

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019012601

王顺慧, 李慧珍, 游静. 利用毒代动力学模型研究氟虫腈在夹杂带丝蚓体内的手性选择性积累过程[J]. 环境化学, 2020, 39(1): 12-18.

WANG Shunhui, LI Huizhen, YOU Jing. Enantioselective bioaccumulation of waterborne fipronil in *Lumbriculus variegatus* with toxicokinetic modeling [J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(1): 12-18.

利用毒代动力学模型研究氟虫腈在夹杂带丝 蚓体内的手性选择性积累过程*

王顺慧^{1,2,3,4} 李慧珍² 游静^{2**}

(1. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州, 510640;

2. 暨南大学环境学院, 广东省环境污染与健康重点实验室, 广州, 510632;

3. 西南石油大学化学化工学院, 四川省油气田应用化学重点实验室, 成都, 610500; 4. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 农药的生物积累直接影响其毒性, 但是手性农药在生物体内的选择性积累过程仍不明确. 本文在恒定环境水浓度的条件下, 开展手性农药氟虫腈的外消旋体及其对映体在底栖无脊椎动物夹杂带丝蚓体内的生物积累实验. 在 96 h 和 72 h 的吸收和消除实验过程中, 测定生物体内的氟虫腈的外消旋体和对映体浓度随时间的变化情况, 构建毒代动力学模型, 获取吸收和消除速率常数. 结果表明夹杂带丝蚓对 *R*-氟虫腈的生物浓缩因子(1981 L·kg⁻¹脂肪) 比对 *S*-氟虫腈(1748 L·kg⁻¹脂肪) 更大. *R*-氟虫腈和 *S*-氟虫腈的吸收速率常数相当, 分别为 311±11 L·kg⁻¹脂肪·h⁻¹ 和 313±13 L·kg⁻¹脂肪·h⁻¹, 而 *R*-氟虫腈的消除速率常数小于 *S*-氟虫腈, 分别为 0.157±0.006 h⁻¹ 和 0.179±0.008 h⁻¹, 因此相对较慢的消除是导致 *R*-氟虫腈在夹杂带丝蚓体内更高生物积累的主要原因. 研究说明毒代动力学参数可有效阐释手性外源物质在生物体内选择性积累的差异.

关键词 毒代动力学模型, 手性农药, 生物积累, 氟虫腈.

Enantioselective bioaccumulation of waterborne fipronil in *Lumbriculus variegatus* with toxicokinetic modeling

WANG Shunhui^{1,2,3,4} LI Huizhen² YOU Jing^{2**}

(1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510640, China; 2. School of Environment and Guangdong Key Laboratory of Environmental Pollution and Health, Jinan University, Guangzhou, 510632, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Oil & Gas Field Applied Chemistry Key Laboratory of Sichuan Province, Southwest Petroleum University, Chengdu, 610500, China;

4. University of Chinese Academy of Science, Beijing, 100049, China)

Abstract: Bioaccumulation of pesticides directly affects their toxicity, but the enantioselective bioaccumulation processes of chiral pesticides in organism remained unclear. In the present study, the bioaccumulation tests of fipronil, a chiral pesticide, in a benthic invertebrate *Lumbriculus variegatus* were conducted with constant water concentrations of fipronil throughout testing. During the courses of the 96 h absorption and 72 h elimination experiments, the concentrations of fipronil racemate and enantiomers were analyzed in organism over time. Then, toxicokinetic models were established and absorption and elimination rate constants of individual fipronil enantiomers were estimated from the toxicokinetic models. Results showed that *L. variegatus* had a higher

2019 年 1 月 26 日收稿 (Received: January 26, 2019).

* 广东省自然科学基金 (2017A030313065, 2015A030310219, 2016A030312009) 资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030313065, 2015A030310219, 2016A030312009).

** 通讯联系人, E-mail: youjing@jnu.edu.cn

Corresponding author, E-mail: youjing@jnu.edu.cn

bioconcentration factor to *R*-fipronil (1981 L·kg⁻¹ lipid) than *S*-fipronil (1748 L·kg⁻¹ lipid). The *R*- and *S*-fipronil had similar absorption rate constants, being 311±11 and 313±13 L·kg⁻¹ lipid·h⁻¹, respectively. On the other hand, the elimination rate constant of *R*-fipronil was smaller than that of *S*-fipronil, with the values being 0.157±0.006 h⁻¹ and 0.179±0.008 h⁻¹, respectively. As a consequence of slower elimination, the bioaccumulation potential of *R*-fipronil was greater than *S*-fipronil in the blackworms. The current study showed that toxicokinetic parameters could effectively elucidate enantioselective bioaccumulation of xenobiotics in the organisms.

Keywords: toxicokinetic modeling, chiral pesticide, bioaccumulation, fipronil.

