

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2020120602

柴玉峰, 钟慧, 陈梅雪, 等. 猪粪中 21 种常见抗生素的同步提取检测方法研究及应用[J]. 环境化学, 2022, 41(4): 1252-1260.

CHAI Yufeng, ZHONG Hui, CHEN Meixue, et al. Research and application of detection method of simultaneous extraction and detection of 21 common antibiotics from pig manure[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(4): 1252-1260.

## 猪粪中 21 种常见抗生素的同步提取检测方法研究及应用\*

柴玉峰<sup>1,3</sup> 钟慧<sup>1,2\*\*</sup> 陈梅雪<sup>1,2</sup> 隋倩雯<sup>1,2</sup> 王瑞<sup>1,2</sup>  
柳蒙蒙<sup>1,2</sup> 卢亚楠<sup>1,2</sup> 魏源送<sup>1,2,4</sup>

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京, 100085; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 水污染控制实验室, 北京, 100085; 3. 中建环能科技股份有限公司, 技术中心, 成都, 610045; 4. 江西省科学院能源所, 南昌, 330096)

**摘要** 为实现猪粪中抗生素的有效削减及控制, 迫切需要开发快速、同步兽用抗生素的检测分析方法, 明确猪粪中多种类抗生素赋存特征. 本研究建立并优化了猪粪中 21 种常见抗生素的同步分析方法. 该方法采用甲醇和 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(1:1, V/V)提取, 提取液经固相萃取净化后高效液相色谱串联质谱检测. 猪粪样品中 5 种四环素类、2 种 β-内酰胺类、6 种大环内酯类、4 种磺胺类和 4 种喹诺酮类抗生素的内标定量回收率 29.53%—116.36%, 检出限 0.90—26 μg·kg<sup>-1</sup> DS, 定量限 2.91—85.20 μg·kg<sup>-1</sup> DS, 相关系数 R<sup>2</sup> 均大于 0.997. 采用该方法对单个猪场不同畜舍样品加标回收率的单因素方差分析发现, 除了四环素-D<sub>6</sub>(TC-D<sub>6</sub>)有显著性影响之外, 其它内标回收率在不同样品中无显著性影响. 分别采集不同地区 2 个猪场的猪粪样品进行验证分析, 发现猪粪样品中单个抗生素含量范围在 ND—99.37 mg·kg<sup>-1</sup> DS. 结果表明, 该方法可用于猪粪中多种类抗生素的同步检测.

**关键词** 猪粪, 内标法, 兽用抗生素, 高效液相色谱-质谱联用法, 固相萃取.

## Research and application of detection method of simultaneous extraction and detection of 21 common antibiotics from pig manure

CHAI Yufeng<sup>1,3</sup> ZHONG Hui<sup>1,2\*\*</sup> CHEN Meixue<sup>1,2</sup> SUI Qianwen<sup>1,2</sup> WANG Rui<sup>1,2</sup>  
LIU Mengmeng<sup>1,2</sup> LU Yanan<sup>1,2</sup> WEI Yuansong<sup>1,2,4</sup>

(1. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China; 2. Laboratory of Water Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China; 3. Technology Center, SCIMEE Sci. & Tech. Co., Ltd., Chengdu, 610045, China; 4. Institute of Energy, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, 330096, China)

**Abstract** In order to achieve effective reduction and control of antibiotics in pig manure, there is an urgent need to develop rapid and simultaneous detection and analysis methods for veterinary antibiotics, and to clarify the characteristics of the occurrence of multiple antibiotics in pig manure.

2020 年 12 月 6 日收稿(Received: December 6, 2020).

\* 国家重点研发计划项目(2016YFD0501405), 国家水污染控制与治理科技重大专项(2015ZX07203-007), 国家自然科学基金(41501513)和江西省重点研发计划项目(20171ACG70018)资助.

**Supported by** National Key RESEARCH and Development Program of China (2016YFD0501405), National Water Pollution Control and Treatment Science and Technology Major Project of China (2015ZX07203-007), National Natural Science Foundation of China (41501513) and Key Research and Development Program of Jiangxi Province (20171ACG70018).

\*\* 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: zhonghui1977@163.com

In this study, a simultaneous analytical method was developed and optimized for the determination of 21 common antibiotics in swine manure. The method used methanol and Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer solution (1 : 1, V/V) for extraction, and the extracts were cleaned up by solid phase extraction and detected by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The recoveries of the internal standard quantification of five tetracyclines, two  $\beta$ -lactams, six macrolides, four sulfonamides and four quinolones antibiotics in pig manure samples ranged from 29.53% to 116.36%, the limits of detection (LODs) were 0.90—26  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS, and the limits of quantification (LOQs) were 2.91—85.20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS, with the correlation coefficients  $R^2$  were greater than 0.997. Using this method to analyze the single-factor analysis of variance for the recovery rates of samples from different houses of a single pig farm, it was found that except for the significant effect of tetracycline-D6 (TC-D6), the recovery rates of other internal standards were not significant in different samples. Pig manure samples from two pig farms in different regions were collected for verification and analysis. It was found that the content of a single antibiotic in the pig manure samples ranged from ND—99.37  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS. The results show that this method can be used for simultaneous detection of multiple antibiotics in pig manure.

