

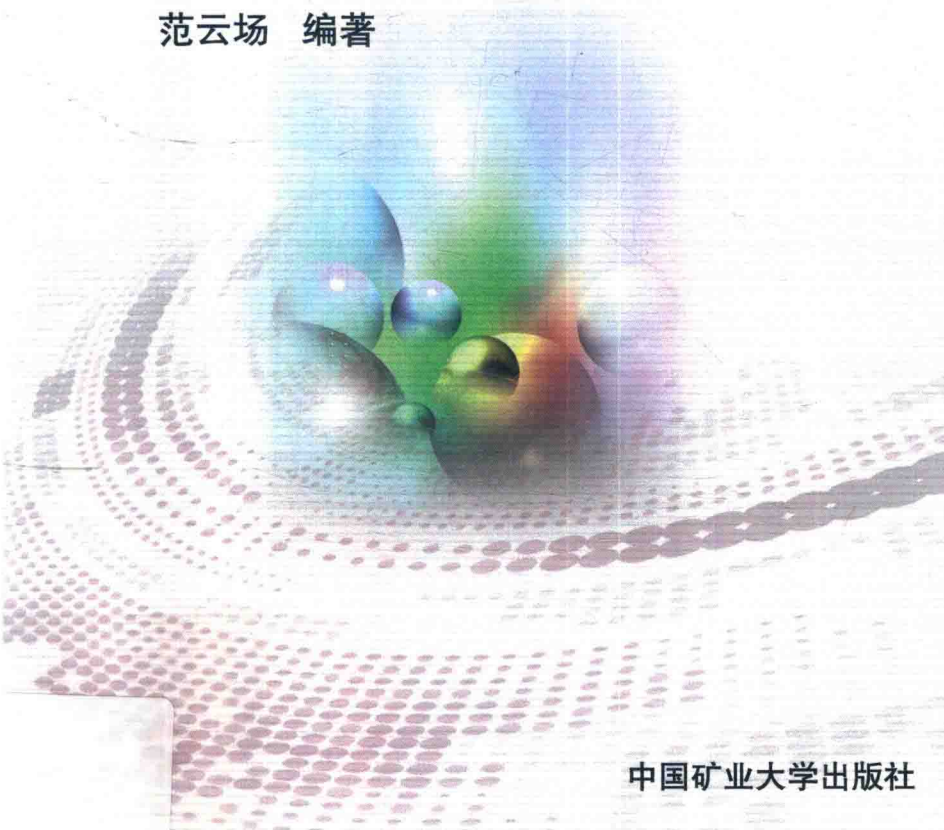
Mei Yizhi Jishu

Zai Pinggu Lizi Yeti Duxing Zhong De Yingyong

酶抑制技术

在评估离子液体毒性中的应用

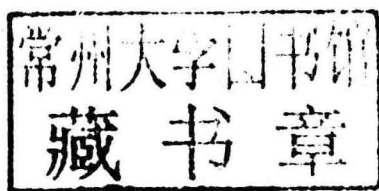
范云场 编著



中国矿业大学出版社

酶抑制技术在评估离子 液体毒性中的应用

范云场 编 著



中国矿业大学出版社

内 容 简 介

近年来,离子液体被视为环境友好型溶剂,得到了广大科技工作者的广泛关注。其环境效应、毒性评估也引起人们的高度重视。本书结合作者的前期研究成果,介绍了离子液体的概念、基本性质,重点阐述了离子液体影响酶活性的分子机理,以期对离子液体毒性评估研究、离子液体的功能化设计以及离子液体在酶催化领域的应用起到启迪和推动作用。

本书可供化学、化工、能源、环境、生物、医学及相关领域的科技工作者以及高等院校相关专业的师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

