

多肽类抗生素的最大残留限量标准分析与 检测方法研究进展

顾艳, 胡文彦, 杨军*

(南京市食品药品监督检验院, 南京 211198)

摘要: 多肽类抗生素是一类由氨基酸以肽键相连而成的抗生素, 广泛用作兽药添加到动物饲料中, 用于预防、治疗动物传染病。但是, 过量使用或者不遵循休药期使用可能导致动物源性食品中多肽类抗生素残留, 造成食品安全问题。本文综述了多肽类抗生素最大残留限量标准与检测方法的研究成果, 简要介绍了多肽类抗生素的来源、分类与应用, 以及国内外关于多肽类抗生素残留限量标准及其中的相关规定, 详细归纳总结了多肽类抗生素残留检测的方法, 以为多肽类抗生素的检测与管理提供参考依据。

关键词: 多肽类抗生素; 最大残留限量标准; 检测方法

Research progress on maximum residue limit standards and detection methods of polypeptide antibiotics

GU Yan, HU Wen-Yan, YANG Jun*

(Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: Polypeptide antibiotics are a kind of antibiotics composed of amino acids linked by peptide bonds, which are widely used as veterinary drugs and added to animal feed to prevent and treat animal infectious diseases. However, excessive use or non-compliance with the drug withdrawal period may lead to polypeptide antibiotic residues in animal derived foods, resulting in food safety problems. This paper reviewed the research results of the maximum residue limit standard and detection method of polypeptide antibiotics, briefly introduced the source, classification and application of polypeptide antibiotics, as well as the residue limit standard of polypeptide antibiotics at home and abroad and its relevant provisions, summarized the detection methods of polypeptide antibiotics in detail, in order to provide reference for the detection and management of polypeptide antibiotics.

KEY WORDS: polypeptide antibiotic; maximum residue limit standard; detection method

0 引言

多肽类抗生素(polypeptide antibiotics), 又被称为抗菌肽, 是一类由氨基酸以肽键相连而成的抗生素。多肽类抗

生素大多是从多粘杆菌或产气孢子杆菌的培养液中提取制得的, 广泛存在于自然界各种生物中, 具有抗革兰氏菌、真菌、病毒、绿脓杆菌、原虫、抑杀癌细胞、调节免疫等作用^[1]。多肽类抗生素主要包括多粘菌素(polymyxin)、杆

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK140)

Fund: Supported by the Project of State Administration for Market Regulation (2020MK140)

*通信作者: 杨军, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: Yj711003@sina.com

*Corresponding author: YANG Jun, Professor, Nanjing Institute for Food and Drug Control, No.199, Wenfang Road, Nanjing 211198, China. E-mail: Yj711003@sina.com

菌肽(bacitracin)和维吉尼霉素(virginiamycin, VGM)等, 广泛用作兽药添加到动物饲料中, 用于预防、治疗动物传染病、促进饲料转化率和提高动物的生长速度。但是, 过量使用或者不遵循休药期使用可能导致动物源性食品中多肽类抗生素残留, 造成食品安全问题^[2-4]。因此, 多肽类抗生素的检测一直是国内外动物和人类医学、饲料/食品学和免疫学等领域研究的热点内容。国内外专家、学者就多肽类抗生素的残留标准以及检测方法进行了深入探究, 本文就此领域的研究成果进行梳理总结, 系统归纳出多肽类抗生素最大残留限量最新标准以及检测的主要方法, 以期有多肽类抗生素的检测与管理提供参考依据。

1 多肽类抗生素最大残留限量标准

多肽类抗生素因广泛应用于兽药、农药中, 因此在食用动植物产品中往往有残留, 且残留超标的问题也频繁发生。人一旦食用了残留超标的动植物食品后, 多肽类抗生素就会在体内积蓄, 产生过敏、畸形、癌症等不良后果, 直接危害人体的健康甚至生命^[5]。因此, 多肽类抗生素最大残留限量和检测成为食品安全监管的重要内容。

美国、日本、欧盟、新西兰等国家和组织均对抗生素最大残留进行了限量规定或禁用规定。其中, 日本规定的数量最多, 高达 418 种^[6]; 欧盟制订的限量数量也高达 390 种^[7]。1998 年 12 月 14 日, 在布鲁塞尔召开的一次会议上, 欧盟 15 国农业部长投票决定禁用 4 种抗菌素作为饲料添加剂

