

分类号:

学校代码: 10140

密级: 公开

学号: 4031031284



遼寧大學

LIAONING UNIVERSITY

硕士学位论文

THESIS FOR MASTER DEGREE

论文题目:

抗生素在城市河流中的污染特征
及生态毒性研究

英文题目:

Study on few typical antibiotics pollution characteristics and ecological
toxicities in the river systems in the northern city, in China.

论文作者: 卫毅梅

指导教师: 张 远 研究员

专 业: 环境科学

完成时间: 二〇一三年四月

申请辽宁大学硕士学位论文

抗生素在城市河流中的污染特征及生态毒性研究

Study on few typical antibiotics pollution
characteristics and ecological toxicities in the river
systems in the northern city, in China.

作 者: 卫 毅 梅

指导教师: 张 远 研究员

专 业: 环 境 科 学

答辩日期: 2013 年 5 月 25 日

二〇一三年四月·中国辽宁

辽宁大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下独立完成的。论文中取得的研究成果除加以标注的内容外，不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体均已在文中进行了标注，并表示谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：卫毅梅

2013年5月30日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的原件、复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权辽宁大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。同时授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本学位论文收录到《中国博士学位论文全文数据库》和《中国优秀硕士学位论文全文数据库》并通过网络向社会公众提供信息服务。学校须按照授权对学位论文进行管理，不得超越授权对学位论文进行任意处理。

保密（ ），在____年后解密适用本授权书。（保密：请在括号内划“√”）

授权人签名：卫毅梅

指导教师签名：张红

日期：2013年5月30日

日期：2013年5月31日

摘要

可利用水资源紧缺的现状促使我们对使用过的水进行回收再利用。回灌城市河道是再生水主要用途之一。污水处理厂不能很有效的去除抗生素,随着再生水的广泛使用,其中的抗生素类污染物的环境影响不容忽视。本文针对常用的四类抗生素(磺胺类、四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类),建立了它们在水体和沉积物中的分析方法,通过方法优化实现了对多种抗生素的同时分析检测,并应用于北京市清河中抗生素残留状况研究。同时针对调查中清河含有的几种抗生素进行了毒性实验,为清河的生态风险和环境健康评价提供基础数据。

主要研究内容和结果如下:

(1) 四类抗生素固相萃取-高压液相色谱串联质谱检测方法的优化

通过优化梯度淋洗色谱分离条件,优化沉积物中抗生素的提取过程,选取最优质谱离子对,使本方法适用于同时检测水体和沉积物中的四类抗生素。在水样前处理中,当 $\text{pH}=3$ 时,所加入目标物为 10ng/L 和 100ng/L 时的回收率分别达到了 $61\text{--}89\%$ 和 $60\text{--}95\%$,置信区间在 10% 以内;替代物的回收率为 $79.9\text{--}96.4\%$; LOD 为 $0.56\text{--}6.52\text{ng/L}$, LOQ 为 $1.18\text{--}18.52\text{ng/L}$ 。在沉积物样品前处理中,当提取液中甲醇和柠檬酸缓冲液($\text{pH}=5$)体积比为 $1:1$ 时,含有 50 , 100 和 $200\mu\text{g/Kg}$ 抗生素浓度梯度的沉积物相应的回收率分别为 $55.9\text{--}104.2\%$, $48.1\text{--}90.9\%$ 和 $67.1\text{--}105.3\%$; LOD 为 $0.1\text{--}4.9\mu\text{g/Kg}$, LOQ 为 $0.2\text{--}12.6\mu\text{g/Kg}$;沉积物样品中的替代物的回收率为 $66.8\text{--}85.9\%$ 。方法回收率高,重复性好,灵敏度和准确性较高,可适用于同时测定环境中多种类抗生素,为环境中痕量抗生素的监测提供了重要的方法。

(2) 北京市清河中四类抗生素的污染特征

通过对清河四季水体和沉积物中痕量抗生素的调查研究表明:清河水体中抗生素污染物浓度水平为 ng/L 和 $\mu\text{g/L}$,沉积物中浓度水平达到 $\mu\text{g/Kg}$,远高于国内外其他河流。在清河水体中氧氟沙星的浓度最高,其在三月份的最高浓度为 $17.0\mu\text{g/L}$,在一月份为 $11.2\mu\text{g/L}$;甲氧苄氨嘧啶的中位数浓度在一月份高达 $1.8\mu\text{g/L}$;在沉积物中土霉素的浓度最高,为 $218.0\mu\text{g/Kg}$;氯霉素在水体和沉积物中的伪分配系数最大, K_d 值中位数范围为 $386.2\text{--}775.3\text{L/Kg}$ 。夏秋两季抗生素的检出率和检出量高于冬春两季,而冬春两季抗生素的浓度高于夏秋两季;

秋季抗生素的伪分配系数最高，沉积物中的抗生素可能成为除了污水处理厂出水的第二污染源。因此清河中的氧氟沙星、甲氧苄氨嘧啶、土霉素和氯霉素在冬春两季的环境行为需要引起关注。

（3）三种抗生素的急性毒性试验

本文采用费氏弧菌和大型蚤为受试生物，测定了甲氧苄氨嘧啶、磺胺甲噁唑和磺胺氯吡嗪三种抗生素在不同浓度下对费氏弧菌的抑制和对大型蚤的活动的影响作用，磺胺氯吡嗪相对于其余两种抗生素来说，对细菌的毒性较强，对应的 EC_{50} 浓度为 16mg/L ，而对大型蚤的毒性较弱，最大无效应浓度高于 200mg/L 。低浓度情况下，甲氧苄氨嘧啶可为细菌提供生长所需碳源，促进细菌增殖，其对应的 EC_{50} 浓度为 154mg/L 。磺胺甲噁唑对费氏弧菌的毒性较弱，对大型蚤的毒性和甲氧苄氨嘧啶相当，二者 48h 毒性的 EC_{50} 分别为 115mg/L 和 103mg/L 。甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑对大型蚤的联合毒性试验表明，两者在环境中为简单相加作用。混合物对大型蚤 48h 半数致死时，其中所含甲氧苄氨嘧啶浓度为 105.0mg/L ，磺胺甲噁唑为 0.9mg/L 。为生态风险评价更贴近环境现实提供了数据支持。

关键词：抗生素，固相萃取，高压液相色谱，清河，生态毒性

ABSTRACT

The shortage of water resources has prompted the water reuse in China. Urban river recharging is one of ways of reclaimed water reuse. However, wastewater treatment plants are not designed to treat emerging contaminants, such as antibiotics, and the extensive use of reclaimed water may lead to the ecological risks caused by the presence of trace antibiotics. In this paper, analytical methods were developed for determination of four types of commonly used antibiotics in water and sediments, and were applied to investigate the distribution of target antibiotics residues in Qinghe River in Beijing. Ecotoxicity tests for target antibiotics were also conducted to provide fundamental data for the ecological risk and environment health evaluation in Qinghe River.

The research contents and results are as the followings:

(1) The optimization of SPE-HPLC method for four types of antibiotics.

This method is suitable for the simultaneous detection of four types of antibiotics in water and sediments, by optimizing the gradient elution chromatography conditions, the optimal mass ion pair and the extraction process of antibiotics in the sediments. The recovery study in water samples showed that at pH=3, the recoveries of two spiking levels at 10ng/L and 100ng/L were 61-89% and 60-69%, respectively, with the confidence interval less than 10%. The recovery of surrogate was 79.9-96.4%, the LOD was 0.56-6.52ng/L, and the LOQ was 1.18-18.52ng/L. For sediment, with the extracting solution of citrate buffer and methanol (V:V=1:1), the recovery of antibiotics is preferable. The sediment recovery study with antibiotics at three spiking levels of 50μg/Kg, 100μg/Kg and 200μg/Kg was 55.9-104.2%, 48.1-90.9% and 67.1-105.3% respectively. The LOD was 0.1-4.9μg/Kg, and LOQ was 0.2-12.6μg/Kg. The recovery rate of surrogate in sediment was 66.8-85.9%.

(2) The pollution characteristics of antibiotics in Qinghe River.

The antibiotics levels in water of Qinghe River were at ng/L and μg/L, and in

sediment the level was up to $\mu\text{g/Kg}$, far higher than other rivers. Ofloxacin had the highest concentration in water samples, with $17.0\mu\text{g/L}$ in March and $11.2\mu\text{g/L}$ in January, followed by trimethoprim with the median concentration of $1.8\mu\text{g/L}$ in January, while oxytetracycline was the most dominant one in sediment with the value of $218.0\mu\text{g/Kg}$. The pseudo-partition of chlortetracycline was highest among all target compounds, with the median value ranged from $386.2\text{--}775.3\text{L/Kg}$. The detection rate and detectable amount of antibiotics was higher in summer and fall, but the concentration was higher in spring and winter. The risks of ofloxacin, trimethoprim, oxytetracycline and chlortetracycline in Qinghe River should not be overlooked.

(3) The toxicity test.

In this study, toxicity of three antibiotics' (trimethoprim, sulfamethoxazole and sulfachloropyridazine) to *V. fischeri* and *D. magna* was investigated. Sulfachloropyridazine has the strong toxicity to *V. fischeri* with the EC_{50} of 16mg/L , and less toxicity to *D. magna* with the maximum no-effect concentration higher than 200mg/L . Trimethoprim can be a carbon source for bacterial at low concentration with EC_{50} of 154mg/L . Sulfamethoxazole has less toxicity to *V. fischeri*, and a similar 48h- EC_{50} to trimethoprim on *D. magna*, with the concentrations of 115mg/L and 103mg/L , respectively. The study on combination toxicity of trimethoprim and sulfamethoxazole to *D. magna* indicated that the effect of the two drugs in the environment was a simple additive effect. The mixture to *D. magna* for the median lethal in 48h contained trimethoprim with the concentration of 105.0mg/L and sulfamethoxazole 0.9mg/L .

Key words: antibiotics, SPE, HPLC, Qinghe River, ecotoxicity

目 录

引 言	1
0.1 概述	1
0.1.1 抗生素简介	1
0.1.2 抗生素的使用现状	2
0.1.3 再生水简介	3
0.1.4 再生水的使用现状	4
0.2 水环境中抗生素的来源与归宿	5
0.2.1 城市河流环境中抗生素的来源	5
0.2.2 城市河流环境中抗生素的归宿	6
0.3 水环境中抗生素残留的危害	7
0.4 水环境中抗生素的分析方法	8
0.4.1 样品预处理方法	8
0.4.2 样品检测技术	9
0.5 水体中抗生素的生态毒性研究方法	10
0.5.1 发光细菌在毒性研究中的作用	11
0.5.2 大型溞在毒性研究中的作用	12
0.5.3 联合毒性	12
0.6 课题来源、意义及研究内容	14
0.6.1 课题来源	14
0.6.2 研究背景及意义	14
0.6.3 研究内容	14
0.6.4 创新点	15
0.6.5 技术路线	16
0.7 小结	16
第 1 章 17 种抗生素多环境介质的前处理及分析方法的优化	17

1.1 实验材料	17
1.1.1 仪器与设备	17
1.1.2 标准物质与试剂	17
1.2 实验方法	20
1.2.1 玻璃容器的清洗	20
1.2.2 水样及沉积物样品采集	20
1.2.3 样品前处理	21
1.2.4 液相色谱与双质谱联用的分析	22
1.2.5 定量和方法验证	22
1.3 结果与讨论	23
1.3.1 HPLC-MS/MS 条件的选择与优化	23
1.3.2 水样前处理优化	26
1.3.3 沉积物样品前处理的优化	27
1.3.4 分析方法的确认及定量	29
1.4 本章小结	32
第 2 章 北京清河中抗生素的污染特征	33
2.1 研究区域概况	33
2.2 样品采集与样品前处理	33
2.3 结果与讨论	36
2.3.1 抗生素在城市河流水体中四季的浓度含量调查结果	36
2.3.2 抗生素在城市河流沉积物中四季的浓度含量调查结果	40
2.3.3 抗生素在城市河流水体和沉积物中的伪分配系数	44
2.4 本章小结	45
第 3 章 三种典型抗生素的急性毒性研究	47
3.1 受试生物与材料	47
3.1.1 受试生物	47
3.1.2 实验材料和仪器	47
3.2 实验方法	47
3.2.1 费氏弧菌毒性实验的方法	48

3.2.2 单个抗生素的大型蚤毒性实验的方法	48
3.3 结果和分析	49
3.3.1 费氏弧菌毒性实验的结果和分析	49
3.3.2 单个抗生素大型蚤毒性实验的结果和分析	50
3.3.3 混合抗生素的大型蚤联合毒性实验的结果与分析	51
3.4 本章小结	52
第 4 章 总结与展望	54
4.1 总结	54
4.2 展望	55
致 谢	56
参考文献	57

图 表 目 录

图目录

图 0-1 本文技术路线	16
图 1-1 密云水库沉积物的加标回收实验中 18 种抗生素的总离子色谱图. . .	25
图 1-2 选取的每种抗生素的离子 MRM 色谱图	26
图 1-3 不同 pH 值的柠檬酸提取液和不同甲醇与柠檬酸缓冲液配比的回收率	28
图 2-1 清河地图及采样点位	33
图 2-2 在 2012 年春季和 2011 年秋季清河水体中抗生素在不同点位的浓度	38
图 2-3 在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河水体中抗生素在不同点位的浓度	39
图 2-4 在 2012 年春季和 2011 年秋季清河沉积物中抗生素在不同点位的浓度	42
图 2-5 在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河沉积物中抗生素在不同点位的浓度	43
图 3-1 三种抗生素对费氏弧菌的抑制率	49
图 3-2 大型蚤对两种抗生素的毒性结果	50
图 3-3 甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的混合毒性对大型蚤的抑制率	52

表目录

表 0-1 毒性单位法的评价标准	13
表 0-2 剂量-反应曲线法的评价标准	13
表 1-1 抗生素的主要信息	18
表 1-2 在 HPLC-MS/MS 条件最优情况下,质谱仪检测每种抗生素相应的 MRM 的参数	24
表 1-3 优化后的淋洗梯度条件	25
表 1-4 水样加标回收率实验结果	29
表 1-5 沉积物加标回收实验结果	30

表 2-1	采样点经纬度坐标	34
表 2-2	采样点水体的理化性质	34
表 2-3	不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季水体中的分布情况汇总 ..	36
表 2-4	不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季的水体中的分布情况汇总	37
表 2-5	不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季沉积物中的分布情况汇总	40
表 2-6	不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季沉积物中的分布情况汇总	41
表 2-7	不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季清河水体和沉积物之间的伪分配系数	44
表 2-8	不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河水体和沉积物之间的伪分配系数	45
表 3-1	三种抗生素对费氏弧菌的 EC50 值	49
表 3-2	两种抗生素的大型蚤毒性实验浓度	50
表 3-3	两种抗生素对大型蚤的 48h-EC50 值	51
表 3-4	甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的毒性单位法实验浓度	51
表 3-5	甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑对大型蚤的混合毒性实验结果	52

引言

在全球水资源紧缺的背景下，水资源的再生利用越来越广泛。在我国，再生水主要作为城市河流的补给水源，并且这种河流正逐步成为中国城市河流的主要类型。而再生水中以抗生素为代表的药物和个人护理用品痕量有机污染物则对人体健康和生态系统存在很大的潜在影响。

0.1 概述

0.1.1 抗生素简介

抗生素是一类能在低微浓度情况下抑制或影响生物机能的化学物质，在医疗及动、植物病虫害防治方面发挥了巨大的作用。自 20 世纪 40 年代开始，抗生素被广泛用于疾病预防、治疗和促进动物生长，它们在人类医用药物使用中居第 3 位、占处方药总量的 6%以上。抗生素在生物体中只有少部分可被代谢，90%以上会以母体化合物或者代谢物的形式随排泄物进入自然环境，虽然在环境中的浓度较低，但是也会影响其中的动、植物和其他生物的正常生命活动，并可能通过食物链威胁人类健康（Khetan SK, 2007）。目前被广泛使用的抗生素按照化学结构可分为： β -内酰胺类、喹诺酮类、四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类、磺胺类等。

（1） β -内酰胺类抗生素： β -内酰胺类抗生素是抗生素中用量最大的一类，其化学结构中具有 β -内酰胺环，主要包括青霉素和头孢菌素两大种，青霉素极易失效，头孢菌素毒性低。按照其天然与否，可分为天然的和半合成的两类。 β -内酰胺类抗生素的是通过抑制转肽酶从而干扰细胞壁合成，作用于抗革兰氏阳性菌，部分可作用于抗革兰氏阴性菌。该类抗生素具有一定的刺激性，能引起部分人群的过敏性反应。

（2）喹诺酮类抗生素：喹诺酮类抗生素在人类和动物临床上被广泛使用，又称吡酮酸类或吡啶酮酸类，是一种合成的广谱抗生素，被称之为是理想的抗菌药物。喹诺酮类抗生素发展至今已经到了第三代，即氟喹诺酮类抗生素，其

效果优于第一代和第二代喹诺酮类抗生素，主要包括诺氟沙星（norfloxacin）、环丙沙星（ciprofloxacin）、氧氟沙星（ofloxacin）和恩诺沙星（enrofloxacin）等。其抗菌作用与头孢类抗生素相似，但抗菌力强、体内低残留、价格低廉、安全性高。但是这类药物对于幼年动物承重关节部位的软组织可能具有永久性损伤。

（3）四环素类抗生素：四环素类抗生素都具有同一种基本母核（氢化骈四苯），其作用机理是通过抑制细菌蛋白质合成达到杀菌的作用，属人畜共用抗生素，为广谱抗生素，极易产生抗药性，主要有四环素、土霉素和氯霉素等。其对畜禽呼吸系统疾病和家畜的细菌性腹泻具有有效的治疗作用，当其被连续低浓度的投药时，能增加禽畜的生殖量和促进禽畜生长。但其不当的使用则可能导致牙齿发育不全，骨骼、心脏畸形等，严重者也可能会死亡。

（4）氨基糖苷类抗生素：氨基糖苷类抗生素是由氨基糖和氨基环醇由氧桥连接而成的，其作用机理为可诱导细菌合成错误的蛋白质以及阻止和抑制已合成蛋白的释放，从而使细菌死亡，该类抗生素仅对需氧菌有效，并且其抗菌活性显著强于其他类抗生素。主要包括链霉素、庆大霉素、卡那霉素和阿米卡星等。由于其吸收极性较大，全身给药多采用肌肉注射，吸收迅速而完全。其使用会对耳、肾和神经肌肉都有一定的副作用。

（5）大环内酯类抗生素：大环内酯类抗生素是由 12-16 个碳骨架的大内脂环为母体，其作用机理为阻断转肽作用及 mRNA 位移，可选择性抑制蛋白质合成，以达到抑菌效果。主要有红霉素、罗红霉素和麦迪霉素等。长期大量的使用该类药物可导致胆和肝的内分泌失调，甚至可对中枢神经系统产生副作用，出现头部眩晕、心情焦虑、恶梦、幻觉或意识模糊等症状。

（6）磺胺类抗生素：磺胺类抗生素都是以对位氨基苯磺酰胺为基本结构的衍生物，为重要的化学治疗药物，其作用机理为干扰细菌核酸和蛋白质的合成，但只能抑菌不能杀菌。主要包括磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑和甲氧苄氨嘧啶。其具有抗菌谱较广、性质稳定和使用方便的优点，但是易吸收的磺胺类抗生素则会引起皮疹和药热以及对肾脏、造血系统、中枢神经系统和胃肠道有不良影响。

0.1.2 抗生素的使用现状

作为抗生素的生产大国，在 2003 年，我国青霉素年产 28000t，土霉素年产

10000t, 分别占世界总产量的一半以上 (Bruee JR, 2005)。同时, 数据表明, 我国也是抗生素的使用大国, 每年抗生素的人均消费量在 138g 左右, 而美国仅为 13g。抗生素按使用对象, 可分为人用抗生素和兽用抗生素。

