

· 研究论文 ·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0081

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐在马尾松树体内的 代谢产物研究

姜 壮¹, 宋林松¹, 李云帆², 蔡伟飞⁴, 初 楚³,
陈安良³, 王继栋², 张绍勇^{*2}

(1. 贵州省湄潭县林业局, 贵州 遵义 564100; 2. 湖州师范学院 浙江省媒介生物学与病原传播控制重点实验室, 浙江 湖州 313000; 3. 浙江农林大学 生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 杭州 311300;
4. 浙江省松阳县森林资源保护管理站, 浙江 丽水 323400)

摘要: 为了明确甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(以下简称甲维盐)注干施药后的代谢产物和降解途径, 研究了甲维盐在马尾松树体内的代谢途径、代谢产物及其活性。通过超声浸提、硅胶柱层析、凝胶柱层析、制备色谱、高效液相色谱(HPLC)、液-质联用色谱(LC-MS)、室内生测7个步骤, 对甲维盐注干施药17个月后的马尾松树体内进行残留分析和代谢产物鉴定。结果表明: 甲维盐保留率为50.05%~54.26%。在马尾松树体内分离到16种甲维盐代谢产物, 表征了其中11种代谢产物, 分别为 $C_{49}H_{77}NO_{14}$ 、 $C_{49}H_{75}NO_{14}$ 、 $C_{41}H_{60}O_{11}$ (MSB_{1a})、 $C_{42}H_{63}NO_{10}$ 、 $C_{49}H_{77}NO_{14}$ 、 $C_{49}H_{73}NO_{14}$ (FAB_{1a})、 $C_{48}H_{72}O_{14}$ (4S-OH-B_{1a})、 $C_{49}H_{75}NO_{13}$ 、 $C_{50}H_{77}NO_{13}$ 、 $C_{50}H_{77}NO_{13}$ 和 $C_{49}H_{77}NO_{13}$ 。10 mg/L代谢产物混合物处理松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 24 h的死亡率为69.12%。在树体内无光条件下, 甲维盐分解代谢速度较慢, 分解的代谢产物对松材线虫也具有杀虫活性。本研究解释了甲维盐注干施药可以在较长时间内有效防治松材线虫病的原因。

关键词: 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐; 马尾松树; 注干施药; 代谢产物; 生物活性

中图分类号: S482; S763.7 文献标志码: A

Study on metabolism degradation of emamectin benzoate in *Pinus massoniana*

JIANG Zhuang¹, SONG Linsong¹, LI Yunfan², CAI Weifei⁴, CHU Chu³,
CHEN Anliang³, WANG Jidong², ZHANG Shaoyong^{*2}

(1. Meitan Forestry Bureau of Guizhou Province, Zunyi 564100, Guizhou Province, China; 2. Key Laboratory of Vector Biology and Pathogen Transmission Control in Zhejiang Province, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China; 3. National Local Joint Engineering Laboratory of High efficiency Preparation Technology of Biopesticide, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; 4. Forest Songyang Resources Administration of Zhejiang Province, Lishui 323400, Zhejiang Province, China)

收稿日期: 2024-03-28; 录用日期: 2024-07-31; 网络首发日期: 2024-08-21.

Received: March 28, 2024; Accepted: July 31, 2024; Published online: August 21, 2024.

URL: <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0081>

<http://www.nyxxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0081>

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(No. 2019C02024); 湖州市公益性研究项目(No. 2021GZ25); 教育厅科研项目(No. Y202043997); 国家大创项目(No. 202210347005).

Funding: Supported by the Key R & D Program of Zhejiang Province (No. 2019C02024); Huzhou Public Welfare Research Project (No. 2021GZ25); Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (No. Y202043997) and National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program(No. 202210347005).

第一作者(First author): 姜壮, E-mail: yang20z@163.com. *通信作者(Corresponding author): 张绍勇, E-mail: lzhangshaoyong@163.com.

The authors declare that they have no competing interests.



Abstract: To clarify the metabolites and degradation pathways of emamectin benzoate (EB) after trunk injection, the metabolic degradation, metabolites, and their activities of EB in *Pinus massoniana* were investigated. Residue analysis and metabolite identification were carried out using ultrasonic extraction, silica gel column chromatography, gel column chromatography, preparative chromatography, HPLC, LC-MS, and indoor bioactivity test in *P. massoniana* after 17 months of trunk application of EB. The retention rate of EB was 50.05%-54.26%. Sixteen metabolites of EB in *P. massoniana* were isolated and 11 of them were characterized by their molecular formulas: $C_{49}H_{77}NO_{14}$, $C_{49}H_{75}NO_{14}$, $C_{41}H_{60}O_{11}$ (MSB_{1a}), $C_{42}H_{63}NO_{10}$, $C_{49}H_{77}NO_{14}$, $C_{49}H_{73}NO_{14}$ (FAB_{1a}), $C_{48}H_{72}O_{14}$ (4''-S-OH-B_{1a}), $C_{49}H_{75}NO_{13}$, $C_{50}H_{77}NO_{13}$, $C_{50}H_{77}NO_{13}$ and $C_{49}H_{77}NO_{13}$. The mortality of *Bursaphelenchus xylophilus* exposed to the metabolite mixture at 10 mg/L for 24 hours was 69.12%. In the absence of light inside the tree, the metabolism of EB is slower and the catabolic products remain active against pine wood nematodes. This study explains why the dry application of EB can be effective in controlling pine wood nematode disease over a longer period.

