

高效液相色谱-荧光检测法同时分析鸡粪中六种氟喹诺酮类抗生素

刘 博^{1,2}, 薛南冬^{2*}, 杨 兵², 龚道新¹, 李发生², 张石磊², 周玲莉², 孟 磊², 陈宣宇^{1,2}, 燕云仲²

(1.湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128; 2.中国环境科学研究院 环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012)

摘 要:通过对样品预处理过程优化、提取剂与洗脱剂的筛选和检测色谱条件优化,建立了基于固相萃取-高效液相色谱荧光检测法分析鸡粪中6种氟喹诺酮类(FQs)的检测方法。该方法选用 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液:乙腈(1:1, V/V)(pH=2)作为提取剂,超声提取时间 15 min,经 HLB 固相柱净化,选用甲醇为洗脱剂,浓缩后用 HPLC/FLD 检测,采用乙腈/0.7%磷酸作为流动相。FQs 在 0.01~1.0 mg·kg⁻¹ 浓度范围内呈现良好线性关系, R^2 为 0.996 9~0.999 9。加标(浓度水平 0.01、0.5、1.0 mg·kg⁻¹ 干重)回收率达 76.7%~106.7%,相对标准偏差 0.7%~14.4%($n=4$)。方法检出限为 0.002~0.022 mg·kg⁻¹,方法定量限为 0.006 8~0.074 mg·kg⁻¹。应用该方法对北京地区 5 个养鸡场内鸡粪样品中 6 种 FQs 进行分析,检出浓度为 ND~1.13 mg·kg⁻¹。

关键词:氟喹诺酮类抗生素;固相萃取-高效液相色谱荧光检测法(SPE-HPLC/FLD);禽畜粪便;分析方法

中图分类号:X502 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)05-1050-07 doi:10.11654/jaes.2014.05.031

Simultaneous Determination of Six Fluoroquinolones in Chicken Manures by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

LIU Bo^{1,2}, XUE Nan-dong^{2*}, YANG Bing², GONG Dao-xin¹, LI Fa-sheng², ZHANG Shi-lei², ZHOU Ling-li², MENG Lei², CHEN Xuan-yu^{1,2}, YAN Yun-zhong²

(1.College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: An analytical method for simultaneous determination of six fluoroquinolones (FQs) in chicken manures based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with a fluorescence detection (HPLC/FLD) was developed in the current study. Samples were ultrasonically extracted in McIlvaine-Na₂EDTA buffer/acetonitrile (1:1) (pH=2) for 15 min. The extract was cleaned by a HLB solid-phase extraction column, and then eluted with methanol solvent. The fluoroquinolones in the extract were determined by HPLC/FLD with acetonitrile/0.7% phosphate as mobile phase. In a concentration range of 0.01~1.0 mg·kg⁻¹, R^2 of calibration was greater than 0.99. The average percent recoveries ranged from 76.7% to 106.7% for six compounds in chicken manure samples at three different spiked levels (0.1, 0.5 mg·kg⁻¹ and 1.0 mg·kg⁻¹). The detection limits (LOD) were from 0.002 mg·kg⁻¹ to 0.022 mg·kg⁻¹, and limit of quantification (LOQ) from 0.006 8 mg·kg⁻¹ to 0.074 mg·kg⁻¹. This method was used to analyze six FQs in chicken manures collected from 5 chicken farms in Beijing. All six FQs were detected in most samples, with concentrations ranging from LOD to 1.13 mg·kg⁻¹.

Keywords: fluoroquinolones (FQs); solid-phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection; livestock and poultry excrement; analytical method

收稿日期:2014-02-13

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)(2012AA06A304);国家公益性行业科研专项重大项目(2011467017)

