

前言

本标准是根据GB/T1.1—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/T0001—1995《出口商品中药药、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年编写的《畜、水产食品中的残留物质检验方法》中盐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盐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天津进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：袁和森、王素琴、李剑影。

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盐霉素残留量检验的抽样、制样和滤纸片测定方法。

本标准适用于出口鸡肉中盐霉素残留量的检验。

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，但每袋重量超过2kg者，可用灭菌刀具在抽出的包件中每件割取不少于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

从原始样品中取出部分有代表性的样品，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，装入清洁容器内，加封并标明标记。

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

用甲醇提取试样中盐霉素残留，提取液与四氯化碳进行液—液分配。将四氯化碳提取液减压浓缩至干，残渣用正己烷溶解。过硅胶柱净化，用三氯甲烷—甲醇溶液洗脱。洗脱液减压浓缩至干，残渣用甲醇溶解，溶液再过氧化铝柱净化。所得甲醇溶液经减压浓缩至干，再以甲醇溶解残渣，并定容为样液。样液用滤纸片法测定，利用样液中盐霉素残留与嗜热脂肪芽孢杆菌作用产生抑菌圈，根据抑菌圈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 无水甲醇。
- 3.2.2 甲醇水溶液：10%，90% (V/V)。
- 3.2.3 四氯化碳。
- 3.2.4 正己烷。
- 3.2.5 三氯甲烷。
- 3.2.6 三氯甲烷—甲醇 (95+5)。
- 3.2.7 无水硫酸钠：经650℃灼烧4h，置干燥器中冷却后备用。
- 3.2.8 硅胶：60目。经130℃活化2h，置干燥器中冷却后备用。
- 3.2.9 氧化铝：270～335目。经300℃活化3h，于干燥器中冷却备用。
- 3.2.10 硅胶柱：将3g硅胶装到层析柱 (高200 mm，内径10 mm)内，在其上部再装填2g无水硫酸钠。
- 3.2.11 氧化铝柱：将活性氧化铝5g装填入层析柱 (高20 mm，内径10 mm)中。
- 3.2.12 盐霉素标准品：纯度979 μg/mg，中国兽药监察所提供。密封避光、防潮，4℃冰箱保存。
- 3.2.13 盐霉素标准贮备液：称取适量的盐霉素标准品 (精确至0.1mg)，用无水甲醇配制成浓度为500 μg/mL的标准贮备液。于4℃冰箱中保存，可使用二周。
- 3.2.14 盐霉素标准工作液：吸取一定量盐霉素标准贮备液，用10% 甲醇溶液稀释成浓度为2、4、8、16、32 μg/mL的标准工作液，其中4 μg/mL为参考浓度的标准工作液，以上溶液须当日配制和使用。
- 3.2.15 试验菌种：嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus var. calidolactis)，菌号ATCC 10149，由American Type Culture Collection提供。
- 3.2.16 培养基I (附录A中A1)。
- 3.2.17 培养基II (附录A中A2)。
- 3.2.18 培养基III (附录A中A3)。
- 3.2.19 生理盐水：称取8.5g氯化钠，溶解于1L水中，于121℃高压灭菌15min。
- 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或塑料皿，具陶瓦盖。
- 3.3.2 滤纸片：直径10 mm，厚1.1mm，吸水量0.07～0.08mL的滤纸圆片，日本Toyo Roshi Kaisha, Ltd. 产品，或相当的产品。
- 3.3.3 微量注射器：10～100 μL。
- 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：不低于10 000 r/min。
- 3.3.6 离心机：不低于8000r/min。
- 3.3.7 恒温培养箱：(55±1)℃，隔板保持水平。
- 3.3.8 高压灭菌器。
- 3.3.9 绞碎机：电动。
- 3.3.10 旋转真空蒸发器。
- 3.4 测定步骤
- 3.4.1 样液制备

称取10g试样 (精确至0.1g)于均质杯内，加入20 mL甲醇，于10 000 r/min均质3min。移入离心管中离心30 min (8000 r/min)。吸取上清液置分液漏斗中，于残渣中再加入3mL甲醇，搅匀，离心。合并上清液，加入80 mL四氯化碳，振荡10 min，移四氯化碳层于500 mL茄形瓶中。同上重复操作两次，合并三次四氯化碳层。于40～45℃减压浓缩至干，加入20 mL正己烷溶解残渣。将正己烷溶液移入硅胶柱中，以0.6mL/min流速过柱。用100 mL三氯甲烷淋洗后弃去流出液。用30mL三氯甲烷—甲醇溶液 (3.2.6)进行洗脱。将洗脱液于40～45℃减压浓缩至干，加入20 mL甲醇溶液 (90%)以溶解残渣。溶液再过氧化铝柱，用20 mL甲醇溶液 (90%)淋洗，收集全部流出液，于40～45℃减压浓缩至干。加入1.6mL甲醇以溶解残渣，所得溶液作为最终样液。

3.4.2 菌悬液的制备

将嗜热脂肪芽孢杆菌接种于培养基I内 (3.2.16)，于 (55±1)℃培养 (17±1)h。于8000 r/min离心15min，弃去上层液。加入适量生理盐水，离心，反复洗涤，弃去洗液。最后加入30 mL生理盐水，制成菌悬液，于4℃冰箱保存，可使用6～8个月。

