

# 基于质谱特征碎裂片段的巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物非定向筛查方法构建

樊成<sup>1</sup>, 王新<sup>2</sup>, 邹力<sup>1</sup>, 范芳芳<sup>1</sup>, 贾玮<sup>2\*</sup>

(1. 陕西省产品质量监督检验研究院, 陕西西安 710048)

(2. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

**摘要:** 该研究利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱高分辨质谱技术, 对 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物色谱信息、分子离子质荷比和二级碎裂片段的质荷比进行采集, 解析了碎裂途径, 建立了氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库, 筛选特征碎裂片段; 采用数据非依赖扫描模式, 获取可追溯的样品质谱信息, 构建了乳制品中氯化烟碱类药物及其代谢产物的非定向筛查方法。该方法确定限和检测容量分别为 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~0.33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  与 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~0.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 回收率为 84%~104%, 其相对标准偏差为 4.4%~7.1%。将所建立的方法用于 81 个批次巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物的筛查工作当中, 发现样品中含有未检出的吡虫脒-代谢物-IM-1-4, 含量为 0.32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果显示该方法快速、简便, 可实现乳制品中氯化烟碱类药物及其代谢产物准确定性和精准定量。

**关键词:** 巴氏杀菌乳; 氯化烟碱类药物及其代谢产物; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱; 非定向筛查

文章编号: 1673-9078(2021)10-317-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0226

## Non Targeted Screening for Chloronicotinoids and Their Metabolites in Pasteurized Milk Based on Characteristic Fragments of Mass Spectrometry

FAN Cheng<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>, ZOU Li<sup>1</sup>, FAN Fang-fang<sup>1</sup>, JIA Wei<sup>2\*</sup>

(1. Shaanxi Testing Institute of Product Quality Supervision, Xi'an 710048, China)

(2. School of Food and Biological Engineering Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** In this study, UHPLC quadrupole-orbitrap mass spectrometry was used to collect the chromatographic information, mass charge ratio of molecular ions and mass charge ratio of secondary fragmentation fragments of 12 kinds of chloronicotinoids and their metabolites, the fragmentation pathway was analyzed, the standard database of chloronicotinoids and their metabolites were established, and characteristic fragments were screened; The independent data scanning mode was used to obtain the traceable mass spectrum information of samples, and a non targeted screening method for chloronicotinoids and their metabolites in dairy products was established. The determination limit and the detection capacity of this method were in range of 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~0.33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~0.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The recoveries were 84%~104%, and the relative standard deviations were 4.4%~7.1%. The established method was applied to the screening of chloronicotinoids and their metabolites in 81 batches of pasteurized milk. It was found that the

引文格式:

樊成,王新,邹力,等.基于质谱特征碎裂片段的巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物非定向筛查方法构建[J].现代食品科技,2021,37(10):317-325,+246

FAN Cheng, WANG Xin, ZOU Li, et al. Non targeted screening for chloronicotinoids and their metabolites in pasteurized milk based on characteristic fragments of mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 317-325, +246

收稿日期: 2021-03-04

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目 (2019MK070)

作者简介: 樊成 (1973-), 男, 正高级工程师, 研究方向: 食品检验学, E-mail: 170422811@qq.com

通讯作者: 贾玮 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: jiawei@sust.edu.cn

samples contained acetamiprid-metabolite-IM-1-4, which was not detected, and the content was 0.32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The results showed that the method was rapid and simple, and could realize the accurate qualitative and quantitative analysis of chloronicotinoids and their metabolites in dairy products.

**Key words:** pasteurized milk; chloronicotinoids and their metabolites; UHPLC quadrupole-orbitrap mass spectrometry; non targeted screening

近年来,乳及乳制品消费量持续增长,奶牛规模化养殖迅猛发展。乳品工业产业链各环节间联系密切,从农田到餐桌的全过程均影响乳品品质<sup>[1]</sup>,涵盖饲料种植、奶牛养殖、乳制品加工、终端销售<sup>[2]</sup>等多个环节。环境富集<sup>[3]</sup>与动植物传递<sup>[4]</sup>是农药残留污染的主要来源。氯化烟碱类药物含有硝基亚甲基杂环结构<sup>[5]</sup>,具有显著的杀虫活性,选择性强等特点<sup>[6]</sup>,被广泛用于动物饲料种植培养中,其原药及其代谢物最终通过生物富集作用转移到原料乳中<sup>[7]</sup>。

动物源性食品中氯化烟碱类药物的检测方法主要有液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、色谱质谱联用法<sup>[8]</sup>等。目前,我国颁布的《GB/T 20772-2008 动物肌肉中 461 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》内包含有氯化烟碱类药物检测标准,采用液相色谱-串联质谱实现乳制品中氯化烟碱类药物的准确定量,但仅关注氯化烟碱类药物的分析,无法实现对其代谢产物的高通量定性定量分析。非定向筛查技术是基于静电场高分辨质谱可变的数据非依赖扫描 (Variable data independent acquisition, vDIA) 模式,根据目标分析物所分布的质荷比 ( $m/z$ ) 范围,动态调整隔离窗口范围,具有高选择性、扫描速度快的特点<sup>[9]</sup>。非定向技术旨在鉴定及筛选分析物中未知化合物,实现海量数据的高通量分析,可实现乳制品中氯化烟碱类药物及其代谢物分析。

