

蜂胶胶囊中多种硝基咪唑类药物残留的检测

廖夏云¹, 杨黎², 刘星², 刘常凯², 苏小婷¹, 卢羽玲¹

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530021) (2. 广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西南宁 530021)

摘要: 本文建立了采用液相色谱-串联质谱法测定蜂胶胶囊(以蜂胶为主要原料的保健食品)中多种硝基咪唑类药物(甲硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑、二甲硝基咪唑、羟基甲硝唑、羟甲基甲硝唑)残留的检测方法。样品经0.1 mol/L盐酸溶液溶解分散, 涡旋混匀, 超声提取目标成分, 通过HLB SPE小柱净化; 采用Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 m×100 mm) 色谱柱进行分离, 流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 经三重四级杆串联质谱测定, 电喷雾正离子MRM模式检测, 离子丰度比定性, 外标法定量。结果6种目标分析物线性关系良好, 相关系数均大于0.998; 在2.5、5.0、10.0 μg/kg三个水平下, 回收率为68.12%~92.20%, RSD为1.20%~5.83%; 该方法简单可靠, 重复性好, 推广应用前景较好, 能适用于蜂胶保健食品中多种痕量硝基咪唑类药物的同时检测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 蜂胶; 保健食品; 硝基咪唑; 残留

文章编号: 1673-9078(2020)05-295-303

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.039

Determination the Residues of Nitroimidazoles in Propolis Capsules by LC-MS/MS

LIAO Xia-yun¹, YANG Li², LIU Xing², LIU Chang-kai², SU Xiao-ting¹, LU Yu-ling¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530021, China)

(2. Guangxi-ASEAN Food Safety Inspection and Testing Center, Nanning 530021, China)

Abstract: In this paper, a method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of residues of various nitroimidazoles (metronidazole, lomidazole, isopropynidazole, dimethylnitroimidazole, hydroxymetronidazole, hydroxymethylnitroimidazole) in health food with propolis as the main raw material was established. The samples were dissolved and dispersed with 0.1 mol/L hydrochloric acid solution, mixed well with vortex, then the target components were extracted by ultrasound and purified by HLB SPE column. The extract was separated on a Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 m×100 mm) with gradient elution using a mobile phase consisting of 0.1% formic acid and acetonitrile. A tandem quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) source in positive ion mode was employed for the quantitative analysis of the analyte using multiple reaction monitoring (MRM) scanning mode, with ion abundance ratio for qualitative analysis and external standard method for quantitative analysis. Under the optimal conditions, good linearities ($R > 0.998$) were obtained in the related linear ranges. With addition level at 2.5, 5.0, 10.0 μg/kg, the recovery rates were 68.12%~92.20%, the relative standard deviations were 1.20%~5.83%. This method was simple, sensitive, accurate, and reproducible, has great popularization and application value, and could be suitable for the determination of various trace amounts of nitroimidazoles in propolis-derived health foods.

Key words: HPLC-MS/MS; propolis; health food; nitroimidazole; residues

引文格式:

廖夏云, 杨黎, 刘星, 等. 蜂胶胶囊中多种硝基咪唑类药物残留的检测[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 295-303

LIAO Xia-yun, YANG Li, LIU Xing, et al. Determination the residues of nitroimidazoles in propolis capsules by LC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 295-303

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 广西食品药品监督管理局科技项目(YJJ16001); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(2018002); 广西高等学校高水平创新团队自主计划(桂教2019-52)

作者简介: 廖夏云(1985-)女, 博士, 工程师, 研究方向: 保健食品研究与开发

通讯作者: 杨黎(1986-)女, 主管药师, 研究方向: 食品药品安全检验技术

随着现代农业和畜牧业的发展,多种兽药被用于预防感染或促进生长。然而,超范围或者超限量使用兽药可能导致动物源性食物中含有药物残余,对人类构成潜在危险。硝基咪唑类药物(Nitroimidazoles, NMZs)是一类带有硝基的咪唑类化合物,不同的NMZs被广泛用于治疗动物的厌氧细菌和寄生虫感染^[1]。NMZs在兽药处方中属于抗原虫药类,具有抗菌、抗原虫、抗球虫等作用^[2]。

近年来,一些国家将NMZs广泛的应用于养蜂业中以预防和控制蜜蜂的寄生虫病等。蜜蜂是群居动物,疾病容易在群体内扩散,硝基咪唑类药物因此被蜂农用来预防和控制蜜蜂孢子虫病等,而其因疗效好,价格低,故被广泛使用。但是,不恰当的使用容易造成该类药物在蜂产品中的残留,而现在的研究表明NMZs对哺乳动物具有致癌致畸致突变作用和遗传毒性,通过食品接触NMZs可能对人类健康构成潜在风险^[3,4]。因此,欧美禁止该类药物在动物源性食品中使用,我国也将这类药物列入《食用动物禁用的兽药及其他化合物清单》中^[5-7]。

