

综述

动物源性食品中多肽类抗生素残留检测技术研究进展

孙兴权¹ 李哲² 林维宣¹

(1. 辽宁出入境检验检疫局理化中心, 辽宁 大连 116001;

2. 大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116001)

摘要:多肽类抗生素作为抗菌药物,常用于畜禽疾病的防治,但往往因使用不当会在动物体内产生残留,对人体健康造成严重危害。综述了近年来动物源性食品中多肽类抗生素残留量检测技术的研究进展情况。

关键词:食品; 药物残留; 肽类; 黏菌素; 杆菌肽; 维吉霉素; 微生物学技术

明更为科学和客观。采取列表制度与行政许可相结合的管理制度可有效地提高行政管理效率,并节约社会资源。

欧洲功能食品的理论基础是现代营养学,营养成分、其他食物成分与健康效应间联系的科学研究,所以选择针对具体成分与健康效应的食物声称作为管理功能食品的切入点是很合适的。但中国保健(功能)食品的理论基础是传统中医药养生理论,有中草药参与组方的产品占注册产品总量的75%以上,而混杂成分与健康效应间的联系很难确定,所以不能选择针对成分的健康声称,而只能选择仅针对功能、回避功效成分的声称进行管理和标注。

FUFOSE认为功能食品是平衡膳食的组成部分,应该保持普通食品的形态,所以欧洲功能食品没有片剂、胶囊等形态,片剂、胶囊只能去申报膳食补充剂和非处方药(Over the Counter, OTC)药物。而中国保健(功能)食品剂型80%以上为片剂、胶囊和口服液。出现这种差异的原因是由于不同的管理理念、不同的原料选择和对消费者迎合度的不同而造成的。这从一个侧面提示,应重视保健食品的食用乐趣,相关管理部门应给予以普通食品形式申报的保健食品以适当的政策倾斜,以利于丰富中国保健食品的形态。

参考文献

[1] MARGARET ASHWELL. Concepts of Functional Foods [M]. ILSI

Europe, 2006:1-23, 32-35.

- [2] Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus document [M]. Office for Official Publications of the European Communities, 2004:5-27.
- [3] 杨月欣,刘静,郭军,等. 膳食纤维能量效应的人体试验研究[J]. 营养学报, 2007, 29(4):336-343.
- [4] BARBARA SCHNEEMAN. Gastrointestinal physiology and functions [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(Suppl. 2): 159-163.
- [5] LOUISE DYE, JOHN BLUNDELL. Functional foods: psychological and behavioral functions [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(Suppl. 2): 187-211.
- [6] FRED BROUNS, MICHEL VAN NIEUWENHOVEN, ASHKER JENKENDRUP, et al. Functional foods and food supplements for athletes: from myths to benefit claims substantiation through the study of selected biomarkers [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(Suppl. 2): 177-186.
- [7] 付佳,杨月欣. 食物健康声称——欧洲 PASSCLAIM 的循证程序[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3):280-283.
- [8] AGGETT, ASP N G, CONTER L. PASSCLAIM [M]. ILSI Europe, 2006:14-15.
- [9] Regulation on nutrition and health claim made on foods (EC No 1924/2006 of the European Parliament) [S]. Entered into force on 19th January 2007.
- [10] Scientific and Technical Guidance for the Preparation and Presentation of the Application for Authorization of a Health Claim [M]. ILSI Europe, 2007.
- [11] ROBERFROID. Global view on functional foods: European Perspectives [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(Suppl. 2): 133-138.

[收稿日期:2008-01-14]

中图分类号:R15;TS218

文献标识码:E

文章编号:1004-8456(2008)03-0260-04

作者简介:孙兴权 男 博士 工程师

Advance on Detection Technologies of Polypeptide Antibiotic Residues in Animal-derived Food

SUN Xing-quan, LI Zhe, LIN Wei-xuan

(Inspection & Quarantine Technology Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P. R. C., Liaoning Dalian 116001, China)

Abstract: Polypeptide antibiotic is used to prevent diseases of animal as antibacterial agents. But it is harmful to human health when it remained in some animal due to improper use. The advance on detection techniques of polypeptide antibiotic residues in animal derived foods in recent years was reviewed.

