

新類尼古丁殺蟲劑殺蟲藥理作用與 尼古丁-乙醯膽鹼接受器之關係

謝再添

前 言

在昆蟲體內有關乙醯膽鹼傳遞之接受器主要包括三者，分別是：(一) 尼古丁-乙醯膽鹼接受器(簡稱 nAChR)，(二) 腐魚毒-自動接受器(muscarinic autoreceptors)，及(三) 混合型之乙醯膽鹼接受器(mixed nicotinic/muscarinic receptors)。昆蟲神經傳導物質主要由昆蟲之神經內分泌系統所分泌，職司傳遞神經訊息及調節神經及內分泌系統平衡等功能，依其功能構造不同可分成四大類：(一) 生物胺神經傳導物 (Biogenic amine transmitters)，(二) 胺基酸傳導物(Amino acid transmitters)，(三) 神經肽傳導物(Neuropeptide transmitters) 及(四) 一氧化氮化物(Nitric oxides, NO)。目前，雖然沒有直接證據顯示一氧化氮氣體在昆蟲體內具神經傳導作用，但 Elphick et al (1993)指出在蝗蟲(*Schistocerca gregoria*)腦內具有氧化氮化物及一氧化氮活化 guanylyl cyclase 存在之事實；乙醯膽鹼及本文所述尼古丁-乙醯膽鹼接受器依據 Osborne(1996)分類應屬於生物胺類之神經傳導系統。

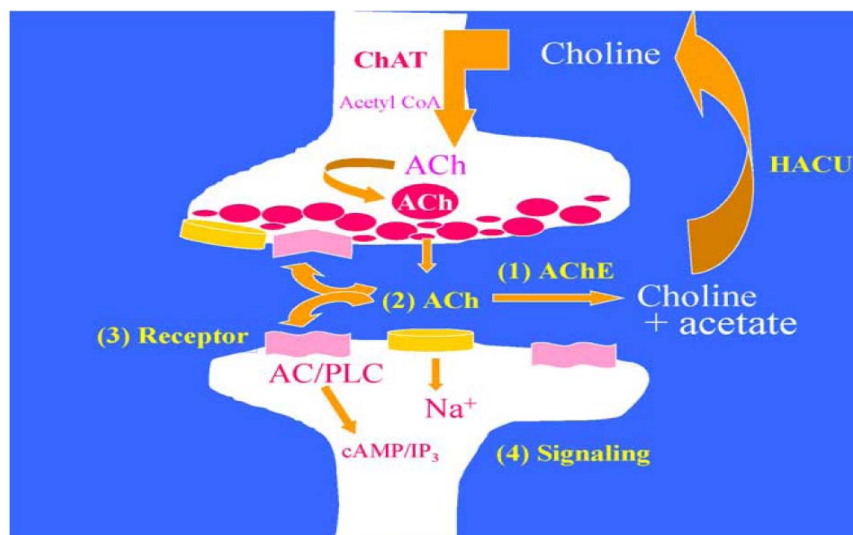


圖 1. 膽鹼性突觸、乙醯膽鹼接受器及乙醯膽鹼酶相關交互作用。

Fig. 1. The diagram of interaction related with cholinergic synapse, acetylcholine receptor and acetylcholin esterase. (Pope et al., 2005)

圖 1. 顯示乙醯膽鹼、乙醯膽鹼酯酶及尼古丁-乙醯膽鹼接受器三者在神經突觸區之交互作用。在前突觸區可發現膽鹼經由乙醯膽鹼轉換酶 (Choline acetyltransferase) 及乙醯輔酶 A 共同作用產生乙醯膽鹼，當乙醯膽鹼變成可攜帶訊息之神經傳導物質後分流至兩個方向，一則與乙醯膽鹼酯酶作用分解為乙酸乙酯及膽鹼然後進入前述循環中；另一則轉至後突觸區與乙醯膽鹼接受器及 Adenylate cyclase/ Phospholipase C (AC/PLC) 等交互作用後將神經訊息傳達至昆蟲中央神經系統 (Pope *et al.*, 2005)。

