

土壤和堆肥中四环素类抗生素的检测方法优化及其在土壤中的降解研究

李玲玲¹, 黄利东¹, 霍嘉恒², 鍾仁赐², 章永松^{1*}

(1 教育部环境修复与生态健康重点实验室, 浙江省亚热带土壤与植物营养重点实验室, 浙江大学环境与资源学院, 浙江杭州 310029; 2 台湾大学农业化学研究所, 台湾台北 10617)

摘要: 在对土霉素(OTC)、四环素(TC)和金霉素(CTC)3种四环素类抗生素的高效液相色谱(HPLC)检测分析方法以及在土壤和堆肥中的提取方法进行改进和优化的基础上,采用该方法进行了3种抗生素在土壤中的降解试验。结果表明,选用 Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.01 mol/L 草酸/乙腈/甲醇 (79/10.5/10.5, v/v/v) 为流动相,紫外检测波长 268 nm,流速 1.0 mL/min,进样量 5 μL,采用外标法定量,可使3种四环素类抗生素在 20 min 内全部洗脱并达到基线分离;在 0~10 mg/L 范围内,抗生素浓度与峰面积呈显著的线性关系,相关系数(r)均 > 0.999。土壤和堆肥样品中的 OTC、TC 和 CTC 可用 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇 (25/25/50, v/v/v) 混合溶液提取,其回收率在 76.0%~92.5% 之间。加入到土壤中的抗生素在 25℃ 下避光培养 49 d 后,在壤土和红土中的降解率分别是 67%~72% 和 36%~46%,对应的半衰期分别为 26~30 d 和 46~75 d,说明抗生素在壤土中比红土中容易降解。此外,3种抗生素在壤土中的半衰期没有显著性差异,而在红土中 CTC 和 TC 的降解速率显著高于 OTC。

关键词: 四环素类; 抗生素; 土壤; 堆肥; 检测; 降解

中图分类号: R917; S151.9

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2010)05-1176-07

Method optimization for determination of tetracyclines in soils and compost and their degradation in soils

LI Ling-ling¹, HUANG Li-dong¹, FOK Ka-Hang², CHUNG Ren-Shih², ZHANG Yong-song^{1*}

(1 Ministry of Education Key Laboratory of Environmental Remediation and Ecosystem Health/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropic Soil and Plant Nutrition/College of Natural Resource and Environment Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2 Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan)

Abstract: Based on method improvement and optimization for determination of Oxytetracycline (OTC), Tetracycline (TC) and Chlortetracycline (CTC) using high-performance liquid chromatography (HPLC) and the extraction method of tetracyclines (TCs) in soils and compost, the degradation of these three TCs in soils was studied. The results indicated that these three TCs could be completely eluted to baseline separation in 20 min by a column of Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.01 mol/L oxalic acid-ACN-MeOH (79/10.5/10.5, v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume of sample solution was 5 μL and the UV detector wavelength was at 268 nm. A significant linear correlation between these TCs under the concentration of 0–10 mg/L was observed ($r > 0.999$). The TCs in soils and compost could be extracted by a mixture solution of 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L oxalic acid/ethanol (25/25/50, v/v/v), with the recoveries ranged from 76.0% to 92.5%. After 49 d of incubation at 25 °C in the dark condition, the degradation rates of the TCs in loam soil and red clay were 67%–72% and 36%–46%, respectively. The corresponding half-life of TCs was 26–30 d in loam

收稿日期: 2009-12-11

接受日期: 2010-03-09

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2008C12061-1); 科技部农业科技成果转化资金项目 (2010GB23600669); 国家科技支撑计划 (2008BADA6B02) 资助。

作者简介: 李玲玲 (1982—), 女, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事农业有机废弃物资源化利用方面的研究。E-mail: lingjiaren@gmail.com

* 通讯作者 E-mail: yszhang@zju.edu.cn.

soil and 46–75 d in red clay, respectively, indicating that the degradation of TCs in the loam soil was significantly faster than that in the red clay. Moreover, there was no significant difference between the half-life of TCs in the loam soil, while the degradation rates of CTC and TC in the red clay were significantly higher than that of OTC.

