

藥物食品檢驗局調查研究年報9:341-348,1991
Ann. Rept. NLFDTaiwan R.O.C. 9:341-348,1991

食品中四環素類抗生素殘留之 檢驗方法探討

張翠瑛 朱淑儀 王貞懿 張圓笙 洪其璧*

第五組

摘要

本報告以圓筒平板法及TLC-生物自析法進行豬肉、豬肝、雞肉、雞肝、鮮乳及鮮蛋中四環素類抗生素殘留之檢驗方法探討。

檢體經均質後以0.1%檸檬酸：乙醇(7:3)混合液萃取，再經XAD-2吸附性樹脂管柱淨化，最後以甲醇溶離，所得檢液分別利用圓筒平板法及生物自析法定性定量。圓筒平板法之最低檢出限量經四環素(OTC)，四環素(TC)均為0.05 $\mu\text{g/g}$ ，氯四環素(CTC)則為0.01 $\mu\text{g/g}$ 。鮮肉及內臟中OTC回收率89.7%~92.7%，TC81.3%~84.7%，CTC83.3%~88.0%；鮮乳之CTC平均回收率為86.3%，鮮蛋之CTC平均回收率為73.3%。在生物自析法中以正丁醇：醋酸：去離子水(10:1:2)展開液展開後，Rf值分別為CTC0.52, CTC0.32及TC0.43，感度三種均達5ng。

於檢體中分別添加鏈黴素、林可黴素、健牠黴素、新黴素5 $\mu\text{g/g}$ ，結果均無抑制圈形成；泰黴素、紅黴素在5 $\mu\text{g/g}$ 時有抑制圈，2.5 $\mu\text{g/g}$ 時則無抑制圈形成；配尼西林在0.03, 0.02 $\mu\text{g/g}$ 時有抑制圈，0.01 $\mu\text{g/g}$ 時則無抑制圈形成。

由市面抽購120件檢體進行實驗，結果僅檢出豬肝1件中有OTC0.062 ppm之殘留，符合規定。

鍵語：食品(Food)、四環素類抗生素(Tetracyclines)、殘留(Residues)、微生物方法(Microbiological Method)

前言

四環素類抗生素(Tetracyclines, TCs)屬廣效性抗生素，在所有動物用抗生素中可說是用量最大，常作為飼料添加劑、家禽輔助劑，以提高飼料利用效率、產蛋率、促進生長、預防

或治療疾病等，經常使用之四環素類抗生素主要有氯四環素(Chlortetracycline, CTC)，經四環素(Oxytetracycline, OTC)及四環素(Tetracycline, TC)三種¹⁻⁶。但是，低濃度、長期使用可能導致人類之過敏症、抗藥性等結果，故已引起世界各國對食品抗生素殘留問題之重視⁷⁻¹⁰。

我國行政院衛生署於76年4月11日公告「動物用藥殘留標準」其中對CTC,OTC及TC在禽畜可食部分、乳及蛋等之殘留標準已作明確規定¹¹。目前中國國家標準對於乳品、鮮肉之殘留抗菌物質雖訂有檢查法^{12、13}，但無法鑑定其種類，所以建立適用於食品中四環素類抗生素殘留之檢驗法實屬必要。

四環素類抗生素易溶於水，安定性低，且受溶媒之pH值、光、熱變化等影響大²，食品中干擾物亦多，如使用化學分析(如氯相層析法、高速液相層析法等)^{14、15}可能出現許多干擾波峰(peak)造成分析結果誤判且通常物理化學反應並不與抗生物質之抗菌性平行相關¹⁶，因此在例行之食品抗生素檢驗工作上，微生物檢定法(Microbiological assay)仍是值得¹⁷⁻²¹。

本局於75、76年度中曾參考中國國家標準¹²對市售禽肉、乳品及參考丹野等人的方法對養殖魚類進行抗生素殘留調查^{22,23}，初步結果不錯。因此本研究擬繼續利用圓筒平板法(cup-and-plate method)及TLC-生物自析法(TLC-bioautography)，進行四環素類抗生素在食品中殘留檢驗法之探討，以期建立鑑別定量方法。

