

污泥中氟喹诺酮类微污染物的测定方法研究

王洋¹, 杨雪玲¹, 易玲², 丁小双¹, 钟懿¹, 于洁¹, 王侃^{1*}, 莫春阳³

(1. 宁波大学 土木与环境工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波中科检测技术服务有限公司, 浙江 宁波 315105;

3. 三门峡市春和建材有限公司, 河南 三门峡 472135)

摘要: 污泥中累积了高浓度的氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, FQs)有机微污染物, 对生态环境和人类健康潜在危害巨大. 本文对污泥中氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、诺氟沙星(Norfloracin, NOR)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP) 3种 FQs 的固相萃取-液相色谱分析方法进行优化研究. 结果表明, 污泥经 EDTA-Na₂、磷酸盐溶液-乙腈混合液(1:1, pH=3)超声提取两次, 提取液经 HLB 固相萃取柱富集纯化, 甲醇和碱性甲醇洗脱, 洗脱液经氮吹浓缩后, 污泥中 FQs 的回收率较高. 液相色谱测定流程经优化后为 C18 色谱柱为分离柱、甲醇/水溶液为流动相进行梯度洗脱, 荧光检测器检测. 色谱图中 OFL、NOR、CIP 具有较好的分离效果, 污泥中 OFL、NOR、CIP 回收率为 48.1%~53.4%.

关键词: 污泥; 氟喹诺酮类; 固相萃取; 液相色谱

中图分类号: X708

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2021) 03-0060-06

医药类污染物是近年来出现的一类“新兴污染物”, 其主要来源于医药品的大量生产和使用. 中国已成为最大的原料药生产国, 且对药物的消耗速率惊人^[1]. 近年来, 各种医药品不断在地表水、地下水、饮用水、土壤和动植物体内检出, 这些物质广泛存在, 持久性较强, 对生态环境具有较大的潜在危害^[2-3]. 医药类污染物对生态环境和人体的影响主要体现在抗生素抗性、内分泌干扰和生态毒性等方面, 其产生作用的质量浓度可低至 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4]. 抗生素类药物进入环境后, 会引起细菌的抗性, 进而导致人类的致病菌产生抗性^[5]. 一些医药类污染物会导致生物体的内分泌系统失衡, 如干扰细胞的酶活性, 改变血细胞吞噬作用, 影响细胞粘附作用以及脂质过氧化作用等^[6]. 同时, 土壤中的一些医药类污染物会被植物吸收和积累, 并对植物生长产生不利影响^[2,7].

氟喹诺酮(Fluoroquinolones, FQs)是一类广谱抗生素医药品, 近年来生产量和使用量快速增加,

目前占全球抗生素市场份额的 15.3%. FQs 的大量使用导致其在环境中的检出频率和检出浓度不断升高. 市政污水处理厂是 FQs 进入环境的重要点源^[8]. 在世界各地污水处理厂中, 已检出大量高浓度 FQs^[8-10]. 在我国污水处理厂进水和出水中, 已检出氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)的质量浓度达 $368\sim 3\,675\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $165\sim 1\,561\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 诺氟沙星(Norfloracin, NOR)的质量浓度达 $263\sim 2\,746\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $85\sim 1\,162\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)的质量浓度达 $268\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $199\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11-12]. 这些污染物会随污水厂出水进入地表水体, 产生较大的生态毒性风险, 如影响水生动物肝细胞的氧化代谢, 导致氧化损伤; 诱导水体产生 FQs 抗性细菌等, 产生作用的质量浓度可低至 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\sim\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]. 同时, FQs 由水体迁移至土壤中后, 在 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的质量浓度下即可影响土壤微生物群落结构, 且会在植物中富集, 并通过食物链进入人体^[14].

在污水处理流程中, 活性污泥的吸附作用是

收稿日期: 2020-11-13.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(51408325).