Key words: tetracyclines; antibiotics; soil; compost; HPLC; determination; degradation

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 是一种广谱抗菌素,对革兰氏阳性菌、阴性菌、立克次体、滤过性病毒、螺旋体属乃至原虫类都有很好的抑制作用,被广泛应用于畜禽疾病的预防和治疗。TCs 不会被动物体完全吸收,70%~90% 的抗生素会随排泄物排出体外^[1-2]。许多国家和地区将畜禽排泄物制成堆肥施于土壤,作为植物营养来源并进行土壤修复,这就为抗生素进入土壤环境提供了途径。TCs 会在土壤中持久存在,并随着肥料的不断施用,在土壤中会逐年累积^[3],给环境安全和食品安全带来危害。因此,土壤和堆肥中的抗生素残留量研究日益受到国内外学者的广泛关注,其检测技术也成为研究热点。

目前,国内外对四环素类抗生素的检测方法主要有高效液相色谱 (HPLC) 法、生物传感器法^[4] 和酶联免疫吸附试验法^[5] 等。色谱法具有快速、灵敏和特异性高等优点,因而被广泛应用于四环素的检测。土壤和堆肥成分复杂,以往的提取方法多采用 EDTA–McIlvaine 缓冲溶液,经 HLB 小柱纯化富集,再用甲醇或乙腈洗脱,真空旋转蒸发浓缩后用 HPLC 测定^[6]。此方法不能将有机质完全去除,易在 HPLC 检测中形成干扰峰,从而影响色谱分离效果;而且此方法操作繁琐,多次转移造成抗生素的损失,回收率降低。为改进土壤和堆肥中 TCs 的提取和检测方法,采用外标法定量,以建立提取和检测抗生素的有效方法;并在此基础上,进行四环素类抗生素在土壤中的降解研究,以期为深入了解四环素类抗生素在土壤中的降解和评估其环境风险提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤为台湾两种典型的农耕土:壤土 (Haplaquents) 和红土 (Kandiudox)。壤土 (IS) 取自大湖镇 (24.40°N, 120.82°E),红土 (RC) 取自平镇 (24.92°N, 121.21°E)。土壤风干后过 2 mm 筛备用。供试堆肥 (SMC) 由猪粪和木屑堆制发酵而成,取自屏东县金峰堆肥厂。置于 50℃ 烘箱中烘干后过 0.149 mm 筛,备用。供试土壤和堆肥理化性状

见表 1。

试验用仪器包括:Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,配有自动进样器,真空在线脱气机和四元泵,DC200H 超声波清洗器,离心机,G-560 漩涡仪。

所用药品:四环素 (TC)、土霉素 (OTC)、金霉素 (CTC) 为标准品 (Sigma 公司),甲醇、乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司),草酸、氯化钠、酒精、Na₂EDTA、Na₂HPO₄、柠檬酸、CaCl₂ 等试剂均为分析纯。

表 1 供试土壤和堆肥理化性状

Table 1 Characteristics of the compost and soils studied

土壤 Soils	pH	OC (mg/g)	CEC (cmol/kg)
堆肥 Compost	7.45	191	51.0
壤土 Loam soil	6.92	6.8	35.2
红土 Red clay	4.55	16.4	60.0

注 (Note): OC—有机碳 Organic carbon content

1.2 抗生素标准溶液配制

标准储备液的配制:准确称取 3 种抗生素各 10 mg,用甲醇溶液溶解并定容至 10 mL。此溶液中 OTC、TC 和 CTC 浓度各为 1 g/L,置于冰箱 (4℃) 保存备用。

标准中间液的配制:准确吸取四环素标准储备液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,各抗生素浓度为 10 mg/L。

标准使用液的配制:准确吸取标准中间液 0、0.5、1、2、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,得到抗生素标准系列为 0、0.5、1、2、4、6、8、10 mg/L。

1.3 色谱分离条件选择和优化

高效液相色谱分离条件包括:色谱柱,流动相,检测波长,流量及进样量。为确定合适的分离条件,选用 2 种高纯硅胶为基质的色谱柱:Waters Cosmosil 5C18–AR–II (4.6 × 250 mm) 和 Agilent Eclipse XDB–C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm),在流动相流量为 1.0 mL/min 和进样量为 5 μL 条件下,以抗生素浓度为 10 mg/L 的标准液进行 2 种流动相 (0.01

mol/L草酸/乙腈(75/25, v/v)和0.01 mol/L草酸/乙腈/甲醇(79/10.5/10.5, v/v/v))和2个波长(268和365 nm)的组合分离效果试验。

