

水产品中红霉素残留分析的现状

惠芸华, 于慧娟, 姜朝军, 黄冬梅 (中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部水产品质量监督检验测试中心, 上海 200090)

摘要 介绍了红霉素的特性、水产品中红霉素残留对人体所产生的副作用以及目前国内外主要的分析检测方法和技术, 包括微生物法、薄层色谱法、高效液相色谱法以及色/质联用法。同时, 对水产品中红霉素残留分析的前景进行了展望。

关键词 水产品; 红霉素残留; 微生物法; 高效液相色谱法; 色/质联用法

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)02-00795-02

Current Status of the Erythromycin Residues in Seafood

HUI Yun-hua et al (Ministry of Agriculture Supervision and Testing Center for Aquatic Products, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090)

Abstract The characteristics of erythromycin and its main side effects on human body were introduced. The main analysis method and technology at home and abroad were also introduced including microbiological assay, TLC, HPLC and LC-MS. Meanwhile, the prospect of the analysis of erythromycin residues in seafood was forecasted.

Key words Seafood; Erythromycin residues; Microbiological assay; TLC; HPLC; LC-MS

红霉素是大环内酯类抗生素的第 1 代产品, 是从红色链丝菌培养液中分离出来的一种抗生素, 于 1952 年发现, 1953 年首次上市, 在临床上已应用近半个世纪。其对敏感革兰氏阳性球菌有良好的治疗效果, 在临床上被广泛用于治疗呼吸道、泌尿生殖系统、皮肤、胆管、牙周组织、耳鼻喉科以及儿科感染^[1-2], 在水产养殖上主要用于防治烂鳃病、白皮病、白头白嘴病, 花鲢、白鲢出血病等^[3]。

1 红霉素的分子结构及其理化性质

红霉素属于大环内酯类抗生素, 是由 4 种结构密切相关的组分所组成的混合物, 分别称为红霉素 A、B、C 和 D。其中, 红霉素 A 是最重要的组分, 抗菌活性最强 (是其他组分的 3~5 倍), 故临床使用的红霉素均为红霉素 A。红霉素 A 的分子结构如图 1 所示, 它是由 1 个 14 元环组成的内酯, 第 3 和 5 位碳上通过糖苷键分别连接 1 个红霉素糖 (克拉定糖) 和去氧糖胺^[1]。

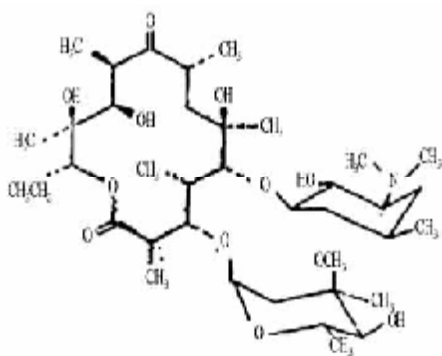


图 1 红霉素 A 的分子结构

Fig. 1 The molecular structure of erythromycin A

红霉素为弱碱性物质, 其 pKa 值为 8.8, 难溶于水, 易溶于有机溶剂。

2 红霉素在水产品中的残留及危害

2.1 红霉素在水产品中的残留原因 我国是个渔业大国,

渔业资源丰富, 品种多样。水产品出口贸易额约占食品总贸易额的 20%, 出口创汇额每年近 60 亿美元, 排在各类食品的首位。但是, 我国的水产品中 62% 是人工养殖所得, 在水产品的养殖过程中, 由于以下几个方面的原因, 造成了红霉素的残留: 不遵守休药期, 超量使用红霉素, 没有使用国家法定药物, 饲料加工和运输过程受到污染^[4]。

红霉素在动物体内代谢时间比较长, 不可避免地在动物体内产生残留。由于红霉素的毒、副作用以及滥用抗生素给人带来的危害, 世界各国对红霉素的使用和在食品中的残留量进行了规定。欧盟从 1999~2002 年 3 次对红霉素在食品中的残留量进行了修改, 允许剂量从 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 修改到 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5-6], 残留限量的要求日趋严格, 说明国际上对食品安全的高度重视。我国于 2002 年将红霉素列入禁用兽药, 不得使用, 并规定其在水产品中的残留量为不得检出。

2.2 红霉素残留的危害

2.2.1 急慢性毒性作用。红霉素像许多兽药或添加剂一样, 有一定的毒性, 如果长期食用含有这些药物的动物性食品, 就有可能产生慢性中毒^[4,7-9]。

2.2.2 过敏和变态反应。过敏和变态反应是一种与药物有关的抗原抗体反应。由于机体处于敏感性增高状态, 导致机体产生不良后果, 表现为皮疹、浮肿、血压下降、呼吸困难、吐泻, 严重者出现休克乃至死亡^[7-9]。

