

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2019)06-0352-07

调环酸钙在马铃薯及植株中的残留和消解分析

董见南*, 李雪茹, 陈国峰, 刘 峰, 张晓波, 廖 辉

(黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 调环酸钙作为植物生长调节剂广泛用于禾谷科作物、马铃薯及其他作物中, 其在农作物中的残留引起了人们的广泛关注。研究比较了4种不同提取溶剂对调环酸钙的提取效率以及2种分散固相萃取净化剂对提取液的净化效果, 最终确立了马铃薯和马铃薯植株样品用酸化乙腈振荡提取, 盐析后取有机相经超高效液相色谱-串联质谱测定的残留检测方法。调环酸钙在马铃薯中的平均回收率为87.8%~99.0%, 相对标准偏差为1.7%~3.2%; 在马铃薯植株中的平均回收率为93.9%~98.0%, 相对标准偏差为2.1%~4.8%。调环酸钙在马铃薯中的最小检测浓度为0.02 mg/kg。采用田间试验方法研究了调环酸钙在马铃薯植株中的消解动态规律, 半衰期为1.4~1.5 d; 在马铃薯样品中的残留量均<0.02 mg/kg。

关键词: 调环酸钙; 马铃薯; 消解; 残留

Residue and Dissipation Analysis on Prohexadione-calcium in Potato and Plant

DONG Jiannan*, LI Xueru, CHEN Guofeng, LIU Feng, ZHANG Xiaobo, LIAO Hui

(Safety and Quality Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural

Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Prohexadione-calcium as a plant growth regulator has been widely used in cereal crops, potatoes and other crops, and its residues in crops have been taken more and more attentions. After the extraction efficiencies of four different extraction solvents for prohexadione-calcium and the purification effects of two dispersive solid-phase extraction purifiers on the extract were compared, a method of determination prohexadione-calcium in potatoes and potato plants was developed. Samples were extracted with acidic acetonitrile, and the supernatant organic phase was determined by UPLC-MS/MS after salting and concentration. The average recoveries of prohexadione-calcium in potatoes were 87.8%-99.0%, with their relative standard deviations were 1.7%-3.2%. The average recoveries of prohexadione-calcium in potato plants were 93.9%-98.0%, with their relative standard deviations were 2.1%-4.8%. The minimum detectable concentration of prohexadione-calcium in potatoes was 0.02 mg/kg. The dissipation dynamic rhythm of prohexadione-calcium in potato plants was investigated in a field experiment, and the half-lives (DT_{50}) were 1.4-1.5 d. The final residues of prohexadione-calcium in potatoes were <0.02 mg/kg.

Key Words: prohexadione-calcium; potato; dissipation; residue

调环酸钙(Prohexadione-calcium)化学名称为3, 5-二氧化-4-丙酰基环己烷羧酸钙, 是由日本组合

化学工业公司(Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.)合成开发的植物生长调节剂。其常见用于禾谷科作

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 农业农村部农药检定所农药登记残留试验项目(CL199-2017-07)。

作者简介: 董见南(1987-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事农药残留研究。

*通信作者(Corresponding author): 董见南, E-mail: jiannan_dong@163.com。

物, 能有效地抑制作物节端生长, 缩短茎秆长度, 使茎秆粗壮、植株矮化抗倒伏^[1,2], 也有报道用于花生^[3]和烟草^[4], 目前马铃薯也开始开发使用调环酸钙用作植物生长调节剂。关于调环酸钙的研究主要集中在合成^[5,6]、制剂研制^[7]、制剂含量分析^[8,9]及生产应用研究^[1,4], 残留分析方面的报道主要集中在糙米中分析方法研究及检测结果^[10]方面。虽然调环酸钙属低毒低残留农药^[1], 但其原药有胎鼠致畸毒性的报道^[11], 因此调环酸钙在农作物中的残留量应引起人们的重视。本文建立了马铃薯及马铃薯植株中调环酸钙的分析方法, 并应用于田间样品的分析, 为指导农药的合理安全使用及制定中国调环酸钙在马铃薯上的最大残留限量提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试剂

