

# 液相色谱-串联质谱法测定蜂王浆中双甲脒及其代谢物的残留量

侯建波<sup>1,2</sup>, 谢文<sup>1,2</sup>, 曾淦宁<sup>3</sup>, 张文华<sup>1,2</sup>, 史颖珠<sup>4</sup>, 钱艳<sup>4</sup>, 周启令<sup>4</sup>

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016;

2. 浙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 浙江 杭州 310016;

3. 浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310014;

4. 浙江立德产品技术有限公司, 浙江 杭州 310016)

**摘要:**采用固相萃取-液相色谱-串联质谱法(SPE-LC-MS/MS)测定蜂王浆中双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和2,4-二甲基苯胺的残留量。样品经氨水稀释、氨化乙腈沉淀蛋白并提取,通过中性 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 固相萃取柱净化,以液相色谱-串联质谱多反应监测正离子模式检测,同位素稀释内标法和外标法定量。结果表明,双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和2,4-二甲基苯胺的定量限分别为0.05、0.5、5.0和0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,在空白蜂王浆基质溶液0~300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内绘制线性工作曲线,线性相关系数大于0.997,对空白蜂王浆进行添加浓度5.0、10、100、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的实验,总体回收率为50.5%~110%,相对标准偏差为0.8%~15.0%。该方法简便、快捷,定量限能够满足目前国内外残留限量要求,可为蜂王浆中双甲脒及其代谢物残留量的测定提供参考。

**关键词:**蜂王浆;双甲脒;代谢物;液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2019)02-0131-08

doi:10.7538/zpxb.2017.0176

## Simultaneous Determination of Amitraz and Its Metabolites in Royal Jelly by HPLC-MS/MS

HOU Jian-bo<sup>1,2</sup>, XIE Wen<sup>1,2</sup>, ZENG Gan-ning<sup>3</sup>, ZHANG Wen-hua<sup>1,2</sup>,

SHI Ying-zhu<sup>4</sup>, QIAN Yan<sup>4</sup>, ZHOU Qi-ling<sup>4</sup>

(1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China;

2. The Technic Center of Zhejiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China;

3. Ocean College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

4. Zhejiang Lead Product Technic Co. Ltd., Hangzhou 310016, China)

**Abstract:** Royal jelly is a popular nutritional supplement, its quality directly affects consumer's health. In this work, solid phase extraction coupled with high performance

收稿日期:2017-11-09;修回日期:2018-02-07

基金项目:浙江省科技计划项目(2017C37011);国家质检总局科技计划项目(2016IK280);浙江出入境检验检疫局科技计划项目(ZK201710X)资助

作者简介:侯建波(1983—),男(满族),内蒙古人,高级工程师,从事食品中药物残留检测。E-mail: houjb@ziq.gov.cn

网络出版时间:2018-05-15;网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180515.0916.002.html>

liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) was developed for determination of amitraz, *N*-2,4-dimethyl phenyl-*N*-methylformamidine (DMPF), *N*-(2,4-dimethylphenyl) formamide (DMF) and 2,4-dimethylaniline (DMA) in royal jelly. The protein of royal jelly was precipitated, and the extracts were dissolved and distilled with ammonia solution and ammonia of acetonitrile solution. The supernatant solution was cleaned up with solid phase extraction column of N-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cartridges and eluted with ammonia of acetonitrile solution into a glass culture tube, the eluate evaporated to dryness and reconstituted in acetonitrile solution, and then filtered through nylon membrane into a glass LC vial for LC-MS/MS analysis. The solution was separated by Agilent Eclipse XDB-C18 column (150 mm×4.6 mm×5 μm) and the quantitative detection was performed on LC-MS/MS by multiple reaction monitoring (MRM) mode under positive electrospray ionization (ESI<sup>+</sup>). Isotopes dilution internal standard method or external standard method were used to determine the residue contents in sample. The limits of quantification (LOQs, S/N = 10) of amitraz, DMPF, DMF and DMA are 0.05, 0.5, 5.0 and 0.5 μg/kg, respectively. Single-laboratory method validation data were determined, the calibration standard curves concentration are 0, 5.0, 10, 100, 200, 300 μg/kg and correlation coefficients are more than 0.997. Appropriate amounts of the standard target compounds were spiked into the “blank” royal jelly and fixed at four final concentration levels of 5.0, 10, 100 and 200 μg/kg, the recoveries and relative standard deviations (RSDs) using spiked matrix calibration standard curves are 50.5%-110% and 0.8%-15.0%, respectively. This method is convenient, rapid and effective, it is suitable for determination and confirmation of amitraz and its metabolites in royal jelly sample, and in line with the regulations of European Union (EU).

