

# 全自动固相萃取-高效液相色谱法测定水中6种头孢抗生素

李双双 何媛媛 王晨希

江苏省镇江环境监测中心

DOI:10.12238/eep.v5i5.1643

**[摘要]** 建立了可同时分析水中6种头孢化合物(头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢拉定、头孢他定、头孢噻肟)残留的高效液相色谱法。采用全自动固相萃取技术,对萃取条件进行优化,确定了最优前处理方案。结果表明:水样经HLB固相萃取小柱富集,用1.0%甲酸甲醇溶液洗脱,水中6种头孢类抗生素的回收率可达62.4%~93.1%。以10mmol/L乙酸铵水溶液和乙腈为流动相,梯度淋洗,在10min内可以完成水中6种抗生素的完全分离。在0.50~10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,线性关系良好,相关系数 $\geq 0.998$ 。方法检出限为0.21~0.60  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,测定下限为0.82~2.40  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。方法自动化程度高,可用于同时测定水中6种头孢抗生素痕量残留。

**[关键词]** 头孢化合物; 全自动固相萃取; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R978.1 **文献标识码:** A

## Determination of Six Cephalosporin Antibiotics in Water by Fully Automatic Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography

Shuangshuang Li Yuanyuan He Chenxi Wang

Zhenjiang Municipal Environmental Monitoring Center

**[Abstract]** The simultaneous determination of six cephalosporin compounds (cefadroxil, cefadroxime, cefoperazone, cefuroxime, Cefradine, ceftazidime and cefotaxime) in water was established by HPLC. The ASPE technology was used to optimize the extraction conditions and determine the optimal pretreatment scheme. The results showed that the water samples were enriched by HLB and eluted with methanol solution containing 1.0% formic acid. The recovery of six cephalosporins in the water could reach 62.4%~93.1%. Using 10mmol/l ammonium acetate aqueous solution and acetonitrile as mobile phase, gradient elution can complete the complete separation of six antibiotics in water within 10min. Within the concentration range of 0.50 to 10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the linear relationship is good, and the correlation coefficient is  $\geq 0.998$ . The detection limit of the method is 0.21~0.60  $\mu\text{g}/\text{l}$ , and the lower limit of determination is 0.82~2.40  $\mu\text{g}/\text{l}$ . The method has a high degree of automation and can be used for the simultaneous determination of trace residues of six cephalosporins in water.

**[Key words]** Cephalosporin antibiotics; ASPE; HPLC

头孢化合物从化学结构上,属7-氨基头孢烷酸衍生物,是 $\beta$ -内酰胺抗生素的一种<sup>[1]</sup>。自合成以来,被广泛应用于人畜疾病防治上,给人们的生产生活带来极大的便利<sup>[2]</sup>。但研究表明近70%左右的药物不能被生物体吸收,会随着消化系统排出体外成为生活、医疗或者养殖污水<sup>[3]</sup>。除此外,还有大量的药物或原料药,因过期变质、储存不规范和粗放的处理模式成为环境的直接污染源,造成严重的环境污染<sup>[4]</sup>。有研究表明,在制药废水、京杭运河以及太湖流域地表水体,甚至自来水中均有异常高值的头孢化合物被检出<sup>[5-6]</sup>。

经文献调研,环境水体中头孢化合物的分析方法主要是高

效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法两种<sup>[7-10]</sup>。由于水体基体复杂,且抗生素残留处于痕量水平,因此分析方法还需结合高效的前处理手段<sup>[11,12]</sup>。本研究采用全自动固相萃取技术(ASPE),结合高效液相色谱法(HPLC),建立了同时分析地表水中头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢乙腈、头孢氨苄、头孢拉定、头孢替安等6种头孢抗生素的ASPE-HPLC方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器、试剂与耗材

仪器: 1200LC高效液相色谱仪(安捷伦); 全自动固相萃取仪(GL Sciences); 万分之一分析天平(普利赛斯)。

试剂: 蒸馏水(屈臣氏); 乙腈, 甲醇, 甲酸均为色谱纯, 购置于德国默克; 6种头孢抗生素(头孢羟氨苄、头孢克肟、头孢乙腈、头孢氨苄、头孢拉定、头孢替安)均购置于墨质标准物质中心。

