

喹啉铜在枇杷上的消解、储藏稳定性及风险评估

徐小军¹, 付 岩², 王全胜², 张 亮², 吴银良^{2*}

(1. 浙江医药高等专科学校, 宁波 315100; 2. 宁波市农业科学研究院, 宁波 315040)

摘 要: **目的** 评估喹啉铜在枇杷中的残留消解、储藏稳定性和慢性膳食风险。**方法** 实验样品用草酸溶液提取, 亲水亲脂平衡(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)固相萃取柱净化, 超高效液相色谱检测, 外标法定量, 评估储藏稳定性和慢性膳食风险。**结果** 喹啉铜在枇杷上的消解速率符合一级动力学方程, 半衰期为 3.4~4.6 d。枇杷样品在-18 °C储藏 150 d, 喹啉铜的降解率小于 30%。膳食风险评估结果表明, 各年龄段人群喹啉铜的估算每日摄入量为 0.0891~0.6945 μg/kg bw/d, 膳食摄入风险为 0.45%~3.47%。**结论** 喹啉铜在枇杷中消解较迅速; 喹啉铜在枇杷样品中储藏稳定期至少为 150 d; 对不同年龄阶段人群的长期慢性膳食暴露风险极低, 均在可接受范围之内。

关键词: 喹啉铜; 枇杷; 消解; 储藏稳定性; 风险评估

Evaluation of residual digestion, storage stability and chronic dietary risk of oxine-copper in loquat

XU Xiao-Jun¹, FU Yan², WANG Quan-Sheng², ZHANG Liang², WU Yin-Liang^{2*}

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the residual digestion, storage stability and chronic dietary risks of oxine-copper in toloquat. **Methods** Loquat samples were extracted with oxalic acid, purified with hydrophilic-lipophilic balance (HLB) solid phase extraction column, finally detected by ultra performance liquid chromatography. The samples were quantified by external standard method. The storage stability and chronic dietary risk were assessed. **Results** The digestion rate of oxine-copper in loquat followed the first-order kinetics. The half-lives of oxine-copper in loquat were 3.4~4.6 d. Loquat samples were stored at -18 °C for 150 d, and the degradation rate of oxine-copper was less than 30%. The results of dietary risk assessment indicated that the estimated daily intake of oxine-copper for all age groups was 0.0891-0.6945 μg/kg bw/d, and the dietary intake risk was 0.45%-3.47%. **Conclusion** The digestion of oxine-copper in loquat was rapid. The stable storage period of oxine-copper in loquat samples is at least 150 d. The risk of long-term chronic dietary exposure for people of different ages is extremely low and within the acceptable range.

KEY WORDS: oxine-copper; loquat; dissipation; storage stability; risk assessment

基金项目: 宁波市农产品质量安全创新工程(2019CXGC006)

Fund: Supported by Ningbo Agricultural Product Quality and Safety Innovation Project (2019CXGC006)

*通讯作者: 吴银良, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wupaddyfield@sina.com

*Corresponding author: WU Yin-Liang, Ph.D, Professor, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, No.19, Dehou Road, Yinzhou District, Ningbo 315040, China. E-mail: wupaddyfield@sina.com

1 引言

喹啉铜是有机螯合铜杀菌剂,具有高效、广谱等特点,对真菌、细菌性病害都具有良好的防治效果^[1]。其作用机理是缓慢释放杀菌的铜离子,在作物表面形成一层严密的保护膜,抑制病菌萌发和侵入^[2]。真菌病害占果树总病害数量的 70%~80%,喹啉铜目前已在我国登记用于苹果、荔枝、梨、杨梅、柑橘等果树上真菌病害的防治^[3]。喹啉铜虽然在防治很多真菌病害上发挥重要作用,但若使用不当会对人类及环境存在一定危害^[4]。Wang 等^[5]研究表明喹啉铜在一定剂量下会通过影响乙酰胆碱酯酶活性和氧化应激反应导致斑马鱼胚胎发育缺陷和行为的改变。目前我国制定的水果上喹啉铜最大残留限量值介于 2~5 mg/kg,尚未制定枇杷上喹啉铜的最大残留限量值^[6]。

