

基于整体材料搅拌棒固相萃取高效液相色谱联用测定 饲料和水样中硝基呋喃类药物残留

张咏, 梅萌, 黄晓佳*, 袁东星

(厦门大学环境与生态学院 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用自制的以聚(乙烯咪唑-二乙烯基苯)(VIDB)整体材料为涂层的固相萃取搅拌棒(VIDB-SBSE)萃取3种硝基呋喃类药物,然后与高效液相色谱-二极管阵列检测器联用建立了测定饲料和水样品中硝基呋喃类药物残留的方法。详细考察了萃取过程中萃取和解吸时间、样品基质的pH值以及离子强度等实验条件对萃取效率的影响。在最佳条件下,呋喃唑酮的线性范围为0.5~200 μg/L,呋喃妥因和呋喃西林的线性范围为0.25~200 μg/L,3种目标物的检出限(LOD)(S/N=3)在0.068~0.11 μg/L之间,所建方法具有理想的日内和日间重现性(RSD值均小于6%)。在对饲料和实际水样的测定中,不同加标浓度呋喃唑酮、呋喃妥因和呋喃西林的回收率在80.6%~108%之间。研究表明,所建立的方法具有简便、灵敏、环境友好等特点。

关键词: 搅拌棒吸附萃取;整体材料;高效液相色谱;硝基呋喃类残留;饲料;水样

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2014)04-0402-05

Determination of nitrofuran residues in feed and water samples by monolith-based stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography

ZHANG Yong, MEI Meng, HUANG Xiaojia*, YUAN Dongxing

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystem, College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A simple, efficient and sensitive method for the simultaneous determination of nitrofurantoin (NFT), furazolidone (FZD) and nitrofurazone (NFZ) in feed and water samples was developed by stir bar sorptive extraction (SBSE) coupled to high performance liquid chromatography with diode array detection. The SBSE based on poly(vinylimidazole-divinylbenzene) (VIDB) monolithic material as coating was used to concentrate the three target analytes. To obtain the optimum extraction performance, several VIDB-SBSE parameters were investigated and studied, including pH value, ionic strength of sample matrix, extraction and desorption time. Under the optimized experimental conditions, the linear ranges were 0.5–200 μg/L for FZD, 0.25–200 μg/L for NFT and NFZ. The limits of detection (S/N=3) were in the range of 0.068–0.11 μg/L for the three analytes. The precision of the proposed method was evaluated in terms of intra- and inter-day repeatability calculated as RSD, and it was found that the RSDs were all below 6%. The developed method was successfully applied to the determination of nitrofuran residues in animal feed and water samples. The satisfactory recoveries of the spiked target compounds were in the range of 80.6%–108%.

Key words: stir bar sorptive extraction (SBSE); monolithic material; high performance liquid chromatography (HPLC); nitrofuran residues; feed; water samples

呋喃唑酮(FZD)、呋喃妥因(NFT)和呋喃西林(NFZ)属于硝基呋喃类(NFA)抗生素,由于具有优良的药效和较长的持药性而被广泛用于饲料添加

剂、治疗药物或直接投入水体防治病害^[1,2]。近几年来发现NFA及其代谢物具有强的“三致”毒副作用,欧盟、日本、中国等国家与组织都将其列为禁用

* 通讯联系人. Tel: (0592) 2189278, E-mail: hxj@xmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21377105, 21077085); 福建省新世纪优秀人才项目.

