

灭幼脲 III 号在好气水环境中的降解代谢的初步研究

徐 盈 徐立红 张甬元

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

本文研究了新农药灭幼脲 III 号在好气水环境中的降解与代谢。在避光条件下, 观察了灭菌组与实验组中灭幼脲 III 号及其主要代谢产物的消长过程, 比较了它的化学水解与微生物降解的差异。在室内模拟好气系统中, 研究了母体化合物在水体中的残留动态和生物降解半衰期, 及其初期主要代谢途径的转化产物, 同时分别用高效液相色谱法, 紫外吸收光谱扫描, 以及特征有机质谱图, 对灭幼脲 III 号的两种主要代谢产物进行了定性定量测定。结果表明: 灭幼脲 III 号在室内好气环境中较易水解, 而且水中微生物的存在能加速它的降解, 母体化合物在水体中初期代谢主要途径为分子中的苯甲酰碳与脲氮键首先开裂, 生成邻氯苯甲酸 (CBA) 和对氯苯基脲素 (CPU)。

关键词 降解, 代谢, 灭幼脲, 好气水环境

具有抑制昆虫蜕皮激素生物合成的苯酰苯脲杀虫剂, 是一种新型高效低毒低环境残留的广谱性农药。灭幼脲 III 号, 化学名称 1-(4-氯代苯基)-3-(2-氯代苯甲酰基)脲素,(以下简称 CCU)。这是我国自行开发研制的新农药, 已广泛用于农林业虫害防治。CCU 是国外苯酰苯脲杀虫剂除虫脲 Diflubenzuron (以下简称 DFB) 的同系物, 关于 DFB 的环境化学行为及毒理学方面, 国外已进行了不少研究工作^[1-8]但对 CCU 在环境中的行为及其对环境的影响等方面, 研究甚少, 尤其有关 CCU 在水环境中的代谢途径研究尚未见报道。

本研究的目的在于获得 CCU 在好气水环境中的降解动力学及初期代谢产物方面的资料。为进一步探讨 CCU 在水环境中的行为和有关部门今后合理、安全使用 CCU 提供依据。

材 料 与 方 法

1. 试剂 灭幼脲 III 号 1-(4-氯代苯基)-3-(2-氯代苯甲酰基)脲素, 纯度 >95%, 由中国科学院生态环境研究中心提供。邻氯苯甲酸 (CBA) 和对氯苯基脲素 (CPU) 纯度均

>99.9%，为西德 Merck 公司生产的色谱纯试剂，由西德辐射与环境研究中心 GSF 生态化学所提供。甲醇、二氯甲烷、醋酸乙酯均为A.R 级。超纯水由美国密理博公司生产的纯水装置制备 (18.3MΩ)。1mol/L HCl 水溶液，用优级纯或分析纯 HCl 配制并经二氯甲烷抽提后使用。

2. 仪器 pH₆-3c 型酸度计，上海雷磁仪器厂产；美国贝克曼电导测定仪；JD 系列国产照度计，上海市嘉定学联仪表厂产；TH-2 溶氧测定仪，无锡太湖无线电元件厂产；美沃特斯高效液相色谱系统，由 600MS-490MS UV 扫描检测器-745 积分仪组成，并带 U.K 进样器。

3. 水样中灭幼脲 III 号及其代谢产物的测定 对于水样中灭幼脲 III 号对氯苯基脲素和邻氯苯甲酸的测定，在参考前人方法^[4]的基础上，采用有机溶剂提取→旋转蒸发浓缩→超声溶解残渣→HPLC UV 检测。各样品成份的萃取和回收率试验条件与结果见表 1,2。

表 1 样品萃取和回收率试验条件与结果

Tab. 1 Experimental condition and results of sample extraction and recovery test

测定成分 Components	取样量 (ml) Sampled volume	提取溶剂及用量 (ml) Solvents and volume	平均回收率 Recovery mean±SD:n = 6
CCU	10	二氯甲烷 20,20,15	94.6±5.4
CBA	50	先用 0.45μm 纤维薄膜过滤，再加 0.21mol/L HCl 调 pH = 3.0 后，二氯甲烷 20,20,15	87.5±3.5
CPU	20	醋酸乙酯 20,20,15	90.0±5.0

