

热敏型可修复分子印迹固相微萃取纤维的制备及其应用

郭跃龙¹, 吴丹², 郑枫², 纪顺利^{2*}

(¹江苏省省级机关医院药剂科,南京 210024; ²中国药科大学药物分析教研室,南京 210009)

摘要 以螺旋霉素为模板分子,甲基丙烯酸和N-异丙基丙烯酰胺为功能单体,乙二醇甲基丙烯酸酯为交联剂,硅烷化的石英毛细管为载体合成了具有热敏型、可修复的分子印迹固相微萃取纤维。通过扫描电镜和氮气吸附/脱附对制备的分子印迹固相微萃取纤维进行表征,并对影响萃取效果的参数进行了优化。分子印迹固相微萃取纤维对大环内酯类抗生素具有高选择性和灵敏性,与高效液相色谱联用可对食品基质中的螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、交沙霉素4种大环内酯类抗生素进行定量分析,在0.5~50 μg/mL范围内,色谱峰面积与浓度呈良好的线性关系,样品在3种不同添加水平下的加标回收率在81.8%~119.1%之间,日间精密度均小于13.8%(n=6),日内精密度均小于15.5%(n=3)。

关键词 分子印迹;固相微萃取纤维;高效液相色谱;大环内酯类抗生素

中图分类号 R917;O658 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)06-0702-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200609

引用本文 郭跃龙,吴丹,郑枫,等.热敏型可修复分子印迹固相微萃取纤维的制备及其应用[J].中国药科大学学报,2020,51(6):702-710.

Cite this article as: GUO Yuelong, WU Dan, ZHENG Feng, et al. Preparation and application of thermosensitive and repairable molecularly imprinted solid phase microextraction fiber[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(6): 702-710.

Preparation and application of thermosensitive and repairable molecularly imprinted solid phase microextraction fiber

GUO Yuelong¹, WU Dan², ZHENG Feng², JI Shunli^{2*}

¹Department of Pharmacy, Jiangsu Province Official Hospital, Nanjing 210024;

²School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In this study, thermosensitive and repairable molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers were synthesized using spiramycin as template molecule, methacrylic acid and N-isopropylacrylamide as functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking agent, and silanized quartz capillary as carrier. The prepared molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers were characterized by scanning electron microscope and nitrogen adsorption/desorption, and various parameters affecting the extraction efficiency were optimized. Due to high selectivity and sensitivity of the fibers for macrolide antibiotics, the quantitative analysis of four macrolide antibiotics in food matrix, spiramycin, tilmicosin, tylosin, and josamycin, was performed in combination with high performance liquid chromatography. In the range of 0.5 to 50 μg/mL, the chromatographic peak area showed a good linear relationship with the concentration. The spike recoveries of the samples at three different addition levels were between 81.8% and 119.1%; the inter-day precisions were less than 13.8% (n=6), and the intra-day precisions were less than 15.5% (n=3).

Key words molecularly imprinting; solid phase microextraction fiber; high performance liquid chromatography; macrolide antibiotics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81703472), and the Fundamental Research

收稿日期 2020-04-23 *通信作者 Tel:17715279164 E-mail:jishunli_sx@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81703472);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. 2632020ZD05)

Funds for the Central Universities (No. 2632020ZD05)

大环内酯类抗生素 (macrolides antibiotics, MACs) 是一类分子结构中具有 12~16 碳内酯环的药物总称, 主要用于治疗需氧革兰阳性球菌和革兰阴性球菌感染所引发的疾病^[1], 不良反应包括消化道症状、肝毒性、心脏毒性等。日常生产生活中, 抗生素常被添加到饲料中促进动物生长, 部分没有代谢的抗生素最终在人体内蓄积, 进而影响人体健康。许多国家的监管机构都制定了食品基质中 MACs 的最大残留限定 (MRLs), 因此, 开发快速有效的食品基质中 MACs 的定量检测技术非常必要。

MACs 结构中缺乏发色团, 紫外响应弱, 不能使用紫外检测器对含量低的样品直接定量检测^[2]; 此外, 食品基质复杂, 可能会干扰目标物的检测。为富集目标物以及屏蔽基质干扰, 需要开发合适的样品前处理方法。常用的样品前处理方法有固相萃取^[3-4]、基质分散固相萃取^[5]、QuEChERS^[6] 和固相微萃取 (SPME) 等。其中, SPME 是一种集采样、萃取和浓缩于一体的方法, 适用于痕量化合物的提取和净化。SPME 的核心在于萃取头, 传统萃取头以非特异性吸附为主, 选择性、热稳定性和化学稳定性差, 因此制备可重复利用、具有良好选择性和稳定性的新型涂层材料是非常值得关注的。

分子印迹聚合物 (molecular imprinting polymer, MIPs) 是一种稳定性高、具有特异识别功能的新材料, 可通过模板分子和功能单体与交联剂聚合而获得。聚合后移除模板分子, 会留下特定的空穴, 可以根据大小、形状和功能基团选择性地“锁定”并富集目标化合物, 适用于各种复杂样品的前处理。近年来, 报道了多种分子印迹材料对食品样品中的红霉素或替米考星进行选择性富集的材料, 诸如磁性分子印迹聚合物^[5]、固相萃取^[7] 和固相微萃取 (SPME)^[8] 等。但目前尚无有关热敏型、可修复的分子印迹固相微萃取纤维 (MIP-fibers) 制备方法的报道。本研究以螺旋霉素为模板分子, *N*-异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇甲基丙烯酸酯为交联剂, 硅烷化的石英毛细管为载体合成了具有热敏型、可修复的、能够特异性识别 MACs 的 MIP-fibers, 并用其同时检测食品基质中多种 MACs。