1.4 土壤和堆肥中抗生素提取方法

以往用于提取土壤和堆肥中抗生素的常用提取剂有: EDTA-McIlvaine 缓冲溶液^[6]、NaCl/草酸/乙醇混合溶液^[7]和柠檬酸/Na₂HPO₄混合溶液^[3], 这些提取方法的回收率不尽相同。另外, 考虑到四环素类抗生素是水溶性的, 并且在研究 TCs 在土壤中的吸附时, 常以 0.01 mol/L CaCl₂ (pH 5.5) 作为背景溶液^[7]。因此, 本研究比较了 5 种提取剂对四环素类抗生素的提取效果。所用的 5 种提取剂分别为: 1) 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液, pH 4.0; 2) 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇(25/25/50, v/v/v)混合溶液, pH 1.5; 3) 0.1 mol/L 柠檬酸/0.2 mol/L Na₂HPO₄, pH 7.0; 4) 0.01 mol/L CaCl₂, pH 5.5; 5) 水, pH 7.0。

称取一定重量的土壤或堆肥样品若干份, 吸取一定体积已知浓度的 OTC、TC 和 CTC 标准液加入到样品中, 置于通风橱内, 用玻璃棒搅拌至甲醇完全蒸发^[8], 防止甲醇对提取带来的影响。分别用上述 5 种提取液提取 3 次, 每次加提取剂 3 mL。加入提取剂后, 用漩涡仪匀质 30 s, 超声分离 15 min, 2500 r/min 离心 10 min, 收集 3 次提取的上清液, 2500 r/min 离心 15 min, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 用于 HPLC 分析。同时做不加土壤或堆肥样品的空白。每处理重复 3 次。

1.5 抗生素在土壤中的降解试验

分别采用壤土(LS)和红土(RC)2种土壤进行试验。称取30 g风干土, 置于100 mL塑料烧杯(高7 cm × 直径5 cm)中, 吸取4.5 mL含有3种TCs的甲醇溶液, 喷洒到盛有土壤的烧杯中, 使土壤中TCs最终浓度为150 mg/kg。为避免甲醇对土壤微生物活性产生影响, 将烧杯置于通风橱中, 用玻璃棒搅拌至甲醇完全蒸发^[8]。加入去离子水, 使样品含水量达到田间饱和持水量的60%。用parafilm封口膜将烧杯口盖住, 留4个直径为2 mm的小洞在封口膜上, 使烧杯内气体和外界流通以保持微生物活性。将烧杯置于25 °C恒温箱中进行避光培养49 d, 每周对样品进行称重, 补充水分, 使其含水量保持稳定。每周取样一次, 测定土壤中的TCs含量, 每处理重复3次。

1.6 统计分析

应用 Excel 软件, 对抗生素浓度与峰面积之间

进行相关性分析, 并对抗生素回收率和残留量进行作图分析。降解百分比和半衰期数据均经过 DPS 软件统计检验, 平均值间差异比较采用 *t* 检验法, *P* < 0.05。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件选择和优化

在 TCs 结构中都含有酸性的酚羟基和烯醇羟基及碱性的二甲氨基, 该类药物均为两性化合物, 在近中性条件下能与二价和三价金属离子形成螯合物, 也能和色谱固相载体中的硅烷醇基相互作用。所以, 色谱柱中的金属杂质和自由硅烷醇基会引起峰面积扩大及反相吸附剂拖尾现象, 使得 TCs 不能很好地进行色谱分离, 因而通常使用由高纯硅或高分子吸附剂填充的色谱柱来分离 TCs。此外, TCs 色谱分析大多采用 UV 检测器, 其检测波长的选择对检查灵敏度和排除杂质峰的干扰至关重要。根据胡冠九等^[9]和徐冬梅等^[10]对 OTC、TC 和 CTC 进行光谱扫描的结果显示, 3 种抗生素在 268 和 365 nm 波长下均有最大吸收峰。故本研究选用 2 种不同的以高纯硅胶为基质的色谱柱, Waters Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 × 250 mm)和 Agilent Eclipse XDB-C8(4.6 × 150 mm, 5 μm), 分别在波长 268 和 365 nm 下对 TCs 混合标准液进行了测定, 以比较对 TCs 的分离效果。

