

ICS 67.100

X 16

# DB13

## 河北省地方标准

DB13/T 1080—2009

---

### 乳及乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的测定

Detection of  $\beta$ -lactamases in milk and milk products

2009-05-27 发布

2009-06-11 实施

---

河北省质量技术监督局 发布



## 前 言

本标准的附录 A 和附录 C 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本标准由河北省质量技术监督局提出并归口。

本标准第一法由河北省食品质量监督检验研究院起草。

本标准第二法由河北省食品质量监督检验研究院起草。

本标准第三法由河北省科学院生物所起草。

本标准第一法主要起草人：周正、周巍、李丛芬、穆燕魁、张岩。

本标准第二法主要起草人：李挥、张敬轩、庞坤、范斌、张岩。

本标准第三法主要起草人：闫静辉、陈英珠、吴萌、程华、李春生、张小兵、董超、李亚璞。



# 乳及乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的测定

## 第一法 杯碟法

### 1 范围

本标准规定了乳及乳制品中 $\beta$ -内酰胺酶的检验方法-杯碟法。

本标准适用于生鲜乳、巴氏杀菌乳及灭菌乳中具有活性且对舒巴坦敏感的 $\beta$ -内酰胺酶的检验。

本方法的检出限为 4 U/mL。

### 2 原理

该方法采用对青霉素类药物绝对敏感的标准菌株，利用舒巴坦特异性抑制 $\beta$ -内酰胺酶的活性，并以青霉素作为指示物，通过比对加入 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂与未加入抑制剂的样品所产生的抑菌圈的大小来间接测定样品中的 $\beta$ -内酰胺酶。

### 3 设备和材料

3.1 抑菌圈测量仪或测量尺。

3.2 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 高压灭菌器。

3.4 无菌培养皿：内径 90 mm，具陶瓦盖。

3.5 无菌牛津杯：外径 ( $8.0\pm 0.1$ ) mm，内径 ( $6.0\pm 0.1$ ) mm，高度 ( $10.0\pm 0.1$ ) mm。

3.6 麦氏比浊仪或标准比浊管。

3.7 无菌吸管：1 mL (0.01 mL 刻度值)，10 mL (0.1 mL 刻度值)。

3.8 加样器：5  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$ ，20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$  及配套吸头。

### 4 培养基和试剂

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的三级水。

4.1 试验菌种：藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*, CMCC (B) 28001)，使用菌株代数 3~14 代。

4.2 磷酸盐缓冲溶液：按附录 A 中 A.1 规定。

4.3 生理盐水 (8.5 g/L)：按附录 A 中 A.2 规定。

4.4 青霉素标准溶液：按附录 A 中 A.3 规定。

4.5  $\beta$ -内酰胺酶标准溶液：按附录 A 中 A.4 规定。

4.6 舒巴坦标准溶液按附录 A 中 A.5 规定。

4.7 营养琼脂培养基：按附录 A 中 A.6 规定。

4.8 抗生素检测用培养基 II：按附录 A 中 A.7 规定。

4.9 空白牛奶：按附录 A 中 A.8 规定

### 5 操作步骤

#### 5.1 菌悬液的制备

将藤黄微球菌接种于营养琼脂斜面上，经  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~22 h，用无菌生理盐水洗下菌苔即为

## DB13/T 1080—2009

菌悬液，测定菌悬液浓度，终浓度应大于  $1 \times 10^0$  CFU/mL，4℃保存，贮存期限 2 周。

## 5.2 样品的制备

将待检样品充分混匀，取 1 mL 待检样品于 1.5 mL 离心管中共 4 管，分别标为：A、B、C、D，每个样品做三个平行。

## 5.3 对照的制备

5.3.1 阴性对照，每次检验应取空白牛奶 1 mL 加入到 1.5 mL 离心管中共四管，分别标为：A、B、C、D，每次实验均做三个平行作为对照。

5.3.2 阳性对照，取空白牛奶 1 mL 加入到 1.5 mL 离心管中，加入  $\beta$ -内酰胺酶标准溶液 25  $\mu$ L，共做四管，分别标为 A、B、C、D，每次实验均做三个平行作为对照。