手性是自然界中普遍存在的现象,目前在用农药中具有手性结构的大概占据四分之一,而且该比例仍在持续增长^[1].多数手性农药以外消旋体的方式生产出售,但其对映体的生物效应可能出现较大手性差异,因此有必要探讨差异的原因.氟虫腈是一种具有神经毒性的杀虫剂^[2],在环境中广泛检出.氟虫腈具有硫原子的手性中心,前期研究发现其对水生无脊椎动物的毒性表现出对映体选择性.Wilson 等^[3]报道氟虫腈对模糊网纹蚤(*Ceriodaphnia dubia*)的 24 h 和 48 h 半致死浓度(LC50)表现显著手性差异,*S*-氟虫腈和 *R*-氟虫腈之比分别为 0.278(LC50_{24h})和 0.206(LC50_{48h}).在其他甲壳动物中也观察到了氟虫腈对映体毒性的显著差异,如 *S*-氟虫腈和 *R*-氟虫腈对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)72 h 的 LC50_{72h} 的比例为 0.193^[4],而对克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)96 h 的 LC50_{96h} 的比例为 5.55^[5].虽然目前毒性数据常用环境介质中的污染物浓度表征,而真正产生毒性效应的是能进入生物体内并到达作用靶位的部分,因此研究手性农药的选择性积累过程,有利于更准确评价估算农药对映体在生物体中的浓度.当手性物质进入生物体后,与体内具有立体选择性的大分子如蛋白质、核酸和糖类结合,可能导致对映体在生物体内的吸收、代谢和消除存在差异,改变手性分子在生物体内的积累,影响其毒性效应^[6].

毒代动力学过程是外源物质进入生物体后,其随时间的变化过程,包括污染物在生物体内的吸收、代谢和消除等^[7].建立毒代动力学模型可帮助阐述外源物质在生物体内的归趋,理解污染物的积累过程,以提高毒性评价的准确性,同时,毒代动力学模型估算也可帮助填补体内-体外测试外推法的数据缺乏,并利于外推至物种间进行毒性的预测^[8-9].通过毒代动力学模拟获得的吸收、代谢、消除参数与生物体内对映体的积累密切相关,故可在机理的层面上,为手性外源物质的毒性差异提供一定信息.

本文以常用于水体污染物生物积累测试的淡水模式生物夹杂带丝蚓(*Lumbriculus variegatus*)为测试生物,建立毒代动力学模型,定量研究氟虫腈手性对映体的生物积累过程.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 试剂与主要仪器

标准品和试剂:外消旋氟虫腈标准品(纯度 99%)购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,回收率指示物噻虫胺-d₃(纯度 99%)购自 CDN Isotopes 公司(加拿大魁北克),内标¹³C-氟虫腈(纯度 99%)购自 Toronto Research Chemicals 公司(加拿大安大略).乙腈、正己烷、异丙醇和丙酮均为 HPLC 级,购自瑞典 Oceanpak 公司.甲酸(LC/MS 级,纯度 > 98%)购自上海安谱公司.

仪器:高效液相色谱-二级质谱联用仪(HPLC/MS/MS,其中 HPLC 为日本岛津公司 DGU-30A,MS 为美国 AB SCIEX 公司 Triple Quad 5500)、TissuePre TP-24 组织破碎仪(Bio-Explorer 公司,中国)、Synergy H1 酶标仪(BioTek, 美国)、Sorvall Legend Micro 17R 离心机(ThermoFisher 公司,美国)、氮气吹扫仪(上海净信).

1.2 生物积累实验

1.2.1 积累测试

为了研究氟虫腈在水生无脊椎动物夹杂带丝蚓体内的手性选择性积累过程,开展了 7 d 的生物吸收和消除实验.将 100 μL 氟虫腈标样(母液浓度 1500 μg·mL⁻¹,溶于丙酮)加标至 15 L 实验室配制的生物养殖用中度硬水中^[10],磁力搅拌 1 h 混匀,获得 10 μg·L⁻¹的氟虫腈溶液.同时进行空白样品的生物测

试,水中仅仅加入 100 μL 丙酮溶剂.在进行生物测试前,250 mL 的氟虫腓溶液转移到 400 mL 暴露用烧杯中平衡过夜.此后,每个烧杯中随机加入 30 只夹杂带丝蚓开始生物积累实验.测试温度保持在 23 ± 1 $^{\circ}\text{C}$,光照和黑暗时间的比例为 16:8 h,整个实验过程中每 12 h 更换 1 次水,以保证水体中氟虫腓浓度维持恒定.水质参数包括 pH 值、温度、电导率和溶解氧每天测 1 次,每 3 天测 1 次氨氮.

