

Table 6 Sensitivity of aminoglycoside antibiotics in standard solution

Antibiotics	Linearity range ($\mu\text{g/mL}$)	R	Slope
Apramycin (APM)	0.3 ~ 4.8	0.98898	13.2564
Kanamycin (KM)	0.1 ~ 1.6	0.99420	12.1217
Gentamicin (GM)	0.1 ~ 1.6	0.99377	8.3438
Dihydrostreptomycin (DSM)	0.05 ~ 0.8	0.99771	9.0680
Streptomycin (SM)	0.05 ~ 0.8	0.99683	9.0406
Destomycin A (DM)	3.2	—	—
Neomycin (NM)	0.4 ~ 6.4	0.98808	7.8062
Paromomycin (PM)	0.2 ~ 3.2	0.99300	9.0489

Table 7 Comparison of elution solvent from the Oasis MCX cartridge using neomycin

Elution solvent	Recovery (%)
25 %ammonia solution-D.W-methanol (1:6:3)	87.9
25 %ammonia solution-D.W-methanol (1:4:5)	71.8
25 %ammonia solution-D.W-methanol (1:2:7)	85.0
25 %ammonia solution-D.W-methanol (1:0:9)	81.4

Table 8 Recoveries and detection limits of aminoglycoside antibiotics in meat

Antibiotics	Spiked (ppm)	Sample	Recovery* ¹ (%)	DL* ² (ppm)	MRL (ppm)
APM	0.06	Swine muscle	106.3	0.06	0.06
		Swine liver	168.1	0.06	0.06
KM	0.1	Swine muscle	133.9	0.02	0.1
		Swine liver	90.7	0.03	0.1
GM	0.1	Swine muscle	121.0	0.02	0.1
	2.0	Swine liver	176.1	0.02	2.0
DSM	0.6	Swine muscle	ND* ³	NT* ⁴	0.6
		Swine liver	ND* ³	NT* ⁴	0.6
SM	0.6	Swine muscle	ND* ³	NT* ⁴	0.6
		Swine liver	ND* ³	NT* ⁴	0.6
NM	0.5	Swine muscle	104.4	0.2	0.5
		Swine liver	152.8	0.2	0.5
PM	0.5	Swine muscle	103.8	0.04	0.5
	2.0	Swine liver	131.4	0.04	2.0

*1 N = 3

*2 The concentration of each antibiotic which confirmed that inhibition zone of 12 mm was formed.

*3 Inhibition zone were not confirmed

*4 Not tested

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進) 研究報告書
食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

分担研究報告書

「アフィニティーカラムによるアミノグリコシド系抗生物質の保持検討および
分子認識法またはアフィニティーカラムを用いた試料精製の比較」

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

複雑なマトリックスから構成されている食肉中に残留する抗生物質として、特にその試料前処理が困難とされているアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを分析するため、夾雑物質を効果的に除去できる高い精製能力を有する前処理として、抗原抗体反応を利用したアフィニティーカラムによる試料精製法を検討した。本研究では、ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムを作製して、構造が類似した他のアミノグリコシド系抗生物質への適用可能性について検討した。測定対象物質には、ゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシンを選択し、それぞれの標準品および食肉抽出液からの回収率を求めた。その結果、食肉抽出液にシソマイシンを添加した試料溶液を除いて、いずれも良好な回収率が得られた。

他方、アフィニティーカラムと同様に、特異的な前処理が可能な分子認識法と、従来用いられている固相抽出カートリッジ(Oasis HLB)およびアフィニティーカラムによる試料精製について、ハチミツを試料として比較・検討した。その結果、精製能においては MIP とアフィニティーカラムが優れ、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラム、コスト面においては Oasis HLB と MIP が優れていることが確認された。

A 研究目的

近年、輸入食品を中心に抗生物質の残留が検出されている。一例として、中国産ハチミツにおいて、ストレプトマイシ

ンの検出が確認されている。このような残留実態を明らかにするために、食品中に残留する抗生物質の測定法が必要とされているが、食品は複雑なマトリックス

から構成されていることから、微量に残留している抗生物質を測定する際に、マトリックスに含まれる多くの夾雑物質の影響を受けて分析が困難となる。そのため、前年度においては、特にその試料前処理が困難とされているアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを分析するため、夾雑物質を効果的に除去できる高い精製能力を有する前処理として、抗原抗体反応を利用したアフィニティーカラムによる試料精製法を検討した。しかし、アフィニティーカラムで用いられる抗原抗体反応は特異性が高く、目的対象物質以外の複数の成分の前処理に用いることは困難と言われている。他方、抗原抗体反応には、類似の構造を有する物質との交差反応も存在することから、本研究では、ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムが、構造が類似した他のアミノグリコシド系抗生物質へ適用可能か否か検討した。

また、アフィニティーカラムと同様に、特異的な前処理が可能な分子認識ポリマー(MIP)と、従来用いられる固相抽出カートリッジおよびアフィニティーカラムによる試料精製を比較・検討した。

B 研究方法

B.1 アミノグリコシド系抗生物質のアフィニティーカラムへの適用性の検討

B.1.1 測定対象物質および試料

ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムを作製し、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシンを測定対象物質とした。実試料には鳥のむね肉(市

販品)を用いた。

B.1.2 機器分析の測定条件

アミノグリコシド系抗生物質の測定には、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法(HPLC/FL)を使用した。分析用ポンプには島津製作所社製 LC-10AD、蛍光検出器には島津製作所社製 RF-10A_{XL}を用いた。移動相には、10 mM ギ酸緩衝液(pH = 3.0)：アセトニトリル = 13 : 87(v/v)、分析カラムには Waters 社製 Atlantis C18(2.1 × 150 mm)を用いた。蛍光検出器の測定波長は、励起波長 265 nm、蛍光波長 313 nm とした。

B.1.3 アフィニティーカラムの作製方法

抗ゲンタマイシン抗体 1 mg を、0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)で希釈し、HiTrap NHS-activated HP Columns(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)に負荷し、室温で 2 時間反応を行った。反応後、0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)を負荷した。次に未反応基のブロッキングおよび洗浄のため、0.5 M NaCl 含有 0.5 M モノエタノールアミン(pH = 8.3)と 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 酢酸緩衝液(pH = 4.0)を交互に 3 回負荷した。最後にカラムの平衡化として PBS を負荷し、ゲンタマイシン用のアフィニティーカラムを作製した。

B.1.4 アフィニティーカラムによる精製法

アフィニティーカラムのコンディショニングとして、PBS 5 mL を負荷した。次に試料溶液 1 mL を負荷し、精製水 5 mL でカラムを洗浄した後、1% 酢酸 5 mL によりアミノグリコシド系抗生物質を溶出