第一作者: 王洋(1994-), 男, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 有机固废处理与资源化. E-mail: 1193261998@qq.com

*通信作者: 王侃(1977-), 男, 浙江宁波人, 博士/副教授, 主要研究方向: 水污染控制. E-mail: wangkan@nbu.edu.cn

FQs 从污水中去除的主要机制(FQs 较难生物降解), 这导致污泥中累积了种类繁多、质量浓度很高的 FQs, 如 $3\,450\sim 24\,760\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DS(干固体)OFL、 $240\sim 5\,280\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DS NOR、 $6\,858\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DS CIP^[3,15-17]。然而, 污泥基质的复杂性导致污泥中 FQs 的检测流程复杂且回收率较低。目前主要采用超声、微波或加压溶剂等提取方法结合固相萃取、液相色谱质谱联用仪等分析检测污泥中的 FQs, 其中涉及到的操作参数及变量较多, 如提取溶剂种类及浓度、固相萃取方法、色谱操作条件等, 且液相色谱质谱联用仪分析成本高昂。因此, 需对检测流程和操作参数进行优化, 探索准确、高效且成本较低的污泥中 FQs 的分析检测方法^[18-19]。

OFL、NOR、CIP 是污泥中检出频率和检出浓度最高的 3 种 FQs, 本文通过优化污泥中 FQs 的提取方法、固相萃取方法、液相色谱参数等, 得到一种能够同时检测污泥中 OFL、NOR、CIP 的方法, 可为研究污泥中 FQs 的迁移转化及降解去除提供基础和支撑^[3,15-16]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所使用的污泥采自宁波市江东北区污水处理厂。该污水处理厂污水处理工程采用 A²O 工艺, 日处理能力 10 万 t。污泥取自二沉池, 采回实验室后经 24 目筛除去悬浮物及固体杂质后, 冷冻干燥并研磨, 避光保存于干燥器中。除特殊说明, 文中所用的溶剂均为色谱级。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

分别称取 2.5 mg OFL、NOR、CIP 标准品(中检所), 采用 2 mL 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶解, 甲醇定容于 25 mL 棕色容量瓶中, 即为 100 mg·L⁻¹ 标准贮备液, 于 4 ℃ 避光保存。

1.2.2 从污泥中提取 FQs

取 1 g 污泥, 将 OFL、NOR、CIP 标准贮备液稀释为 10 mg·L⁻¹, 取一定体积(0.2~1 mL)加入污泥中, 震荡 10 min 后避光静置 24 h, 保证 OFL、NOR、CIP 在污泥中分配均匀。向加标和未加标的污泥中加入不同种类的提取溶剂, 振荡 20 min 后超声提取 15 min, 混合液在 7 000 g 离心 10 min, 收集上清液。重复上述步骤, 合并上清液, 随后稀释至一定体积。

提取溶剂包括: (a) 20 mL 乙腈-水溶液(25:75, 氨水调 pH=10); (b) 4 mL 50% 硝酸镁-氨水溶液(96:4); (c) 0.1 g EDTA-Na₂, 15 mL 乙腈-0.1 M EDTA-McIlvaine 溶液(1:1); (d) 0.1 g EDTA-Na₂, 10 mL 磷酸盐溶液-乙腈混合液(1:1, pH=3)。

1.2.3 固相萃取

采用 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱(500 mg, 6 mL)进行固相萃取, 萃取流程包括活化、进样、淋洗、洗脱 4 个步骤^[20]。设置 8 组固相萃取流程(A~H), 见表 1。收集的洗脱液采用氮吹或旋转蒸发进行浓缩, 处理温度 40~50 ℃, 干燥后溶解于 21.5% 甲醇溶液, 经 0.22 μm 有机膜过滤, 用于液相色谱分析。

