

李 勇, 龙 玲, 余向阳. 叶菜根系分泌物成分鉴定及对 2 种结合态农药的活化差异[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(23): 222–227.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.053

叶菜根系分泌物成分鉴定及对 2 种结合态农药的活化差异

李 勇, 龙 玲, 余向阳

(省部共建国家重点实验室培育基地—江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:研究首先基于 GC-TOF/MS(气相色谱飞行时间质谱联用仪)对叶菜根系分泌物成分进行定性分析,然后选取单一根系分泌物成分如有机酸、氨基酸、糖类对土壤中结合态苯醚甲环唑和吡虫啉的活化规律进行研究。试验结果表明,基于 GC-TOF/MS 分析叶菜根系分泌物样品共检测出 535 个特征质谱峰,基于 FiehnBinbase 数据库共定性出的 75 个化合物,包括糖醇类 20 个、氨基酸类 6 个、有机酸类 31 个、脂肪酸类 10 个、其他类 8 个。不同根系分泌物对土壤中 2 种结合态农药的活化差异存在显著差异,其中对结合态苯醚甲环唑的活化效果为草酸>柠檬酸>丙氨酸>甘氨酸>葡萄糖>果糖,而对结合态吡虫啉的活化效果为柠檬酸>草酸>果糖>葡萄糖>甘氨酸>丙氨酸。另外,同一根系分泌物对结合态苯醚甲环唑的活化效果要高于吡虫啉,这可能与农药的物理化学性质相关,如辛醇比分配系数($\lg K_{ow}$)等。研究结果对农产品安全生产以及有效地评价土壤残留农药的危害风险具有重要的理论指导意义。

关键词:根系分泌物;结合态农药;吡虫啉;苯醚甲环唑;有机酸

中图分类号: S481⁺.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0222-05

我国是农业大国,农药是保障农业丰收的重要手段。然而,农业生产中高毒性、高残留、难降解农药的长期使用,致使农药大量残留于土壤、地下水 and 大气中,造成严重的环境污染^[1-4]。农药长期残留于土壤中会与其中的有机质形成结合态残留,可以降低农药毒性,使其生物有效性低,且农药结合态残留不能被植物和微生物直接吸收降解^[5-8]。农药结合态残留会受土壤环境影响转化为可提取态,其生物有效性较高,具有高毒性,会对环境再次造成危害^[9-12]。Gao 等研究发现,土壤种植作物根系可以向土壤中释放多种可溶性低分子活性有机物质,其与土壤有机污染物的亲和力一般大于有机污染物与土壤有机质的亲和能力,所以可以促进土壤中结合形态农药残留的解吸,即起到了活化的作用^[13]。Nardi 等发现,植物根系分泌的有机酸能够活化土壤中的有机质,试验通过外加有机酸证明,低分子量有机酸能够通过螯合无机离子来部分瓦解土壤结构,从而促使结合态的有机污染物解析,提高其生物有效性^[14]。Luo 等通过外加有机酸试验证实,植物根系分泌物以及草酸盐都可以促进土壤中 DDT(滴滴涕)结合态残留的解吸^[15]。本研究拟首先基于 GC-TOF/MS(气相色谱飞行时间质谱联用仪)对叶菜蔬菜根系分泌物成分进行定性分析,然后选取单一根系分泌物成分如有机酸、氨基酸、糖类对土壤中结合态苯醚甲环唑和吡虫啉的活化规律进行

研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试蔬菜为高梗白白菜,购自福州农播王种苗有限公司。供试农药包括:吡虫啉标准品,分析纯,购买于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;苯醚甲环唑标准品,分析纯,购买于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。

主要仪器包括高效液相色谱质谱联用仪(HPLC-MS/MS),Agilent 1290-6470,USA;气相色谱飞行时间质谱联用仪(GC-TOF/MS),Agilent 7890B-LECO Chroma TOF PEGASUS HT,USA;高速离心机,TG16-WS 型,长沙湘智离心机仪器有限公司;微型旋涡混合仪,WH-3,上海沪西分析仪器厂有限公司;电子天平,AP2500-0 型,瑞士 Ohaus;超纯水仪,Direct-R 公司;ALPHA 1-2 LD plus 型冷冻干燥机,德国 Christ;高通量样品振荡仪,Thmorgan。

主要试剂包括:氯化钠,分析纯,西陇化工股份有限公司;乙腈,HPLC,德国 Merck 公司;无水硫酸镁(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)(德国 CNW Technologies);石墨化炭黑(GCB)(德国 CNW Technologies);双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)[含体积分数为 1% 的三甲基氯硅烷(TMCS)](美国 REGIS Technologies);甲氧胺盐试剂(分析纯,日本 TCI)。

