

文章编号:1000-8551(2016)01-0145-09

^{14}C - 环氧虫啉光学异构体在不同土壤中的矿化、结合残留及其在腐殖质中的分布

张晗雪¹ 陈敏¹ 王伟¹ 李忠² 叶庆富¹

(¹ 浙江大学原子核农业科学研究所/农业部核农学重点实验室,浙江 杭州 310029;² 华东理工大学药学院,上海 200237)

摘要:环氧虫啉是我国自主创制的手性新烟碱类杀虫剂,从对映体层面研究其环境行为和归趋对科学使用手性农药及其风险评估有着重要意义。本文采用 ^{14}C 标记技术,研究了环氧虫啉2个对映异构体(1S2R-环氧虫啉,1R2S-环氧虫啉)和外消旋混合物(RM)在酸性红砂土S1、中性黄松土S2及碱性滨海盐土S3好氧和淹水培养中的矿化、结合残留形成及其在腐殖质中的分布规律。结果表明:土壤施药后培养100 d,环氧虫啉的异构体在3种土壤2种培养方式中的矿化、结合残留形成及在腐殖质中的分布均无明显差异;环氧虫啉在好氧和淹水培养的3种土壤中矿化量均有显著差异,在好氧的S1中矿化量最低(占引入量的0.21%~0.23%),S3中矿化量最高(占引入量的16.45%~17.06%),淹水的3种土壤中矿化均小于1%;环氧虫啉在好氧和淹水的S2和S3中结合残留量有显著差异,在S1中结合残留量差异不显著且残留量最小(56.84%~64.38%),好氧的S2中结合残留量最大(占引入量的79.55%~82.99%),淹水的S3中结合残留量最大(占引入量的73.85%~84.11%);环氧虫啉2种光学异构体和外消旋混合物在3种土壤2种培养方式下,结合残留在土壤腐殖质中的分布均呈现富啡酸>胡敏素>胡敏酸的规律。因此,手性杀虫剂环氧虫啉在土壤中的行为归趋不存在对映体选择性。

关键词: ^{14}C -环氧虫啉;手性;矿化;结合残留;腐殖质;新烟碱杀虫剂

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2016.01.0145

新烟碱类杀虫剂作用机制新颖,具有对非靶标生物毒性低、杀虫谱广、良好内吸传导性等突出优点,一度作为环境友好型杀虫剂取代了毒性高或者选择性差的有机磷、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药,广泛应用于农业害虫防治、动物健康保护和卫生害虫防治等领域^[1-2]。吡虫啉(imidacloprid)是第一个商业化开发的新烟碱类杀虫剂,也是目前世界上销售量最大的杀虫剂品种之一^[3]。尽管新烟碱类杀虫剂已被广泛使用了几十年,但对其环境行为的研究却依然相当匮乏。近年来,在对蜜蜂等传粉生物毒性的研究中发现了使用烟碱类杀虫剂所造成的危害。如Whitehorn等^[4],Henry等^[5]发现吡虫啉对野生熊蜂种群有负面作用,因此该杀虫剂在欧洲暂停使用。环氧虫啉(cyclozaprid),化学名为9-[(6-氯吡啶-3-基)甲

基]-4-硝基-8-氧杂-10,11-二氢咪唑并[2,3-a]双环[3,2,1]辛-3-烯,是我国自主研发的一种新烟碱类杀虫剂,室内活性和田间药效测试结果均表现出对半翅目害虫的高活性,交互抗性研究表明其对吡虫啉抗性褐飞虱和B-型烟粉虱同样表现出高效性,有望作为吡虫啉的替代品被广泛使用^[6]。因此,为预测环氧虫啉的环境风险并防止在今后大面积施用时造成不良后果,研究其环境行为非常重要。

由于氧桥的存在,环氧虫啉含有2个手性中心,2个对映异构体。手性化合物的研究与开发是当前研究的热点之一,不同的对映体在理化性质、生物活性、代谢及毒性等方面存在显著差异。前人研究表明,许多手性农药在环境残留和生物转化上均存在立体选择性差异,仅从外消旋体的研究很难准确反映对映体的真

收稿日期:2014-12-12 接受日期:2015-02-03

基金项目:农业部公益性行业科研专项(201103007),国家自然科学基金青年项目(21207113),浙江大学基本科研业务费专项资金(2014FZA6016)

作者简介:张晗雪,女,主要从事环境生物物理学、核技术农业应用研究。E-mail: hanxue_zhang@163.com

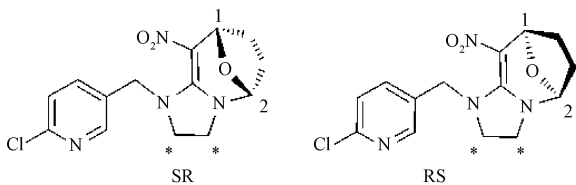
通讯作者:叶庆富,男,教授,主要从事核技术农业应用、环境生物物理学、农药作用机理与环境行为研究。E-mail: qfye@zju.edu.cn