Key word: Food; Drug Residues; Peptides; Colistin; Bacitracin; Virginiamycin; Microbiological Techniques

近年来,兽药残留问题作为食品安全性的重要因素已成为人们普遍关注的一个社会热点。动物源性食品中残留的兽药可直接或间接地通过环境和食物链的作用对人体产生一定的毒副作用,并可引起细菌耐药性的增加。多肽类抗生素的不当使用是造成兽药残留的诸多因素之一,加强对该类抗生素的管理和提高其分析检测技术水平是控制兽药残留的重要手段。

多肽类抗生素是从多粘杆菌或产气孢子杆菌的培养液中提取制得的具有多肽结构特征的一类抗生素,包括多粘菌素(polymyxin)、杆菌肽(bacitracin)和维吉尼霉素(virginiamycin)等,可分别对抗革兰阳性菌、革兰阴性菌、绿脓杆菌、真菌、病毒、螺旋体、原虫的感染,并且对败血症、呼吸道感染、泌尿道感染、牛乳腺炎等疾病有较好的治疗作用。

多粘菌素是由多粘芽孢杆菌产生的一族理化性质相似,由环状多肽和脂肪酸结合而成的碱性多肽类抗生素,可分为多粘菌素A、B、C、D、E、K、M和P 8种,其中多粘菌素B和多粘菌素E(又称粘杆菌素,colistin)毒性较低,多以硫酸盐形式广泛应用。多粘菌素族抗生素主要对革兰阴性菌有很好的抗菌作用,主要是通过其带正电荷的氨基与细菌敏感细胞膜磷脂中带负电荷的磷酸根相结合,破坏外膜的完整性,使菌体内嘌呤、嘧啶、核苷酸等小分子外逸而导致细菌死亡。

杆菌肽又称枯草菌肽,包括杆菌肽及短杆菌肽(gramicidin)两种,是地衣型芽孢杆菌产生的一类多肽类抗生素,对大部分革兰阳性菌有高度抗菌活性。杆菌肽的作用机理主要是抑制细菌细胞壁的合成;短杆菌肽则主要是通过改变细菌胞浆膜的渗透性杀灭多种病原微生物。在实际应用中,杆菌肽与锌的复合物杆菌肽锌是很好的饲料添加剂,可促进畜禽生长,目前应用较广。

维吉尼霉素又称维吉尼亚霉素、肥大霉素,是一种由链丝菌发酵提取制得的含有内酯环的多肽类抗

生素,一般只对革兰阳性菌有抑制作用,不产生耐药性。维吉尼霉素由70%M1亚基和30%S1亚基混合组成,其中M1为大环内酯,S1为环状多肽,两者结构不同,抗菌范围也不同。维吉尼霉素主要是通过其氨基与革兰阳性菌的50s核糖体亚基结合,抑制其蛋白质的合成而将其杀灭。此外,维吉尼霉素也是一种良好的抗生素促生长剂。

目前,对多肽类抗生素进行分析检测主要有微生物法、免疫分析法、毛细管电泳法、高效液相色谱法和液质联用技术等方法,本文综述了近年来动物源性食品中多肽类抗生素残留检测技术的研究进展情况。

1 微生物法

微生物法是多肽类抗生素残留检测中应用较广的一种检测方法,是根据抗生素对微生物生理机能和代谢的抑制作用来对样品中的药物残留进行定性或定量分析。杯碟法是微生物法中较常用的一种方法,我国行业标准SN/T 1134—2002^[1]就是利用杯碟法检验进出口肉及肉制品中维吉尼霉素的残留量。该方法的检测低限为0.05 mg/kg,鸡肉中维吉尼霉素添加浓度分别为0.050、0.100、0.200 mg/kg时,回收率分别为80.0%、81.0%、81.3%,准确度较好。

微生物法成本低,操作简便,具有一定的灵敏度,在同时分析大批样品中具有一定优势。但该方法作为经典方法分析速度慢,专一性差,必须与薄层分析配套使用才可进行相关的定性分析,并且只能测定有生物活性的残留物。

2 免疫分析法

免疫分析法有放射性免疫分析法、酶联免疫分析法(ELISA)等多种,其中后者最为常用。ELISA法是一种以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的检测方法。在实际应用中,Mariko Matsumoto等^[2]曾用ELISA法测定了鸡血中杆菌肽的残留量,

即用辣根过氧化物酶为酶标记物,用杆菌肽抗体 IgG 测试条进行检测。该法简便快速,检测低限为 1 ng/ml,回收率范围为 97%~103%。Williams C 等^[3]通过 ELISA 技术分析了动物饲料中杆菌肽锌各组分与其抗体的反应情况,以此来监测杆菌肽锌在贮藏过程中的稳定性。

ELISA 法特异性强,灵敏度高,快速简便,可准确定性、定量,适用于现场检测和大量样品的快速检测,是一种较理想的兽药残留筛查方法。但该法抗体制备比较困难,在不能肯定样品中的兽药品种时,有一定的盲目性,易出现假阴性、假阳性现象。此外,ELISA 法采用的试剂盒一般价格较贵,且仅能对单一兽药进行检测,使其应用范围受到了一定的限制。