表 1 不同固相萃取流程

流程	活化	上样	淋洗	洗脱
A	6 mL 甲醇、6 mL 水	直接上样	6 mL 水	6 mL 甲酸:甲醇(5:95)
B	6 mL 甲醇、6 mL 水	直接上样	2 mL 5% 甲酸水溶液	6 mL 甲醇
C	4 mL 甲醇、10 mL 水	加水至 100 mL, pH 调为 3	100 mL 水(pH=3), 5 mL 甲醇	10 mL 甲醇:乙腈:甲酸(20:75:5)
D	6 mL 甲醇、6 mL 水(pH=3)	加水至 200 mL, pH 调为 3	6 mL 水(pH=3)	3 mL 含 1% 乙酸的乙腈
E	6 mL 甲醇、6 mL 水(pH=3)	加水至 200 mL, pH 调为 3	10 mL 水(pH=3)	6 mL 甲醇、6 mL 含 2% 氨水的甲醇
F	6 mL 丙酮、6 mL 甲醇、6 mL 0.5% 甲酸	加水至 200 mL, pH 调为 3	6 mL 0.5% 甲酸	6 mL 甲醇
G	6 mL 甲醇、6 mL 0.2% EDTA-Na ₂ 水溶液(pH=4.2)	加水至 200 mL, 加入 0.4 g EDTA-Na ₂ , pH 调为 4.2	5 mL 0.2% EDTA-Na ₂ 水溶液(pH=4.2)	2 mL 甲醇:水(75:25), 2 mL 甲醇
H	4 mL 甲醇、10 mL 水(pH=3)	加水至 200 mL, pH 调为 3	50 mL 水(pH=3)	10 mL 甲醇:乙腈:甲酸(20:75:5)

1.2.4 液相色谱测定

采用配有荧光检测器的液相色谱仪(岛津, 日本)进行 FQs 质量浓度检测, 选用 Luna 5u C8 色谱柱(250×4.6 mm, 菲罗门, 美国)和 Inertsil ODS-SP C18 色谱柱(5 μ m, 250×4.6 mm, 岛津, 日本), 进样体积 10 μ L, 流速 1 mL·min⁻¹, 激发、发射波长 278、445 nm, 流动相为甲醇/水溶液, 等度或梯度洗脱. 梯度洗脱条件设置为: 15% 甲醇经 7.9 min 变为 21.5% 甲醇, 再经过 10.8 min 达到 30%, 并保持 10 min.

回收率为样品的色谱峰面积与标准溶液色谱峰面积的比值.

2 结果与讨论

2.1 固相萃取流程优化

固相萃取用于净化污泥提取液, 是影响后续液相色谱检测和分析的重要环节^[19]. 选用表 1 所示的 8 种不同固相萃取方法(A~H), 对 1 mg·L⁻¹ 的 OFL、NOR、CIP 标准溶液进行固相萃取, 回收率如图 1 所示. 方法 E 得到的回收率最高, OFL 的回收率为 75.6%, NOR 的回收率为 68.3%, CIP 的回收率为 66.4%; 其次依次为方法 C、H、A、B、F, 对应的回收率分别为 56.3%~64.3%、54.3%~56.4%、25.1%~30.8%、8.9%~10.1%、0.8%~4.0%; 方法 D 和 G 对 OFL、NOR、CIP 基本无回收. 可见, 最佳的固相萃取流程为方法 E: 6 mL 甲醇、6 mL 水(pH=3)活化 HLB 固相萃取柱, 200 mL pH=3 的样品上样, 后用 10 mL 水(pH=3)淋洗, 6 mL 甲醇、6 mL 含 2% 氨水的甲醇洗脱.

