

前言

本标准是根据GB/T 1.1—1993《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》及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》的要求进行编写的。其中测定方法采用了日本厚生省1990年编写的《畜、水产食中的残留物质检验方法》中的粘菌素检验方法。技术内容上稍作改变，经验证后，按规定格式要求作了编辑性修改。在标准中同时制定了抽样和制样方法。

本标准的附录A是标准的附录。

本标准的附录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浙江进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：费飞金、高雯洁。

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粘菌素残留量检验的抽样、制样和杯碟测定方法。

本标准适用于出口鸭肉中粘菌素残留量的检验。

2 抽样和制样

- 2.1 检验批
- 以不超过2500件为一检验批。
- 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。
- 2.2 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

2.3 抽样方法

按2.2规定的抽样件数随机抽取，逐件开启。每件至少取500 g(或一袋)作为原始样品，抽取的原始样品总量不少于2kg，放入清洁容器内，加封后，标明标记，及时送交实验室。

2.4 试样制备

从所取回的原始样品中取出部分有代表性样品，将可食部分放入绞碎机中绞碎，充分混匀。用四分法缩分至不少于500 g作为试样。装入清洁容器内，加封后标明标记。

2.5 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。

3 测定方法

3.1 方法提要

用磷酸盐缓冲液抽提试样中残留的粘菌素，经均质、离心，取上清液进行杯碟法测定。利用样液中的残留粘菌素与支气管败血性博代氏杆菌的作用，根据产生抑菌圈的大小用标准曲线法定量。

3.2 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。

3.2.1 粘菌素甲基磺酸钠标准品；已知效价标准品。1 μg相当于0.613 μg粘菌素。

3.2.2 缓冲液I：pH6.0±0.1。称取80.0 g无水磷酸二氢钾溶于700 mL水中，另取20.0 g无水磷酸氢二钾溶于300 mL水中，两者混合，于121℃高压灭菌15min。

3.2.3 缓冲液II：pH6.0±0.1。称取80.0 g无水磷酸二氢钾溶于700 mL水中，另取20.0 g无水磷酸氢二钾溶于300 mL水中，两者混合。称取铁氰化钾以0.2%比例溶解于该溶液中。

3.2.4 试验菌种：支气管败血性博代氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)，由美国标准菌株收藏中心提供，菌株号ATCC 4617。

3.2.5 粘菌素标准储备液：称取适量的粘菌素甲基磺酸钠标准品(精确到0.1mg)，用缓冲液I溶解并制备成浓度为1000 μg/mL的粘菌素标准储备液。置4℃保存，可使用8天。

3.2.6 粘菌素标准工作液：分别吸取一定量粘菌素标准储备液，用缓冲液I稀释成浓度为0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2 μg/mL的粘菌素标准工作液。需当日配制和使用。

3.2.7 培养基I(见附录A中A1)。

3.2.8 培养基II(见附录A中A2)。

3.2.9 培养基III(见附录A中A3)。

3.3 仪器和设备

3.3.1 培养皿：内径90 mm，底部平整光滑的玻璃皿或塑料皿，具陶瓦盖。

3.3.2 牛津杯：不锈钢圆筒，外径(8.0±0.1)mm，内径(6.0±0.1)mm，高度(10.0±0.1)mm。

3.3.3 游标卡尺：测量范围0～200 mm，精度0.02mm，或抑菌圈测量仪。

3.3.4 绞碎机：电动。

3.3.5 均质器：不低于10000 r/min。

3.3.6 离心机：不低于4000 r/min。

3.3.7 恒温培养箱：(36±1)℃，搁板应保持水平。

3.3.8 高压灭菌器。

3.3.9 恒温水浴锅：恒温±1℃。

3.4 测定步骤

3.4.1 样液制备

称取10.0g试样(精确至0.1g)于均质杯内，加入10mL缓冲液x，搅匀，放置的min，均2min(10 000 r/min)后，放入水浴锅中煮沸3min。移入离心管中离心不少于10 min(4000 r/min以上)，取出上清液。在残渣中再加10 mL缓冲液II，按上述方法均质、离心，取出上清液。合并两次上清液，并定容为20 mL作为样液。

3.4.2 菌悬液的制备

将支气管败血性博代氏杆菌接种于培养基I制成的试管斜面上于(36±1)℃培养16～24h后，再转种到培养基III中，于(36±1)℃培养16～24h，制成菌悬液(使用时注意摇匀)。

3.4.3 菌悬液最佳用量测定

测试前应先用0.025 μg/mL粘菌素标准工作液，对上述菌悬液进行预测试。以不同量的菌悬液加入经熔化并冷却至45～50℃的培养基III中，充分混合，并经(36±1)℃培养(17±1)h后，选择能使该标准工作液产生直径大于等于10 mm清晰完整的抑菌圈的菌悬液加入量，即为菌悬液的最佳用量。

3.4.4 检定平板制备

将培养基III熔化，注20 mL于灭菌培养皿内保持水平，待其凝固，作为基层。另取培养基III熔化，冷却至45～50℃，加入上述测得的最佳菌悬液用量，充分混合，取约4mL注入已铺有基层培养基的平板中作种层，保持水平，使其凝固，制成检定用的平板。所用平板需当天制备。

