SN

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

SN 0179—92

出口食品中四环素族抗生素残留量检验方法

Method for determination of the residue of tetracycline series antibiotics in food for export

1992-12-28发布　　1993-05-01实施

中华人民共和国国家进出口商品检验局　发布

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

出口食品中四环素族抗生素残留量检验方法

SN 0179—92

代替 ZB X22 005—87

Method for determination of the residue of tetracycline series antibiotics in food for export

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中四环素族抗生素残留量的检验方法。

本标准适用于出口肉或肉制品中四环素族抗生素残留量检验。蛋类和水产品可参照使用。

2 设备和材料

2.1 平皿：内径为 90 mm，底部平整光滑，具陶瓷盖。

2.2 不锈钢小管(即牛津杯，简称小管)：内径 6±0.1 mm，外径 7.8±0.1 mm，高度 10±0.1 mm。

2.3 游标卡尺：测量抑菌圈直径用。

2.4 均质器或乳钵。

2.5 离心机：4 000 r/min。

2.6 恒温水浴锅。

2.7 恒温箱：30±0.5℃，隔层必须水平。

2.8 电热干烤箱：170±1℃，器皿灭菌用。

3 培养基及试剂

3.1 培养基

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	14～16 g
蒸馏水	1 000 mL

将各成分加热溶解于蒸馏水中，高压灭菌(121℃，15 min)，最终 pH 应为 6.5±1。

3.1.2 检定用培养基

胰蛋白胨	6.0 g
牛肉膏	1.5 g
酵母膏	3.0 g
琼脂	14～16 g

中华人民共和国国家进出口商品检验局 1992-12-28 批准　　1993-05-01 实施

蒸馏水　　1 000 mL

将各成分加热溶解于蒸馏水中，高压灭菌(121℃，15 min)，最终 pH5.8±0.1。

3.2 试剂

3.2.1 $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/dm³ 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，并定容至 1 000 mL。高压灭菌(115℃，30 min)。置 4℃冰箱中保存。

3.2.2 生理盐水：称取氯化钠 8.5 g，溶解于 1 000 mL 蒸馏水中，高压灭菌(115℃，30 min)。

3.2.3 标准抗生素：四环素(TC)，土霉素(OTC)，金霉素(CTC)，从中国药品生物制品检定所购买。要密封避光，防潮保存在 4℃冰箱中。

3.2.4 标准抗生素原液和稀释液

3.2.4.1 原液

a. 四环素原液：称取 50 mg 左右四环素标准品，用 $c(HCl)=0.1$ mol/dm³ 盐酸稀释并定容至 1 000 μg/mL。

b. 土霉素原液：称取 50 mg 左右土霉素标准品，用 $c(HCl)=0.1$ mol/dm³ 盐酸溶解之，再用蒸馏水稀释并定容至 1 000 μg/mL。

c. 金霉素原液：称取 50 mg 左右金霉素标准品，用蒸馏水稀释并定容至 1 000 μg/mL。

以上原液保存在 4℃冰箱中，可使用 7 d。

3.2.4.2 稀释液

a. 四环素稀释液：取上述原液用 $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/dm³ 磷酸盐缓冲液稀释配制成 0.025，0.050，0.100，0.200，0.400，0.800 μg/mL 的稀释液，为制备标准曲线的最终标准浓度溶液，0.100 μg/mL的稀释液为参考浓度溶液。

b. 土霉素稀释液：与四环素稀释液相同。

c. 金霉素稀释液：取上述原液用 $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/dm³ 磷酸盐缓冲液稀释配制成 0.005，0.010，0.050，0.100，0.200，0.400 μg/mL 的稀释液，为制备标准曲线的最终标准浓度溶液，0.100 μg/mL的稀释液为参考浓度溶液。

以上稀释液均在使用当天配制。

4 样品制备

取肉样品约 20 g，剪碎，称取其中 10.0 g 加入 $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/dm³ 磷酸盐缓冲液 20.0 mL，小心搅匀，放置 60 min，置灭菌的均质杯中(9 000～10 000 r/min)均质 2 min(或置灭菌的乳钵内研磨呈乳糜状)，经 4 000 r/min 离心 30 min，其上清液作为被检样液。

5 菌液和检定用平板的制备

5.1 菌液的制备

5.1.1 菌种：蜡样芽孢杆菌，菌号 63301，由中国药品生物制品检定所提供。

5.1.2 菌液的制备：将菌种移种于盛有 300 mL 菌种用培养基的克氏瓶内，30℃培养 7 d，镜检芽孢数达 85%以上，用 25 mL 生理盐水洗下菌苔，置于 65℃恒温水浴加热 30 min，经离心(2 000 r/min) 20 min，弃去上清液，再加生理盐水，经离心弃去上清液，如此重复洗涤芽孢悬液三次，再置于 65℃恒温水浴中加热 30 min，然后用 50 mL 生理盐水制成芽孢悬液。置 4℃冰箱中可保存 30 d。