1 材 料

1.1 试 剂

替米考星 (TILM)、螺旋霉素 (SPI)、交沙霉素 (JOS)、泰乐菌素 (TYL) (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 阿奇霉素 (AZI)、克拉霉素 (CLA)、罗红霉素 (ROX) (中国食品药品检定研究院); 磺胺嘧啶 (美国 Alfa Aesar 公司); 盐酸土霉素、恩诺沙星、偶氮二异丁腈 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷 (美国 Acros 公司); *N*-异丙基丙烯酰胺 (上海麦克林生化科技有限公司); 甲基丙烯酸 (MAA)、4-乙烯基吡啶、丙烯酰胺、乙二醇甲基丙烯酸酯 (中国上海阿拉丁试剂有限公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。实验用水由 Milli-R04 净化系统 (美国 Millipore 公司) 制得。

1.2 仪 器

Alliance 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); FESEM NOVA NanoSEM450 扫描电子显微镜 (美国 FEI 公司); TriStar^{II} 3020TM 比表面积和孔体积分析仪 (美国 Micromeritic 公司)。

2 方 法

2.1 溶液配制

准确称取适量 7 种 MACs 标准品, 用甲醇-水 (20:80) 溶解并定容, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液, 于 4 ℃ 冰箱中保存, 在使用前用 20 mmol/L K₂HPO₄ 溶液 (pH 7.4) 稀释定容制成混合标准工作液。恩诺沙星、磺胺嘧啶和盐酸土霉素除用甲醇溶解外, 其余处理方法均与 MACs 相同。

2.2 MIP-fibers 的制备

截取长约 4 cm 的石英毛细管 (50 μm × 365 μm), 火烧去除一半长度的外壁保护层。将毛细管依次浸泡在 1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 溶液中、去离子水洗至中性后氮气吹干。毛细管硅烷化过程参照文献[9]中方法: 将上述毛细管浸泡在 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷-丙酮 (1:9) 溶液中 2 h 后, 100 ℃ 下干燥 2 h。

热敏型 MIP-fiber 参照文献[10] 中的最佳实验条件制得: 称取 SPI 0.1 mmol、甲基丙烯酸 0.42

mmol、*N*-异丙基丙烯酰胺 0.4 mmol 溶于二甲基亚砜-氯仿(1:2)溶液 3 mL 中, 混合均匀后加入乙二醇甲基丙烯酸酯 2 mmol 和偶氮二异丁腈 10 mg, 即得预聚合物溶液。将毛细管硅烷化的一端插入 2 cm 长的玻璃管(0.9~1.1 mm)后, 放进 4 mL 的离心管中, 加入制备好的预聚合物溶液, 60 °C 水浴条件下反应 24 h。待反应结束后, 将毛细管从玻璃管中推出, 即得 MIP-fiber。将 MIP-fiber 浸入乙酸-甲醇(1:4)中, 涡旋 5 min 后去除模板分子后保存在甲醇中, 待后续实验使用。

非印迹固相微萃取纤维(NIP-fiber)的制备过程中不加入 SPI, 其余合成步骤与 MIP-fiber 相同。

2.3 色谱条件

MACs 是一种碱性抗生素, 用普通的 C₁₈ 色谱柱通常会出现拖尾现象, 因此选用表面带正电荷的 Acchrom XCharger-C₁₈ 型反相色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)来解决该问题。流动相: 乙腈(A), 0.02% 磷酸水溶液(B); 梯度洗脱程序: 0~9 min, A 相从 5% 到 44%; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 通道 1(283 nm), 通道 2(232 nm), 如图 1。

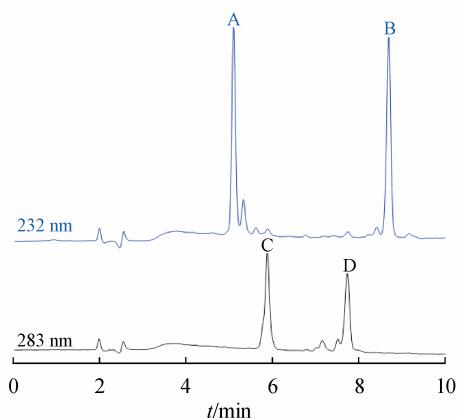


Figure 1 Separation of 4 macrolides antibiotics (MACs)
A: Spiramycin (SPI); B: Josamycin (JOS); C: Tilmicosin (TILM); D: Tylosin (TYL)

2.4 样品预处理

用 4 种不同来源的蜂蜜样品来评价 MIP-fiber 的富集效果, 选择洋槐花蜂蜜作为空白样品(经检测该蜂蜜不含目标抗生素)。样品预处理方法如下: 称取空白样品 2 g(精确至 0.01 g), 置于 10 mL 离心管中, 加入 20 mmol/L K₂HPO₄(pH 7.4)缓冲溶液 5 mL, 充分涡旋混合 30 s 后, 以 4 500 r/min 离心

