

毕风兰,何东兵. 基于高效液相色谱法检测氟唑菌酰胺在小麦上的残留量[J]. 江苏农业科学,2022,50(24):151-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.24.023

基于高效液相色谱法检测氟唑菌酰胺 在小麦上的残留量

毕风兰,何东兵

(江苏省镇江市植保植检站,江苏镇江 212009)

摘要:为明确氟唑菌酰胺在小麦的田间残留行为,建立了麦穗中氟唑菌酰胺残留量的高效液相色谱检测方法,并在单因素试验的基础上,采用响应面法优化前处理条件。利用空白基质配制标样,用 HPLC-UV 法检测,外标法定量,流速 1 mL/min,流动相为乙腈-水梯度洗脱,色谱柱为 C_{18} 柱,进样体积为 100 μ L,可以使氟唑菌酰胺得到有效分离。试验结果表明,在 0.1~5.0 μ g/mL 的范围内,线性相关系数为 0.995 2,方法的检出限和定量限分别为 0.183 μ g/mL 和 0.617 μ g/mL,精密度良好。响应面分析表明:在料液比 1 g:14 mL、乙腈体积分数 61%、提取时间 33 min 的最佳提取条件下,得到氟唑菌酰胺提取量为 44.79 μ g/g,与预测值一致。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,小麦喷施氟唑菌酰胺 1 次和 2 次,其半衰期分别为 5.82 d 和 5.72 d。收获后麦粒中氟唑菌酰胺残留量均约为 0.02 μ g/g,表明氟唑菌酰胺属于易降解农药。该方法简便可行、准确度高,可以为小麦中氟唑菌酰胺测定标准制定提供参考依据。

关键词:氟唑菌酰胺;高效液相色谱法;小麦;响应面分析;消解;残留量

中图分类号:S481+.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)24-0151-05

氟唑菌酰胺是瑞士先正达开发的新型吡唑酰胺类杀菌剂(development code number: SYN545974),其分子式为 $C_{16}H_{16}Cl_3F_2N_3O_2$,其作用机理为抑制复合 II 酶(complex II enzymes)活性来干扰植物病原体的呼吸,从而有效控制植物病害^[1-2],具有分子结构新颖、杀菌谱广、药剂高效、作用持久、效果稳定等特点,同时对作物、环境及膳食安全,适用于小麦、豆类、蔬菜等多种作物上的真菌防治,且具有较好的防治效果^[3]。

氟唑菌酰胺为琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂,对镰刀菌及其变种有较好的杀菌效果^[4-5]。2020 年初在我国开始上市^[3],但我国尚未建立其残留检测方法,关于氟唑菌酰胺残留分析方法的研究报道也较少^[6-7],2017 年,氟唑菌酰胺成功上市,美国环境保护署规定,氟唑菌酰胺在小麦中的最大残留限量标准为 0.3 mg/kg^[8-9]。响应面法可全

方位、多因素地对试验参数进行优化,确定最佳水平范围^[10-13]。近年来,响应面分析法在食品药品有效成分提取中被广泛应用,而在农残检测前处理方法优化上报道较少。本试验建立了氟唑菌酰胺在麦穗上残留的高效液相色谱检测方法,同时研究了 20% 氟唑菌酰胺悬浮剂在小麦上的消解及最终残留量,旨在为该药剂在小麦上科学合理使用以及制定氟唑菌酰胺在小麦中最大残留限量提供依据,为小麦安全生产提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2022 年 4—5 月在江苏省句容市行香农田进行,小麦品种为镇麦 13,常规田间管理。药剂:20% 氟唑苯酰胺可分散悬浮剂(先正达公司产品)。

1.2 消解动态试验

20% 氟唑菌酰胺按照推荐用量(有效成分)施药分别施药 1 次和 2 次,每个处理 3 次重复,小区面积 20 m²,随机区组排列,以清水处理作为空白对照。施药处理,分别于施药后 1 h 及 1、3、5、7、10、15、14、20 d 在每个小区按照对角线 5 点取麦穗样品,样品经过 50 $^{\circ}$ C 烘干粉碎后 4 $^{\circ}$ C 保存,待测。

