

混合模式固相萃取-高效液相色谱法测定牛奶中 4种非甾体抗炎药残留

丁健桦 徐文平 朱玉玲*

(东华理工大学化学与材料学院, 南昌 330013)

摘 要 制备了咪唑离子液体功能化的混合模式硅胶吸附剂(Sil-IL),将其作为固相萃取(SPE)吸附剂,结合高效液相色谱-紫外检测方法(HPLC-UV),建立了测定牛奶中酮洛芬、萘普生、吲哚美辛和托芬那酸 4 种非甾体类抗炎药物(NSAIDs)的分析方法。通过红外光谱、拉曼光谱和元素分析对 Sil-IL 进行了表征,初步探索了 Sil-IL 对目标物的保留作用机理,考察了样品溶液的 pH 值、上样流速、淋洗液及洗脱溶剂体积等因素对 SPE 效率的影响。结果表明, Sil-IL 对 4 种 NSAIDs 的保留主要通过疏水作用和阴离子交换作用, Sil-IL 吸附剂对 4 种 NSAIDs 具有较好的萃取选择性和萃取效率。在优化的 SPE 条件下,托芬那酸的线性检测范围为 4~1000 $\mu\text{g/L}$,其它 3 种 NSAIDs 的线性范围为 3~1000 $\mu\text{g/L}$,相关系数(R^2)为 0.9996~0.9998,检出限为 1.2~1.9 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N=3$),日内和日间精密度分别为 1.0%~3.0%和 1.9%~6.3%,加标回收率为 90.8%~105.3%。本方法准确可靠、灵敏度高、背景干扰低小、操作简便,可用于奶制品中 4 种 NSAIDs 残留的同时检测。

关键词 离子液体; 非甾体类抗炎药; 固相萃取; 高效液相色谱; 牛奶

非甾体类抗炎药(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是一类不含甾体结构的人工合成药物,具有消炎、止痛和退热等作用,在畜禽养殖业中常被用于预防、治疗动物疾病以及促进动物的生长,其使用量仅次于抗生素和糖皮质激素^[1-2]。但是,NSAIDs 具有一定的毒副作用,过量服用或滥用可导致在食品中残留,被人体摄入后,会对胃肠道、肾脏、肝脏和神经系统等造成损害^[3]。许多国家对 NSAIDs 在动物源性食品中的最大残留量进行了限定^[4],我国食品安全国家标准(GB31650-2019)^[5]对安乃近、萘普生和对乙酰氨基酚 3 种 NSAIDs 的使用也有规定和限量要求^[5]。因此,建立准确、灵敏和稳定的分析方法用于动物源性食品中 NSAIDs 残留的日常监测对于保障食品安全具有非常重要的意义。

NSAIDs 的检测方法主要包括高效液相色谱法^[6-9]、液相色谱-质谱法^[10-16]和气相色谱-质谱法^[17-18],我国对动物源性食品中 NSAIDs 的日常监测主要参照检验检疫行业标准^[10]方法。由于动物源性食品基质复杂而 NSAIDs 含量低,测定前须进行适当的样品前处理,以去除基质干扰和富集目标物,提高检测灵敏度和准确性。常用的样品前处理方法主要有液液微萃取(LLME)^[18-19]、固相微萃取(SPME)^[7-8]、搅拌棒吸附萃取(SBSE)^[20]和固相萃取(SPE)^[2, 11, 21]等,其中, SPE 因具有操作简单、重现性好、选择性和回收率高等特点,成为目前食品安全检测中应用最广泛的一种样品前处理方法。萃取吸附剂是 SPE 技术的核心,是决定分析方法灵敏度和选择性的关键。现已报道的 SPE 吸附剂有反相键合硅胶(C_{18})^[22]、有机聚合物材料(HLB)^[22]、反相/阴离子交换混合型吸附剂(MAX)^[14]、金属有机框架材料(MOF)^[8]和分子印迹聚合物(MIP)^[23]等。虽然这些吸附剂在一定程度上对 NSAIDs 的萃取均能获得较好的回收率,但是将其应用于实际样品时仍存在一些不足,如 C_{18} 和 HLB 缺乏选择性, MIP 的吸附容量偏低, MOF 稳定性较差。因此,寻找选择性好、吸附容量高和稳定性好的吸附材料十分必要。

离子液体(Ionic liquid, IL)是一种在室温或室温附近呈液态的离子型化合物,由有机阳离子和无机阴离子或有机阴离子组成。因 IL 具有蒸汽压低、稳定性好、溶解能力强、结构可设计和活性位点多等独特性质,在样品前处理和色谱分离分析等领域得到了广泛应用^[24-26]。通过物理吸附或化学键合方法将

2021-03-21 收稿; 2023-05-29 接受

江西省科技厅重点研发计划项目(No. 20192BBG7008)和东华理工大学博士科研启动基金项目(No. DHBK2019145)资助。

* E-mail: zyl9568@ecut.edu.cn

IL 固定在固体载体中构建的 IL 固定化材料,兼具了 IL 和固体载体材料的独特性能,同时有效克服了 IL 黏度大、不易操作等不足^[24]。自 2009 年 Tian 等^[27]首次将 IL 改性的硅胶作为 SPE 吸附剂用于丹参中丹参酮的 SPE 以来,IL 固定化材料在 SPE 中的应用受到越来越多的关注。相较于其它 SPE 材料,该材料具有吸附容量高、酸碱稳定性好、萃取选择性强、IL 利用率高以及与目标物之间可产生多种相互作用等优点。然而,目前尚未见将 IL 固定化材料用于牛奶中 NSAIDs 的分离富集的报道。

本研究制备了一种辛基咪唑离子液体固定化硅胶(Sil-IL),将其作为 SPE 吸附剂,选择酮洛芬(KPF)、萘普生(NPX)、吲哚美辛(IMC)和托芬那酸(TFA)4 种 NSAIDs 作为模型目标物,考察了此吸附剂对牛奶中 NSAIDs 的分离富集能力,并结合高效液相色谱-紫外检测器法(HPLC-UV),建立了同时测定牛奶中 4 种 NSAIDs 残留的分析方法。本方法操作简单、准确可靠、重复性好、灵敏度高,可用于牛奶中 4 种 NSAIDs 残留的同时测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱仪、Nicolet iS10 傅立叶红外光谱仪和 Nicolet NEXUS 670 傅里叶拉曼光谱仪(美国 Thermo 公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海锦玖仪器设备有限公司); Vario EL III 元素分析仪(德国 Hanau 公司); Easy 系列超纯水仪(香港力康生物医疗科技控股有限公司); KQ-50B 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); BF2000 氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司); 12 位固相萃取装置(北京安捷伦科技有限公司)。

