

### 3 小结

在筛选的基础上,本研究制备了牛乳中二噁英类化合物标准物质,采用高分辨气相色谱-高分辨质谱法测定 29 种二噁英类化合物。瓶间均匀性检验和 12 个月的长期稳定性检验显示,制备的标准物质均匀性和稳定性良好,多家实验室协作定值结果可比。该标准物质的研制,将为二噁英类化合物检测提供质量评价手段,同时为食物基体标准物质的制备提供技术支持。

(志谢 感谢参与本次定值工作的中国检验检疫科学研究院、浙江省疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心、深圳市疾病预防控制中心)

### 参考文献

- [1] 胡晓燕. 我国标准物质/标准样品发展综述[J]. 山东冶金, 2006, 28(4): 1-4.
- [2] 蒋锦锋, 李栋, 刘惠芳, 等. 三乙酸甘油酯中丙酮溶液标准物质[J]. 烟草科技, 2013(5): 36-48.
- [3] Wegener J W M, Cofino W P, Maier E A, et al. The preparation, testing and certification of two freshwater sediment reference

materials for polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls; BCR CRM 535 and CRM 536[J]. Trends Anal Chem, 1999(18): 1.

- [4] 卢宪波, 陈吉平, 王淑秋, 等. 贻贝中有机氯农药和多氯联苯标准物质的研制及同位素稀释高分辨质谱法定值[J]. 色谱, 2012, 30(9): 915-921.
- [5] 高丽荣, 郑明辉, 李敬光, 等. 土壤中多氯联苯成分分析标准物质的研制与定值[J]. 分析化学, 2006, 34(11): 1579.
- [6] 邓波, 张建清, 张立实, 等. 某市市售牛奶及其制品中二噁英类化合物污染水平[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(10): 867-870.
- [7] 中国国家标准化委员会. GB/T 5009. 205—2007 食品中二噁英及其类似物毒性当量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [8] 国家标准物质研究中心. JJG 1006—1994 一级标准物质技术规范[S]. 北京: 中国计量出版社, 1994.
- [9] 黄文军, 高丽荣, 弓爱君, 等. 同位素稀释高分辨气相色谱-高分辨质谱法测定土壤中痕量有机氯农药残留[J]. 色谱, 2010, 28(5): 460.
- [10] Leeuwen S P J, Van Cleuvenbergen R, Abalos M, et al. New certified and candidate certified reference materials for the analysis of PCBs, PCDD/Fs, OCPs and BFRs in the environment and food[J]. Trends Anal Chem, 2006, 25(4): 397-409.

## 论著

# 我国部分地区市售巴氏杀菌乳中 $\beta$ -内酰胺酶含量调查

周蕊, 丁颖, 周爽, 赵云峰

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:**目的 采用酶热生物传感器法对我国部分地区巴氏杀菌乳样品中 $\beta$ -内酰胺酶进行快速检测及本底含量调查。方法 在巴氏杀菌乳样品中预先加入一定量青霉素 G, 室温震荡反应 3 h, 使样品中的 $\beta$ -内酰胺酶充分酶解青霉素 G 底物, 直接通过酶热生物传感器测定青霉素 G 含量。根据反应前后样品中青霉素 G 含量的变化, 间接计算巴氏杀菌乳样品中 $\beta$ -内酰胺酶的活性。2013 年 6~8 月在 13 个省市采集巴氏杀菌乳样品 106 份, 对其 $\beta$ -内酰胺酶含量进行本底调查。结果 该方法线性范围为 4~20 U/ml, 检出限和定量限分别为 2 和 4 U/ml。全国 106 份样品的总检出率为 3.8%, 其中北京市的 47 份样品中 $\beta$ -内酰胺酶活性均 < 2 U/ml; 其他 12 个省市的 59 份样品中 $\beta$ -内酰胺酶活性均 < 4 U/ml, 其中 4 个样品在 2~4 U/ml 之间。结论 我国 13 个省市 106 份巴氏杀菌乳样品的测定结果表明样品中 $\beta$ -内酰胺酶含量普遍较低, 一定程度上表明我国巴氏杀菌乳中违法添加 $\beta$ -内酰胺酶的问题已得到较大改善。

