



中华人民共和国国家标准

GB/T 20196—2006

饲料中盐霉素的测定

Determination of salinomycin in feeds

2006-02-24 发布

2006-07-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准在查阅国内外文献基础上,提出饲料中盐霉素测定的两种方法。

第一法为微生物检验法(仲裁法),微生物检验方法主要参考了我国原进出口商品检验局 SN 0673—1997《出口肉及肉制品中盐霉素残留量检验方法 滤纸片法》和日本厚生省 1990 年编写的《畜、水产食品中的残留物质检验方法》中盐霉素残留量检测方法制定的。其方法原理、微生物检定操作步骤基本相同,方法的范围、称样量、试样提取条件进行了改进,改进技术内容如下:

- 将提取液由甲醇,四氯化碳分离提取改为用甲醇和水直接提取;
- 由先过硅胶柱再过氧化铝层析柱净化改为直接用氧化铝层析柱净化。

第二法为高效液相色谱柱前衍生化法,参考《Journal of Chromatography A》1999 报导《高效液相色谱柱前衍生化法测定动物饲料中拉沙里霉素、莫能霉素、盐霉素、甲基盐霉素》制定。其方法原理、基本操作步骤相同,方法的范围、试样称样量根据试验进行了改进,改进技术内容如下:

- 本标准范围适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、盐霉素预混剂,较文献扩大;
- 本标准称样量、盐霉素提取液稀释度见附录 A。

以上两种方法均增加了“重复性”。

本标准的附录 B、附录 C 为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:国家饲料质量监督检验中心(武汉)。

本标准起草人:刘小敏、张勇、高利红、何一帆。

饲料中盐霉素的测定

1 范围

本标准规定了饲料中盐霉素的微生物检验方法和高效液相色谱柱前衍生化检验方法。

本标准两种方法均适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中盐霉素的测定。最低检出限为 1.25 mg/kg。其微生物检验方法为仲裁法。本标准高效液相色谱柱前衍生化法也适用于盐霉素预混剂中盐霉素的测定。

注 1: 1 000 盐霉素单位(U)相当于 1 mg 的盐霉素($C_{42}H_{70}O_{11}$)。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验 总则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 方法 1:微生物检验方法(仲裁法)

3.1 原理

用甲醇和水提取试样中盐霉素,提取液过氧化铝层析柱净化,除去饲料中的干扰性物质。洗脱液经稀释(或浓缩),利用试液中盐霉素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测定盐霉素含量。

3.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

3.2.1 甲醇溶液

9+1(V+V)。

3.2.2 氧化铝

270 目~335 目;经 300℃活化 3 h,于干燥器冷却备用。

3.2.3 氧化铝层析柱

将活化氧化铝装填入层析柱中(高 20 mm,内径 10 mm),同时轻轻拍柱至氧化铝表面不再下降。氧化铝的高度为 8 cm~9 cm。

3.2.4 试验菌株

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)。

3.2.5 盐霉素标准溶液

3.2.5.1 盐霉素标准储备溶液

精确称取盐霉素钠标准品(含量 94.1%)0.106 3 g,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,其浓度为 1 000 μ g/mL,置于 0℃冰箱中,有效期两周。

3.2.5.2 盐霉素标准中间液

准确移取 10.00 mL 标准储备液(3.2.5.1)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,其浓度分别为 100.0 μ g/mL。当日配制和使用。

3.2.5.3 盐霉素标准工作溶液

分别准确移取一定量盐霉素中间液(3.2.5.2),用甲醇溶液(3.2.1)稀释成浓度为5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 、15.00 $\mu\text{g/mL}$ 、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液,其中5.00 $\mu\text{g/mL}$ 为参考浓度的标准工作液。以上溶液须当日配制和使用。

3.2.6 培养基

按附录B中规定制备。

3.2.7 菌悬浮液

嗜热脂肪芽孢杆菌接种于培养基I内,于 $(55\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 $(17\pm 1)\text{h}$ 。于8 000 r/min离心15 min,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生理盐水制成均悬浮液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,该溶液可使用6周~8周。

3.2.8 检定平板的制备

在制平板前,先放上牛津杯注入0.10 mL的5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的标准工作液(3.2.5.3)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溶化并冷却至50 $^{\circ}\text{C}$ ~55 $^{\circ}\text{C}$ 的培养基II,充分混合,于 $(55\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 $(17\pm 1)\text{h}$ 后,选择能使该浓度标准工作液产生直径 $\geq 12\text{ mm}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ ~55 $^{\circ}\text{C}$ 的培养基II,保持水平,待其凝固后,制成基层。再注入已加入最佳用量菌悬液的培养基II,保持水平,使其凝固制成检定平板,所用平板需当天制备。

