

SPE-HPLC 法测定水中 4 种头孢类抗生素

陶辉 李文君 陈卫 陈连生 冯博 王伦 徐峰

(河海大学 环境学院浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098)

摘要: 药品与个人护品 (PPCPs) 是目前饮用水和环境领域内的研究热点之一。为深入研究 PPCPs 在环境中及其在水处理过程中的迁移转化规律, 建立了 SPE-HPLC 法同时检测水中头孢氨苄、头孢拉定、头孢他定和头孢噻肟等 4 种常见头孢类抗生素的方法。结果表明: 亲水亲脂平衡反相吸附剂 (Poly-Sery HLB 型) 对水中 4 种头孢类抗生素的富集效果较好, 在含量为 0~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 4 种头孢类抗生素的回收率为 82%~121%, 远高于反相 C18 型吸附剂。以甲醇-水为流动相, 采用梯度淋洗的方法, 可在 7min 内完成水中 4 种抗生素完全分离。测定 4 种抗生素的线性范围均为 0.1~5mg/L, 线性良好, 均 $R^2 > 0.999$, 峰面积的相对标准偏差 $\leq 0.45\%$, 时间的相对标准偏差 $\leq 2.37\%$, 加标平均回收率为 84.19%。水样经 HLB 预处理后, 四种抗生素的方法检出限均为 50ng/L, 方法回收率在 83.62%~122.12% 之间。该方法的回收率高, 重现性好, 准确性和灵敏度较高, 可适用于同时测定水中 4 种头孢类抗生素。

关键词: 头孢类抗生素; 检测; 固相萃取; 高效液相色谱

药品与个人护品 (PPCPs) 是目前饮用水和环境领域内的研究热点之一。我国是抗生素生产和使用大国, 头孢类抗生素的生产量和使用量增长趋势明显^[1]。头孢类抗生素是 20 世纪 50 年代开始应用的抗生素, 为 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 的衍生物, 较耐酸和重金属, 毒性低, 但天然产物活性较低。头孢菌素比青霉素的 β -内酰胺环张力较小, 故较青霉素稳定, 并且具有抗菌谱广、杀菌力强和过敏反应少的特点^[2], 但也引起细菌的耐药性、毒副作用以及过量滥用等问题^[3]。药物经人体或动物摄入后, 事实上只有少部分发生代谢, 大部分以原形药物最终通过尿液或粪便进入污水系统中; 此外, 一些不用和过期的药物则通过厕所丢弃等方式最终也会汇入环境中, 而现有常规处理技术对其中相当大一部分无明显去除效果, 致使它们最终排入天然水体, 长期、大量、持续的往环境中排放抗生素, 会造成水环境抗生素“假性持久性”污染^[4]。

目前, 水环境中已检测出多种 PPCPs, 如磺胺类药物^[5, 6]、三氯生^[7, 8]、氟喹诺酮类抗生素^[9, 10]等等。针对头孢类抗生素的含量的测定方法有毛细管区带电泳法^[11]、分光光度法^[12]、单扫描示波极谱法^[13]、荧光光度法^[14]。这些种方法检测

限偏高，多为单种物质的检测，不适用于复杂水环境中头孢的检测。最近几年，高效液相色谱法应用于头孢类抗生素的检测^[15]，但常用于检测生物样品或食品中的头孢抗生素残留^[3,16]，而针对水体中多种头孢抗生素同时测定的报道较为少见。

因此，为深入研究 PPCPs 在环境中及其在水处理过程中的迁移转化规律，建立了固相萃取——高效液相色谱法（SPE-HPLC 法）同时检测水中头孢氨苄、头孢拉定、头孢他定和头孢噻肟等 4 种常见头孢类抗生素的方法。四种头孢类抗生素的化学式如图 1 所示。

