

- 关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(3): 227-229.
- [7] 刘春宇, 王绍岩, 徐抒平, 等. 食品中苏丹红 I 和辣椒红的表面增强拉曼散射(SERS)光谱与激发-发射矩阵荧光光谱鉴别[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(11): 2505-2510.
- [8] 郝勇, 陈斌. 亚胺硫磷表面增强拉曼光谱定量解析模型研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(9): 2563-2566.
- [9] 孙旭东, 董小玲. 蜂蜜中乐果农药残留的表面增强拉曼光谱定量分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(6): 1572-1576.
- [10] HUANG R, HAN S, LI X S. Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(21): 6815-6822.
- [11] LI D W, QU L L, ZHAI W L, et al. Facile on-site detection of substituted aromatic pollutants in water using thin layer chromatography combined with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(9): 4046-4052.
- [12] POZZI F, SHIBAYAMA N, LEONA M, et al. TLC-SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2013, 44(1): 102-107.
- [13] LUCOTTI A, TOMMASINI M, CASELLA M, et al. TLC-surface enhanced Raman scattering of apomorphine in human plasma [J]. Vibrational Spectroscopy, 2012, 62(7): 286-291.
- [14] LEE P C, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1982, 86(17): 3391-3395.
- [15] 张扬, 刘玉静. TLC同时测定10种精神安定药物的血药浓度[J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(3): 165-167.
- [16] 李太平, 孙永振. 薄层扫描法同时测定尿中几种安定类药物[J]. 中国医院药学杂志, 1996, 16(9): 418-419.
- [17] DOLLISH F R, FATELEY W G, BENTLEY F F. Characteristic Raman frequencies of organic compounds[M]. Wiley, 1974.

实验技术与方法

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中乙撑硫脲残留

叶倩, 黄聪灵, 高毓文, 冯若玮, 朱富伟, 万凯

(广东省农业科学院农产品公共监测中心 农业部农产品质量安全检测与评价重点实验室
农业部农产品质量安全风险评估实验室(广州), 广东 广州 510640)

摘要:目的 建立蔬菜中乙撑硫脲(ethylenethiourea, ETU)的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱(QuEChERS-UPLC-MS/MS)检测方法。方法 样品经氨水乙腈提取, 石墨化碳黑净化, 以 Shim-pack XR-ODSIII C₁₈ 色谱柱(2.0 mm × 150 mm, 1.6 μm)分离待测物, 采用电喷雾离子化, 正离子扫描和多反应监测模式(MRM)检测, 基质匹配标准溶液外标法定量。结果 乙撑硫脲在 0.005 ~ 1.0 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 1; 在 0.010, 0.10, 0.50 mg/kg 3 个浓度下, 菜心、芹菜和叶用莴苣 3 种基质中乙撑硫脲的回收率为 73.7% ~ 93.3%, 相对标准偏差(RSD)为 0.8% ~ 6.6%, 检出限(LOD)为 0.002 ~ 0.005 mg/kg, 方法定量限(LOQ)为添加的最低浓度 0.010 mg/kg。结论 该方法简便、准确、经济、环保, 能够满足蔬菜中的快速检测要求。

关键词:蔬菜; 乙撑硫脲; 农药残留; QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱; 代森锌; 代谢物; 食品安全; 检测
中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)04-0382-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.04.009

Determination of ethylenethiourea residues in vegetables using QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YE Qian, HUANG Cong-ling, GAO Yu-wen, FENG Ruo-wei, ZHU Fu-wei, WAN Kai

(Key Laboratory of Testing and Evaluation for Agro-Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-Products (Guangzhou), Ministry of Agriculture, Public Monitoring Center for Agro-Product, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 广东省农业科学院院长基金项目(201804); 广东省农业厅特色蔬菜创新团队-质量安全控制岗位专家项目(2017LM1097)

