

# 乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶快速检测方法的研究

刘芳, 李传礼, 何永盛, 张毅杰, 杨平

(深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518131)

**摘要:**利用Charm试剂盒建立快速检测 $\beta$ -内酰胺酶的方法,并以杯碟法作为比较,通过加标试验确定 $\beta$ -内酰胺酶在不同乳制品中的最低检出限,进而利用两种方法对样品进行检测,并以耐久性和耐热性试验研究样品存放时间和加热杀菌处理对 $\beta$ -内酰胺酶活性的影响。结果显示, $\beta$ -内酰胺酶在快速检测法中的最低检出限为 $1.5\times 10^{-4}\sim 1.6\times 10^{-3}$ U/mL(U/g),而在杯碟法中则为 $2.0\times 10^{-5}\sim 1.6\times 10^{-4}$ U/mL(U/g),178份样品在两种方法中的 $\beta$ -内酰胺酶检出率相同,表明快速检测法具有与杯碟法相近的准确度与灵敏度。 $\beta$ -内酰胺酶的耐久性和耐热性试验表明,样品的存放时间对 $\beta$ -内酰胺酶的活性影响不大,但加热杀菌处理却明显地降低了 $\beta$ -内酰胺酶活性。

**关键词:**乳制品, $\beta$ -内酰胺酶,快速检测法,杯碟法

## Study on rapid detection method of $\beta$ -lactamase in dairy products

LIU Fang, LI Chuan-li, HE Yong-sheng, ZHANG Yi-jie, YANG Ping

(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518131, China)

**Abstract:**The purpose of this study was to establish a rapid detection method for detecting  $\beta$ -lactamase in dairy products.  $\beta$ -lactamase was added to different dairy products, and its detection limit was determined by rapid detection method and cylinder plate method respectively. Influence of storage time and heating treatment to the enzymatic activity of  $\beta$ -lactamase was investigated by durability and stability experiments. The detection limit of  $\beta$ -lactamase in rapid detection method was  $1.5\times 10^{-4}\sim 1.6\times 10^{-3}$ U/mL(U/g), and in cylinder plate method was  $2.0\times 10^{-5}\sim 1.6\times 10^{-4}$ U/mL(U/g). The  $\beta$ -lactamase positive rate of 178 samples detected by rapid detection method and cylinder plate method was identical. It suggested that the sensitivity and accuracy of two methods were similar. Results of durability and stability experiments showed that the influence of storage time to  $\beta$ -lactamase was not significant, but heating treatment decreased the enzymatic activity of  $\beta$ -lactamases obviously.

**Key words:**dairy products; $\beta$ -lactamase;rapid detection method;cylinder plate method

中图分类号:TS252.7

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2013)04-0069-04

抗生素残留是乳品行业面临的一个重要安全问题<sup>[1-3]</sup>。以青霉素为代表的 $\beta$ -内酰胺类抗生素可用于治疗牛乳房炎和其他细菌感染性疾病<sup>[4]</sup>,然而过度使用或滥用会导致其通过乳牛机体的血液残留于牛奶中。我国对生鲜乳中抗生素的含量作出了严格规定<sup>[5]</sup>,然而部分不法商贩和奶农把 $\beta$ -内酰胺酶加入到牛奶中,掩盖其抗生素残留超标的事实,这可能会使消费者对青霉素等抗生素类药物耐药性增高<sup>[6]</sup>。为了保障人民群众身体健康,有必要建立快速有效的方法来检测乳制品中的 $\beta$ -内酰胺酶。研究者已建立了多种方法检测乳制品中的 $\beta$ -内酰胺酶<sup>[7-10]</sup>,但这些方法均存在着一定的不足。碘量法的灵敏度和重现性较差;酸测定法存在假阳性和假阴性的问题;液相色谱法的样品前处理步骤繁琐,检测仪器昂贵;微生物

