

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.05.007

咪鲜胺及其代谢物三氯苯酚在百合植株中的 残留检测方法及其动态研究

王妙, 陈武瑛, 熊浩, 罗杰, 宋增收,
罗香文, 张卓, 李凯龙

湖南省农业科学院 植物保护研究所, 长沙 410125

摘要: 建立了 QuEChERS 前处理结合高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 的方法检测百合植株中咪鲜胺的残留量。同时, 采用气相色谱 (GC) 对咪鲜胺的主要代谢产物三氯苯酚在百合植株中的残留情况进行了测定和分析。结果表明, 添加量为 0.01~0.5 mg/kg 时, 咪鲜胺和三氯苯酚在百合植株中的平均回收率分别为 80.2%~87.8% 和 81.1%~105.5%, RSD 分别为 5.2%~6.7% 和 3.0%~8.4%。消解动态结果表明, 咪鲜胺降解速度快、残留低, 属于容易降解的农药, 但施用后咪鲜胺很快转化为毒性更强的环境污染物质 2, 4, 6-三氯苯酚, 这为咪鲜胺在百合上的安全使用提供了参考数据。

关键词: 咪鲜胺; 三氯苯酚; 百合;
检测; 残留

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)05-0056-07

Residue Determination and Dynamic Research of Prochloraz and Its Metabolite 2, 4, 6-Trichlorophenol in Lily Plants

WANG Miao, CHEN Wuying, XIONG Hao, LUO Jie,
SONG Zengshou, LUO Xiangwen, ZHANG Zhuo, LI Kailong

Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China

Abstract: A QuEChERS combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass

收稿日期: 2024-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202340); 农业行业标准制定和修订项目(125C0701)。

作者简介: 王妙, 助理研究员, 主要从事农药安全性评价研究。

通信作者: 李凯龙, 副研究员, 主要从事农药残留分析研究。

spectrometry (HPLC-MS/MS) and gas chromatography (GC) were established to detect the residues of prochloraz and its metabolite trichlorophenol in lily plants, respectively. The sample was extracted with acetonitrile, purified by dispersed solid-phase extraction, and detected by HPLC-MS/MS and GC. The results showed that at the spike levels of 0.01~0.5 mg/kg, the average recovery rates of prochloraz and trichlorophenol in lily plants were 80.2%~87.8% and 81.1%~105.5% with RSD of 5.2%~6.7% and 3.0%~8.4%, respectively. The analysis method is simple and accurate. The degradation dynamics of prochloraz in lily plants indicate that prochloraz has a fast degradation rate and low residue, which is an easily degradable pesticide. However, after application, prochloraz quickly transformed into the more toxic environmental pollutant 2, 4, 6-trichlorophenol. Results of this study provide the reference data for the safe use of prochloraz in lily.

Key words: prochloraz; 2, 4, 6-trichlorophenol; lily plant; determination; residue dynamic

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物的统称,最早载于《神农本草经》,性味甘寒,具有养阴清肺、清心安神之功,用于治疗阴虚久咳、虚烦、失眠等症。《中华人民共和国药典(2015年版)》收录的百合为百合科植物卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb)、百合(*L. brownii* F. E. Brown var. *Viridulum* Baker)、细叶百合(*L. Pumilum* DC)^[1]。百合生长季节易发生病虫害,常见病有病毒病、百合疫病、软腐病、灰霉病等^[2-3]。目前,我国在百合上仅登记了苯醚甲环唑和氟硅唑2种杀菌剂^[4],但在实际生产中,由于百合连作障碍严重,可能会使用其他杀菌剂进行病害防治。其中,咪鲜胺在防治植物病害方面表现优异,且具有防治谱宽、低毒、见效快等优点^[5]。