酶抑制技术在评估离子液体毒性中的应用/范云场

编著. —徐州:中国矿业大学出版社,2017.9

ISBN 978 - 7 - 5646 - 3715 - 6

I. ①酶… II. ①范… III. ①蛋白酶抑制剂—应用—
离子—液体—毒性—研究 IV. ①O646.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 253277 号

书 名 酶抑制技术在评估离子液体毒性中的应用

编 著 范云场

责任编辑 陈 慧

出版发行 中国矿业大学出版社有限责任公司

(江苏省徐州市解放南路 邮编 221008)

营销热线 (0516)83885307 83884995

出版服务 (0516)83885767 83884920

网 址 <http://www.cumtp.com> E-mail: cumtpvip@cumtp.com

印 刷 江苏凤凰数码印务有限公司

开 本 850×1168 1/32 印张 6.5 字数 170 千字

版次印次 2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月第 1 次印刷

定 价 36.00 元

(图书出现印装质量问题,本社负责调换)

前 言

离子液体是完全由离子组成的化合物,具有难挥发、环境友好等优点。作为环境兼容性溶剂,离子液体已广泛地应用于生物催化、化学、化工、材料、新能源、环境、医学等诸多领域。在离子液体大规模工业化应用之前,有必要研究其环境效应,评估其毒性。生物酶是评价污染物毒性常用的生物标志物。本书选取常见的咪唑类离子液体,以经典的蛋白水解酶、脂肪酶、氧化还原酶等为生物标志物,采用荧光、紫外可见、圆二色、红外光谱等技术,系统研究了离子液体和酶相互作用的分子机制,以期为离子液体的功能化设计、离子液体毒性评估及离子液体在生物催化领域的应用提供参考。

本书编写过程中参考了部分文献报道,主要参考文献已列出,在此对文献原作者深表感谢。硕士研究生董兴参与本书部分图片的制作和校阅,在此表示感谢。本书内容为编者所承担国家自然科学基金青年基金(项目编号:21307028)的一部分,感谢国家自然科学基金委员会的资助。

由于编者水平有限,书中难免存在不当甚至错误之处,恳请广大读者多提宝贵意见,以利于本书水准的进一步提高。

编 者

2017年7月

目 录

第 1 章	绪论	1
1.1	离子液体简介	1
1.2	离子液体的应用	2
1.3	离子液体的毒性评估	7
第 2 章	离子液体与过氧化氢酶相互作用研究	12
2.1	实验部分	12
2.2	结果与讨论	16
2.3	本章小结	27
第 3 章	离子液体对胰蛋白酶活性抑制研究	29
3.1	实验部分	29
3.2	结果与讨论	31
3.3	本章小结	39
第 4 章	离子液体对蚓激酶水解酪蛋白的影响	40
4.1	实验部分	40
4.2	结果与讨论	43
4.3	本章小结	54
第 5 章	离子液体与乳酸脱氢酶相互作用的光谱研究	55
5.1	实验部分	55

5.2	结果与讨论	57
5.3	本章小结	67
第 6 章	离子液体与脂肪酶作用机理研究	69
6.1	实验部分	69
6.2	结果与讨论	71
6.3	本章小结	82
第 7 章	总结与展望	83
参考文献		85
附录 I		112
附录 II		129
附录 III		146
附录 IV		169
附录 V		180

第 1 章 绪 论

1.1 离子液体简介

离子液体(ionic liquids, ILs)是指完全由阴阳离子组成,在室温或近室温状态下呈液态的盐类,一般是由有机阳离子和无机阴离子组成。由于离子液体中只存在阴阳离子,因而具有可忽略的蒸汽压、较宽的液态温度范围、良好的溶解性、良好的热力学稳定性、较宽的电化学窗口以及可调控性等优越特性^[1-3]。

离子液体的阳离子一般体积较大且不对称。目前所研究的离子液体的阳离子种类大致可分为八类(图 1-1):咪唑类(记作 $[C_n \text{mim}]^+$)、吡啶类(记作 $[C_n \text{Py}]^+$)、吡咯烷类(记作 $[C_n \text{Pyr}]^+$)、哌啶类(记作 $[C_n \text{pi}]^+$)、吗啉类(记作 $[C_n \text{mor}]^+$)、异喹啉类(记作 $[C_n \text{isoq}]^+$)、季铵类(记作 $[\text{NR}_4]^+$)和季磷类(记作 $[\text{PR}_4]^+$)。其中,1,3-二烷基咪唑类离子液体因其性质稳定、熔点较低且制备工艺简单而被广泛使用。几种常见的离子液体阳离子结构式见图 1-1。

