

饲料中黄霉素 A 含量测定的研究进展

周迎春¹ 华向美² 刘少博³

1. 河南进口肉类指定口岸漯河查验区服务中心, 河南漯河 462300;

2. 中华人民共和国漯河海关, 河南漯河 462300; 3. 大咖国际食品有限公司, 河南焦作 454850

摘要 对于抗生素的禁用, 进行饲料中黄霉素 A 含量测定是源头治理的关键。为此, 本文对黄霉素的应用及危害和饲料中黄霉素 A 含量测定方法的研究进展进行了综述, 以为饲料中黄霉素 A 含量测定提供参考。

关键词 饲料; 黄霉素 A; 测定; 研究进展

黄霉素又称富拉磷^[1]、默诺霉素、斑伯霉素、黄磷脂素^[2]或黄磷脂醇素、富乐霉素, 它是一种多组分磷酸糖脂类抗生素, 由灰绿链霉菌厌氧发酵产生^[3-5]。黄霉素呈弱酸性, 属于强极性化合物, 易溶于水、甲醇、二甲基甲酰胺等小分子物质^[6]; 200 °C 开始分解^[7], 在中性水和甲醇溶液中稳定^[8], 紫外吸收峰为 258 nm^[9]。

现有研究表明, 黄霉素有 5 种活性成分, 皆具有类似的化学特性和抗菌活性^[10-11], 黄霉素 A 是黄霉素中最主要活性组分^[12], 占活性组分总量 60% ~ 80%^[13], 我国规定黄霉素 A 的相对量应大于 50%^[14]。由于黄霉素 5 种活性成分结构相似且难以生产单一成分的标准品, 因此, 目前的研究中多通过检测黄霉素 A 的含量来衡量黄霉素的含量。

1 黄霉素的应用及危害

黄霉素作为国外上市最早的一种抗生素饲料添加剂, 它曾是国外唯一允许在养殖业中使用的含磷脂糖脂类抗生素。黄霉素用量少, 但对牛、猪、鸡等动物促生长效果突出^[15], 提高饲料利用效率^[16], 可用于预防球虫病^[17], 抑制细菌如金黄色葡萄球菌、链球菌、双球菌、巴氏杆菌、布氏杆菌等^[18-20], 与其他药物添加剂如维生素、氨基酸、微量元素等无配伍禁忌^[21]。黄霉素具有的显著优势使其被广泛用于畜禽

和水产养殖中。

在美国, 黄霉素被批准用于牛、猪和家禽, 但使用水平应在 0.5 ~ 20 mg/kg, 可以单独使用, 也可以与莫能菌素、拉沙里菌素或盐霉素等离子载体抗生素联合使用, 以提高增重率和饲料效率^[22]。2002 年我国原农业部正式批准黄霉素预混剂为新兽药, 并在同年引进外国先进的黄霉素生产工艺技术进行大规模生产^[23]。黄霉素以及所有与其有关的产品已被广泛使用在我国畜禽水产养殖中来提高动物的生长繁殖性能^[24]。2005 年欧盟农业部长会议决定, 自 2006 年 1 月 1 日起, 禁止在饲料中添加黄霉素^[25], 2009 年 9 月 30 日起黄霉素仅允许用于兔子饲养过程中^[1]。

研究表明, 黄霉素可引起瘤胃细菌的适应性反应, 从而显著改变其抗生素敏感性^[26]。黄霉素本身无抗原性, 与其他常用的抗生素之间有无交叉抗原性有待深入研究。作为非代谢类药物, 黄霉素经口服后几乎不被吸收, 一方面可能在动物产品中残留^[27], 另一方面通过动物粪便会不可避免地排到环境中, 容易污染土壤、地表水等环境^[28], 进而可能给人类安全带来威胁。长期食用黄霉素残留的动物源食品会破坏人体肠道菌群^[29]; 对动物的骨骼发育有影响, 大量摄入甚至会产生造血功能障碍^[30], 其对动物及人体的其他危害还有待于深入研究^[15]。

