

食品中動物用藥殘留檢驗方法－抗生素類別之檢驗

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

鍵語：動物用藥殘留、veterinary drug residue、抗生素類別、antibiotic class。

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素類別之檢驗。

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，厚度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以內者。

2.2.8. 攪拌均質器(Blender)。

2.2.9. 冰箱：能維持5±3°C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. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。

2.2.13. 振盪器(Shaker)。

2.2.14. 濃縮瓶：250 mL。

2.2.15. 測徑用游標尺(Vernier calipers)。

2.2.16. C<sub>18</sub>固相萃取匣(Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge)：500 mg或其它同級品。

2.2.17. COOH型萃接管柱(Carboxylic acid extraction column)：500 mg。

2.2.18. 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、無水磷酸二氫鈉、氯化鈉、檸檬酸(citric acid)、EDTA-二鈉鹽(disodium ethylenediaminetetraacetate)、甲醇、正己烷、氯仿、鹽酸及氫氧化鈉均採化學試藥級。青黴素類安比

西林鈉鹽(sodium ampicillin)、胺基糖甾硫酸康黴素(kanamycin sulfate)、四環素類鹽酸羥四環素(oxytetracycline hydrochloride)及巨甾類紅黴素月桂硫酸鹽(erythromycin estolate)對照標準品。

#### 2.4. 試驗用培養基：

##### 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 5.85 ± 0.05。滅菌後冷卻至約 50°C，以 1：100 之比例加入 *B. mycooides* ATCC 11778 孢子懸浮液，混合均勻後於每一培養皿分裝 8 mL 供做試驗用培養基。

##### 2.4.3. 營養培養基(Nutrient agar)

蛋白朊(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 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 10<sup>8-9</sup> 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 之比例加於已冷卻至約 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 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> 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 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU/mL。

## 2.6. 緩衝溶液之配製：

### 2.6.1. 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至 100 mL。

### 2.6.2. 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。

- 2.6.3. 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。
- 2.6.4. 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。
- 2.6.5. 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。
- 2.6.6. 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，必要時調整 pH 值，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。
- 2.6.7. 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，定容至 1,000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。
- 2.6.8. 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 值至 3.0，以 121°C 滅菌 15 分鐘後備用。
- 2.7. 管柱之活化：
- 2.7.1. C<sub>18</sub> 固相萃取匣之活化：  
C<sub>18</sub> 固相萃取匣先以甲醇 5 mL，復以蒸餾水 5 mL，最後以飽和 EDTA-二鈉鹽溶液 5 mL 依序清洗。沖洗流速約為 1.5 mL/min。
- 2.7.2. COOH 型萃接管柱之活化：  
COOH 型萃接管柱先以正己烷 5 mL 清洗，抽氣除去正己烷約 1 分鐘後，再依序以甲醇 5 mL、蒸餾水 5 mL 及 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液 5 mL 清洗，沖洗流速約為 1.5 mL/min，進行檢體分析前管柱必須浸於 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液中。
- 2.8. 標準溶液之配製：
- 2.8.1. 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。
- 2.8.2. 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。

2.8.3. 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0.1N 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。

2.8.4. 紅黴素月桂硫酸醯標準溶液：

取紅黴素月桂硫酸醯對照標準品適量，精確稱定，移入容量瓶中，先以少量甲醇溶解後，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 8.0 磷酸鹽緩衝溶液稀釋供作標準溶液。

2.9. 檢液之調製：

2.9.1. 禽畜肉及其內臟、魚：

2.9.1.1. 檢液 A：

將檢體細切，以攪拌均質器均質後，取檢體 10 g，加入含 0.01M EDTA-二鈉鹽之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液 30 mL，攪拌均勻，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘。取上澄液，加正己烷 10 mL，充分振盪，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘。收集水層，加氯仿 30 mL，充分振盪，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘，分別收集氯仿層及水層。氯仿層於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液 1 mL 溶解供作檢液 A。

2.9.1.2. 檢液 B：

先將已活化 C<sub>18</sub> 固相萃取匣和 COOH 型萃接管柱連接，將 2.9.1.1. 節之水層注入已活化 C<sub>18</sub> 固相萃取匣，俟其完全流出後，分別取下 C<sub>18</sub> 固相萃取匣及 COOH 型萃接管柱。已活化 C<sub>18</sub> 固相萃取匣先以蒸餾水 10 mL 清洗，再以甲醇沖提。將最初流出之沖提液 0.5 mL 丟棄，收集其後之沖提液 5 mL 並於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 pH 4.5 磷酸鹽緩衝溶液 1 mL 溶解供作檢液 B。

