

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

陈鹭平¹, 李久兴², 吴敏¹, 林立毅¹, 陈达捷¹, 周昱¹, 徐敦明^{1*}

(1. 厦门出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 福建 厦门 361026; 2. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过优化质谱、液相色谱和萃取缓冲液等条件, 建立了一种简单、快速、灵敏测定食品中二硫代氨基甲酸酯的方法。在优化条件下, 代森锌(EBDC)、丙森锌(PBDC)的线性范围为 2~100 $\mu\text{g/L}$, 相关系数均不小于 0.997。在花椰菜、萝卜和豌豆中 EBDC 和 PBDC 的检出限 ($S/N > 3$) 为 2 $\mu\text{g/kg}$; 萝卜和豌豆中 EBDC 和 PBDC 的定量下限 ($S/N > 10$) 为 10 $\mu\text{g/kg}$, 而花椰菜中 EBDC 和 PBDC 的定量下限 ($S/N > 10$) 为 15 $\mu\text{g/kg}$ 。在花椰菜、萝卜和豌豆基质中加标 5~100 $\mu\text{g/kg}$ 的 EBDC 和 PBDC 时, 测定加标回收率为 83%~96%, 相对标准偏差为 4.4%~10.5%, 方法可满足定量分析的要求。

关键词: LC-MS/MS; 食品; 二硫代氨基甲酸酯; 检测

中图分类号: O657.63; S482.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2013)03-0287-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.03.004

Determination of Dithiocarbamates in Foodstuffs by LC-MS/MS

CHEN Lu-ping¹, LI Jiu-xing², WU Min¹, LIN Li-yi¹, CHEN Da-jie¹, ZHOU Yu¹, XU Dun-ming^{1*}

(1. The Center of Inspection and Quarantine Technology, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A simple, fast and sensitive method was developed for the determination of dithiocarbamates, including tiezene (EBDC) and pestanal (PBDC), by optimizing the parameters of LC-MS/MS and extraction buffer. Under the optimized conditions, the calibration curves of EBDC and PBDC were linear in the range of 2-100 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficients not less than 0.997. The limits of detection (LODs, $S/N > 3$) of EBDC and PBDC were 2 $\mu\text{g/kg}$ for cauliflower, turnip and pea, and the limits of quantitation (LOQs, $S/N > 10$) of EBDC and PBDC were 10 $\mu\text{g/kg}$ for turnip and pea, and 15 $\mu\text{g/kg}$ for cauliflower. The recoveries in cauliflower, turnip and pea samples at spiked concentration levels of 5-100 $\mu\text{g/kg}$ ranged from 83% to 96% with relative standard deviations (RSDs) of 4.4% - 10.5%. The method could meet the requirement for the analysis of dithiocarbamates in foodstuffs.

Key words: LC-MS/MS; foodstuffs; dithiocarbamate; determination

二硫代氨基甲酸酯类(DTCs)作为农业上常用的杀菌剂始于19世纪30年代,至今已有70余年历史。DTCs被用作70多种农作物中400多种病原菌的杀菌剂,世界年消耗量达35000吨,其中有些被世界卫生组织列为有害物质^[1]。在工业上二硫代氨基甲酸酯主要用作橡胶硫化加速剂、橡胶抗氧化剂,造纸业、糖厂和污水处理的杀粘菌剂,冷却水系统的防污剂。一些二硫代氨基甲酸酯具有药理活性,被用于酒精中毒的治疗和艾滋病与癌症的临床诊断^[1]。DTCs是一种含有二硫基团取代的化合物,主要包括二甲基二硫代氨基甲酸酯(DMDCs,如福美钠、福美铁、福美锌、福美双等)、乙撑二硫代氨基甲酸酯(EBDCs,如代森钠、代森锰、代森锌、代森锰锌等)和丙撑二硫代氨基甲酸酯(PBDCs,如丙森钠、丙森锌等),其结构式如图1所示。通常情况下二硫代氨基甲酸酯的毒性并不大,但若其中含有重金属离子时毒性会显著增强。二硫代氨基甲酸酯不溶于大部分溶剂,但可用含EDTA的碱性溶剂溶解。它们的稳定性受氧含量、湿度、温度和pH值的影响,因此较难直接分析未降解的二硫代氨基甲酸酯的含量^[2]。

