

◆ 加工与分析 ◆

农药沉积利用率喷雾指示剂诱惑红的酶标仪测定方法

石 鑫,高赛超,杨代斌,袁会珠,闫晓静*

(中国农业科学院 植物保护研究所,北京 100193)

摘要:诱惑红是一种水溶性染料,近年来被用作农药沉积利用率测定的指示剂。诱惑红的检测方法为高效液相色谱法和分光光度法。高效液相色谱法需要专门的分析仪器,且价格昂贵,可见分光光度计法操作繁琐,试剂用量大,耗时长,均不适宜田间快速高效测定。笔者发展了诱惑红的酶标仪测定方法,简单高效,可批量检测多个样品,且准确度和精密度高,线性关系良好,514 nm检测波长下不受其他农药影响,并应用于玉米无人飞机喷雾场景下农药雾滴在玉米冠层的沉积利用率测定。

关键词:农药沉积利用率;诱惑红;酶标仪;方法验证

中图分类号:TQ450.7 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.01.007

High-throughput Quantification of Allura Red Trace Used in Determining Pesticide Deposition Utilization by Microplate Reader

SHI Xin, GAO Saichao, YANG Daibin, YUAN Huizhu, YAN Xiaojing*

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Allura red is a water-soluble dye which is used as a trace in determination of pesticide deposition utilization in recent years. High performance liquid chromatography (HPLC) and UV-Vis spectrophotometry are common methods to determine the content of allura red. However, HPLC method is expensive in instruments and reagent while UV-Vis spectrophotometry method is time-consuming, inconvenience of operation. Both of these methods are not suitable for rapid and efficient determination in field trial. In this paper, a simple and rapid method for determination of allura red was developed, which could detect multiple samples in batches with high accuracy and precision and good linear relationship by microplate reader. The detection wavelength of allura red was 514 nm, which was not affected by most of pesticides. This method was also verified in the scenario of measuring the pesticide deposition utilization rate in the corn canopy by UAV spraying.

Key words: pesticide deposition utilization rate; allura red; microplate reader; method validation

我国是一个农业有害生物频发、重发的国家。近年来,年均病虫草鼠害发生面积70多亿亩次,防治面积达85亿亩次左右,年均使用农药量(折百量)30万吨左右^[1-2]。我国的农药品种90%以上通过施药机械进行叶面喷施,所以施药机械质量、喷雾技术直接影响到农药的利用率。此外作物种类、施药时

作物所处的生长阶段,以及施药组织方式等也影响农药的利用率^[3-4]。我国在20世纪90年代开始关注农药利用率的问题,我国农药利用率主要依据作物靶标农药沉积量占施药总量的比率来测算^[5]。

在叶面喷雾施药过程中,测定作物靶标上农药沉积量的方法主要有化学测定法和指示剂法^[6]。化

收稿日期:2020-01-18

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0201305)

作者简介:石鑫(1995—)男,河南洛阳人,硕士研究生,研究方向为植保无人飞机使用技术。E-mail: 82101185114@caas.cn

通信作者:闫晓静(1981—)女,河南周口人,博士,副研究员,主要从事农药使用技术研究。E-mail: yanxiaojing@caas.cn

学测定法需针对不同药剂采用不同的提取和分析方法,样品处理繁琐,且需要有专门的专用分析仪器和试剂。指示剂法就是把染色剂或荧光剂加入药液体系中,通过测定指示剂的沉积量来表征农药在靶标作物上的沉积量。然而很多荧光指示剂的光稳定性差,需要喷雾后快速进行试验,否则荧光剂降解会对试验结果产生较大影响。因此指示剂法的关键就是选择对光稳定、易从靶标洗脱并且安全的示踪剂。

诱惑红具有良好的光稳定性和水解稳定性,易从靶标作物上洗脱,并且作为一种食品添加剂,其具有很高的安全性,因此我们选择诱惑红作为农药沉积利用率测定的示踪剂^[7]。

目前诱惑红常用的检测方法为高效液相色谱法和可见分光光度计法。高效液相色谱法需要专门的分析仪器,价格昂贵,且不宜田间快速高效测定。紫外可见分光光度法相对于高效液相色谱法成本大大降低,但是其操作繁琐,每次只能测定几个样品,而且试剂用量很大,耗时很长,显然不适合田间大量试验样品的测定。酶标仪法和紫外可见分光光度法对物质含量测定具有相同的理论基础,均服从朗伯比尔定律。利用酶标仪测定物质含量时通过采用24孔、48孔或96孔酶标板来进行测定,每个样品管只需添加200 μL 的待测溶液。很显然,酶标仪法具有更高效,试剂用量少的特点,适用于大批量样品的快速检测^[8]。考虑到农药沉积率测定的场景多样化,样品量大,采用酶标仪进行诱惑红测定具有十分重要的现实意义。笔者发展了诱惑红的酶标仪测定方法,并对方法进行了验证和应用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