本研究利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱技术,在数据依赖扫描模式下建立 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库,同时将氯化烟碱类药物及其代谢产物特征碎裂片段应用于巴氏杀菌乳非定向药物筛查技术中,使用数据非依赖扫描模式对实际分析样品进行非定向筛查,实现了巴氏杀菌乳中 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物残留的高通量非定向筛查,本方法的建立为风险监控提供数据和技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与材料

LC-MS 级乙酸铵、甲酸、甲酸铵、乙腈、冰醋酸均购自美国 Sigma 公司;无水硫酸镁 (优级纯),

醋酸钠, 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF 滤膜;噻虫胺、噻虫嗪、吡虫啉、啶虫脒、五羟基吡虫啉、呋虫胺、吡虫啉尿素、啶虫脒-代谢物-IM-1-4(IM-1-4)、啶虫脒-代谢物-IM-1-2(IM-1-2)、呋虫胺-代谢物-UF(UF)、啶虫脒-代谢物-6-氟烟酸(6-Chloronicotinic acid)、啶虫脒-代谢物-IM-2-1(IM-2-1)共 12 种农药标准品 (纯度均大于 95%) 购自德国 Sigma-Aldrich 公司及德国 Dr.Erenstofer 公司。称取 12 种农药标准品各 10 mg (精确至 0.1 mg),放置于 10 mL 容量瓶中,依据 12 种农药标准品在三种溶剂 (乙腈、正己烷和丙酮) 中的溶解度,选择相应的溶剂溶解并定容至 10 mL,配制成浓度为 1 mg/mL 的单一化合物标准储备液,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下避光保存。然后移取单一化合物标准储备液各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈-水溶液 (1:1,  $V/V$ ) 稀释、定容至刻度,配制成浓度为 10 mg/L 的标准物质混合溶液,于棕色密闭瓶  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存。用基质匹配混合标准溶液来绘制标准校正曲线,取 12 份牛乳空白样品提取液各 5 mL 于 10 mL 容量瓶中,采用真空氮气吹干仪吹至近干后,分别加入氯化烟碱类药物及其代谢产物标准品混合溶液 10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、40  $\mu\text{L}$ 、80  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、400  $\mu\text{L}$ 、800  $\mu\text{L}$ 、1000  $\mu\text{L}$ 、2000  $\mu\text{L}$ 、4000  $\mu\text{L}$ 、5000  $\mu\text{L}$  于容量瓶中,各加入乙腈 5 mL 后,用 8 mmol/L 甲酸铵水溶液定容,配制成 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、80  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、800  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2000  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4000  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5000  $\mu\text{g}/\text{L}$  的基质匹配标准溶液,实验所用所有标准溶液现用现配。

### 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱 (配备有电喷雾离子源),美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Thermo Hypersil Gold C18、C8 色谱柱与 Accucore aQ 色谱柱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Avanti J-26 $\times$ PI 型高速冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 公司; 调速多用振荡器、Vortex.Genie 2T 型旋涡混合器,美国 Scientific Industries 公司。

### 1.3 样品前处理

称取巴氏杀菌乳 10 g (精确至 0.01 g), 于 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 1% 乙酸乙腈 (V/V) 溶液, 涡旋混合 30 s 后加入 5.0 g 无水硫酸镁、1.5 g 乙酸钠, 涡旋 30 s 后振荡提取 1 min, 在 3000 r/min 下离心 3 min (4 °C)。取上清液至 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入 900 mg MgSO<sub>4</sub>、300 mg PSA 和 150 mg C18, 涡旋 30 s 后以 3000 r/min 离心 10 min, 取 250 μL 提取液以 0.1 mol/L 乙酸铵 1:1 (V/V) 稀释, 经 0.45 μm PVDF 滤膜过滤, 运用超高效液相色谱-四极杆-轨道离子阱质谱测定。

#### 1.4 色谱质谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil Gold C 18 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 与 UHPLC 保护柱 Accucore aQ (10 mm×2.1 mm, 2.6 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。柱温 35 °C。流动相为水+0.1%甲酸+4 mmol/L 甲酸铵 (A) 与甲醇+0.1%甲酸+4 mmol/L 甲酸铵 (B)。梯度洗脱程序: 0 min, 100% A; 1~7 min, 100% A~0% A; 12~13 min, 0% A~100% A; 13~15 min, 100% A, 流速为 0.3 mL/min。碰撞气: 高纯氮气 (纯度≥99.999%), 电喷雾 (ESI) 离子源, 化合物测定采用正模式, 鞘气流速 60 arb, 辅助气流速 30 arb, 气帘气流速 2 arb, 喷雾电压 3.5 kV, 离子源温度 50 °C, 毛细管温度 350 °C, 加热温度 350 °C, 进样量 5 μL。

质谱扫描方式为全扫描/数据非依赖扫描。全扫描 (Full MS) 模式下, 分辨率为 70,000 FWHM, 自动增益控制目标值 (AGC) 设为 3.0×10<sup>6</sup>。二级扫描模式为可变的数据非依赖采集 (vDIA), 扫描时间为 0 min~15 min, 分辨率采用 17,500 FWHM, 最大注入时间为 120 ms, 自动增益控制的目标值设为 1.0×10<sup>6</sup>, 信息列表分为: 125.00000、175.00000、225.00000、275.00000、325.00000、375.00000、425.00000、475.00000、550.00000、650.00000、750.00000、850.00000、950.00000, 其中 125.00000~475.00000 设定为第一个 vDIA 扫描, 隔离窗口范围设为 52.0 m/z, Loop Count 设定为 8 (即 8 个扫描段), 550.00000~950.00000 设为第二个 vDIA 扫描, 隔离窗口范围设为 104.0 m/z, Loop Count 设定为 5。碰撞能量分别为 15.0 eV、30.0 eV、45.0 eV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

