

水胺硫磷在大鼠肝微粒体的生物转化和代谢动力学

魏霞, 谢剑炜, 李桦

(军事医学科学院毒物药物研究所药物代谢研究室, 北京 100850)

摘要: **目的** 探讨水胺硫磷在大鼠肝微粒体的体外代谢活化产物及代谢动力学特征。**方法** 应用液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(LC/QTOF MS)筛查并鉴定水胺硫磷在大鼠肝微粒体孵育液中的氧化产物。用乙酰胆碱酯酶抑制法考察水胺硫磷及其氧化产物水胺氧磷的抑酶活性。应用液相色谱-三重四级杆串联质谱(LC/Triple-Q MS/MS)定量检测肝微粒体中的水胺硫磷及其代谢产物水胺氧磷,研究水胺硫磷及其产物的消长动力学和氧化产物生成的酶动力学。**结果** 筛查并鉴定了水胺硫磷在大鼠肝微粒体的氧化脱硫产物水胺氧磷。水胺氧磷对乙酰胆碱酯酶的抑制活性远高于水胺硫磷,IC₅₀值比水胺硫磷低4个数量级,表明水胺硫磷的氧化脱硫反应是一个代谢活化过程。水胺硫磷在大鼠肝微粒体中的半衰期($t_{1/2}$)为14.6 min,外推得到体内肝清除率 Cl_H 为 $43.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。水胺氧磷的生成符合双相酶动力学模型, $K_{m,app1}$ 为 $1.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,产物生产最大速率(V_{max1})为 $0.43 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;蛋白 $K_{m,app2}$ 为 $67.92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max2} 为 $1.28 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白。**结论** 水胺硫磷在大鼠肝微粒体中能快速代谢消除,生成抑酶活性更高的产物水胺氧磷而产生毒性。

关键词: 有机磷化合物; 水胺硫磷; 水胺氧磷; 代谢; 药代动力学; 毒性作用

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)03-0333-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.03.014

有机磷农药(organophosphorous pesticides, OP)是农业生产和生活中使用最为广泛的杀虫剂之一,其毒性机制是抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的活性,降低其水解乙酰胆碱的能力,造成乙酰胆碱在神经末梢大量蓄积,从而引起神经功能紊乱,造成各种中毒症状^[1]。昆虫由于缺乏水解有机磷的酯酶,对有机磷化合物非常敏感,所以OP对靶标生物具有高选择性,但其对非靶标生物也有急性或慢性毒性作用。OP在体内代谢酶的作用下可以发生水解等解毒反应,也可通过氧化反应形成活化产物。OP在靶标和非靶标生物体的代谢转化以及转化动力学对其安全性评价,以及对环境和人类健康产生危害的风险评估具有重要意义。

水胺硫磷(isocarbofos),化学名O-甲基-O-(2-异丙基氧基羰基苯基)硫代磷酰胺酯,是一种高效广谱的杀螨、杀卵和杀虫剂,于1981年引入我国,

国内原料药的年产量达到5000吨^[2]。水胺硫磷是一种较强的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)抑制剂,48 h暴露于一种淡水蚤大型蚤(*Daphnia magna*)的LC₅₀为13.9~353 mg·L⁻¹^[3],大鼠经口LD₅₀为25~50 mg·kg⁻¹^[4-5],急性毒性有一定的性别差异,雄性大鼠比雌性大鼠更为敏感^[5]。近年来,水胺硫磷的大量应用引起一系列的环境和社会问题逐渐受到关注,2007年就有报道在芹菜中检测到水胺硫磷残留超过9 mg·kg⁻¹^[6],2009和2010年又相继报道其在豇豆中的残留超标。但是水胺硫磷的毒性以及残留对动物和人体的危害的相关研究却较少,其在哺乳动物体内的代谢转化和毒物代谢动力学更是鲜见报道。本文研究了水胺硫磷在大鼠肝微粒体(rat liver microsomes, RLM)氧化代谢的活化产物和代谢动力学,为水胺硫磷在哺乳动物代谢和毒理学评价提供必要的资料 and 科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

水胺硫磷(99%)和三唑磷(triazophos, 98%)购自北京亚希尔科技有限公司;水胺氧磷由本实验室合成,纯度>98%(经高效液相色谱鉴定);电鳗

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZXJ09006-001)

作者简介: 魏霞(1973-),女,博士研究生,主要从事毒物代谢研究, Tel: (010)66874619, E-mail: 870027273@qq.com; 李桦,女,研究员,博士生导师,主要从事药物毒物代谢研究。

