

- [24] GB 14935—1994. 食品中铅限量卫生标准及编制说明[S].
- [25] GB 14961—1994. 食品中铬限量卫生标准[S].
- [26] GB 15199—1994. 食品中铜限量卫生标准[S].
- [27] GB 15200—1994. 食品中铁限量卫生标准[S].
- [28] GB 15201—1994. 食品中镉限量卫生标准及编制说明[S].
- [29] GB 15202—1994. 面制食品中铝限量卫生标准及编制说明[S].
- [30] GB 2713—1996. 淀粉类制品卫生标准[S].
- [31] GB 2716—1988. 食用植物油卫生标准[S].
- [32] GB 2719—1996. 食醋卫生标准[S].
- [33] GB 2746—1999. 酸牛乳[S].
- [34] GB 2748—1996. 蛋卫生标准[S].
- [35] GB 2749. 蛋制品卫生标准[S].
- [36] GB 2758—81. 发酵酒卫生标准[S].
- [37] GB 5408. 1—1999. 巴氏杀菌乳[S].
- [38] GB 5408. 2—1999. 灭菌乳[S].
- [39] GB 5415—1999. 奶油[S].
- [40] GB 5410—1999. 全脂乳粉、脱脂乳粉、全脂加糖乳粉和调味乳粉[S].
- [41] GB 5417—1999. 全脂无糖炼乳和全脂加糖炼乳[S].
- [42] GB 7099—1998. 糕点、面包卫生标准[S].
- [43] GB 8837—1995. 饮用天然矿泉水[S].
- [44] GB 9678. 2—94. 巧克力卫生标准[S].
- [45] GB 9679—88. 茶叶卫生标准[S].
- [46] GB 10765~6—97. 婴儿配方乳粉[S].
- [47] GB 10767—97. 婴儿配方粉及婴幼儿补充粉[S].
- [48] GB 10775~10780—89. 婴幼儿辅助食品[S].
- [49] GB 11671—89. 果蔬类罐头食品卫生标准[S].
- [50] GB 13099—91. 番茄酱罐头卫生标准[S].
- [51] GB 13100—91. 肉类罐头食品卫生标准[S].
- [52] GB 13103—91. 色拉油卫生标准及编制说明[S].
- [53] GB 13104—1991. 白糖卫生标准[S].
- [54] GB 14939—94. 鱼罐头卫生标准[S].
- [55] GB 14964—1994. 蜂蜜卫生标准[S].
- [56] GB 14964—94. 赤砂糖卫生标准[S].
- [57] GB 16565—1996. 油炸小食品类卫生标准[S].
- [58] GB 17399—1998. 胶姆糖卫生标准[S].

[续完]

[收稿日期:2001-08-08]

中图分类号:R15;TS201.6 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2002)02-0039-06

## 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况(综述)

蒋定国 杨大进

(卫生部食品卫生监督检验所,北京 100021)

氯霉素(Chloramphenicol)是由 Ehrlich 等在 1947 年首次从微生物代谢物中分离的一种抗生素。目前用人工方法合成,已广泛用于动物各种传染性疾病的治疗。<sup>[1]</sup>但是氯霉素有严重的副作用,它能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病,因此动物食品中的氯霉素残留对人类的健康构成了潜在的危害。美国仅允许氯霉素用于非食用动物,规定在动物性食品中不得检出氯霉素。欧共体不允许氯霉素用于产奶母牛和产蛋鸡,在其它动物的使用上也有限制,并严格规定肉中的氯霉素残留量不得超过 10 μg/kg。<sup>[2,3]</sup>我国还没有制定氯霉素残留量的食品卫生标准。然而由于其抑菌谱广,效果好以及相对廉价,在我国用氯霉素治疗家畜、禽类疾病也比较普遍。为了保障我国人民的健康及扩大动物性食品的贸易往来,建立灵敏度高,特异性强,简便易行的动物性食品中氯霉素残留的检验方法是非常必要的。近年来,国内外食品分析工作者都十分关注氯霉素的残留检测技术,发展了

