

# 胶体金免疫层析法和气相色谱法测定动物产品中氯霉素残留

宋红波, 陈 军, 王 栋, 方 琳, 余文婕, 储 芳

(江苏省产品质量监督检验研究院溧阳检测中心, 溧阳市农畜水产品质量监督检验测试中心, 江苏 溧阳 213300)

**摘 要:** 对动物产品中氯霉素残留检测的胶体金免疫层析法和气相色谱法进行比较研究。向样品中分别添加 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g/kg}$  三个添加水平的氯霉素标准品, 用两种方法进行检测。胶体金免疫层析法对 0.5  $\mu\text{g/kg}$  以上均能检出, 气相色谱法平均回收率分别为 78.1%、85.3% 和 88.3%, 变异系数为 5.3%~9.0%, 最低检测限为 0.3  $\mu\text{g/kg}$ 。对 108 个样品用胶体金免疫层析法筛选出 3 个阳性样品, 经气相色谱法验证皆为阳性, 105 个阴性样品经气相色谱法检测皆为阴性, 未发现假阳性和假阴性。结果表明: 胶体金免疫层析法具有快速, 简便, 特异, 灵敏度高的特点, 适合基层检验机构对动物产品中氯霉素残留现场快速筛选; 气相色谱法灵敏度高, 适用于阳性样品的精确定量。

**关键词:** 动物产品; 氯霉素; 胶体金免疫层析法; 气相色谱法

## Comparative Applications of Colloidal Gold Immunochromatographic Assay and Gas Chromatography for the Determination of Chloramphenicol Residues in Food Products of Animal Origin

SONG Hong-bo, CHEN Jun, WANG Dong, FANG Lin, YU Wen-jie, CHU Fang

(Liyang Testing Center, Institute of Supervision and Inspection Product Quality of Jiangsu Province, Liyang Agricultural, Domestic and Aquatic Products Quality Supervision and Testing Center, Liyang 213300, China)

**Abstract:** Colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) and gas chromatography (GC) was separately used for the analysis of chloramphenicol (CAP) residues in creatural products. Samples were spiked with 0.3, 0.5  $\mu\text{g/kg}$  and 1.5  $\mu\text{g/kg}$  CAP and determined by the methods. CAP residues at concentrations above 0.5  $\mu\text{g/kg}$  could be detected by GICA. The average recovery rates of GC were 78.1%, 85.3% and 88.3%, respectively with relative standard deviation (RSD) of 5.3% — 9.0% and the detection limit was 0.3  $\mu\text{g/kg}$ . Three positive samples and other 105 samples analyzed by GICA were confirmed by GC and no false positive and negative samples were observed. Therefore, GICA is a rapid, accurate, reproducible and suitable to be used for rapid *in situ* screening of CAP residues in food products of animal origin, while GC is sensitive and suitable to be used for quantification of positive samples.

**Key words:** food products of animal origin; chloramphenicol; GICA; GC

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0229-04

氯霉素是一类广谱抗生素, 对革兰氏阴性菌和阳性菌均有很好的抑制作用, 由于其优良的抗菌性、稳定的药性和低廉的价格, 曾作为细菌性疾病的治疗药物广泛应用于人和动物临床<sup>[1]</sup>。然而研究发现氯霉素对人体的造血系统毒害极大, 同时具有肝脏毒性<sup>[2]</sup>。许多国家已禁止氯霉素在动物生产中使用, 联合国粮农组织也建议在畜牧业生产中停止使用氯霉素<sup>[3]</sup>, 欧盟规定进口水产品中氯霉素不得检出<sup>[4]</sup>。因此, 探讨快速、便捷的氯霉素残留检测方法也引起了世界各国的广泛关注。

