

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017022301

柴玉峰, 冯玉启, 张玉秀, 等. 猪场废水中 24 种抗生素同时检测方法优化[J]. 环境化学, 2017, 36(10): 2147-2154.

CHAI Yufeng, FENG Yuqi, ZHANG Yuxiu, et al. Optimization of an analytical method for the simultaneous determination of 24 antibiotics in swine wastewater[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(10): 2147-2154.

## 猪场废水中 24 种抗生素同时检测方法优化\*

柴玉峰<sup>1,3</sup> 冯玉启<sup>2</sup> 张玉秀<sup>1\*\*</sup> 陈梅雪<sup>3\*\*</sup> 王瑞<sup>3</sup> 柳蒙蒙<sup>3</sup> 魏源送<sup>3</sup>

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京, 100083; 2. 北京建筑大学环境与能源工程学院, 北京, 100044;  
3. 中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

**摘要** 采用优化固相萃取-液相色谱-串联质谱同步检测养猪废水中 24 种抗生素的. 水样用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸调节 pH 值至 3.5—4.0, 流经 Oasis HLB 固相萃取柱富集后再用甲醇和乙酸乙酯 ( $V:V=1:1$ ) 进行洗脱. 以 Agilent eclipse plus C<sub>18</sub> 色谱柱为分离柱, 以 0.1% 甲酸水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾正离子源, 多反应监测模式检测. 24 种抗生素的检出限 ( $S/N=3$ ) 在  $0.03\text{—}3.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  之间. 进一步以不同养猪场废水进行实际样品测定, 四环素类、大环内酯类、 $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类、磺胺类等 5 大类抗生素均有检出, 土霉素、替米考星和磺胺甲噁唑等 3 种抗生素为主要污染抗生素, 最高浓度可达  $147.10$ 、 $107.83$ 、 $100.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磺胺甲噁二唑及去甲基金霉素均未检出. 本研究建立了快速准确的同步分析 5 大类 24 种抗生素的分析方法.

**关键词** 兽用抗生素, 高效液相色谱-质谱联用法, 固相萃取, 养殖废水.

## Optimization of an analytical method for the simultaneous determination of 24 antibiotics in swine wastewater

CHAI Yufeng<sup>1,3</sup> FENG Yuqi<sup>2</sup> ZHANG Yuxiu<sup>1\*\*</sup> CHEN Meixue<sup>3\*\*</sup>  
WANG Rui<sup>3</sup> LIU Mengmeng<sup>3</sup> WEI Yuansong<sup>3</sup>

(1. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining and Technology, Beijing, 100083, China;  
2. School of Energy & Environmental Engineering, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing, 100044, China;  
3. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

**Abstract:** An optimized method employing solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry was established for the simultaneous determination of 24 antibiotics in swine wastewater. After adjusting pH to 3.5—4.0 by using  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydrochloric acid, the samples were concentrated and collected after flowing through an Oasis HLB solid-phase extraction column, and were eluted with methanol and ethyl acetate ( $V:V=1:1$ ). The gradient elution was carried out with 0.1% ( $V:V$ ) formic acid solution and acetonitrile as the mobile phase by using the Agilent eclipse plus C18 column, and the detection was performed under the monitoring mode of the electrospray ionization source multiple reaction. The limit of detection ( $S/N=3$ ) of the 24 antibiotics was

2017年2月23日收稿(Received: February 23, 2017).

\* 国家自然科学基金(41501513, 21577161), 中央高校基本科研业务费专项(2010YH05), 国家科技重大专项参与单位任务(2015ZX07203-007-003)和国家重点研发计划课题(2016YFD0501405)资助.

Supported by the the State Natural Sciences Foundation(41501513, 21577161), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2010YH05), National Science and Technology Major Project (2015ZX07203-007-003) and National Key Research and Invention Program (2016YFD0501405).

\*\* 通讯联系人, E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn; mxchen@rcees.ac.cn

Corresponding author, E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn; mxchen@rcees.ac.cn

between 0.03—3.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tetracyclines, macrolides,  $\beta$ -lactams, quinolones and sulfonamides were all detected by this method in the swine wastewater samples. As the three main antibiotics, oxytetracycline, tilmicosin and sulfamethoxazole were found to have a maximum concentration of 147.10, 107.83 and 100.20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively whereas sulfadoxiazole and dimethyl chlortetracycline were not detected. The rapid and accurate detection of 24 antibiotics in 5 major classes was established.