法的检测周期较长。与之相比,利用试剂盒建立的快速检测方法不需要经过复杂的样品前处理,操作简便,结果精确而且直观易懂<sup>[11]</sup>,因此也越来越多地被应用到 $\beta$ -内酰胺酶的检测当中。目前对 $\beta$ -内酰胺酶检测的研究多集中在以一种或两种检测方法对某一类乳制品中的 $\beta$ -内酰胺酶进行检测,为 $\beta$ -内酰胺酶在不同种类乳制品中建立相应的检测方法并分别确定其最低检出限的报道尚不多见。Charm试剂盒法作为一种免疫分析方法,利用 $\beta$ -内酰胺酶可分解 $\beta$ -内酰胺类抗生素的原理,通过配体-受体识别法快速检测与 $\beta$ -内酰胺酶反应后残留的青霉素的含量,从而可以间接检测样品中是否含有 $\beta$ -内酰胺酶。本研究尝试利用Charm试剂盒建立一种快速检测方法,测定 $\beta$ -内酰胺酶在不同种类乳制品中的最低检出限,并以杯碟法作为比较,利用这两种方法进行样品的检测,为建立不同种类乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的检测方法提供参考依据。

收稿日期:2012-08-08

作者简介:刘芳(1982-),女,硕士,工程师,研究方向:食品微生物。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与仪器

藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) CMCC (B) 28001, 购自中国医学细菌保藏管理中心;  $\beta$ -内酰胺酶标准品 (0.54U/mg)、青霉素G标准品 sigma公司; 舒巴坦 Fluorochem公司; 抗生素鉴定培养基 II 北京陆桥技术有限责任公司; 牛津杯 深圳新拓扑生物科技有限公司; Charm试剂盒、孵育器和读数仪 北京博欧实德生物技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品的前处理 液态奶样品可直接使用; 酸奶样品用磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 按1:4 (v/v) 的比例进行稀释; 奶粉和奶酪样品用磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 按1:7 (m/v) 的比例进行稀释。

1.2.2 快速检测法测定乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限 准确称取一定量的 $\beta$ -内酰胺酶标准品, 以前处理后的乳制品为溶剂, 配制浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ U/mL的加标样液, 从不同浓度的加标样液中取出300 $\mu$ L至1.5mL离心管, 加入60 $\mu$ L青霉素阳性质控液, 配成待检溶液, 室温下反应3min。用移液枪取出300 $\mu$ L待检溶液, 滴加至检测条的凹槽中, 56 $^{\circ}$ C孵育8min, 取出后3min内判读结果。根据加标样液的检测结果确定每个样品在快速检测法中的 $\beta$ -内酰胺酶检出限, 以每类乳制品中检出限的最大值作为该类乳制品在快速检测法中的 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限。

1.2.3 杯碟法测定乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限 准确称取一定量的 $\beta$ -内酰胺酶标准品, 配制浓度为 $1.5 \times 10^{-3}$ U/mL的 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液, 同时以前处理后的乳制品为溶剂, 配制浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ U/mL的加标样液, 参照《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》进行检测和结果判定。根据加标样液的检测结果确定每个样品在杯碟法中的 $\beta$ -内酰胺酶检出限, 以每类乳制品中检出限的最大值作为该类乳制品在杯碟法中的 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限。

1.2.4 样品中 $\beta$ -内酰胺酶的检测 从市场上购买不同品牌的液态奶、酸奶、奶粉、奶酪等乳制品以及原料奶作为样品, 分别用快速检测法和杯碟法进行检测, 以此比较两种方法的 $\beta$ -内酰胺酶检出率。

1.2.5  $\beta$ -内酰胺酶的耐热性和耐久性实验 以液态奶为溶剂配制浓度范围为 $8.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ U/mL的 $\beta$ -内酰胺酶加标样液, 于室温下放置一周, 期间每天均用快速检测法对不同浓度加标样液中 $\beta$ -内酰胺酶的残留活性进行检测。另外, 配制浓度范围为 $8.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-4}$ U/mL的 $\beta$ -内酰胺酶加标样液, 模拟巴氏杀菌 (65 $^{\circ}$ C 30min或75 $^{\circ}$ C 15s) 以及保持灭菌 (115 $^{\circ}$ C 10min) 的条件, 对加标样液进行加热处理, 用快速检测法检测 $\beta$ -内酰胺酶的残留活性, 研究这些处理方式对 $\beta$ -内酰胺酶活性的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 快速检测法中 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限的测定

选取液态奶、酸奶、奶粉和奶酪各10种产品进行

快速检测法的加标实验。加标乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的浓度控制在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ U/mL之间, 以每类乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶检出限的最大值作为该类乳制品在快速检测法中的最低检出限。表1的检测结果显示, 液态奶中 $\beta$ -内酰胺酶的检出限最低, 而其他乳制品由于在前处理中以磷酸盐缓冲液按一定的比例进行了稀释, 所以折算后的 $\beta$ -内酰胺酶检出限均比液态奶高。