本文擬以益達胺、賽速安及可尼丁三者為例探討有關新類尼古丁劑之生物藥效及其與尼古丁-乙醯膽鹼接受器間親和力之關聯性和作用機制。

新類尼古丁劑研發史

新類尼古丁劑之化學構造主要由三部份組合而成(圖 2.)分別是：(一) 環狀系統(Ring system)或直鏈構造(noncyclic structures)，(二) 含氮代基之異環官能基(Heterocyclic N-substituents)，(三) 不同型態之藥理團(Different types of pharmacophores)：計有三種型態分別是 2-Chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl-(CTM)、6-Chloro-pyrid-3-ylmethyl-(CPM) 及 (±)-6-Tetrahydro-fur-3-ylmethyl-(TFM)。

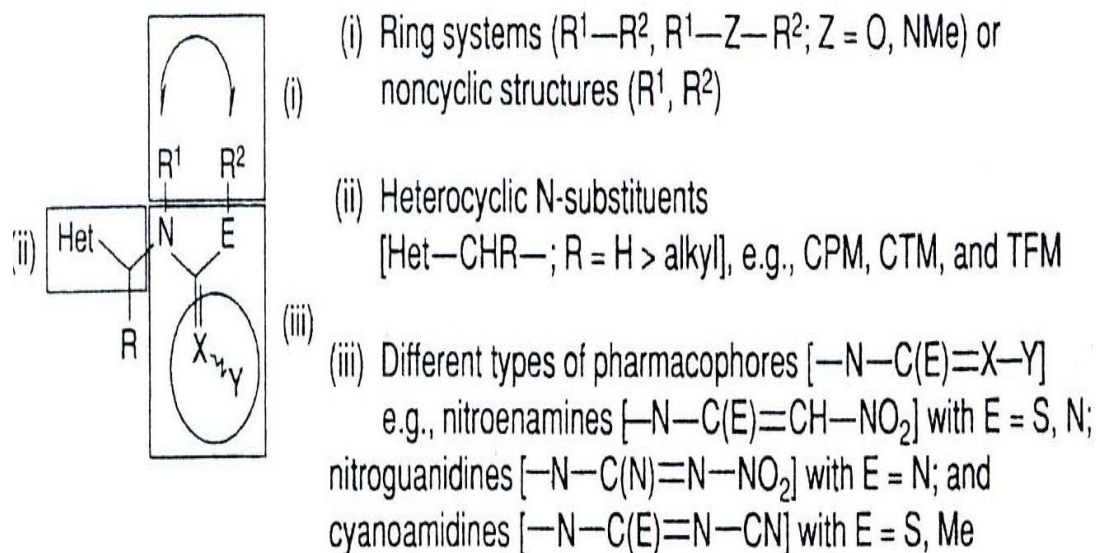
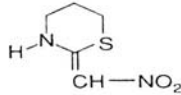
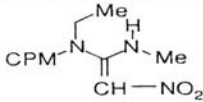
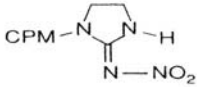
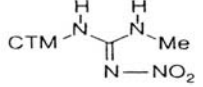
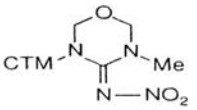
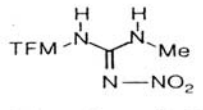
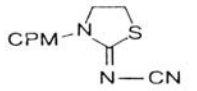
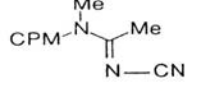


圖 2. 新類尼古丁劑主要三個結構官能團示意圖。

Fig. 2. Structural segments for family of neonicotinoids. (Jeschke and Nauen, 2005)

SKI-71 為殼牌(Shell)公司於 1970 年所研發之產品，命名為 nithiazine，是後來一系列新類尼古丁劑產品之先驅(圖 3.)，也是 nitromethylene heterocyclic 類化合物之殺蟲劑，其生化作用機制為與尼古丁-乙醯膽鹼接受器結合而阻斷乙醯膽鹼神經訊息之傳遞。由於 SKI-71 對目標生物及哺乳類動物毒性強且安定性差，故未能成為商品化之殺蟲劑。15 年後第一個商品化之新類尼古丁劑-益達胺被發展出來，藥效廣及半翅目、鞘翅目及一部份之鱗翅目，其作用方式包括接觸、胃毒及系統性毒效，在應用上可以是噴灑、粒劑撒布、澆灌或種子處理等，此藥劑之投入植物保護市場，可謂掀起一段不小之波瀾；繼益達胺之後六個類尼古丁劑被發展出來且上市應用(圖 3.)，其中包括有本文之主角-可尼丁(於 1989 年被研發出來)及賽速安(於 1992 年被研發出來) 2 種殺蟲劑 (Jeschke *et al.*, 2002)。