整个 7 d 的生物积累测试包括 96 h 的吸收阶段和 72 h 的消除阶段.吸收阶段的时间点包括 4、10、24、48、72、96 h,当吸收阶段结束后,暴露后的夹杂带丝蚓转移到空白中度硬水中,开始消除阶段实验,其采样时间点为 100、102、106、118、144、168 h.每个采样时间点随机采取 3 个平行样.在每个采样时间点,夹杂带丝蚓用干净水清洗,擦干、称重保存至 -20 $^{\circ}\text{C}$,用于生物体脂肪含量测定和体内化合物浓度分析.

1.2.2 生物脂肪含量测定

每一个采样时间点的 3 个平行样中各随机取一只夹杂带丝蚓用于脂肪含量测定,其他用于化学分析测定体内浓度.用于测定脂肪含量的生物在均浆器中破碎后,采用 1 mL 正己烷萃取脂肪,离心后转移上清液到干净试管,重复上述步骤两次,合并萃取液,氮吹浓缩近干,加入浓硫酸,加热 5 min 后,使用香草醛-磷酸试剂显色,生物的脂肪含量通过酶标仪测定^[11].

1.2.3 样品前处理及仪器分析

夹杂带丝蚓体内氟虫腓含量分析的样品前处理参考文献方法[11].在破碎后的生物样品中加入回收率指示物噻虫嗪- d_3 后,用 2 mL 乙腈超声萃取 15 min,萃取重复 3 次.将萃取液合并,在 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,将上层清液转移到一个新的试管中,氮吹浓缩后转移到 1.5 mL 离心管中.样品于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 12 h 后取出,立即在 $9000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,上层清液转移到另一个干净试管中,另用 200 μL 乙腈清洗离心管,重复上述步骤两次,合并溶液,浓缩至 0.5 mL,加入内标 ^{13}C -氟虫腓,定容,过膜后进行仪器分析.为了测定水体中氟虫腓浓度,直接取一定体积的水样,加入回收率指示剂和内标后定容、过膜后,采用 HPLC/MS/MS 分析氟虫腓的外消旋体和对映体.

氟虫腓外消旋体分析:氟虫腓外消旋体(*rac*-氟虫腓)、内标(^{13}C -氟虫腓)和回收率指示物(噻虫嗪- d_3)的检测采用反相 HPLC/MS/MS 分析,条件为 C18 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm i.d., 1.8 μm),柱温:40 $^{\circ}\text{C}$,含有 0.1% 甲酸的水溶液(A)和乙腈(B)作为流动相,进样体积:5 μL .质谱检测采用电喷雾电离(ESI),在多反应检测模式(MRM)条件下进行,其他质谱条件包括:离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$,气帘气(Curtain Gas, CUR):40 psi,碰撞气(Collision Gas, CAD):8 psi,雾化气(Ion Source Gas1, GS1):55 psi,辅助气(Ion Source Gas 2, GS2):55 psi.*rac*-氟虫腓和 ^{13}C -氟虫腓在负离子模式下进行检测,其喷雾电压(IonSpray Voltage, IS)为 -4500 V. HPLC 条件为:流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,梯度洗脱:初始设定 B 含量 10%,0—3 min 70% B,保留 4 min.定性定量离子对氟虫腓为 m/z : Q1: 435 Q3: 330,339, ^{13}C -氟虫腓为 m/z : Q1:439 Q3: 322,334.噻虫嗪- d_3 的正离子模式下进行分析,喷雾电压设定为 5500 V. HPLC 分析条件:流速 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,梯度洗脱:初始设定 B 含量 10%;0—1 min 30% B;1—2 min 80% B,保留 2 min.噻虫嗪- d_3 的定性定量离子(m/z)为 Q1 为 295,而 Q3 分别为 131、214.

氟虫腓对映体分析:氟虫腓对映体浓度使用正相 HPLC/MS/MS 分析,条件为(R,R)-Whelk-O1 手性柱(250 mm \times 4.6 mm I.D., Regis Technologies 公司,美国),异丙醇和环己烷的混合溶剂($V:V=1:9$)作为流动相,流速: $1.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 23 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 14 μL .质谱检测在大气压化学电离(APCI)方式,负离子模式和多反应检测模式(MRM)条件下进行.具体质谱条件:离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$,气帘气(Curtain Gas, CUR):55 psi,碰撞气(Collision Gas, CAD):8 psi,喷雾电压(IonSpray Voltage, IS): -4500 V;雾化气(Ion Source Gas1, GS1):60 psi;辅助气(Ion Source Gas 2, GS2):0 psi,定性定量离子为(m/z)Q1:435, Q3:330,339,定量校准标准曲线范围从 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.2.4 质量控制与保证

为保证分析数据的有效性,在仪器分析过程中,每 20 个样品进一个标样检测仪器性能,确定分析数据的标准偏差在 20% 之内.此外,每 20 个样品同时分析一套质控样品,包括方法空白、基质空白、基质加标和基质加标的平行样.空白样品中均未检出氟虫腓及其代谢产物.回收率指示物噻虫嗪- d_3 的回收率是 $96\%\pm 10\%$,而生物样品中 R-氟虫腓和 S-氟虫腓的回收率分别是 $99\%\pm 4\%$ 和 $98\%\pm 8\%$.生物样品中氟虫

腈的报告检测限通过标准校正曲线的最低浓度计算,为 $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 湿重.