我国农业行业标准《NY/T5030-2016 无公害农产品 兽药使用准则》中明确规定硝基咪唑类药物禁止用于所有动物促生长,不得在所有动物可食用组织中检出^[8]。以蜂胶为主要原料的保健食品因为具有多种保健功能^[9-11],从而受到消费者喜爱,作为保健食品为达到其标称的功效,消费者可能持续定量服用,过度关注其功效性,忽略原料安全性是目前整个蜂胶原料保健食品的现状。查阅我国历年发布的有关蜂胶的标准,仅对蜂胶的质量指标做了有限规定,但在可能的农药残留和兽药残留及重金属等安全性指标上的检验方法及规定几乎空白,建立蜂胶原料保健食品中兽药残留方法是有必要的。检索国内外文献,其他动物源性食品比如肉类、水产类、蜂蜜等基质中硝基咪唑残留的相关研究文献较多,关于蜂胶原料保健食品中硝基咪唑残留检验方法尚未见报道。

本研究以蜂胶胶囊为研究对象,建立了以蜂胶为主要原料保健食品中多种硝基咪唑类药物(甲硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑、二甲硝基咪唑、羟甲基甲硝唑、羟甲基甲硝咪唑)残留的检测方法。本方法简单高效准确,能够满足以蜂胶为主要原料保健食品中多种硝基咪唑类药物残留的检测要求,本课题组已将该方法成功应用于实际样品检测中,具有一定的推广意义。在此次研究中首次检出蜂胶中含有硝基咪唑类药物的阳性样品,且甲硝唑阳性检出最大量为82.83 μg/kg。

保健食品因其标称功效,消费者一般都是按量定期服用,不可避免大大增加了甲硝唑的摄入量,这将对机体健康造成一定的危害,因此本方法将为制订蜂胶保健食品中的兽药残留检测标准提供了有力的技术支持,也为相关部门监管蜂胶安全提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲硝唑(纯度99.5%, BePure, CAS号443-48-1),洛硝哒唑(纯度99.0%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS号7681-76-7),异丙硝唑(纯度99.9%, BePure, CAS号14885-29-1),二甲硝基咪唑(纯度99.0%, Dr. Ehrenstorfer GmbH, CAS号551-92-8),羟甲基甲硝唑(纯度99.3%, BePure, CAS号4812-40-2),羟甲基甲硝咪唑(纯度99.5%, WITEGA, CAS号936-05-0);乙腈、甲醇、正己烷、甲酸(色谱纯),默克;25%氨水、盐酸、乙酸乙酯(分析纯),广东光华科技股份有限公司;Oasis HLB固相萃取小柱(6 mL, 200 mg), Waters公司;Agela Cleanert NH₂-SPE小柱(500 mg/3 mL)。

样品:硬胶囊剂和软胶囊剂均为本地市售。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC I-Class高效液相色谱仪、waters TQ-XS三重四极杆串联质谱仪, Waters公司;Mettler Toledo ML204电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;多管式涡旋振荡器, Heidolph公司;Thermo Multifuge X3R低温冷冻高速离心机, Thermo公司;Organomation N-EVAP 112氮吹仪, Organomation公司;ZABN2000氮气发生器, 南京日立。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别准确称取适量的标准品,置100 mL容量瓶中,用甲醇溶解配制成100 μg/mL标准储备液,-20 °C冰箱保存。根据所需用0.1%甲酸水-乙腈(90:10, V/V)逐级稀释成一系列适当浓度的混合标准工作液,临用新配。

1.3.2 样品处理

称取样品内容物2.00(±0.05) g于50 mL离心管中,精密加入0.1 mol/L HCl溶液10.0 mL,(软胶囊剂在此步加入10 mL正己烷脱脂)立即置于涡旋混合器上高速涡旋2 min,超声5 min后以10000 r/min离心10 min;

将Oasis HLB固相萃取小柱预先用5 mL甲醇和5 mL水活化, 取离心后上层清液上样(软胶囊此步取中间层清液上样, 上层是正己烷层, 弃去), 自然滴完, 然后用5 mL水、5 mL 5%甲醇淋洗后负压抽干10 min。将NH₂-SPE小柱用5 mL甲醇活化, 保持柱体湿润, 串接在抽干后的HLB下面, 用5 mL甲醇、5 mL 4%氨化甲醇洗脱。收集洗脱液, 50 ℃以下氮吹至干, 用0.1%甲酸水-乙腈(90:10, V/V) 2.0 mL复溶, 过0.22 μm微孔滤膜, 待测定。

1.3.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈柱(1.7 μm, 2.1 m×100 mm), 柱温: 40 ℃; 进样量: 1 μL; 流动相: A为0.1%甲酸水, B为乙腈; 液相洗脱程序见表1。