一些氯霉素残留分析方法,如微生物学方法,放射免疫法,色谱法和酶免疫分析法等。本文主要对这些检测方法作一评述。

### 1 微生物学方法和放射免疫法测定氯霉素残留

微生物学方法是氯霉素测定的最常用的方法。<sup>[4]</sup>该方法易操作,费用低,可用于大量样品的筛选。该方法是用拭子采取动物体内的组织液,然后将其放置于涂满枯草杆菌的培养基中保温过夜。观察是否在拭子周围出现抑菌环,若有即表明组织液中有大量抗生素存在,如果该动物只用过氯霉素进行治疗,则可以认为该组织中存在氯霉素残留。此方法虽然简单,但灵敏度低。有报道认为该方法不能检出牛肌肉组织中 3 mg/kg 以下氯霉素的残留,<sup>[5]</sup>另外其特异性差,一般抗生素类药物都有此类反应。

放射免疫法也可用于测定动物性食品中氯霉素残留。Arnold 等报道了在蛋、肉、奶中氯霉素的放射免疫的痕量分析。<sup>[6]</sup>对于用氯霉素治疗的动物组织和其它可食用产品,此方法检出限量约为 0.2

$\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  以上的氯霉素残留能被准确定量,在蛋、肉中平均回收率为 85%,在奶中回收率高于 95%。但放射免疫法具有同位素半衰期短、存在放射性污染及需要复杂仪器设备等缺点,使其应用范围受到限制。

## 2 色谱法测定氯霉素残留

色谱法具有精确可靠、灵敏度高等优点。近年来,国内外关于用色谱法测定动物性食品中氯霉素残留的文献较多。在国外学者报道的方法中,前处理的净化步骤相对较多,因而回收率有些偏低。国内学者对前处理技术加以改进,回收率有所提高。

### 2.1 国外研究概况

1980 年 Wal J. M 等首次报道了牛奶中氯霉素残留测定的液相色谱法,但方法繁杂费时,并且不适于动物组织中氯霉素的测定。<sup>[7]</sup> 试样处理方法为向 25 mL 牛奶中加入 75 mL 乙酸乙酯,取出 37.5 mL 乙酸乙酯提取液,浓缩干后用 5 mL 乙腈分两次洗涤残留物,用异辛烷脱脂,浓缩干乙腈相,加入 0.2 mL 氯仿和 0.2 mL 丙二醇-水(1:1),取丙二醇-水相用于分析。色谱条件:  $5 \mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$  Spherisorb ODS (25 cm  $\times$  2.1 mm) 柱, 甲醇-水(30:70, 体积分数) 为流动相, 检测波长 280 nm。回收率为 72% ~ 99.5%, 检出限量为  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1983 年 Bories 等用液相色谱法测定了家禽组织中氯霉素残留并采用 GC-MS 法予以确证。<sup>[8]</sup> 试样处理: 将 20 g 动物组织匀浆, 加入 120 mL 乙酸乙酯和 10 g 碳酸钾, 过滤提取液, 与 50 mL 水混合后分层, 将有机相浓缩干, 加入 80 mL 用异辛烷饱和的乙腈, 再加入 20 mL 用乙腈饱和的异辛烷, 取乙腈相浓缩, 用 0.25 mL 氯仿溶解残留物, 再加入 0.25 mL 丙二醇-水(1:1), 丙二醇-水相用于分析。色谱条件:  $5 \mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$  Spherisorb ODS (25 cm  $\times$  2.1 mm) 柱, 甲醇-水(35:65, 体积分数) 为流动相, 检测波长 280 nm。结果: 当氯霉素为  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  时, 回收率为 75%, GC-MS 法能完全确证  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  以上的氯霉素。

1984 年 Schwartz 等报道了柱色谱在净化和富集氯霉素过程中的应用。<sup>[9]</sup> 其过程是将含有氯霉素的牛奶通过 Chromsorb 102 柱来吸附氯霉素, 用水洗涤杂质, 然后用甲醇洗脱氯霉素, 洗脱液直接通过氧化铝柱和阳离子交换树脂( $\text{H}^+$  型) 柱, 并继续用甲醇洗脱, 用氮气吹干甲醇, 最后将氯霉素还原和重氮化后进行测定, 检测限量为  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1986 年 Keukens 等报道了用高效液相色谱法筛选和确证在可食用的动物组织中的氯霉素残留<sup>[10]</sup>。筛选方法是将试样用蒸馏水提取, 提取液通过 Ex-

