



UNIVERSITÄT HOHENHEIM  
INSTITUT FÜR LEBENSMITTELTECHNOLOGIE  
FACHGEBIET LEBENSMITTEL PFLANZLICHER HERKUNFT  
LEITER: PROF. DR. REINHOLD CARLE

DIPLOMARBEIT

ENTWICKLUNG, VALIDIERUNG UND  
APPLIKATION EINER GC-MS-METHODE ZUR  
BESTIMMUNG VON PACLOBUTRAZOL-  
RÜCKSTÄNDEN  
IN MANGO- UND BODENPROBEN

VORGELEGT VON  
KATHRIN REINTJES

STUTTGART-HOHENHEIM  
SEPTEMBER 2005

*-Diese Arbeit wurde gefördert aus Mitteln der Eiselen-Stiftung Ulm.-*

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine hochspezifische Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) Methode mit Festphasenmikroextraktion (SPME) optimiert und zur Bestimmung von Paclobutrazol (PBZ) -rückständen in Mango- und Bodenproben erarbeitet. Die Probenbearbeitung umfasste die Anreicherung und Reinigung des Analyten aus dem Extrakt mittels hochstandardisierter SPME mit manueller Injektion in das GC-MS-System. Innerhalb des gescannten Massenspektrums ( $m/z = 50-300$ ), wurde PBZ bei einer Retentionszeit von  $17,0 \pm 0,2$  min anhand der charakteristischen Fragmentionen der Massen 294, 236 und 125 identifiziert. PBZ war somit eindeutig von dem internen Standard Diclobutrazol (DBZ) mit der Retentionszeit von  $17,51 \pm 0,2$  min und den charakteristischen Ionenmassen von  $m/z = 270, 272$  und 159 zu unterscheiden. Diese Erarbeitung beinhaltet die Bestätigung der Literaturangaben bzw. Optimierung für die Extraktionszeiten und die Probenbehandlung, wie zum Beispiel der Einfluss der Sterilisation des Bodens, zudem eine Bestimmung der Nachweisgrenze und der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen anhand von Proben, die mit Paclobutrazollösungen angereichert worden waren. Das Detektionslimit in Mangomesokarp lag bei 0,005 mg/kg. Die Analysen basierten auf einer Kalibrierung über eine Potenzfunktion mit einer Wiederfindung von PBZ im Mangomesokarp zwischen 62,2% und 96,3% bei bzw. über der Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg.

Nach der Validierung der Methode wurden Mango- und Bodenproben vom Versuchsfeld der Universität Chiang Mai, in Mae Jo, Thailand, auf Paclobutrazolrückstände hin untersucht. Auf der Versuchsfläche des Teilprojektes E 2.2 (Obstverwertung) und B 2.2 (Transport von Agrochemikalien) des Sonderforschungsbereiches 564 (Nachhaltige Landnutzung und ländliche Entwicklung in Bergregionen Südostasiens) wurden in einem Langzeitversuch durch die Applikation des Wachstumsregulators Paclobutrazol, mit einer einmaligen Bodenbehandlung (ungefähr 1 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup> Baumkronendurchmesser) pro Erntejahr, begleitet von einer regelmäßigen Probennahme des Bodens, off-season-Mangos produziert, um den Verbleib des Paclobutrazols im Boden darzustellen. Für Rückstandsuntersuchungen an Früchten standen in dieser Arbeit Früchte von Bäumen, die mit unterschiedlichen PBZ-Konzentrationen behandelt wurden und Früchte von Kontrollbäumen des Teilprojektes D 1.2 (Ertragsbeeinflussung bei Obstbäumen), zur Verfügung.

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass das PBZ, wie aufgrund des Transportweges über das Xylem angenommen, von den Bäumen nicht in die Früchte transportiert wird. Die PBZ-Konzentration in den Früchten der mit PBZ behandelten Bäume (0,5 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup>

BD) lag unterhalb der Nachweisgrenze von 0,005 mg/kg, und im gleichen Bereich wie die Früchte von Kontrollbäumen.