**Keywords:** veterinary antibiotics, LC-MS/MS, solid phase extraction (SPE), swine wastewater.

兽用抗生素已广泛应用于畜禽养殖业中疾病预防、治疗以及促生长<sup>[1]</sup>,在我国兽用抗生素的平均使用量每年达到约6000吨<sup>[2]</sup>.据估计,大约75%的抗生素是不被动物所利用<sup>[2]</sup>,通过尿液或粪便以原药或代谢产物的形式排泄到环境中,导致环境中耐药水平的提高,成为重要的新型环境污染物,严重危害生态环境安全和人类健康<sup>[3]</sup>.畜禽养殖废水中有机物浓度高,成分复杂,抗生素多以痕量( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ )存在<sup>[4]</sup>,闰幸等<sup>[5]</sup>检测出养猪废水中四环素类浓度为0.4—164.26  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,磺胺和喹诺酮类浓度分别为0.003—3.470  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和0.08—5.920  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;Hou等<sup>[6]</sup>研究发现8种兽用抗生素在养猪场和鱼塘的检出浓度在0.12—47  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,比当地污水处理厂的检出浓度高1—2个数量级,集约化养猪业给农村水体带来了严重的抗生素污染.刘新程等<sup>[7]</sup>在江苏检测土霉素、金霉素平均浓度在2.11、11.96  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,如果畜禽粪便未经处理即排放到环境中,可能对农田中微生物群落产生影响.Kim等<sup>[8]</sup>在畜禽污水处理厂中检测到磺胺类和四环素类抗生素浓度范围在0.2—41.8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和0.8—4.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .根据饲养动物的类型和育龄,兽用抗生素种类多,有大环内酯类、林可胺类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类等<sup>[9-10]</sup>,建立快速高效的畜禽养殖废水中多种抗生素的同时检测方法对于研究抗生素在处理过程中的迁移转化规律尤为重要.

目前的分析方法中,废水中抗生素的预处理主要采用固相萃取<sup>[11-12]</sup>,检测方法主要使用液相色谱-质谱联用法<sup>[13-14]</sup>.养殖废水基质复杂,所含抗生素种类较多,建立多种抗生素快速准确的分析方法成为研究者的努力的目标.固相萃取的条件是影响多种抗生素同步检测的重要条件,本研究优化了前处理固相萃取方法,建立了24种抗生素同步分析的方法,对进一步开展畜禽养殖废水中多种抗生素残留相关研究奠定基础.

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 超高效液相色谱、Micromass<sup>®</sup> AB-API5000 质谱联用仪、Sigma 2-16P 高速离心机 (Sigma 公司)、SE812 型氮吹仪 (北京帅恩科技有限责任公司)、固相萃取柱 (Oasis HLB, 6 cc/300 mg, 美国 Waters 公司)、固相萃取装置 (美国 Supelco 公司).

四环素类药物: 盐酸四环素 (tetracyclines, TC, 97%, CTX)、4-差向四环素盐酸盐 (4-epi-tetracycline hydrochloride, ETC, 99%)、四环素-d6 (tetracycline-d6, ETC, 80%)、金霉素 (CTC, 99%)、盐酸差向金霉素 (4-epichlortetracycline hydrochloride, ECTC, 97%)、土霉素 (oxytetracycline, OTC, 97%)、4-差向土霉素 (4-epioxytetracycline, EOTC, 97%, CTX).

$\beta$ -内酰胺类药物: 青霉素 (penicillin, PCN, 99%)、氨苄西林 (ampicillin, AMP, 99%)、头孢噻肟 (cefotaxime sodium, CFX, 97%).

大环内酯类药物: 螺旋霉素 (spiramycin, SPM, 96%)、新螺旋霉素 (neo spiramycin I, NSPM, 97%)、克拉霉素 (clarithromycin, CLR, 99%)、罗红霉素 (roxithromycin, ROX, 97%)、替米考星 (tilmicosin, TIL, 97%)、泰乐菌素 (tylosin, TYL, 98%).

喹诺酮类药物: 诺氟沙星 (norfloxacin, NOR, 97%)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP, 97%)、恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR, 97%)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFX, 97%).

磺胺类药物: 磺胺甲基嘧啶 (sulfamerazine, SMZ, 97%)、磺胺间甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine sodium, SMX, 97%)、磺胺甲噻二唑 (sulfamethizole, SML, 99%)、磺胺嘧啶 (sulfadiazine, SD, 97%)、磺胺甲

嘧啶(sulfamerazine, SMN, 99%)均购自购于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

甲醇、乙腈, 乙酸乙酯均为色谱纯,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 甲酸、氢氧化钠, 盐酸均为分析纯, 超纯水由 Milli-Q 系统(Advantage A10, Millipore)制取.

## 1.2 溶液的配制

### 1.2.1 抗生素标准储备液的配制

精确称取药品各 0.010 g, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 混匀, 得到质量浓度  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液, 置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内避光保存, 精密量取各标准储备溶液  $100 \mu\text{L}$  至 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释定容, 配制成  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合标准中间溶液.

### 1.2.2 缓冲液的配制

$\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine 缓冲溶液的配制: 将 1 L  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸溶液和 625 mL  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠混匀, 并加入 60.5 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶解后混合均匀, 用  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调节  $\text{pH}=3.85\pm 0.1$ .

