

陈 曦,张 聪,宋 超,等. 氟虫腈在中华绒螯蟹中的残留效应[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):176–180.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.033

氟虫腈在中华绒螯蟹中的残留效应

陈 曦^{1,2,3}, 张 聪^{1,2,3}, 宋 超^{1,2,3}, 方龙香^{1,2,3}, 董欣悦⁴, 陈家长^{1,2,3,4}

[1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,江苏无锡 214081; 2. 农业农村部水产品质量安全环境因子风险评估实验室(无锡),江苏无锡 214081; 3. 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室,北京 100000; 4. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081]

摘要:采用半静态实验法,设置质量浓度为 10、30、50 $\mu\text{g/L}$ 的氟虫腈水溶液在中华绒螯蟹中的残留效应试验。结果表明,不同质量浓度的处理组分析,高质量浓度组中华绒螯蟹腿中氟虫腈的含量显著高于低质量浓度组,高质量浓度组中华绒螯蟹身体中的含量也显著高于低质量浓度组。对中华绒螯蟹不同部位氟虫腈的含量分析无差异性,氟虫腈富集部位的走向应该是先从腿部再到身体最后到性腺。氟虫腈在中华绒螯蟹体内的残留没有性别选择性,但雌性中华绒螯蟹体内富集的速度比雄性的快。此次研究可为处理相关的渔业污染事故提供一定的参考。

关键词:氟虫腈;中华绒螯蟹;残留效应

中图分类号: X592;X714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0176-05

2018 年 6 月,德国发现受氟虫腈污染的荷兰“毒鸡蛋”流入超市,食品安全问题引发了人们的关注。氟虫腈是一种广谱类杀虫剂,对害虫以胃毒作用为主,并有触杀和内吸作用,用于杀灭蚜虫、鳞翅目幼虫、蝇类和鞘翅目等害虫^[1-3]。按照我国农药急性毒性分级标准,氟虫腈属于中等毒性药物^[4]。由于氟虫腈对甲壳类水生生物和蜜蜂具有高风险,并且其在水和土壤中降解慢,我国在《中华人民共

和国农业部公告第 1157 号》文件中规定,自 2009 年 10 月 1 日起,除卫生用、玉米等部分旱田种子包衣剂外,在我国境内停止销售和使用含氟虫腈成分的农药制剂^[5]。

中华绒螯蟹肉味鲜美、营养丰富、经济价值较高,深受广大消费者喜爱。玉米是中华绒螯蟹的主要饲料成分之一,含氟虫腈成分包衣剂的使用可能会引入到中华绒螯蟹的生长环境中。研究表明,氟虫腈对甲壳类动物有剧毒^[6];王志铮等研究发现,氟虫腈对中华鳖稚鳖 96 h 半致死质量浓度为 0.28 mg/L ^[7];单正军等通过稻田-鱼塘模拟试验表明,氟虫腈对中华绒螯蟹(体质量 1 g) 96 h 的 LC_{50} 为 0.008 6 mg/L ^[8]。目前,氟虫腈在中华绒螯蟹中的残留含量研究较少,同时,考察氟虫腈对中华绒螯蟹不同部位、不同性别的残留区别研究亦未见报道。为此,本研究通过采用室内模拟试验,研

收稿日期:2018-11-30

基金项目:中国水产科学研究院基本科研业务费(编号:2018HY-ZD0605);国家水产品质量安全风险项目(编号:GJFP2018009)。

作者简介:陈 曦(1992—),女,安徽无为,硕士,研究实习员,主要从事渔业生态环境修复方面的研究。E-mail:chenx@ffrc.cn。

通信作者:陈家长,硕士,研究员,主要从事渔业环境监测与保护,水产品质量安全与风险评估方面的研究。E-mail:chenjz@ffrc.cn。

[21]林毅雄,林艺芬,陈 莲,等. 解偶联剂 DNP 处理对采后龙眼果实呼吸作用和细胞膜透性的影响[J]. 中国食品学报,2018(2):191–196.

[22]Frear D S, Swanson H R, Tanaka F S. *N*-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas; isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton[J]. *Phytochemistry*, 1969, 8(11):2157–2169.

[23]Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human *CYP1A1*, *CYP2B6*, and *CYP2C19*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(8):2985–2991.