## 5.4 检验用平板的制备

取 90 mm 灭菌培养皿，底层加 10 mL 灭菌的抗生素检测用培养基 II，凝固后上层加入 5 mL 含有浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 藤黄微球菌的抗生素检测用培养基 II，每个检验用平板上均匀放置 4 个无菌牛津杯。

## 5.5 样品的测定

按照下列顺序分别将青霉素标准溶液、 $\beta$ -内酰胺酶标准溶液、舒巴坦标准溶液加入到 5.2 各离心管中：

A 青霉素 5  $\mu$ L。

B 舒巴坦 25  $\mu$ L、青霉素 5  $\mu$ L。

C  $\beta$ -内酰胺酶 25  $\mu$ L (终浓度 4 U/mL)、青霉素 5  $\mu$ L。

D  $\beta$ -内酰胺酶 25  $\mu$ L (终浓度 4 U/mL)、舒巴坦 25  $\mu$ L、青霉素 5  $\mu$ L。

将上述 A~D 试样混匀后各取 200  $\mu$ L 加入放置于检验用平板上的 4 个无菌牛津杯中， $36 \pm 1$ ℃培养 18~22 h，测量抑菌圈直径。取三组平行试验平均值。

## 6 结果观察

各平行试验结果差异应小于 2.0 mm；阴性对照与阳性对照结果应符合表 1 实验现象，则可进行结果报告。

表 1 实验现象对应表

阴性对照	阳性对照
A 抑菌圈直径应在 $20 \pm 2.0$ mm 范围内	
B、D 均产生抑菌圈	B、D 均产生抑菌圈
C 抑菌圈与 D 抑菌圈差异大于等于 3.0 mm	C 抑菌圈与 D 抑菌圈差异大于等于 3.0 mm
A 抑菌圈与 B 抑菌圈差异小于 3.0 mm	A 抑菌圈与 B 抑菌圈差异大于等于 3.0 mm

## 7 结果报告

7.1 样品结果同阳性对照结果实验现象一致可判定检验结果阳性。

7.2 如样品结果同阴性对照结果现象一致可判定检验结果阴性。

## 第二法 高效液相色谱—质谱/质谱法

### 1 范围

本标准规定了乳及乳制品中具有活性的 $\beta$ -内酰胺酶的高效液相色谱-串联质谱的定性检测方法。本标准适用于生鲜乳、巴氏杀菌乳及灭菌乳中具有活性的 $\beta$ -内酰胺酶的定性检验。本方法对 $\beta$ -内酰胺酶的检测低限为4 U/mL。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法（GB/T 6682—2008，ISO 3696:1987，MOD）。

### 3 原理

利用 $\beta$ -内酰胺酶酶解青霉素族药物的原理，在试样中加入一定量氨苄青霉素，酶解后，试样中氨苄青霉素经乙腈-水溶液提取，提取液浓缩后，用缓冲溶液溶解，固相萃取净化，浓缩，液相色谱-质谱/质谱测定，外标法定量，通过试样中氨苄青霉素酶解率，间接定性 $\beta$ -内酰胺酶。

### 4 试剂

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 乙腈：高效液相色谱级。
- 4.2 甲醇：高效液相色谱级。
- 4.3 甲酸：高效液相色谱级。
- 4.4 氯化钠。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 磷酸二氢钾。
- 4.7 磷酸氢二钾。
- 4.8 0.1 mol/L 氢氧化钠：称取4 g 氢氧化钠，并用水稀释至1 000 mL。
- 4.9 乙腈+水（15+2，体积比）。
- 4.10 乙腈+水（30+70，体积比）。
- 4.11 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液（pH=7.0）：称取3.4 g 磷酸二氢钾，超纯水溶解，稀释至1 000 mL，用氢氧化钠调节pH至7.0±0.1。
- 4.12 0.01 mol/L 乙酸铵溶液（pH=4.5）：称取0.77 g 乙酸铵，超纯水溶解，稀释至1 000 mL，用甲酸调节pH=4.5±0.1。
- 4.13 氨苄青霉素标准品：纯度大于等于95%。
- 4.14 标准储备溶液（100  $\mu$ g/mL）：称取适量标准品（4.14），用超纯水溶解并定容至1 000 mL，置于-18℃冰箱避光保存，保存期5 d。
- 4.15 标准工作溶液：吸取适量的氨苄青霉素标准储备液（4.15），用空白样品提取液稀释成适当浓度的基质标准工作溶液，用时现配。
- 4.16 Oasis HLB 固相萃取小柱，或相当者：500 mg，6 mL，使用前用甲醇和水预处理，即先用2 mL 甲醇淋洗小柱，然后用1 mL 水淋洗小柱。

