

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》的要求而进行编写的。其中测定方法是参考了国内外有关文献，经研究、改进和验证后而制定的。本标准同时制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉制品中庆大霉素残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

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国家进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：韩继玲、郑连胜、张铁军、张再生、任怀秀。

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庆大霉素残留量检验的抽样、制样和杯碟测定方法。

本标准适用于出口鸡肉中庆大霉素残留量的检验。

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
- 按照2.2规定的抽样数量随机抽取，逐件开启。每件至少取一袋，作为原始样品。如每件中无小包装，或有小包装，但每袋重量超过2kg者，则可用灭菌刀具从抽出的包件中割取不少于100 g，作为原始样品。原始样品总量不少于2kg，混合后，置于清洁容器内，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，将可食部分放入组织捣碎机中捣碎，充分混匀。用四分法缩分至不少于500 g，装入清洁容器内，作为试样。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
- 试样中庆大霉素残留用磷酸盐缓冲液提取，提取液经离心后，取上清液与表皮葡萄球菌作用，用杯碟法进行测定，根据抑菌圈的大小用标准曲线法进行定量。
- 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 硫酸庆大霉素标准品：已知纯度标准品，1 μg相当于0.631 μg庆大霉素，由中国药品生物制品检定所提供，或等效品。
- 3.2.2 磷酸盐缓冲液：pH8.0±0.1。称取13.3g磷酸二氢钾及6.2g氢氧化钾，溶于水中，用水定容至1 000mL。于121℃高压灭菌15min。
- 3.2.3 庆大霉素标准储备液：精确称取适量的硫酸庆大霉素标准品，用磷酸盐缓冲液配制成浓度为1000 μg/mL的标准储备液。保存于4℃冰箱中，可使用1个月。
- 3.2.4 庆大霉素标准工作液：吸取一定量的庆大霉素标准储备液，用磷酸盐缓冲液稀释成庆大霉素浓度为20 μg/mL的中间标准液，再以此中间标准液用磷酸缓冲液稀释成浓度为0.05，0.10，0.20，0.40，0.80，1.60 μg/mL的庆大霉素标准工作液。以上溶液均需当日配制。
- 3.2.5 试验菌种：表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)，菌号CMCC 1 2228，由中国药品生物制品检定所提供。
- 3.2.6 培养基I (见附录A中A1)。
- 3.2.7 培养基II见附录A中A2)。
- 3.2.8 培养基III (见附录A中A3)。
- 3.2.9 生理盐水：称取8.5g氯化钠，溶解于1000 mL水中，分装后，于121 ℃高压灭菌15min。
- 3.2.10 展开剂：三氯甲烷—甲醇—浓氨水 (1+1+1)。
- 3.2.11 碘片。
- 3.3 仪器和设备
- 3.3.1 培养皿：内径为90 mm，高度为20 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(10±0.1)mm。
- 3.3.3 克氏瓶：800 mL。
- 3.3.4 游标卡尺：测量范围0～200 mm，精度0.02mm或抑菌圈测量仪。
- 3.3.5 均质器：转速不低于10 000 r/min。
- 3.3.6 离心机：转速不低于4000 r/min。
- 3.3.7 恒温水浴锅：0～100℃，精度±1℃。
- 3.3.8 恒温培养箱：(36±1.0)℃，搁板必须保持水平。
- 3.3.9 高压灭菌器。
- 3.3.10 半对数坐标纸。
- 3.3.11 旋转蒸发器。
- 3.3.12 色谱缸：20 cm×15cm×30 cm。
- 3.3.13 薄层硅胶G板：5cm×10 cm或10 cm×20 cm。
- 3.3.14 微量注射器：10 μL或20 μL。
- 3.4 测定步骤
- 3.4.1 样液制备
- 称取10 g试样(精确至0.1g)于均质杯内，加入10 mL磷酸盐缓冲液(3.2.2)，均质3min(8000r/min)后，室温放置60 min，移入离心管中离心30min(4000 r/min)，取上清液于大试管中，再加入10 mL磷酸盐缓冲液，使与残渣混匀，进行二次离心，合并两次上清液于茄形瓶中，用1mol/L氢氧化钠溶液调 pH至8.0±0.1，并用缓冲液定容至20 mL，作为待测样液。
- 3.4.2 菌悬液的制备
- 将试验菌种(3.2.5)接种于培养基II(3.2.7)的试管中，经(36±1)℃培养(24±1)h。移1mL菌液于盛有适量培养基I(3.2.6)的克氏瓶中，使菌液均匀覆盖在琼脂表面，于(36±1)℃培养(24±1)h。然后用适量生理盐水将菌苔洗下，备用。置4℃冰箱中(不宜超过1个月)。
- 3.4.3 检定平板的制备
- 在测定前，需进行预测试，以求得菌悬液最佳用量。用0.10 μg/mL庆大霉素标准工作液对加有不同量的菌悬液的平板进行测试，经培养后能使0.10 μg/mL标准工作液在平板上产生直径大于等于10mm清晰、完整的抑菌圈的菌悬液用量为最佳用量。
- 将培养基III(3.2.8)熔化，冷却至50℃左右，加入最佳用量菌悬液，使其充分混合后，取10 mL，注入灭菌培养皿中，保持水平，待其凝固制成检定平板。所用平板需当天制备。
- 3.4.4 标准曲线的制备
- 用庆大霉素标准工作液(3.2.4)绘制标准曲线，以0.2 μg/mL浓度的标准工作液为参考浓度，以0.05 μg/mL浓度的标准工作液作阴性对照。每个标准工作液浓度取3个检定平板作为一组。在每个平板上置6个牛津杯，使牛津杯在半径为2.8cm的圆面上成60°角间距，其中3个杯中加满参考浓度的标准工作液，另三个杯中加满其他浓度的一种标准工作液。参考浓度溶液与标准工作液要间隔放置。5个浓度的标准工作液共计1 5个检定平板，用于绘制标准曲线。这样0.2 μg/mL参考浓度标准工作液将得到45个抑菌圈直径的数值，而其他标准工作液分别得到9个抑菌圈直径的数值。盖好皿盖，置(36±1)℃培养(17±1)h后，翻转平板，除去牛津杯。精确测量各个浓度的抑菌圈直径(精确到0.1mm)，求得各自的平均值。再求出0.2 μg/mL参考浓度的45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，与每组平板参考浓度的抑菌圈直径平均值之差，来校正其他各浓度标准工作液的抑菌圈读数的平均值。
- 将校正后的值，按式(1)、式(2)求出L点和H点。在半对数坐标纸上，以抑菌圈直径(mm)为纵坐标(算术级)，庆大霉素浓度为横坐标(对数级)，标出L和H点。通过L点、H点连一直线，即为标准曲线。

