

张圣新,朱 磊,鲍恩东,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定养殖污水中强力霉素残留[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):249-251.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.060

# 固相萃取-高效液相色谱法测定养殖污水中强力霉素残留

张圣新<sup>1</sup>, 朱 磊<sup>1</sup>, 鲍恩东<sup>2</sup>, 王 冉<sup>1</sup>, 魏瑞成<sup>1</sup>

[1. 省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品质量安全重点实验室/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所,江苏南京 210014; 2. 南京农业大学,江苏南京 210095]

**摘要:**为了监测养殖场排污水中兽药抗生素污染状况,拟建立 1 种固相萃取-高效液相色谱方法测定养殖场污水中强力霉素残留。养殖场排污水离心后取上清液过滤膜并调整溶液 pH 值,分别采用固相萃取柱进行富集和洗脱,氮吹浓缩处理, C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 0.01 mol/L 乙二酸溶液+甲醇-乙腈溶液洗脱。结果显示,标准曲线在 1~20 μg/mL 浓度范围内呈线性关系,相关系数  $r$  为 0.999 8;在 10~50 μg/L 添加浓度范围内,强力霉素平均回收率为 91.55%~95.14%,日内相对标准偏差为 1.66%~6.45%,日间相对标准偏差为 0.62%~0.75%,该方法的检测限为 0.1 μg/mL。该方法操作简便、高效,适用于养殖场排污水中强力霉素残留的快速测定。

**关键词:**强力霉素;固相萃取;高效液相色谱;抗生素残留;检测方法

**中图分类号:**X839.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)23-0249-03

兽药抗生素在现代畜牧业的发展和动物性产品的丰富供给方面发挥了重要作用。据报道,2013 年我国用在养殖业中的抗生素量约为 8.4 万 t,约占其生产总量的 52%,相当于美国养殖业使用量的 6 倍<sup>[1]</sup>。然而药物在动物体内的利用效率不高,高达 90% 的饲用抗生素将以母体或代谢产物的形式随畜禽粪尿排出体外,对环境产生污染<sup>[2-3]</sup>。目前,在动物粪便、土壤、水体等样品中检出多种抗生素残留<sup>[2,4-6]</sup>,其中四环素类药物作为养殖场常用兽药,在环境中的检出率相对较高<sup>[7-8]</sup>。强力霉素(doxycycline,简称 DOX)为四环素类抗生素的一种,于 1967 年获得食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,简称 FDA)批准,因其具有良好的组织穿透性、分布广和抑菌作用强等特点而被广泛应用于兽医临床<sup>[9]</sup>,是目前养殖业使用的主要四环素类药物之一。饲喂动物后,约有 85% 的强力霉素以原形或代谢物形式随粪尿排出<sup>[10]</sup>。养殖场水冲粪、水泡粪清粪工艺产生的污水较多,残留的抗生素随同污水排放进入环境,使得环境中微生物处于长期选择压下,将诱导病原菌产生抗性<sup>[11]</sup>,破坏环境生态平衡,并发生纵向传递和横向传播,对生态环境和食品安全造成威胁<sup>[12-13]</sup>。

目前,已报道的强力霉素检测方法主要用于动物产品和饲料等养殖投入品<sup>[14-15]</sup>,养殖污水等环境基质中强力霉素残留的检测标准缺失,色谱检测方法也鲜有报道。因此,建立方法简便、快速、高效和灵敏的养殖粪污水中强力霉素残留的测

定方法,可为研究强力霉素在环境中的行为、评估其对水生生态系统生态风险以及环境风险提供技术支撑,也为粪污中其他类抗生素测定方法的建立提供参考和借鉴,对抗生素的科学监管、合理使用以及制定养殖场抗生素排放标准具有重要意义。强力霉素的结构见图 1。

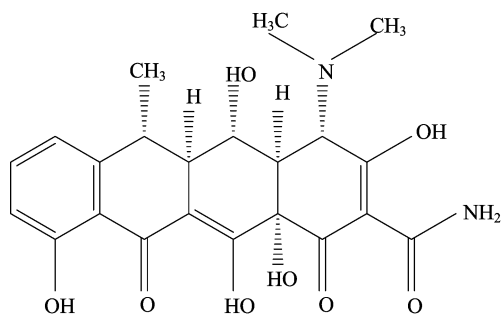


图1 强力霉素的结构

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

强力霉素标准品(纯度≥97.0%),购自 Dr. Ehrenstorfer 公司;甲醇和乙腈(色谱纯),购自美国天地(TEDIA)公司;盐酸和氢氧化钠(分析纯),购自南京化学试剂一厂;乙二胺四乙酸二钠和乙二酸(分析纯),购自国药集团化学试剂有限公司;柠檬酸和磷酸氢二钠(分析纯),购自西陇化工股份有限公司。