材料與方法

一、檢體來源：

抽購市售之豬肉、豬肝、雞肉、雞肝、鮮乳及雞蛋等六種食品檢體，分別進行回收率測試。

二、試藥及器具：

(一)標準品溶液配製

確取對照用標準品鹽酸羥四環素(OTC, 935 μ g/mg)，鹽酸四環素(TC, 988 μ g/mg)及鹽酸氯四環素(CTC, 928.5 μ g/mg)——分別以pH4.5磷酸緩衝液配製1000 μ g/ml之原液，再稀釋成所需之不同濃度。

(二)pH4.5磷酸緩衝液

稱取13.6g磷酸二氫鉀溶解於蒸餾水中，然後稀釋成1000ml。

(三)實驗菌株

Bacillus cereus var. *mycoides* ATCC 11778配製孢子懸浮液。

(四)定性定量用培養基

取適量ATCC 11778孢子懸浮液加入滅菌之Antibiotic medium NO.8,使培養基菌量約 4.2×10^5 cells/ml。

1. 取上述培養基7ml倒入直徑9cm之培養皿內備用。

2. 另取上述培養基80ml加入220mm \times 220mm \times 10mm之玻璃製四方型平皿內備用。

(五)試藥

甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、鹽酸、醋酸均採試藥特級；檸檬酸、氫氧化鉀、磷酸二氫鉀均採試藥級。

(六)萃取液

0.1%檸檬酸：乙醇=7：3(v/v)。

(七)XAD-2吸附性樹脂管柱

XAD-2吸附性樹脂(Merck製, Art 15259)先以1N NaOH洗淨，以蒸餾水沖洗至pH7；再加1N HCL沖洗，續以水洗滌至接近pH7，最後以甲醇洗滌之後，亦以水沖至接近pH7，稱取10g填充於內徑10mm，長度300mm之管柱中，並以蒸餾水濕潤，保存備用。

(八)薄層層析板(Merck製, Art5552, TLC aluminium sheets cellulose, 不含螢光劑, 200X200X0.1mm)。

(九)展開液：

正丁醇：醋酸：去離子水=10：1：2

正丁醇：甲醇：去離子水=4：1：2

正丁醇：醋酸：去離子水=4：1：5

pH4.0之麥氏緩衝液 [12.29ml之0.1M檸檬酸溶液檸檬酸二鈉之溶液(Na₂HPO₄ 2H₂O 35.62g/l)之溶液] 之甲乙酮飽合溶液
乙酮：氯仿：正丙醇：浸漬液=16：20：27：16

浸漬液：[0.1N苯二甲酸鹽pH3.75 + 甘油(19+1)]

(十)器具及裝置

1. 均質攪拌器(Multi-Blender mill, 日本精機製作所)。

2. 離心機(Sigma, 2D)轉速可達2500rpm者。

3. 減壓濃縮機(BÜCHI 011 Rotavapor)。

4. 展開槽：玻璃製品、槽底平坦。

食品中四環素類抗生素殘留之檢驗方法探討

5. 恆溫培養箱：溫度可控制 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 者。
6. 定量瓶：玻璃製品附蓋，容量10ml, 25ml, 50ml及100ml。
7. 微量吸管(Micropipette)：可定量250 μl 者。
8. 游標尺(MITUTOYO製)。

(二)其他抗生素

選取衛生署公告「動物用藥殘留標準」中之另外七種抗生素：鏈黴素 (Streptomycin, ST) 新黴素 (Neomycin, NM), 健牠黴素 (Gentamycin sulfate, GM), 林可黴素 (Lincomycin, LM), 泰黴素 (Tylosin, TS), 紅黴素 (Erythromycin, EM), 配尼西林 (Penicillin G, PC), 分別溶於適當之磷酸緩衝液，予以稀釋備用。

三、方法(表一)²⁰

(一)檢體處理

1. 豬肉、雞肉—分別以攪拌器充分攪拌後，稱取10g。
2. 豬肝、雞肝—同鮮肉之處理。
3. 鮮乳—使充分混合均勻後，取10ml。
4. 雞蛋—全蛋5個，充分攪拌均勻後，取10g。

