

# 出口食品中四环素族抗生素残留量检验方法

Method for determination of the residue of tetracycline series antibiotics in food for export

SN 0179—92  
代替 ZB X22 005—87

## 1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中四环素族抗生素残留量的检验方法。

本标准适用于出口肉或肉制品中四环素族抗生素残留量检验。蛋类和水产品可参照使用。

## 2 设备和材料

- 2.1 平皿：内径为90mm，底部平整光滑，具陶瓷盖。
- 2.2 不锈钢小管(即牛津杯，简称小管)：内径 $6\pm0.1$  mm，外径 $7.8\pm0.1$  mm，高度 $10\pm0.1$  mm。
- 2.3 游标卡尺：测量抑菌圈直径用。
- 2.4 均质器或乳钵。
- 2.5 离心机：4 000r/min。
- 2.6 恒温水浴锅。
- 2.7 恒温箱： $30\pm0.5^{\circ}\text{C}$ ，隔层必须水平。
- 2.8 电热干烤箱： $170\pm1^{\circ}\text{C}$ ，器皿灭菌用。

## 3 培养基及试剂

### 3.1 培养基

#### 3.1.1 菌种培养基

胰蛋白胨	10.0g
牛肉膏	5.0g
氯化钠	2.5 g
琼脂	14~16g
蒸馏水	1000mL

将各成分加热溶解于蒸馏水中，高压灭菌( $121^{\circ}\text{C}$ ，15min)，最终pH应为 $6.5\pm1$ 。

#### 3.1.2 检定用培养基

胰蛋白胨	6.0g
牛肉膏	1.5g
酵母膏	3.0g
琼脂	14~16g
蒸馏水	1000mL

将各成分加热溶解于蒸馏水中，高压灭菌( $121^{\circ}\text{C}$ ，15min)，最终pH $5.8\pm0.1$ 。

### 3.2 试剂

3.2.1  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 磷酸盐缓冲液(pH4.5)：精确称取13.6g磷酸二氢钾(分析纯)溶解于蒸馏水，并定容至1 000mL。高压灭菌( $115^{\circ}\text{C}$ ，30min)。置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

3.2.2 生理盐水：称取氯化钠8.5g，溶解于1 000mL蒸馏水中，高压灭菌( $115^{\circ}\text{C}$ ，30min)。

3.2.3 标准抗生素：四环素(TC)，土霉素(OTC)，金霉素(CTC)，从中国药品生物制品检定所购买。要密封避光，防潮保存在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

#### 3.2.4 标准抗生素原液和稀释液

##### 3.2.4.1 原液

- 四环素原液：称取50 mg左右四环素标准品，用 $c(\text{HCl})=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 盐酸稀释并定容至 $1000\mu\text{g/ml}$ 。
- 土霉素原液：称取50mg左右土霉素标准品，用 $c(\text{HCl})=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 盐酸溶解之，再用蒸馏水稀释并定容至 $1000\mu\text{g/ml}$ 。
- 金霉素原液：称取50mg左右金霉素标准品，用蒸馏水稀释并定容至 $1000\mu\text{g/ml}$ 。

以上原液保存在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，可使用7d。

##### 3.2.4.2 稀释液

a. 四环素稀释液：取上述原液用 $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 磷酸盐缓冲液稀释配制成为0.025，0.050，0.100，0.200，0.400，0.800  $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液，为制备标准曲线的最终标准浓度溶液，0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液为参考浓度溶液。

b. 土霉素稀释液：与四环素稀释液相同。

c. 金霉素稀释液：取上述原液用 $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 磷酸盐缓冲液稀释配制成为0.005，0.010，0.050，0.100，0.200，0.400  $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液，为制备标准曲线的最终标准浓度溶液，0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液为参考浓度溶液。

以上稀释液均在使用当天配制。

## 4 样品制备

取肉样品约20g，剪碎，称取其中10.0g加入 $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0.1\text{ mol/l}$   $\text{dm}^3$ 磷酸盐缓冲液20.0mL，小心搅匀，放置60min，置灭菌的均质杯中(9 000~10 000r/min)均质2min(或置灭菌的乳钵内研磨呈乳糜状)，经4 000r/min离心30min，其上清液作为被检样液。

## 5 菌液和检定用平板的制备

### 5.1 菌液的制备

#### 5.1.1 菌种：蜡样芽孢杆菌，菌号63301，由中国药品生物制品检定所提供。

5.1.2 菌液的制备：将菌种移种于盛有300mL菌种用培养基的克氏瓶内， $30^{\circ}\text{C}$ 培养7d，镜检芽孢数达85%以上，用25 mL生理盐水洗下菌苔，置于 $65^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴加热30 min，经离心(2 000 r/min)20min，弃去上清液，再加生理盐水，经离心弃去上清液，如此重复洗涤芽孢悬液三次，再置于 $65^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中加热30min，然后用50mL生理盐水制成芽孢悬液。置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存30d。