离子液体常见阴离子主要有无机阴离子 Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 NO_3^- 、 $\text{N}(\text{CN})_2^-$ 和有机阴离子三氟甲烷磺酸根离子 $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ (或 $[\text{TfMs}]^-$)、醋酸根离子 $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$ 、双三氟甲磺酰亚胺根离子 $[\text{N}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2]^-$ 等。

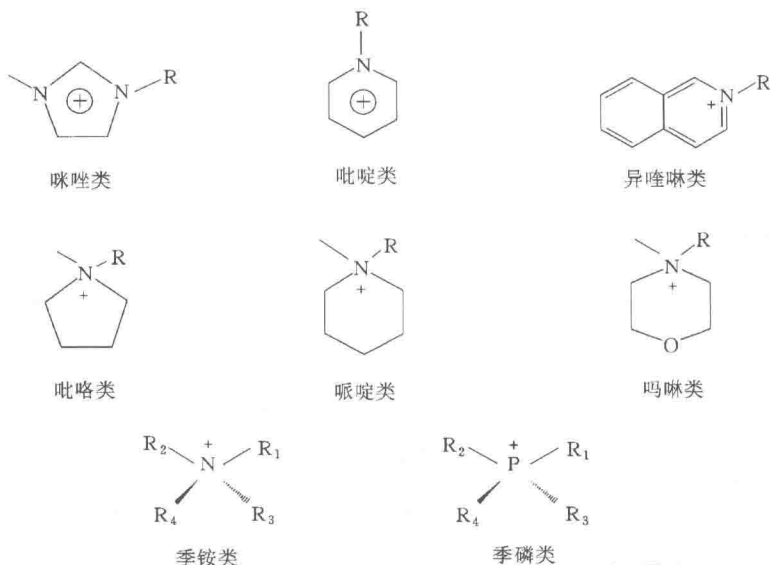


图 1-1 离子液体阳离子的结构式

1.2 离子液体的应用

1.2.1 在有机合成中的应用

离子液体不易挥发且稳定性较高,具有溶剂和催化剂的双重功能,此外离子液体还具有重复利用仍保持高效性等特点,因此离子液体在诸多有机合成反应中应用广泛,如:合成酯^[4-8]、醇^[9-11]、酮^[12-16]、胺^[17-19]以及聚合物^[20-24]等。

Xu 等^[6]研究了离子液体作为催化剂,由蓖麻油和甲醇进行酯交换合成蓖麻油酸甲酯(MR)的反应,实验比较了四种催化剂,即 1-甲基咪唑硫酸氢盐([Hmim]HSO₄)、1-丁基-3-甲基咪唑氢氧化物盐([C₄mim]OH)、NaOH、H₂SO₄ 对酯交换合成的催化效率,

并对反应因素如醇油比、反应温度、反应时间以及催化剂的用量分别进行单因素实验研究,采用响应面方法对反应条件进行优化,最终得出最佳实验条件,指出 $[\text{Hmim}]\text{HSO}_4$ 是最适合的催化剂,在最佳条件下产物 MR 合成效率高达 89.92%,同时实验指出离子液体 $[\text{Hmim}]\text{HSO}_4$ 可利用乙酸乙酯洗涤回收重复利用,并在回收利用 4 个循环周期后仍具有较高催化活性。Ouyang 等^[7]探究了 5 种四乙胺氨基酸盐离子液体的合成,并将其作为均相催化剂用于正丁醇(BuOH)与碳酸二甲酯(DMC)进行酯交换合成碳酸二丁酯(DBC),结果表明四乙胺脯氨酸盐($[\text{N}_{2222}][\text{Pro}]$)相比其他 4 种离子液体表现出最好的催化活性,在最佳条件下 DMC 转化率高达 96%,DBC 产率可达 72%,量子力学计算表明这种高效 DBC 产率源于 $[\text{N}_{2222}][\text{Pro}]$ 的协同双活化催化作用,即同时提高了 BuOH 的亲电性和 DMC 的亲核性,从而发挥高效的催化性能。此外,离子液体 $[\text{N}_{2222}][\text{Pro}]$ 可回收重复利用 5 次仍保持高催化效率且无明显质量损失。因此, $[\text{N}_{2222}][\text{Pro}]$ 可作为一种高效可回收均相催化剂用于无光气合成碳酸二丁酯,具有潜在的工业应用价值。

