

氯霉素类抗生素残留分析研究进展

■ 周正红¹ 邓斌 林保银²

(1. 暨南大学生命科学院生物工程系 广州 510630 ;

2. 广州市诺森生物技术有限公司 广州 510630)

摘要: 本文综述了近几年来国内外畜禽产品、水产品、食品原料中氯霉素残留分析方法。从专一性强、灵敏度高的ELISA测定方法,到定量的液相色谱法和气相色谱法,以及残留确认的色质联用法。本文分别综述了各种方法的优势与不足,最后展望了氯霉素残留检测的发展趋势。

关键词: 氯霉素;残留;免疫法;HPLC法;GC法;色/质联用法

New study on the analysis testing methods of Chloramphenicol residues

Zhou Zhenghong¹, Deng bin, Lin Baoyin²

(1. Jinan University, Guangzhou, 510630;

2. ROSA Biotech Co. Ltd, Guangzhou, 510630)

Abstract: This article has summed analysis-testing methods of chloramphenicol residues in animal tissue, food and materials recent years. It is highly sensitive that ELISA can detect chloramphenicol residues in animal tissues. But when quantifying chloramphenicol residues, methods of HPLC, GC, GC/MS or LC/MS/MS are best select methods. Each method's advantage and disadvantage would be comprised in the article. At last, promising methods for chloramphenicol residues were brought forward.

Key word: chloramphenicol; residues; ELISA; HPLC; GC; GC/MS; LC/MS

氯霉素类(Chloramphenicol, 简称CAPs)包括氯霉素及其衍生物,又称为酰胺醇类(Amphemicols)。主要有氯霉素(Chloramphenicol)、琥珀氯霉素(Chloramphenicol succinate)、棕榈氯霉素(Chloramphenicol palmitate)、甲矾霉素(Thiamphenicol, TAP)、氟甲霉素(Florfenicol, FF)和乙酰氯霉素(Cetafenicol)。氯霉素是一种广谱抗生素,能抑制细菌蛋白质的合成,但对革兰氏阴性菌较强。对各种立克氏体、原虫及部分病毒也有一定的抑制作用。目前氯霉素类药物在水产养殖和畜禽养殖中应用广泛。

由于氯霉素有抑制人体骨髓造血功能引起再生障碍性贫血症,许多国家严格禁止将氯霉素用

于食品动物(特别是蛋鸡和奶牛),规定的最大残留限量为0~10ng/g。美国已严格规定不允许在家禽饲养中使用氯霉素,出售的家禽必须作氯霉素残留的检测,同样欧共体也严格规定肉中的氯霉素残留量不过0.1ng/g。我国农业部已禁止在食品源性动物中使用氯霉素。无论是内销还是出口的水产品、畜禽产品氯霉素都是必检项目。所以动物性食品中氯霉素的残留量分析,近年来得到国内外食品分析工作者的关注,并致力于检测氯霉素残留的快速、准确、灵敏度高的方法。

氯霉素残留的检测方法主要有微生物法、高效液相色谱法、免疫测定法。其中最常用的方法是微生物方法,但因受其他抗生素的干扰,其定量检

测灵敏度在 0.5 ~ 1mg/g 范围内,不适用于出口产品中氯霉素残留测定。测定氯霉素和甲砒霉素可以使用生化方法,但这种方法的灵敏度一般,如果样品含有其他抗菌剂,灵敏度会更低。氯霉素是较早采用理化测定技术的抗生素,主要是 GC 和 HPLC 分析法。在 GC 和 GC/MS 分析法中,不易挥发的氯霉素和甲砒霉素需要在测定前进行衍生化。由于氯霉素类结构中含有吸电子的卤素,用 GC/ECD 法测定能得到很高的灵敏度,检测限可达 0.1 ~ 5ng/g。由于氯霉素、甲砒霉素都有强的紫外吸收,可直接采用高效液相色谱测定,或 LC/MS 进行确证。在液相色谱中,氯霉素的检测限一般为 1 ~ 5ng/g,甲砒霉素和氟甲砒霉素的检测限一般为 1ng/g。而目前国内、外生产的氯霉素检测 ELISA 试剂盒的检测限可达 0.1ng/g。