(12 国赞成, 3 国弃权), 分别是 VGM、磷酸泰乐菌素(tylosinphos-phate)、螺旋霉素(spiramycin)和杆菌肽锌(zincbaci-tracin); 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)制定的“联邦法案 CFR21 食品与药品第 556 章”对食品中新兽药的允许残留量进行了规定, 附录中共对 98 种兽药在食品中的允许残留量做出了规定, 其中就涉及到多肽类抗生素的最大残留限量^[8]; 我国农业部于 2002 年发布 NY 5071—2002《无公害食品渔用药物使用准则》, 将杆菌肽列为渔业禁用药物。2010 年, 我国食品安全整顿工作办公室发布关于《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第四批)》的通知(整顿办函〔2010〕50 号), 将万古霉素列为可能违法添加的非食用物质。我国在数量上有所滞后, 于 2002 年虽制定农业部 235 号公告, 但随着相关标准以及国外禁限用兽药及农化学物名录的不断更新, 我国至 2019 年才发布最新的国标 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药残留最大限量》, 于 2020 年 4 月 1 日替代农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》相关部分, 对残留标志物、靶组织、限量值等方面做了更新和修正。该标准规定了动物性食品中阿苯达唑等 104 种(类)兽药的最大残留限量; 规定了醋酸等 154 种允许用于食品动物, 但不需要制定残留限量的兽药; 规定了氯丙嗪等 9 种允许作治疗用, 但不得在动物性食品中检出的兽药^[9]。我国和其他部分国家和组织多肽类抗生素最大残留限量标准分别见表 1 和 2。

表 1 我国部分多肽类抗生素最大残留限量标准

Table 1 Part of the maximum residue limit standards of polypeptide antibiotics in China

肽类抗生素名称	执行标准	限量
维吉尼霉素	农业部公告第 168 号	猪饲料 20~50 g/t; 鸡饲料 10~40 g/t
	农业部公告第 235 号	猪组织: 肌肉 100 μg/kg; 肝脏 300 μg/kg; 肾脏 400 μg/kg
万古霉素	农业部公告第 560 号	禁用
粘菌素	SN/T 5142—2019《进出口动物源性食品中粘菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》	50~300 μg/kg
多粘菌素 E	SN/T 5142—2019	牛/猪兔/鸡组织: 脂肪/肌肉/肝 150 μg/kg; 肾 200 μg/kg 鸡蛋: 300 μg/kg
维吉尼亚霉素	SN/T 5142—2019	100~400 μg/kg
杆菌肽	GB 31650—2019	500 μg/kg
多粘菌素	/	禁用
截短侧耳素类抗生素泰妙菌素	GB 31650—2019	猪/兔/鸡/火鸡肌肉: 100 μg/kg
		猪/兔肝: 500 μg/kg
		鸡肝: 1000 μg/kg 火鸡肝: 300 μg/kg

表 2 部分国家和组织对多肽类抗生素最大残留限量标准
Table 2 Maximum residue limit standards of polypeptide antibiotics in part of countries and organizations

肽类抗生素名称	国别	限量
	欧盟	禁用
维吉尼霉素	日本	牛奶、鸡蛋: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
	美国	家禽组织: 肌肉 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 肝脏 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 肾脏 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$
万古霉素	欧盟、美国	禁用
多粘菌素 E	欧盟	150 $\mu\text{g}/\text{kg}$
	欧盟	牛奶: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
杆菌肽锌	日本	牛奶: 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$
	瑞典	动物饲料: 禁用
截短侧耳素类抗生素 妙菌素	欧盟、美国	肌肉组织: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 肝脏: 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2 多肽类抗生素残留检测方法

2.1 微生物检测法

微生物检测肽类抗生素的原理是利用抗生素在琼脂培养基中的扩散作用,抑制试验菌的繁殖,从而形成一定浓度的含抗生素球形区即抑菌圈,通过比较标准物质与待测物质两者在相同条件下对接种试验菌的表现抑菌圈的大小,来检验试验菌对试验菌的供效价^[10]。微生物检测法主要有纸片法(paper disc, PD)、杯碟法(cylinder plate, CP)和氯化三苯基四唑(triphenyltetrazole chloride, TTC)显色法等^[11]。诸多发达国家都有一套微生物检测法快速检测抗生素药物在动物组织中残留的方法,如美国棉签法、加拿大兽患抗生素和磺胺制剂实验法、德国的三碟实验法,欧盟的四碟实验法等^[12]。我国 SN/T 1134—2002《进出口肉及肉制品中维吉尼霉素残留量检验方法 杯碟法》用于出入境的肉和肉制品中的维吉尼霉素就是采取杯碟法来检测,该方法检测限为 0.05 mg/kg。PIKKEMAAT 等^[13]指出,微生物筛选方法对来自动物来源的食品中是否存在抗菌残留物进行监测是一种高效的方法,这一方法符合欧盟立法,但目前该方法的应用还不太令人满意。AZYRKINA 等^[14]采用定性微生物法对家禽肉类、肝脏和肾脏中的杆菌肽残留量进行了测定,研究得出该方法的特异性、准确性和灵敏度均为 100%,符合乌克兰卫生部家禽肉类安全标准中对杆菌肽的限量要求。张开礼等^[15]用微生物法测定人血浆中去甲万古霉素,该方法检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均回收率为 98.1%~100.7%,该方法操作简便、测定快速、费用低,与高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)比较,2 种检测方法结果差异无统计学意义。