图 1A 和图 1B 为用 Agilent C8 柱对 3 种抗生素分别在检测波长 268 和 365 nm 下测得的色谱图; 而图 1C 和图 1D 则为用 Waters C18 柱测得的色谱图。从中可以清楚看出, 3 种抗生素在 Agilent C8 柱中的保留时间较短, 20 min 内就可达到基线分离, 在 Waters C18 柱中保留时间较长, 35 min 内才能将其完全分离。而无论在 268 nm 还是在 365 nm 的吸光度下, TCs 在 Agilent C8 柱中的 mAU 值远远高于 Waters C18 柱, 表明 Agilent C8 柱的检测灵敏度高。虽然图 1A 显示 4.864 min 时的杂质峰和 OTC 峰相邻, 但基本还是分开的, 因此选用 Agilent C8 柱作为上述 3 种抗生素的分离和检测色谱柱。

图 1A 和图 1B 看出, TCs 在 268 nm 检测波长下的吸光度值高于 365 nm, 图 1A 显示在 2.5 min 之前, 用 268 nm 检测时出现较大的负干扰峰, 但是可以通过 2.5 min 后开启 UV 检测器的方式来排除色谱图中的负干扰峰。因此, 选用 268 nm 作为检测波长较为合适。

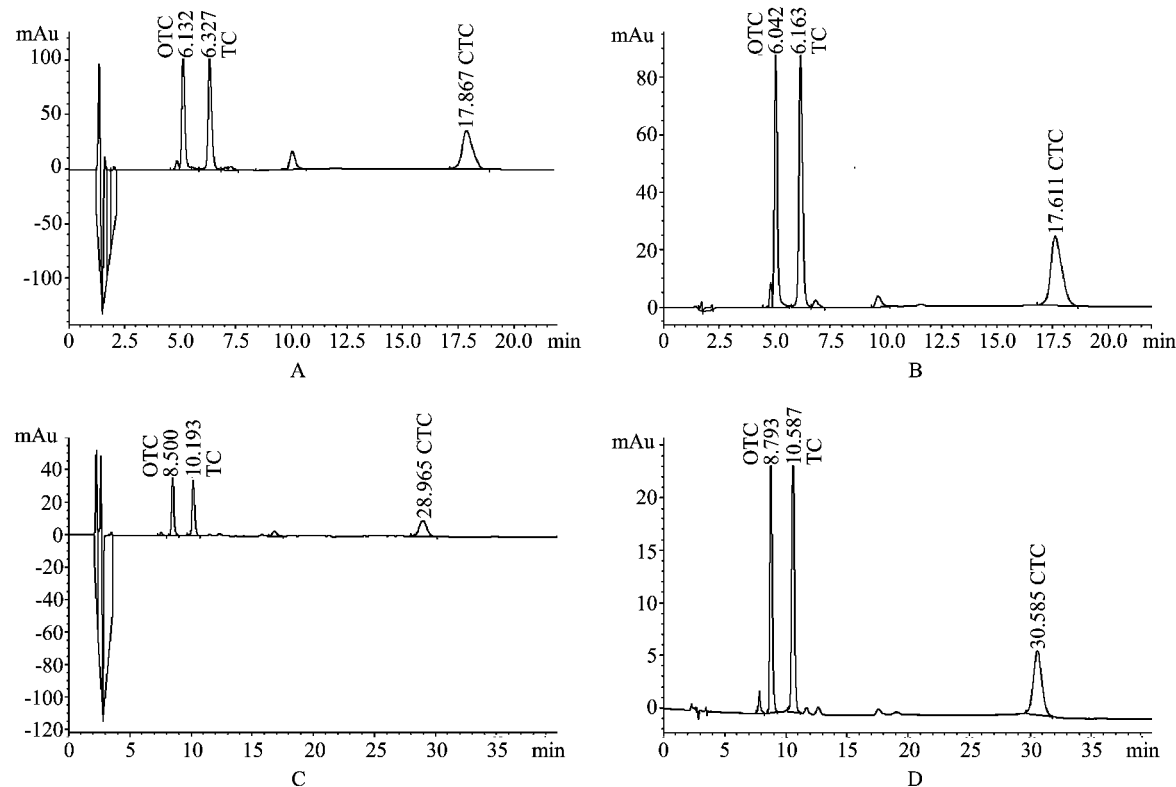


图1 不同色谱柱和检测波长下测得的四环素类抗生素图谱

Fig.1 Chromatograms of tetracyclines using different columns and detecting wavelength

[注(Note): 流动相 Mobile phase: 0.01 mol/L 草酸/乙腈/甲醇 oxalic acid/ACN/MeOH (79/10.5/10.5 v/v/v); 抗生素浓度 Concentrations of OTC, TC and CTC, 10 mg/L. A: Agilent C8 柱, 波长 268 nm Agilent C8 column, wavelength 268 nm; B: Agilent C8 柱, 波长 365 nm Agilent C8 column, wavelength 365 nm; C: Waters C18 柱, 波长 268 nm Waters C18 column, wavelength 268 nm; D: Waters C18 柱, 波长 365 nm Waters C18 column, wavelength 365 nm.]

为避免抗生素和二价金属离子形成螯合物,反相色谱柱常使用低 pH 值的流动相。Arikan 等^[11]在研究中采用 0.01 mol/L 草酸 (pH 2.0)/乙腈 (75/25, v/v) 为流动相来检测 OTC。然而,我们发现这个条件不能将 OTC 和 TC 完全分离。而采用 Fritz 和 Zuo^[12]在草酸和乙腈中加入甲醇的流动相,上述问题则可以得到很好解决,因为甲醇作为修饰剂,可使抗生素在色谱柱内和流动相中的分配时间发生变化,延长 OTC 和 TC 出峰的时间间隔,从而获得更好的分离效果。试验最终确定流动相组成为 0.01 mol/L 草酸/乙腈/甲醇 (79/10.5/10.5, v/v/v),可以较好地分离 OTC、TC 和 CTC 3 种抗生素。