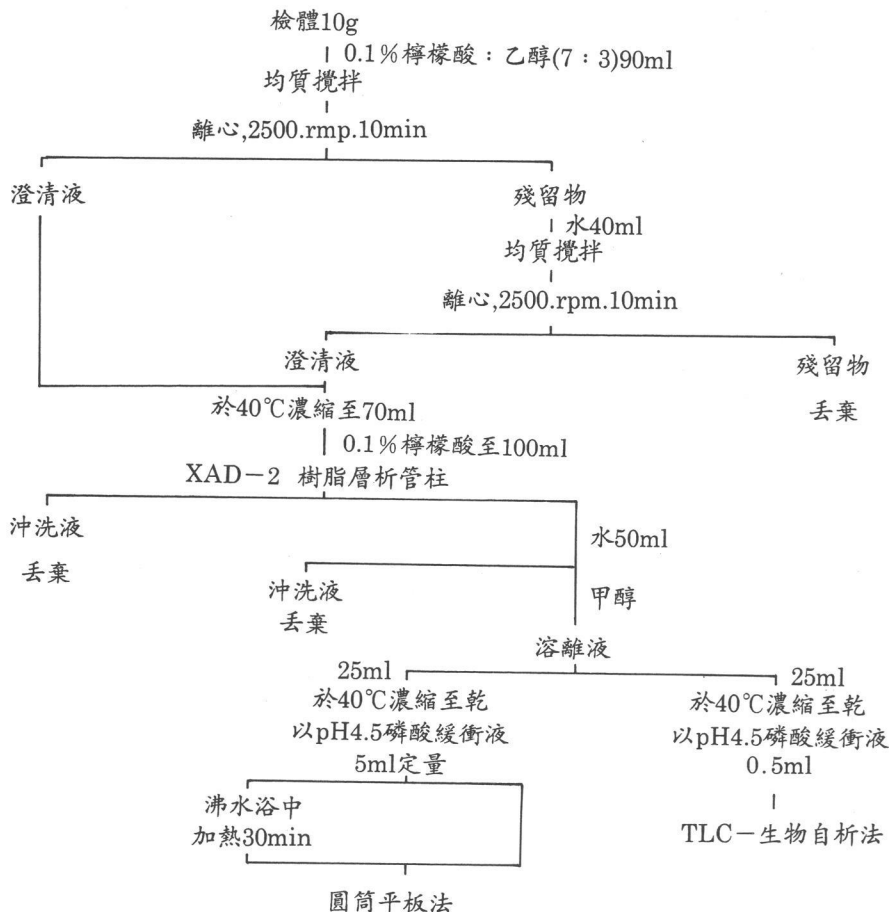
(二)萃取

檢體10g(或10ml)加90ml之0.1%檸檬酸與乙醇混合液(7:3)以均質攪拌器攪拌3分鐘後，離心(2500rpm, 10分鐘)，取澄清液，殘留物再加40ml蒸餾水攪拌後離心，取澄清液，合併二次澄清液，於 40°C 水浴中減壓濃縮至約70ml，再加0.1%檸檬酸溶液至100ml。

(三)淨化

將檢液100ml倒入已填充之XAD-2吸附性樹脂管柱中，以50ml蒸餾水沖洗，沖洗液丟棄，

表一 經四環素(OTC)氯四環素(CTC)及四環素(TC)之檢驗流程



再用50ml甲醇溶離，收集甲醇溶離液，平分為二部份，一部份濃縮至乾後加入定量5ml pH4.5磷酸緩衝液進行圓筒平板法分析，另一部份濃縮至乾後，以pH4.5磷酸緩衝液0.5ml溶出，進行TLC-生物自析法試驗。

(四)圓筒平板法(Cup-and-plate method)。

將已滅菌不銹鋼圓筒(外徑8mm,內徑6mm,高10mm)置於定性定量用培養基上,添加不同濃度TCs標準溶液及檢液,均為三重複,經30°C,18小時培養後,以游標尺測量抑制圈大小。

(五)TLC-生物自析法(TLC-bioautography)。

距TLC板下端2cm處,滴標準品溶液或檢液30 μ l(邊點邊以吹風機冷風吹乾)後,置展開槽內以不同展開液展開至12-14cm取出,風乾30分鐘,再覆蓋於已製備好之玻璃製四方型平皿培養基上,於室溫靜置30分鐘後,將TLC板移去,四方型平皿則放入培養箱中,經30°C,18小時培養後,測量抑制圈之Rf值。

