

# 超快速液相检测牛奶中的青霉素剂

## ——β-内酰胺酶

LC-036

**摘要：** 本文通过检测牛奶中的青霉噻唑酸铵，间接检测牛奶中是否添加了β-内酰胺酶。用4个不同浓度标准品进样(10, 50, 100, 500, 1000 μg/L)，得到校准曲线相关系数为0.9999，检测限为6.05 μg/L，定量限为18.34 μg/L。连续5针进样(进样浓度：100 μg/L，进样体积：2 μL)，保留时间相对标准偏差为0.071%，峰面积相对标准偏差为0.962%。对市售两种品牌牛奶进行检测，两种牛奶中均检测到青霉噻唑酸铵，浓度分别是31.2 μg/mL和5.4 μg/mL。

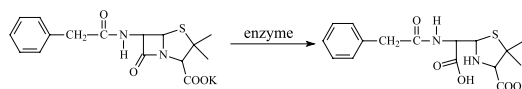
**关键词：** UFLC 青霉素 β-内酰胺酶 牛奶

随着国家对食品安全问题的关注和部分乳制品企业2010年无抗奶目标的提出，抗生素残留问题成为影响乳制品安全的重要因素之一。目前，青霉素作为β-内酰胺类药物是治疗牛乳腺炎的首选药物，是牛奶中最常见的残留抗生素。由于国内多数乳品企业对抗生素残留超标的牛乳采取降价收购的原则，出于经济利益的驱动，一些不法奶站为了谋求自己的经济利益，人为的使用解抗剂去降解牛乳中残留的抗生素，生产人造“无抗奶”。目前市售解抗剂的主要成分是β-内酰胺酶，它是由革兰氏阳性细菌产生和分泌的，可选择性分解牛奶中残留的β-内酰胺类抗生素。β-内酰胺酶为我国不允许使用的食品添加剂，该酶的使用掩盖了牛奶中实际含有的抗生素。β-内酰胺酶能够使青霉素内酰胺结构破坏而失去活性，导致青霉素、头孢菌素等抗生素类药物耐药性增高，从而大大降低了人们抵抗传染病的能力，给消费者的身体健康带来危害。本文通过检测牛奶中的青霉噻唑酸铵，间接检测牛奶中是否添加了β-内酰胺酶，供相关检测人员参考。

### 实验部分

#### 1.1 原理

牛乳中的青霉素钾(Benzylpenicillin Potassium)在β-内酰胺酶(β-lactamase)的作用下，生成青霉噻唑酸铵(Penicilloic Potassium)，并伴随生成少量的青霉胺、青霉醛等物质(见图1)。经去脂肪、蛋白等前处理后，可以将青霉噻唑酸铵提取出来，经高效液相色谱仪检测确认其是否存在，从而判定该牛乳是否为人造“无抗奶”。



青霉素钾

青霉噻唑酸铵

图1 青霉素钾分解生成青霉噻唑酸铵

#### 1.2 仪器与试剂

岛津UFLC快速液相系统，包括LC-20ADXR×2(输液泵)，SIL-20ACXR(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，SPD-20AV(紫外可见检测器)，CBM-20A(系统控制器)，LCsolution(色谱工作站)。

青霉素钾，β-内酰胺酶(2510 benzylpenicillin units/mg protein)，Sigma公司。

甲醇，HPLC级，Sigma公司。

磷酸二氢钾，分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

### 1.3 分析条件

流动相：甲醇/10 mM磷酸二氢钾(pH = 4.5) =

40/60

流速：1.0 mL/min

进样体积：2  $\mu$ L

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II 3.0 mm I.D.  $\times$  75

mm L. 2.2  $\mu$ m

柱温：40 $^{\circ}$ C

检测波长：230 nm

### 1.4 标准品溶液的配制及样品前处理

#### 1.4.1 标准溶液配制

称取50 mg青霉素钾于50 mL容量瓶中，加入1.6 mg  $\beta$ -内酰胺酶，室温放置2 h使青霉素钾酶解完全后用去离子水定容，得到青霉噻唑酸钾标准溶液，浓度1000  $\mu$ g/mL。逐级稀释得到500  $\mu$ g/mL，100  $\mu$ g/mL，50  $\mu$ g/mL，10  $\mu$ g/mL的标准溶液。采用5点外标法得到青霉噻唑酸钾的校准曲线。

#### 1.4.2 实验步骤

称取20 g试样，在4 $^{\circ}$ C，16000 rpm条件下离心30 min。取下层清液10 g于50 mL塑料离心管，加入无水乙醇15 mL，振荡提取30 min后离心，取清液经0.45  $\mu$ m的滤膜过滤，待测。

