

## DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210308003

汪震, 华修德, 施海燕, 等. 异菌脲在油菜植株、土壤和水中的代谢途径及代谢物 3,5-DCA 的毒性研究[J]. 生态毒理学报,2022, 17(4): 378-385 Wang Z, Hua X D, Shi H Y, et al. Studies on metabolic pathways of iprodione in rape plant, soil, and water and toxicity of metabolite 3,5-DCA [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 378-385 (in Chinese)

# 异菌脲在油菜植株、土壤和水中的代谢途径及代谢物 3,5-DCA 的毒性研究

汪震,华修德,施海燕,王鸣华\*

南京农业大学植物保护学院,南京 210095 收稿日期:2021-03-08 录用日期:2021-05-08

**摘要:**为了明确异菌脲在作物和环境中的代谢及代谢产物 3,5-二氯苯胺(3,5-DCA)的生态风险,通过水培试验、土壤孵育和水解试验,采用 UPLC-TOF-MS/MS,鉴定了异菌脲在油菜植株、土壤和水中的代谢产物,推测了代谢途径,并研究了 3,5-DCA 对 细胞和蚯蚓的毒性。在油菜植株中检测到 4 种异菌脲代谢产物(M1、M3、M6 和 M7),在土壤中发现了 5 种代谢产物(M1、M3、M6 太M7 和 M8),在水中发现了 7 种代谢产物(M1、M2、M4、M5、M7、M8 和 M9)。根据代谢产物的化学结构,明确了异菌脲的代谢主要通过酰胺键的断裂及脱烷基化反应,并推测了异菌脲在油菜植株、土壤和水中的代谢途径。代谢产物 3,5-DCA 对 Hep G2 的细胞毒性(IC<sub>50</sub> 为 99.7 mg·L<sup>-1</sup>)是异菌脲(IC<sub>50</sub> 为 304.8 mg·L<sup>-1</sup>)的 3.1 倍,对赤子爱胜蚓的 14 d 急性毒性(LC<sub>50</sub> 为 31.56 mg ·kg<sup>-1</sup>)是母体的 15 倍以上(LC<sub>50</sub> >500 mg·kg<sup>-1</sup>),表明异菌脲的代谢为增毒代谢。研究结果对异菌脲的环境安全性评价具有重要的意义。

关键词:异菌脲;代谢产物;细胞毒性;蚯蚓急性毒性;代谢途径 文章编号:1673-5897(2022)4-378-08 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

# Studies on Metabolic Pathways of Iprodione in Rape Plant, Soil, and Water and Toxicity of Metabolite 3,5-DCA

Wang Zhen, Hua Xiude, Shi Haiyan, Wang Minghua<sup>\*</sup> College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China **Received** 8 March 2021 **accepted** 8 May 2021

**Abstract**: In order to clarify the metabolisms of iprodione in crop and environment and the ecological risk of metabolite 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA), the metabolites of iprodione in rape plant, soil and water were identified by UPLC-TOF-MS/MS through the hydroponic experiment, soil incubation and hydrolytic experiment, and the metabolic pathways were speculated. In addition, the toxicity of 3,5-DCA was studied. Four metabolites (M1, M3, M6 and M7) were found in rape plants, five metabolites (M1, M3, M6, M7 and M8) were found in the soil, and seven metabolites (M1, M2, M4, M5, M7, M8 and M9) were found in water. According to the chemical structure of the metabolites, we found that iprodione are mainly metabolized by the cleavage of amide bond and dealkylation reaction, while the metabolic pathways of iprodione in rape plant, soil and water were speculated. The cytotoxicity of

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0200207)

第一作者:汪震(1996—),男,博士研究生,研究方向为农药残留与环境毒理,E-mail: 2020202059@stu.njau.edu.en

<sup>\*</sup> 通讯作者(Corresponding author), E-mail: wangmha@njau.edu.cn

metabolite 3,5-DCA (IC<sub>50</sub> was 99.7 mg·L<sup>-1</sup>) to Hep G2 was 3.1 times higher than that of iprodione (IC<sub>50</sub> was 304.8 mg·L<sup>-1</sup>), and the 14 d acute toxicity of 3,5-DCA (LC<sub>50</sub> was 31.56 mg·kg<sup>-1</sup>) to earthworm was more than 15 times greater than that of the parent (LC<sub>50</sub>>500 mg·kg<sup>-1</sup>), which indicated that the metabolic process of the iprodione was toxicity-increased metabolism. The results are of great significance for the environmental safety evaluation of iprodione.

