

84年5月27日衛署食字第84027399號公告  
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正

食品中動物用藥殘留量檢驗方法—孟寧素之檢驗  
Method of Test for Veterinary Drug Residues in  
Food—Test for Monensin

鍵語：孟寧素(monensin)、生物分析法(bioassay)、生物自析鑑別法(bioautography)。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於生鮮牛肉及雞肉中孟寧素(monensin)之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 器具及材料：

2.1.1. 不鏽鋼圓筒 (Stainless cup or cylinder): 規格外徑 $8.0 \pm 0.1$  mm, 內徑 $6.0 \pm 0.1$  mm, 高 $10.0 \pm 0.1$  mm。

2.1.2. 圓筒置放器 (Cup dropper): 適用於可同時等高度投置六個不鏽鋼圓筒者(註)。  
註：若無本置放器，將不鏽鋼圓筒置於容器內滅菌，試驗時以滅菌過之鑷子取六個於間隔適當距離置於定量用培養基上。

2.1.3. 抗生素抑菌圈測讀計 (Antibiotic zone reader) (註)。

註：若無本測讀計，可使用游標尺精確測量。

2.1.4. 減壓濃縮裝置 (Rotary evaporator)。

2.1.5. 攪拌均質機 (Blender): 能適用於無菌操作者。

2.1.6. 離心分離機 (Centrifuge): 轉速可達3,000 rpm 者。

2.1.7. 微量吸管 (Micropipette): 可量取 $280 \mu\text{L}$  者。

2.1.8. 玻璃製方型平皿 (Glass square dish): 底皿需平坦，大小 $220 \text{ mm} \times 220 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ , 附皿蓋。

2.1.9. 薄層層析板 (TLC plate): 已劃槽之矽膠 (silica gel) 60A LK6D 玻璃層析板，大小 $20 \times 20 \text{ cm}$ , 厚度 $0.25 \text{ mm}$ , Whatman 或同級品。高效能矽膠 (high performance silica gel) 60 玻璃層析板，大小 $10 \times 10 \text{ cm}$ , 厚度 $0.2 \text{ mm}$ , Merck, 或同級品。

2.1.10. 展開槽 (Developing chamber): 玻璃製品槽底需平坦，供 TLC 板展開用。

2.1.11. 噴霧器 (Sprayer): 玻璃製品容量60或100 mL, 附送風球。

2.1.12. 培養箱 (Incubator): 能維持內部溫差在 $\pm 1.0^\circ\text{C}$  以內者。

2.1.13. 培養皿：內徑約9 cm, 深度 $1.5 \sim 1.8 \text{ cm}$ , 底皿之內外應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。

2.1.14. 乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達 $170^\circ\text{C}$  以上，並

維持該溫度 1 小時以上者。

2.1.15. 高壓滅菌蓋：培養基及稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用。  
(此滅菌溫度以 121°C 滅菌 15 分鐘以上)。

2.1.16. 微量注射器 (Microsyringe)：可量取 10  $\mu\text{L}$  者。

2.1.17. 培養瓶：容量為 300 mL。

2.2. 試藥：甲醇、正己烷 (n-hexane)、四氯化碳 (carbon tetrachloride)、乙酸乙酯 (ethylacetate)、硫酸、香蘭醛 (vanillin)、醋酸、異辛烷 (isooctane)、三乙胺 (triethylamine) 等均採用化學試藥級，孟寧素標準品。

2.3. 培養基：

2.3.1. 抗生素培養基 1 號 (Antibiotic medium 1) 之配製：

蛋白胨 (peptone)	6.0g
胰消化乾酪素 (pancreatic digest of casein)	4.0g
酵母抽出物 (yeast extract)	3.0g
牛肉抽出物 (beef extract)	1.5g
葡萄糖 (dextrose)	1.0g
洋菜 (agar)	15.0g
蒸餾水	1000mL

稱取上列各成分加水至 1000 mL，加熱至沸騰溶解之，將溶液冷至室溫並調整其 pH 值，使於 121°C 高壓滅菌 15 分鐘後 pH 為 6.5±0.1，作為種層培養基 (seed layer)。

2.3.2. 抗生素培養基 2 號 (Antibiotic medium 2) 之配製：

蛋白胨 (peptone)	6.0g
酵母抽出物 (yeast extract)	3.0g
牛肉抽出物 (beef extract)	1.5g
洋菜 (agar)	15.0g
蒸餾水	1000mL

稱取上列各成分加水至 1000 mL，加熱至沸騰溶解之，將溶液冷至室溫並調整其 pH 值，使於 121°C 高壓滅菌 15 分鐘後 pH 為 6.5±0.1，作為基層培養基 (base layer)。

2.4. 展開液：乙酸乙酯：異辛烷：醋酸：三乙胺 (200:6:0.4:0.2, V/V)。

2.5. 試驗菌 Bacillus subtilis ATCC6633 芽孢懸浮液之配製：ATCC6633 試驗菌種，先以抗生素培養基 1 號斜面培養，且至少每隔一星期移植更新一次並加

以保存之。於測定前先製備芽孢懸浮液，方法如下：將此菌種移植於新配製之抗生素培養基之1號斜面培養基上，於32~37°C培養16~24小時，經二次培養後，以滅菌生理食鹽水2~3mL收集菌體製成懸浮液，將所得之懸浮液接入貯有抗生素培養基1號300mL之培養瓶中，接入時可用滅菌之玻璃珠使菌體均勻分佈於培養基表面上，於32~37°C培養5~7日。待其產生芽孢後以生理食鹽水50mL，倒入培養瓶並藉玻璃珠之助，洗培養基表層上之菌層，洗液盛入離心管中離心，倒去離心管中之上清液，重新加入生理食鹽水70mL，再次洗滌後，將此懸浮菌液於65°C加熱三十分鐘。然後將此菌液以生理食鹽水洗滌二次。再於65°C加熱三十分鐘並洗滌後重新懸浮於生理食鹽水約100mL中，再以適量之生理食鹽水稀釋此懸浮液，使此懸浮液於580nm處之透射率為25% (1cm之貯液管)。此懸浮液應於5°C以下貯之，通常其貯存時間若超過六個月，即不再作為供試驗用。(此懸浮液之接種量應先依測定法作初步試驗，其量以接種於種層培養基100mL中能呈現明顯之抗生直徑為度)。測定當日按初步試驗結果於種層培養基加入約0.4mL之菌種懸浮液，充分混合，即得試驗用接種層液。

2.6.定量用培養基之製備：配製適量抗生素培養基1號，先經加熱溶解再滅菌取出，待冷卻至50°C左右再加入2.5.節之B. subtilis芽孢懸浮液，使每mL定量用培養基約含 $5.0 \times 10^6$ 個試驗芽胞菌。分裝10mL於每個培養皿，於平坦的一面自然凝固備用。

2.7.標準溶液之配製：稱取適量之孟寧素標準品於定量瓶中，以甲醇配製成1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，當做原液(stock solution) (應保存於冰箱內冷藏一個月內使用)。取適量之原液，置於定量瓶中，再以甲醇稀釋成0.05, 0.1, 0.25, 0.5及1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等五種不同濃度，其中0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 訂為參比濃度(reference concentration)。

#### 2.8.標準曲線之製作：

2.8.1.使用圓筒置放器將經滅菌之不銹鋼圓筒投放於定量用培養基上，每次投入6個圓筒(或以滅菌過之鑷子取滅菌不銹鋼圓筒，在定量用培養基上按60°圓心角放置六個圓筒)。

2.8.2.每一抗生素濃度溶液均取三個培養皿為一組，因此四種不同濃度(參比濃度除外)共需12個供定量用培養皿。

2.8.3.在每個定量用培養皿放置六個圓筒相間之三個圓筒內注入該標準液，其餘三個圓筒則注入參比濃度標準液。注入量為280 $\mu\text{L}$ 或適當量。

2.8.4.於36±1°C之恆溫箱中培養17±1小時後，以抗生素抑菌圈測讀計或游標尺測定其抑菌圈直徑之大小。

2.8.5.量取抗生素同一濃度之 9 個抑菌圈直徑及 9 個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算其平均值。

2.8.6.求取抗生素參比濃度 36 個抑菌圈直徑平均值，做為該抗生素標準曲線之修正點 (correction point)。

2.8.7.以抗生素之修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差數，做為該抗生素各個濃度抑菌圈直徑平均值之修正依據。