1 免疫分析法

免疫法测定氯霉素残留的方法已比较成熟。已报道了氯霉素免疫测定法包括 RIA、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和免疫荧光-毛细管电泳测定法。检测限通常低于 1 ~ 10 μ g/kg。1966 年, Hamburger^[1] 首次制备抗氯霉素抗体。目前建立的各种免疫分析方法都是针对氯霉素,一般直接采用琥珀氯霉素作为免疫半抗原制备复合抗原。抗体对氯霉素、琥珀氯霉素的交叉反应分别为 100%、85.3%,对其他常见的 32 种抗微生物药物 (包括 β -内酰胺、四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类、多肽类、磺胺类和硝基呋喃类) 的交叉反应都低于 0.01%。

1984 年 Arnold 等^[2]建立了氯霉素的放射免疫测定法 (RIA),并与 GC/ECD 进行了比较,检测限为 0.2 μ g/kg。徐减奕等用放射法测定对虾中氯霉素残留其检测限过 0.15ng/g^[7]。Van de Water 等 (1987, 1989)^[3,4]报道了牛奶中 CAP 的免疫亲和色谱 (IAC) 净化法,样品经离心、过滤和稀释 (固体样品首先用水提取) 后用 IAC 柱净化, HPLC/UV 测定,回收率 70% ~ 99%。牛奶样品的检测限最低可达 20ng/L (由于 IAC 的高度选择性方法检测限将主要决定于取样量)。通过柱切系统, Haagsma 等^[5] 还进一步建立了牛奶中 CAP 的在线亲和色谱/HPLC/UV 测定法,能直接分析液体样品或提取液。

因 ELISA 具有快速、灵敏度高、专一性强的优势,在肉制品、水产品与环境中的应用相当广泛。目前国内、外研制的氯霉素 ELISA 检测试剂盒,广泛用于氯霉素的检测。如 Randox 公司提供的氯霉素检测试剂盒对组织中氯霉素的检测限可达 0.02ng/kg,尿液中氯霉素的检测限可达 0.01ng/kg,回收率为 84% 以下,且与四环素、庆大霉素,氨苄青霉素无交叉反应,检测时间不到 1.5 小时。

2 高效液相色谱法

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素都有很强的紫外吸收,因此可直接用 HPLC/UV 测定。大多数方法中都有用 C_{18} 柱,但也可用 C_8 分析柱^[8,9]。一般来说 C_8 分析柱用于分析用普通流动相 (如甲醇/乙腈-水) 在 C_{18} 柱上不能很好保留的化合物。由于 C_{18} 分析柱可能很好地分离氯霉素和甲砒霉素,因此多数方法都有使用这种柱子分析这两种抗生素。使用的流动相主要是甲醇或乙腈与磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液或水。氯霉素的检测波长可选择 214nm、254nm 或 278nm。在 214nm 氯霉素的检测灵敏度最高,但样品提取液的色谱图上会有许多内源性化合物的干扰峰;在 278nm 检测氯霉素时干扰峰较少。甲砒霉素和氟甲砒霉素在 224nm、225nm 或 230nm 进行检测。HPLC 测定氯霉素使用的内标有 5-乙基-P-甲基巴比土酸^[10], 3-异丁基甲基黄嘌呤^[11], 替硝唑^[12] 和硝基乙酰苯胺^[13]。而测定甲砒霉素使用的内标有 N-乙酰基-p-氨基酚^[14]。

德国 RusseI 首先报道了液相色谱法检测氯霉素残留^[12]。用乙腈和硫酸钠提取肌肉组织中的氮霉素,用正己烷去除脂类物质,乙腈相浓缩后进行液相色谱分析。检测限为 1 μ g/kg,回收率为 71 $\pm$ 8%。色谱条件: Nucleosil 10-NO₂ 色谱柱,紫外检测器 254nm,流动相为二异丙醚-甲醇 (85:15, v/v)。

彭莉,岳秀英^[13] (2002) 报道了用高效液相色谱法 (HPLC) 检测牛奶中氯霉素的残留量,采用乙酸乙酯提取牛奶中残留的氯霉素,用正烷-氯仿 (50:50, V/V) 溶解残渣,以乙腈-0.005mol/L 磷酸氢二钠 (18:82, V/V) 作为流动相,用高效液相色谱仪紫外检测器在 278nm 检测。平均回收率 94.8%,变异系数 < 12.0%。样品前处理简单、回收率高、实用性强、检测灵敏度高、重现性好、检测