**Keywords** Pig manure, internal standard method, veterinary antibiotics, high performance liquid chromatography-mass spectrometry, solid phase extraction.

我国每年生产抗生素约 21 万吨,其中 10 万吨用于畜禽养殖业<sup>[1-2]</sup>。畜禽养殖业大量使用抗生素主要用于疾病预防治疗及促生长<sup>[3]</sup>。由于抗生素在动物肠道中吸收较差,约有 30%—90% 抗生素以原药或代谢产物的形式通过排泄排放到环境<sup>[4]</sup>,导致环境中耐药水平提高,严重危害生态环境安全和人类健康<sup>[5]</sup>。研究表明,生猪粪便中可检测出多种抗生素,如四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、林可霉素和杆菌肽等<sup>[5-7]</sup>。尽管单一类别抗生素的检测准确度较高,但针对养殖粪污抗生素污染的削减与控制,开展多种抗生素同步检测更为迫切。

猪粪基质复杂,不同抗生素辛醇-水分配系数( $K_{ow}$  值)差异较大,加大了猪粪中多种抗生素同步分析检测的难度。已有研究中主要针对浓度较高的单一类别抗生素,主要集中在四环素类抗生素<sup>[8-11]</sup>,Pan 等<sup>[12]</sup>建立了同步检测方法,调查了猪场粪污中残留的 9 种抗生素,磺胺类抗生素、四环素类和泰乐菌素抗生素的含量范围为 5.5—36271.1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;An 等<sup>[4]</sup>用固相萃取-高效液相色谱-串联质谱固相萃取法,用外标法定量测定了猪粪中 4 种四环素类和 4 种磺胺类抗生素,发现金霉素残留含量最高为 143.97  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。受复杂基质影响,无论是外标法、内标法定量都具有一定的局限性<sup>[13]</sup>;不同猪粪样品的内标是否会受基质影响尚不清晰<sup>[14-15]</sup>。

建立快速准确的多种类抗生素同步检测方法是评价与控制畜禽粪便中残留抗生素污染的重要环节,本研究以猪粪中抗生素为对象,以内标-外标法建立五类(四环素类、 $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类、磺胺类、喹诺酮类)常见的 21 种抗生素同步的定量分析方法,以为畜禽粪便中残留抗生素污染评价与控制提供科技支撑。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

1290 高效液相色谱仪和 6460 三重四极杆质谱仪(安捷伦科技有限公司);超临界固相萃取装置(美国 Supelco 公司);Oasis HLB 型固相萃取柱(6 cc/300 mg, 美国 Waters 公司);SE812 型氮吹仪(北京帅恩科技有限责任公司);2-16P 高速离心机(Sigma 公司)。

甲醇、乙腈和乙酸乙酯(色谱纯,美国 Fisher 公司);Na<sub>2</sub>EDTA、甲酸和盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);超纯水(Milli-Q 系统(Advantage A10, Millipore)制取)。

四环素类抗生素(TCs):四环素(tetracyclines, TC, 97%)、4-差向四环素(4-epi-tetracycline

hydrochloride, ETC, 99%)、金霉素(chlorotetracycline, CTC, 99%)、土霉素(oxytetracycline, OTC, 97%)、4-差向土霉素(4-epioxytetracycline, EOTC, 97%)等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

$\beta$ -内酰胺类抗生素( $\beta$ -lactam): 青霉素(Penicillin, PCN, 99%)、头孢噻肟(Cefotaxime Sodium, CFX, 97%)等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

大环内酯类抗生素(MLs): 罗红霉素(roxithromycin, ROX, 97%)、克拉霉素(clarithromycin, CLR, 99%)、螺旋霉素(spiramycin, SPM, 96%)、新螺旋霉素(neo spiramycin I, NSPM, 97%)、替米考星(tilmicosin, TIL, 97%)、泰乐菌素(tylosin, TYL, 98%)等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

喹诺酮类抗生素(FQs): 氧氟沙星(ofloxacin, OFX, 97%)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR, 97%)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR, 97%)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP, 97%)、等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

磺胺类抗生素(SAs): 磺胺嘧啶(sulfadiazine, SD, 97%)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, SMN, 99%)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine sodium, SMX, 97%)、磺胺甲噻二唑(sulfamethizole, SML, 99%)等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

内标: 氧氟沙星-D<sub>3</sub>(ofloxacin-D<sub>3</sub>, OFX-D<sub>3</sub>, 99%)、环丙沙星-D<sub>8</sub>(ciprofloxacin-D<sub>8</sub>, CIP-D<sub>8</sub>, 95%)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, PHENYL-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, 99%)、去甲基金霉素(demethylchlortetracycline, DMCTC, 97%)、四环素-D<sub>6</sub>(tetracycline-D<sub>6</sub>, TC-D<sub>6</sub>, 80%)等购自于德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH.

