

分析与监测

SPE-HPLC 法测定松花江哈尔滨段水样中11种抗生素

郎 朗^{1,2}, 董晓琪², 狄静波²

(1. 哈尔滨商业大学 中药学博士后科研流动站, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要: 应用 SPE-HPLC 法检测松花江哈尔滨段 4 种喹诺酮类、3 种磺胺类和 4 种大环内酯类抗生素的含量。实验结果表明, 固相萃取小柱的富集效果好, 抗生素在 10 ~ 2 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好, 精密度、重现性、回收率良好, 符合试验要求。测定结果表明, 松花江哈尔滨段选取的四个监测断面均存在抗生素的污染, 朱顺屯断面主要是喹诺酮类抗生素的污染, 阿什河口下和呼兰河口下断面主要是磺胺类和大环内酯类抗生素的污染, 大顶子山断面仅在 6 月份检出红霉素。经分析可知抗生素污染主要来自沿岸企业废水和生活污水, 同时受径流量、流速因素以及气候的影响。

关键词: 松花江流域; 抗生素; 固相萃取; 高效液相色谱

中图分类号: TU991 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)20-0114-05

Determination of 11 Antibiotics in Harbin Section of Songhua River by SPE-HPLC

LANG Lang^{1,2}, DONG Xiao-qi², DI Jing-bo²

(1. Post-doctoral Research Station of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. Center of Research on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The content of four quinolones, three sulfonamides and four macrolide antibiotics in the Harbin section of Songhua River was detected by SPE-HPLC. The experimental results showed that the solid phase extraction cartridge had a good enrichment effect. A good linear relationship had been gained in the antibiotics concentration range of 10 - 2 000 $\mu\text{g/L}$, and the precision, reproducibility and recovery rate all reached the test requirements. The test results showed that there were antibiotic pollution in the four monitoring sections selected in the Harbin section of Songhua River. Quinolone antibiotics were the main pollutants in Zhushuntun section. Sulfonamides and macrolides were the main pollutants in Ashihekouxia and Hulanhekouxia sections. Erythromycin were detected in Dadingzishan section only in June. According to the analysis results, the pollution of antibiotics mainly came from coastal enterprise wastewater and domestic sewage, and was also affected by other factors such as runoff, flow rate factors and climate.

基金项目: 哈尔滨市青年项目(2013RFQXJ054); 2018 年哈尔滨商业大学研究生创新科研项目(YJSCX2018-549HSD); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541188)

Key words: Songhua River basin; antibiotics; solid phase extraction; high performance liquid chromatography

松花江全长 1 927 km,是黑龙江在中国境内最大的支流,松花江主要流经中国东北地区的北部,经吉林省和黑龙江省,为沿岸居民的农、林、牧、产等生活提供资源,作为中国的七大河之一,监测和研究其污染现状具有重要意义。

抗生素污染已成为近年来江河湖泊污染的重要组成部分,我国是抗生素的主要生产和使用国,年产量占到世界年产量的 46%,生产的抗生素 40% 用于临床治疗,47% 用于畜牧养殖业,还有 13% 出口到国外^[1~3]。临床使用的抗生素进入人体后并不能充分利用,而是代谢后以原型和代谢产物的形式排出体外,进入环境最终流入江河湖泊,给环境带来不可估量的危害。

笔者采用固相萃取(SPE)联合高效液相色谱(HPLC)法,选取松花江哈尔滨段的四个监测断面进行取样,检测水样中喹诺酮类(环丙沙星、恩诺沙星、洛美沙星、诺氟沙星)、磺胺类(磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲嘧啶)和大环内酯类(螺旋霉素、泰乐菌素、红霉素、罗红霉素)3 类抗生素的污染物含量。

喹诺酮类和磺胺类抗生素属于人工合成的抗菌药物,喹诺酮类具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点,磺胺类抗菌谱广、性质稳定、品类多,大环内酯类抗生素是由链霉菌产生的一类抗生素,对肺炎支原体、肺炎衣原体有明显抑制作用,具有口服利用率高等优点,这三类抗生素都因其毒副作用小而被广泛应用于人和动物细菌性疾病的治疗和预防。喹诺酮类和磺胺类抗生素在国内外各类水体中检出率相当高,在我国境内主要河流检出率高达 100%。大环内酯类抗生素在我国部分河流中最高检出浓度可高达 1 900 ng/L^[4]。检测喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类抗生素的污染,不仅有助于掌握抗生素的残留现状,同时也对松花江哈尔滨段的水质情况有所了解,为今后治理与修复提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters2695-2996);超声波清洗机(JP-030ST,深圳市洁盟清洗设备有限公