通讯作者: 李桦, E-mail: amms_hli@126.com, Tel: (010)66930664

AChE (AChE from *Electrophorus electricus*, EE-AChE)、重组人 AChE (recombinant human AChE, rH-AChE)、碘化硫代乙酰胆碱、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、牛血清白蛋白、6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖、色谱纯乙腈、甲醇和甲酸均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; NADPH, NADP 二钠盐购自瑞士 Roche 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器

Cary Win UV300 型紫外可见分光光度计, 美国瓦立安公司; SpectraMax M5 型多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 6520 型 LC/Q-TOF 液质联用仪、6430 型三重四级杆质谱仪(配有 ESI 源及数据处理系统)、1200 型四元梯度泵和自动进样器, MG II C₁₈ 液相色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm), 均日本 Shiseido 公司; Zorbax SB C₁₈ 液相色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 美国 Agilent 公司; Centrifuge 5418 型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Milli-QTM 型超纯水净化器, 美国 Millipore 公司。

1.3 动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体质量 180 ~ 200 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK-(军)2007-004。

1.4 肝微粒体制备

大鼠禁食不禁水 12 h 后, 脱颈椎处死, 立即剖取完整的肝组织, 差速离心法制备肝微粒体悬液^[7], 用 Lowry 等^[8]法测定蛋白浓度。

1.5 LC-MS/MS 定量分析方法

色谱条件: 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸甲醇溶液(B), 梯度洗脱程序为 0 ~ 2.5 min (40% B ~ 80% B), 2.5 ~ 2.8 min (80% B), 2.81 ~ 4.2 min (40% B)。流速 0.35 ml·min⁻¹, 柱温 25℃, 内标为三唑磷。质谱条件: ESI 源正离子 MRM 模式检测; 毛细管电压 3500 V, 碎裂电压 120 V。用于定性和定量分析的离子对分别为: 水胺硫磷质荷比(mass-to-charge, *m/z*) 312 → 236 (CID 10 V) 和 *m/z* 231 → 121 (CID 18 V); 水胺氧磷 *m/z* 214.9 → 121 (CID 20 V) 和 *m/z* 274 → 215 (CID 8 V); 三唑磷 *m/z* 314 → 178 (CID 12 V) 和 *m/z* 314 → 162 (CID 5 V)。

应用灭活 RLM 孵育液配制系列水胺硫磷和水胺氧磷 0.01, 0.02, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 10 μmol·L⁻¹ 的混合标准样品, 加入 500 μl 含内标三唑磷的终止液(甲醇: 乙腈 = 1: 1), 涡旋 2 min, 14 480 × *g* 离心 10 min, 取上清 2 μl 进样 LC-MS/MS 分析, 得到标准曲线。同上配制水胺硫磷和水胺氧

磷 0.02, 0.5, 8 μmol·L⁻¹ 混合质控样品, 连续 3 d 每日测定各浓度的 3 个平行样品, 得到水胺硫磷的日内、日间精密度及准确度。

1.6 水胺硫磷在大鼠肝微粒体的代谢产物筛查

孵育体系为含有水胺硫磷(终浓度 20 μmol·L⁻¹) 和 RLM(蛋白浓度 0.5 g·L⁻¹) 的磷酸盐缓冲液 0.1 mol·L⁻¹ (pH 7.4), 37℃ 预孵 5 min 后加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 1 mmol·L⁻¹ 启动反应, 37℃ 孵育 2 h 后加入同体积乙腈终止反应, 涡旋, 14 480 × *g* 离心 10 min, 取上清 5 μl 进样至 LC/Q-TOF MS, 在 MGII C₁₈ 柱(2.1 × 150 mm, 3.5 μm) 上用 0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸乙腈梯度洗脱 30 min, 分别以正负离子模式检测。对照组先用乙腈沉淀肝微粒体后同上处理。