我国的人用抗生素使用的非常广泛, 总量约为美国的 600 倍左右, 其估计用量在我国所有药品使用量中占 30%左右, 在基层医院, 其比例甚至高达 50%。除了处方药外, 药店出售的药品中很大一部分也是抗生素, 而且居民家中普遍备有该类药物。而在西方发达国家, 抗生素的用量则仅占所有药品的 10%左右。据忧思科学家联盟 (Union of Concerned Scientists) 统计 (UCS, 2001), 在美国, 每年使用大约 16000t 抗生素, 其中将近 70%用于非治疗目的。人用抗生素的滥用导致了抗生素的耐药性增高, 据统计, 目前青霉素的耐药性已经高达 100% (Bruee JR, 2005)。近十年来, 人用抗生素的组成发生了较大的变化, β -内酰胺环、大环内酯类、喹诺酮类的抗生素用量显著增加。并且, 喹诺酮类抗生素凭借其抗菌谱广、抗菌活性强、不良反应小以及因其作用机理与其他抗生素不同而无交叉耐药性等优点, 其使用量已接近青霉素类, 甚至超过大环内脂类 (刘护鱼, 2004)。

用于养殖业的兽用抗生素除了作为治疗之外, 还被作为药物性饲料添加剂 (MFAs) 添加到动物饲料或饮水中用于预防病害和促进生长 (Jin S., 1997)。统计表明, 每年我国生产的 700t 喹诺酮类抗生素, 半数以上用于养殖业; 从 1950 年到 1999 年, 美国每年用于养殖业的抗生素量, 从 91t 增加到了 9300t, 到 2000 年已经达到 16200t; 澳大利亚每年用于人类、兽类的抗生素比例为 36%和 64%, 其中兽类用药中有 87.5%的抗生素用于饲料添加剂 (Khaehatourians G G, 1998)。土霉素和四环素等四环素类抗生素是兽用抗生素中使用最广泛、使用量最大的一类抗生素 (李宗品, 2006)。

0.1.3 再生水简介

再生水是对工业污水、生活污水等非传统的水源进行回收, 经适当处理后达到一定水质标准, 并在一定范围内重复利用的一类水资源。再生水相较于天然水体或自来水, 其在微生物、重金属、营养盐、盐分以及有机污染物等方面均高于天然水体, 因此再生水的使用过程常伴随影响城市河流生态系统健康的问题, 例如: 水华暴发、水体黑臭等。

目前对于再生水的回用可能引起的环境问题的研究，大部分都集中在再生水中的 COD、BOD 及氮磷等污染，或者病原体等微生物污染（Ibekwe AM，2003；钱靖华，2006；Guidelines for water reuse, 2004），同时也有大量研究表明再生水还含有抗生素类新型有机污染物，其存在危害了受纳水体的生态安全 and 人体健康。Ternes 等早在 20 世纪 90 年代对德国 49 个污水处理厂的出水进行了调查，检测出 32 种药物类污染物，其中有些抗生素的浓度达到了 $\mu\text{g/L}$ 水平（Ternes T A.，1998）。随后，在美国、加拿大、瑞典等许多国家的污水处理厂出水中也都频繁检出氟喹诺酮、大环内酯、磺胺和四环素等多种抗生素（Carballa M，2004；Lindberg RH，2005；Miao XS，2004）。我国也在再生水中检测出多种抗生素，例如：在对广州市污水处理厂的进出水的调查中，徐维海等检测到氧氟沙星、诺氟沙星、罗红霉素、脱水红霉素和磺胺甲恶唑等，浓度水平介于 9-2054ng/L 之间（徐维海，2007）；胡建英课题组调查了北京 6 个污水处理厂进出水中的抗生素，共检出了 5 种磺胺类抗生素，其中磺胺吡啶在出水中的最高浓度达到 $1.0\mu\text{g/L}$ （Chang H，2008），在北京高碑店污水处理厂的进出水中检出了 8 种喹诺酮类抗生素，并在其中首次检出第四代喹诺酮加替沙星（Xiao Y，2008）。

虽然由于抗生素使用现状及各地对污水处理的方式不同，导致不同国家和地区污水处理厂出水中抗生素种类和含量有很大差异，但是抗生素已经成为各地区再生水中的主要污染物质之一，并对环境水体造成了一定影响。美国地质调查局在 1999-2000 年间对美国境内 30 个州的 139 条河流进行调查，发现抗生素的检出率达到 40-50%（Kolpin DW，2002）；英国、德国、意大利、瑞士等国家的城市河流中也检测出甲氧苄啶、大环内酯和磺胺类等抗生素（刘锋，2010）；广州城市河段中曾经检测出多种目标抗生素，浓度均高于美、欧等国城市河流中的含量（徐维海，2006）。高立红等分析了北京市两个以再生水为水源的河流（清河和高碑店湖）的水样，均检出了部分抗生素药物，其中磺胺嘧啶的浓度可达到 715ng/L（高立红，2010）。

0.1.4 再生水的使用现状

目前，再生水已成为我国第二水源，在许多城市得到广泛应用。将再生水用作城市河流水系补给，是再生水的重要用途之一，可以在一定程度上缓解城

市景观和生态用水短缺的压力。

早在 19 世纪 30 年代，城市污水再生处理后作为河道和湖泊的补给用水就已经开始。1932 年美国在旧金山建立了世界上第一个污水再生水厂，用于公园湖泊观赏用水的补给。现加州建有 200 多个污水再生水厂，多用于河湖补给和绿地浇灌等。西欧、日本等地也建有相似的污水再生水厂。例如：在日本大阪市公园局，建有污水日处理能力 1 万吨的再生水厂，再生水主要用于大阪城外河道环境用水。日本从 1985 年到 1996 年已使用再生水复活了 150 多条城市小河流。

在我国，北京市较早就开始利用城市再生水补给河道和景观水体，2008 年北京市总用水量为 35.3 亿立方米，其中地表水 5.7 亿立方米，地下水 23.4 亿立方米，再生水 6.2 亿立方米，再生水的用量已超过了地表水（王宝贞，2010）。2010 年北京市城市污水再生利用率达到 65%，其中回用于河道景观用水量达到 50 万 m^3/d 。随着天津、石家庄、西安、合肥、郑州等城市也开始实施类似工程，以再生水为补给水源的河流已成为中国城市河流的主要类型。

0.2 水环境中抗生素的来源与归宿

0.2.1 城市河流环境中抗生素的来源

抗生素经过人体和动物摄入后，在生物体内经过各种各样的生物代谢作用，随后相当大一部分以母体抗生素的形式而另一部分则以代谢产物的形式随着生物体的排泄物进入自然环境。有研究表明，一些抗生素的代谢产物进入环境后可在适当的条件下重新合成为原来的抗生素原体（Berger K，1986）。

环境中的抗生素主要来源有两种，一种是工厂、医用、生活废水中残留的抗生素。对于抗生素生产厂排放的废水来说，由于该类废水处理技术不够成熟，且投资和处理成本高，以至于废水的实际处理率很低。我国医院抗生素使用和家庭自备抗生素的高比率导致医用废水和生活废水中抗生素的普遍存在，并且由于污水处理厂出水的水质指标控制标准不包含大多数抗生素，因此抗生素类药物的去除不太被重视，一般污水处理厂的抗生素去除效率在 60%到 90%，因此，尽管城市污水大部分进入污水处理系统，也不可避免的导致抗生素在地表水中的高检出率，并污染饮用水源和地下水（陈涛，2010）。

另一种抗生素污染源为养殖业。抗生素被大量用于养殖业，作为预防动物疾病和促长剂。研究表明用于禽畜的抗生素大约有 30-75%以母体抗生素的形式随排泄物排入体外，且能在施用粪肥的土壤中长期滞留（Hamscher G，2005）。我国在世界上是禽畜养殖大国，据估算在 2010 年，我国禽畜粪便年排量可达到 45 亿吨，然而 80%以上的粪便没有经过合适的处理，而被直接用于农田施肥（鲍艳宇，2008）。而许多水产养殖户则是直接将大量抗生素撒入水体。这种不合理不规范的使用处理方法导致养殖业的成为我国抗生素面源污染的主要来源之一（李兆君，2008）。

对于城市河流中抗生素的来源来说，污水处理厂出水成为其主要污染源。

0.2.2 城市河流环境中抗生素的归宿

抗生素在进入环境后，其环境行为主要包括吸附和降解两个过程。其中，吸附作用是抗生素在环境中迁移的重要路径。抗生素的吸附能力因其分子结构、理化性质、沉积物类型和环境条件的不同而不同。研究表明，四环素类抗生素在黏土矿物、土壤和沉积物上有很强的吸附效应（Sithole BB，1987；Rabolle M，2000）；一部分大环内酯类和氟喹诺酮类抗生素在土壤中的黏土矿物成分上也有较强的吸附作用，但较四环素类要弱一些（Rabolle M，2000；Nowara A，1997）；磺胺类抗生素在土壤和活化淤泥上的吸附较弱（Thiele S，2000；Ingerslev F，2000）。被吸附或与胶体结合后，抗生素将失去其抗菌活性，从而影响其生物活性（Kummerer K，2009）。而水环境中存在的一些其它物质，如腐殖酸、水合氧化铝等也会与抗生素相互作用，影响其吸附过程（Gu C，2008；Sibley SD，2008）。

降解作用是环境中抗生素消除的主要途径，具体包括水解、光降解和微生物降解等。其中水解是水中抗生素降解的重要环境行为。Huang 等认为水解是四环素的一种重要的转化机理， β -内酰胺类和大环内酯类最易溶于水，发生水解（Huang CH，2001；Lunestad BT，1995），磺胺类在水环境为酸性条件下易于水解，而在中性条件下其水解可以忽略不计（Huang CH，2001）。光解是抗生素在水环境中的另一种降解途径。四环素类抗生素容易发生光解，研究表明。在太阳光照射下，21 天后海水 1 米深度内的土霉素的降解率可达 99%，而磺胺类抗生素在水中不容易发生光解（Lunestad BT，1995）。抗生素在水中也可发

生生物降解，例如在好氧水体中，喹乙醇、甲硝唑、泰乐菌素以及土霉素的半衰期分别为 4-8 天、9.5-40 天、14-104 天、42-46 天，而在缺氧条件下抗生素的降解速度明显变慢（Ingerslev F，2001）。

目前对于环境中抗生素的研究，多集中在研究其在天然水体或沉积物中的吸附、水解和光解等环境行为，缺乏针对以再生水为介质的研究。尽管近期也有人研究了以再生水为补给水源的河流中抗生素随着河水的迁移以及在水相和沉积物相间的分配（Massey LB，2010），但并未揭示出这种河流的特殊水环境化学特征对抗生素迁移转化环境行为的影响。实际上，以再生水为补给水源的河流，其水质参数（有机质含量、营养盐水平等）和生态系统结构等均与天然水体有较大差异（Wang Z，2003；Ferreira da Fonseca A，2007），而这些特殊的水化学参数，比如有机质含量，会对抗生素的环境行为造成重要的影响。Zhang 等人发现，天然有机质对四环素在沉积物上吸附过程的影响作用要强于沉积物的阳离子交换量和粘粒含量（Zhang GX，2010）。而腐殖酸能明显减缓氟喹诺酮类抗生素沙拉沙星和加替沙星的光降解（葛林科，2009）。

0.3 水环境中抗生素残留的危害

由于抗生素的作用机理主要针对的是人体及动物体内的病原性致病细菌，因此抗生素在进入环境后不仅会对目标生物起作用，同时也会对非目标生物以及生态系统产生影响。众多研究表明，不同种类的抗生素的生态毒性差异较大，并且同一种抗生素对不同种类的生物的毒性也不同。

孔维栋的研究表明，抗生素可在低浓度的时候促进植物生长，在高浓度的时候抑制植物生长，并且不同的土壤或生长基质，也会导致抗生素对植物的影响差异非常大（孔维栋，2007）。2004 年，Sanderson 等人采用 QSARs 和现有的水生生物生态毒理学实验数据，对 226 种抗生素的生态毒性进行了系统的评价，结果显示，超过 50% 的抗生素对鱼类具有毒害作用；20% 的抗生素对藻类非常毒；16% 的抗生素对大型蚤极毒（Sanderson H，2004）。同时，抗生素的滥用也导致了环境中细菌对抗生素的耐药性越来越普遍。研究结果表明，污水处理厂中的大肠杆菌对四环素的耐药性高达 57%（Reinthal F.F.，2003），并且抗生素在土壤中残留累积也会导致抗生素耐药性细菌数量的增加（Halling-Sorensen B.，2002）。

0.4 水环境中抗生素的分析方法

近年来，痕量药物检测技术不断发展，检测限和检出限不断降低，但是由于药物本身残留的低浓度，强极性和弱稳定性，其分析和研究方法仍然受到了很大的挑战。

0.4.1 样品预处理方法

样品预处理的目的是浓缩和净化样品，使目标物可以被更好，更明晰的检测和分析。样品预处理的好坏直接关系到分析测定结果的准确度，在分析测定过程中占有重要地位。时至今日，样品预处理的方法基本完善，预处理方法多达几十种。经典的预处理方法主要包括固相萃取（SPE）、固相微萃取（SPME）、液相微萃取（LPME）、液膜萃取（LME）、超临界流体萃取（SFE）、液-液萃取（LLE）、微波辅助提取（MAE）等。目前广泛应用的有固相萃取、固相微萃取、液相萃取等。

（1）固相萃取

20 世纪 70 年代以来，固相萃取（SPE）得到了迅猛的发展，其主要用于痕量物质的分析，如捕集大气中的痕量有机物，处理环境水样及固体样品。固相萃取柱主要包括 Oasis Oasis HLB、C18、Oasis WAX、ENVI-18、C8、Strata X、Lichrolute EN、CBX、Isolute ENT⁺等，其采用选择性吸附和选择性洗脱的方式对样品进行富集、分离和纯化，除去干扰物质（程雪梅，2002）。SPE 可配大容量采样器和快速浓缩干燥装置，批量处理样品，并可与液相和气相等联用进行在线监测。除此之外，它还具有有机溶剂用量少、方便、安全、高效、精密度高等优点。缺点为需要使用有毒的有机溶剂解吸，并且极性化合物的萃取也存在一定问题。

（2）固相微萃取

固相微萃取（SPME）最先由加拿大 Waterloo 大学的 Pawliszyn 教授的研究小组于 1989 年首次进行开发研究，在 1993 年由美国的 Supelco 公司实现商品化（Arthur C.L.，1990）。固相微萃取的三种基本模式有包括直接萃取、顶空萃取和膜萃取。相较于固相萃取，固相微萃取无需使用有机溶剂，将采样、萃取、浓缩、进样集于一体，便于携带，可以对样品进行现场采集和富集，并且其选择性强、灵敏度高，可分析复杂样品，能够与气相、气相-质谱、液相、液相-

质谱仪联用，易于自动化。其缺点为萃取涂层脆弱，使用寿命有限，有样品残留的问题。

（3）液相微萃取

自 20 世纪 90 年代以来，国际上开发了另一种新的方法 LPME(Liquid Phase Microextraction)，即液相微萃取，是液液萃取的微型化，在溶剂用量上只需几到几百 μL ，是一种环境友好的萃取技术，在样品需求量上只需 1 到 10ml 左右 (Quintana J.B. , 2004)。其萃取效率高，富集比可达 1000 倍以上，这一特点使其非常适合于对环境样品中的痕量或超痕量污染物和生物样品中低浓度药物的萃取。液相微萃取的萃取与进样都只需一个微量进样器，且萃取和浓缩可一步完成，使用方便、简单、检测快速、污染少、便宜、且可达到与 SPME 相同的萃取效果。并且其可与 HPLC、GC 及 HPLC-MS 等仪器实现在线联用。

0.4.2 样品检测技术

色谱法为目前广泛使用的检测方法，是一种根据混合物中诸组分在两相间不同的分配原理以获得混合物的分离和分析的方法，适合于有机化合物的定量分析。按两相的状态可以分为气相色谱法和液相色谱法。近几年，色谱和色谱/质谱联用在环境药物检测方面的应用也有较多报道。

（1）气相色谱法和气相色谱与质谱联用法

气相色谱法适合于分析检测挥发性和对热稳定的物质，在使用气相色谱分析之前，样品需要先进行衍生化，并且气相色谱的检测限较低，而且不能直接给出定性分析结果，这些原因影响到方法的稳定性和精确性。而气相色谱与质谱的联用在一定程度上弥补了这一缺陷，具有定性能力强、选择性好、灵敏度高和成本低等优点，并作为美国环保署 (EPA) 和日本工业标准 (JIS) 规定的自来水和废水中部分有机污染物的标准分析方法。

（2）高效液相色谱法和高效液相色谱与质谱联用法

高效液相色谱 (HPLC) 是目前广泛应用的一种检测方法，气相色谱理论的引入以及技术上高压泵、高效固定相以及高灵敏度检测器的采用，使其相较于气相色谱，拥有不受样品的理化性质限制、样品分离速度更快、效率更高和操作可自动化等优点。据统计，在已知的化合物中，20%的化合物可使用气相色谱分析，而 70-80%可使用液相色谱分析。

自 2000 年以来,关于液相色谱与质谱联用检测环境中痕量药物的报道越来越多。Quintana 等采用 SPE-LC 法建立了一种自动在线检测技术,该法的目标分析物回收率均大于 88%,检测限为 0.02-0.67ng/mL,变异系数小于 11%,以对地表水、污水和尿液中的水杨酸、萘普生、酮洛芬、布洛芬、双氯酚、苯扎贝特等进行在线检测 (Brown K.D., 2006)。Imran 等采用 SPE-HPLC 法测定污水中的抗呕吐剂-多潘立酮。样品通过 C18 固相萃取柱净化,使用乙腈洗脱, HPLC-UV 测定。此方法的流动相为磷酸缓冲液 (50mM, pH 3.5)-乙腈 (80:20, v/v),流速为 2.0mL/min,检测波长为 230nm。此法预处理简单方便,成本低廉,梯度洗脱分离效果好,重现性高,回收率为 95.0% (Ali I., 2006)。Hirsch 等采用 HPLC/MS/MS 技术,对地表水和污水处理厂污水中四大类十八种抗生素进行分析检测,检测限低至 ng/L:四环素用 125×3mm Macherey&Nagel 多孔玻璃 100RP-18 色谱柱分离,流动相为草酸和乙腈混合溶液;青霉素和其他抗生素用 125×3mm Merck 多孔玻璃 100RP-18 色谱柱,但流动相分别为醋酸铅与乙腈混合溶液及醋酸氨与乙腈混合溶液;除了氯霉素外,其它抗生素的分析都是在阳离子模式下进行 (Hirsch R., 1998)。McArdell 等同样应用该方法,对污水处理厂进水和出水中的大环内脂类抗生素进行检测,结果表明,5000 倍浓缩时,方法检测限为 2.0-35.0ng/L (McArdell C S, 2003)。Campagnolo 等采用 HPLC/MS/MS 方法对家畜养殖厂中动物排泄物的存储池以及附近水源中残留的抗生素进行了检测,除四环素检测限为 0.15mg/L 外,其余抗生素都是 0.05mg/L (Hartig C, 1999)。

0.5 水体中抗生素的生态毒性研究方法

目前,关于抗生素对不同生物,包括水生和陆生生物的毒性效应的研究已经较为系统。对水生生物的毒性效应研究多为短期急性毒性试验,以生长、死亡和繁殖作为主要衡量指标,但是实验室研究大多采用高剂量的抗生素暴露生物体试验,浓度水平在 mg/L,而水环境中抗生素的实际残留浓度多在 ng/L-μg/L 之间并且还是多种抗生素的混合,因此开展抗生素联合毒性、低剂量、长期污染暴露试验显得十分必要。本研究选取常规毒性实验生物,开展抗生素的单独和联合急性毒性试验,为后期开展慢性毒性试验奠定基础的同时,为生态风险评估提供数据。

0.5.1 发光细菌在毒性研究中的作用

发光细菌是一种在正常生长过程中能发射出可见荧光的非致病性革兰氏阴性菌。它们主要以共生、腐生、寄生及自由方式在海洋中存在，并且只需一种有机营养物就可生存和繁衍，被称为“广食性”细菌。发光细菌在正常的生理过程中可发出波长为 450-490nm 的蓝绿光，并且研究表明，不同种类发光菌的发光机理都是酶促氧化还原反应（Thomtdka KW, 1993）。