2.2.3 “三致”作用。即致畸、致癌和致突变作用。

2.2.4 细菌耐药性。经常食用低剂量抗生素残留的食品会使体内细菌产生耐药性。研究证实, 在动物性食品中存在的耐药菌, 如烹调不当, 这些耐药菌将会通过食物链传递给人类, 从而加速了“超级细菌”的产生。

2.2.5 菌群失调。如果人们长期食用含有抗生素的肉制品后, 体内敏感菌群将被杀灭或抑制, 而耐药菌群却大量繁殖, 从而打破原来的平衡状态, 导致长期腹泻或营养不良, 严重时还可造成耐药菌感染, 给临床治疗带来困难^[4,7-9]。

2.2 红霉素残留的危害

2.2.1 急慢性毒性作用。红霉素像许多兽药或添加剂一样, 有一定的毒性, 如果长期食用含有这些药物的动物性食品, 就有可能产生慢性中毒^[4,7-9]。

2.2.2 过敏和变态反应。过敏和变态反应是一种与药物有关的抗原抗体反应。由于机体处于敏感性增高状态, 导致机体产生不良后果, 表现为皮疹、浮肿、血压下降、呼吸困难、吐泻, 严重者出现休克乃至死亡^[7-9]。

2.2.3 “三致”作用。即致畸、致癌和致突变作用。

2.2.4 细菌耐药性。经常食用低剂量抗生素残留的食品会使体内细菌产生耐药性。研究证实, 在动物性食品中存在的耐药菌, 如烹调不当, 这些耐药菌将会通过食物链传递给人类, 从而加速了“超级细菌”的产生。

2.2.5 菌群失调。如果人们长期食用含有抗生素的肉制品后, 体内敏感菌群将被杀灭或抑制, 而耐药菌群却大量繁殖, 从而打破原来的平衡状态, 导致长期腹泻或营养不良, 严重时还可造成耐药菌感染, 给临床治疗带来困难^[4,7-9]。

3 水产品中红霉素残留的分析检测方法

3.1 样品处理 常用的处理方法为溶剂提取和固相萃取分离富集。

3.1.1 溶剂提取。通常是将水产品样品与提取溶剂一起研

基金项目 中国水产科学研究院东海水产研究所资助项目。

作者简介 惠芸华 (1981-), 女, 山东日照人, 硕士, 研究实习员, 从事水产品安全研究。* 通讯作者, E-mail: yuhuijuan607@sohu.com。

收稿日期 2008-10-20

磨或高速匀浆处理,然后再进行离心分离,得到初步的提取溶液。在水产品的抗生素残留提取过程中,常用的提取溶剂包括乙酸乙酯、水-甲醇混合溶剂、乙腈-硫酸钠、二氯甲烷、EDTA-甲醇-水溶液。红霉素残留的提取溶剂包括乙腈、二氯甲烷、甲酸铵溶液。

3.1.2 固相萃取。通常是将溶剂提取液用适当的方法洗涤除去部分杂质后,经过固相萃取柱,使红霉素富集在柱上,实现红霉素的进一步提纯与富集。常用的固相萃取柱有 $C_8/C_{12}/C_{18}$ 。经过处理后的富集有待测红霉素残留物的固相柱,可以直接进行色谱分离、分析,也可用适当的溶剂将其洗出后,进行相应分析。

3.2 检测方法 水产样品经溶剂提取后所得溶液含有多种抗生素,甚至是和红霉素性质相近的杂质,需用高效分离技术和高灵敏度的检测仪器进行定性、定量分析;或使用高选择性、低检测限的生物分析方法实现其定量鉴定。能够同时进行分离、分析的主要包括薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、液相色谱法(HPLC)、高效毛细管电泳法(HPCE)、气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用法等;具有高选择性、低检测限的定量鉴定方法多为生物学方法,主要有酶联免疫分析法、微生物学方法和放射免疫法等^[10]。

3.2.1 微生物检测法。微生物检测法是应用较广泛的方法,如纸片法、TTC法等,因其测定原理是基于抗生素对微生物的生理机能、代谢的抑制作用,因而与临床应用的要求一致,缺点是测定时间长且结果误差较大。目前趋向研究灵敏、准确、简便、快速的微生物检测方法,如酶标抗体检测法等。

杯碟法(cup method)即琼脂扩散法(agar diffusion method),是目前我国食品卫生标准中规定的检查蜂蜜中红霉素残留量的测定方法(GB/T 18932.8-2002)。

3.2.2 理化检测法。理化检测方法主要是利用红霉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、比色法、荧光分光光度法等,能进行定性、定量分析检测,灵敏度较高。水产品中红霉素残留检测最为常用的理化检测方法是高效液相色谱法和联用技术。

