

牛乳中青霉素 G 残留三种检测方法的比较研究

李延华¹, 王伟君^{1,*}, 张兰威², 马 薇³, 陈丽安¹

(1. 通化师范学院制药与食品科学系, 吉林 通化 134002

2. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090 3. 东宁出入境检验检疫局, 黑龙江 东宁 157200)

摘 要: 本实验对乳中抗生素残留的三种微生物检测法进行比较, 确定三种检测法对牛乳中青霉素 G 残留的检测限、检测时间、检测成本、操作难易程度等关键参数, 同时指出国标 TTC 法在检测限方面的缺陷, 建议采用经济省时、简便易行、检测限较低的试管扩散法作为 AOAC 纸片法及国标 TTC 法的补充, 应用于牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留的检测。

关键词: 牛乳; 青霉素 G; 检测方法; 比较

Comparison among Three Detecting Methods for Penicillin G in Raw Milk

LI Yan-hua¹, WANG Wei-jun^{1,*}, ZHANG Lan-wei², MA Wei³, CHEN Li-an¹

(1. Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China;

2. College of Food Science and Engineering, Harbin Industry University, Harbin 150090, China;

3. Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of Dongning, Dongning 157200, China)

Abstract: Three microbial methods for determining antibiotic in milk were compared, and the critical parameters of three methods for detecting penicillin G, the residue limits, detection time, cost price and difficulty to operate were studied. At the same time, the study pointed out some disadvantages of TTC method on residue limits, and the tube diffusion method is introduced as a good supplement for the two methods of TTC and AOAC paper disk to determine β -lactams in milk, inexpensive, quick, simple and convenient, and the low limits of detection for the operation.

Key words: raw milk; penicillin G; detecting method; comparison

中图分类号: TS252.7 S859.796

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0325-03

牛乳是人们尤其是婴幼儿的主要营养食品, 牛乳中残留抗生素会影响乳制品加工, 降低食品安全, 危害人体健康, 同时也影响乳制品的进出口贸易^[1-2]。我国原料乳及乳制品中抗生素残留严重, 对乳中抗生素的检测是我国乳品加工中至为关注的问题^[3]。目前, 我国 β -内酰胺类抗生素在牛乳中残留检出报道最多^[4]。

本研究以 β -内酰胺类抗生素中最常用的青霉素 G 为检测抗生素, 对 AOAC 纸片法、国标 TTC、试管扩散法进行比较, 为牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留的检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜热乳酸链球菌(*Streptococcus thermophilus*, St) 东北农业大学食品学院畜产品加工实验室; 嗜热脂肪芽孢杆菌 10149953(*Bacillus stearothermophilus*, Bs) 中科院微生物研究所。青霉素 G、青霉素酶 美国 Sigma 公司; 脱脂乳粉和全脂无抗乳粉 国家乳品检测中心; 空白滤纸片(直径 13mm) 上海新亚净化器厂。溴甲酚紫、TTC、孔雀石绿、沙黄 天津科密欧化学试剂开发中心。

1.2 仪器与设备

PHS-25 型酸度计、SW-CJ-1FD 净化工作台、YXQ-SG41.280A 型电热手提压力蒸汽灭菌器、JD500-2 型电子天平、FA2004 电子分析天平、DH5000A 电热恒温培养箱、高速离心机、双筒电光显微镜、数显恒温水浴锅、

收稿日期: 2007-03-09

基金项目: 通化师范学院自然科学课题(200735)

作者简介: 李延华(1979-), 女, 讲师, 研究方向为发酵食品与乳制品工艺学。E-mail: liyanhua607@sohu.com

* 通讯作者: 王伟君(1979-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为发酵食品与功能性食品。E-mail: wangweijunid@sohu.com

游标卡尺等。

1.3 培养基及含抗奶样的配制

1.3.1 10% (W/W) 脱脂乳培养基

该培养基经 0.07MPa、15min 高压灭菌后置冰箱中备用。

1.3.2 抗生素 4# 培养基^[5-6]

胰消化明胶 6g, 牛肉膏 1.5g, 无水葡萄糖 1.0g, 琼脂 15.0g, 重蒸水 1000ml, 用浓度为 1mol/L 的 NaOH 调节 pH, 灭菌后 pH 为 6.5~6.6。

1.3.3 胰蛋白胨大豆培养基

胰蛋白胨 17.0g, 大豆蛋白胨 3.0g, NaCl 为 5.0g, K_2HPO_4 为 2.5g, 重蒸水 1000ml, 用浓度为 2mol/L 的 NaOH 调节 pH, 灭菌后 pH 为 7.3 ± 0.2 。在制备芽孢悬液时, 添加 31.3mg 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

1.3.4 平皿计数培养基^[5]

用于嗜热脂肪芽孢杆菌的菌落计数及抗生素检测。配制方法如下: 胰蛋白胨 5.0g, 酵母粉 2.5g, 无水葡萄糖 1g, 琼脂 15.0g, 重蒸水 1000ml, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 7.0~7.1, 121℃ 灭菌 20min, 备用。