2.2 线性关系

用上述优化色谱条件: 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm), 流动相组成为 0.01 mol/L 草酸/乙腈/甲醇 (79/10.5/10.5, v/v/v), 紫外检测波长 268 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μL, 对 OTC、TC 和 CTC 的标准曲线 0、0.5、1、2、4、6、8、10 mg/L 进行测定, 根据每个浓度下四环素类抗生素的峰面积 Y 和浓度 X 做回归, 并根据信噪比

S/N=2 得出检测限。表 2 看出, 在 0 ~ 10 mg/L 范围内, 抗生素浓度与峰面积呈显著的线性关系, 相关系数 r>0.999, 说明该色谱分离条件适用于 OTC、TC 和 CTC 的检测。

表 2 回归方程、相关系数和检测限

Table 2 Regression equation, correlation coefficient and detection limit

抗生素 Antibiotics	回归方程 Regression equation	r	检测限 Detection limit (μg/L)
土霉素 OTC	Y = 32.28X - 2.46	0.9995	8
四环素 TC	Y = 39.51X - 2.56	0.9996	10
金霉素 CTC	Y = 17.13X - 4.55	0.9991	15

2.3 样品预处理中提取液的选择及 TCs 在堆肥和土壤中的回收率

采用 5 种不同提取剂对堆肥中四环素类抗生素的提取测定结果 (图 2) 表明, 以 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇 (25/25/50, v/v/v) 混合溶液提取堆肥中

的抗生素的回收率最高,OTC、TC、CTC 的回收率分别达 91.4%、78.5% 和 89.3%,均显著高于其他 4 种提取液。其原因很可能与四环素类抗生素为两性化合物,其结构中都含有酸性的酚羟基和烯醇羟基及碱性的二甲胺基,具有 3 个 pK_a 值,在酸性条件下,四环素的稳定性高^[13],易被提取回收。从堆肥提取液中抗生素的 HPLC 图谱(图 3)可清楚看出,该提取剂以及检测方法即使用于成分非常复杂的堆肥中抗生素的提取,也没有干扰峰出现,分离和检测效果均比较满意。因此,pH 1.5 的 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇(25/25/50, v/v/v)可作为堆肥中四环素类抗生素的一种较为理想的提取剂。

