

超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡粪中 16 种残留抗生素

吴丹^{1,2} 韩梅琳² 邹德勋¹ 王旭明² 高敏² 仇天雷^{*2}

¹(北京化工大学环境科学与工程系, 北京化工大学, 北京 100029)

²(北京市农林科学院生物技术研究中心, 北京市农林科学院, 北京 100097)

摘 要 建立了固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 同时检测畜禽粪便中四环素类、磺胺类、氟喹诺酮类和大环内酯类 16 种抗生素的分析方法。针对目标物化学性质和样品杂质情况, 对质谱条件、提取液种类、超声功率等参数进行了优化。最终以 50% 乙腈 (V/V) 的磷酸盐缓冲溶液 (pH=4) 提取 3 次, 经过超声、离心、旋蒸、稀释后, SAX-HLB 串联小柱净化富集, 用 10 mL 甲醇-丙酮混合液 (80:20, V/V) 洗脱, 35℃ 氮吹近干后, 用含 0.1% 甲酸-甲醇 (1:1, V/V) 定容, 在 UPLC-MS/MS 多反应检测模式下进行定性及定量分析。结果表明, 粪便中四环素类、磺胺类、氟喹诺酮类和大环内酯类抗生素的平均加标回收率为 56.4% ~ 94.6%, 相对标准偏差 (RSD) 在 2.6% ~ 19.8% 之间, 方法检出限 (LOD, $S/N=3$) 和定量限 (LOQ, $S/N=10$) 分别为 0.01 ~ 2.50 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.05 ~ 7.90 $\mu\text{g/kg}$ 。本方法简便、稳定性好、灵敏度高、重现性好, 适用于畜禽粪便中多种抗生素的同时检测。

关键词 四环素类; 磺胺类; 氟喹诺酮类; 大环内酯类; 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱; 畜禽粪便

1 引言

抗生素在促进动物生长、预防和治疗动物疾病等方面具有重要作用, 因此被广泛用于畜禽养殖业^[1]。据统计, 2013 年我国抗生素总使用量约 16.2 万吨, 其中 52% 为兽用抗生素^[2]。摄入动物体内的抗生素大多未能被充分吸收, 约有 60% ~ 90% 的抗生素以原型或代谢产物的形式随粪尿排放到环境中, 人为地增加了土壤或水体环境中抗生素含量^[3,4], 提高了环境中抗性基因丰度, 给人类健康和生态环境带来长期、潜在的危害^[5]。目前, 畜禽粪便中抗生素的处理主要有好氧发酵和厌氧消化两种途径, 大量研究表明, 好氧发酵可以更有效地降解畜禽粪便中抗生素^[6,7]。为了更有效地监测畜禽粪便中抗生素残留, 提高抗生素在环境中的检出效率, 建立有效的前处理方法, 减少基质干扰, 发展灵敏、可靠的分析技术是研究抗生素环境残留的基础。

目前, 畜禽粪便中抗生素药物残留的检测技术有酶联免疫检测技术 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[8,9]、气相色谱-质谱联用技术 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[10]、毛细管电泳分析技术 (Capillary electrophoresis detection technique, CE)^[11]、液相色谱技术 (Liquid chromatography, LC)^[12~14] 和高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS)^[15] 等。酶联免疫检测技术操作简单, 但对试剂的选择性高, 不能同时分析多种成分; 气相色谱-质谱联用技术灵敏度高, 且具有广泛的谱库, 适合分析挥发性成分, 缺点是测定前需要采用衍生化处理, 操作繁琐, 稳定性差; 毛细管电泳检测技术分辨率高, 进样量少, 保留时间短, 但是灵敏度低, 重现性差; 液相色谱检测技术测定范围广, 可灵活调节流动相的组成和 pH 值, 能够使相当数量极难分离的待测物质得以测定, 与质谱检测器串联可以提高灵敏度和精确度, 已成为应用广泛的检测分析技术^[16~18]。

本研究采用具有高灵敏度和高选择性的固相萃取-超高效液相色谱-质谱联用方法, 建立了鸡粪中四环素类、磺胺类、喹诺酮类和大环内酯类等 16 种抗生素的快速检测方法。经优化后, 本方法以 50% 乙腈的磷酸盐缓冲液提取 3 次, 确保目标物的提取效率; 同时采用液相色谱-质谱联用法检测, 保证了样品检测的灵敏度。采用本方法优化的提取液和旋蒸的净化方式, 得到的目标物回收率更高, 方法检出

