

利用反相阳离子交换混合模式色谱法同时检测 10种 β -内酰胺类抗生素

刘名扬^{1,2,3*}, 郭 祯¹, 赵景红², 朱程云¹, 刘 月¹

(1. 大连交通大学环境与化学工程学院, 大连 116028; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;
3. 中国科学院大连化学物理研究所, 分离分析化学重点实验室, 大连 116023)

摘 要: **目的** 建立反相/弱阳离子交换混合模式色谱(C_{18}/WCX)对10种 β -内酰胺类抗生素(头孢羟氨苄、头孢替唑钠、头孢唑肟钠、头孢唑啉、头孢拉定、头孢西酮、头孢孟多酯钠、头孢噻吩、哌拉西林、氯唑西林钠)同时检测的方法。**方法** 以 C_{18}/WCX 为固定相, 以乙腈:甲酸铵:水为流动相, 流速为1 mL/min; 温度为30℃; 检测波长为254 nm, 并以常规反相色谱分析柱Unitary C_{18} 为对照。**结果** 结果表明, 中性条件下优化流动相洗脱梯度, 10种 β -内酰胺类抗生素在 C_{18}/WCX 具有较高的分离选择性。通过缓冲盐浓度和pH值的调控, 发现 C_{18}/WCX 与样品间分离机制由反相作用力与离子交换2种作用力共同作用。**结论** 研究表明, 混合模式色谱在 β -内酰胺类抗生素的分离分析中具有较大的潜力。

关键词: 混合模式色谱法; 反相/弱阳离子交换混合模式; β -内酰胺类抗生素

Simultaneous determination of 10 kinds of β -lactam antibiotics by reverse-phase exchange mixed-mode chromatography

LIU Ming-Yang^{1,2,3*}, GUO Zhen¹, ZHAO Jing-Hong², ZHU Cheng-Yun¹, LIU Yue¹

(1. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 10 kinds of β -lactam antibiotics (cefadroxil, ceftazidime sodium, cefuroxime sodium, cefazolin, cephadrine, cefazidone, cefamandil sodium, cephalothin, piperacillin and cloxacillin sodium) by reversed-phase liquid chromatography/weak cation exchange (RPLC/ WCX , C_{18}/WCX). **Methods** Chromatographic separation was achieved on a C_{18}/WCX , using a mixture of acetonitrile, ammonium formate and water as mobile phase with a flow rate at 1 mL/min and 30℃, and the detector was set at 254 nm. **Results** Compared with the conventional reversed-phase chromatography Unitary C_{18} , the selectivity of C_{18}/WCX could be improved. It was found that the mechanism of samples separated on C_{18}/WCX were hydrophobic interaction and ion exchange interaction by regulated by the salt concentration and pH value. **Conclusion** It showed that the mixed-mode chromatography would be a potential approach for the analysis and separation of β -lactam antibiotics.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21177040)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21177040)

*通讯作者: 刘名扬, 研究员, 教授, 主要研究方向为化学仪器分析。E-mail: liumy@mail.tsinghua.edu.cn

*Corresponding author: LIU Ming-Yang, Researcher, Professor, College of Environment and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China. E-mail: liumy@mail.tsinghua.edu.cn

KEY WORDS: mixed-mode chromatography; reversed-phase liquid chromatography/ weak cation exchange; β -lactam antibiotics

1 引言

青霉素类抗生素和头孢菌素类抗生素是 2 种具有较强杀菌特性、也是临床上最常用的典型的 β -内酰胺类抗生素。由图 1 结构式可见, 两者是一类带有羧基和疏水性基团的化合物^[1-4]。目前对抗生素的分离主要在同类物质间进行。常规的反相色谱分析柱对于此类化合物的选择主要依赖固定相与溶质间的疏水性差异而进行分离^[5-8], 但由于同类物质具有结构相似的特性, 导致此类化合物在固定相上的分离选择性不足^[9,10]。同时也暴露出常规反相固定相对于酸性基团的选择性的缺失。