目前氯霉素残留分析方法很多<sup>[5-6]</sup>, 主要有酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[7-9]</sup>、气相色谱法(gas chromatography, GC)<sup>[10]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[11-12]</sup>、气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)<sup>[13-14]</sup>、液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometer, LC-MS-MS)<sup>[15]</sup>、胶体金免疫层析法(gold immunochromatographic assay, GICA)<sup>[16]</sup>亦可见报道。本实验对胶体金免疫层析法和气

收稿日期: 2011-04-05

作者简介: 宋红波(1980—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事食品安全检测技术研究。E-mail: lichenlsong@yahoo.com.cn

相色谱法测定动物产品中氯霉素残留的方法进行比较研究,并对方法的回收率、精密度及检测限进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 样品及制备

实验样品为冻鸡肉、冻鱼肉、冻虾仁,均购自市场。其中鸡肉 50 份,鱼肉 30 份,虾仁 28 份。将样品去皮、去骨后取肌肉,制成均质物,储存于  $-18^{\circ}\text{C}$  备前处理用。

#### 1.1.2 试剂

氯霉素标准品(纯度 99.5%) 德国 Dr Ehrenstorfer 公司;氯霉素胶体金免疫层析法试剂盒(包括反应孔 48 个、氯霉素指示剂 1 瓶、检测试纸片 48 片、10 倍浓缩稀释缓冲液) 大连普瑞康生物技术有限公司;  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱(填料量 500mg, 3mL); 乙酸乙酯、乙腈、正己烷(均为农残级) 美国 Tedia 公司; 4g/100mL 氯化钠溶液; BSTFA + TMCS (99:1) 衍生化试剂 美国 Supelco 公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

6890N 型气相色谱仪(配 ECD 检测器) 美国安捷伦公司; JA-5002 电子天平 上海精天电子仪器厂; AllegraTM21R 台式高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司; R-205 旋转蒸发器 德国 Büchi 公司; 漩涡混合器、NEVAP-11155 氮吹仪、固相萃取 SPE 装置、微量移液枪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品前处理

GICA 法: 称取样品 3g(精确到 0.01g), 用 6mL 乙酸乙酯提取, 3000r/min 离心后吸取乙酸乙酯 2mL 置于 10mL 刻度离心管, 氮气流吹干; 先用 2mL 正己烷溶解残渣, 再加入 1mL 稀释缓冲液, 漩涡混合 10s, 3000r/min 离心 10min, 弃去上层正己烷层, 下层水相备用。

GC 法: 称取样品 5g(精确到 0.01g), 用乙酸乙酯 30mL 分 2 次提取, 速度离心 4000r/min, 将提取液乙酸乙酯层合并转移到 100mL 细口鸡心瓶中, 于温度  $40^{\circ}\text{C}$  水浴中, 减压旋转蒸发至干。向鸡心瓶中加入 15mL、4g/100mL 氯化钠溶液, 再用 20mL 正己烷分两次脱脂, 除去上层正己烷相, 水相保留备用。给每个样品准备一根  $\text{C}_{18}$  柱, 依次用 5mL 甲醇和 5mL 水活化, 将上一步脱脂得到的水相溶液注入  $\text{C}_{18}$  柱, 弃去流出液, 用 3mL 水洗涤并抽干小柱, 再用 4mL 乙腈将  $\text{C}_{18}$  小柱中的氯霉素洗脱至 5mL 具塞离心管中, 用氮气吹干。加 100  $\mu\text{L}$  衍生化试剂, 盖塞并漩涡混合 10s, 在  $60^{\circ}\text{C}$  烘箱中反应 30min。用氮气流吹除多余的试剂, 至样品管刚好吹干

为止。加入 1mL 正己烷定容, 供 GC(ECD) 检测。

#### 1.2.2 GICA 法分析步骤

用微量移液器吸取 70  $\mu\text{L}$  水相溶液加入反应孔中, 然后以试剂盒自带小吸管加入氯霉素指示剂 1 滴(使用前充分摇匀), 充分振荡混合 5min。于待测反应孔中放入试纸片(白色端在下), 跑片 10min 后按照试剂盒说明判定结果, 判定时间不宜超过 20min。

