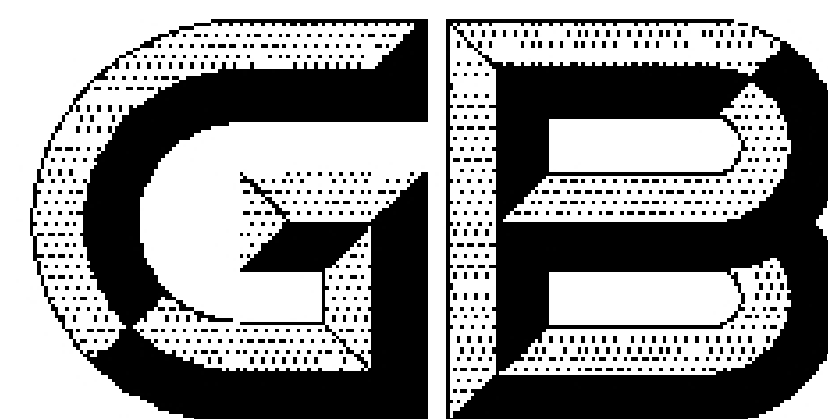




中华人民共和国国家标准

GB/T 20444—2006

猪组织中四环素族抗生素残留量 检测方法 微生物学检测方法

Method for the determination of tetracycline antibiotics in
swine tissue—Microbiological method

2006-08-28 发布

2006-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：农业部畜禽产品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：李卫东、吴银良、李艳华。



猪组织中四环素族抗生素残留量 检测方法 微生物学检测方法

1 范围

本标准规定了猪组织中四环素族(四环素、金霉素、土霉素、强力霉素)残留量的检测方法。

本标准适用于猪组织中四环素族(四环素、金霉素、土霉素、强力霉素)残留量的检测。

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 6682 分析实验室用水规格及试验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,搅碎并使均匀。

3.2 样品的保存

样品在 -20°C 冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法原理

四环素族抗生素具有很强的抑菌作用,在含有特定微生物的平板培养基上放入牛津杯,在牛津杯内加满四环素族(包括强力霉素、四环素、金霉素、土霉素)抗生素溶液,于培养箱中培养一定时间后,测量抑菌圈直径的大小,根据抑菌圈的大小从标准曲线上求得样品中四环素族抗生素的含量。

4.2 仪器和设备

4.2.1 恒温培养箱: $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,调整水平位置(隔层要求水平)。

4.2.2 高压灭菌锅。

4.2.3 恒温水浴锅。

4.2.4 培养皿(塑料):内径 $90\text{ mm}\pm 0.5\text{ mm}$,高 26 mm ,皿底平整光滑,厚薄均匀无凹凸现象。

4.2.5 陶瓦盖:内径 110 mm ,外径 116 mm ,高 26 mm 。

4.2.6 离心机: $3\,000\text{ r/min}\sim 5\,000\text{ r/min}$ 。

4.2.7 均质器或组织捣碎机。

4.2.8 牛津杯(即不锈钢小管):内径 $6\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$,外径 $7.8\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$,高度 $10\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$ 。

4.2.9 游标卡尺:测量抑菌圈直径用,精密度 0.05 mm 。

4.2.10 水平仪。

4.2.11 克氏瓶。

4.3 试剂和材料

4.3.1 培养基

4.3.1.1 菌种培养基

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼脂	14 g~16 g
蒸馏水	1 000 mL

将各种成分加热溶解于蒸馏水中,调 pH 至 6.5,高压灭菌(121℃,15 min)。

4.3.1.2 检定培养基

胰蛋白胨	6.0 g
牛肉膏	1.5 g
酵母膏	3.0 g
琼脂	14 g~16 g
蒸馏水	1 000 mL

将各种成分加热溶解于蒸馏水中,调 pH 至 5.8,高压灭菌(121℃,15 min)。

4.3.2 试剂

4.3.2.1 0.1 mol/L KH_2PO_4 磷酸盐缓冲液(pH4.5):精确称取 13.6 g 磷酸二氢钾(分析纯)溶解于蒸馏水中,转移到 1 000 mL 容量瓶中并定容至刻度。115℃高压灭菌 30 min,冷却后置 4℃冰箱中保存。

4.3.2.2 生理盐水:称取氯化钠 8.5 g 溶解并用蒸馏水稀释至 1 000 mL,115℃高压灭菌 30 min。

4.3.2.3 0.1 mol/L 盐酸溶液。

4.3.3 菌种

蜡样芽孢杆菌。

4.3.4 标准品

四环素标准品、强力霉素标准品、金霉素标准品、土霉素标准品,密封避光,防潮保存在 4℃冰箱中。

4.3.5 标准品贮备液和工作液

4.3.5.1 贮备液

精确称取 50 mg 四环素、强力霉素、金霉素、土霉素标准品(1 000 国际单位/mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释定容至浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$,配制后置于冰箱中保存可使用一周。贮备液保存在 4℃冰箱中,可使用 7 天。

