

日本鹌鹑对吡虫啉的毒性效应响应

邓兆荣, 王 猛, 管 磊, 慕 卫, 刘 峰*

(山东农业大学植物保护学院, 山东农业大学农药环境毒理研究中心, 山东 泰安 271018)

摘要:以日本鹌鹑为试验生物,采用经口服和饲喂两种染毒方式,测定了其吡虫啉的急性和蓄积性毒性的响应,并结合血液生化指标评价了其吡虫啉的亚慢性毒理效应。结果显示,吡虫啉对日本鹌鹑的急性经口 LD_{50} 为 $30.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,毒性等级为高毒;急性饲喂 LC_{50} 为 $1455.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 饲料,毒性等级为低毒;吡虫啉对日本鹌鹑的蓄积系数 $K>5$,属于轻度蓄积。亚慢性毒性试验后期,中、高浓度处理组的雌、雄鹌鹑体重、耗食量均明显减少,血液血清生化指标中血肌酐(CREA)和尿酸(UA)与空白对照组相比显著升高;高浓度处理组的鹌鹑肝脏脏器系数极显著($P<0.01$)高于空白对照组。

关键词:吡虫啉;日本鹌鹑;毒性;毒理效应

中图分类号:X503.224 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)08-1529-08 doi:10.11654/jaes.2013.08.006

The Toxic Effects of Imidacloprid on Japanese Quail

DENG Zhao-rong, WANG Meng, GUAN Lei, MU Wei, LIU Feng*

(Research Center of Pesticide Environmental Toxicology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: The acute and accumulation toxicities of imidacloprid on Japanese quail were determined by oral way or feeding exposure method, and the sub-chronic toxicological effects of imidacloprid were also evaluated according to the blood biochemical indicators. The results showed that the LD_{50} of oral acute toxicity was $30.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$, it belongs to high toxicity grade. The dietary LC_{50} was $1455.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ feed and the toxicity level is low grade. The cumulative coefficient (K) was greater than 5, which belongs to a low-grade accumulation. At the later of sub-chronic toxicity period, the weight and food consumption were significantly reduced with the treatment of the middle and high concentration. The serum creatinine and uric acid of blood serum biochemical parameters were significantly increased compared with the control group. The liver organ coefficient of the treated quail with the high concentration was higher than the control group ($P<0.01$). The maximum no-effect level (MNEL) of imidacloprid on Japanese quail was $29.10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ feed, and the minimum effect level (MEL) was more than $72.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ feed. The main target organ of imidacloprid on the Japanese quail was liver and it was also harmful to kidney in a certain extent.

Keywords: imidacloprid; Japanese quail; toxicity; toxicological effects

禽鸟在生态系统食物链中占重要位置,亦是衡量生态平衡的重要标志。环境毒理学的基本观点认为,农药作为“毒物”进入生态系统后,会对其产生直接、间接和潜在的影响,禽鸟在生态环境和害虫防治中的作用和地位使其成为最重要和最具代表性的环境有益生物之一。因此,进行农药对鸟类毒性影响的研究及安全性评价对于爱护鸟类,维护生态平衡,保护人

类健康有着重要的意义^[1-3]。

吡虫啉是一种新型的硝基亚甲基类的内吸杀虫剂,具有胃毒和触杀作用,由于具有低毒和高效作用成为我国第一批首选高毒农药替代品种,广泛用于水稻、棉花、小麦、蔬菜及各种果树上防治刺吸式口器害虫^[4-5]。吡虫啉的剂型涵盖可湿性粉剂、乳油、悬浮剂等几乎所有常见剂型^[6],主要用于叶面喷雾,近年来为节约劳动力成本、简化施药技术,用于种子处理的悬浮种衣剂的生产量和使用量明显上升。吡虫啉拌种对有害生物产生效应的同时,经口进入鸟体内的几率大大增加。由于吡虫啉广泛、长期、大量的使用,对鸟类等非靶标生物的毒害影响已引起人们的关注^[7-8]。

收稿日期:2013-01-22

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903033)

作者简介:邓兆荣(1988—),男,研究实习员,研究方向为农药环境毒理与安全性评价。E-mail: dzt_880408@126.com

*通信作者:刘 峰 E-mail: fliu@sdau.edu.cn

有关吡虫啉对哺乳动物及部分环境生物的毒性效应及毒作用机制国内外已有不少研究报道。李华文等^[7]研究了吡虫啉的致突变性和亚慢性毒性,结果表明 95%吡虫啉原药在 $30.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 体重}$ 下无明显致突变作用,雌、雄 SD 大鼠亚慢性(90 d)经口喂饲的最大无作用剂量分别为 7.56 、 $6.93 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。龚瑞忠等^[8]采用多种室内模拟试验,测定了吡虫啉对家蚕、溞类、鱼类和虾类的毒性并作了安全性评价,结果表明:吡虫啉对溞类、鲤鱼的 LC_{50} 48 h 值分别为 50.4 、 $138.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,毒性等级为低毒;对家蚕和沼虾的 LC_{50} 48 h 值分别为 $0.36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 桑叶}$ 、 $34.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,毒性等级为高毒。吡虫啉对不同环境生物毒性差异与其化学结构及作用机制密切相关。目前,我国有关吡虫啉对鸟类的毒性资料较为少见,国外的数据绝大部分未公开发表,检索十分不便。本文通过对吡虫啉急性经口毒性、饲喂毒性、蓄积毒性及亚慢性毒性的试验研究,旨在进一步完善和积累吡虫啉毒性资料,阐明其初步毒理效应,为新烟碱类农药的环境毒理学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试生物:日本鹌鹑(*Coturnix japonica*):体重(100 ± 10)g,30 日龄,同批孵化,健康、活泼,购于嘉祥县鸿新鹌鹑养殖有限公司。