2017-03-20 收稿; 2017-06-24 接受

本文系现代农业产业技术体系北京市创新团队专项 (No. BAIC04-2017)、国家重点研发计划重点专项 (No. 2016YFD0800205)、科技部重点研发计划 (No. 2017YFD0801402) 和国家自然科学基金 (No. 51308022) 项目资助

* E-mail: qitianlei@baafs.net.cn

限和定量限更低。结果表明,本方法简便、快速、准确、灵敏,可在 25 min 内完成粪便中四环素、磺胺、氟喹诺酮和大环内酯类 16 种抗生素的同步提取与同时测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 超高效液相色谱、Thermo LTQ XL 离子阱质谱(美国 Thermo 公司); Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm, 美国 Thermo 公司); SAX 阴离子交换柱(3 mL/200 mg, 美国 Thermo 公司); HLB 小柱(6 mL/500 mg, 美国 Waters 公司); 十二孔固相萃取装置(美国 Supelco 公司); Avanti™J-20XP 离心机(美国 Beckman Coulter 公司); N-EVAPTM111 氮吹仪(美国 Organomation 公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); QL-901 旋涡混合器(海门市其林贝儿仪器制造有限公司)。

目标物盐酸土霉素(OTC)、四环素(TC)、盐酸金霉素(CTC)、强力霉素(DOX)、磺胺对甲氧嘧啶(SM)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺甲恶唑(SMX)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺喹噁啉(SQ)、诺氟沙星(NOR)、盐酸环丙沙星(CIP)、恩诺沙星(ENR)、红霉素(ERY)、罗红霉素(ROX),均购于中国食品药品检定研究院;泰乐菌素(TS)和醋酸钠购于 Sigma-Aldrich 公司。

甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司);实验用水为超纯水(电阻率≥18.2 MΩ·cm); Na₂EDTA、Na₂HPO₄、HCl、NaOH、H₃PO₄等均为分析纯。

2.2 标准溶液与缓冲溶液配制

将 1 L 0.1 mol/L 柠檬酸溶液和 625 mL 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 溶液混合,配制成 McIlvaine 缓冲溶液。必要时用 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 调至 pH 4.00±0.05。将 McIlvaine 缓冲溶液和乙腈溶液按 1:1(V/V)混合,制得提取液。

准确称取上述 13 种抗生素目标物标准品各 10 mg,以甲醇溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶,配制成 100 mg/L 混合标准储备液,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星用 0.1% 甲酸-甲醇(1:1, V/V)溶液溶解并定容至 100 mL,在-20℃保存。使用时,用 0.1% 甲酸-甲醇(1:1, V/V)稀释至所需浓度。

2.3 样品的采集和样品前处理

蛋鸡和肉鸡鸡粪采集自北京市平谷、怀柔、密云、大兴等地区的规模化养鸡场,堆肥样品采集自北京市怀柔区某堆肥厂,空白鸡粪样品(不含抗生素)采集自重庆市某农家鸡舍。

将采集的样品自然风干后,过 2 mm 孔径筛,称取 1 g 研磨样品于 50 mL 离心管中,加入提取液 10 mL,涡旋 1 min,超声提取 15 min,8000 r/min 离心 10 min(10℃),上清液转移至蒸馏瓶中。反复提取 3 次后,合并上清液。在 35℃ 水浴下旋转蒸发至乙腈完全挥发,用超纯水稀释至 200 mL,加入 0.4 g Na₂EDTA,溶解以螯合阳离子。将 HLB 小柱和 SAX 小柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,用固相萃取适配器将 SAX 和 HLB 小柱串联。开启真空泵,控制流速约为 3~5 mL/min,将提取液上柱。过柱完成后,用 10 mL 超纯水冲洗串联柱,抽气干燥 10 min,拆下 SAX 小柱,将 HLB 柱于 N₂ 保护下干燥 10 min。最后,加入洗脱液(甲醇-丙酮,80:20, V/V)10 mL,收集洗脱液,在 35℃ 水浴下用 N₂ 吹至近干,加入 1 mL 0.1% 甲酸-甲醇(1:1, V/V)溶液,涡旋 1 min,0.22 μm 膜过滤后检测。

2.4 优化的仪器工作条件

2.4.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm×3 μm),柱温 35℃;进样体积:15 μL;流速:0.35 mL/min。四元梯度泵,流动相 A 为 0.1%(V/V)甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵,流动相 B 为甲醇,流动相 C 为超纯水,流动相 D 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。采用流动相 A、D,具体的线性梯度如下:0 min,5% D;0~4 min,5%~16% D;4~8 min,16%~40% D;8~15 min,40%~65% D;15~20 min,65%~95% D;20~25 min,5% D。

