

牛乳中抗生素残留及其检测方法的研究进展

吴 瑕 张兰威

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨, 150030)

摘 要 文中首先说明了牛乳中抗生素残留危害性, 其次阐述了牛乳中抗生素残留的原因及残留现状, 最后介绍了牛乳中抗生素残留检测方法的研究进展。

关键词 牛乳 抗生素残留 检测方法

抗生素在畜牧业的广泛应用, 不可避免地造成牛乳中抗生素残留。由于牛乳与人们的生活息息相关, 因此牛乳中的抗生素残留问题一直是各国政府和食品安全机构关心的重点, 中国近年来对牛乳中存在的抗生素残留问题也逐渐予以关注。

1 牛乳中抗生素残留的危害性

牛乳作为一种营养品, 若含有抗生素, 对于长期饮用的消费者来说无疑是等于长期服用小剂量的抗生素。对抗生素有过敏体质的人服用残留抗生素的牛乳后, 会发生过敏反应, 如皮疹、过敏性休克等^[1, 2]。长期饮用, 不仅会引起抑制人体肠道中正常的敏感菌群的生长, 使致病菌、念珠菌大量繁殖而导致全身或局部感染, 并且会导致人体对抗生素产生抗药性, 给临床治疗带来不可估量的麻烦。对于乳品生产来说, 细菌含量是对牛乳定级的一个重要指标, 而抗生素的存在会抑制牛乳中细菌的正常繁殖, 因此牛乳中是否含有抗生素, 会造成收乳人员对牛乳质量的误判, 以优质乳的价格收购次级乳, 给企业的经济利益造成影响。从乳品加工角度来看, 原料乳中抗生素残留物严重干扰发酵乳制品的生产, 抗生素可严重影响干酪、黄油、发酵乳的后期风味的形成^[1, 3]。

2 牛乳中抗生素残留的原因及现状

牛乳中抗生素残留的原因^[1]主要是: 非治

疗目的的用药、治疗目的的用药和非人为掺杂。非治疗目的的用药主要指在牛饲料中添加含有一定比例的抗生素的饲料添加剂, 主要作用是预防疾病, 这是牛乳中抗生素残留的重要原因。在牛乳场抗生素的主要用途是治疗乳牛临床型、隐性型乳房炎和子宫内膜炎。乳管注药法就是让药物直接注入乳房, 通过乳腺管进入某个已感染区进行消炎。乳牛在接受这种治疗后, 乳中的药物残留期可延缓到停药 3~5 d 后。不同给药途径、剂量造成不同残留时间(见表 1)^[2]。

美国食品和药品管理局(FDA)调查表明, 泌乳期乳牛用药不当或不注意安全时间是牛乳中抗生素残留的主要原因^[4]。一些不法乳户在高温季节为防止乳的酸败, 往往向牛乳中掺杂各种抗生素, 这也是牛乳中抗生素残留的一个来源。除了以上 3 个主要原因, 1982 年, Egan 调查表明, 用经抗生素治疗的乳牛使用过的挤乳器给正常乳牛挤乳, 也可使正常的乳中残留抗生素。

联合国粮农组织(FAO)及世界卫生组织(WHO)早在 1969 年就提出, 应对各种动物性食品中的抗生素残留提出允许标准, 并建议在乳牛中接受抗生素治疗停药后至少 3 d (最好 5~9 d) 内的乳汁不能作为食用乳的原料。美国食品和药品管理局(FDA)规定每毫升牛乳中的抗生素含量不得超过 0.006 国际单位, 使用抗生素的牛乳在 96 h 内应废弃。我国 1990 年

表 1 经治疗停药后乳牛生牛乳中抗生素残留情况

药 物	用药途径	结 果	停药后时间/d					
			2	3	4	5	6	7
青霉素 G80 万 U	乳管注药	阳性率/%	65	20	10	5	0	0
青霉素 G40 万 U+链霉素 50 万 U	乳管注药	阳性率/%	65	35	17	4	0	0
庆大霉素 24 万 U	乳管注药	阳性率/%	63	33	11	0	0	
青霉素 G400 万 U	肌肉注射	阳性率/%	54	33	8	0	0	
土霉素 4g+呋喃西林 2g	子宫投药	阳性率/%			35	18	11	0
对照组		阳性率/%	0	0	0	0	0	0