药剂:95%吡虫啉(Imidacloprid)原药,山东省联合农药工业有限公司提供,分散助剂为宁乳 34#,邢台蓝星助剂厂提供;黄原胶,郑州凯利生物科技有限公司提供。试验时,将吡虫啉原药加工成 20%的悬浮剂,具体加工方法:称取吡虫啉原药 21.05 g,加入宁乳 34# 2.00 g、黄原胶 0.10 g,蒸馏水补足到 100 g,砂磨机研磨 1.5 h。助剂系统加工方法:称取宁乳 34# 2.00 g、黄原胶 0.10 g,蒸馏水补足到 100 g,砂磨机研磨 1.5 h。

仪器:Liasys 自动生化分析仪(意大利 AMS 公司),百分之一电子天平(北京赛多利斯有限公司),0.1~1 mL 移液器(德国 Eppendorf 公司)。

饲料来源及组成:将玉米(59%)、豆粕(36%)和预混料(5%)掺匀后粉碎,现用现配。预混料,潍坊天合饲料有限公司提供,玉米、豆粕直接从农户购买。

1.2 方法

1.2.1 急性经口毒性试验

参照《化学农药环境安全评价试验准则》^[9]、

USEPA^[10]及 OECD^[11]的相关准则,通过 IUPAC(国际纯粹与应用化学联合会)数据库查询吡虫啉对鸟类的急性经口毒性数据,进行预实验;根据预试验的结果确定正式试验的剂量为 20、24.58、30.25、37.25、45.75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$,每组 10 只鸟[雌雄各半,30 日龄,体重(100 ± 10)g],并设空白对照和助剂对照。试验采用一次性经口灌胃法,将不同剂量的药液进行灌胃染毒,按每 100 g 体重鹌鹑灌药 1 mL 处理,连续 7 d 观察试验用鸟的死亡数与中毒症状。试验在(25 ± 2)℃与正常的饲养条件下进行,记录试验用鸟的死亡数,对试验数据进行统计,计算其 LD_{50} 值并判定毒性等级。

1.2.2 急性饲喂毒性试验

参照《化学农药环境安全评价试验准则》^[9]、USEPA^[12]及 OECD^[13]的相关准则,通过 IUPAC(国际纯粹与应用化学联合会)数据库查询吡虫啉对鸟类的急性饲喂毒性数据,进行预实验;根据预试验的结果确定正式试验的浓度为 500、825、1 361.25、2 246.06、3706 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ feed}$,并设空白对照和助剂对照,空白对照饲喂正常饲料,助剂对照饲喂拌有一定浓度助剂的饲料,每个处理 10 只鸟[雌雄各半,30 日龄,体重(100 ± 10)g]。将农药定量拌入饲料中进行饲喂,试验时间为 8 d,前 5 d 饲喂含药饲料(现用现配),后 3 d 饲喂正常饲料。试验在(25 ± 2)℃与正常的饲养条件下进行,观察记录试验用鸟的中毒症状和死亡情况。试验观察期为 8 d,死亡数字 8 d 累计。计算其 LC_{50} 值并判定毒性等级。

1.2.3 蓄积毒性试验

采用剂量递增蓄积系数法^[14]。将试验动物随机分为雌雄两组,每组各 10 只,以 4 d 为 1 期,第 1 期给药剂量为 0.1 倍 LD_{50} ,以后各期给药剂量依次按 1.5 倍递增,直至雌雄两组合计死亡一半或继续给药直至累计剂量达到 5.0 倍 LD_{50} 以上为止,计算蓄积系数。试验具体操作为:随机挑选 30 日龄健康、活泼的雌、雄鹌鹑各 10 只,隔夜禁食后,按表 1 的染毒方案,以 4 d 为一期,采用连续经口灌胃染毒的方法,以 1 mL 药液/100 g bw 的标准给药。同时设置空白对照和助剂对照组,以每 100 g bw 1 mL 清水(或助剂系统溶液)的标准灌胃供试生物。根据蓄积毒性评价标准: $K < 1$ 为高毒蓄积; $1 \leq K < 3$ 为明显蓄积; $3 \leq K < 5$ 为中度蓄积, $K \geq 5$ 为轻度蓄积,来划分供试药剂的蓄积毒性等级。

$$\text{蓄积系数}(K) = \frac{\text{LD}_{50}(n)}{\text{LD}_{50}(1)}$$

式中: $\text{LD}_{50}(n)$ 为多次染毒使供试生物出现半数死亡

表 1 剂量定期递增染毒剂量
Table 1 Doses of periodic increasing administrating

染毒时间/d	1~4	5~8	9~12	13~16	17~20	21~24	25~28
每日染毒剂量	0.1	0.15	0.22	0.34	0.50	0.75	1.12
4 d 累积剂量	0.4	0.6	0.90	1.36	2.00	3.00	4.48
累积总剂量	0.4	1.0	1.90	3.26	5.26	8.26	12.74

注:剂量以急性毒性的 LD₅₀ 为单位。
Note: With LD₅₀ of acute toxicity as unit.