1.3.5 抗生素残留奶样的制备

将用去离子水配制青霉素的标准贮液与 10% 的无抗乳混合制成 0、1、2、4、6、8 $\mu g/kg$ 等 6 个最大残留量限制倍量的抗生素残留奶样, 其中 0 $\mu g/kg$ 的乳样为阴性对照^[7]。配制 10 $\mu g/kg$ 的青霉素 G 残留乳样作为 AOAC 纸片法^[6]、试管扩散法的阳性对照^[8-9]; 配制 12、18、22、24、30、60 $\mu g/kg$ 青霉素 G 残留乳样, 用以确定国标 TTC 法的检测限, 其中 60 $\mu g/kg$ 作为国标 TTC 法的阳性对照^[10]。

1.4 检测方法

1.4.1 AOAC 纸片法^[5-6]

据 AOAC 纸片法对所配置的 6 个最大残留量限制倍量的青霉素 G 残留乳样进行检测。分别进行鉴别试验(过筛试验)、确证试验, 检测时, 每个浓度作 4 个平皿, 重复 3 次。

1.4.2 国标 TTC 法^[11]

据 GB/T4789.27-2003, 食品卫生微生物学检验, 鲜乳中抗生素残留检验, 采用 TTC 法检测所配制的青霉

素 G 残留乳样, 每个浓度重复 3 次, 每次 4 个平行, 检测时间 3~3.5h。

1.4.3 试管扩散法^[8-9]

采用平板计数(琼脂) PCA 培养基为基础培养基, 嗜热脂肪芽孢杆菌 953 为指示菌, 溴甲酚紫为颜色指示剂, 对所配制的 6 个最大残留量限制倍量的青霉素 G 残留乳样进行检测。每个浓度重复 3 次, 每次 4 个平行, 检测时间 2.5~3.0h。

试管扩散法检测时间是指阴性对照管由紫色变为最纯正黄色的时间; 颜色变化强度的判断依据见表 1, 颜色编号对应的颜色梯度见图 1, 判断结果分为抗生素阴性、抗生素可疑、抗生素阳性三种结果。

表 1 试管法结果判断颜色依据表

Table 1 Tube color classification after incubation

颜色编号	颜色强度	判断结果
a	-----	阴性
b	-----+	阴性
c	--++	可疑
d	-+++	阳性
e	++++	阳性

注: -----表示黄色最纯正; -----+表示黄色略暗; --++表示黄紫色; -+++表示稍浅的紫色; ++++表示深紫色。

1.5 数据处理

采用 SPSS11.5 软件, 对实验数据进行统计分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 AOAC 纸片法检测结果

将纸片法检测青霉素 G 所得的抑菌圈直径进行统计分析, 计算平均值与标准偏差, 结果如表 2 所示。

从表 2 可看出, AOAC 纸片法可检测出牛乳中青霉素 G 的欧盟及食品法规委员会规定的最大残留限制 4 $\mu g/kg$, 当 AOAC 纸片法测得的抑菌圈直径大于 $13.96 \pm 0.08mm$ 时, 表征该乳样中青霉素 G 超出欧盟及食品法规委员会规定范围^[7,13]。

2.2 国标 TTC 法检测效果

据 TTC 被指示菌代谢产物还原后由白色变为粉红色的显色反应, 判得国标 TTC 法检测 6 个最大残留量限制倍量的结果, 并确定该法对青霉素 G 的检测限, 结果

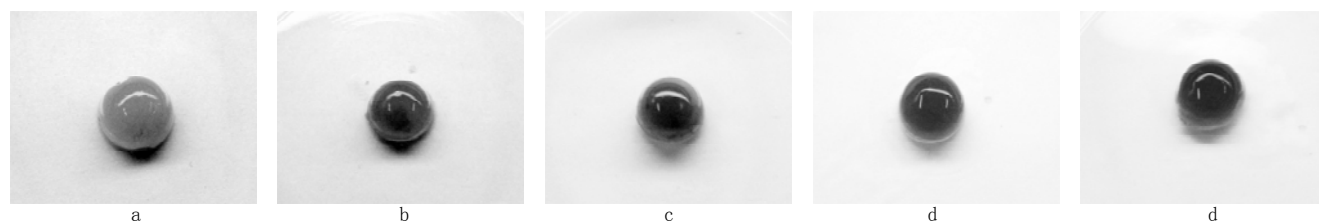


图 1 颜色依据表对应的颜色梯度

Fig.1 Color grade corresponding with color code table

表5 三种检测方法的关键参数比较
Table 5 Comparison of critical parameters by three methods

检测方法	AOAC 纸片法	TTC 法	试管扩散法
检测限($\mu\text{g/kg}$)	4	24	6
检测时间(h)	4.0~5.0	3.0~3.5	2.5~3
操作难易程度	在平皿中进行检测, 制备鉴定平皿、 摆放滤纸片、 抑菌圈直径测定等操作繁琐。	检测前 15h 制备菌液、 检测中添加 TTC 等 方面操作较繁琐。	芽孢悬液在 0~4℃ 可保存 6~8 个月 ^[5] , 检测管制备、稳定性、 加样方式较 AOAC 纸片法简便。
检测成本	三者检测成本相当, 检测单样成本小于 ¥1.00		