收稿日期:2022-09-10

基金编号:江苏省镇江市“1+1+N”新型农业技术推广项目(编号: ZJNJ[2021]03)。

作者简介:毕风兰(1973—),女,江苏镇江人,高级农艺师,主要从事绿色防控技术集成研究与推广工作。E-mail:535097149@qq.com。

1.3 样品分析方法

1.3.1 仪器测定条件 岛津 LC-15C 高效液相色谱仪, C₁₈ 色谱柱, 柱温为 40 ℃, 进样体积为 20 μL, 检测波长为 230 nm, 采用二元梯度洗脱分离, 以水 (A) 和乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱条件为 0 ~ 10 min, 50% B, 10 ~ 20 min, 50% B ~ 60% B, 20 ~ 25 min, 60% B, 25 ~ 30 min, 60% B ~ 50% B, 流速为 1 mL/min。

1.3.2 标准溶液的配制 准确称取氟唑菌酰胺标准物质 (国药集团购买) 100 mg, 利用乙腈定容至 100 mL, 配制成为 1 mg/mL 的储备液, -20 ℃ 保存, 备用。标准工作液: 利用乙腈将母液逐级稀释成 0.1、0.5、1、2、4、8 μg/mL 共 6 个浓度的系列标准溶液, 备用。准确称取 0.5 g 经色谱验证未检出氟唑菌酰胺的空白小麦样品, 加入 2 μg/mL 标准品溶液 10 mL, 在室温条件下振荡提取 30 min, 离心取上清液 2 mL, 氮气吹干后, 加入 80% 乙腈溶解, 氨基柱 (安捷伦) 净化, 收集流出液, 氮气吹干, 加入 50% 乙腈溶解后, 待测。

1.3.3 单因素试验 取 0.5 g 初次施药的小麦麦穗 (施药 1 次初次取样样品), 分别加入提取液溶解, 振荡提取 30 min, 离心取上清 2 mL, 在 40 ℃ 条件下氮气吹干, 加入 80% 乙腈溶解, 氨基柱 (安捷伦) 净化, 收集流出液于氮吹仪中干燥后加入 50% 乙腈溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。选料液比、乙腈体积分数、提取时间、温度 4 个因素进行提取试验, 具体试验方案: (1) 固定乙腈浓度为 100%, 温度为 30 ℃, 时间为 30 min, 考察料液比 (g : mL) 分别为 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25 时氟唑菌酰胺的提取量; (2) 固定料液比为 1 g : 15 mL, 温度为 30 ℃, 提取时间为 30 min, 考察乙腈体积分数分别为 0、20%、40%、60%、80%、100% 时氟唑菌酰胺的提取量; (3) 固定料液比为 1 g : 15 mL, 乙腈体积分数 60%, 时间为 30 min, 考察温度分别为 25、30、40、50、60、70 ℃ 时氟唑菌酰胺的提取量; (4) 固定料液比为 1 g : 15 mL, 乙腈体积分数 60%, 温度为室温, 考察提取时间分别为 5、15、30、45、60 min 时氟唑菌酰胺的提取量。根据单因素试验结果, 确定主要影响因素和各因素的适宜范围。

1.3.4 响应面分析试验设计 根据 Box-Behnken 试验设计原理^[14-17], 以氟唑菌酰胺含量为指标, 设定料液比、乙腈体积分数、提取时间 3 个因素为主要考察因素, 进行响应面试验设计, 因素与水平见

表 1。

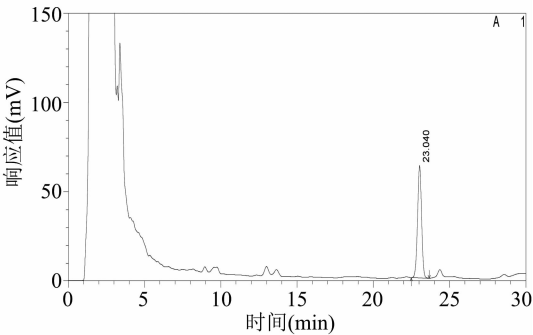
表 1 氟唑菌酰胺提取响应面因素与水平

编码	A:料液比 (g : mL)	B:乙腈体积分数 (%)	C:提取时间 (min)
-1	1 : 5	40	15
0	1 : 10	60	30
1	1 : 15	80	45