的累积剂量;LD₅₀(l)为试验生物死亡一半时有害物质的剂量。

染毒开始后,每隔 4 d 称量试验鸟体重、余食并记录。每天观察鸟的外观、行为、死亡数及中毒症状。

试验结束后(累积死亡数超过一半),采用全自动血液生化分析仪测定存活鹌鹑血清生化指标;检查项目和测定方法主要包括:谷草转氨酶(AST)-速率法、谷丙转氨酶(ALT)-速率法、总胆红素(TBIL)-钼酸盐氯化法、总蛋白(TP)-双缩脲法、碱性磷酸酶(ALP)-速率法、γ 谷氨酰转肽酶 (GGT)-速率法、尿素氮(UREA)-脲酶紫外速率法、尿酸(UA)-尿酸酶比色法、血肌酐(CREA)-苦味酸法^[9]。对所有存活鹌鹑进行解剖,取心、肝、脾、肺、肾、睾丸称量并计算脏器系数,计算公式为:

脏器系数= $\frac{\text{脏器鲜重}}{\text{动物体重}} \times 100\%$

1.2.4 亚慢性饲喂毒性试验

将试验动物随机分为 5 组,每组 20 只,雌、雄各半。设低、中、高 3 个浓度组,参考急性饲喂毒性试验 LC₅₀ 值,设计试验浓度为 LC₅₀ 的 1/50、1/20 和 1/5,即 29.10、72.76、291.02 mg·kg⁻¹ 饲料,每天进行饲喂染毒,连续 90 d^[5]。另设空白对照和助剂对照,空白对照饲喂正常饲料,助剂对照饲喂拌有一定浓度助剂的饲料,其余处理同染毒浓度组^[16]。

染毒开始后每隔 15 d 称量试验鸟体重、余食并记录。每天观察鸟的外观、行为、死亡数及中毒症状。染毒结束后,测定血液生化指标(生化指标及检测方法,同 1.2.3 蓄积毒性试验),对所有存活鹌鹑进行解剖,取心、肝、脾、肺、肾、睾丸称量并计算脏器系数。根据各项检测结果,评定农药的亚慢性经口动物最大无作用剂量及最小有作用剂量。

1.2.5 数据分析

试验所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析,显著性分析均采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)法,多重比较采用最小显著差值(Dunnett)法。

2 结果与分析

2.1 吡虫啉对日本鹌鹑的急性经口毒性试验

染毒 20 min 后,灌胃吡虫啉剂量为 30.25、37.25、45.75 mg·kg⁻¹ 体重的鹌鹑迅速被击倒,肌肉震颤、头部下垂、体温下降,2 h 后出现死亡,死亡前双腿后蹬、头部后仰、呕吐。5~6 h 后,存活鹌鹑的中毒症状有所缓解,逐渐恢复饮食、饮水。灌胃剂量为 20、20.58 mg·kg⁻¹ 的鹌鹑出现了精神萎靡、羽毛耸立、闭眼、拉稀、食欲不振的症状,8 h 后基本恢复正常。空白和助剂对照组鹌鹑无任何异常反应。

吡虫啉急性经口毒性试验鹌鹑死亡数见表 2。连续观察一周,结果表明死亡数与浓度呈正相关。根据试验结果,吡虫啉的 LD₅₀ 为 30.25 mg·kg⁻¹ 体重。按禽鸟急性毒性划分标准:LD₅₀>500 a.i.mg·kg⁻¹ 体重为低毒,50 a.i.mg·kg⁻¹ 体重<LD₅₀≤500 a.i.mg·kg⁻¹ 体重为中毒,10 a.i.mg·kg⁻¹ 体重<LD₅₀≤50 a.i.mg·kg⁻¹ 体重为高毒,LD₅₀≤10 a.i.mg·kg⁻¹ 体重为剧毒。吡虫啉对日本鹌鹑的急性经口毒性为高毒。

表 2 吡虫啉急性经口毒性试验日本鹌鹑的死亡数

Table 2 Deaths of Japanese quail in imidacloprid acute oral toxicity test

剂量 /mg·kg ⁻¹ bw	处理鹌鹑 总数/只	死亡数/只							
		0	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
空白对照	10	0	0	0	0	0	0	0	0
助剂对照	10	0	0	0	0	0	0	0	0
20	10	1	1	1	1	1	1	1	1
24.58	10	2	4	4	4	4	4	4	4
30.25	10	4	5	5	5	5	5	5	5
37.25	10	6	6	6	6	6	6	6	6
45.75	10	8	9	9	9	9	9	9	9

2.2 吡虫啉对日本鹌鹑的急性饲喂毒性试验

试验中观察到,染毒开始后的前 24 h 内鹌鹑并没有出现死亡现象,2 d 后染毒组均呈现不同程度的拉稀、精神萎靡的中毒症状。3706 mg·kg⁻¹ 饲料浓度处理的鹌鹑首先出现死亡,5 d 染毒结束后,染毒鹌鹑的死亡数不再变化,存活鹌鹑逐渐恢复正常的饮食,与染毒之前相比,饮食量下降,身体消瘦。

吡虫啉急性饲喂毒性试验鹌鹑死亡数见表 3。连续观察 8 d,根据试验结果,吡虫啉的 LC₅₀ 为 1 455.11 mg·kg⁻¹ 饲料。按禽鸟急性毒性划分标准:LC₅₀>1000 a.i.mg·kg⁻¹ 饲料为低毒,500 a.i.mg·kg⁻¹ 饲料<LC₅₀≤1000 a.i.

