

# 3 种水中头孢曲松钠检测方法的对比

崔延瑞, 张璐璐, 程瑶, 吴青, 孙剑辉

(河南师范大学 环境学院; 黄淮水环境与污染防治教育部重点实验室; 河南省环境污染控制重点实验室, 河南 新乡 453007)

**摘 要:**分别对褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法 3 种头孢曲松钠的检测方法进行了实验对比, 实验得到 3 种方法的检出限分别是 0.13、0.028 和 0.004 7 mg · L<sup>-1</sup>, 回收率分别达到 78%~81%、92%~96% 和 99%~101%。实验对高效液相色谱法色谱条件进行了优化, 采用 Waters XBridge C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 柱温 30 °C, 流动相为甲醇和 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 三乙胺水溶液(体积比为 27 : 73), 检测波长 254 nm。实验结果表明, 精度要求较高的情况下可以选用高效液相色谱法, 在检出限不低于 0.03 mg · L<sup>-1</sup> 的情况下, 紫外分光光度法由于所需仪器价格低廉, 不失为一种便捷的方法, 尤其在厂矿企业具有巨大的应用价值。

**关键词:**头孢曲松钠; 检测方法; 检出限; 回收率; 色谱条件

**中图分类号:**X502

**文献标志码:**A

近年来, 我国已成为抗生素生产和使用大国之一, 抗生素在环境中残留的问题日渐突出, 在污水处理厂、地表水和地下水都发现有抗生素的存在<sup>[1-4]</sup>。抗生素的滥用容易导致细菌的耐药性, 其废水随意排放容易对水生及陆生生物构成风险, 甚至可能威胁到人类的健康, 对环境造成巨大破坏<sup>[5-7]</sup>。有关抗生素在水体中污染状况的检测及其处理方法已经受到人们的广泛关注。头孢曲松钠(ceftriaxone sodium)是第三代半合成头孢菌素类抗生素, 该药对绝大多数革兰氏阳性菌、阴性菌有较强的抗菌活性, 属于广谱抗生素<sup>[8]</sup>, 也是半衰期最长的头孢菌素之一, 在抗生素市场中占有较大份额<sup>[9]</sup>。控制头孢曲松钠对环境的污染会很大程度地解决抗生素污染问题。目标物质的检测是开展科学研究的关键, 但是目前关于水体中头孢曲松钠的检测方法没有统一标准。报道的方法有高效液相色谱法<sup>[10-11]</sup>、褪色分光光度法<sup>[12]</sup>、紫外分光光度法<sup>[13]</sup>、高效毛细管电泳法<sup>[14]</sup>、荧光法等<sup>[15]</sup>。其中褪色分光光度法、紫外分光光度法试剂简单、操作简便, 高效液相色谱法是药典规定的检测方法, 准确度高, 毛细管电泳法和荧光法使用较少。不同检测方法原理不同, 使用仪器也不同, 因此, 不同方法具有不同的特点和精度, 需要的仪器价格和操作难易程度区别巨大。针对不同的检测需要选取合适的方法, 不仅能够节约检测经费和设备费用, 还能够缩短检测时间, 提高研究效率。本文对高效液相色谱法、褪色分光光度法和紫外分光光度法进行对比分析, 为深入开展头孢曲松钠研究提供检测方法的支持, 并进一步为开展头孢类抗生素研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

头孢曲松钠标准品购自珠海联邦制药股份有限公司, 甲醇、磷酸和三乙胺为色谱纯, 购自美国 TEDIA 公司。高锰酸钾、浓硫酸均为分析纯, 实验用水为高纯水。实验前, 配制头孢曲松钠标准品储备液(1 000 mg · L<sup>-1</sup>)贮存于洁净棕色试剂瓶内, 置于冰箱中冷藏。所有样品在测定前均使用已洗净的 0.45 μm 水系滤膜进行过滤, 采用 Origin 9.0 软件进行数据处理分析。

收稿日期:2017-06-07; 修回日期:2017-10-31.

