

◆ 残留与环境 ◆

牛脂胺聚氧乙烯醚对3种水生生物的毒性研究

邵苗苗^{1,2,3}, 蓝 帅^{1,2}, 宋伟华^{1,2,3}, 袁善奎^{1,2,3*}, 侯玉霞^{3*}

(1. 农业农村部农药检定所, 北京 100125; 2. 农业农村部农药评价重点实验室, 北京 100125; 3. 中国农业大学理学院, 北京 100193)

摘要:在室内条件下测定了牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对斑马鱼、大型溞和羊角月牙藻的急性毒性及对大型溞的繁殖毒性。结果表明,牛脂胺聚氧乙烯醚对供试3种水生生物均有一定的急性毒性效应,毒性等级均为中等毒;对大型溞21 d繁殖毒性NOEC为0.177 mg/L, LOEC为0.248 mg/L。在使用牛脂胺聚氧乙烯醚加工农药制剂的过程中,应关注其对水生生物的潜在风险,以避免或减少其对水生生态系统的危害。

关键词:牛脂胺聚氧乙烯醚;水生生物;急性毒性;慢性毒性

中图分类号:TQ 450.2⁺⁶ 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2024.02.012

Study on the toxicity of polyoxyethylene tallow amine to three aquatic organisms

SHAO Miaomiao^{1,2,3}, LAN Shuai^{1,2}, SONG Weihua^{1,2,3}, YUAN Shankui^{1,2,3*}, HOU Yuxia^{3*}

(1. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China; 2. Key Laboratory of Pesticide Evaluation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China; 3. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The acute toxicities of polyoxyethylene tallow amine (98%) to *Brachydanio rerio*, *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, and its reproductive toxicity to *Daphnia magna* were determined in laboratory. The results indicated that polyoxyethylene tallow amine had median acute toxicity to three tested aquatic organisms. The 21-day reproductive toxicity NOEC for *Daphnia magna* was 0.177 mg/L, and the LOEC was 0.248 mg/L. Therefore, in the process of using the pesticide adjuvant polyoxyethylene tallow amine to process pesticide formulations, attention should be paid to its potential risk to the aquatic organisms, in order to avoid or reduce its hazard to aquatic ecosystems.

Key words: polyoxyethylene tallow amine; aquatic organism; acute toxicity; chronic toxicity

化学农药在保障世界粮食产量和质量安全方面发挥了重要作用,我国已成为农药生产和出口大国。然而,几乎所有化学合成的农药原药都需要添加农药助剂才能成为可用于实际农业生产的农药制剂^[1]。虽然农药助剂本身对靶标生物不具备毒害效应,但其对人体或环境存在潜在危害性^[2]。研究表明,部分农药助剂及其代谢产物可能导致健康问题,包括致癌、致畸、致突变(即“三致效应”),干扰内分泌,影响繁殖能力以及引发神经毒性等健康危害^[3]。目前,我国尚未建立农药助剂登记管理体系,但其在

环境和人体中的暴露风险引发了广泛关注,已成为近年来农药学和农产品安全研究领域的研究热点。

牛脂胺聚氧乙烯醚(POE-tallowamine)是一类广泛应用于草甘膦制剂的农药助剂,具有良好的增效性能。除草甘膦外,其还可以应用于其他除草剂,以及杀虫剂和杀菌剂等。牛脂胺聚氧乙烯醚通过促进农药活性成分穿透叶片角质层而发挥作用,从而增加农药的生物有效性和防治效果^[4]。但其也具有比较突出的缺点,如刺激皮肤和眼睛,对人体细胞存在明显毒性,对鱼类等水生生物具有较高的毒

收稿日期:2023-09-28;修回日期:2024-01-21

作者简介:邵苗苗(1992—),女,安徽宿州人,硕士研究生,主要研究方向为农药生态毒理学。E-mail:18356073727@163.com

通信作者:袁善奎(1976—),男,湖北利川人,博士,研究员,主要从事农药环境风险评估与管理。E-mail:skyan76@sina.com

共同通信作者:侯玉霞(1963—),女,银川人,博士,教授,主要研究方向为农药毒理与生物技术。E-mail:hoyuxia@cau.edu.cn

性,因此,其使用在一定程度上受到限制^[5]。欧洲食品安全局(EFSA)对牛脂胺聚氧乙烯醚的毒性进行了研究,发现在以草甘膦为有效成分的配方中,牛脂胺聚氧乙烯醚的毒性明显大于草甘膦,且牛脂胺聚氧乙烯醚还可能造成DNA损伤^[6]。

