

**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—1 995《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。其中测定方法采用了日本厚生省1990年编写的《畜、水产食品中残留物质检验方法》中大环内酯类抗生素残留量分析方法。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。同时在标准中制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉品中林可霉素残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

本标准附录A为标准的附录。

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上海进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：李慧珠、王培梁。

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林可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林可霉素残留量的检验。

**2 抽样和制样**

**2.1 检验批**

以不超过2500件为一检验批。

同一检验批的产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。每件至少取一袋作为原始样品。如每件中无小包装或有小包装，但每袋小包装重量超过2kg者，可用灭菌刀具从包件中割取不少于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，加封并标明标记，及时送交实验室。

**2.4 试样制备**

从混合原始样品中取出部分代表性样品，将可食部分放入绞碎机内绞碎，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：在抽样和制样的操作过程中，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**

试样中林可霉素残留用缓冲溶液(pH8.0)提取。提取液经离心后取上清液与藤黄微球菌作用，根据产生抑菌圈的大小用标准曲线法定量。必要时，用纸层谱法进行确证。

**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 林可霉素标准品：已知纯度≥85.4%，由卫生部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)：称取33.46g无水磷酸氢二钾及1.046g无水磷酸二氢钾，溶于水并定容至1000 mL。

3.2.3试验菌种：藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)，由卫生部药品生物制品检定所提供，菌号 CMCC 28001。

3.2.4 林可霉素标准贮备液：称取一定量林可霉素标准品(精确至0.1mg)，用磷酸盐缓冲液溶解并稀释，配成浓度为100 μg/mL的林可霉素标准贮备液，保存于4℃冰箱中(不宜超过一个月)。

3.2.5 林可霉素标准工作液：取上述贮备液用磷酸盐缓冲液稀释，分别配制成浓度为0.15、0.30、0.60、1.20、2.40 μg/mL的标准工作液，作为绘制标准曲线用。需当天配制，当天使用。

3.2.6 培养基1(附录A中A1)。

3.2.7 培养基2(附录A中A2)。

3.2.8 培养基3(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，于121℃，高压灭菌15min。

3.2.10 展开剂：磷酸盐缓冲液(3.2.2)—甲醇(1+1)。

**3.3 仪器与设备**

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(10±0.1)mm。

3.3.3 克氏瓶：800mL。

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 绞碎机：电动。

3.3.6 均质器：10 000 r/min，带均质杯(300 mL)。

3.3.7 离心机：8000 r/min。

3.3.8 水浴锅：恒温±1℃。

3.3.9 恒温培养箱：(30±1)℃，搁板应保持水平。

3.3.10 高压灭菌器。

3.3.11 长方形培养皿：1.5cm×8cm×23cm。

3.3.12 色谱缸：20 cm×1.5cm×30 cm。

3.3.13 色谱纸：6cm×20 cm滤纸。

3.3.14 微量注射器：10 μL或50 μL。

**3.4 测定步骤**

**3.4.1 样液制备**

称取30 g试样(精确至0.1g)于均质杯内，加入5mL磷酸盐缓冲液，以8000r/min均质2min。移入离心管中，以8000r/min离心10min。按上述各步骤再重复两次，合并三次上清液。用1mol/L氢氧化钠溶液将其调至pH8.0，以磷酸盐缓冲液(3.2.2)定容至20 μL，再离心，取上清液作为样液。

**3.4.2 菌悬液的制备**

将菌种(3.2.3)接种于培养基1(3.2.6)中，混匀，置(30±1)℃培养(24±2)h。再转种到培养基2(3.2.7)斜面上，置(30±1)℃培养16～18h后，加入3mL培养基1(3.2.6)，洗下菌苔。吸取1mL此菌液，转种至克氏瓶中培养(3.2.7)的表面，置(30±1)℃培养(24±2)h。用15mL生理盐水(3.2.9)洗下琼脂表面上的菌苔，制成菌悬液，置4℃冰箱保存(可保存2周)。

**3.4.3 菌悬液最佳用量测定**

测试前应先用0.60 μg/mL林可霉素标准工作液对上述菌悬液的用量进行预测试。以不同量的菌悬液加入经熔化并冷却至45～50℃的培养基3(3.2.8)中，经充分混合并经(30±1)℃培养(18±1)h后，选择能使该标准工作液产生直径为18.50 mm(±10%)清晰、完整的抑菌圈的菌悬液，加入量为菌悬液的最佳用量。

**3.4.4 检定平板的制备**

将培养基3(3.2.8)熔化，冷却至40～45℃，加入最佳用量(从3.4.3中求得)菌悬液使其充分混合后，取7.5mL注入灭菌培养皿中，保持水平，待凝固制成检定平板。所用平板需当天制备。

