

# 气相色谱串联质谱分析引起蜜蜂中毒的 农药及其代谢物

周萍<sup>1</sup> 李珊珊<sup>2</sup> 尹志红<sup>1</sup> 吴晓群<sup>3</sup> 李樱红<sup>4</sup> 胡福良<sup>2</sup>

(1 杭州碧于天保健品有限公司, 桐庐311500; 2 浙江大学动物科学学院, 杭州310058;

3 桐庐县市场监管局, 桐庐311500; 4 浙江省食品药品检验研究院, 杭州310052)

**摘要:** 运用气相色谱串联质谱法测定健康蜜蜂、中毒蜜蜂和可疑蜂药。结果表明: 中毒蜜蜂中含有禁用的克螨特、蝇毒磷及双甲脒代谢物, 最高浓度达到7920  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。可疑蜂药中检出禁用蜂药成分克螨特、蝇毒磷, 最高浓度达到9250  $\text{mg}/\text{kg}$ 。分析了蜜蜂中毒可能的原因, 提出了科学使用蜂药的建议。

**关键词:** 气相色谱串联质谱; 蜜蜂中毒; 农药; 原因分析

## Analysis of pesticides and their metabolites causing bee poisoning by gas chromatography tandem mass spectrometry

Zhou Ping<sup>1</sup>, Li Shanshan<sup>2</sup>, Yin Zhihong<sup>1</sup>, Wu Xiaoqun<sup>3</sup>, Li Yinghong<sup>4</sup>, Hu Fuliang<sup>2</sup>

(1 Hangzhou Biyutian Health Products Co. Ltd., Tonglu 311500; 2 Animal Science College of Zhejiang University, Hangzhou 310058; 3 Tonglu County Market Supervision and Administration Bureau, Tonglu 311500; 4 Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052)

**Abstract:** Gas chromatography tandem mass spectrometry was used to determine healthy and poisoned bees as well as suspected bee drugs. The results showed that the poisoned bees contained banned metabolites of chlorimid, fly toxic phosphorus and amitraz, and the highest concentration was 7920  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The banned bee medicine components of ketamite and fly toxic phosphorus were detected in the suspected bee medicine, and the maximum concentration was 9250  $\text{mg}/\text{kg}$ . The causes of bee poisoning were analyzed, and the suggestions on the scientific use of bee medicine were put forward.

**Key words:** gas chromatography tandem mass spectrometry, bee poisoning, pesticide, analysis of causes

蜜蜂作为一种自然界和农业生态系统中庞大的、高效的传粉昆虫<sup>[1]</sup>, 其授粉产生的社会和经济效益远大于蜂产品自身<sup>[2]</sup>。蜜蜂的健康不仅可以保证蜂农获得良好的经济效益、保证蜂产品安全, 而且还有益于维护生态系统的平衡。

蜜蜂在自然界活动的过程中存在中毒的现象。一方面, 养蜂是蜂农的主要经济收入来源, 为了最大限度保证蜜蜂能够正常生产蜂产品, 需要使用药物来防治蜂病。然而, 蜂农的违规用药, 导致蜂产品中出现禁用药物或者超过限量要求的药物残留, 导致蜂产品中药物残留超标, 甚至可能导致蜜蜂的中毒死亡。另一方面, 为了农作物、果蔬、森林、植被等植物的病虫害防治, 人们需要喷洒农药。农药在蜜源植物上的使用已经非常普遍<sup>[3]</sup>, 这也会不同程度地导致蜜蜂中毒<sup>[4-6]</sup>, 同时也会引起蜂产品中的药物残留超标。此外, 有毒蜜源、有毒花粉<sup>[7]</sup>等也可以引起蜜蜂中毒。

气相色谱串联质谱仪可以对大多数高温下易挥发且不易分解的化学物质进行全扫描分析，这些化学物质经离子化后得到的碎片离子在仪器上得到检测，通过质谱数据库定性分析出药物的分子量、化学结构式和化学名称，使用该化学物质的标准品可以进一步进行定量分析。这对于鉴定某样品中存在某种具体化学物质非常有效<sup>[8-10]</sup>。将气相色谱串联质谱仪用于中毒蜜蜂中农药残留成分的鉴定分析目前尚鲜见报道。