2.4.2 质谱条件 质谱系统由 Thermo LTQ XL 检测器和离子源组成。离子源:电喷雾电离(ESI+);加热温度:350℃;鞘气流速:35 arbitrary unit(arb,自定义单位),辅助气流速 10 arb,喷雾电压 3.5 kV,离子传输管温度:350℃,Tube Lens 电压:65 V;检测方式:SRM。各物质的检测参数见表 1。

表 1 目标物的 SRM 模式检测参数
Table 1 Selected reaction monitoring (SRM) parameters of compounds

化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子 Quantitative ion (<i>m/z</i>)	碰撞能 Collision energy (eV)	保留时间 Retention time (min)
土霉素 Oxytetracycline, OTC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460.4	443.0	18	4.73
四环素 Tetracycline, TC	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444.4	427.1	15	5.23
金霉素 Chlortetracycline, CTC	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479.0	461.9	44	6.83
多西环素-强力霉素 Doxycycline, DOX	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445.0	428.1	41	7.13
磺胺对甲氧嘧啶 Sulfameter, SM	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280.3	155.8	35	4.93
磺胺二甲嘧啶 Sulfadimidine, SM2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.1	185.9	42	4.80
磺胺氯哒嗪 Sulfachloropyridazine, SCP	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285.1	156.0	33	5.95
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole, SMX	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254.0	187.9	40	6.50
磺胺二甲氧嘧啶 Sulfadimethoxine, SDM	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0	244.9	31	7.71
磺胺喹噁啉 Sulfaquinoxaline, SQ	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	300.3	156.0	27	7.78
诺氟沙星 Norfloxacin, NOR	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319.3	302.0	45	4.92
环丙沙星 Ciprofloxacin, CIP	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332.2	314.1	42	5.13
恩诺沙星 Enrofloxacin, ENR	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360.2	316.2	43	5.66
红霉素 Erythromycin, ERY	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734.3	576.2	13	8.39
泰乐菌素 Tylosin, TS	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916.5	772.0	12	8.75
罗红霉素 Roxithromycin, ROX	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837.2	679.3	14	9.50

3 结果与讨论

3.1 缓冲液种类的选择

综合考虑所检测的 16 种抗生素的 pK_a ^[19], 参考美国 EPA 推荐方法及文献[20,21], 分别以 Na₂HPO₄、柠檬酸钠和 NaH₂PO₄ 与柠檬酸按一定比例配制 McIlvaine 缓冲溶液, 与乙腈按 1:1 (V/V) 比例混合作为提取液, 提取 400 μg/kg 的加标空白鸡粪样, 含乙腈的提取液用超纯水稀释至 200 mL 后过柱。如图 1 所示, 以柠檬酸钠作为缓冲液提取时, 四环素类和大环内酯类的平均回收率>60%, 但磺胺类和氟喹诺酮类的回收率<50%。以 NaH₂PO₄ 作为缓冲溶液提取时, 四环素类、磺胺类和大环内酯类回收率>50%, 多数在 60% ~ 95% 之间, 但是对氟喹诺酮类提取效率非常低。Na₂HPO₄ 作为缓冲溶液可以实现四类抗生素物质的同时提取, 16 种抗生素中回收率在 48% ~ 93% 之间。因为在低 pH 值下, 目标抗生素均以中性分子和阳离子态为主, 不易被 SAX 柱保留, 从而提高了目标抗生素的回收率^[22~25]。

