

苯噻草酮单次给药在大鼠体内的毒代动力学规律及其组织分布

张康^{1,2}, 程桂红¹, 李龙¹

摘要: [目的] 研究苯噻草酮(metamitron)在大鼠体内的毒代动力学规律及组织分布。[方法] 采用高效液相色谱紫外检测法测定大鼠血液、组织、粪尿样品中苯噻草酮原药浓度, 计算毒代动力学参数。[结果] 苯噻草酮在雌、雄大鼠体内符合血管外给药一级吸收-一室模型。主要毒代动力学参数包括: 吸收半衰期为 0.77 h 和 0.69 h, 消除半衰期为 7.34 h 和 2.12 h, 参数消除率为 0.78 L/(h·kg) 和 2.59 L/(h·kg), 表观分布容积为 10.75 L/kg 和 8.33 L/kg, 药时曲线下面积为 1594.07 mg/(L·h) 和 975.36 mg/(L·h); 雄性药动学方程为 $C=8.79(e^{-0.39t}-e^{-1.04t})$, 雌性大鼠药动学方程为 $C=4.96(e^{-0.13t}-e^{-2.01t})$ 。大鼠灌胃苯噻草酮 4 h 后, 在肝、心、脑脂肪中的浓度高于血清中的浓度, 各组织的浓度最高值时的顺序依次是: 肝>心>脑>脾>脂肪>肌肉>肺>肾>睾丸。大鼠通过粪便方式排出苯噻草酮 7 d 累积排泄量占总剂量的 71.44%, 尿液为 8.91%。[结论] 在该试验条件下, 苯噻草酮经灌胃吸收迅速, 消除较快, 在体内分布广泛, 主要通过粪便方式排出体外。

关键词: 苯噻草酮; 毒代动力学; 大鼠; 高效液相色谱法

Toxicokinetic Study on Single Dose of Metamitron to Rat ZHANG Kang^{1,2}, CHENG Gui-hong¹, LI Long¹
(1.Department of Toxicology, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2.Liuzhou Center for Disease Control and Prevention, Liuzhou, Guangxi 545007, China). Address correspondence to LI Long, E-mail: longl606@mails.tjmu.edu.cn
• The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study toxicokinetic characteristics of metamitron in rat plasma and tissue. [Methods] High performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detector method was used to determine the concentration of metamitron in rat blood, tissues, and excrement samples, and toxicokinetic parameters were analyzed. [Results] The serum drug-time curves were consistent with first-order models of both male and female rats. The main toxicokinetic parameters for female and male rats were: $t_{1/2}(K_a)$, 0.77 h and 0.69 h; $t_{1/2}(K_e)$, 7.34 h and 2.12 h; CL, 0.78 L/(h·kg) and 2.59 L/(h·kg); Vd, 10.75 L/kg and 8.33 L/kg; AUC, 1594.07 mg/(L·h) and 975.36 mg/(L·h). The kinetic equations for male and female rats were $C=8.79(e^{-0.39t}-e^{-1.04t})$ and $C=4.96(e^{-0.13t}-e^{-2.01t})$, respectively. Concentrations of metamitron in liver, heart, and fat tissue were higher than those in plasma at the 4th hour after stomach lavaging with metamitron to the rats. The order of peak metamitron concentrations in rat tissues was: liver > heart > brain > spleen > fat > muscle > lung > kidney > testicle. The 7-day cumulative meramitron in feces and urine were 71.44% and 8.91%, respectively. [Conclusion] Quick gavage absorption, wide distribution to varied tissues and organs, and elimination via feces and urine of metamitron are observed under the reported experimental settings.

