

食品中兽药残留检验

一、概述

二、兽药残留的检验



谷物制品

一、概述



(一) 兽药和兽药残留的概念 【掌握】

典型的兽药：是指用于预防和治疗畜禽疾病的药物。但是，随着集约化养殖生产的开展，一些化学的、生物的药物成分被开发成具有某些功效的**动物保健品或饲料添加剂**，也属于兽药的范畴。

兽药的主要用途：防病治病、促进生长、提高生产性能、改善动物性食品的品质等。



兽药残留：是指食品动物用药后，动物性食品中含有的某种兽药的原形或其代谢物以及与兽药相关的杂质的残留。

兽药残留的来源：

- 治病用药
- 饲料中加入的添加剂
- 动物性食品保鲜

另外，休药期（是指自停止给药到动物获准屠宰或其动物性产品获准上市的间隔时间）过短，是造成动物性食品兽药残留过量的另一个重要原因。



(二) 兽药残留的种类【掌握】

1. 抗生素类药物

这类药物多为天然发酵产物，是临床应用最多的一类抗菌药物，如青霉素类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、螺旋霉素、链霉素、土霉素、金霉素等。

青霉素类最容易引发过敏反应，四环素类、链霉素有时也能引起过敏反应：轻度时，短时间内出现血压下降、皮疹、身体发热、血管神经性水肿、血清病样反应等，严重者可能导致过敏性休克甚至死亡。长期摄入含氨基糖苷类残留超标的动物性食品，可损害听力及肾脏功能。





2. 磺胺类药物

主要用于抗菌消炎，如磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺咪、茵得清、新诺明等。

● 近年来，**磺胺类药物**在动物性食品中的残留超标现象，在所有兽药当中**是最严重的**。

后果：长期摄入含磺胺类药物残留的动物性食品后，药物可不断在体内蓄积，造成泌尿系统损伤，引起**结晶尿、血尿、管型尿**。



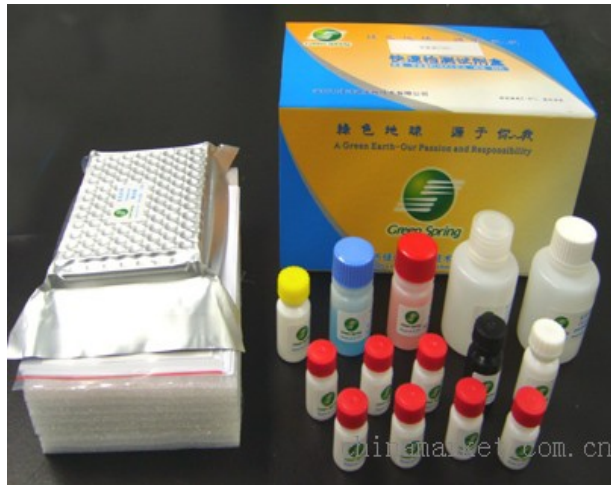


3. 硝基呋喃类药物

主要用于抗菌消炎，如呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因等。

❖ **危害：**主要是胃肠反应和过敏反应。

剂量过大或肾功能不全者，可引起严重毒性反应，主要表现为周围神经炎、嗜酸性白细胞增多、溶血性贫血等。长期摄人可引起不可逆性末端神经损害，如感觉异常、疼痛及肌肉萎缩等。我国尚未制定硝基呋喃类药物残留检测标准。





4. 抗寄生虫类药物

主要用于驱虫或杀虫，如苯并咪唑、左旋咪唑、克球酚、吡喹酮等。

● 危害：致畸和致突变

对于妊娠期的孕妇有可能发生胎儿畸形，如短肢、兔唇等；对所有消费者来说，可能由于其致突变作用使消费者发生癌变和性染色体畸变，从而其后代有发生畸形的危险。





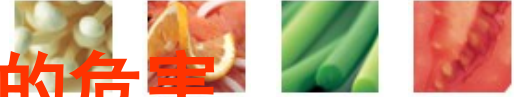
5. 激素类药物

主要用于**提高动物的繁殖和加快生长发育速度**，使用于动物的激素有性激素和皮质激素，而以性激素最常用，如孕酮、睾酮、雌二醇等。

正常情况下，动物性食品中天然存在的性激素含量是很低的，因而不会干扰消费者的激素代谢和生理机能。

但超标的话，可能会影响消费者的正常生理机能，并具有一定的致癌性，可能导致儿童早熟、儿童发育异常、儿童异性趋向等。

(三) 兽药残留的危害



● 毒性作用

急性中毒、慢性中毒、“三致”（致癌、致畸、致突变）

● 耐药性

动物体内耐药性菌株通过食品传递给人，给治疗带来困难。

● 过敏反应

● 激素作用

潜在致癌、儿童性早熟等

● 污染环境影响生态

兽药排入环境后，仍然有活性，对土壤微生物、水生生物等造成影响。

(四) 兽药残留限量标准和检验



● 兽药最高残留限量 (MRLVD) :