离子液体除在酯合成方面应用广泛之外,在聚合反应中也具有很大的应用价值。如 Tang 等^[23]研究了在离子液体 1-丙烯基-3-甲基咪唑氯盐($[\text{Amim}]\text{Cl}$)中通过原子转移自由基聚合(ATRP)合成纤维素接枝聚甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(cellulose-g-PDEAEMA)。实验中用乙醇作共溶剂降低 $[\text{Amim}]\text{Cl}$ 的黏度和增加 DEAEMA 在离子液体中的溶解度从而得到均相体系,所得聚合物由酯化反应和 ATRP 反应两步完成,均在离子液体 $[\text{Amim}]\text{Cl}$ 中进行,离子液体 $[\text{Amim}]\text{Cl}$ 可溶解纤维素同时保持其特性。离子液体还可用作原料制备离子交换膜,如 Fang 等^[20]研究了以两种聚合性咪唑鎓盐离子液体(IILs)1-乙烯基-3-甲基咪唑碘盐($[\text{Vmim}]\text{I}$)和 1-乙烯基-3-丁基-咪唑溴盐($[\text{Vbim}]\text{Br}$)为原料通过自由基共聚和溶液浇铸法合成

新型阴离子交换膜(AEMs)用作碱性燃料电池。IILs 作为原料,一方面为自由基共聚提供 —C=C— ,通过控制在反应物中的单体比率有效地合成目标共聚物,IILs 中的阳离子基团可以为 AEMs 提供离子传导,即直接传递阴离子以合成共聚物,避免合成过程中氯甲基化;另一方面由于 IILs 存在大 π 键,咪唑阳离子相比常规的四烷基铵阳离子在高 pH 和高温下更稳定,制备所得 AEMs 显示了适当的吸水能力、优异的离子交换容量和离子传导性以及热稳定性和化学稳定性。

1.2.2 在分离过程中的应用

传统的分离技术一般使用有毒、易挥发、易燃的有机溶剂,造成严重的环境污染,因此寻求环境友好型绿色替代溶剂成为分离技术领域的研究热点,而离子液体具有极低的蒸汽压和对有机物和无机物良好的溶解能力等独特性质,因此在分离领域的研究逐渐得到研究者的广泛关注,也给分离技术产业带来了广阔的应用前景。离子液体非常适合作为萃取分离过程的溶剂,已广泛用于金属元素^[25-33]、有机物^[34-43]和无机物^[44-45]的分离提纯,脱硫脱氮^[46-50]的萃取,以及生物大分子的提取分离^[51-55]等领域。

近年来,离子液体广泛应用于分离提取金属元素,如 Zhao 等^[26-27]研究了用离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[\text{C}_8\text{mim}]\text{PF}_6$)从过渡金属铬中提取钒的分离过程,虽然得到了有效的分离效果,但由于 PF_6^- 和钒之间进行阴离子交换使得离子液体 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{PF}_6$ 损失部分阴离子。在此基础上改进使用甲基三辛基硝酸铵($[\text{A}_{336}]\text{NO}_3$)配合有机酸化伯胺($[\text{N}_{1923}][\text{RNH}_3]\text{NO}_3$)作为混合萃取剂。结果表明两者混合对提取钒表现出明显的协同效应,离子液体 $[\text{A}_{336}]\text{NO}_3$ 不仅是钒的有效协同萃取剂,也是离子型萃取体系的有效萃取溶剂,而且在 NO_3^- 和 $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ (或 $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$)之间存在典型的阴离子交换机制,能够有效阻止有机阳离子配体释放进入水相,使得萃取过程能够持续进行,这为工业回收钒提供了有效的提取手

