

微流控芯片联用高效液相色谱-荧光检测器同时测定肉类食品中 4 种磺胺类药物残留

邱启全¹, 李美玲¹, 孙悦^{1,2,3,4*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006;
3. 国家中医药管理局, 中药数字化质量评价技术重点实验室, 广州 510006;
4. 广东省中药质量工程技术研究中心, 广州 510006)

摘要: **目的** 建立一种使用微流控芯片进行肉类食品前处理, 并结合高效液相色谱-荧光检测器(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)同时测定肉类食品中 4 种磺胺残留的方法。**方法** 样品先用乙酸乙酯提取后, 在微流控芯片中用 2 mol/L 盐酸溶液反萃取和正己烷脱脂, 收集盐酸流出液 100 μ L, 与 0.5 g/mL 醋酸钠溶液按照 1:1 (V:V)混合, 加入 0.2 g/L 荧光胺 50 μ L 进行衍生化反应, 采用岛津 ODS-3 色谱柱进行分离, 流动相为乙腈-2%乙酸水溶液。**结果** 4 种磺胺完全分离且在 0.01~1.00 mg/L 呈良好的线性关系, 在 50、100、200 μ g/kg 3 个添加水平下, 平均回收率为 72.1%~91.6%, 相对标准偏差为 4.7%~13.6%, 方法检出限为 1~5 μ g/kg。**结论** 该方法具有快速、方便、经济、除脂效果好、环保等优点, 适合肉类食品中 4 种磺胺类药物残留分析, 并且提供了一个新的样品前处理思路。

关键词: 微流控芯片; 高效液相色谱-荧光检测器; 磺胺类药物; 肉类食品

Simultaneous determination of 4 kinds of sulfonamides residues in meat products by microfluidic chip and high performance liquid chromatography-fluorescence detector

QIU Qi-Quan¹, LI Mei-Ling¹, SUN Yue^{1,2,3,4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Research Center for Quality Engineering Technology of Traditional Chinese Medicine, Guangdong University, Guangzhou 510006, China; 3. Key Research Office of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 4. Guangdong Traditional Chinese Medicine Quality Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for simultaneous determination of 4 kinds of sulfonamides residues in meat products by microfluidic chip and high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD). **Methods** The sample was extracted with ethyl acetate, and then reextracted with 2 mol/L hydrochloric acid solution in the microfluidic chip and degreased with *n*-hexane. Then 100 μ L of hydrochloric acid effluent was collected and mixed with 0.5 g/mL sodium acetate solution at 1:1 (V:V), the derivations were performed by adding

基金项目: 2020 年广东省普通高校重点领域专项(2020ZDZX1028)

Fund: Supported by the Special Projects in Key Fields of Colleges and Universities in Guangdong Province in 2020 (Rural Revitalization) (2020ZDZX1028)

*通信作者: 孙悦, 博士, 教授, 主要研究方向为分析化学。E-mail: sunyuesdzb@163.com

*Corresponding author: SUN Yue, Ph.D, Professor, Guangdong Pharmaceutical University, No.280, East Outer Ring Road, University Town, Panyu District, Guangzhou 510006, China. E-mail: sunyuesdzb@163.com

0.2 g/L fluorescent amine 50 μ L, Shimadzu ODS-3 chromatographic column was used for separation, and the mobile phase was acetonitrile-2% acetic acid aqueous solution. **Results** Four kinds of sulfonamides were completely separated and showed a linear relationship at 0.01–1.00 mg/L. The recoveries were 72.1%–91.6% at 50, 100 and 200 μ g/kg levels, the relative standard deviations were 4.7%–13.6%, and the limits of detection were 1–5 μ g/kg. **Conclusion** This method is rapid, convenient, economical, good in degreasing effect and environmental protection, which is suitable for the analysis of 4 kinds of sulfonamides residues in meat products and provides a new idea for sample pretreatment.

KEY WORDS: microfluidic chip; high performance liquid chromatography-fluorescence detector; sulfonamides; meat products

0 引言

磺胺类药物是一大类合成抗生素,能够抑制细菌的生长繁殖,高效率 and 低成本使得其在动物养殖中被广泛应用。但是许多养殖者由于对磺胺类药物的毒性认识不足,滥用药物使得动物性产品中的磺胺残留量超标,而人长期摄入含磺胺类药物的肉类食品容易引起过敏反应,排尿和造血紊乱等危害^[1]。因此,磺胺类药物残留量也是衡量食品安全的关键指标之一。中国和欧盟均规定可食用肉类中所有磺胺类药物的最大残留水平为 100 μ g/kg,而日本规定的食用组织中的磺胺类药物最大残留量为 20 μ g/kg^[2]。目前,测定磺胺类药物的方法主要有免疫检测法^[3]、毛细管电泳分析法^[4]、高效液相色谱法^[5–7]等。免疫测定法具有灵敏度高、操作简单、成本低廉的优点,但容易出现假阳性,难以准确地同时测定多个磺胺成分含量^[8]。毛细管电泳分析法分离效果好、试剂消耗少,可以实现多物质的同时检测,但灵敏度不高^[9]。高效液相色谱法是同时测定多种磺胺成分最常用的方法,常规的液相色谱-紫外检测器灵敏度较低,在低浓度检测时样品基质干扰大,而液相色谱-质谱法可以获得比较高的灵敏度,但是仪器价格昂贵^[10]。由于磺胺类药物可与衍生试剂荧光胺进行反应,生成具有荧光特性的衍生物,而使用液相色谱-荧光检测器可以实现该衍生物的灵敏检测^[6],所以本研究选择使用液相色谱-荧光检测器作为检测仪器。

肉类食品基质复杂,建立简单、快速、高效的样品前处理方法是色谱分析前非常重要的环节。目前,已报道的前处理方法主要有液-液萃取(liquid-liquid-extraction, LLE)^[11–12]、固相萃取(solid-phase extraction, SPE)^[13–14]、基质固相分散(matrix solid-phase dispersion, MSPD)^[15–16]和 QuEChERS^[17–20]等。LLE 法萃取溶剂易获得,对操作技能要求较低,应用范围广,但需使用大量挥发性有机试剂,还时常有乳化现象,手动操作多,重复性差;SPE 法操作简单、省时省力,但成本高、固相萃取柱容易堵塞,且回收率低;基质固相分散法将样品均化、预处理、过滤、净化、提取过程一并完成,但常需要进一步净化;QuEChERS 法回收率高,操作简单,适用范围大,但过程较为烦琐,且

