

# 高效液相色谱 – 质谱联用法同步测定城市污水处理厂活性污泥中的多类抗生素残留

潘 寻, 贲伟伟, 强志民

(中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

**摘要:** 采用超声萃取、固相萃取及高效液相色谱 – 质谱联用技术 (LC – MS), 建立了活性污泥中 3 类共 9 种抗生素 (包括 5 种磺胺类、3 种四环素类及 1 种大环内酯类) 的同时分析方法。样品经甲醇 – Na<sub>2</sub>EDTA/McIlvaine 缓冲液 (1 : 1, 体积比) 超声萃取, HLB 固相萃取柱净化富集后, 以 Symmetry C<sub>18</sub> 反相柱为分析柱, 0.2% 甲酸 – 乙腈为流动相梯度洗脱, 采用电喷雾电离源在选择离子扫描模式下进行抗生素的定性及定量分析。方法的线性范围为 0.001 ~ 1 mg/L, 相关系数均大于 0.99, 在 3 个加标水平下的回收率分别为 80% ~ 108% (磺胺类)、91% ~ 112% (四环素类) 及 50% ~ 59% (大环内酯类), 日内及日间相对标准偏差分别不大于 7.4% 和 13.7%, 方法检出限为 1 ~ 16 μg/kg。该方法被成功地应用于北京市两家污水处理厂活性污泥中的抗生素残留分析, 5 种目标抗生素被检出, 其中磺胺类的检出量为 124.9 ~ 523.3 μg/kg, 四环素类的检出量为 166.5 ~ 2 296.4 μg/kg。

**关键词:** 抗生素; 高效液相色谱 – 质谱联用; 城市污水处理厂; 活性污泥

中图分类号: O657.63; S859.79 文献标识码: A 文章编号: 1004 – 4957 (2011)04 – 0448 – 05

doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.04.019

## Simultaneous Determination of Several Classes of Antibiotics in the Activated Sludge of Municipal Sewage Treatment Plants by High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

PAN Xun, BEN Wei-wei, QIANG Zhi-min

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** A highly selective and sensitive analytical method was developed for simultaneous determination of three classes of commonly used antibiotics, including five sulfonamides, three tetracyclines and one macrolide in the activated sludge of municipal sewage treatment plants (STPs) by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and high performance liquid chromatography – mass spectrometry (LC – MS). The activated sludge sample was ultrasonically extracted with a mixture of methanol and Na<sub>2</sub>EDTA/McIlvaine buffer (1 : 1), then concentrated and purified with an HLB cartridge. The separation of targeted compound was performed with a Waters Symmetry C<sub>18</sub> column using 0.2% formic acid (A) – acetonitrile (B) as mobile phase. The qualification and quantification of the selected antibiotics were carried out by MS with an electrospray ionization (ESI) under the positive ion mode. The method showed good linearity ( $r^2 > 0.99$ ) for the antibiotics concentration in the range of 0.001 – 1 mg/L. The recoveries at three spiked levels were in the range of 80% – 108% for sulfonamides (SAs), 91% – 112% for tetracyclines (TCs) and 50% – 59% for tiamulin (TIA). The inter-day and intra-day relative standard deviations were no more than 7.4% and 13.7%, respectively. The limits of detection (LOD) were between 1 μg/kg and 16 μg/kg. The developed method was applied in the detection of the activated sludge samples collected from two STPs located in Beijing and five target antibiotics were detected with concentrations of 124.9 – 523.3 μg/kg for sulfanomindes and 166.5 – 2 296.4 μg/kg for tetracyclines, respectively.

收稿日期: 2010 – 10 – 10; 修回日期: 2011 – 01 – 04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50878206); 国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2007AA06Z344, 2009BAC57B02)

通讯作者: 强志民, Tel: 010 – 62849632, E – mail: qiangz@cees.ac.cn

**Key words:** antibiotics; high performance liquid chromatography – mass spectrometry; municipal sewage treatment plant; activated sludge

抗生素在环境中的残留、累积会诱导产生抗药菌, 从而对生态系统及人类健康构成潜在威胁<sup>[1-3]</sup>。城市污水处理厂是环境中抗生素污染的重要来源, 近年来, 国内外已有针对城市污水处理厂中的抗生素浓度检测及不同处理工艺对抗生素去除效果的研究<sup>[4-7]</sup>。抗生素在污水厂处理流程中可能会不同程度地吸附在活性污泥上<sup>[8-9]</sup>。剩余污泥脱水填埋或堆肥处理后施于农田, 可能导致其中残留的抗生素迁移至土壤或地下水中, 造成二次污染并最终通过食物链危害人类健康<sup>[10]</sup>。磺胺类( Sulfonamides, SAs)、四环素类( Tetracyclines, TCs) 及大环内酯类( Microlides) 药物均属广谱抗生素, 被广泛应用于人类及动物疾病的预防和治疗, 在城市污水厂的出水中也被频繁检出<sup>[11-12]</sup>; 但目前未见有关活性污泥中这三类抗生素残留同时检测的文献报道。