实环境行为,从而造成对其环境风险的评价过高或过低^[7-12],因此,很有必要将其作为不同化合物进行区别研究。前期研究表明,与环氧虫啉结构类似的新烟碱杀虫剂哌虫啉在土壤中的行为表现出对映异构体选择性差异^[13-15],然而关于环氧虫啉在土壤中的结合残留和矿化等环境行为的研究,尤其是对映体层面的研究尚未见报道。本试验采用¹⁴C 同位素标记示踪技术,在光学异构层面研究环氧虫啉 2 种对映异构体及外消旋混合物在不同土壤 2 种培养方式中的矿化、结合残留形成及其在腐殖质中的分布规律,旨在为准确评价环氧虫啉的环境风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标记化合物 ¹⁴C-环氧虫啉由浙江大学和华东理工大学共同合成^[16-18],使用 LC-20AB 制备型高效液相色谱仪(岛津公司,日本)将其 2 个异构体 1S2R-环氧虫啉(SR)和 1R2S-环氧虫啉(RS)进行分离,结构式和¹⁴C 标记位点如图 1 所示。SR,RS 和外消旋环氧虫啉(racemic mixture, RM)的化学纯度和放射化学纯度均 >98%,比活度为 $2.55 \times 10^7 \text{ Bq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 。



注: *: ¹⁴C 标记位置。

Note: *: The locations of ¹⁴C labeling were marked.

图 1 ¹⁴C-环氧虫啉 2 个异构体的结构式

Fig. 1 Structure of ¹⁴C-cycloxyprid isomers

1.1.2 土壤 选取 3 种不同类型的土壤进行试验,分别为:浙江省龙游的红砂土(S1)、浙江省杭州的黄松土(S2)及浙江省慈溪的滨海盐土(S3),均选取未曾使

用过环氧虫啉的稻田表层土(0~15 cm),其主要理化性质见表 1。将土壤风干后去除砂砾和植物残体,碾碎混匀并过 1mm 筛,避光储存备用。

1.1.3 试剂 2,5-二苯基恶唑(PPO)、1,4-双[2-(5-苯基恶唑)](POPOP)为闪烁纯,其他试剂均为分析纯。闪烁液 A 配方:7 g PPO 和 0.5 g POPOP 溶于 650 mL 二甲苯和 350 mL 乙二醇乙醚中;闪烁液 B 配方:7 g PPO 和 0.5 g POPOP 溶于 175 mL 乙醇胺、225 mL 乙二醇乙醚和 600 mL 二甲苯中。

1.2 仪器与设备

PQX2450B230H 型培养箱(宁波莱福科技有限公司),HZ-9211K 型摇床(太仓华利达实验室设备公司),Eppendorf 5804 R 型高速离心机(Eppendorf 公司,德国),Tri-Carb 2910 TR 型液体闪烁测量仪(PerkinElmer 公司,美国),Quatalus-1220 型超低本底液体闪烁测量仪(PerkinElmer 公司,美国),OX-501 型生物氧化燃烧仪(Harvey 公司,美国),Delta-640s 型 pH 计(Mettler Toledo 公司,美国)等。

1.3 方法

1.3.1 好氧培养 ¹⁴C-环氧虫啉在 3 种不同土壤中好氧培养的试验方案按照 OECD307 指导方针设计^[19]。分别调节 3 种土壤的含水量至 30% 田间最大持水量(WHC, water-holding capacity),在培养箱中避光预培养 7 d,使土壤中的微生物复苏。将 3 种¹⁴C-环氧虫啉(SR, RS, RM)溶于含 0.2% 乙腈的超纯水中,配成浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,并在每份 50 g(风干重)不同土壤中分别加入 1 mL 母液,充分混合后置于通风橱。待乙腈挥发后分别与对应种类的 450 g(风干重)土壤充分混合,调节含水量至 60% WHC。每个异构体设置 3 个重复。土壤中初始环氧虫啉浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (风干重),放射性浓度为 $833.33 \text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ (风干重)。将每份土壤转移至 1 L 棕色广口瓶中,广口瓶前串联 2 个 100 mL 锥形瓶,依次装有 30 mL 5.0 M NaOH 溶液用于去除空气中本身存在的 CO₂ 和 30 mL 超纯水用于润湿空气;广口瓶后串联 3 个 100 mL 锥形瓶,依次装有 30 mL 乙二醇和 1.0 M H₂SO₄ 吸

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical property of soils tested

| 编号 No. | 土壤类型 Soil type | pH (H ₂ O) | 有机质 OM/% | 阳离子代换量 CEC/($\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 粘粒 Clay/% | 粉粒 Silt/% | 砂粒 Sand/% |
|-----------|-------------------|--------------------------|-------------|--|--------------|--------------|--------------|
| S1 | 红砂土 | 4.20 | 8.4 | 6.62 | 39.0 | 41.1 | 19.9 |
| S2 | 黄松土 | 7.02 | 30.5 | 10.83 | 8.0 | 71.3 | 20.8 |
| S3 | 滨海盐土 | 8.84 | 9.5 | 10.17 | 24.3 | 71.1 | 4.6 |

收挥发性有机物以及 2 个 30 mL 0.2 M NaOH 溶液用于吸收环氧虫啉开环矿化产生的¹⁴C- CO₂。将装置置于 25 ± 1 °C 的培养箱中避光培养,空气泵每天通气 5 min,并及时补充由于挥发损失的水分。定期更换锥形瓶中的吸收液,并用 LSC 法(液体闪烁测量法)测其放射性活度,其中乙二醇和 H₂SO₄ 溶液需调 pH 至中性后进行测试。

