

• 大学生科技园地 •

文章编号: 1002 - 0217( 2018) 01 - 0089 - 03

## 芜湖地区饮用水中四环素类抗生素含量检测分析

丁苗苗<sup>1</sup>, 金晨<sup>1</sup>, 胡春媛<sup>2</sup>, 于荣<sup>2</sup>, 刘飞<sup>2</sup>, 文育锋<sup>2</sup>

( 皖南医学院 1. 公共卫生学院; 2. 检验学院, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】目的:** 对芜湖地区饮用水中残留的四环素类抗生素进行检测, 以评估抗生素残留现状。**方法:** 从芜湖 7 个地区采集自来水末梢水水样 21 份, 采用固相萃取联合高效液相色谱法检测自来水末梢水水样中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的含量。**结果:** 四种抗生素的线性范围为 0.05 ~ 10 mL/L,  $r > 0.999$ , 方法检出限为 0.0272 ~ 0.2241  $\mu\text{g/L}$ , 方法的平均加标回收率为 81.82% ~ 151.11%, 相对标准偏差为 0.73% ~ 8.40%, 末梢水中目标抗生素含量低于检测限。**结论:** 芜湖地区饮用水中四环素类抗生素残留量较低。

**【关键词】**四环素类; 抗生素; 饮用水; 高效液相色谱; 固相萃取

**【中图分类号】**R 123.1 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.01.028

## Detection and analysis of the tetracyclines concentration in drinking water in Wuhu area

DING Miaomiao, JIN Chen, HU Chunyuan, YU Rong, LIU Fei, WEN Yufeng

School of Public Health, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To detect the tetracyclines concentration for evaluation of the status of residual antibiotics in the drinking water in Wuhu area. **Methods:** Twenty-one samples were obtained from the tap water in seven areas of Wuhu city. High performance liquid chromatography (HPLC) and solid-phase extraction (SPE) were performed to measure the level of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in the samples. **Results:** The standard curves for four tetracyclines were linear over the concentration range of 0.05-10 mL/L, with correlation coefficients all above 0.999. The detection limit was 0.0272 - 0.2241  $\mu\text{g/L}$ . The average recovery ranged from 81.82% to 151.11%, and the relative standard deviation varied between 0.73% and 8.40%. The target antibiotic content in the tap water was lower than the detection limits. **Conclusion:** Tetracyclines level remain relatively lower in the drinking water in Wuhu area.

**【Key words】** tetracyclines; antibiotics; drinking water; high performance liquid chromatography; solid-phase extraction

用于人类和动物的抗生素 30% ~ 90% 可以通过尿液和粪便排泄到水环境中, 且大部分未代谢, 常规废水和再循环水处理只能部分去除或降解, 抗生素残留已被公认为对健康有影响的新一类环境污染物<sup>[1]</sup>。当前我国关于水环境中抗生素的残留分析主要集中在海水、河水和城市污水, 对饮用水中抗生素的污染调查及评估非常缺乏, 饮用水中抗生素长期低剂量暴露, 可加剧致病微生物耐药性的发展<sup>[2-4]</sup>, 来自食物或饮用水中的抗生素暴露与儿童肥胖风险增加有关<sup>[5]</sup>, 因此, 开展饮用水中抗生素残留检测与评估的研究具有现实意义。

我国四环素类抗生素的使用占整个抗生素市场

份额的 15.8%, 其在环境中降解后吸附力强, 可长期稳定地存在于水环境中<sup>[6-7]</sup>, 极易通过饮用水进入人体从而影响健康。研究显示在河流、湖泊、地下水中均检测到四环素类抗生素的残留<sup>[8-9]</sup>。在安徽地区, 仅有王莹<sup>[10]</sup>针对饮用水源及污水开展过抗生素污染相关研究, 为评估芜湖地区的饮用水抗生素残留现状, 本研究以四环素类抗生素为目标检测物, 对芜湖地区饮用水中四环素类抗生素进行检测分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

##### 1.1.1 仪器 高效液相色谱仪带紫外检测器

**基金项目:** 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610368042); 安徽省自然科学基金项目(1708085QH187); 安徽省高等学校省级质量工程项目预防医学专业综合改革试点(2013zy046)

**收稿日期:** 2017-06-08

**作者简介:** 丁苗苗(1995-), 女, 2013 级预防医学本科生, (电话) 18375314208, (电子信箱) dmm.8.28@qq.com;

刘飞, 男, 讲师, 博士, (电子信箱) 44743372@qq.com, 通信作者;

文育锋, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) wyf@wnmc.edu.cn, 通信作者。

(U3000型, Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); 12位固相萃取装置(57044型, Sepelco 公司, 美国); 12位手动氮吹仪(HGC-12A型, 天津恒奥科技发展有限公司, 中国); Sepelco HLB 固相萃取小柱(200 mg/6 mL); 超纯水发生器。

1.1.2 试剂 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素 4种标准品均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 甲醇、乙腈、乙酸乙酯为色谱纯, 草酸与浓盐酸为分析纯。

