

阿特拉津及其主要代谢物在大鼠体内的组织分布

梁秋云¹, 朱丹¹, 黄慧学^{1,2*}, 谭珍媛¹

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021;

2. 广西中医学院药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定大鼠血浆和组织中阿特拉津(ATR)及其主要代谢物脱乙基脱异丙基阿特拉津(DEDIA)的浓度,研究 ATR 及 DEDIA 在大鼠组织的分布特征。方法:大鼠单剂量灌胃 ATR,分别在给药后 0.5、2、6 和 12 h 取血和组织样本,以乙腈沉淀蛋白,0.5% 冰醋酸甲醇液-0.5% 冰醋酸水溶液梯度洗脱,HPLC 测定样品浓度。结果:ATR 在体内被快速且大量的代谢为 DEDIA,血浆和组织中均能检测到 ATR 和 DEDIA,尤以 DEDIA 为主;DEDIA 在各组织中广泛分布,但消除速率不一,以肝、肾消除速度最慢。结论:ATR 及 DEDIA 在大鼠各组织中的分布及消除规律,可为临床毒代动力学提供参考。

[关键词] 阿特拉津;代谢物;组织分布

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0222-04

Tissue Distribution of Atrazine and Its Main Metabolite in Rat

LIANG Qiu-yun¹, ZHU Dan¹, HUANG Hui-xue^{1,2*}, TAN Zhen-yuan¹

(1. Faculty of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Faculty of Pharmaceutical Science, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of atrazine (ATR) and its main metabolite (DEDIA) in rat plasma and tissues, and to study tissue distribution. **Method:** Rats were oral administrated atrazine at a single dose, blood and tissues samples were collected at 0.5, 2, 6 and 12 h after administration. After precipitated protein with acetonitrile, an HPLC-UV method was established to determine the concentration of ATR and DEDIA, the analytes were eluted by gradient solvent of MeOH/H₂O which contained 0.5% acetic acid. **Result:** ATR was quickly and extensively metabolized to DEDIA in rat, ATR and DEDIA could be detected in plasma and tissues;DEDIA widely distributed in various tissues, but with varies elimination rates, especially slow in liver and kidney. **Conclusion:** Those distribution and elimination regular of ATR and DEDIA can provide references for toxicokinetics study.

[Key words] atrazine;metabolite;tissue distribution

阿特拉津(atrazine, ATR)作为一种低毒除草剂,已在世界范围内广泛使用,近年来在我国的使用面

积也不断扩大。但 ATR 在环境中不易降解,且水溶性强,大量使用的 ATR 随地表水和地下水等进入食物链,对生物造成一定的影响。ATR 在体内 P450 酶系作用下可发生去烷基化,最终生成脱乙基脱异丙基阿特拉津(deethyldeisopropylatrazine, DEDIA)等代谢物^[1]。目前研究发现 ATR 是一种环境雌激素,在低浓度长期暴露下会对人和生物体的内分泌系统产生干扰作用,从而引起一系列疾病,甚至癌症等^[2]。通过食物链传递的 ATR 能影响机体脏器功能和生殖功能,使肝、肾、心脏等出现中毒症状,严重影响人

[收稿日期] 20101221(020)

[基金项目] 广西教育厅项目(200911MS135);广西中医学院中药药效研究重点实验室开放课题(09-007-06-16)

[第一作者] 梁秋云,博士,从事中药药理与机制研究,E-mail: qiuyun_liang@yahoo.com.cn, Tel:0771-5358272

[通讯作者] *黄慧学,在站博士后,从事新药开发,E-mail: hhx123@yahoo.com.cn, Tel:0771-3137585

类及动物的生殖与繁育^[3]。因此阿特拉津被列为环境荷尔蒙的可疑物质,备受各国政府的监控。而 ATR 及其代谢物在组织中分布特征尚未见报道。本研究采用高效液相色谱法,考察大鼠灌胃给药后 ATR 及其代谢物在各组织中的分布及消除特征,为临床毒代动力学研究提供相关参考。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters2695 高效液相系统(四元梯度泵,紫外检测器,自动进样器,Empower 2 色谱数据处理软件);日本 Hitachi CR21F 高速冷冻离心机;FSH-2A 组织匀浆机(江苏常州);BF-2000M 15A 型氮吹仪(北京八方世纪有限公司);美国 Milli-Q 纯水机。

