较好的溶解性。它蒸汽压很低、不容易燃烧、导电性强并且性质稳定。因此, 能够代替传统挥发性有机溶剂发挥作用^[1-2]。

本文所采用的离子液体是 1-十二烷基-3-甲基氯化咪唑 $[C_{12}mim]Cl$, 属于咪唑类离子液体。它是一种新发展起来的离子化合物, 具有较大的液态稳定温度范围、较好的化学稳定性和较强的选择溶解能力, 在化学反应、液体分离等过程中表现出良好的应用潜能^[3]。然而, 从目前的文献报道来看, 其物化性质、理化参数等还缺乏统一的标准; 在评价其降解性、毒性和腐蚀性等有关环境、安全和卫生方面的指标时, 证据还存在明显的不足。因此, 本文用毒理学方法研究咪唑类离子液体 $[C_{12}mim]Cl$ 对大鳞副

泥鳅的毒性影响, 为水生生物的安全和人类的健康生活提供科学依据。

大鳞副泥鳅为泥鳅科、副泥鳅属的鱼类, 俗名大泥鳅, 是中国的特有物种。它们具有较强的抗污能力, 同时对外源物质反应灵敏; 并且分布广泛, 生活能力很强, 对环境要求不高, 室内极易饲养, 可以作为理想的水生生物实验材料。本文以大鳞副泥鳅为实验材料, 研究离子液体 $[C_{12}mim]Cl$ 对其急性毒性效应, 及对红细胞微核和肝脏中 SOD 和 CAT 酶活性的影响, 旨在为人们认识 $[C_{12}mim]Cl$ 的危害提供实验依据^[4]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成体大鳞副泥鳅体质量为 $18 \sim 22\text{ g}$, 体长 $13 \sim 16\text{ cm}$, 从河南省新乡市的宏达市场购买。实验用水需要提前暴晒 1 周, 并且每隔 24 h 更换 1 次。实验前将 2 种泥鳅在实验室先驯养 1 周, 选取身体大小相似、健康活泼的个体备用, 并将死亡个体及时捞出。 $[C_{12}mim]Cl$ 试剂购自上海成捷化学有限公司,

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 河南省省级动物学重点学科资助项目。

通信作者: 杜启艳 (1964-), 女, 河南卫辉人, 教授, 主要从事动物遗传学研究。

常重杰 (1965-), 男, 河南禹州人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传学研究。

SOD 和 CAT 试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验 在预实验的基础上, 确定正式实验中 [C₁₂mim]Cl 的浓度范围. 在正式实验中, 将 [C₁₂mim]Cl 配制成浓度梯度为 26、31、37、45 和 54 mg · L⁻¹ 的 5 个实验组, 另设 1 个空白对照组. 每组分别投放 10 尾健康、活泼的个体, 每 24 h 更换 1 次等体积等浓度的 [C₁₂mim]Cl 溶液. 每天观察 2 种泥鳅的中毒症状, 并记录它们的死亡时间和数量. 如果发现有死亡个体时, 应当及时捞出. 统计完成后, 分别计算出 24 h 和 48 h 的半致死浓度 LC₅₀ 以及安全浓度 S_c.

1.2.2 微核实验 参考急性毒性实验结果先预实验, 设计合理的实验浓度梯度. 正式实验时, 设计 2、4 和 8 mg · L⁻¹ 共 3 个浓度梯度和 1 个对照组. 每组均投放 10 个个体, 实验持续 6 d, 于第 2 天、第 4 天及第 6 天各取 1 次材. 每次从每个浓度组各取 3 尾大鳞副泥鳅, 断尾取血, 制成血涂片. 涂片自然晾干后, 用甲醇固定 15 min, 用以 PBS 液 (pH 值为 6.8) 稀释的 Giemsa (体积比 9: 1) 染色 10 min, 用 PBS 冲洗, 晾干. 要求每尾制作 2 张涂片. 在光学显微镜下观察微核细胞形状, 记录微核细胞数量, 并计算微核率^[5]. 每张涂片随机观察 6 000 个红细胞, 计算出微核率, 结果用千分率表示. 微核细胞率 / ‰ = 实验过程中观察到的微核细胞数 / 细胞总数 × 1 000‰.

