

# 四种水溶性离子液体对斜生栅藻的急性毒性研究

卢珩俊\*, 沈宋利, 鹿燕, 叶涛

浙江方圆检测集团股份有限公司化工产品检验所, 浙江 杭州

收稿日期: 2023年2月9日; 录用日期: 2023年3月11日; 发布日期: 2023年3月17日

## 摘要

本文选取斜生栅藻作为模式生物, 合成且研究了咪唑类离子液体系列1-丁基、1-辛基、1-十二烷基-3-甲基咪唑盐酸盐([C<sub>n</sub>mim][Cl] (n = 4, 8, 12)) 3种咪唑类离子液体和一种由食品原料合成的离子液体邻磺酰苯甲酰亚胺胆碱([Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>)的暴露对斜生栅藻种群生长抑制率的影响。此外, 还选取了常见的无机阴、阳离子毒物作为阳性对照, 比如重金属盐CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、ZnCl<sub>2</sub>及阴离子毒物重铬酸钾, 研究了斜生栅藻对有毒物质的敏感性。根据前述受试物各自剂量-效应曲线的拟合结果显示, 随着咪唑类离子液体咪唑环上烷基侧链碳原子数的增加, 它们对斜生栅藻种群生长的抑制效应也会相应增强, 3种离子液体对斜生栅藻的E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub>依次为45.62 mg/L、0.6083 mg/L和41.87 μg/L, 而邻磺酰苯甲酰亚胺胆碱离子液体([Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>)对斜生栅藻种群的生长抑制效应相对较小, 其E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub>为13030 mg/L。后两种咪唑类离子液体对斜生栅藻的E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub>比无机毒物重铬酸钾对斜生栅藻的(E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 1.107 mg/L)和重金属盐CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 1.800 mg/L)及ZnCl<sub>2</sub> (E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 2.201 mg/L)低了1~2个数量级, 剩下的一种则高了1个数量级。

## 关键词

水溶性离子液体, 水生生物, 斜生栅藻, 急性毒性, 剂量-效应关系

## Research on the Acute Toxicity of Four Hydrosoluble Ionic Liquids to *Scenedesmus obliquus*

Hengjun Lu\*, Songli Shen, Yan Lu, Tao Ye

Institute of Chemical Product Inspection, Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou Zhejiang

Received: Feb. 9<sup>th</sup>, 2023; accepted: Mar. 11<sup>th</sup>, 2023; published: Mar. 17<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

## Abstract

In this paper, acute toxicity of three imidazolium ionic liquids, 1-butyl-, 1-octyl-, 1-dodecyl-3-methylimidazolium chloride ([C<sub>n</sub>min][Cl] (n = 4, 8, 12)) and one kind of o-sulfonyl benzamide choline ([Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>) that synthesized from food materials on the growth inhibition rate of the population of *Scenedesmus obliquus* in artificial algal medium were studied. In addition, cation toxic inorganics such as CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and ZnCl<sub>2</sub> and anionic toxic inorganic like potassium dichromate were selected as positive control for the susceptibility test of *Scenedesmus obliquus* to toxic substance. According to the fitting results of the dose-effect curves of the hydrosoluble ionic liquids mentioned above, with the increase in length of the alkyl side chain on the imidazole rings, the inhibitory effect of the imidazolium ionic liquids to *Scenedesmus obliquus* would be accordingly increased, the E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> values of the three ionic liquids were 45.62 mg/L, 0.6083 mg/L, 41.87 μg/L, respectively, while the o-sulfonyl benzamide choline ionic liquids ([Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>) had a relatively small inhibitory effect on the growth of *Scenedesmus obliquus*, its E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> value was 13030 mg/L. The E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> ratio of the latter two imidazolium ionic liquids to the E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 1.107 mg/L and the heavy metal salts CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 1.800 mg/L) and ZnCl<sub>2</sub> of the inorganic poisons potassium dichromate (E<sub>b</sub>C<sub>50-96h</sub> = 2.201 mg/L) is 1~2 orders of magnitude lower, and the remaining one is 1 order of magnitude higher.

## Keywords

Hydrosoluble Ionic Liquids, Hydrobios, *Scenedesmus obliquus*, Acute Toxicity, Dose-Response Relationship

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

离子液体是一类完全由有机阳离子和对应的无机或有机阴离子构成的低熔点盐类，由于它们在近室温或较低温度(<100℃)下呈液态，故而又称室温离子液体(room-temperature ionic liquids) [1] [2]。由于其几乎不挥发、不易燃、导电性强、化学性质稳定，且对多数无机盐和有机物具有良好的溶解性等特点，因此在很多化学过程中都显示出良好的应用前景[3] [4]，一度被认为是环境友好的“绿色产品” [5] [6]。然而，近年来的研究却显示，部分离子液体可能对生态环境及其中的生物存在潜在风险[7]。

目前，有关离子液体对于生物体毒性效应方面的研究已见诸报道。此前的研究者以乙酰胆碱酯酶[8] [9]、哺乳动物细胞系[10] [11]、微生物[12] [13] [14]、土壤线虫[15]、高等植物[7] [16]、大型蚤[17] [18]、淡水蜗牛[19]和斑马鱼[20]等研究材料从不同测试水平对一些离子液体的毒性效应进行了初步探讨，其中多数研究者认为，这些离子液体的阳离子部分对于它们的生物毒性具有主要贡献。

藻类作为地球生态系统中最重要初级生产者，其种类的多样性和初级生产量的不可替代性可以直接影响水生态系统的结构和功能，因而成为很多测试模型中监测评价水环境质量的首选指标[21]。其中，斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)是自然水环境中的常见藻类，也是鱼类重要的天然饵料。它对各类化学毒物非常敏感、且藻种容易获得、个体较小、繁殖速度快，可在相对较短的时间内实现化学物质对其许多

世代及种群水平影响的观察与评价,是一种较为理想的模式生物[22]。关于斜生栅藻应用于目标物的毒性评价,国内已有一些报道[23] [24],但大多数文献都未讨论数据重复性方面的问题,对离子液体成系列的研究报道则更少见,而这些对于离子液体毒性的评价、各毒理学实验室间对比,以及未来筛选高效、低毒离子液体,离子液体藻类毒性数据库的建立等方面具有重要意义。

本研究着眼于建立稳健的离子液体毒性初筛方法,先以重金属盐  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  及阴离子毒性参照物重铬酸钾作为阳性对照,考察斜生栅藻模型的稳定性和实验数据的可靠性;然后用 1-丁基、1-辛基、1-十二烷基-3 甲基咪唑盐酸盐和邻磺酰苯甲酰亚胺胆碱 4 种离子液体使用相同的染毒方法和评判标准对斜生栅藻进行毒性测试;最后对它们的剂量-效应相关关系进行拟合,根据拟合曲线分别计算不同暴露时间的  $\text{E}_0\text{C}_{50}$ ,以便为更深入地研究它们对斜生栅藻的生物毒性及最终构建离子液体毒性初筛方法体系提供参考,为未来研制出真正能够实现工业应用的高效、低毒的离子液体提供支持。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂与仪器

