

氟虫腴的毒作用机理及其残留的检测方法

侯莉莉, 李艳, 张冷思, 沈青龙 (盐城市农产品质量监督检验测试中心, 江苏盐城 224002)

摘要 氟虫腴是一种以 γ -氨基丁酸(GABA)受体为靶点的广谱苯吡唑杀虫剂和兽药, 在世界范围内得到了广泛的应用。然而, 越来越多的研究表明, 氟虫腴在动植物以及环境中会代谢生成毒性较高的砒化物或亚砒化物, 对生态环境、生态系统甚至人类健康都产生了一定的影响。对氟虫腴的理化性质和毒作用机理进行了较为全面的阐述, 并对目前氟虫腴及其代谢物在农产品、畜产品以及水产品中常用的检测方法进行探究, 以供后期参考。

关键词 氟虫腴; 毒作用机理; 残留; 检测方法

中图分类号 TS 207.5⁺3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)03-0008-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.03.003



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Toxic Mechanism of Fipronil and Its Residue Detection Method

HOU Li-li, LI Yan, ZHANG Leng-si et al (Yancheng Agricultural Products Quality Supervision, Inspection and Testing Center, Yancheng, Jiangsu 224002)

Abstract Fipronil is a broad-spectrum phenylpyrazole insecticide and veterinary drug targeting the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor, which has been widely used across the world. However, more and more studies have shown that fipronil metabolizes to produce sulfone or sulfoxide in animals and plants as well as in the environment, which has a variety of toxic effects on the ecological environment, ecosystem and even human health. In this review, the physical and chemical properties and toxic mechanism of fipronil were described comprehensively, and the commonly used detection methods of fipronil and its metabolites in agricultural products, livestock products and aquatic products were summarized as reference in the later stage.

Key words Fipronil; Toxic mechanism; Residue; Detection method

氟虫腴, 作为一种广谱杀虫剂, 在 20 世纪 90 年代中期开始得以应用, 主要用于治理农作物害虫和对动物寄生虫进行消杀。虽然氟虫腴具有良好的杀虫效果, 但是越来越多的研究表明, 氟虫腴及其代谢物在水和土壤中降解缓慢, 对生态环境造成一定的影响^[1-3]。此外, 随着人们对食品安全的要求越来越高, 氟虫腴的农药残留问题也受到人们的重视。笔者从氟虫腴的理化性质入手, 重点阐述了氟虫腴的毒作用机理, 并且列举了目前常用的检测氟虫腴农药残留的方法, 以期为未来的检测过程提供参考。

1 氟虫腴的理化性质

氟虫腴是一种苯基吡唑类杀虫剂, 化学名称为(RS)-5-氨基-1-(2,6-二氯-a,a,a-三氟-对-甲苯基)-4-三氟甲基亚磺酰基吡唑-3-腴, 外观为白色固体, 熔点 200~201 °C, 难溶于水, 易溶于有机溶剂, 如丙酮、二氯甲烷等。在 pH=5、7 的水中稳定, 在 pH=9 时缓慢水解, 农药半衰期(DT₅₀)约为 28 d, 在太阳光下缓慢降解, 但在水溶液中经光照可快速分解。

2 氟虫腴的毒作用机理

氟虫腴作为一种广谱苯吡唑杀虫剂和兽药, 在世界范围内得到了广泛的应用。氟虫腴是一种以 γ -氨基丁酸(GABA)受体为靶点的杀虫剂, 对昆虫有较好的选择性毒性。然而, 由于氟虫腴的广泛使用及不正确使用导致水和土壤污染。越来越多的研究表明, 氟虫腴对各种水生生物具有很高的毒性^[4]。先前的研究表明, 氟虫腴对水生生物、家蚕、蜜蜂等都具有较强的毒性, 而且氟虫腴能够刺激啮齿类动物甲状

腺激素的分泌而可能导致甲状腺癌。此外, 氟虫腴对人体的神经、消化和循环系统都有一定的影响。更重要的是, 氟虫腴在外界环境中能够代谢生成毒性更高的氟虫腴砒和氟虫腴亚砒等化合物, 其结构式见图 1。