1.2 叶菜根系分泌物的提取及定性分析

1.2.1 叶菜根系分泌物的提取 根系分泌物收集试验在江苏省农业科学院实验室中进行,供试的叶菜类蔬菜为高梗白白菜,种子经 50~60℃ 的温水浸泡 1 h,将浮在水面的种子挑出,剩余的种子均匀铺在上下贴有湿润滤纸的培养皿中,放于阴凉处 24 h 后查看长势,待出芽后,将种子播在装有营养液

收稿日期:2019-09-17

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0200203);江苏省自然科学基金(编号:BK20160576);国家自然科学基金(编号:31601665)。

作者简介:李 勇(1987—),男,黑龙江鹤岗人,博士,副研究员,主要从事农产品质量安全研究。E-mail:liyong_213@163.com。

通信作者:余向阳,博士,研究员,主要从事农产品质量安全研究。

E-mail:yuxy@jaas.ac.cn。

的塑料盒中,培养过程中按需补充营养液。水培营养液使用的营养液配方参照文献[16]。待蔬菜生长至 8 张叶片后,选取长势较好的 1 株植株,用二级蒸馏水冲洗干净,移入含 50 mL 超纯水的棕色广口瓶中,将瓶盖用锡箔纸裹住,尽量减少水分蒸发,置于光照培养箱光照 24 h。将植株取出,并利用超纯水对叶菜根系进行冲洗,将冲洗液与棕色广口中剩余溶液混合,并装于 50 mL 试管中,冷冻于 -20 ℃ 冰箱中,待使用。

1.2.2 根系分泌物样品的预处理 将冷冻后的根系分泌物置于冻干机中冻干,然后用 2.5 mL 乙腈复溶。取样本 2 mL 于进样瓶(已甲烷硅基化的)中,置于真空浓缩器中将提取物干燥;再加入 20 μ L 甲氧胺盐试剂,混匀后,放入温度为 80 ℃ 的烘箱中 30 min;再加入 BSTFA 30 μ L,于温度为 70 ℃ 的烘箱中 1.5 h;混匀,上机检测。取样本 2 mL 于进样瓶(已甲烷硅基化的)中,置于真空浓缩器中将提取物干燥;再加入 20 μ L 甲氧胺盐试剂,混匀后,放入温度为 80 ℃ 的烘箱中 30 min;再加入 BSTFA 30 μ L,于温度为 70 ℃ 的烘箱中 1.5 h;混匀,上机检测。

1.2.3 根系分泌物的检测 利用 GC-TOF/MS 仪器对根系分泌物样品进行检测,具体仪器条件如下:色谱柱为 Agilent DB-5MS 毛细管柱(30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, J & W Scientific, Folsom, CA, USA);进样量为 1 μ L,不分流模式;载气为氦气;前进样口吹扫流速为 3 mL/min;柱流速为 1 mL/min;柱温为 50 ℃ 保持 1 min,以 10 ℃/min 上升至 310 ℃,保持 8 min;前进样口温度为 280 ℃;传输线温度为 270 ℃;离子源温度为 220 ℃;电离电压为 70 eV;扫描方式为 50~500 m/z ;扫描速率为 20 spectra/s;溶剂延迟为 6.1 min。

1.2.4 根系分泌物的定性分析 利用 MS-DIAL 软件对质谱数据进行峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析,然后利用 FiehnBinbase 数据库对质谱峰进行定性分析,包括质谱匹配及保留时间指数匹配,具体步骤参照文献[17-18]。

1.3 不同根系分泌物对土壤中结合态农药的活化

1.3.1 含结合态农药的土壤制备 土壤样品取自江苏省农业科学院大田未施药地块,将采回的土壤样品置于阴凉、通风的房间内。当土壤样品达到干燥状态时,用木锤粉碎成沫,然后过 60 目筛。将土置于密封的玻璃罐中,分别加入用丙酮溶解的高浓度吡虫啉或苯醚甲环唑,混匀后加入超纯水使土壤含水量为 30%,置于阴凉处密封保存 60 d,即得到老化后的土壤。分别称取苯醚甲环唑老化土和吡虫啉老化土 10.00 g,分别置于 50 mL 塑料试管中,加入丙酮和二氯甲烷(体积比=1:1),共 10 mL,振荡 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,倒掉其提取液,再加入相同的提取液,再同上操作 1 遍。将提取过后的土壤晾干,磨碎,过 60 目筛,最终制备成含结合态农药的试验土。

