

食品中動物用藥殘留檢驗方法－抗生物質之檢驗

Method of Test for Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Antibiotic Substances

鍵語：動物用藥殘留、veterinary drug residues、抗生物質、antibiotic substances

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜肉及其內臟、魚、蛋及蜂蜜中殘留抗生物質之檢驗。

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. 紙錠：直徑10 mm，厚1.1~1.2 mm，121°C 15分鐘滅菌烘乾後使用。

2.2.2. 高壓滅菌釜(Autoclave)。

2.2.3. 微量分注器(Micro pipettor)：可調至20 µL、100 µL及200 µL。

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

2.2.5. 離心機(Centrifuge)：轉速可達4,000 rpm者。

2.2.6. 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。

2.2.7. 培養箱：能維持內部溫差在±1°C者。

2.2.8. 攪拌均質器(Blender)。

2.2.9. 冰箱：能維持5±3°C以內者。

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

2.2.11. 乾熱滅菌器。

2.2.12. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。

2.2.13. 試驗菌：*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (CCRC 10449)

Bacillus subtilis ATCC 6633 (CCRC 10447)

Bacillus mycoides ATCC 11778 (CCRC 10446)

2.3. 試藥：無水磷酸二氫鉀、無水磷酸氫二鉀、氯化鈉、檸檬酸、氫氧化鉀、丙酮及鹽酸均採化學試藥級。安比西林鈉鹽(sodium ampicillin)、硫酸康徽素(kanamycin sulfate)及鹽酸羥四環素(oxytetracycline hydrochloride)。

2.4. 培養基：

2.4.1. 抗生素培養基5號(Antibiotic Medium 5)

蛋白朊(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 1,000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.9 ± 0.1。滅菌後待冷卻至約 50°C，以 1：5 之比例加入 *M. luteus* ATCC 9341 菌液，混合均勻後於每一培養皿分裝 8 mL 供作試驗用培養基。另以 1：100 之比例加入 *B. subtilis* ATCC 6633 孢子懸浮液，混合均勻後於每一培養皿分裝 8 mL 供作試驗用培養基。

2.4.2. 抗生素培養基 8 號(Antibiotic Medium 8)

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	1,000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.85 ± 0.05。滅菌後待冷卻至約 50°C，以 1：100 之比例加入 *B. mycoides* ATCC 11778 孢子懸浮液，混合均勻後於每一培養皿分裝 8 mL 供作試驗用培養基。

2.4.3. 營養培養基(Nutrient agar)

蛋白胨(peptone)	10.0 g
肉抽出物(meat extract)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1,000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1。

2.4.4. 敏感性試驗用培養液(Sensitivity test broth)

酪蛋白(casein)	16.5 g
心肌抽出物(heart extract)	3.0 g
溶解性澱粉(soluble starch)	1.5 g
葡萄糖(glucose)	2.0 g
L-色氨酸(L-tryptophan)	0.05 g
L-胱氨酸(L-cystine)	0.05 g
生物素(biotin)	5 µg
蒸餾水	1,000 mL

加熱溶解後，以 115°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.1。

2.5. 試驗菌液之製備：

2.5.1. *M. luteus* ATCC 9341 菌液：

將菌株接種於敏感性試驗用培養液，於 30°C 培養 18 小時後調整菌液濃度。以 1：5 之比例加入已冷卻至約 50°C 之抗生素培養基 5 號，於每一

培養皿分裝 8 mL。培養基凝固後，取一已在濃度為 0.025 µg/mL 安比西林鈉鹽標準溶液浸漬完全並去除多餘溶液之紙錠放置於培養基上，於 30°C 培養 18 ± 1 小時，以可形成抑菌圈直徑為 14 ± 1 mm 之菌液作為試驗用菌液，其菌數約為 10⁸⁻⁹ CFU/mL。

2.5.2. *B. subtilis* ATCC 6633 孢子懸浮液：

將菌株接種於營養培養基，於 30°C 培養 1 週，刮下培養基表層之菌體，加入適量無菌生理食鹽水，於 65°C 加熱 30 分鐘後，於 3,000 rpm 離心 20 分鐘，移棄上澄液，沉澱物以無菌生理食鹽水稀釋成系列濃度之孢子懸浮液。以 1：100 之比例加入已冷卻至約 50°C 之抗生素培養基 5 號，於每一培養皿分裝 8 mL。培養基凝固後，取一紙錠浸於 0.5 µg/mL 硫酸康黴素標準溶液，俟其完全浸濕後，去除多餘溶液，放置於培養基上，於 30°C 培養 18 小時，以可形成抑菌圈直徑為 14 ± 1 mm 之孢子懸浮液作為試驗用孢子懸浮液，其孢子數約為 10⁷~10⁸ CFU/mL。

2.5.3. *B. mycoides* ATCC 11778 孢子懸浮液：

將菌株接種於營養培養基，於 30°C 培養 1 週，刮下培養基表層之菌體，加入適量無菌生理食鹽水，於 65°C 加熱 30 分鐘後，於 3,000 rpm 離心 20 分鐘，移棄上澄液，沉澱物以無菌生理食鹽水稀釋成系列濃度之孢子懸浮液，以 1：100 之比例加入已冷卻至約 50°C 之抗生素培養基 8 號，於每一培養皿分裝 8 mL。培養基凝固後，取一紙錠浸於 0.25 µg/mL 鹽酸羥四環素標準溶液，俟其完全浸濕後，去除多餘溶液，放置於培養基上，於 30°C 培養 18 小時，以可形成抑菌圈直徑為 14 ± 1 mm 之孢子懸浮液作為試驗用孢子懸浮液，其孢子數約為 10⁷~10⁸ CFU/mL。