## 1.2 溶液配制

### 1.2.1 标准储备液配制

精确称取各标准品 0.010 g, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 配成质量浓度 1000 mg·L<sup>-1</sup> 的标准储备液, 置于-20 °C 冰箱内保存. 使用前取各标准储备溶液 10  $\mu$ L 至 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释定容, 配制成 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 的混合标准中间溶液.

### 1.2.2 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲液配制

称取 60.5 g Na<sub>2</sub>EDTA, 溶解于 1000 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸溶液和 625 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钠的混合液中, 并用 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调节 pH=(3.85 $\pm$ 0.1).

## 1.3 猪粪样品中抗生素提取

### 1.3.1 猪粪样品采集及预处理

在 2018 年 9—10 月, 猪粪样品分别采集于山东一个集约化生猪养殖场(猪场 1)和北京两个集约化生猪养殖场(猪场 2 和猪场 3). 猪场 1 和猪场 2 样品为畜舍鲜猪粪, 猪场 3 为畜舍水冲猪粪. 样品采集后冷藏保存, 猪场 3 样品在 8000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 15 min, 采集离心后的固体样品. 每个样品置于-20 °C 预冻 48 h, 然后将预冻后的样品冷冻干燥 48 h, 碾磨过筛(100 目)后储存于棕色玻璃瓶. 3 个猪场猪粪的常规理化指标测定方法参照《水和废水监测方法(第四版)》<sup>[16]</sup>, 具体参数见表 1, 剩余部分置于-20 °C 冰箱保存用于抗生素测定. 本研究使用猪场 2 猪粪进行方法优化研究, 猪场 1 和猪场 3 样品进行分析验证.

表 1 3 个猪场猪粪的基本理化参数  
Table 1 Characteristics of three samples of manure of three pig farm

参数 Parameter	猪场1 Sample 1	猪场2 Sample 2	猪场3 Sample 3
COD/(g·kg <sup>-1</sup> )	170	288	96
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg·kg <sup>-1</sup> )	2770	3947	2280
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg·kg <sup>-1</sup> )	1145	2275	535
TOC/(mg·kg <sup>-1</sup> )	6045	7528	3288

### 1.3.2 猪粪样品中抗生素提取方法

分别准确称取 0.5000 g 猪场 1 的不同畜舍的 3 个干燥样品, 置于 50 mL 聚四氟乙烯管中, 分别加入 20 mL 下列不同组的提取液: pH=4 的 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液、甲醇、乙腈、1% 甲酸乙腈和甲醇与 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(1:1, V:V), 每组样品设置 3 个平行. 将样品放在振荡器中涡旋振

荡 1 min, 置于 20 °C 水浴锅中超声 30 min, 并在 8000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 下离心 15 min, 取上清液转移至干净的 60 mL 聚四氟乙烯管中, 重复上述步骤 3 遍, 将 3 次上清液混合, 并取 5 mL 上清液稀释 10 倍后(用 pH=4 的纯水稀释), 加入 100 μL 饱和 Na<sub>2</sub>EDTA 溶液, 取 10 mL 进行固相萃取。

#### 1.4 固相萃取

固相萃取使用固相萃取柱, 预先采用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 甲醇、5 mL pH=3.85 纯水依次淋洗活化。开启真空泵, 控制流速约为 3—5 mL·min<sup>-1</sup>, 将过膜上清液上柱, 上样量为 10 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 9 mL 50% 甲醇+50% 乙酸乙酯洗脱(1:1, V:V), 收集洗脱液并在室温下用 N<sub>2</sub> 吹扫至近干, 用 10% 甲醇在自动进样瓶中定容至 1 mL, 待测。

#### 1.5 液相色谱质谱条件

##### 1.5.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液; 柱温: 35 °C; 流速: 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 梯度洗脱程序: 0—1 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; 进样量: 10 μL。目标抗生素总离子流图(TIC)如图 1 所示。