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(17A610009); 河南省科技厅重点科技攻关项目(172102310698); 新乡市科技攻关计划项目(CXGG16008).

作者简介(通信作者):崔延瑞(1972-), 男, 河南新乡人, 河南师范大学教授, 主要从事水污染控制和环境污染物分析的教学与科研工作, E-mail: yanruicui@yeah.net.

752 紫外可见分光光度计:上海菁华科技仪器有限公司.

高效液相色谱仪:美国 Waters 公司,紫外检测器.色谱柱为 Waters XBridge C18 Column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm).

## 1.2 实验方法

实验水样:采用高纯水稀释头孢曲松钠标准品,获得不同质量浓度的实验水样.

褪色分光光度法:以高锰酸钾为氧化剂,在酸性条件下,高锰酸钾与头孢曲松钠发生氧化还原反应<sup>[16]</sup>.反应后高锰酸钾浓度降低,颜色变浅,在 525 nm 处的吸光度降低.高锰酸钾吸光度的降低值  $\Delta A_{525}$  与头孢曲松钠的质量浓度  $\rho$  在一定范围内成正比.

紫外分光光度法:在 190~700 nm 波长范围内对头孢曲松钠溶液体系进行扫描,得到体系吸收光谱谱图,头孢曲松钠为无色溶液,在可见光区无吸收,在 254 nm 处有较强吸收峰,实验选择 254 nm 为检测波长.在 254 nm 处头孢曲松钠的质量浓度  $\rho$  与其吸光度  $A_{254}$  在一定范围内线性相关.

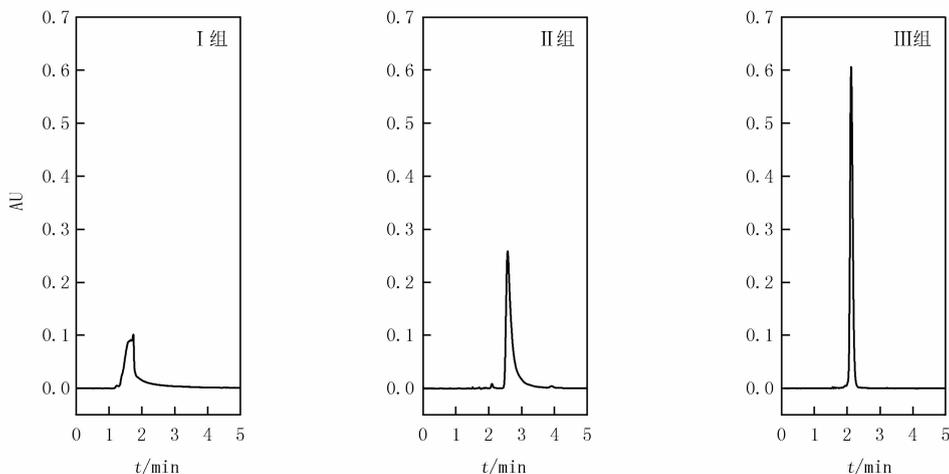
高效液相色谱法:将头孢曲松钠加入流动相混合溶解,采用高压输液系统,将其泵入装有固定相的色谱柱进行色谱分离,用紫外吸收检测器,于波长 254 nm 处检测头孢曲松钠,色谱图出峰的峰面积 Area(A) 与质量浓度  $\rho$  在一定范围内线性相关,可计算出其含量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 高效液相色谱条件优化

