

3408 抗生素残留量检查法（培养法）

本法系依据在琼脂培养基内抗生素对微生物的抑制作用，比较对照品与供试品对接种的试验菌产生的抑菌圈的大小，检查供试品中氨苄西林或四环素残留量。

磷酸盐缓冲液 (~~pH6.0~~) 的制备 取磷酸二氢钾8.0g和磷酸氢二钾2.0g，加水溶解并稀释至1000ml，经121℃灭菌30分钟 (~~pH6.0~~)。

抗生素 II 号培养基的制备 称取胨6g、牛肉浸出粉1.5g和酵母浸出粉6g，加入水适量使溶解，加琼脂13~14g，加热使溶胀，滤过，取上清液，加葡萄糖1g，振摇使溶解，加水至1000ml，调pH值使灭菌后为6.5~6.6，分装于玻璃管或锥形瓶中，经115℃灭菌30分钟，4℃保存。

菌悬液的制备 (1) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 悬液 用于检测氨苄西林。取金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26003] 营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，35~37℃培养20~22小时。临用时，用灭菌水或~~0.85~0.90%~~无菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

(2) 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 悬液 用于检测四环素。取藤黄微球菌 [CMCC (B) 28001] 营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，置26~27℃培养24小时。临用时，用~~0.85~0.90%~~无菌氯化钠溶液将菌苔洗下 并调节菌悬液浓度，使10倍稀释后600nm吸光度值约为0.3，备用。

供试品溶液制备 除另有规定外，液体供试品直接检测，冻干供

试品按照标识量复溶后检测。

对照品溶液的制备 取氨苄西林对照品适量，用0.01mol/L盐酸溶解并制成每1ml中含氨苄西林10.0mg的溶液，精密量取适量，用磷酸盐缓冲液稀释成每1ml中含1.0 μ g的溶液。

取四环素对照品适量，用0.85~0.90%氯化钠溶液溶解并适量稀释成每1ml中含0.125 μ g的溶液(临用现配)。

检查法 取直径8cm或10cm的培养皿，注入融化的抗生素II号培养基15~20ml，使在碟底内均匀摊布，放置水平台上使凝固，作为底层。取抗生素II号培养基10~15ml，置50℃水浴预热的试管中，加入0.5%~1.5%(ml/ml)的菌悬液100~300 μ l，混匀，取适量注入已铺制底层的培养皿中，放置水平台上，放冷后，在每个培养皿上等距离均匀放置钢管(内径6~8mm、壁厚1~2mm、管高10~15mm的不锈钢管，表面应光滑平整)，于钢管中依次滴加供试品溶液、阴性对照溶液(磷酸盐缓冲液)及对照品溶液。培养皿置37℃培养18~22小时。

结果判定 对照品溶液应有抑菌圈，阴性对照溶液应无抑菌圈。供试品溶液抑菌圈的直径小于对照品溶液抑菌圈的直径时判为阴性；否则判为阳性。

【附注】 本试验应在无菌条件下进行，使用的玻璃仪器、钢管等应无菌。供试品如存在干扰成分，则不宜采用此法，应建立其他适宜方法检测。

修订说明

为完善抗生素残留量检查法（培养法）中四环素残留量检查法，对本法进行如下修订：

1. 增加对检查用菌液浓度要求

增加“并调节菌悬液浓度，使10倍稀释后600nm吸光度值约为0.3”菌液浓度要求，量化菌液浓度。

2. 增加四环素对照品配制要求

根据四环素对照品溶液稳定性考察发现，其存放过程中四环素容易析出，同时可能出现抗菌活性降低，故增订“临用现配”要求。

3. 增加菌悬液加入量要求

增订菌液加入量“100~300 μ l”的要求有利于增强阳性对照效果。

4. 增加实验受到干扰的处置要求

由于阳性对照的较高灵敏度要求，容易受到干扰因素影响，增加品种适用性提示，“供试品如存在干扰成分，可采用其他适宜方法进行抗生素残留检测”。

起草单位：中国食品药品检定研究院

联系电话：010-67095426

谷本裕司