



中华人民共和国国家标准

GB/T 21542—2008

饲料中恩拉霉素的测定 微生物学法

Determination of enramycin in feeds—Microbiological method

2008-04-09 发布

2008-07-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布



中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中恩拉霉素的测定 微生物学法
GB/T 21542—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2008年5月第一版 2008年5月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-31414 定价 14.00 元



GB/T 21542-2008

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：上海市兽药饲料监察所。

本标准主要起草人：顾欣、蔡金华、刘雅妮、沈富林、王蓓、黄土新、金陵艳。

饲料中恩拉霉素的测定 微生物学法

1 范围

本标准规定了饲料中恩拉霉素的微生物学测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料中恩拉霉素的含量测定。

本方法测定饲料中恩拉霉素的定量限为 0.5 mg/kg(500 U/kg)。

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—1992 分析实验室用水规格和试验方法(neq ISO 3696:1987)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(ISO 6498:1998,IDT)

中华人民共和国兽药典(2005 年版一部)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

恩拉霉素效价单位 **potency unit of enramycin**

微生物学法测定的恩拉霉素生物活性单位用 U 表示。1 mg 恩拉霉素相当于 1 000 U。

4 原理

用酸性甲醇溶液提取试样中的恩拉霉素,然后提取液用大孔吸附树脂对恩拉霉素吸附、洗脱,除去饲料中的干扰物质。利用标准溶液中恩拉霉素浓度的对数与其对敏感微生物生长抑制而产生的抑菌圈的直径成正比关系的原理制作标准曲线,根据试样液中恩拉霉素产生抑菌圈的大小来测定饲料中恩拉霉素的含量。

5 试剂和材料

除另有规定外,在分析中使用的试剂均为分析纯,水为蒸馏水或去离子水,应符合GB/T 6682—1992 规定的三级用水要求。

5.1 甲醇溶液

甲醇-水(1+1)。

5.2 盐酸溶液

取盐酸 9 mL,加水至 1 000 mL,混匀。

5.3 氢氧化钠溶液

取澄清的氢氧化钠饱和溶液 112 mL,加水至 1 000 mL,混匀。

5.4 洗涤液

甲醇溶液(5.1),用氢氧化钠溶液(5.3)调节 pH 值至 8。

5.5 提取液

甲醇溶液(5.1),用盐酸溶液(5.2)调节 pH 值至 3。

5.6 洗脱液

甲醇-水(7+3),用盐酸溶液(5.2)调节 pH 值至 3。

5.7 灭菌水

按附录 A 的规定制备。

5.8 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)

按附录 A 的规定制备。

5.9 大孔吸附树脂

多孔苯乙烯-二乙烯苯聚合物树脂(Amberlite XAD-2,粒度:20 目~60 目,平均孔径:9nm,比表面积:300 m²/g,孔容积:0.65 mL/g,骨架密度:1.08 g/mL,25℃)。可使用参数相同的同类产品。

将准备使用的大孔吸附树脂浸入足量的甲醇中(液面高出树脂层 2 cm~5 cm),轻轻地搅拌,使充分混合,放置 15 min,小心地尽量倾去上层甲醇液,加入足量的水,搅拌混合,放置 10 min,备用。

5.10 大孔吸附树脂层析柱

将预处理过的大孔吸附树脂(5.9)湿法装入层析柱中(高 20 cm,内径 10 mm),使柱床高度为 15 cm,使用 25 mL 洗涤液(5.4)以 0.4 mL/min 流速过柱,平衡后待用。

5.11 恩拉霉素标准溶液

5.11.1 恩拉霉素标准贮备溶液

称取恩拉霉素标准品(效价单位不小于 900 U/mg)适量,精确至 0.1 mg,用甲醇溶液(5.1)溶解并稀释成含恩拉霉素 1 000 U/mL 的溶液,在 0℃~4℃可保存 7 d。

5.11.2 恩拉霉素标准工作溶液

精确量取恩拉霉素标准贮备溶液(5.11.1),用 pH6.0 磷酸盐缓冲液(5.8)稀释成 0.4 U/mL、0.8 U/mL、1.6 U/mL、3.2 U/mL、6.4 U/mL 浓度的标准工作溶液。以 1.6 U/mL 为中心浓度标准工作溶液。

5.12 培养基 I

按附录 A 的规定制备。

5.13 培养基 II

按附录 A 的规定制备。

5.14 试验菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63 501 或 CVCC717]。

5.15 菌悬液

取枯草芽孢杆菌(5.14)的新鲜培养物接种于培养基 I (5.12)内,在 35℃~37℃培养 7 d,用灭菌水将芽孢洗下,在 65℃水浴加热 30 min 后,于 3 000 r/min 离心 30 min,弃去上层液,加入足量的灭菌水使沉淀物重悬浮,离心,重复洗涤三次,弃去洗液,最后加入适量的灭菌水制成菌悬液,此菌悬液在 0℃~4℃可保存 6 个月。

5.16 双碟的制备

取培养基 II (5.13)加热融化,冷却至 60℃,加入适量的菌悬液(以 1.6 U/mL 中心浓度标准工作溶液产生的抑菌圈直径不小于 16 mm 为宜),摇匀。每个双碟加入 10 mL 含菌培养基,均匀摊布,放置于水平操作台上冷却,待培养基凝固后,在每个双碟内半径为 2.8 cm 的圆周上等距离放置 6 个已灭菌的不锈钢小管。