**关键词:**  $\beta$ -内酰胺酶; 酶热生物传感器; 巴氏杀菌乳; 青霉素 G

中图分类号: R155; TS252.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)03-0209-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.03.002

**Investigation of  $\beta$ -lactamases activity in pasteurized milk in parts of China**

ZHOU Rui, DING Hao, ZHOU Shuang, ZHAO Yun-feng

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the  $\beta$ -Lactamases activities in pasteurized milk in China based on an enzyme thermistor (ET) biosensor. **Methods** Certain amount of penicillin G was incubated with the milk sample for 3 h, then an aliquot of the mixture was directly injected into the ET system to give a signal corresponding to penicillin G remained. The amount of  $\beta$ -lactamase was calculated by the penicillin G consumed during incubation. 106 pasteurized milk samples collected from 13 provinces were tested. **Results** The linear range of this method was 4–20 U/ml with LOQ and LOD of 2 and 4 U/ml, respectively. The total detection rate was 3.8%. 47 pasteurized milk products collected in Beijing showed negative results containing  $\beta$ -lactamase lower than 2 U/ml (LOD). 59 products collected from 12 other provinces contained  $\beta$ -lactamase lower than 4 U/ml, among which 4 products were within the range of 2 to 4 U/ml. **Conclusion** Low levels of  $\beta$ -lactamase were detected in 106 milk samples collected from 13 provinces in China, and it was suggested that the illegal use of  $\beta$ -lactamase was almost eliminated in China.

**Key words:**  $\beta$ -lactamase; enzyme thermistor biosensor; pasteurized milk; penicillin G

在乳牛养殖中, $\beta$ -内酰胺类抗生素是治疗乳牛疾病最常用的抗生素,也是牛乳中最主要的残留抗生素<sup>[1-2]</sup>。随着我国乳及乳制品抗生素残留监管的日趋严格,在经济利益的驱使下,能有效水解此类抗生素的 $\beta$ -内酰胺酶被违法添加入牛乳,使不合格奶源流入乳制品生产及消费环节。由此导致消费者食用后耐药性增高,为食品安全埋下重大隐患。因此,2009年2月 $\beta$ -内酰胺酶被列入前卫生部公布的《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》<sup>[3]</sup>。

迄今已发现400多种 $\beta$ -内酰胺酶,而市场上出售的用于水解牛乳中抗生素的 $\beta$ -内酰胺酶制剂,主要为对青霉素有特效分解作用的亚类。对于种类繁多、结构多样的 $\beta$ -内酰胺酶制剂,针对酶结构的直接检测方法难度较大。目前绝大多数方法通过表征酶解前后底物的变化对乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的活性进行间接测定,如卫生部颁布的乳及乳制品中舒巴坦敏感 $\beta$ -内酰胺酶类药物检验方法——杯碟法<sup>[4]</sup>,该方法灵敏度高,重现性好,但存在实验周期长,技术要求高等局限性。本实验室前期成功开发了基于酶热生物传感器的快速检测方法,快速、简便,结果与杯碟法具有良好的可比性<sup>[5]</sup>,本文即采用酶热生物传感器法对我国13个省市的106个巴氏杀菌乳样品进行测定,并初步分析我国牛乳中 $\beta$ -内酰胺酶的本底值含量,为食品安全相关政策的制定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

于2013年6~8月在北京(47份)、黑龙江

(4份)、河北(4份)、新疆(7份)、贵州(4份)、陕西(4份)、甘肃(7份)、内蒙(2份)、湖南(6份)、宁夏(1份)、江苏(7份)、浙江(6份)、湖北(7份)13个省市采集市售不同品牌、不同批次巴氏杀菌乳样品共106份。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

