

制药废水中头孢类抗生素残留检测方法与环境风险评估

汤薪瑶,左剑恶*,余忻,杨波,王凯军 (清华大学环境学院,环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京100084)

摘要:基于固相萃取-超高效液相色谱-两级串联质谱(SPE-UPLC/MS/MS)技术,建立了制药废水中头孢克洛、头孢曲松、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢西丁、头孢噻吩和头孢拉定共9种头孢类抗生素的测试方法,定量限为27.5~131.8ng/L,目标物回收率为72.8%~102.2%;利用该技术,检测某采用两级生物氧化工艺的制药废水处理厂各级单元出水,共检测出头孢曲松、头孢唑啉、头孢噻肟和头孢呋辛4种头孢类抗生素,其在进水中平均浓度分别为7.6,12.9,5.6,91.6 μ g/L,在一级氧化出水中平均浓度分别为4.2,5.2,2.2,37.4 μ g/L,在二级氧化出水中平均浓度分别为2.0,2.7,0.6,24.4 μ g/L;风险商值法评估制药废水出水中残留的头孢曲松、头孢唑啉、头孢噻肟和头孢呋辛的环境风险均为高风险等级。

关键词:头孢类抗生素;SPE-UPLC/MS/MS;制药废水;环境风险评价

中图分类号:X832;X820.4 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2014)09-2273-06

Residue analysis method and environmental risk assessment of cephalosporin antibiotics in pharmaceutical wastewater. TANG Xin-yao, ZUO Jian-e*, YU Xin, YANG Bo, WANG Kai-jun (State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China). *China Environmental Science*, 2014,34(9): 2273~2278

Abstract: Based on solid phase extraction (SPE) and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), a testing method for 9 cephalosporin antibiotics, i.e., cefaclor, ceftriaxone, cephalexin, cefotaxime, cefazolin, cefuroxime, cefoxitin, cefalotin and cefradine, in pharmaceutical wastewater was established. The limit of quantitation was from 27.5 to 131.8ng/L, and the recovery efficiencies for different analytes ranged from 72.8% to 102.2%. With this method, cephalosporin antibiotics in the effluent of each processing unit of a pharmaceutical wastewater treatment plant (P-WWTP), which adopted two-stage biological oxidation processes, were tested. Ceftriaxone, cefazolin, cefotaxime and cefuroxime were found in the pharmaceutical wastewater. Their average concentrations in influents were 7.6, 12.9, 5.6 and 91.6 μ g/L, in effluents of first-stage oxidation unit were 4.2, 5.2, 2.2 and 37.4 μ g/L, and in effluents of second-stage oxidation unit were 2.0, 2.7, 0.6 and 24.4 μ g/L, respectively. Risk quotient method was utilized to evaluate the environmental risks of these four antibiotics in the effluents, and all the results were high risk levels.

Key words: cephalosporin antibiotics; SPE-UPLC/MS/MS; pharmaceutical wastewater; environmental risk assessment

头孢类抗生素抗菌谱广、杀菌力强,是国内外临床应用最多的一类抗感染药物^[1]。大量的市场需求导致我国头孢类药物生产量逐年增加^[1],生产过程中所产生的制药废水量也逐年增加。实际生产中,制药废水的处理多采用以生物处理为主、结合物化处理工艺的常规废水处理工艺,然而,传统废水处理方法不能将废水中残留的抗生素完全去除^[2-5],导致近年来制药废水的排放成为自然环境中药品和个人护理品(PPCPs)的重要来源之一^[5]。

研究表明,自然环境中 PPCPs 能以一定浓度长期稳定地存在于自然环境中,为“假持久性”污染物^[6]。痕量 PPCPs 更可能引发生物毒性^[7]和耐药性^[8-11]等生物安全性问题,已引起国内外学者的广泛关注。

液相色谱-两级串联质谱法(LC-MS/MS)由

收稿日期:2014-01-12

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07529-006, 2012ZX07205-001)

