

食品中動物用藥殘留檢驗方法－枯草菌素之檢驗

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

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於畜禽水產食品中殘留枯草菌素之檢驗。
2. 檢驗方法：
 - 2.1 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度約為100呎燭光)，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。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 生物分析盤(Bioassay plate)：長24.5 cm，寬24.5 cm，厚2.5 cm。
 - 2.2.3 薄層層析板(Thin layer chromatography plate)：長20 cm，寬20 cm，厚250 μ m 矽膠層析板或同級品。
 - 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)：2 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
 - 2.2.7 微量吸管尖(Tips)：10 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
 - 2.2.8 微量離心管(Eppendorf tube)：1.5 mL 及 2 mL。
 - 2.2.9 離心管(Centrifuge tube)：已滅菌，Polypropylene 材質，15 mL 及 50 mL。
 - 2.2.10 離心機(Centrifuge)：轉速可達 $2500 \times g$ 者。
 - 2.2.11 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度約1.5 cm，底皿之內外面應平坦、無氣泡、刮傷或其它缺點。
 - 2.2.12 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內，並具備振盪裝置者。
 - 2.2.13 均質機(Homogenizer)。
 - 2.2.14 冰箱：能維持 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 者。
 - 2.2.15 吸管：已滅菌，1 mL 者應有0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 者應有0.1 mL 之刻度。
 - 2.2.16 吸管輔助器(Pipet-aid)。
 - 2.2.17 三角錐瓶：100 mL、200 mL、500 mL 及 1000 mL。
 - 2.2.18 容量瓶。
 - 2.2.19 測徑用游標尺(Vernier calipers)。
 - 2.2.20 漩渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.21 分光光度計(Spectrophotometer)：可測波長600 nm 吸光值，靈敏度為0.01 或以下。
 - 2.2.22 乾熱滅菌器。
 - 2.2.23 天平：靈敏度為1 mg 或以下。
 - 2.2.24 pH 測定儀。

2.2.25 真空烘箱。

2.2.26 乾燥器(Desiccator)。

2.2.27 氮氣。

2.2.28 蠟膜(Parafilm)。

2.3 試驗菌：*Micrococcus luteus* ATCC 10240 (CCRC 10452)。

2.4 試藥：無水磷酸二氫鉀、無水磷酸氫二鉀、氫氧化鈉、鹽酸、甲醇、丙酮
均採用化學試藥特級，枯草菌素鋅鹽(bacitracin zinc salt)對照標準品。

2.5 試驗菌液之製備：

將試驗菌繼代保存於營養培養基，每兩週移植 1 次，於 35°C 培養 36 小時。
或取超低溫冷凍保存之菌株，於營養培養基上行劃線培養，於 35°C 培養 36
小時。使用時，自培養基上挑取菌落，接種於營養培養液 20 mL 中，於 35°C
震盪培養 24~36 小時後，以營養培養液調整菌液濃度，使菌液於分光光度
計波長 600 nm 吸光值為 0.8 ± 0.05 。試驗菌液於每次製備試驗培養基時，需
重新調製。

2.6 培養基：

2.6.1 營養培養液(Nutrient broth)

蛋白朊(peptone)	5.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後分裝於三角錐瓶，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。
可於冰箱保存 2 週，使用前於室溫回溫。

2.6.2 營養培養基(Nutrient agar)

蛋白朊(peptone)	5.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 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 6.8 ± 0.2 。冷卻至約
50°C，分注於培養皿中，每皿 15~20 mL。凝固後可於冰箱保存 2 週，
使用前於室溫回溫。

2.6.3 抗生素培養基 1 號(Antibiotic medium 1)

蛋白朊(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 6.5 ± 0.1 。冷卻至約
50°C，以 0.2% 之比例加入 OD₆₀₀ 吸光值為 0.8 ± 0.05 之試驗菌液，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。試驗培養皿以蠟膜封妥後，可於冰箱中保存 2 週，使用前需先於室溫回溫。

2.7 展開液之配製：

甲醇：丙酮：蒸餾水=4：4：1(v/v/v)。

2.8 緩衝溶液之配製：

2.8.1 pH 6.5 之 5%磷酸鹽緩衝溶液：

稱取無水磷酸氫二鉀 22.15 g 及無水磷酸二氫鉀 27.85 g，溶於蒸餾水並定容至 1000 mL，以鹽酸調整其 pH 值至 6.5，於 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.8.2 0.01N 鹽酸水溶液：