**Key words:** royal jelly; amitraz; metabolites; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

蜂王浆可辅助控制血管扩张,具有降血糖、降血脂、降血压、保护肝脏、抗菌消炎以及提高免疫力、抗衰老等功效<sup>[1]</sup>。我国是蜂王浆的主要生产国,产品主要出口日本、欧盟和美国等发达国家和经济体<sup>[2]</sup>。随着蜂王浆营养价值认可度的不断提高,人们对其消费需求不断增长,对其质量要求也越来越高,药物残留成为衡量蜂王浆产品质量的重要指标。

双甲脒(amitraz),又称为 *N,N*-双(2,4-二甲苯亚氨基甲基)甲胺,是一种常见的有机氮杀虫、杀螨剂,广泛用于果树、蔬菜、茶叶、棉花等作物的害虫防治<sup>[3]</sup>。由于双甲脒可以有效防治狄瓦氏螨引起的蜂病,且对蜜蜂低毒,因此广泛用于蜂巢除螨<sup>[4-5]</sup>。双甲脒易发生代谢或降解,生成单甲脒(DMPF)、2,4-二甲基苯基甲酰胺(DMF)和 2,4-二甲基苯胺(DMA),其代谢途径示于图 1。其中,DMA 在化工合成中常作为

单甲脒和双甲脒的合成原料,具有毒副作用和致突变性,对肝脏的损伤较大<sup>[6]</sup>。因此,各国纷纷制订双甲脒在农产品及蜂产品中的限量,以保证其质量安全,其中,欧盟、日本和美国规定蜂产品中双甲脒限量为 0.2 mg/kg,意大利和德国规定的限量为 0.01 mg/kg,同时检测其代谢物<sup>[7-10]</sup>。

目前,测定食品中双甲脒及其最终代谢产

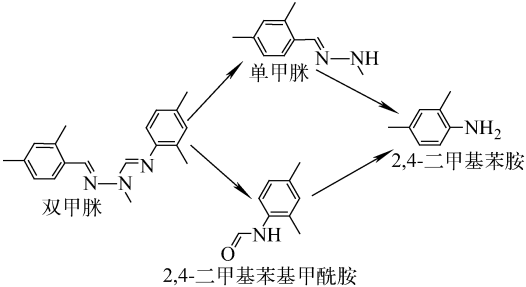


图 1 双甲脒的主要代谢路径

Fig. 1 Metabolism routes of amitraz

物 2,4-二甲基苯胺残留量通常采用气相色谱法<sup>[11-14]</sup>和气相色谱-质谱法<sup>[15-19]</sup>,前处理方式以酸、碱环境下高温水解样品居多。对蜂产品的检测主要集中于蜂蜜样品<sup>[11-14,17-18,20-21]</sup>,而对蜂王浆的检测报道较少<sup>[19,22]</sup>。随着液相色谱和质谱的不断发展,研究人员通过高效液相色谱(HPLC)法<sup>[23-24]</sup>和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测了食品、水和血液等样品中双甲脒及其代谢物<sup>[25-28]</sup>。

本工作拟采用固相萃取-液相色谱-串联质谱法(SPE-LC-MS/MS)测定蜂王浆中双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和 2,4-二甲基苯胺的残留量,希望为蜂王浆的质量控制提供方法和数据参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

1260-6495 型液相色谱-串联质谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有电喷雾离子源;固相萃取装置:美国 Supelco 公司产品;氮吹仪:美国 Organomation 公司产品;台式离心机:美国 Thermo 公司产品;Milli-Q 超纯水器:美国 Millipore 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