* 责任作者, 教授, jiane.zuo@tsinghua.edu.cn

于灵敏度高、检出限低,以及所需固相萃取(SPE)前处理技术成熟,被广泛应用于地下水^[12,16]、地表水^[9,11-13,15]、再生水^[10,16]和生活污水及城市污水处理厂出水^[12,14-15]中痕量抗生素的浓度检测。但目前关于制药废水中头孢类抗生素的残留水平及其环境风险的研究还较少。本文拟建立制药废水中头孢类抗生素浓度检测方法(SPE-UPLC/MS/MS,固相萃取-超高效液相色谱串联两级质谱法),以探明制药废水处理厂不同处理单元和最终出水中的头孢类抗生素残留情况,并评估制药废水出水中残留头孢类抗生素的环境风险等级。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

头孢克洛、头孢曲松、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢西丁和头孢噻吩标准品均为美国药典(USP)标准品,头孢拉定标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。头孢呋辛标准品纯度为 91.8%,头孢曲松标准品纯度为 92.4%,头孢噻肟标准品纯度为 93.7%,头孢噻吩标准品纯度为 94.7%,其余标准品纯度均大于 98%。甲醇和乙腈为色谱纯,购自美国 J. T. Baker 公司;甲酸为色谱纯,购自中国 DikmaPure 公司;其余试剂为分析纯。试验用水为美国 Millipore 公司 Mili-Q 纯水器制得的超纯水。试验前,分别配置 9 种头孢类标准品单标甲醇储备液(50mg/L)和混合标准品甲醇储备液(50mg/L),贮存于洁净棕色玻璃瓶内,-20℃ 冷藏。

采用美国 Supelco-24 孔固相萃取装置和 Waters 公司 Oasis HLB 固相萃取柱(6cc/500mg)对样品进行洗涤(5mL 高纯水),真空干燥,洗脱(5mL 甲醇)预处理,采用美国 Waters 公司超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(Quattro Premier XE)检测样品,采用 MassLynx V4.1 软件分析目标抗生素浓度。

1.2 仪器条件

设定 UPLC-MS/MS 仪器参数如下:毛细管电压 2.5kV;源温度 120℃,去溶剂化温度 400℃,脱溶剂气流量 900L/h,锥孔反吹气流量 50L/h,碰撞气流速 0.1mL/min,取样量 10μL;采用电喷雾离

子源正离子模式(ESI+)和多反应监测模式(MRM);以氦气(≥99.99%)作为脱溶剂气,以氩气(≥99.99%)作为碰撞气。

质谱条件的优化主要包括离子源模式、锥孔电压和母离子,以及碰撞能和子离子的选择,优化结果最终影响目标物质的信号强度和仪器灵敏度。选用 ESI(+)离子源^[14,17],以乙腈为流动相,借助蠕动泵和进样针,将 9 种头孢类抗生素单标准液(头孢呋辛和头孢噻吩标准液浓度为 1000μg/L,其余为 500μg/L)以 20μL/min 的流速注入到质谱样品室内。找到母离子后,调节锥孔电压值至母离子信号最强;开启氩气,对母离子进行轰击,找到信号较强的子离子为定量离子,信号较弱的子离子为定性离子,分别调节碰撞能值至两个子离子信号最强。由此得到的目标物特征定量、定性离子对和最佳仪器参数值见表 1。

色谱柱为 ACQUITY UPLC Waters® BEH C₁₈ 1.7μm(2.1×50mm Column);柱温为 35℃。流动相为 0.1%甲酸的乙腈溶液(A)和 0.1%甲酸的水溶液(B);流动相以 0.4mL/min 的流速进行梯度洗脱,任意时刻 A 与 B 百分比之和为 100%;洗脱步骤为 0~1.90min,A 由 5.0%线性变化至 14.5%;1.90~4.40min,A 由 14.5%线性增长至 20.0%;4.40~5.54min,A 由 20.0%线性变化至 30.0%;5.54~5.541min,A 由 30.0%骤降到 5.0%,稳定 2min 后开始测定下一个样品。