結 果

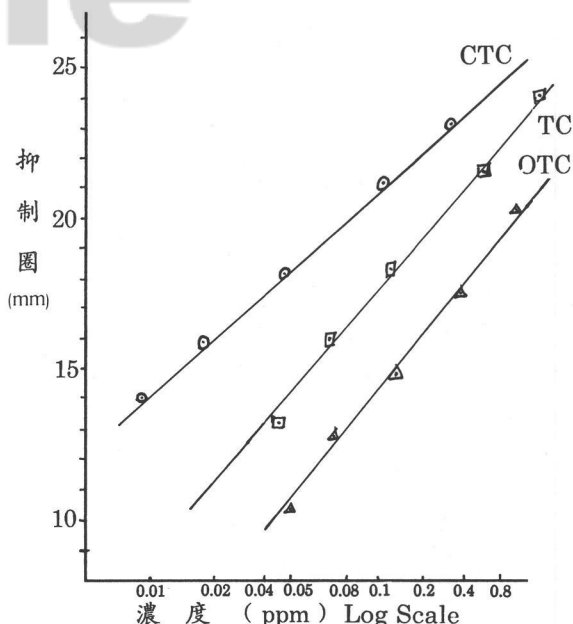
一、標準曲線之製作

配製OTC及TC 0.05 0.1 0.2 0.4 0.8 μ g/ml, CTC則為0.01 0.02 0.04 0.08 0.16 μ g/ml各五種標準溶液,依中國國家標準抗生素之微生物測定法²⁴製作標準曲線(圖一),最低感度OTC及TC均達12.5ng,CTC可達2.5ng。

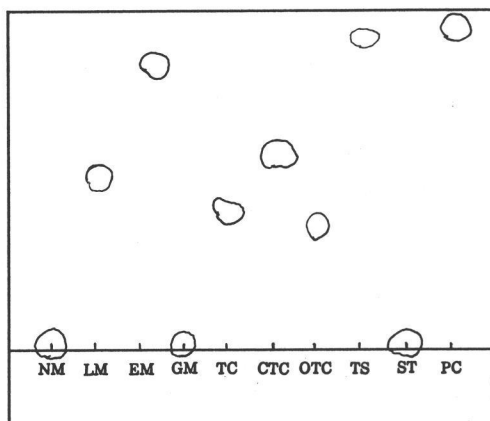
二、回收率測試及檢出限量

取適當濃度之TCs標準溶液分別添加於豬肉、豬肝、雞肉、雞肝、鮮乳及雞蛋等檢體中,進行回收率測試,並作空白試驗,各類食品添加TCs之回收率詳如表二。OTC,TC之最低檢出限量為0.05 μ g/g,CTC為0.01 μ g/g,在各檢出限量之存在下,仍有微量抑制圈的形成。

三、四環素類抗生素之生物自析法經不同展開液展開後,TCs之Rf值,以正丁醇:醋酸:去離子水=10:1:2展開之效果最佳,Rf值為OTC 0.32,CTC 0.52和TC 0.43(表三)且與其他抗生素之Rf值亦可分開(圖二),在TLC-生物自析法中,三種四環素類抗生素之感度均達5ng。



圖一 四環素、經四環素之圓筒平板法標準曲線圖



NM: 新黴素 CTC: 氯四環素
 LM: 林可黴素 OTC: 經四環素
 EM: 紅黴素 TS: 泰黴素
 GM: 健牠黴素 ST: 鏈黴素
 TC: 四環素 PC: 配尼西林
 展開液: 正丁醇: 醋酸: 去離子水 10:1:2
 Rf值: OTC: 0.32
 TC: 0.43
 CTC: 0.52

圖二 四環素類抗生素與其他抗生素之Rf值比較

食品中四環素類抗生素殘留之檢驗方法探討

四、添加其他抗生素之結果

於鮮乳檢體中，分別添加四環素類以外的鏈黴素(ST)，林可黴素(LM)，泰黴素(TS)，紅黴素(EM)，健牠黴素(GM)，新黴素(NM)使濃度成 $5\mu\text{g/g}$ 及 $2.5\mu\text{g/g}$ ，配尼西林(PC)則為 $0.03, 0.02, 0.01\mu\text{g/g}$ ，依表一之檢驗流程以圓筒平板法進行測試，結果TS, EM在 $3\mu\text{g/g}$ ，有不明顯之抑制圈形成，當濃度為 $2.5\mu\text{g/g}$ ，則無抑制圈形成；PC在 $0.03, 0.02\mu\text{g/g}$ 時均有不明顯之抑制圈形成，但濃度降至 $0.01\mu\text{g/g}$ 時則無抑制圈的形成；其餘ST、LM、GM、NM等四種抗生素在 $5\mu\text{g/g}$ 及 $2.5\mu\text{g/g}$ 時均無抑制圈形成(表四)。