是指某种兽药在食物中或食物表面产生的最高允许兽药残留量 (单位 $\mu\text{g} / \text{kg}$, 以鲜重计)。

● 兽药最高残留限量标准

2002 年农业部颁布最新《动物性食品中最高残留限量》

不需要制定最高残留限量的药物： 88 种

需要制定最高残留限量的药物： 94 种

可以使用，但不得在食品中检出的药物： 9 种

禁止使用，且不得在食品中检出的药物有： 31 种



二、兽药残留的检验

(一) 检验方法简介

(二) 常见兽药残留的检验

(一) 检验方法简介



常用方法

气相色谱法 (GC): 常规分析法

高效液相色谱法 (HPLC): 常规分析法, 最多采用

酶联免疫法 (ELISA): 选择性强、灵敏度高、简单、快速

仪器联用法 (GC-MS, LC-MS, TLC-MS 等)



(二) 常见兽药残留的检验

- 1. 四环素类兽药残留的检验**
- 2. 磺胺类兽药残留的检验**
- 3. 硝基呋喃类兽药残留的测定**
- 4. 盐酸克伦特罗残留的检验**
- 5. 激素类兽药的测定（了解）**

残留分析的样品

□ 可食性组织及产品

- 肝、肾、肌肉、脂肪、皮肤、血液
- 奶、蛋
- 其他加工食品

□ 其他

- 毛发、尿、粪便等

样本的收集

➤ 取样方法

- ❖ 代表性原则、随机采样
- ❖ 各种标准规定

➤ 活体检测

- ❖ 一般采集毛发、血液、尿液和粪便

➤ 屠宰场取样

- ❖ 其他高浓度的样本：肝、肾、胆汁、注射部位
- ❖ 排泄物：尿液

样本的贮存

➤ 容器材料

- ❖ 一般为玻璃或塑料

- ❖ 硅烷化处理防止器皿壁对痕量残留组分的吸附

 - 塑料吸附脂溶性物质

 - 玻璃表面吸附碱性物质

硅烷化处理是以有机硅烷水溶液为主要成分对金属或非金属材料进行表面处理的过程。

➤ 预处理

- ❖ 匀化、缩分、过筛、离心、过滤、防腐、抑制降解等

1. 四环素类药物残留的检验



● 常用四环素类药物有：四环素、土霉素、金霉素

● 测定方法 {
 HPLC（高效液相色谱法）
 TLC（薄层色谱法）
 ELISA（酶联免疫法）

GB/T 5009.116-2003 (HPLC 法)

畜、禽肉中土霉素、四环素、金霉素残留量的

测定



四环素类药物残留的检验 (HPLC 法)

(一) 原理

样品经**提取**，微孔滤膜过滤后直接**进样**，用反相色谱分离，**紫外检测器检测**，以保留时间定性，**标准曲线法定量**，也可以用**标准加入法定量**。

配置四环素类药物的**混合标准溶液**，**绘制标准曲线**，根据标准曲线计算样品中各残留药物的含量。

。



标准曲线法定量：配置四环素类药物的混合标准溶液，绘制标准曲线，根据标准曲线计算样品中各残留药物的含量。

标准加入法定量：在待测食品的样品中，加入配置好的四环素类药物的混合标准溶液后，经过提取、离心等前处理后，绘制工作曲线，根据工作曲线计算样品中各残留药物的含量。

国标采用：标准加入法定量（准确度高）

(二) 样品处理



取 5.00g 切碎的肉样食品，置于 50ml 的锥形瓶中，加入 25ml 的 5% 高氯酸振荡提取 10min，提取液经离心后，取上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤。

(三) 分析步骤

(1) 色谱条件

- 色谱柱：ODS-C₁₈ 柱 (6.2 mm×15 cm, 5 μ m) ；
- 检测器：紫外检测器；波长：355 nm ；
- 流动相：乙腈 + 0.01mol/L NaH₂PO₄ (pH 2.5) = 35:65
- 柱温：室温；
- 流速：1.0ml/min