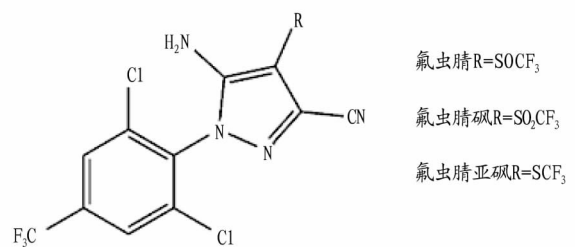


图 1 氟虫腴及其代谢物结构

Fig. 1 Structure of fipronil and its metabolites

γ -氨基丁酸(GABA)是成熟脊椎动物和无脊椎动物中枢神经系统中的主要抑制性神经递质。GABA 受体有两类: GABA_A 和 GABA_B^[5]。作为配体门控离子通道, GABA_A 受体结合 GABA, 从而导致膜对氯离子的通透性增加, 引发神经元的超级化, 抑制和降低神经元的活性, 使得神经信号传递抑制^[6]。GABA_B 受体被激活后, 通过偶联 G-蛋白而减少钙内流, 增加钾外流、降低细胞内环磷酸腺苷水平, 从而抑制兴奋性递质的释放, 使得突触后膜的超级化和阻碍突出囊泡的募集。虽然 GABA 门控氯通道在脊椎动物和无脊椎动物的中枢神经系统中都有表达, 但相对于脊椎动物 GABA_A 受体而言, 氟虫腴对昆虫 GABA 受体的亲和力要高得多^[7], 与哺乳动物 GABA 调节的氯通道的结合亲和力降低, 提高了对昆虫的选择性, 并增加了其安全性^[8]。如 1 μ mol/L 的氟虫腴可完全抑制蜚蠊 GABA 受体离子流, 但对大鼠神经细胞 GABA 受体离子流的抑制率仅有 30%, 其 IC₅₀ 为 1.6 μ mol/L^[9]。

作者简介 侯莉莉(1992—), 女, 江苏灌南人, 硕士, 从事农产品质量检测研究。

收稿日期 2019-07-22

此外,谷氨酸激活的氯通道也是氟虫腈的靶目标^[10]。除了 GABA 受体外,氟虫腈对无脊椎动物的作用比脊椎动物更有效,因为无脊椎动物中存在哺乳动物中没有的谷氨酸激活的氯通道,比如昆虫^[11-12]。氟虫腈干扰 GABA 门控通道的功能,并通过靶向 GABA-门控氯离子通道破坏正常神经元的流入,干扰中枢神经系统的正常功能^[13],使昆虫如蚜虫、叶蝉、飞虱、鳞翅目幼虫、苍蝇和鞘翅目昆虫致毒,因此可用于土壤或叶面喷洒^[14]。甘氨酸受体可能是氟虫腈新的脊椎动物毒性靶点。甘氨酸受体是氨基酸神经递质甘氨酸的电离受体,通过氯电流产生作用。甘氨酸受体作为中枢神经系统中分布最广泛的抑制性受体之一,在介导脊髓和脑干的抑制性神经传递中起着至关重要的作用^[15]。先前的研究表明,氟虫腈完全抑制人 $\alpha 1$ 、 $\alpha 1\beta$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 甘氨酸受体亚型,与其在脊椎动物 GABA_A 受体上的作用相似,显示了所有人类甘氨酸受体亚型都可能是氟虫腈的毒性靶点^[16]。

3 氟虫腈及其代谢物的检测方法

为了减少氟虫腈的危害,人们对其使用和残留量有着明确规定。欧盟和日本规定,牛奶中氟虫腈的残留限量值分别为 0.005 mg/kg^[17] 和 0.02 mg/kg^[18]。我国农业部第 1157 号公告规定:除卫生用、部分旱田种子包衣剂外,在中国境内停止销售和使用用于其他方面的含氟虫腈成分的农药制剂^[19]。我国《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》(GB 2763—2016)也有明确规定,氟虫腈在农作物中的最大残留量为 0.1 mg/kg^[20],但尚未对动物源性食品中氟虫腈的最大残留限量作出规定。目前,国内外建立了多种氟虫腈的残留检测方法,常用的方法主要有气相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱法。