表3 吡虫啉急性饲喂毒性试验日本鹌鹑的死亡数

Table 3 Deaths of Japanese quail in imidacloprid dietary toxicity test

浓度/ mg·kg ⁻¹ feed	处理鹌鹑 总数/只	时间(d)/死亡数(只)									
		0	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
空白对照	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
助剂对照	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
825	10	0	0	1	1	3	3	3	3	3	3
1 361.25	10	0	0	2	3	5	5	5	5	5	5
2 246.06	10	0	0	4	4	7	7	7	7	7	7
3706	10	0	1	5	7	8	8	8	8	8	8

mg·kg⁻¹ 饲料为中毒, 50 a.i.mg·kg⁻¹ 饲料 <LC₅₀ ≤ 500 a.i.mg·kg⁻¹ 饲料为高毒, LC₅₀ ≤ 50 a.i.mg·kg⁻¹ 饲料为剧毒。吡虫啉对鹌鹑的急性饲喂毒性为低毒。

2.3 吡虫啉对日本鹌鹑的蓄积毒性试验

2.3.1 中毒症状、死亡数、体重和平均耗食量变化

染毒开始后的前3个周期, 鹌鹑只表现出轻微的中毒症状: 闭眼、羽毛耸立、精神萎靡, 没有出现死亡。第4周期, 鹌鹑表现出轻微的中毒症状: 打盹、活动减少、趴伏, 饮食和饮水下降。第5周期, 鹌鹑中毒症状加剧, 身体颤抖、拉稀严重、粪便中出现白色泡状物, 并出现死亡(表4)。

表4 吡虫啉蓄积毒性试验日本鹌鹑的死亡数

Table 4 Deaths of Japanese quail in imidacloprid cumulative toxicity test

处理	死亡数/只				
	1~4 d	5~8 d	9~12 d	13~16 d	17~20 d
空白对照	0	0	0	0	0
助剂对照	0	0	0	0	0
吡虫啉	0	0	0	1	10

蓄积毒性试验鹌鹑体重变化结果见表5。染毒开始的前5d内, 所有组鹌鹑的平均体重都有所增长, 在试验的5~13d内, 染毒鹌鹑体重出现下降; 第13d后, 由于鹌鹑对药剂的耐药力增加, 体重有所回升。第17~20d, 由于增大了药剂量, 身体消瘦、耐药力差的鹌鹑首先出现中毒死亡, 存活鹌鹑体重变化不明显。试验期间, 空白和助剂对照组鹌鹑体重整体呈上升趋势。

图1结果显示, 所有供试鹌鹑第2期的耗食量均呈下降趋势, 可能与鹌鹑变换生活环境有关。染毒鹌鹑前3期耗食量持续下降, 从第3期开始耗食量保持在一定水平, 但均小于第1期时的耗食量。助剂对照

表5 吡虫啉蓄积毒性试验日本鹌鹑的体重变化

Table 5 Body weight of Japanese quail in imidacloprid cumulative toxicity test

时间/d	空白对照/g	助剂对照/g	吡虫啉/g
1	103.15±4.91	100.95±7.98	99.50±6.44
5	106.15±6.76	102.35±8.44	98.00±10.12
9	108.10±10.16	107.55±12.04	93.75±8.27
13	113.50±5.48	110.80±9.34	94.70±11.04
17	115.15±10.92	109.15±12.19	98.35±17.05
20	120.75±14.82	119.60±16.04	98.00±17.92

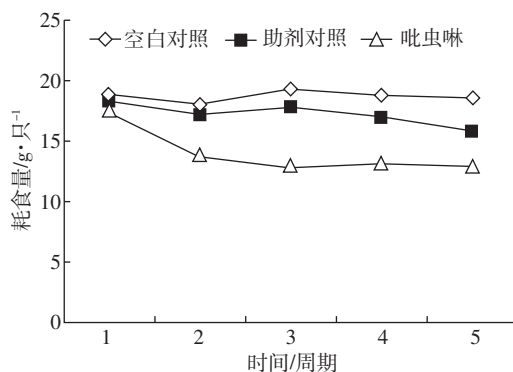


图1 吡虫啉蓄积毒性试验中日本鹌鹑的平均耗食量

Figure 1 The average food consumption of Japanese quail in imidacloprid cumulative toxicity test

与空白对照组耗食量变化趋势一致, 均是先下降后上升, 然后稳定在一定水平。整个试验期间, 染毒组与助剂对照组耗食量均小于空白对照组。试验表明吡虫啉可能对鹌鹑的消化或生理造成干扰, 也有可能对神经系统等造成损伤影响到饮食。

2.3.2 主要器官脏器系数

试验结束后, 对所有鹌鹑进行系统解剖时发现, 染毒鹌鹑与空白对照组鹌鹑相比身体明显消瘦, 肝脏呈现暗黄色、边缘乌青, 肝细胞空泡化; 肾脏稍脆, 睾丸大小不等、形状不一, 肺脏及脾未见明显异常变化。脏器系数的结果见表6, 染毒鹌鹑的各个脏器系数与空白对照在统计学上无显著性差异($P>0.01$)。

2.3.3 血液生化酶检测

蓄积毒性试验鹌鹑的血液生化酶统计结果见表7, 染毒鹌鹑的ALT、ALP和UA与空白对照组在统计学上存在极显著性差异($P<0.01$), 其中: ALT、UA值显著升高, ALP值显著降低; 助剂对照组和空白对照组相比各指标无显著性差异($P>0.01$)。说明鹌鹑生化指标中ALT、ALP和UA的活性大小与吡虫啉中毒机制具有一定相关性。

表 6 吡虫啉蓄积毒性试验日本鹌鹑脏器系数统计表
Table 6 Organ coefficient of Japanese quail in imidacloprid cumulative toxicity test

脏器名称	空白对照/%	助剂对照/%	吡虫啉/%
心	0.867±0.114	0.836±0.141	0.820±0.892
肝	2.988±0.739	3.083±0.697	3.525±0.670
脾	0.071±0.017	0.089±0.009	0.065±0.010
肺	0.860±0.197	0.964±0.145	0.812±0.179
肾	0.766±0.165	0.720±0.143	0.666±0.118
睾丸	5.262±0.378	5.001±0.471	4.863±0.384