目前已有喹啉铜在谷物^[1]、蔬菜^[7-9]和水果^[10-13]等中的残留检测方法的相关报道。Li 等^[11]采用高效液相色谱法研究了梨中喹啉铜的残留及消解动态,结果表明以 937.5 mg/kg 剂量施药 1 次,喹啉铜在梨中的半衰期为 7.1~11.4 d,消解较快。Liu 等^[13]采用液相色谱串联质谱法研究柑橘中喹啉铜的残留消解及膳食风险,结果表明喹啉铜在柑橘上的半衰期为 1.9~3.7 d,风险商为 0.026~0.199。这些方法中通常仅对喹啉铜的残留消解进行分析,分析其储藏稳定性的报道较少。农药残留储存稳定性不仅受农药理化性质的影响,还受储存条件和基质性质(含水量、pH 和微生物)影响^[14]。

本研究针对枇杷上使用喹啉铜的安全性进行了研究分析,为规范喹啉铜在枇杷生产中的使用和其在枇杷上最大残留限量的制定提供数据支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Acquity 超高压液相色谱(美国 Waters 公司); KS4000ic 恒温振荡器(德国 IKA 公司); CR18P 离心机(德国 Sigma 公司); XPR5003S 电子天平、FG2-ELK pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司); N-EVAP-24 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

喹啉铜 (oxine-copper, 纯度 98.2%, 德国 Dr.Ehrensorfer 公司); 36%喹啉·戊唑醇悬浮剂(喹啉铜质量分数 24%, 浙江海正化工股份有限公司); 甲醇(色谱纯)、Waters OAsis HLB 固相萃取小柱(200 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司); 二水合草酸、氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 田间实验

按照 NY/T 788-2018《农作物中农药残留试验准则》^[15]要求设计田间试验,于 2018 年在浙江和广西开展了喹啉铜在枇杷中的残留试验。试验小区面积为 4 棵树,小区间设隔离带,另设空白对照区。最终残留试验施药剂量为

600 mg/kg, 喷雾施药 2 次, 间隔期为 7 d。最后一次施药后 14、21 d 采集样品。消解试验: 在最终残留试验小区内进行, 最后一次施药后 2 h(0 d)和 1、3、5、7 d 采集样品。每小区采集 2 份独立样品, 每个样品至少从树的不同位置随机采集 12 个果实。样品制备: 将枇杷去掉果柄和果核后用匀浆机匀浆, 残留量计算计入果核的重量。

2.3 样品前处理

准确称取 5.0 g 匀浆后的枇杷样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入 15 mL 1%草酸溶液, 用振荡器振荡 30 min, 之后以 9500 r/min 离心 3 min, 移取上清液于塑料离心管中, 定容至 20 mL 混匀, 定容溶液为 1%草酸溶液。上述溶液过滤后取 10 mL, 将 pH 值调节至 3。HLB 固相萃取柱依次用甲醇和水各 5 mL 活化后, 加入调节 pH 后的溶液, 待流出后加入 5 mL 甲醇:水=1:9(V:V)的淋洗液, 舍弃并抽干固相萃取柱, 再加 3 mL 10 g/L 草酸甲醇溶液洗脱, 收集于 15 mL 塑料试管中, 氮气吹至近干, 用 1%草酸溶液定容至 2 mL, 过 0.22 μm 滤膜到进样瓶中待测。

2.4 液相色谱条件

采用 BEH C₁₈(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离; 柱温 40 ℃; 进样体积为 10.0 μL; 检测波长为 252 nm。流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 喹啉铜的梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of oxine-copper