3.4.5 标准曲线的绘制

用粘菌素标准工作液(3.2.6)绘制标准曲线。以0.05 μg/mL浓度的标准工作液为参考浓度；以0.0125 μg/mL浓度的标准工作液作阴性对照用。每个标准工作液浓度取三个检定平板作为一组，每个平板上置4个牛津杯，使牛津杯在半径为2.5cm的圆面成90°角间距，对角两个杯中注满0.05 μg/mL参考浓度标准工作液，另两个对角杯中注满其他浓度的一种标准工作液。4个浓度标准工作液共12个检定平板，用于制备标准曲线。其中0.05 μg/mL参考浓度的标准工作液将得到24个抑菌圈直径的数值，而其他标准工作液分别得到6个抑菌圈直径的数值。

盖好平皿盖，置(36±1)℃培养(17±1)h。翻转平板，除去牛津杯，测量各个浓度产生的抑菌圈直径(精确到0.1mm)，求得各自的平均值。再求出0.05 μg/mL参考浓度24个抑菌圈直径的平均值。用参考浓度的抑菌圈直径的总平均值减去每组平板参考浓度的抑菌圈直径平均值的差，即为各组平板的校正值。将校正后的值用式(1)和式(2)算出L和H点的直径值，在半对数坐标纸上，以抑菌圈直径为横坐标(算术级)，粘菌素浓度为纵坐标(对数级)，通过L和H点连一直线即为标准曲线。

$$L = \frac{7a + 4b + c - 2d}{10} \quad \text{..... (1)}$$

$$H = \frac{7d + 4c + b - 2a}{10} \quad \text{..... (2)}$$

式中：L—标准曲线上最低浓度抑菌圈的直径，mm；

H—标准曲线上最高浓度抑菌圈的直径，mm；

b—参考浓度0.05 μg/mL的24个抑菌圈直径的平均值，mm；

a、c、d—分别表示标准曲线上其他标准工作液浓度(0.025、0.1、0.2 μg/mL)的抑菌圈直径经校正后的平均值，mm。

3.4.6 样液的测定

每份样液取3个检定平板，在每个平板上置4个已灭菌的牛津杯(按制备标准曲线方法放置)，在对角的2只牛津杯里注满被检样液，在剩余的2只牛津杯里分别注满粘菌素参考浓度标准工作液(即0.05 μg/mL)。于(36±1)℃培养(17±1)h，翻转平板，除去牛津杯。如有抑菌圈产生，量取抑菌圈直径(精确到0.1mm)。

3.5 结果的计算和表述

如样液抑菌圈的直径小于10 mm，即报告为“阴性”。

如样液抑菌圈的直径大于等于10 mm，求出每组三个检定平板上样液和参考浓度标准工作液抑菌圈直径的平均值，经校正后，从标准曲线上查出相应的粘菌素的浓度，通过式(3)，计算试样中粘菌素残留的含量：

$$X = \frac{c}{m} \quad \text{..... (3)}$$

式中：X—试样中粘菌素残留的含量，mg/kg；

c—从标准曲线上查得样液中粘菌素浓度，μg/mL；

m—每毫升是终样液所代表的试样量，g。

注：如测定结果呈阳性，即所显的抑菌圈直径的平均值大于等于10 mm，必要时尚需进行确证试验(可用薄层层析法，参见附录B)，以证明抑菌物确系粘菌素。

4 测定低限和回收率

4.1 测定低限

本方法的测定低限为0.05mg/kg。

4.2 回收率

鸭肉中粘菌素添加浓度及其回收率的实验数据：

0.5mg/kg时，回收率为78.0%；

0.100mg/kg时，回收率为85.0%；

0.200mg/kg时，回收率为90.0%。

附 录 A  
(标准的附录)

培 养 基

A1 培养基I

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

将上述成分于水中加热溶解，调节pH使其灭菌后pH为6.5±0.1，分装于试管或克氏瓶中，于121℃高压灭菌15min。灭菌后可制成斜面。

A2 培养基II

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
水	1000 mL

将上述成分溶解于水中，调节pH使其灭菌后pH为7.0±0.1，分装于试管或克氏瓶中，于121℃高压灭菌15min。

A3 培养基III

蛋白胨	17.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	2.5 g
磷酸氢二钾	2.5 g
木瓜蛋白酶大豆	3.0 g
琼脂	12.0 g
水	1000 mL

将上述成分于水中加热溶解，调节pH使其灭菌后pH为7.3±0.1，分装于锥形瓶中，于121℃高压灭菌15min。

附 录 B  
(提示的附录)

确证试验

确证试验采用薄层层析法，用粘菌素标准品作对照，求品值，以确证试样中是否存在粘菌素。薄层层析条件：

薄层板：硅胶G板。

点样量：50 μL，点状。

展开剂：丙酮—水(1+1)。

展开：在饱和槽内进行。

显色剂：0.5%(m/v)茚三酮丙酮溶液。

检测：喷洒显色剂茚三酮溶液，反应时间约5min。