

# 离体条件下鱼对灭幼脲的代谢

徐立红 张甬元 徐 盈 陈 专

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

## 提 要

实验选用甘氨酸-氢氧化钠 ( $\text{pH}9 \pm 0.01$ ) 缓冲溶液, 草鱼或鲤鱼肝脏匀浆液经低速离心后取上清液作为酶, 反应系统中加入 CCU 后在  $25^\circ\text{C}$  保温 5h, 用醋酸乙酯萃取代谢产物, 用 TLC 对代谢产物进行分离纯化, 用 HPLC 方法对代谢产物进行定性定量测定, 证明有对氯苯基脲素 CPU 产生。为进一步证实代谢产物为 CPU, 用能给出绝对光谱定性数据的紫外检测器在一定的波长范围内, 对标样及斑点中测定的组分进行扫描, 从光谱学上证明了产物是 CPU。当加入专一性酯酶抑制剂后, 酶活性被抑制 89—99%, 证明酯酶在 CCU 的降解中起重要作用。

**关键词** 鱼, 灭幼脲, 离体代谢, 酯酶

灭幼脲 III 号(1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl)urea, 简称 CCU), 化学名称 1-邻氯苯甲酰基-3-(4-氯苯基)脲, 是我国自行开发生产的一种新型杀虫剂。由于其杀虫的高效性, 有着广泛的利用前景, 因而研究它的毒理学性质以及环境化学行为尤其显得重要。

灭幼脲结构与国外的同类产品除虫脲 (Diflubenzuron, 简称 DFB) 极为相似。关于 DFB 在水环境及土壤中的归趋, 对非靶生物的毒性, 昆虫体内的解毒机制等人们已作了大量研究, 结论是 DFB 是一种选择性强, 对害虫毒性强, 对较高等的生物无可见影响的高效杀虫剂<sup>[4,5]</sup>。从目前对 CCU 的研究来看, 它的许多特性与 DFB 相似。CCU 在好气水环境中易降解, 产生代谢产物对氯苯基脲素 (4-chlorophenyl-urea, 简称 CPU) 和邻氯苯甲酸 (2-chlorobenzoyl acid, 简称 CBA)<sup>[1]</sup>; 虽然在水中溶解度很低, 但在鱼体中积累并不高<sup>[2]</sup>, 这些特性均与 DFB 相似, 也正是人们所期望的。

CCU 在水中溶解度低但又不象 DDT 这类物质在鱼体中有高残留, 这预示着鱼体内肯定存在着某些机制能使进入鱼体内的 CCU 降解, 就 DFB 而言, 这种推测已在多种生物中得到证实<sup>[1,3,6-10]</sup>。若能阐明这一问题, 对评估 CCU 在水环境中的安全性有着重要意义, 本实验从这方面进行了初步探索。用两种鲤科鱼作材料, 研究离体条件下鱼肝脏对 CCU 的降解, 用薄板层析方法将代谢产物分离, 用高效液相色谱方法 (HPLC) 对产物进行定性定量测定, 利用专一性抑制剂确定对 CCU 降解起主要作用的酶。

淡水生态与生物技术国家重点实验室资助。

1991年5月14日收到。1994年10月5日修回。

## 1. 材料与方法

**1.1 材料** 草鱼鱼种, 体重 200—2000g, 取自中国科学院水生生物研究所养殖场; 鲤鱼, 体重约 250g, 从市场上购买, 健康无异常。用活性炭过滤的水暂养于实验室中。

**1.2 酶制备** 将鱼剪断尾动脉, 取出肝脏, 迅速称重, 按 1:8(W/V) 加入冷超纯水匀浆 (置冰浴中), 低速离心 5min, 弃去沉淀, 上清液待用。

**1.3 酶实验** 反应系统共 32ml, 其中 16ml 0.1mol Gly-NaOH 缓冲溶液 (pH9 $\pm$ 0.01), 8ml 水, 8ml 匀浆上清液。加入 80 $\mu$ l 浓度 320 $\mu$ g/ml 的 CCU 贮液, CCU 终浓度 0.8 $\mu$ g/ml, 在 25 $^{\circ}$ C 下保温 5h, 对照中加入热失活的匀浆上清液。