司);循环水式多用真空泵(SHB-Ⅲ型,郑州长城科工贸有限公司);C18 固相萃取小柱。乙腈、甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司),甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),冰乙酸(色谱纯,天津市耀华化学试剂有限公司);喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类抗生素均购自中国药检所(纯度均不低于 96.0%)。

1.2 样品的采集与前处理

1.2.1 样品采集

依据《地表水和污水监测技术规范》(HJ/T 91-2002)中对于水面宽度大于 100 m 的河流取样方法,在松花江哈尔滨段四个监测断面(朱顺屯、阿什河口下、呼兰河口下、大顶子山)分别进行取样,每个监测断面设三条垂线,中心点一条,左右距岸边 0.5 m 处各一条,取表层水,即水面下 0.5 m 深处取样,将三个取样点的水样混合备用。

1.2.2 样品前处理

本次实验中所用采样器和玻璃瓶均经过清洗并用水样润洗三次,选用直立式采水器分别在 3、6、9、12 月对四个监测断面进行三点采集,采集后的样品立即装入 2 L 的棕色玻璃瓶中,尽快放入 4 ℃ 冰箱中保存待测。

1.3 高效液相色谱条件

本实验采用高效液相色谱法进行检测,色谱柱为 Waters Symmetry Shield™ (4.6 mm × 250 mm × 5 μm),柱温为 25 ℃,流速为 0.8 mL/min;进样量为 20 μL;环丙沙星(CIP)、恩诺沙星(ENR)、洛美沙星(LOM)、罗红霉素(RTM)、螺旋霉素(SPM)流动相 A 为 0.1% 甲酸,磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺吡啶(Sulfapyridine)、磺胺二甲嘧啶(Sulfadimidine)、诺氟沙星(NOR)、红霉素(ERY)流动相 A 为 0.1% 乙酸,泰乐菌素(TYLOSIN)流动相 A 为 0.2% 甲酸,流动相 B 均为乙腈,梯度洗脱程序:0~25 min,5% B~30% B;25~40 min,30% B~100% B;40~45 min,100% B~5% B。

1.4 标准品溶液制备

准确称取 0.01 g 抗生素标准品,置于 10 mL 棕色瓶中,用甲醇定容,配成 1 g/L 储备液,-18 ℃ 保存,一个月内使用。

1.5 样品溶液制备

取1 L采集的水样,经0.45 μm微孔滤膜真空抽滤,加入0.5 g EDTA,再利用稀磷酸调节pH值到4。依次量取甲醇、超纯水12 mL活化C18固相萃取小柱,水样上柱,以5~10 mL/min流速流出,用5 mL超纯水淋洗萃取柱,待萃取柱干燥15 min后,用6 mL甲醇超声洗脱15 min,收集洗脱液,挥发至近干,1 mL甲醇-水溶液(体积比为15:85)复溶,

0.22 μm微孔滤膜过滤备测。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

将1 g/L的抗生素储备液用超纯水梯度稀释,配制成5个不同的浓度,按照本实验中的色谱条件平行测定三次,以峰面积均值和浓度进行线性回归,绘制标准曲线,结果见表1。由表1可见,线性关系良好。

表1 抗生素的回归方程、相关系数及线性范围

Tab.1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of antibiotics

抗生素	保留时间/min	回归方程	相关系数 R^2	线性范围/(μg·L ⁻¹)
环丙沙星	8.50	$y = 1\,406.5x + 7\,774.5$	0.999 5	10 ~ 1 000
恩诺沙星	14.78	$y = 1\,396x + 10\,527$	0.999 4	10 ~ 1 000
洛美沙星	13.84	$y = 1\,273.5x + 13\,417$	0.999 8	20 ~ 1 000
诺氟沙星	12.80	$y = 1\,511.4x - 10\,043$	0.999 4	20 ~ 1 000
磺胺吡啶	17.81	$y = 714.5x - 2\,418$	0.999 3	10 ~ 2 000
磺胺嘧啶	19.33	$y = 895.8x + 10\,260$	0.999 5	10 ~ 1 000
磺胺二甲嘧啶	23.37	$y = 839.0x + 10\,730$	0.999 5	10 ~ 1 000
罗红霉素	7.33	$y = 83.70x + 6\,810$	0.999 6	50 ~ 1 000
红霉素	17.39	$y = 168.4x + 6\,748$	0.999 3	10 ~ 500
螺旋霉素	28.22	$y = 61.74x + 7\,992$	0.999 8	10 ~ 1 000
泰乐菌素	29.66	$y = 175.1x + 11\,070$	0.999 4	10 ~ 1 000