1.3 采样方法

废水水样取自某头孢制药废水处理厂,如图 1 所示,共设置 3 个采样点(1、2、3)。采样在 2013 年 7 月 1、9、18、26 日进行,每天采样 3 次,每 8h 采样 1 次;每次从采样点 1 取样 100mL,从采样点 2 和 3 各取样 300mL。全部水样盛装于棕色玻璃采样瓶内,4℃ 保存,48h 内完成抗生素残留浓度测试。

抗生素残留浓度较高(10μg/L 以上)的水样经 0.22μm 水系滤膜过滤后,直接上机测试;抗生素残留浓度较低(低于 10μg/L)的水样通过固相萃取技术净化、浓缩后,再上机测试。

1.4 环境风险评价方法

采用风险商值法(RQ)评估制药废水处理厂出水中残留头孢类抗生素的环境风险等级。RQ 值为

预测环境浓度(PEC)或实测环境浓度(MEC)与预测无效应浓度(PNEC)的比值.根据 RQ 值大小,将环境风险等级分为 3 级,即 RQ 值在 0.01~0.1 间为低环境风险,在 0.1~1.0 间为中等环境风险,大于 1

为高环境风险^[6].基于 SPE-UPLC/MS/MS 测试技术,可试验测得制药废水处理厂出水中头孢类抗生素的 MEC 值,查询文献可获得相应头孢类抗生素的 PNEC 值,即可依据 RQ 法判断环境风险等级.

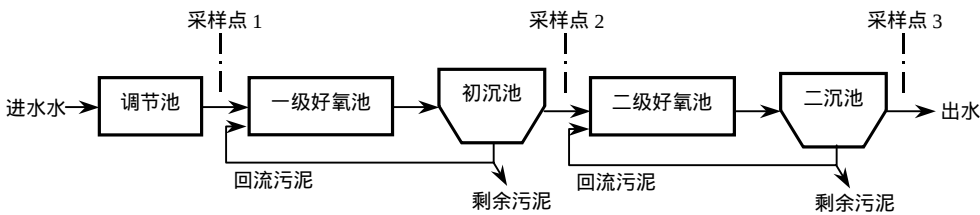


图 1 制药废水处理厂工艺流程示意

Fig.1 Process of the pharmaceutical wastewater treatment plant

2 结果与讨论

2.1 流动相种类选择

选用乙腈和高纯水作为流动相主体.在流动相中添加适量甲酸,可有效提高信号响应,改善色谱峰拖尾现象,增强分离效果^[17].因此,分别设计了高纯水+乙腈、0.01%甲酸高纯水溶液+0.01%甲酸乙腈溶液和 0.1%甲酸高纯水溶液+0.1%甲酸乙腈溶液 3 种流动相组合.试验采用 500μg/L 混合物质标准液,流动相流速为 0.4mL/min.

孢噻吩 4 种目标抗生素的色谱峰面积得到有效提升.同时,当甲酸添加量为 0.1%时,9 种目标物在 8min 内实现色谱峰分离,色谱峰形状美观,无拖尾现象,分离效果好(图 3).因此,为实现同时连续测定,综合考虑 9 种目标抗生素信号强度和整体分离效果,确定选用 0.1%甲酸高纯水溶液和 0.1%甲酸乙腈溶液作为流动相.

