

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

刘新程^{1,2,3}, 董元华^{1,2,3}, 王 辉^{1,2,3}

(1.中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008; 2.中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 江苏 南京 210008; 3.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要:2005—2006 年在江苏省范围内采集了 181 个集约化养殖场畜禽排泄物样品,用高效液相色谱对其中的四环素类抗生素残留进行了检测。结果显示,土霉素(OTC)、金霉素(CTC)、美他环素(MC)、多西环素(DC)在排泄物样品中的检出率分别为 16.6%、38.1%、18.8%、17.1%,残留量中位数分别在 2.11、11.96、3.07、4.63 mg·kg⁻¹,均以金霉素最高;在不同动物的排泄物中,牛排泄物中金霉素的残留量比猪的要高,美他环素在鸡排泄物中的残留量较高;从区域上看,各区域之间药物残留量差异不显著。

关键词:土霉素;金霉素;美他环素;多西环素;畜禽排泄物;残留量

中图分类号:X835 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-1177-06

Residues of Tetracyclines in Animal Manure from Intensive Farm in Jiangsu Province

LIU Xin-cheng^{1,2,3}, DONG Yuan-hua^{1,2,3}, WANG Hui^{1,2,3}

(1.State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences-Hong Kong Baptist University (ISSAS-HKBU) Joint Laboratory on Soil and Environment, Nanjing 210008, China; 3.Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: 181 samples of animal manure were collected from intensive farm in Jiangsu province from 2005 to 2006, the residues of oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), methacycline (MC) and doxycycline (DC) were determined by HPLC. The results reveal that percent ages of detection are 16.6%, 38.1%, 18.8% and 17.1%, the average residues are 2.11, 11.96, 3.07 and 4.63 mg·kg⁻¹ for OTC, CTC, MC and DC respectively. CTC has the highest pollution load. In different kinds of animal manure, the residues of CTC in dairies are higher than in pigs, while the residues of MC were higher in chooks. The residues have no obvious difference among different areas.

Keywords: oxytetracycline; chlortetracycline; methacycline; doxycycline; animal manure; residue

四环素类抗生素是由放线菌属产生的一类广谱抗生素,均是氢化骈四苯的衍生物^[1]。由于其成本低廉、使用方便和副作用相对较小等原因,在畜牧养殖业中作为抗病药物、生长促进剂等添加于饲料中。目前大约有 8 种四环素族抗生素作为人用和兽用药物。在兽药领域,土霉素(OTC)、金霉素(CTC)、美他环素

(MC)、多西环素(DC)应用相对广泛^[2]。当四环素进入动物体内,经过代谢,将有 50%~80%以原形或者代谢物形式通过动物的粪便、尿液排出体外^[3]。这些抗生素将随着畜禽排泄物进入环境,从而造成土壤、水体等的污染。2002 年 Kolpin 等对美国河流中痕量有机污染物的普查显示,抗生素已经广泛进入了水域环境^[4]。抗生素进入环境之后,会影响环境微生物种群,使耐药菌在环境中被诱发和散播,对环境和人体健康产生危害^[5-6]。畜禽排泄物是四环素进入环境的主要途径,而且四环素类抗生素在环境中的半衰期很长^[7],因此对畜禽排泄物中四环素含量的检测,对其进入环境后的行为,以及污染风险和生态毒性评价等都有重要意义。而结合国内外文献来看,关于畜禽排泄物污染的

收稿日期:2007-08-19
基金项目:中国科学院知识创新工程方向项目(kzcx3-sw-435, KSCX2-YW-N-51-02);国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD10B05);国家自然科学基金项目(40671093);江苏省自然科学基金前期预研项目(BK2004219)
作者简介:刘新程(1978—),男,博士研究生,主要研究方向为土壤环境化学。E-mail: xcliu@issas.ac.cn
通讯联系人:董元华 E-mail: yhdong@issas.ac.cn

报道多为以氮磷和病原菌的污染为主^[8,9],残留抗生素对细菌的影响时有报道^[10,11]。抗生素的残留检测多是在动物性食品中^[2,12],少量的环境样品(水、土壤)中也有报道^[4,7],抗生素在畜禽排泄物中残留的调查却很少见。本研究采用我们自己建立的针对畜禽排泄物中四环素类抗生素的检测方法,对江苏省各地市进行了采样、分析,为进一步研究四环素类抗生素在我国环境中的残留与风险评价提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 药品试剂

四环素类药物标样均购自中国药品生物制品检定所。土霉素(OTC):92.4%;金霉素(CTC):95.3%;美他环素(MC):90.1%;多西环素(DC):86.0%。