发光细菌按照《伯杰系统细菌学手册》的分类，主要包括有弧菌属(Vibrio)，代表菌种为费氏弧菌(V.fischeri)；希瓦氏菌属(Shewanella)，代表菌种为羽田希瓦氏菌(S.hanedai)；发光杆菌属(Photobacterium)，代表菌种为明亮发光杆菌。其按存在区域可划分为海洋发光菌、淡水发光菌和陆生发光菌。其中淡水发光菌为弧菌属(Vibrio)中的霍乱弧菌(V.cholerae)和青海弧菌(V.Qinghaiensis)，陆生发光菌主要为肠杆菌科的发光杆菌属(Photorhabdus)，其余皆为海洋发光菌（Daniela C, 1999；Holt J G, 1994）。

自 1978 年美国的 Backman 公司研制出一种生物毒性测定仪即“Microtox”之后，由于发光细菌毒性效应测定灵敏、快速并且价格相对低廉，发光细菌的毒性检测技术在全球范围内得到了广泛应用。发光细菌在环境污染毒性评价和检测上起到了重要作用。Younghee Kim 等利用费氏弧菌检测了乙酰胺酚(acetaminophen)、卡巴西平(carbamazepine)、西米替丁(cimetidine)、地尔硫卓(diltiazem)、甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim)和五种磺胺类(sulfonamides)抗生素的 EC50，Ferrari 等也采用同样的发光细菌检测了卡巴西平(carbamazepine)和磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole)两种抗生素的 EC50，结果表明，即使使用相同种类的发光菌和抗生素，其测定结果也有相当大的差异（Younghee Kim, 2007；Ferrari B, 2004）。石颖等的研究表明，不同的发光细菌对抗生素的灵敏度不同，青海弧菌 Q67 对低浓度喹诺酮类(quinolones)抗生素比磺胺类(sulfonamides)和呋喃类(nitrofurans)检测灵敏度高，最小检出限为 0.002mg/L；明亮发光杆菌 T3 则对磺胺间甲氧嘧啶钠(Sulfamonomethoxine sodium)的检测灵敏度高于恩诺沙星，最小检出限为 0.1mg/L（石颖, 2012）。Evelien De Bel 等利用大肠杆菌和凝结芽孢杆菌对环丙沙星(Ciprofloxacin)及其降解产物进行了毒性试验，在 120 分钟以内，随着降解时间的增长，两种杆菌被抑制的越来越强，表明环丙沙星的降解产物毒性要

比母体强 (Evelien De Bel, 2009)。

0.5.2 大型蚤在毒性研究中的作用

大型蚤 (Daphnia) 是国际公认的标准毒性实验生物, 被广泛用作指示生物研究评价环境中各种污染物的生物毒性 (ISO, 1989)。大型蚤是一种体型较小的浮游动物, 以藻类为食, 对水体净化有重要作用; 是鱼类和无脊椎捕食动物的饵料, 在水生生态系统的物质循环和能量流动中担任重要环节; 其广泛分布于多种水体; 对污染物反应灵敏; 在适宜条件下以孤雌生殖为主, 可确保实验材料的均一性, 以及生物对环境条件的反应有良好的一致性; 生长和繁殖周期短, 繁殖量大, 实验周期短; 实验室培养成本低; 可综合反应被测样品毒性。

大型蚤监测化学污染物毒性的方法有很多种, 包括有急性致死实验、慢性中毒实验和生物富集实验等。急性致死实验的实验周期为 24 小时至 48 小时, 一般是评估程序的第一步, 需测试的数据包括半数致死浓度 (LC50)、半数效应浓度 (EC50) 和近年兴起的更快速的大型蚤 3 小时趋光指数抑制浓度。其实验操作简便, 毒理学意义大, 经常成为立法依据。但急性致死实验得到的浓度值相比实际环境中污染物存在的浓度往往偏大两个数量级, 因此, 慢性中毒实验和生物累积实验显的更有意义。慢性中毒实验是将大型蚤置于含有污染物的溶液中, 以得到污染物对大型蚤的存活、生长和繁殖的影响信息, 确定污染物的最高允许毒性浓度, 并将其类推到自然种群。生物富集实验是测定大型蚤随着水和食物摄入, 污染物在其体内累积的程度, 根据污染物在动物组织内的累积水平计算出生物浓缩系数, 用于评价污染物的环境危害。

0.5.3 联合毒性

在实际环境中, 污染物往往不止一种, 生物体也很少或者根本不可能暴露于单一的污染物中。因此研究多种污染物对水生生物体的联合毒性效应可以更贴近环境现实。联合毒性作用的分类和评价主要包括毒性单位法、剂量-反应曲线法、相加指数法、相似性参数法等。

(1) 毒性单位法

毒性单位法最早由 Sprague 提出, 用于测定混合物在特定反应水平上毒性

的一种方法 (Sprague J. B., 1965)。Marking 在 1975 年将这一概念应用推广到混合物的相加作用 (Marking L. L., 1975)。

规定：

$$TU_i = C_i / EC_{50,i} \tag{0-1}$$

其中， C_i 是混合物在半抑制效应时第 i 组分的浓度； $EC_{50,i}$ 是第 i 组分单独作用时的半抑制浓度。

评价：

$$M = \sum TU_i \tag{0-2}$$

其中， M 为混合物的毒性，是各组分的毒性单位之和。若 M_0 表示混合物中各组分毒性单位的最大值，则具体评价标准见表 0-1 (De Meester , 1991)。

表 0-1 毒性单位法的评价标准

M 值范围	$M=1$	$M>1$	$M<1$	$M=M_0$	$M_0>M>1$
混合物的作用类型	简单相加	拮抗	协同	独立	相加

(2) 剂量-反应曲线法

此方法是一种评价不同混合物联合毒性效应的新方法 (Li W. , 1999)。规定，若两种物质的作用方式相似，固定其中一种物质 (B) 的剂量，对另一种物质 (A) 的剂量变化作剂量反应曲线。实验数据符合 S 形，其逻辑方程使用四个参数：

$$y = [(a - b)/(1 + x/c)b] + d \tag{0-3}$$

其中， a 为曲线中的最大响应； b 为斜率； c 为 EC_{50} ； d 为曲线中的最小响应； y 为响应； x 为剂量。根据物质 A 和混合物 (A+B) 实验所得的剂量反应曲线可由计算机计算出理论曲线参数 (Poch G. , 1995)。

评价：用 F 检验比较实验所得曲线和理论曲线的斜率。具体评价标准见表 0-2。

表 0-2 剂量-反应曲线法的评价标准

P 值	作用类型
$P>0.05$	相加作用

0.6 课题来源、意义及研究内容

0.6.1 课题来源

本课题来源于国家自然科学基金“以再生水为水源的城市河流及城市河流湿地中抗生素的迁移转化及控制机理研究”(项目代码:E0804)。

0.6.2 研究背景及意义

在过去的二十年里,中国的水资源压力日益增长,人均可用水量减少、水质恶化、水资源匮乏,这些现象迫使人们寻找更有效的利用有限的水资源的途径,比如水的再生利用,因此再生水的应用越来越广泛。在世界上,再生水用于浇灌植物是水资源回用的常见做法(Olli Varis, 2001; Francisco Pedreroa, 2010)。尽管抗生素在环境中是痕量存在,并且研究表明抗生素的48h-EC50通常都在mg/L的水平,但是抗生素在环境中长期暴露可能会诱发其潜在的基因毒性效应,促进细菌进化成抗性菌,甚至破坏水生生态系统(Mearns, 2011; Kummerer, 2004)。在国内,北京相对于其他城市,城市化严重,在2011年最高用水量就达到了27400t/d。同年,北京市处理污水总量为118万吨,污水处理效率达到82%,利用再生水71万吨,利用率达到60%,经过处理的再生水,大多用于回灌城市河流。由于污水处理厂对抗生素的去除效率差、抗生素的过量使用和再生水的广泛使用,导致抗生素在环境中广泛存在。因此,对城市河流中抗生素污染的研究工作意义重大。

本研究针对来自于再生水的抗生素类污染物,采用SPE-HPLC-MS/MS技术,研究其在城市河流中的空间分布特征,季节变化,环境因子对污染物的影响,以及其可能污染来源和输入途径;研究抗生素对生物的生态毒性,为城市再生水的安全使用和水质转化提供理论依据。

0.6.3 研究内容

根据文献报告以及研究组对北京市清河（该河流是北京市城市水系中以再生水为补给水源的典型河流，其河道上建有人工湿地）的前期研究，拟选择磺胺类、大环内酯类、四环素类和喹诺酮类抗生素为重点研究对象。主要包括以下几个方面。

（1）环境介质中痕量抗生素的前处理及分析方法的优化

在实验室内建立同时检测多种抗生素的分析方法，通过筛选空白的污染低的实验容器及溶剂、同位素标记样品内标以及最终样品外加标样分析技术，确保正确定量，并排除分析过程中的样品污染。

（2）城市河流中抗生素的来源、组成及分布特征研究

以北京清河为研究区域，在不同季节，调查排入清河的污水的组成和污染水平，分析抗生素浓度在空间和时间上的变化，采用多元统计分析方法，分析城市河流各环境因子对抗生素污染特征的相关性，识别主要影响因素。

（3）抗生素的生态毒性研究

选取三甲氧苄氨嘧啶（trimethoprim）、磺胺甲恶唑（sulphamethoxazole）和磺胺氯吡嗪（sulphachloropyridazine）为研究物质，采用费氏弧菌和大型蚤为受试生物。计算物质在单种和联合作用下对受试生物的48h-EC50，为风险评价提供数据支持。

0.6.4 创新点

（1）再生水在城市水系中扮演者越来越重要的角色，以再生水为补给的河流正成为中国城市河流的主要类型，针对这类河流开展研究，具有实际意义和创新效果。

（2）针对以再生水为水源的城市河流的水环境特点，开展抗生素类污染物的环境行为研究，有助于揭示目标污染物在城市河流中的污染特征和因果关系。

0.6.5 技术路线

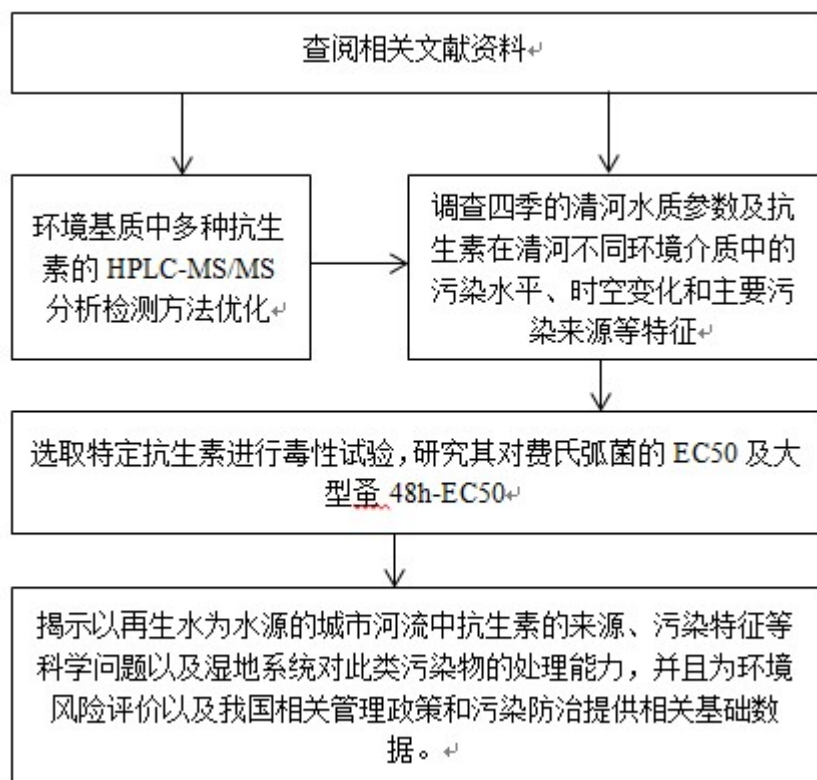


图 0-1 本文技术路线

0.7 小结

本文以四类抗生素在清河中的分布、浓度水平为研究对象, 同时挑选特定抗生素, 以费氏弧菌和大型蚤为受试动物, 研究其 48h-EC50 值, 研究结果对于再生水补给河流中抗生素的生态风险评价有重要的参考价值, 也为今后课题组在毒理层面探索抗生素对水生生物的慢性毒性和生殖毒性提供了重要依据。

第1章 17种抗生素多环境介质的前处理及分析方法的优化

抗生素在水环境中的残留问题已成为当前环境领域的研究热点之一（王朋华，2008）。目前水环境中的四环素类、磺胺类、喹诺酮类以及大环内酯类等抗生素的测定方法报道较多（谭建华，2007；Cha J.M.，2006；Niu H.，2007），但只有少数几篇报道了这四类抗生素的综合测定。本论文根据现有的工作条件，采用固相萃取（SPE）和高效液相色谱与质谱相串联的结合方法，通过优化检测和提取方法等，建立适用于同时检测多环境介质中多种抗生素的分析方法，为我国抗生素水污染状况的调查提供重要技术支撑。

1.1 实验材料

1.1.1 仪器与设备

固相萃取及色谱仪器与设备：十二孔固相萃取（SPE）装置（Supelco，USA），Oasis HLB 固相萃取柱（500mg/6mL，Waters），安捷伦高效液相色谱（Palo Alto，CA，USA），Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column（4.6×150 mm，5 μm）色谱柱，微量进样器（25 μL），样品瓶（1.5 mL）。

其他设备：过滤装置（Waterman 滤膜、0.22 μm 微孔滤膜），超声仪、Delta320 pH 计（Mettler TOLEDO），电子天平（精度 0.0001g），氮吹仪，振荡器，离心机，4L 棕色采样瓶。

1.1.2 标准物质与试剂

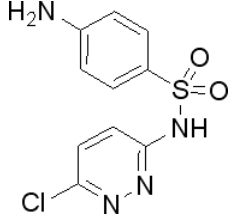
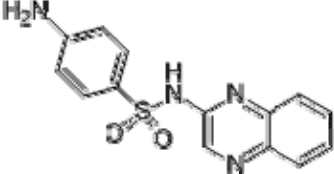
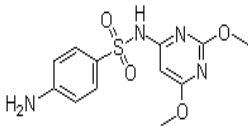
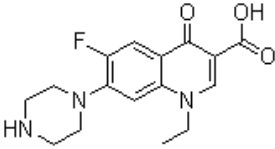
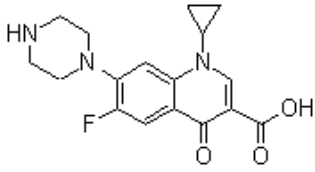
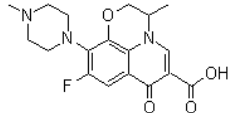
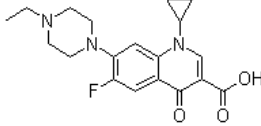
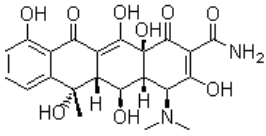
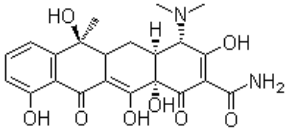
四类抗生素类物质：磺胺二甲嘧啶（sulfadimidine），磺胺甲基嘧啶（sulfamerazine），磺胺氯吡嗪（sulfachloropyridazine），磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole），磺胺地索辛（sulfadimethoxine），磺胺甲氧嘧啶（sulfamethoxypyridazine），甲氧苄氨嘧啶（trimethoprim），恩诺沙星（enrofloxacin），氧氟沙星（ofloxacin），土霉素（oxytetracycline），四环素

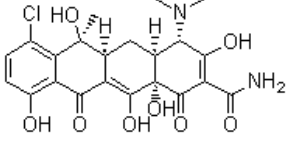
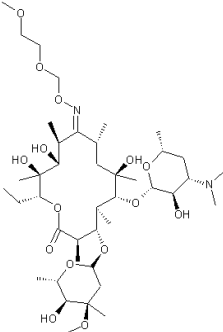
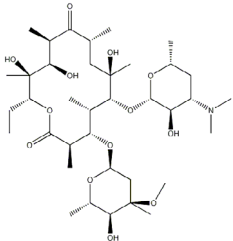
(tetracycline), 氯四环素 (chlortetracycline), 红霉素 (erythromycin) 和罗红霉素 (roxithromycin) 均购自美国 sigma 公司 , 主要信息见表 1-1。回收率指示物 $^{13}\text{C}_3$ -caffeine 购自美国剑桥同位素实验室。甲醇和乙腈为色谱级 , 购于 Fisher Scientific (Houston, TX, USA)。甲酸、 Na_2EDTA 、丙酮、二水合柠檬酸钠和七水合柠檬酸购自北京化学试剂公司。实验用水为去离子水 (除非有特别说明)。

标准物质储备液：分别将各种磺胺类、四环素类、大环内脂类溶于甲醇配成 100mg/L 的溶液；喹诺酮类溶于甲醇与 0.1% , 1M 的甲酸中配成 100mg/L 的溶液。储备液冷藏于-20 。

表 1-1 抗生素的主要信息

种类	化合物	CAS 号	分子量	结构图
Sulfonamides	Trimethoprim (TMP)	738-70-5	290.3	
	Sulfadimidine (SMD)	57-68-1	278.3	
	Sulfamerazine (SMA)	127-79-7	264.3	
	Sulphachloropyridazine (SCP)	80-32-0	284.7	
	Sulphamethoxazole (SMX)	723-46-6	253.3	
	Sulfamethoxypyridazine (SMP)	80-35-3	280.3	
	Sulfathiazole (STZ)	72-14-0	255.3	

Quinolones	Sulfachloropyridazine (SPD)	80-32-0	284.7	
	Sulfachinoxaline (SCX)	59-40-5	300.3	
	Sulphadimethoxine (SDX)	122-11-2	310.3	
	Norfloxacin (NOR)	70458-96-7	319.3	
	Ciprofloxacin (CIP)	85721-33-1	331.3	
	Ofloxacin (OFL)	82419-36-1	361.4	
Tetracyclines	Enrofloxacin (ENR)	93106-60-6	359.4	
	Oxytetracycline (OTC)	79-57-2	460.4	
	Tetracycline (TC)	60-54-8	444.4	

Macrolides	Chlortetracycline (CTC)	57-62-5	478.9	
	Roxithromycin (ROM)	80214-83-1	837.1	
	Erythromycin (ERM)	114-07-8	733.9	

1.2 实验方法

1.2.1 玻璃容器的清洗

由于本实验中所研究的目标抗生素浓度极低，因此实验结果容易受到干扰影响，所以在前处理各步骤和液相色谱与质谱的检测阶段用到的容器应当充分清洗，以免实验过程中其他物质对测定结果的干扰。

本试验中，所有玻璃容器加中性洗涤剂超声清洗后，分别用自来水、去离子水润洗 3 次，然后用锡纸包裹置于 130 ℃ 烘箱中干燥 4 小时以上，备用。

1.2.2 水样及沉积物样品采集

本实验采用密云水库的水与沉积物作为环境基质。

本试验水样采集使用 4L 棕色采样瓶采样，以防止抗生素发生光敏作用。采样前，应充分清洗采样瓶，采样时用待采集的水样荡洗数次；沉积物则使用采

泥器采集，放入密封袋中。所采样品须立即送回实验室，水样于 4℃ 冷藏，沉积物样于-20℃ 冷冻。由于抗生素易降解，所以所有分析应尽量在一周内完成。

1.2.3 样品前处理

（1）水样前处理

水样采集完毕后，水样品需经多步样品前处理。样品前处理的主要目的有两点，一是对水样中的目标分析物进行浓缩富集。本实验运用固相萃取手段对水样中的痕量抗生素进行富集，提高仪器检测的有效性。另外是对目标物的分离净化，否则水样中的某些污染物会干扰测定结果的灵敏度和准确性，同时影响色谱柱的使用寿命。