中性 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 固相萃取柱(1 g/3 mL)和 C18 固相萃取柱(500 mg/3 mL):中国上海安谱实验科技股份有限公司产品;HLB 固相萃取柱(500 mg/6 mL)和 MCX 固相萃取柱(150 mg/6 mL):美国 Waters 公司产品;乙腈、甲醇和甲酸:均为色谱纯,美国 Tedia 公司产品;实验用水:Milli-Q 高纯水;氨水:分析纯,中国上海国药集团产品;双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和 2,4-二甲基苯胺标准品:纯度均为 99%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;双甲脒-D<sub>6</sub> 标准品:纯度 98%,加拿大 TRC 公司产品;2,4-二甲基苯胺-D<sub>6</sub> 标准品:纯度 98%,加拿大 C/D/N Isotopes 公司产品。用乙腈将各化合物溶解、稀释并定容,制得 10 mg/L 标准储备液,再用乙腈将其稀释至所需浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的提取 精确称取 2.00 g 蜂王浆样品于 50 mL 聚塞离心管中,加入 20 ng 同位素内标和 8 mL 5%氨水溶液,以 2 000 r/min

涡旋混合 1 min,静置 5 min;再加入 10 mL 5%氨水-乙腈溶液,以 2 000 r/min 涡旋混匀 1 min,静置 5 min,定容至 20 mL,涡旋混匀;以 8 500 r/min 离心 5 min,移取 2.0 mL 上清液,加入 2 mL 5%氨水-乙腈溶液,涡旋混匀;以 8 500 r/min 离心 5 min,取上清液,待净化。

1.3.2 样品的净化 将提取液转移至中性 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 固相萃取柱,用 2 mL 5%氨水-乙腈溶液洗涤固相萃取柱,接收流出液,40 ℃下氮吹至不足 0.5 mL;加入乙腈定容至 2 mL,再加入 2 mL 水,涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜,待测。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18 柱(150 mm×4.6 mm×5 μm);流动相:A 为 0.15%甲酸溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~8.0 min(40%~65%B),8.0~9.0 min(65%~95%B),9.0~14.0 min(95%B),14.0~15.0 min(95%~40%B),15.0~19.0 min(40%B);流速:0~8.0 min(0.4 mL/min),8.0~9.0 min(0.4~0.7 mL/min),9.0~15.0 min(0.7 mL/min),15.0~16.0 min(0.7~0.4 mL/min),16.0~19.0 min(0.4 mL/min);进样量 10 μL;柱温 25 ℃。

1.3.4 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式;多反应监测模式(MRM);毛细管电压 2 500 V;离子源温度 130 ℃;干燥气流速 16 L/min;鞘气温度 250 ℃,流速 11 L/min。其他质谱条件列于表 1。

表 1 各化合物基本信息及质谱测定条件

Table 1 Basic informations and optimized mass spectrometric parameters

| 化合物<br>Compound          | 离子对<br>MRM<br>transition<br>(m/z) | 碰撞能<br>Collision<br>energy/V | 保留时间<br>Retention<br>time/min |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 双甲脒                      | 294.2/163.2*                      | 14                           | 14.26                         |
|                          | 294.2/122.2                       | 33                           |                               |
| 单甲脒                      | 163.2/122.2*                      | 17                           | 3.30                          |
|                          | 163.2/107.2                       | 30                           |                               |
| 2,4-二甲基苯基甲酰胺             | 150.1/107.1*                      | 24                           | 7.09                          |
|                          | 150.1/132.1                       | 14                           |                               |
| 2,4-二甲基苯胺                | 122.1/107.1*                      | 17                           | 3.61                          |
|                          | 122.1/79.1                        | 34                           |                               |
| 双甲脒-D <sub>6</sub>       | 300.2/166.1                       | 15                           | 14.25                         |
| 2,4-二甲基苯胺-D <sub>6</sub> | 128.1/110.0                       | 19                           | 3.61                          |