Pharmacophores [—N—C(E)=X—Y]	Structure type	
	Ring system (R ¹ —R ² , R ¹ —Z—R ²)	Noncyclic structure (R ¹ , R ²)
Nitroenamines (E = S, N) (nitromethylenes) [—N—C(E)=CH—NO ₂]	 Nithiazine	 Nitenpyram (1987) ^a
Nitroguanidines (E = N) [—N—C(N)=N—NO ₂]	 Imidacloprid (1985) ^a	 Clothianidin ^b (1989) ^a
	 Thiamethoxam (1992) ^a	 (±)-Dinotefuran (1993) ^a
Cyanoamidines (E = S, Me) [—N—C(E)=N—CN]	 Thiachloprid (1986) ^a	 Acetamiprid (1988) ^a

^aYear of the first patent application (priority date) covering the insecticide.

圖 3. 先驅 Nithiazine 及後續商品化之新類尼古丁殺蟲劑具不同藥理團之結構示意圖。

Fig. 3. Chemical structures of the first generation neonicotinoid nithiazine and sequential commercialized neonicotinoids displaying the different types of pharmacophors. (Jeschke *et al.*, 2002)

何以新類尼古丁劑可以與 尼古丁-乙醯膽鹼接受器交互作用且具選擇性？

對於此問題之可能解答為以下 2 種：(一)由於尼古丁及新類尼古丁劑之六環氮素與另一五環氮素之距離為 5.9 Å，此距離剛好等於尼古丁-乙醯膽鹼接受器兩處結合位置(Binding site)之距離，故新類尼古丁劑可以與尼古丁-乙醯膽鹼接受器有很好之親和力(圖 4)；(二)至於新類尼古丁劑施用時對哺乳動物較安全乃因五環或直鏈上碳氮雙鍵接 NO₂、碳碳雙鍵接 NO₂ 或碳氮雙鍵接 CN 等官能基對昆蟲之毒性強過哺乳動物之故 (Tomizawa, 2005)。