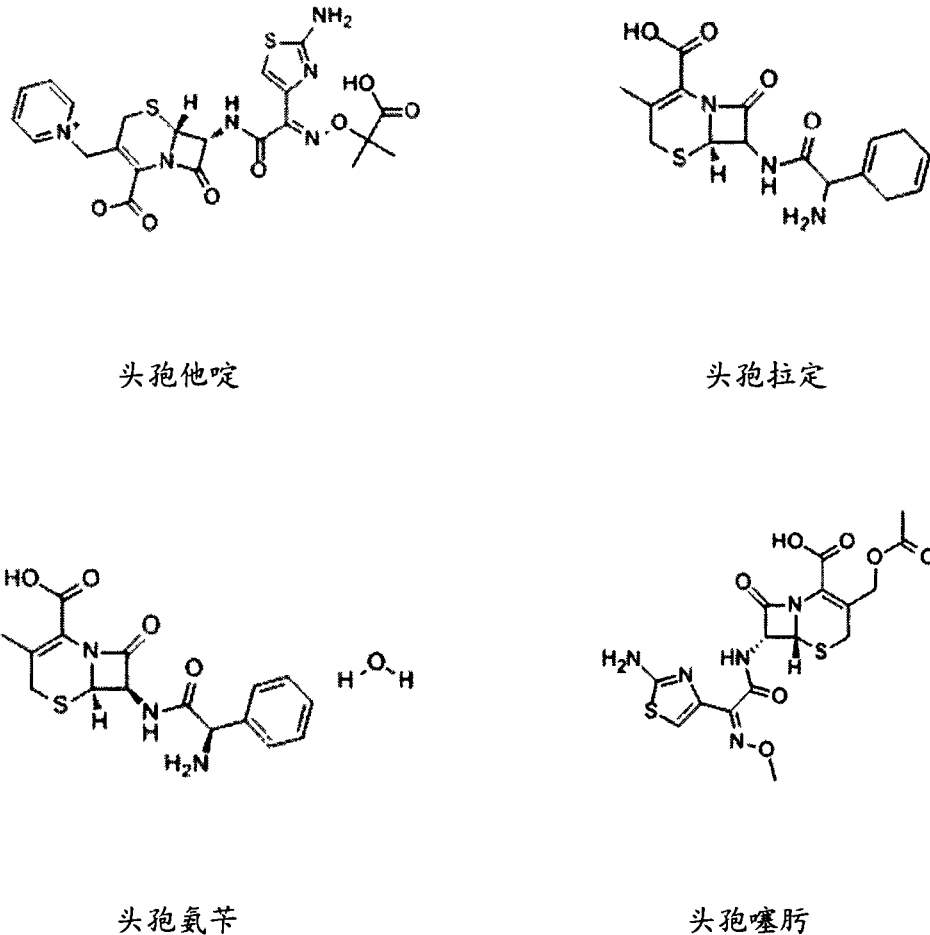


图 1 四种头孢类抗生素的化学式示意图

1 试验材料与方法

1.1 仪器与装置

液相色谱仪采用 LC1260 型高效液相色谱 (Agilent 公司), UV 检测器。固相萃取装置 (Supelco 公司)。固相萃取小柱为 Poly-Sery HLB (500mg/3ml, CNW 公司) 和 LC-18 (500mg/3mL, Supelco 公司)。

1.2 试剂

头孢类抗生素标准品: 头孢氨苄 (Cephalexin, CLX, CAS No. : 15686-71-2)、头孢拉定 (Cefradine, CED, CAS No. : 38821-53-3)、头孢他啶 (Ceftazidime, CAZ, CAS No. : 78439-06-2)、头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX, CAS No. : 63527-52-6) 均购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯 (Merck 公司), 稀 HCl (2mol/L) 为色谱纯, 实验用水为超纯水 (Milli-Q, 电阻率 $>18\text{M}\Omega/\text{cm}$)。

1.3 色谱条件

预柱为 Eclipse XDB-C18 ($4.6\times 12.5\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, Agilent 公司), 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 ($4.6\times 150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, Agilent 公司)。流动相: 超纯水 (A), 甲醇 (B)。流动相浓度梯度淋洗程序: 在 0~10 min 时, 流动相 A: B 体积比由 90: 10 均匀变化到 10: 90; 在 10~13min 时, 流动相 A: B 体积比由 10: 90 均匀变化到 90: 10; 13~15min 时, 流动相 A: B 体积比保持为 90: 10。流速始终保持在 $1\text{mL}/\text{min}$, 柱温为 35°C , 紫外检测波长为 254nm , 进样体积为 $10\mu\text{L}$ 。