注:配制标准溶液用的各种器具,须干热灭菌或蒸汽消毒灭菌,无任何抗生素。

4.3.5.2 工作液

取上述贮备液(包括四环素、强力霉素、土霉素)用磷酸盐缓冲液稀释配制成 0.050 $\mu\text{g/mL}$, 0.100 $\mu\text{g/mL}$, 0.200 $\mu\text{g/mL}$, 0.400 $\mu\text{g/mL}$, 0.800 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液,为制备标准曲线的标准浓度溶液 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液为参考浓度溶液。工作液要在使用当天配制。

金霉素稀释液:取上述原液用磷酸盐缓冲液稀释配制成 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.050 $\mu\text{g/mL}$, 0.100 $\mu\text{g/mL}$, 0.200 $\mu\text{g/mL}$, 0.400 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液,为制备标准曲线的标准浓度溶液 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 的稀释液为参考浓度溶液。

实验室用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格,本方法中所用试剂,除特殊说明外,均为分析纯。

4.4 测定步骤

4.4.1 菌悬液的制备

将蜡样芽孢杆菌接种于肉汤培养基中于 37℃±1℃培养 6 h~8 h 后,接种于菌种培养基上 30℃±1℃培养 7 d,用 25 mL 灭菌生理盐水冲洗菌苔,恒温水浴 65℃±1℃加热 30 min,以 2 000 r/min 的速度离心 20 min,除去上清液,保留下层,重复三次洗涤芽孢悬液,然后用 50 mL 灭菌生理盐水制成芽孢悬液,放置 4℃冰箱保存备用,可放置 2 个月。

4.4.2 芽孢悬液用量的测定

先试几个平板,即把不同浓度的芽孢悬液加入检定用的培养基中使各标准品工作浓度中最小浓度的四环素族抗生素产生 12 mm 以上的清晰、完整的抑菌圈而获得最适宜芽孢悬液用量。一般用量为每 100 mL 检定用培养基内加 0.5 mL 至 1.0 mL 或芽孢计数后使 1.0 mL 菌液含芽孢数约 10^6 个。

4.4.3 检定用平板的制备

将适量芽孢悬液加到熔化后冷却至 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 的检定培养基中混匀,每个平皿内加入 6 mL,前后摇动平皿,使含有芽孢的检定培养基均匀覆盖于平皿表面,置水平位置,盖上陶瓷盖,待凝固后,每个平板的培养基表面放置 6 个小管,使小管在半径为 2.8 cm 的圆面上成 60° 角的间距,所用平板须当天制备。

4.4.4 样品制备

取样品约 20 g 左右剪碎,称取其中 10.0 g 加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 10.0 mL,小心搅匀,放置 60 min,置灭菌的均质杯中(9 000 r/min $\sim$ 10 000 r/min)均质 2 min(或置灭菌的乳钵内研磨成乳糜状),经 4 000 r/min 离心 30 min,其上清液作为被检样液。

4.4.5 标准曲线的制备

取上述各标准品工作液和 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液为参照浓度工作液按微生物琼脂扩散法测定各浓度的抑菌圈直径,其中最低标准品工作浓度作为阴性结果的平板对照,其他标准品工作浓度按式(1)和式(2)计算后用来绘制标准曲线:

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

$$D = (3e + 2d + c - a)/5 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

L ——标准曲线的最低浓度的抑菌圈直径(四环素、强力霉素、土霉素为 0.050 $\mu\text{g/mL}$,金霉素为 0.005 $\mu\text{g/mL}$);

D ——标准曲线的最高浓度的抑菌圈直径(四环素、强力霉素、土霉素为 0.800 $\mu\text{g/mL}$,金霉素为 0.005 $\mu\text{g/mL}$);

c ——参照浓度 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 的所有抑菌圈直径的平均值;

a, b, d, e ——标准曲线中其他标准浓度的抑菌圈直径经校准后的平均值。

然后根据计算所得的 L 和 D 作为横坐标, L 和 D 对应的浓度的对数值作为纵坐标,绘制标准曲线。

4.4.6 样品测定

每个样品取 3 个检定平板,每个检定平板放入 6 个牛津杯。将 3 个间隔的牛津杯中注满被检样液。另 3 个牛津杯中注满 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 标准液。将培养皿小心轻放入 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中,17 h $\pm$ 1 h 培养。培养后用游标卡尺测量抑菌圈内直径(精确到 0.1 mm),并分别求出平均值,经校正后,从标准曲线查出被检样液中四环素、强力霉素、金霉素、土霉素的含量,再乘以稀释倍数。

4.4.7 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述

供试组织中四环素族抗生素残留含量按式(3)计算:

$$X = c \times V/m \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X ——供试组织中四环素族抗生素含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——供试试料试样溶液中四环素族抗生素浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——供试试料试样溶液总体积,单位为毫升(mL);

m ——供试试料质量,单位为克(g)。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法的检测限其中四环素、土霉素、强力霉素为 0.05 mg/kg,金霉素为 0.01 mg/kg。

5.2 准确度

本方法中各四环素族抗生素在各浓度水平下回收率均在 60%~110%范围内。

5.3 精密度

本方法的批内误差小于 10%,批间误差小于 15%。