作者简介: 叶倩 女 助理研究员 研究方向为农产品质量安全 E-mail: yeqian.liao@foxmail.com

通信作者: 万凯 男 副研究员 研究方向为农产品质量安全 E-mail: 149431103@qq.com

Abstract: Objective A rapid method for determination of ethylenethiourea (ETU) residues in vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (QuEChERS-UPLC-MS/MS) was developed. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile containing $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and cleaned up by GCB adsorbents. The resulting samples were separated on a Shim-pack XR-ODSIII C_{18} column (2.0 mm \times 150 mm, 1.6 μm), and detected under positive polarity multiple reactions monitoring (MRM) mode. **Results** The matrix-matched external standard calibration curves were used for quantitative analysis. The result indicated that the linearities of ETU was in the concentration range of 0.005-1.0 mg/L with correlation coefficients higher than 0.999 1. The average recoveries of ETU in three vegetables samples at three spiked levels of 0.010, 0.10 and 0.50 mg/kg were in the ranges of 73.7% -93.3%, and the relative standard deviations (RSDs) were in the range of 0.8% -6.6%, respectively. The limits of detection (LODs) for these three vegetables were in the range of 0.002-0.005 mg/kg, and the limit of quantification (LOQ) of ETU was 0.010 mg/kg which was the lowest spiked concentration. **Conclusion** The method was simple, accurate, economic and friendly to the environment, and could meet the requirements for rapid determination of ETU residues in vegetables.

Key words: Vegetable; ethylenethiourea; pesticide residues; QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; zineb; metabolite; food safety; test

乙撑硫脲(ETU)是二硫代氨基甲酸酯类(DTCs)杀菌剂(如代森锰锌、代森锌、丙森锌、福美双等)的主要代谢产物,二硫代氨基甲酸酯类因具有高效、广谱杀菌的效果而在农业生产中广泛使用^[1-2]。国际癌症研究机构(IARC)评估乙撑硫脲对动物存在致癌作用^[3-4],但食用含有乙撑硫脲残留的蔬菜水果是否会对人体健康产生危害,已引起公众关注^[5-6]。

目前关于乙撑硫脲残留的检测方法主要有气相色谱法^[7-8]、高效液相色谱法^[9-11]、液相色谱-串联质谱法^[12]和气相色谱-质谱法^[13]等,但这些方法主要应用于土豆及其土壤、荔枝、西瓜及其土壤、柑橘及其土壤、番茄以及部分水果中。目前对蔬菜中乙撑硫脲残留检测的报道相对较少,叶类蔬菜中更是少见。已有的报道中,普遍存在前处理过程相对复杂繁琐、耗时长、检出限高、回收率偏低等不足,限制了其应用,因此建立快速、准确的测定蔬菜中乙撑硫脲残留的分析方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

菜心、叶用莴苣和芹菜样品均购自广州市市场。

1.1.2 主要仪器与试剂

LCMS-8050 三重四级杆质谱(配岛津 LC-30AD 超高效液相色谱,日本 SHIMADZU)、ESI 电喷雾离子源、涡旋仪、高速离心机、Milli Q 超纯水系统(美国 Millipore)。

乙撑硫脲标准品(CAS: 96-45-7,德国 Dr. Ehrenstorfer,纯度 $\geq 98.5\%$),乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, C_{18} 、石墨化碳黑(GCB)、Florisorb 净化剂均购自天津博纳艾杰尔公司,*N*-丙基乙二胺(PSA)净

化剂(美国 Agilent),氯化钠、无水硫酸镁均为分析纯,尼龙 66 微孔滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取乙撑硫脲标准品 0.010 g 于 10 ml 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,配成 1 000 mg/L 的标准储备液,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。准确移取适量标准储备液,按照梯度稀释的原则,用菜心、叶用莴苣和芹菜空白基质配成 0.005、0.010、0.050、0.100、0.500、1.000 mg/L 的乙撑硫脲标准工作液系列。

1.2.2 样品前处理

菜心、叶用莴苣和芹菜样品去除枯黄叶片,组织匀浆机匀浆, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。准确称取 10.00 g 匀浆样品于 50 ml 具塞离心管中,加入 10.00 ml 含 1% 氨水的乙腈(叶用莴苣使用含 0.5% 氨水的乙腈),涡旋振荡 5 min;以 4 500 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一支离心管中,再向残渣中加入 10.00 ml 提取液,重复以上操作,合并两次上清液,加入 1.00 g 氯化钠、2.00 g 无水硫酸镁,振荡混匀 2 min,4 500 r/min 离心 5 min,吸取上层有机相 1.5 ml 于 2 ml 离心管(含 0.020 g GCB 吸附剂)中,涡旋振荡 1 min,静置 2 min,上清液过 0.22 μm 尼龙 66 微孔滤膜,待测。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:Shim-pack XR-ODSIII C_{18} 柱(2.0 mm \times 150 mm, 1.6 μm),柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,流动相:A 为 0.2% 甲酸水,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0 ~ 1 min,2% B;1 ~ 5 min,2% ~ 95% B;5 ~ 8.5 min,2% B;流速 0.2 ml/min;进样体积 5 μl 。采用 ESI 离子源,正离子多反应监测模式(MRM)检测。雾化气