10 min, 收集上清液, 作为 SPME 上样液。

2.5 净化

净化流程如图 2 所示: 将制备好的萃取纤维(MIP-fiber 或 NIP-fiber)浸没在样品溶液中, 500 r/min 下搅拌 60 min。然后将纤维取出, 用乙腈-水(1:4)1.5 mL 淋洗, 最后采用涡旋法 45 °C 条件下洗脱 2 min, 洗脱液为乙酸-乙腈(1:4)1.5 mL。洗脱液氮气吹干后, 用甲醇-水(1:4)200 μL 复溶, 进行紫外检测。

3 结果与讨论

3.1 去除模板分子

去除模板分子是制备分子印迹材料中最关键的一步, 但是通常存在耗时较长和难去除彻底的问题, 为此, 以甲醇-乙酸(8:1)作为洗脱液, 测试了两种不同的去模板方法。(1)振荡法: 将 3~5 根 MIP-fiber 放进加有洗脱液的离心管中, 以 200 r/min 的条件振荡 24 h, 每 8 h 更换一次洗脱液。该方法可有效去除 SPI, 但所需时间长, 在振荡过程中纤维之间的摩擦容易造成 MIP 材料的损失。(2)涡旋法: 采用相同的洗脱液涡旋洗脱 5 min, 重复该洗脱过程直至无模板被检出。采用该方法使得萃取纤维在洗脱液中高速旋转, 可快速去除模板分子且不会损失涂层材料, 所以选择涡旋法去除模板分子。

3.2 MIP-fibers 制备条件的优化

分别以 MAA、丙烯酰胺(AM)、4-乙烯基吡啶(4-VP)为功能单体, 改变模板与功能单体之间的物质的量比制备 5 种 MIP-fibers, 将制得的 MIP-fibers 分别放入 20 μg/mL SPI 溶液 5.0 mL 中, 45 °C 水浴条件下萃取 120 min 后使用高效液相色谱法测定溶液中 SPI 的浓度, 结果如表 1 所示, 可以看出 MAA 作为单体时的吸附能力最强; 模板分子与 MAA 的物质的量比为 1:4.2 时达到最大吸附量 82.5%。

3.3 表征

图 3-A 为 MIP 反应前后毛细管的对比照片, 经 MIP 反应后, 毛细管外可见均匀的印迹聚合物涂层。MIP-fiber 和 NIP-fiber 的扫描电子显微镜照片(SEM)如图 3 所示, 相较于 NIP(图 3-C), MIP(图 3-B)具有更多的孔隙结构和更高的交联度, 因此具有更大的表面积, 从而有较高的吸附容量。MIP-

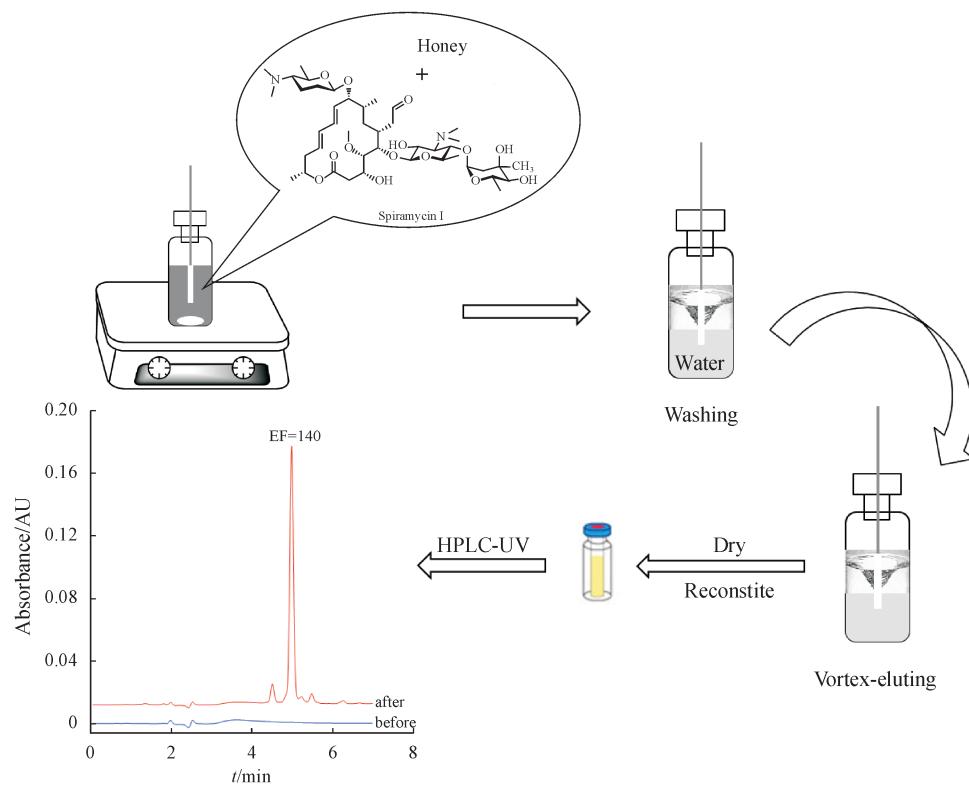


Figure 2 Purification process of sample

Table 1 Optimization of functional monomer

Functional monomer	<i>n</i> (template): <i>n</i> (functional monomer)	Adsorption capacity/%
AM	1:4.2	5.7
4-VP	1:4.2	5.1
MAA	1:1.2	42.6
MAA	1:2.4	58.1
MAA	1:4.2	82.5