表1 不同乳制品在快速检测法中的 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限

样品类型	前处理稀释比例 (v/v或m/v)	样品中 $\beta$ -内酰胺酶的最低检出限 (U/mL或U/g)
液态奶	-	$1.5 \times 10^{-4}$
酸奶	1:4	$1.5 \times 10^{-3}$
奶粉	1:7	$1.2 \times 10^{-3}$
奶酪	1:7	$1.6 \times 10^{-3}$

### 2.2 杯碟法中 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限的测定

同样选取液态奶、酸奶、奶粉和奶酪各10种样品进行杯碟法的加标实验。加标乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的浓度控制在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ U/mL之间, 实验的结果如表2所示。与快速检测法得出的结果类似, 液态奶样品中 $\beta$ -内酰胺酶的检出限低于其他三类乳制品, 而在杯碟法中每类乳制品测得的 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限都要低于快速检测法中对应的测定值。

表2 不同乳制品在杯碟法中的 $\beta$ -内酰胺酶最低检出限

样品类型	前处理稀释比例 (v/v或m/v)	样品中 $\beta$ -内酰胺酶的最低检出限 (U/mL或U/g)
液态奶	-	$2.0 \times 10^{-5}$
酸奶	1:4	$7.5 \times 10^{-5}$
奶粉	1:7	$1.6 \times 10^{-4}$
奶酪	1:7	$1.6 \times 10^{-4}$

### 2.3 两种方法对样品的检测

从市场上购买不同品牌的液态奶、酸奶、奶粉、奶酪样品以及数批原料奶, 运用快速检测法和杯碟法分别对这些样品进行检测。表3的检测结果显示, 液态奶、酸奶、奶粉和奶酪样品均未检出 $\beta$ -内酰胺酶, 而50个原料奶样品中有一个检出 $\beta$ -内酰胺酶呈阳性, 两种检测方法得出的结果完全一致, 说明两种方法均能满足实际样品检测的需要。

### 2.4 $\beta$ -内酰胺酶的耐久性实验

用液态奶配制浓度范围为 $8.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ U/mL的 $\beta$ -内酰胺酶加标样液, 于室温下放置一周, 期间每隔24h用快速检测法对不同浓度加标样液中 $\beta$ -内酰胺酶的残留活性进行检测。从表4的检测结果可以看出, 加标样液放置2d后其 $\beta$ -内酰胺酶活性有所下降, 最低检出限由 $1.0 \times 10^{-4}$ U/mL提高至 $2.0 \times 10^{-4}$ U/mL, 但随后放置至第7d为止, 其最低检出限仍与放置2d后的检测结果相同, 而有研究报道<sup>[12]</sup>也显示 $\beta$ -内酰胺

表3 快速检测法和杯碟法对样品的检测结果

Table 3 Detection results of dairy products by Charm detection method and cylinder plate method

样品类型	抽检数量	快速检测法		杯碟法	
		阳性样品数	阴性样品数	阳性样品数	阴性样品数
液态奶	30	0	30	0	30
酸奶	16	0	16	0	16
奶粉	65	0	65	0	65
奶酪	17	0	17	0	17
原料奶	50	1	49	1	49

表4 放置时间对β-内酰胺酶活性的影响

Table 4 Influence of storage time to the enzymatic activity of β-lactamase

β-内酰胺酶浓度(U/mL)	即时检测	放置1d	放置2d	放置3d	放置4d	放置5d	放置6d	放置7d
5.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
4.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
3.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-
9.0×10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
8.0×10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示检出β-内酰胺酶；“-”表示未检出β-内酰胺酶；表5同。