注: \* 表示定量离子对

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取条件的选择

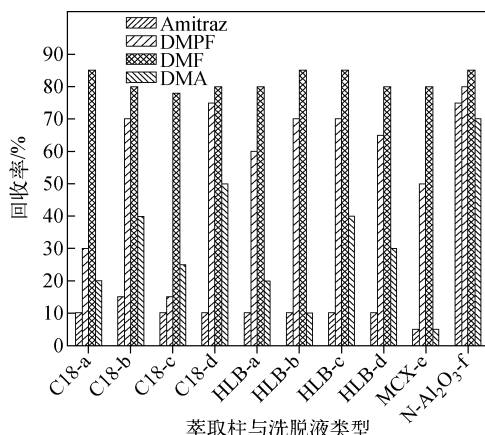
测定蜂王浆中药物残留时通常需要去除蛋白,以降低蛋白质对测定的影响。已有研究表明<sup>[26,29]</sup>,酸性环境下双甲脒易分解。本实验分别考察了1%、3%和5%氨水溶液对样品的提取效果,以及1%、3%和5%氨水-乙腈溶液沉淀蛋白的效果。结果表明,向2 g 蜂王浆样品中加入8 mL 5%氨水溶液,提取液pH处于9~10之间,可保持提取液的酸碱度,有助于提高前处理过程中化合物的稳定性。加入5%氨水-乙腈溶液可有效沉淀蜂王浆中蛋白质,同时保持提取液的碱性环境,所以净化固相萃取柱前,向提取液中再加入2 mL 5%氨水-乙腈溶液,可进一步沉淀蛋白质,以减少蛋白质对检测结果的影响。

### 2.2 净化条件的选择

本实验分别考察了C18、HLB、MCX 和中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  四种固相萃取柱的净化效果。实验添加5 ng 标准混合溶液,其中C18 和 HLB 固相萃取柱采用5 mL 水上样,5 mL 水淋洗,依次用5 mL 二氯甲烷、甲醇、乙腈和二氯甲烷-乙腈-甲醇混合液(2:1:1, V/V/V)进行洗脱;MCX 固相萃取柱采用5 mL 酸性水溶液上样,5 mL 水淋洗,5 mL 5% 氨化甲醇洗脱;中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  固相萃取柱直接用5 mL 5% 氨化乙腈进行洗脱净化,结果示于图2。C18、HLB 和 MCX 固相萃取柱对双甲脒的回收率小于15%,对2,4-二甲基苯胺的回收率低于50%,中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  固相萃取柱对目标物的回收率均大于70%。因此,选择中性  $\text{Al}_2\text{O}_3$  固相萃取柱进行样品的净化。

### 2.3 色谱条件的优化

样品稀释剂对待测物的峰形、分离度和灵敏度有一定的影响,本实验比较了乙腈-0.15% 甲酸水溶液(4:6, V/V)和乙腈-水溶液(1:1, V/V)作为样品稀释剂对色谱分离效果的影响。结果表明,采用乙腈-0.15% 甲酸水溶液(4:6, V/V)为稀释剂,双甲脒在8 h 内几乎完全分解;采用乙腈-水溶液(1:1, V/V)为稀释剂,各化合物可以在24 h 之内稳定存在,且色谱峰峰形良好。故本实验采用乙腈-水溶液(1:1, V/V)作为样品定容溶液。



注:a. 二氯甲烷;b. 甲醇;c. 乙腈;

d. 二氯甲烷-乙腈-甲醇(2:1:1, V/V/V);

e. 5% 氨化甲醇溶液;f. 5% 氨化乙腈溶液

图2 使用不同洗脱液,C18、HLB、MCX 和  $\text{N-Al}_2\text{O}_3$  固相萃取柱的净化效果

Fig. 2 Purification effect of C18, HLB, MCX and  $\text{N-Al}_2\text{O}_3$  SPE under different eluent fluid

参考相关文献<sup>[26,28]</sup>,本实验选择C18 柱对目标化合物进行分离。选择0.15% 甲酸水溶液为流动相的水相,分别考察了甲醇、乙腈为有机相的分离效果。结果表明,采用乙腈-0.15% 甲酸溶液为流动相可以实现蜂王浆样品基质干扰峰的良好分离,不影响目标物定量。空白蜂王浆基质加标溶液的检测结果示于图3。

### 2.4 质谱条件的优化

正离子模式下,采用直接进样方式对1.0 mg/L 待测物的标准溶液进行母离子全扫描,以确定分子离子峰,再对其子离子进行全扫描,各化合物的主要子离子及可能的碎片信息示于图4。实验选取信噪比高、峰形好、干扰小的离子对作为定量离子对,以多反应监测正离子模式优化质谱参数,获得的最佳质谱条件列于表1。由于双甲脒容易发生源内裂解生成单甲脒,因此需降低毛细管电压和离子源温度。

