

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120726001

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, 8(1): 92-96

Yan S G, Nan P, Du Q Y, et al. Toxicity of [C₁₆mim]Cl to loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 92-96 (in Chinese)

离子液体 [C₁₆ mim] Cl 对泥鳅的毒性效应

燕帅国, 南平, 杜启艳, 常重杰*

河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

摘要: 以泥鳅为受试动物, 采用急性毒性、微核试验及酶活分析实验, 研究了离子液体[C₁₆mim]Cl 对水生生物的生物毒性作用。急性实验表明: [C₁₆mim]Cl 对泥鳅有明显的毒性, 其对泥鳅 24、48 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 2.533、1.763 和 1.379 mg·L⁻¹; 微核实验表明: 对照组红细胞微核率为 0.5‰ 左右, 而处理组红细胞微核率最高达到 12.89‰, 且各处理组均明显高于对照组 (P < 0.05); 酶活分析实验表明: 处理组血清的 GPT 和 GOT 活力均明显高于对照组, 且随 [C₁₆mim]Cl 浓度增高而呈现上升趋势。从以上结果可以得出: [C₁₆mim]Cl 对泥鳅具有显著的遗传毒性和生理毒性效应, 因而推测其大量使用可能对水生生物及生态环境具有一定的毒害作用。

关键词: 泥鳅; [C₁₆mim]Cl; 微核; GPT; GOT

文章编号: 1673-5897(2013) 1-92-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Toxicity of [C₁₆ mim] Cl to Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)

Yan Shuaiguo, Nan Ping, Du Qiyan, Chang Zhongjie*

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Received 26 July 2012 **accepted** 12 December 2012

Abstract: The toxicity effect of [C₁₆mim]Cl was explored using the loach as tested animal based on the acute toxicity, micronucleus (MN) and enzyme assay test. The acute test result showed that [C₁₆mim]Cl had evident toxicity effect on loach, which LC₅₀ of 24, 48 and 96 h were 2.533, 1.763 and 1.379 mg·L⁻¹, respectively. The results of MN test indicated that the MN frequency of control group just only was 0.5‰, while the highest frequency of MN was 12.89‰ in treating group, and there was significant difference between the treatment groups and the control group (P < 0.05). In enzyme assay test, the results indicated that the GPT and GOT activity of blood serum in treatment groups were significantly higher than that of control fish (P < 0.05), which increased with the increasing of treating concentration and time of [C₁₆mim]Cl ion liquid. It was concluded that [C₁₆mim]Cl had significant genetic toxicity and physiological toxicity effect on loach, suggesting that the use of [C₁₆mim]Cl in industry may have the toxic effect on aquatic organisms and ecosystem.

Keywords: loach (*Misgurnus anguillicaudatus*); [C₁₆mim]Cl; micronucleus; GPT; GOT

近年来, 一种新型溶剂——离子液体引起了化工合成学界的广泛兴趣。它是一类完全由离子组成

的在室温下呈液态的盐, 一般由体积相对较大的有机阳离子和体积相对较小的无机阴离子构成。因其

收稿日期: 2012-07-26 录用日期: 2012-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(Nos.3071666); 河南师范大学博士基金项目(No. 01046500120)

作者简介: 燕帅国(198-), 男, 副教授, 研究方向: 动物遗传学; E-mail: yanshuaiguo@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: changzhongjie@tom.com

不挥发、不易燃、导电性强和热稳定等优势,离子液体在化工合成、分离过程和吸附反应等领域具有广阔的应用前景,并因此曾被认为是环境友好的“绿色溶剂”^[1]。然而近几年研究发现,离子液体对环境和生物体有潜在风险,有些离子液体甚至是有强毒的^[2]。另外,研究发现,离子液体毒性的强弱取决于其阳离子的类型及其取代基碳链的长短,而与其阴离子的类型和大小关系不大,即:在同类离子液体中,其毒性随阳离子取代基碳链的增长而增加^[3,4],这为进一步研究离子液体的生物毒性提供了重要的理论依据。但是,有关离子液体生物毒性的研究目前还处于初步阶段,国内外的研究报告多集中于急性毒性研究的结果。本研究首次以泥鳅为受试对象,采用急性毒性、微核分析和酶活分析等毒理学实验技术,研究了离子液体 $[C_{16}mim]Cl$ 对水生生物的生物毒性作用,这将为离子液体对生态环境的影响与应用风险评价等提供重要的理论指导意义。