数据准确可靠,可作为牛奶中氯霉素残留检测的确证方法。

1992年Nagata等报道了用液相色谱法同时测定动物肌肉和养殖鱼肌肉中的甲砒氯霉素和氯霉素残留方法^[14]。试样用乙酸乙酯提取,提取液浓缩至干后的残留物溶于3%氯化钠溶液,正己烷脱脂,水相用乙酸乙酯萃取,浓缩干乙酸乙酯后用正己烷溶解,通过Sep-Pak Florisil柱净化后,用ODS柱分离,225nm或270nm检测,当氯霉素为0.1ug/g时平均回收率大于74.1%,检出限量为0.01ug/g。为建立氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的多残留分析方法,Nagata等用甲醇/水(20:80,v/v)作流动相,使用三种不同填料的色谱柱研究了氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的保留时间。在Inertsil ODS-2柱上,氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的保留时间分别为18.0min、5.11min和9.07min;在Inertsil C₈柱上,氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的保留时间分别为19.56min、5.44min和9.76min;在TSK-GEL 80TM分离柱上,氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的保留时间分别为19.26min、5.86min和10.69min。在这几种分离柱上,这三种抗菌素的色谱峰峰形均良好。甲砒霉素在分离柱上保留时间最短,并且在短波长有很强的紫外吸收,因此先在225nm检测甲砒霉素和氟甲砒霉素,然后把波长切换到278nm检测氯霉素。HPLC/UV直接检测的灵敏度也能满足测定要求,操作简单。

1997年李兰生等用高效液相色谱法检测了对虾体内氯霉素的残留量,并进行了氯霉素在对虾体内的动力学研究^[15]。试样制备:对虾组织中加入与试样等量的蒸馏水,匀浆,加入4倍量甲醇,振摇提取,离心后上清液分析。分离条件: μ -Bondapak C₁₈柱,甲醇-水(30:70,v/v)为流动相,在氯霉素浓度为2.5mg/kg时的回收率为91.2%。

3 气相色谱

近20年来,氯霉素和甲砒霉素一般都用液相色谱法测定,但过去绝大多数实验室都用气相色谱法测定。从这两种药物的结构上看,都含有羟基、氯基、硫基及亚氨基,都有很强的极性,很难挥发。须对它们的极性官能团进行酯化、硅烷化或酰化,生成热稳定和易挥发的衍生物,才能用GC或GC/MS进行测定。要同时测定氯霉素、甲砒霉

素和氟甲霉素,选择合适的衍生化试剂非常重要。Pfenning等(1998)使用N,0-二[三甲基硅]三氟醋酸胺(BSTFA)/三甲基氯硅烷(TMCS)(99:1,v/v)衍生化试剂,同时测定了牛奶中的氯霉素、甲砒霉素和氟甲霉素。取10ml牛奶,加25ml乙腈提取,离心,SPE C₁₈柱净化,随后进行衍生,GC/ECD测定。结果表明这三种抗生素分离良好,5ng/L添加浓度的回收率均达到76.4%以上。

在GC和LC测定方法中,奶样的处理主要使用乙酸乙酯、甲醇或乙腈从奶样中提取药物。因牛奶样中药物浓度低,提取后需要用液-液分配或固相萃取柱作进一步净化,在净化步骤中,C₁₈柱固相萃取最常用,回收率高。液-液分配之后通常需用固相萃取进一步净化。常用的固相萃取柱有C₁₈柱、氧化铝柱和Florisil柱。但有许多情况下,用C₁₈固相萃取柱净化后,再通过C₁₈分析柱用LC进行分析,这样可能会发生某些干扰杂质不能与被测物分开,因此人们进一步研究氧化铝固相萃取柱和Florisil固相萃取柱净化效果。王太全等采用乙酸乙酯提取试样中的氯霉素^[16],然后将乙酸乙酯蒸发至干,用正己烷净化,再用乙酸乙酯提取氯霉素并进行无水硫酸钠脱水,经C₁₈小柱净化,硅烷化后用带有微池电子捕获器的气相色谱仪进行测定。方法测定限达0.1ug/kg以下。

4 色/质联用分析法

用液相色谱法测定氯霉素使用的定性手段有二极管阵列检测器和质谱检测器。尽管用二极管阵列检测器定性简便,但在测定或鉴别样品中残留的痕量氯霉素时,基专一性与检测限并不理想。Ramsey^[25](1989)用乙酸乙酯从鲑鱼中提取氯霉素,经硅胶柱净化,用正己烷-丙酮洗脱氯霉素,LC/CIMS测定。结果发现在氯霉素的保留时间附近干扰峰很多,但用串联质谱(LC/MS/MS)得到的子离子谱图则没有背景干扰。在LC/MS/MS方法中^[26],氮气作为化学电离的反应气体。氯霉素也可通过碰撞诱导解离(CID)进行定性,得到的碎片离子峰分别为m/z323[M+H]⁺、305[M-H₂O+H]⁺和275[M-2H₂O-CH₂O]⁻。通过简单的净化步骤,LC/MS/MS就可以对鲑鱼和牛奶中残留的氯霉素给出明确定性结果。但这种方法只能对氯霉素残