## 3 方法验证

### 3.1 线性关系和定量限

本实验通过测定混合溶剂标准溶液和空白提取溶液基质加标标准溶液,计算离子抑制率,以评价基质效应<sup>[30-31]</sup>,结果列于表2。可见,单甲脒和2,4-二甲基苯胺的离子抑制率均大于30%,存在明显的抑制效应。实验采用添加同

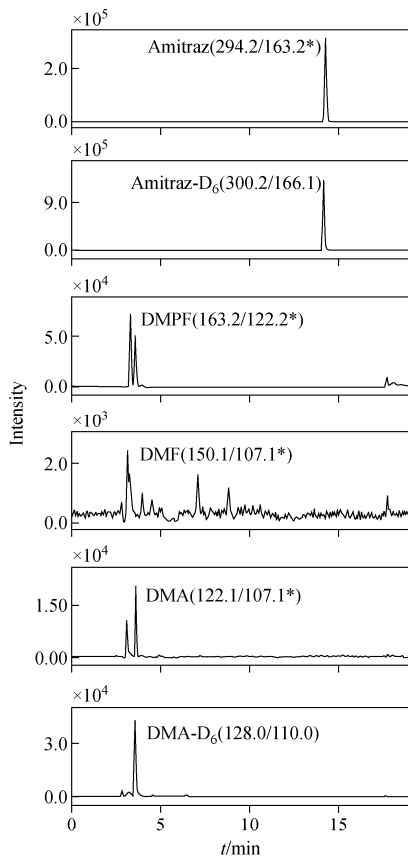


图3 空白蜂王浆基质加标溶液检测结果(5.0 µg/kg)  
Fig. 3 Separation results of royal jelly matrix (5.0 µg/kg)

位素内标物和稀释空白蜂王浆提取液配制标准工作曲线溶液的方式减弱基质效应。

以标准品与同位素内标物峰面积比值  $y$  为纵坐标(外标法以谱峰面积为纵坐标),以待测物质量浓度  $x(\mu\text{g/kg})$  为横坐标,绘制各化合物标准溶液工作曲线,结果列于表3,在0~300 µg/kg 浓度范围内,线性相关系数  $R^2$  均大于0.997。蜂王浆样品中双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和2,4-二甲基苯胺的定量限( $S/N=10$ )分别为0.05、0.5、5.0、0.5 µg/kg。

### 3.2 回收率及精密度

在不含各目标化合物的蜂王浆中进行5、10、100和200 µg/kg 浓度水平的添加回收率实验,每个浓度水平取6个平行样,结果列于表3。双甲脒和2,4-二甲基苯胺采用内标法定量,单甲脒和2,4-二甲基苯基甲酰胺采用外标法定量,方法回收率为50.5%~110%,相对标准偏差小于15.0%。

