

多壁碳纳米管固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱测定烤烟中粉唑醇残留量

翟争光¹, 贾楠², 李昆奇³, 曾维爱¹, 谢鹏飞¹, 蔡海林¹, 赵阿娟¹,
霍晓宜², 周勇^{2*}

(1. 湖南省烟草公司长沙市公司, 长沙 410011; 2. 湖南省农业科学院, 湖南省农业生物技术研究所, 长沙 410125;
3. 浏阳市烤烟生产指导中心, 浏阳 410300)

摘 要: **目的** 建立多壁碳纳米管固相萃取净化结合超高效液相色谱-串联质谱法(Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定烤烟中粉唑醇残留量的方法。**方法** 烤烟样品用 0.1%甲酸乙腈溶液提取, NaCl 盐析, 多壁碳纳米管(MS-NANO-V)净化, 并采用超高效液相色谱-串联质谱法检测, 以 0.1%甲酸水溶液-甲醇溶液作为流动相, 外标法定量。**结果** 粉唑醇在 0.001~1 mg/L 浓度范围内的相关系数为 0.9989, 呈现良好的线性关系。在 0.005、0.5、5 mg/kg 3 个添加水平下, 粉唑醇在烤烟中的平均回收率范围为 90%~102%, 相对标准偏差范围为 4.9%~9.6%。方法的定量限为 0.005 mg/kg。**结论** 该方法高效、准确, 操作简便、精密度好, 适用于烤烟中粉唑醇残留量的检测。

关键词: 多壁碳纳米管; 烤烟; 粉唑醇; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of flutriafol residue in flue-cured tobacco by multi-wall carbon nanotubes solid phase extraction/ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAI Zheng-Guang¹, JIA Nan², LI Kun-Qi³, ZENG Wei-Ai¹, XIE Peng-Fei¹, CAI Hai-Lin¹,
ZHAO A-Juan¹, HUO Xiao-Yi², ZHOU Yong^{2*}

(1. Changsha City Tobacco Company of Hunan Province, Changsha 410011, China; 2. Institute of Biotechnology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China;
3. Liuyang Flue-cured tobacco Production Guidance Center, Liuyang 410300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of flutriafol residue in flue-cured tobacco by multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with 0.1% formic acid and acetonitrile solution, then salted out with NaCl, purified with multi-walled carbon nanotubes (MS-NANO-V), and detected by UPLC-MS/MS. The mobile phase was 0.1% formic acid solution-methanol, and the contents were quantified by external standard method. **Results** Flutriafol had good linear relationships in the range of 0.001–

基金项目: 长沙烟区烟叶质量安全风险控制点分析研究与应用(CYKJ2017-01)

Fund: Supported by the Analysis and application of risk control points of tobacco quality and safety in Changsha tobacco-growing areas (CYKJ2017-01)

*通讯作者: 周勇, 博士, 主要研究方向为农药残留。E-mail: qimiaobuchugan@126.com

*Corresponding author: ZHOU Yong, Ph.D, Institute of Biotechnology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China. E-mail: qimiaobuchugan@126.com

1.0 mg/L, and the correlation coefficient was 0.9989. The average recoveries of flutriafol in flue-cured tobacco were 90%–102% with the 3 spiked levels of 0.005、0.5 and 5 mg/kg, the relative standard deviations were 4.9%–9.6%. The limit of quantification was 0.005 mg/kg. **Conclusion** The method is efficient, accurate, simple and precise, and is suitable for the determination of residual powder azolidol in flue-cured tobacco.

KEY WORDS: multi-walled carbon nanotubes; flue-cured tobacco; flutriafol; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

粉唑醇是一种广谱内吸性杀菌剂,能有效防治多种锈病及白粉病等病害,具有高效、低毒、低抗性的优点^[1,2],该药药效持久且不会对环境造成污染^[3],其作用机理是通过抑制麦角甾醇的合成,从而抑制菌丝生长^[4],在我国目前粉唑醇在烟草上登记用于防治烟草白粉病^[5]。农药残留影响烟叶质量安全,因此检测粉唑醇在烟草上的残留量对保障烟草品质具有重要意义。