色谱条件主要是对流动相的调整和温度的控制<sup>[17]</sup>.研究表明,采用反相色谱法分离并检测弱酸 ( $3 \leq \text{pKa} \leq 7$ ) 或弱碱 ( $7 \leq \text{pKa} \leq 8$ ) 样品时,常用反相离子抑制技术,即为了抑制样品组分的解离,增加组分在固定相上的保留,可以调节流动相的 pH 值,分析弱酸样品时加入少量弱酸,分析弱碱样品时加入少量弱碱,然后使峰形得到改善的技术<sup>[18-19]</sup>.本研究设置了 3 种流动相的组合,用以改善峰形和提高头孢曲松钠的信号响应强度,3 组流动相分别为: I 组,甲醇和 0.1% 磷酸(体积分数)水溶液; II 组,甲醇和高纯水; III 组,甲醇和 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 三乙胺水溶液.参考 2010 版药典测定方法,3 组流动相的体积比均为 27 : 73.3 组不同的流动相对高效液相色谱法检测质量浓度为 50 mg · L<sup>-1</sup> 头孢曲松钠水样的峰形和峰面积影响如图 1 所示.

通过实验可知,在 I 组条件下,头孢曲松钠出峰效果并不好,峰形不规则,分离度不好,峰高很低;在 II 组条件下,可以看到明显的物质峰,峰高有所增加,但是有严重拖尾现象,需要改善峰形;在 III 组条件下,峰形得到很好的改善,可以看到对称的窄峰,而且峰高大大增加,物质信号响应



I 组: 甲醇和 0.1% 磷酸水溶液; II 组: 甲醇和高纯水; III 组: 甲醇和 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 三乙胺水溶液.

图 1 3 组不同流动相条件下 50 mg · L<sup>-1</sup> 头孢曲松钠水样色谱图比较

强度明显增强.与文献<sup>[19]</sup>所述情况一致.由此可以确定,头孢曲松钠的检测用流动相为甲醇和 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 三乙胺水溶液.

有文献指出温度对高效液相色谱分析也有很大的影响,通过控制色谱柱的柱温可以增加分离度<sup>[20]</sup>、缩短分析时间、改善峰形<sup>[21]</sup>、提高柱效等<sup>[22]</sup>.本次研究设置了 25、30、35 和 40 °C 4 个温度分别检测 10、50 和

100 mg · L<sup>-1</sup>的头孢曲松水样,比较4个温度下的检测效果,选择最佳柱温.不同温度条件下,高效液相色谱法检测头孢曲松钠的峰面积如图2所示.从图中可以看出,检测头孢曲松钠在3个不同浓度条件下,温度的影响是相似的.30℃时的峰面积达到最大,表明30℃时柱效最高,由此确定,头孢曲松钠的最佳检测柱温为30℃.

## 2.2 3种检测方法的线性及检出限比较

采用褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法对相同样品进行了分析实验,检测结果的线性回归图如图3所示.

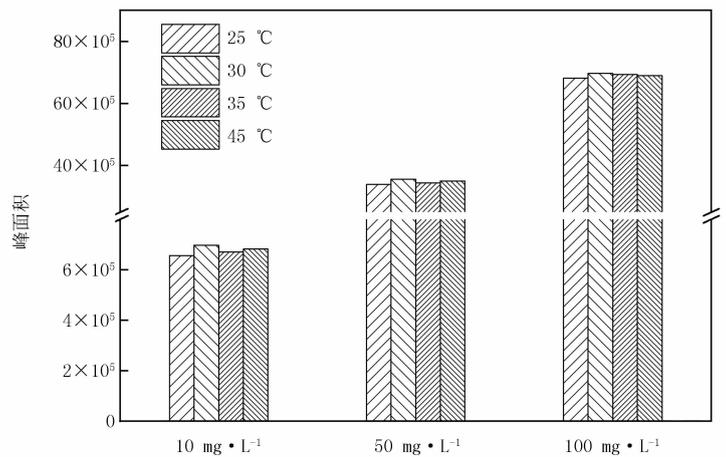
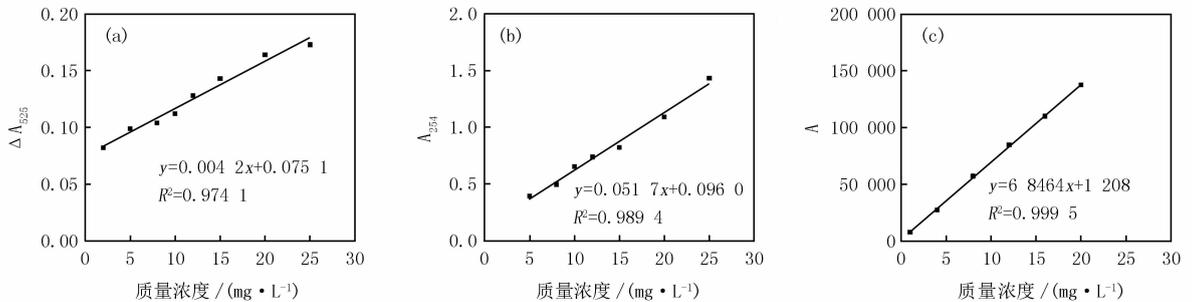


