

# 基于分子印迹聚合物微球的在线固相萃取-液相色谱联用技术测定牛奶中酰胺醇类药物残留

吕运开, 张婧琦, 王晓虎, 李攀, 刘晓辉  
(河北大学化学与环境科学学院, 河北 保定 071002)

**摘要:** 以氟苯尼考为模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 二甲基丙烯酸乙二醇酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 用乳液-悬浮聚合法制备分子印迹聚合物微球。将制备的微球用于固相萃取, 建立酰胺醇类抗生素的在线固相萃取-高效液相色谱检测方法, 优化在线萃取条件及影响因素。在最佳条件下, 分离检测了牛奶中的酰胺醇类药物, 实现了有效地净化, 其加标回收率为80.6%~96.7%, 检出限为6.8~27.8 $\mu\text{g/kg}$ 。

**关键词:** 分子印迹聚合物; 高分子微球; 在线固相萃取; 酰胺醇类抗生素; 奶

## On-line Solid-Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymer Microspheres in Combination with HPLC for the Determination of Amphenicols Residues in Milk

LÜ Yun-kai, ZHANG Jing-qi, WANG Xiao-hu, LI Pan, LIU Xiao-hui  
(College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** Molecularly imprinted microspheres (MIMs) were synthesized using florfenicol as template molecule, methacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking agent, 2,2-azobisisobutyronitrile as initiator by emulsion-suspension polymerization. An analytical method was established for the determination of amphenicols residue milk using on-line solid-phase extraction with the microspheres coupled with high performance liquid chromatography. Some extraction and detection conditions were investigated. Under the optimal conditions, the best separation and cleanup were obtained. The average recoveries for spiked milk were in the range of 80.6%–96.7% and the detection limits for thiamphenicol, florfenicol and chloramphenicol were 6.8, 10.9  $\mu\text{g/kg}$  and 27.8  $\mu\text{g/kg}$ , respectively.

**Key words:** molecularly imprinted; polymers microspheres; on-line solid-phase extraction; amphenicols; milk

中图分类号: O652.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0238-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316048

食品安全中药物的残留问题已引起人们的高度重视。酰胺醇类药物是一种广谱抗菌素, 主要包括氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考, 它对人的造血系统、消化系统具有严重的毒性反应, 有可能引发人的再生障碍性贫血<sup>[1-2]</sup>, 因此各国政府规定了奶中酰胺醇类药物的最高残留量不得超过0.1mg/kg。动物组织、体液、牛奶、鸡蛋等基体中酰胺醇类药物的检测方法已有一些报道<sup>[3-10]</sup>, 应用较多的有气相色谱法、气质联用法、液相色谱法和液质联用法等。在残留分离检测中, 样品前处理是分析的关键步骤, 常用正己烷<sup>[4,9]</sup>、 $\text{C}_{18}$ 柱<sup>[7]</sup>、LC-Si硅胶柱和弗罗里硅土柱净化<sup>[9]</sup>, 处理过程复杂, 并影响分析的准确度。为了实现样品中分析物能定量转移到分析系统中, 在样品中加入提取液离心后, 直接进样的在线富集净化与检测联用技术是未来发展趋势<sup>[11-12]</sup>。

近年来, 酰胺醇类药物分子印迹聚合物制备及其在固相萃取中应用得到了人们的高度重视<sup>[13-14]</sup>。与传统固相萃取的吸附剂相比, 分子印迹聚合物对目标物及其结构类似物有较好地特异性吸附, 是制备选择性固相萃取吸附剂最有效的方法之一。为了提高柱效和传质速率, 分子印迹聚合物微球制备方法获得了迅速发展<sup>[15-16]</sup>。分子印迹聚合物微球的主要制备方法是悬浮聚合, 其反应温度易控制, 模板分子容易除去, 聚合产物易分离、干燥, 但是所得产物的单分散性较差<sup>[17]</sup>。乳液聚合是一种重要的合成微球的方法, 利用此法可以很好地控制产物的粒径, 但在聚合过程中粒子表面会吸附较多的杂质并且很难除去, 进而影响其性能与形貌<sup>[18-19]</sup>, 巧合的是悬浮聚合却可以克服乳液聚合所存在的上述缺点, 根据悬浮聚合和乳液聚合反应的特点<sup>[20]</sup>, 采用乳液修饰悬浮聚合是可行的。

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(B2011201081); 国家自然科学基金面上项目(21375032)