本研究考察了 Hypersil Gold 系列中 3 种不同选

择性的 aQ、C8 和 C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm), 三种色谱柱都是将长链烷基键合于多孔硅胶表面。实验中啉虫脒-代谢物-IM-1-4 (IM-1-4)、啉虫脒-代谢物-IM-1-2 (IM-1-2)、呋虫胺-代谢物-UF (UF)、啉虫脒-代谢物-6-氟烟酸 (6-Chloronicotinic acid)、啉虫脒-代谢物-IM-2-1 (IM-2-1)、啉虫脒 (Acetamiprid) 的加标浓度为 10 μg/kg, 以巴氏杀菌乳为基质, 样品按照 1.3 前处理后, 考察目标化合物峰面积。Hypersil Gold C 8 为中等极性色谱柱, 载碳量为 8%, 疏水性弱于 C18 烷基链键合相的色谱柱, 对于啉虫脒-代谢物-6-氟烟酸、啉虫脒-代谢物-IM-2-1 和啉虫脒等中度疏水性化合物保留能力强, 对啉虫脒-代谢物-IM-1-4、啉虫脒-代谢物-IM-1-2 和呋虫胺-代谢物-UF 等极性较强的农药及其代谢产物保留能力较弱。aQ 极性官能团封端使得啉虫脒-代谢物-IM-1-4 与啉虫脒-代谢物-IM-1-2 等极性化合物具有较强的分离和保留能力, 协同机制与次级相互作用确保了不同农药及其代谢产物均有较好的峰形 (图 1a)。

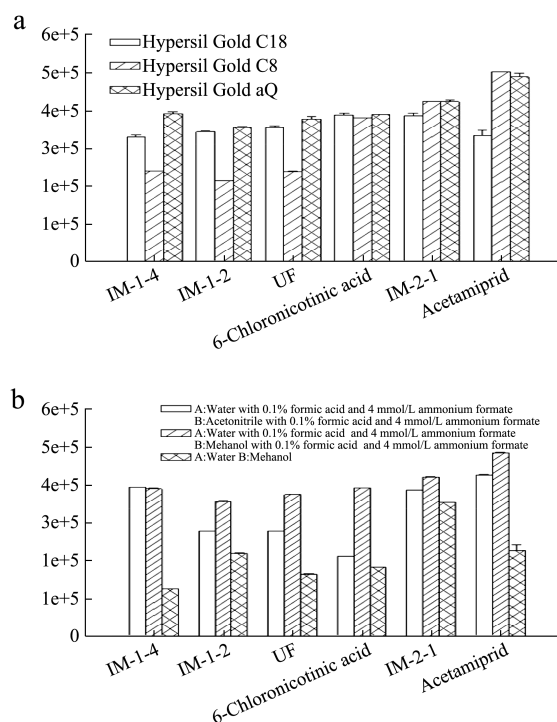


图 1 6 种农药经不同色谱柱与流动相分离的色谱峰响应值

Fig.1 Peak response values of six pesticides separated by different chromatographic columns and mobile phases (n=6)

依次以乙腈-水、甲醇-水作为流动相考察目标化合物的分离度、峰形及响应值 (图 1b), 以啉虫脒-代谢物-IM-1-4、啉虫脒-代谢物-IM-1-2、呋虫胺-代谢物-UF、啉虫脒-代谢物-6-氟烟酸、啉虫脒-代谢物-IM-2-1、啉虫脒为例, 加标浓度为 10 μg/kg, 以巴氏杀菌乳为基质, 甲醇的介电常数及发生的电荷转移高

于乙腈,因此离子化效率较高,以甲醇-水为流动相的离子化效率优于乙腈-水流动相。实验比对了六种不同流动相缓冲体系的分离效果,分别为 0.05% (V/V) 甲酸量和 3 mmol/L 甲酸铵盐量 (pH=3.19), 0.05% (V/V) 甲酸量和 4 mmol/L 甲酸铵盐量 (pH=3.27), 0.1% (V/V) 甲酸量和 3 mmol/L 甲酸铵盐量 (pH=2.93), 0.1% (V/V) 甲酸量和 4 mmol/L

甲酸铵盐量 (pH=3.01), 0.2% (V/V) 甲酸量和 3 mmol/L 甲酸铵盐量 (pH=2.70), 0.2% (V/V) 甲酸量和 4 mmol/L 甲酸铵盐量 (pH=2.76), 如图 2 所示甲醇-水流动相在 0.1% (V/V) 甲酸量和 4 mmol/L 甲酸铵盐量时 (pH=3.01) 获得最佳分离效果。确定以 0.1% (V/V) 甲酸-4 mmol/L 甲酸铵水溶液和 0.1% (V/V) 甲酸-4 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液为流动相。