3.4.3 检定平板的制备

在制平板前，先用吸有0.08mL的2 μg/mL浓度的标准工作液的滤纸片对菌悬液的最佳用量进行预测试。以不同量的菌悬液加入经熔化并冷却至50～55℃的培养基III (3.2.18)，经充分混合并经 (55±1)℃培养 (17±1)h后，选择能使该浓度标准工作液产生直径≥12mm清晰、完整的抑菌圈的菌悬液用量为最佳用量。

于灭菌平皿中加入20 mL熔化并冷却至50～55℃的培养基III (3.2.18)，保持水平，待其凝固后，制成基层。再注入4mL已加入最佳用量菌悬液的培养基III (3.2.18)，保持水平，使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

以4.0 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张滤纸片，使滤纸片在半径为2.8cm的圆面上成80°角间距。其中3张滤纸片滴加参考浓度溶液，另3张滤纸片滴加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 (1.0 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4.0 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，于4℃放置1～2h后，在 (55±1)℃培养 (17±1)h。翻转平板，除去滤纸片。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4.0 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 (4.0 μg/mL)的所有45个抑菌圈直径读数的平均值。用45个参考浓度抑菌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，以抑菌圈平均直径 (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 (2.0 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

H—标准曲线上的最高浓度 (32.0 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

c—参考浓度4.0 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 (2.0、8.0、16.0、32.0 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

每份样液用三个检定平板，在同一检定平板上放6张滤纸片，使滤纸片在半径为2.8cm的圆面上成80°角间距，其中3张逐个滴加0.08mL样液，所余3张分别滴加0.08mL参考浓度 (4 μg/mL)的标准工作液，样液于标准液滤纸片间隔放置，轻轻压实，盖上陶瓦盖。于4℃放置1～2h后，在 (55±1)℃下培养 (17±1)h。

去盖，除去滤纸片，如有抑菌圈产生，精确测量其直径。经校正后，求出其平均值。

3.5 结果的计算和表述

如样液呈现抑菌圈直径<12mm，即报告为“阴性”。

如样液呈现出抑菌圈直径平均值≥12mm时，经校正后，从标准曲线上查出相应的盐霉素的浓度。

再用式 (3)计算试样中盐霉素残留含量。

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

式中：X—试样中盐霉素残留的含量，mg/kg；

c—从标准曲线上查出的最终样液中盐霉素浓度，μg/mL；

m—最终样液所代表的试样量浓度，g/mL。

注：如测定结果呈阳性，即所显抑菌圈的平均直径≥12mm，必要时，尚需进行确证试验 (可用生物自显影法，参见附录B)，以证明抑菌物确系盐霉素。

4 测定下限和回收率

4.1 测定下限

本方法的测定下限为0.32mg/kg。

4.2 回收率

鸡肉中盐霉素添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.32mg/kg时，回收率为80.8%；

在1.28mg/kg时，回收率为83.1%；

在5.12mg/kg时，回收率为86.5%。

附 录 A		
(标准的附录)		
培 养 基		
A1 培养基I		
蛋白胨	5.0 g	
牛肉浸膏	1.0 g	
氯化钠	5.0 g	
酵母浸膏	2.0 g	
琼脂	15.0 g	
水	1000 mL	

将上述各成分于水中加热溶解，调节pH，使其灭菌后pH为7.4±0.1，分装于试管中，于121℃灭菌15min。灭菌后，制成斜面备用。

A2 培养基II		
酵母浸膏	10.0 g	
胰蛋白胨	20.0 g	
葡萄糖	0.5 g	
水	1000 mL	

将上述各成分于水中加热溶解，调节pH，使其灭菌后pH为8.0±0.1，分装于试管中，于121℃灭菌15min。

A3 培养基III		
酵母浸膏	2.5 g	
胰蛋白胨	5.0 g	
葡萄糖	1.0 g	
琼脂	15.0 g	
水	1000 mL	

将上述各成分于水中加热溶解，调节pH，使其灭菌后pH为7.0±0.1，分装于锥形瓶中，于121℃灭菌15min。

附 录 B	
(提示的附录)	
确 证 试 验	
确证试验采用生物自显影法，用标准品作对照，求见值，以确证样液中存在的抑菌物是否确实是盐霉素。	
生物自显影法条件：	
薄层板：硅胶Q/YT 257—85SG，5cm×20 cm。使用前于110℃活化2h。	
点样量：20 μL，点状。	
展开剂：甲醇。	
展开：在饱和槽内进行。	
检测：将每个样液及标准溶液分别点在四块薄层板上。先于每块薄层板下端2cm处划一条基线，然后在这条基线上分别点20 μL样液和2.0 μg/mL盐霉素标准溶液，试液和标准溶液点相距2.5cm。在展开缸中用甲醇进行展开，直至溶剂前沿线距板顶端1.5cm处为止，取出薄层板，风干后备培养用。	
将薄层板水平置于高压灭菌的长方形培养皿中，在无菌条件下将已熔化并冷却至50～55℃的生物自显影用培养基均匀地喷在其表面上，然后用10 mL上述接种芽孢菌悬液的培养基铺满整个薄层板，保持水平，待其凝固，于 (55±1)℃培养 (17±1)h。	
经过培养后，在薄层板上与盐霉素标准液产生抑菌圈的R _f 值相同位置上，显现抑菌圈者即证明抑菌物确是盐霉素。	