1.2 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体重(180~200)g,由广西医科大学动物试验中心提供,动物使用许可证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.3 试剂 ATR, DEDIA 及内标物西玛津购于美国 Sigma 公司,甲醇、乙腈购于美国 Fisher 公司,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液配制 分别取 ATR 和 DEDIA 适量,置于 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并定容成 0.2,1 g·L⁻¹ 的贮备液。分别吸取贮备液各 1 mL 置于 25 mL 量瓶中,加乙腈至刻度,制成含 ATR 和 DEDIA 分别为 8,40 mg·L⁻¹ 的混合标准贮备液待用。另取西玛津约适量,置于 10 mL 量瓶中用乙腈溶解,并加至刻度,混匀后制成 0.2 g·L⁻¹ 的内标液,取该溶液 1 mL 置于 100 mL 量瓶中,继续用乙腈稀释至刻度,摇匀成 2 mg·L⁻¹ 的内标液待用。

2.2 色谱条件 WelchTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 0.5% 冰醋酸甲醇液(A)-0.5% 冰醋酸水溶液(B),梯度洗脱:0~10 min,5%~30% A;10~20 min,30%~60% A;20~25 min,60%~75% A;30 min,返回 5% A,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 225 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。在该色谱条件下,血浆及组织匀浆液中内源性物质不干扰 ATR, DEDIA 及内标物的测定(以肝组织为代表,其他组织色谱图略)。ATR, DEDIA 及内标物的峰形良好,与相邻峰分离度 > 1.5,见图 1。

2.3 动物及样品处理 取 SD 大鼠 24 只,随机分为 4 组,每组 6 只。实验前禁食不禁水 12 h,各组大鼠按 50 mg·kg⁻¹ 灌胃给予 ATR,分别于给药后 0.5,2,

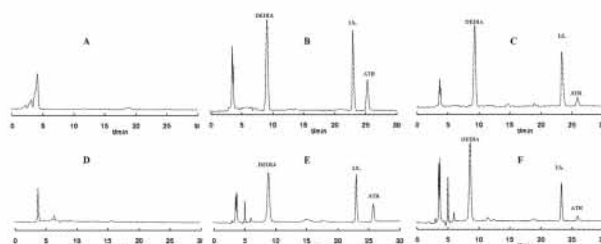


图 1 ATR 及 DEDIA 在大鼠血浆和肝组织中的 HPLC

A. 空白血浆;B. 空白血浆加对照品;
C. 给药后 1 h 血浆;D. 空白肝匀浆液;
E. 空白肝匀浆液加对照品;F. 给药后 1h 肝匀浆液

6,12 h 眼眶取血约 0.5 mL,取血后处死,迅速分离心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、睾丸、骨骼肌和脑组织。血样以肝素抗凝,于 4 °C 条件下 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离血浆,置于 -20 °C 冰箱备用;组织样本用生理盐水反复冲洗,滤纸吸干,准确称定质量并取一定质量,加入 4 倍量生理盐水,用组织匀浆机制成 20% 的组织匀浆液,于 4 °C 条件下 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液置于 -20 °C 冰箱备用。

取 100 μL 血浆或组织匀浆液,加 400 μL 乙腈(含 2 mg·L⁻¹ 的 I.S.),涡旋震荡 5 min,静置 30 min 后于 4 °C 条件下 1 万 r·min⁻¹ 离心 30 min,分取上清液,作为供试液。

2.4 线性试验及检测限 精密吸取 200,100,50,25,10,5 μL 混合标准贮备液,氮气吹干,加入空白血浆或组织匀浆液 100 μL 制成不同浓度的对照品液,按 2.3 项下条件处理,分别进样,记录峰面积。以 ATR 或 DEDIA 对内标峰面积比 Y 对浓度 X 进行直线回归,回归方程见表 1。血浆和各组织中 ATR 在 0.40~16.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好,定量限为 0.40 mg·L⁻¹ (S/N > 10),检测限均为 0.20 mg·L⁻¹ (S/N > 3); DEDIA 在 2.0~80 mg·L⁻¹ 线性关系良好,定量限为 2.0 mg·L⁻¹ (S/N > 10),检测限均为 1.0 mg·L⁻¹ (S/N > 3)。

