

食品中動物用藥殘留檢驗方法－青黴素之檢驗

Method of Test Veterinary Drug Residues in Foods - Test of Penicillin

代碼：NLFDUAPEN00

鍵語：青黴素、penicillin、圓筒平板法、cylinder plate method、動物用藥殘留、veterinary drug residue。

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於禽畜等產品中殘留青黴素之檢驗。
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. 不銹鋼圓筒：外徑 8 ± 0.1 mm，內徑 6 ± 0.1 mm，高 10 ± 0.1 mm。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜(Autoclave)。
 - 2.2.3. 微量吸管(Microliter pipetter)：20 μ L、100 μ L及200 μ L。
 - 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)：轉速可至3,000 \times g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 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.8. 攪拌均質機(Homogenizer)。
 - 2.2.9. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.10. 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。
 - 2.2.11. 乾熱滅菌器。
 - 2.2.12. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
 - 2.2.13. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。
 - 2.2.14. 分光光度計。
 - 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、氫氧化鈉均採化學試藥級，青黴素酶(10^7 units/mL)及青黴素G鈉鹽對照標準品。
 - 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%，使添加於種層培養基後，於高倍稀釋之標準溶液(0.0075 µg/g)呈現直徑約10 mm之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液(0.06 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(Peptide)	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分鐘後作成斜面培養基，最終pH值為 6.5 ± 0.1 。或於滅菌後冷卻至約48°C，每一培養皿分裝10 mL，於平坦檯面自然凝固供作底層培養基。

2.6.2. 抗生素培養基4號(Antibiotic Medium 4)

蛋白胨(Peptide)	6.0 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

加熱溶解後於121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 6.5 ± 0.1 。待冷卻至約48°C，加入0.2~0.5%之試驗菌液，混合均勻，取4 mL至裝有抗生素培養基1號10 mL之底層培養基上，並使其在培養基上分佈均勻供作種層培養基(試驗當日製備)。

2.7. 磷酸鹽緩衝溶液之配製：

2.7.1. 1%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溶解於蒸餾水，定容至1,000 mL後調pH值至 6.0 ± 0.1 ，於121°C滅菌15分

鐘後放冷備用。

2.7.2. pH 6.0磷酸鹽緩衝溶液：

稱取無水磷酸二氫鉀7.0 g溶解於蒸餾水500 mL中，另取無水磷酸氫二鈉6.0 g亦溶解於蒸餾水500 mL，將兩液混合後調pH值至 6.0 ± 0.1 ，於 121°C 滅菌15分鐘後放冷備用。

2.8. 標準溶液之配製：

取青黴素G鈉鹽對照標準品30 mg，以pH 6.0磷酸緩衝溶液配製成 $600 \mu\text{g/mL}$ 之標準原液，並於冰箱內保存，於2日內使用。使用時，以pH 6.0磷酸鹽緩衝溶液稀釋成0.075、0.015、0.03、0.06及 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 五種不同濃度供作標準溶液，其中 $0.03 \mu\text{g/mL}$ 為參比濃度(reference concentration)。

2.9. 標準曲線之製作：

2.9.1. 將經滅菌之不銹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。

2.9.2. 每一濃度之青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)需12個配製好之含試驗菌之平板培養基。

2.9.3. 於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 17 ± 1 小時後，以測徑用游標尺測量抑菌圈直徑。

2.9.4. 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。

2.9.5. 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)。

2.9.6. 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 ，參比濃度抑菌圈平均 19.8 mm ，二者之差為 0.2 mm ，標準溶液抑菌圈平均值若為 17.0 mm ，則修正為 17.2 mm)。

2.9.7. 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)。

2.9.8. 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。

2.10. 檢液之調製：

取切碎混勻後之檢體10 g，加入1%磷酸鹽緩衝溶液10 mL，以均質器均質2分鐘後，以2330 ×g離心10分鐘，取上層液過濾後供作檢液。

2.11. 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

2.11.1. 將經滅菌之6個不銹鋼圓筒等距離投放於含試驗菌之培養基上。按60°圓心角放置6個圓筒。

2.11.2. 使用微量吸管分別吸取檢液280 μL注入於間隔之3個圓筒內，另外3個圓筒內則分別注入參比濃度之標準溶液各280 μL，行三重複試驗。

2.11.3. 於30 ± 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。

2.11.4. 檢液無明顯抑菌圈(直徑小於9 mm)表示無青黴素之殘留，有明顯抑菌圈(直徑9 mm以上)則繼續進行下述步驟。

2.12. 確認試驗：

添加足夠量之青黴素酶(50 μL/mL檢液)於檢液並於37°C培養30分鐘後重複圓筒平板法之試驗，若抑菌圈有明顯變小或變無時，表示有青黴素之殘留。

2.13. 回收率試驗：

分別添加濃度為5、10、20、30、40 μg/mL之青黴素標準溶液各100 μL於檢體10 g中，使添加濃度分別為0.05、0.10、0.20、0.30及0.40 μg/mL，做三重複試驗。依2.10調製檢液，再依2.11分別測量其抑菌圈直徑，並以下列公式計算檢體之回收率。

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：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添加濃度檢體回收率之平均值。

2.14. 青黴素殘留量之計算：

以青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青黴素殘留量，並以下列公式計算該檢體之青黴素實際殘留量。

檢體青黴素殘留量(ppm)=S / R

S：標準曲線求得之檢體青黴素殘留量(ppm)。

R：該類空白檢體添加青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黴素類抗生素檢驗法。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檢查法。第11頁。
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, USA.