

氚标记青鲜素 (5,6—³H—MH) 制备及其在荔枝果实中的运转与残留的研究*

邱似德 梁元冈 骆日佑 王集民 林展江

(园艺系)

(广东省测试分析研究所)

提 要

青鲜素 (MH) 的氚标记是以丁炔二醇氧化成丁炔二酸后, 通氚加成得 2,3—³H—丁烯二酸, 再与硫酸肼反应制成 5,6—³H—MH, 其放射性比度 3.3 毫居里/毫克分子, 放射化学纯度 98.1%。

5,6—³H—MH 在荔枝果实中的示踪研究表明: MH 经果皮吸收后运转至果核、枝、叶, 12 天后急剧下降, 喷 ³H—MH 1,000 ppm 的荔枝果实, 成熟采收时果肉中的 MH 已消解殆尽, 全无残留。

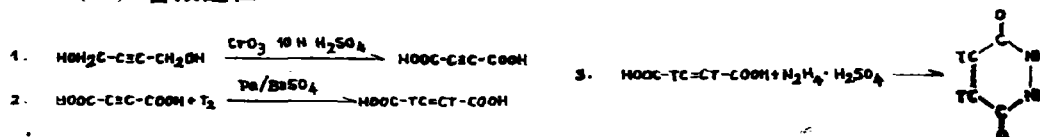
前 言

MH (马来酰肼、青鲜素, Maleic hydrazide) 是用硫酸肼与丁烯二酸 (或酸酐) 作用生成的一种化合物^[2], 由于具有多方面用途^[7], 如抑制马铃薯、洋葱贮藏期中的早期萌发; 提高植物越冬抗性、控制植物不适当的枝梢生长、延迟开花; 诱导雄性不育乃至防除杂草等等。在抑制胚的发育^[5]、诱导产生无核 (细核) 果方面近年又有了新的发展, 应用已愈来愈加广泛。但由于对其毒性及残留等方面的不了解, 以致应用上有所顾虑, 有的甚至不敢使用。因此, 研究其在植物体中, 尤其在食用部位的运转及残留, 具有理论研究及指导实践的价值, 为达此目的, 我们用放射性氚标记的 MH 进行研究。放射性氚标记 MH 的制备方法, 国内未见报道。故本研究包括两部分:

1. 氚标记 MH (5,6—³H—MH) 制备研究; 2. 5,6—³H—MH 在荔枝果实中的运转、残留动态的示踪研究。

氚标记青鲜素 (5,6—³H—MH) 的制备

(一) 合成途径



* 本研究是在李沛文教授、黄昌贤教授主持的荔枝研究课题下所作。承刘绍德副教授审阅, 谨致谢意。

(二) 合成方法

1. 丁炔二酸的制备^[1]: 在装有迴流冷凝器的500毫升圆底烧瓶中, 将20克氧化铬(CrO_3)溶于250毫升10N硫酸中, 用冰水浴冷却到7℃时, 边搅拌边滴入含4.3克丁炔二醇的50毫升丙酮溶液, 滴入速度据于反应体系温度不超过10℃。加完后, 在5—10℃间继续搅拌反应1.5小时。取出反应液, 减压蒸发浓缩至100毫升左右, 用等体积乙醚萃取3次, 合并乙醚相, 用冷水(约10℃)洗三次, 每次50毫升。将乙醚相减压蒸发至20毫升后, 以等体积3N氢氧化钠反萃3次, 合并水相, 用15毫升乙醚洗提一次。水相用18N硫酸中和至中性后, 用等体积乙醚萃取3次, 合并乙醚相, 减压蒸发至小体积后, 置于真空干燥器内抽干, 此残渣为粗产品丁炔二酸, 称重为425.7毫克。纸层析法检定其 $R_f = 0.83$, 文献^[8]值 $R_f = 0.82$ 。