作者简介:刘 博(1989—),男,湖南湘阴县人,研究方向为土壤有机污染物环境行为与污染修复。E-mail:liubows88@sina.com

* 通信作者:薛南冬 E-mail:ndxue2013@gmail.com

氟喹诺酮类(FQs)抗生素是一类由人工合成的广谱类抗菌药,是喹诺酮的哌嗪基派生物,通过抑制细菌的DNA解旋酶Ⅱ(Topoisomerase Ⅱ)和拓扑异构酶Ⅳ(Topoisomerase Ⅳ)而影响细菌的DNA复制过程^[1]。由于具有广谱抗革兰氏细菌活性和口服吸收效果好等特性,FQs在禽畜养殖业被大量用于禽畜疾病防治以及被用作饲料添加剂^[2]。据世界卫生组织统计,全球每年消耗的抗生素总量中,有90%被用于禽畜养殖。如美国每年养殖业使用抗生素约超过1万t,由于代谢率仅为10%~40%,大部分抗生素被直接排放到环境中。近年来中国养殖业发展迅猛,规模化、集约化的程度不断提高,每年用于饲料添加剂的抗生素占全球使用量的50%以上。中国每年畜禽粪便产生量约是工业固体废弃物的2倍以上,部分地区甚至超过4倍。大量抗生素将进入环境中,这可能带来生物毒性和致病菌产生抗药性基因等环境风险和生态风险^[3-5]。而以欧盟为例,氟喹诺酮类和喹诺酮类作为主要的兽药抗生素,其在欧盟主要国家使用比例仅次于四环素类、磺胺类,由此带来的环境风险不容忽视^[6]。

由于畜禽粪便基质复杂,FQs在畜禽粪便中的分析受到较大干扰。目前环境基质中抗生素的检测技术中,高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)具有检测范围宽、灵敏度高、抗干扰能力较强等特点^[7-9],但LC-MS/MS成本较高,影响到它的广泛应用。由于FQs在灵敏度较高而成本相对较低的荧光检测器(FLD)下有响应,通过高效液相色谱-荧光分析法(LC/FLD)检测FQs的应用越来越多。潘媛等^[10]使用LC/FLD对动物源性食品中6种FQs进行了检测分析,Li等^[11]使用LC/FLD对土壤中的4种FQs进行残留检测,但回收率相对偏低(洛美沙星为61.3%~67.8%、恩诺沙星为63.2%~75.7%)。Zhao等^[12]建立了LC-FLD对禽畜粪便中7种FQs同时检测分析的方法,但由于未经过SPE净化过程,方法定量限偏高(0.031~0.15 mg·kg⁻¹)。本研究基于SPE-HPLC/FLD法建立了鸡粪样品中6种典型FQs残留同时检测分析的方法,该方法具有较高的回收率,较低的定量限,且分析成本较LC-MS/MS方法低,适合对复杂环境介质中6种FQs分析,为研究和治理环境中FQs类抗生素污染提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(附荧光检测器、自动进样器、二元泵、柱温箱、LC-solution 工作

站),日本 Shimadzu 公司;WATERS Xterra RP18 色谱柱(250 mm×4.6 μm,5 μm),美国 WATERS 公司;Oasis HLB 柱(3 mL/60 mg),美国 WATERS 公司;Visiprep™-DL 固相萃取装置,美国 Supelco 公司;HITACHI CR21G II 高速离心机,日本 HITACHI 公司;DELTA 320 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;CM-12 水浴氮吹仪,北京成荫伟业科技有限公司;KQ-500DB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;SENCOR 系列旋转蒸发器,上海申科科技有限公司。

诺氟沙星(纯度≥99.91%)、环丙沙星(纯度≥99.91%)、达氟沙星(纯度≥99.91%)、恩诺沙星(纯度≥99.91%)、沙拉沙星(纯度≥99.91%),农业部环境保护科研监测所;洛美沙星(≥90.7%),中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯;磷酸为优级纯;乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、乙酸、乙酸铵、硝酸镁、氨水、HCl、NaOH 等均为分析纯;试验用水为超纯水。

1.2 溶液配制

称取柠檬酸 12.9 g、磷酸氢二钠 5.45 g、乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,用超纯水定容至 1 L,制成 0.1 mol·L⁻¹的 Na₂EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液(pH=4 左右)。将 Na₂EDTA-Mcllvaine 与乙腈 1:1(V/V)混合,配制成混合提取液,用 HCl 调节 pH=2 左右。

甲醇、乙酸和水按 6:1:3(V/V/V)混合(pH=3.11)。50% Mg(NO₃)₂ 溶液:称取 50 g Mg(NO₃)₂·6H₂O 溶于 100 mL 水中。50% Mg(NO₃)₂-2.5% NH₃·H₂O 提取液:将 50% Mg(NO₃)₂ 溶液与 2.5% NH₃·H₂O 按 96:4(V/V)混合。

准确吸取诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、洛美沙星(LOM)、达氟沙星(DAN)、恩诺沙星(ENR)和沙拉沙星(SAR)等 6 种抗生素目标物 100 mg·L⁻¹ 标准溶液 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,以甲醇溶解并定容,配制成 10 mg·L⁻¹ 混合标准储备液,于 5℃避光保存。