2.8.8.將修正過的該抗生素不同濃度之抑菌圈直徑修正值 (包括修正點) 在半對數函數紙上，繪出標準曲線。

2.8.9.該標準曲線最低濃度抗生素直徑計算值 (L) 及標準曲線最高濃度抗生素直徑計算值 (H) 可由下列公式計算出：

$$L = (3a+2b+c-e)/5$$

$$H = (3e+2d+c-a)/5$$

式中之 a、b、d、e 分別代表修正後由低至高各濃度抑菌圈直徑值，c 為 36 個參比濃度抑菌圈直徑之平均值(即為修正點)。

## 2.9. 檢液之調製：

2.9.1. 稱取 30 g 之樣品，加入甲醇 60 mL，均質後以 3,000 rpm, 5 分鐘離心分離，取上層液。

2.9.2. 沈渣加入 40 mL 甲醇再均質，離心分離後取上層液。

2.9.3. 合併 2 次上層液，加入氯仿 30 mL，振搖 5 分鐘，重覆此步驟 3 次，合併 3 次氯仿層，以減壓濃縮機濃縮 (40°C) 至乾涸。

2.9.4. 殘渣加入 2 mL 正己烷洗 3 次，以氮氣將正己烷洗出液吹乾，再加甲醇定容，作為檢液。

2.9.5. 將檢液分成二份，一份供作生物分析法 (bioassay) 之用，另一份供作生物自析鑑別法 (bioautography) 之用。

## 2.10. 生物分析法：

2.10.1. 用圓筒置放器將經滅菌之圓筒等高投放於定量用培養基上，每次投入 6 個圓筒。

2.10.2. 使用微量吸管定量吸取 2.9.5. 所述之樣品檢液 280  $\mu$ L，注入培養基上預置每間隔之 3 個圓筒內。

2.10.3. 於另外 3 個圓筒則分別注入孟寧素參比濃度之標準液各 280  $\mu$ L。

2.10.4. 每一樣品濃度溶液取三個平板作測試。

2.10.5. 於 36±1°C 恒溫箱中培養 17±1 小時後，以抗生素抑菌圈測讀計，測定樣品檢液 (共 9 個值) 及抗生素參比濃度 (共 9 個值) 之圓筒抑菌圈直徑平均值，並將結果紀錄。

2.10.6. 樣品無明顯抑菌圈 (直徑小於 9 mm) 表示該樣品無孟寧素殘留。若樣品有明

顯抑菌圈（直徑9 mm 以上）時，則繼續進行 2.11. 節生物自析鑑別法。

#### 2.11. 生物自析鑑別法：

- 2.11.1. 裁取適當大小之薄層層析板於距薄層層析板下端 3 公分處，分別設定樣品檢液及抗生素標準液之原點，點間距離為 2 公分。
- 2.11.2. 於設定之原點上，以微量注射器分別注入濃度25 ng/mL 之標準溶液及樣品檢液各10  $\mu$ L 於 TLC 板上，滴入原點之大小，以直徑5 mm 為原則。
- 2.11.3. 將 TLC 板放入展開槽中，以展開液展至原點上方 15 公分處，取出風乾至少 30 分鐘後，置於 80°C 烘箱，乾燥 5 小時，冷卻備用。
- 2.11.4. 取抗生素培養基 1 號100 mL，經滅菌後冷卻至50°C，加入適量 *B. subtilis* 芽孢懸浮液(添加量參照 2.6. 定量用培養基之製備)，充分搖勻後，注入已鋪有抗生素培養基 2 號60 mL，且經滅菌並冷卻之玻璃製方型平皿中，並於平坦之枱面上靜置固化。
- 2.11.5. 將風乾之 TLC 板密貼在上述方型平皿之培養基上，排除接觸面之氣泡，加皿蓋置於室溫下使其擴散至少 30 分鐘，移去 TLC 板。
- 2.11.6. 將方型平皿移入 36±1°C 之恆溫箱中培養 17±1 小時。
- 2.11.7. 以一透明膠紙放在培養基表面將各個原點及抑菌點之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。
- 2.11.8. 以尺量標準品及樣品抑菌點中心到原點之高度以求出  $R_f$  值，予以記錄。當樣品抑菌點之  $R_f$  值和孟寧素標準液之  $R_f$  值相同時，即可確認該種抗生素之殘留。
- 2.11.9. 再以該抗生素標準曲線之參比濃度來修正點修正生物分析法中該抗生素參比濃度之抑菌圈直徑平均值，並計算出該樣品抑菌圈直徑修正值，並依下列公式計算，以求得該樣品之抗生素實際殘留量。

$$\text{樣品抗生素殘留量 (ppm)} = S \div R$$

S：標準曲線上求得之樣品殘留該抗生素濃度 ( $\mu$  g/mL)。

R：該類空白樣品添加該種抗生素試驗平均回收率 (%)。

食品中動物用藥殘留檢驗方法—林可微素之檢驗  
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods – Test of Lincomycin

代碼：NLFDUALIN00

鍵語：林可微素、lincomycin、動物用藥殘留、veterinary drug residue、圓筒平板法、cylinder plate method、生物自析鑑別法、bioautography。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜等產品中殘留林可微素之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度為100呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。

2.2. 器具及材料：

- 2.2.1. 不鏽鋼圓筒：外徑 $8 \pm 0.1$  mm，內徑 $6 \pm 0.1$  mm，高 $10 \pm 0.1$  mm。
- 2.2.2. 生物分析盤(Nunc bioassay plate)：長24.3 cm，寬24.3 cm，厚1.8 cm。
- 2.2.3. 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長20 cm，寬20 cm，厚100 μm纖維素層析板。
- 2.2.4. 展開槽(Developing chamber)：玻璃製品，槽底需平坦，供薄層層析展開用。
- 2.2.5. 高壓滅菌釜(Autoclave)。
- 2.2.6. 微量吸管(Microliter pipetter)：20 μL、100 μL及200 μL。
- 2.2.7. 離心管(Centrifuge tube)：玻璃或塑膠製品，容量為50 mL。
- 2.2.8. 離心機(Centrifuge)：轉速可至3,000 x g者。
- 2.2.9. 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度1.5~1.8 cm，底皿之內外應平坦，無氣泡、刮傷或其它缺點。

2.2.10. 培養箱：能維持內部溫差在±1°C以內者。

2.2.11. 攪拌均質機(Homogenizer)。

2.2.12. 冰箱：能維持 $5 \pm 3$  °C者。

2.2.13. 吸管：已滅菌，1 mL者應有0.01 mL之刻度；5及10 mL者應有0.1 mL之刻度。

2.2.14. 乾熱滅菌器。

2.2.15. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。

2.2.16. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。

2.2.17. 振盪器(Shaker)。

2.2.18. 分光光度計

2.3. 試藥：正丙醇、吡啶(pyridine)、醋酸、甲醇、氯化鈉、氯仿、正己烷、無水磷酸氫二鉀、無水磷酸二氫鉀均採化學試藥級，林可微素對照標準品。

2.4. 試驗菌：*Micrococcus luteus* ATCC 9341。

2.5. 試驗菌液之製備：

將試驗菌繼代保存於斜面抗生素培養基1號，每週移植1次，於26~32°C 培養16~18小時。使用時，調其菌液濃度使於分光光度計580 nm之透光度為25%。添加於抗生素培養基5號後，於高倍稀釋之標準溶液(0.8 µg/g)呈現直徑約10 mm之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液(3.2 µg/g)呈現直徑約20~25 mm之抑菌圈。此試驗菌液於冰箱中保存不可超過2週。

2.6. 培養基：

2.6.1. 抗生素培養基1號(Antibiotic Medium 1)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後分裝於試管，於121°C 滅菌15分鐘作成斜面培養基，最終pH值為6.5 ± 0.1。

2.6.2. 抗生素培養基5號(Antibiotic Medium 5)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，於121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為7.9 ± 0.1。滅菌後待冷卻至約50°C，以0.2~0.5%之比例加入試驗菌液，混合均勻，於每培養皿分裝10 mL，生物分析盤則每只分裝200 mL，於平坦檯面自然凝固備用。

2.7. 展開液之配製：

正丙醇：吡啶：醋酸：水 = 15 : 10 : 3 : 12 (v/v)。

2.8. 磷酸鹽緩衝溶液之配製：

稱取無水磷酸氫二鉀6.2 g及無水磷酸二氫鉀13.3 g，溶解於蒸餾水並定容至1,000 mL，最終pH值為8.0 ± 0.1。

2.9. 標準溶液之配製：

取林可黴素對照標準品適量，精確稱定，以磷酸鹽緩衝溶液配製成1,000 µg/mL之標準原液(5°C下冷藏，15日內使用)。使用時，再以磷酸鹽緩衝溶液稀釋成0.2、0.4、0.8、1.6及3.2 µg/mL五種不同濃度供作標準溶液，其中0.8 µg/mL為參比濃度(reference concentration)。