调环酸钙(92.0%)标准品由 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司提供, 乙腈(色谱纯, 迪马公司), 甲醇(色谱纯, 迪马公司), 甲酸(色谱纯, 迪马公司), 无水 Na₂SO₄(分析纯, 北京化学试剂公司), N-丙基乙二胺(Primary secondary amine, PSA, 40–60 μm, 博纳艾杰尔公司), 弗罗里硅土(40–60 目, 博纳艾杰尔公司)。

1.2 仪器设备

ACQUITY UPLC/TQ Detector 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); Shim-pack GISS C18(50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)色谱柱(日本岛津公司); BSA6202S 电子天平(德国 Sartorius 公司); HS501 振荡器, MS3 basic 涡旋混合器(德国 IKA 公司); N-EVAP 112 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); 过滤器(滤膜孔径 0.22 μm); 常用玻璃器皿。

1.3 田间试验

供试药剂为 8% 调环酸钙泡腾颗粒剂, 推荐剂量为 24~48 g/hm²(制剂用药量 300~600 g/hm²)。参照农业部《农药残留试验准则》^[12], 2017 年在黑龙江省哈尔滨市和湖南省长沙市 2 地进行了消解动态和最终残留试验。黑龙江试验地的马铃薯品种为‘尤金’, 湖南试验地的马铃薯品种为‘费乌瑞它’。

消解动态试验: 施药剂量为 72 g/hm²(制剂用药

量 900 g/hm²)。施药后 2 h, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30 和 45 d 采集马铃薯植株样品。最终残留试验: 设 2 个施药剂量, 低剂量施药量为 48 g/hm²(制剂用药量 600 g/hm²), 高剂量施药量为 72 g/hm²(制剂用药量 900 g/hm²), 每个处理设 3 个重复小区, 每小区 30 m², 马铃薯收获期采集马铃薯块茎。施药时期均为马铃薯现蕾期。另设不施药的马铃薯田为对照区, 于施药前采集马铃薯植株空白对照样品, 于马铃薯收获期采集马铃薯空白对照样品。样品采集后用自封袋密封, 贴好标签后-20 ℃以下保存。

1.4 分析方法

1.4.1 前处理

参考调环酸钙的溶解度、解离常数及韦婕等^[10]的研究结果, 经优化后确立马铃薯及马铃薯植株的前处理方法。准确称取马铃薯、马铃薯植株样品 10.0 g, 加入 20 mL 酸化乙腈(体积分数 0.2% 甲酸), 加盖后振荡提取 30 min, 加入 10 g 无水 Na₂SO₄, 涡旋 1 min 盐析, 然后以 3 500 r/min 离心 5 min。

移取 2 mL 上清液至玻璃试管中, 40 ℃ 水浴下 N₂ 吹干。用超纯水定容至 1 mL, 过 0.22 μm 水系滤膜, 用超高效液相色谱-串联质谱进行测定, 外标法进行定性和定量分析。

1.4.2 仪器条件

色谱柱: Shim-pack GISS C18(50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm); 柱温 35 ℃; 流速 0.25 mL/min; 梯度洗脱(流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈): 0~1.0 min 为 90% A, 1.5 min 为 50% A, 3.0 min 为 50% A, 3.2 min 为 90% A。进样量 10 μL。电喷雾离子源 ESI; 正离子源模式; 毛细管电压为 3.0 kV; 锥孔电压为 25 V; 离子源温度为 120 ℃; 干燥器温度为 350 ℃; 干燥器流速 650 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 调环酸钙在流动相中电离为调环酸, 质谱监测对象为调环酸, 多重反应监测(MRM)方式, 调环酸以离子对(m/z) 214.2→158.1 进行定量分析, 214.2→141.0 进行定性分析。在上述色谱条件下, 调环酸的保留时间为 2.2 min。

1.4.3 标准工作曲线的绘制

称取调环酸钙标准品 0.010 9 g(精确至 0.000 1 g), 用少量 pH 2 的磷酸水溶液溶解, 再用超纯水定容至刻度线, 配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准贮备

液, 试验时再用超纯水逐级稀释成质量浓度为2.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05和0.01 mg/L的系列标准溶液。在选定的仪器条件下测定, 以标准溶液浓度为横坐标(x)、定量离子峰峰面积为纵坐标(y)绘制标准工作曲线。