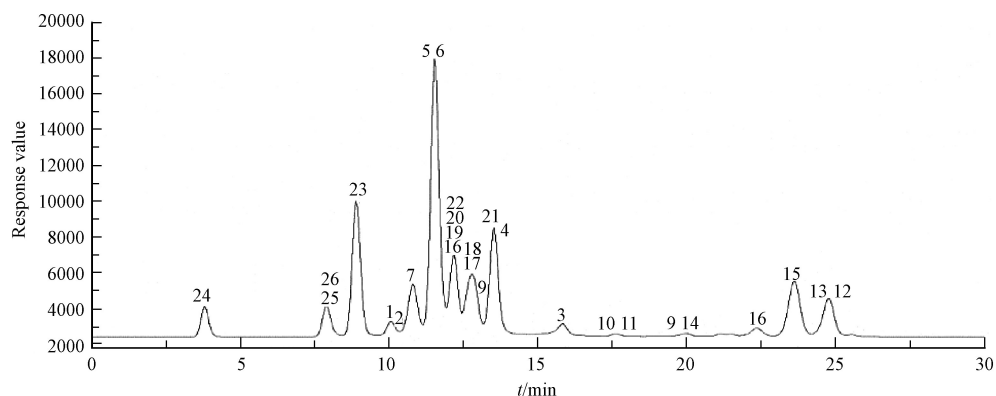


图 1 目标抗生素的总离子流图(编号见表 2)

Fig.1 Chromatogram of target antibiotics(The numbers are shown in Table 2)

##### 1.5.2 质谱条件

电喷雾离子源: 正离子扫描; 雾化气、脱溶剂气和锥孔气: 氮气, 碰撞气: 氩气; 源温度: 90 °C, 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂流速: 500 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流速: 70 L·h<sup>-1</sup>; 毛细管电压: 4 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。目标抗生素质谱条件以及辛醇水分配常数见表 2。

#### 1.6 回收率与样品定量

对于抗生素的痕量分析, 本研究采取选择与待测物性质相似的内标物, 用于明确样品处理过程中待测物的损失以及检测过程中干扰物的影响<sup>[17]</sup>。配制一系列浓度范围的抗生素标准溶液, 经过 LC-MS 测定, 以抗生素的质谱信号响应值对浓度得到标准曲线。加入不同浓度的目标抗生素混标储备液, 使样品成为 20、50、100 μg·L<sup>-1</sup> 的加标猪粪样品, 同样按上述方法前处理后经 SPE-LC-MS/MS(Agilent 1260 超高效液相色谱、Agilent 6420 三重四极杆质谱)测定, 记录各化合物及内标色谱峰面积。计算加标样品及空白样品中的抗生素浓度。回收率计算方法如下:

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{加标样品测定值} - \text{未加标样品测定值}}{\text{加标量}} \times 100\%$$

将抗生素混标储备液配制成 0.1、1、2、5、10、20、50.0、100、200 μg·L<sup>-1</sup> 等 9 个浓度, 对所测样品进行内标定量分析。以标准偏差除以标准曲线的斜率乘以信噪比 3 和 10 计算仪器检出限(limits of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)<sup>[18]</sup>。整个流程重复 3 次, 计算不同样品的方法精密度。



表 2 目标抗生素的质谱参数

Table 2 Mass spectrometric parameters of target antibiotics

序号	类别	目标分析物	辛醇水分配常数lgK <sub>ow</sub>	母离子(m/z)	子离子(m/z)	定量离子(m/z)	碰撞能/eV	保留时间/min
	Category	Compounds	Octanol-water partition coefficient	Parent ions	Product ions	Quantitative ions	Collision energy	Retention time
1		TC	0.54	445.1	427.3	410.3	6, 10	10.8
2		E-TC	—	445.8	428.5	411.2	6, 10	10.81
3		CTC	-0.62	479.3	462.3	444.3	8, 12	15.82
4	TCs	*DMCTC	—	465.3	448	430	6, 15	13.44
5		OTC	-0.9	461.3	443.3	426.1	5, 12	11.58
6		E-OTC	—	461.5	443.3	426.1	5, 12	11.58
7		*TC-D <sub>6</sub>	—	451.3	416.2	433.9	12, 16	10.7
8	β- lactam	PCN	-3.29	335	217	91	5, 45	21.5
9		CTX	0.64	456	324	167	5, 15	12.62
10		SPM	-2.04	843.4	174.1	142.1	35, 30	17.68
11		NSPM	—	699.3	174	142	20, 25	17.58
12	MLs	CLA	3.16	748.3	158.1	126.9	25, 20	24.79
13		TYL	1.63	916.9	145.1	173.8	50, 35	24.57
14		TIL	3.8	869.6	696.4	174	40, 40	19.96
15		ROX	2.75	837.4	679.3	158.1	15, 20	23.65
16		NOR	-1.03	320.1	302	276.1	10, 15	12.17
17		CIP	0.28	332.1	314.1	288.2	9, 12	12.89
18	FQs	*CIP-D <sub>8</sub>	—	340.3	296.3	249.2	12, 22	12.84
19		*OFX-D <sub>3</sub>	—	365.3	321.3	261.2	14, 24	11.48
20		OFX	-2	362.1	344	318.1	15, 15	11.54
21		ERX	0.7	360.1	342.2	316.1	15, 15	13.51
22		SMX	0.7	281.1	156	92	10, 25	12.17
23		SML	0.54	271	156	92	5, 20	9.01
24	SAs	SD	-0.09	251	156	108	9, 17	3.83
25		SMN	0.19	279.1	156	124	10, 25	8.91
26		*SMN- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	-0.07	285.1	124	186	20, 22	8.9