甲醇和乙腈(色谱纯,购于美国天地公司),乙酸(分析纯,购于南京化学试剂一厂),Milli-Q超纯水自制。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪(Waters2695分离单元,配2996紫外检测器,美国),低速台式大容量离心机(RJ-TDC-5A,无锡瑞江分析仪器有限公司),旋涡混合仪(WH-2,上海沪西分析仪器厂有限公司),数控超声波清洗器(KQ-600DE型,昆山超声仪器有限公司),Milli-Q超纯水仪,0.22 μm孔径针式滤膜,色谱柱(Gemini C18,150 mm×4.6 mm I.D.,5 μm),保护柱(Gemini C18,4.0 mm×3.0 mm I.D.)。

1.3 样品采集与储存

畜禽排泄物样品于2005年10月至2006年5月采集于江苏省13个地级市,每市布点11~16个,共181个样品。采集时注意各地猪、牛、鸡各类畜禽的比例。采集的样品用1 000 mL聚乙烯塑料瓶封口冷冻保存,实验室内于-20℃储存并尽快测定。粪便样品采回后立即测定水分含量。

1.4 试验方法

1.4.1 标准溶液的配制

分别准确称取各种标准品,用甲醇配成500 mg·L⁻¹的储备液,-20℃避光储存。分别取各种储备液5 mL,混合,然后用甲醇稀释到50 mL,即为50 mg·L⁻¹的工作液。

1.4.2 色谱条件

流动相为乙腈、0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱程序见表1。柱温30℃。紫外检测器:检测波长350 nm。进样量:20 μL。

1.4.3 样品前处理

称取1.0 g排泄物样品于15 mL聚乙烯离心管,加入1 mL提取液(甲醇:乙酸=49:1),涡旋1 min,再将其放入超声波清洗器中超声30 min。取出后2 500 r·min⁻¹离心5 min,将上层清液倒出。再重复提取2次,将3次的提取液混合,经0.22 μm的针式过滤器移入进样瓶中,待测。

1.4.4 相关参数的测定

将工作溶液逐级稀释至0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg·L⁻¹,按照上述方法进样,进样量20 uL,求得各标准物质的峰面积和不同浓度之间的线性关系。

随机抽取1份样品,称取1.0 g,向其中加入50 mg·L⁻¹的工作溶液0.1 mL,静置,-20℃过夜。按照前述前处理方法进行提取。共6个重复。测定并扣除未添加标准物质样品中的残留量,计算回收率和检出

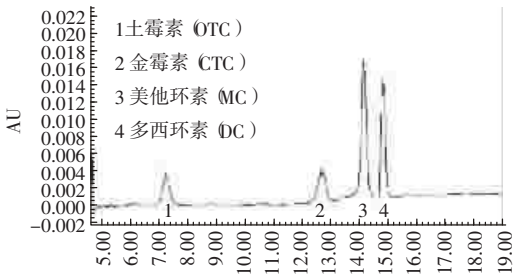


图1 四环素类抗生素色谱峰图
Figure 1 Chromatogram of 4 TCs

表1 高效液相色谱梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure of HPLC

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	0.05%磷酸水溶液/%	乙腈/%
0	1	90	10
10	1	90	10
11	1	80	20
17	1	80	20
19	1	90	10
22	1	90	10

限。相关数据见表 2。

为了保证方法的重现性,每 5 个样品设重复 1 个,每 10 个样品设添加回收实验 1 个,以保证样品批处理间的分析质量。

所建立方法的回收率在 49%~72%之间,结合国外文献对环境样品中四环素类抗生素残留检测的方法来看,本方法回收率尚属满意(见表 3)。

1.5 数据处理方法

实验数据采用 SPSS10.0 软件进行分析。样品中各种药物残留量不符合正态分布,故其平均值采用中位数表示;在对样品药物残留量与样品类型和地域分布进行 M-W 非参数统计差异显著性检验时,未检出样品按照方法检出限的 1/2 处理。

2 结果与讨论

2.1 样品中抗生素残留量

在检测的 181 个样品中,金霉素的检出率最高,达到 38.1%,其他依次为:美他环素 18.8%,多西环素 17.1%,土霉素 16.6%。其中样品中没有抗生素检出的仅仅占了 37.0%,检出 1 种的占 42.5%,检出 2 种和 3

种的分别占 15.0%和 3.9%,而 4 种全部有检出的有 3 个样品,占 1.7%。土霉素、美他环素、多西环素的残留量中位数值在 5 mg·kg⁻¹ 以下,而检出最多的金霉素的相对含量也较大,中位数在 11.96 mg·kg⁻¹ 左右(表 4)。