注：湖水添加回收率试验时，同时测定湖水空白值。

表 2 测定灭幼脲 III 号及其代谢产物的色谱参数

Tab. 2 Chromatographic parameters for detecting chlorobenzuron and its metabolites

测定成分 Components	色谱柱 Column	流动相 Mobile phase	流速 ml/min Flow rate	UV 检测波长 UV wavelength
CCU	NovaPak C ₁₈ 4mmid×15cm	7:3MeOH/H ₂ O V/V	0.8	254nm
CPU	NovaPak C ₁₈ 4mmid×15cm	3:7MeOH/H ₂ O V/V	0.8	254nm
CBA	NovaPak C ₁₈ 4mmid×15cm	1:10MeOH/2mmol/L NaAc-HAc pH3.6 V/V	0.8	230nm

注：样品组分采用色谱外标法定量，进样量控制在与其峰高呈线性关系范围内。当样品组分浓度过大时，可采用流动相稀释后进样测定。

结 果 和 讨 论

1. 水中 CCU 的化学水解和生物降解速率比较

为了比较水环境中 CCU 化学水解和生物降解的速率，分别将 2L 东湖水过滤后与

自来水等量混合,倒入两个 5L 玻璃试验瓶内,每个瓶外壁均用深色牛皮纸包裹遮光,以避免可能引起的光解和防止藻类滋生。实验分灭菌组和试验组,试验过程中加磁力搅拌使其维持好气状态,溶解氧约保持在 7.0mg/L 左右。实验开始时在高速搅拌下,用微量注射器将 CCU 乙醇浓标液加入水样中,使其浓度为 0.2mg/L 左右,充分搅拌 0.5h 后,取样测定准确含量,作为初始浓度,以后在不同时间间隔取样,测定 CCU 的残留量,并描绘出 CCU 分别在有菌和无菌条件下的残留动态曲线。试验过程 pH 为 7.2—7.5(图 1)。

灭菌组中母体化合物消失速率比试验组缓慢,到试验第 25d 时,灭菌组和试验组中 CCU 残留量分别为 70% 和 40%(图 1),说明 CCU 较易发生水解,同时水中微生物的存在,能够加速 CCU 的降解过程。

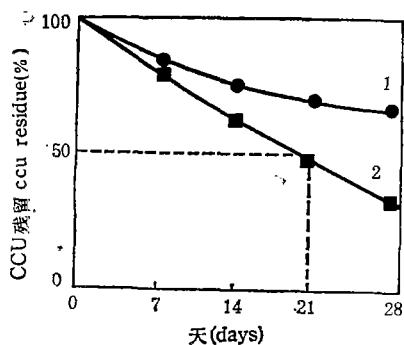


图 1 灭幼脲 III 号在东湖水中的残留动态曲线
Fig. 1 Residue dynamics of CCU in lake water

- 1. 灭菌组 sterilized group
- 2. 实验组 test group

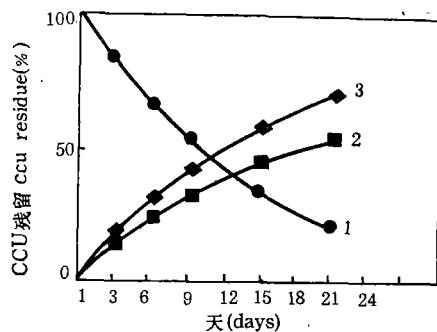


图 2 湖水中灭幼脲 III 号的降解及其代谢产物的生成
Fig. 2 Degradation of CCU and Production of its metabolites in lake water