受基质影响大^[21]。肉类食品的传统净化方法有手动操作多,有机试剂使用量大等缺点,因此建立一个自动化的萃取净化方法十分有必要。

微流控芯片(microfluidic chip)又称芯片实验室,指的是把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室各种功能的一种技术。微流控芯片在食品检测中有越来越多的应用^[22–24]。WENG 等^[22]研究开发了一种微流控 ELISA 平台,结合光学传感器,可用于小麦面筋中 Arah1 蛋白的定量分析,与商用的 ELISA 试剂盒相比,微流控 ELISA 生物传感器将总检测时间从数小时缩短到 15–20 min,并将样品和试剂消耗减少到 5–10 μ L,具有出色的灵敏度;XIANG 等^[23]研究开发了一种基于量子点免疫测定的聚二甲基硅氧烷重力驱动的微流控芯片,可用于检测玉米和水稻中的黄曲霉毒素,其检出限为 0.06 ng/mL,回收率为 98.1%–101.8%,具有特异性高、精密度好和可重复使用的优点;JIANG 等^[24]开发了一种能够检测食品、饲料和饲料成分中呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)的纸基微流控芯片,将比色竞争性免疫测定法整合到纸微流体装置中,并使用金纳米颗粒作为信号指示剂,成功检测到固体食品、饲料或饲料成分的水提取物中的 DON,检测范围为 0.01–20 ppm,12 min 即可完成检测,与传统方法相比,该方法可以大大降低食品和饲料工业中 DON 检测的成本和时间。可以看出,基于微流控芯片的检测方法相比传统方法有一定的优势,在食品检测中具有非常大的发展潜力。本研究采用微流控芯片三相层流技术平台对肉类食品中使用范围最为广泛 4 种磺胺类药物残留进行集成化样品前处理,样品使用乙酸乙酯进行提取,提取后的乙酸乙酯在微流控芯片中经过盐酸溶液反萃取和正己烷除脂,调节 pH 后加入荧光胺溶液进行衍生化,衍生后使用液相色谱-荧光检测器进行检测,为肉类食品中磺胺类药物残留检测提供了一种新的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

样品均购于广东广州超市,猪肉,鸡肉剁碎均化后

-20°C保存,海龙打粉后-20°C保存。

磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SM1)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, SM2)、磺胺多辛(sulfadimoxine, SDM)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole, SIZ)、荧光胺(纯度 $\geq 99\%$,上海麦克林生化科技有限公司);4种磺胺药物的化学结构见图1;甲醇、乙腈(色谱纯,美国霍尼韦尔公司);乙酸乙酯、正己烷、醋酸钠、氢氧化钠、浓盐酸(分析纯,天津致远化学试剂有限公司);二氯二甲基硅烷、正己醇(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);乙酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);铬板、抛光片(长沙韶光铬板有限公司)。

1.2 仪器与设备

JKG-2A型光刻机(上海华岩仪器设备有限公司);MI12型生物倒置显微镜(广州市明美光电技术有限公司);ZHX-13型打孔机(杭州西湖台钻有限公司);KSL型箱式高温烧炉(合肥科晶材料技术有限公司);DK-S24型水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);SPLab01/02型单/双泵头注射泵(保定申辰泵业有限公司);BP211D型微量分析精密十万分之一电子天平(上海熙浩实业有限公司);KQ3200型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);RE-E5旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);XS-02A型多功能粉碎机(上海兆申科技有限公司);聚四氟乙烯管/硅胶管(上海革方机电设备有限公司);LC-20A高效液相色谱仪(日本SHIMADZU有限公司);5020-01732 inertsil ODS-3岛津色谱柱(上海岛

津实验器材有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 微流控芯片制作

使用光刻和湿化学刻蚀技术^[25]在由玻璃(厚1.7 mm、宽32 mm和长63 mm)制成的微流控芯片中制造通道,如图2所示。3个独立通道的宽度均为100 μm ,萃取通道之间有40 μm 宽的间隙,主通道长度为40 mm。在刻蚀35 min后(刻蚀速度为1 $\mu\text{m}/\text{min}$),当沟道深度达到35 μm 时,获得了沟道深度约为一半的引导结构,其作用是辅助层流的快速形成和稳定。芯片通道进样口端和出样口端都分别用打孔机钻有直径大为2 mm的小孔。小孔正上方用甲基丙烯酸酯AB胶粘合内径1 mm、外径6 mm、高12 mm的半三通管作为连接聚四氟乙烯管的接头装置,再用聚四氟乙烯管和橡胶管与3个注射泵相连。对上下两个通道表面选择硅烷化试剂进行疏水处理^[26]。

1.3.2 标准溶液的配制

标准储备溶液:分别精密称取各类磺胺标准品各1 mg,于各自的1 mL容量瓶中,使用甲醇定容至刻度,制成质量浓度为1 mg/mL的标准储备溶液,并在4°C下保存。

混合标准工作液:分别准确吸取各磺胺标准储备溶液50 μL 至5 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,制成各磺胺类药物相应质量浓度为10 mg/L的混合标准工作液,并在4°C下保存。

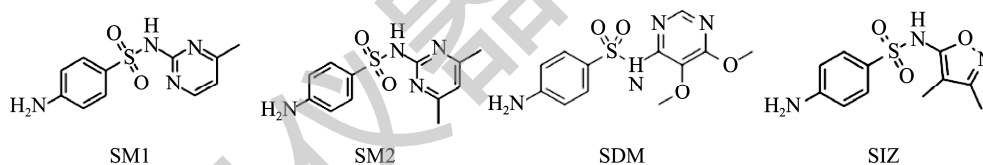


图1 磺胺类药物结构

Fig.1 Structures of sulfonamides

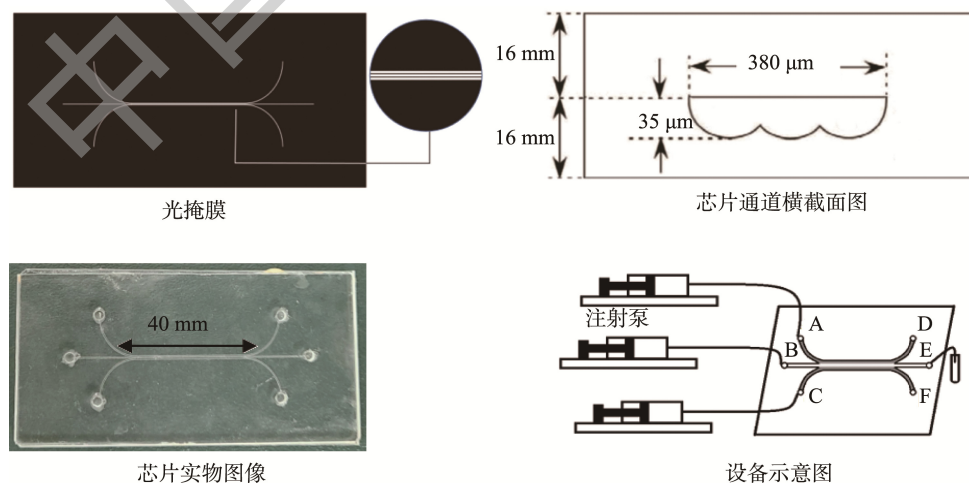


图2 微流控芯片和设备示意图

Fig.2 Schematic diagram of microfluidic chip and equipment

1.3.3 样品处理

(1)样品的制备

称取均匀肉类样品 2.00 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 2 min,超声 5 min,8000 r/min 离心 5 min,将乙酸乙酯层转移到旋蒸瓶中;用玻璃棒捣匀离心管中的样品,再向原离心管中加入 10 mL 乙酸乙酯,操作方法同上,再将乙酸乙酯层转移到旋蒸瓶中,最后把旋蒸瓶中的乙酸乙酯旋转蒸发浓缩并定容至 2 mL,制成乙酸乙酯的样品初提液。

