



【应用技术】

动物源性食品的氯霉素 ELISA 检测及分析

孙 俐, 郑文杰

(天津出入境检验检疫局, 天津 300201)

摘要: 采用酶联免疫法检测了 730 例天津口岸进出口肉制品、水产品、乳制品和蜂蜜等几种动物源性食品中的氯霉素含量, 对阳性结果经液相色谱-质谱联用 EEC Cy3.6 confirming method 进行确证, 分析了其残留现状, 并对英国 RANDOX 公司氯霉素检测试剂盒从检测范围、B/B₀50%抑制浓度、板内变异、板间变异、样品添加试验、实际样品检测、稳定性等方面各项指标进行试验。结果表明, 试剂盒的检测低限为 0.1 ng/mL, 线性范围为 0.05~4.7 ng/mL, B/B₀50%抑制浓度为 0.4 ng/mL, 样品加标回收率为 80.5%~110%, 板内变异系数小于 5%, 板间变异系数小于 10%, 试剂盒稳定性好。

关键词: 氯霉素; 酶联免疫法; 兽药残留

中图分类号: S859.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-6510 (2007) 02-0076-04

Analysis for the ELISA Detection of Chloramphenicol Residues in Animal Food

SUN Li, ZHENG Wen-jie

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300201, China)

Abstract: Studied on screening, determination and confirmation of chloramphenicol (CAP) in four kinds of matrices, including meat product, fishery products, milk products, honey etc, by enzyme-linked immunoassay (ELISA), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS²) have been carried out. The following parameters of kits were determined: detection capability, specificity, accuracy, applicability and stability. Data obtained show that the limit of detection (LOD) is 0.1ng/mL. The linear plots are obtained between 0.05 and 4.7 ng/mL. The inhibited concentration (B/B₀50%) is 0.4ng/mL. The overall recoveries are between 80.5% and 110%; and the intra- and inter-precision values are within 5% and 10%. The stability of kit is good.

Keywords: chloramphenicol; ELISA; veterinary residue

氯霉素 (Chloramphenicol) 又称氯胺苯醇, 简称 CAP, 是一种广谱抗生素, 被普遍应用于家畜禽的传染病预防及治疗。但氯霉素存在严重的副作用, 能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症等疾病。氯霉素在动物组织中的残留不仅会对动物和人体产生直接危害, 而且低浓度药物残留会诱发致病菌的耐药性, 对人类的健康构成潜在威胁。为此, 欧美等发达国家相继禁止或严格限制使用氯霉素。目前世界各国不断降低氯霉素的最高残留检测限量, 欧盟规定氯霉素的最高残留限量 (MRL) 0.1 μg/kg^[1], 美国为 0.3 μg/kg, 加拿大为 0.1 μg/kg, 日本为 0.5 μg/kg, 韩国则规定动物组织中不得检出氯霉素, 我国也规定氯霉素在所有动物性产品中不得检出。

目前用于氯霉素残留分析方法很多, 主要是色谱法 (气质联用、液质联用)、放射免疫法和酶联免疫测定法。色谱法灵敏度高, 结果可靠, 但样品前处理复杂, 仪器化程度高, 分析速度慢, 难以进行大量样品的测定, 通常作为确证方法使用。放射免疫法灵敏度高, 但由于存在同位素半衰期短, 放射性污染及需要复杂仪器设备等缺点, 使其应用范围受限。酶联免疫测定法具有操作程序规范化、简单化, 特异性强、灵敏度高、样品预处理简单、适用范围宽、检测速度快等优点, 它能在短短的几小时内检测几十个到上百个样品, 且不需要复杂的仪器设备, 因此, 酶联免疫测定 (ELISA)^[2,3] 法非常适合对大量动物源性食品中氯霉素残留进行筛选检测。本文使用英国 RANDOX 公司 ELISA 试剂

收稿日期: 2006-11-14; 修回日期: 2007-03-23

作者简介: 孙 俐 (1975—), 女, 天津人, 工程师, 硕士。

盒对 730 例肉制品、水产品、乳制品、蜂蜜等各类动物源性食品中氯霉素残留检测结果进行了分析,其中阳性结果经液质联用 EEC Cy3.6 confirming method 进行确证,并对该试剂盒的各项指标进行了评价。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器与设备

DNA expert 型酶标仪(450 nm 滤光片),奥地利 TECAN 公司;均质器,德国;TDL-5000B 型低温冷冻多管离心机,上海安亭科学仪器厂;Mettler 602 N 型电子天平,涡旋式振荡器 MS1 Minishaker,马来西亚;可调微量移液器,单道 5 ~ 50 μL 、100 ~ 1 000 μL ,8 道 50 ~ 300 μL ,日本立洋公司。

