

◆ 农药分析 ◆

高效液相色谱法测定S-诱抗素及其设计浓度验证

姚晨涛^{1,2}, 刘铭钰¹, 孙 晓^{1,2}, 贾芳莹¹, 彭宇漩¹, 姜兴印^{1,2*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018 2. 山东农业大学环境毒理研究中心, 山东泰安 271018)

摘要:建立了S-诱抗素的高效液相色谱检测方法,采用Pgrandsil-STC-C₁₈分离,紫外检测器检测,以甲醇+甲酸水溶液为流动相,在260 nm波长条件下测定S-诱抗素质量分数。在质量浓度为1.0~100.0 mg/L时,S-诱抗素线性关系良好,回收率为100.08%~100.40%,标准偏差为0.08~3.33,变异系数为0.88。98% S-诱抗素原药对藻类生长抑制试验、溞类急性活动抑制试验和鱼类急性毒性试验结果表明供试物的实测浓度均不低于设计浓度的80%,可用设计浓度计算EC₅₀值和LC₅₀值。

关键词:S-诱抗素;高效液相色谱法;回收率;水生生物

中图分类号:S 482.8+99 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2019.03.009

Determination of S-ABA and Design Concentration by High Performance Liquid Chromatography

Yao Chen-tao^{1,2}, Liu Ming-yu¹, Sun Xiao^{1,2}, Jia Fang-ying¹, Peng Yu-xuan¹, Jiang Xing-yin^{1,2*}

(1. College of Plant Protection Shandong Agricultural University, Shandong Tai'an 271018, China; 2. Shandong Agricultural University Environmental Toxicology Research Center, Shandong Tai'an 271018, China)

Abstract: A method for separation and quantitative analysis of S-ABA was established by HPLC, using methanol and water (volume ratio of 60:40) as mobile phase, on Pgrandsil-STC-C₁₈ column and PDA. At the concentration of 1.0-100.0 mg/L, the average recoveries were 100.08%-100.40%, the relative standard deviations were 0.08-3.33, the variation coefficient was 0.88. During the alga growth inhibition test, the daphnia acute activity inhibition test and the fish acute toxicity test, the water sample test data showed that the measured concentration of the test substance was not less than 80% of the design concentration. The EC₅₀ and LC₅₀ could be calculated using the design concentration.

Key words: S-ABA; HPLC; recovery; aquatic organisms

农药对控制作物病害、保证农作物的高产丰收发挥着重要作用^[1],但农药的不合理使用也会对生态环境造成危害^[2]。农药进入田间后,一部分会通过不同环境介质汇集到水体中,降低水生生态环境的质量,影响水生生态系统,甚至整个生态系统的结构和功能^[3]。在我国未来,现代农业仍离不开农药。为了将农药使用造成的危害与风险降到最低,对农药进行毒性检测已经成为评价水环境质量的重要环节。目前,生态风险评价已成为农药环境安全管理的有力技术支撑,是我国农药登记管理中必不可少的环节^[4]。

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)是水体的初级生产者,它对生态系统的平衡和稳定起着十分重要的作用^[5]。大型溞(*Daphnia Magna* Straus)属于浮游甲壳类动物,以藻类为食,是水生生态系统中物质循环和能量流动的重要环节。因其生活周期短、繁殖快、对毒物敏感及易于在实验室培养等优点,目前已被广泛应用于水体环境污染监测和水生生物毒性试验和评价中^[6]。鱼类是水生生态系统的消费者,在食物链上与人类的关系最密切。斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)是一种小型热带淡水鱼,因其价格低廉、容易获得、管理饲养易行等诸多因素

收稿日期:2018-10-24

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2018YFD0200604)、山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-02-10)

作者简介:姚晨涛(1992—),男,山东省运城市人,硕士研究生,主要从事S-诱抗素在植物上的应用研究及农药抗性研究。

E-mail yaoct2009@163.com

通讯作者:姜兴印(1967—),山东省临沂市人,副教授,博士,主要从事植物生长调节剂和种衣剂的研究。E-mail xyjiang@sdau.edu.cn

引起环保组织重视,现已经将化学品对其急性、慢性毒性作为评价污染物对水生环境危害程度的指标^[7]。

S-诱抗素(abscisic acid)是活性高、功能强大的植物内源生长调节物质^[8-9]。其具有调节植物生长,改善农作物品质,提高作物生存能力等特性,广泛用于农业生产的抗灾减灾、生态植被建设和农产品安全生产等领域。

