

前言

本标准是根据GB/T1.1—1 993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则第1部分：标准编写的基本规定》和SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求而编写的。其中测定方法采用了日本厚生省1990年编著的《畜、水产食品中的残留物质检查法》中竹桃霉素残留量检验方法，但在技术内容上稍作改变，经验证后，按规定格式的要求作了编辑性修改。标准中同时制定了抽样和制样方法。

- 本标准的测定下限是根据国际上对肉品中竹桃霉素的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。
- 本标准中的附录A是标准的附录。
- 本标准中的附录B是提示的附录。
- 本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。
- 本标准由中华人民共和国内蒙古进出口商品检验局负责起草。
- 本标准主要起草人：刘中学、甄宏太。
- 本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

- 本标准规定了出口肉及肉制品中竹桃霉素残留量检验的抽样、制样和杯碟测定方法。
- 本标准适用于出口猪肉中竹桃霉素残留量的检验。

2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

- SN 0179—92 出口食品中四环素族抗生素残留量检验方法

3 抽样和制样

- 3.1 检验批
- 以不超过2500件商品为一检验批。
- 同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

3.2 抽样数量

批量，件	最低抽样数，件
1～25	1
26～100	5
101～250	10
251～500	15
501～1000	17
1001～2500	20

3.3 抽样方法

按3.2规定的抽样件数随机抽取，逐件开启。每件至少取一袋作为原始样品。如果每件内无小包装或有小包装但其重量超过2kg，则可用无菌刀具从每件内割取不少于100 g，混合后置于清洁容器中，作为混合原始样品。原始样品总量不得少于2kg，加封后，标明标记，及时送交实验室。

3.4 试样制备

从原始样品中取出部分有代表性样品，将可食部分用绞碎机绞碎，充分混匀，用四分法缩分出不少于500 g作为试样。装入清洁容器中，加封后，标明标记。

3.5 试样保存

- 将试样于－18℃以下冷冻保存。
- 注：在抽样及制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

4 测定方法

4.1 方法提要

用磷酸盐缓冲液(pH 7.9±0.1)提取试样中的竹桃霉素残留物，离心后取上清液作为样液，以藤黄微球菌作为指示菌，用杯碟法进行测定，根据所产生抑菌圈的大小用标准曲线法定量。

4.2 试剂和材料

- 除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水。
- 4.2.1 磷酸盐缓冲液(pH 7.9±0.1)：精确称取无水磷酸二氢钾0.523g和无水磷酸氢二钾16.73g，溶解于1000 mL水中，于121℃高压灭菌15min。

4.2.2 试验菌种：藤黄微球菌(Micrococcus luteus)菌号CMCC 28001，中国药品生物制品检定所提供。

4.2.3 竹桃霉素标准品：纯度≥95%。美国SIGMA化学制品公司提供，或等效品。密封、防潮、避光保存于4℃冰箱。

4.2.4 竹桃霉素标准储备液：准确称取适量的竹桃霉素标准品，溶于约2mL甲醇中，再用磷酸盐缓冲液(4.2.1)稀释，配制成浓度为250 μg/mL的标准储备液。4℃冰箱中保存，可使用5天。

4.2.5 竹桃霉素标准中间液：取竹桃霉素标准储备液10.0 mL于500 mL容量瓶中，用磷酸盐缓冲液(4.2.1)稀释至刻度，配制成浓度为5.0 μg/mL的标准中间液。使用当天配制。

4.2.6 竹桃霉素标准工作液：取一定量竹桃霉素标准中间液，用磷酸盐缓冲液(4.2.1)分别稀释成浓度为0.01、0.025、0.05、0.10、0.20和0.40 μg/mL的一组标准工作液。使用当天配制。以0.10 μg/mL浓度为参考浓度；以0.01 μg/mL浓度为判断阴性对照浓度。

4.2.7 培养基I(见附录A中A1)。

4.2.8 培养基x(见附录A中A2)。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 恒温培养箱：(26±1)℃，搁板必须水平。
- 4.3.2 震荡培养箱：(30±1)℃。
- 4.3.3 培养皿：内径90 mm、底部平整光滑的玻璃皿或塑料皿，配陶瓦盖，或玻璃盖内嵌入干燥的滤纸。
- 4.3.4 牛津杯：不锈钢圆筒，外径(8.0±0.1)mm，内径(6.0±0.1)mm，高(10.0±0.1)mm。
- 4.3.5 游标卡尺：测量范围0～200 mm，精度0.02mm。或抑菌圈测量仪。
- 4.3.6 均质器：不低于8000 r/min。
- 4.3.7 离心机：不低于4000 r/min。
- 4.3.8 半对数坐标纸。

4.4 测定步骤

4.4.1 样液制备

- 称取试样约10 g(精确至0.1g)，置于均质杯中，加入10.0 mL磷酸盐缓冲液(4.2.1)，小心搅匀。
- 放置60 min后，于8000～10 000 r/min均质2min，移入离心管中，于4000 r/min离心20 min，取上清液作为样液。

4.4.2 菌悬液制备

将试验菌种(4.2.2)接种于装有培养基I的试管中，于(30±1)℃培养24h。吸取约1 mL该培养物接种于装有50 mL培养基I的锥形瓶中，于(30±1)℃震荡培养18～20 h。此培养物即为菌悬液，贮于4℃冰箱中可使用1周。