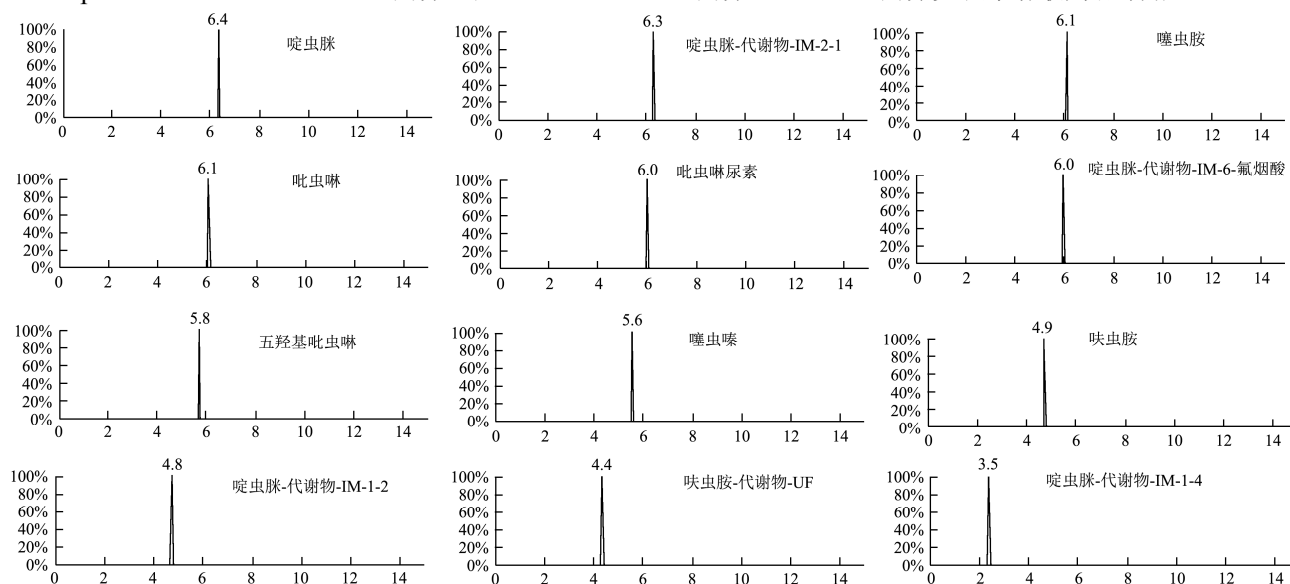


图 2 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物提取离子流色谱图

Fig.2 Ion flow chromatogram of 12 kinds of chloronicotinoids and their metabolites

## 2.2 数据库的建立

逐级稀释氯化烟碱类药物及其代谢产物标准溶液至 300  $\mu\text{g/L}$ , 平行进样分析 6 次, 以实现标准物质数据库的重现性与准确性。首先运用 Full MS/dd-MS2 数据依赖监测模式采集氯化烟碱类药物及其代谢产物标准物质的全扫描与二级碎裂谱图。数据依赖扫描监测模式下 1 秒内实现 3 次扫描, 信息列表中包括氯化烟碱类药物及其代谢产物的色谱保留时间与质谱质荷比, 设置二级碎裂容许质量误差阈值范围为 10 ppm, 若一级全扫描的目标化合物提取流色谱图离子响应强度高于  $8.3 \times 10^4$  阈值, 或该色谱峰在 3 s~6 s (Apex Trigger 3 s~6 s) 内响应强度下降, 即将该目标分子离子推送至碰撞池, 通过低 (15 eV)、中 (30 eV)、高 (45 eV) 三种不同碰撞能量进行裂解, 不同能级质谱信息叠加后得到一张标准物质裂解离子谱图。标准物质数据库包括色谱保留时间、全扫描及二级片段质荷比、碎裂片段丰度比与同位素丰度比等信息。基于每种氯化烟碱类药物的碎裂途径以及各自离子碎片间的相对信号强度, 选择离子信号强度比大于 10% 来区分同类分析物的二级碎片作为定量信息 (表 1)。基于实测碎裂信息与理论裂解途径的分析结果,

构建氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库, 包含了不同离子模式下多种加合物形式 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ ) 36 张谱图信息 (表 1)。在进行巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物非定向筛查时, 应用 mzCloud 与 TraceFinder 对标准物质数据库信息进行管理, 选择 Compound Discover 对所采集样品进行背景扣除、峰提取与对齐、质谱信息匹配识别。

## 2.3 碎裂片段特征及其在氯化烟碱类药物及其代谢产物筛查中的应用

### 2.3.1 碎裂途径与机理研究

实验中对 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物进行了碎裂片段机理研究, 得到了所有质谱碎裂片段的反应途径。以氯化烟碱类药物及其代谢产物啶虫脒为例进行分析, 啶虫脒 dd-MS2 扫描谱图如图 3 所示。

该分析物通过低 (15 eV)、中 (30 eV)、高 (45 eV) 三种不同碰撞能量进行裂解, 3 种碰撞能量谱图的均一化结果即为所得到的二级谱图。分析物通过失去一个电子或加和质子等方式形成的离子是一个奇电子离子, 奇电子离子有两个活泼的反应中心, 因此

该分析物的碎裂机理主要为电荷引发的反应 (i 断裂)、 $\pi$  电子云迁移反应、重排反应 (rH<sub>R</sub> 与 rH<sub>C</sub>) [10]。啶虫脒的分子离子质荷比 (*m/z*) 理论值为 223.07450, 该分子离子主要碎裂途径如图 4 所示。

下, 进行重排反应形成新的双键及电荷中心。新形成的分子离子 [M+H]<sup>+</sup> 均在电荷中心的吸引下产生 i 断裂, 正电荷中心分别位于三键相连的不饱和 N 原子 (氰基) 及不饱和 N 原子 (亚胺基) 上, 乙亚胺基与氰基相连的亚氨基结构相连一对电子被正电荷中心所吸引, 造成电荷的转移和两端饱和及亚氨基及不饱和 N 键的断裂。