(2)样品的净化

在注射泵的驱动下,往芯片入口端 A、B 和 C 分别注入乙酸乙酯的样品初提液、2 mol/L 的盐酸溶液和正己烷,调节注射泵流速,使 3 种溶液在通道中形成稳定的层流,E 口收集 100 μ L 反萃取溶液于 1 mL 聚丙烯离心管中。

(3)荧光衍生

在收集了 100 μ L 反萃取溶液的 1 mL 聚丙烯离心管中加入 0.5 g/mL 乙酸钠溶液 100 μ L、0.2 g/L 荧光胺溶液 50 μ L,涡旋混匀 30 s,静置 60 min 充分衍生化后经 0.22 μ m 的滤膜过滤后分析。

1.3.4 荧光衍生实验的设计

磺胺类药物和荧光胺本身不具有荧光性,磺胺类药物分子中磺酰胺的对位氨基(伯胺)活泼性高,可与衍生试剂荧光胺进行反应,生成具有荧光特性的衍生物,衍生物峰面积越大,荧光强度越高,衍生物荧光强度受衍生时间、衍生试剂质量浓度和 pH 影响^[15],故本研究考察衍生时间(15、30、45、60、120、180、240 min)、衍生试剂质量浓度(0.1、0.2、0.4、0.8 g/L)和 pH(1、2、3、4、5)对荧光衍生物荧光强度的影响。

1.3.5 芯片实验设计思路

动物食品中磺胺类成分的测定主要受到基质中蛋白质和脂肪成分的干扰,所以前处理过程中需要提取、除蛋白、除脂肪等多步操作,步骤比较烦琐,容易产生磺胺类成分损失。微流控芯片的优势在于操作步骤的集成化、自动化。本研究采用有机溶剂提取、水溶液反萃取、正己烷脱脂的前处理方法,以获得提取效率高、且纯度好的样品,并用三相层流芯片实现反萃取及脱脂步骤的集成化。

在微流控芯片上,流体分别从几个入口引入同一个微通道,流体因为雷诺指数低而形成层流。由公式(1)可知,芯片层流萃取效率(R)取决于分子扩散系数(D)、扩散时间(t)和扩散距离(l),即通道宽度。在连续层流溶液中,分子扩散时间(t)取决于溶液流速 v ,流速越低,通道宽度越窄,提取效率越高。但是,通道太窄会增加操作难度,因此,本研究将芯片光掩模中各萃取通道的宽度设计为 100 μ m。流速比例和流速会影响层流的稳定性,选取不含目标化合物的海龙样品 2 g,磺胺混合标准工作液加入量为 200 μ g/kg,设定了 5:3:5、5:5:5 和 5:7:5 的萃取流速(μ L/min)比例,按

照 1.3.3 操作,得出最佳的流速比例,再通过进一步实验得出最佳的流速用于层流提取。同时,在通道中构建引导结构,并进行硅烷化处理,以帮助稳定层流获得更高的萃取效率。芯片中最佳流速(μ L/min)比为 5:5:5 情况下,2 mol/L HCl 反萃取率(E ,%)按照公式(2)计算;磺胺药物加入空白基质后,按照公式(3)(4)计算回收率:

$$R = \frac{\sqrt{tD}}{l} \times 100\% \quad (1)$$

$$E\% = \frac{C_d V_d t}{C_s V_s t} = \frac{C_d}{C_s} \times \frac{V_d}{V_s} \times 100\% \quad (2)$$

$$C_f = C_p / E\% \quad (3)$$

$$\text{回收率}/\% = C_f / C_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中, C_s 为入口 A 标准溶液检测质量浓度(mg/L); C_d 为出口 E 的检测质量浓度(mg/L); V_s 为标准溶液流速(μ L/min); V_d 为 2 mol/L HCl 的流速(μ L/min); t 为萃取时间(min); C_f 为出口 E 的检测浓度(μ g/kg); C_i 为提取到乙酸乙酯中的磺胺浓度(μ g/kg); C_0 为加入空白基质的磺胺浓度(μ g/kg)。

1.4 色谱条件

流动相由 2%乙酸水溶液(A)和乙腈(B)组成。梯度洗脱条件为:0~15 min,75%~70% A;15~30 min,70%~65% A;30~40 min,65%~55% A;40~42 min,55%~35% A;42~50 min,35% A;50~65 min,75% A,流动相的流速保持在 1.0 mL/min,柱温控制在 40 $^{\circ}$ C,测定 4 种磺胺的激发波长和发射波长分别为 405 和 495 nm^[10],进样量 20 μ L。

1.5 绘制标准曲线

配制质量浓度为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L 的磺胺混合溶液,按照 1.3.3(3)方法进行衍生化反应后,分别取 20 μ L 过 0.22 μ m 的微孔滤膜,经高效液相色谱-荧光检测器检测,以衍生物峰面积为纵坐标(Y),标准溶液质量浓度为横坐标(X ,mg/L),构建标准曲线。

1.6 数据处理

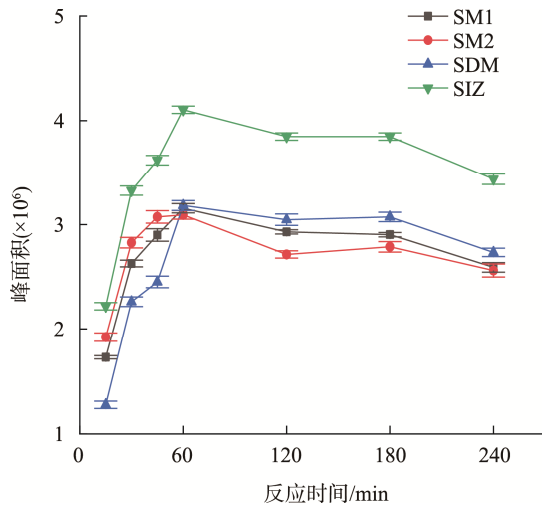
采用 Origin 2018 进行数据处理,表格采用 Microsoft Excel 2019 进行制表,使用 Coreldraw X7 进行光掩膜的绘图。