酶热生物传感器(瑞典欧米克生物科技集团)、全温振荡培养箱。

青霉素标准品(1 500~1 750 U/mg,编号:1502508,美国Sigma)、 $\beta$ -内酰胺酶标准品(4 460 kU/ml,编号:130441,中国药品生物制品检定所)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇,试剂均为分析纯或以上纯度,试验用水为重蒸去离子水。

## 1.2 方法

依照参考文献[5]中酶热生物传感器法操作。

### 1.2.1 样品前处理

取巴氏杀菌乳样品置于5 ml离心管中,共2管(2 ml/管),分别标为A、B。在A、B两管中各加入20  $\mu$ l青霉素G标准溶液至终浓度为0.2 mmol/L,A管立即进行检测,B管室温翻转振荡3 h后进行检测。

### 1.2.2 配制标准溶液

$\beta$ -内酰胺酶标准溶液:准确量取或称取适量 $\beta$ -内酰胺酶标准物质,用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容为500 U/ml的标准溶液,现用现配。青霉素标准溶液:准确称取适量(精确至0.1 mg)青霉素标准物质,用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容为20  $\mu$ mol/ml的标准溶液,现用现配。磷酸盐缓冲溶液:以磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0)。75%乙醇:将无水乙醇和水以体积比3:1混合均匀。

### 1.2.3 酶热生物传感器条件

传感器工作温度 30 ℃,流动相为磷酸盐缓冲溶液,流速 1.0 ml/min,进样量 350  $\mu$ l。

### 1.2.4 样品测定

将按 1.2.1 处理后的 A、B 两管溶液以酶热生物传感器进行测定,记录信号峰高。以 A、B 溶液信号峰高之差作为样品信号,通过标准曲线进行定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理条件的优化

酶热生物传感器基于酶柱对底物特异性的催化作用而对底物浓度进行测定,因此专一性强,基质干扰小,对样品前处理的要求低;并且酶柱中填充的多孔玻璃微珠直径在 125 ~ 150  $\mu$ m 之间,脂肪、蛋白质等大分子不会对酶柱造成堵塞,因此样品无需进行离心、过滤,可直接进样分析。

为保证酶解过程充分,本试验比较了 3 种不同温育条件对酶解过程的影响。将加标巴氏杀菌乳样品(含有 10 U/ml 的  $\beta$ -内酰胺酶)与青霉素 G 标准溶液混合,使其中青霉素 G 浓度达到 0.2 mmol/L,分别按以下 3 种条件进行酶解反应:① 25 ℃ 振荡 3 h;② 37 ℃ 静置 3 h;③ 25 ℃ 静置 3 h。反应后测定剩余的青霉素 G,并计算出 3 种条件下的青霉素 G 分解百分率,结果见图 1。

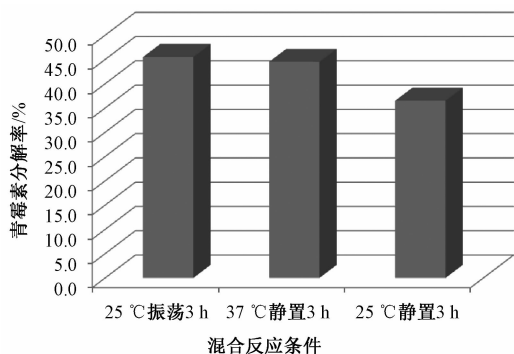


图 1 酶解反应条件优化结果

Figure 1 Optimization of conditions during enzyme catalysis reaction

3 种条件下,牛乳中的  $\beta$ -内酰胺酶均能催化青霉素 G 的分解,其中在①和②两种条件下,青霉素 G 的水解效率更高。这可能是由于振荡过程有助于物质的扩散,保证了酶与底物的充分接触。同时, $\beta$ -内酰胺酶的活性受温度影响较明显,其酶活最佳温度为 37 ℃,在该温度下酶解效率较高。因此,25 ℃ 振荡 3 h 和 37 ℃ 静置 3 h 均为较好的酶解条件,能获得较高的检测灵敏度。