表2 AOAC 纸片法检测青霉素 G6 个最大残留量限制倍量
抑菌圈直径(n=12)

Table 2 Detection diameter of AOAC paper disk on detecting six concentrations of penicillin G (n=12)

药物浓度($\mu\text{g/kg}$)	0	1	2	4	6	8
BSDA 法抑菌圈直径(mm)	未检 测到	未检 测到	未检 测到	13.96± 0.08	15.80± 0.12	17.64± 0.32

表3 TTC 法检测青霉素 G 的结果(n=12)

Table 3 Detection results by method of TTC on detecting six concentrations of penicillin G (n=12)

药物浓度($\mu\text{g/kg}$)	0	1	2	4	6	8
TTC 法	未检 测到	未检 测到	未检 测到	未检 测到	未检 测到	未检 测到
TTC 法检测限($\mu\text{g/kg}$)	24					
阳性对照($\mu\text{g/kg}$)	60					

如表 3 所示。

从表 3 可以看出, 国标 TTC 法检测限、检测灵敏度很低, 经国标 TTC 法检测合格的乳, 抗生素残留量仍旧很高, 远超出欧盟规定的 $4\mu\text{g/kg}$ 残留浓度, 与范立冬报道的结果相一致^[10]。

2.3 试管扩散法检测结果

参照图 1, 采用试管扩散法对青霉素 G6 个最大残留量限制倍量的检测结果见表 4 所示。

表4 试管扩散法检测青霉素 G6 个最大残留量限制倍量结果(n=12)

Table 4 Detection results by tube diffusion test on detecting six concentrations of penicillin G (n=12)

药物浓度($\mu\text{g/kg}$)	0	1	2	4	6	8
试管扩散法	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到	+	+
试管扩散法检测限($\mu\text{g/kg}$)	6					
阳性对照($\mu\text{g/kg}$)	10					

从表 4 可以看出, 试管扩散法能检测出乳中青霉素 G 的 $6\mu\text{g/kg}$ 残留浓度, 检测限较低、灵敏度较高, 适合应用于牛乳中青霉素 G 的检测。

2.4 三种检测方法的关键参数比较

Shitandi A 提出评价某种抗生素残留检测法的依据主要有三点: 检测限、灵敏度、检测成本^[9], 而实际检测过程中检测时间、操作难易程度也是评价检测法优劣的关键因素, 将三种检测法的检测限、检测时间、操作难易

程度、检测成本四个关键参数进行比较, 结果见表 5。

3 结 论

3.1 三种检测法均利用微生物受阻的检测原理, 检测成本低, 适于国内牛乳中抗生素残留的检测。

3.2 AOAC 纸片法及 TTC 法对青霉素 G 的检测限分别为 $4\mu\text{g/kg}$ 和 $24\mu\text{g/kg}$, 国内现行使用的 TTC 法检测限远高于欧盟规定, 不符合国际要求, 对食品加工及食用安全潜在危害很大。

3.3 试管扩散法在检测时间、检测操作方便程度上较 AOAC 纸片法及国标 TTC 法具有一定的优越性。

3.4 试管扩散法经济省时、简便易行、检测限较低, 可作为 AOAC 纸片法及国标 TTC 法的补充, 应用于牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留的检测。

参考文献:

- [1] KUKUROVA I, HOZOVA B. Interactions of antimicrobials in milk and their detection by the disk diffusion method and delvotest SP[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(3): 529-533.
- [2] COGAN T M. Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics [J]. Appl Microbiol, 1972, 23(5): 960-965.
- [3] 林敬平. 国内乳品抗生素残留值得重视[J]. 当代畜禽养殖业, 2005(3): 3.
- [4] 陈福生, 高志贤, 王建华. 食品安全检测与现代生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 74-80.
- [5] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注释: 微生物学部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 837-849.
- [6] ARNOST B. Microbiological determination of penicillin G, ampicillin, and cloxacillin residues in milk[J]. AOAC International, 1979, 62(6): 1247-1250.
- [7] ALIMENTARIUS C. Residues of veterinary drugs in foods: Volume 3 [S]. 2nd Edition. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 1993.
- [8] SHITANDI A. Sensitivity of the improved dutch tube diffusion test for detection of antimicrobial residues in kenyan milk[J]. The Journal of Food Technology in Africa, 2001(6): 5-7.
- [9] SHITANDI A. Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for β -lactam residues in Kenyan milk[J]. African Journal of Biotechnology, 2004, 3(1): 82-87.
- [10] 范立冬, 鲁志远, 张长利. 检测鲜乳中残留抗菌素-TTC法的探讨[J]. 食品科学, 1991, 12(7): 39-42.
- [11] GB/T4789. 27-2003. 食品卫生微生物学检验鲜乳中抗生素残留量检验[S].
- [12] 余建英, 何旭宏. 数据统计分析与SPSS应用[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2003: 68-125.
- [13] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 143-182.