2.2 畜禽种类对四环素类残留的影响

不同种类的畜禽,由于其生长状况、易感染病菌种类以及对抗生素的代谢机理存在一定的差异,可能会对排泄物中的抗生素残留数量有一定影响。表 5 列出了不同种类畜禽排泄物中的各种四环素的残留量。

从数据中看出,3 种动物的排泄物中各种药物均有检出。其中土霉素检出率相差不大,金霉素的检出率均相对较高,美他环素和多西环素检出率在不同种类间差别比较大。美他环素在鸡的排泄物中检出率较高,而多西环素在牛的排泄物中检出率很低。从残留量上看,牛排泄物中的金霉素残留量较高,而猪排泄物中除土霉素外其他药物的残留量都相对牛和鸡的较低,而美他环素和多西环素在鸡排泄物中的残留量较高。美他环素在鸡排泄物中的残留量和检出率都比较高的现象需要引起重视。经过 SPSS 软件分别对每

表 2 仪器分析的相关参数

Table 2 Analytical parameters

化合物	回收率/% <i>n</i> =5	校准值		最低检出限/mg·kg ⁻¹
		线性方程	<i>r</i>	
土霉素	65.3±2.12	$y=4.19\times10^{-5}x-0.22$	0.996 9	0.10
金霉素	71.7±1.59	$y=1.85\times10^{-5}x-0.04$	0.996 7	0.13
美他环素	53.8±2.27	$y=3.96\times10^{-6}x-0.02$	0.993 7	0.09
多西环素	49.1±2.80	$y=5.97\times10^{-5}x-0.17$	0.998 4	0.18

表 3 国内外一些文献中四环素类抗生素在环境样品残留检测方法回收率

Table 3 Recoveries of TCs residue in environmental samples with different determination methods according some literatures

化合物	样品	方法	回收率/%	来源
土霉素	土壤	高效液相色谱-紫外检测	38.1	Kay P (2005) ^[13]
土霉素、金霉素	土壤	高效液相色谱-质谱	33.8, 76.2	Hamscher G(2002) ^[14]
土霉素	河流底泥	高效液相色谱-荧光检测	60.0~82.0	Simon N.S. (2005) ^[15]
土霉素、金霉素	猪粪	高效液相色谱-质谱	34.0, 52.0	Agersø Y(2006) ^[10]
土霉素	猪粪	高效液相色谱-质谱	71.0	Loke M.(2003) ^[16]
土霉素、金霉素	粪便	高效液相色谱-质谱	87.3, 94.1	Hamscher G(2002) ^[14]

表 4 四种抗生素的残留量 (以干重计)

Table 4 Residues of TCs (dry weight)

名称	检出数	最大值/mg·kg ⁻¹	最小值/mg·kg ⁻¹	中位数值/mg·kg ⁻¹	中位数标准差
土霉素	30	62.51	0.18	2.11	2.40
金霉素	69	105.75	0.28	11.96	3.09
美他环素	34	14.28	0.47	3.07	0.64
多西环素	31	26.05	1.30	4.63	1.05

表 5 不同种类畜禽的排泄物中四环素类残留数量

Table 5 Residues of TCs in different kinds of animal manure

畜禽种类	化合物	检出率/%	最小值/mg · kg ⁻¹	最大值/mg · kg ⁻¹	中位数/mg · kg ⁻¹	中位数标准差
猪 (n=81)	土霉素	17.3	0.18	62.51	1.95	4.91
	金霉素	30.9	0.28	82.41	9.75	3.69
	美他环素	12.3	0.67	4.20	2.20	0.41
	多西环素	18.5	1.30	13.79	3.15	0.79
牛 (n=36)	土霉素	16.7	1.05	6.97	2.71	0.89
	金霉素	47.2	3.48	105.75	59.80	6.39
	美他环素	13.9	0.47	7.35	2.33	1.16
	多西环素	2.8	4.48	4.48	4.48	0
鸡 (n=64)	土霉素	15.6	0.18	16.64	1.49	1.56
	金霉素	42.2	1.02	71.17	8.51	2.92
	美他环素	29.7	0.58	14.29	5.38	1.00
	多西环素	23.4	2.9	26.05	8.07	1.75

两种类型的排泄物残留量进行两独立样本 M-W 非参数检验表明,牛排泄物中的多西环素残留量和猪、鸡的有显著差异 ($\alpha<0.05$),鸡排泄物中的美他环素残留量和牛、猪的有显著差异,牛和猪排泄物中金霉素的残留量差异极显著(表 6)。造成差异的原因,可能与采样的年份禽类疾病比较严重,而美他环素在四环素类抗生素中的抗菌性比较强有关。