Keywords: emamectin benzoate; *Pinus massoniana*; trunk injection; metabolic degradation; biological activity

甲氨基阿维菌素苯甲酸盐 (以下简称甲维盐) 注干施药是目前防治林木病虫害的重要手段, 对白蜡窄吉丁 (*Agrilus planipennis*)^[1-2]、红翅大小蠹 (*Dendroctonus rufipennis*)^[3]、天牛 (*Cerambycidae*)^[4] 及检疫性有害生物松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*)^[5-9] 等的防治具有精准、高效、环保的特点。甲维盐对松材线虫病的防控效果达 3 年以上, 研究者通过液相色谱和液-质联用对甲维盐在树体内的残留、传导规律进行了初步研究^[10-12]。但甲维盐在树体内的降解途径、代谢产物的结构及其活性等仍有待进一步研究。国外学者对甲维盐在蔬菜上的代谢途径进行了初步研究, Feely 等^[13] 通过¹⁴C 和³H 标记甲维盐处理白菜, 发现天然产物如蛋白质、纤维素、木质素和淀粉中含有放射性物质, 推测甲维盐可能结合植物体内的糖类和蛋白类参与代谢转化; Allen 等^[14] 通过光解实验证实, 植物体可能通过代谢途径将甲维盐与其内源

物结合转化为本身所需物质。

甲维盐进入树体后的代谢过程较为复杂, 可能存在微生物降解、酶解、水解等代谢途径, 较难进行代谢产物的分析和鉴定。Burkhard 等^[15] 通过树干微注射方法探究了甲维盐在黄栗树体内的传导和降解过程, 发现仅有少量甲维盐可通过落叶进入土壤参与降解或被土壤固定, 其余大部分仍保留在树体内参与代谢过程, 代谢产物未明; Chukwudebe 等^[16] 在好氧和厌氧条件下用¹⁴C 标记甲维盐处理土壤, 发现甲维盐可降解为 8a-OH-MAB_{1a} 和 8a-OXO-MAB_{1a} (图 1) 及其他极性较大、成分复杂、含量较低的降解物; Mushtaq 等^[17] 研究表明, 甲维盐进入土壤后与土壤结合紧密, 迁移率极低。综上, 甲维盐通过注干施药进入树体后, 大部分保留在树体内参与代谢过程, 少量通过落叶进入土壤经微生物降解或被土壤固定, 最终转化成 CO₂。

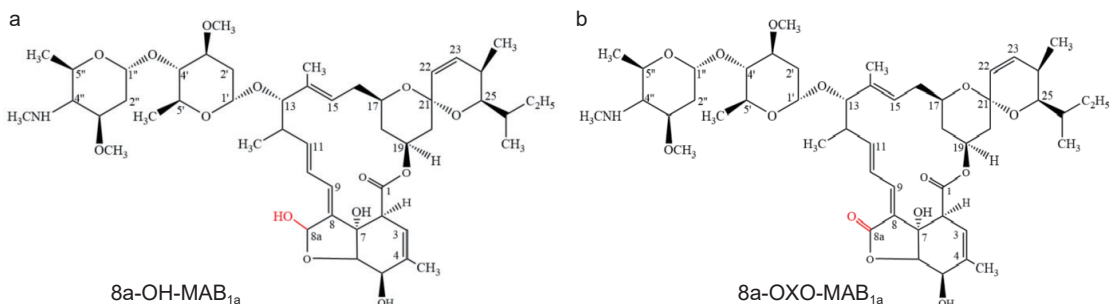


图 1 8a-OH-MAB_{1a} 和 8a-OXO-MAB_{1a} 结构式^[16]

Fig. 1 Structure diagram of 8a-OH-MAB_{1a} and 8a-OXO-MAB_{1a}^[16]

课题组前期研究了甲维盐注干施药对马尾松树内生真菌和细菌多样性的影响^[18], 本研究在此基础上, 将采用超声提取、柱层析、高效液相色谱(HPLC)、液-质联用色谱(LC-MS)、生物活性测定等技术, 进一步研究甲维盐注干施药后在马尾松树体内的代谢产物, 以期阐明甲维盐在马尾松树体内持效期较长的原因。

1 材料与方法

1.1 药剂、试剂及仪器

甲维盐标准品(纯度 98%, 浙江钱江生物化学股份有限公司); 20 g/L 甲维盐微乳剂(实验室标准品自行配制, 标准品 2040.8 mg, 正丁醇 40 mL, 二甲基甲酰胺 10 mL, 烷基酚聚氧乙烯醚-10(OP-10) 助剂 15 mL, 水补足至总质量 100 g, 质量浓度为 20 000 mg/L)。甲醇(色谱级, 美国天地试剂有限公司); 乙腈(质谱级, 德国默克集团); 三乙胺(色谱级, 阿拉丁试剂有限公司); 甲酸(质谱级, 赛默飞世尔公司); 其余试剂均为分析级(国药集团化学试剂有限公司)。

RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 2500C 多功能粉碎机(永康市红太阳机电有限公司); KQ 500E 超声波清洗仪(昆山市超声仪

