

文章编号:1000-8551(2020)02-0442-10

时间分辨同步荧光法同时检测水中硫酸新霉素和磺胺二甲基嘧啶含量

陈健 刘木华 袁海超 黄双根 赵进辉* 徐宁
王婷 胡围

(江西农业大学江西省现代农业装备重点实验室/

江西省果蔬采后处理关键技术及质量安全协同创新中心,江西 南昌 330045)

摘要:为探究同时检测水中的硫酸新霉素(NEO)和磺胺二甲基嘧啶(SM2)的新方法,根据NEO和SM2在2-巯基乙醇的存在下可与邻苯二甲醛生成具有荧光特性的衍生物,建立时间分辨同步荧光法同时检测水中NEO和SM2的含量。通过研究不同组分的时间分辨同步荧光光谱,确定NEO与邻苯二甲醛衍生物、SM2与邻苯二甲醛衍生物的同时激发特征峰分别为335和291 nm波长处,最佳采集时间分别为1和80 min,最佳同步波长差分别为120和150 nm;采用单因素试验考察邻苯二甲醛溶液、2-巯基乙醇溶液和BR缓冲液的加入量对荧光强度的影响,确定最优的加入量:邻苯二甲醛溶液1.0 mL、2-巯基乙醇溶液0.25 mL、BR缓冲液0.025 mL;据此建立NEO浓度与荧光强度的线性关系,在0.5~14.0 mg·L⁻¹范围内,得到其线性方程为 $Y=14.73X+6.14$;建立SM2浓度与荧光强度的线性关系,在0.25~9.0 mg·L⁻¹范围内,得到其线性方程为 $Y=13.86X+21.49$ 。NEO和SM2的检出限分别为0.5和0.25 mg·L⁻¹,训练集决定系数(R_c^2)分别为0.9975和0.9669,水中NEO和SM2含量的真实值与预测值之间的预测集决定系数(R_p^2)分别为0.9982和0.9889,预测集均方根误差(RMSEP)分别为0.3803和0.2575 mg·L⁻¹,回收率分别处于101.8%~114.0%和92.3%~115.8%之间,相对标准偏差(RSD)分别为4.0%~8.4%和3.6%~6.6%。本方法线性关系良好,可实现水中NEO和SM2的同时测定。

关键词:硫酸新霉素;磺胺二甲基嘧啶;时间分辨同步荧光

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.02.0442

硫酸新霉素(neomycin sulfate, NEO)和磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine, SM2)均属于广谱抗生素,对多种致病菌具有抑制或杀灭的效果。它们被广泛应用于水产养殖业、畜牧业和治疗疾病等领域^[1-2]。然而,这些抗生素的大量使用必然会给生态环境带来巨大压力,特别是未被生物体有效吸收的药物会直接进入水环境,不仅危害生态系统安全,而且会危害人体健康^[3-4]。研究表明,现有的水处理工艺不能彻底去除水体中的痕量抗生素^[5-7],我国作为抗生素生产和使用大国,水中抗生素污染比其他国家或地区更加严重^[8-9]。因此,迫切需要一种快速、便捷和可靠的水中

抗生素检测方法来规范水中抗生素污染的现象。

目前,高效液相色谱法^[10-12]、免疫分析法^[13-14]、毛细管电泳法^[15-16]等均已被用于水中抗生素的检测。其中高效液相色谱法抗干扰能力强、灵敏度高,但是运行成本高,不易推广;免疫分析法样品处理较为困难,部分环节成本高;毛细管电泳法重复性差。而荧光分析法因其具有线性范围大、灵敏度高以及可供选择的参数多等优点,在诸多领域得到了应用。NEO属于氨基糖苷类抗生素,具有氨基糖结构,SM2属于磺胺类抗生素,具有芳伯胺基结构,NEO和SM2本身不发荧光,但它们与邻苯二甲醛在还原剂2-巯基乙醇的作用下

收稿日期:2019-04-15 接受日期:2019-08-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31660485),江西省教育厅科技计划资助项目(GJJ160350)