时间/min	流速/(mL/min)	10 mmol/L 草酸溶液/%	甲醇/%
0	0.20	95	5
10	0.20	95	5
13	0.20	10	90
14	0.20	10	90
16	0.20	95	5
20	0.20	95	5

2.5 储藏稳定性试验

按照 NY/T 3094-2017《植物源性农产品中农药残留储藏稳定性试验准则》^[16], 对喹啉铜进行储藏稳定性试验。枇杷样品采自宁波市农业科学研究院实验园区。称取枇杷空白样品 5.00 g 于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 共 8 个, 样品中添加喹啉铜标准溶液, 作为储藏样品, 添加水平均为 2.0 mg/kg, 样品在 24 h 内冷冻储藏, 储藏温度不高于 -18℃。取样时间为储藏 0、30、90、150 d, 各次的样品均设 2 个平行, 另设空白对照和 2.0 mg/kg 的质控样品。根据公式(1)计算样品储藏过程中喹啉铜残留的降解率。

$$D = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \tag{1}$$

式(1)中, D 为降解率, %; C_0 为储藏样品的初始浓度, mg/kg; C_t 为储藏时间为 t 时样品的检测浓度, mg/kg。

2.6 慢性膳食暴露风险评估

根据规范残留试验中值计算枇杷中喹啉铜的估算每日摄入量(estimated daily intake, EDI)。计算公式如下^[17]:

$$EDI = \frac{STMR \times F}{bw} \quad (2)$$

式(2)中, $STMR$ (supervised trials median residue)为枇杷的规范残留试验中值, mg/kg; F (food intake)为枇杷的消费量, g/d; bw (body weight)为人群平均体重, kg。喹啉铜的慢性膳食暴露风险用 EDI 占每日允许摄入量(acceptable daily intake, ADI)的百分比来表示, 我国规定喹啉铜的 ADI 值为 0.02 mg/kg bw^[6]。计算公式如下:

$$\%ADI = \frac{EDI}{ADI} \times 100\% \quad (3)$$

当 $\%ADI \leq 100\%$ 时, 表示风险可以接受, 处于安全水平; 当 $\%ADI > 100\%$ 时, 表示有不可接受的风险。

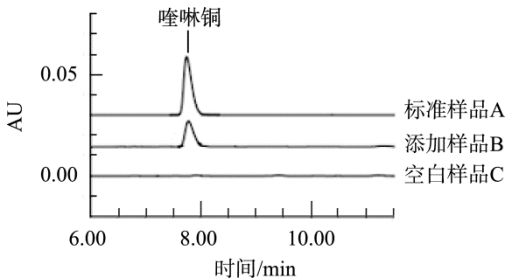
3 结果与分析

3.1 方法的线性范围及检出限

准确称取喹啉铜标准品约 10 mg, 用甲醇定容至 100 mL, 配制成 100 mg/L 的标准储备液, -20 °C 保存。精密量取喹啉铜标准储备液, 用 1% 草酸溶液逐级稀释, 配制成浓度为 0.10、0.50、1.0、5.0、10 mg/L 的系列标准工作溶液。经超高效液相色谱测定, 在 0.1~10 mg/L 范围内, 其质量浓度(X)与峰面积(Y)间呈现良好的线性关系。所得喹啉铜标准曲线方程为 $Y = 580132X + 1037$, 相关系数 r^2 为 1.0000。该检测条件下, 喹啉铜的检出限(limit of detection, LOD)为 1.0×10^{-9} g。

3.2 回收率及精密度实验

回收试验采用枇杷空白基质, 分别以 0.2、2.0、5.0 mg/kg 的添加浓度进行试验, 每个浓度处理重复 5 次, 同时做空白对照, 按 2.3 方法进行样品前处理。结果显示, 喹啉铜在枇杷中平均添加回收率为 86%~97%, 相对标准偏差 $\leq 8\%$, 能满足农药残留定量分析的要求^[15]。相关谱图见图 1。