## 1.3 样品采集及前处理

猪场废水分别取自北京(猪场一)、山东(猪场二)、江西(猪场三)的养猪场, 3 个养殖场均有较规范的猪场废水处理工艺. 用 500 mL 棕色玻璃瓶采集厌氧进料池中水样, 取样后  $4\text{ }^\circ\text{C}$  储存, 带回实验室进行下一步分析. 水质指标见表 1.

表 1 三个猪场养殖废水样品的水质参数  
Table 1 Water quality parameters of three swine wastewater

参数 Parameter	猪场一 Pig farm 1	猪场二 Pig farm 2	猪场三 Pig farm 3
COD/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	38120	41650	540
$\text{NH}_4\text{-N}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	1127	1256	370
pH	7.34	7.85	7.24
SS/( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2.36	4.58	2.84

500 mL 样品于  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10min, 取上清液过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜, 用  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸调节滤液 pH 值为 3.85, 加入  $100 \mu\text{L}$  饱和  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶液. SPE 固相萃取柱(Oasis HLB 柱,  $6 \text{ mL}/500 \text{ mg}$ ), 预先采用 5 mL 乙酸乙酯, 5 mL 甲醇, 5 mL  $\text{pH}=3.85$  纯水依次淋洗活化. 开启真空泵, 控制流速约为  $3\text{--}5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  将过膜上清液上柱, 上样量为 5 mL. 过柱完成后, 分别用 5 mL 5% 甲醇水、5 mL 超纯水冲洗小柱, 对 HLB 柱抽真空干燥 30 min, 最后, 用 4.5 mL 甲醇和 4.5 mL 50% 甲醇+50% 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液并在室温下用  $\text{N}_2$  吹扫至近干, 用 10% 甲醇定容至 1 mL, 待测.

## 1.4 色谱条件

色谱条件为: 色谱柱 Agilent eclipse plus C18 ( $100 \text{ mm}\times 2.1 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$ ); 动相为乙腈(A)和 0.1% 甲酸溶液(B), 柱温  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , 流速  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 梯度洗脱程序:  $0\text{--}1 \text{ min}, 90\% \text{ A}, 1\text{--}10 \text{ min}, 90\%\text{--}80\% \text{ A}; 10\text{--}20 \text{ min}, 80\%\text{--}50\% \text{ A}; 20\text{--}25 \text{ min}, 50\%\text{--}50\% \text{ A}; 25\text{--}26 \text{ min}, 50\%\text{--}90\% \text{ A}; 26\text{--}35 \text{ min}, 90\%\text{--}90\% \text{ A}$ , 进样量  $10 \mu\text{L}$ . 多反应监测模式下, 24 种总离子流图(TIC)如图 1 所示.

## 1.5 质谱条件

电喷雾离子源; 正离子扫描; 雾化气、脱溶剂气、锥孔气为氮气, 碰撞气为氩气; 源温度和脱溶剂气温度分别为  $90\text{ }^\circ\text{C}$  和  $350\text{ }^\circ\text{C}$ ; 脱溶剂流速和锥孔气流速分别为  $500$  和  $70 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 毛细管电压为  $4 \text{ kV}$ . 检测方式为 MRM 模式, 采用 ESI-MS/MS 正离子检测, 用注射泵直接进入的方式, 测定每个化合物的母离子、子离子, 并优化锥孔电压、碰撞能, 24 种抗生素的串联质谱检条件见表 2.

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 固相萃取方法优化

#### 2.1.1 洗脱溶剂的优化

许多研究者用甲醇洗脱的目标化合物<sup>[15-16]</sup>, 本文研究了甲醇、乙酸乙酯、乙腈等 3 种洗脱溶剂, 结果

表明,甲醇和乙酸乙酯分别对 5 大类抗生素的洗脱效果各有优势.因此,进一步考察了单独甲醇、乙酸乙酯和甲醇+单独乙酸乙酯 3 种洗脱方案,结果表明,乙腈对于大部分抗生素不能洗脱下来,分别用甲醇和乙酸乙酯洗脱时,回收率大多低于 50%,当用甲醇和乙酸乙酯体积比为 1:1 时,对 5 类目标抗生素的回收率均高于 50%,回收率达到 65.92%—195.30% (见图 2).但对抗生素氨苄西林洗脱回收率较低,回收率仅为 34.95%,因此,综上所述,本研究选择甲醇和乙酸乙酯( $V:V=1:1$ )作为洗脱液.