硅胶(Silica, 粒径 40~63 μm)购于北京绿百草有限公司; 3-巯丙基三甲氧基硅烷(MPTMS, 98%)购自湖北武大有机硅新材料股份有限公司; 酮洛芬(KPF, 98%)和氢化可的松(HCS, 99%)购于 Adamas 试剂公司; 1-乙基咪唑(98%)、1-溴辛烷(99%)、普奈洛尔(PPN, 98.5%)、吲哚美辛(IMC, 98%)、萘普生(NPX, 99%)和托芬那酸(TFA, 97%)购于北京百灵威科技有限公司; 偶氮异丁腈(AIBN, 化学纯)购于上海四赫维化工有限公司,使用前用乙醇重结晶纯化; 甲醇(色谱纯)和甲酸(色谱纯)购于北京万瑞达科技有限公司。实验中使用的其它化学试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为超纯水(18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 标准储备液配制

分别称取 PPN、HCS、NPX、IMC、KPF 和 TFA 标准品各 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1000 mg/L 的单标储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2.2 4种NSAIDs混标准液的配制

分别量取 NPX、IMC、KPF 和 TFA 的单标储备液各 1 mL, 用甲醇稀释并定容至 10 mL, 配制成 100 mg/L 的混合标准储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。使用时稀释至所需浓度。

1.3 液相色谱条件

色谱柱为 Kinetex C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm I.D., 5 μm , 菲罗门公司)。流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.03% (体积浓度, V/V) 甲酸溶液。梯度洗脱程序: 0~3 min, 75% A; 3~10 min, 75%~100% A; 10~10.5 min, 100% A; 10.5~11 min, 100%~75% A; 11~12 min, 75% A。UV 检测波长: 0~6.4 min, 250 nm; 6.4~11 min, 292 nm; 11~12 min, 250 nm。流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 20 μL 。

1.4 Sil-IL的制备

Sil-IL 的制备过程如图 1 所示。

1.4.1 巯基化硅胶(Sil-SH)的制备

按照文献^[28]方法对硅胶进行活化处理。称取 2 g 经活化的硅胶于 100 mL 圆底烧瓶中, 依次加入 30 mL 无水甲苯、8 mL MPTMS 和 0.5 mL 三乙胺, 在 N_2 保护下 110 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h, 停止反应, 待冷却至室温后过滤, 并依次用甲醇和丙酮各洗涤 3 次, 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥过夜, 得到 Sil-SH。

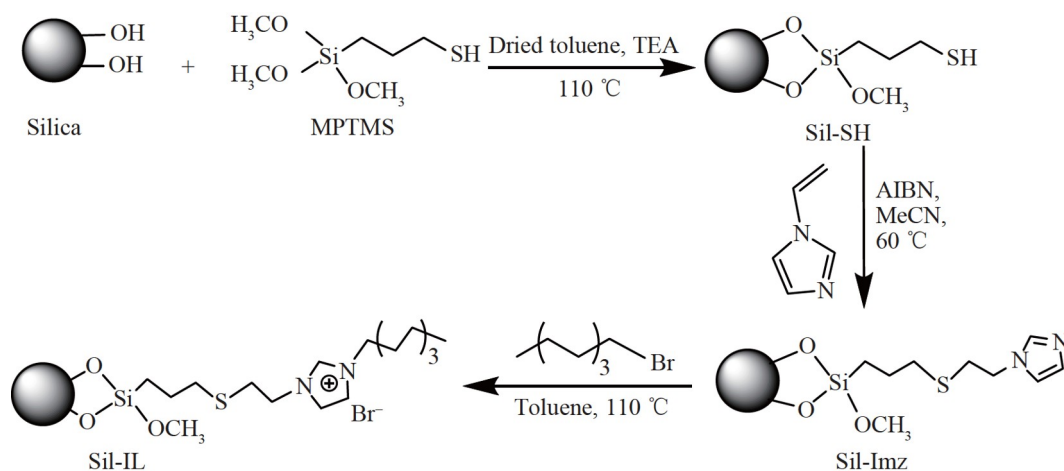


图1 离子液体固定化硅胶(Sil-IL)的合成路线

Fig.1 Synthesis route of ionic liquid-functionalized silica (Sil-IL) sorbent

1.4.2 咪唑基功能化硅胶(Sil-Imz)的制备

称取 2 g Sil-SH 置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 40 mL 乙腈,分散均匀,依次加入 0.3 g *N*-乙基咪唑和 0.03 g AIBN, 60 °C 搅拌反应 24 h,冷却至室温,过滤,并依次用乙腈、无水乙醇分别洗涤 3 次, 60 °C 真空干燥 6 h, 得到 Sil-Imz。

1.4.3 Sil-IL 的制备

称取 1.5 g Sil-Imz 置于 100 mL 圆底烧瓶中,依次加入 50 mL 无水甲苯和 0.5 g 1-溴辛烷,在 N_2 保护下,在 110 °C 回流反应 48 h, 冷却至室温,过滤,依次用甲苯、无水乙醇、水和丙酮各洗涤 3 次, 60 °C 真空干燥 6 h, 得到 Sil-IL。

1.5 样品预处理

牛奶样品购于本地超市。参考文献[29]的方法,称取 10 g 牛奶于 50 mL 聚丙烯材质离心管中,加入 20 mL 乙腈和 2 g NaCl,涡旋混匀,超声处理 15 min, 于 5 °C 下 6000 r/min 离心 10 min, 取 10 mL 上层(乙腈层)清液至另一干净离心管中,在 50 °C 下氮吹浓缩至约 0.5 mL,加入 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)至 10 mL, 混匀并过 0.45 μ m 滤膜,滤液用 SPE 净化。

1.6 SPE 过程

称取 200 mg 制得的 Sil-IL 填料,置于柱管体积为 3 mL 且底部加有聚乙烯材质筛板的 SPE 空柱管内,轻轻敲打使管内填料平整均匀,然后在其上加入另一个筛板,并稍微压实,制得 Sil-IL SPE 小柱。

依次用 4 mL 甲醇和 2 mL PBS(20 mmol/L, pH 7.0)活化 Sil-IL SPE 小柱。然后,加入 10 mL 样品溶液,以 3 mL/min 流速通过 SPE 小柱,待样品溶液完全通过后,依次用 3 mL 20 mmol/L PBS(pH 7.0)和 4 mL 甲醇淋洗,加入 2 mL 5%(V/V)甲酸-甲醇溶液洗脱目标物,将收集的洗脱流出液于 45 °C 下氮气吹干,用 1 mL 20 mmol/L PBS(pH 3.0)-甲醇(50:50, V/V)复溶,涡旋溶解后,过 0.45 μ m 滤膜,滤液进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 Sil-IL 的表征