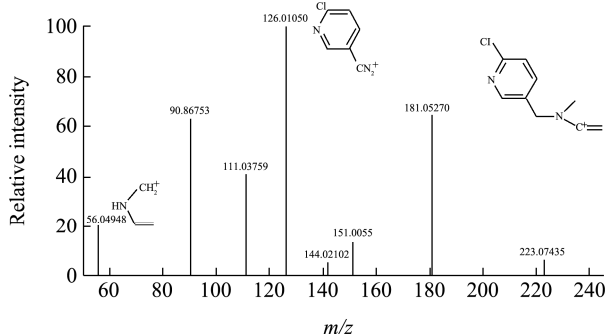


图 3 啶虫脒超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱图

Fig.3 Ultra performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field orbital ion trap mass spectrometry of acetamidiprid

C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub><sup>+</sup> *m/z* 为 181.05270 碎裂片段有两条产生途径, 该碎裂机理为啶虫脒经加氢后形成奇电子离子, 形成不同的离域体系及不同的电荷中心, 电荷中心分别定义于不饱和 N 原子 (亚氨基) 及三键相连的不饱和 N 原子 (氰基) 上, 在 N 电荷中心的诱导

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CIN<sup>+</sup> *m/z* 为 126.01050 碎裂片段有四个来源途径, 其中三个来源途径为电荷中心诱导断裂 (i 断裂), 啶虫脒经加氢后形成奇电子离子, 正电荷中心分别位于双键相连的不饱和 N 原子 (亚氨基) 上、饱和 N 原子 (亚氨基) 上、三键相连的不饱和 N 原子 (氰基) 上, 与 6-氯吡啶结构相连饱和 N 原子的键上、与 6-氯吡啶结构相连饱和 N 原子 (亚氨基) 键上、与 6-氯吡啶结构相连饱和 N 原子的键上一对电子被正电荷中心所吸引, 造成电荷的转移及相应单键的断裂。第二个来源途径为远端重排反应 (rH<sub>R</sub>), 由于  $\pi$  电子云的迁移, 6-氯吡啶结构中 2、3 号, 4、5 号, 1、6 号 C=C、C=C、N=C 键发生断裂并在 4 号碳上形成电荷中心, 极不稳定, 在游离基诱导的氢重排反应中, 该氢与 6-氯吡啶结构内部不成对电子位置发生互换, 因此, 与 6-氯吡啶结构相连饱和 N 原子的键断裂。

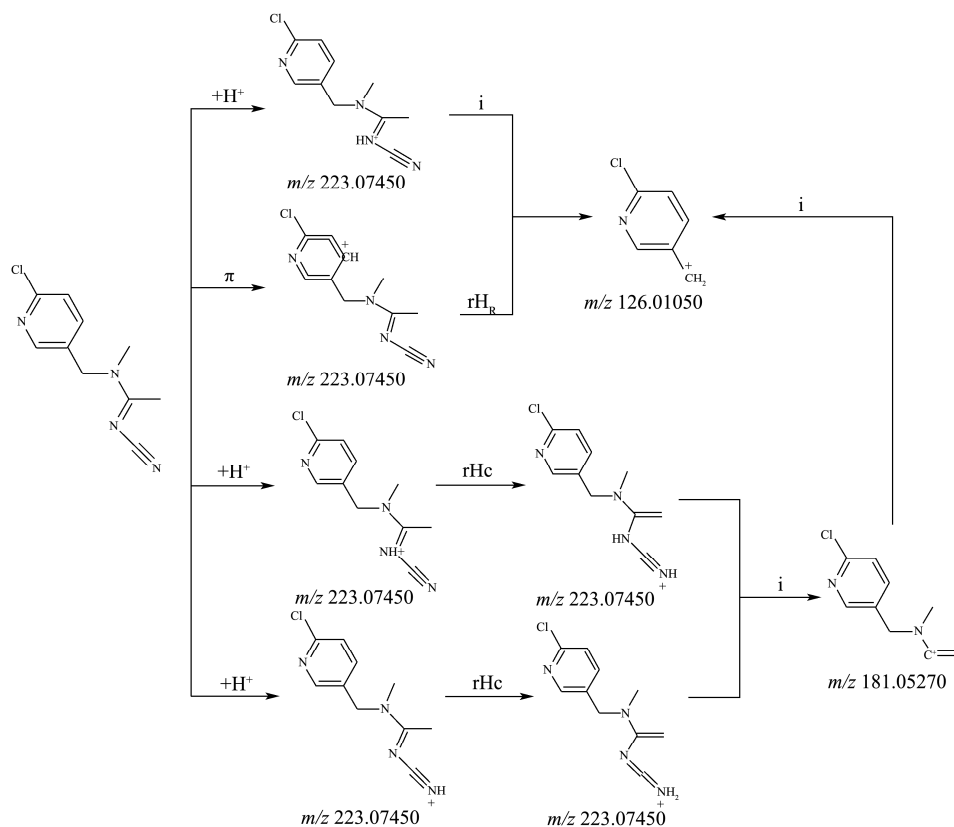


图 4 啶虫脒碎裂机理示意图

Fig.4 Fragmentation mechanism of acetamidiprid

表 1 12 种氯化烟碱类药物及其代谢产物的标准物质信息

Table 1 Standard material information for 12 kinds of nicotine chloride drugs and their metabolites