N-甲基咪唑(99%,浙江临海凯乐化工厂)、1-氯正丁烷及 1-氯正辛烷(化学纯,中国国药集团上海化学试剂有限公司)、氯代正十二烷(95%,日本国东京化成工业株式会社)、氯化胆碱(分析纯,上海三爱思试剂有限公司)、邻磺酰苯甲酰亚胺钠(分析纯,中国国药集团上海化学试剂有限公司)、无水乙醇(分析纯,上海申翔化学试剂有限公司)、实验用水为超纯水(Millipore, Molsheim, France)、3 种阳性对照物及水藻培养液配方表中所列药品均为国产分析纯试剂。

加热磁力搅拌器(RCT 基本型,德国 IKA 集团混合分散生产设备公司)、接触式电子温度计(EST-D5,德国 IKA 集团量热分析技术公司)、旋转蒸发器(IKA RV10 basic,德国 IKA 集团)、超纯水器(Millipore, Molsheim, France)、SHIMADZU UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津制作所)、KQ5200DE 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、HIRAYAMA HG-50 高压蒸汽灭菌器(日本株式会社平山制作所)、苏州净化 SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏州净化设备有限公司)、赛福 PRX250-B 智能人工气候箱(宁波海曙赛福实验仪器厂)、细胞计数板(上海医用光学仪器厂一分厂)、1 cm 光程石英比色皿(江苏宜兴晶永光学仪器厂)、尼康 YS2-H 双目生物显微镜(尼康株式会社)、DGG-9140A 型电热鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司)、实验用锥形瓶(100、1000 mL)。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 离子液体合成及其纯度评价

咪唑类离子液体系列按 Shimojo [25] 等的方法用等物质的量的 N-甲基咪唑和氯代正丁烷、氯代正辛烷、氯代正十二烷分别在适当水浴温度下合成及纯化。胆碱系离子液体按 Peter [26] 等的方法用等物质量的氯化胆碱和邻磺酰苯甲酰亚胺钠于室温下乙醇中合成,四种离子液体的结构如图 1。

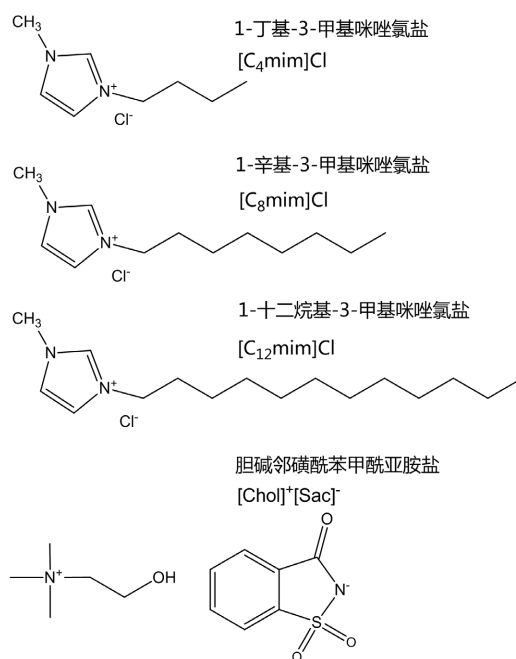
离子液体的纯度评价方法分别参考 Peter [26] 和 Cassol [27] 等的研究利用核磁共振仪分别对上述所合成离子液体的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱和  $^1\text{H}$ -NMR 谱进行测定,解谱得到各离子液体的纯度,所得结果见表 1。

离子液体贮备液的配制:根据各离子液体的相对分子量,分别在万分之一电子天平上准确称取以上合成的  $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 、 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl}$ 、 $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$  和  $[\text{Chol}]^+[\text{Sac}]^-$  四种离子液体各 17.4670 g、23.0780 g、5.7376 g 和 28.6350 g 于 100 mL 棕色容量瓶中,用超纯水定容储于 4℃ 冰箱备用,除  $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$  为 0.2000 mol/L 外其余三种离子液体储备液浓度均为 1.000 mol/L。

#### 2.2.2. 培养基的配制及准备

关于培养基不同研究者曾提出不同的方案[28] [29] [30] [31],本实验中为使其他阴离子对藻可能产生

的影响减至最低，也兼顾敏感性测试过程中重金属离子可能的沉淀问题，最终确定使用 BS EN ISO 8692:2004 推荐的培养基，配方见表 2。



**Figure 1.** Structures of ionic liquids used in this study  
**图 1.** 用于本研究的离子液体结构

**Table 1.** Purity of four ionic liquid products

**表 1.** 四种离子液体产品的纯度

物质名称	相对分子质量	主成分纯度(%)
[C <sub>4</sub> mim]Cl	174.67	92.48
[C <sub>8</sub> mim]Cl	230.78	96.26
[C <sub>12</sub> mim]Cl	286.88	91.14
[Chol] <sup>+</sup> [Sac] <sup>-</sup>	286.35	96.11

**Table 2.** Recipe of algal medium liquids

**表 2.** 水藻培养液配方

营养素溶液类别	所含培养基组分	含量
1. 常量营养盐	氯化铵 NH <sub>4</sub> Cl	15 mg/L
	氯化镁 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12 mg/L
	氯化钙 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18 mg/L
	硫酸镁 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15 mg/L
	磷酸氢二钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6 mg/L
2. Fe-EDTA	氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	64 μg/L
	EDTA 二钠 Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100 μg/L

Continued

3. 微量元素	硼酸 $\text{H}_3\text{BO}_3$	185 $\mu\text{g/L}$
	氯化锰 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 $\mu\text{g/L}$
	氯化锌 $\text{ZnCl}_2$	3 $\mu\text{g/L}$
	氯化钴 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 $\mu\text{g/L}$
	氯化铜 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 $\mu\text{g/L}$
	钼酸钠 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 $\mu\text{g/L}$
4. 碳酸氢钠	碳酸氢钠 $\text{NaHCO}_3$	50 $\text{mg/L}$

### 2.2.3. 斜生栅藻藻种的预处理和预培养

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)购自中国科学院武汉水生生物研究所国家淡水藻种库(FACHB),藻种编号为 FACHB-39。收到藻种后,于严格无菌条件下(无菌操作台紫外线灭菌 30 min 后,0.3 m/s 正压通风 10 min,并一直保持通风,直至实验操作结束)将瓶塞稍稍松开,放入 PRX250-B 智能人工气候箱中,温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,白色日光灯管光源,光照强度为 2400 lux,光暗比 12 h:12 h,每天等间隔定时摇动 4 次,活化培养 24 h。