急性毒性实验是确定有毒化学物质毒性高低的主要技术方法,也是进行慢性毒性的基础和前提,其中获得被测试化学毒物对实验动物的半致死浓度(LD_{50} 或 LC_{50})是其中心任务。而微核则是细胞在有丝分裂时因各种有害因素损伤,使细胞核成分残留在核外的微小核染色质块,类似细胞核,但体积较小($\leq 1/3$ 细胞核)。此外,酶活性的改变是反应生物体生理变化的一项灵敏指标,暴露于污染的环境中,生物体在致死甚至半致死效应之前,生理生化反应就已经发生了明显的变化,有些酶的活性会被抑制或激活。谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是广泛存在于动物线粒体中的重要的氨基酸转氨酶,在机体蛋白质代谢中起重要作用,其活性变化是反映细胞受损伤的主要敏感指标之一。

泥鳅(*Misgurnus anguillicadatus*)属鲤形目鳅科,是广泛分布于朝鲜、东南亚和我国的一种淡水鱼类,也是深受人们喜爱的优质鱼类。同时,泥鳅还是一种抗污能力较强,对外界污染物反应灵敏,且易于在实验室中饲养,因而是毒理学研究和环境监测的模式生物^[5]。综上,本研究以泥鳅为受试动物,采用泥鳅外周血红细胞的微核及谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)作为生物标志物,研究离子液体 $[C_{16}mim]Cl$ 对水生动物的遗传毒性及生理毒性,旨在探讨 $[C_{16}mim]Cl$ 对水生生物和人类健康的潜在威胁及毒性风险的大小,为其生态风险评价及其合理研发与应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

泥鳅 200 尾,购自新乡市宏达市场,健康状况良好,体重 12~17 g,平均体长 10~13 cm,实验前在曝气的自来水中驯养一周,每 24 h 换一次水,死亡个体及时捞出。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验

在预实验中,找出其 96 h 的最小全致死(100%死亡率)浓度及最大全存活(0 死亡率)浓度。然后采用 5 个等比级数实验浓度,将 $[C_{16}mim]Cl$ 配制成为 1.581、1.879、2.277、2.732 和 3.33 $ng \cdot L^{-1}$ 5 个实验组(10 尾/组)。每 24 h 换一次相同质量的 $[C_{16}mim]Cl$ 水溶液。前 12 h 连续观察,随后 24 和 48 h 观察记录。采用改进寇氏法(Karber)计算出 $[C_{16}mim]Cl$ 对泥鳅的半致死浓度(LC_{50})及安全浓度^[6]。

1.2.2 微核检测实验

根据急性毒性的结果,设置 0.125、0.25 和 0.50 $mg \cdot L^{-1}$ 3 个处理组和 1 个空白对照组,挑选体长和生长状况相似的泥鳅随机放入各实验组(15 尾/组)。处理各组每隔 24 h 更换 1 次相同质量的处理液,空白对照组采用曝气的自来水处理,也是每个 24 h 更换一次相同体积的曝气自来水。实验各组均在染毒后 4、8 和 12 d 随机取 2 尾泥鳅,断尾取血,制备血涂片并做好标记。荧光显微镜下观察并计数拍照。每张涂片随机观察 1 000 个红细胞,并统计有微核的细胞数,计算微核率:微核细胞率($\%$) = 带有微核的细胞数/观察的细胞总数 $\times 1000\%$ 。

1.2.3 酶活分析实验

本实验设计同 1.2.2,分别于染毒后 3、6 和 9 d 各取材一次,每浓度组随机取 2 尾泥鳅,断尾取血,每尾泥鳅的血分别与 400 μL 抗凝剂混匀,3 500 rpm 离心 10 min 制备血清待测,GPT 和 GOT 酶活测定方法按照试剂盒说明书的操作步骤进行。

1.3 数据分析

所有实验数据均采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),用最小显著差数法(LSD)进行多重比较并作图。显著性差异以 P 值表示, $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 $[C_{16}mim]Cl$ 对泥鳅的急性毒性