Key Words: metamitron; toxico-kinetics; rat; high performance liquid chromatography

苯噻草酮(metamitron), 化学名为 4-氨基-3-甲基-6-苯基 1, 2, 4 三嗪-5 酮^[1], 是 1975 年联邦德国拜耳(bayer)公司研制开发推广的低毒、低残留除草剂新品种^[2]。它主要通过植物根部吸收, 再输送到叶片内, 通过抑制光合作用的希尔反应起到杀草的作用^[3]。苯噻草酮在土壤中的光解作用已得到证实^[4], 在水中光解后产生氨基的脱氨基作用也被证实^[5]。本实验拟通过动物模型, 研究分析苯噻草酮在体内的分布表现、分布模型

及代谢机制, 探讨苯噻草酮在大鼠血液的毒代动力学规律、组织分布及排泄情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 苯噻草酮标准品(纯度 98.0%, 法国), 乙腈(优级纯), 乙酸乙酯, 花生油, 超纯水。

1.1.2 仪器 高效液相色谱仪为 Agilent1100 系列, 产自美国安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies), 包括 G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B 紫外检测器、Agilent 化学工作站; 50 μ L 微量注射器。

1.1.3 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 28 只, 雌性 4 只, 体重 (250 $\pm$ 10)g, 由华中科技大学同济医学院医学实验动物中心

[作者简介] 张康(1984—), 男, 硕士生; 研究方向: 卫生毒理学; E-mail: zhangkang311@yahoo.com.cn

[通信作者] 李龙副教授, E-mail: longl606@mails.tjmu.edu.cn

[作者单位] 1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院卫生毒理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 柳州市疾病预防控制中心, 广西 柳州 545007

提供; 动物合格证号: SCXK(鄂)2010-0007。

1.2 方法

1.2.1 给药剂量及染毒方式 在下述各项实验过程中, 均采用经口灌胃方式染毒, 雄性大鼠给药剂量为 2 000 mg/kg, 雌性给药剂量为 1 360 mg/kg, 给药容积为 5 mL/kg。

1.2.2 高效液相检测方法的建立 色谱柱: 150 mm × 4.6 mm (i.d) 不锈钢柱, 内填 uBondapakC18, 粒径 5 μm; 流动相为乙腈:水=1:1; 流速为 0.5 mL/min; 柱温 25℃; 检测波长为 306 nm; 进样量为 20 μL。标准品的保留时间为 4.36 min。本方法灵敏度高, 最低检测限为 0.1 μg/mL, 方法回收率 ≥ 90.4%, 相对标准偏差(RSD) 0.9%~6.0%, 连续 3 d 检测方法的日间精密度 RSD < 3%, 线性相关系数 $R^2=0.9999$, 曲线方程为 $y=189.85x-3.2651$ 。

1.2.3 血药浓度毒代动力学实验 大鼠 8 只, 雌雄各半, 大鼠隔夜禁食, 经口灌胃苯噻草酮后 5、15、30 min, 1、2、4、8、12、24 h, 分别通过大鼠剪尾采血 0.5 mL 于离心管中, 离心半径为 13.5 cm, 4 000 r/min 离心 8 min, 分离血清于 -20℃ 冻存。每只大鼠在采血后灌胃补充相当于所采集血液量的生理盐水^[6]。

1.2.4 组织分布实验 大鼠 24 只, 灌胃给药后分别在 0.5、2、4、8、24 h 及 7 d 后断头处死, 取心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、肌肉、脂肪, 将取出的组织, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称重后于 -20℃ 保存。

1.2.5 粪尿排泄实验 雄性大鼠 4 只, 灌胃给药后将大鼠置于代谢笼中, 每天收集大鼠所排出的尿液和粪便, 连续 7 d。粪便经烘干后, 碾磨成粉末密封保存。

1.2.6 样品制备及测定 取血清 100 μL, 加 1 mL 乙腈涡旋 3 min, 4 000 r/min 离心 5 min(离心半径为 13.5 cm), 取上清; 残渣中反复提取 2 次, 合并上清液, 精确量取适量体积, 80℃ 水浴挥干, 用 1 mL 乙腈溶解挥干的样品, 涡旋, 离心, 取上清, 待测^[7]; 精确称取组织 0.5 g, 加 2 倍体积乙腈匀浆后, 同血清的提取过程, 制备待测样品; 将粪便混匀, 用等分法^[8], 精确称取 0.5 g, 加 1 mL 乙酸乙酯提取, 离心, 过滤, 取上清, 残渣中反复提取 2 次, 合并上清液, 精确量取适量体积, 挥干后, 制备待测样品。精确量取尿液 1 mL, 加等体积蒸馏水^[9], 提取过程同粪便, 制备待测样品。