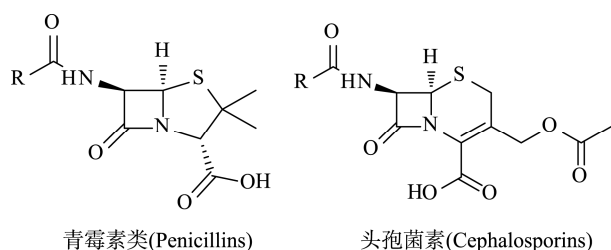


图 1 青霉素类与头孢菌素类结构式

Fig. 1 Structure of penicillins and cephalosporins

反相/弱阳离子交换(C_{18} /WCX)功能的混合模式色谱填料, 是一类表面同时键合正十八烷基疏水链

和 3-羧丙基两种基团的混合模式色谱材料, 结构式如图 2 所示, 分别提供了疏水作用力与静电作用力。结合 β -内酰胺类抗生素结构特性, 固定相材料上的烷基疏水链与样品上的疏水杂环基团间可能存在疏水作用力, 同时固定相材料上的羧基基团与样品上的羧基基团间也可能存在静电排斥作用力。此类化合物可以依靠疏水作用和静电作用, 来增强其在固定相的分离选择性。

本文以 C_{18} /WCX 为色谱分析固定相, 选取 10 种常见的 β -内酰胺类抗生素(8 种头孢菌素类和 2 种青霉素类), 结构式如图 3 所示。研究其在 C_{18} /WCX 上的保留行为, 并与常规反相色谱分析柱 Unitary C_{18} 进行对比。

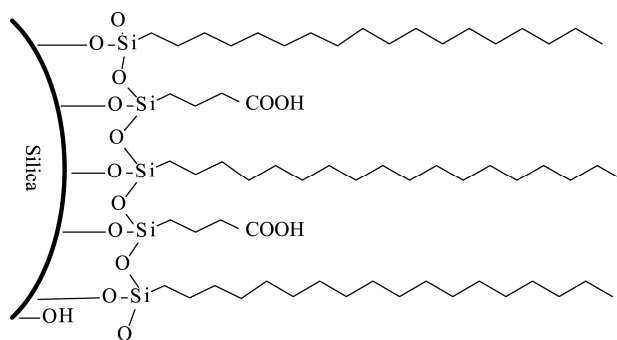
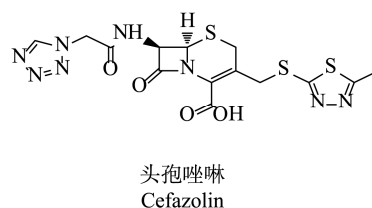
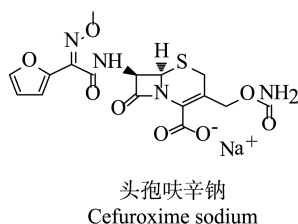
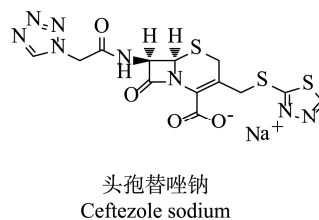
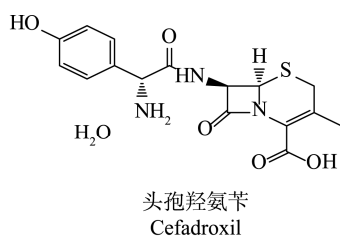