藻种活化后按 1:2 稀释在上述条件下接种至已灭菌并自然冷却后的水藻培养液中,仍然按前述条件培养,随着藻细胞密度的增加,逐步提高光照,培养  $7 \times 24$  h,再按 1:2 稀释比稀释进行扩大培养[24]。扩大培养培养时,在上述无菌条件下换瓶,用 4 层灭菌纱布封口以防污染,温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照强度 4800 lux,光暗比 12 h:12 h,每天等间隔定时摇动 4 次,定时测定吸光值,以保持藻种处于对数生长期。

藻种培养及实验所用锥形瓶用前均经去污粉刷洗,清水浸泡过夜,超声清洗,纯水润洗三遍,用 4 层纱布及一层牛皮纸纱线捆扎封口;移液管清洗后管头加入脱脂棉塞,报纸捆扎;121 $^\circ\text{C}$ 蒸汽灭菌 30 min,105 $^\circ\text{C}$ 倒置烘干备用;水藻培养液与上述器具同时灭菌,仅限当日使用。

### 2.2.4. 斜生栅藻最大光吸收值的确定及其生物量标线的绘制

取 1.2.3 中处于对数生长期未经稀释的原藻液,水藻培养液进行等体积稀释,配得 4 个浓度梯度系列(1、1/2、1/4、1/8),以水藻培养液作参比,分别对该系列每一个样品在 400~800 nm 间进行全扫描,进行对比分析,确定可见光范围内斜生栅藻的最大光吸收波长为 687.0 nm,且该波长不随藻浓度改变而变化,见图 2。

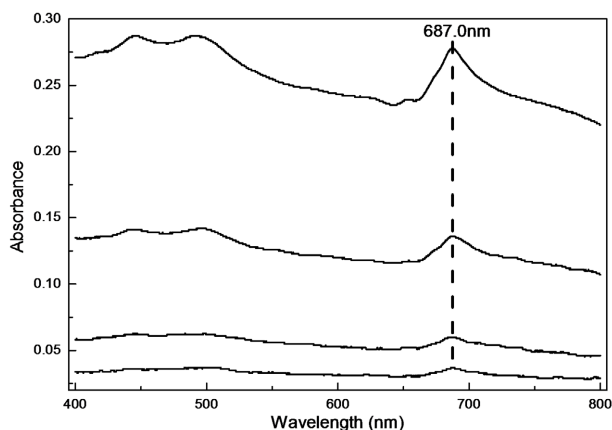


Figure 2. Maximum absorption peak of *Scenedesmus obliquus*  
图 2. 斜生栅藻最大吸收峰

用移液管分别移取 2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、60.00、80.00、100.00 mL 上述藻液于 100 mL 容量瓶中，用灭菌后的水藻培养液定容摇匀，配得不同浓度藻细胞的梯度系列，取适量在显微镜下细胞计数板上进行计数，同一浓度取三次计数结果的平均值与对应浓度藻稀释液在分光光度计上测得的光吸收值作图，建立斜生栅藻的生物量标线方程及图像见图 3。

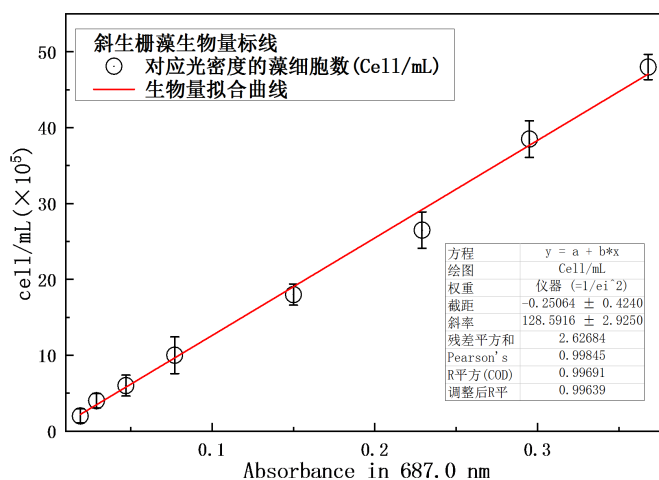


Figure 3. Biomass standard curve of *Scenedesmus obliquus*  
图 3. 斜生栅藻生物量标线

### 2.2.5. 斜生栅藻的染毒

斜生栅藻经 1.2.3 预处理和预培养后，于实验开始前 48 h 在 1.2.3 所示无菌条件下接种至新的无菌培养瓶，初始接种浓度约为  $2.0 \times 10^5$  个/mL，培养条件与 1.2.3 扩大培养条件相同，至实验前，用分光光度计分别测定 687.0 nm 处吸光度值，代入标线计算藻浓度，藻浓度应达到约  $8.0 \times 10^5$  个/mL，备用。否则，应检查藻种活力，或换用新的藻种。

实验开始前，所有器具均应陈列于净化工作台上，先经 1.2.3 中无菌条件预处理，然后按预先确定的浓度用已灭菌并冷却经空气平衡的水藻培养液对各受试药物的储备液进行稀释，配得各受试药物的稀释系列，备用。

实验分设 3 个组：1) 空白对照组，分别在 100 mL 锥形瓶中加入 25.00 mL 培养基和藻密度为  $8.0 \times 10^5$  个/mL 的藻液，总体积为 50.00 mL，本组设置 3 个平行；2) 实验组，按预先设计的浓度加入确定量的各受试药物的稀释系列，并用培养基补齐至 25.00 mL，然后再加入 25.00 mL 藻密度为  $8.0 \times 10^5$  个/mL 的藻液，使总体积为 50.00 mL，本组中各浓度均设置 3 平行；3) 光吸收空白组，各受试药物的稀释系列加入量与对应浓度实验组相同，用培养基补齐至 50.00 mL，本组每个浓度均设置 1 个平行，设置本组目的是为考察受试药物在整个实验周期内对培养液中藻类光吸收值的影响。