AM:Acrylamide;4-VP:-Vinylpyridine;MAA:Methacrylic acid

fiber 干燥状态下的 SEM 如图 3-D 所示, 可以观察到许多断层, 说明聚合物材料在干燥环境和溶液中的柔韧性不同, 这与实际应用过程中发现的现象是一致的。有趣的是将干燥后断裂的 MIP-fibers 浸泡在甲醇溶液中一段时间后, 纤维上的断层消失, 恢复到刚制备出来的形态。因此, 判断 MIP-fibers 有自修复功能。

采用氮气吸附孔隙度测定法测定 MIP/NIP 材料的比表面积和孔容, MIP、NIP 的比表面积分别为 130.928、1.761 m^2/g , 孔容分别为 0.294、0.017 cm^3/g 。与 SEM 检测所得到的结果相同, MIP 材料的比表面积远远大于 MIP 材料, 这充分说明所制备的 MIP-fiber 非常适合于样品前处理。

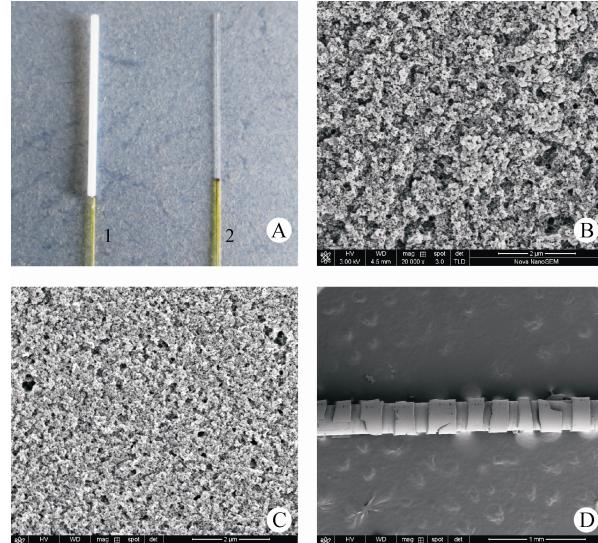


Figure 3 Photographs and SEM images of molecular imprinting polymer(MIP)-fiber and non-imprinting polymers (NIP)-fiber

A:Fibers after molecular imprinting (1) and before molecular imprinting (2);B:Morphology of MIP-fiber;C:Morphology of NIP-fiber;D:SEM image of MIP-fiber in dry condition

3.4 静态吸附和吸附动力学实验

吸附容量和速率是影响固相微萃取吸附剂性能的重要因素。

3.4.1 静态吸附实验 分别将一根 MIP-fiber/NIP-fiber 放入装有 30~900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPI 溶液 5 mL 的离心管中, 密封后 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下搅拌 24 h。HPLC-UV 测定溶液中 SPI 的残留量, 并根据公式(1)计算 MIP-fiber/NIP-fiber 吸附容量。

$$Q = \frac{(c - c_i)V}{m} \quad (1)$$

其中: c (mg/mL)、 c_i (mg/mL) 分别代表 SPI 初始、结束时的质量浓度; V (mL) 代表样品体积; m (g) 代表涂层质量。

得到结果如图 4-A 所示, 在 SPI 浓度较低时二

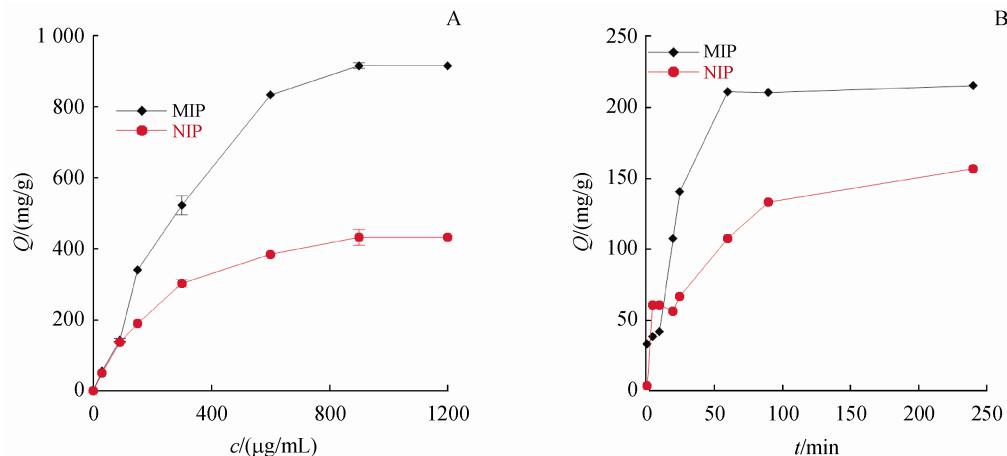


Figure 4 Adsorption isotherms (A) and adsorption kinetic (B) curves of SPI on MIP-fibers and NIP-fibers ($n=3$)