**3.4.5 标准曲线的制备**

以0.60 μg/mL浓度的标准工作液作为参考浓度。标准曲线上的每个标准工作液浓度各取3个检定平板为一组。在每个平板的表面放置6个牛津杯，使牛津杯在半径为2.8cm的圆面上成80°角间距。其中3个牛津杯内加满参考浓度溶液，另3个牛津杯内加满其他一种浓度的标准工作液。参考浓度溶液与标准工作液要间隔放置。5种浓度的标准工作液共用15个检定平板。含量最低的标准工作液(0.15 μg/mL)的3个检定平板作为判断阴性结果的对照，其他12个检定平板用来绘制标准曲线。这样，0.60 μg/mL参考浓度溶液将得出45个抑菌圈直径的数值，而其他浓度的标准工作液将得出各9个抑菌圈的数值。

将陶瓦盖盖好，置(30±1)℃培养(18±1)h。翻转平板，除去牛津杯。精确地测量所产生的抑菌圈的直径(精确到0.1mm)。求出每组3个检定平板上0.60 μg/mL浓度的抑菌圈直径读数与其他浓度标准工作液的抑菌圈直径读数的平均值。再求出参考浓度(0.60 μg/mL)的所有45个抑菌圈直径数值的平均值。用45个参考浓度抑制圈直径的平均值与每组中9个参考浓度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，用式(1)、(2)算出L和H。在半对数坐标纸上，以抑菌圈直径(mm)为纵坐标(算术级)，以浓度μg/mL为横坐标(对数级)，标出L和H点。通过L和H点连一直线即为标准曲线。

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

$$H = (3e + 2d + c - a) / 5 \cdots \cdots (2)$$

式中：L—标准曲线上的最低浓度(0.15 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

H—标准曲线上的最高浓度(2.40 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

c—参考浓度0.60 μg/mL的45个抑菌圈直径的平均值，mm；

a、b、d、e—分别表示标准曲线中其他浓度标准工作液(0.15、0.30、1.20、2.40 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，在每个检定平板上放置6个已灭菌的牛津杯(按制备标准曲线方法放置)。3个间隔的牛津杯内加满林可霉素参考浓度标准溶液，另外3个牛津杯内加满被检样液。将陶瓦盖盖好，置(30±1)℃培养(18±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。

**3.5 结果计算和表述**

如样液抑菌圈的直径<10 mm，即报告为“阴性”。

抑菌圈的直径≥10 mm，经校正后，从标准曲线上查出相应的林可霉素的浓度。再用式(3)计算试样中林可霉素的含量。

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

式中：X—试样中林可霉素残留的含量，mg/kg；

c—从标准曲线上查出的样液中林可霉素浓度，μg/mL；

m—每毫升最终样液所代表的试样量，g/mL。

**3.6 确证试验**

如测定结果呈阳性，即所显抑菌圈的平均直径≥10 mm时，必要时，尚需进行确证试验，可用纸层色谱法以证明抑菌物确系林可霉素。

用磷酸盐缓冲液(3.2.2)喷涂于色谱用纸(6cm×20 cm)上，自然干燥后备用。

取上述样液(3.4.1)6.8mL(相当10 g试样)，用氢氧化钠(1mol/L)调节pH至8.0。置于40℃水浴中，通以氮气蒸发近干。加1mL磷酸盐缓冲液(3.2.2)，等待测液。

取1.0 μg/mL林可霉素标准工作液，以及待测液各10～20 μL，分别用微量注射器吸取并点在上述备用纸上。将色谱纸移放在盛有展开液(3.2.10)的色谱缸中，展开1～2h后取出。待溶剂挥发后，将色谱纸轻轻贴在加有60 mL含有最佳用量菌悬液的培养基3(3.2.3)的长方形培养皿中，移至4℃的冰箱中放置1h。取出培养皿，移去色谱纸，将培养皿置于(30±1)℃进行培养(20±1)h。根据培养皿上出现的抑菌圈的位置，测得抑菌圈的R<sub>F</sub>值。对照标准，以确定被检测试样中抗生素是否是林可霉素。

**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**

猪肉中林可霉素添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.10 mg/kg时，回收率为82.7%；

在0.20 mg/kg时，回收率为94.5%；

在0.40 mg/kg时，回收率为90.7%。

附 录 A		
(标准的附录)		
培 养 基		

A1 培养基1		
	明胶的胰酶消化物	5.0 g
	酵母浸膏	1.5 g
	牛肉浸膏	1.5 g
	氯化钠	3.5 g
	葡萄糖	1.0 g
	无水磷酸氢二钾	3.68 g
	无水磷酸二氢钾	1.32 g
	水	1000 mL
调节溶液pH到7.0±0.1，分装试管，于121℃高压灭菌15min。		
A2 培养基2		
	胰酪胨	4.0 g
	酵母浸膏	3.0 g
	牛肉浸膏	1.5 g
	葡萄糖	1.0 g
	琼 脂	15.0 g
	水	1000 mL
调节溶液pH到8.5±.1，分装试管，于121℃高压灭菌15min。		
A3 培养基3		
培养基的成分同A2，调节溶液pH到8.0±0.1，分装试管，于121℃高压灭菌15min。		