2. 2,3- ^3H -丁烯二酸的制备: 在2~3毫升反应瓶中, 加入37毫克丁炔二酸, 18.5毫克5%钼-硫酸钡催化剂、1毫升甲醇、10微升喹啉。将反应瓶接真空系统, 干冰-丙酮冷却后, 抽真空至 $4 \times 10^{-2} \text{ mmHg}$ 。解冻, 通氘气(放射性强度10.5居里, 同位素丰度99%), 电磁搅拌反应1.5小时(反应开始时温热5分钟)。反应毕, 取下, 过滤, 用少量甲醇洗涤4次。合并滤液, 减压蒸发至干, 然后再用少量95%乙醇溶解、减压蒸发至干, 反复三次, 以除去不稳定氘。此干涸物为粗产品2,3- ^3H -丁烯二酸。将它配成10毫升50%乙醇溶液备用。

3. 5,6- ^3H -MH的制备: A烧杯中加硫酸脲0.4651克($3.51 \times 10^{-3} \text{ M}$), 用3毫升水溶解并煮沸。B烧杯中加顺丁烯二酸酐0.7047克($7.19 \times 10^{-3} \text{ M}$), 用5毫升2,3- ^3H -丁烯二酸溶液溶解、并煮沸。然后, 将B烧杯溶液倒进A烧杯中, 搅拌、煮沸。当混合液出现混浊时, 立即置于电磁搅拌器上搅拌保育1小时(温度控制在70~90℃)。取下, 冷却到25℃以下, 使5,6- ^3H -MH结晶析出更完全。然后, 抽滤, 并用低于25℃水洗至无硫酸根为止(BaCl_2 检验)。将结晶物置于干燥器中, 减压蒸发至恒重, 得产品5,6- ^3H -MH为130.1毫克(1.1216毫克分子)。

(三) 5,6- ^3H -MH的分析鉴定

1. 化学纯度: 用纸层析法, 在新华3号层析滤纸上, 分别点产品5,6- ^3H -MH和标准MH。溶剂为正丁醇: 冰乙酸: 水 = 10:3:4 (v/v), 上行展开12.5厘米。吹干, 在2537 Å紫外分析灯下观察, 产品5,6- ^3H -MH和标准MH两者斑点位置完全一致, R_f 值皆为0.70, (图1)。

2. 放射化学纯度: 将上述鉴定化学纯度的层析纸, 在PANAX-RTLS-IA

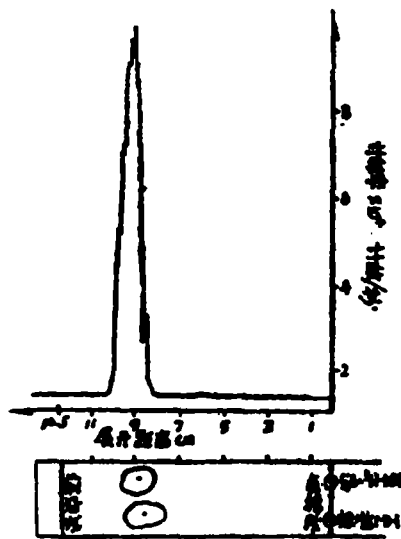


图1 5,6- ^3H -MH的放射性纸层析扫描谱图

放射性薄层扫描仪上从点样线前0.5厘米处始一直扫描到前沿后0.5厘米处止。得放射性纸层析扫描谱图1。从图1知,产品5,6-³H—MH放射性高峰位置与紫外分析灯下观察的5,6-³H—MH和标准MH的斑点完全重合。经计算,得产品5,6-³H—MH的放射化学纯度为98.1%。

3. 放射性比度: 准确称取7.2毫克5,6-³H—MH, 配成10毫升2%醋酸溶液。取10微升于闪烁杯内, 加5毫升闪烁液(2克PPO, 4.2克POPOP, 甲苯溶解并稀释到500毫升), 用LKB—Wallac 1215型液体闪烁计数器, 测量其放射性计数率, 换算得5,6-³H—MH的放射性比度为3.3毫居里/毫克分子。