3.1 农产品中氟虫腈残留的检测 目前,氟虫腈及其代谢物残留检测方法在蔬菜水果中应用较多,检测样品种类越来越多,检测方法也越来越简便、准确。丁慧瑛等^[21]用气相色谱法对粮谷、蔬菜、水果、茶叶中氟虫腈残留进行检测,样品经丙酮提取,正己烷反萃取,中性氧化铝加少量活性炭净化,最后经 GC/ECD 方法测定;该方法检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 84%~110%。Tsukioka^[22]用气相色谱-电子捕获检测法(GC-ECD)对农产品中的氟虫腈及其代谢物残留进行检测,对于油脂含量高的农产品先用乙腈分馏,再经弗罗里硅土柱净化后进样;对于油脂含量低的水果、蔬菜等农产品则用弗罗里硅土柱净化后直接进气相色谱检测;该方法的检出限为 0.001 $\mu\text{g}/\text{g}$,回收率在 85%以上。周晓冬等^[23]建立了在豆类蔬菜中检测氟虫腈残留的方法,该方法检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 92.3%~101.7%。Paramasivam 等^[24]用气相色谱-质谱法建立了一种同时测定蔬菜和水果中的氟虫腈及其主要代谢物;该方法用乙酸乙酯提取氟虫腈残留,用分散固相萃取法对水果和蔬菜样品进行净化;该方法平均回收率为 86%~112%,RSD<10.15%。白宝清等^[25]运用 QuEChERS-DLLME-高效液相色谱法测定蔬菜中氟虫腈残留,样品经乙腈提取,硫酸镁和氯化钠盐析后,再经 N-丙基乙二胺和石墨化碳吸附净化,分散液液微萃取富集,以甲醇和水作为流动

相梯度洗脱,该方法检出限为 0.70~0.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 90.5%~108.5%,RSD<10%。

3.2 水产品中氟虫腈残留的检测 氟虫腈对许多水生生物的毒性较高,其中对甲壳类生物、虾蟹类具有极高的毒性,极少量的氟虫腈农药进入水体中也会造成比较严重的影响。但是目前对氟虫腈残留检测的方法主要集中在对植物类体内的残留检测,对动物源体内残留检测的报道较少。高蓉等^[26]利用气相色谱法建立了河虾体内氟虫腈残留量的检测方法。陈姗姗等^[27]通过气相色谱-负化学电离-质谱联用技术检测氟虫腈及其代谢物的漂移对池塘水和虾体的影响。陈志涛等^[28]通过分散固相萃取-气相色谱法,以活鳗和北美对虾为基质,对氟虫腈和丁烯氟虫腈残留进行分析检测,该方法检出限为 0.8~0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在 83.9%以上。吕磊等^[29]对草鱼、对虾、甲鱼等样品进行预处理后,采用乙腈提取,正己烷除脂,然后经 PSA 和 C₁₈ 吸附剂净化后通过气相色谱仪进样分析,该方法检出限为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 75.6%~102.8%。

3.3 畜禽产品中氟虫腈残留的检测 一直以来,氟虫腈及其代谢物的检测方法主要集中于针对蔬菜水果和环境水体,对畜禽产品的检测方法较少。自 2017 年 6 月,欧洲一些国家相继在鸡蛋中检出氟虫腈超标,从而引发了食品安全危机,因此更多的研究者将目光聚集到畜禽产品中氟虫腈残留的检测。宁霄等^[30]通过超高效液相色谱-串联质谱对禽蛋、动物肌肉、内脏中氟虫腈及其代谢物进行检测,回收率在 75%以上,检出限在 0.5~1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。王艳丽等^[31]采用电子轰击和负化学 2 种离子源技术建立了 GC-MS 和 GC-MS/MS 测定肉、蛋及内脏中氟虫腈及其代谢物残留的分析方法,结果发现,GC-MS/EI、GC-MS/NCI 以及 GC-MS/MS/EI 的检出限(LOD)分别为 0.15、0.05、0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 80.0%~108.0%。沈伟健等^[32]建立了气相色谱-负化学源质谱联用技术(GC-NCI-MS)测定禽蛋中氟虫腈及其 3 种代谢物残留量的方法。吕冰等^[33]基于低温处理和 QuEChERS,采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱建立了牛奶、鸡蛋和鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留的分析检测方法,该方法在鸡蛋中的回收率为 81.6%~96.9%,在牛奶中的回收率为 79.1%~100.1%,在鸡肉中回收率为 81.2%~96.0%。

