

孙 星,杨邦保,闫小龙,等. 超高效液相色谱串联质谱法分析氟唑菌酰胺在小麦和土壤中的残留与消解动态[J]. 江苏农业科学,2020,48(19):210-214.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.045

超高效液相色谱串联质谱法分析氟唑菌酰胺 在小麦和土壤中的残留与消解动态

孙 星, 杨邦保, 闫小龙, 王冬兰

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

摘要:采用基于分散固相萃取建立起来的一种农药多残留快速(quick)、简单(easy)、便宜(cheap)、高效(effective)、耐用(rugged)、安全(safe)的分析方法——QuEChERS法进行前处理,结合高效液相色谱—串联质谱测定氟唑菌酰胺在小麦和土壤中的残留降解动态和最终残留量。氟唑菌酰胺在仪器中检出限为 2×10^{-3} ng,定量限为0.02 mg/kg。氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤中的添加回收率分别为90.9%~98.4%、86.7%~93.6%、88.3%~88.7%。氟唑菌酰胺在小麦植株中降解动态符合一级动力学指数模型,氟唑菌酰胺在江苏、河南、吉林3地小麦植株中的半衰期分别为4.4、8.6、3.9 d。氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤中的最终残留量分别为 $<0.02 \sim 0.050$ mg/kg、 $0.057 \sim 1.152$ mg/kg、 $0.031 \sim 0.238$ mg/kg。氟唑菌酰胺在小麦籽粒中的最终残留浓度符合GB 2763—2019《食品中农药最大残留限量标准》要求,可以安全使用。

关键词:氟唑菌酰胺;QuEChERS;HPLC-MS/MS;降解;残留;小麦;土壤

中图分类号: S481+.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)19-0210-05

氟唑菌酰胺是甲酰胺类化合物,为琥珀酸脱氢抑制剂发挥作用的杀菌剂,由德国巴斯夫公司开发^[1],它能抑制孢子的发芽、芽孢管的伸长、菌丝体的生长和孢子的形成,通过叶面处理或种子处理防治谷物、水果和蔬菜上由壳针孢菌、葡萄孢菌、白粉菌、尾孢菌、柄锈菌、丝核菌引起的病害^[2],可广泛用于谷物、水果和蔬菜等多种作物^[3-4],目前氟唑菌酰胺的研究方向主要包括辣椒、黄瓜、水稻等的病害防治效果^[5-8],原药含量分析^[9],在谷物、水果、蔬菜中的液相色谱和液相色谱-质谱联用检测方法^[10-15],阐述土壤中的吸附、迁移,水中的降解特性^[16],而鲜有氟唑菌酰胺在小麦中残留以及降解动态的报道。本试验采用基于分散固相萃取建立起来的一种农药多残留快速(quick)、简单(easy)、便宜(cheap)、高效(effective)、耐用(rugged)、安全(safe)的分析方法——QuEChERS法对样品进行前处理同时结合高效液相色谱-串联质谱检测技

术^[17-19],研究氟唑菌酰胺在小麦中的残留降解动态和最终残留量,为氟唑菌酰胺在小麦上的施用剂量和安全间隔期提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和试剂

所用仪器:Agilent 1290-6470A液相色谱串联质谱仪(美国Agilent公司)、R10 v. v.食品切碎搅拌机(法国robot coupe公司)、QL-901漩涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)、Talboys数显型多管式漩涡混合器(上海安谱实验科技股份有限公司)、十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、百分之一电子天平(常州双杰电子有限公司)。

所用试剂:99.5%氟唑菌酰胺标准品(德国Dr. Ehrenstorfer公司)、乙腈(HPLC级,上海星可高纯溶剂有限公司)、乙腈(色谱级,德国默克化工技术有限公司)、PSA吸附剂(天津博纳艾杰尔科技有限公司)、甲酸(HPLC级,SIGMA-ALDRICH公司)。