1.3.2 不同根系分泌物对土壤中结合态农药的活化试验 称取试验土 1.0 g 置于 50 mL 塑料试管中,2 种药剂分别称取 185 个样品,各加入 30 mL 不同浓度的草酸、柠檬酸、丙氨酸、甘氨酸、葡萄糖、果糖,浓度梯度为 0.001、0.01、0.1、1.0、3.0、5.0 mg/L,对照组加入 30 mL 超纯水,每个样品首先涡旋 2 min,置于控温摇床(250 r/min,25 ℃)振荡 24 h 后,离心

10 min,取上层清液和甲醇(体积比=1:1)涡旋 2 min,取 1 mL 过 0.45 μ m 有机滤膜,待上机分析。

1.3.3 农药检测方法 本试验用 LC-MS 对苯醚甲环唑和吡虫啉进行检测,具体仪器参数如下:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.7 μ m);柱温为 28 ℃;进样量为 5.0 μ L;流动相 A 为水,B 为乙腈(测定吡虫啉)/甲醇(测定苯醚甲环唑)。梯度洗脱条件为 0~0.8 min,90% A;0.8~1.0 min,90%~10% A;1.0~3.5 min,10% A;3.5~3.8 min,10%~90% A,3.8~5.0 min,90% A。流速为 0.3 mL/min;离子源为电喷雾离子源 ESI(+);扫描模式为多反应离子监测模式(MRM);离子源温度为 150 ℃;脱溶剂气温为 400 ℃;电喷雾电压为 3.0 kV;脱溶剂气体流速为 800 L/h。吡虫啉和苯醚甲环唑的定性及定量离子对信息见表 1。

表 1 LC-MS 测定吡虫啉和苯醚甲环唑的定性定量信息

| 化合物 | 母离子 m/z | 子离子 m/z | 碎裂电压 (V) | 碰撞能量 (V) |
|-------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 吡虫啉 | 256.1 | 209(定量) | 120 | 10 |
| | 256.1 | 175(定性) | 120 | 10 |
| 苯醚甲环唑 | 406.3 | 291.1(定量) | 130 | 20 |
| | 406.3 | 250.9(定性) | 130 | 30 |

1.3.4 标准曲线的建立 精确称取吡虫啉、苯醚甲环唑标准品(精确至 0.000 1 g),用甲醇溶剂配制成 100 mg/L 的标准液,存于 4 ℃ 待用。然后用乙腈稀释标准母液配得 5.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02 mg/L 系列标准溶液,以标准溶液浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 叶菜根系分泌物的定性分析

根系分泌物是指在植物生长过程中根系不同部位向根际环境中分泌或释放的各种化合物,包括低分子量的初级代谢产物和次级代谢产物,它是植物与土壤进行物质交换和信息传递的重要载体物质^[8]。GC-TOF/MS 测定叶菜根系分泌物的 TIC(总离子流)见图 1。利用 MS-DIAL 软件对质谱数据进行分析,共检测出 535 个化合物,然后基于 FiehnBinbase 数据库共定性出 75 个化合物(表 2)。定性出的糖醇类化合物(20 个)包括苏阿糖醇、木糖、核糖、6-脱氧-D-葡萄糖、核糖醇、二聚丙三醇、塔格糖、山梨糖、果糖、葡萄糖、山梨醇、肌醇、蔗糖、乳糖、纤维二糖、麦芽糖、槐糖醇、甘油、龙胆二糖、半乳糖;定性出的氨基酸类化合物(6 个)包括缬氨酸、焦谷氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸;定性出的有机酸类化合物(31 个)包括丙酮酸、乳酸、乙醇酸、草酸、3-羟基丁酸、丙二酸、2-羟基戊酸、甲基丙二酸、4-羟基丁酸、2-酮己二酸、磷酸、苯乙酸、琥珀酸、D-甘油酸、氢化肉桂酸、3,4-二羟基丁酸、苹果酸、水杨酸、4-氨基丁酸、蔗糖酸、邻苯二甲酸、D-甘油 1-磷酸、葡萄糖-1-磷酸、对苯二甲酸、壬二酸、柠檬酸、奎宁酸、D-半乳糖醛酸、葡萄糖酸、糖庚酸、苯甲酸;定性出的脂肪酸类化合物(10 个)包括辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈烯酸、棕榈酸、反油酸、油酸、硬脂酸、二十烷酸、二十四酸;定性出的其他类化合物(8 个)包括 2-羟基吡啶、羟