させた。

B.1.5 試料前処理方法

細切した鶏肉約 5 g を精密に量り取り、1.2% メタリン酸を 15 mL 加えてホモジナイズし、均質化した。その後、遠心分離(3000 rpm, 4°C, 10 min)により得られた上清を分取した。残渣に 1.2% メタリン酸 10 mL を加えてよく攪拌した後、再度、遠心分離(3000 rpm, 4°C, 10 min)を行い、上清を分取した。先の上清と合わせ、n-ヘキサン 12.5 mL を加えてよく混和した後、上層を除去した。下層に再度 n-ヘキサン 12.5 mL を加えて同様の操作を行った。分取した下層はメンブランフィルター(孔径 0.2 μm)でろ過した後、40°C, 減圧下で乾固し、残渣に PBS 3 mL を加えた。更に 5 M NaOH で pH 7.0~8.0 に調整した後、PBS で全量を 5 mL とした。この液に n-ヘキサンを 2.5 mL 加えてよく混和した後、上層を除去した。下層に再度 n-ヘキサン 2.5 mL を加えて同様の操作を行った。下層はメンブランフィルター(孔径 0.2 μm)でろ過し、抽出液とした。抽出液 1 mL をアフィニティーカラムに負荷し、B.1.4 で示した手順でアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した抽出液 500 μL に 1 M NaOH 70 μL , 200 mM ホウ酸緩衝液(pH : 8.0)430 μL を加えて pH 7.0~8.0 付近に調整し、蛍光誘導体化用の試料溶液とした。

B.1.6 蛍光誘導体化法

試料溶液 200 μL に 200 mM ホウ酸緩衝液(pH = 8.0)100 μL および 1 mM 9-フルオレニルメチルクロロホルメート

(FMOC-Cl) 50 μL を加え、37°Cの温浴槽で 15 分間反応させた。次に、反応停止薬である 100 mM グリシンを 50 μL 加えて 5 分間放置した。その後、ペンタン 1 mL を加えてよく攪拌し、下層 300 μL を分取して HPLC 試料溶液とした。

B.2 分子認識ポリマー(MIP)による試料精製と、アフィニティーカラムおよび固相抽出カートリッジによる試料精製効果の比較

B.2.1 測定対象物質および試料

クロラムフェニコールを測定対象物質とし、実試料にはハチミツ(市販品)を用いた。

B.2.2 機器分析の測定条件

クロラムフェニコールの測定には、高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光度法(HPLC/UV)を使用した。分析用ポンプには島津製作所社製 LC-10AD, 紫外吸光度計には島津製作所社製 SPD-10A を用いた。移動相には、水 : アセトニトリル = 75 : 25(v/v), 分析カラムには Waters 社製 Atlantis C18(2.1 \times 150 mm)を用いた。紫外吸光度計の測定波長は 278 nm とした。

B.2.3 アフィニティーカラムの作製方法

B.1.3 と同様な操作でアフィニティーカラムを作製した。その際、使用した抗クロラムフェニコール抗体は、脱塩処理を行ってから使用した。概略は以下の通りである ; 脱塩用カラムとして HiTrap Desalting(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)を用い、初めにカラムの準備として、精製水および 0.5 M NaCl 含有 0.2 M

炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)を 15 mL 負荷した。次に、抗クロラムフェニコール抗体を 1 mL 負荷し、最後に 0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)を 5 mL 負荷した。カラムから通水して流出してきた液の始めの 1.5 mL を廃棄し、それ以降の 4 mL までを回収した。

B.2.4 MIP による試料精製法

MIP には、SUPELCO 社製 SupelMIP™ SPE - Chloramphenicol を使用した。コンディショニングとして、メタノールおよび精製水各 1 mL を負荷した。試料溶液 1 mL を負荷し、クロラムフェニコールを保持させた。次に、洗浄として、精製水 1 mL (2 回繰り返す)、5% アセトニトリル含有 0.5% 酢酸 1 mL (1 回繰り返す)、精製水 1 mL (2 回繰り返す)、20% アセトニトリル含有 1% 水酸化アンモニウム 1 mL (1 回繰り返す)、2% 酢酸含有ヘプタン 1 mL (3 回繰り返す) の順でそれぞれ負荷した。溶出には、メタノール 1 mL (2 回繰り返す) を負荷した。溶出液を窒素乾固した後、25% アセトニトリル 1 mL で再溶解した。他の方法と精製能を比較する実験においては、乾固後に 0.1 M グリシン(pH = 2.5) 5 mL を用いて再溶解した。

B.2.4.2 アフィニティーカラム

アフィニティーカラムのコンディショニングとして、PBS 5 mL を負荷した。次に試料溶液 1 mL を負荷し、精製水 5 mL を流して洗浄した後、0.1 M グリシン(pH = 2.5) 5 mL により溶出させた。

B.2.4.3 固相抽出カートリッジ

固相抽出カートリッジには Waters 社製 Oasis HLB を使用した。コンディショニングとして、メタノールおよび精製水を 2 mL 負荷した。試料溶液 1 mL を負荷し、クロラムフェニコールを保持させた。次に、20% メタノール 3 mL を負荷して洗浄した後、60% メタノール 3 mL を負荷して溶出させた。溶出液を窒素乾固した後、25% アセトニトリル 1 mL で再溶解した。他の方法と精製能を比較する実験においては、乾固後に 0.1 M グリシン(pH = 2.5) 5 mL を用いて再溶解した。

B.2.5 前処理方法

ハチミツ約 5g を精密に量り取り、PBS をハチミツと合わせて 10 mL になるよう添加した。その溶液をメンブランフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過し、MIP、アフィニティーカラム、Oasis HLB によりそれぞれ精製を行った。

C 研究結果および考察

C.1 アミノグリコシド系抗生物質のアフィニティーカラムへの適用性の検討

C.1.1 測定対象物質の選択

ゲンタマイシン以外のアミノグリコシド系抗生物質としては、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシンおよびカナマイシンなどを始めとして多くの種類が存在する。その中でも、ゲンタマイシンと構造式が類似するものとしては、シソマイシンおよびネチルマイシンが挙げられる。シソマイシンとネチルマイシンは医療用医薬品として使用されているが動物用医薬品としてはほとんど使用さ

れていない。しかし、今回の研究では、アフィニティーカラムが構造式の類似する医薬品を保持可能であるか否かについて検討することが目的であり、またこれらの抗生物質も、今後、動物用医薬品として使用される可能性があるため、シソマイシンとネチルマイシンを選択した。ゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシンの構造式を Fig. 1 に示す。

C.1.2 アフィニティーカラムの保持能の検討

ゲンタマイシン(ゲンタマイシン C1 (40%), C1a (23%), C2 (37%)の混合標準品)、シソマイシンおよびネチルマイシンの標準品 500 ng/mL 各 1mL をアフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、それぞれ、104.6, 111.3, 103.1, 106.3 および 105.1%であった。また、食肉に対して 500 ng/g となるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は 89.5, 96.8, 89.3, 68.4 および 87.1%であり、食肉抽出液でのシソマイシンを除いて、どれも良好な回収率であった (Table 1)。しかし、食肉抽出液での回収率は、標準品の回収率に比べていずれも若干低下していることが分かった。特にシソマイシンでは低下が顕著であった。このことから、食肉など多くの夾雑物質が共存すると、アフィニティーカラムへの保持が弱まることが示唆された。また、シソマイシンはゲンタマイシンおよびネチルマイシンに比べ、抗原抗体反応における親和力が弱いことが推察された。

