

· 研究简报 ·

乙羧氟草醚对斑马鱼的急性毒性和生物富集性研究

邹积鑫¹, 何雄奎^{*}, 陶传江², 朴秀英², 姜辉²

(1. 中国农业大学 理学院, 北京 100094 2 农业部农药检定所 生物技术研究测试中心, 北京 100026)

摘要: 采用半静态法测定了乙羧氟草醚对斑马鱼 *Brachydanio rerio* 的急性毒性和生物富集系数。以 N, N-二甲基甲酰胺和吐温-80 为助剂, 配制不同浓度的乙羧氟草醚溶液, 测得其对斑马鱼的 LC₅₀ 值为 3.10 mg/L, 属于中等毒性。生物富集性试验中设乙羧氟草醚浓度为 0.03 和 0.30 mg/L, 持续暴露时间为 8 d, 测得生物富集系数 (BCF_{8d}) 分别为 1.16 和 2.43, 属于低富集性。

关键词: 乙羧氟草醚; 斑马鱼; 急性毒性; 生物富集

中图分类号: X503.2 S481.8

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)04-0375-04

Acute Toxicity and Bio-concentration of Fluoroglyphen-ethyl to *Brachydanio rerio*

ZOU Ji-xin¹, HE Xiong-kuai^{*}, TAO Chuan-jiang², PIAO Xiu-ying², JIANG Hui²

(1. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Center for Agrochemical Biological and Environmental Technology, Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

Abstract The acute toxicity and bio-concentration factor of fluoroglyphen-ethyl were measured by using zebrafish (*Brachydanio rerio*) as test organism by semi-static method. N, N-Dimethylformamide and Tween-80 were used as adjuvant to prepare the solution of fluoroglyphen-ethyl. The LC₅₀ value of fluoroglyphen-ethyl to *B. rerio* was 3.10 mg/L. When exposed for 8 days, the bio-concentration factor (BCF_{8d}) of fluoroglyphen-ethyl was 1.16 and 2.43 at the concentrations of 0.03 and 0.30 mg/L, respectively. The results suggested that bio-concentration of fluoroglyphen-ethyl in *Brachydanio rerio* was low.

Key words fluoroglyphen-ethyl; *Brachydanio rerio*; acute toxicity; bio-concentration

我国农药施用技术相对落后, 有效利用率仅有 20% 左右^[1]。施用于农田中的农药通过各种途径进入水环境中, 经食物链逐级浓缩而对水生生态系统造成危害, 甚至最终危害到人类健康^[2, 3]。农药对水生生物的急性毒性和生物富集性与农药的合理施用密切相关, 是农药环境安全评价的重要参数^[4]。

乙羧氟草醚 (fluoroglyphen-ethyl) 是罗门·哈

斯公司于 20 世纪 90 年初开发的一种二苯醚类除草剂, 具有高效、低毒、低残留、见效快、应用范围广等特点, 适用于小麦、大麦、花生、大豆和稻田除草^[5]。国内外有关其对水生生物影响的研究报道尚不多见。华小梅等^[6, 7]对其同类药剂乙氧氟草醚在鱼塘-稻田中的残留情况进行了模拟研究, 结果表明: 尽管乙氧氟草醚对水生生物毒性较高, 但在规定剂量下使用时, 其在模拟系统的稻田水、鱼

收稿日期: 2006-05-16; 修回日期: 2006-09-12.

作者简介: 邹积鑫 (1981-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者: 何雄奎 (1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事药械与施药技术研究. 联系电话:

010-62731446; E-mail: xiongku@cau.edu.cn

池及邻近鱼塘中的实际残留浓度均已降低到对其中的水生生物不再有危害的水平。作者测定了乙羧氟草醚对斑马鱼的急性毒性和生物富集系数, 以为评价其对水生生态系统的影响提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

VARIAN CP-3800 型气相色谱仪 [带 ECD (Ni^{63}), 美国瓦里安公司], H19143 溶解氧测定仪 (意大利哈纳公司), BP211D 型万分之一电子天平、KA-F25 型分散机、Sigma4-15 离心机 (德国 Satorius 公司), 弗罗里硅土固相萃取柱 (北京艾杰尔科技有限公司, 规格 1 000 mg/6 mL)。

