

吴 艳,黄力彦,谭艳来,等. 马拉硫磷手性对映体在大鼠体内的代谢研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):306-308.

# 马拉硫磷手性对映体在大鼠体内的代谢研究

吴 艳,黄力彦,谭艳来,王 楠,陈大志,于晋华

(广东省工程技术研究所/广东省水环境污染控制重点实验室,广东广州 510440)

**摘要:**用高效液相色谱法建立马拉硫磷手性农药对映异构体的拆分检测方法,以大鼠为研究对象,分为空白对照组(C)和试验组(T)。C组灌胃生理盐水2 mL/只,试验组灌胃马拉硫磷700 mg/kg后,分15、30、60、120 min分别采大鼠血浆、心脏、肝脏等样品,测定所有试验鼠血浆、组织中马拉硫磷对映体含量的变化情况,用EF(对映体分数)表示。通过口服途径对大鼠进行马拉硫磷对映体分析方法的建立及选择性代谢行为研究。结果表明,马拉硫磷对映体在大鼠血浆和组织中代谢存在明显的立体选择性,且R-构型较S-构型活性高。

**关键词:**马拉硫磷;大鼠;对映体分数

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0306-03

有机磷手性农药被作为杀虫剂和杀菌剂广泛应用,对映异构体具有几乎完全相同的物理化学性质,但是其生物活性、毒性、代谢、残留等行为差别较大。但由于手性农药的特殊性,对映体选择性的转化及代谢行为还是人们比较陌生的领域,因此对映体的检测和代谢行为引起了人们广泛的关注。

马拉硫磷是目前广泛使用的手性农药,具有多种毒性效应,包括神经毒性、遗传毒性、免疫毒性和生殖毒性<sup>[1-2]</sup>等。目前对于马拉硫磷的水解,以及在土壤中的降解等行为已经研究得较为清楚,有关毒性、毒理方面的研究也已有很多报道。对于以高效液相色谱法建立马拉硫磷手性农药对映异构体的残留检测方法,通过测定血样及组织中对映体含量的变化情况,最终确定对映体的选择性代谢行为。本研究探讨了农药对人类健康潜在危害的成因,为合理使用农药、制定相关

食品安全法规提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和药剂

安捷伦-1100型高效液相色谱仪,配有四元泵;RE-52AA型旋转蒸发仪;马拉硫磷标准储备液浓度为100 mg/L,由农业部环境保护科研监测所提供。无水硫酸钠(分析纯),乙酸乙酯、乙腈(美国天地)、异丙醇及正己烷为色谱纯;用前过0.45 μm滤膜,去离子三蒸水。

### 1.2 马拉硫磷手性拆分与定量

手性拆分由高效液相色谱仪完成,每次分离进样量10 μL,手性色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为纤维素三苯甲酸酯(CDMPC,由本实验室自制)<sup>[3-4]</sup>,流动相为正己烷:异丙醇=95:5(体积比),流速0.8 mL/min,紫外检测波长254 nm,检测器进行定量分析。以保留时间定性,峰面积外标法定量<sup>[5-6]</sup>。柱温15℃,配制浓度为0.30、1.65、3.03、15.10、30.30、151.00 μmol/L的马拉硫磷标准溶液,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得出标准曲线,根据标准曲线拟

术出版社,2000。

[3] Christensen J B, Jensen D L, Grøn C, et al. Characterization of the dissolved organic carbon in landfill leachate - polluted groundwater [J]. Water Research, 1998, 32(1): 125-135.

[4] 蒋 疆,王 果,陈芳育,等. 草炭溶解态有机物质与Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>络合稳定性的研究[J]. 土壤与环境, 2002, 11(2): 116-120.

[5] 窦 森,华士英. 施用有机肥料对胡敏酸结构特征的影响——胡敏酸的<sup>1</sup>H-核磁共振波谱[J]. 土壤学报, 1997, 34(3): 225-234.

[6] 张晋京,窦 森,李翠兰,等. 土壤腐殖质分组研究[J]. 土壤通报, 2004, 35(6): 706-709.

[7] Grassel L, Guignard C, Ambles A. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate[J]. Organic Geochemistry, 2002, 33(3): 181-188.

[8] 文启孝. 土壤有机质研究法[M]. 北京:农业出版社,1984.

[9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2008.

[10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科学技

[11] 窦 森. 土壤有机培肥后HA结构性质变化规律的系统研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,1988.