Compound	Molecular formula	RT/min	Precursor ( $m/z$ )	Ionization mode	Fragment 1		Fragment 2		Fragment 3	
Acetamiprid (啶虫脒)	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	6.4	223.07450	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> <sup>+</sup>	181.05270	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> <sup>+</sup>	110.08127
Acetamiprid-metabolite-IM-2-1 (啶虫脒-代谢物-IM-2-1)	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub>	6.3	209.05885	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> <sup>+</sup>	173.08217	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub> <sup>+</sup>	167.03705	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050
Clothianidin (噻虫胺)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	6.1	250.01600	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> ClN <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	146.97782	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> ClNS <sup>+</sup>	131.96692	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ClNS <sup>+</sup>	119.96692
Imidacloprid (吡虫啉)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	6.1	256.05958	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>3</sub> <sup>+</sup>	194.04795	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	117.04070
Imidacloprid-urea (吡虫啉尿素)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O	6.0	212.05852	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	195.03197	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	176.08184	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050
Acetamiprid-metabolite-6-chloronicotinic acid (啶虫脒-代谢物-6-氟烟酸)	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ClNO <sub>2</sub>	6.0	158.00033	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClNO <sup>+</sup>	142.00542	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	114.01050
Imidacloprid,5OH-Acetamiprid (五羟基吡虫啉)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	5.8	272.05449	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>2</sub> O	169.01632	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub> <sup>+</sup>	167.03705	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050
Thiamethoxam (噻虫嗪)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	5.6	292.02656	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	262.01600	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	185.06692	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	161.06692
Dinotefuran (呋虫胺)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	4.9	203.11387	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	175.08257	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	157.07200	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	129.04070
Acetamiprid-metabolite-IM-1-2 (啶虫脒-代谢物-IM-1-2)	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub> O	4.8	241.08507	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> <sup>+</sup>	181.05270	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sup>+</sup>	44.04948
Dinotefuran-metabolite-UF (呋虫胺-代谢物-UF)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.4	159.11280	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sup>+</sup>	102.09134	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sup>+</sup>	85.06479	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sup>+</sup>	83.04914
Acetamiprid-metabolite-IM-1-4 (啶虫脒-代谢物-IM-1-4)	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub>	3.5	157.05270	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClN <sup>+</sup>	126.01050	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	121.07602	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sup>+</sup>	44.04948

表 2 氯化烟碱类药物及其代谢产物特征碎裂片段

Table 2 Characteristic fragmentation of nicotine chloride drugs and their metabolites

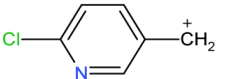
Category	Characteristic fragmentation	Structural formula	$m/z$
氯化烟碱类药物	6-氯吡啶-3-甲基杂环基团结构		126.01050

表 3 巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物的线性范围、确定限、检测容量、相关系数、平均回收率及精密度

Table 3 Linearity ranges, decision limit, detection capability, correlation coefficients ( $r^2$ ), recoveries and precision of 12 nicotine chloride drugs and their metabolites for pasteurised milk (n=6)

Compound	Linear range ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$r^2$	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Added levels					
					$CC\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		$2CC\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		$4CC\beta$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
					Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Clothianidin (噻虫胺)	2.0~500	0.9998	0.09	0.20	100	5.8	100	6.9	96	5.6
Thiamethoxam (噻虫嗪)	1.0~500	0.9997	0.08	0.15	103	5.3	96	5.8	95	6.8
Imidacloprid (吡虫啉)	2.0~500	0.9989	0.03	0.07	89	5.1	95	5.4	100	4.8
Acetamiprid (啶虫脒)	1.0~200	0.9986	0.05	0.11	99	5.9	84	5.8	101	5.6
Imidacloprid,5OH-Acetamiprid (五羟基吡虫啉)	1.0~200	0.9993	0.06	0.09	96	7.0	86	4.9	102	7.1
Dinotefuran (呋虫胺)	5.0~1000	0.9982	0.15	0.25	86	5.6	100	5.5	86	5.8
Imidacloprid-urea (吡虫啉尿素)	2.0~1000	0.9978	0.01	0.03	103	4.9	86	6.0	89	4.9
Acetamiprid-metabolite-IM-1-4 (啶虫脒-代谢物-IM-1-4)	10~1000	0.9984	0.021	0.03	92	5.4	98	6.3	102	4.8
Acetamiprid-metabolite-IM-1-2 (啶虫脒-代谢物-IM-1-2)	2.0~500	0.9996	0.05	0.13	89	6.9	99	5.2	84	5.6
Dinotefuran-metabolite-UF (呋虫胺-代谢物-UF)	0.05~10	0.9994	0.09	0.10	93	5.1	100	5.6	86	5.7
Acetamiprid-metabolite-6-chloronicotinic acid (啶虫脒-代谢物-6-氟烟酸)	5.0~500	0.9989	0.33	0.59	103	4.4	104	6.2	101	4.9
Acetamiprid-metabolite-IM-2-1 (啶虫脒-代谢物-IM-2-1)	1.0~200	0.9996	0.21	0.39	101	6.8	86	6.5	89	4.8

表 4 阳性样品筛查定量结果

Table 4 Quantitative results of positive sample screening (n=6)

Sample	Metabolites of chloronicotinoids	Concentration/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD/(%, n=6)
巴氏杀菌乳样品	Acetamiprid-metabolite-IM-1-4 (啶虫脒-代谢物-IM-1-4)	0.32	3.2