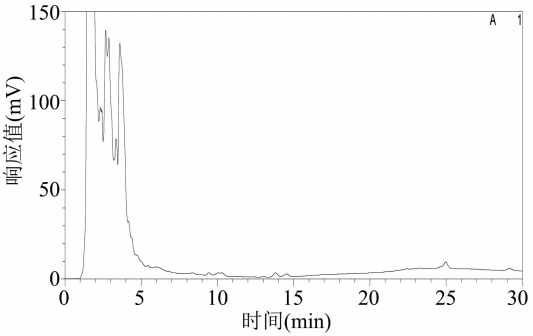
2 结果与分析

2.1 色谱条件选择和标准曲线的绘制

通过岛津 LC-15C 高效液相色谱的光谱采集功能, 发现氟唑菌酰胺的最大吸收波长为 230 nm, 且该波长下溶剂对其产生的干扰不显著。等度洗脱, 流动相 50% ~ 100% 乙腈不能很好地将样品分离, 梯度洗脱条件为: 0 ~ 10 min, 50% B, 10 ~ 20 min, 50% B ~ 60% B, 20 ~ 25 min, 60% B, 25 ~ 30 min, 60% B ~ 50% B, 氟唑菌酰胺与杂质峰分离较好, 峰形对称, 分析时间较短。具体色谱图见图 1。



A. 2 μg/mL 标准品溶解于空白小麦提取液



B. 空白小麦提取液

图1 氟唑菌酰胺色谱图

氟唑菌酰胺标样在 0.1、0.5、1、2、4、8、10 μg/mL 浓度范围内, 按照“1.3.2”节方法进行处理后, 进行检测, 得到标准曲线为 $y = 5576.7x + 52724$, $r^2 = 0.9832$, 标准曲线的线性范围为 0.1 ~ 10 μg/mL, 在此范围内进行精确检测, 该方法检出限为

0.183 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.617 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比的影响 图 2 表明, 相同提取条件下, 随着料液比的增加, 氟唑菌酰胺提取量不断增大, 当料液比超过 1 g : 15 mL 后, 氟唑菌酰胺提取量反而有所下降, 可能由于小麦样品中其他成分的溶出增加, 影响氟唑菌酰胺的提取分离, 导致提取量下降。料液比在 1 g : 10 mL ~ 1 g : 15 mL 之间氟唑菌酰胺的提取量无显著差异, 但显著高于其他处理, 料液比增加可在一定程度提高传质推动力, 但是从溶剂用量、能耗和提取效果 3 方面考虑, 选择 1 g : 5 mL ~ 1 g : 15 mL 为提取最佳浓度范围。

2.2.2 提取液乙腈体积分数的影响 通过上述试验, 采用乙腈作为提取液, 加入一定量的水, 对氟唑菌酰胺的溶出有促进作用。由图 3 可见, 在乙腈体积分数为 60% 时, 提取量最高, 说明 60% 的乙腈极性与氟唑菌酰胺极性相当, 因此选择乙腈体积分数最佳范围为 40% ~ 80%。

2.2.3 温度的影响 温度在 20 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 范围内对氟

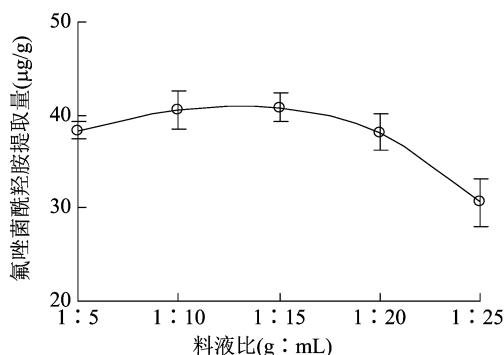


图2 料液比对氟唑菌酰胺提取量的影响

唑菌酰胺的提取量无显著性影响 (图 4), 说明在 30 min 内, 氟唑菌酰胺基本溶出, 不受温度的影响。考虑能耗和经济问题, 提取温度选择室温。

2.2.4 提取时间的影响 随着提取时间的延长氟唑菌酰胺的提取量增加, 当达到 30 min 时, 达到最大, 此后随着时间的延长, 提取量下降, 说明氟唑菌酰胺的溶出在 30 min 达到最大 (图 5), 而长时间提取使小麦样品中其他成分的溶出增加, 影响提取量。因此, 选择最佳提取时间范围为 20 ~ 40 min。