1.4.4 方法的回收率和精密度

向空白马铃薯及马铃薯植株中添加调环酸钙标准溶液, 使得马铃薯样品中添加质量分数为0.02, 0.05, 0.5 mg/kg, 马铃薯植株样品中添加质量分数为0.05, 0.5, 2.0 mg/kg。每个质量分数进行5次重复试验, 按照1.4.3方法测定, 以添加回收样品峰面积和相应进样浓度的标准溶液峰面积相比较, 计算回收率; 以各质量分数的5次重复试验的回收率计算平均回收率和相对标准偏差。

2 结果与分析

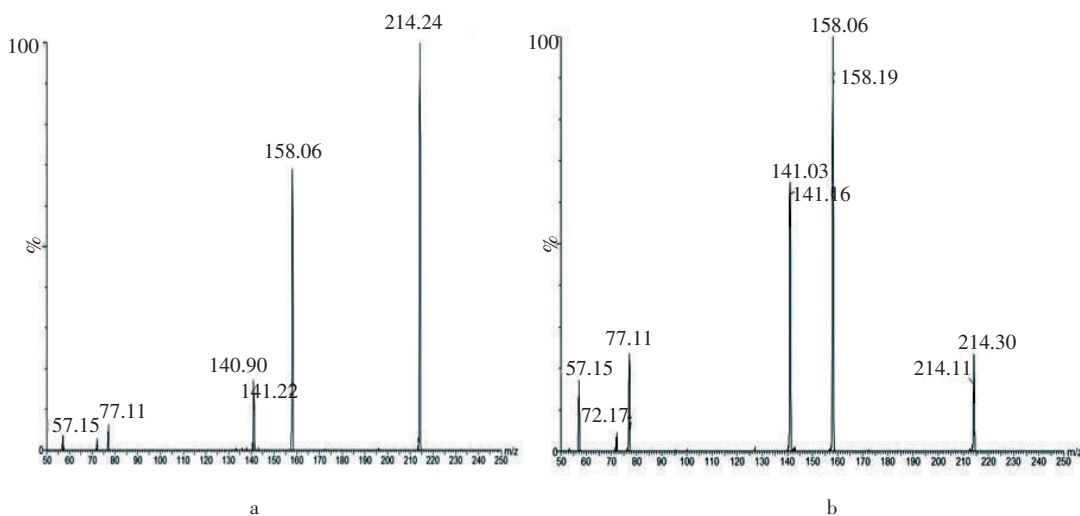
2.1 质谱参数优化

尝试了超高效液相色谱法-串联质谱法。调环酸钙在流动相中电离为调环酸, 质谱监测对象为调环酸, 用电喷雾离子源分别采用正/负模式下进行全扫描(m/z 50~350), 可得到3个调环酸准分

子离子峰: $[M-1]$ 峰(m/z 211.3)、 $[M+1]$ 峰(m/z 213.1)和 $[M+2]$ 峰(m/z 214.2), 比较仪器响应值得正离子模式响应远高于负离子模式, 选用调环酸 $[M+2]$ 峰(m/z 214.2)为母离子。通过进一步优化二级质谱参数, 分别选择离子对(m/z) 214.2→158.1进行定量分析, 选择离子对(m/z) 214.2→141.0进行定性分析, 见图1。

2.2 前处理方法摸索

比较了乙腈、0.2%甲酸乙腈、甲醇和0.2%甲酸甲醇4种提取溶剂的提取效率, 结果见图2。酸化乙腈和酸化甲醇的提取效率明显高于乙腈和甲醇, 且提取率更稳定, 这可能与调环酸钙易酸解离有关。由于乙腈易与水相分离, 既去除了水溶性杂质且利于后续的浓缩步骤, 因此本文最终选择使用0.2%甲酸乙腈作提取溶剂。对浓缩后的提取液, 通过比较无净化、25 mg PSA和50 mg 弗罗里硅土的试验结果可知, PSA对调环酸钙有明显的吸附作用, 弗罗里硅土的净化效果不显著。由于浓缩后的定容液为超纯水, 即可去除酸化乙腈提取液中的部分弱极性杂质, 因此最终选择超纯水定容且不需要其他净化步骤。



a. 碰撞能量 5 eV, b. 碰撞能量 10 eV。

a. Collision energy 5 eV, and b. Collision energy 10 eV.