1.2.3 生化毒性实验 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅的生化毒性实验浓度与遗传毒性实验设计的浓度相同. 分别于染毒后第 2 天、第 4 天和第 6 天各取材 1 次, 每个浓度组投放 10 尾大鳞副泥鳅, 每组 3 个平行, 每个平行 3 个重复, 并从中随机取 2 尾泥鳅, 迅速取其肝脏制成肝脏匀浆, 按 1: 9 的比例加入生理盐水稀释. SOD 和 CAT 酶活测定方法严格按照试剂盒说明书的操作步骤进行^[5].

1.3 实验数据分析

采用 SPSS16.0 软件对所有实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并用最小显著差数法 (LSD) 对数据进行多重比较, 同时还利用了 Excel 2003 对数据进行分析作图. 统计学意义上显著性差异以 P 值表示, P < 0.05 (*) 表示具有统计学意义上显著差异; P < 0.01 (**) 表示具有统计学意义上极显著差异.

2 结果

2.1 急性毒性实验

离子液体 [C₁₂mim]Cl 在处理大鳞副泥鳅过程中, 大鳞副泥鳅行为异常 (尤其是高浓度组), 如开始表现为焦躁不安地到处游动, 并不时地把头探出水面排气泡. 大鳞副泥鳅有时变得安静, 有时又表现得非常不安^[6]. 一段时间之后, 动作开始变得缓慢, 反应不灵敏, 身体出现侧翻, 最终漂浮在水面上, 身体僵硬, 出现死亡现象. 急性毒性结果表明, [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅具有较明显的毒性.

所得急性毒性结果见表 1 和图 1, 大鳞副泥鳅的 LC_{50 24 h} 和 LC_{50 48 h} 分别为 45.83 和 36.82 mg · L⁻¹, 48 h 的 S_c 为 7.13 mg · L⁻¹; 处理 24 h 时, 最低浓度组 26 mg · L⁻¹ 和最高浓度组 54 mg · L⁻¹ 的死亡率分别达到 10% 和 70%; 处理 48 h 时, 26 mg · L⁻¹ 和 54 mg · L⁻¹ 浓度组的死亡率分别达到 20% 和 90%. 可见, 低浓度的 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅的致死作用不明显, 随着 [C₁₂mim]Cl 浓度的增加, 大鳞副泥鳅的死亡数量也不断增加.

表 1 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅的急性毒性

浓度 / (mg · L ⁻¹)	死亡率 / %		半致死浓度 / (mg · L ⁻¹)		安全浓度 / (mg · L ⁻¹)
	24 h	48 h	24 h	48 h	
26	10	20			
31	10	30			
37	20	50	45.83	36.82	7.13
45	30	70			
54	70	90			

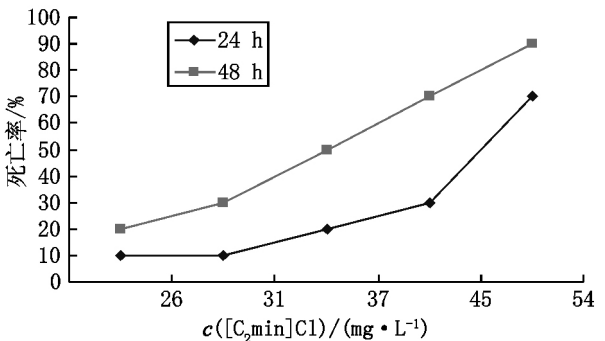


图 1 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅的急性毒性

2.2 遗传毒性实验

离子液体 [C₁₂mim]Cl 处理大鳞副泥鳅后所得实验结果见表 2、图 2 和图 3. 显微镜下观察, 大鳞副泥鳅肝细胞的微核位于细胞质中, 与主细胞核分开, 形状呈圆形或椭圆形, 边缘光滑, 染色性质与主细胞