**1.4 抑制剂实验** 抑制剂 Profenofos 用乙醇配成浓贮液将上述反应系统中的 8ml 水改成加入 8ml 抑制剂贮液, 反应系统中的终浓度为 8.5mg/l, 加入的乙醇量对酶活性无影响。

**1.5 代谢产物的萃取、分离、测定** 反应结束时, 用 64ml 醋酸乙酯分两次萃取, 经无水硫酸钠过滤, 将醋酸乙酯层合并、浓缩、蒸干, 再用一定量的二氯甲烷溶解备用。将二氯甲烷溶解的样品点在 F<sub>254</sub> 硅胶 G60 板上 (5 $\times$ 20cm), 展层剂苯: 四氢呋喃: 冰醋酸 = 80:20:1, CCU 标样及可能的代谢产物 CPU 标样同时展层, 展层后, 切割样品展层线上与标样 Rf 值相同的部分, 用甲醇溶解, 超声, 过滤, 吹干, 用 30% 甲醇水溶解, 用 HPLC 方法定性定量测定, 流动相为甲醇: 水 (30:70), NOVAPAK C<sub>18</sub> 柱, UV254nm 检测。

**1.6 试剂** CCU 标样, 中国科学院生态环境研究中心提供 (吉林通化药厂提供原药); CPU 标样及 TLC 板, 德国 Merck 公司产品; 抑制剂 Profenofos, 纯度 >90.6%, 瑞士 Ciba Geigy 产品; 超纯水用美国 Milli Q 纯水制备系统制备。其它试剂均为色谱纯或分析纯。

**1.7 仪器** 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司 600MS-490MS-745B 系统。

## 2. 结果

**2.1 代谢产物的分离** TLC 图谱如图 1 所示, 紫外灯下可见酶反应物中残余的 CCU, 而与 CPU 标样对应处无可见斑点, 这是因为 CPU 量较少, 紫外检测无法检出。图中斑点 1 为 CCU, 斑点 2 为 CPU, 斑点 3 为酶反应物中残余的 CCU, 虚线所划的斑点 4 中可能含有代谢产物 CPU。

**2.2 代谢产物的定性定量测定** 本实验借助 HPLC 法对斑点 4 进行定性定量测定。如图 2 所示, 通过比较标样与斑点 4 在色谱柱上的保留时间, 证明斑点 4 含有 CPU (图 2)。为进一步证实产物为 CPU, 采用了能给出绝对光谱定性数据的紫外检测器, 在一定的波长范围内, 对标样及斑点 4 中检测出的组份进行扫描, 所获两个吸收光谱是吻合的 (图 3), 从光谱学上证明了产物是 CPU。

**2.3 离体条件下草鱼、鲤鱼肝脏对 CCU 的代谢** 在碱性

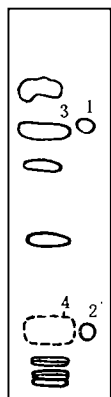


图 1 标样及酶反应提取物的薄层层析图谱

Fig.1 TLC chromatogram of standards and extracts of enzyme test

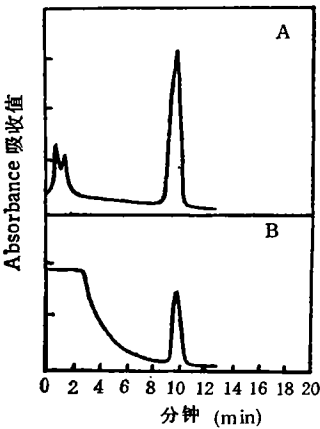


图2 CPU 标样与酶解产物 HPLC 图谱 流动相:甲醇/水 (70:30, v/v) 色谱柱: NOVAPAK C<sub>-18</sub>3.9×150mm 流速: 0.8ml/min  
A: 标样 CPU B: 斑点 4  
Fig.2 HPLC chromatograph of CPU standard and metabolite of CCU Mobile phase: methanol/water (70/30, v/v); column: NOVAPAK C<sub>-18</sub>3.9×150mm; flow rate: 0.8ml/min  
A: standard CPU B: spot 4

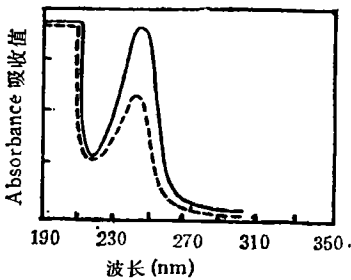


图3 CPU 标样与酶解产物紫外吸收光谱图 (色谱条件同图 2)  
扫描灵敏度: 0.1AUFS 波长幅度: 190—350 nm 扫描速度: 2nm/s 纸速: 4cm/min 节距: 1nm ——标样 ----斑点 4  
Fig.3 UV absorbance spectrum of CPU standard and metabolite of CCU(chromatographic parameter as for Fig.2)  
scan sensitivity: 0.01AUFS; wavelength range: 190—350nm;scan rate:2nm/s; chart speed: 4cm/min; wavelengthstep:1nm  
——standard CPU ----spot 4