1.2 分析方法

1.2.1 样品预处理 麦粒样品:将田间麦穗样品脱粒,混匀后,用四分法缩分残留样品,取2份250 g样品用高速万能粉碎机粉碎。

收稿日期:2019-12-30

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0200203)。

作者简介:孙 星(1985—),男,江苏镇江人,助理研究员,主要从事农药残留分析研究。E-mail:sun0519@sohu.com。

通讯作者:王冬兰,研究员,主要从事农药残留分析研究。E-mail:wangdonglan2013@163.com。

秸秆样品:将田间植株样本剪成 1 cm 以下的小段,混匀后,用四分法缩分残留样品,取 2 份 250 g 样品用罗伯特食品搅拌机加干冰粉碎。

1.2.2 提取与净化 称取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加 25 mL 乙腈,组织研磨仪振荡 30 min,经 5 000 r/min 离心,取 2 mL 上清液转移至 5 mL 离心管中,氮气吹至干,2 mL 色谱乙腈定容,加入 0.1 g *N*-丙基乙二胺(PSA)填料,涡流振荡,5 000 r/min 离心,取上清液过 0.22 μm 滤膜后于进样瓶中待测。

1.2.3 色谱和质谱条件 色谱条件:使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 2.1 mm × 50 mm 1.8 μm 色谱柱;柱温 35 °C;进样体积:2.0 μL;流动相及洗脱程序如表 1 所示。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (0.1% 甲酸)(%)	流动相 B (乙腈)(%)	流速 (mL/min)
0	90	10	0.3
0.8	90	10	0.3
1.0	10	90	0.3
3.5	10	90	0.3
3.8	90	10	0.3

质谱条件:使用电喷雾离子源(ESI);多反应离子监测(MRM),正负离子切换扫描;毛细管电压为 3 500 V;干燥气压力为 1.03×10^5 Pa;温度 300 °C;雾化气压力为 4.48×10^5 Pa;辅助气压力为 4.83×10^5 Pa;采用多反应监测模式,采集参数见表 2。

表 2 氟唑菌酰胺的质谱参数

分析物	扫描模式	分子量	离子对 (<i>m/z</i>)	传输电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氟唑菌酰胺	正模式	381.3	382.2/207*	75	30
			382.2/158.9	75	30

注:*为定量离子。

1.3 田间试验设计

本试验于 2017 年 3 月在江苏省南京市、吉林省双辽市、河南省新乡市进行了小麦植株和土壤中氟唑菌酰胺降解动态,小麦籽粒、植株和土壤中的氟唑菌酰胺最终残留试验,按照 NY/T 788—2004《农作物中农药残留试验准则》^[20] 执行,设有空白对照区、低剂量处理区、高剂量处理区、消解动态处理区。

1.3.1 降解动态试验 分别于小麦试验地及空白土壤地均匀施药。施药剂量为制剂量 202.5 g/hm^2 ,施药 1 次,施药后 2 h 和施药后 1、3、

5、7、10、14、21、30、45 d 采样。植株样本的采集:随机在试验小区内剪取地表以上的全株(去根)1 kg,切碎、混匀后采用四分法留样 500 g,装入样本容器中,粘好标签,备用。土壤样本的采集:随机取点 5~10 个,用土钻采集 0~10 cm 的土壤 2 kg,除去土壤中的碎石、杂草、植物根茎等杂物,在盆中混合均匀后采用四分法留样 500 g,装入样本容器中,粘好标签,备用。

1.3.2 最终残留试验 分别设低剂量 135 g/hm^2 与高剂量 202.5 g/hm^2 2 个施药剂量,施药 2~3 次,施药间隔期 7 d。距离最后 1 次施药的间隔时间 21、28、35 d 采样。植株样本采集:用随机方式在试验小区内剪取土表以上的全株 1 kg,切碎、混匀后采用四分法留样 500 g,装入样本容器中包扎妥当,粘好标签,备用。小麦籽粒样本采集:用随机方式在小区内剪取稻穗 2 kg,装入样本袋中包扎妥当,粘好标签,备用。土壤样本采集:随机取点 5~10 个,采用土钻采集 0~15 cm 的土壤 1~2 kg,除去土壤中的碎石、杂草和植物根茎等杂物,装入样本容器中包扎妥当,粘好标签,备用。