本文就一起蜜蜂中毒事件，用气相色谱串联质谱仪分析了中毒蜜蜂和2种可疑药物（用于蜜蜂的药品），通过与健康蜜蜂的色谱图比较，分析出存在的具体药物及其含量，对这些药物的合规性、毒性进行分析，得出造成蜜蜂中毒的可能原因。通过此次蜜蜂中毒事件，我们提出了一些科学安全的养蜂用药对策，以指导蜂农进行合理用药。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 7890B-7000D气相色谱仪串联质谱仪；Sartorius BS224S分析天平；旋转蒸发仪；研钵；超声波仪；台式离心机；标准品：双甲脒、单甲脒（DMPF）、2,4-二甲基苯胺（DMA）、2,4-二甲基苯基甲酰胺（DMF）、蝇毒磷、克螨特、氟胺氰菊酯（纯度≥98%，Sigma公司）；乙腈为HPLC级。

中毒蜜蜂、健康蜜蜂、可疑蜂药1、可疑蜂药2，由江苏东台清华蜂业公司提供。

### 1.2 分析方法

#### 1.2.1 样品处理

1.2.1.1 药物处理：称取2 g样品，加入20 mL乙腈，超声提取20 min，4500 rpm离心3 min，取上清液0.2 mL，用乙腈定容至10 mL。

1.2.1.2 蜜蜂处理：取约20 g蜜蜂，用研钵研成浆状，称取2 g，加入20 mL乙腈，超声提取20 min，4500 rpm离心3 min，取上清液10 mL，40℃下旋转蒸发至干，用乙腈定容至1 mL。

表1 DMRM监测药物离子对及碰撞电压

No.	英文名称	中文名称	简写	CAS	前级离子/产物离子	CE
1	tau-fluvalinate	氟胺氰菊酯	FLU	102851-06-9	250.1/55.0	20
					250.1/200.0	20
2	coumaphos	蝇毒磷	COU	56-72-4	210/182	10
					361.9/109	15
3	Amitraz	双甲脒	AMZ	33089-61-1	293.1/162.1	10
					293.1/147.1	10
4	Semiamitraz	单甲脒	DMPF	33089-74-6	132.0/117.1	15
					162.0/121.1	10
5	2,4-Dimethylphenyl formamide	2,4-二甲基苯基甲酰胺	DMF	60397-77-5	149.0/121.2	10
					149.0/106.1	20
6	2,4-Dimethyl aniline	2,4-二甲基苯胺	DMA	95-68-1	121.0/106.1	10
					120.0/77.1	20
7	propargite	克螨特	BPPS	2312-35-8	135/107.1	10
					149.9/135.1	5

#### 1.2.2 测试条件

##### 1.2.2.1 气相色谱质谱仪器条件

色谱柱：HP-5MS，30 m×0.25 mm×0.25 μm

升温程序：50℃（1 min）→10℃/min→140℃  
→25℃/min→180℃→12℃/min→300℃（5min）

流速：1.0 mL/min

进样量：1 μL

进样口温度：250℃

不分流进样

质谱条件：离子源温度280℃，色谱质谱接口温度280℃，溶剂延迟：4 min，灯丝电流400 μA，电子倍增器eV=70，增益因子20，计算EMV=1568.1 V。

1.2.2.2定性分析：全扫描M/Z=50-500。

1.2.2.3定量分析的离子对监测方法：DMRM监测。

DMRM监测药物离子对及碰撞电压见表1，粗体为定量离子对。

1.2.3标准曲线制备

分别称取双甲脒、单甲脒（DMPF）、2, 4-二甲基苯胺（DMA）、2, 4-二甲基苯基甲酰胺（DMF）、蝇毒磷、克螨特、氟胺氰菊酯标准品各10 mg，分别用乙腈配制成1000 mg/L的贮备液。分别吸取适量贮备液混合，用乙腈配制适当浓度的混合标准中间液，用该中间液以乙腈为溶剂，通过逐级稀释的方法，最终稀释成5 μg/L，10 μg/L，20 μg/L，50 μg/L，100 μg/L系列标准溶液。按1.2.2.1和1.2.2.3的条件进行上机检测。以各种药物标准液的峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

1.2.4定性与定量

将1.2.1处理的样液按1.2.2的条件进行上机分析。运用安捷伦质谱数据软件NIST-2014年版，进行各色谱峰定性分析，用外标法进行药物的定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品处理与净化