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \dots\dots\dots (1)$$
$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5} \dots\dots\dots (2)$$

式中：L—标准曲线上的最低浓度(0.10 μg/mL)抑菌圈直径，mm；  
H—标准曲线上的最高浓度(1.60 μg/mL)抑菌圈直径，mm；  
c—参考浓度(0.20 μg/mL)的45个抑菌直径的平均值，mm；  
a、b、d、e—分别表示标准曲线中其他浓度标准工作液(0.10、0.40、0.80、1.60 μg/mL)的抑菌圈直径经校正后的平均值，mm。

3.4.5 样液的测定

每份样品采用三个检定平板，在每个检定平板上置6个已灭菌的牛津杯。在每个检定平板上3个间隔的牛津杯内加满庆大霉素标准参考浓度溶液，另外3个牛津杯内加满被检样液。将陶瓦盖盖好，置(36±1)℃培养(17±1)h。翻转平板，除去牛津杯。如果有抑菌圈产生，精确测量其直径。

3.5 结果计算和表述

如样液抑菌圈的平均直径小于10 mm，即报告试样中庆大霉素残留为“阴性”。

如样液抑菌圈的平均直径大于等于1 0 mm，经校正后，从标准曲线上查出相应的庆大霉素浓度。按式(3)计算试样中庆大霉素含量。

$$X = \frac{C}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中：X—试样中庆大霉素残留的含量，mg/kg；  
c—由标准曲线上查出的样液中庆大霉素浓度，μg/mL；  
m—最终试液所代表的试样的浓度，g/mL。

注：如测定结果呈阳性，即所显抑菌圈的平均直径大于等于10 mm，必要时，尚需进行确证试验(可用薄层色谱法，参见附录B)，以证明抑菌物质确为庆大霉素。

4 测定低限和回收率

4.1 测定低限

本方法的测定低限为0.10 mg/kg。

4.2 回收率

鸡肉中庆大霉素的添加浓度及其回收率的试验数据：

0.10 mg/kg，回收率为97.7%；

0.20 mg/kg，回收率为92.5%；

0.40mg/kg，回收率为98.0%。

附 录 A	
(标准的附录)	
培 养 基	
<b>A1 培养基I</b>	
胰蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼 脂	14.0～16.0 g
蒸馏水	1000 mL
将上述成分于蒸馏水中加热溶解，调节pH为6.5～6.6，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。	
<b>A2 培养基II</b>	
胰蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
将上述成分于蒸馏水中加热溶解，调节pH为6.5～6.6，分装于试管或克氏瓶中，于121℃高压灭菌15min。	
<b>A3 培养基III</b>	
蛋白胨	6.0 g
酵母浸膏	4.0 g
牛肉浸膏	1.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼 脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
将各成分加热并溶解于蒸馏水中，调节pH为6.5，于121℃灭菌15min。临用前用1 mol/L氢氧化 钠溶液，调节pH至8.0。	

附 录 B	
(提示的附录)	
确 证 试 验	
采用薄层色谱法进行确证试验。	
B1 将普通硅胶G薄层板(5cm×10 cm)于105℃活化2h，冷却后备用。	
B2 取样液(3.4.1)20.0 mL(相当于10.0 g样品)，用氢氧化钠溶液(1mol/L)调节pH至8.0，于65～70℃减压浓缩至干。用1.0mL磷酸盐缓冲液(3.2.2)溶解残渣，溶液作待测样液。	
B3 用微量注射器分别吸取浓度为20 μg/mL的庆大霉素标准工作液及待测样液各2.0 μL，分别点在上述薄层板上(间距2cm)。将薄层板移放至盛有展开剂(3.2.10)的展开缸中展开，至溶剂展延至薄层板前沿(约20min)后退出。待溶剂挥发后，将薄层板置于另一充满饱和碘蒸气之展开缸内，观察显色情况。根据薄层板上待测液斑点的颜色及位置，测得R <sub>f</sub> 值，对照标准液斑点，以确定样涂中的抑菌物质是否为庆大霉素。	