

UPLC-MS/MS 法检测麦穗中氟唑菌酰胺的残留和消解动态

吴琴燕^{1,5}, 陈宏州¹, 李冬冬², 张文文³, 杨红福¹, 庄义庆^{1,4*}

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所中心实验室, 镇江 212400; 2. 江苏农林职业技术学院, 镇江 212400;
3. 江苏省镇江市农业农村局, 镇江 212000; 4. 江苏省农业科学院, 南京 210014;
5. 江苏省镇江市农业科学技术实业公司, 镇江 212400)

摘要 建立了小麦扬花期和收获期麦穗中氟唑菌酰胺超高效液相色谱—串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测方法, 明确了氟唑菌酰胺在小麦麦穗中的消解动态。试验结果表明, 在室温条件下, 当乙腈浓度为 60%, 液固比为 20 mL/g, 超声破碎时间为 15 min, 扬花期和收获期样品中氟唑菌酰胺提取量均达到较高水平, 分别为 3.34 $\mu\text{g/g}$ 和 1.12 $\mu\text{g/g}$; 利用空白加标试验, 扬花期和收获期样品加标回收率为 80.3%~115.8%, 方法的检出限为 0.03 ng/mL, 定量限为 0.15 ng/mL。氟唑菌酰胺在麦穗上的消解动态符合一级反应动力学方程, 半衰期为 3.2~4.4 d。收获后麦粒中氟唑菌酰胺残留量为 0.12 $\mu\text{g/g}$, 低于美国规定的农药残留限量标准(0.3 $\mu\text{g/g}$)。结果表明, 氟唑菌酰胺用于小麦病害防治是安全的。

关键词 氟唑菌酰胺; 超高效液相色谱—串联质谱; 麦穗; 消解

中图分类号: S 481.8 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019716

Degradation dynamics and residue analysis of pydiflumetofen in wheat by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

WU Qinyan^{1,5}, CHEN Hongzhou¹, LI Dongdong², ZHANG Wenwen³, YANG Hongfu¹, ZHUANG Yiqing^{1,4*}

(1. Central Laboratory of Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences in Hilly Area of Jiangsu Province, Zhenjiang 212400, China; 2. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China; 3. Zhenjiang Agricultural and Rural Bureau, Jiangsu Province, Zhenjiang 212000, China; 4. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 5. Zhenjiang Industrial Company of Agricultural Science and Technology in Jiangsu, Zhenjiang 212400, China)

Abstract A ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed to determine the degradation dynamics of pydiflumetofen in wheat spikes at flowering and harvest stages, respectively. The results showed that, the extraction amount of pydiflumetofen from the samples at flowering and harvest stages all reached a higher level, when the concentration of acetonitrile was 60%, the liquid-solid ratio was 20 mL/g, and the ultrasonic breaking time was 15 minutes, which was 3.34 $\mu\text{g/g}$ and 1.12 $\mu\text{g/g}$, respectively. The recovery rate of pydiflumetofen in fortified wheat spikes at flowering and harvest stages ranged from 80.3% to 115.8%; the detection limit (LOD) of the method was 0.03 ng/mL, and the quantitative limit (LQD) was 0.15 ng/mL. The digestion dynamics of pydiflumetofen residue with time accorded with first-order reaction kinetics equation. The half-life of pydiflumetofen in wheat spikes was 3.2–4.4 d. The residue of pydiflumetofen in wheat grains was 0.12 $\mu\text{g/g}$, which was lower than the maximum residue limit of the United States (0.3 $\mu\text{g/g}$). Therefore, pydiflumetofen is safe for wheat disease control.