由于重金属与抗生素的螯合作用，使环境基质中抗生素的提取有一定的难度。研究表明， Na_2EDTA 可以螯合重金属，提高萃取率（Tong L, 2009）。在采集的 1L 水样过 0.47mm 的 Whatman 滤膜，加入内标指示物 $^{13}\text{C}_3$ -咖啡因 100ng 和 0.2g Na_2EDTA ，并用 3M 的 H_2SO_4 将样品 pH 调至 3，备用。Oasis HLB 小柱（500mg，6ml）依次用 6mL 甲醇，6mL 去离子水活化，保持柱内有水不干。利用大流量采样器将样品及预淋洗过的 Oasis HLB 小柱串联，开通真空泵，调节流速 3-5mL/min，使水样通过 Oasis HLB 固相萃取柱，待样品完全流出后，用 5mL 10% 的甲醇溶液和 5mL 高纯水依次清洗 Oasis HLB 固相萃取柱，弃去全部流出液。固相柱在 65kPa 负压下，抽干 1 小时，然后用 8mL 甲醇淋洗，收集洗脱液于 10mL 试管中，在 40℃ 下将洗脱液氮吹浓缩至近干，将浓缩液移至棕色 GC 小瓶，并用甲醇水溶液（甲醇/水=1/9，v/v）定容于 1.0mL，待测。

（2）沉积物前处理

沉积物样品冷冻干燥完之后，研磨过 60 目的筛子，备用。将各种抗生素的甲醇溶液等量的加入 10g 土壤中，并且加入一定丙酮促进混合液和沉积物的混合（Xu J, 2008）。将搅拌均匀的沉积物置于室温，暗光下，使其自然蒸发 12 小时。根据所需要的浓度，把加过混合物的样品混入未处理的沉积物中，使沉积物中的抗生素浓度达到所需浓度。

方法的优化是以抗生素含量浓度为 100 $\mu\text{g/Kg}$ 的沉积物为实验对象。沉积物中提取抗生素的关键是提取液，文献中提取液的种类各种各样，在本实验中分别采用五种萃取液（A：甲醇；B：柠檬酸缓冲液；C：甲醇+柠檬酸缓冲液（50:50

v/v);D 甲醇+柠檬酸缓冲液(20:80 v/v);E:甲醇+柠檬酸缓冲液(80:20 v/v)),柠檬酸缓冲液的 pH 分别为(3,5,7)对沉积物中的目标物进行提取。最终选择柠檬酸缓冲液(pH=5)与甲醇体积比例为 1:1 的混合溶液为沉积物中抗生素的提取液。

取研磨好的加入目标抗生素的沉积物样品 2g 放入 100mL 的 PP 材质的离心管中,加入 5mL、0.1M 的 Na₂EDTA 溶液,15ml 甲醇,10ml 柠檬酸缓冲液,100ng ¹³C₃-咖啡因。将盛有混合物的离心管超声 15 分钟,震荡 20 分钟(300 转/分钟),离心 5 分钟(4000 转/分钟)。上述方法重复 3 次,收集上清液于 500mL 烧杯中,用去离子水将上清液稀释至 500mL 备用,剩余处理方法与水样相同。

1.2.4 液相色谱与双质谱联用的分析

(1) 仪器参数

色谱分析柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6×150mm, 5μm);流动相 A:乙腈,流动相 B:0.1%的甲酸溶液;检测波长:检测波长 254nm,参照波长 270nm;色谱柱温度:30;流速:0.30mL/min;进样量:10μL。三重串联四级杆质谱的电离源为电喷雾电离源(ESI);雾化器压强为 40psi;扫描方式:正离子扫描;毛细管电压为 4000V;干燥气流速:8L/min;干燥气温度:350;多反应选择监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式检测。

(2) 目标抗生素的质谱检测参数的优化

通过直接注入 1mg/L 每种目标物的标准溶液来优化 ESI-MS 条件。向质谱仪中注入各抗生素的单标溶液后先进行全扫描,找出准确的[M+H]⁺的分子离子峰。随后分别对此分子离子进行能量轰击,以获得二次破裂产生的子离子,将分子离子和信号强度适宜的子离子组成监测对,用 MRM 模式进行检测。在此基础上选定母离子和子离子组成的特征离子的丰度和比例达到最佳的监测对,以便后续进行定性和定量分析。

(3) 目标抗生素的液相色谱淋洗分离的优化

在上述仪器参数情况下,先通过等度洗脱确定个目标物的保留时间,后调整梯度淋洗程序,以确立实验目标物的最佳分离度的液相色谱分组分离条件。

1.2.5 定量和方法验证

磺胺类的混合标准工作溶液：吸取不同体积中间浓度混合标准储备溶液，用棕色 GC 瓶（1.5mL 规格）配成 5.00 μ g/L、10.0 μ g/L、20.0 μ g/L、50.0 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L 不同浓度的基质混合标准工作溶液，溶液为甲醇水溶液（甲醇/水=1/9，v/v）。4 保存，可使用一周。

非磺胺类的混合标准工作溶液：吸取不同体积中间浓度混合标准储备溶液，用棕色 GC 瓶（1.5mL 规格）配成 5.00 μ g/L、10.0 μ g/L、20.0 μ g/L、50.0 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L 不同浓度是基质混合标准工作溶液，溶液为甲醇水溶液（甲醇/水=1/9，v/v）。当天使用，当天配制。

将配置好的标准曲线分别进样，以标准工作溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。通过外标法根据监测产物离子的峰面积，计算样品中抗生素的浓度。所有分析显示，两种环境基质中的抗生素在选定的浓度范围内线性关系良好，且相关系数高于 0.98。

回收率实验以密云的水和沉积物为样品。水样中加入的两种抗生素浓度等级（10 和 100ng/L），沉积物中则加入三个浓度等级（50，100 和 200 μ g/Kg）。分别在信噪比（S/N）为 3 和 10 时，计算抗生素的检测限（LOD）和定量限（LOQ）。信噪比是使用 MassHunter 软件（安捷伦）计算在 5 μ g/Kg 浓度时的磺胺类和大环内酯类，与 10 μ g/Kg 浓度时的氟喹诺酮类和四环素的回收率试验的结果得到的。

1.3 结果与讨论

1.3.1 HPLC-MS/MS 条件的选择与优化

由于绝大部分抗生素具有热不稳定性和低挥发性，所以它们不能使用气相色谱检测。而配备有电喷雾电离源（ESI）的液相色谱拥有高敏感度和选择性，并且根据化合物的结构信息，可以快速测定复杂环境介质中多重残留的物质，因此它被用来测定抗生素在环境介质中的含量（Romero-González R，2007）。

ESI 是一个非常好的、温和的电离方法，适合于极性和非极性化合物的电离。质谱分析的运行条件根据安捷伦最优控制器软件调节其运行环境，包括每种抗生素的碰撞能量、碰撞诱导电解电压和定量离子对。MRM 模式是在二级质谱串联的基础上，实现对一级质谱中的母离子分子和二级质谱中的 2-3 个

子离子同时进行监测，选取两对丰度最高的特征离子对，其中相应较高的离子对为定量离子对，另一个为定性离子对。表 1-2 列出了各种目标物的定性化和定量化的最佳条件。根据 Mistri H N 等的研究，选取乙腈和 0.1%甲酸水溶液为流动相，以保障色谱条件优化至有完全最优的峰形和分辨率(Mistri H N ,2010)。优化后的淋洗梯度见表 1-3。图 1-1 表明优化后的色谱条件对目标化合物的分离和辨别十分有效。图 1-2 表明选取的每种抗生素的离子 MRM 色谱图具有很好的峰形。

表 1-2 在 HPLC-MS/MS 条件最优情况下，质谱仪检测每种抗生素相应的 MRM 的参数

(a 子离子用于定量；b 子离子用于定性；c 为回收率替代物)

化合物	停留时间 (min)	碰撞诱导解离电 压 (V)	MRM 转变 (m/z)	碰撞能量 (eV)
Sulphacetamide	9.90	90	215→156 ^a	5
		90	215→108 ^b	18
¹³ C ₃ -caffeine ^c	10.32	120	198→120 ^a	15
Sulphathiazole	10.79	110	256→156 ^a	10
		110	256→108 ^b	20
Trimethoprim	12.08	110	291→230 ^a	25
		110	291→261 ^b	25
Norfloxacin	13.31	90	320→302 ^a	18
		90	320→276 ^b	18
Ofloxacin	13.65	110	362→318 ^a	15
		110	362→261 ^b	25
Oxytetracycline	13.97	120	461→426 ^a	15
		120	461→444 ^b	10
Ciprofloxacin	14.95	110	332→314 ^a	20
		110	332→231 ^b	35
Tetracycline	16.67	120	445→410 ^a	15
		120	445→427 ^b	10
Enrofloxacin	16.85	130	360→316 ^a	15
		130	360→342 ^b	15
Sulphamethizole	17.19	100	271→156 ^a	12
		100	271→92 ^b	25
Chlortetracycline	18.60	130	479→444 ^a	18
		130	479→462 ^b	13
Sulphachloropyridazine	19.53	100	285→156 ^a	10
		100	285→92 ^b	25
erythromycin	19.99	90	734.5→158 ^a	35
		90	734.5→576 ^b	15
Sulphamethoxazole	20.31	100	254→156 ^a	10
		100	254→92 ^b	25
Sulphisoxazole	20.79	100	268→156 ^a	8
		100	268→92 ^b	25
Roxithromycin	21.61	130	837.5→679 ^a	15
		130	837.5→158 ^b	35

Sulphadimethoxine	21.76	100	311→156 ^a	18
		100	311→92 ^b	35

表 1-3 优化后的淋洗梯度条件

时间/min	流速/(mL/min)	A:乙腈/(%)	B:0.1mol/L 甲酸溶液/(%)
0	0.3	10	90
4	0.3	40	60
8	0.3	90	10
9	0.3	100	0
14	0.3	100	0
15	0.3	10	90

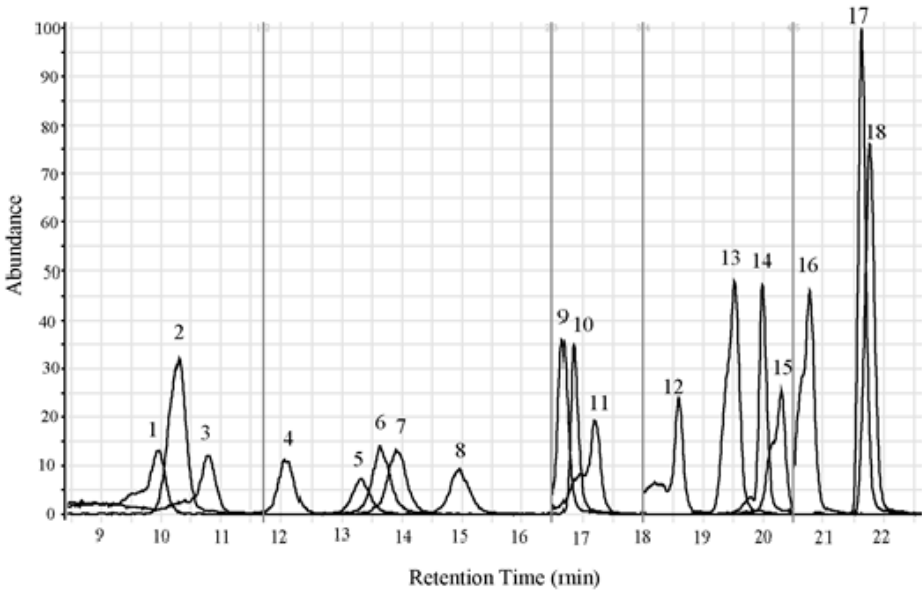


图 1-1 密云水库沉积物的加标回收实验中 18 种抗生素的总离子色谱图

(每种抗生素含量为 100 μ g/Kg , 其中 1: SCT , 2: 13C3-caffeine , 3: STZ , 4: TMP , 5: NOR , 6: OFL , 7: OTC , 8: CIP , 9: TC , 10: ENR , 11: SMZ , 12: CTC , 13: SCP , 14: ERM , 15: SMX , 16: SIA , 17: ROM , 18: SDX)

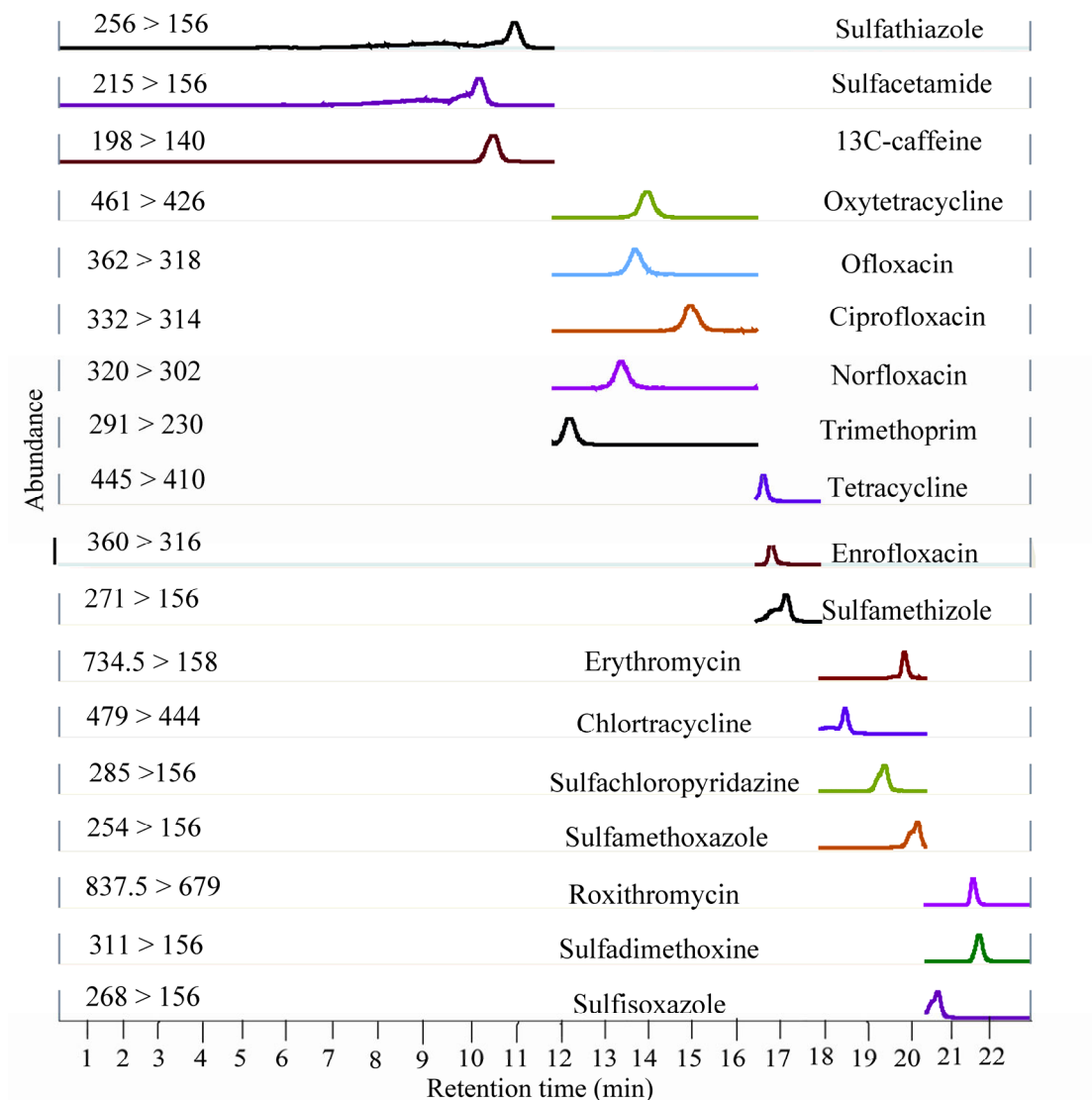


图 1-2 选取的每种抗生素的离子 MRM 色谱图

(每种抗生素 100 μ g/Kg, 沉积物加标回收实验)

1.3.2 水样前处理优化

许多研究都对采用 SPE 小柱对抗生素进行富集时的样品的 pH 值进行了优化, 几乎所有文章都报道当在酸性条件下, 抗生素的回收率很好。一些抗生素为两性抗生素, 如氟喹诺酮类同时有羧基(pKa 5)和一个甚至多个胺功能团(pKa 8-9), 磺胺类可因其自身的苯胺氮呈现弱碱性, 或者可如磺胺嘧啶类因自身携

带的 N-H 结合键呈现弱酸性 (Tong L, 2009)。另外, 一些抗生素在中性或者基本条件下水解。如, 氧四环素的降解速率和水溶液 pH 值呈正相关 (Yang J-F, 2010; Klaus K, 2009)。而在酸性条件下, 这些抗生素不容易分解。因此, 提取条件选择 pH 值为 3。

1.3.3 沉积物样品前处理的优化

研究表明柠檬酸缓冲液和甲醇的混合溶液对抗生素的提取很有效率 (Luo Y, 2011; Li W, 2012)。乙腈和麦基尔文 (McIlvaine) 缓冲液不能很好的提取喹诺酮类抗生素 (Luo Y, 2011; Hu W, 2012; Yang J-F, 2010), 因此本文选取柠檬酸缓冲液作为提取溶液。本文就沉积物样品前处理中提取液的 pH 和组成配比进行了优化。实验结果如图 1-3, 图 (a) 为不同柠檬酸缓冲液 pH 和甲醇混合提取沉积物中抗生素的对比; 图 (b) 为不同提取方法提取抗生素的对比。(A: 甲醇; B: 柠檬酸缓冲液; C: 甲醇+柠檬酸缓冲液 (50:50 v/v); D: 甲醇+柠檬酸缓冲液 (20:80 v/v); E: 甲醇+柠檬酸缓冲液 (80:20 v/v))

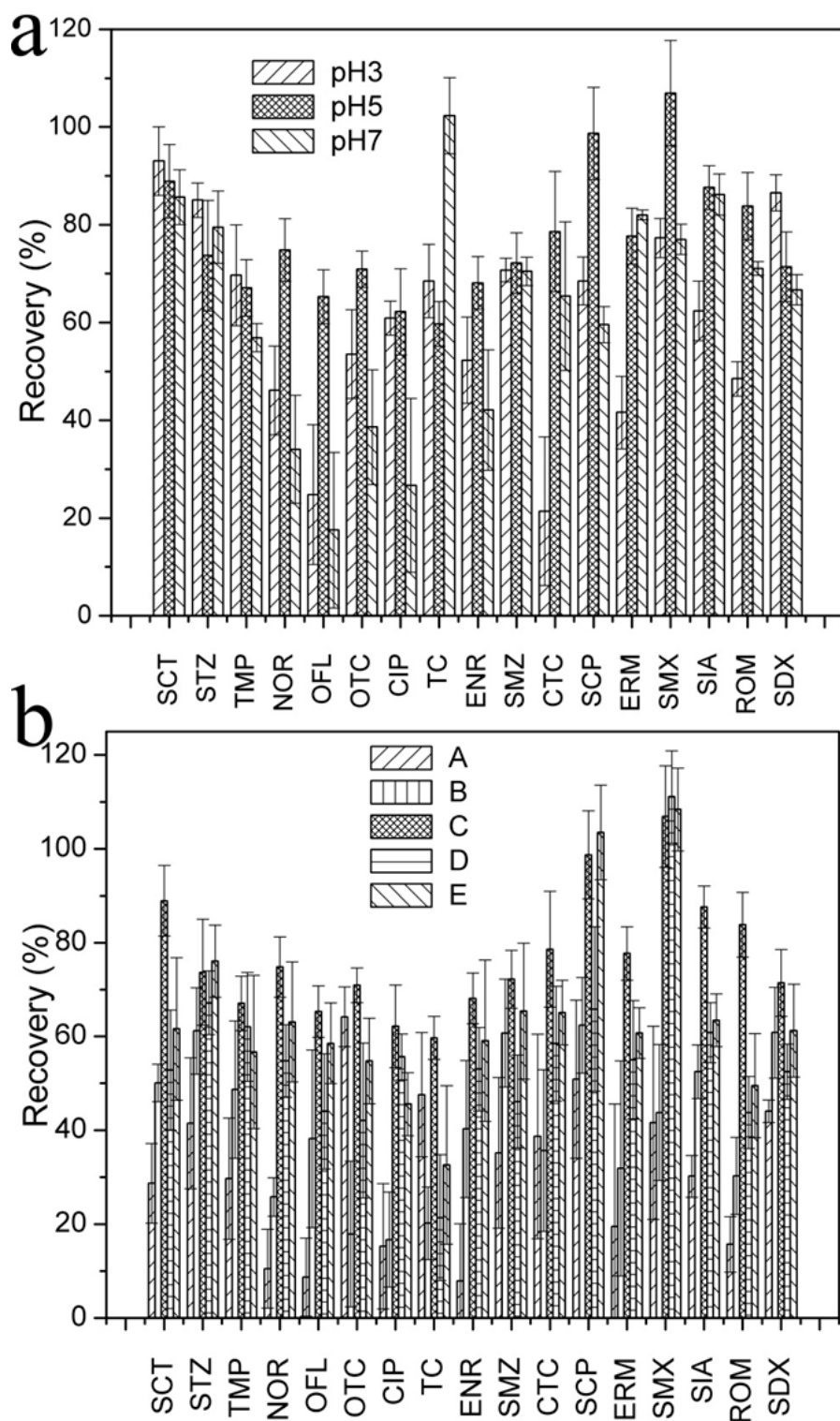


图 1-3 不同 pH 值的柠檬酸提取液和不同甲醇与柠檬酸缓冲液配比的回收率

一般来说，缓冲液的 pH 值为 5 时，对于在室温和中性条件下易水解的抗生素来说，有很好的回收率和较低的标准偏差（Yang J-F，2010）。不同沉积物中抗生素提取缓冲液的 pH 的优化实验结果如图 4a。表明，柠檬酸缓冲液的 pH 为 5 时抗生素的回收率最好。四环素类抗生素的回收率实验表明回收率的高低取决于化合物，磺胺类抗生素的回收率实验则在不同 pH 值下有了些微的波动。