酶放置4d后仍具有很强的抗生素降解能力，这表明存放时间对β-内酰胺酶活性的影响并不大。

### 2.5 β-内酰胺酶的耐热性实验

用液态奶配制浓度范围为8.0×10<sup>-5</sup>~8.0×10<sup>-4</sup>U/mL的β-内酰胺酶加标样液，模拟巴氏杀菌和保持灭菌的条件对加标样液进行加热处理，研究这些处理对β-内酰胺酶活性的影响，试验的结果如表5所示。75℃加热处理15s的巴氏杀菌方式并没有对加标样液中β-内酰胺酶的活性造成影响，而另外一种巴氏杀菌方式(65℃ 30min)则使β-内酰胺酶的活性有所降低，导致加标样液中β-内酰胺酶的最低检出限由原来的1.0×10<sup>-4</sup>U/mL提高至4.0×10<sup>-4</sup>U/mL，这与Korycka等<sup>[13]</sup>的研究结果相吻合。保持灭菌(115℃, 10min)的处理方式对β-内酰胺酶的活性影响最大，经过这种处理后，即使加标样液中β-内酰胺酶的浓度高达8.0×10<sup>-4</sup>U/mL时也不能被检测出含有β-内酰胺酶。

表5 加热处理对β-内酰胺酶活性的影响

Table 5 Influence of heating treatment to the enzymatic activity of β-lactamase

β-内酰胺酶浓度(U/mL)	不作加热处理	65℃加热处理30min	75℃加热处理15s	115℃加热处理10min
8.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	-
7.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	-
6.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	-
5.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	-
4.0×10 <sup>-4</sup>	+	+	+	-
3.0×10 <sup>-4</sup>	+	-	+	-
2.0×10 <sup>-4</sup>	+	-	+	-
1.0×10 <sup>-4</sup>	+	-	+	-
9.0×10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
8.0×10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-

### 3 结论

3.1 本研究利用快速检测法和杯碟法分别测定了不同乳制品中β-内酰胺酶的最低检出限。不同乳制品中β-内酰胺酶在快速检测法中的检出限为1.5×10<sup>-4</sup>~1.6×10<sup>-3</sup>U/mL(U/g)，在杯碟法中则为2.0×10<sup>-5</sup>~1.6×10<sup>-4</sup>U/mL(U/g)，两种方法对β-内酰胺酶的最低检出限均能满足样品检测的需要，两者在样品检测中的β-内酰胺酶检出率也相同。

3.2 快速检测法操作简单，节省时间，无需大型设备仪器，对β-内酰胺酶检测的灵敏度和准确性均与杯碟法相当，因此很适合在基层单位中作为检测β-内酰胺酶的主要手段。杯碟法对β-内酰胺酶的检出限虽然比快速检测法稍低，但其耗时长，操作复杂，对试验的要求严格，较难满足快速检测乳制品中β-内酰胺酶的需要，可以作为快速检测法检测结果的确证方法。

3.3 β-内酰胺酶的耐久性和耐热性实验表明，乳制品的存放时间对β-内酰胺酶的活性影响不大，但加热杀菌工艺则较为明显地降低了β-内酰胺酶的活性，可能会降低β-内酰胺酶在乳制品中的检出率。由此可见，为了杜绝β-内酰胺酶在乳制品中的非法添加使用，应从原料奶的质量安全进行监控，从而保障人民群众喝上放心奶。

### 参考文献

[1] 何金环, 王一凡. TTC和ELISA法检测纯牛奶中抗菌药物残留比较[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2576-2577.  
 [2] 买合木提·克衣木, 宋迎春, 买热木尼沙·吾甫尔. 无公害牛奶安全生产探析[J]. 现代农业科技, 2009(3): 239-240.  
 [3] 梁勇, 李巧芬. 关于动物源食品安全性的思考[J]. 现代农业

(下转第79页)



落刺激因子协同,能促进原始骨髓源细胞的生长和分化,它与多种疾病如肿瘤、感染、发热和内毒素性休克等反应发生和发展有关,且创伤越严重,IL-6值越高。IL-6监测对炎症的辅助诊断、分期及预后判断具有重要意义<sup>[5]</sup>。细胞炎症实验结果表明,枫香叶中的挥发油具有很好的抗炎作用。

**3.2 止血**包括血液凝固、血小板聚集和血管收缩3个重要因素。当外伤或疾病出血时可见受损局部血管收缩,血小板在血管破损处凝集,启动内源性及外源性凝血途径完成凝血过程,形成血块而止血<sup>[6]</sup>。血浆复钙实验表明,枫香叶挥发油很可能对凝血酶具有活化作用,通过增加凝血酶的活性,激活血小板,促进血栓形成,实现止血作用。