## DB13/T 1080—2009

## 5 仪器

- 5.1 液相色谱-质谱/质谱仪 (LC-MS/MS): 配有电喷雾离子源。
- 5.2 旋转蒸发器。
- 5.3 固相萃取装置。
- 5.4 低温冷冻离心机。
- 5.5 均质器。
- 5.6 涡旋混合器。
- 5.7 pH 计。
- 5.8 氮吹仪。

## 6 试样制备与保存

取代表性样品, 混匀后, 装入洁净容器中, 密封, 并标明标记, 于 0~4℃ 冷藏存放。

## 7 分析步骤

## 7.1 氨苄青霉素的加入

称取 10 g 样品 (精确到 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 0.1 mL 氨苄青霉素标准储备液 (4.15), 混匀。

## 7.2 酶解

将 7.1 试样置于 37℃ 恒温水浴, 酶解 1 h。

## 7.3 提取

在 7.2 酶解后的试样中加入 20 mL 乙腈 (4.9), 均质提取 30 s, 4 000 r/min 低温冷冻离心 5 min, 上清液转移至 50 mL 离心管中; 另取一离心管, 加入 10 mL 乙腈水溶液 (4.9), 洗涤均质器刀头, 用玻璃棒捣碎离心管中的沉淀, 加入上述洗涤均质器刀头溶液, 在涡旋混合器上振荡 1 min, 4 000 r/min 低温冷冻 5 min, 上清液合并至 50 mL 离心管中, 重复用 10 mL 乙腈水溶液 (4.9) 洗涤刀头并提取一次, 上清液合并至 50 mL 离心管中, 用乙腈水溶液 (4.9) 定容至 50 mL。准确移取 25 mL 于 100 mL 鸡心瓶。

将鸡心瓶于旋转蒸发器上 (37℃ 水浴) 蒸发除去乙腈, 易起沫样品可加入 4 mL 饱和氯化钠溶液。

## 7.4 净化

迅速向已除去乙腈的鸡心瓶中加入 25 mL 磷酸盐缓冲溶液 (4.11), 涡旋混匀 1 min, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 为 8.5, 通过经过预处理的固相萃取柱, 流速控制在 1 mL/min, 先用 2 mL 磷酸盐缓冲溶液 (4.11) 淋洗 2 次, 再用 1 mL 超纯水淋洗, 然后用 3 mL 乙腈洗脱, 流速控制在 1 mL/min。将洗脱液于 45℃ 下氮气吹干, 用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (4.12) 定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 供 LC-MS/MS 分析。

## 7.5 测定

## 7.5.1 参考色谱条件

- 7.5.1.1 色谱柱: ODS-C18 柱, 250 mm×4.6 mm, 粒度 5 μm, 或相当者。
- 7.5.1.2 流动相: A 组为 0.01 mol/L 乙酸铵溶液 (甲酸调 pH 至 4.5); B 组为乙腈。A:B=90:10。
- 7.5.1.3 流速: 1.0 mL/min。
- 7.5.1.4 进样量: 10 μL。

## 7.5.2 参考质谱条件

- 7.5.2.1 离子源: 电喷雾离子源。
- 7.5.2.2 扫描方式: 正离子扫描。
- 7.5.2.3 检测方式: 多反应监测 (MRM)。
- 7.5.2.4 毛细管电压: 4 000 V。