咪鲜胺是咪唑类农药中的一种广谱性杀菌剂,能够抑制病原菌中麦角甾醇的生物合成,对多种半知菌和子囊菌病害均有显著控制效果,可防治稻瘟病、赤霉病、青绿霉病、炭疽病、褐斑病、黑腐病等病害^[6-9]。有研究表明,咪鲜胺在水果中降解后的最终主要代谢产物为2, 4, 6-三氯苯酚^[10]。而2, 4, 6-三氯苯酚被人体摄入后可能会在脂质组织中累积,对人的神经和呼吸系统造成影响,严重时甚至可能引发淋巴瘤和白血病等^[11]。另外,2, 4, 6-三氯苯酚还易造成环境污染,已被欧盟环境协会和美国环保署列入环境污染物清单^[12]。关于咪鲜胺在水果和蔬菜中的残留检测方法和残留动态行为,国内外已有报道,刘骞等^[13]发现丝瓜中的咪鲜胺残留量最大时为0.36 mg/kg,原始沉积量低,3 d后便检测不出咪鲜胺残留量;冯义志等^[14]发现45%咪鲜胺微乳剂在葱中的消解速度较快,半衰期为5.3~6.3 d;连秀叶等^[15]发现5%咪鲜胺乳油在荔枝果实中的原始沉积量为0.093 6 mg/kg,半衰期为2.2 d;刘骞等^[16]发现45%咪鲜胺水乳剂在芹菜中的半衰期为6.1~6.8 d,而咪鲜胺在姜植株内的残留量在30 d内基本没有变化,没有明显降解;杜文瑜等^[17]发现,在常温和冷藏条件下,咪鲜胺在哈密瓜中的半衰期分别为3.8和4.5 d,代谢物2, 4, 6-三氯苯酚在贮藏期间含量呈增加趋势。然而,咪鲜胺在中药材中的残留研究相对缺乏。本研究拟建立百合中咪鲜胺及其代谢物2, 4, 6-三氯苯酚的超高效液相色谱-串联质谱和气相色谱分析方法,对其在百合植株中的残留降解动态进行分析,以期为咪鲜胺在百合中的安全合理使用准则以及安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Aglien LC1290液相系统配备ABSCIEX 4500Q质谱,购于美国Aglien和SCIEX公司;气

相色谱仪 7890A, 购于美国 Aglien 公司; 电子天平 CPA225D, 购于德国赛多利斯股份公司; 高速离心机 Centrifuge 5424, 购于 Eppendorf 艾本德公司; 低速台式离心机 TDL-40B, 购于上海安亭科学仪器厂; 微量移液器, 购于 Eppendorf 艾本德公司; 多管涡旋混匀仪, 购于杭州瑞诚仪器有限公司。

试验样品名称: 45%咪鲜胺微乳剂, 购于深圳诺普信作物科学股份有限公司; 咪鲜胺, 纯度 99.4%, 2, 4, 6-三氯苯酚, 纯度 99.6%, 购于 Dr.Ehrenstoifer; 色谱级乙腈、甲醇、乙酸乙酯和甲酸, 购于默克化工技术(上海)有限公司; 分析级乙腈、乙酸乙酯、无水硫酸镁, 购于国药集团化学试剂有限公司; 净化剂 C18、PSA、GCB, 购于天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 田间试验

按照《农作物中农药残留试验准则》(NY/T 788—2018)^[18]要求, 设 50 m² 百合消解动态试验小区, 另设相应对照小区, 小区间留有保护行。45%咪鲜胺微乳剂在防治百合叶枯病中的推荐剂量为 506.25 g a.i./ha(制剂 75g/667 m²)。施药方法为喷雾, 施药时期为叶枯病发病初期, 施药次数为 1 次。施药后分别在 2 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 时采集百合植株样品, 设 3 个重复, 另设空白对照。田间试验分别在湖南省娄底市双峰县甘棠镇(露地)和山东省德州市齐河县祝阿镇(露地)进行。

百合植株样品的采集与制备: 分别在对照小区和处理小区内随机剪取不少于 12 株生长正常、无病害的百合植株地面部分(样品量不少于 2 kg), 去掉明显腐坏和萎蔫的茎叶, 切成长约 1 cm 的小段样品, 混匀后用四分法分别取 200 g 的样品两份, 装入样品袋中, 贴好标签, 贮存于 -20 °C 冰箱中冷冻保存。

1.3 分析方法

1.3.1 样品前处理

咪鲜胺: 称取均质后百合植株样品 10 g(精确到 0.01 g)于 100 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈(含 0.1%乙酸), 多管涡旋振荡器振荡提取 10 min, 摇匀, 4 000 r/min 离心 5 min。取 1 mL 上清液于装有 50 mg C18、10 mg GCB 和 150 mg 硫酸镁的微量离心管中, 剧烈振摇 1 min, 在 12 000 r/min 离心 4 min, 上清液过 0.2 μm 滤膜后液质联用仪待测。