收稿日期: 2012-10-10; 修回日期: 2012-11-08

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20092009, 3502Z20102013); 国家质检总局科技计划项目(2010IK162, 2010IK192)

* 通讯作者: 徐敦明, 高级工程师, 研究方向: 食品安全, Tel: 0592-3269935, E-mail: Xudm@xmciq.gov.cn

1.4.2 质谱检测条件 电喷雾离子源(ESI), 负离子模式扫描, 扫描时间: 0.1 s; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 5 L/min; 雾化气气压: 60 psi; 鞘气温度: 90 °C; 鞘气流速: 11 L/min; 毛细管电压: 3 500 V; 喷嘴电压: 1 500 V。代森锌(EBDC)和丙森锌(PBDC)的其它质谱分析条件见表1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

EBDC 和 PBDC 在碱性溶液中以负离子的形式存在, 因此采用负离子扫描模式; 可能的裂解原理如图2所示。实验用 pH 12.0 的 1 mmol/L EDTA 配成 1 mg/L 的 EBDC 和 PBDC 进行质谱条件的优化, 在电喷雾正离子方式下对 EBDC 和 PBDC 进行一级质谱分析(Q1 扫描), 得到分子离子, 即母离子; 对化合物的分子离子进行二级质谱分析(子离子扫描), 得到碎片离子信息, 即子离子; 优化 EBDC 和 PBDC 的二级质谱参数, 使特征碎片离子强度达到最大时为最佳, 得到每种化合物的二级质谱图; 按照二级质谱图提供的碎片离子信息, 选择 EBDC 和 PBDC 的定性和定量离子, 图3为其多反应监测谱图。根据各化合物的质谱图, 对 EBDC 采用 210.7/57.9 作为定量离子对, 以 210.7/135.2 和 210.7/176.9 作为定性离子对; 而 PBDC 采用 225/58.1 作为定量离子对, 以 225/149.2 和 225/191.2 作为定性离子对。

表1 代森锌与丙森锌的质谱分析参数

Table 1 Mass parameters of EBDC and PBDC

DTC standard	Type	MRM transition (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
EBDC	Quantifier	210.7/57.9	60	0
	Quantifier1	210.7/135.2	60	0
	Quantifier2	210.7/176.9	60	0
PBDC	Quantifier	225.0/58.1	66	0
	Quantifier1	225.0/149.2	66	0
	Quantifier2	225.0/191.2	66	0