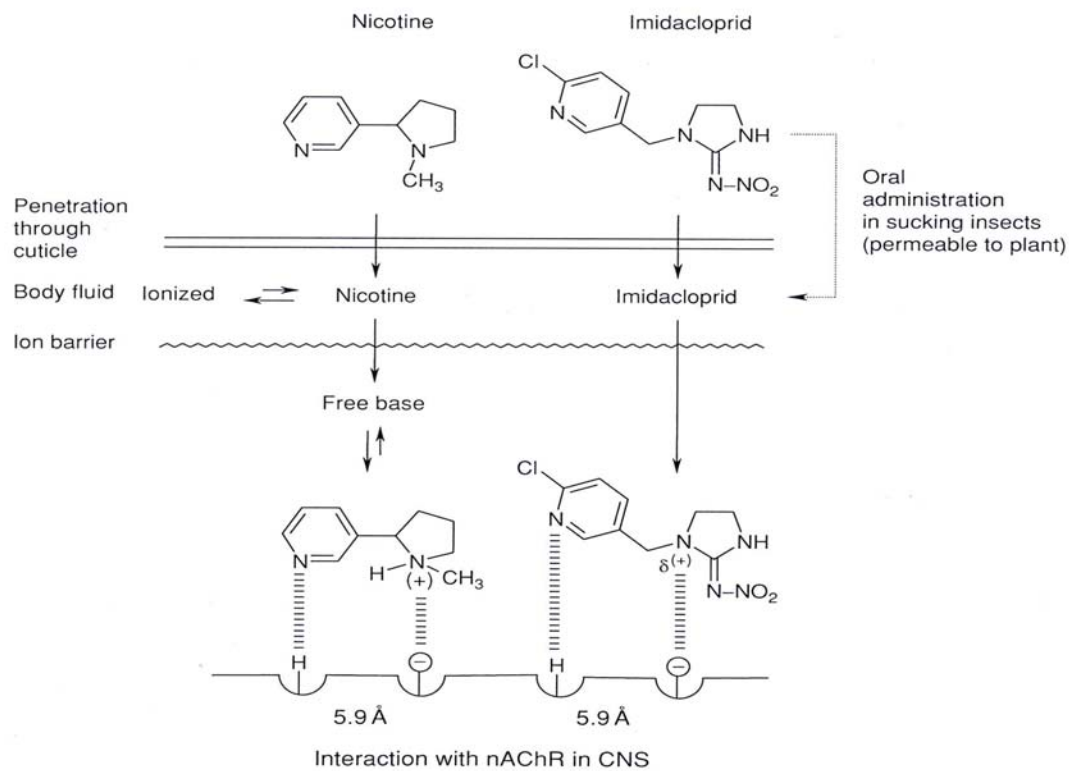


圖 4. 尼古丁及益達胺殺蟲作用機制圖。
Fig. 4. Insecticidal mode of action of (S)-nicotine and imidacloprid.
(Tomizawa, 2005)

新類尼古丁劑對目標害蟲生物藥效之比較

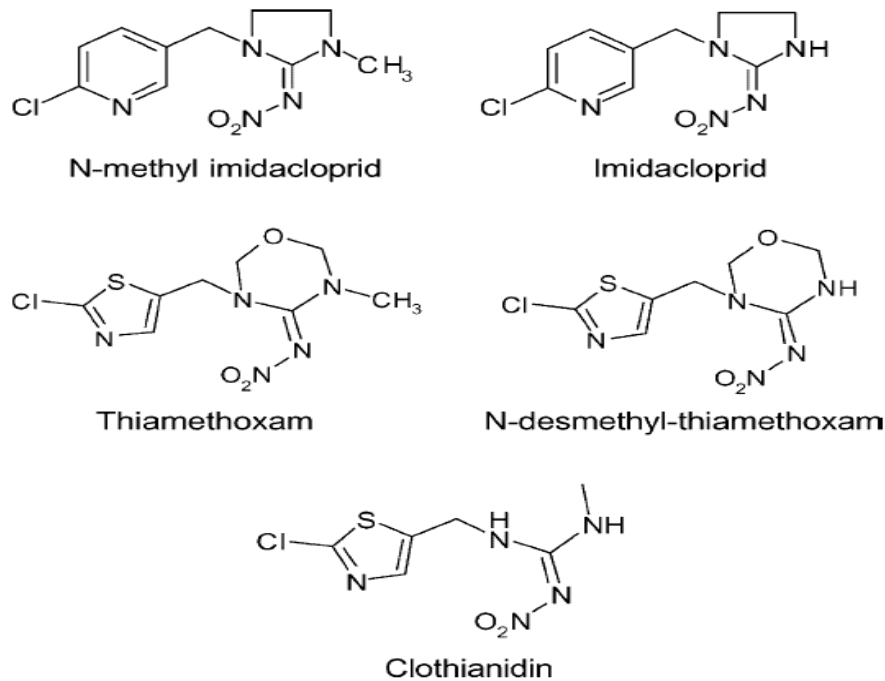


圖 5. 新類尼古丁藥劑如益達胺、可尼丁及賽速安等之化學構造圖。
Fig. 5. Chemical structure of neonicotinoid insecticides such as imidacloprid, clothianidin and thiamethoxam (Nauen *et al.*, 2003)

本文供試藥劑主要包括：可尼丁、益達胺、賽速安及其代謝產物 *N*-methyl imidacloprid, *N*-desmethyl thiamethoxam(圖 5.)，由結構上可發現可尼丁與賽速安之結構較相似，在其環狀系統部分有差異，前者為開放之直鏈結構，而後者則為封閉之環狀結構(Nauen *et al.*, 2003)。

第一個試驗是以萵苣或菜豆葉片浸漬不同濃度之新類尼古丁劑藥液，陰乾後置於紙製蟲盒中然後引入菸草夜蛾(Tobacco budworm)或蕃茄甜菜夜蛾(Fall armyworm)二齡幼蟲取食 4 小時後移至不含藥劑之人工飼料穴盤中，3 天後計數其不同濃度之死亡率。

結果(表 1.)顯示：3 種藥劑對於蕃茄甜菜夜蛾及菸草夜蛾之二齡幼蟲之毒效最強者首推可尼丁，在濃度 8ppm 下就可使 2 種害蟲之死亡率超過 95%，其次是賽速安，最差者為 *N*-desmethyl thiamethoxam，而此兩者之生物藥效分別為可尼丁之 1/5 及 1/25 (Nauen *et al.*, 2003)。