Key words pydiflumetofen; UPLC-MS/MS; wheat spikes; degradation

收稿日期: 2019-12-25 修订日期: 2020-03-15

基金项目: 句容市社会发展项目(SF2018589878)

* 通信作者 E-mail: 64816324@qq.com

氟唑菌酰胺是瑞士先正达公司开发的新型杀菌剂,为琥珀酸脱氢酶抑制剂,其分子式为 $C_{16}H_{16}Cl_3F_2N_3O_2$, 分子量为 426.67^[1-2]。该药剂主要通过影响病原菌的呼吸链电子传导系统,阻碍其能量代谢,从而抑制病原菌的生长^[3-4],具有广谱、高效的特点,适用于多种作物。

据报道氟唑菌酰胺对小麦赤霉病菌具有较高的活性^[5-6],并具有提高小麦产量的作用^[4]。近年来,氟唑菌酰胺陆续在美国、加拿大、阿根廷等国家登记上市^[7-8]。美国环境保护署规定^[9],氟唑菌酰胺在小麦中的最大残留限量标准为 0.3 μg/g。由于该药剂在国内刚刚登记上市,目前暂未规定其最大残留限量和检测方法。氟唑菌酰胺悬浮液的高效液相色谱分析方法及其在西瓜中的残留动态已有报道^[10-11],但其在小麦中的残留分析暂无报道。

本文引入超声辅助提取技术提取扬花期和收获期麦穗中氟唑菌酰胺,并建立其 UPLC-MS/MS 分析方法,研究氟唑菌酰胺在麦穗中的消解动态,掌握其消解规律,为小麦安全生产提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

三重四级杆串联液相质谱联用仪 (Agilent 1290, ABSciex 4500), 安捷伦科技有限公司; XP105DR 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; AWL-020I-P 超纯水系统, 艾科浦仪器有限公司; KQ-250E 型超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; H2050R 型医用离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

甲醇和乙腈 (色谱纯, 美国默克公司), 甲酸铵 (≥98%, 德国 CNW 公司), 质谱用水为屈臣氏蒸馏水, 氟唑菌酰胺 (>98%) 标准样品和 20% 氟唑苯酰胺悬浮剂 (SC) 购自先正达生物科技有限公司。

1.2 田间试验

试验于 2017 年和 2018 年 4 月中旬在江苏省句容市镇江农业科学院行香园区试验田进行, 小麦品种为 ‘镇麦 13’, 试验地水、肥条件良好, 常规田间管理。

采用 20% 氟唑菌酰胺 SC 按照推荐用量 8 g/667 m² (有效成分) 分别施药 1 次和 2 次。首次施药时间为扬花初期。2 次施药的间隔期为 7 d。每处理 3 次重复, 随机区组排列。小区面积 20 m², 小区

间设保护行, 以清水处理作为空白对照。分别于施药后 1 h 及 1、3、5、7、10、15、20、25、30 d 按照对角线 5 点取样法取样, 每点取麦穗 10 株, 麦穗在 40℃ 下烘干粉碎后于 -20℃ 保存, 待测。

1.3 样品分析方法建立

液相色谱柱为 Agilent C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 甲酸铵溶液 (A)—甲醇 (B), 75% 甲醇等度洗脱 10 min。流速为 200 μL/min, 柱温 40℃; 进样量 1 μL。

质谱检测条件: 正离子模式 (ESI⁺), 检测方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 气帘气: 35 psi; 喷雾电压: 5 500 V; 雾化温度: 450℃; 雾化气: 40 psi; 辅助气: 40 psi; 其他 MRM 参数见表 1。

表 1 氟唑菌酰胺的多反应监测 (MRM) 参数

Table 1 MRM parameters for pydiflumetofen

母离子 (<i>m/z</i>) Parent ion	子离子 (<i>m/z</i>) Daughter ion	去簇电压/kV DP	碰撞能/kV CE
426.0	406.1	80	18
426.0	193.1	80	35

