

有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶 选择性抑制的研究*

余孝颖

(中国科学院地球化学研究所, 贵阳 550002)

摘要 用酶电极法研究了有机磷农药对 3 种不同生物来源的乙酰胆碱酯酶(AchE)的选择性抑制, 发现敌敌畏对家蝇的 AchE 抑制最强, 电鳐次之, 鸡肝最弱. 同时研究了 5 种农药对电鳐 AchE 的选择性抑制能力, 发现 9.8×10^{-8} mol/L 的辛硫磷即可抑制其活性的 10%. 给出了各种农药的检出限. 实验还证明在 20—45℃ 内温度对固定化 AchE 活性的影响不大, 讨论了影响其活性的最佳 pH 值, 离子强度和产生选择性抑制的机制.

关键词 有机磷农药, 胆碱酯酶, 选择性抑制, 酶电极.

有机磷农药杀虫的主要机制是抑制昆虫体内的胆碱酯酶等酶系的活性, 引起神经系统中毒而亡. 同时, 有机磷农药也能抑制哺乳动物和人的胆碱酯酶, 造成人畜中毒. 不同生物来源的 AchE 在结构上有一定的差异, 因而受有机磷抑制时, 表现出不同的选择性. 利用这种选择性, 可以建立监测农药污染的高效特异方法. 笔者采用生物传感器, 将不同生物来源的 AchE 与牛血清白蛋白一起通过戊二醛共价交联、固化到 pH 电极上, 制成 3 种 AchE 电极, 用它来研究有机磷对固化了的、不同生物来源 AchE 的选择性抑制, 为寻找检测不同有机磷农药的最佳酶源, 为研究农药使用的增效性等提供一些新方法和依据.

1 实验材料和方法

电鳐 AchE 按文献[1]提取, 家蝇、鸡肝 AchE 按文献[2]提取. 牛血清白蛋白(Fluka 公司), 溴化乙酰胆碱(化学纯, 上海试剂三厂), 戊二醛(25%, 进口分装); 敌敌畏, 辛硫磷, 敌百虫, 乐果, 叶蝉散 5 种有机磷和氨基甲酸酯类农药.

HM-5ES 型 pH 计(日本产), HITACHI-056 型记录仪(美国 PE 公司), 电磁搅拌器(上

海司东仪器厂), 232 型玻璃电极, 222 型甘汞电极(上海电光器件厂).

按文献[3]所述的方法制备电鳐、家蝇和鸡肝 3 种 AchE 电极, 并用这 3 种电极来检测敌敌畏对它们的抑制率, 然后用电鳐 AchE 电极来检测敌敌畏、辛硫磷、敌百虫、乐果和叶蝉散 5 种农药对它的抑制率. 同时还做了温度、离子强度和 pH 值对 AchE 电极活性影响的实验.

2 结果与讨论

2.1 影响选择性抑制的因素

(1) 酶分子结构的影响 表 1 是敌敌畏抑制 3 种不同生物来源 AchE 的测定结果. 从表 1 中可以看出, 相同浓度的敌敌畏, 对家蝇的 AchE 抑制最强, 对电鳐次之, 对鸡肝最弱.

