

除草剂代谢研究与新除草剂创制

向文胜^{1,2}, 王相晶², 巨修炼¹, 任天瑞¹

(1. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100080;

2. 东北农业大学生命科学与生物技术研究中心, 哈尔滨 黑龙江 150030)

摘要:概述了一些除草剂在植物体内的活化作用及研究除草剂代谢对新除草剂创制的重要性. 除草剂代谢研究与创制新除草剂的前期研究相结合, 为新除草剂设计提供了新的思路, 可加速新除草剂的开发进程, 提高了新除草剂研制的命中率. 此外, 论述了基于一些高毒农药代谢特性来改造母体农药的结构, 能获得高效、低毒的前体农药.

关键词:除草剂; 代谢; 活化作用; 创制

中图分类号: O622

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2004)02-0187-06

1 前言

建国以来, 我国的农药研究和农药产业有了很大的发展, 但总体上仍以仿制为主, 自主创制的新农药仅占极少数. 随着国际上知识产权保护的各项法规在我国逐步实行, 新农药的研制已日益显示出其重要性和紧迫性. 然而, 新农药的创制是以研究农药作用机理、抗性机制、代谢机理为基础, 我国在这些方面研究十分薄弱, 严重地制约了新农药的创制.

近 20 年来, 新的技术、新的发现层出不穷, 建立起了不少新的学科, 也对农药学学科的发展产生了深远的影响. 分子生物学的出现揭示了生命过程中的分子基础, 电子学、波谱技术以及化学各分支学科的发展, 又使对生物大分子的结构与功能的研究进一步深入. 结构生物学(structural biology)为农药作用的靶分子提供了详尽的数据, 为农药合理设计打下了基础. 基因重组、分子克隆技术的出现, 使人们获得了一批有高效价值的生物农药. 植物基因组计划的实施, 揭示了另外一大批功能基因和特殊功能基因. 计算机的运用又衍生出生物信息学(bioinformatics)这一新学科, 使人们有可能预测一些可用作农药的靶分子, 同时也可以通过计算机分子图形技术预测一些靶分子的结构, 并有目的地修饰某些已知结构和创造新的功能分子. 这些新学科的兴起, 为农药学研究提供了与过去的研究模式完全不同的理论和概念.

在新农药创制的研究方法上, 20 世纪 90 年代以来已打破了过去经验式的农药分子设计和手工式的个别合成、个别修饰的研究方法. 后基因组计划的一个直接的结果是发现了一批功能基因和对研究新农药具有直接指导作用的基因. 因此, 目前世界各研究单位普遍采用三大技术进行农药研究: (1) 利用组合化学(combinatorial chemistry)的方法合成具有分子多样性的分子库(molecular library); (2) 通过对农药作用过程的深入了解, 建立起以生物靶分子为模型的筛选系统, 进行快速筛选(high throughput screening); (3) 针对靶分子用计算机进行农药的合理设计(computer aided drug design). 可见, 新农药研究已形成了一个多种技术、多个学科的互相融合, 人们预期 21 世纪新农药的研究将会出现一个新的发展时期.

收稿日期: 2003-04-07, 修回日期: 2003-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30270888.30000113); 中国博士后科学基金资助项目(编号: 15381)

作者简介: 向文胜(1968-), 男, 湖北省来凤县人, 博士后, 教授, 农药专业; 任天瑞, 通讯联系人, E-mail: ttren@lcc.ipe.ac.cn.

2 除草剂代谢研究在新除草剂创制中的作用

除草剂代谢与代谢动力学研究在新除草剂创制中有重要作用。通过除草剂代谢研究,确定除草剂在生物体内转化产物的结构,并分别对母体除草剂和代谢产物进行药效研究,可以阐明除草剂在生物体内发挥药效的化学原理,也为进一步改进活性除草剂的化学结构提供依据^[1,2];研究除草剂在生物体内转化的参与酶,如细胞色素 P450 多功能氧化酶,将有助于理解除草剂代谢机制及除草剂与代谢酶的相互作用,以改变化合物的化学结构,开发出具备良好代谢特点、更有利于选择性的新除草剂,或设计出抑制代谢酶活性的化合物以作为除草剂的增效剂^[3]。阐明农药的代谢机理是新农药分子设计逐步由基于受体生物大分子结构的药物设计方法(structure based drug design, SBDD)向基于农药作用机理的农药设计方法(mechanism based drug design, MBDD)的过渡,即在农药设计中是全面考虑农药在生物体中的传导、与受体的结合及代谢等过程的重要一环。通过除草剂代谢动力学研究,阐明新化合物在生物体内的代谢特点,可对该化合物是否具备预期候选除草剂的条件做出初步判断;通过不同植物的除草剂动力学比较研究,阐明除草剂在生物体内种属代谢的差异,可为分析除草剂的选择性、抗性机理及其预测新除草剂的选择性提供基础,同时,可利用高效催化除草剂代谢酶基因,获得抗除草剂转基因作物;通过调控作物对除草剂代谢的动力学研究,可为开发除草剂的安全剂奠定基础;认识除草剂吸收、分布、代谢的基本规律以及生物利用度,可为除草剂安全、高效、合理使用提供理论基础^[4-10]。