表1 高效液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	0.4	95	5
2	0.4	80	20
4	0.4	75	25
7	0.4	45	55
9	0.4	45	55
13	0.4	10	90
17	0.4	10	90
18	0.4	95	5
21	0.4	95	5

1.3.4 质谱测定条件

表2 目标化合物的质谱参数

Table 2 MS/MS parameters of NMZs

化合物名称	保留时间	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	锥孔电压 cone/V	碰撞能量 collision/eV
甲硝唑	1.59	172.0	128.2*	27	17
			82.1	27	21
洛硝哒唑	1.90	201.1	140.2*	21	10
			54.8	21	20
异丙硝唑	3.72	170.1	124.1*	35	22
			109.0	35	17
二甲硝基咪唑	1.82	142.2	96.1*	29	16
			81.2	29	23
羟基甲硝唑	1.37	188.0	123.1*	26	12
			126.1	26	17
羟甲基甲硝咪唑	1.62	158.0	140.2*	28	11
			55.1	28	19

注: *定量离子。

采用ESI源; 正离子模式检测, 扫描方式: 多反应监测(MRM), 分段采集, 毛细管电压: 1.3 kV, 离子源温度: 150 ℃, 脱溶剂温度: 500 ℃, 脱溶剂气流速: 1000 L/h, 锥孔气流速: 150 L/h, 碰撞气(氩气)流速: 0.15 mL/min, 其他MRM参数见表2。

1.3.5 上机测定及数据处理

将系列标准溶液、样品溶液按上述仪器方法上机进行测定, 采用 Mass Lynx 软件进行数据处理与分析。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

蜂胶中含有大量的树脂、蜂蜡以及蜜蜂上腭腺分泌的粘液质等成分, 首先考虑减少共提取物, 选择合适的提取溶剂。NMZs是一类带有硝基的咪唑类化合

物, 属于中等极性的化合物, 具有一定的弱碱性, 能和酸结合成盐, 常用的提取溶剂有乙酸乙酯、乙腈、甲苯、不同质量浓度酸溶液等^[12-15]。本文对比了分别采用乙酸乙酯、乙腈、水和0.1 mol/L盐酸溶液为溶剂时目标化合物的提取效率(见图1)。实验发现, 采用乙酸乙酯、乙腈提取时, 提取液颜色较深, 提取效率相对更低, 可能系提取出来的干扰共提取物较多, 导致响应相对降低而影响提取效率; 水作为提取溶剂时部分药物在HLB柱上不能有效吸附导致回收率较低; 采用0.1 mol/L盐酸溶液可以使硝基咪唑类兽药离子化, 增强在HLB固相萃取柱上的吸附, 洗脱时采用具有一定弱碱性的氨化甲醇可以将此类物质有效洗脱下来, 最终选择0.1 mol/L盐酸溶液进行提取, 氨化甲醇进行洗脱。

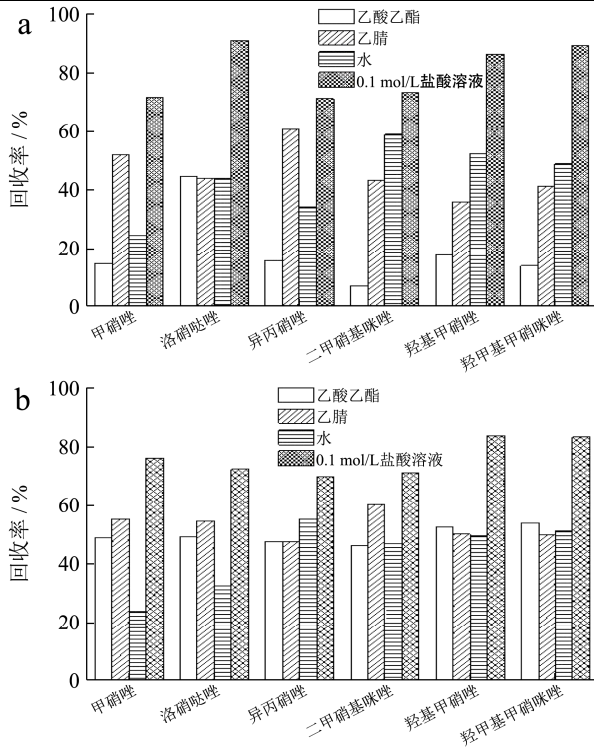


图1 不同提取溶剂对6种目标化合物回收率的影响

Fig.1 Effects of different extraction solvents on the recovery of six target compounds