蜂药中含有较高浓度的药物，当稀释足够倍数时，基质效应会大大降低。实验表明，当稀释500倍时，药物的样液呈无色透明，上机检测可以获得满意的全扫描色谱图。

蜜蜂主要成分为蛋白质、纤维素类，不溶于乙腈，乙腈对色素的溶解度非常低，采用本文的方法处理后，样液呈淡黄色，上机检测可以获得满意的全扫描色谱图。

### 2.2 样品全扫描结果分析

样品上机进行全扫描分析，出现若干色谱峰，见图1。运用安捷伦质谱数据软件NIST-2014年版，进行各色谱峰分析，发现了如下物质：

萘：出峰时间11.3 min，具有香樟气味，驱虫剂。

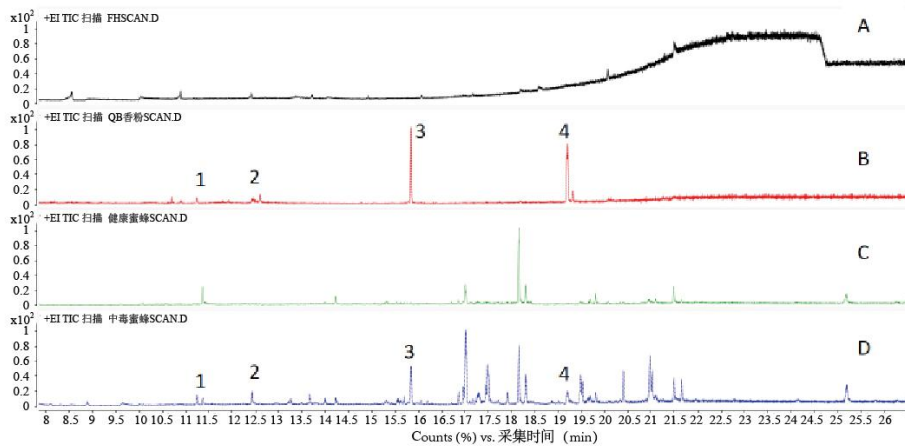
DMF：出峰时间12.4 min，杀虫剂双甲脒的代谢物。

对叔丁基苯酚：出峰时间15.8 min，具有特殊的苯酚气味，制造医药驱虫剂、农药克螨特的原料。

克螨特：出峰时间19.2 min

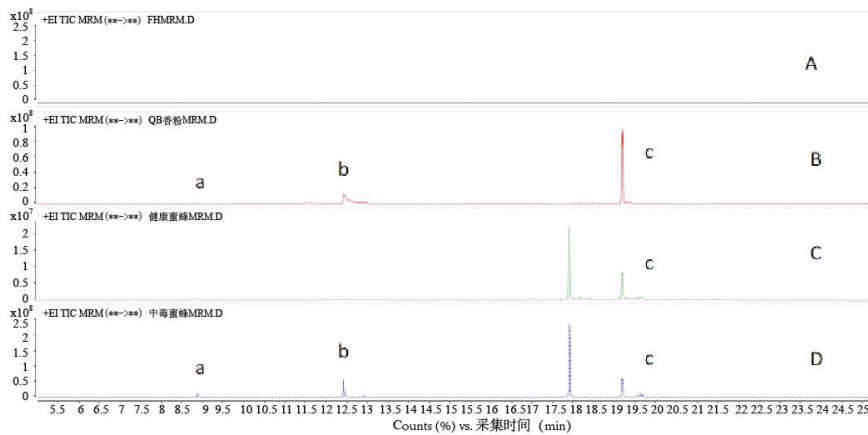
以上4种物质，除DMF外均在药物和中毒蜜蜂和可疑药物1中找到。DMF在中毒蜜蜂中存在，在可疑药物1中未找到。考虑蜂农可能还使用了另一种药物，经过询问，蜂农讲述还使用了另一种药物（可疑药物2）。我们按1.2分析方法进行了检测，色谱图见图2，结果未扫描到高浓度的DMF在内的药物。