1.4 样品提取方式和提取条件的优化

以 2017 年施药 1 次麦穗样品为材料进行提取方式和条件的优化。分别取施药后 10 d (扬花期) 和施药后 30 d (收获期) 麦穗样品, 冷冻干燥粉碎后准确称取 1 g, 加入 20 mL 乙腈, 在室温条件下, 分别采用振荡和超声破碎两种方式提取 30 min, 比较两种提取方式下氟唑菌酰胺的提取量, 选择最优提取方式进一步对提取条件进行优化。

乙腈浓度筛选: 在 30℃ 条件下, 按液固比 100 mL/g, 乙腈浓度分别在 0、20%、40%、60%、80% 和 100% 的条件下超声提取 15 min, 检测氟唑菌酰胺的提取量; 液固比筛选: 采用最适宜的乙腈浓度, 在 30℃ 条件下, 分别采用液固比 10、25、50、100 mL/g 和 200 mL/g 超声提取 15 min, 检测氟唑菌酰胺的提取量; 温度筛选: 采用最适宜的乙腈浓度和液固比, 分别在 30、40、50、60℃ 和 70℃ 条件下超声提取 15 min, 检测氟唑菌酰胺的提取量。

1.5 样品前处理

采用优化的条件提取不同时间采集的麦穗样品中的氟唑菌酰胺, 以及收获的麦穗经人工脱壳并粉碎后获得的麦粒样品中的氟唑菌酰胺。

2 结果与分析

2.1 LC-MS 方法的建立

用 50% 乙腈溶液溶解标样, 考察氟唑菌酰胺特征峰在正、负离子扫描模式下的电离强度, 发现正离子扫描模式下的电离强度明显高于负离子模式。以 $[M+H]^+$ 作为母离子进行子离子扫描分析, 选择丰度较大的 2 个离子作为特征碎片离子, 如图 1 所示, 根据特征碎片离子对去簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE) 等参数进行优化, 使得离子对的信号最强。

采用 UPLC 常用的 C18 色谱柱, 考察了以 5 mmol/L 甲酸铵为水相, 分别以甲醇和乙腈为有机相时的色谱分离情况。发现以甲醇为有机相时响应值较高, 基线平稳, 水相中加入 0.1% 的甲酸, 响应值提高 1 倍。经过反复试验, 可在 5 min 内获得良好的分离效果。图 1 和图 2 分别为 50 ng/mL 氟唑菌酰胺标准溶液的质谱扫描图和 MRM 色谱图。

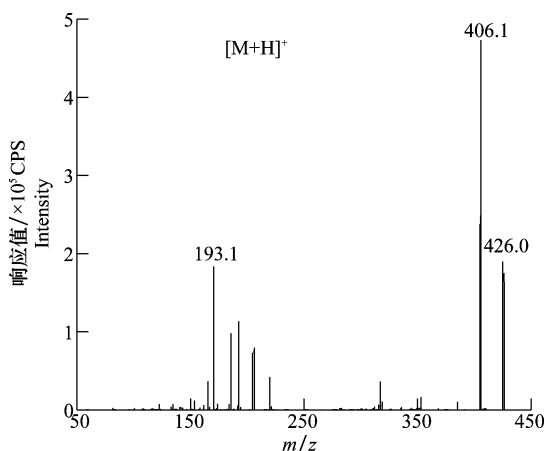


图 1 50 ng/mL 氟唑菌酰胺标准溶液二级扫描质谱图
Fig. 1 Secondary scanning mass spectrometry of standard solution containing 50 ng/mL pydiflumetofen

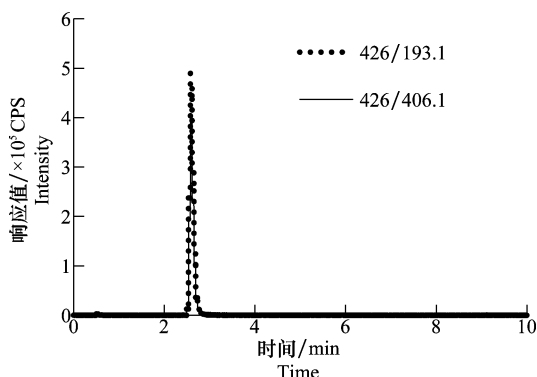


图 2 50 ng/mL 氟唑菌酰胺标准溶液的 MRM 色谱图
Fig. 2 MRM chromatogram of standard solution containing 50 ng/mL pydiflumetofen