表 1. 葉片浸漬可尼丁、賽速安及 *N*-desmethyl thiamethoxam 3 種藥劑
測試對菸草夜蛾與蕃茄甜菜夜蛾二齡幼蟲之藥效(3 天)

Table 1. Efficacy of clothianidin (CLT), thiamethoxam (TMX), and *N*-desmethyl thiamethoxam (ND-TMX) against 2nd instar larvae of *H. virescens* and *S. frugiperda* in a leaf-dip bioassay (3days)

Conc. (mgL ⁻¹)	<i>Spodoptera frugiperda</i>			<i>Heliiothis virescens</i>		
	CLT	TMX	ND- TMX	CLT	TMX	ND- TMX
1000	100	100	100	100	100	100
200	100	100	95	100	100	100
40	100	85	0	100	78	20
8	100	15	0	95	2	0

Values represent percentage of mortality.

(Nauen *et al.*, 2003)

第二個試驗是以豆科植物葉片浸漬 6~7 種不同濃度之新類尼古丁劑藥液約 3 秒鐘，陰乾後引入桃蚜成蟲(無翅型)，試驗設計為每個處理濃度使用 30 隻桃蚜成蟲，每處理三重複，試驗 6 天後計算其死亡率並估算每一藥劑之 95%致死濃度(LC₉₅)值。

表 2. 結果顯示賽速安、可尼丁及益達胺 3 種藥劑對桃蚜之生物藥效在伯仲之間，其 LC₉₅ 介於 1.09~1.31 之間，分別為 2 種中間代謝產物 *N*-Desmethyl thiamethoxam 及 *N*-Methyl imidacloprid 之 25 及 5 倍(Nauen *et al.*, 2003)。

表2. 葉片浸漬5種新類尼古丁藥劑測試對桃蚜之藥效(6天)

Table 2. Efficacy of different neonicotinoid insecticides against *Myzus persicae* in leaf-dip bioassays (6 days after treatment)

Compound	LC ₉₅		Slope±SD
	(mgL ⁻¹)	95%FL ^a	
Thiamethoxam	1.31	1.07-1.75	4.8±0.48
<i>N</i> -Desmethyl thiamethoxam	31	19-140	3.6±0.40
Clothianidin	1.28	0.79-4.5	3.7±0.40
<i>N</i> -Methyl imidacloprid	5.93	4.51-8.59	2.7±0.26
Imidacloprid	1.09	0.83-1.57	2.8±0.26

^a95% Fiducial limits.

(Nauen *et al.*, 2003)

賽速安及可尼丁對尼古丁-乙醯膽鹼接受器具 顯著不同親和力之證據

作者為了解賽速安及可尼丁對尼古丁-乙醯膽鹼接受器之親和力，執行賽速安等 5 種藥劑在家蠅頭部細胞膜上置換 $[^3\text{H}]$ imidacloprid 之能力比較(表 3.)，結果發現賽速安之 I_{50} 最高-5000 nM，分別是可尼丁及益達胺 8,000 及 6,500 倍， I_{50} 是一指數代表從結合位置(Binding site)置換一半以 $[^3\text{H}]$ 標示之益達胺所需之濃度，故 I_{50} 值愈高表示其與 nAChR 之結合力量愈弱(Nauen *et al.*, 2003)。

表3. 家蠅頭細胞膜製備之nAChR被不同新類尼古丁劑內 $[^3\text{H}]$ imidacloprid 置換情形

Table 3. Displacement of $[^3\text{H}]$ imidacloprid by different neonicotinoids from nAChR preparation from housefly head membranes

Compound	I_{50} (nM)
Thiamethoxam	5000
N-Desmethyl thiamethoxam	8.0
Clothianidin	0.60
N-Methyl imidacloprid	1600
Imidacloprid	0.79

I_{50} : This represents the concentration needed to displace half of the radioligand from its binding site.

