

土壤及畜禽粪肥中四环素类抗生素 固相萃取—高效液相色谱法的优化与初步应用

张志强¹, 李春花¹, 黄绍文^{1*}, 高伟², 唐继伟¹

(1 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部植物营养与肥料重点实验室, 北京 100081;

2 天津市农业资源与环境研究所, 天津 300192)

摘要: 本研究优化了土壤和有机肥中 3 种四环素类抗生素的提取和测定方法。方法经优化后, 土壤和有机肥中的抗生素的提取效率达到 52%~95%, 且分析时间大大缩短。本研究还利用优化方法在天津进行了有机肥和菜地中 3 种抗生素残留的初步调查。集约化养殖场的猪、鸡粪便中四环素类抗生素残留状况为: 金霉素 (CTC) 检出率达到 78%, 最高残留值达到 563.8 mg/kg(干基); 四环素 (TC) 和土霉素 (OTC) 检出率也高达 56%, 最高值分别达到 34.8 mg/kg 和 22.7 mg/kg。在天津销售的几种商品有机肥中同样检测出四环素类抗生素的残留, 残留水平与猪粪和鸡粪相当。菜田土壤样品中 Σ TCs 的总检出率为 64%, 3 种抗生素中土霉素检出率最低为 18%, 最高值达到 105.6 μ g/kg(风干基); 四环素检出率为 36%, 最高值达到 196.7 μ g/kg; 金霉素检出率为 32%, 最高值达到 477.8 μ g/kg。在所调查土壤中, 温室和大棚土壤 TCs 的残留水平高于露地土壤。占调查样品 27.3% 的菜田土壤中 TCs 总量超过欧盟规定的生态安全触发线(100 μ g/kg), 存在一定的潜在生态风险。

关键词: 四环素类抗生素残留; 土壤; 畜禽粪便; 固相萃取—高效液相色谱法

中图分类号: X53; S129

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2013)03-0713-14

Optimization of residual tetracyclines analysis in soils and manure using SPE - HPLC and pilot survey in Tianjin

ZHANG Zhi-qiang¹, LI Chun-hua¹, HUANG Shao-wen^{1*}, GAO Wei², TANG Ji-wei¹

(1 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China;

2 Tianjin Institute of Agricultural Resources and Environment, Tianjin 300192, China)

Abstract: Tetracyclines (TCs) are the most commonly detected antibiotics reminded in soils and manures in China. The survey of the residual status of tetracyclines is important for evaluating possible biological risks caused by direct exposure of bioorganisms and human beings. In this study, Analytical methods of three kinds of tetracyclines, oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline, is optimized using SPE - HPLC. The residual status of TCs in soils and manure in Tianjin was investigated using the optimized method. The obtained method recovery rates for soils and manure are increased to the range of 52% - 95%. In the surveyed feces samples from intensive piggeries and poultries, CTC is detected in 78% of manures with the highest mg/kg, and OTC and TC are detected in 56% of feces with the highest values of 34.8 and 22.7 mg/kg, respectively. TCs are also detected in the market manure in Tianjin with similar residual levels and percentages to those in the feces samples. The total percentage of garden soils containing detectable TCs is 64% of the surveyed soils, and those for OTC, TC and CTC are 18%, 36% and 32%, respectively. The highest values for OTC, TC and CTC are 105.6, 196.7 and 477.8 μ g/kg in dry weight

收稿日期: 2012-10-17 接受日期: 2013-02-03

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25-C-11); 公益性行业(农业)科研专项(201203095); 国家留学基金(2012-01)资助。

作者简介: 张志强(1985—), 男, 山东寿光人, 硕士研究生, 主要从事肥料资源利用研究。E-mail: zzq551@qq.com

* 通信作者 Tel: 010-82108662, E-mail: huangshaowen@caas.cn

respectively. The residual levels in soils under facilities are higher than those in open fields. In 25% of surveyed garden soils, the total amounts of three kinds of TCs are higher than those in the trigger lines causing biological safety.

Key words: tetracyclines residue; soil; manure; SPE – HPLC

四环素类抗生素(TCs)是一类广谱抗生素,由于其成本低廉、使用方便、副作用相对较小等原因,常在畜牧养殖业中作为预防和抗病药物、生长促进剂等添加于饲料中,目前已成为我国畜禽饲养业中生产和临床使用量最大的一类抗生素^[1]。虽然我国对饲料添加抗生素的数量有相关的规定^[2],但受经济利益的驱使,违规超量、滥用抗生素的现象较为普遍^[3-4]。大量TCs在动物体内不能被完全吸收,大约40%~90%会以母体或代谢物的形式随粪尿排出体外^[5-6]。胡献刚等^[7]测定的天津畜禽养殖基地粪样中土霉素(OTC)最高含量达到173.2 mg/kg。畜禽粪便一般未经处理或经简单堆沤后作为有机肥施入土壤,TCs由此进入土壤环境中。TCs在土壤中比较稳定,并随粪肥的不断施入在土壤中累积^[8],危害农产品质量安全^[9-10],对生态环境和人类健康带来一定的风险^[11]。四环素(TC)、土霉素(OTC)和金霉素(CTC)是我国畜禽粪便和土壤中检出率最高的三种TCs^[12-15]。因此,需要系统研究有机肥中残留的这三种TCs可能引起的环境风险。

目前土壤和畜禽粪肥中TCs常用的测定方法是用缓冲溶液提取,经SPE小柱固相萃取、高效液相色谱法测定。 Na_2EDTA -McIlvaine缓冲溶液是动物性食品中最常用的抗生素提取液^[16-18],也有人用来提取土壤、畜禽粪便等环境样品中的TCs^[12-13,19]。从文献可以看出, Na_2EDTA -McIlvaine缓冲溶液对OTC、TC和CTC的提取效率差异较大,分别在27%~85%、33%~62%和36%~76%范围内^[8,12,19]。本研究预备实验中得到的该缓冲液对OTC、TC和CTC的提取率只有30%~50%。李彦文等^[20]在缓冲液中加入甲醇,抗生素的提取效率有了一定的提高,但仍存在浓缩时间较长,提取杂质增多等问题。因此,本研究通过试验筛选适宜的提取液、洗脱液等对OTC、TC和CTC 3种抗生素的萃取方法进行了优化,选取了最佳流动相组成和洗脱程序,确立了相对简便、快速、准确的土壤和畜禽粪肥中TCs的测定方法,并应用该方法对天津地区蔬菜种植基地土壤和畜禽粪肥进行了调查分析。

1 材料与方法

1.1 供试设备与试剂

本研究使用Agilent 1100型高效液相色谱仪(Agilent Technologies公司),色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C18, 3.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm(Agilent Technologies公司); VisiprepTM-DL型固相萃取装置(Supelco公司); SK8200HP超声波器(中国上海); N-EVAP111氮吹仪(中国北京); 低温离心机(Sigma公司); MS2 Minishaker涡旋混合器(中国广州); 0.22 μm 滤膜(天津津腾); Bond Elut-SAX固相萃取小柱(500 mg/6mL, Agilent Technologies公司), Poly-Sery HLB固相萃取小柱(500 mg/6mL, CNW Technologies公司)。

甲醇、乙腈和丙酮为HPLC级(Fisher公司); 磷酸氢二钠、柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠、草酸和三氯乙酸为分析纯(国药公司); 四环素、土霉素和金霉素纯度大于等于99%(Sigma公司); 溶液配制及洗脱等所用水均为二次蒸馏水。

McIlvaine缓冲溶液: 将625 mL 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液与1000 mL 0.1 mol/L柠檬酸溶液混合,用NaOH或HCl调 $\text{pH} = 4.0 \pm 0.05$ 。

0.1 mol/L Na_2EDTA -McIlvaine缓冲溶液: 称取60.50 g乙二胺四乙酸二钠放入1625 mL McIlvaine缓冲溶液中,使其溶解,摇匀。

TCs混合标准工作溶液: 精确称取0.100 g土霉素(OTC)、0.100 g四环素(TC)和0.200 g金霉素(CTC),定容于100 mL甲醇中,即得含有浓度为1000 mg/L OTC、1000 mg/L TC和2000 mg/L CTC的储备液。用混合流动相将混合标准储备液稀释100倍,得到含有10 mg/L OTC、10 mg/L TC和20 mg/L CTC的混合标准工作溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