微生物检测法实验过程简单,无需大型仪器与设备,同时,可以筛选出大量的样品。但由于特异性的菌株筛选工作存在较大的难度,检测过程中常因其他抗生素的干扰导致测定的结果存在误差^[16]。随着目前人们对抗生素残留限量的要求越来越严格,微生物检测法已经不能满足大量、广泛、快速的检测要求,仅在一些仪器条件相对落后的地区或者小型的工厂还将这一检测方法作为抗生素超标的初步筛检方法。

2.2 免疫检测法

上世纪八十年代出现的免疫检测法(immunoassay, IA),其基本原理是通过利用抗原使动物体内产生相应抗体,然后将所产生的抗体与抗原相结合,从而对底物(药物、抗生素等)进行检测。免疫检测法主要包括以下几种方法:放射免疫法^[17]、酶联免疫吸附法^[18-21]、荧光偏振免疫测定法^[22-23]、胶体金免疫层析方法^[24-25]和蛋白芯片法^[26-28]等。目前在多肽抗生素残留测定研究中报道较多的是酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和荧光免疫测定法。

ELISA 是一种异相酶免疫检测技术,可以分为直接竞争法和间接竞争法 2 种。其操作方法是将抗体包放入聚苯乙烯微孔反应板中,加入酶标记的待测物和待测物,进行 2 种抗体的竞争,反应完成后,清除反应液并洗涤酶标板,吸附在酶反应板上的酶标记的待测物与待测液中药含量成反比。添加酶底物显色后,进行比色,可以通过肉眼观察,或者用分光光度法来测定,这样就可确定药物的含量^[29]。MATSUMOTO 等^[30]利用辣根过氧化物酶来标记杆菌肽的抗体,建立了 ELISA 测定鸡血杆菌肽残留量的检测方法,该方法的检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 97%~103%。WILLIAMS 等^[31]建立了酶联免疫吸附测定法检测动物饲料中残留的杆菌肽锌,该方法简单快速,非常稳定,最低检出限为 1 mg/kg。KONG 等^[32]用酶联免疫法测定了生牛乳和动物饲料中万古霉素和去甲万古霉素残留量,对酶联免疫测定过程中的溶液 pH 和氯化钠的浓度等参数进行了优化,研究结果显示,该方法的回收率达到 89.2%~121.6%,万古霉素和去甲万古霉素的检测限分别为 0.06 和 0.13 ng/mL,方法灵敏度高。MCNAMEE 等^[33]采用甲醇萃取、固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)和酶联免疫吸附法测定家禽组织中 VGM M₁ 的含量,得出 VGM M₁ 的检出限小于 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在泰乐霉素和螺旋霉素的情况下,该方法检测到比质谱法更高的残留水平。SITU 等^[34]以多克隆抗体为基础,建立了 ELISA 方法检测动物饲料中 5 种禁用饲料添加剂,包括 VGM、杆菌肽、螺旋霉素、泰乐菌素和喹啉多肽,它们的检出限分别为 0.2、0.3、0.6 和 1.5 mg/kg。LI 等^[35]采用间接竞争酶联免疫吸附实验(indirect competitive-ELISA, ic-ELISA)检验制备的抗多粘菌素-B 的

单克隆抗体 3C6 的灵敏度, 该抗体的半数最大抑制浓度为 13.13 ng/mL, 基于此, 建立了胶体金免疫层析试纸条检测牛奶和饲料中的多粘菌素-B, 肉眼检出限分别为 100 ng/mL 和 1000 µg/kg, 方法灵敏度高。

荧光偏振免疫测定法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)主要是利用荧光物质经过 485 nm 的单面蓝偏振光照射后, 吸收光能进入激发态, 然后恢复为基态, 从而产生单面偏振荧光(525 nm)。FPIA 在多肽抗生素万古霉素的检测中应用较多。DINA 等^[36]采用 HPLC+FPIA 方法, 测定行体外循环术患者给药前及给药后 12 h 血浆中的万古霉素水平, 该方法在回收率、线性、选择性和各种稳定性条件下都得到了充分的验证。黄进等^[37]比较了 FPIA 和 HPLC 测定血清中万古霉素浓度的效果, 应用 FPIA 测得万古霉素的浓度为(29.67±13.96) µg/mL, 2 种方法差值均值为(0.37±1.46) µg/mL, 在 0~100 µg/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系。邹国芳等^[38]同样比较了 FPIA 和 HPLC 测定万古霉素的血清浓度, 研究得出, FPIA 测定值明显高于 HPLC 测定值, 分析原因为万古霉素代谢降解产物干扰导致本底响应值偏高。