流速3 L/min,加热气流速 10 L/min,干燥气流速 10 L/min,离子源接口温度 300 ℃;脱溶剂温度 250 ℃,加热块温度 400 ℃。

质谱:定量离子对 m/z 103/44.15,碰撞能量 -19 V;定性离子对 m/z 103/60.1,碰撞能量 -32 V。

1.2.4 添加回收率试验和精密度

称取经测定不含乙撑硫脲的空白样品 10.00 g,分别对应添加 0.010、0.10 和 0.50 mg/kg 3 个浓度水平。涡旋混匀后放置过夜 12 h,按照 1.2.2 进行前处理。每个添加浓度水平重复 6 次,考察方法回收率和精密度。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

乙撑硫脲在进入一级质谱后,可产生稳定的 $[M+H]^+$ 离子,该离子即为乙撑硫脲的母离子;在 Product Scan 模式下,对化合物母离子施加一定的碰撞能(CE),母离子发生断裂或重排等反应产生不同的离子碎片,进入二级质谱。最后在 MRM 模式下,优化 Q1、Q3 电压及目标物离子碎片的碰撞能量。乙撑硫脲在的二级离子质谱图见图 1。

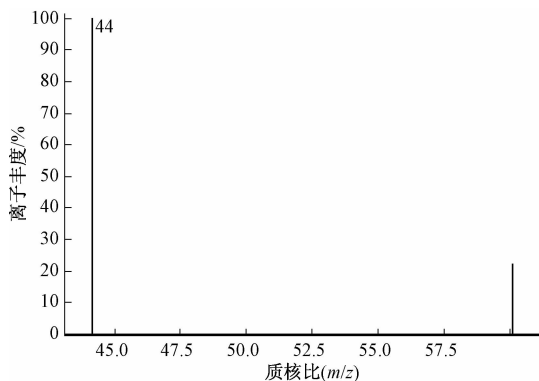


图 1 乙撑硫脲的二级离子质谱图

Figure 1 MS/MS spectra of ethylenethiourea

2.2 色谱条件的优化

流动相的类型和离子强度对目标离子的色谱保留时间及质谱电喷雾离子的电离程度均有影响。本试验对比了 0.1% 甲酸水-乙腈、0.2% 甲酸水-乙腈、0.3% 甲酸水-乙腈 3 种流动相体系对乙撑硫脲峰形及响应值的影响。结果表明,以 0.2% 甲酸水-乙腈作为流动相时,乙撑硫脲的峰形较好,响应值较高。本试验最终选择 0.2% 甲酸水-乙腈作为流动相体系。

2.3 提取溶剂的优化

目前报道的关于乙撑硫脲的提取溶剂主要使用乙腈^[6,14]、甲醇^[5,15]。本试验使用菜心、芹菜、叶用莴苣,考察了甲醇、乙腈、含 0.5% 氨水的乙腈、含

1.0% 氨水的乙腈以及含 1.5% 氨水的乙腈 5 种提取溶剂对乙撑硫脲的回收率。结果表明(图 2),以乙腈作为提取溶剂时,3 种蔬菜样品中乙撑硫脲的回收率约为 40%~60%,均高于甲醇作为提取溶剂时的回收率,但总体上回收率仍较低。试验在乙腈中添加适量氨水(0.5%,1.0%,1.5%),考察不同氨水浓度对乙撑硫脲回收率的影响。结果表明(图 2),含 1.0% 氨水的乙腈对菜心、芹菜的提取效果较好,加标回收率达 80% 以上。叶用莴苣使用含 0.5% 氨水的乙腈时,提取效果最好,加标回收率达 90%,因此最终选择含 1.0% 氨水的乙腈(叶用莴苣为含 0.5% 氨水的乙腈)作为提取溶剂。