1.3 数据分析

为了定量阐明氟虫腈外消旋体及其对映体在夹杂带丝蚓中的毒代动力学过程,分别建立一级动力学模型,并定量模拟氟虫腈在生物体内中的吸收和消除参数^[12],公式如下:

$$dC_p/dt = k_u \times C_w - k_e \times C_p \quad (1)$$

其中, C_p ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 脂肪) 为 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈在生物体内浓度; C_w ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈在水中浓度,而 k_u ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脂肪 $\cdot\text{h}^{-1}$) 和 k_e (h^{-1}) 分别为 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈吸收速率常数和消除速率常数.

通过 k_e 可以计算得到生物体内 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈的半衰期($t_{1/2}$) (公式 2).

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e \quad (2)$$

当体内氟虫腈浓度达到稳态时, *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈在夹杂带丝蚓中的生物浓缩因子 (BCF_{ss}, $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脂肪) 通过其在生物体内稳态浓度和水中平均浓度的比值计算得到 (公式 3). 另外, 生物浓缩因子 (BCF_{ik}, $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脂肪) 也可通过毒代动力学中生物体内氟虫腈的吸收和消除速率常数的比值估算求得 (公式 4).

$$\text{BCF}_{ss} = C_{b,ss} / C_w \quad (3)$$

C_w ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 $C_{b,ss}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脂肪) 分别为 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈在水体中平均浓度和达到稳态时的脂肪标准化的生物体浓度.

$$\text{BCF}_{ik} = k_u / k_e \quad (4)$$

k_u ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 脂肪 $\cdot\text{h}^{-1}$) 和 k_e (h^{-1}) 分别为 *rac*-、*R*-或 *S*-氟虫腈吸收和消除速率常数.

毒代动力学数据的模拟利用 Scientists 2.01 实现 (公式 1), 而数据的偏差分析用 SPSS version 21 单因素 (ANOVA) 和 *t* 检验 (*t*-test) 分析 ($P < 0.05$).

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 氟虫腈对映体在夹杂带丝蚓中的生物积累

整个生物积累实验过程持续监测了水质参数, 包括溶解氧 ($7.53 \pm 0.85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、pH (7.80 ± 0.06)、温度 ($22.9 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$)、电导率 ($367 \pm 7 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) 和氨氮 ($< 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 水质参数均符合美国环保署标准要求^[10]. 另外, 7 d 的生物测试中均未发现夹杂带丝蚓的行为异常, 夹杂带丝蚓数量在测试前后没有变化, 每个平行样中夹杂带丝蚓总重量 ($0.161 \pm 0.019 \text{ g}$) 和生物体内脂肪含量 ($1.0\% \pm 0.2\%$) 在测试前后也没有显著变化.

在生物积累实验的吸收阶段, 水体中氟虫腈外消旋体的浓度在整个暴露过程中基本恒定 ($P = 0.179$), 在整个 96 h 吸收阶段实验过程中水中氟虫腈平均浓度为 $8.93 \pm 0.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1). 生物体内 *rac*-氟虫腈的浓度从暴露开始逐步上升, 直到 24 h, 浓度达到 $15.1 \pm 3.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 脂肪, 随后生物体内 *rac*-氟虫腈的浓度维持基本恒定, 吸收阶段结束 (96 h) 时 *rac*-氟虫腈浓度为 $15.3 \pm 2.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 脂肪 (表 2).

表 1 水中氟虫腈外消旋体及其手性对映体在不同时间点的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Table 1 Concentrations of *rac*-, *S*- and *R*-fipronil in water at various time intervals ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

时间 Time	浓度 Concentration							平均值 ^b Average
	0 h	4 h	10 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
<i>rac</i> -氟虫腈 <i>rac</i> -fipronil	8.93 ± 0.10^a	8.93 ± 0.13	8.89 ± 0.40	8.58 ± 0.25	9.16 ± 0.16	9.33 ± 0.63	8.71 ± 0.29	8.93 ± 0.36
<i>S</i> -氟虫腈 <i>S</i> -fipronil	4.34 ± 0.07	4.30 ± 0.07	4.33 ± 0.21	4.17 ± 0.09	4.40 ± 0.24	4.55 ± 0.30	4.29 ± 0.25	4.33 ± 0.20
<i>R</i> -氟虫腈 <i>R</i> -fipronil	4.59 ± 0.03	4.63 ± 0.06	4.56 ± 0.19	4.41 ± 0.16	4.87 ± 0.41	4.77 ± 0.33	4.62 ± 0.20	4.64 ± 0.25

^a 平均值 \pm 标准偏差, $n = 3$. ^a mean \pm standard deviation, $n = 3$.