2.10. 標準曲線之製作：

- 2.10.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按 $60^{\circ}$ 圓心角放置6個圓筒。
- 2.10.2. 每一濃度之林可黴素標準溶液均取含試驗菌之平板培養基三個為一組，於每個培養基上放置之6個圓筒相間之3個圓筒內注入標準溶液，其餘3個圓筒注入參比濃度標準溶液，注入量為 $280\text{ }\mu\text{L}$ 。四種標準溶液(參比濃度除外)共需12個含試驗菌之平板培養基。
- 2.10.3. 於 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 $17 \pm 1$ 小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。
- 2.10.4. 量取同一濃度標準溶液之9個抑菌圈直徑及9個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算其平均值。
- 2.10.5. 量取參比濃度36個抑菌圈直徑，計算其平均值，並以此作為該抗生素標準曲線之修正點(correction point)。
- 2.10.6. 以修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，調整各標準溶液抑菌圈直徑平均值，每一標準溶液因此可得一修正抑菌圈直徑平均值(如當修正點為 $20.0\text{ mm}$ ，參比濃度抑菌圈直徑平均值為 $19.8\text{ mm}$ ，二者之差為 $0.2\text{ mm}$ ，標準溶液抑菌圈直徑平均值若為 $17.0\text{ mm}$ ，則修正為 $17.2\text{ mm}$ )。
- 2.10.7. 在半對數函數紙上，以四種濃度之標準溶液修正抑菌圈直徑平均值及修正點為橫軸(自然數值)，濃度為縱軸(對數值)，繪出標準曲線(亦可利用電腦軟體繪出標準曲線)。
- 2.10.8. 該標準曲線最低濃度抑菌圈直徑平均值(L)及最高濃度抑菌圈直徑平均值(H)亦可由下列公式算出：

$$L = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$H = (3e + 2d + c - a)/5$$

a, b, d, e 為由低至高濃度標準溶液之修正抑菌圈直徑平均值，c為修正點。

2.11. 檢液之調製：

取切碎混勻後之檢體 $10\text{ g}$ ，加入甲醇 $12\text{ mL}$ ，以攪拌均質機均質30秒鐘後置離心管，再以甲醇 $2\text{ mL}$ 清洗均質機上之殘渣，重複洗兩次，收集洗液於離心管。以振盪器振搖30分鐘，再以 $700 \times g$ 離心10分鐘，取上層液至另一離心管，重複上述甲醇萃取步驟兩次，合併萃取液。萃取液以 $700 \times g$ 離心10分鐘，上層液倒入 $100\text{ mL}$ 濃縮瓶，加入氯化鈉 $100\text{ mg}$ ，於 $50^{\circ}\text{C}$ 水浴減壓濃縮至 $10\text{ mL}$ 。將濃縮液移入 $125\text{ mL}$ 分液漏斗，加入正己烷 $15\text{ mL}$ ，充分振盪，取下層液。重複此步驟一次，合併下層液，於 $50^{\circ}\text{C}$ 水浴中減壓濃縮至乾，殘留物以甲醇 $1\text{ mL}$ 溶出，供圓筒平板法或生物分析法用。

2.12. 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

- 2.12.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按60°圓心角放置6個圓筒。
- 2.12.2. 取上述培養基3個，使用微量吸管分別吸取檢液280  $\mu\text{L}$ 注入於每個培養皿之3個間隔圓筒內，另外3個圓筒內則分別注入參比濃度標準溶液280  $\mu\text{L}$ 。
- 2.12.3. 於36±1°C培養17±1小時後，測量檢液與抗生素參比濃度標準溶液之抑菌圈直徑。
- 2.12.4. 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於9 mm)表示無林可微素之殘留，有明顯抑菌圈(直徑9 mm以上)則繼續進行下述步驟。

2.13. 生物自析鑑別法(Bioautography)：

- 2.13.1. 於薄層層析板下端起3 cm基線處，分別設定檢液及林可微素標準溶液之原點，各點間距離為2 cm。
- 2.13.2. 於設定之原點上，以微量吸管分別點入檢液及林可微素標準溶液各30  $\mu\text{L}$ 於薄層層析板後吹乾。
- 2.13.3. 將薄層層析板放入展開槽中，以展開液展至原點上方約15 cm處，取出風乾至少30分鐘後，於80°C烘箱乾燥2小時後冷卻備用。
- 2.13.4. 將上述之薄層層析板密貼於裝有含試驗菌抗生素培養基之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋置於室溫下靜置30至60分鐘後移去薄層層析板。
- 2.13.5. 將上述之生物分析盤移入36±1°C培養17±1小時。
- 2.13.6. 以一透明膠紙放在生物分析盤表面，將各原點及抑菌圈之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。
- 2.13.7. 以測徑用游標尺量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之高度，以求出 $R_f$ 值( $R_f$ 值之計算為：抑菌圈中心至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當檢液抑菌圈之 $R_f$ 值和林可微素標準溶液之 $R_f$ 值相同時，即可確認為有林可微素之殘留。

2.14. 回收率試驗：

分別添加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 林可微素標準溶液20、40、80、160及320  $\mu\text{L}$ 於檢體20 g中，使添加濃度分別為0.1、0.2、0.4、0.8及1.6  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，做三重複試驗。依2.11調製檢液，再依2.12分別測量其抑菌圈直徑，並以下列公式求得檢體之回收率。

$$\text{各添加濃度之檢體回收率}(\%) = A / B \times 100\%$$

A：各添加濃度檢液之抑菌圈直徑平均值。

B：10倍於各添加濃度標準溶液抑菌圈直徑平均值。

檢體平均回收率為5個添加濃度檢體回收率之平均值。

2.15. 林可微素殘留量之計算：

以林可微素標準曲線之修正點和參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，  
修正檢液抑菌圈直徑平均值，以檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標  
準曲線求得檢體中林可微素殘留量。並以下列公式求得該檢體之林  
可微素實際殘留量。

$$\text{檢體中林可微素殘留量(ppm)} = S / R$$

S：由標準曲線求得之檢體林可微素量殘留(ppm)。

R：該類空白檢體添加林可微素試驗之平均回收率(%)。

備註：1.本檢驗方法之最低檢出含量為0.1ppm。

2.不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。

參考文獻：

1. Ragheb, H. S., Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feeds. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th ed., pp. 33-66, 42-43. Cunniff, P. ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
2. Neidert, E., Saschenbrecker, P. W., Tittiger, F. 1987. Thin Layer Chromatographic/Bioautographic Method for Identification of Antibiotic Residues in Animal Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl. 70(2): 197-200.
3. 王鳳英、張圓笙。1991。乳品、禽肉、豬肝中林可微素及健牠微素殘留之  
檢驗。藥物食品檢驗局調查研究年報。9：333-340。

食品中動物用藥殘留檢驗方法—紅黴素之檢驗  
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods – Test of Erythromycin

代碼：NLFDUAERY00

鍵語：紅黴素、erythromycin、動物用藥殘留、veterinary drug residue、圓筒平板法、cylinder plate method、生物自析鑑別法、bioautography。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜等產品中殘留紅黴素之檢驗。
2. 檢驗方法：
  - 2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度為100呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為每15分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。
  - 2.2. 器具及材料：
    - 2.2.1. 不鏽鋼圓筒：外徑  $8 \pm 0.1$  mm，內徑  $6 \pm 0.1$  mm，高  $10 \pm 0.1$  mm。
    - 2.2.2. 生物分析盤(Nunc bioassay plate)：長24.3 cm，寬24.3 cm，厚1.8 cm。
    - 2.2.3. 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長20 cm，寬20 cm，厚100  $\mu$ m 纖維素層析板。
    - 2.2.4. 展開槽(Developing chamber)：玻璃製品，槽底需平坦，供薄層層析展開用。
    - 2.2.5. 高壓滅菌釜(Autoclave)。
    - 2.2.6. 微量吸管(Microliter pipetter)：20  $\mu$ L、100  $\mu$ L及200  $\mu$ L。
    - 2.2.7. 離心管(Centrifuge tube)：玻璃或塑膠製品，容量為50 mL。
    - 2.2.8. 離心機(Centrifuge)：轉速可至3,000 x g 者。
    - 2.2.9. 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度1.5~1.8 cm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其它缺點。
    - 2.2.10. 培養箱：能維持內部溫差在± 1°C 以內者。
    - 2.2.11. 攪拌均質機(Homogenizer)。
    - 2.2.12. 冰箱：能維持5±3°C者。
    - 2.2.13. 吸管：已滅菌，1mL者應有0.01 mL之刻度；5及10 mL者應有0.1 mL之刻度。
    - 2.2.14. 乾熱滅菌器。
    - 2.2.15. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
    - 2.2.16. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。
    - 2.2.17. 振盪器(Shaker)。
    - 2.2.18. 分光光度計。
  - 2.3. 試藥：甲醇、氯仿、丙酮、吡啶、醋酸、無水磷酸二氫鉀、氫氧化鉀、氯化鈉均採化學試藥級，紅黴素月桂硫酸鹽(Erythromycin estolate)對照標準品。

2.4. 試驗菌：*Micrococcus luteus* ATCC 9341。

2.5. 試驗菌液之製備：

將試驗菌繼代保存於斜面抗生素培養基1號，每週移植1次，於26~32°C培養16~18小時。使用時，調其菌液濃度使於分光光度計580 nm透光度為25%，使添加於抗生素培養基5號後，於高倍稀釋之標準溶液(0.5 µg/mL)呈現直徑約10 mm之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液(2.0 µg/mL)呈現直徑約20~25 mm之抑菌圈。此試驗菌液於冰箱中保存不可超過2週。

2.6. 培養基：

2.6.1. 抗生素培養基1號(Antibiotic Medium 1)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後分裝於試管，於121°C滅菌15分鐘後做成斜面培養基，最終pH值為6.5 ± 0.1。