2.1.1 拉曼光谱分析

由于巯基的红外吸收特征峰较弱,在红外光谱中难以观察到,故首先采用拉曼光谱分别对 Sil-SH、Sil-Imz 和 Sil-IL 进行表征。如图 2A 所示, Sil-SH(图 2A 曲线 a)在 2580 cm^{-1} 处出现巯基($-SH$)特征峰,说明 MPTMS 已成功键合到硅胶中。在 Sil-Imz 的谱图(图 2A 曲线 b)中, 2580 cm^{-1} 的巯基特征峰基本消失,同时在 3144 和 3120 cm^{-1} 处出现两个特征峰,归属为咪唑环中双键碳上的 C—H 伸缩振动峰,说明咪唑基已被成功键合到 Sil-SH 表面,并且 Sil-SH 表面的巯基几乎耗尽。根据 Sil-Imz 和 Sil-SH 中巯基特征

峰的峰面积估算, Sil-Imz 的产率大于 90%。经 1-溴辛烷与 Sil-Imz 反应后, Sil-IL(图 2A 曲线 c)中未观察到 Sil-Imz 在 3144 和 3120 cm^{-1} 处的咪唑环 C—H 特征峰,同时位于 2800~3000 cm^{-1} 处归属为甲基和亚甲基的拉曼峰强度明显增加,表明 Sil-Imz 与 1-溴辛烷已反应,由此证明 Sil-IL 已被成功制备。根据 Sil-IL 和 Sil-Imz 中咪唑环 C—H 特征峰的峰面积估算, Sil-IL 的产率约为 95%。

2.1.2 红外光谱表征

图 2B 为 Sil-SH、Sil-Imz 和 Sil-IL 的红外光谱图。与 Sil-SH 的谱图(图 2B 曲线 a)对比, Sil-Imz(图 2B 曲线 b)在 1515 cm^{-1} 处出现咪唑环的 C=N 伸缩振动吸收峰,说明咪唑基已成功修饰到硅胶中。与 Sil-Imz 的谱图相比, Sil-IL(图 2B 曲线 c)在 1515 cm^{-1} 处未观察到咪唑环的 C=N 特征吸收峰,但在 1565 cm^{-1} 处出现 1 个新峰,该峰归属于咪唑基季胺化后的 C—N 特征吸收峰,说明 Sil-Imz 中的中性咪唑基团已转化成咪唑鎓阳离子,同时在 2960 cm^{-1} 处出现甲基的 C—H 伸缩振动峰,并且位于 2932 和 2859 cm^{-1} 处的亚甲基 C—H 吸收峰强度明显增强,进一步说明 Sil-Imz 中的咪唑基与 1-溴辛烷已发生反应。上述结果证明已成功合成 Sil-IL。

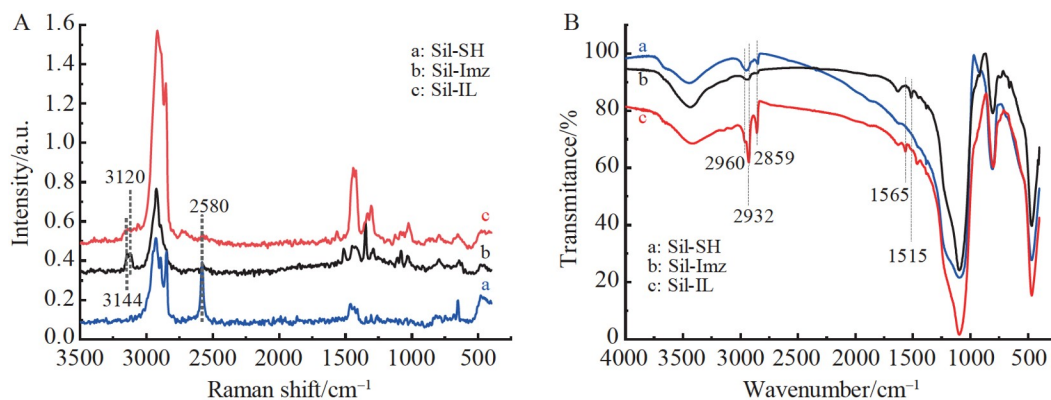


图2 巯基化硅胶(Sil-SH, a)、咪唑基功能化硅胶(Sil-Imz, b)和离子液体功能化硅胶(Sil-IL, c)的拉曼光谱(A)和红外光谱(B)

Fig.2 Raman (A) and infrared (B) spectra of mercapto-functionalized silica (Sil-SH, a), imidazole-functionalized silica (Sil-Imz, b) and ionic liquid functionalized silica (Sil-IL, c)

2.1.3 元素分析

采用元素分析仪分别对裸硅胶(Silica)、Sil-SH、Sil-Imz 和 Sil-IL 中的碳、氮含量进行了测定,结果见表 1。由测定结果可知, Sil-SH 中碳含量明显高于 Silica,说明通过硅烷化反应,巯基已被引入到硅胶表面;与 Sil-SH 相比, Sil-Imz 中的碳、氮含量明显增加,证明咪唑基团已成功键合到硅胶表面,与 Sil-Imz 相比, Sil-IL 的碳含量明显增加。根据碳、氮含量分别计算得到硅胶表面巯基、咪唑基和离子液体基团的键合量分别为 0.97、0.93 和 0.92 mmol/g。由此可计算得到, Sil-SH 表面巯基和 Sil-Imz 表面咪唑基的转化率分别约为 96%和 99%,离子液体在硅胶表面的键合产率为 95%,此结果与由拉曼光谱估算的结果基本一致。上述结果说明,已成功制备 Sil-IL,其纯度约为 95%。

2.2 SPE条件优化

为得到最佳的萃取效果,采用单一变量法对样品溶液 pH 值、上样流速、清洗溶剂和洗脱溶剂体积等影响 SPE 效率的实验条件进行了优化。采用 20 mmol/L PBS 稀释混合标准溶液进行实验, 4 种 NSAIDs 目标物浓度均为 200 $\mu\text{g/L}$, 所有实验平行测定 3 次。

2.2.1 样品溶液pH值的影响

样品溶液 pH 值不仅影响目标物在溶液中的存在状态,同时也决定了吸附剂表面的作用位点,进而影响目标物与吸附剂之间的相互作用,因此样品溶液 pH 值是影响 SPE 效率的一个重要参数。Sil-IL 表面含辛烷基咪唑离子液体功能团,可与目标物之间发生疏水作用、离子交换和氢键等多种作用。选择 PPN、HCS 和 4 种 NSAIDs 目标物(NPX、IMC、KPF 和 TFA)分别作为碱性、中性和酸性药物的探针目标物,其结构、 pK_a 和 $\text{lg}P$ 如图 3 所示。采用 20 mmol/L PBS 配制含此 6 种目标物的混合标准溶液,并用