加液完成后的锥形瓶用灭菌后的四层纱布封口，按预先设计的位置，将所有实验组一同放入同一个 PRX250-B 智能人工气候箱中，与 1.2.3 中藻液扩大培养时的条件相同，每天定时摇动 4 次，分别于 0、24、48、72、96 h 取出，用分光光度计分别测定各组藻液在 687.0 nm 处的吸光值。实验过程中，光吸收空白组的吸光值与对应的空白对照组起始点吸光值之比应控制在 5% 以内(若超过此阈值，本组实验数据无效，需查找原因重新进行实验)。

$$\text{实验组校正吸光值} = \text{实验组吸光值} - \text{相同浓度光吸收空白组吸光值}$$

### 2.2.6. 斜生栅藻模型的敏感性测试

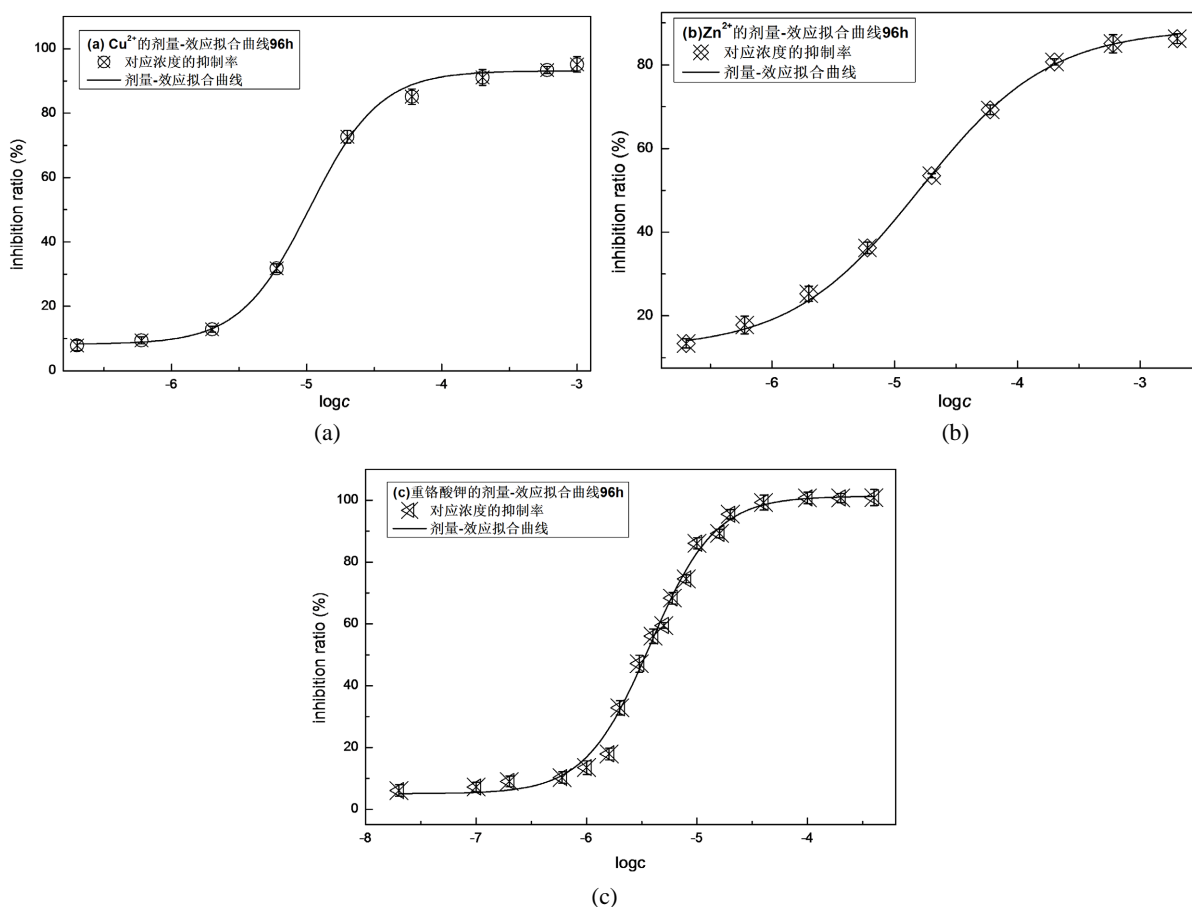
以不同浓度的重铬酸钾、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 按 1.2.5 的染毒方法分别检测对斜生栅藻的毒性效应。结果见表 3，表 3 中  $E_bC_{50-96h}$  值为至少 5 次有效重复实验数据的平均值。它们对斜生栅藻的剂量 - 效应曲线(DRC)如图 4。

**Table 3.** The toxicity of *Scenedesmus obliquus* towards known poisons

**表 3.** 斜生栅藻对已知毒物的染毒情况

物质名称	$E_bC_{50-96h}$ (mg/L)	中文文献值	外文文献值
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.800	3.754 [32]	-
$\text{ZnCl}_2$	2.201	4.880 [32]	-
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1.107	5.328 [33]	0.84* [31] 1.19** [31]

注：\*近具刺链带藻(*Desmodesmus subspicatus*)；\*\*近头状伪蹄形藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)。



**Figure 4.** Dose-Response Curves (DRC) of the positive control toxicity to *Scenedesmus obliquus*

**图 4.** 阳性对照对斜生栅藻的剂量 - 效应曲线(DRC)

敏感性测试结果显示，受试的 3 种阳性对照物重铬酸钾、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 均对斜生栅藻生长表现出强烈的抑制效应。重铬酸钾具有强氧化性，会损伤细胞内的染色体； $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 两种重金属虽然都是斜生栅藻的微量营养元素，但当浓度超出正常值时，这些离子就可与生物分子配体的其他配位点结合[32]，从而影

响生物分子配体的活性。

将实测  $E_bC_{50}$  值分别与国内外文献参考值进行横向比较, 本文所测得数据均优于国内文献报道值, 其中重铬酸钾实测值  $E_bC_{50}$  介于两种国际公认的的藻类抑制实验标准试验种近具刺链带藻(与斜生栅藻同属) (*Desmodesmus subspicatus*)和近头状伪蹄形藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)  $E_bC_{50}$  值之间。结果表明, 斜生栅藻对受试阳性对照物均具有较高的敏感性, 数据的稳定性也较高, 适合作为离子液体毒性试验的模式生物。

### 2.2.7. 离子液体急性毒性的预试验

预实验目的旨在确定斜生栅藻完全抑制、部分抑制和无明显生长抑制的浓度区间, 为正式实验浓度设计提供数据。

取离子液体贮备液进行等比例稀释得到一系列浓度, 进行预实验, 直至得到斜生栅藻完全抑制、部分抑制和无明显生长抑制的正式实验浓度区间。预实验的每个浓度点设置 3 个平行实验, 每种毒物均设一个空白组, 每个浓度点重复试验 3 次。

预实验结果: 各离子液体完全抑制和无明显生长抑制区间,  $[C_4mim]Cl$  约在  $10^{-2} \sim 10^{-5}$  mol/L;  $[C_8mim]Cl$  约在  $10^{-3} \sim 10^{-7}$  mol/L;  $[C_{12}mim]Cl$  约在  $10^{-5} \sim 10^{-10}$  mol/L;  $[Chol]^+[Sac]^-$  在  $0.2 \sim 10^{-3}$  mol/L 区间内并未观察到藻类生长完全抑制的情况, 从该离子液体溶解度及光吸收空白组吸光值稳定性等方面考虑, 最终决定继续沿用该浓度区间作为正式实验的浓度区间。