$[^3\text{H}]$ imidacloprid : $1.406 \text{ GBq}\mu\text{mol}^{-1}$

(Nauen *et al.*, 2003)

另一方法是以電生理學測定由激化電位與基底電位間之電位差，作法是以 *disperse* 從菸草夜蛾腦神經球分離出神經元細胞，於 37°C 體外培育 5 分鐘後離心分離擷取含神經元細胞之上層液，利用基底電壓-70mV 及整個細胞電壓捕捉技術(Whole-cell voltage clamp technique)做神經細胞之電生理反應。

結果顯示賽速安及 N-Methyl imidacloprid 兩化合物於濃度高達 $100\mu\text{M}$ ，仍然無電位差反應。相反地，可尼丁及益達胺濃度低至 100nM 及 $3\mu\text{M}$ 即有明顯且強烈之電位差反應(圖 6.)，由以上兩個實驗可發現賽速安對 nAChR 之結合力量十分弱(Nauen *et al.*, 2003)。

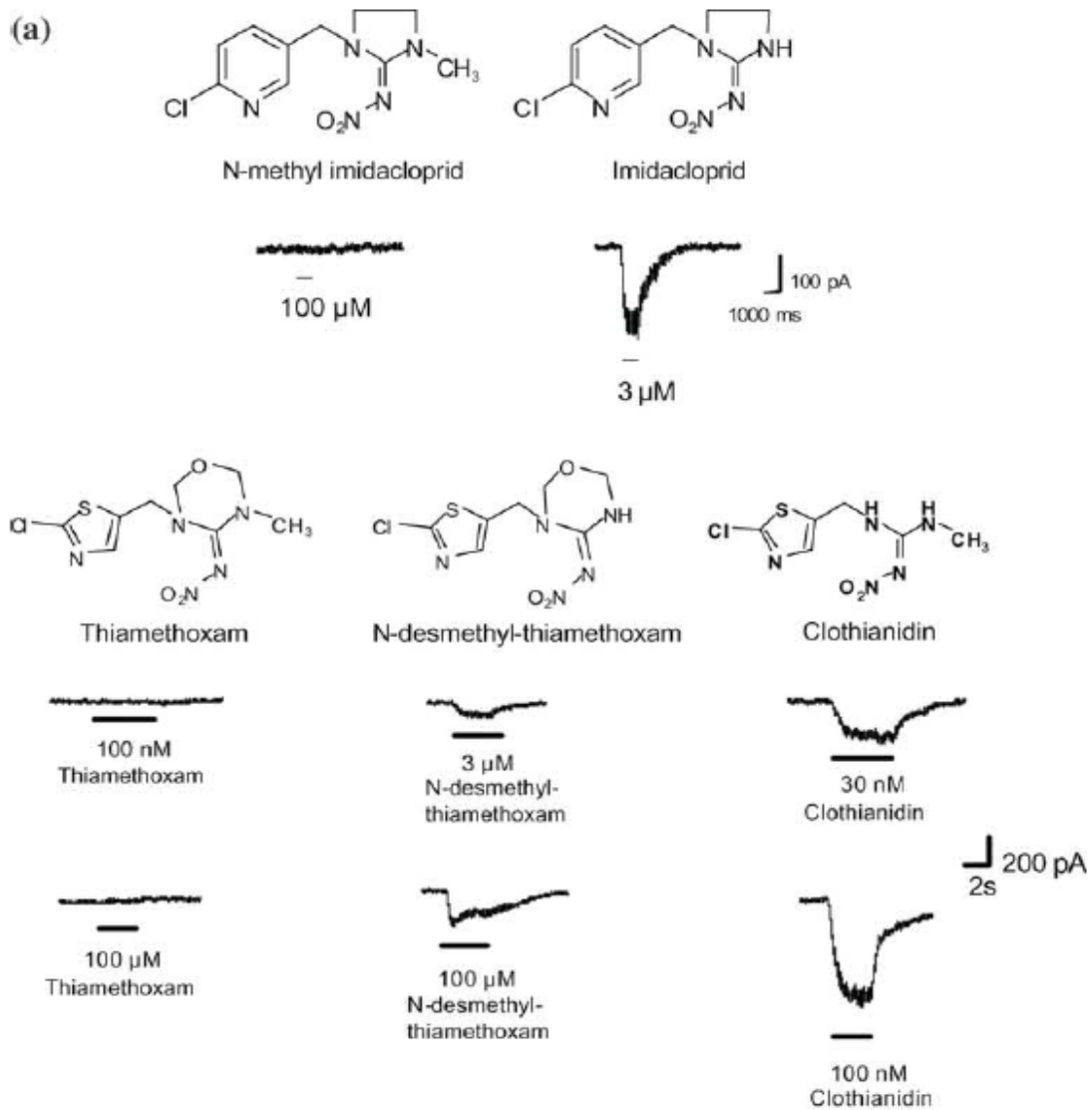


圖 6. 五種新類尼古丁劑處理菸草蛾後自神經系統分離神經原細胞整個細胞電流(壓)反應分析圖。

Fig. 6. Whole cell current responses (holding potential -70 mV) of neurons isolated from the CNS of tobacco budworm, *H. virescens* after application of neonicotinoid insecticides. (Nauren *et al.*, 2003)

