

◆ 残留与环境 ◆

放射性同位素示踪法研究氟啶虫酰胺 在蛋鸡中的排泄

王泽华, 陈东宇, 孙 慧, 王 帅, 王喜乐, 黄 伟, 胡文岩, 刘永利, 余 洋*

(沈阳沈化院测试技术有限公司安全评价中心, 沈阳 110141)

摘要: 为了研究氟啶虫酰胺在蛋鸡中的排泄, 本研究采用放射性同位素 ^{14}C 标记氟啶虫酰胺, 以蛋鸡为试验材料, 通过胶囊经口方式给药, 并对给药胶囊稳定性进行考察, 采用氧化燃烧的方法对粪便中的总放射性残留进行分析, 采用液体闪烁计数分析仪(LSC)对鸡蛋及清洗液进行总放射性残留的分析。试验结果显示, 在给药过程中胶囊中的氟啶虫酰胺稳定, 2次平行样品的放射化学纯度偏差为0.101%。鸡蛋样品的残留量为0.239~1.570 mg/kg, 氟啶虫酰胺的总回收量为2.364 mg, 占总给药量的3.01%; 粪便样品的残留量为4.73~12.70 mg/kg, 氟啶虫酰胺的总回收量为69.58 mg, 占总给药量的88.8%; 粪便清洗液样品的残留量为0.756 mg/kg, 氟啶虫酰胺的总回收量为0.675 mg, 占总给药量的0.861%; 受试物质氟啶虫酰胺的总物质平衡回收率为92.7%。研究表明, 氟啶虫酰胺在蛋鸡体内主要通过粪便排泄, 鸡蛋中的排泄量较低, 并且在蛋鸡其他组织中分布较少。

关键词: 放射性同位素; 氟啶虫酰胺; 蛋鸡; 排泄

中图分类号: TQ 453 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2023.01.010

Study on the Excretion of Flonicamid in Laying Hens by Radioisotope Tracer

WANG Zehua, CHEN Dongyu, SUN Hui, WANG Shuai, WANG Xile, HUANG Wei, HU Wenyan, LIU Yongli, YU Yang*
(Safety Evaluation Center of Shenyang SYRICT Testing Co., Ltd., Shenyang 110141, China)

Abstract: In this study, the radioisotope ^{14}C -labeled flonicamid was administered in capsules to study the excretion of flonicamid in laying hens. The stability of the administered capsules was investigated. The total radioactive residues in feces were analyzed by oxidative combustion method, and the total radioactive residues in eggs and washing liquid were analyzed by liquid scintillation counting analyzer (LSC). The deviation of the radiochemical purity was 0.101%, which indicated that the test substance in the capsule was stable during the administration. The residues of egg samples were 0.239-1.570 mg/kg, and the total recovery of flonicamid was 2.364 mg, accounting for 3.01% of the total dose administered. The residues of feces samples were 4.73-12.70 mg/kg, and the total recovery of flonicamid was 69.58 mg, accounting for 88.8% of the total dose administered. The residue of the fecal washing liquid sample was 0.756 mg/kg, and the total recovery of flonicamid was 0.675 mg, accounting for 0.861 % of the total dose administered. The mass balance recovery rate of the test substance flonicamid was 92.7%. The results showed that flonicamid mainly existed in feces of laying hens, and the excretion in eggs and other tissues of laying hens were low.