2, 4, 6-三氯苯酚: 称取均质后的百合植株样品 10 g(精确到 0.01 g)于 100 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈(含 0.1%乙酸), 多管涡旋振荡器振荡提取 10 min, 摇匀, 4 000 r/min 离心 5 min。取 2 mL 上清液用旋转蒸发仪 40 °C 水浴蒸干, 然后用丙酮复溶, 定容至 1 mL 后置于装有 50 mg C18、10 mg GCB 和 150 mg 硫酸镁的微量离心管中, 剧烈振摇 1 min, 12 000 r/min 离心 4 min, 上清液过 0.2 μm 滤膜, 最后使用气相色谱仪检测。

1.3.2 仪器条件

液相条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18(3 m×100 mm, 1.8 μm), 柱温为 35 °C, 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 1.0 μL, 流动相为乙腈/0.1% 甲酸水 (V/V) 溶液。梯度洗脱: 0~0.5 min, 40%乙腈; 0.6~2.9 min, 90%乙腈; 3.0~4.0 min, 40%乙腈。质谱条件: 离子源类型为 ESI+, 离子源温度为 500 °C, 离子喷雾电压为 5 500 V, 气帘气压力为 40 psi, 喷雾气压力为 45 psi, 辅助加热气压力为 45 psi, 咪鲜胺质谱测定参数见表 1。

表1 咪鲜胺质谱测定参数

农药	保留时间/min	母离子	子离子	锥孔电压	碰撞能量
咪鲜胺	3.9	357.9	307.9*	16	15
			70.0	16	39

注: * 为定量离子.

气相色谱条件: 色谱柱为 HP-5(30 m×320 μm, 0.25 μm), 进样口温度为 250 °C, 进样量为 1.0 μL, 检测器温度为 325 °C, 升温程序条件为首先从 100 °C 以 10 °C/min 升温至 200 °C, 保持 1 min, 再以 25 °C/min 升温至 300 °C, 保持 2 min.

1.3.3 标准溶液的配制

分别称取咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚标准物质, 分别用乙腈和丙酮溶解, 配制成 1 000 mg/L 的母液. 再用乙腈和丙酮逐级稀释成质量浓度分别为 1、0.5、0.1、0.05、0.01 和 0.005 mg/L 的标准溶液.

空白百合样品经过上述提取及净化过程, 得到基质空白溶液. 移取 1 mL 空白基质溶液于进样小瓶中, 用氮气吹至近干, 用溶剂标溶解并定容至 1 mL. 按此方法分别配制咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚百合植株系列空白基质标准溶液.

1.3.4 添加回收试验

称取 10 g 百合植株样品于 100 mL 离心管中, 分别添加 0.01、0.1 和 0.5 mg/L 的咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚的标准溶液, 静置 3 h 后按上述条件进行前处理及检测. 每个处理重复 5 次, 计算添加平均回收率及相对标准偏差.

1.4 数据处理

采用一级动力学方程计算咪鲜胺在百合植株中的残留量变化:

$$C_T = C_0 e^{-kT} \quad (1)$$

$$T_{1/2} = \ln 2 / k \quad (2)$$

其中: C_0 为施药后咪鲜胺在百合植株中的拟合原始沉积量(mg/kg), T 为施药后时间(d), C_T 为施药后时间 T 时百合植株中咪鲜胺的残留量(mg/kg), k 为百合植株中咪鲜胺的消解系数, $T_{1/2}$ 为咪鲜胺在百合植株中的消解半衰期(d).

基质效应计算植株提取物对咪鲜胺在质谱中响应值的影响:

$$ME = (K_m / K_s - 1) \times 100 \quad (3)$$

其中: K_m 和 K_s 分别为基质标准曲线和溶剂标准曲线的斜率.

2 结果与分析

2.1 分析方法的线性关系、准确度和精密度

以标准溶液浓度为自变量 x , 以峰面积为应变量 y 进行回归拟合. 结果表明, 添加量为 0.005~1 mg/kg 时, 咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚的溶剂标和基质标均具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.99$)(见表 2). 添加量为 0.01~0.5 mg/kg 时, 咪鲜胺在百合植株中的平均回收率为 80.2%~87.8%, RSD 为 5.2%~6.7%; 2, 4, 6-三氯苯酚在百合植株中的平均回收率为 81.1%~105.5%, RSD 为 3.0%~8.4%(见表 3).

结果表明, 本试验所建立方法的准确性和重现性均能满足农药残留分析要求.

咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚检测方法的检出限(LOD)分别为 0.001 mg/kg 和 0.005 mg/kg, 最低检测浓度(LOQ)均为 0.01 mg/kg.