2.9.1.3. 檢液 C：

2.9.1.2. 節取下之 COOH 型萃接管柱以 pH 3.0 MacIlvaine 緩衝溶液 5 mL 沖提。取沖提液以 1N 及 5N NaOH 將 pH 值調至 7.5 供作檢液 C。

2.9.2. 蛋：

2.9.2.1. 檢液 A：

取全蛋之蛋黃約 10 g，加入含 0.01M EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液 30 mL 及正己烷 30 mL，攪拌均勻，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘。取水層，加氯仿 40 mL，充分振盪，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘，分別收集水層及氯仿層。水層加氯仿 20 mL，充分振盪，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘，合併氯仿層於上述之氯仿層，並於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液定容至 1 mL 供作檢液 A。

2.9.2.2. 檢液 B：

取 2.9.2.1.節之水層，依 2.9.1.2.節調製檢液 B。

2.9.2.3. 檢液 C：

2.9.2.2.節取下之 COOH 型萃取管柱，依 2.9.1.3.節調製檢液 C。

2.9.3. 蜂蜜：

2.9.3.1. 檢液 A：

取蜂蜜 10 g，精確稱定，加入含 0.01 M EDTA 之 pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液 30 mL 及氯仿 30 mL，攪拌均勻，於 3,000 rpm 離心 15 分鐘，分別收集氯仿層及水層。氯仿層於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 pH 8.0 磷酸鹽緩衝溶液定容至 1 mL 溶解供作檢液 A。

2.9.3.2. 檢液 B：

將 2.9.3.1.節之水層注入已活化 C<sub>18</sub> 固相萃取匣，續以蒸餾水 10 mL 清洗萃取匣，再以甲醇沖提，將最初流出之沖提液 0.5 mL 丟棄，收集其後沖提液 5 mL。於 40°C 水浴減壓濃縮至乾，殘留物以 pH 4.5 磷酸鹽緩衝溶液 1 mL 溶解供作檢液 B。

2.10. 試驗與判定：

以鑷子取紙錠，分別浸入檢液 A、檢液 B、檢液 C 及對照檢液，俟其完全浸濕後，去除多餘溶液，分別輕壓放置於三種含試驗菌培養基上，先在 4°C 放置 30 分鐘後，於 30°C 培養 18 ± 1 小時，觀察有無抑菌圈形成，並以測徑用游標尺量抑菌圈直徑。每一檢液至少使用兩紙錠。若檢液於含試驗菌培養基上產生抑菌圈，且平均抑菌圈直徑大於 12 mm；而對照檢液無抑菌圈形成，則判定為陽性。依各檢液在三種含試驗菌培養基上所形成之抑菌圈之相對大小，對照下表判定殘留抗生素之類別。