C.1.3 実試料のクロマトグラム

ゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシンの標準品を添加した食肉抽出液を用い、アフィニティーカラムにより精製を行い、HPLC/FL により測定した。その結果、夾雑物質が少ない良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 2)。このことから、アフィニティーカラムは精製能が高いことが示唆された。

C.2 MIP による試料精製と、アフィニティーカラムおよび固相抽出カートリッジによる試料精製効果の比較

C.2.1 MIP およびアフィニティーカラムの保持能の検討

クロラムフェニコールの標準品 (1 µg/mL) 各 1 mL を、MIP およびアフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、それぞれ 92.1 および 94.5%と、良好な回収率が得られた (Table 2)。このことから、MIP およびアフィニティーカラムは、クロラムフェニコールを十分に保持可能であることが分かった。

C.2.2 試料精製能の比較

ハチミツを試料として、B.2.5 に示す前処理を行い、MIP、アフィニティーカラムおよび Oasis HLB により精製した。精製後の溶液にクロラムフェニコールの標準品 1000 ng を添加し、HPLC/UV により測定を行った。その結果、MIP およびアフィニティーカラムにより精製した場合、Oasis HLB により精製した場合に比べ、良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 3)。このことから、MIP およびアフィニティーカラムは同等な精製能を有しており、

精製能は、Oasis HLB に比べ高いと考えられた。

C.2.3 コストパフォーマンス

MIP、アフィニティーカラムおよび Oasis HLB の一本あたりの価格を比較した。一本あたり MIP の場合、1320 円、アフィニティーカラムの場合、54300 円、Oasis HLB の場合、300 円であった(Fig. 4)。このことから、MIP および Oasis HLB はアフィニティーカラムに比べ、格段に低コストであることが分かった。しかし、アフィニティーカラムは自作したため価格が高かったが、MIP や Oasis HLB のようにメーカーの市販品があれば、より低価格になることも予想された。

C.2.4 操作性

MIP による試料精製では、洗浄に計 9 回の操作が必要であり、また、試料負荷の際には 0.5 mL/min 以下、溶出の際には 0.2 mL/min 以下という流速の制限もあったことから煩雑となり、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラムが優れていた。しかし、今回用いたアフィニティーカラムは自家調製であったことから、事前の調製も考慮すると操作の簡便性では、Oasis HLB > MIP > アフィニティーカラムの順となった。

D 結論

D.1 アミノグリコシド系抗生物質のアフィニティーカラムへの適用性の検討

ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムを使用し、そのアフィニティーカラムがゲンタマイシン以外のアミノ

グリコシド系抗生物質を保持可能か否か検討したところ、作製したアフィニティーカラムはゲンタマイシンと構造式の類似するシソマイシンおよびネチルマイシンも保持可能であることが分かった。しかし、シソマイシンの場合、標準品に比べて食肉抽出液での回収率の低下が認められた。このことから、食肉由来の夾雑物質が共存すると、アフィニティーカラムへの保持が弱まること、また、シソマイシンはゲンタマイシンおよびネチルマイシンに比べ、抗原抗体反応における親和力が弱いことが推察された。

D.2 MIP による試料精製と、アフィニティーカラムおよび固相抽出カートリッジによる試料精製効果の比較

ハチミツを試料として、それぞれの試料精製効果を比較・検討した結果、精製能においては MIP とアフィニティーカラムが優れ、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラム、コスト面においては Oasis HLB と MIP が優れていることが確認された。

以上のことをまとめると、夾雑物質の少ない試料におけるスクリーニング分析には固相抽出カートリッジが適しており、また行政検査など、より精製を必要とする試料の分析には MIP が、確認試験など、より定性を重要視される分析にはアフィニティーカラムが適していることが示唆された。従って、これらのクリーンアップ法は、状況に応じてそれぞれ使い分ける、または併用することが望ましいと考えられた。

E 健康危険情報

特になし

F 研究成果

1.学会発表

1) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椛沢 圭介, 岡山 明子, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之; 食肉中ゲンタマイシン測定におけるアフィニティーカラムの有用性の検討; 第 51 回日本薬学会関東支部大会 (2007 年 10 月・星薬大)

2) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椛沢 圭介, 岡山 明子, 加藤 美穂子, 小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之; アフィニティークロマトグラフィーを用いた食肉中残留抗菌性物質の試料精製; 日本薬学会第 128 年会(2008 年 3 月・横浜)

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 アフィニティーカラムを用いたアミノグリコシド系抗生物質の回収率

	添加量(ng/mL or ng/g)	回収率 (% ; mean ± S.D.)	
		標準品	鳥肉抽出液
ゲンタマイシンC ₁	200	104.6 ± 7.2	89.5 ± 17.5
ゲンタマイシンC _{1a}	115	111.3 ± 13.1	96.8 ± 18.4
ゲンタマイシンC ₂	185	103.1 ± 7.4	89.3 ± 17.6
シソマイシン	500	106.3 ± 16.8	68.4 ± 16.2*
ネチルマイシン	500	105.1 ± 16.0	87.1 ± 17.3*

n = 5 (* : n = 3)