^b 所有采样时间点氟虫腈水体浓度的平均值. ^b the average concentration of fipronil in water at all sampling time points.

氟虫腈手性对映体在水体和生物体内随时间变化的趋势与其外消旋体基本一致.水中氟虫腈对映体单体的浓度在整个暴露过程的不同时间点基本恒定($P = 0.425$),*S*-氟虫腈和*R*-氟虫腈浓度各时间点平均值分别为 $4.33 \pm 0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.64 \pm 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1).氟虫腈两个对映体在生物体内的浓度从暴露开始急剧升高,直到 24 h 时,*S*-氟虫腈和*R*-氟虫腈浓度分别为 $7.05 \pm 1.04 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂肪和 $8.42 \pm 1.29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂肪,随后氟虫腈对映体在生物体内浓度基本恒定,直到吸收阶段结束(96 h),*S*-氟虫腈和*R*-氟虫腈分别为 $7.05 \pm 0.77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂肪和 $7.83 \pm 0.85 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂肪(表 2).随后,氟虫腈暴露的夹杂带丝蚓被转入清水中开始消除阶段实验.在消除阶段,生物体内氟虫腈对映体的浓度随时间变化而快速下降,直到 120 h 后下降趋于平缓.

从实验结果来看,两种氟虫腈手性对映体均易于积累在夹杂带丝蚓体内,在同一采样时间点*R*-氟虫腈的浓度均高于*S*-氟虫腈,但是差别不显著(24、48、72、96 h 的 P 值分别为 0.226、0.059、0.068、0.774).这与前期关于氟虫腈在其他软体动物体内积累研究类似.土壤中氟虫腈对映体在赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)体内的生物积累研究发现,*S*-和*R*-对映体在生物体内积累量没有明显差异^[13].另一方面,氟虫腈对映体在颤蚓(*Tubifex tubifex*)中的积累出现了明显的不同,颤蚓体内*R*-氟虫腈的浓度大于*S*-氟虫腈^[14].这主要是因为物种间的差异对氟虫腈对映体的生物积累影响较大^[15].另外,外界环境介质中微生物也可能造成介质中污染物发生手性选择性降解,从而使进入生物体内对映体的量不同^[16].

表 2 在不同时间下氟虫腈外消旋体及其手性对映体在夹杂带丝蚓体内浓度($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂肪)

Table 2 Concentrations of *rac*-, *S*- and *R*-fipronil in *Lumbriculus variegatus* at various time intervals ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ lipid)

	吸收阶段时生物体内浓度 Chemical concentration in biota during uptake phase						
	0 h	4 h	10 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>rac</i> -氟虫腈 <i>rac</i> -fipronil	ND ^a	8.58 ± 0.69^b	13.7 ± 1.7	15.1 ± 3.4	17.4 ± 2.1	19.2 ± 2.6	15.3 ± 2.1
<i>S</i> -氟虫腈 <i>S</i> -fipronil	ND	4.20 ± 0.64	6.31 ± 0.81	7.05 ± 1.04	7.42 ± 0.85	8.69 ± 0.84	7.05 ± 0.77
<i>R</i> -氟虫腈 <i>R</i> -fipronil	ND	4.67 ± 0.71	7.39 ± 0.94	8.42 ± 1.29	9.61 ± 1.17	10.6 ± 1.0	7.83 ± 0.85
	消除阶段时生物体内浓度 Chemical concentration in biota during elimination phase						
	100 h	102 h	106 h	118 h	144 h	168 h	
<i>rac</i> -氟虫腈 <i>rac</i> -fipronil	4.25 ± 0.35	1.34 ± 0.11	0.817 ± 0.050	0.386 ± 0.090	0.154 ± 0.015	0.133 ± 0.021	
<i>S</i> -氟虫腈 <i>S</i> -fipronil	2.02 ± 0.19	0.636 ± 0.023	0.398 ± 0.036	0.171 ± 0.063	0.0734 ± 0.0022	0.0659 ± 0.0139	
<i>R</i> -氟虫腈 <i>R</i> -fipronil	2.21 ± 0.18	0.748 ± 0.024	0.418 ± 0.040	0.180 ± 0.064	0.0788 ± 0.0024	0.0690 ± 0.0143	

^a ND; 未检测到.^a ND; not detected.