1.7 水胺硫磷及水胺氧磷的体外抑酶活性测定

采用 Ellman 法^[9]测定 AChE 活性。用磷酸缓冲液 0.1 mol·L⁻¹ (pH 7.4) 分别配制 EE-AChE 和 AChE 工作溶液, 加入适量牛血清白蛋白使蛋白含量 > 1 g·L⁻¹。通过预实验选择能抑制 10% ~ 90% AChE 的浓度范围, 并控制酶浓度使底物的水解速度在 0.05 ~ 0.10 ΔA·min⁻¹ 的范围内。以同一缓冲液分别新鲜配制系列浓度的水胺硫磷及水胺氧磷工作液。在 96 孔板中加入 20 μl 待测液(或溶剂空白)和 80 μl 酶工作液, 震荡混匀, 37℃ 孵育不同时间后加入 150 μl 硫代乙酰胆碱 0.5 mmol·L⁻¹ 和 DTNB 0.28 mmol·L⁻¹ 溶液, 在 3 min 内于 412 nm 以 30 s 间隔测定吸光度变化, 得到初始酶活性([E₀]) 和终点酶活性([E_r])。

IC₅₀ 值用以评价水胺硫磷及产物的抑酶活性。以不同浓度下的 ln[E_r]/[E₀] 对抑制时间 *t* 作图并线性拟合, 由公式(1) 得到表观磷酸化常数 *k_{app}*; 根据公式(2), 以 *k_{app}* 的倒数(1/*k_{app}*) 对 1/[*I*] 作图并线性拟合, 由截距的倒数得到磷酸化常数 *k_p*, 斜率的倒数即为双分子速率 *k_i*, 解离常数 *k_d* 由 *k_p*/*k_i* 求得, 并根据式(3) 计算 IC₅₀ 值。

$$k_{app} = -\ln \frac{[E_r]}{[E_0]} / t \quad (1)$$

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_r} \times \frac{1}{[I]} \quad (2)$$

$$IC_{50} = \frac{\ln 2}{k_i \times 30} \quad (3)$$

1.8 水胺硫磷与大鼠肝微粒体孵育的代谢动力学测定和计算

孵育体系为含有 NADPH 再生系统(NADP 1 mmol·L⁻¹, 6-磷酸脱氢酶 1 kU·L⁻¹, 6-磷酸葡萄糖

5 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 3.3 mmol·L⁻¹) 的磷酸钾缓冲液 0.1 mol·L⁻¹ (pH 7.4), 加入水胺硫磷 (终浓度 5 μmol·L⁻¹) 于水浴中 37℃ 预孵育 5 min 后, 加入 5 μl RLM (微粒体蛋白含量 0.4 g·L⁻¹) 启动反应, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 20, 30 min 取样加入 500 μl 含内标的甲醇: 乙腈 (1:1) 溶液, 涡旋 2 min 终止反应, 4℃ 下 14 480 × g 离心 10 min, 取上清, LC-MS/MS 定量分析水胺硫磷的剩余量和代谢产物的生成量。为测定水胺硫磷的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} , 将水胺硫磷系列浓度 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 和 50 μmol·L⁻¹ 在上述体系中反应 2 min 后同上处理。

为计算代谢消除动力学参数, 将水胺硫磷的零时浓度作为 100%, 得到其他时间点的剩余百分比。以各时间点剩余百分比的自然对数与相应孵育时间作图, 直线回归得斜率 ($-k$), 由公式 (4) 求出水胺硫磷微粒体代谢的 $t_{1/2}$ (min)。应用 Well Stirred Model 对微粒体数据外推, 由公式 (5) 和 (6) 求得水胺硫磷在大鼠肝中的固有清除率 Cl_{int} (ml·min⁻¹·kg⁻¹) 和肝清除率 Cl_H (ml·min⁻¹·kg⁻¹)^[10]。根据文献[11], 大鼠相关参数经验值为: 肝微粒体质量 (mg)/肝质量 (g) 为 40, 肝质量 (g)/体质量 (kg) 为 44.8, 肝血流 (Q_H) 为 55.2。

$$t_{1/2} = -0.693/k \quad (4)$$

$$Cl_{int} = \frac{0.692}{t_{1/2}} \times \frac{\text{孵育体积 (ml)}}{\text{微粒体质量 (mg)}} \times 40 \times 44.8 \quad (5)$$

$$Cl_H = \frac{Q_H \times Cl_{int}}{Q_H + Cl_{int}} \quad (6)$$

为了计算氧化产物的生成动力学参数, 根据 Eadie-Hofstee 图解法, 用 SigmaPlot 软件的非线性回归分析得到产物的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 。

1.9 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Excel 2010 软件的 FTEST 和 TTEST 检验进行统计学分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LC-MS/MS 定量分析方法学验证