由于烟草样品基质较为复杂,样品净化是实验的关键影响因素。多壁碳纳米管是由多层石墨平面卷曲形成的一种新型纳米材料,其结构独特,性能优异,具有层状中空结构特征,比表面积大,附载能力强,可作为吸附剂用于吸附复杂基质中的干扰物质等^[6,7],蒋湘等^[8]利用多壁碳纳米管净化测定鸡蛋中药物残留,赵海香等^[9]利用多壁碳纳米管固相萃取净化来测定猪肉和鸡肉中的磺胺残留,蒋明明等^[10]利用多壁碳纳米管测定普洱茶中农药残留。烟草中农药残留检测常用的有气相色谱-串联质谱法^[11,12]和液相色谱-串联质谱法^[13]等,粉唑醇的检测方法有气相色谱法^[14,15],液相色谱法^[16,17],气相色谱-串联质谱法^[18,19]等。何进^[4]采用超高效液相色谱法测定烟叶中粉唑醇残留量,但存在样品前处理过程繁琐,方法精密度及灵敏度较低等不足。

本研究采用多壁碳纳米管对样品进行净化,超高效液相色谱-串联质谱法测定烤烟中粉唑醇的残留量,具有更好的抗干扰能力和更高的灵敏度,为粉唑醇在烟草上的安全使用提供了技术保障。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

TSQ Endura 三重四级杆液质联用仪(美国赛默飞世尔公司); Hypersil GOLD C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)色谱柱; Blixer 6 V.V.乳化搅拌机(法国罗伯特公司); TDZ5-WS 低速离心机、TGL-16A 高速冷冻离心机(湖南平凡科技有限公司); MTV-100 多管旋涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司); XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); ME104E 电子天平(梅特勒-托利多国际贸易

易上海有限公司); YP5102 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司); DHG-9030A 电热鼓风干燥箱(中仪国科科技有限公司)。

乙腈、氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯,德国默克公司); 甲酸(色谱纯,德国 CNW 科技公司); 超纯水(屈臣氏集团有限公司); 固相萃取碳纳米净化管(MS-NANO-V, 15 mL 离心管,博纳艾杰尔科技公司)。

粉唑醇标准品(纯度 98.2%, 坛墨质检科技股份有限公司)。

实验所用烤烟样品来自湖南长沙 8 个烟叶生产基地。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取匀浆的 5.0 g 烤烟样品于 100 mL 离心管中,加 10 mL 超纯水,25 mL 0.1%甲酸乙腈溶液,在多管涡旋混合仪上涡旋 10 min,加 5.0 g 氯化钠,涡旋 3 min,于 4000 r/min 条件下离心 3 min,取 1.5 mL 上清液于 MS-NANO-V 净化管中,涡旋 1 min,使上清液和净化管中的多壁碳纳米管充分混合,然后在 4000 r/min 条件下离心 3 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中待检测。

2.2.2 液相色谱条件

三重四级杆液质联用仪 TSQ Endura, 色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm), 柱温为 35 °C, 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μL, 流动相 A 为甲醇溶液, 流动相 B 为 0.1%甲酸水溶液(V/V); 梯度洗脱条件: 0~0.5 min: 20% B; 0.5~2.0 min: 20% B-95% B; 2.0~4.5 min: 95% B; 4.5~4.6 min: 95% B-20% B; 4.6~5.5 min: 保持 20% B。

2.2.3 质谱条件

电离源模式: 电子喷雾离子化(electron spray ionization, ESI); 电离源极性: 正; 雾化气: 氮气; 鞘气压力: 276 kPa; 离子传输管温度: 320 °C; 喷嘴温度: 300 °C; 离子喷雾电压: 3500 V。粉唑醇的保留时间、母离子、子离子和碰撞能量和 RF Lens 等参数见表 1。

2.2.4 标准曲线

称取 0.0101 g 粉唑醇标准品,用甲醇溶解并定容至 100 mL,得到 99.2 mg/L 的母液。取制备好的不含目标化合物的空白样品,按照 2.2.1 的方法进行样品前处理,得到

基质空白溶液。用基质空白溶液将 99.2 mg/L 的母液逐级稀释成浓度分别为 10、1.0、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001 mg/L 的基质标准溶液。按 2.2.2 和 2.2.3 的条件进行检测, 每个浓度重复测定 3 次, 外标法定量。以进样浓度为横坐标、相对应的峰面积为纵坐标, 绘制粉唑醇的基质标准曲线。

表 1 粉唑醇的质谱参数
Table 1 Mass spectrum parameters of flutriafol

保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	射频透镜电压/V	碰撞能量/eV
3.81	302.2	70.3	97	29
	302.2	123.1	97	21