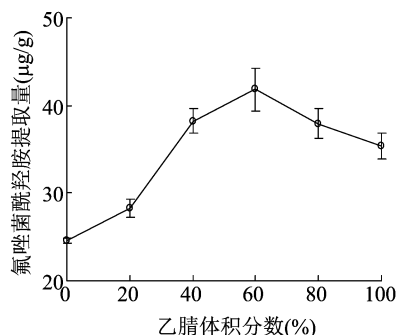


图3 乙腈体积分数对氟唑菌酰胺提取量的影响

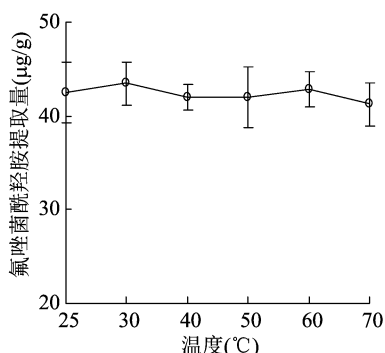


图4 温度对氟唑菌酰胺提取量的影响

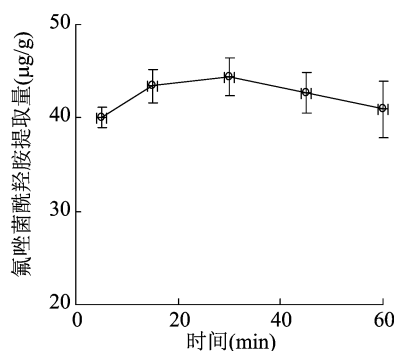


图5 提取时间对氟唑菌酰胺提取量的影响

2.3 响应面分析

2.3.1 二次回归方程数学模型的建立及方差分析

采用 Design Expert 10 软件, 利用 Box - Behnken 设计原理, 以唑菌酰胺提取量 (y) 为响应值, 以 A (料液比)、 B (乙腈体积分数) 和 C (提取时间) 3 个因素为自变量, 进行响应面试验, 其设计及结果见表 2, 得到二次多项回归模型方程:

$$y = 13.99 + 1.73A - 0.21B + 0.099C - 0.53AB + 0.093AC + 0.73BC - 1.13A^2 - 1.29B^2 - 0.70C^2.$$

方差分析结果见表 3, 该模型 F 值为 11.16, R^2 为 0.9349, 均达到显著水平, 表明模型中各因素对氟唑菌酰胺的影响显著, 可以用该方程对唑菌酰胺的提取条件进行预测。失拟项值为 0.7782, 说

明模型对纯误差不显著, 该模型调整确定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.8511$, 说明该模型能解释 85.11% 响应值的变化, 因素 A 、 A^2 、 B^2 对氟唑菌酰胺提取率影响显著, 由 P 值可以看出, 提取条件对唑菌酰胺提取含量影响程度从大到小依次为料液比 > 乙腈体积分数 > 提取时间。

2.3.2 响应面模型解析 根据二次模型所做的响应面可评价试验因素对唑菌酰胺提取量的两两交互作用, 以及确定各因素的最佳水平范围。椭圆的等高线图表示两因素间交互作用强, 圆形的等高线图表示两因素间交互作用弱 (图 6)。料液比与提取时间、乙腈体积分数与提取时间具有显著的交互作用, 料液比与乙腈体积分数交互作用不显著。

表 2 氟唑菌酰胺提取响应面试验方案及结果

编号	水平			提取量(μg/g)	
	因素 A	因素 B	因素 C	测定值	预测值
1	1	1	0	43.16	42.10
2	0	-1	-1	38.82	38.88
3	0	1	1	40.87	40.82
4	0	0	0	44.43	43.75
5	0	0	0	46.47	43.75
6	0	0	0	42.22	43.75
7	-1	-1	0	28.87	29.94
8	1	0	1	42.93	44.05
9	-1	0	-1	33.70	32.60
10	-1	0	1	32.92	32.63
11	1	0	-1	42.55	42.85
12	0	-1	1	35.67	34.90
13	0	1	-1	34.83	35.61
14	1	-1	0	41.43	41.10
15	-1	1	0	31.24	31.59
16	0	0	0	40.49	43.75
17	0	0	0	45.13	43.75

表 3 Box - Behnken 中心组合设计的方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	P 值
模型	417.14	9	11.160	0.002 2
A	234.82	1	56.540	0.000 1
B	3.53	1	0.850	0.387 4
C	0.76	1	0.180	0.680 8
AB	0.10	1	0.025	0.878 7
AC	0.34	1	0.082	0.783 2
BC	21.12	1	5.090	0.058 7
A ²	52.97	1	12.760	0.009 1
B ²	68.25	1	16.440	0.004 8
C ²	19.93	1	4.800	0.064 6
残差	29.07	7		
失拟项	6.35	3	0.370	0.778 2
纯误差	22.72	4		
总和	446.21	16		
标准差	2.04			
平均值	39.17			
变异系数	5.20			
拟合程度	57.36			