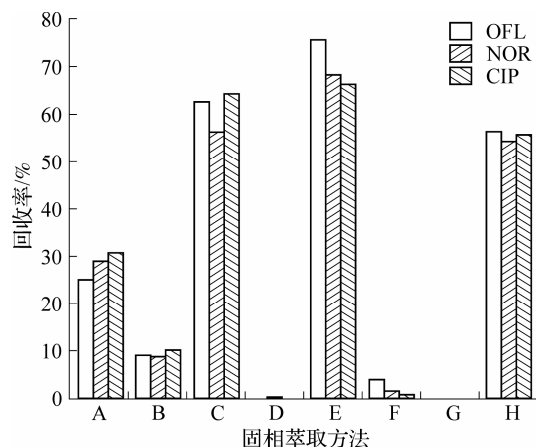


图 1 不同萃取方法对 OFL、NOR、CIP 回收率的影响

2.2 浓缩方法优化

氮吹和旋蒸是常用的有机溶剂浓缩方法. 将不同质量浓度的 OFL、NOR、CIP 标准溶液进行氮吹或旋蒸浓缩后, 样品的回收率如图 2 所示. 氮吹或旋蒸浓缩均可得到较高的回收率, 样品经氮吹后, 回收率在 81.4%~99.6%之间, 经旋蒸后, 回收率为 92.3%~125.4%. 同一浓缩方法对相同质量浓度的 OFL、NOR、CIP 标准溶液的回收率基本一致, 波动在±7%以内. 但不同浓缩方法对样品的回收率有一定影响, 旋蒸浓缩后样品的回收率整体高于氮吹浓缩, 但旋蒸浓缩后部分样品回收率大于 100%, 故选择氮吹浓缩用于污泥中 FQs 的提取纯化, 这也与文献[19]中的浓缩方法一致.

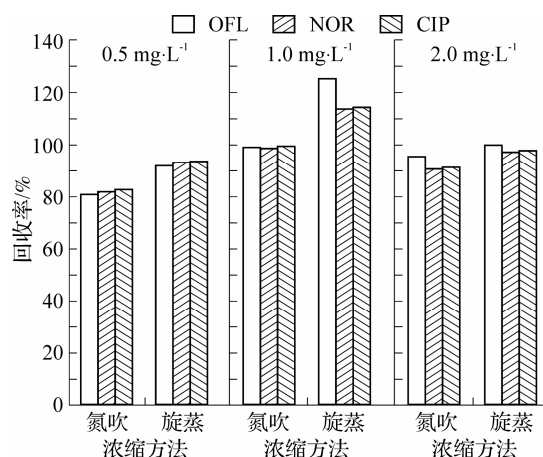


图 2 氮吹和旋蒸浓缩对不同质量浓度 OFL、NOR、CIP 回收率的影响

2.3 提取溶剂优化

不同提取溶剂(a、b、c、d)对于污泥中 OFL、NOR、CIP 回收率的影响如图 3 所示.

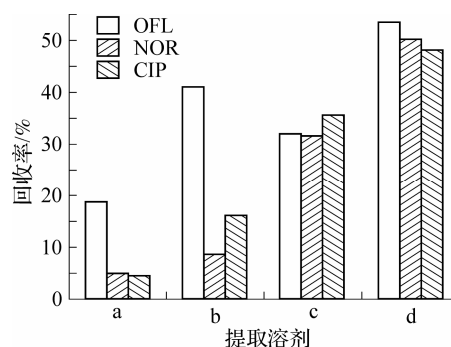


图 3 不同提取溶剂对 OFL、NOR、CIP 回收率的影响

溶剂 d 对污泥中 FQs 的提取效率最高, OFL、NOR、CIP 的回收率分别为 53.4%、50.1%、48.1%.

其次为溶剂 c, 可分别得到 31.9%、31.5%、35.6% 的回收率. 溶剂 a、b 对污泥中 FQs 的提取效率较低, 除了 OFL 在溶剂 b 提取时得到 41.0% 的回收率, 其余回收率均低于 20%. 因此, 优选溶剂 d: 0.1 g EDTA- Na_2 、10 mL 磷酸盐溶液-乙腈混合液(1:1, pH=3)进行污泥中 OFL、NOR、CIP 的提取.

