

# 丙硫磷对乙酰胆碱酯酶的抑制能力 及其毒力与药效研究\*

夏春胜 朱正昌

**摘要** 以两种对称型有机磷杀虫剂倍硫磷和敌敌畏为对照,利用 Ellman 法测定了不对称有机磷杀虫剂丙硫磷(Prothiofos)对体外乙酰胆碱酯酶(AchE)的抑制能力,并对褐刺蛾(*Setora postornata* Hampson)进行了3种杀虫剂的触杀毒力测定和野外药效试验。结果表明,丙硫磷为弱的 AchE 体外抑制剂,酶抑制能力与毒力和药效间无相关性,抑制能力最差的丙硫磷对褐刺蛾幼虫毒力最强,野外药效也最好。说明丙硫磷的三元不对称结构和特殊的毒效基团与其高效低毒的特点之间可能有着密切的联系。

**关键词** 丙硫磷、乙酰胆碱酯酶、毒力、药效、褐刺蛾

森林生态系统的特殊性使森林害虫羽化期多不整齐,大发生时危害时间长,给防治工作造成许多困难。现有的有机磷及其它化学杀虫剂多为持效期较短,需要在害虫危害期内多次施药,累积用药量大;而持效期长的有机氯杀虫剂在环境中难于降解,易在生物体内富集,给环境和人类健康造成不良后果;另外,由于许多害虫已对现用杀虫剂产生了不同程度的抗性,大大降低了药剂使用效果。因此,研究开发高效、低毒、具一定持效期、在生物体和自然界易于降解,且具有克服害虫抗药性的杀虫剂是森林保护工作的迫切任务。结构不对称的有机磷杀虫剂丙硫磷就是极有前途的替代品种。

丙硫磷原为西德拜耳公司与日本特殊农药公司合作生产,近年引起我国同行注意。其化学结构突破了传统有机磷杀虫剂的模式,使其不仅高效、低毒、持效期长,而且对已产生抗性的许多害虫特别有效<sup>[1]</sup>。目前,国内尚未见有关丙硫磷的应用研究报告。为使这一优良杀虫剂能尽快在森林害虫防治上发挥作用,笔者就丙硫磷对乙酰胆碱酯酶的体外抑制能力、对褐刺蛾幼虫的毒力及药效进行了研究,为弄清其杀虫机理提供依据,以便指导剂型研制与应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 药剂 95.6%丙硫磷原油(江苏农药研究所);89.5%倍硫磷原油(浙江黄岩农药厂);92%敌敌畏原油(上海农药厂)。

1.1.2 试剂 毒扁豆碱(Fluka 公司),纯度 99%,配成 1 mg/mL 液;硫代乙酰胆碱(Carl Roth KG 公司),配成  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 液;显色剂二硫双对硝基苯甲酸(DTNB)(东风生化试剂厂),配成  $4 \times 10^{-3}$  mol/L 液;0.1 mol 磷酸缓冲液(pH7.2),可作上述试剂的溶剂。

1994-09-02 收稿。

夏春胜讲师,朱正昌(南京林业大学 南京 210037)。

\* 本文为南京林业大学科研发展基金研究课题“不对称有机磷杀虫剂的开发与应用研究”的一部分。酶抑制试验得到南京农业大学昆虫生理毒理室老师的指导;江苏农林厅王习保、南京林业大学周贤军等同志参加部分试验,特此致谢。

1.1.3 试虫 象蝇成虫(南京农业大学培养并提供);褐刺蛾幼虫(采自南京林业大学树木园)。

1.1.4 主要仪器 匀浆器;冰冻离心机;751G型分光光度计。

## 1.2 试验方法

1.2.1 酶源制备 将家蝇置于低温冰箱速冻至死,用预冷缓冲液冲洗干净,迅速剪取家蝇头部,置于预冷的匀浆器中,约6~7个家蝇头加1 mL预冷缓冲液,冰浴匀浆,将匀浆液转入4 000 r/min离心机,离心15 min,取上清液置冰浴上备用。