图2 不同温度条件下10、50和100 mg · L<sup>-1</sup>头孢曲松钠的色谱峰面积比较



a. 褪色分光光度法; b. 紫外分光光度法; c. 高效液相色谱法.

图3 3种检测方法的线性回归曲线

在一定范围内,头孢曲松钠的质量浓度与吸光度或峰面积呈线性关系.根据《全球环境监测系统水检测操作指南》规定的检出限计算方法如公式(1),在给定置信水平为95%时,样品测定值与零浓度样品的测定值有显著性差异即为检出限<sup>[23]</sup>.

$$D.L = 4.6\sigma_{wb}, \quad (1)$$

式中:D.L——检出限;

$\sigma_{wb}$ ——空白平行测定(批内)标准偏差(重复测定20次以上).

褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法3种方法的线性回归方程及检出限的测定结果如表1.根据表1可知3种检测方法都有良好的线性关系,相关系数均可达到0.97以上,但是,相关系数还是有区别的,顺序为高效液相色谱法>紫外分光光度法>褪色分光光度法.3种方法检出限水平区别较大,褪色分光光度法检出限达到10<sup>-1</sup> mg · L<sup>-1</sup>,紫外分光光度法达到10<sup>-2</sup> mg · L<sup>-1</sup>,高效液相色谱法达到10<sup>-3</sup> mg · L<sup>-1</sup>.通过以上研究可知,高效液相色谱法最优,紫外分光光度法次之,褪色分光光度法较差.以上实验获得的检测限为高纯水配制样品,可以为环境水体样品测定提供参考.

表1 褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法线性及检出限比较

检测方法	线性回归方程	相关系数	检出限/(mg · L <sup>-1</sup> )
褪色分光光度法	$\Delta A_{525} = 0.004 2\rho + 0.075 1$	0.974 1	0.13
紫外分光光度法	$A_{254} = 0.051 7\rho + 0.096 0$	0.989 4	0.028
高效液相色谱法	$A = 68 464\rho + 1 208$	0.999 5	0.004 7

### 2.3 3种检测方法的加标回收率分析

采用高纯水加标进行加标回收率实验,加标量分别为 5、10 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,每个浓度每种方法分别平行测定 3 次,测得的平均回收率以及相对标准偏差(RSD)如表 2 所示.由表 2 结果可得,褪色分光光度法对头孢曲松钠的回收率较低,达到 78%~81%,紫外分光光度法回收率可以达到 92%~96%,高效液相色谱法回收率达到 99%~101%.高效液相色谱法回收率符合 2015 版中国药典规定的回收率限值.从回收率的角度比较 3 种方法可知,高效液相色谱法最优,紫外分光光度法次之,褪色分光光度法较差.