器有限公司); TDL-80-2B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司); 凝胶(LH-20)层析柱(直径 5.0 cm, 柱高 100 cm); XBridge-C₁₈ 分析色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters 公司); ZORBAX-C₁₈ 制备色谱柱(I: 9.4 mm × 250 mm, 5.0 μm; II: 21.2 mm × 250 mm, 5.0 μm)、1260 II 高效液相色谱仪和制备液相色谱仪、6545 Q-TOF 液-质联用高分辨质谱仪(色谱柱为 Extend-C₁₈ 柱, 100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)(美国安捷伦科技有限公司); 柱层析硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工厂); HSGF254 薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验设计 试验地位于浙江省杭州市临安区浙江农林大学东湖校区后山马尾松树林, 占地约 6.67 hm², 海拔 20.4~45.8 m。随机选取 5 株生长健康(整体呈绿色、无枯枝或较少)、胸径在 8.5~10 cm 10~15 年生马尾松树作为试验用树, 挂牌标记(表 1), 其中 1 株为对照, 不做任何处理。注干药剂为 20 g/L 甲维盐微乳剂。采用打孔注药的方式, 施药时间为 2020 年 3 月 8 日, 注药孔距地面 10 cm, 注药 1 周后检查瓶内无剩余药液。定期观测马尾松树生长状况。

表 1 供试马尾松树信息表

Table 1 Information table of *P. massoniana*

树木编号 Serial number of plant	胸径 Breast diameter/cm	树高 Tree height/m	生长状况 Growth condition	注药量 Injection dose/mg	17 个月生长状况 Growth status after 17 months
18A3701	10.0	6.0	健康 Healthy	1000	健康 Healthy
18A3708	9.0	5.5	健康 Healthy	1000	健康 Healthy
18A3703	8.5	5.0	健康 Healthy	1000	健康 Healthy
18A3705	9.5	5.0	健康 Healthy	1000	健康 Healthy
18A3706(对照)	9.3	5.8	健康 Healthy	0	健康 Healthy

1.2.2 样品采集及提取 样品采集: 注药 17 个月后, 即 2021 年 8 月 6 日对供试马尾松树通过挖根方式整株取样, 并分为 5 段: 松根(距注药孔 10 cm 以下的基部, 包括主根和侧根)、主干(地上部分主干至顶端最后一轮松枝处)、松枝(所有枝条侧枝)、松针(整株针叶)和松果, 分别装袋, 称重。于 50 °C 黑暗条件下烘干至恒重, 用柴刀劈成条状, 再用剪刀分段后粉碎机粉碎, 过 50~100 目标准筛, 称重, 备用。

样品提取: 分别对粉碎后 5 个部分的全部样品进行浸提。将样品全部倒入 2~5 L 烧杯, 用甲

醇淹没样品, 超声振荡 30 min 得提取液, 提取液经放有两层滤纸的漏斗过滤, 残渣再加入甲醇进行提取, 重复 3 次, 最后一次残渣倒入漏斗, 用 100~500 mL 甲醇淋洗; 合并淋洗液和提取液, 经旋转蒸发器减压浓缩(45 °C, 60~90 r/min), 得到松根、主干、松枝、松针、松果 5 个部分的粗提浸膏, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

1.2.3 甲维盐残留量测定 粗提浸膏净化: 取 1~2 mL 浸膏, 过自制的十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)净化小柱(5 mL 注射器, 底端塞入脱脂棉, 加入 3 mL ODS 填料, 甲醇活化), 浸膏位于

净化小柱上层,用甲醇淋洗;收集洗脱液,定容至 10 mL,过 0.45 μm 有机滤膜,得粗提液,待测。

标准溶液配制:准确称取甲维盐标准品 10 mg,用适量甲醇溶解,定容至 10 mL,得 1000 mg/L 的甲维盐标准溶液。再用甲醇分别配制成 1000、500、100、50、10、1 mg/L 的系列甲维盐工作溶液,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

高效液相色谱检测条件:检测波长 244 nm,流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙腈}):V(0.1\% \text{ 三乙胺水溶液})=40:43:17$,流速 1 mL/min,进样量 20 μL ,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,外标法定量。

1.2.4 总粗提浸膏净化 硅胶柱层析:为保证最大程度获取甲维盐代谢产物,选取 4 个样品中甲维盐整株保留率最高的粗提浸膏,与硅胶按体积比 1:1 拌样后,置于避光通风橱内晾干,研磨成无明显颗粒的粉末后,与硅胶以体积比 1:5 装柱,分两部分洗脱。第一部分,洗脱剂梯度为 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70$,每梯度 0.8 L,收集洗脱液,进行薄层色谱层析分析,根据显色层合并浓缩。第二部分,洗脱剂梯度为 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=95:5, 90:10, 80:20$,每梯度 1 L,收集洗脱液,以甲维盐标样为参照,进行薄层色谱层析分析,根据甲维盐标样显色层(目标段)合并浓缩甲维盐类似物,得到目标段 I。

凝胶柱层析:取目标段 I 过凝胶层析柱,洗脱剂为 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=1:1$,洗脱体积 1 L,收集洗脱液,以甲维盐标样为参照,进行薄层色谱层析分析,根据标样显色层(目标段)合并浓缩甲维盐类似物,得到目标段 II。

高效液相色谱检测条件:目标段 II 通过制备、分离、除杂,经浓缩得到目标段 III, C_{18} 色谱柱 II (21.2 mm \times 250 mm, 5.0 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 20 mL/min,进样量 3 mL,流动相 0~30 min,水 30%~13%,甲醇 70%~87%;检测波长 244 nm。

1.2.5 甲维盐在马尾松树体内代谢产物分析 高效液相色谱分析:以前期鉴定的甲维盐光解产物^[19]、伊维菌素和甲维盐标准品为参考,对目标段 III 单个峰按出峰时间进行编号后制备纯化。分析条件为柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 mL/min,进样量 5 μL ,流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{甲醇}):V(0.1\% \text{ 三乙胺}$

