

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》的要求而编写的。其中测定方法采用了日本厚生省1990年编集的《畜、水产食品中的残留物质检验方法》中泰乐菌素残留量分析方法，但在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。

测定低限是根据国际上对禽蛋中泰乐菌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浙江进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：蔡靖毅、孔先利。

本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

本标准规定了出口禽蛋中泰乐菌素残留量检验的抽样、制样和杯碟测定法。

本标准适用于出口鸡蛋、鸭蛋、冰全蛋中泰乐菌素残留量的检验。

2 抽样和制样

- 2.1 检验批
- 以不超过1020箱(一个车皮)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
- 按批次，每百箱取样三箱，每增百箱增取一箱，尾数不足百箱但超过30箱的增抽一箱。
- 2.3 抽样方法
- 按2.2规定的抽样件数随机油取，逐件开启。每件至少取2枚(冰全蛋不少于100 g)作为原始样品，抽取的原始样品总量不少于1kg。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
- 从原始样品中，随机分出一半(不少于500 g)，鲜蛋需去壳。将蛋黄和蛋白于混合器中充分混匀，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
- 试样经加水均质、离心后，取上清液，进行杯碟法测定。利用被测液液中的泰乐菌素残留与藤黄微球菌的作用产生抑菌圈，根据产生抑菌圈的大小用标准曲线法进行定量测定。
- 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 缓冲液(pH8.0±0.1)：称取1 3.3g无水磷酸二氢钾加入900 mL水溶解，再加入100 mL 6.2% 氢氧化钾溶液，混匀，于121℃高压灭菌15min。
- 3.2.2 生理盐水：称取8.5g氯化钠，溶于1000 mL水中，于121℃高压灭菌15min。
- 3.2.3 泰乐菌素标准品：820 μg/mg，由日本和光纯药工业株式会社提供，或等效品。
- 3.2.4 泰乐菌素标准贮备液：称取适量的泰乐菌素标准品(精确到0.1mg)，先用少量甲醇溶解，再用水定容至1 000 mL，使其浓度达1000 μg/mL，置4℃冰箱保存，可使用8天。
- 3.2.5 泰乐菌素标准工作液：吸取一定量泰乐菌素标准贮备液，分别用缓冲液稀释成浓度为0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μg/mL的标准工作液。需当天配制和使用。
- 3.2.6 试验菌种：藤黄微球菌(Micrococcus luteus)，菌种号CMCC 28001，中国药品生物制品检定所提供。
- 3.2.7 培养基1(见附录A中A1)。
- 3.2.8 培养基2(见附录A中A2)。
- 3.2.9 培养基3(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 均质器：不低于10 000 r/min。
- 3.3.5 离心机：不低于8000r/min。
- 3.3.6 恒温培养箱：(30±1)℃，搁板应保持水平。
- 3.3.7 高压灭菌器。
- 3.3.8 恒温水浴锅：恒温±1℃。
- 3.4 测定步骤
- 3.4.1 样液制备
- 将试样均质1min(5000r/min)后，再称取20.0 g(准确到0.1g)于离心管内，加入5mL水，充分搅匀，放置60 min后，离心20min(8000 r/min)，取上清液作为样液。
- 3.4.2 菌悬液的制备
- 用约3mL培养基2(3.2.8)将培养基1试管斜面(3.2.7)上的藤黄微球菌培养物洗下，并移种到克氏瓶中的100 mL培养基1的(3.2.7)表面上，用灭菌玻璃珠使其均匀地铺于整个表面，在26~32℃培养24h后，用约15mL灭菌生理盐水洗下琼脂表面的培养物，制成菌悬液，置4℃冰箱中可保存2周。
- 3.4.3 检定用平板的制备
- 在测定前，需进行预测试，以求得菌悬液是最佳用量。用0.1 μg/mL泰乐菌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0.1 μg/mL标准工作液在平板上产生直径大于等于10 mm清晰、完整的抑菌圈的菌悬液用量为最佳用量。
- 注入10 mL熔化的培养基3(3.2.9)于灭菌培养皿内，水平静置，使其凝固，再于已熔化并冷却至45~50℃的同一培养基内，加入最佳用量的菌悬液使之充分混合后，取约4mL注入上述已铺有培养基3(3.2.9)的平板上，保持水平，使其凝固。所用平板需当天制备。
- 3.4.4 标准曲线的绘制
- 用泰乐菌素标准工作液(3.2.5)制备标准曲线，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个检定用平板作为一组，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，对角两个杯中加入0.2 μg/mL参考浓度标准工作液，另两个对角杯中加入其他一种浓度的标准工作液。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0.2 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。
- 盖好陶瓦盖，置(30±1)℃培养(17±1)h。翻转平板，除去牛津杯，精确地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0.2 μg/mL参考浓度24个抑菌圈直径的平均值。
- 求出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，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(mm)为横坐标(算术级)，泰乐菌素浓度(μg/mL)为纵坐标(对数级)，通过L和H点连一直线，即为标准曲线。