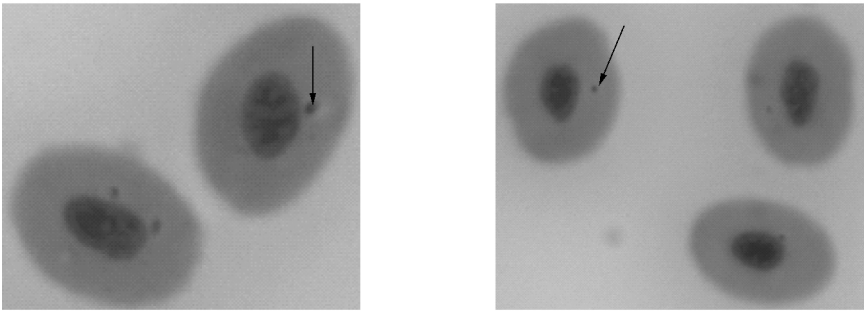
核一致. 异常核位于细胞质中,形状不规则,如核内凹、核变形、核破裂、核内有空泡,周围不光滑,染色性质与主细胞核相同. 实验结果显示, $[C_{12}mim]Cl$ 能诱导大鳞副泥鳅的红细胞产生微核,具有一定的遗传毒性作用,实验各组的微核率均高于对照组,表现出统计学意义上极显著差异;在同一处理时间下,

随着处理浓度的不断升高,处理组与对照组的微核率差异越来越明显. 在同一浓度下,随着处理时间的不断增加,处理组与对照组的微核率差异也越来越明显. $[C_{12}mim]Cl$ 与其诱发的大鳞副泥鳅红细胞微核率具有时间-剂量效应.

表2 $[C_{12}mim]Cl$ 诱导大鳞副泥鳅红细胞的微核率

实验动物	浓度/ ($mg \cdot L^{-1}$)	观察细胞 数/个	微核率/%		
			2 d	4 d	6 d
大鳞副泥鳅	0	6 000	0.95 ± 0.02	1.05 ± 0.01	0.99 ± 0.01
	2	6 000	$1.45 \pm 0.01^{**}$	$2.16 \pm 0.01^{**}$	$2.91 \pm 0.02^{**}$
	4	6 000	$3.43 \pm 0.01^{**}$	$3.45 \pm 0.02^{**}$	$4.39 \pm 0.01^{**}$
	8	6 000	$2.59 \pm 0.01^{**}$	$4.77 \pm 0.02^{**}$	$5.25 \pm 0.01^{**}$

注: ** 表示与对照组相比具有统计学意义上极显著差异 ($P < 0.01$).



箭头所指显示的是大鳞副泥鳅红细胞中的微核。
图2 大鳞副泥鳅红细胞的微核(×100)

