

土霉素、金霉素和四环素的检测方法

1. 分析目标化合物

土霉素，金霉素，四环素

2. 仪器设备

带荧光检测器的高效液相色谱仪。

3. 试剂

除下列试剂外，使用附录2所列试剂。

咪唑：特级

咪唑缓冲溶液：将68.08g咪唑、0.37g EDTA 和10.72g乙酸镁溶解在800mL水中，用乙酸调节pH7.2后，加水至1,000mL。

含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液：第1液：将21.0g柠檬酸溶解在水中至1,000mL。第2液：将71.6g磷酸氢二钠溶解在水中至1,000mL。在1.86g乙二胺四乙酸中加入307mL第1液和193mL第2液混合的溶液溶解。

苯乙烯-二乙烯苯共聚物小柱（265mg）：在内径8~9mm 聚乙烯管中填充265mg柱色谱用苯乙烯-二乙烯苯共聚物或具有同等分离特性的物质。

4. 标准品

盐酸土霉素：本品1.000mg 含有土霉素0.850mg以上效价，分解点为190℃~194℃。

盐酸金霉素：本品1.000mg含有盐酸金霉素0.900mg以上效价，分解点为210℃以上。

盐酸四环素：本品1.000mg 含有盐酸四环素0.900mg以上效力，分解点为214℃以上。

5. 试验溶液的制备

a 提取方法

①肌肉、肝脏和肾脏

肌肉：尽可能除去脂肪层，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

肝脏和肾脏：搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

加入30mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，搅拌1分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，水层移入100mL分液漏斗中。离心分离管的残留物中加入20mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，用振荡器激烈振荡1分钟后，按上述同样条件离心分离，合并水层于上述分液漏斗中。加入20mL正己烷，用振荡器激烈振荡5分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，分取水层。

① 脂肪

脂肪：尽可能除去肌肉层，搅碎混合均匀后，称取其20.0g。

加入200mL正己烷，搅拌1分钟后，加入40mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，再搅拌1分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，分取水层。正己烷层中加入20mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，用振荡器激烈振荡1分钟后，按上述同样条件离心分离，分取水层，合并于先分取的水层中。

② 奶

称取5.00g样品，加入30mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液和20mL正己烷，用振荡器激烈振荡5分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，分取水层。

③ 蛋

除去蛋壳，充分均匀后，称取其5.00g。加入30mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，均匀后，加入100mL正己烷，搅拌1分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，水层移入100mL分液漏斗中。离心管的残留物中加入20mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，用振荡器激烈振荡1分钟后，按上述同样条件离心分离，合并水层于分液漏斗中。加入20mL正己烷，用振荡器振荡5分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，分取水层。

⑤ 鱼贝类

有壳贝类：除去壳，搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

其它鱼贝类：搅碎混合均匀后，称取其5.00g。

加入30mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，搅拌1分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，水层移入100mL分液漏斗中。离心管的残留物中加入20mL含有乙二胺四乙酸的柠檬酸缓冲溶液，用振荡器激烈振荡1分钟后，按上述同样条件离心分离，合并水层于分液漏斗中。加入20mL正己烷，用振荡器激烈振荡5分钟后，以每分钟3000转离心分离10分钟，分取水层。

b 净化方法

在苯乙烯二乙烯苯共聚物小柱（265mg）中，顺次注入10mL甲醇、10mL水和5mL饱和EDTA溶液，弃去流出液。柱中注入a提取方法所得的溶液后，注入10mL水，弃去流出液。注入10mL甲醇，收集流出液于磨口减压浓缩器中，40℃以下除去甲醇。残留物中加入1.0mL 1.36%磷酸二氢钾溶液溶解，此为试验溶液。

6. 操作方法

a 定性试验

按下列操作条件进行试验，试验结果必须与标准品的一致。

操作条件

柱填充剂：十八烷基甲硅烷基化硅胶（粒度5 μm）。

柱：内径4.0~6.0mm，长150mm不锈钢管。

柱温：40℃

检测器：激发波长380nm，发射波长520nm。

流动相：土霉素和四环素试验时，用咪唑缓冲溶液：甲醇（17：3）的混合溶液。调整流速使土霉素约5分钟流出。

金霉素试验时，用咪唑缓冲溶液：甲醇（3：1）的混合溶液。调整流速使金霉素约7分钟流出。

b 定量试验

根据与a 定性试验相同操作条件所得的试验结果，峰高法或峰面积法定量。

7. 定量限

a 肌肉，肝脏，肾脏，奶，蛋和鱼贝类

土霉素：0.02 mg/kg

金霉素：0.03 mg/kg

四环素：0.02 mg/kg

b 脂肪

土霉素：0.005 mg/kg

8. 注意事项

(1) 试验溶液的制备

① 离心分离温度保持在室温。

② 抽滤后滤液混浊时，滤液再次进行离心分离。

③ 在苯乙烯-二乙烯苯共聚物柱色谱中，注入试验溶液后，30mL水分数次加入效果较好地洗净柱中残留的乙二胺四乙酸。

(2) 标准溶液的配制

① 称取相当于10.0mg土霉素的标准品，溶解在甲醇中至10mL，作为土霉素的标准原液（土霉素1,000mg（效价）/L，1,000mg/L）。本标准原液保存在-20℃，1年内稳定。