## 4 阳性样品分析

应用本方法测定12批次不同品牌的蜂王浆样品,未检测到双甲脒及其代谢物,该结果与GB 23200.103—2016 检测结果一致。

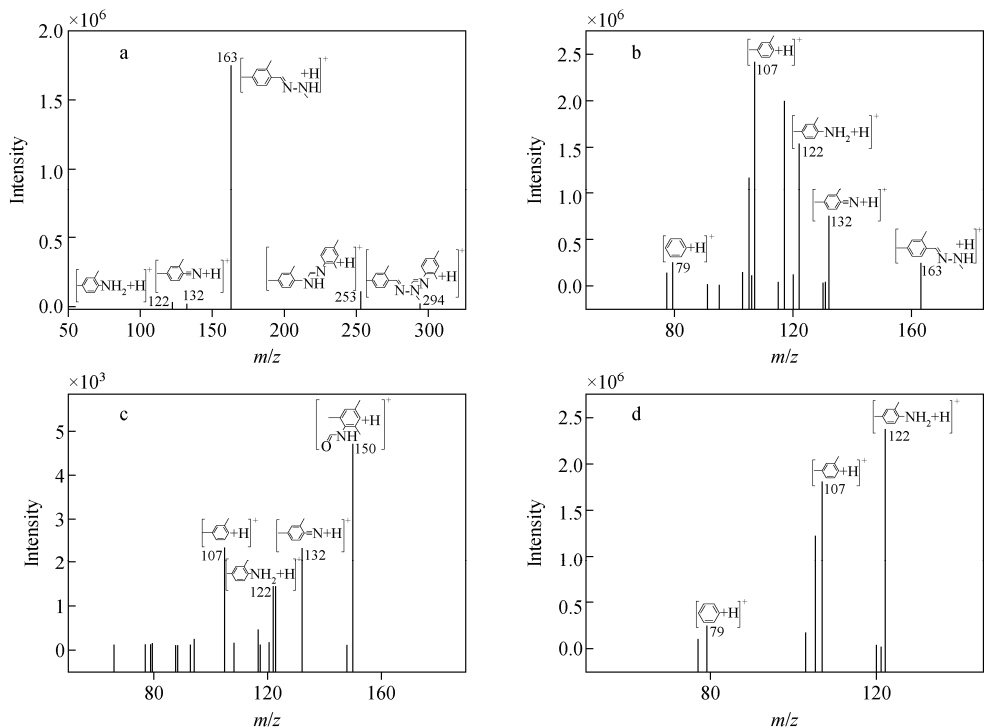


图4 双甲脒(a)、单甲脒(b)、2,4-二甲基苯基甲酰胺(c)和2,4-二甲基苯胺(d)的质谱图和碎片离子结构式  
Fig. 4 Mass spectra and possible fragment ions of amitraz (a), DMPF (b), DMF (c) and DMA (d)

表 2 蜂王浆基质对各化合物的基质效应

Table 2 Matrix effect of royal jelly on the investigated compounds

| 化合物<br>Compound | 离子对<br>MRM<br>transition<br>( <i>m/z</i> ) | 溶液浓度<br>Concentration/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 溶剂线性<br>响应强度<br>Intensity of<br>solvent | 基质加标溶液<br>响应强度<br>Intensity of<br>blank matrix | 离子抑制率*<br>Ration of ion<br>suppression/% |
|-----------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 双甲脒             | 294. 2/163. 2                              | 0. 5                                          | 5040290                                 | 4484871                                        | 11. 0                                    |
| 单甲脒             | 163. 2/122. 2                              | 0. 5                                          | 1334008                                 | 826277                                         | 38. 1                                    |
| 2,4-二甲基苯基甲酰胺    | 150. 1/107. 1                              | 0. 5                                          | 15741                                   | 17684                                          | 12. 3                                    |
| 2,4-二甲基苯胺       | 122. 1/107. 1                              | 0. 5                                          | 699708                                  | 334201                                         | 52. 2                                    |

注：\* 离子抑制率(%)=(混合溶液中响应强度-空白蜂王浆基质加标溶液响应强度)×100%/混合溶液中响应强度

表 3 4 种化合物的线性关系和回收率(*n*=6)

Table 3 Results of liner relationships and recoveries (*n*=6)

| 化合物<br>Compound | 线性方程<br>Calibration<br>equation | 相关系数<br>Correlation<br>coefficient<br>( <i>R</i> <sup>2</sup> ) | 添加水平<br>Spiked<br>level/<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | 回收率<br>Recovery/% | 相对标准<br>偏差<br>RSD/% |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 双甲脒             | $y=0.0446x-3.97\times10^{-6}$   | 0.9974                                                          | 5.0                                              | 92.0~110          | 6.8                 |
|                 |                                 |                                                                 | 10                                               | 84.0~97.0         | 5.7                 |
|                 |                                 |                                                                 | 100                                              | 91.8~108          | 5.4                 |
|                 |                                 |                                                                 | 200                                              | 107~110           | 1.0                 |
| 单甲脒             | $y=1.32\times10^5x-16$          | 0.9992                                                          | 5.0                                              | 62.0~64.0         | 1.6                 |
|                 |                                 |                                                                 | 10                                               | 55.0~60.0         | 4.1                 |
|                 |                                 |                                                                 | 100                                              | 50.5~70.5         | 15.0                |
|                 |                                 |                                                                 | 200                                              | 66.3~72.0         | 3.2                 |
| 2,4-二甲基苯基甲酰胺    | $y=2595x-0.27$                  | 0.9996                                                          | 5.0                                              | 80.0~100          | 8.6                 |
|                 |                                 |                                                                 | 10                                               | 94.0~102          | 3.0                 |
|                 |                                 |                                                                 | 100                                              | 101~107           | 2.2                 |
|                 |                                 |                                                                 | 200                                              | 97.7~105          | 2.8                 |
| 2,4-二甲基苯胺       | $y=0.0706x-9.2\times10^{-6}$    | 0.9994                                                          | 5.0                                              | 80.0~94.0         | 7.3                 |
|                 |                                 |                                                                 | 10                                               | 89.0~106          | 6.1                 |
|                 |                                 |                                                                 | 100                                              | 87.2~109          | 9.8                 |
|                 |                                 |                                                                 | 200                                              | 108~110           | 0.8                 |