1.2 土壤和有机肥样品的采集

土壤样品于2012年5~6月采自天津西青区、武清区、北辰区、静海县主要蔬菜种植基地,共22块菜田(包括10个日光温室、6个大棚和6个露地菜田),同时采集3个粮田土样作为对照。每个地块按S型选择10个点,采集0—20 cm的土壤,将10

个点的土样混匀,经 4 分法缩减到 0.5 kg 左右,并调查取样地块的种菜历史、栽培制度、茬口、施肥等信息。

粪肥样品采自天津蔬菜基地附近的 9 个畜禽养殖场,包括鸡粪样 5 个、猪粪样 4 个。在每个粪堆表层 0—30 cm 和 30—50 cm 各选 5 个点采集粪肥,混匀后按照四分法取 0.5 kg 作为该养殖场的粪肥样品,在 -20℃ 条件下避光保存。商品有机肥为市售商品有机肥,从每种商品有机肥包装袋内 5 个不同位置采样,混匀后按照四分法取 0.5 kg 作为供试样品。土壤和有机肥样品风干粉碎后过 1 mm 筛待用,并测定含水量。

1.3 土壤和有机肥样品的测定

土壤和有机肥样品的处理基本依照孙刚^[19]的方法:称取 3.00 g 土样或猪、鸡粪样品 1.00 g 置于 50 mL 离心管,加入 10 mL 提取液,涡旋 1 min 后超声提取 10 min,于 4℃、4500 r/min 条件下离心 10 min,收取上清液;沉淀部分再加入 8 mL、6 mL 提取液重复以上提取过程两次,合并三次上清液,在 40℃ 下氮吹浓缩至 12 mL 左右。粪样提取上清液中加入 1 mL 10% 三氯乙酸溶液摇匀后,静置 30 min 后浓缩。固相萃取(SPE)小柱(土样只用 HLB 小柱、粪样用 SAX 小柱与 HLB 小柱串联)依次加入 5 mL 甲醇、5 mL 二次蒸馏水活化。土壤、有机肥提取液在真空条件下以流速约 1 mL/min 全部通过 SPE 小柱后,用 5 mL 5% 甲醇水溶液淋洗小柱,并真空抽干 10 min。以 5 mL 洗脱液洗脱小柱,收集该洗脱液并在 40℃ 下氮吹浓缩至 0.5 mL 以下,用混合流动相(0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇的体积比为 76-16-8)定容到 1 mL,过 0.22 μm 滤膜后转移至上机瓶,用 HPLC 测定 3 种抗生素含量。流动相和洗脱程序根据实验优化结果确定,流速为 1.0 mL/min、柱温为 25℃、检测波长为 355 nm、进样量为 20 μL。

1.4 数据处理

本研究采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS16.0 进行数据分析,数据间的差异显著性用 Duncan 新复极差法检验。

2 结果与分析

2.1 分析方法的优化

2.1.1 色谱仪参数的优化 TCs 的流动相一般由缓冲溶液与有机溶剂按一定比例混合组成,0.01 mol/L 草酸溶液是最常用的水相,乙腈和甲醇由于

紫外吸收较低,是最为常用的有机溶剂^[7,21]。已报道的 0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇比例有 75-25-0^[22]、79-10.5-10.5^[22]、76-19-5^[23]和 76-16-8^[19]。本实验用 OTC、TC 和 CTC 的加标浓度分别为 10、10 和 20 mg/L 的 TCs 混合标准溶液对这几种比例的流动相进行了比较。流动相中不含甲醇,OTC 和 TC 不能基线分离(图 1a);乙腈和甲醇同时做有机相且比例相同时,3 种抗生素分离效果较好但响应值较低(图 1b);乙腈和甲醇比例为 19:5 时,OTC 和 TC 的峰形较差(图 1c);乙腈和甲醇比例为 2:1 时能实现两者的互补,3 种抗生素信号峰分离清晰且响应值较高。所以选择三者比例为 76-16-8 的流动相用于 HPLC 的测定。

利用 0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇(体积比为 76-16-8)等度洗脱,加标土壤样品中的目标峰无干扰且所有成分可在 12 min 内能够全部洗出(图 2A、图 2B、图 2C);而畜禽粪便样品由于成分更加复杂,蛋白质、碳水化合物、脂肪和各种无机组分等杂质干扰较大^[24],采用同样方式洗脱,目标组分虽然在 12 min 内全部出现,但在进样 30 min 后仍有杂质峰不断出现,表明在目标成分洗出后,需要提高流动相对非极性成分的洗脱能力来加快色谱柱的清洗,减少对下一个样品带来的干扰。因此,进行了几个梯度洗脱程序的预试验,最后确定的洗脱程序为:0~12 min,16% 乙腈+8% 甲醇;12~16 min,25% 乙腈+15% 甲醇;16~30 min,16% 乙腈+8% 甲醇(图 2B)。

2.1.2 土壤和有机肥样品萃取方法的优化

1) 提取液的确定 本研究对比了 0.1 mol/L 的 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(以下简称缓冲溶液)、缓冲溶液/甲醇等体积混合和缓冲溶液/丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)等体积混合(图 3 中依次用 A、B 和 C 表示,每种提取液做 4 次重复)对提取效率的影响。结果表明,缓冲溶液中加入甲醇或者丙酮都可以显著提高土壤中 OTC、TC 和 CTC 的回收率,加入甲醇可分别提高 15.6、13.2 和 16.3 个百分点,加入丙酮可分别提高 16.7、24.6 和 20.0 个百分点。加入甲醇和丙酮的提取效果相差不大,但由于提取液中加入的有机溶剂需要在上柱之前采用氮吹浓缩法除去,因此有机溶剂的挥发特性大大影响着浓缩过程的快慢。丙酮的挥发性明显强于甲醇,且极性比甲醇弱,对腐植酸的溶解性也较小^[25],因此选择在提取液中加入等体积丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)作为优化的提取缓冲液。

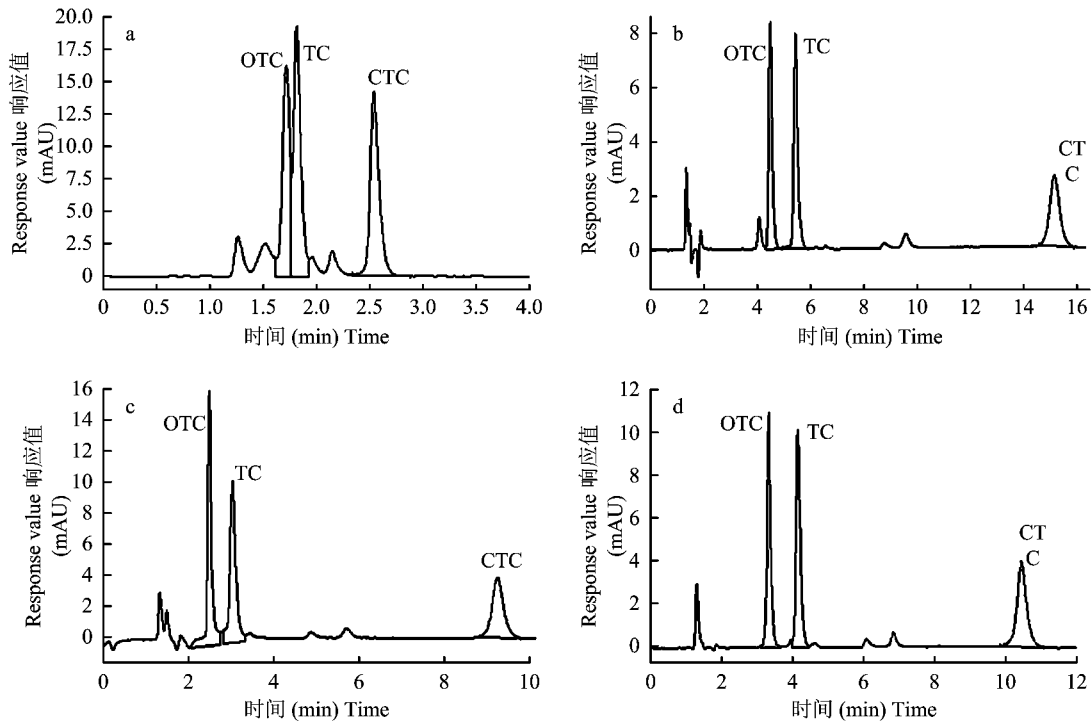


图1 不同流动相比比例 TCs 标准溶液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of tetracyclines obtained in 4 kinds of mobile phases

[注(Note): a—0.01 mol/L 的草酸溶液/乙腈 = 70/30 0.01 mol/L dicarboxyl-acetonitril (V/V = 70/30); b—0.01 mol/L 的草酸溶液/乙腈/甲醇 = 79/10.5/10.5 0.01 mol/L dicarboxyl-acetonitril-methanol (V/V/V = 79/10.5/10.5); c—0.01 mol/L 的草酸溶液/乙腈/甲醇 = 76/19/5 0.01 mol/L dicarboxyl-acetonitril-methanol (V/V/V = 76/19/5); d—0.01 mol/L 的草酸溶液/乙腈/甲醇 = 76/16/8 0.01 mol/L dicarboxyl-acetonitril-methanol (V/V/V = 76/16/8) .]

