

应用通讯

液相色谱质谱法

UHPLC-MS/MS [LCMS-8060]联用于蜂蜜中新烟碱类化合物、氟虫腈及其代谢产物的超灵敏快速含量测定

C140 号

新烟碱类化合物是一类广泛用于保护农田、水果和蔬菜的农药。最近，这一类化合物的使用引起极大争议，因为其被视为导致蜜蜂种群衰竭失调的原因之一。授粉对农业至关重要，为评价新烟碱类化合物对蜜蜂健康的影响，研究人员进行大量研究。随后，欧洲食品安全局（EFSA）限制噻虫嗪、噻虫胺及吡虫啉的使用。氟虫腈是一种属另一类化学结构的农药，由于危害蜜蜂健康的风险较高，EFSA也禁止其用于玉米种子的农害防治。

为更好地了解这些化合物对蜜蜂的影响及其对花粉和蜂蜜的污染情况，有必要对其建立一种高灵敏度的含量测定方法。我们采用 Nexera X2 和 LCMS-8060 联用建立这一方法。

■样品制备

使用噻虫嗪-d3、吡虫啉-d4 及噻虫胺-d3 作内标物。

采用 QuEChERS（快速、简单、廉价、有效、可靠及安全）法及分散固相萃取（dSPE）步骤萃取待测化合物。精密称取 5 g（±1%）蜂蜜置 50 mL 聚丙烯离心管中。内标溶液为各内标物浓度均为 5 μg/mL 的乙腈溶液。精密加入内标溶液 5 μL，挥干 10 分钟。精密加入超纯水 10 mL，涡旋 1 分钟使混匀。精密加入乙腈 10mL，涡旋混合 1 分钟。

室温下温和震荡 1 小时。加入市售混合盐（硫酸镁 4 g、柠檬酸钠 1 g、柠檬酸钠倍半水合物 0.5g、氯化钠 1g，购自 Biotage），摇匀。于 10 °C 下离心 5 分钟，转速 3000 rpm。

取上层清液 6 mL，置于预先装有净化材料的 15 mL 净化管（硫酸镁 1200 mg、N-丙基乙二胺 400 mg、十八烷基硅烷键合硅胶 400mg，购自 Biotage）中。再次于 10 °C 下离心 5 分钟，转速 3000 rpm。取上层清液置配有 LCMS 认证报告的惰性玻璃样品瓶（岛津 LabTotal，产品编号 227-34001-01）中，即得。

■回收率

取购自本地超市的“全花”蜂蜜，一份加入 50 ng/L 的内标物，一份不加内标，同法萃取制备样品。同法萃取制备一份不加蜂蜜的基质空白样以评价基质干扰作用。测定结果见表 1。

计算所得回收率均在 EU SNATE/11945/2015 允许范围 70~120% 之内。

表 1 蜂蜜中各待测物回收率

化合物	回收率	化合物	回收率
噻虫腈	78.8 %	氟虫腈砒化物	74.2 %
N-去甲噻虫腈	93.4 %	吡虫啉	83.2 %
噻虫胺	70.6 %	烯啶虫胺	87.0 %
呋虫胺	76.5 %	噻虫啉	82.2 %
氟虫腈	78.1 %	噻虫嗪	75.6 %