1.1.2 试剂

乙酸乙酯、异辛烷、氯仿均为分析纯;氯霉素对照品,含量 994 IU/mg,批号 03039613,中国兽医药品监察所。

1.1.3 氯霉素试剂盒

英国 RANDOX 公司产品。

1.1.4 样品来源

样品均来源于天津口岸进出口动物源性食品。

1.1.5 阴性样品

组织样品为市售牛肉,鱼肉,经 LC-MS/MS 检测不含氯霉素。

1.2 标准品配制

1.2.1 氯霉素标准储备液(1 mg/mL)

准确称取氯霉素对照品 0.1 g,用无水甲醇稀释,使成 1 mg/mL 的溶液, - 18 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 氯霉素标准液 I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

准确量取 0.50 mL 标准储备液于 50 mL 容量瓶中,加无水甲醇稀释至刻度,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 氯霉素标准液 II (100 ng/mL)

准确量取 0.50 mL 标准液 I 于 50 mL 容量瓶中,加无水甲醇稀释至刻度,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 氯霉素标准液 III (10 ng/mL)

准确量取 5 mL 标准液 I 于 50 mL 容量瓶中,加无水甲醇稀释至刻度,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 样品制备

1.3.1 样品预处理

(1) 肉制品 剔除牛肉中的脂肪组织、筋膜部分,于匀浆机中绞碎并混匀,18 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

(2) 水产品 于匀浆机中绞碎并混匀,18 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

1.3.2 添加样品制备

(1) 牛肉 0.3 ng/g: 准确吸取 90.0 μL 氯霉素标准液 III, 添加到 3.0 g 匀质的阴性牛肉中,混匀。0.5 ng/g: 准确吸取 150.0 μL 氯霉素标准液 III, 添加到 3.0 g 匀质的阴性牛肉中,混匀。

(2) 鱼肉 0.3 ng/g: 准确吸取 90.0 μL 氯霉素标准液 III, 添加到 3.0 g 匀质的阴性鱼肉中,混匀。0.5 ng/g: 准确吸取 150.0 μL 氯霉素标准液 III, 添加到 3.0 g 匀质的阴性鱼肉中,混匀。

1.3.3 提取

称取 3.0 g 匀质组织于离心管中,加入 6 mL 乙酸乙酯,匀浆 1 min。室温 2 000 r/min 离心 15 min,吸取 4 mL 上清液,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 干燥。用 2 mL 异辛烷/氯仿混合物(2 : 3)溶解干燥的残留物,涡旋振荡 1 min,加 0.5 mL 已稀释的样品稀释剂,涡旋振荡 2 min, 25 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 2 000 r/min 离心 15 min,取 50 μL 上层水相进行分析。

1.4 检测方法

根据试剂盒提供的方法操作。先分别吸取氯霉素标准溶液、样品溶液至各自的微孔,再加入已稀释的酶标记抗原至每个微孔,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。倒掉微孔中的液体,用洗涤缓冲液洗板操作 6 次。加入发色剂至每一微孔中,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。加入终止液至每个微孔中,充分混匀,在 30 min 内,测量并记录每个微孔溶液 450 nm 波长的吸光度值。

1.5 方法的灵敏度

相同条件下,按照 1.4 中方法重复操作试剂盒 15 次,绘制各自的标准曲线,计算出 B/B₀ 为 50% 时所对应的药物浓度的平均值^[4],进行比较。

1.6 板内与板间的变异系数

1.6.1 板内变异系数

标准曲线中每一浓度的标准液在同一酶联板中重复添加 10 个孔,按 1.4 中方法操作,测定吸光度值,并计算变异系数。

1.6.2 板间变异系数

同一批次 3 块酶联板上同时作标准曲线,按 1.4 中方法操作,分别测定各浓度标准溶液的吸光度值,并计算变异系数。

1.7 回收率的计算

用 1.3.3 中方法对牛肉,鱼肉阴性添加样品进行提取,用 1.4 中方法进行测定,求出氯霉素含量的平均值,并计算回收率。

2 结 果

2.1 氯霉素检测结果

检测样品共 730 份,检验各类产品药物残留限量、

阳性数、阳性率及检测方法最低检测限见表 1, 各类产品阳性分布情况如图 1。

表 1 氯霉素检测结果

Tab.1 Experimental results of chloramphenicol

种类	份数	阳性数	阳性率/%	检测限/ ng·mL ⁻¹	最高允许 残留限量
肉制品	161	30	18.6	0.1	不得检出 ND
肠衣	59	17	28.8	0.1	不得检出 ND
水产品	418	27	6.4	0.1	不得检出 ND
乳制品	81	0	0	0.1	不得检出 ND
蜂蜜	11	1	9.1	0.1	不得检出 ND