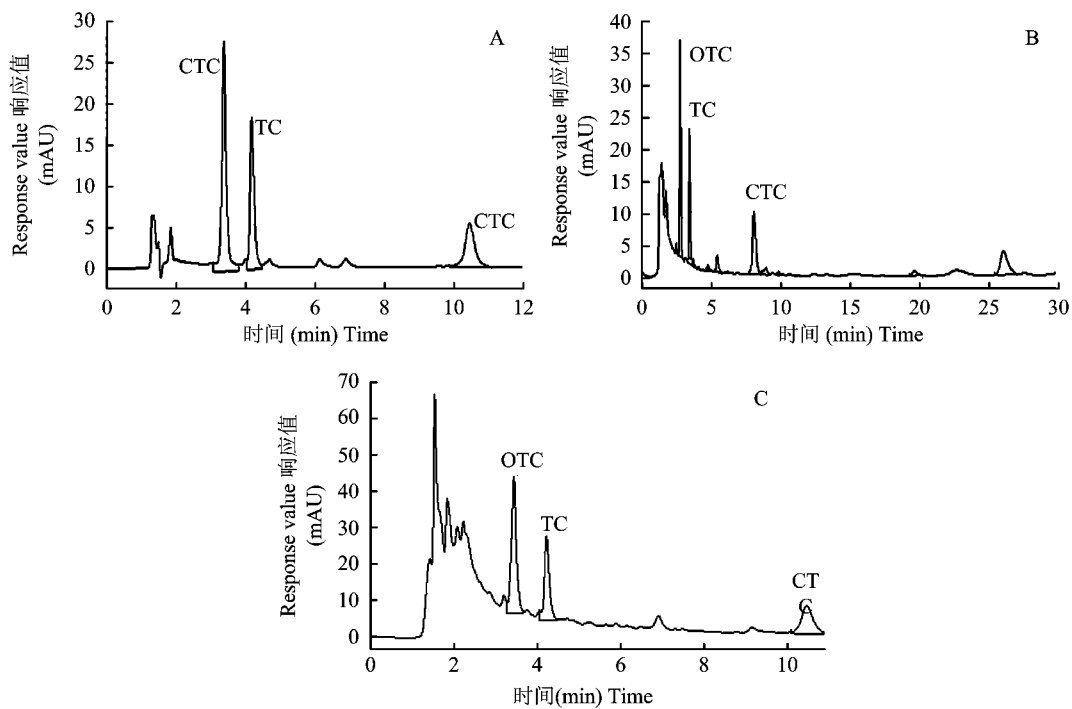


图2 加标土壤、粪样的 TCs 色谱图

Fig.2 Chromatograms of tetracyclines in spiked soil and manure samples

[注(Note): A—土壤样品 Soil sample; B—猪粪样品 Swine manure sample; C—鸡粪样品 Chicken manure sample.]

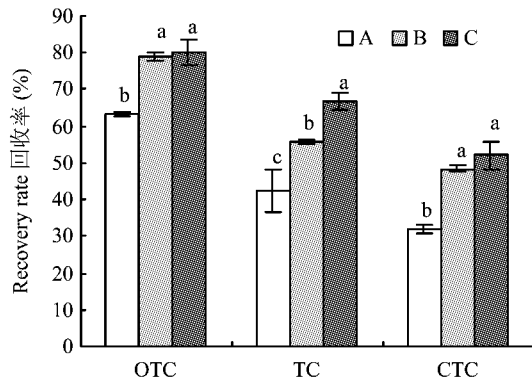


图3 不同提取液对土壤中 TCs 的提取效率

Fig.3 Recoveries of tetracyclines extracted with different buffer solutions in soils

[注(Note): A—0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine buffer solution; B—0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液/甲醇等体积混合 Equivalent volume mixture of 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine buffer solution and methanol; C—0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液与丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)等体积混合 Equivalent volume mixture of 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine buffer solution and acetone (containing 20% of 0.01 mol/L dicarboxyl in methanol). 柱上不同字母表示不同提取液间提取效率在 5% 水平差异显著 Different letters above the bars mean significant at the 5% level.]

用加入等体积丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)的缓冲溶液提取猪粪和鸡粪中的 TCs,也取得了良好的效果,回收率分别达到 61.2%~94.2% 和 69.9%~81.8%。

2) 洗脱液的选择 本实验对比了 0.01 mol/L 草酸甲醇和丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)两种洗脱液的效果(图 4)。前者的 OTC、TC 和 CTC 回收率分别为 96.0%、90.8% 和 91.6%, 后者的回收率分别为 99.1%、98.4% 和 91.3%, 两者差异不明显。但是丙酮的极性比甲醇小,对腐殖质等

有机物杂质的溶解性小^[23],可以减少土壤中有机质等杂质的干扰。且丙酮洗脱液浓缩所用的时间要明显少于前者,故选择丙酮(含 20% 0.01 mol/L 草酸甲醇)作为洗脱液。

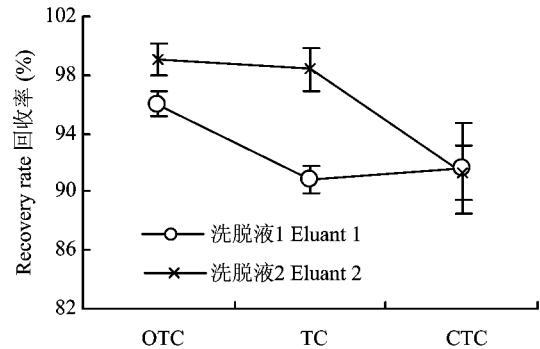


图4 不同洗脱液的效果比较

Fig.4 Recoveries of two styles of eluant

[注(Note): 洗脱液 1 为 0.01 mol/L 草酸甲醇 Eluant 1 was 0.01 mol/L dicarboxyl in methanol; 洗脱液 2 为丙酮(含 20% 0.01 mol/L 草酸甲醇) Eluant 2 was acetone (containing 20% of 0.01 mol/L dicarboxyl in methanol.)]

2.1.3 线性回归分析、回收率以及检出限 配制系列浓度混合标准溶液,得 3 种 TCs 的响应面积(y)与浓度(x)均呈现出良好的线性关系($R^2 > 0.999$),分别以 3 倍和 10 倍信噪比求得检出限和定量限,结果见表 1。将 0.5 mg/L 和 2.0 mg/L 的标准溶液分别连续进样 6 次,3 种 TCs 的保留时间和峰面积相对标准偏差(RSD)均在 0.6% 以下,重现性较好。

称取 3 g 土样(取自连续多年未施有机肥的菜田)和 1 g 畜禽粪肥(经高温堆肥和暴晒处理),各加入 1 mL 的 TCs 混合标准工作溶液,静置 12 h 以上,采用 1.4 所述方法进行样品前处理及测定,重复 3 次。结果表明,土壤样品的添加回收率在 52.1%~

表1 3种 TCs 的线性回归分析、检出限、定量限和回收率

Table 1 Linear correction equation, LOD, LOQ and recovery rate of three tetracyclines

抗生素 Antibiotic	线性方程 Linear equation	R^2	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery rate(%)		
					土壤 Soil	猪粪 Swine manure	鸡粪 Chicken manure
OTC	$y = 34.6611 * x - 0.1713$	0.9999	7	25	80.1 \pm 3.5	94.2 \pm 9.7	81.8 \pm 9.0
TC	$y = 34.2408 * x - 0.0136$	0.9998	7	25	67.0 \pm 2.4	61.2 \pm 8.3	73.5 \pm 3.0
CTC	$y = 15.2184 * x + 0.1177$	1.0000	18	60	52.1 \pm 3.8	68.5 \pm 11.7	69.9 \pm 7.5

注(Note): 土壤、猪粪和鸡粪中 OTC、TC 和 CTC 的加标浓度分别为 10、10 和 20 mg/L The spiking levels of OTC, TC and CTC in soil, swine manure and chicken manure are 10, 10 and 20 mg/L, respectively. LOD—Limit of Detection; LOQ—Limit of quantification.