不同浓度 $[C_{16}mim]Cl$ 溶液对泥鳅的急性毒性实

验结果见表1。在高浓度处理组中,处理鱼很快就出现异常现象,如水中侧翻打转,上下直窜,几小时后反应迟钝,游动缓慢,逐渐丧失游动能力,最后出现浮头、翻白肚现象,直至死亡。其24、48和96 h的半致死浓度分别为2.533、1.763和1.379 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为0.368 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 不同浓度 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 水溶液对泥鳅红细胞微核率的影响

显微镜下观察,泥鳅正常的成熟红细胞一般为圆形或椭圆形,大小相似,分布均匀,具有1个细胞核(多为椭圆形),位于细胞的中央。而经 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 溶液染毒后,部分外周血红细胞的外形呈现不规则形态,有些细胞核也出现各种异常现象,如核质变形、出现微核等。其中,微核位于细胞质中,为小球形,直径大约相当于主核1/10,且染色程度不一;位置多与主核相近(图1),不同浓度 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 染毒后泥鳅红细胞微核率统计结果见表2。该实验结果显示,实验各组的微核率均高于对照组,且随着处理浓度的升高红细胞微核率也有明显的升高;同时,随着时间的推移,红细胞微核率也有一定程度的升高(图2)。

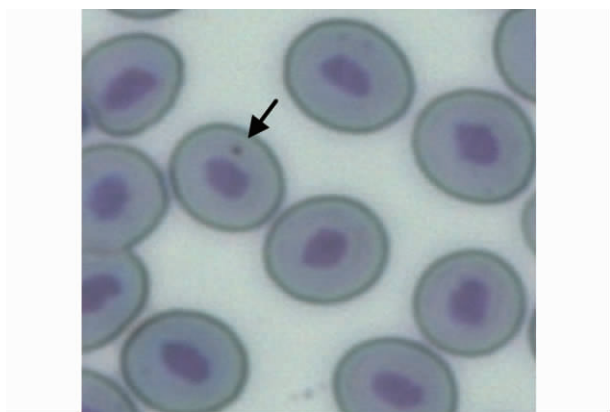


图1 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 诱导泥鳅血细胞的微核细胞(箭头所示)

Fig. 1 Micronuclear cytological map of blood cells induced by $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ in loach

表1 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 诱导泥鳅红细胞微核率的结果

Table 1 Micronucleus cell rate of loach induced by $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$

浓度 $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	微核率/%		
	4 d	8 d	12 d
0	0.500 ± 0.071	0.875 ± 0.106	0.865 ± 0.050
0.125	$4.245 \pm 0.700^*$	$5.575 \pm 0.247^*$	$6.765 \pm 1.577^*$
0.25	$8.465 \pm 0.205^{**}$	$9.940 \pm 0.354^{**}$	$10.565 \pm 0.403^{**}$
0.5	$9.285 \pm 0.021^{**}$	$11.630 \pm 1.137^{**}$	$12.890 \pm 0.650^{**}$

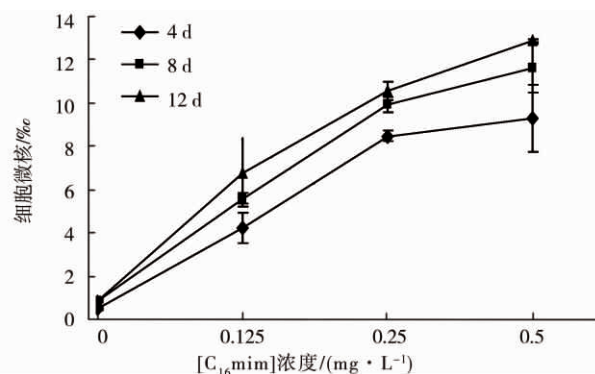


图2 泥鳅血细胞微核率与 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 的关系

Fig. 2 Relation between micronucleus blood cell rate of loach and $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$

2.3 不同浓度 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 对泥鳅血清中GOT、GPT酶活力的影响