\*为DMCTC、TC-D<sub>6</sub>、CIP-D<sub>8</sub>、OFX-D<sub>3</sub>、SMN-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-同位素内标(Isotope Internal Standard)。

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 猪粪中抗生素提取方法优化

五种提取液的优化研究表明,乙腈对 21 种目标抗生素的平均提取率最低(约 24%),且 CTC、NOR 和 AMP 等未被提取出来。1% 甲酸乙腈对目标物的提取效率也偏低,平均回收率 42% 左右。单独用甲醇提取时,大多数抗生素均可被提取,其中 FQs 抗生素的提取效率较高(OFX、CIP、ETM 的回收率分别为 96%、65% 和 92%), TCs 抗生素的提取效率较低(TC、OTC、CTC 的回收率分别为 29%、73% 和 40%),但 E-TC 和 AMP 和 CFX 等未能提取。Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液的提取效率较高,平均回收率 68%,其中 TCs 抗生素的提取效率较高(TC、OTC、CTC 的回收率分别在 70%、109% 和 112%), FQs 抗生素的提取效率较低(OFX、CIP、ERX 的回收率分别在 62%、31% 和 0%)。

为了提高 TCs 和 FQs 抗生素回收率,本研究采用甲醇和 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(V:V=1:1)的混合液提取目标抗生素,目标抗生素的回收率见图 2。结果表明,混合提取的回收率(平均 83%)高于单独提取(61% 和 68%),尤其是 TCs 抗生素的回收率提高较大(TC、OTC、CTC 的回收率分别在 110.15%、116.36% 和 93.28%)。

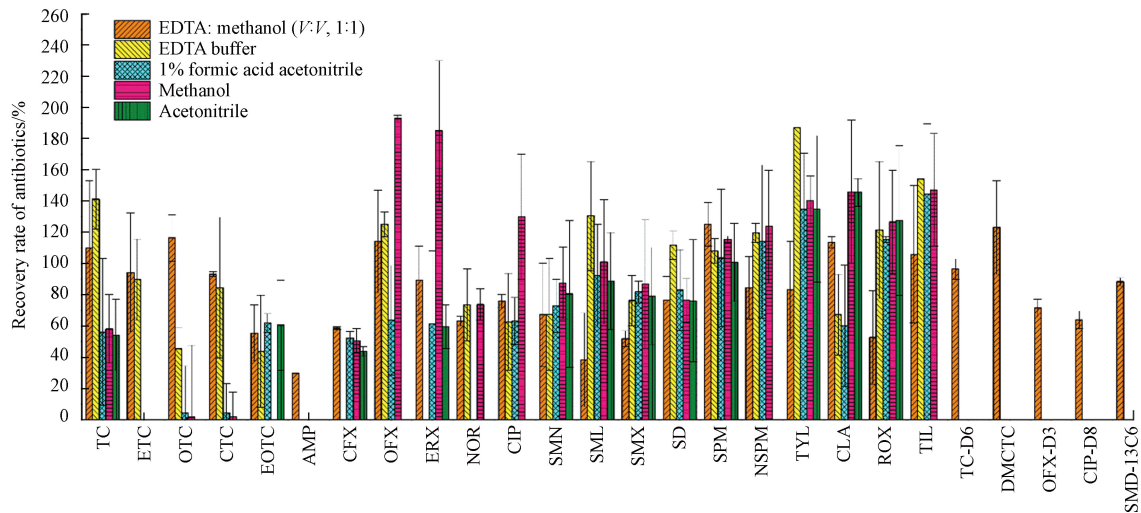


图 2 固体样品中抗生素的加标回收率( $n=3$ )

Fig.2 Recoveries of antibiotics in the solid sample( $n=3$ )

由于样品成分复杂,基质干扰效应较强,抗生素种类繁多,为此选取了 5 种分别与目标抗生素化学性质相似的内标抗生素消除可能存在的系统误差,并用甲醇和  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  缓冲溶液 ( $V:V=1:1$ ) 的混合液进行提取,发现 5 种内标抗生素的回收率除 PCN 外,其他目标抗生素回收率在 51.85%—116.36% 之间.本研究最终选取 20 mL 甲醇和  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  缓冲溶液 ( $V:V=1:1$ ) 的混合液,超声 15 min,重复提取 3 次,合并上清液后取 5 mL 稀释,进行固相萃取.