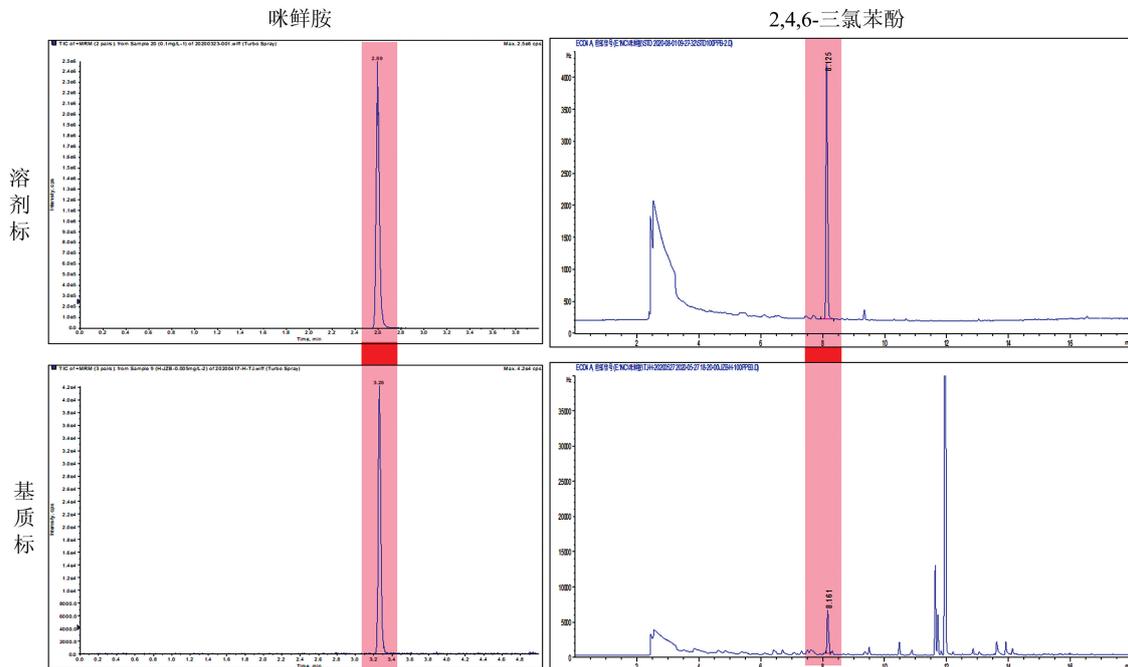


图1 咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚的典型色谱图

植物中的代谢产物在农药残留检测中会对质谱检测产生干扰而影响分析结果的准确性与精密度,因此在残留分析中应考虑不同作物所带来的基质效应^[16].结果表明:百合植株提取液对咪鲜胺的基质效应分别为 60.0%,属于强基质效应,植株样本检测均采用基质标准曲线进行校正计算(表 2).

表 2 咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚的线性方程

农药	类型	线性方程	相关系数	基质效应/%
咪鲜胺	溶剂标	$y = 33\ 644\ 540.45x + 263\ 459.05$	$R^2 = 0.996\ 0$	60.0
	基质标	$y = 52\ 470\ 380.38x + 11\ 881.48$	$R^2 = 0.999\ 7$	
2, 4, 6-三氯苯酚	溶剂标	$y = 207\ 074x - 4\ 883.3$	$R^2 = 0.999\ 1$	-0.2
	基质标	$y = 206\ 729x - 1\ 959.4$	$R^2 = 0.998\ 8$	

表 3 咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚在百合植株样品中的回收率和检出限($n = 5$)

农药	添加水平 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均回收率/ (%)	RSD/ (%)	LOD/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
咪鲜胺	0.01	84.7	5.2	0.001	0.01
	0.1	80.2	6.2		
	0.5	87.8	6.7		
2, 4, 6-三氯苯酚	0.01	105.5	8.4	0.005	0.01
	0.1	81.1	3.8		
	0.5	92.2	3.0		