$C_5H_8N_3^+$   $m/z$  为 110.07127 碎裂片段有两个来源途径, 第一个来源途径是在  $\pi$  电子云的迁移下, 6-氯吡啶结构中 2、3 号, 4、5 号, 1、6 号 C=C、N=C 键发生断裂并在 4 号碳上形成电荷中心, 与 6-氯吡啶基与饱和 N 原子相连键上一对电子被正电荷中心所吸引, 造成正电荷的转移同时形成新的双键(亚胺基)。第二个来源途径是, 啉虫脒加氢后, 形成的奇电子离子中有一个未成对电子, 此电子在分子离子中处于反应的最有利位置, 形成活泼的反应中心, 在 N 游离中心诱导下, 随后进行重排反应 ( $rH_C$ ), 形成质荷比为 110.07127 碎裂片段。

最后一条碎裂途径为产生质荷比 ( $m/z$ ) 为 56.04948 的碎裂片段, 该碎裂机理为啉虫脒经加氢后形成奇电子离子, 正电荷中心位于饱和 N 原子(亚氨基)上, 随后进行重排反应 ( $rH_C$ ), 最后进行远端重排反应 ( $rH_R$ )。

### 2.3.2 碎裂片段的特征

啉虫脒的分子式  $C_{10}H_{11}ClN_4$ , 属于新烟碱类药物, 新烟碱类药物目前有两种主要结构: 以第一代新烟碱类药物啉虫脒为代表的氯代吡啶、以第二代新烟碱类药物噻虫胺为代表的氯代噻唑, 以呋虫胺为代表的四氢呋喃环。其中, 氯化烟碱类药物及其代谢产物是乙酰胆碱酯酶受体抑制剂, 作用于昆虫中枢神经系统, 且与传统的农药之间不存在交互抗性<sup>[11]</sup>。通过对 6-氯吡啶-3-甲基杂环基团结构的氯化烟碱类药物及其代谢产物的碎裂片段机理研究, 发现啉虫脒、啉虫脒-代谢物-IM-2-1、啉虫脒-代谢物-IM-1-2、啉虫脒-代谢物-6-氟烟酸、吡虫啉、吡虫啉尿素及五羟基吡虫啉等氯代吡啶结构农药均有  $C_6H_5ClN^+$  碎片 ( $m/z$  为 126.01050), 即药物的功能特性(结构特性)与碎裂片段的功能特性相一致。表 2 列出了氯化烟碱类药物及其代谢产物的特征碎裂片段。

### 2.3.3 特征碎裂片段在氯化烟碱类药物及其代谢产物筛查中的应用

将特征碎裂片段与氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库相结合应用于巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物非定向筛查中。采用 Full MS/vDIA 扫描模式, 运用表 2 中氯化烟碱类药物及其代谢产物特征碎裂片段的精确质荷比及结构对色谱图进行峰提取并分析呈高斯分布的色谱峰; 比对氯化烟碱类药物及其代谢产物的标准数据库信息, 初步判断该物质的类属, 其次通过其质荷比 ( $m/z$ )、保留时间、同位素丰度比、碎裂片段丰度比等质谱信息以及碎裂途径, 推断该分析物的分子式与结构式。最后采用标准物质的色谱质谱信息进行判定与定量。分析物浓度等于巴

氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物与标准物质的峰面积之比与标准物浓度的乘积。例如, 在筛查巴氏杀菌乳时, 运用氯化烟碱类药物及其代谢产物的特征碎裂片段  $m/z$  为 126.01050 提取出呈高斯分布且在标准数据库中没的色谱峰, 如图 5 所示。

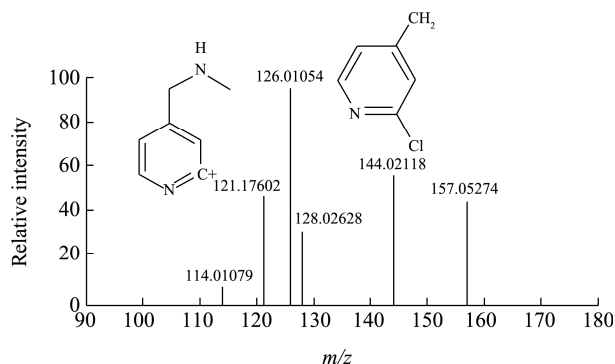


图 5 啉虫脒-代谢物-IM-1-4 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱图

Fig.5 Ultra performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field orbital ion trap mass spectrometry of acetamiprid-metabolite-IM-1-4

通过质荷比 ( $m/z$ )、保留时间、同位素丰度比、碎裂片段丰度比等质谱信息推断出该分析物分子式为  $C_xH_yClN_z$ , 将丰度较高的碎裂片段与氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库的其他化合物断裂途径进行对比, 发现该未知化合物与啉虫脒的碎裂片段断裂机理相似(如图 6), 通过对谱图与标准物质比对分析, 判断该化合物为啉虫脒-代谢物-IM-1-4, 最终定量浓度为 0.32  $\mu g/kg$ 。