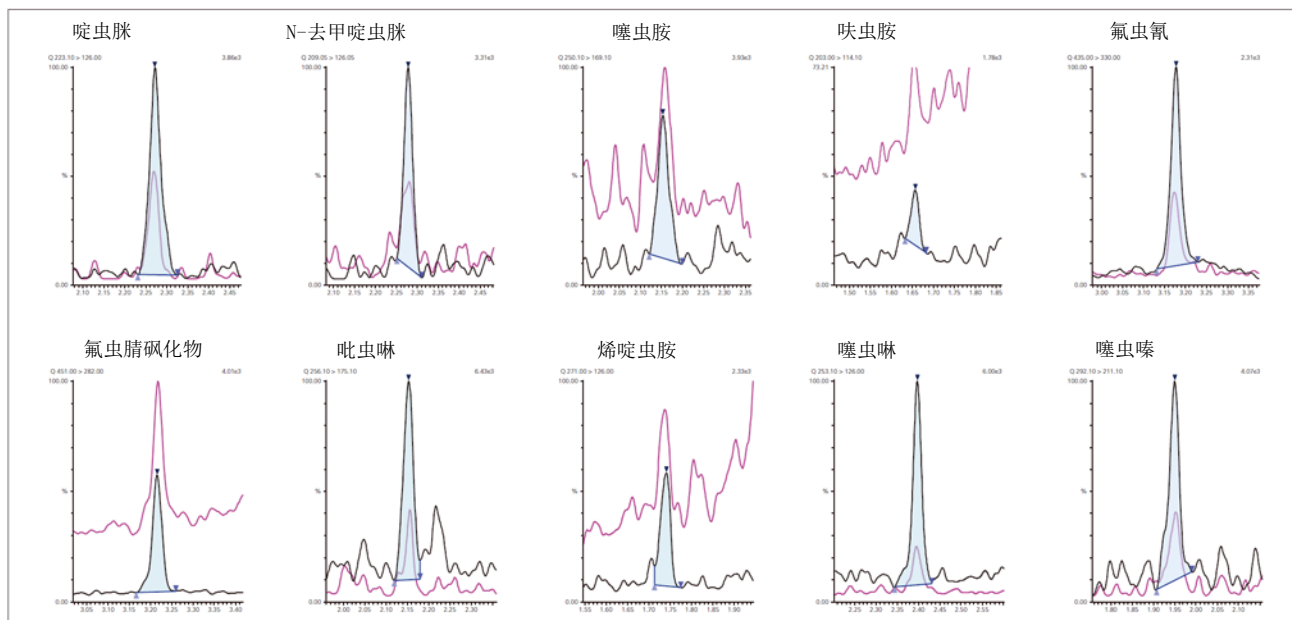


图 1 各目标化合物在其定量下限浓度时的色谱图

表 2 分析条件

色谱系统	: Nexera X2	质谱系统	: LCMS-8060
色谱柱	: ACE SuperC18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 2 μm)	离子源	: 加热 ESI 源
柱温	: 30 °C	离子源电压	: +1 kV (正离子模式) -1.5 kV (负离子模式)
流动相	: A相: 水 + 0.05 % 氨水 B相: 甲醇 + 0.05 % 氨水	温度	: 接口: 400 °C 脱溶剂管: 200 °C 加热模块: 400 °C
流速	: 600 μL /min	气体流速	: 雾化气: 3 L /min 加热气: 10 L /min 干燥气: 5 L /min
梯度洗脱程序	: 0 至 3 分钟, B 相比例由 5 % 至 100 % 3 至 3.1 分钟, B 相比例由 100 % 至 5%		
总运行时间	: 4 min		
进样体积	: 2 μL (POISe 模式, 10 μL 水)		

表 3 MS/MS 采集参数

MRM 通道	名称	正负离子对	定性离子对	内标物
	啶虫脒 Acetamiprid	+ 223.1 > 126.0	223.1 > 56.1	2
	N-去甲啶虫脒 N-Acetamiprid-N-desmethyl	+ 209.1 > 126.0	211.1 > 128.0	2
	噻虫胺 Clothianidin	+ 250.1 > 169.1	250.1 > 132.0	3
	呋虫胺 Dinotefuran	+ 203.0 > 114.0	203.0 > 87.0	1
	氟虫腈 Fipronil	- 435.0 > 330.0	435.0 > 250.0	3
	氟虫腈砒化物 Fipronil sulfone	- 451.0 > 415.0	451.0 > 282.0	3
	吡虫啉 Imidacloprid	+ 256.1 > 175.1	258.1 > 211.1	2
	烯啶虫胺 Nitenpyram	+ 271.0 > 126.0	271.0 > 225.0	3
	噻虫啉 Thiacloprid	+ 253.1 > 126	253.1 > 90.1	1
	噻虫嗪 Thiamethoxam	+ 292.1 > 211.1	292.1 > 181.1	1
	噻虫嗪-D3 Thiamethoxam-D3	+ 295.1 > 214.05	---	1
	吡虫啉-D4 Imidacloprid-D4	+ 260.1 > 179.1	---	2
	噻虫胺-D3 Clothianidin-D3	+ 253.1 > 132.05	---	3