1.2.2 抑制剂对AChE的抑制能力测定 参考Ellman的硫代乙酰胆碱——二硫双法(简称Asch-DTNB法)<sup>[2]</sup>,稍加改进后进行AChE残余活力测定。具体操作步骤为:将供试药剂配成5个浓度,每浓度设2次重复。在各试管中依次加入磷酸缓冲液2.2 mL,底物硫代乙酰胆碱0.5 mL,抑制剂(杀虫剂)0.3 mL,摇匀并平衡5 min,加入酶液0.5 mL,摇匀,于30℃下严格保温30 min,再加入终止剂毒扁豆碱3滴终止反应,用不同含量的抑制剂各0.3 mL将各管抑制剂补充为相同浓度,以消除抑制剂本身颜色对吸光率的影响,之后加入显色剂0.5 mL,摇匀,在721 G型分光光度计上测定各管在412 nm光波处的光密度OD值。试验同时各设一个空白处理和一个对照处理。空白处理为在加入酶液前加入终止剂,其余各步同上,用于调光密度OD值至零点;对照处理为酶与底物作用30 min后,再加入终止剂终止作用,之后加入抑制剂,其余各步同上,其OD值表示酶活力100%,也即未被抑制剂抑制时的酶活力。各处理对酶的抑制率按下式计算:

$$\text{抑制剂对酶的抑制率(\%)} = \frac{\text{对照管 OD 值} - \text{处理管 OD 值}}{\text{对照管 OD 值}} \times 100\%$$

将抑制率转换成机率值(Y),抑制剂浓度换算成对数值(x),求回归方程 $Y = a + bx$ ,据此求得各抑制剂对AChE的抑制中浓度 $I_{50}$ 。

1.2.3 毒力测定 采用FAO推荐的点滴法进行。将各杀虫剂配成5个浓度的丙酮液,用定量毛细管点滴于褐刺蛾4龄幼虫的前胸背面,每头虫1  $\mu$ L,每个处理20头虫,重复3次,以分析纯丙酮处理作对照。检查24 h试虫死亡情况,用Abbot's公式求校正死亡率,以Finney机率值<sup>[3]</sup>用计算机求剂量对数——死亡机率值回归直线方程、 $LD_{50}$ 及95%置信限。

1.2.4 药效试验 将各杀虫剂配成含量一定的乳油,然后均稀释成有效含量的2 500倍。野外选择樱花树枝,接4龄褐刺蛾幼虫于叶背,并用同样方式均匀喷洒药液于各接虫枝叶,使各处理受药量尽可能一致。套上尼龙网,每笼30头虫,每处理重复3次,另设一对照,用清水处理后套笼。24 h后检查死亡情况,计算校正死亡率。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种药剂对AChE的体外抑制能力

通过测定数据换算处理,得到3种药剂对家蝇头AChE的体外抑制效果(表1),表1可知,

表1 3种药剂对家蝇头AChE的抑制效果

药剂名称	剂量对数—抑制机率值回归方程	相关系数	抑制中浓度 $I_{50}$ (M/L)
丙硫磷	$Y = 7.3113 + 0.6480x$	0.992	$2.7113 \times 10^{-4}$
倍硫磷	$Y = 7.1221 + 0.5720x$	0.992	$1.9500 \times 10^{-4}$
敌敌畏	$Y = 8.1199 + 0.4902x$	0.997	$2.3195 \times 10^{-7}$

丙硫磷和倍硫磷在体外抑制 AchE 的能力相当,大大低于敌敌畏。据回归直线斜率值  $b$  比较知,在可抑制范围内,丙硫磷浓度变化最小,对 AchE 的敏感性增强速度最快;斜率  $b$  值最小的敌敌畏正好相反,尽管在极低浓度下就能对 AchE 产生一定程度的抑制作用,但随着浓度的增加,敌敌畏对 AchE 的抑制率增加速率最小;倍硫磷则居两者之间。

## 2.2 毒力测定

将测定数据处理后得表 2。由表 2 知,丙硫磷对褐刺蛾的触杀毒力最强,倍硫磷最弱。这一顺序与 3 种药剂对体外 AchE 的抑制能力并不一致。酶抑制能力比丙硫磷高出 1 000 余倍的敌敌畏,其毒力却是前者的约 1/3。酶抑制能力略强于丙硫磷的倍硫磷,其毒力也不及丙硫磷的 1/3,然后两者间的酶抑制力与毒力的相对差距远不如前两者间的显著。

表 2 3 种药剂对褐刺蛾幼虫的毒力回归方程与  $LD_{50}$

药剂名称	毒力回归方程	$LD_{50}(\mu\text{g}/\text{头})$	95%置信限
丙硫磷	$Y=4.6572+2.0164x$	1.4792	1.3411~1.6173
倍硫磷	$Y=3.8869+1.5381x$	5.2934	4.6759~5.9111
敌敌畏	$Y=4.0745+1.4783x$	4.2272	3.7182~4.7362

比较 3 种药剂对褐刺蛾幼虫的毒力回归线的斜率值知,倍硫磷与敌敌畏的相差很小,说明褐刺蛾幼虫群体对两者的敏感性差异程度相近;而丙硫磷毒力回归线的斜率是前两者的 1.3 倍左右,说明褐刺蛾幼虫群体对丙硫磷的敏感性差异程度较前两种药剂的小。