2.2.5 添加回收率

往空白样品中添加 0.005、0.5、5 mg/kg 3 个浓度水平的基质标准溶液, 添加后振荡混匀, 静置 30 min, 按照 2.2.1 的方法进行样品前处理, 按 2.2.2 和 2.2.3 的条件进行检测分析, 每个浓度重复 5 次, 计算添加回收率和标准偏差。

3 结果与分析

3.1 超高效液相色谱-串联质谱工作条件的优化

对粉唑醇标准溶液进行母离子全扫描, 再对子离子进行全扫描。选择 2 对响应值高的特征离子对: 302.2/70.3 作为定量离子对, 302.2/123.1 作为定性离子对, 再进行碰撞能量等参数的优化。粉唑醇的色谱图见图 1, 烤烟空白样品色谱图见图 2, 添加样品色谱图见图 3。

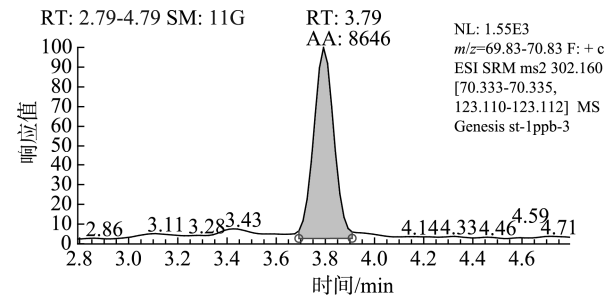


图 1 粉唑醇标准溶液色谱图(0.001 mg/L)
Fig.1 Chromatogram of flutriafol standard solution (0.001 mg/L)

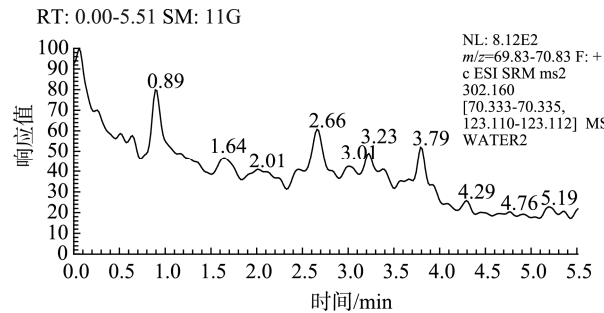


图 2 空白样品色谱图
Fig.2 Chromatogram of blank sample

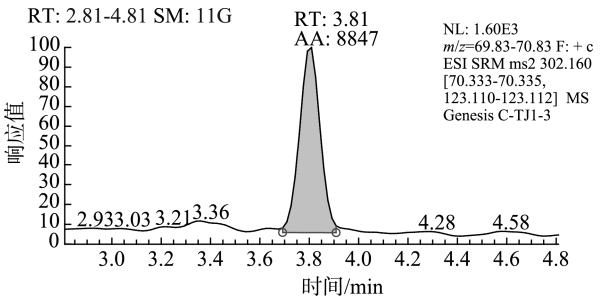


图 3 加标样品色谱图(0.005 mg/kg)
Fig.3 Chromatogram of spiked sample(0.005 mg/kg)

3.2 流动相的选择

选择甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液 2 种流动相, 比较粉唑醇在这 2 种流动相下的响应强度。结果表明流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液时, 提高了粉唑醇的离子化效率, 峰形较好不拖尾, 目标峰重现性好且响应更高, 因此选择甲醇-0.1%甲酸水溶液作为液相流动相条件。

3.3 方法的线性、定量限

按照 2.2.2 和 2.2.3 的条件, 将配制的粉唑醇基质标准溶液进行检测, 每个浓度平行测定 3 次。以溶液浓度为横坐标, 相对应的峰面积为纵坐标, 绘制粉唑醇基质标准曲线, 得到粉唑醇的线性回归方程。结果表明, 在 0.001~1.0 mg/L 范围内, 粉唑醇的线性关系良好, 线性方程为 $Y=2788675X+94618$, 相关系数 $r^2=0.9989$ 。

3.4 方法的回收率

粉唑醇在烤烟中的添加回收率实验结果表明(如表 2), 在 0.005、0.5、5 mg/kg 3 个添加水平下, 粉唑醇的平均添加回收率为 90%~102%, 相对标准偏差为 4.9%~9.6%。符合农药残留检测的要求。以添加回收实验的最低添加浓度作为方法的定量限, 本方法的定量限为 0.005 mg/kg。

3.5 实际样品测定

使用本方法对采自湖南长沙 8 个烟叶生产基地的烤烟样品进行检测, 结果显示, 8 个生产基地烤烟样品粉唑醇含量均小于本方法定量限 0.005 mg/kg。

表 2 粉唑醇在烤烟中的添加回收率和相对标准偏差(n=5)
Table 2 Spiked recoveries and relative standard deviation of flutriafol in flue-cured tobacco(n=5)