2016 年 8 月, 国家卫生计生委等十四部委联合

收稿日期: 2021-03-09

基金项目: 中华人民共和国漯河海关科研项目(2021KY001)

周迎春, 女, 1990 年生, 硕士, 助理工程师。

发布《遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)》,黄霉素作为一种抗菌药物,不可例外地受到风险评估^[31]。检验检疫部门也将黄霉素列为饲料和动物源性食品残留监控计划^[32]。农业农村部第194号公告指出^[33],自2020年1月1日起,退出除中药外的所有促生长类药物饲料添加剂品种,这其中就包含禁用黄霉素预混剂。对饲料中黄霉素A的含量进行检测是实现源头治理的关键,因此有必要深入了解黄霉素A测定方法的研究进展。

2 黄霉素A检测技术研究进展及存在的问题

目前针对黄霉素检测技术的研究主要是对其主要活性组分黄霉素A的测定,一般通过检测黄霉素A的含量间接计算样品中黄霉素的添加量。检测技术主要有液相色谱法^[34]、液相色谱-串联质谱法^[30]、离子对高效液相色谱法^[35],测定对象多为饲料,个别为猪肉、禽类组织。

2.1 液相色谱法检测进展及存在问题

2003年杨秀玉等^[9]利用液相色谱法对规格为4%和8%的黄霉素预混剂及各生产厂家提供的标准品中黄霉素A的相对量进行了检测。试验利用YMC-Pack ODS-A S色谱柱、乙腈+甲酸铵溶液(45+55)等度洗脱对黄霉素5种活性组分进行分离,采用高效液相色谱仪,在258 nm检测波长下,用紫外检测器进行检测,最后利用归一化法计算黄霉素A的相对量。该方法操作简便、快速,但定量结果与外标法相比,误差较大。

我国2006年版《进口兽药质量标准》^[36]指出,可通过液相色谱法来检测黄霉素预混剂中黄霉素A含量。该测定方法与2003年杨秀玉等^[9]研究方法相似,采用归一化法定量,与外标法相比,不能很好地反映黄霉素A实际含量。

江苏省实施的地方标准《DB32/T 1279-2008饲料和饲料添加剂中黄霉素A的测定高效液相色谱法》^[37]中指出:饲料和饲料添加剂中黄霉素A经甲醇水提取,中性氧化铝柱净化,乙腈+甲酸铵溶液(45+55)等度洗脱,C18色谱柱分离,紫外检测器258 nm波长测定,采用外标法定量,可使饲料和饲料添加剂方法检出限达到1 000 μg/kg。

2010年,李会荣等^[38]建立了利用高效液相色谱仪测定饲料中黄霉素A含量的方法。称5 g饲料,样

品中的黄霉素经甲醇甲酸铵2次提取,用C18小柱净化除杂,其他条件与阮静等^[7]检测方法一致,黄霉素A方法定量限为1.5 mg/kg,黄霉素添加浓度为2、3、5 mg/kg时,黄霉素A的回收率在88.5%~113.2%,变异系数在2.2%~5.1%。与《DB32/T 1279-2008饲料和饲料添加剂中黄霉素A的测定高效液相色谱法》相比,该方法定量限较高,且以黄霉素标准品换算成相当于黄霉素A的质量来配制标准曲线,加之黄霉素各组分分离度较差,必然会增大实验误差,不利于准确定性、定量。

安徽省实施的地方标准《DB34/T 1358-2011饲料中黄霉素的测定-高效液相色谱法》^[39]中指出:饲料中黄霉素经50%的甲醇提取后,用pH 6.0磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度,上机条件与江苏省《DB32/T 1279-2008饲料和饲料添加剂中黄霉素A的测定高效液相色谱法》一致,该方法中黄霉素5种组分得到很好的分离,峰型好,方法检出限为500 μg/kg,有效提高了检测的灵敏度。

