

化学处理-紫外法降解药渣中四环素的研究^①

卜春苗¹, 陈卫民²

1. 宁夏大学 化学化工学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学 环境工程研究院, 银川 750021

摘要:以四环素生产过程中药渣为研究对象, 改性的大豆油脂作为特制化学处理剂, 采用化学处理和光降解相结合的方法去除药渣中残留的四环素。主要探讨化学处理剂的用量、化学处理温度、光降解时间对四环素降解率的影响, 通过液相-质谱法(LC-MS/MS)测定药渣中四环素的降解率, 结果显示, 采用 10% 的化学处理剂, 60 °C 下 15 h 的紫外光照射或 100 °C 下 5 h 的光照时间, 四环素的降解率均高于 90%。

关键词:药渣; 光降解; 化学处理

中图分类号: X705

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2019)05-0045-05

药物残留(Pharmaceutical Residues)引发的安全问题引起了全世界广泛的关注。我国医药发酵企业每年约有 180 万 t 的药渣产生, 但目前对药渣的无公害处理与资源化利用现状看, 却存在着严重的污染和利用不合理问题^[1]。四环素发酵药渣是以淀粉、葡萄糖和蛋白胨为主要原料作培养基发酵提取药物后的副产品, 粗蛋白含量在 48% 以上, 是非常有价值的动物蛋白饲料待开发的原料。但是, 原渣中含有微量的四环素, 直接作为蛋白饲料原料利用, 会造成动物产品中含有抗生素药残, 存在食品安全隐患, 必须降解处理后才可以利用。

目前, 国内外对于环境水样中残留抗生素降解的研究报道较多^[2-3], 常采用的方法有光降解^[4-5]、水解^[6]、氧化降解^[7]、生物降解^[8]等。但是, 至今国内外在抗生素药渣治理与资源化方面的研究报道较少。最早, 马志强等采用微生物法对药渣中残留的四环素进行降解, 降解率为 86.1%^[9]。为了进一步提高四环素的降解率, 本研究采取将化学处理和紫外光降解相结合的方法, 以四环素生产药渣为研究对象, 验证对残留四环素的降解效果, 皆为四环素废弃药渣环保处理及资源化利用提供新的解决办法。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

LC-20AD 超快速液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); Xevo TQ-S 三重四级杆质谱系统; Oasis MCX 多功能净化柱(美国 Waters 公司); B-400 均质仪(瑞士 Buchi 公司), N-EVAPd934-AH 玻璃纤维滤纸(直径 110 mm, 1.5 μm , 美国 Whatman 公司); 平行样品浓缩仪(瑞士 Buchi 公司); 台式冷冻离心机; 超纯水仪; 漩涡混合器; 傅里叶红外光谱仪(日本 Shimadzu 公司)。四环素标准品(纯度 $\geq 99\%$, 美国 Sigma 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 购自美国 TEDLA 公司); 乙酸铵(天津市科密欧有限公司)。

1.2 降解实验

降解实验在特制的反应容器中进行, 在一定量药渣样品中加入不同用量的化学处理剂, 在不同紫外光

① 收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 宁夏大学科学研究基金项目(ZR1711)。

作者简介: 卜春苗(1980-), 女, 高级实验师, 博士, 主要从事吸附材料研究。

照时间下,收集药渣样品,通过液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,测定处理药渣中四环素残留量,计算降解效率:

$$x = \frac{c_0 - c_t}{c_0} \times 100\%$$

式中: c_0 为四环素药渣中初始质量比, c_t 为处理药渣中残留四环素质量比.

1.2.1 配制标准储备液

称取 10.0 mg 四环素标准物质于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释即得 1.0 mg/mL,避光保存.

1.2.2 提取净化

提取:分别称取 1.0 g 原渣、降解药渣样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中,依次加入 100 μ L 不同质量浓度的标准贮备液(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 g/L)和 5 mL 4%氯化钠溶液,充分匀浆后,再加入 5 mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 10 min. 取出后,加入 10 mL 乙酸乙酯,振荡提取 5 min,−4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min,取上层有机相待净化.

净化: Oasis MCX 小柱,使用前依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 乙酸乙酯活化,取 5.0 mL 上层有机相于柱中(重力过柱),用 10 mL 试管收集,待过柱完成后,用 2 mL 乙酸乙酯淋洗,再用 2 mL 甲醇淋洗小柱,压干后,用 3 mL 5%氨化甲醇洗脱,收集于另一 10 mL 试管中,压干,得洗脱液. 将洗脱液置于氮吹仪上,50 $^{\circ}$ C 下吹干,后用 10%甲醇-水溶液定容至 1 mL,涡旋 30 s,采用 0.2 μ m GD/Nylon 多层针头式滤器过滤到进样小瓶中,供 LC-MS/MS 检测.