将除草剂代谢、除草剂代谢动力学研究与创制新除草剂的早期研究相结合,为新除草剂设计提供了新的思路,可大大加速新除草剂的开发进程,提高新除草剂研制的命中率。同时,为母核化合物进行再开发、寻求低毒的新活性化合物创造一条经济有效的方法。

3 除草剂在植物体内的代谢活化作用

除草剂在植物体内代谢通常是产生去毒作用,但也有部分除草剂因代谢而增加了毒性。如苯氧丁酸化合物除草剂 2,4-二氯苯氧丁酸、2-甲-4 氯苯氧丁酸以及侧链碳原子为偶数的衍生物本身无除草活性,但被一些阔叶杂草吸收后在体内通过 β -氧化作用变为 2,4-D 或 2 甲 4 氯^[11],从而产生除草活性;Bromoxynil octanoate 是前体除草剂,在植物体内水解代谢成光合作用抑制剂 bromoxynil^[13](图 1, 化合物 1);除草剂萘丙胺(naproanilide)、稗草胺(clomeprop)是防治稻田阔叶及莎草科杂草的高效选择性除草剂,化合物本身无活性,而是在植物体内及土壤中酰基酰胺键水解分别产生的代谢产物 2-(萘氧基)丙酸(图 1, 化合物 3)^[14]、2-(2,4-二氯-3-甲基苯氧基)酸^[15]发挥除草作用;硫代氨基甲酸酯(thiocarbamate)类除草剂丙草丹(eptam)在植物体内迅速转换成具有除草活性的亚砷化合物^[16];一些含硫化合物的化合物在植物体内也能被氧化成亚砷类化合物,从而增加了生物活性;含硫化合物在植物体内可氧化成高生物活性的除草剂,已成为开发前体农药除草剂的策略^[17,18]。

4 除草剂在植物体内的差异代谢—去毒作用与活化作用

一些除草剂在作物、杂草体内产生不同的代谢途径,在杂草体内进行活化作用,而在作物体内产生去毒作用。除草剂 methazole 仅在敏感的植物中代谢成具有光合作用抑制的化合物(图 2, 化合物 1)^[19];磺酰脲类除草剂 DPX-L8747 在所防治的杂草内进行活化作用,imazaethabenz-methyl 也存在这种现象。DPX-L8747(图 2)分子对靶酶 ALS 仅具有弱活性,在敏感植物 *A. fatua* 内被细胞

色素 P450 代谢成 N-脱甲基化合物(图 2 ,化合物 2) ,而形成一种潜在的 ALS(acetolactate synthase) 抑制剂,在抗性小麦、大豆中则被细胞色素 P450 代谢成羟基化合物(图 2 ,化合物 2)或 hGSH 衍生物(图 2 ,化合物 3)^[20]。咪唑啉酮除草剂前体 imazaethabenz-methyl 在敏感杂草内水解为活性 ALS 抑制剂,而在抗性玉米与小麦内则产生羟基化作用^[21]。哒嗪酮除草剂前体 metflurazon 则需通过细胞色素 P450 代谢的 N-脱甲基化作用形成类胡萝卜素生物合成中的靶酶八氢番茄红素去饱和酶的有效抑制剂^[22]。脲类除草剂绿麦隆(chlortoluron)、优草隆(fluometuron)、利谷隆(linuron)、敌草隆(diuron)及其均三氮苯类除草剂阿特拉津(atrazine)也有同样的特性,被细胞色素 P450 代谢成的 N-脱甲基代谢物的毒性仅比母体化合物毒性略低^[23]。磺酰脲类除草剂 R7402 被土壤细菌 *Streptomyces griseolus* 的 P450sul 催化 N-脱烷基化后,活性增加了 400 倍^[24,25](图 3)。现已认为细胞色素 P450 与农药相互作用的模式及其与前体农药的创制有着重要关系。