tre lut 柱(Merck 11737), 用二氯甲烷洗脱, 氮气吹干洗脱液, 用水溶解残留物并与甲苯分配, 水相用于色谱分析。检出限量为  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 在  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  时的回收率为 58%; 确证方法: 用乙酸钠缓冲液提取, 加入葡糖苷酸酶和芳基磺酸酶于 37 °C 孵育 16 h, 然后加入 200 mL 乙酸乙酯和 20 g 氯化钾, 将有机相浓缩后溶于二氯甲烷-石油醚(1:1), 通过硅胶 Sep-Pak 柱, 用 5 mL 石油醚以及 5 mL 乙酸乙酯-正己烷(1:1) 洗涤层析柱, 然后用 25 mL 乙酸乙酯-正己烷(7:3) 洗脱, 将洗脱液浓缩后溶于 Tris 缓冲液(pH 10.4), 用乙醚萃取氯霉素, 浓缩后溶于水和甲苯, 水相用于色谱分析。该方法能确证  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  以上的氯霉素残留, 回收率为 85%。

1986 年 Haagsma 等报道了一种高效液相色谱法测定猪肌肉中氯霉素的简单方法。<sup>[11]</sup> 该方法分析过程为超声波辅助乙酸乙酯提取, 无水硫酸钠脱水, 将一定量正己烷与提取液混合后流过小硅胶柱, 用少量正己烷洗涤, 再用甲醇洗下氯霉素, 浓缩后用流动相溶解并用于色谱分析。色谱柱为  $5 \mu\text{m}$  Chromspher  $\text{C}_8$  柱(100.0 mm  $\times$  3.0 mm), 流动相为乙腈-乙酸钠缓冲液(0.01 mol/L, pH 4.3) (25:75, 体积分数), 检测波长 280 nm。在氯霉素  $10 \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$  时, 平均回收率为 79%。

1988 年 Tjaden 等报道了采用阀门切换技术的双柱反相液相色谱法测定猪肾中氯霉素残留。<sup>[12]</sup> 试样处理: 乙醚提取, 提取液用氮气吹干, 2 mL 乙腈和 3 mL 石油醚溶解残留物, 乙腈相用氮气吹干, 用流动相溶解后用于色谱分析。色谱条件: 第一柱为  $5 \mu\text{m}$  Chromsep  $\text{C}_{18}$  柱(100.0 mm  $\times$  3.0 mm i. d.), 第二柱为  $5 \mu\text{m}$  PRP-1 柱(100.0 mm  $\times$  3.0 mm i. d.), 检测波长为 280 nm, 流动相为乙腈-水(90:10)。本方法检出限量小于  $0.01 \mu\text{g}/\text{g}$ , 在  $125 \mu\text{g}/\text{kg}$  时回收率为 41.7%。

1989 年 Aerts 等研究了鸡、牛、猪肉中氯霉素残留的液相色谱法并在几个实验室进行了验证实验。<sup>[13]</sup> 试样处理: 蒸馏水提取, 取一半滤液通过 Ex-tre lut 柱, 用二氯甲烷洗脱, 浓缩后用水溶解, 与甲苯分配, 水相用于分析。也采用反相柱, 检测波长为 285 nm。在氯霉素为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  时, 平均回收率只有 55.1%, 检测限量为  $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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。<sup>[13]</sup> 试样用乙酸乙酯提取, 提取液浓缩干后的残留物溶于 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, 225

nm 或 270 nm 检测,当氯霉素为 0.1  $\mu\text{g/g}$  时平均回收率大于 74.1%,检出限量为 0.01  $\mu\text{g/g}$ 。

## 2.2 国内研究概况

1991 年王秉栋报道了动物性食品中氯霉素残留测定的高效液相色谱法。<sup>[14]</sup> 试样处理:将 10 g 试样用一定量的无水硫酸钠研成干粉状,加 1 mol/L 乙酸钠缓冲液 20 mL、乙酸乙酯 10 mL,振荡提取,过滤,残渣用乙酸钠缓冲液 10 mL 洗涤,并入提取液,分出有机层,水相再用乙酸乙酯萃取两次,将乙酸乙酯提取液用饱和氯化钠洗涤两次,乙酸乙酯浓缩后用 10 mL 20%乙腈水溶液溶解,再用 20 mL 石油醚脱脂,水层用于分析。色谱条件:检测波长为 280 nm, Hypersil H<sub>2</sub> ODS 柱, 10 cm  $\times$  4 mm, 流动相为水 - 乙腈 - 1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (80 20 1)。