2008年,曾兆国等^[35]在流动相中加入庚烷基磺酸钠离子对试剂,利用液相色谱仪分离鉴别黄霉素。试验采用C18色谱柱,以乙腈-3%庚烷基磺酸钠水溶液(35:65)为流动相,流速1.0 mL/min,柱温25℃,紫外检测器检测波长256 nm。黄霉素是一种弱酸性的多组分的物质,庚烷基磺酸钠是一种离子对试剂,它在水中可电解成庚烷基磺酸钠负离子,与胺类电离成的铵正离子结合而改变其保留性质,因此,本试验中建立的检测方法可使黄霉素5种主要组分完全有效分离,而且无其他杂峰干扰,但具体运用到实际样品的检测,仍需要建立前处理方法以满足上机测定条件。

液相色谱法实验条件操控起来相对较容易,但它单纯利用极性进行分离测定,很难将黄霉素A从相似的组分中有效分离出来且方法检出限、定量限往往偏高,难以满足检测需要。黄霉素成分的复杂性、结构的相似性让超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱技术成为黄霉素A检测的首选方法。

2.2 液相色谱-串联质谱法研究进展及存在问题

2007年,Sandra^[34]利用液相色谱-单四级杆串联质谱仪对鸡粪中黄霉素通过C4 SPE小柱,50℃甲醇洗脱,C18柱,0.3%的甲酸水+乙腈作为流动相,测定黄霉素A。确定黄霉素A两个母离子[M-H]⁻ 1 580.6 m/z和[M-H]⁻ 789.8 m/z,根据两个母离

子的峰面积绘制 50-5 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内的曲线图, 研究表明必须通过基质曲线定量, 否则结果严重不准确。该研究为后来学者利用液相色谱-串联质谱法测定黄霉素 A 提供了思路, 但是由于液相色谱-单四级杆串联质谱仪不能利用二级质谱定性, 容易引起检测结果不准确。

2010 年, Gallo 等^[1]建立了测定饲料中黄霉素 A 含量的方法。样品中的黄霉素 A 经氨水甲醇提取, 旋转蒸发至近干除去有机相后复溶, 经 HLB 柱净化, 采用液相色谱-串联质谱仪, 以 Synergi MAX RP 色谱柱为分析柱, 乙腈+10 mmol/L 的乙酸铵为流动

相进行梯度洗脱, 多反应监测(MRM)、负离子模式下检测。以单荷电分子离子和双荷电分子离子作为母离子($[\text{M} - \text{H}]^-$ 1 580.4 m/z 和 $[\text{M} - \text{H}]^{2-}$ 789.9 m/z), 从中筛选出 4 个主要子离子产物(详见图 1), $[\text{M} - \text{H}]^{2-}$ 中 575.7 m/z (定量离子)、554 m/z 以及 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 中 1 152 m/z, 1 109 m/z 定性离子, 利用饲料基质配制标准曲线, 对饲料中黄霉素 A 进行了分析。方法的检出限为 30 $\mu\text{g/kg}$, 方法的定量限为 100 $\mu\text{g/kg}$, 平均回收率 83.9% ~ 94.2%, 相对标准偏差 RSD < 23%。相比液相色谱法, 该方法特异性强, 但需要配置基质校准曲线, 增加了操作的复杂性。

