

制药废水中头孢类抗生素残留检测方法探讨

朱培颖

杭州中美华东制药有限公司, 浙江 杭州 310000

[摘要] 较低检出限与较高灵敏度是 LC-MS/MS 法 (液相色谱——两级串联质谱) 的主要优势, 加之对固相萃取进行前处理的相关工艺愈发成熟, 因此现已广泛运用于检测地下水、再生水以及污水处理站中的出水含有的痕量抗生素。从当前相关领域的研究情况来看, 制药废水中有关残留头孢类抗生素检测其所含浓度的成果相对有限, 故而文本尝试建立并分析使用固相萃取——超高效液相色谱串联两级质谱法, 检测制药厂产生的废水中头孢类抗生素的残留浓度。

[关键词] 孢类抗生素; 制药废水; 抗生素残留; 检测方法

DOI: 10.33142/sca.v7i10.13650

中图分类号: X703.1

文献标识码: A

Exploration on Detection Methods for Cephalosporin Antibiotic Residues in Pharmaceutical Wastewater

ZHU Peiyong

Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, 310000, China

Abstract: Low detection limit and high sensitivity are the main advantages of LC-MS/MS method (liquid chromatography-two-stage tandem mass spectrometry), coupled with the increasingly mature pre-treatment process for solid-phase extraction. Therefore, it has been widely used to detect trace antibiotics in groundwater, recycled water, and effluent from sewage treatment plants. From the current research situation in related fields, the results of detecting the concentration of residual cephalosporin antibiotics in pharmaceutical wastewater are relatively limited. Therefore, this article attempts to establish and analyze the use of solid-phase extraction ultra-high performance liquid chromatography tandem two-stage mass spectrometry to detect the residual concentration of cephalosporin antibiotics in pharmaceutical wastewater.

Keywords: spore antibiotics; pharmaceutical wastewater; antibiotic residues; detection methods

引言

杀菌力出色与抗菌谱广的头孢类抗生素, 是现阶段国内临床工作以及国际临床工作中的运用范围相对广泛的一种抗感染类药物^[1]。面对国内外市场需求的不断增加, 不仅带动了此类的药物生产量提高, 也增加了制药产生的废水量。当前处理制药废水的常见工艺, 是主要选择生物处理技术再配合进行物化处理, 但传统使用的处理工艺很难将制药废水的抗生素残留彻底消除, 因此排放的制药废水逐渐成为近些年自然环境中药物 PPCPs 的一个主要来源。有关 PPCPs, 在自然环境中能长期以一定浓度稳定存在, 属于污染物中“假持久性”一类, 加之痕量 PPCPs 极易发生生物安全问题, 所以检测以及治理制药废水中抗生素残留显得尤为重要^[2]。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和实验仪器

本次实验选择的头孢类抗生素标准品都属于 USP 标准品, 主要包含以下 9 类, 分别是头孢克洛、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。其中针对头孢拉定而言, 实验使用的标准品来自 Dr. Ehrenstorfer (德国); 实验使用的头孢呋辛, 其纯度达到 91%; 实验使用的头孢曲松, 经过检测浓度为 92%, 实验使用的头孢噻肟纯度达到 93%, 至于实验中使用到的头孢噻吩的

纯度是 94%, 剩余头孢类抗生素标准品保障其纯度高于 98%。

本次实验选择的乙腈以及甲醇均属于色谱纯, 其出产商为 J. T. Baker 公司 (美国); 甲酸采购于 DikmaPure 公司 (中国); 至于其他实际试剂均属于 AR (分析纯); 实验期间的用水均是经过纯水设备制备形成的超纯水。正式开展实验前, 由实验人员依据每升 50mg 的标准配置头孢类抗生素九种标准品的单标甲醇储备液, 按照每升 50mg 的标准制备标准品甲醇储备液, 然后将两类储备液储存到棕色玻璃瓶并将其放于 -20℃ 的室内冷藏。实验人员需要将样品通过 Supelco-24 孔固相萃取设备、Oasis HLB 固相萃取进行洗涤, 再将其真空干燥以及使用 5mL 的甲醇溶液进行洗脱预处理; 通过 Quattro Premier XE 设备 (美国) 检测本次实验涉及的样品, 利用 MassLynx V4.1 对九个目标头孢类抗生素的浓度加以检测。