#### 1.2.3 GC 法测试条件

色谱柱: 填料 35% 聚二苯基二甲基硅氧烷(DB-35) 毛细管柱, 规格长: 30m, 内径 0.25mm 或 0.32mm, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ; 载气: 氮气; 流量: 1.2mL/min; 尾吹气流量: 60mL/min; 进样口温度:  $260^{\circ}\text{C}$ ; 柱温: 采用程序升温: 初温  $80^{\circ}\text{C}$ , 维持 1min;  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $200^{\circ}\text{C}$ , 维持 0min; 然后  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $250^{\circ}\text{C}$ , 维持 5min; 最后设定  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $270^{\circ}\text{C}$ , 维持 5min 以确保所有的化合物已经流出; 检测器温度:  $300^{\circ}\text{C}$ ; 进样方式: 不分流进样, 分流吹扫时间 0.75min; 进样量: 1  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.4 GC 法精密度和准确度

方法准确度以回收率表示, 而精密度以变异系数来表示。向空白样品中分别添加 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个水平的氯霉素标样, 每个添加量至少做 3 个平行, 同时做 3 个空白样。按 1.2.1 节方法进行前处理, 气相色谱法检测定量, 计算回收率及各添加水平的变异系数。

#### 1.2.5 GICA 方法验证

称取样品 5g(精确到 0.01g), 向样品中分别添加 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  氯霉素标样 150、250、750  $\mu\text{L}$ , 即添加水平为 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个水平, 每个水平设 16 个平行, 同时做 8 个空白样, 按 1.2.1 节前处理和 1.2.2 节测定。

用胶体金免疫层析法对 108 个禽、水产品进行筛选, 阳性样品用气相色谱法验证, 阴性样品同时用气相色谱法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

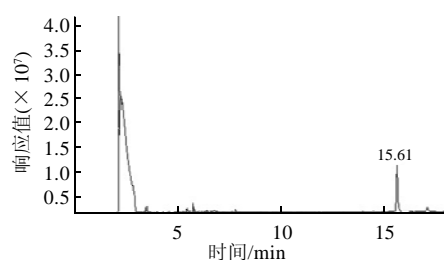


图1 氯霉素标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of chloramphenicol standard

氯霉素标准曲线：以 1、10、20、50、100  $\mu\text{g/L}$  氯霉素标准工作液衍生后进样，测定其峰面积值，以峰面积对质量浓度做工作曲线。结果表明氯霉素保留时间为 15.41min，在 1~100  $\mu\text{g/L}$  质量浓度范围内呈良好线性关系，回归方程为  $Y = 4 \times 10^6 x + 2 \times 10^7$ ， $r^2 = 0.997$ 。气相色谱仪检测氯霉素标准品的色谱图见图 1。

## 2.2 GC 法精密度和准确度

实验的准确度以回收率表示，精密度以变异系数来表示，加标量为 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g/kg}$ ，精密度和准确度见表 1。

表 1 GC 法测定的准确度和精密度测定结果  
Table 1 Accuracy and precision of GC

| 添加量/( $\mu\text{g/kg}$ ) | 0.3             | 0.5             | 1.5             |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 回收率/%                    | 70.8            | 89.7            | 92.5            |
| 回收率/%                    | 78.7            | 80.6            | 83.1            |
| 回收率/%                    | 84.8            | 85.5            | 89.3            |
| 平均回收率/%                  | 78.1 $\pm$ 7.02 | 85.3 $\pm$ 4.55 | 88.3 $\pm$ 4.78 |
| 变异系数/%                   | 8.99            | 5.33            | 5.41            |

从表 1 可看出，向样品中添加 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g/kg}$  三个水平的氯霉素标准品时，平均回收率分别为 78.1%、85.3% 和 88.3%，变异系数为 5.3%~9.0%，方法重复性较好。