1.3 样品采集与前处理

鸡粪样品来自北京市郊区 4 个规模化养鸡场(养鸡场 1、养鸡场 2、养鸡场 3 和养鸡场 4)和 1 个天然放养场(养鸡场 5)。在养鸡场鸡舍使用不锈钢铲采集当天新鲜鸡粪,在一个养鸡场内多点收集并混合均匀成为一个鸡粪样品,避光密封(每个养鸡场分别编号为 1、2、3、4、5),带回实验室在-10℃保存。从鸡粪样品取适量经冷冻干燥、粉碎后过 2 mm 筛,取(0.5±0.005)g 研磨过筛,样品置于离心管中,加入 5

mL EDTA-McIlvaine:乙腈=1:1(V/V)提取液漩涡混匀 30 s, 超声 15 min, 以 $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液转入 250 mL 容量瓶中, 重复提取两次。合并 3 次提取液, 利用旋转蒸发仪在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右水浴中减压蒸发, 去除有机溶剂。提取液过孔径为 $1.2\text{ }\mu\text{m}$ 、直径为 22 mm 的玻璃纤维滤膜, 然后以 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率通过 HLB 柱并抽干, 用 6 mL 5% 甲醇溶液清洗小柱, 最后经 5 mL 甲醇洗脱目标抗生素, 收集洗脱液, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下高纯氮气吹至近干, 用乙腈:0.7% 磷酸 (1:9, V/V) 定容至 1 mL, 超声 5 min 促溶, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后待测。

1.4 色谱条件

WATERS Xterra RP18 色谱柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ }\mu\text{m}\times 5\text{ }\mu\text{m}$), 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 荧光检测器 (FLD) 检测波长: 激发波长 280 nm , 发射波长 450 nm ; 进样体积: $20\text{ }\mu\text{L}$; 流速: $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。二元梯度泵, 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.7% 磷酸溶液。梯度洗脱程序: $0\sim 20\text{ min}$, 10% A; $20\sim 35\text{ min}$, 10%~25% A; $35\sim 45\text{ min}$, 40% A; $45\sim 55\text{ min}$, 10% A。

2 结果与讨论

2.1 SPE 过程优化

2.1.1 提取液的选择

对 FQs 类物质从环境样品中提取, 提取剂的选择非常重要。目前常用的提取剂有 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液^[9,11]、EDTA-McIlvaine 缓冲液^[13]和乙腈^[13-14]等。比较 50% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -2.5% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、EDTA-McIlvaine 缓冲液 ($\text{pH}=4$) 和乙腈等提取液, 甲醇:乙酸:水 (6:1:3, V/V/V)^[15]和 EDTA-McIlvaine:乙腈 (1:1, V/V) 等混合提取液, 以及 EDTA-McIlvaine 缓冲液与甲醇:乙酸:水 (6:1:3, V/V/V) 复合提取时各目标物的回收率。结果如表 1, 从表中可以看出, 单独使用无机提取液 50% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -2.5% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、EDTA-McIlvaine 缓冲液或有机提取液乙腈时, 均无法从基质中有效提取出目标物; 而使用有机无机混合提取液甲醇:乙酸:水 (6:1:3, V/V/V) 时, 对于 NOR、CIP 等目标物提取效率仍然偏低, 采用 EDTA-McIlvaine 缓冲液与甲醇:水:乙酸 (6:1:3, V/V/V) 复合提取时, 提取效率基本能达到要求, 但实验提取剂使用量较大, 提取步骤较繁琐, 需两种提取剂先后各提取两次, 前处理后的样品上机检测时检出的杂质也较多; 而使用 EDTA-McIlvaine:乙腈 (1:1, V/V) 时, 6 种目标物回收率均较理想, 且溶剂使用量小, 提取步骤简便, 杂质也较少。这是因为 FQs

容易与环境样品中的二价或三价金属离子形成化合物, 加入螯合剂 EDTA 可以防止被二价或三价金属离子绑定^[16]。而乙腈相对于甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷等具有更好的提取喹诺酮类的效果^[14], 并且乙腈在沉淀粪便样品中蛋白质方面效果较好, 优于甲醇和丙酮。综合考虑, 选择 EDTA-McIlvaine:乙腈 (1:1, V/V) 作为提取剂。

表 1 不同提取剂的比较

Table 1 Percent recoveries and relative standard deviation (RSD) with different extraction agents