## 2.2 线性范围、检出限、定量限及回收率

在 0.1、1、2、5、10、20、50.0、100、200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  等 9 个浓度范围,计算各待测目标抗生素在猪粪中的加标回收率(表 3),除 PCN 和 SML 外,21 种目标抗生素的回收率均大于 51.85%;在 0.5—200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内,标准曲线的线性良好,检出限在 0.90—26  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,定量限在 2.91—85.20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,内标定量回收率 29.53%—116.36%,相关系数  $R^2$  均大于 0.997.

## 2.3 实际猪粪样品中抗生素的同步检出

### 2.3.1 内标回收率

为了验证针对不同来源猪粪样品分析的准确性,本研究采用内标法,分别将猪场 2 不同畜舍的 3 个样品的内标回收率进行显著性分析.每个样品做 5 个平行( $n=5$ ).内标回收率的  $F$  检验( $F$ -test)<sup>[19]</sup> 结果表明(表 4),不同猪场猪粪的  $P$  值(除 TC- $\text{D}_6$ )均大于 0.05,这表明不同猪粪样品使用内标法定量回收率时,在不同来源的猪粪抗生素回收率分析中没有显著性影响,TC- $\text{D}_6$  用作内标法定量时,受基质作用影响较大,不适宜作为内标定量猪粪中抗生素浓度.根据保留时间和线性关系内控分析后发现 DMCTC、CIP- $\text{D}_8$ 、OFX- $\text{D}_3$  和 SMZ- $^{13}\text{C}_6$  分别可以标定 TCs 与 CFX、MLs、FQs 和 SAs 抗生素(文中所述抗生素种类).此方法适用不同猪粪样品的分析,回收率满足分析要求.

### 2.3.2 抗生素残留水平检测

在猪场 1 和猪场 3 猪粪样品按上述方法进行前处理并通过 SPE-LC-MS/MS 分析.结果如表 5 所示,5 大类抗生素均有被检出,2 个猪场的猪粪均含有 TCs 抗生素,以 TC、CTC、OTC、E-TC、E-OTC 和 TIL 等 6 种抗生素为主.猪场 1 和 3 的猪粪中抗生素浓度范围分别为 ND—2055.95  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS 和 ND—52.06  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS.万位宁等<sup>[15]</sup> 使用固相萃取-超高效液相色谱串联质谱同时检测出畜禽粪便中 17 种抗生素,包括 6 种磺胺类(SAs)、4 种四环素类(TCs)、3 种氟喹诺酮类(FQs)、3 种大环内酯类(MLs)等,回收率在 42.3%—79.6% 之间,残留抗生素含量在 0.60—13  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,与本研究的结果相似.张丽丽等<sup>[20]</sup> 的研究选择了京郊 35 家规模化养猪场的猪粪进行 TCs 抗生素分析,TCs 抗生素浓度范围在 0.48—29.2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DS,本研究高于其结果.猪场 1 和猪场 3 抗生素含量和 Hou 等<sup>[21]</sup> 的研究对比,FQs 的浓度与其结果相似( $411.3\pm 1453.4$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).通过以上研究分析,发现本方法适用于复杂基质下猪粪中抗生素的同步检出,且通过回收率验证发现本研究中的方法更适用于同步检测 TCs、MLs 和 FQs 抗生素.

表 3 目标抗生素的线性范围、线性回归方程、检出限、定量限和回收率

Table 3 Linear detection range, linear regression equations, limit of detection, limit of quantity and recoveries for the target antibiotics

类别Category	抗生素Compounds	线性回归方程 Linear regression equation	检出限/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Limit of detection	定量限/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Limit of quantity	回收率/% Recovery rate	RSD/%	$R^2$
TCs	TC	$y = 1.2419x - 6.7764$	0.90	3.04	110.15	10.46	0.9952
	ETC	$y = 0.9317x + 0.9728$	15.00	51.50	94.29	2.79	0.9986
	CTC	$y = 1.1215x - 2.1872$	5.97	19.90	93.28	7.26	0.9996
	DMCTC	$y = 1.0674x - 0.3681$	4.64	15.46	105.06	1.75	0.9999
	OTC	$y = 1.2335x - 8.288$	12.00	39.30	116.36	11.75	0.9954
	EOTC	$y = 1.0522x - 4.3296$	6.91	23.05	55.47	3.85	0.9974
	TC-D <sub>6</sub>	$y = 1.0666x - 5.5293$	2.10	7.03	99.17	8.55	0.9958
$\beta$ -lactam	PCN	$y = 1.046x - 6.9819$	2.90	9.63	29.53	7.61	0.9953
	CFX	$y = 1.0059x - 0.4935$	1.93	6.44	87.99	6.94	0.9998
MLs	SPM	$y = 1.0172x - 2.2896$	5.40	18.00	80.68	4.23	0.9986
	NSPM	$y = 0.946x + 2.3059$	8.40	27.90	84.52	6.10	0.9999
	CLA	$y = 0.9973x + 0.7278$	6.00	19.90	113.72	7.85	0.9999
	TYL	$y = 0.9915x + 0.7085$	8.67	28.91	83.45	6.72	0.9998
	TIL	$y = 1.0243x - 3.2394$	13.00	44.90	105.97	6.89	0.9973
	ROX	$y = 1.0015x - 0.1942$	2.00	6.70	89.21	5.23	0.9999
FQs	NOR	$y = 0.8307x + 1.4863$	2.00	6.62	63.01	2.53	0.9994
	CIP	$y = 1.0352x + 2.382$	2.26	7.55	75.94	8.68	0.9990
	CIP-D <sub>8</sub>	$y = 1.0448x - 0.7331$	1.96	6.52	70.41	3.65	0.9992
	OFX-D <sub>3</sub>	$y = 1.096x - 1.7729$	1.60	5.31	85.42	11.20	0.9994
	OFX	$y = 1.0299x - 0.1603$	0.90	2.91	114.12	4.10	0.9998
	ERX	$y = 0.8981x - 1.5119$	6.90	23.10	86.25	2.73	0.9983
SAs	SMX	$y = 0.9317x + 0.9728$	12.00	38.90	51.85	5.14	0.9999
	SML	$y = 0.946x + 2.3059$	9.90	33.10	38.34	8.31	0.9984
	SD	$y = 1.0125x - 0.7419$	15.00	48.90	76.71	2.79	0.9992
	SMN	$y = 1.0771x + 0.0393$	26.00	85.20	67.29	2.15	0.9984
	SMN- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	$y = 24.538x + 289.43$	1.80	5.85	75.16	8.55	0.9975