2.5 精密度和方法回收率试验 空白血浆或组织加入 ATR 及 DEDIA,配制高、中、低 3 种质量浓度(ATR 为 16.0,4.0,0.8 mg·L⁻¹; DEDIA 为 80.0,20.0,4.0 mg·L⁻¹),按 2.3 项下条件处理,分别进样,各浓度日内重复测定 6 次,并连续测定 6 d,计算日内、日间的精密度;另取空白血浆或组织加入 ATR 及 DEDIA,配制高、中、低 3 种质量浓度(ATR 为

表 1 ATR 及 DEDIA 在血浆和各组织中的回归方程

部位	ATR		DEDIA	
	回归方程	r	回归方程	r
血浆	$Y=1.05X+0.36$	0.995	$Y=2.21X-1.60$	0.998
心	$Y=0.92X-0.89$	0.991	$Y=1.32X+0.55$	0.996
肝	$Y=1.74X-0.88$	0.997	$Y=0.93X+0.69$	0.999
脾	$Y=0.99X+0.43$	0.998	$Y=0.61X+0.34$	0.996
肺	$Y=1.07X+0.82$	0.993	$Y=1.11X-0.62$	0.997
肾	$Y=2.96X+1.03$	0.998	$Y=1.14X+0.31$	0.999
胃	$Y=0.32X-0.57$	0.996	$Y=3.07X-1.44$	0.998
小肠	$Y=1.58X-0.82$	0.994	$Y=1.37X+0.57$	0.996
睾丸	$Y=0.44X+0.21$	0.992	$Y=1.83X+0.66$	0.996
骨骼肌	$Y=0.80X+0.52$	0.993	$Y=2.60X-0.94$	0.997
脑	$Y=1.32X-0.71$	0.993	$Y=1.34X+0.91$	0.996

16.0, 4.0, 0.8 mg·L⁻¹; DEDIA 为 80.0, 20.0, 4.0 mg·L⁻¹), 按 2.3 项下条件处理, 分别进样, 计算回收率, 结果血浆和各组织中 ATR 峰面积的日内 (n=6) 和日间 (n=6) RSD < 15%, DEDIA 峰面积 RSD < 10%; ATR 在血浆和组织中的方法回收率 86.6% ~ 128.4%, DEDIA 为 90.2% ~ 113.7%, 见表 2。

2.6 稳定性考察 取空白血浆或组织配制高、中、低 3 个质量浓度 (16.0, 4.0, 0.8 mg·L⁻¹) 的 ATR, 分别考察在 4℃ 存放 24 h、-20℃ 存放 7 d 和反复冻融 3 次的稳定性。按 2.3 项下条件处理, 分别进样, 测定 ATR 的浓度无明显降低 (RSD < 10%); 另取空白血浆或组织配制高、中、低 3 个质量浓度 (80.0, 20.0, 4.0 mg·L⁻¹) 的 DEDIA, 分别考察在 4℃ 存放 24 h、-20℃ 存放 7 d 和反复冻融 3 次的稳定性。

表 2 ATR 及 DEDIA 精密度和方法回收率

%

样本	ATR			DEDIA		
	回收率 (n=3)	日内 RSD (n=6)	日间 RSD (n=6)	回收率 (n=3)	日内 RSD (n=6)	日间 RSD (n=6)
血	97.5	2.72	5.39	91.2	1.06	1.52
	96.2	3.11	4.24	94.0	1.95	2.73
	93.8	8.42	10.30	90.2	2.67	3.44
心	128.4	1.70	2.18	98.3	1.94	2.42
	88.6	1.94	2.77	94.1	2.46	4.17
	92.1	3.26	5.01	96.2	3.48	5.22
肝	101.3	5.39	9.66	96.8	2.15	2.09
	97.1	4.92	10.71	101.6	2.79	4.56
	86.6	11.60	13.83	95.4	4.83	6.72
脾	98.4	3.58	3.64	96.2	1.64	2.67
	90.7	4.99	6.08	102.7	3.72	2.83
	88.3	4.73	9.66	109.4	5.11	4.49
肺	94.5	3.70	4.47	98.2	1.20	1.92
	100.2	2.93	6.18	95.1	3.48	2.60
	98.4	5.24	7.00	96.5	2.25	4.54
肾	87.2	2.81	3.16	98.1	3.00	2.99
	93.7	4.41	3.97	93.3	2.67	3.02
	92.4	5.66	6.02	113.7	4.65	5.01
胃	97.1	2.18	4.14	94.0	1.03	1.40
	94.8	7.24	6.61	96.3	2.96	2.07
	90.7	5.53	8.03	98.4	4.87	5.82
小肠	92.6	1.40	3.34	92.4	1.24	2.20
	99.1	3.17	5.00	93.5	1.70	3.39
	102.4	5.19	4.82	93.7	3.56	4.61

