

高效液相色谱法测定畜、禽肌肉中氯霉素残留量^{*}

方从容¹ 蒋定国¹ 杨大进¹ 文玉雪² 王玉莲³ 王竹天¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;2. 珲春市卫生防疫站,吉林 珲春 133300;3. 泰安市卫生防疫站,山东 泰安 271000)

氯霉素(Chloramphenicol,简称 CAP)是广谱的抗生素,它曾被用于家畜和家禽疾病的预防和治疗。如果人体长期接触氯霉素,可引起再生障碍性贫血症。因此美国禁止在家禽饲养中使用氯霉素,^[1]韩国规定了在牛肉、猪肉和鸡肉中不得检出,^[2]欧盟(EEC)规定在鸡蛋和乳牛中禁止使用氯霉素,在鸡肉、肝、肾中的氯霉素残留量不得超过 0.01 mg/kg。^[2]我国还没有制定氯霉素残留量的卫生标准。由于氯霉素治疗效果好且价格低廉,在我国普遍用于治疗 and 预防家畜、家禽疾病。为了对动物源肉品中的氯霉素进行监控,必须建立高灵敏、高选择性的氯霉素测定方法。

氯霉素的测定方法有微生物法、放射免疫法、气相色谱-质谱法和液相色谱法等多种方法。微生物法选择性低,放射免疫法和气-质谱法,操作方法复杂费时,所需试剂昂贵。液相色谱法具有精确可靠、灵敏度高等优点。近年来,在国外学者报道的关于用色谱法测定氯霉素残留的方法中,前处理的净化步骤相对较多,因而回收率有些偏低;^[1,4-7]国内学者对前处理技术加以改进,回收率有所提高,方法的检测限为 7.3 μg/kg,方法平均回收率为 92.5%,但样品品种单一。^[8]

我们在参考国内外检测方法的基础上,建立了用液相色谱法测定禽和畜肌肉中氯霉素残留量方法,方法简便,灵敏度高,定量准确且适合各种动物肌肉组织的分析,方法的检测限为 1.7 μg/kg,平均回收率为 84.7%~98.5%,测定相对标准偏差为 4.9%~8.4%。

1 材料与方 法

1.1 仪器 Waer's 510 高效液相色谱仪(附 481 型紫外检测器)。

KS-500D 超声波清洗器,宁波科生仪器厂。

LD4-2 离心机,北京医用离心机厂。

461 型旋转蒸发器,宁波科生仪器厂。

XW-80A 旋涡式混合器,上海医科大学仪器厂。

1.2 试剂

一般试剂 乙酸乙酯(分析纯)。甲醇(保证试剂)。正己烷(分析纯)。高氯酸溶液(保证试剂)。无水硫酸钠(分析纯)。

氯霉素标准品(sigma 公司,纯度 99.99%)。

氯霉素标准储备溶液 称取 0.010 g 氯霉素置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,此溶液浓度 1 mg/mL,置于冰箱冷藏室保存。

氯霉素标准工作液 准确吸取 0.5 mL 储备液于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,此溶液浓度 10 μg/mL,置于冰箱冷藏室保存。

1.3 液相色谱测试条件

色谱柱 Hypersil C₁₈ 25 cm × 4.6 mm, 5 μm; 预柱 Guard-pak C₁₈; 流动相 甲醇 + 水 = 40 + 60; 流速 1.0 mL/min 检测波长 278 nm; 柱温 室温; 进样量 20 μL。

1.4 氯霉素校正曲线的制备

准确量取标准工作溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中用 0.5 mol/L 高氯酸溶液定容,得到 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μg/mL 的标准溶液系列,在上述色谱条件下进行 HPLC 测定,其相关系数 $r = 0.9994$, $y = 46683x + 1334$ 。

1.5 操作步骤

1.5.1 试样处理 称取 20 g 剁碎的试样,置于 100 mL 三角瓶中,加入 40 mL 乙酸乙酯,轻摇,超声波提取 30 min,过滤,残渣用乙酸乙酯洗涤,再加入 20 mL 乙酸乙酯于超声波中提取 15 min,过滤,残渣再加入 20 mL 乙酸乙酯于超声波中提取 15 min,过滤。全部滤液转移到浓缩瓶中,60 °C 水浴旋转蒸发器上浓缩至干。准确加入 1.0 mL 0.5 mol/L 高氯酸溶液洗涤浓缩瓶中残留物,再加入 1.0 mL 正己烷振摇 1 min,将全部溶液转移置 10 mL 试管中,静置分层,弃去正己烷层,再加入 2.0 mL 正己烷分 2 次提取脂肪,高氯酸溶液过 0.45 μm 滤膜,滤液供 HPLC 测定。