表1 硅胶、Sil-SH、Sil-Imz和Sil-IL的元素分析结果

Table 1 Elemental analysis results of silica, Sil-SH, Sil-Imz and Sil-IL

吸附剂 Adsorbent	元素分析 Elemental analysis		表面键合量 ^a Surface coverage amount ^a		
	C/ %	N/ %	SH/ (mmol/g) ^b	Imz/ (mmol/g) ^c	IL/ (mmol/g) ^d
硅胶 Silica	1.290	0.000	—	—	—
巯基化硅胶 Sil-SH	4.437	0.000	0.97	—	—
咪唑基功能化硅胶 Sil-Imz	10.651	2.386	—	0.93	—
咪唑离子液体固定化硅胶 Sil-IL	18.236	2.187	—	—	0.92

^a表面键合量计算参照文献[36]；^b SH表示硅胶表面键合的巯基，其含量根据碳含量计算；^c Imz表示硅胶表面键合的咪唑基，其含量根据氮含量计算；^d IL表示硅胶表面键合的离子液体基团，其含量根据碳含量计算。

^a The amount of functional groups on the silica surface calculated according to the reference [36]; ^b SH is the amount of sulfhydryl groups on Sil-SH calculated from carbon content; ^c Imz is the amount of imidazole groups on Sil-Imz calculated from nitrogen content; ^d IL is the amount of ionic liquid groups on Sil-IL calculated from carbon content.

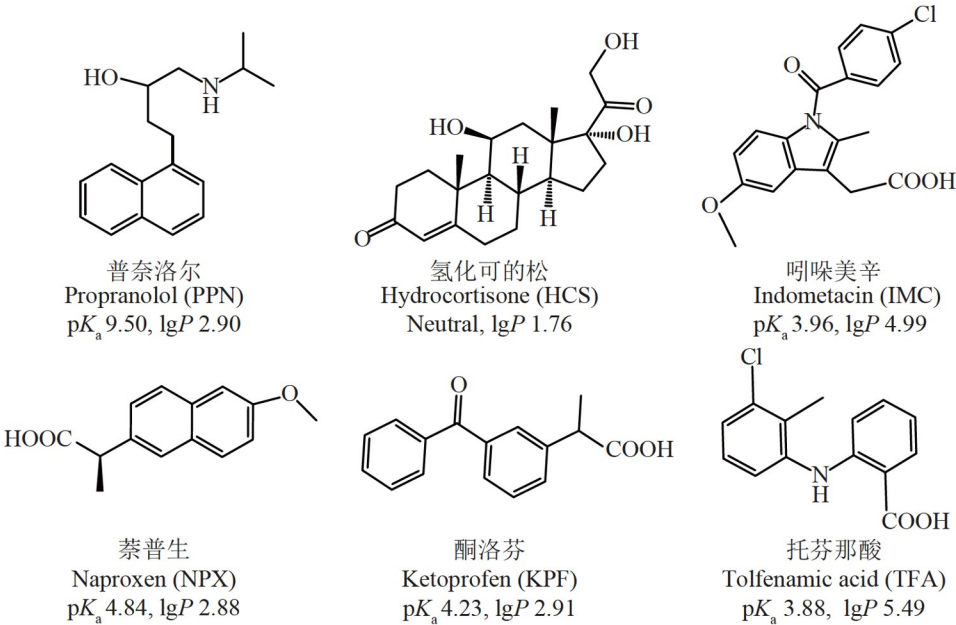


图3 目标化合物的化学结构、 pK_a 和 lgP 值
Fig.3 Chemical structure, pK_a and lgP of the target compounds

NaOH 和 H₃PO₄ 调节溶液 pH 值,按照 1.6 节的 SPE 方法进行萃取,但甲醇和 5%(V/V)甲酸-甲醇溶液用量均为 5 mL, 以保证目标物被完全洗脱,结果见图 4。

在上样溶液 pH 值(3.0~10.0)范围内,碱性目标物 PPN 和中性目标物 HCS 均在第一步甲醇淋洗中被全部洗脱下来, HCS 的回收率基本不受上样溶液 pH 值的影响,而 PPN 的回收率随上样 pH 值的升高而增大,在 pH=7.0 时达到最大值(图 4A)。对于 4 种酸性 NSAIDs,在上样溶液 pH=3.0~7.0 时,均在第二步 5%(V/V)甲酸-甲醇溶液洗脱过程中被全部洗脱下来,并且回收率随着 pH 值的升高而增大(图 4B); 当样品溶液 pH 值由 7.0 升至 10.0 时, 4 种 NSAIDs 都在第一步甲醇淋洗中被部分洗脱,并且随着 pH 值升高,其在甲醇洗脱液中的回收率逐渐增大(图 4A),而在第二步 5% (V/V)甲酸-甲醇洗脱过程中回收率逐渐降低(图 4B),但 4 种 NSAIDs 在甲醇和 5% (V/V)甲酸-甲醇两洗脱液组分中的回收率总和基本不受 pH 值影响,均在 90%以上。由此说明, Sil-IL 对碱性和中性目标物的吸附主要通过疏水作用,与 4 种酸性

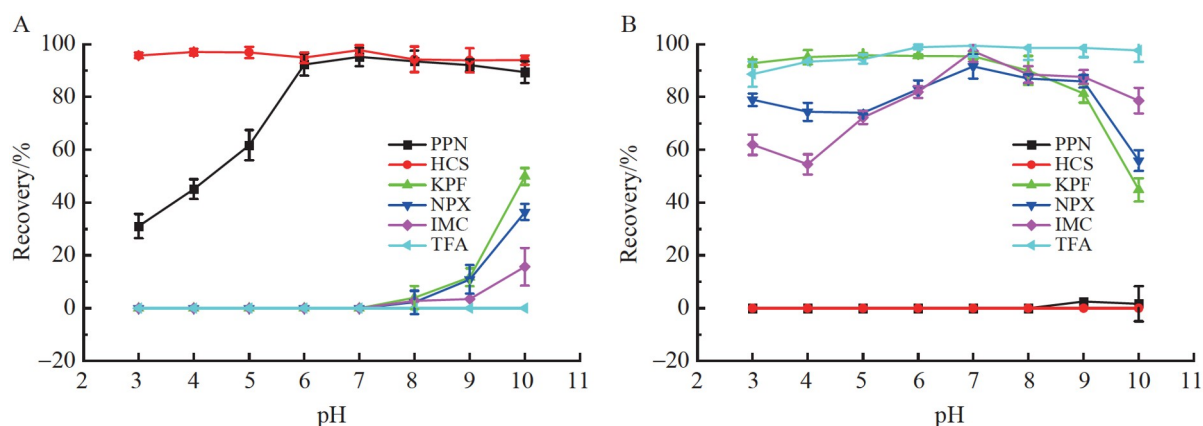


图4 样品溶液的 pH 值对萃取回收率的影响: (A) 甲醇清洗液; (B) 5% 甲酸-甲醇洗脱液

Fig.4 Effect of sample pH value on extraction recovery: (A) eluate 1 with methanol washing; (B) eluate 2 with 5% formic acid-methanol eluting