Keywords: iprodione; metabolite; cytotoxicity; acute toxicity against earthworms; metabolic pathways

异菌脲(iprodione)是二甲酰亚胺类高效广谱保 护性杀菌剂。其作用机理是抑制蛋白激酶,控制许 多细胞功能的细胞内信号,包括与碳水化合物结合 进入真菌细胞组分,起到干扰作用,既可抑制真菌孢 子萌发和产生,也可抑制菌丝生长,主要防治由灰葡 萄孢属<sup>[1]</sup>、丛梗孢属<sup>[2]</sup>、核盘菌属<sup>[3]</sup>、小菌核菌属和交 链孢属<sup>[4]</sup>等引起的多种蔬菜、果树和果实贮藏期病 害<sup>[5]</sup>。据中国农药信息网统计,目前我国登记的含 有异菌脲的产品有 161 个,其中登记在油菜上防治 油菜菌核病的产品有 9 个。

化学农药的代谢产物和代谢途径受环境因素影 响其转化过程复杂多样<sup>60</sup>。研究证明,有些农药代 谢物的毒性比母体化合物更大。例如,Zhang 等<sup>77</sup>通 过细胞毒性试验发现丙硫菌唑的主要代谢物脱硫丙 硫菌唑的细胞毒性高于母体;Gao 等<sup>[8]</sup>研究发现乙 虫腈的代谢产物乙虫腈亚砜对斑马鱼的毒性是母体 的6倍;Liu等<sup>99</sup>报道了吡丙醚在5种土壤中的主要 降解产物 4-羟基-吡丙醚对蚯蚓的毒性远高于母体 吡丙醚。因此,研究和评估农药代谢产物的环境风 险对食品安全和生态安全具有重要的意义[10-12]。研 究表明.异菌脲在植物表面主要通过脱卤反应发生 代谢<sup>[13]</sup>。此外,研究发现 3,5-二氯苯胺(3,5-DCA)是 二甲酰胺类杀菌剂(异菌脲、腐霉利和乙烯菌核利) 在植物和环境中的代谢产物之一。Ambrus 等<sup>[14]</sup>报 道了二甲酰亚胺类杀菌剂在大豆、黄瓜和花生等植 物上的主要代谢物之一为 3,5-DCA。Rifai 等[15]发 现3,5-DCA是腐霉利的光解产物。美国环境保护 局(U.S. Environmental Protection Agency, US EPA)报 道了 3,5-DCA 比母体化合物具有更强的毒性和持 久性<sup>[16]</sup>。Dom 等<sup>[17]</sup>研究发现,3,5-DCA 对羊角月牙 藻的 72 h-EC<sub>50</sub> 值为 14.5 mg·L<sup>-1</sup>, 对大型溞的 48 h-EC<sub>50</sub>值为0.60 mg·L<sup>-1</sup>。Lai 等<sup>[18]</sup>研究发现异菌脲 代谢产物 3.5-DCA 对斑马鱼成鱼的毒性高于母体 异菌脲。因此,联合国粮食与农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 规定乙烯菌核利的残留定义为乙烯菌核利及其所有

含 3,5-DCA 部分的代谢产物之和<sup>[19]</sup>。异菌脲在我 国主要用于防治油菜菌核病,其在发挥药效作用的 同时,也会对环境造成污染,还会降解产生代谢产 物。因此,开展异菌脲在油菜上的代谢研究至关重 要,有助于明确其代谢途径。同时研究异菌脲代谢 产物 3,5-DCA 的生态毒性对于异菌脲的风险评估 具有重要的意义,可为异菌脲的残留物定义提供参 考信息。本文通过室内模拟试验,采用 UPLC-TOF-MS/MS 研究异菌脲在油菜植株、土壤和水中的代谢 产物,推测异菌脲可能的代谢途径,并研究了代谢产 物 3,5-DCA 对 Hep G2 细胞和蚯蚓的毒性。

# 1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 供试材料

供试土壤:选用江苏省南京市 0~20 cm 未被污染的耕作层土壤,实验前先将土壤活化一周,将活化后的土壤室内阴干,过2.0 mm 筛,置于常温下备用。供试油菜:采用甘蓝型油菜品种(扬油 1号),油菜籽购于江苏金土地种业有限公司。细胞株:选用肝癌Hep G2 细胞系为体外实验模型,由中国科学院细胞库提供。供试蚯蚓:赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),由江苏省镇江市句容蚯蚓养殖场提供,并在实验室条件下饲养 14 d 后,选择体质量在 0.30~0.60 g 的具有生殖环带的蚯蚓进行实验。