耗材: 0.22 μm聚四氟乙烯(PTFE)针式过滤器(CNW安谱科技); HLB固相萃取小柱(200mg/6mL, 迪马科技)。

### 1.2 试样制备

取1000mL水样进行全自动化的固相萃取: 依次用5mL水和5mL甲醇活化HLB小柱, 加载水样后, 以抽真空和氮吹的叠加模式干燥小柱, 最后用20mL 1.0%甲酸的甲醇溶液缓慢洗脱, 收集液于50℃下氮吹浓缩至净干状态, 加纯水定容至1.0mL, 经PTFE滤膜过滤后, 进HPLC分析。

### 1.3 分析方法

色谱柱: Pickering C8(5.0 μm, 4.6×250mm); 柱温32℃; 进样量: 5.0mL; 检测器: DAD; 波长: 254nm; 流动相: A-10mmol/L乙酸铵水溶液, B-乙腈; 流速: 1.0mL/min; 梯度洗脱程序: 0~3min, A: 93%; 3~4min, A: 93%~88%; 4~11min, A: 88%; 11~12min, A: 88%~32%; 12~14min, A: 32%; 14~15min, A: 32%~93%。在此分析条件下, 6种头孢化合物在10min内出峰完全, 见图1。

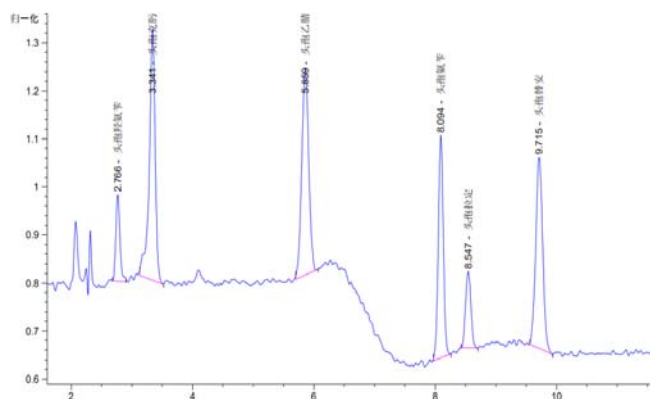


图1 6种头孢化合物的HPLC色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 固相萃取条件选择

本研究采用ASPE对水中6种头孢化合物进行前处理, 对影响萃取效率关键的固相萃取柱填料和洗脱试剂进行了优化。

填料: 实验选择了常用的C18(十八烷基型填料)和HLB(亲水亲脂平衡反相吸附剂填料)两种固相萃取柱, 比较了其在水中6种头孢化合物的萃取效率。结果表明, HLB柱的回收率(62.4%~93.1%)明显高于C18柱(8%~35%)。

洗脱试剂: 实验选择含甲酸的甲醇溶液为洗脱试剂, 并对甲酸的含量进行了优化(0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%)。实验结果表明, 用1.0%甲酸甲醇溶液洗脱时, 6种头孢化合物的回收率可以达到最高。

综上, 以1000 mL蒸馏水为空白样品, 添加1.0 μg/mL混标溶液。选择HLB固相萃取小柱, 以1.0%甲酸甲醇为洗脱试剂, 进行ASPE, 回收率除头孢羟氨苄(62.4%)外, 均≥85.0%, 其中头孢克

肟为88.5%, 头孢乙腈为92.1%, 头孢氨苄为78.8%, 头孢拉定为93.1%, 头孢替安为85.0%。分析原因: 头孢化合物结构含羧酸和酰胺的结构, 分子极性较大且结构较大, HLB填料要更利于化合物的洗脱。而头孢羟氨苄因为结构中还含有羟基, 易与水溶液形成氢键, 在HLB吸附时易造成损失, 所以洗脱后回收率相比其他5种头孢化合物偏低。

### 2.2 标准曲线、检出限和定量限

标准曲线: 分别精确称取10.0mg(±0.1mg)6种头孢抗生素(头孢羟氨苄、头孢克肟、头孢乙腈、头孢氨苄、头孢拉定、头孢替安)标准品于10mL棕色容量瓶中, 用N,N-二甲基甲酰胺稀释并定容成1000 μg/L的混标储备液, 于-4℃保存, 临用时用纯水稀释成浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/mL的标准工作溶液。按1.4方法分析, 以化合物浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明在0.5~10.0 μg/mL的范围内6种头孢化合物的线性关系良好, 相关系数均≥0.995, 具体详见下表1。