基质	添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
烤烟	0.005	102	9.6
	0.5	95	7.7
	5	90	4.9

4 结论与讨论

烤烟中含有大量的油脂、烟碱及其他较为复杂的物质, 对其农药残留检测造成一定难度, 因此前处理净化过程对整个试验结果的准确性有较大影响。多壁碳纳米管是多孔结构, 且具有疏水表面, 其表面经过官能化修饰后, 大大增加了色素、脂肪酸等干扰物的选择性。通过 π - π 作用、疏水相互作用以及范德华力等多种作用力达到对化合物的吸附目的, 其吸附能力较强, 净化效果良好^[9]。同时通过表面去活技术, 控制了材料对药物的过分吸附力, 保证了目标农药的回收率。采用多壁碳纳米管对基质复杂的烤烟样品起到了良好的净化效果, 达到了实验的要求。

本研究通过对仪器工作条件、液相色谱流动相等条件的优化, 建立了多壁碳纳米管固相萃取结合液相色谱串联质谱法测定烤烟中粉唑醇残留量的分析方法, 该方法操作简便, 灵敏度高, 精密度好, 适合烤烟中粉唑醇残留量的检测分析。

参考文献

[1] 黄超群, 丁慧瑛, 朱晓雨, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 7 种三唑醇类杀菌剂的残留量[J]. 分析测试学报, 2011, 30(6): 656-660.
Huang CQ, Ding HY, Zhu XY, *et al.* Simultaneous determination of 7 triazole alcohol fungicides in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2011, 30(6): 656-660.

[2] 王冬兰, 简秋, 宋稳成, 等. 粉唑醇在小麦和土壤中的残留[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2): 423-429.
Wang DL, Jian Q, Song WC, *et al.* Residues of flutriafol in wheat and soil [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2014, 30(2): 423-429.

[3] 刘烨潼, 谢蕴琳, 张强, 等. 粉唑醇在稻田中的残留消解动态及风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 7057-7063.
Liu YT, Xie YL, Zhang Q, *et al.* residual dynamics and risk assessment of flutriafol in paddy [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(20): 7057-7063.

[4] 何进. 25%粉唑醇悬浮剂在烟草及土壤中的残留分析及消解动态研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
He J. Study on residue analysis and digestion dynamics of 25% powder azolidol suspension in tobacco and soil [D]. Guiyang: Guizhou University, 2015.

[5] 刘刚, 吕爱芹, 闫鹏, 等. 粉唑醇登记应用现状及下步管理建议[J]. 现代农药, 2019, 18(4): 1-4.
Liu G, Lv AQ, Yan P, *et al.* Application status and management suggestions of the registration of flutriafol [J]. Mod Agrochem, 2019,

18(4): 1-4.

[6] 林涛, 王宗楠, 贺利民. MWCNT-MIP 技术在兽药残留分析前处理中的应用进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(12): 57-60.
Lin T, Wang ZN, He LM. Progress on multi-walled carbon nanotube-molecularly imprinted solid-phase extraction technique in the analysis of veterinary drugs residues [J]. Chin J Vet Med, 2013, 47(12): 57-60.

[7] Cirillo G, Caruso T, Hampel S, *et al.* Novel carbon nanotube composites by grafting reaction with water-compatible redox initiator system [J]. Coll Polymer Sci, 2013, 291(3): 699-708.

[8] 蒋湘, 吴毅, 黄燕红, 等. 多壁碳纳米管净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 44 种药物残留[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 230-237.
Jiang X, Wu Y, Huang YH, *et al.* Determination of 44 drug residues in eggs by purified multi-walled carbon nanotubes-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(10): 230-237.

[9] 赵海香, 刘海萍, 闫早婴. 多壁碳纳米管固相萃取净化-高效液相色谱法测定猪肉和鸡肉中的磺胺多残留[J]. 色谱, 2014, (3): 294-298.
Zhao HX, Liu HP, Yan ZY. Analysis of sulfonamide residues in pork and chicken by high performance liquid chromatography coupled with solid-phase extraction using multiwalled carbon nanotubes as adsorbent [J]. Chin J Chromatogr, 2014, (3): 294-298.