表 1 敌敌畏抑制 3 种不同来源 AchE 的测定结果

酶来源	敌敌畏浓度/mol · L ⁻¹	抑制率/%
电鳐	5×10^{-7}	12
家蝇	5×10^{-7}	25
鸡肝	5×10^{-7}	7

* 国家自然科学基金和贵州省科学基金资助项目

收稿日期: 1995-11-20

结果说明不同种属动物的 AchE 分子类型之间存在着一定差异, 但各种动物的 AchE 都含有一个活性中心, 它由 3 个部位组成^[4], 即催化部位(脂动部位)、季铵基结合部位(阴离子部位)和空间异构部位(疏水性区域), 后 2 个部位主要是固定底物, 使其接近催化部位. 而催化部位, 含有活性中心丝氨酸以及在立体结构上与之相距很近的组氨酸咪唑基功能团^[5], Krupka^[6]等认为催化机制很可能是丝氨酸上的羟基被邻近组氨酸上的咪唑基激活, 形成氢键, 使丝氨酸的氧上产生部分负电荷, 由它对底物上的羰基或抑制剂上的磷酰基进行亲核进攻, 这样形成的乙酰化丝氨酸能迅速水解, 即酶络合物又将酶释放出来. 当有机磷与底物乙酰胆碱分子结构相似时, 会竞争酶的活性中心, 不同的是乙酰化的 AchE 会迅速水解, 把酶释放出来; 而磷酰化的 AchE 却很难水解, 使酶处于受抑制状态; 所以, 影响选择性的第一个因素, 是酶的分子结构, 是酶与抑制剂的亲和力, 即酶与抑制剂“吻合”的程度. 它主要受阴离子部

位和空间构象部位的影响. 已知昆虫 AchE 的阴离子部位与酯动部位的距离与哺乳动物的不一样, 如图 1 所示. 因而一些有间烷基的抑制剂(如倍硫磷等), 对昆虫 AchE 酯动部位的亲和力比哺乳动物强, 表现出抑制昆虫酶的选择性高于哺乳动物^[7].

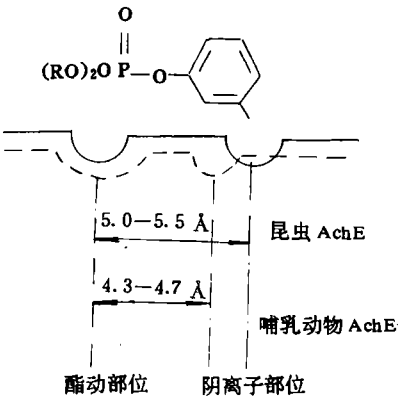


图 1 昆虫和哺乳动物 AchE 的阴离子部位与酯动部位的距离

(2) 抑制剂分子结构的影响

表 2 5 种农药对电鳗 AchE 的抑制结果

有机磷种类	分子类型	抑制剂浓度/mol·L ⁻¹ 检出限	抑制率/%	抑制是否可逆
敌敌畏	磷酸酯	5×10 ⁻⁷	10	不可逆
敌百虫	磷酸酯	6.4×10 ⁻⁵	10	不可逆
辛硫磷	胍类硫逐磷酸酯	9.8×10 ⁻⁸	10	不可逆
乐果	硫逐硫赶磷酸酯	2×10 ⁻⁶ (氧化后抑制)	10	氧化后不可逆
叶蝉散	氨基甲酸酯	8.5×10 ⁻⁵	10	可逆

表 2 是 5 种农药对电鳗 AchE 的抑制结果. 从表 2 可以看出, 不同分子类型的有机磷和氨基甲酸酯类农药对同一种 AchE 的抑制浓度是很不一样的, 氨基甲酸酯类农药叶蝉散对电鳗 AchE 的抑制能力最弱, 而且抑制是可逆的. 硫逐硫赶磷酸酯类如乐果次之, 需要用溴水氧化后才能抑制 AchE, 但辛硫磷是一个例外, 它虽属于硫逐磷酸酯类, 可是因为含有胍基, 选择毒性大大增加, 并且抑制是不可逆的, 用活化剂 2-PAM 解磷啶也无法使其活性恢复. 磷酸酯类的敌百虫抑制能力更强一些, 它在碱性溶液中很容易转变成抑制能力很强的敌敌畏. 而磷酸酯类的敌敌畏, 抑制能力最强, 对 AchE

表现出很高的抑制选择性. 引起这种选择性的原因, 主要是抑制剂的分子类型, 各个基团的功能和分子的结构. 分子结构不同, 除了影响与酶活性中心的亲和力之外, 也影响对酶酯动部位丝氨酸羟基的磷酰化能力, 对同一种 AchE 来说, 抑制剂的磷酰化能力越强, 选择性抑制能力越高. 磷酰化能力主要受抑制剂电子因子的影响.