水溶液)=40:38:22,检测波长 244 nm。 C_{18} 色谱柱 I (9.4 mm \times 250 mm, 5.0 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.5 mL/min,进样量 90 μL ,流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=85:15$,检测波长 244 nm。40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩,待 LC-MS 分析。

LC-MS 分析:流动相 A,乙腈, B, 0.1% 甲酸水溶液。洗脱梯度:0~2 min, 80%~10% B, 20%~90% A; 2~3 min, 10% B, 90% A; 3~4 min, 10%~80% B, 90%~20% A; 4~6 min, 80% B, 20% A,流速 0.3 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。质谱采用 TOF 全扫描模式,检测在正离子模式下进行。质谱参数:鞘气温度 250 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流量 10.0 L/min,干燥气温度 320 $^{\circ}\text{C}$,雾化器压力 35 psi,毛细管电压 4000 V,Skimmer 电压 65 V,喷嘴电压 500 V,质荷比扫描范围 50~1700 m/z 。参比液内标离子为 121.0508 m/z 和 922.0098 m/z 。

1.2.6 室内杀线活性测定 对 1.2.5 节得到的目标段 III 除主峰外 (MAB_{1a}) 的其他峰进行收集,将所得代谢产物混合物阴干后用甲醇溶解,加入助剂 [$m(\text{甲醇}):m(\text{助剂 OP-10})=9:1$],用水稀释为 1、5、10 mg/L 作为参照。将 1.2.4 节所得主干浸膏、目标段 I、目标段 II 甲维盐类似物用甲醇配制成 1、5、10 mg/L,作为供试药剂,将甲维盐微乳剂用水配制成 1、5、10 mg/L 作为对照药剂,另设清水、甲醇、助剂为空白对照。

杀松材线虫活性测定:将松材线虫(同龄)用水配制成 2000 头/mL 左右的悬浊液备用。于 96 孔培养板中加入 90 μL 松材线虫悬浮液,再分别加入 10 μL 药液,每个浓度 3 次重复。处理后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养,于 24 h 后统计松材线虫的存活数和死亡数,以终浓度计算处理死亡率,死亡判断标准为虫体僵直、体壁无折光性或呈“J”形或“C”形。按照公式(1)计算校正死亡率。

$$M_c = (M_t - M_0) / (1 - M_0) \quad (1)$$

式中: M_c 为校正死亡率, M_t 为处理组死亡率, M_0 为对照组死亡率。

以上数据使用 Excel 2019、SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 马尾松树体各部分甲维盐残留量分析

甲维盐标准品 100 mg/L 的保留时间 (R_t) 为 15.479 min,以标准品质量浓度 (mg/L) 和高效液

相色谱检测峰面积为横纵坐标, 制作甲维盐标准曲线为 $y=8.3956x+1.5806$, $R^2=1$ 。在1~1000 mg/L范围内, 甲维盐浓度与对应的峰面积之间呈良好线性关系。

注干17个月后采样, 粗提浸膏中各部分甲维盐残留量如表2所示。甲维盐在主干、松枝、松

针、松果、松根中均有残留分布。其中在主干含量最高, 为342.00~428.31 mg/L; 保留率在主干浸膏中最高, 为44.70%~47.52%; 在松根中也检测到甲维盐残留; 整株保留率为50.05%~54.26%。表明马尾松树在注药17个月后, 甲维盐稳定保留在马尾松树体内。

表2 马尾松树体各部分甲维盐残留量

Table 2 Residue of emamectin benzoate in various parts of *P. massoniana*

树体编号 Serial number of plant	检测部位 Part detected	浸膏总体积 Total volume of extract/mL	抽检体积 Sampling volume/mL	检出质量浓度 Detected concentration/(mg/L)	残留量 Residue/(mg/kg)	保留率 Retention rate/%
18A3705	主干 Trunk	245	2	387.94	62.45	47.52
	松枝 Branch	60	1	23.06	4.83	1.38
	松针 Needle	225	2	23.00	12.09	2.59
	松果 Fruit	60	1	8.84	11.52	0.53
	松根 Root	85	1	26.26	10.55	2.23
	整株 Whole	675				54.26
	18A3703	主干 Trunk	211	2	428.31	63.51
松枝 Branch		43	1	27.93	5.40	1.20
松针 Needle		188	2	19.73	10.25	1.86
松果 Fruit		35	1	11.57	16.88	0.41
松根 Root		76	1	25.74	10.21	1.96
整株 Whole		553				50.60
18A3708		主干 Trunk	240	2	372.51	59.21
	松枝 Branch	56	1	19.29	3.96	1.08
	松针 Needle	230	2	16.97	8.95	1.95
	松果 Fruit	40	1	3.85	4.81	0.15
	松根 Root	86	1	25.16	9.84	2.16
	整株 Whole	652				50.05
	18A3701	主干 Trunk	267	2	342.00	57.00
松枝 Branch		68	1	19.28	4.31	1.31
松针 Needle		240	2	16.92	9.02	2.03
松果 Fruit		73	1	3.12	4.30	0.23
松根 Root		102	2	45.82	10.10	2.34
整株 Whole		750				51.56