[12] 顾志忙,王晓蓉,顾雪元,等. 傅里叶变换红外光谱和核磁共振法对土壤中腐殖酸的表征[J]. 分析化学, 2000, 28(3): 314-317.

[13] 吴景贵,王明辉,万忠梅,等. 玉米秸秆腐解过程中形成胡敏酸的组成和结构研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(3): 443-451.

[14] 窦 森,陈恩凤,谭世文,等. 不同来源胡敏酸的结构表征[J]. 吉林农业大学学报, 1989, 11(2): 50-56, 123.

[15] 窦 森,陈恩凤,须湘成,等. 施用有机肥料对土壤胡敏酸结构特征的影响——胡敏酸的光学性质[J]. 土壤学报, 1995, 32(1): 41-49.

[16] 周江敏,代静玉,潘根兴. 土壤中水溶性有机质的结构特征及其与富里酸、胡敏酸的比较[J]. 土壤, 2004, 36(1): 46-50.

[17] 肖彦春,窦 森. 土壤腐殖质各组分红外光谱研究[J]. 分析化学, 2007, 35(11): 1596-1600.

合计算出马拉硫磷对映体的浓度。采用峰高定量,高效液相色谱测试稀释的标准样品,以噪声的 3 倍计算出农药的最小检测灵敏度。

1.3 动物试验和分组

1.3.1 试验动物及分组 35 只清洁级雄性 SD 大鼠,体重 200 g 左右,购于广州中医药大学实验动物中心。饲养环境温度(20.0±1.0)℃,湿度 50%~60%,自由饮水进食。35 只大鼠预饲 1 周后,分为空白对照组(C),C 组灌胃生理盐水 2 mL/只;试验组共分 4 组,每组 7 只大鼠。试验组灌胃马拉硫磷 700 mg/kg 后,(1) T<sub>1</sub>:处理后 15 min;(2) T<sub>2</sub>:处理后 30 min;(3) T<sub>3</sub>:处理后 60 min;(4) T<sub>4</sub>:处理后 120 min;采大鼠血浆、心脏、肝脏等,-20℃备用。

1.3.2 样品处理 移取 5 mL 血浆于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 30 mL 乙腈-正己烷(1:1)溶液,涡旋振荡提取 30 min,6 000 r/min,离心 5 min,上清液转入 250 mL 分液漏斗中,另用 30 mL 乙腈-正己烷(1:1)提取残留物,合并提取液。用 40 mL 正己烷与 40 mL 饱和 NaCl 溶液萃取。静置分层后,收集正己烷层(无水硫酸钠干燥),旋转蒸发仪浓缩至 4 mL,再用乙腈提取 3 次,弃去正己烷层,并收集乙腈层,旋转蒸发仪干燥后 0.5 mL 正己烷定容,过 0.45 μm 滤膜后取 20 μL 进样。组织样品匀浆后,称取 5 g 样品匀浆液于 50 mL 聚丙烯离心管中,后续处理方法同上血浆前处理方法。

表 1 马拉硫磷测定的各种参数

马拉硫磷	保留时间 (min)	线性方程	相关系数 (r)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
马拉硫磷(+)	4.010	$Y=60.688X-56.564$	0.999 6	3.37	5.21
马拉硫磷(-)	6.202	$Y=59.444X-18.981$	0.999 3	4.24	5.53

表 2 大鼠血浆及各组织中马拉硫磷的回收率

马拉硫磷	回收率(%)		
	血浆	心脏	肝脏
马拉硫磷(+)	105.71	87.10	89.95
马拉硫磷(-)	104.66	73.75	119.95

2.2 血浆中马拉硫磷手性对映体含量

大鼠在灌胃马拉硫磷 15 min 左右即表现出神经症状,包括产生震颤,伴有兴奋、痉挛、钻洞、反跳、腹泻等中等毒性症状,均未出现死亡<sup>[10]</sup>。

大鼠血浆中马拉硫磷手性对映体含量见图 1。从图 1 可以看出,与对照组相比,灌胃马拉硫磷 15 min,血浆中 EF 值就在 0.8 左右,并且随着时间增加 EF 值增加;至处理后 60 min,EF 值达到 1,表明随时间增加,马拉硫磷对映体在血浆中的选择性是逐渐增大。

2.3 心脏中马拉硫磷手性对映体含量

大鼠心脏中马拉硫磷手性对映体含量见图 2。从心脏组织中 EF 值随时间变化趋势图中,我们可以看出,与对照组相比,用药后 15 min EF 值就接近 0.6,且 EF 值随时间增大而增大。随着时间延长 EF 值趋于平稳。表明在心脏组织中,马拉硫磷 2 对映体是立体选择性降解的。