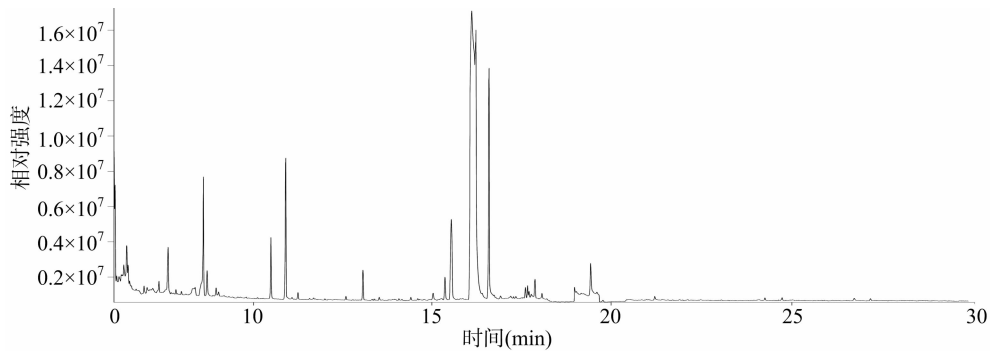


图1 高梗白根系分泌物的 TIC

表 2 高梗白根系分泌物的 GC - TOF/MS 分析结果

| 序号 | 时间 (min) | 英文名称 | 中文名称 | 类别 |
|----|-------------|------------------------------|------------------|------|
| 1 | 7.20 | 2 - hydroxypyridine | 2 - 羟基吡啶 | 其他类 |
| 2 | 7.34 | pyruvic acid | 丙酮酸 | 有机酸类 |
| 3 | 7.46 | lactic acid | 乳酸 | 有机酸类 |
| 4 | 7.69 | glycolic acid | 乙醇酸 | 有机酸类 |
| 5 | 8.07 | alanine | 丙氨酸 | 氨基酸类 |
| 6 | 8.26 | hydroxylamine | 羟胺 | 其他类 |
| 7 | 8.46 | oxalic acid | 草酸 | 有机酸类 |
| 8 | 8.76 | 3 - hydroxypyridine | 3 - 羟基吡啶 | 其他类 |
| 9 | 8.89 | 3 - hydroxybutyric acid | 3 - 羟基丁酸 | 有机酸类 |
| 10 | 9.52 | malonic acid | 丙二酸 | 有机酸类 |
| 11 | 9.60 | 2 - hydroxyvaleric acid | 2 - 羟基戊酸 | 有机酸类 |
| 12 | 9.66 | methylmalonic acid | 甲基丙二酸 | 有机酸类 |
| 13 | 9.66 | valine | 缬氨酸 | 氨基酸类 |
| 14 | 9.97 | 4 - hydroxybutyrate | 4 - 羟基丁酸 | 有机酸类 |
| 15 | 10.15 | 2 - ketoadipate | 2 - 酮己二酸 | 有机酸类 |
| 16 | 10.38 | ethanolamine | 乙醇胺 | 其他类 |
| 17 | 10.41 | caprylic acid | 辛酸 | 脂肪酸类 |
| 18 | 10.45 | phosphate | 磷酸 | 有机酸类 |
| 19 | 10.46 | glycerol | 甘油 | 糖醇类 |
| 20 | 10.74 | isoleucine | 异亮氨酸 | 氨基酸类 |
| 21 | 10.92 | phenylacetic acid | 苯乙酸 | 有机酸类 |
| 22 | 10.93 | glycine | 甘氨酸 | 氨基酸类 |
| 23 | 11.06 | succinic acid | 琥珀酸 | 有机酸类 |
| 24 | 11.23 | D - glycericacid | D - 甘油酸 | 有机酸类 |
| 25 | 11.39 | uracil | 尿嘧啶 | 其他类 |
| 26 | 12.22 | thymine | 胸腺嘧啶 | 其他类 |
| 27 | 12.53 | hydrocinnamic acid | 氢化肉桂酸 | 有机酸类 |
| 28 | 12.58 | 3,4 - dihydroxybutanoic acid | 3,4 - 二羟基丁酸 | 有机酸类 |
| 29 | 12.89 | threose | 苏氨酸 | 氨基酸类 |
| 30 | 12.98 | capric acid | 癸酸 | 脂肪酸类 |
| 31 | 13.30 | malic acid | 苹果酸 | 有机酸类 |
| 32 | 13.41 | threitol | 苏阿糖醇 | 糖醇类 |
| 33 | 13.63 | salicylic acid | 水杨酸 | 有机酸类 |
| 34 | 13.79 | oxoproline | 焦谷氨酸 | 氨基酸类 |
| 35 | 13.84 | 4 - aminobutyric acid | 4 - 氨基丁酸 | 有机酸类 |
| 36 | 14.15 | threonic acid | 苏糖酸 | 有机酸类 |
| 37 | 15.35 | xylose | 木糖 | 糖醇类 |
| 38 | 15.52 | ribose | 核糖 | 糖醇类 |
| 39 | 15.79 | phthalic acid | 邻苯二甲酸 | 有机酸类 |
| 40 | 15.97 | 6 - deoxy - D - glucose | 6 - 脱氧 - D - 葡萄糖 | 糖醇类 |

