



杨晓云, 黄其亮, 江腾辉, 等. 印楝素在甘蓝及土壤中的消解动态[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 37-40.

印楝素在甘蓝及土壤中的消解动态

杨晓云¹, 黄其亮², 江腾辉³, 徐汉虹¹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室/华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 广东省环境保护职业技术学校, 广东 广州 510655; 3 广东省农业有害生物预警防控中心, 广东 广州 510500)

摘要:【目的】甘蓝 *Brassica oleracea* 生长期施用 w 为 0.3% 的印楝素乳油, 检测印楝素在甘蓝和土壤中的残留及消解动态。【方法】印楝素在 0.05 ~ 5.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水平范围内取 0.1、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 添加, 样品中的印楝素经乙腈超声波辅助提取, 弗罗里硅土固相萃取柱净化, 高效液相色谱(HPLC) 检测, 外标法定量。【结果】印楝素在甘蓝中的平均回收率为 88.52% ~ 93.21%, 相对标准偏差为 2.75% ~ 3.55%; 在土壤中平均回收率为 90.69% ~ 93.32%, 相对标准偏差为 2.09% ~ 3.46%。印楝素在甘蓝中的残留半衰期为 0.89 d, 在土壤中的残留半衰期为 2.40 d。【结论】印楝素属易降解农药。该施药方法安全可靠, 值得借鉴。

关键词:印楝素; 乳油; 甘蓝; 土壤; 农药残留; 高效液相色谱

中图分类号:S481.8

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2017)04-0037-04

Degradation dynamics of azadirachtin in cabbage and soil

YANG Xiaoyun¹, HUANG Qiliang², JIANG Tenghui³, XU Hanhong¹

(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Vocational and Technological School of Environmental Protection, Guangzhou 510655, China; 3 Agricultural Pest Prevention and Control Center of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China)

Abstract:【Objective】To identify the residual and degradation dynamics of azadirachtin in cabbage and soil after spraying 0.3% azadirachtin emulsifiable concentrate during the growth period of cabbage (*Brassica oleracea*). 【Method】Azadirachtin was added with three concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ within the range from 0.05 to 5.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Azadirachtin was extracted from cabbage and soil using acetonitrile assisted with ultrasonic, purified using a florisil solid phase extraction column, detected by HPLC and quantified by external standard method. 【Result】The average recovery rates of azadirachtin in cabbage ranged from 88.52% to 93.21% with relative standard deviations ranging from 2.75% to 3.55%, and the average recovery rates in soil were ranged from 90.69% to 93.32% with relative standard deviations ranging from 2.09% to 3.46%. The half-lives of azadirachtin in cabbage and soil were 0.89 and 2.40 d respectively. 【Conclusion】Azadirachtin is an easily degradable pesticide. Application of 0.3% azadirachtine emulsifiable concentrate is safe and recommended.

Key words: azadirachtin; emulsifiable concentrate; cabbage; soil; pesticide residue; HPLC

收稿日期:2017-03-02 优先出版时间:2017-06-21

优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170621.1924.012.html>

作者简介: 杨晓云 (1966—), 男, 苗族, 副教授, 博士, E-mail: yxyhyxy@scau.edu.cn; 通信作者: 徐汉虹 (1961—) 男, 教授, 博士, E-mail: hxxu@csau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (20377015)

印楝素 (Azadirachtin) 是一类从印楝 *Azadirachta indica* 中分离出来的活性较强的化合物,它属于四环三萜类,结构复杂,其活性最好的是印楝素 A,目前发现的活性成分还有印楝素 B 等^[1]。印楝素是世界公认的低毒、广谱、高效、易降解的杀虫剂^[2-3]。到目前为止,我国尚未出台印楝素的最高允许残留值及相关检测方法,但根据欧盟地区的标准,蔬菜中印楝素的 MRL 为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。目前,分光光度法在测定印楝素总含量方面的应用较为普遍^[4-5],但其他物质容易对其产生干扰;对于较高含量的印楝素的测定,可用薄层色谱酸化香兰素显色法^[6];液相色谱法可用于分析植物生长与印楝素的相关性^[7]和茶叶中印楝素的残留量^[8],也可分析水^[9]、土壤^[10]和橄榄树 *Canavium album*^[11]中印楝素的降解。