分析表明，可疑药物1中添加了萘和克螨特成分，而且在该药物中检出了制造克螨特的原料成分——对叔丁基苯酚，说明所添加的克螨特可能为工业级。



**图1 药物和蜜蜂GC/MS全扫描色谱图**

A.可疑蜂药1, B.可疑蜂药2, C.健康蜜蜂, D.中毒蜜蜂  
1.茶; 2.2,4-二甲基苯基甲胺 (DMF); 3.对叔丁基苯酚; 4.克螨特



**图2 药物和蜜蜂DMRM色谱图**

A.可疑蜂药1; B.可疑蜂药2; C.健康蜜蜂; D.中毒蜜蜂  
a. DMA (2,4二甲基苯胺); b. DMF (二甲基苯基甲酰胺); c.克螨特

### 2.3 样品定量分析结果讨论

将1.2.1处理的样品,按1.2.2条件进行DMRM定量分析检测,色谱图见图2。

排除了病毒源性、有毒蜜源、粉源的因素,蜜蜂中毒至死很可能摄入了大量的药物。我们采用灵敏度更高的GC/MS/MS方法,对2种药物、健康蜜蜂和中毒蜜蜂进行了蜂产品中高风险药物克螨特、双甲脒及其代谢物、蝇毒磷和氟胺氰菊酯<sup>[11]</sup>的定量分析,分析结果如表2:

从表中可知,我们从中毒蜜蜂中检出超高含量的克螨特、双甲脒代谢物和蝇毒磷,从可疑药物1中检出相同种类的药物,其中克螨特含量高达9250 mg/kg,表2中的所有成分在可疑药物2中均未检测出,可以推定:中毒蜜蜂摄入了大量可疑药物1。

农药对蜜蜂的毒性有较多文献报道<sup>[12-17]</sup>,以上药物在中毒蜜蜂中的残留量虽然很高,但是从可以查到的资料看,都未达到各种药物的半数致死量(LD<sub>50</sub>)。蜜蜂的死亡很可能是多种高浓度药物长期综合作用的结果<sup>[18]</sup>。

值得注意的是:阅读可疑药物1标签内容,发现配方中仅为升华硫,并没有克螨特、双甲脒代谢物和蝇毒磷成分,然而却在检测中发现这些成分的大量存在。所以,该药物的质量值得高度怀疑。

表2 蜜蜂和可疑药物中高风险药物含量

药物名称	中毒蜜蜂 (mg/kg)	每只蜜蜂 中的含量 ( $\mu\text{g}$ )	药物的半 数致死量 ( $\mu\text{g}$ )	健康蜜蜂 (mg/kg)	可疑药物1 (mg/kg)	可疑药物2 (mg/kg)
克螨特	7.9	0.79	47.9 <sup>[12]</sup>	0.9	9250	未检出
2,4-二甲基苯胺 (DMA)	4.0	0.40	无数据	0.1	594	未检出
2,4-二甲基苯基甲 酰胺 (DMF)	3.8	0.38	无数据	0.05	3100	未检出
单甲脒DMPF	0.6	0.06	无数据	0.03	170	未检出
双甲脒	未检出	/	50 <sup>[12]</sup>	未检出	未检出	未检出
蝇毒磷	1.5	0.15	无数据	0.3	1000	未检出
氟胺氰菊酯	0.1	0.01	无数据	未检出	未检出	未检出

注 1: 方法检测限  $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

注 2: 每只蜜蜂重量以  $0.1\text{g}$  计。

### 3 讨论

本文建立了用乙腈溶解稀释样品, 经超声提取, 运用气相色谱串联质谱仪进行分析, 用全扫描方法鉴定可疑物质, 用DMRM方法对药物定量, 分析中毒蜜蜂、健康蜜蜂和可疑药物中的农药种类和含量, 为科学分析蜜蜂中毒原因提供一定的参考。

近年来, 随着欧盟等进口国对蜂产品提出日益严苛的药物残留要求, 越来越多的药物种类从蜂产品中检出, 蜂产品的质量安全问题越来越受到蜂产品生产者和消费者的关注。利用科学手段对蜜蜂饲养、蜂产品安全进行控制已经迫在眉睫。为此, 我们提出如下建议供同行参考:

(1) 广大蜂农要掌握科学用药知识, 提高科学养蜂水平。正确认识“预防为主”, 通过饲养抗病力强的蜂种、饲养强群、加强营养、保温、通风、降湿等管理手段来减少病害的发生, 不能有病没病都用药防治。一旦病害发生, 到非用药治疗不可时, 必须做到绝不使用国家颁布的禁用兽药及其他化合物。