图 2 C_{18} /WCX 混合模式固定相色谱柱

Fig. 2 C_{18} /WCX mixed-mode stationary phase



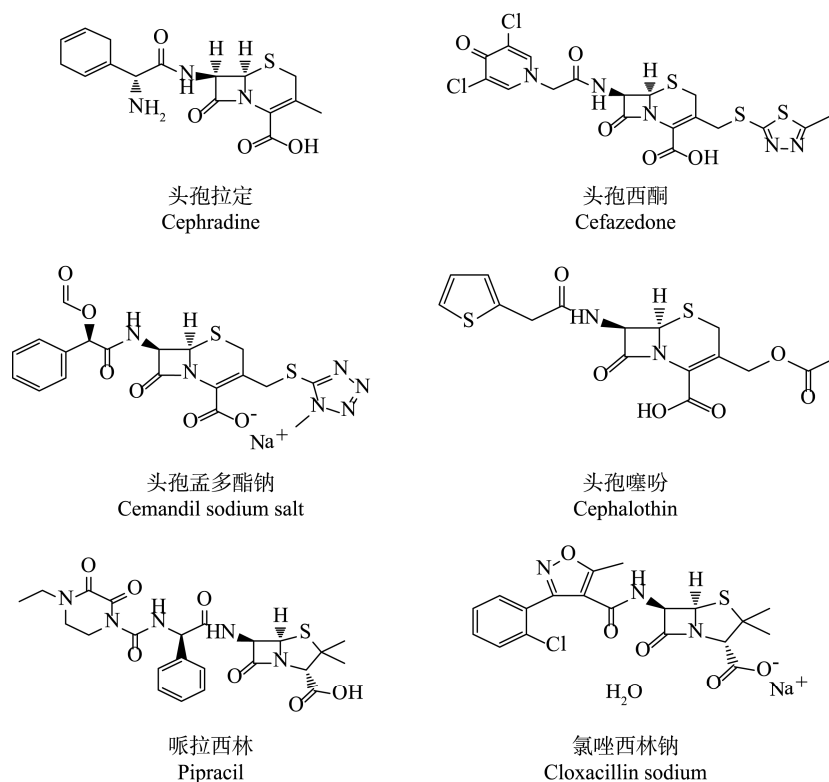
图 3 10 种 β -内酰胺类抗生素的结构式

Fig. 3 The structure of ten kinds of beta lactam antibiotics

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

甲酸铵(NH_4FA , 99%)、甲酸(98%)、醋酸铵(98%)、乙腈(ACN, 99.9%, HPLC/PREP 级)均购自北京百灵威科技有限公司。头孢羟氨苄(CAS 66592-87-8)、头孢替唑钠(CAS 26973-24-0)、头孢呋辛钠(CAS 56238-63-2)、头孢唑啉(CAS 25953-19-9)、头孢拉定(CAS 58456-86-3)、头孢西酮(CAS 56187-47-4)、头孢孟多酯钠(CAS 42540-40-9)、头孢噻吩(CAS 58-71-9)、哌拉西林(CAS 66258-76-2)、氯唑西林钠(CAS 7081-44-9), 以上工作对照品均为本实验室所收集, 纯度均大于 90%。

2.2 仪器与设备

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪, 配有 Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); DHG-9140A 型电热

鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); AB135S 微量电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 β -内酰胺类抗生素混合溶液的配制

准确称取头孢羟氨苄 3.3 mg、头孢替唑钠 3.5 mg、头孢呋辛钠 3.4 mg、头孢唑啉 3.5 mg、头孢拉定 2.1 mg、头孢西酮 3.5 mg、头孢孟多酯钠 3.0 mg、头孢噻吩 5.6 mg、哌拉西林 9.8 mg、氯唑西林钠 8.1 mg, 分别加入 1 mL 样品溶剂(甲酸铵 100 mmol/L, pH 6.5 与甲醇溶液, 按体积比 4:1 进行混合, 摇匀后静置备用), 进行溶解。将 10 种样品溶液分别用 0.22 μm 的有机滤膜过滤后, 用封口膜进行密封处理后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内储藏、备用。

分别取上述溶液头孢羟氨苄 60 μL 、头孢替唑钠 40 μL 、头孢呋辛钠 40 μL 、头孢唑啉 40 μL 、头孢拉定 110 μL 、头孢西酮 35 μL 、头孢孟多酯钠 85 μL 、头孢噻吩 50 μL 、哌拉西林 40 μL 、氯唑西林钠 200 μL , 再加入 0.6 mL 的样品溶剂于聚丙烯塑料小管内, 摇

匀后静置备用。

2.3.2 色谱分离条件选择

色谱柱分别采用 $C_{18}/WCX(150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m})$ 和 Unitary $C_{18}(150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m})$; 流动相为乙腈、100 mmol/L pH 6.5 甲酸铵和水; 流速为 1 mL/min; 温度为 30 °C; 检测波长为 254 nm。

以 C_{18}/WCX 为固定相时, 缓冲盐甲酸铵浓度为 5 mmol/L, 乙腈的梯度为 0~15 min, 5%~15%乙腈; 15~20 min, 15%~60% 乙腈; 以 Unitary C_{18} 为固定相时, 缓冲盐甲酸铵浓度为 5 mmol/L, 乙腈的梯度为 0~5 min, 5%~15% 乙腈; 5~10 min, 15%乙腈; 10~20 min, 15%~40%乙腈。