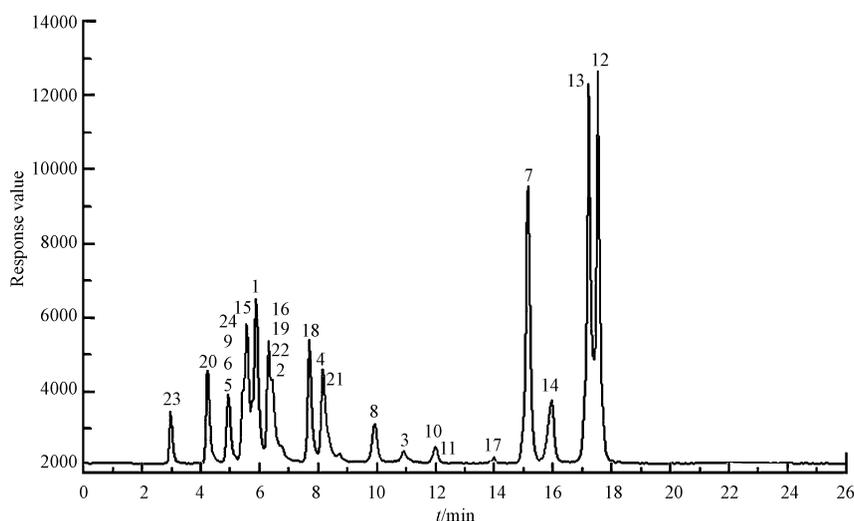


图 1 多反应监测模式下的总离子流色谱图(编号见表 2)

Fig.1 The total ion current chromatogram acquired under multi-reaction monitoring mode(The numbers are shown in Table 2)

表 2 MRM 模式下 24 种抗生素的定量定性离子、碰撞能和保留时间

Table 2 Ion characteristics, retention time and collision energy of the selected 24 antibiotics in the MRM mode

No.	抗生素 Compounds	母离子 Parent ions/ (m/z)	子离子 Product ions/ (m/z)	定量离子 Quantitative ions/(m/z)	碰撞能 Collision energy/eV	保留时间 Retention time/min
1	TC	445.1	427.3	410.3	6,10	6.68
2	ETC	445.8	428.5	411.2	6,10	6.63
3	CTC	479.3	462.3	444.3	8,12	11.36
4	ECTC	465.3	448.0	430.0	6,15	8.68
5	OTC	461.3	443.3	426.1	5,12	7.20
6	EOTC	461.5	443.3	426.1	5,12	7.82
7	PCN	335.0	217.0	91.0	5,45	15.31
8	AMP	350.0	174.0	106.0	5,10	10.84
9	CTX	456.0	324.0	167.0	5,15	5.56
10	NSPM	699.3	174.0	142.0	20,25	12.79
11	SPM	843.4	174.1	142.1	35,30	12.78
12	CLR	748.3	158.1	126.9	25,20	18.24
13	TYL	916.9	145.1	173.8	50,35	17.65
14	ROX	837.4	679.3	158.1	15,20	15.60
15	NOR	320.1	302.0	276.1	10,15	5.98
16	CIP	332.1	314.1	288.2	9,12	6.47
17	TIL	869.6	696.4	174.0	40,40	14.97
18	ENR	360.1	342.2	316.1	15,15	7.93
19	OFX	362.1	344.0	318.1	15,15	6.06
20	SMZ	265.0	108.0	92.0	25,25	4.11
21	SMX	281.1	156.0	92.0	10,25	7.90
22	SML	271.0	156.0	92.0	5,20	6.07
23	SD	251.0	156.0	108.0	9,17	2.90
24	SMN	279.1	156.0	124.0	10,25	5.45