1.2 试剂与仪器

异菌脲标准品(99.5%,上海安谱实验科技股份 有限公司);3,5-DCA标准品(98%,上海迈瑞尔化学 技术有限公司);色谱纯正己烷、乙腈、甲醇(美国 TE-DIA 公司);CCK-8试剂盒(北京 Solarbio 生物有限公 司),其他化学试剂均为分析纯。岛津 LC 20ADXR 液相色谱(Shimadzu,日本)串联 AB SCIEX Triple TOF 5600质谱仪(AB SCIEX,美国);Forma Series II 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Electron);M5 多功能 酶标仪(美国 Molecular Dexices)。

#### 1.3 水解

用 pH 7 的 Clark-Lubs 缓冲溶液配制 5 mg·L<sup>-1</sup>

异菌脲标准溶液,超声混匀,分装于棕色容量瓶中, 置于25℃的恒温培养箱中避光密闭培养,于0、3、 6、12、24和48h采集水样分析,设3个重复。

1.4 土壤降解

参照《化学农药环境安全评价试验准则》(GB/T 31270—2014),准确称取 50.0 g 土壤,加入 5 mL 浓 度为 200 mg·L<sup>-1</sup>的异菌脲丙酮溶液,搅拌均匀,置 于避光通风处,待有机溶剂挥发后,再与 200 g 土壤 充分混合,使土壤中的终浓度为 4 mg·kg<sup>-1</sup>,分装在 50 mL 离心管中(每管 10.0 g),含水量保持在饱和持 水量的 60%,置于(25±1)℃黑暗的恒温恒湿培养箱 中培养,分别在 0、3、7、14、21、35 和 63 d 取样分析。 记录所有离心管的原始质量,培养过程中每 2 d 添 加水分使质量保持初始水平,保持土壤原有的持水 量。另设不加异菌脲的土壤作为空白对照和溶剂对 照,设 3 个重复。

1.5 植物代谢

按照文献方法<sup>[20-22]</sup>,对油菜种子进行消毒和萌发。萌发后选取5~7叶期的健康幼苗,将其移至含Hogland营养液培养瓶中,待其稳定生长后,用小型手持式喷雾在油菜叶表面均匀喷施50 mL 10 mg·L<sup>-1</sup>的异菌脲水溶液(含 0.1% Triton X-100),置于恒温培养箱内(光周期 14 h·d<sup>-1</sup>,温度(25±1) ℃,相对湿度75%)培养。在处理后的3 h、6 h、1 d、3 d、6 d、9 d 和 16 d 采集植株样品检测,每次随机取 3 株。 另设不施药的空白对照和溶剂对照。

1.6 样品分析方法

1.6.1 样品提取

土壤:称取土壤样品 10.0 g 于 50 mL 离心管 中,添加 5 mL 水和 30 mL 乙腈,涡旋 10 min 后再超 声 15 min,加入 2.0 g 无水 MgSO<sub>4</sub>和 3.0 g NaCl,涡 旋 5 min,随后以 4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,取一半上 清液过无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 后减压浓缩,2 mL 色谱乙腈溶 解定容,过 0.22 μm 滤膜,待测。

油菜植株:称取剪碎后的油菜植株样品 10.0 g 于 250 mL 三角瓶中,加入 10 mL 水和 30 mL 乙腈, 振荡 1 h,抽滤后置于含有 3.0 g NaCl 的具塞量筒中, 充分振荡 1 min,静置 30 min,取一半上清液,减压浓 缩,用 2 mL 色谱乙腈定容,过 0.22 μm 滤膜,待测。

水样:取2 mL 水样直接进样分析。

1.6.2 LC-MS 仪器检测条件

LC-MS 的分析采用岛津 LC 20ADXR 液相色 谱串联 AB SCIEX Triple TOF 5600 质谱仪,色谱柱 Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm×50 mm, 2.7 μm; Aglient),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样体积 5 μL,流动相 由 0.1% 甲酸水 (A)和甲醇 (B)组成,采用梯度洗 脱:0~0.5 min,90% A;0.5~2.5 min,90%~40% A;2.5~9.0 min,40% A;9.0~10.0 min,40%~5% A;10.0~14.0 min,5% A;14.0~14.2 min,5%~ 90% A;14.2~16.0 min,90% A<sub>0</sub>分析时间 16 min<sub>0</sub>