1.3.2 淹水培养 为了模拟稻田淹水胁迫条件,¹⁴C-环氧虫啉在 3 种不同土壤中淹水培养的试验方案按照 OECD 307 指导方针设计并改良^[19]。土壤复苏、¹⁴C-环氧虫啉引入的方法和浓度与好氧培养相同,并将每 10.00 g(干重)土壤转移至 1 个样品瓶,加超纯水至 WHC,静置。待吸附充分后,加超纯水溶液至总水量为 15 mL,上层淹水约 2 cm。将每组样品瓶放入干燥器中,设置 1 个样品组,并在干燥器后串联 3 个 100 mL 锥形瓶,依次装有 30 mL 乙二醇和 1.0 M H₂SO₄ 以吸收挥发性有机物,以及 2 个 30 mL 0.2 M NaOH 溶液用于吸收环氧虫啉开环矿化产生的¹⁴C- CO₂。干燥器内放置 30 mL 的小烧杯,内置 15 mL 超纯水,以保持内部湿润环境。进气端定期通入 N₂,并在培养过程中补充水分维持体积不变,保持淹水环境。定期更换锥形瓶中的吸收液,并测其放射性活度,方法与好氧培养相同。

1.3.3 土壤提取及结合残留(¹⁴C-BR)的总量测定 在培养的第 100 天时,每个平行分别取 10.00 g(风干重)培养土于 100 mL 离心管中,采用 Mordaunt 等^[20]的四步连续振荡提取法:分别用 0.01 M CaCl₂、乙腈:水=9:1(v/v)、甲醇和二氯甲烷各 30 mL 依次提取,每步重复 2 次,手动搅拌均匀后于摇床上充分振荡 2 h,5 000 r·min⁻¹离心 10 min 并取上层清液,将同种提取液合并后测其放射性活度,相加即为可提态残留总量,记为 A_{ER}。四步提取后的沉淀物于通风橱内风干,搅拌均匀,称取 1.00 g 于生物氧化燃烧仪中燃烧,用闪烁液 B 吸收结合残留转化生成的¹⁴CO₂。经燃烧回收率校正和质量换算后得结合残留总量,记为 A_{BR}。

对于淹水培养的样品,从干燥器中取出相应的玻璃瓶,放置于超低温冰箱充分冷冻后,将冰冻状态下的培养土转移至 100 mL 离心管中。待充分解冻后,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液并测其放射性活度记为 E₀。沉淀物如前述方法继续进行四步提取,可提态残留总量为 4 种提取液放射性活度与 E₀的总和。

1.3.4 土壤腐殖质的分级及各组分中¹⁴C-BR 的测定 称取 5.00 g 经四步提取后风干的含有 BR 的土渣,采用改良的丘林法^[21]进行腐殖质(富啡酸、胡敏酸和

胡敏素)分级。加入 0.1 M NaOH + 0.1 M Na₄P₂O₇ 混合溶液,充分混匀后振荡 30 min,连续 3 次,5 000 r·min⁻¹离心 10 min 后合并上清液(含富啡酸和胡敏酸),定容至 100 mL。取 2 mL 测放射性活度,换算得到总活度,记为 A_{HA+FA}。调节上清液 pH 值至 1~1.5,80 °C 水浴过夜后过滤,滤渣为胡敏酸,滤液为富啡酸。调节滤液 pH 值至 6.5~7.5,定容至 100 mL。取 2 mL 测放射性活度,换算得到总活度,记为 A_{FA}。胡敏素的放射性活度 A_{Hummin} = A_{BR} - A_{HA+FA},胡敏酸的放射性活度 A_{HA} = A_{HA+FA} - A_{FA}。

1.4 数据统计分析

本试验数据采用 Origin 8.0 和 SAS 9.1 统计软件分析处理。

2 结果与分析

2.1 质量平衡

质量平衡代表了整个培养试验与测量的可重复性和准确性。由于在培养过程中,除了 NaOH 外的吸收液检测出的放射性活度接近本底,因此以引入的放射性活度折算,回收率 $r = (A_{\text{矿化}} + A_{\text{ER}} + A_{\text{BR}}) / A \times 100\%$ 。培养 100 d 后 3 种¹⁴C 环氧虫啉(SR, RS, RM)在 3 种土壤 2 种培养方式的回收率在 91.13%~106.39% 之间(表 2)。良好的回收率说明整个培养试验满足质量平衡的要求,确保了其他相关结果的可信度。

2.2 ¹⁴C-环氧虫啉对映体及消旋体在不同土壤中的矿化

2 种条件培养 100 d 时,环氧虫啉(SR, RS, RM)在 3 种土壤的开环矿化量见表 3。从对映体层面分析,在好氧和淹水培养条件下 3 种土壤中,SR, RS 和 RM 的矿化量均未表现出显著差异,说明环氧虫啉在 3 种供试土壤中开环矿化均不存在手性选择性。从不同土壤类型分析,在好氧培养中不同土壤中的矿化量存在差异,呈现 S3 > S2 > S1 的规律。S3 中的 RS 矿化量最大(达到引入量的 17.06%),S1 中的 RM 矿化量最小(仅为引入量的 0.21%),即环氧虫啉好氧培养时在碱性土壤中最易矿化,在酸性土壤中最难。其中,环氧虫啉对映体及消旋体在 S2 的矿化量(6.69%~7.31%)以及在 S3 的矿化量(16.45%~17.06%)均达到欧盟的相关要求(>引入量的 5%)。