在柠檬酸缓冲液的 pH 为 5 时，对提取液中柠檬酸缓冲液和甲醇的体积比做了优化。图 b 表明：当提取液中甲醇与柠檬酸缓冲液体积比为 1:1 的时候，所有抗生素的回收率绝大部分在 60%以上；柠檬酸缓冲液和甲醇的混合提取液比单独使用两种物质提取抗生素的效果好；在五种条件下，四环素类

（17.9%-78.6%）和喹诺酮类（7.9%-74.8%）的回收率相比磺胺类（28.7%-106.9%）和大环内酯类（20.7%-83.8%），变化更大；对于易络合金属离子和易被吸附在沉积物上的四环素类来说，使用柠檬酸缓冲液作为提取液比甲醇更能增加实验的回收率，表明柠檬酸的对沉积物中抗生素的吸附能力够强；对于喹诺酮类和四环素类抗生素，在提取液中柠檬酸和甲醇的配比方法为 A，B，D 和 E 时，其回收率低于 30%。

实验结果表明：当柠檬酸缓冲液 pH 值为 5 时，且柠檬酸缓冲液与甲醇的体积比为 1:1 时，所有目标抗生素有好的回收率。

1.3.4 分析方法的确认及定量

采用优化的实验方法，对加入目标物的密云水样及沉积物样品进行了加标回收实验。实验结果见表 1-3 和表 1-4：

表 1-4 水样加标回收率实验结果

化合物	加入抗生素浓度（ng/L）		LOD	LOQ	线性（ r^2 ）
	10	100			
Sulphacetamide	88±0.8	63±4.1	0.36	0.92	0.9984
Sulphathiazole	67±2.0	89±2.7	1.04	3.34	0.9959
Trimethoprim	82±4.2	89±3.9	3.05	10.10	0.9955
Norfloxacin	83±2.9	91±3.5	0.56	1.18	0.9988
Ofloxacin	72±3.1	94±4.3	3.11	10.20	0.9982

Oxytetracycline	89±3.7	86±4.8	4.17	12.66	0.9959
Ciprofloxacin	72±4.8	93±2.3	3.10	10.64	0.9980
Tetracycline	82±3.1	84±4.3	2.52	9.52	0.9987
Enrofloxacin	82±2.3	95±4.7	2.60	8.70	0.9969
Sulphamethizole	65±8.7	60±9.3	0.81	2.70	0.9955
Chlortetracycline	68±9.2	71±8.3	4.15	12.63	0.9991
Sulphachloropyridazine	81±3.5	71±2.9	1.02	5.12	0.9973
Erythromycin	77±1.9	79±3.1	4.28	12.44	0.9923
Sulphamethoxazole	61±7.7	66±8.2	1.20	4.10	0.9976
Sulphisoxazole	67±6.3	68±5.8	0.86	2.93	0.9928
Roxithromycin	83±2.4	85±2.2	3.52	11.14	0.9932
Sulphadimethoxine	75±1.9	78±2.4	0.62	2.08	0.9970

表 1-5 沉积物加标回收实验结果

化合物	加入抗生素浓度 ($\mu\text{g/Kg}$)	回收率 (%)	LOD	LOQ
Sulphacetamide	50	97.6±13.7	1.4	4.6
	100	90.9±16.6		
	200	105.3±7.3		
Sulphathiazole	50	79.8±17.2	3.4	11.2
	100	72.6±6.9		
	200	73.2±12.6		
Trimethoprim	50	83.8±8.4	0.2	1.1
	100	82.9±10.6		
	200	87.0±10.4		
Norfloxacin	50	69.1±10.8	3.8	11.9
	100	65.8±4.7		
	200	68.0±6.6		
Ofloxacin	50	69.4±5.8	0.6	1.9
	100	70.5±5.4		
	200	73.7±6.9		
Oxytetracycline	50	86.3±7.1	0.9	3.0
	100	83.0±4.8		
	200	87.5±11.2		
Ciprofloxacin	50	73.3±14.3	0.9	3.0
	100	75.8±13.1		
	200	77.1±9.5		
Tetracycline	50	55.9±8.3	1.9	6.2
	100	48.1±10.6		
	200	67.1±9.8		
Enrofloxacin	50	65.5±1.1	4.9	12.6
	100	77.6±6.3		

	200	69.4±1.7		
	50	65.8±5.1		
Sulphamethizole	100	77.2±8.3	0.3	1.1
	200	76.7±9.1		
	50	79.3±16.8		
Chlortetracycline	100	83.2±19.4	0.4	1.3
	200	85.5±19.9		
	50	75.8±4.9		
Sulphachloropyridazine	100	80.0±7.5	0.2	0.6
	200	79.7±6.0		
	50	70.3±7.1		
Erythromycin	100	74.7±11.7	0.3	1.1
	200	75.8±11.5		
	50	104.2±5.2		
Sulphamethoxazole	100	88.1±11.9	0.1	0.4
	200	97.6±8.6		
	50	69.9±11.3		
Sulphisoxazole	100	76.4±5.8	0.1	0.2
	200	74.5±12		
	50	70.1±2.2		
Roxithromycin	100	73.5±4.1	0.1	0.5
	200	81.8±6.1		
	50	79.1±4.1		
Sulphadimethoxine	100	84.2±1.7	0.1	0.4
	200	91.7±3.3		

由表 1-3 可以看出当水样的 pH 调至 3 时,所加入目标物在 10ng/L 和 100ng/L 时有很好的回收率,分别达到了 61-89% 和 60-95%,置信区间在 10%以内。回收率替代物的回收率为 79.9-96.4%。LOD 为 0.56-6.52ng/L, LOQ 为 1.18-18.52ng/L。

由表 1-4 可知,含有 50, 100 和 200μg/kg 抗生素浓度梯度的沉积物回收率实验中相应的回收率分别为 55.9-104.2%, 48.1-90.9%和 67.1-105.3%;除了四环素,其余抗生素的回收率均高于 65%,四环素相对较低的回收率可能由于其可以被沉积物强烈的吸附,并且 Jacobsen 采用提取液为甲醇和 0.2M 的柠檬酸体积比为 1:1 时对土壤中四环素的提取回收率为 50-70%,与本实验相符(Jacobsen A M, 2004); LOD 为 0.1-4.9μg/kg, LOQ 为 0.2-12.6μg/kg。沉积物样品中的回收率替代物的回收率为 66.8-85.9%。

回收率实验表明:此方法可适用于同时检测不同种类和具有不同理化性质的抗生素。就算是对于四环素,其回收率也在 48.1-67.1%之间,可用于沉积物中该物质的定量。

1.4 本章小结

本章优化了环境介质中痕量抗生素的检测技术。通过优化梯度淋洗色谱分离条件，优化沉积物中抗生素的提取过程以及质谱运行参数，并且通过抗生素在自然基质中的回收率试验验证，得出本方法适用于同时检测水体和沉积物中的四类抗生素，并且为环境中多种痕量抗生素的监测提供了重要的方法依据。

第 2 章 北京清河中抗生素的污染特征

2.1 研究区域概况

清河总流域面积为 210 平方千米，位于北京北部，为温榆河的支流。如下图 2-1。发源于京密引水渠，在立水桥东汇入温榆河，全长 23.8 公里。作为城市排水及灌溉的主要渠道。清河流域内建有 3 座污水处理厂，为上游的肖家河污水处理厂、中上游的清河污水处理厂和中下游的北苑污水处理厂，日处理能力分别为 2 万吨、45 万吨和 4 万吨。目前污水直排最严重的区域为清河中游，该段水质为劣五类。

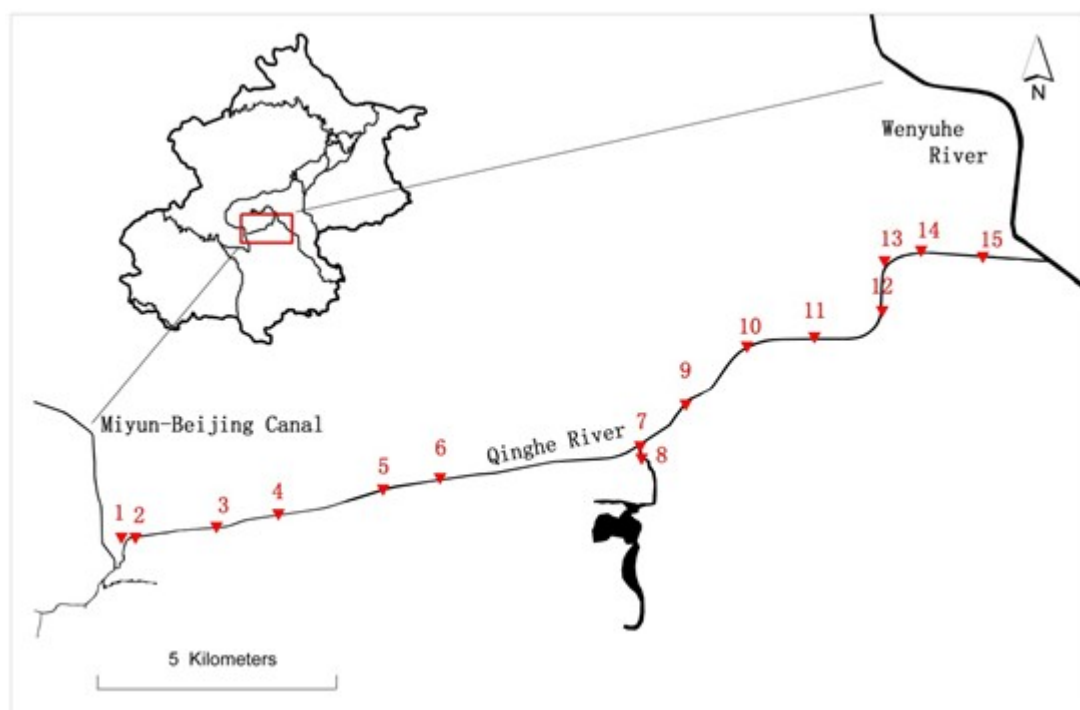


图 2-1 清河地图及采样点位

2.2 样品采集与样品前处理

采样时间为 2011 年 9 月和 2012 年 1 月，3 月，7 月，采取清河四季的水样

和沉积物样品，采样点位置如图 2-1，经纬度如表 2-1。样品采集与样品前处理参照 1.2。采样点详细信息如表 2-2。

表 2-1 采样点经纬度坐标

Sampling sites	Longitude	Latitude
1	40°00'38"N	116°16'02"E
2	40°00'39"N	116°16'10"E
3	40°00'48"N	116°17'23"E
4	40°01'00"N	116°18'15"E
5	40°01'21"N	116°19'50"E
6	40°01'35"N	116°20'39"E
7	40°01'49"N	116°23'37"E
8	40°02'00"N	116°23'36"E
9	40°02'36"N	116°24'16"E
10	40°03'30"N	116°25'10"E
11	40°03'37"N	116°26'9"E
12	40°04'00"N	116°27'05"E
13	40°04'44"N	116°27'11"E
14	40°04'52"N	116°27'42"E
15	40°04'49"N	116°28'38"E

表 2-2 采样点水体的理化性质

(“--”表示数据缺失)

Sampling sites	T ()	pH	Con (μs/cm)	Sal (/00)	DO (mg/L)	TDS (g/L)	TOC (mg/L)
January , 2012							
4	4.6	6.6	7.1	6.6	2.1	6.3	26.1
5	0	6.5	6.0	6.4	2.5	6.1	27.6
6	8.8	7.4	11.7	10.1	3.2	9.6	230.1
7	11.6	6.9	8.1	6.2	1.6	5.9	40.4
8	8.3	7.8	7.8	6.5	2.4	6.3	37.9
9	8.5	7.6	7.9	6.4	1.5	6.2	39.6
10	6.6	6.2	8.3	7.3	1.8	7.0	53.9
11	8.0	7.4	8.6	7.1	1.9	6.9	77.9

12	7.0	6.6	8.1	7.1	2.1	6.8	56.8
13	6.5	6.8	8.1	7.1	2.8	6.8	58.4
14	5.5	6.8	7.8	7.1	5.4	6.8	57.0
15	6.9	6.9	7.8	6.9	2.0	6.6	47.2
July , 2012							
1	26.3	8.7	0.6	0.3	3.5	0.4	7.4
2	27.0	9.1	0.9	0.4	6.9	0.6	6.7
3	27.5	9.4	0.9	0.4	7.1	0.6	6.7
4	28.4	8.9	1.0	0.5	5.8	0.6	6.7
5	28.9	9.9	1.0	0.4	9.5	0.6	6.2
6	26.8	9.5	1.0	0.5	4.6	0.7	47.8
7	26.4	8.6	1.0	0.5	4.3	0.6	15.7
8	25.6	8.7	1.0	0.5	1.8	0.6	17.9
9	26.2	8.8	1.0	0.5	1.6	0.7	22.1
10	24.9	8.9	0.5	0.2	1.3	0.3	17.5
11	24.7	8.8	1.0	0.5	1.5	0.7	21.9
12	25.0	8.8	1.0	0.5	2.7	0.7	27.5
13	25.1	8.3	0.5	0.2	0.6	0.3	47.1
14	25.0	8.7	1.0	0.5	1.6	0.7	26.8
15	25.5	8.8	1.0	0.5	1.3	0.7	19.9
Mrach , 2012							
1	17.1	7.6	8.6	5.6	0.5	5.5	14.5
2	19.7	8.4	8.9	5.6	0.8	5.4	21.0
3	18.8	7.9	9.8	6.3	0.8	6.1	13.5
4	19.3	9.1	9.6	6.1	1.1	5.9	26.9
5	22.9	9.9	8.6	5.0	1.2	4.9	21.1
6	25.7	9.1	10.5	5.8	2.0	5.6	118
7	20.7	7.6	10.2	6.3	1.7	6.2	61.1
8	18.1	7.6	10.5	6.9	1.1	6.7	56.4
9	17.4	7.7	10.8	7.2	1.4	7.0	51.0
10	17.4	7.6	10.8	7.3	4.8	7.0	38.4
11	15.6	7.6	10.8	7.5	0.1	7.3	52.8
12	15.8	7.6	10.2	7.2	4.9	6.9	53.3
13	16.7	7.6	10.4	7.2	3.7	6.9	52.6
14	16.1	7.5	10.3	7.1	1.7	6.8	39.7
15	16.3	7.4	10.6	7.3	2.8	7.1	40.1
September , 2011							
1	16.8	6.9	0.8	--	5.9	--	--
2	21.2	6.8	0.7	--	7.8	--	--

3	22.5	6.7	0.9	--	7.6	--	--
4	21.3	6.8	0.9	--	4.1	--	--
5	24.3	7.8	0.9	--	8.3	--	--
6	22.9	6.9	0.8	--	4.9	--	--
7	24.8	7.0	0.9	--	3.5	--	--
8	22.5	6.8	0.8	--	4.2	--	--
9	23.2	7.0	0.8	--	2.6	--	--
10	26.2	8.0	1.0	--	1.9	--	--
11	23.6	7.3	1.0	--	2.3	--	--
12	24.5	7.6	1.1	--	3.1	--	--
13	27.3	7.8	1.1	--	0.5	--	--
14	24.2	6.9	1.0	--	1.0	--	--
15	23.8	6.8	1.0	--	0.5	--	--

2.3 结果与讨论

2.3.1 抗生素在城市河流水体中四季的浓度含量调查结果

抗生素在清河水体中四季抗生素的浓度含量调查结果见下列表和图。

表 2-3 不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季水体中的分布情况汇总

(包含检出率(%),浓度(ng/L)的最小值 ,中位值和最大值。“ Nd ”表示未检测出 ;“ <LOD ”表示小于检出限)

Compound	March , 2012				September , 2011			
	Freq.	Min.	Med.	Max.	Freq.	Min.	Med.	Max.
Sulfonamides								
STZ	100	1.5	2.3	3.5	20.0	1.7	1.7	3.6
SPD	80.0	5.4	158.0	260.6	86.7	1.0	4.1	379.7
SCX	86.7	0.8	2.2	9.9	93.3	1.7	2.0	11.4
SDX	6.7	31.8	31.8	31.8	93.3	<LOD	3.4	12.2
SMX	100	3.0	94.7	129.7	100	4.3	8.4	185.9
SCP	80.0	1.4	2.7	3.5	0	Nd	Nd	Nd
SMP	6.7	1.5	1.5	1.5	6.7	1.7	1.7	1.7
SMA	0	Nd	Nd	Nd	86.7	0.6	1.8	5.0
Quinolones								
OFL	100	4.4	7632.1	16952.5	100	6.4	912.9	3146.7
ENR	100	4.9	19.9	496.4	53.3	3.1	3.7	6.3

NOR	100	16.0	1048.6	4461.8	100	3.3	403.5	2264.4
CIP	93.3	5.7	581.1	1399.2	100	35.8	404.6	672.2
Tetracyclines								
OTC	100	1.6	622.1	3320.3	100	4.8	16.3	963.2
TC	93.3	3.5	187.2	484.2	93.3	2.7	12.0	101.6
CTC	80.0	1.9	6.5	1208.6	53.3	4.5	4.8	7.0
Macrolides								
ERM-H2O	86.7	<LOD	697.2	1636.5	100	2.8	770.9	1875.7
ROM	73.3	<LOD	114.8	295.6	100	1.7	75.4	352.1

表 2-4 不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季的水体中的分布情况汇总
(包括检出率(%),浓度(ng/L)的最小值,中位值和最大值。“Nd”表示未检测出;“<LOD”表示小于检出限。)

Compounds	January , 2012				July , 2012			
	Freq.	Min.	Med.	Max.	Freq.	Min.	Med.	Max.
Sulfonamides								
SDX	0	Nd*	Nd	Nd	66.7	<LOD*	0.2	1.9
SMX	100	4.2	11.2	69.9	100	12.9	59.4	254.6
SCP	50.0	<LOD	2.1	45.1	93.3	<LOD	1.2	11.6
SMP	16.7	0.3	0.4	0.4	80.0	0.1	2.2	5.6
SMD	100	1.9	2.5	4.4	100	0.9	3.3	7.6
SMA	92.0	<LOD	1.5	3.9	100	1.2	4.1	10.8
Quinolones								
OFL	100	17.4	3483.7	11197.6	100	28.4	1510.3	3353.2
ENR	100	7.7	10.2	39.9	100	22.7	352.7	53969.2
Tetracyclines								
OTC	100	46.5	409.3	2788.9	100	7.3	127.8	631.2
TC	100	43.0	134.6	618.7	100	2.5	53.7	134.7
CTC	91.7	2.9	5.2	15.3	100	2.3	5.8	9.3
Macrolides								
ERM-H2O	66.7	26.5	613.7	2154.6	80.0	0.4	73.7	1516.1
ROM	100	8.6	252.6	1445.0	100	8.7	103.5	381.8
Other								
Trimethoprim	100	537.6	1788.4	5024.8	100	45.5	355.4	676.1