1.3 毒代动力学参数的计算和分析

监测大鼠经灌胃给药后血药浓度, 通过 DAS 3.0 程序分析处理药时数据, 确定最佳权重和最佳房室模型, 求出主要血药动力学参数。利用 Excel 分析处理组织分布数据和粪尿排泄数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 给药后血药浓度随时间变化趋势及动力学参数

根据大鼠给药后 24 h 苯噻草酮的血药浓度数据, 雄性大鼠在给药后血药浓度达峰时间是 2 h, 达峰浓度为 65.96 mg/L, 见图 1。雌性大鼠血药浓度达峰时间是 3.50 h, 达峰浓度是 40.00 mg/L, 见图 2。从图 1、2 结合表 1 中吸收半衰期小于消除半衰期可以看出, 雌雄大鼠吸收速率均较快, 消除速率均较慢, 但雌性大鼠与雄性大鼠之间吸收率和消除速率不同。

血药浓度符合一级吸收一室模型, 雄性药动力学方程为 $C=8.79(e^{-0.39t}-e^{-1.04t})$, 雌性大鼠药动力学方程为 $C=4.96(e^{-0.13t}-e^{-2.01t}) \times 10^3$ 。

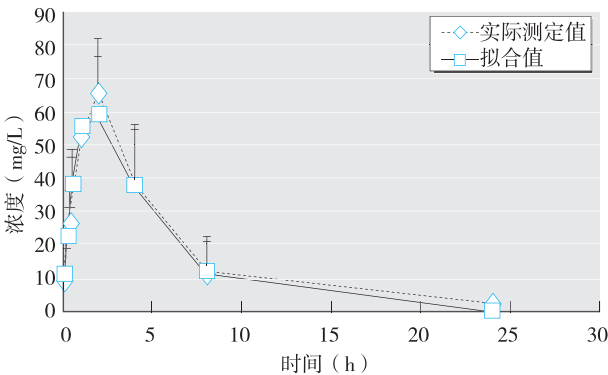


图 1 雄性大鼠给药后血液中苯噻草酮浓度随时间的变化趋势

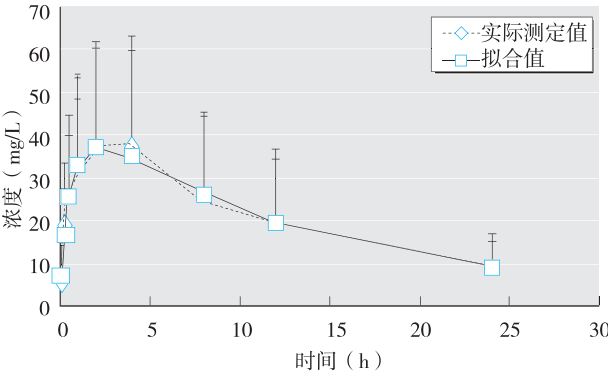


图 2 雌性大鼠给药后血液中苯噻草酮浓度随时间的变化趋势

表 1 大鼠单剂量经口给药后血液中苯噻草酮浓度毒代动力学参数 ($\bar{x} \pm s$)

参数	雄性大鼠	雌性大鼠
Ke(1/h)	0.39 ± 0.20	0.13 ± 0.02
t1/2Ke(h)	2.12 ± 0.96	7.34 ± 3.02
Vd(L/kg)	8.33 ± 7.45	10.76 ± 6.41
CL[L/(h·kg)]	2.58 ± 1.40	0.78 ± 0.21
AUC _{0-∞} [mg/(L·h)]	975.36 ± 513.54	1 594.08 ± 446.16
AUC _{0-∞} [mg/(L·h)]	977.37 ± 512.98	1 832.76 ± 462.52
R _{AUC} (t/∞)(%)	99.70 ± 0.41	86.80 ± 8.98
Ka(1/h)	1.04 ± 0.24	2.01 ± 0.34
t1/2Ka(h)	0.69 ± 0.13	0.76 ± 0.13
T _{max} (h)	2.00 ± 0.00	3.50 ± 1.00
C _{max} (mg/L)	65.95 ± 15.53	40.00 ± 24.97