1.4 计算公式

氟唑菌酰胺消解反应动力学方程按公式 $C_t = C_0 e^{-kt}$ 计算,降解半衰期按公式 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 计算^[21]。式中: $t_{1/2}$ 为降解半衰期, k 为降解速率常数, C_0 为氟唑菌酰胺及硫酮菌唑的初始浓度, C_t 为 t 时刻氟唑菌酰胺及硫酮菌唑的残留浓度。

2 结果与分析

2.1 基质标准曲线绘制

按“1.2.2”节中所述方法对空白小麦籽粒、植株和土壤提取净化得到空白基质溶剂,配制标准工作溶液 1、2、5、10、20、50、100、200、500 μg/L,在上述液相色谱/质谱条件下测定,以氟唑菌酰胺标准溶液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。其中,小麦籽粒基质曲线方程为: $y = -2 802.2x^2 + 14 215x + 5.872$, $r^2 = 1$;小麦植株基质曲线方程为: $y = -123.27x^2 + 8 009.2x + 33.814$, $r^2 = 1$;小麦土壤基质曲线方程为: $y = -2 484.4x^2 + 9 690.4x + 3.897 5$, $r^2 = 0.999 9$ 。峰面积与溶液浓度呈良好的线性关系。

2.2 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)条件优化

试验中采用乙腈与水的梯度洗脱为 HPLC-

MS/MS 的流动相,正扫描反应离子监测模式检测氟唑菌酰胺,保证氟唑菌酰胺有较高灵敏度和准确度。进入一级质谱后,在正离子检测方式下,氟唑菌酰胺产生稳定的分子离子峰 $[M]^+$,即 $m/z = 382.2$ 。进行二级质谱扫描,得到氟唑菌酰胺的特征碎片离子为 $m/z = 207$ 和 $m/z = 158.9$ 。选取 $m/z = 207$ 为氟唑菌酰胺的定量离子, $m/z = 158.9$ 为氟唑菌酰胺的定性离子。

2.3 前处理方法优化

乙腈是农药残留检测方面常用提取溶剂,虽然难以提取农作物中糖、蛋白质类化合物,但对绝大多数农药有较高的回收率^[22],因此选择乙腈作为本试验提取试剂,以最大限度地提取小麦中的残留农药,并使提取液中的干扰物较少,以确保目标化合物的有效提取。本试验借鉴了 QuEChERS 净化方法,比较了 PSA、 NH_2 、 C_{18} 、炭黑(GCB)4种填料在净化上的效果,研究结果显示,GCB 填料虽然除杂效果好,但对氟唑菌酰胺吸附明显,影响回收率,PSA、 NH_2 、 C_{18} 综合效果比较,PSA 对氟唑菌酰胺回收率和相对标准偏差最好,因此本试验选用 PSA 作为净化的吸附剂。

2.4 方法准确度、精密度和灵敏度

在 0.02、0.1、0.5 mg/kg 3 个添加水平下,氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤中回收率为 90.9% ~ 98.4%、86.7% ~ 93.6%、88.3% ~ 88.7%,相对标准偏差为 2.4% ~ 9.0%、3.8% ~ 6.2%、3.6% ~ 6.0% (表 3)。各样本的添加回收率和变异系数在允许范围内,符合 NY/T 788—2004 的要求。在小麦籽粒、小麦植株及土壤中添加氟唑菌酰胺,添加水平为 0.5 mg/kg,典型图谱如图 1 所示。

表 3 氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤中的添加回收率和相对标准偏差数据($n=5$)

样品基质	定量限 (mg/kg)	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
小麦籽粒	0.02	0.02	91.6	9.0
		0.1	90.9	2.4
		0.5	98.4	3.3
植株	0.02	0.02	93.6	5.2
		0.1	91.5	6.2
		0.5	86.7	3.8
土壤	0.02	0.02	88.7	6.0
		0.1	88.3	3.6
		0.5	88.5	3.9