2.2 咪鲜胺在百合中的消解动态

使用 45% 咪鲜胺微乳剂对百合喷雾施药, 百合植株中咪鲜胺的残留量随着时间的推移而逐渐降低, 且消解动态符合一级动力学方程. 湖南点消解动态方程为 $C_T = 3.4955e^{-2.71}$, $R^2 = 0.9018$, 半衰期为 0.3 d, 山东点消解动态方程为 $C_T = 7.9096e^{-1.86}$, $R^2 = 0.9135$, 半衰期为 0.4 d; 消解动态结果表明, 咪鲜胺在百合植株中降解迅速, 属于易降解农药, 施药后 28 d 时, 咪鲜胺在百合植株中的残留量仅为 0.002 mg/kg 和 0.097 mg/kg. 代谢物 2, 4, 6-三氯苯酚表现为积累和消解两个阶段, 呈先上升后下降的变化规律, 代谢物 2, 4, 6-三氯苯酚残留水平在施药后第 3 d 达到最高, 而后逐渐消解. 说明咪鲜胺施用百合上后很快降解成了 2, 4, 6-三氯苯酚, 随后主要以 2, 4, 6-三氯苯酚形式在百合植株体内存在.

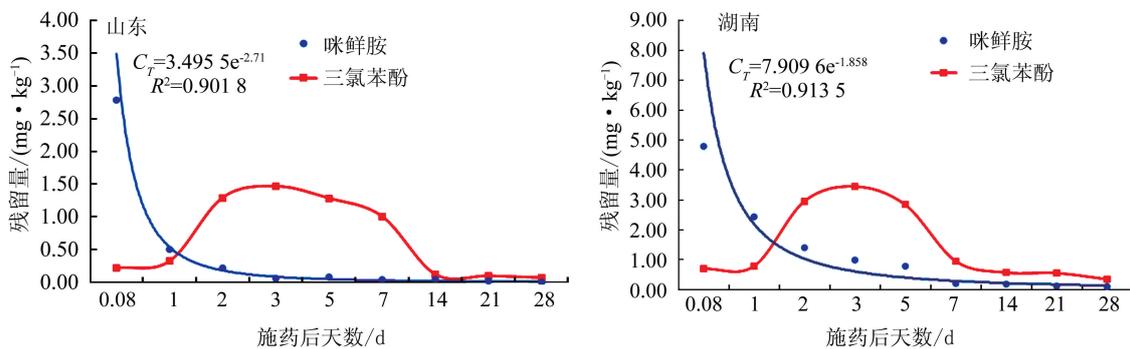


图 2 咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚在百合植株中的残留消解动态

3 结论与讨论

农作物种植过程中使用农药有助于农业生产, 预防和控制病虫害. 咪鲜胺作为一种广谱性杀菌剂, 在水果和蔬菜中应用广泛. 但长期不合理使用会导致农药残留量超标, 进而降低农产品的质量. 蔬菜中咪鲜胺残留量常规检测方法需用丙酮盐酸提取, 在 240 °C 条件下与盐酸吡啶盐反应, 将样品中的咪鲜胺分解为 2, 4, 6-三氯苯酚后, 通过气相色谱检测总的 2, 4, 6-三氯苯酚含量, 最后得到咪鲜胺残留量. 该方法过程复杂, 操作难度大, 且不能同时检测咪鲜胺和 2, 4, 6-三氯苯酚^[13, 16]. 本研究建立了乙腈提取和分散固相萃取净化, 结合超高效液相色谱-串联质谱法和气相色谱法, 同时测定百合植株中咪鲜胺及其代谢物 2, 4, 6-三氯苯酚残留的分析方法, 该方法简单快速, 准确度和精密度均符合农药残留试验准则的相关要求.

本研究发现咪鲜胺在百合植株中降解迅速, 半衰期不到 1 d, 而其代谢物 2, 4, 6-三氯苯酚则表现为积累和消解两个阶段, 呈先上升后下降的变化趋势. 说明咪鲜胺施用百合上后很快降解成了 2, 4, 6-三氯苯酚, 随后主要以 2, 4, 6-三氯苯酚形式在百合植株体内存在. 这一研究结果与前人关于咪鲜胺在蔬菜和水果上的残留行为一致. 而另有研究发现, 咪鲜胺在不同土壤环境中的残留消解速度也较快, 水稻土壤中的消解半衰期为 4.72 d^[20], 人参土壤中为 8.39 d^[21], 小麦土壤中为 2.83~8.76 d^[22].