1.2 标准溶液及溶液配制 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素 4种标准品用甲醇配置成质量浓度为 1 g/L 的储备液, 在 -18℃ 下避光保存; 混合标准工作液现用现配, 准确吸取适量的标准储备液于棕色容量瓶中, 用超纯水稀释成所需的浓度。

1.3 样本采集 在芜湖市弋江区、镜湖区、鸠江区、三山区、南陵县、繁昌县、芜湖县七个地区的居民家中采集自来水水样, 置于棕色瓶中保存, 48 h 内上机测定。

1.4 样品前处理 取 1000 mL 的末梢水, 加入浓盐酸调节 pH 至 2 左右, 以 12 mL/min 左右的流速通过 Sepelco HLB 固相萃取小柱, HLB 小柱在使用前预先依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 超纯水活化, 活化时要保持萃取小柱浸在溶液中, 水样萃取结束后负压抽干小柱 5 min, 再用 10 mL 含 10% 甲醇的乙酸乙酯溶液洗脱并收集, 置于氮吹仪上氮气吹干, 以 30% 的甲醇溶液定容至 2 mL, 样品经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

1.5 液相色谱条件 Thermo Fisher C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 40℃; 流动相 A 为甲醇, B 为乙腈, C 为 0.01 mol/L 草酸; 流速为 1 mL/min; 进样量为 20 μL; 检测波长为 365 nm。见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流速 /(mL/min)	甲醇 /%	乙腈 /%	0.01 mol/L 草酸 /%
0	1	1	4	95
3	1	10	20	70
8	1	5	45	50
10.5	1	5	45	50
11	1	1	4	95
20	1	1	4	95

## 2 结果

### 2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择 参照 GB/T 20764-2006《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》, 流动相采用甲

醇 + 乙腈 + 0.01 mol/L 草酸(2 + 1 + 7), 4种药物能得到有效分离, 但峰型欠佳, 保留时间较长, 怀疑是未进行梯度洗脱的原因。故根据贺蕴普等已发表的文献<sup>[11]</sup>, 流动相参照其体系①方法: 甲醇 + 乙腈 + 0.01 mol/L 草酸, 同时采用梯度洗脱的方式, 色谱峰之间分离良好, 四个目标峰峰型尖锐; 参照其体系②方法: 甲醇 + 乙腈 + 0.01 mol/L 三氯乙酸, 4种药物分离效果良好, 峰型尖锐, 但出峰时间相对延长; 参照其体系③方法: 甲醇 + 乙腈 + 0.01 mol/L 草酸 + 0.01 mol/L 三氯乙酸, 在①的基础上添加 20% 的三氯乙酸, 并未出现原文中 4种药物的洗脱速度提升现象, 反而出峰速度变慢且保留时间相对的延长。因此本研究参照贺蕴普体系①方法, 选择甲醇 + 乙腈 + 0.01 mol/L 草酸为流动相, 并进行梯度洗脱。

2.1.2 色谱图结果 图 1 为 4种四环素类抗生素的标准液相色谱图, 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的保留时间分别为 6.905、7.255、8.550、9.005 min, 可见四种药物分离效果良好, 能在 10 min 内完全洗脱, 峰型尖锐。见图 1。

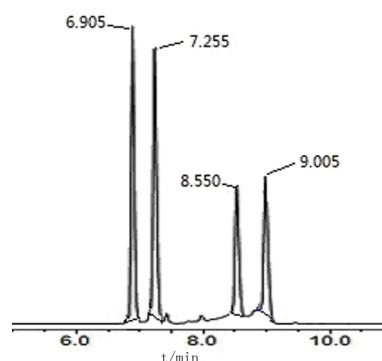


图 1 4种四环素类抗生素标准品的液相色谱图

2.2 线性范围及方法检出限 配制浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1、10 mg/L 的混合标准工作液, 每个浓度均取 20 μL 进行 HPLC 检测, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作标准曲线, 计算其线性范围、线性方程与相关系数。在空白样品中加标液并稀释, 取信噪比为 3 时所对应的浓度为方法检出限。见表 2。

表 2 4种四环素类抗生素的工作曲线

抗生素	线性方程	相关系数	方法检出限/(μg/L)
土霉素	y = 0.6674x - 0.0072	0.9998	0.0689
四环素	y = 0.7416x + 0.0106	0.9997	0.0272
金霉素	y = 0.5070x - 0.0489	0.9994	0.2241
强力霉素	y = 0.4460x - 0.0014	0.9999	0.0512

2.3 回收率与精密度 准确吸取适量的混合标准溶液添加到空白末梢水中, 配制成浓度为 0.1 mg/L

和 1 mg/L 的加标水样,每个水平取 7 个平行进样,做加标回收率实验,同时计算相对标准偏差( relative standard deviation, RSD),结果见表 3。由表 3 可知,4 种四环素类抗生素的平均回收率为 81.82% ~ 151.11%,精密度良好。

表 3 方法的回收率和精密度(  $n=7$  )