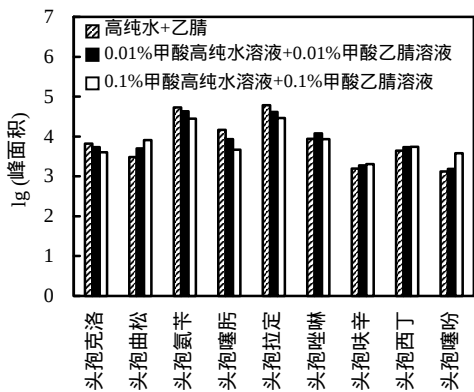


图 2 流动相组合对目标物色谱峰面积的影响
Fig.2 Mobile phase's effect on targets' peak area

如图 2 所示,随着甲酸浓度的增加,头孢克洛、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定和头孢唑林 5 种目标抗生素的色谱峰面积(Peak Area)变化幅度不大,但头孢曲松、头孢呋辛、头孢西丁和头

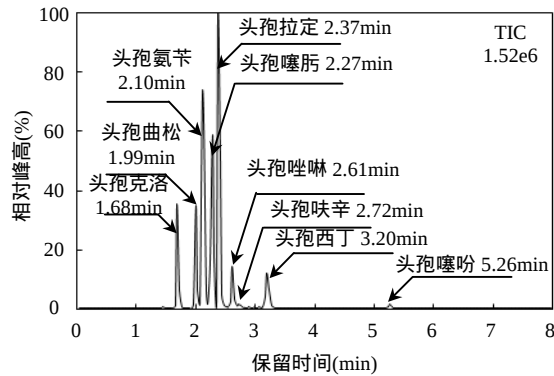


图 3 9 种头孢类抗生素标准物质(500μg/L)色谱
Fig.3 Chromatogram of the 9 cephalosporin standards (500μg/L)

2.2 固相萃取条件选择与方法评价

制药废水中含有少量蛋白质,易与目标物竞争固相萃取柱上吸附位点,随着水样富集倍数的增加还可能引起固相萃取小柱堵塞^[18],导致回收率降低,干扰测试结果.因此,在固相萃取前,需对制药废水进行蛋白沉淀净化处理.采用 30%硫酸

锌+20%亚铁氰化钾溶液作为蛋白沉淀剂;为避免目标物与沉淀剂中金属离子络合而影响回收率,采用 Na₂EDTA 作为稳定剂^[4].该步骤的目标物回收率均在 80%以上.

水样 pH 值是影响固相萃取回收率的主要原因^[18].对于 Oasis HLB 固相萃取柱,合适的 pH 值可使目标化合物成分子状态而被固相萃取小柱吸附,同时使杂质成离子形态而不被吸附,从而保证了目标物质的高回收率.本文以硫酸氢二钠-柠檬酸为 pH 缓冲溶液,采用 Oasis HLB 固相萃取柱,经 HLB 柱活化(5mL 甲醇和 5mL 高纯水)、上样(流速为 5mL/min)、洗涤(5mL 高纯水)、真空干燥(2h)、洗脱(5mL 甲醇)、氮吹(37)和复溶(1mL 高纯水)固相萃取步骤,分别考察水样 pH 值为 3、4、5、6、7、8 时的目标物回收率.结果表

明,pH=5 时,目标物回收率最高,在 72.8%~102.2% 之间,相对标准偏差均小于 9.51%.

SPE-UPLC/MS/MS 测试方法定量限(LOQ) 公式为:

$$LOQ = \frac{IQL \times 100}{R(\%) \times C}$$

(1)

试中:IQL 为仪器定量限,即色谱峰信噪比 S/N 等于 10:1 时对应的目标物浓度,μg/L;R 为 SPE 回收率,是目标物实测浓度值与外加浓度值的百分比;C 为样品浓缩倍数.试验可得各目标物 IQL 值,结果列于表 1 中;C 为 100(添加目标物浓度为 500ng/L).在各物质 IQL 至 1000μg/L 范围内,9 种目标物色谱峰面积与浓度均表现出良好的线性相关性($R^2>0.99$).因此,本文所建立测试方法的定量限为 27.5~131.8ng/L.