图1 调环酸钙的二级质谱图

Figure 1 Typical daughter scan chromatograms of prohexadione-calcium

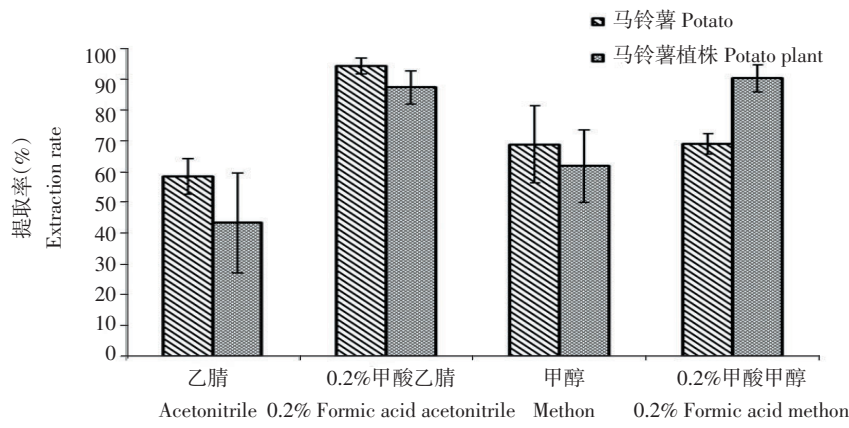


图2 4种不同提取溶剂对马铃薯及马铃薯植株中调环酸钙的提取效率
Figure 2 Extraction efficiencies of four different solvents on extraction of prohexadione-calcium from potato and potato plant

2.3 检测方法评价

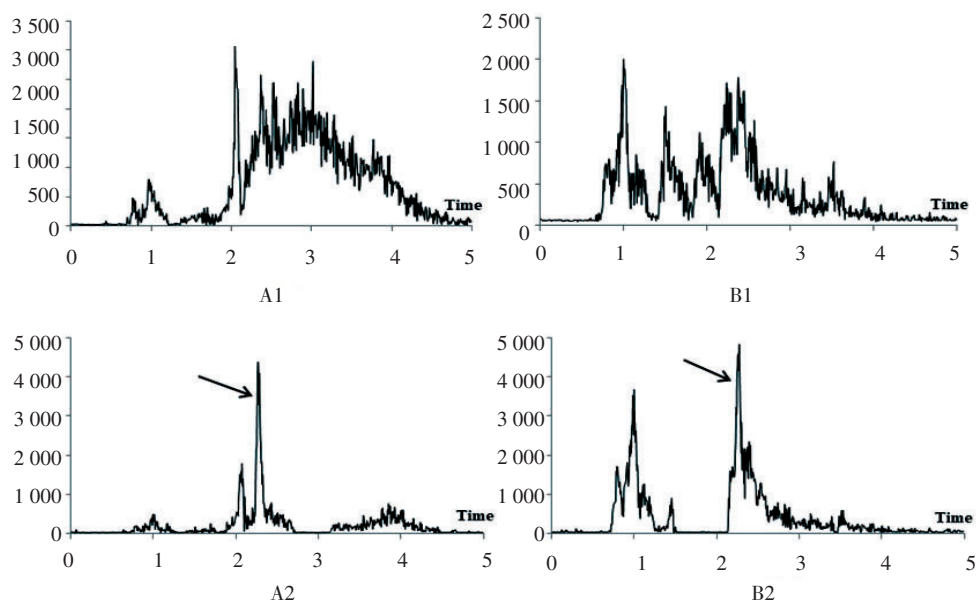
用超纯水配制不同质量浓度的调环酸钙系列标准溶液, 浓度与仪器条件见 1.4.2, 在 0.01~2.0 mg/L 浓度线性良好, 标准工作曲线为: $y = 10\,280x + 137.3$, R^2 为 0.999 6。