条件下, CCU 极不稳定,容易发生水解,代谢产物之一为 CPU。本实验所选 pH 为 9,因而在此条件下的化学水解不能忽视。将热失活的匀浆上清液加入反应系统中,以此作为对照,可测定同样条件下的化学降解产生的 CPU,这样可以准确的测出酶作用而产生的 CPU 的量。表 1 中列出了几次实验中酶实验产生的 CPU 绝对量 (ET<sub>cpu</sub>) 与对照组中产生的 CPU 绝对量 (C<sub>cpu</sub>) 的比值,从表中 1 可看出,酶实验中产生的 CPU 的量远远大于对照组中的,这表明了离体条件下,鱼体肝脏对 CCU 的酶解作用确实存在。

从各次实验测定的酶作用产生的 CPU 的量,反应时间,组织用量计算酶比活,结果列于表 2。

表 1 酶实验与对照中 CPU 量(单位: ng) 的比值  
Tab.1 The ratio of ET<sub>cpu</sub> to C<sub>cpu</sub> (ng)

实验号 No.	1	2	3	4	5	6
ET <sub>cpu</sub>	36.36	122.07	79.20	73.03	125.04	92.31
C <sub>cpu</sub>	9.09	17.59	20.14	13.96	21.31	21.88
$\frac{ET_{cpu}}{C_{cpu}}$	4.00	6.94	3.93	5.23	5.87	4.22

无论是草鱼还是鲤鱼,都可以使 CCU 水解,虽然每条鱼的比活有所不同,这可能是

匀浆和离心的差异造成的,但仍可以反映出酶活性是确实存在的。

表 2 鱼肝脏中 CCU 水解酶的比活

Tab. 2 The specific activities (s. a.) of CCU hydrolase in fish liver

鱼种类 Species	大小 Weight	比活 s. a. (cpu ng/g liver/h)
草 鱼 Grass carp	750g	12.05
	750g	15.96
	200—300g	19.90
	2000g	17.18
鲤 鱼 Common carp	250g	27.18

**2.4 抑制剂对 CCU 酶解的抑制作用** Profenofos 是专一性酯酶抑制剂, 当加入抑制剂后, 若 CPU 的产生受到影响, 则表明酯酶在 CPU 的产生中起重要作用。表 3 是当抑制剂浓度为  $8.5\mu\text{g/ml}$  时, 对照管(C)、抑制剂管(I)、实验管(E)的 CPU 绝对量, 从表中各项数据看出, 当加入抑制剂后, CPU 的产生几乎被全部抑制。两次实验抑制程度不同, 这是因为两次实验中酶蛋白含量不同。

表 3 Profenofos 对 CPU 产生的抑制

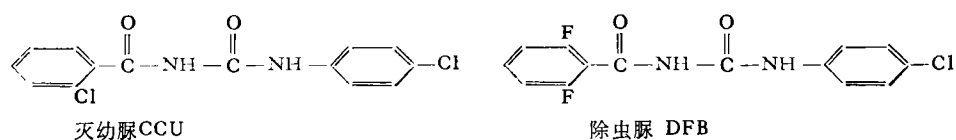
Tab. 3 Inhibition of profenofos to the producing of CPU

实验次数 No.	CPU 量 Amount of CPU			抑制百分数 Percentage of inhibition
	对照 Control	抑制剂 Inhibitor	酶实验 Enzyme test	
1	21.88	29.63	92.31	89
2	21.31	22.03	125.04	99.3

### 3. 讨论

一般而言, 苯酰苯脲类物质是一种具选择性的杀虫剂, 可以作用于不同昆虫而对人或昆虫天敌的影响很小, 具有这样性质的物质对控制农业害虫是十分有用的。这类杀虫剂作用机制主要是干扰几丁质的代谢, CCU 即是一种这样的杀虫剂, 阐明其对生物的毒性、在生物体内的积累及转移可对其应用前景作出全面评估。

不同研究结果表明 DFB 的初级代谢产物在几种生物中几乎都相同<sup>[1,3,6-10]</sup>, 其降解方式之一是 N-1 与 C-1 键断裂形成 2,6-二氟苯甲酸和对氯苯基脲素。CCU 与 DFB 的化学结构



非常相似,CCU 的降解途径也应与 DFB 的类似,即亦可从 N-1 与 C-1 键断裂,形成 CPU 与 CBA。在实验室模拟好气水环境中 CCU 可降解产生 CPU 与 CBA,在本实验中从酶反应系统检测到了 CPU,这证明与 DFB 初级代谢类似的途径的确存在于 CCU 的代谢中。