如图 1 所示, 在本研究的测定条件下, 孵育液中杂质不干扰待测化合物和内标三唑磷的测定。水胺硫磷和水胺氧磷在 0.01 ~ 10 μmol·L⁻¹ 浓度范围内线性良好, $r^2 > 0.99$, 定量限为 0.01 μmol·L⁻¹。水胺硫磷的日内和日间精密度分别是 2.7% 和 3.8%; 水胺氧磷的日内和日间精密度分别是 3.1% 和 5.4%, 二者的准确度范围为 85% ~ 110%, 表明此

方法的专属性、灵敏度和精密度均满足研究的要求。

2.2 水胺硫磷在大鼠微粒体的代谢产物

在加入 NADPH 的条件下, 将水胺硫磷与 RLM 孵育, 用 LC-TOF MS 筛查代谢产物。观察正离子模式下 0 和 2 h 孵育样品的总离子流色谱图 (图 1B 和 C) 可见, 除了保留时间 t_R 为 17.6 min 的水胺硫磷峰外, 2 h 样品在 t_R 12.6 min 处出现一个丰度较高的新色谱峰 (图 1B), 命名为 M1。负离子检测未发现明显新增色谱峰。

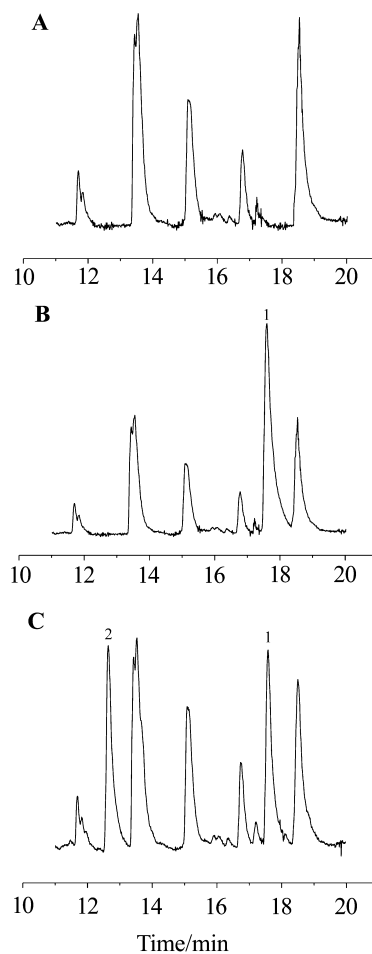


Fig.1 LC/QTOF MS total ion chromatograms of the rat liver microsomes incubates with isocarbophos. A: blank; B: 0 min; C: 2 h. The analysis was performed using an Agilent 6520 LC/QTOF MS, equipped with a 1200 HPLC and a MGII C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm). The mobile phase was water (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) at a gradient mode. The flow rate was 0.2 ml·min⁻¹. Peak 1: isocarbophos; peak 2: M1.

比较水胺硫磷与 M1 的质谱图 (图 2A 和 2B), 二者的 $[M + Na]^+$ 、 $[M + K]^+$ 和主要碎片离子 $[M - C_3H_7O]$ 之间质量数均相差 16, 精确质量数的差值在 15.9771 ~ 15.9775 范围内, 接近硫和氧原子精确质量数的差值 15.9772, 表明 M1 可能是氧化脱硫的产物。据此合成得到水胺氧磷的标准品, 进一