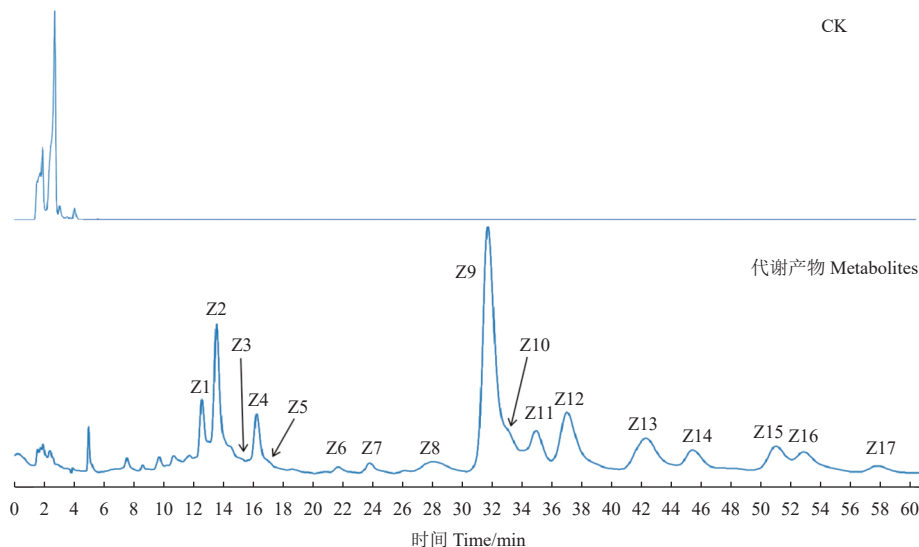
注: 总注药量1000 mg; 保留率%=(检出浓度×定容体积×浸膏总体积)/(抽检体积×1000)/总注药量×100。

Note: Total injection dose 1000 mg. Retention rate%=(detected concentration × constant volume × total volume of extract)/(sampling volume × 1000)/total injection dose × 100.

2.2 甲维盐在马尾松树体内代谢产物分析

18A3705 代谢产物在高效液相色谱上的分离情况如图2所示。以空白马尾松树处理主干样品为对照, 对代谢产物依次标记为Z1~Z17, 共17个类似物(Z9为甲维盐母体MAB1_a)。其中Z1~Z8极性大于甲维盐, Z10~Z17极性小于甲维盐。表明样品净化效果较好, 除去了大量杂质, 保留了甲维盐类似物, 分离到16个甲维盐类似代谢产物。

LC-MS 分析结果(表3)表明, 在正离子模式下, (M+H)⁺质谱分析精度及得分均较高, 初步鉴定了8个代谢产物的分子式依次为C₄₉H₇₇NO₁₄、C₄₉H₇₅NO₁₄、C₄₂H₆₃NO₁₀、C₄₉H₇₇NO₁₄、C₄₉H₇₅NO₁₃、C₅₀H₇₇NO₁₃、C₅₀H₇₇NO₁₃和C₄₉H₇₇NO₁₃。以前期鉴定的甲维盐光解产物^[19]、甲维盐和伊维菌素标准品为参考, 对代谢产物进行比较, 结果如图3所示, 且依据对应质谱测量值相同, 可推断Z3为MSB_{1a}(C₄₁H₆₀O₁₁), Z6为FAB_{1a}(C₄₉H₇₃NO₁₄),



注: CK 为空白对照。

Note: CK is the blank control.

图 2 甲维盐在马尾松树体代谢产物色谱图

Fig. 2 Chromatograms of emamectin benzoate metabolites in *P. massoniana*

Z8 为 4''-S-OH-B_{1a}(C₄₈H₇₂O₁₄)。其中 Z5 和 Z1 分子式相同, 但色谱上极性相差较大, 推测两者互

为同分异构体; 同样地, Z9 和 Z11、Z12 和 Z13 均互为同分异构体。

表 3 甲维盐在马尾松树体内代谢产物的鉴定结果

Table 3 Identification of emamectin benzoate metabolites in *P. massoniana*

代谢产物 Metabolite	离子 Molecular ion	分子式 Formula	理论值 Neutral mass (<i>m/z</i>)	测量值 Measured value (<i>m/z</i>)	质谱精度 Mass accuracy	保留时间 <i>R_t</i> /min	分值 Score/%
Z1	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₇ NO ₁₄	904.5417	904.5417	0.05	12.3~13.0	99.87
Z2	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₄	902.5260	902.5278	-1.80	13.3~14.0	97.59
Z4	(M + H) ⁺	C ₄₂ H ₆₃ NO ₁₀	742.4525	742.4527	-0.31	16.1~16.5	99.73
Z5	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₇ NO ₁₄	904.5417	904.5427	-0.73	16.7~17.5	97.75
Z9	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	886.5311	886.5318	-0.71	31.0~31.8	99.38
Z11	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	886.5311	886.5319	-1.15	34.5~35.6	98.39
Z12	(M + H) ⁺	C ₅₀ H ₇₇ NO ₁₃	900.5468	900.5479	-1.04	37.0~38.0	98.61
Z13	(M + H) ⁺	C ₅₀ H ₇₇ NO ₁₃	900.5468	900.5479	-1.00	41.5~42.5	98.43
Z14	(M + H) ⁺	C ₄₉ H ₇₇ NO ₁₃	888.5468	888.5490	-2.08	45.0~46.0	95.83

注: *R_t* 表示高效液相色谱分析保留时间。

Note: *R_t* represents the retention time of high-performance liquid chromatography analysis.