3 结果与讨论

C_{18}/WCX 是一种表面分别键合了疏水基团和弱阳离子交换基团的混合模式色谱材料, 以此材料为固定相, 建立一种简单、高效的 β -内酰胺类抗生素液相色谱分离方法, 考察 10 种常见的 β -内酰胺类抗生素在 C_{18}/WCX 固定相上的分离选择。在流动相中适当的添加缓冲盐可以增强电荷性质等因素, 再结合固定相的分离优势以及样品本身的特性等, 选取乙腈、甲酸铵缓冲溶液、水三相为流动相组成。

3.1 中性条件下 β -内酰胺类抗生素在 C_{18}/WCX 和 Unitary C_{18} 上分离效果

首先在乙腈:甲酸铵(5 mmol/L, pH 6.5)水条件下, 对样品在 C_{18}/WCX 上的保留进行优化, 即对乙腈的梯度进行优化。在如表 1 的流动相梯度条件下, 10 种 β -内酰胺类抗生素可以较好分离, 且各样品峰的峰形良好, 色谱图如图 4(b)所示。

以 Unitary C_{18} 为固定相时, 以表 1 为流动相梯度变化条件, 样品分离不太理想; 对流动相梯度进行适度优化, 在表 2 所示流动相条件下, 表现出的分离选择性一般, 分离选择效果如图 4(a)所示。

经过梯度优化后, 10 种 β -内酰胺类抗生素样品在 C_{18}/WCX 与 Unitary C_{18} 2 种固定相上均能够实现较好分离, 与在 Unitary C_{18} 固定相比较, 头孢替唑钠、头孢呋辛钠、头孢唑啉在 C_{18}/WCX 固定相上的分离度增大, 哌拉西林、氯唑西林钠拖尾现象有明显改善, 在 Unitary C_{18} 固定相上未分开的杂质峰, 在 C_{18}/WCX 固定相上与目标化合物分离。原因可能是 Unitary C_{18} 为高密度键合烷基链的反相色谱固定相, 在表 2 所示的流动相条件下, 样品间主要依赖与固定

相间的疏水作用力差异来进行分离。而 C_{18}/WCX 为一种表面分别键合了疏水基团和弱阳离子交换基团的混合模式色谱材料, 在表 1 所示的流动相条件下, 固定相与样品处于电离状态, 样品在固定相上的分离可能主要由疏水作用与静电作用共同作用。

为验证上述猜想, 又分别从以下 2 方面来考察 β -内酰胺类抗生素的保留行为: (i)不同缓冲盐离子强度条件下, (ii)不同缓冲盐 pH 值条件下, 并与常规反相柱(Unitary C_{18})上的保留行为进行对照。

3.2 离子强度对保留时间的影响

甲酸铵溶液的 pH 值固定为 6.5 时, 乙腈的梯度变化如表 1 和表 2 中所示, 考察在上述甲酸铵缓冲盐浓度为 5、10、20 mmol/L 时, 样品在 C_{18}/WCX (图 5a) 和 Unitary C_{18} (图 5b) 2 种固定相上的保留变化。

如图 5a 中所示, 混合样品溶液中 10 种 β -内酰胺类抗生素样品中的大多数在 C_{18}/WCX 固定相上随着盐浓度的增加, 保留增强。原因是 C_{18}/WCX 带有羧基, 羧基电离后带有负电荷, 对处于电离状态、同样带有负电荷的样品具有一定的排斥作用。随着离子强度的增加, 样品与固定相表面由于静电作用而吸附有盐离子, 形成双电层, 样品与固定相之间的排斥作用减弱, 导致保留增强。而在 Unitary C_{18} 的柱子上, 盐浓度变化对样品的影响不明显。这是由于在 Unitary C_{18} 上不带有电荷, 因而没有静电作用力, 样品与固定相之间只存在疏水作用力, 所以盐浓度变化对样品保留时间影响不大(图 5b)。

表 1 以 C_{18}/WCX 为固定相时流动相的梯度条件
Table 1 Gradient conditions of mobile phase with C_{18}/WCX as stationary phase

时间/min	100 mmol/L 甲酸铵(pH 6.5)	乙腈	水
0	5	5	90
15	5	15	80
20	5	60	35

表 2 以 Unitary C_{18} 为固定相时流动相的梯度条件
Table 2 Gradient conditions of mobile phase with Unitary C_{18} as stationary phase