氟唑菌酰胺标样在 0.05~50 ng/mL 浓度范围内标准曲线为 $y = 35\,654x + 26\,164.89$, $R^2 = 0.998\,77$, 在此范围内, 本试验建立的方法的检出限为 0.03 ng/mL, 定量限为 0.15 ng/mL。

2.2 样品前处理方式和条件优化

试验首次施药时小麦处于扬花期, 试验过程麦穗从绿逐渐变黄。扬花期麦穗主要基质以叶绿素为主, 收获期麦穗主要基质为淀粉、糖、蛋白质等。基质不同, 提取条件可能存在差异, 因此分别针对扬花期和收获期麦穗进行提取条件优化。

2.2.1 提取方式的优化

图 3 为超声和振荡两种提取方式对氟唑菌酰胺提取量的影响, 扬花期和收获期氟唑菌酰胺提取量均在提取 15 min 时达到较高水平。扬花期样品超声处理后, 最大提取量从振荡提取的 1.69 $\mu\text{g/g}$ 提高至 2.28 $\mu\text{g/g}$; 收获期样品从振荡提取的 0.68 $\mu\text{g/g}$ 提高至 0.85 $\mu\text{g/g}$, 说明超声条件更有利于氟唑菌酰胺的溶出, 由于超声波辐射可产生破碎、混合搅拌、空化作用等多级效应, 从而使分子运动速度和频率加快, 使物料内部组织和结构崩溃^[12-13], 从而促进了氟唑菌酰胺溶出。

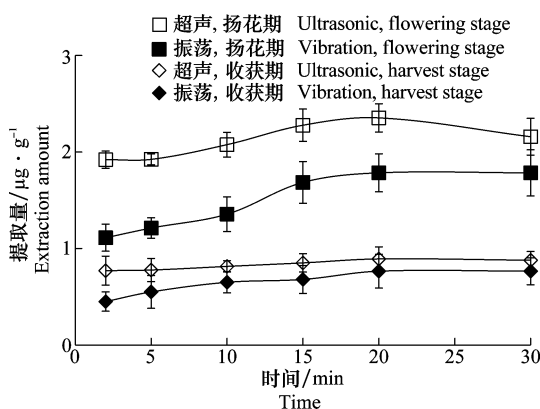


图 3 提取方式对氟唑菌酰胺提取量的影响
Fig. 3 Effects of different extraction methods on the extraction amount of pydiflumetofen

2.2.2 超声提取条件的优化

从图 4 可知, 乙腈浓度对氟唑菌酰胺提取量有明显影响, 乙腈浓度在 40%~80% 之间时提取效果较好, 其中浓度为 60% 时, 扬花期和收获期样品的提出量均为较高, 且维持在稳定水平, 分别为 3.34 $\mu\text{g/g}$ 和 1.12 $\mu\text{g/g}$, 当乙腈浓度超过 80%, 氟唑菌酰胺的提取量明显下降, 这可能是由于氟唑菌酰胺为非极性化合物, 当乙腈溶液浓度低时溶

液极性相对较大,不利于氟唑菌酰胺的溶出,适量水的溶胀作用可以促进氟唑菌酰胺的溶出,而当乙腈浓度过大,水的溶胀作用减弱,使氟唑菌酰胺提取量下降^[14]。温度和液固比对氟唑菌酰胺提取量无明显影响。