- 7.5.2.5 雾化气压力：0.055 MPa。  
 7.5.2.6 干燥气流速：10 L/min。  
 7.5.2.7 离子源温度：350℃。  
 7.5.2.8 定性离子对、定量离子对等参数见表 1。

表 1 氨苄青霉素定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和碰撞电压

名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞气能量 (V)	碰撞电压 (V)
氨苄青霉素 ampicillin	350/192 350/160	350/160	10	120

### 7.5.3 液相色谱-质谱/质谱测定

#### 7.5.3.1 定性测定

选择氨苄青霉素的 1 个母离子，2 个及以上子离子，在相同试验条件下，样品中待测物质的保留时间与基质标准溶液中对应物质的保留时间偏差在±2.5%之内；样品色谱图中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准溶液的色谱图中离子相对丰度比，若偏差不超过表 2 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

#### 7.5.3.2 定量测定

用氨苄青霉素标准储备溶液配成的基质标准溶液 (4.16) 进样分析，以标准工作溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，标准曲线的相关系数要求不小于 0.995。根据试样中被测物的含量情况，选取响应值相近的标准工作液进行单点校准，外标法计算。

#### 7.5.4 本底实验

除不加氨苄青霉素外，均按上述操作步骤进行。

## 8 结果计算与表述

### 8.1 试样中氨苄青霉素含量的计算

试样中氨苄青霉素的含量 (μg/kg 或 μg/L)：按式 (1) 计算

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中氨苄青霉素的含量，单位为微克每千克或微克每升 (μg/kg 或 μg/L)；  
 A——试样溶液中氨苄青霉素的峰面积；  
 A<sub>s</sub>——标准工作液中氨苄青霉素的峰面积；  
 C<sub>s</sub>——标准工作液中氨苄青霉素的浓度，单位为微克每千克或微克每升 (μg/kg 或 μg/L)；  
 V——试液最终定容体积，单位为毫升 (mL)；  
 W——最终样液代表的试样质量，单位为克 (g)。

计算结果以平行测定值的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

计算结果需折算回收率。

## DB13/T 1080—2009

## 8.2 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

## 8.3 回收率

本方法在试样中添加 0.5 mg/kg~2 mg/kg 浓度时回收率为 80%~110%。

## 9 定性判定

## 9.1 氨苄青霉素的酶解率

酶解后试样中氨苄青霉素的酶解率 (%)：按式 (2) 计算

$$Y = \frac{C_0 - (C - C_s)}{C_0} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

Y——酶解后试样中氨苄青霉素的酶解率，单位为百分比 (%)；

$C_0$ ——酶解前试样中氨苄青霉素的加入浓度，单位为微克每千克或微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  或  $\mu\text{g}/\text{L}$ )；

C——酶解后试样中氨苄青霉素的含量，单位为微克每千克或微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  或  $\mu\text{g}/\text{L}$ )；

$C_s$ ——酶解后试样本底中氨苄青霉素的含量，单位为微克每千克或微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  或  $\mu\text{g}/\text{L}$ )。

## 9.2 结果判定

酶解率  $\geq 30\%$ ，则判定为阳性。

酶解率  $< 30\%$ ，则判定为阴性。

## 第三法 碘量法

### 1 范围

本标准规定了鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的快速碘量法检测方法。

本标准适用于鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的测定。

本方法对 $\beta$ -内酰胺酶的检测低限为5 U/mL。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法（GB/T 6682—2008，ISO 3696:1987，MOD）。

### 3 原理

$\beta$ -内酰胺酶能裂解青霉素的 $\beta$ -内酰胺环形成青霉噻唑酸，它与淀粉竞争游离碘，破坏了碘和淀粉的兰色复合物，使兰色变为白色。如果牛奶中的 $\beta$ -内酰胺酶浓度高于检测限，检测结果为白色。

### 4 试剂

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 可溶性淀粉：按附录C中C.1规定。
- 4.2 碘：按附录C中C.2规定。
- 4.3 碘化钾：按附录C中C.3规定。
- 4.4 盐酸：按附录C中C.4规定。
- 4.5 青霉素钠：按附录C中C.5规定。
- 4.6  $\beta$ -内酰胺酶对照品：按附录C中C.6规定。
- 4.7 不含 $\beta$ -内酰胺酶的乳品：按附录C中C.7规定。