2.3.4 蓄积系数

经过连续灌胃染毒,供试鹌鹑在第 13 d 时首先出现死亡(表 4),此时灌药量为 0.34 倍 LD₅₀ 剂量,在第 20 d 时雌、雄鹌鹑死亡总数超过一半,此时蓄积系数为 5.24,根据蓄积毒性评价标准,吡虫啉对日本鹌鹑的蓄积毒性为轻度蓄积。

2.4 吡虫啉对日本鹌鹑的亚慢性饲喂毒性试验

2.4.1 中毒症状

试验第 1 个月,染毒组鹌鹑无明显中毒症状,觅食及饮水正常,无死亡发生;试验第 2 个月,中、高浓度染

毒组鹌鹑出现异常:雄性鹌鹑表现出极度活跃、易受惊吓,拉稀严重;雌性鹌鹑出现羽毛蓬松、活动减少、角弓反张、运动失调的症状。试验第 3 个月,所有染毒组鹌鹑症状开始缓解,但整体饮食、饮水下降,机体消瘦,并且高浓度处理组出现个别死亡现象。试验期间,助剂与空白对照组鹌鹑健康、活泼,未出现任何异常状况。

2.4.2 平均耗食量、体重变化

由表 8 结果可见,在试验初期(2~4 周),染毒组鹌鹑的耗食量与空白对照组相差不大;试验的中、后期(6~13 周),染毒组鹌鹑的耗食量均低于空白对照组,高浓度组鹌鹑的耗食量均低于中、低浓度组的耗食量;同一染毒浓度下雄性鹌鹑的耗食量稍低于雌性。助剂对照组耗食量与空白对照组差别不大。

由表 9 结果可见,从第 6 周开始,高浓度组的鹌鹑体重比空白对照组明显下降。第 6~13 周,雄性鹌鹑体重与空白对照在统计学上存在极显著性差异,第 8~10 周雌性鹌鹑与空白对照在统计学上存在极显著性差异;中、低浓度染毒组和助剂对照组的鹌鹑体重与空白对照组在统计学上差异不显著($P>0.01$)。

2.4.3 主要器官脏器系数

表 7 吡虫啉蓄积毒性试验日本鹌鹑主要血液生化酶

Table 7 Blood biochemistry of Japanese quail in imidacloprid cumulative toxicity test

处理	生化酶								
	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹	UREA/mmol·L ⁻¹	UA/μmol·L ⁻¹	CREA/μmol·L ⁻¹
空白对照	261.12±78.79	1.88±0.58	21.53±13.01	32.78±8.25	1 918.67±512.94	3.63±0.95	1.00±0.23	153.83±37.66	75.33±26.42
助剂对照	273.42±56.40	2.47±0.43	28.77±5.48	28.53±2.27	1 891.53±358.58	4.12±0.87	0.80±0.22	163.88±64.47	84.68±19.45
吡虫啉	258.20±58.05	6.07±0.63 *	26.78±8.56	29.02±4.82	931.38±171.52 *	3.32±0.59	1.22±0.31	660.77±168.73 *	96.97±18.59

注:处理组分别与空白对照相比的 Dunnett *t*-检验(2-sided);* 表示在 $P<0.01$ 水平上存在极显著差异。

Note: Dunnett *t*-test compared the treated groups against CK; * Significant difference at the 0.01 level.

表 8 吡虫啉亚慢性毒性试验日本鹌鹑的平均耗食量

Table 8 The average food consumption of Japanese quail in imidacloprid sub-chronic toxicity test

性别	浓度/ mg·kg ⁻¹ feed	耗食量/g·只 ⁻¹ ·d ⁻¹						
		2 周	4 周	6 周	8 周	10 周	12 周	13 周
雄	空白对照	20.66	22.08	22.32	23.12	24.49	24.85	24.85
	助剂对照	23.93	22.44	22.16	23.54	22.85	19.73	22.99
	29.10	22.30	20.18	20.01	22.45	20.41	21.59	21.63
	72.76	20.45	21.19	18.68	20.00	18.53	19.85	19.71
	291.02	20.69	20.70	18.00	18.18	16.57	16.22	16.47
雌	空白对照	22.05	22.99	24.50	23.64	25.70	25.44	25.96
	助剂对照	20.91	24.83	21.80	22.61	24.86	23.70	23.55
	29.10	22.10	22.64	23.37	23.34	23.33	21.68	22.60
	72.76	21.40	22.76	21.63	20.69	20.93	22.81	22.67
	291.02	21.02	20.94	19.75	17.12	18.97	19.50	18.50

试验结束后,对存活的鹌鹑进行系统解剖,结果发现,中、低浓度染毒组鹌鹑各脏器和空白对照组未发现肉眼可见的病理学改变。高浓度染毒组鹌鹑肝脏肿大、颜色暗黄,肾脏较脆。亚慢性毒性试验主要脏器系数结果见表 10,其中高浓度组肝脏的脏器系数与空白对照在统计学上存在极显著差异($P>0.01$),其余和空白对照无显著性差异,初步分析认为,肝脏是吡虫啉的主要靶器官。

2.4.4 血液生化酶检测

表 11 结果显示,雄性鹌鹑中、高浓度处理组的 TBIL、UA 和 CREA 与空白对照在统计学上存在极显著差异;雌性鹌鹑高浓度处理组的 ALT、UREA、UA

和 CREA 与空白对照在统计学上存在极显著差异($P<0.01$)。所有检测的生化酶中,染毒组鹌鹑的 AST、TP、ALP、GGT 与空白对照在统计学上无显著性差异。综合分析,UA 和 CREA 的活性大小与吡虫啉的中毒机制具有较大相关性。