85%诱惑红,浙江吉高德色素科技有限公司;蒸馏水、FlexStation 3多功能酶标仪,美谷分子仪器有限公司;T-16大疆植保无人机,深圳市大疆创新科

技有限公司;AL204电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 诱惑红标准曲线

准确称取0.02 g(精确至0.000 1 g)诱惑红于100 mL容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,作为标准储备液。用蒸馏水把上述标准储备液进行梯度稀释,得到0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0和50.0 mg/L的标准溶液,用酶标仪于波长514 nm处检测其吸光度值,每个浓度连续测定3次取平均值,以诱惑红浓度为横坐标,对应的吸光度值为纵坐标,绘制诱惑红标准曲线。

1.3 精密度和准确度测定

配置5.0、10.0和25.0 mg/L的诱惑红标准溶液,用酶标仪于波长514 nm处检测其吸光度值,通过诱惑红标准曲线计算配置溶液浓度,每个浓度平行测定6次。根据6次平行测定的相对标准偏差(RSD)和回收率,评价诱惑红酶标仪测定方法的精密度和准确度。

1.4 诱惑红酶标仪测定方法的实际应用

本研究将诱惑红酶标仪测定方法应用于华北玉米田植保无人飞机喷雾场景下农药雾滴在玉米冠层的沉积利用率测定,具体试验方法如下。实验地点:河北省石家庄市藁城区韩家洼村(海拔54 m,北纬40°16'5",东经117°2'37")。植保无人飞机型号:T-16;飞行参数:速度为4 m/s,高度为2 m(距离作物),施药量:15 L/hm²。进行每个试验处理时,将10.0 g诱惑红作为指示剂加入到药液中进行喷雾,根据设定的飞行参数进行喷施。喷雾结束后,每个小区随机选取10个点,每点取1株玉米植株,加入100 mL的水洗涤玉米植株上的诱惑红,洗涤液用酶标仪测得吸光度值。根据诱惑红的标准曲线和样品的吸光度计算出洗涤液中诱惑红的浓度,从而计算出试验区诱惑红在单位面积玉米植株上的沉积量,然后除以试验区单位面积的施用总量。农药沉积利用率按式(1)计算。

$$\text{沉积率}/\% = \frac{\text{样品诱惑红浓度} \times \text{洗脱液体积} \times \text{种植密度}}{\text{单位面积施用总量}} \times 100 \quad (1)$$

式中:样品中诱惑红浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$;洗脱液体积 mL ;种植密度 $\text{株}/\text{m}^2$;单位面积施用总量 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

在本次试验中,取100 mg/L诱惑红标准溶液,用UV2100型紫外-可见分光光度计进行全波长扫描。

经扫描后发现,波长扫描范围为190~700 nm,紫外-可见光吸收光谱见图1。诱惑红在514 nm处具有较强吸收,考虑到大多数农药在514 nm处基本无吸收峰,因此选择514 nm作为诱惑红酶标仪测定的检测波长。