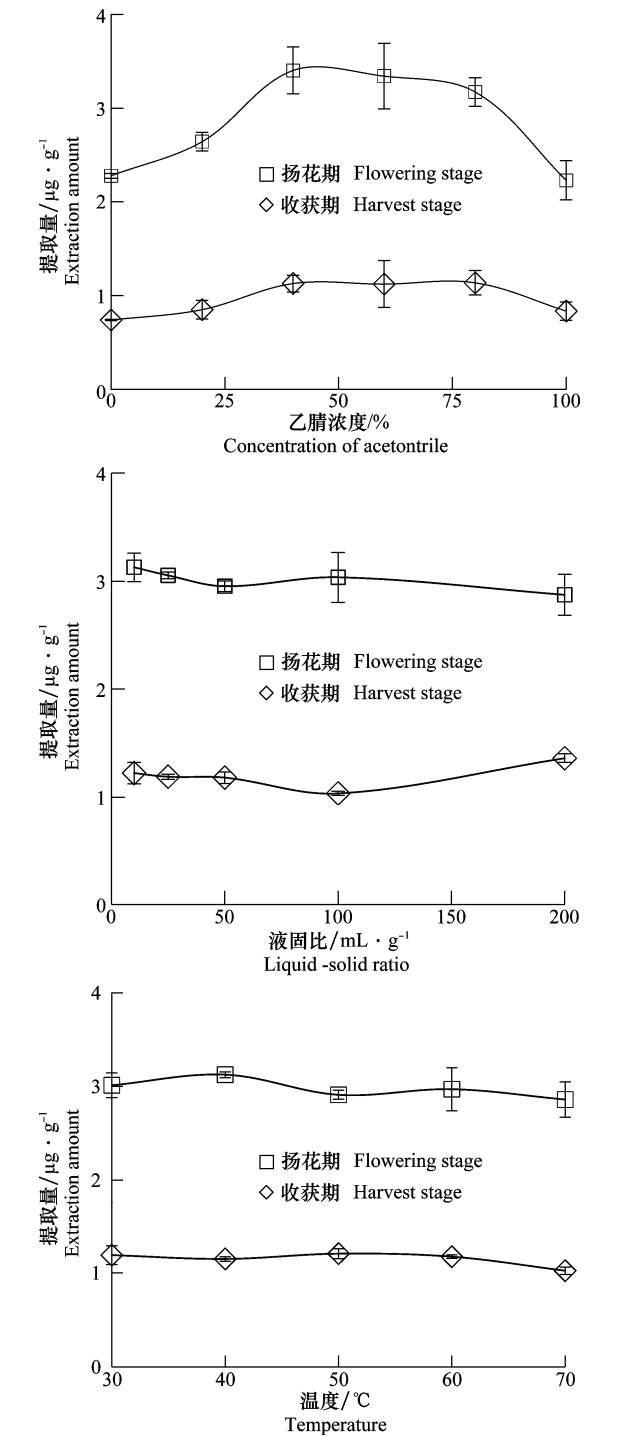


图 4 提取条件对氟唑菌酰胺提取量的影响

Fig. 4 Effects of various factors on the extraction amount of pydiflumetofen

2.3 回收率和标准偏差

在空白样品中分别添加 4 个浓度水平的标准品溶液进行提取,标准溶液采用 60% 的乙腈配制而成,每个浓度平行测定 3 次,在液固比为 20 mL/g 的条件下,超声破碎 15 min。由表 2 可知,扬花期样品平均回收率为 80.3%~115.8%,相对标准偏差为 2.4%~10.5%;收获期样品平均回收率为 99.8%~109.6%,相对标准偏差为 3.6%~8.5%,扬花期和收获期样品均符合检测要求。

表 2 样品加标回收率和相对标准偏差

添加浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Additive concentration	扬花期 Flowering stage		收获期 Harvest stage	
	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%	平均回 收率/%	相对标准 偏差/%
	Average recovery rate	RSD	Average recovery rate	RSD
0.15	80.3	10.5	109.6	8.5
1.5	115.8	3.4	104.7	6.6
6	102.3	2.4	102.1	3.6
25	91.3	5.6	99.8	4.7