呈弱酸性的缓冲溶液如 EDTA – McIlvaine 溶液、柠檬酸缓冲溶液等, 常被用作动物组织、土壤及河流底泥等环境固体样品中抗生素的萃取液<sup>[13-14]</sup>。固相萃取法( Solid-phase extraction, SPE) 因具有富集分析目标物及去除干扰杂质的双重作用, 常作为环境样品中微量污染物分析的前处理方法<sup>[15]</sup>。液相色谱-质谱联用技术由于具有选择性强、灵敏度高的特点, 在国内外被广泛应用于抗生素的测定<sup>[16-17]</sup>。

本研究建立了城市污水处理厂活性污泥中 3 类共 9 种抗生素的同步萃取及检测方法, 目标化合物包括 5 种磺胺类: 磺胺噻唑( Sulfathiazole, STZ)、磺胺甲噁唑( Sulfamethoxazole, SMX)、磺胺地索辛( Sulfadimethoxine, SDM)、磺胺甲二唑( Sulfamethizole, SML) 和磺胺二甲嘧啶( Sulfamethazine, SMN); 3 种四环素类: 四环素( Tetracycline, TCN)、土霉素( Oxytetracycline, OTC) 和金霉素( Chlortetracycline, CTC); 1 种大环内酯类: 泰妙霉素( Tiamulin, TIA)。活性污泥样品通过超声萃取后, 再经过 SPE 富集净化, 以减少活性污泥中背景基质对抗生素分析的干扰, 最后采用高效液相色谱-质谱联用法( LC – MS) 进行分析。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Alliance 2695/ZQ4000 型高效液相色谱-质谱联用仪: 配有电喷雾离子源( 美国 Waters 公司); 24 管防交叉污染 SPE 装置( 美国 Supelco 公司); Oasis HLB 固相萃取柱( 500 mg/6 mL, 美国 Waters 公司); TGL-16G 型台式离心机( 湖南星科公司); DC-12 型氮吹仪( 上海安谱公司); FD-1 型冷冻干燥机( 北京博医康公司)。

磺胺噻唑、磺胺甲噁唑、磺胺地索辛、磺胺甲二唑、四环素盐酸盐、土霉素盐酸盐( 美国 Sigma 公司), 磺胺二甲嘧啶、金霉素盐酸盐( 比利时 Acros 公司), 泰妙霉素( 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。分别精确称取抗生素药品各 0.010 g, 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 配制成质量浓度为 100 mg/L 的抗生素储备液。磺胺类及泰妙霉素储备液放置于 4 °C 冰箱中, 四环素类储备液放置于 -18 °C 下, 避光保存, 备用。甲醇、乙腈和二氯甲烷为色谱纯, 其它试剂均为分析纯, 水为 Milli-Q 高纯水。Na<sub>2</sub>EDTA – McIlvaine 缓冲溶液: 称取柠檬酸( 含 1 个结晶水) 21.0 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17.75 g、Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O 60.5 g, 溶解于 1.625 L 水中, 调节 pH 值至 4.00 ± 0.05。

### 1.2 色谱与质谱条件

色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub> 柱( 150 mm × 2.1 mm i. d., 5 μm, Waters); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.2% 甲酸溶液( A) 和乙腈( B); 梯度洗脱程序( 线性变化): 0 ~ 10 min, 90% A, 10 ~ 12 min, 90% ~ 87% A, 12 ~ 14 min, 87% ~ 78% A, 14 ~ 24 min, 78% ~ 55% A, 24 ~ 25 min, 55% ~ 0% A, 25 ~ 30 min, 0% A, 30 ~ 32 min, 0% ~ 90% A; 32 ~ 42 min, 90% A; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 20 μL。

离子化模式: ESI +; 扫描模式: 选择离子扫描( SIR); 毛细管电压 3.5 kV; 离子源温度 120 °C; 脱溶剂温度 300 °C; 脱溶剂气流速 300 L/h; 锥孔气流速 50 L/h。其余条件见表 1。