离子液体 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 水溶液处理3、6和9 d后,测得泥鳅血清中GPT/GOT酶活力的结果如表2所示,酶活力的变化与不同浓度 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 溶液的关系如图2和表2所示。处理组的酶活力均高于对照组,且同一时间随着处理浓度的增高,泥鳅血清中GPT和GOT活力均呈上升趋势;同时,随着处理时间的延长同一浓度泥鳅血清酶活力也在上升,即:酶活力与染毒时间的长短呈正相关。经SPSS方差分析,除最低浓度组在处理3和6 d后与其对照组无显著差异外,其他各处理组与其对照组间均存在显著差异或极显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。该实验结果显示:离子液体 $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ 对泥鳅具有较强的生理毒性影响,并表现出明显的时间效应和剂量效应。

3 讨论(Discussion)

Ranke等^[7]研究了咪唑类离子液体对细菌(*Vibrio fischeri*)的急性毒性作用,并与4种常用的传统溶剂甲醇、丙酮、乙腈和甲基叔丁基醚(MTBE)相应的半数效应浓度值比较,发现离子液体对*Vibrio fischeri*的毒性大于传统溶剂甲醇、丙酮和乙腈,而与MTBE相当。南平等^[8]的研究结果发现,传统溶剂甲醇对大鳞副泥鳅24、48和96 h的 LC_{50} 分别为461.23、425.32和365.04 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为176.82 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验结果表明, $[\text{C}_{16}\text{Mim}]\text{Cl}$ 对大鳞副泥鳅24、48和96 h的 LC_{50} 分别为2.533、1.763和1.379 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全浓度为0.368 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,毒性远远高于传统有机溶剂甲醇等,属于剧毒,该研究后续的血细胞

表 2 [C₁₆mim] Cl 诱导的泥鳅红细胞酶活性(U·(mg·prot)⁻¹) 测定结果
Table 2 GOT and GPT activity induced by [C₁₆mim]Cl in loach blood cells

浓度 (mg·L ⁻¹)	3 d		6 d		9 d	
	GPT	GOT	GPT	GOT	GPT	GOT
0	56.8 ± 1.8	47.7 ± 1.5	59.5 ± 1.7	50.5 ± 2.7	58.4 ± 2.8	51.7 ± 1.9
0.125	81.7 ± 3.7	64.4 ± 4.0	119.7 ± 5.0 [*]	100.3 ± 4.4 [*]	155.8 ± 6.6 ^{**}	128.5 ± 6.0 [*]
0.25	114.4 ± 3.4 [*]	89.7 ± 6.5 [*]	150.3 ± 7.0 [*]	121.5 ± 5.2 [*]	187.2 ± 5.6 ^{**}	163.6 ± 4.5 ^{**}
0.5	147.1 ± 5.1 [*]	123.1 ± 5.5 [*]	176.5 ± 7.2 ^{**}	156.8 ± 7.2 ^{**}	217.4 ± 7.9 ^{**}	184.5 ± 6.1 ^{**}

注: 与对照组比较, * 表示存在显著差异(P < 0.05), ** 表示存在极显著差异(P < 0.01)。

微核分析和血清中 GPT/GOT 酶活分析的结果也证实了其剧毒性。

外源毒物进入高等动物体后,通过血液参与机体循环输送到靶器官,可与血液中的细胞、功能蛋白等发生作用,因此,鱼类外周血细胞变化(如数量、形态、生化指标 GPT 和 GOT 等)是生物体毒理学敏感指标之一。而在利用鱼类检测水环境污染中,微核测定法越来越受到人们的重视。这是因为鱼类染色体数目多、个体小,不便做染色体畸变分析,而微核技术检测污染物对鱼类的损伤恰好弥补了这一缺陷;另外,该法取材方便、操作简单、观察准确迅速、效果明显直观,因此,微核测定法日益成为遗传毒理学实验中的首选检测手段。微核是细胞在有丝分裂时因各种有害因素的作用而产生,并在间期细胞时能观察到的染色体畸变后遗留产物。对于微核的成因,有学者认为,是由无着丝粒的染色体断片或落后染色体形成,也有学者认为,可直接由间期核形成,或由细胞核向外突出并延伸而成^[9]。另外,微核的发生需要一定的条件,有害物质浓度在合理的范围之内时,对细胞的影响较小,不会干扰其分裂能力;当有害物质浓度过高时,就会对细胞的正常分裂活动有影响,从而导致红细胞微核率的增加。因此,微核率与染色体畸变率之间有一定的相关性,微核千分率的大小可以反映染色体受损的程度^[10]。我们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[C₁₆mim]Cl 对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[C₁₆mim]Cl 是一种具有较强毒性的诱变剂,能诱发泥鳅微核率显著上升(P < 0.05,表 1)并且表现出明显的浓度效应和时间效应(图 2)。此外,在本实验中,随着[C₁₆mim]Cl 浓度的增加和处理时间的延长,血清中 GPT 和 GOT 酶活力依次明显升高,实验各组与其对照组的酶活力均存在显著差异,该结果间接地反映出机体中毒后的受损程度,