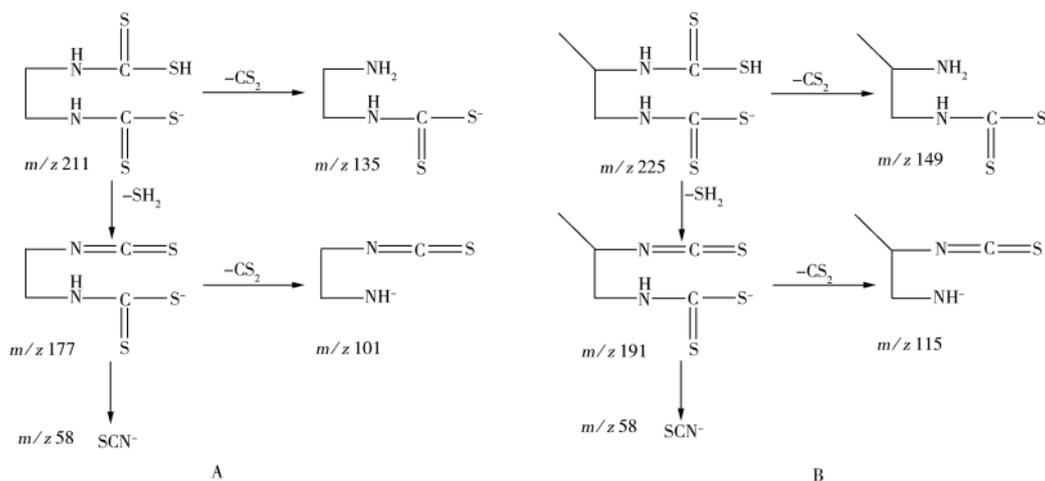


图2 EBDC(A)和PBDC(B)的可能碎片

Fig. 2 Possible fragmentations of EBDC(A) and PBDC(B)

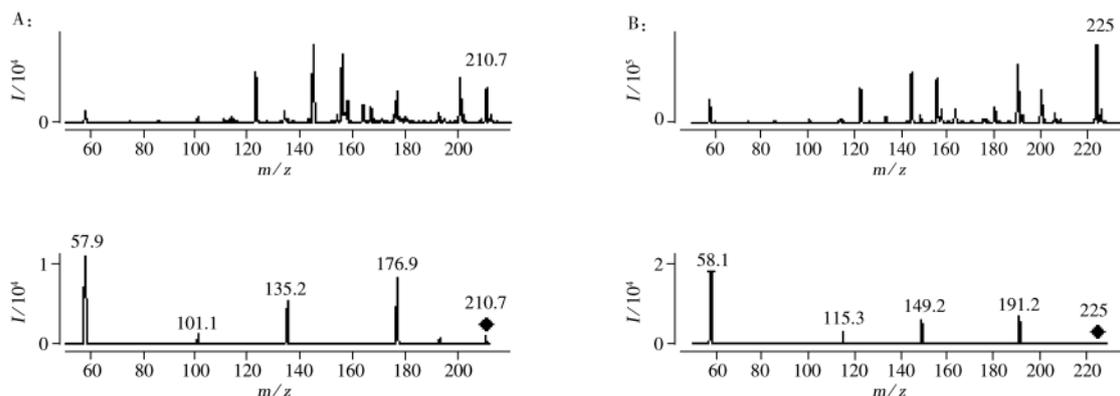


图3 EBDC(A)和PBDC(B)的质谱图

Fig. 3 MS spectra of EBDC(A) and PBDC(B)

up: full scan, bottom: product ion scan

2.2 液相色谱条件的优化

对比了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-10 mmol/L 醋酸铵、乙腈-10 mmol/L 氨水(不调 pH 值)、乙腈-10 mmol/L 氨水(pH 8.0)作为流动相时 EBDC 及 PBDC 的分离效果,发现以甲醇-水、乙腈-10 mmol/L 醋酸铵、乙腈-10 mmol/L 氨水(pH 8.0)作为流动相进行洗脱时,不论如何改变流动相比例,目标物均无响应,其中以甲醇-水为流动相时由于甲醇的雾化效果不好而导致目标物无响应;而以乙腈-10 mmol/L 醋酸铵、乙腈-10 mmol/L 氨水(pH 8.0)为流动相时由于两者的水相中分别含有大量的醋酸铵和氯化铵,从而产生离子抑制效应,导致目标物无响应。以乙腈-水、乙腈-10 mmol/L 氨水(不调 pH 值)作为流动相时,目标物均显示了很强的响应,且 10 mmol/L 氨水能更好的将色谱柱中的杂质除去,因此实验最终采用乙腈-10 mmol/L 氨水(不调 pH 值)作为最佳流动相。