注: A. 喹啉铜标准样品(0.5 mg/L); B. 枇杷添加样品(添加浓度为 0.2 mg/kg); C. 枇杷空白样品。

图 1 不同样品中喹啉铜的色谱图

Fig.1 Chromatograms of oxine-copper in different samples

3.3 喹啉铜在枇杷中的消解动态

喹啉铜以 600 mg/kg 的剂量施用于枇杷上 2 次, 间隔期 7 d。广西、浙江两地枇杷中喹啉铜初始沉积量为 0.75~0.86 mg/kg。不同试验点间初始沉积量略有差别, 其中广西点高于浙江点。这可能与不同地点作物不同生长状况有关, 此外, 施药时的风速、施药器械和不同施药人员等因素也会影响施药后农药在枇杷上的附着量^[18]。喹啉铜在两地枇杷中的消解动态均符合一级动力学方程: $C_t = 0.8906e^{-0.1507t}$ (广西), $C_t = 0.7181e^{-0.2056t}$ (浙江), 决定系数(r^2)分别为 0.9899 和 0.9770, 半衰期分别为 4.6 d 和 3.4 d。施药后 14 d, 枇杷中喹啉铜残留量降到定量限以下, 属于易降解农药。喹啉铜在两地枇杷上消解半衰期有略微差异, 可能是由气温、降水量等因素不同造成的。消解动态如图 2, 试验期间, 广西试验点平均气温为 23.2 °C, 最高气温 32 °C; 浙江试验点平均气温为 23.8 °C, 最高气温 37 °C。高温可能有利于喹啉铜的消解。

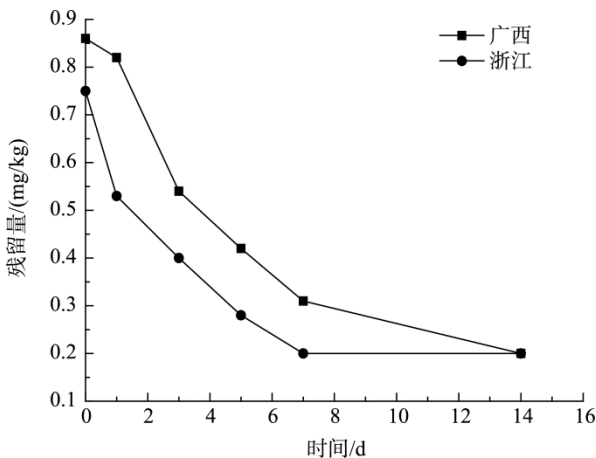


图 2 喹啉铜在枇杷中的消解动态

Fig.2 Dissipation curves of oxine-copper in loquat

3.4 喹啉铜在枇杷中的储藏稳定性

喹啉铜在枇杷中的储藏稳定性试验结果见表 2。由表 2 可看出, 喹啉铜添加水平为 2 mg/kg 的枇杷样品, 在 -18 °C 冷冻条件下储藏 0、30、90 和 150 d 后喹啉铜降解率最大为 13%; 随着时间的增加, 喹啉铜的残留量变化不大。整个储藏期内, 喹啉铜在枇杷基质中降解率为 0~13%, 质控样品的回收率为 100%~110%。储藏期间降解率未超过准则规定的 30%, 因此在上述条件下, 喹啉铜储藏期间至少为 150 d。

3.5 喹啉铜在枇杷中慢性膳食暴露风险评估

最终残留试验结果显示, 在最后一次施药后 14、21 d 采集的枇杷样品中均未检出喹啉铜残留, 其残留试验中值按照定量限(0.2 mg/kg)来计算。不同年龄段人群的平均体重

和水果摄入量采用《中国居民营养与健康状况调查报告》^[19]中数据。慢性膳食暴露风险评估结果见表3。结果表明：枇杷中喹啉铜残留在我国各类人群中的慢性膳食暴露风险水平都是非常低的，估算每日摄入量为 0.0891~0.6945 μg/kg bw/d，