注: * 显著 $P < 0.05$; ** 极显著 $P < 0.01$; 不显著 $P > 0.10$ 。
 $R^2 = 0.934\ 9$; $R^2_{adj} = 0.851\ 1$ 。

2.3.3 验证试验结果 对试验模型进行进一步分析,得到最佳条件为:料液比 1 g : 13.81 mL,乙腈体积分数 61.35%,提取时间 32.78 min,氟唑菌酰胺提取预测值为 45.841 μg/g,考虑到实际操作局限

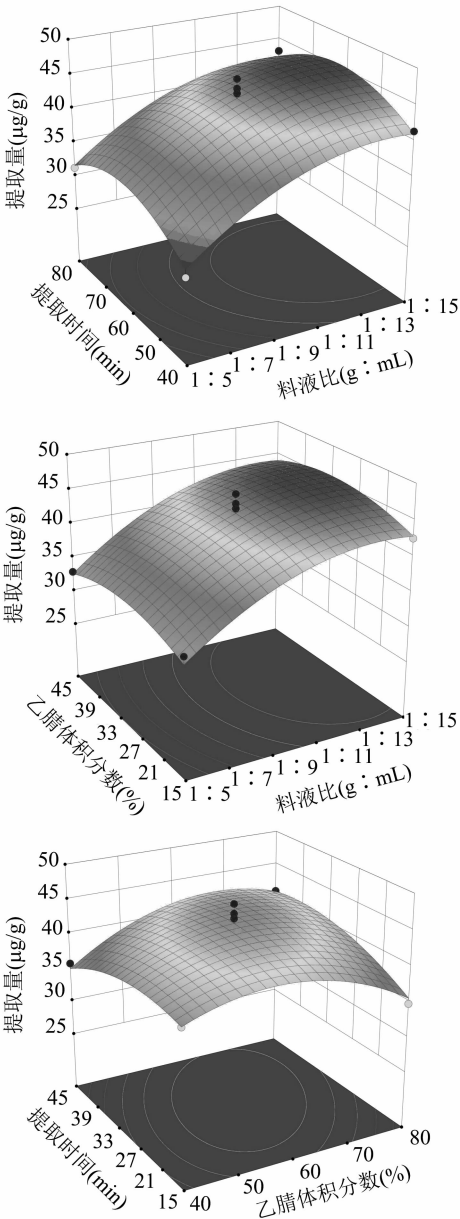


图 6 三因素交互影响氟唑菌酰胺提取量的响应面

性,对影响因素加以修正,修正后的工艺条件:料液比 1 g : 14 mL,乙腈体积分数为 61%,提取时间 33 min,在此条件下,经过 3 次平行试验,平均氟唑菌酰胺提取结果为 44.79 μg/g,测定结果稳定,偏差不大,说明响应面优化模型能较好地预测小麦中氟唑菌酰胺残留提取量。

2.4 消解动态分析及最终残留量

田间条件下,分别喷施氟唑菌酰胺 1 次和 2 次,观察 20 d 内的消解动态,建立消解动力学方程(表 4)。施药 1 次和施药 2 次原始积累量分别为 37.39 μg/g 和 60.44 μg/g,于麦穗上的消解动态如图 7 所示。消解率与时间的关系符合一级动力学模

型^[18],半衰期分别为 5.82 d 和 5.72 d,施药次数对氟唑菌酰胺降解半衰期无显著影响。本次收获麦粒中氟唑菌酰胺含量约为 0.02 $\mu\text{g/g}$,符合最大残留量限量标准。

表 4 氟唑菌酰胺的降解动力学参数

施药次数	降解动力学方程	相关系数	半衰期(d)
1	$C_t = 27.312e^{-0.129x}$	0.969 9	5.82
2	$C_t = 51.326e^{-0.131x}$	0.932 6	5.72