提取剂	(回收率 $\pm$ RSD)/%					
	NOR	CIP	LOM	DAN	ENR	SAR
a	15.9 $\pm$ 2.9	23.6 $\pm$ 3.0	51.7 $\pm$ 3.5	49.0 $\pm$ 2.5	61.2 $\pm$ 6.6	73.7 $\pm$ 5.9
b	61.1 $\pm$ 7.7	48.9 $\pm$ 12.0	69.0 $\pm$ 7.6	40.7 $\pm$ 4.0	65.2 $\pm$ 12.0	59.8 $\pm$ 12.8
c	11.7 $\pm$ 1.6	14.8 $\pm$ 2.2	14.1 $\pm$ 2.1	19.5 $\pm$ 3.0	28.1 $\pm$ 4.1	43.4 $\pm$ 10.4
d	59.9 $\pm$ 6.6	57.7 $\pm$ 4.6	71.5 $\pm$ 5.2	71.0 $\pm$ 10.2	78.0 $\pm$ 22.7	62.9 $\pm$ 18.8
e	72.4 $\pm$ 8.9	63.1 $\pm$ 5.7	80.2 $\pm$ 3.4	65.5 $\pm$ 5.9	63.1 $\pm$ 12.5	76.7 $\pm$ 4.1
f	83.6 $\pm$ 4.4	68.0 $\pm$ 4.9	74.1 $\pm$ 6.1	79.7 $\pm$ 4.8	90.8 $\pm$ 4.7	64.3 $\pm$ 5.5

注: a. 50% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -2.5% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$; b. EDTA-McIlvaine 缓冲液 ($\text{pH}=4$); c. 乙腈; d. 甲醇:乙酸:水 (6:1:3, V/V/V); e. EDTA-McIlvaine ($\text{pH}=4$) 与甲醇:乙酸:水 (6:1:3, V/V/V) 复合提取; f. EDTA-McIlvaine ($\text{pH}=4$):乙腈 (1:1, V/V)。

2.1.2 提取剂 pH 值

由于氟喹诺酮类抗生素结构式含哌嗪基, 有 2 个 pK_a 值 ($\text{pK}_{a1}=5.5\sim 6.3$, $\text{pK}_{a2}=7.6\sim 8.5$), 在水溶液酸性条件下 (通常 $\text{pH}<5$), 氟喹诺酮是阳离子形式, 在对喹诺酮类样品预处理中大多将样品 pH 调节为酸性, 将其转化为阳离子形式有利于提取^[17-18]。选择 EDTA-McIlvaine:乙腈 (1:1, V/V) 作为提取剂, 用 HCl 或 NaOH 调节提取液 pH 为 1.0~8.0 后对样品进行提取, 过 SPE 柱后上机测定, 研究提取液在不同 pH 条件下的提取效率。结果如表 2, 各目标物回收率受提取剂 pH 变化影响非常明显, 在一定范围内, 抗生素回收率随着 pH 的降低而提高。 $\text{pH}\geq 5$ 时, 目标物回收率较低, 均小于 60%, 而当 $\text{pH}\leq 3.0$ 时, 6 种氟喹诺酮类回收率均较高, 在 68.5% 以上, 且在 $\text{pH}=2$ 时回收率最佳, 达 76.6%~104.3%, 同时提取液中所含杂质相对较少。因此选择 EDTA-McIlvaine:乙腈 (1:1, V/V) 作为提取剂, pH 调至 2 时, 提取效率最佳。

2.1.3 提取时间与次数

提取时间影响目标物的回收率, 提取时间过短无法有效将目标抗生素从基质中提取出来, 致使回收率低, 而提取时间过长则可能将基质中的有机物杂质提取出来, 影响随后的分析测定。本文比较了不同超声

表 2 提取液不同 pH 值条件下 6 种 FQs 的回收率和相对标准偏差比较

Table 2 Percent recoveries and relative standard deviations (RSD) of 6 FQs in extracting buffer solution with different pH values

pH	(回收率±RSD)/%					
	NOR	CIP	LOM	DAN	ENR	SAR
1	94.8±16.56	83.0±15.94	75.4±10.28	85.6±13.69	96.4±8.39	80.9±10.04
2	95.5±15.70	83.7±17.87	77.9±7.95	84.3±4.30	104.3±5.75	76.6±5.25
3	80.9±3.66	76.7±14.44	70.2±1.79	78.9±2.17	103.8±6.31	68.5±4.41
4	71.5±14.87	74.6±24.93	62.9±8.76	65.8±12.58	87.2±16.95	56.0±10.97
5	48.8±6.99	36.8±8.45	52.0±12.05	37.5±5.40	59.5±10.30	35.7±2.69
6	34.8±15.99	24.1±12.22	43.6±13.89	36.7±12.11	68.5±6.71	28.4±14.05
7	17.0±6.8	10.5±5.0	36.1±5.6	22.3±4.2	51.8±6.2	16.0±4.9
8	9.4±2.3	4.8±1.2	26.5±6.8	13.7±2.6	50.7±4.5	10.8±0.9