这与以上微核实验结果相一致。

以上研究结果表明,在本研究中,[C₁₆mim]Cl 水溶液对泥鳅表现出明显的急性毒性、遗传毒性和生理毒性,因而推测其大量使用可能对水生生物、甚至人类及生态环境具有一定的毒害作用。因此,在生产实践中我们一定要谨慎使用这些咪唑类离子液体。

通讯作者简介: 常重杰(1965—),男,博导,教授,主要研究方向为动物分子遗传学,发表学术论文 120 余篇。

参考文献:

- [1] Manuel A G, Angel I. Design of ionic liquids: An ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach [J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(6): 1507-1516
- [2] 柯明,周爱国,宋昭峥,等. 离子液体的毒性[J]. *化学进展*, 2007, 19(5): 671 - 679
Ke M, Zhou A G, Song S Z, et al. Toxicity of ionic liquids [J]. *Progress in Chemistry*, 2007, 19(5): 671 - 679 (in Chinese)
- [3] Benot R J, Brueske M A, Evans - White M A, et al. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(1): 87 - 92
- [4] Pretti C, Chiappe C, Pieracini D, et al. Acute toxicity of ionic liquids to zebra fish (*Danio rerio*) [J]. *Green Chemistry*, 2006, 8(3): 238-240
- [5] 陈细香, 卢昌义, 黄荣昌. 5 种洗发剂对泥鳅血细胞微核及核异常的影响[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(5): 19 - 20
Chen X X, Lu C Y, Huang R C. Effects of five shampoos on micronuclei in erythrocytes of *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Freshwater Fishes*, 2007, 37(5): 19 - 20 (in Chinese)
- [6] 杜后艳,常重杰,南平,等. 柠檬黄对泥鳅的急性毒性及遗传毒性实验[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(15): 6321 - 6323
Du Q Y, Chang C J, Nan P, et al. Experiment on the acute toxicity and genetic toxicity of tartrazine on *Paramis-*

- gumus dabraynus [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(15): 6321- 6323
- [7] Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chainlengths in acute *Vibrio fischeri* and WsT-1 cell viability assays [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 58(3): 396-404
- [8] 南平, 杨场, 王君, 等. 甲醛对泥鳅的毒性研究[J]. *河南农业科学*, 2012, 41(1): 156 - 159
Nan P, Yang Y, Wang J, et al. Study on the toxicity of formaldehyde to loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2012, 41(1): 156 - 159 (in Chinese)
- [9] 李宁宁, 党炳俊, 杜启艳, 等. 有机融雪剂对泥鳅的急性毒性以及红细胞微核研究[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(9): 24 - 26
Li N N, Dang B J, Du Q Y, et al. Research of CH_3COOK to *Misgurnus anguillicaudatus* of acute toxicity and effects on micronuclei in erythrocytes [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2009, 48(9): 24 - 26 (in Chinese)
- [10] 蔡燕燕, 蔡婉玲, 陈文静, 等. 养猪场污水对泥鳅红细胞微核和核异常的影响[J]. *福建农业学报*, 2007, 22(3): 315 - 319
Cai Y Y, Cai W L, Chen W J, et al. Effects of pig farm wastewater on the micro-nucleus and abnormal nucleus in erythrocytes of *Misgurnus Anguillicaudatus* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 22(3): 315- 319 (in Chinese) ◆