

# 高效液相色谱法同时测定蔬菜中有机酸与磺胺类抗生素

薛华玉 张一木 吴 伟

南京科技职业学院 江苏南京 210048

**摘要:** 硫化物是畜牧中常用的兽药之一,在日常生产中广泛使用。在摄入磺胺类药物后,动物主要被粪便和尿液排出体外,进入外部环境,受到外部环境中的物理、化学或生物因素的影响,迁移和转化,并对水和土壤环境构成潜在威胁。磺胺类抗生素是一类水溶性高、挥发性低的化合物。使用GC-MS进行分析时,必须进行复杂的分流反应。不受控制的反应过程对分析结果的可复制性有很大影响,目前没有得到广泛应用。固相萃取-高效液相色谱串联质谱法同时测定土壤中的硫化物、四环素和喹诺酮类抗生素;采用高效液相色谱和串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定城市废水中痕量硫化物和其他抗生素。

**关键词:** 高效液相色谱; 蔬菜; 有机酸; 磺胺类抗生素;

## 引言

有机酸广泛存在于植物、根瘤菌和土壤环境中。一方面,有机酸是水果和蔬菜中的独特成分,其种类和含量不仅决定着水果和蔬菜的味道和质量,而且也是水果和蔬菜加工和储存的重要基础。另一方面,当植物处于恶劣的环境中时,植物的根会分泌某些物质(特别是有机酸),以适应在环境污染和卫生方面起着重要作用的压力环境。

## 一、磺胺类分子印迹聚合物反应体系的研究现状

和功能单体的选择。硫化物由p-氨基苯磺酰胺和取代硫化物组中氢的杂交团(注r)组成,其中包括胺基和硫-氧化合物,这两种化合物可形成与功能单体的氢键力,以及苯循环,这两种化合物可形成疏水力和相互作用力磺胺类抗生素的结构特性决定了其大多数分子印迹聚合方法属于非共价聚合。这种聚合方法的分子间相互作用力较低,需要模型分子的功能场址数目适中。尽管模型分子和功能单体之间有足够的相互作用力,但这可以避免模型分子由于模型分子和功能单体的组合过于强大而难以从mip中去除的情况。此外,分子指纹还要求模型分子具有较高的溶解度。磺胺嘧啶(SD)、磺胺嘧啶(SMZ)和磺胺嘧啶(SDM)均为磺胺基抗菌药物。这三种化合物结构相似,溶解度较好。r组吡啶循环上的两组胺类化合物可提供两个氢键场。它可以帮助硫化物上的四个氢接触点形成稳定的非共价复合结构,这有利于形成特定于密克罗尼西亚联邦的空洞。因此,以吡啶类化合物为模型分子的磺胺类抗生素的发生率为57%,也就是说,抗生素磺胺类化合物打印的模型分子中有一半属于硫化物。一方面,这是由于其化学性质的适应

性;另一方面,它是由应用于市场决定的。SD、SMZ和SDM作为中型抗菌药物具有广泛的相对严重的应用和残留物,与它们一起准备的mip更具实用性。磺胺嘧啶(SMO)作为一种常用于磺胺类抗生素的药物,也存在严重的药物污染问题,其氧杂环也可为MIP提供两个氢化合物场地,这是一种理想的分子模型材料。因此,全球观测系统经常被用作MIP的模型分子,占19%。功能单体与有机环境中的模型分子之间的识别程度差异也是影响模型分子选择的因素之一。由于功能单体的pH值、极性和结构不同,不同的硫化物模型分子和功能单体之间的复杂效应也不同。在现有报告中,甲基丙烯酸(AMM)的使用最为普遍,这可能与用作硫化物分子指纹共同模型分子的硫化物有关。当SMZ和MAA分别用作模型分子和功能单体时,mip的选择性是显着的。利用计算机模拟技术,对这一现象进行了分析,发现MAA与磺酰胺的结合能为-91.9364 kJ/mol,是1-乙烯基咪唑与磺酰胺结合能的两倍,而功能单体与模板分子之间的能量越高,MIP的结合位点亲和力越高。由于磺胺类药物分子印迹所用的模板结构与SMZ相似,MAA功能单体一般适用于磺胺类药物的分子印迹。然而,MAA作为一种既能作为氢键给体又能作为氢键受体的功能单体,在MAA和MAA之间具有很高的结合能。当模板分子与MAA的结合能不足时,MAA容易自聚,但MIP效果不理想。当SMO作为模板分子时,功能单体MAA不能给分子印迹聚合物带来良好的特异性。此外,可以发现功能单体的复合使用大大提高了分子印迹聚合物的吸附性能和选择性,乙烯基功能单体的复合使用为磺胺类分子印迹的优化提供了更多的可能性。近年来,为了