### 1.2 仪器设备

高效液相色谱系统(Agilent 1100S,配二极管阵列检测器 DAD),购自 Agilent 公司;分析天平(AL204)、pH 计(320),购自梅特勒-托利多仪器有限公司;漩涡混合器(XW-80A),购自上海琪特分析仪器有限公司;调速多用振荡器(HY-4),购自常州国华电器有限公司;高速离心机(Eppendorf),购自德国 Eppendorf 公司;超纯水仪(Milli-Q),购自美国

收稿日期:2019-01-24

基金项目:国家农产品质量安全风险评估项目(编号:GJFP2018012、GJFP2019012)。

作者简介:张圣新(1992—),女,江苏镇江人,硕士,研究实习员,主要从事抗生素安全评价研究。E-mail:17351781405@163.com。

通信作者:魏瑞成,博士,副研究员,主要从事抗生素安全评价研究。E-mail:rcwei79@jaas.ac.cn。

Millipore 公司;氮吹仪(N-EVAPTM112),购自美国 Organomation 公司;固相萃取装置,购自美国 Supelco 公司;HLB 固相萃取柱(200 mg,6 mL),购自美国 Waters 公司。

### 1.3 标准溶液的配制

准确称取强力霉素标准物质 10 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容配成 1 mg/mL 标准储备液,吸取一定量的储备液,用甲醇配成 100  $\mu\text{g/mL}$  标准中间液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光存放。用流动相稀释中间液配制浓度为 1、5、7、10、20  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准工作液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光存放,1 周更换。

### 1.4 提取和净化方法

污水取自养殖场净化池后流出液,将采集的样品低温运送回实验室,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心后取上清液过 0.8  $\mu\text{m}$  滤膜,加入 20 mL 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -柠檬酸缓冲溶液到 1 L 过滤样液中,调节 pH 值至 6 后过 HLB(亲脂-亲水平衡)柱净化。固相萃取 HLB 柱依次用甲醇和 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -柠檬酸缓冲溶液(pH 值为 4)各 6 mL 进行活化,然后取 100 mL 调节 pH 值后的样液过柱净化,样液装载流速为 3 mL/min,用 10 mL 水淋洗并真空抽干,然后用 8 mL 甲醇洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,在 10 mL 离心管中收集洗脱液,在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中用氮气浓缩至近干,加入 1 mL 流动相溶解残余物,过 0.22  $\mu\text{m}$  孔径有机滤膜后用于高效液相色谱仪测定。

### 1.5 高效液相色谱(HPLC)测定

色谱柱为 Agilent  $\text{C}_{18}$  250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ;流动相 0.01 mol/L 乙二酸溶液:甲醇-乙腈溶液(甲醇和乙腈体积比为 1:1)比例为 65:35;柱温为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;流速设定为 1.0 mL/min;检测器波长为 350 nm;进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 流动相条件的优化

为了减少样品中杂质峰的干扰,试验对流动相的配比进行了优化,选择 0.01 mol/L 乙二酸溶液+甲醇-乙腈为流动相,比较流动相组成比例分别为 60:40、65:35 和 70:30 时对色谱峰的影响。结果发现,当流动相中的甲醇-乙腈增加时,即有机相的比例增加时,强力霉素出峰时间前移,目标物的色谱峰与样品中的杂质峰分离度降低;当有机相组成减少时,强力霉素出峰时间延后,将增加样品分析的时间与试验成本,尤其是在对批量样品分析的情况下。综合上述试验结果,流动相配比为 65:35 时可以较好地满足分析需要。