收稿日期: 2013-10-16

药物。但有研究表明,有不法分子仍在动物饲料及饮用水中非法添加 NFA,2002-2003 年欧盟在其从葡萄牙、希腊等国进口的猪肉中检测出 NFA 及其代谢物^[3]。因此监测饲料和水样中的硝基咪唑类抗生素可以从源头上监控 NFA 的非法使用^[4,5]。目前高效液相色谱法是分析 NFA 的最常用方法^[6,7],但实际样品基底的复杂性要求样品分析前必须进行合适的前处理。固相萃取(SPE)是分析 NFA 最常用的样品前处理方法,但其操作繁琐,同时需要较多的有机溶剂^[8,9]。因此发展简便、高富集效率和环境友好的样品制备技术对 NFA 的监测具有重要意义。搅拌棒固相萃取技术(SBSE)是一种集萃取、富集、净化为一体的新型样品前处理技术,具有操作简便、溶剂使用量少、富集倍数高和环境友好等优点^[10,11]。但目前 SBSE 主要的商品化涂层——聚二甲基硅氧烷(PDMS)只能有效富集中性和弱极性化合物,而 NFA 均为强极性物质(FZD、NFT 和 NFZ 的 $\log K_{ow}$ 值分别为 -0.04、-0.47 和 0.23),因此可以预计 PDMS-SBSE 无法直接萃取 NFA。

我们在前期研究中制备了以聚(乙烯基咪唑-二乙烯基苯)(VIDB)整体材料为涂层的 SBSE,由于极性基团咪唑基的存在,VIDB-SBSE 可通过包括氢键、偶极-偶极及疏水等多重作用力对极性化合物进行有效萃取^[12,13]。因此在本研究中,利用 VIDB-SBSE 来萃取 3 种极性 NFA,同时与高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)联用,建立可对饲料和水样中 NFA 残留进行有效监测的 VIDB-SBSE-HPLC-DAD 分离分析体系。本研究还对比了其他自制的基于整体材料的 SBSE(SBSE_s)对上述 3 种 NFA 的萃取性能,并计算了目标物在这些 SBSE_s 上的分配系数。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱设备:LC-20AB 泵;CBA-20A 控制器;SPD-M20A DAD 检测器(Shimadzu, Kyoto, Japan);进样阀:7725i(Rheodyne, USA);定量阀:20 μ L。商品化搅拌棒(PDMS-SBSE):涂层材料为 PDMS,棒长 20 mm,涂层厚度 1.0 mm(Twister; Gerstel, Müllheim a/d Ruhr; Germany)。自制的基于整体材料的 SBSE 包括 VIDB-SBSE(以聚(N-乙烯基咪唑-二乙烯基苯)整体材料为涂层^[12])、VPDB-SBSE(以聚(N-乙烯基吡咯烷酮-二乙烯基苯)整体材料为涂层^[14])、VPDE-SBSE(以聚(N-乙烯基吡

啶-乙二醇二甲基丙烯酸酯)整体材料为涂层^[15])和 VPDP-SBSE(以聚(N-乙烯基邻苯亚胺-N,N-二甲基双丙烯酰胺)整体材料为涂层^[16])。这 4 种 SBSE 的棒长均为 30 mm,涂层厚度均为 1.0 mm。

FZD、NFT 和 NFZ 标准品均购自 Sigma 公司;乙腈(ACN)和甲醇(色谱纯)购自 Tedia 公司(Fairfield, USA);全部实验用水均为超纯水(Millipore, Bedford, MA, USA)。

1.2 标准溶液的配制

分别称取 2.5 mg 各标准样品,以甲醇溶解并定容于 25 mL 棕色瓶中,配制成 100 mg/L 的单标准储备液,置于 4 °C 的冰箱中保存。使用时,用甲醇为稀释液,取各单标准储备液适量,用稀释液配制所需浓度的混合标准溶液。

饲料样品购自厦门市场;实际水样采自厦门淡水养殖场,置于冰箱冷藏待用。

1.3 色谱条件

色谱分离柱:Kromasil LC-18 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:水/乙腈(体积比为 75:25)二元溶液;流速:1.0 mL/min;检测波长:366 nm;进样体积:20 μ L。