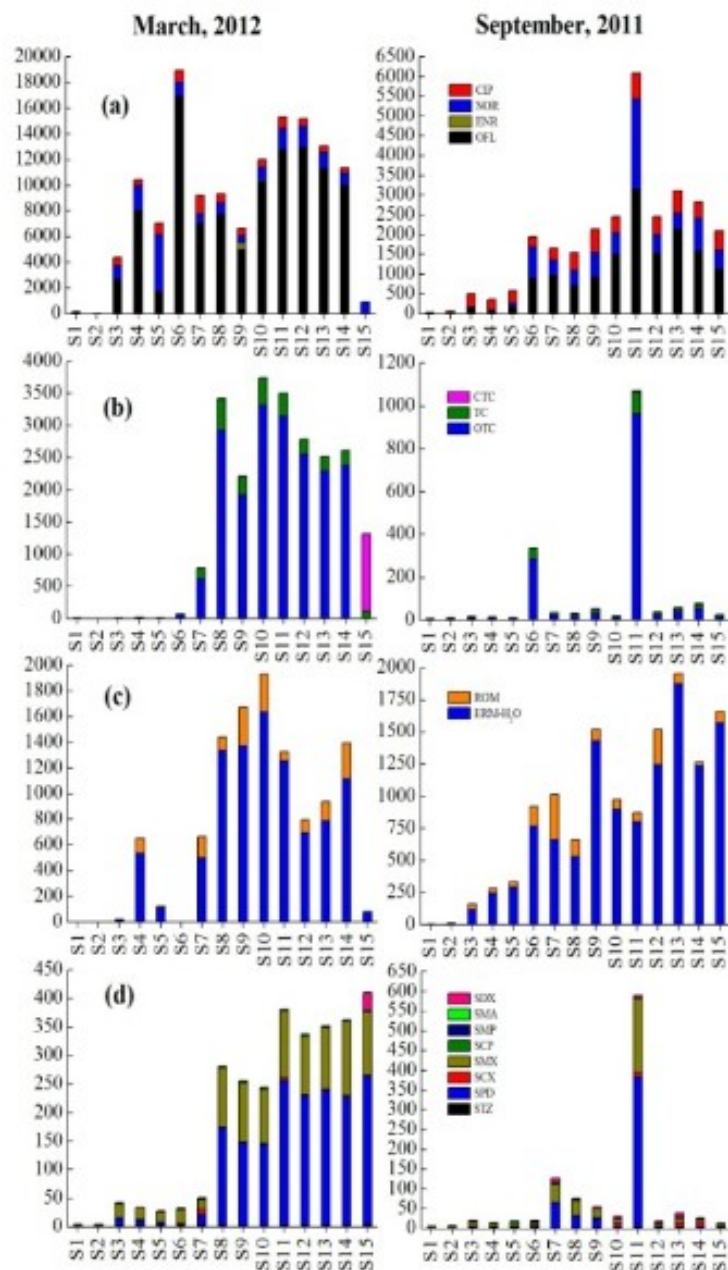


图 2-2 在 2012 年春季和 2011 年秋季清河水体中抗生素在不同点位的浓度
((a) 喹诺酮类 ; (b) 四环素类 ; (c) 大环内酯类 ; (d) 磺胺类))

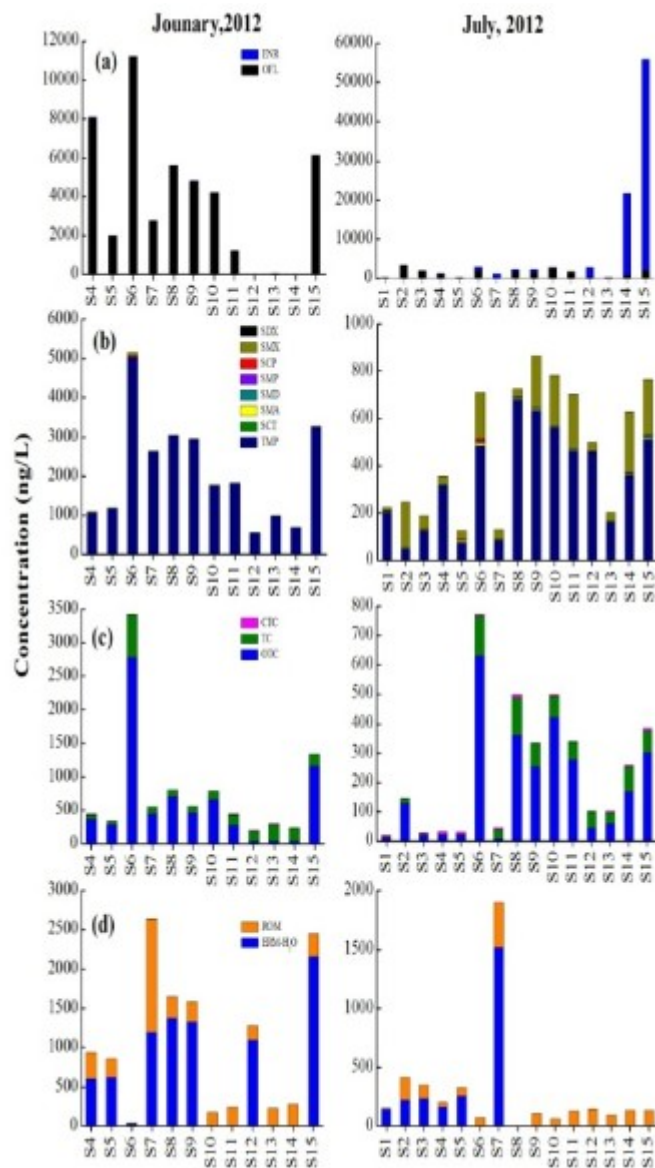


图 2-3 在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河水体中抗生素在不同点位的浓度

((a) 喹诺酮类；(b) 磺胺类和甲氧苄氨嘧啶；(c) 四环素类；(d) 大环内酯类)

研究结果表明，四季水体中的喹诺酮类含量最高，其中氧氟沙星（OFL）浓度对清河抗生素的总浓度起主导作用，其在春天的浓度的中位数可达 $7.6\mu\text{g/L}$ ，是所有抗生素中位数浓度最高。在冬、夏两季中浓度其次高的为甲氧苄氨嘧啶中位数浓度分别为 $1.8\mu\text{g/L}$ 和 355.4ng/L ；在秋季浓度其次高的为大环内酯类，其中脱水红霉素中位数浓度为 770.9ng/L ；在春季浓度其次高的为四环

素类 ,其中土霉素中位数浓度为 622.1ng/L。水体污染严重的季节为冬季和春季 ,并且抗生素在清河中的浓度明显高于国内外的一些河流(Changlun Tong ,2011 ; Jianxian Sun , 2012 ; Xu, W.H. , 2009 ; Xu, W.H. , 2007 ; Chang, H. , 2008 ; Choi, K. , 2008 ; Hirsch, R. , 1999 ; Lei Jiang , 2011 ; Jifeng Yang , 2011 ; Yang , 2004)。秋夏两季抗生素的检出率明显高于冬春两季。抗生素在上游水体中的含量明显低于下游 ,各类抗生素普遍在下游点位 S6、S11、S15 处含量最高。结果表明 ,河流水体的理化性质对抗生素的含量有很大的影响。夏秋两季用水量过大以至于未处理的污水直排入清河 ,造成清河中抗生素的检出率高于冬春两季 ;夏秋两季降雨量、温度等因素高于冬春两季致使水体中抗生素浓度被稀释和降解导致抗生素在夏秋两季的浓度小于冬春 (Karthikeyan, K.G. , 2006)。夏季上游水体即从 S1 到 S4 点位中抗生素的总浓度的大幅度波动除了与抗生素自身的光解和水解有关外 ,可能还与河道上种植的人工湿地降解有关。

2.3.2 抗生素在城市河流沉积物中四季的浓度含量调查结果

抗生素在清河沉积物中四季的浓度含量调查结果见下列图和表。

表 2-5 不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季沉积物中的分布情况汇总
(包括检出率(%),浓度($\mu\text{g/Kg}$)的最小值 ,中位值和最大值。“ Nd ”表示未检测出 ;“ <LOD ”表示小于检出限)

Compound	March , 2012				September , 2011			
	Freq.	Min.	Med.	Max.	Freq.	Min.	Med.	Max.
Sulfonamides								
STZ	44.4	1.2	1.2	3.6	44.4	1.0	1.0	1.9
SPD	0	Nd	Nd	Nd	55.6	<LOD	1.8	2.6
SCX	0	Nd	Nd	Nd	33.3	1.2	1.2	1.3
SDX	0	Nd	Nd	Nd	100	0.6	9.3	63.0
SMX	44.4	1.8	2.9	4.0	100	1.6	2.9	38.1
SCP	0	Nd	Nd	Nd	0	Nd	Nd	Nd
SMP	0	Nd	Nd	Nd	0	Nd	Nd	Nd
SMA	0	Nd	Nd	Nd	0	Nd	Nd	Nd
Quinolones								
OFL	77.8	7.1	13.3	21.4	100	3.9	4.2	5.9
ENR	22.2	3.7	3.8	3.8	55.6	2.2	2.2	2.2
NOR	55.6	11.5	15.0	18.7	55.6	<LOD	5.1	49.1
CIP	88.9	3.4	3.7	5.0	100	3.2	12.6	28.3

Tetracyclines								
OTC	100	6.3	28.9	218.0	100	3.3	7.7	95.6
TC	100	3.3	6.3	33.7	100	2.2	6.6	37.3
CTC	88.9	1.4	5.5	44.3	88.9	3.4	3.8	9.6
Macrolides								
ERM-H2O	77.8	<LOD	4.1	5.5	100	1.7	3.5	18.2
ROM	77.8	<LOD	3.3	6.7	100	1.2	2.2	5.4

表 2-6 不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季沉积物中的分布情况汇总

(包括检出率(%) ,浓度($\mu\text{g/Kg}$)的最小值 ,中位值和最大值。“ Nd ”表示未检测出 ;“ <LOD ”表示小于检出限)

Compound	January , 2012				July , 2012			
	Freq.	Min.	Med.	Max.	Freq.	Min.	Med.	Max.
Sulfonamides								
SDX	0	<LOD*	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD
SMX	22.2	<LOD	0.6	0.7	12.5	0.4	0.4	0.4
SCP	0	<LOD	<LOD	<LOD	0	Nd*	Nd	Nd
SMP	0	Nd	Nd	Nd	0	Nd	Nd	Nd
SMD	0	<LOD	<LOD	<LOD	12.5	0.2	0.2	0.2
SMA	0	<LOD	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD
Quinolones								
OFL	100	0.7	1.2	9.1	100	0.7	2.7	29.1
ENR	88.9	<LOD	1.8	229.2	87.5	<LOD	1.5	4.2
Tetracyclines								
OTC	100	2.0	27.3	40.0	100	7.1	51.7	68.5
TC	100	1.2	5.3	46.3	100	2.0	10.6	16.0
CTC	100	1.5	1.9	4.4	100	1.5	2.1	5.3
Macrolides								
ERM-H2O	66.7	0.6	0.8	14.1	75.0	1.8	4.1	18.8
ROM	66.7	1.0	1.6	8.5	100	0.7	2.6	19.9
Other								
Trimethoprim	88.9	<LOD	4.3	35.4	100	0.8	1.2	111.4

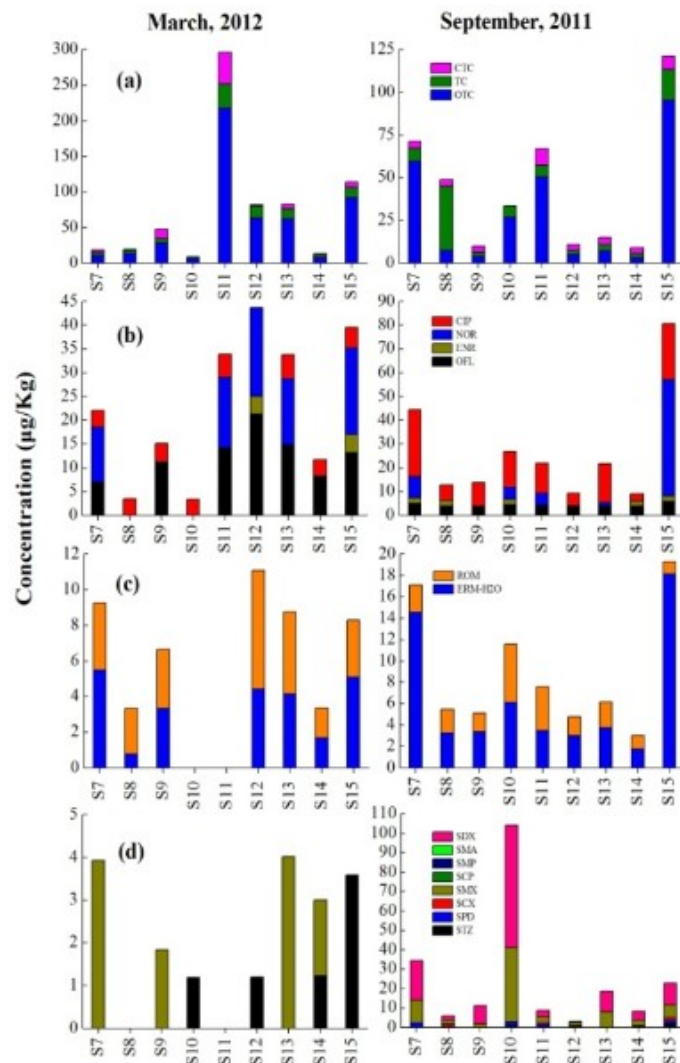


图 2-4 在 2012 年春季和 2011 年秋季清河沉积物中抗生素在不同点位的浓度

((a) 四环素类；(b) 喹诺酮类；(c) 大环内酯类；(d) 磺胺类)

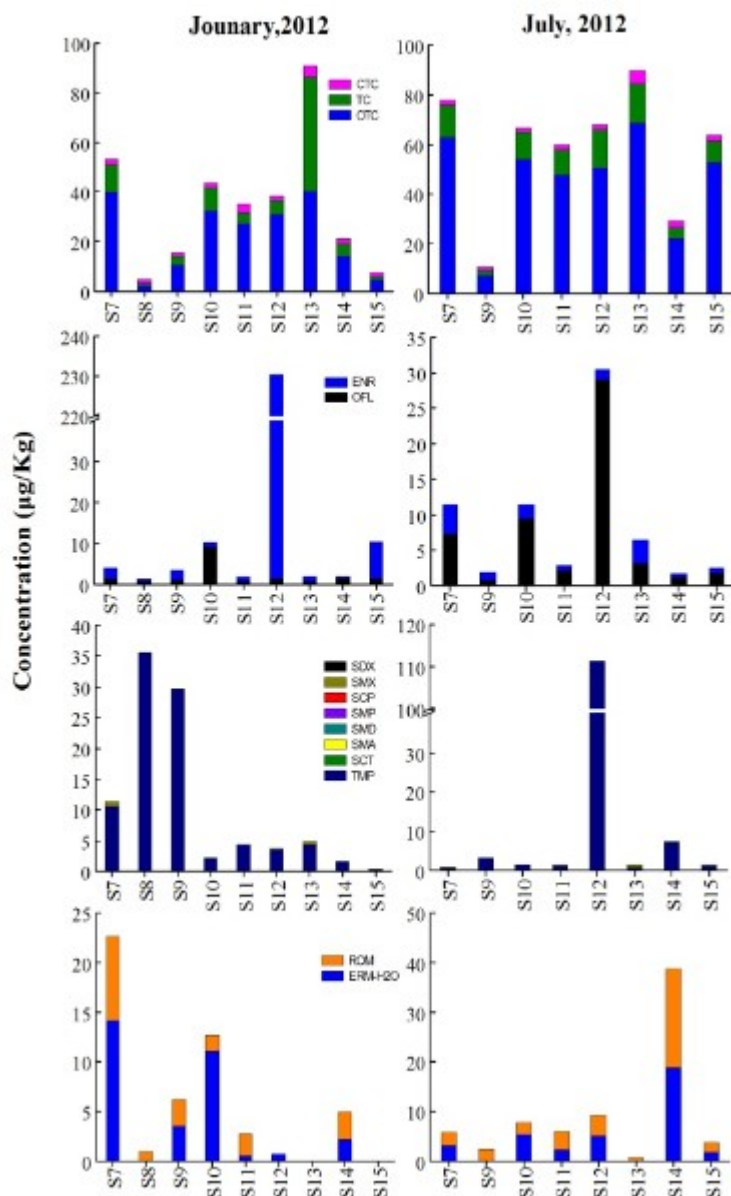


图 2-5 在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河沉积物中抗生素在不同点位的浓度

((a) 四环素类；(b) 喹诺酮类；(c) 磺胺类和甲氧苄氨嘧啶；(d) 大环内酯类)

沉积物作为河流的重要组成部分，其对污染物的降解和吸附解析有重要影响。因此调查抗生素在沉积物中的分布情况显的尤为重要。由于河道硬化，所以沉积物样品的采集点位从 S7 到 S15。研究表明，在春秋两季的沉积物中四环素类含量最高，其中土霉素 (OTC) 占沉积物中抗生素总浓度的主导地位，春季时土霉素的中位数浓度为 $28.9\mu\text{g/Kg}$ ；春季喹诺酮类含量其次高，秋季磺胺

类其次高。对于夏冬两季，甲氧苄氨嘧啶在夏季沉积物中含量最高，喹诺酮类在冬季含量最高，四环素在夏冬两季含量其次高。冬季和春季沉积物中抗生素污染严重；抗生素在夏秋两季的检出率要普遍高于冬春两季；各类抗生素普遍在 S7、S12 和 S15 点位沉积物中含量较高。结果表明，与众多研究一样，四环素类吸附于沉积物上的能力极强（Rabolle, M. , 2000 ; Sarmah, A.K. , 2006 ）。四季中土霉素和四环素在沉积物中的含量高于海河和辽河，冬季里氯霉素和四环素的含量低于美国的 Cache La Poudre 河；珠江沉积物中检出的氧氟沙星高达 1560 μ g/Kg，远远高于清河沉积物中的含量；清河沉积物里的大环内脂含量也低于辽河和珠江；由于磺胺类和甲氧苄氨嘧啶亲水性极强，因此，其在沉积物中的检出较低（Jifeng Yang , 2011 ; Xu, L. , 2010 ; Lijun Zhou , 2011 ; Kim, S.C. , 2007 ; Yang, J.F. , 2010 ）。由于水体中的抗生素在 S6、S11 和 S15 处最高并且沉积物中抗生素在 S7、S12 和 S15 处含量最大，说明抗生素进入河流，会在相对稳定的环境条件下慢慢吸附于沉积物中。可能是由于温度及微生物活性的原因，沉积物中抗生素的含量在夏季最低，在冬季最高。水体中抗生素在夏秋两季的高检出率直接引起了沉积物中的抗生素在这两季的高检出。

2.3.3 抗生素在城市河流水体和沉积物中的伪分配系数

抗生素在清河水体和沉积物中的伪分配系数见下表。

表 2-7 不同抗生素在 2012 年春季和 2011 年秋季清河水体和沉积物之间的伪分配系数
(“--”表示数据缺失)

Compounds	March , 2012			September , 2011		
	Min.	Med.	Max.	Min.	Med.	Max.
STZ	74.8	341.3	668.5	--	--	--
SPD	--	--	--	3.6	32.1	1883.1
SCX	--	--	--	109.3	619.0	668.3
SMX	13.7	27.4	243.3	14.9	262.2	4510.3
SDX	--	--	--	128.1	2008.9	11090.7
OFL	0.8	1.3	15.2	1.4	3.1	5.6
ENR	123.5	352.4	581.3	498.3	605.1	720.4
NOR	9.0	11.4	576.9	0.6	3.3	100.2
CIP	2.5	6.4	944.5	0.1	17.0	47.5
OTC	1.9	17.0	874.8	2.8	198.5	7446.3