5 结论

本研究采用固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂王浆中双甲脒、单甲脒、2,4-二甲基苯基甲酰胺和 2,4-二甲基苯胺的残留量。蜂王浆经氨水稀释、氨化乙腈沉淀蛋白并提取,中性 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱多反应监测正离子模式检测,同位素稀释内标法

和外标法定量。该方法简便、快捷,可满足目前国内外相关化合物最大残留限量的检测要求。应用该方法测定了 12 批次不同品牌的蜂王浆样品,与标准方法测定结果一致。

参考文献:

[1] 刘喜生,李春雁,靳黎. 蜂王浆的药理和生理作

- 用[J]. 中国蜂业, 2015, 66(5): 48-49.
- LIU Xisheng, LI Chunyan, JIN Li. The pharmacological and physiological effects of royal jelly [J]. Apiculture of China, 2015, 66(5): 48-49(in Chinese).
- [2] 中国医药保健品进出口商会. 2012 年蜂王浆产品出口额创十年最高[J]. 中国蜂业, 2013, 64: 45-46.
- China Chamber of Commerce for Import & Export of Medicines & Health Products. In 2012, the highest level for export of royal jelly products in last ten years[J]. Apiculture of China, 2013, 64: 45-46(in Chinese).
- [3] 王少成, 姜元振. 双甲脒(螨克)防治果、菜、棉植食性螨、蚜、木虱等的药效评价[J]. 农药科学与管理, 1992, (2): 6-7.
- WANG Shaocheng, JIANG Yuanzhen. The efficacy evaluation of amitraz to control fruit, vegetables, cotton for mite, aphid and psylla[J]. The Pesticide Science and Management, 1992, (2): 6-7(in Chinese).
- [4] 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.
- DAI Pingli, WANG Qiang, SUN Jihu, et al. Bioassay of four pesticides on *Apis mellifera* [J]. Agrochemicals, 2007, 46(8): 546-547(in Chinese).
- [5] GERARDO P S, GABRIEL O C, DAVID M S, et al. Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques[J]. Florida Entomologist, 2000, 83(4): 468-476.
- [6] OSANO A O, ADMIRAALA W, KLAMERC H J C, et al. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on vibrio fischeri and chironomus riparius[J]. Environmental Pollution, 2002, 119(2): 195-202.
- [7] RIAL-OTERO R, GASPAR E M, MOURA I, et al. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: an overview [J]. Talanta, 2007, 71(2): 503-514.
- [8] The European Union. Council Regulation (EU) No 2377/90/EEC/1990[S]. 1990.
- [9] Japan. Positive list system for agricultural chemical residues in foods[EB/OL]. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/2017/11/01>.
- [10] The United States of America. Code of federal regulations (40 CFR Part 180, 180. 287) [S]. 2006.
- [11] 郑用权, 姚建仁, 邵向东, 等. 蜂蜜中双甲脒残留量检测方法[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(3): 14-16.
- ZHENG Yongquan, YAO Jianren, SHAO Xiangdong, et al. Residue analysis method of amitraz in honey by GC[J]. Pesticide Science and Administration, 2000, 21(3): 14-16(in Chinese).
- [12] AMOLI J S, HASAN J, HEJAZY M. Determination of amitraz residue by headspace gas chromatography in honey and beeswax samples from Iran[J]. American Journal of Food Technology, 2009, 4(1): 56-59.
- [13] SHAMSIPUR M, HASSAN J, SALAR-AMOLI J, et al. Headspace solvent microextraction-gas chromatographic thermionic specific detector determination of amitraz in honey after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, (21): 264-270.
- [14] JIMÉNEZ J J, BERNAL J L, NOZAL M J D, et al. Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 524 (1/2): 271-278.
- [15] 伊雄海, 杨惠琴, 郭德华, 等. 气相色谱质谱法测定鳊鱼中双甲脒及其代谢物残留量[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 27(5): 524-527.
- YI Xionghai, YANG Huiqin, GUO Dehua, et al. Determination of acaricides amitraz and its metabolite residues in Eel-GC-MS method[J]. Journal of Shang Hai Jiao Tong University: Agricultural Science, 2009, 27(5): 524-527(in Chinese).
- [16] YU H, TAO Y F, LE T, et al. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite residue in food animal tissues by gas chromatography-electron capture detector and gas chromatography-mass spectrometry with accelerated solvent extraction[J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(21): 1 746-1 752.
- [17] 李阿丹, 王晶, 崔宗岩, 等. 固相微萃取-气相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中双甲脒及其代谢产物