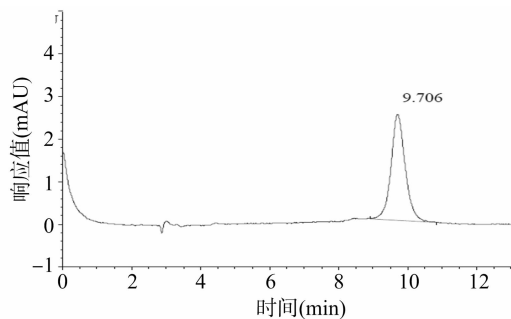
### 2.2 前处理条件优化

养殖场净化池为粪水混合物,在好氧与厌氧发酵等条件下,依靠物理化学和微生物的作用促进残留抗生素的降解。由于产生的污水多为悬浊液,易堵塞固相萃取柱,影响过柱效率及降低吸收富集的效果。试验中通过高速离心去除大颗粒悬浮物的干扰,然后利用 0.8  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤掉溶液中的小粒径颗粒,强力霉素属于小分子化合物,试验发现离心和过滤基本不影响其在污水中的残留。

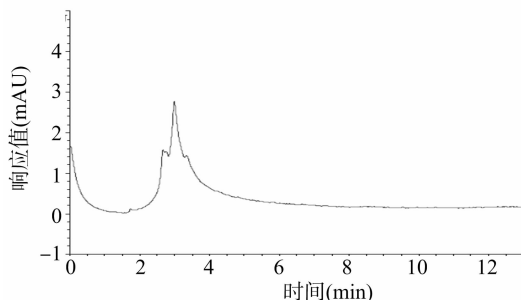
### 2.3 固相萃取-高效液相色谱法的建立

2.3.1 标准工作曲线 对 1~20  $\mu\text{g/mL}$  强力霉素标准工作液进行分析,每个浓度重复测定 4 次取平均值,根据色谱峰面积(y)与强力霉素浓度(x)作线性回归分析,强力霉素在浓度范围内线性良好,回归方程为  $y = 10.4560x - 2.2778$ ,相关

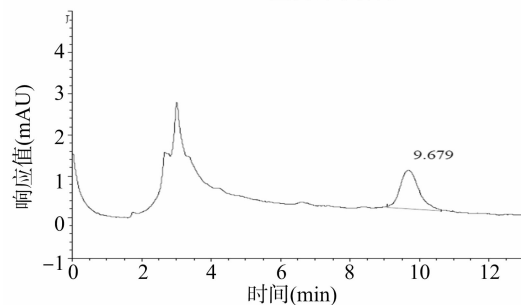
系数大于 0.99。强力霉素标准溶液和添加样品在试验优化的色谱条件下的谱图见图 2,目标药物色谱保留时间为 9.706 min,由于室温的影响,色谱保留时间在很小范围内波动,控制柱温可以消除影响,在分析过程中目标物色谱峰与杂质峰具有很好的分离度,保证了目标化合物分析的准确性。



a. 标准工作液(5  $\mu\text{g/mL}$ )



b. 空白污水样品



c. 添加 10  $\mu\text{g/L}$  的加标水样

图2 强力霉素的标准溶液和添加样品色谱

2.3.2 回收率、精密度与检出限 用空白污水样品进行加标回收试验,吸取适量的标准中间溶液到空白污水中,配成强力霉素浓度分别为 10、20、50  $\mu\text{g/L}$  的待测样品,每个浓度设 3 个平行。分别取 100 mL 待测样液按照上述处理方法对待测样品进行制备处理,进行 HPLC 测定,计算强力霉素在养殖污水中批内和批间的回收率和精密度,结果见表 1。强力霉素平均回收率为 91.55%~95.14%,日内相对标准偏差(RSD)为 1.66%~6.45%,日间相对标准偏差为 0.62%~0.75%,说明该方法具有较好的回收率和重现性。以能够产生 3 倍信噪比( $S/N=3$ )所对应的药物浓度计算方法检测限(MDL),目标药物的 MDL 为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  [16]。

### 2.4 方法应用

利用建立的分析方法测定了 6 个猪场净化池流出的污水样品,分析结果显示,猪场污水样品中强力霉素浓度为 0~150.8  $\mu\text{g/L}$ 。对阳性样品进行加标回收,评价本方法分析实际样品的能力,结果表明,加标回收率为 88.5%~90.2%,相对标

表 1 养殖污水中强力霉素的添加回收率和相对标准偏差

添加浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	测定批次	平均浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
10	1	9.175	91.75	4.71	0.75
	2	9.283	92.83	3.08	
	3	9.155	91.55	6.45	
20	1	18.682	93.41	3.84	0.70
	2	18.937	94.69	2.56	
	3	18.756	93.78	3.29	
50	1	47.284	94.57	3.67	0.62
	2	47.569	95.14	2.81	
	3	46.983	93.97	1.66	