抗生素	加标浓度 /( mg/L)	实测值 /( mg/L)	回收率 /%	RSD /%
土霉素	0.1	0.08635	86.35	7.42
	1	0.87660	87.66	1.10
四环素	0.1	0.08395	83.95	4.68
	1	0.84718	84.72	0.73
金霉素	0.1	0.15111	151.11	4.87
	1	0.81214	81.21	7.04
强力霉素	0.1	0.08546	85.46	8.40
	1	0.92017	92.02	2.64

2.4 实际样品测定 用上述分析方法对 21 份芜湖市居民家中的末梢水进行测定,结果水样中四环素组分的浓度均低于检出限,均未检出 4 种抗生素。

### 3 讨论

针对环境水体中四环素类抗生素的检测方法主要有:高效液相色谱与紫外联用( HPLC-UV)、液相色谱与质谱联用( LC-MS)、高效液相色谱与串联质谱联用( HPLC-MS/MS) 及超高效液相色谱串联质谱联用( UPLC-MS/MS) 等<sup>[12]</sup>。高效液相色谱( HPLC) 是检测四环素类药物的首选方法<sup>[13]</sup>,本研究采用的是 HPLC-UV 法,相对于高效液相色谱与质谱( HPLC-MS) 联用或串联质谱( HPLC-MS/MS) 联用法灵敏度较低,检出限较高,但成本低廉,更适合常规实验室或一般检测分析使用。本研究建立的方法选择 Sepelco HLB 小柱萃取四环素类抗生素,该柱的萃取效率较高( > 80%),保证了此研究方法有较好的重现性。四环素类抗生素通常以盐酸盐形式存在,在酸性溶液中较稳定,故本研究中用浓盐酸将水样 pH 调节至 2 左右,流动相中采用浓度为 0.01 mol/L 的草酸,提高目标物的稳定性。

本研究在检测饮用水中的四环素类抗生素时仅采用定性方法,确定了检出限,并未进一步探究定量限,故在检出四环素类抗生素的前提下,不能够更进一步明确其具体残留量。此外,研究中饮用水的采集地为芜湖,芜湖处在长江南岸,青弋江与长江汇合

处,河湖水网密布,雨量充沛,水系发达,也有可能是抗生素残留浓度低未检测出的原因,而赵腾辉等检测东江上游水体四环素浓度达 32.24 ng/L<sup>[14]</sup>。由于多数抗生素在环境中的浓度与有机物污染有关联,同时也受水体的自净能力和其他污染物等环境因素的制约和影响,因此在进一步探索抗生素残留检测方法、开展抗生素残留对健康危害的研究的同时,环境因素的分析也是必要的。

### 【参考文献】

- [1] HE K, SOARES AD, ADEJUMO H, *et al.* Detection of a wide variety of human and veterinary fluoroquinolone antibiotics in municipal wastewater and wastewater-impacted surface water [J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2015, 106( 4) : 136 - 143.
- [2] XU J, XU Y, WANG H, *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 1379 - 1385.
- [3] LUO Y, MAO D, RYSZ M, *et al.* Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. *Environmental science & technology*, 2010, 44( 19) : 7220 - 7225.
- [4] RODRIGUEZ-MOZAZ S, CHAMORRO S, MARTI E, *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river [J]. *Water research*, 2015, 69: 234 - 242.
- [5] WANG HX, WANG N, WANG B, *et al.* Antibiotics detected in urines and adipogenesis in school children [J]. *Environment international*, 2016, 89-90: 204 - 211.
- [6] 宋超. 四环素强化生物去除及其在自然水体中迁移转化规律的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [7] 李道荣, 牛振华, 包瑞格, 等. Fenton 试剂氧化降解水中的盐酸四环素 [J]. *环境工程学报*, 2017, 11( 4) : 2227 - 2232.
- [8] CARVALHO IT, SANTOS L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario [J]. *Environment international*, 2016, 94: 736 - 757.
- [9] BURKE V, RICHTER D, GRESKOWIAK J, *et al.* Occurrence of Antibiotics in Surface and Groundwater of a Drinking Water Catchment Area in Germany [J]. *Water Environ Res*, 2016, 88( 7) : 652 - 659.
- [10] 王莹. 安徽部分饮用水源及污水中 9 种抗生素的污染分布特征 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [11] 贺蕴普, 贺德春, 王志良, 等. 养殖废水中四环素 HPLC 分析方法的研究 [J]. *广州化学*, 2011, 36( 1) : 26 - 31.
- [12] 李艳艳, 刘迎亚, 范霄, 等. 饮用水中抗生素残留检测方法的研究进展 [J]. *化学通报*, 2016, 79( 3) : 213 - 219.
- [13] 方小丹, 柯建明, 陈振贺, 等. 固相萃取-超高效液相色谱法测定水中四环素类抗生素 [J]. *生命科学仪器*, 2014( 3) : 32 - 34.
- [14] 赵腾辉, 陈奕涵, 韩巍, 等. 东江上游典型抗生素污染特征及生态风险评价 [J]. *生态环境学报*, 2016, 25( 10) : 1707 - 1713.