Table 2 MIP およびアフィニティーカラムを用いたクロラムフェニコールの回収率

添加量	回収率 (% ; mean ± S.D.)	
	MIP	アフィニティーカラム
1 µg/mL	92.1 ± 0.81	94.5 ± 2.8

n = 3

試料: 標準品

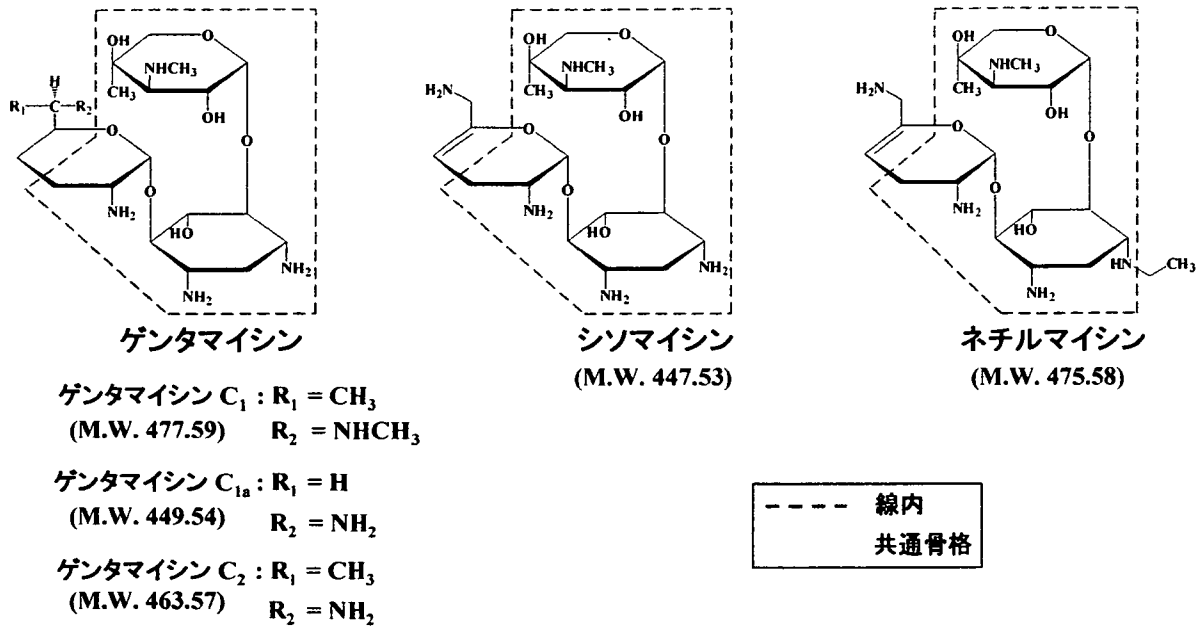


Fig. 1 アミノグリコシド系抗生物質の化学構造

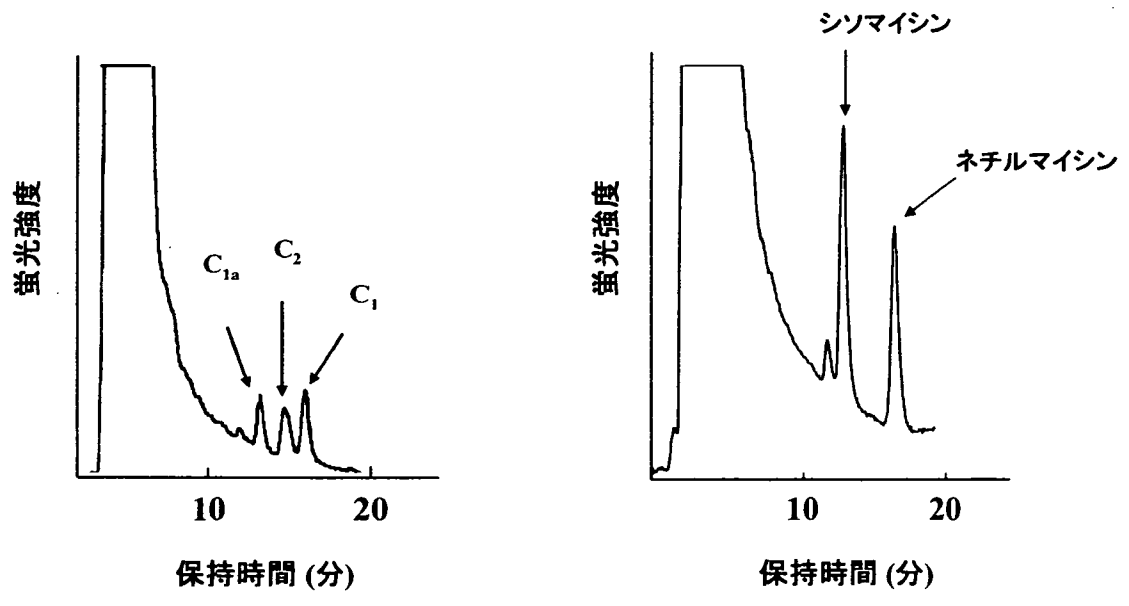
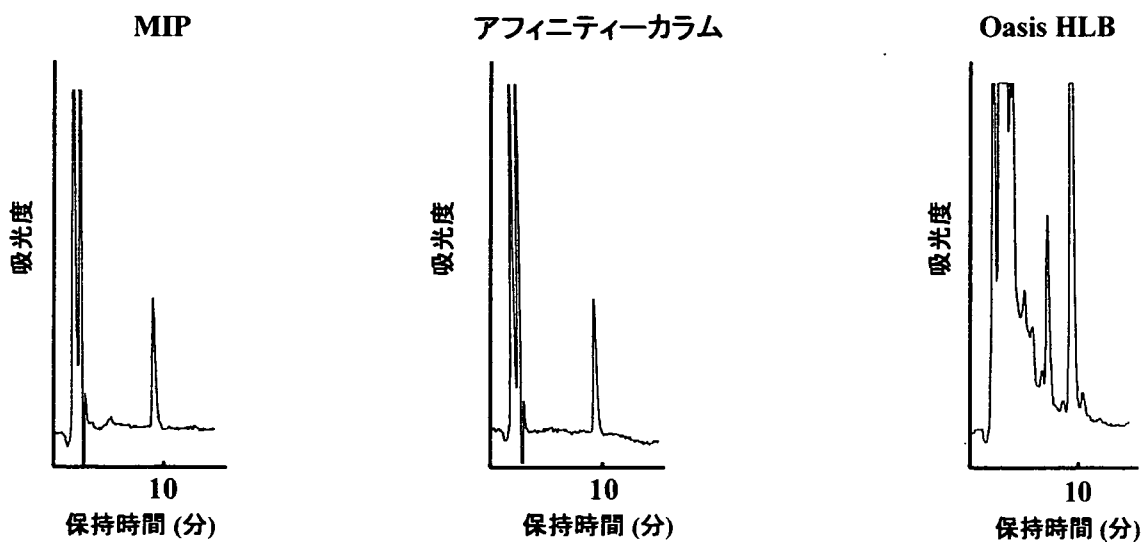


Fig. 2 実サンプルのクロマトグラム
(試料: 鳥むね肉)

ゲンタマイシン(500 ng/g 添加) シソマイシン, ネチルマイシン(500 ng/g 添加)