### 5 仪器

- 5.1 冷冻干燥机。
- 5.2 恒温干燥箱：40℃。
- 5.3 微量振荡器。
- 5.4 分析天平：精度0.001 g。
- 5.5 微波炉。
- 5.6 移液器：10  $\mu$ L、40  $\mu$ L、150  $\mu$ L。
- 5.7 冰箱。
- 5.8 微孔板。

### 6 试样制备与保存

取代表性样品，混匀后，装入洁净容器中，密封，并标明标记，于0~4℃冷藏短期存放。

### 7 对照制备

- 7.1 取阳性对照，用移液器注入500  $\mu$ L水，振荡，充分溶解备用；
- 7.2 取阴性对照：用移液器注入500  $\mu$ L水，振荡，充分溶解备用；

## DB13/T 1080—2009

## 8 测定

- 8.1 根据检测样品数量取适量的检测孔，每孔检测一个样；
- 8.2 取阳性对照 150  $\mu\text{L}$  加入 1 个小孔中；
- 8.3 取阴性对照 150  $\mu\text{L}$  加入 1 个小孔中；
- 8.4 样品处理：取奶样，去除悬浮物，用微量移液器吸取奶样 150  $\mu\text{L}$  分别加入到检测孔中；
- 8.5 所有样品加完后，贴封口膜，置微量振荡器上振荡 10 分钟；
- 8.6 放入 40℃ 恒温箱中，保温 20 分钟；
- 8.7 取出检测孔，除去封口膜，用微量移液器吸取 1% 的淀粉溶液，每孔加入 40  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀；
- 8.8 用微量移液器吸取碘液，每孔 40  $\mu\text{L}$ ，用移液器吹吸均匀；
- 8.9 振荡 2 分钟，观察结果。

## 9 检测注意事项

混匀要彻底，但不要产生泡沫，严禁将样品溅出。

## 10 结果判定

白色为阳性。

蓝色为阴性。

附 录 A  
(规范性附录)  
培 养 基

A.1 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.0)

无水磷酸二氢钾 8.0 g  
无水磷酸氢二钾 2.0 g  
蒸馏水 加至 1 000 mL

A.2 生理盐水 (8.5 g/L)

氯化钠 8.5 g  
蒸馏水 1 000 mL  
121℃高压灭菌 15 min。

A.3 青霉素标准溶液

准确称取适量青霉素标准物质，用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容为 0.1 mg/mL 的标准溶液。当天配制，当天使用。

A.4 β-内酰胺酶标准溶液

准确量取或称取适量 β-内酰胺酶标准物质，用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容为 160 U/mL 的标准溶液。当天配制，当天使用。

A.5 舒巴坦标准溶液

准确称取适量舒巴坦标准物质，用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容为 1 mg/mL 的标准溶液，分装后-20℃保存备用，不可反复冻融使用。