调环酸钙在马铃薯及马铃薯植株中的添加回收试验结果如表 1 所示, 典型色谱图如图 3 所示。在马铃薯中的平均回收率为 87.8%~99.0%, 相对标准偏差(RSD)为 1.7%~3.2%; 在马铃薯植株中的平均回

收率为 93.9%~98.0%, RSD 为 2.1%~4.8%。将最小添加浓度确定为方法的定量限(LOQ, 以质量分数计, mg/kg), 调环酸钙在马铃薯及马铃薯植株中的 LOQ 分别为 0.02 和 0.05 mg/kg。中国制定的最大残留限量标准(GB 2763-2016)中尚无调环酸钙在马铃薯中的最大残留限量(MRL), 韩国已制定调环酸钙在马铃薯中的 MRL 值为 0.2 mg/kg。结果表明所建方法的准确度、精密度及灵敏度较好, 均符合农药残留分析试验的要求。

表1 调环酸钙在马铃薯及马铃薯植株中的添加回收率
Table 1 Recoveries of prohexadione-calcium in potato and potato plant

处理 Treatment	添加质量分数 (mg/kg) Spiked level	回收率(%) Recovery					平均回收率(%) Average recovery	相对标准偏差(%) Relative standard deviation
		1	2	3	4	5		
马铃薯 Potato	0.02	90.3	90.0	86.4	83.6	88.6	87.8	3.2
	0.05	99.7	96.7	99.3	98.1	101.2	99.0	1.7
	0.5	94.3	93.8	97.0	99.4	99.4	96.8	2.8
马铃薯植株 Potato plant	0.05	97.4	100.4	94.8	97.0	98.5	97.6	2.1
	0.5	95.4	91.3	87.6	95.9	99.2	93.9	4.8
	2.0	100.8	98.1	96.3	95.7	99.0	98.0	2.1



A1. 马铃薯空白, A2. 马铃薯基质匹配标样 0.02 mg/kg, B1. 马铃薯植株空白, B2. 马铃薯植株基质匹配标样 0.05 mg/kg。

A1. Blank potato, A2. Potato matrix standard 0.02 mg/kg, B1. Blank potato plant, and B2. Potato plant matrix standard 0.05 mg/kg.

图3 调环酸钙在马铃薯及马铃薯植株空白和基质匹配标样的典型色谱图

Figure 3 Typical UPLC-MS/MS chromatograms of prohexadione-calcium in potato and potato plant

2.4 调环酸钙在马铃薯植株中的消解动态

由图4结果所示, 调环酸钙在马铃薯植株中的残留量随着时间的延长逐渐降低, 其消解过程符合一级动力学方程, 经拟合后计算可知, 调环酸钙在马

铃薯植株中的消解半衰期分别为 1.4 d(黑龙江)和 1.5 d(湖南), 原始沉积量在 0.37~0.56 mg/kg。由半衰期可知, 不同试验地域的气候类型和作物品种等差异对调环酸钙在马铃薯植株体内的消解速率影响