表 2(续)

| 序号 | 时间 (min) | 英文名称 | 中文名称 | 类别 |
|----|-------------|--|--|------|
| 41 | 16.15 | ribitol | 核糖醇 | 糖醇类 |
| 42 | 16.26 | putrescine | 腐胺 | 其他类 |
| 43 | 16.48 | <i>D</i> - glycerol 1 - phosphate | <i>D</i> - 甘油 1 - 磷酸 | 有机酸类 |
| 44 | 16.55 | glucose - 1 - phosphate | 葡萄糖 - 1 - 磷酸 | 有机酸类 |
| 45 | 16.55 | diglycerol | 二聚丙三醇 | 糖醇类 |
| 46 | 16.88 | terephthalic acid | 对苯二甲酸 | 有机酸类 |
| 47 | 16.92 | azelaic acid | 壬二酸 | 有机酸类 |
| 48 | 16.98 | citric Acid | 柠檬酸 | 有机酸类 |
| 49 | 17.29 | tagatose | 塔格糖 | 糖醇类 |
| 50 | 17.48 | quinic acid | 奎宁酸 | 有机酸类 |
| 51 | 17.49 | myristic Acid | 肉豆蔻酸 | 脂肪酸类 |
| 52 | 17.56 | sorbose | 山梨糖 | 糖醇类 |
| 53 | 17.62 | fructose | 果糖 | 糖醇类 |
| 54 | 17.87 | glucose | 葡萄糖 | 糖醇类 |
| 55 | 18.26 | sorbitol | 山梨醇 | 糖醇类 |
| 56 | 18.34 | <i>D</i> - galacturonic acid | <i>D</i> - 半乳糖醛酸 | 有机酸类 |
| 57 | 18.86 | gluconic acid | 葡萄糖酸 | 有机酸类 |
| 58 | 19.24 | palmitoleic acid | 棕榈烯酸 | 脂肪酸类 |
| 59 | 19.43 | palmitic acid | 棕榈酸 | 脂肪酸类 |
| 60 | 19.77 | myo - inositol | 肌醇 | 糖醇类 |
| 61 | 19.93 | <i>N</i> - acetyl - β - <i>D</i> - mannosamine | <i>N</i> - 乙酰基 - β - <i>D</i> - 甘露糖胺 | 其他类 |
| 62 | 20.08 | glucoheptonic acid | 糖庚酸 | 有机酸类 |
| 63 | 21.02 | elaidic acid | 反油酸 | 脂肪酸类 |
| 64 | 21.04 | oleic acid | 油酸 | 脂肪酸类 |
| 65 | 21.23 | stearic acid | 硬脂酸 | 脂肪酸类 |
| 66 | 22.87 | arachidic acid | 二十烷酸 | 脂肪酸类 |
| 67 | 24.30 | sucrose | 蔗糖 | 糖醇类 |
| 68 | 24.40 | behenic acid | 苯甲酸 | 有机酸类 |
| 69 | 24.78 | lactose | 乳糖 | 糖醇类 |
| 70 | 25.00 | cellobiose | 纤维二糖 | 糖醇类 |
| 71 | 25.06 | maltose | 麦芽糖 | 糖醇类 |
| 72 | 25.21 | sophorose | 槐糖醇 | 糖醇类 |
| 73 | 25.81 | gentiobiose | 龙胆二糖 | 糖醇类 |
| 74 | 25.84 | lignoceric acid | 二十四酸 | 脂肪酸类 |
| 75 | 26.77 | galactinol | 半乳糖醇 | 糖醇类 |

胺、3 - 羟基吡啶、乙醇胺、尿嘧啶、胸腺嘧啶、腐胺、*N* - 乙酰基 - β - *D* - 甘露糖胺。另外,已定性出的糖醇类、氨基酸类、有机酸类、脂肪酸类、其他类化合物分别占定性出化合物总量的 26.7%、8.0%、41.3%、13.3%、10.7%,可见定性出的有机酸类化合物占比最高,这与检测仪器以及数据库容量有关系。