Key words: radioisotopes; flonicamid; laying hen; excretion

氟啶虫酰胺(Flonicamid)是由日本石原产业株式会社发现的吡啶酰胺(或烟酰胺)类杀虫剂^[1],主

要用于防治农作物上的刺吸式口器害虫,尤其对蚜虫高效。氟啶虫酰胺是一种选择性杀虫剂,对蜜蜂、

收稿日期: 2022-05-25

作者简介: 王泽华(1994—),男,辽宁大连人,硕士,初级工程师,主要从事动植物代谢研究工作。E-mail: wangzehua@sinochem.com

通信作者: 余洋(1987—),男,河南信阳人,硕士,工程师,主要从事毒物与药物代谢研究工作。E-mail: yuyang17@sinochem.com

草蛉、寄生蜂、瓢虫等天敌昆虫表现出很好的安全性^[2]。放射性同位素示踪技术是以放射性核素作为示踪剂对研究对象进行标记并检测的微量分析方法,该技术具有示踪、直观、简便、痕量和准确等特点^[3-5]。人们利用各种现代化分析测试手段开展了大量研究工作。然而,在诸多研究分析方法中,放射性同位素示踪技术以独特的优势成为国际公认的研究药物代谢及处置的最有效手段之一^[6-10]。利用放射性同位素不断地放出特征射线的核物理性质,可以用现代放射性检测仪器,如液体闪烁计数分析仪和在线同位素检测仪等,追踪药物在体内的分布、含量变化及排泄等^[11];通过将示踪剂引入动物体内,研究其在动物体内吸收、分布、代谢及消减等动态过程中的规律。目前对氟啶虫酰胺的研究大多集中于环境、作物中的残留与毒性安全评价,而有关其在动物体内的研究相对较少,至今未见在蛋鸡排泄的研究报道。因此本研究采用¹⁴C标记氟啶虫酰胺,研究其在蛋鸡体内的排泄,为进一步研究该物质的毒理作用机制和毒物安全评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

99.2%氟啶虫酰胺原药,国家农药质量监督检验中心(沈阳);¹⁴C标记氟啶虫酰胺(比活度:51.74 mCi/mmol),无锡贝塔医药科技有限公司;闪烁液,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯),Sigma-Aldrich公司;明胶胶囊,浙江天龙胶丸有限公司。

Tricarb-2910型液体闪烁计数分析仪(LSC),配备QuantaSmart 4.00操作软件,美国Perkin Elmer仪器公司;高效液相色谱-在线同位素检测仪(HPLC-ARC),配备Empower 3与ARC101 2.8.0.142B操作软件,美国Waters与ARC仪器公司;Harvey OX-501型生物氧化燃烧仪,美国Harvey仪器公司;超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;BP211D型十万分之一电子天平、Milli-Q超纯水机,德国Sartorius公司;移液

器,德国Eppendorf公司。

海兰蛋鸡,辽阳县柳壕镇北方牧业。

1.2 试验设计与饲养管理

动物室温度为24.0~28.0℃,湿度为30%~71%,自动控制光照,12 h光照,12 h黑暗。试验动物使用过程完全接受沈阳沈化院测试技术有限公司动物管理委员会(IACUC)的监督。试验前所有蛋鸡饲养于家禽动物房中不锈钢饲养笼内,蛋鸡产蛋期配合饲料喂养。饲料及饮用水不包含任何影响试验结果的污染物,试验期间动物自由饮水,每日饲喂2次。

试验设空白对照组和给药组,空白对照组1只蛋鸡,给药组10只蛋鸡。采用胶囊经口方式给药,给药剂量设定为10 mg/kg饲料,每只动物每天给药量为1.12 mg,即每天经口给予胶囊1粒,连续给药7 d;空白对照组每天经口给予安慰剂(空白胶囊)。

1.3 给药溶液的配制

精确称取¹⁴C氟啶虫酰胺40.00 mg于25 mL的容量瓶中,加入未标记氟啶虫酰胺60.07 mg,用甲醇溶解并定容,得到质量浓度为4 mg/mL的供试药剂溶液,贴好标签,备用。

1.4 给药胶囊的制备

根据每只动物每天的给药量,结合给药溶液的质量浓度计算每个胶囊所需试药溶液的体积;移取280 μL的试药溶液于明胶胶囊中,在通风橱中用氮气吹干溶剂后封口,共制作72粒试药胶囊,将胶囊置于塑料瓶中,贴好标签,于-20℃保存备用。

1.5 给药胶囊中试药的稳定性考察

氟啶虫酰胺试药溶液配制完成后,用甲醇稀释为8 μg/mL的溶液,取2个平行样品,采用HPLC-ARC测定其放射化学纯度;在最后1次给药完成后,将剩余的胶囊打开1粒,置于50 mL的离心管中,加入15 mL甲醇,超声提取3次,每次提取10 min。合并3次的提取液于50 mL的容量瓶中,甲醇定容,稀释至接近的浓度,测定稀释液(平行2个样品)的放射化学纯度,通过比较2次的测定结果评价给药胶囊中试药的稳定性。按式(1)计算偏差。2次测定的放射化学纯度偏差不超过±10%,则符合试验检测要求。

$$\text{偏差}/\% = \frac{\text{给药结束时的平均放射化学纯度} - \text{开始时的平均放射化学纯度}}{2 \text{次测定的平均放射化学纯度}} \times 100 \quad (1)$$