[24]肖鹏飞,近藤隆一郎. 细胞色素 P450 抑制剂对白腐菌 *Phlebia*

lindneri 降解氯丹的影响[J]. 农药学报,2012,14(5):515–520.

[25]Burnet M M, Loveys B R, Holtum J M, et al. Increased detoxification is a mechanism of simazine resistance in *Lolium rigidum*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1993, 46(3):207–218.

[26]Cabanne F, Huby D, Gaillardon P, et al. Effect of the cytochrome P450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat[J]. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 1987, 28(3):371–380.

[27]Elmore M T, Brosnan J T, Arnel G R, et al. Cytochrome P450 inhibitors reduce creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) tolerance to topramezone[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0130947.

究氟虫腈在中华绒螯蟹中的残留含量,以期为中华绒螯蟹食用安全性及相关渔业污染事故处理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 受试生物 试验种类为中华绒螯蟹成蟹(最后一次蜕壳之前),购自江苏省江阴市某中华绒螯蟹养殖场,大小一致,体质量为(91.79±12.21)g,先在室内饲养1周,以适应环境,选择健康有活力的用于试验。

1.1.2 试验用水 在室外曝气3 d以上的自来水,水温20~24℃。

1.1.3 仪器与试剂 GL-22MS 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);sartorius 离心机(Sigma);Acquity UPLC I-Class,Xevo TQD 液质联用仪(Waters)。Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除净化管;Agilent Bond Elut EMR-Lipid Polish 反萃管。甲醇、甲酸、乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯,水为超纯水,氟虫腈标准溶液。

1.2 试验方法

1.2.1 氟虫腈暴露处理 采用半静态试验法,室内温度设为23℃。将供试中华绒螯蟹放入玻璃缸内(长39.5 cm×宽28.5 cm×深29.5 cm),在缸内分别装入6 L不同浓度的稀释液,用增氧泵进行增氧,每个缸内放入5只中华绒螯蟹,共设6个处理和2个空白对照,每个处理3个重复。试验期间不喂食,每隔48 h更换1次药液,试验周期为4周,每隔1周采样1次。根据课题组预试验以确定本次试验药物质量浓度,既可以测出中毒中华绒螯蟹体内氟虫腈的残留又要保持在试验结束时中华绒螯蟹不至于全部死亡。处理组的质量浓度分别为10、30、50 μg/L,每个质量浓度分性别作2个处理。

1.2.2 前处理方法 采样时,每个缸随机采集1只中华绒螯蟹,分别提取身体(B)、性腺(G)、蟹腿(L)的可食部分进行检测。称取5 g样品于50 mL离心管中,加入10 mL提取液(乙酸乙酯、乙腈和甲酸,其体积比为99.5:99.5:1.0),2 000 r/min 涡旋振荡15 min,12 000 r/min 离心5 min;取5 mL离心后的上清液加入至已用5 mL水活化好的Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除净化管中,2 000 r/min 涡旋振荡5 min,4 000 r/min 离心5 min;将离心后的上清液全部转入含1.7 g EMR-

Lipid Polish MgSO₄ 的离心管中,2 000 r/min 涡旋振荡5 min,4 000 r/min 离心5 min,取有机相(上层)过0.22 μm 有机相滤膜,待UPLC-MS/MS分析。

1.2.3 仪器分析条件 质谱条件:离子采集模式为ES⁻;毛细管电压:2.6 kV;锥孔电压:36 V;离子源温度150℃;脱溶剂气温度350℃;脱溶剂气流速650 L/h;锥孔气流速30 L/h;MRM监测模式下氟虫腈的母离子质荷(*m/z*)比为434.844,定量离子质荷比(*m/z*)为317.930;保留时间为2.13 min。

色谱条件:色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm,2.1×100 mm column;柱温:30℃;自动进样器温度设为10℃;进样量5 μL。

梯度洗脱程序见表1。

表1 液相梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相比比例(%)		Curve
		A	B	
Initial	0.3	90	10	Initial
0.25	0.3	90	10	6
0.50	0.3	50	50	6
1.00	0.3	20	80	9
1.50	0.3	2	98	1
2.50	0.3	2	98	6
3.00	0.3	20	80	6
3.20	0.3	50	50	6
3.50	0.3	90	10	6
5.00	0.3	90	10	6