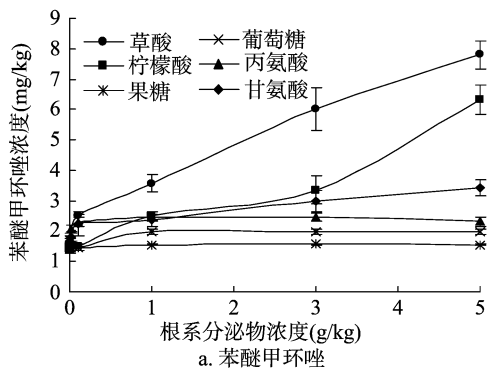
2.2 不同根系分泌物对土壤中 2 种结合态农药的活化差异

根据已鉴定出的叶菜根系分泌物,选取单一有机酸(柠檬酸、草酸)、氨基酸(丙氨酸、甘氨酸)、糖类(葡萄糖、果糖)对土壤中 2 种结合态农药的活化规律进行研究。试验中通过测定土壤中可提取态农药残留来判断不同根系分泌物对土壤中结合态农药的活化效果,即可提取态含量越高,表明该根系分泌物成分对土壤中结合态农药的活化效果越好。含结合态农药土壤中添加不同浓度根系分泌物后可提取态农药含量见图 2,可以发现不同根系分泌物对土壤中结合态农药的活化

效果差异很大。根据不同根系分泌物对土壤中结合态苯醚甲环唑的活化结果(图 2 - a),可知柠檬酸、草酸、丙氨酸、甘氨酸、葡萄糖 5 个根系分泌物成分均对土壤中结合态苯醚甲环唑存在活化效果。柠檬酸、草酸、甘氨酸的活化效果随其浓度增加而增强。6 个根系分泌物中,草酸的活化效果最强,在其浓度为 5.0 g/kg 时,苯醚甲环唑可提取态的浓度达到了 7.80 mg/kg。在浓度为 0 ~ 0.1 g/kg 时,甘氨酸对结合态苯醚甲环唑的活化效果要大于柠檬酸,而二者浓度在 1.0 ~ 5.0 g/kg 时,柠檬酸对结合态苯醚甲环唑的活化效果要大于甘氨酸。丙氨酸和葡萄糖均在 1.0 g/kg 浓度时对土壤中结合态苯醚甲环唑的活化效果最强,此时,苯醚甲环唑可提取态的浓度分别是 2.35 mg/kg 和 1.97 mg/kg,而后随着其浓度的增加,土壤中结合态苯醚甲环唑活化效果基本没有变化。在含结合态苯醚甲环唑的土壤中添加不同浓度果糖后,可提取态苯醚甲环唑含量无显著差异,表明果糖对结合态苯醚甲环

唑没有活化效果。添加柠檬酸、草酸、丙氨酸、甘氨酸、葡萄糖后,土壤中可提取态苯醚甲环唑的平均浓度分别是 2.59、3.47、2.27、2.12、1.97 mg/kg,其可提取态浓度分别是对照组的 1.82、2.45、1.60、1.49、1.21 倍。由此可以判断 6 个根系分泌物的活化效果为草酸 > 柠檬酸 > 丙氨酸 > 甘氨酸 > 葡萄糖 > 果糖。

不同根系分泌物对土壤中结合态吡虫啉的活化结果见图 2-b,可以发现 6 个根系分泌物成分均对土壤中结合态吡虫啉存在活化效果。柠檬酸、草酸在 0~1.0 g/kg 浓度时,对结合态吡虫啉的活化效果随其浓度增加而增强,而在 1.0~5.0 g/kg 浓度时,对土壤中结合态吡虫啉的活化效果变化不



大。葡萄糖和果糖在最高浓度时对结合态吡虫啉的活化效果最强,此时,可提取态吡虫啉浓度分别为 2.56、2.64 mg/kg。甘氨酸浓度为 0.1 g/kg 时对土壤中结合态吡虫啉的活化效果最强,而后可提取态吡虫啉的浓度存在下降趋势。与甘氨酸类似,丙氨酸在浓度为 1.0 g/kg 时对土壤中结合态吡虫啉的活化效果最强。添加柠檬酸、草酸、丙氨酸、甘氨酸、葡萄糖、果糖后可提取态的苯醚甲环唑的平均浓度分别是 2.58、2.50、2.30、2.32、2.41、2.47 mg/kg,其可提取态浓度分别是对照组的 1.14、1.10、1.01、1.02、1.07、1.09 倍。由此可以判断 6 个根系分泌物成分的活化效果为柠檬酸 > 草酸 > 果糖 > 葡萄糖 > 甘氨酸 > 丙氨酸。