作者简介: 吕运开(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全检测技术。E-mail: lvyunkai@hbu.edu.cn

本研究的目的是发展乳液-悬浮聚合法,合成粒径较小且大小可控的氟苯尼考分子印迹聚合物微球,并将其填充于不锈钢小柱中,与高效液相色谱在线联用,建立一种在线固相萃取-液相色谱分离检测牛奶中酰胺醇类抗生素残留的新方法,实现奶样品提取离心后,可直接进行的简便、快速、准确地测定酰胺醇类抗生素残留量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牛奶 市购。

氟苯尼考(FF)、氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA) 瑞士Fluka公司;偶氮二异丁腈(AIBN) 北京化学试剂公司;聚乙烯醇(PVA)1788、十二烷基磺酸钠(SDS) 美国Sigma-Aldrich公司;甲基丙烯酸(MAA)甲醇、乙醇、乙腈、三氟乙酸、醋酸 天津化学试剂公司。所有试剂均为分析纯或色谱纯,实验用水为去离子水。所有用于液相色谱的试剂和样品都要过0.45 $\mu$ m滤膜。

### 1.2 仪器与设备

LC-20AT高效液相色谱仪(配有DT-230A色谱柱恒温箱、二元泵、LCsolution Lite工作站、SPD-20A紫外检测器) 日本岛津公司;KQ-250B超声清洗仪 昆山市超声仪器有限公司;HCT-165台式高速离心机 长沙易达仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱: Venusil XBP C<sub>18</sub>柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m);流动相: 甲醇-水(40:60, V/V);温度: 25 $^{\circ}$ C, 流速: 0.8mL/min;检测波长: 225nm。

#### 1.3.2 分子印迹聚合物微球的合成

1)将氟苯尼考0.2687g(0.75mmol)、3mmol甲基丙烯酸0.255mL、氯仿4mL、醋酸0.8mL、三氟乙酸0.53mL加入三角瓶中,在0 $^{\circ}$ C条件下超声30min。2)将二甲基丙烯酸乙二醇酯2.8275mL(15mmol)、氯仿2mL、偶氮二异丁腈0.15g、加入三角瓶中,室温条件下超声10min。3)将聚乙烯醇3.45g在650r/min的搅拌条件下溶于85 $^{\circ}$ C的去离子水(130mL)中,然后冷却至室温。4)将十二烷基磺酸钠加入三角瓶中,室温条件下超声使其完全溶解。

将1)和2)混合,3)和4)混合,然后将合并好的两种溶液分别在室温条件下搅拌2h,最后加入一个250mL的三颈瓶中,在室温,氮气保护下搅拌60min。将温度升至60 $^{\circ}$ C,热引发聚合反应24h。反应结束后,将上层乳液倾去,抽滤、水洗,最后甲醇洗涤。将微球放入索氏提取仪中,用甲醇提取除去模板分子。将处理好的微球在50 $^{\circ}$ C条件下真空干燥24h,将得到的印迹聚合物微球,储

存于干燥器中备用。非印迹聚合物微球的制备,除了不加入模板分子,其他过程相同。

#### 1.3.3 在线固相萃取小柱的制备

取一定量氟苯尼考印迹聚合物微球放入一个小烧杯中,加适量的水将其调成均匀的糊状,用小勺将适量的糊状物填充到不锈钢小柱中,然后用液相色谱泵加压,直到压力稳定,继续填充,用泵压实,反复进行此过程直到小柱中充满聚合物且填充密实。将填充好的小柱连入液相色谱系统中,用甲醇-乙酸(4:1, V/V)的溶剂冲洗小柱至检测器中所显示的基线平稳,然后用水将小柱冲洗至中性,将柱中充满甲醇,两端密封保存备用。

#### 1.3.4 动态穿透实验

将不锈钢小柱与液相B泵相连,用乙醇-水(5:95, V/V)冲洗柱子30min。将柱子的末端与色谱的检测器相连,继续用上述溶剂冲洗柱子直到基线平稳。断开柱子与泵的连接,将B泵滤头到泵这一段流路中的乙醇-水(5:95, V/V)替换为0.2mg/mL的氟苯尼考乙醇-水(5:95, V/V)溶液,然后将柱子与B泵重新连接。将流速设定为0.8mL/min,检测波长设为225nm,然后将B泵打开,采集谱图,得到穿透曲线。待谱图采集好后马上停B泵同时开启A泵,用甲醇冲洗检测器,冲洗流速为5mL/min,冲洗时间为10min。用甲醇将B泵滤头冲洗干净,然后依次用甲醇-乙酸(4:1, V/V)、水、乙醇-水(5:95, V/V)冲洗柱子,使其再生。预柱的动态吸附量用如下公式进行计算:

$$Q = (t_{50\%} - t_0) F \rho / m$$

式中:  $Q$ 为吸附量/(mg/g);  $t_{50\%}$ 为穿透曲线突跃50%时所对应的时间/min;  $t_0$ 为死时间/min;  $F$ 为流速/(mL/min);  $\rho$ 为样品的质量浓度/(mg/mL);  $m$ 为小柱中填料的质量/g。

#### 1.3.5 实际样品分析

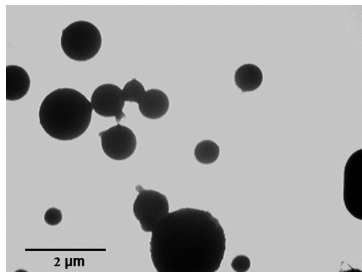
称取5g奶样,添加不同量的标准酰胺醇类抗生素的混合物(TAP、FF、CAP),加标量均为0.05、0.1、0.2mg/kg,然后分别加入0.25mL 5%的高氯酸、10mL乙酸乙酯,漩涡振荡10min,将混合物放入离心机中9000r/min离心10min,取上清液,下层混合物用10mL乙酸乙酯重复提取1次,合并上清液。将提取液在30 $^{\circ}$ C以下旋蒸至干,残渣用5mL流动相重新溶解,进行在线固相萃取-高效液相色谱分析。

## 2 结果与分析

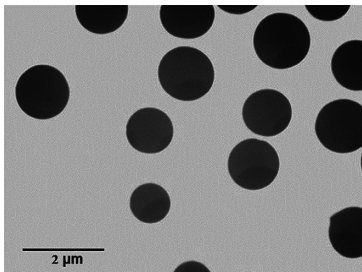
### 2.1 分子印迹聚合物微球的合成

为了实现在线样品处理,需要制备粒径均匀且分散性好的微球,提高传质速率、柱效、分离和净化能力。首先用传统的悬浮聚合法合成印迹微球,所得到的产品(图1a)粒径均匀性很差,并且粘连严重。在悬浮聚合

中,有许多因素影响微球的合成,例如反应温度、搅拌速度、分散剂的用量等。尝试改变各种条件,来优化微球的合成,但效果都不太理想,最后在反应体系中加入十二烷基磺酸钠形成乳液,所制备的微球变得比较均匀,并且微球之间的粘连性问题也得到了解决(图1b)。由图1可见,微球的粒径在1.5~2.0 $\mu\text{m}$ 之间,用改进后的方法合成的分子印迹聚合物微球作为固相萃取的吸附剂,可以提高分离效率,缩短样品前处理时间。



a.传统方法所制备的微球

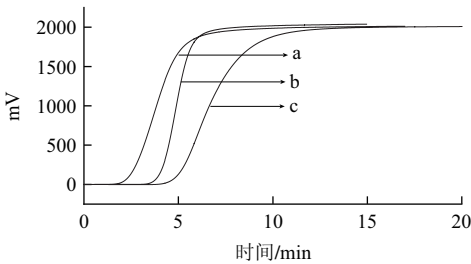


b.乳液-悬浮聚合法所制备的微球

图1 微球的光学显微镜图

Fig.1 Images of the MIMs under light microscope

2.2 上样溶剂的选择



a.甲醇-水(5:95,  $V/V$ ); b.乙腈-水(5:95,  $V/V$ ); c.乙醇-水(5:95,  $V/V$ )。

图2 不同上样溶剂时的透过曲线

Fig.2 Breakthrough curves obtained with different solvents

样品溶剂的强度对预柱的动态吸附量影响较大,为了找到合适的上样溶剂,考察甲醇-水(5:95,  $V/V$ ),乙醇-水(5:95,  $V/V$ )和乙腈-水(5:95,  $V/V$ )作为上样溶剂时的动态吸附量。分别用质量浓度为0.2mg/mL的氟苯尼考溶液上样,在流速为0.8mL/min的条件下,考察不同样品溶液的穿透曲线。3种不同溶剂的氟苯尼考溶液穿透

