

出口禽肉中莫能菌素残留量检验方法

生物自显影法 SN 0296 — 93

Method for the determination of monensin

residues in poultry meat for export

Bioautography method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口禽肉中莫能菌素残留量的抽样、制样和生物自显影测定法。

本标准适用于出口冻鸡中莫能菌素残留量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

以不超过 2500 件商品为一检验批。

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,原始样品总量不少于 2kg,放入清洁容器内,加封后标明标记,及时送交实验室。

2.4 样品制备

从每袋原始样品中取出部分有代表性样品,将可食部分放入高速组织捣碎机中捣碎均匀,充分混匀,用四分法缩分出不少于 1kg 试样。装入清洁容器内,加封后标明标记。

2.5 样品保存

将试样于-18℃冷冻保存。

注:在抽样及制样过程中,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

用甲醇提取肉样中莫能菌素,经四氯化碳萃取后浓缩至干,以甲醇溶解残留物,用薄层分离,再用生物自显影法测定。

3.2 设备和材料

3.2.1 微量注射器: 50 μ L。

3.2.2 薄层板: 硅胶, Q/YT 257/85SG, 5cm \times 20cm, 使用前 110℃活化 2h。

3.2.3 展开缸: 240mm \times 57mm \times 32mm。

3.2.4 游标卡尺: 测量范围 0~200mm, 精度 0.02mm 或使用抑菌圈测量仪测量。

3.2.5 离心机: 转速 3000 r/min。

3.2.6 旋转浓缩器。

3.2.7 恒温培养箱: 37 \pm 1℃。

3.2.8 高压灭菌器。

3.2.9 长方形培养皿：20cm×10cm×5cm。

3.2.10 均质器：带均质杯 250mL。

3.3 试剂和培养基

3.3.1 试剂

3.3.1.1 甲醇：分析纯。

3.3.1.2 四氯化碳：分析纯。

3.3.1.3 乙酸乙酯：分析纯。

3.3.1.4 莫能菌素标准品：960 μ g(效价)/mg(中国兽药监察所提供)。

3.3.1.5 试验菌种：枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)，菌种号 ATCC 6633(卫生部药品生物制品检定所提供)。

3.3.2 培养基

3.3.2.1 菌种用培养基(见附录 A 第 A1 章)。

3.3.2.2 生物自显影用培养基(见附录 A 第 A2 章)。

3.3.2.3 肉汤培养基(见附录 A 第 A3 章)。

3.4 测定步骤

3.4.1 工作液制备

3.4.1.1 莫能菌素标准贮备液

准确称取适量的莫能菌素标准品，用甲醇溶解配制成浓度为 500 μ g(效价)/mL 的莫能菌素标准溶液。配制后于冰箱中保存，一周内使用。

3.4.1.2 莫能菌素标准工作液

吸取标准贮备液，用甲醇分别稀释成 2,3,4,5,10 和 15 μ g(效价)/mL 的标准工作液。以上稀释液均须当日配制。

3.4.1.3 菌种培养及芽胞菌悬浮液制备

将菌种安瓿瓶的上部消毒后敲碎，加入少量肉汤培养基，使其溶解并移至肉汤管中混匀。置 37 \pm 1 $^{\circ}$ C 温箱中培养 24h。将培养物接种于菌种培养基中，置于 37 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养一周，镜检含芽胞菌数达 85% 以上，便可制备芽胞悬浮液。

用适量灭菌生理盐水冲洗菌苔，然后将该菌液转移至离心管中，充分摇匀后，于 3000 r/min 离心 30min，弃去上清液，再加入同样量的灭菌生理盐水重复离心一次。弃去上清液，再加入适量灭菌生理盐水，摇匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30min，然后，于 1000 r/min 离心 5min，取上清液并转入灭菌试管中，即为芽胞菌悬浮液，置于冰箱中保存，可使用一个月。

3.4.2 试液制备：准确称取绞碎试样 10g(精确至 0.1g)于均质杯中，加入 20mL 甲醇，均质 2min 后，移入离心管中，于 3000 r/min 离心 20min。取其上清液 15mL，转入盛有 5mL 蒸馏水的 250mL 分液漏斗中，混合后加入 10 mL 四氯化碳，充分振摇，静置分层，放出四氯化碳层于 150 mL 茄形瓶中。用四氯化碳再重复提取两次，合并四氯化碳至上述茄形瓶中，于 50~60 $^{\circ}$ C 水浴中用旋转蒸发器浓缩至干，加入 0.5mL 甲醇溶解残留物供 TLC 实验用。此样液中相当于禽肉试样浓度为 15g/mL。