### 2.2.8. 离子液体的急性毒性试验

根据前期预实验结果,  $[C_4mim]Cl$ 、 $[C_8mim]Cl$  和  $[C_{12}mim]Cl$ 、 $[Chol]^+[Sac]^-$  4 种离子液体的实验组中分设 11~12 个浓度点, 设置的浓度样点以最大程度覆盖剂量-效应曲线(DRC)中部为最终目标, 同时向高低浓度两个方向作适当延伸。离子液体水溶液的实际浓度用文献方法[34]验证, 按 1.2.5 方法进行染毒操作。正式实验时每个实验浓度设置 3 个平行实验组, 每一毒物组均设一个空白组, 每个浓度样点重复试验 8 次以上。斜生栅藻生长抑制率按以下公式计算[30]:

实验组校正吸光值 = 实验组吸光值 - 相同浓度光吸收空白组吸光值

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

上式中,  $A$  为生长曲线以下的面积;  $N_0, N_1 \dots N_n$  为  $t_0, t_1 \dots t_n$  时刻每毫升藻液中的细胞数;  $t_0, t_1 \dots t_n$  为试验开始后第 1 至  $n$  次测定的时间(单位 h)。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100\%$$

上式中,  $I_A$  指每一受试物浓度细胞生长抑制的百分率;  $A_c$  对照组生长曲线下所包围的面积  $A_t$  是每个受试物浓度生长曲线下所围成的面积。

### 2.2.9. 剂量-效应曲线(DRC)的拟合[35]

先用迪克逊(Dixon)法对实验所得数据进行离群值检验, 根据计算结果剔除其中的可疑值, 再对剩余的有效数据取算术平均值, 最终得到每一浓度点的斜生栅藻生长抑制率平均值。再将以上生长抑制率平均值与对应浓度的对数值输入计算机, 应用 Origin 8.5 软件, 以毒物浓度的对数值为横坐标, 以对应浓度的平均生长抑制率为纵坐标作散点图。根据实验得到的 DRC 数据散点图的大致形状, 同时根据 DRC 数据实验点的个数, 利用 Origin 8.5 软件中非线性最小二乘拟合(NLSF)模块对实验所得 DRC 数据进行非线性拟合[36] [37], 求解得各拟合模型的参数。然后对根据非线性拟合相关系数的大小对拟合效果进行比较分析, 选择拟合相关系数最大而均方根误差最小者为最优模型, 结果显示最优模型为药理学(pharmacology)

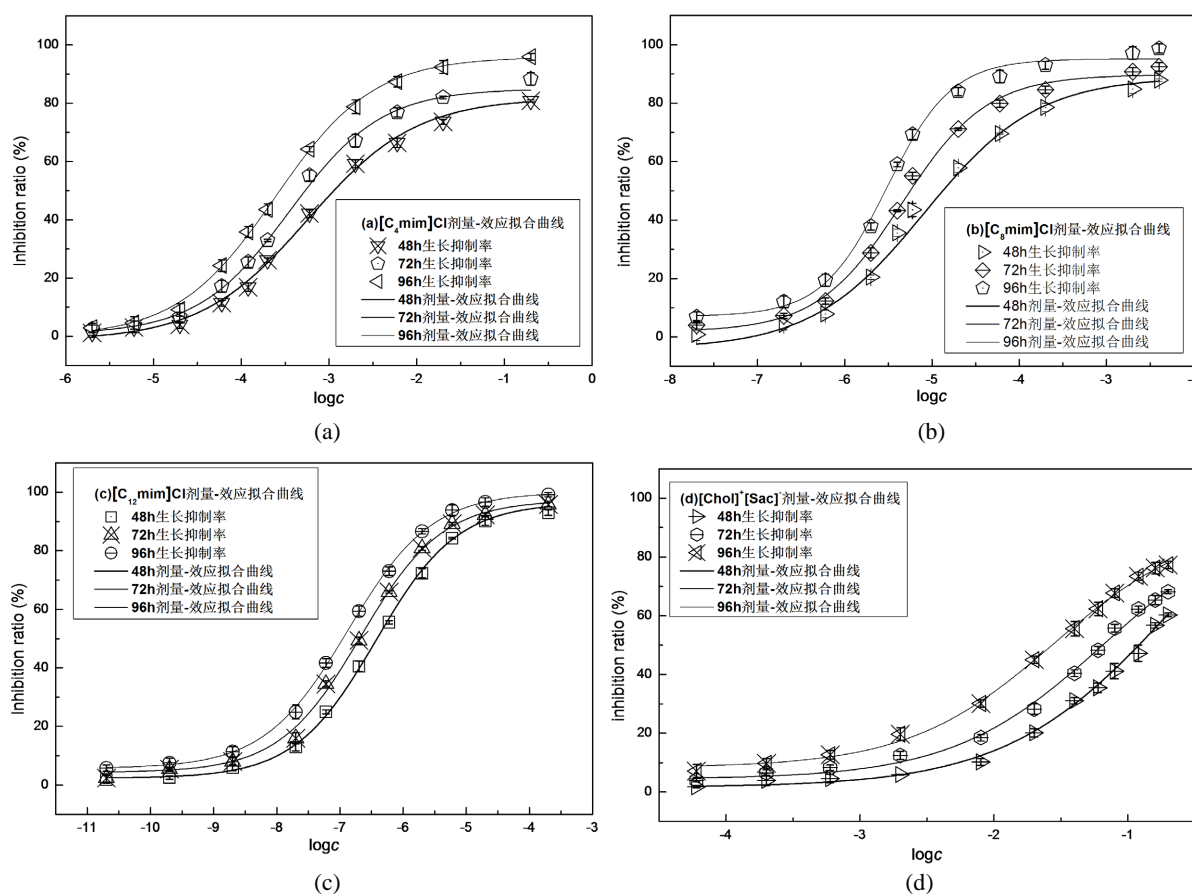


模块下的 DseResp 函数。利用该函数对所有实验数据进行非线性拟合后得到离子液体对斜生栅藻各暴露时间的毒性 - 效应曲线(48 h、72 h、96 h)，根据所得拟合方程分别计算各离子液体对于斜生栅藻的  $E_0C_{50}$  值(染毒后斜生栅藻生长抑制率为 50%时的受试物浓度)。计算结果显示，最优实验数据拟合的剂量 - 效应曲线(DRC)所对应的拟合函数模型及其反函数的数学表达式如表 4。所有 4 种受试离子液体对斜生栅藻剂量 - 效应曲线(DRC)如图 5。