驻留时间 : 依据各化合物的转换程度设置为 3~34 毫秒不等, 确保每个色谱峰至少采 30 个点 (最大总循环时间为 140 毫秒)

延迟时间 : 1 毫秒

四极杆分辨率 : Q1:中等 Q3:中等

■ 校准

以乙腈为溶剂配制校准曲线样品, 使其最终浓度在 0.5 μg/mL (色谱柱上浓度 1 fg) 至 5 ng/mL 范围内, 分别相当于在蜂蜜中的浓度为 1 ng/kg 和 10 μg/kg。

选择各化物测定准确度在 80~120% 间的标曲最低浓度作为定量下限 (见表 4)。

典型标准曲线图见图 2。

表 4 蜂蜜中各待测物的定量限

化合物	定量限 (μg/kg)	化合物	定量限 (μg/kg)
啶虫脒	0.005	氟虫腈砒化物	0.001
N-去甲啶虫脒	0.005	吡虫啉	0.020
噻虫胺	0.020	烯啶虫胺	0.020
呋虫胺	0.010	噻虫啉	0.005
氟虫腈	0.001	噻虫嗪	0.005

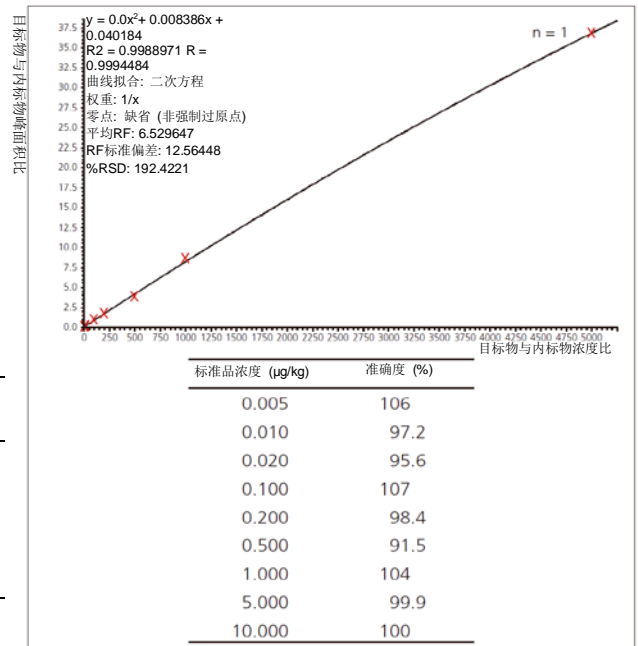


图 2 啶虫脒的校准曲线

实际样品测定

购自本地超市或作为化妆品原料（橘树蜂蜜）的9个蜂蜜样品作为未知样品。

所有被测蜂蜜样品中的农药浓度都远低于标准的最大残留限量。但由于方法灵敏度极高，浓度非常低的新烟碱类化合物也可定量测定。测定结果见表5。图3显示蜂蜜样品的典型色谱图。

表5 蜂蜜样品测定结果（浓度单位： $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）

蜂蜜	啉虫脒	噻虫胺	吡虫啉	噻虫啉	噻虫嗪
1. 乳脂状普罗旺斯蜜	---	---	0.20	---	0.010
2. 乳脂状意大利蜜	0.15	---	0.17	---	---
3. 液状比利牛斯山蜜	0.38	---	0.043	0.020	---
4. 乳脂状法国-西班牙蜜	0.27	---	0.047	0.020	---
5. 液态百里香蜜	---	---	---	---	---
6. 乳脂状柠檬树蜜	1.7	---	0.15	0.033	---
7. 液状橘树蜜	1.2	---	0.62	---	---
8. 乳脂状花蜜	0.14	---	0.055	0.39	---
9. 液状花蜜	0.34	---	0.11	0.010	---