2.4 肝脏中马拉硫磷手性对映体含量

肝脏中马拉硫磷手性对映体含量见图 3。从肝脏组织中

1.4 统计处理

采用对映体分数 EF 值作为马拉硫磷手性对映体选择性变化的指标<sup>[7]</sup>, $EF=E_1/(E_1+E_2)$ 。E<sub>1</sub>和 E<sub>2</sub>分别表示第 1 个出峰的对映体与第 2 个出峰的对映体的峰面积。EF 值的变化范围在 0~1.0 之间,EF=0.5 表示外消旋体。所得到的 EF 值偏离外消旋体标样的 EF 值越远,表明马拉硫磷对映体在样本中的立体选择性行为越明显。本研究中 E<sub>1</sub>代表 R-构型,E<sub>2</sub>代表 S-构型。

2 结果与分析

2.1 马拉硫磷的 HPLC 色谱分析

马拉硫磷经自制纤维素三苯甲酸酯(CDMPC)手性固定相色谱柱,8 min 内分离成 2 个峰,经圆二色检测器<sup>[8-9]</sup>,确定 2 个对映体流出先后顺序为先流出的是右旋,后流出的是左旋。在 0.3~151.0 μmol/L 的范围内,2 个对映体峰面积与浓度呈线性关系,相关系数为 0.999 3、0.999 6。最低检测限为 81.2 nmol/L,检测灵敏度高。配制 15.1 μmol/L 的马拉硫磷测定的右旋、左旋对映体的日内、日间精密度分别为 3.37%、5.21%和 4.24%、5.53%,均在 6% 以内,精密度符合要求,测定方法可靠,可以作为定量的依据,结果见表 1。马拉硫磷在大鼠血浆、心脏和肝脏等组织中的回收率分别为 73.75%~119.95%,结果见表 2。

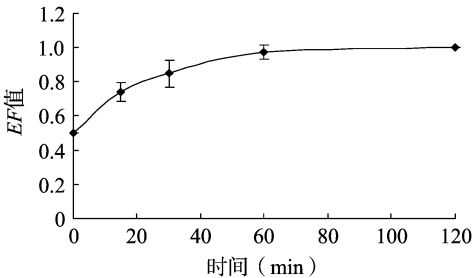


图 1 大鼠血浆中 EF 值动态变化

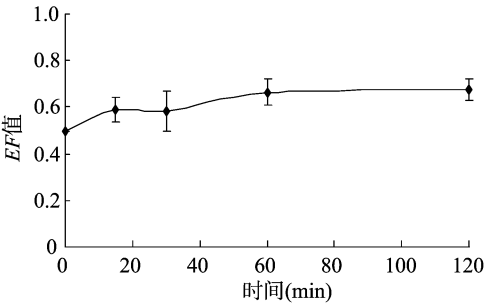


图 2 大鼠心脏中 EF 值动态变化

EF 值随时间变化趋势图我们可以看出,与对照组相比,在用药后 15 min EF 值就已经偏离 0.5,且 EF 值随时间增大而增大。30 min 时 EF 值接近 0.8,然后随着时间延长 EF 值趋于

平稳。表明在肝脏组织中,马拉硫磷的 2 对映体是立体选择性降解的。

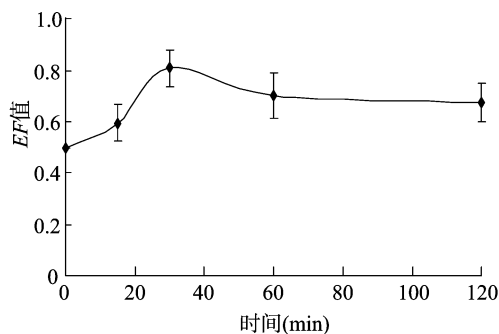


图3 大鼠肝脏中EF值动态变化

## 2.5 马拉硫磷对映体在大鼠体内不同样本中立体选择性差异

马拉硫磷对映体在大鼠血浆及部分组织中有立体选择性行为,不同时间各样本中EF值见图4。在所有时间点2对映体在血浆中的选择性是最明显,肝脏在30 min时EF值偏高,随着时间的增加各组织中EF值趋于稳定。

