

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年编写的《畜、水产食品中的残留物质检验方法》中新生霉素残留量检验方法，技术内容稍作改变，经验证后按规定格式要求作了编辑性修改。标准中同时制定了抽样和制样方法。

本标准的测定低限是根据国际上对肉品中新生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：袁而森、陈子红。

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新生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新生霉素残留量的检验。

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，则可用灭菌刀具在抽出的包件中每件割取不少于100 g样品，混合后置于清洁容器内，作为混合原始样品。原始样品的总量不少于2kg，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
- 用丙酮水溶液提取试样中残留的新生霉素，提取液经离心、过滤后，取滤液进行滤纸片法测定。利用滤液中的残留新生霉素与表皮葡萄球菌作用产生抑菌圈，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 丙酮水溶液：50% (V/V)。
- 3.2.2 磷酸盐缓冲液 (pH8.0±0.1)：称取13.3g磷酸二氢钾 (精确至0.1g)，溶解于900 mL水中，另取6.2g氢氧化钾溶解于100 mL水中，二者混合均匀。于121℃高压灭菌15min。
- 3.2.3 新生霉素标准品：纯度90%，美国SIGMA化学公司产品，或相当者。
- 3.2.4 试验菌种：表皮葡萄球菌 (Staphylococcus epidermidis)，菌号CMCC26069，由中国药品生物制品检定所提供。
- 3.2.5 培养基I (附录A中A1)。
- 3.2.6 培养基II (附录A中A2)。
- 3.2.7 培养基III (附录A中A3)。
- 3.2.8 新生霉素标准贮备液：称取一定量的新生霉素标准品 (精确至0.1mg)，用磷酸盐缓冲液 (3.2.2)配制成浓度为500 μg/mL的新生霉素标准贮备液，于5℃冰箱中保存，可使用15天。
- 3.2.9 新生霉素标准工作液：吸取一定量的新生霉素标准贮备液，用磷酸盐缓冲液 (3.2.2)稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/mL浓度的标准工作液。以上溶液均须配制后当日使用。
- 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 Raisha, 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8000 r/min。
- 3.3.7 恒温培养箱：(36±1)℃，隔板保持水平。
- 3.3.8 绞碎机：电动。
- 3.4 测定步骤
- 3.4.1 样液制备
- 称取10 g试样 (精确至0.1g)，置于均质杯内，加入40.0 mL丙酮水溶液 (3.2.1)，于10000r/min均质5min。移入带盖的离心管中，于8000 r/min离心30 min。然后取20.0 mL的上清液过滤，滤液作为样液。
- 3.4.2 菌悬液的制备
- 将表皮葡萄球菌接种于盛有培养基II (3.2.6)的试管内，于(36±1)℃培养17h，经转种3次培养的菌悬液，方可使用。
- 3.4.3 检定平板的制备
- 在制平板前，先用吸有0.08mL的0.25 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和冷却至45～50℃的培养基III (3.2.7)，经充分混合并经 (36±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。
- 将培养基III (3.2.7)熔化和冷却至45～50℃，加入最佳用量的菌悬液，使之充分混匀后，取8mL注入已灭菌的培养皿内，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
- 以0.5 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60°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个浓度标准工作液共用15个检定平板。含量最低的标准工作液 (0.25 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0.50 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36℃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0.5 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 (0.5 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 (0.25 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

H—标准曲线上的最高浓度 (4.0 μg/mL)抑菌圈直径，mm；

c—参考浓度0.5 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 (0.25、0.1、2.0、4.0 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。取6张滤纸片，用微量注射器分别吸取0.08mL样液滴加于其中3张滤纸片上，其余3张则分别滴加0.08mL浓度为0.5 μg/mL的标准工作液，间隔放于同一检定平板上，使滤纸片在半径为2.8cm的圆面上成60°角间距，轻轻压实，盖上陶瓦盖。于4℃放置 (1±0.5)h后，在 (36±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”。

抑菌圈的直径≥12mm，经校正后，从标准曲线上查出相应的新生霉素的浓度。再用式 (3)计算试样中新生霉素残留的含量。

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

式中：X—试样中新生霉素残留的含量，mg/kg；

c—从标准曲线上查出的最终样液中新生霉素浓度，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 (可用微生物显像法，参见附录B)，以证明抑菌物确系新生霉素。

4 测定低限和回收率

- 4.1 测定低限
- 本方法的测定低限为1.0 mg/kg。
- 4.2 回收率
- 鸡肉中新生霉素的添加浓度及其回收率的实验数据：
- 1.0 mg/kg时，回收率为76.9%；
- 2.0 mg/kg时，回收率为86.3%；
- 4.0 mg/kg时，回收率为88.5%。

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	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6.5±0.1，分装于试管中，于121℃灭菌15min。灭菌后，制备成斜面备用。

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，分装于试管中，于121℃灭菌15min。

A3 培养基III

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
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6.5±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

- B1 确证试验采用生物自显影法，用标准品作对照，求R_f值，以确证样液中存在的抑菌物是否确实是新生霉素。
- B2 生物自显影法条件：
- 微量注射器：50 μL。
- 薄层板：硅胶G/YT 257-85SG，5cm×20cm。使用前于110℃活化2h。
- 点样量：20 μL，点状。
- 展开剂：磷酸盐缓冲液 (3.2.2)-无水乙醇 (1+1)。
- 展开缸：240 mm×57mm×32mm。
- 长方形培养皿：20 cm×10 cm×5cm。
- 展开：在饱和的展开缸内进行。
- B3 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0.25 μg/mL新生霉素标准溶液，试液和标准溶液点相距2.5cm。在展开缸中用磷酸盐缓冲液-无水乙醇进行展开，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，在无氧条件下将已熔化和冷却至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上述接种表皮葡萄球菌悬液的培养基铺满整个薄层板，保持水平，待其凝固，于 (36±1)℃培养18h。
- 经过培养后，在薄层板上与新生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新生霉素。