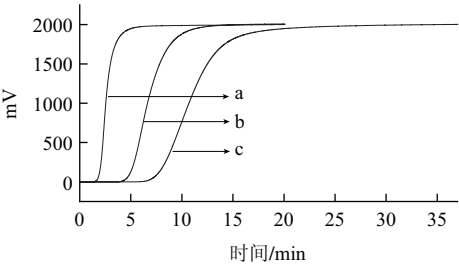
曲线见图2。预柱填料的质量为0.44g,通过计算得知,当以甲醇-水(5:95,  $V/V$ )、乙醇-水(5:95,  $V/V$ )和乙腈-水(5:95,  $V/V$ )为上样溶剂时,预柱的动态吸附量分别为0.72、1.75mg/g和1.19mg/g,结果见表1。在3种上样溶剂中用乙醇-水(5:95,  $V/V$ )上样时的吸附量较大,因此被选择作上样溶剂。

表1 不同样品溶剂上样时预柱的动态吸附量  
Table 1 Adsorption capacity of the pretreatment column with different solvents for loading samples

上样溶剂	质量浓度/(mg/mL)	流速/(mL/min)	$t_b$ /min	$t_{95\%}$ /min	吸附量/(mg/g)
甲醇-水(5:95, $V/V$ )	0.2	0.8	1.87	3.85	0.72
乙醇-水(5:95, $V/V$ )	0.2	0.8	1.83	6.64	1.75
乙腈-水(5:95, $V/V$ )	0.2	0.8	1.65	4.91	1.19

2.3 上样流速考察

在固相萃取过程中,流速对吸附剂的吸附性有一定的影响,为了达到较好的萃取效果,并且提高分析效率,考察在不同流速条件下预柱的动态吸附量,穿透曲线见图3。由表2可知,当流速为0.6、0.8、1.0mL/min时,预柱的吸附量分别为2.25、1.75mg/g和0.49mg/g,所用的时间分别为10.70、6.64、2.55min。综合考虑各种因素,选用0.8mL/min的流速上样。



a. 1.0mL/min; b. 0.8mL/min; c. 0.6mL/min。

图3 不同流速时的透过曲线

Fig.3 Breakthrough curves at different flow rates

表2 不同流速上样时预柱的动态吸附量  
Table 2 Adsorption capacity of the pretreatment column at different sample loading flow rates

上样溶剂	质量浓度/(mg/mL)	流速/(mL/min)	$t_b$ /min	$t_{95\%}$ /min	吸附量/(mg/g)
乙醇-水(5:95, $V/V$ )	0.2	0.6	2.44	10.70	2.25
乙醇-水(5:95, $V/V$ )	0.2	0.8	1.83	6.64	1.75
乙醇-水(5:95, $V/V$ )	0.2	1.0	1.47	2.55	0.49

2.4 淋洗剂的选择

在保证回收率的前提下,尽量使用较强的溶剂淋洗预柱,可以使更多的杂质被洗下来。本实验分别考察0.2mL乙醇-水(5:95,  $V/V$ )、乙醇-水(7.5:92.5,  $V/V$ )、乙醇-水(10:90,  $V/V$ )对氟苯尼考的淋洗效果,发现随着溶剂中乙醇比例的增加回收率逐渐降低,结果见表3。虽然乙醇-水(5:95,  $V/V$ )作为淋洗剂,分析物回收率较高,但净化效果和精密度都比7.5:92.5差,因此,选择乙醇-水(7.5:92.5,  $V/V$ )作为淋洗剂,可获得较好的净化效果。



表3 使用不同淋洗剂时的回收率

Table 3 Recoveries of amphenicols with different washing solvents

淋洗剂	乙醇-水(5:95, V/V)	乙醇-水(7.5:92.5, V/V)	乙醇-水(10:90, V/V)
回收率/%	100.28	95.51	87.93