解决乙烯基功能单体聚合的MIP易受强极性溶剂干扰的问题,有报道提出了选择非乙烯基功能单体的研究思路。3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTEs)、3-(甲基丙烯酰氧基)丙基三甲氧基硅烷(KH570)等需要通过溶胶-凝胶法聚合的硅烷偶联剂功能单体,以及水溶性亲水功能单体如三聚氰胺、间苯二酚等,都属于新型非乙烯基功能单体。这类功能单体不同于传统的乙烯基功能单体,如MAA、4-VP等。具有较多的羟基和在水性环境中聚合的能力,能有效抑制强极性环境对自身的干扰。此外,具有特殊性能的功能单体也可以赋予MIP特殊的控制性能。4-[(4-甲基丙烯酰氧基)苯偶氮]苯磺酸(4-[(4-甲基丙烯酰氧基)苯偶氮]苯磺酸(MAPASA))中的偶氮苯发色团在指定的光波长下可以发生异构化,其识别位点的空间排列可以通过光波长的变化而改变,从而使MIP具有控制模板分子结合和释放的能力。功能单体的设计选择和创新应用是分子印迹制备中的重要课题。

## 二、磺胺类分子印迹聚合物合成方法的研究现状

### 1. 硅胶表面的分子印迹

分子印迹聚合物作为硅胶基质,可作为色谱柱填料应用于固相萃取、色谱分离和吸附剂等预处理领域。目前,基于硅胶的表面分子印迹是研究的热点,可以分为两大类:(1)传统的硅胶基质分子印迹。用于传统的二氧化硅产品,如纳米二氧化硅颗粒和二氧化硅毛细管柱。表面分子印迹修饰能有效增加分子印迹的比表面积,有效提高印迹位点的吸附效率和利用率。用硅烷偶联剂对纳米二氧化硅粒子进行表面修饰,制备了一种具有一层印迹胶束结构的球形二氧化硅纳米粒子。由于基质形貌的限制,成品仅用作SPE填料,但有许多方法可以对基质进行修饰,如选择性新型限制进入分子印迹材料(RA-MIP)。硅胶毛细管柱可以被印迹层包覆,用作选择性萃取搅拌棒,有效地增加了印迹的应用途径。这类印迹具有较高的吸附效率和利用率,但本质上是乙烯基聚合的分子印迹聚合物,易受水的影响,需要在有机溶剂环境中使用。(2)新型二氧化硅分子印迹。采用溶胶-凝胶法在水介质中合成了分子印迹二氧化硅。这类聚合物受水等强极性溶剂的影响较小,一定程度上保留了模板分子与功能单体在强极性溶剂环境中的络合能力。将分子印迹与表面印迹有机结合,先在水中聚合TEOS形成掺杂荧光量子点的核壳结构,再加入模板分子SD和功能单体APTEs形成印迹层,从而得到掺杂荧光量子点的分子印迹聚合物。由于MIS在聚合阶段是在水中进行的,所以用MIS萃取水样时,模板SD的IF值远高于其他五种磺胺

类药物,特异性显著。此外,凝胶膜的状态来源于mis。该产品的检出限低至 $0.06\mu\text{g/L}$ ,其灵敏度优于大多数商用免疫分析产品。这一发现使得分子印迹聚合物有望成为独立的产品,对进一步拓展分子印迹聚合物的应用领域起到积极的作用。