TC	7.9	28.9	2395.6	0.5	193.3	3258.5
CTC	100.2	622.5	7128.3	670.5	775.3	1381.3
ERM-H ₂ O	0.3	2.4	10.9	1.4	4.4	22.0
ROM	1.2	22.8	67.4	6.5	19.6	71.8

表 2-8 不同抗生素在 2011 年冬季和 2012 年夏季清河水体和沉积物之间的伪分配系数
(“--”表示数据缺失)

Compounds	January , 2012			July , 2012			Reference
	Min.	Med.	Max.	Min.	Med.	Max.	Variation
TMP	0.1	4	11.7	2.3	4.9	245.6	15~286
SMD	--*	--	--	28.8	28.8	28.8	
SMX	0.4	9.2	59.5	0.1	0.6	10.3	4~2809
OFL	0.1	0.5	78.6	0.5	2.7	255	233~5548
ENR	52.4	115.8	19624.2	0.6	4.2	49.6	
OTC	2.9	89.6	810.1	28	173	8671.3	
TC	7.7	38.6	188.9	26.1	160.4	417.1	174~308
CTC	245.3	386.2	1258.6	260.5	496	1356.6	
ERM-H ₂ O	0.7	2.6	11.9	2	653.9	2617.1	10~200
ROM	3.5	9.2	10.5	7.3	27	151.3	

抗生素在水体和沉积物中的浓度是一个动态平衡的过程，沉积物中的抗生素在河流理化条件变化的情况下，会解析至水体中，成为水体中抗生素的另一个污染源。因此需要对抗生素在水体和沉积物中的分配进行研究。研究结果表明（见表 2-7 和表 2-8），抗生素在清河中的伪分配系数在秋季最高，其次为春季。在秋季，磺胺类的伪分配系数最高；在春冬两季中金霉素（CTC）的伪分配系数最高；在夏季，红霉素（ERM）的伪分配系数最高，其次为氯四环素。与美国同样以污水处理厂出水为补给水源的 Ozark 河相比与结果表明，磺胺类伪分配系数在秋季过高可能是由于水体中抗生素的含量过小。相较其余三季，秋季沉积物中的抗生素可能作为污染源解析到水体中。

2.4 本章小结

清河河流中抗生素的主要来源为污水处理厂出水。清河水体中抗生素污染物浓度水平达到 ng/L 和 $\mu\text{g/L}$ ，沉积物中浓度水平达到 $\mu\text{g/Kg}$ ，远远高于其他河流。在清河水体中氧氟沙星和甲氧苄氨嘧啶的浓度最高，在沉积物中土霉素的

浓度最高，氯霉素在水体和沉积物中的伪分配系数最大。夏秋两季抗生素的检出率和检出量高于冬春两季，而冬春两季抗生素的浓度高于夏秋两季；秋季抗生素的伪分配系数最高，沉积物中的抗生素可能成为除了污水处理厂出水的第二污染源。因此清河中的氧氟沙星、甲氧苄氨嘧啶、土霉素和氯霉素在冬春两季的环境行为需要引起关注。

第 3 章 三种典型抗生素的急性毒性研究

根据第三章对清河抗生素的调查结果，因为磺胺类抗生素在环境中降解周期长，吸附能力低，易随水流长距离迁徙，因此本文拟选在清河调查中的磺胺类含量相对较高的甲氧苄氨嘧啶，磺胺氯哒嗪和磺胺甲噁唑三种磺胺类抗生素为研究对象。

3.1 受试生物与材料

3.1.1 受试生物

费氏弧菌冻干粉，购自北京滨松光子技术股份有限公司；大型蚤为实验室繁衍三代以上，喂食衣藻，培养条件为：温度为 25 ± 1 ；光照强度为 2500lx ；光照周期为 12h （光）， 12h （暗）；四天换水并喂食衣藻；培养用水为密云水库的水。挑选出生时间在 $6\text{-}24\text{h}$ 之间的幼蚤用于实验。

3.1.2 实验材料和仪器

溶液配制：费氏弧菌毒性试验：分别配 200mg/L 的甲氧苄氨嘧啶，磺胺氯哒嗪和磺胺甲噁唑的去离子水溶液。大型蚤毒性实验：以过 Whatman 滤膜（GF/F $0.47\mu\text{m}$ ）的密云水库的自然水体为背景水，分别配 200mg/L 的甲氧苄氨嘧啶，磺胺氯哒嗪和磺胺甲噁唑的溶液。储备液经过稳定实验，为保障储备液的目标物含量维持在 90% 以内，室温下可存放 3 天，3 天后重新配制。

仪器和器皿：滨松光子学商贸（中国）有限公司的 BHP9514 型饮用水安全快速检测仪， $1000\mu\text{l}$ 和 10ml 量程的移液枪， 100ml 的玻璃烧杯，软吸管，培养皿。

3.2 实验方法

3.2.1 费氏弧菌毒性实验的方法

- (1) 取一支费氏弧菌冻干粉置于室温 (20 左右), 平衡 15min。
- (2) 取 0.5ml 专用复苏稀释液加入到平衡后的费氏弧菌冻干粉试剂瓶中。
- (3) 溶解后的冻干粉溶液置于室温下 10min 后用于测定样品。
- (4) 空白对照的制备: 取 2ml 复苏稀释液加入到干净的测试管中。
- (5) 待测样品溶液制备: 取 1.7ml 的待测溶液和 0.3ml 的渗透压调节液, 加入到 2ml 的干净测试管中。
- (6) 向各个测试管中加入 0.05ml 的冻干粉溶液, 轻轻震荡, 使充分混合均匀, 放置 15min 后测定发光值。

3.2.2 单个抗生素的大型蚤毒性实验的方法

试验方法参考 OECD Guidelines Test No.202 标准方法 (OECD, 1981)。

一、预试验

在进行正式试验之前, 为了确定抗生素的试验浓度范围, 必须先进行大型蚤毒性的预试验。预备试验浓度梯度可宽一些, 保证每个浓度至少放 5 个幼蚤。通过预试验得出抗生素使全部大型蚤运动受抑制的浓度和所有大型蚤的无效应浓度。

二、正式试验

- (1) 根据预试验的结果确定正式试验的浓度范围, 设计实验浓度梯度。
- (2) 在 100mL 的玻璃烧杯中装 50mL 试验液, 置小蚤 10 个。每个浓度设 3 个平行。一组实验设 1 个空白对照, 内装相等体积的天然背景水。试验期间不要喂食。实验期间需验证大型蚤的敏感性, 重铬酸钾的 24h-EC₅₀ 在 0.5-1.2ppm 之间。
- (3) 在试验期间, 保证受试溶液的溶解氧浓度高于空气饱和值的 60%。48h 后, 记录每个烧杯中可以活动的大型蚤的数量。若轻摇试管, 15s 内大型蚤不能自主游动, 判定为不能活动。

3.2.3 混合抗生素的大型蚤联合毒性实验

以抗生素单独毒性 EC₅₀ 值为基础, 根据 0.5.3 章节列出的混合物添加模型,

按照 3.2.2 的实验方法进行实验。

3.3 结果和分析

3.3.1 费氏弧菌毒性实验的结果和分析

三种抗生素分别对费氏弧菌的毒性实验结果见图 3-1 和表 3-1。

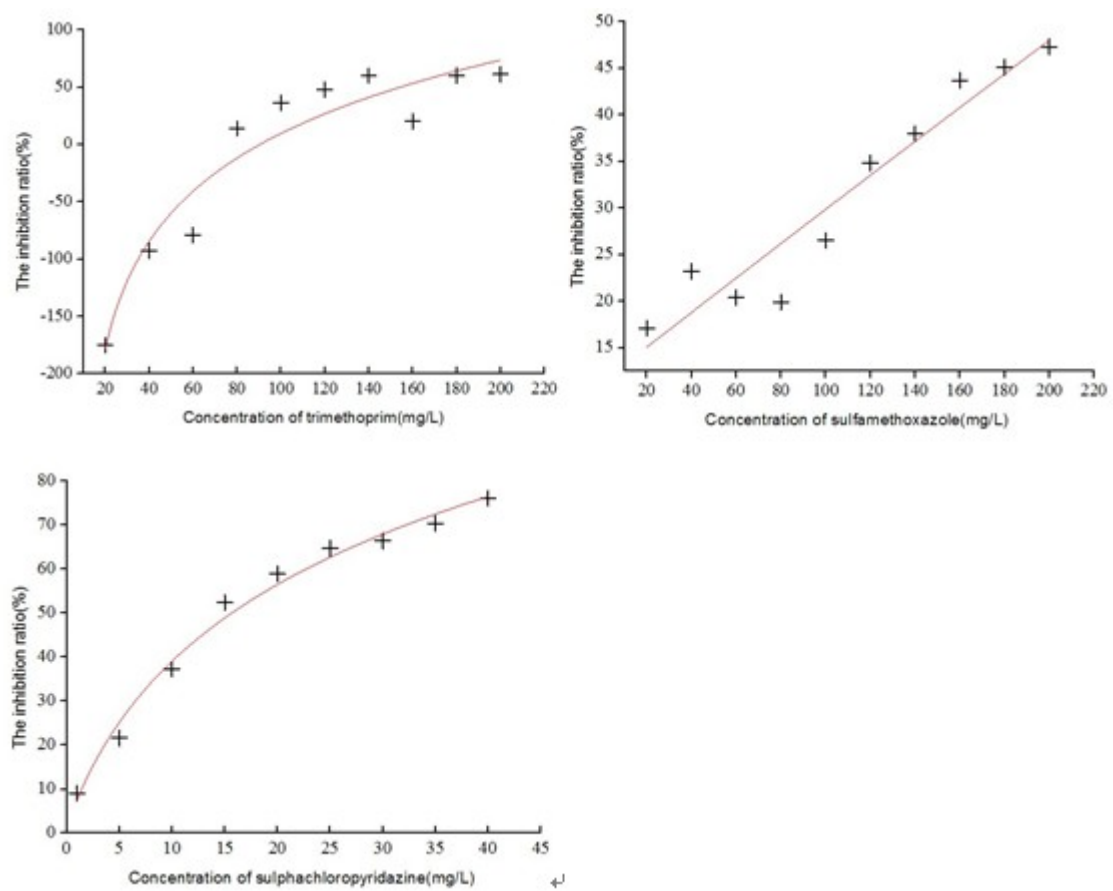


图 3-1 三种抗生素对费氏弧菌的抑制率

表 3-1 三种抗生素对费氏弧菌的 EC50 值

化合物	EC50	95%的置信区间 (mg/L)	对数方程	R ²
甲氧苄氨嘧啶	154mg/L	-63.3697-53.91	Y=-376.09+85.70ln(X-9.97)	0.89
磺胺甲噁唑	>200mg/L	23.36-39.84	Y=-6602.37+792.22ln(X+4222.92)	0.90
磺胺氯吡嗪	16mg/L	32.94-68.59	Y=-52.29+33.85ln(X+4.87)	0.98

观察三种抗生素，发现甲氧苄氨嘧啶在低浓度（<80mg/L）时，对费氏弧菌的抑制率呈负，说明，在此浓度下，抗生素为费氏弧菌的生长繁殖提供了碳源，其 EC50 值为 154mg/L；磺胺甲噁唑对费氏弧菌的毒性呈平稳上升趋势，且磺胺甲噁唑的 EC50 浓度大于 200mg/L，说明费氏弧菌这一菌种对磺胺甲噁唑反应不敏感，Ferrari 等的研究表明磺胺甲噁唑对费氏弧菌的 EC50>84mg/L（Ferrari 等，2004）；费氏弧菌对磺胺氯哒嗪相对较敏感，抑制率随着磺胺氯哒嗪的浓度增高而增大，其 EC50 值为 16mg/L。Younghee Kim 等以费氏弧菌为受试生物的研究结果表明，甲氧苄氨嘧啶、磺胺甲噁唑以及磺胺氯哒嗪的 EC50 值分别为 165.1mg/L、74.2mg/L 和 53.7mg/L（Younghee Kim 等，2007）。

3.3.2 单个抗生素大型蚤毒性实验的结果和分析

通过预实验可知，大型蚤对甲氧苄氨嘧啶的无效应浓度为 70mg/L，全致死浓度为 200mg/L；对磺胺甲噁唑的无效应浓度为 70mg/L，全致死浓度为 180mg/L；磺胺氯哒嗪的无效应浓度高于 200mg/L。大型蚤毒性实验主要针对甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑，实验浓度如下表 3-2，实验结果见图 3-2 和表 3-3。

表 3-2 两种抗生素的大型蚤毒性实验浓度

化合物	实验浓度（mg/L）
甲氧苄氨嘧啶	70、80、90、100、120、140、160、180、200
磺胺甲噁唑	70、80、90、100、120、140、160、170、180

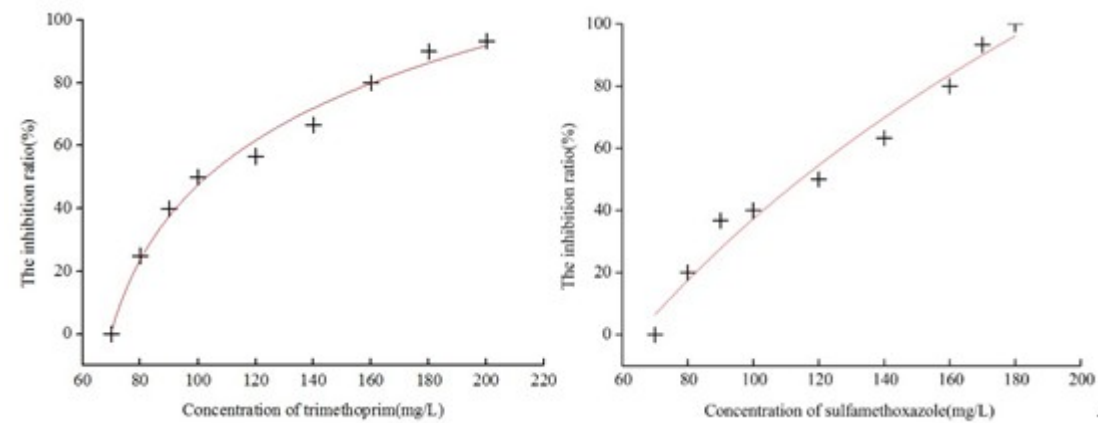


图 3-2 两种抗生素对大型蚤的毒性效应结果

表 3-3 两种抗生素对大型蚤的 48h-EC50 值

化合物	48h-EC50	95%置信区间 (mg/L)	对数方程	R ²
甲氧苄氨嘧啶	103mg/L	32.00-79.48	$Y=-87.44+36.22\ln(X-58.48)$	0.99
磺胺甲噁唑	115mg/L	27.91-79.49	$Y=-645.91+136.63\ln(X+48.49)$	0.96

观察大型蚤在两种不同浓度的抗生素内暴露 48h 后的情况可知：甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的变化趋势相同，都是随着抗生素浓度的增加，大型蚤的抑制性越强。甲氧苄氨嘧啶对于大型蚤 48h 急性毒性实验的 EC50 值为 103mg/L Stuer-Lauridsen 等对其的实验 EC50 值为 123mg/L，Youngee Kim 等的实验数据为 167.4mg/L；磺胺甲噁唑对于大型蚤的 48h 急性毒性实验的 EC50 值为 115mg/L，Ferrari 等的研究结果其 EC50>100mg/L，Youngee Kim 等的研究结果为 189.2mg/L（Stuer-Lauridsen 等，2000；Youngee Kim 等，2007；Ferrari 等，2004）。对比参考文献发现，甲氧苄氨嘧啶对于大型蚤的毒性要高于磺胺甲噁唑。

3.3.3 混合抗生素的大型蚤联合毒性实验的结果与分析

由三种抗生素的单独毒性试验结果得知，磺胺氯哒嗪对大型蚤反应不敏感，因此联合毒性实验选择清河含量较高的甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑为研究对象。根据毒性单位法规定的公式，以及清河冬季中甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的比率（121.8:1），计算得出实验浓度如表 3-4。

表 3-4 甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的毒性单位法实验浓度 (mg/L)

TU	0.2	0.4	0.8	1.2	1.4	1.6
甲氧苄氨嘧啶	21.0	42.0	84.0	126.0	147.0	168.0
磺胺甲噁唑	0.2	0.3	0.7	1.0	1.2	1.4

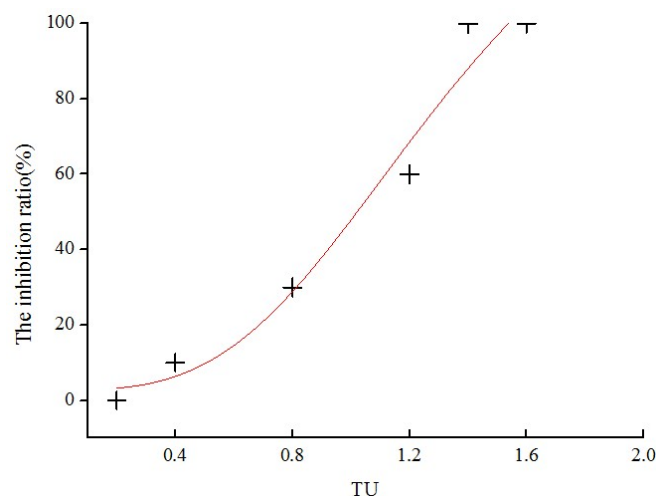


图 3-3 甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的混合毒性对大型蚤的抑制率

表 3-5 甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑对大型蚤的混合毒性实验结果

混合化合物物	48h-EC50	R ²
甲氧苄氨嘧啶+磺胺甲噁唑	TU=1	0.93

根据表 0-1 可知，当 $TU=1$ 时，混合物毒性为简单相加作用。由图 3-3 和表 3-4 可知，甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的混合物的 48h-EC50 对应的 TU 值为 1，因此这两种抗生素的毒性为简单相加作用。

混合物的 48h-EC50 值对应的甲氧苄氨嘧啶浓度为 105.0mg/L，磺胺甲噁唑的浓度为 0.9mg/L。而甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑单独对大型蚤的毒性效应值 48h-EC50 分别为 103mg/L 和 115mg/L。对比可知，在复杂的环境中，以每种抗生素对大型蚤的单独毒性效应来进行生态风险评价不能很好的反应环境中的实际情况，因此抗生素的联合毒性实验显得尤为重要。

3.4 本章小结

本章试验测定了不同抗生素在不同浓度下对费氏弧菌的抑制和对大型蚤的活动的影响作用，磺胺氯哒嗪相对于其余两种抗生素来说，对细菌的影响较大，对大型蚤的影响较小。低浓度情况下，甲氧苄氨嘧啶可为细菌提供生长所需碳源。磺胺甲噁唑对费氏弧菌的影响不明显，对大型蚤的毒性和甲氧苄氨嘧啶相

当。联合毒性实验结果表明，甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑在环境中的作用为简单相加作用，为生态风险评价更贴近环境实际提供了数据支持。

第4章 总结与展望

4.1 总结

针对再生水的普遍利用,以及污水再生过程中对抗生素的去除率低等现状,本实验旨在优化环境中多种类抗生素的同时检测分析方法,对以再生水为补给水源的清河做四个季度的抗生素调查,对其中浓度含量高的磺胺类抗生素和甲氧苄氨嘧啶做急性毒性试验,为评价其生态风险评价提供基础数据。

(1) 通过优化梯度淋洗色谱分离条件,优化沉积物中抗生素的提取过程,选取最优质谱离子对,使本方法适用于同时检测水体和沉积物中的四类抗生素,为环境中痕量抗生素的监测提供了重要依据。在自然基质中加入抗生素的回收率试验方法验证中,得出优化后的方法回收率高,重复性好,灵敏度和准确性较高,可适用于同时测定环境中多种类抗生素。

(2) 清河河流中抗生素的主要来源为污水处理厂出水,且枯水期时抗生素的污染更需要引起关注。清河水体中抗生素污染物浓度水平达到 ng/L 和 $\mu\text{g/L}$,沉积物中浓度水平达到 $\mu\text{g/Kg}$,远远高于其他河流。在清河水体中氧氟沙星和甲氧苄氨嘧啶的浓度最高,在沉积物中氧四环素的浓度最高,氯四环素在水体和沉积物中的伪分配系数最大。夏秋两季抗生素的检出率和检出量高于冬春两季,而冬春两季抗生素的浓度高于夏秋两季;秋季抗生素的伪分配系数最高,沉积物中的抗生素可能成为除了污水处理厂出水的第二污染源。因此清河中的氧氟沙星、甲氧苄氨嘧啶、氧四环素和氯四环素在冬春两季的环境行为需要引起关注。