2.3 不同地区四环素类残留的差异

表 6 不同种类畜禽排泄物样品中各种药物残留量

M-W 非参数检验的 α 值

Table 6 α in Mann-Whitney Test of TCs residues in different kinds of animal manure

项目	OTC	CTC	MC	DC
猪-牛	0.993	0.006	0.819	0.025
猪-鸡	0.763	0.181	0.005	0.258
牛-鸡	0.804	0.061	0.049	0.006

江苏省南北狭长,中间有长江和洪泽湖相隔,地区经济发展不平衡。以苏锡常为代表的苏南地区和以徐连宿为代表的苏北地区经济指标差异很大。因此,调查将江苏省划分为 3 个部分:苏州、无锡、常州为苏南地区,镇江、南京、扬州、泰州、南通为苏中地区,盐城、淮安、徐州、宿迁、连云港为苏北地区。

表 7 列出了江苏省不同大区中畜禽排泄物的四环素类抗生素残留量数据。结果表明,从检出率来看,金霉素的检出率在各地区都是最高的,而且地区间差别较大,其他几种抗生素的检出率在各地区差别不大,但是浓度范围上还是差异比较大。传统药物土霉素,在苏南发达地区残留浓度比其他地区低,但是相对高效的多西环素和美他环素比其他地区稍高。但用 SPSS 软件对不同区域残留量进行两独立样本 M-W 非参数检验证明,各区域之间各种药物的残留量差异均不显著(表 8)。

表 7 不同地区畜禽的排泄物中四环素类残留数量

Table 7 Residues of TCs in animal manure in different areas

区域	化合物	检出率/%	最小值/mg · kg ⁻¹	最大值/mg · kg ⁻¹	中位数/mg · kg ⁻¹	中位数标准差
苏南 (n=42)	土霉素	14.3	0.49	2.11	0.99	0.28
	金霉素	50.0	0.28	81.41	6.88	5.30
	美他环素	16.7	2.42	12.46	3.70	1.36
	多西环素	19.0	1.3	20.11	3.18	2.16
苏中 (n=72)	土霉素	15.3	0.18	39.75	2.71	4.78
	金霉素	31.9	0.91	105.75	23.25	6.64
	美他环素	16.6	0.47	7.57	2.20	0.73
	多西环素	15.3	2.9	16.7	4.96	1.20
苏北 (n=67)	土霉素	19.4	0.18	62.51	2.63	3.82
	金霉素	37.3	0.38	62.35	13.43	3.32
	美他环素	22.4	0.64	14.29	3.53	1.18
	多西环素	17.9	1.51	26.04	6.26	2.06

土霉素和金霉素的价格比多西环素和美他环素要便宜很多,产量也要大些,成本问题可能是目前养殖业比较重视的一个问题。而土霉素已经长期使用,尤其是一些经济相对发达的地区,其抗药性的逐渐产生不可避免。将成本和药物的抗菌性结合起来看,应该是金霉素目前使用比较普遍的原因。

表 8 不同地区畜禽排泄物样品中各种药物残留量
M-W 非参数检验的 α 值
Table 8 α in Mann-Whitney Test of TCs residues in animal manure in different areas

	OTC	CTC	MC	DC
苏南-苏中	0.733	0.232	0.878	0.731
苏南-苏北	0.457	0.390	0.505	0.993
苏中-苏北	0.595	0.747	0.335	0.670

3 讨论

从江苏省范围来看,四环素类抗生素在畜禽排泄物中的残留不容忽视。各地市的样品普遍有检出,而且高残留的样品分散于各地。抗生素进入环境中的归趋和危害已经成为全球性的热点研究课题,而对于抗生素进入环境的重要源头之一的畜禽排泄物的管理和监测以及建立相应的预警机制将是摆在我们眼前的一项重要任务。

四环素类药物在环境中比较稳定,其半衰期长达 20 d 到半年^[18],其对环境和人类的长期效应尚待深入评估。目前已经有了关于抗生素导致土壤环境中菌群异常的文献报道^[17],因此如何处理抗生素的主要来源—畜禽排泄物,必须得到相应的重视。

张劲强等^[19]对四环素类药物的发光菌毒性研究所得的数据表明,土霉素和金霉素的 EC_{50} 分别为 64.32 和 6.11 $mg \cdot L^{-1}$,根据这个浓度,本调查的 181 个样品中,土霉素残留没有超过 EC_{50} 的样品,而金霉素有 51 个超过 EC_{50} ,占有金霉素检出样品的 73.9%。而 Halling-Sørensen 在 2002 年的实验表明^[5],土霉素对底泥细菌的 EC_{50} 值在 1.2 $mg \cdot L^{-1}$ 。本次调查中,有 18 个样品残留超过该值,占土霉素检出样品的 60%。