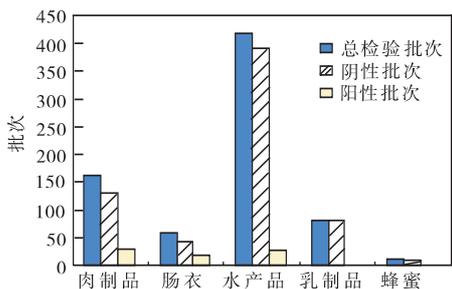


图 1 各类产品阳性分布情况

Fig.1 Distribution of all kinds of positive products distribution

检出肉制品 30 批中 CAP 含量为 $0.446 \pm 0.529 \mu\text{g}/\text{kg}$, 肠衣 17 批中 CAP 含量为 $0.298 \pm 0.186 \mu\text{g}/\text{kg}$, 水产品 27 批中 CAP 含量为 $0.187 \pm 0.164 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

使用 EEC Cy3.6 conforming method 进行确证, 检测结果阳性数分别为肉制品 29 批、肠衣 14 批、水产品 25 批、蜂蜜 1 批, 与酶联方法检测结果的符合率分别为 96%、82%、93%、100%。

2.2 试剂盒性能指标

2.2.1 氯霉素标准曲线

氯霉素标准曲线见图 2, 其回归方程式:

$Y = -0.2694 \log X + 0.6313$, 其中 $r = 0.993$, 氯霉素检测在 $0.5 \sim 4.7 \text{ ng}/\text{mL}$ 范围内显示出良好的相关性。

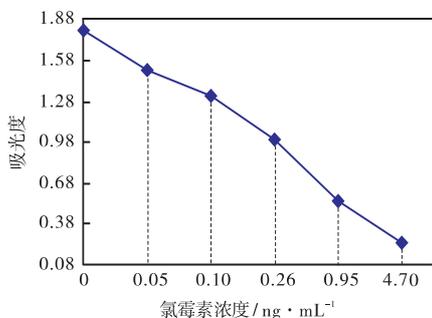


图 2 氯霉素标准曲线

Fig.2 Chloramphenicol standard curve

2.2.2 B/B₀50%抑制浓度

经 15 次试验, 绘制各自的标准曲线, 计算出百分

吸光度值 B/B_0 为 50% 时所对应的氯霉素浓度值在 $0.37 \sim 0.44 \text{ ng}/\text{mL}$ 之间, 平均值为 $0.40 \text{ ng}/\text{mL}$, 变异系数为 10.3%。

2.2.3 试剂盒板内与板间变异系数比较

试剂盒板内与板间变异系数比较结果见表 2. 试剂盒板内变异系数在 2.3% ~ 4.9% 之间, 板间变异系数在 1.2% ~ 6.8% 之间. 说明本法重复性好。

表 2 板内与板间变异系数比较

Tab.2 Compare of the intra- and inter-values values values precision

氯霉素浓度/ ng · mL ⁻¹	板内 (n=10)		板间 (n=3)	
	百分吸 光度/%	变异系数/ %	百分吸光 度/%	变异系数/ %
0	100.0	2.3	100.0	6.8
0.05	93.6	2.8	94.7	3.2
0.10	87.2	3.0	88.0	3.0
0.26	68.1	2.5	68.3	2.5
0.95	41.7	5.0	40.7	2.1
4.70	18.3	4.9	17.7	1.2

2.2.4 回收率实验

按 1.3.3 方法对牛肉、鱼肉阴性添加样品进行提取, 用 1.4 方法进行测定, 求出牛肉、鱼肉中氯霉素含量的平均值, 并计算回收率. 结果如表 3。

表 3 回收率与精密度

Tab.3 Recovery and precision values

样品	添加量/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	平均回收率/%	相对标准偏差/%
牛肉	0.3	94.0	11.3
	0.5	90.0	8.2
鱼肉	0.3	110.0	22.5
	0.5	80.5	18.7

2.2.5 试剂盒稳定性

选定 2 批次的试剂盒, 进行稳定性试验. 实验条件为 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱存放, 每隔 1.5 个月测定标准样品的吸光度, 每次取 3 份, 测 3 个值, 取平均值. 如零标准吸光度值小于 0.6 可视为失效. 实验结果表明有效期在 13~13.5 个月, 故在 12 个月的有效期内试剂质量有保证。

3 讨论

3.1 检验结果分析

检测样品总数为 730 份, 阳性结果数为 75 份. 其中肉制品 30 份, 肠衣 17 份, 水产品 27 份, 蜂蜜 1 份. 阳性率分别为 18.6%、28.8%、6.4%、9.1%. 检出的肉制品中 CAP 含量为 $(0.446 \pm 0.529) \mu\text{g}/\text{kg}$, 肠衣中 CAP

含量为 $(0.298 \pm 0.186) \mu\text{g}/\text{kg}$, 水产品中 CAP 含量为 $(0.187 \pm 0.164) \mu\text{g}/\text{kg}$. 其中肉制品和肠衣类产品中阳性率较高, 说明饲养过程中使用了这些药物, 或虽已停止生产和使用氯霉素药, 但由于它在人体、动物肌体及自然生态环境中蓄积的时间较长, 而肠衣制品经过加工可能导致氯霉素浓缩.