1.2 实验仪器条件

实验使用的检测技术仪器参数具体设置如下: (1) 将毛细管电压设置为 2.5 千伏; (2) 设置源温度为 120℃; (3) 将去溶剂的温度设定成 400℃, 脱溶剂设置其气流量为每小时 900L, 设置每小时的锥孔反吹气流量是 50L, 将每分钟的碰撞气流速度设定为 0.1mL, 取样量确定是 10L; (4) 实验选择的检测模式是 ESI+ 以及 MRM; (5) 实

验选择的脱溶剂气是浓度为 99.99% 的氮气；(6) 实验使用的碰撞气是浓度为 99.99% 的氩气。

优化质谱条件，主要通过选择离子源模式、母离子与碰撞能等要素来实现，其结果最后对检测设备灵敏性、目标物质信号强度造成直接影响^[3]。实验选择的离子源是 ESI(+), 将乙腈作为其中的流动相，利用进样针与蠕动泵依据每分钟 20L 的流速，在质谱样品间中注入选择的九种头孢类抗生素标准液（单标）。在确认母离子的基础上，对其信号使用锥孔电压调整到最高水平，然后将氩气阀开启旨在对母离子轰击，关于其中的定量离子，主要指的是信号水准相对较高的子离子；对于其中的定性离子来讲，则为信号较弱的，完成上述实验步骤后将碰撞能数值调整到最强信号标准水平，从而得到目标物特点的定量离子、定性离子对。

实验使用的色谱柱是 ACQUITY UPLC Waters® BEH C18 1.7 μm (2.1×50mm Column)；技术人员需要对柱温进行调整，本次实验的温度为三十五摄氏度；关于流动相本次实验选的是浓度为 0.1% 甲酸的乙腈溶液（水溶液）；与此同时，流动相流速控制在每分钟 0.4mL 并闸门开梯度洗脱，而且乙腈溶液和甲酸浓度在任何时刻下的百分比总和是百分百；本次实验遵循的洗脱步骤如下表所示。

表 1 实验洗脱步骤

步骤	时间	效果
第一步	0~1.90 分钟	含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液从 5.0% 线性变化到 14.5%
第二步	1.90~4.40 分钟	含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液从 14.5% 线性增长到 20.0%
第三步	4.40~4.54 分钟	含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液从 20% 线性变化到 30.0%
第四步	5.54~5.541 分钟	含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液从 30.0% 下降到 5.0%，且持续 2 分钟后进行下一种样品检测。

1.3 采样方法

本次实验的废水采样于 X 头孢制药废水处理厂，该处理厂使用的工艺流程见下图。为了保障测定结果可靠性，总共设置采样点 1、采样点 2 与采样点 3。选择的采样时间为 2023 年 7 月 1 日、7 月 9 日、7 月 18 日以及 7 月 26 日，实验人员进行三次采样且每间隔 8 小时进行一次采样；在采样点 1 收集样品 100mL，而采样点 2 与采样点 3 分收集样品 300mL。将从采样点收集到的样品倒入采样瓶（棕色玻璃瓶）并在 4℃ 的环境下保存，要求于 48 小时内检测九种头孢类抗生素的残留情况。

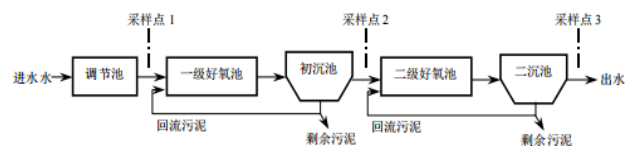


图 1 X 头孢制药废水处理厂工艺流程

需要注意的是：(1) 残留的头孢类抗生素浓度如果每升水样超过 10 μg，应将其先通过 0.22 μm 的水系滤膜进行过滤，然后上设备检测；(2) 残留的抗生素浓度如果

每升水样低于 10 μg，使用固相萃取技术进行浓缩净化处理，然后上设备检测。

1.4 评价环境风险

通过 RQ（风险商值法）对最终出单元头孢类抗生素残留浓度带来的环境风险展开有效评估，RQ 值可以选择两种类型的比值，第一种是预计的环境浓度与预计的无效应浓度，第二种则为实测的环境浓度与预计的无效应浓度^[4]。结合具体的 RQ 值划分环境风险为三个等级，具体如下表所示。

