

蜂产品中氯霉素残留检测方法的研究进展

魏玲, 李越, 陈舜琮, 李宝明, 张小莉, 武会娟*

(北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

摘要: 本文综述了近年来蜂产品中氯霉素残留的主要检测方法及其研究进展, 包括微生物法、免疫分析法、色谱分析法和生物传感器法。其中, 免疫分析法着重介绍了酶联免疫法, 色谱分析法则主要介绍了高压液相色谱和色谱-质谱联用技术。最后, 对现有检测方法进行了比较分析。

关键词: 蜂产品; 氯霉素残留; 检测方法

Review on detection methods for chloramphenicol residues in bee products

WEI Ling, LI Yue, CHEN Shun-Cong, LI Bao-Ming, ZHANG Xiao-Li, WU Hui-Juan*

(Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Recent progress on major methods for detecting chloramphenicol residues in bee products have been reviewed in this paper. The detection methods include microbiological methods, immunoassays (emphasizing on enzyme linked immune sorbent assay), chromatography analysis (emphasizing on high pressure liquid chromatography and chromatography-mass spectrometry) and biosensors. Finally, these detection methods and the development trends were compared and discussed.

KEY WORDS: bee products; chloramphenicol residues; detection methods

氯霉素作为一种有严重毒副作用的抗生素^[1], 不仅在临床上已经禁止使用, 而且为防止食品中氯霉素残留对消费者的危害, 对食用动物也禁止使用氯霉素。美国、欧盟、日本等许多国家都将氯霉素列为违禁药品, 且不断降低检出限, 我国也规定氯霉素在动物性食品中不得检出^[2,3]。

蜂产品作为广大消费者日常生活中重要的营养品, 含有丰富的蛋白质、生物酶、维生素以及对人体有益的矿物质等, 具有美容养生、增强免疫力等功效。我国在世界上是养蜂大国, 蜂群饲养和蜂产品产量均居世界首位。2002年初, 欧盟以我国动物源性产品抗生素(氯霉素)残留超标为由, 而全面禁止中国蜂

蜜进入欧盟市场。这在世界各国引起连锁反应, 对我国蜂产品的国际声誉造成严重影响。目前, 虽然形势有所缓和, 但各国仍严格限制我国蜂产品的进口, 退货、索赔、扣留事件时有发生。因此, 加强蜂产品的生产管理, 提高蜂产品中氯霉素残留的检测灵敏度, 对我国蜂产品工业的发展来说已显得十分迫切。

目前, 蜂产品中氯霉素残留的检测方法主要有微生物法、免疫分析法、色谱分析法及生物传感器法等。

1 微生物法

微生物法是氯霉素测定的常用方法, 也是目前

基金项目: 北京市科学技术研究院萌芽计划项目

Fund: Support by Program of Beijing Academy of Science and Technology

*通讯作者: 武会娟, 副研究员, 主要研究方向为食品安全分析和检测、分子诊断。E-mail: sunnywhj@126.com

*Corresponding author: WU Hui-Juan, Research Associate, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, No.27, Fengxian Middle Road, HaiDian District, Beijing 100089, China. E-mail: sunnywhj@126.com

我国药典中引用的标准方法。样品中若有氯霉素残留会对培养基中的细菌产生抑菌圈,根据抑菌圈的有无及大小可以判定结果。主要有纸片法、TTC (triphenyl tetrazolium chloride)法及氯化三苯基四氮唑法等。但传统的微生物检测法存在较多缺点,如:时间长、显色状态通过肉眼判断误差较大、操作复杂,因此不宜应用。

2 免疫分析法

免疫分析法包括免疫凝聚沉淀法、放射免疫法和酶联免疫法(ELISA),但目前对蜂产品中氯霉素残留量检测的研究与应用主要为酶联免疫法。

酶联免疫法包括直接竞争法和间接竞争法,其基本原理是在合适的载体(常用的载体是聚苯乙烯微孔板)上,酶标记抗体或抗原与相应的抗原或抗体形成酶标记的抗原-抗体复合物,在酶底物的参与下,复合物上的酶催化底物使其水解,氧化或还原成为另一种有色物质^[4]。氯霉素是半抗原,不能刺激机体产生抗体,因而要使其与大分子载体物质(蛋白质)结合制备成人工抗原,将其作为抗原进行免疫,动物体内即产生特异性抗体,然后建立免疫分析方法测定氯霉素含量。