2.6.2. 抗生素培養基5號(Antibiotic Medium 5)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後於121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.9 ± 0.1。滅菌後冷卻至約50°C，以0.2~0.5%之比例加入試驗菌液，混合均勻，於每培養皿分裝10 mL，生物分析盤則每只分裝200 mL，於平坦檯面自然凝固備用。

2.7. 展開液之配製：

丙酮：吡啶：醋酸：水 = 15 : 10 : 3 : 12 (v/v)。

2.8. pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液之配製：

稱取無水磷酸二氫鉀13.3 g溶解於蒸餾水900 mL。另取氫氧化鉀6.2 g溶解於蒸餾水100 mL中，將兩液混合，最終pH值為8.0 ± 0.1。

2.9. 標準溶液之配製：

取紅微素月桂硫酸鹽對照標準品適量，精確稱定，以甲醇配製成1,000 µg/mL之標準原液(於5°C下，7日內使用)。使用時，再以pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液稀釋成0.5、1.0、2.0、4.0及8.0 µg/mL五種不同濃度供作標準溶液，其中2.0 µg/mL為參比濃度(reference concentration)。

2.10.標準曲線之製作：

- 2.10.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按60°圓心角放置6個圓筒。
- 2.10.2. 每一濃度之紅黴素標準溶液均取含試驗菌之平板培養基三個為一組，於每個培養基上放置之6個圓筒相間之3個圓筒內注入標準溶液，其餘3個圓筒注入參比濃度標準溶液，注入量為280  $\mu\text{L}$ 。四種標準溶液(參比濃度除外)共需12個含試驗菌之平板培養基。
- 2.10.3. 於36±1°C培養17±1小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。
- 2.10.4. 量取同一濃度標準溶液之9個抑菌圈直徑及9個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算其平均值。
- 2.10.5. 量取參比濃度36個抑菌圈直徑，計算其平均值，並以此作為該抗生素標準曲線之修正點(corrrection point)。
- 2.10.6. 以修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，調整各標準溶液抑菌圈直徑平均值，每一標準溶液因此可得一修正抑菌圈直徑平均值(如當修正點為20.0 mm，參比濃度抑菌圈直徑平均值為19.8 mm，二者之差為0.2 mm，標準溶液抑菌圈直徑平均值若為17.0 mm，則修正為17.2 mm)。
- 2.10.7. 在半對數函數紙上，以四種濃度之標準溶液修正抑菌圈直徑平均值及修正點為橫軸(自然數值)，濃度為縱軸(對數值)，繪出標準曲線(亦可利用電腦軟體繪出標準曲線)。
- 2.10.8. 該標準曲線最低濃度抑菌圈直徑平均值(L)及最高濃度抑菌圈直徑平均值(H)亦可由下列公式算出：

$$L = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$H = (3e + 2d + c - a)/5$$

a, b, d, e 為由低至高濃度標準溶液之修正抑菌圈直徑平均值，c為修正點。

2.11. 檢液之調製：

取切碎混勻後之檢體10 g，加入甲醇15 mL，以攪拌均質機均質30秒後置離心管中，再以甲醇2 mL清洗攪拌均質機上之殘渣，重複洗三次，合併洗液於離心管，以振盪器振搖30分鐘後，以 760 x g 離心10分鐘，取上層液至另一離心管，重複上述甲醇萃取步驟二次，合併萃取液。萃取液以 760 x g 離心10分鐘，上層液倒入100 mL濃縮瓶，加入氯化鈉 200 mg，於50°C水浴中減壓濃縮至3~4 mL，將濃縮液移入125 mL分液漏斗中，加氯仿25 mL，充分振盪。取氯仿層，並重複上述氯仿萃取步驟二次，合併氯仿層，於50°C水浴中減壓濃縮至乾。殘留物以甲醇1mL溶出，供圓筒平板法或生物分析法用。

2.12. 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

- 2.12.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按60°圓心角放置6個圓筒。
- 2.12.2. 取上述培養基3個，以微量吸管分別吸取檢液280  $\mu\text{L}$ 注入於每個培養皿之3個間隔圓筒內，另外3個圓筒內則分別注入參比濃度標準溶液280  $\mu\text{L}$ 。
- 2.12.3. 於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培養 $17 \pm 1$ 小時後，測量檢液與抗生素參比濃度溶液之抑菌圈直徑。
- 2.12.4. 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於9 mm)表示無紅黴素之殘留，有明顯抑菌圈(直徑9 mm以上)則繼續進行下述步驟。

2.13. 生物自析鑑別法 (Bioautography)：

- 2.13.1. 於薄層層析板下端起3 cm基線處，分別設定檢液及標準溶液之原點，各點間距離為2 cm。
- 2.13.2. 於設定之原點上，以微量吸管分別點入檢液及標準溶液各30  $\mu\text{L}$ 於薄層層析板後吹乾。
- 2.13.3. 將薄層層析板放入展開槽中，以展開液展開至原點上方約15 cm處，取出風乾至少30分鐘後，於 $80^\circ\text{C}$ 烘箱乾燥2小時後冷卻備用。
- 2.13.4. 將上述之薄層層析板密貼於裝有含試驗菌培養基之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋置於室溫下靜置30至60分鐘後移去薄層層析板。
- 2.13.5. 將上述之生物分析盤於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培養 $17 \pm 1$ 小時。
- 2.13.6. 以一透明膠紙放在生物分析盤表面，將各原點及抑菌圈之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。
- 2.13.7. 以測徑用游標尺量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之高度，求出 $R_f$ 值( $R_f$ 值之計算為：抑菌圈中心至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當檢液抑菌圈之 $R_f$ 值和紅黴素標準溶液之 $R_f$ 值相同時，即可確認為有紅黴素之殘留。

2.14. 回收率試驗：

分別添加1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  紅黴素標準溶液5、10、20、40及80  $\mu\text{L}$ 於檢體10 g中，使添加濃度分別為0.05、0.1、0.2、0.4及0.8  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，做三重複試驗。依2.11調製檢液，再依2.12分別測量其抑菌圈直徑，並以下列公式求得檢體之回收率。

各添加濃度之檢體回收率(%) = A / B × 100%

A：各添加濃度之檢液所產生之抑菌圈直徑平均值。

B：10倍於各添加濃度之標準溶液所產生之抑菌圈直徑平均值。

檢體平均回收率為5個添加濃度檢體回收率之平均值。

### 2.15. 紅黴素殘留量之計算：

以紅黴素標準曲線之修正點和參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，修正檢液抑菌圈直徑平均值，以檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標準曲線求得檢體中紅黴素殘留量，並以下列公式求得該檢體之紅黴素實際殘留量。

$$\text{檢體中紅黴素殘留量(ppm)} = S / R$$

S：由標準曲線求得之檢體紅黴素殘留量(ppm)。

R：該類空白檢體添加紅黴素試驗之平均回收率(%)。

備註：1.本檢驗方法之最低檢出含量為0.05 ppm。

2.不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。

### 參考文獻：

1. 經濟部中央標準局。1983。飼料添加物檢驗法—抗生素之微生物學測定通則。中國國家標準總號902，類號N4098。
2. 經濟部中央標準局。1988。肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗法。中國國家標準總號12322，類號N6209。
3. 經濟部中央標準局。1996。食品中動物用藥殘留量檢驗方法—孟寧素之檢驗。中國國家標準總號13630，類號N6281。
4. 日本厚生省生活衛生局乳肉衛生課。1990。畜水產食品中の殘留物質検査法。第27頁。
5. 張圓笙、蔡淑貞、鄭崇明、蘇婷、張洳楣、洪其壁、陳陸宏。1989。食品中青黴素、鏈黴素、紅黴素、新黴素等殘留之檢驗方法探討。食品科學。16:414-424。
6. Ragheb, H. S., Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feeds. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th ed., pp. 33-36, 49. Cunniff, P. ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
7. Maturin, L. J., Peeler, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count. In "FDA Bacteriological Analytical Manual." 8th ed., pp. 3.01-3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

## 食品中動物用藥殘留檢驗方法—泰黴素之檢驗

### Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods – Test of Tylosin

代碼：NLFDUATYL00

鍵語：泰黴素、tylosin、動物用藥殘留、veterinary drug residue、圓筒平板法、cylinder plate method、生物自析鑑別法、bioautography。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜等產品中殘留泰黴素之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度為100呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。

2.2. 器具及材料：

2.2.1. 不鏽鋼圓筒：外徑 $8 \pm 0.1$  mm，內徑 $6 \pm 0.1$  mm，高 $10 \pm 0.1$  mm。

2.2.2. 生物分析盤(Nunc bioassay plate)：長24.3 cm，寬24.3 cm，厚1.8 cm。

2.2.3. 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長20 cm，寬20 cm，厚100 μm纖維素層析板。

2.2.4. 展開槽(Developing chamber)：玻璃製品，槽底需平坦，供薄層層析展開用。

2.2.5. 高壓滅菌釜(Autoclave)。

2.2.6. 微量吸管(Microliter pipetter)：20 μL、100 μL及200 μL。

2.2.7. 離心管(Centrifuge tube)：玻璃或塑膠製品，容量為50 mL。

2.2.8. 離心機(Centrifuge)：轉速可至3,000 × g者。

2.2.9. 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度1.5~1.8 cm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其它缺點。