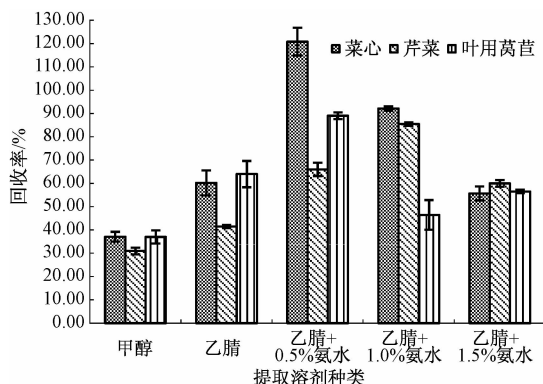


图 2 提取溶剂对乙撑硫脲回收率的影响

Figure 2 Effect of extraction solvents on recoveries of ETU

2.3.1 提取溶剂优化探讨

本试验在提取溶液优化中使用了甲醇、乙腈以及含氨水的乙腈做比较,结果显示,乙腈效果优于甲醇,含氨水的乙腈效果优于乙腈。试验在乙腈中添加不同比例氨水,用以优化提取试剂,结果显示,对于乙撑硫脲的提取,不同种类的样品,所需添加的氨水含量有一定的差别。叶孟亮等^[12]的研究中添加 1.5% 氨水乙腈对水果中乙撑硫脲提取效果最好。EKMAN 等^[6]的研究表明,碱性环境有助于提高乙撑硫脲在乙腈中的溶解度,二者存在一定的共轭效应,且乙撑硫脲在 pH = 5.0~9.0 的环境下较稳定^[14]。本试验与叶孟亮等^[12]的研究中离心后所得提取液的 pH 值均为 8.7,这可能是由于水果、蔬菜本身 pH 值有所差别,导致提取液中所需添加的氨水量有所区别,本试验结果与已有研究相一致,因此,乙撑硫脲的提取,对提取液的 pH 值有一定的要求,根据不同类型样品通过添加不同比例氨水,使该试验方法更加适合于某一类样品。

2.3.2 提取次数探讨

本试验在确定了最佳提取溶剂、最佳吸附剂后尝试使用增加提取液体积,以减少提取次数。试验表明,增大 1 倍提取液体积,只提取 1 次,目标物回

收率为 50% 左右,而使用相同提取液体积分两次提取时,目标物回收率提高到 90% 以上。试验表明,少量多次提取可明显增加提取效率。

2.4 净化剂的优化

本试验以菜心为例,采用 QuEChERS 方法,考察了 C18、PSA、GCB、中性氧化铝、碱性氧化铝、Florisil 6 种净化剂和直接用提取液进行检测对菜心中色素、有机酸、脂肪等杂质的净化效果以及对乙撑硫脲回收率的影响(见图 3)。结果表明,以 GCB 作为吸附剂时乙撑硫脲回收率可达 90% 以上。同时对吸附剂 GCB 的用量进行了优化(见图 4),结果表明,使用 20 mg GCB 进行净化时,回收率达到 90% 以上,净化效果最好,最终选择 20 mg GCB 作为净化剂。

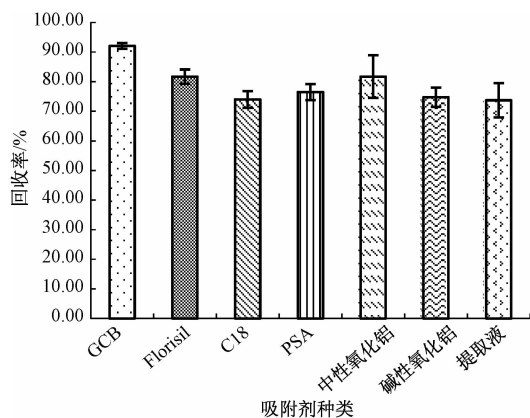


图 3 吸附剂对乙撑硫脲回收率的影响

Figure 3 Effect of adsorbents on recoveries of ETU

2.5 基质效应评价

为提高目标化合物的测定准确度,需要对不同基质产生的基质效应作出评价,并选择合适的方法减小基质效应的干扰。本试验采用基质效应 = (基质标准溶液响应 - 溶剂标准溶液响应) / 溶剂标准溶液响应 × 100 的方式评价了乙撑硫脲在蔬菜样品中的基质效应,结果见表 2。3 种蔬菜样品提取液经过净化后,3 种蔬菜样品均表现为减弱基质效应,