### 2. 基于磁性粒子的表面分子印迹

磁性粒子表面分子印迹聚合物是以磁珠为核,油酸或二氧化硅为连接层,以分子印迹为壳的核壳聚合物。这种基质的制作过程类似于传统的表面印迹法,但需要注意的是,由于磁珠不能与印迹层直接连接,磁性颗粒表面的分子印迹不能像硅胶一样根据使用要求调整形貌和结构。以磁性颗粒为基质的分子印迹聚合物的体积一般较小。利用他的2,2-双(4-羟基苯基)丙烷印迹聚合物的制备方法,制备了内径为70 nm、外径为150 nm的核壳型纳米氨基功能化磁性印迹聚合物(CS-NR-MAG-MIP),检测限低至 $0.004\mu\text{g/L}$ 。这种表面印迹方法保留了二氧化硅表面印迹比表面积大的优点,同时可以实现磁性印迹聚合物与样品的快速分离,并且具有用量少的优点利用磁性颗粒MIP在外磁场作用下可吸附在一处的特点,简化固相萃取步骤,采用磁性基质固相萃取法对鸡肉、牛奶和羊奶样品进行检测,回收率分别为82.27%~120.93%、78.67%~98.90%和62.66%~94.73%,回收效果较好,与鸡肉、牛奶和羊奶样品不同。这类分子印迹聚合物的回收率适中,部分成品存在检测限高的问题,可能是由于磁珠之间的磁性吸附关系,导致磁性MIP容易团聚,磁性MIP的印迹层利用率相对降低。

### 3. 基于其他物质的表面分子印迹

利用分子印迹技术改造化学传感器的电极,使电化学传感器可以选择性地定量检测样品中的目标物质,实现电化学传感器检测的定性和定量分析。在电极表面印迹需要用低沸点溶剂将MIP分散在电极表面,经过干燥、抛光、水洗等步骤,待溶剂挥发后在电极表面形成一层印迹膜,然后得到修饰电极。经过研究,出现了多种修饰碳糊电极(CPE)、氧化石墨烯(GO)修饰玻碳电极(玻碳电极)、GCE)、修饰表面声波(SAW)芯片的金电极等。这些电极能有效抑制样品中杂质对检测结果的干扰,检测结果稳定、重现性好、灵敏度高。对于基于聚合物的分子印迹聚合物,主要可以增加印迹的应用领域,拓宽印迹的应用途径。聚苯乙烯种子微球和聚丙烯中空纤维分别用作基质。制备的聚合物通过不同组分萃取效率的差异,可以有效分离样品中的磺胺类抗生素。这类聚合物的检出限仅为 $0.2\sim 3\mu\text{g/L}$ ,略逊于其他基质。

### 三、磺胺类药物分子印迹聚合物在样品分析中的运用

#### 1. 作为固相萃取柱的应用

磺胺类药物在水产养殖和畜牧业中作为抗菌剂使用,大多出现在畜产品中。一些药物通过养殖水流入环境。因此,该药物的检测样本集中在环境样本和食品样本中。当MIP在畜产品中用作固相萃取材料时,步骤是最复杂的。畜禽产品包括奶、蛋、肉等。富含蛋白质、脂类、纤维等大分子物质。在用MIP富集之前,一般需要进行初步提取,以消除样品中大分子对MIP的干扰。牛奶可以用少量醋酸铅溶液沉淀去除蛋白质,而畜禽肉需要经过均质、吸水、用各种溶剂反复提取、蒸发、复溶等一系列步骤。这类样品的初始萃取一般需要较长的时间和复杂的步骤,萃取效率受样品在萃取剂中溶解度等因素的影响。如果MIP可以消除大分子干扰,家禽样品可以直接应用,无需复杂的初始提取步骤,可以有效简化MIP应用程序,提高MIP应用效率。水产品 and 土壤样品也需要进行初步提取,然后MIP才能富集目标成分。但与畜产品的初始提取步骤相比,水产品 and 土壤样品的初始提取步骤更简单,只能使用能快速提取目标分子的有机溶剂进行提取。唯一的困难主要在于水产品样品中的高含水量,这容易降低MIP的特异性。将MIP制成固相萃取柱,并调整洗涤溶剂的极性和流速,可以有效地分离这一缺陷。MIP对静态吸附的选择性较差,但正是在同一溶剂环境中各组分和官能团的作用力不同,才有效地分离了样品中的磺胺类药物。该方法利用了清洗溶剂可以破坏分析物和官能团之间的相互作用力,同时保留目标分析物和印迹位点之间的结合能力的特征。目标分子及其结构类似物在MIP固相萃取柱中的洗脱速度比其他结构慢,从而有效地将目标分子与其他组分离开,这也适用于水性样品的直接应用。