80.1%之间,猪粪和鸡粪的添加回收率在61.2%~94.2%和69.9%~81.8%之间,与他人^[12,19,22]的研究结果相近。

2.2 土壤和有机肥样品的测定结果

利用上述优化后的分析方法,对天津市蔬菜种植基地的25个土壤样品及其附近9个规模化养猪(鸡)场的粪样和4种商品有机肥进行了检测。

2.2.1 畜禽粪便和商品有机肥的抗生素残留初步调查结果 由表2可以看出,所调查的天津9个养殖场粪样均检测到不同水平的TCs残留,但所含的种

类和残留水平差异很大。有3个样品同时检测到了3种抗生素,2个样品同时检测到了2种,4个样品只检测到了1种。检出率以CTC最高,达到78%,OTC和TC均为56%。OTC残留水平从小于检出限(LOD)~34.8 mg/kg(干基,以下粪样都为干基),中间值7.3 mg/kg;TC从小于检出限(LOD)~22.7 mg/kg,中间值1.5 mg/kg;CTC从小于检出限(LOD)~563.8 mg/kg,中间值6.4 mg/kg。残留最高的样品来自武清石各庄镇的肉鸡粪,OTC、TC和CTC残留分别高达16.2、22.7和563.8 mg/kg;在

表2 畜禽粪便和商品有机肥中TCs的残留情况
Table 2 Tetracyclines residues of animal manure and commercial organic fertilizers

取样地点 Surveyed site	养殖规模 Farm scale (No.)	粪样来源 Animal source	含水量 Moisture (%)	TCs 含量 Residual level (mg/kg, dry basis)			
				OTC	TC	CTC	∑TCs
天津西青区辛口镇 Xinkou Town, Xiqing Dist. Tianjin	8000	蛋鸡 Hen	75.9	3.65 ± 0.58	9.53 ± 0.10	2.90 ± 0.07	16.08
天津西青区 Xiqing Tianjin	50000	蛋鸡 Hen	74.9	nd	3.09 ± 0.13	6.37 ± 0.34	9.46
天津农学院养殖场 Farm of TAU	20000	蛋鸡 Hen	78.9	nd	3.58 ± 0.35	nd	3.58
天津静海县独流乡 Duliu Town, Jinghai Dist. Tianjin	4600	蛋鸡 Hen	76.5	nd	nd	2.10 ± 0.47	2.10
天津武清区石各庄镇 Shigezhuang Town, Wuqing Dist. Tianjin	6000	肉鸡 Broiler	73.8	16.19 ± 0.49	22.67 ± 0.66	563.82 ± 13.94	602.68
天津西青区辛口镇 Xinkou Town, Xiqing Dist. Tianjin	100	猪 Swine	78.7	34.78 ± 1.17	1.45 ± 0.24	15.15 ± 1.05	51.39
天津静海县独流乡 Duliu Town, Jinghai Dist. Tianjin	100	猪 Swine	72.6	7.26 ± 0.28	nd	nd	7.26
天津西青区程翔养殖场 Chengxiang Farm, Xiqing Dist. Tianjin	1000	猪 Swine	73.1	nd	nd	7.26 ± 0.33	7.26
天津武清区石各庄镇 Shigezhuang Town, Wuqing Dist. Tianjin	90	猪 Swine	66.0	14.29 ± 0.25	nd	157.92 ± 14.03	172.20
辽宁 Liaoning Province	—	商品鸡粪 Comm. chicken manure	24.5	2.23 ± 0.25	nd	7.65 ± 0.47	9.88
江苏 Jiangsu Province	—	商品猪粪 Comm. swine manure	25.6	6.59 ± 0.38	nd	17.49 ± 2.12	24.09
江苏 Jiangsu Province	—	商品猪粪 Comm. swine manure	27.8	1.33 ± 0.14	0.87 ± 0.03	4.51 ± 0.88	6.71
江苏 Jiangsu Province	—	商品猪粪 Comm. swine manure	12.0	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	1.07 ± 0.08	1.44

注(Note): nd—未检出 Not detectable

该镇采集的猪粪也测到了很高的 OTC 和 CTC,残留水平分别高达 14.3 和 157.9 mg/kg。与肉鸡粪和猪粪相比,蛋鸡粪便中的抗生素残留水平虽然在不同养殖场的样品中残留差异较大,但相对较低。

在检测的 4 个商品有机肥样品中,有 2 个同时检测到 3 种 TCs,2 个检测到 2 种,OTC 和 CTC 的检出率为 100%,TC 的检出率也在 50%。OTC、TC 和 CTC 平均残留分别为 2.6、0.3 和 7.7 mg/kg,CTC 的平均水平高于集约化养殖场的畜禽粪便中检测的中间值。

2.2.2 土壤调查结果 土壤调查结果见表 3。从表 3 可以看出,3 个很少施用有机肥的粮田土壤样品均未检测到抗生素的残留。22 个菜田土壤样品中,有 14 个样品中检测到了不同程度的抗生素污染,检出率为 64%。有 6 个样品 TCs 的总量超过欧盟规定的土壤抗生素残留的生态安全触发线(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[26]。TC 在 8 个菜地土壤中检出,最高残留量为 196.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (风干基,以下土壤样品均为风干基);CTC 在 7 个菜地土壤中检出,最高达到 477.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;OTC 在 4 个菜地土壤中检出,最高达到 105.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。菜田土壤中 3 种抗生素的检出率大小顺序为 TC(36%) > CTC(32%) > OTC(18%)。

从三种蔬菜栽培方式看,10 个温室土壤样品有 6 个检测到 TCs,检出率为 60%;6 个大棚土壤样品中有 4 个检测到 TCs,检出率为 67%;6 个露地菜田土壤样品有 5 个检测到 TCs,检出率为 83%。TCs 总量超过生态安全触发线的 6 个样品中有 5 个出自温室和大棚土壤,1 个来自于露地土壤。

比较不同种植年限的土壤结果显示,11 个种菜历史在 5 年以内的土壤样品,有 7 个检测到了 TCs,检出率为 64%,其中有 2 个检测到了 OTC,4 个检测出了 TC,3 个检测出了 CTC,OTC、TC 和 CTC 残留量平均分别为 12.5、26.9 和 67.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。9 个种菜历史在 10~19 年的土壤样品中,有 7 个检测到 TCs,检出率为 78%,其中有 2 个检测到了 OTC,3 个检测出了 TC,3 个检测出了 CTC,OTC、TC 和 CTC 残留量平均分别为 7.4、37.9 和 37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 3 还显示,菜地中的抗生素残留呈现一定的地域性,西青区辛口镇的 7 个样品中均检出 TCs,而在其它几个镇的检出率就很低。但由于对具体施肥数量和来源调查不全,尚不能明确施肥数量和来源对土壤残留水平的影响。

3 讨论

3.1 优化分析方法的可靠性和实用性

因为菜地土壤和有机肥中成分复杂,腐殖酸类、磷脂类非极性有机成分多,对四环素类极性小分子的吸附强^[27-29],所以 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液用于土壤 TCs 的提取回收率较低,特别是对 CTC 的回收效率一般低于 50%^[30-31]。李彦文等^[20]对缓冲液进行了改进,在缓冲液中加入等体积甲醇以提高溶液的非极性,CTC 的回收率提高到 75%,但由于样品过柱前去除甲醇需要的时间过长,不适宜大量样品的提取。本研究对前处理和测定方法优化后,土壤、猪粪和鸡粪样品中 TCs 回收率分别在 52.1%~80.1%、61.2%~94.2% 和 69.9%~81.8 之间,特别是金霉素的回收率大大高于同类报道,因此,这一优化方法不仅耗时短,而且回收效率高,为样品的准确和批量分析提供了基础。