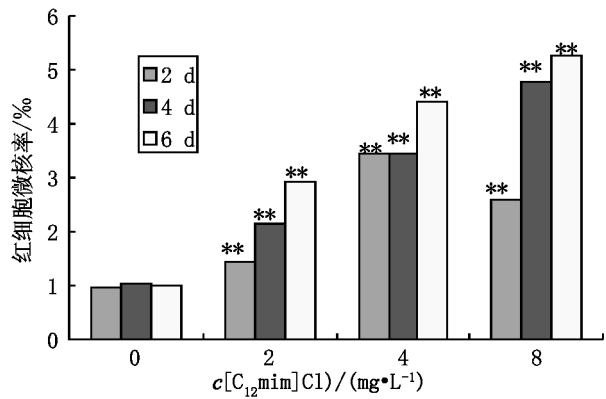


图3 大鳞副泥鳅血细胞微核率与 $[C_{12}mim]Cl$ 的关系

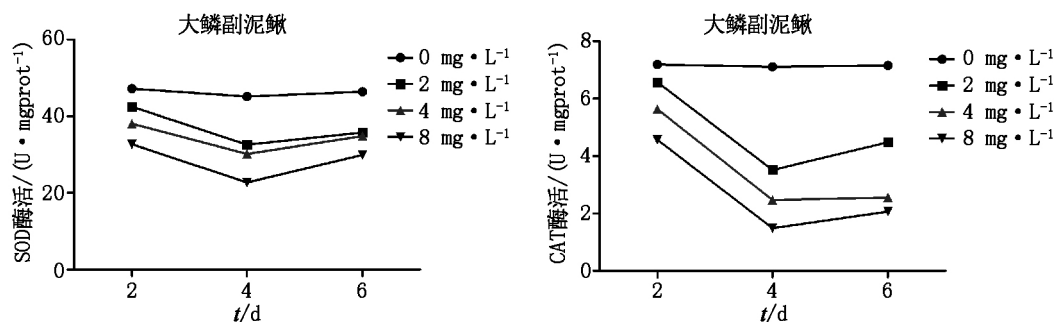
2.3 生化毒性实验

离子液体 $[C_{12}mim]Cl$ 处理大鳞副泥鳅 2、4、6 d 后,测得其肝脏中 SOD 和 CAT 酶活力的影响结果见表 3 和图 4. 各处理组与对照组相比,均有统计学意义上极显著差异. 总体来看,在同一浓度不同时间的处理组中,两酶的活性是先降低后升高;在同一时间不同浓度的处理组里,两酶随处理浓度的升高,活性降低;表现出明显的时间效应和剂量效应.

表3 $[C_{12}mim]Cl$ 对大鳞副泥鳅肝脏中的 SOD、CAT 酶活力的影响 $U \cdot mgprot^{-1}$

浓度/ ($mg \cdot L^{-1}$)	2 d		4 d		6 d	
	SOD 活力	CAT 活力	SOD 活力	CAT 活力	SOD 活力	CAT 活力
0	47.21 ± 0.64	7.19 ± 0.01	45.19 ± 0.06	7.11 ± 0.01	46.41 ± 0.01	7.16 ± 0.01
2	$42.50 \pm 0.22^{**}$	$6.58 \pm 0.03^{**}$	$32.56 \pm 0.01^{**}$	$3.52 \pm 0.03^{**}$	$35.78 \pm 0.03^{**}$	$4.48 \pm 0.01^{**}$
4	$38.07 \pm 0.01^{**}$	$5.64 \pm 0.01^{**}$	$30.19 \pm 0.01^{**}$	$2.47 \pm 0.01^{**}$	$34.85 \pm 0.01^{**}$	$2.56 \pm 0.01^{**}$
8	$32.73 \pm 0.13^{**}$	$4.57 \pm 0.01^{**}$	$22.71 \pm 0.01^{**}$	$1.49 \pm 0.01^{**}$	$29.94 \pm 0.28^{**}$	$2.07 \pm 0.01^{**}$

注: ** 表示在 0.01 水平有差异.

图4 血清 SOD 和 CAT 酶活力与 [C₁₂mim]Cl 的关系

3 讨论

3.1 微核实验是检测染色体损伤的有效方法

经济、简单、快速是微核实验最大的特点,并且微核实验方法在敏感性、特异性和准确性方面的优势与经典的染色体畸变分析方法大体相当^[7].国际上普遍认为微核来源于染色体断片或丢失的整条染色体,根据这一理论,细胞必须经过分裂后,才能观察到微核.但国内有学者提出了间期细胞可以以核芽突方式形成微核学说,并认为该途径与染色体断片和染色体丢失形成微核理论并不矛盾,都是遗传物质的丢失,具有相同的遗传毒理效应^[8].本文在微核镜检测中也发现有核外突、核内凹、主核和微核相连等现象,推测可能是 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅血细胞核产生毒性引起,进而形成微核.该微核实验结果表明,离子液体 [C₁₂mim]Cl 是一种具有较强毒性的诱变剂,能诱发大鳞副泥鳅微核率显著上升,并且表现出明显的浓度效应和时间效应^[9].