膳食摄入风险为 0.45%~3.47%。虽然在不同人群中有差异，枇杷中喹啉铜对儿童的风险要大于普通人群，但总体上风险水平都很低，表明在枇杷上合理使用喹啉铜不会对一般人群健康产生不可接受的风险。

表 2 2 mg/kg 喹啉铜在枇杷添加样品中的储藏稳定性
表 2 Storage stability of 2 mg/kg oxine-copper in loquat

储藏时间/d	储藏试验样品					质控样品		
	残留量/mg/kg		降解率/%			回收率/%		
	1	2	1	2	平均	1	2	平均
0	2.1	2.3	/	/	/	105	110	108
30	2.0	2.1	4.8	8.7	6.8	105	105	105
90	2.1	2.0	0	13.0	6.5	100	100	100
150	2.1	2.1	0	8.7	4.4	110	105	108

表 3 不同人群中喹啉铜的慢性膳食摄入风险评估
Table 3 Risk assessment of chronic dietary intake of oxine-copper in different populations

年龄/岁	体重/kg	水果摄入量/(g/d)	EDI/(μg/kg bw/d)	%ADI
2~3	12.7	44.1	0.6945	3.47
4~6	16.5	49.3	0.5976	2.99
7~10	22.30	47.0	0.4215	2.11
11~13	34.05	46.3	0.2720	1.36
14~17	45.95	53.3	0.2320	1.16
18~29	55.25	47.4	0.1716	0.86
30~44	60.30	40.7	0.1350	0.67
45~59	60.05	34.7	0.1156	0.58
60~69	57.95	34.3	0.1184	0.59
>70	54.75	24.4	0.0891	0.45

4 结 论

喹啉铜在枇杷果实中的消解符合一级动力学方程，在 36%喹啉·戊唑醇悬浮剂以 600 mg/kg 兑水喷雾 2 次，施药间隔期 7 d，喹啉铜消解半衰期为 3.4~4.6 d。同时根据储藏稳定性试验结果，-18 ℃冷冻条件下储藏 150 d 内，喹啉铜在枇杷果实上的残留基本稳定。此外，慢性膳食暴露风险评估结果表明，我国不同年龄阶段人群枇杷中喹啉铜的估算每日摄入量为 0.0891~0.6945 μg/kg bw/d，枇杷中喹啉铜残留对上述不同年龄阶段人群的膳食摄入风险均较低(%ADI≤3.47%)，远低于 100%，处于安全水平。

参考文献

[1] 肖浩, 龚道新, 吴亮, 等. 高效液相色谱法测定稻田样品中喹啉铜残留[J]. 农药学报, 2015, 17(1): 106-110.

Xiao H, Gong DX, Wu L, et al. Determination of oxine-copper residue in paddy field samples by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Pestic Sci, 2015, 17(1): 106-110.

[2] 陈思宇, 王明月, 林冰, 等. 分散固相萃取法测定黄瓜中的喹啉铜残留量[J]. 热带作物学报, 2019, 40(7): 1449-1454.

Chen SY, Wang MY, Lin B, et al. Determination of oxine-copper residue in *Cucumis sativus* L. by dispersive solid phase extraction [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(7): 1449-1454.

[3] 中国农药信息网农药登记数据 [EB/OL]. [2020-03-22]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>.

Pesticide registration data of China pesticide information network [EB/OL]. [2020-03-22]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>

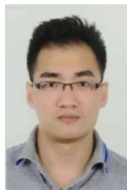
[4] 徐娟, 李敏青, 邵琳智, 等. 液相色谱-串联质谱法测定果蔬中喹啉铜的残留量[J]. 分析科学学报, 2019, 35(6): 847-852.

Xu J, Li MQ, Shao LZ, et al. Determination of oxine-copper in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2019, 35(6): 847-852.