- 残留[J]. 燕山大学学报, 2016, 40(3): 236-240.
- LI Adan, WANG Jing, CUI Zongyan, et al. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite 2, 4-dimethylaniline in honey by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Yanshan University, 2016, 40(3): 236-240(in Chinese).
- [18] 薛晓锋, 赵静, 邱静, 等. 气相色谱-质谱法同时测定蜂蜜中的双甲脒及其代谢物残留[J]. 现代科学仪器, 2005, (1): 65-67.
- XUE Xiaofeng, ZHAO Jing, QIU Jing, et al. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite (2, 4-xylidine) residues in honey by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Modern Scientific Instruments, 2005, (1): 65-67 (in Chinese).
- [19] 周召千, 丁慧瑛, 吴娟, 等. 动物源产品中双甲脒及其代谢产物残留量的气相色谱-质谱法测定[J]. 农药研究与应用, 2009, 13(4): 23-26.
- ZHOU Zhaoqian, DING Huiying, WU Juan, et al. Determination of amitraz and its metabolites residues in foods of animal origin by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Agrochemicals Research & Application, 2009, 13(4): 23-26 (in Chinese).
- [20] YAMINI Y, FARAJI M, GHAMBARIAN M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction followed by gas chromatography-glame ionization detection for the determination of amitraz in honey and water samples[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(3): 758-766.
- [21] BASHIRI JUYBARI M, MEHDINIA A, JAB-BARI A, et al. Determination of amitraz in the honey samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection[J]. American Journal of Analytical Chemistry, 2011, 2(5): 632-637.
- [22] GB 23200.103—2016 食品安全国家标准蜂王浆中双甲脒及其代谢产物残留量的测定气相色谱-质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [23] 赵增运, 吴斌, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱法测定蜂蜜中的双甲脒残留[J]. 中国养蜂, 2005, 56(5): 4-6.
- ZHAO Zengyun, WU Bin, SHEN Chongyu, et al. Determination of amitraz residue in honey by HPLC with UV detector[J]. Apiculture of China, 2005, 56(5): 4-6(in Chinese).
- [24] GB/T 21169—2007 蜂蜜中双甲脒及其代谢物残留量测定-液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [25] TOKMANA N, SOLERA C, FARRÉ M, et al. Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(15): 3 138-3 146.
- [26] XU J Z, MIAO J J, LIN H, et al. Determination of amitraz and 2, 4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS[J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(23/24): 4 020-4 024.
- [27] 郭浩, 郭东东, 李恒, 等. 固相萃取/液相色谱-串联质谱法测定鱼塘水中双甲脒及其代谢产物[J]. 分析测试学报, 2014, 33(12): 1 416-1 420.
- GUO Hao, GUO Dongdong, LI Heng, et al. Detection of amitraz and its metabolites in pond-water using SPE/LC-MS/MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(12): 1 416-1 420(in Chinese).
- [28] GUO H, ZHANG P, WANG J W, et al. Determination of amitraz and its metabolites in whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 951/952(1): 89-95.
- [29] KORTA E, BAKKALI A, BERRUETA L A, et al. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(12): 5 835-5 842.
- [30] STAHNKE H, KITTLAUS S, KEMPE G N, et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(3): 1 474-1 482.
- [31] FERRER C, LOZANO A, AGUERA A, et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1 218(42): 7 634-7 639.