NSAIDs 之间存在离子交换作用和疏水作用等多种作用力。当样品溶液 $\text{pH} \leq 7.0$ 时, Sil-IL 对 4 种 NSAIDs 的保留主要通过离子交换作用; 当样品溶液 $\text{pH} > 7.0$ 时, 疏水作用随着 pH 值升高而逐渐起主导作用。这说明 Sil-IL 是具有反相/阴离子交换作用的混合型吸附剂。从萃取选择性和回收率两方面综合考虑, 选择 pH 7.0 作为 NSAIDs 的最佳上样 pH 值。

2.2.2 上样流速

上样流速是影响 SPE 效率的另一重要因素。上样速度过快会导致目标物回收率下降, 速度太小则降低工作效率。考察了上样流速对 4 种 NSAIDs 萃取回收率的影响, 结果见图 5。当上样流速为 1~3 mL/min 时, 4 种目标物的回收率没有明显区别, 均保持在 93% 以上; 当上样流速由 3 mL/min 继续增大时, 其回收率逐渐下降。综合考虑回收率 and 时间, 选择 3 mL/min 作为最佳上样流速。

2.2.3 淋洗液体积

为获得更高的检测灵敏度和准确性, 在洗脱目标物之前使用适当的溶剂对 SPE 柱进行淋洗, 尽可能地除去样品基质的干扰。在预实验中发现使用不同浓度的甲醇水溶液进行一步淋洗时, 淋洗效果均不佳。在样品溶液 pH 值优化过程中发现, 先用缓冲盐溶液再用甲醇溶液淋洗时, 收集的洗脱液不浑浊, 并且杂质去除效果也较好。因此, 本实验采用两步淋洗, 第 1 步使用 20 mmol/L PB (pH 7.0) 淋洗, 以使被保留的碱性干扰物去质化, 同时增强 NSAIDs 目标物与 Sil-IL 吸附剂之间的静电作用力; 第 2 步使用纯有机溶剂淋洗去除通过疏水作用保留在 SPE 柱中的基质干扰物。此前考察样品溶液 pH 值影响时发现, 甲醇对吸附在 SPE 柱中的碱性和中性物质有很好的去除效果, 因此本研究直接选择甲醇作为淋洗剂, 并对其用量进行了考察。选择碱性药物 PPN 和中性药物 HCS 作为基质干扰物探针, 配制含 PPN、HCS 和 4 种 NSAIDs 目标物的混合样品溶液进行萃取, 分别考察使用不同体积的 20 mmol/L PB (pH 7.0) 和甲醇清洗 Sil-IL SPE 柱后, 5% (V/V) 甲酸-甲醇溶液洗脱组分中各目标物回收率的变化。保持甲醇用量为 5 mL, 考察了 20 mmol/L PB (pH 7.0) 的用量对萃取效果的影响。如图 6A 所示, 4 种 NSAIDs 目标物在所考察的体积 (2~8 mL) 范围内回收率没有明显变化, 均大于 90%, 干扰物 PPN 和 HCS 几乎完全被去除。综合考虑净化效果和时间, 最终选择 20 mmol/L PBS (pH 7.0) 的最佳体积为 3 mL。考察了不同体积 (1、2、3、4 和 5 mL) 甲醇对干扰物的清洗效果, 结果见图 6B, 甲醇体积为 4 mL 时干扰物 PPN 和 HCS 基本去除完全, 故选择 4 mL 甲醇进行后续实验。

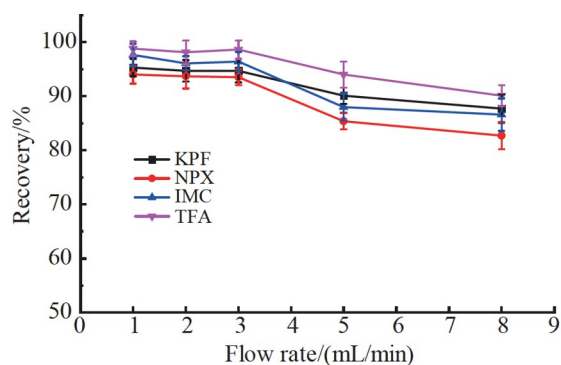


图5 上样流速对萃取回收率的影响

Fig.5 Effect of flow rate of loading sample on extraction recovery

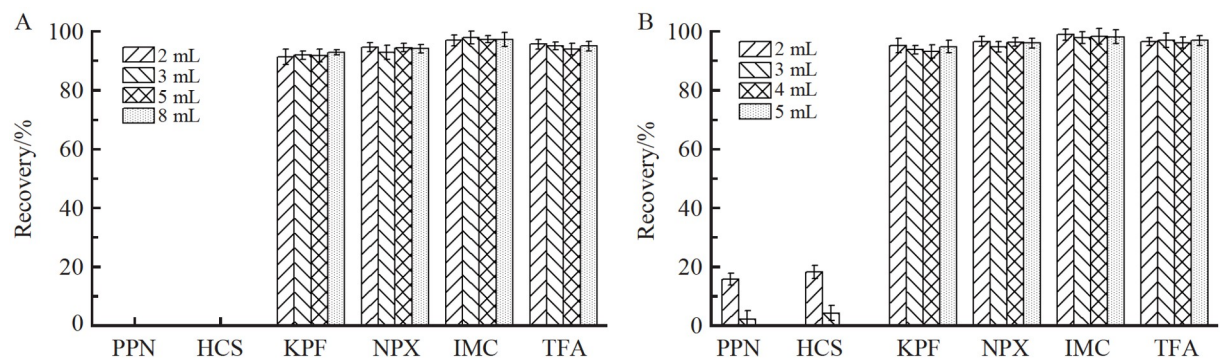


图6 淋洗剂体积对萃取效率的影响: (A) 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0); (B) 甲醇
Fig.6 Effects of volume of flushing solvent on extraction efficiency: (A) 20 mmol/L phosphate buffer solution (pH 7.0); (B) methanol