注:A为0.1% FA水,B为0.1% FA甲醇。

2 结果与讨论

2.1 中华绒螯蟹中毒症状

试验初始,受试中华绒螯蟹放入药液中比较兴奋,四处乱窜,之后静伏于容器底部,在玻璃缸中正常生存与对照组无明显差别。所设置的3个处理组在96 h内,中华绒螯蟹无明显中毒症状,有个别中华绒螯蟹死亡,后高质量浓度组中华绒螯蟹出现8足支起呈穹形,发生抱团群聚行为,中华绒螯蟹之间互相打架,用螯足将对方的步足不断钳掉,6 d后高质量浓度组的中华绒螯蟹陆续吐黄水继而死亡。随着试验时间延长,各试验梯度有不同个数的死亡个体,中华绒螯蟹的中毒表现为,抱团群聚、反应迟钝、口吐白沫。在解剖过程中,可以发现中毒的中华绒螯蟹肢体软塌没有弹性,背甲与胸腹的黏合不强。

氟虫腈属于苯基吡唑类化合物,它的作用机制

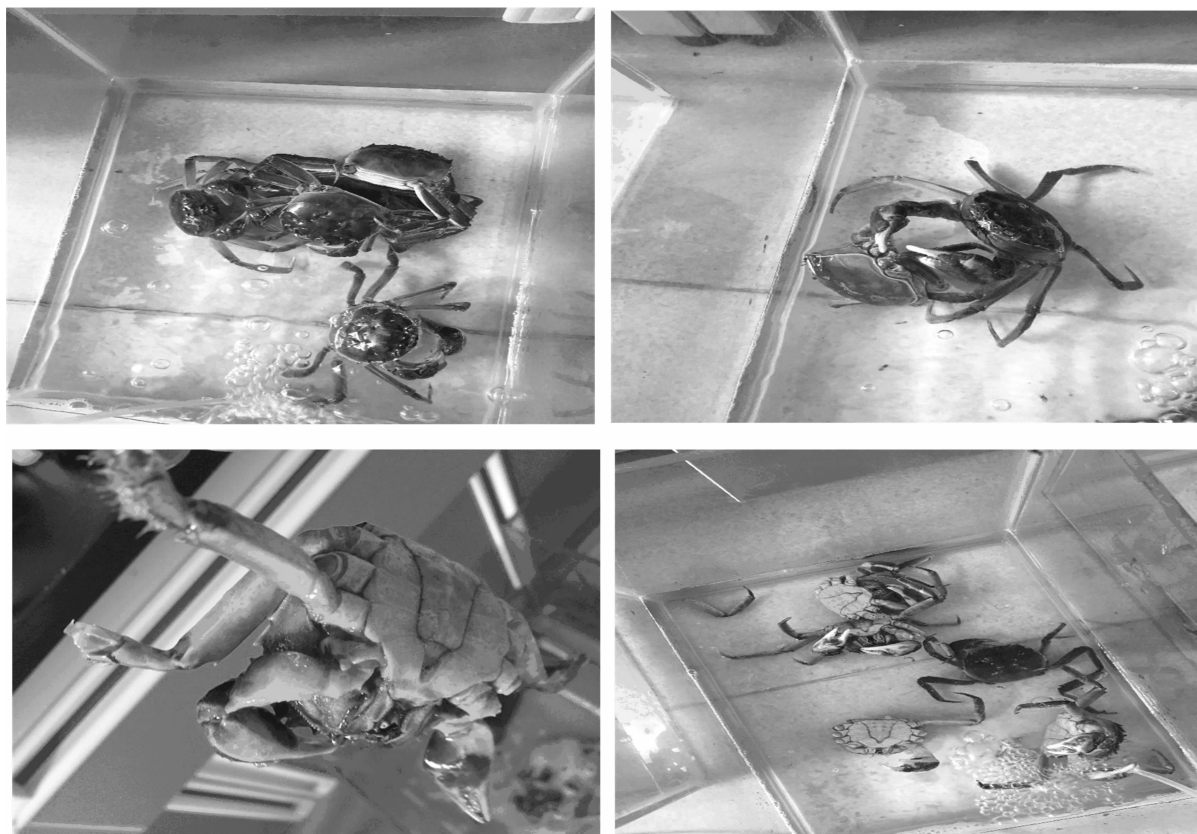


图1 中华绒螯蟹中毒症状

是能够阻断 γ -氨基丁酸介导的氯离子通道的开放,从而造成中枢神经系统的过度兴奋^[9]。王志铮等研究发现,氟虫腈对中华鳖稚鳖的急性毒性试验中,中华鳖稚鳖中毒的神经症状与本次试验的中华绒螯蟹神经症状类似,该研究认为氟虫腈导致神经传导、呼吸受阻以及代谢活动紊乱共同引发的中毒行为^[7]。氟虫腈急性中毒的小鼠神经元细胞出现神经胶质细胞空泡化、细胞核膜间隙轻度扩张等病理特征^[10]。Carla M. Stehr 等探索了氟虫腈对斑马鱼胚胎和幼鱼的影响,发现氟虫腈可通过抑制甘氨酸受体亚型的功能从而损害鱼的脊髓运动。中华绒螯蟹的背部拱起、抱团行为等神经中毒症状可能也与甘氨酸受体的损害有关^[11]。乙酰胆碱酯酶可以保证神经冲动在突触间的正常传导,严海娟等研究发现氟虫腈对锦鲤脑组织乙酰胆碱酯酶的抑制率可达 35.21%,中华绒螯蟹神经症状的表现与氟虫腈对乙酰胆碱酯酶的抑制有关^[12]。

2.2 同一时间同一部位不同质量浓度处理中华绒螯蟹体内氟虫腈的含量

由表 2 可知,随时间变化,不同处理组的中华绒螯蟹体内氟虫腈的含量,其中,空白组的中华绒螯

蟹蟹腿中有氟虫腈检出,含量为 1.3 ng/g 左右。同一时间,高质量浓度组中华绒螯蟹中氟虫腈的残留高于中质量浓度组高于低质量浓度组(图 2)。经数据分析发现,高质量浓度组中华绒螯蟹蟹腿中氟虫腈的含量显著高于低质量浓度组($P < 0.05$),高质量浓度组中华绒螯蟹身体中的含量也显著高于低质量浓度组($P < 0.05$)。性腺中氟虫腈的残留没有较大差异,第 1 次采样时高质量浓度组的中华绒螯蟹性腺中含量相差较大,分布不均,这可能是高质量浓度的情况下,性腺对氟虫腈的吸附能力不同或是性腺中氟虫腈的积累与个体差异相关。