### 2.2 基质加标标准曲线

以空白巴氏杀菌乳样品配制  $\beta$ -内酰胺酶基质加

标标准曲线,标准系列浓度为 0、4、10、20 U/ml。按照 1.2.1 和 1.2.3 进行处理和测定,以温育反应前后信号峰高之差为纵坐标,其对应浓度为横坐标作图,绘制校准曲线,见图 2。标准曲线线性范围为 4 ~ 20 U/ml,回归方程为  $y = 0.340x + 0.068$ ,  $r^2 = 0.997$ ,方法检出限为 2 U/ml,定量限为 4 U/ml。当浓度 > 20 U/ml 时,超出线性范围,需稀释后进行测定。

### 2.3 样品测定结果

将 106 份巴氏杀菌乳样品用 1.2.1 和 1.2.3 方法分 5 批进行处理、测定,每批随机插入 1 个质控样品( $\beta$ -内酰胺酶含量为 6、10 或 18 U/ml)用于评价测定结果的有效性。5 个质控样品的回收率均在 85% ~ 108% 之间,表明了结果的可信度,样品测定结果见表 1。其中北京、黑龙江、河北、甘肃、内蒙、湖南、宁夏、江苏、湖北 9 个省市的样品中均未检出  $\beta$ -内酰胺酶 (< 2 U/ml);新疆、贵州、陕西、浙江 4 个省市各有 1 份样品检出  $\beta$ -内酰胺酶,含量均 < 4 U/ml。对 4 个阳性样品进行 3 次平行验证,测定结果见表 2。由于其含量介于检出限与定量限之间,其 RSD 值较大,因此测定结果只能作为半定量参考。

表 1 我国 13 个省市巴氏杀菌乳中  $\beta$ -内酰胺酶含量测定结果  
Table 1  $\beta$ -lactamase activities in pasteurized milk products collected from 13 provinces

采集地点	样品数/份	阴性样品数/份 (< 2 U/ml)	阳性样品数/份 (> 2 U/ml)	检出率/%
北京	47	47	0	0.0
黑龙江	4	4	0	0.0
河北	4	4	0	0.0
新疆	7	6	1	14.0
贵州	4	3	1	25.0
陕西	4	3	1	25.0
甘肃	7	7	0	0.0
内蒙	2	2	0	0.0
湖南	6	6	0	0.0
宁夏	1	1	0	0.0
江苏	7	7	0	0.0
浙江	6	5	1	16.7
湖北	7	7	0	0.0
合计	106	102	4	3.8

## 3 讨论

乳及乳制品中违法添加  $\beta$ -内酰胺酶已引起全社会广泛关注,并于 2009 年列入《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》。针对该问题也已发展出一系列检测方法。然而,由于牛乳中  $\beta$ -内酰胺酶来源复杂,除可能外源性人为添加外,也有动物体内细菌分泌产生的内源性  $\beta$ -内酰胺酶,且内源性酶含量水平受诸种因素影响<sup>[6]</sup>。现有的检测方法均无法实现对内、外源性  $\beta$ -内酰胺酶含量的区

表2 阳性样品测定结果( $n=3$ )Table 2  $\beta$ -lactamase detected in 4 milk samples

样品编号	测定值(U/ml)	平均值(U/ml)	RSD/%
新疆-S4	2.7	3.1	15.4
	2.9		
	3.6		
贵州-S7	2.6	2.4	23.3
	1.8		
	2.9		
陕西-S2	2.2	2.9	21.5
	3.1		
	3.4		
浙江-S1	3.9	3.7	15.2
	4.2		
	3.1		