段。另外, Shi 等^[33]研究了离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[\text{C}_4\text{mim}]\text{PF}_6$)、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[\text{C}_6\text{mim}]\text{PF}_6$)、1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[\text{C}_8\text{mim}]\text{PF}_6$)对盐水湖中锂的萃取, 结果表明该萃取过程为阳离子交换机制, 离子液体的萃取效率随烷基链的碳原子数增加而降低。

分离纯化有机物是离子液体在萃取方面的又一重要研究领域, 并且已有广泛工业生产应用。离子液体多用于萃取有机酸^[34-35]、醇^[36-37]以及酚类化合物^[38-43], 如 Anderson 等^[34]报道了利用碳酸酯类离子液体通过中和反应从多巴油中萃取环烷酸; Cai 等^[37]研究了三种离子液体 1,3-二甲基咪唑二甲基磷酸($[\text{Mmim}]\text{DMP}$)、1-乙基-3-甲基咪唑二乙基磷酸盐($[\text{Emim}]\text{DMP}$)和 1-丁基-3-甲基咪唑二丁基磷酸盐($[\text{C}_4\text{mim}]\text{DBP}$)作为溶剂从己烷和庚烷混合物中液液萃取甲醇的过程, 结果表明离子液体烷基链越短萃取效率越高, 因此 $[\text{Mmim}]\text{DMP}$ 是分离提取甲醇最有效的溶剂。许多文献还报道了离子液体萃取酚类化合物的研究, Garron 等^[38]报道了使用 $[\text{C}_n\text{mim}]\text{NTf}_2$ 类离子液体萃取酚类化合物的效果; Huang 等^[39]利用疏水性离子液体四丁基磺基琥珀酸二辛酯液相萃取酚类, 结果表明这种离子液体对酚类的萃取效率较高。

1.2.3 在生物柴油合成过程中的应用

生物柴油作为潜在的传统燃料替代品越来越受到人们的重视, 早期生物柴油的生产主要采用各种油类和低级醇为原料, 用强碱 NaOH 或强酸如硫酸、盐酸、磷酸以及有机磺酸等作为催化剂来制备, 然而催化剂回收困难, 使得生产后处理过程中产生大量废水对环境造成严重污染。近年离子液体以其高催化活性、高选择性、易回收等独特的性质已被用作催化剂制备生物柴油, 并且容易回收^[56-65]。特别是磺酸功能化离子液体用作生产生物柴油的催化剂和反应介质, 表现出优异的性能和高收益率。

Li 等^[61]对 7 种不同酸性的离子液体催化油酸和甲醇酯化合

成生物柴油进行了研究,结果表明,离子液体酸性越强其对应的酯化活性越高,而 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基团的引入显著提高了离子液体的酸性。Ullah等^[65]用3种磺酸功能化咪唑类离子液体催化废棕榈食用油来生产生物柴油,结果显示1-丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐($[\text{C}_4\text{mim}]\text{HSO}_4$)基于其较长侧链,相比其他两种离子液体表现出了更高的催化效率,最终产率高达95.65%,与常规催化剂相比,酸性离子液体以其低成本、低损耗等特点,在工业化应用上有了良好的发展前景。

1.2.4 在纤维素溶解-再生中的应用

天然纤维素作为一种丰富的可再生聚合物,具有可再生性、生物相容性、生物降解等优点,已经广泛应用于化学、生物和药理学等领域。然而,纤维素的分子结构中存在许多氢键,导致纤维素难以溶于常见的有机和无机溶剂,对其加工、修改和应用造成了困难。离子液体作为新型高效绿色溶剂用于纤维素的降解研究发展十分迅速,在纤维素的溶解和再生^[23,66-77]方面取得了很大的进展。