3.2 SOD 和 CAT 酶活检测污染物毒性的依据

生化毒性实验是研究环境中毒性物质对机体代谢影响的重要方法之一.肝脏是生物体中代谢最复杂的器官,是很多有毒物质对机体作用的重要靶器官.有毒物质的毒性作用大小可以用肝脏细胞内各种酶的活性变化来判断.酶活性可以作为一种生化指标来快速反映环境胁迫对生物体的影响^[10-11],这为利用各种抗氧化酶的活性来检测环境中存在的各种污染物提供理论基础^[12-13].

机体在受到环境污染产生的活性氧自由基伤害时,抗氧化系统中各种抗氧化酶的活力或活性物质的含量先下降,当损害到一定程度后该系统会产生诱导效应,此时各种抗氧化酶的活力或活性物质的含量升高.但是随着有毒物质浓度的不断增加或暴露时间的延长,活性氧自由基大量增加,抗氧化系

统的清除能力下降,各种抗氧化酶的活力或活性物质的含量也随着下降^[14-16].实验结果表明,各处理组中, SOD 和 CAT 酶活力均低于对照组的水平,并且随着 [C₁₂mim]Cl 浓度的增加,酶活力先下降后上升.用 [C₁₂mim]Cl 处理 2 种泥鳅 2 d 后,各浓度组中 2 种酶的活力下降;在处理 4 d 后,各浓度组中 2 种酶的活力上升;在处理 6 d 后,各浓度组中 2 种酶的活力降低.本实验结果显示出 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅具有显著的生化毒性效应,间接地反映出机体中毒后的受损程度,这与微核实验结果相一致.

3.3 离子液体环境毒性的相关研究

在离子液体对生态环境的影响与应用风险评价方面,离子液体的毒性起着非常重要的作用.温度、pH 值、培养基成分等因素,均会影响离子液体的毒性.同种离子液体的毒性,会随着温度的升高而增大.原因是温度升高后,胞内、胞外酶的活性增强,导致离子液体对生物的毒害作用增大^[17].目前,离子液体的毒性研究已取得一些进展,可以初步确定离子液体的毒性与阳离子核、阳离子的取代侧链有较大关联,与阴离子种类关系较小^[18]. [C₁₂mim]Cl 属于咪唑类离子液体,本试验结果表明, [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 45.83 和 36.82 mg · L⁻¹, 48 h 的 S_c 为 7.13 mg · L⁻¹,说明 [C₁₂mim]Cl 对大鳞副泥鳅有明显的毒性.因此,用鱼类作为毒理学研究的试验材料,分析环境中有毒化学物质对水生生态系统的危害很有必要^[19].

4 参考文献

- [1] Fatemi M H, Izadiyan P. Cytotoxicity estimation of ionic liquids based on their effective structural features [J]. Chemosphere 2011, 84(5): 553-563.
- [2] Lucia Casal-Dujat, Mafalda Rodrigues, Alex Yague, et al. Gemini imidazolium amphiphiles for the synthesis, stabilization, and drug delivery from gold nanoparticles [J].