关于S-诱抗素对3种水生生物的环境毒性评价尚未见报道,本试验根据国家《化学农药环境安全评价试验准则》^[10-13]研究S-诱抗素对3种水生生物的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1200 HPLC高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市定山湖检测仪器厂)、QUINTIX125D-1CN型十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)、甲醇(色谱纯,美国Sigma公司)、98% S-诱抗素标准样品(四川龙蟒福生科技有限责任公司)。

1.2 溶液配制

准确称取98% S-诱抗素标准样品0.025 51 g于小烧杯中,加入甲醇,移至50 mL容量瓶,定容,得500.0 mg/L的S-诱抗素储备液。用甲醇稀释配制成质量浓度为100.0、50.0、20.0、10.0、2.0、1.0 mg/L的S-诱抗素标准溶液。

1.3 水样采集与处理

藻类生长抑制试验各浓度处理重复3次,分别于0 h、72 h在水体中部取样;溞类急性活动抑制试验各浓度处理重复4次,分别于0 h、48 h水体中部取样;鱼类急性毒性试验各浓度处理重复3次,分别于

0 h、96 h水体中部取样,重复混合后过0.22 μm水系滤膜,直接进样,分别检测不同时间水中样品含量。

1.4 HPLC液相色谱条件

液相色谱柱:Pgrandsil-STC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇+水(体积比60:40),甲酸调溶液pH值为3;检测波长:260 nm;柱温:25℃;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。所用试剂和溶液进入色谱系统前经0.22 μm微孔滤膜过滤。

1.5 测定

在上述操作条件下,待仪器基线稳定后,注入数针标样溶液,计算各针相对响应值的重复性,待相邻2针S-诱抗素响应值变化≤1.5%时,再按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

1.6 数据处理

将待测样品溶液的峰面积值代入下列公式计算,得溶液中的有效成分质量分数。

$$X/\% = \frac{S_1 \times C}{S_2} \times 100$$

式中:X为待测样品溶液中有效成分质量浓度,单位为mg/L;C为标准样品溶液中有效成分质量浓度,单位为mg/L;S₁为待测样品溶液峰面积值;S₂为标准样品溶液峰面积值。

2 结果与讨论

2.1 方法的线性关系

S-诱抗素标准样品色谱图如图1-A所示,出峰时间为9.283 min。以S-诱抗素标准溶液质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,S-诱抗素线性回归方程为 $y=100\ 982x+6\ 935.1$,相关系数 $R^2=0.999\ 8$,结果见图1-B。试验结果表明,在质量浓度为1.0~100.0 mg/L时,S-诱抗素的质量浓度与相应的峰面积呈现的线性关系良好。