草甘膦在我国的用量较大,尤其是在非耕地领域,加之未来转基因耐草甘膦作物的大面积推广应用,草甘膦制剂使用量还会不断增加,释放到环境中的牛脂胺聚氧乙烯醚也将随之增加,其对环境非靶标生物的影响亟待引起关注。本研究测定了牛脂胺聚氧乙烯醚(质量分数98%)对斑马鱼、大型蚤、羊角月牙藻3种水生生物的急性毒性和对大型蚤的繁殖毒性,旨在为评估该助剂的环境安全性提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试物和参照物

供试物为牛脂胺聚氧乙烯醚(质量分数98%),由山东欣广化学有限公司生产。

参照物为重铬酸钾(优级纯)。

1.2 供试生物

斑马鱼(*Brachydanio rerio*),购买于北京宏大高峰水族用品经营部。试验开始前需驯养7~14 d,驯养环境应与试验期间相同,试验水温控制在21~25℃,以红线虫为饲料,每天适量投喂并及时清除鱼缸内粪便及食物残渣。试验前24 h停止喂食,试验选用健康活泼、体长相近的斑马鱼。

大型蚤(*Daphnia magna*),购买于中国科学院水生生物研究所。试验水温18~22℃、光照周期为16 h:8 h,每日用纯种小球藻喂养。试验用蚤选用在实验室内稳定培养3代以上,来源于同一母系且出生时间为6~24 h的非头胎健康蚤,即未出现头胎延迟、体色异常、死亡率高等异常现象。试验期间,无需喂食受试蚤。

羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*),购买于中国科学院水生生物研究所。试验用藻先进行预培养,使羊角月牙藻基本达到同步生长阶段。染毒前,显微镜观察试验用藻,确保藻种无污染,藻细胞形态正常。试验条件:试验温度21~24℃,连续均匀光照,光强4 440~8 880 lx,光照强度差异保持在±15%范围内。

1.3 试验方法

1.3.1 鱼类急性毒性试验

参照GB/T 31270.12—2014《鱼类急性毒性试验准则》^[7],采用静态法进行试验。根据预试验结果,

设置6个浓度梯度进行正式试验,有效成分质量浓度分别为1.036、1.077、1.120、1.165、1.212 mg/L和1.260 mg/L。随机选取大小一致的斑马鱼放入装有试验药液的鱼缸中,同时设置不添加药液的曝气水为空白对照。试验处理和空白对照均不设重复,每组处理10尾斑马鱼,试验溶液体积为5 L,试验期间斑马鱼禁食。试验开始后,在96 h的试验周期内,每日进行试验用鱼的中毒症状和死亡情况的观察和记录,并及时清除死鱼,计算出96 h的斑马鱼半致死浓度LC₅₀及95%置信限。

1.3.2 蚤类急性毒性试验

参照GB/T 31270.13—2014《蚤类急性活动抑制试验准则》^[8],采用静态法进行试验。根据预试验结果,设置7个浓度梯度进行正式试验,有效成分质量浓度分别为0.700、0.980、1.372、1.921、2.689、3.765 mg/L和5.271 mg/L,并设空白对照组。每个处理4次重复,每重复5只蚤,试验药液体积50 mL,试验期间不喂食。试验开始后24 h、48 h定时观察和记录每个容器中试验用蚤活动受抑制个体数及任何异常症状或表现。