2 结果与分析

2.1 衍生条件的优化

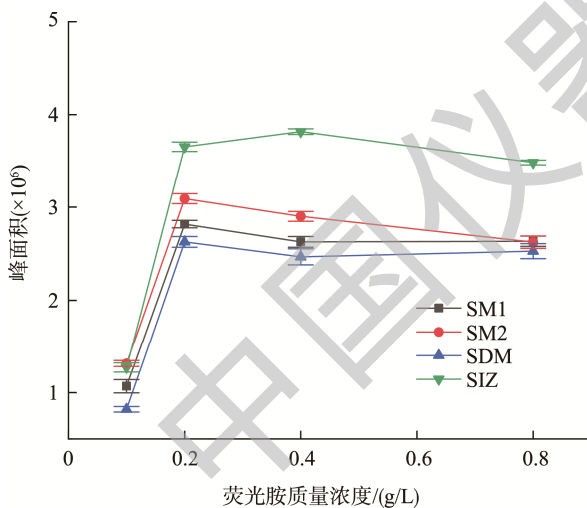
2.1.1 衍生时间的考察

如图 3 所示,衍生物峰面积在衍生 30 min 时达到较大值,但在 30 min 后仍然有上升的趋势,到 60 min 时逐渐稳定,说明此时衍生产物的形成和水解速度相近,峰面积达到一个相对稳定的水平^[27-28],而其中 SIZ 的衍生物峰面积相较于其他 3 种磺胺药物高,有可能是其衍生物水解的速度较为缓慢。为了保证测定结果的重现性,选择衍生时间为 60 min。

图 3 衍生时间对峰面积的影响($n=3$)Fig.3 Effects of derivatization times on peak areas ($n=3$)

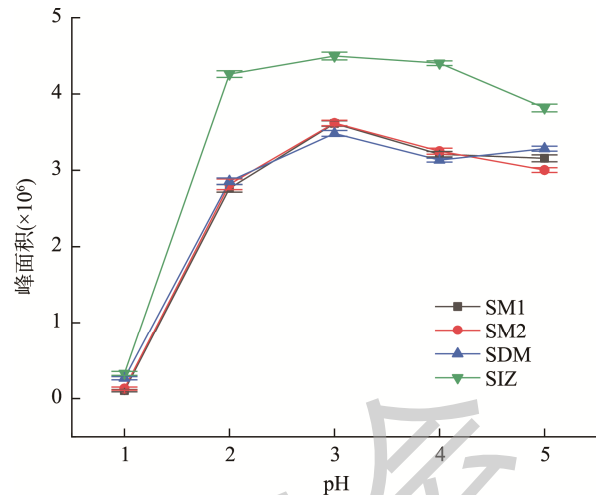
2.1.2 衍生试剂用量影响

如图 4 所示,随着荧光胺质量浓度的升高,衍生物峰面积也会升高,当加入的荧光胺质量浓度到 0.2 g/L 时,峰面积达到较大的值,继续增加荧光胺质量浓度,部分磺胺衍生产物的峰面积反而会有所下降。可能是荧光胺浓度过大,与磺胺衍生反应的竞争增加,从而导致反应速率减慢^[29],因此本研究确定使用 0.2 g/L 的荧光胺的甲醇溶液。

图 4 荧光胺质量浓度对峰面积的影响($n=3$)Fig.4 Effects of the amount of the fluorescamine on peak areas ($n=3$)

2.1.3 衍生 pH 的考察

如图 5 所示,在 pH 为 2~5 时,衍生物峰面积较大,可见磺胺和荧光胺的衍生反应在弱酸性的条件下反应更完全,原因可能是在酸性条件可促进衍生物中带荧光的羧基酸环化成非荧光的内酯,然后进一步结构重排为二酮,从而导致峰面积变小^[15,28-29],其中 pH 为 3 时荧光强度达到最大值,故本研究选择 pH 3 为最佳衍生 pH。

图 5 pH 对峰面积的影响($n=3$)Fig.5 Effects of pH on peak areas ($n=3$)

2.2 溶剂的选择

2.2.1 提取溶剂的选择

在预实验中,结合目前文献报道中常用的提取试剂^[29-31],本研究考察了乙酸乙酯和乙腈对肉类中磺胺残留的提取效果,结果显示,乙酸乙酯(76.2%~83.8%)和乙腈(69.7%~84.5%)的提取率相当,但相比之下,乙酸乙酯与 2 mol/L 的 HCl 不相溶,使得芯片中两股流体的层流界限清晰,更加有利于 2 mol/L 的 HCl 收集和层流调节,操作简便。因此,本研究选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

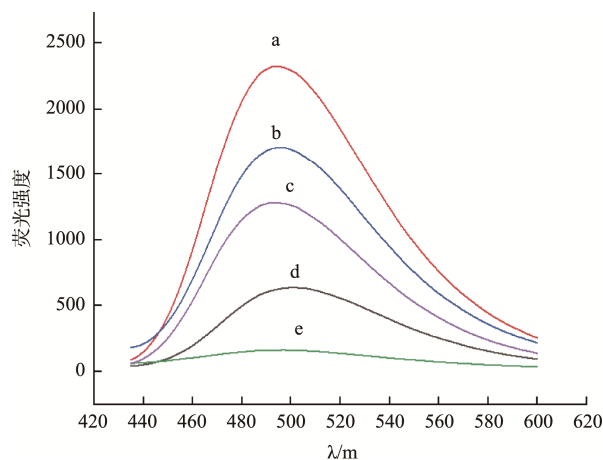
2.2.2 反萃取溶剂的选择

磺胺类药物难溶于水,易溶于稀酸、稀碱和部分有机溶剂,纯化方法常见有稀酸、稀碱溶液反萃取^[10]。本研究采用荧光光谱实验考察了 0.1 mol/L 的 HCl、2.0 mol/L 的 HCl、0.1 mol/L 的 NaOH、2.0 mol/L 的 NaOH 和 pH=3 的 HCl-NaAC 缓冲溶液对含 1.0 mg/L 磺胺甲基嘧啶的乙酸乙酯溶液的反萃取效果,反萃取后的溶液调节 pH 为 3,加入 0.2 g/L 荧光胺衍生,静置 60 min 后进行荧光检测器检测,结果见图 6。其中,衍生物荧光强度越高,说明磺胺在该溶液的溶解度越好,由图 6 可知,衍生物荧光强度表现为 2.0 mol/L 的 HCl>0.1 mol/L 的 HCl>0.1 mol/L 的 NaOH>2.0 mol/L 的 NaOH>HCl-NaAC 缓冲溶液。可能是因为磺胺类药物中有芳香第一胺和磺酰氨基^[32],可与碱或酸成盐而溶于水,而与酸形成的盐溶解度要比与碱形成的盐大,所以 2.0 mol/L 的 HCl 反萃取效果最好。因此,本研究选择 2.0 mol/L 的 HCl 为反萃取溶剂,其中,2 mol/L 的 HCl 在芯片中对 SM1、SM2、SDM、SIZ 的反萃取率分别为 79.2%、85.1%、80.9%、55.1%。