注：a：软胶囊的影响；b：对硬胶囊的影响。

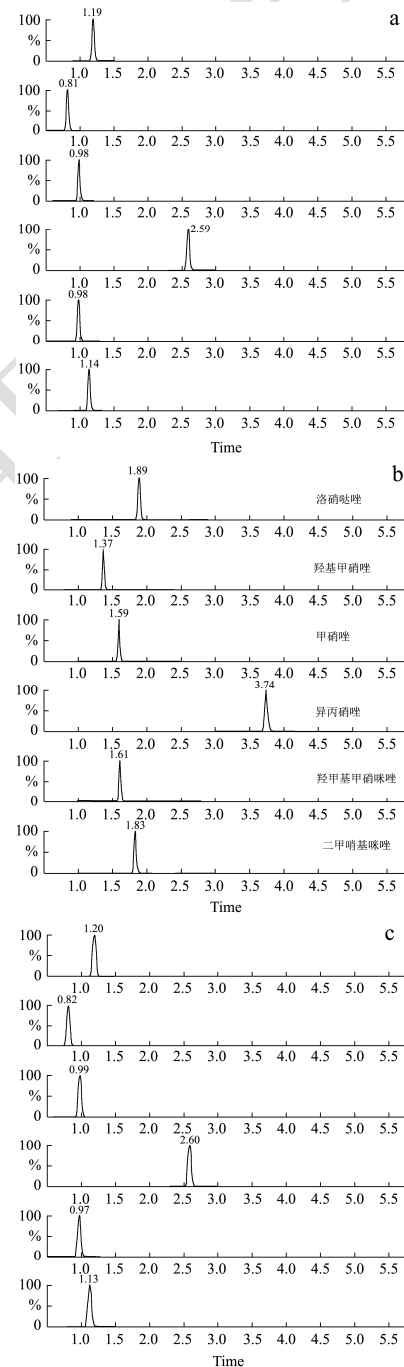
2.2 净化方式的选择

各类型固相萃取小柱常用于多种兽药残留检测的净化手段^[16-18]，张璐等^[16]以Cyclone-P为净化柱，使用在线净化装置净化蜂蜜样品，方法简便快速，但具备在线净化装置的实验室并不多，该方法普适性不强，蜂胶基质远比蜂蜜复杂，需要找到简便实用的净化方式。HLB小柱填料为聚苯乙烯/二乙烯苯以及亲水性的吡咯烷酮基团，同时具有亲水性和疏水性，对各类极性和非极性化合物都具有一定的吸附作用，能够去除样品中的不保留基质组分，如盐类、糖类、极性脂质和蛋白质等。实验中发现，HLB小柱上样后必须经过水、5%甲醇清洗步骤，如果不清洗的话氮吹后会有大量未知粘稠物在试管底部，影响复溶及目标物的回收率；比较了HLB（6 mL，200 mg）和HLB（6 mL，500 mg）两种规格SPE固相萃取柱对回收率的影响，结果（6 mL，200 mg）规格能提高目标物的绝对回收率约10%~15%左右，可能系填料含量下降不影响目标物的吸附，但截留的干扰成分减少，导致基质效应下降，目标物响应相对提高，最后选择6 mL，200 mg规格的HLB小柱。在HLB柱后串接NH₂柱进行洗脱，NH₂柱具有弱阴离子交换和正相保留作用，对脂肪酸、极性色素和糖具有很好的结合力，可以去除食品基质中影

响检测的脂肪酸（如油酸、棕榈酸、亚油酸），有机酸、部分色素，金属离子，糖类干扰物等，提高净化效果。

2.3 检测条件的优化

对检测条件优化主要考量目标物的峰形、响应及与干扰物的分离。考察了BEH C₁₈（1.7 μm，2.1 m×100 mm）和（1.7 μm，2.1 m×50 mm）两种规格的色谱柱，结果增加柱长目标物流出时间延后，可更好地与共流干扰物得到分离；考察了甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水两种流动相体系，结果采用乙腈-0.1%甲酸水体系6种目标物峰形更尖锐、响应更好。



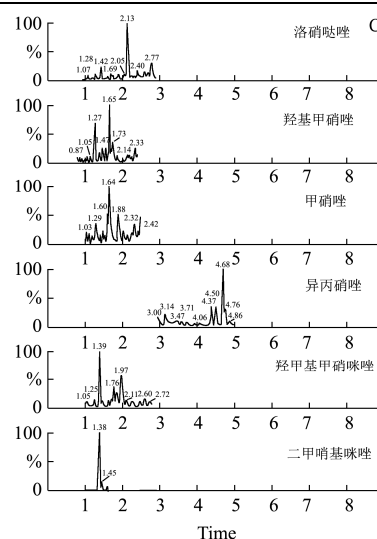
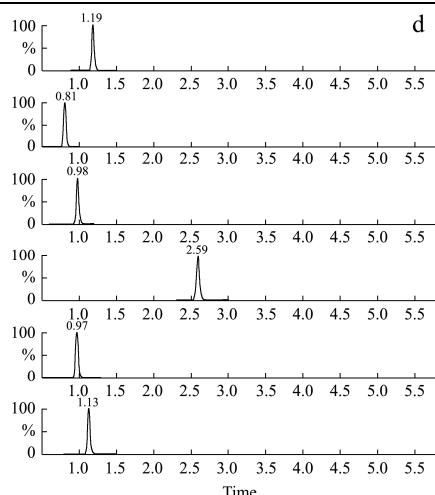