酶联免疫法具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度较高、特异性强等诸多优点,适合于现场筛选。目前已有多种市售的ELISA试剂盒用于氯霉素残留的检测。但ELISA中可发生多种非特异吸附作用,其主要的非特异反应是由于抗体反应体系选择不当所致,不合适的抗体反应体系引起的非特异反应可导致ELISA出现假阳性结果,只作为阴性确认,其结果若为阳性,还需用其他方法进一步确认。

彭运平等^[5]应用间接竞争酶联免疫分析法(ELISA法)测定了鱼肉、蜂蜜中的氯霉素残留量,其中蜂蜜的添加回收率大于85.5%,批内变异系数和批间变异系数分别小于13.6%和12.3%,检测限为0.081 g/kg。2010年,Sai等^[6]对传统的ELISA法做了改进,把小分子的半抗原直接涂到微量滴定板和生物素-链亲和素体系(BASA)的表面,并用戊二醛聚合物处理微量滴定板引进乙醛基团(可与氯霉素发生交联反应),再用生物素酰化的单克隆抗体和(horse radish peroxidase, HRP)标记的链亲和素来扩大反应信号,以此提高免疫检测的灵敏度,检测限达到0.2 ng/mL。Van Dorst等^[7]则首次报道了将单链可变区片段噬菌体

(scFv)用于氯霉素的ELISA检测,噬菌体具有高度吸附性和特异性、快速廉价制取的优点,将其作为氯霉素的抗体捕捉剂,获得了0.1 ng/mL的检测限。

2011年,Zhang等^[8]首次提出将基于AlphaLISA (amplified luminescent proximity homogeneous assay)方法的免疫检测应用于蜂蜜中氯霉素含量的检测。AlphaLISA利用微珠作为供体和受体来进行生物分子的检测。如果样品中存在检测目标,供体微珠和受体微珠会由于抗体的特异性识别而相互接近,从而激发受体微珠上级联放大的化学发光反应,最后将信号传递到铂上,产生信号。该方法避免了复杂的样品清洗工作,灵敏度高、特异性强、准确度高,并可以在30 min内完成检测;检测限为0.0086 ng/mL,工作区间为0.0096~25 ng/mL。AlphaLISA技术比传统的ELISA具有更大的优势,如:无需洗涤,样品体积更小,检测范围可达3-5个数量级。可以进行384、1536、3456孔板的高通量检测。目前,已有商品化的检测试剂盒在售。

3 色谱分析法

3.1 高压液相色谱法

高压液相色谱法又叫做高效或高速液相色谱、高分离度液相色谱或近代柱色谱,其以液体为流动相,采用高压输液系统将供试品在柱内进行分离,各成分先后进入检测器,用记录仪或数据处理装置记录色谱图和进行数据处理,得出测定结果。此方法灵敏度较高、可靠性高、重复性好、假阳性少,可以进行定量鉴定。

2009年,Chen等^[9]利用分散液液微萃取-液相色谱法(DLLME-HPLC)对蜂蜜中的氯霉素含量进行测定,检测限为0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。具体方法为:将含有1,1,2,2-四氯乙烷的乙腈注射到含有待分析样品的水溶液中,然后离心分相溶液获得富集的待分析物,再用高压液相-多波长探测器进行样品数据的收集分析。Han等^[10]建立了水二相体系([Bmim]BF₄-Na₃C₆H₅O₇)提取法,结合高压液相色谱法(HPLC)测定蜂蜜中的氯霉素含量,检测限达0.3 ng/mL,回收率为90.4%~102.7%。

3.2 色谱-质谱联用法

色谱-质谱联用方法是一种高灵敏度、高选择性的检测方法,特别是液相色谱-串联质谱系统通过多

反应监测模式(MRM)则可进一步提高检测的灵敏度和选择性,降低检测限和假阳性检测结果的出现几率,如气相色谱-质谱联用(GC-MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)。GC-MS已相当成熟,主要采用电子轰击源(EI)和负离子化学源(NCI)。EI源气相色谱-质谱联用法的检出限一般高于5 g/kg; NCI源气相色谱-质谱联用法的灵敏度更高,检出限可达到0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但NCI源的单一性限制了其应用。目前已有不同源可以互换的质谱仪,可以应用得更广泛^[11,12]。