五、市售檢體之檢驗結果

由市面抽購120件檢體(豬肝、豬肉、雞肝、雞肉、鮮乳及雞蛋各20件)依本方法(表一)進行實驗，結果僅檢出豬肝1件中，有OTC 0.062 ppm之殘留，符合規定。

討 論

本研究係依據「動物用藥殘留標準」選取較具代表性之食品，包括豬肉、豬肝、雞肉、雞肝、鮮乳及雞蛋進行探討。在檢體前處理時，肉類所含油脂較多²⁵，以離心方式不易分離，此時採用抽吸方式(Suction)過濾，效果良好。丹野等人²⁰曾就十二種抽取液對於四環素類抗生素之回收率加以比較，其中並包括日本厚生省在畜水產品殘留抗生物質之同定分析時所使用之抽取液[水及磷酸緩衝液：丙酮(7:3)二種]，結果發現以0.1%檸檬與乙醇混合液(7:3)對四環素類抗生素之回收率最高，因此本研究就0.1%檸檬酸：乙醇(7:3)進行六種食

品之四環素類抗生素回數率測試均在80%以上，甚至高達92.7%，鮮蛋之回收率略低，為73.3%，可能含多量卵白之故。

分別添加OTC、TC $0.05\mu\text{g/g}$ 及CTC $0.01\mu\text{g/g}$ 於食品檢體中，結果有抑制圈形成，故最低檢出限量經四環素、四環素均為 $0.05\mu\text{g/g}$ ，氯四環素則為 $0.01\mu\text{g/g}$ 。至於其他抗生素添加於檢體中，依本研究方法之實驗結果，雖然部份之抗生素有抑制圈產生但小於1mm，此可能係抽取液之pH值，試驗菌株培養基等等不適合之因素且經展開後其Rf值與四環素類抗生素亦不同，故不影響四環素類抗生素之測定。

四環素類抗生素之定量可用圓筒平板法，定性則可將檢液置於沸騰之水中加熱30分鐘並測定其抑制圈有無縮小或消失現象²¹，同時進行TLC—生物自析法之Rf值比較予以判定；若有二種或二種以上存在時，此時定量方式可採用點面積測量法(Spot-area measurement)予以測定²⁶。

食品中抗生素之殘留及其檢驗方法探討一直是相當受到關切的問題^{27,28,29}，因業者在防治家畜家禽疾病時，常以數種抗生素或抗菌物質摻雜使用期能達到最好的預防及治療效果^{30,31}，且食品本身雜質多，故檢驗上可能會出現甚多干擾造成研判上之困難。本篇探討四環素類抗生素之檢驗方法，結果回收率可達80%以上，操作簡便與化學方法如HPLC比較，經濟且不必複雜貴重設備，目前應用在例行性食品之四環素類抗生素殘留檢驗工作上，仍為可行之方法。

表二 不同食品中添加四環素類抗生素之回收率

食品種類	回收率*(Av.±S.D)%		
	經四環素(OTC)	氯四環素(CTC)	四環素(TC)
豬肉	91.3±2.6	84.0±3.3	82.0±1.4
豬肝	92.7±1.9	83.7±2.5	84.7±1.9
雞肉	89.7±1.7	83.3±1.7	81.3±1.3
雞肝	92.3±2.9	88.0±1.6	82.0±1.6
鮮乳	—*	86.3±1.2	—
雞蛋	—	73.3±2.9	—

* 係三重複之平均值，添加量OTC及TC均為1ppm，CTC為0.1ppm。

** 未進行測試

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

表三 四環素類抗生素 (TCs) 在不同展開液之Rf值比較

展開液種類 #	Rf值 \ TCs種類	CTC	TC	OTC	展開時間*
		A	0.52	0.43	
B	0.82	0.66	0.62	六小時	
C	0.73	0.57	0.50	六小時	
D	0.77	0.72	0.64	三小時	&
E	0.77	0.73	0.62	五小時	