采用等度洗脱时,若流动相中乙腈/水的比例低于 90:10 时,目标物几乎无保留,比例高于 90:10 时,目标物的保留过强。用 97:3 的乙腈-10 mmol/L 氨水进行等度洗脱时,流动相对目标物的洗脱效果不好,会形成很宽的峰;而以 60:40 的乙腈-10 mmol/L 氨水进行等度洗脱时,则由于水含量太高,雾化效果不好,导致目标物的响应很低;若先用 97:3 的乙腈-10 mmol/L 氨水洗脱,再将两者的比例梯度升至 60:40,待测物的分离效果仍不理想。经过多次尝试,发现进样后,将流动相的比例迅速由高含水量转为低含水量,再经低含水量进行洗脱可获得很好的峰形和很强的响应(见图 4),EBDC 和 PBDC 虽然不能完全分开,但已不影响定量分析;此时再用高含水量的流动相洗去在柱子上有强保留的物质,并在进样前向柱子中通入一段低含水量的流动相以保留柱子上的目标物。

EBDC 和 PBDC 的保留时间及特征离子峰可作为实际样品测定的定性依据。SeQuant™ ZIC-HILIC 柱不能很好地将 EBDC 和 PBDC 分开(两者的保留时间均约为 6.1 min),但可通过两者的定性离子分别对其进行鉴定。EBDC 的定量和定性离子(m/z 57.9、135.2、176.9)的丰度比为 100:32:56, PBDC 的定量和定性离子(m/z 58.1、149.2、191.2)的丰度比为 100:35:42,相对标准偏差在 20% 以内。

2.3 缓冲液对目标物的影响

考察了抗坏血酸、L-半胱氨酸(L-cys)、D-氰霉素、柠檬酸、酒石酸和乙二胺四乙酸(EDTA)作为缓冲液时对目标物(100 $\mu\text{g/L}$)分离的影响,各种缓冲物的浓度均为 10 mmol/L, pH 值调为 12.0。结果发现只有 L-半胱氨酸(L-cys)和乙二胺四乙酸(EDTA)作为缓冲液时目标物才有响应。因此研究了 20 mmol/L EDTA、20 mmol/L L-cys、10 mmol/L EDTA + 10 mmol/L L-cys、50 mmol/L EDTA + 50 mmol/L L-cys、200 mmol/L EDTA + 200 mmol/L L-cys 和 10 mmol/L EDTA + 200 mmol/L NaCl 作为缓冲液时对目标物分离的影响(如图 5),结果发现 50 mmol/L EDTA + 50 mmol/L L-cys、200 mmol/L EDTA + 200 mmol/L L-cys 和 10 mmol/L EDTA + 200 mmol/L NaCl 作为缓冲液时,目标物均无响应,可能是由于离子抑制效应而致;而 20 mmol/L EDTA、20 mmol/L L-cys 作为缓冲液时,目标物的响应较小,而以 10 mmol/L EDTA + 10 mmol/L L-cys 作为缓冲液时目标物有很强的响应,因此选其作为最佳萃取缓冲液。

2.4 EBDC 与 PBDC 的稳定性研究

取 10 μL 100 g/L 的 EBDC 和 PBDC 悬浮液,加入 7 mL 的萃取缓冲液,用 2 mol/L 的 HCl 调 pH 至

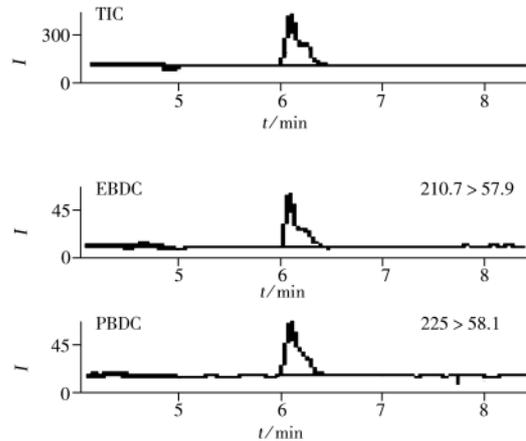


图 4 EBDC 和 PBDC 的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of EBDC and PBDC