对印楝素在草莓 *Fragaria ananassa*、番茄 *Solanum lycopersicum* 等水果上的残留已有研究报道^[12-14],而在蔬菜上的残留则鲜见报道。本研究根据文献[15]中的方法设计田间试验,印楝素乳油施用于甘蓝田后,采用超声波萃取、固相萃取净化、高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 测定甘蓝和土壤中印楝素的残留,记录印楝素在甘蓝及土壤中的消解动态,以期规避农药残留风险。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent1100 高效液相色谱仪 (配 DAD 检测器、自动进样器、化学工作站);旋转蒸发器 EYELAN-1100 (日本 EYELA 公司);超声波清洗器 KH-500 (昆山创超声仪器有限公司);循环水真空泵 SHB-III;组织捣碎机 MJ-25BM02C (常州博远实验仪器厂);烘箱 S. C. 101 (上海试验仪器厂);万分之一电子天平 BS210S (德国 Sa RtoRius 公司);精密移液枪 (德国艾本德公司)。

SPE 小柱 (Florisol, 标准样品为 1g);*w* 为 95% 印楝素标准品 (美国 Sigma 公司);甲醇和乙腈为色谱纯 (美国 MREDA 公司);*w* 为 0.3% 印楝素乳油 (成都绿金生物科技有限责任公司);乙腈、丙酮、氯化钠、正己烷为分析纯 (天津富士精细化工有限公司),自制超纯水,电阻 $\geq 18.0\text{ M}\Omega$ 。

1.2 方法

1.2.1 田间试验方案及样品采集 试验小区面积均为 30 m^2 ,另外设空白对照区,每组 3 个重复,并在各小区间进行相应隔断处理。采用常规手动喷雾器

对甘蓝进行喷雾处理,1 次施药,多次取样。施药时间结合甘蓝的害虫防治期和推荐采收间隔期确定。施药剂量是 $5.4\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。土壤残留消解动态试验在旁边随机选择的空白地进行。于药后 1、6 h 和 1、2、3、4、5、7 d 采集样品。每次在每个小区内随机采集多于 1 kg 生长正常的植株,在小区内随机采集深度为 0~10 cm 处的土壤,且多于 1 kg。样品采集后放入样品袋,并尽快运回实验室在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存待测。

1.2.2 印楝素的提取 准确称取 20 g 甘蓝样品放入匀浆机中并加入乙腈 100 mL,高速匀浆 2 min 后用滤纸过滤,将滤液加入到含有氯化钠 (6 g) 的量筒中,剧烈震荡数分钟后静置 30 min,使乙腈和水分层,吸取上清液 50 mL,加入平底烧瓶中,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下减压浓缩处理,加 *V* (正己烷):*V* (丙酮) = 7:3 的混合液 2 mL 溶解,待净化。准确称取 20 g 土壤加入到三角瓶中,并加入乙腈 100 mL,超声提取 30 min,过滤,将滤液加入到含有氯化钠 (6 g) 的量筒中,剧烈震荡数分钟后静置 30 min,使乙腈和水分层,吸取上清液 50 mL,加入平底烧瓶中,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行减压浓缩处理,其后用甲醇定容到 1 mL 并经微孔滤膜过滤后,进行测定。

1.2.3 样品净化 预先用 *V* (正己烷):*V* (丙酮) = 7:3 的混合液 5 mL 活化 Florisol 固相萃取柱,转移提取液到柱上,用 *V* (正己烷):*V* (丙酮) = 7:3 的混合液进行洗脱处理,每次 5 mL,共洗脱 3 次,然后在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下用氮吹仪进行浓缩,其后用甲醇定容到 1 mL 并经微孔滤膜过滤后,进行测定。

1.2.4 液相色谱 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ ($5\text{ }\mu\text{m}$), $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$;柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相为 *V* (乙腈):*V* (水) = 40:60;流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;二极管阵列检测波长 217 nm,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。定量方式采用外标法。在上述检测条件下印楝素的保留时间为 9.80 min。

2 结果与分析

2.1 印楝素在甘蓝和土壤中的添加回收率及检出限

以 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 印楝素标样测定的标准曲线如图 1A 所示。在 $0.5\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 线性范围内,进行添加回收处理,分别在空白甘蓝和空白土壤中,准确添加 3 个质量分数 ($0.1、0.5、1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的印楝素标准溶液,每个质量分数重复 5 次,然后测定回收率,添加回收色谱图见图 1B,由图 1B 可知,印楝

素峰形好、重现性较好且未见杂质干扰。印楝素在土壤中平均回收率为 90.69% ~ 93.32%, 相对标准偏差为 2.09% ~ 3.46%, 在甘蓝中的平均回收率为 88.52% ~ 93.21%, 相对标准偏差为 2.75% ~ 3.55% (表 1)。此方法的准确度和精密度均符合农药残留分析的要求。该方法的最小检出量为 2 ng, 印楝素的最低检出浓度为 0.02 mg · kg⁻¹。