何以對尼古丁-乙醯膽鹼接受器親和性低之賽速安對目標害蟲仍具高毒效？

作者認為賽速安如同培丹為沙蠶毒素之前驅物一樣為可尼丁之前驅物，其理論基礎為賽速安經由植物或昆蟲吸收後在體內經由一系列之代謝反應而轉變為對尼古丁-乙醯膽鹼接受器親和性高且具殺蟲效果之可尼丁，於是作者便開始設計以下實驗來證實其看法。

在植體內葉部組織賽速安轉換成可尼丁之證據

將含 100 ppm 賽速安溶液澆灌至棉花，3 天後取植體葉片(3 葉片/每株)，以液態氮冷凍乾燥並研磨之，然後以有機溶劑萃取、離心及取上層液之方式，最後以 LC-MS/MS 分析鑑定其成分。

結果顯示在棉花葉片上的賽速安 3 天後可直接轉換為可尼丁，但其中間代謝產物 *N*-desmethyl thiamethoxam 並未衍生出來(圖 7)。觀察 3 個葉片組織，結果均顯示可尼丁之生成為漸進式，可能之差異為在植體可直接生成可尼丁，但速度較在昆蟲體內慢(Nauen *et al.*, 2003)。

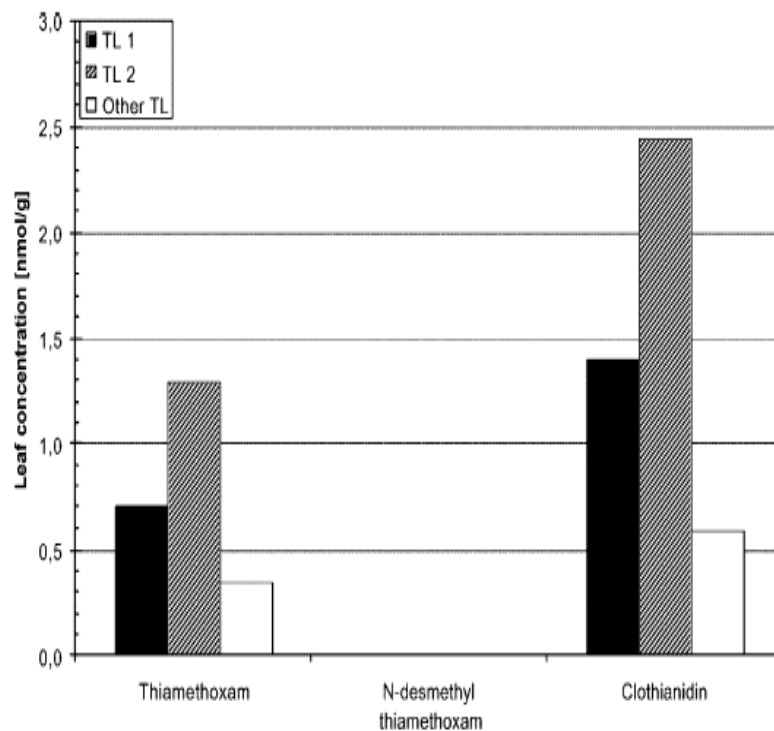


圖 7. 棉花以賽速安 100ppm 澆灌 3 天後觀察葉片中賽速安、*N*-desmethyl thiamethoxam 及可尼丁之濃度含量。

Fig. 7. True leaf (TL) concentration of thiamethoxam, *N*-desmethyl thiamethoxam, and clothianidin in cotton plants 3 days after drench application of 100 ppm thiamethoxam.