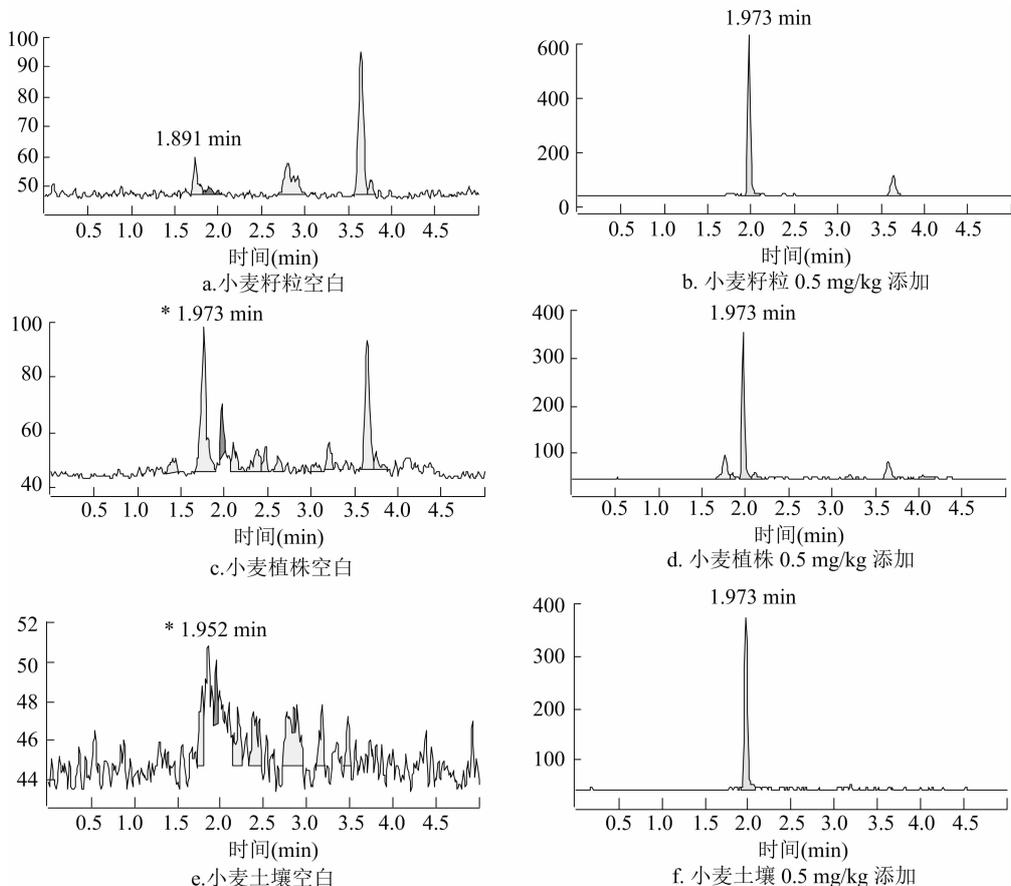


图1 0.5 mg/kg 氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤样品的 LC-MS/MS 色谱图

2.5 氟唑菌酰胺消解动态结果

江苏、河南、吉林三地中氟唑菌酰胺在植株的原始沉积量分别为 1.93、1.32、2.04 mg/kg, 在土壤中的原始沉积量分别为 0.15、0.20、0.12 mg/kg, 植株中残留量与施药后间隔时间呈指数关系, 降解动态符合一级动力学方程回归曲线(图2)。土壤中残留量与施药后间隔时间不呈指数关系, 这可能与土

壤的复杂环境有关, 因此未作回归曲线。江苏试验点植株消解动力学方程为 $C_t = 1.4728e^{-0.155t}$, $r^2 = 0.9124$, 半衰期 $t_{1/2} = 4.5$ d; 河南试验点植株消解动力学方程为 $C_t = 0.9529e^{-0.079t}$, $r^2 = 0.8635$, 半衰期 $t_{1/2} = 8.8$ d; 吉林试验点为植株消解动力学方程 $C_t = 1.1376e^{-0.177t}$, $r^2 = 0.8491$, 半衰期 $t_{1/2} = 3.9$ d。