表 2 褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法加标回收率比较

检测方法	加标量/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%			平均回收率/%	RSD/%( $n=3$ )
		第 1 次	第 2 次	第 3 次		
褪色分光光度法	5	77.35	79.14	79.86	78.78	1.34
	10	80.6	78.04	81.76	80.13	1.94
	50	78.56	81.37	80.97	80.30	1.55
紫外分光光度法	5	91.3	94.65	91.11	92.35	1.76
	10	93.23	97.46	94.75	95.15	1.84
	50	97.27	96.24	94.33	95.95	1.27
高效液相色谱法	5	99.84	98.71	100.37	99.64	0.69
	10	100.56	99.59	98.49	99.55	0.85
	50	99.61	100.3	101.05	100.32	0.59

### 2.4 3种检测方法的对比分析

褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法检测水中头孢曲松钠工作原理不同,使用仪器不同,因此,各具特点,在应用中根据需要,选取合适的检测方法,不仅能够节约检测经费和设备费用,还能够缩短检测时间,提高研究效率.表 3 对比了以上 3 种检测方法的特点,在精度要求较高的情况下应该选用高效液相色谱法,但是仪器费用较高,不是所有场合都适用.在检出限不低于  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的情况下,紫外分光光度法不失为是一种便捷的方法,由于仪器费用低廉,尤其在厂矿企业具有巨大的应用价值.

表 3 褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法对比分析

检测方法	检测仪器	检出限/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%	优点	缺点
褪色分光光度法	可见分光光度计	0.13	78~81	试剂简单、操作简便、仪器价格低廉	试剂自身光照易分解引起误差;试剂强氧化性,氧化其他杂质引起误差
紫外分光光度法	紫外分光光度计	0.028	92~96	无需外加试剂、操作简便、重现性好、仪器价格低廉	在同样波长处有紫外吸收的杂质可能引起误差
高效液相色谱法	高效液相色谱仪	0.004 7	99~101	分离效果好、检出限低、重现性高、不易受杂质影响	试剂与仪器价格昂贵;所用试剂有一定毒性;寻找色谱条件费时费力

## 3 结 论

(1)高效液相测定头孢曲松钠色谱条件为:流动相为甲醇和  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  三乙胺水溶液(体积比为 27:73);柱温  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;进样量  $20 \mu\text{L}$ ;紫外检测器,254 nm 波长处检测吸收峰.

(2)褪色分光光度法、紫外分光光度法和高效液相色谱法对高纯水配制头孢曲松钠样品的检出限分别是 0.13、0.028 和  $0.004 7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,回收率分别达到 78%~81%、92%~96%和 99%~101%.

(3)精度要求较高的情况下可以选用高效液相色谱法,在检出限不低于  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的情况下,紫外分光光度法也是一种便捷的方法,在厂矿企业具有巨大的应用前景.

## 参 考 文 献

[1] 汤薪瑶,左剑恶,余忻,等.制药废水中头孢类抗生素残留检测方法与环境风险评估[J].中国环境科学,2014,34(9):2273-2278.