2.2.4 洗脱剂体积

上述考察结果表明, 5%(V/V)甲酸-甲醇溶液对 4 种 NSAIDs 目标物均有较好的洗脱能力, 故选择 5% (V/V)甲酸-甲醇溶液作为洗脱剂, 并考察了其用量(2、4、6、8 mL)对 4 种 NSAIDs 洗脱效果的影响, 结果见图 7。在考察的用量范围内, 随着洗脱剂用量增大, 4 种目标物的回收率没有明显增加。为节约成本, 选择 5% (V/V)甲酸-甲醇溶液的最佳用量为 2 mL。

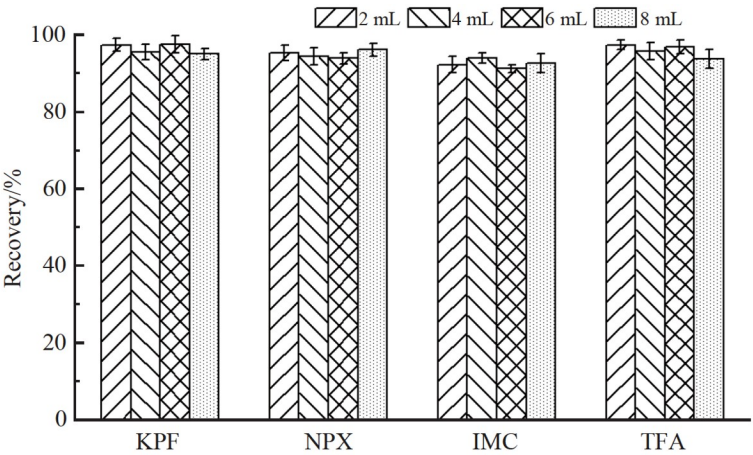


图7 洗脱溶剂体积对萃取回收率的影响
Fig.7 Effect of eluent volume on extraction recovery

2.3 SiI-IL的重复利用性

为考察 SiI-IL 吸附剂的可重复利用性, SiI-IL SPE 小柱经洗脱后, 用 3 mL 5% (V/V)甲酸-甲醇进行淋洗以除去残留的物质, 然后重复进行 SPE 过程。结果(图 8)表明, SiI-IL SPE 小柱重复使用 8 次后, 4 种 NSAIDs 的回收率均保持在 91%以上, 表明 SiI-IL 具有较好的重复利用性。

2.4 萃取性能比较

为了进一步考察 SiI-IL 对 NSAIDs 的萃取性能, 选用 3 种常用的商品化吸附剂(SampliQ C₁₈、Oasis WAX 和 Oasis MAX)与自制的吸附剂 SiI-IL 进行比较。每种吸附剂各称取 200 mg, 按照 1.6 节中 SPE 柱装填方法制备相应的 SPE 小柱。在最佳实验条件下, 利用装填好的不同 SPE 柱对添加 4 种 NSAIDs 目标物的空白牛奶样品进行萃取分析, 结果见表 2, 本研究制备的吸附剂 SiI-IL 对 4 种 NSAIDs 的回收率与两种商品化混合型吸附剂(Oasis WAX 和 Oasis MAX)相当, 并且均优于 SampliQ C₁₈。由此可见, 本研究制备的吸附剂 SiI-IL 对 4 种 NSAIDs 均具有较好的萃取能力。

2.5 方法学验证

在优化的实验条件下, 采用外标法对建立的 SiI-IL-SPE-HPLC/UV 方法的线性范围、检出限、定量

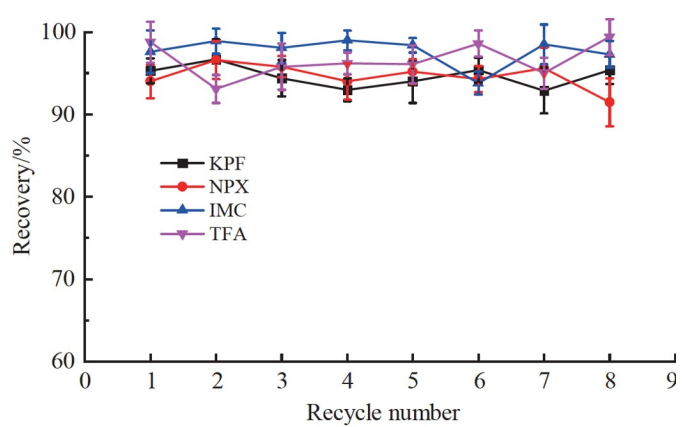


图8 吸附剂 Sil-IL 的重复利用性
Fig.8 Reusability of Sil-IL sorbent

表2 Sil-IL和3种商品化吸附剂对4种NSAIDs的回收率
Table 2 Recoveries of 4 kinds of NSAIDs using different sorbents as solid phase extraction (SPE) sorbent

化合物 Compound	C ₁₈		WAX		Sil-IL		MAX	
	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, n=3)	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, n=3)	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, n=3)	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, n=3)
酮洛芬 KPF	73.6	9.1	93.7	3.7	91.3	2.4	97.3	3.0
萘普生 NPX	76.3	3.2	89.4	4.5	91.8	3.1	94.0	4.8
吲哚美辛 IMC	80.1	1.3	94.2	2.8	90.7	5.4	97.6	3.8
托芬那酸 TFA	82.4	4.8	96.9	3.2	84.7	4.2	94.2	2.8

注: C₁₈: C₁₈键合硅胶吸附剂(SampliQ C₁₈); WAX: 反相/弱阴离子交换混合型吸附剂(Oasis WAX); MAX: 反相/强阴离子交换混合型吸附剂(Oasis MAX)。
Note: C₁₈: C₁₈ bonded silica sorbent (SampliQ C₁₈); WAX: Reversed phase/weak anion-exchange mixed-mode sorbent(Oasis WAX); MAX: Reversed/strong anion-exchange mixed-mode sorbent.

限和精密度进行了考察。首先按照 1.5 节的方法处理空白牛奶样品,得到空白基质溶液;然后,利用此空白基质溶液配制系列浓度的 NSAIDs 混合标准溶液,在优化的条件下进行 SPE 以及 HPLC 分析。在 3~1000 μg/L 浓度范围内(TFA 为 4~1000 μg/L),4 种 NSAIDs 的浓度与峰面积具有良好的线性关系,其相关系数(R^2)为 0.9996~0.9998。方法的检出限($S/N=3$)为 1.2~1.9 μg/kg,定量限($S/N=10$)为 4.0~6.2 μg/kg (表 3)。本方法的灵敏度优于国家标准方法(4 种 NSAIDs 的检出限为 1~25 μg/kg)^[10],并且样品前处理过程更简单、绿色。考察了方法的重现性,以低、中两个浓度(10 和 100 μg/L)的空白牛奶加标样品进行了日内和日间精密度的测定,方法的日内和日间精密度分别为 1.0%~3.0%和 1.9%~6.3%(表 3),表明本方法重现性好。以经 SPE 处理后 4 种 NSAID 的浓度与原始溶液中浓度的比值作为富集倍数,计算得到本方法对 4 种目标物的富集倍数为 9~10。