3.3 仪器与设备¹⁾

3.3.1 高压灭菌锅或灭菌箱。

3.3.2 恒温培养箱:55 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,隔板保持水平。

3.3.3 旋转真空蒸发器。

3.3.4 振荡器:往复式。

3.3.5 离心机:不低于7 000g(9 000 r/min)。

3.3.6 游标卡尺:测量范围0 mm~200 mm,精度0.02 mm;或抑菌圈测量仪。

3.3.7 培养皿:内径90 mm,底部平整光滑的玻璃皿,具陶瓦盖。

3.3.8 牛津杯:内径6.0 mm,高10.0 mm,外径7.8 mm的不锈钢管。

3.3.9 可调微量移液器:200 μL ~1 000 μL 。

注2:可调微量移液器需经过校准。

3.3.10 实验室常用玻璃器皿。

3.4 试样的制备

按GB/T 14699.1饲料采样方法采样,选取饲料样品至少500 g,四分法缩减至少100 g,磨碎,通过0.28 μm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 试液制备

3.5.1.1 微生物实验室的操作注意事项按GB 4789.1执行。

3.5.1.2 准确称取一定量试样,精确至0.000 1 g,于250 mL具塞三角瓶中,准确加入20.0 mL样品提取液(3.2.1),在往复振荡器上振荡1 h,静置片刻,全部转移到准备好的氧化铝柱(3.2.3)中,用样品提取液(3.2.1)不间断地洗脱。用100 mL容量瓶接收至刻度。

3.5.1.3 根据提取液(3.5.1.2)中盐霉素预计浓度(依据标示量、称样量和提取液量确定分取量,参见附录A)吸取一定量提取液(3.5.1.2)置于旋转蒸发器中,减压至干。加入适量样品提取液(3.2.1)稀

1) 可以用一次性使用的仪器代替可重复使用的仪器。

释,使试液中盐霉素含量为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}\sim 20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

3.5.2 标准曲线的制备

以 $5.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度的标准工作液作为参考浓度。标准曲线上的每个标准浓度各取 3 个检定平板为一组。在每个平板上放置 6 个牛津杯,使牛津杯在半径为 28 mm 的圆面上成 60° 角间距。其中 3 个牛津杯滴加 0.1 mL 的参考浓度,另 3 个滴加 0.1 mL 其他一种浓度的标准工作液。参考浓度溶液与标准浓度溶液要间隔放置。4 种浓度的标准工作液共用 12 个检定平板。

将陶瓦盖盖好,于 4°C 放置 $1\text{ h}\sim 2\text{ h}$ 后,在 $(55\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 $(17\pm 1)\text{ h}$ 。除去牛津杯。精确地测量所产生的抑菌斑(精确到 0.1 mm)。求出每组 3 个检定平板上 $5.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度的抑菌斑直径读数(B)与其他浓度标准液的抑菌斑直径读数的平均值(A)。再求出参考浓度($5.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)的所有 36 个抑菌斑直径读数的平均值(B')。用 36 个参考浓度抑菌斑直径的平均值(B')与每组中 9 个参考浓度抑菌斑直径平均值(B)之差来校正其他各浓度标准工作液的抑菌斑读数的平均值(A')。

以溶液浓度为横坐标,该溶液被校正后的抑菌斑的直径(A')为纵坐标,绘制标准曲线图或计算回归方程。

校正按式(1)计算:

$$A' = B' - B + A \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A' ——被校正后的抑菌斑直径读数,单位为毫米(mm);

B' ——标准对照溶液抑菌斑直径读数总平均值,单位为毫米(mm);

B ——被校正溶液组内的标准对照溶液抑菌斑平均读数,单位为毫米(mm);

A ——被校正溶液的抑菌斑直径的平均读数,单位为毫米(mm)。

3.5.3 测定

每份样液用三个检定平板,在每个平板上放置 6 个牛津杯,使牛津杯在半径为 28 mm 的圆面上成 60° 角间距。其中 3 个牛津杯滴加 0.1 mL 样液,另 3 个滴加 0.1 mL 参考浓度($5.00\text{ }\mu\text{g/mL}$)的标准工作液,样液与参考浓度标准工作液要间隔放置。将陶瓦盖盖好,于 4°C 放置 $1\text{ h}\sim 2\text{ h}$ 后,在 $(55\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 $(17\pm 1)\text{ h}$ 。除去牛津杯。精确地测量所产生的抑菌斑的直径(精确到 0.1 mm)。校正后,求其平均值。

3.6 结果计算

3.6.1 如样液呈现抑菌圈直径小于 12 mm ,即报告为“阴性”。

如样液呈现抑菌圈直径平均值大于等于 12 mm ,经校正后,从标准曲线上查出(或计算出)相应盐霉素的浓度,再按式(2)计算试样中盐霉素含量。

如测定结果为阳性,即所显抑菌圈直径平均值大于等于 12 mm ,必要时,尚需进行确证试验(可用生物自显影法,参见附录 C),以证明抑菌物确系盐霉素。

3.6.2 饲料中盐霉素含量按式(2)计算:

$$\omega = \frac{c \times n}{m} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