1992 年陈家华报道了高效液相色谱法快速测定家禽组织中氯霉素残留的研究。<sup>[15]</sup> 前处理方法为用乙酸乙酯提取,然后用氮气吹干提取液,用 0.5 mol/L 高氯酸溶液净化提取液,用正己烷脱去脂溶性杂质。分离条件: $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (30 cm  $\times$  4 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) 柱, 甲醇 - 水 (35 65, 体积分数) 流动相, 1 mL/min 的流速, 检测波长为 280 nm。结果:平均回收率为 92.5%, 检测灵敏度 0.73 ng, 检测极限为 7.3 ng/g。

1994 年胡大晰等进行了蜂蜜中氯霉素残留量的色谱分析。<sup>[16]</sup> 试样用去离子水溶解后,经 1 - X - 8 吸附树脂柱净化和富集,在 Waters C<sub>18</sub> 柱上分离,紫外检测器测定,检测限为 0.01  $\mu\text{g/g}$ ,回收率为 86.37% ~ 101.5%, RSD 为 5.86% ~ 11.92%。

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。<sup>[17]</sup> 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: $\mu$  - Bondapak C<sub>18</sub> 柱, 甲醇 - 水 (30:70, 体积分数) 为流动相,在氯霉素浓度为 2.5 mg/kg 时的回收率为 91.2%。

1998 年谢君等报道了反相高效液相色谱法同时测定动物血浆中氯霉素含量,<sup>[18]</sup> 血样由甲醇 - 氯仿混合液提取,采用 ODS 柱,以甲醇 - 乙腈 - 醋酸钠溶液为流动相,检测波长为 278 nm,在氯霉素浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时,回收率为 97.8%, RSD 为 2.12%。

1999 年李英伦等用高效液相色谱法测定猪血浆中氯霉素的含量,<sup>[19]</sup> 血样用甲醇提取,采用 ODS 柱,流动相为甲醇 - 1%醋酸溶液 (50 50),紫外检测器波长为 254 nm,回收率为 95.8%, RSD 为 2.01%。

另外,还有人采用单克隆抗体制备的亲合层析柱对试样中氯霉素进行特异性提取和富集,再用高

效液相色谱法测定其含量,该方法在牛奶中检出限量可达 0.02  $\mu\text{g/kg}$ 。<sup>[20]</sup>

## 3 酶免疫测定法检测氯霉素残留

酶免疫测定法是以酶学和免疫化学为基础发展起来的一种新技术,由于该技术灵敏度高、特异性强、快速、经济,已在许多领域中得到广泛应用。<sup>[20]</sup> 近年来有许多关于应用此技术测定农药及兽药残留的报道,用酶免疫测定法检测食品中氯霉素的残留是一个成功的范例。<sup>[6]</sup> 由于氯霉素是半抗原,它不能刺激机体产生抗体,因而要使半抗原性物质具有免疫原性就需使其与大分子载体物质(蛋白质)相结合制备人工抗原,而后将其作为抗原进行免疫,动物体内即可产生特异性抗体。然后建立酶免疫竞争法测定氯霉素含量。

1984 年 Gwendolyns 等用竞争酶联免疫法测定牛肌肉组织中氯霉素残留,最低检出限量可达 1  $\mu\text{g/kg}$ ,特异性也很好。<sup>[6]</sup> 另外还有采用单克隆抗体竞争性酶联免疫法测定猪肌肉组织中氯霉素残留的报道。<sup>[6]</sup> 随着研究工作的深入发展已有测定氯霉素的试剂盒投放市场,如  $\times \times$  公司的 EMIT 试剂盒,它用于经氯霉素治疗后人血清中氯霉素含量的分析,此试剂盒主要适用于医用日常分析,该方法与高效液相色谱法及微生物学方法相比较具有明显的优点。经大量试验 D. J. Berry 等曾提出用 EMIT 试剂盒酶免疫法代替高效液相色谱法,但它灵敏度不高,只能检测 2.5 mg/kg 以上氯霉素的含量。<sup>[6]</sup> 后来荷兰推出了测定氯霉素残留的酶联免疫测定试剂盒 Quik-card, 现又称 La cart test 试剂盒,该试剂盒可测定牛、羊、猪等肌肉中氯霉素残留,检出限量为 1 ~ 3  $\mu\text{g/kg}$ ,也有人用它检测牛奶中氯霉素的残留,试样不经预处理检出限量为 5 ~ 10  $\mu\text{g/kg}$ ,样品经预处理及浓缩后检出限量可达 1  $\mu\text{g/kg}$  以下,此外还有用它检测鸡蛋,尿液中氯霉素的报道。<sup>[6]</sup> 另外,还有用单克隆抗体亲合素 - 生物素酶联免疫法测定猪肌肉组织中和牛奶中氯霉素残留的方法。<sup>[6]</sup>