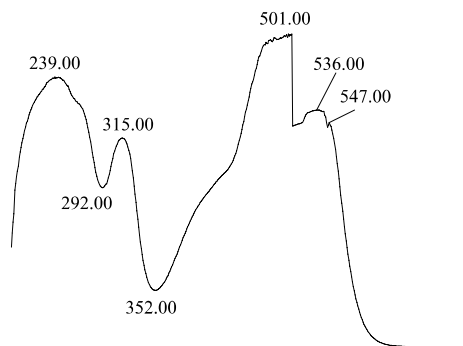


图1 诱惑红紫外-可见光吸收光谱图

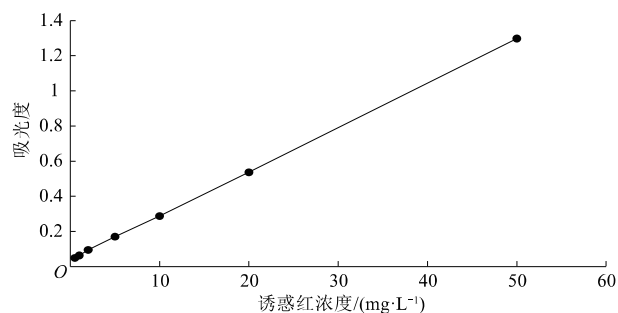


图2 诱惑红标准曲线

2.2 分析方法的线性相关试验

将1.2中配制的标准溶液在选定的514 nm下进行测定,并绘制诱惑红标准曲线(图2)。结果表明,诱惑红在0.5~50.0 mg/L内,具有良好的线性关系,其吸光度值对浓度的回归方程为 $y=0.0251x+0.0394$, $R^2=0.9999$,符合定量要求。

2.3 分析方法的精密度和准确度

分别取5.0、10.0和25.0 mg/L的诱惑红标准溶液,用酶标仪于波长514 nm处检测其吸光度值,通过诱惑红标准曲线计算配置溶液浓度。6次平行测定的相对标准偏差(RSD)在2.51%~3.76%,回收率在102.87%~105.93%(表1),说明发展的诱惑红酶标仪测定方法是准确可靠的,符合定量分析的要求。

表1 诱惑红酶标仪测定精密度和准确度结果

浓度/(mg·L ⁻¹)	重复1	重复2	重复3	重复4	重复5	重复6	均值	回收率/%	RSD值/%
5.0	5.08	5.10	5.09	5.12	5.08	4.95	5.14	102.87	3.11
10.0	10.25	10.89	11.02	10.45	9.98	10.36	10.59	105.93	3.76
25.0	24.25	24.89	24.65	24.40	24.96	25.25	25.87	103.49	2.51

2.4 诱惑红酶标仪测定方法的实际应用

为考察诱惑红酶标仪测定方法的实际应用价值,笔者将该方法应用于玉米田植保无人飞机喷雾场景下农药雾滴在玉米冠层的沉积利用率测定。典型的植保无人飞机施药场景见图3。按照1.4描述的方法进行沉积在玉米冠层诱惑红的收集及沉积利用率测定。在不添加助剂、亩施药液量为1 L且植保无人飞机飞行速度为4 m/s时,诱惑红在玉米田冠层的农药沉积利用率为39.3%。



图3 华北玉米无人机施药典型场景

3 结论

诱惑红作为农药示踪剂被广泛应用,其具有水溶性好,对药剂黏度、表面张力、密度、雾滴谱及沉积无显著影响等优点^[7]。发展的诱惑红酶标仪测定方法简单方便快捷,可批量检测多个样品,且准确

度和精密度高,线性关系良好,514 nm检测波长下不受其他农药影响。相较于高效液相色谱仪,酶标仪更容易普及且适用于田间样品的快速高效测定,可为不同施药场景下农药沉积利用率的测定提供准确高效的方法。

参考文献

- [1] 束放,郭永旺. 2018年农作物有害生物防治和农药械市场需求预测[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(5): 69-71.
- [2] 李永平. 2018年农药械市场特点及2019年趋势展望[J]. 农药市场信息, 2018(30): 41-42.
- [3] 闫晓静,杨代斌,薛新宇,等. 中国农药应用工艺学20年的理论研究与技术概述[J]. 农药学报, 2019, 21(5): 908-920.
- [4] 何雄奎. 中国植保机械与施药技术研究进展 [J]. 农药学报, 2019, 21(5): 921-930.
- [5] 袁会珠,杨代斌,闫晓静,等. 农药有效利用率与喷雾技术优化[J]. 植物保护, 2011, 37(5): 14-20.
- [6] 屠豫钦. 农药使用技术标准化[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001: 218.
- [7] GAO S C, WANG G B, ZHOU Y Y, et al. Water soluble food dye of allura red as a tracer to determine the spray deposition of pesticide on target crops[J]. Pest Management Sciences, 2019, 75: 2592-2597.
- [8] 张恩芬,查飞,周建宝,等. 酶标仪法测定发酵液中谷胱甘肽的含量[J]. 滁州学院学报, 2019, 21(5): 31-34.

(责任编辑:高蕾)