1.6 同位素稀释试药比活度的测定

取适量供试药剂溶液,用甲醇稀释成4 μg/mL,取2个100 μL平行样品,分别加入10 mL Ultima Gold闪烁液后,采用LSC测定放射性活度浓度。按式(2)

计算未标记供试药剂的比活度。

$$a = \frac{A}{VC} \quad (2)$$

式中:A为测定活度,Bq;V为量取体积,μL;C为

质量浓度, mg/mL, a 为稀释后比活度, Bq/mg。

1.7 总放射性残留与物质平衡回收率试验

1.7.1 样品的采集及储藏

在给药期间, 每日上午给药前和下午各收集鸡蛋1次, 空白组每天收集的鸡蛋去壳后, 冷冻保存在-20℃的冰箱中; 将下午收集的给药组10只鸡蛋去壳, 与第2天上午收集的鸡蛋混合作为同一天的样品, 冷冻保存在-20℃的冰箱中。第7次给药后, 动物宰杀前收集的鸡蛋作为第7 d的样品; 称重记录每天鸡蛋样品的重量, 冷冻保存在-20℃的冰箱中。

每天给药前收集空白组与给药组蛋鸡的排泄物, 将相同时间段的给药组10只蛋鸡的粪便样品混合, 末次(宰杀前)收集后用80%甲醇-水清洗粪盘, 将给药组10只蛋鸡的清洗液混合。记录每天粪便及末次清洗液的重量, 冷冻保存在-20℃的冰箱中。

1.7.2 样品处理

鸡蛋: 鸡蛋样品解冻, 混匀; 称取 0.25 ± 0.0005 g样品于闪烁瓶中, 每个样品2个平行; 加入0.8 mL的超纯水, 混匀后, 加入20 mL的Ultima Gold闪烁液, 利用液体闪烁计数分析仪进行总放射性残留的分析。

粪便清洗液: 样品解冻, 混匀; 称取 0.5 ± 0.0005 g样品于闪烁瓶中, 每个样品2个平行; 加入10 mL的闪烁液Ultima Gold, 利用液体闪烁计数分析仪进行总放射性残留的分析。

粪便: 样品解冻, 将不同时间段的空白粪便样品混合, 给药组各时间段的粪便样品单独处理, 向粪便样品中加入50%的乙腈-水溶液, 浸泡30 min后匀浆; 混匀后称重, 记录各时间段匀浆液的重量。称取匀浆液样品约 0.5 ± 0.0005 g于燃烧盘中(2个平行样品), 随后置于70℃烘箱中烘干; 烘干后的样品进行氧化燃烧, 生成的 $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ 经Carbo-Sorb E与Permafluor E⁺(3:5, V/V)混合闪烁液吸收, 利用液体闪烁计数分析仪进行总放射性残留的分析。

1.7.3 总放射性残留与物质平衡回收率分析

根据液体闪烁计数分析仪分析结果, 按式(3)~(6)分别计算回收量、样品总残留量、回收量占比、平衡回收率。

$$m_{\text{回收}} = \frac{A_{\text{试样}} - A_{\text{空白样品}}}{m_{\text{试样}} a} \quad (3)$$

$$C_{\text{样品}} = \frac{m_{\text{回收}}}{m_{\text{样品}}} \quad (4)$$

$$\text{回收量占比}/\% = \frac{\text{回收总量}}{\text{每天给药量} \times \text{给药天数}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{平衡回收率}/\% = \frac{\text{样品总残留}}{\text{每天给药量} \times \text{给药天数}} \times 100 \quad (6)$$

式中: $m_{\text{回收}}$ 为回收量, mg; $A_{\text{试样}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为试样和空白样品的放射性活度测定值, Bq; $m_{\text{试样}}$ 为测定量, g; a 为稀释后比活度, Bq/mg; $C_{\text{样品}}$ 为样品总残留量, mg/kg; $m_{\text{样品}}$ 为样品量, mg。每天给药量, mg/(只·d)。