A.6 营养琼脂

蛋白胨 10 g  
牛肉膏 3 g  
氯化钠 5 g  
琼脂 15~20 g  
蒸馏水 1 000 mL

将上述成分加入蒸馏水中，搅混均匀，分装试管每管约 5~8 mL，120℃高压灭菌 15 min，灭菌后摆放斜面。

A.7 抗生素检测培养基 II

蛋白胨 10 g  
牛肉浸膏 3 g  
氯化钠 5 g  
酵母膏 3 g  
葡萄糖 1 g  
琼脂 14 g  
蒸馏水 1 000 mL

将上述成分加入蒸馏水中，搅混均匀，120℃高压灭菌 15 min，其最终 pH 值约为 6.6。

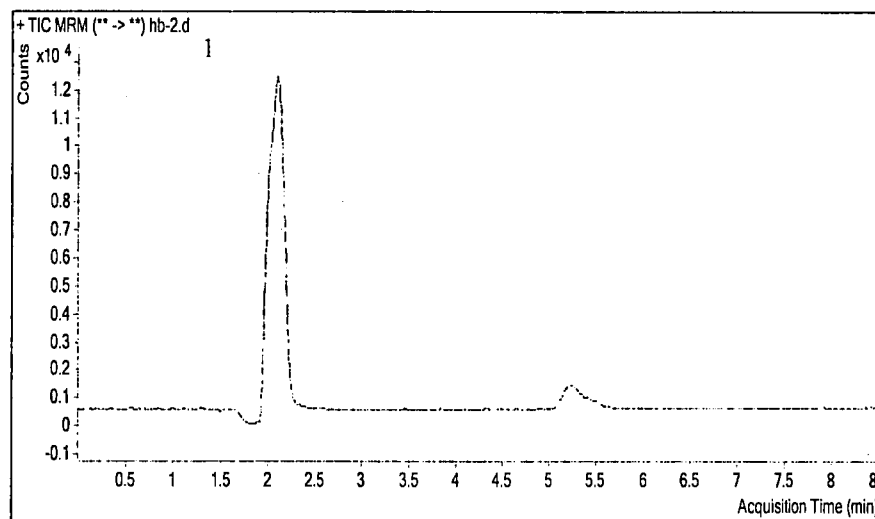
A.8 空白牛奶

脱脂奶粉标准品 2 g  
蒸馏水 20 mL

准确称取脱脂奶粉标准品 2 g，蒸馏水定容至 20 mL

附录 B  
(资料性附录)

氨苄西林标准品的总离子流图和定量、定性离子对色谱图



1. 氨苄青霉素

图 A.1 氨苄青霉素标准溶液 (10 μg/L) 的总离子流色谱图

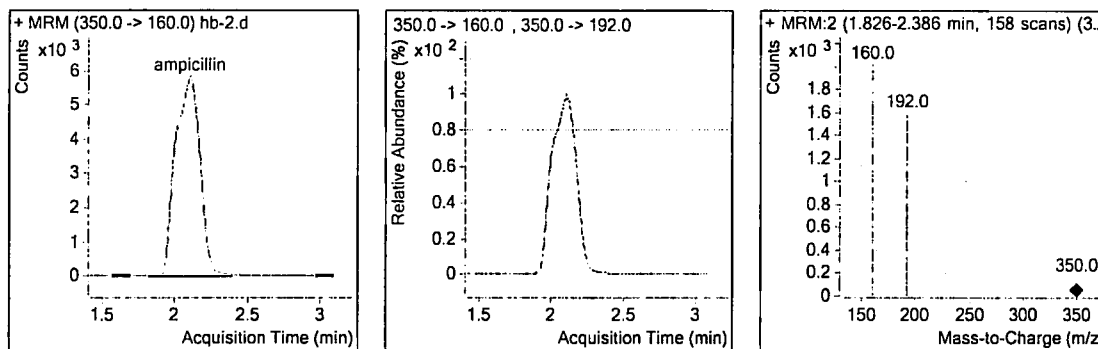


图 A.2 氨苄青霉素标准溶液 (10 μg/L) 的定量、定性离子对色谱图

附 录 C  
(规范性附录)

试剂

C.1 试剂保存

试剂配制好，装入洁净容器中，密封，并标明标记，于 0~4℃冷藏存放。

C.2 青霉素工作液配置

取青霉素钠，充分溶解，配成 20 mg/ml。

C.3 96 孔板点板

吸取青霉素工作液加入到 96 孔板小孔中，50 ul/孔。

C.4 1%的淀粉溶液

称取 5 g 可溶性淀粉，溶于沸水，定容 500 ml。

C.5 碘液

35 gKI 溶于 800 ml 水，在加入 13 gI<sub>2</sub>，溶解，加入 500 ul 盐酸，混匀，定容到 1 000 ml，闭光保存。

C.6 阳性样品

取不含 β-内酰胺酶的乳品 0.5 ml，加入 100 单位 β-内酰胺酶，冷冻干燥。

C.7 阴性样品

取不含 β-内酰胺酶的乳品 0.5 ml，冷冻干燥。

---