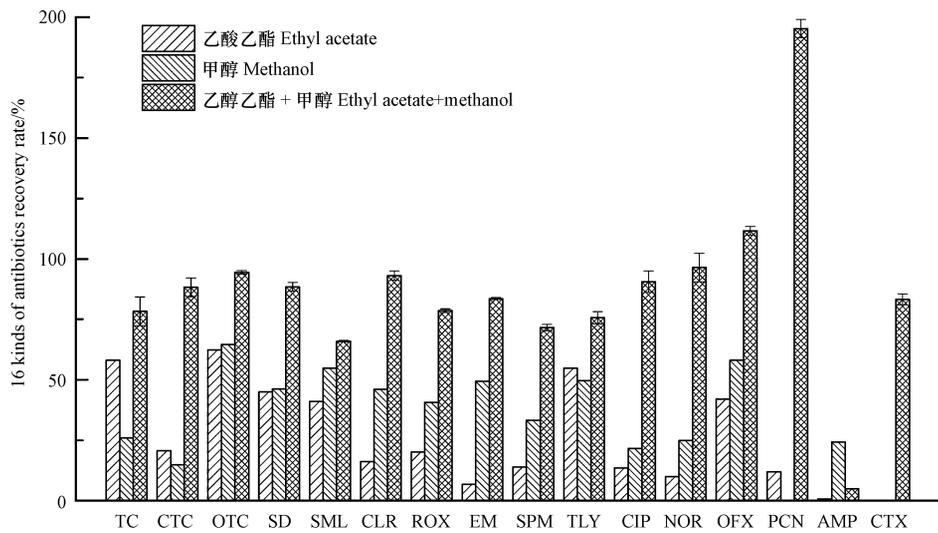


图 2 不同洗脱溶剂对目标抗生素回收率的影响

Fig.2 Effect of different eluents on the recovery of the target antibiotics

### 2.1.2 pH 值对 SPE 效果的影响

pH 的优化根据 Venkateswarlu 和 Chiesa<sup>[15, 17]</sup> 发表的固相萃取方法并有所改进,采用在酸性条件下,目标物的回收率较高.本研究经实验后,研究了 pH 4 和 pH 8 时,用甲醇、乙酸乙酯、乙腈和甲醇+乙酸乙酯为洗脱剂的回收率,结果表明,当 pH 4 时大部分目标化合物回收率高于 pH 8 的回收率,并且 pH 4 时可检出的抗生素种类多于 pH 8 时检出的抗生素(如图 3),综上,甲醇和乙酸乙酯体积比为 1:1,萃取体系 pH 4 时,对各类抗生素的均能有较高回收率,并且可洗脱出的抗生素种类多于 pH 8 时检出的,所以本研究采用 pH 4 作为萃取体系 pH 值.

Dorival 等<sup>[18]</sup>研究了磺胺类、喹诺酮类抗生素的检测方法, Kim<sup>[8]</sup>等研究了 4 种磺胺类抗生素和四环素,为了对本研究的方法做进一步验证,增加了 5 类抗生素的 8 种做进一步验证.结果表明,通过综合萃取体系 pH 值和洗脱溶剂回收率比较(见图 4),发现萃取体系 pH 4,用甲醇和乙酸乙酯(1:1, V:V)洗脱同样适用于这 8 种抗生素.

### 2.2 色谱条件优化研究

根据文献报道,乙腈与 0.1%甲酸水作为二元流动相体系适用于各种抗生素的检测,试验也选择这种流动相体系进行试验.结果表明,可以得到较高的响应值,但是大多数目标抗生素的响应峰重叠,分离效果差,如图 5(a),分别调试流动相比例,分别得到图 5(b、c、d)的总离子流图,最终确定出梯度洗脱程序:0—min, 90% A; 1—10 min, 90%—80% A; 10—20 min, 80%—50% A; 20—25 min, 50%—50% A; 25—26 min, 50%—90% A; 26—35 min, 90%—90% A 时,分离效果较好,而且色谱峰形窄,表明这种流动相体系对抗生素的分离效果较好.

### 2.3 线性范围、检出限、定量限及回收率

采用外标法对样品中浓度进行定量分析,线性方程浓度范围由 2.0、5.0、10.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  等 8 个浓度组成.由于现实中很难找到不受抗生素污染的养猪场废水,基质的背景污染对方法回收率和检出限计算影响甚大.整个流程重复 3 次,计算不同水样的方法精密度,结果如表 3 所示.