5,6-³H—MH在荔枝果实中的运转、残留研究

(一) 材料和方法

以成年大荔枝树的‘槐枝’品种植株为试材, 将5,6-³H—MH配制成1,000ppm溶液, 以NaOH将pH调至中性, 于盛花后18天采用浸果穗及局部喷雾的方法处理果穗(1983年5月18日)。

处理后第6、9、12、15、21、28、35天及果实成熟期(57天即7月12日)各采样一次, 共八次。采样方法是同一株树上采带枝叶的已喷5,6-³H—MH及未喷5,6-³H—MH的果穗各3穗, 又在远离试验树的未作标记的植株采样作为对照(天然本底)。采后立即以腊封切口装于塑料袋内送往分析室。

(二) 样品的溶解、测量、计算

1. 溶解: 取新鲜样品(枝条、叶片、果皮、果肉、果核)分别剪成碎小块, 混合均匀, 称取 0.1 ± 0.01 克样品置于小试管内, 加0.3毫升42%高氯酸, 片刻后, 加0.3毫升30%过氧化氢。将小试管于80~90℃水浴中溶解和保育1.5小时, 溶液变清(有极个别叶片样品有少许悬浮白色絮状物)即成。

2. 测量: 将上述溶液倒进闪烁杯内后, 用4毫升乙二醇丁醚洗涤数次试管, 再倒进闪烁杯内与样品液混匀。加进10毫升闪烁液, 摇匀成均相后于LKB—1215 I型液体闪烁计数器上测量样品的放射性计数率, 内标准法确定探测效率达10.6~13.7%。

3. 计算:

(1) 确定空白(天然)样品中含有的衰变率, 按下式计算:

$$A_B = N_B / G_B \cdot Y_B \dots\dots\dots (1)$$

式中: A_B —空白(天然)样品中的衰变率(衰变/分)

N_B —空白(天然)样品中的计数率(计数/分)

G_B —空白(天然)样品的重量(克)

Y_B —空白(天然)样品的探测效率(%)

(2) 确定样品的衰变率, 按下式计算:

$$A = N / G \cdot Y \dots\dots\dots (2)$$

式中: A —样品中的衰变率(衰变/分)

N —样品中的计数率(计数/分)

G—样品中的重量 (g)

Y—样品的探测效率 (%)

(3) 确定样品中5,6—³H—MH的含量。以施药时5,6—³H—MH的放射性强度 (12.8416×10^6 衰变/mg) 为基准进行计算, 按下式:

$$W = (A - A_B) / A_W \dots \dots \dots (3)$$

式中: W—样品中5,6—³H—MH的含量 (mg)

A_W —5,6—³H—MH的放射性强度 (衰变/mg)

由此可知, 经 (1)、(2)、(3) 式计算后, 即可确定样品中 5,6—³H—MH 的量。后文的数据即依此计算而得。

(三) 结果及讨论

1. 残量及消解^{[7][8][4]}: 由于MH属于低毒化合物, 消解又快, 其毒性只相当于CCC的 $\frac{1}{2}$ 、相当于2.4—D的 $\frac{1}{2}$, 故世界上只有很少国家有容许残留量的规定, 美国、加拿大对几种植物食用部份的容许残留量为15~160ppm, 容许量中对洋葱要求最严, 为15ppm。本研究经5,6—³H—MH 1,000ppm的果穗局部喷雾处理后, 果实各部及附近枝叶的MH均属低含量, 稍高的部位是果核、果皮, 但最高峰时也仅达21~23ppm, 而且6~12天即急剧下降, 到36天果皮中已全部消解、成熟期的果核中则不到1ppm, 果肉因发育迟, 到第21天才进行测定, 当时也低达0.9ppm, 远不到上述食用部分15ppm的最严容许残留标准, 而且至36天已全部消解 (表1)。