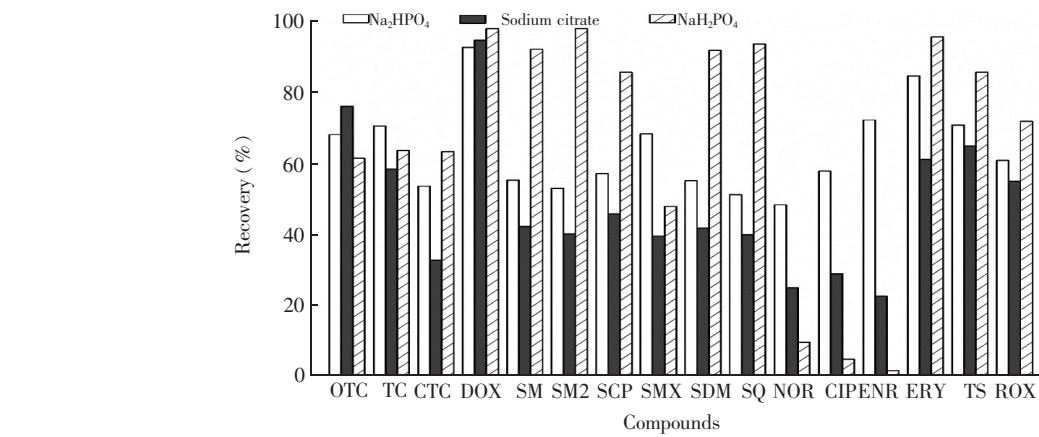


图 1 不同缓冲液对鸡粪中抗生素的提取效果
Fig. 1 Efficiency of different buffers on extraction of antibiotics in chicken manure

3.2 超声功率优化

在超声功率分别为 50、60 和 300 W 下对抗生素进行提取(图 2)，结果表明，超声波的空化作用可以增加有机相和水相间的接触面积，提高萃取速率，但是超声功率过大，会导致待提取物降解，影响抗生素的提取效果^[26,27]。在超声功率为 60 或 300 W 时，磺胺类的回收率>50%，而喹诺酮类的回收率低于 10%。超声功率为 50 W 时，四大类抗生素的回收率在 60% ~ 97% 之间，提取效果最好。

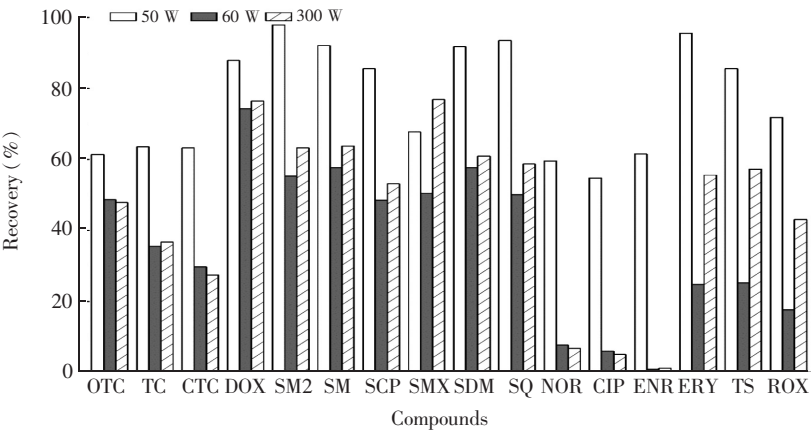


图 2 不同超声功率对鸡粪中抗生素的提取效果
Fig. 2 Influence of ultrasonic power on extraction of antibiotics in chicken manure

3.3 Na₂EDTA 用量对回收率的影响

在固相萃取前用超纯水稀释至 200 mL，分别加入 0.2 和 0.4 g Na₂EDTA 螯合溶液中的阳离子(图 3)。结果表明，Na₂EDTA 的用量对四环素类、磺胺类和大环内酯类的回收率影响不大，但是对氟喹诺酮类的回收率影响较大。Na₂EDTA 用量为 0.2 g 时，氟喹诺酮类回收率约为 20%；Na₂EDTA 用量为 0.4 g 时，氟喹诺酮类回收率在 58% ~ 62% 之间。这可能是由于 Na₂EDTA 充分络合粪便中的金属离子，减少抗生素与粪便中金属离子螯合，增加了固相萃取柱对氟喹诺酮类抗生素的吸附，从而提高了氟喹诺酮类抗生素的回收率^[24]。

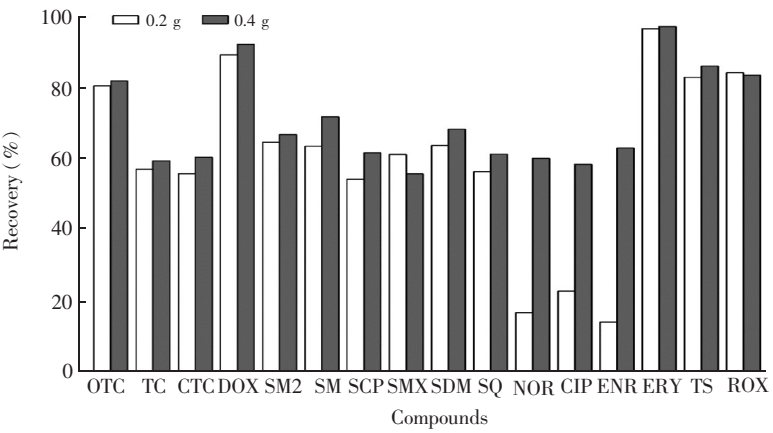


图 3 不同 Na₂EDTA 用量对鸡粪中抗生素的提取效果
Fig. 3 Influence of different amount of Na₂ EDTA on extraction of antibiotics in chicken manure