3.5 萃取条件的考察

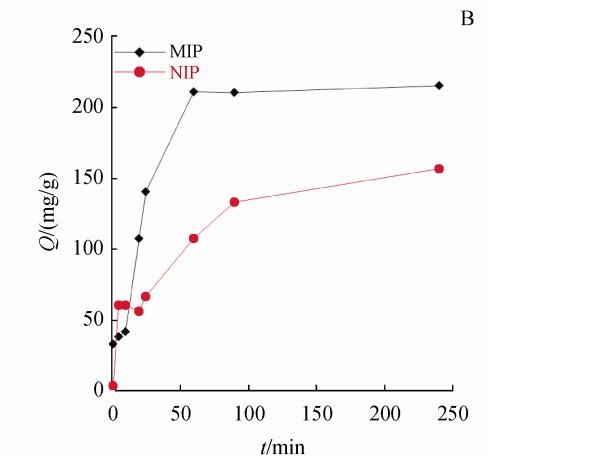
固相萃取通常包括萃取、淋洗和洗脱 3 步, 为了得到最佳富集效果, 本研究对几个可能影响萃取效率的参数进行了优化。除特殊说明外, 其他样品处理及固相微萃取条件均采用“2.4”和“2.5”项中方法, 并重复操作 3 次。

3.5.1 温度的影响 由于 N -异丙基丙烯酰胺和 MAA 的加入, 使得 MIP-fiber 同时具有 pH 和温度响应的立体选择性。其根本原因为温度会改变 MIP 聚合物内部孔道的大小, 使得 MIP-fiber 在较低温度下膨胀, 在较高温度下收缩, 从而与目标化合物的匹配程度不同。为此研究了 MIP-fiber 在不同温度下对 4 种 MACs 的吸附情况, 结果如图 5-A 所示, 验证了以上结论, 同时在 45 $^{\circ}\text{C}$ 时 MIP-fiber 与模板分子 SPI 的匹配程度最高, 因此在后续试验中采取 45 $^{\circ}\text{C}$ 作为萃取温度。

3.5.2 pH 的影响 蜂蜜溶液的 pH 在 3 附近, 因此本实验选择 pH 为 3~10 的 K_2HPO_4 缓冲盐溶液

者差异很小, 随着初始溶液中 SPI 浓度的增加, 二者的吸附量都有所提高, 但是 MIP-fiber 比 NIP-fiber 提高得更明显, 表明 MIP-fiber 的吸附性能优于 NIP-fiber。

3.4.2 吸附动力学实验 将一根 MIP-fiber/NIP-fiber 放入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPI 溶液 25.0 mL 中, 密封后 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下搅拌 240 min, 分别在 1、5、10、15、20、25、60、90 和 240 min 时进行取样, 检测 SPI 的浓度。得到结果如图 4-B 所示, MIP-fiber 在 60 min 内达到吸附平衡, NIP-fiber 在 240 min 后仍未达到吸附平衡, 表明 MIP-fiber 具有更稳定的吸附性能。



(20 mmol/L) 对蜂蜜进行稀释后进行萃取, 结果如图 5-B 所示。萃取体系 pH 逐渐升高, 4 种 MACs 的萃取效率均呈现“先升后降”趋势, 并在 pH 7.4 时达到最高, 因此, 后续实验中, 使用 pH 为 7.4 的 K_2HPO_4 溶液作为蜂蜜的稀释溶液。

3.5.3 淋洗条件 良好的淋洗溶液可以在不影响目标物回收率的前提下洗去非特异性保留的物质, 从而达到屏蔽基质及其他杂质干扰的目的。本研究使用 4 种不同的淋洗溶液, 结果如图 5-C 所示, 4 种淋洗溶液均会对目标物造成一定的损失, 但去离子水和乙腈淋洗后损失较少, 分别损失 0.15% 和 4.46%。因此进一步研究了乙腈与水不同比例时对 MACs 回收率的影响, 发现乙腈-水 (1:4) 溶液能有效消除基质干扰, 且无 MACs 的损失。最终选择乙腈-水 (1:4) 作为后续实验的淋洗溶剂。