酶免疫测定法不是十全十美的,它也存在一些缺点,如由于抗体的批次不同,测定结果可能出现微小差异等。

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,整个分析过程也是简便易行的,一般的单位都可以采用。预计今后,氯霉素残留检测技术将主要是在这两个方面上发展和完善。

#### 参考文献:

- [1] 张龙,主编. 兽医药物化学[M]. 北京:中国农业出版社,1999,280—282.
- [2] 庄无忌,主编. 各国食品和饲料中农药兽药残留大全[M]. 北京:中国对外经济贸易出版社,1998,982—1014.
- [3] Aerts, Keukens. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat: interlaboratory study[J]. J Assoc off Anal Chem, 1989,72(4):570—576.
- [4] Hans R M, Galbraith M, Alguani W G. In analytical microbiology[M]. F Karanagh (Ed.) Academic Press New York, NY,1963,271—281.
- [5] 刘智宏. 酶标免疫测定法(EIA)在检测动物性食品中氯霉素残留的应用[J]. 中国兽药杂志,1995,29(2):47.
- [6] Arnold, Somogyi. 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—989.
- [7] Wal J M, Pelepan. High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk[J]. J Assoc off Anal Chem,1980,63(5):1044—1048.
- [8] Bories, Pelepan. Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues[J]. J Assoc off Anal Chem,1983,66(6):1521—1526.
- [9] Schwartz, McDonough. Practical screening procedure for chloramphenicol in milk at low parts per billion level[J]. J Assoc off Anal Chem,1984,67(3):563—565.
- [10] Keukens, Beek. High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode array UV-VIS detection[J]. Journal of Chromatography, 1986,352:445—453.
- [11] Haagsma, Schreuder. Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography, 1986,363:353—359.
- [12] Tjaden, Stegehuis. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques[J]. Analyst,1988,113:171—174.
- [13] Nagata, Saeki. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography[J]. J liquid chromatography,1992,15(12):2045—2056.
- [14] 王秉栋,主编. 动物性食品卫生理化检验[M]. 北京:中国农业出版社,1991,399—400.
- [15] 陈家华. 高效液相色谱快速测定家禽组织中氯霉素残留的研究[J]. 中国抗生素杂志,1992,17(5):351—355.
- [16] 胡大晰,李庆才. 蜂蜜中氯霉素残留量的色谱分析[J]. 烟台师范学院学报(自然科学版),1994,2:45—47.
- [17] 李兰生,王勇强. 氯霉素在对虾体内的动力学研究[J]. 色谱,1997,15(5):431—434.
- [18] 谢君,李英伦. 反相高效液相色谱法同时测定动物血浆中泰乐松注射液的多种组分[J]. 分析实验室,1998,17(3):87—89.
- [19] 李英伦,谢君. HPLC法测定猪血浆中速免痢-C注射液两种组分[J]. 四川畜牧兽医,1999,94(2):17.
- [20] 张存帅. 酶免疫分析法(EIA)在动物性食品中有机化学残留物测定上的应用[J]. 中国兽药杂志,1992,26(4):32—34.

[收稿日期:2001-09-17]

中图分类号:R15,R978.1 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2002)02-0044-04

## 医学相关弧菌的分类及鉴定进展(综述)

周洪彦 梁冬

(哈尔滨市传染病院,黑龙江 哈尔滨 150030)

多年来许多学者致力于致病性弧菌的研究。《伯杰氏系统细菌学手册》(1984.九版)自问世以来,有许多过去没能认定的致病性弧菌有所证实及归属。致病性弧菌的种类也由过去的几种增加到30多个种。为便于基层专业人员的日常工作,现将

国内外部分相关研究做一综述。

1 弧菌的分类变化 从医学细菌的鉴定需要出发,弧菌科包括弧菌属、气单胞菌属与邻单胞菌属。它们的共同特征是:革兰氏阴性杆菌、需氧及兼性厌