在淹水培养中,矿化量总体小于 1%,在不同土壤中的矿化量同样存在差异,呈现 S2 > S3 > S1 的规律。其中 S2 中的 SR 矿化量最大,仅为引入量的 0.39%,

表2 质量平衡

Table 2 Material mass balance

| 环氧虫啉 Cyclozaprid | 好氧培养 In aerobic soils | | | 淹水培养 In flooded paddy soils | | |
|---------------------|--------------------------|---------------|--------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| | S1 | S2 | S3 | S1 | S2 | S3 |
| SR | 98.28 ± 2.74 | 100.72 ± 4.31 | 96.17 ± 8.32 | 101.21 ± 6.54 | 105.67 ± 1.40 | 105.60 ± 8.04 |
| RS | 93.50 ± 3.89 | 96.31 ± 6.38 | 97.61 ± 1.76 | 97.17 ± 2.73 | 106.39 ± 1.37 | 104.61 ± 2.01 |
| RM | 98.29 ± 2.00 | 97.61 ± 2.88 | 99.81 ± 4.73 | 91.13 ± 2.56 | 97.30 ± 0.62 | 97.31 ± 5.71 |

注:SR、RS、RM 分别为¹⁴C-环氧虫啉的2个对应异构体和外消旋混合物;S1、S2、S3 分别为酸性红砂土,中性黄松土和碱性滨海盐土。下同。

Note: SR, RS and RM were short for the two optical stereoisomers and racemic mixture of cyclozaprid, respectively. S1, S2 and S3 were short for red-clayed soil, fluvio-marine yellow loamy soil and coastal saline soil, respectively. The same as following.

表3 不同土壤培养100d 矿化形成¹⁴C-CO₂ 占引入量的百分比Table 3 The mineralized¹⁴C-CO₂ accounts for the percentage of applied amount in soils after 100d of incubation

| 环氧虫啉 Cyclozaprid | 好氧培养 In aerobic soils | | | 淹水培养 In flooded paddy soils | | |
|---------------------|--------------------------|---------------|----------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| | S1 | S2 | S3 | S1 | S2 | S3 |
| SR | 0.23 ± 0.03Aa | 6.92 ± 0.59Ba | 16.82 ± 2.98Ca | 0.03 ± 0.01Da | 0.39 ± 0.04Ea | 0.13 ± 0.01Fa |
| RS | 0.22 ± 0.07Aa | 6.69 ± 0.39Ba | 17.06 ± 0.86Ca | 0.03 ± 0.00Da | 0.37 ± 0.04Ea | 0.10 ± 0.01Fa |
| RM | 0.21 ± 0.02Aa | 7.31 ± 0.97Ba | 16.45 ± 1.32Ca | 0.03 ± 0.02Da | 0.32 ± 0.03Ea | 0.08 ± 0.01Fa |

注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$),大写字母代表不同土壤之间的差异,小写字母代表不同对映体之间的差异。下同。

Note: Different letters mean significant difference at 0.05 level. The capital letters indicate the differences between soils, and the lowercase letters refer to the differences between optical isomers. The same as following.

S1 中矿化量最小,仅为引入量的0.03%。即环氧虫啉淹水培养时在中性土中最易矿化,在酸性土壤中最难。

从培养方式角度来看,环氧虫啉在好氧培养和淹水培养条件下3种土壤中的矿化量均存在显著差异。前者的矿化量明显高于后者,尤其是在碱性土中,好氧培养产生的矿化量是淹水培养的100倍以上。由于受淹水胁迫的影响,好氧培养中的微生物含量更多,因此环氧虫啉可以通过生物降解和化学降解2种作用产生CO₂,而在淹水培养中,生物降解受到抑制,因此抑制了CO₂的产生。

2.3 ¹⁴C-环氧虫啉对映体及消旋体在不同土壤中的结合残留

2种条件培养100d时,环氧虫啉SR,RS,RM在3种土壤形成的结合残留量见表4。从对映体层面分析,与矿化情况相同,在好氧和淹水培养条件下3种土壤中,SR,RS和RM的结合残留量均未表现出显著差异,说明环氧虫啉在3种供试土壤中形成结合残留均不存在手性差异。从不同土壤类型分析,在好氧条件下不同土壤中的结合残留量存在显著差异,呈现S2 > S3 > S1的规律。S2中的SR结合残留量最高(达到引

入量的82.99%),S1中的RS结合残留量最小(占引入量的56.84%),即环氧虫啉好氧培养时在中性富含有机质的土壤中最易形成结合残留,在酸性贫瘠的土壤中最难。

在淹水条件下不同土壤中的结合残留量也存在显著差异,呈现S3 > S2 > S1的规律。S3中的RS结合残留量最大(达到引入量的84.11%),S1中矿化量最小(占引入量的57.09%),即环氧虫啉淹水培养时在碱性土中最易形成结合残留,在酸性土壤中最难。其中,环氧虫啉对映体及消旋体在好氧的S1、S3和淹水的S1中培养100d时形成结合残留的量(56.84% ~ 61.22%、66.60% ~ 68.90%、57.09% ~ 64.38%)均达到欧盟的相关要求(<引入量的70%)。