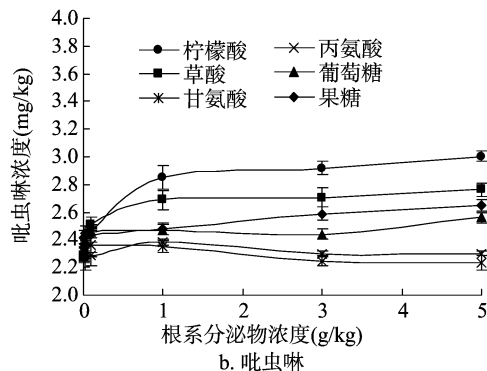


图2 含结合态农药土壤中添加不同浓度根系分泌物后可提取态苯醚甲环唑和吡虫啉的含量

从图 2 还可以看出,不同根系分泌物成分对土壤中 2 种结合态农药的活化效果差异很大,其中,对结合态苯醚甲环唑的活化效果为有机酸 > 氨基酸 > 糖类,而对结合态吡虫啉的活化效果为有机酸 > 糖类 > 氨基酸。总体可以看出,有机酸对结合态农药的活化效果要高于糖类和氨基酸。但就柠檬酸和草酸而言,其对土壤中结合态苯醚甲环唑的平均活化效果分别是对照组的 1.82 倍和 2.45 倍,明显高于对结合态吡虫啉的活化效果的 1.14 倍和 1.10 倍。这可能与农药本身的理化性质相关,相关研究表明,辛醇比分配系数越高,土壤中结合态农药占总量的比例越高^[2]。苯醚甲环唑和吡虫啉的辛醇比分配系数($\lg K_{ow}$)分别为 4.4 和 0.57,表明相比于吡虫啉,苯醚甲环唑在土壤中更易形成结合态。因此,土壤中结合态苯醚甲环唑占总量的比例高于吡虫啉。这可能导致同一根系分泌物对结合态苯醚甲环唑的活化效果要高于吡虫啉。

3 结论

本研究首先基于 GC-TOF/MS 对高梗白根系分泌物成分进行定性分析,共定性出 75 个化合物,其中包括糖醇类 20 个、氨基酸类 6 个、有机酸类 31 个、脂肪酸类 10 个、其他类 8 个,从其中选取柠檬酸、草酸、甘氨酸、草酸、葡萄糖和果糖对土壤中 2 种结合态农药的活化规律进行研究,研究结果表明,不同根系分泌物对土壤中 2 种结合态农药的活化效果存在显著差异,其中对结合态苯醚甲环唑的活化效果为草酸 > 柠檬酸 > 丙氨酸 > 甘氨酸 > 葡萄糖 > 果糖,而对结合态吡虫啉的活化效果为柠檬酸 > 草酸 > 果糖 > 葡萄糖 > 甘氨酸 > 丙氨酸。另外,同一根系分泌物对结合态苯醚甲环唑的活化效果要高于吡虫啉,这可能与农药的物理化学性质相关,如辛醇比分配系数($\lg K_{ow}$)等。

参考文献:

- [1] Geva B, Semple K T, Jones K C. Bound pesticide residues in soils; a review[J]. Environmental Pollution, 2000, 108(1): 3-14.
- [2] 郇红建, 蒋新. 土壤中结合残留态农药的生态环境效应[J]. 生态环境, 2004, 13(3): 399-402.
- [3] Wang X J, Piao X Y, Chen J, et al. Organochlorine pesticides in soil profiles from Tianjin, China[J]. Chemosphere, 2006, 64(9): 1514-1520.
- [4] 曾跃春, 高彦征, 凌婉婷, 等. 土壤中有机污染物的形态及植物可利用性[J]. 土壤通报, 2009, 40(6): 1479-1484.
- [5] Kelsey J W, Alexander M. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997, 32(3): 892-902.
- [6] 王海珍, 陈建明, 谢正苗, 等. 土壤中¹⁴C-甲磺隆存在形态的动态研究[J]. 土壤学报, 2001, 38(4): 547-557.
- [7] Feth Z H, Catherine S, Thierry H, et al. Root exudates mediated interactions belowground[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2014, 77: 69-80.
- [8] Lori A P, Charles W G, Richard E F, et al. Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered - hydrocarbon contaminated soil[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 52: 56-64.
- [9] Rogier F D, Leendert C, Peter A H. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere; a review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2012, 32(1): 227-243.
- [10] Valerie V, Klement R, Keith S, et al. Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose; a review[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 176(2): 175-199.
- [11] Ulrike B, Enrico M. Root exudates; the hidden part of plant defense

王永徐,邱天越,李 臣,等. 甘薯叶黄酮的基因型差异及磷酸氢二钾乙醇双水相提取工艺的响应面优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):227-231.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.054

甘薯叶黄酮的基因型差异及磷酸氢二钾乙醇双水相提取工艺的响应面优化

王永徐,邱天越,李 臣,叶夏芳,崔 鹏,曹如霞,陆国权

(浙江农林大学农业与食品科学学院/浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室/浙江农林大学薯类作物研究所,浙江临安 311300)