表1 喷5,6—³H—MH各期各部位示踪情况

部位 \ 喷药后天数	样品中5,6— ³ H—MH含量 (ppm)							
	6 天	9 天	12 天	15 天	21 天	28 天	35 天	57天 (成熟期)
枝	10.990	7.941	3.666	3.254	2.657	1.044	检不出	检不出
叶	检不出	9.836	3.769	4.636	3.599	检不出	检不出	检不出
果皮	20.963	18.135	16.272	7.155	3.386	1.989	0.367	4.327
果肉						0.920	检不出	检不出
果核	22.860	10.325	2.183*	7.773	2.809	2.210	1.869	0.601

* 测定cpm时不是均相所致。

这种迅速消解的情况与上海植生所以4,000ppmMH处理甜菜后一个月, 残留不到2ppm的趋向是相吻合的。

2. 运转: 处理果穗后, 不论是喷雾或是直接浸穗, 5,6—³H—MH都很快向果核、梢端运转, 尤其是果核, 不仅到达快而且是含量最高的部位 (图2、3)。

这与Grafts所称^{[7][8]}, MH在植物体内的移动是按‘源和库’的模式流向生长活跃部位是相符合的。叶部位则出现迟、高峰低, 这还和运转速度有关, 按Andersen估计^[7], MH在韧皮部的运转速度为10~100cm/小时。但叶片含水量水平低主要是其属非

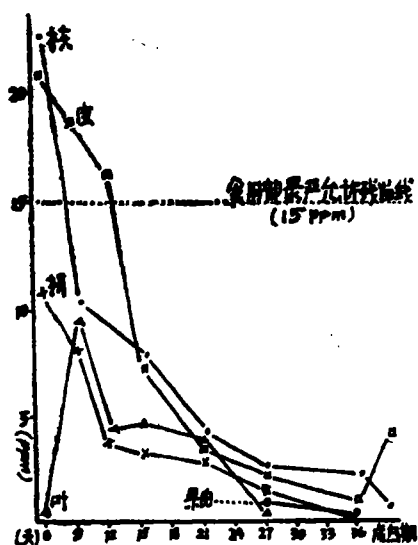


图2 果穗喷 ^3H -MH的样品中各期各部位 ^3H -MH分布图

生长活跃部位之故。

对处理树未喷雾的空白部位测定表明(图4), 远离处理部位的同树未喷药果穗也出现相似的曲线, 不同的是出现迟, 在处理后12天才出现(比处理的迟了六天, 见表2), 而量较低, 说明MH运转的距离是远的, 运转后的分布则叶、果皮、果核都同时具有比较接近的水平。