留在0.5mg/kg以上的样品进行定性检测。Yashida等^[27](1994)用LC/APCI/MS测定了牛奶中的甲砷霉素。样品经乙酸乙酯提取,液-液分配净化,然后用Wakosil-5HG色谱柱,乙腈-水(50:50, v/v)作流动相,进行分离,测定。SIM离子是 $[M+H]^+$, M/Z 357。一般来讲,LC/MS技术确证氯霉素比GC/MS技术确证迅速,但由于GC/MS技术的灵敏度高,可利用的碎片离子多,所以目前确证牛奶中氯霉素类残留主要用GC/MS技术。

孙亮等(2003)采用GC-MS/MS方法测定虾仁中氯霉素的残留量^[22]。色谱柱:CP-Sil8CB/MS, 30m*0.25*0.25um;载气:氦气;进样口温度:280;柱温:初始温度为150,保持1min,20/min升至270,保持5min;不分流进样:进样量:1ul,离子源温度200,传输线温度200;监测离子225,361,451;MS/MS方式的母离子225,子离子208、178。样品提取:称取10g样品,于50ml离心管中加入10g无水硫酸钠,分别加入15、5ml乙酸乙酯提取,用均质器均质2min,4000rpm离心10min。将上清液移至另一离心管,合并有机相,旋转蒸发至干,加入1ml甲醇、25ml 4%氯化钠溶液、10ml正己烷,充分混合,于1000rpm离心3min,弃去上清液。重复正己烷提取步骤。水相加入1ml乙酸乙酯,充分混合,于1200rpm离心5min,吸取上清液,重复乙酸乙酯提取步骤。合并有机相,旋转蒸发至干,加入3ml乙腈-水(5:95, v/v)溶解残渣。 C_{18} 小柱净化:用5ml甲醇、5ml三氯甲烷,5ml甲醇和10ml水依次洗脱后,加入样品提取液,用5ml乙腈/水(5:95, v/v)洗脱。再用3ml乙腈/水(5:95, v/v)洗脱并收集氯霉素,用2*5ml乙酸乙酯提取洗脱液中的氯霉素。衍生化:将乙酸乙酯液用氮气吹干,加入100ul BSTFA+TMCS(99:1, v/v),密闭后于70加热30min。放置冷却后用氮气吹干,加100ul正己烷溶解,供GC/MS测定。同时进行氯霉素标准的衍生化。该方法的检测限达0.1ug/kg。张辉也用离子阱时间串联质谱法测定了食品中的氯霉素^[23],该方法的检测限为0.1ug/kg。

杨成对等(2004)用HPLC-MS定量检测对虾中微量的氯霉素残留^[24]。采用乙酸乙酯超声提取对虾组织中的氯霉素残留,以甲醇为流动相,选择

m/z 321/152为氯霉素的检测离子对,用多反应监测(MRM)技术测定。氯霉素流出液相色谱的时间在1.5min以内;线性范围是0.28~28.0ug/L;线性相关系数为0.99991。对虾中氯霉素的定量检测下限是0.07ug/kg,平均回收率在89%以上。该方法快速、灵敏,定量范围宽,检验结果准确可靠,应用性强。

5 小结

总之,酶免疫测定法非常适合对氯霉素残留筛选的需要,它能在短短的几个小时检测几十到上百个试样,也不需要复杂的仪器设备,并有特异性强、灵敏度高、试样预处理简单等优点,它在现场监控和基层实际检测上有着广阔的应用前景。而高效液相色谱法和气相色谱法具有精确可靠、灵敏度高、重复性好以及假阳性少等优点,只要选择出简单的前处理条件和色谱条件。在氯霉素残留确认工作中,GC/MS和LC/MS/MS是首选的方法。因此,食品中氯霉素残留的检测方法,今后仍采取ELISA试剂盒对样品进行初筛,对阳性或样品用GC/MS或LC/MS/MS进行确证。