## 2.3 GICA 法检测结果

GICA 法的原理是将特异性抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带，当该硝酸纤维素膜一端浸入样品时，由于毛细管作用，样品沿着膜向前移动，当移动至固定有抗体的区域时，样品中相应的抗原即与该抗体特异性结合，使免疫胶体金染色的该区域显示一定的颜色，从而实现特异性免疫诊断。

向空白样品中分别添加 0.3、0.5、1.5  $\mu\text{g/kg}$  三个水平的氯霉素标样，每个水平设 16 个平行，同时做 8 个空白样，按 1.2.1 前处理和 1.2.2 节测定，结果见表 2。

表 2 GICA 法样品检测结果  
Table 2 Results of sample detection by GICA

| 添加水平/( $\mu\text{g/kg}$ ) | 空白 | 0.30 | 0.50 | 1.50 |
|---------------------------|----|------|------|------|
| 平行数                       | 8  | 16   | 16   | 16   |
| 阳性样品数                     | 0  | 14   | 16   | 16   |
| 阴性样品数                     | 8  | 2    | 0    | 0    |

从表 2 可知，8 个空白样品检测结果为阴性；16 个添加 0.3  $\mu\text{g/kg}$  氯霉素标准品的样品，经检测有 2 个样品为阳性，14 个样品为阴性；添加 0.5、1.5  $\mu\text{g/kg}$  氯霉素标准品的样品，检测结果为阳性，检出率为 100%。

## 2.4 检测限

胶体金免疫层析法试剂盒检测限：取试剂空白、0.30、0.60  $\mu\text{g/L}$  的氯霉素标准品各 8 份，按 1.2.2 节测定，结果见表 3。

表 3 GICA 法标准品检测结果  
Table 3 Results of standard CPA detection by GICA

| 标准品质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ ) | 空白 | 0.3 | 0.5 |
|-----------------------------|----|-----|-----|
| 平行数                         | 8  | 8   | 8   |
| 阳性样品数                       | 0  | 8   | 8   |
| 阴性样品数                       | 8  | 0   | 0   |

由表 3 可知，胶体金免疫层析法对 0.3  $\mu\text{g/L}$  及以上质量浓度的标准品均能检出，试剂盒检测限为 0.3  $\mu\text{g/L}$ 。

样品检测限：从表 2 看出，向 16 个样品中添加 0.5  $\mu\text{g/kg}$  水平的氯霉素标准品均能检出，初步确定该法检测限至少为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ 。根据《农业部公告 781-1—2006 动物源食品中氯霉素残留量的测定：气相色谱-质谱法》(确证方法)中定量限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ ，GICA 法的检测限能满足筛选要求。

气相色谱法最低检测限按照信噪比  $R_{\text{SN}} = 3$  计算，得该方法检测限为 0.3  $\mu\text{g/kg}$ 。

## 2.5 GICA 法和 GC 法检测实际样品结果比较

用胶体金免疫层析法对 108 个禽、水产品进行检测，筛选出 3 个阳性样品(按检测限 0.5  $\mu\text{g/kg}$  判定)，用气相色谱法验证亦为阳性；其余 105 个样品用胶体金免疫层析法筛选为阴性，经气相色谱法检测均为阴性(检测限 0.3  $\mu\text{g/kg}$ )，结果见表 4。

表 4 GICA 法和 GC 法检测结果比较  
Table 4 Comparison of determination results of chloramphenicol residues in 108 samples by GICA and GC

| 样品                           | 鸡肉   | 异育银鲫 | 南美白对虾 | 其余 105 个样品                      |
|------------------------------|------|------|-------|---------------------------------|
| GICA 检测结果                    | 阳性   | 阳性   | 阳性    | 阴性                              |
| GC 检测结果/( $\mu\text{g/kg}$ ) | 0.67 | 1.94 | 1.02  | 均未检出(检测限 0.3 $\mu\text{g/kg}$ ) |