由于各国抗生素环境残留的调查工作都处于开始阶段,相关数据并不是很多,但是,从现有报道来看,金霉素残留量多在 0.1 $mg \cdot kg^{-1}$ 以下^[13,14],相比而言,我们国家的残留要高很多。

4 结论

本次调查的结果表明,四环素类抗生素在排泄物

中的残留无论从检出率还是残留量上都值得重视。尤其是金霉素检出率高达 38%,残留量的中位数值也在 11.96 $mg \cdot kg^{-1}$ 。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。因此应该重视四环素类药物,尤其是残留比较普遍、残留量较大的金霉素在环境中残留、归趋等方面的深入研究。

参考文献:

[1] 尤启冬.药物化学[M].北京:化学工业出版社,2004. 185.
YOU Qi-dong. Medicinal Chemisty[M]. Chemical Industry Press, 2004. 185
[2] Oka H, Ito Y, Matsumoto H, et al. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods [J]. *J of Chrom A*, 2000,882:109-133.
[3] Campagnolo E R, Johnson K R, Karpati A, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations [J]. *Sci Total Environ*, 2002,299:89-95.
[4] Kolpin D W, Furlung E T, Meyer M T, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance [J]. *Environ Sci Technol*, 2002,36(6): 1202-1211.
[5] Halling-Sørensen B, Sengelöv G, Tjørnelund J. toxicity of tetracycline and tetracycline degradation products to environmentally-relevant bacteria, including, selected tetracycline-resistant bacteria [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2002,43:263-271.
[6] Ingham E R, Coleman D C, Crossley D A, et al. Use of sulfamethoxazole-penicillin, oxytetracycline, carbofuran, carbaryl, naphthalene and temik to remove key organism groups in soil in a corn agroecosystem [J]. *J Sustain Agric*, 1994,4:7-30.
[7] Capone D G, Westen D P, Miller V, et al. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture [J]. *Aquaculture*,1996, 145: 55-75.
[8] 徐伟朴,陈同斌,刘俊良,等.规模化畜禽养殖对环境的污染及防治策略[J].环境科学,2004,25:104-108.
XU Wei-pu, CHEN Tong-bin, LIU Jun-liang, et al. Environmental pollution , comprehensive prevention and control tactics of the scale and intensify poultry farming[J]. *Environmental Science*, 2004,25:104-108.
[9] 王方浩,马文奇,赛争霞,等.中国畜禽粪便产生量估算及环境效应[J].中国环境科学, 2006, 26(5):614-617.
WANG Fang-hao, MA Wen-qi, DOU Zheng-xia, et al. The estimation of the production amount of animal manure and its environmental effect in China[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(5):614-617.
[10] Agersö Y, Wulff G, Vaclavik E, et al. Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene tet(M) in soil microcosms [J]. *Environ Inter*, 2006,32:876-882.
[11] Lau M M, Ingham S C. Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001,33:131-136.
[12] 秦 燕,陈毓芳,林 峰,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中的多种四环素残留[J].食品科学, 2005,26(3):202-204.
QIN Yan, CHEN Yu-fang, LIN Feng, et al. Application of SPE-HPLC

for simultaneous determination of multi-tetracyclines residues in milk [J]. *Food Science*, 2005,26(3):202-204.

[13] Kay P, Blackwell P A, Boxall A B A. A lysimeter experiment to investigate the leading of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data [J]. *Environ Pollut*, 2005, 134:333-341.

[14] Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, et al. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2002,74: 1509-1518.

[15] Simon N S. Loosely bound oxytetracycline in riverine sediments from two tributaries of the chesapeake bay[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 3480-3487.

[16] Loke M L, Jespersen S, Vreeken R. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems [J]. *J of Chrom B*, 2003, 783(1):11-23.

[17] Nygaard K, Lunested BT, Hektoern H, et al, Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments [J]. *Aquaculture*, 1992, 104:31-36.

[18] Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils[J]. *Plant Nute Soil Sci*, 2003, 166:145-167.

[19] 张劲强, 梁言, 董元华, 等. 差向异构对四环素类药物的发光菌毒性研究[J]. *毒理学杂志*. 2006, 20(5):279-281.

ZHANG Jin-qiang , LIANG Yan , DONG Yuan-hua, et al. Toxicity of tetracyclines and their epi-isomers on the luminescent bacterium [J]. *Journal of Health Toxicology*, 2006, 20(5):279-281.