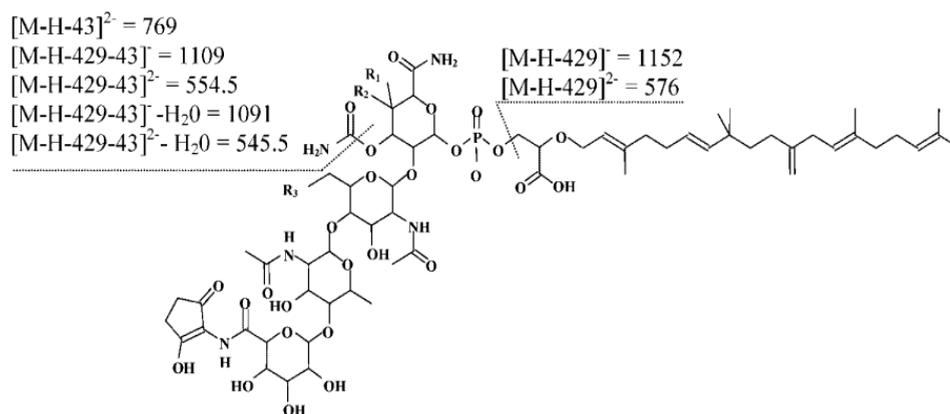


图 1 负离子模式下黄霉素 A 可能存在离子碎片

2012 年, 李金强等^[32]也对液相色谱-串联质谱法测定饲料中黄霉素 A 含量进行了研究, 试验选用 Agilent Ecillps C18 色谱柱为分析柱, 选择 $[\text{M} - \text{H}]^{2-}$ 789 m/z 为母离子, 其子离子分别为 575.7 m/z (定量离子) 和 553.8 m/z (定性离子), 经液相色谱-串联四级杆质谱检测。黄霉素 A 的线性范围为 100 ~ 5 000 $\mu\text{g/L}$, 相关系数(r)为 0.999 725。方法的检出限为 30 $\mu\text{g/kg}$, 方法的定量限为 100 $\mu\text{g/kg}$, 回收率在 75% ~ 95%, 相对标准偏差在 4.7% ~ 6.4%。该方法特异性强, 且该方法不需要配置基质校准曲线, 操作简便, 利于推广应用。

2016 年, 吴家鑫等^[40]利用超高效液相色谱-高分辨四级杆飞行时间串联质谱仪对预混剂中的黄霉素 5 种组分进行鉴别分析。黄霉素预混剂样品加入适量 50% 甲醇溶液, 混匀, 置超声浴中超声 15 min, 放冷至室温, 用 50% 甲醇溶液稀释至适当浓度, 摇匀, 过滤后上机。采用 C18 色谱柱分离样液中的 5 种黄霉素组分, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液(含 2 mmol/L 乙酸

铵)为流动相梯度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 质谱条件为电喷雾离子源, 检测方式为负离子全扫描模式, 通过保留时间、精确分子质量和二级质谱特征碎片完成对黄霉素的 5 种组分的鉴别。与高效液相色谱方法比较, 本方法具有判断准确、鉴别快速的特点, 但用于检测时仍需要建立相应的前处理方法。

3 展 望

饲料中黄霉素 A 含量测定的研究有了一定的基础, 但其检测技术和监控体系仍相对滞后。由于黄霉素 A 的纯品难以获得, 试验方法多以黄霉素为标准品, 测定结果通过含量换算来计算黄霉素 A 含量, 加大了检测误差, 多数前处理中提取液需要旋蒸近干复溶后才能进行净化, 整个流程过于复杂, 不利于大批量快速检验检测。因此, 尽快制得黄霉素 A 标准品, 优化前处理方法, 建立准确、高效的检测黄霉素 A 含量的方法势在必行。