表 1 SIR 模式下 9 种抗生素的优化质谱条件和保留时间

Table 1 Optimal mass parameters and retention times of nine selected antibiotics under SIR mode

Compound	Molecular weight	Precursor ion ( $m/z$ )	Qualifier ion ( $m/z$ )	Cone voltage $U/V$	Retention time $t/min$
SMX	253.3	254	156	20	22.5
STZ	255.3	256	156	20	7.1
SML	270.3	271	156	20	16.0
SMN	278.3	279	156	30	12.1
SDM	310.3	311	156	30	25.5
TCN	444.4	445	427	20	10.1
OTC	460.4	461	443	20	8.7
CTC	478.9	479	462	20	20.5
TIA	493.7	494	192	30	24.4

### 1.3 样品前处理

1.3.1 超声萃取 将冷冻干燥后的活性污泥碾磨后过 0.5 mm 筛(35 目),准确称取 1.00 g(精确至 0.01 g)置于 15 mL 玻璃离心管中,加入甲醇 - Na<sub>2</sub>EDTA/McIlvaine(1:1)萃取液 10 mL,漩涡混合 1 min 后超声萃取 10 min,离心并收集上清液。重复萃取 2 次,步骤同上。将 3 次操作收集的上清液合并,加水稀释至 300 mL,使其中的甲醇含量低于 5%,用 0.45 μm 玻璃纤维滤膜过滤。

1.3.2 固相萃取 HLB 固相萃取柱分别以 3 mL 甲醇、3 mL 0.5 mol/L HCl 和 3 mL 水活化,将稀释后的萃取液以 5 mL/min 的速度通过萃取柱,之后依次用 5 mL 5% 甲醇溶液及 5 mL 水清洗萃取柱,弃去全部流出液。萃取柱抽干后用 8 mL 甲醇 - 二氯甲烷 - 丙酮(40:36:24)洗脱。将洗脱液氮吹浓缩至干,依次加入 0.8 mL 甲醇、1.2 mL 水溶解,经 0.22 μm 玻璃纤维滤膜过滤后进行 LC-MS 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件的优化

活性污泥样品经甲醇 - Na<sub>2</sub>EDTA/McIlvaine 缓冲液(1:1)超声萃取后,在过 SPE 前先将萃取液中的甲醇含量稀释至 5% 以下,防止在较高甲醇浓度下萃取液中的抗生素穿脱萃取柱,影响其回收率。本研究采用甲醇 - 二氯甲烷 - 丙酮混合溶液作为 SPE 洗脱液,考察了甲醇含量分别为 0%、20%、40%、60%、80%、100% 时 9 种抗生素的回收率。结果表明,当甲醇 - 二氯甲烷 - 丙酮的体积比为 40:36:24(即甲醇含量为 40%)时,磺胺类、四环素类的回收率在 EPA 推荐的 70%~120% 范围内,泰妙霉素回收率稳定在 50% 以上。甲醇含量减少会降低抗生素的洗脱效率,但含量进一步提高对抗生素回收率无显著影响。

### 2.2 色谱分离及质谱测定条件的优化

在使用液相色谱分离抗生素时,通常在流动相中添加如甲酸、草酸等有机酸或醋酸铵等缓冲盐来调节流动相的 pH 值,以改善目标物的峰形,提高灵敏度<sup>[18]</sup>。本研究发现,采用 0.2% 甲酸溶液作流动相可提高抗生素尤其是四环素类的质谱响应信号。由于 9 种抗生素的极性有一定差别,为实现有效分离,采用流动相梯度淋洗。经反复优化,确定了“1.2”所示的梯度条件,9 种抗生素在 27 min 内出峰并具有理想的分离效果(见图 1)。此外,本研究还发现柱温为 30 °C 时,9 种抗生素的分离度及峰形对称性最理想。

选择电喷雾电离源(ESI),在正离子模式下采用单个抗生素的标准溶液以流动注射方式对  $m/z$  100~500 范围内的离子进行全扫描,确定各抗生素的分子离子  $[M+H]^+$  作为其定量离子,并以分子离子达到最大丰度为目标,优化了质谱的运行参数。由于活性污泥经前处理后,样品中仍含有一定量的杂质,为提高检测的准确性,选取各抗生素电离后丰