2.6. 稀釋液之配製：

2.6.1. 0.2 M 檸檬酸溶液：

稱取檸檬酸 4.2 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL。

2.6.2. 0.5 M 氫氧化鉀溶液：

稱取氫氧化鉀 2.8 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL。

2.6.3. 檸檬酸-氫氧化鉀溶液：

量取等體積 0.2 M 檸檬酸溶液及 0.5 M 氫氧化鉀溶液混合，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.6.4. 檸檬酸-丙酮緩衝溶液：

無菌水、丙酮及檸檬酸-氫氧化鉀溶液，以 30：35：35 (v/v/v) 之比例混合後備用。

2.6.5. pH 4.5 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取無水磷酸二氫鉀 13.6 g，以蒸餾水溶解後，必要時調整 pH 值，並定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.6.6. pH 6.0 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取無水磷酸二氫鉀 8.0 g 及無水磷酸氫二鉀 2.0 g，以蒸餾水溶解後，必要時調整 pH 值，並定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.6.7. pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液：

稱取無水磷酸二氫鉀 0.523 g 及無水磷酸氫二鉀 16.73 g，以蒸餾水溶解後，必要時調整 pH 值，並定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.6.8. 生理食鹽水：

稱取 8.5 g 氯化鈉，以蒸餾水溶解後定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。

2.7. 標準溶液之配製：

2.7.1. 安比西林鈉鹽標準溶液：

取安比西林鈉鹽對照標準品適量，精確稱定，移入容量瓶中，以無菌水溶解並配製成濃度為 1,000 µg/mL 之標準原液。使用時，再以 pH 6.0 磷酸鹽緩衝溶液稀釋供作標準溶液。

2.7.2. 硫酸康黴素標準溶液：

取硫酸康黴素對照標準品適量，精確稱定，移入容量瓶中，以無菌水溶解並配製成濃度為 1,000 µg/mL 之標準原液。使用時，再以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液稀釋供作標準溶液。

2.7.3. 鹽酸羥四環素標準溶液：

取鹽酸羥四環素對照標準品適量，精確稱定，移入容量瓶中，先以少量 0.1 N HCl 溶解後，以無菌水配製成濃度為 1,000 µg/mL 之標準原液。使用時，再以 pH 4.5 磷酸鹽緩衝溶液稀釋供作標準溶液。

2.8. 檢液之調製：

2.8.1. 禽畜肉及其內臟、魚：

將檢體細切，以攪拌均質器均質後，取約 5 g，精確稱定，加檸檬酸-丙酮緩衝溶液 20 mL，攪拌均勻，以濾紙過濾，所得之濾液供作檢液(若過濾不易，可先以 3,000 rpm 離心 15 分鐘後再過濾上清液)。

2.8.2. 蛋：

取全蛋之蛋黃加四倍量之檸檬酸-丙酮緩衝溶液，攪拌均勻供作檢液。

2.8.3. 蜂蜜：

取檢體約 5 g，精確稱定，加檸檬酸-丙酮緩衝溶液 20 mL，攪拌均勻供作檢液。

2.9. 試驗及判定：

以鑷子取紙錠浸入檢液，俟其浸漬完全並去除多餘溶液後，分別輕壓放置於三種含試驗菌之培養基上，先於 4°C 放置 30 分鐘後，再於 30°C 培養 18 小時。

另取紙錠浸於檸檬酸-丙酮緩衝溶液為對照試驗。每一檢液至少使用兩紙錠。含檢液之紙錠於任一種試驗培養基中產生抑菌圈且平均抑菌圈直徑大於 12 mm，而對照試驗無抑菌圈產生即判定為陽性。

參考文獻：

1. 日本社團法人日本食品衛生協會。1996。食品衛生檢查指針—追補 II。260~265 頁。
2. 神保勝彥、片岡潤、小久保彌太郎、小沼博隆、近藤房生。1995。畜水産食品中の残留抗菌性物質検査における微生物学的簡易検査法の検出感度。食衛誌. 36(4): 525~531。
3. 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.

表一、檢測抗生素種類及其檢測敏感度

抗生素	檢測敏感度(ppm)
安比西林(Ampicillin)	0.20
安默西林(Amoxicillin)	0.20
氣噁唑西林(Cloxacillin)	12.5
雙氣噁唑西林(Dicloxacillin)	6.25
配尼西林(Penicillin G)	0.39
Cephalonium	1.56
Cephoxazole	3.13
德畜黴素(Destomycin A)	> 100
雙氫鏈黴素(Dihydrostreptomycin)	6.25
新黴素(Neomycin)	> 100
健牠黴素(Gentamicin)	12.5
效高黴素(Hygromycin B)	> 100
康黴素(Kanamycin)	12.5
觀黴素(Spectinomycin)	> 100
鏈黴素(Streptomycin)	3.13
紅黴素(Erythromycin)	0.78
交沙黴素(Josamycin)	1.56
北里黴素(Kitasanycin)	3.13
歐黴素(Oleandomycin)	1.56
史黴素(Spiramycin)	6.25
泰黴素(Tylosin)	3.13
林可黴素(Lincomycin)	6.25
安巴素(Avoparcin)	6.25
枯草菌素(Bacitracin)	3.13
可利斯汀(Colistin)	> 100
恩黴素(Enramycin)	100
純黴素(Virginiamycin)	1.56
氯四環黴素(Chlortetracycline)	0.78
脫氧羥四環黴素(Doxycycline)	0.20
羥四環黴素(Oxytetracycline)	0.78
四環黴素(Tetracycline)	1.56
培可黴素(Bicozamycin)	> 100
氯黴素(Chloramphenicol)	25
復西黴素(Fosfomycin)	25
諾伯黴素(Novobiocin)	6.25
泰妙素(Tiamulin)	3.13