3.4 方法的回收率

采用以上固相萃取条件优化结果，选取空白鸡粪添加混合标准溶液，添加水平分别为 100 和 250 μg/kg，每个添加水平取 3 个平行样，计算各目标物基质效应、回收率及相对标准偏差(RSD)，结果见表 2。根据 Matuszewski 等^[28]的方法，绝对基质效应(Matrix effect)为样品基质提取后加标除以纯的标准品溶液得到，相对基质效应为选择 6 个不同来源(猪粪、鸡粪、牛粪、污泥、土壤和污水)样品的基

质效应，计算变异系数得到相对基质效应。16 种抗生素的回收率为 54.5% ~ 97.9%，方法相对偏差为 2.6% ~ 19.8%。与文献[29]中四类抗生素加标回收率 42.3% ~ 79.6%，文献[30]中磺胺类回收率 47% ~ 101% 相比，本方法的回收率明显提高，更有利于鸡粪中抗生素的有效提取。

表 2 鸡粪中 16 种抗生素的基质效应及回收率($n=3$)
Table 2 Matrix effect and recovery ($n=3$) of 16 antibiotics in chicken manure

化合物 Compounds	基质效应 Matrix effect (%)	相对基质 效应 Relative matrix effect (%)	加标量 Spiked			
			100 (μg/kg)		250 (μg/kg)	
			回收率 Recovery (%, $n=3$)	RSD (%)	回收率 Recovery (%, $n=3$)	RSD (%)
土霉素 OTC	93.3	8.4	56.7	3.5	61.4	9.1
四环素 TC	92.2	0.1	62.8	13.6	63.6	13.1
金霉素 CTC	94.4	11.5	57.6	5.7	63.2	7.1
多西环素-强力霉素 DOX	86.4	8.8	91.3	8.9	97.9	9.0
磺胺对甲氧嘧啶 SM	83.2	10.7	89.4	1.6	92.1	4.6
磺胺二甲嘧啶 SM2	81.9	11.2	81.3	18.4	97.9	19.8
磺胺氯哒嗪 SCP	94.3	6.9	83.1	14.0	85.6	11.1
磺胺甲恶唑 SMX	96.8	0.4	61.7	5.8	62.8	7.5
磺胺二甲氧嘧啶 SDM	82.3	14.9	79.9	2.6	91.8	8.1
磺胺喹噁啉 SQ	94.6	6.1	86.6	10.5	93.5	9.5
诺氟沙星 NOR	85.7	13.5	59.4	6.2	54.7	18.1
环丙沙星 CIP	106.3	6.2	58.3	9.1	54.5	12.3
恩诺沙星 ENR	90.0	2.5	60.8	7.7	65.8	5.9
红霉素 ERY	91.1	11.7	85.6	18.4	95.6	8.8
泰乐菌素 TS	82.7	10.8	55.4	8.5	85.6	8.9
罗红霉素 ROX	80.5	13.6	46.4	9.3	71.8	14.0

3.5 方法学质量控制

配制添加水平为 10 ~ 500 μg/kg 混合标准溶液按上述方法进行实验，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。16 种抗生素的检出限为 0.01 ~ 2.50 μg/kg，定量限为 0.05 ~ 7.90 μg/kg，线性相关系数为 0.9914 ~ 0.9996，满足定量分析要求。与文献[29,31]的检出限为 0.1 ~ 2.8 μg/kg，定量限为 0.3 ~ 6.6 μg/kg 相比，本方法具有更高的检测灵敏度。

表 3 方法的检出限、定量限、回归方程及线性系数
Table 3 Detection limits, quantification limits, regression equations and correlation coefficients of the method