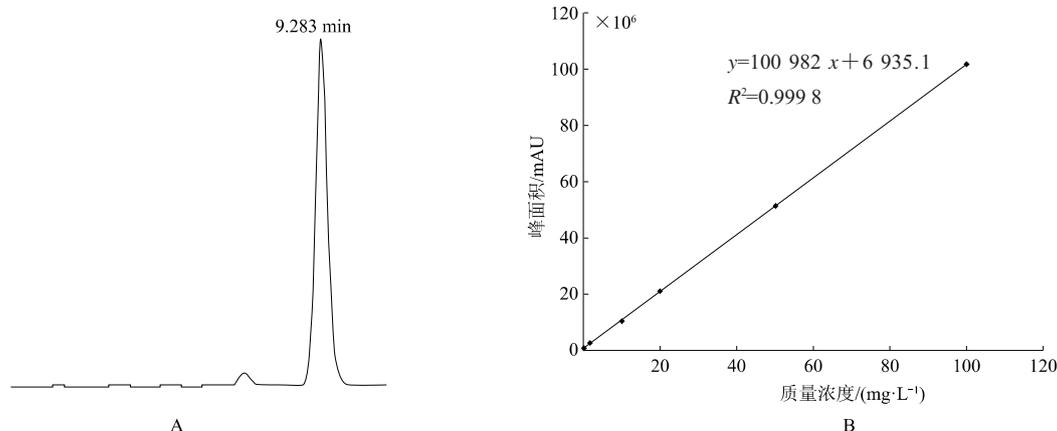


图1 S-诱抗素标准样品色谱图及标准曲线

2.2 精密度、准确度的测定

试验期间,空白对照中未检测出待测样品。精密度的测定方法为:称取空白样品1.0 g,分别加入质量浓度为2.0 mg/L的*S*-诱抗素标准溶液,每个添加水平下每个样品平行测定3次,结果见表1。*S*-诱抗素的标准偏差为0.86,变异系数为0.88%。

表1 98% *S*-诱抗素原药精密度测定结果

质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	质量分数/%			平均值/ %	标准 偏差	变异 系数/%
	1	2	3			
2	99.02	97.29	98.22	98.18	0.86	0.88

准确度测定方法为:称取空白样品1.0 g,分别加入质量浓度为2.0、50.0、100.0 mg/L 3个添加水平的*S*-诱抗素标准溶液,每个添加水平下每个样品平行测定2次,结果见表2。*S*-诱抗素平均添加回收率为100.08%~100.40%。

表2 98% *S*-诱抗素原药准确度测定结果

质量分数/(mg·L ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%
2.0	100.22	100.08
	99.95	
50.0	100.17	100.40
	100.64	
100.0	100.25	100.19
	100.13	

2.3 藻类生长抑制试验水样检测结果

在98% *S*-诱抗素原药对藻类生长抑制试验期间,设计质量浓度为2、3、4.5、6.75、10.125、15.188 mg/L时,*S*-诱抗素72 h实测浓度与设计浓度比值分别为91.35%~94.68%,结果见表3。*S*-诱抗素72 h的实测浓度均高于设计浓度的80%,因此该设计浓度可用于计算藻类生长抑制EC₅₀值。

表3 藻类生长抑制试验各处理药液浓度测量数据

设计质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	0 h实测/(mg·L ⁻¹)		72 h实测/(mg·L ⁻¹)		72 h实测浓度与0 h 实测浓度比值/%	72 h实测浓度与 设计浓度比值/%
	质量浓度	质量浓度平均值	质量浓度	质量浓度平均值		
2.000	1.974	1.948	1.822	1.827	93.80	91.35
	1.923		1.814			
	1.946		1.845			
3.000	2.874	2.884	2.758	2.789	96.71	92.98
	2.885		2.826			
	2.894		2.784			
4.500	4.412	4.432	4.262	4.257	96.05	94.59
	4.412		4.226			
	4.471		4.282			
6.750	6.562	6.610	6.410	6.391	96.68	94.68
	6.644		6.387			
	6.625		6.376			
10.125	9.787	9.835	9.606	9.533	96.93	94.16
	9.966		9.465			
	9.752		9.529			
15.188	14.984	15.076	14.011	14.253	94.54	93.84
	15.127		14.424			
	15.117		14.324			

2.4 溞类急性活动抑制试验水样检测结果

在98% *S*-诱抗素原药对溞类急性活动抑制试验期间,当设计质量浓度为8、12、18、27、40.5、60.75 mg/L时,*S*-诱抗素48 h实测浓度与设计浓度比值分别为92.77%~95.42%,结果见表4。供试物48 h实测浓度均高于设计浓度的80%,因此此设计浓度可用于计算溞类急性活动抑制EC₅₀值。

2.5 斑马鱼急性毒性试验水样检测结果

在98% *S*-诱抗素原药对斑马鱼急性毒性试验期间,设计质量浓度为100 mg/L时,0 h、96 h实测浓度与设计浓度比值分别为98.646%和96.673%,结果见表5。供试物96 h的实测浓度均高于设计浓度的80%,因此可用设计浓度为100 mg/L为计算溞类急性活动抑制LC₅₀值。