5.1.3 芽孢悬液用量的测定：在实际检定前，先试几个平板，即把不同浓度的芽孢悬液加入检定用培养基中，使 0.050 μg/mL 浓度的标准四环素稀释液可产生 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 至 1.0 mL 或芽孢计数后使 1.0 mL 悬液含芽孢数约为 10^6。

5.2 检定用平板的制备：将适量芽孢悬液(已于 5.1.3 条中确定)加到溶化后冷却至 55～60℃的检定

用培养基中，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。

6 检定

6.1 标准曲线的制备

标准曲线上的每个标准浓度取 3 个检定用平板为一组。在每个检定用平板上的其中 3 个小管内加满参考浓度溶液，另 3 个小管内加满标准浓度溶液，参考浓度与标准浓度溶液要间隔放置，5 个标准浓度共用 15 个检定用平板，含量最低的标准浓度（四环素和土霉素为 0.025 μg/mL，金霉素为 0.005 μg/mL）的 3 个检定用平板作为产生阴性结果的平板对照，其他 12 个检定用平板用来绘制标准曲线，这样参考浓度 0.100 μg/mL 的稀释液将得出 45 个抑菌圈直径的数值，而标准曲线上其他的标准浓度将得出 9 个抑菌圈直径的数值。

将陶瓷盖重新盖好，置 30±1℃培养 17±1 h。然后翻转平板，除去小管，精确地测量产生的抑菌圈直径（精确到 0.1 mm），求出每组 3 个检定用平板上 0.100 μg/mL 浓度的抑菌圈直径读数与其他标准浓度的抑菌圈直径读数的平均值，再求出参考浓度 0.100 μg/mL 的所有 45 个抑菌圈直径数值的平均值作为标准曲线的校正点，来校正其他各标准浓度的抑菌圈读数的平均值。

例如：参考浓度 0.100 μg/mL 的 45 个抑菌圈直径数值的平均值为 15.0 mm，而一组 3 个标准浓度为 0.200 μg/mL 检定用平板中 9 个 0.100 μg/mL 浓度抑菌圈直径数值的平均值为 14.8 mm，则校正值为＋0.2 mm，如 3 个检定用平板中 0.200 μg/mL 浓度抑菌圈直径数值的平均值为 17.0 mm，经校正后的值应为 17.2 mm。

将这些校准后的值，包括 0.100 μg/mL 浓度的平均值在双周半对数坐标图纸上，以抑菌圈直径为横坐标（算术级），以 μg/mL 计的浓度为纵坐标（对数级），通过这些点以式(1)、(2)绘出最佳直线。

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

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

式中：L——标准曲线的最低浓度的抑菌圈直径（四环素，土霉素为 0.050 μg/mL，金霉素为 0.010 μg/mL）；

H——标准曲线的最高浓度的抑菌圈直径（四环素，土霉素为 0.800 μg/mL，金霉素为 0.400 μg/mL）；

c——参考浓度 0.100 μg/mL 的 45 个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。

6.2 样品中四环素族抗生素残留量的检定

6.2.1 四环素残留量的检定：每份样品取 3 个检定用平板，在每个检定用平板上 3 个间隔的小管内加满四环素标准参考浓度溶液，另外 3 个小管内加满被检样液，将陶瓷盖重新盖好，30±1℃培养 17±1 h，然后翻转平板，除去小管，精确地测量产生的抑菌圈直径（精确到 0.1 mm），分别求出 3 个检定用平板上参考浓度和被检样液的抑菌圈直径数值的平均值，经校正点校准后的值从四环素标准曲线上查出被检样液中的四环素的含量。

6.2.2 土霉素残留量的检定：除在每个检定用平板上 3 个间隔的小管内加满土霉素标准参考浓度溶液及经校正点校准后的值从土霉素标准曲线上查出被检样液中土霉素的含量外，其他步骤与四环素残留量的检定相同。

6.2.3 金霉素残留量的检定：除在每个检定用平板上 3 个间隔的小管内加满金霉素标准参考浓度溶液及经校正点校准后的值从金霉素标准曲线上查出被检样液中金霉素的含量外，其他步骤与四环素残留量的检定相同。

7 样品中四环素族抗生素残留量的计算和报告

从标准曲线上查出符合该被检样液经校准后的抑菌圈直径数值的含量，乘以稀释倍数 3，得出结果以 μg/g 报告。

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

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。

本标准主要起草人陈春芝。