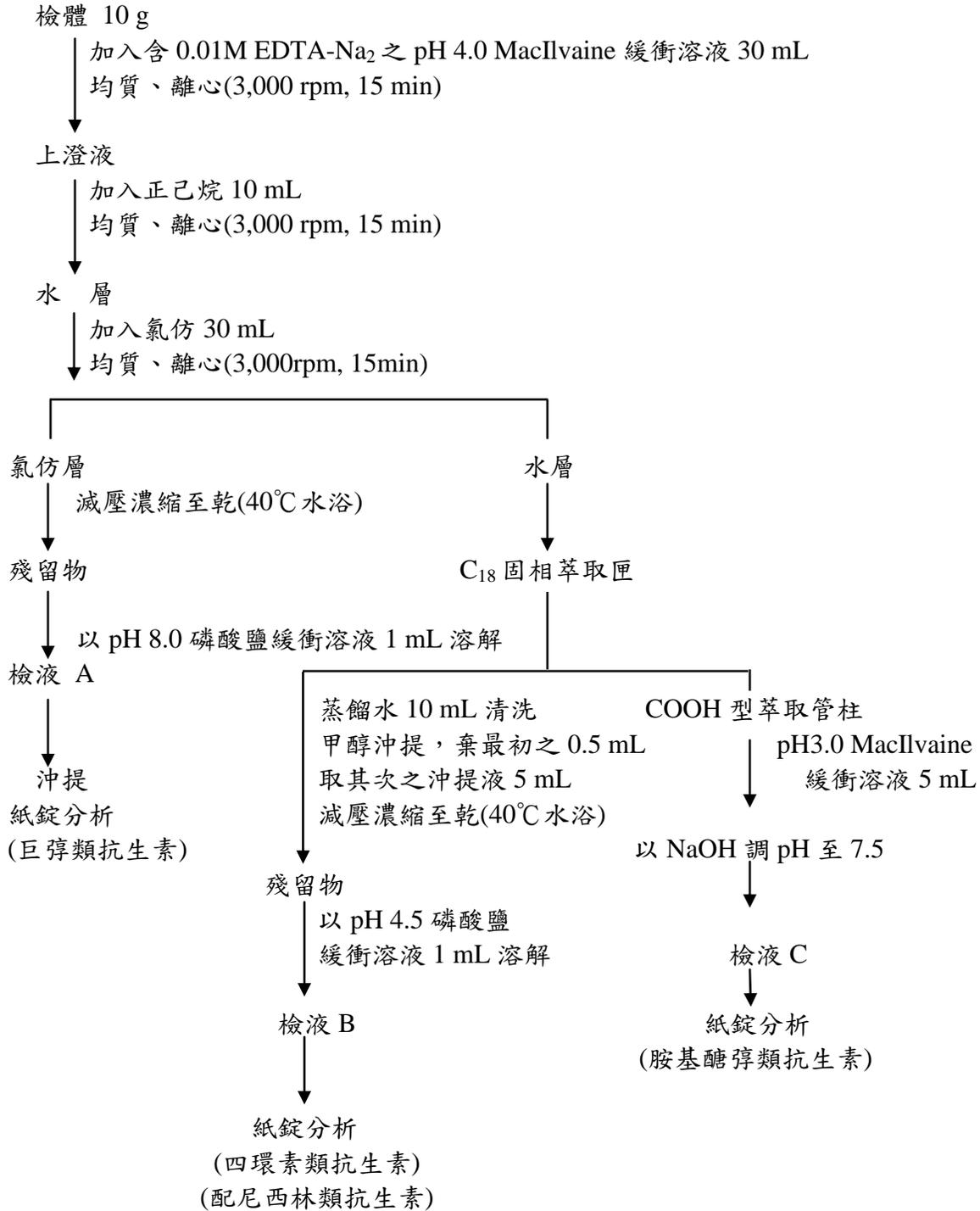
檢液	含試驗菌培養基			抗生素類別
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. mycooides</i>	
A	+	++	-	巨環素類 (Macrolides)
	-	+	-	
B	+	-	++	四環素類 (Tetracyclines)
	-	-	+	
	+	++	-	青黴素類 (Penicillins)
	-	+	-	
C	++	-	+	胺基糖甾類 (Aminoglycosides)
	+	-	-	