4 总结

由于“毒鸡蛋”事件的曝光,氟虫腈的使用及其危害越来越受到人们的重视,在科研工作者的努力下,伴随着科技进步的不断发展,研发了多种氟虫腈及其代谢物的残留检测方法。该研究列举近年来氟虫腈及其代谢物在农产品、水产品 and 畜禽产品中的残留检测方法,回收率均在 75%以上,且这些方法都具有成本低、方法简单、灵敏准确等优点,可供检测工作者在未来的工作中进行参考。

参考文献

- [1] NGIM K K, CROSBY D G. Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields [J]. Environmental toxicology and chemistry, 2001, 20(5): 972-977.
- [2] RAMESH A, BALASUBRAMANIAN M. Kinetics and hydrolysis of fenami-

- phos, fipronil, and trifluralin in aqueous buffer solutions[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1999, 47(8): 3367-3371.
- [3] 陆贻通, 周培, 吴银良, 等. 锐劲特在菜地生态系统中的残留动态研究[J]. 环境污染与防治, 2001(5): 219-221, 231.
- [4] TAILLEBOIS E, ALAMIDDINE Z, BRAZIER C, et al. Molecular features and toxicological properties of four common pesticides, acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2015, 23(7): 1540-1550.
- [5] FATEMI S H, FOLSOM T D. GABA receptor subunit distribution and FM- RP-mGluR5 signaling abnormalities in the cerebellum of subjects with schizophrenia, mood disorders, and autism[J]. Schizophrenia research, 2015, 167(1/2/3): 42-56.
- [6] CHEBIB M, JOHNSTON G A. GABA-activated ligand gated ion channels: Medicinal chemistry and molecular biology[J]. Journal of medicinal chemistry, 2000, 43(8): 1427-1447.
- [7] 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.
- [8] BADGUJAR P C, CHANDRATRE G A, PAWAR N N, et al. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD1 and catalase gene expression in male mice liver; Protection by vitamins E and C[J]. Environmental toxicology, 2016, 31(9): 1147-1158.
- [9] 胡国新, 陈晓宇, 周红宇, 等. 氟虫腈及其砷化物在兔体内的毒物代谢动力学[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(4): 356-360.
- [10] NARAHASHI T, ZHAO X L, IKEDA T, et al. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals[J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2010, 97(2): 149-152.
- [11] NARAHASHI T, ZHAO X, IKEDA T, et al. Differential actions of insecticides on target sites; Basis for selective toxicity[J]. Human & experimental toxicology, 2007, 26(4): 361-366.
- [12] SIMON-DELSON N, AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES L P, et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(1): 5-34.
- [13] GUNASEKARA A S, TRUONG T, GOH K S, et al. Environmental fate and toxicology of fipronil[J]. Journal of pesticide science, 2007, 32(3): 189-199.
- [14] MOHAMED F, SENARATHNA L, PERCY A, et al. Acute human self-poisoning with the *N*-phenylpyrazole insecticide fipronil-A GABA-gated chloride channel blocker[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2004, 42(7): 955-963.
- [15] LYNCH J W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel[J]. Physiological reviews, 2004, 84(4): 1051-1095.
- [16] ISLAM R, LYNCH J W. Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels[J]. British journal of pharmacology, 2012, 165(8): 2707-2720.
- [17] The European Commission. Commission regulations (EU) No 750/2010 of 7 July 2010, amending annexes II and III to regulation (EC) No 396/2005 of the European parliament and of the council as regards maximum residue levels for certain pesticides in or on certain products (Text with EEA relevance)[J]. Official journal of the European Union, 2010, 220: 1-56.
- [18] The Japan Food Chemical Research Foundation. Maximum residue limits (MRLs) list of agricultural chemicals in foods [DB/OL]. [2018-02-24]. <http://db.foodmate.net/kending/agrlist.php?lang=zh&agrichem=>.
- [19] 中华人民共和国农业部种植业司. 中华人民共和国农业部公告第1157号[A/OL]. (2009-02-25) [2018-02-24]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/200902/t20090227_1226994.htm.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [21] 丁慧瑛, 谢文, 刘海山. 植物性食品中锐劲特残留量的检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 113-115.
- [22] TSUKIOKA T. Determination of fipronil and its metabolite MB-46513 in agricultural products [R]. Bulletin of the Nagano Research Institute for Health & Pollution, 2003.
- [23] 周晓冬, 余兵, 胡进. 豆类蔬菜中氟虫腈残留分析方法的研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(S1): 211-214.
- [24] PARAMASIVAM M, CHANDRASEKARAN S. Determination of fipronil and its major metabolites in vegetables, fruit and soil using QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry[J]. International journal of environmental analytical chemistry, 2013, 93(11): 1203-1211.
- [25] 白宝清, 李美萍, 张生万. QuEChERS-DLLME-高效液相色谱法测定蔬菜中溴虫腈和氟虫腈残留[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 254-258.
- [26] 高蓉, 陈景衡, 赵人峥. 河虾体中氟虫腈残留量气相色谱法测定[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(5): 624.
- [27] 陈珊珊, 丁丞, 郭立新, 等. 气相色谱-负化学电离-质谱联用技术检测痕量氟虫腈及其代谢物的漂移对池塘水和虾体的影响[J]. 质谱学报, 2013, 34(5): 274-281.
- [28] 陈志涛, 丁立平, 吴文凡, 等. 分散固相萃取-气相色谱法测定水产品中氟虫腈和丁烯氟虫腈的残留[J]. 农药, 2014, 53(12): 904-905.
- [29] 吕磊, 何力, 甘金华, 等. 分散固相萃取-气相色谱法测定水产品中氟虫腈残留[J]. 分析试验室, 2015, 34(7): 847-849.
- [30] 宁霄, 金绍明, 高文超, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 分析化学, 2018, 46(8): 1297-1305.
- [31] 王艳丽, 陈克云, 梁秀清, 等. 分散固相萃取/气相色谱质谱法测定动物源性食品中的氟虫腈及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2018, 37(4): 440-445.
- [32] 沈伟健, 柳茜, 张睿, 等. 气相色谱-负化学源质谱法测定禽蛋及蛋制品中氟虫腈及其代谢物[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1224-1228.
- [33] 吕冰, 尹帅星, 陈达炜, 等. QuEChERS-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱测定动物性食品中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(12): 1424-1430.