根据甲维盐脱除苯甲酸后母体化合物 MAB_{1a} 结构中易发生变化部位, 推测表 3 和图 3 中共 11 个代谢产物的结构如图 4 所示。Z1 在代谢途径中至少发生两次以上的代谢反应, 可能由母体 MAB_{1a} 结构中 8a-O 环的断裂和 C-11 与 C-10 或 C-14 与 C-15 双键的氧化产生; Z2 可能由母体 MAB_{1a} 在 C-11 与 C-10 双键发生氧化产生; Z3 可能由母体 MAB_{1a} 在 4' 脱掉一个糖苷产生; Z4 可能由母体 MAB_{1a} 在 4'' 脱掉一个糖苷, 再进行 4'-

OH 羟氨基化和 C-5 羟基甲基化反应产生; Z5 可能由母体 MAB_{1a} 在 8a-O 环的断裂和 C-11 与 C-10 或 C-14 与 C-15 双键的氧化以及 8,9 双键异构化产生; Z6 可能由母体 MAB_{1a} 在 4'' 位醛基化反应产生; Z8 由母体 MAB_{1a} 在 C-12 氧化反应产生; Z11 可能由母体 MAB_{1a} 在 C-8 与 C-9 双键异构化反应产生; Z12 可能由母体 MAB_{1a} 在 C-5 羟基甲基化产生; Z13 可能由母体 MAB_{1a} 在 C-5 羟基甲基化和 C-8 与 C-9 双键异构化反应产生;

