



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.95—2003
代替 GB/T 13110—1991

蜂蜜中四环素族抗生素 残留量的测定

Determination of tetracyclines residues in honey

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 13110—1991《蜂蜜中四环素族抗生素残留量的测定方法》。

本标准与 GB/T 13110—1991 相比主要修改如下：

- 修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《蜂蜜中四环素族抗生素残留量的测定》；
- 按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：福建省食品卫生监督检验所、福建省药品检验所。

本标准主要起草人：林升清、马赛骏、黄宏南、耿莹莹、林桂生。

原标准于 1991 年首次发布，本次为第一次修订。

蜂蜜中四环素族抗生素残留量的测定

1 范围

本标准规定了用微生物管碟法测定蜂蜜中四环素族抗生素残留量的方法。

本标准适用于天然或加工蜂蜜中四环素族抗生素残留量的测定。

2 原理

试样中四环素族抗生素经 McIlvaine 缓冲液提取后,用 SEP-PAK C₁₈ 柱纯化。四环素族三种抗生素四环素、土霉素及金霉素利用薄层层析生物检测法进行分离和定性;以蜡样芽胞杆菌为试验菌株,用微生物管碟法进行定量检测。

3 试剂

3.1 McIlvaine 缓冲液(pH4):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)27.6 g、柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)12.9 g、乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,用水溶解后稀释并定容至 1 000 mL。

3.2 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH4.5):称取磷酸氢二钾 13.6 g,用水溶解后稀释并定容至 1 000 mL。115℃灭菌 30 min,置 4℃冰箱中保存。

3.3 乙二胺四乙酸二钠水溶液(50 g/L)。

3.4 Waters SEP-PAK C₁₈ 柱(或国产 PT-C₁₈ 柱):用时先经 10 mL 甲醇滤过活化,再用 10 mL 蒸馏水置换,然后用 10 mL 50 g/L 乙二胺四乙酸二钠流过。

3.5 抗生素标准品:四环素、土霉素、金霉素标准品(由卫生部药品生物制品检定所提供)。

3.6 抗生素标准溶液:

3.6.1 抗生素标准原液的配制:准确称取四环素、土霉素、金霉素标准品适量(按效价进行换算),用 0.01 mol/L 盐酸溶解并定容至 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置 4℃冰箱中(可使用 7 天)。

3.6.2 抗生素标准稀释液配制:临用前取上述原液按 1:0.8 剂距用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液逐步稀释配制成标准稀释液。制备四环素、土霉素标准曲线的标准浓度为 0.16,0.21,0.26,0.32,0.40,0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,参考浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;制备金霉素标准曲线的标准浓度为 0.033,0.041,0.051,0.064,0.080,0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,参考浓度为 0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。定性试验用标准液浓度四环素、土霉素为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,金霉素为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.7 展开剂:正丁醇-乙酸-水(4+1+5)。

4 仪器

4.1 隔水式恒温箱。

4.2 冰箱:0℃~4℃。

4.3 恒温水浴。

4.4 高压灭菌器。

4.5 旋转式减压蒸馏器。

4.6 离心机:2 000 r/min。

4.7 天平:感量 0.1 mg。

4.8 层析缸:内长 20 cm、宽 15 cm、高 30 cm。

4.9 长方形培养皿:1.5 cm×8 cm×23 cm。

- 4.10 层析纸 7 cm×22 cm,中速滤纸。
- 4.11 微量注射器:10 μL、50 μL。
- 4.12 电吹风机。
- 4.13 游标卡尺。
- 4.14 吸管:容量为 1 mL 和 10 mL,标有 0.1 mL 单位刻度。
- 4.15 注射器:容量为 20 mL。
- 4.16 平皿:内径为 90 mm,高 16 mm~17mm,底部平整光滑,具陶瓷盖。
- 4.17 不锈钢小管(简称小管):内径 6.0 mm±0.1 mm,外径 7.8 mm±0.1 mm,高度 10 mm±0.1 mm。

5 培养基

5.1 菌种培养基:

| | |
|------|------------|
| 胰蛋白胨 | 10.0 g; |
| 牛肉浸膏 | 5.0 g; |
| 氯化钠 | 2.5 g; |
| 琼脂 | 14 g~16 g; |
| 蒸馏水 | 1 000 mL。 |

将上述各成分混合于蒸馏水中,搅拌加热至溶解,110℃灭菌 30 min,最终 pH 值为 7.2~7.4。

5.2 检定用培养基:

| | |
|------|-----------|
| 胰蛋白胨 | 5.0 g; |
| 牛肉浸膏 | 3.0 g; |
| 磷酸氢钾 | 3.0 g; |
| 琼脂 | 14~16 g; |
| 蒸馏水 | 1 000 mL。 |