(上接第3页)

- [2] SINGER V L, LAWLOR T E, YUE S, et al. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test) [J]. Mutation research, 1999, 439(1): 37-47.
- [3] WARING M J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids[J]. Journal of molecular biology, 1965, 13(1): 269-282.
- [4] STELLWAGEN N C. Effect of the electric field on the apparent mobility of large DNA fragments in agarose gels[J]. Biopolymers, 1985, 24(12): 2243-2255.
- [5] LERMAN L S, FRISCH H L. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? [J]. Biopolymers, 1982, 21(5): 995-997.
- [6] LUMPKIN O J, DÉJARDIN P, ZIMM B H. Theory of gel electrophoresis of DNA[J]. Biopolymers, 1985, 24(8): 1573-1593.
- [7] BORST P. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis; How it started[J]. IUBMB Life, 2005, 57(11): 745-747.
- [8] SIGMON J, LARCOM L L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1996, 17(10): 1524-1527.
- [9] SLATER G W. DNA gel electrophoresis; The reptation model(s) [J]. Electrophoresis, 2009, 30: 181-187.
- [10] HUANG Q, FU W L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis [J]. Clinical chemistry & laboratory medicine, 2005, 43(8): 841-842.
- [11] ZIPPER H, BRUNNER H, BERNHAGEN J, et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications[J]. Nucleic acids research, 2004, 32(12): 1-10.
- [12] KONSCHAK R, TINHOFFER I. Prestaining of PCR products with SYBR Green for agarose gel electrophoresis; Advantages and limitations [J]. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2011, 49(6): 1069-1071.
- [13] KIRSANOV K I, LESOVAYA E A, YAKUBOV SKAYA M G, et al. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames test[J]. Mutation research, 2010, 699: 1-4.
- [14] LI X F, WU Y H, ZHANG L, et al. Comparison of three common DNA concentration measurement methods [J]. Analytical biochemistry, 2014, 451: 18-24.
- [15] HUANG Q, BAUM L, FU W L. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis[J]. Clinical laboratory, 2010, 56(3/4): 149-152.