3.5.4 洗脱条件 为了尽量将目标物完全洗脱, 从而得到满意的回收率, 对洗脱溶液的种类及比例进行了考察。选取甲醇、丙酮、乙醇和乙腈 4 种

洗脱溶液, 结果发现使用乙腈溶液进行洗脱效果最好; 进一步考察了乙腈中乙酸比例的影响, 洗脱液中待测物峰面积如图 5-D 所示, 乙酸含量在

0%~20% 之间时, 增加乙酸用量可提高洗脱效果, 并在 20% 时达到最大值, 因此选择乙酸-乙腈(1:4) 作为后续实验的洗脱溶液。

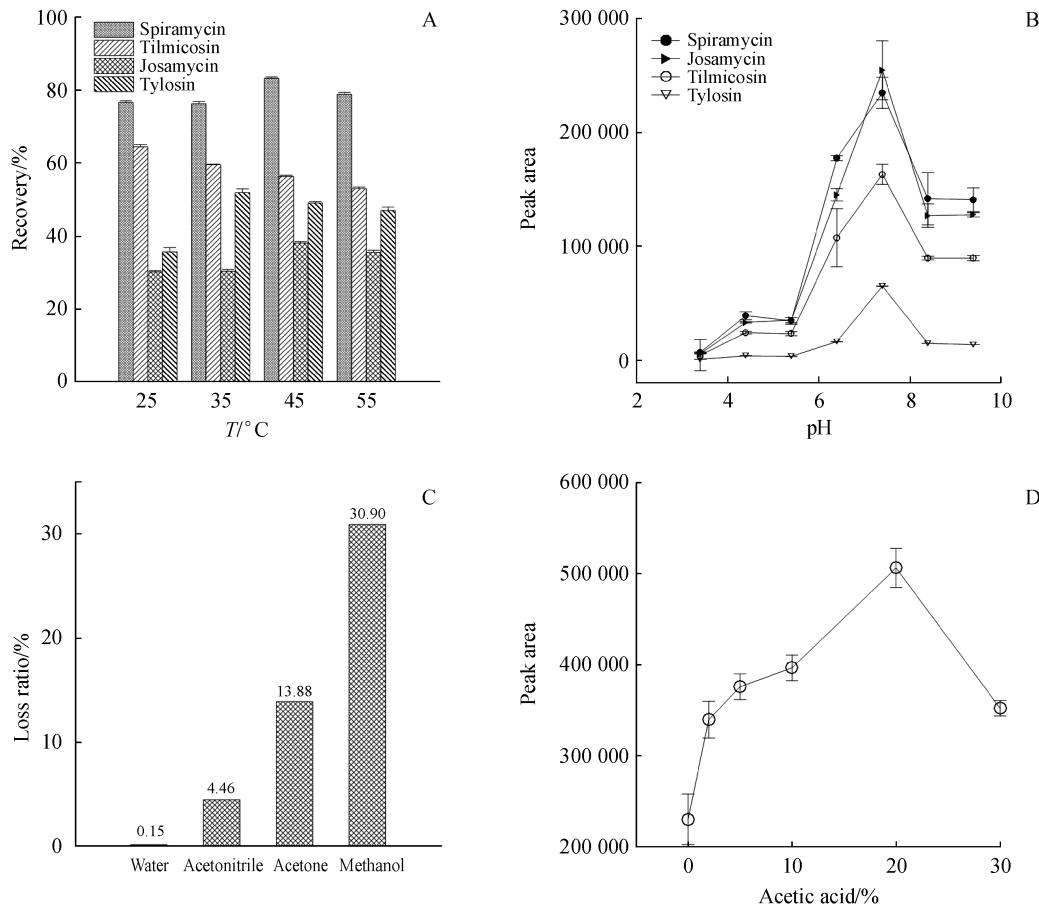


Figure 5 Effect of temperature (A), pH(B), eluent (C) and percentage of acetic acid (D) on solid-phase microextraction (SPME) efficiency ($n=3$)

3.6 富集倍数测定

固相微萃取的富集原理是目标物在样品基质和吸附层之间达到分配平衡, 因此溶液中目标物的质量浓度会影响萃取效率。本研究控制 SPI 总量为 10 μ g, 配制体积分别为 5、20、200 mL 3 种不同质量浓度的溶液, 探究在不同质量浓度下 MIP-fiber/NIP-fiber 对目标物的富集效果, 目标分子的富集因子 EF 通过公式(2)计算得到:

$$EF = \frac{A_1 \times c_0}{A_0 \times c_1} \quad (2)$$

其中: c_0 和 c_1 分别为标准溶液直接进样的质量浓度及富集前样品溶液的质量浓度; A_0 和 A_1 分别为直接进样得到的峰面积及富集后的峰面积大小。

结果见图 6, 可以看出 MIP-fiber 对 MACs 具有较好的富集浓缩能力, 尤其是在低浓度条件下,

MIP-fiber 的富集效果明显优于 NIP-fiber。

3.7 选择性实验

为了验证 MIP-fiber 可以对 MACs 进行特异性选择, 选取 SPI 和蜂蜜中常被检测到的 3 类非大环内酯类抗生素(磺胺嘧啶、恩诺沙星、盐酸土霉素)添加到基质中进行测试。3 类非大环内酯类抗生素的浓度均为 5 mg/kg, SPI 的浓度为 0.5 mg/kg。实验结果如图 7 所示, 使用 MIP-fiber 富集后, 3 种非大环内酯类抗生素峰响应不升反降, 说明 MIP-fiber 对以上干扰物几乎无富集作用, 但对 SPI 的富集效果非常好。在某种程度上确认了 MIP-fiber 上存在特异性识别位点, 可以选择性富集目标物、降低杂质效应、排除基质干扰。

3.8 线性范围与检出限

为了验证 MIP-HPLC-UV 检测方法的可行性,

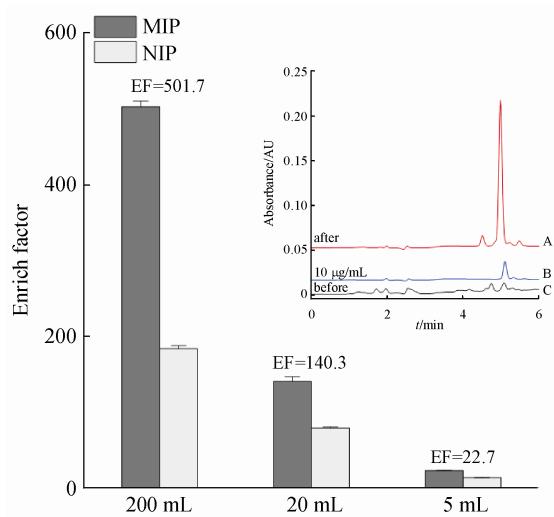


Figure 6 Effects of loading volume on the extraction efficiency
Inset: Chromatogram of (A) injection after SPME treatment (5 mL of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spiramycin standard solution with 2 g honey sample),(B) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spiramycin standard solution, and (C) direct injection without SPME treatment (5 mL of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spiramycin standard solution with 2 g honey sample)