4.4.3 检定平板的制备

制备前，先预测一下藤黄微球菌悬液的最佳用量。方法是先用不同量的菌悬液加到培养基II中，经培养获得适当大小(用0.10 μg/mL竹桃霉素标准工作液时直径在16mm以上)且清晰的抑菌圈，菌悬液的该加入量即为最佳用量。

平板制备时，先向培养皿中加入20 mL融化的培养基II保持水平，待其凝固。将最佳用量的菌悬液加入到事先融化并冷却至45～50℃的培养基II中，充分混匀后，向每个培养皿中基层琼脂上加4mL，使其均匀分布，并保持水平，凝固后即为检定用平板。所用平板需当天制备。

4.4.4 标准曲线的绘制

- 按照SN 0179—92中6.1进行，但标准工作液用4.2.6中所制备的一组标准工作液。
- 4.4.5 样液的测定

每份样液用3个检定平板。在每个平板上置6只牛津杯，使其在半径约28mm的圆周上呈60°角均匀分布，间隔注满样液和0.10 μg/mL的竹桃霉素标准工作液。于(26±1)℃培养(17±1)h。翻转平板，除去牛津杯。如有抑菌圈产生，精确测量其直径。

4.5 结果计算和表述

在3个检定平板上，各浓度竹桃霉素标准工作液均出现适当大小的清晰抑菌圈时，如样液抑菌圈直径的平均值<10 mm，即报告试样中竹桃霉素残留为“阴性”。如样液抑菌圈直径的平均值≥10 mm，经校正后从标准曲线上查出相应的竹桃霉素浓度值，再用式(1)计算出试样中竹桃霉素残留含量。

$$X=\frac{c}{m}$$

式中：X—试样中竹桃霉素残留含量，mg/kg；

c—于标准曲线上查出的样液中竹桃霉素浓度值，μg/mL；

m—最终样液所代表的试样的质量浓度，g/mL。

注：如测定结果呈阳性，必要时尚需进行确证试验(确证试验方法见附录B)，以证明抑菌物质确系竹桃霉素。

5 测定低限和回收率

5.1 测定低限

- 本方法的测定低限为0.05mg/kg。

5.2 回收率

- 猪肉中竹桃霉素添加浓度及其回收率实验数据：
- 在0.05mg/kg时，回收率为71.3%；
- 在0.1mg/kg时，回收率为89.7%；
- 在0.2mg/kg时，回收率为91.7%。

附 录 A		
(标准的附录)		
培 养 基		
A1 培养基I		
	蛋白胨	10.0g
	牛肉浸膏	5.0g
	氯化钠	2.5g
	水	1000mL
将上述成分于水中加热溶解，分装于试管(2mL/管)和锥形瓶(50 mL/瓶)中，于121℃高压灭菌15min。最终pH为7.0±0.1。		
A2 培养基II		
	蛋白胨	6.0g
	胰酪胨	4.0g
	牛肉浸膏	1.5g
	酵母浸膏	3.0g
	葡萄糖	1.0g
	琼脂	15g
	水	1000mL
将上述成分于水中加热溶解，分装于锥形瓶中，于121℃高压灭菌15min。最终pH为7.9±0.1。		
附 录 B		
(提示的附录)		
确 证 试 验		
确证试验采用纸层析法。		
B1 展开剂：甲醇。		
B2 显色剂：取1.0 mL10%四氯化铂溶液和2.5mL4%碘化钾溶液混合并用水稀释至250 mL。		
B3 层析缸：圆柱形玻璃标本缸，高300 mm，内径90 mm。		
B4 层析纸：Whatman No.1滤纸或等效品，规格200 mm×200 mm。		
B5 确证方法：称取绞碎、混匀的试样50 g，置于均质杯中，加入50 mL甲醇，小心搅匀。放置60 min后，于8000—10 000 r/min均质2min。移入离心管中，于4000 r/min离心20 min。吸取上清液，向其中加入10mL正己烷，振荡数次，于4000 r/min离心1 0 min，弃去上层液。将下层液移入旋转真空浓缩器中，于40℃以下真空浓缩至约1mL，移出此液作为层析用样液。		
用已知不合竹桃霉素的肉样，按上述方法处理，制备空白层析用试液。		
在层析纸上画一条距底边25mm的水平线。用0.1mol/L盐酸溶液将层析纸充分湿润后，夹在吸墨纸中间吸干。在水平线上，从距纸边≥50 mm处开始，以≥25mm的间隔分别滴加20 μL样液和20 μL空白试液。稍干后，空白液处复加10 μL竹桃霉素标准中间液(5.0 μg/mL)。将层析纸稍干，但不要使其完全变干。将仍湿润的层析纸卷成圆筒状，使其侧边相重叠25mm，并用别针予以固定。将层析纸筒直立于底部加有12.5mm高甲醇的层析缸中。待甲醇前沿上升至距起始水平线约125mm时取出层析纸，使其自然干燥，喷以显色剂。将层析纸挂在烘箱中于100℃烘3min。如样液上方出现紫色斑点，测得R _f 值，与竹桃霉素标准液的色斑和R _f 值对比，以确定被检试样中抑菌物质是否是竹桃霉素。		