2.2 影响 AchE 电极活性的因素

温度对 AchE 电极活性的影响见图 2, 从图 2 中可以看出, 与以往游离态(液态)AchE 分解底物需 37℃保温的报道不同, 实验发现, 在 20—45℃内温度对固化了的 AchE 活性影响不大,

超过 45℃ 酶活性下降。

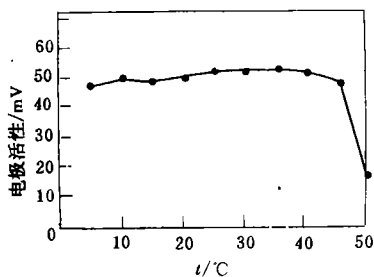


图 2 温度对固化 AChE 活性的影响

图 3 是 pH 值和离子强度对固化 AChE 活性的影响。实验表明, 磷酸盐缓冲液 pH 值为 9.0, 离子强度为 0.01 mol/L, 底物浓度为 10^{-3} mol/L 时酶电极活性最高。但许多农药在碱性溶液中易分解, 故缓冲液 pH 选在 8.4 左右。因有机磷抑制 AChE 的机制是与底物乙酰胆碱一起竞争酶的活性中心, 所以底物浓度不宜过大, 实验表明选择乙酰胆碱浓度为 10^{-3} mol/L 较合适。

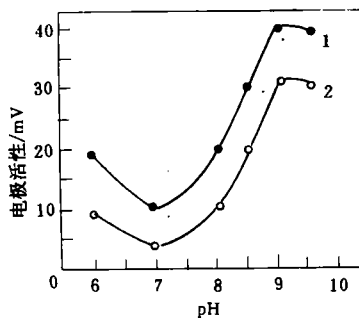


图 3 pH 值和离子强度对固化 AChE 活性的影响

1. 缓冲液离子强度 0.01 mol/L,
2. 缓冲液离子强度 0.02 mol/L

参 考 文 献

- 1 孙曼霖等. 生物化学杂志, 1985, 1: 47
- 2 Guilbault G G et al. Food Chem., 1970, 18(4): 692
- 3 Schwedt G and Hauck M et al. Anal. Chem., 1988, 331: 316
- 4 Quinn D M. Chem. Rev., 1987, 87: 955
- 5 Sussman J L et al. Science, 1991, 253: 872
- 6 Krupka R M. Biochemistry, 1966, 5: 1988
- 7 江藤守著, 杨石先等译. 有机磷农药的有机化学与生物化学. 北京: 化学工业出版社, 1981: 4
- 8 G·G·吉尔鲍特著, 缪辉南, 陈石根译. 酶法分析手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 22

(上接第 40 页)

长的 96 h- EC_{50} 3.5 mg/L^[6], 说明斜生栅藻比蛋白核小球藻对单甲脒的敏感度低。尽管如此, 在自然水环境中单甲脒的存在仍然对斜生栅藻的生长产生较大的影响。

(2) 在单甲脒初始浓度分别为 2, 4 和 8 mg/L 情况下, 斜生栅藻都不具备降解单甲脒的能力。另外, 蛋白核小球藻也没有降解单甲脒的能力^[6], 这更进一步说明了单甲脒可能是藻

类难降解的有机污染物。

参 考 文 献

- 1 Klekner V. Environ. Technol., 1992, 13(5): 493
- 2 林毅雄. 中国环境科学, 1984, 2(2): 15
- 3 Matsumura F. 国外环境科学技术, 1983, (4): 55
- 4 阎海等. 环境化学, 1995, 14(4): 350
- 5 周永欣等. 水生生物毒性试验方法. 北京: 农业出版社, 1989: 176
- 6 阎海等. 环境科学, 1995, 16(1): 23

Sci., **17**(4), 1996, pp. 39—40

To study an interaction between *S. obliquus* and N-(2, 4-dimethylphenyl)-N'-methylformamide, a standard method of algal bioassay for evaluating the toxicity of toxic chemicals was applied and 96 h-EC₅₀ of N-(2, 4-dimethylphenyl)-N'-methylformamide on inhibition of *S. obliquus*'s growth was calculated as 6.5 mg/L. It was found that N-(2, 4-dimethylphenyl)-N'-methylformamide can not be biodegraded by *S. obliquus* at the initial concentration of 2, 4 and 8 mg/L respectively.