3 讨论

张珍玲等^[17]研究了吡虫啉对大鼠的急性毒性,其对大鼠经口急性毒性及经皮毒性雌、雄两性均属低毒类。染毒后大鼠的中毒症状表现为抑制作用,出现呼吸急促、侧卧等症状。本试验采用经口和饲喂两种染毒方式对供试生物进行染毒处理,能够很好地模拟供

表 9 吡虫啉亚慢性毒性试验日本鹌鹑体重变化

Table 9 Body weight of Japanese quail in imidacloprid sub-chronic toxicity test

性别	浓度/ mg·kg ⁻¹ feed	体重/g						
		2 周	4 周	6 周	8 周	10 周	12 周	13 周
雄	空白对照	99.02±3.41	96.70±2.57	100.83±2.51	108.37±7.11	123.55±4.43	126.57±11.72	131.70±13.66
	助剂对照	102.33±3.14	98.35±2.37	107.87±5.22	105.21±12.92	118.71±9.22	120.31±10.44	129.24±12.52
	29.10	99.25±10.92	97.54±10.60	112.51±11.12	113.37±7.73	112.79±10.72	119.31±8.34	125.71±11.09
	72.76	97.21±5.63	101.24±6.87	100.50±7.54	104.80±9.72	107.51±7.90	111.83±11.76	116.81±12.85
	291.02	98.77±11.64	84.87±8.83	78.20±7.27*	80.51±8.37*	85.74±11.86*	91.31±14.41*	100.51±9.30*
雌	空白对照	109.80±10.51	113.30±15.10	121.21±16.24	126.50±16.71	131.04±8.12	129.50±19.52	139.87±11.13
	助剂对照	111.32±10.63	108.24±15.37	119.31±16.77	122.04±18.67	123.81±6.87	130.51±12.96	131.25±13.54
	29.10	110.2±10.3	116.22±16.80	108.50±14.16	120.72±12.64	125.72±22.96	127.01±15.12	133.36±15.01
	72.76	104.71±9.34	109.59±11.45	109.74±11.72	116.29±15.83	126.34±17.16	128.24±15.73	128.54±8.23
	291.02	103.24±5.50	95.24±10.43	96.30±8.11	93.51±11.78*	93.71±10.90*	115.07±17.81	121.71±15.26

注:处理组分别与空白对照相比的 Dunnett t -检验(2-sided);* 表示在 $P<0.01$ 水平上存在极显著差异。

Note: Dunnett t -test compared the treated groups against CK; * Significant difference at the 0.01 level.

表 10 吡虫啉亚慢性毒性试验日本鹌鹑脏器系数统计

Table 10 Organ coefficient of Japanese quail in imidacloprid sub-chronic toxicity test

性别	浓度/ mg·kg ⁻¹ feed	脏器系数/%					
		心	肝	脾	肺	肾	睾丸
雄	空白对照	0.876±0.198	1.650±0.524	0.072±0.012	0.921±0.291	0.561±0.059	4.900±0.607
	助剂对照	0.915±0.096	1.846±0.581	0.083±0.019	1.121±0.241	0.627±0.170	4.829±0.576
	29.10	0.835±0.144	2.038±0.695	0.076±0.011	0.999±0.375	0.753±0.199	5.113±0.517
	72.76	0.944±0.197	2.373±0.287	0.085±0.013	0.915±0.299	0.795±0.161	4.672±0.389
	291.02	0.859±0.198	3.455±0.642 *	0.077±0.016	0.855±0.137	0.608±0.207	4.943±0.461
雌	空白对照	0.896±0.240	2.415±1.066	0.078±0.021	1.117±0.290	0.689±0.213	—
	助剂对照	0.909±0.182	2.471±1.258	0.067±0.018	1.269±0.134	0.786±0.223	—
	29.10	0.782±0.164	3.363±0.641	0.075±0.017	0.746±0.257	0.775±0.197	—
	72.76	1.007±0.094	3.822±1.138	0.083±0.014	1.187±0.255	0.640±0.183	—
	291.02	0.785±0.223	4.039±0.578 *	0.071±0.014	1.006±0.241	0.638±0.197	—

注:处理组分别与空白对照相比的 Dunnett t -检验(2-sided);* 表示在 $P<0.01$ 水平上存在极显著差异。

Note: Dunnett t -test compared the treated groups against CK; * Significant difference at the 0.01 level.

表 11 吡虫啉亚慢性毒性试验日本鹌鹑主要血液生化酶

Table 11 Blood biochemistry of Japanese quail in imidacloprid sub-chronic toxicity test

性别	浓度/ mg·kg ⁻¹ feed	生化酶								
		AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹	UREA/immol·L ⁻¹	UA/μmol·L ⁻¹	CREA/μmol·L ⁻¹
雄	空白对照	343.18±41.47	1.91±0.34	22.08±6.55	30.40±6.69	1782.19±144.48	3.91±1.34	1.04±0.13	153.85±32.99	56.33±7.26
	助剂对照	299.76±36.41	1.87±0.35	26.12±3.71	33.09±8.97	1534.92±346.49	3.39±0.77	1.00±0.25	163.98±58.83	58.77±10.75
	29.10	330.54±41.09	2.01±0.39	28.79±4.80	29.79±4.54	1832.74±199.41	3.33±1.40	0.92±0.12	174.03±58.32	75.65±20.25
	72.76	324.02±39.94	2.10±0.26	34.41±4.54*	20.34±3.56	1499.94±246.85	3.51±1.08	0.96±0.24	207.00±31.91*	78.13±22.35*
	291.02	290.72±37.86	2.22±0.19	45.58±9.58*	21.62±4.65	1403.70±380.55	4.02±1.25	0.89±0.23	232.56±26.26*	81.81±11.18*
雌	空白对照	328.51±49.59	1.82±0.27	35.12±4.91	32.60±8.13	2627.71±357.23	3.94±1.56	1.33±0.13	168.45±48.21	93.09±11.99
	助剂对照	335.45±62.77	1.87±0.30	28.89±5.66	28.43±7.30	2597.46±294.06	3.78±1.37	1.12±0.20	195.80±45.12	84.52±23.37
	29.10	294.24±78.45	2.28±0.51	24.21±6.15	33.17±6.30	2809.16±442.15	4.10±1.02	1.20±0.21	226.23±32.95	90.18±19.90
	72.76	304.62±86.61	2.21±0.23	31.03±10.56	22.13±4.09	2730.00±313.76	3.81±1.24	1.01±0.29	245.57±38.25*	101.43±8.82 *
	291.02	305.24±65.46	2.61±0.44*	26.55±5.10	21.79±3.65	2380.61±354.95	3.85±1.37	0.88±0.13*	257.15±30.43*	137.51±10.69*