时间/min	100 mmol/L 甲酸铵(pH 6.5)	乙腈	水
0	5	5	90
5	5	15	80
10	5	15	80
20	5	40	55

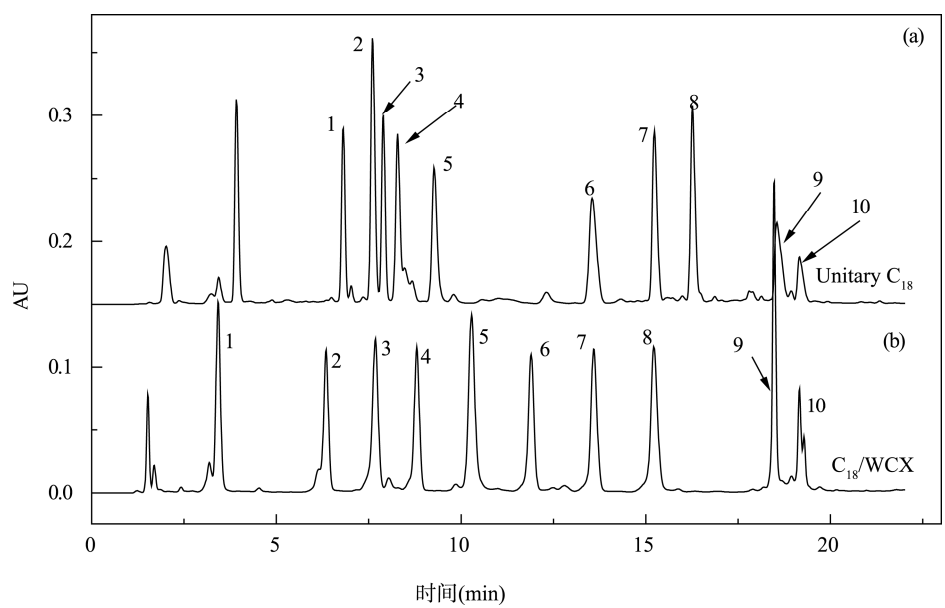


图 4 梯度优化后样品在 Unitary C₁₈(a)与 C₁₈/WCX(b)上分离效果图

Fig. 4 Separation of samples in the stationary phase of Unitary C₁₈(a) and C₁₈/WCX(b) after gradient optimization

1: 头孢羟氨苄; 2: 头孢替唑钠; 3: 头孢呋辛钠; 4: 头孢唑啉; 5: 头孢拉定; 6: 头孢西酮; 7: 头孢孟多酯钠; 8: 头孢噻吩; 9: 哌拉西林; 10: 氯唑西林钠

1: cefadroxil; 2: ceftazole sodium; 3: cefuroxime sodium; 4: cefazolin; 5: cephadrine; 6: cefazedone; 7: cemandil sodium; 8: cephalothin; 9: piperacil; 10: cloxacillin sodium

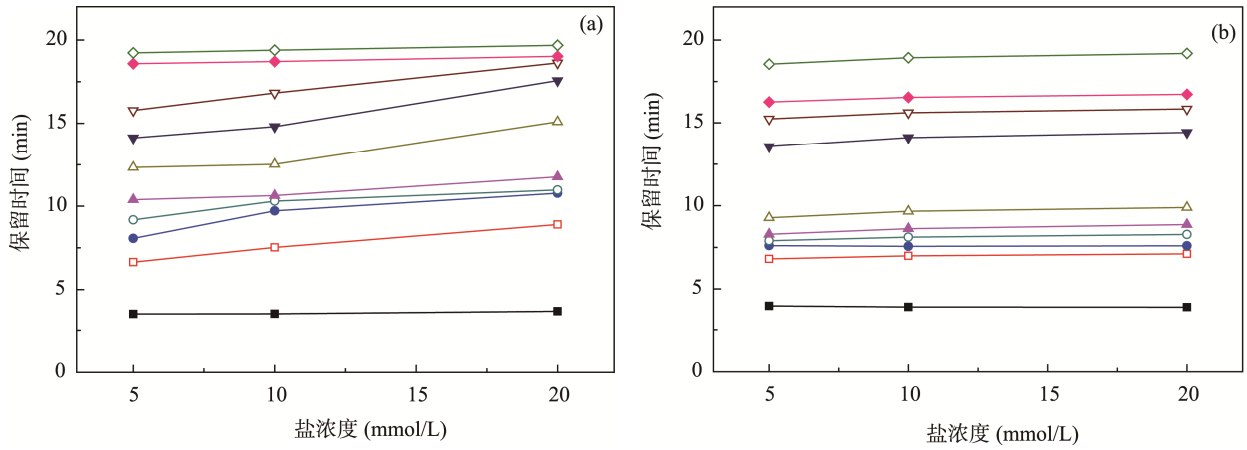


图 5 C₁₈/WCX 柱(a)和 Unitary C₁₈ 柱(b)甲酸铵盐浓度变化对样品保留时间的影响

Fig. 5 Effect of the ammonium formate concentration on the retention time of samples in stationary phase of C₁₈WCX (a) and Unitary C₁₈ (b)