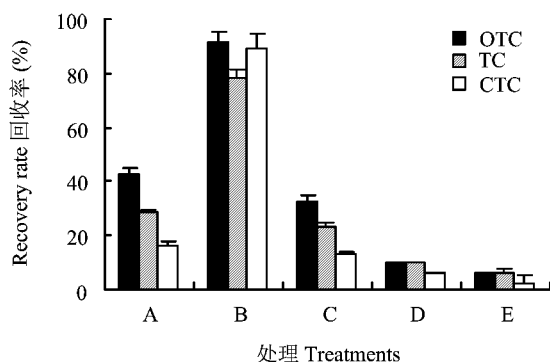


图 2 不同提取剂对 TCs 在堆肥中的回收率

Fig. 2 Recovery rates of TCs in compost by different extractants

[注(Notes): A、B、C、D、E 分别为提取剂 1) 0.1 mol/L Na_2EDTA -Mellvaine 缓冲液, pH 4.0; 2) 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇(25/25/50, v/v/v) 混合溶液, pH 1.5; 3) 0.1 mol/L 柠檬酸/0.2 mol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0; 4) 0.01 mol/L $CaCl_2$, pH 5.5; 5) 水, pH 7.0. A, B, C, D, E were extract solution 1) 0.1 mol/L Na_2EDTA -Mellvaine buffer, pH 4.0; 2) 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L oxalic acid/ethanol(25/25/50, v/v/v) mixture solution, pH 1.5; 3) 0.1 mol/L citric acid/0.2 mol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0; 4) 0.01 mol/L $CaCl_2$, pH 5.5; 5) water, pH 7.0, respectively.]

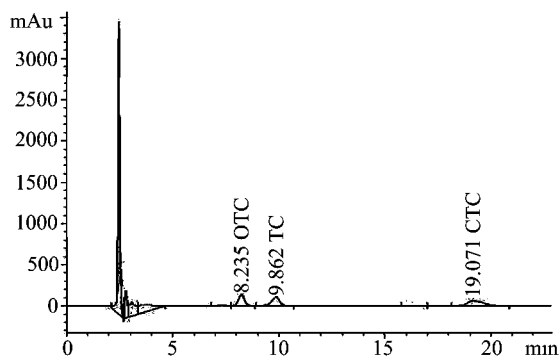


图 3 堆肥提取液中四环素类抗生素图谱

Fig. 3 Chromatogram of TCs in the compost extraction solution

为验证 1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇(25/25/50, v/v/v) 混合溶液是否适用于土壤中四环素类抗生素的提取,选用壤土和红土为基质加入一定量的抗生素进行回收率试验,结果(表 3)看出,OTC、TC 和 CTC 3 种抗生素在 2 种土壤中的回收率在 76.0%~92.5% 之间,RSD 在 1.38%~3.07% 之间,表明该方法定量准确,重现性好。同时还看出,3 种抗生素在壤土中的回收率略高于红土。就 3 种抗生素而言,回收率的顺序为 OTC > CTC > TC。

表 3 四环素类抗生素在壤土和红土中的回收率

Table 3 Recovery rates of TCs in Loam and Red clay

土壤 Soils	抗生素 Tetracyclines	回收率(%) Recovery rate	RSD (%, n = 6)
壤土 Loam soil	OTC	92.5	1.38
	TC	79.2	2.51
	CTC	87.7	1.85
红土 Red clay	OTC	91.0	1.43
	TC	76.0	3.07
	CTC	87.2	1.86