表 1 质谱条件选择与方法评价
Table 1 Optimized parameters for MS/MS and method assessment

目标物	锥孔电压(V)	母离子 (m/z)	碰撞能 (eV)	子离子 (m/z)	回收率±相对标准偏差(n=6) (%)	IQL (μg/L)	LOQ (ng/L)
头孢克洛	15	368.2	15	174.7 ^a	90.2±9.51	5	55.4
			7	191.7 ^b			
头孢曲松	20	555.1	13	396.4 ^a	74.9±3.64	5	66.8
			18	324.8 ^b			
头孢氨苄	15	348.3	10	158.5 ^a	84.0±6.48	5	59.5
			15	174.6 ^b			
头孢噻肟	20	456.3	10	396.9 ^a	102.2±8.44	5	48.9
			15	324.9 ^b			
头孢拉定	17	350.3	10	158.5 ^a	72.8±9.33	2	27.5
			15	176.6 ^b			
头孢唑啉	17	455.1	11	323.8 ^a	99.4±5.04	5	50.3
			15	295.8 ^b			
头孢呋辛	20	447.2	10	386.7 ^a	82.5±6.04	10	121.2
			15	342.5 ^b			
头孢西丁	20	339.3	10	215.7 ^a	79.5±4.67	5	62.9
			18	197.7 ^b			
头孢噻吩	25	419.1	13	359.7 ^a	75.9±9.08	10	131.8
			14	315.7 ^b			

注:^a定量离子,^b定性离子

2.3 制药废水中头孢类抗生素浓度检测

利用本文建立的测试方法,分析制药废水处理厂所得残留浓度时空分布.如图 4 所示,共检测出头孢曲松、头孢唑啉、头孢噻肟和头孢呋 4 种头孢类抗生素.进水中浓度最高的为头孢呋辛

(42.4~119.0μg/L),其次为头孢唑啉(10.6~14.5μg/L)、头孢曲松(5.1~10.0μg/L)和头孢噻肟(5.0~6.3μg/L).残留浓度随采样时间不同而有较大变化,这与制药厂的实际生产情况有关.

头孢呋辛在调节池出水、一级氧化出水和二级

氧化出水中残留的平均浓度分别为 91.6,37.4, 24.4 $\mu\text{g/L}$;头孢唑林在 3 个处理单元出水中残留的平均浓度依次为 12.9,5.2,2.7 $\mu\text{g/L}$;头孢曲松在 3 个处理单元出水中残留的平均浓度依次为 7.6,4.2,2.0 $\mu\text{g/L}$; 头孢噻肟在 3 个处理单元出水中残留的平均浓度依次为 5.6,2.2,0.6 $\mu\text{g/L}$.计算可得,一级氧化处理单元对 头孢呋辛、头孢唑林、头孢曲松和头孢噻肟的平均

去除率分别 59.2%、59.8%、44.8%和 60%;二级氧化处理单元对 4 种头孢类抗生素的平均去除率平均为 34.8%、47.0%、52.5%和 75.1%;两级氧化处理单元对 4 种头孢类抗生素的平均去除率为 73.4%、78.7%、73.8%和 90.0%.由此可见,常规好氧污水处理工艺对制药废水中头孢类抗生素具有较好的去除能力,但无法实现完全去除.