液相色谱-串联质谱法作为确证的方法已被权威的监督检验机构运用。Lu等^[13]于2010年用高压液相色谱-串联质谱法对蜂蜜中的氯霉素含量进行了检测,用多壁纳米碳管作为吸附剂进行固相萃取,提取物用 C_{18} 柱进行分离,得到了较满意的结果。权武英等^[14]建立了蜂蜜中氯霉素的液液萃取-液相色谱-串联质谱检测方法,该方法的线性范围为0.01~1.0 g/kg,且灵敏、准确、快速,能满足蜂蜜中氯霉素的监督检测需要。田文礼等^[15]建立了蜂蜜中氯霉素残留的高压液相色谱-串联四极杆质谱联用测定方法,用乙酸乙酯提取样品, EclipseXDB- C_{18} 柱分离,流动相为水-甲醇溶液,电喷雾负离子MRM模式检测。该方法的检出限为0.1 ng/mL,样品的定量下限为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,线性范围为0.1~10.0 ng/mL,加标回收率为86.0%~93.2%,相对标准偏差为3.26%。Taka等^[16]建立了一种基于LC-MS/MS的快速灵敏检测蜂蜜总氯霉素含量的方法,该方法样品的清洗无需经过固相萃取和分子印迹,明显简化了检测过程,回收率达97%以上。该方法在欧盟决议2002/657基础上执行,最低检出限的实验室内变异系数(coefficient of variation, CV)小于10%。

Barreto等^[17]提出了一种可靠、简单、灵敏的液相-电喷射离子-串联质谱法(LC-ESI-MS/MS)。该方法采用水溶解蜂蜜,然后用乙酸乙酯萃取蜂蜜水溶液中的氯霉素,蒸干后用水溶解样品残渣,然后用HLB小柱进行固相萃取,以乙腈-水作为流动相对样品中的氯霉素进行净化前处理, C_{18} 色谱柱对蜂蜜的氯霉素进行分离,最后用电喷雾质谱负离子多反应监测模式(ESI-MRM)对氯霉素进行检测。本技术对样品的需求量低,有效地节省了分析时间和流动相的消耗量,降低了假阳性机率,提高了检测的准确性和灵敏度,检测限达0.02 g/kg。Alechaga等^[18]于2012年提出了用超高压液相色谱法分析包括蜂产品在

的食品中氯霉素及其相关化合物的检测,处理后的样品进入仪器后2 min 检出结果。

4 生物传感器法

生物传感器(biosensor)又称为生物电极(bio-electrode)或生物芯片,包括生物敏感膜和换能器两部分,它可以将生物分子间的相互识别与反应转化为电信号、光信号等。其将大量生物大分子有序地固定于支持物的表面,组成密集二维分子阵列,然后与已标记的待测生物样品中靶分子结合,通过特定的仪器对芯片信号强度进行检测分析,从而判断出样品中靶分子的数量与含量。该技术尚处于初级研究阶段,尚未有成熟的技术应用案例。

柴春彦等^[19]研究阳离子表面活性剂对氯霉素在玻碳电极上伏安行为的影响,从而建立生物电极法检测生物样品中氯霉素残留的高灵敏度技术。该技术检测氯霉素的检出限为0.83 mg/mL。2010年,我研究组^[3]利用 F_0F_1 -ATPase酶生理特性和一定的连接体系制备具有捕获氯霉素能力的纳米生物传感器,通过检测捕获前后生物传感器相对荧光值的变化情况来反应氯霉素的有无和多少,结果显示在 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} g/L三浓度现出良好的梯度性。但仅用该方法检测了氯霉素标准品。2011~2012年,我实验室又利用该方法对蜂蜜中氯霉素残留检测的可行性进行了研究和验证。

2004年,Ferguson等^[20]报道了表面等离子共振生物传感器与Qflex氯霉素试剂盒检测蜂蜜中氯霉素残留。蜂蜜样品需先用乙酸乙酯萃取,然后用表面等离子体共振对其中氯霉素与氯霉素葡糖醛酸残留进行免疫化学筛选,在传感器芯片上涂上氯霉素衍生物和抗体进行测定,检出限为0.02 g/kg。Yuan等^[21,22]分别于2008年和2009年报道了其利用表面离子共振技术来检测蜂蜜中氯霉素残留量。2008年,他们将金纳米颗粒作为信号增强剂固定于混合自组装单分子膜(mixed self-assembled monolayer, mSAM)传感器膜上,对蜂蜜样品中氯霉素检测限为175 pg/mL; 2009年,他们则将氯霉素与合成的氯霉素胺类衍生物连接并固定于不能再生的右旋糖酐膜表面,通过表面离子共振产生信号,该方法对蜂蜜样品中氯霉素的检测限为42.4 pg/mL。