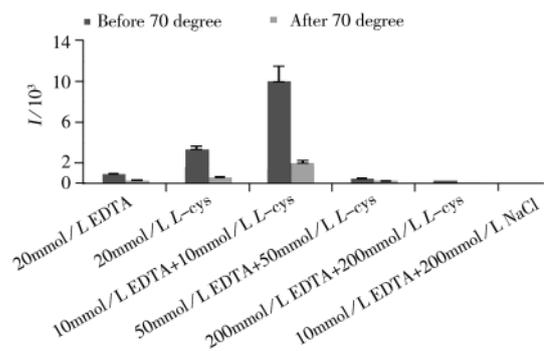


图 5 不同缓冲液对 EBDC 及 PBDC 响应强度的影响

Fig. 5 Effects of different buffers on signal intensities of EBDC and PBDC

相应值, 放置 30 min 后再用萃取缓冲液定容至 10 mL, 配成 100 $\mu\text{g/L}$ 的 EBDC 和 PBDC 溶液, 结果如图 6A。在 $\text{pH} > 7.0$ 时, EBDC 和 PBDC 的信号稳定; 而当 $\text{pH} < 7.0$ 时, 随着 pH 值的降低 EBDC 和 PBDC 信号开始降低, 这可能是 EBDC 和 PBDC 逐渐发生降解, 或调 pH 值时加入的 HCl 导致溶液的离子强度增大, 在电喷雾时发生离子抑制作用所致。用萃取缓冲液配制 100 $\mu\text{g/L}$ 的 EBDC 和 PBDC 溶液, 在不同温度的水浴中放置 10 min, 结果如图 6B。可以看出在温度低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, EBDC 和 PBDC 可以稳定存在。约 70 $^{\circ}\text{C}$ 时 EBDC 和 PBDC 的响应信号降低, 表示此时 EBDC 和 PBDC 开始发生降解。

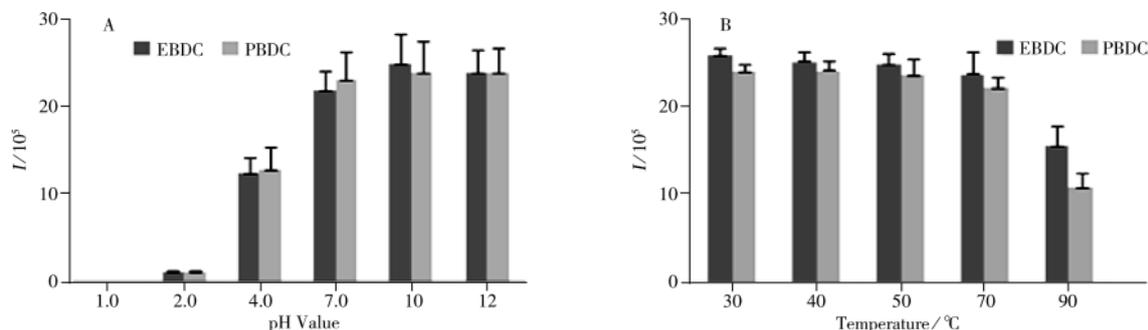


图6 不同 pH 值(A)和温度(B)对 EBDC 和 PBDC 响应信号的影响

Fig. 6 Effects of different pH values (A) and temperatures (B) on signal intensities of EBDC and PBDC

2.5 标准曲线与定量下限

用萃取液配制 100、50、20、10、5、2 $\mu\text{g/L}$ 的 EBDC 和 PBDC 标准溶液。以质谱响应 (y) 对其溶液浓度 (x , $\mu\text{g/L}$) 作标准曲线, 测得 EBDC 和 PBDC 的线性方程分别为 $y = 104.49x + 63.72$ 、 $y = 204.9x + 291$, 两者的线性系数均大于 0.999, 其中 PBDC 显示了比 EBDC 更强的响应, 其具体原因有待于进一步研究。由于不同的基质会产生不同的基质效应, 因此测定不同物质时需通过基质校正曲线