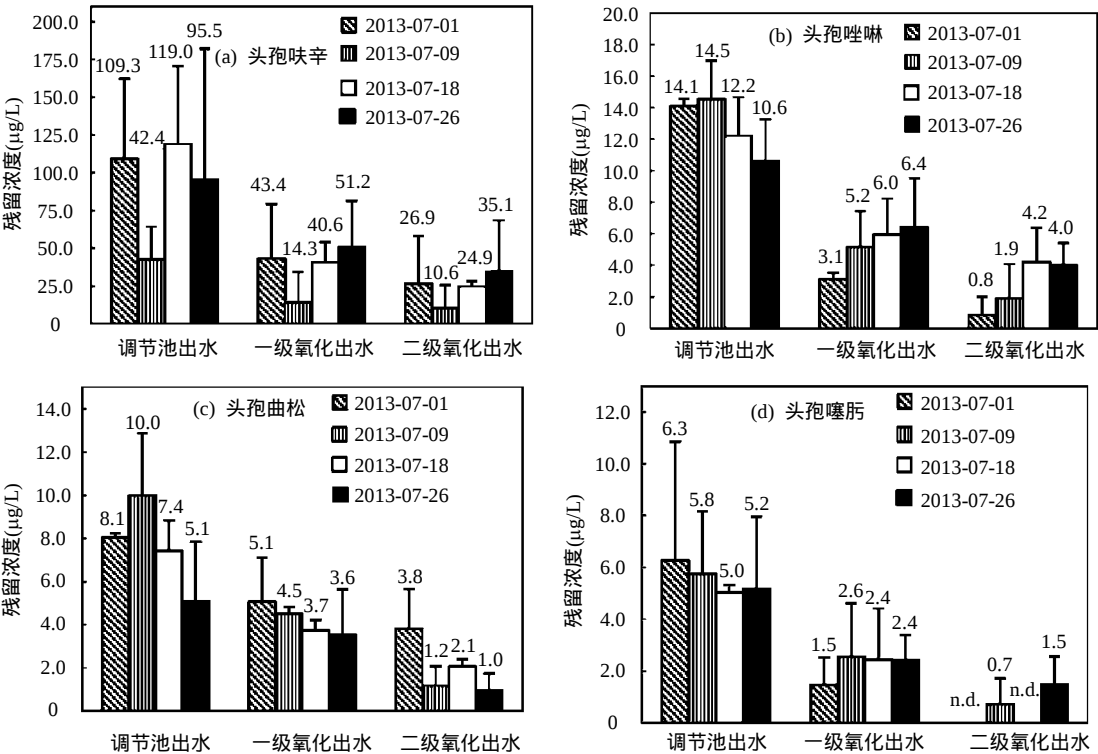


图 4 各制药废水处理单元中 4 种头孢类抗生素残留浓度分布

Fig.4 The 4 kinds of cephalosporin residue concentration in pharmaceutical wastewater
n.d.:未检出

2.4 头孢制药废水环境风险评价

常规两级好氧污水工艺对进水中各头孢类抗生素的去除率达到 73.0%以上,但总出水中仍残留了较高浓度的抗生素,最高的为头孢呋辛 (10.6~35.1 $\mu\text{g/L}$),其次为头孢唑林(0.8~4.2 $\mu\text{g/L}$)、头孢曲松 1.0~3.8 $\mu\text{g/L}$)和头孢噻肟(n.d.~1.5 $\mu\text{g/L}$).该浓度水平远远高于生活污水出水中头孢类抗生素的残留水平^[14,19].

采用“最大值”原则来评价实测制药废水出水中 4 种残留头孢类抗生素的环境风险.根据风

险商值法计算制药废水中残留抗生素的 RQ 值,结果如表 2 所示,计算所得 RQ 值均大于 1.因此,可评估出制药废水出水中残留抗生素的环境风险等级均为高.

本研究中的制药废水处理厂出水不直接进入自然水体,而是被排入下游城镇污水处理厂或工业园区污水处理厂进一步处理.本研究将进一步优化测试方法、降低方法定量限,以开展制药废水厂下游接纳污水处理厂中头孢类抗生素的残留分析,评价其对自然水体的最终环境风险.