Bodenproben für die Analysen wurden in dem Zeitraum von Dezember 2003 bis Ende September 2004 (Plot 2/B) bzw. bis Mitte Oktober 2004 (Plot 1/Y) sukzessive in drei Bodentiefen innerhalb des Ringsegmentes, welches für die PBZ-Applikation um jeden Baum herum genutzt wurde genommen. Die PBZ-Applikation fand beim Plot 2/B am 24.04.2004 statt, beim Plot 1/Y am 15.07.2004 (9,43 – 13,2 mg of PBZ [a.i]/Baum), woraus jeweils ein Anstieg von anfangs 0,01-0,3 mg PBZ/kg trockener Erde auf Gehalte von über 10 mg/kg abhängig von der Bodentiefe resultierte. In der untersten Bodenschicht (10-20 cm), die in dieser Arbeit untersucht wurde, blieb die Startkonzentration von ungefähr 10-40 mg/kg nach der ersten Applikation hingegen nahezu konstant. Bei beiden Varianten konnte festgestellt werden, dass der Paclobutrazolgehalt nach der ersten Applikation in der obersten Bodenschicht (0-5 cm) von einem Gehalt von 1050 – 1300 mg PBZ/kg trockener Erde auf Gehalte wie im Bereich der untersten Schicht innerhalb des Beobachtungszeitraumes sehr stark abnahm. Diese Abnahme wurde zum einen durch das Einsickern der PBZ-Lösung in tiefere Schichten bedingt, zum größten Teil jedoch durch die Auswaschung bei Regenfällen während der beginnenden Regenzeit. Weitere Untersuchungen von Bodenproben, die nach der zweiten Paclobutrazolapplikation im nächsten Erntejahr genommen wurden, müssen nun zeigen, in welchem Grade hier eine Anreicherung des Paclobutrazols im Boden bei einer Produktion von off-season-Mangos in dieser Region erwartet werden muss.

Neben dem Umwelteinfluss von Paclobutrazol, wurde der potentielle Einfluss von Paclobutrazol auf die Reifung und Qualität von Mangos untersucht. Die Reifung am Baum wurde mit regelmäßigen Reifegradanalysen, während eines Zeitraumes von 18 Tagen um den erwarteten Erntetermin im April 2005, für Früchte von Bäumen, die mit Paclobutrazol oder dem alternativen Wachstumsregulator Calcium-Prohexadion behandelt wurden, und für Früchte von Kontrollbäumen, von der gleichen Versuchsfläche des Teilprojektes D 1.2 (siehe oben) beobachtet. Die Analysen sollten es ermöglichen, eine Spezifizierung einer geeigneten physiologischen Erntereife zum Zeitpunkt der Ernte aufzustellen und die Erntezeit zu definieren. Die charakteristische Veränderung der Respirationsrate und die Ethylenproduktion, die die Ausreifung der klimakterischen Früchte induzieren, sollte indirekt über die Veränderungen der Fruchtqualität verfolgt werden. Wegen der Verzögerung der Reifung, die für alle Varianten beobachtet wurde, war der erwartete Erntetermin (124 Tage nach der Vollblüte) zu früh, jedoch mussten die Untersuchungen der Reifung am Baum aufgrund von unzureichendem Probenmaterial sieben Tage vor der tatsächlichen Ernte (135

Tage nach der Vollblüte), unabhängig von der Behandlungsart des Baumes, beendet werden. So konnte die physiologische Erntereife nur grob spezifiziert werden. Während der Untersuchungen wurde die Reifung am deutlichsten durch den überproportionalen Anstieg des Zucker-Säure-Verhältnisses (TSS/TA) und die erwartete lineare Abnahme des Reifeindex, welcher auf dem Zucker-Säure-Verhältnis und der Fruchtfleischfestigkeit basiert, widergespiegelt.