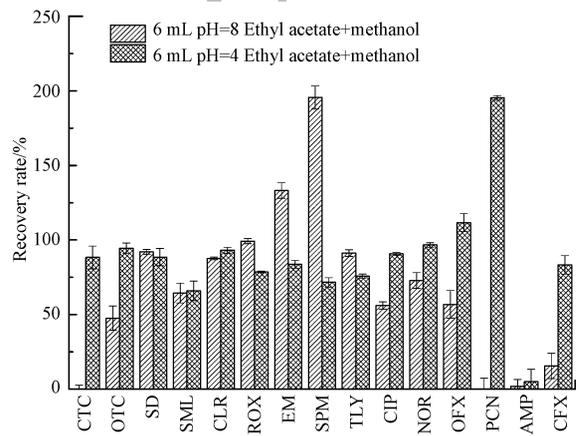


图 3 pH 值对 5 类抗生素固相萃取回收率的影响

Fig.3 Effect of pH on the recovery of 5 classes of antibiotics by SPE method

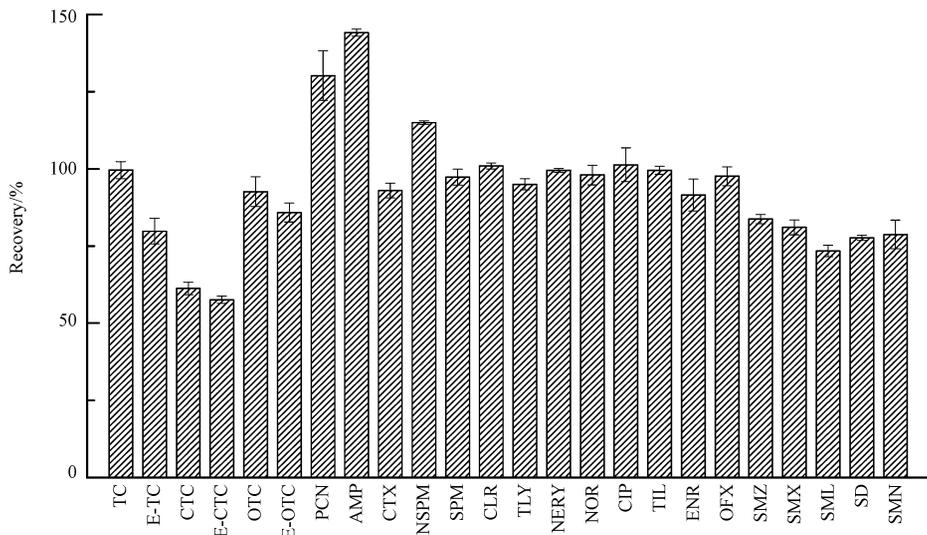


图4 24种抗生素固相萃取法的回收率

Fig.4 Recovery of the 24 antibiotics by SPE method

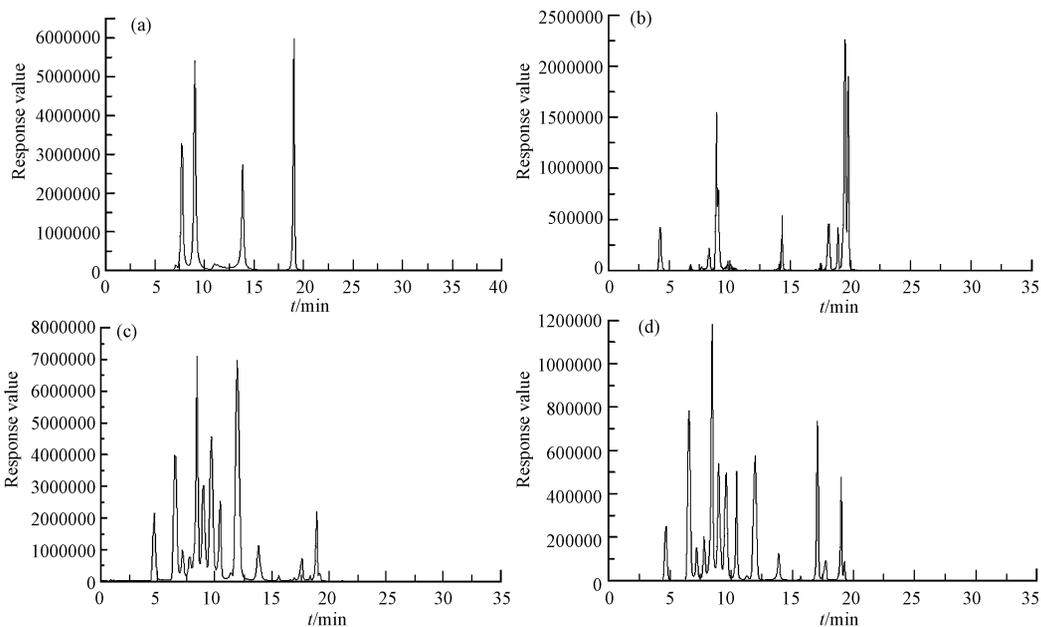


图5 24种抗生素不同洗脱梯度总离子流图

Fig.5 Total ion chromatograms of the 24 antibiotics with different elution gradients

仪器的检出限为3倍信噪比时的浓度,仪器定量限为10倍信噪比时的浓度,氨苄西林响应值最大.检出限在 $0.03\text{--}3.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,相关性系数为 $R^2$ 为 $0.990\text{--}0.999$ ,满足分析要求.

#### 2.4 实际废水样品中24种抗生素的同步检出

如图6所示,调查了3个猪场的抗生素含量,发现5大类抗生素均有被检出,四环素类药物在所有猪场中均含有,OTC、TIL和SMN等3种抗生素为主要污染抗生素,最高浓度可达 $147.10$ 、 $107.83$ 、 $100.20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .江西猪场中CTC、TC、NOR、OFX浓度均高于江西省某养猪场废水( $0.009$ 、 $0.074$ 、 $0.007$ 、 $0.299\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但SML未检出<sup>[19]</sup>;与北京地区养猪场对比,SMX、SML、SMN、TCN、OTC、CTC检出量对比(范围分别在 $\text{ND}\text{--}1.01$ 、 $\text{ND}$ 、 $\text{ND}\text{--}10.07$ 、 $1.14\text{--}4.62$ 、 $6.18\text{--}25.36$ 、 $2.65\text{--}32.67\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),本样品中未检出SML,除OTC、SMN高于Ben的研究<sup>[20]</sup>,其他抗生素含量相当;同样和山东3个猪粪废水样品中SMX、SML、SMN、TCN、OTC、CTC检出量(范围分别在 $1.1\text{--}20.1$ 、 $\text{ND}\text{--}9.0$ 、 $\text{ND}\text{--}2.5$ 、 $0.8\text{--}41.2$ 、 $3.5\text{--}387.1$ 、 $3.0\text{--}138.8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对比,SMX、SML、SMN均未检出,TCN、OTC、CTC含量高于本研究的样品浓度.