1.2.3 仪器条件

色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY BEH C18 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m),柱温 40 $^{\circ}$ C,样品室温度 20 $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL/min,进样体积 5.0 μ L,流动相 A 为乙腈、流动相 B 为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液,梯度洗脱程序见表 1.

表 1 以乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液
为流动相梯度洗脱程序

时间/min	A 水相/%	B 有机相/%
0.1	80	20
0.3	10	90
1.0	10	90
2.5	80	20
8.0	80	20

注: 质谱条件离子源为电喷雾离子源(ESI),扫描方式为负离子扫描(ESI $^{-}$),检测方式为多反应检测(MRM).

2 结果与讨论

2.1 检测方法选取

四环素的定量方法较多,如荧光光度法、毛细管电泳、高效液相色谱法,但降解药渣中四环素残留量较低,这些方法的灵敏度均不能满足检测要求^[10]. 本研究采用 LC-MS/MS 法测定样品中四环素残留量,保证分析结果的准确性. 选择 C18 作为分析柱,乙腈-乙酸铵作为流动相,采用空白基质加标定量方法,对降解药渣中四环素含量进行测定. 图 1 为四环素标液和药渣降解后阳性样品的对照谱图. 以目标组分峰面积与标准工作液浓度进行线性回归,绘制工作曲线,线性 $y = 1.53 \times 10^{-4}x + 2.46 \times 10^4$,线性相关系数 R^2 为 0.999 3,方法检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别以最低加标浓度样品中被分析物质的定性离子 $S/N = 3$ 和 10 计算所得,分别为 0.08 mg/kg 和 0.24 mg/kg,满足本方法的检测需求.

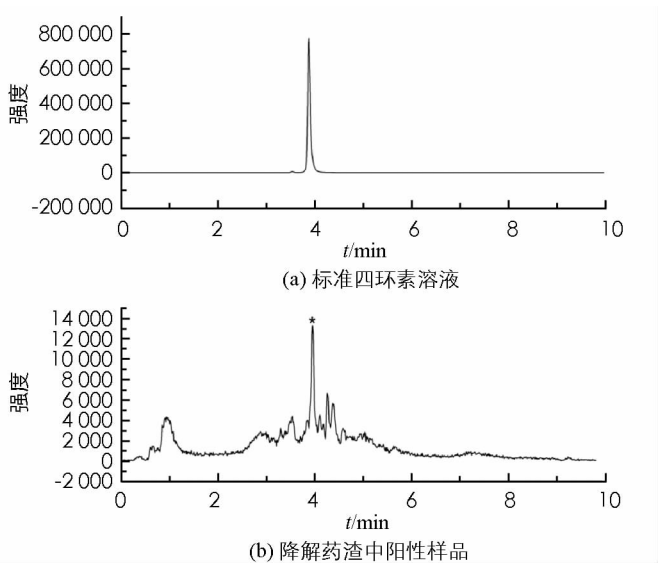


图 1 标准四环素溶液和降解药渣中
阳性样品的 LC-MS/MS 谱图

2.2 处理剂用量对四环素降解的影响

为了确保药渣固有的营养价值,将大豆油脂经过脱脂、脱胶、脱腊、脱酸处理处理(已获授权发明专利,专利号:200610137031.7),将其转化为一种安全、无毒的化学试剂,不同于常规的氧化型处理剂,处理后的大豆油脂为一种特殊的混合型处理剂,在降解过程中应存在多种化学作用. 本研究首先考察处理后的大豆油脂用量对药渣中四环素降解的影响,在室温、处理时间为 10 h 的条件下,质量分数为 5%,10%和 15%的化学处理剂对四环素降解效果明显不同. 随着处理剂的用量从 5%提高到 10%,四环素的降解率大幅度提高,降解率由 10% 增长到 60%;继续增加处理试剂用量,降解率为 61%,基本保持不变,结果证明采用 10% 的化学处理试剂是降解药渣中四环素的最佳用量.

2.3 处理温度对四环素降解的影响

采用质量分数为 10%的化学处理试剂,考察不同温度下药渣中四环素的降解率. 结果显示,20,60,100 ℃下的降解率分别为 9.7%,81.6%和 88%,可以看出,当温度由 0 ℃升高到 60 ℃,四环素的降解率明显升高,但继续升高温度,降解率的变化很小. 因此,为了保持药渣处理后的保健功效,60 ℃条件下进行降解实验最佳.