3.4.3 测定

3.4.3.1 生物自显影

将每个样品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 μ L 试液和 3 μ g(效价)/mL 莫能菌素标准溶液，试液和标准溶液点相距 2.5cm。在展开缸中用乙酸乙酯进行展开，直至溶剂前沿距板顶端 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,无菌操作将已熔化并冷却至 50~55℃ 的生物自显影用培养基均匀地喷在其表面上,然后用 10mL 上述接种芽胞菌悬液的培养基铺满整个薄层板,保持水平,待其凝固,于 37±1℃ 培养 18 h。

3.4.3.2 对照试验

除不加试样外,按上述测定步骤进行。

3.5 结果计算和表述

经过培养后,在薄层板上与莫能菌素标准液产生抑菌圈的 Rf 值(约 0.38)相同位置上,显现抑菌圈者即为阳性。

当样品判定为阳性时,测量四块薄层板上的试液及标准溶液产生的抑菌圈直径,分别计算出平均值。当每组四个直径值的相对标准偏差(RSD)均不超过 5%时,并且试液的抑菌圈直径与标准溶液(20μL)的抑菌圈直径近似(直径相差不超过±1mm),则其样品中莫能菌素含量按下式计算:

c

$X = \frac{c}{m}$

m

式中: X??样品中莫能菌素的含量,mg/kg;

c??试验中所用的标准溶液的浓度,μg/mL;

m??最终试液所代表的禽肉试样的浓度,g/mL。

4 测定低限、回收率

4.1 测定低限

本方法测定低限为 0.20mg(效价)/kg。

4.2 回收率

回收率的实验数据:莫能菌素浓度在 0.20~0.67mg(效价)/kg 范围内,回收率为 81%~100%。

附 录 A

培养基成分及制备方法

(补充件)

A1 菌种用培养基

蛋白胨 10.0g

牛肉浸膏 5.0g

氯化钠 2.5g

琼脂 15.0g

蒸馏水 1000mL

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解,用 1mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH,使其灭菌后 pH 为 6.5±0.1,分装于试管或克氏瓶内,于 121℃ 15min 高压灭菌,灭菌后制备成所需斜面备用。

A2 生物自显影用培养基

蛋白胨 10.0g

酵母浸膏 2.5g

葡萄糖 10.0g

琼脂 15.0g

蒸馏水 1000mL

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解,用 1mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH,使其

灭菌后 pH 为 6.0±0.1,分装于锥形瓶内,于 121℃ 15 min 高压灭菌,备用。

A3 肉汤培养基

蛋白胨	10.0g
牛肉浸膏	5.0g
氯化钠	2.5g
蒸馏水	1000mL

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解,用 1mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH,使其灭菌后 pH 为 7.0±0.1,分装于试管中,于 121℃ 15min 高压灭菌。

附录 B

检验程序图 (补充件)

试样(10.0g) 试验菌培养

| |

| 于均质杯内加入 |

| 20 mL 甲醇 |

| |

均质 2 min |

| 移入离心管 |

| |

离心 20 min(3000r/min) 菌液制备

| |

取上清液(15 mL) |

| 转入盛有 5mL 蒸馏 生物自显影用培养基

| 水的分液漏斗中 |

| |

| |

加入四氯化碳(10 mL) |

| 充分振摇后分取四氯化碳层 |

| 转入茄形瓶中,再重复两次 |

| |

合并入上述茄形瓶中 |

| |

蒸干 |

| |

用 0.5mL 甲醇溶解 |

| |

层析 |

| |

|_____|

|

培养

|

|

检定

|
|

结果和表述

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。

本标准主要起草人袁而森、王素琴、李剑影。

本标准等同采用日本厚生省检验方法：畜水产食品中の残留物质检查法(1990)。

中华人民共和国国家进出口商品检验局 1993-12-28 批准 1994-05-01 实施

资料提供：



cence[®]

全称：长沙湘仪离心机仪器有限公司

湖南湘仪实验室仪器开发有限公司

生产地址：湖南望城台商投资开发区湘仪工业园

营销中心地址：湖南省长沙市枫林二路裕园大厦三单元 16 楼

联系人：卢一红

手机：13874972826

电话：0736-2842826/0731-2842825

传真：0731-2842829

邮编：410205

客服 QQ：784757816

网址：<http://www.xiangyilxi.com>

E-mail：lxjxy@lxjxy.com / xiangyi@xiangyilxj.com

注：如没有特殊说明，本公司所提供资料均从互联网搜集所得，故不对资料内容负任何责任