^b 平均值 \pm 标准偏差, $n=3$.^b mean \pm standard deviation, $n=3$.

2.2 氟虫腈对映体毒代动力学模型的建立

为进一步定量描述氟虫腈外消旋体及其手性对映体在生物体内的积累过程,本文根据生物体内浓度随时间变化建立了夹杂带丝蚓富集水中氟虫腈的毒代动力学模型(图 1, 公式 1),并以此推导得出吸收和消除速率常数(表 3).通过 Scientists 2.01 软件拟合 *rac*-、*S*-、*R*-氟虫腈随时间变化曲线,其相关系数(COD)分别为 0.855、0.896、0.847(表 3),表现出良好的拟合度.*rac*-、*S*-、*R*-氟虫腈的吸收速率常数分别为 297 ± 11 、 313 ± 13 、 $311 \pm 11 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪} \cdot \text{h}^{-1}$,而 *rac*-、*S*-、*R*-氟虫腈的消除速率常数分别为 0.157 ± 0.006 、 0.179 ± 0.008 、 $0.157 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$.

单纯水体暴露下,夹杂带丝蚓对氟虫腈的吸收和消除途径主要是通过表皮的被动交换.本研究表

明,氟虫腈易于通过生物膜进入夹杂带丝蚓体内.当生物被转移到清水中后,氟虫腈迅速消除,这可能与氟虫腈适中的 $\lg K_{ow}$ (4.0) 值有关^[15,17].You 等^[18]估算了水中另一种较强疏水性的当前在用农药(氯菊酯, $\lg K_{ow} = 6.1$)在夹杂带丝蚓中的总消除速率常数(代谢和母体消除之和),其值为 $0.153 \pm 0.084 \text{ h}^{-1}$,该

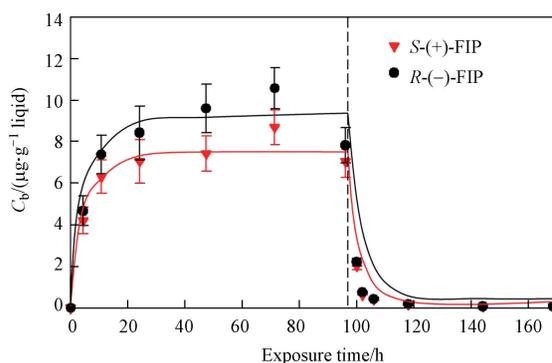


图 1 氟虫腈(FIP)对映体在夹杂带丝蚓体内毒代动力学模拟曲线

Fig.1 Toxicokinetic simulation curves of fipronil (FIP) enantiomers in *Lumbriculus variegatus*.

数据与本文测定氟虫腈在夹杂带丝蚓中的 k_e 值 ($0.157 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$) 非常接近. 与鱼类不同, 化合物在夹杂带丝蚓中的 k_e 值受化合物疏水性的影响很小, 这主要是因为夹杂带丝蚓脂肪含量较低, 具有更大的比表面积和更高的表皮血液循环交换, 使化合物更容易从夹杂带丝蚓体内排出, 而受化合物自身性质限制较小^[19]. 近期研究报道, 氟虫腈从罗非鱼 (tilapia) 体内总消除速率常数 (包含代谢和母体消除) 为 $0.106 \pm 0.020 \text{ h}^{-1}$ ^[11], 说明了氟虫腈从罗非鱼中的消除比从夹杂带丝蚓更慢 ($P < 0.05$), 这与污染物在两种生物表皮被动迁移受生物体特征差异影响密切相关. 此外, 外界环境暴露介质也会影响生物体内污染物的消除. Qin 等^[20] 报道了氟虫腈对映体从赤子爱胜蚓的 k_e 值 (*S*-氟虫腈: 0.015 h^{-1} , *R*-氟虫腈: 0.017 h^{-1}), 该数据比氟虫腈从夹杂带丝蚓中的消除低一个数量级, 但是与沉积物暴露情况下多溴联苯醚从夹杂带丝蚓中消除的速率 (0.009 — 0.015 h^{-1}) 相当^[19]. 与单纯水体暴露不同, 生物从土壤或沉积物中吸收的污染物还需要考虑污染物从土壤或沉积物中的解吸, 以及通过进食途径富集在颗粒物上的污染物在生物体内的消化过程^[16,21].