② 称取相当于10.0mg金霉素的标准品，溶解在甲醇中至10mL，作为金霉素的标准原液（金霉素1,076mg（效价）/L，1,000mg/L）。本标准原液保存在-20℃，1年内稳定。

③ 称取相当于10.0mg四环素的标准品，溶解在甲醇中至10mL，作为四环素的标准原液（四环素1,082mg（效力）/L，1,000mg/L）。本标准原液保存在-20℃，1年内稳定。

④ 用1.36%磷酸二氢钾溶液将土霉素，金霉素和四环素各标准原液递减稀释，作为制作标准曲线用的标准溶液。

(3) 其它

① 同时进行很多样品试验的筛选试验法提高判断效率时，用「○土霉素，金霉素和四环素的筛选法（参照117页）」判断为阳性的，不妨用本检测方法实施试验。

② 使用本检测方法检出土霉素，金霉素和四环素时，最好用带质量检测器的高效液相色谱仪确证。

9. 参考文献

无

10. 类型

A

○土霉素，金霉素和四环素的筛选法

1 试验菌液的配制

将继代保存的试验菌株（使用 *Bacillus mycoides* ATCC 11778。以下称试验菌株。）涂抹在继代保存用培养基中，在30℃培养1周，形成芽胞。再用显微镜确认染色的芽胞，确认1个视野中形成80%以上的芽胞。芽胞的形成不好时，再培养10天以上，确认没有改善时，考虑到试验菌的变异等，不使用这样的试验菌。

接着将在继代保存用培养基上发育的菌苔浮游在杂灭菌的生理盐水中，在65℃加热30分钟。以每分钟3,000转离心分离20分钟，沉淀再浮游在灭菌的生理盐水中，此为芽胞原液。用此芽胞原液作递减稀释，按1%比例将这些稀释液混和在约50℃保温的种层用培养基中，分别流入8mL于培养皿（用内径80~90mm已灭菌的培养皿。以下称培养皿。）成平板。各平板上放置含有土霉素0.2μg效价/mL的纸圆盘（直径10mm，厚1.1~1.2mm纸圆盘在121℃高压灭菌15分钟，充分干燥。以下称纸圆盘。）或在各平板上放置的圆筒（已干热灭菌的外径8mm，内径6mm，高10mm圆筒。以下称圆筒。）中注入250μL土霉素2μg效价/mL，在30℃培养17±1小时，显示抑菌圈的直径为14±1mm的平板，其相应的稀释液作为试验菌液。此时的芽胞数为10⁴~10⁵个/mL。

继代保存用培养基：在1,000mL培养基中含有10.0g胨、5.0g肉汤，2.5g氯化钠和15.0g琼脂。灭菌后调整pH 6.5±0.1。

种层用培养基：在1,000mL培养基中含有6.0g胨、1.5g肉汤，3.0g酵母汤和15.0g琼脂。灭菌后调整pH 5.8±0.1。

2 试验溶液的制备

试验溶液的制备按照土霉素，金霉素和四环素检测方法的实施。

3 操作方法

在灭菌后温度冷却至不影响菌生长的种层用培养基中，添加10⁴~10⁵个/mL的试验菌液，充分混合后，流入其8mL于培养皿中，水平静置固化作为检验用平板，按照以下所示的(1)或(2)的方法操作。

(1) 纸圆盘方法的检验用平板上，将浸渍试验溶液和0.2μg效价/mL土霉素标准溶液的纸圆盘风干约10分钟后，放置各纸圆盘于正方形的各对角顶点上，用镊子的前端轻轻固定。冷藏放置30分钟以上后，在30±1℃培养17±1小时。培养后，测定形成的抑菌圈直径，分别求得2处的平均值。

由试验溶液得到的抑菌圈直径（平均值）大于由0.2μg效价/mL土霉素标准溶液得到的抑菌圈直径（平均值），判断为阳性。此时，抑菌圈直径在14mm左右。

(2) 圆筒平板方法

在检验用平板上，放置4个圆筒于每个正方形的各顶点上，对角的2个圆筒中分别注入250μL试验溶液和0.2μg效价/mL土霉素标准溶液，在30±1℃培养17±1小时。培养后，测定形成的抑菌圈直径，分别求得2处的平均值。

由试验溶液得到的抑菌圈直径（平均值）大于由0.2μg效价/mL土霉素标准溶液得到的抑菌圈直径（平均值），判断为阳性。此时，抑菌圈直径在18mm左右。

4 其他 本方法的定量限，形成与0.2μg效价/mL的标准溶液同等的抑菌圈时，脂肪以外样品：0.04mg/kg，脂肪：0.01mg/kg。