摘要:选用 20 个各地主栽品种,测其甘薯叶黄酮含量,其中观赏品种台湾红的黄酮含量最高,为 25.37 mg/g,徐薯 27 的黄酮含量最低,为 10.63 mg/g,不同品种间甘薯叶黄酮含量差异达到极显著水平($P < 0.01$)。不同品种间的甘薯叶黄酮含量为紫叶甘薯品种 > 绿叶紫薯品种 > 绿叶常规品种。超声辅助双水相法提取甘薯叶黄酮,在单因素试验的基础上,选取磷酸氢二钾用量、乙醇用量和样品量为自变量,甘薯叶黄酮得率为响应值,运用 Minitab 17 软件通过 Box-Behnken 试验设计及响应面分析法,分析各自变量之间交互作用对黄酮得率的影响,建立了黄酮得率的二次多项式回归方程的预测模型。各单因素及其交互作用对黄酮得率的影响,优化甘薯叶黄酮的提取工艺条件。结果表明,优化后的提取条件为磷酸氢二钾用量 3 g(30%),乙醇用量 3.06 g(30.65%),样品量是 0.45 g,此时最大萃取得率为 8.11%。

关键词:甘薯茎叶;双水相;黄酮;超声辅助

中图分类号: R284.2; TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)23-0227-05

甘薯 [*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill], 是旋花科 (Convolvulaceae) 薯蓣属一年生或多年生蔓生草本植物,别称红薯、地瓜、番薯、甜薯等。甘薯是粮食作物^[1]和经济作物,具有高产、稳产、适应性广等优点。我国是甘薯重要的产区之一,是甘薯种植的第一大国,我国甘薯种植面积占世界甘薯种植面积的 65% 左右,年产 1.2 亿 t,占世界甘薯产量的 86%。近几年,我国甘薯种植面积呈现缓慢下降趋势^[2],而种植专用型甘薯品种的面积在不断增加。随着消费多元化的发展,甘薯育种方向和加工方式都趋向于多元化发展。所以对甘薯

茎叶的资源再利用具有十分重要的价值。甘薯茎叶含有丰富的蛋白质、氨基酸、胡萝卜素、维生素 B、维生素 C 以及铁、钙、镁、钠等矿质元素,而且富含活性多糖、多酚和黄酮类化合物,具有清除自由基、调剂免疫力、抗疲劳、抗菌、抗肿瘤、抗糖尿病等一系列功能。随着天然产物的开发检测技术日趋成熟,关于甘薯抗氧化功能物质的研究越来越多。由于甘薯是我国重要的粮食经济作物,对于废弃甘薯茎叶的开发利用变得尤为重要。本研究应用新型提取方法优化提取的工艺条件,探究甘薯叶黄酮的最佳提取工艺条件,为甘薯叶黄酮的开发利用提供理论依据。

收稿日期:2018-09-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31671750);国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-B-18);浙江省重大科技专项(编号:2012C12902-3)。

作者简介:王永徐(1992—),男,山东临沂人,硕士,研究方向为甘薯茎叶功能成分。E-mail:w824981332@163.com。

通信作者:陆国权,博士,教授,研究方向为薯类品质评价及其产后商品化技术。E-mail:lugq10@zju.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 2017 年 5 月 9 日在浙江省杭州市临安区浙江农林平山试验基地种植徐薯 22。每个小区面积 3.6 m²,并扦插 60 株,3 次重复。8 月 5 日开始采收测定小区内的甘薯叶,间隔 10 d 再进行 1 次采收,至 8 月 25 日共采收 3 次;采收的甘薯叶片叶柄在 45 ℃ 烘干至恒质量,粉碎、过 90 目筛低

[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(2): 90-98.

[12] White J C. Differential bioavailability of field - weathered p,p' -DDE to plants of the *Cucurbita* and *Cucumis* genera [J]. Chemosphere, 2002, 49(20): 143-152.

[13] Gao Y, Ren L, Ling W, et al. Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1159-1165.

[14] Nardi S, Reniero F, Concheri G. Soil organic matter mobilization by root exudates of three maize hybrids [J]. Chemosphere, 1997, 35(10): 2237-2244.

[15] Luo L, Zhang S Z, Shan X Q, et al. Oxalate and root exudates

enhance the desorption of p,p' -DDT from soils [J]. Chemosphere, 2006, 63(8): 1273-1279.

[16] Li Y, Yang L, Yan H, et al. Uptake, translocation and accumulation of imidacloprid in six leafy vegetables at three growth stages [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 164: 690-695.

[17] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. Nature Methods, 2015, 12(6): 523-526.

[18] Li Y, Long L, Ge J, et al. Effect of imidacloprid uptake from contaminated soils on vegetable growth [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(26): 7232-7242.