2010年, Kim等^[23]将抗氯霉素的乙酰转移酶抗体固定于硫化镉纳米颗粒修饰的人造分子上,并将

其连接于导电聚合物层(poly-TTAC)上,用此传感器检测氯霉素含量,得到了45 pg/mL的检测限,线性区间为50~950 pg/mL。Zhang等^[24]则将金纳米颗粒和壳聚糖混合组分修饰于碳电极上,做成了无标签的电化学传感器,用于检测氯霉素含量。Karaseva等^[25]利用聚合物为材料制作的压电传感器检测了食品(肉、牛奶、鸡蛋、蜂蜜)中的氯霉素残留,检测限为0.2 ng/mL,线性区间为0.5~100.0 ng/mL。

5 小结

微生物法操作简便、样品用量少、预处理简单,在基层大规模筛选工作中有很大的应用价值。但同时易受组织中其他抗生素的影响,特异性低,灵敏度也不高。酶联免疫法简单、快速、特异性强,此类试剂盒的开发使其在现场筛选工作中变得越来越适用,但该方法容易出现假阳性结果,因此一般只作为阴性确认。目前市场上的商业化试剂盒均在不断提高灵敏度,降低检出限的同时也降低了假阳性率。色谱分析法由于其高灵敏度、重复性好、可靠性高而越来越受到关注,尤其是色谱-质谱多级联用技术,将分离与检测技术结合,近年来已取得重大进展,为国际公认的可信定量技术。虽然该方法前期样品处理比较复杂,但其仪器化程度高、分析速度快,适用于实验室研究及后期检测确认。由于其仪器费高且占用空间大,暂时无法满足现场及基层检测的快速、大批量、仪器设备简单的现状。如果该方法朝着便携式仪器的方向发展,将会更加提高其应用范围。

与传统检测方法相比,生物传感器法虽然反应灵敏、准确度高,有些传感器还可以在单一芯片上完成样品的预处理、分离、稀释、混合、化学反应、检测到产物提取的全过程,但其稳定性不易控制,目前还没有比较成型的易操作体系,这需要科研人员不断努力,积极推进该方法的应用进程。

参考文献

- [1] 徐理奇, 卢春香. 动物食品中氯霉素类药物的残留状况及检测方法比较[J]. 饲料工业, 2008, 29(15): 15, 41-42.
Xu LQ, L CX. The comparison on detection methods for chloramphenicol residues in Food of Animal in food of animal [J]. Feed Ind, 2008, 29(15): 15, 41-42.
- [2] 李卓, 董文宾, 李娜, 等. 食品中霉素残留检测技术研究新进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 408-411.
Li Z, Dong WB, Li N. New development of detection technology of chloramphenicol residues in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(4): 408-411.
- [3] 武会娟, 魏玲, 刘清璐, 等. 纳米生物传感器在氯霉素检测中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 167-170.
Wu HJ, Wei L, Liu QJ, *et al.* Application of Nano Biosensor-technology in Chloramphenicol Detection [J]. Food Sci, 2010, 31(08): 167-170.
- [4] 周枫. 蜂产品中抗生素残留检测方法研究进展[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2010, 20(2): 132-139.
Zhou F. Research development of assay of antibiotics residue in bee products [J]. J Xinyang Agr Coll, 2010, 20(2): 132-139.
- [5] 彭运平, 齐维, 唐海波, 等. 应用酶联免疫法检测鱼肉、蜂蜜中氯霉素的残留量[J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1414-1416.
Peng YP, Qi W, Tang HB, *et al.* Detection the Residues of Chloramphenicol in Fish Meat and Honey Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay [J]. Mod Food Sci Technol, 2010, 26(12): 1414-1416.
- [6] Sai N, Chen Y, Yu G, *et al.* A sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin-streptavidin system for the detection of chloramphenicol [J]. Talanta, 2010, 4(82): 1113-1121.
- [7] Van Dorst B, Mehta J, Rouah-Martin E, *et al.* Selection of scFv phages specific for chloramphenicol acetyl transferase (CAT), as alternatives for antibodies in CAT detection assays [J]. J Appl Toxicol, 2012, 32(10): 783-789.
- [8] Zhang Y, Huang B, Zhang J, *et al.* Development of a homogeneous immunoassay based on the AlphaLISA method for the detection of chloramphenicol in milk, honey and eggs [J]. J Sci Food Agr, 2012, 92(9): 1944-1947.
- [9] Chen H, Chen H, Ying J, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey [J]. Anal Chim Acta, 2009, 632(1): 80-85.
- [10] Han J, Wang Y, Yu CL, *et al.* Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatograph [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399(3): 1295-1304.
- [11] 李晓川, 孔轶群, 冷凯良, 等. 水产品中氯霉素残留测定方法的比较分析[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 76-81.
Li XC, Kong YQ, Leng KL, *et al.* Analysis of determination method of chloramphenicol residues in aquatic products, Marine Fisheries Research [J]. Mar Fish Res, 2002, 23(4): 76-81.