表 4 内标回收率的  $F$  检验 ( $F$ -test)

Table 4 Single factor analysis of variance of internal antibiotics

序号Number	抗生素内标名称 Internal standard of antibiotics	$P$	
1	CIP-D <sub>8</sub>	0.333164	$P > 0.05$
2	DMCTC	0.083809	$P > 0.05$
3	TC-D <sub>6</sub>	0.0092	$*P < 0.05$
4	OFX-D <sub>3</sub>	0.848074	$P > 0.05$
5	SMN- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	0.091021	$P > 0.05$

\*  $P < 0.05$ 水平差异显著(The differences in levels were significant.).

表 5 不同规模化养猪场猪粪中的抗生素含量( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )  
Table 5 Residues of antibiotics in pig manure from different pig farms

样品 Sample	猪场1 Pig farm1	猪场3 Pig farm3
TC	65.69	751.3
E-TC	149.86	853.42
CTC	60.16	1653.34
OTC	219.35	52057.2
E-OTC	145.71	37013.86
PCN	ND	ND
CTX	ND	ND
SPM	ND	ND
NSPM	ND	ND
CLA	17.38	ND
TYL	39.87	117.48
TIL	2055.95	4641.27
ROX	ND	ND
NOR	ND	ND
CIP	121.56	476.23
OFX	16.59	85.97
ERX	3.36	ND
SMX	3.86	8.66
SML	ND	ND
SD	ND	ND
SMN	20.04	ND

### 3 结论(Conclusion)

本研究对快速实现多种抗生素在猪粪等复杂基质下的同步检测进行了探索,在猪粪中不同抗生素的回收率不同,检测猪粪中 5 种 TCs、2 种  $\beta$ -lactams、6 种 MLs、4 种 FQs 和 4 种 SAs 抗生素,检测限在  $0.5\text{--}200\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  浓度范围内,标准曲线的线性良好,相关系数  $R^2$  均大于 0.997,检出限在  $0.90\text{--}26\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,定量限在  $2.91\text{--}85.20\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。SML 和 PCN 回收率较低(38.34% 和 29.53%),在实际应用时可尝试其它优化提取条件以提高回收率。此方法用四种内标(CIP- $\text{D}_8$ 、DMCTC、OFX- $\text{D}_3$ 、SMZ- $^{13}\text{C}_6$ )标定,不同猪粪样品内标的回收率无显著性差异,并且根据保留时间和线性关系内控分析后发现 DMCTC、CIP- $\text{D}_8$ 、OFX- $\text{D}_3$  和 SMZ- $^{13}\text{C}_6$  分别可以标定 TCs 与 CFX、MLs、FQs 和 SAs 抗生素,通过以上研究分析,发现本方法适用于复杂基质下猪粪中抗生素的同步检出,且通过回收率验证发现本研究中的方法更适用于检测 TCs、MLs 和 FQs 抗生素。

#### 参考文献 (References)

- [ 1 ] 印遇龙,杨哲.天然植物替代饲用促生长抗生素的研究与展望 [J]. 饲料工业, 2020, 41(24): 1-7.  
YIN Y L, YANG Z. Research and prospect of natural plant substitute for antibiotic growth promoters in feed [J]. Feed Industry, 2020, 41(24): 1-7(in Chinese).
- [ 2 ] 王怀禹.减抗、限抗、禁抗及其替代方案对生猪养殖的影响 [J]. 猪业科学, 2020, 37(1): 42-44.  
WANG H Y. Effects of reducing, restricting and prohibiting antibiotics and their alternatives on pig breeding [J]. Swine Industry Science, 2020, 37(1): 42-44(in Chinese).
- [ 3 ] RAMASWAMY J, PRASHER S O, PATEL R M, et al. The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2294-2299.