注:处理组分别与空白对照相比的 Dunnett *t*-检验(2-sided);*:表示在 $P<0.01$ 水平上存在极显著差异。

Note: Dunnett *t*-test compared the treated groups against CK; *: Significant difference at the 0.01 level.

试生物在自然环境中接触药剂的方式,通过观察和记录中毒症状及各项检测指标,寻求一种合理而且科学的试验方法。在急性经口毒性试验中,鹌鹑的中毒症状出现较快,而且剂量越高,症状越明显、死亡率越高,未死亡的鹌鹑恢复较快,灌胃后 24 h 后无鹌鹑死亡;在急性饲喂毒性试验中,前 2 d 内鹌鹑并未出现死亡,只是表现出厌食、精神萎靡、拉稀的症状,身体逐渐消瘦,染毒结束后体重明显下降,饮食量也下降。我们认为,上述差异主要归纳为三方面的因素:一是鹌鹑接触药剂的周期不同,药物在体内的存留时间就会产生差异,即活化或解毒酶系差异引起的不同;二是由于药剂侵入机体的途径不同,药剂在体内的分布、吸收速度也不同,吸收量大的毒性大,产生的毒性反应强;三是鹌鹑摄取药剂的方式不同,灌喂染毒是被动的,而饲喂染毒是主动的,后者可能通过减少取食量减少与药剂接触,因此受药量不十分准确。

体重是反映鹌鹑身体状况、机能代谢尤其是能量代谢和全身中毒反应的综合性指标,体重的变化与药剂剂量具有相关性。蓄积毒性试验中,鹌鹑的体重先下降后上升,表明吡虫啉对鹌鹑的能量代谢和转化产生影响。本试验测定吡虫啉对鹌鹑的蓄积系数 $K>5$,属于轻度蓄积。试验中观察到,在剂量较低的情况下,鹌鹑可以通过自身的解毒体系将外界的毒物排出体外。当毒物在体内的积累量超过鹌鹑自身的解毒代谢能力时,自身的器官组织已不能消耗掉摄入体内的毒物,毒物扩散至靶器官引起鹌鹑中毒并造成死亡。在蓄积毒性和亚慢性试验组织病理学检测中发现,肝脏有

一定程度肿大、颜色暗黄,初步推断肝脏是吡虫啉的主要作用靶器官。亚慢性试验中肾脏颜色变浅、质地变软,表明吡虫啉对肾脏功能也造成一定程度损伤。

血液是构成有机体内环境的重要组成部分,内环境的变化可能导致血液组成成分或性质发生特征性的变化。血液的生理正常值是反映机体健康状况的主要指标,也是疾病诊断和监测的指标之一^[18]。据文献报道,在长达 1 年的狗喂饲实验中,吡虫啉慢性毒性的无可察觉的作用水平为 $4.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,随剂量增加,不良反应主要有血液胆固醇含量上升和肝脏的一些应激反应^[19]。丙氨酸转氨酶(ALT)是临床上常用检查肝细胞损伤的一项敏感指标,肝细胞一旦遭到打击和破坏,ALT 就被释放到血液中,1%的肝脏细胞损害,可以使血中 ALT 的浓度增加一倍,某些药物和毒物也会引起 ALT 活性升高。尿酸(UA)、血肌酐(CREA)和尿素氮(UREA)是临床医学上检测肾脏功能及病变的常用指标。肾脏受损、急性慢性肾炎等肾脏疾病表现为血液生化指标中 UA 和 CREA 值的升高。在蓄积和亚慢性试验中,染毒剂量组均发现 ALT 显著升高,进一步证实肝脏是吡虫啉的主要作用靶器官。亚慢性试验中、高剂量组 UA、CREA 明显升高,表明长时间的药剂积累已经超过了肾脏的储备能力,对肾脏造成了一定程度的损害。

鸟类接触农药的途径有许多如农药直接喷洒在巢穴或鸟类身上、鸟类采食药剂处理过的种子以及食物链富集等^[20]。本试验通过模拟鸟类在田间受农药污染的途径,观察药剂对供试鸟类体重、耗食量以及脏

器系数等相关指标的影响,认为饲喂染毒法是研究农药对鸟类长期毒性较适合的染毒方法。有关吡虫啉亚慢性毒性试验药剂在鹌鹑体内的残留、分布,对鹌鹑产蛋量、孵化率的影响和吡虫啉种子处理对鸟类的实际风险还需要做进一步研究。