Zhao等^[66-67]研究了一系列咪唑类离子液体 $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ ($n=2\sim10$)和1-丁基-3-甲基吡啶氯盐($[\text{C}_4\text{mpy}]\text{Cl}$)对纤维素溶解性能的影响,结果表明 $[\text{C}_4\text{mpy}]\text{Cl}$ 相比 $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ 有更好的溶解能力, $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ 烷基链越短溶解能力越强,即阳离子的吸电子基团的引入有助于提高对纤维素的溶解性;另外,对比研究了离子液体阳离子为 $[\text{C}_2\text{mim}]^+$ 时,不同种类阴离子的影响,并指出纤维素和阴离子间的相互作用力由强到弱排序为: $\text{Cl}^- > [\text{Ac}]^- > [(\text{CH}_3\text{O})^- \text{PO}_2]^- > [\text{SCN}]^- > [\text{PF}_6]^-$ 。

Gupta等^[76]从微观层面对纤维素在离子液体中溶解-再生进行了深入的研究,结果表明氢键起着极其重要的作用,溶解纤维素的驱动力是纤维素与阴离子之间形成氢键以及与阳离子的疏水作用,纤维素的再生则是加入抗溶剂来破坏纤维素与离子液体间的氢键,促进纤维素分子间的氢键形成进而沉淀。

1.3 离子液体的毒性评估

近几年,离子液体作为绿色溶剂受到人们的广泛关注,然而大多数人们只看到了离子液体的优点,比如极低的蒸汽压、极好的热稳定性和广泛可调的理化性质等。随着人们对环境关注度的提高,人们逐渐发现离子液体也存在许多不足,如离子液体不易挥发会导致回收困难,在环境中长期积累会造成环境污染以及对人类健康的潜在威胁等。因此,对离子液体毒性的研究逐渐引起人们的重视。

1.3.1 对动物的毒性研究

对于脊椎动物,尤其是哺乳动物,肝脏是其代谢和解毒的最重要靶器官。Yu 等^[78]研究了离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐对小鼠的急性毒性,结果显示小鼠的肝重指数显著增加,肝蛋白含量明显下降,通过对比肝脏内超氧化歧化酶、过氧化氢酶以及谷胱甘肽过氧化氢酶含量的变化,得出了离子液体对小鼠有毒性,导致小鼠肝脏内的抗氧化反应的结论。

虽然离子液体蒸汽压极低,不会挥发造成空气污染,但由于离子液体可溶解在水中,导致其可在水生环境中累积,因此许多文献报道了离子液体对水生生物的毒性评估^[79-84]。Tsarpali 等^[81]研究了离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($[C_4mim]BF_4$)和 1-辛基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($[Omim]BF_4$)对水生生物的毒性大小,结果表明离子液体的毒性与传统有机溶剂毒性相当,有时甚至高于有机溶剂;Roy 等^[84]利用一系列离子液体对大型蚤的毒性研究预测建立了 QSAR 模型,发现芳香族离子液体毒性高于脂肪族离子液体。另外,离子液体可沉积吸附在土壤中,造成地表和地下水污染,成为持久性环境污染物,对土壤生物造成严重威胁。南平等^[85]研究了离子液体 $[C_8mim]Cl$ 对泥鳅胚胎和仔鱼的毒性,结

果显示, $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl}$ 对泥鳅胚胎及仔鱼的发育具有明显的致畸、致死作用。石长应等^[86]研究了 4 种不同烃链长度咪唑类离子液体对日本三角涡虫的急性毒性, 结果表明, 4 种离子液体毒性强弱顺序为 $[\text{C}_{10}\text{mim}]\text{Br} > [\text{C}_8\text{mim}]\text{Br} > [\text{C}_6\text{mim}]\text{Br} > [\text{C}_4\text{mim}]\text{Br}$, 由此可见咪唑类离子液体对涡虫的急性毒性随碳链长度增加而增大, 这是由于随着碳链的延长, 离子液体的亲脂性增强, 对细胞膜的破坏作用增大, 从而更易进入细胞内对生物体产生毒性效应。