吐温-80N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 为化学纯, 其余试剂为市售分析纯。

1.2 试验材料

乙羧氟草醚 (fluroglycofen-ethyl) 标准品, 纯度为 99%, 农业部农药检定所提供。试验生物: 当年生斑马鱼 *Brachydanio rerio*, 试验前在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下驯养 14 d 以上, 自然死亡率 $< 1\%$, 平均体长 3.00 cm, 平均体重 0.20 g。试验用水: 曝气充氧除氯 24 h 以上的自来水, 水温 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 7.8 溶解氧 7.0~8.0 mg/L, 硬度 159 mg/L (以 CaCO_3 计)。

1.3 乙羧氟草醚对斑马鱼的急性毒性测定

按文献 [8] 方法进行。以 DMF (1.70 g) 为溶剂, 吐温-80 (0.30 g) 为助溶剂, 将乙羧氟草醚标准品配制成乳油, 添加至 10 L 自来水中配成 0.60 1.20 1.80 2.40 3.02 4.00 5.03 mg/L 的乙羧氟草醚溶液供试。试验期间光暗比为 12 h: 12 h 温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。设 3 个重复, 并设 2 个试剂空白对照。每缸乙羧氟草醚溶液为 10 L, 斑马鱼 10 条, 不投饵, 48 h 换药一次。按 Trimmed Spearman-Kärber 统计分析方法, 使用 SPSS 12 软件计算 LC_{50} 值 (96 h)。

1.4 残留检测方法

1.4.1 水中乙羧氟草醚的提取 移取 20.0 mL 乙羧氟草醚溶液于 150 mL 分液漏斗中, 加入 4.00 g 氯化钠, 振荡至溶解, 分别用 15.0 mL 乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相, 于 40°C 下减压浓缩至约 1.0 mL, 氮气吹至近干。以正己烷-乙酸乙酯 (体积比为 1:1 下同) 混合溶液定容, 待 GC-ECD

检测。

1.4.2 鱼体内乙羧氟草醚的提取、净化 参考 Taizo 等^[9] 建立的鱼肉中农药残留的分析方法, 并根据本农药的性质在溶剂选择方面有所改变。将 10 条斑马鱼准确称重后捣碎 (平均总重量为 2.00 g), 加入 10.00 g 无水硫酸钠, 静置 5 min 左右。加入 100.0 mL 丙酮, 于 6 000 r/min 高速匀浆后离心 10 min, 过滤并收集滤液于 250 mL 圆底烧瓶中, 40°C 下减压浓缩至近干, 氮气吹干。用 10.0~15.0 mL 正己烷将残余物转移至分液漏斗中, 分别用 30.0 mL 乙腈 (已用正己烷预饱和) 萃取两次, 合并乙腈层, 于 40°C 下减压浓缩至近干。依次用 10.0 mL 丙酮、乙酸乙酯、正己烷预淋后再用 10.0 mL 正己烷将提取浓缩液转移至弗罗里硅土柱上, 用 10.0 mL 正己烷-乙酸乙酯淋洗, 收集淋洗液, 于 40°C 下减压浓缩至干, 用正己烷-乙酸乙酯定容, 待 GC-ECD 检测。

1.4.3 气相色谱条件 色谱柱为 $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ (i.d.) $\times 0.25\ \mu\text{m}$ DB-5 石英毛细管柱。程序升温: 初始温度 60°C , 保持 5 min, $30^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C , 保持 12 min, 进样口温度 250°C , 检测器温度 300°C , 载气为氮气, 流速 $1\ \text{mL}/\text{min}$ 进样量 1.0 μL 。在此条件下乙羧氟草醚的保留时间约为 18.8 min。

1.4.4 添加回收试验 将 0.052, 0.104, 0.208, 0.312, 0.520 mg/L 的乙羧氟草醚标准溶液直接进气相色谱检测, 制作标准曲线。

水溶液中添加浓度分别为 2.06×10^{-2} 、 2.06×10^{-1} mg/L, 斑马鱼中添加浓度分别为 0.25、2.50 mg/kg 分别测定其回收率。