- [2] 冯晶晶,王小万,靖瑞锋.控制抗生素滥用的国际经验及启示[J].中国抗生素杂志,2014,39(1):14-18.
- [3] Yin R,Guo W,Zhou X,et al.Enhanced sulfamethoxazole ozonation by noble metal-free catalysis based on magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles: catalytic performance and degradation mechanism[J].RSC Advances,2016,6(23):19265-19270.
- [4] Homem V,Santos L.Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices-A review[J].Journal of Environmental Management,2011,92(10):2304-2347.
- [5] Hu Y,Zhu Y,Lu N.Primary antibiotic resistance of helicobacter pylori in China[J].Digestive Diseases and Sciences,2017,62(5):1146-1154.
- [6] Wang P,Zhang D,Zhang H,et al.Impact of concentration and species of sulfamethoxazole and ofloxacin on their adsorption kinetics on sediments [J].Chemosphere,2017,175:123-129.
- [7] 欧丹云,陈彬,陈灿祥,等.九龙江下游河口水域抗生素及抗性细菌的分布[J].中国环境科学,2013,33(12):2243-2250.
- [8] 张春桃,王静康,王永莉.头孢曲松钠结晶工艺研究进展[J].中国抗生素杂志,2006,31(7):388-391.
- [9] 陈谦.谈谈头孢曲松钠的不良反应[J].中国医药指南,2012,8(24):114-115.
- [10] Yu X,Tang X,Zuo J,et al.Distribution and persistence of cephalosporins in cephalosporin producing wastewater using SPE and UPLC-MS/MS method[J].Science of The Total Environment,2016,569/570:23-30.
- [11] 王朋华,谭佑铭,吕妍,等.水中头孢类抗生素的测定方法[J].环境化学,2008,27(3):380-381.
- [12] 吕庆余,余惠媛,姜靖亚.Ceftazidime 等四种头孢菌素的钡配合物及其在分析测定中的应用[J].中国抗生素杂志,1989,14(2):98-100.
- [13] 尹玉琴,杨柳萌,徐贵丽,等.围术期患者血液及胆汁中头孢曲松钠浓度的测定[J].中国药房,2002,13(7):417-418.
- [14] 涂林,胡昌勤.毛细管电泳法测定头孢曲松钠有关物质及含量[J].药物分析杂志,2005,25(3):303-307.
- [15] 郝巧艳,张远敏,王金中.抑制动力学荧光法测定头孢曲松钠[J].化学研究,2008,19(1):73-76.
- [16] 朱琪,孙双姣,李明娟.褪色分光光度法测定剂中头孢曲松钠[J].微量元素与健康研究,2015,32(4):58-59.
- [17] 汤薪瑶.制药废水处理厂中头孢类抗生素残留与去除工艺研究[D].北京:清华大学,2014.
- [18] Ming X,Han S,Qi Z,et al.Chromatographic retention prediction and octanol-water partition coefficient determination of monobasic weak acidic compounds in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography using acids as ion-suppressors[J].Talanta,2009,79(3):752-761.
- [19] 全红娜,金松子,雷勇胜,等.反相高效液相色谱中流动相选择与优化的研究进展[J].现代药物与临床,2014,29(10):1190-1194.
- [20] Tchaplá A,Heron S,Colin H,et al.Role of temperature in the behavior of a homologous series in reversed phase liquid chromatography [J].Analytical Chemistry,1988,60(14):1443-1448.
- [21] 成洪达,李彤,张维冰.温度对高效液相色谱分离性能的影响[J].现代科学仪器,2006,16(5):74-78.
- [22] Yang Y.A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography[J].Analytica Chimica Acta,2006,558(1):7-10.
- [23] 中国环境监测总站.环境水质监测质量保证手册[M].2版.北京:北京化学工业出版社,1994:228-229.

## Comparison of three analysis methods for ceftriaxone sodium in water

Cui Yanrui, Zhang Lulu, Cheng Yao, Wu Qing, Sun Jianhui

(School of Environment; Key Laboratory for Yellow River and Huai River Water Environment and Pollution Control, Ministry of Education; Henan Key Laboratory of Environmental Pollution Control, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Three detection methods of ceftriaxone sodium in water, including the fading spectrophotometry, the ultraviolet spectrophotometry, and the high performance liquid chromatography were developed. The detection limits and the recoveries of the three methods were  $0.13$ ,  $0.028$  and  $0.0047 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $78\% - 81\%$ ,  $92\% - 96\%$  and  $99\% - 101\%$ , respectively. The chromatographic conditions were optimized as follows. Mobile phase: methanol and  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  triethylamine (the volume ratio is  $27 : 73$ ); column: Waters XBridge C18 ( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); column temperature:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detection wavelength:  $254 \text{ nm}$ . By comparison, the method of high performance liquid chromatography has higher accuracy requirements with the detection limit of not less than  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  case; the method of UV spectrophotometry is easy to apply because of the simple equipment required, especially in water from the factories and mines enterprises.

**Keywords:** ceftriaxone sodium; detection method; detection limit; recovery rate; chromatographic conditions