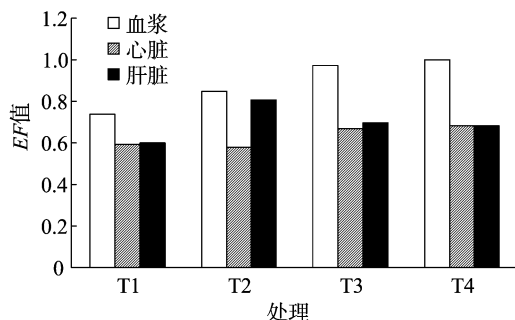


图4 大鼠血浆不同组织中EF值变化比较

## 3 讨论

一般认为,有机磷农药中毒主要机理是抑制乙酰胆碱酯酶的活性,引起中枢神经调节功能紊乱、神经过分刺激、冲动不能休止,造成机体痉挛、瘫痪等一系列神经中毒症状,甚至死亡。

手性化合物对映体在代谢过程中的立体选择性表现在吸收、分布、代谢和消除的整个过程中,这种选择性来源于手性药物与生物体内的手性环境及内源性手性分子的相互作用。手性农药在体内,可能受酶系统或消化道菌丛的作用发生结构性生物转化。

本研究中,经口服灌胃外消旋马拉硫磷后,在大鼠体内表现出明显的立体选择性药代动力学行为和降解特征,用药后1 h内,2对映体在血浆中的浓度差异很大,EF值趋于1,表明S-构型在代谢过程中消失。造成这种现象最有可能的原因就是对映体发生了转化。在药物进入血液中后,由于某种酶的作用,马拉硫磷左旋体发生转化,迅速转化成对映体右旋体,相关机理还有待于进一步深入研究。

药物代谢可以从体内消除,也可进一步代谢。大多数代

谢在肝中进行,也有在其他器官代谢。从各组织中EF含量可见,在心脏和肝脏组织中R-构型的含量也是一直高于S-构型的,随着时间的增加EF值趋于稳定。由此可以推断出马拉硫磷的毒性与构型相关,且R-构型起主要作用。本结论也与一般认为有机磷杀虫活性与对动物的毒性相关,R-构型较S-构型具有更高的活性的结论相符<sup>[11]</sup>。本研究结果马拉硫磷对映体在大鼠血浆和组织中代谢存在明显的立体选择性,且R-构型较S-构型活性高,S-构型不稳定,易降解转化。

## 参考文献:

- [1] Abdel R A, Dechkovska I M, Gold S B, et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats [J]. *Toxicol Environ Health A*, 2004, 67: 331 - 356.
- [2] Betancourt M, Reséndiz A, Fierro E C R. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer - assisted semen analysis (CASA) *in vitro* [J]. *Reproductive Toxicology*, 2006, 22: 508 - 512.
- [3] Huisdea R E, kraak J C, Poppe H. Modification of silica with glucose for the separation of proteins by high - performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography a*, 1990, 508 (2): 289 - 299.
- [4] 孟磊, 郑先福, 宁爱民, 等. 纤维素 - 三(3,5 - 二甲苯基氨基甲酸酯)手性柱的制备及应用 [J]. *河南科学*, 2005, 23 (3): 352 - 355.
- [5] Uhe A M, Collier G R, McLennan E A, et al. Quantitation of tryptophan and other plasma amino acids by automated pre - column O - phthalaldehyde derivatization high - performance liquid chromatography: improved sample preparation [J]. *J Chrom*, 1991, 564: 81 - 91.
- [6] di Piero D, Lazzarino G, Pastore F S, et al. Determination of boronophenylalanine in biological samples using precolumn O - phthalaldehyde derivatization and reversed - phase high - performance liquid chromatography [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 284 (2): 301 - 306.
- [7] Ulrich E M, Foreman W T. Complications with using ratios for environmental data: Comparing enantiomeric ratios (ERs) and enantiomer fractions (EFs) [J]. *Chemosphere*, 2003, 53: 531 - 538.
- [8] Berk M A E, Qu Inn dA. Thompson C M. interaction of acetylcholine sterase with the enantiomers of malathion and Iso malathion [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1993, 6: 724 - 730.
- [9] 王鹏, 王玉红, 冯楠, 等. 淀粉衍生物固定相对马拉硫磷和氟虫腈对映体的手性拆分 [J]. *应用化学*, 2006, 23 (10): 1170 - 1172.
- [10] Shafer T J, Meyer D A, Crofton K M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113 (2): 123 - 136.
- [11] 周炳, 赵美蓉, 张安平, 等. 马拉硫磷对映体对人成神经细胞瘤细胞生长影响的选择性差异 [J]. *农药学报*, 2007, 9 (3): 263 - 268.