2.2.10. 培養箱：能維持內部溫差在±1°C以內者。

2.2.11. 攪拌均質機(Homogenizer)。

2.2.12. 冰箱：能維持 $5 \pm 3$  °C者。

2.2.13. 吸管：已滅菌，1mL者應有0.01 mL之刻度；5及10 mL者應有0.1 mL之刻度。

2.2.14. 乾熱滅菌器。

2.2.15. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。

2.2.16. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。

2.2.17. 振盪器(Shaker)。

2.2.18. 分光光度計。

2.3. 試藥：甲醇、氯仿、無水磷酸二氫鉀、氫氧化鉀、氯化鈉均採化學試藥級，酒石酸泰黴素(Tylosin tartrate)對照標準品。

2.4. 試驗菌：*Micrococcus luteus* ATCC 9341

2.5. 試驗菌液之製備：

將試驗菌繼代保存於斜面抗生素培養基1號，每週移植1次，於26~32°C培養16~18小時。使用時，調其菌液濃度使於分光光度計580 nm透光度為25%，使添加於抗生素培養基5號後，於高倍稀釋之標準溶液(0.2 µg/mL)呈現直徑約10 mm之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液(0.8 µg/mL)呈現直徑20~25 mm之抑菌圈。此試驗菌液於冰箱中保存不可超過2週。

2.6. 培養基：

2.6.1. 抗生素培養基1號(Antibiotic Medium 1)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後分裝於試管中，於121°C滅菌15分鐘後做成斜面培養基，最終pH值為6.5 ± 0.1。

2.6.2. 抗生素培養基5號(Antibiotic Medium 5)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後於121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.9 ± 0.1。滅菌後冷卻至約50°C，以0.2~0.5%之比例加入試驗菌液，混合均勻，於每培養皿分裝10 mL，生物分析盤則每只分裝200 mL，於平坦檯面自然凝固備用。

2.7. 展開液之配製：

氯仿：甲醇 = 9 : 1 (v/v)

2.8. pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液之配製：

稱取無水磷酸二氫鉀13.3 g溶解於蒸餾水900 mL，另取氫氧化鉀6.2 g溶解於蒸餾水100 mL，將兩液混合，最終pH值為8.0 ± 0.1。

2.9. 標準溶液之配製：

取酒石酸泰黴素對照標準品適量，精確稱定，以少量甲醇溶解後，再以蒸餾水配製成1,000 µg/mL之標準原液(5°C以下，7日內使用)。使用時，再以pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液稀釋成0.2、0.4、0.8、1.6及3.2 µg/mL五種不同濃度供作標準溶液，其中0.8 µg/mL為參比濃度(reference concentration)。

2.10.標準曲線之製作：

- 2.10.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按 $60^{\circ}$ 圓心角放置6個圓筒。
- 2.10.2. 每一濃度之泰黴素標準溶液均取含試驗菌之平板培養基三個為一組，於每個培養基上放置之6個圓筒相間之3個圓筒內注入標準溶液，其餘3個圓筒注入參比濃度標準溶液，注入量為 $280 \mu\text{L}$ 。四種標準溶液(參比濃度除外)共需12個含試驗菌之平板培養基。
- 2.10.3. 於 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 $17 \pm 1$ 小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。
- 2.10.4. 量取同一濃度標準溶液之9個抑菌圈直徑及9個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算其平均值。
- 2.10.5. 量取參比濃度36個抑菌圈直徑，計算其平均值，並以此作為該抗生素標準曲線之修正點(corrrection point)。
- 2.10.6. 以修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，調整各標準溶液抑菌圈直徑平均值，每一標準溶液因此可得一修正抑菌圈直徑平均值(如當修正點為 $20.0 \text{ mm}$ ，參比濃度抑菌圈直徑平均值為 $19.8 \text{ mm}$ ，二者之差為 $0.2 \text{ mm}$ ，標準溶液抑菌圈直徑平均值若為 $17.0 \text{ mm}$ ，則修正為 $17.2 \text{ mm}$ )。
- 2.10.7. 在半對數函數紙上，以四種濃度之標準溶液修正抑菌圈直徑平均值及修正點為橫軸(自然數值)，濃度為縱軸(對數值)，繪出標準曲線(亦可利用電腦軟體繪出標準曲線)。
- 2.10.8. 該標準曲線最低濃度抑菌圈直徑平均值(L)及最高濃度抑菌圈直徑平均值(H)亦可由下列公式算出：

$$L = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$H = (3e + 2d + c - a)/5$$

a, b, d, e 為由低至高濃度標準溶液之修正抑菌圈直徑平均值，c為修正點。

2.11. 檢液之調製：

取切碎混勻之檢體 $10 \text{ g}$ ，加入甲醇 $15 \text{ mL}$ ，以攪拌均質機均質30秒後置離心管中，再以甲醇 $2 \text{ mL}$ 清洗均質機上之殘渣，重複洗三次，合併洗液於離心管，以振盪器振搖30分鐘後，再以 $760 \times g$ 離心10分鐘，取上層液至另一離心管，重複上述甲醇萃取步驟二次，合併萃取液。萃取液以 $760 \times g$ 離心10分鐘，上層液倒入 $100 \text{ mL}$ 濃縮瓶，加入氯化鈉 $200 \text{ mg}$ ，於 $50^{\circ}\text{C}$ 水浴減壓濃縮至 $3\sim4 \text{ mL}$ ，將濃縮液移入 $125 \text{ mL}$ 分液漏斗中，加氣仿 $25 \text{ mL}$ ，充分振盪。取氣仿層，並重複上述氣仿萃取步驟二次，合併氣仿層，於 $50^{\circ}\text{C}$ 水浴中減壓濃縮至乾。殘留物以甲醇 $1 \text{ mL}$ 溶出；供圓筒平板法或生物分析法用。

2.12. 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

- 2.12.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按60°圓心角放置6個圓筒。
- 2.12.2. 取上述培養基3個，使用微量吸管分別吸取檢液 280  $\mu\text{L}$ 注入於每個培養皿之3個間隔圓筒內，另外3個圓筒內則分別注入參比濃度標準溶液280  $\mu\text{L}$ 。
- 2.12.3. 於36 ± 1°C 培養17 ± 1小時後，測量檢液與抗生素參比濃度溶液之抑菌圈直徑。
- 2.12.4. 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於9 mm)表示無泰黴素之殘留，有明顯抑菌圈(直徑9 mm以上)則繼續進行下述步驟。

2.13. 生物自析鑑別法 (Bioautography)：

- 2.13.1. 於薄層層析板下端起3 cm基線處，分別設定檢液及標準溶液之原點，各點間距離為2 cm。
- 2.13.2. 於設定之原點上，以微量吸管分別點入檢液及標準溶液各30  $\mu\text{L}$ 於薄層層析板後吹乾。
- 2.13.3. 將薄層層析板放入展開槽中，以展開液展開至原點上方約15 cm處，取出風乾至少30分鐘後，於80°C 烘箱乾燥2小時後冷卻備用。
- 2.13.4. 將上述之薄層層析板密貼於裝有含試驗菌培養基之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋於室溫下靜置30至60分鐘後移去薄層層析板。
- 2.13.5. 將上述之生物分析盤於36 ± 1°C 培養17 ± 1小時。
- 2.13.6. 以一透明膠紙放在生物分析盤表面，將各原點及抑菌圈之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。
- 2.13.7. 以測徑用游標尺量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之高度，求出 $R_f$ 值 ( $R_f$ 值之計算為：抑菌圈中心至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當檢液抑菌圈之 $R_f$ 值和泰黴素標準溶液之 $R_f$ 值相同時，即可確認為有泰黴素之殘留。

2.14. 回收率試驗：

分別添加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  泰黴素標準溶液 10、20、40、80及160  $\mu\text{L}$  於檢體10 g 中，使添加濃度分別為0.1、0.2、0.4、0.8及1.6  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，做三重複試驗。依2.11調製檢液，再依2.12分別測量其抑菌圈直徑，並以下列公式求得檢體之回收率。

$$\text{各添加濃度之檢體回收率}(\%) = A / B \times 100\%$$

A：各添加濃度之檢液所產生之抑菌圈直徑平均值。

B：10倍於各添加濃度之標準溶液所產生之抑菌圈直徑平均值。

檢體平均回收率為5個添加濃度樣品回收率之平均值。

2.15. 泰黴素殘留量之計算：

以泰黴素標準曲線之修正點和參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，修正檢液抑菌圈直徑平均值，以檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標準曲線求得檢體中泰黴素殘留量，並以下列公式求得該檢體之泰黴素實際殘留量。

$$\text{檢體中泰黴素殘留量(ppm)} = S / R$$

S：由標準曲線求得之檢體泰黴素殘留量(ppm)。

R：該類空白檢體添加泰黴素試驗之平均回收率(%)。

備註：1. 本檢驗方法之最低檢出含量為0.1 ppm。

2. 不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。

參考文獻：

1. 經濟部中央標準局。1983。飼料添加物檢驗法—抗生素之微生物學測定法通則。中國國家標準總號9028，類號N4098。
2. 經濟部中央標準局。1988。肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗法。中國國家標準總號12322，類號N6209。
3. 經濟部中央標準局。1996。食品中動物用藥殘留量檢驗方法—孟寧素之檢驗。中國國家標準總號13630，類號N6281。
4. 日本厚生省生活衛生局乳肉衛生課。1990。畜水產食品中の殘留物検査法。
5. 張圓笙、蔡淑貞、鄭崇明、蘇婷、張洳楣、洪其壁、陳陸宏。1989。食品中青黴素、鏈黴素、紅黴素、新黴素等殘留之檢驗方法探討。食品科學。16:414-424。
6. Ragheb, H. S., Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feeds. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th ed., pp. 33-36, 49. Cunniff, P. ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
7. Maturin, L. J., Peeler, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count. In "FDA Bacteriological Analytical Manual." 8th ed., pp. 3.01-3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