表 3 氟虫腈外消旋体及其手性对映体在夹杂带丝蚓体内的吸收速率常数 ($k_u \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪} \cdot \text{h}^{-1}$)、消除 ($k_e \text{ h}^{-1}$) 速率常数、半衰期 ($t_{1/2} \text{ h}$) 和生物浓缩因子 (BCF_{ss} 、 $\text{BCF}_{tk} \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$)^a

Table 3 Uptake (k_u) and elimination (k_e) rate constants, half-life ($t_{1/2}$) and bioconcentration factors (BCF_{ss} , BCF_{tk}) of waterborne fipronil enantiomers in *Lumbriculus variegatus*

	k_u	k_e	$t_{1/2}$	COD ^a	$C_{b,ss}$	BCF_{ss}	BCF_{tk}
<i>rac</i> -氟虫腈 <i>rac</i> -fipronil	297±11	0.157±0.006	4.41±0.17	0.855	16.9	1892±76	1892±101
<i>S</i> -氟虫腈 <i>S</i> -fipronil	313±13	0.179±0.008	3.87±0.19	0.896	7.57	1748±81	1748±107
<i>R</i> -氟虫腈 <i>R</i> -fipronil	311±11	0.157±0.006	4.41±0.17	0.847	9.19	1981±107	1981±103

^a: $\text{BCF}_{ss} = C_{b,ss}/C_w$; $\text{BCF}_{tk} = k_u/k_e$

^b: COD: 相关系数. COD: Coefficient of determination.

氟虫腈及其对映体在夹杂带丝蚓体内的积累潜力可以通过 BCF 值表达, 根据稳态时生物体内浓度 (公式 3) 以及通过毒代动力学参数 (公式 4) 计算得到的 *rac*-、*S*-、*R*-氟虫腈的 BCF 值是一致的 (*rac*-、*S*-、*R*-氟虫腈各自的 BCF_{ss} 和 BCF_{tk} 平均值的标准偏差有重叠, 表明 BCF_{ss} 和 BCF_{tk} 值未表现显著性^[22]), 分别为 1892 ± 76 、 1748 ± 81 、 $1981 \pm 107 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$ 和 1892 ± 101 、 1748 ± 107 、 $1981 \pm 103 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$. 两种方式计算出的 BCF 值一致性, 反映了本文构建的一级毒代动力学模型可以有效描述在夹杂带丝蚓体内氟虫腈外消旋体及其对映体浓度随时间变化的生物积累过程. 与氟虫腈在罗非鱼中富集的 BCF 值 (1016 — $1047 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$) 相比^[11], *rac*-氟虫腈在夹杂带丝蚓中的 BCF 值 ($1892 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$) 更高. 考虑到氟虫腈从鱼体中消除速率低于从夹杂带丝蚓中的消除, 可以推断氟虫腈在鱼体的吸收速率小于其在夹杂带丝蚓中的吸收, 这也和前面两种生物特征与被动交换过程的讨论一致. 本研究获得 *rac*-氟虫腈在夹杂带丝蚓中的半衰期为 $4.41 \pm 0.17 \text{ h}$, 比其在罗非鱼的半衰期 ($6.5 \pm 1.9 \text{ h}$) 略小, 但无显著差异 ($P = 0.123$)^[11], 但是却显著小于氟虫腈在虹鳟中的半衰期 ($14.6 \pm 0.7 \text{ h}$) ($P < 0.05$)^[23]. 这些结果反映氟虫腈在夹杂带丝蚓与罗非鱼的体内消除相近, 但是比个体更大的鱼类虹鳟快, 这说明物种差异可导致氟虫腈在不同生物体内消除不同.

氟虫腈生物积累的手性差异而言, 从其两个手性对映体的 BCF 值的显著性差异分析可知: *S*-氟虫腈和 *R*-氟虫腈的 BCF_{ss} (*S*: 1748 ± 81 , *R*: $1981 \pm 107 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$) 和 BCF_{tk} (*S*: 1748 ± 107 , *R*: $1981 \pm 103 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ 脂肪}$) 平均值的标准偏差未重叠, 表明二者显著性不同, 即 *S*-氟虫腈比 *R*-氟虫腈的生物积累能力弱^[22]. 虽然两个对映体的吸收速率常数 (k_u) 之间没有显著性差异 ($P = 0.849$), 但是 *S*-氟虫腈的消除常数 k_e 比 *R*-氟虫腈大 ($P < 0.05$), 导致更多的 *R*-氟虫腈在生物体内积累. 这也导致 *S*-氟虫腈在夹杂带丝蚓体内的半衰期 ($3.87 \pm 0.19 \text{ h}$) 小于 *R*-氟虫腈的半衰期 ($4.41 \pm 0.17 \text{ h}$) ($P < 0.05$). 与本研究相似的, 从对映体分数 (EF) 的变化, 有研究表明在虹鳟 (Rainbow Trout) 体内的 *S*-氟虫腈比 *R*-氟虫腈的积累能力稍弱^[23]. 整体而言, 夹杂带丝蚓对 *R*-氟虫腈的生物积累能力更高, 而这与 *R*-氟虫腈消除较慢有关. 通过毒代动力学参数的定量模拟, 有利于更好解释不同对映体在生物体内手性积累差异的原因.