检出限和定量限: 以3倍信噪比浓度(0.05~0.08 μg/mL)做为仪器检出限(EDL)。采用标准加入法, 以1000 mL蒸馏水为空白样品, 添加3~5倍EDL浓度的混标溶液(0.20 μg/mL), 制备试样并分析, 平行实验7次, 得到的测定结果根据公式 $MDL=3.143 \times s$ ,  $LDL=4 \times MDL$ , 得到6种头孢化合物的MDL为0.21~0.60 μg/L, LDL为0.82~2.40 μg/L, 详细结果见下表1。

表1 6种头孢化合物的标准曲线、相关系数、方法检出限和测定下限

序号	化合物	校准曲线	相关系数 r	方法检出限 (ng/L)	测定下限 (ng/L)
1	头孢羟氨苄	$y=0.9439x-0.1293$	0.9983	60	240
2	头孢克肟	$y=3.7721x-0.1159$	0.9999	21	82
3	头孢乙腈	$y=3.6316x-0.1284$	0.9999	25	100
4	头孢氨苄	$y=2.5608x+0.0429$	0.9999	22	88
5	头孢拉定	$y=1.0318x-0.0492$	0.9996	45	180
6	头孢替安	$y=3.1674x+0.0344$	0.9999	33	132

### 2.3 结论

本研究建立了同时水中6种头孢化合物的高效液相色谱法, 可以在10分钟内实现6种化合物的完全分离, 且峰型和线性良好。在水样的前处理上, 采用了全自动化固相萃取技术对1000mL水样进行富集, 并通过对水样的加标分析来进一步优化固相萃取方法, 使得该方法能够适用于自动化分析环境水样中的多种头孢抗生素, 方法检出限: 21~60ng/L, 回收率: 62.4%~93.1%。方法自动化程度高, 检测快速, 能满足环境水样头孢化合物痕量残留的检测要求。

### [基金项目]

太湖流域镇江水系18种头孢抗生素污染现状调查及监测方法研究(2102); 江苏省镇江环境监测中心独立承担项目。

### [参考文献]

[1]程恒友.上海市污水处理厂中头孢类抗生素的迁移转化规律[D].上海:上海应用技术大学,2020.

[2]潘葳,罗钦,刘文静.水产品与水产饲料中药物残留问题的分析及对策[J].福建农业学报,2011,26(6):1096-1100.

[3]杨宇轩,冯启言,王秋旭.我国地表水体中抗生素污染的研究进展[J].环境与健康杂志,2019,36(3):261-264.

[4]Gułkowska A, Leung H W, So M K, et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research, 2008,42(1):395-398.

[5]Li J S, Qiu Y M, Wang C. Veterinary drug residue analysis. Science and Technology Press, 2002:301-305.

[6]刘昔,王智,王学雷.我国典型区域地表水环境中抗生素污染现状及其生态风险评价[J].环境科学,2019,40(5):2094-2099.

[7]冯丽雄,彭莺,吴伟东,等.SPE-UPLC测定制药企业污水中7种头孢抗生素[J].山东化工,2020,50(20):100-102.

[8]陶辉,李文君,陈卫,等.SPE-HPLC法测定水中4种头孢类抗生素[J].中国给水排水.2014,30(10):96-99.

[9]莫楠,张立佳,吕志勇,等.PRIMEHLB固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定乳制品中头孢菌素类药物残留[J].乳业科学与技术,2018,41(4):29-32.

[10]章豪,吴银良,张宜文,等.PRIMEHLB固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂产品中10种头孢类药物的残留量[J].食品科学,2020,41(2):330-336.

[11]柴蕊.水体中头孢类抗生素降解及吸附效果的研究[J].辽宁:辽宁工业技术大学,2019.

[12]顾蓓乔,梅光明,张小军,等.多壁碳纳米管净化-超高效液相色谱-质谱法测定水产品中头孢菌素残留量[J].分析化学研究报告,2017,45(3):381-388.

#### 作者简介:

李双双(1985--),女,汉族,江苏扬州人,硕士研究生,研究方向:环境中痕量有机化合物的监测分析。