食品中動物用藥殘留檢驗方法—新黴素之檢驗  
Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods – Test of Neomycin

代碼：NLFDUANE000

鍵語：新黴素、neomycin、動物用藥殘留、veterinary drug residue、圓筒平板法、cylinder plate method、生物自析鑑別法、bioautography。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜等產品中殘留新黴素之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞，潔淨，光線良好(操作平臺光度為100呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為每15分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。

2.2. 器具及材料：

- 2.2.1. 不鏽鋼圓筒：外徑 $8 \pm 0.1$  mm，內徑 $6 \pm 0.1$  mm，高 $10 \pm 0.1$  mm。
- 2.2.2. 生物分析盤(Nunc bioassay plate)：長24.3 cm，寬24.3 cm，厚1.8 cm。
- 2.2.3. 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長20 cm，寬20 cm，厚250  $\mu$ m 砂膠層析板。
- 2.2.4. 展開槽(Developing chamber)：玻璃製品，槽底需平坦，供薄層層析展開用。
- 2.2.5. 高壓滅菌釜(Autoclave)。
- 2.2.6. 微量吸管(Microliter pipetter)：20  $\mu$ L、100  $\mu$ L及200  $\mu$ L。
- 2.2.7. 離心管(Centrifuge tube)：玻璃或塑膠製品，容量為50 mL。
- 2.2.8. 離心機(Centrifuge)：轉速可至3,000 x g 者。
- 2.2.9. 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度1.5~1.8 cm，底皿之內外應平坦，無氣泡、刮傷或其它缺點。
- 2.2.10. 培養箱：能維持內部溫差在  $\pm 1^\circ\text{C}$  以內者。
- 2.2.11. 攪拌均質機(Homogenizer)。
- 2.2.12. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^\circ\text{C}$  者。
- 2.2.13. 吸管：已滅菌，1 mL者應有0.01 mL之刻度；5及10 mL者應有0.1 mL之刻度。
- 2.2.14. 乾熱滅菌器。
- 2.2.15. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。
- 2.2.16. 分光光度計。
- 2.2.17. 真空烘箱。
- 2.2.18. 培養瓶:500 mL。

2.3. 試藥：無水磷酸二氫鉀、無水磷酸氫二鉀、氯化鈉、氫氧化鉀均採化學試藥級，硫酸新黴素（Neomycin sulfate）對照標準品。

2.4. 試驗菌：*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228。

2.5. 試驗菌液之製備：

將試驗菌繼代保存於斜面抗生素培養基1號，每週移植1次，於26~32°C 培養16~18小時。使用時，調其菌液濃度使於分光光度計580 nm之透光度為25%，使添加於種層培養基後，於高倍稀釋之標準溶液(0.3 μg/mL)呈現直徑約10 mm之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液(1.2 μg/mL)呈現直徑約20~25 mm之抑菌圈。此試驗菌液於冰箱中保存不可超過2週。

2.6. 培養基：

2.6.1. 抗生素培養基1號(Antibiotic Medium 1)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後分裝於試管，於121°C 滅菌15分鐘後做成斜面培養基，最終pH值為6.5 ± 0.1。

2.6.2. 抗生素培養基11號(Antibiotic Medium 11)

蛋白胨(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為8.0 ± 0.1。滅菌後待冷卻至約48°C，以1%之比例加入試驗菌液，混合均勻於每 培養皿分裝10 mL，生物分析盤則每只分裝200 mL，於平坦檯面自然凝固備用。

2.7. 展開液之配製：

稱取無水磷酸氫二鉀 68 g 及無水磷酸二氫鉀 20 g，溶解於蒸餾水，並定容至1,000 mL，最終pH值為7.0 ± 0.1。

2.8. 緩衝溶液之配製：

2.8.1. 磷酸鹽緩衝溶液I：

稱取無水磷酸氫二鉀 1.046 g 及無水磷酸二氫鉀 33.46 g，溶解於蒸餾水並定容至1,000 mL，最終pH值為8.0 ± 0.1。

### 2.8.2. 磷酸鹽緩衝溶液II：

稱取氫氧化鉀 6.2 g 及無水磷酸二氂鉀 13.3 g，溶解於蒸餾水並定容至1,000 mL，最終pH值為8.0±0.1。

### 2.9. 標準溶液之配製：

取經 60°C，5 mm 水銀柱壓力真空烘箱內乾燥 3 小時之硫酸新黴素對照標準品適量，以磷酸鹽緩衝溶液 II 配製成1,000 µg/mL 作為標準原液 (5°C下冷藏，15日內使用)。使用時，再以磷酸鹽緩衝溶液 II 稀釋成 0.125、0.25、0.5、1.0及 2.0 µg/mL 五種不同濃度供作標準溶液，其中0.5 µg/mL為參比濃度(reference concentration)。

### 2.10. 標準曲線之製作：

- 2.10.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之平板培養基上，按60°圓心角放置6個圓筒。
- 2.10.2. 每一濃度之新黴素標準溶液均取含試驗菌之平板培養基三個為一組，於每個培養基上放置之6個圓筒相間之3個圓筒內注入標準溶液，其餘3個圓筒注入參比濃度標準溶液，注入量為280 µL。四種標準溶液(參比濃度除外)共需12個含試驗菌之平板培養基。
- 2.10.3. 於32±1°C 培養17±1小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。
- 2.10.4. 量取同一濃度標準溶液之9個抑菌圈直徑及9個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算其平均值。
- 2.10.5. 量取參比濃度36個抑菌圈直徑，計算其平均值，並以此作為該抗生素標準曲線之修正點(correction point)。
- 2.10.6. 以修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，調整各標準溶液抑菌圈直徑平均值，每一標準溶液因此可得一修正抑菌圈直徑平均值(如當修正點為20.0 mm，參比濃度抑菌圈直徑平均值為19.8 mm，二者之差為0.2 mm，標準溶液抑菌圈直徑平均值若為17.0 mm，則修正為17.2 mm)。
- 2.10.7. 在半對數函數紙上，以四種濃度之標準溶液修正抑菌圈直徑平均值及修正點為橫軸(自然數值)，濃度為縱軸(對數值)，繪出標準曲線(亦可利用電腦軟體繪出標準曲線)。
- 2.10.8. 該標準曲線最低濃度抑菌圈直徑平均值(L)及最高濃度抑菌圈直徑平均值(H)亦可由下列公式算出：

$$L = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$H = (3e + 2d + c - a)/5$$

a, b, d, e 為由低至高濃度標準溶液之修正抑菌圈直徑平均值，c為修正點。

### 2.11. 檢液之調製：

取切碎混勻後之檢體10 g，加入磷酸鹽緩衝溶液I 10 mL，以攪拌均質機均質後，振盪萃取30分鐘，以 1,710 x g 離心10分鐘，取上層液供作檢液。

2.12.圓筒平板法(Cylinder plate method)：

- 2.12.1. 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之抗生素平板培養基上，按 $60^\circ$ 圓心角放置6個圓筒。
- 2.12.2. 取上述培養皿3個，使用微量吸管分別吸取檢液 $280\text{ }\mu\text{L}$ 注入於每個培養皿之3個間隔圓筒內，另外3個圓筒內則分別注入參比濃度標準溶液 $280\text{ }\mu\text{L}$ 。
- 2.12.3. 於 $32 \pm 1^\circ\text{C}$  培養 $17 \pm 1$ 小時後，測量檢液與抗生素參比濃度溶液之抑菌圈直徑。
- 2.12.4. 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於 $9\text{ mm}$ )表示無新微生物之殘留；有明顯抑菌圈(直徑 $9\text{ mm}$ 以上)則繼續進行下述步驟。