5.1.3 芽孢悬液用量的测定：在实际检定前，先试几个平板，即把不同浓度的芽孢悬液加入检定用培养基中，使0.050  $\mu\text{g/ml}$ 浓度的标准四环素稀释液可产生12mm以上的清晰、完整的抑菌圈而获得最适宜芽孢悬液用量。一般用量为每100mL检定用培养基内加0.5至1.0mL或芽孢计数后使1.0mL悬液含芽孢数约为 $10^6$ 。

5.2 检定用平板的制备：将适量芽孢悬液(已于5.1.3条中确定)加到溶化后冷却至 $55\sim60^{\circ}\text{C}$ 的检定用培养基中，混匀，每个平皿内加入6mL，前后摇动平皿，使含有芽孢的检定培养基均匀覆盖于平皿表面，置水平位置，盖上陶瓷盖，待凝固后，每个平板的培养基表面放置6个小管，使小管在半径为2.8cm的圆面上成 $60^{\circ}$ 角的间距。所用平板须当天制备。

## 6 检定

### 6.1 标准曲线的制备

标准曲线上的每个标准浓度取3个检定用平板为一组。在每个检定用平板上的其中3个小管内加满参考浓度溶液，另3个小管内加满标准浓度溶液，参考浓度与标准浓度溶液要间隔放置，5个标准浓度共用15个检定用平板，含量最低的标准浓度(四环素和土霉素为0.025  $\mu\text{g/ml}$ ，金霉素为0.005  $\mu\text{g/ml}$ )的3个检定用于板作为产生阴性结果的平板对照，其他12个检定用平板用来绘制标准曲线，这样参考浓度0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液将得出45个抑菌圈直径的数值，而标准曲线上其他的标准浓度将得出9个抑菌圈直径的数值。

将陶瓷盖重新盖好，置 $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 培养 $17\pm1$  h。然后翻转平板，除去小管，精确地测量产生的抑菌圈直径(精确到0.1 mm)，求出每组3个检定用平板上0.100  $\mu\text{g/ml}$ 浓度的抑菌圈直径读数与其他标准浓度的抑菌圈直径读数的平均值，再求出参考浓度0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的所有45个抑菌圈直径数值的平均值作为标准曲线的校正点，来校正其他各标准浓度的抑菌圈读数的平均值。

例如：参考浓度0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的45个抑菌圈直径数值的平均值为15.0mm，而一组3个标准浓度为0.200  $\mu\text{g/ml}$ 检定用平板中9个0.100  $\mu\text{g/ml}$ 浓度抑菌圈直径数值的平均值为14.8mm，则校正值为+0.2mm，如3个检定用平板中0.200  $\mu\text{g/ml}$ 浓度抑菌圈直径数值的平均值为17.0mm，经校正后的值应为17.2mm。

将这些校准后的值，包括0.100  $\mu\text{g/ml}$ 浓度的平均值在双周半对数坐标图纸上，以抑菌圈直径为横坐标(算术级)，以 $\mu\text{g/ml}$ 计的浓度为纵坐标(对数级)，通过这些点以式(1)、(2)绘出最佳直线。

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5 \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$H = (3a + 2b + c - e) / 5 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：L—标准曲线的最低浓度的抑菌圈直径(四环素，土霉素为0.050  $\mu\text{g/ml}$ ，金霉素为0.010/1  $\mu\text{g/ml}$ )；

H—标准曲线的最高浓度的抑菌圈直径(四环素，土霉素为0.800  $\mu\text{g/ml}$ ，金霉素为0.400  $\mu\text{g/ml}$ )；

c—参考浓度0.100  $\mu\text{g/ml}$ 的45个抑菌圈直径的平均值；

a、b、d、e—标准曲线中其他标准浓度的抑菌圈直径经校准后的平均值。

### 6.2 样品中四环素族抗生素残留量的检定

6.2.1 四环素残留量的检定：每份样品取3个检定用平板，在每个检定用平板上3个间隔的小管内加满四环素标准参考浓度溶液，另外3个小管内加满被检样液，将陶瓷盖重新盖好， $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 培养 $17\pm1$ h，然后翻转平板，除去小管，精确地测量产生的抑菌圈直径(精确到0.1 mm)，分别求出3个检定用平板上参考浓度和被检样液的抑菌圈直径数值的平均值，经校正点校准后的值从四环素标准曲线上查出被检样液中的四环素的含量。

6.2.2 土霉素残留量的检定：除在每个检定用平板上3个间隔的小管内加满土霉素标准参考浓度溶液及经校正点校准后的值从土霉素标准曲线上查出被检样液中土霉素的含量外，其他步骤与四环素残留量的检定相同。

6.2.3 金霉素残留量的检定：除在每个检定用平板上3个间隔的小管内加满金霉素标准参考浓度溶液及经校正点校准后的值从金霉素标准曲线上查出被检样液中金霉素的含量外，其他步骤与四环素残留量的检定相同。

## 7 样品中四环素族抗生素残留量的计算和报告

从标准曲线上查出符合该被检样液经校准后的抑菌圈直径数值的含量，乘以稀释倍数3，得出结果以 $\mu\text{g/g}$ 报告。

### 附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国天津进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人陈春芝。