图2 采用不同色谱柱及流动相下的多反应监测 (MRM) 图谱

Fig.2 Multireaction detection (MRM) atlas of different chromatographic columns and mobile phases

注: a: 色谱柱为BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 m×50 mm) 规格;
b: 色谱柱为BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 m×100 mm) 规格; c: 流动相为甲醇-0.1%甲酸水体系; d: 流动相为乙腈-0.1%甲酸水体系。

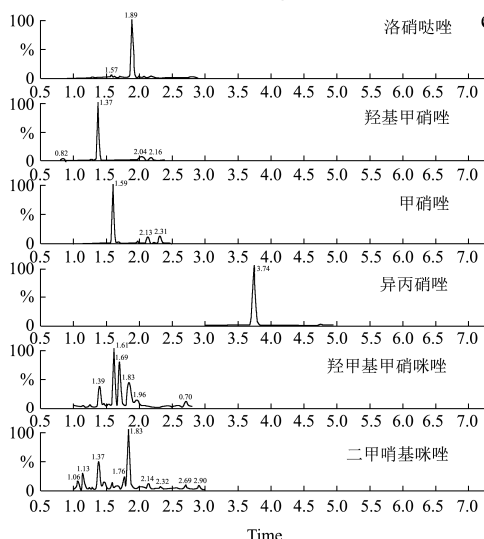
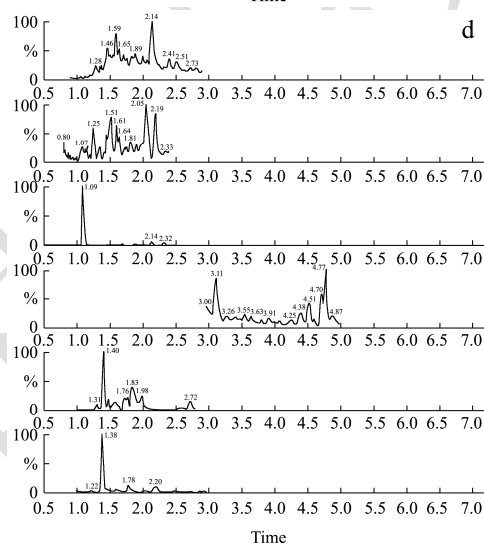
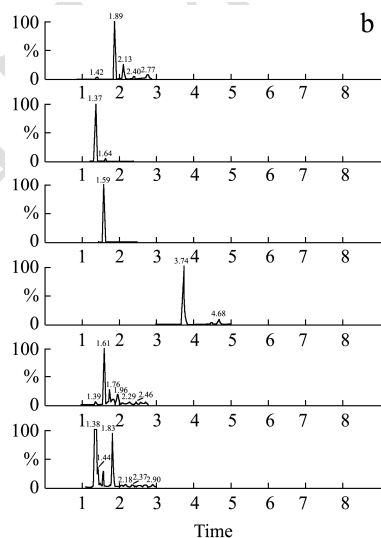
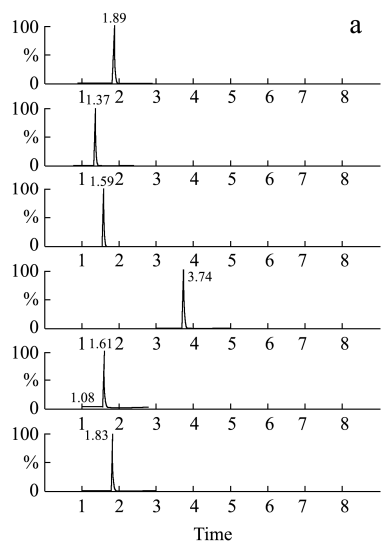


图3 标准品溶液、蜂胶基质空白及蜂胶基质空白添加目标物2.5 μg/kg的多反应检测 (MRM) 图谱

Fig.3 Multireaction detection (MRM) atlas of standard solution, propolis matrix blank and propolis matrix blank adding target substance of 2.5 μg/kg

注: a: 标准品溶液; b: 软胶囊基质空白添加目标分析物; c: 软胶囊基质空白; d: 硬胶囊基质空白; e: 硬胶囊基质空白添加目标分析物。

配制100 ng/mL的混合标准溶液用针泵直接进样, 分别对毛细管电压、离子源温度、脱溶剂温度、脱溶剂气流速、锥孔气流速、碰撞气(氙气)流速、锥孔电压、碰撞能量等质谱参数进行了优化, 以确定化合物的母离子和碎片离子, 以强度较大的子离子作为定量离子, 而以强度稍小的子离子作为定性离子。多反应监测图谱见图3。由基质加标的图谱可见, 在本实验条件下软胶囊基质和硬胶囊基质中目标物均能与共流