^{*} 科技部社会公益研究专项基金项目

1.5.2 色谱分析 量取 20 μL 标准溶液和试样溶液注入色谱仪中,以保留时间定性以试样峰高或峰面积与标准比较定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

文献报道多用 μ Bondapak C_{18} ^[4,8] 做分析柱,根据现有设备条件,我们选用 Hypsersil C_{18} 为分析柱。文献报道的流动相甲醇 + 水 = 35 + 65,分析鸡、鸭、牛、猪、羊等肌肉组织中的氯霉素残留量,试样基质与氯霉素能很好地分离,但保留时间稍长。因此我们改变流动相比率为甲醇 + 水 = 40 + 60,缩短了分析时间 2 min,11 min 内就可完成分析工作,试样基质能与氯霉素完全分离。

2.2 前处理方法的选择

2.2.1 提取方式的选择 采用不同的提取方式作 6 次加标回收实验,结果见表 1。

表 1 提取方式对回收率的影响

提取方式	提取时间 min	6 次的平均回收率 %
超声波提取	30、15、15	95.8
振荡提取	30、15、15	93.0

试验结果表明 2 种提取方式的回收率差异无显著性,但采用振荡法,振荡时提取溶剂易流出,影响结果的准确性,而超声波提取法操作简便,因此我们选择超声波提取方式。

2.2.2 提取液量的选择

在国内外文献报道中,^[5,8]为了能快速检测试样中的氯霉素残留,多采用量取部分提取液净化的方式。但考虑氯霉素在我国和部分国家禁止使用,在肌肉中残留量较低,为使肌肉中的氯霉素更易被检出,我们采用收集全部提取液而不是量取部分提取液净化的方式。

2.2.3 提取溶剂与净化条件的选择

乙酸乙酯作为提取溶剂,既能有效提取氯霉素,又能减少试样中蛋白质等水溶性杂质被萃取到溶剂中,超声波提取 3 次,基本上能将试样中的氯霉素完全提取出来。氯霉素可溶解于高氯酸溶液和水溶液中,但使用高氯酸溶液能有效地净化残留物,减少对氯霉素的干扰,因此用高氯酸溶液溶解残留物。

2.3 方法的回收率和相对标准偏差

根据试样的测定步骤,以空白鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉、羊肉作 2 个浓度加标回收实验,每个浓度作 6 个平行样,低加标量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 86.6%,高加标量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 96.6%。回收率结果满足食品分析的要求。

对本方法精密度进行试验,试验结果表明该方法的精密度较好,含 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP 测定的平均相对偏差为 5.6%,含 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP 测定的平均相对偏差为 6.0%。

表 2 方法的准确度和精密度

试样	加标量 $\mu\text{g}/\text{kg}$	回收率	平均回收率	%	
				RSD	
鸡肉	20	80.3、83.4、85.8、87.6、93.4、89.8	86.7	5.4	
	100	103.91.4、90.8、107.92.7、86.2	95.2	8.4	
猪肉	20	81.9、88.2、93.6、85.4、78.2、87.1	85.7	6.2	
	100	105.101.92.6、93.8、96.1、94.8	97.2	4.9	
羊肉	20	80.3、88.9、92.4、94.7、90.4、87.1	89.0	5.6	
	100	91.6、96.6、108.102.95.3、97.4	98.5	5.8	
鸭肉	20	84.6、78.9、84.2、92.0、85.7、82.9	84.7	5.0	
	100	95.1、93.4、107.98.0、90.7、97.3	96.9	5.8	
牛肉	20	80.5、83.4、88.9、84.1、94.6、90.2	87.0	6.0	
	100	88.4、98.1、92.6、94.3、102.95.5	95.2	4.9	

2.4 方法的适用性

为了考察本方法的适用性,对市场上的猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等样品进行了检测,共计 67 份。测定结果见表 3。

表 3 畜、禽肌肉中氯霉素残留量测定结果

试样种类	检测份数	未检出数	检出数	份	
				氯霉素含量 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
猪肉	36	35	1	8.0	
鸡肉	21	21	0	<1.7	
羊肉	4	4	0	<1.7	
牛肉	6	5	1	3.0	

注:以上阳性试样均未超过欧盟(EEC)的限量标准。^[2]

参考文献:

- [1] Bories, Peleran, Wal. Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues[J]. J Assoc off Anal Chem, 1983, 66 (6):1521—1526.
- [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, 1982—1014.
- [3] 蒋定国,杨大进. 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(2): 44—47.
- [4] Keukens Beek Aerts. 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.
- [5] Haagsma, Schreuder, Rensen. 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.