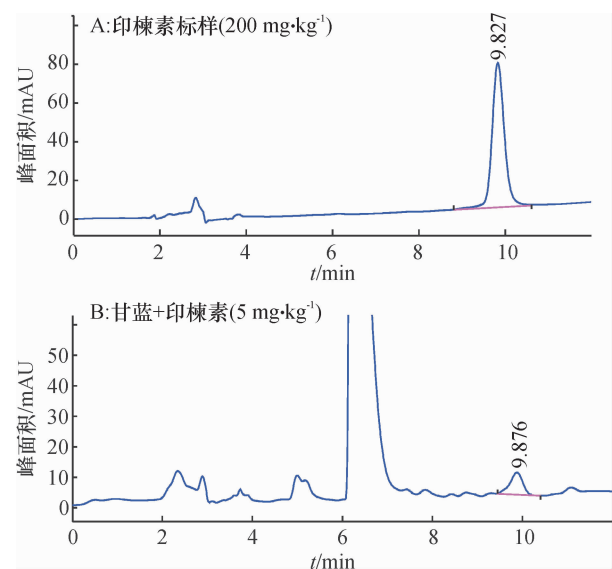


图 1 甘蓝添加印楝素的高效液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of cabbage sample spiked with azadirachtin

表 1 印楝素在甘蓝和土壤的添加回收率 Tab.1 Recovery rates of azadirachtin in cabbage and soil			
样品	$w(\text{印楝素})/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率/%	变异系数/%
甘蓝	0.1	88.52 ± 3.14	3.55
	0.5	89.31 ± 2.90	3.25
	1.0	93.21 ± 2.56	2.75
土壤	0.1	91.38 ± 3.16	3.46
	0.5	90.69 ± 2.88	3.18
	1.0	93.32 ± 1.95	2.09

2.2 印楝素在甘蓝和土壤中的消解动态

空白对照组的液相色谱图见图 2。表 2 为 0.3% (w) 印楝素乳油在甘蓝和土壤上的消解动态, 当施药量为 2.7 g · m⁻² 时, 印楝素在甘蓝和土壤中的原始沉积量分别为 3.93 和 0.31 mg · kg⁻¹, 药后 5 d 在甘蓝和土壤中印楝素的残留量分别为 0.07 和 0.06 mg · kg⁻¹, 消解率分别为 98.21% 和 80.64%。印楝素在甘蓝和土壤中的消解动态符合一级反应动力学, 即 $C_t = C_0 e^{-kt}$, 运用 DPS 进行统计分析后, 可以得到印楝素在甘蓝和土壤中的残留消解的动态方程 (表 2)。由表 2 可知, 印楝素在甘蓝中的半衰期为 0.89 d, 在土壤中的半衰期为 2.40 d。

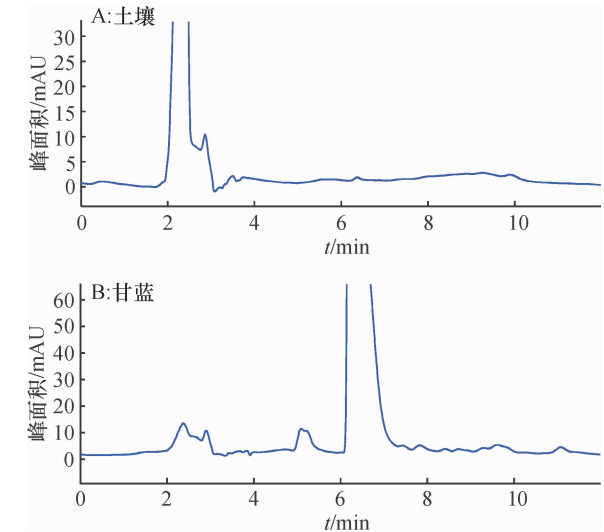


图 2 空白对照的高效液相色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of control without azadirachtin

表 2 0.3% (w) 印楝素乳油在甘蓝和土壤中的消解动态
Tab.2 Dissipation dynamics of 0.3% azadirachtin EC residue in cabbages and soil