出物进行良好分离。

2.4 线性关系

为消除基质效应的影响, 保证定量结果的准确性, 对不同的基质分别采用空白基质配制标准曲线。按样品制备方法提取阴性基质溶液, 用阴性基质溶液配制质量浓度为0.20~2.00 μg/L的混合系列标准工作液, 以目标物的质量浓度(x, μg/L)为横坐标, 目标物的峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3。6种目标物在硬胶囊和软胶囊基质中线性关系良好, 相关系数均大于0.998。

表3 6种化合物的线性方程、线性范围、相关系数

Table 3 Linear equations, linear range, correlation coefficients of six compounds

基质	化合物	线性回归方程	线性范围/(μg/L)	相关系数 r
软胶囊	甲硝唑	y=22836.3×x+370.013	0.5~20	0.9998
	洛硝哒唑	y=21462×x+12047.8	1.0~20	0.9988
	异丙硝唑	y=52692.8×x-33.103	0.2~20	0.9999
	二甲硝基咪唑	y=23476×x+2420.38	0.5~20	0.9996
	羟基甲硝唑	y=14141.7×x+286.486	0.5~20	0.9999
	羟甲基甲硝咪唑	y=27498.4×x+294.08	0.5~20	0.9998
硬胶囊	甲硝唑	y=18694.4×x+748.303	1.0~20	0.9997
	洛硝哒唑	y=18719.9×x+17617.8	1.0~20	0.9995
	异丙硝唑	y=50171.9×x+807.978	0.2~20	0.9996
	二甲硝基咪唑	y=21448.1×x+3872.04	1.0~20	0.9997
	羟基甲硝唑	y=9323.37×x-37.207	0.5~20	0.9998
	羟甲基甲硝咪唑	y=27653.6×x-7622.33	1.0~20	0.9990

2.5 检出限与定量限

在阴性样品中添加0.5 μg/kg的目标化合物, 提取净化后进行测定, 以信噪比S/N≥3确定方法的检出限,

S/N≥10确定方法的定量限, 结果见表4。在本试验条件下, 方法检出限为0.014~0.285 μg/kg, 定量限为0.045~0.951 μg/kg。

表4 6种化合物的检出限、定量限

Table 4 Detection limit and quantitative limit of 6 target compounds

基质	化合物	S/N	LOD (S/N≥3)/(μg/kg)	LOQ (S/N≥10)/(μg/kg)
软胶囊	甲硝唑	21.10	0.071	0.240
	洛硝哒唑	5.26	0.285	0.951
	异丙硝唑	67.96	0.022	0.074
	二甲硝基咪唑	32.15	0.047	0.156
	羟基甲硝唑	77.53	0.019	0.064
	羟甲基甲硝咪唑	47.61	0.032	0.105
硬胶囊	甲硝唑	53.14	0.028	0.094
	洛硝哒唑	8.99	0.167	0.556
	异丙硝唑	57.28	0.026	0.087
	二甲硝基咪唑	8.43	0.178	0.593
	羟基甲硝唑	110.98	0.014	0.045
	羟甲基甲硝咪唑	27.43	0.055	0.182

2.6 回收率和精密度

以蜂胶为主要原料的保健食品有多种剂型, 文献报道主要是软胶囊, 软胶囊的数量占到蜂胶剂型总数的 67.25%, 其次是硬胶囊^[19,20], 不同剂型的辅料组成不同, 对软胶囊和硬胶囊两种基质分别进行了方法学

验证, 在阴性基质中分别添加 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的标准品, 每个浓度 5 份, 依本法处理。计算目标化合物的绝对回收率以及相对标准偏差, 结果见表 5。由表 5 可以看出, 6 种目标化合物的平均加标回收率在 68.12%~92.20%间, RSD 为 1.20%~5.83%, 能够达到痕量残留目标物检测的要求。

表5 目标化合物在样品中不同添加水平的回收率

Table 5 Recovery of NMZs in blank samples at the levels of 2.5~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (n=5)