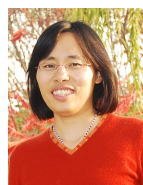
- [12] 王建华, 刘心同, 王修林, 等. 气相色谱-负化学源质谱法测定蜂蜜和奶粉中氯霉素残留量[J]. 化学分析计量, 2004, 13(2): 26-27.
Wang JH, Liu XT, Wang XX, *et al.* Determination of Chloramphenicol residue in milk powder and honey by GC-negative chemical ionization mass spectrometry [J]. Chem Anal Meter, 2004, 13(2): 26-27.
- [13] Lu Y, Shen Q, Dai Z, *et al.* Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the ultra-fast determination of chloramphenicol in egg, honey, and milk by fused-core C₁₈-based high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(4): 1819-1826.
- [14] 权武英, 张秀丽, 栾燕, 等. 液液萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2): 117-119.
Quan WY, Zhang XL, Luan Y, *et al.* Determination of Chloramphenicol Residue in Honey by Liquid-Liquid Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2007, 19(2): 117-119.
- [15] 田文礼, 彭文君, 韩胜明, 等. 液相色谱-串联三重四极杆质谱测定蜂蜜中的氯霉素残留[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 285-287.
Tian WL, Peng WJ, Han SM, *et al.* Liquid Chromatography/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometric Determination of Chloramphenicol Residue in Honey [J]. Food Sci, 2009, 30(14): 285-287.
- [16] Taka T, Baras MC, Chaudhry Bet ZF. *et al.* Validation of a rapid and sensitive routine method for determination of chloramphenicol in honey by LC-MS/MS [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2012, 29(4): 596-601.
- [17] Barreto F, Ribeiro C, Hoff RB, *et al.* Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2012, 29(4): 550-558.
- [18] Alechaga É, Moyano E, Galceran MT. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods [J]. Analyst, 2012, 137(10): 2486-2494.
- [19] 柴春彦, 徐明刚, 刘国艳. 阳离子表面活性剂对电化学法测试牛奶中氯霉素残留量的影响[J]. 分析化学研究报告, 2006, 34(12): 1715-17181.
Chai CY, Xu MG, Liu GY, *et al.* Effect of Cationic Surfactant on the Voltammetric Determination of Chloramphenicol Residue in Milk [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(12): 1715-17181.
- [20] Ferguson J, Baxter A, Young P, *et al.* Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex®kit chloramphenicol [J]. Anal Chim Acta, 2005, 529(1-2): 109-113.
- [21] Yuan J, Oliver R, Aguilar MI, *et al.* Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol [J]. Anal Chem, 2008, 80(21): 8329-8333.
- [22] Yuan J, Addo J, Aguilar MI, *et al.* Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol without surface regeneration [J]. Anal Biochem, 2009, 390 (1): 97-99.
- [23] Kim DM, Rahman MA, Do MH, *et al.* An amperometric chloramphenicol immunosensor based on cadmium sulfide nanoparticles modified-dendrimer bonded conducting polymer[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1781-1788.
- [24] Zhang N, Xiao F, Bai J, *et al.* Label-free immunoassay for chloramphenicol based on hollow gold nanospheres/chitosan composite [J]. Talanta, 2011, 87: 100-105.
- [25] Karaseva NA, Ermolaeva TN. A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food [J]. Talanta, 2012, (93): 44-48.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



魏玲, 硕士, 助研, 主要研究方向为食品安全检测研究。
E-mail: weilingscnu@126.com



武会娟, 博士, 副研究员, 副主任, 主要研究方向为食品安全分析和检测、分子诊断。
E-mail: sunnywhj@126.com