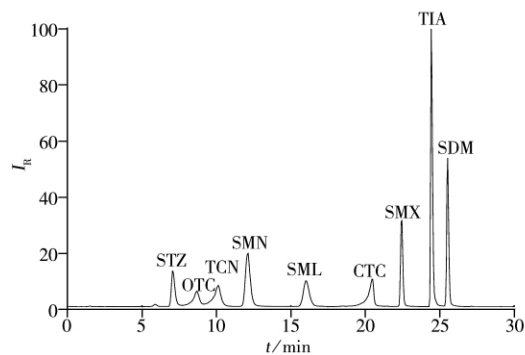


图 1 抗生素标准溶液的选择离子扫描(SIR)色谱图

Fig. 1 SIR chromatogram of nine antibiotics standard solution

concentrations: SAs 1.0 mg/L, TCs 5.0 mg/L, TIA 2.0 mg/L

度较强的碎片离子作为其定性离子, 结合色谱保留时间对抗生素进行定性(见表1)。磺胺类的定性离子由其结构中的磺胺酰基形成, 四环素类的定性离子为  $[M + H - H_2O]^+$  的碎片离子, 泰妙霉素则选择由其结构中酯基断裂形成的  $m/z$  192 碎片离子作为定性离子。

### 2.3 方法的回收率与精密度

将9种抗生素的储备液混合稀释配制标准溶液, 其中磺胺类、四环素类及泰妙霉素的质量浓度分别为1.0、5.0、2.0 mg/L。取一系列1.00 g的活性污泥样品, 分别加入一定量的标准溶液, 漩涡混合2 min后冷冻干燥, 获得3个水平的加标样品, 按本方法进行前处理和分析后, 计算回收率及相对标准偏差。未添加抗生素的活性污泥空白样品同步分析以计算本底浓度。如表2所示, 不同加标水平下磺胺类及四环素类的回收率( $n=3$ )为80%~112%, 泰妙霉素的回收率稍低, 但稳定在50%~59%之间。日内及日间的相对标准偏差分别为0.3%~7.4%和2.2%~13.7%, 表明该方法具有较好的重复性。

表2 活性污泥中抗生素的加标回收率及相对标准偏差  
Table 2 Recoveries and RSDs of the antibiotics in spiked activated sludge

Compound	High level <sup>a</sup>			Middle level <sup>b</sup>			Low level <sup>c</sup>		
	Recovery <i>R</i> /%	Inter-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%	Intra-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%	Recovery <i>R</i> /%	Inter-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%	Intra-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%	Recovery <i>R</i> /%	Inter-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%	Intra-RSD <i>s<sub>r</sub></i> /%
SMX	94	9.7	0.5	103	2.8	2.9	108	12.8	1.1
STZ	85	2.9	1.9	100	5.3	1.0	98	4.3	7.4
SML	80	9.2	3.3	90	4.5	5.1	102	7.7	4.9
SMN	88	2.3	1.6	104	13.7	6.0	95	8.6	1.7
SDM	80	2.7	0.4	88	3.4	1.6	83	6.6	6.8
TCN	97	10.7	1.0	105	3.7	1.7	96	11.4	3.6
OTC	92	11.2	1.1	103	8.9	1.9	99	10.0	3.0
CTC	91	4.3	2.1	96	9.4	3.6	112	5.5	7.3
TIA	59	2.2	1.3	50	4.6	0.3	51	3.7	0.5

spiked level<sup>a</sup>: SAs 2.0 mg/kg, TCs 10.0 mg/kg, TIA 4.0 mg/kg; spiked level<sup>b</sup>: SAs 0.4 mg/kg, TCs 2.0 mg/kg, TIA 0.8 mg/kg; spiked level<sup>c</sup>: SAs 0.1 mg/kg, TCs 0.5 mg/kg, TIA 0.2 mg/kg

### 2.4 方法的线性范围与检出限

将各抗生素储备液以高纯水稀释, 获得6个浓度梯度的标准溶液; 由于检测方法对各抗生素的信号响应强度不同, 9种抗生素的浓度梯度范围也不同。将标准溶液在优化LC-MS条件下进行测定, 以峰面积 $y$ 为纵坐标, 待测物的质量浓度 $x$ (mg/L)为横坐标进行线性回归分析。由表3可见, 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 且线性范围宽, 9种抗生素的方法检出限(信噪比 $S/N=3$ )为1~16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 满足活性污泥中抗生素残留的分析需要。

表3 抗生素的线性范围、回归方程、相关系数、检出限及实际样品的测定  
Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients( $r$ ) and limits of detection(LODs) of the antibiotics and analytical result of real sample