表4 藻类急性活动抑制试验各处理药液浓度试验数据

设计质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	0 h 实测/(mg·L ⁻¹)		48 h 实测/(mg·L ⁻¹)		48 h 实测浓度与0 h 实测浓度比值/%	48 h 实测浓度与 设计浓度比值/%
	质量浓度	平均值	质量浓度	平均值		
8.00	7.708		7.655		99.09	94.84
	7.615	7.657	7.522	7.587		
	7.647		7.584			
12.00	11.718		11.272		94.59	92.83
	11.866	11.776	11.001	11.140		
	11.745		11.146			
18.00	17.734		16.899		95.37	92.77
	17.303	17.508	16.533	16.698		
	17.487		16.662			
27.00	25.956		25.075		98.03	93.35
	25.515	25.710	25.382	25.204		
	25.659		25.154			
40.50	40.272		38.340		95.36	94.22
	39.560	40.016	38.036	38.158		
	40.215		38.098			
60.75	60.693		57.813		95.84	95.42
	60.121	60.487	57.938	57.968		
	60.648		58.154			

表5 斑马鱼急性毒性试验各处理药液浓度实验数据

设计质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	0 h 实测/(mg·L ⁻¹)		96 h 实测/(mg·L ⁻¹)		96 h 实测浓度与0 h 实测浓度比值/%	96 h 实测浓度与 设计浓度比值/%
	质量浓度	平均值	质量浓度	平均值		
100	98.223		97.089		97.99	96.67
	99.258	98.646	96.180	96.673		
	98.457		96.749			

3 结论

本研究采用高效液相色谱法,以甲醇+水(体积比为60:40)为流动相,使用Pgrandsil-STC-C₁₈液相色谱柱分离,紫外检测器测定S-诱抗素质量浓度。试验结果表明,本分析方法准确度、灵敏度良好。

在98% S-诱抗素原药对藻类生长抑制试验、藻类急性活动抑制试验和鱼类急性毒性试验期间,结果表明供试物的实测浓度均不低于设计浓度的80%,可用设计浓度来计算藻类生长抑制EC₅₀值、藻类急性活动抑制EC₅₀值和鱼类急性毒性LC₅₀值。

参考文献

- [1] 李如男,董丰收,吴小虎,等. 农药对农产品营养和风味的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 31-37.
- [2] 肖军,赵景波. 农药污染对生态环境的影响及防治对策[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(12): 2376-2377.
- [3] 靳聪聪,杨扬,刘帅磊,等. 农村废水农药污染的生态修复技术研究[J]. 生态环境学报, 2017, 26(1): 142-148.
- [4] 刘芳,黄潇潇,季国荣,等. 斑马鱼在农药生态风险评估中的应用[J]. 毒理学杂志, 2016(3): 243-246.
- [5] 陈蔚洁,杨爱江,胡霞,等. 斜生栅藻对不同形态砷胁迫的响应及抗性研究[J]. 西北植物学报, 2018, 38(4): 108-115.
- [6] 吴慧明,陈颖,胡婷婷,等. 农药和重金属复合污染物对大型溞的毒性效应[J]. 农药学报, 2017, 19(6): 716-722.
- [7] 王丰,陈彤,杨达汉,等. 草铵膦对斑马鱼胚胎及仔鱼的毒性研究[J]. 农药学报, 2016, 18(3): 323-329.
- [8] 袁传卫,姜兴印. 5% S-诱抗素水剂对巨峰葡萄着色和贮藏期果实品质的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2013(6): 14-17.
- [9] 李刚,张风文,姚晨涛,等. 干旱胁迫下S-诱抗素对玉米幼苗生长及生理作用的影响[J]. 植物生理学报, 2017(9): 1711-1716.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 31270.14—2014 化学农药环境安全评价试验准则第14部分 藻类生长抑制试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 31270.13—2014 化学农药环境安全评价试验准则第13部分 藻类急性活动抑制试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 31270.12—2014 化学农药环境安全评价试验准则第12部分 鱼类急性[S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- [13] 徐慧敏,施婷婷,檀华蓉,等. 高效液相色谱法同时测定蔬菜中有机酸与磺胺类抗生素[J]. 分析试验室, 2016(10): 1135-1139.

(责任编辑:石凌波)