2.4 色谱条件优化

C8 和 C18 色谱柱是在分析极性污染物过程中常用的两类反相色谱柱, 其类型直接影响了样品的保留时间和选择性. 以 21.5% 和 25% 甲醇为流动相对 OFL、NOR、CIP 混合溶液进行等度洗脱, 比较两种色谱柱对于目标化合物的分离效果, 结果

如图 4 所示. C8 色谱柱无法有效分离 OFL、NOR、CIP, 3 种物质的色谱峰均出现重叠. 而使用 C18 色谱柱时, OFL、NOR、CIP 的色谱峰得到了有效分离, 具有较好的分离效果和灵敏度, 故优选 C18 色谱柱用于液相色谱检测.

在对污泥提取液进行液相色谱分析时, 干扰物质的存在导致色谱峰对 OFL、NOR、CIP 的分离度远低于标准混合液的分离度. 因梯度洗脱的分离效果通常优于等度洗脱, 故采用梯度洗脱对污泥提取液中 OFL、NOR、CIP 进行分离, 梯度条件: 15% 甲醇经 7.9 min 变为 21.5% 甲醇, 再经过 10.8 min 达到 30%, 并保持 10 min, 结果如图 5 所示. 在

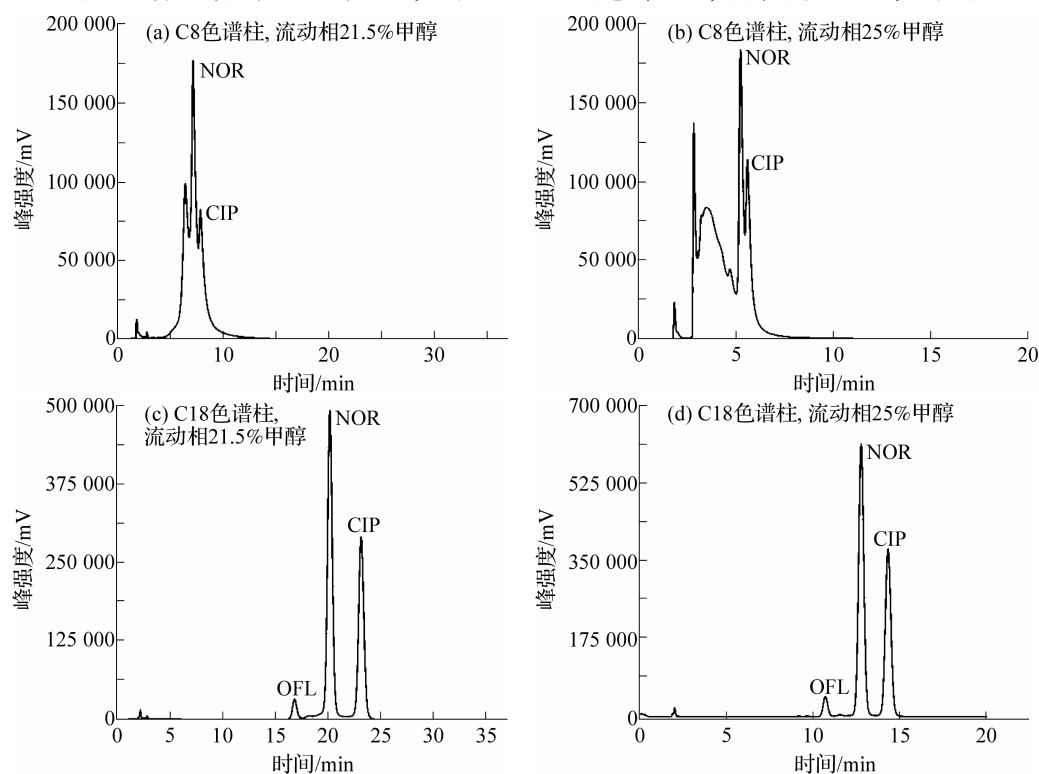


图 4 OFL、NOR、CIP 混合溶液经色谱柱分离后的液相色谱

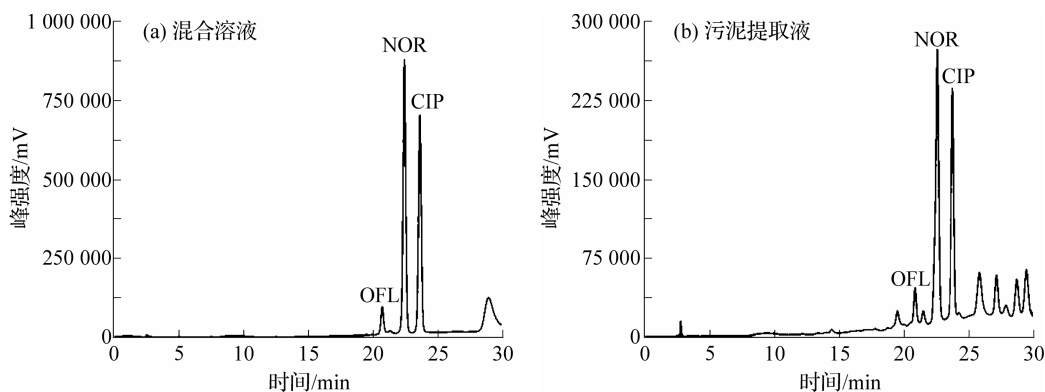


图 5 OFL、NOR、CIP 混合溶液和污泥提取液经梯度洗脱后的液相色谱

污泥提取液的色谱图中, OFL、NOR、CIP 的色谱峰附近检测出一些杂峰, 这说明在污泥样品的提取过程中, 一些与 OFL、NOR、CIP 性质接近的有机物也被提取出来。同时, OFL、NOR、CIP 的色谱峰与杂峰得到了有效的分离, 这说明优化后的色谱条件能够满足污泥中 OFL、NOR、CIP 的同时分析检测。