2.4 抗生素在土壤中的降解

根据加入量计算,土壤中抗生素的初始浓度理论值应为 150 mg/kg,由于抗生素在壤土和红土中的回收率略有差异,因此初始浓度的实际检测值略有不同(图 4)。在 25 ℃ 恒温条件下避光培养 49 d,土壤中抗生素的含量总体呈随培养时间而不断下降的趋势,表明 OTC、TC 和 CTC 在壤土和红土中都发生了降解。但在降解过程中,抗生素含量会有波动,因四环素类抗生素具有相似的化学性质,在 pH 2~6 时,TCs 发生降解反应和可逆的异构化反应,在 C-4 位置形成光学异构体 4-epi-TCs^[14-15],致使抗生素含量在下降过程中呈振荡的趋势。Kühne 等^[16]在研究四环素在水和猪粪水中的稳定性时,也发现有类似现象。

培养 49 d 后,抗生素在壤土和红土中的降解百分比和半衰期(表 4)看出,壤土中有 67%~72% 的抗生素发生了降解,半衰期为 26~30 d;红土中抗生素减少了 36%~46%,半衰期为 46~75 d。可见,抗生素在红土中的降解速度明显比壤土中慢,这很可能与土壤的理化性质有关。红土为酸性土壤,壤土的 pH 接近中性,四环素在酸性条件下的稳定性较高,随着 pH 增加,四环素的降解速率增加^[13]。此外,红土的有机碳和 CEC 含量分别为 1.64% 和 60.0 cmol/kg,显著高于壤土的有机碳含量 0.68%

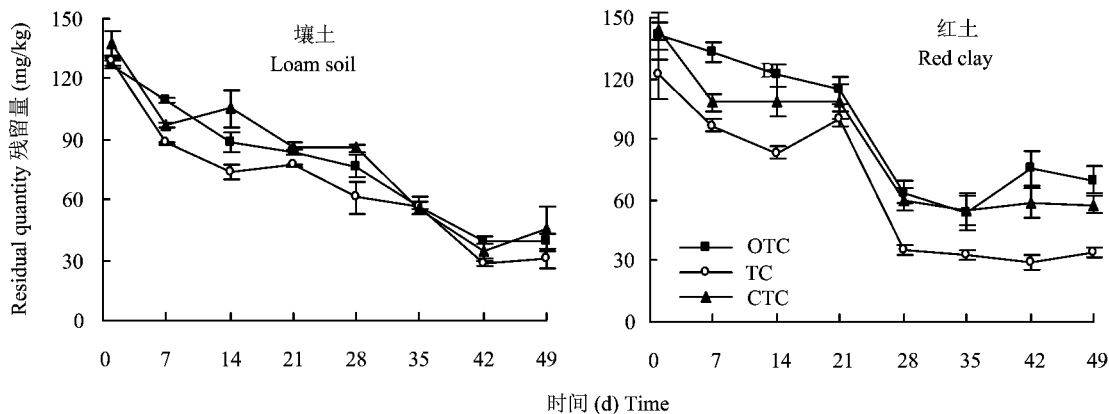


图4 四环素类抗生素在壤土和红土中的降解

Fig.4 The degradation of TCs in loam soil (A) and red clay (B) during incubation

表4 培养49 d后四环素类抗生素降解百分比和半衰期
Table 4 Percentages of degraded TCs after incubation for 49 d and their half-life

基质 Substrates	降解百分比(%) Degraded			半衰期(d) t _{1/2}		
	OTC	TC	CTC	OTC	TC	CTC
壤土 LS	68 a	72 a	67 a	29 a	26 a	30 a
红土 RC	36 b	42 a	46 a	75 a	46 b	54 b

注(Note): 同一行数值后不同字母表示差异达5 %显著水平
Values followed by different letters in the same line mean significant at 5 % level.

和 CEC 含量 35.2 cmol/kg。有研究表明,土壤有机碳和 CEC 含量高可以增加对四环素类抗生素的吸附^[17],从而增加抗生素的稳定性。

表4 还看出,壤土中3种抗生素的半衰期没有显著性差异,而红土中 CTC 和 TC 的降解速率显著高于 OTC。表明四环素类抗生素的降解速率除受土壤性质影响外,还与四环素本身的结构和理化性质有关。Blackwell^[18]指出,OTC 在土壤中的存在是持久性的,并且可能随着施肥产生累积。CTC 分子结构中 C7 位上 Cl 原子的存在可增加 CTC 的溶解度,从而可加快降解速率^[19]。