1.5 乙羧氟草醚的水解规律及生物富集系数测定

按文献 [8] 方法进行。乙羧氟草醚浓度按 LC_{50} 值的 1/10 和 1/100 计, 分别为 0.03 和 0.30 mg/L。每 48 h 更换一次, 保证 8 d 中乙羧氟草醚的最高降解率不超过 20%。每个浓度设 3 个重复, 每缸投放 20 条鱼。在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下饲养, 定期测定水中溶解氧的含量, 分别于 0 和 6 h 及 1、2、4、6、8 d 取水样测定乙羧氟草醚浓度。第 8 d 时取出各缸中的斑马鱼, 每缸鱼分成质量相当的两组, 准确称重, 测定各组鱼体内的乙羧氟草醚浓度。同时设置两个乙羧氟草醚溶液对照 (将等量乙羧氟草醚加入到没有斑马鱼的水中) 及两个试剂对照 (仅将试剂加入到有斑马鱼的水中)。

按下式计算生物富集系数 (BCF)^[8]:

$$BCF = c_{fs} / c_{ws}$$

式中, c_w 为水溶液中农药的浓度 (mg/L), c_{fs} 为鱼体内的农药浓度 (mg/kg)。

2 结果与分析

2.1 方法的灵敏度、准确度和精密度

乙羧氟草醚在 0.052~0.520 mg/L 范围内呈

现良好的线性关系, r^2 为 0.999 9, 变异系数为 1.4%~8.9%。水中的平均添加回收率 ($n=5$) 分别为 74.18%、74.99%, 变异系数为 3.5% 和 4.0%, 斑马鱼中的平均添加回收率 ($n=5$) 分别为 83.94% 和 96.21%, 变异系数为 5.6% 和 2.7%, 方法的最低检测浓度分别为 0.01 mg/L (水) 和 0.01 mg/kg (鱼)。

乙羧氟草醚在水和鱼体中残留量的典型色谱图见图 1。

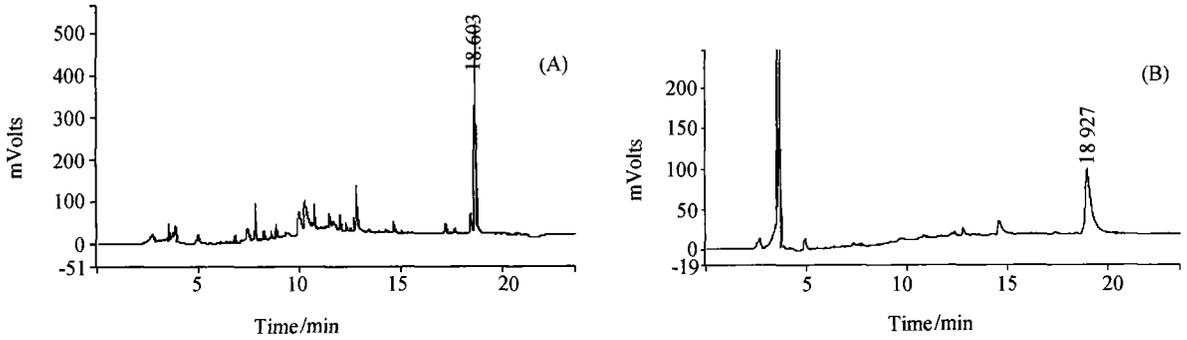


Fig 1 GC chromatography of fluoroxyfen-ethyl in water(A) and fish(B)

2.2 乙羧氟草醚对斑马鱼的急性毒性

试验测得乙羧氟草醚对斑马鱼的 LC_{50} (96 h) 值为 3.10 mg/L, 95% 置信限区间为 2.68~3.70 mg/L。根据《化学农药环境安全评价试验准则》的评价标准 (以下简称“评价标准”), 乙羧氟草醚对斑马鱼属于中等毒性。

2.3 乙羧氟草醚的水解规律及生物富集系数

8 d 内 0.03 和 0.30 mg/L 乙羧氟草醚溶液的

最高降解率分别为 7.78% 和 12.00%, 符合“评价标准”要求。

生物富集系数测定结果见表 1。两个处理浓度下, BCF_{8d} 值分别为 1.16 和 2.43。根据“评价标准”, 乙羧氟草醚对斑马鱼为低富集性。试验过程中未发现斑马鱼死亡, 试剂对照斑马鱼中未检出乙羧氟草醚。