2.6 实际样品分析

采用建立的 Sil-IL-SPE-HPLC/UV 方法对 3 个品牌的纯牛奶样品进行分析。在 3 种牛奶样品中均未检出 4 种 NSAIDs。对 3 种牛奶样品添加 4 种 NSAIDs 标准溶液进行加标回收实验,结果见表 4,在两个加标水平下,4 种 NSAIDs 的回收率在 90.8%~105.3%之间, $RSD \leq 6.1\%$ 。图 9 曲线 a 和曲线 b 为牛奶样品和加标浓度为 10 μg/L 的牛奶样品经 Sil-ILSPE 净化处理后的 HPLC 谱图,图 9 曲线 c 为 100 μg/L 混合标准溶液直接进样的 HPLC 谱图。结果表明,吸附剂 Sil-IL 对 4 种 NSAIDs 具有很好的净化富集能力,建立的 Sil-IL SPE-HPLC/UV 方法可用于奶制品中 NSAIDs 的分析检测。

表3 Sil-IL-固相萃取-高效液相色谱-紫外检测方法(SPE-HPLC/UV)检测4种NSAIDs的分析性能参数

Table 3 Analytical parameters of Sil-IL-SPE-high performance liquid chromatography-ultraviolet detector (HPLC-UV) method for determination of 4 kinds of NSAIDs

化合物 Compound	线性范围 Linear range/ (μg/L)	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	检出限 LOD/ (μg/kg)	定量限 LOQ/ (μg/kg)	日内精密度 Intra-day precision/ (%, $n=5$)		日间精密度 Inter-day precision/ (%, $n=5$)	
					10 μg/L	100 μg/L	10 μg/L	100 μg/L
酮洛芬 KPF	3~1000	0.9996	1.5	5.0	1.3	2.3	4.6	2.6
萘普生 NPX	3~1000	0.9996	1.2	4.0	2.0	1.8	2.8	4.1
吲哚美辛 IMC	3~1000	0.9998	1.4	4.6	2.4	1.0	3.5	1.9
托芬那酸 TFA	4~1000	0.9997	1.9	6.2	3.0	2.5	5.1	6.3

表4 不同品牌牛奶样品中4种NSAIDs的加标回收率

Table 4 Recoveries of 4 kinds of NSAIDs spiked in different brand milk samples

化合物 Compound	加标浓度 Spiked level/ (μg/L)	样品 1 Sample 1		样品 2 Sample 2		样品 3 Sample 3	
		回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, $n=3$)	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, $n=3$)	回收率 Recovery/ %	RSD/ (%, $n=3$)
酮洛芬 KPF	10	98.4	1.4	95.9	3.0	92.0	1.9
	100	96.7	1.8	94.0	1.6	95.3	3.8
萘普生 NPX	10	91.6	3.9	101.1	2.7	90.8	6.1
	100	92.3	4.9	96.0	3.6	94.7	1.9
吲哚美辛 IMC	10	92.0	1.8	95.5	1.5	91.4	3.8
	100	91.3	2.6	98.7	3.4	94.2	1.7
托芬那酸 TFA	10	93.7	4.7	91.3	5.2	95.7	2.9
	100	96.5	3.4	104.0	3.9	105.3	4.2

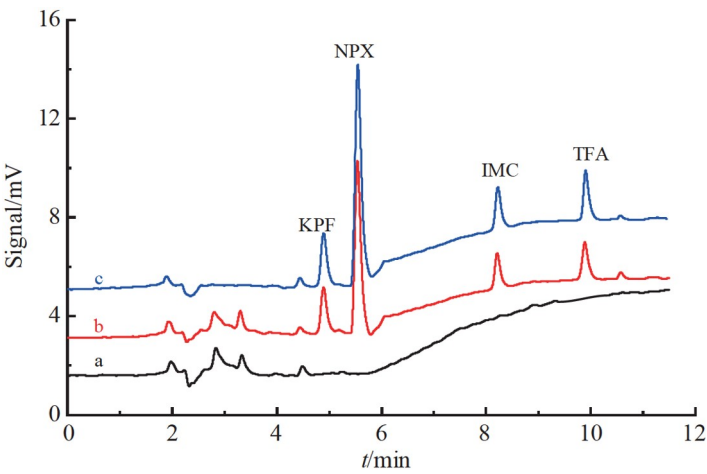


图9 不同样品的 HPLC 谱图：(a) 经 Sil-IL SPE 柱处理的牛奶样品；(b) 经 Sil-IL SPE 处理的加标浓度为 10 μg/L 的牛奶样品；(c) 未经 SPE 处理直接进样的 4 种 NSAIDs(浓度为 100 μg/L)的混合标准溶液

Fig.9 HPLC chromatograms of different samples: (a) milk sample extracted by Sil-IL SPE; (b) spiked milk sample (10 μg/L) extracted by Sil-IL SPE; (c) standard solution of the 4 kinds of NSAIDs (100 μg/L) directly injected without SPE

3 结论

制备了一种具有阴离子交换作用、疏水作用等混合模式的 SiI-IL 材料,并将其作为 SPE 吸附剂,结合 SPE 和 HPLC-UV 法建立了测定牛奶中 KPF、NPX、IMC 和 TFA 4 种 NSAIDs 残留的分析方法。结果表明,此离子液体固定化硅胶对酸性 NSAIDs 表现出很好的萃取选择性和富集能力,是一种良好的 SPE 材料。此外,此材料具有优异的可重复利用性,可通过再生循环使用,降低了检测成本。本方法操作简便、灵敏度高、准确可靠、选择性好,有望用于奶制品中多种 NSAIDs 的同时检测。