作者简介:陈健,男,主要从事农畜产品无损检测研究。E-mail:chenjian1528@foxmail.com

*通讯作者:赵进辉,男,副教授,主要从事图像处理与农畜产品无损检测研究。E-mail:9115328@qq.com

会生成有荧光特性的异吲哚衍生物^[17-19],生成路线见图1。

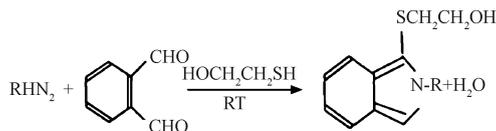


图1 邻苯二甲醛与伯胺类化合物衍生反应示意图
Fig.1 Schematic diagram of derivative reaction of o-phthalaldehyde with primary amines

目前关于NEO和SM2的荧光法检测方法大多是对禽肉、禽蛋、牛奶等的检测,如徐将等^[17]采用荧光法建立了鸭肉中NEO的测定方法,检测限为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;赵进辉等^[20]采用导数同步荧光光谱、小波、分段遗传算法(subsection genetic algorithm, SGA)和最小二乘支持向量回归(least square support vector regression, LSSVR)联用建立了鸭蛋中NEO的预测模型,模型预测集的决定系数(R^2)为0.9671;邓樱花等^[21]采用荧光法建立了蛋清和牛奶中SM2的检测方法,检出限为 $2.8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而有关水中NEO或SM2采用荧光法检测的相关报道较少,尤其是水中NEO和SM2采用荧光法同时检测,鲜见相关报道。同步荧光法具有光散射少、选择性高和简化图谱等优势^[22]。时间分辨荧光法适用于对混合体系中光谱重叠但荧光寿命有差异的组分进行检测^[23-24]。时间分辨同步荧光法结合了时间分辨荧光法与同步荧光法的优点,能避免水中NEO、SM2与邻苯二甲醛衍生物的同步荧光光谱重叠^[25]。本研究采用时间分辨同步荧光法同时对它们进行定性、定量解析,尝试建立一种水中NEO和SM2含量快速检测的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

NEO标准品(分析标准品),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;SM2标准品(99.4%),德国Dr. Ehrenstorfer公司;邻苯二甲醛(99.0%),成都艾科达化学试剂有限公司;2-巯基乙醇(99.0%),成都艾科达化学试剂有限公司;硼酸($\geq 99.5\%$),西陇科学股份有限公司;磷酸($\geq 85.0\%$),西陇化工股份有限公司;冰乙酸($\geq 99.5\%$),天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要仪器与设备

Cary Eclipse 荧光分光光度计, Varian, Inc. 美国; FA1004B 型电子天平(精度为 0.1 mg),上海上平仪器有限公司;石英比色皿(1 cm 光程),宜兴市晨伟玻璃

仪器厂;全自动RO纯水机,湖南科尔顿水务有限公司;JK-50B型超声波清洗器,合肥金尼克机械有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准液及试剂溶液的配制 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO标准贮备液配制:准确称取NEO标准品 10.0 mg 于 100.0 mL 容量瓶中,先用少量超纯水溶解,待超声后,冷却至室温,再用超纯水定容,配制成浓度为 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NEO标准贮备液; $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SM2标准贮备液配制:准确称取SM2标准品 10.0 mg 于 100.0 mL 容量瓶中,先用少量超纯水溶解,待超声后,冷却至室温,再用超纯水定容,配制成浓度为 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SM2标准贮备液。 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO标准工作液配制:准确量取NEO标准贮备液 8.0 mL 于 100.0 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,配制成浓度为 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NEO标准工作液; $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SM2标准工作液配制:准确量取SM2标准贮备液 8.0 mL 于 100.0 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,配制成浓度为 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SM2标准工作液。不同质量浓度的NEO与SM2水溶液配制:分别量取不同体积的 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO标准贮备液和 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SM2标准贮备液于 10.0 mL 容量瓶中,用超纯水定容至 10.0 mL ,得到不同质量浓度的NEO与SM2水溶液(NEO质量浓度范围为 $0.5\sim 14.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, SM2质量浓度范围为 $0.25\sim 9.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。邻苯二甲醛溶液配制:准确称取邻苯二甲醛标准品 13.4 mg 于 100.0 mL 容量瓶中,先用少量超纯水溶解,待超声后,冷却至室温,再用超纯水定容,配制成浓度为 $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲醛溶液;2-巯基乙醇溶液配制:准确量取2-巯基乙醇 $140\text{ }\mu\text{L}$ 于 100.0 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,配制成浓度为 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2-巯基乙醇溶液;BR缓冲液配制:用超纯水配制浓度各为 $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸、乙酸和硼酸混合缓冲溶液。