步比较 M1 和水胺氧磷合成标准品的质谱图(图 1C),可见二者完全一致,证实 M1 是水胺硫磷脱硫氧代的产物水胺氧磷。

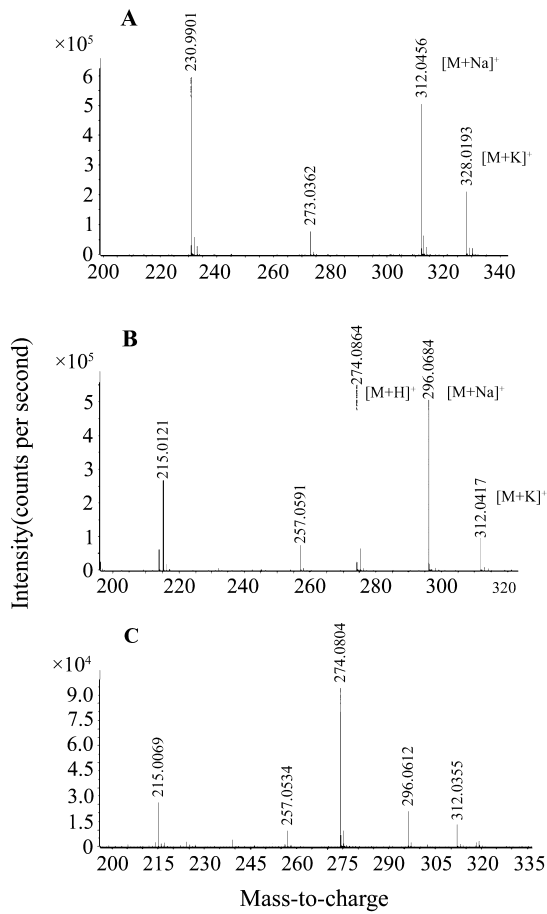


Fig. 2 High resolution mass spectra of isocarbopos (A), MI (B) and standard reference of isocarbophos oxon (C). The data were obtained on an Agilent 6520 LC/QTOF MS with an ESI source. The fragmentor was 120 V.

2.3 水胺硫磷和水胺氧磷的体外抑酶活性

水胺氧磷不同浓度剩余 EE-AChE 活性-时间半对数曲线(图 3), k_{app} - $[I]$ 双倒数曲线(图 4), 线性关系 $Y = 1.0735X + 1.6611$ ($R^2 = 0.9958$), 得到的 k_p 、 k_i 、解离常数 k_d 和 IC_{50} 值如表 1 所示。水胺氧磷

抑制 EE-AChE 和 rH-AChE 的 IC_{50} 值在一个数量级上,对 EE-AChE 的抑制能力是 rH-AChE 的 2 倍。水胺氧磷对 AChE 的抑制活性要高于水胺硫磷,其抑制 EE-AChE 的 IC_{50} 值分别是水胺硫磷的 6193 倍。由此可见,水胺硫磷氧化形成水胺氧磷是一个活化代谢过程,氧化产物水胺氧磷很可能对水胺硫磷的体内毒性有较大的贡献。

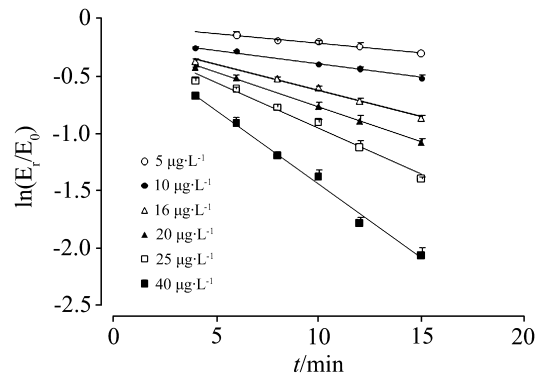


Fig. 3 k_{app} in acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (EE-AChE) with isocarbophos oxon. A series of concentrations of isocarbophos oxon were incubated with EE-AChE and the activity of AChE was measured at different time with Ellman method. $[E_0]$ is the initial activity of AChE, $[E_t]$ is the remaining activity at the time of measurement. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

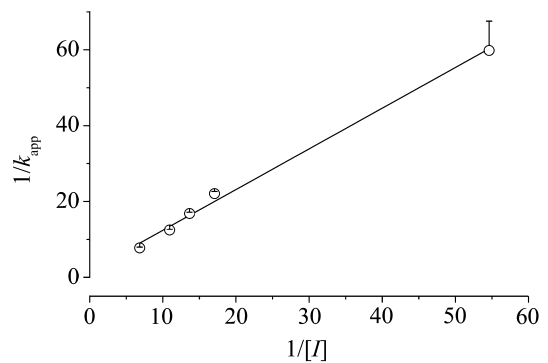


Fig. 4 Double reciprocal plot of k_{app} vs $[I]$ in the inhibition of EE-AChE by isocarbophos oxon. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

Tab. 1 Inhibitory parameters of isocarbopos and isocarbophos oxon on EE-AChE and recombinant human acetylcholinesterase (rH-AChE)

Parameter	EE-AChE		rH-AChE
	Isocarbopos	Isocarbophos oxon	Isocarbophos oxon
$k_i/\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	0.12 ± 0.02	$740 \pm 34^{**}$	$370 \pm 17^{**}$
k_p/min^{-1}	0.51 ± 0.11	0.47 ± 0.05	$0.26 \pm 0.02^{**}$
$k_d/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	422.4 ± 87.0	$0.67 \pm 0.70^{**}$	$0.70 \pm 0.03^{**}$
$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	192 ± 47	$0.031 \pm 0.002^{**}$	$0.062 \pm 0.004^{**}$

See Fig. 3 legend for experiment procedure. IC_{50} was the data in 30 min. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^{**} P < 0.01$, compared with isocarbopos.