1.3.2 对植物的毒性研究

微藻作为初级生产者, 在生态系统的物质循环和能量流动中起着关键作用, 在水生环境毒素评估方面承担了重要角色, 因此, 众多研究者选取微藻作为研究对象, 来研究离子液体对植物的毒性影响^[87-90]。Das 等^[88]利用对离子液体毒性预测模型, 评估了离子液体对栅藻的生态毒性, 结果显示, 离子液体阳离子中脂肪族长侧链的疏水性与其毒性有很大关联。因此, 可以通过: 第一减少阳离子取代基的侧链长度, 第二增加阳离子氢键供体特性, 第三用简单的饱和基团替代大体积不饱和的阴离子即降低其亲脂性来降低离子液体的毒性。另外, Liu 等^[89]也研究了离子液体烷基链长度与其毒性之间的关系, 实验测试了 5 种 1-烷基-3-甲基咪唑氯盐 $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$, $n = 6, 8, 10, 12, 16$ 离子液体对绿藻斜生栅藻的毒性。结果表明, 离子液体对斜生栅藻的生长抑制速率随离子液体浓度和烷基链长度增长而增加, 进而得出离子液体毒性顺序为 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Cl} < [\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl} < [\text{C}_{10}\text{mim}]\text{Cl} < [\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl} < [\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$, 与 Das 等研究得出的结论相同。

此外, 离子液体对高等植物的毒性研究也日益增多^[91-94]。如 Liu 等^[92]还研究了 3 种咪唑类离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑氯盐 $[\text{Omim}]\text{Cl}$ 、1-癸基-3-甲基咪唑氯盐 $[\text{Dmim}]\text{Cl}$ 、1-十二烷基-3-甲基咪唑氯盐 $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ 对水培水稻幼苗生长的影响。结果也证实了烷基咪唑氯盐类离子液体对植物生长的毒性随烷基链的增长

而增加,即毒性顺序为:[Omim]Cl<[Dmim]Cl<[C₁₂mim]Cl,与 Das 和 Liu 等研究结果相同。

1.3.3 对微生物的毒性研究

由于菌类具有生长周期短、繁殖速度快以及对环境敏感等特点,因此广泛应用于对离子液体的毒性测定。在水生环境中,Vibrio fischeri 作为最普遍的毒理学调查测定对象,目前许多文献报道了离子液体对其毒性影响^[95-99],以此进一步探究离子液体的结构与毒性的关系。Wang 等^[95]报道了 24 种溴盐离子液体对 Vibrio fischeri 和大型蚤的毒性影响,主要研究了离子液体的阳离子与其毒性之间的关系,研究表明阳离子环相同时,烷基侧链越长毒性越大;烷基侧链相同时,对 Vibrio fischeri 的毒性顺序为吡啶环>咪唑环>哌啶环>吡咯环。Viboud 等^[99]主要探究了离子液体 3 个主要组成部分,即阳离子环、烷基侧链以及阴离子对离子液体毒性的影响,研究发现含有丁基链的离子液体毒性高于含酚基的离子液体;当官能基团如腈基、羟基、醚加到阳离子基团上时,离子液体毒性显著降低;阴离子为氰基的离子液体毒性高于阴离子为三氟甲磺酸盐和硫氰酸盐的离子液体。Costa 等^[96]研究指出就阳离子而言,包含胆碱和四丁基铵的离子液体毒性小于含咪唑环的,证明阳离子含有芳香环的离子液体比含非芳香族基团的毒性高;对于阴离子,含氟(四氟硼酸盐与双三氟甲磺酰亚胺盐)的离子液体对细菌的毒性高于其他种类。