Compound	Linear range $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Linear equation	$r^2$	LOD	Content $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	
				$w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	1#	2#
SMX	0.002~0.2	$y=250\ 623x-52$	0.999 2	2	-*	-
STZ	0.005~0.5	$y=110\ 254x-127$	0.999 8	6	-	-
SML	0.005~0.5	$y=104\ 793x+72$	0.999 9	4	-	-
SMN	0.005~0.5	$y=241\ 822x-271$	0.999 9	4	124.9±0.2	209.8±5.5
SDM	0.001~0.1	$y=390\ 945x+291$	0.999 8	1	523.3±3.4	-
TCN	0.01~1	$y=23\ 976x+457$	0.990 1	10	198.6±11.8	166.5±4.9
OTC	0.01~1	$y=37\ 681x-164$	0.997 5	16	1\ 314.2±4.4	2\ 296.4±2.8
CTC	0.01~1	$y=21\ 781x+808$	0.994 4	10	504.8±15.6	498.6±12.5
TIA	0.001~0.1	$y=497\ 736x+726$	0.999 0	1	-	-

\* no detected

### 2.5 实际样品分析

本方法具有选择性强、灵敏度高的特点, 可用于活性污泥中9种抗生素的同步确证检测。于2010年3月采集北京市两家污水处理厂二沉池的回流污泥, 应用本方法进行分析, 结果见表3。磺胺类中

SMN 和 SDM 被检出, 检出量为 124.9 ~ 523.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 3 种四环素类均被检出, 检出量为 166.5 ~ 2 296.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 泰妙霉素未被检出。该检测结果表明, 城市污水处理厂活性污泥中的抗生素残留问题不容忽视, 污泥的合理处置应考虑残留抗生素的去除。

参考文献:

- [1] 罗义, 周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1499 - 1505.
- [2] BOXALL A, KOLPIN D, HALLING - SØRENSEN B, TOLLS J. Are veterinary medicines causing environmental risks [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(15): 286A - 294A.
- [3] MARTÍNEZ J. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 365 - 367.
- [4] CARBALLA M, OMIL F, LEMA J, LIOMPART M, GARCÍA - JARES C, RODRÍGUEZ I, GÓMEZ M, TERNES T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant [J]. *Water Res*, 2004, 38(12): 2918 - 2926.
- [5] 常红, 胡建英, 王乐征, 邵兵. 城市污水处理厂中磺胺类抗生素的调查研究[J]. 科学通报, 2008, 53(2): 159 - 164.
- [6] CASTIGLIONI S, BAGNATI R, FANELLI R, POMATI F, CALAMARI D, ZUCCATO E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(1): 357 - 363.
- [7] XU W, ZHANG G, LI X, ZOU S, LI P, LI J. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China [J]. *Water Res*, 2007, 41(19): 4526 - 4534.
- [8] KIM S, EICHHORN P, JENSEN J, WEBER A, AGA D. Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(15): 5916 - 5923.
- [9] LI B, ZHANG T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process [J]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(9): 3468 - 3473.
- [10] KIM S, AGA D. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants [J]. *J Toxicol Environ Health Part B*, 2007, 10(8): 559 - 573.
- [11] YANG S, CHA J, CARLSON K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr: A*, 2005, 1097(1/2): 40 - 53.
- [12] GÖBEL A, MCARDELL C, JOSS A, SIEGRIST H, GIGER W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies [J]. *Sci Total Environ*, 2007, 372(2/3): 361 - 371.
- [13] KIM S, CARLSON K. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 38(4): 1301 - 1315.
- [14] AGA D, OCONNOR S, ENSLEY S, PAYERO J, SNOW D, TARKALSON D. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography - mass spectrometry [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53(18): 7165 - 7171.
- [15] 张海霞, 朱彭龄. 固相萃取[J]. 分析化学, 2000, 28(9): 1172 - 1180.
- [16] TONG L, LI P, WANG Y, ZHU K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE - LC/MS/MS [J]. *Chemosphere*, 2008, 74(8): 1090 - 1097.
- [17] 谢文, 陈笑梅, 丁慧瑛, 侯建波, 奚君阳, 钱燕. 液相色谱串联质谱同位素稀释法对蜂王浆中 10 种硝基咪唑类药物残留的检测 [J]. 分析测试学报, 2010, 29(5): 497 - 506.
- [18] 唐才明, 黄秋鑫, 余以义, 彭先芝. 高效液相色谱 - 串联质谱法对水环境中微量磺胺、大环内酯类抗生素、甲氧苄胺嘧啶与氯霉素的检测 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(8): 909 - 913.