IA 的试样前处理较为简单、用时短、成本低, 适用于大量样品的检测, 因而成为前期筛查中使用较为广泛的方法。但是, 免疫检测法的假阳性交高, 因此极少作为确证方法。该方法在初期大量样品的筛检和现场监测中具有较高的应用价值。

2.3 仪器检测法

利用色谱或质谱等大型精密仪器进行残留检测是目前使用较为广泛的、可以精确定量检测的方法。目前在多肽抗生素检测研究中报道较多的仪器检测法包括 HPLC、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)、毛细管电泳法等。

HPLC 是一种以液体为流动相的高压输液系统, 它将具有不同极性的流动相泵入带有固定相的色谱柱中, 在柱中分离出各种成分后, 进入检测器进行检测, 从而实现样品的分析。该方法是目前应用最为广泛的检测方法, 具有分离速度快、效率高和操作自动化的优势特点。翟卫红等^[39]建立了猪小肠组织中那西肽残留检测方法, 结果显示, 猪小肠那西肽平均回收率为 71.07%~87.9%, 检出限低至 5 ng/mL, 该方法大大降低了实验成本、缩短了样品处理时间、具有良好的稳定性和便捷性。李晓翠等^[40]运用 HPLC 测定了大鼠血浆和尿液中多粘菌素 B₁ (多肽类抗生素)的含量, 结果表明, 小鼠血浆和尿液中多粘菌素 B₁ 的线性范围分别是 0.12~4.00 µg/mL ($r^2=0.998$)和 0.12~4.00 µg/mL ($r^2=0.9964$), 日间与日内精密密度均小于 15%, 体现出该方法的快速、准确、稳定性和特异性高的优点。HPLC 能对多肽抗生素样品进行高分离、定量检测, 但不能准确地进

行定性分析。随着各国规定的兽药残留的最大残留限量日益降低, HPLC 限于检测器的特点, 无法满足低残留检测的需求, 因此, 对于多肽抗生素低残留限量的检测, HPLC 方法还存在一定的局限性。

LC-MS/MS 相比于 HPLC, 具有更加强大的定性能力, 可较好地排除基质的干扰, 且具有高灵敏度特性, 适合分析基质复杂的样品^[41]。目前 LC-MS/MS 多应用于分析动物源中的药物残留。相关标准对多肽抗生素残留的检测方法大多采用 LC-MS/MS, 例如 GB/T 22981—2008《牛奶和奶粉中杆菌肽残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB/T 20743—2006《猪肉、猪肝和猪肾中杆菌肽残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、SN/T 5142—2019、农业部 1862 号公告-3—2012《饲料中万古霉素的测定 液相色谱-串联质谱法》。另外, SN/T 2748—2010《进出口动物源性食品中多肽类兽药残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》针对进出口动物源性食品中杆菌肽 A、粘杆菌素和 VGM M₁ 的残留量的测定规定采用 LC-MS/MS。

BOISON 等^[42]采用 LC-MS/MS 测定鸡肉组织中的多粘菌素 B₁、多粘菌素 B₂、多粘菌素 E₁、多粘菌素 E₂、杆菌肽 A、恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B 等 7 种多肽抗生素的残留液, 分析结果显示, 采用该方法检测的上述 7 种肽类抗生素的检出限分别为 74.0、71.0、39.0、50.0、30.0、66.0 和 50.0 µg/kg, 方法灵敏度高。SULEIMAN 等^[43]建立了一种适用于杆菌肽试验药物中有关物质的液相色谱四极杆飞行时间质谱法(liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, LC-Q-TOF-MS), 在正电喷雾电离模式下共检测到 12 种相关物质。通过对所有相关物质的质子化亲本和产物离子的分析和鉴定, 确定它们是杆菌肽共存的活性成分和降解产物。钱卓真等^[44]利用 HPLC-MS/MS 测定水产养殖环境沉积物中的多肽抗生素残留。前处理采用甲醇-柠檬酸-Na₂HPO₄ 溶液提取、乙二胺乙酸二钠络合物(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)除杂、甲基异丁基甲酮和 HLB 固相萃取柱进一步净化。粘菌素、杆菌肽和维吉尼霉素在各自浓度范围内线性良好, 该方法检出限为 2~5 µg/kg, 定量限为 4~10 µg/kg, 回收率为 79.7%~91.6%。周迎春等^[45]建立了一种利用(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)快速测定动物源性食品中万古霉素残留量的方法, 该方法最低检出限为 0.3 µg/kg, 定量限为 1.0 µg/kg; 回收率为 70.05%~102.97%, 相对标准偏差不得超过 4.65%, 有效地解决了样品基质效应大、灵敏度低等问题, 能够保证分析结果的准确性, 适用于高脂肪含量的动物源性食品中万古霉素的残留量测定。杜业刚等^[46]建立了一种超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中 8 种多肽类抗生素残留量分析方法, 采用选择反应监测(selective reactive monitoring, SRM), 外标法定量, 得出 8 种多肽抗生素方法检出限为 0.1~10.0 µg/kg, 去甲万古霉素和