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验

配制100 μg/L抗生素标准品,制备上样,重复测定5次,根据结果计算相对标准偏差,考察精密度,RSD值均小于5%,本实验方法适合11种抗生素的测定。

2.2.2 重现性试验

准确称取5份加标水样,每份1 L,按前述方法

制备上样,考察其重现性,RSD值均小于3%,表明该方法重现性良好。

2.2.3 回收率试验

取超纯水9份,每份1 L,按低(10 μg/L)、中(100 μg/L)、高(1 000 μg/L)三个水平添加混合标准溶液,每水平3份样品,测定抗生素样品的加标回收率。

结果见表2。

表2 抗生素的加标回收率及相对标准偏差($n=3$)

Tab.2 Antibiotic recovery and relative standard deviation($n=3$)

%

项 目	10 μg/L		100 μg/L		1 000 μg/L	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
环丙沙星	96.2	4.5	97.8	3.8	94.3	5.8
恩诺沙星	96.4	3.3	97.6	4.5	98.2	4.9
洛美沙星	98.6	4.8	96.6	4.2	97.5	4.7
诺氟沙星	97.5	5.7	98.9	5.6	95.7	5.2
磺胺吡啶	94.9	7.5	93.2	2.5	97.3	5.8
磺胺嘧啶	91.3	4.5	94.2	6.2	96.0	1.9
磺胺二甲嘧啶	92.6	9.6	97.5	1.1	96.6	4.6
罗红霉素	91.7	4.1	95.8	2.4	98.2	7.6
螺旋霉素	94.3	3.4	97.3	1.4	92.4	8.5
红霉素	91.4	8.5	95.9	5.4	96.3	3.3
泰乐菌	93.2	6.4	92.5	9.4	97.9	6.8

2.3 松花江不同监测断面抗生素残留量

各监测断面测定结果如表 3 所示。

表 3 松花江不同监测断面抗生素残留量

Tab. 3 Residues of antibiotics in different monitoring sections of Songhua River $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

项 目		朱顺屯	阿什河口下	呼兰河口下	大顶子山
3 月	环丙沙星	0.023 4			
	恩诺沙星			0.042 9	
	磺胺嘧啶			0.096 0	
	红霉素		0.113 0	0.060 0	
6 月	洛美沙星	0.048 9			
	磺胺吡啶		0.026 0		
	磺胺嘧啶			0.033 0	
	红霉素		0.052 0		0.046 0
9 月	恩诺沙星			0.148 2	
	磺胺吡啶	0.016 0		0.020 0	
	泰乐菌素		0.021 0		
12 月	环丙沙星	0.079 6			
	磺胺吡啶			0.048 0	
	磺胺嘧啶		0.032 0		
	磺胺二甲嘧啶		0.012 0	0.018 0	
	红霉素		0.070 0		
	泰乐菌素			0.065 0	

2.3.1 各监测断面的抗生素污染来源分析

本实验选取松花江哈尔滨段作为研究对象,全长 66 km,选取朱顺屯、阿什河口下、呼兰河口下、大顶子山四个监测断面进行采样,其中朱顺屯断面为Ⅲ类水体,用于生活饮用、渔业用水和娱乐用水,阿什河口下、呼兰河口下、大顶子山均为Ⅳ类水体,主要用于工业用水和农业用水^[5]。朱顺屯断面的水质情况是上游水质的反映,上游水质主要受到嫩江、第二松花江、饮马河沿岸城镇及两江汇合处下游的肇源影响^[6]。从检测结果可知,朱顺屯主要是喹诺酮类抗生素的污染。阿什河口下监测断面是磺胺类和大环内酯类抗生素的污染。阿什河污染主要是由于河流沿岸的阿城区和成高子镇居民生活污水及周边未入管网的企业废水大量排放造成的^[7,8]。呼兰河口下监测断面检出的抗生素最多,污染最严重,污染主要是磺胺类和大环内酯类抗生素。呼兰河的污染原因为其上游肇东市和呼兰镇有大量的制药企业,仅呼兰区就有 30 余家药企,其中 3 家生产人体用抗生素药品,2 家生产兽用抗生素药品,区域内居民和企业产生的生活、生产污水经处理后排入呼兰河中,造成松花江主江段污染^[9~11]。大顶子山断面