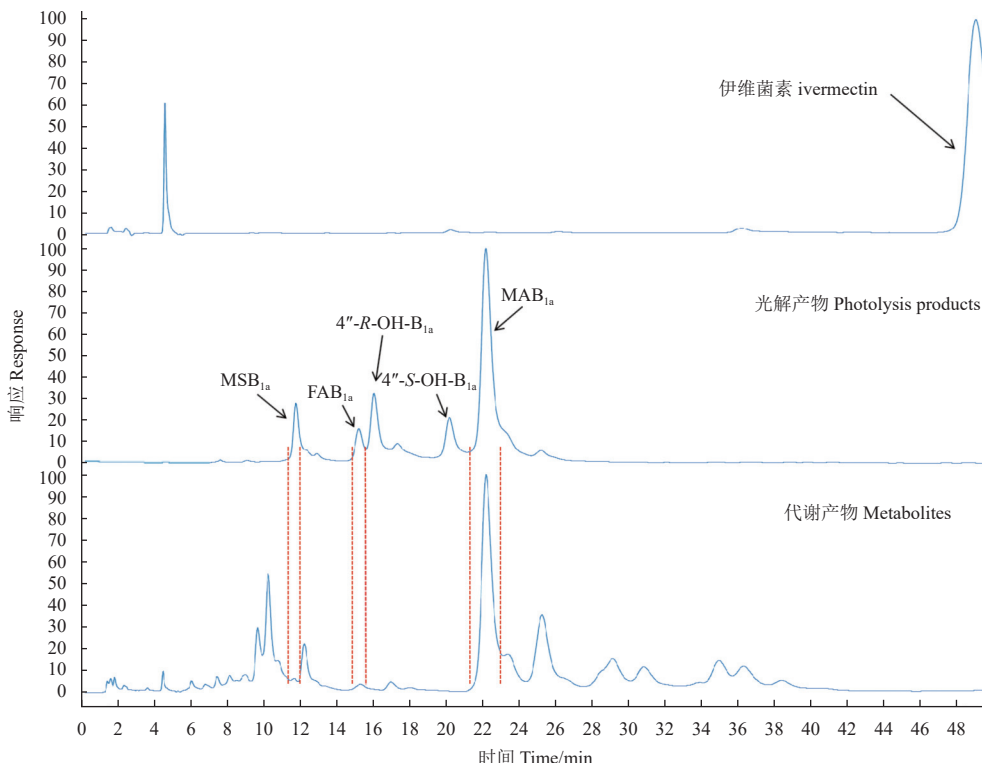


图 3 甲维盐光解产物和代谢产物色谱图

Fig. 3 Chromatogram of photolysis products and metabolites of emamectin benzoate

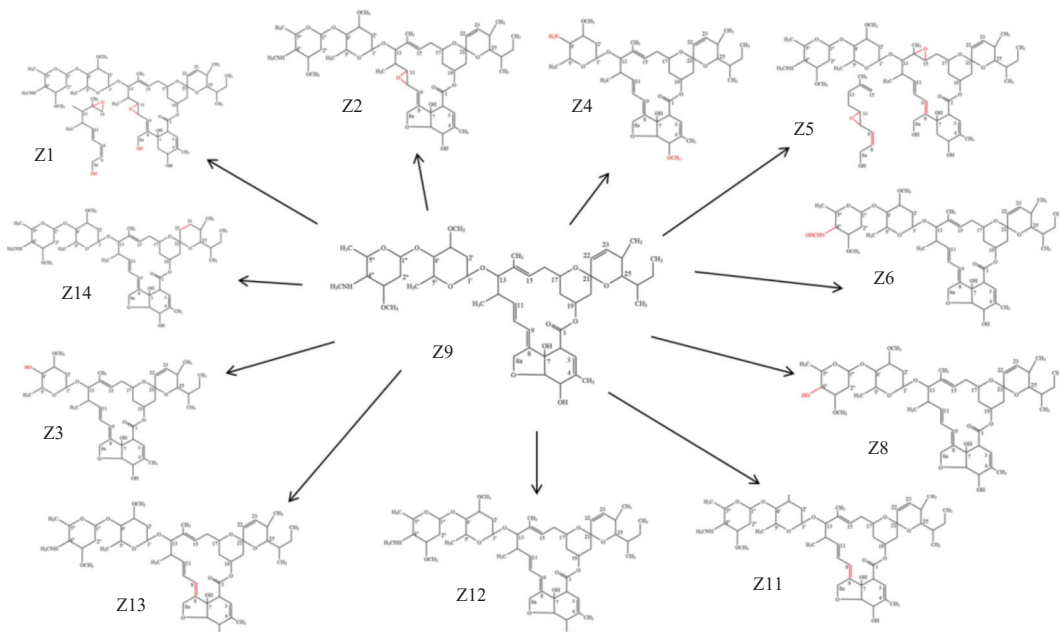


图 4 甲维盐在马尾松树体内的代谢产物结构

Fig. 4 Structure diagrams of emamectin benzoate metabolites in *P. massoniana*

Z14 可能由母体 MAB_{1a} 在 C-22 和 C-23 发生加氢还原反应产生。

2.3 甲维盐代谢产物杀线虫活性

甲维盐注干施药后在马尾松树体内的代谢产物对松材线虫的室内活性结果如表 4 所示。1 mg/L 提取物对线虫活性较低, 10 mg/L 提取物处理松材

线虫均表现出良好的活性, 对松材线虫 24 h 致死率为 60.27%~77.85%, 其中目标段 II 对松材线虫致死率最高, 达 77.85%, 接近成品药剂杀线虫效果 (81.60%), 随着纯化程度的不断提高, 甲维盐及代谢产物有效成分含量提高, 杀线虫效果提升。表明甲维盐进入马尾松树体后经代谢降解产

表 4 室内处理松材线虫 24 h 死亡率
Table 4 24-hour mortality of *B. xylophilus* treated indoors

施用剂量 Dosage/(mg/L)	校正死亡率 Corrected mortality rate/%							
	甲维盐微乳剂 MB ME	代谢产物混合物 Metabolic degradation	目标段 II Target II	目标段 I Target I	粗提浸膏 Crude extract	助剂 Adjuvant	甲醇 MeOH	清水 Water
10	81.60 ± 5.28	69.12 ± 5.56	77.85 ± 7.06	73.65 ± 10.28	60.27 ± 13.02	0	0	0
5	66.52 ± 6.98	40.25 ± 2.05	60.38 ± 2.38	60.78 ± 2.73	47.82 ± 6.92	0	0	0
1	63.33 ± 1.18	20.36 ± 2.61	53.25 ± 0.87	50.25 ± 2.45	39.22 ± 0.39	0	0	0

生的代谢产物具有一定的杀线虫活性。

3 结论与讨论

甲维盐进入马尾松树体内经蒸腾作用从注药孔向上或向水平方向传导扩散至主干、枝、叶、果实中，同时，本研究在距离注药孔 10 cm 以下的主根和侧根中也检测到甲维盐残留，表明甲维盐存在双向传导。目前尚未见甲维盐在植物体内向下传导的报道，推测是甲维盐随着水分和矿物质从木质部的导管自下而上运输到叶片中，再随叶片中的有机物从韧皮部筛管中自上而下运输到根部。但也可能由于药剂扩散和重力的影响，导致甲维盐向下扩散至根部。

甲维盐注干 17 个月后，在马尾松树体内虽然进行了一系列复杂的代谢反应，但仍能检测到大部分甲维盐(含量为 50.05%~54.26%)以稳定状态存在于树体内各个组织(表 2)，其余部分参与代谢降解。经高效液相色谱、质谱初步鉴定了 11 个代谢产物，其中 4 个代谢产物与文献^[19]报道的光解产物相同，其余 8 个代谢产物主要在甲维盐分子中几个易发生改变的部位生成，分别是 4"取代基团，8, 9 双键异构，10, 11 双键氧化，14, 15 双键氧化或移位，22, 23 双键还原以及 C-5 取代基团改变(图 4)。化合物 Z1 和 Z2 的极性均大于 Z3(MSB_{1a})，在已知甲维盐降解产物结构中较为少见^[13,20-22]。可能是由于树体内水、脂类、微生物、生物酶等不同环境组成了复杂的反应体系^[16]，甲维盐进入树体后发生了氧化、还原、异构化等反应。

甲维盐在马尾松树体内的代谢产物对松材线虫活性较好。代谢混合物在较低质量浓度(1 mg/L)时，具有一定的杀松材线虫活性(表 4)，说明混合物中存在一种或多种活性物质，也可能是多种代谢产物共同作用。前期研究发现^[19]，在甲维盐光解产物中，单个产物在较低质量浓度(1~10 mg/L)下处理松材线虫，其致死率为 3.45%~47.22%，对比高效液相色谱(图 2~3)、质谱(表 3)发现，光解

和代谢降解可产生相同的产物：Z3(MSB_{1a}，C₄₁H₆₀O₁₁)、Z6(FAB_{1a}，C₄₉H₇₃NO₁₄)和 Z8(4"-S-OH-B_{1a}，C₄₈H₇₂O₁₄)，因此甲维盐代谢产物中均存在杀松材线虫的活性物质。

综上，甲维盐注干进入马尾松树体内，在树体各组织分布并不均匀，主要分布于马尾松树树脂道，松脂起到了隔离水分的作用，使甲维盐可长期存在于树体中，不易分解，且代谢产物对松材线虫也具有较高活性。本研究初步解释了甲维盐注干施药防治松材线虫病的药效期较长的原因。

参考文献 (References):