质谱参数:多反应监测模式下,Q-TOF-MS 电离 模式采用电喷雾离子化正离子源(ESI<sup>+</sup>), m/z 扫描范 围 50~500,离子喷雾电压 5 500 V,源温度 550 ℃, 雾化气 4.48×10<sup>6</sup> Pa,加热气 4.48×10<sup>6</sup> Pa,帘气 2.41× 10<sup>6</sup> Pa 去簇电压 80 V,碰撞能量 40 V,碰撞能量扩散 20 eV,离子释放延迟 67 ms,离子释放宽度 25 ms。

1.7 细胞毒性

细胞毒性测定选用细胞检测试剂盒(CCK-8)检 测细胞增殖活性。将生长至对数期的 Hep G2 细胞 以 1×10<sup>5</sup> ~4×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>的初始密度接种于 96 孔 板中,每孔 100 µL,将培养板放在培养箱中预培养 24 h(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>);吸出培养液换为不同浓度的 含药培养液(异菌脲浓度为 50、100、200、250 和 300 mg·L<sup>-1</sup>;3,5-DCA 浓度为 25、50、100、150 和 200 mg ·L<sup>-1</sup>),染毒 24 h;向每孔加入 10 µL 的 CCK-8 溶液, 将培养板在培养箱内孵育 4 h;用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。按式(1)计算细胞抑制率。

细胞抑制率= $[(A_c - A_s)/(A_c - A_b)] \times 100\%$  (1) 式中: $A_s$ 为试验孔吸光度(含有细胞和待测物的培 养基); $A_c$ 为对照组吸光度(含有细胞的培养基,无待 测物); $A_b$ 为空白孔吸光度(含有培养基,不含细胞和 待测物)。

#### 1.8 蚯蚓毒性

按照《化学农药环境安全评价试验准则》(GB/T 31270—2014)中蚯蚓急性毒性人工土壤法进行 3,5-DCA 对蚯蚓的急性毒性实验,设 7 个浓度组(10、20、30、40、50、60 和 70 mg·kg<sup>-1</sup>),并设空白对照组和 溶剂对照组。每个浓度设 3 个重复,每个重复 10 条 蚯蚓。观察并记录蚯蚓的中毒症状和死亡数(用针 轻触蚯蚓尾部,蚯蚓无反应则为死亡),及时清除死 蚯蚓。统计第 7 天和第 14 天的死亡率,计算 LC<sub>50</sub>。同时使用氯乙酰胺作为参比物质中测定蚯蚓对化合物的敏感性。

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 异菌脲在水中代谢产物的鉴定及代谢途径分析 异菌脲及其代谢产物在水中的提取离子图如图 1(a) 所示。在保留时间为 11.81、7.98、8.00、6.91、 11.46、11.76 和 6.53 min 分别发现了代谢产物 M1 (C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)、 M2 (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)、 M4 (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O)、 M5 (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)、 M7 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、M8 (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)和 M9 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>N)。根据各代谢产物的分子离子峰、质荷 比、典型碎片、二级质谱信息及文献,确定了代谢物 的结构,如表1所示。



图 1 异菌脲(IPR)及其代谢产物在水(a)、油菜植株(b)和土壤(c)样品中的提取离子图 Fig. 1 Extracted ion chromatograms of iprodione (IPR) and its metabolites from UPLC-TOF-MS/MS analysis in water (a), rape plant (b) and soil (c) samples

根据代谢产物推断异菌脲在水中可能的代谢途径,如图2所示。因为异菌脲是二甲酰亚胺类杀菌剂,结构式中二氧代咪唑烷的酰胺键不稳定,易发生水解反应。此外,还发生了C—N键断裂,N-脱烷基化反应。异菌脲(M0)二氧代咪唑烷4号位酰胺键发生水解形成一级代谢产物 M1;2号位的羰基水解形成 M2,M2的脲酰胺键断裂产生代谢物 M4。异菌脲苯环上脱去 Cl 原子形成 M5;还可以通过水解作用形成 M7,M7的咪唑烷继续水解形成代谢物 M8,最终水解形成代谢物 3,5-DCA(M9)。

2.2 异菌脲在油菜植株中代谢产物的鉴定及代谢 途径分析

异菌脲及其代谢产物在油菜植株上的提取离子 图如图 1(b)所示。保留时间 11.81、12.30、11.54 和 11.46 min 分别为 M1、M3 (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)、M6 (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)和 M7 这 4 种代谢物。M3 和 M6 结 构式如表 1 所示。