試料：ハチミツ

Fig. 3 MIP, アフィニティーカラムおよび Oasis HLB により精製されたハチミツのクロマトグラム

一本あたりの値段

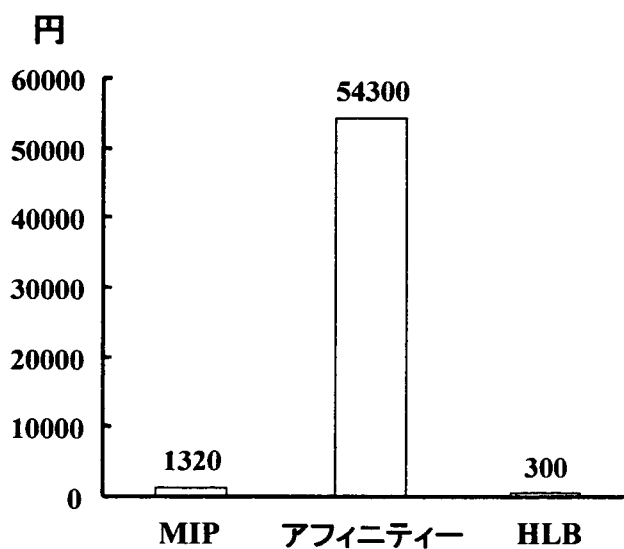


Fig. 4 MIP, アフィニティーカラムおよび Oasis HLB の一本あたりの価格

研究成果

- 1) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 中澤裕之: 微生物学的試験法による畜産物中に残留する抗菌性物質の高感度測定法. 分析化学, 56, 1097-1103 (2007)
- 2) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 牛山慶子, 竹葉和江, 坂本美穂, 林洋, 井草京子, 井部明広, 永山敏廣: 微生物学的スクリーニング, HPLC および LC/MS/MS による食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質 4 薬剤の迅速分析, 日本食品衛生学雑誌, 49(1), 37-44 (2008)
- 3) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 井部明広, 藤田和弘, 丹野憲二, 中澤裕之: 食肉中に残留する抗菌性物質の微生物学的簡易検査法, 食品衛生学雑誌, 49, 印刷中 (2008)
- 4) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan, James D. MacNeil : Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Food Additives and Contaminants, to be submitted (2008)
- 5) Kazuhiro Fujita, Hironobu Ito, Michiyo Ishihara, Sachi Inukai, Hiroyuki Tanaka, Makoto Taniguchi: Analysis of Trace residues of Tetracyclines in Dark Colored Honeys by High-Performance Liquid Chromatography Using Polymeric Cartridge and Metal Chelate Affinity Chromatography : 食品衛生学雑誌, 49, 投稿中 (2008)
- 6) 八津川洋一, 藤田和弘, 中村宗知, 渡井正俊, 村山三徳, 米谷民雄: LC/MS による畜産物中のセデカマイシンおよびテルデカマイシンの同時分析法: 食品衛生学雑誌, 49, 投稿中 (2008)
- 7) Kazuhiro Fujita, Hironobu Ito, Munetomo Nakamura, Masatoshi Watai, and Makoto Taniguchi: Determination of Chloramphenicol Residues in Bee Pollen by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: J. AOAC Int. to be submitted (2008)

報 文

微生物学的試験法による畜産物中に残留する 抗菌性物質の高感度測定法

堀江 正一^①, 小林 晴美¹, 石井 里枝¹, 中澤 裕之²

畜産食品中に残留するペニシリン系抗生物質 (PCs), セファロsporin系抗生物質 (CEs), テトラサイクリン系抗生物質 (TCs), マクロライド系抗生物質 (MLs), アミノグリコシド系抗生物質 (AGs), キノロン系抗菌剤 (QNs) などを中心とした, より多くの抗菌性物質を一括して検出できる微生物学的試験法を検討した. 畜産食品から 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2) で除タンパクと同時に薬物を抽出し, ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した. 各グループから代表的薬剤を選び, 残留基準値レベルで添加回収実験を行った結果, 明瞭な阻止円が観測され, 回収率はおおむね 70% 以上であった. 本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高い PCs, CEs, MLs, TCs, AGs, QNs を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 抗菌性物質の残留の有無を簡便に判定できる有効な方法であると思われる.

1 緒 言

畜水産動物の疾病予防及び治療を目的に数多くの抗菌性物質が使用され, 畜水産物の生産性向上に大きく寄与している. しかし, 一方では, これら薬物の畜水産物中への残留が食品衛生上強く懸念されていることから¹⁾, 残留の有無を確認する簡易かつ迅速な分析法の確立が必要とされている. 残留抗菌性物質の分析法は, 微生物学的試験法と理化学的試験法に大別される. 微生物学的試験法とは, 抗菌性物質が有する微生物の増殖を抑制する作用 (抗菌作用) を指標とした分析法であり, 形成された阻止円大きさを測定することにより, 試料中の抗菌性物質の量を求めることができる. 抗生物質をはじめとする抗菌性物質の残留分析には, 従来から微生物学的試験法が汎用されてきた²⁾. 現在, 日常検査には平成 6 年に厚生省から示された「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」及び「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法 (改訂)」が公定法として用いられている. しかし, これらの検査法³⁾は, 試料前処理に有害な有機塩素系溶媒を使用しており, 操作も煩雑な面がある. 更に検出感度の点で改善すべき問題がある. そこで今回, 畜産食品中に残留する可能性が高いペニシリン系抗生物質, セファロsporin系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノ

グリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤などを中心とした, より多くの抗菌性物質の残留の有無を一括して判定できる実用的な微生物学的試験法の構築を試みた.

2 実 験

2.1 試料及び試薬

試料には, 埼玉県内で市販されていた牛, 豚, 鶏の筋肉部及び豚肝臓を用いた.

標準抗菌性物質: 試験に供した抗生物質及び合成抗菌剤は動物用医薬品として汎用されている薬剤を中心に選択し, ペニシリン系抗生物質 (PCs) 7 種, セファロsporin系抗生物質 (CEs) 7 種, マクロライド系抗生物質 (MLs) 8 種, アミノグリコシド系抗生物質 (AGs) 6 種, テトラサイクリン系抗生物質 (TCs) 4 種, クロラムフェニコール (CP), サルファ剤 (SAs) 10 種, キノロン剤 (QNs) 12 種の計 55 種類の抗菌性物質を用いた (Table 1).

標準溶液: 各標準品約 20 mg を精秤し, PCs, CEs, MLs, TCs, CP, SAs, QNs はメタノール 50 mL に, AGs は精製水 50 mL に溶解して標準原液を調製し, 適宜 10% メタノールで希釈して標準溶液とした.

除タンパク・抽出用溶液: 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリルを (6:2:2) の割合に混合し, 約 10°C に冷却をして用いた (用時調製).

Oasis HLB カートリッジ (200 mg): Waters 製, カートリッジはあらかじめメタノール 5 mL, 次いで精製水 5 mL でコンディショニングした後使用した.

その他の試薬は, いずれも特級品を使用した.

¹ 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

² 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Detection Limit of Antibacterials

Antibacterials			Detection limit/ $\mu\text{g mL}^{-1}$			
			<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 8)	<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 5)	<i>M.l.</i> ATCC 9341	
Antibiotics	Penicillins	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	
		Ampicillin	0.05	0.05	0.01	
		Benzylpenicillin	0.05	0.1	0.01	
		Cloxacillin	0.25	2.5	2.5	
		Dicloxacillin	0.25	1	1	
		Nafcillin	0.5	2.5	0.05	
		Oxacillin	0.1	2.5	0.25	
		Cephalosporins	Cefoperazone	2	>50	0.5
	Cefuroxime		0.25	>50	0.5	
	Cephapirin		0.01	0.5	0.1	
	Cephalonium		0.25	5	1	
	Cephalexin		0.5	5	0.5	
	Cefquinome		1	2.5	0.25	
	Ceftiofur		0.05	2.5	0.1	
	Macrolides		Erythromycin	0.5	0.1	0.05
		Oleandomycin	5	0.5	0.25	
		Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	
		Josamycin	2.5	1	0.25	
		Spiramycin	10	2.5	0.5	
		Tylosin	2.5	0.5	0.5	
		Tilmicosin	2.5	1	0.5	
		Mirosamicin	2.5	0.5	0.1	
	Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin	10	0.5	2.5	
		Neomycin	10	0.5	10	
		Gentamycin	1.0	0.25	5	
		Kanamycin	2.0	1	12.5	
		Spectinomycin	>10	>10	>10	
		Streptomycin	5.0	0.5	2.5	
		Tetracyclines	Oxytetracycline	0.25	1	>10
	Chlortetracycline		0.05	0.5	10	
	Tetracycline		0.1	1	>10	
	Doxycycline		0.05	0.1	1	
	Others	Chloramphenicol	10	10	2.5	
	Synthetic antibacterials	Sulfa drugs	Sulfadiazine	>50	>50	>50
			Sulfadimethoxine	>50	>50	>50
			Sulfadimazine	>50	>50	>50
			Sulfadoxine	>50	>50	>50
			Sulfamethoxazole	>50	>50	>50
			Sulfamethoxypyridazine	>50	>50	>50
			Sulfamerazine	>50	>50	>50
			Sulfamonomethoxine	>50	>50	>50
			Sulfaquinoxaline	>50	>50	>50
			Sulfathiazole	>50	>50	>50
			Quinolones	Danofloxacin	0.5	0.05
		Difloxacin		0.5	0.05	>50
		Enrofloxacin		0.5	0.25	10
		Flumequine		1.0	2.5	>50
Nalidixic acid		2.5		10	>50	
Norfloxacin		1.0		0.5	>50	
Ofloxacin		1.0		0.25	10	
Orbifloxacin		0.5		0.25	25	
Oxolinic acid		0.5		1.0	>50	
Piromidic acid		1.0		5.0	>50	
Vebufloxacin		1.0		0.5	25	
Sarafloxacin		0.5		0.25	50	