2.4 水胺硫磷及产物在大鼠微粒体的消长动力学

水胺硫磷及其产物在 RLM 的消长动力学曲线如图 5 所示。水胺硫磷与 RLM 孵育 20 min 内其剩余百分比的自然对数与孵育时间呈线性(图 6), $Y=0.047X+4.473$ ($R^2=0.9787$), 由此得到水胺硫磷在 RLM 的消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 14.6 min, Cl_{int} 为 $213 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。由公式(6)外推得到的肝清除率 Cl_H 为 $43.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 约为大鼠肝血流量 $55.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 80%, 表明水胺硫磷在通过大鼠肝时即可被快速消除。水胺氧磷的生成在 4 min 内呈线性, 由此得到初始生成速率为 $0.81 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白。

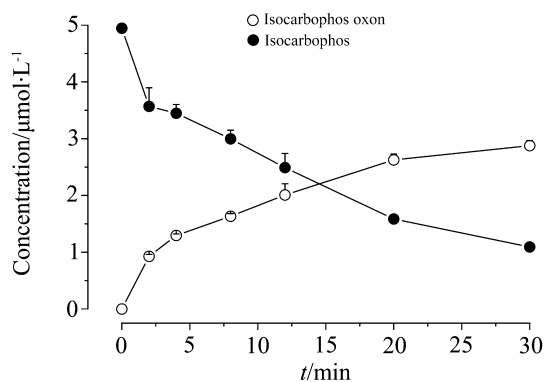


Fig. 5 Concentration-time curves of isocarbophos metabolism and isocarbophos oxon formation. Isocarbophos $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was incubated with rat liver microsome at the protein content of $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and isocarbophos and its metabolite isocarbophos oxon were determined at different time on an Agilent 6430 LC/Triple-Q MS/MS with an Zorbax SB C₁₈ column ($2.1 \text{ mm}\times 50 \text{ mm}, 1.8 \text{ }\mu\text{m}$, Agilent). The mobile phase was water (containing 0.1% formic acid) and methanol (containing 0.1% formic acid) at a gradient mode. The flow rate was $0.35 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. $\bar{x}\pm s$, $n=3$.

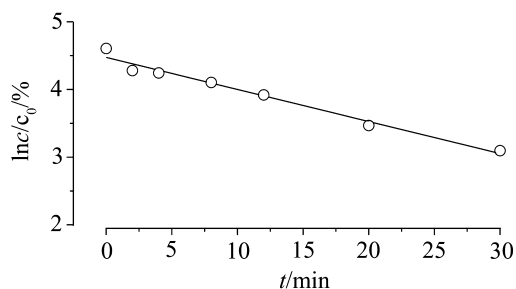


Fig. 6 Remaining percentage of isocarbophos and incubation time. Isocarbophos $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was incubated with rat liver microsome at the protein content of $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. See Fig. 5 for the conditions. $\bar{x}\pm s$, $n=3$.

2.5 水胺氧磷生成的酶动力学特性

将不同浓度的水胺硫磷与 RLM 共孵育 2 min, 得到水胺氧磷生成速率与原型浓度之间的关系(图 7),

应用不同的酶动力学模型进行拟合, 发现动力学数据与 Eadie-Hofstee 图形相符, 显示水胺氧磷的生成动力学符合双相动力学规律。提示水胺硫磷氧化代谢生成水胺氧磷的反应可能是个双酶或多酶反应^[17]。非线性回归拟合得到 $K_{m,app1}$ 为 $1.12 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{max1} 为 $0.43 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白; $K_{m,app2}$ 为 $67.92 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 V_{max2} 为 $1.28 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白。