* : 係展開到12-14cm所需時間。

& : 需再經55°C, 二小時烘乾。

** : A : 正丁醇 : 醋酸 : 去離子水 = 10 : 1 : 2

B : 正丁醇 : 甲醇 : 去離子水 = 4 : 1 : 2

C : 正丁醇 : 醋酸 : 去離子水 = 4 : 1 : 5

D : pH 4.0之麥氏緩衝液 [12.29 ml之0.1 M檸檬酸溶液 (檸檬酸1H₂O 21.01 g/l) 內添加 7.71 ml之0.2 M檸檬酸二鈉之溶液 (Na₂HPO₄ 2H₂O 35.62 g/l) 之溶液] 之甲乙酮飽合溶液

E : 乙酮 : 氯仿 : 正丙醇 : 浸漬液 = 16 : 20 : 27 : 16

浸漬液 : [0.1N苯二甲酸鹽pH3.75 + 甘油 (19+1)]

表四 不同抗生素添加於鮮乳檢體中之結果^a

抗生素種類	添加濃度 ($\mu\text{g} / \text{g}$)	抑制圈之形成有無
鏈黴素 (Streptomycin)	5.0	— ^c
	2.5	—
新黴素 (Neomycin)	5.0	—
	2.5	—
健牠黴素 (Gentamycin)	5.0	—
	2.5	—
林可黴素 (Lincomycin)	5.0	—
	2.5	—
紅黴素 (Erythromycin)	5.0	± ^c
	2.5	—
泰黴素 (Tylosin)	5.0	±
	2.5	—
配尼西林 (Penicillin G)	0.03 ^b	± ^c
	0.02	±
	0.01	—

a : 依表一之檢驗流程，以圓筒平板法進行測試 (試驗菌株ATCC 11778)

b : μ / g

c : 一無抑制圈形成

±有不明顯之抑制圈形成

參考文獻

1. 陳岱全, 陳德輝. 1981. 第43章四環素類與氟黴素. 藥理學(下冊)p.131-142. 合記出版社.
2. 林達雄. 1979. 四環素系抗生素禽畜專用之抗生素與疫苗. p.48-32, 雞友天地雜誌社.
3. HONIKEL K. O., SCHMIDT U., WOLTERS DORF W. and LETSTNER. 1978. Effect of Storage and Processing on Tetracycline Residues in Meat and Bones. J. Assoc. OFF. ANAL. CHEM (5) : 1222-1227.
4. KATZ S. E., FASSBENDER C. A. and DORFMAN D. 1972. Chlorotetracycline Residues in Broiler Tissue and Organs. J. Assoc. OFF. ANAL. CHEM 55 (1) : 134-138.
5. 曾弘智, 陳立治. 1975. 牛乳中抗生素之殘留及消長關係. 中華農學會報. 台灣地區畜產品衛生安全性之研究. 第二報. 80 : 45-55.
6. LEVY S. B. 1987. Antibiotic Use for Growth Promotion in Animals : Ecologic and Public Health Consequences Journal of Food Protection. 50 (7) : 616-620.
7. SMITHER R., LOTT A. F., DALZIEL R. W. and OSTLER D. C. 1980. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; an assessment of specific tests to detect and identify antibiotic residues. J. Hyg. Camb. 85 : 359-369.
8. LIVINGSTON R. C. 1985. Antibiotic Residues in Animal-Derived Food. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 68 (5) : 966-967.
9. 間 邦彦. 1988. 最近の家畜衛生事情. 食品衛生研究. 38(5) : 7-26.
10. BRADY M. S. and KATZ S. E. 1988. Antibiotic/Antimicrobial Residues in Milk. Journal of Food Protection. 51 (1) : 8-11.
11. 行政院衛生署. 1987. 動物用藥殘留標準. 衛署食字第658449號公告.
12. 中國國家標準. 1989. 乳品檢驗法—抗生素之鑑定. 3453, N6069.
13. 中國國家標準. 1989. 鮮肉之抗菌物質殘留檢驗法. 5916, N6121.
14. RAYMOND B. A. 1985. Liquid Chromatographic Assay of Tetracyclines in Tissues of Food-producing Animals. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 68 (5) 1013-1018.
15. 星野庸二, 堀江正一, 能勢憲英, 岩崎久天. 1984. 高速液體クロマトグラフィーによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質及びマクロライド系抗生物質の定量. 食衛誌. 25(5) : 430-435.
16. 黃日輝. 1972. 第五章抗生物質之分析方法. 抗生物質. 大夫出版社.
17. BARNES C. J. 1986. Drug Residues in Animal Tissues. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 69 (2) : 278.
18. NEIDERT E., SASCHENBRECKER R. W. and TITTEER F. 1987. Thin Layer Chromatographic/Bioautographic Method for Identification of Antibiotic Residues in Animal Tissues. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 70 (2) : 197-200.
19. 米田豐, 尾崎博子, 小湊 昭, 井山一郎. 1981. ディスフ法とTLC-バイオオートクラフィーによる食肉中殘留抗生物質の化學系統別分類. 食衛誌. 22(4) : 299-306.
20. 丹野憲二, 岡崎真紀子, 齊藤文一, 內部博泰. 1982. ブタ肝臟中の殘留テトラサイクリン系抗生物質の分析法. 食衛誌. 23(3) : 259-264.
21. 傅祖慧. 1988. 日本、美國及我國的畜水產品殘留抗生物質檢驗法. 第二版. 台灣區肉品發展基金會.
22. 陳陸宏, 王繼忠, 朱淑儀, 張翠瑛, 郭淑寬. 1986. 禽肉中抗生素殘留之調查. 藥物食品檢驗局調查研究年報. 6 : 182-187.
23. 張翠瑛, 黃琬惟, 朱淑儀, 郭淑寬, 洪其璧. 1989. 臺灣地區養殖魚類抗生素殘留之調查. 藥物