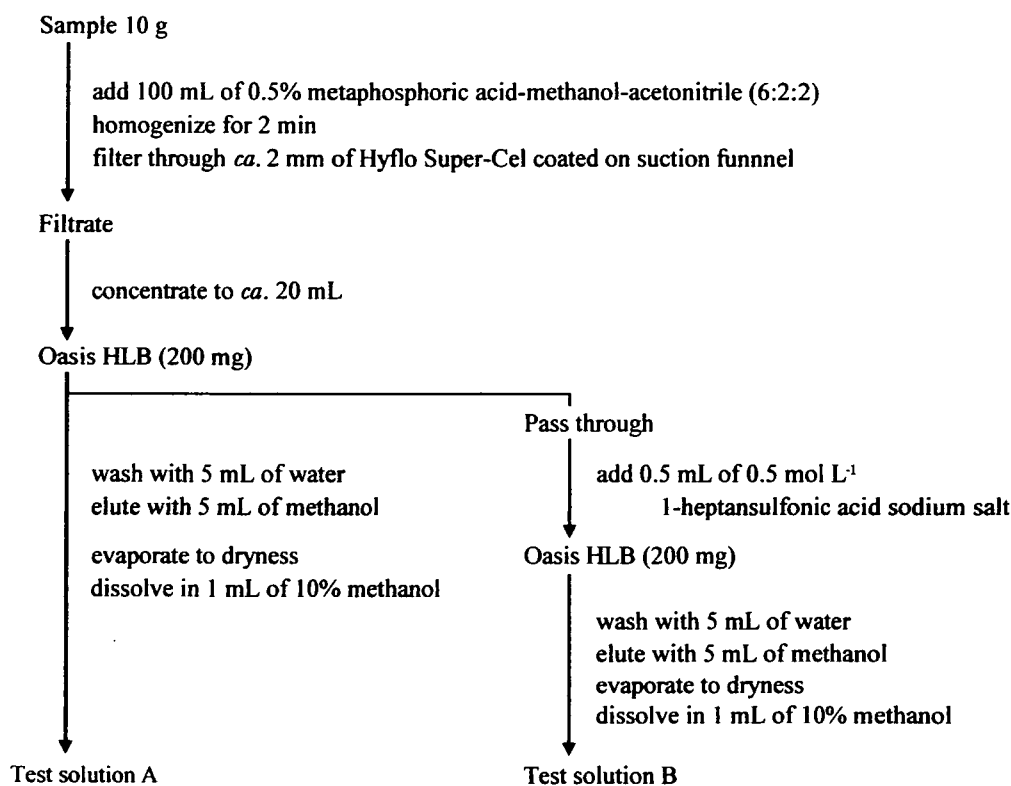


Fig. 1 Analytical procedure for antibacterials in livestock products

2・2 微生物学的試験法

試験菌としては, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B.s.* ATCC 6633) 及び *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M.l.* ATCC 9341) を用いた. 試験菌液の調製は「動物用抗生物質製剤検定一般基準」⁴⁾ に準拠した. 検査用平板培地は「畜産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾ におおむね準拠して調製した. すなわち, 検査用平板は, いずれも Difco 製の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地) 及び Antibiotic Medium 5 (AM5 培地) を使用した. これらの培地を 121°C, 15 分間高压滅菌処理後, 55°C ± 1 に保持し, これに *B.s.* ATCC 6633 芽胞菌液 (使用培地; AM5 及び AM8 の 2 種類では, 培地の 1/100 量を), *M.l.* ATCC 9341 試験菌液 (使用培地; AM5 では培地の 1/5 量) を加え, 十分に混合した後, その 9 mL をペトリ皿に注入し, 水平に静置して凝固させ, 検査用平板培地を作製した. パルプディスクはアドバンテック東洋製の直径 10 mm, 厚さ 1.2 mm (吸水量 0.08 mL ± 0.01 mL) の厚手タイプを用いた. パルプディスクを試験溶液に浸漬し, 検査用平板培地上に置いた. それらの平板は, 約 5°C で 30 分間放置した後, 30°C で 18 時間培養した.

2・3 検量線の作成

各標準品の濃度が 0.01 ~ 10 ppm となるように標準溶液を調製し, 微生物学試験法に供した. 出現した阻止円の直径から片対数グラフを用いて検量線を作成した. すなわ

ち, 片対数グラフの縦軸に阻止円直径を, 横軸 (対数目盛) に薬剤濃度をプロットして検量線を作成した.

2・4 試験溶液の調製

試料 10 g を取り, 除タンパク・抽出用溶液 100 mL を加えてホモジナイズした後, 濾過補助剤ハイフロスーパーセルを厚さ約 2 mm に敷いた吸引濾過器 (桐山漏斗製) を用いて濾過した. なお, 試料が肝臓の場合はホモジナイズ抽出液にもハイフロスーパーセル約 3 g 加え, 吸引濾過した. 濾液を 40°C の水浴中で約 20 mL に減圧濃縮した後, Oasis HLB カートリッジに負荷した. カートリッジを精製水 5 mL で洗浄後, メタノール 5 mL で溶出した. 溶出液を減圧乾固した後, 残留物を 10% メタノール 1.0 mL で溶解し, PCs, CEs, MLs, TCs 及び QNs 検査用試験溶液 (試験溶液 A) とした. 一方, カートリッジ流出液及び洗浄液を合わせ, 0.5 M ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加えた後, 再度コンディショニング (先に使用したカートリッジをメタノール 5 mL 及び精製水 10 mL で洗浄) した Oasis HLB カートリッジに負荷した. カートリッジを精製水 5 mL で洗浄した後, メタノール 5 mL で溶出した. 溶出液を減圧乾固した後, 残留物を 10% メタノール 1.0 mL で溶解し, AGs 検査用試験溶液 (試験溶液 B) とした (Fig. 1).