表2 花椰菜、萝卜和豌豆的基质校正曲线

Table 2 The matrix calibration curve of cauliflower, turnip and pea

Sample	Component	Regression equation	r
Cauliflower	EBDC	$y = 43.22x + 45.22$	0.999
	PBDC	$y = 92.32x + 50.98$	0.999
Turnip	EBDC	$y = 37.24x + 59.64$	0.999
	PBDC	$y = 72.19x + 186.5$	0.998
Pea	EBDC	$y = 30.88x + 66.54$	0.997
	PBDC	$y = 74.05x + 272.0$	0.997

进行校正。花椰菜、萝卜和豌豆的基质校正曲线见表 2。从表中可以看出萝卜和豌豆的基质效应比花椰菜的严重, 但在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, 花椰菜、萝卜和豌豆的基质校正曲线均具有良好的线性关系。研究中发现, 香菇干由于严重的离子抑制效应而使目标物无响应。

按信噪比 $S/N > 3$ 确定萝卜、豌豆和花椰菜中 EBDC 和 PBDC 的检出限为 2 $\mu\text{g/kg}$; 按信噪比 $S/N > 10$ 确定萝卜和豌豆的方法定量下限为 10 $\mu\text{g/kg}$, 花椰菜为 15 $\mu\text{g/kg}$ 。相比于文献 [7] 中的检出限 (0.1 mg/kg), 本方法显示了更高的灵敏度。

2.6 实际样品中的加标回收率与重现性

在花椰菜、萝卜和豌豆中加标 100、50、10、5 $\mu\text{g/kg}$ 的 EBDC 和 PBDC, 加标回收率见表 3。不同样品中 EBDC 和 PBDC 的加标回收率在 83%~96% 之间, 相对标准偏差为 4.4%~10.5%, 方法可满足定量分析的要求。对比在花椰菜、萝卜和豌豆中加标 10 $\mu\text{g/kg}$ 的 EBDC 和 PBDC 和不加标的实际样品色谱图 (图 7), 发现花椰菜、萝卜的基质对目标物保留时间的影响较小, 而豌豆基质会使目标物的保留时间延长。

表3 花椰菜、萝卜和豌豆中加标 EBDC 和 PBDC 的加标回收率与相对标准偏差 ($n = 6$)

Table 3 Spiked recoveries and RSDs of EBDC and PBDC for cauliflower, turnip and pea ($n = 6$)

Component	Added $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	Cauliflower		Turnip		Pea	
		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
EBDC	5, 10, 50, 100	90, 94, 94, 94	7.8, 4.5, 5.8, 6.3	86, 93, 93, 92	10.5, 8.6, 9.6, 7.6	83, 90, 91, 90	9.5, 6.9, 4.5, 6.5
PBDC	5, 10, 50, 100	90, 91, 93, 92	8.3, 8.0, 9.4, 6.6	87, 94, 96, 96	8.4, 6.7, 7.8, 7.0	86, 92, 93, 94	7.5, 8.5, 5.7, 4.4

3 结 论

本研究建立了一种简单、快速、灵敏检测食品中二硫代氨基甲酸酯的方法。以 pH 12.0 的 10 mmol/L EDTA - 10 mmol/L L-半胱氨酸的混合溶液作为萃取剂, 采用 HILIC 柱分离, LC - MS/MS 定性和定量分析豌豆、花椰菜和萝卜中的乙撑二硫代氨基甲酸锌和丙撑二硫代氨基甲酸锌。在花椰菜、萝卜和豌豆中 EBDC 和 PBDC 的检出限 ($S/N > 3$) 为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 对于萝卜和豌豆, EBDC 和 PBDC 的定量下限 ($S/N > 10$) 为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而花椰菜中 EBDC 和 PBDC 的定量下限 ($S/N > 10$) 为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法避免了衍生、过柱等繁琐操作, 分析成本低, 适于分析豌豆、花椰菜和萝卜等基质抑制效应不强的食品, 但不适于香菇干等易使萃取液离子强度增高的食品。