头孢羟氨苄(■); 头孢替唑钠(□); 头孢呋辛钠(●); 头孢唑啉(○); 头孢拉定(▲); 头孢西酮(△); 头孢孟多酯钠(▼); 头孢噻吩(▽); 哌拉西林(◆); 氯唑西林钠(◇)

cefadroxil (■); ceftazole sodium (□); cefuroxime sodium (●); cefazolin (○); cephradine (▲); cefazedone (△); cemandil sodium (▼); cephalothin (▽); piperacil (◆); cloxacillin sodium (◇)

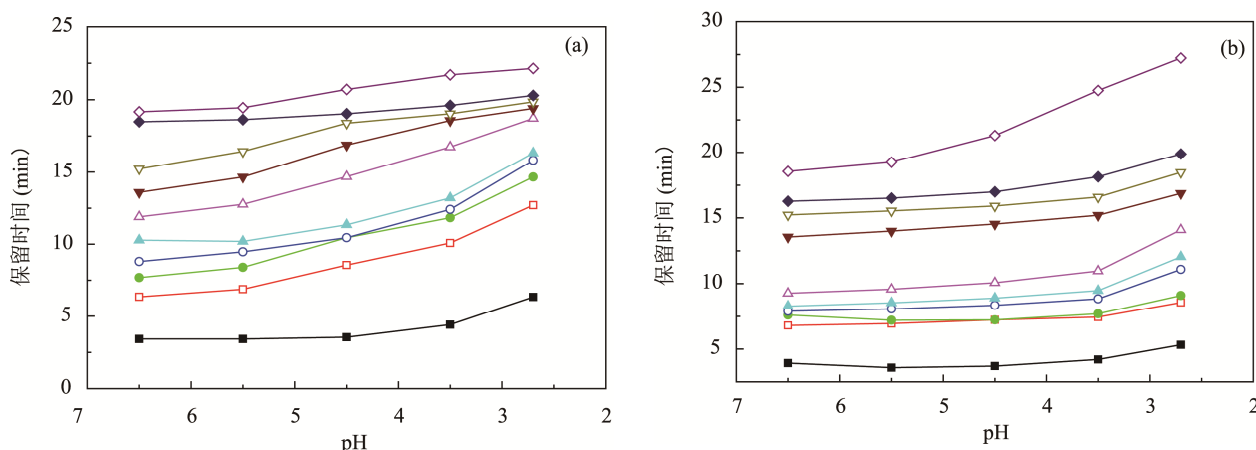


图6 C₁₈/WCX柱(a)和Unitary C₁₈柱(b)甲酸铵盐pH变化对样品保留时间的影响

Fig. 6 Effect of the ammonium formate pH on the retention time of samples in stationary phase of C₁₈/WCX (a) and Unitary C₁₈ (b) 头孢羟氨苄(■); 头孢替唑钠(□); 头孢呋辛钠(●); 头孢唑林(○); 头孢拉定(▲); 头孢西酮(△); 头孢孟多酯钠(▼); 头孢噻吩(▽); 哌拉西林(◆); 氯唑西林钠(◇)

cefadroxil (■); ceftezole sodium (□); cefuroxime sodium (●); cefazolin (○); cephradine (▲); cefazedone (△); cemandil sodium (▼); cephalothin (▽); piperacillin (◆); cloxacillin sodium (◇)

3.3 pH值对保留时间的影响

以C₁₈/WCX为固定相,乙腈的梯度变化如表1所示。考察在5 mmol/L甲酸铵溶液pH值为6.5、5.5、4.5、3.5、2.7时,10种β-内酰胺类抗生素样品保留的变化。同时以Unitary C₁₈柱为对照,乙腈的梯度变化如表2中所示。