3.2 天津地区集约化养殖场产生的粪便中 TCs 残留状况

在天津调查的 9 个有机肥样品中,均检出了 TCs 的残留,但检出率和残留水平差异较大。集约化养殖场的粪样中 CTC 检出率达到 78%,中间值为 6.4 mg/kg,最高值达到 563.8 mg/kg;OTC 和 TC 的检出率也高达 56%,中间值分别达到 7.3 和 1.5 mg/kg,最高值达到 34.8 和 22.7 mg/kg。天津市的集约养殖场畜禽粪便中 CTC 残留水平最高,OTC 和 TC 残留水平接近。我国 7 个省、市的典型规模化养殖场猪粪中 OTC、TC 和 CTC 的平均含量分别为 9.1、5.2 和 3.6 mg/kg,鸡粪中的平均含量分别为 6.0、2.6 和 1.4 mg/kg^[30]。北京市猪粪中 TC、OTC 和 CTC 的平均含量分别为 19.3、12.5 和 15.7 mg/kg,鸡粪中相应含量分别为 9.9、4.2 和 3.7 mg/kg^[30]。沈阳鸡粪和猪粪中检测到的 OTC 含量分别为 69.5 和 127.1 mg/kg^[31]。刘新程^[14]对江苏 181 个有机肥样品的检测表明,CTC 的检出率最高,为 38.0%,OTC 为 16.6%。浙江省 155 个代表性畜禽粪样(包括 93 个猪粪样,31 个鸡粪样,18 个鸭粪样和 13 个牛粪样)TC、OTC 和 CTC 抗生素的残留含量分别在 0~16.8、0~29.6 和 0~11.6 mg/kg 之间,平均残留含量为 OTC(5.1 mg/kg) > CTC(2.2 mg/kg) > TC(2.0 mg/kg)^[13]。总的来讲,3 种抗生素的检出率均较高,同一个样品中经常可以同时检测到 2 到 3 种 TCs。虽然有的粪样检测不到抗生素残留,但残留水平高达数十甚至数百个 mg/kg 水

表 3 天津土壤样品 TCs 残留情况
Table 3 Tetracyclines residual levels in soil samples of Tianjin

调查点 Surveyed site	栽培方式 Land use pattern	种菜历史 Years for vegetable prod. (a)	有机肥种类 Manure source	有机肥用量 Manure appl. rate (m^3/hm^2)	距基施时间 Days after basal application (d)	TCs 含量 Residual level ($\mu\text{g}/\text{kg}$, dry basis)			
						OTC	TC	CTC	
						OTC	TC	CTC	ΣTCs
北辰区上河头镇 SHT, BC	温室菜田 VFG with wall	10	牛粪 + 鸡粪 Cattle + chicken manure	93 + 132	—	nd	nd	nd	nd
北辰区青光镇 QG, BC	温室菜田 VFG with wall	3	鸡粪 + 猪粪 Chicken + swine manure	133.5	110	nd	nd	nd	nd
北辰区青光镇 QG, BC	温室菜田 VFG with wall	2	牛粪 + 鸡粪 Cattle + chicken manure	75 + 75	150	nd	35.9 ± 2.1	179.0 ± 15.6	214.9
北辰区青光镇 QG, BC	粮田 Grain field	0	—	0	—	nd	nd	nd	nd
北辰区青光镇 QG, BC	露地菜田 Open vegetable field	2	—	—	—	nd	43.9 ± 3.8	477.8 ± 14.4	521.7
静海县独流乡 DL, JH	温室菜田 VFG with wall	20	牛粪 + 鸡粪 Cattle + chicken manure	100.5	120	nd	nd	nd	nd
静海县独流乡 DL, JH	露地菜田 Open vegetable field	27	鸡粪 Chicken manure	90	30	nd	nd	nd	nd
静海县独流乡 DL, JH	粮田 Grain field	0	—	0	—	nd	nd	nd	nd
武清区大孟庄镇 DMZ, WQ	温室菜田 VFG with wall	10	鸡粪 Chicken manure	90	180	nd	nd	nd	nd
武清区大孟庄镇 DMZ, WQ	露地菜田 Open vegetable field	10	鸡粪 Chicken manure	90	80	32.0 ± 1.2	nd	nd	32.0
武清区大孟庄镇 DMZ, WQ	粮田 Grain field	0	—	0	—	nd	nd	nd	nd
武清区石各庄镇 SGZ, WQ	温室菜田 VFG with wall	1	鸡粪 + 猪粪 Chicken + swine manure	37.5 + 37.5	—	nd	nd	nd	nd
武清区石各庄镇 SGZ, WQ	露地菜田 Open vegetable field	1	鸡粪 + 猪粪 Chicken + swine manure	120	—	nd	22.5 ± 2.1	61.3 ± 3.3	83.8
武清区石各庄镇 SGZ, WQ	温室菜田 VFG with wall	2	牛粪 + 鸡粪 Cattle & chicken manure	75 ~ 90	50	105.6 ± 7.9	147.0 ± 11.3	nd	252.5

续表 3 Table 3 continuous

调查点 Surveyed site	栽培方式 Land use pattern	种菜历史 Years for vegetable prod. (a)	有机肥种类 Manure source	有机肥用量 Manure appl. rate (m^3/hm^2)	距基施时间 Days after basal application (d)	TCs 含量 Residual level ($\mu\text{g}/\text{kg}$, dry basis)			
						OTC	TC	CTC	
						ΣTCs			
天津农科院基地 Farm of TAAS	露地菜田 Open vegetable field	1	鸡粪 Chicken manure	93.75	—	nd	46.1 ± 1.6	nd	46.1
天津农科院基地 Farm of TAAS	大棚菜田 VFG without wall	1	鸡粪 Chicken manure	93.75	—	nd	nd	nd	nd
天津农科院基地 Farm of TAAS	大棚菜田 VFG without wall	1	鸡粪 Chicken manure	93.75	—	nd	nd	nd	nd
天津农科院基地 Farm of TAAS	温室菜田 VFG with wall	1	鸡粪 Chicken manure	93.75	—	nd	nd	20.9 ± 1.4	20.9
西青区辛口镇 XK, XQ	温室菜田 VFG with wall	12	鸡粪 Chicken manure	150	90	nd	nd	144.9 ± 4.4	144.9
西青区辛口镇 XK, XQ	温室菜田 VFG with wall	16	鸡粪 Chicken manure	100.5	90	34.3 ± 1.7	nd	47.9 ± 3.0	82.2
西青区辛口镇 XK, XQ	大棚菜田 VFG without wall	4	鸡粪 Chicken manure	150	90	32.0 ± 4.2	nd	nd	32.0
西青区辛口镇 XK, XQ	大棚菜田 VFG without wall	13	—	—	—	nd	89.7 ± 2.4	nd	89.7
西青区辛口镇 XK, XQ	露地菜田 Open vegetable field	13	—	—	—	nd	54.7 ± 0.4	nd	54.7
西青区辛口镇 XK, XQ	大棚菜田 VFG without wall	13	—	—	—	nd	196.7 ± 4.7	nd	196.7
西青区辛口镇 XK, XQ	大棚菜田 VFG without wall	13	—	—	—	nd	nd	145.0 ± 7.1	145.0

注(Notes): SHT, BC—Shanghetou Town, Beichen District; QC, BC—Qingguang Town, Beichen District; DL, JH—Duliu Town, Jinghai District; DMZ, WQ—Damengzhuang Town, Wuqing District; SGZ, WQ—Slingszhuang Town, Wuqing District; XK, XQ—Xinkou Town, Xiqing District; VFG—Vegetable field in greenhouse. nd—未检出 Not detectable; “—”表示无该数据或不详 No information.