3 结论 (Conclusions)

本文以手性分子氟虫腈为目标化合物,通过恒定水浓度条件下开展氟虫腈的生物积累实验,探究氟虫腈外消旋体及其手性对映体在夹杂带丝蚓体内的积累量随时间变化的动态过程.通过在对映体层面上建立污染物在夹杂带丝蚓体内的毒代动力学模型,模拟获取吸收和消除速率常数,阐明生物富集的对映体差异的原因.同时,推断氟虫腈对映体在夹杂带丝蚓体内的生物积累主要取决于该生物可从外界水环境中的快速交换能力.本文研究了手性农药在无脊椎动物内的生物积累过程,为明确手性污染物在生物体的选择性,也为水体农药污染导致的毒性评估提供理论支撑.

参考文献 (References)

- [1] LIU W P, GAN J, SCHLENK D, et al. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102: 701-706.
- [2] GUNASEKARA A S, TRUONG T T, GOH K S, et al. Environmental fate and toxicology of fipronil [J]. Journal of Pesticide Science, 2007, 32: 189-199.
- [3] WILSON W A, KONWICK B J, GARRISON A W, et al. Enantioselective chronic toxicity of fipronil to *Ceriodaphnia Dubia* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 54: 36-43.
- [4] QU H, MA R X, LIU D H, et al. The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 312: 169-174.
- [5] OVERMYER J P, ROUSE D R, AVANTS J K, et al. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets [J]. Journal of Environmental Science and Health Part B, 2007, 42: 471-480.
- [6] 刘维屏, 张颖. 手性农药毒性评价进展 [J]. 浙江大学学报, 2012, 38(1): 63-70.
LIU W, ZHANG Y. Progress in potential toxicity of chiral pesticides [J]. Journal of Zhejiang University, 2012, 38(1): 63-70 (in Chinese).
- [7] ASHAUER R, ESCHER B I. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modeling in aquatic ecotoxicology and risk assessment [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2010, 12: 2056-2061.
- [8] WIBERG-LARSEN P, GRAEBER D, KRISTENSEN E A, et al. Trait characteristics determine pyrethroid sensitivity in nonstandard test species of freshwater macroinvertebrates: A reality check [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50: 4971-4978.
- [9] ASHAUER R, JAGER T. Physiological modes of action across species and toxicants: The key to predictive ecotoxicology [J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2018, 20: 48-57.
- [10] U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates [M]. EPA 600/R-99/064. 2nd ed. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2000: 63-71.
- [11] LI H Z, YOU J, WANG W X. Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: Accumulation, biotransformation and elimination [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 360: 420-427.
- [12] LANDRUM P F, LEE H, LYDY M J. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1992, 11: 1709-1725.
- [13] QU H, WANG P, MA R X, et al. Enantioselective toxicity, bioaccumulation and degradation of the chiral insecticide fipronil in earthworms (*Eisenia foetida*) [J]. Science of the Total Environment, 2014, 485-486: 415-420.
- [14] LIU T T, WANG P, LU Y L et al. Enantioselective bioaccumulation of soil-associated fipronil enantiomers in *Tubifex tubifex* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 219-220: 50-56.
- [15] KATAGI T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 204: 1-132.
- [16] KATAGI T, OSE K. Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm [J]. Journal of Pesticide Science, 2015, 40: 69-81.
- [17] MICHEL N, FREESE M, BRINKMANN M, et al. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe [J]. Science of the Total Environment, 2016, 568: 171-179.
- [18] YOU J, BRENNAN A, LYDY M J. Bioavailability and biotransformation of sediment-associated pyrethroid insecticides in *Lumbriculus variegatus* [J]. Chemosphere, 2009, 75: 1477-1482.
- [19] ZHANG B Z, LI H Z, WEI Y L, et al. Bioaccumulation kinetics of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane from field-collected sediment in the oligochaete, *Lumbriculus variegatus* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32: 2711-2718.
- [20] QIN F, GAO Y X, XU P, et al. Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure [J]. Pest Management Science, 2015, 71: 553-561.
- [21] 吕银知, 张芊芊, 赵建亮, 等. 生理毒代动力学模型及其在有机污染物水生生态毒理研究中的应用 [J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 11-26.
LV Y Z, ZHANG Q Q, ZHAO J L, et al. Physiologically based toxicokinetic models and application in aquatic ecotoxicological studies of organic pollutants: A review [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 11-26 (in Chinese).
- [22] SOKAL R R, ROHLF F J, Biometry [M]. 3rd ed. New York, NY, USA: W.H. Freeman and Company, 1995.
- [23] KONWICK B J, GARRISON A W, BLACK M C, et al. Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40: 2930-2936.