註：1. +表示檢液在試驗培養基上有抑菌圈形成；++表示同一檢液於該試驗培養基上形成之抑菌圈較在其他試驗培養基上形成之抑菌圈+相對較大；-表示無抑菌圈形成。

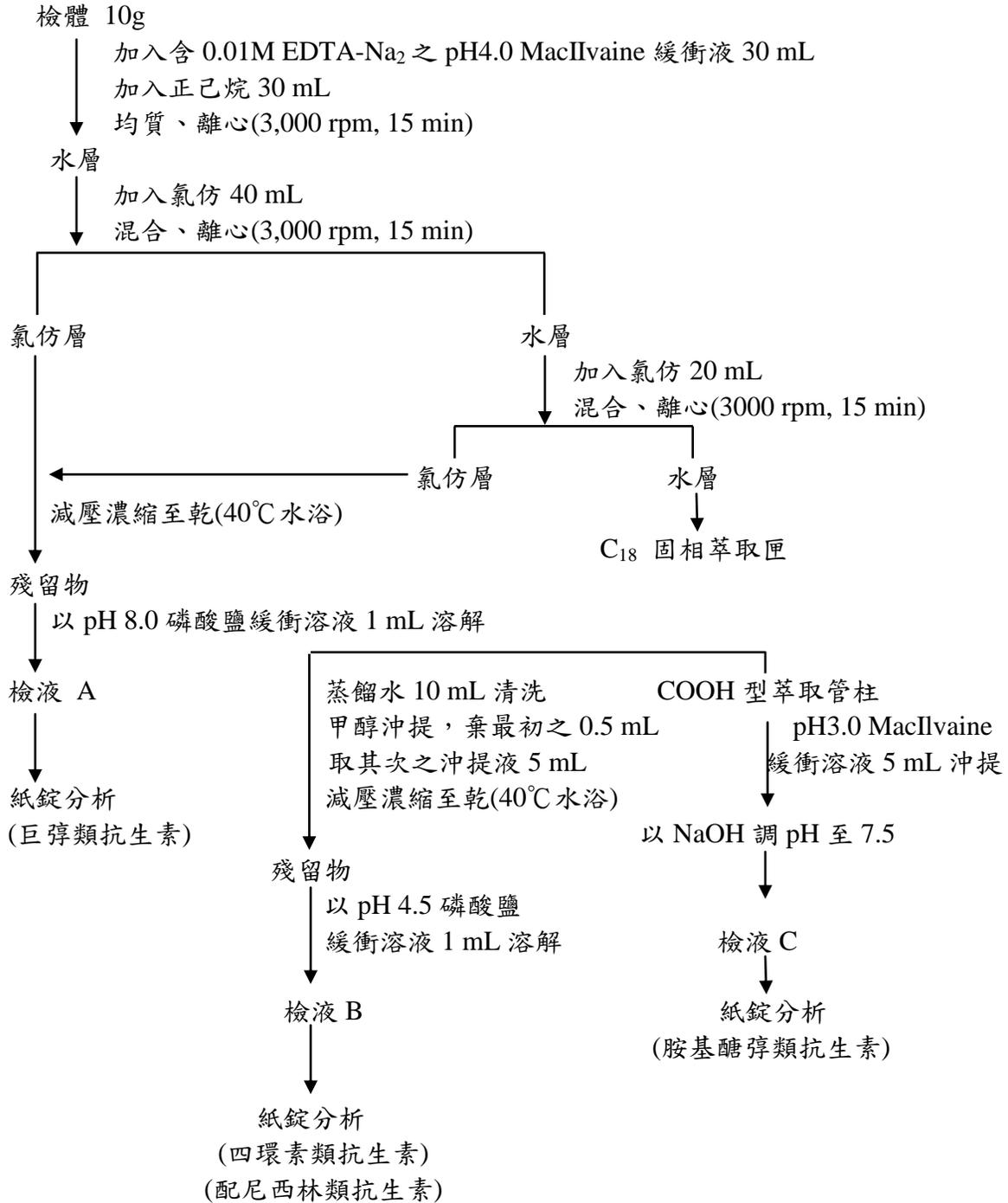
2.若檢液對三種含試驗菌培養基均形成抑菌圈，則該檢液須經適當稀釋後再試驗。

參考文獻：

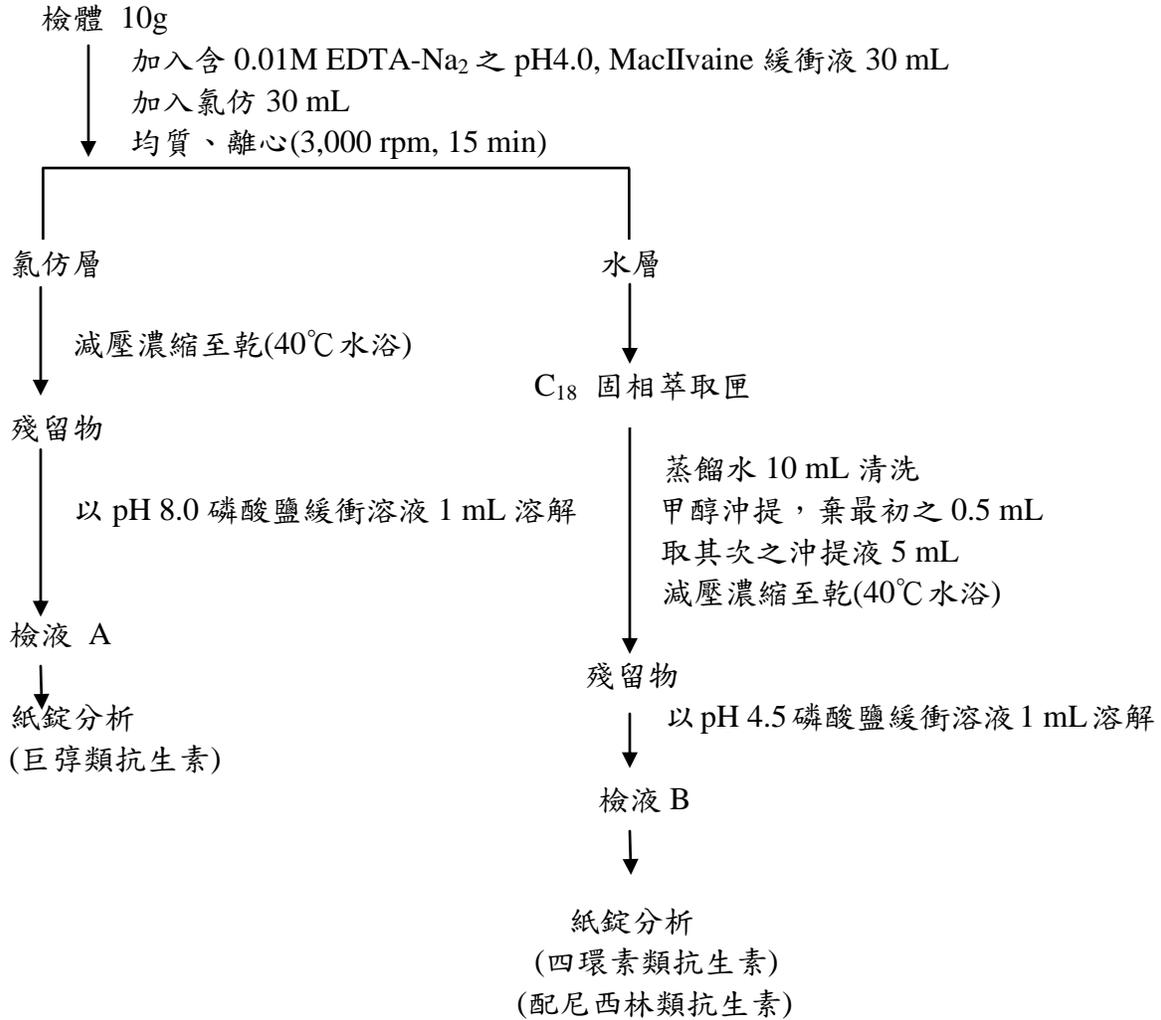
1. 日本社團法人日本食品衛生協會。1996。食品衛生檢查指針—追補 II。265～269 頁。
2. 神保勝彥。1992。畜產物中殘留抗菌性物質微生物學的檢查法。食肉科學 33(2): 181-190。
3. 神保勝彥、門間千枝、丸山 務、松本昌雄。1991。食肉中殘留抗菌性物質簡易系統別檢查法。食衛誌. 32(2): 86-92。
4. Maturin, L. J. and Peeler, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count. In "FDA Bacteriological Analytical Manual." 8<sup>th</sup> ed., pp. 3.01-3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.