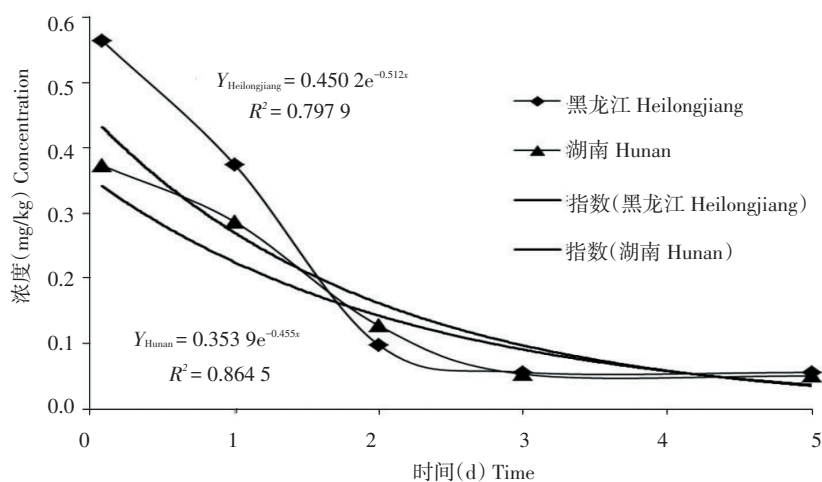


图4 调环酸钙在马铃薯植株中的消解趋势

Figure 4 Residue dissipation curves of prohexadione-calcium in potato plant

表2 调环酸钙在马铃薯最终残留样品中的残留量
Table 2 Final residues of prohexadione-calcium in potato

处理 Treatment	有效成分施药量 48 g/hm ² Dosage of active ingredient 48 g/ha			有效成分施药量 72 g/hm ² Dosage of active ingredient 72 g/ha		
	1	2	3	1	2	3
黑龙江 Heilongjiang	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
湖南 Hunan	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

不大，且消解迅速。

2.5 调环酸钙在马铃薯中的最终残留

按照有效成分 48 和 72 g/hm² 的剂量在马铃薯现蕾期施用 1 次，马铃薯收获时采集马铃薯块茎样本进行残留量测定。结果表明马铃薯中调环酸钙的最终残留量均<0.02 mg/kg(表 2)。韩国制定调环酸钙在马铃薯中的最大残留限量(MRL)值为 0.2 mg/kg，试验结果表明按照此施药方法施用，收获马铃薯中调环酸钙的残留量在 0.2 mg/kg 以下。以上数据为中国制定调环酸钙在马铃薯上的 MRL 值提供了数据支持。

3 讨 论

由于调环酸钙的辛醇-水分配系数(K_{ow} ,logP) 为-2.9，解离常数(pKa)为 5.15，其在水及有机溶剂中的溶解能力和酸解离现象使得目标基质中调环酸钙的提取和浓缩成为其残留检测分析的难点。目前尚无调环酸钙在马铃薯中提取方法的报道，本研究结合调环酸钙的理化特性和稻米^[10]中调环酸钙检测方法，比较了 4 种不同溶剂的提取效率，结果表明酸化甲醇和酸化乙腈提取效率优于甲醇和乙腈且更稳定。由于酸化乙腈对马铃薯基质的提取效果更佳，且乙腈更易于与水分离，本文最终选择酸化乙腈作为提取溶剂，这与韦婕等^[10]在稻米中的研究结果相一致。分析原因可能为适当的 H⁺ 浓度能抑制调环酸钙的电离，使其更容易以分子形式存在，从而更容易进入有机溶剂中易于提取。乙腈与水的混溶和盐析特性在保证提取效率的同时简化了净化步骤，本研究用无水 Na₂SO₄ 代替经典 QuERChERS^[13] 方法中的 NaCl，提供盐离子的同时吸收乙腈中的微量水分，

更利于后续的浓缩操作。本研究尝试了分散固相萃取的净化方法，对浓缩后的提取液进行了无净化、25 mg PSA 和 50 mg 弗罗里硅土 3 种试验。结果表明 PSA 对调环酸钙有强吸附作用，使用后回收率大大降低；弗罗里硅土无明显净化效果，使用后进样溶液颜色无目视变化且灵敏度无明显提高。本试验浓缩后使用超纯水定容，该换相处理有效地去除了易溶于乙腈且不易溶于水相的弱极性杂质，从而达到了净化目的。韦婕等^[10]在进行稻米中调环酸钙的检测时同样将提取液浓缩后直接用超纯水定容。结果表明净化剂 PSA 和弗罗里硅土不适用于调环酸钙的提取，换相定容的试验方法能有效去除杂质。本文将超高效液相色谱-串联质谱用于调环酸钙的检测，结果表明超高效液相色谱-串联质谱能稳定的检测调环酸钙并表现出较高的灵敏度，相比于已报道的紫外检测器^[8-10]的检测手段，串联质谱拥有更强的抗干扰能力，为前处理过程中的浓缩和净化步骤减少了压力。然而串联质谱灵敏度的稳定性一直是此项检测技术的难点，且其线性范围较窄，这些都是科研工作今后研究探索的重点。同时开发和发现适合调环酸钙类似结构和理化特性的净化剂，或固相萃取方法，在分离调环酸钙和杂质、提高检测分析的灵敏度方面或可有更大益处。本研究建立了采用超高效液相色谱-串联质谱联用检测马铃薯和马铃薯植株中调环酸钙残留量的方法，该方法操作简便，准确性和灵敏度均能满足农药残留检测的要求。