3 毛细管电泳法

毛细管电泳法是凝胶电泳技术的发展和高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 的补充,具有微量、快速、高效的特点。胶束电动毛细管色谱法 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC) 可同时分离分析离子型和电中性样品分子,适用于抗生素的检测。Kang J W 等^[4]利用 MECC 技术对杆菌肽进行了定量分析,在 pH 为 2.5 的 Tris - 磷酸缓冲体系下,线性范围为 0.05~1.0 mg/ml, LOD (limit of detection) 值为 0.005 mg/ml, LOQ (limit of quantification) 值为 0.012 mg/ml。Injac R 等^[5]利用 MECC 法检测分析了动物饲料中的杆菌肽和制菌霉素,以含有 20 mmol/L 十二烷基磺酸钠 (SDS) 和 10% 甲醇 (体积分数) 的硼酸盐或磷酸盐 (pH=8.2) 为缓冲体系,紫外检测器检测。结果在 215 nm 下二者均被检出,192 nm 和 254 nm 下只检出杆菌肽,305 nm 下只检出制菌霉素。该法具有很好的特异性,准确度和精密度均较好。

4 高效液相色谱法

近年来,高效液相色谱法因其选择性好、灵敏度高、速度快和操作自动化等优点已成为分析化学领域广泛应用的一种分析方法。在多肽类抗生素的检测过程中,一些新的前处理技术、新型高效固定相以及柱前和柱后衍生技术和高灵敏度检测器等的应用,大大提高了高效液相色谱法的检测效率。

超声波辅助萃取 (Ultrasonic Assisted Extraction, UAE) 技术是新近发展的一种很好的样品提取技术,具有萃取效率高、简便快速、重现性好等优点。Morales-Munoz S 等^[6]利用 UAE 技术,在线柱前荧光衍生的方法对多粘菌素 E 进行了 HPLC 分析检测,

取得了较好的分析效果。除 UAE 外,加速溶剂提取 (Accelerated Solvent Extraction, ASE)、固相萃取 (Solid Phase Extraction, SPE)、超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction, SFE)、免疫亲和层析 (Immunoaffinity Chromatography, IAC) 等技术也是快速提取、纯化食品中痕量成分的好选择,可以明显缩短检测周期。

目前,作为新型高效固定相的整体柱 (monolithic column) 技术已走向实用化。整体柱是一种利用有机或无机聚合方法在色谱柱内进行原位聚合的连续床固定相,利用其进行高效液相色谱分析具有低压、高速、重现性好、选择性强等特点^[7]。在实际应用中, Pavli V 等^[8]用反相硅胶整体柱对杆菌肽进行了快速分离,结果表明整体柱技术对各种缓冲体系的适应性更强,分离效率更高,而且缩短了保留时间,可以更有效地分离杆菌肽成分。

反相高效液相色谱法 (Reversed-phase HPLC, RP-HPLC) 和荧光衍生技术是多肽类抗生素检测的常用方法, Capitan-Vallvey L F 等^[9]利用 RP-HPLC 法对动物饲料中的杆菌肽进行分离后,进一步柱后衍生,然后荧光检测,检测低限小于 5 mg/kg。而 Gmur D J 等^[10]则将老鼠和狗血浆中的多粘菌素 E 提取后进行荧光衍生,再用 RP-HPLC 进行分析测定,荧光检测器检测,结果表明该实验的准确度、精密度都很好,线性范围为 0.05~5.00 μg/ml。

此外,光电二极管矩阵检测器 (Photodiode Array Detector, PAD) 的使用,也使得多肽类抗生素检测效率倍增。耿志明等^[11]利用 PAD 检测器对 RP-HPLC 分离分析的鸡组织中维吉尼亚霉素 M1 的残留进行检测,结果表明该方法在鸡组织中的回收率为 74.5%~91.1%,批内、批间相对标准差均在 10% 以内,检测低限均为 10 μg/kg。

5 液质 (LC-MS) 联用技术

质谱作为高效液相色谱的高端检测器,可以较好地给出待测物质的定性分析结果,所以液质 (LC-MS) 联用技术既具备色谱高效分离的优点,又具有质谱可以准确鉴定化合物结构的特点,可同时达到定性、定量的检测目的,而且所需样品量少,灵敏度高,快速准确,特别适用于兽药残留分析研究中的确证性分析。Della wai-mei Sin 等^[12]以多粘菌素 B 为内标物,用 LC-MS/MS 法分析了牛奶、动物组织样品中杆菌肽、粘杆菌素主要成分的残留量。牛奶经三氯乙酸去蛋白质并离心净化,动物组织则借助 SPE 技术净化,二者净化后的样品液进一步经 RP-HPLC 分离后,在多反应监测 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) 模式下进行质谱扫描。杆菌肽 A、