2.13.生物自析鑑別法 (Bioautography)：

- 2.13.1. 於薄層層析板下端起 $3\text{ cm}$ 基線處，分別設定檢液及新微生物標準溶液之原點，各點間距離為 $2\text{ cm}$ 。
- 2.13.2. 於設定之原點上，以微量吸管分別點入檢液及新微生物標準溶液各 $30\text{ }\mu\text{L}$ 於薄層層析板後吹乾。
- 2.13.3. 將薄層層析板放入展開槽中，以展開液展至原點上方約 $15\text{ cm}$ 處，取出風乾至少30分鐘後，於 $80^\circ\text{C}$ 烘箱乾燥2小時後冷卻備用。
- 2.13.4. 將上述之薄層層析板密貼於裝有含試驗菌抗生素平板培養基之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋置於室溫下靜置30至60分鐘後，移去薄層層析板。
- 2.13.5. 將上述之生物分析盤於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培養 $17 \pm 1$ 小時。
- 2.13.6. 以一透明膠紙放在生物分析盤表面，將各原點及抑菌圈之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。
- 2.13.7. 以測徑用游標尺量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之高度，以求出 $R_f$ 值( $R_f$ 值之計算為：抑菌圈中心至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當檢液抑菌圈之 $R_f$ 值和新微生物標準溶液之 $R_f$ 值相同時，即可確認為有新微生物之殘留。

2.14.回收率試驗：

分別添加 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 新微生物標準溶液 $20\text{ }、40\text{ }、80\text{ }、160$ 及 $320\text{ }\mu\text{L}$ 於檢體 $10\text{ g}$ 中，使添加濃度分別為 $0.2\text{ }、0.4\text{ }、0.8\text{ }、1.6$ 及 $3.2\text{ }\mu\text{g/g}$ ，做三重複試驗。依2.11調製檢液，再依2.12分別測量其抑菌圈直徑，並以下列公式計算檢體之回收率。

$$\text{各添加濃度之檢體回收率} (\%) = A / B \times 100\%$$

A：各添加濃度之檢液所產生之抑菌圈直徑平均值。

B：各添加濃度之標準溶液所產生之抑菌圈直徑平均值。

檢體平均回收率為5個添加濃度檢體回收率之平均值。

### 2.15. 新黴素殘留量之計算：

以新黴素標準曲線之修正點和參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，修正檢液抑菌圈直徑平均值。以檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標準曲線求得檢體中新黴素殘留量。並以下列公式求得該檢體之新黴素實際殘留量。

$$\text{檢體中新黴素殘留量(ppm)} = S / R$$

S：由標準曲線求得之檢體新黴素殘留量 (ppm)。

R：該類空白檢體添加新黴素試驗之平均回收率(%)。

備註：1. 本檢驗方法之最低檢出含量為0.2 ppm。

2. 不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。

### 參考文獻：

1. 經濟部中央標準局。1983。飼料添加物檢驗法—抗生素之微生物學測定法通則。中國國家標準總號902，類號N4098。
2. 日本厚生省生活衛生局乳肉衛生課。1990。畜水產食品中の殘留物質検査法。第19頁。
3. 張圓笙、蔡淑貞、鄭崇明、蘇婷、張洳楣、洪其璧、陳陸宏。(1989)。食品中青黴素、鏈黴素、紅黴素、新黴素等殘留之檢驗方法探討。食品科學。16：414-424。
4. Ragheb, H. S., Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feeds. In "Official Methods of Analysis of AOAC International." 16th ed., pp. 33-36, 45C-45D. Cunniff, P. ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
5. Maturin, L. J., Peeler, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count, In "FDA Bacteriological Analytical Manual". 8th ed., pp.3.01-3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.

食品中動物用藥殘留檢驗方法—鏈黴素之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods – Test of Streptomycin

鍵語：鏈黴素、streptomycin、動物用藥殘留、veterinary drug residue、圓筒平板法、cylinder plate method、生物自析鑑別法、bioautography。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜肉、內臟及其製品中殘留鏈黴素之檢驗。

2. 檢驗方法：

2.1 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度為 100 呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。

2.2 器具及材料：

- 2.2.1 不鏽鋼圓筒：外徑  $8 \pm 0.1$  mm，內徑  $6 \pm 0.1$  mm，高  $10 \pm 0.1$  mm。
- 2.2.2 生物分析盤(Bioassay plate)：長 24.3 cm，寬 24.3 cm，厚 1.8 cm。
- 2.2.3 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長 20 cm，寬 20 cm，厚 250  $\mu\text{m}$  砂膠層析板。
- 2.2.4 展開槽(Developing chamber)：玻璃製品，槽底需平坦，供薄層層析板展開用。
- 2.2.5 高壓滅菌釜(Autoclave)。
- 2.2.6 微量吸管(Micropipette)：20  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$  及 200  $\mu\text{L}$ 。
- 2.2.7 離心管(Centrifuge tube)：玻璃或塑膠製品，容量為 50 mL。
- 2.2.8 離心機(Centrifuge)：轉速可至 3,000  $\times g$  者。
- 2.2.9 培養皿：已滅菌，內徑約 9 cm，深度 1.5~1.8 cm，底皿之內外面應平坦、無氣泡、刮傷或其它缺點。
- 2.2.10 培養箱：能維持內部溫差在  $\pm 1^\circ\text{C}$  以內者。
- 2.2.11 攪拌均質機(Homogenizer)。
- 2.2.12 冰箱：能維持  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  者。
- 2.2.13 吸管：已滅菌，1 mL 者應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 者應有 0.1 mL 之刻度。
- 2.2.14 培養瓶：500 mL。
- 2.2.15 乾熱滅菌器。
- 2.2.16 測徑用游標尺(Vernier calipers)。
- 2.2.17 真空烘箱。
- 2.2.18 振盪器(Shaker)。
- 2.2.19 分光光度計。
- 2.2.20 COOH 型萃取管柱(Carboxylic acid extraction column)：500 mg。

90年7月16日衛署食字第0900047004號公告  
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正

- 2.3 試藥：無水磷酸二氫鉀、無水磷酸氫二鉀、無水磷酸氫二鈉、檸檬酸(citric acid)、EDTA-二鈉鹽(disodium ethylenediaminetetraacetate)、硫酸錳( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )、正己烷、氯仿、氫氧化鈉、甲醇、鹽酸均採化學試藥級，硫酸鏈黴素(Streptomycin sulfate)對照標準品。
- 2.4 試驗菌：*Bacillus subtilis* ATCC 6633。

- 2.5 *B. subtilis* ATCC 6633 孢子懸浮液之製備：
- 試驗菌保存於抗生素培養基 1 號斜面，製備芽孢懸浮液時，將試驗菌移植於新配製之斜面抗生素培養基 1 號，於 32~37°C 培養 16~24 小時。經連續培養二次後，以無菌生理食鹽水 2~3 mL 沖洗斜面收集菌體，製成懸浮液。將所得懸浮液接種於裝有抗生素培養基 32 號 300 mL 之培養瓶中，接種時可使用已滅過菌之玻璃珠使菌體均勻分佈於培養基表面，於 32~37°C 培養 5~7 日後，倒入無菌生理食鹽水 50 mL。藉玻璃珠之助，刮洗培養基表層之菌體，取洗液至離心管中離心，棄上層液，續加入無菌生理食鹽水 70 mL，混合均勻。此混合液於 65°C 加熱 30 分鐘後，離心，將菌體以無菌生理食鹽水洗滌及離心二次後製成懸浮液，再於 65 °C 加熱 30 分鐘，離心，加入無菌生理食鹽水 100 mL 作成孢子懸浮液。使用時，以適量之無菌生理食鹽水稀釋，取分光光度計 580 nm 下透光度為 25% 之懸浮液。

2.6 培養基：

2.6.1 抗生素培養基 1 號(Antibiotic Medium 1)

蛋白餌(Peptone)	6.0 g
胰消化乾酪素(Pancreatic digest of casein)	4.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
葡萄糖(Dextrose)	1.0 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後分裝於試管或培養瓶，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $6.5 \pm 0.1$ 。

2.6.2 抗生素培養基 32 號(Antibiotic Medium 32)

於抗生素培養基 1 號 1,000 mL 中加入硫酸錳( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) 0.3 g，加熱溶解後，每培養瓶分裝 300 mL，於 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

### 2.6.3 抗生素培養基 5 號(Antibiotic Medium 5)

蛋白餌(Peptone)	6.0 g
酵母抽出物(Yeast extract)	3.0 g
牛肉抽出物(Beef extract)	1.5 g
洋菜(Agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.9±0.1。滅菌後冷卻至約 50°C，以 0.1% 之比例加入試驗菌株孢子懸浮液，混合均勻，培養皿每只分裝 10 mL，生物分析盤則每只分裝 200 mL，於平坦檯面自然凝固備用。

### 2.7 展開液之配製：

稱取無水磷酸氫二鉀 68 g 及無水磷酸二氫鉀 20 g 溶解於蒸餾水，並定容至 1000 mL，最終 pH 值為 7.0±0.1。

### 2.8 緩衝溶液之配製：

2.8.1 0.1 M 檸檬酸溶液：稱取檸檬酸 2.1 g，以蒸餾水溶解後定容 100 mL。

2.8.2 0.2 M 磷酸氫二鈉溶液：稱取無水磷酸氫二鈉 2.84 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL。