消解动态试验结果表明，调环酸钙在黑龙江和湖南 2 试验地马铃薯植株中的消解半衰期分别为 1.4 和 1.5 d，试验地气候类型和作物品种等差异对调环

酸钙在植株中的原始沉积量和消解速率影响不大, 调环酸钙在马铃薯植株体内消解迅速。

最终残留试验结果表明, 以最高推荐施药剂量 48 g/hm² 和 1.5 倍最高推荐施药剂量 72 g/hm² 在马铃薯现蕾期施用一次, 收获期马铃薯中的调环酸钙残留量均 < 0.02 mg/kg。中国未制定调环酸钙在马铃薯中的最大残留限量, 韩国规定为 0.2 mg/kg, 结果表明, 按照推荐剂量施用调环酸钙制剂后, 收获马铃薯中调环酸钙的残留量是安全的(相对韩国的限量标准), 此试验数据为中国制定调环酸钙在马铃薯上的 MRL 值提供了数据支持。

[参 考 文 献]

- [1] 黄建平, 曾勇军, 吕伟生, 等. 5%调环酸钙水悬浮剂在水稻生产上的应用研究[J]. 生物灾害科学, 2015, 38(1): 7-10.
- [2] 杨国章. 调环酸(prohexadione-calcium) [J]. 世界农药, 2014, 36(2): 61-62.
- [3] 杜连涛. 调环酸钙对丘陵地区夏直播花生生理特性及产量的影响[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2014, 29(3): 365-369.
- [4] 潘明君, 尹永强, 沈方科, 等. 调环酸钙对低温胁迫下烟草幼苗生理指标的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(2): 288-293.
- [5] 郑先福, 赵东生, 孙炳剑, 等. 调环酸钙的合成工艺[J]. 江西农业学报, 2011, 23(1): 129-131.
- [6] 庄文明, 李素华, 于南树. 调环酸钙的合成工艺研究进展[J]. 广州化工, 2017, 45(17): 1-2.
- [7] 郭恒, 郑先福, 万翠, 等. 15%调环酸钙悬浮剂研制[J]. 现代农药, 2015, 14(2): 19-21.
- [8] 李岩, 王胜翔, 史娜, 等. 调环酸钙5%泡腾片剂高效液相色谱分析[J]. 农药科学与管理, 2012, 33(9): 40-42.
- [9] 郑先福, 蹇天佑, 郑昊, 等. 调环酸钙的高效液相色谱分析[J]. 世界农药, 2014, 36(2): 58-60.
- [10] 韦婕, 行艳景, 陈荣华, 等. 高效液相色谱法检测调环酸钙在稻米中的残留[J]. 农药, 2015, 54(7): 528-529.
- [11] 付少华, 瞿晶菁, 屈文, 等. 调环酸钙原药对大鼠致畸试验研究[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(1): 74-76.
- [12] 中华人民共和国农业部. NY/T 788-2004 农药残留试验准则[S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [13] Anastassiades M, Lehotay S J, Štajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. Journal of AOAC international, 2003, 86(2): 412-431.

书

讯

现有《中国马铃薯》杂志 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017 和 2018 年精装合订本, 中国马铃薯大会论文集 2011 年《马铃薯产业与科技扶贫》, 2012 年《马铃薯产业与水资源高效利用》, 2013 年《马铃薯产业与农村区域发展》, 2014 年《马铃薯产业与小康社会建设》, 2015 年《马铃薯产业与现代可持续农业》, 2016 年《马铃薯产业与中国式主食》, 2017 年《马铃薯产业与精准扶贫》, 2018 年《马铃薯产业与脱贫攻坚》和 2019 年《马铃薯产业与健康消费》, 每本定价 100 元。有需要的读者, 可通过邮局将书款汇至哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部, 款到寄书。

联系电话: 0451-55190003