Key words: *Scenedesmus obliquus*, N-(2, 4-dimethylphenyl)-N'-methylformamide, algal bioassay, biodegradation.

A Study on the Selective Inhibition of Immobilized Acetyl Cholinesterases of Different Biosources by Organophosphorus insecticides.

Yu Xiaoying (Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002); *Chin. J. Environ. Sci.*, **17**(4), 1996, pp. 41—43

The enzyme electrode method was used to study the selective inhibition of acetyl cholinesterases (AChE) extracted from three different biosources by organophosphorus insecticides. It was found that the inhibition extent of AChE by DDVP follows the order of fly, electric fish, chicken liver. In addition the capacity of five kinds of insecticides to selective inhibition AChE extracted from electric fish was studied. It was found that 9.8×10^{-8} mol/L phoxim is sufficient enough to inhibit 10% of AChE's mobility of electric fish. The detection limits of various kind of insecticides are also presented in this paper. The experiment also showed that in the range of 20—45°C temperature would exert almost no influence on the mobility of AChE. The optimum pH value, ionic strength and the mechanism of selective inhibition which affect the mobility of AChE were discussed.

Key words: organophosphorus insecticides, acetyl cholinesterases, selective inhibition, enzyme electrode.

Research of Upflow Solid Reactor (USR) Treating Chicken farm wastewater at Anaerobic Digestion Condition. Zhou Mengjin et al. (Dept. of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037); *Chin. J. Environ. Sci.*, **17**(4), 1996, pp. 44—46

The paper presents the result of Chicken farm

wastewater anaerobic digestion in upflow solid reactor (USR) at 35°C. The influent concentration was as follows: COD: 41900—61500 mg/L, SS: 50—60 g/L, TVA: 3174 mg/L, pH = 6.61. After 67 days of USR proceeding, the loading rate of USR reached to 10.45 g/(L·d), gas production rate achieved 4.88 L/(L·d), and average amount of CH₄ was 59.75% in which, the COD removing rate increased to 86.62%. At 5 days of HRT, the SRT was 24.8 d, SS removing rate was 66.16%.

Key words: upflow solid reactor (USR), Chicken farm wastewater, anaerobic digestion.

Preparation of Compound Granulated Adsorbent of Attapulgit and Studies on Its Adsorbability to Lead.

Qin Fei, Xu Ouyong (Dept. of Environ. Sci. and Eng., Nanjing University, Nanjing 210093), Jiang Tingda (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **17**(4), 1996, pp. 47—50

The granulated adsorbent of Attapulgit (AT) with some additive which includes cement (SN), quartz sands (SS) and steel crumbs (CS) was researched in order to produce a practical adsorbent for removal of lead in the waste water. The manufacture progress of granulated adsorbent and its adsorbability were discussed in detail. Optimum adsorbent is AT-SS among adsorbent of AT-SS, AT-SN and AT-CS. It has a capacity of adsorbing lead of 500 mg/g under the static conditions and of 60 mg/g under the dynamic conditions when it was manufactured at a AT-SS mixing ratio of 5 : 1 and by roasting at a temperature of 700°C for 120 min. The penetration time is 20 h and the regeneration rate is 48.3% with the current velocity of 1.5 ml/min. The Pb concentration of effluence is lower than standard within 236 times bed volume at the intake concentration of 200 mg/L.

Key words: wastewater treatment, adsorbent, lead, attapulgit, cement, quartz sands, steel crumbs.

Effect of Nitrate on Acclimatic Process for Terephthalic Acid Anaerobic Degradation. Li Xiaoming et al. (Dept. of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036); *Chin. J. Environ. Sci.*, **17**(4), 1996, pp. 51—53

Nitrate can promote the acclimatic process for