(2) 混合标准溶液的配制

- ① **土霉素 (OTC) 标准溶液:** 称取土霉素 0.0100g (精确到 $\pm 0.0001\text{g}$) , 用 0.1mol/L 的盐酸溶液溶解, 并定容到 10mL ;
- ② **四环素 (TC) 标准溶液:** 称取四环素 0.0100g (精确到 $\pm 0.001\text{g}$) , 用 0.01mol/L 的盐酸溶液溶解, 并定容到 10mL ;
- ③ **金霉素 (CTC) 标准溶液:** 称取金霉素 0.0100g (精确到 $\pm 0.001\text{g}$) , 溶于蒸馏水中并定容到 10mL 。

混合标准溶液: 取①②标准溶液各 1.00 ml , ③标准溶液 2.00ml, 置于 10 ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度。此溶液每毫升含土霉素、四环素各 0.1mg , 金霉素 0.2mg , 临用时现配



(3) 工作曲线

取 7 份切碎的肉样食品，每份 5.00g，分别加入混合标准溶液 25,50,100,150,200,250 μg （含土霉素、四环素各为 2.5,5.0,10.0,15.0,20.0,25.0 μg ）；含金霉素 0,5.0,10.0,20.0,30.0,40.0,50.0 μg ），按（二）样品处理的方法操作，峰高为纵坐标，以抗生素含量为横坐标，绘制工作曲线。

(4) 试样测定

取经 0.45 μm 滤膜过滤的待测液 10 μL 进样，记录峰高，从工作曲线上查含量。



(四) 结果计算

$$X = \frac{A \times 1\,000}{m \times 1\,000}$$

式中：

X — 试样中抗生素含量，单位为 **mg/kg**

A — 试样溶液测得抗生素质量，单位为 **μg**

m — 试样质量，单位为 **g**

(五) 方法说明



- (1) 流动相中加 NaH_2PO_4 及调节 pH 值目的：改善四环素类药物在 C_{18} 柱上的分离度和峰形；
- (2) 用 5% 高氯酸处理样品时，当 PH 值低于蛋白质等电点时，蛋白质以阳离子形式存在，高氯酸可与蛋白质阳离子形成不溶性盐而沉淀，通过离心除去；
- (3) 本方法测定四环素类药物的加标回收率分别为：OTC：82%–93%，TC：80%–90%，CTC：80%–95%；
- (4) 出峰顺序为土霉素（OTC）、四环素（TC）、金霉素（CTC）



二、磺胺类药物残留的测定

(一) 概述

(二) 测定方法 (掌握)

磺胺类药物结构

- 磺胺类药物的基本结构为**对氨基磺酰胺**，简称磺胺的衍生物，具有芳氨基和磺酰胺基，多为两性化合物。结构 P_{118}
- **常用的有：**磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶等。



(二) 测定方法

测定方法

高效液相色谱法 (HPLC 法) : 最常用

气相色谱法 (GC)

TLC (薄层色谱法)

ELISA (酶联免疫法)

分光光度法



HPLC 法测定磺胺类药物残留

1、原理

动物性食品样品经过**预处理**后，用**流动相溶解**，所得样液用 **HPLC- 紫外检测器**检测。与**标准比较**，用**保留时间定性、标准曲线法定量**。

2、样品的预处理

提取

●**提取**：磺胺类药物不易溶于非极性溶剂，而在极性较大的溶剂中溶解性较好，一般常用乙腈等提取；

净化

●**净化**：在乙腈提取的上清液中，加入适量**正己烷**振荡除去样品中的**脂溶性杂质**，离心，**弃去正己烷**；下层液体加入**正丙醇**适量，于**50℃**下**减压干燥**，加一定量**95%**乙腈溶解残留物，并过**氧化铝 B 小柱**净化；用**95%**乙腈洗脱杂质，再用适量**70%**乙腈洗脱，收集洗脱液；

浓缩

●**浓缩**：在洗脱液中加入适量正丙醇，**50℃**下**减压干燥**，然后再准确加入一定量的流动相溶解，得到样品处理液。

3、色谱条件

- ❖ 色谱柱： ODS-C₁₈(4.6 mm×250 mm) 柱；
- ❖ 检测器： 紫外检测器；
- ❖ 波长： 270 nm ；
- ❖ 进样量： 20 μL ；
- ❖ 柱温： 35℃ ；
- ❖ 流动相： 乙腈 + 甲醇 + 水 + 乙酸 = 2:2:9:0.2 ；
- ❖ 流速： 1.0ml/min