植物对外源化合物的解毒代谢主要分为3个阶 段,其中 I 相代谢是由植物酶介导的催化反应和非 生物降解过程,包括氧化、水解和还原等<sup>[23]</sup>。参与 I 相代谢的酶主要包括植物细胞色素 P450、漆酶、含 铜多酚的氧化酶、羧酸酯酶和硝基还原酶等[24]。同 时农药在植物角质层还会发生光解和非酶介导的水 解<sup>[25]</sup>。 I 相代谢是植物代谢最重要的一步,起到解 毒作用。Liu 等<sup>[26]</sup>研究报道了玉米体内 P450 酶参 与了烟嘧磺隆的降解过程;Huang 等<sup>[27]</sup>鉴定表达了 水稻 2 个水稻漆酶基因(LOC Os01g63180 和 LOC Os12g15680),发现能降解莠去津和异丙隆,并检测 到相应代谢物羟基脱氢莠去津(HDHA)和 2-OH-异 丙基-异丙隆。异菌脲在油菜植株中可能的代谢途 径如图2所示。进入油菜植株的异菌脲首先进行I相 代谢,通过水解作用产生 M1、M3、M6 和 M7 共4 种 代谢物,后3种与Ambrus等[14]的研究结果一致,而 M1 首次在油菜中发现。代谢物 M1 也在水解试验中 发现,因此可能是 M1 由植物表面非酶介导的水解过 程中产生。综合分析异菌脲在油菜上产生的代谢产 物,推测异菌脲在油菜上的代谢是由于多种植物酶介 导的体内代谢与非酶介导的化学降解共同作用的。

2.3 异菌脲在土壤中代谢产物的鉴定及代谢途径 分析

异菌脲在土壤中代谢产物的提取离子图如图 1 (c)所示,发现了 5 种代谢物(M1、M3、M6、M7 和 M8)。由图2可知,异菌脲在土壤中的降解途径主要是通过非生物降解为代谢物 M1 和 M3,通过生物降解为代谢物 M6、M7 和 M8。Athiel 等<sup>[29]</sup> 和 Mercadier 等<sup>[29]</sup> 提出了土壤微生物降解异菌脲的代谢途 径,微生物可将异菌脲水解为 N-(3,5-二氯苯基)-咪唑 啉-2,4-二氧咪唑烷(M7)和 3,5-二氯苯基脲-乙酸(M8)。 Campos 等<sup>[30]</sup> 从土壤中分离出菌株 C1 通过水解可产 生代谢物 M7 和 M8。可见,异菌脲在土壤中的降解

代谢物代号	保留时间/min Retention	典型碎片离子		结构式	化学名称		
code	time/min	$\frac{\text{[M+H]}^+ m/z}{\text{[M+H]}^+ m/z}$	$(MS^2)m/z$	Structural formula	Chemical name		
M0	11.47	330.0334	244.9889 161.9878		3-(3,5-二氯苯基)-1-异丙基氨基甲酰基乙内酰脲 3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4- dioxoimidazolidine-1-carboxamide		
M1	11.81	348.0510	262.9984 113.0599 76.0405		N-((3,5-二氯苯基)氨甲酰基)-N-(异丙基氨甲酰基)甘氨酸 N-(3,5-dichlorophenylcarbamoyl)- N-isopropylcarbamoyl-glycine		
M2	7.98	304.0612	242.2403 161.9869 127.0184		N-(3,5-二氯苯基)-2-(3-异丙基脲基)乙酰胺 N-(3,5-dichlorophenyl)-2-(3-isopropylureido)acetamide		
M3	12.30	290.0455	161.9869 127.0184		N-(3,5-二氯苯基)-N-异丙基-2-氨基甲酰脲 N-(3,5-dichlorophenyl)-5-isopropyl biuret		
M4	8.00	219.0085	175.1029 161.0812 147.0597		2-氨基-N-(3,5-二氯苯基)乙酰胺 2-amino-N-(3,5-dichlorophenyl)acetamide		
M5	6.91	296.0795	211.0245 149.0204 128.0234		3-(3-氯苯基)-N-异丙基-2,4-二氧代咪唑烷-1-甲酰胺 3-(3-chlorophenyl)-N-isopropyl-2,4- dioximidazolidine-1-carboxamide		
M6	11.54	287.9935	187.9690 173.9872 161.9875 56.0160		3-(3,5-二氯苯基)-2,4-二氧咪唑烷-1-甲酰胺 3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioximidazolidine- 1-carboxamide		
M7	11.46	244.9879	173.9873 138.0108 56.0161	CI NH	3-(3,5-二氯苯基)-咪唑啉-2,4-二氧代咪唑烷 3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioxoimidazolidine		
M8	11.76	262.9984	159.9730 132.9608 127.0181 76.0397	сі — Ц Ц СІ СІ	((3,5-二氯苯基)氨基甲酰)甘氨酸 ((3,5-dichlorophenyl)carbamoyl)glycine		
М9	6.53	161.9870	144.9616 127.0187 108.9843		3,5-二氯苯胺 3,5-dichloroaniline		