平的样本也时常可以检测到,这与我们在天津的调查分析是一致的。

在天津不同来源的有机肥调查结果中,没有发现 TCs 的残留水平和残留的种类与养殖动物种类、养殖规模之间的关系,即使在相同村镇,差异也很大。单英杰对 155 个规模化养殖场的调查结果表明,猪粪中抗生素含量高于其他畜禽粪,牛粪和鸡粪中 CTC 含量较高,猪粪中 OTC 含量较高^[32]。本研究在天津调查的样品中,只有肉鸡粪中 3 种抗生素水平都远高于其它来源(包括蛋鸡粪和猪粪样品),没有显示出猪粪明显高于鸡粪。鸡粪中所含 OTC 的降解主要受微生物及 OTC 初始浓度的影响^[33-34]。避光条件下,鸡粪中 OTC 的初始浓度为 10、20 和 40 mg/kg 时,OTC 降解半衰期分别为 55.5、123.8 和 173.3 d^[34]。孙刚等通过堆肥试验研究了 OTC、TC 和 CTC 在不同粪肥中的降解情况,结果表明 OTC 在鸡粪、猪粪和牛粪堆肥过程中的半衰期均约为 5 d,TC 和 CTC 在三种畜禽粪便堆肥中半衰期为 4~7 d 和 3~4 d^[19]。虽然两份研究报告的鸡粪中 OTC 的降解半衰期相差较大,可能是因为所设处理的初始浓度差异较大。但是随着堆放时间的延长,鸡粪中的 OTC 含量会降低。因此,畜禽粪样中的 TCs 含量在不同样品之间不存在可比性,而主要取决于取样时(或使用)距给药时间长短、所选择的抗生素种类及其用量,还有光照、温度等条件。

商品有机肥中的有机物料按照标准要求需经过严格、充分的高温堆腐过程。高温堆肥可以有效去除畜禽粪便中的 TCs,去除效率由大到小的顺序均为 TC > CTC > OTC^[30]。在天津调查的 4 个以集约化养殖场的鸡粪和猪粪为原料生产的商品有机肥样品中,依然检测出不同水平的 TCs 残留,OTC、TC 和 CTC 平均残留量分别为 2.6、0.3 和 7.7 mg/kg(干基),OTC 和 CTC 的平均水平高于集约化养殖场的畜禽粪便中检测的中间值,商品有机肥中的平均含量是 TC < CTC < OTC,与张树清^[30]的研究结果基本一致,但是仍有商品有机肥中的抗生素 TCs 高于 5 mg/kg。这可能是因为粪样中 TCs 的初始浓度较高,抑制了微生物的活性^[33-34]。四环素类药物的发光菌毒性研究表明,OTC 和 CTC 的 EC50 分别为 64.3 和 6.1 mg/L^[35],OTC 对底泥细菌的 EC50 值为 1.2 mg/L^[36]。从本研究调查的养殖场畜禽粪和国内的一些报道可以看出,有机物料中的 TCs 含量特别是 CTC 的含量 50% 以上超过 6.1 mg/L,因此就

不难理解,商品有机肥中仍残留相当数量的 TCs。此外,还有可能是商品有机肥生产过程中,有机物料的发酵不充分。因此,商品有机肥的使用仍有一定的安全隐患。

3.3 天津菜地土壤中的 TCs 残留状况

在天津共调查了 3 个粮田土壤样品、22 个菜地土壤样品,粮田样品中均未检测到抗生素的残留,而 22 个菜地土壤样品中有 14 个样品中检测到了不同程度的抗生素污染,检出率为 64%。根据有机肥施用情况调查(表 3),粮田土壤未施用有机肥,而菜田有机肥的年用量为 75~225 m³/hm²。在浙北地区的调查表明,施用畜禽粪肥的农田土壤中土霉素、四环素和金霉素残留水平分别是未施畜禽粪肥农田的 38、13 和 12 倍^[13]。因此,畜禽粪肥的大量使用是菜地中 TCs 残留的主要原因。

在检测的 3 种 TCs 中,OTC、TC 和 CTC 的检出率分别为 18%、36% 和 32%,最高残留量分别为 105.6、196.7 和 477.8 μg/kg,平均残留量分别为 9.3、28.9 和 48.9 μg/kg。这一调查结果与我国类似的报道接近,比如广州、深圳等地菜地土壤中 3 种四环素类单个化合物检出率为 19.4%~96.8%,平均含量为 9.6~44.1 μg/kg^[20];东莞长期使用养殖场粪肥的蔬菜基地土壤中 OTC 平均含量为 9.0 μg/kg,CTC 平均含量为 5.1 μg/kg^[37]。导致不同地区土壤调查结果差异明显的原因很多,既有有机肥本身残留水平的差异,也与不同作物、土壤施用有机肥数量差异巨大有关,与有机肥的分解速率以及抗生素在不同气候、土壤条件和微生物群系的积累特点也有关^[38]。奥地利的研究发现,虽然粪肥中 CTC、OTC 和 TC 含量分别高达 46、29 和 23 mg/kg,但施用该粪肥土壤中检测不到 OTC 和 TC,而 CTC 含量却高达 391 μg/kg^[39]。不同蔬菜根际理化特征也有差异,导致了根际微生物种群结构与功能不同,对不同抗生素的降解、吸收和积累特征不同^[40],同一基地种植不同蔬菜,土壤中检测出的 TCs 组成特征也会不同^[37]。由于 TCs 在我国养殖业中的使用普遍,虽然不同地区施用有机肥后土壤中 TCs 残留特征和残留水平不同,但是其检出率却普遍较高。

从三种蔬菜栽培方式看,TCs 总量超过生态安全触发线的 6 个土壤中有 5 个出自温室和大棚,说明有机肥带入土壤中的 TCs 在环境中的降解和迁移是十分活跃的。虽然 TCs 一般被视为持久性有机污染物,可能会在土壤中持久存在,并随时间的延长而不断的累积^[41],但不同种植年限土壤中的 TCs 含量

主要取决于当年或当季所使用粪肥中的残留状况。随着施用时间的延长,TCs 会逐渐降解,或通过地表径流、渗透、挥发等过程迁移出地表土壤。露地栽培方式的土壤中 TCs 相对于温室和大棚栽培较高的检出率和较低的残留水平有可能是因为 TCs 在露地土壤中的迁移和降解稍逊而导致的长期积累。鸡粪和猪粪中残留的 TCs 的降解途径主要为化学水解,在 TCs 不稳定的 A 环手性原子 C4 和 C 环 C6 的羟基易发生差向异构和降解反应^[42]。虽然有培养试验证明在鸡粪和猪粪培养前 50 d 左右,光照对 OTC 的降解率占了 20%^[31],但在实际生产中,光照很难穿透 5 cm 以下的土层,因此,光降解不是主要途径。有机肥中可溶性成分可随水移动,因此,极性强的 TCs 在露地土壤上更容易在表土层内积累。不同栽培方式下,微生物在施肥初期由于抗生素抑制作用,对抗生素的分解贡献率很小,但随着时间的延长,微生物对抗生素的分解作用逐步加强。土壤中微生物活性越强,抗生素降解速度越快^[38]。温室和大棚栽培条件下,全年温室内土壤温度较高,微生物的活性较高,对有机物的分解较快,吸附在有机质上的 TCs 被释放出来,进而被水解。而北方露地栽培在冬季、早春土壤温度一般低于 0℃,微生物的活性在此时很低,对有机质的分解能力因此减弱,TCs 有可能得以吸附于有机质上而免于被水解或淋洗。而且温室、大棚等设施菜地土壤的湿度一般比露地菜田的大,高温、高湿条件下更有利与抗生素的降解^[43],因此,虽然露地栽培方式的有机肥用量一般低于温室和大棚,其 TCs 的检出率仍有可能高于温室栽培。

本项调查中菜田土壤中抗生素的残留没有随种菜年限的延长而增加,种菜时间较短的土壤上 TCs 的残留比种菜历史较长的地块严重。这可能与种植历史较长的土壤上产生了对 TCs 抗性较强的微生物有关^[44-45]。此外,我国动物养殖过程中抗生素使用种类、数量也由于管理水平和养殖规模存在随机性,天津的鸡粪和猪粪样品残留的抗生素没有显示出一定的规律性,因此,使用该有机肥的土壤中残留的 TCs 种类也没有显示出与不同来源有机肥样品的一致性。由于此项调查的土壤均来自随机选取的农田,有机肥来源、有机肥质量以及种植作物个体性强,除了大体上看出抗生素的残留状况,尚不能得出施肥量、有机肥种类以及施用时间与 TCs 残留之间的关系。因此,从源头上控制进入土壤的 TCs 总量才是防治 TCs 残留的最好方法。