Table 2 Comparison of test organisms on limit of detection of tetracyclines

Tetracyclines	Detection limit/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 8)	<i>B.m.</i> ATCC 11778 (AM 8)
Oxytetracycline	0.25	0.1
Chlortetracycline	0.05	0.05
Tetracycline	0.1	0.1
Doxycycline	0.05	0.05

3 結果及び考察

3.1 テトラサイクリン系抗生物質の検出

「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾では、試験菌として *B.s.* ATCC 6633, *M.l.* ATCC 9341 及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B.m.* ATCC 11778) の3試験菌を採用している。3試験菌の中で、特に *B.m.* ATCC 11778 は TCs を感度よく検出する目的で採用されている²⁾。しかし、試験菌 *B.m.* ATCC 11778 は、試験菌液の調製が煩雑な面がある。そこで、試験菌 *B.m.* ATCC 11778 の代わりに *B.s.* ATCC 6633 の使用を検討した。一般に試験菌 *B.s.* ATCC 6633 の培地には、pH が 7.9 である AM 5 が採用されている。しかし TCs は、弱酸性領域で安定であることから、抽出溶液及び培地の pH 共に弱酸性領域 (pH 4.5 及び 6.5) が用いられている。そこで、*B.s.* ATCC 6633 を試験菌に用い、培地の pH が弱酸性 (pH 5.9) に調整済みの AM 8 を採用したところ、*B.m.* ATCC 11778 に比べ、幾分劣るものの TCs を感度よく検出することが可能であった (Table 2)。

3.2 抗菌性物質の検出限界

畜水産食品中に残留する抗菌性物質の検査に数多くの試験菌及び培地が採用されている⁴⁾。しかし、個々の抗菌性物質に対して好ましい試験菌及び培地を採用することは、試験操作が非常に煩雑となり、結果を得るまでに長時間を必要とする。そこで、比較的多くの抗菌性物質に対して感受性を示す 2 試験菌、3 検査用平板培地を用いることとした {*B.s.* ATCC 6633 (使用培地: AM5 及び AM8 の 2 種類) 及び *M.l.* ATCC 9341 (使用培地: AM5)}。本検査用培地に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べた (Table 1)。Table 1 に示すとおり、2 菌種、3 種平板培地を用いることにより、今回分析に供した多くの抗菌性物質は 0.1~0.5 ppm レベルで検出することが可能であった。なお、SAs はいずれも 50 ppm レベルでも阻止円の形成が十分でなく、通常の残留レベルでは検出困難と思われた。したがって、以後の検討から SAs は除くこととした。

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度の

施行により、畜水産食品中に含まれる抗菌性物質の検出感度としては、残留基準 (暫定基準を含む) 及び一律基準 (0.01 ppm) を満足する検出感度が要求される。抗菌性物質の牛、豚、鶏等の筋肉可食部、肝臓及び魚介類に対する残留基準 (暫定基準を含む) は、PCs, CEs では 0.005~2.0 ppm, MLs は 0.05~2 ppm, AGs は 0.04~2.0 ppm, TCs は 0.05~0.6 ppm, QNs は、0.01~2 ppm の範囲である。抗菌性物質及び対象食品により、残留基準値は大きく異なるが、望まれる検出感度は一律基準を含めた残留基準を総合的に考慮すると、微生物学的試験法においては 0.01~0.1 ppm とと思われる。

3.3 前処理法の検討

現在公定法として採用されている「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」³⁾における前処理法は、試料 5 g をクエン酸アセトン緩衝液 20 mL でホモジナイズ抽出するのみと簡易な操作である。しかし、この方法は畜産食品中に残留する薬物を 5 倍希釈するため、検出感度上問題がある。一方、「畜水産食品中の残留抗生物質分別推定法 (改訂)」³⁾では最終的に残留薬物は 10 倍に濃縮されるが、操作にクロロホルム等を使用し、かつ操作が極めて煩雑である。

畜水産食品中の残留抗菌剤の前処理法として種々の方法が用いられている。著者らはこれまでに、メタリン酸-メタノール系⁵⁾⁶⁾あるいはメタリン酸-アセトニトリル系溶液⁷⁾⁸⁾で除タンパクと同時に抽出し、多くの薬物が保持される逆相カートリッジによる前処理法を採用してきた。MLs や TCs はメタリン酸-メタノール系を、一方 QNs はメタリン酸-アセトニトリル系を用いることにより高回収率を得た。なお、除タンパク・抽出溶媒中のメタリン酸については、その濃度が高くなるに従い、除タンパク効果は向上するが、回収率が低下する薬物も見られた。そこで、除タンパク・抽出溶媒には 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2)⁹⁾を用いることにした。

次に、カートリッジであるが、TCs や QNs はシリカベースのオクタデシルシラン (ODS) 系カートリッジでは、充填剤中の残存シラノール基や金属不純物の影響を強く受け、不可逆的に一部が吸着される⁷⁾。そこで、カートリッジには残存シラノール基や金属不純物の影響の少ないポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いることにした。

なお、本前処理法では AGs は、そのほとんどがカートリッジに保持されずに流出した。AGs は、アミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であるためと考えられる。そこで、カートリッジ流出液にイオンペアー剤を加え、アミノグリコシド系抗生物質を保持させる手法を採用した¹⁰⁾¹¹⁾。

Table 3 Recoveries of Antibacterials from Swine Muscle and Liver

Antibacterials			Added/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery, % (mean, $n = 3$)	MRL in sample/ $\mu\text{g g}^{-1}$
Penicillins	Penicillin G	Swine Muscle	0.05	77	0.05
		Swine Liver	0.05	72	0.05
	Ampicillin	Swine Muscle	0.05	77	0.06
		Swine Liver	0.05	72	0.06
Cephalosporins	Cefapilin	Swine Muscle	0.1	89	0.03
		Swine Liver	0.1	82	0.03
	Cefalexin	Swine Muscle	0.1	86	0.2 (cattle muscle)
		Swine Liver	0.1	81	0.2 (cattle liver)
Macrolides	Erythromycin	Swine Muscle	0.1	75	0.05
		Swine Liver	0.1	70	0.05
	Spiramycin	Swine Muscle	0.1	81	0.2
		Swine Liver	0.1	73	0.6
Tetracyclines	Oxytetracycline	Swine Muscle	0.2	82	0.2
		Swine Liver	0.2	75	0.6
	Chlortetracycline	Swine Muscle	0.2	70	0.2
		Swine Liver	0.2	65	0.6
Aminoglycosides	Streptomycin	Swine Muscle	0.5	83	0.6
		Swine Liver	0.5	72	0.6
	Dihydrostreptomycin	Swine Muscle	0.5	81	0.6
		Swine Liver	0.5	77	0.6
Quinolones	Enrofloxacin	Swine Muscle	0.1	85	0.05
		Swine Liver	0.1	82	0.1
	Oxolinic acid	Swine Muscle	0.1	88	1
		Swine Liver	0.1	84	1

3.4 添加回収実験

豚の筋肉及び肝臓に PCs からベンジルペニシリン, アンプシリン, CEs からセファピリン, セファレキシン, MLs からエリスロマイシン, スピラマイシン, TCs からオキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, AGs からストレプトマイシン, デヒドロストレプトマイシン, QNs からエンロフロキサシン, オキソリン酸を選び, 添加回収実験を行った. 添加レベルは, 残留基準を参考にして 0.05~0.5 ppm とした. 今回検討した各抗菌性物質の添加回収率を Table 3 に示す. 添加回収率は, おおむね 70% 以上であり, 残留分析法としてほぼ満足すべき結果であると思われる.