表 2 环境风险等级划分

RQ 区间	环境风险等级
>1	高环境风险
0.1~1.0	中环境风险
0.01~0.1	低环境风险

通过本次实验选择的检测技术，能测得该处理厂在最终出水单元残留的 MEC 值。技术人员通过文献查询掌握 PNEC 值，由此进行环境风险等级的判断。

2 结果与讨论

2.1 选择固相萃取条件及其方法评价

制药废水中如果存在蛋白质，会对目标物质在萃取柱上的吸附效果带来影响，随着水样逐渐增大的富集倍数也会在在一定程度上导致阻塞萃取小柱，一方面回收率下降，另一方面难以保障最终测试结果的可靠性，鉴于此，进行固相萃取工艺之前，选择浓度为 20% 的亚铁氰化钾溶液和一定量的锌用于蛋白沉淀剂；考虑到防止目标物络合沉淀剂中的锌离子、铁离子影响回收，因此选择 Na₂EDTA 用于此次实验的稳定剂，该步骤回收能回收超过 80% 的目标。水样酸碱度由于会干扰回收固相萃取，那么 Oasis HLB 固相萃取柱保证适宜的酸碱度，可以让目标物质以分子形态被吸附，同时不会吸附以离子状态存在的杂质，保障高效回收目标物质^[5]。本次实验选择的缓冲溶剂为磷酸一氢钠——柠檬酸，通过固相萃取柱并利用 HLB 柱活化、以每分钟 5mL 的流速上样、使用 5mL 高纯水洗涤、进行两小时真空干燥、使用 5mL 甲醇溶液洗脱、进行 37℃ 的氮吹与使用 1mL 高纯水复溶，完成上步骤后考察水样酸碱度在 pH=3、pH=4、pH=5、pH=6、pH=7、pH=8 情况下的目标物质回收率。据实验观察结果表明，目标物在水样 pH=5 的条件下回收率最高，区间在 72.8% 到 102.2%，而且标准偏差都没有超过 9.51%。

本次实验检测方法的定量限计算公式是：IQLX100/(R)%XC。公式中的 IQL 代表仪器定量限；公式中 R 表示的是 SPE 回收率，即实际测量目标物质浓度值和外加浓度值之间的百分比；公式中 C 代表的是样品浓缩倍数；C 的值为 100。各物质的仪器定量限至每升 1000mL 范围内，九种头孢类抗生素目标物质的色谱峰面积以及浓度，呈现出来的线性相关性明显 (R²>0.99)。结合这一结果，检测方法的定量限是每升 27.5~131.8 ng。

2.2 选择流动相类型

实验的流动相主体选择使用高纯水与乙腈，其中加入一定量的甲酸有利于信号响应增强，还能缓解色谱峰拖尾的同

时提高分离效果^[6]。鉴于此,实验设计三种流动相组合:(1)高纯水+乙腈、(2)浓度为0.1%甲酸乙腈溶液混合相同浓度的甲酸乙腈溶液、(3)浓度为0.01%的酸乙腈溶液混合相同浓度的甲酸高纯水溶液。选择每升500 μg的混合物质标准液,设定其流速是每分钟0.4mL,其中“克洛”“氨苄”“噻肟”“拉定”以及“唑啉”五种目标物质,伴随增加的甲酸浓度,其色谱峰面积未呈现大幅度变化,而“曲松”“呋辛”“西丁”以及“噻吩”的色谱峰面积有所提升。与此同时,在添加量是0.1%的情况下,九种头孢类抗生素目标物在8分钟内结束色谱峰分离,不仅形状美观而且没有拖尾现象(见图2)。由此可见,为了达到同一时间连续测定的效果,分析目标物的分离效果及其信号强度,最终确定的流动相组合是浓度为0.1%甲酸乙腈溶液混合相同浓度的甲酸乙腈溶液。

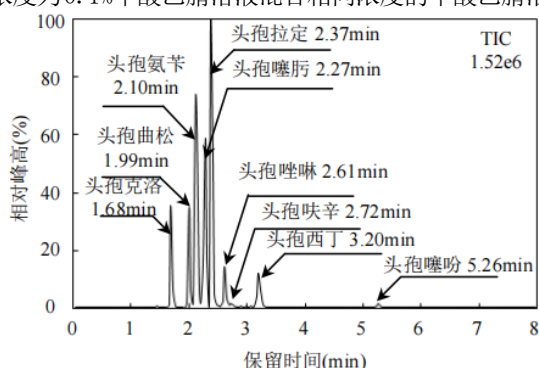


图2 实验目标物色谱(500 μg/L)