**Table 4.** Non-linear fitting functions of Dose-response Curves (DRC)

**表 4.** 剂量 - 效应曲线(DRC)的非线性拟合函数

函数名称	函数表达式	反函数表达式
Dse-Resp	$E = A_1 + (A_2 - A_1) / (1 + 10 \exp((\log x_0 - c) \cdot p))$	$c = (\log(E - A_1) - \log(A_2 - E)) / p - \log x_0$



**Figure 5.** Dose-Response Curves (DRC) of  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  ( $n = 4, 8, 12$ ) and  $[\text{Chol}]^+[\text{Sac}]^-$  to *Scenedesmus obliquus*

**图 5.**  $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$  ( $n = 4, 8, 12$ )及 $[\text{Chol}]^+[\text{Sac}]^-$ 对斜生栅藻的剂量 - 效应曲线(DRC)

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 离子液体对斜生栅藻的剂量 - 效应曲线(DRC)

综上所述，利用筛选出的 DseResp 函数对数据进行非线性拟合，得到各离子液体剂量 - 效应曲线和对应方程(函数表达式见表 4)。将所得参数代入其反函数，即可求得各效应浓度(表 4)。由表 5 可知，所得 DRC 对于实验数据的低效应区和高效应区浓度均可进行有效估计，由该模型计算所得 4 种离子液体的

效应拟合值与实验值相符,  $r > 0.99$ , 拟合结果显著性水平较高, 可见斜生栅藻适合作为离子液体毒性评价的模式生物。经国内外近期文献报告值[38]比对, 本文实测离子液体[C<sub>4</sub>mim]Cl 的  $E_bC_{50-48h}$ 、 $E_bC_{50-72h}$ 、 $E_bC_{50-96h}$  值与文献报道值处于同一数量级, 且均低于文献值。

**Table 5.** Toxicity effect curve parameters of four ionic liquids for 96 h to *Scenedesmus obliquus*  
**表 5.** 4 种离子液体对斜生栅藻的 96 h 毒性效应曲线参数

	暴露时间 (h)	拟合模型参数					$r$	$E_bC_{50}$ 均值(mg/L)	SD (%)
		$A_1$	$A_2$	$\log x_0$	$p$	Span			
[C <sub>4</sub> mim]Cl	48	-1.41	81.84	-3.23	0.71	83.26	0.9991	101.0	0.82
	72	0.76	84.98	-3.45	0.83	84.22	0.9994	61.94	1.53
	96	-2.48	98.77	-3.58	0.70	101.26	0.9995	45.62	1.84
[C <sub>8</sub> mim]Cl	48	-4.06	88.97	-5.09	0.67	93.03	0.9981	1.884	0.96
	72	1.77	89.74	-5.34	0.89	87.96	0.9982	1.045	1.74
	96	-2.21	97.29	-5.64	0.77	99.50	0.9911	0.6083	2.36
[C <sub>12</sub> mim]Cl	48	2.21	96.75	-6.43	0.66	94.54	0.9994	0.1074	0.57
	72	4.30	97.21	-6.67	0.67	92.91	0.9994	0.06126	1.68
	96	5.76	100.4	-6.84	0.65	94.61	0.9996	0.04187	2.25
[Chol] <sup>+</sup> [Sac] <sup>-</sup>	48	1.59	121.0	-0.68	0.71	119.4	0.9994	59420	1.02
	72	4.37	96.10	-1.18	0.77	91.73	0.9986	18860	1.67
	96	6.80	109.1	-1.34	0.62	102.3	0.9996	13030	2.40

注:  $A_2$ 、 $A_1$  分别为拟合曲线的上、下渐近线;  $\log x_0$  为拟合曲线中点(平均生长抑制率 = 50%处)的纵坐标;  $p$  为拟合曲线中点(平均生长抑制率 = 50%处)的斜率; Span = abs( $A_1 - A_2$ )。

根据 4 种受试离子液体在不同暴露时间下对斜生栅藻毒性效应拟合曲线的趋势(图 5(a)-(d))可得, 不同的离子液体在不同暴露时间下所对应曲线的形状和斜率有所不同, 不同暴露时间下对应的  $E_bC_{50}$  值也有不同变化, 浓度差达到 7 个数量级。另外, 它们对斜生栅藻的生长抑制毒性效应曲线都是非线性变化趋势, 呈现典型的 S 型剂量 - 效应关系。

若以  $E_bC_{50-96h}$  作为毒性强弱判断标准, 4 种离子液体及 3 种阳性对照物对斜生栅藻的抑制毒性顺序为: [C<sub>12</sub>mim]Cl > [C<sub>8</sub>mim]Cl > K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> > CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O > ZnCl<sub>2</sub> > [C<sub>4</sub>mim]Cl > ... > [Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>。与对照试剂 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和重铬酸钾相比, [C<sub>12</sub>mim]Cl、[C<sub>8</sub>mim]Cl 两种咪唑类离子液体对斜生栅藻的  $E_bC_{50-96h}$  值比 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和重铬酸钾对斜生栅藻的  $E_bC_{50-96h}$  值低 1~2 个数量级, 但咪唑类离子液体[C<sub>4</sub>mim]Cl 的  $E_bC_{50-96h}$  值比对照试剂 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和重铬酸钾高出 1 个数量级。此外, 胆碱系离子液体[Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>的  $E_bC_{50-96h}$  值远高于所有其他受试毒物。可见, 胆碱系离子液体[Chol]<sup>+</sup>[Sac]<sup>-</sup>的毒性极低, 几乎可以忽略, 而咪唑类离子液体对斜生栅藻毒性则相对较大。

### 3.2. 离子液体结构与其毒性效应的关系

咪唑类离子液体随着碳链加长, 96 h 平均生长抑制率接近 100%时( $E_bC_{100-96h}$ )所对应的浓度不断降低, 从[C<sub>4</sub>mim]Cl 的约 3500 mg/L 到[C<sub>12</sub>mim]Cl 的约 60 mg/L 咪唑环的烷基链长与离子液体对斜生栅藻的  $E_bC_{50-96h}$  值显著相关, 烷基链长越长毒性越大。例如, [C<sub>4</sub>mim]Cl 到[C<sub>8</sub>mim]Cl 咪唑环烷基侧链增加 4 个碳原子, [C<sub>8</sub>mim]Cl 的  $E_bC_{50-96h}$  值降为[C<sub>4</sub>mim]C 的 1.33%; 而当从[C<sub>4</sub>mim]Cl 到[C<sub>12</sub>mim]Cl 咪唑环烷基侧

链增加 8 个碳原子时,  $[C_{12}mim]Cl$  的  $E_bC_{50-96h}$  值降为  $[C_4mim]Cl$  的 0.09%; 可见, 随着咪唑环烷基侧链长度的增加, 相应离子液体  $E_bC_{50-96h}$  值的下降速度极为显著。