1.4 实际样品前处理

饲料样品:准确称取 1.0 g 样品于离心管中,加入 2.5 mL 乙腈,漩涡振荡混匀 5 min,然后超声提取 5 min,高速离心 10 min,取上清液。用 2.5 mL 乙腈再重复提取一次,合并两次提取液。取 1.0 mL 提取液于 250 mL 烧杯中,加入 99 mL 水,将溶液 pH 值调到 10.0,并加入 15% (质量分数)的 NaCl。放入搅拌棒以 300 r/min 的速度进行搅拌萃取 2.0 h。萃取完成后,取出搅拌棒,将其放置于 3.0 mL 乙腈中,在同样的搅拌速度下解吸 1.5 h,解吸液直接进行色谱分析。

实际水样:将水样过 0.45 μ m 滤膜,然后取 100 mL 滤液于 250 mL 烧杯中,余下步骤(调 pH,加入 NaCl,萃取,解吸)同饲料样品的处理。

1.5 目标物在整体材料涂层和水中分配系数($K_{MC/W}$)的计算

根据文献^[17],FZD、NFT 和 NFZ 的 $K_{MC/W}$ 计算如方程(1)所示。

$$K_{MC/W} = \frac{C_{MC}}{C_W} = \left[\frac{m_{MC}}{m_W} \right] \left[\frac{V_W}{V_{MC}} \right] = \beta \frac{m_{MC}}{m_W} \quad (1)$$

其中 $K_{MC/W}$ 为萃取达平衡时,目标物在整体材料涂层中的浓度(C_{MC})和水中的浓度(C_W)之比,即等于目标物在整体材料涂层中的质量(m_{MC})和水中的质量(m_W)之比与相比的乘积。在本研究中,所使

用的以整体材料为涂层的 4 根搅拌棒相比均为 1 062。

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的优化

在 SBSE 过程中,萃取和解吸时间、样品基底 pH 值和离子强度对目标物的富集性能有较大影响。为了得到 VIDB-SBSE 对 3 种 NFA 的最佳萃取条件,本研究对上述萃取条件进行了详细优化。

2.1.1 萃取和解吸时间的优化

图 1 为萃取时间对萃取效率的影响。由图 1 可见,在其他实验条件保持不变时,萃取时间在 0.5 ~ 2.0 h 之间时,随着萃取时间的增加,VIDB-SBSE 对 3 种目标物的萃取量逐渐增大,在 2.0 h 时,吸附达到平衡。因此,实验中选择 2.0 h 为最佳萃取时间。解吸时间对实验结果也有较大影响。本研究考察了解吸时间在 15 ~ 120 min 之间时解吸效果的变化,实验结果表明在 90 min 的时候,目标化合物可以从 VIDB-SBSE 中被完全解吸,因此解吸时间确定为 1.5 h。

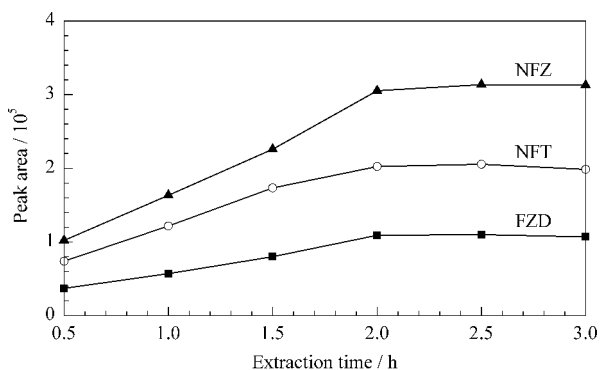


图 1 萃取时间对萃取效率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on extraction efficiency

Conditions: desorption time was 1.0 h; the pH value of sample matrix was unadjusted; no salt was added; the spiked concentration of each analyte was 50 $\mu\text{g/L}$.