11 月颁布的乳与乳制品管理办法第 4 条明确规定 ,乳牛在应用抗生素期间和停药后 5 d 内的乳汁不得供食用。但值得注意的是由于各种原因 ,我国原料乳及乳制品的抗生素超标情况十分严重。1996 年 ,广州市卫生防疫站对广州市销售乳制品进行检测的结果表明^[2] :在广州市面销售的国产消毒牛乳抗生素残留率 31% ,国产乳粉 57% ,生牛乳 60% ,婴幼儿乳粉 44% ,而进口消毒乳和乳粉的阳性率为 0%。2000 年 ,张莉琴^[5]对西宁市售鲜牛乳中抗生素残留情况调查表明 :西宁市市售 77 份鲜牛乳样品中 ,抗生素阳性乳 9 份 ,抗生素残留率为 11.7%。尽管我国也有鲜牛乳中抗生素残留量标准(GB4689. 27—1994) ,但大部分地区并未启用。

3 牛乳中抗生素残留检测方法的研究进展

根据 WHO 提供的数据 ,欧盟药典确定了食品中各种抗生素最大残留量限制(MRL) ,同时欧盟规定食品中兽药的残留量必须与国际认可的其他法规(如国际食品法典委员会的法规) 相一致。为了使原料乳和乳制品中抗生素残留量符合 MRL 要求 ,乳牛场、乳制品厂、政府监督部门都在努力寻求准确可行的抗生素检测方法 ,许多大型化学试剂和仪器公司也在致力于开发抗生素残留量的检测方法和仪器。牛乳中抗生素残留的检测方法主要有 :微生物受阻检测法、理化检测法、免疫学分析法。

3.1 微生物受阻检测法

检验牛乳中抗生素残留的传统方法是微生物受阻检测法。其测定原理是根据抗生素对微

生物的生理机能、代谢的抑制作用来定性或定量确定样品中抗微生物药物残留。我国鲜乳中抗生素量检验标准(GB4689. 27—1994)TTC 检测法 ,还有六七十年代国外普遍采用的抑菌圈试验、浑浊度试验均属于此类。

3.1.1 氯化三苯四氮唑法(TTC)

氯化三苯四氮唑法最早由 Neel 和 Calbert 2 人在 1955 年提出 ,能检测出牛乳中青霉素含量 0.004 U/mL^[6]。20 世纪 50 年代 TTC 法是日本检测牛乳中青霉素残留的法定方法。该法 1955 年 4 月 1 日起在我国生效为法定方法。其原理是 :当乳中加入嗜热链球菌后 ,如乳中无抗生素 ,嗜热链球菌就生长繁殖 ,在新陈代谢中进行生物氧化 ,其中脱出的氢可以和加在乳中的氧化型 TTC 结合而成为还原型 TTC ,氧化型 TTC 是无色的 ,还原型 TTC 是红色 ,所以可使乳变红色。相反 ,如乳中存在抗生素 ,嗜热链球菌就不能生长繁殖 ,没有氢释放 ,TTC 也不被还原 ,仍为无色 ,乳汁也无色 ,检测时间 2.5 h 以上。

3.1.2 管碟法(cylinder plate method)

由 Foster 和 Wood Ruff 2 人于 1944 年创建 ,就是用含有敏感菌的琼脂做成平皿 ,上面放小管 ,管中放已知抗生素标准液和未知试样液 ,经培养后 ,抗生素标准液周围琼脂不长细菌 ,即为抑菌圈 ,如试样周围也出现抑菌圈表示含有抗生素 ,当时所用菌种为枯草杆菌。同年由 Schmich 和 Moyer 2 人用金黄色葡萄球菌代替。1954 年 ,Mee Wes 和 Mlosevic 2 人又发现 ,不含有青霉素的生乳有时也能抑制金黄色葡萄球菌 ,故改进为采用藤黄八迭球菌(*Sarcina lntea*)来检测青霉素。1958 年 ,美国 FDA 将藤

黄八迭球菌管碟法作为法定方法,检测青霉素的敏感度 0.01 U/mL。

3.1.3 纸片法(paper disk method)