分,从而导致评判标准难以界定。因此,开展广泛的本底调查工作对于判定是否违法添加意义重大。目前已陆续出现一些区域性的调查结果<sup>[7-10]</sup>,如但对全国范围的采样和调查仍未见报道。本文以此为出发点在全国部分地区巴氏杀菌乳中 $\beta$ -内酰胺酶含量进行初步调查分析,能够在一定程度上反映我国部分地区,特别是我国主要的乳制品生产和消费地区的 $\beta$ -内酰胺酶含量现状。

从调查结果方面分析,2012—2013年间的区域性调查显示:苏州市售31份液体乳样品中 $\beta$ -内酰胺酶的检出率为3.2%<sup>[7]</sup>;甘肃地区50份成品奶中 $\beta$ -内酰胺酶的检出率为6%<sup>[8]</sup>;吉林省152份牛乳样品中 $\beta$ -内酰胺酶的检出率为17.1%<sup>[9]</sup>;南通市102份市售牛乳样品中 $\beta$ -内酰胺酶的检出率为14.7%<sup>[10]</sup>。这些结果与本文结果较为一致。而我国在2007年发表的一项研究结果<sup>[11]</sup>显示,在所采集的77份市售牛乳样品中,检出率高达64%。与之相比,可见我国近年来乳制品中违法添加 $\beta$ -内酰胺酶的问题已得到较大改善。由于巴氏杀菌乳储存及运输的难度,部分地区未能进行样品采集,没有涵盖在本次调查范围内。此外, $\beta$ -内酰胺酶含量受季节气候影响也较明显,持续监测同一地区不同时间的 $\beta$ -内酰胺酶含量变化也具有重要意义,可以为人群乳制品消费及相关部门的政

策制定提供参考依据。

(志谢 感谢黑龙江省CDC、河北省CDC、新疆新疆维吾尔自治区CDC、新疆生产建设兵团CDC、贵州省CDC、陕西省CDC、甘肃省CDC、内蒙古自治区CDC、湖南省CDC、宁夏回族自治区CDC、江苏省CDC、浙江省CDC、湖北省CDC对本文采样工作的支持和帮助)

## 参考文献

- [1] Stead S L, Ashwin H, Richmond S F, et al. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest (R) SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk [J]. International Dairy Journal, 2008(18):3-11.
- [2] Ashwin H M, Stead S L, Taylor J C, et al. Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, 529(1-2):103-108.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)(食品整治办[2009]5号)[Z]. 2009-02-04.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 关于印发乳及乳制品中舒巴坦敏感 $\beta$ -内酰胺酶类药物检验方法:杯碟法的通知(卫监督发[2009]44号)[Z]. 2009-05-08.
- [5] ZHOU S, ZHAO Y F, Mecklenburg M, et al. A novel thermometric biosensor for fast surveillance of  $\beta$ -lactamase activity in milk [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 15(49):99-104.
- [6] 张克春, 缪德年. 科学对待牛奶中的 $\beta$ -内酰胺酶 [C] // 中国畜牧兽医学会第七届养牛学分会 2009 年学术研讨会论文集, 江苏南京:2009.
- [7] 朱莉勤, 汤全英, 张梦寒, 等. 苏州市生乳及乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶残留状况调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(10):2381-2383.
- [8] 胡晓宁, 苏诚玉, 权玉玲, 等. 甘肃省生鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶含量调查分析 [J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(5):79-83.
- [9] 黄鑫, 刘桂华, 白光大, 等. 2010 年吉林省生鲜乳和乳制品 $\beta$ -内酰胺酶污染状况调查 [J]. 中国卫生工程学, 2012, 11(2):158-159.
- [10] 熊海平, 苏婧, 许海燕. 南通市市售牛乳中 $\beta$ -内酰胺酶检测结果分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5):417-419.
- [11] CUI S H, LI J Y, HU C Q, et al. Development of a method for the detection of beta-lactamases in milk samples [J]. Journal of AOAC International, 2007(90):1128-1132.