培养方式结果表明,环氧虫啉在好氧培养和淹水培养条件下3种土壤中的结合残留量均存在显著差异。结合残留的形成与土壤性质和微生物含量有关,一般来说高的有机质和微生物含量会促进结合残留的形成。对于S1,由于其有机质和微生物含量均低,好氧培养形成的结合残留量与淹水培养形成的结合残留量无显著区别。对于S2,好氧培养形成的结合残留量略高于淹水培养形成的结合残留量。对于S3,由于好

表 4 不同土壤培养 100d 形成 ^{14}C -BR 占引入量的百分比Table 4 The formation of ^{14}C -BR accounts for the percentage of applied amount in soils after 100d of incubation

| 环氧虫啉 Cycloxyaprid | 好氧培养 In aerobic soils | | | 淹水培养 In flooded paddy soils | | |
|----------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| | S1 | S2 | S3 | S1 | S2 | S3 |
| | SR | 61.22 ± 2.18 Aa | 82.99 ± 3.93 Ba | 66.80 ± 8.55 Ca | 64.38 ± 9.78 Aa | 73.52 ± 4.50 Da |
| RS | 56.84 ± 3.85 Aa | 79.55 ± 6.51 Ba | 68.01 ± 3.29 Ca | 58.40 ± 8.90 Aa | 78.77 ± 2.63 Da | 84.11 ± 6.22 Ea |
| RM | 60.10 ± 2.52 Aa | 79.95 ± 2.64 Ba | 68.90 ± 4.63 Ca | 57.09 ± 4.29 Aa | 71.39 ± 3.70 Da | 73.85 ± 7.66 Ea |

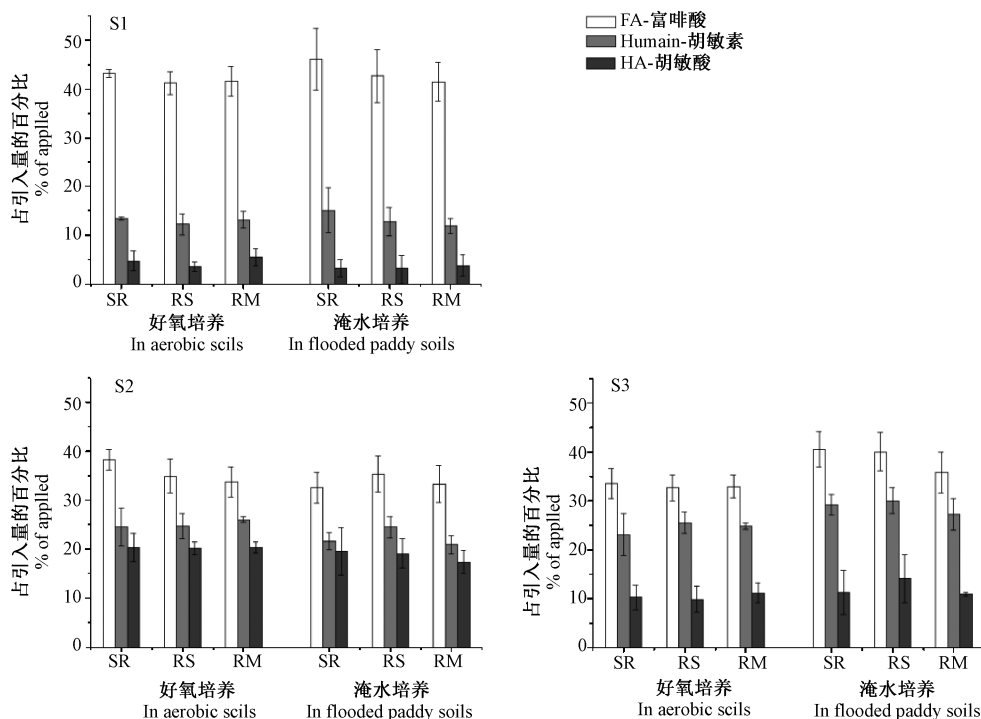
氧培养产生的矿化量非常大,形成的结合残留占总引入量的值低于淹水培养。但是,如果分别求其结合残留量与可提态残留量的比值(即 BR:ER),好氧培养为 4.46 ~ 7.45,淹水培养为 3.17 ~ 4.28,故开环矿化以外的 ^{14}C - 环氧虫啉在好氧培养条件下更倾向形成结合残留。

2.4 ^{14}C - 环氧虫啉对映体及消旋体在不同土壤中的结合残留在腐殖质中的分布特性

2 种条件培养 100 d 时,环氧虫啉(SR,RS,RM)形成的结合残留在 3 种土壤的腐殖质中分布情况如图 2 所示。对映体层面分析表明,环氧虫啉在不同培养中腐殖质的分布情况同样无显著差异,再次证实环氧虫啉与腐殖质组分(富啡酸,胡敏酸和胡敏素)形成结合

残留时并无手性差异。不同土壤层面分析表明,在好氧和厌氧条件下,腐殖质的分布均呈现富啡酸 > 胡敏素 > 胡敏酸的规律,说明环氧虫啉在与土壤腐殖质形成结合残留的过程中,富啡酸起主要作用,胡敏酸作用最小。富啡酸和胡敏素表面带有大量的芳环、羧基、羰基和羟基等,且富含负电荷,可能与 ^{14}C - 环氧虫啉和/或其降解物形成疏水作用、偶极作用、离子交换作用以及氢键等。因此, ^{14}C - 环氧虫啉和/或降解物易与富啡酸和胡敏素结合,形成常规方法难以提取的结合残留。