4、标准曲线的绘制

准确称取各磺胺类兽药对照品于容量瓶中，以甲醇定容作为标准储备液，吸取各标准储备液，以甲醇稀释至质量浓度为 $0-2.0\text{mg/L}$ 的标准系列，各取 $20\ \mu\text{L}$ 进样分析，根据峰面积与相应的质量浓度进行线性回归，绘制标准曲线。

5、样品的测定

将处理好的待测样品，在 3 所述的色谱条件下，用 **HPLC-紫外检测器** 检测，与标准比较，用 **保留时间定性、标准曲线法定量**。



硝基呋喃类兽药残留的测定

(一) 概述

(二) 测定方法 (掌握)



一、概述

- **硝基呋喃类药物包括：**呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因等。
- **国际法典委员会、中国和欧美等大多数国家禁止使用此类药物，在动物性食品和饲料中不得检出：**硝基呋喃类药物和代谢物能使实验动物发生癌变和基因突变。



测定方法

高效液相色谱法（HPLC法）：最常用

ELISA（酶联免疫法）：快速筛选检验

LC-MS法（液质连用）



HPLC 法测定畜禽肉中呋喃唑酮残留

一、原理

动物性食品样品经过**预处理**后，用**流动相溶解**，过**氧化铝小柱**后供**HPLC**检测。与标准比较，用**保留时间定性**、**标准曲线法定量**。

二、样品的预处理



- ① 称取适量畜禽肉样品，按 1 : 1.5 的比例加入 C_{18} ，混匀后装入玻璃层析柱中；
- ② 用正己烷淋洗，去除脂肪；
- ③ 再用乙酸乙酯洗脱，收集洗脱液，在 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 下减压干燥浓缩至干；
- ④ 加少量流动相溶解残渣，过氧化铝小柱净化，洗脱液供 HPLC 测定。

大型中压特制玻璃柱(带转换接头)(带座架)



三、样品的测定



(1) 色谱条件

色谱柱: ODS-C18 柱 (250 mm×4.6 cm, 5 μ m) ;

检测器: 紫外检测器; 波长: 367 nm ;

流动相: 乙腈 + 0.015mol/L H₃PO₄ = 2:8

流速: 0.7~1.0ml/ min

(2) 样品测定

用流动相稀释标准系列, 经氧化铝小柱净化, 分别测定标准和样品净化液, 绘制标准曲线, 根据标准曲线定量。

四、方法说明



- ① 本法适用于鸡的肌肉、肝、肾组织和鱼肉组织中呋喃唑酮残留检测；
- ② 呋喃唑酮的检出限和回收率：鸡的肌肉组织 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ；加标回收率为 $80\%\sim 110\%$ ，鱼肉组织 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ ， $70\%\sim 120\%$ 。
- ③ C_{18} 的去垢效应和巨大的表面积，浓缩了传统的样品前处理中所需的样品匀化、组织细胞裂解、提取、净化等过程，避免了样品在上述处理中待测物的损失。



盐酸克伦特罗残留的检验

(一) 概述

(二) 测定方法 (掌握)

(一) 概述



- 盐酸克伦特罗，俗称“瘦肉精”。它曾经作为药物用于治疗支气管哮喘，在饲料中添加可以促进动物生长、提高瘦肉率，后由于其副作用太大而**遭禁用**。
- 分子式： $C_{12}H_{18}C_{12}N_2O-HCl$ ，白色或类白色的结晶粉末，无臭、味苦，熔点 $161^{\circ}C$ ，溶于水、乙醇，微溶于丙酮，不溶于乙醚。
- **化学性质稳定**，一般方法不能将其破坏，含有瘦肉精的肉制品在加工过程中经 $100^{\circ}C$ 沸水煮、烧烤和微波处理等过程，其残留并不减少。



● 瘦肉精的发现和应用

发现：上世纪 80 年代初，美国脂胺公司的研究人员意外地发现，将一定量的**盐酸克伦特罗**添加在饲料中，能够改变营养物质的代谢途径，促进动物肌肉特别是骨骼肌蛋白质的合成，同时对脂肪合成有一定的抑制作用，从而**可以促进动物生长，增加瘦肉率**，并根据一定试验得出，如果在饲料中添加适量的盐酸克伦特罗，可以提高饲料转化率、生长速率、胴体瘦肉率 10 % 以上。