综合分析本实验所得数据, 再结合此前其他研究同行的相关结论[10] [38] [39] [40] [41] [42], 我们认为, 由于咪唑类离子液体的阳离子结构与阳离子表面活性剂的结构非常相似, 而表面活性剂对藻类的毒性作用主要是它们可引起细胞膜脂结构的破坏和细胞膜组成的改变[28], 由于咪唑阳离子也是一类一端亲水(咪唑端)而另一端亲油(烷基端)的两亲分子[39], 故其对斜生栅藻的致毒机理也与之类似, 其他相关研究[38]也证实, 它们可引起藻细胞的质壁分离, 从而使得咪唑类阳离子透过细胞壁, 渗透到由磷脂双分子层构成的细胞膜中, 从而干扰细胞膜的正常生理活动和功能, 当斜生栅藻细胞内的离子液体阳离子浓度达到一定量时可能会进一步阻断胞内各细胞器的正常生理活动从而直接导致斜生栅藻细胞死亡。而随着离子液体阳离子取代烷基侧链的增长, 离子液体阳离子烷基端的亲脂性显著增强, 对细胞膜的破坏作用也会相应增大, 这一趋势在实验数据上表现为  $E_bC_{50-96h}$  值的降低。

此外, 以上观点也可以从胆碱系离子液体  $[Chol]^+[Sac]^-$  处得到反证, 由于该离子液体阴阳离子对的亲水性都比较强, 且离子中无疏水端, 无法透过细胞膜的磷脂双分子层, 故表现为对斜生栅藻的毒性较低, 与咪唑类离子液体相比, 毒性几乎可以忽略。

由表 5 数据可得, 各离子液体的剂量 - 效应拟合曲线中点(平均生长抑制率 = 50% 处)的斜率(拟合参数  $p$ )随着离子液体暴露时间的增加都有逐渐增大的趋势。这一趋势在图形上表现为毒性作用曲线的中部逐渐变陡, 但其中一些曲线在 96 h 处会出现突然下降的现象, 这可能是由于斜生栅藻在实验开始 72 h 后会有部分藻成团后自然老化沉底造成。

## 4. 结论

1) 4 种离子液体  $[C_4mim]Cl$ 、 $[C_8mim]Cl$ 、 $[C_{12}mim]Cl$  及  $[Chol]^+[Sac]^-$  对斜生栅藻的生长抑制曲线均呈典型的 S 型剂量 - 效应相关关系, 若以  $E_bC_{50-96h}$  作为受试毒物对斜生栅藻生长抑制潜力的判断依据, 它们对斜生栅藻的生长抑制潜力排序为:  $[C_{12}mim]Cl > [C_8mim]Cl > [C_4mim]Cl > \dots > [Chol]^+[Sac]^-$ 。

2) 在对 DRC 拟合过程中发现, DseResp 函数为最优拟合函数模型, 该函数对高、低效应区均可进行有效估计, 适用于斜生栅藻剂量 - 效应曲线的拟合。

3) 从毒性表现上来说, 咪唑类离子液体对斜生栅藻的毒性至少表现在两个不同层次上: 宏观而言, 由于上述 3 种咪唑类离子液体暴露产生的胁迫压力从生物量的快速下降来看, 它们严重抑制了斜生栅藻的生长, 这种抑制作用既随着咪唑类离子液体质量浓度和暴露时间增加而增强, 也随着咪唑环上烷基侧链碳原子数的增加增强, 有研究者[43]认为, 这种抑制作用是由藻细胞膜被破坏引起的; 而从微观层面的进一步研究[44]认为, 这一现象可能与生物膜系统受损后导致的叶绿体片层断裂后光合效率降低、线粒体变形肿胀、液泡中出现沉淀物质以及胞内多种重要自我修复机制受损和一系列功能紊乱有关。

4) 相较于咪唑类离子液体, 胆碱系离子液体  $[Chol]^+[Sac]^-$  来自具有完整毒理学资料的食品添加剂原料, 且毒性极低, 表现出了良好的工业应用前景, 这也为未来低毒离子液体的设计合成提供了一条新思路[45]。

5) 由于阴阳离子的可变性, 离子液体种类繁多[46], 而斜生栅藻藻种易得、运行成本极低, 其有望成为将来应用于离子液体毒性初筛试验的理想模式生物。

## 参考文献

- [1] Parvulescu, V.I. and Hardacre, C. (2007) Catalysis in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, **107**, 2615-2665. <https://doi.org/10.1021/cr050948h>