2.2.3 正己烷脱脂的影响

反萃取的过程中一些小分子脂质如胆固醇等在萃取过程中会进入反萃取溶液,反萃取后若经过正己烷除脂肪。由图 7 和表 1 可知,不加正己烷脱脂的色谱图中出现

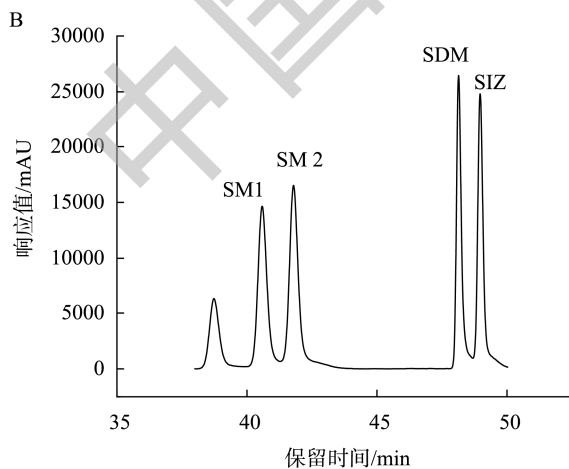
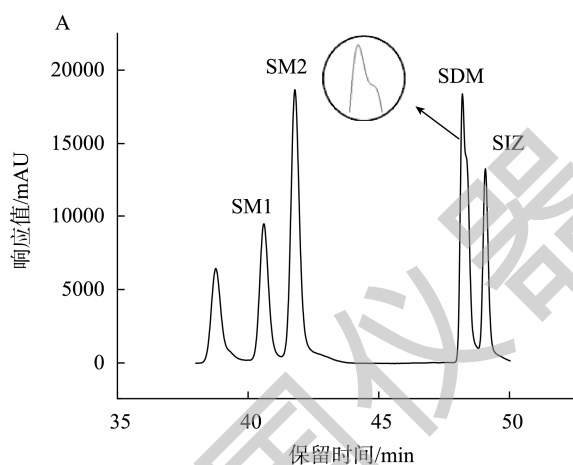
肩峰, 且峰面积偏低, 塔板数下降。为了防止色谱柱污染, 反萃取后的溶液还要经过正己烷的进一步净化。



注: a: 2.0 mol/L HCl; b: 0.1 mol/L HCl; c: 0.1 mol/L NaOH; d: 2.0 mol/L NaOH; e: HCl-NaAC 缓冲溶液。

图 6 不同反萃取溶剂的反萃取效果

Fig.6 Reverse extraction effects of different reverse extraction solvents



注: A 为不加正己烷脱脂; B 为加了正己烷脱脂。

图 7 加正己烷脱脂前后色谱图比较

Fig.7 Comparison of chromatograms before and after *n*-hexane degreasing

表 1 加正己烷脱脂前后塔板数情况比较

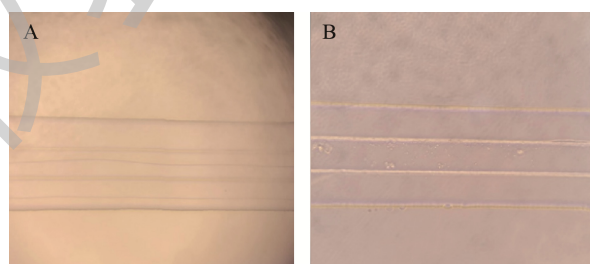
Table 1 Comparison of the number of trays before and after degreasing with *n*-hexane degreasing

磺胺类药物	不加正己烷除脂	加入正己烷除脂
SM1	62412	65909
SM2	73915	76726
SDM	128678	270738
SIZ	261283	265111

2.3 芯片实验条件的优化

2.3.1 玻璃表面改性的影响

玻璃表面是亲水性的, 而通入的乙酸乙酯和正己烷是有机溶液, 玻璃表面使用硅烷化试剂进行疏水化处理后, 与有机溶液的相斥减少了, 更有利于层流的形成。本研究考察了上下两个通道表面选择硅烷化试剂进行疏水处理前后的层流情况。如图 8 所示, 芯片通道未改性时, 引入通道的溶液不能形成层流, 波动十分不稳定, 在改性之后, 层流十分稳定。因此芯片上下两个通道需要用硅烷化试剂处理。



注: A 为在玻璃上实施疏水改性前; B 为在玻璃上实施疏水改性后。

图 8 芯片改性前后层流情况

Fig.8 Lamellar flow before and after chip modification

2.3.2 流速比例选择

不同萃取流速比例对 2 mol/L 的 HCl 反萃取效果的影响结果见表 2。乙酸乙酯、2.0 mol/L HCl 和正己烷的流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$) 比例为 5:5:5 时, 每种液体都可以均匀地填满相应的通道区域, 此时 2 mol/L 的 HCl 对 SM1、SM2、SDM、SIZ 的反萃取效果最好, 而流速比例为 5:3:5 和 5:7:5 时, 流速较高的液体会被挤到相邻的通道, 且反萃取效果不好, 这也说明层流的稳定性是影响微流控芯片萃取效率的重要因素。通过对层流稳定情况及萃取后溶液在最佳条件下衍生的峰面积进行比较, 本研究选择 1:1:1 作为萃取流速比例。

2.3.3 流速大小选择

不同萃取流速对 2 mol/L 的 HCl 反萃取效果的影响结果见表 3。当流速为 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, 层流不大稳定, 三股流体之间的界限时常波动, 萃取效果不好, 而当流速为 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时, 层流稳定, 但反萃取效果不如流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。这是因为降

低流速会延长分子在芯片通道中的扩散时间,从而提高萃取率,但是过低的流速也会使层流不稳定,导致萃取率下降。通过对层流稳定情况及萃取后溶液在最佳条件下衍生的峰面积进行比较,本研究选择 5:5:5 作为萃取流速($\mu\text{L}/\text{min}$)。

表 2 流速比对反萃取效果的影响($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)
Table 2 Effects of flow rate ratio on back extraction effect ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)