参考文献:

- [1] Szolar O. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 582: 191 - 200.
- [2] Elias A, Constantine D, Christos G, Constantina N. *Chemosphere*, **2007**, 68: 2104 - 2110.
- [3] Eloisa D, Maria H, Maria C, Luiz K R, Joaquim F. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49: 4521 - 4525.
- [4] Roland C, Holger V, Wolfgang S. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48: 792 - 796.
- [5] Hu X Q, Li Z, Wu M, Cang T, Li K. *Chin. J. Pestic.* (胡秀卿, 李振, 吴珉, 苍涛, 李康. 农药), **2005**, 44: 519 - 520.
- [6] Zisis V, Emmanouil N, Euphemia P. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50: 2220 - 2226.
- [7] Chen L P, Zhou W, Wu M, Zhou Y. *Inspection and Quarantine Science* (陈鹭平, 邹伟, 吴敏, 周昱. 检验检疫科学), **2004**, 14: 22 - 25.
- [8] Xu Y C, Zhu J L, Zhang Y, Hou Z G, Song Y Y. *J. Jilin Agric. Univ.* (许允成, 朱杰丽, 张宇, 侯志广, 宋艳宇. 吉林农业大学学报), **2004**, 26: 197 - 181.
- [9] Tatsuhiko K, Miho Y, Nobuko M. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074: 155 - 161.
- [10] Bian Z Y, Tang G L, Zhang H F, Li Z H, Hu Q Y. *Tobacco Sci. Technol.* (边照阳, 唐纲岭, 张洪非, 李中皓, 胡清源. 烟草化学), **2011**, 284: 46 - 49.
- [11] Denise B, Paulo C, Helio M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47: 212 - 216.
- [12] Garcinuno R, Fernandez H, Camarab C. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1043: 225 - 229.
- [13] Kenneth W, Christie L, David L. *Anal. Chem.*, **1998**, 70: 4800 - 4804.
- [14] Tatsuhiko K, Miho Y, Nobuko M. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074: 155 - 161.
- [15] Hu X Q, Li Z, Wu M, Li K, Cang T. *Acta Agriculture Zhejiangensis* (胡秀卿, 李振, 吴珉, 李康, 苍涛. 浙江农业学报), **2004**, 16: 282 - 285.
- [16] Albert W, Ghan W, Fion S, Lo C H, Raymond C K, Liang Y Z. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 339: 123 - 129.
- [17] Francuaise G, Boide F, Queffelec A, Haelters J, Thouvenot D, Corbel B, Nodet B. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48: 4492 - 4499.
- [18] Tadashi H, Kunihiro Y, Suzuko O, Nodet Y, Kenichiro T, Hitoshi N, Masatoshi Y. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1141: 251 - 258.
- [19] Tadashi H, Makoto T S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 392: 969 - 976.
- [20] Blasco C, Font G, Pico Y. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028: 267 - 276.
- [21] Goranka C, Wolfgang S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21: 4009 - 4016.

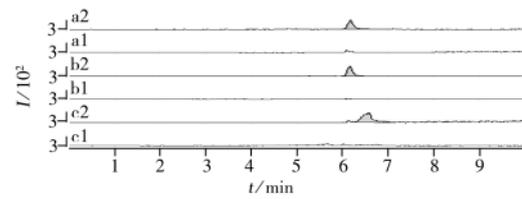


图 7 实际样品加标 EBDC 和 PBDC 前(1)后(2)的总离子流色谱图

Fig. 7 TIC chromatograms of real sample before (1) and after (2) spiked with EBDC and PBDC
a, b and c refer to cauliflower, turnip and pea, respectively