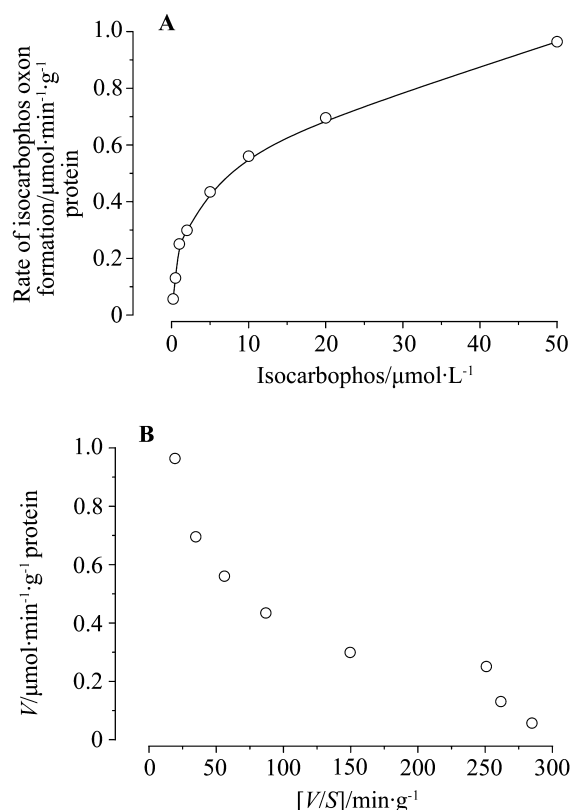


Fig. 7 Formation velocity of isocarbophos oxon versus isocarbophos concentration in rat liver microsomes (A) and its Eadie-Hofstee plot (B). A series of concentrations of isocarbophos were incubated with rat liver microsome at the protein content of $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 2 min. S: Concentration of the substrate isocarbophos.

3 讨论

OP 通常在靶向生物体内氧化生成活性更高的脱硫氧代产物而发挥作用, 同一反应也可在非靶向生物体内发生并由此产生毒性, 它们在体内也可经水解等反应而解毒, 这些农药在体内的代谢活化和代谢解毒过程及程度与它们的毒性紧密相关。例如广泛应用的对硫磷、氯吡硫磷(毒死蜱, chlorpyrifos)和二嗪磷, 其代谢转化和毒性的相关性已有较为深入的研究^[12-13], 而水胺硫磷的相关研究尚未见报道。本文应用 LC-MS/MS 技术, 对水胺硫磷在大鼠微粒体中的氧化脱硫产物进行了筛查和鉴定, 并对原型和产物的毒性进行了体外评价。水胺硫磷在大鼠肝微粒体中

的代谢消除很快, $t_{1/2}$ 为 14.6 min。根据原型和氧化产物的消长动力学可知, 氧化代谢是水胺硫磷在大鼠微粒体中的主要转化途径, 主要的氧化产物为水胺氧磷。抑酶实验结果表明, 氧化脱硫产物显示了很强的抑酶活性, 对 AChE 抑制的 IC_{50} 比水胺硫磷低 4 个数量级, 提示水胺硫磷与其他硫逐磷酸酯类 OP 相似, 在体内可以通过氧化活化而产生毒性。水胺硫磷和水胺氧磷对 AChE 抑制动力学结果表明, 原型和氧化产物对酶的磷酸化能力相似, 但解离常数远远大于氧化产物, 即水胺硫磷与乙酰胆碱酯酶活性中心紧密结合的能力远远小于其氧化产物。

水胺硫磷在大鼠微粒体中的酶动力学结果表明, 其氧化生成水胺氧磷的反应与对硫磷和氯吡硫磷相似, 具双相动力学特征^[14], 两相的表观 K_m 值分别为 1.12 和 67.92 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其与微粒体酶的亲和力在对硫磷和氯吡硫磷之间(二者 $K_{m,app1}$ 分别为 0.23 和 1.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{m,app2}$ 分别为 71.3 和 50.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 提示水胺硫磷的氧化脱硫反应可能是由双酶或多酶介导的反应。有研究报道, 对硫磷和氯吡硫磷等硫逐磷酸酯类 OP 的氧化脱硫反应都是由细胞色素 P450(CYP) 的多个同工酶介导的。CYP1A2, 2B6 和 3A4 介导了对硫磷的氧化; 对于氯吡硫磷, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 和 CYP3A4 都参与了其代谢, 其中 CYP2B6 和 CYP3A4 的氧化脱硫活性较高^[15]。同时, 氯吡硫磷在人肝微粒体的代谢要慢于大鼠, 并表现出一定的性别差异, 这些发现为氯吡硫磷的毒性评价和人体接触暴露农药后的风险评估提供了重要的资料。水胺硫磷具有与对硫磷和氯吡硫磷相似的氧化脱硫反应, 本课题的后期研究表明, 水胺硫磷在大鼠和人肝微粒体中的代谢均是多种亚型参与的, 且两个种属间的代谢速率有较大差异(另文待发表)。因此, 有必要进一步研究水胺硫磷 CYP 代谢酶表型和代谢活化的种属差异, 评价其代谢与毒性的相关性, 为合理安全使用水胺硫磷提供科学依据。