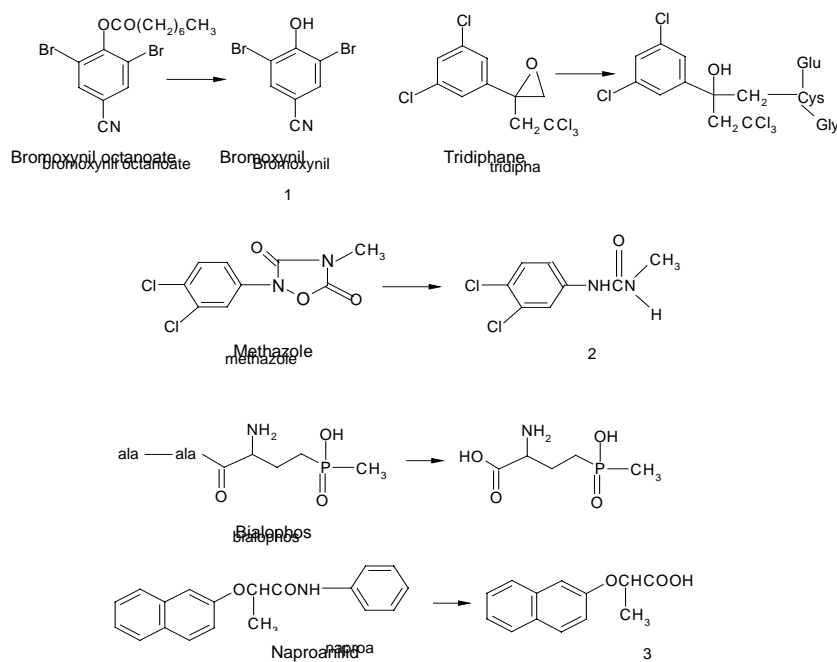


图 1 前体除草剂的代谢活化作用

Fig.1 Metabolic activation of some pro-herbicide

5 讨论

研究农药代谢机理,往往会带来新农药创制(特别是前体农药)与开发的重要进展。许多农药的改进过程都包括对农药代谢机理研究的成果与贡献。例如,以已知农药母核化合物灭多威(methomyl)、克百威(carbofuran)、多菌灵(carbendazim)、乙嘧酚(ethirimol)、甲胺磷(methamidophos)、敌敌畏(dichlorvos)、氧乐果(omethoate)、对氧磷(paraoxon)、二酮腈等开发出的前体农药硫双灭多威(thiodicarb)、丁硫克百威(carbosulfan)、苯菌灵(benomyl)、乙嘧酚磷酸酯(bupirimate)、乙酰甲胺磷(acephate)、二溴磷(naled)、乐果(dimethoate)、对硫磷(parathion)、异恶唑草酮(isoxaflutole)等。这些前体农药化合物性质改善后,一般具有良好的生物利用度,降低了毒性和药害,增加了安全性。国际上这些成功的经验表明,将农药代谢与代谢动力学和创新农药的早期研究相结合,为农药设计提供新的思路,将大大加速新农药的开发进程,提高新农药的命中率。