表1	异菌脲及其代谢产	"物的质谱信息汇总

Table 1 Summary of all MS and MS<sup>2</sup> data for metabolites of iprodione



图 2 异菌脲在水、油菜植株和土壤中可能的代谢途径 Fig. 2 Proposed pathways of iprodione in water, rape plants and soil

包括水解酶参与的微生物降解,通过水解反应形成代谢产物 M7 和 M8。此外,本文还检测出代谢产物 M6,推测 M6 是降解过程中的中间产物。Athiel 等<sup>[28]</sup>研究发现,异菌脲可通过非生物转化形成 N-((3,5-二氯苯基)氨甲酰基)-N-(异丙基氨甲酰基)甘氨酸,与本文 M1 的分子质量和结构式一致,因此推测代谢物 M1 和 M3 是通过化学水解形成,是非生物降解途径。

通过对异菌脲在土壤、水和油菜植株中的代谢 产物及代谢途径研究发现,异菌脲在土壤中的代谢 主要是微生物参与的水解反应,在水相中的代谢主 要为化学水解,在油菜植株中主要为降解酶参与的 N-脱烷基化和水解反应。因此,推测异菌脲的水解 作用是其在环境和植株中代谢的主要机制。

2.4 异菌脲及其代谢产物 3,5-DCA 的细胞毒性

如表 2 所示, 异菌脲对 Hep G2 的 IC<sub>50</sub> 为 304.8 mg·L<sup>-1</sup>, 代谢物 3,5-DCA 的 IC<sub>50</sub> 为 99.7 mg·L<sup>-1</sup>, 3,5-DCA 对 Hep G2 细胞毒性是异菌脲的 3.1 倍, 表 明异菌脲的代谢属于增毒代谢。3,5-DCA 也是乙烯 菌核利的代谢产物, Lee 等<sup>[31]</sup>等研究发现 3,5-DCA 对 Hep G2 细胞株的存活率有显著影响, IC<sub>50</sub> 为 70.48 mg·L<sup>-1</sup>, 而经 228.89 mg·L<sup>-1</sup>乙烯菌核利暴露的 Hep G2 细胞的存活率没有显著下降,表明其对细胞的毒性也显著高于母体。

2.5 3,5-DCA 对赤子爱胜蚓的急性毒性

参比试验结果显示 14 d-LC<sub>50</sub> 为 28.15 mg a.i.• kg<sup>-1</sup>(干质量),达到国标中规定的 20~80 mg a.i.• kg<sup>-1</sup>(干质量)范围,证明实验蚯蚓对化合物敏感,可 用于后续试验。

人工土壤法测定 3,5-DCA 对赤子爱胜蚓急性 毒性结果如表 3 所示。结果显示,3,5-DCA 对赤子 爱胜蚓 7 d、14 d-LC<sub>50</sub> 分别为 53.29 mg·kg<sup>-1</sup>和 31.56 mg·kg<sup>-1</sup>。根据《化学农药环境安全评价试验准则》 (GB/T 31270—2014)中农药对蚯蚓的毒性等级划 分,3,5-DCA 对赤子爱胜蚓为低毒(>10 mg·kg<sup>-1</sup>)。 根据 国际纯粹 与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC),人工 土壤法下异菌脲对赤子爱胜蚓急性毒性的 LC<sub>50</sub>> 500 mg·kg<sup>-1</sup>,3,5-DCA 对赤子爱胜蚓急性毒性约为 其母体的 15 倍以上。由此可知,异菌脲在代谢过程 中增加了对土壤生物蚯蚓的毒性效应。

本文通过高分辨质谱,鉴定了异菌脲在水中的 7 种代谢产物(M1、M2、M4、M5、M7、M8 和 M9)、土

	Table 2Cytotoxicity of iprodione and 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA)				
化合物	回归方程	决定系数(R <sup>2</sup> )	P值	IC <sub>50</sub>	95%置信区间/(mg·L⁻¹)
Compound	Regression equation	Coefficient of determination $(R^2)$	P value	$/(mg \cdot L^{-1})$	95% confidence interval/(mg·L <sup>-1</sup> )
异菌脲	<i>y</i> =0.8176 <i>x</i> +1.6928	0.9659	0.0011	304.8	211.9 ~438.6
3,5 <b>-</b> DCA	<i>y</i> =3.5978 <i>x</i> +4.3676	0.9573	0.0109	99.7	80.4 ~ 115.7