参考文献:

- [1] Fang JF, Wang YY. Advances of studies on the mechanism of organophosphate pesticide poisoning[J]. *J Health Toxicol*(卫生毒理学杂志), 1999, **13**(4):275-277.
- [2] Jia Z, Li Y, Lu S, Peng H, Ge J, Chen S. Treatment of organophosphate-contaminated wastewater by acidic hydrolysis and precipitation [J]. *J Hazard Mater*, 2006, **129**(1-3):234-238.
- [3] Lin K, Liu W, Li L, Gan J. Single and joint acute tox-

- icity of isocarbophos enantiomers to *Daphnia magna* [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(11):4273-4277.
- [4] Liu XM, Xiao HZ, Chen GH, Liu YG. Study on toxicity of isocarbophos [J]. *Agrochemicals*(农药), 1981, **4**:21-24.
- [5] Eto M. *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry* [M]. Cleveland: CRC Press Inc., 1974:263.
- [6] Rong L, Guo X, Chen K, Zhu J, Li S, Jiang J. Isolation of an isocarbophos-degrading strain of *Arthrobacter* sp. scl-2 and identification of the degradation pathway [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(11):1439-1446.
- [7] von Bahr C, Groth CG, Jansson H, Lundgren G, Lind M, Glaumann H. Drug metabolism in human liver *in vitro*: establishment of a human liver bank [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, **27**(6):711-725.
- [8] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265-275.
- [9] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, **7**:88-95.
- [10] Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, **27**(11):1350-1359.
- [11] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, **10**(7):1093-1095.
- [12] Eyer F, Roberts DM, Buckley NA, Eddleston M, Thiermann H, Worek F, et al. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF) [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, **78**(5):531-537.
- [13] Buratti FM, Leoni C, Testai E. The human metabolism of organophosphoro-thionate pesticides: consequences for toxicological risk assessment [J]. *J Verbr Lebensm*, 2007, **2**:37-44.
- [14] Ma T, Chambers JE. A kinetic analysis of hepatic microsomal activation of parathion and chlorpyrifos in control and phenobarbital-treated rats [J]. *J Biochem Toxicol*, 1995, **10**(2):63-68.
- [15] Tang J, Cao Y, Rose RL, Brimfield AA, Dai D, Goldstein JA, et al. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29**(9):1201-1204.

Biotransformation and kinetics of isocarbophos in liver microsomes of rats *in vitro*

WEI Xia, XIE Jian-wei, LI Hua

(Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the metabolic activated metabolites and the kinetic characteristics of isocarbophos in rat microsomes *in vitro*. **METHOD** Metabolites of isocarbophos were screened and identified by liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (LC/Q TOF MS) in rat liver microsomes. The toxicity of isocarbophos and its metabolite was assessed by the acetylcholinesterase inhibition assay. The quantification analysis of isocarbophos and its metabolite was made using a liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (LC/Triple-Q MS/MS) method to investigate the metabolic kinetics of the isocarbophos and its oxidative metabolite. **RESULTS** Isocarbophos was rapidly eliminated in rat liver microsomes, and its $t_{1/2}$ was 14.6 min and the extrapolated Cl_H was $43.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. The major oxidative metabolite identified in incubates was its desulfuration metabolite isocarbophos oxon. The enzyme inhibition activity of the metabolite was much higher than that of isocarbophos and its IC_{50} was found to be four orders of magnitude lower than the parent, which indicated that the biotransformation of isocarbophos to isocarbophos oxon was a metabolic activation process. The kinetic curve of desulfuration to form isocarbophos oxon was biphasic, and the parameters obtained were $K_{m,app1} 1.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{max1} 0.43 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$, $K_{m,app2} 67.92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $V_{max2} 1.28 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$. **CONCLUSION** Isocarbophos can be metabolically activated by rat hepatic microsomes to form isocarbophos oxon. Like other phosphorothioates, the metabolic activation of isocarbophos may contribute significantly to its toxicity in bodies.

Key words: organophosphorus compounds; isocarbophos; isocarbophos oxon; metabolism; pharmacokinetics; toxicity

Foundation item: The project supported by National S & T Major Special Project on Major New Drug Innovation of China (2008ZXJ09006-001)

Corresponding author: LI Hua, E-mail: amms_hli@126.com, Tel: (010)66930664

(收稿日期: 2012-02-03 接受日期: 2012-03-20)

(本文编辑: 付良青)