- [4] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展 [J]. *环境化学*, 2013, 32(9): 1619-1633.  
Gao L H, Shi Y L, Li W H, et al. Environmental behavior and impacts of antibiotics [J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(9): 1619-1633(in Chinese).
- [5] 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.
- [6] ZHOU L J, YING G G, ZHANG R Q, et al. Use patterns, excretion masses and contamination profiles of antibiotics in a typical swine farm, South China [J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2013, 15(4): 802.
- [7] CHEN Y S, ZHANG H B, LUO Y M, et al. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(6): 606-614.
- [8] 钟冬莲, 丁明, 汤富彬, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定畜禽粪便中四环素类抗生素 [J]. *分析科学学报*, 2014, 30(3): 433-436.  
ZHONG D L, DING M, TANG F B, et al. Determination of tetracyclines antibiotics residues in animal manure by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Science*, 2014, 30(3): 433-436(in Chinese).
- [9] 罗庆, 孙丽娜, 胡筱敏. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜禽粪便中罗红霉素和3种四环素类抗生素 [J]. *分析试验室*, 2014, 33(8): 885-888.  
LUO Q, SUN L N, HU X M. Simultaneous determination of roxithromycin and three tetracyclines in manure by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(8): 885-888(in Chinese).
- [10] 吴晓凤, 郑嘉熹, 魏源送, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时检测复杂基质中四环素类抗生素及其代谢产物 [J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(11): 2293-2301.  
WU X F, ZHENG J X, WEI Y S, et al. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in complicated matrix by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(11): 2293-2301(in Chinese).
- [11] 沈颖, 魏源送, 郭睿, 等. 超高效液相色谱串联质谱检测猪粪中残留的四环素类抗生素 [J]. *环境化学*, 2009, 28(5): 747-752.  
SHEN Y, WEI Y S, GUO R, et al. Determination of tetracyclines residues in swine manure by uplc/ms [J]. *Environmental Chemistry*, 2009, 28(5): 747-752(in Chinese).
- [12] PAN X, QIANG Z M, BEN W W, et al. Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(10): 1729-1737.
- [13] 李艳霞, 李帷, 张雪莲, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时检测畜禽粪便中14种兽药抗生素 [J]. *分析化学*, 2012, 40(2): 213-217.  
LI Y X, LI W, ZHANG X L, et al. Simultaneous determination of fourteen veterinary antibiotics in animal manure using solid phase extraction and liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(2): 213-217(in Chinese).
- [14] 郭欣妍, 王娜, 郝利君, 等. 超高效液相色谱/串联质谱法同时测定水、土壤及粪便中25种抗生素 [J]. *分析化学*, 2015, 43(1): 13-20.  
GUO X Y, WANG N, HAO L J, et al. Simultaneous detection of 25 kinds of veterinary antibiotics in soil, manure and water samples using liquid Chromatography Tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(1): 13-20(in Chinese).
- [15] 万位宁, 陈熹, 居学海, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留 [J]. *分析化学*, 2013, 41(7): 993-999.  
WAN W N, CHEN X, JU X H, et al. Simultaneous determination of residual antibiotics in livestock manure by solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(7): 993-999(in Chinese).
- [16] 水和废水监测分析方法[M]. 中国环境科学出版社, 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会编, 2002.  
Water and wastewater monitoring and analysis methods[M]. Compilation by China Environmental Science Press, State Environmental Protection Administration, Editorial Board of Water and Waste water Monitoring and Analysis Methods, 2002(in Chinese).
- [17] YUAN X J, QIANG Z M, BEN W W, et al. Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(9): 1949-1959.
- [18] PAN X, QIANG Z M, BEN W W, et al. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China [J]. *Chemosphere*, 2011, 84(5): 695-700.
- [19] 张秀英. 抗生素微生物检定中的常见问题分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(3): 45-46.  
ZHANG X Y. Analysis on common problems in testing antibiotics by microbiological method [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(3): 45-46(in Chinese).
- [20] 张丽丽, 直俊强, 张加勇, 等. 北京地区猪粪中四环素类抗生素和重金属残留抽样分析 [J]. *中国农学通报*, 2014, 30(35): 74-78.  
ZHANG L L, ZHI J Q, ZHANG J Y, et al. Study on tetracyclines and heavy metals residues in pig feces from Beijing area [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(35): 74-78(in Chinese).
- [21] HOU J, WAN W N, MAO D Q, 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.