常用的纸片法有枯草杆菌纸片法和嗜热脂肪杆菌纸片检测法。这 2 种方法主要用来检测牛乳中的 β -内酰胺类抗生素,其操作过程基本相同,而选用的菌种不同。枯草杆菌纸片法检测的结果易出现假阳性,为了确定阳性物质是否为青霉素(或 β -内酰胺类),对加热后的乳样用青霉素酶处理,以灭活乳样中的青霉素。然后再行检测,检测限可达 0.01 U/mL。而嗜热脂肪杆菌脂肪纸片法不仅用于检测乳样中 β -内酰胺类抗生素,并能暗示是否还存在其他抑菌物质,检测限可达 0.008 U/mL 以下。一般在 4h 内即可获得结果。1981 年由 FDA 认可,1982 年 1 月 1 日生效为法定方法。

3.1.4 德尔文特斯特法(delvotest-P)

此法是一种琼脂扩散试验。把含有营养物和溴甲酚紫的片剂放入含有嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢的琼脂安瓿中,加入 0.1 mL 牛乳样后,把安瓿于 63~66℃ 培养 2.5 h,牛乳中青霉素浓度 ≤ 0.002 U/mL 时培养基为黄色(抗生素残留阴性); ≥ 0.005 U/mL 时培养基为紫色(抗生素残留阳性);0.003~0.004 U/mL 时培养基为黄紫色(抗生素残留可疑)。

为了使这类试验更加操作易行,荷兰 Gist-brocades BV 公司开发了 delvotest-P,delvotest-SP,delvotest cow test,delvotest-MCS 检测系列。delvotest-P 已经在全世界通用,可以检测到 0.005 U/mL 浓度的青霉素 G,检测时间 3h。微孔板格式一次可同时检测 96 个乳样,适用于大批乳样检验。delvotest-SP 则可检测到包含 β -内酰胺类抗生素在内的更多种抗生素,如磺胺类、泰乐霉素、红霉素、链霉素、庆大霉素、三甲氧苄二氮嘧啶等抗生素,培养时间为 2h。对青霉素 G 的敏感度可提高到 0.003~0.004 U/mL。delvotest cow test 适合牛乳场水平使用。delvotest-MCS 是 delvotest-SP 的微孔板格式,适用于大型检测中心使用^[7]。

美国 Charm Science 股份有限公司也推出

了类似的系列检测方法。charm AIM-96 检测试剂盒是一种与 delvotest-SP 微孔板格式相似的检测技术,一次可同时检测 96 乳样,能检测 β -内酰胺类、磺胺类、四环素类、大环内脂类、氨基糖苷类等抗生素。培养时间一般为 3~4 h。

3.2 理化检测法

理化检测法是利用抗生素分子中的基团所具有的特殊反应或性质来测定其含量,如高效液相色谱法、气相色谱法、质谱法、联用技术等,能用于进行定性、定量和药物鉴定。敏感性较高,但检测程序复杂,检测费用较高。在牛乳中抗生素残留检测方面,最常用的理化检测方法是高效液相色谱和联用技术。

3.2.1 高效液相色谱

高效液相色谱(HPLC)是目前广泛应用的一种理化检测方法,它引入了气相色谱理论,在技术上采用了高压泵,高效固定相和高灵敏度检测器,实现了分离速度快、效率高和操作自动化。反相 HPLC 发展最快,目前已成为大多数抗生素残留的常规分析方法。彭莉等报道了用高效液相色谱法检测牛乳中氯霉素的残留量,采用乙酸乙酯提取牛乳中残留的氯霉素,用紫外检测器在 278 nm 检测样品平均回收率 94.8%,变异系数 $< 12.0\%$,此方法样品前处理简单,回收率高,实用性强,检验灵敏度高,重现性好,检测数据准确可靠,可作为牛乳中氯霉素残留检测的确证方法^[8]。

3.2.2 联用技术

各种分析技术联用是现代兽药残留分析乃至整个分析化学方法上的发展特点。计算机的应用加速了这一趋势。联用技术可扬长避短,一般集分离、定量和定性于一体,因而特别适用于确证性分析。常用的联用技术有薄层液相色谱和质谱联用(TLC-MS)、气相色谱和质谱联用(GC-MS)、液相色谱和质谱联用(LC-MS)、毛细管区域电泳和质谱联用(CIE-MS)、液相色谱和核磁共振波谱联用(LC-NMR)、超临界流体色谱和质谱联用(SFC-MS)等。Straub 等使用 LC-ES-MS 测定了牛乳中的几种青霉素残留,青霉素、邻氯青霉素的最高检测限为 3~5