$t_{\text{取样}}/\text{d}$	甘蓝		土壤	
	残留量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	消解率/ %	残留量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	消解率/ %
0	3.93		0.31	
0.25	3.46	11.95	0.29	6.45
1.00	1.80	54.19	0.26	16.12
2.00	0.85	78.37	0.19	38.70
3.00	0.37	90.58	0.14	54.83
4.00	0.18	95.41	0.09	70.96
5.00	0.07	98.21	0.06	80.64
7.00	...	...	...	...
消解方程	$C_t = 4.025 \cdot 1e^{-0.777 \cdot 5t}$		$C_t = 0.319 \cdot 5e^{-0.288 \cdot 2t}$	
相关系数	0.998 9		0.990 9	
F	2 288		270	
P	0.000 01		0.000 02	
半衰期/d	0.89		2.40	

3 结论

本研究建立了较为简便的检测印楝素在甘蓝和土壤中残留的方法。试验结果表明, 经过此方法处理的样品, 液相色谱图峰形良好且该方法的添加回收率及准确度等均符合要求。本研究用 2 倍的推荐剂量对田间甘蓝进行施药, 6 h 后印楝素的残留量就已经低于检出限而检测不出。为了进一步获得印楝素在甘蓝上残留降解行为的信息, 本研究采用了 20 倍的推荐剂量施药, 施药后 1 h 在甘蓝上的原始沉积量为 3.93 mg · kg⁻¹, 半衰期为 0.89 d, 7 d 后已检测不出。施药后 1 h 在土壤中的原始沉积量为 0.31

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 半衰期为 2.40 d。印楝素属于植物性杀虫剂, 目前国内鲜见印楝素在蔬菜上的 MRL 和安全使用标准。欧盟则规定印楝素在蔬菜上的 MRL 为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 安全间隔期为 3 d。根据本研究结果, 并参照 FAO/WHO 和国内农药残留限量标准, 可知印楝素属于低毒、低残留农药。但为了保证安全, 仍需进一步开展各种试验, 多积累数据并结合毒性资料等来制定印楝素在农产品中的 MRL 值。

参考文献:

- [1] 唐艳梅, 黎其万, 刘宏程, 等. 固相萃取-高效液相色谱测定水果中印楝素残留量[J]. 农药, 2011, 50(1): 53-54.
- [2] MOHAN K, GOPALAN M, BALASUBRAMANIAN G. Studies on the effects of neem products and monocrotophos against major pests of rice and their safety to natural enemies[J]. Ind J Plant Protect, 1991, 19(1): 23-30.
- [3] KRISHNAIAH N V, KUMAR K M, LINGAIAH T, et al. Effect of neem formulations on feeding of *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Nephotettix virescens* of rice[J]. Pest Res J, 2001, 13(2): 235-238.
- [4] DAI J, YAYLAYAN V A, RAGHAVAN G S, et al. Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3): 1169-1174.
- [5] 李永江, 张毅, 肖为民, 等. 比色法测量印楝种仁提取物中柠檬苦素类物质[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(2): 150-152.
- [6] TANUJA P, VENUGOPAL N, SASHIDHAR R B. Development and evaluation of thin-layer chromatography-digital image-based analysis for the quantitation of the botanical pesticide azadirachtin in agricultural matrixes and commercial formulations; Comparison with ELISA[J]. J AOAC Int, 2007, 90(3): 857-863.
- [7] SIDHU O P, KUMAR V, BEHL H M. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(4): 910-915.
- [8] 罗应兰, 刘宏程. 超声波固相萃取-高效液相色谱法同时测定茶叶中印楝素及类似物残留量[J]. 农药, 2016, 5(12): 915-917.
- [9] THOEMING G, DRAEGER G, POEHLING H M. Soil application of azadirachtin and 3-tigloy-azadirachtol to control western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): Translocation and persistence in bean plants[J]. Pest Manag Sci, 2006, 62(8): 759-767.
- [10] THOMPSON D G, CHARTRAND D T, KREUTZWEISER D P. Fate and effects of azadirachtin in aquatic mesocosms: Fate in water and bottom sediments[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2004, 59(2): 186-193.
- [11] CABONI P, CABRAS M, ANGIONI A, et al. Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(12): 3491-3494.
- [12] CABONI P, SARAIS G, ANGIONI A, et al. Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26): 10026-10032.
- [13] CABONI P, SARAIS G, ANGIONI A, et al. Fate of azadirachtin A and related azadirachtoids on tomatoes after greenhouse treatment[J]. J Environ Sci Health B, 2009, 44(6): 598-605.
- [14] SARAIS G, ANGIONI A, LAI F, et al. Persistence of two neem formulations on peach leaves and fruit: Effect of the distribution[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(6): 2457-2461.
- [15] 王运浩, 季颖, 龚勇, 等. 农药登记残留田间试验标准操作规程[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 68-72.

【责任编辑 霍欢】