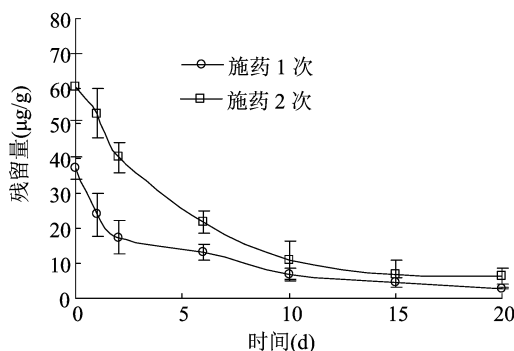


图 7 氟唑菌酰胺的降解曲线

3 结论

对小麦中氟唑菌酰胺残留量的 HPLC 检测和降解动态进行了研究,采用响应面法优化 HPLC 测定麦穗中氟唑菌酰胺残留量的提取条件。建立小麦麦穗中氟唑菌酰胺残留量的 HPLC 测定方法,该方法在 0.1 ~ 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,线性相关系数为 0.995 2,方法的检出限和定量限分别为 0.185 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.617 $\mu\text{g/mL}$ 。前处理单因素试验表明,仅料液比、乙腈体积分数和提取时间对氟唑菌酰胺残留检测具有显著影响,通过响应面分析,在修正后的最佳条件下(料液比 1 g : 14 mL,乙腈体积分数 61%,提取时间 33 min)得到氟唑菌酰胺含量为 44.79 $\mu\text{g/g}$ 。氟唑菌酰胺的降解速率较快($T_{1/2} < 30$ d),属于降解农药,收获后小麦中氟唑菌酰胺含量为 0.02 $\mu\text{g/g}$,低于美国、加拿大等规定的氟唑菌酰胺在小麦上的最大残留限量(0.3 $\mu\text{g/g}$)。

参考文献:

- [1]袁娜. 跨国巨头面临低迷市场,业绩增长锁定新品研发[J]. 营销界(农资与市场),2016(11):44-48.
- [2]Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, et al. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II

- (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction[J]. Journal of Biological Chemistry,2006,281(11):7309.
- [3]冷伟锋,赵红,刘松,等. 新型农药氟唑菌酰胺[J]. 烟台果树,2022(3):36-39.
- [4]Hou Y P, Mao X W, Wang J X, et al. Sensitivity of *Fusarium asiaticum* to a novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pydiflumetofen[J]. Crop Protection,2017,96:237-244.
- [5]Avenot H F, Michailides T J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi[J]. Crop Protection,2010,29(7):643-651.
- [6]智沈伟,闫思月,李兴海,等. 高效液相色谱法测定氟唑菌酰胺在西瓜中的残留[J]. 农药,2017,56(4):276-278.
- [7]李景壮,吴进龙,郭海霞. 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(z1):20-22.
- [8]陈宏州,韩凯,杨红福,等. 不同杀菌剂在麦穗中的降解动态及对小麦赤霉病防效评估[J]. 麦类作物学报,2022,42(4):504-511.
- [9]吴琴燕,陈宏州,李冬冬,等. UPLC-MS/MS 法检测麦穗中氟唑菌酰胺的残留和降解动态[J]. 植物保护,2021,47(2):164-168.
- [10]Pan Y, Zhang J, Shen T, et al. Optimization of ultrasonic extraction by response surface methodology combined with ultrafast liquid chromatography-ultraviolet method for determination of four iridoids in *Gentiana rigescens*[J]. Journal of Food and Drug Analysis,2015,23(3):529-537.
- [11]何凤兰,李灿军,朱东霞,等. 响应面法优化石柑子的提取工艺[J]. 江西中医药,2017,48(7):63-65.
- [12]Olaya G, Linley R, Edlebeck K, et al. ADEPIDYNTM fungicide: cross resistance patterns in *Alternaria solani*[C]. APS Annual Meeting,2016:61-70.
- [13]Zhang H, Ma Y. Optimisation of high hydrostatic pressure assisted extraction of anthocyanins from rabbiteye blueberry pomace[J]. Czech Journal of Food Sciences,2017,35(2):180-187.
- [14]Ma Q, Rahman A, Holland P T, et al. Field dissipation of acetochlor in two New Zealand soils at two application rates[J]. Journal of Environmental Quality,2004,33(3):930.
- [15]Bezerra M A, Santelli R E, Oliveira E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta,2008,76(5):965-977.
- [16]吴菲,吕晓丹,唐俊杰,等. 响应面法优化萃取条件用于高效液相色谱分析饮用水中痕量邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯及其迁移规律[J]. 色谱,2016,34(10):992-997.
- [17]Cao W, Zhang C, Ji H, et al. Optimization of peptic hydrolysis parameters for the production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate from *Acetes chinensis* through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture,2012,92(1):42-48.
- [18]Liang Y, Wang W, Shen Y, et al. Dynamics and residues of chlorpyrifos and dichlorvos in cucumber grown in greenhouse[J]. Food Control,2012,26(2):231-234.