表 3 乙撑硫脲在不同蔬菜中的标准方程、相关系数、检出限、回收率及相对标准偏差 (n = 6)

Table 3 Standard regression equations, correlation coefficients (R^2), LODs, recoveries and RSDs of ETU obtained from different vegetables

样品	线性方程	相关系数 R^2	LOD / (mg/kg)	添加浓度 / (mg/kg)	回收率 / %	相对标准偏差 / %
菜心	$y = 1.24 \times 10^6 x + 1.52 \times 10^4$	0.999 7	0.004	0.010	93.3	6.2
				0.10	92.0	5.0
				0.50	91.2	6.6
芹菜	$y = 9.97 \times 10^5 x - 1.12 \times 10^4$	0.999 2	0.005	0.010	82.0	1.2
				0.10	73.7	0.8
				0.50	84.9	1.7
叶用莴苣	$y = 2.99 \times 10^6 x - 5.04 \times 10^4$	0.999 1	0.002	0.010	82.0	5.3
				0.10	78.7	1.5
				0.50	78.8	1.9

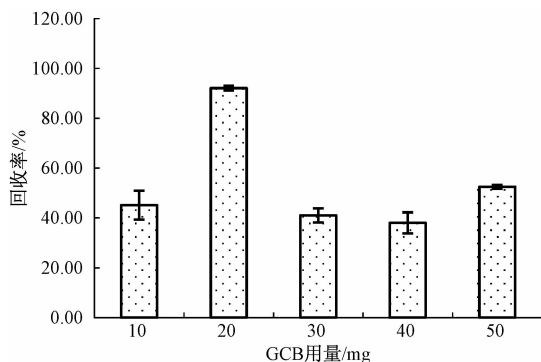


图 4 不同用量 GCB 对乙撑硫脲回收率的影响

Figure 4 Effect of different dosage GCB on recoveries of ETU

且芹菜最强,其次为菜心,最后为叶用莴苣,因此,为保证方法的准确性和实用性,本试验采用基质匹配标准溶液对基质效应进行补偿。

表 2 乙撑硫脲在不同蔬菜样品中的基质效应

Table 2 Matrix effects of ETU in different vegetables

浓度/(mg/kg)	菜心/%	芹菜/%	叶用莴苣/%
0.010	-64.7	-68.6	-48.3
0.10	-35.6	-46.1	-37.5
0.50	-13.9	-15.9	-3.3

2.6 线性方程、相关系数、检出限与定量下限

用不同蔬菜空白基质分别配制 0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500, 1.0 mg/L 质量浓度的基质匹配标准溶液。以待测物浓度为横坐标(x), 定量离子对的色谱峰面积为纵坐标(y)得到乙撑硫脲工作曲线。结果表明,乙撑硫脲在 0.005 ~ 1.0 mg/L 范围内线性良好,相关系数均大于 0.999 1,见表 3。以 3 倍信噪比(S/N = 3)计算方法的检出限(LOD),以最低添加浓度 0.010 mg/kg 为定量限(LOQ)。3 种蔬菜样品中乙撑硫脲的 LOD 为 0.002 ~ 0.005 mg/kg, 方法的灵敏度可满足农药残留检测的要求^[16]。

2.7 回收率与相对标准偏差

分别对 3 种不同蔬菜样品进行 0.010, 0.10, 0.50 mg/kg 3 个浓度的添加回收率试验。按照 1.2.2 进行前处理,1.2.3 进行测定,结果见表 3。

经基质匹配标准溶液校正后,乙撑硫脲在3种蔬菜样品中的回收率为73.7%~93.3%,相对标准偏差为0.8%~6.6%,表明该方法具有良好的准确度和精密度,能够满足蔬菜中乙撑硫脲残留分析的要求^[16]。