[注]Ke: 消除速率常数; t1/2(Ke): 消除半衰期; Vd: 表观分布容积; CL: 参数清除率; AUC: 药时曲线下面积; Ka: 吸收速率常数; t1/2(Ka): 吸收半衰期; T_{max}: 达峰时间; C_{max}: 达峰浓度。

2.2 给药后苯噻草酮在各个组织脏器中的分布

表 1 中表观分布容积 [Vd(L/kg)=8.33 ± 7.45] 较大, 可以说明苯噻草酮在雄性大鼠体内分布较广; 同时表 2 中显示苯噻草酮在所测组织中均能检测到, 进一步说明该药在体内分布广泛。且大鼠经灌胃给药后, 0.5 h 就可以在组织中测到, 含量达到峰值时间为: 心、脾、肺、睾丸、脂肪在给药后的 2 h, 而肝、脑、肌肉在给药后 4 h, 肾在 8 h。其中肝的峰值含量最高, 其余依次为心 > 脑 > 脾 > 脂肪 > 肌肉 > 肺 > 肾 > 睾丸。但在给药后 4 h

前,组织中浓度均小于血液中浓度;给药后 24 h 时,苯噻草酮在大鼠体内脂肪中含量仍较高,其次是脑>肾>脾>肝>脾>睾丸>心>肌肉;从给药后 7 d 的含量分布可以看出,心、脾、肺中仍有苯噻草酮残留。

表 2 大鼠灌胃给药后不同时间点取各组织苯噻草酮含量($\bar{x} \pm s$)

样品含量(mg/kg)	不同时间点					
	0.5h	2h	4h	8h	24h	7d
心	35.58 ± 17.77	97.83 ± 52.63	96.63 ± 81.27	41.25 ± 28.87	10.10 ± 7.28	0.50 ± 0.10
肝	63.53 ± 22.24	63.83 ± 39.19	111.30 ± 78.63	60.08 ± 35.22	13.63 ± 11.15	—
脾	53.85 ± 26.74	93.01 ± 58.01	61.90 ± 54.22	53.80 ± 34.30	12.60 ± 7.69	0.53 ± 0.15
肺	69.45 ± 39.92	84.83 ± 50.52	81.75 ± 74.14	43.18 ± 32.30	16.90 ± 5.78	0.28 ± 0.05
肾	54.60 ± 20.10	53.30 ± 16.70	67.30 ± 49.97	83.90 ± 85.13	17.03 ± 7.76	—
脑	57.78 ± 21.20	92.48 ± 32.91	96.18 ± 71.26	82.80 ± 66.06	19.30 ± 9.40	—
睾丸	68.78 ± 41.08	70.50 ± 13.65	62.37 ± 25.78	59.63 ± 38.91	11.13 ± 4.24	—
肌肉	48.38 ± 16.61	86.25 ± 25.29	89.70 ± 85.51	62.73 ± 52.45	3.43 ± 1.94	—
脂肪	43.43 ± 14.32	92.93 ± 63.85	90.67 ± 55.36	85.17 ± 56.24	19.57 ± 12.27	—
血	103.98 ± 32.56	138.30 ± 53.73	89.15 ± 76.77	33.68 ± 20.06	3.20 ± 0.95	—

2.3 给药后粪尿中药物排泄随时间的变化

连续 7 d 收集并测定粪尿中苯噻草酮含量,粪尿中均可测出,第 1 天含量最高,之后呈下降趋势;到第 6 天粪便中含量开始在检测限以下,从第 5 天开始,尿液中含量在检测限以下;7 d 内粪便中平均累积量达到 357.22 mg/kg,占总给药量的 71.44%(按照大鼠平均体重为 250 g 计),尿液中平均累积量达到 44.55 mg/kg,占总给药量的 8.91%,可以说明苯噻草酮主要以粪便方式排出体外,见图 3。