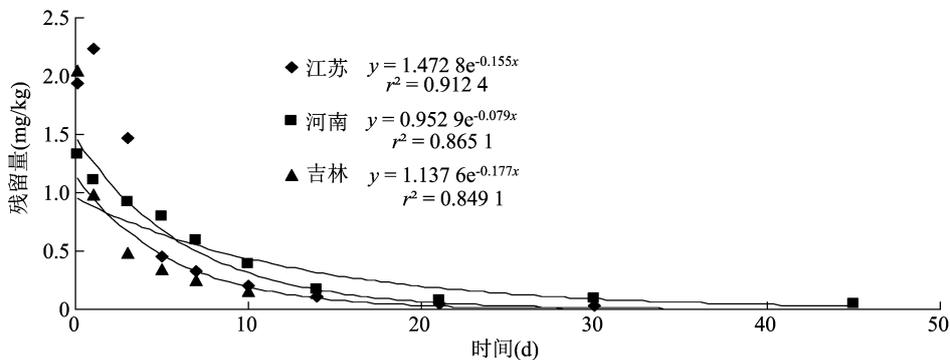


图2 氟唑菌酰胺及硫酮菌唑在小麦植株的消解动态曲线

2.6 氟唑菌酰胺最终残留测定结果

小麦收获时采收, 1年3地氟唑菌酰胺在小麦籽粒中残留量为 <0.020 ~ 0.050 mg/kg, 小麦植株中残留量为 0.057 ~ 1.152 mg/kg, 在土壤中残留量为 0.031 ~ 0.238 mg/kg(表4)。

表4 氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株及土壤中的残留量

试验点	施药剂量 (g/hm ²)	施药次数	采收间隔 (d)	残留量 (mg/kg)		
				小麦籽粒	植株	土壤
江苏	135	2	28	0.050	0.600	0.041
			35	0.032	0.400	0.085
		42	0.038	0.390	0.087	
		3	28	0.029	0.248	0.031
			35	0.043	0.333	0.105
			42	<0.020	0.124	0.080
	202.5	2	28	0.048	0.505	0.051
			35	0.028	0.400	0.061
		42	0.024	0.190	0.229	
		3	28	0.042	0.733	0.105
			35	0.031	0.552	0.171
			42	0.022	0.229	0.181
河南	135	2	28	0.022	0.810	0.051
			35	0.024	0.667	0.066
		42	0.024	0.638	0.076	
		3	28	0.022	0.762	0.050
			35	0.025	0.895	0.114
			42	0.020	0.876	0.133

表4(续)

试验点	施药剂量 (g/hm ²)	施药次数	采收间隔 (d)	残留量 (mg/kg)		
				小麦籽粒	植株	土壤
河南	202.5	2	28	0.026	1.133	0.063
			35	0.029	1.086	0.083
			42	0.022	0.933	0.162
		3	28	0.028	1.133	0.114
			35	0.027	1.152	0.181
			42	0.025	0.876	0.078
吉林	135	2	28	0.061	0.181	0.087
			35	<0.020	0.362	0.105
		3	28	<0.020	0.124	0.067
			35	0.031	0.190	0.162
			42	0.026	0.190	0.133
		河南	202.5	2	28	0.022
35	0.026				0.276	0.181
42	<0.020			0.057	0.092	
3	28			0.028	0.324	0.190
	35			0.020	0.210	0.238
	42			<0.020	0.419	0.152

3 讨果与结论

本试验采用 QuEChERS 前处理方法结合 HPLC - MS/MS 检测技术, 定性、定量研究氟唑菌酰胺在小麦籽粒、小麦植株、土壤中的残留降解动态和最终残留量。HPLC - MS/MS 检测技术灵敏度

高,通过二级质谱的定性离子对进行定性,具有良好的准确性和科学性。因此,此方法具有检测快速、准确等优点,能满足有效成分和残留检测的要求。

本试验结果发现,土壤动态样品中氟唑菌酰胺残留量没有规律,这可能由于土壤环境复杂,收获时采收的小麦植株残留量也远大于籽粒中残留量,这可能是由于氟唑菌酰胺为亲脂性农药,施药方式为喷雾,这就导致农药主要附着在小麦植株上。

氟唑菌酰胺在小麦植株中降解动态符合一级动力学指数模型,土壤中降解动态不符合一级动力学指数模型。氟唑菌酰胺在小麦植株中半衰期为 3.9 ~ 8.6 d,表明氟唑菌酰胺降解较快。以 135 g/hm² 推荐剂量及 202.5 g/hm² 1.5 倍剂量施药时,氟唑菌酰胺在小麦籽粒中残留量为 <0.020 ~ 0.050 mg/kg,低于我国规定的氟唑菌酰胺在小麦上的临时最大残留限量(MRL)^[23](0.3 mg/kg),表明在推荐使用剂量下,在小麦上施用氟唑菌酰胺是安全的。