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Kihak 等以 NCI 方式的 LC-PB-MS 技术成功地对牛乳中氧四环素(OTC)、四环素(TC)与金霉素(CTC)残留量进行确证,方法检测限为 $0.02\sim 0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2.3 其他理化检测方法

牛乳中抗生素残留检测方法还有气相色谱法(GC)、高效薄层色谱法(HPTLC)、超临界流体色谱(SFC)和毛细管区域电泳法(CIE)等。这些方法尽管在残留检测中不常用,但因其各自特有的性能,能弥补常用方法中不足之处。如 GC 有许多高灵敏度、通用性或专一性强的检测器供选用,如氢火焰离子化检测器(FID)、氯磷检测器(NPD)等,检测限可达 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级;HPTLC 的斑点原位扫描定量、定性和高效分离材料($3\sim 10\ \mu\text{m}$)改变了常规在灵敏度和重现性方面的不足,但保持了 TLC 的简便、快速和样品容量大的优点,可使用正相或反相板,分辨率几乎与 HPLC 相当,在抗生素残留的快速检测方面应用广泛。

3.3 免疫分析法

免疫学分析方法在食品分析中正得到越来越广泛的运用。目前药物残留免疫分析技术主要分为 3 大类:相对独立的分析方法,即免疫测定法;免疫分析技术与常规理化分析技术联用的方法;免疫受体法。

3.3.1 免疫测定法(immunoassays, IAs)

相对独立的免疫测定法有放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附分析法(ELISA)、固相免疫传感器(soindphase immunosensor)等。

3.3.2 免疫分析技术与常规理化分析技术联用方法

利用免疫分析的高选择性作为理化测定技术中的净化手段,典型的方式为免疫亲和色谱(IAC)。与传统的微生物受阻法和常规的理化分析方法技术相比,免疫分析技术最突出的优点是操作简单、速度快。以使用微量滴定板的 ELISA 为例,免疫测定法取样量小,前处理简单、容量大,仪器程度化低,检测乳与液相色谱和质谱联用(GC/MS)相似,可方便地达到 $\text{ng}/\text{g}\sim\text{pg}/\text{g}$ 级,分析效率则为 HPLC 或 GC 的几十

倍以上。目前大部分抗生素已建立了免疫测定法,如磺胺二甲嘧啶^[9,10]、氯霉素^[11]、磺胺甲基嘧啶^[12]、链霉素等。在联用方法中,免疫分析技术既可作为 HPLC 或 GC 等测定技术的样品净化或分离手段,也可作为其离线或在线检测方法,这些方法结合了免疫分析的选择性、灵敏度、高速与 HPLC、GC 等技术的高效分离和准确检测能力,使分析过程简化、分析成本下降,拓展了待测物范围。

3.3.3 免疫受体法

免疫受体法是目前国际法规认可的一类专利检测方法^[3]。免疫受体检测法是酶联免疫分析(ELISA)的一个变换形式,其基本原理是将特定抗生素类群作为靶子,让固定在一定部位的特定抗体或广谱受体捕捉。大多数检测法利用竞争性原理,使样品内的抗生素与内置抗生素标志物竞争与固定抗体或广谱受体结合,然后进行冲洗和显色。内置抗生素标志物与固定抗体或广谱受体形成复合体,通过酶的作用分解形成有色物质或发光物质。通过测定色度或光度并与参比物对照,就可以判断结果是阴性还是阳性。免疫受体试验的特点是速度快,通常在 10 min 内可以得到试验结果,但一般只能作为定性试验,特异性很强,检测费用较高。

美国 Idexx 实验室生产的针对 β -内酰胺类抗生素的 LacTek 内酰胺检测法是一种适合在实验室进行的检测法,7 min 就可以得出结果。LacTek 内酰胺具有高度特异性,头孢霉素不能被检测出来。LacTek 其他针对检测四环素类、磺胺类、庆大霉素类及氯霉素类的检测系列也已分别被开发出来。该实验室 SNAP 检测法由一个试管和一个装有试剂的一次性塑料装置,也称为“摁下”的装置组成,它利用毛细管现象托拽乳样和酶示踪物试剂通过固定抗体。整个试验基本是在干燥状态下进行,既可用于牛乳场、乳品加工厂也可用于实验室。乳样首先被加入试管内,放入加热套保温一段时间,然后倒入 SNAP 装置一端的加样孔里,乳样将沿着滤纸条向前流淌,10 min 后装置的中部出现 2 个色电(控制点和检测点);将它们 2 个的色度