磺胺类药物	流速比		
	5:3:5	5:5:5	5:7:5
SM1	98.8 \pm 4.6	143.4 \pm 8.4	76.2 \pm 1.4
SM2	100.1 \pm 6.2	148.8 \pm 6.2	86.0 \pm 2.0
SDM	90.0 \pm 6.2	133.2 \pm 10.4	89.2 \pm 5.0
SIZ	63.2 \pm 2.0	83.8 \pm 4.0	52.4 \pm 3.0

表 3 流速对反萃取效果的影响($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)
Table 3 Effects of flow rate on back extraction effect ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)

磺胺类药物	流速比		
	3:3:3	5:5:5	7:7:7
SM1	122.0 \pm 4.8	143.4 \pm 8.4	95.4 \pm 7.4
SM2	128.0 \pm 6.8	148.8 \pm 6.2	103.2 \pm 7.8
SDM	136.0 \pm 5.8	133.2 \pm 10.4	105.6 \pm 7.8
SIZ	73.8 \pm 3.0	83.8 \pm 4.0	66.6 \pm 6.0

2.4 方法学考察

如表 4 所示, 4 种磺胺在 0.01~1.00 mg/L 范围内线性良好($r>0.999$), 同一个均匀样品, 分 6 次进行衍生化处理, 所得的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)值为 3.44%~6.01%, 说明该衍生方法线性关系和重现性较好。选取不含目标化合物的海龙样品进行添加回收实验, 在添加水平在 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 平均回收率为

72.1%~91.6%, 检出限为 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, RSDs 为 4.7%~13.6%。由此可见, 本方法回收率和灵敏度较高, 重现性较好, 可用于肉类食品中 4 种磺胺类药物残留的检测。

表 4 4 种磺胺类药物的线性方程和检出限
Table 4 Linear equations and limits of detection of 4 kinds of sulfonamides

磺胺类药物	线性方程	检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
SM1	$Y=3.48\times 10^6X+856$	5
SM2	$Y=3.46\times 10^6X+21840$	5
SDM	$Y=3.30\times 10^6X-4169$	1
SIZ	$Y=4.50\times 10^6X-9501$	1

2.5 样品测定

以水产品(干海龙)、新鲜肉(鸡肉和猪肉)为样品, 对本方法适用性进行了考察, 用该前处理方法与传统液液萃取方法^[10]进行对比。在最佳流速和最佳衍生条件下进行不同肉类基质的空白加标回收实验, 结果见表 5。芯片方法有更高的萃取率, 萃取率比传统方法高 10.1%~34.1%; 其中猪肉基质的萃取率增加度更多, 原因可能是由于萃取原理不同, 普通液液萃取是溶剂分子之间撞击过程中溶质的再分配, 而芯片里面的萃取是溶质分子的扩散, 本研究结果表明在脂肪含量高的样品中, 芯片方法更显优势。4 种磺胺类药物在不同的基质下回收率在 70.0%~90.2%之间, 表明该方法可适用于不同肉类的磺胺类药物残留测定, 其中猪肉的回收率偏低, 原因可能是猪肉脂肪含量高, 磺胺类药物较难提取。

净化效果如图 10 所示, 可见芯片方法的净化效果也略优于传统方法, 可能是芯片方法比传统液液萃取方法少了振荡操作, 许多脂质小分子没有进入反萃取溶液, 此外, 芯片方法把前处理集成在芯片中进行, 减少了样品前处理步骤和时间。

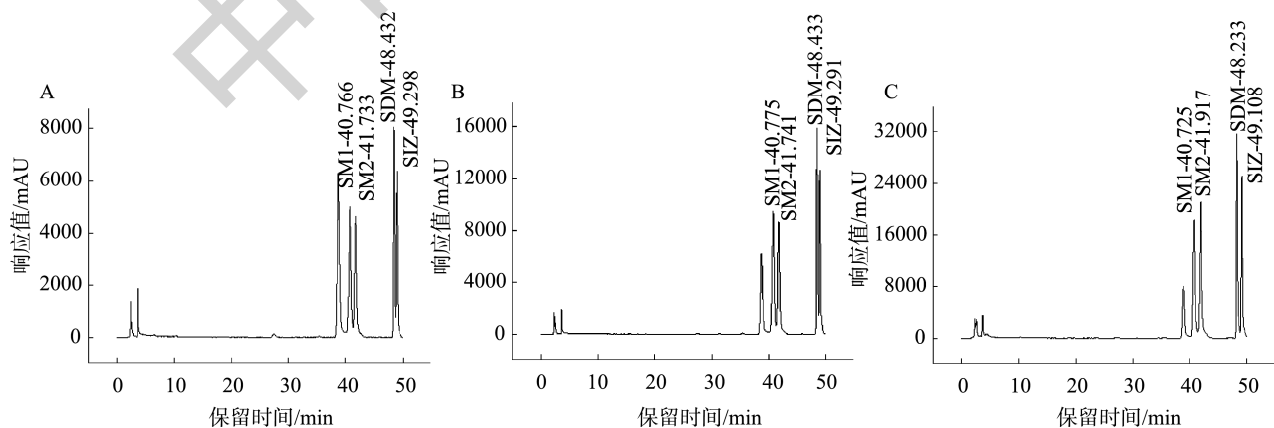
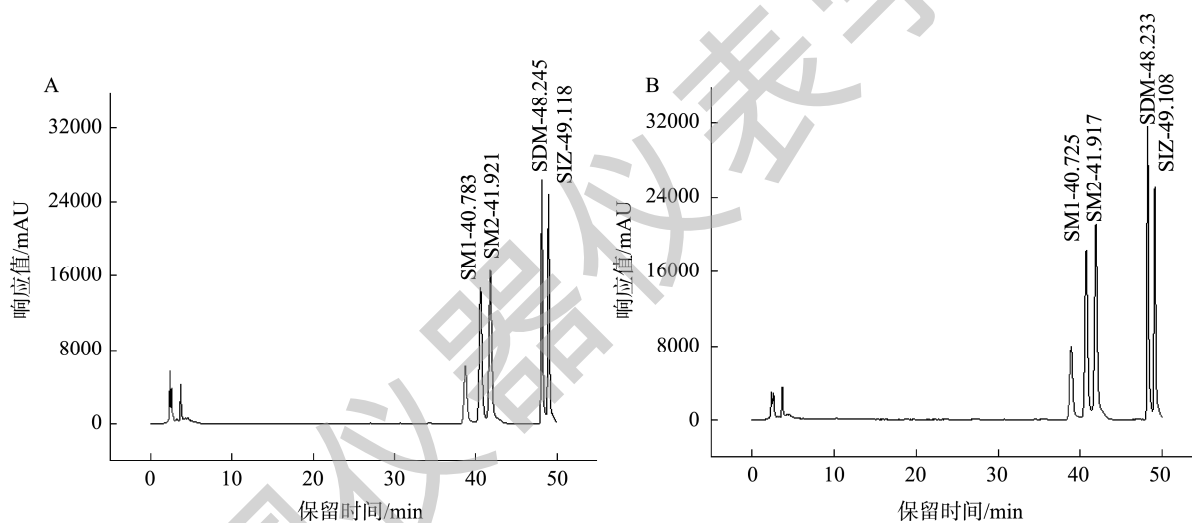