取鹽酸 2.03 mL，加入蒸餾水中並定容至 250 mL。

2.8.3 鹽酸－甲醇溶液：

取鹽酸 20.4 mL，加入甲醇中並定容至 1000 mL。

2.9 標準溶液之配製：

取預經真空烘箱內 60°C，5 mm 水銀柱壓力乾燥 3 小時，並於乾燥器中過夜平衡之枯草菌素對照標準品適量，精確稱定。以 0.01N 鹽酸水溶液配製成濃度為 2,000 µg/mL 之標準原液(於冰箱保存，2 週內使用)。使用時，以 pH 6.5 之 5%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 將經滅菌之不銹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。

2.10.2 每一濃度之枯草菌素標準溶液均取三個含試驗菌之平板培養基，每個培養基上放置之 6 個圓筒，於相間之 3 個圓筒內注入標準溶液，其餘 3 個圓筒則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皿。於 35°C 培養 32 小時後，以游標尺測量抑菌圈直徑。

2.10.3 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。

2.10.4 量取參比濃度 36 個抑菌圈直徑，計算其平均值，作為該抗生素標準曲線之修正點(correction point)。

2.10.5 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)。

2.10.6 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)。

2.10.7 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：

將檢體細切或剪成小塊，以均質機均質後，取 20 g 精確秤定，置入 50 mL 無菌離心管。加入鹽酸—甲醇溶液 20 mL，振盪混合均勻後於 2500 × g 離心 10 分鐘，取上層液 5 mL，以氮氣吹乾後，以 pH 6.5 之 5% 磷酸鹽緩衝溶液 5 mL，振盪溶解即為檢液。

2.12 圓筒平板法(Cylinder plate method)：

2.12.1 將經滅菌之不銹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。

2.12.2 取上述培養基 3 個，分別注入檢液 280 μL 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等量參比濃度標準溶液。

2.12.3 於 35°C 培養 32 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)時，表示無枯草菌素之殘留；有明顯抑菌圈(直徑 9 mm 以上)時，則繼續進行下述步驟。

2.13 生物自析鑑別法(Bioautography)：

取 2.11 節上層液 2 mL，以氮氣吹乾，加入甲醇 100 μL，振盪溶解，作為生物自析鑑別試驗檢液。另添加適量之枯草菌素標準原液於 20 g 已絞碎之空白檢體中，攪拌混合均勻後作為生物自析鑑別試驗之陽性對照。

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，點間距離為 2 cm。

2.13.2 於設定原點上，以微量吸管分別注入檢液及經添加標準溶液於檢體之陽性對照萃取檢液各 30 μL 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 12~15 cm 處，取出風乾至少 30 分鐘後備用。

2.13.4 將 2.13.3 之薄層層析板密貼於裝有含試驗菌之抗生素培養基 1 號之生物分析盤，排除接觸面之氣泡，加皿蓋於室溫靜置 30 至 60 分鐘後，移去薄層層析板，於 35°C 培養 32 小時。

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

2.13.6 以游標尺測量標準溶液及檢液抑菌圈中心到原點之距離，求出 R_f 值(R_f 值之計算為：抑菌圈中心點至原點之距離/展開液從原點展開之距離)。當待測檢液和陽性對照檢液之抑菌圈 R_f 值相同時，即可確認為有枯草

菌素之殘留。

2.14 回收率試驗：

分別量取 2000 µg/mL 枯草菌素標準原液 3.5、5、7.5、10 及 20 µL 注入於檢體 20 g 中，使添加濃度分別為 0.35、0.5、0.75、1.0、2.0 µg/g，依 2.11 節調製檢液，再依 2.12 節行三重複試驗，分別測量其抑菌圈直徑，並依下列公式求得檢體之回收率。

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

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 枯草菌素殘留量之計算：

以枯草菌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，將檢液之修正抑菌圈直徑平均值由標準曲線求得檢體中枯草菌素殘留量。並以下列公式計算求得該檢體中枯草菌素之實際殘留量。

$$\text{檢體中枯草菌素殘留量(ppm)} = \frac{S}{R}$$

S：標準曲線求得之枯草菌素殘留量(ppm)。

R：該類空白檢體添加枯草菌素試驗之平均回收率(%)。

備註：1. 本檢驗方法之檢出限量為 0.35 ppm。

2. 不同食品基質是否影響檢驗結果，應自行檢討。