万古霉素在20~1000 $\mu\text{g/L}$ 、多粘菌素B和E在40~1000 $\mu\text{g/L}$ 、杆菌肽A在10~1000 $\mu\text{g/L}$ ，杆菌肽B在6~614 $\mu\text{g/L}$ ，VGM M_1 和 S_1 在1~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内，加标回收率为61.0%~99.6%。该方法简便快速、灵敏度高、重现性良好。LC-MS/MS因灵敏度高、能进行痕量检测及准确性的特点而成为肽类化合物分析的首选方法，同时2D-LC高效液相色谱的发展也为高通量高灵敏度药物残留检测提供了更好的支撑^[47]。WANG等^[48]建立了一种灵敏度高、可靠的UPLC-MS/MS法测定鸡和猪肌肉、脂肪、肝脏和肾脏样品中VGM M_1 ，采用BEH C_{18} 液相色谱柱进行分离，采用三重四极杆质谱法对被测物进行检测，方法的线性关系良好，检出限为2~60 ng/mL，方法灵敏度高。

毛细管电泳，也称为高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)，是近年来兴起的一种分离分析方法。它以高压电场为驱动力，将毛细管用作分离的通道，是一种基于每样品之间的分布行为，或者在不同浓度下进行分离的技术^[49]。KANG等^[50]建立了多粘菌素B的毛细管区带电泳紫外检测法，使用胶束电动毛细管色谱法(micellar electrokinetic chromatographic, MEKC)测定杆菌肽，该方法的线性范围为0.05~1.00 mg/mL，定量限和检出限分别为5.0和1.2 $\mu\text{g/mL}$ 。INJAC等^[51]应用毛细管胶束电泳结合紫外检测器检测了饲料中杆菌肽锌的含量，目标分析物在215 nm紫外波长下被检测到，检出限为4.72 mg/mL，回收率为99.4%~100.6%，相对标准偏差小于1.3%，体现了这一方法分离速度快、分离效率高，操作简便、溶剂用量少等优点。但是，毛细管电泳法本身具有毛细管管径窄、进样体积小以及光程短等缺陷，导致使用紫外线(ultraviolet, UV)检测时存在较高的检测限，无法满足兽药残留的痕量检测需要。

2.4 其他方法

除了上述主要方法外，研究学者还提出或实践检验了其他多肽类抗生素残留的检测方法。如CHEN等^[52]指出微生物检测法和免疫检测法均存在灵敏度差、特异性不足等缺点，提出一种简单、高效、高灵敏的抗生素残留筛选方法——生物传感器，用于动物性食品中抗生素残留的筛选，该方法具有可移植性强、样本量小、灵敏度高、特异性好等优点。KHAN^[53]同样对生物传感器监测方法进行了研究，指出其与纳米技术的融合使其具备了对动物性食品中的不同肽类抗生素残留的灵敏、快速和现场监测优势。ZHANG等^[54]基于水溶性花二酞亚胺(perylene diimide, PDI)衍生物的超分子聚集物，建立了在100%水介质中检测多粘菌素B的方法，即PDI衍生物监测法。通过筛选PDI-1作为最有效的探针，在溶液态和固体载体中都具有快速直观检测多粘菌素B的特点。多肽类抗生素残留检测方法及其优缺点汇总表3。

3 结束语

本文对多肽类抗生素的最大残留限量标准分析与检测方法研究进展进行了综述。通过研究发现，国外诸多国家对于多肽类抗生素最大残留限量标准均作出了明确、严格的规定，尤其以日本、美国、欧盟为主要代表。我国针对维吉尼霉素、万古霉素、粘菌素等多肽类抗生素最大残留限量也做了严格规定，体现出我国在此领域中的努力和进步。对多肽类抗生素残留检测方法的研究报道的总结分析可知，微生物检测法、免疫检测法、仪器检测法是当前研究与应用较普遍的检测方法，其中，ELISA、LC-MS/MS等是当前应用最多、技术最为成熟的检测方法。此外，也有学者提出采用生物传感器、PDI衍生物监测法等新型检测方法

表3 多肽类抗生素残留检测方法及其优缺点汇总

Table 3 Polypeptide antibiotic residue detection methods and their advantages and disadvantages