本法により, 今回検討した 12 種類の牛, 豚, 鶏の筋肉部及び豚肝臓における検出感度は, 0.005~0.05 ppm レベルであった. 代表例として, 豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度を Table 4 に示す. 牛, 鶏の筋肉部及び豚肝臓における検出感度も豚筋肉部及び豚肝臓とほぼ同じであった. 今回検討した 12 種類の抗菌剤の本法における検出感度は, 基準以下の濃度の検出が可能であり, 満足できるものであった.

本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高い PCs, CEs, MLs, TCs, AGs, QNs を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 残留抗菌性物質の簡易かつ高感度な検出法として日常検査に用いら

れることが期待される.

4. 結 語

畜産食品中に残留する主な抗菌性物質として, ペニシリン系抗生物質, セファロsporin系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノグリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤などを中心とした, より多くの抗菌性物質を一括して検出できる高感度な微生物学的試験法を検討した.

畜産食品から 0.5% メタリン酸-メタノール-アセトニトリル (6:2:2) で除タンパクと同時に薬物を抽出し, ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した. 各グループから代表的薬剤を選び, 残留基準値レベル (0.05~0.5 ppm) で添加回収実験を行った結果, その回収率はおおむね 70% 以上であった.

本法は, 動物用医薬品として汎用され, 畜産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質, セファロsporin系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質, マクロライド系抗生物質, アミノグリコシド系抗生物質, キノロン系抗菌剤を簡易かつ高感度に検出することが可能であり, 残留抗菌性物質の簡易かつ高感度な検出法として日常検査に用いられる実用的な方法であると考えられる.

本研究は, 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安

Table 4 Limit of detection for swine muscle and liver

			Detection limit/ $\mu\text{g g}^{-1}$			MRL in sample/ $\mu\text{g g}^{-1}$
			<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 8)	<i>B.s.</i> ATCC 6633 (AM 5)	<i>M.L.</i> ATCC 9341	
Penicillins	Penicillin G	Swine Muscle	0.005	0.01	0.005	0.05
		Swine Liver	0.01	0.01	0.005	0.05
	Ampicillin	Swine Muscle	0.01	0.01	0.005	0.06
		Swine Liver	0.01	0.01	0.005	0.06
Cephalosporins	Cefapilin	Swine Muscle	0.005	0.01	0.01	0.03
		Swine Liver	0.005	0.01	0.02	0.03
	Cefalexin	Swine Muscle	0.05	0.5	0.1	0.2 (cattle muscle)
		Swine Liver	0.05	0.5	0.1	0.2 (cattle liver)
Macrolides	Erythromycin	Swine Muscle	0.05	0.01	0.005	0.05
		Swine Liver	0.2	0.02	0.005	0.05
	Spiramycin	Swine Muscle	2	1	0.05	0.2
		Swine Liver	2	1	0.05	0.6
Tetracyclines	Oxytetracycline	Swine Muscle	0.05	0.5	0.5	0.2
		Swine Liver	0.05	0.5	0.5	0.6
	Chlortetracycline	Swine Muscle	0.01	0.1	0.5	0.2
		Swine Liver	0.01	0.1	0.5	0.6
Aminoglycosides	Streptomycin	Swine Muscle	0.5	0.05	0.2	0.6
		Swine Liver	0.5	0.05	0.2	0.6
	Dihydrostreptomycin	Swine Muscle	0.5	0.05	0.2	0.6
		Swine Liver	0.5	0.05	0.2	0.6
Quinolones	Enrofloxacin	Swine Muscle	0.05	0.02	1	0.05
		Swine Liver	0.05	0.02	1	0.1
	Oxolinic acid	Swine Muscle	0.1	0.1	>10	1
		Swine Liver	0.1	0.1	>10	1

心・安全確保推進事業)により実施したものである。関係各位に
深謝します。

文 献

- 堀江正一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **36**, 329 (1995).
- 神保勝彦: 食品衛生学雑誌, **40**, J195 (1999).
- 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法, 畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法: 厚生省乳肉衛生課長通知, 衛乳第107号, 平成6年7月1日.
- 動物用抗生物質製剤検定一般基準: 農林水産省告示第1437号, 昭和54年10月17日.
- M. Horie, K. Saito, R. Ishii, H. Nakazawa: *J.*

Chromatogr. A, **812**, 295 (1998).

- M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa: *Anal. Chim. Acta*, **492**, 187 (2003).
- 堀江正一, 齋藤貢一, 能勢憲英, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **34**, 289 (1993).
- M. Horie, K. Saito, N. Nose, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **653**, 69 (1994).
- 堀江正一, 齋藤貢一, 吉田栄充, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **39**, 383 (1998).
- 堀江正一, 吉田栄充, 菊池好則, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **42**, 374 (2001).
- M. Horie, H. Saito, T. Natori, J. Nagata, H. Nakazawa: *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **27**, 863 (2004).

Sensitive Microbiological Assay of Residual Antibacterials in Meat by Microbiological Method

Masakazu HORIE¹, Harumi KOBAYASHI¹, Rie ISHII¹ and Hiroyuki NAKAZAWA²

¹ Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

² Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 20 July 2007, Accepted 2 November 2007)

A simple and sensitive screening method using bioassay for the simultaneous analysis of antibacterials (penicillins, cephalosporins, macrolides, tetracyclines, aminoglycoside, quinolones, etc.) in meat has been developed. The drugs were extracted with 0.5% metaphosphoric acid-methanol-acetonitrile (6:2:2), and the extracts were cleaned up on an OASIS HLB cartridge (200 mg). The pulp disk method with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (pH 6 and 8) and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (pH 8) as test organisms was employed for assaying the antibacterials. Many antibacterials, except for sulfa drugs, were detected with sufficient sensitivity (0.01 ~ 0.5 µg/mL). The recoveries of typical antibacterials (penicillin G, ampicillin, cefapirin, cefalexin, erythromycin, spiramycin, oxytetracycline, chlortetracycline, streptomycin, dihydrostreptomycin, enrofloxacin and oxolinic acid) from swine muscle and liver fortified at levels of 0.05 ~ 0.5 µg/g were 65 ~ 89%. Therefore, we recommend this proposed screening method for the routine analysis of residual antibacterials in livestock products.

Keywords : antibacterials; bioassay; residual analysis; meat.