3 结论

1) 利用高效液相色谱法同时测定3种抗生素的条件为: Agilent Eclipse XDB-C8(4.6 × 150 mm, 5 μm)色谱柱;流动相为0.01 mol/L 草酸/乙腈/甲醇(79/10.5/10.5, v/v/v),流速1.0 mL/min,进样量5 μL;紫外检测波长268 nm,外标法定量。

2) 用1 mol/L NaCl/0.5 mol/L 草酸/乙醇(25/

25/50, v/v/v)混合溶液能有效提取土壤和堆肥样品中的土霉素、四环素和金霉素,其回收率在76.0%~92.5% 之间。

3) 四环素类抗生素在土壤中的降解受多种因素影响。抗生素在红土中的降解速度显著比壤土中慢;壤土中3种抗生素的半衰期没有显著性差异,红土中 CTC 和 TC 的降解速率显著高于 OTC。

参考文献:

[1] 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]. Agric. , Ecosyst. Environ. , 2002, 93 (1-3): 267-278.

[2] Elmund G K, Morrison S M, Grant D W *et al.* Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste[J]. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. , 1971, 6 (2): 129-132.

[3] 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 (7): 1509-1518.

[4] Hansen L H, Aarestrup F, Sorensen S J. Quantification of bioavailable chlortetracycline in pig feces using a bacterial whole cell biosensor[J]. Veterinary Microbiol. , 2002, 87 (1): 51-57.

[5] Kumar K, Thompson A, Singh A K *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples[J]. J. Environ. Qual. , 2004, 33: 250-256.

[6] Blackwell P A, Lützhøft H C H, Ma H P *et al.* Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection[J]. Talanta, 2004, 64: 1058-1064.

[7] Sassman S A, Lee L S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange[J]. Environ. Sci. Tech. , 2005, 39 (19): 7452-7459.

- [8] Tan H, Cao Y, Tang T *et al.* Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils[J]. *Sci. Total Environ.*, 2008, 407(1): 428–437.
- [9] 胡冠九,王冰,孙成. 高效液相色谱法测定环境水样中5种四环素类抗生素残留[J]. *环境化学*, 2007, 26(1): 106–107.
Hu G J, Wang B, Sun C. Determination of five tetracyclines residues in environmental water samples using high-performance liquid chromatography[J]. *Environ. Chem.*, 2007, 26(1): 106–107.
- [10] 徐冬梅,刘广深,李青,等. 高效液相色谱法同时测定动物组织中3种抗生素残留量[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(2): 233–234.
Xu D M, Liu G S, Li Q *et al.* Determination of three antibiotics simultaneous in animal tissue residues using high-performance liquid chromatography method[J]. *China Public Health*, 2002, 18(2): 233–234.
- [11] Ankan O A, Sikora L J, Mulbry W *et al.* Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves[J]. *Bioresour. Tech.*, 2007, 98(1): 169–176.
- [12] Fritz J W, Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography[J]. *Food Chem.*, 2007, 105: 1297–1301.
- [13] Doi A M, Stoskopf M K. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter[J]. *J. Aquatic Anim. Health*, 2000, 12(3): 246–253.
- [14] Vej-Hansen B, Bundgaard H, Kreilgard B. Kinetic degradation of oxytetracycline in aqueous solution[J]. *Arch. Pharma. Chem. Sci. Ed.*, 1978, 6: 151–163.
- [15] Khan N H, Roets E, Hoogmartens J *et al.* Quantitative analysis of chlortetracycline and related substances by high performance liquid chromatography[J]. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 1989, 7(3): 339–353.
- [16] Kühne M, Ihnen D, Möller G *et al.* Stability of tetracycline in water and liquid manure[J]. *J. Veterinary Medic., Series A*, 2000, 47(6): 379–384.
- [17] Sithole B B, Guy R D. Models for tetracycline in aquatic environments I. Interaction with Bentonite clay systems[J]. *Water Air Soil Poll.*, 1987, 32: 303–314.
- [18] Blackwell P A, Kay P, Ashauer R *et al.* Effects of agricultural conditions on the leaching behavior of veterinary antibiotics in soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 75(1): 13–19.
- [19] Budavari S. *The Merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 11th ed. [C]. Rahway: Merck Co. Inc., NJ, 1989.