ω ——试样中盐霉素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——从标准曲线上查出的试样液中盐霉素浓度,单位为毫克每千克(mg/kg);

n ——稀释倍数;

m ——称取试样的质量,单位为克(g)。

3.6.3 平行测定结果用算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

3.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的测定值的绝对差值:

——盐霉素的含量 $\leq 4.00 \times 10^3$ mg/kg 时,不超过算术平均值的 15%;

——盐霉素的含量 $> 4.00 \times 10^3$ mg/kg 时,不超过算术平均值的 10%。

4 方法 2:高效液相色谱仪柱前衍生化检验方法

4.1 原理

用甲醇提取试样中盐霉素,以 2,4-二硝基苯肼(DNP)为衍生剂,应用高效液相色谱柱前衍生化法、采用紫外检测器对饲料中的盐霉素进行测定。

4.2 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水

GB/T 6682,一级。

4.2.2 三氯乙酸溶液

$c=500$ g/L。

4.2.3 甲醇

色谱纯。

4.2.4 衍生化试剂

$c=0.5$ mg/mL:称取 50 mg 2,4-二硝基苯肼置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇充分溶解后稀释至刻度。

4.2.5 提取液

用甲醇与水(90+10,V+V)配制而成。

4.2.6 盐霉素标准溶液

4.2.6.1 盐霉素标准储备溶液

精确称取盐霉素钠标准品(含量 94.1%)0.106 3 g,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,其浓度为 1 000 μ g/mL,置于 0℃ 冰箱中,有效期二周。

4.2.6.2 盐霉素标准工作溶液

分别准确移取 1.00 mL、10.00 mL 标准贮备液(4.2.6.1)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,其浓度分别为 10.0 μ g/mL、100.0 μ g/mL,现配现用。

4.2.7 流动相

将 1.5 mL 冰乙酸(优级纯)加入 98.5 mL 水中,并按 10:90 的比例和甲醇混合。用前超声或做其他脱气处理。

4.3 仪器与设备

4.3.1 实验室常用玻璃器皿。

4.3.2 振荡器,往复式。

4.3.3 旋转真空蒸发器。

4.3.4 离心机:不低于 7 000g(9 000 r/min)。

4.3.5 微型混合器。

4.3.6 可调微量移液器,10 μ L~50 μ L,100 μ L~200 μ L,200 μ L~1 000 μ L。

注 3:可调微量移液器需经过校准。

4.3.7 高效液相色谱仪:配有四联泵、柱温箱、紫外(UV)或二极管阵列检测器,ODS C_{18} 色谱柱(如粒度 4 μ m,长 150 mm,内径 3.9 mm)。

4.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 饲料采样方法采样,选取饲料样品至少 500 g,四分法缩减至少 100 g,磨碎,通过 0.28 μ m 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

4.5 分析步骤

4.5.1 试液提取

4.5.1.1 称取一定量试样(参见附录A),精确至0.000 1 g,于250 mL具塞三角瓶中,准确加入100.0 mL样品提取液(4.2.5),在往复振荡器上振荡1 h,静置片刻,取上清液10 mL于离心管中,以1 000 g(3 500 r/min)离心10 min。

4.5.1.2 如需将试液浓缩,根据提取液(4.5.1.1)中盐霉素预计浓度(依据标示量、称样量和提取液量确定分取量,参见附录A)吸取一定量提取液(4.5.1.1)置于旋转蒸发器中,减压至干,再加入700 μ L样品提取液(4.2.5),使试液中盐霉素含量为20 μ g/mL~100 μ g/mL。

4.5.2 试液衍生化

用可调微量移液器(4.3.6)准确吸取700 μ L上清液于具螺口的离心管中,准确加入100 μ L三氯乙酸水溶液(4.2.2),盖紧后,在微型混合器上混旋20 s,室温放置10 min,再准确加入200 μ L二硝基苯肼衍生化试液(4.2.4)盖紧,同样混旋20 s后,置于55℃水浴锅中反应30 min后,取出,待冷却后进行检测。

如发现衍生化液混浊,需7 000 g(9 000 r/min)离心后,取上清液上机测定。

4.5.3 标液衍生化

用可调微量移液器(4.3.6)准确吸取10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、300 μ L、500 μ L盐霉素标准工作液(4.2.6.2)于具螺口的离心管中,用甲醇稀释至700 μ L,另设1个空白管加700 μ L甲醇作对照,按4.5.2衍生化方法衍生。