Table 1 Results of bio-concentration tests of fluoroxyfen-ethyl

Concentration level/(mg/L)	c_{fs} /(mg/kg)	c_{ws} /(mg/L)	BCF_{8d} value	Average BCF_{8d} value
0.03	0.030 81	0.023 21	1.33	1.16
	0.044 76	0.023 21	1.93	
	0.022 80	0.024 44	0.93	
	0.020 85	0.024 44	0.85	
	0.025 32	0.025 97	0.97	
	0.023 99	0.025 97	0.92	
	0.30	0.510 2	0.243 8	
0.403 7	0.243 8	1.66		
0.412 9	0.239 3	1.73		
0.639 8	0.239 3	2.67		
0.547 8	0.230 9	2.37		
0.678 9	0.230 9	2.94		

Note: c_{ws} : Concentration of pesticide in test solution (mg/L); c_{fs} : Concentration of pesticide in fish (mg/kg); BCF_{8d} : Bio-concentration factor after 8 d exposure

从表 1 还可看出, 0.03 和 0.30 mg/L 两个处理中的 c_{fs} 值变化幅度较大, 这可能是由于本研究中试验生物样本数尚不够大而引起的实验误差。

生物富集性试验对阐明污染物在环境中的行为, 评价和预测污染物进入环境后的危害以及制订环境评价标准均有重要意义^[10]。试验结果表明, 乙羧氟草醚对斑马鱼的生物富集性较低, 但具有中等急性毒性, 因此应合理、适量使用, 以免对生态环境造成危害。

3 小结

进行农药对鱼类的毒性试验时, 应尽可能避免溶剂和助剂本身对鱼类的影响^[11]。

乙羧氟草醚对斑马鱼 8 d 的生物富集系数很低, 在鱼体内的富集量较少, 而且其在水中的溶解性较差 (溶解度仅 0.6 mg/L), 降解较快, 因此一般不会对水生生物产生长期的毒害和富集作用。但其对鱼类的急性毒性较高, 因此在施用时应合理控制剂量, 尽量减少对水生生物的影响。

比较乙羧氟草醚生物富集试验中各试验浓度组鱼样和空白对照组鱼样的 HPLC 或 GC 图谱, 未发现在鱼体内有该农药的代谢产物形成。

参考文献:

- [1] HE X iang-kui (何雄奎). 改变我国植保机械和施药技术严重落后的现状 [J]. Transactions of CSAE (农业工程学报), 2004, 20: 13-14
- [2] LU Feng-zhang (刘锋章). 农药对自然环境和人类社会的负面影响及危害 [J]. Shandong Environ (山东环境), 1998,

85: 70

- [3] SHEN Guo-xing (沈国兴), YAN Guo-an (严国安), PENG Jin-liang (彭金良), et al 农药对藻类的生态毒理学研究 [J]. Adv Environ Sci (环境科学进展), 1999, 7 (6): 131-139.
- [4] TU Yu-qin (屠豫钦). 关于农药与环境问题的反思 [J]. Pestic Sci Adm in (农药科学与管理), 2001, 22 (3): 32-36
- [5] LÜ L iang-zhong (吕良忠). 乙羧氟草醚 [J]. Fine and Specialty Chemicals (精细与专用化学品), 2001, 4 (3): 23-24
- [6] HUA X iao-mei (华小梅), GONG Rui-zhong (龚瑞忠), ZHU Zhong-lin (朱忠林), et al 乙氧氟草醚在模拟稻田-鱼塘生态系统中残留动态的研究 [J]. Res Environ Sci (环境科学研究), 1997, 10 (4): 42-46
- [7] HUA X iao-mei (华小梅), GONG Rui-zhong (龚瑞忠). 乙氧氟草醚在水和土壤中的残留分析方法研究 [J]. Environ Sci in Shanghai (上海环境科学), 1996, 15 (11): 26-27
- [8] CAI Dao-jia (蔡道基), YANG Pei-zhi (杨佩芝), GONG Rui-zhong (龚瑞忠), et al 《化学农药环境安全评价试验准则》 [S]. State Environmental Protection Administration of China (国家环保局), 1989
- [9] Taizo T, Mihoko K, Hiroyuki H, et al Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorous insecticides and their oxidation products in killifish [J]. Chemosphere, 1997, 35 (5): 939-949
- [10] KONG Zhi-ming (孔志明), XU-Chao (许超). Environmental Toxicology (环境毒理学) [M]. Nanjing (南京): Nanjing University Press (南京大学出版社), 1995, 12
- [11] Statton G W. Effect of the solvent acetone on membrane integrity in the green alga Chlorella pyrenoidosa [J]. Bull Environ Toxicol, 1989, 42: 754-760

(Ed. TANG J)