参考文献:

- [1]邓金保. 巴斯夫的新杀菌剂 fluxapyroxad 及它的一些复配制剂在欧美获登记[J]. 农药市场信息,2012(28):37-38.
- [2]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,2015,14(1):1-7,20.
- [3]Vicentini C B, Romagnoli C, Andreotti E, et al. Synthetic pyrazole derivatives as growth inhibitors of some phytopathogenic fungi[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (25): 10331-10338.
- [4]Nagahori H, Yoshino H, Tomigahara Y, et al. Metabolism of furametpyr. 1. Identification of metabolites and *in vitro* biotransformation in rats and humans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2000,48(11):5754-5759.
- [5]陈春利,王绍敏,杨慧,等. 氟唑菌酰胺及其混剂防治辣椒灰霉病药效分析[J]. 农药,2014,53(9):685-687.
- [6]霍建飞,姚玉荣,郝永娟,等. 吡唑醚菌酯·氟唑菌酰胺防治黄瓜灰霉病田间药效评价[J]. 天津农业科学,2018,24(1):76-78.
- [7]栾炳辉,高一风,姜法祥,等. 12% 苯醚甲环唑·氟唑菌酰胺悬浮剂对黄瓜白粉病田间药效评价[J]. 黑龙江农业科学,2019(1):45-47.
- [8]梁仁敏,罗继腾,陈兰天,等. 氟唑菌酰胺对水稻纹枯病的防治效果研究[J]. 现代农业科技,2016(24):118-119,121.
- [9]万宇,张晓波,王军,等. 氟唑菌酰胺原药的高效液相色谱分析方法[J]. 现代农药,2015,14(4):20-22.
- [10]Dong F S, Chen X, Liu X G, et al. Simultaneous determination of five pyrazole fungicides in cereals, vegetables and fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A,2012,1262:98-106.
- [11]刘磊,邵辉,李辉,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定草莓中氟唑菌酰胺残留量[J]. 农药,2014,53(11):818-820.
- [12]路彩红,杨林,申流柱,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水稻和土壤中氟唑菌酰胺的残留及消解动态[J]. 植物保护,2016,42(4):132-136.
- [13]刘艳萍,王思威,孙海滨. 田间条件下氟唑菌酰胺和吡唑醚菌酯在芒果上的残留及消解动态[J]. 农药学报,2016,18(4):509-515.
- [14]许晓梅. 吡唑醚菌酯和氟唑菌酰胺在番茄中的残留测定研究[C]//中国植物保护学会. 植保科技创新与农业精准扶贫. 中国植物保护学会 2016 年学术年会论文集. 北京:中国植物保护学会,2016:183-188.
- [15]陈文婷,向发椿,徐健蓉,等. 高效液相色谱法测定水和土壤中氟唑菌酰胺残留[J]. 农药,2017,56(5):351-353.
- [16]向发椿. 氟唑菌酰胺在土壤中的吸附、迁移及水中降解特性研究[D]. 绵阳:西南科技大学,2017.
- [17]孙长花,于智勇,王君,等. 基于 QuEChERS-气相色谱-串联质谱法检测大米中多农药残留[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):191-193.
- [18]赵小云,谢德芳. 超高效液相色谱-串联质谱对香蕉中苯醚甲环唑和噁唑啉酮农药残留的检测[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):181-185.
- [19]杨昌彪,付春艳,罗廷武,等. QuEChERS-LC-MS/MS 快速检测番茄 18 种农药残留[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):218-222.
- [20]农业部. 农药残留试验准则:NY/T788—2004[S]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [21]赵文晋,李明,顾桂飞,等. 异丙威和啶虫脒在稻田土壤及水稻中的残留检测与消解动态[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):220-224.
- [22]刘荔彬,端裕树,秦亚萍,等. 农产品中多种残留农药的气相色谱质谱快速检测[J]. 分析化学,2006,34(6):783-786.
- [23]农业部. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S]. 北京:中国农业出版社,2016.