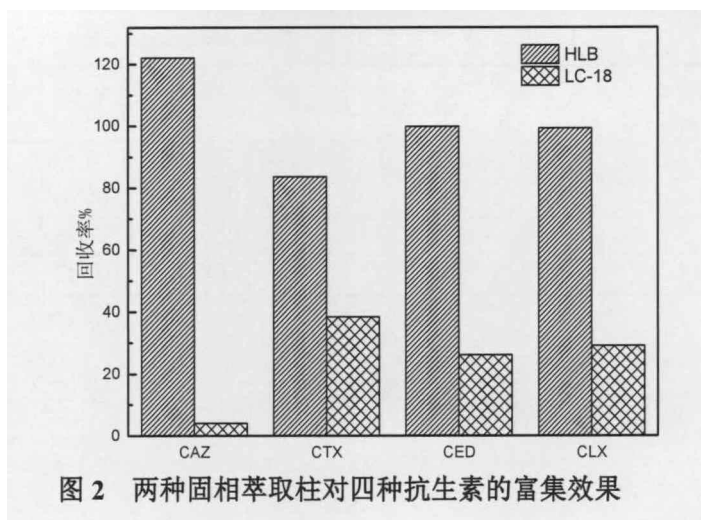
1.4 固相萃取方法

固相萃取柱 (Poly-Sery HLB 和 LC-18) 预先经 5 ml 甲醇和 5 ml 纯水活化后备用。取水样 1000ml 经孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜过滤去除可能造成固相萃取柱堵塞的颗粒物后, 加 HCl 调节水样 $\text{pH}=2.0\pm 0.2$ 。将酸化后的水样以 $8\text{mL}/\text{min}$ 的流速通过活化后的固相萃取柱。待水样萃取完毕, 用 5ml 去离子水和 5ml 5% 甲醇-水依次淋洗固相萃取柱。待没有液体流出后, 继续抽气 15min 以尽量除去残留的水分。然后用 10 ml 甲醇洗脱固相萃取柱并收集洗脱液于浓缩管中, 再在 40°C 下氮吹浓缩至 1ml。

2 试验结果与讨论

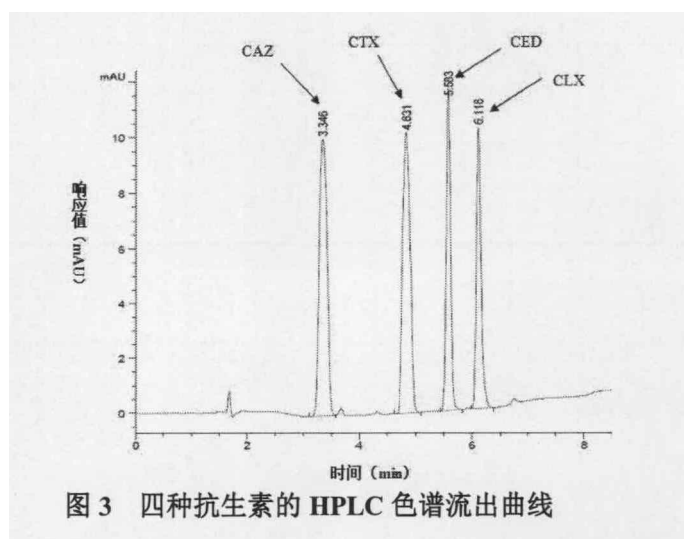
2.1 固相萃取柱的选择

固相萃取柱中吸附剂类型对目标物的富集效果影响较大。试验选择了水质测试过程中常用的十八烷基型吸附剂 (LC-18) 和亲水亲脂平衡反相吸附剂 (Poly-Sery HLB, 以下简称 HLB) 两种固相萃取柱, 对比了其在水中的 4 种头孢类抗生素的富集效果, 结果见图 2 所示。由图 2 可见, 由于头孢类抗生素的极性较弱且分子较大, 因此采用亲水亲脂平衡反相吸附剂的 HLB 固相萃取柱对头孢灯抗生素的吸附效果较好, 对于 CED 的回收率为 99.77%, CLX 的回收率为 99.33%, 对 CAZ 的回收率为 121%, 对 CTX 的回收率为 83%, 远高于采用十八烷基型吸附剂的 LC-18 型固相萃取柱 (8%~39%)。故选择 HLB 作为检测方法的固相萃取柱。