基质	化合物	添加量/2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		添加量/5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		添加量/10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
软胶囊	甲硝唑	70.41	1.90	69.11	1.61	71.73	3.90
	洛硝哒唑	84.20	3.53	87.92	2.60	91.10	2.01
	异丙硝唑	69.42	1.50	68.12	1.20	71.24	1.51
	二甲硝基咪唑	73.90	2.33	75.91	1.73	73.21	3.63
	羟基甲硝唑	86.23	2.90	86.43	3.21	86.40	4.40
	羟甲基甲硝唑	92.20	3.21	89.94	2.50	89.30	2.61
硬胶囊	甲硝唑	73.51	2.74	74.20	4.83	76.41	5.12
	洛硝哒唑	70.22	5.42	71.32	3.80	72.60	4.02
	异丙硝唑	68.43	3.60	69.10	5.83	70.23	6.41
	二甲硝基咪唑	69.20	4.73	70.83	3.94	71.40	5.30
	羟基甲硝唑	79.62	2.81	80.80	2.91	84.10	4.64
	羟甲基甲硝唑	78.81	5.10	84.03	3.42	83.72	5.21

2.7 实际样品的检测

表6 市售样品检测结果

Table 6 Test results of commercial samples

编号	产品名称	批次	甲硝唑含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	羟基甲硝唑含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
1	蜂胶软胶囊 1	16012601	/	/
2	蜂胶软胶囊 2	151201	/	/
3	蜂胶软胶囊 3	150824	/	/
4	蜂胶软胶囊 4	20150901	/	/
5	蜂胶软胶囊 5	20151102	0.40	/
6	蜂胶软胶囊 6	20160102	0.60	/
7	蜂胶软胶囊 7	20150101	/	/
8	蜂胶软胶囊 8	20151103	/	/
9	蜂胶软胶囊 9	20150801	4.35	/
10	蜂胶软胶囊 10	150401	71.09	0.20
11	蜂胶软胶囊 11	20160301	/	/
12	蜂胶软胶囊 12	20150501	0.15	/
13	蜂胶软胶囊 13	RFJ788204	0.48	/
14	蜂胶软胶囊 14	20160101	/	/
15	蜂胶软胶囊 15	151102	/	/
16	蜂胶软胶囊 16	20151012	0.77	/
17	蜂胶软胶囊 17	20150913	/	/

转下页

接上页

18	蜂胶软胶囊 18	426966004	/	/
19	蜂胶软胶囊 19	201501003	/	/
20	蜂胶软胶囊 20	/	/	/
21	蜂胶软胶囊 21	20151001-09	/	/
22	蜂胶软胶囊 22	20151102-09	/	/
23	蜂胶软胶囊 23	/	/	/
24	蜂胶软胶囊 24	20150601	/	/
25	蜂胶软胶囊 25	15070901	/	/
26	蜂胶软胶囊 26	20150108	/	/
27	蜂胶软胶囊 27	20160302G	/	/
28	蜂胶软胶囊 28	16010802	0.38	/
29	蜂胶软胶囊 29	426965034	/	/
30	蜂胶软胶囊 30	16013601	/	/
31	蜂胶软胶囊 31	16032602	/	/
32	蜂胶软胶囊 32	150117	20.46	/
33	蜂胶软胶囊 33	151102	82.83	0.16
34	蜂胶软胶囊 34	15102601	/	/
35	蜂胶软胶囊 35	426965024	/	/
36	蜂胶软胶囊 36	20130201	/	/
37	蜂胶软胶囊 37	/	5.20	/
38	蜂胶软胶囊 38	20160119	/	/
39	蜂胶软胶囊 39	20150911	1.85	/
40	蜂胶硬胶囊 1	F17M	/	/
41	蜂胶硬胶囊 2	33320-20	/	/

按本法对实验室历年来收集到的不同厂家共 41 批市售样品进行测定, 其中 12 批样品检出甲硝唑, 检出阳性率为 29.3%, 残留量从 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~82.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 不等; 2 批样品检出羟基甲硝唑, 检出阳性率为 4.9% (详见表 6); 在蜜蜂饲养过程中蜂农如不遵守休药期规定违规给药, 导致 NMZs 残留, 说明蜂胶原料保健食品中存在较大的 NMZs 药物污染的风险。

3 结论

欧美和我国禁止在动物源性食品中使用 NMZs 类药物, 蜂胶中 NMZs 类药物残留检测国内外研究非常少, 且我国至今没有相应的检测标准。本文根据蜂胶原料保健食品的基质特点, 开发了同时检测 6 种 NMZs 类药物残留的测定方法, 并对市售蜂胶样品进行了检测, 结果阳性检出率较高, 可见蜂胶保健食品中的兽药残留情况不容乐观; 大众信任保健食品的功效, 在日常定量摄入的情况下, NMZs 残留不可避免会对人体的健康造成一定影响, 规范蜂胶保健食品市场迫在眉睫。本方法操作简单, 结果准确可靠, 可为制定蜂胶中硝基咪唑类残留量的国家标准提供了一定