粘杆菌素的检测低限分别为 100 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 所有样品日间 ($n = 7$) 和日内 ($n = 4$) 回收率范围分别为 89.2% ~ 110% ($RSD < 10\%$) 和 90.4% ~ 112% ($RSD < 13\%$)。Poucke C V 等^[13] 利用 LC-MS 对杆菌肽锌、维吉尼霉素等动物饲料添加剂进行了定量检测。样品经甲醇/水体系萃取, SPE 小柱净化后, RP-HPLC 检测, LOQ 值低于 1 mg/kg 。

6 展望

食品中的抗生素残留检测属于较为复杂的痕量组分分析技术, 一次成功的检测分析需要有许多操作条件的正确选择和结合。在样品前处理技术方面, 少用乃至不用有毒有机溶剂, 能处理复杂基质、痕量成分、特殊性质成分, 能适合野外、原位等特殊研究的需求, 能尽量集采样、萃取、净化、浓缩、预分离、进样于一身, 所以联用和自动化分析等将是未来发展的趋势。在分析检测方面, 研发新的分离分析技术和方法, 在提高检测的定性能力、检测的灵敏度和检测覆盖范围的同时能够做到自动化和智能化将是兽药残留检测的发展方向, 生物芯片技术就是很好的例证。生物芯片是一项集电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术, 具有前处理简单、速度快、可同时检测多种兽药、准确性高等优点, 其效率是传统检测手段的成百上千倍。目前尽管用于兽药残留检测的生物芯片正处于发展初期, 可检测的兽药种类还相对较少, 但已初步实现了多残留检测, 显示出其集成化、自动化和高通量检测的优势。

参考文献

- [1] 肖典云, 主编. 进出口食品中农兽药残留检测新标准技术实用手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 885-890.
- [2] MATSUMOTO M, TSUNEMATSU K, TSUJI A, et al. Enzyme immunoassay using peroxidase as a label and a dip-strip test for monitoring residual bacitracin in chicken plasma [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 346: 207-213.
- [3] WILLIAMS C, PATEL I, WILLER C J, et al. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of zinc bacitracin in animal feedingstuffs[J]. *J Chromatogr A*. 2005, 1066(1-2): 1-7.
- [4] KANG J W, DE REYMAEKER G, VAN SCHEPDAEL A, et al. Analysis of bacitracin by micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelle in acidic solution [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(7): 1356-1362.
- [5] INJAC R, KAC J, MLINARIC A, et al. Micellar electrokinetic capillary chromatography determination of zinc bacitracin and nystatin in animal feed[J]. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(9): 1288-1293.
- [6] MORALES-MUNOZ S, DE CASTRO M D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of colistin from feeds with on-line pre-column derivatization and liquid chromatography-fluorimetric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066(1-2): 1-7.
- [7] 刘国诠, 余兆楼, 编著. 色谱柱技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 335-338.
- [8] PAVLI V, KMETEC V. Fast separation of bacitracin on monolithic silica columns[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36(2): 257-264.
- [9] CAPITAN-VALLVEY L F, TITOS A, CHECA R, et al. High-performance liquid chromatography determination of Zn-bacitracin in animal feed by post-column derivatization and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 943(2): 227-34.
- [10] GMUR D J, BREDL C R, STEBLE S J, et al. Determination of polymyxin E in rat plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 789: 365-372.
- [11] 耿志明, 陈明, 许大光, 等. 高效液相色谱法测定鸡组织中维吉尼亚霉素 M1 的残留[J]. *江苏农业学报*, 2005, 21(3): 172-175.
- [12] SIN D W M, HO C, WONG Y C, et al. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 535: 23-31.
- [13] POUCKE C V, KEYSER K D, BALTUSNIKIENE A, et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 99-109.

[收稿日期: 2007-10-30]

中图分类号: R15 文献标识码: E 文章编号: 1004-8456(2008)03-0263-04

消息(六)

ISO 22000《食品安全管理体系要求》是自愿采用的国际标准。该标准对全球食品安全管理体系提出了一个统一要求, 我国食品及食品包装生产企业应未雨绸缪, 尽快熟悉和掌握此标准, 建立健全食品安全管理体系。有关部门应根据此标准对进口食品的生产企业提出相应的要求。