2 结果与分析

2.1 给药胶囊的稳定性分析

给药前药溶液放射化学纯度平均值为99.9%, 给药结束时胶囊提取液放射化学纯度平均值为100%, 2次测定的放射化学纯度偏差为0.101%, 说明在给药过程中胶囊中的供试物质稳定。2次平行样品给药前后的HPLC-ARC在线放射性谱图见图1。

2.2 给药溶液同位素稀释后的比活度

根据给药溶液的测定浓度计算出2个平行样品的放射性活度浓度分别为10 490 000、10 426 167 Bq/mL, 根据放射性活度浓度及质量浓度计算经未标记氟啶虫酰胺稀释后的给药溶液比活度分别为2 622 500、2 606 542 Bq/mg, 平均值为2 614 521 Bq/mg(表1)。此处的给药溶液同位素稀释后的平均比活度用于物质平衡回收量的计算。

表1 给药溶液同位素稀释后的比活度

平行组	测定活度/Bq	放射性活度浓度/ (Bq·mL ⁻¹)	稀释后比活度/ (Bq·mg ⁻¹)
1	1 049	10 490 000	2 622 500
2	1 043	10 426 167	2 606 542
平均值	1 046	10 458 084	2 614 521

2.3 总放射性残留与物质平衡回收率

试验结果表明, 鸡蛋样品的残留量为0.239~1.570 mg/kg, 氟啶虫酰胺的回收量为0.107~0.597 mg, 总回收量为2.364 mg, 占总给药量的3.01%; 粪便样品的残留量为4.73~12.70 mg/kg, 氟啶虫酰胺的回收量为5.08~16.30 mg, 总回收量为69.58 mg, 占总给药量的88.8%; 粪便清洗液样品的残留量为0.756 mg/kg, 氟啶虫酰胺的回收量为0.675 mg, 占总给药量的0.861%(表2)。根据以上鸡蛋、粪便和粪便清洗液样品的回收率结果, 可以计算给药氟啶虫酰胺后受试物质的总物质平衡回收率为92.7%。由此可以发现氟啶虫酰胺在蛋鸡体内主要通过粪便排泄, 鸡蛋中的排泄量较低。