Die Vollblüte fand bei allen untersuchten Bäumen zur gleichen Zeit stattfand (Dezember 2004), ungeachtet der unterschiedlichen Auswirkungen auf die Blütenbildung, die im Teilprojekt D1.2 beobachtet wurden. Dadurch war die Fruchtreifung bei allen Varianten gleichartig vom lokalen Klima beeinflusst und die Unterschiede in der physiologischen Fruchtreife war dadurch äußerst gering. Ungeachtet der Variabilität zwischen den Früchten zeigten die Untersuchungen im Allgemeinen jedoch, dass der Gehalt an löslicher Trockensubstanz bei Früchten der Variante mit 0,5 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup> Baumkronendurchmesser (BD) und der Calcium-Prohexadion-Variante etwa 10% niedriger lag als bei den Kontrollfrüchten. Der Säuregehalt war bei den Früchten dieser beiden Varianten deutlich niedriger (40%) und das Zucker-Säureverhältnis um etwa 50% höher. Früchte der Bäume, die mit 1 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup> BD behandelt wurden, zeigten weitgehend die gleiche Qualität wie die Früchte der Kontrollbäume.

Abschließend lässt sich feststellen, dass das Paclobutrazol grundsätzlich dazu geeignet ist, die Alternanz von Mangobäumen zu reduzieren und die Bildung von Blüten ohne das Risiko von untolerierbaren PBZ-Rückständen im Mangomesokarp zu fördern. In weiteren Versuchen ist jedoch auch großer Wert auf weniger persistente Wachstumsregulatoren zu legen, wie zum Beispiel Calcium-Prohexadion, das ähnliche Ergebnisse bei der Fruchtreife und Qualität wie PBZ erzielte. Jedoch ist die wesentlich geringere Blüteninduktion, die auch bei den Bäumen der gegenwärtigen Untersuchungen beobachtet wurde, ein Problem, das für den Einsatz in der Mangoproduktion noch gelöst werden muss.

## 8 SUMMARY

In the present study, a highly specific gaschromatographic-mass spectrometric (GC-MS) method with solid phase microextraction (SMPE) has been optimised and validated for the determination of paclobutrazol (PBZ) residues in mango and soil samples. Sample preparation included the accumulation and purification of the analyte from the extract by highly standardised SPME with manual injection into GC-MC. In the scanned mass range of  $m/z = 50 - 300$ , PBZ was identified with a retention time of  $17.038 \pm 0.2$  min using the characteristic ions of  $m/z = 294, 236,$  and  $125$  in the selective ion mode for quantification. PBZ was thus clearly distinguished from the internal standard that was diclobutrazol (DBZ) with a retention time of  $17.51 \pm 0.2$  min and the characteristic masses of  $m/z = 270, 272,$  and  $159$ . The methodical study comprised the verification of reported analytical procedures and further optimisation, respectively, regarding the extraction time and sample preparation such as the influence of soil sterilisation, and the evaluation of detection limit, recovery, and reproducibility by use of respective sample material that was enriched in paclobutrazol. The limit of detection in mango mesocarp was  $0.005$  mg/kg. Quantification was based on a power law calibration curve with the recovery of PBZ in mango mesocarp being  $62.2 - 96.3$  % at and above the quantification limit of  $0.01$  mg/kg.

After this method had been validated, mango- and soil samples originating from a mango orchard of the research station of the Mae Jo University, Chiang Mai Province, Thailand, were subjected to paclobutrazol residue analysis.

In order to study the persistence of paclobutrazol in the soil during its application in off-season mango fruit production, off-season mangos have been produced through the defined application of the growth regulator paclobutrazol as single soil drench (approx.  $1$  g PBZ [a.i]/ $m^2$  of canopy diameter [CD]) per crop year along with the regular collection of soil samples in the scope of a long-term experiment on a research plot of the two subprojects E 2.2 (*Fruit processing*) and B 2.2 (*Agrochemical transport*) of the Special Research Program SFB 564 ('Sustainable Land Use and Rural Development in Mountainous Regions of Southeast Asia'). Mango fruits produced in the subproject D1.2 (*Alternate bearing of fruit trees*) through treatments of trees with three different PBZ levels including a zero check were made available for the evaluation of potential PBZ residues in mango mesocarp. As assumed from the major mode of PBZ mobility via the xylem, the latter results gave evidence that PBZ is not carried into the fruits. The PBZ contents found in fruits of trees treated with PBZ ( $0.5$  g a.i./ $m^2$  of CD) was below the detection limit of  $0.005$  mg/kg, being at the same level as those