2.4 紫外光照射时间对四环素降解的影响

光降解是降解四环素的一种重要途径^[11]. 为了进一步提高药渣中四环素的降解效果,拟采用光降解和化学处理相结合的方法,验证对四环素的降解性能. 由于紫外光照射简便易用,且文献已经证实 254 nm 紫外光照射对四环素具有较强的光解作用^[5],本文在加入 10% 的特制化学处理剂条件下,采用 254 nm 紫外光照射,分别测定 0,5,10,15 h 光照时间下药渣中四环素的残留量,计算降解率(图 2). 随着光照射时间的延长,四环素的降解率由 81.8%提高到 91%,实现了进一步提高四环素降解效果的目的,表明本研究采用的化学处理-紫外光降解的方式在去除药渣中残留四环素方面具有潜在的应用价值.

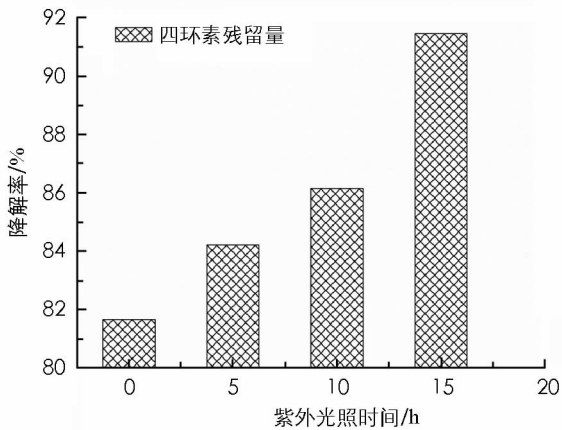


图 2 紫外照射时间对四环素降解的影响

目前,众多研究证明四环素降解是一个复杂的过程,同时发生多种化学反应增加了降解机理的分析难度. 而大豆油脂作为一种特殊的混合型处理剂,降解过程将更为复杂,但探究污染物质在降解过程中产生的中间产物和最终产物,对环境分析和生态毒性分析有着重要的研究意义,因此,后续工作的重点是探讨本研究所采用的特制处理剂对四环素的降解机理.

2.5 毒性评价

四环素在环境中的降解往往转化为一系列氧化或代谢产物,生物毒性减弱、可生化性增强,而有的产物由于氧化过度毒性更强,对环境造成二次污染. 因此,检测降解产物毒性,是评价降解方法,验证抗生素降解是否彻底化、绿色化的重要依据. 本研究以降解药渣中四环素,促进药渣循环再利用为目标,更应考察降解药渣的毒性. 依据抗生素在低浓度下能抑制或灭杀其他微生物的特性,称取 150 mg 降解药渣、药渣原样,用 10 mL 50%甲醇提取,再 5 倍水稀释,得到了两种样品提取液,将 1 mL 金葡菌直接铺板,考察提取液对金黄色葡萄球菌的杀菌作用,结果见图 3. 降解后的药渣素样品提取液对金色葡萄球菌无效(A 皿),而原药渣废料液对金葡有绝杀(B 皿),证明降解后的药渣样品生物毒性显著降低.

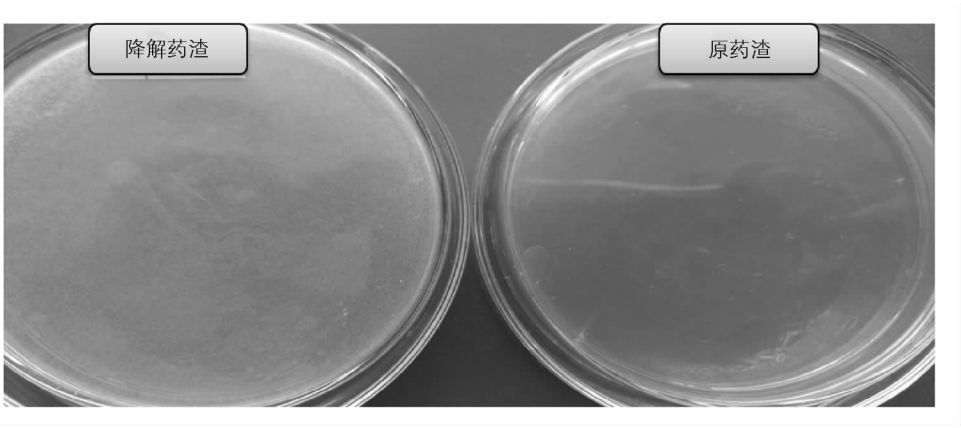


图 3 降解药渣和原药渣样品对葡萄球菌的作用

2.6 综合考虑温度、化学处理剂用量和紫外光照时间对四环素降解的影响

采用 10% 化学处理剂，综合考察 20, 60, 100 ℃处理温度下以及不同紫外光照射时间下对四环素降解的效果。由图 4 可以看出，在处理温度为 100 ℃，紫外照射时间为 5 h 的条件下，四环素的降解效果最好，高达 94%。