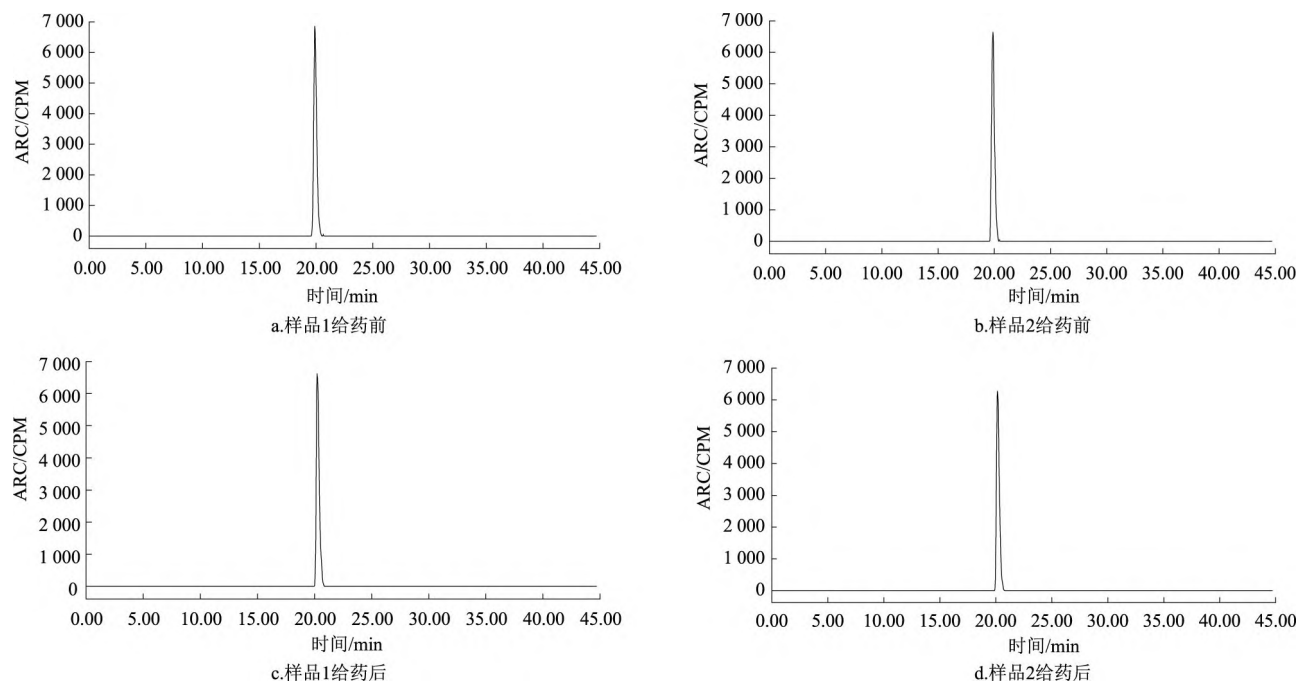


图 1 给药前后给药溶液的 HPLC-ARC 在线放射性谱图

表 2 鸡蛋、粪便和粪便清洗液样品的总放射性残留与物质平衡回收率

样品名称	取样时间/d	残留量/(mg·kg ⁻¹)	回收量/mg	总回收量/mg	回收量占比/%	平衡回收率/%
鸡蛋	1	0.239	0.107	2.364	3.01	92.7
	2	0.499	0.225			
	3	0.684	0.322			
	4	0.770	0.349			
	5	1.030	0.481			
	6	1.260	0.597			
	7	1.570	0.283			
粪便	1	4.73	6.26	69.58	88.8	
	2	9.61	11.40			
	3	6.81	8.14			
	4	9.89	11.10			
	5	11.10	11.30			
	6	12.70	16.30			
	7	11.30	5.08			
粪便清洗液	7	0.756	0.675		0.861	

3 结论

本研究利用放射性同位素示踪技术研究氟啶虫酰胺在蛋鸡体内的排泄,通过鸡蛋、粪便及清洗液中回收率结果可以得出,氟啶虫酰胺主要通过粪便排泄,鸡蛋中的残留量较少。本研究考虑蛋鸡排泄后,粪盘上会有残留,用80%甲醇-水充分清洗获得粪便淋洗液并进行测定,以保证总物质回收率计算的准确性。蛋鸡给氟啶虫酰胺7 d后总回收率为92.7%,说明放射性物质在蛋鸡体内其他组织中分

布较少。总物质平衡回收率的研究结果也为氟啶虫酰胺在蛋鸡体内代谢产物的研究奠定基础。该方法是跟踪农药及其代谢产物最有效的手段,能准确地测定农药及其代谢产物,追踪农药的转移和转变^[12]。利用同位素标记化合物的示踪作用,能够在保证生物样品原有属性的同时,快速精确地得到原始总残留,为合理使用农药提供试验数据。

参考文献

[1] BCPC. The e-pesticide manual (16th ed)[DB/OL]. (2011-07-01)