2.3 检测头孢类抗生素残留的浓度

通过实验选择的检测方法对X制药废水处理厂的头孢类抗生素残留浓度时空分布进行分析,在进水位置检测出四种头孢类抗生素,分别是“曲松”“唑啉”“噻肟”以及“呋辛”,其中“呋辛”浓度每升达到42.4 μg到119.0 μg,残留浓度最高;“唑啉”浓度每升达到10.6 μg到14.5 μg,居于第二位;“曲松”浓度每升达到5.1 μg到10.0 μg,居于第三位;“噻肟”浓度每升达到5.0 μg到6.3 μg,居于第四位。之所以采样时间不同导致头孢类抗生素残留浓度变化较大,主要是因为和制药厂生产情况相关。针对头孢呋辛而言,调节池出水单元的平均残留浓度是每升91.6 μg、一级和二级氧化出水单元平均残留浓度分别是每升37.4 μg、每升24.4 μg;对头孢克洛抗生素中的头孢唑啉来讲,调节池出水单元的平均残留浓度是每升12.9 μg、一级氧化出水单元平均残留浓度是每升5.2 μg、二级氧化出水单元的平均残留浓度达到27 μg;头孢曲松在调节池出水单元的平均残留浓度是每升7.4 μg、一级氧化出水单元平均残留浓度是每升4.2 μg、二级氧化出水单元的平均残留浓度达到2.0 μg;至于头孢噻肟调节池出水单元的平均残留浓度是每升5.6 μg、一级氧化出水单元平均残留浓度是每升2.2 μg、二级氧化出水单元的平均残留浓度达到0.6 μg。通过计算可得,X处理厂的一级氧化处理单元去除头孢呋辛残留能达到59.2%、去除头孢唑啉残留达到59.8%、去除头孢曲松残留达到44.8%、

去除头孢噻肟残留达到60%;X处理厂的二级氧化处理单元去除头孢呋辛残留能达到34.8%、去除头孢唑啉残留达到47.0%、去除头孢曲松残留达到52.5%、去除头孢噻肟残留达到75.1%;X处理厂的两级氧化处理单元去除头孢呋辛残留能达到73.4%、去除头孢唑啉残留达到78.7%、去除头孢曲松残留达到73.8%、去除头孢噻肟残留达到90.0%。综上,利用好氧污水处理工艺虽然能够去除制药废水中含有的头孢类抗生素残留,却不能彻底去除。

2.4 评估制药废水环境风险

通过两级好氧污水工艺去除处理厂进水单元九种头孢类抗生素效果达到73.0%,而处理厂的总出水单元的抗生素残留浓度相对较高,其中头孢呋辛残留浓度达到每升10.6 μg到35.1 μg,居于第一位;头孢唑啉残留浓度达到每升0.8 μg到4.2 μg,居于第二位;头孢曲松残留浓度达到每升1.0 μg到3.8 μg,居于第三位;至于头孢噻肟残留浓度为每升n.d.到1.5 μg。由此说明,残留浓度已经超过生活污水中的标准水平。基于“最大值”的原则就出水单元的头孢类抗生素(四类)残留实施环境风险评估,通过风险商值法完成对RQ值的计算,最终计算结果都超过1,由此说明环境风险等级都属于高风险。X处理厂的出水不会在自然环境的水体中排放,而是先送入该城市工业园区的污水处理厂继续处理。针对这一实际情况,需要把检测方法继续优化且调整定量限,分析工业园区的污水处理厂出水单元头孢类抗生素的残留浓度,评估对自然环境水平的环境风险。

3 结论

(1)本次实验中的固相萃取——超高效液相色谱串联两级质谱法,同时对X制药污水处理厂中九种头孢类抗生素的残留浓度进行检测。最后的检测结果说明,该方面不仅性能稳定,还能满足浓度的检测分析需求。(2)头孢类抗生素在制药废水中残留浓度偏高,运用两级好氧工艺去除的效果为73%。(3)四类头孢类抗生素在制药废水中检测的残留RQ值都超过1。

[参考文献]

- [1]彭安萍,高虎,张新波.制药废水中抗生素抗性的污染特征、检测手段和控制方法[J].环境科学,2024,45(2):844-853.
 - [2]雷雨洋,李方方,欧阳洁,等.浙江地区抗生素残留的环境分布特征及来源分析[J].化学进展,2021,33(8):1414-1425.
 - [3]汤薪瑶,左剑恶,余忻,等.制药废水中头孢类抗生素残留检测方法及其环境风险评估[J].中国环境科学,2014,34(9):2273-2278.
 - [4]张昱,唐妹,田哲,等.制药废水中抗生素的去除技术研究进展[J].环境工程学报,2018,12(1):1-14.
- 作者简介:朱培颖(1992.9—),女,籍贯:安徽芜湖,职称:中级,职务:环保工程师,毕业时间:2017.02,毕业院校:苏州科技大学,学历:研究生,学位专业:建筑与土木工程,研究方向:河道修复、废水处理。