● **应用：**所以，当时认为这是一种不可多得的饲料药物添加剂，并在世界各地进行推广应用；**我国也于 80 年代后期，在一些大专院校、科研院所进行了研发试验和推广试验，**经过证明其作用效果十分明显，**并把盐酸克伦特罗简称瘦肉精。**虽然这种饲料添加剂一直没有得到国家主管部门的认可，但是在利益的驱使下，我国许多地区的饲料加工企业和养殖户都开始推广应用。



作用：

能使猪提高生长速度，增加瘦肉率，猪毛色红润光亮，收腹，卖相好；屠宰后，肉色鲜红，脂肪层极薄，往往是皮贴着瘦肉，瘦肉丰满。肥猪饲喂瘦肉精后，逐渐发生四肢震颤无力，心肌肥大心力衰竭等毒副作用。



中毒的临床表现

急性中毒有心悸，面颈、四肢肌肉颤动，手抖甚至不能站立，头晕，乏力，原有心律失常的患者更容易发生反应，心动过速，室性早搏；含“瘦肉精”的食品对心脏病、高血压患者、老年人的危害更大。

检测方法



GB/T 5009.192-2003

动物性食品中克伦特罗残留量的测定

测定方法

GC-MS 法（气质连用）（国标第一法）

高效液相色谱法（HPLC 法）：第二法（自学）

ELISA（酶联免疫法）：第三法

(第一法) GC-MS 法



一、原理

将肉类样品剪碎，经过提取、净化处理后，经 N, O- 双三甲基硅烷三氟乙酰胺（BSTFA）衍生后用 GC-MS 测定。以美托洛尔为内标物，用内标法定量。

二、样品处理



(1) 提取:

准确称取适量肉样，加一定量 0.1mol/L 高氯酸匀浆，超声波提取后置于 80℃ 水浴中加热，冷却后离心。取上清液，沉淀用 0.1mol/L 高氯酸溶液洗涤，再离心，合并上层清液，调节 PH=9.5±0.1，若有沉淀，再离心。在上清液中加入 NaCl，混匀，加入异丙醇 - 乙酸乙酯（40+60），振荡提取。

取上层有机相，下层水相用异丙醇 - 乙酸乙酯（40+60）再提取一次，合并有机相，于 60℃ 水浴中旋转蒸发至近干。用少量 0.1mol/L NaH_2PO_4 缓冲液（PH6.0）溶解残留物，经微孔过滤膜过滤，并用缓冲液定容。



(2) 净化:

用乙醇、水、 NaH_2PO_4 缓冲液 (PH6.0)、水依次淋洗弱阳离子交换柱, 然后取适量提取液过阳离子交换柱, 再分别用水、乙醇淋洗去除杂质。最后用乙醇 + 浓氨水 (98+2) 洗脱, 收集洗脱液, 吹氮气浓缩至干。

(3) 衍生化

于净化后的试样残渣中加入甲醇和内标, 浓缩至干, 迅速加入衍生剂 (BSTFA), 密闭, 混匀, 于 75°C 下衍生化。蒸干后加入适量甲苯, 混匀待用。克伦特罗标准系列同时衍生化。

三、测定



● 测定条件

GC 条件:

色谱柱: **DB-5** (**30m*0.25mm** , **0.25 μ m**)

载气: 氦气, 柱前压: **8psi**

进样口温度: **240 $^{\circ}$ C** , 进样量: **1 μ l**

MS 条件:

EI 源电子轰击能: **70eV**, 接口温度: **285 $^{\circ}$ C** ,

溶剂延迟: **12min** 。



测定方法

美托洛尔内标标准溶液：准确称取美托洛尔标准品，用甲醇溶解配制成 2.4mg/L 的内标使用液；

克仑特罗标准溶液：准确称取克仑特罗标准品，用甲醇溶解配制成 0.5mg/L 的标准使用液。

取适量样品衍生物或标准系列衍生液注入 GC-MS 仪中，**以试样峰与内标物峰的相对保留时间定性。**

以试样峰与内标峰的峰面积比值单点或多点标准定量。



四、方法说明

- 肉样应先绞成肉糜，然后取样检验；
- 本方法的检出限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围为 $0.025\text{ng}-2.5\text{ng}$ ，回收率为 $92-98.7\%$ ；
- 本法采用高氯酸匀浆、超声波萃取、离心和液-液萃取等样品处理方法，效果较好；
- 液-液萃取中加入氯化钠起防止乳化的作用；
- 衍生化前经净化处理可防止具有相同官能团的杂质也生成衍生干扰测定。