2.1.2 pH 值的影响

由于硝基咪唑类药物分子结构中含有丰富的氮原子,同时整体材料结构存在着咪唑基团,因此样品基底 pH 值会影响 NFA 和咪唑基团的存在形式,从而影响 VIDB-SBSE 对 NFA 的萃取性能。在其他实验参数不变的条件下,基底 pH 值从 2.0 增加到 12.0,其对萃取效率的影响如图 2 所示。从图 2 中可以看出,当 pH 值较低时,VIDB-SBSE 主要通过疏水作用对 NFA 进行吸附,但此时 NFA 和整体材料的咪唑基团中的氮原子均被质子化而产生电荷排斥作用,因而减弱了 VIDB-SBSE 对目标物的吸附能

力。随着 pH 值的升高,质子化程度减弱,电荷排斥作用减小,因此萃取性能提高。随着 pH 值的继续增加,氮原子完全去质子化,此时除了疏水作用外,咪唑基团和 NFA 还存在着氢键和偶极-偶极作用,在多重作用力下,VIDB-SBSE 对 NFA 的萃取能力进一步增强。但当 pH 提高到 10 以上时,溶液中过多的 OH^- 严重削弱了氢键和偶极-偶极作用,导致萃取性能下降。根据实验结果,选择 10.0 为最优 pH 值。

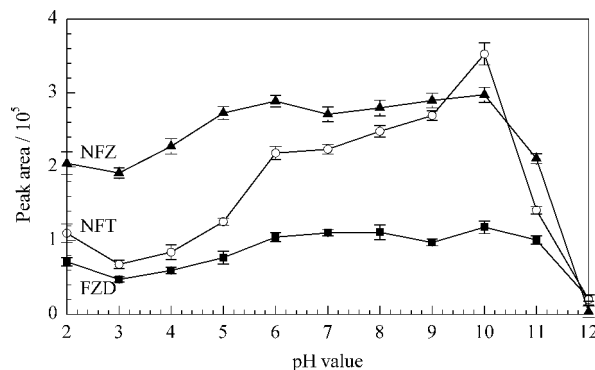


图 2 样品 pH 值对萃取效率的影响

Fig. 2 Effect of pH value of sample matrix on extraction efficiency

Conditions: extraction and desorption times were 2.0 h and 1.5 h, respectively; no salt was added; the spiked concentration of each analyte was 50 $\mu\text{g/L}$, and the sample pH values were adjusted by 0.1 mol/L HCl or 0.1 mol/L NaOH.

The symbols are the same as in Fig. 1.

2.1.3 离子强度的影响

根据文献^[14-17],对于极性化合物的萃取,由于存在盐析作用及静电相互作用,因此离子强度对萃取效率有很大影响。本实验通过添加不同量的 NaCl 来改变基底的离子强度,添加量从 0 到 35% (质量分数) (0%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 和 35%)。从图 3 可以看出,当 NaCl 含量为 15% 时,VIDB-SBSE 对目标物的萃取性能均达到最大值,因此选择 15% 为最佳的 NaCl 添加量。

综合实验结果,VIDB-SBSE 对 3 种 NFA 的最佳萃取条件为:吸附 2.0 h,解吸 1.5 h,基底 pH 值调为 10.0,NaCl 的含量为 15%。

2.2 与其他 SBSE 的对比

在最佳萃取条件下,VIDB-SBSE 对 FZD、NFT 和 NFZ 显示出理想的萃取性能。从图 4 可以看出,与加标水样富集前(图 4a)相比,经过 VIDB-SBSE 富集后,3 种目标物的色谱峰明显增高(图 4c),VIDB-SBSE 对 FZD、NFT 和 NFZ 的富集效率分别为 76.5%、82.2% 和 80.1%,而商品化的 PDMS-SBSE 则对目标物没有富集效果(图 4b)。

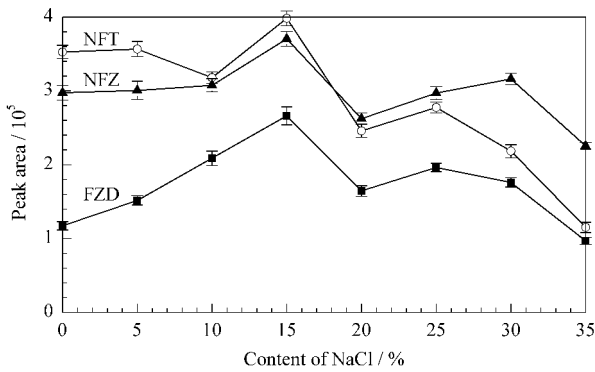


图 3 离子强度对萃取效率的影响

Fig. 3 Effect of ionic strength in sample matrix on extraction efficiency

Conditions: pH value was adjusted to 10.0. The other conditions were the same as in Fig. 2.