表 2 异菌脲和 3,5-二氯苯胺(3,5-DCA)的细胞毒性

表 3 3,5-DCA 对赤子爱胜蚓 LC<sub>50</sub> Table 3 The LC<sub>50</sub> of 3,5-DCA to *Eisenia foetida* 

时间/d Time/d	回归方程 Regression equation	决定系数(R <sup>2</sup> ) Coefficient of determination (R <sup>2</sup> )	$LC_{50}$ /(mg·kg <sup>-1</sup> )	95%置信区间/(mg·kg <sup>-1</sup> ) 95% confidence interval/(mg·kg <sup>-1</sup> )
7	y=2.9406x-0.0773	0.9864	53.29	46.52~61.03
14	y=3.3517x-0.0247	0.9657	31.56	26.97 ~ 36.93

壤中的 5 种代谢物(M1、M3、M6、M7 和 M8)和油菜 植株中的 4 种代谢产物(M1、M3、M6 和 M7),推测 了异菌脲的代谢途径。其中,代谢产物 M4 和 M5 为首次在水中发现,M1 是油菜植株中新发现的代 谢产物,完善了异菌脲的代谢途径。异菌脲在油菜 上的代谢途径与其在大豆、黄瓜和花生中的代谢途 径相同,主要是通过酰胺键的裂解(水解作用)和 C—N 键断裂(N-脱烷基化)。细胞毒性和蚯蚓毒性 试验结果表明异菌脲的代谢属于增毒代谢。本文探 究了异菌脲在水、土壤和油菜中的代谢产物和代谢 途径,明确了异菌脲在作物和环境中的代谢途径,并 为异菌脲及其代谢物 3,5-DCA 的生态风险评估提 供了相关理论依据。

通讯作者简介:王鸣华(1961—),男,教授,博士生导师,主要 研究方向为农药残留及环境毒理。

#### 参考文献(References):

- [1] 刘琨,李勇,王蓉,等. 我国人参产区灰霉病菌抗药性研究初报[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 196-198, 208
  Liu K, Li Y, Wang R, et al. Preliminary report of the resistance of *Botrytis cinerea* isolates from ginseng producing area to four fungicides in China [J]. Plant Protection, 2020, 46(2): 196-198, 208 (in Chinese)
- [2] Dutra P S S, Pereira W V, De Mio L L M. Brazilian isolates of *Monilinia fructicola* from peach do not present reduced sensitivity to iprodione [J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 153(4): 1341-1346
- [3] Molaei H, Abrinbana M, Ghosta Y. Baseline sensitivities to azoxystrobin and tebuconazole in *Sclerotinia sclerotio*-

*rum* isolates from sunflower in Iran related to sensitivities to carbendazim and iprodione [J]. Journal of Phytopathology, 2020, 168(6): 353-362

- [4] Kim E, Lee H M, Kim Y H. Morphogenetic alterations of *Alternaria alternata* exposed to dicarboximide fungicide, iprodione [J]. The Plant Pathology Journal, 2017, 33(1): 95-100
- [5] 汪汉成, 张敏, 张之矾, 等. 多菌灵等 5 种杀菌剂对烟 草立枯病菌的生物活性[J]. 农药学学报, 2017, 19(5): 569-575

Wang H C, Zhang M, Zhang Z F, et al. Bioactivities of carbendazim, etc. five fungicides against *Rhizoctonia solani* in tobacco [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2017, 19(5): 569-575 (in Chinese)

- [6] Kiss A, Virág D. Photostability and photodegradation pathways of distinctive pesticides [J]. Journal of Environmental Quality, 2009, 38(1): 157-163
- [7] Zhang Z X, Du G Z, Gao B B, et al. Stereoselective endocrine-disrupting effects of the chiral triazole fungicide prothioconazole and its chiral metabolite [J]. Environmental Pollution, 2019, 251: 30-36
- [8] Gao J, Wang F, Cui J N, et al. Assessment of toxicity and environmental behavior of chiral ethiprole and its metabolites using zebrafish model [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 414: 125492
- [9] Liu H, Yi X T, Bi J W, et al. The enantioselective environmental behavior and toxicological effects of pyriproxyfen in soil [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 365: 97-106
- [10] 宋晓. 氟虫腈及其代谢物的细胞毒性研究[D]. 北京: 中 国农业科学院, 2019: 6-7
   Song X. Research on the cytotoxicity of fipronil and its

metabolites [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019: 6-7 (in Chinese)