3.4 有机肥的施用风险

有机肥中残留的 TCs 在进入土壤后可能被作物直接吸收^[10,46-47],或通过诱导产生致病菌影响人体健康。紫花苜蓿可以主动吸收 OTC,致使 OTC 在其根部大量蓄积^[48]。小麦根系暴露于 OTC 下,具有抗生素抗性的人类机会致病菌 *Pseudomonas*、*Sphingomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属细菌检出率明显增加^[44]。设施菜田每年种植 2~3 茬,每公顷以鸡粪、猪粪、牛粪为主要成分的有机肥施入总量大多在 75000 kg 以上(湿基,按 60% 含水量计),其带入的 TCs 很有可能通过以上两个途径影响人体健康。如果按照欧盟规定的引发环境风险的土壤中抗生素含量 0.1 mg/kg 估算^[26],当有机肥中抗生素含量在 7.5 mg/kg(干基)以上时,由当季有机肥带入土壤中的抗生素就会超过生态安全触发线。从天津地区畜禽粪样及有机肥的调查结果看,OTC、TC 和 CTC 残留超过这个触发线的样品分别有 3 个、2 个和 3 个,单个化合物残留超标,粪肥样品数有 6 个(占调查总数的 46.2%)。若以调查的 CTC 最高残留量的鸡粪(563.8 mg/kg)估算,每公顷仅施用 997.5 kg 的有机肥就可能带来超过土壤生态风险触发线的 CTC 残留。从菜地土壤调查结果看,有 6 个土壤(占调查样品的 27.3%)其 TCs 总残留量超过触发生态风险的最低水平,有机肥带入土壤的 TCs 残留不容忽视。

目前,虽然已有一些关于 TCs 在畜禽粪和在土壤中降解特征的研究,但是有机肥-土壤-植物体系中抗生素的研究还不够系统,比如,由有机肥带入的抗生素与土壤中抗生素残留之间的关系;不同抗生素残留水平下作物对抗生素的吸收情况;畜禽粪肥施入土壤后给人类带来的健康风险以及有机肥的安全用量等方面还有待研究。

4 结论

1) 经优化比较,用 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液与丙酮(含 20% 的 0.01 mol/L 草酸甲醇)等体积混合作为提取液,丙酮(含 20% 0.01 mol/L 草酸甲醇)作为洗脱液,对土壤和有机肥中 TCs 的提取效率可达到 52%~95%。在液相色谱仪上进行样品测定时,适宜的流动相为 0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇(体积比为 76-16-8),土壤样品采用 0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇(体积比为 76-16-8)等度洗脱、有机肥样品采用以下梯度洗脱:0~12 min,16% 乙腈+8% 甲醇;

12 ~ 16 min, 25% 乙腈 + 15% 甲醇; 16 ~ 30 min, 16% 乙腈 + 8% 甲醇, 可实现三种化合物的较好分离和样品中所有成分的完全洗脱。

2) 天津集约化养殖场的畜禽粪中 CTC 检出率达到 78%, 中间值为 6.4 mg/kg, 最高值达到 563.8 mg/kg; OTC 和 TC 的检出率也高达 56%, 中间值分别为 7.3 和 1.5 mg/kg, 最高值达到 34.8 和 22.7 mg/kg。

3) 商品有机肥中同样存在 TCs 残留, 且三种抗生素的残留水平和检出率与养殖场相当, 商品有机肥的生态安全仍然是需要关注的。

4) 天津土壤样品中 TCs 的总检出率为 64%。三种抗生素中, OTC 检出率最低(18%), 最高值达到 105.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (风干基), 平均 9.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$; TC 检出率为 36%, 最高值达到 196.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均 28.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$; CTC 检出率为 32%, 最高值达到 477.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均 48.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。有 6 个菜田土壤样品(占调查样品的 27.3%) TCs 总量超过生态安全触发线, 存在一定的生态风险。

5) 天津菜田土壤中的 TCs 的残留主要由畜禽肥带来。本调查土壤中抗生素残留未随种菜年限延长而增加, 温室和大棚土壤的 TCs 残留水平高于露地土壤。

参考文献:

[1] 李兆君, 姚志鹏, 张杰, 梁永超. 兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(1): 15-20.
Li Z J, Yao Z P, Zhang J, Liang Y C. A review on fate and ecological toxicity of veterinary antibiotics in soil environments [J]. *Asian J. Ecotoxicol.*, 2008, 3(1): 15-20.

[2] 中华人民共和国农业部. 饲料药物添加剂施用规范(农业部公告第 168 号) [ED/OL]. <http://www.foodmate.net/law/qita/163454.html>, 2010-05-24.
The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China's. No. 168 Announcement-the specification of drug additive feed [ED/OL]. <http://www.foodmate.net/law/qita/163454.html>, 2010-05-24

[3] 杨海峰. 畜产品中抗生素残留的原因及危害[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(7): 19-20.
Yang H F. Causes and hazards of antibiotic residues in animal derived food[J]. *Chin. J. Animal Quarant.*, 2007, 24(7): 19-20.

[4] 王云鹏, 马越. 养殖业抗生素的使用及其潜在危害[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(9): 519-523.
Wang Y P, Ma Y. Potential public hazard of using antibiotics in livestock industry[J]. *Chin. J. Antibiot.*, 2008, 33(9): 519-

523.

[5] 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.

[6] Liguoro M D, Cibin V, Capolongo F *et al.* Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: Evaluation of transfer to manure and soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 52: 203-212.

[7] 胡献刚, 罗义, 周启星, 徐琳. 固相萃取高效液相色谱法测定畜牧粪便中 13 种抗生素药物残留[J]. 分析化学, 2008, 9(36): 1162-1166.
Hu X G, Luo Y, Zhou Q X, Xu L. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2008, 9(36): 1162-1166.

[8] Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, Nau H. 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.

[9] Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants [J]. *Chemosphere*, 2003, 52(7): 1233-1244.

[10] 姚圆, 莫测辉, 李彦文, 等. 固相萃取-高效液相色谱法分析蔬菜中四环素类抗生素[J]. 环境化学, 2010, 3: 536-541.
Yao Y, Mo C H, Li Y W *et al.* Determination of tetracyclines in vegetables using solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection [J]. *Environ. Chem.*, 2010, 29(3): 536-541.

[11] 周启星, 孔繁翔, 朱琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
Zhou Q X, Kong F X, Zhu L. *Ecotoxicology* [M]. Beijing: Science Press, 2004.

[12] 刘虹, 张国平, 刘丛强. 固相萃取-色谱测定水、沉淀物及土壤中氯霉素和 3 种四环素类抗生素[J]. 分析化学, 2007, 3: 315-319.
Liu H, Zhang G P, Liu C Q. Determination of chloramphenicol and three tetracyclines by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2007, 3: 315-319.

[13] 张慧敏, 章明奎, 顾国平. 浙北地区畜禽粪便和农田土壤中四环素类抗生素残留[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24(3): 69-73.
Zhang H M, Zhang M J, Gu G P. Residues of tetracyclines in livestock and poultry manures and agricultural soils from north Zhejiang province[J]. *J. Ecol. Rural Environ.*, 2008, 24(3): 69-73.