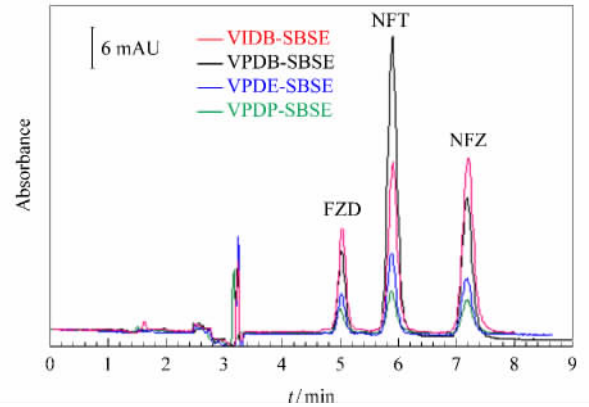


图 5 不同 SBSEMs 富集 3 种硝基咪唑类药物后的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of FZD, NFT and NFZ after enrichment with different SBSEMs

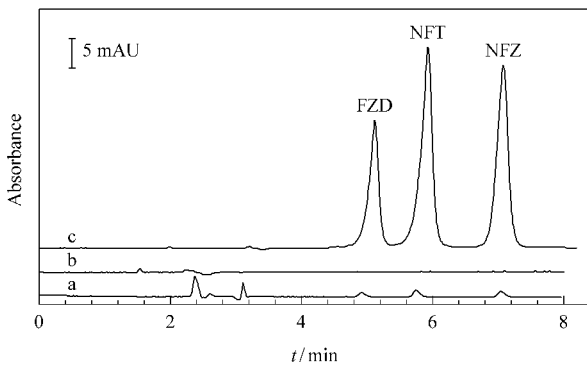


图 4 3 种硝基咪唑类药物经 VIDB-SBSE 和 PDMS-SBSE 萃取后的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of FZD, NFT and NFZ after enrichment with VIDB-SBSE and PDMS-SBSE

a. direct injection of spiked water sample with each analyte at 50 $\mu\text{g/L}$; b. spiked water sample with each analyte at 50 $\mu\text{g/L}$ and treated with PDMS-SBSE; c. spiked water sample with each analyte at 50 $\mu\text{g/L}$ and treated with VIDB-SBSE.

图 5 为自制的不同 SBSEMs 对 FZD、NFT 和 NFZ 萃取性能比较, 从图 5 中可见, 不同 SBSEMs 对

FZD、NFT 和 NFZ 有不同的萃取性能。VIDB-SBSE 对 FZD 和 NFZ 的萃取性能优于其他 3 种 SBSEMs, 而 VPDB-SBSE 则对 NFT 有最高吸附能力, 这说明不同涂层的 SBSE 对不同化合物具有不同的萃取性能。表 1 列出了咪唑啉酮、咪唑啉酮和咪唑啉酮西林在不同 SBSEMs 上的分配系数, 分配系数越大, 说明该 SBSE 对目标物的吸附能力越强。表 1 数据表明, 3 种目标物在 4 种 SBSEMs 的 K 值均高于 $K_{\text{PDMS/W}}$, 说明这 4 种自制的 SBSEMs 对 3 种目标物的吸附能力均优于商品化的 PDMS-SBSE, 其原因主要是这几种 SBSEMs 涂层中含有极性基团和疏水基团, 因此可通过多重作用力对 NFA 进行有效萃取, 而 PDMS-SBSE 则只能通过较弱的疏水作用萃取目标物, 因此萃取性能较低。