参考文献

- [1] Hamburger R M. Science, 1966, 152: 203.
- [2] Arnold D, et al. Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and meat, comparison of gas chromatography and radioimmunoassay [J]. J Assoc off Anal Chem, 1985, 68(5): 984.
- [3] Van de Wster C, Haagsma N. J Chromatogr, 1987, 411: 415.
- [4] Van de Wster C, Haagsma N. J Chromatogr, 1989, 478: 205.
- [5] Haagsma N, Schreuder C, Rensen E R A. Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1986, 363: 353.
- [6] Aerts R M L, Keukens H J, Werdmueller G A. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat: inter laboratory study [J]. J AOAC, 1989, 72(4): 570.
- [7] 徐美奕, 孟庆勇. 养殖对虾中氯霉素残留的放射免疫分析. 广州食品工业科技, 19(3): 66.

牛肉贡丸的加工工艺

■ 司俊玲 郑坚强 (郑州轻工业学院食品与生物工程学院 郑州 450002)

摘 要: 本文主要是利用牛肉加工厂的下脚碎肉为原料, 经科学配制, 研究出了一种新型的休闲食品, 并详细地说明了它的配方、加工工艺和操作要点。

关键词: 牛肉贡丸; 腌制; 油炸

Study on Processing Technology of Tribute Bolus From The Beef

Si Junling ZhengJianqiang

Abstract: In the experiment, the raw materials is mainly use the leftover and pieces meat which from the beef processing factory, research a kind of new-type recreation food, and detail explain the prescription, processing technology and operating the main point.

Key words: tribute-bolus of beef; curing; deep-fry

近年来, 伴随我国肉牛养殖业的迅速发展, 牛肉产品加工企业也发展迅速。但是, 有些企业下脚碎肉却没有利用, 对牛肉的综合利用程度不高。本加工工艺是对牛肉下脚碎肉进行开发, 研究出了一种新型的、营养价值高、味美诱人的产品, 有利于企业的发展和牛肉的综合

利用。

1 主要设备和材料

1.1 主要设备

绞肉机、斩拌机、丸子成型机、腌制缸、油炸锅、真空包装机等。

-
- [8] Wong S H Y, et al. J Liq Chromatogr, 1988, 11: 1143.
- [9] Holt D E, et al. J Antimicrob Chemother, 1990, 26: 107.
- [10] samsey E D, et al. Biomed Environmental Mass Spectrom, 1989, 18: 5.
- [11] Felice L, Abdennebi E H, Ashraf M. JAOAC, 1988, 71: 1156.
- [12] Russell H A. Lipid Chromatographic Analysis of Chloramphenicol in Bovine Muscles [J]. Chromatographia, 1978, [1]: 341.
- [13] 彭莉, 岳秀英. 高效液相色谱法测定牛奶中的氯霉素残留. 中国兽医药杂志, 2002, 36(8): 23 ~ 24, 22.
- [14] Nagata T, Saeki M. Simultaneous determination of thiamphenicol, flufenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography [J]. J Liq Chromatogr, 1992, 15: 2045.
- [15] 李兰生, 王勇强. 氯霉素在对虾全内的动力学研究 [J]. 色谱, 1997, 15(5): 431.
- [16] 王太全, 钱成, 徐成等. 气相色谱法测定出品龙虾中氯霉素残留量的研究. 肉品卫生, 2003, (9):

- 11 ~ 14.
- [17] Karlowski K. Chem Abstr, 1980, 93: 24564.
- [18] Hollstein E, Laue W, Zapfe G. Nahrung, 1979, 25: 143.
- [19] Holtmannspotter H, Their HP. Dtsch Lebensm Rundsch, 1982, 78: 347.
- [20] Malish R, Sandmeyer U, Kypke-Hutter K. Lebensmittelchem Gerichl Chem, 1983, 38: 11.
- [21] Keukens H J, et al. High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and online diode array UV-Vis detection [J]. J Chromatogr, 1986, 352: 445.
- [22] 孙亮, 陈海东. GC-MS/MS 测定虾仁中氯霉素的研究. 中国卫生检验杂志. 2003, 13(3): 293 ~ 294.
- [23] 张辉. 离子阱时间串联质谱测定食品中的氯霉素. 浙江科技学院学报. 2003, 15(11).
- [24] 杨成对, 宋莉晖等. 对虾中氯霉素残留的分析方法研究. 分析化学研究简报. 2004, 32(7): 905 ~ 907.