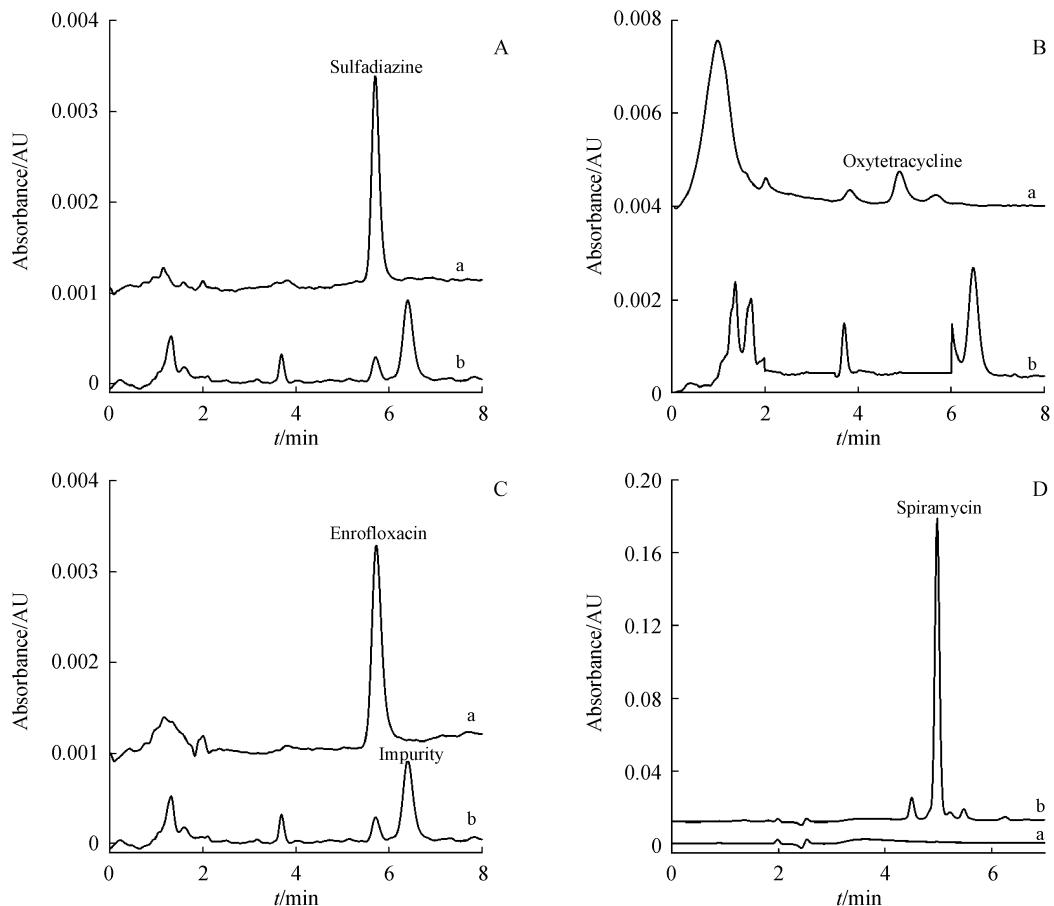


Figure 7 Selectivity of MIP-fibers to non-macrolide antibiotics and macrolide antibiotic
A:Enrofloxacin;B:Oxytetracycline hydrochloride;C:Sulfadiazine;D:Spiramycin (a is direct injection and b is the eluted fraction after SPME treatment)

在蜂蜜样品中制备一系列含不同浓度的SPI、JOS、TYL和TILM的基质匹配混合标准溶液。如表2所示,在0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的线性范围内,该方法对4种MACs均表现出良好的线性,相关系数 r^2 高于0.99。在抗生素残留分析中,方法的灵敏度通常表示为检测限(LOD)和定量限(LOQ)。在这项研究中,以特征色谱峰的信噪比 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ 分别为方法的LOD和LOQ,4种MACs的LOD范围为23.8~85.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而LOQ范围为79.2~284.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.9 方法应用

采用MIP-HPLC-UV法对当地购买的蜂蜜样品进行检测,4种蜂蜜中均未检测到MACs。为了验证检测方法的正确性,本研究在蜂蜜样品中进行1.25、12.5和125 mg/kg 3个浓度的加标试验,结果如表3所示,目标化合物的回收率(81.8%~119.1%)较好,日间精密度小于13.8%($n=6$),日内精密度小于15.5%($n=3$),回收率高、重复性好,可用于蜂蜜样品中MACs的测定。

Table 2 Linear range, LODs and LOQs of MACs by HPLC-UV ($n=3$)

Compound	Linear equations	Linear range/ ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)
SPI	$y = 42.472x + 183.484$	0.5–50	0.990 7	79.2	23.8
TILM	$y = 48.583x + 121.621$	0.5–50	0.992 7	109.2	32.8
JOS	$y = 62.830x + 133.823$	0.5–50	0.992 2	130.7	39.2
TYL	$y = 17.493x + 35.809$	0.5–50	0.993 2	284.5	85.4

SPI:Spiramycin;TILM:Tilmicosin;JOS:Josamycin;TYL:Tylosin

Table 3 Precision and reproducibility of MACs

Compound	Spiked level/ ($\mu\text{g/kg}$)	Inter-day ($n=3$)		Intra-day ($n=6$)	
		Recovery/%	RSD	Recovery/%	RSD
SPI	1.25	87.4	11.9	99.5	10.0
	12.5	111.8	9.5	119.1	9.2
	125	94.5	10.0	100.8	6.2
TILM	1.25	81.8	9.8	86.0	6.9
	12.5	101.7	10.5	107.7	12.3
	125	102.0	10.4	111.9	10.2
JOS	1.25	95.2	9.0	104.3	7.6
	12.5	101.4	7.7	106.7	7.8
	125	101.4	7.9	105.4	5.7
TYL	1.25	99.3	15.5	108.8	13.8
	12.5	100.2	15.4	115.5	13.8
	125	97.2	12.0	106.6	9.9