提取时间(5、10、15、20、25 min)的回收率变化(图 1)。从图 1 可以看出,10 min 时回收率已接近最高值,而在 15 min 以后,各目标物回收率提高较少。因此在 40 ℃条件下超声提取时间确定为 15 min。同时,试验表明,第 4 次提取液中抗生素已低于检出限。因此采用 3 次提取,每次提取时间 15 min,合并提取液,以备下一步处理。

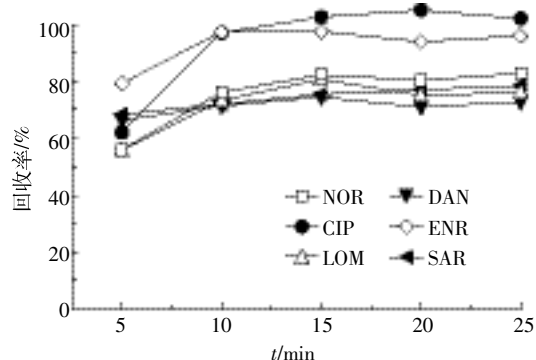


图 1 提取时间对回收率的影响

Figure 1 Effect of extraction time on recoveries of FQs

2.1.4 洗脱溶剂和洗脱体积

由于鸡粪基质的复杂性,需选择适当的有机溶剂尽可能将目标物洗脱,同时避免洗脱下来干扰杂质影响目标物的检测。目前常用的洗脱溶剂有甲醇^[16,19]、甲醇:丙酮(80:20, V/V)^[20]、甲醇:乙酸乙酯(10:90, V/V)^[21]和二氯甲烷^[22]。将 1 mL 混合标准溶液(各目标物浓度均为 1 mg·L⁻¹)用超纯水(约 20 mL)稀释后过 HLB 柱,分别以甲醇、甲醇:丙酮(80:20, V/V)、甲醇:乙酸乙酯(10:90, V/V)和二氯甲烷为洗脱剂,进行洗脱实验,实验结果见图 3。甲醇的洗脱效果最为理想(92.7%~100.8%),而其他几种洗脱溶剂的洗脱能力均比甲醇低。结果也表明,甲醇洗脱实际样品后产生的杂质峰

并不会对目标峰产生干扰。所以对实际样品洗脱选用了甲醇。用 2、4、6、8、10 mL 甲醇洗脱吸附在固相萃取柱上的目标物,结果表明 4 mL 时目标物洗脱效率已达最高值,最终确定最佳洗脱体积为 4 mL。

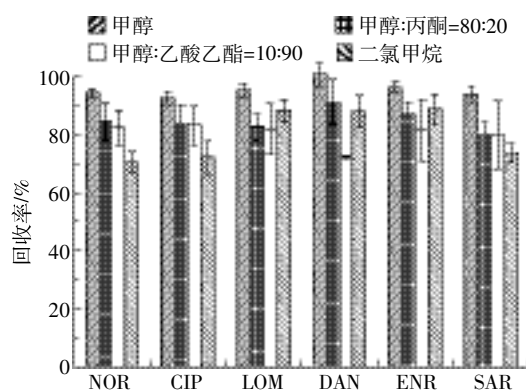


图 2 不同洗脱液对回收率的影响

Figure 2 Effect of different elution solutions on recoveries of FQs

2.2 色谱条件优化

高效液相色谱荧光检测法(SPE-HPLC/FLD)测定氟喹诺酮类(FQs)抗生素,流动相的选择非常重要。目前采用 0.025 mol·L⁻¹ 的乙酸铵-0.5%乙酸缓冲液与乙腈或 0.7%磷酸与乙腈^[11-12] 作为流动相较为常见。为了同时测定 6 种 FQs, 分别用①0.025 mol·L⁻¹ 的乙酸铵-0.5%乙酸缓冲液与乙腈和②0.7%磷酸与乙腈作为流动相试验,发现用①0.025 mol·L⁻¹ 的乙酸铵-0.5%乙酸缓冲液与乙腈作为流动相,采用梯度洗脱程序,6 种 FQs 分离效果不好,且拖尾现象严重。而选用②0.7%磷酸与乙腈作为流动相,采用梯度洗脱程序,结果 6 种 FQs 抗生素出峰时间稳定,分离效果较好,分离度均大于 1.5,无拖尾现象。