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

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

式中：L—标准曲线上最低浓度(0.1 μg/mL)抑菌圈的直径；

H—标准曲线上最高浓度(0.8 μg/mL)抑菌圈的直径；

b—参考浓度0.2 μg/mL的24个抑菌圈直径的平均值，mm；

a、c、d—分别表示标准曲线中其他标准浓度(0.1、0.4、0.8 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个牛津杯里注满被检样液，在剩余的2个牛津杯里分别注满泰乐菌素标准工作液(浓度为0.1 μg/mL和0.2 μg/mL)，于(30±1)℃下培养(17±1)h后翻转平板，除去牛津杯。如有抑菌圈产生，准确测量抑菌圈直径(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3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泰乐菌素的浓度，通过式(3)，计算试样中泰乐菌素残留量：

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

式中：X—试样中泰乐菌素残留的含量，mg/kg；

c—从标准曲线上查出的样液中泰乐菌素浓度，μg/mL；

m—每毫升最终液所代表的试样量，g。

注：如测定结果呈阳性，即所显示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(可用液相色谱法，见附录B)，以证明抑菌物确系泰乐菌素。

4 测定低限和回收率

- 4.1 测定低限
- 本方法的测定低限为0.2mg/kg。
- 4.2 回收率
- 泰乐菌素添加浓度及其回收率的实验数据：
- 鸡蛋中，0.2mg/kg时，回收率为80.0%；
- 0.4mg/kg时，回收率为89.6%；
- 0.8mg/kg时，回收率为92.2%。
- 鸭蛋中，0.2mg/kg时，回收率为86.3%；
- 0.4mg/kg时，回收率为93.3%；
- 0.8mg/kg时，回收率为96.5%。
- 冰全蛋中，0.2mg/kg时，回收率为80.3%；
- 0.4mg/kg时，回收率为87.4%；
- 0.8mg/kg时，回收率为89.1%。

附 录 A
(标准的附录)
培 养 基

A1 培养基1

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

将上述成分于水中加热溶解，调节pH使其灭菌后pH8.5±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2

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

将上述成分于水中加热溶解，调节pH使其灭菌后pH7.0±0.1，分装于试管中，于21℃高压灭菌15Inin。

A3 培养基3

蛋白胨	6.0 g
牛肉浸膏	1.5 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
胰水解酪蛋白	4.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

将上述成分于水中加热溶解，调节pH使其灭菌后pH8.5±0.05，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 法

采用液相色谱法，用标准品作对照，以保留时间定性。

液相色谱条件：

色谱柱：C₁₈，300 mm×3.9mm(内径)；

柱温：25℃；

流动相：乙脂-甲醇-0.005mol/L磷酸二氢铵(180+50+20)；

流速：1.0mL/min；

检测波长：280nm；

进样量：20 μL；

保留时间：约8min