1.3.3 藻类生长抑制试验

参照GB/T 31270.14—2014《藻类生长抑制试验》^[9],根据预试验结果设置0.042、0.588、0.823、1.152、1.613 mg/L和2.258 mg/L等6个有效成分质量浓度梯度,并设培养基空白对照。对照组及处理组均设3次重复。三角瓶用无菌培养容器封口膜封口,随机摆放至人工气候箱中,培养箱内温度21~24℃,连续均匀光照,光照强度范围为4 440~8 880 lx,且强度差异保持在±15%范围内。试验观察期为72 h,每隔24 h取样,参照藻类生长抑制法,用分光光度计直接测定各处理藻液在650 nm处的吸光率,计算每个处理的藻细胞数。

1.3.4 大型蚤繁殖试验

参照GB/T 21828—2008《化学品 大型蚤繁殖试验》^[10],采用半静态法,每周更换2次试验药液。根据大型蚤急性毒性结果范围设置正式繁殖试验质量浓度,分别为0.126、0.177、0.248、0.347 mg/L和0.486 mg/L,对照组和处理组均设10次重复,每重复放置1只雌性大型蚤幼蚤,试验药液50 mL,每天喂食小球藻浓缩藻液,试验周期21 d。每24 h观察记录产蚤数,并取出新生幼蚤。试验结束时,对每只存活亲蚤繁殖的存活幼蚤总数进行评价。

1.4 数据统计分析

采用SPSS22.0统计软件计算牛脂胺聚氧乙烯醚

(98%)对斑马鱼、大型蚤和羊角月牙藻的毒力回归曲线方程、 LC_{50} (或 EC_{50})及其95%置信限。依据《化学农药环境安全评价试验准则》(GB/T 31270—2014)中的标准,评估牛脂胺聚氧乙烯醚对上述3种试验生物的毒性等级。针对大型蚤繁殖试验的数据,采用单因素方差分析($P<0.05$)的方法,确定在不同处理条件下产蚤总数的无可观察效应浓度(NOEC)、最低可观察效应浓度(LOEC)。

2 结果与分析

2.1 急性毒性

2.1.1 中毒症状

牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对斑马鱼的急性毒性试验中,试验组斑马鱼中毒初期,身体和鳍动作节奏明显加快,游动速度变快;一段时间后,斑马鱼平衡能力下降,包括侧翻、正面或侧面平躺、游动缓慢或沉于水底,伴随出现鳃部变红、脊柱弯曲等中毒症状,且对外界刺激反应迟钝直至死亡。在大型蚤的急性运动抑制试验中,试验组大型蚤出现游动缓慢、沉于容器底部、身体痉挛、体色发白等中毒症状。在羊角月牙藻的生长抑制试验中,试验组羊角月牙藻藻细胞生长量显著下降,藻液失绿,沉积瓶底,变为黄色,产生絮状物;在显微镜下用血球计数板观察,试验组藻细胞出现破裂、畸形、膨胀变大等症状。随着试验处理浓度的增加,各供试生物中毒

表现症状越明显,而对照组中供试生物无任何明显症状。

2.1.2 急性毒性试验结果

牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对3种水生生物的急性毒性试验结果如表1所示。通过计算出不同暴露时间下的急性毒性终点值,可以看出存在明显的时间效应关系。其中,98%牛脂胺聚氧乙烯醚对斑马鱼96 h的 LC_{50} 为1.158 mg/L,置信限为1.092~1.217 mg/L;对大型蚤48 h的 EC_{50} 为1.558 mg/L,置信限为1.356~1.784 mg/L,毒性等级均为中等毒。这表明在相对短的时间内,较高浓度的牛脂胺聚氧乙烯醚可对斑马鱼和大型蚤产生明显的毒性效应。通过藻类生长抑制率计算得牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对藻72 h的 E_rC_{50} 为2.532 mg/L,置信限为2.074~3.433 mg/L;通过藻类生物量增长抑制率计算得牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对藻72 h的 E_yC_{50} 为0.906 mg/L,置信限为0.814~1.005 mg/L。根据藻72 h的 E_rC_{50} 和藻72 h的 E_yC_{50} 得出,牛脂胺聚氧乙烯醚(98%)对藻72 h的急性毒性均为中等毒。本试验结果表明:农药助剂牛脂胺聚氧乙烯醚对水生生物具有较高的急性毒性,这种较高毒性可能对水体生态系统造成潜在危害,在农药使用中需要谨慎考虑其潜在的环境影响。未来的研究可以进一步深入,以了解牛脂胺聚氧乙烯醚对其他水生生物和生态系统的潜在影响,并制定更有效的环境保护策略。