2.3 标准工作曲线的制作

用标准储备液配制不同浓度梯度的溶液, 在最佳萃取条件下, 考察方法的线性范围、相关系数、检出限、定量限及日内和日间重复性, 结果见表 2。

表 1 咪唑啉酮、咪唑啉酮和咪唑啉酮西林在不同 SBSEMs 上的分配系数

Table 1 Distribution coefficients (K) of FZD, NFT and NFZ on different SBSEMs

Compound	$\log K_{\text{VIDB/W}}$	$\log K_{\text{VPDB/W}}$	$\log K_{\text{VPDE/W}}$	$\log K_{\text{VPDP/W}}$	$\log K_{\text{PDMS/W}}$
FZD	2.56	2.32	2.01	1.59	-0.04
NFT	3.12	3.55	2.64	1.98	-0.47
NFZ	2.88	2.66	2.31	1.76	0.23

表 2 3 种 NFA 的线性范围、线性相关系数 (R^2)、检出限、定量限、萃取效率及日内和日间重复性

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients (R^2), LODs and LOQs, extraction efficiencies, inter-day and intra-day precisions achieved for the three NFA

Compound	Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	R^2	LOD ^{a)} / ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ^{b)} / ($\mu\text{g/L}$)	Extraction efficiency /%	RSDs /%	
						Intra-day ^{c)} (n = 3)	Inter-day ^{c)} (n = 4)
FZD	0.5 - 200	0.9992	0.11	0.36	88.6	3.56	4.05
NFT	0.25 - 200	0.9947	0.068	0.22	75.5	2.13	5.01
NFZ	0.25 - 200	0.9990	0.074	0.24	90.8	3.28	5.23

a) $S/N = 3$; b) $S/N = 10$; c) assays at 50 $\mu\text{g/L}$ level.

从表 2 中的数据可知,呋喃唑酮的线性范围为 0.5 ~ 200 $\mu\text{g/L}$,呋喃妥因和呋喃西林的线性范围为 0.25 ~ 200 $\mu\text{g/L}$,3 种目标化合物均具有良好的线性关系 ($R^2 > 0.99$)。同时研究取得了与 MS 检测^[18,19]在同一级别的灵敏度,其 LOD 在 0.068 ~ 0.11 $\mu\text{g/L}$ 之间,LOQ 在 0.22 ~ 0.36 $\mu\text{g/L}$ 之间,所建方法的日内和日间的实验重复性良好 (RSD < 6%)。表明本方法具有较高的灵敏度和重复性。

2.4 实际样品测定及加标回收率试验

将所建的 VIDB-SBSE-HPLC-DAD 方法用于饲

料和实际水样中 NFA 的测定,其结果如表 3 所示。结果表明,在一个水样中测得低浓度的 NFT,而饲料样品均未检出 NFA。实际样品中复杂基底可能对萃取效率产生影响,为了考察所建立的方法用于实际样品中 3 种 NFA 物质测定的可行性,测定了饲料和实际水样中不同加标量的回收率。从表 3 可以看出,对于两种不同质量浓度加标量 (5.0 和 100 $\mu\text{g/L}$) 在不同饲料和水样中均取得了理想的回收率,3 种目标物的回收率在 80.6% ~ 108% 之间。同时实验重现性良好,所有 RSD 值均小于 10%。

表 3 实际饲料和水样中 3 种目标物的测定结果及加标回收率 ($n=3$)

Table 3 Results of determination and recoveries of water and feed samples spiked with the three target analytes ($n=3$)