仅在 6 月份测出红霉素,主要是与大顶子山地区人口密集程度以及畜牧养殖业有关。

2.3.2 季节和径流量对抗生素污染的影响

哈尔滨属于温带大陆性季风气候,降雨量全年不均,雨季 6 月—9 月降水量是全年的 60%~80%,称为丰水期,而冬季 12 月—3 月降水量仅为 5%,称为枯水期。流域径流量在枯水期和丰水期具有非常明显的差异,6 月—9 月的丰水期径流量高于 2 300 m^3/s ,12 月—3 月的枯水期径流量在 300 m^3/s 左右^[12]。当水体径流量较大时,对水体环境中抗生素的浓度有很大的稀释作用,导致水体环境中抗生素的残留相对偏低。可以看出,在阿什河口下、呼兰河口下 3 月和 12 月的抗生素污染较 6 月和 9 月严重,这是因为 3 月和 12 月哈尔滨处于冰冻期,冰封期只有污水排入,无自然水稀释。因此径流量、流速因素以及气候是松花江流域抗生素含量的主要影响因素。

3 结论

① 建立了固相萃取-高效液相色谱法检测 3 大类 11 种抗生素的方法,该方法线性关系、精密度、重现性良好,符合实验要求。

② 松花江哈尔滨段抗生素污染量受径流量、流速因素以及气候的影响,3 月和 12 月较 6 月和 9 月严重。阿什河口下和呼兰河口下磺胺类和大环内酯类抗生素的污染主要来源于周边企业废水和生活污水的排放。

参考文献:

[1] Bruce J R,Paul K S L,Michael M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia,with particular reference to Southern China[J]. Mar Pollut Bull,2005,50(9):913-920.

[2] Roman H,Thomas T,Klaus H,et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment[J]. Sci Total Environ,1999,225(1/2):109-118.

[3] Yan C,Yang Y,Zhou J,et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment[J]. Environ Pollut,2013,175:22-29.

[4] Chen J Q,Guo R X. Access the toxic effect of the antibiotic cefradine and its UV light degradation products on two freshwater algae[J]. J Hazard Mater,2012,209/210:520-523.

- [5] 樊庆铤,杨先兴,邱微. 松花江哈尔滨段城市水环境质量评价[J]. 中国环境科学,2014,34(9):2292-2298.
Fan Qingxin, Yang Xianxing, Qiu Wei. Study on water environmental quality in Harbin section of the Songhua River[J]. China Environmental Science, 2014, 34(9): 2292-2298 (in Chinese).
- [6] Li W, Shi Y, Gao L, *et al.* Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China[J]. Chemosphere, 2013, 92(4):435-444.
- [7] 杨先兴. 松花江哈尔滨段水环境质量时空变化特征分析[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2014.
Yang Xianxing. Research on Temporal and Spatial Variation of Water Environmental Quality in Harbin Section of the Songhua River[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014 (in Chinese).
- [8] McArdell C, Molnar E, Suter M J-F, *et al.* Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland[J]. Environ Sci Technol, 2003, 37(24):5479-5486.
- [9] 刘丹丹,韩帅. 松花江哈尔滨段枯水期水环境质量评价[J]. 黑龙江环境通报,2015,39(2):27-32.
Liu Dandan, Han Shuai. Evaluate the water environmental quality of the Songhua River in the dry season Harbin section[J]. Heilongjiang Environmental Journal, 2015, 39(2):27-32 (in Chinese).
- [10] 李亚男. 大顶子山工程建成后松花江哈尔滨段水质分析与污染控制[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
Li Yanan. Study on Water Quality Analysis and Pollution Control in Songhua River Harbin Section after Dad-
ingzishan Project Completed[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2012 (in Chinese).
- [11] 邵雪. 松花江哈尔滨段水质变化趋势分析与控制对策研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2011.
Shao Xue. Analysis the Songhua River in Harbin Section's Water Quality Trend and Research on the Control Measures[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2011 (in Chinese).
- [12] 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 Junsuo, Qiu Yueming, Wang Chao. Veterinary Drug Residue Analysis[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2002 (in Chinese).



作者简介:郎朗(1979-),女,满族,黑龙江大庆人,博士,副研究员,研究方向为环境生态学、环境毒理学。

E-mail: lang8968@163.com

收稿日期:2018-07-06

讣告

本刊编委、清华大学环境学院刘文君教授,因病医治无效,于2018年9月29日1时在北京不幸逝世,享年50岁。

深切悼念刘文君教授、编委!

谨此以讣。

《中国给水排水》杂志社
2018年10月