样品前处理后,定容的溶剂也影响 6 种抗生素的

检测。研究发现样品前处理后使用甲醇定容时,6 种抗生素色谱峰拖尾严重,未完全分离,而采用初始流动相乙腈:0.7%磷酸(1:9,V/V)定容时,色谱峰峰形对称,分离效果较好。定容后采取超声 5 min 促溶后目标物回收效率要优于直接定容。标准样品($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、加标样品(在来自养鸡场 5 的样品中添加浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和环境样品中 6 种氟喹诺酮类抗生素的色谱分离图见图 3。

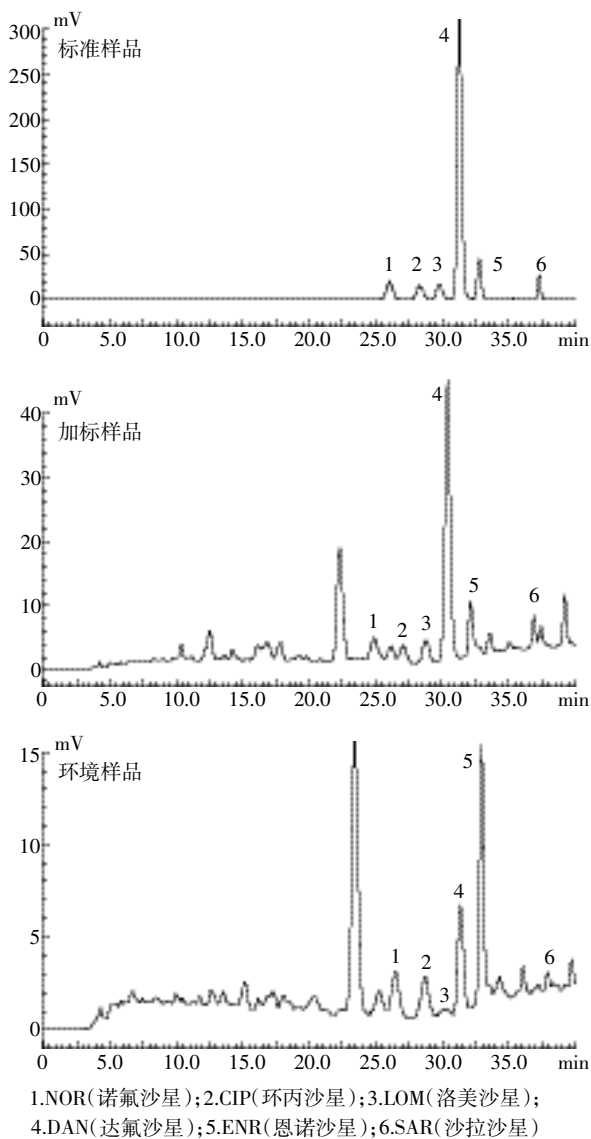


图 3 标准样品($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、加标样品(添加浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和环境样品中氟喹诺酮类的色谱图

Figure 3 Chromatograms of FQs in a standard sample($1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a spiked sample($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and an environmental sample

2.3 线性范围与检测限

配制 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.5 、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列混合标准溶液,按照前述的色谱条件进行检测,以色谱

峰面积对抗生素质量浓度作校正曲线后得到线性回归方程和相关系数,采用 3 倍信噪比计算检出限(LOD),10 倍信噪比计算定量限(LOQ),结果见表 3。

2.4 添加回收率

分别在 0.5 g 空白粪便样品中添加 0.1 、 0.5 、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的混合标准溶液,每个添加水平取 4 个平行样,按上述方法进行实验,并计算各目标物平均回收率及相对标准偏差(RSD),结果见表 4。6 种抗生素的回收率为 $76.7\%\sim 106.7\%$,方法标准偏差为 $0.7\%\sim 14.5\%$ 。

表 3 6 种 FQs 标准曲线方程
Table 3 Calibration curves and correlation coefficients of the developed method

抗生素	回归方程	相关系数	LOQ/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	LOD/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
NOR	$y=965\ 786x-1\ 361.9$	0.999 8	0.025	0.007 5
CIP	$y=784\ 441x-586.1$	0.999 9	0.016 8	0.005
LOM	$y=839\ 878x+1\ 783.7$	0.999 9	0.011 5	0.003 4
DAN	$y=9\ 000\ 000x-8\ 097.7$	0.999 9	0.006 8	0.002
ENR	$y=1\ 000\ 000x-1\ 889.2$	0.999 9	0.011 4	0.003 4
SAR	$y=617\ 788x-2\ 867.7$	0.996 9	0.074	0.022 2