## 结果与讨论

### 2.1 线性范围及检出限

标准品进样后图谱如下图2所示。色谱峰1和2分别对应于青霉噻唑酸钾和青霉酸钾。

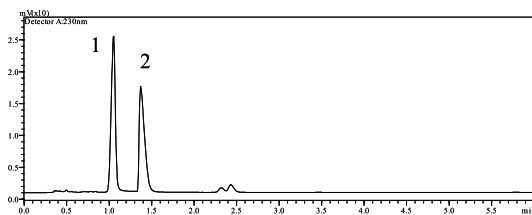


图2 标准溶液色谱图：1.青霉噻唑酸钾 2.青霉酸钾

同时检测了 $\beta$ -内酰胺酶，青霉素钾在该条件下的色谱图，见图3。

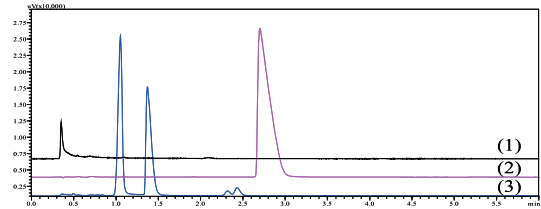


图3  $\beta$ -内酰胺酶溶液(1)，青霉素钾(2)和青霉噻唑酸钾(3)的色谱图

以浓度为纵坐标，为峰面积横坐标绘制工作曲线见图4，结果表明：在此范围内，线性关系良好，相关系数达到了0.9999。回归方程为 $Y=(72.355)X+(455.8749)$ 。计算机自动计算青霉噻唑酸钾的检测限为6.053  $\mu$ g/L，定量限为18.344  $\mu$ g/L。

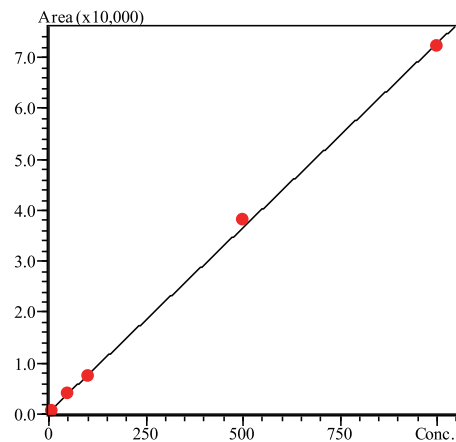


图4 青霉噻唑酸钾的校准曲线

### 2.2 精密度试验

100  $\mu$ g/mL的混合标样连续测定5次，考察方法的精密度。保留时间和峰面积的RSD%结果如表1所

表1 青霉噻唑酸钾的重现性

No.	RT (min)	Area
1	1.038	8929
2	1.039	8872
3	1.038	8777
4	1.037	8741
5	1.038	8740
Average	1.038	8812
RSD%	0.071	0.962

### 2.3 实际样品分析结果

按照1.4所述方法处理市售的两个品牌的纯牛奶，测定结果见图5。两种牛奶中均检测到青霉噻唑酸钾，浓度分别是：31.2  $\mu\text{g/mL}$ 和5.4  $\mu\text{g/mL}$ ，说明牛奶中添加过 $\beta$ -内酰胺酶。

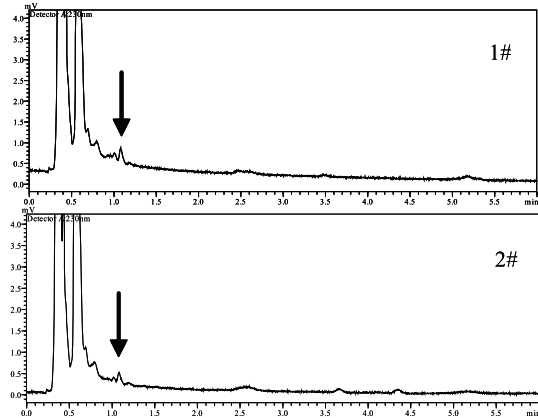


图5 市售两种品牌牛奶样品的色谱图

### 结论

本文使用超快速液相UFLCXR，配合岛津shim pack XR-ODS II 3.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2  $\mu\text{m}$ 快速分析色谱柱，测定市售牛奶中青霉噻唑酸钾的含量，标准曲线线性良好，重现性良好，1#样品中青霉噻唑酸钾为31.2  $\mu\text{g/mL}$ ，2#样品中青霉噻唑酸钾为5.4  $\mu\text{g/mL}$ ，说明牛奶中添加过 $\beta$ -内酰胺酶。