检测方法类别	方法名称	优点	缺点
微生物检测法	纸片法	优点过程简单，仪器与设备简单；可筛选出大量样品	对特异性菌株筛选难度大，结果有误差
	杯碟法		
	氯化三苯基四唑显色法		
免疫检测法	放射免疫法	前处理简单；用时短；成本低；适用于大量样品检测	假阳性较高
	酶联免疫吸附法		
	荧光偏振免疫测定法		
	胶体金免疫层析方法		
仪器检测法	蛋白芯片法	分离速度快；效率高；操作自动化	不能准确进行定性分析；无法满足低残留检测的需求
	高效液相色谱法		
	液相色谱-串联质谱法		
其他方法	毛细管电泳法	强大的定性能力；高灵敏度	成本高；对环境要求高；测试速度慢
	生物传感器	分离速度快；分离效率高；操作简便；溶剂用量少	管径窄；进样体积小；光程短；紫外线检测时存在较高的检测限
其他方法	PDI衍生物监测法	简单；高效；高灵敏度	适用性窄
		快速；直观	操作复杂

尽管在各类检测方法的应用与研究上都相对丰富,但涉及到的肽类抗生素的种类还不够全面,其中,VGM、杆菌肽、万古霉素、去甲万古霉素等的检测方法研究较多,而替考拉宁、雷莫拉宁、达托霉素等的检测方法研究相对较少,因此,完善多肽类抗生素残留检测方法是未来研究的一个方面,同时,采用多种检测方法拓展对不同种类的多肽类抗生素的检测范畴也是需要继续完善的重要领域。