图 9 不同加标水平色谱图
Fig.9 Chromatogram of different spiking levels

表 5 不同前处理方法的比较(n=3)
Table 5 Comparison of different pretreatment methods (n=3)

肉类种类	磺胺类药物	传统方法萃取效果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	芯片方法萃取效果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	芯片方法相较传统方法 增加率/%	芯片方法 回收率/%
海龙	SM1	109.6 \pm 7.6	143.4 \pm 8.4	30.9	90.2
	SM2	117.8 \pm 6.0	148.8 \pm 6.2	26.2	87.5
	SDM	112.2 \pm 9.2	133.2 \pm 10.4	18.5	82.2
	SIZ	75.6 \pm 4.4	83.8 \pm 4.0	10.9	76.3
猪肉	SM1	88.0 \pm 5.8	108.8 \pm 5.0	23.6	70.2
	SM2	95.8 \pm 8.4	118.4 \pm 5.4	23.5	70.0
	SDM	86.4 \pm 6.4	113.8 \pm 5.2	31.6	70.1
	SIZ	58.6 \pm 2.6	78.6 \pm 5.6	34.1	71.6
鸡肉	SM1	119.4 \pm 11.0	138.8 \pm 9.8	16.2	87.3
	SM2	120.4 \pm 7.4	132.6 \pm 4.0	10.1	78.0
	SDM	118.2 \pm 6.6	140.8 \pm 9.0	19.2	86.9
	SIZ	82.2 \pm 5.8	92.6 \pm 8.8	12.8	84.3



注: A: 传统方法前处理; B: 芯片方法前处理。

图 10 海龙样品的不同前处理方法色谱图

Fig.10 Chromatograms of different pretreatment methods of *Syngnathus* sample

3 讨论与结论

本研究建立了一种微流控芯片联用 HPLC-FLD 用于肉类食品中 4 种磺胺类药物残留测定的方法, 检出限为 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 低于使用高效液相色谱-紫外检测器^[33-34]的检出限(6~26 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 且低于使用常规前处理方法下的高效液相色谱-荧光检测器^[10,35]的检出限(4~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。该方法采用荧光衍生的方式, 前处理省去了固相萃取的操作, 龙举^[10]等虽然也是利用荧光胺衍生和高效液相色谱-荧光检测器检测, 但是相比之下, 本实验的方法简化了部分震荡摇匀等烦琐的手动操作, 减少了有机溶剂的使用, 具有快速、方便、经济、除脂效果好、环保等优点。

该方法适合于肉类食品中磺胺类药物残留分析, 提

供了一个新的样品前处理思路, 但还存在许多有待解决的问题。实验中仍然使用了具有毒性的有机试剂, 后续的研究可以寻找更加环保和绿色的萃取试剂; 本研究采用的进样方式是泵注射, 也需要手动操作, 后续的研究可以采用毛细作用力或电动微泵进行自动进样; 实验中的 pH 调节和荧光衍生是在芯片外进行的, 且衍生时间较长, 若 pH 调节和荧光衍生均可在芯片中进行同时缩短衍生时间, 则可以进一步实现自动化和高效化。

参考文献

- [1] STANISLAVA GD, ELENA VK, VLADIMIR VA, *et al.* Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection—A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 850: 6–25.
- [2] VEMALA G, BABU RN, RAO VA. Determination of sulfadoxine residues

- in poultry meat by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *J Entomol Zool*, 2018, 6(2): 2580–2584.
- [3] JAKI S, MIHALJEV E, KARTALOVIC B, *et al.* Evaluation of ELISA tests as screening methods for determination of antibiotics and sulfonamides in honey [J]. *Food Feed Res*, 2018, 45(1): 11–17.
- [4] AN JX, WANG X, MING MT, *et al.* Determination of sulfonamides in milk by capillary electrophoresis with PEG@MoS₂ as a dispersive solid-phase extraction sorbent [J]. *Roy Soc Open Sci*, 2018, 5(5): 172104.
- [5] WANG YX, LI JH, JI L, *et al.* Simultaneous determination of sulfonamides antibiotics in environmental water and seafood samples using ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2160.
- [6] EWELINA P, MONIKA PS, KRZYSZTOF K. Determination of sulfonamides in feeds by high-performance liquid chromatography after fluorescamine precolumn derivatization [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 452.
- [7] LI XY, LI QL, XUE AF, *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with single-drop microextraction for the fast determination of sulfonamides in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *Anal Methods-UK*, 2016, 8(3): 517–525.
- [8] 顾晔, 张爽, 王成军, 等. 基于免疫原理的 7 种磺胺类兽药残留快速检测试剂结果准确性评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(3): 992–1000.
- GU Y, ZHANG S, WANG CJ, *et al.* Accuracy evaluation of rapid detection kits for 7 kinds of sulfonamides veterinary drug residues based on immune principle [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(3): 992–1000.
- [9] 张健, 李利军. 高效毛细管电泳胶束溶剂堆积法检测鸡蛋中磺胺甲噁二唑、磺胺二甲氧嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶的药物残留[J]. *分析试验室*, 2020, 39(9): 1024–1029.
- ZHANG J, LI LJ. Determination of sulfamethizole, sulfadimethoxine and sulfameter residues in egg by high performance capillary electrophoresis using micelle to solvent stacking [J]. *Chin J Anal Lab*, 2020, 39(9): 1024–1029.
- [10] 龙举, 马剑锋, 张小军. 荧光胺柱前衍生-高效液相色谱法同时测定水产品中 8 种磺胺的残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(14): 4737–4743.
- LONG J, MA JF, ZHANG XJ. Simultaneous determination of 8 kinds of sulfonamides residues in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column derivatization [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(14): 4737–4743.
- [11] NATALIA AM, LAURA GG, ANA MGC. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2014, 143: 459–464.
- [12] CAROLINA N, PATRICIA R, JOSE MM, *et al.* Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2294–2299.
- [13] 张微, 肖曼, 吴丹, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖“非药品”投入品中 37 种禁限兽药[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(12): 1751–1757.
- ZHANG W, XIAO M, WU D, *et al.* Simultaneous determination of 37 kinds of prohibited veterinary drug residues in aquacultural “non pharmaceutical” in puts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(12): 1751–1757.
- [14] WEN L, LIU L, WANG X, *et al.* Spherical mesoporous covalent organic framework as a solid-phase extraction adsorbent for the ultrasensitive determination of sulfonamides in food and water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1625: 461275.
- [15] 陈晓燕, 周静峰, 施家威. 基质分散固相萃取-高效液相色谱-可变波长检测法测定新鲜牛奶中 8 种抗生素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12): 4812–4817.
- CHEN XY, ZHOU JF, SHI JW. Determination of 8 kinds of antibiotics in fresh milk by matrix dispersion solid phase extraction-high performance liquid chromatography-variable wavelength detection method [J]. *Food Saf Qual*, 2021, 12(12): 4812–4817.
- [16] WANG ZB, HE MY, JIANG CZ, *et al.* Matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous ionic liquid microextraction for the determination of sulfonamides in animal tissues using high-performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(23): 4127–35.
- [17] 洪妍妍, 陈海玲, 王翠玲, 等. 样品前处理 QuEChERS 法及新型吸附材料在水产品中抗生素残留分析中的应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(21): 6898–6906.
- HONG YY, CHENG HL, WANG CL, *et al.* Application progress of sample pretreatment QuEChERS method and new adsorbents materials in the analysis of antibiotic residues in aquatic products [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(21): 6898–6906.
- [18] 李婧妍, 韩波, 安乐, 等. QuEChERS 前处理结合 HPLC-MS/MS 同时测定原料乳中 30 种兽药残留[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(9): 176–185.
- LI QY, HAN B, AN L, *et al.* Simultaneous determination of residues of 30 veterinary drugs in raw milk by QuEChERS and HPLC-MS/MS [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(9): 176–185.
- [19] 邵丽, 董耀, 王晓, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法快速测定鸡肉中 36 种兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(14): 5561–5567.
- SHAO L, DONG Y, WANG X, *et al.* Rapid detection of 36 kinds of veterinary drug residues in chicken by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(14): 5561–5567.
- [20] 李朔, 张臻, 马玲, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同步测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 301–308.
- LI S, ZHANG C, MA L, *et al.* Simultaneous determination of 24 sulfonamide antibiotics in fish products by QuEChERS with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(9): 301–308.
- [21] 谭荣霞, 胡玉斐, 李攻科. 动物源性食品磺胺类抗生素残留快速前处