表 4 6 种抗生素添加回收率与相对标准偏差($n=4$)
Table 4 Percent recoveries and relative standard deviations(RSD) of the developed method for 6 FQs($n=4$)

抗生素	添加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
NOR	0.1	94.3	14.5
	0.5	87.6	5.9
	1.0	96.5	14.4
CIP	0.1	104.9	13.7
	0.5	91.2	4.9
	1.0	96.5	11.4
LOM	0.1	87.3	6.8
	0.5	87.2	3.1
	1.0	80.8	5.8
DAN	0.1	106.7	8.7
	0.5	86.9	0.7
	1.0	85.0	3.3
ENR	0.1	93.8	2.0
	0.5	89.1	2.6
	1.0	103.9	6.5
SAR	0.1	105.1	3.1
	0.5	82.1	5.2
	1.0	76.7	5.2

2.5 实际样品检测

取适量鸡粪样品冷冻干燥,按上述方法进行提取与检测,结果见表 5。4 个规模化养鸡场(养鸡场 1、

表5 北京市郊养鸡场6种FQs含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 干重)

Table 5 Contents of 6 FQs in different samples from Beijing measured by the developed method

采样点	NOR	CIP	LOM	DAN	ENR	SAR
养鸡场1	ND	0.25	ND	0.07	0.94	0.18
养鸡场2	1.13	0.49	ND	0.59	ND	0.40
养鸡场3	0.23	0.39	0.21	0.06	0.74	0.10
养鸡场4	0.09	0.39	ND	0.04	0.24	0.24
养鸡场5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

2、3、4)的样品均有不同程度目标物检出,而在天然放养场(养鸡场5)的样品中未有任何目标物检出。同一养鸡场中的不同类抗生素检出率以及含量差异较大。其中养鸡场3均有各抗生素不同浓度的检出,其中ENR含量达 $0.74\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,养鸡场2中检出的NOR、CIP、DAN和SAR4种抗生素含量范围达 $0.40\sim 1.13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,养鸡场1检出的最高含量抗生素为ENR,含量为 $0.94\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,养鸡场4除了LOM外,其他抗生素均有检出,不过其含量($0.04\sim 0.39\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)与其他养鸡场相比相对较低。同一种抗生素在不同养鸡场鸡粪样品中含量也不同,CIP、DAN和SAR污染较为严重,在不同养鸡场样品中均有不同浓度的检出,其中CIP检出含量达 $0.25\sim 0.49\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,而LOM只在养鸡场3中有检出,NOR检出的最高含量在养鸡场2中,达 $1.13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,ENR除了在养鸡场2中未检出,在其他3个养鸡场中均有,且含量较高($0.24\sim 0.94\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

3 结论

建立了基于固相萃取-高效液相色谱荧光检测法(SPE-HPLC/FLD)分析禽畜粪便中6种氟喹诺酮类药物(诺氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和洛美沙星)的方法。选用McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液:乙腈(1:1,V/V)($\text{pH}=2$)作为提取剂,超声提取时间15 min,经HLB固相柱净化,选用甲醇为洗脱剂,浓缩后用HPLC/FLD检测,采用乙腈:0.7%磷酸作为流动相。添加回收率为76.7%~106.7%,标准偏差为0.7%~14.4%。应用该方法对北京地区养鸡场鸡粪样品中6种FQs进行分析,为研究和治理该地区养鸡场禽畜粪便中FQs类抗生素污染提供支撑。

参考文献:

- [1] 汪昆平,章琴琴,郭劲松,等.环境中氟喹诺酮类抗生素残留检测和去除研究进展[J].安全与环境学报,2012,12(2):104-110.
WANG Kun-ping, ZHANG Qin-qin, GUO Jin-song, et al. Review of the determination of fluoroquinolones in the environment and its removal from the sewage[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2012, 12(2):104-110.
- [2] Golet E M, Strehler A, Alder A C, et al. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(21):5455-5462.
- [3] Kim K R, Owens G, Kwon S I, et al. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 2011, 214:163-174.
- [4] Jjemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2002, 93(1-3):267-278.
- [5] Elmund G K, Morrison S M, Grant D W, et al. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1971, 6(2):129-132.
- [6] Kools S A E, Moltmann J F, Knacker T. Estimating the use of veterinary medicines in the european union[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50:59-65.
- [7] Shelver W L, Hakk H, Larsen G L, et al. Development of an ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-residue sulfonamide method and its application to water, manure slurry, and soils from swine rearing facilities[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(8):1273-1282.
- [8] 刘 峰,廖德润,李 可,等.畜禽养殖基地磺胺类喹诺酮类和大环内酯类抗生素污染特征[J].农业环境科学学报,2013,32(4):847-853.
LIU Feng, LIAO De-run, LI Ke, et al. Pollution characteristics of the sulfonamides, quinolones and macrolides in the samples collected from livestock and poultry feedlots[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(4):847-853.
- [9] 赵 扬,郑志明,金社胜,等.液质联用法同时测定猪粪便中16种(氟)喹诺酮类药物残留[J].农业环境科学学报,2011,30(6):1248-1253.
ZHAO Yang, ZHENG Zhi-ming, JIN She-sheng, et al. Simultaneous determination of six (fluoro) quinolones residues in pig faeces by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(6):1248-1253.
- [10] 潘 媛,牛 华,程晓云,等.动物源性食品中六种氟喹诺酮类残留检测前处理的优化[J].中国兽药杂志,2011,45(4):28-32.
PAN Yuan, NIU Hua, CHENG Xiao-yun, et al. Pretreatment optimization on determination of six fluoroquinolones in animal foods[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(4):28-32.
- [11] Li Y W, Wu X L, Mo C H, et al. Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the pearl river delta area, Southern China[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59:7268-7276.
- [12] 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, 408:1069-1075.

- [13] Hu X G, Luo Y, Zhou Q X, et al. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(9): 1162-1166.
- [14] Martínez-Carballo E, González-Barreiro C, Scharf S, et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 148: 570-579.
- [15] 吴银宝, 汪植三, 廖新梯, 等. 恩诺沙星在鸡体中的排泄及其在鸡粪中的降解[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1069-1074.
- WU Yin-bao, WANG Zhi-san, LIAO Xin-di, et al. Study on the excretion of enrofloxacin in chicken and its degradation in chicken feces[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 1069-1074.
- [16] Zhou L J, Ying G G, Liu S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1244: 123-138.
- [17] Seifrtová M, Nováková L, Lino C, et al. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 649: 158-179.
- [18] Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils: A review[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2003, 166: 145-167.
- [19] Hu X G, Zhou Q X, Luo Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, Northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158: 2992-2998.
- [20] 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粪便中多种抗生素残留[J]. 分析化学, 2013, 41(7): 993-999.
- WAN Wei-ning, CHEN Xi, JU Xue-hai, 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.
- [21] 夏天骄, 夏训峰, 徐东耀, 等. 基于固相萃取-高效液相色谱法的畜禽粪便中四环素类抗生素残留量检测[J]. 安全与环境学报, 2013, 13(2): 121-125.
- XIA Tian-jiao, XIA Xun-feng, XU Dong-yao, et al. Determination of the residual tetracycline antibiotics in the manures of livestock via the solid-phase extraction-high performance liquid chromatography method[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2013, 13(2): 121-125.
- [22] 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): 213-221.
- LI Yan-xia, LI Wei, ZHANG Xue-lian, 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): 213-221.

《保鲜与加工》杂志 2014 年征订征稿启事

《保鲜与加工》是由国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津)主办的农产品采后技术研究领域的科技期刊,为中国科技核心期刊和中国北方优秀期刊,本刊已被美国《化学文摘》(CA)、中国学术期刊(光盘版)杂志收录。主要报道农产品保鲜与加工相关领域基础理论、新技术、新工艺、新设备、新材料的研究成果及国内外相关行业的动态与信息。主要设置专家论坛、保鲜研究、加工研究、专题论述、技术指南、行业资讯、科普沙龙、政策法规等栏目。适于科技人员、农业技术推广人员、相关企业管理和技术人员、大专院校师生及广大从事保鲜与加工技术研发领域的人士参阅。

本刊为双月刊,大 16 开本,64 页,逢单月 10 日出版,国内外公开发行,每期定价 10 元,全年 60 元,国内统一连续出版物号:CN12-1330/S,国际标准连续出版物号:ISSN1009-6221,邮发代号:6-146。欢迎在全国各地邮局(所)或本刊编辑部订阅,欢迎广大读者踊跃投稿,并诚邀刊登各类相关广告。

通信地址:天津市西青区津静公路 17 公里处,国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津)《保鲜与加工》编辑部

邮编:300384

电话:022-27948711

邮箱:bxyjg@163.com

投稿平台:www.bxyjg.com