- 1. CCU 2. CBA 3. CPU

2. 室内模拟系统中,CCU 的降解代谢

室内模拟试验的光照系统由两组四支 40W 日光灯组成,定时 12h 明暗交替,水族箱中水面的光照强度为 2 000lx。4 个实验水族箱,每个体积为 12L,分别盛有 10L 过滤东湖水,实验过程中使用搅拌器缓慢搅动,转速控制在 600r/min 试验容器加玻璃盖以防止水份蒸发。实验湖水的湖沼学参数为:水温 $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 8.0 ± 0.2 , 溶氧 7.0mg/L 左右,电导 $430 \mu\text{s/cm}$ 。DFB 在好气水环境中,能形成 2,6-二氟苯甲酸和对氯苯基脲素(CPU)两个初期代谢产物^[4],考虑到 CCU 和 DFB 两者在结构上的相似性,可能存在相似的代谢途径。因此,除测定母体化合物 CCU 外,还测定了 CPU 和邻氯苯甲酸(CBA)的含量。实验开始时,先在高速搅拌下,加入 CCU 乙醇储备液于每一实验箱内,添加浓度为 0.1mg/L 左右。 0.5h 后测定初始值,以后在不同时间取样,获得水体中 CCU, CPU 和 CBA 的一系列浓度随时间变化的数值。同时计算出从母体化合物到代谢产物这一过程的初期降解代谢转化率(图 2)。

CCU 在室内模拟好气系统中的生物降解半衰期为 10d,要比避光条件下 CCU 在好气东湖水中的生物降解半衰期短,这可能与实验系统中,因藻类光合作用引起的水的 pH 升高有关。由于 CCU 的降解与水中的 pH、温度,悬浮物和微生物存在等多种因素

有关,因此半衰期的实验不易获得十分重现结果。国外报道有关 DFB 在水中的半衰期的差别也很大^[1,2],显然与具体试验条件各不相同有关。CCU 母体在水中浓度不断减少的同时,水中 CPU 和 CBA 的浓度不断增加(图 2),这表明 CPU 和 CBA 是 CCU 在好气水环境中的两个主要初期代谢产物。

3. 初期代谢产物的定性鉴定

为了进一步定性水样中 CCU 的初期代谢产物,除了利用高效液相色谱图上标样的保留值来比较同一条件下水样的未知成分,从而求得相对色谱定性数据外,还利用美国沃特斯的 490MS 紫外自动扫描检测器,分别对标样与水样中的相应成分在同一波长范围内进行扫描,用所获得的 UV 吸收光谱图进行比较,作为绝对光谱定性数据(图 3)。

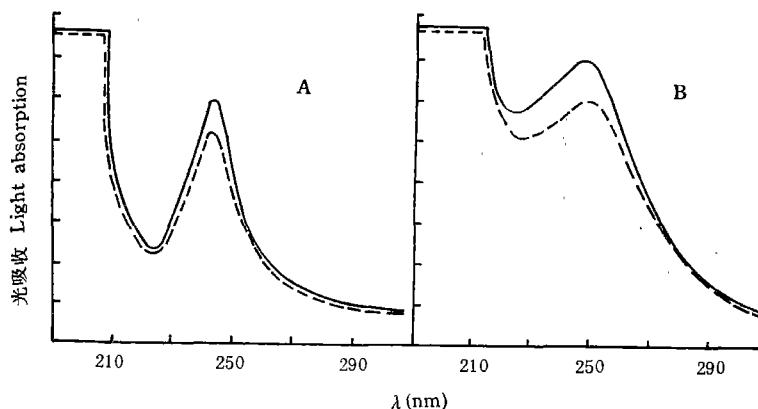


图 3 对氯苯基脲素 (A) 和灭幼脲 III 号 (B) 的紫外吸收光谱图

Fig. 3 UV absorbance spectrum of CCU(A) and CPU(B)