将上述各成分混合于蒸馏水中,搅拌加热至溶解,110℃灭菌 30 min,最终 pH 值为 6.5±0.1。

6 试样处理

6.1 定量试验用样液制备:称取混匀的蜂蜜试样 10.0 g,加入 30 mL pH4.0 的 McIlvaine 缓冲液,搅拌均匀,待溶解后进行过滤,滤液分数次置于注射器中,用经预处理的 SEP-PAKC₁₈ 柱滤过,用 50 mL 水洗柱,再用 10 mL 甲醇洗脱,洗脱液经 40℃减压浓缩蒸干后,准确加入 pH4.5 磷酸盐缓冲液 3 mL~4 mL 溶解,备定量检测用。

6.2 定性试验用样液制备:称取蜂蜜试样 5 g,按 6.1 步骤处理,甲醇洗脱液经 40℃减压浓缩蒸干后,用 0.1 mL 甲醇溶解,备定性试验用。

7 菌液和检定用平板的制备

7.1 试验菌种:蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* var. *mycoides*),菌号 63301,由卫生部药品生物制品检定所提供。

7.2 菌液的制备:将菌种移种于盛有菌种用培养基的克氏瓶内,于 37℃培养 7 天,使镜检芽胞数达 85%,先用 10 mL 灭菌水洗下菌苔,离心 20 min,弃去上清液,重复操作一次,再加 10 mL 灭菌水于沉淀物中,混匀。然后,将此芽胞悬浮液置 65℃恒温水浴中加热 30 min。从水浴中取出,于室温下放置 24 h,再于 65℃恒温水浴中加热 30 min,待冷后置 4℃冰箱保存。用时可取此芽胞悬液以灭菌水稀释 10 倍成稀菌液。

7.3 芽胞悬液用量的测定:把不同量的稀菌液加入检定用培养基中,按本法进行操作,0.25 μg/mL 的

四环素参考浓度可产生 15 mm 以上的清晰、完整的抑菌圈,选择出最适宜的芽胞悬液用量。一般为每 100 mL 检定用培养基加入 0.2 mL~0.5 mL 稀菌液。

7.4 检定用平板的制备:试验用平皿内预先铺有 20 mL 检定培养基作为底层,将适量稀菌液(已于 7.3 中确定)加到溶化后冷却至 55℃~60℃的检定用培养基中,混匀后往上述平皿内加入 5 mL 作为菌层。前后摇动平皿,使菌层均匀覆盖于底层表面,置水平位置上,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 2.3 cm 的圆面上成 60°角的间距。所用平板应当天准备。

8 定量试验

8.1 标准曲线的制备:取 3 个检定用平板为一组,6 个标准浓度需要六组,在该组每个检定用平板的 3 个间隔小管内注满一参考浓度液,在另 3 个小管内注满一标准浓度液,于 37℃±1℃培养 16 h,然后测量参考浓度和标准浓度的抑菌圈直径,求得各自 9 个数值的平均值,并计算出各组内标准浓度与参考浓度抑菌圈直径平均值的差值 F ,以标准浓度 c 为纵坐标,以相应的 F 值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

8.2 测定:每份试样取 3 个检定用平板,在每个平板上 3 个间隔的小管内注满 0.25 μg/mL 四环素参考浓度(或 0.25 μg/mL 土霉素或 0.05 μg/mL 金霉素,视所含抗生素种类而定),另 3 个小管内注满被检样液,于 37℃±1℃培养 16 h,测量参考浓度和被检样液的抑菌圈直径,求得各自 9 个数值的平均值,并计算出被检样液与参考浓度抑菌圈直径平均值的差值 F_1 。

9 定性试验

取层析用滤纸(7 cm×22 cm)均匀喷上 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 4.5),于空气中晾干、备用。在距滤纸底边 2.5 cm 起始线上,分别滴加 10 μL 2 μg/mL 四环素、土霉素及 1 μg/mL 金霉素标准稀释液与定性试验样液,将滤纸挂于盛有展开剂(3.7)的层析缸中,以上行法展开,待溶剂前沿展至 15 cm 处将滤纸取出,于空气中晾干,贴在事先加有 60 mL 含有试验用菌菌层的长方形培养皿上,30 min 后移去滤纸,在 37℃±1℃培养 16 h,由抑菌圈测得比移值,以确定被检试样中所含四环素族抗生素的种类。

10 结果计算

根据被检试样液与参考浓度抑菌圈直径平均值的差值 F_1 ,从该种抗生素标准曲线上查出抗生素的浓度 c_1 (μg/mL),试样中若同时存在两种以上四环素族抗生素时,除了四环素、金霉素共存以金霉素表示结果外,其余情况均以土霉素表示结果。试样中四环素族抗生素残留量按下式计算:

$$X = \frac{c_1 \times V \times 1000}{m \times 1000}$$

式中:

X ——试样中四环素族抗生素残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_1 ——检定用样液中四环素族抗生素的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——待检定样液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

11 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。