References

- [1] VAN PAMEL E, DAESELEIRE E. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407(15): 4485-4494.
- [2] HU Ting, PENG Tao, LI Xiao-Juan, CHEN Dong-Dong, DAI Han-Hui, ZHOU Yue-Ning, XIA Xi, DING Shuang-Yang, ZHU Ai-Ling, JIANG Hai-Yang. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2012, 40(2): 236-242.
胡婷, 彭涛, 李晓娟, 陈冬东, 代汉慧, 周玥宁, 夏曦, 丁双阳, 朱爱玲, 江海洋. *分析化学*, 2012, 40(2): 236-242.
- [3] FU De-Xing, FENG Yu-Fei. *Chin. Gen. Pract.*, 2008, (2): 136-138.
傅得兴, 封宇飞. *中国全科医学*, 2008, (2): 136-138.
- [4] Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. *Off. J. Eur. Union*, L15: 1-72.
- [5] GB 31650-2019. National Food Safety Standard: Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. National Standards of the People's Republic of China.
食品安全国家标准—食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB 31650-2019.
- [6] TARTAGLIA A, KABIR A, D'AMBROSIO F, RAMUNDO P, ULUSOY S, ULUSOY H I, MERONE G M, SAVINI F, D'OVIDIO C, GRAZIA U D, FURTON K G, LOCATELLI M. *J. Chromatogr. B*, 2020, 1144: 122082.
- [7] SEIDI S, SANATI S E. *Microchim. Acta*, 2019, 186(5): 297.
- [8] MIRZAJANI R, KARDANI F, RAMEZANI Z. *Microchem. J.*, 2019, 144: 270-284.
- [9] LI W, HUANG L, GUO D, ZHAO Y, ZHU Y. *J. Chromatogr. A*, 2018, 1571: 76-83.
- [10] SN/T 2190-2008. Determination of Residues of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Foodstuffs of Animal Origin for Import and Export: LC-MS/MS Method. Industry Standards of Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People's Republic of China.
进出口动物源性食品中非甾体类抗炎药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. SN/T 2190-2008.
- [11] WANG Y, OU Y, XIE S, CHEN D, WANG X, PAN Y, WANG Y, HUANG L, CHENG G, QU W, LIU Z, TAO Y, YUAN Z. *Food Anal. Methods*, 2019, 12(6): 1346-1368.
- [12] SHISHOV A, NECHAEVA D, BULATOV A. *Microchem. J.*, 2019, 150: 104080.
- [13] MARTA Z, BOBALY B, FEKETE J, MAGDA B, IMRE T, SZABO P T. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 160: 99-108.
- [14] HUANG C, LI Y, YANG J, PENG J, TAN J, FAN Y, WANG L, CHEN J. *Talanta*, 2018, 190: 15-22.
- [15] REINHOLDS I, PUGAJEVA I, ZACS D, LUNDANES E, RUSKO J, PERKONS I, BARTKEVICS V. *Environ. Monit. Assess.*, 2017, 189(11): 568.
- [16] KANG J W, PARK S J, PARK H C, GEDI V, SO B J, LEE K J. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 174(1): 1-5.
- [17] GOKTAS E F, KABIL E, ABIOZ F. *Drug. Test. Anal.*, 2020, 12(8): 1065-1077.
- [18] AVINO P, NOTARDONATO I, PASSARELLA S, RUSSO M V. *Appl. Sci.*, 2020, 10(16): 5441.
- [19] JI Y, DU Z, ZHANG H, ZHANG Y. *Anal. Methods*, 2014, 6(18): 7294-7304.
- [20] JAFARI Z, HADJMOHAMMADI M R. *Anal. Methods*, 2020, 12(36): 4429-4437.
- [21] MEUCCI V, MINUNNI M, VANNI M, SGORBINI M, CORAZZA M, INTORRE L. *Bioanalysis*, 2014, 6(16): 2147-2158.
- [22] AZZOUZ A, JURADO-SANCHEZ B, SOUHAIL B, BALLESTEROS E. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59(9): 5125-5132.
- [23] GUC M, SCHROEDER G. *Appl. Sci.*, 2020, 10(12): 4217.
- [24] WANG Yi-Cong, LIU Lei-Lei. *Chin. J. Chromatogr.*, 2021, 39(3): 241-259.
王艺聪, 刘磊磊. *色谱*, 2021, 39(3): 241-259.
- [25] YANG Xin-Yue, GAO Li, SUN Ya-Ming, ZHAO Wen-Jie, XIANG Guo-Qiang, JIANG Xiu-Ming, HE Li-Jun, ZHANG Shu-Sheng. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, 48(12): 1607-1615.
杨新月, 高莉, 孙亚明, 赵文杰, 向国强, 江秀明, 何丽君, 张书胜. *分析化学*, 2020, 48(12): 1607-1615.
- [26] BERTHOD A, RUIZ-ÁNGEL M J, CARDA-BROCH S. *J. Chromatogr. A*, 2018, 1559: 2-16.
- [27] TIAN M, YAN H, ROW K H. *J. Chromatogr. B*, 2009, 877(8-9): 738-742.

- [28] ZHU Y, ZHANG W, LI L, WU C, XING J. *Anal. Methods*, 2014, 6(7): 2102-2111.
- [29] JEDZINIAK P, SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ T, PIETRUK K, SLEDZINSKA E, ZMUDZKI J. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 403(10): 2955-2963.
- [30] KIBBEY C E, MEYERHOFF M E. *Anal. Chem.*, 1993, 65(17): 2189-2196.

Mixed-mode Solid Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography for Analysis of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Residues in Bovine Milk

DING Jian-Hua, XU Wen-Ping, ZHU Yu-Ling*

(School of Chemistry and Material Science, East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract A imidazolium ionic liquid-functionalized silica (Sil-IL) was synthesized and used as mixed-mode sorbent for solid phase extraction (SPE) of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, naproxen, ketoprofen, indometacin and tolfenamic acid) residues from bovine milk. A method combining this mixed-mode SPE and high performance liquid chromatography-ultraviolet detector (HPLC-UV) was established for simultaneous analysis of four kinds of NSAIDs residues in bovine milk. The prepared Sil-IL was characterized by Fourier transform infrared spectra, Raman spectra and elemental analysis. Then the retention mechanism of NSAIDs on Sil-IL sorbent was explored and the parameters affecting the extraction efficiency were optimized. Experimental results showed that Sil-IL had good extraction selectivity and high extraction efficiency towards four kinds of NSAIDs. Meanwhile, the interaction between Sil-IL and NSAIDs was mainly hydrophobic and anion exchange interactions. Under optimal SPE conditions, good sensitivity was achieved with a limit of detection of 1.2–1.9 $\mu\text{g/kg}$. The method displayed good linear relationship in the concentration range of 3–1000 $\mu\text{g/L}$ for ketoprofen, naproxen, indomethacin and 4–1000 $\mu\text{g/L}$ for tolfenamic acid, with the correlation coefficient (R^2) of 0.9996–0.9998. The intra-day and inter-day precision were 1.0%–3.0% and 1.9%–6.3%, respectively. The recoveries of four kinds of NSAIDs in bovine milk at two spiked levels were 90.8%–105.3% with relative standard deviations less than 6.1%. The established method was proved to be accurate, reliable, simple, sensitive and selective, and could be used for determination of NSAIDs residues in milk sample.

Keywords Ionic liquid; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Solid phase extraction; High performance liquid chromatography; Bovine milk

(Received 2021-03-21; accepted 2023-05-29)

Supported by the Department of Science and Technology of Jiangxi Province (No. 20192BBG7008) and the Doctoral Research Fund of East China University of Technology (No. DHBK2019145).