- 理与检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4543-4550.
- TAN RX, HU YF, LI GK. Research progress on rapid pretreatment and detection methods of sulfonamide antibiotic residues in animal-derived food [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(14): 4543-4550.
- [22] WENG X, GAUR G, NEETHIRAJAN S. Rapid detection of food allergens by microfluidics ELISA-based optical sensor [J]. *Biosens*, 2016, 6(2): 24.
- [23] XIANG X, YE Q, SHANG Y, *et al.* Quantitative detection of aflatoxin B₁ using quantum dots-based immunoassay in a recyclable gravity-driven microfluidic chip [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 190(1): 113394.
- [24] JIANG Q, WU J, YAO K, *et al.* Paper-based microfluidic device (DON-chip) for rapid and low-cost deoxynivalenol quantification in food, feed, and feed ingredients [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(11): 3072-3079.
- [25] YIN XF, SHENG H, FANG ZL. Simple processing technology for making glass microfluidic chips [J]. *Anal Chem*, 2003, 31(1): 116-119.
- [26] HUH YS, JEONG CM, CHANG HN, *et al.* Rapid separation of bacteriorhodopsin using a laminar-flow extraction system in a microfluidic device [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(1): 14103.
- [27] ZOTOU A, VASILADOU C. A fluorescence-LC method for the determination of sulfonamides in biological fluids with pre-column derivatization [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(3-4): 389-397.
- [28] BERNARDO S, WEIGELE M, TOOME V, *et al.* Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1974, 163(1): 390-399.
- [29] 吴翠琴, 陈迪云, 陈永亨, 等. 荧光胺衍生液相色谱法测定猪肝中10种磺胺[J]. *分析实验室*, 2018, 37(12): 1370-1374.
- WU CQ, CHEN DY, CHEN YH, *et al.* Fluorescamine derivatization determination of 10 sulfonamide residues in pork liver by HPLC with fluorescence detector [J]. *Chin J Anal Lab*, 2018, 37(12): 1370-1374.
- [30] 许晓辉, 徐惠昌, 王小乔, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定海螵蛸中9种磺胺类药物残留量[J]. *化学试剂*, 2021, 43(11): 1546-1550.
- XU XH, XU HC, WANG XQ, *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nine kinds of sulfonamides residues in cuttlebone [J]. *Chem Reag*, 2021, 43(11): 1546-1550.
- [31] 王雪峰, 魏光强, 范江平, 等. 水产品中3种磺胺类药物和孔雀石绿的样品前处理及检测条件优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(21): 5709-5715.
- WANG XF, WEI GQ, FAN JP, *et al.* Optimization of pretreatment and test conditions for the detection of 3 kinds of sulfonamides and malachite green in aquatic products [J]. *Food Saf Qual*, 2018, 9(21): 5709-5715.
- [32] 赵寅, 卢玉, 刘桂亮, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中22种磺胺类兽药残留[J]. *分析实验室*, 2022, 41(2): 187-191.
- ZHAO Y, LU Y, LIU GL, *et al.* Determination of 22 sulfonamides residues in milk by high performance liquid chromatography coupled with solid phase extraction [J]. *Chin J Anal Lab*, 2022, 41(2): 187-191.
- [33] 傅宏庆, 王颖, 张丹, 等. 高效液相色谱-紫外法对13种磺胺类药物的同步检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(4): 233-237.
- FU HQ, WANG Y, ZHANG D, *et al.* Simultaneous determination of 13 sulphonamides by high performance liquid chromatography-ultraviolet [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2012, 39(4): 233-237.
- [34] 吴银良, 刘素英, 单吉浩, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定鸡肝中磺胺类药物残留量[J]. *分析化学*, 2005, (12): 1713-1716.
- WU YL, LIU SY, SHAN JH, *et al.* Simultaneous determination of sulfonamide residues in chicken liver by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2005, (12): 1713-1716.
- [35] 郑斌, 余海霞, 杨会成, 等. 高效液相色谱-在线柱后衍生荧光检测法同时测定水产品中14种磺胺类药物残留[J]. *食品科学*, 2012, 33(4): 230-233.
- ZHENG B, YU HX, YANG HC, *et al.* Simultaneous determination of 14 sulfonamide residues in fishery products by high performance liquid chromatography with online postcolumn derivatization and fluorescence detection [J]. *Food Sci*, 2012, 33(4): 230-233.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

作者简介



邱启全, 硕士, 主要研究方向为分析化学。

E-mail: 979575704@qq.com



孙悦, 博士, 教授, 主要研究方向为分析化学。

E-mail: sunyuesdzb@163.com