(2) 要特别关注蜂药的质量与安全性, 蜂农使用药物前, 应仔细确认是否含有禁用药物或者毒性较高的药物。而且, 蜂药必须从正规渠道采购, 有了质量问题可以投诉, 减少蜂农损失。

(3) 蜂药使用的剂量必须根据蜂群的实际需要, 杜绝超剂量频繁滥用药物。蜂农为了确保蜂群健康, 出于多重保险考虑, 往往会同时使用多种药物, 这反而增加蜂群的健康危害, 甚至导致蜂群的中毒死亡<sup>[18]</sup>。

(4) 国家相关管理部门应加大对蜂药的管理力度, 对不按批文规定生产蜂药, 特别是添加违禁药物的蜂药厂家依法严厉查处。本例中, 可疑药物1获得合法的生产批文, 却在实际生产中添加了大量法律禁止使用的药物, 其真实配方与标签配方严重不符, 属于严重的违法行为。

### 参考文献

- [1] 徐鹏滔, 胡福良. 蜜蜂对全球气候变化的生态响应[J]. 蜜蜂杂志, 2022, (1):20-23
- [2] 李旭涛. 农药对蜜蜂生态环境的影响及保护对策[J]. 养蜂科技, 2005, (1):16-19
- [3] 李志勇, 王志, 牛庆生, 等. 农药与蜜蜂生态安全[J]. 中国蜂业, 2014, (2):26-27
- [4] 彭建, 李道纯, 邵陪林. 蜜蜂中毒的原因分析及对策[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2020, (1): 43-44
- [5] 赵春炎. 郸城县飞机喷防蜜蜂中毒纪实[J]. 中国蜂业, 2018, 69(10): 29
- [6] 宋心仿. 山东最大一起蜜蜂中毒索赔案获胜[J]. 中国蜂业, 1999, (6): 29

- [7] 黄庆. 这些植物的花粉可引起蜜蜂中毒[J]. 农村实用科技信息, 2002, (9): 29
- [8] 张晓波. 气相色谱-质谱法分析鉴定鱼体内杀虫双[J]. 理化检验-化学分册, 2005, 41(9): 633-635
- [9] 郭远明, 钟志, 陈雪昌, 等. 气相色谱质谱法在渔业污染事故调查鉴定中的应用[J]. 水产科技情报, 2005, 32(5): 223-224
- [10] 孙静. 气相色谱-质谱联用技术研究进展及前处理方法综述[J]. 当代化工研究, 2017, (9): 4-5
- [11] 李樱红, 周萍, 徐权华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂王浆中7种高风险农药残留[J]. 色谱, 2018, 36(2): 136-142
- [12] 廖建华, 程燕, 卜元卿, 等. 中国主要蜜源作物上登记的农药品种及其中杀虫剂对蜜蜂的初级风险评估[J]. 农药学学报, 2018, 20(1): 100-109
- [13] 卜元卿, 单正军, 周军英, 等. 农药对蜜蜂生物毒性及安全性评价研究回顾[J]. 农药, 2009, 48(6): 399-401, 426
- [14] 王瀛寰, 张艳峰, 张旭, 等. 五种农药对中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂的经口毒性比较[J]. 农药学学报, 2012, 14(4): 453-456
- [15] 林小丽, 叶纪明, 单正军, 等. 农药对蜜蜂的风险评价技术进展[J]. 农药学学报, 2008, 10(4): 404-409
- [16] 苍涛, 赵学平, 张志恒, 等. 草莓生产中常用农药对蜜蜂的毒性及安全评价[J]. 浙江农业科学, 2009, (4): 785-787
- [17] 代平礼, 王强, 孙继虎, 等. 4种农药对意大利蜜蜂的毒力测定[J]. 农药, 2007, 46(8): 546-547
- [18] 吴艳艳, 周婷, 王强, 等. 杀螨剂对蜜蜂的危害[J]. 中国蜂业, 2014, 65(8): 30-30

基金项目：财政部和农业农村部：国家现代农业产业技术体系建设项目（CARS-44）；2021年度浙江省市场监督管理局科技项目（20210127）

通讯作者：胡福良, E-mail: flhu@zju.edu.cn