- [1] DUAN J J, CRANDALL R S, GROSMAN D M, et al. Effects of emamectin benzoate trunk injections on protection of neighboring ash trees against emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) and on established biological control agents[J]. *J Econ Entomol*, 2023, 116(3): 848-854.
- [2] DE ANDRADE R B, ABELL K, DUAN J J, et al. Protective neighboring effect from ash trees treated with systemic insecticide against emerald ash borer[J]. *Pest Manag Sci*, 2021, 77(1): 474-481.
- [3] FETTIG C J, MUNSON A S, BLACKFORD D C, et al. Effectiveness of emamectin benzoate and propiconazole for protecting *Picea engelmannii* (Pinales: Pinaceae) from mortality attributed to *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae) in Wyoming[J]. *J Entomol Sci*, 2022, 57(2): 240-247.
- [4] WANG J H, CHE S C, QIU L F, et al. Efficacy of emamectin benzoate trunk injection against the Asian long-horned Beetle [*Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae)] [J]. *J Econ Entomol*, 2020, 113(1): 340-347.
- [5] ZHANG W J, WU X Q, YE J R, et al. Toxicity of an emamectin benzoate microemulsion against *Bursaphelenchus xylophilus* and its effect on the prevention of pine wilt disease[J]. *Forests*, 2023, 14(7): 1476.
- [6] 王勇军, 唐光辉, 陈祖海, 等. 树干注药防治松材线虫病研究进展[J]. *中国森林病虫*, 2022, 41(3): 59-63.
WANG Y J, TANG G H, CHEN Z H, et al. Advanced research of trunk injection against pine wilt disease[J]. *For Pest Dis*, 2022, 41(3): 59-63.
- [7] 黄俊, 张娟, 李明江, 等. 树干注药技术预防松材线虫病的效果评价[J]. *林业科技开发*, 2014(4): 118-120.
HUANG J, ZHANG J, LI M J, et al. Evaluation on the effects of

- trunk-injection technique against the pine wood nematode disease[J]. *China For Sci Technol*, 2014(4): 118-120.
- [8] 潘伟华, 吴继来, 贾进伟, 等. 甲维盐注干施用对松材线虫病的防治效果分析[J]. *中国森林病虫*, 2014, 33(6): 41-44.
PAN W H, WU J L, JIA J W, et al. Control effect of trunk injection of emamectin benzoate against pine wilt disease[J]. *For Pest Dis*, 2014, 33(6): 41-44.
- [9] 张欣伟, 韩群琦, 汪天娜, 等. 注干用 10% 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐可溶粒剂的研制及对松材线虫病的防治效果[J]. *农药学报*, 2019, 21(4): 538-544.
ZHANG X W, HAN Q Q, WANG T N, et al. Preparation of 10% emamectin benzoate soluble granule for trunk injection and its control efficacy on pine wilt disease[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2019, 21(4): 538-544.
- [10] 张娟, 李军, 黄俊, 等. 园林树木种类及树冠大小对自流式注干药剂吸收及传导的影响[J]. *农药学报*, 2018, 20(4): 529-534.
ZHANG J, LI J, HUANG J, et al. Effects of tree species and crown size on the absorption and conduction of insecticides applied by trunk injection[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2018, 20(4): 529-534.
- [11] 王大伟. 甲维盐在四种树木的分布及含量动态变化研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015.
WANG D W. Study on the distribution and dynamic change of emamectin benzoate in four kinds of trees[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2015.
- [12] 张欣伟. 甲维盐注干可溶粒剂的研制及应用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
ZHANG X W. Preparation and application of emamectin benzoate dry soluble granules[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2019.
- [13] FEELY W F, CROUCH L S. Fate of [¹⁴C] emamectin benzoate in cabbage. 2. Unextractable residues[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(7): 2758-2762.
- [14] ALLEN L S, WRZESINSKI C L, FEELY W F, et al. Incorporation of emamectin benzoate (MK-0244) residues into soluble sugars of plants[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(10): 4131-4136.
- [15] BURKHARD R, BINZ H, ROUX C A, et al. Environmental fate of emamectin benzoate after tree micro injection of horse chestnut trees[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2015, 34(2): 297-302.
- [16] CHUKWUDEBE A C, ATKINS R H, WISLOCKI P G. Metabolic fate of emamectin benzoate in soil[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(10): 4137-4146.
- [17] MUSHTAQ M, FEELY W F, SYINTSAKOS L R, et al. Immobility of emamectin benzoate in soils[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(3): 940-944.
- [18] 刘鹏, 姜壮, 初楚, 等. 甲维盐注干施药对马尾松内生真菌和细菌多样性的影响[J]. *浙江林业科技*, 2023, 43(5): 66-76.
LIU P, JIANG Z, CHU C, et al. Effect of trunk injection of emamectin benzoate on diversity of endophytic bacteria and fungi in *Pinus massoniana*[J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2023, 43(5): 66-76.
- [19] 姜壮, 张绍勇, 初楚, 等. 松脂二烯对甲维盐光解的影响[J]. *农药*, 2023, 62(8): 570-575.
JIANG Z, ZHANG S Y, CHU C, et al. Effects of pinolene on photodegradation of emamectin benzoate[J]. *Agrochemicals*, 2023, 62(8): 570-575.
- [20] CROUCH L S, FEELY W F. Fate of [¹⁴C] emamectin benzoate in head lettuce[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(12): 3075-3087.
- [21] WRZESINSKI C L, ARISON B H, SMITH J, et al. Isolation and identification of residues of 4'-epi-methylamino)-4'-deoxyavermectin B_{1a} benzoate from the surface of cabbage[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(1): 304-312.
- [22] CROUCH L S, WRZESINSKI C L, FEELY W F. Fate of [¹⁴C/³H] emamectin benzoate in cabbage. 1. Extractable residues[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(7): 2744-2757.

(责任编辑: 李 蕊)