4.5.4 测定

4.5.4.1 高效液相色谱仪(HPLC)测定参数的设定

色谱柱:ODS C₁₈柱,粒度4 μ m,长150 mm,内径3.9 mm或性能类似的分析柱。

柱温:30℃。

流动相:同4.2.7,流速1.0 mL/min。

检测器:紫外(UV)或二极管阵列检测器。

检测波长:392 nm。

进样量:10 μ L~20 μ L。

4.5.4.2 定性、定量测定

取适量的4.5.2获得的衍生化试液和相应浓度的4.5.3衍生化标准工作液进行测定。以保留时间和衍生液紫外光区特征光谱定性。以色谱峰面积积分值做单点或多点校准定量。

4.6 结果计算

4.6.1 饲料中盐霉素含量按式(3)计算:

$$\omega = \frac{P_i \times V \times c \times V_{st} \times n}{P_{st} \times m \times V_i \times V_1} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

ω ——试样中盐霉素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——标准工作液衍生化液中(4.5.3)中盐霉素浓度,单位为毫克每千克(mg/kg);

P_i ——标准工作液衍生液峰面积值;

V_{st} ——标准工作液衍生液进样体积,单位为微升(μ L);

P_{st} ——试样衍生液峰面积值;

V_i ——试样衍生液进样体积,单位为微升(μ L);

V ——试样体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——参与衍生的试液体积(4.5.2),单位为毫升(mL);

n ——稀释或浓缩倍数;

m ——称取试样的质量,单位为克(g)。

4.6.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的测定值的绝对差值:

- 盐霉素的含量 $\leq 4.00 \times 10^3$ mg/kg 时,不超过算术平均值的 15%;
- 盐霉素的含量 $> 4.00 \times 10^3$ mg/kg 时,不超过算术平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)
试样的称样量

给出饲料样品标示量、称样量及盐霉素提取液稀释度示例。见表 A.1、表 A.2。

表 A.1 饲料样品标示量、称样量及盐霉素提取液稀释度(微生物检验方法)

饲料类别	盐霉素标示量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	称样量 m / g	提取液量 V / mL	提取液中 盐霉素浓度 c / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	提取液稀释 或浓缩倍数 n	检测预计 浓度 / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
预混合饲料	7 000 000	2	100	140	10	14.0
	3 000 000			60	5	12.0
浓缩饲料	350 000	5	100	17.5	1	17.5
	150 000			7.5		7.5
配合饲料	70 000	10	100	7	0.5	14
	30 000			3		6

表 A.2 饲料样品标示量、称样量及盐霉素提取液稀释度(HPLC)

饲料类别	盐霉素标示量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	称样量 m / g	提取液量 V / mL	提取液中 盐霉素浓度 c / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	提取液稀释 或浓缩倍数 n	注入 HPLC 预 计浓度 / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
盐霉素预混剂	100 000 000	1.0	100.0	1 000.0	10.0	70.0
	120 000 000	0.8		960.0	10.0	42.0
预混合饲料	7 000 000	2.0	100.0	140.0	1.0	98.0
	3 000 000	4.0		120.0	1.0	84.0
浓缩饲料	350 000	20.0	100.0	70.0	1.0	49.0
	150 000	20.0		30.0	1.0	21.0
配合饲料	70 000	20.0	100.0	14.0	0.5	19.6
	30 000	20.0		6.0	0.2	21.0

附 录 B
(规范性附录)
培养基和试剂制备

B.1 培养基 I**B.1.1 成分**

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	1 000 mL

B.1.2 制法

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

B.2 培养基 II**B.2.1 成分**

胰蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
酵母浸膏	2.5 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

B.2.2 制法

将上述各成分于水中加热溶解,调节 pH 值 7.0 ± 0.1 ,分装于锥形瓶中,于 121°C 灭菌 15 min。

B.3 生理盐水

称取 8.5 g 氯化钠,溶于 1 L 水中,于 121°C 高压灭菌 15 min。

附 录 C
(规范性附录)
微生物检验方法确证试验

C.1 原理

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盐霉素。

C.2 生物自显影法条件

C.2.1 薄层板

硅胶 Q/YT 257—85SG, 5 cm×20 cm。使用前于 110℃ 活化 2 h。

C.2.2 点样量

20 μ L, 点状。

C.2.3 展开

在饱和槽内进行。

C.2.4 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 2 cm 处划一条基线;然后在这条基线上分别点 20 μ L 样液和 2.0 μ g/mL 盐霉素标准溶液,试液和标准溶液点相距 2.5 cm。在展开缸中用甲醇进行展开,直至溶剂前沿距板顶端 1.5 cm 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 II 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 II 铺满整个薄层板,保持水平,待其凝固,于 $(55\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 $(17\pm 1)\text{h}$ 。

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。