用肉眼或比色剂进行对比,就可得到检测结果。SNAP 试剂盒可分别为青霉素类、头孢类、庆大霉素类等抗生素进行检测。另一种美国 Idexx 实验室开发的获得专利的检测方法是 Parallax 检测系统。整个检测过程只需 4min,被称为固相荧光免疫分析系统。它将泵、离心机、荧光检测仪等一系列设备有机地联结在一起,是集加样、混匀、保温、读数为一体的自动快速抗生素残留检测设备。

4 结 语

纵观以上所列的抗生素残留检测方法,微生物受阻法可靠性高、操作简单、费用低,但必须经过几小时的培养过程才能观察到结果。理化检测法敏感性较高,准确度高,但有的检测程序较复杂且检测费用较高。至于免疫受体检测法虽然速度快,特异性强,但因受到使用成本,操作难易程度、对主要设备要求以及供货连续性等众多因素的影响,还没有在我国得到广泛推广。随着广大消费者对无抗需求呼声不断提高,研制准确、快速、成本低廉,适合我国国情的牛乳抗生素残留检测方法已成为迫切的课题。

参 考 文 献

- 1 孟昭赫. 食品卫生检验方法注释(微生物学部分) [M]. 北京:人民卫生出版社,1996
- 2 许明贞. 广州市牛乳中抗生素残留的现状分析[J].

- 中国食品卫生,1999,14(3):30~33
- 3 马兆瑞,祝战斌,卡尔·莱金特. 乳和乳制品中残留抗生素的检测方法[J]. 中国乳品工业,2003,31(4):37~40
- 4 Jones G M. On-farm test for drug residues in milk [J]. Virginia Tech,1995,26(5):401~404
- 5 张莉琴. 西宁市售鲜牛乳中抗生素残留情况调查[J]. 青海畜牧兽医,2000,30(1):28
- 6 王 晶,王 林,黄晓蓉. 食品安全快速检测技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2002
- 7 Paul Neaves,William Neaves. Comparative sensitivities of delvotest p, delvotest MCS tests for the detection antimicrobials in milk[J]. British Mastitis Conerence,1999,97~99
- 8 邓 斌,邓春来,张 曦. 牛乳中抗生素残留及其检测方法研究进展[J]. 饲料工业,2003,24(4):24~27
- 9 杨 红. ELISA 测定牛乳、猪血浆和猪尿中的磺胺二甲嘧啶[J]. 华西药学杂志,1999,14(4):238~241
- 10 Milan Franek. Determination of sulphadimidin(sulphamethazine)residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA[J]. Food and Agriculture Immunology,1999,11:339~349
- 11 周 斌,石德时,谭亚丽等. 氯霉素间接竞争(Ci-ELISA)检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2000,2X(增刊):122~126
- 12 吴 定,张羽航,姚汝华. ELISA 测定乳中磺胺甲基嘧啶残留[J]. 中国兽医学报,1999,19(2):175~177

Development of Methods for Detection of Antibiotics Residues in Milk

Wu Xia Zhang Lanwei

(Food Science and Technology College of Northeast Agriculture University, Harbin, 150030)

ABSTRACT The hazard of antibiotics residues in milk was discussed in this paper. The cause and the actuality of antibiotics residues are discussed. And then the development of antibiotics screening test in milk is introduced.

Key words milk, antibiotics residues, screening test

丹尼斯克推出女性果蔬汁

丹尼斯克(DaniscoUSA)公司最近在美国市场推出了一种冷冻果蔬汁“Eteua-Tions1000”,让人惊奇的是这是一种成块状的新品。这种特殊制品的市场销售对象特别瞄准了20~40岁的女性。为了使产品具有鲜明爽快而又清爽的风味,新产品在浓缩胡萝卜与苹果的混合果汁中添加了天然芒果的香精。

“EteuaTions1000”果蔬汁的最大特点是,能够在溶解的同时迅速释放出非常特殊的果香味。