2.5 在线SPE-HPLC分离检测过程

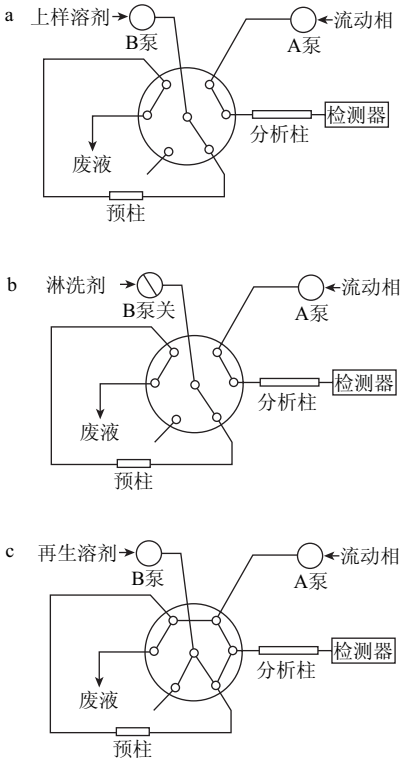


图4 在线SPE-HPLC联用系统  
Fig.4 On-line SPE-HPLC system

如图4a所示，六通阀位于进样状态，用进样针从进样口进样，样品为酰胺醇类抗生素(FF、TAP、CAP)的乙醇-水(5:95, V/V)溶液。进样后用乙醇-水(5:95, V/V)将样品富集到预柱上，同时用分析流动相(甲醇-水, 40-60, V/V)平衡分析柱，图4b用乙醇-水(7.5:92.5, V/V)淋洗预柱，同时继续平衡分析柱；图4c搬动六通阀，用分析流动相将酰胺醇类抗生素(FF、TAP、CAP)洗脱到C<sub>18</sub>柱上，完成对目标物的分离分析。实验中所用的流速均为0.8mL/min，检测波长为225nm。

2.6 分析参数

配制含有3种酰胺醇类抗生素的一系列混合标准溶液，质量浓度范围为0.05~0.5mg/L。在选定的色谱条件下进样，然后以样品的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，仪器的检出限按3倍信噪比计算，具体结果见表4。可知，氟苯尼考、甲砒霉素、氯霉素在所考察的质量浓度范围内线性良好，仪器的检出限分别为8.43、5.77μg/L和25.83μg/L。

表4 3种酰胺醇类药物的线性方程、相关性系数、线性范围和检出限  
Table 4 Linear regression equations, correlation coefficients (r), linear ranges and detection limits for three amphenicols

分析物	线性方程	相关性系数	线性范围/(mg/L)	LOD/(μg/L)
FF	$Y=1116+3.70\times10^4C$	0.9994		8.43
TAP	$Y=-289+4.51\times10^4C$	0.9984	0.05~0.5	5.77
CAP	$Y=-623+2.54\times10^4C$	0.9983		25.83

2.7 在线联用技术在实际样品分析中的应用

对加标牛奶样品进行处理，然后用考察好的在线固相萃取-高效液相色谱方法进行分析，样品经固相萃取前后的色谱图见图5，可见固相萃取可以消除牛奶中的大部分基质，经萃取后干扰目标测定的杂质基本上被除去了，这证明在线预柱具有良好的净化效果。3种酰胺醇类药物的加标回收率、相对标准偏差、检出限和定量限，见表5。

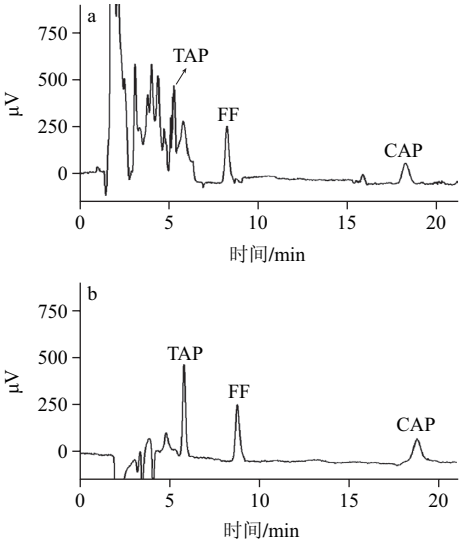


图5 加标奶样的色谱(a)和加标奶样经在线固相萃取后(b)的色谱图  
Fig.5 Chromatograms obtained from the detection of three amphenicols from the milk samples

表5 奶样中酰胺醇类药物的回收率、相对标准偏差(RSD)、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

Table 5 Average recoveries, RSD (n = 3), LODs and LOQs of three amphenicols in spiked milk samples

分析物	加标量/(mg/kg)	检出量/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%	LOD <sup>a</sup> /(μg/kg)	LOQ <sup>b</sup> /(μg/kg)
FF	0.05	0.048	95.6	2.7		
	0.1	0.094	94.1	1.8	10.9	36.3
	0.2	0.193	96.7	2.3		
TAP	0.05	0.040	80.6	1.3		
	0.1	0.082	81.8	2.9	6.8	22.7
	0.2	0.171	85.5	2.8		
CAP	0.05	0.043	85.7	2.2		
	0.1	0.087	87.0	3.3	27.8	92.7
	0.2	0.169	84.3	2.0		