2.2 色谱分离度与标准曲线

四种头孢类抗生素在分子结构、分子量、亲疏水性、极性、等电点等特性上均较为接近，因此做到4种头孢类抗生素的快速、完全分离在测试过程中尤为重要。为此，采用甲醇、乙腈、水等作为流动相开展了4种抗生素的色谱分离度研究，最后优选的流动相及梯度淋洗条件1.3节所述。在优化的色谱条件下，4种头孢类抗生素的色谱流出曲线如图3所示。由图3可知，在7min内完成了4种头孢类抗生素的基线分离。



用超纯水配制4种头孢抗生素混合标准系列溶液，设置5个浓度系列，4种头孢抗生素在5个系列点下的浓度分别为5.0mg/L、2.0mg/L、1.0mg/L、0.5mg/L、0.1mg/L。在1.3节所述色谱条件下测定，以浓度为纵坐标、峰面积为横坐标绘制校准曲线，结果表明此方法的线性关系良好（见表1）。

表1 四种头孢类抗生素的标准曲线回归方程

物质	保留时间 (min)	线性范围 (mg/L)	标准曲线	R ²
CAZ	3.346	0.1~5.0	$y=0.05150x+0.00918$	0.99999
CTX	4.831	0.1~5.0	$y=0.05238x-0.00765$	0.99998
CED	5.583	0.1~5.0	$y=0.08007x-0.00464$	0.99999
CLX	6.118	0.1~5.0	$y=0.0861x+0.0402$	0.99978

2.3 精密度、准确度与检出限

2.3.1 精密度

在1.3节所述色谱条件下,分别取5mg/L、2mg/L、1mg/L 3个水平的4种头孢类抗生素混标溶液,每个样品重复进样(n=10),计算峰面积RSD以及保留时间的RSD,用来测定仪器的精密度,结果如表2所示。

表2 不同浓度的四种头孢类抗生素的精密度比较

物质	浓度 (mg/L)	峰面积 RSD (%)	时间 RSD (%)
CAZ	5	0.36	2.37
	2	0.15	0.26
	1	0.01	0.13
CTX	5	0.16	0.81
	2	0.40	0.11
	1	0.01	0.08
CED	5	0.09	0.06
	2	0.23	0.04
	1	0.01	0.03
CLX	5	0.20	0.02
	2	0.45	0.03
	1	0.01	0.01

由表2可见,所检测的四种抗生素的不同浓度的样品,峰面积的相对标准偏差 $\leq 0.45\%$,时间的相对标准偏差 $\leq 2.37\%$,满足痕量物质检测时相对标准偏差 $\leq 5\%$ 的要求,该检测方法的重现性较好。

2.3.1 准确度

向已知浓度(2.5、1.0、0.5mg/L)水样中分别加入不同浓度(1.00、0.50、0.25mg/L)的四种抗生素标准溶液,在相同的操作条件下定量分析并计算样品的回收率,结果见表3。由表3可知,采用上述方法分析头孢类抗生素的加标回收率为69.52%~98.85%,平均回收率为84.19%,满足痕量物质检测时的要求,表明本实验所采用的方法测定结果准确、可靠。

表3 四种抗生素加标回收率测定结果

物质	初始浓度 (mg/L)	加入量 (mg/L)	测得量 (mg/L)	回收率 (%)
CAZ	2.5	1.00	3.305	94.43
	1.0	0.50	1.446	96.40
	0.5	0.25	0.534	71.26
CTX	2.5	1.00	3.460	98.85
	1.0	0.50	1.438	95.87
	0.5	0.25	0.521	69.52
CED	2.5	1.00	3.430	98.01
	1.0	0.50	1.445	96.31
	0.5	0.25	0.540	71.98
CLX	2.5	1.00	3.312	94.63
	1.0	0.50	1.392	92.80
	0.5	0.25	0.522	69.65

采用超纯水加标（加标量 $1 \mu\text{g/L}$ ）进行萃取实验。加标后的水样经 SPE 前处理后，在 1.3 节所述色谱条件下，利用 HPLC-UV 进样测定。测定结果表明，四种头孢类抗生素的回收率均较好，头孢他啶、头孢噻肟、头孢拉定和头孢氨苄的回收率分别为 122.12%、83.62%、99.77%和 99.33%。