蜂蜜	呋虫胺	烯啶虫胺	N-去甲啉虫脒	氟虫腈	氟虫腈
1. 乳脂状普罗旺斯蜜	---	0.052	0.005	---	---
2. 乳脂状意大利蜜	---	0.040	---	---	---
3. 液状比利牛斯山蜜	---	---	0.015	0.004	---
4. 乳脂状法国-西班牙蜜	---	0.032	---	---	---
5. 液态百里香蜜	---	---	---	---	---
6. 乳脂状柠檬树蜜	---	---	0.020	---	---
7. 液状橘树蜜	---	0.024	0.018	---	---
8. 乳脂状花蜜	---	---	0.016	---	---
9. 液状花蜜	---	---	0.006	---	---

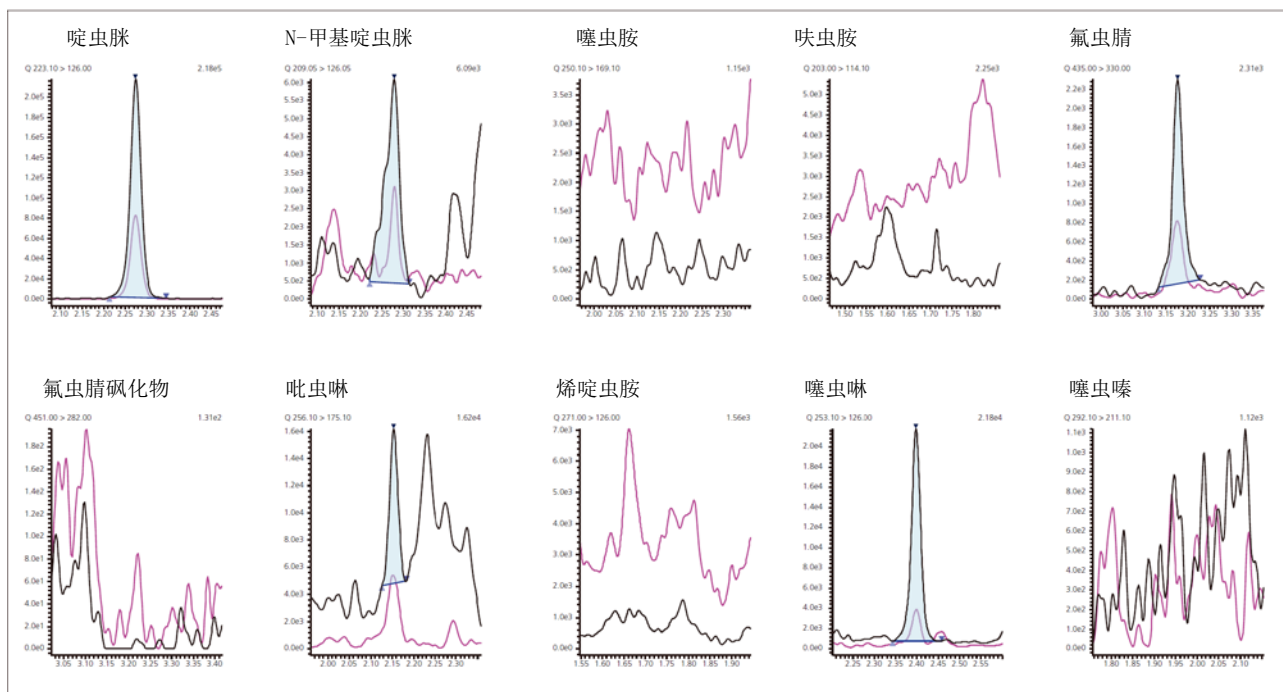


图3 比利牛斯山蜂蜜样品的色谱图

稳定性

在所有目标化合物均未检出的百里香蜂蜜中加入各化合物标准品使其浓度均为50 ng/kg，再进行萃取。萃取所得样品连续进样150针。图4显示了测定结果。结果表明，即使在如此低的浓度时，响应信号稳定性仍非常好。由此证明，由于离子源出色的重现性，实际样品长序列进样时可持续保持极高灵敏度。