(3) 即使是同一种抗生素对不同生物的毒性也不同。本文采用费氏弧菌和大型蚤为受试生物,测定了不同抗生素在不同浓度下对费氏弧菌的抑制和对大型蚤的活动的影响作用,磺胺氯哒嗪相对于其余两种抗生素来说,对细菌的影响较大,对大型蚤的影响较小。低浓度情况下,甲氧苄氨嘧啶可为细菌提供生长所需碳源。磺胺甲噁唑对费氏弧菌的影响不明显,对大型蚤的毒性和甲氧苄氨嘧啶相当。联合毒性实验结果表明,甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑在环境中的作用为简单相加作用,为生态风险评价更贴近环境实际提供了数据支持。

4.2 展望

本论文今后可在以下几个方面继续开展工作：

（1）对清河流域中抗生素的含量进行长期监测，尤其是在枯水时期。以更准确的反应区域内抗生素的污染情况。

（2）建立湿地模型，可以进一步研究，抗生素在湿地中的行为和环境归宿，从分子空间结构方面，研究其在在湿地中的降解途径。推行实际应用，为再生水作为城市河道的补给水源的利用提供保障。

（3）继续进行抗生素的毒性试验，注重于对大型蚤的联合毒性、慢性毒性和生殖毒性的测定，从生物化学的角度研究研究抗生素对生物的影响，并建立相关的生态风险评价及健康风险评价指标体系，期望为更好的评价环境中抗生素的污染程度提供依据，同时也为再生水的合理利用和再生水中痕量污染物的控制提供理论基础和科学依据。

致 谢

本篇硕士论文的整理和撰写是在导师张远研究员的悉心指导下完成的，在此由衷的感谢我的导师张远研究员，以及所有关心我的老师，家人和朋友。张远老师学识渊博、治学严谨、看问题眼光独到，其清晰的逻辑科研思维和创新性的科研角度令我受益匪浅，成为我今后学习的典范。另外张远老师乐观豁达的生活观和真诚淡然的处世态度影响着我积极面对生活，不断提醒我在生活中顺利时戒骄戒躁，不顺利时心平气和地努力改变现状。

同时我也要感谢辽宁大学环境学院的老师和班级的同学们在学习和生活中给予我的温暖友情和无私帮助；还要感谢课题组的徐建研究员、郭昌胜助理研究员和师兄师姐们在我试验过程中给予的关心和帮助。在实验室的生活是充实的，忙碌的实验时有枯燥，但是在每个出数据特别是得出好结果的时刻还是令我惊喜，并且不断积累起小小的成就感。在实验室的生活中我庆幸遇到了一班良师益友，我们曾一起工作，一起欢笑，彼此扶持，成为了工作上和生活上的好伙伴。在此我要感谢本实验室李蕾、贺艳师姐在试验过程和生活上对我的帮助和照顾；特别感谢柏杨巍以及王山峰和郝智能师兄在样品采集和试验过程中对我的大力协助和支持！

在论文即将付梓之际，我必须要感谢养育我的父母和关心我的亲人。他们在我成长和求学的道路上给予了我精神上无尽的关爱和物质上莫大的支持，没有他们的付出，就没有我今天的收获，亲人的爱是我不断前进的动力！我要把这篇论文送给他们相信远方的父母也会露出欣慰的微笑！

最后，向评审本文的各位专家、学者表示衷心的感谢！

卫毅梅

二〇一三年四月

参考文献

- [1] Khetan S K, Collins TJ, Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews*, 2007, Vol.107(6):2319~2364
- [2] Bruee JR, Paul K S L MichaelM, Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care Products (PPCPs) in Asia, with Particular reference to Southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, Vol.50(9):913~920
- [3] UCS (Union of Concerned Scientist), 2001. Hogging it!: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. http://www.ucsusa.org/food_and_environment/antibiotic_resistance/index, p. 4.
- [4] 刘护鱼.新一代氟喹诺酮类药物-加替沙星. *西北药学杂志*, 2004, Vol.19(4):189-191
- [5] Jin, S., Regulation, realities and recommendation on antimicrobial use in food animal production in China. In: *The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals*. WHO, Geneva (Section 2.3.4), 1997
- [6] Khaehatourians G G, Agricultural use of antibiotics and evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, 1998, Vol.159(9):1129~1136
- [7] 四环素市场分析预测. <http://www.21360.cn/Html/cygc/200610/22609.html>, 2006-10-31
- [8] 李宗品.中国富余产能迎接国际医药外包. *中国医药报道*, 2006, Vol.16(3):59-60
- [9] Ibekwe AM, Grieve CM, Lyon SR, Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, Vol.69(9):5060~5069
- [10] 钱靖华, 田宁宁.再生水回用于景观水体存在的问题及防治对策. *给水排水*, 2006, Vol.32(5):71-74
- [11] Guidelines for water reuse. US. Environment Protection Agency. 2004,395~401
- [12] Ternes T A, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 1998, Vol.32(11):3245~3260
- [13] Carballa M, Omil F, Lema JM, et al., Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 2004, Vol.38(12):2918~2926
- [14] Lindberg RH, Wennberg P, Johansson MI, et al., Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology*, 2005, Vol.39(10):3421~3429
- [15] Miao XS, Bishay F, Chen M, et al., Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. *Environmental Science & Technology*, 2004, Vol.38(13):3533~3541
- [16] 徐维海, 张干, 邹世春, 等.典型抗生素类药物在城市污水处理厂中的含量水平及其行为特征. *环境科学*, 2007, Vol.28(8):1779-1783
- [17] Chang H, Hu JY, Wang LZ, et al., Occurrence of sulfonamide antibiotics in sewage

treatment plants. Chinese Science Bulletin, 2008, Vol.53(4):514~520

[18] Xiao Y, Chang H, Jia A, et al., Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2008, Vol.1214(1-2):100~108

[19] Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, et al., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science & Technology, 2002, Vol.36(6):1202~1211

[20] 刘锋, 陶然, 应光国, 等. 抗生素的环境归宿与生态效应研究进展. 生态学报, 2010, Vol.30(16): 4503-4519

[21] 徐维海, 张干, 邹世春, 等. 香港维多利亚港和珠江广州河段水体中抗生素的含量特征及其季节变化. 环境科学, 2006, Vol.27(12): 2458-2462

[22] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测环境水样 22 种抗生素类药物. 色谱, 2010, Vol.28(5): 491-497

[23] 王宝贞. 城市水资源开发与水环境改善有效途径探讨. 中国建设信息(水工业市场), 2010, Vol.1(2): 32-35

[24] Berger K., Petersen. B. & Buening-Pfaue H., Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. Archiv fuer Lebensmittelhygiene, 1986, Vol.37(4): 99~102

[25] 陈涛. HPLC/MS/MS 分析广州和珠海污水处理厂废水中多种抗生素污染研究: [硕士学位论文]. 广州: 暨南大学理工学院, 2010

[26] Mueller S.R., Occurrence and fate of antibiotics in manure, soil and water. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 2003, Vol.94(6): 574~578

[27] Hamscher G, Pawelzick H T., Hper H. & Nau H., Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, Vol.24(4): 861~868

[28] 鲍艳宇. 四环素类抗生素在土壤中的环境行为及生态毒性研究: [博士后学位论文]. 天津: 南开大学环境科学与工程学院, 2008

[29] 李兆君, 姚志鹏, 张杰, 梁永超. 兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展. 生态毒理学报, 2008, Vol.3(1): 15-20

[30] Sithole BB, Guy RD., Models for tetracycline in aquatic environments: interaction with bentonite clay system. Water, Air, and Soil Pollution, 1987, Vol.32(3-4):303~314

[31] Rabolle M, Spliid NH., Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. Chemosphere, 2000, Vol.40(7):715~722

[32] Nowara A, Burhenne J, Spiteller M., Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, Vol.45(4):459~463

[33] Thiele S., Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess chernozem. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2000, Vol.163(6):589~594

[34] Ingerslev F, Halling-Sorensen B., Biodegradability properties of sulfonamides in activated

- sludge. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2000, Vol.19(10):2467~2473
- [35] Kummerer K., Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosphere*, 2009, Vol.75(4):417~434
- [36] Gu C, Karthikeyan KG, Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*, 2008, Vol.37(2):704~711
- [37] Sibley SD, Pedersen JA., Interaction of the macrolide antimicrobial clarithromycin with dissolved humic acid. *Environmental Science & Technology*, 2008, Vol.42(2):422~428
- [38] Huang CH, Renew JE, Smeby LK, et al., Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resources Update*, 2001, Vol.120(1):30~40
- [39] Lunestad BT, Samuelsen OB, Fjelde S, et al., Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*, 1995, Vol.134(3-4):217~225
- [40] Ingerslev F, Torang L, Loke ML, et al., Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. *Chemosphere*, 2001, Vol.44(4):865~872
- [41] Massey LB, Haggard BE, Galloway JM, et al., Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. *Ecological Engineering*, 2010, Vol.36(7):930~938
- [42] Wang Z, Chang AC, Wu L, et al., Assessing the soil quality of long-term reclaimed wastewater-irrigated cropland. *Geoderma*, 2003, Vol.114(3):261~278
- [43] Fonseca A F, Herpin U, Paula A M, et al., Agricultural use of treated sewage effluents: agronomic and environmental implications and perspectives for Brazil. *Scientia Agricola*, 2007, Vol.64(2):194~209
- [44] Zhang GX, Liu XT, Sun K, et al., Sorption of tetracycline to sediments and soils: assessing the roles of pH, the presence of cadmium and properties of sediments and soils. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, 2010, Vol.4(4):421~429
- [45] 葛林科. 水中溶解性物质对氯霉素类和氟喹诺酮类抗生素光降解的影响: [博士学位论文]. 大连: 大连理工大学环境学院, 2009
- [46] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展. *生态毒理学报*, 2007, Vol.2(1): 1-9
- [47] Sanderson H, Brain R.A., Johnson D.J., Wilson C.J. and Solomon K.R., Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*, 2004, Vol.203(1-3): 27~40
- [48] Reinthaler F.F., Posch J., Feierl G., Wust G., Haas D., Ruckebauer G., Mascher F. and Marth E., Antibiotic resistance of *E. Coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 2003, Vol.37(8): 1685~1690
- [49] Halling-Sorensen B., Sengelov G. and Tjornelund J., Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, Vol.42(3): 263~271
- [50] 程雪梅. 色谱分析样品前处理技术-固相萃取法. *热带农业工程*, 2002, Vol.1(1): 14-16

- [51] Arthur C.L., Pawliszyn J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 1990, Vol.62(19): 2145~2148
- [52] Quintana J.B., Rodil R., Recmtsma T., Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 2004, Vol.1061(1):19~26
- [53] Brown K.D., Kulis J., Thomson B., et al., Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, 2006, Vol.366(2): 772~783
- [54] Ali I., Gupta V.K., Singh P., et al., Screening of domperidone in wastewater by high performance liquid chromatography and solid phase extraction methods. *Talanta*, 2006, Vol.68(3): 928~931
- [55] Hirsch R., Temes T., Haberer K., et al., Determination of antibiotic in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1998, Vol.815(2): 213~223
- [56] Mcardell C S, 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. *Environmental Science & Technology*, 2003, Vol.37(24): 5479~5486
- [57] Hartig C, Storm T, Jekel M., Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal wastewater by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1999, Vol.23(854):163~173
- [58] Thomtdka KW.et al., Use of bioluminescent bacterium *photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, Vol.51 (4):538~544
- [59] Daniela C, Francescopaolo D C, Concetta G, et al., Polyphasic approach to characterization of marine luminous bacteria. *Research in Microbiology*, 1999, Vol.150 (3): 221~230
- [60] Younghee Kim, Kyungho Choi, Jinyong Jung, et al., Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 2007, Vol.33 (3):370~375
- [61] Ferrari B, Mons R, Vollat B, Fraysse B, Paxcus N, Giudice R, et al., Environmental Risk Assessment of six human pharmaceuticals: are the current environment risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, Vol.23(5):1344~1354
- [62] 石颖.发光细菌快速检测畜产品中兽药残留研究:[硕士学位论文]. 咸阳:西北农林科技大学食品科学与工程学院, 2012
- [63] Evelien De Bel, Jo Dewulf, Bavo De Witte, et al., Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. *Chemosphere*, 2009, Vol.77(2):291~295
- [64] ISO. Water quality-determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus

(Cladocera: crustacea).1989, ISO6341~1989

- [65] Sprague J. B., Ramsay B.A., Lethal levels of mixed copper-zinc solution for juvenile salmon. Journal of Fisheries Board of Canada, 1965, Vol.22(2): 425~432
- [66] De Meester L., An analysis of phototactic behavior of *Daphnia magna* clones and their sexual descendants. Hydrobiologia, 1991, Vol.225(1): 217~227
- [67] Li W., Wu W. Z., Toxicity of mixtures of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls determined by dose-response curve analysis. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, Vol.62(5):539~546
- [68] Poch G., pancheva S.N., Calculating slope and ED₅₀ of additive dose-response curves, and application of these tabulated parameter values. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1995, Vol.33(3): 137~145
- [69] Olli Varis, Pertti Vakkilainen, China's 8 challenges to water resources management in the first quarter of the 21st Century. Geomorphology, 2001, Vol.41(2):93~104
- [70] Pedrero F, Kalavrouziotis I, Alarcón J J, et al., Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—review of some practices in Spain and Greece. Agricultural Water Management, 2010, Vol.97(9): 1233~1241
- [71] Mearns, Alan J., Reish, Donald J., Oshida, Philip S., et al., Effects of Pollution on Marine Organisms. Water Environment Research, 2011, Vol.83(10):1789~1852
- [72] Kummerer, K., Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, Vol.54(2):311~320
- [73] Available from <http://www.bjwater.gov.cn/>
- [74] 王朋华, 袁涛, 谭佑铭. 水环境药物污染对水生物和人体健康的影响. 环境与健康杂志, 2008, Vol. 25(2): 172-173
- [75] 谭建华, 唐才明, 余以义, 等. 高效液相色谱法同时分析城市地表水中的多种抗生素. 色谱, 2007, Vol. 25(4): 546-549
- [76] Cha J.M., Yang S., Carlson K.H., Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography, 2006, Vol.1115(1-2): 46~57
- [77] Niu H., Cai Y., Shi Y., et al., Evaluation of carbonnanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the extraction of cephalosporins antibiotics, sulfonamides and phenolic compounds from aqueous solution. Analytica Chimica Acta, 2007, Vol.594(1): 81~92
- [78] 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. Chemosphere, 2009, Vol.74(8): 1090~1097
- [79] Xu J, Wu L, Chen W, Chang A C., Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2008, Vol.1202(2): 189~195
- [80] Romero-González R, López-Martínez J C, Gómez-Milán E, Garrido-Frenich A, Martínez-Vidal J L., Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead

seabream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2007, Vol.857(1): 142~148

[81] Mistri H N, Jangid A G, Pudage A, Shah A, Shrivastav P S., Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in microgram quantities from low plasma volume by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 2010, Vol.94(2): 130~138

[82] 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. *Chemosphere*, 2009, Vol.74(8): 1090~1097

[83] Yang J-F, Ying G-G, Zhao J-L, Tao R, Su H-C, Chen F., Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of The Total Environment*, 2010, Vol.408(16): 3424~3432

[84] Klaus K., Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosphere*, 2009, Vol.75(4): 417~434

[85] Luo Y, Xu L, Rysz M, Wang Y, Zhang H, Alvarez P J J., Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin. China. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, Vol.45(5): 1827~1833

[86] Li W, Shi Y, Gao L, Liu J, Cai Y., Investigation of antibiotics in mollusks from coastal waters in the Bohai Sea of China. *Environ. Pollut.*, 2012, Vol.162: 56~62

[87] Hu W, Ma L, Guo C, Sha J, Zhu X, Wang Y., Simultaneous extraction and determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides antibiotics in soils using optimised solid phase extraction chromatography-tandem mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2012, Vol.92(6): 698~713

[88] Yang J-F, Ying G-G, Zhao J-L, Tao R, Su H-C, Chen F., Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of The Total Environment*, 2010, Vol.408(16): 3424~3432

[89] Jacobsen A M, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, Honoré Hansen S., Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, Vol.1038(1-2): 157~170

[90] Changlun Tong, Xiajun Zhuo, Yun Guo., Occurrence and Risk Assessment of Four Typical Fluoroquinolone Antibiotics in Raw and Treated Sewage and in Receiving Waters in Hangzhou, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, Vol.59(13):7303~7309

[91] Jianxian Sun, Jianying Hu, et al., Molecular and physiological characterization of fluoroquinolone resistance in relation to uropathogenicity among *Escherichia coli* isolates isolated from Wenyu River, China. *Chemosphere*, 2012, Vol.87(1):37~42

[92] Xu, W.H., Zhang, G, Zou, S.C., Ling, Z.H., Wang, G.L., Yan, W., A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotics in the Yellow River and its tributaries, China. *Water Environment Research*, 2009, Vol.81(3):248~254

- [93] Xu, W.H., Zhang, G, Zou, S.C., Li, X.D., Liu, Y.C., Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environment Pollution*, 2007, Vol.145(3):672~679
- [94] Chang, H., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S., Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 2008, Vol.1190(1):390~393
- [95] Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park, C.K., Kim, M.Y., Kim, H.S., Kim, P., Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the Total Environment*, 2008, Vol.405(1):120~128
- [96] Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 1999, Vol.225(1-2):109~118
- [97] Lei Jiang, Xialin Hu, Daqiang Yin, et al., Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, 2011, Vol.82(6):822~828
- [98] Yang J F, Ying G G, Zhao J L, et al., Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2011, Vol.46(3): 272~280
- [99] Yang S, Carlson K H., Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *Journal of Chromatography A*, 2004, Vol.1038(1): 141~155
- [100] Available from <http://www.bjwater.gov.cn/>
- [101] Karthikeyan K G, Meyer M T., Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*, 2006, Vol.361(1): 196~207
- [102] Rabolle, M., Spliid, N.H., Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, 2000, Vol.40(7):715~722
- [103] Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 2006, Vol.65(5):725~759
- [104] Yang J F, Ying G G, Zhao J L, et al., Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2011, Vol.46(3): 272~280
- [105] Xu, L., Luo, Y., Xu, B.J., Simultaneous determination for 12 antibiotics in sediments of Hai River by HPLC-MS/MS method. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, Vol.1(29):17~21
- [106] Lijun Zhou, Guangguo Ying, Jianliang Zhao, et al., Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environmental Pollution*, 2011, Vol.159 (7):1877~1885
- [107] Kim S C, Carlson K., Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental science &*

technology, 2007, Vol.41(1): 50~57

[108] Yang, J.F., Ying, G.G., Zhao, J.L., Tao, R., Su, H.C., Chen, F., Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS. Science of the Total Environment, 2010, Vol.408(16):3424~3432

[109] Leslie B. Massey, Brian E. Haggard et al., Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. Ecological Engineering, 2010, Vol.36(7):930~938

[110] OECD, Guideline for testing of chemicals 202: Daphnia sp. acute immobilization test and reproduction test. Paris: OECD, 1981

[111] Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen L P, et al., Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere, 2000, Vol.40(7): 783~793

攻读学位期间发表的学术论文及参加科研情况

一、 发表论文

1. 《Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments and fish muscles by liquid chromatography –tandem mass spectrometry》, Frontiers of Environmental Science and Engineering , 13 年版, 已发表, 第一作者。
2. 《Occurrence of antibiotics and seasonal variation in an urban river supplemented by reclaimed water》, 已完成待发表, 第二作者。

二、 科研项目

1. 国家自然科学基金项目, “以再生水为水源的城市河流及城市河流湿地中抗生素的迁移转化及控制机理研究”, 项目代码: E0804。



遼寧大學
LIAONING UNIVERSITY

硕士学位论文

THESIS FOR MASTER DEGREE