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

- 食品檢驗局調查研究年報.7 : 122-130.
24. 經濟部中央標準局.1989.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.9028,N4098.
25. 黃伯超,游素玲.1983.台灣常用食品之營養成分.營養學精要(第七版)p.268-314.台北市合作書刊出版合作社.
26. 劉朝鑫,李功固,呂鋒州.1983.第一章薄層色層分析法.畜水產品殘留化學物質檢查法.p.1-34.台灣區肉品發展基金會.
27. 洪其璧,李志恆,許鳳麟,謝榮添.1982.市售食品中殘留抗生素之分析.藥物食品檢驗局調查研究年報.1 : 151-161.
28. 阮喜文,施宗雄.1980.台灣中部市售豬肉抗生素殘留量之調查.中國畜牧學會會誌.p47-54.
29. 傅祖慧.1987.食品的抗生素殘留.食品安全研討會論文彙編p.168-174,食品工業發展研究所.
30. 行政院農業委員會.1985.飼料添加物使用規範.農牧字第65040號公告修訂.
31. 台灣省水產試驗所.1970.鰻病治療用藥劑及其使用方法.水產養殖淺說No.55.基隆市.

MICROBIOLOGICAL METHOD OF TEST FOR TETRACYCLINES RESIDUES IN FOODS

TSUI-YIN CHANG, SHU-YI CHU, JEN-YI WANG,
YUARN-SHENG CHANG AND CHI-BYI HORNG

DIVISION OF FOOD MICROBIOLOGY

ABSTRACT

The cup-plate-method and TLC-bioautographic method were tested for analyzing the residual tetracyclines (TCs) in pork, pork liver, chicken muscle, chicken liver, egg and milk.

After extraction with 0.1% citric acid : ethanel solvent (7 : 3) from homogenized samples the extract was concentrated. The concentrated solution was passed through AmbeiteAD-2 resin column and then eluted with methanol. The eluate was divided into two parts for quantity and qualitative analysis using the cup-plate-method and TLC-bioautography.

The recoveries of OTC added to meats and livers were 89.7% and 92.7%, respectively; those of TC were 81.3% and 84.7%; those CTC were 83.3% and 88.0%. The

average recoveries of CTC add to milk was 88.3%, while CTC in egg was 73.3%. As little as 0.05ug/g(OTC, TC) or 0.01 ug/g (CTC) was detectable in cup-plate-method. TLC plate was developed by the solvent system of butanol : acetic acid : deionized water(10 : 1 : 2), their Rf values were CTC 0.52, OTC 0.32 and TC 0.43, respectively. All of the sensitivity was 5ng.

Other antibiotics were also added to sample and detected by the cup-plate-method. Results of milk and Streptomycin (5μg/g), Lincomycin (5μg/g), Gentamycin (5μg/g), Neomycin (5μg/g), Tylosin (2.5μG/g), Erythromycine (0.5μg/g) or Penicillin (0.01μ/g) showed no inhibition zone; but in Tylosin (5μg/g), Erythromycin (5μg/g) and penicillin(0.03μ/g, 0.02μ/g) inhibition zones occurred.