化合物 Compounds	检出限 LOD (μg/kg)	定量限 LOQ (μg/kg)	线性方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)
土霉素 OTC	2.50	7.90	$y=13487.9+2158.22x$	0.9953
四环素 TC	0.01	0.05	$y=174040+3103.58x$	0.9914
金霉素 CTC	0.07	0.22	$y=-1550.26+1447.6x$	0.9945
多西环素-强力霉素 DOX	0.05	0.50	$y=-12731.4+2047.21x$	0.9956
磺胺对甲氧嘧啶 SM	0.40	2.00	$y=579.494+91.2775x$	0.9981
磺胺二甲嘧啶 SM2	0.17	0.56	$y=25958.9+5858.27x$	0.9993
磺胺氯哒嗪 SCP	1.60	5.30	$y=-1235.66+902.016x$	0.9994
磺胺甲恶唑 SMX	0.24	0.80	$y=-157.33+392.889x$	0.9929
磺胺二甲氧嘧啶 SDM	0.07	0.24	$y=-1751.7+2362.22x$	0.9979
磺胺喹噁啉 SQ	2.30	7.60	$y=-1635.68+1404.28x$	0.9996
诺氟沙星 NOR	0.07	0.22	$y=14890.2+857.892x$	0.9979
环丙沙星 CIP	0.21	0.69	$y=21210.4+812.769x$	0.9962
恩诺沙星 ENR	0.15	0.51	$y=60867.6+11358.8x$	0.9946
红霉素 ERY	0.05	0.17	$y=11436.2+680.842x$	0.9997
泰乐菌素 TS	0.06	2.00	$y=39600.1+3065.29x$	0.9974
罗红霉素 ROX	0.05	0.16	$y=152036+6315.2x$	0.9990

3.6 畜禽粪便样品分析

样品取自北京市郊区 8 个养鸡场和 2 个堆肥厂，共 10 个样品。将采集的蛋鸡和肉鸡粪便样品风干后准确称取 1 g，按照 2.3 节前处理方法进行操作，利用 2.4 节设定的条件进行 UPLC-MS/MS 测定，加标鸡粪样品的 HPLC-MS 总离子流图如图 4 所示，样品检测结果见表 4。4 类抗生素在两种粪便中均有不同程度检出，最多可同时检出 15 种物质。四环素类、磺胺类、氟喹诺酮类和大环内酯等四类抗生素的浓度范围分别为：蛋鸡鸡粪 0.012 ~ 12.1 mg/kg，0.0091 ~ 15.5 mg/kg，0.0077 ~ 5.52 mg/kg，0.0036 ~ 0.0436 mg/kg；肉鸡鸡粪 0.0792 ~ 11.6 mg/kg，0.0064 ~ 3.12 mg/kg；0.064 ~ 6.29 mg/kg，0.0034 ~ 23.3 mg/kg。成品肥中四环素类、磺胺类、氟喹诺酮类和大环内酯等四类抗生素的浓度范围分别为 0.0078 ~ 0.536 mg/kg、0.0057 ~ 0.0324 mg/kg、0.0137 ~ 0.0404 mg/kg、0.024 ~ 0.0722 mg/kg，其中 TC、CIP 和 TS 在好氧发酵过程中被完全降解，说明好氧发酵可以有效消减抗生素的种类和含量，减少畜禽粪便中抗生素对生态环境造成的危害。

表 4 蛋鸡鸡粪、肉鸡鸡粪和成品肥样品中抗生素残留情况 (mg/kg)

Table 4 Antibiotic residue level (mg/kg) in hen manure, chicken broiler manure and compost products

组分 compound	样品编号 Sample No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OTC	0.012	0.084	ND	ND	ND	0.618	ND	0.079	0.069	ND
TC	ND	ND	ND	ND	0.464	ND	0.611	0.126	ND	ND
CTC	0.383	0.493	0.165	0.274	12.1	0.161	11.6	5.17	0.0078	0.318
DOX	0.104	0.783	0.082	0.285	1.064	2.27	5.07	0.301	0.536	0.256
SM	15.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0057	0.027
SM2	0.320	ND	ND	ND	ND	0.195	ND	ND	ND	0.022
SCP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SMX	0.534	0.020	ND	ND	ND	0.565	3.12	ND	0.032	ND
SDM	0.013	ND	ND	ND	0.045	0.0064	0.0092	0.041	0.0064	0.011
SQ	0.038	ND	ND	ND	0.0091	0.020	0.015	ND	ND	ND
NOR	0.274	5.52	0.160	ND	ND	ND	ND	ND	0.040	0.378
CIP	0.357	0.668	1.012	0.159	0.486	ND	0.167	0.508	ND	ND
ENR	0.205	0.056	0.0077	ND	0.228	ND	0.0637	6.295	0.0137	0.447
ERY	ND	0.0225	0.0126	0.030	0.0436	ND	ND	0.166	ND	0.072
TS	ND	ND	ND	ND	ND	23.3	ND	0.0617	ND	ND
ROX	0.0069	0.0046	0.0042	0.00356	0.0041	0.0043	0.0034	0.0063	ND	0.0241

样品 1 ~ 5 号为蛋鸡粪，6 ~ 8 号为肉鸡粪，9 ~ 10 号为堆肥厂成品肥。
Sample 1-5: hen manure; Sample 6-8: manure of chicken broiler; Sample 9 and 10: compost products. ND: not detected.