综上, 污泥中 FQs 的提取和测定流程优化为: 采用 0.1 g EDTA- Na_2 、10 mL 磷酸盐溶液-乙腈混合液(1:1, pH=3)进行污泥中 OFL、NOR、CIP 的提取, 提取液经固相萃取进行净化, 净化流程为 6 mL 甲醇、6 mL 水(pH=3)活化 HLB 固相萃取柱、200 mL pH=3 的提取液上样, 后用 10 mL 水(pH=3)淋洗, 6 mL 甲醇、6 mL 含 2%氨水的甲醇洗脱, 洗脱液经氮吹浓缩后用于液相色谱测定; 液相色谱配备 C18 色谱柱, 流动相为甲醇/水, 流动相梯度为 15%甲醇经 7.9 min 变为 21.5%甲醇, 再经过 10.8 min 达到 30%, 并保持 10 min。

2.5 定量范围

将 OFL、NOR、CIP 的标准溶液(质量浓度 10~500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)进行液相色谱测定, 绘制标准曲线, 结果表明在测定的浓度范围内标准曲线线性关系良好, 相关系数均高于 0.99。采用 10 倍信噪比计算定量限, 可得其值为 66.7 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DS, 可满足一般污泥中 OFL、NOR、CIP 的测定要求。

3 结论

通过对提取溶剂、固相萃取流程、浓缩方法、色谱条件等进行优化, 得到了较优的污泥中 OFL、NOR、CIP 的提取和测定方法: 采用 EDTA- Na_2 、磷酸盐溶液-乙腈混合液对污泥进行超声提取, HLB 固相萃取柱分离净化, 甲醇和碱性甲醇洗脱, 氮吹浓缩, 液相色谱(C18 色谱柱和梯度洗脱)测定。该方法能够同时检测污泥中的 OFL、NOR、CIP, 具有较高的分离度和回收率。

参考文献:

[1] Liu J, Wong M. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China[J]. *Environment International*, 2013, 59:208-224.
[2] Wu C, Spongberg A L, Witter J D, et al. Uptake of

pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(16):6157-6161.
[3] McClellan K, Halden R U. Pharmaceuticals and personal care products in archived US biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey[J]. *Water Research*, 2010, 44(2):658-668.
[4] Thanh Thuy H T, Nguyen T D. The potential environmental risks of pharmaceuticals in Vietnamese aquatic systems: Case study of antibiotics and synthetic hormones[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(11):8132-8140.
[5] Kumar K, Gupta S C, Chander Y, et al. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment [J]. *Advances in Agronomy*, 2005, 87:1-54.
[6] Gagné F, Blaise C, André C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(3):329-336.
[7] Jjemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, 93(1/2/3):267-278.
[8] Michael I, Rizzo L, McArdell C S, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review[J]. *Water Research*, 2013, 47(3):957-995.
[9] Sturini M, Speltini A, Maraschi F, et al. Sunlight-induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent: Photoproducts identification and toxicity[J]. *Chemosphere*, 2015, 134:313-318.
[10] van Doorslaer X, Dewulf J, van Langenhove H, et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 500/501:250-269.
[11] Gao L, Shi Y, Li W, et al. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China[J]. *Chemosphere*, 2012, 86(6):665-671.
[12] Tong C, Zhuo X, Guo Y. Occurrence and risk assessment of four typical fluoroquinolone antibiotics in raw and treated sewage and in receiving waters in Hangzhou, China[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13):7303-7309.
[13] Ebert I, Bachmann J, Kühnen U, et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin

- to photoautotrophic aquatic organisms[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(12):2786-2792.
- [14] Riaz L, Mahmood T, Khalid A, et al. Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil[J]. *Chemosphere*, 2018, 191: 704-720.
- [15] Chen Y, Yu G, Cao Q, et al. Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(9): 1765-1772.
- [16] Narumiya M, Nakada N, Yamashita N, et al. Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 260:305-312.
- [17] Wang K, Gao D, Xu J, et al. Interaction of ciprofloxacin with the activated sludge of the sewage treatment plant[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(35):35064-35073.
- [18] Dorival-García N, Zafra-Gómez A, Camino-Sánchez F J, et al. Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques[J]. *Talanta*, 2013, 106:104-118.
- [19] 陈莉, 贾春虹, 刘冰洁, 等. 高效液相色谱-荧光检测同时测定污泥中 7 种氟喹诺酮类抗生素[J]. *地学前缘*, 2019, 26(6):7-12
- [20] Speltini A, Sturini M, Maraschi F, et al. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(8):1337-1350.

Improved determination of three fluoroquinolones in sewage sludge

WANG Yang¹, YANG Xueling¹, YI Ling², DING Xiaoshuang¹, ZHONG Yi¹,
YU Jie¹, WANG Kan^{1*}, MO Chunyang³

(1.School of Civil and Environmental Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Ningbo Zhongke Testing Technology Service Co., Ltd., Ningbo 315105, China;

3.Sanmenxia Chunhe Building Materials Co., Ltd., Sanmenxia 472135, China)

Abstract: High concentration of fluoroquinolones antibiotic has been detected in the sewage sludge, posing great hazards to the environment and human health. An improved solid phase extraction and liquid chromatography method was developed for the determination of ofloxacin (OFL), norfloxacin (NOR), and ciprofloxacin (CIP) in the sludge. The OFL, NOR, and CIP were extracted two times from the sludge by sonication with EDTA-Na₂ and phosphate solution/acetonitrile (1:1, pH=3). The extract was purified using HLB solid phase extraction column, eluted with methanol and alkaline methanol, and concentrated by nitrogen blowing, followed by liquid chromatography determination. The liquid chromatography was equipped with a C18 column and a fluorescence detector, with methanol and pure water as mobile phase for gradient elution. The OFL, NOR, and CIP in the sludge were well extracted and separated with recoveries of 48.1%–53.4% by the developed method.

Key words: sludge; fluoroquinolones; solid phase extraction; liquid chromatography

(责任编辑 韩 超)