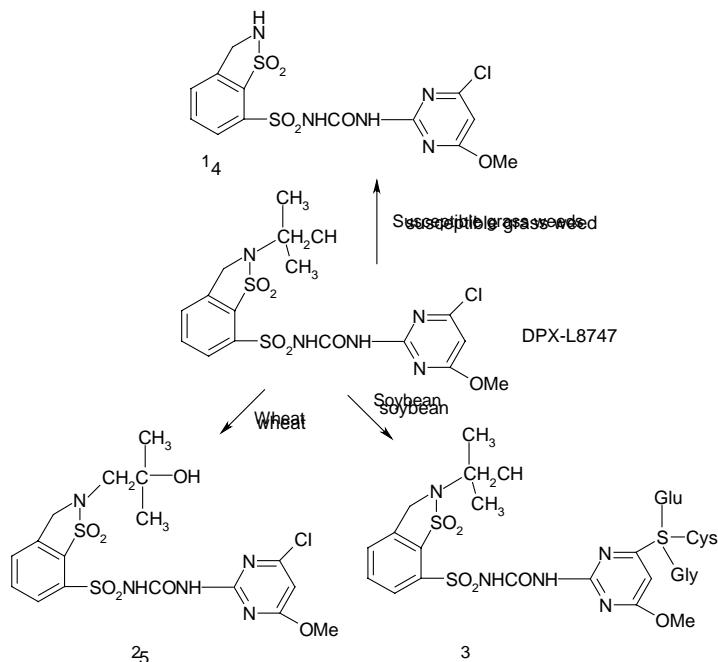


图 2 磺酰脲除草剂 DPX-L8747 在作物、杂草中的差异代谢

Fig.2 Differential metabolism of selective sulfonylurea herbicide DPX-L8747 in weeds and crops

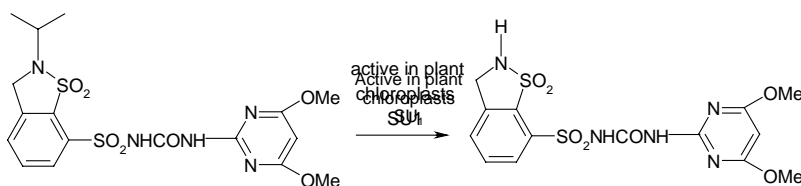


图 3 前体磺酰脲除草剂 R7402 被 P450 SU₁ 的代谢

Fig.3 Metabolism of sulfonylurea proherbicide R7402 by cytochrome P450 SU₁

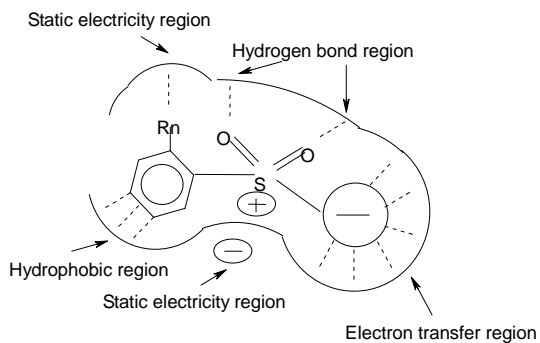


图 4 磺酰脲、磺酰胺类除草剂与 ALS 酶相互作用初级模型
Fig.4 Elementary model of interaction between sulfonylurea, sulfonamide herbicide molecule and ALS²⁶

研究农药的代谢活性物，可能成为创制新农药的一条捷径和获得活性化合物的源泉。本实验室利用基因克隆、酵母异源表达获得一小麦细胞色素 P450，在体外它能催化磺酰脲类除草剂绿磺隆(chlorsulfuron)、醚苯磺隆(triasulfuron)代谢，代谢产物分别为 5-羟基-绿磺隆和 5-羟基-醚苯磺隆，二者在体外均能抑制小麦和菜豆 ALS 酶的活性，且其 IC₅₀ 与母体化合物绿磺隆、醚苯磺隆十分接近。但它们茎叶喷雾小麦、菜豆幼苗均未表现出活性，这可能是 5-羟基代谢产物迅速与葡萄糖轭合而失去活性。5-羟基

—绿磺隆和 5-羟基-醚苯磺隆在体外能抑制 ALS 酶的活性,这与早期报道的磺酰脲分子与 ALS 酶分子作用模型矛盾(图 4)^[26,27],其作用模型认为在磺酰脲分子苯环 5 位上不能有基团,且这一部位为疏水区时,磺酰脲(磺酰胺)类除草剂才能有活性,前期商品化的磺酰脲类除草剂也的确符合这一作用模型;而且通常认为除草剂的羟基化作用是重要的去活性作用.不管怎样,近期报道的磺酰脲分子在苯环 5 位上有基团的一系列化合物具有除草活性(图 5)^[28],连接的基团为-I, MeSO₂NH-, COHNH-, F₃C-, 这与磺酰脲分子常连接的基团-CH₃, -OCH₃, -COOCH₃ 等有较大的差别,其中 AgrEvo 公司开发的磺酰脲类除草剂 Iodosulfuron 在苯环 5 位上连接的基团为-I,其用量为 10 g ai/ha 时,茎叶喷雾能有效防除小麦地的大多数阔叶杂草和部分禾本科杂草.最近 Hacker 等^[29]对磺酰脲类除草剂在苯环 5 位连有基团并有除草活性的系列化合物(图 6)申请了专利.可见,在磺酰脲分子苯环 5 位上连接适当的基团,对获得高活性除草剂是可能的.