- [5] Wang HL, Zhou LQ, Liao XJ, *et al.* Toxic effects of oxine-copper on development and behavior in the embryo-larval stages of zebrafish [J]. *Aquat Toxicol*, 2019, 210: 242–250.
- [6] GB 2763-2019 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763-2019 National food safety standard-Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [7] 郑振山, 陈勇达, 赵旭东, 等. 喹啉铜在马铃薯中的残留及消解动态 [J]. *农药*, 2020, 59(1): 46–48.
Zheng ZS, Chen YD, Zhao XD, *et al.* Residues and decline dynamics of fungicideoxine-copper in potatoes [J]. *Agrochemicals*, 2020, 59(1): 46–48.
- [8] 周梦春, 舒耀皋, 王颖, 等. 反相高效液相色谱法测定黄瓜和土壤中的喹啉铜残留量[J]. *新疆农业大学学报*, 2008, 31(4): 47–49.
Zhou MC, Shu YG, Wang Y, *et al.* Determination of oxine-copper residues in cucumber and soil by antiphase HPLC method [J]. *J Xinjiang Agric Univ*, 2008, 31(4): 47–49.
- [9] 范珺, 王明林, 于建奎, 等. 黄瓜中霜脲氰和喹啉铜的残留检测及膳食风险评估[J]. *山东农业科学*, 2014, 46(5): 122–126.
Fan J, Wang ML, Yu JL, *et al.* Residue detection of cymoxanil and oxine-copper in cucumber and dietary risk assessment [J]. *Shandong Agric Sci*, 2014, 46(5): 122–126.
- [10] 李雨晨, 李腾, 邓立刚, 等. 超高效液相色谱法测定西瓜中的喹啉铜残留量[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(8): 951–954.
Li YC, Li T, Deng LG, *et al.* Determination of copper 8-quinolinolate residues in watermelon by ultra performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(8): 951–954.
- [11] Li ZM, Deng LG, Zhang SQ, *et al.* Dynamics of oxine-copper in pears and soil by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Lett*, 2016, 49(5): 737–743.
- [12] 姚杰, 刘传德, 周先学, 等. 气相色谱-氮磷检测法检测喹啉铜在苹果中的残留及消解动态[J]. *农药学报*, 2016, 18(1): 130–134.
Yao J, Liu CD, Zhou XX, *et al.* Residues and dissipation dynamics of oxine-copper in the apple by gas chromatography-flame thermionic detector [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2016, 18(1): 130–134.
- [13] Liu X, Yang Y, Chen Y, *et al.* Dissipation, residues and risk assessment of oxine-copper and pyraclostrobin in citrus [J]. *Food Addit Contam*, 2019, 36(10): 1538–1550.
- [14] 卞艳丽, 刘丰茂. 农药残留储存稳定性的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(8): 3013–3019.
- Bian YL, Liu FM. Research progress on storage stability of pesticide residues [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(8): 3013–3019.
- [15] NY/T 788-2018 农作物中农药残留试验准则[S].
NY/T 788-2018 Guideline for the testing of pesticide residues in crops [S].
- [16] NY/T 3094-2017 植物源性农产品中农药残留储藏稳定性试验准则[S].
NY/T 3094-2017 Guideline for stability testing of pesticide residues in stored commodities of plant origin [S].
- [17] FAO. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed [R]. Rome: FAO, 2009: 123–133.
- [18] 王全胜, 付岩, 张亮, 等. 基于 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测依维菌素在杨梅上的残留[J]. *农药学报*, 2018, 20(5): 684–688.
Wang QS, Fu Y, Zhang L, *et al.* Residue analysis of ivermectin on *Myrica rubra* based on QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Pest Sci*, 2018, 20(5): 684–688.
- [19] 金水高. 中国居民营养与健康状况调查报告之十: 2002 年营养与健康状况数据集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
Jin SG. The tenth report of nutrition and health status for china residents: Nutrition and health status of annual 2002 [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



徐小军, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为药品安全检测。
E-mail: xuxiaojun558@126.com



吴银良, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: wupaddyfield@sina.com