2.3 相同时间同质量浓度处理中华绒螯蟹不同部位氟虫腈的含量

经 JMP 软件分析,中华绒螯蟹不同部位氟虫腈的含量无差异性。但相同暴露时间相同质量浓度下,腿部的残留量相对较低。有报道称,氟虫腈在脂肪组织中含量较高^[8],腿部组织中脂肪含量少,因此氟虫腈在腿部富集相对偏少。在试验过程中,处理组均发生断腿的现象,分析可能是骨眼部位受氟虫腈的影响被破坏,再者氟虫腈对中华绒螯蟹神经系统的损害,致使中华绒螯蟹个体间互相残杀。

表 2 不同质量浓度处理中华绒螯蟹体内氟虫腈的残留

试验分组及部位	浓度 (ng/g)	残留量(ng/g)		
		性腺 G	腿部 L	身体 B
7 d	0	0.000 ± 0.000b	1.292 ± 0.075c	0.000 ± 0.000b
	10	0.000 ± 0.000b	1.532 ± 0.398c	1.840 ± 1.144b
	30	7.859 ± 8.730ab	3.981 ± 1.717b	9.355 ± 9.943ab
	50	17.634 ± 21.412a	5.982 ± 1.329a	15.799 ± 9.704a
14 d	0	0.000 ± 0.000b	1.274 ± 0.565b	0.000 ± 0.000b
	10	4.658 ± 0.023a	2.754 ± 0.967b	2.858 ± 0.837b
	30	5.279 ± 0.970a	3.472 ± 1.107b	3.766 ± 1.048b
	50	6.198 ± 0.015a	7.004 ± 5.353a	9.677 ± 6.800a
21 d	0	0.000 ± 0.000a	1.337 ± 0.012b	0.000 ± 0.000c
	10	2.191 ± 0.473a	1.875 ± 1.436b	1.820 ± 0.544b
	30	9.651 ± 8.904a	1.570 ± 0.226b	2.185 ± 0.368ab
	50	5.483 ± 0.000a	5.275 ± 0.000a	3.179 ± 0.000a