**3.3 通过气质联用技术对枫香叶中挥发油的化学成分进行鉴定**,鉴定出26种化合物,其中10种化合物: $\beta$ -月桂烯、 $\alpha$ -水芹烯、邻甲基异丙烯苯、1,5,5,6-四甲基-1,3-环己二烯、 $\alpha$ -石竹烯、(+)-表双环倍半水芹烯、(+)-喇叭烯、 $\gamma$ -榄香烯、蓝桉醇、角鲨烯为首次报道。有文献曾报导其中成分 $\alpha$ -蒎烯(34.48%)、 $\beta$ -蒎烯(19.25%)和柠檬烯(26.97%)的作用主要为抑制白色念珠菌的生物合成以及抗炎促凝血作用<sup>[7]</sup>。而以上本文首次报道的 $\gamma$ -榄香烯、蓝桉醇、角鲨烯成分都具有抗氧化、抗肿瘤效果<sup>[8-10]</sup>。挥发油成分的结构鉴定进一步佐证了上文抗炎以及促凝血实验的结果。

本实验研究所进行的枫香叶挥发油抗炎及促凝血作用和其中物质结构鉴定具有一定的现实意义和应用价值,扩大了其在药品和食品等方面的应用。本

研究为枫香叶药材的进一步开发和应用提供了研究应用的理论基础。

### 参考文献

- [1] 翁玲玲,蒋家谈,张鼎画,等. 乡土树种枫香的研究现状与发展前景[J]. 福建林业科技, 2007, 34(2): 184-185.
- [2] 广西壮族自治区革命委员会卫生局主编. 广西本草选编(上册)[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974: 1900-1901.
- [3] 郑毅,张青. 江西野生枫香活性成分提取及鞣质含量的研究[J]. 江西化工, 2004: 99-102, 105-109.
- [4] 江蔚新,赵玺. 龙胆多糖的抗凝血作用研究[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(5): 31-32.
- [5] Kang Liu, Tianjiong Luo, Zhongai Zhang, et al. Modified Si-Miao-San extract inhibits inflammatory response and modulates insulin sensitivity in hepatocytes through an IKK $\beta$ /IRS-1/Akt-dependent pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 136: 473-479.
- [6] 赵宝明,张志谦,张书信,等. 广痛消泡沫气雾剂止血抗炎作用实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(10): 2164-2166.
- [7] 吕小满,胡艳芬. 松塔化学成分及生物活性的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(7): 35-38.
- [8] 邹丽娟,李杰. 榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 大连医科大学学报, 1998, 20(2): 87-90.
- [9] 夏文斌,薛震,李帅,等. 杜鹃蓝化学成分及肿瘤细胞毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(23): 1827-1829.
- [10] 李东霞,张双全. 鲨鱼软骨活性物质研究进展[J]. 河北中西医结合杂志, 1998, 7(11): 1694-1696.

(上接第71页)

科技, 2008(17): 295-296.

[4] 陆松才. 奶牛乳房炎病因分析和防治[J]. 现代农业科技, 2007(8): 103-111.

[5] NY5045-2008. 无公害食品生鲜牛乳[S]. 北京: 中华人民共和国农业部.

[6] 魏国美. 杯碟法测定乳与乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶[J]. 福建分析测试, 2010, 19(3): 57-59.

[7] Sykes R B, Nordstrom K. Microiodometric Determination of  $\beta$ -Lactamase Activity[J]. American Society for Microbiology, 1972(2): 94-99.

[8] 马洁,李孝君. 利用酸度计检测奶制品中残留的 $\beta$ -内酰胺酶[J]. 化学通报, 2009(4): 370-373.

[9] 赵静枚,都锋瑛,张铭俊. 青霉素裂解液的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2001, 19(1): 88-89.

[10] Cui S, Li J, Hu C, et al. Development of a method for the detection of  $\beta$ -lactamases in milk sample[J]. Journal of AOAC International, 2007, 90(4): 1128-1132.

[11] 康海英,王加启,卜登攀,等. 两种检测生鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶方法的比较[J]. 生物技术通报, 2010(6): 202-205.

[12] 刘志楠,喻东威,赵源,等. 乳与乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的特性及检测方法[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(1): 53-55.

[13] Korycka-Dahl M, Richardson T, Bradley R L Jr. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk[J]. Journal of Dairy Science, 1985, 68(8): 1910-1916.