- [2011-12-01]. <https://www.scienceopen.com/document?vid=1423bc1c-8fb3-4d03-9476-67741f4694fc>.
- [2] 钮建国. 氟啶虫酰胺对昆虫取食与排泄影响的毒理机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [3] 曹国祥, 谭天秩. 放射性碘化IBZM在大鼠体内的分布与代谢[J]. 华西医科大学学报, 2000, 31(2): 171-173.
- [4] MALHOTRA B K, IYER R A, SOUCEK K M, et al. Oral bioavailability and disposition of [14 C]omapatrilat in healthy subjects [J]. Journal of Clinical Pharmacology, 2001, 41(8): 833-841.
- [5] GAULTIER J, FARENHORST A, CATHCART J, et al. Degradation of [carboxyl- 14 C] 2,4-D and [ring-U- 14 C] 2, 4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content[J]. Soil Biology Biochemistry, 2008, 40(1): 217-227.
- [6] 姜国华, 刘忠敏. 同位素示踪法研究 125 I-NGF在小鼠体内的吸收、分布及排泄[J]. 现代仪器, 2012, 18(1): 10-13.
- [7] 张锦荣, 罗志福. 中国放射性同位素技术与应用进展[J]. 中国工程科学, 2008, 10(1): 61-69.
- [8] WU C C, HUANG L, TANG S, et al. Enantioselective absorption and transformation of a novel chiral neonicotinoid [14 C]-cycloxaprid in rats[J]. Environmental Pollution, 2016, 213: 770-775.
- [9] KIM N, PATRICK L, MAIR S, et al. Absorption, metabolism and excretion of [14 C]-gemigliptin, a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, in humans[J]. Xenobiotica, 2014, 44(6): 522-530.
- [10] NOHYNEK G J, SKARE J A, MEULING W, et al. Human systemic exposure to [14 C]-paraphenylenediamine-containing oxidative hair dyes: absorption, kinetics, metabolism, excretion and safety assessment[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 44(6): 522-530.
- [11] 斯琴朝克图, 黄玲利, 袁宗辉. 放射性同位素标记药物在药物代谢与处置研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(13): 1475-1484.
- [12] WAIT J C M, VACCHARAJANI N, MITROKA J, et al. Metabolism of [14 C]-gemopatrilat after oral administration to rats, dogs, and humans[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2006, 34(6): 961-970.

(责任编辑: 金兰)

2023年全国水稻重大病虫害发生趋势预报

全国农技中心组织各省(区、市)测报技术人员和有关专家会商, 结合水稻病虫害基数、水稻栽培管理和品种布局、今冬明春气候条件等因素综合分析, 预计2023年全国水稻病虫害将呈偏重发生态势, 发生面积11.6亿亩次。其中, 虫害发生面积8.0亿亩次, 病害发生面积3.6亿亩次; 稻飞虱、稻纵卷叶螟、二化螟、水稻纹枯病偏重发生, 稻瘟病、稻曲病中等发生, 三化螟、水稻病毒病偏轻发生。

(一) 虫害

稻飞虱在南方稻区总体偏重发生, 全国发生面积3.0亿亩次。其中, 白背飞虱在华南西部和东部、西南东部偏重发生, 南方其他稻区中等发生, 全国发生面积1.5亿亩次; 褐飞虱在华南、江南、长江中下游沿江及以南稻区偏重发生, 南方其他稻区中等发生, 全国发生面积1.5亿亩次。

稻纵卷叶螟在华南东部、江南、长江下游稻区偏重发生, 南方其他稻区中等发生, 全国发生面积2.0亿亩次。

二化螟在江南、长江中游单双季稻混栽区大发生, 西南部、华南北部稻区偏重发生, 其他大部稻区中等发生, 全国发生面积2.2亿亩次。

三化螟在华南南部、西南西北部稻区中等发生, 南方其他稻区偏轻至轻发生, 全国发生面积800万亩次。

灰飞虱、大螟、稻秆潜蝇、粘虫、台湾稻螟、水稻跗线螨、稻粉虱等其他虫害在部分稻区有一定程度发生, 其中大螟、水稻跗线螨在华南中部稻区呈上升趋势, 新发虫害稻粉虱在华南稻区有一定发生面积; 全国发生面积7 000万亩次。

(二) 病害

水稻纹枯病在华南中西部、江南、西南部、长江中下游和江淮稻区偏重发生, 其他稻区中等发生, 全国发生面积2.3亿亩。

稻瘟病总体中等发生, 东北主产区、南方丘陵山区和沿江沿淮稻区及感病品种大面积种植地区穗颈瘟偏重流行风险高, 全国发生面积5 800万亩次。

稻曲病总体中等发生, 长江中下游沿江、沿淮稻区存在偏重发生风险, 全国发生面积3200万亩。

南方水稻黑条矮缩病在南方稻区总体偏轻发生, 华南东部和江南中部局部稻区存在中等发生风险, 全国发生面积200万亩。

水稻白叶枯病、穗腐病、胡麻叶斑病、根结线虫病、橙叶病等其他病害在部分稻区有一定程度发生, 全国发生面积4 000万亩。

(来源: 病虫害测报处)