2.4 氟唑菌酰胺消解动态

20% 氟唑菌酰胺 SC 以 $8 \text{ g}/667 \text{ m}^2$ 的用量于 2017 年和 2018 年连续两年在麦穗上施用,施药 1 次的原始积累量分别为 $37.4 \mu\text{g}/\text{g}$ 和 $47.2 \mu\text{g}/\text{g}$,施药 2 次的原始积累量分别为 $60.4 \mu\text{g}/\text{g}$ 和 $89.0 \mu\text{g}/\text{g}$ 。氟唑菌酰胺在麦穗上的残留动态如图 5 所示。在麦穗上的消解率与时间的关系符合一级动力学模型,施药 1 次的半衰期约为 3.2 d,施药 2 次的半衰

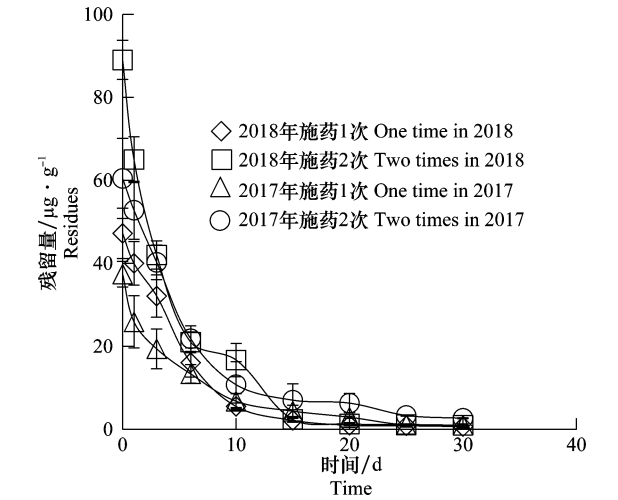


图 5 氟唑菌酰胺在麦穗中的消解动态

Fig. 5 Digestion dynamics of pydiflumetofen residues in wheat spikes

期为 3.49~4.35 d,不同年份对氟唑菌酰胺消解半衰期无明显影响。

表 3 氟唑菌酰胺在麦穗中的消解动态
Table 3 Digestion dynamics of pydiflumetofen in wheat spikes

年份 Year	施药次 数/次 Application times	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	半衰期/d Half-life
2017	1	$y=0.7415e^{-0.120x}$	0.975 1	3.29
	2	$y=0.7931e^{-0.106x}$	0.954 6	4.35
2018	1	$y=0.8175e^{-0.156x}$	0.946 5	3.22
	2	$y=0.9116e^{-0.172x}$	0.901 3	3.49

收获的麦穗中,2017 年和 2018 年施药 1 次氟唑菌酰胺含量分别为 0.98 μg/g 和 0.62 μg/g,施药 2 次分别为 2.66 μg/g 和 0.89 μg/g,而 2 年试验收获的麦穗脱壳后,麦粒中氟唑菌酰胺含量均约为 0.12 μg/g,说明氟唑菌酰胺大部分集中于麦穗表皮,本试验收获的麦粒中氟唑菌酰胺含量均未超过美国规定的最大残留限量。

3 结论

本文采用超声提取,对提取溶剂、温度、液固比 3 个主要提取条件进行优化,建立了氟唑菌酰胺在麦穗中的液相色谱串联质谱分析方法,该方法适合不同时期麦穗中氟唑菌酰胺的提取和检测,方法的灵敏度、准确度和回收率均符合农药残留检测要求。2017 年和 2018 年两年在江苏句容消解动态试验表明,氟唑菌酰胺在麦穗中消解速率较快,属于易降解农药 ($T_{1/2}<30$ d),收获后麦粒残留量约为 0.12 μg/g,低于美国规定的氟唑菌酰胺在小麦上的最大残留限量(0.3 μg/g)。

参考文献

[1] HOU Yiping, MAO Xuewei, WANG Jianxin, et al. Sensitivity of *Fusarium asiaticum* to a novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pydiflumetofen [J]. Crop Protection, 2017, 96:237 - 244.

