

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 15CFU／培養皿。

2.2 器具及材料：

2.2.1 不銹鋼圓筒：外徑 $8\pm 0.1\text{mm}$ ，內徑 $6\pm 0.1\text{mm}$ ，高 $10\pm 0.1\text{mm}$ 。

。

2.2.2 高壓滅菌釜 (Autoclave)。

2.2.3 微量吸管 (Microliter pipetter)：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 50mL。

2.2.5 離心機 (Centrifuge)：轉速可至 3,000xg 者。

2.2.6 培養皿：已滅菌，內徑約 9 cm，深度 1.5—1.8cm，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 0.01mL 之刻度；5 及 10mL 者應有 0.1mL 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（10（七次方）units/mL）及青黴素 G 鈉鹽對照標準品。

2.4 試驗菌：Micrococcus luteus ATCC 9431。

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 580nm 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 μ g/mL）呈現直徑約 10mm 之抑菌圈，於低倍稀釋之標準溶液（0.06 μ g/mL）呈現直徑約 20~25mm 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)

蛋白朊 (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

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。或於滅菌後冷卻至約 48 °C，每一培養皿分裝 10mL，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)

蛋白朊 (Peptone)	6.0g
酵母抽出物 (Yeast extract)	3.0g
牛肉抽出物 (Beef extract)	1.5g
酵母抽出物 (Yeast extract)	

葡萄糖 (Dextrose)	1.0g
洋菜 (Agar)	15.0g
蒸餾水	1000mL

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 4mL 至裝有抗生素培養基 1 號 10mL 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 8.0g 及無水磷酸氫二鉀 2.0g 溶解於蒸餾水，定容至 1,000mL 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 7.0g 溶解於蒸餾水 500mL 中，另取無水磷酸氫二鈉 6.0g 亦溶解於蒸餾水 500mL，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 30mg，以 pH6.0 磷酸鹽緩衝溶液配製成 600 μg /mL 之標準原液，並於冰箱內保存，放 2 日內使用。使用時，以 pH6.0 磷酸鹽緩衝溶液稀釋成 0.0075、0.015、0.03、0.06 及 0.12 μg /mL 五種不同濃度供作標準溶液，其中 0.03 μg /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 °C 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 μ g。四種標準溶液（參比濃度除外）需 12 個配製好之含試驗菌平板培養基。

- 2.9.3 於 30 \pm 1 $^{\circ}$ C 培養 17 \pm 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 20.0mm，參比濃度抑菌圈直徑平均 19.8 mm，二者之差為 0.2mm，標準溶液抑菌圈直徑平均值若為 17.0mm，則修正為 17.2mm）。
- 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 10g，加入 1% 磷酸鹽緩衝溶液 10mL，以均質器均質 2 分鐘後，以 2330xg 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平板培養基上。按 60 °C 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 μ L 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 μ L，行三重複試驗。

2.11.3 於 30 \pm 1°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。

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

2.12 確認試驗：

添加足夠量之青黴素 (50 μ L /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 μ g /mL 之青黴素標準溶液各 100mL 於檢體 10g 中，使添加濃度分別為 0.05、0.10、0.20、0.30 及 0.40 μ g /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 \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 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。

$$\text{檢體青黴素殘留量 (ppm)} = S / R$$

S：由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 0.05ppm。
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.
6. Maturin, L. J. 1998. Chapter 20A. Inhibitory Substance in Milk. In "FDA Bacteriological Analytical Manual". 8th ed. pp. 20.01~20.13 AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
7. Rahgeb, H. S., Smallidge, R. L. 1998. Chapter 5. Drugs in Feed s. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th., pp.33–36, 48. Cunniff, P.(ed.), AOAC International, Gaithersburg MD, USA.

8. Bishop, J. R., Senyk, G. F., Duncan, S. E. 1992. Chapter 12, Detection of Antibiotic/Drug Residues in Milk and Dairy Products. In "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" ..Marshall, R.T. (ed.)6th edition. American Public Health Association. USA.
9. AOAC International. 1998. AOAC Official Method of Analysis. 16th ed., 8.5.3.20 AOAC Official Method 967.41. Procaine Penicillin in Feeds. Microbiological Method. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.