另据观察,3 种药剂对褐刺蛾幼虫的致死速度也不同,敌敌畏的致死速度明显快于丙硫磷和倍硫磷,幼虫在受药后 5~6 h 即出现大量死亡,而后两药剂在施药 5~6 h 后仅有少量幼虫死亡,大量死亡则发生在施药 10 h 以后。

## 2.3 药效试验

野外套笼药效试验结果见表 3,从表 3 看出,3 种药剂的药效试验结果与其毒力大小趋势一致,即致死中浓度最低的丙硫磷药效最好;致死中浓度最高的倍硫磷药效最差;致死中浓度略低于倍硫磷的敌敌畏效果明显好于倍硫磷,这可能与野外较高的气温(36 ℃)使敌敌畏的杀虫效果得到增强有关。另外,本药效试验测得的是各药剂触杀与胃毒的联合作用效果,毒力测定时所测的仅是触杀毒力,而供试的 3 种药剂均兼具触杀与胃毒作用。因此说,毒力与药效间的一致性只是一种趋势,它们分别代表了各药剂不同作用方式的含义。

表 3 3 种药剂乳油 2 500 倍液对褐刺蛾幼虫的药效

药剂名称	试验虫数(头)	死亡虫数(头)	死亡率(%)	校正死亡率(%)
丙硫磷	90	76	84.4	82.7
倍硫磷	90	62	68.9	65.4
敌敌畏	90	69	76.7	74.1
对照	30	3	10.0	—

## 3 问题讨论

到目前为止的昆虫毒理学研究成果表明<sup>[4]</sup>,有机磷杀虫剂在昆虫体内的作用,主要是抑制乙酰胆碱酯酶的活性而引起昆虫中毒死亡。但不同的药剂与 AchE 产生磷酸化作用的情况也

不一样,据资料推测<sup>[5]</sup>,敌敌畏在极低浓度下就开始对 AchE 产生一定的抑制作用,可能是其结构中 P=O 键的氧原子与酶容易以氢键结合,促进磷酸化反应,而倍硫磷与丙硫磷属于硫代磷酸酯类,其结构中 P=S 键的硫原子电负性低,不易与酶的活性部位形成氢键,因此,进行磷酸化反应较慢,表现为对体外 AchE 的抑制能力较 P=O 型磷酸酯弱得多。

丙硫磷和倍硫磷对体外 AchE 的抑制能力均很弱,但毒力测定结果说明,两者在昆虫体内对 AchE 的抑制力却很强,分别高于和略低于敌敌畏。这里除了 3 种杀虫剂在脂肪和水中溶解度所具差异而影响各自的表皮穿透速度外,丙硫磷和倍硫磷进入虫体后进行氧化活化而变成强的 AchE 抑制剂,可能是更重要的原因<sup>[5]</sup>。当然也不能排除两者还能对昆虫体内其它酶系产生作用而导致中毒死亡的可能性<sup>[6]</sup>。

丙硫磷对体外 AchE 的抑制能力很弱,可能是其对人畜低毒的一个重要原因。日本学者研究认为<sup>[7]</sup>,一般有机磷药剂对昆虫和哺乳动物的毒性,与它们的 AchE 抑制能力之间有平行关系。O'Brien<sup>[8]</sup>也认为 P=S 型化合物在体内被氧化成 P=O 型化合物需要一段时间,在此时间内,哺乳动物的解毒酶系统(如磷酸酶、羧酸酶等)可将磷酸酯毒剂解毒而失效。因而他认为,P=S 键是选择性杀虫剂必备的条件之一。所试 3 种药剂对哺乳动物毒性试验资料<sup>1)</sup>表明,敌敌畏属高毒品种,倍硫磷为中等毒性,丙硫磷为低毒品种,这与 3 种药剂体外抑制 AchE 的能力大小呈正向平行关系。从该意义上看,丙硫磷是一种高效低毒的选择性杀虫剂。

丙硫磷对 AchE 的体外抑制能力略低于倍硫磷,但其对褐刺蛾幼虫的触杀毒力却是后者的 3 倍多,其野外药效试验也表现出明显的优越性。两者在化学结构上均属硫代磷酸酯类,均具 P=S 键,所不同的是丙硫磷具三元不对称的化学结构和独特的正丙硫基,这可能是其对鳞翅目幼虫褐刺蛾特别有效的重要原因。