- Langmuir 2012 8(5):2368-2381.
- [3] 王仲妮,王洁莹,司友华,等.咪唑类离子液体的研究进展[J].化学进展 2008 20(7/8):1057-1063.
- [4] 杜启艳,吴小华,南平,等.苏丹红 I 对泥鳅红细胞微核率和组织磷酸酶活性的影响[J].安徽农业科学, 2008 36(14):5902-5903 5907.
- [5] 燕帅国,南平,韩晨露,等.离子液体[C₈mim]Cl 对泥鳅毒性效应的研究[J].水生态学杂志,2012 33(5):119-122.
- [6] 常重杰,王君,肖静,等.苏丹红 III 对泥鳅的急性毒性、遗传及生理毒性研究[J].水生态学杂志,2012 33(4):113-116.
- [7] Heddle J A, Cimino M C, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future[J]. Environ Mole Mutagen, 1991, 18: 277-291.
- [8] 曹佳.微核试验在中国的应用、发展与展望[J].遗传, 2003 25(1):73-75.
- [9] 燕帅国,南平,杜启艳,等.离子液体[C₁₆mim]Cl 对泥鳅的毒性效应[J].生态毒理学报 2013 1(8):92-96.
- [10] Cai Lishe, Ma Li, Gao Yang, et al. The effects of an thracene, phenanthrene, pyrene and chrysene on activity of antioxidant enzymes of ruditapes philippinamm [J]. Marine Sciences 2005 29(8):47-52.
- [11] Scott-Fordsm J J, WEEKS J M. Biomarkers in earth worms [J]. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology 2000 165:117-159.
- [12] 张宜奎,宋秀凯,刘爱英,等. Cd²⁺ 胁迫对文蛤鳃组织 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的影响[J].安全与环境学报 2011 11(6):19-23.
- [13] 李存焕,郭静怡,张心,等.生物源农药防治草坪蛴螬效果研究[J].江西师范大学学报:自然科学版 2014 38(1):30-33.
- [14] 王重刚,余群,郝昂,等.苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏超氧化物歧化酶活性的影响[J].海洋环境科学, 2002 21(4):10-13.
- [15] 赵元凤,吕景才,宋晓阳,等.镉污染对鲢鱼超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响[J].农业生物技术学报 2002(10):267-271.
- [16] 简乐,胡迪生.二硫化碳接触者血清铜锌超氧化物歧化酶与丙二醛水平观察[J].工业卫生与职业病,1999, 25(3):142-144.
- [17] Ma Jianmin, Cai Linlin, Zhang Bangjun, et al. Acute toxicity and effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on green algae [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety 2010 73(6):1465-1469.
- [18] 许晓霞,薛永来,杜道林.离子液体毒性及对环境影响研究进展[J].广东农业科学 2013(1):170-173.
- [19] 徐韵,李兆利,陈海刚,等.兽药添加剂唑乙醇对水生生物的毒理学研究[J].南京大学学报:自然科学版, 2004 40(6):728-733.

Acute Toxicity and Effects of [C₁₂mim]Cl Ionic Liquids on *Paramisgurnus dabryanus*

DU Qi-yan, WANG Qiong-qiong, NAN Ping, CHANG Zhong-jie*
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing Henan 453007, China)

Abstract: In this experiment, the acute toxicity, genotoxicity and physiological toxicity effects of the ionic liquid [C₁₂mim]Cl on *Paramisgurnus dabryanus* were studied. Acute tests showed: [C₁₂mim]Cl have significant toxicity on *P. dabryanus*, its 24 h and 48 h LC₅₀ were 45.83 and 36.82 mg · L⁻¹ respectively; 48 h of S_c is 7.13 mg · L⁻¹. Micronucleus test showed that: compared with the control group, erythrocyte micronucleus rate were significantly higher with time and concentration after exposure. The physiological toxicity test indicates that: the activities of SOD and CAT both increase earlier and then decrease in the treatment of different times in the same concentration. And when times are the same, the activities of SOD and CAT decrease with concentration increasing. From the results above, it can be concluded that [C₁₂mim]Cl has significant genetic and physiological toxicity effects on *P. dabryanus*. And this study can provide a basis for people to recognize hazards of [C₁₂mim]Cl.

Key words: *Paramisgurnus dabryanus*, [C₁₂mim]Cl; acute toxicity; genetic toxicity; physiological toxicity

(责任编辑: 刘显亮)