说明这 3 种四环素类抗生素是目前我国畜禽养殖常用的兽用抗生素.磺胺类抗生素部分猪场会使用,其他抗生素成分及浓度均有差异.

表 3 24 种抗生素的线性范围、线性回归方程、检出限、定量限和回收率

Table 3 Linear detection range, linear regression equation, limit of detection, limit of quantity and recovery for the 24 antibiotics

抗生素 Compounds	线性范围 Linear range/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Limit of detection / ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	定量限 Limit of quantity/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率 Recovery/%	RSD/%
TC	10—1000	$y = 1.0072x - 2.6452$	0.999	0.10	3.30	99.59	12.3
ETC	50—1000	$y = x + 2 \times 10^{-13}$	0.994	0.70	2.30	79.82	25.5
CTC	10—1000	$y = 0.9959x + 1.9184$	0.999	0.60	2.00	61.24	13.3
ECTC	10—1000	$y = 1.0021x - 0.7548$	0.998	0.60	2.00	57.56	10.4
OTC	5—1000	$y = 1.0187x - 6.8084$	0.999	0.30	1.00	92.58	14.6
EOTC	5—1000	$y = 1.0238x - 8.6947$	0.996	3.00	8.50	85.84	17.6
PCN	10—1000	$y = 1.8033x - 17.632$	0.990	1.00	3.00	130.15	21.2
AMP	10—500	$y = 1.0208x - 7.6455$	0.999	0.23	0.75	144.10	5.2
CTX	5—1000	$y = 0.9928x + 2.6356$	0.990	0.5	1.50	92.96	11.9
NSPM	50—1000	$y = 0.9994x - 0.6122$	0.999	0.40	1.30	114.99	1.4
SPM	50—1000	$y = 1.0224x - 2.551$	0.999	0.20	0.80	97.29	8.3
CLR	5—1000	$y = 0.9891x + 4.0051$	0.999	0.03	0.10	100.91	4.3
TLY	5—1000	$y = 0.8964x - 0.3166$	0.990	0.15	0.40	95.00	8.0
ROX	10—1000	$y = 1.0025x - 0.8967$	0.999	0.15	0.50	99.51	3.0
NOR	10—1000	$y = 1.0368x - 13.508$	0.997	0.40	1.30	98.01	49.8
CIP	10—1000	$y = 1.0372x - 13.68$	0.999	0.40	1.20	101.32	41.3
TIL	50—1000	$y = 1.018x - 2.0408$	0.990	0.80	2.67	99.53	2.5
ENR	5—1000	$y = 1.0323x - 11.823$	0.990	0.30	0.10	91.53	49.0
OFX	5—1000	$y = 1.0295x - 10.767$	0.998	0.20	0.70	97.58	51.0
SMZ	50—1000	$y = 0.8617x + 50.388$	0.990	0.04	0.10	83.75	10.7
SMX	50—1000	$y = 0.8402x + 58.219$	0.990	0.06	0.20	81.08	12.8
SML	50—1000	$y = 0.9301x + 25.437$	0.998	0.07	0.20	73.42	18.4
SD	50—1000	$y = 0.8536x + 53.326$	0.990	0.06	0.20	77.67	8.9
SMN	50—1000	$y = 0.8697x + 47.476$	0.990	0.30	0.90	78.76	7.8

### 3 结论 (Conclusion)

本研究通过优化固相萃取法和液相色谱-串联质谱法,建立了一种可以快速同步准确检测养猪废水中 5 大类 24 种抗生素的分析方法,通过方法的验证,6 种四环素类、3 种  $\beta$ -内酰胺类、6 种大环内酯类、4 种喹诺酮类和 5 种磺胺类抗生素分别在  $0.005\text{—}1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.005\text{—}0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.005\text{—}1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.01\text{—}1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.05\text{—}1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性良好,相关系数  $R^2 > 0.99$ ,5 大类抗生素的检出限分别为  $0.03\text{—}3.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5\text{—}1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5\text{—}1.5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5\text{—}0.8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.5\text{—}1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,确定了萃取体系的 pH 值为 3.85,用甲醇和乙酸乙酯 ( $V:V=1:1$ ) 进行洗脱,5 大类抗生素的回

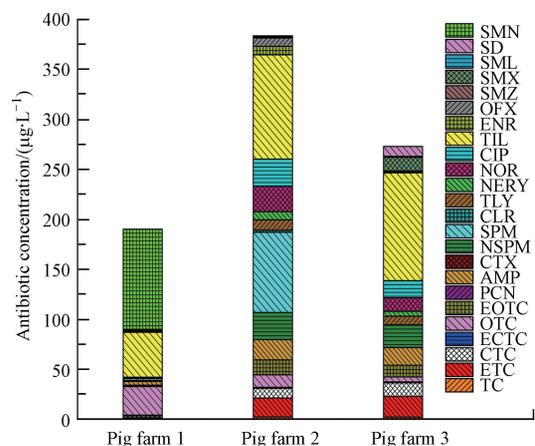


图 6 不同养殖场中 24 种抗生素浓度

Fig.6 Concentrations of the 24 antibiotics in different swine farms detected by LC-MS/MS