表1 牛脂胺聚氧乙烯醚对3种水生生物的急性毒性试验结果

水生生物	时间/h	毒力回归曲线方程($y=a+bx$)	R^2	毒性终点值/(mg/L)	95%置信限/(mg/L)
斑马鱼	24	$y=-5.389+57.100x$	0.917	$LC_{50}=1.243$	1.216~1.314
	48	$y=-3.249+40.123x$	0.992	$LC_{50}=1.205$	1.172~1.252
	72	$y=-1.875+26.208x$	0.939	$LC_{50}=1.177$	1.134~1.235
	96	$y=-1.413+22.205x$	0.945	$LC_{50}=1.158$	1.092~1.217
大型蚤	24	$y=-1.900+3.116x$	0.952	$EC_{50}=4.071$	3.303~5.913
	48	$y=-1.118+5.801x$	0.975	$EC_{50}=1.558$	1.356~1.784
羊角月牙藻	24	$y=-0.656+1.457x$	0.988	$E_rC_{50}=2.822$	2.138~4.601
	48	$y=-0.669+1.850x$	0.967	$E_rC_{50}=2.300$	1.892~3.100
	72	$y=-0.807+1.999x$	0.976	$E_rC_{50}=2.532$	2.074~3.433
	24	$y=-0.274+1.575x$	0.987	$E_yC_{50}=1.493$	1.268~1.870
	48	$y=0.058+2.253x$	0.961	$E_yC_{50}=0.943$	0.843~1.052
	72	$y=0.102+2.381x$	0.982	$E_yC_{50}=0.906$	0.814~1.005

2.2 对大型蚤的繁殖毒性

在大型蚤的慢性毒性试验中,试验结束时对照组亲蚤死亡率不超过20%,且对照组每只存活亲蚤所产存活幼蚤的平均值不低于60只,证明了试验的有效性。在试验观察时间内,中毒亲蚤出现沉入水底、

体色发白、游动迟缓等症状。对照组和试验组的产蚤头胎时间都在第8天,从产出第1窝幼蚤开始,每天移除和计数每只亲蚤所产幼蚤数。各处理组平均产蚤量如图1所示。对照组的平均产蚤量明显高于试验组,且试验浓度越高,对亲蚤产蚤量的影响越

显著。

利用SPSS软件进行单因素方差分析,比较各试验与对照组之间繁殖量的差异。结果显示,较低质量浓度组0.126、0.117 mg/L与对照组相比无显著性差异,而较高质量浓度组0.248、0.347、0.486 mg/L则与对照组存在显著性差异,能显著抑制大型蚤的繁殖。牛脂胺聚氧乙烯醚对大型蚤繁殖影响按照每只存活亲蚤所产存活幼蚤总数统计,NOEC为0.177 mg/L,LOEC为0.248 mg/L。这一发现提示,牛脂胺聚氧乙烯醚在较高浓度下可能对大型蚤的繁殖产生显著的负面影响。该结果不仅强调了该农药助剂对水生生物体的潜在危害,同时也明确了在实际农业生产中谨慎使用这类化学物质的必要性。