从不同培养方式角度分析,好氧培养和淹水培养条件下结合残留在腐殖质不同组分中的分布规律基本相同,符合富啡酸 > 胡敏素 > 胡敏酸的规律。如 SR

图 2 培养 100d 后 ^{14}C -BR 在不同土壤中富啡酸、胡敏素和胡敏酸的分布(占引入量的百分比)Fig. 2 The distribution of ^{14}C -BR in the fulvic acid, humin and humic acid of soils after 100d of incubation (% of applied)

在 S1 中,好氧培养时结合残留在腐殖质中的分布为:富啡酸 43.20%,胡敏素 13.36%,胡敏素 4.66%,淹水培养时结合残留分布为:富啡酸 46.18%,胡敏素 15.01%,胡敏酸为 3.19%。说明不同培养方式的改变未影响环氧虫啉结合残留在腐殖质各组分的分布规律,并且微生物对腐殖质各组分与环氧虫啉母体及代谢产物结合能力的影响相对较小。

3 讨论

3.1 ^{14}C - 环氧虫啉在土壤中行为无对映体选择性的机理探索

大量研究表明手性农药施加到自然界后,对映体在环境中的代谢消解与归趋往往是不同的^[22]。Ma 等^[23]发现异丙甲草胺在土壤中的降解存在对映体选择性;Buerge 等^[24]发现甲霜灵在土壤中的降解具有对映体选择性,且这种降解与土壤的性质有关。然而,本研究证实,环氧虫啉的 2 个光学异构体 SR 和 RS 以及环氧虫啉的消旋体混合物 RM,在 3 种不同土壤经过 2 种不同方式培养 100 d 后,其矿化和结合残留的形成均不具有显著性差异,即环氧虫啉在环境中的归趋不具有对映体选择性。国内外相关研究也有相似的报道,如 Qi 等^[25]发现敌草胺在土壤降解中无手性差异,Liu 等^[26]研究了乙烯菌核利在 5 种土壤中的代谢,只在 1 种土壤中呈现了手性差异。农药的矿化及结合残留的形成与其母体的降解规律密切相关,环氧虫啉在土壤中的行为不存在手性差异可能与其氧桥不稳定有关。前人研究证实了这一现象,如庄英滢等^[27]对环氧虫啉光解和水解的研究发现,环氧虫啉在水溶液中极不稳定,其主要降解物为 6-Cl-PMNI,化学名 2-氯-5-{2-(硝基亚甲基)咪唑啉-1-基}甲基吡啶,不具有手性特征。Liu 等^[28]进一步研究表明, ^{14}C -环氧虫啉异构体在淹水土壤中母体通过氧桥断裂迅速降解,产生了 11 个不具有手性的代谢降解产物。环氧虫啉母体不稳定且代谢/降解物不具有手性,因此环氧虫啉和/或降解物与土壤基质形成的结合残留及其矿化不存在选择性行为。综上所述,有关环氧虫啉环境行为的后续研究可以从消旋体层面进行。

3.2 ^{14}C - 环氧虫啉在不同土壤及培养方式存在差异的原因

农药在土壤中矿化与结合残留的形成,除取决于化合物的结构和化学性质外,还与土壤的理化性质和环境条件及耕作方式等密切相关。不同的耕种方式对土壤的性质和微生物群落都会产生影响,因此也影响

农药在土壤中的归趋和代谢。与环氧虫啉结构类似并同样为手性农药的哌虫啉,其差向异构体在土壤中的归趋表现明显的差异性,并在不同培养方式的土壤中表现不同。Fu 等^[15]发现好氧培养 100 d 后, ^{14}C -哌虫啉的 4 个异构体在黄松土中矿化为 1.76% ~ 6.10%,结合残留量为 12.01% ~ 31.20%。Li 等^[13]发现淹水培养 100 d 后 ^{14}C -哌虫啉的 4 个异构体在黄松土中矿化为 0.90% ~ 3.97%,结合残留量为 8.06% ~ 25.68%。对于哌虫啉,相比淹水培养,好氧培养可以产生更高的矿化并形成更多的结合残留。同样的现象也出现于本试验中, ^{14}C -环氧虫啉在黄松土好氧培养 100 d 后,其矿化和结合残留量分别为 6.69% ~ 7.13% 和 79.55% ~ 82.99%,而淹水培养 100 d 后,则相应为 0.32% ~ 0.39% 和 71.39% ~ 78.77%。同种土壤好氧和淹水培养间的这种差异与后者缺氧胁迫导致土壤中微生物种类、含量、功能等发生变化有关。

大量研究表明,不同类型土壤的理化性质影响农药矿化和结合残留的形成。有关吡虫啉的研究发现,其结合残留随着土壤有机质含量的增加而增加^[29]。本研究也发现, ^{14}C -环氧虫啉在高有机质的黄松土中最倾向于形成结合残留,在有机质最低的红砂土中形成结合残留最少。然而,在淹水培养条件下有机质较低的碱性土中却形成了最高量的结合残留,这种现象可能是土壤多种因子协同作用造成的,与单因子的相关性并不显著。前期有关 ^{14}C -甲磺隆^[30]、 ^{14}C -绿磺隆^[31]、 ^{14}C -丙酯草醚^[32-33]和 ^{14}C -哌虫啉^[13-15, 34]等农药的研究也出现了类似的现象。目前研究一般认为农药与土壤的结合可以被微生物逆转和释放,并造成长期的潜在威胁^[35],然而也有研究认为结合残留的生物有效性有限,可以作为一种解毒的途径^[36]。鉴于环氧虫啉在好氧的中性和碱性土壤及淹水的中性土壤中的结合残留含量均超过了欧盟的规定限值(<70%),因此有关环氧虫啉结合残留的环境毒性及其生物有效性等还有待进一步证实。