- [6] Tjaden, Stegehuis. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques[J]. Analyst, 1988, 113:171—174.
- [7] Nagata, Saeki. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of ani-

mals and cultured fish by liquid chromatography[J]. J liquid chromatography, 1992, 15(12):2045—2056.

- [8] 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.

[收稿日期:2002-07-26]

中图分类号:R15;O675.7⁺2;S816.73 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2002)06-0017-03

一起豆瓣酱引起的肉毒中毒及其实验诊断

张雪平 薛峰 王荫椿

(兰州生物制品研究所,甘肃兰州 730046)

新疆地区历来是我国肉毒中毒发病最多的地区,尤以新疆居多。^[1]究其原因是(1)北疆土壤中肉毒梭菌芽胞污染率高。(2)北疆汉族居民较多,他们大多有家制发酵豆制品的传统习惯,常因食用含毒的发酵豆制品而致中毒。新疆地区肉毒中毒多发生在冬春季节(12月、1、2、3、4月份),这个时期缺少蔬菜,常以家制豆豉、臭豆腐佐餐,中毒机会较多。

最近新疆吐鲁番地区发生的一起家庭式肉毒中毒,全家8口中有5人吃了自制发酵豆瓣酱而中毒,尤以父母亲为重,当地疑为A型肉毒中毒,但因无该型抗毒血清而于发病后8天入住甘肃省人民医院救治。我们协助做了流行病学调查和实验诊断,从中毒食品中检测出B型肉毒毒素,并分离到一株B型肉毒梭菌,编号为B-020115,证实此起中毒为B型肉毒中毒。

1 流行病学调查

1.1 豆瓣酱的制作过程 1月2日家庭主妇朱××将本地农场产的黄豆淘净,煮烂(约煮2h)后,倒入缸中,用塑料袋封口,置于火墙上焖一周。一周后打开用筷子挑一挑,见有丝状物出现,味奇臭,即加入冷盐水、茴香、辣椒等调味品,第二天开始食用。

1.2 进食及发病情况 2002年1月10日5人开始食用自制豆瓣酱,夫妇2人每天吃1碗,混在稀饭里吃,并送给二儿子夫妇及大儿子食用,食量不等。1月15日5人先后开始发病,主要症状是全身无力,视力模糊,吞咽困难。小儿子一家离父母亲较远,未食用,均未发病。

1.3 临床症状 全身无力、视力模糊、吞咽困难,发病后第三天出现复视,眼睑下垂,瞳孔散大,腹胀,舌头发硬,头昏,肩膀重,气喘。

2 例住院患者在未确定型别的情况下,于1月

25日自购并使用A型肉毒抗毒素2万单位,1月26日经本实验室检验确诊为B型肉毒中毒后,立即(发病10日后)改用B型肉毒抗毒素治疗(停用A型肉毒抗毒素),每天每人肌注2万单位,每人总量5万单位。家中其它患者于明确诊断后也在当地使用了B型肉毒抗毒素。5人均痊愈,无一例死亡。

2 实验诊断^[2]

2.1 豆瓣酱中B型肉毒毒素检测 取豆瓣酱汁液适量置于灭菌离心管中离心,吸取上清液供中和试验和毒力测定用。将上清液做不同倍数稀释,选用14~16g小白鼠,进行腹腔注射,每只0.5mL,测得每毫升豆瓣酱汁液至少含有1600LD₅₀的肉毒毒素(即肉毒毒素含量1600LD₅₀/mL)。

中和试验证明样品中含有B型肉毒毒素。中和试验所用A、B、C、D、E、F型和6型混合肉毒诊断血清由兰州生物制品研究所生产(批号960601,1996年6月生产,有效期至2006年6月)。

2.2 豆瓣酱中B型肉毒梭菌检测 取增菌产毒培养基(明胶琼脂半固体培养基)接种豆瓣酱少许,煮沸1h,冷却,于35℃培养5d,进行增菌产毒试验。由增菌产毒培养液中检出16000LD₅₀/mL(培养液毒力测定结果)的B型肉毒毒素(由肉毒分型血清的中和试验证实)。

2.3 由豆瓣酱中分离的一株B型肉毒梭菌 将上述增菌产毒培养液接种于葡萄糖血琼脂平板,35℃厌氧培养3~4d,根据菌落形态及菌体形态挑取可疑菌落,接种增菌产毒培养基,于35℃培养5d进行毒素检测、中和试验和培养特性检查。经过反复分离、增菌产毒培养和分型检定,分离到一株纯一的B型肉毒梭菌,编号为B-020115。