2.8.3 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液：

取 0.1 M 檸檬酸溶液 12.3 mL 和 0.2 M 磷酸氫二鈉溶液 7.7 mL 混合後，調整 pH 至 4.0，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.8.4 含 0.01 M EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液：

取 EDTA-二鈉鹽 3.72 g，以 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液溶解後定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.8.5 pH 3.0 MacIlvaine 緩衝溶液：

取 0.1 M 檸檬酸溶液 15.9 mL 和 0.2 M 磷酸氫二鈉溶液 4.1 mL 混合後，調整 pH 至 3.0，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.8.6 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液之配製：

稱取無水磷酸氫二鉀 16.73 g 及無水磷酸二氫鉀 0.523 g 溶於蒸餾水，並定容至 1000 mL，最終 pH 值為 8.0±0.1。

### 2.9 標準溶液之配製：

取預經 60°C, 5 mm 水銀柱壓力真空烘箱內乾燥 3 小時之硫酸鏈黴素對照標準品適量，精確稱定，以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液配製成濃度為 1,000 µg/mL 之標準原液(15°C 以下，30 日內使用)。使用時，再以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液稀釋成 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 µg/mL 五種不同濃度供作標準溶液，其中 0.8 µg/mL 為參比濃度(reference concentration)。

2.10 標準曲線之製作：

- 2.10.1 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之培養基上，按  $60^{\circ}$  圓心角放置 6 個圓筒。
- 2.10.2 每一濃度之鏈黴素標準溶液均取含試驗菌之平板培養基三個為一組，於每個培養基上放置之 6 個圓筒相間之 3 個圓筒內注入標準溶液，其餘 3 個圓筒注入參比濃度標準溶液。注入量為  $280 \mu\text{L}$ 。四種標準溶液(參比濃度除外)共需 12 個含試驗菌之平板培養皿。
- 2.10.3 於  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培養  $17 \pm 1$  小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。
- 2.10.4 量取同一濃度標準溶液之 9 個抑菌圈直徑及 9 個參比濃度之抑菌圈直徑，分別計算平均值。
- 2.10.5 量取參比濃度 36 個抑菌圈直徑，計算其平均值，並以此作為該抗生素標準曲線之修正點(correction point)。
- 2.10.6 以修正點和該抗生素參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，調整各標準溶液抑菌圈直徑平均值，每一標準溶液因此可得一修正抑菌圈直徑平均值(如當修正點為  $20.0 \text{ mm}$ ，參比濃度抑菌圈平均值為  $19.8 \text{ mm}$ ，二者之差為  $0.2 \text{ mm}$ ，標準溶液抑菌圈平均值若為  $17.0 \text{ mm}$ ，則修正為  $17.2 \text{ mm}$ )。
- 2.10.7 在半對數函數紙上，以四種濃度之標準溶液修正抑菌圈直徑平均值及修正點為橫軸(自然數值)，濃度為縱軸(對數值)，繪出標準曲線(亦可利用電腦軟體繪出標準曲線)。
- 2.10.8 該標準曲線最低濃度抑菌圈直徑平均值(L)及最高濃度抑菌圈直徑平均值(H)亦可由下列公式算出：

$$L = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$H = (3e + 2d + c - a)/5$$

a, b, d, e 為由低至高濃度標準溶液之修正抑菌圈直徑平均值，c 為修正點。

2.11 管柱之活化：

取 COOH 型萃取管柱先以正己烷  $5 \text{ mL}$  清洗後，抽氣約 1 分鐘除去正己烷，再依序以甲醇  $5 \text{ mL}$ 、蒸餾水  $5 \text{ mL}$  及 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液  $5 \text{ mL}$  清洗，沖洗流速約為  $1.5 \text{ mL/min}$ 。進行檢體分析前管柱必須浸於 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液中

2.12 檢液之調製：

- 2.12.1 將檢體細切，以攪拌均質器均質後，取約  $10 \text{ g}$ ，精確稱定，加入含  $0.01\text{M}$  EDTA-二鈉鹽之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液  $20 \text{ mL}$ ，攪拌均勻，於  $1,710 \times g$  離心 15 分鐘，取上澄液，加正己烷  $10 \text{ mL}$ ，充分振盪，於  $1,710 \times g$  離心 15 分鐘，收集水層，加氯仿  $20 \text{ mL}$ ，充分振盪，於  $1,710 \times g$  離心 15 分鐘，收集水層。

2.12.2 將 2.12.1. 節收集之水層注入 2.11. 節之 COOH 型萃取管柱，俟其完全流出後，取下 COOH 型萃取管柱，以 pH 3.0 MacIlvaine 緩衝溶液 5 mL 沖提，沖提液以 5N NaOH 調 pH 至 7.5 供作檢液。

2.13 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

2.13.1 將經滅菌之不鏽鋼圓筒投放於含試驗菌之培養基上，按 60°圓心角放置 6 個圓筒。

2.13.2 取上述培養基 3 個，使用微量吸管吸取檢液 280  $\mu\text{L}$  注入於每個培養基之 3 個間隔圓筒內，另外 3 個圓筒內則分別注入參比濃度標準溶液 280  $\mu\text{L}$ 。

2.13.3 於  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培養  $17 \pm 1$  小時後，測量檢液與抗生素參比濃度標準溶液之抑菌圈直徑。

2.13.4 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於 9 mm )表示無鏈黴素之殘留；有明顯抑菌圈(直徑 9 mm 以上)則繼續進行下述步驟。

2.14 生物自析鑑別法 (Bioautography)：

2.14.1 於薄層層析板下端起 3 cm 基線處，分別設定檢液及標準溶液之原點，點間距離為 2 cm 。

2.14.2 於設定之原點上，以微量吸管分別注入檢液及標準溶液各 30  $\mu\text{L}$  於薄層層析板後吹乾。

2.14.3 將薄層層析板放入展開槽中，以展開液展至原點上方 12~15 cm 處，取出風乾至少 30 分鐘後，於  $80^\circ\text{C}$  烘箱乾燥 2 小時，冷卻備用。

2.14.4 將上述之薄層層析板密貼於裝有含孢子懸浮液抗生素培養基之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋置於室溫下靜置 30 至 60 分鐘後，移去薄層層析板。

2.14.5 將上述之生物分析盤於  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培養  $17 \pm 1$  小時。

2.14.6 以一透明膠紙放在生物分析盤表面，將各原點及抑菌圈之位置及範圍用油性簽字筆描繪出。

2.14.7 以測徑用游標尺量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之高度，求出  $R_f$  值( $R_f$  值之計算為：抑菌圈中心至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當檢液抑菌圈之  $R_f$  值和鏈黴素標準溶液之  $R_f$  值相同時，即可確認為有鏈黴素之殘留。

2.15 回收率試驗：

分別添加  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  鏈黴素標準原液 2、4、8、16 及  $32 \mu\text{L}$  於檢體 10 g 中，使添加濃度分別為 0.2、0.4、0.8、1.6 及  $3.2 \mu\text{g}/\text{g}$ ，行三重複試驗。依 2.12 節調製檢液。再依 2.13 節分別測量其抑菌圈直徑。並依下列公式求得檢體之回收率。

90年7月16日衛署食字第0900047004號公告  
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正

各添加濃度之檢體回收率 = A / B × 100%

A：各添加濃度之檢液所產生之抑菌圈直徑平均值。

B：2倍於各添加濃度之標準溶液所產生之抑菌圈直徑平均值。

檢體平均回收率為5個添加濃度檢體回收率之平均值。

## 2.16 鍾黴素殘留量之計算：

以鍾黴素標準溶液之修正點和參比濃度抑菌圈直徑平均值之差，修正檢液抑菌圈直徑平均值，以檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標準曲線求得檢體中鍾黴素殘留量。並以下列公式計算求得該檢體之鍾黴素實際殘留量。

檢體中鍾黴素殘留量(ppm) = S / R

S：標準曲線求得之鍾黴素殘留量(ppm)。

R：該類空白檢體添加鍾黴素試驗之平均回收率(%)。

- 備註：1. 本檢驗方法之最低檢出含量為0.2 ppm。  
2. 不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。

## 參考文獻：

- 經濟部中央標準局。1983。飼料添加物檢驗法—抗生素之微生物學測定法通則。中國國家標準總號9028，類號N4098。
- 經濟部中央標準局。1988。肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗法。中國國家標準總號12322，類號N6209。
- 經濟部中央標準局。1996。食品中動物用藥殘留量檢驗方法—孟寧素之檢驗。中國國家標準總號13630，類號N6281。
- 日本厚生省生活衛生局乳肉衛生課。1990。畜水產食品中殘留物質檢查法。
- 神保勝彥、門間千枝、丸山務、松本昌雄。1991。食肉中殘留抗菌性物質簡易系統別檢查法。食衛誌。32(2): 86-92。
- Maturin, L. J. and Peeler, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count, In "FDA Bacteriological Analytical Manual". 8th ed., pp. 3.01-3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Ragheb, H. S. and Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feeds. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th ed., pp. 33-36, 49. Cunniff, P. ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.