由表 4 可见，GICA 法筛选出的 3 个阳性样品经 GC 检测结果均在 0.5  $\mu\text{g/kg}$  以上，而阴性样品均低于 0.3  $\mu\text{g/kg}$ ，显示两种检测方法结果的吻合度较高。其中阳性鸡肉样品氯霉素浓度在检测限附近，用 GICA 法亦能明显判为阳性。表 4 的结果表明 GICA 法筛选假阳性率和假阴性率都为 0，适用于动物产品中氯霉素残留筛选。

## 3 讨 论

目前对动物产品中氯霉素残留的主要方法为气相色谱法、气质联用法、液质联用法、液相色谱法、酶

联免疫法,而胶体金免疫层析法的运用才刚刚起步。气相色谱法、气质联用法、液质联用法灵敏度高、准确性好,但前处理繁琐,检测成本高,且需要昂贵的仪器;液相色谱法检测限过高,达不到出口产品残留限要求,目前使用不多;酶联免疫法是目前广泛使用的氯霉素残留筛选方法之一,其精密度与准确度都很高,但阳性结果仍需经气相色谱法、气质联用法确证。

用胶体金免疫层析法对动物产品中氯霉素残留进行筛选,能在几小时内检测几十到上百个样品,且不需要复杂的仪器设备,样品预处理简单,检测成本低,作为一种快速筛选手段,能大大提高检测效率,在现场监控和基层检测中有着广阔的推广应用前景。但目前筛选法的检测标准极少,检测限(即阳性浓度标准)不统一,给检测结果判定带来一定困难,对筛选可疑结果需用色谱方法进行确证。

#### 参考文献:

- [1] 王自良,赵坤,张改平. 氯霉素的毒性及其在动物性食品中的残留与检测[J]. 河南科技学院学报: 自然科学版, 2005, 33(2): 101-105.
- [2] 李秀萍,尉新华,孙艳霞. 浅谈氯霉素的危害及控制[J]. 中国动物检疫, 2003, 20(5): 18.
- [3] 郭志儒. 联合国粮农组织建议在畜牧业生产中停止使用氯霉素[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 124.
- [4] 陈述平,陈瑞文. 从对虾氯霉素事件浅析欧盟法规[J]. 渔业现代化, 2002(2): 11-12.
- [5] 李晓川,孔轶群. 水产品中氯霉素的问题与检测[J]. 农业质量标准, 2003(3): 18-19.
- [6] 李晓川,孔轶群. 水产品中氯霉素残留测定方法的分析研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 76-81.
- [7] 王伊琴,包勇敢,胡烈山,等. ELISA 在检测动物组织氯霉素残留中的应用[J]. 畜牧兽医科学, 2006, 22(4): 26-29.
- [8] WATER D, HANGSMA N. Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swinemuscle tissue[J]. Assoc Of Anal Chem, 1990, 73(4): 534-540.
- [9] 杨利国. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 279-281.
- [10] 赵文亚,沈美芳,徐幸莲,等. 气相色谱法测定水产品中氯霉素残留[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 278-282.
- [11] BEEK E. High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and online diode array UV-VIS detection[J]. J Chroma, 1986, 352(21): 445-453.
- [12] 蒋定国,杨大进,方从容,等. 高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素残留量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(1): 36-38.
- [13] 黄冬梅,于慧娟,李庆,等. GC-MS 测定水产品中氯霉素的残留量[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 65-67.
- [14] TOMOKON, HISAO O. Detection of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry[J]. Agric Food Chem, 1996, 44(5): 1280-1284.
- [15] R?NNING H T, EINARSEN K, ASP T N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1118(2): 226-233.
- [16] 李余动,张少恩,吴志刚,等. 胶体金免疫层析法快速检测氯霉素残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(5): 416-419.