[2] 邓红霞,钱跃言. 新型杀菌剂氟唑菌酰胺研究进展[J]. 浙江化工, 2017, 48(11):35 - 37.

[3] 向礼波,杨立军,薛敏峰,等. 禾谷镰孢菌对氟唑菌酰胺敏感性基线的建立及药剂田间防效[J]. 农药学报, 2018(4):445 - 451.

[4] 仇是胜,柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展(Ⅱ)[J]. 现代农药, 2015(1):1 - 7.

[5] 陆小成,杨玲军. 不同药剂防治小麦赤霉病药效试验研究[J]. 现代农村科技, 2014, 61(14):52 - 53.

[6] 潘燕,孔祥英,秦吉洋,等. 不同药剂防治小麦赤霉病试验研究[J]. 上海农业科技. 2019(3):119 - 122.

[7] 顾林玲. 先正达新杀菌剂 Miravis Top 在阿根廷上市[J]. 现代农药, 2018(1):36.

[8] 顾林玲. 先正达杀菌剂 Miravis(氟唑菌酰胺)将获得澳大利亚登记[J]. 现代农药, 2018(2):11.

[9] 中国农药网,美国修订三环唑和氟唑菌酰胺在多种食品中的残留限量[EB/OL]. (2019-08-14)[2019-12-15]. <http://nongyao.jinnong.cn/n/2019/08/14/5851905476.shtml>.

[10] 智沈伟,李兴海,赵尔成,等. 分散固相萃取-分散液液微萃取/高效液相色谱法测定西瓜中氟唑菌酰胺残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(10):107 - 110.

[11] 李景壮,吴进龙,郭海霞,等. 氟唑菌酰胺悬浮剂高效液相色谱分析方法研究[J]. 农药科学与管理, 2015,36(S1):20 - 22.

[12] 邵婷,刘昕,黎重阳,等. 超声波辅助高效提取辣木籽中的蛋白质[J]. 食品与发酵工业, 2019,45(9):207 - 213.

[13] 王辰,高玲. 超声波辅助提取葛根黄酮的工艺研究[J]. 长江大学学报(自然科学版)农学卷, 2009, 6(4):61 - 64.

[14] 常娅妮,王亚岚,李玲. 酸木瓜总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发, 2019,40(17):52 - 57.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 163 页)

[21] TIAN Qian, FENG Jianjun, HU Jie, et al. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 35457. DOI: 10.1038/srep35457.

[22] 全国植物检疫标准化技术委员会. 黄瓜细菌性角斑病菌检疫鉴定方法: GB/T 36853-2018 [S]. 北京: 北京标准出版社.

[23] 张昕,李国英,金潜,等. 新疆哈密瓜细菌性病害病原菌研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(1): 1 - 3.

[24] 任毓忠,李晖,李国英,等. 哈密瓜种子带细菌性果斑病菌检测技术的研究[J]. 植物检疫, 2004, 18(2):3 - 6.

[25] 李亚利,贾迎春,蒲崇建,等. 采用 16S rDNA 鉴定甜瓜细菌性叶斑病菌 [J]. 植物保护, 2007, 33(3):65 - 68.

[26] 徐瑞,胡白石,田艳丽,等. 应用锁式探针结合斑点杂交技术检测甜瓜细菌性叶斑病[J]. 中国农业科学, 2017, 50(4): 679 - 688.

[27] 宋蕊,刘箐,刘雅莉,等. 西瓜细菌性果斑病菌快速免疫 PCR 检测[J]. 植物检疫, 2009, 23(2): 9 - 11.

[28] 张靓,田茜,刘凤权,等. 六种重要瓜类种传细菌可视基因芯片筛查方法研究[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(1): 120 - 126.

(责任编辑: 杨明丽)