表 2 制药废水中残留头孢类抗生素环境风险评价
Table 2 Environmental risk assessment of cephalosporin residues in pharmaceutical wastewater

药物名称	PNEC ^[20] (μg/L)	Max MEC (μg/L)	RQ	风险等级
头孢曲松	0.02	3.8	>1	高
头孢唑啉	1.25	4.2	>1	高
头孢噻肟	0.15	1.5	>1	高
头孢呋辛	0.04	35.1	>1	高

3 结论

3.1 建立了同时测定制药废水中 9 种头孢类抗生素残留浓度的 SPE-UPLC/MS/MS 快速测试方法,方法稳定可靠,能满足制药废水中 9 种头孢类抗生素浓度的检测分析。

3.2 常规两级好氧废水处理工艺能够有效去除制药废水进水中残留的较高浓度头孢类抗生素,去除率在 73%以上。

3.3 在头孢类制药废水出水中,检测出头孢曲松、头孢唑啉、头孢噻肟和头孢呋辛 4 种头孢类药物,其浓度水平在 ppb 量级,环境风险等级为高。

参考文献：

[1] 薛雨,陈宇瑛.头孢菌素类抗生素的最新研究进展[J].中国抗生素杂志,2011,36(2):86-92.

[2] Sui Q, Huang J, Deng S, et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China[J]. Water Research, 2010,44(2):417-426.

[3] Kim J W, Yoon S M, Lee S J, et al. Occurrence and fate of PPCPs wastewater treatment plants in Korea [C]//TheSecond International Conference on Environment and Industrial Innovation, IPCBEE, Singapore, LACSIT Press, 2012,35:57-61.

[4] 李再兴,张非非,左剑恶,等.SPE-UPLC-MS/MS 法测定制药废水中四环素类抗生素[J].环境科学与技术,2013,36(7):139-142.

[5] Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I[J]. Chemosphere, 2009,75(4):417-434.

[6] Hernando M D, Mezcuia M, Fernandez-Alba A R, et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments[J]. Talanta, 2006,69(2):334-342.

[7] Yu X, ZuoJ, Tang X, et al. Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmusobliquus* and the bacterium *Vibrio fischeri* [J]. J. Hazard. Mat., 2014,266:68-74.

[8] 欧丹云,陈彬,陈灿祥,等.九龙江下游河口水域抗生素及抗性细菌的分布[J].中国环境科学,2013,33(12):2243-2250.

[9] 杨弯弯,武氏秋贤,吴亦潇,等.恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的毒性研究[J].中国环境科学,2013,33(10):1829-1834.

[10] Wang F, Qiao M, Lv Z, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in publi parks, Beijing, China [J]. Environmental Pollution, 2014,184:247-253.

[11] 施嘉琛,胡建英,常红,等.北京温榆河流域耐药大肠杆菌的调查[J].中国环境科学,2008,28(1):39-42.

[12] Petrovic M, Skrbic B, Zivancev J, et al. Determination of 81pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia [J]. Sci. Tot. Environ., 2014,468-469:415-428.

[13] Zhang R, Tang J, Li J, et al. Antibiotics in the offshore waters of the Bohai Sea and the Yellow Sea in China: Occurrence, distribution and ecological risks [J]. Environmental Pollution, 2013,174:71-77.

[14] Li B, Zhang T, Xu Z, et al. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2009,645(1/2):64-72.

[15] Al Aukidy M, Verlicchi P, Jelic A, et al. Monitoring release of pharmaceutical compounds-occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy [J]. Sci. Tot. Environ., 2012,438:15-25.

[16] Estevez E, Cabrera M C, Molina-Diaz A, et al. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain) [J]. Sci. Tot. Environ., 2012,433:538-546.

[17] Becker M, Zittlau E, Petz M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquild chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anlytica Chimica Acta, 2004,520(1/2):19-32.

[18] 陈小华,汪群杰.固相萃取技术与应用 [M]. 北京:科学出版社,2010,29-30,324-325.

[19] Sim W J, Lee J W, E. Lee S, et al. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. J. Chromatography A, 2013,1292:173-188.

[20] Kummerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2003, 9(12): 1203-1214.

致谢：感谢制药废水处理厂对于样品采集的大力支持。

作者简介：汤薪瑶(1989-),女,辽宁省台安县人,清华大学环境学院硕士研究生,主要从事制药废水水质分析与处理研究。