4 结论

本试验通过经口和饲喂两种方式,获得了吡虫啉对鹌鹑的毒性数据,并初步确定了毒作用靶器官,主要结论归纳如下:(1)吡虫啉对日本鹌鹑的急性经口 LD_{50} 为 $30.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重,急性饲喂 LC_{50} 为 $650\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 饲料,根据《化学农药环境安全评价试验准则》中规定的急性毒性划分标准,吡虫啉对鹌鹑的急性经口毒性为高毒,急性饲喂毒性为低毒。(2)吡虫啉对日本鹌鹑的蓄积系数 $K>5$,属于轻度蓄积。(3)吡虫啉对日本鹌鹑的最大无作用剂量(MNEL, Maximal No-Effect Level)为 $29.10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 饲料,最小有作用剂量(MEL, Minimal Effect Level)大于 $72.76\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 饲料。(4)吡虫啉作用于日本鹌鹑的主要靶器官为肝脏,对肾脏也有一定程度的损害。

参考文献:

- [1] 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1999:3-18.
CAI Dao-ji. The pesticide environmental toxicology research[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1999:3-18.
- [2] Pimentel D, McLaughlin L, Zepp A, et al. Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture[J]. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1993.
- [3] 杨佩芝, 蒋新明, 蔡道基. 化学农药对禽鸟的毒性与评价[J]. 农村生态环境, 1994, 10(4):78-80.
YANG Pei-zhi, JIANG Xin-ming, CAI Dao-ji. The toxicity and evaluation of chemical pesticides on birds[J]. *Rural Eco-environment*, 1994, 10(4):78-80.
- [4] 张咏梅, 李今越. 吡虫啉的应用及其安全性研究进展[J]. 医学动物防治, 2004, 20(12):728-730.
ZHANG Yong-mei, LI Jin-yue. The application and security research progress of imidacloprid[J]. *Chinese Journal of Pest Control*, 2004, 20(12):728-730.
- [5] 王圣印, 刘永杰, 周仙红, 等. 新烟碱类杀虫剂吡虫啉的研究进展[J]. 江西农业学报, 2012, 24(3):76-79.
WANG Sheng-yin, LIU Yong-jie, ZHOU Xian-hong, et al. Research progress in new neonicotinoid insecticide imidacloprid[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2012, 24(3):76-79.
- [6] 华 纯. 浅议吡虫啉的剂型[J]. 现代农药, 2007, 6(4):11-13.
HUA Chun. Imidacloprid and its formulation[J]. *Modern Agrochemicals*, 2007, 6(4):11-13.
- [7] 李华文, 陆 丹, 吴 军, 等. 吡虫啉原药的毒性研究[J]. 实用预防医学, 2008, 6(15):901-902.
LI Hua-wen, LU Dan, WU Jun, et al. Imidacloprid original drug toxicity studies[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2008, 6(15):901-902.
- [8] 龚瑞忠, 陈 锐, 陈良燕. 吡虫啉对环境生物的毒性与安全性评价[J]. 农药科学与管理, 1999, 20(3):13-16.
GONG Rui-zhong, CHEN Rui, CHEN Liang-yan. Evaluation on toxicity and safety of imidacloprid to environmental organisms[J]. *Pesticide Science and Administration*, 1999, 20(3):13-16.
- [9] 蔡道基, 等. 化学农药环境安全评价试验准则. 国家环保局, 1989.
CAI Dao-ji, et al. The chemical pesticide environmental safety evaluation test criteria. State Environmental Protection Administration. People's Republic of China, 1989.
- [10] USEPA. Avian acute oral toxicity test(OPPTS 850. 2100)[Z]. Washington, D. C. 20460:USEPA, 1996.
- [11] OECD. Avian acute oral toxicity test(223)[Z]. Paris:OECD, 2010.
- [12] USEPA. Avian dietary toxicity test(OPPTS 850. 2200)[Z]. Washington, D. C. 20460:USEPA, 1996.
- [13] OECD. Avian dietary toxicity test(205)[Z]. Paris:OECD, 1984.
- [14] GB 15670—1995. 农药登记毒理学试验方法[S]. 1996:217-219.
GB 15670—1995. The pesticide registration toxicology test methods [S]. 1996:217-219.
- [15] 郭燕红. 氟吗啉(SYP-L190)对日本鹌鹑毒性试验的初步研究[D]. 新疆农业大学, 2004:39-41.
GUO Yan-hong. Toxicity studies of flumorph(SYP-L190) on Japanese Quail[D]. Xinjiang Agricultural University, 2004:39-41.
- [16] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:103-108.
SHEN Jian-zhong. Animal Toxicology[M]. Beijing:China Agriculture Press, 2002:103-108.
- [17] 张珍玲, 唐玲芳, 姜允申, 等. 新杀虫剂吡虫啉的急性毒性和蓄积作用观察[J]. 南京医科大学学报, 1996, 16(3):274-275.
ZHANG Zhen-ling, TANG Ling-fang, JIANG Yun-shen, et al. Acute toxicity and accumulation action observation in the new insecticide imidacloprid[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing*, 1996, 16(3):274-275.
- [18] 申晓莉, 图 雅, 贾 斌, 等. 日本鹌鹑的部分血液生理生化指标[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2008, 26(2):209-211.
SHEN Xiao-li, TU Ya, JIA Bin, et al. Some biochemical and physiological indices in blood of Japanese Quail[J]. *Journal of Shihezi University(Natural Science)*, 2008, 26(2):209-211.
- [19] Imidacloprid. Pesticide tolerances[M]. Federal Register, 1995, 60(234):62366-62369.
- [20] 朱忠林, 龚瑞忠, 韩志华, 等. 农药对鸟类的毒性及其安全性评价[J]. 农村生态环境, 2003, 19(3):53-57, 60.
ZHU Zhong-lin, GONG Rui-zhong, HAN Zhi-hua, et al. Toxicity of pesticides to birds and their safety evaluation[J]. *Rural Eco-environment*, 2003, 19(3):53-57, 60.