在C₁₈/WCX柱上(图6a),随着pH的降低,10种β-内酰胺类抗生素样品的保留增强。在Unitary C₁₈柱上(图6b),随着pH的降低,除氯唑西林钠保留时间明显增强外,其余样品的各个峰保留时间,在pH3.5~6.5范围内,也略有增强的趋势,但增加幅度小于C₁₈/WCX,而在pH2.7~3.5范围内,各样品的保留时间明显增强。

可能原因是在高pH的环境下,样品都呈现电离状态,随着pH的降低,样品的电离减弱,极性也随之降低,与烷基链之间的疏水作用增强,保留也随之增强。此外在C₁₈/WCX固定相上,羧基与样品的电离也会减弱,二者之间的排斥作用减弱,保留时间增强。在以Unitary C₁₈为固定相时,随着pH的降低,样品与烷基链之间的疏水作用增强,保留也随之增强,即疏水作用力起主导作用。

对比C₁₈/WCX和Unitary C₁₈对样品的保留值变化,随着缓冲盐浓度以及缓冲盐pH值的变化,

C₁₈/WCX对β-内酰胺类抗生素依据疏水作用力和静电作用力共同作用,具有更好的分离选择性。而Unitary C₁₈与β-内酰胺类抗生素之间主要是疏水作用力,随着缓冲盐浓度以及缓冲盐pH值的变化,Unitary C₁₈的保留值略有增加,但增幅较小。从上述结果可以看出,混合模式的色谱填料在不同离子强度范围以及较宽的pH变化范围内,仍可以提供多种作用力,此模式对于β-内酰胺类抗生素具有较强的分离选择性,进一步说明C₁₈/WCX混合模式色谱材料在β-内酰胺类抗生素分离上具有巨大的潜力。

4 结论

在中性条件下通过优化流动相洗脱梯度,10种β-内酰胺类抗生素在C₁₈/WCX具有较高的分离选择性。通过缓冲盐浓度和pH值的调控,发现混合模式色谱材料C₁₈/WCX上主要由2种力共同作用,即静电作用力与疏水作用力共同作用,对样品进行分离选择;而在Unitary C₁₈单一模式色谱上疏水作用起主导作用。C₁₈/WCX在β-内酰胺类抗生素方面具有良好的分离选择性和巨大的潜力。

参考文献

- [1] Marina VP, Bienvenida GL, Juan FGR, *et al.* Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by

- fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2011, 85: 1419–1427.
- [2] Camara M, Gallego-Pico A, Garcinuno RM, *et al.* An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 829–834.
- [3] Juhel MG, Delepine B, Gautier S, *et al.* Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach [J]. *Food Addit Contam*, 2009, 26(11): 1459–1471.
- [4] Lina K, Marinella F, Martin S, *et al.* Fully automated analysis of Lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(11): 4285–4295.
- [5] Carolina QM, Berengere C, Ana MGC, *et al.* Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer [J]. *Food Chem*, 2012, 135: 775–779.
- [6] Didier O, Emmanuelle C, Philippe J, *et al.* Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2363–2374.
- [7] Junza A, Amatya R, Barron D, *et al.* Comparative study of the LC–MS/MS and UPLC–MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk, and validation according to the regulation 2002/657/EC [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 2601–2610.
- [8] Karageorgou EG, Samanidou VF. Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk [J]. *J Sepa Sci*, 2010, (33): 2862–2871.
- [9] Wang CR, Guo ZM, Long Z, *et al.* Overloading study of basic compounds with a positively charged C_{18} column in liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1281: 60–66.
- [10] Snyder LR, Dolan JW, Carr PW, *et al.* The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1060: 77–116.
- [11] Cai X, Guo Z, Xue X, *et al.* Two-dimensional liquid chromatography separation of peptides using reversed-phase/weak cation-exchange mixed-mode column in first dimension [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 242–249.
- [12] 董雪芳, 蔡晓明, 沈爱金, 等. 混合模式色谱分离材料的研究及其应用进展[J]. *色谱*, 2013, 31(4): 297–302.
- Dong XF, Cai XM, Shen AJ, *et al.* Development and application of separation materials for mixed-mode chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(4): 297–302.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



刘名扬, 博士, 研究员, 教授, 主要研究方向为光谱、色谱仪器分析。
E-mail: liumy@mail.tsinghua.edu.cn