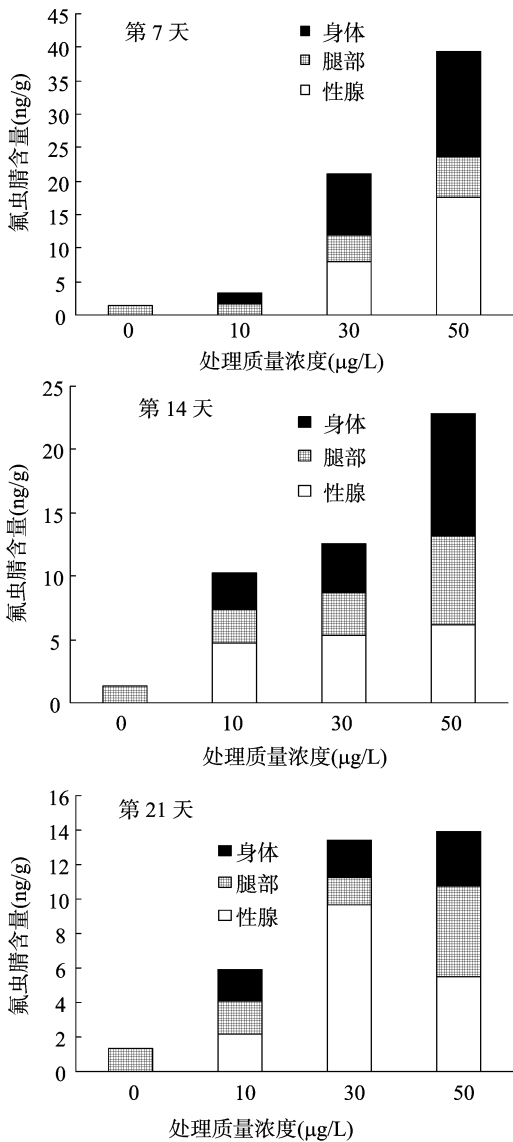


图2 相同时间不同质量浓度氟虫腈的残留

在 7 d 时,低质量浓度组的性腺中未检测到氟虫腈残留,在空白组中只有腿部检测到氟虫腈的含量,应该是氟虫腈的富集先从腿部再到身体最后到性腺,这可能与中华绒螯蟹受到外部甲壳的保护有关。

2.4 同时间相同质量浓度处理不同性别中华绒螯蟹氟虫腈的含量

由图 3 可知,在 7 d 时,低质量浓度处理组雌性、雄性中华绒螯蟹体内氟虫腈含量差异不大,检测均值在 2 ng/g 左右;中质量浓度和高质量浓度处理组均是雌性体内的氟虫腈含量显著高于雄性体内,雌性体内的含量是雄性体内的 2 倍。在 14、21 d,高质量浓度组只有雄性个体存活,低质量浓度组雄性体内的氟虫腈含量高于雌性体内的。相对来说,随时间变化,雌性中华绒螯蟹体内氟虫腈富集的速度比雄性快。虽然试验最后高质量浓度组只剩雄性中华绒螯蟹存活,但其体内氟虫腈的含量与其他组无显著差异,不能说明雄性中华绒螯蟹的耐受性强。据报道,雄性河口底栖桡足类对氟虫腈比较敏感,能够扰乱雄性性腺发育过程中非常重要的神经激素级联,从而损害其生殖功能使后代数量减少^[13]。氟虫腈对雌、雄性大鼠的内分泌均有干扰,可使雄性大鼠甲状腺激素下降^[4],也会影响雌性大鼠血浆孕酮、雌二醇水平^[14]。可见,氟虫腈对雌雄性动物的激素均有一定的损害作用,但氟虫腈在中华绒螯蟹体内的残留没有性别选择性。在相同质量浓度下,氟虫腈在雌性中华绒螯蟹体内富集的速度比雄性快,并且氟虫腈对中华绒螯蟹的生殖功能有一定的损害作用。