将图4与图2相比, 两者开始差异大, 到21天以后则差距小, 水平接近, 这进一步说明了MH的运转情况。

至于图2中果实成熟期果皮的5,6- ^3H -MH略有低微回升的情况尚待研究, 但并不影响上述讨论的结果。

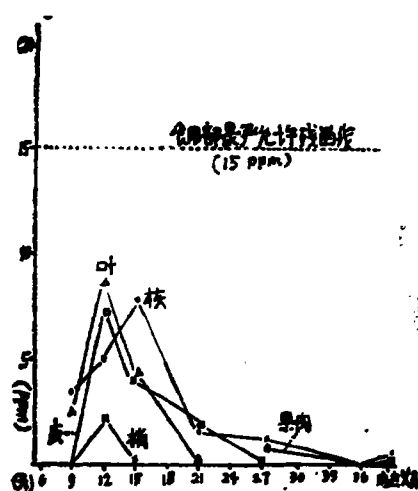


图3 直接以 ^3H -MH浸果穗的样品中各期各部位 ^3H -MH分布图

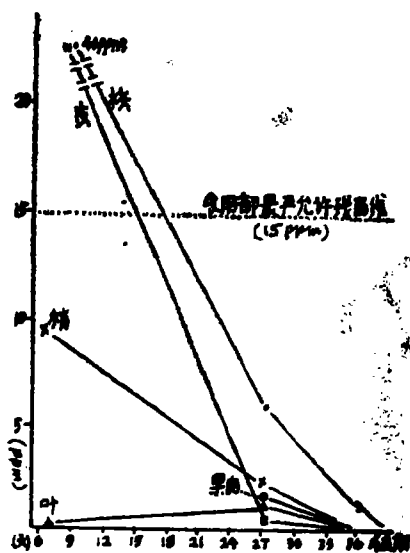


图4 处理树空白部位(未直接喷药)各期各部位 ^3H -MH分布图

表2

处理与未处理部位MH含量高峰期

	枝	叶	果皮	果核	果肉
处理果穗	第6天	第9天	第6天	第6天	第21天
未处理果穗	第12天	第12天	第12天	第15天	第27天
相差	6天	3天	6天	9天	6天

小 结

(一) MH属低毒化合物, 经1,000ppm处理荔枝果穗后, 植物体中含量低微、消解快, 食用部(果肉)已无残留, 树体其他部份也基本没有积累残留现象, 又据调查, 对树体也无副作用, 使用安全。

(二) MH处理果穗后, 很快向果核、梢端运转, 有流向生长活跃部位的趋向, 故其施用后容易对上述部位发生作用。

(三) MH在树体内易于运转, 由直接处理的果穗可以运转到另一个枝条的未处理果穗中, 其前期含量是前者明显的高, 后期则两者趋于接近。

(四) 本文所述氚标记MH化合物的制备合成途径是可行的, 放射性比度达3.3毫居里/毫克分子, 放射性纯度达98.1%, 可以满足示踪研究的需要, 达到研究青鲜素(MH)在荔枝果实中运转与残留的目的。

(五) 用5,6-³H-MH示踪的运转残留的研究方法是可行的。

参 考 文 献

- [1] 王葆仁著, 《有机合成反应》, (上册) 21, 科学出版社, 1981年。
- [2] 姆·西蒂格编张立言译, 《农药制造方法二集》, 64—66, 石油化学工业出版社, 1976年。
- [3] Brown & Hitz 1957. An interpretation of the influence of Maleic Hydrazide upon the growth of strawberry runners based upon radioisotope studies. *proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 70, 131
- [4] Constance, A. & Mahon, J. H. 1958. A modified procedure for determining MH residues in plant material. *J. of the association of official Agriculture chemists.* Vol. 41(1); 177—182.
- [5] Darlington, C. D. 1954. Action of Maleic Hydrazide on the cell. *Nature* 167: 407—408.
- [6] FAO/WHO Pesticide residues in Food-1980 "Report" & "Evaluation".
- [7] Hoffman, I. & Parups, E. V. 1964. Mode of action of MH in relation to residues in crops and soils. *Residues Reviews* Vol. 7: 96—113.
- [8] Louis, Meites. *Handbook of analytical chemistry*. 1st edition; McGraw-Hill book comp. 10—70.

STUDIES OF THE PREPARATION OF 5,6-³H-MH AND ITS TRANSLOCATION AND RESIDUES IN LYCHEE FRUITS

Chou Shide Liang Yuengang

(Department of Horticulture)

Luo Riyou Wang Jimin Lih Zhanjiang

(Guangdong Measurements and Analysis Research Institute)

ABSTRACT

5,6-³H-MH is synthesized from the oxidation of butynediol to produce butynedioic acid, to which tritium is introduced. Then the 2,3-³H-butynedioic acid is obtained. Finally butynedioic acid will react again with sulfate hydrazine to produce 5,6-³H-MH. The radioactive ratio of the product is 3.3 mci/mM, with radioactive purity 98.1%.

The results of the experiment showed that MH was readily translocated. Also the breakdown of MH in the aril of the fruit was rapid. The uptake MH passing through the peel, was then translocated to the seed the shoot and the leave. 12 days after treatment the existence of MH declined strikingly. During harvest time, the existence of MH in the aril of the fruit decreased below detectable levels.