4 结 论

采用 50% 乙腈的磷酸盐缓冲溶液提取，UPLC-MS/MS 检测，外标法定量，在 10 ~ 500 μg/kg 添加水平下，16 种抗生素在粪便中的平均回收率为 54.5% ~ 97.9%；在鸡粪样品中总抗生素检出的浓度范围为 0.0337 ~ 23.3 mg/kg，经过好氧发酵后总抗生素最高浓度残留量为 0.536 mg/kg，说明好氧发酵是一种可以消减畜禽粪便中抗生素残留污染的有效途径。样品经过好氧发酵后，四大类抗生素均有不同程度消减，有的抗生素被完全去除，如 TC、CTC、SM、CIP 和 TS 在高温好氧发酵过程中被降解至检出限以下。本方法灵敏度高，检出限低，稳定性好，可用于畜禽粪便中抗生素含量的分析检测。

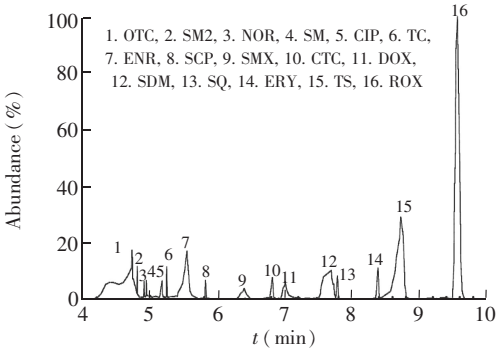


图 4 加标鸡粪样品的 HPLC-MS 总离子流图
Fig 4 Total ion chromatograms (TIC) of spiked chicken manure

References

- 1 YAN Lian-Ying, LIU Gui-Hua, QIN Song, HU Gang, FAN Cheng-Wu. *Acta Agriculturae Jiangxi*, **2016**, 28(9): 90–94
严莲英, 刘桂华, 秦松, 胡岗, 范成五. 江西农业学报, **2016** (09): 90–94
- 2 Zhang Q, Ying G, Pan C. *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49(11): 6772–6782
- 3 Vaclavik E, Halling-Sørensen B, Ingerslev F. *Chemosphere*, **2004**, 56(7): 667–676
- 4 Hua F, Yuling H, Yuan M Y, Xiong P, Yun L Y. *Chemosphere*, **2014**, 96(2): 51–56
- 5 TIAN Tian-Tian, WANG Rui-Fei, YANG Qing-Xiang. *Microbiology*, **2016**, 8: 1844–1853
田甜甜, 王瑞飞, 杨清香. 微生物学通报, **2016**, 8: 1844–1853
- 6 Ho Y B, Zakaria M P, Latif P A, Saari N. *Bioresour. Technol.*, **2013**, 131(131C): 476–484
- 7 Mohring S A I, Strzysch I, Fernandes M R, Kiffmeyer T K, Tuerk J, Hamscher G. *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 43(7): 2569–2574
- 8 Kumar K, Thompson A, Singh A K, Chander Y, Gupta S C. *J. Environ. Quality*, **2004**, 33(1): 250–256
- 9 Shelper W L, Shappell N W, Franek M, Rubio F R. *J. Agr. Food Chem.*, **2008**, 56(15): 6609–6615
- 10 Sacher F, Lange F T, Brauch H J. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 938(1): 199–210
- 11 García-Campa M, Gámiz-Gracia L, Lara J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 395(4): 967–986
- 12 Lee H B, Peart T E, Svoboda M L. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1139(1): 45–52
- 13 Seifrtová M, Pena A, Lino C M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(3): 799–805
- 14 Herrera-Herrera A V, Hernández-Borges J, Borges-Miquel T M. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **2013**, 75(5): 130–137
- 15 XU Lin, LUO Yi, XU Bing-Jie. *Journal of Instrumental Analysis*, **2010**, 29(1): 17–21
徐琳, 罗义, 徐冰洁. 分析测试学报, **2010**, 29(1): 17–21
- 16 López-Serna R, Petrovic M, Barceló D. *Chemosphere*, **2011**, 85(8): 1390–1399
- 17 Le Fur C, Legeret B, de Sainte Claire P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2013**, 27(6): 722–730
- 18 Gros M, Petrovic M, Barceló D. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(3): 898–912
- 19 Tong L, Li P, Wang Y X, Zhu K Z. *Chemosphere*, **2009**, 74(8): 1090–1097
- 20 LI Yan-Wen, MO Ce-Hui, ZHAO Na, ZHANG Rui-Jing, YI Ru-Han. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(7): 954–958
李彦文, 莫测辉, 赵娜, 张瑞京, 亦如翰. 分析化学, **2008**, 36(7): 954–958
- 21 Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division (4303T), EPA-821-R-08-002 Method 1694, in *Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*. **2007**, Water Science: The USA.
- 22 Batt A L, Snow D D, Aga D S. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(9): 2940–2947
- 23 Shelper W L, Hakk H, Larsen G L, de Sutter T M, Casey F X M. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(8): 1273–1282
- 24 Luo Y, Xu L, Rysz M, Wang Y Q, Zhang H, Alvarez P J J. *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, 45(5): 1827–1833
- 25 Jacobsen A M, Sørensen B H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 384(5): 1164–1174
- 26 LI Zeng-Xin. *Journal of Biology*, **2005**, 22(1): 34–36
李增新. 生物学杂志, **2005**, 22(1): 34–36
- 27 GUO Wei. *Food Science*, Shaanxi: Northwest A&F University. **2006**: 23–24
郭伟. 食品科学. 陕西: 西北农林科技大学. **2006**: 23–24
- 28 Matuszewski B K, Constanzer M L, Chavez-Eng C M. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(13): 3019–3030
- 29 CHEN Xi, WAN Wei-Ning, JU Xue-Hai, MU Quan-Hua, WANG Chong, MAO Da-Qing, LUO Yi. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(7): 993–999
陈熹, 万位宁, 居学海, 母全华, 王冲, 毛大庆, 罗义. 分析化学, **2013**, 41(7): 993–999
- 30 LI Yan-Xia, LI Wei, ZHANG Xue-Lian, YANG Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(2): 213–217
李艳霞, 李帷, 张雪莲, 杨明. 分析化学, **2012**, 40(2): 213–217
- 31 HE Nan-Nan, GUAN Yong-Xiang, LIANG Yong-Hong, WU Tian-Xiang, ZHAO Hai-Yan, LUO Chao-Hui, GU Zu-Li, WU Hao. *Journal of Analytical Science*, **2017**, 33(3): 373–377
贺南南, 管永祥, 梁永红, 吴田乡, 赵海燕, 罗朝晖, 顾祖丽, 吴昊. 分析科学学报, **2017**, 33(3): 373–377

Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of 16 Kinds of Residual Antibiotics in Chicken Manure

WU Dan^{1,2}, HAN Mei-Lin², ZOU De-Xun¹, WANG Xu-Ming², GAO Min², QIU Tian-Lei^{*2}

¹(Department of Environmental Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 10029, China)

²(Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract A sensitive and effective method for determination of 16 kinds of antibiotics, including tetracycline, sulfonamide, fluoroquinolone and macrolide, in livestock and poultry manure using solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. Aiming at the chemical properties and sample impurities of the target, the parameters such as mass spectrum conditions, types of extraction and ultrasonic power were optimized. Finally, the samples were extracted with 50% acetonitrile in phosphate buffer solution (pH = 4) for three times, followed by ultrasonic steaming, centrifugal and rotary, dilution, and purified by SAX-HLB. After sample loading, the solid phase was washed with 10 mL of methanol-acetone (80:20, V/V), evaporated to near dryness at 35°C, and then re-dissolved and vortex mixed in 1 mL of 0.1% formic acid : methanol (1:1, V/V). The extracts were analyzed with UPLC-MS/MS and calculated by external standard method based on the monitored product ion. The results indicated that the average spiked recoveries of tetracycline, sulfonamide, fluoroquinolone and macrolide in manure were 56.4%–94.6% with relative standard deviations (RSDs) of 2.6%–19.8%, the LODs ($S/N=3$) were 0.01–2.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the LOQs ($S/N=10$) were 0.05–7.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was simple with high stability, high sensitivity and good reproducibility, and suitable for the simultaneously determination of many antibiotics in animal and poultry manure.

Keywords Tetracycline; Sulfonamide; Fluoroquinolone; Macrolide; Solid-phase extraction; Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Animal and poultry manure

(Received 20 March 2017; accepted 24 June 2017)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing, China (No. BAIC04-2017), the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2016YFD0800205), Key Research and Development Plan of Ministry of Science and Technology of China (No. 2017YFD0801402) and National Natural Science Foundation of China (No. 51308022).