(Nauen, R. *et al.*, 2003)

在目標害蟲體內賽速安轉換成可尼丁之證據

選用蕃茄甜菜夜蛾之五齡幼蟲，以含有不同劑量之賽速安之洋菜膠人工飼料丁餵食，20 分鐘後將供試幼蟲移至不含藥劑之飼料穴盤中，然後取同一劑量 3 隻幼蟲之前足部位混合之，並以氘甲烷萃取，再以冷凍離心機 10,000 g 轉速離心 10 分鐘，取上層液後以 LC-MS/MS 分析鑑定其成分。

結果顯示以劑量 1 μ g 賽速安處理之洋菜膠人工飼料丁餵食蕃茄甜菜夜蛾幼蟲 4 小時及 24 小時後，蟲體內除了賽速安由原來 65%降低至 5%，其他如中間產物 *N*-desmethyl thiamethoxam 及可尼丁均有明顯增加之趨勢，尤其是可尼丁變化最為明顯，由原來約 25%之含量遽增為 90%；而此狀況在高劑量 5 μ g 處理之賽速安變化亦雷同(圖 8.)。

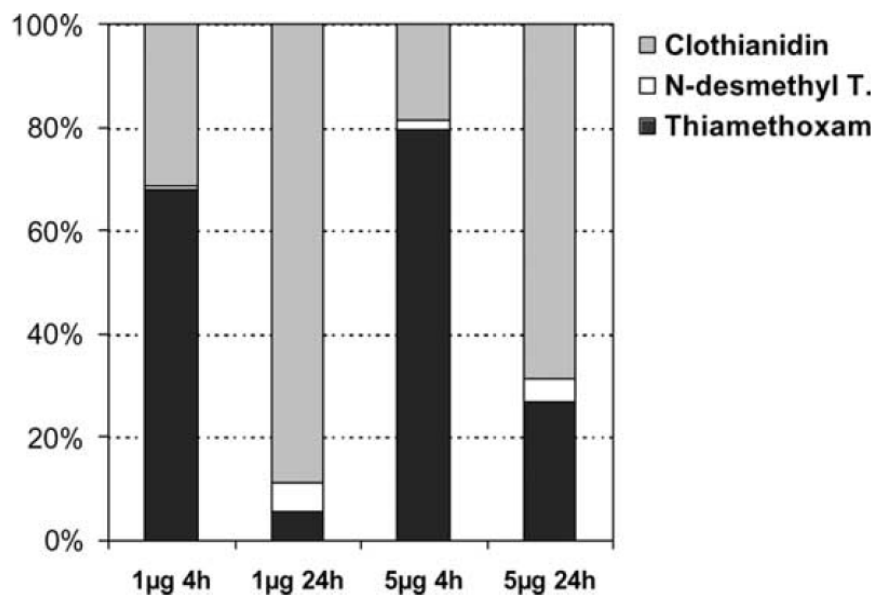


圖 8. 賽速安以 2 種不同劑量餵食蕃茄甜菜夜蛾經 4 及 24 小時後觀察在幼蟲可萃取賽速安、*N*-desmethyl thiamethoxam 及可尼丁之含量百分比。

Fig. 8. Extraction of thiamethoxam, *N*-desmethyl thiamethoxam, and clothianidin from whole larvae of *S. frugiperda*, 4 and 24 h after oral administration of different doses of thiamethoxam.

(Nauen *et al.*, 2003)

結 語

由以上之試驗結果，作者等人歸納以下幾點結論：

- 一、以整個細胞電壓捕捉技術分析菸草夜蛾之神經細胞顯示賽速安對 nAChR 無任何之親和活性存在，儘管如此並無損賽速安對目標害蟲之優越生物毒效。
- 二、可尼丁是賽速安處理之棉花葉片組織內最優勢的代謝產物；非但如此，蕃茄甜菜夜蛾幼蟲取食以賽速安處理過之飼料 20 分鐘後，就可以在幼蟲體腔組織發現到此代謝化合物。
- 三、由於賽速安不但可經由植體代謝轉換成可尼丁，亦可經由昆蟲體腔更快速代謝轉換為可尼丁(幾分鐘)；因此作者建議以可尼丁為防治藥劑之作物上，應避免再使用賽速安藥劑，此乃以抗性管理之觀點來看，主要是避免增加對目標害蟲之選汰壓力。

參考文獻

1. Matsuda, K., S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso and D. B. Satelle. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.* 22 : 573-580.
2. Nagata, K., Y. Iwanaga, T. Shono, and T. Narahashi. 1997. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel by imidacloprid and cartap. *Pestic. Biochem. Physiol.* 59 : 119-128.
3. Nauen, R., U. Ebbinghaus-Kintscher, V. L. Salgado, and M. Kausmann. 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 76 : 55-69.
4. Osborne, R. H. 1996. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* 69 : 117-142.
5. Pope, C., S. Karanth, and J. Liu 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19 : 433-446.