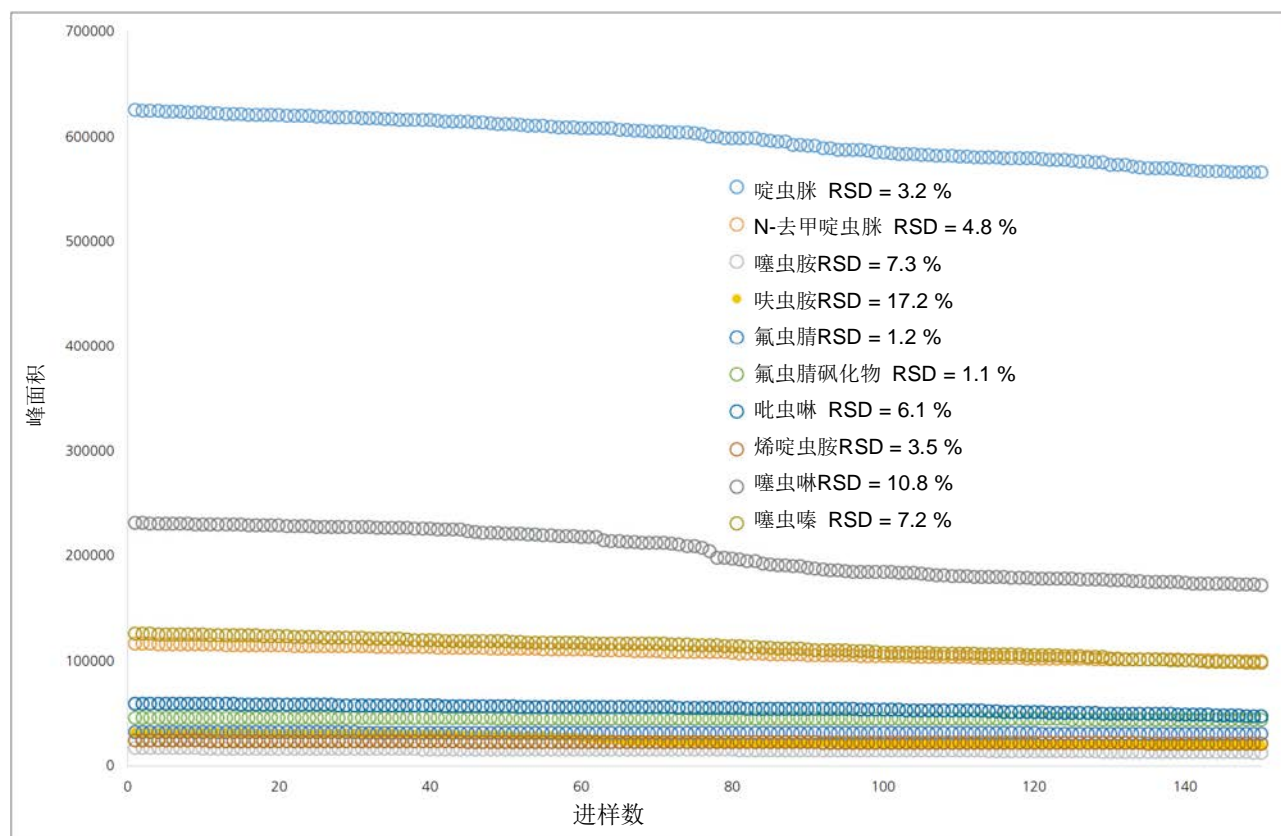


图4 真实蜂蜜样品中化合物峰面积稳定性

结论

建立了一种蜂蜜中新烟碱类化合物的超灵敏含量测定方法。本方法样品制备步骤简单，回收率高。采用的进样模式成功省去繁琐的蒸发/重新溶解或稀释步骤。由于灵敏度极高，本含量测定方法可在远低于规定残留限量的浓度水平测定实际样品。此外，即使是测定长序列的低浓度实际样品，系统仍可保持稳定。

本方法可作为研究新烟碱类化合物对蜜蜂患蜂群衰竭失调作用影响的有力支撑手段，本方法稍作调整还可应用于花粉或蜜蜂样品的测定。



岛津企业管理（中国）
有限公司岛津（香港）有
限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：