——标样 standard

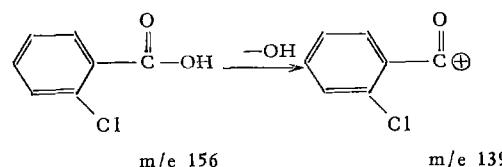
……水样 water sample

A. 流动相 MeOH/H₂O 30:70; 光吸收灵敏度
0.1AuFs; 扫描灵敏度 0.1AuFs; 节距 1nm

B. 流动相 MeOH/H₂O 70:30; 光吸收灵敏度
0.1AuFs; 扫描灵敏度 0.1AuFs; 节距 1nm

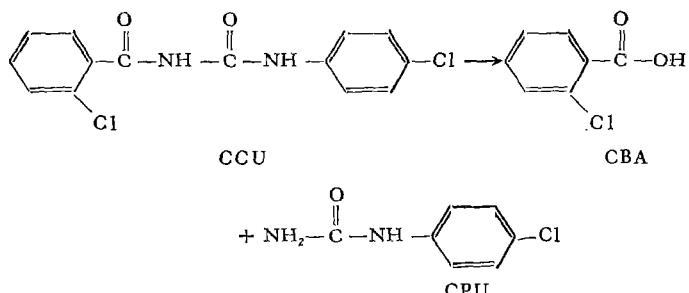
扫描结果表明: 标样 CCU 和 CPU 的 UV 吸收光谱与用 HPLC 法测定的水样中相应的 CCU 和 CPU 的峰组分的 UV 吸收光谱是吻合的。

对于 CCU 的另一代谢产物 CBA,在 VG7070EHF 质谱仪上,分别对标样与水样中的 CBA 提取成分,采用标准进样杆法直接进样分析,其操作条件为: 分辨率 1 000,离子源温度 200°C,加速电压 6kV,电离电压 70eV。结果在峰扫描质谱图上,成功地获得了作为定性 CBA 的特征质谱数据,即分子离子峰 m/e 156 及主要碎片 m/e 139 的峰。



本研究所获得的全部 HPLC 色谱图,UV 吸收光谱图及特征质谱碎片,均证实了在好气水环境中 CCU 的初期代谢主要途径同国外 DFB 的途径相似,即母体分子中的苯

甲酰碳与脲氮键首先开裂,生成邻氯苯甲酸和对氯苯基脲素:



参 考 文 献

- [1] Charles, H. S. and Emil, F. D., Jr., 1970. Factors affecting the stability of Dimilin in water and the persistence of Dimilin in field water. *Food Chem.*, 24: 733—739.
- [2] Cunningham, P. A. and Myers, L. E., 1986. Dynamics of diflubenzuron (Dimilin) concentration in water and sediment of supratidal saltmarsh site following repetitive aerial application for mosquito control. *Environ. Pollution (Series A)* 41: 63—88.
- [3] Dipoma, S. J., Cannizzaco, R. D., Roger, J. C., and Ferrell, G. D., 1978. Analysis of diflubenzuron residues in environment samples by high pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 968—971.
- [4] Ivie, G. W., 1978. Fate of diflubenzuron in cattle and sheep. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 80—81.
- [5] Ivie, G. W., Bull, D. L., and Veech, J. A., 1980. Fate of diflubenzuron in water. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 330—337.
- [6] Metcalf, R. L., P. Y. and Bowlus, S., 1975. Degradation and environmental fate of 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl) urea. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 259—364.
- [7] Opdycke, J. G., Miller, R. W., and Menzer R. E., 1982. Metabolism and fate of diflubenzuron in swine. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1223—1233.
- [8] Ruzo, L. O., Zabik, M. J. and Schuerz, R. D., 1974. Photochemistry of bioactive compounds 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-dihalobenzoyl) ureas. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 1106—1108.

PRELIMINARY STUDIES ON THE DEGRADATION AND METABOLISM OF CHLOROBENZURON UNDER AEROBIC AQUATIC ENVIRONMENT

Xu Ying Xu Lihong and Zhang Yongyuan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

The degradation and metabolism of a new insecticide Chlorobenzuron or 1-(4-chlorophenyl)-3-(2-chlorobenzoyl) urea (CCU) under aerobic aquatic environment are reported in this paper. Through observations on the process of the breakdown of CCU and the production of two primary metabolites under dark condition in sterilized group and test one respectively, the differences between chemical hydrolysis and biodegradation were compared, in a laboratory model aerobic system, the residue dynamics and biodegradation half life for the parent compound, and the major conversion products of its primary metabolism pathway were investigated. Meanwhile, two main metabolites were measured and identified by high performance liquid chromatography, UV absorbance spectrum scanning and characteristic mass spectra. All the results obtained show that chlorobenzuron is less stable, its hydrolysis is affected by microorganisms. The main pathway of the primary metabolism for the parent compound in water is the cleavage of the bond between benzoyl carbon and urea nitrogen, producing orthochlorobenzoic acid (CBA) and 4-chlorophenylurea (CPU).

Key words Degradation, Metabolism, Chlorobenzuron, Aerobic environment