6 仪器与设备

6.1 分析天平:感量 0.000 1 g。

- 6.2 天平:感量 0.01 g。
- 6.3 振荡器:往复式。
- 6.4 离心机。
- 6.5 旋转真空蒸发器。
- 6.6 电热恒温水浴锅:温度波动 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.7 平底双碟:直径为 90 mm,高 16 mm~17 mm,符合《中华人民共和国兽药典》2005 年版一部的要求。
- 6.8 陶瓦盖。
- 6.9 不锈钢小管:高 10.0 mm $\pm$ 0.1 mm,外径 8.0 mm $\pm$ 0.1 mm,内径 6.0 mm $\pm$ 0.1 mm,符合《中华人民共和国兽药典》2005 年版一部的要求。
- 6.10 恒温培养箱:温度波动 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.11 高压灭菌锅。
- 6.12 可调式微量移液器:200 μL ~1 000 μL 。
- 6.13 游标卡尺(精度 0.02 mm)或抑菌圈测定仪。

7 试样的制备

按 GB/T 20195 制备试样,经粉碎后全部通过 1 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中备用。

8 含量测定

8.1 标准曲线的制备

取制备好的双碟(5.16)平均分为 5 组,标准工作溶液(5.11.2)每一个浓度为一组,每组不少于 3 个碟子。每个双碟的 6 个不锈钢小管中,间位的 3 个使用可调式微量移液器滴加 200 μL 中心浓度标准工作溶液(5.11.2),另外 3 个滴加 200 μL 该组浓度标准工作溶液,将双碟小心移至恒温培养箱中,盖上陶瓦盖,于 36 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h~18 h。

测量各组中心浓度标准工作溶液和该组标准工作溶液的抑菌圈直径,分别计算平均值,再计算所有双碟中心浓度标准工作溶液抑菌圈直径的总平均值,作为修正值。

各浓度组的抑菌圈直径按式(1)修正:

$$A_a = B_a - B + A \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_a ——该浓度标准工作溶液被修正后的抑菌圈直径;

B_a ——修正值;

B ——该浓度组中心浓度标准工作溶液所至抑菌圈直径读数平均值;

A ——该浓度标准工作溶液抑菌圈直径读数平均值。

以各组溶液浓度的对数与该组溶液被修正后的抑菌圈直径作线性回归,求出回归方程。

相关系数 r 应不小于 0.99。

8.2 试样溶液的制备

8.2.1 准确称取 10 g 的试样,精确至 0.01 g,置于 250 mL 具塞锥形瓶内,加入 50.0 mL 提取液(5.5),摇匀,调节 pH 至 3,使用往复式振荡器振荡 30 min。转移至 100 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液过滤,将滤液用氢氧化钠溶液(5.3)调节 pH 至 8。

8.2.2 量取 20.0 mL 滤液,以 0.6 mL/min 的流速经过大孔吸附树脂层析柱(5.10),再用 12 mL 洗涤液(5.4)以 0.4 mL/min 的流速过柱,洗涤去除杂质。然后用 40 mL 洗脱液(5.6)以 0.2 mL/min 的流

速过柱,收集洗脱液。

8.2.3 将洗脱液用旋转真空蒸发器于 45 ℃ 蒸干,加入适量的甲醇溶液(5.1)于蒸发瓶中,溶解残渣,定容(使溶液中的恩拉霉素浓度在 0.4 U/mL~6.4 U/mL 之间)制成试样溶液。

8.3 测定

取与标准曲线同时制备的至少 3 个双碟(5.16),按标准曲线的制备方法(8.1)分别滴加试样溶液(8.2)和中心浓度标准工作溶液,与标准曲线同时操作和培养。

9 判定与结果计算

9.1 判定

试样溶液不产生抑菌圈,判定饲料中恩拉霉素为阴性。

试样溶液产生抑菌圈,判定饲料中恩拉霉素为阳性并计算含量。

9.2 结果计算

用回归方程求出中心浓度标准工作溶液对应的抑菌圈直径作为修正值,按式(1)校正试样溶液抑菌圈直径数的平均值,再用回归方程求出试样溶液中恩拉霉素的实测浓度(c)。

饲料中恩拉霉素的含量 X ,以效价单位每千克(U/kg)表示,按式(2)计算:

$$X = \frac{c \times V}{n \times m} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

c ——试样溶液中恩拉霉素的实测浓度,单位为效价单位每毫升(U/mL);

V ——提取液的体积数,单位为毫升(mL);

n ——提取液过柱后的浓缩倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留至三位有效数字。

10 重复性

由同一操作者对同一试样同时两次平行测定所得结果的相对偏差不大于 15%。

附 录 A
(规范性附录)
培养基及溶液的配制

A.1 培养基 I

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸出粉	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼脂	15 g
水	1 000 mL

A.1.2 制法

除琼脂外,混合上述成分,调节 pH 值比最终 pH 值略高 0.2~0.4,加入琼脂,加热溶化后过滤,调节 pH 值使灭菌后为 6.5 ± 0.1 ,分装于试管中,于 121℃ 灭菌 15 min。制成斜面备用。

A.2 培养基 II

A.2.1 成分

蛋白胨	5.0 g
牛肉浸出粉	5.0 g
氯化钠	80 g
磷酸氢二钠	2.0 g
琼脂	15 g
水	1 000 mL

A.2.2 制法

除琼脂外,混合上述成分,调节 pH 值比最终 pH 值略高 0.2~0.4,加入琼脂,加热溶化后过滤,调节 pH 值使灭菌后为 8.0 ± 0.1 ,分装于锥形瓶中,于 121℃ 灭菌 15 min。

A.3 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)

A.3.1 成分

磷酸氢二钾	2.0 g
磷酸二氢钾	8.0 g
水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述各成分于水中溶解,分装于锥形瓶中,于 121℃ 灭菌 15 min。

A.4 灭菌水

将水分装于锥形瓶中,于 121℃ 灭菌 15 min。