[14] 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, 72(3): 1177-1182.
Liu X C, Dong Y H, Wang H. Residues of tetracyclines in

- animal manure from intensive farm in Jiangsu province[J]. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2008, 72(3): 1177-1182.
- [15] 尹春艳, 骆永明, 滕应, 等. 典型设施菜地土壤抗生素污染特征与积累规律研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(8): 2810-2816.
- Yin C Y, Luo Y M, Teng Y *et al.* Pollution characteristics and accumulation of antibiotics in typical protected vegetable soils[J]. *Chin. J. Envir. Sci.*, 2012, 33(8): 2810-2816.
- [16] GB/T20764-2006. 可食动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定—液相色谱—紫外检测法[S]. GB/T20764-2006.
- Method for the determination of oxytetracycline, tetracycline chlortetracycline and doxycycline residues in edible animal muscles HPLC-UV detection method[S]. GB/T20764-2006.
- [17] 吉彩霓, 岳振峰, 谢丽琪, 等. 高效液相色谱法同时检测水产品中7种四环素类抗生素残留的研究[J]. *中国兽医科技*, 2005, 35(10): 820-826.
- Ji C N, Yue Z F, Xie L Q *et al.* Study on simultaneous detection of 7 tetracyclines residues in aquatic products by high performance liquid chromatography[J]. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.*, 2005, 35(10): 820-826.
- [18] 岳振峰, 秋月明, 林秀云, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中四环素类抗生素及其代谢产物[J]. *分析化学*, 2006, 9: 1255-1259.
- Yue Z F, Qiu Y M, Lin X Y *et al.* Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2006, 9: 1255-1259.
- [19] 孙刚, 袁守军, 彭书传, 等. 固相萃取—高效液相色谱法测定畜禽粪便中的土霉素、金霉素和四环素[J]. *环境化学*, 2010, 29(4): 739-743.
- Sun G, Yuan S J, Peng S C *et al.* Determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in manure by SPE-HPLC method[J]. *Environ. Chem.*, 2010, 29(4): 739-743.
- [20] 李彦文, 莫测辉, 赵娜, 等. 菜地土壤中磺胺类和四环素类抗生素污染特征研究[J]. *环境科学*, 2009, 6(30): 1762-1766.
- Li Y W, Mo C H, Zhao N *et al.* Investigation of sulfonamides and tetracyclines antibiotics in soils from various vegetable fields[J]. *Chin. J. Envir. Sci.*, 2009, 6(30): 1762-1766.
- [21] 王蕾, 徐智秀, 张孝松, 邵学广. 反相高效液相色谱法快速测定7种四环素类抗生素[J]. *分析化学*, 2003, 1: 52-54.
- Wang L, Xu Z X, Zhang, Shao X G. Rapid determination of 7 tetracyclines by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2003, 1: 52-54.
- [22] 李玲玲, 黄利东, 霍嘉恒, 等. 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[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(5): 1176-1182.
- Li L L, Huang L D, Huo J H *et al.* Method optimization for determination of tetracyclines in soils and compost and their degradation in soils[J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2010, 16(5): 1176-1182.
- [23] 唐春玲, 张文清, 夏玮, 等. 固相萃取—高效液相色谱法测定有机肥中四环素类抗生素药物残留[J]. *中国土壤与肥料*, 2011, 2: 92-95.
- Tang C L, Zhang W Q, Xia W *et al.* Determination of tetracycline antibiotic residues in organic manure by SPE-HPLC[J]. *China Soils Fert.*, 2011, 2: 92-95.
- [24] Loftin K A, Henny C, Adams C D *et al.* Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate[J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, 24(4): 782-788.
- [25] Li N, Lee H K. Tandem-cartridge solid-phase extraction followed by GC/MS analysis for measuring partition coefficients of association of polycyclic aromatic hydrocarbons to humic acid[J]. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 3077-3084.
- [26] Karcl A, Balçoğlu I A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey[J]. *Sci. Totle Environ*, 2009, 407(16): 4652-4664
- [27] Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods[J]. *J. Chromatogr. A*, 2000, 882: 109-133.
- [28] Rabølle M, Spliid N H. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline, and tylosin in soil[J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 715-722.
- [29] Figueira R A, Mackay A A. Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide-rich soils[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39(17): 6664-6671.
- [30] 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 等. 规模化养殖畜禽粪主要有害成分测定分析研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(6): 822-829.
- Zhang S Q, Zhang F D, Liu X M *et al.* Determination and analysis on main harmful composition in excrement of scale livestock and poultry feedlots[J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2005, 11(6): 822-829.
- [31] 张健, 关连珠, 颜丽. 鸡粪与猪粪所含土霉素在土壤中的降解的动态变化及原因分析[J]. *环境科学*, 2012, 33(1): 323-328.
- Zhang J, Guang L Z, Yan L. Dynamics of degradation of oxytetracycline of pig and chicken manures in soil and mechanism investigation[J]. *Chin. J. Envir. Sci.*, 2012, 33(1): 323-328.
- [32] 单英杰, 章明奎. 不同来源畜禽粪的养分和污染物组成[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(1): 80-86.
- Shan Y J, Zhang M J. Contents of nutrient elements and pollutants in different sources of animal manures[J]. *Chin. J. Eco-Agric.*, 2012, 20(1): 80-86.
- [33] 匡光伟, 孙志良, 陈小军, 等. 四环素类抗菌药物在鸡粪中的降解研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(5): 1784-1788.
- Kuang G W, Sun Z L, Chen X J *et al.* Degradation of

- tetracyclines in chicken feces[J]. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2007, 26(5): 1784-1788.
- [34] 王志强, 韩艳, 张斌. 土霉素在鸡粪中的残留及降解规律研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(10): 2124-2129.
Wang Z Q, Han Y, Zhang B. Residue and degradation of oxytetracycline in chicken feces [J]. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2011, 30(10): 2124-2129.
- [35] 张劲强, 梁言, 董元华, 黄铭洪. 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 J Q, Liang Y, Dong Y H, Huang M H. Toxicity of tetracyclines and their epi-isomers on the luminescent bacterium [J]. *J. Health Toxicol.*, 2006, 20(5): 279-281.
- [36] Halling-Sørensen B, Nielsen S N, Lanzky P F. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2): 357-393.
- [37] 邵义萍, 莫测辉, 李彦文, 等. 长期施用粪肥菜地土壤中四环素类抗生素的含量与分布特征[J]. *环境科学*, 2011, 32(4): 1182-1187.
Tai Y P, Mo C H, Li Y W *et al.* Concentrations and distribution of tetracycline antibiotics in vegetable field soil chronically fertilized with manures [J]. *Chin. J. Envir. Sci.*, 2011, 32(4): 1182-1187.
- [38] 沈颖, 魏源送, 郑嘉熹, 等. 猪粪中四环素类抗生素残留物的生物降解[J]. *过程工程学报*, 2009, 9(5): 962-967.
Chen Y, Wei Y S, Zheng J X *et al.* Biodegradation of tetracycline antibiotics residues in swine manure [J]. *Chin. J. Proc. Eng.*, 2009, 9(5): 962-967.
- [39] Marti'nez-Carballo E, Gonza'lez-Barreiro C, Scharf S, Gans O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria [J]. *Environ. Pollut.*, 2007, 148: 570-579.
- [40] Cai Q Y, Mo C H, Zeng Q Y *et al.* Potential of *Ipomoea aquatica* cultivars in phytoremediation of soils contaminated with di-n-butyl phthalate [J]. *Environ. Exp. Bot.*, 2008, 62: 205-211.
- [41] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. *Chemosphere*, 2006, 62: 725-759.
- [42] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
Li J S, Qiu Y M, Wang C. Analysis of veterinary drug residues [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2002.
- [43] Wang Q Q, Yates S R. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 56(5): 1683-1688.
- [44] 张昊, 张利兰, 王佳, 等. 土霉素暴露对小麦根际抗生素抗性细菌及土壤酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(2): 508-516.
Zhang H, Zhang L L, Wang J *et al.* Influence of oxytetracycline exposure on antibiotic resistant bacteria and enzyme activities in wheat rhizosphere soil [J]. *Acta Ecol. Sin.*, 2012, 32(2): 508-516.
- [45] 麻万诸, 章明奎. 土霉素对猪粪污染土壤微生物数量和酶活性的影响研究 [J]. *现代农业科技*, 2010, (8): 290-292, 303.
Ma W Z, Zhang M K. Effect research of oxytetracycline on microorganisms number and enzyme activity in soil affected by pig manure [J]. *Mod. Agric. Sci. Technol.*, 2010, (8): 290-292, 303.
- [46] Kumar K, Gupta, S C, Baidoo S K *et al.* Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure [J]. *J. Envir. Qual.*, 2005, 34, 2082-2085.
- [47] Boxall A B A, Johnson P, Smith E J *et al.* Uptake of veterinary medicines from soils into plants [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(6): 2288-2297.
- [48] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(1): 2-9.
Kong W D, Zhu Y G. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes [J]. *Asian J. Ecotoxicol.*, 2007, 2(1): 2-9.