4 结论

环氧虫啉的 2 个对映异构体 SR,RS 和外消旋混合物 RM 在 3 种不同土壤 2 种培养方式的开环矿化、结合残留及其在腐殖质中的分布均无手性选择性;好氧培养 100 d 后,环氧虫啉在红砂土和滨海盐土中结合残留小于 70%,在黄松土和滨海盐土的矿化大于 5%;淹水培养 100 d 后,在红砂土中结合残留小于 70%,以上情况符合欧盟有关要求;环氧虫啉的矿化在

同种土壤不同培养条件下存在显著差异,在不同土壤同种培养条件下也存在显著差异;环氧虫啉的结合残留在同种土壤(除红松土 S1 外)不同培养条件下存在显著差异,在不同土壤同种培养条件下也存在显著差异;在好氧和淹水条件下不同土壤中环氧虫啉的结合残留在腐殖质中的分布均呈现富啡酸 > 胡敏素 > 胡敏酸的规律。研究成果可为环氧虫啉的环境安全风险决策提供依据,同时为高效友好型农药的研创及施用提供科学依据,确保环境安全,降低健康风险,推进绿色农业进程。

参考文献:

- [1] Tomizawa M, Casida J E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 42(2): 260 - 269
- [2] Jeschke P, Nauen R. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry [J]. *Pest Management Science*, 2008, 64(11): 1084 - 1098
- [3] Bai D L, Lummis S C R, Leicht W, Breer H, Sattelle D B. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone [J]. *Pesticide Science*, 1991, 33(2): 197 - 204
- [4] Whitehorn P R, O' Connor S, Wackers F L, Goulson D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production [J]. *Science*, 2012, 336(6079): 351 - 352
- [5] Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees [J]. *Science*, 2012, 336(6079): 348 - 350
- [6] Shao X, Swenson T L, Casida J E. Cycloxyprid insecticide: Nicotinic acetylcholine receptor binding site and metabolism [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(33): 7883 - 7888
- [7] Weissbuch I, Leiserowitz L, Lahav M. Stochastic "Mirror symmetry breaking" via self-assembly, reactivity and amplification of chirality: relevance to abiotic conditions [J]. *Prebiotic Chemistry*, 2005, 259: 123 - 165
- [8] Liu W, Gan J, Schlenk D, Jury W A. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(3): 701 - 706
- [9] Garrison A W. Probing the enantioselectivity of chiral pesticides [J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(1): 16 - 23
- [10] Liu W, Gan J, Qin S. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of synthetic pyrethroid insecticides [J]. *Chirality*, 2005, 17(S1), S127 - S133
- [11] Liu W, Ye J, Jin M. Enantioselective phytoeffects of chiral pesticides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(6): 2087 - 2095
- [12] Wiberg K, Letcher R, Sandau C, Norstrom R, Tysklind M, Bidleman T. The enantioselective bioaccumulation of chiral chlordane and α - HCH contaminants in the polar bear food chain [J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34(13): 2668 - 2674
- [13] Li J Y, Zhang J B, Li C, Wang W, Yang Z, Wang H Y, Gan J, Ye Q F, Xu X Y, Li Z. Stereoisomeric isolation and stereoselective fate of insecticide Paichongding in flooded paddy soils [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47(22): 12768 - 12774
- [14] Fu Q G, Zhang J B, Xu X Y, Wang H Y, Wang W, Ye Q F, Li Z. Diastereoselective metabolism of a novel cis-nitromethylene neonicotinoid Paichongding in aerobic soils [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47(18): 10389 - 10396
- [15] Fu Q G, Wang Y C, Zhang J B, Zhang H X, Bai C, Li J Y, Wang W, Wang H Y, Ye Q F, Li Z. Soil microbial effects on the stereoselective mineralization, extractable residue, bound residue, and metabolism of a novel chiral cis neonicotinoid, Paichongding [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(32): 7689 - 7695
- [16] Li C, Xu X Y, Li J Y, Ye Q F, Li Z. Radiosynthesis of tritium-labeled novel nitromethylene neonicotinoids compounds with NaB₃H₄ [J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2011, 54(5): 256 - 259
- [17] Li C, Xu X Y, Li J Y, Ye Q F, Li Z. Synthesis and chiral purification of ¹⁴C-labeled novel neonicotinoids, paichongding [J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2011, 54(13): 775 - 779
- [18] Li C, Xu X Y, Liu X Q, Fu Q G, Wang W, Ye Q F, Li Z. An overview of radio or stable isotope-labeled cis-neonicotinoid analogs [J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2012, 55: 339 - 345
- [19] Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil, No. 307 [S]. Paris, 2002
- [20] Mordaunt C J, Gevao B, Jones K C, Semple K T. Formation of nonextractable pesticide residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(1): 25 - 34
- [21] 欧国菁. 应用焦磷酸钠对土壤腐殖质组分及性质的初步研究 [J]. *土壤通报*, 1963, (2): 37 - 43
- [22] Ye J, Zhao M, Liu J, Liu W. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(7): 2371 - 2383
- [23] Ma Y, Liu W P, Wen Y Z. Enantioselective degradation of Rac-metolachlor and S-metolachlor in soil [J]. *Pedosphere*, 2006, 16(4): 489 - 494
- [24] Buege I J, Poiger T, Muller M D, Buser H R. Enantioselective

- degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(12): 2668-2674
- [25] Qi Y L, Liu D H, Sun M J, Di S S, Wang P, Zhou Z Q. The chiral separation and enantioselective degradation of the chiral herbicide napropamide[J]. *Chirality*, 2014, 26(2): 108-113
- [26] Liu H, Liu D H, Shen Z G, Sun M J, Zhou Z Q, Wang P. Chiral Separation and Enantioselective Degradation of Vinclozolin in Soils [J]. *Chirality*, 2014, 26(3): 155-159
- [27] 庄英滢. 环氧虫啉水解及光解稳定性研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014
- [28] Liu X Q, Xu X Y, Li C, Zhang H X, Fu Q G, Shao X S, Ye Q F, Li Z. Degradation of chiral neonicotinoid insecticide cycloxaprid in flooded and anoxic soil[J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 334-341
- [29] Cox L, Koskinen W C, Yen P Y. Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soils[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(4): 1468-1472
- [30] 叶庆富, 邬建敏, 孙锦荷. ^{14}C -甲磺隆在土壤中的可提态残留、结合残留和矿化[J]. *环境科学*, 2002, 23(6): 62-68
- [31] 叶庆富, 戚文元, 邬建敏, 孙锦荷. ^{14}C -绿磺隆在土壤中的可提态残留、结合残留和矿化研究[J]. *核农学报*, 2003, 17(1): 46-55
- [32] 岳玲, 余志扬, 汪海燕, 叶庆富, 吕龙. 好氧土壤中[C环-U- ^{14}C]丙酯草醚的结合残留及其在腐殖质中的分布动态[J]. *核农学报*, 2009, 23(1): 134-138
- [33] Wang W, Yue L, Zhang S F, Ye Q F, Qi W Y, Wang H Y, Chen Z Y. Fate of pyribambenz propyl (ZJ0273) in anaerobic soils revealed by position-specific C-14 labeling [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 258: 151-158
- [34] 付秋果, 柳汝阳, 董永汉, 曾娇, 张键波, 白蝉, 张晗雪, 沈佳君, 王伟, 叶庆富. ^{14}C -啉虫啉光学异构体在土壤中的矿化、结合残留及其在腐殖质中的分布[J]. *核农学报*, 2013, 27(8): 1195-1202
- [35] Khan S U, Behki R M. Effects of pseudomonas species on the release of bound C-14 residues from soil treated with [C-14] Atrazine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(11): 2090-2093
- [36] Berry D F, Boyd S A. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues [J]. *Environmental Science and Technology*, 1985, 19(11): 1132-1133

Diastereoselective Mineralization and Bound Residue Formation of ¹⁴C-cycloxaprid and Its Distribution in Humus in Aerobic and Flooded Paddy Soils

ZHANG Hanxue¹ CHEN Min¹ WANG Wei¹ LI Zhong² YE Qingfu¹

(¹ Key Laboratory of Nuclear-agricultural Sciences, Ministry of Agricultural/Institute of Nuclear-agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029; ² College of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Cycloxaprid, a novel neonicotinoid insecticide developed independently in China, has two optical stereoisomers, 1S2R-cycloxaprid and 1R2S-cycloxaprid. The environmental behavior and fate of chiral pesticides in antipode level had great significance to the scientific use and risk assessment of cycloxaprid. The stereoisomer-specific mineralization and bound residue (BR) of cycloxaprid in aerobic soils and flooded paddy soils were studied using ¹⁴C-isotope tracing, respectively in this study. The results were as follows: No significant difference was observed between the two optical isomers for the mineralization, BR and its distribution in humus at 100 days after the application. Significant difference in the mineralization of the stereoisomers was observed between aerobic and anoxic condition in soils ($p < 0.05$). Under aerobic condition, and the mineralization of cycloxaprid in S1 was the lowest (0.21% to 0.23% of the applied amount), and the highest in S3 (16.45% to 17.06% of the applied). Under anoxic condition, the mineralization of cycloxaprid was less than 1% in all tested soils. Significant difference in the BR of cycloxaprid was observed between aerobic and anoxic conditions in S2 and S3 ($p < 0.05$), while no significant difference was found in S1. The BR in S1 was the lowest under both aerobic and anoxic conditions (56.84% to 64.38% of the applied amount), while the highest in aerobic S2 (79.55% to 82.99% of the applied amount) and in anoxic S3 (73.85% to 84.11% the applied amount), respectively. Bound residue of ¹⁴C-cycloxaprid distributed in humus showed a tendency of fulvic acid > humin > humic acid in three soils under both aerobic condition and anoxic condition. The results indicated that no significant selectivity difference has been found in the environmental behavior and fate of chiral insecticide, cycloxaprid in soil.

Keywords: ¹⁴C-cycloxaprid, chiral, mineralization, bound residue, humus, neonicotinoid insecticide