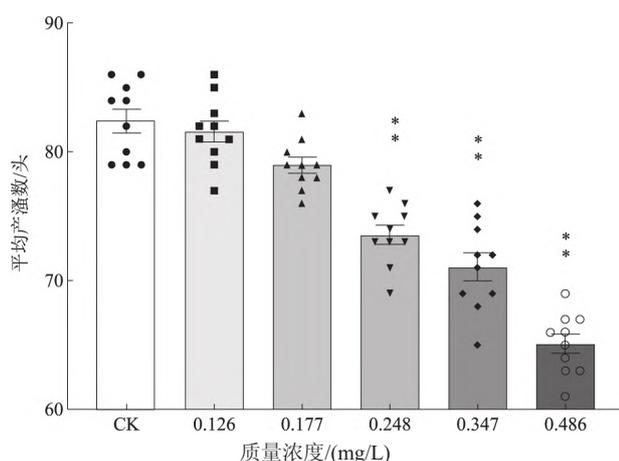


图 1 牛脂胺聚氧乙烯醚 (98%) 对大型蚤的繁殖毒性

2.3 参比试验

供试生物斑马鱼和大型蚤试验前均以重铬酸钾为参照物进行参比试验,斑马鱼的参照物试验结果 LC_{50} (24 h) 为276.959 mg/L,符合标准200~400 mg/L要求,95%置信限为216.627~364.330 mg/L;重铬酸钾对大型蚤的参比试验结果 EC_{50} (24 h) 为0.813 mg/L,符合标准0.6~2.1 mg/L要求,95%置信限为0.701~0.960 mg/L。参比试验结果均满足标准规定。

3 结论与讨论

在对农药的环境安全性评估方面,既往研究大多关注于有效成分的毒性,而忽视了农药助剂的毒性。近年来,随着全社会对环保要求的日益重视,农药助剂对环境和人体的暴露风险引起了更加广泛的关注。作为草甘膦制剂产品中广泛使用的农药助剂,牛脂胺聚氧乙烯醚用量约占草甘膦制剂的3%~18%,且其毒性比活性成分草甘膦大^[11-12];此外,牛脂

胺聚氧乙烯醚在其他行业应用也很广泛,如塑料、纺织、涂料等行业^[9]。因此,对于牛脂胺聚氧乙烯醚毒性的研究应引起重视。

本研究主要测试了牛脂胺聚氧乙烯醚 (98%) 对3种水生生物的急性毒性和对大型蚤的繁殖毒性。急性毒性结果显示,牛脂胺聚氧乙烯醚对3种水生生物的毒性等级均为中等毒;大型蚤繁殖毒性结果显示,牛脂胺聚氧乙烯醚对大型蚤的繁殖具有抑制作用。鉴于牛脂胺聚氧乙烯醚对水生生物表现出的较高毒性,应对其使用采取相应管控措施。针对牛脂胺聚氧乙烯醚的使用,部分国家和地区已对其制定了严格的管控措施,如法国已于2016年禁止使用含牛脂胺聚氧乙烯醚的草甘膦制剂,美国和加拿大也分别规定除草剂中牛脂胺聚氧乙烯醚的用量不得超过25%和20%,同时欧盟已将其列入农药助剂的负面清单^[5]。而我国农药助剂的管理起步相对较晚,农业农村部农药检定所2015年起草的《农药助剂禁限用名单》(征求意见稿)列出了部分禁用助剂和限用助剂名单,尚未对牛脂胺聚氧乙烯醚制定相应的管理措施,建议在农药制剂研发过程中密切关注牛脂胺聚氧乙烯醚对水生生物的影响。

参考文献

- [1] 姜锦林,单正军,程燕,等.常用农药助剂类产品对水生生物效应研究进展[J].生态毒理学报,2017,12(4):45-58.
- [2] 卜元卿,王咎畅,智勇,等.农药制剂中助剂使用状况调研及风险分析[J].农药,2014,53(12):932-936.
- [3] MARK G, ARPAD S, THERACAD R. Tiered approach for exposure and risk assessment of inert ingredients in pesticide product formulations [J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2019, 258.
- [4] BEDNAROVA A, KROPF M, KRISHNAN N. The surfactant polyethoxylated tallowamine (POEA) reduces lifespan and inhibits fecundity in *Drosophila melanogaster*- in vivo and in vitro study [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 188: 109883.
- [5] 李敏洁,张琛,李晓慧,等.农药助剂牛脂胺聚氧乙烯醚的毒性及其分析技术研究进展[J].农药学报,2023,25(2):310-318.
- [6] EFSA. Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine[J]. EFSA Journal, 2015, 13(11): 3-10.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.化学农药环境安全评价试验准则第12部分:鱼类

(下转第 79 页)

基质效应的常用方法,可采用基质标样溶液校正降低基质效应对测定结果的影响^[13-14]。

表5 方法基质效应 ($n=6$)