CCU 在水中溶解度低,而在实验中发现 CCU 在鱼体中的残留很低,这与 DFB 的特性类似,酶实验结果可以对此作出解释:CCU 虽然易在鱼组织中积累,但由于鱼体内存在的酶的作用使其发生分解,形成了代谢产物,因而在鱼组织中不可能积累到很高浓度,DFB 在鱼组织中的低残留也是由于酶的作用<sup>[11]</sup>。

在杀虫剂降解中起主要作用的酶,主要包括:酯酶,多功能氧化酶(MFO)和谷胱甘肽转移酶(GSAT)<sup>[10]</sup>。至于在 DFB 降解中起主要作用的酶,不同的研究得出不同的结论。DFB 在埃及棉叶虫体内降解是酯酶的作用<sup>[9]</sup>;在家蝇中酯酶和谷胱甘肽转移酶对 DFB 的代谢有一定影响,而起主要作用的是多功能氧化酶<sup>[8,9]</sup>。虽然控制 DFB 降解的酶系统在不同生物体内不尽相同,但 DFB 分子的断裂方式几乎都相同。本研究中的抑制剂实验表明,鱼体中对 CCU 代谢起主要作用的是酯酶,虽然不能完全排除多功能氧化酶和谷胱甘肽转移酶的作用,但在此条件下酯酶的作用占主导地位这一事实是不可否认的。

从实验可得出结论:离体条件下草鱼和鲤鱼肝脏可代谢 CCU,其分子断裂方式与 DFB 的相同;本实验条件下对 CCU 代谢起关键作用的酶是酯酶。关于 MFO 及 GSAT 在此过程中是否起作用以及活体实验中 CCU 代谢产物的测定等问题有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Hass-Jobolius M., 张甬元,徐盈,陈专。灭幼脉 III 号与除虫脉在实验室鱼水系统中归趋的比较研究。水生生物学报,1991,15(3): 207—211。
- [2] 徐盈,徐立红,张甬元。灭幼脉 III 号在好气水环境中的降解代谢的初步研究。水生生物学报,1992,16(2): 119—124。
- [3] Booth G M. and Ferrell D. Degradation of Dimilin by aquatic foodwebs. In: Pesticide in Aquatic Environment, Mohammed Abdul Qudua Hhan (ed). Plenum Press, New York and London. 1977 pp221—242.
- [4] Ishaaya I. and Degheele D. Properties and toxicological significance of diflubenzuron hydrolase activity in *Spodoptera littoralis* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1988, 32:180—187.
- [5] Ivie G W. Fate of diflubenzuron in cattle and sheep. *J Agric. Food Chem.* 1978a, 26: 81—89.
- [6] Ivie, G W, Wright J. E. Fate of diflubenzuron in the stable fly and house fly. *J.Agric. Food Chem.* 1978b, 26:90—94.
- [7] Opdycke J C., Miller R W, Menzer R E. In vivo and liver microsomal metabolism of diflubenzuron by two breeds of chickens. *J. Agric. Food Chem.* 1982a, 30:1227—1233.
- [8] Opdycke J C, Miller R W. Menzer R E. Metabolism and fate of diflubenzuron in swine. *J. Agric. Food Chem* 1982b, 30:1223—1227.
- [9] Pimprikar G, Georgiou D. Mechanism of resistance to diflubenzuron in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem Physiol.* 1979, 12:10—22.
- [10] Pimprikar G D, Georgiou G P. Effect of sesamex on the in vivo metabolism of diflubenzuron in larvae of susceptible and resistant strains of the housefly, *Musca domestica* L. *J. Agric. Food chem.* 1982, 30:615—628.
- [11] Schaefer C H, Dupras E F, Stewart Jr, Sterart R J, Davudson L W, Colwell A E. The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1979 21:249—254.

## IN VITRO METABOLISM OF CCU IN FISH

Xu Lihong, Zhang Yongyuan, Xu Ying and Chen Zhuan

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

### Abstract

The reaction system includes 0.1 M Gly-NaOH buffer and the supernatant of the homogenate of the grass carp and common carp liver representing the enzyme solution. After addition of CCU, the reaction mixture was incubated at 25°C for 5h. The metabolite was extracted with ethyl acetate, separated by TLC and identified by HPLC. It was demonstrated that CPU was produced in the mixture. That the product was CPU was further verified by spectroscopy, using a special UV detector which could give absolute spectral evidence for the identification of CCU metabolite, and comparing the UV scanning chromatograph for CPU standard with that of the metabolite spot at the certain range of wavelengths. When specific inhibitor of esterase was applied to the reaction mixture the activity of enzyme was decreased by 89~99 percent. It shows the key role of esterase in the production of CPU.

**Key words** Fish, CCU, In vitro metabolism, Esterase