综上所述,不对称型有机磷杀虫剂丙硫磷较之传统的对称型有机磷杀虫剂有许多突出特点,是极有前途的替代品种,特别适合羽化期不整齐、危害周期长的许多森林害虫的防治需要。因此,对该杀虫剂剂型开发(包括复配制剂)、持效期与残留动态、异构体拆分及毒理研究及其对重要森林害虫的毒力测定与药效试验等,均是开发、利用这一优良杀虫剂的重要课题,值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Bayer pflanzenschutz leverkusen. Tokuthion, Technical Information, 1978.
- 2 Ellaman G. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7: 88~95.
- 3 Finney D J. Probit analysis. London: Cambridge Univ. Press, 1971.
- 4 张宗炳,冷欣夫,刘珣,等. 杀虫药剂毒理及应用. 北京:化学工业出版社,1993. 68~80.
- 5 Bergmann F. Effect of pH on the activity of eel esterase towards different substrates. *Biochem. Jour.*, 1958, 68: 493~499.
- 6 Drabek J. O-芳基 O-烷基 S-烷基硫代磷酸酯类的合成和性质. 农药工业译丛, 1979, (6).
- 7 沙家骏整理. 有机磷光学异构体的合成、生理活性和代谢. 农药工业, 1979, (5).
- 8 龚坤元,刘珣,熊尧,等. 杀虫药剂与昆虫毒理进展. 北京:科学出版社,1964. 37~71.

1)中国农药工业协会. 农药出口产品目录. 1990.

## Studies on the Inhibition of Prothiofos to Acetylcholinesterase and Its Toxicity and Field Effect to *Setora postornata*

Xia Chunsheng    Zhu Zhengchang

**Abstract** A comparison was made between symmetrical organic phosphorus insecticides fenthion and dichlorvos. This paper studied the inhibition effect of structure unsymmetrical organic phosphorus insecticide prothiofos to acetylcholinesterase (AchE) by means of Ellman's method, then measured the touching toxicity and field effect of the three insecticides to the larva of *Setora postornata*. The result shows that the inhibition of prothiofos is the weakest to AchE of house-fly, but its toxicity is the strongest to the larva of *Setora postornata* and its field effect is also the best among the three insecticides. The study indicates that there is probably a relationship between the characteristics of higher effect and lower toxicity of prothiofos and its unsymmetrical structure and unique toxicity effect.

**Key words** Prothiofos, Acetylcholinesterase (AchE), toxicity, field effect, *Setora postornata*

Xia Chunsheng, Lecturer, Zhu Zhengchang (Nanjing Forestry University Nanjing 210037).

### 《中国主要竹材微观构造》评介

中国林业科学研究院环境与生态研究所腰希申等同志, 30 多年来, 采集了 33 属 71 种竹材标本, 进行了深入的剖析研究, 撰写成《中国主要竹材微观构造》一书。最近由大连出版社出版。竹子花期短, 以致形态学特征极不稳定。因此, 传统的以花果等生殖器官为依据的植物学分类方法很难用于竹子。竹子的鉴别与分类成一项世界性难题。

1964 年, 朱惠方、腰希申首次提出了竹子维管束分为断腰型、紧腰型、开放型、半开放型四种类型。进入 80 年代末 90 年代初, 腰希申等同志在已有研究的基础上, 采用独特的炭化制样新方法, 利用先进的扫描电子显微镜, 对我国 33 个属 71 种竹材的微观、超微观结构及其组织比量进行了深入系统的研究。汇编出竹材微观、超微观结构图谱 670 余幅。图谱图像清晰, 立体感强, 描述逼真准确, 具有极高的科学价值。同时他们还对竹材维管束的不同类型及其解剖特征进行归纳分类和综合比较, 列出竹材各属的特征检索表, 为竹种的分类与鉴别提供了科学的依据和方便条件。

《中国主要竹材微观构造》一书的出版, 引起了国内外有关专家的高度重视。吴中伦教授称赞该书“是一本迄今为止最完善的中国竹材微观构造论著”。著名林学专家王恺先生认为该项研究在我国居领先地位。台湾大学教授吴顺昭先生盛赞: “本书对我国竹类解剖构造之研究既深且广, 实为不可多得之书籍。学术性及实用性之价值层面均高, 足以傲视国内外, 其在解剖学之地位也居于领先”。中国文物研究所的专家根据本书, 对汉墓出土的《孙子兵法》竹简, 秦墓出土的睡虎地秦简、马王堆汉墓出土的竹简与竹篮, 湖北曾侯乙墓出土的竹席等竹质文物进行了分析鉴定, “根据不同品种和类型总结出一套科学的保护办法, 使许多极为珍贵的古代文物, 得以妥善保护, 为国际文物保护界的专家所公认, 得到好评”。

本文荣获中共中央宣传部、国家新闻出版署和中国图书评论学会评选的第八届“中国图书奖”。

(购书地址: 大连市中山区大公街 22 号大连出版社 邮编: 116011 电话: 3621170)

(许文彦)