收率均大于 50%,分析时间较短并且加标回收率好,检出限较低.证明此方法适合养猪废水中多种抗生素的同步分析.并且对国内 3 个地方的猪场废水样品进行了分析,得出四环素类抗生素每个猪场都会使用,其他 4 大类抗生素在不同猪场均有被检出.OTC、TIL 和 SMN 等 3 种抗生素含量和检出率均较高,可能对环境安全有更大的威胁.

#### 参考文献 (References)

- [ 1 ] ZHANG T, LI B. Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal wastewater treatment plants[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2011, 11(41): 951-998.
- [ 2 ] ZHAO L, DONG Y H, WANG H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(5): 1069-1075.
- [ 3 ] MANZETTI S, GHISI R. The environmental release and fate of antibiotics[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 79(1-2): 7-15.
- [ 4 ] CHEE-SANFORD J C, MACKIE R I, KOIKE S, et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. *Journal of Environment Quality*, 2009, 38(3): 1086-1108.
- [ 5 ] 阎幸,余卫娟,兰亚琼,等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定猪栏废水中 10 种抗生素[J]. *理化检验(化学分册)*, 2014, 50(3): 273-277.
- LV X, YU W J, LAN Y Q, et al. LC-MS/MS determination of 10 Antibiotics in swinery waste water with solid phase extraction [J]. *Physical Testing & Chemical Analysis*, 2014, 50(3): 273-277 (in Chinese).
- [ 6 ] HOU J, WAN W, MAO D, et al. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(6): 4545-4554.
- [ 7 ] 刘新程,董元华,王辉. 江苏省集约化养殖畜禽排泄物中四环素类抗生素残留调查[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3): 1177-1182.
- LIU X C, DONG Y H, HUI W. Residues of tetracyclines in animal manure from intensive farm in Jiangsu Province [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3): 1177-1182 (in Chinese).
- [ 8 ] KIM H, HONG Y, PARK J, et al. Sulfonamides and tetracyclines in livestock wastewater[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(7): 888-894.
- [ 9 ] 严丽娟,张峰,方恩华,等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的大环内酯类和林可胺类抗生素[J]. *色谱*, 2010, 28(11): 1038-1042.
- YAN L J, ZHANG F, F E H, et al. Simultaneous determination of macrolide and lincosamide antibiotics in animal feeds by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(11): 1038-1042 (in Chinese).
- [ 10 ] 秦燕,张美金,林海丹. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的 10 种磺胺[J]. *色谱*, 2005, 23(4): 397-400.
- QIN Y, ZHANG M J, LIN H D. Qualification and quantification of 10 sulfonamides in animal feedstuff by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(4): 397-400 (in Chinese).
- [ 11 ] CHEN H, LIU S, XU X, et al. Antibiotics in the coastal environment of the Hailing Bay region, South China Sea: Spatial distribution, source analysis and ecological risks[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 95(1): 365-373.
- [ 12 ] JÜRGENSEN S E, HALLING-SØRENSEN B. Drugs in the environment[J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 691-699.
- [ 13 ] DI'AZ-CRUZ M S, LÓPEZ DE ALDA M J, BARCELÓ D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22(6): 340-351.
- [ 14 ] ZHANG R, TANG J, LI J, et al. Occurrence and risks of antibiotics in the coastal aquatic environment of the Yellow Sea, North China[J]. *Science of The Total Environment*, 2013, 450-451: 197-204.
- [ 15 ] NAGESWARA RAO R, VENKATESWARLU N, NARSIMHA R. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1187(1-2): 151-164.
- [ 16 ] LE-MINH N, STUETZ R M, KHAN S J. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2012, 89: 407-416.
- [ 17 ] CHIESA L, NOBILE M, ARIOLI F, et al. Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 185: 7-15.
- [ 18 ] DORIVAL GARCÍA N, ZAFRA GÓMEZ A, CANTARERO S, et al. Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Microchemical Journal*, 2013, 106: 323-333.
- [ 19 ] 陈军平,杨艳丽,吴志强,等. 江西省畜禽养殖废水及环境中抗生素残留现状调查[J]. *安徽农业科学*, 2015(31): 224-227.
- CHEN J P, YANG Y L, WU Z Q et al. Pollution of antibiotics in livestock wastewater and the environmental water in Jiangxi Province[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2015(31): 224-227 (in Chinese).
- [ 20 ] BEN W, QIANG Z, ADAMS C, et al. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1202(2): 173-180.