#### 2. 直接应用于水性样品

理论上,MIP固相萃取柱可以使实际含水样品不经有机溶剂萃取而直接使用,但实际水样中有许多杂质,如酸或盐,会破坏MIP的选择性,降低回收率。对于这类杂质,我们可以调节水基样品的pH值或者让水基样品通过常规吸附剂(如C18、DVD)进行初步除杂,然后MIP固相萃取柱吸附提取所有组分。像水产品样品一样,我们选择一种去污剂,它不会破坏MIP和待检测目标的所有功能位点,并诱导空腔选择性保留目标分析物。最后,

我们可以在MIP中收集目标检测物质,以有效地分离样品中的所有组分。一般检测磺胺类药物时,用甲醇水溶液作去污剂去除杂质,甲醇的比例随MIP保留强度的增加而增加。乙酸:甲醇(5 : 95, v/v)作为洗脱剂进行萃取,此比例的甲醇溶液可以最大程度地回收分子印迹聚合物中的磺胺类药物。随着MIS的发展和运用,分子印迹逐渐摆脱了传统乙烯基聚合方法易受水影响而导致特异性下降的局限。水基MIS受水的强极性影响较小,与荧光量子点混合后与荧光检测器联用,可以提高灵敏度,减少样品的除杂步骤。在一些报告中,水基样品可以通过简单的过滤步骤由MIS直接提取。MIS的出现进一步简化了分子印迹聚合物的应用过程,提高了分子印迹聚合物作为独立的水基样品快速检测产品的潜力。

#### 3. 快速检测方法的应用研究

分子印迹技术的基本原理是由免疫抗原和抗体结合而衍生的仿生技术。基于MIS和电极的分子印迹聚合物在一定程度上可以直接作为快速检测产品。但由于不显色或有明显吸附现象的缺陷,需要附在检测仪器上使用,无法制备类似免疫抗原抗体法等胶体金快速检测的试纸条,不利于推广。部分研究是探索磺胺类药物分子印迹聚合物的应用。观察膜的显色反应后,可直接选用磺胺类药物。手性向列型分子印迹复合膜对磺胺类药物具有选择性,类似于免疫抗原抗体法中的试纸条,具有广泛推广应用的潜力。但其检出限高达0.05 ~ 10 mg/ml,灵敏度不如仪器分析。如果能有效提高该技术的灵敏度,磺胺类抗生素的分子印迹快速检测技术将得到进一步推广和应用。

总之,通过分析模板分子与功能单体之间的非共价键力,选择作用位点适中、易于形成稳定空腔结构的模板分子、功能单体和交联剂,可以实现磺胺类抗生素分子印迹聚合物的优化。

#### 参考文献:

- [1]刘萍. 关于高效液相色谱法同时测定蔬菜中有机酸与磺胺类抗生素.2019.
  - [2]王晓玲. 浅谈高效液相色谱法同时测定蔬菜中有机酸与磺胺类抗生素.2020.
- 2021年江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目:基于香豆素衍生物H2O2荧光探针的开发与性能研究(202112920015Y)。