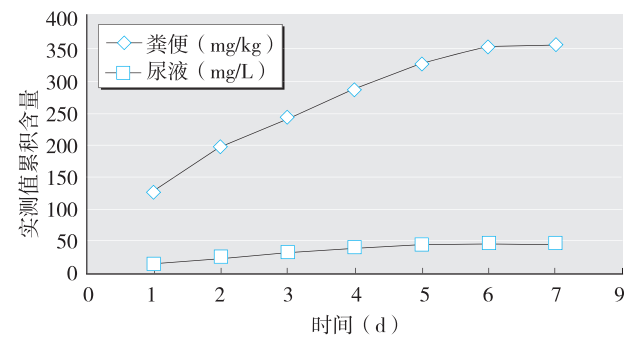


图 3 大鼠给药后 7 d 粪尿累积排泄量随时间的变化趋势

3 讨论

实验给药剂量约为雄雌性大鼠灌胃苯噻草酮半数致死量的 1/2,所给剂量为大鼠有明显中毒症状属于高剂量。由于苯噻草酮极难溶于水,所以用食用油做溶剂,制成悬液后灌胃^[11]。苯噻草酮经灌胃后 0.08 h 均可以在血液中检测到,证实苯噻草酮能迅速被大鼠的胃肠道吸收到达血液,但雌雄大鼠吸收速率及消除半衰期明显不同,说明该药在大鼠体内的代谢存在性别差异。雌、雄消除半衰期分别为 7.34 h 和 2.12 h,消除率分别为 0.78 L/(h · kg) 和 2.59 L/(h · kg),表明苯噻草酮在大鼠体内消除较快,可能无蓄积性。在脑中和睾丸中均能检测到苯噻草酮含量,是否有神经毒性和遗传毒性还有待进一步研究。在粪尿实验中,粪、尿中的排泄量仅分别占给药剂量的 71.44% 和 8.91%,与 DEBNATH 等^[7]对山羊进行苯噻草酮的毒代动力学的研究结果中主要以尿液排出体外不相符,但是粪尿排泄的总量所占比例相近,可能是因为药时曲线下面积蓄量达 975.36 mg/(L · h),表明苯噻草酮在大鼠体内分布广泛;另外,

在实验过程中,伴随着苯噻草酮原药浓度随时间变化不断减少,相反有另一种物质呈规律性上升趋势,说明可能以另外一种物质形式排出体外,从而也证实了粪尿苯噻草酮原药含量少的原因。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] Ludvík J, Urban J, Fábry J, Císarová I, et al. 4-Amino-3-methyl-6-phenyl-1, 2, 4-triazin-5(4H)-one (metamitron) and 4-amino-6-methyl-3-phenyl-1, 2, 4-triazin-5(4H)-one (isometamitron) [J]. Acta Crystallogr C, 2007, 63 (Pt 4): 259-262.

[2] 潘忠稳, 果海霞. 苯噻草酮的合成 [J]. 农药, 2007, 46 (3): 166-175.

[3] 陆阳, 陶京朝, 周志莲. 苯噻草酮的合成新工艺 [J]. 化工中间体, 2010, 12 (6): 50-55.

[4] LAITINEN P, SIIMES K, ERONEN L, et al. Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils [J]. Pest Manag Sci, 2006, 62: 473-491.

[5] CARABIAS-MARTINEZ R, RODRIGUEZ-GONZALO E, FERNANDEZ-LAESPADA ME, et al. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain) [J]. Water Res, 2003, 37 (4): 928-938.

[6] 王文艳, 沈子龙, 姚军, 等. PME-A-Na 在大鼠体内的毒代动力学及其组织分布 [J]. 中国医科大学学报, 2006, 37 (4): 341-345.

[7] DEBNATH SC, KUNDU A, DAS SK, et al. Toxicokinetics, recovery, and metabolism of metamitron in goat [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51 (20): 5977-5984.

[8] JULIET S, MANDAL TK, MAL B, et al. Metabolic study of isoproturon in goats following a single oral administration: toxicokinetics and recovery [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46 (1): 178-183.

[9] CHANDA D, DEBNATH SC, DAS SK, et al. Metabolism of metamitron in goat following a single oral administration of a nontoxic dose level: a continued study [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 7377-7381.

[10] 李少春. 牛羊混合胆汁中有效成分的提取纯化及 GCA 在大鼠体内的药动学研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.

[11] 谢国秀, 邓勇波, 吴冬梅, 等. 甲基磺草酮原药的毒性实验观察 [J]. 职业与健康, 2010, 26 (5): 481-485.

(收稿日期: 2012-05-25)
(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 徐新春)