3.10 液质联用方法验证

上述结果已经证明了 MIP-HPLC-UV 可以用于检测蜂蜜中 MACs 的含量以及 MACs 是否存在超标问题。由于大多数 MACs 紫外响应非常弱, 上述方法无法实现多种痕量 MACs 的同时定量检测。因

此本研究进一步发展了基于 MIP-fiber 的 7 种 MACs 的液质联用(HPLC-MS/MS)定量方法, 线性范围和检测限如表 4 所示, 更低的检测限和线性范围填补了 HPLC-UV 的空白, 使用者可以根据自身条件、目的及要求对仪器进行选择。

Table 4 Calibration curves, LODs and LOQs of macrolide antibiotics by HPLC-MS/MS ($n=3$)

Compound	Linear equations	Linear range/ ($\mu\text{g/kg}$)	r^2	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)
AZI	$y = 1.121.8x - 2.647.5$	0.4–40	0.999 2	0.044	0.013
SPI	$y = 976.5x + 9.403.5$	0.4–40	0.999 0	0.029	0.009
TILM	$y = 127.57x - 2.313.1$	0.4–40	0.998 8	0.197	0.059
CLA	$y = 2.192.9x + 6.714.1$	0.4–40	0.999 8	0.031	0.009
JOS	$y = 890.4x - 2.518.8$	0.4–40	0.999 5	0.067	0.020
ROX	$y = 311.1x - 649.8$	0.4–40	0.999 9	0.079	0.024
TYL	$y = 206.6x - 1.532.9$	0.4–40	0.993 9	0.110	0.034

AZI:Zithromycin; CLA:Clarithromycin; ROX:Roxithromycin

采用所开发的 MIP-HPLC-MS/MS 法对上述 4 种蜂蜜样品的检测结果如表 5 所示, 仅样品 4(洋槐花蜂蜜)中未检测到 MACs, 其他 3 种蜂蜜中均含有不同浓度的 MACs, 但均未超过国家限定标准。

4 结 论

本研究合成了一种具有 pH 和温度响应的 MIP-fibers, 建立了一种快速、高效测定蜂蜜样品中 MACs 的方法。该纤维具有一定的自修复功能, 对

Table 5 Result of the proposed method for honey samples

Actual samples	AZI/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SPI/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TILM/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CLA/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	JOS/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ROX/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TYL/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Sample 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.9
Sample 2	n.d.	n.d.	3.2	n.d.	n.d.	0.56	n.d.
Sample 3	n.d.	1.09	n.d.	n.d.	2.6	n.d.	1.7
Sample 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n. d. :Not detected

MACs具有良好的吸附性和选择性,可采用涡旋法快速去除模板和洗脱目标物。样品预处理简单、经济、节省溶剂、节约时间,为分析蜂蜜样品中痕量MACs的残留提供了一种有效的方法。同时该MIP-fibers对MACs具有较好的富集浓缩能力,适用于大体积样品的现场采样及富集浓缩,将其与液相色谱串联质谱联用可实现痕量MACs的高灵敏检测,后续实验中也将进一步拓展该材料的应用。

参考文献

[1] Arsic B, Barber J, Čikoš A, et al. 16-membered macrolide antibiotics: a review [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, **51**(3): 283-298.

[2] Zhang Y, Li XQ, Li HM, et al. Antibiotic residues in honey: a review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, **110**: 344-356.

[3] Du LJ, Yi L, Ye LH, et al. Miniaturized solid-phase extraction of macrolide antibiotics in honey and bovine milk using mesoporous MCM-41 silica as sorbent [J]. *J Chromatogr A*, 2018, **1537**: 10-20.

[4] Senta I, Krizman-Matasic I, Terzic S, et al. Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in wastewater effluents and ambient waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1509**: 60-68.

[5] Zhou YS, Zhou TT, Jin H, et al. Rapid and selective extraction of multiple macrolide antibiotics in foodstuff samples based on magnetic molecularly imprinted polymers [J]. *Talanta*, 2015, **137**: 1-10.

[6] Zhou WE, Ling Y, Liu T, et al. Simultaneous determination of 16 macrolide antibiotics and 4 metabolites in milk by using Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe extraction (QuEChERS) and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, **1061/1062**: 411-420.

[7] Song XQ, Zhou T, Liu QY, et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2016, **208**: 169-176.

[8] Liu YH, Yang QX, Chen XT, et al. Sensitive analysis of trace macrolide antibiotics in complex food samples by ambient mass spectrometry with molecularly imprinted polymer-coated wooden tips [J]. *Talanta*, 2019, **204**: 238-247.

[9] Diao XF, Zhang FF, Yang BC, et al. Preparation and evaluation of C10-cationic latex particle coated open-tubular column for capillary electrochromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1267**: 127-130.

[10] Xu LC, Pan JM, Dai JD, et al. Preparation of thermal-responsive magnetic molecularly imprinted polymers for selective removal of antibiotics from aqueous solution [J]. *J Hazard Mater*, 2012, **233/234**: 48-56.