- [11] Li H X, Zhong Q, Wang X R, et al. The degradation and metabolism of chlorfluazuron and flonicamid in tea: A risk assessment from tea garden to cup [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 754: 142070
- [12] 张嘉坤, 武宪, 周旭东, 等. 二甲四氯异辛酯及其代谢 物二甲四氯在玉米中的残留量及风险评估[J]. 食品安 全质量检测学报, 2020, 11(20): 7544-7554
  Zhang J K, Wu X, Zhou X D, et al. Residue and risk assessment of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid-isooctyl and its metabolite 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in corn [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(20): 7544-7554 (in Chinese)
- [13] Schwack W, Bourgeois B, Walker F. Fungicides and photochemistry photodegradation of the dicarboximide fungicide iprodione [J]. Chemosphere, 1995, 31(4): 2993-3000
- [14] Ambrus, Buys M, Miyamoto J, et al. IUPAC reports on pesticides, No. 28: Some aspects of the analysis of residues of dicarboximide fungicides in food [J]. Pure and Applied Chemistry, 1991, 63(5): 747-762
- [15] Rifai A, Souissi Y, Genty C, et al. Ultraviolet degradation of procymidone: Structural characterization by gas chromatography coupled with mass spectrometry and potential toxicity of photoproducts using *in silico* tests [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM, 2013, 27 (13): 1505-1516
- [16] United States Environmental Protection Agency (US EPA). Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Procymidone [S]. Washington DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2005
- [17] Dom N, Knapen D, Benoot D, et al. Aquatic multi-species acute toxicity of (chlorinated) anilines: Experimental versus predicted data [J]. Chemosphere, 2010, 81(2): 177-186
- [18] Lai Q, Sun X F, Li L S, et al. Toxicity effects of procymidone, iprodione and their metabolite of 3,5-dichloroaniline to zebrafish [J]. Chemosphere, 2021, 272: 129577
- [19] 农业农村部农药检定所.农药残留物手册[M].北京: 中国农业出版社,2018:216
- [20] 柳嘉怡, 卜宪娜. 霍格兰(Hoagland)溶液对小麦种苗生 长的影响[J]. 现代农业科技, 2020(1): 9-10
   Liu J Y, Bu X N. Effect of Hoagland solution on growth of wheat seedlings [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(1): 9-10 (in Chinese)
- [21] Yang Q Q, Shan W Y, Hu L G, et al. Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants re-

vealed by dual stable isotope tracing [J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(2): 625-633

 [22] 高玉莲,李睿光,常静,等.油菜对3种作物种子萌发和 幼苗生长的化感作用[J].应用生态学报,2020,31(12):
 4153-4160

Gao Y L, Li R G, Chang J, et al. Allelopathy of rape on seed germination and seedling growth of three crops [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(12): 4153-4160 (in Chinese)

[23] 李如男,董丰收,吴小虎,等. 酶介导下农药在植物中的三相代谢转化研究进展[J]. 农药学学报, 2019, 21
 (S1): 799-814

Li R N, Dong F S, Wu X H, et al. Research progress in three-phase metabolic transformations of pesticides in plants mediated by enzymes [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(S1): 799-814 (in Chinese)

- [24] Morant M, Bak S, Møller B L, et al. Plant cytochromes P450: Tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(2): 151-162
- [25] Ter Halle A, Drncova D, Richard C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(9): 2989-2995
- [26] Liu X M, Xu X, Li B H, et al. Genomic and transcriptomic insights into cytochrome P450 monooxygenase genes involved in nicosulfuron tolerance in maize (*Zea mays* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(8): 1790-1799
- [27] Huang M T, Lu Y C, Zhang S, et al. Rice (*Oryza sativa*) laccases involved in modification and detoxification of herbicides atrazine and isoproturon residues in plants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(33): 6397-6406
- [28] Athiel P, Alfizar, Mercadier C, et al. Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3216-3220
- [29] Mercadier C, Garcia D, Vega D, et al. Metabolism of iprodione in adapted and non-adapted soils; Effect of soil inoculation with an iprodione-degrading *Arthrobacter* strain [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(12): 1791-1796
- [30] Campos M, Karas P S, Perruchon C, et al. Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2017, 24(1): 152-163
- [31] Lee J B, Sohn H Y, Shin K S, et al. Microbial biodegradation and toxicity of vinclozolin and its toxic metabolite 3,5-dichloroaniline [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(2): 343-349