续表 2

%

样本	ATR			DEDIA		
	回收率($n=3$)	日内 RSD($n=6$)	日间 RSD($n=6$)	回收率($n=3$)	日内 RSD($n=6$)	日间 RSD($n=6$)
睾丸	89.7	3.11	4.60	98.0	1.14	1.55
	94.0	5.06	6.82	100.8	2.08	3.20
	91.1	4.89	6.21	92.2	5.71	6.18
骨骼肌	96.2	2.19	2.89	98.1	2.33	2.04
	90.8	2.60	3.25	93.3	3.85	4.76
	92.2	3.04	5.47	96.1	4.17	4.51
脑	95.7	2.21	3.09	92.2	2.01	1.95
	93.9	3.37	5.81	94.7	3.17	4.03
	92.1	3.16	7.08	95.3	3.46	3.80

按 2.3 项下条件处理,分别进样,测定 ATR 的浓度无明显降低($RSD < 8\%$)。

2.7 组织分布考察 取血浆和各组织样本,按 2.2 项下条件进样测定,根据标准曲线计算各样本的药物浓度。结果表明,ATR 口服后被大量代谢为 DEDIA,血浆和组织中均能检测到 ATR 和 DEDIA,尤以 DEDIA 为主。DEDIA 在大鼠体内分布广,并能通过血脑屏障,但在 2 h 达到峰值后迅速消除;而在肝、肾组织中的 DEDIA 则消除缓慢,12 h 后仍能大量检测其存在,见图 2。

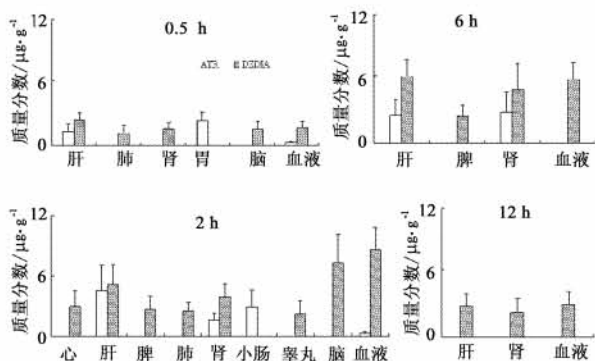


图 2 ATR 及 DEDIA 在各时间点的血浆和组织分布

3 讨论

进入体内的 ATR 在 P450 酶作用下,代谢为亲水性更强的 DEDIA,采用甲醇-水等度洗脱不能同时

检测两者。而采用甲醇-水梯度洗脱时,能同时测定 ATR 及 DEDIA,但其峰形较宽,对称性差;当在流动相体系中加入适量冰醋酸后,能显著改善 ATR 及 DEDIA 的峰形,获得理想的分离效果。由于生物样本样本量小,本实验直接采用乙腈除蛋白法纯化样品,通过线性、检测限、精密度、回收率、稳定性等考察,结果均能满足样品测定的要求。

大鼠组织分布结果表明: ATR 在体内被快速且大量地代谢为 DEDIA, DEDIA 在各组织中广泛分布,并能大量透过血脑屏障,且在肝、肾等部位长时间蓄积,提示肝、肾等组织可能是毒性的靶器官,但 DEDIA 对器官的毒性作用还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 许人骥,魏复盛,王永华,等. 气相色谱法分析尿液样品中的阿特拉津及其代谢物[J]. 色谱,2007,25(5):758.
- [2] Lidia A, Rosamaria L, Antonio M, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells[J]. Environ Health Perspect,2008,116(12):1648.
- [3] Laws S C, Hotchkiss M, Ferrell J, et al. Chlorotriazine herbicides and metabolites activate an ACTH-dependent release of corticosterone in male Wistar rats[J]. Toxicol Sci,2009,112(1):78.

[责任编辑 邹晓翠]