参 考 文 献

- [1] GALLO P, FABBROCINO S, SERPE L, et al. Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry[J]. Rapid communications in mass spectrometry, 2010, 24(7):1017-1024.
- [2] 吴家鑫,张国栋,刘晓洁,等. 聚类分析在黄霉素发酵过程中的应用[J]. 微生物学通报, 2012, 3(6):865-871.
- [3] WALLHAUSSER K H, NESEMANN G, PRAVE P, et al. Moenomycin, a new antibiotic. I. Fermentation and isolation [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1965(5):734.
- [4] HUBER G, SCHACHT U, WEIDENMULLER H L, et al. Meonomycin, a new antibiotic. II. Characterization and chemistry[J]. Antimicrob agents chemother (Bethesda), 1965(5):737-742.
- [5] WASILIEWSKI E, MUSCHAWEK R, SCHUTZE E. Moenomycin, a new antibiotic. III. Biological properties[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1965(5):743-748.
- [6] 卜仕金,徐小艳. 专用抗生素饲料添加剂-黄霉素[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003(3):14-16.
- [7] 阮静,刘晓玥,饶宏英. 黄霉素的特性及检测方法[J]. 饲料广角, 2006(9):32-33.
- [8] 陈永辉,李国泉,曾兆国,等. 黄霉素的研究进展[J]. 饲料博览(技术版), 2008(7):11-13.
- [9] 杨秀玉,吴好庭,张秀英. 高效液相色谱法检查不同厂家黄霉素中黄霉素 A 的相对量[J]. 中国兽药杂志, 2003(12):22-24.
- [10] WELZEL P, WIETFELD B, KUNISCH F, et al. Moenomycin: further structural studies and preparation of simple derivatives[J]. Tetrahedron, 1983, 39(9):1583-1591.
- [11] FEHLHABER H W, GIRG M, SEIBERT G, et al. Moenomycin A: A structural revision and new structure-activity reactions[J]. Tetrahedron, 1990, 46(5):1557-1568.
- [12] 李金强,曹鹏,尹大路,等. 液相色谱串联质谱测定畜禽肉中黄霉素 A 的残留量[J]. 分析实验室, 2013, 32(1):95-98.
- [13] 杨秀玉,孙玉梅,赵晖,等. 抗生素微生物检定法测定黄霉素预混剂的含量[J]. 中国兽药杂志, 2004, 8(5):20-23.
- [14] 中华人民共和国农业部. 农业部兽药质量标准(2003年增补版)[S]. 北京: 农业农村部, 2003:263-264.
- [15] 郑君杰,杨宝良. 黄霉素及其提高动物生产性能作用[J]. 饲料研究, 2003(8):34-36.
- [16] 陈永辉,刘波,曾兆国,等. 黄霉素产生菌在发酵过程中菌丝体内外效价的变化研究[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(5):27-30.
- [17] 范本伦. 斑伯霉素[J]. 精细与专用化学品, 1985(11):16-17.
- [18] PARTICK B, LUC A D, FREDDY H. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria[J]. Clinical microbiology reviews, 2003, 16(2):175-188.
- [19] HUBER G, NESEMANN G. Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis[J]. Biochem biophys res commun, 1968, 30(1):7-13.
- [20] 吴家鑫,刘晓洁,齐鹏,等. 基于主元分析-模糊 C 均值聚类优化黄霉素发酵过程[J]. 化学工程, 2013, 41(10):5-8.
- [21] 郭萍. 动物促生长添加剂-黄霉素[J]. 山东饲料, 2004(9):13-15.
- [22] MOELLER M W, WAIBEL P E, QUARLES C L, et al. Response of turkeys to graded levels of bambamycins[J]. Poultry science, 1976, 55(3):1166-1168.
- [23] 吕丽娟,吴宝强. 黄霉素的发展状况及其发酵工艺研究进展[J]. 饲料博览, 2013(1):22-25.
- [24] 郭金文. 黄霉素在动物生产中的应用[J]. 养殖技术顾问, 2012(5):83.
- [25] Commission of the European Communities. Update (situation as 30 April 2004) of the list of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs[Z]. Off. J. Eur. Commun., 2004(50):1.
- [26] EDWARDS J E, BEQUETTE B J, MCKAIN N, et al. Influence of flavomycin on microbial numbers, microbial metabolism and gut tissue protein turnover in the digestive tract of sheep[J]. Br J Nutr, 2005, 94(1):64-70.
- [27] BUTAYE P, DDEVRIESE L A, HAESBROUCK F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria[J]. Clin Microbiol. Rev, 2003, 16(2):175-188.
- [28] BOXALL A B, KOLPIN D W, BENT H S, et al. Peer reviewed: Are veterinary medicines causing environmental risks[J]. Environmental science & technology, 2003, 37(15):286A-294A.
- [29] JEONG S H, SONG Y K, CHO J H. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota[J]. Regul toxicol pharmacol, 2009, 53(5):209-216.
- [30] 许辉,张鸿伟,王凤美,等. 液相色谱-串联质谱快速检测禽类组织中黄霉素 A 残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12):3784-3789.
- [31] 刘春龙,王仲琴,方威. 中药制剂替代黄霉素对猪生长繁殖性能的影响[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2018, 38