2.8 实际样品检测

从市场中抽取菜心10份、芹菜10份、叶用莴苣10份,运用本试验方法进行前处理,上机检测,结果表明菜心中未检出含有乙撑硫脲;芹菜中有2份样品检出乙撑硫脲,分别为0.005和0.006 mg/kg;叶用莴苣中有1份样品检出乙撑硫脲,为0.004 mg/kg;所有检出均低于最低定量限(0.010 mg/kg)。

3 小结

本试验建立了蔬菜中乙撑硫脲残留的QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱检测方法,采用含氨水乙腈2次提取,GCB净化后,超高效液相色谱-串联质谱仪MRM检测,方法的灵敏度、准确度和精密度均满足国家规定的要求^[16]。可用于蔬菜中乙撑硫脲残留的快速检测和确证分析。同时,可以通过适当调整提取液中氨水比例,将该前处理方法应用到其他蔬菜和水果中乙撑硫脲的残留检测,为蔬菜和水果中乙撑硫脲的残留检测标准制定提供一定的参考依据。

参考文献

- [1] 陈鹭平,李久兴,吴敏,等.非衍生化/液相色谱-串联质谱法测定食品中的二硫代氨基甲酸酯类农药残留[J].分析测试学报,2013,32(3):287-292.
- [2] 陈武瑛,董丰收,刘新刚,等.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定苹果中代森锰锌残留[J].分析化学,2010,38(4):508-512.
- [3] GARCINUO R M, RAMOS L, FERNÁNDEZ-HERNANDO P, et al. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples[J]. J Chromatogr A, 2004, 1041(1/2): 35-41.
- [4] RIPOLLÉS C, SANCHO J V, LÓPEZ F J, et al. Liquid

chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the residue determination of ethylenethiourea (ETU) and propylenethiourea (PTU) in water[J]. J Chromatogr A, 2012, 1243(2): 53-61.

- [5] LEMES V R R, MARTINS-JÚNIOR H A, DE SOUZA S V C, et al. Ethylenethiourea in fruits: optimization and in-house validation of a method by liquid chromatography tandem mass spectrometry, occurrence and dietary exposure assessment[J]. Food Control, 2014, 42(1): 321-328.
- [6] EKMAN E, MAXE M, LITTORIN M, et al. High-throughput method for the analysis of ethylenethiourea with direct injection of hydrolysed urine using online on-column extraction liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2013, 934(6): 53-59.
- [7] 秦冬梅,徐应明,黄永春,等.代森锰锌及其代谢物乙撑硫脲在马铃薯和土壤中的残留动态[J].环境化学,2008,27(3): 305-309.
- [8] 石利利,单正军,金怡,等.荔枝中代森锰锌及其代谢产物乙撑硫脲残留量的气相色谱测定[J].分析测试学报,2005,24(2):92-94.
- [9] 余苹中,贾春虹,赵尔成,等.代森联和乙撑硫脲在西瓜和土壤中的消解及安全性评价[J].农药,2014,53(5):350-352.
- [10] 王钟,杨仁斌,李欢,等.高效液相色谱法测定柑橘及橘园土壤中乙撑硫脲残留[J].环境监测管理与技术,2008,20(5): 30-32.
- [11] 韦婕,宋世明,李雪生.高效液相色谱法检测番茄中乙撑硫脲和丙撑硫脲的残留[J].农药,2016,55(12):912-914.
- [12] 叶明亮,聂继云,徐国锋,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定水果中乙撑硫脲残留[J].分析测试学报,2015,34(11): 1276-1280.
- [13] 韩丽,樊祥,盛永刚,等.气相色谱-质谱法测定蔬菜和水果中乙撑硫脲残留量[J].理化检验-化学分册,2009,45(7): 812-814.
- [14] ZHOU L, LIU X L, KANG S, et al. A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2013, 138(2/3): 1355-1359.
- [15] TRAN K, MACTAL L P, CROMER M R, et al. Development and validation of ethylenethiourea determination in foods using methanol-based extraction, solid-phase extraction cleanup and LC-MS/MS[J]. Food Chem, 2013,140(1/2): 340-342.
- [16] 中华人民共和国农业部.农药残留试验准则:NY/T 788—2004[S].北京:中国标准出版社,2004.