圖一、禽畜肉及魚中殘留抗生素類別分析流程。



圖二、蛋中殘留抗生素類別分析流程。



圖三、蜂蜜中殘留抗生素類別分析流程。

表一、檢測抗生素種類及其檢測敏感度

抗生素類別	抗生素	檢測敏感度(ppm)
四環素類(Tetracyclines)	氯四環黴素(Chlortetracycline)	0.01
	脫氧羥四環黴素(Doxycycline)	0.01
	羥四環黴素(Oxytetracycline)	0.05
	四環黴素(Tetracycline)	0.05
配尼西林類(Penicillins)	安比西林(Ampicillin)	0.0025
	安默西林(Amoxicillin)	0.0025
	苄青黴素(Benzylpenicillin)	0.0025
胺基糖甾類(Aminoglycosides)	得畜黴素(Destomycin A)	0.1
	雙氫鏈黴素(Dihydrostreptomycin)	0.1
	新黴素(Neomycin)	0.1
	康黴素(Kanamycin)	0.1
	健牠黴素(Gentamycin)	0.1
	鏈黴素(Streptomycin)	0.2
巨甾類(Macrolides)	紅黴素(Erythromycin)	0.05
	北里黴素(Kitasamycin)	0.25
	歐黴素(Oleandomycin)	0.1
	史黴素(Spiramycin)	0.1
	泰黴素(Tylosin)	0.1