经 LC-MS/MS 法对酶联免疫检测结果进行确证, 结果进行对比可知, 符合率分别为肉制品 96%, 肠衣 82%, 水产品 93%, 蜂蜜 100%. 水产品 and 肉制品类结果符合性良好, 肠衣类欠佳. 可能由于不同样品基质对检测结果会产生不同影响, 而肠衣类产品通常经过盐渍, 或冷冻处理, 加工引入的盐离子经前处理不能完全清除, 可能对生物反应体系产生影响, 导致了假阳性结果的产生.

3.2 试剂盒性能指标分析

本文参照食品法典委员会关于残留分析方法评价指标和试剂盒评价参数, 对英国 RANDOX 公司 ELISA 试剂盒从灵敏度, 板内、板间变异系数, 回收率

和稳定性等方面进行了分析. 试剂盒的检测范围 $0.10 \sim 4.7 \text{ ng/mL}$, B/B₀50%抑制浓度平均值为 0.40 ng/mL , 变异系数 10.3%. 该试剂盒的板内变异系数小于 5%, 板间变异系数小于 10%. 样品添加回收率为 $80.5\% \sim 110\%$, 符合兽残检测有关回收率的要求. 试剂盒稳定性好, 12 个月的有效期内试剂质量有保证, 该 ELISA 试剂盒具有特异性强、灵敏度高的特点, 适合对动物源性食品中氯霉素残留进行大量快速筛选检测.

参 考 文 献:

- [1] 刘智宏. 酶标免疫测定法 (ELA) 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—48.
- [2] 胡顶飞, 沈建忠. 氯霉素类抗生素的残留分析[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(5): 55—57
- [3] T L Li, Y J Chung-Wang, Y C Shih. Determination and confirmation of chloramphenicol residues in swine muscle and liver[J]. J of Food Sci, 2002, 67(1): 21—28.
- [4] 叶 妮, 刘智宏, 郭文林, 等. 国内外克伦特罗检测试剂盒评价[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(10): 25—28.

(上接第 75 页)

水平最佳. $m_{25} > m_{35} > m_{15}$ 说明占空比的三个水平中, 第二水平最佳. 从而确定最优工艺条件: 乙醇体积分数 40%、提取时间 15 min、提取功率 300 W、料液比 1:60、占空比 50%. 在最优条件下迷迭香酸提取得率为 1.146%.

3 结 论

超声波辅助提取迷迭香酸的最优工艺条件: 提取溶剂为 40% 乙醇溶液, 料液比 1:60, 功率 300 W, 提取时间 15 min, 占空比 50%. 超声波提取法在常温下即可进行, 具有明显的快速、高效的特点.

参 考 文 献:

- [1] 张燕平, 王维华, 董贵玲. 紫苏中天然抗氧化物质的提取及增效作用的研究[J]. 西部粮油科技, 2000, 25(2): 36—39.
- [2] 黄炼栋, 胡之璧, 刘 涤. 迷迭香酸生产的生物技术研

- 究[J]. 国外医药植物药分册, 1997, 12(3): 104—109.
- [3] Makino T, Ono T, Matsuyama K, et al. Suppressive effects of *Perilla frutescens* on IgA nephropathy in HIGA mice[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(3): 484—490.
- [4] Huang ZS, Zhang JT. Antioxidant properties of three water-solubility components from *salvia miltiorrhiza*[J]. Acta Pharm Sin, 1992, 27: 96—100.
- [5] 邹正午, 徐理纳, 田金英. 迷迭香酸抗血栓和血小板聚集作用[J]. 药学学报, 1993, 28(4): 241—245.
- [6] Liu Y, Ji ZZ. Progress in the pharmacological research on rosmarinic acid[J]. World Phar Plant Drug Fascicule, 1993, 8: 248—251.
- [7] Zayas J F. Effect of ultrasonic treatment on the extraction of chymosin [J]. J Dairy Sci, 1986, 69: 1767—1775.
- [8] Kim SM, Zayas J F. Effects of ultrasound treatment on the properties of chymosin [J]. J Food Sci, 1991, 56(4): 926—930.
- [9] 李荣贵, 腾大为, 杜贵彩, 等. 紫苏愈伤组织迷迭香酸的纯化及抗菌活性研究[J]. 微生物通报, 2000, 27(5): 324—327.