- [2] Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2007) Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, **107**, 2757-2785. <https://doi.org/10.1021/cr050946x>
- [3] 赵东滨, 寇元. 室温离子液体: 合成、性质及应用[J]. 大学化学, 2002, 17(1): 42-46+50.
- [4] 顾彦龙, 邓友全. 室温离子液体在石油化工催化中的研究与应用[J]. 石化技术与应用, 2002, 20(2): 73-78+87.
- [5] 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.
- [6] 胡雪生, 余江, 夏寒松, 等. 离子液体的绿色合成及环境性质[J]. 化学通报, 2005, 68(12): 906-910.
- [7] Jastorff, B., Molter, K., Behrend, P., et al. (2005) Progress in Evaluation of Risk Potential of Ionic Liquids-Basis for an Eco-Design of Sustainable Products. *Green Chemistry*, **7**, 362-372. <https://doi.org/10.1039/b418518h>
- [8] Raves, M.L., Harel, M., Pang, Y.P., et al. (1997) Structure of Acetylcholinesterase Complexed with the Nootropic Alkaloid, (-)-huperzine A. *Nature Structural Biology*, **4**, 57-63. <https://doi.org/10.1038/nsb0197-57>
- [9] Stock, F., Hoffmann, J., Ranke, J., et al. (2004) Effects of Ionic Liquids on the Acetylcholinesterase—A Structure-Activity Relationship Consideration. *Green Chemistry*, **6**, 286-290. <https://doi.org/10.1039/B402348J>
- [10] Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., et al. (2004) Biological Effects of Imidazolium Ionic Liquids with Varying Chain Lengths in Acute *Vibrio fischeri* and WST-1 Cell Viability Assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**, 396-404. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00105-2)
- [11] Stepnowski, P., Skladanowski, A.C., Ludwiczak, A., et al. (2004) Evaluating the Cytotoxicity of Ionic Liquids Using Human Cell Line Hela. *Human and Experimental Toxicology*, **23**, 513-517. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht4800a>
- [12] Matsumoto, M., Mochiduki, K. and Kondo, K. (2004) Toxicity of Ionic Liquids and Organic Solvents to Lactic Acid-Producing Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **98**, 344-347. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)00293-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)00293-2)
- [13] Lee, S.M., Chang, W.J., Choi, A.R., et al. (2005) Influence of Ionic Liquids on the Growth of *Escherichia coli*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **22**, 687-690. <https://doi.org/10.1007/BF02705783>
- [14] 刘芳, 刘树深, 刘海玲. 部分离子液体及其混合物对发光菌的毒性作用[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2): 164-171.
- [15] Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Memon, S.B., et al. (2004) Using *Caenorhabditis elegans* to Probe Toxicity of 1-alkyl-3-methyl Imidazolium Chloride Based Ionic Liquids. *Chemical Communications*, **21**, 668-669. <https://doi.org/10.1039/b316491h>
- [16] 刘萍, 孙莉萍, 刘海英, 等. 离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐对小麦种子萌发与幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 425-429.
- [17] 张榜军, 罗艳蕊, 范红军, 等. 离子液体[C<sub>8</sub>mim]Br 对不同日龄大型溞的急性毒性[J]. 生态环境, 2008, 17(3): 1021-1023.
- [18] 牧辉, 彭新晶, 戴宁, 等. 离子液体[C<sub>8</sub>mim]PF<sub>6</sub> 对水生生物的毒性作用[J]. 中国环境科学, 2009, 29(11): 1196-1201.
- [19] Bernot, R.J., Kennedy, E. and Lamberti, G.A. (2005) Effects of Ionic Liquids on the Survival Movement, and Feeding Behavior of the Freshwater snail *Physa acuta*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1759-1765. <https://doi.org/10.1897/04-614R.1>
- [20] Pretti, C., Chiappe, C., Pieraccini, D., et al. (2006) Acute Toxicity of Ionic Liquids to Zebra Fish (*Danio rerio*). *Green Chemistry*, **8**, 238-240. <https://doi.org/10.1039/B511554J>
- [21] Kobraei, M.E. and White, D.S. (1996) Effects of 2,4-Dichlorohenoxyacetic Acid on Kentucky Algae: Simultaneous Laboratory and Field Toxicity Testings. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**, 571-580. <https://doi.org/10.1007/BF00212442>
- [22] 熊丽, 吴振斌, 况琪军, 等. 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 66-73.
- [23] 况琪军, 赵文玉, 邓萍. DBP 对斜生栅藻及天然混合藻类致毒效应研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 103-105.
- [24] 葛会林, 刘树深, 朱祥伟, 等. 微板吸光法测定 9 种农药对斜生栅藻的抑制毒性[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(6): 606-612.
- [25] Shimojo, K. and Goto, M. (2004) Solvent Extraction and Stripping of Silver Ions in Room-Temperature Ionic Liquids Containing Calixarenes. *Analytical Chemistry*, **76**, 5039-5044. <https://doi.org/10.1021/ac049549x>
- [26] Nockemann, P., Thijs, B., Driesen, K., et al. (2007) Choline Saccharinate and Choline Acesulfamate: Ionic Liquids with Low Toxicities. *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 5254-5263. <https://doi.org/10.1021/jp068446a>
- [27] Cassol, C.C., Ebeling, G., Ferrera, B., et al. (2006) A Simple and Practical Method for the Preparation and Purity Determination of Halide-Free Imidazolium Ionic Liquids. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **348**, 243-248.

- <https://doi.org/10.1002/adsc.200505295>
- [28] Organization for Economic Cooperation and Development (2014) OECD Guideline for Testing of Chemicals-201—Alga, Growth Inhibition Test.
- [29] Ma, J., Liang, W., Xu, L., *et al.* (2001) Acute Toxicity of 33 Herbicides to the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**, 536-541. <https://doi.org/10.1007/s001280040>
- [30] 中国国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 715-721.
- [31] International Organization for Standardization (2004) Water Quality—Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae. BS EN ISO 8692.
- [32] 朱歆莹, 高为, 钟运建. 重金属离子对斜生栅列藻毒性的研究[J]. 环境监控与预警, 2010, 2(5): 44-45.
- [33] 刁树林. 藻类急性毒性监测中参比毒物的研究[J]. 环境科学与管理, 2007, 32(9): 139-141.
- [34] Holbrey, J.D., Seddon, K.R. and Wareing, R. (2001) A Simple Colorimetric Method for the Quality Control of 1-Alkyl-3-methylimidazolium Ionic Liquid Precursors. *Green Chemistry*, **3**, 33-36. <https://doi.org/10.1039/b009459p>
- [35] 卢珩俊, 陆胤, 徐冬梅, 等. 咪唑类离子液体系列对卤虫的急性毒性研究[J]. 中国环境科学, 2011, 31(3): 454-460.
- [36] Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., *et al.* (2001) Predicting the Joint Algal Toxicity of Multi-Component *s*-Triazine Mixtures at Low-Effect Concentrations of Individual Toxicants. *Aquatic Toxicology*, **56**, 13-32. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00187-4)
- [37] Faust, M., Altenburger, R., Blanck, H., *et al.* (2003) Joint Algal Toxicity of 16 Dissimilarly Acting Chemicals Is Predictable by the Concept of Independent Action. *Aquatic Toxicology*, **63**, 43-63. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00133-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00133-9)
- [38] 段炼, 杜耀, 陆秋琳, 等. 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐对斜生栅藻的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2012, 32(5): 886-891.
- [39] Docherty, K.M. and Kulpa, C.F.J. (2005) Toxicity and Antimicrobial Activity of Imidazolium and Pyridinium Ionic Liquids. *Green Chemistry*, **7**, 185-189. <https://doi.org/10.1039/b419172b>
- [40] Cross, J. (1994) Introduction to Cationic Surfactants. In: Cross, J. and Singer, E.J., Eds., *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*, Marcel Dekker, New York, 227-233.
- [41] Ranke, J., Müller, K., Bottin-Weber, U., Stock, F., Stolte, S., Arninga, J., Störmann, R. and Jastorff, B. (2007) Lipophilicity Parameters for Ionic Liquid Cations and Their Correlation to *in Vitro* Cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **67**, 430-438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.008>
- [42] 龚良玉, 李雁宾, 王修林, 等. 生物表面活性剂对东海原甲藻生长的影响[J]. 中国环境科学, 2004, 24(6): 692-696.
- [43] 邓祥元, 高坤, 裴峰, 等. [C<sub>8</sub>mim]Br 对聚球藻 7942 生长及生理特性的影响[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 848-851.
- [44] 吴洁, 陈晓娣, 韩萍芳, 等. 离子液体对微藻的急性毒性效应[J]. 安全与环境学报, 2016, 16(1): 381-386.
- [45] 庞俊峰, 高国龙, 王庆, 等. 环境友好材料: 基于氨基酸离子液体的理化性质与毒性研究[J]. 应用化工, 2019, 48(z1): 238-241.
- [46] Rogers, R.D. and Seddon, K.R. (2003) Ionic Liquids-Solvents of the Future? *Science*, **302**, 792-793. <https://doi.org/10.1126/science.1090313>