微生物发酵饲料常见菌种 及在养殖业中的应用

孙超 暴丽梅* 原雪峰 孙彬 张飞

天津市现代天骄农业科技有限公司,天津 301800

摘要 微生物发酵饲料以其诸多优势成为饲料行业研究热点,其作为一种新型无抗饲料,具有改善饲料适口性、促进动物采食量、增加消化利用率、增强机体抗病力等作用。为此,本文结合已有的相关文献,对微生物发酵饲料常见菌种及应用,微生物发酵饲料在生猪、家禽和反刍动物养殖生产中的应用研究进展进行了综述,以期促进我国养殖业得到健康可持续发展。

关键词 微生物发酵饲料;菌种;应用

在我国过去养殖行业的发展历程中,抗生素常应用于饲料中,作用显著。但是,随着我国养殖行业不断呈规模化、集约化发展,药物残留及危害问题日益凸显,使得人们对食品安全格外关注^[1]。因此,在如今“禁抗”“限抗”的背景趋势下,探求环保、营养好、利用率高、污染小的饲料成为行业研究的热点,其中,微生物发酵饲料以其科学、安全、环保等优势,成为现今饲料行业的主流发展方向。为

此,本文将结合有关微生物发酵饲料的研究成果,对微生物发酵饲料常见菌种及应用,微生物发酵饲料在生猪、家禽和反刍动物养殖生产中的应用研究进展进行综述,以期促进我国养殖业得到健康可持续发展。

1 微生物发酵饲料的定义

微生物发酵饲料指将各种原料经过微生物发

收稿日期:2021-03-03

*通讯作者

孙超,男,1969年生,硕士。

(10):36-37.

[32] 李金强,沙美兰,李晓玉,等.液相色谱串联质谱法测定饲料中黄霉素 A 的含量[J].中国兽药杂志,2012,46(9):22-25.

[33] 农业农村部.中华人民共和国农业农村部公告第 194 号[J].浙江畜牧兽医,2020,45(1):28.

[34] SANDRA P,BRENNAN E M,PETER E,et al.Determination of the antimicrobial growth promoter moenomycin-A in chicken litter[J].Journal of chromatography,2007,1175(2):234-241.

[35] 曾兆国,刘波,陈永辉,等.离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法的研究[J].饲料工业,2008(8):46-47.

[36] 中华人民共和国农业部.进口兽药质量标准[S].北京:农业农村部,2006:67-68.

[37] 江苏省质量技术监督局.饲料和饲料添加剂中黄霉素 A 的测定高效液相色谱法:DB32/T1279-2008[S].南京:江苏省农业科学院,2008.

[38] 李会荣,刘继明,强莉,等.饲料中黄霉素 A 的测定[J].中国畜牧杂志,2010,46(14):38-42.

[39] 安徽省农业标准化技术委员会.饲料中黄霉素的测定-高效液相色谱法:DB34/T 1358-2011[S].合肥:安徽省兽药饲料监察所(安徽省畜产品质量安全检测中心),2011.

[40] 吴家鑫,刘敏,尚飞,等.利用超高效液相色谱-高分辨四极杆飞行时间质谱鉴别预混剂中黄霉素[J].中国兽药杂志,2016,50(5):24-28.

【责任编辑:刘少雷】