Sample	Spiked/($\mu\text{g/L}$)	Detected/($\mu\text{g/L}$)			Recoveries (RSDs) /%		
		FZD	NFT	NFZ	FZD	NFT	NFZ
Water sample 1	0.0	ND	ND	ND			
	5.0	4.07	4.61	4.03	81.4 (3.1)	92.1 (1.7)	80.6 (7.2)
	100.0	82.1	84.6	86.8	82.1 (3.1)	84.6 (1.8)	86.8 (8.4)
Water sample 2	0.0	ND	1.10	ND			
	5.0	4.21	5.50	4.41	84.1 (3.6)	88.0 (3.0)	88.1 (2.5)
	100.0	82.9	90.0	86.1	82.9 (2.3)	88.9 (4.6)	86.1 (2.6)
Feed sample 1	0.0	ND	ND	ND			
	5.0	4.27	4.12	4.16	85.4 (8.5)	82.5 (6.0)	83.2 (9.9)
	100.0	91.1	83.7	96.9	91.1 (6.3)	83.7 (5.2)	96.9 (7.0)
Feed sample 2	0.0	ND	ND	ND			
	5.0	4.31	4.26	4.48	86.1 (5.6)	85.1 (3.6)	89.6 (5.9)
	100.0	91.6	92.6	108	91.6 (6.8)	92.6 (3.3)	108 (6.5)

3 结论

本研究利用自制的以聚(*N*-乙烯基咪唑-二乙烯基苯)整体材料为涂层的 SBSE 萃取饲料和水样中的 3 种硝基呋喃类化合物,由于萃取介质可与目标物产生多种作用力,因此 VIDB-SBSE 可对 3 种目标物进行直接有效萃取。在此基础上,建立了可对实际饲料和水样中硝基呋喃类药物进行有效监测的 VIDB-SBSE-HPLC-DAD 分离分析方法。研究结果表明,所建方法具有萃取效率高、操作简便、检出限低、重现性好、环境友好等特点。

参考文献:

[1] Leitner A, Zollner P, Lindner W. J Chromatogr A, 2001, 939: 49
 [2] Yuan Z H. Feed Drug. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2001: 174
 [3] Diblikova I, Cooper K M, Kennedy D G, et al. Anal Chim Acta, 2005, 540: 285
 [4] Nora M, Angelini O D, Rampin B, et al. J AOAC Int, 1997, 80(3): 481
 [5] Laurensen J J, Nouws J F M. J Chromatogr, 1989, 471: 321
 [6] Wang C X, Huang F, Wang M, et al. Chinese Journal of Chromatography (王传现, 黄帆, 王敏, 等. 色谱), 2013, 31(3):

46
 [7] Wang Y, Cai Y Q, Jia D F, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (王媛, 蔡友琼, 贾东芬, 等. 分析试验室), 2009, 28(12): 86
 [8] Wang J R, Zhang L Y. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2006, 29: 377
 [9] Xia X, Li X W, Zhang S X, et al. J Chromatogr A, 2008, 1208: 101
 [10] Baltussen E, Sandra P, David F, et al. J Microcolumn Sep, 1999, 11: 737
 [11] Huertas C, Morillo J, Usero J, et al. Talanta, 2007, 72: 1149
 [12] Huang X J, Qiu N N, Yuan D X. J Chromatogr A, 2009, 1216: 8240
 [13] Huang X J, Chen L L, Lin F H, et al. J Sep Sci, 2011, 34: 2145
 [14] Huang X J, Qiu N N, Yuan D X, et al. Talanta, 2009, 78: 101
 [15] Huang X J, Qiu N N, Yuan D X. J Chromatogr A, 2008, 1194: 134
 [16] Huang X J, Chen L L, Yuan D X, et al. J Sep Sci, 2011, 34: 3481
 [17] Neng N R, Pinto M L, Pires J, et al. J Chromatogr A, 2007, 1171: 8
 [18] Szilagyi S, de la Calle B. Anal Chim Acta, 2006, 572: 113
 [19] Valera-Tarifa N M, Plaza-Bolanos P, Romero-Gonzalez R, et al. J Food Composition Anal, 2013, 30(2): 86