of fruits from the control trees. The analysed soil samples had successively been collected in three depth levels from the ring segments used for PBZ application around each tree in the period from December 2003 to the end of September 2004 (plot 2/B) and to the mid of October 2004 (plot 1/Y), respectively. PBZ was applied to the trees of plot 2/B on April 24 and to those of plot 1/Y on July 15, 2004 (9.43 – 13.2 mg of PBZ [a.i]/tree), each time resulting in an initial rise from approx. 0.01-0.3 mg of PBZ/kg of dry soil to levels above approx. 10 mg/kg depending on the depth. In the lowest soil layer studied (10-20 cm) the PBZ content rather remained at the initial level of approx. 10-40 mg/kg reached after the first application. The PBZ content in the upper soil layer (0-5 cm) strongly decreased after the first application from 1050 – 1300 mg of PBZ/kg of dry soil during the observation period to the range found at the lowest depth level. This decrease was caused by trickling into lower layers, but was largely favoured by leaching through regular rainfalls during the beginning rainy season. Further analyses of soils collected after the second PBZ application in the next cropping cycle will have to prove now to which extent an accumulation of paclobutrazol must be expected in the soil during off-season mango production in this area.

Beside the environmental effects of PBZ, the potential influence of PBZ on the maturation and quality of mango fruits was investigated, monitoring on-tree maturation physiology by regular maturity analyses during a period of 18 days around the expected harvest time in April 2005 by the use of trees treated with either PBZ or the alternative growth regulator calcium-prohexadione and trees for zero-check treatments on the same plot mentioned above for subproject D1.2. These experiments mainly aimed at the specification of the proper physiological maturity at harvest and the definition of the harvest time. The characteristic evolution of the respiration rate and ethylene inducing ripening of the climacteric fruits was indirectly monitored via the effects on fruit quality. However, due to delayed maturation observed for all variants, the anticipated harvest time (124 days after anthesis) had to be postponed and the preharvest monitoring had to be terminated because of insufficient sample material seven days before the time when the fruits could be finally harvested (135 days after anthesis) irrespective of the type of tree treatment. Therefore, physiological harvest maturity could only roughly be specified. During the period studied, maturation was most clearly reflected by the disproportionately high increase in the sugar-acid ratio (TSS/TA) and the associated linear decrease of a ripening index based on TSS/TA and fruit firmness.

As the date of anthesis was the same for all variants studied (December 2004) irrespective of different effects on the extent of flowering observed in subproject D1.2, fruit maturation was equally influenced by the local climate and differences in physiological fruit maturation were

diminishing. However, irrespective of the variability among fruits, the maturation analyses generally showed that the content of soluble solids (TSS) was approx. 10% lower in fruits of those trees treated with 0.5 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup> of CD or with calcium-prohexadione than it was in the control fruits. In the fruits of the PBZ-treated type, the contents of titrable acids were clearly lower (approx. 40%), while the sugar-acid-ratio was up to 50% higher than in control fruits. The fruits of the trees that had been treated with 1 g PBZ (a.i.)/m<sup>2</sup> of CD and those of the control trees were largely of the same quality.

As a conclusion, the experiments confirmed that paclobutrazol is generally capable to reduce the alternate bearing of mango trees, promoting flowering without the risk of intolerable PBZ residues in the edible mesocarp. However, the risk of PBZ accumulation in the soil became evident in the present study. Hence, future studies may focus more on less persistent growth regulators such as calcium prohexadione, since this substance generated similar results as paclobutrazol regarding fruit maturation and quality. However, its much poorer effect on flowering also observed for the trees used in the present study on fruit maturation is still a problem to be solved in mango production.