3.2.2.1 高效液相色谱法。高效液相色谱法是目前广泛应用的一种理化检测方法。该法测定食品的药物残留要经过样品处理(包括样品的提取、脱蛋白、净化、衍生化等步骤)、残留药物的分离以及残留药物的检测等步骤。目前,国外有关水产品中红霉素残留量的测定主要采用液相色谱法,所用检测仪器有电化学检测器和荧光检测器^[11-17]。

3.2.2.2 色/质联用法。色/质联用法由于实现了高效层析分离和检测联机,可用微电脑控制层析条件、程序和数据处理,其特异性、灵敏度和重复性均较好,并可一次同时完成同一样本中多种药物及其代谢物的检测。如Stanley等通过液相色谱配电化学检测器测定、电子喷雾电离质谱确证的方法检测三文鱼肌肉组织中红霉素的残留量,2种检测方法的回收率分别是 $(63.8 \pm 6.0)\%$ 和 $(75.5 \pm 5.4)\%$ ^[11];Delepine描述了采用PB/LC/MS方法检测牛肌肉中的5种大环内酯类抗生素的方法,其中采用梯度洗脱的反相液相色谱-MS检测法证明在牛肌肉中有红霉素、螺旋霉素、泰乐霉素、替米

考星和交沙霉素的残留^[18]。

3.2.2.3 薄层色谱法。薄层色谱(Thin Layer Chromatography)常用TLC表示,又称薄层层析,属于固-液吸附色谱,是近年来发展起来的一种微量、快速而简单的色谱法,它兼备了柱色谱和纸色谱的优点。一方面适用于小量样品(几到几十微克,甚至 $0.01 \mu\text{g}$)的分离;另一方面若在制作薄层板时,把吸附层加厚,将样品点成一条线,则可分离多达500 mg的样品,因此又可用于精制样品。该法特别适用于挥发性较小或在较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。

4 结语

随着人们对食品安全意识的增强,以及现代仪器自动化和联用技术的发展、普及和完善,对水产品中红霉素残留的分析研究必将趋于更加简单、快捷、灵敏和高效。

参考文献

- [1] 任攀江. 红霉素及其衍生物的构效关系[J]. 中国兽药杂志, 2000, 35(3): 58-60.
- [2] 袁天烁. 大环内酯类抗生药的研究与应用进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(19): 2620-2621.
- [3] 曹福震. 抗生素在养鱼生产上的应用[J]. 河北农业科技, 2005(6): 31.
- [4] 周振新. 国内外抗生素在食品动物上的使用规定及安全使用方法[J]. 广西农业科学, 2003(4): 56-57.
- [5] European Union. Committee for veterinary medicinal products erythromycin summary report [R]. EMEA, 2000.
- [6] European Union. Committee for veterinary medicinal products erythromycin summary report [R]. EMEA, 2002.
- [7] 王荣环. 大环内酯类抗生素的不良反应用分析[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(2): 236-237.
- [8] 胡安新, 任荣. 大环内酯类抗生素的不良反应用及药物相互作用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2004, 7(11): 1026-1027.
- [9] 张喜旺, 孔密密, 何燕. 大环内酯类抗生素的不良反应用概况[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(22): 3056-3057.
- [10] 赵惠明, 江秀明, 林贤福. 水产品体内抗生素残留分析研究现状[J]. 水产科学, 2004, 23(8): 39-41.
- [11] BILLEDEAU S M, HEINZE T M, SIITONEN P H. Liquid chromatography analysis of erythromycin in salmon tissue by electrochemical detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Agric Food Chem, 2003, 51(6): 1534-1538.
- [12] EDDER P, COPPEX L, COMINOLI C. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection [J]. Food Additives and Contaminants, 2002, 19(3): 232-240.
- [13] DREASSI E, CORTI P, BEZZINI F. High-performance liquid chromatography assay of erythromycin from biological matrix using electrochemical or ultraviolet detection [J]. Analyst, 2000, 125: 1077-1081.
- [14] ERIKA HANADA, HISAKAZU OHTANI, HIROTA MICHIKO, et al. Determination of erythromycin concentrations in rat plasma and liver by HPLC with amperometric detection [J]. Journal of Chromatography B, 1997, 692: 478-482.
- [15] CHEIKO TANINAKA, HISAKAZU OHTANI, ERIKA HANADA. Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin in plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 738: 405-411.
- [16] FRIEDER KEES, SONJA SPANGLER, MICHAEL WELLENHOFER. Determination of macrolides in biological matrices by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 812: 287-293.
- [17] TORANO J S, GUCHELAA H J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using per-column derivatization with 9-fluorenylmethylloxycarbonyl chloride and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography B, 1998, 720: 89-97.
- [18] DELEPINE B, HURTAUD-PESEL D, SANDERS P. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. AOAC Int, 1996, 79(2): 397-404.