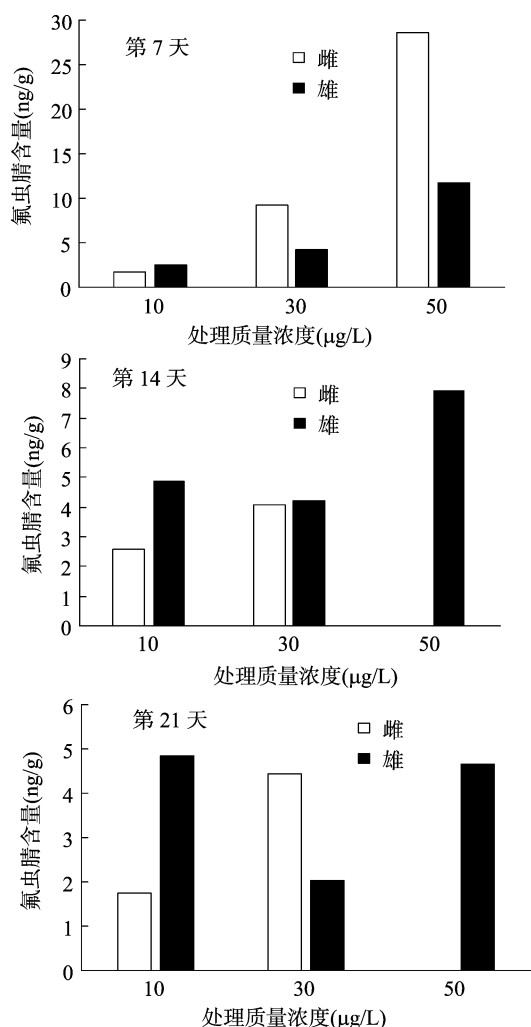


图3 相同时间不同性别氟虫腈的残留

3 结论

氟虫腈在中华绒螯蟹中的残留效应为:同一时间,高质量浓度组中华绒螯蟹中氟虫腈的残留高于中质量浓度组高于低质量浓度组。中华绒螯蟹不同部位氟虫腈的含量无差异性,氟虫腈富集部位的走向应该是先从腿部再到身体最后到性腺。氟虫腈在中华绒螯蟹体内的残留无性别选择性,但雌性中华绒螯蟹体内富集的速度比雄性的快。

氟虫腈是一种对中华绒螯蟹有高风险的药物,10 µg/L 的水体质量浓度不会导致中华绒螯蟹的死亡,但随时间的延长可以使中华绒螯蟹出现一系列

的中毒症状。极低质量浓度的氟虫腈在中华绒螯蟹体内检测不出来,但其已经危害了中华绒螯蟹的生理系统,对养殖池塘的水体及附近环境中的氟虫腈仍应加强监管。

参考文献:

- [1] Cheng Y P, Dong F S, Liu X A, et al. Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical Methods, 2014, 6(6): 1788-1795.
- [2] 张芳芳, 洪雅青, 张 幸. 氟虫腈的毒理学研究进展[J]. 职业与健康, 2008, 24(20): 2211-2213.
- [3] 胡晓飞, 魏凤仙, 李向力, 等. 氟虫腈的危害及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(6): 1226-1233.
- [4] 周 彤, 肖洪喜, 周志俊. 氟虫腈安全性评价资料概述[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(8): 745-748.
- [5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告[J]. 中国兽药杂志, 2014(3): 69.
- [6] 徐广春, 顾中言, 杨玉清, 等. 氟虫腈的应用和风险研究进展[J]. 现代农药, 2008, 7(2): 1-5, 11.
- [7] 王志铮, 施建军, 吕敢堂, 等. 3 种常见农药对中华绒螯蟹的急性致毒效应研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2010, 29(3): 199-205.
- [8] 单正军, 王连生, 蔡道基, 等. 新型杀虫剂锐劲特农药对甲壳类水生生物影响研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 949-952.
- [9] Merkowsky K, Sethi R S, Gill J P, et al. Fipronil induces lung inflammation *in vivo* and cell death *in vitro* [J]. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2016, 11(1): 10.
- [10] 何国鑫, 林锡芳, 刘 晓, 等. 氟虫腈急性中毒小鼠毒性和病理形态学改变[J]. 温州医学院学报, 2005, 35(3): 179-181.
- [11] Stehr C M, Linbo T L, Incardona J P, et al. The developmental neurotoxicity of fipronil: Notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae[J]. Toxicological Sciences, 2006, 92(1): 270-278.
- [12] 严海娟, 于 莉, 夏锦瑜, 等. 阿维菌素和氟虫腈对锦鲤的急慢性毒性效应[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 363-365.
- [13] Cary T L, Chandler G T, Volz D C, et al. Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis* [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(2): 522-528.
- [14] Ohi M, Dalsenter P R, Andrade A J, et al. Reproductive adverse effects of tipronil in Wistar rats[J]. Toxicology Letters, 2004, 146(2): 121-127.