综上所述, 咪鲜胺在百合植株中的消解动态结果表明, 咪鲜胺在百合植株中降解速度快、残留低, 属于容易降解的农药. 但施用后咪鲜胺很快转化为毒性更强的环境污染物 2, 4, 6-三氯苯酚, 这为咪鲜胺在百合上的安全使用提供了警示与参考. 目前我国尚未对咪鲜胺在百合病

虫害防治中的使用进行登记,也尚未制定咪鲜胺在百合上的最大残留限量,建议加强特色经济作物百合上的农药登记和 MRL 制定工作,保障群众食品质量安全。

参考文献:

- [1] 张卫,王嘉伦,张志杰,等.经典名方药用百合本草考证[J].中国中药杂志,2019,44(22):5007-5011.
- [2] 马杰,李庠,傅淋,等.食赏两用百合栽培技术规程[J].现代农业科技,2023(2):53-55.
- [3] 赵统利,王江英,葛金涛,等.观食兼用百合生产技术规程[J].江苏农业科学,2022,50(6):112-115.
- [4] 中国农药信息网.农药登记数据库[EB/OL].[2024-03-08].<http://www.chinapesticide.org.cn/zwb/dataCenter>.
- [5] 沈会芳,杨祁云,蒲小明,等.咪鲜胺防治菠萝黑腐病效果评价[J].中国农学通报,2021,37(34):133-140.
- [6] 黄雅俊,宋会鸣,丁佩,等.450g/L咪鲜胺水乳剂防治铁皮石斛黑斑病田间药效评价[J].农药科学与管理,2017,38(10):60-62.
- [7] 王铁锋,王春莉,薛源清,等.40%咪鲜胺水乳剂防治苹果炭疽病田间药效试验[J].陕西农业科学,2013,59(2):99-100.
- [8] 夏玲,曾莉莎,吕顺,等.荷花腐败病防治药剂室内筛选及田间药效试验[J].南方农业学报,2016,47(7):1129-1134.
- [9] 吉春明,刘建凤,张新建.24%咪鲜胺·噻呋酰胺悬浮剂对水稻纹枯病的防治效果[J].湖南农业科学,2014(23):58-59.
- [10] 赵金利,黄小清,王宇,等.QuEChERS结合超高效液相色谱-串联质谱法测定柑橘类水果中咪鲜胺及其代谢物残留[J].农药,2022,61(11):818-821.
- [11] 石艳玲,王磊,周琪.Vero细胞对2,4,6-三氯苯酚的毒性响应特征和敏感性分析[J].生态毒理学报,2008,3(5):479-487.
- [12] 孙百惠,宋雪英,严俊,等.厌氧微生物菌群XH-1对2,4,6-三氯苯酚的降解特性[J].应用生态学报,2022,33(12):3395-3402.
- [13] 刘骞,程运斌,沈菁.咪鲜胺及其代谢物在丝瓜上的残留检测方法及其动态研究[J].湖北农业科学,2018,57(23):136-138,142.
- [14] 冯义志,李瑞娟,王晓玉,等.45%咪鲜胺微乳剂在葱中的残留行为研究[J].农药科学与管理,2020,41(5):37-42,14.
- [15] 连秀叶.咪鲜胺、溴氰菊酯在荔枝上残留动态及其安全性评价[J].农业科技通讯,2021(6):203-205.
- [16] 刘骞,沈菁,刘军,等.咪鲜胺及其代谢物在芹菜和生姜中的残留行为及膳食风险评估[J].农学学报,2023,13(5):44-49.
- [17] 杜文瑜,赵新玉,韩鑫峰,等.异菌脲、咪鲜胺及其代谢物在哈密瓜贮藏保鲜中的降解动态及安全评价[J].食品安全质量检测学报,2024,15(7):62-67.
- [18] 中华人民共和国农业部.农作物中农药残留试验准则:NY/T 788—2018[S].北京:中国农业出版社,2018.
- [19] 李凯龙,姚燕霞,姜锦林,等.UPLC-MS/MS检测氟吡菌酰胺在菜豆中的残留及消解动态[J].湖南农业科学,2022(11):84-87.
- [20] 刘孟佳,杨仁斌,傅强,等.5%咪鲜胺可湿性粉剂在水稻植株及稻田土壤中的消解动态研究[J].湖南农业科学,2013(23):72-75.
- [21] 王燕,王春伟,高洁,等.咪鲜胺在人参和土壤中的残留动态及其安全性评价[J].东北农业大学学报,2014,45(3):25-30.
- [22] 乔琳,侯红敏,朱爱东,等.咪鲜胺在小麦田中的残留消解与膳食风险评估[J].现代农药,2015,14(3):43-46.

责任编辑 孙文静 崔玉洁