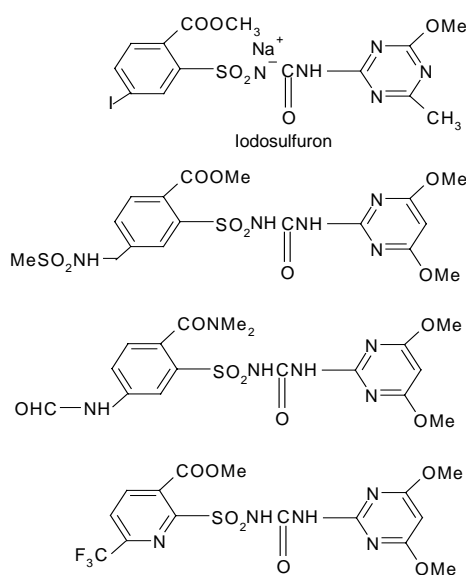
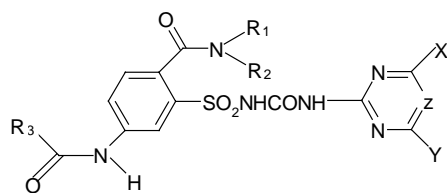


图 5 磺酰脲类除草剂结构

Fig.5 Structures of sulfonylurea herbicide



[R₁ and R₂ are hydrogen or (C₁~C₄) alkyl, preferably methyl or ethyl, in particular methyl. R₃ is hydrogen or (C₁~C₄) alkyl, (C₁~C₄) alkoxy, (C₂~C₄) alkenoxy, (C₂~C₄) alkynoxy, (C₃~C₆) cycloalkyl. One of the radicals X and Y is hydrogen or (C₁~C₄) alkyl, (C₁~C₄) alkoxy, (C₁~C₄) alkylthio. Z is CH or N.]

图 6 酰胺磺酰脲类除草剂结构

Fig.6 Herbicide structures of acylated aminophenylsulfonamide

参考文献:

- [1] 陈万义, 薛振祥, 王能武. 新农药研究与开发 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1997. 278-307.
- [2] 苏少泉. 除草剂的代谢与新品种创制 [J]. 农药, 2001, 40(9): 1-3.
- [3] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶的结构、功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 128-131.
- [4] Barrett M. Metabolism of Herbicides by Cytochrome P450 in Corn [J]. Drug Metab. Drug Interact, 1995, 12: 299-316.
- [5] Frear S. Wheat Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenases: Characterization and Importance in the Metabolic Detoxification and Selectivity of Wheat Herbicides [J]. Drug Metab. Drug Interact, 1995, 12: 329-358.
- [6] Donaldson R P, Luster D G. Multiple Forms of Plant Cytochromes P-450 [J]. Plant Physiol., 1991, 96: 669-674.
- [7] Cole D J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants [J]. Pestic. Sci., 1994, 42: 209-222.
- [8] Ohkawa H, Tsujii H, Shimoji M, et al. Cytochrome P450 Biodiversity and Plant Protection [J]. J. Pestic. Sci., 1999, 24: 197-203.
- [9] Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L. Cytochromes P450 for Engineering Herbicide Tolerance [J]. Trends in Plant Sci., 2000, 5: 116-123.
- [10] Frey M, Chomet P, Glawischnig E, et al. Analysis of a Chemical Plant Defense Mechanism in Grasses [J]. Science, 1997, 277: 696-699.