[10] 蒋明明, 曾小娟, 宋红坤, 等. 多壁碳纳米管/N-丙基乙二胺混合吸附-超高效液相色谱-串联质谱法测定普洱茶中 3 种手性杀菌剂农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1702-1708.
Jiang MM, Zeng XJ, Song HK, *et al.* Determination of 3 chiral fungicide pesticide residues in Pu-erh tea by multi-walled carbon nanotubes/primary secondary amine mixed adsorption-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(6): 1702-1708.

[11] 李玮, 卢春山, 李华, 等. 气相色谱-串联质谱技术分析烟草中 49 种农药残留[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1048-1055.
Li W, Lu CS, Li H, *et al.* Determination of 49 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(11): 1048-1055.

[12] 陈晓水, 边照阳, 唐纲岭, 等. 气相色谱-串联质谱技术分析烟草中的 132 种农药残留[J]. 色谱, 2012, 30(10): 1043-1055.
Chen XS, Bian ZY, Tang GL, *et al.* Determination of 132 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(10): 1043-1055.

[13] 胡雪艳, 彭涛, 陈辉, 等. 茶叶中 10 种农药残留的液相色谱-串联质谱法和气相色谱-串联质谱法测定[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 240-247, 252.
Hu XY, Peng T, Chen H, *et al.* Determination of ten pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(17): 240-247, 252.

[14] 袁烁, 赵建庄, 蔡慧敏, 等. 固相萃取-气相色谱法同时检测草莓中 13 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(9):2869-2876.
Yuan S, Zhao JZ, Cai HM, *et al.* Simultaneous determination for the residue of thirteen pesticides in strawberry with solid phase extraction and gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(9): 2869-2876.

- [15] 于传宗, 徐婧, 吴萍. 粉唑醇在小麦和土壤中残留量的气相色谱测定方法研究[J]. 现代农药, 2010, 9(1): 39–41.
Yu CZ, Xu J, Wu P. Determination of flutriafol residues in soil and wheat by GC [J]. Mod Agrochem, 2010, 9(1): 39–41.
- [16] 曹巍, 关云飞, 陈高部, 等. 粉唑醇的高效液相色谱分析[J]. 农药, 2011, 50(4): 276–277.
Cao W, Guan YF, Chen GB, *et al.* Determination of flutriafol by HPLC [J]. Agrochemicals, 2011, 50(4): 276–277.
- [17] 余苹中, 贾春虹, 朱晓丹, 等. 粉唑醇在小麦和土壤中的消解规律[J]. 农药, 2014, 53(2): 116–118.
Yu PZ, Jia CH, Zhu XD, *et al.* Dissipation dynamics analysis of flutriafol in wheat and soil [J]. Agrochemicals, 2014, 53(2): 116–118.
- [18] 仇磊, 刘一平, 刘青, 等. 粉唑醇在小麦田中的残留及消解动态[J]. 农药科学与管理, 2018, 39(6): 35–40, 50.
Qiu L, Liu YP, Liu Q, *et al.* Residues and degradation dynamics of flutriafol in wheat field [J]. Pest Sci Admin, 2018, 39(6): 35–40, 50.
- [19] 李继革, 王玉飞, 施家威, 等. 固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定水果中 11 种三唑类杀菌剂[J]. 色谱, 2012, 30(3): 262–266.

Li JG, Wang YF, Shi JW, *et al.* Determination of 11 triazole fungicides in fruits using solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(3): 262–266.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



翟争光, 硕士, 主要研究方向为烟叶生产技术与推广。

E-mail: zhai82@126.com



周 勇, 博士, 主要研究方向为农药残留分析。

E-mail: qimiaobuchugan@126.com

“粮油加工与质量安全”专题征稿函

民以食为天, 食以安为先。食品安全的源头在农业, 粮油产品是基础。我国作为粮食生产大国和人口大国, 粮油质量安全受到政府、产业和消费者的高度关注。与此同时, 随着乡村振兴战略和农业高质量发展, 发掘不同产地、不同品种粮油产品特异品质, 促进优质粮油产品开发, 是推动粮油产业高质量发展、满足人民日益增长的消费需要的重要举措。

鉴于此, 本刊特别策划了“粮油加工与质量安全”专题, 主要围绕粮油加工工艺、质量安全检测技术研究、粮油产品特异品质挖掘与评价、粮油产品质量安全风险评估、真实性与产地溯源、检测方法的标准化和分析质量控制技术以及粮油质量安全管理技术等方面展开论述和研究, 本专题计划在 2021 年 4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编吴永宁技术总师特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2021 年 1 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqq@126.com(注明专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部