3 结 论

以降解药渣中残留四环素为目标，采用化学处理和 254 nm 紫外光照射相结合的方式，探讨降解性能，结果表明：

- 1) 采用特制化学处理剂(自制大豆油脂)，药渣中四环素的降解率可达 60%。
- 2) 采用化学处理和紫外光降解相结合的方式，进一步提高对四环素的降解率。结果显示，在 10% 的化学处理剂用量下，60 ℃下光照时间 15 h 或 100 ℃下光照时间 5 h 的条件下，药渣中四环素的降解率均高于 90%，高于目前文献报道值，证明本文方法在降解四环素残留的潜力。
- 3) 评价降解药渣的生物毒性，结果显示降解药渣提取液对金色葡萄球菌无抑制作用，证明本文采用方法能够有效去除药渣中四环素，降低生物毒性。

感谢宁夏疾控中心提供的液质测试技术。

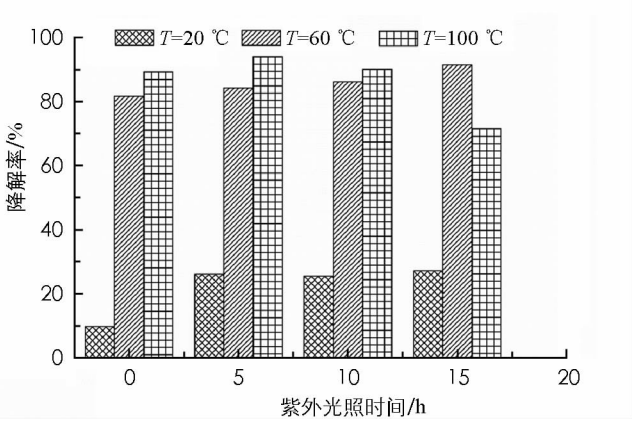


图 4 温度和紫外照射时间对四环素降解的影响

参考文献：

[1] 周瑶琴,游 凤,高 彤,等. 鸡源致病性大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(5): 23-29.

[2] 王丽琼,王 凯,马玉龙. 改性蒙脱石吸附制药废水中残留四环素的研究 [J]. 环境科学与技术, 2017, 40(8): 197-201, 215.

[3] CHEN Y Y, MA Y L, YANG J. Aqueous Tetracycline Degradation by H₂O₂ Alone: Removal and Transformation Pathway [J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 307: 15-23.

[4] REYES C, FERNÁNDEZ J, FREER J, et al. Degradation and Inactivation of Tetracycline by TiO₂ Photocatalysis [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2006, 184: 141-146.

[5] 王红涛,吴 玄,赵慧敏,等. 分子印迹膜修饰 TiO₂ 纳米管及其光催化降解盐酸四环素 [J]. 中国科学, 2011, 56(35):

- 2965-2969.
- [6] 李伟明, 鲍艳宇, 周启星. 四环素类抗生素降解途径及其主要降解产物研究进展 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(8): 2300-2308.
- [7] 郑小刚, 李子黎, 刘 勇, 等. $\text{Sm}_x\text{Ce}_{1-x}\text{VO}_4$ 纳米粒子对四环素抗生素的光降解机制 [J]. 环境科学与技术, 2018, 41(9): 48-54.
- [8] DRILLIA P, DOKIANAKIS S N, FOUNTOULAKIS M S, et al. On the Occasional Biodegradation of Pharmaceuticals in the Activated Sludge Process: The Example of the Antibiotic Sulfamethoxazole [J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 122: 259-265.
- [9] 马志强, 马玉龙, 谢 丽, 等. 微生物法降解药渣中残留四环素的试验研究 [J]. 环境科学与技术, 2012, 35(1): 46-49.
- [10] 李洁玉, 周 浓, 阳文武, 等. HPLC 法测定仙桃草中芦丁、木犀草苷、木犀草素的含量 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2017, 42(8): 80-84.
- [11] 宋晨怡, 尹大强. 四环素光催化降解特性与选择性研究 [J]. 环境科学, 2012, 35(2): 619-625.

On Degradation of Tetracycline Residues in Pharmaceutical Waste in Chemical Treatment-Ultraviolet Method

BO Chun-miao¹, CHEN Wei-min²

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Institute of Environmental Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: In this paper, the pharmaceutical waste of the production of tetracycline as the object of study and the modified soybean oil as a special chemical treatment agent, the chemical treatment-ultraviolet method was used to removing the tetracycline residues. The amount of chemical treatment and the time of UV light were investigated in detail on the influence of the degradation effect. Using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination of degradation rate, the results indicated that the rates were above 90% both on 60 °C with 15 h light time and 100 °C with 5 h light time when the 10% chemical treatment was used.

Key words: pharmaceutical waste; light degradation; chemical treatment

责任编辑 潘春燕