参考文献

- [1] YEWALE PP, AISHWARYA A, HATEKAR PA, *et al.* Molecular typing of antibiotic resistant bacteria isolated and identified as ESBL producers from polluted water reservoirs [J]. *Can J Biotechnol*, 2017, (1): 156981160.
- [2] KITTLÄ T, SCHOPPET M, CRYLE MJ. Online pyrophosphate assay for analyzing adenylation domains of nonribosomal peptide synthetases [J]. *ChemBioChem*, 2016, 17(7): 576–584.
- [3] 王玉琴, 刘华, 郝红元, 等. 固相萃取-液相色谱/质谱联用法测定猪肉中 3 种多肽类抗生素[J]. *分析实验室*, 2017, 36(1): 73–77.
WANG YQ, LIU H, HAO HY, *et al.* Analysis of 3 peptides antibiotics in pork by solid phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2017, 36(1): 73–77.
- [4] INOUE K, HATTORI Y, HINO T, *et al.* An approach to on-line electrospray mass spectrometric detection of polypeptide antibiotics of enramycin for high-speed counter-current chromatographic separation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 1154–1160.
- [5] SONG X, HUANG Q, Y ZHANG, *et al.* Rapid multiresidue analysis of authorized/banned cyclopolypeptide antibiotics in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on dispersive solid-phase extraction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 170(1): 234–242.
- [6] The Japan Food Chemical Research Foundation. Maximum residue limits (MRLs) of agricultural chemicals in foods [EB/OL]. [2021-06-25]. <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/MRLs-p> [2021-06-25].
- [7] EUR-Lex. Access to European Union law [EB/OL]. [2021-06-25]. <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html> [2021-06-25].
- [8] WETZEL C, LONNEMAN M, WU C. Polypharmacological drug actions of recently FDA approved antibiotics [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 209(13): 112931.
- [9] 王聪, 赵晓宇, 张会亮, 等. 中国与国际食品法典委员会动物食品兽药残留标准的对比分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 7164–7169.
WANG C, ZHAO XY, ZHANG HL, *et al.* Comparative analysis of residue standards of animal food and veterinary drugs between China and the International Codex Alimentarius Commission [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(19): 7164–7169.
- [10] 谢建华, 吴锦瑞, 张日俊. 细菌素的生物学特性、作用机理和应用[J]. *饲料工业*, 2009, 30(16): 1–5.
XIE JH, WU JR, ZHANG RJ. The biological characteristics, mechanism and application of bacteriocins [J]. *Feed Ind*, 2009, 30(16): 1–5.
- [11] OBEROI PR, FUKU CA, MAURYA CB, *et al.* Comparative study of two azo dyes using triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) on gamma irradiation induced film dosimeter [J]. *Nucl Instrum Methods B*, 2020, 466(1): 82–89.
- [12] RODEWALD JM. Determination of monensin in raw material, premix and animal feeds by liquid chromatograph with correlation to microbiological assay [J]. *J AOAC Int*, 1992, 75(2): 821–828.
- [13] PIKKEMAAT MG. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(4): 893–905.
- [14] AZYRKINA IM, GARKAVENKO TA, KOZYTSKA TG, *et al.* Determination of bacitracin groups residue in poultry products by microbiological method [J]. 2020, 8(22): 79–83.
- [15] 张开礼, 李成, 李玉珍, 等. HPLC 法与微生物法测定人血浆中去甲万古霉素浓度的差异比较[J]. *中国药房*, 2016, (26): 3655–3657.
ZHANG KL, LI C, LI YZ, *et al.* Comparison of the difference between HPLC method and microbiological method for determination of norvancomycin concentration in human plasma [J]. *China Pharm*, 2016, (26): 3655–3657.
- [16] TANG W, YUAN H, ZHANG H, *et al.* An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method [J]. *Food Control*, 2015, 50(1): 413–422.
- [17] RODBARD D, LENOX RH, WRAY HL, *et al.* Statistical characterization of the random errors in the radioimmunoassay dose-response variable [J]. *Clin Chem*, 2019, 22(3): 350–358.
- [18] LABEUR C, MICHIELS G, BURY J, *et al.* Lipoprotein (a) quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies [J]. *Clin Chem*, 2019, 35(7): 1380–1384.
- [19] BURY J, VERCAEMST R, ROSSENEU M, *et al.* Apolipoprotein E quantified by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Chem*, 2020, 32(2): 265–270.
- [20] PATEY AL, MATTHEW S, ROGER W, *et al.* Determination of aflatoxin concentrations in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Study of three commercial ELISA kits [J]. *J Ass Off Anal Chem*, 2020, 72(6): 965–969.
- [21] ALHABBAB, YOUSEF R. Enzyme immunoassay (EIAs) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. 2018, 1(12): 83–95.
- [22] TEEMU K, VIRVE H, EEVACHRISTINE B, *et al.* Generic lanthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(11): 3091–3098.
- [23] 阿说阿沙, 邹文佳, 付婧洁, 等. 荧光免疫分析法在牛奶抗生素残留检测中的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(9): 62–64.
A SAIS, ZOU WJ, FU JJ, *et al.* Research progress of fluorescence immunoassay in the detection of antibiotic residues in milk [J]. *Chin J Vet Med*, 2019, 55(9): 62–64.
- [24] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, *et al.* Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices [J]. *Analyst*, 2001, 127(1): 98–103.
- [25] 何方洋, 万宇平, 崔廷婷, 等. 谷物中玉米赤霉烯酮残留的胶体金免疫层析法测定[J]. *食品工业*, 2019, 40(5): 308–311.
HE FY, WAN YP, CUI TT, *et al.* Determination of zearalenone residues in cereals by colloidal gold immunochromatography [J]. *Food Ind*, 2019, 40(5): 308–311.
- [26] 李周敏, 李心爱, 姚开安, 等. 可视化蛋白芯片法同时检测牛奶中喹诺酮类抗生素残留的含量[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(6): 1139–1147.
LI ZM, LI XAI, YAO KAN, *et al.* Simultaneous detection of quinolone antibiotic residues in milk using visual protein chip method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(6): 1139–1147.
- [27] YOOU MS, CHO S, CHOI Y. Molecular Docking-assisted protein chip screening of inhibitors for Bcl-2 family protein-protein interaction to discover anticancer agents by fragment-based approach [J]. *BioChip J*, 2019, 13(3): 260–268.
- [28] KLOTH K, RYEJOHNSEN M, DIDIER A, *et al.* A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw

- milk [J]. *Analyst*, 2009, 134(7): 1433–1439.
- [29] MARIANA K, TAURO LB, MOREIRA P, *et al.* Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection [J]. *Virology*, 2018, 15(1): 108.
- [30] MATSUMOTO M, TSUNEMATSU K, TSUJ IA, *et al.* Enzyme immunoassay using peroxidase as a label and a dip-strip test for monitoring residual bacitracin in chicken plasma [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 346(1): 207–213.
- [31] WILLIAMS C, PATEL I, WILLER J, *et al.* Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of zinc bacitracin in animal feeding stuffs [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066 (122): 1–7.
- [32] KONG DZ, XIE ZJ, LIU LQ, *et al.* Development of IC-ELISA and lateral-flow immune chromatographic assay strip for the detection of vancomycin in raw milk and animal feed [J]. *Food Agric Immunol*, 2017, 28(3): 414–426.
- [33] MCNAMEE SE, CUNNINGHAM R, ELLIOTT CT. Simultaneous immunochemical detection of four banned antibiotic growth promoters in raw and cooked poultry tissue [J]. *Food Addit Contam*, 2013, 30(7): 1270–1278.
- [34] SITU C, ELLIOTT CT. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1): 89–96.
- [35] LI Y, LIU L, SONG S, *et al.* A Rapid and semi-quantitative gold nanoparticles based strip sensor for polymyxin B sulfate residues [J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(3): 29510541.
- [36] DINA F, GUILLERMO AP, IGA LG, *et al.* A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18(1): 367–372.
- [37] 黄进, 宋青, 张华峰, 等. 高效液相色谱法和荧光偏振免疫法检测血清万古霉素浓度的比较[J]. *空军医学杂志*, 2013, 29(4): 209–211.
- HUANG J, SONG Q, ZHANG HF, *et al.* High performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay were used to detect the concentration of vancomycin [J]. *Air Force Med J*, 2013, 29(4): 209–211.
- [38] 邹国芳, 钱文强, 李巍, 等. 高效液相色谱法和荧光偏振免疫法测定万古霉素血清浓度的比较[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(1): 68–71.
- ZOU GF, QIAN WJ, LI W, *et al.* The comparison of serum concentrations of vancomycin was determined by HPLC and fluorescence polarization immunoassay [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2015, 35(1): 68–71.
- [39] 翟卫红, 沈建忠, 江海洋. 猪小肠组织中那西肽残留高效液相色谱检测方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(2): 70–71.
- ZHAI WH, SHEN JZ, JIANG HY. Establishment of high performance liquid chromatography method for the determination of nosiheptide residues in pig small intestine tissues [J]. *Chin J Vet Med*, 2011, 47(2): 70–71.
- [40] 李晓翠, 曹国颖, 刘茜, 等. 高效液相色谱法测定多粘菌素 B₁ 在大鼠体内的浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2012, 28(3): 200–202.
- LI XC, CAO GY, LIU Q, *et al.* Determination of the concentration of polymyxin B₁ in rats by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2012, 28(3): 200–202.
- [41] REHM S, RENTSCH KM. LC-MS/MS method for nine different antibiotics [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 511(3): 360–367.
- [42] BOISON JO, LEE S, MATUS J. A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(14): 1–14.
- [43] SULEIMAN SA, SONG F, SU M, *et al.* Analysis of bacitracin and its related substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Anal*, 2017, 7(1): 48–55.
- [44] 钱卓真, 罗冬莲, 罗方方, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定养殖环境沉积物中多肽类抗生素残留量[J]. *分析化学*, 2016, 44(6): 870–875.
- QIAN ZZ, LUO DL, LUO FF, *et al.* Determination of peptide antibiotic residues in sediments of breeding environment by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(6): 870–875.
- [45] 周迎春, 刘少博, 韩海涛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定动物源食品中万古霉素残留量[J]. *肉类研究*, 2018, 32(4): 56–61.
- ZHOU YC, LIU SB, HAN HT, *et al.* Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rapid determination of vancomycin residues in food of animal origin [J]. *Meat Res*, 2018, 32(4): 56–61.
- [46] 杜业刚, 阳洪波, 古丽君, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定动物源性食品中 8 种多肽类抗生素[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(8): 85–91.
- DU YG, YANG HB, GU LJ, *et al.* Simultaneous determination of 8 peptide antibiotics in animal-derived food by UPLC-MS/MS [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2016, 37(8): 85–91.
- [47] SHENG YH, ZHO BT. High-throughput determination of vancomycin in human plasma by a cost-effective system of two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1499(1): 48–56.
- [48] WANG X, WANG M, ZHANG K, *et al.* Determination of virginiamycin M₁ residue in tissues of swine and chicken by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 250(1): 127–133.
- [49] RESTAINO OF, DE ROSA M, SCHIRALDI C. High performance capillary electrophoresis to determine intact keratan sulfate and hyaluronic acid in animal origin chondroitin sulfate samples and food supplements [J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(20): 1740–1748.
- [50] KANG JW, REYMAEKER GD, SCHEPDAEL AV, *et al.* Analysis of bacitracin by micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelle in acidic solution [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(7): 1356–1362.
- [51] INJAC R, KAC J, MLINARIC A, *et al.* Micellar electrokinetic capillary chromatography determination of zinc bacitracin and nystatin in animal feed [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(9): 1288–1293.
- [52] CHEN T, CHENG G, AHMED S, *et al.* New methodologies in screening of antibiotic residues in animal-derived foods: Biosensors [J]. *Talanta*, 2017, 175(1): 435–442.
- [53] KHAN M. Recent biosensors for detection of antibiotics in animal derived food [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2020, 10(1): 1080–1083.
- [54] ZHANG L, ZHAO Y, WU Y, *et al.* An efficient approach for rapid detection of polymyxins B based on the optically active supramolecular aggregates of water-soluble perylene diimide [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2020, 321(1): 128594.

(责任编辑: 李磅礴 郑丽)

作者简介



顾 艳, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品药品检验检测。
E-mail: 17614013@qq.com



杨 军, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: Yj711003@sina.com