准偏差小于 9%, 评价结果满足方法准确度和精密度的要求。

### 3 讨论

在方法开发过程中, 由于色谱柱  $\text{C}_{18}$  反向键合相表面分布有硅醇基, 四环素类药物分子基团与其发生缔合, 将造成强力霉素色谱峰在分析柱上的拖尾, 影响色谱峰宽及目标化合物定量分析的准确性。因此, 为了减少强力霉素色谱峰拖尾情况的发生, 本研究通过优化流动相的组成, 在流动相中加入一定浓度的乙二酸溶液, 以减少目标分析物与分析柱之间的键合作用力, 从而有效减少色谱峰拖尾现象的产生<sup>[17]</sup>。此外, 在试验过程中, 笔者发现养殖场污水的 pH 值会对目标物的回收率产生一定影响。所以本研究通过添加回收试验, 比较了将基质 pH 值分别调整为 3 和 6 时对目标物回收率的影响, 获得最适样品酸碱度。当 pH 值为 3 时, 强力霉素回收率偏低, 研究发现在加样后的固相萃取柱流出液、淋洗液及随后的洗脱液中, 检出了强力霉素特征峰, 提取液的强酸性改变了固相萃取柱的吸附作用, 导致目标药物在柱上保留不充分; 将提取液 pH 值调整为 6 时, 回收效果满足试验要求, 表明弱酸性溶剂有利于四环素类药物在固相萃取柱中富集。同时在样品处理过程和固相萃取柱的预处理液中加入一定浓度的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶液, 可以有效降低样品中强力霉素与二价离子螯合程度<sup>[18]</sup>, 提高目标物的回收率。

### 4 结论

通过高速离心去除粪污中悬浮固体物质、固相萃取柱去除杂质和富集净化、优化溶液 pH 值及流动相的组成和配比, 使得强力霉素的色谱峰与干扰峰分离效果良好。与现有方法比较, 高效液相色谱法具有样品处理过程简便、试剂消耗低的优点, 本方法处理简便、快速, 检测灵敏, 适用于养殖场污水中强力霉素残留的快速测定, 为监测养殖业抗生素污染和制订养殖场抗生素排放标准提供了技术支撑, 也为建立粪污中其他类抗生素测定方法提供了参考和借鉴。

### 参考文献:

[1] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772–6782.

[2] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. Chemosphere, 2006, 65(5): 725–759.

[3] Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2013, 11(3): 209–227.

[4] 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.

[5] Batt A L, Bruce I B, Aga D S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges[J]. Environmental Pollution, 2006, 142(2): 295–302.

[6] Hanna N, Sun P, Sun Q, et al. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: its potential for resistance development and ecological and human risk[J]. Environment International, 2018, 114: 131–142.

[7] Xu J, Xu Y, Wang H M, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent – receiving river[J]. Chemosphere, 2015, 119: 1379–1385.

[8] 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.

[9] 廖治锋, 段新华. 兽用多西环素的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(5): 76–78.

[10] Peng P C, Wang Y, Liu L Y, et al. The excretion and environmental effects of amoxicillin, ciprofloxacin, and doxycycline residues in layer chicken manure[J]. Poultry Science, 2016, 95(5): 1033–1041.

[11] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 236–243.

[12] 王 瑞, 魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染特征及其控制[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(9): 1705–1719.

[13] He L Y, Ying G G, Liu Y S, et al. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments[J]. Environment International, 2016, 92/93: 210–219.

[14] 王旭丹, 刘 静, 王庚南, 等. 高效液相色谱法检测鸡蛋中四环素类药物残留方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(6): 1579–1584.

[15] 贾 涛. 液相色谱-串联质谱法检测牛奶中的四环素类药物[J]. 中国乳业, 2015(4): 54–58.

[16] 王娜妮, 寿 旦, 王绪平, 等. 移液枪头式固相微萃取-高效液相色谱法测定细胞培养液中的 4 种生物碱[J]. 色谱, 2017, 35(1): 14–19.

[17] 魏瑞成, 王 冉, 李 维, 等. 猪粪中金霉素残留的测定方法[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 291–295.

[18] Wei R C, Ge F, Huang S Y, et al. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China[J]. Chemosphere, 2011, 82(10): 1408–1414.