2.3.3 检出限

按 3 倍仪器信噪比计算，采用水样逐级稀释的方式，测得四种抗生素的仪器检测下限为 $50 \mu\text{g/L}$ 。水样经 SPE 浓缩富集 1000 倍以后（1000 mL 水样浓缩至 1 mL），四种抗生素的方法检出限均为 50ng/L 。

2.4 实际应用

在以自来水和太湖水为基质的 4 种头孢类抗生素的混合水样中加标（加标量 $5 \mu\text{g/L}$ ）进行萃取实验。实验结果表明，除头孢他啶回收率不高外（43.34%和 45.53%），其他 3 种物质头孢噻肟、头孢拉定和头孢氨苄的回收率均达到了分析要求（96.65%和 108.27%、95.58 和 88.26%、79.53%和 62.41%）。

3 结论

通过优化梯度淋洗色谱分离条件，优化固相萃取过程，对实际水样进行 1000 倍的富集浓缩，显著降低了该方法的检测限，使得该方法能够适用于分析环境水样中的多种头孢抗生素。四种抗生素的线性范围均为 $0.1 \sim 5\text{mg/L}$ ，线性良好，均 $R^2 > 0.999$ ，峰面积的相对标准偏差 $\leq 0.45\%$ ，四种抗生素的方法检出限均为 $0.05 \mu\text{g/L}$ ，方法回收率在 83.62%~122.12%之间。该方法具有目标物分离完全、峰形好、线性范围宽、回收率良好，重复性高，检测限较低。

参考文献

- [1] 郭文. 2003-2005 年头孢菌素类抗生素医院用药市场分析. 医药市场, 2006, 27(10): 637-640.
- [2] 曹小明, 张展翅. 头孢菌素类抗生素发展与研究概况. 江西化工, 2008, 1:22-23
- [3] 蔡玉娥, 蔡亚. 高效液相色谱-紫外光度法检测尿液和牛奶中多种头孢类抗生素. 分析化学, 2006, 34(6):745-748
- [4] Richardson, B. J., Lam, P. K. S., Martin, M., pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China .Emerging chemicals of concern, 2005, 50(9): 913-920.
- [5] Brain, R. A., Ramirez, A. J., Fulton, B. A. Herbicidal Effects of Sulfamethoxazole in Lemnagibba: Using p-Aminobenzoic Acid As a Biomarker of Effect . Environmental Science & Technology, 2008, 5(23): 8965-8970.
- [6] 石为民, 刘凯英. 磺胺甲噁唑在给水处理系统中的迁移转化及去除研究. 水处理技术, 2011, 37(6):86-89
- [7] Chalew, T., Halden, R. Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban . Water Resources Association, 2008, 45(1):4-13.
- [8] 周雪飞, 陈家斌. 三氯生检测方法的建立与优化. 中国给水排水, 2010, 26(12):126-129
- [9] Richard Lindberg et al. I Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography /mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere, 2004, 57:1479-1488
- [10] 高立红, 史亚利. 污水中氟喹诺酮类抗生素的分析方法. 环境化学, 2010, 29(5):948-95
- [11] 李捷伟, 柴逸峰. 毛细管区带电泳法测定头孢他啶粉针剂的含量. 西北药学杂志, 2002, 17(3):99-100.

[12] 房婷婷, 沙鸥. Fe²⁺-邻菲罗啉分光光度法测定针剂中头孢他啶. 光谱实验室, 2010, 27(2): 630- 632

[13] 李艳霞, 王运生. 单扫描示波极谱法测定针剂中头孢他啶含量. 理化检验: 化学分册, 2009, 45(1): 21- 24.

[14] 王崇妍, 李永强, 张远馥, 王金中. 荧光分光光度法测定注射用头孢他啶的含量. 河南大学学报: 医学版, 2006, 25(4): 48-50.

[15] Gertraud Suhren, Karin Knapstein. Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 363-372

[16] Gulkowska, A, Leung, H W, Richardson, B J. The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters . Marine Pollution Bulletin, 2007, 54(8): 1287-1293.