农药	质量浓度/(mg/L)	基质效应/%	标准偏差	RSD/%
噻嗪酮	0.001	118.7	5.56	4.69
	0.005	96.3	1.47	1.53
	0.010	90.9	1.42	1.57
	0.050	84.6	0.52	0.61
	0.100	82.4	0.41	0.49
三环唑	0.001	121.1	14.09	11.63
	0.005	89.8	4.39	4.89
	0.010	80.3	2.44	3.04
	0.050	72.2	0.93	1.29
	0.100	71.1	2.82	3.97

3 结论

试验采用超高效液相色谱-串联质谱测定桑叶中噻嗪酮和三环唑的残留量,并采用基质标样溶液校正,降低基质效应对测定结果的影响。结果显示:在该试验条件下,噻嗪酮和三环唑峰型良好,基质对其测定干扰小,均可获得较强的离子峰强度。2种农药在质量浓度0.000 1~0.10 mg/L范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均大于0.999。在空白桑叶中分别添加0.001、0.005、0.01、0.05、0.10 mg/kg 5个质量分数标准溶液,方法平均回收率为91.7%~104.5%,相对标准偏差为1.55%~7.30%,方法精密性相对标准偏差为1.31%~8.46%。该方法灵敏度高,准确度高,适用于桑叶中噻嗪酮和三环唑残留量的测定。

参考文献

[1] 何宁佳,向仲怀. 桑树基因组[M]. 北京:中国林业出版社,2016:

16-29.

[2] 刘明鲁,张建平,张雅秋,等. 桑树资源多元化开发与利用[J]. 蚕桑茶叶通讯,2018(3): 13-14.

[3] 尹志亮,王敏,吴繁强,等. 桑叶的功效及食用化开发对策[J]. 蚕桑茶叶通讯,2011(6): 5-6.

[4] 彭宝莹,唐娇,王进博,等. 桑叶安全性及保健功能评价研究进展[J]. 中国现代中药,2021,23(2): 389-394.

[5] 陈淑莹,侯小涛,黄显婷,等. 桑叶化学成分、药理作用及应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2023,25(4): 207-220.

[6] 张美华,陈伟国. 桑园农药登记现状与发展建议[J]. 蚕桑通报,2022,53(1): 26-32.

[7] 青学刚,李文学,陈宝瑞,等. 四川近年典型蚕病事件分析与对策[J]. 四川蚕业,2019,47(1): 44-47.

[8] 孙海燕. 47种杀虫剂产品推荐浓度对家蚕的毒性试验结果摘要[J]. 四川蚕业,2015,43(4): 52-53.

[9] 丁小娟,李俊,陈惠蓉,等. 杀虫剂噻嗪酮对家蚕残毒性试验调查[J]. 四川蚕业,2023,51(2): 53-55.

[10] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Analytical Chemistry, 2003, 75(13): 3019-3030.

[11] 张鹏翔. 色谱分析中的检出限和测定下限及其确定方法[J]. 内蒙古科技与经济,2009(6): 62-63.

[12] 向平,沈敏,卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. 分析测试学报,2009,28(6): 753-756.

[13] 苏萌,艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(2): 511-515.

[14] MEI H, HSIEH Y, NARDO C, et al. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003, 17(1): 97-103.

(编辑:顾林玲)

(上接第74页)

急性毒性试验: GB/T 31270.12—2014[S]. 北京:中国标准化出版社,2014.

[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 化学农药环境安全评价试验准则 第13部分: 藻类急性活动抑制试验: GB/T 31270.13—2014[S]. 北京:中国标准化出版社,2014.

[9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 化学农药环境安全评价试验准则 第14部分: 藻类生长抑制试验: GB/T 31270.14—2014[S]. 北京:中国标准化出版

社,2014.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 化学品 大型蚤繁殖试验: GB/T 21828—2008[S]. 北京:中国标准化出版社,2008.

[11] MESNAGE R, ANTONIOU M N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides[J]. Front Public Health, 2017, 5: 361.

[12] 杜勤惠,孙道远. 草甘膦除草剂表面活性剂的毒性[J]. 中国工业医学杂志,2018,31(5): 368-371.

(编辑:顾林玲)