注：a. LOD=(3×噪音/峰高)×(定容质量浓度×定容体积/样品量)；b. LOQ=(10×噪音/峰高)×(定容质量浓度×定容体积/样品量)。

### 3 结 论

本研究将氟苯尼考印迹微球用作在线净化柱填料,考察影响萃取效果的各种因素。在最佳条件下,实现了牛奶中酰胺醇类抗生素残留的在线固相萃取-液相色谱快速分离检测。结果表明在线净化的联用技术是可行的,并具有操作简单、准确度高、精密度较好的特点。

#### 参考文献:

- [1] FEDER H M, OSIER C, MADERAZO E G. Chloramphenicol: a review of its use in clinical practice[J]. *Rev Infect Dis*, 1981, 3(3): 479-491.
- [2] ALLEN H. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues of food-producing animals[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1985, 68(5): 990-999.
- [3] ZHANG Suxia, SUN Fengyun, LI Jiangheng, et al. Simultaneous determination of florfenicol and florfenicol amine in fish, shrimp, and swine muscle by gas chromatography with amicrocell electron capture detector[J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(5): 1437-1441.
- [4] 彭莉, 程江, 高岚, 等. 牛奶中氯霉素残留的气相色谱测定法研究[J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(9): 14-17.
- [5] SANTOS L, BARBOSA J, CASTILHO M C, et al. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1): 249-256.
- [6] POULIQUEN H, MORVAN M L. Determination of florfenicol in freshwater, sediments and bryophyte *fontinalis antipyrretica* by HPLC with fluorescence detection[J]. *Chromatographia*, 2005, 62(5/6): 225/231.
- [7] 陶昕晨, 黄和, 李志清, 等. 水产品中氯霉素、甲砒霉素氟苯尼考的 HPLC-UV法测定[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(20): 80-83.
- [8] RIET J M, POTER R A, CHRISTIE-FOUGERE M, et al. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol a-mine in farmed aquatic species by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(3): 510-514.
- [9] GB/T 20756—2006 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定: 液相色谱-串联质谱法[S].
- [10] GB/T 22338—2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定[S].
- [11] GE Shenguang, YAN Mei, CHENG Xiaoliang, et al. On-line molecular imprinted solid-phase extraction flow-injection fluorescence sensor for determination of florfenicol in animal tissues[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(4): 615-619.
- [12] LV Yunkai, YANG Lei, LIU Xiaohui, et al. Preparation and evaluation of a novel molecularly imprinted hybrid composite monolithic column for online solid-phase extraction coupled with HPLC to detect trace fluoroquinolone residues in milk[J]. *Anal Methods*, 2013, 5(7): 1848-1855.
- [13] THONGCHAI W, LIAWRUANGATH B, LIAWRUANGRATH S, et al. A microflow chemiluminescence system for determination of chloramphenicol in honey with preconcentration using a molecularly imprinted polymer[J]. *Talanta*, 2010, 82(2): 560-566.
- [14] de BARROS L A, MARTINS I, RATH S. A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(3): 1355-1361.
- [15] SHI Xizhi, WU Aibo, ZHENG Sulian, et al. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850(1/2): 24-30.
- [16] SHAH N, HA J H, UL-ISLAM M, et al. Highly improved adsorption selectivity of *L*-phenylalanine imprinted polymeric beads prepared by modified suspension polymerization[J]. *Korean J Chem Eng*, 2011, 28(9): 1936-1944.
- [17] VIVALDO-LIMA E, WOOD P E, HAMIELEC A E. An updated review on suspension polymerization[J]. *Ind Eng Chem Res*, 1997, 36(4): 939-965.
- [18] ARSHADY R. Suspension emulsion and dispersion polymerization: a methodological survey[J]. *Colloid Polym Sci*, 1992, 270(8): 717-732.
- [19] VOULGARIS D, PETRIDIS D. Emulsifying effect of dimethyldioctadecylammonium-hectorite in polystyrene/poly (ethyl methacrylate) blends[J]. *Polymer*, 2002, 43(8): 2213-2218.
- [20] GU Qiang, LIN Quan, HU Chunling, et al. Study on emulsion and suspension in situ polymerization[J]. *J Appl Polym Sci*, 2005, 95(2): 404-412.