- [11] Thomas E W, Loughman B C, Powell R G. Metabolic Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Stem Tissue of *Phaseolus vulgaris* [J]. *Nature*, 1964, 204: 884–885.
- [12] Lucier G W, Menzer R E. Nature of Oxidative Metabolites of Dimethoate Formed in Rats, Liver Microsomes and Bean Plants [J]. *J. Agr. Food Chem.*, 1970, 18: 698–704.
- [13] Buckland J L, Collins R F, Pullin E M. Metabolism of Bromoxynil Octanoate in Growing Wheat [J]. *Pestic. Sci.*, 1973, 4: 149–162.
- [14] Oyamada M, Kuwatsuke S. Degradation of the Herbicide Naproanilide and Its Hydrolyzed Product in Perfused Soil and by a Bacterium Isolated From Soil [J]. *J. Pestic. Sci.*, 1990, 15: 81–87.
- [15] Kobayashi K. Phytotoxic Activity of Clomeprop in Soil and Concentration of Hydrolysed Metabolite DMPA in Soil Water [J]. *Pestic. Sci.*, 1999, 55: 474–478.
- [16] Dutka F, Komives T. On the Mode of Action of EPTC and Its Antidotes [A]. Miyamoto J, Kearney P C. *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment*, Vol.3 [C]. Oxford: Pergamon, 1983. 213–218.
- [17] Andrawes N R, Ragley W P, Herrett R A. Metabolism of 2-Methyl-2-(methylthio) Propionaldehyde-*O*-(methyl-carbamoyl) Oxime (Temik Aldicarb Pesticide) in Potato Plants [J]. *J. Agr. Food Chem.*, 1971, 19: 731–737
- [18] Payne L K, Stansbury H A, Weiden M H J. The Synthesis and Insecticidal Properties of Some Cholinergic Bisubstituted *Acetaldehyde O*-(MethylCarbamoyl) Oximes [J]. *J. Agr. Food Chem.*, 1966, 14: 356–365.
- [19] Butts E R, Foy C L. Comparative Uptake and Metabolism of Methazole in Prickly Sida and Cotton [J]. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1974, 4: 44–55.
- [20] Brown H M, Fuesler T P, Ray T B, et al. Role of Plant Metabolism in Crop Selectivity of Herbicides [A]. Freehse H. *Pesticide Chemistry: Advances in International Research, Development and Legislation* [C]. Weinheim: VCH, 1991. 258–266.
- [21] Brown M A, Chiu T Y, Miller P. Hydrolytic Activation Versus Oxidative Degradation of Assert Herbicide an Imidazolinone Aryl-carboxylate, in Susceptible Wild Oat Versus Tolerant Corn and Wheat [J]. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1987, 27: 24–29.
- [22] Tantawy M M, Braumann T, Grimme L H. Uptake and Metabolism of the Phenylpyridazinone Herbicide Metflurazon during the Bleaching and Regeneration Process of the Green Alga, *Chlorella Fusca* [J]. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1984, 22: 224–231.
- [23] Slminsky B, Corbin F T, Ward E R, et al. Expression of a Soybean Cytochrome P450 Monooxygenase cDNA in Yeast and Tobacco Enhances the Metabolism of Phenylurea Herbicides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96: 1750–1755.
- [24] Harder P A, O'Keefe D P, Romesser J A, et al. Isolation and Characterization of *Streptomyces griseolus* Deletion Mutants Affected in Cytochrome P-450-mediated Herbicide Metabolism [J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 227: 238–244.
- [25] O'Keefe D P. Plant Expression of a Bacterial Cytochrome P450 that Catalyses Activation of a Sulfonylurea Pro-herbicide [J]. *Plant Physiol.*, 1994, 105: 473–482.
- [26] 杨光福, 刘华银, 杨华铮, 等. 以 ALS 为靶酶的新型除草剂的分子设计、合成及生物活性-磺酰脲除草剂分子与受体作用的初级模型 [J]. *中国科学 B 辑*, 1998, 28(3): 283–288.
- [27] 赖城明, 袁满雪, 李正名, 等. 磺酰脲除草剂分子与受体作用的初级模型 [J]. *高等学校化学学报*, 1994, 15(5): 693–694.
- [28] Kabl-Friedrich J, Wessel N, Oskar S, et al. Herbicide Mixtures [P]. *Agrevo*. Patent: WO 02/17719 A2, 2001–08–30.
- [29] Hacker H, Bieringer H. Herbicide Combination with Acylated Aminophenylsulfonylureas [P]. *US Patent*: 6498126 B1, 2002–12–24.

Herbicide Metabolism and Creation of Novel Herbicides

XIANG Wen-sheng^{1,2}, WANG Xiang-jing², JU Xiu-lian¹, REN Tian-rui¹

(1. Institute Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Research Center of Life Science and Biotechnology, Northeast Agricultural Univ., Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Activation of some herbicides in plants and the importance of herbicide metabolism to the creation of novel herbicides are reviewed. The combination of herbicide metabolism with novel herbicide creation provides new ideals for designing lead compounds, which is helpful for accelerating the process of exploiting new herbicides and enhancing the probability of new herbicide creation. High effective and low toxic pesticides could also be obtained by changing the structures of parent pesticides based on the high toxic pesticides metabolism and the characteristics of metabolism dynamics.

Key words: herbicide; metabolism; activation; novel herbicide creation