依据。

参考文献

- [1] A Mital. Synthetic nitroimidazoles: Biological activities and mutagenicity relationships [J]. *Scientia Pharmaceutica*, 2009, 77(3): 497-520
- [2] I Brook, H M Wexler, E J C Goldstein. Antianaerobic antimicrobials: Spectrum and susceptibility testing [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(3): 526-546
- [3] G R Ferreiro, L C Badias, M López-Nigro, et al. DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives [J]. *Toxicology Letters*, 2002, 132(2): 109-115
- [4] M Arias, O P Chevallier, S F Graham, et al. Metabolomics reveals novel biomarkers of illegal 5-nitroimidazole treatment in pigs. Further evidence of drug toxicity uncovered [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 876-884
- [5] Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs

- of animal origin [J]. Official Journal of the European Union, 2010, L15: 1-72
- [6] Food Animal Residue Avoidance Databank (FADAD), Extra-label drug use restrictions in food animals. sl.ugr.es/FARAD_NDZs, 2014
- [7] USDA Foreign Agriculture Service, List of veterinary drugs banned for use for food animals (Peoples Republic of China). sl.ugr.es/China_NDZs, 2011
- [8] NY/T 5030-2016, 无公害农产品 兽药使用准则[S] NY/T 5030-2016, Guidelines for the use of veterinary drugs in pollution-free agricultural products [S]
- [9] 陈丽芳,王会宾,叶克难. 灵芝孢子粉蜂胶复合物对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 294-297, 302
CHEN Li-fang, WANG Hui-bin, YE Ke-nan. Effect of *Ganoderma lucidum* spores and propolis complex on immune function in mice [J]. Food Industry Technology, 2019, 40(6): 294-297, 302
- [10] 陈萍,谭书明,陈小敏,等. 刺梨、蜂胶、山楂口服液的降血脂功能研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 78-83, 72
CHEN Ping, TAN Shu-ming, CHEN Xiao-min, et al. Study on hypolipidemic activity of *Rosa roxburghii* Tratt, propolis and *Crataegus* oral liquid [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 78-83, 72
- [11] 郑宇斐,蒋侠森,陈曦,等. 2018 年国内外蜂胶的研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2019, 39(4): 1-8
ZHENG Yu-fei, JIANG Xia-sen, CHEN Xi, et al. Research status of propolis in 2018 [J]. Bee Magazine, 2019, 39(4): 1-8
- [12] 方力,邱凤梅,余新威,等. 基质分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物[J]. 色谱, 2018, 36(5): 431-438
FANG Li, QIU Feng-mei, YU Xin-wei, et al. Determination of nitroimidazoles and their metabolites in animal-derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with dispersive solid phase extraction [J]. Chromatography, 2018, 36(5): 431-438
- [13] 励炯,孙岚,王红青,等. 分散固相萃取净化/高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的 5 种硝基咪唑类药物残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(11): 1357-1362
LI Jiong, SUN Lan, WANG Hong-qing, et al. Determination of five nitroimidazoles in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with dispersive solid phase extraction [J]. Journal of Analysis and Testing, 2017, 36(11): 1357-1362
- [14] 高海荣. 二氧化锆 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱测定鱼肉 2 种硝基咪唑及代谢产物[J]. 食品工业科技, 2018, 40(4): 266-270
GAO Hai-rong. Determination of nitroimidazoles in fish by QuEChERS extraction with ZrO₂ coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Industry Technology, 2018, 40(4): 266-270
- [15] 侯建波,谢文,陈笑梅,等. 固相萃取-液相色谱-质谱/质谱法同时测定蜂蜜中的多类药物残留[J]. 色谱, 2011, 29(6): 535-542
HOU Jian-bo, XIE Wen, CHEN Xiao-mei, et al. Simultaneous determination of multi-veterinary drug residues in honey by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(6): 535-542
- [16] 张璐,孔祥虹,王茜,等. 在线净化-超高效液相色谱同位素稀释串联质谱法检测蜂蜜中硝基咪唑类及其代谢物的残留[J]. 分析化学, 2014, 12: 1735-1742
ZHANG Lu, KONG Xiang-hong, WANG Han, et al. Determination of nitroimidazoles and their metabolites in honey by online purification-ultra high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2014, 12: 1735-1742
- [17] 殷居易,谢东华,刘永明,等. 蜂产品中 9 种硝基咪唑类药物原药及代谢物残留量的 HPLC-APCI(+)-MS/MS 分析[J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 935-939
YIN Ju-yi, XIE Dong-hua, LIU Yong-ming, et al. Determination of nine nitroimidazole drug residues in bee products by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization -tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Analysis and Testing, 2009, 28(8): 935-939
- [18] 谢文,陈笑梅,丁慧瑛,等. 液相色谱串联质谱同位素稀释法对蜂王浆中 10 种硝基咪唑类药物残留的检测[J]. 分析测试学报, 2010, 29(5): 497-501, 506
XIE Wen, CHEN Xiao-mei, DING Hui-ying, et al. Determination of ten nitroimidazole residues in royal jelly by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Analysis and Testing, 2010, 29(5): 497-501, 506

(下转第 191 页)