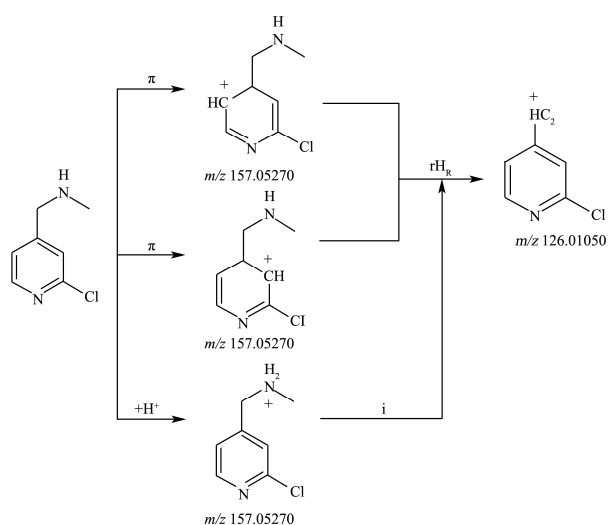


图 6 啉虫脒碎裂机理示意图

Fig.6 Fragmentation mechanism of acetamiprid-metabolite-IM-1-4

## 2.4 方法学参数考察



依据合格评定化学分析方法确认和验证指南 GB/T 27417-2017、欧盟标准 2002/657/EC 和 SANCO/12571/2013 进行方法学参数验证。在电喷雾离子化过程中,巴氏杀菌乳成分中蛋白质与脂质易影响氯化烟碱类药物及其代谢产物的离子化效率,产生基质效应,造成目标化合物的响应强度降低或增加,最终影响所建立分析方法的准确性和灵敏度。实验中对基质效应(C%)进行分析:

$$C/\% = \left( 1 - \frac{S_s}{S_m} \right) \times 100\%$$

式中:

$S_m$ ——标准曲线的斜率,目标分析物应用空白基质制作的基质匹配溶液;

$S_s$ ——标准曲线的斜率,目标分析物使用纯溶剂制作。

结果表明大部分氯化烟碱类药物及其代谢产物分析结果受基质效应影响,其中 16.7%存在强基质效应,50%为较弱基质效应,其余的目标化合物为中等强度基质效应。在配制混合标准工作液过程中,用空白样品基质提取液稀释混合标准储备液,使得样品分析与标准曲线离子化环境相似,进而最大限度的降低基质效应对分析的准确性和灵敏度影响。

利用确定限( $CC\alpha$ )与检测容量( $CC\beta$ )考察检测限与定量下限。 $CC\alpha$ 指大于与等于该值时,由 $\alpha$ 误差概率统计得出,表示测得基质中目标化合物不符合规定结论的限度, $CC\beta$ 指依据 $\beta$ 误差概率以鉴别、检测或定量基质中目标物质最低含量。通过校准曲线法确定 $CC\alpha$ 范围,在巴氏杀菌乳中等距梯度浓度添加混合标准储备液,分析色谱质谱信息后,测得目标化合物最低响应时,纵坐标轴上的浓度含量加合对应重现性标准偏差 2.33 倍即  $CC\alpha$ 。 $CC\alpha$  的值加  $CC\alpha$  取值时重现性标准偏差的 1.64 倍为  $CC\beta$ 。 $CC\beta$  取值为相应化合物  $CC\alpha$  重现性标准偏差的 1.64 倍与  $CC\alpha$  的加和。 $CC\alpha$  和  $CC\beta$  分别为 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -0.33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  与 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -0.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。准确性通过回收率指标,在巴氏杀菌乳基质中添加  $CC\beta$ 、 $2 \times CC\beta$ 、 $4 \times CC\beta$  三个浓度水平的氯化烟碱类药物及其代谢产物混合标准物质溶液,通过 6 次平行实验回收率的相对标准偏差评价建立方法的精密度,样品经提取与净化后,运用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱高分辨质谱检测,相对标准偏差与回收率结果分别为 4.4%~7.1% 和 84%~104% (表 3),建立的方法精密度和准确性能够满足巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物非定向筛查的需要。

## 2.5 实际样品分析

采用所构建的超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱高分辨质谱法筛查 81 个批次巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物<sup>[12]</sup>,表 4 列出筛查结果,研究表明,81 个批次巴氏杀菌乳都未超过国家限量标准《GB 2763-2021 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》。

## 3 结论

本文建立了基于超高效液相色谱-四极杆-轨道离子阱质谱技术的巴氏杀菌乳中氯化烟碱类药物及其代谢产物的快速识别和定量方法,使用 dd-MS2 与 vDIA 两种二级扫描模式分析了氯化烟碱类药物及其代谢产物特征断裂片段获得了氯化烟碱类药物及其代谢产物标准数据库并完成碎裂途径解析、特征碎裂片段筛选、获取可追溯的样品质谱信息,最终实现了巴氏杀菌乳中未知化合物筛查方法的建立。方法学考察及实际样品的检测证明该方法具有灵敏度高、选择性强、质量精确度高的特点,方法的检出限、回收率及精密度满足国家标准的要求适用于氯化烟碱类药物及其代谢产物残留的定量检测与定性确证。

## 参考文献

- [1] Năstăsescu Valentin, Mititelu Magdalena, Goumenou Marina, et al. Heavy metal and pesticide levels in dairy products: evaluation of human health risk [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 146(13): 111844
- [2] Adeniyi K Aseperi, Rosa Busquets, Peter S Hooda, et al. Behaviour of neonicotinoids in contrasting soils [J]. Journal of Environmental Management, 2020, 276: 111329
- [3] Nadeem Raza, Ki-Hyun Kim. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2018, 98: 79-94
- [4] Gavahian Mohsen, Pallares Noelia, Al Khawli Fadila, et al. Recent advances in the application of innovative food processing technologies for mycotoxins and pesticide reduction in foods [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 106(prepublish): 209-218
- [5] Qingyun Diao, Beibei Li, Hongxia Zhao, et al. Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: a Chinese case study [J]. Science of the Total Environment, 2018, 630: 487-494
- [6] Adesogan Adegbola T, Dahl Geoffrey E. MILK Symposium Introduction: dairy production in developing countries [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(11): 9677-9680

(下转第 246 页)