此外,已有众多文献报道了离子液体对其他菌类的毒性研究^[100-106]。如 Hernández-Fernández 等^[105]利用 Microtox[®]毒性测试对 16 种离子液体的毒性进行了评估,其结论为:阳离子中含有吡咯烷的离子液体较之含咪唑和吡啶的毒性小,并指出在阳离子的烷基链中引入羟基取代基可降低离子液体毒性。

1.3.4 细胞水平的毒性研究

细胞是研究有害物质毒性作用机理最适合的材料之一,因此

许多文献报道了离子液体在细胞水平上的毒性评估^[107-112]。井长勤等^[107]研究了 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐在细胞水平的毒性实验,结果表明,离子液体对 DNA 造成了断裂损伤,导致了细胞凋亡。Zhao 等^[108]建立了离子液体毒性的综合数据库,进一步分析其对小鼠白血病细胞系的毒性预测,结果显示增加分子中氧原子的相对数量可使离子液体毒性降低。Bubalo 等^[110]和 Ma 等^[111]分别报道了咪唑类离子液体对斑点叉尾鲷卵巢细胞系和小鼠白血病细胞系的毒性影响,实验结果均表明离子液体的细胞毒性主要取决于阳离子的空间结构和疏水性。

1.3.5 对酶的毒性研究

酶存在于所有活的动植物体内,是维持机体正常功能、消化食物、修复组织等生命活动的一类必需物质。它几乎参与所有的生命活动,消化、吸收、呼吸、运动和生殖等都是酶促反应过程,而外界有毒物质侵入动、植物体内往往使酶变性失活。因此,酶非常适合作为污染物监测的生物标志物,即可通过监测酶的结构、活性及含量的变化来评估污染物的毒性及环境行为。

近年来,酶抑制测试已经成为评估离子液体在亚细胞水平毒性的有效手段。已有众多文献^[113-124]报道了使用酶作为外源生物标志物,评估离子液体对生物体的毒性。Pinto 等^[115]研究了离子液体对过氧化氢酶的毒性影响,探究离子液体的阴阳离子结构对酶活性的毒性影响程度。实验选择阳离子为咪唑鎓、磷鎓、吡咯烷,阴离子为四氟硼酸根、三氟甲烷磺酸根、甲磺酸酯根和氯离子的 7 种离子液体,通过研究过氧化氢酶在离子液体水溶液中活性变化,结果表明,过氧化氢酶在离子液体中活性降低,且随离子液体浓度升高活性降低程度增大。不同阳离子的离子液体对酶毒性作用的表现:① 含有非芳香族阳离子基团的离子液体,即吡咯烷类和磷鎓类,相比含有咪唑环的离子液体表现出较低的 IC_{50} 值;② 烷基侧链越短毒性越小。阴离子不同对离子液体的毒性影

响较小,研究还指出含四氟硼酸根(BF_4^-)的离子液体毒性要高于其他离子液体,这可能与 BF_4^- 水解释放有毒的氢氟酸有关。

Ventura 等^[121]报道了亲水性咪唑类离子液体对南极假丝酵母脂肪酶 B (CaLB)活性的影响,主要考察离子液体烷基链的长度与阴离子对离子液体毒性的影响。首先,离子液体阳离子烷基链越长,使酶活性降低程度越大。这是由于烷基链的增长可导致离子液体的疏水性增加,进而使得离子液体的烷基链部分与酶非极性域的范德华力增强,非极性烷基链形成脂肪域,这些组分会阻塞酶的非极性活性位点,致使底物不能到达酶活性中心,从而导致酶的活性降低。其次,酶的活性随离子液体的浓度增加而降低。这是因为酶失活的程度与水活度有关,随着水活度的降低,酶的活性逐渐下降,而离子液体的加入削弱了体系中酶表面的水化层,指示酶周围的水活度下降,因此酶活性随离子液体浓度增大而降低。最后,阴离子对酶活性的影响主要与其氢键供应能力 α 、氢键接受能力 β 以及极性和色散作用 π 有关,结果显示 α 对酶活性几乎没有影响,而 β 和 π 在阴离子使酶活性降低过程中发挥了重要作用。