1.3.2 不同条件下时间分辨同步荧光光谱的采集

1)不同组分的时间分辨同步荧光光谱的采集:①分别取 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO水溶液、 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SM2水溶液、 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO与SM2水溶液混合液各 2.0 mL 于不同的石英比色皿中。②分别取超纯水 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO水溶液、 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SM2水溶液、 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NEO与SM2水溶液混合液各 1.0 mL 于不同的石英比色皿中,再先后均加入 0.5 mL $0.001\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液、 0.5 mL $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液和 0.5 mL BR缓冲液(pH值1.8)。对步骤①、②中的样品,先采集 1 min 、同步波长差 120 nm 下的同步荧光光谱,再采集 80

min、同步波长差 150 nm 下的同步荧光光谱。

2) 不同荧光衍生化时间和不同同步波长差时的时间分辨同步荧光光谱的采集: ①分别取 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 水溶液、 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SM2 水溶液、 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 与 SM2 水溶液混合液各 1.0 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后均加入 0.5 mL $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液、0.5 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液和 0.5 mL BR 缓冲液 (pH 值 1.8)。②分别取 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 水溶液、 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SM2 水溶液各 1.0 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后均加入 0.5 mL $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液、0.5 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液和 0.5 mL BR 缓冲液 (pH 值 1.8)。对步骤①中样品的采集时间均为 1~120 min, 采集时间间隔均为 1 min, 其中采集 120 nm 同步波长差下 NEO 水溶液和 NEO 与 SM2 水溶液混合液的同步荧光光谱, 采集 150 nm 同步波长差下 SM2 水溶液和 NEO 与 SM2 水溶液混合物的同步荧光光谱。对步骤②中的样品, 分别采集 110、115、120、125、130、135、140、145、150、155 和 160 nm 同步波长差下的同步荧光光谱, 其中 NEO 水溶液采集时间 1~50 min, SM2 水溶液采集时间 1~80 min, 采集时间间隔均为 1 min。

3) 不同邻苯二甲醛溶液加入量的时间分辨同步荧光光谱的采集: 首先, 取 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 与 SM2 水溶液 0.5 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后分别加入不同体积的 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液 (0.25、0.50、0.75、1.00 和 1.25 mL)、0.25 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液、0.25 mL BR 缓冲液 (pH 值 1.8)。先采集 1 min、同步波长差 120 nm 下的同步荧光光谱, 再采集 80 min、同步波长差 150 nm 下的同步荧光光谱。

4) 不同 2-巯基乙醇溶液加入量的时间分辨同步荧光光谱的采集: 首先, 取 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 与 SM2 水溶液 0.5 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后分别加入 1.0 mL $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液, 不同体积的 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液 (0.1、0.2、0.25、0.3 和 0.4 mL, pH 值 1.8) 和 0.25 mL BR 缓冲液 (pH 值 1.8)。先采集 1 min、同步波长差 120 nm 下的同步荧光光谱, 再采集 80 min、同步波长差 150 nm 下的同步荧光光谱。

5) 不同 BR 缓冲液加入量的时间分辨同步荧光光谱的采集: 首先, 取 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NEO 与 SM2 水溶液 0.5 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后分别加入 1.0 mL $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液、0.25 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液及不同体积的 BR 缓冲液 (0.025、0.05、0.1、0.2、0.3 和 0.4 mL)。先采集 1

min、同步波长差 120 nm 下的同步荧光光谱, 再采集 80 min、同步波长差 150 nm 下的同步荧光光谱。

6) 定量样品的时间分辨同步荧光光谱的采集: 首先, 取不同质量浓度的 NEO 与 SM2 水溶液 0.5 mL 于不同的石英比色皿中, 再先后加入 1.0 mL $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二甲醛溶液、0.25 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇溶液和 0.025 mL BR 缓冲液。先采集 1 min、同步波长差 120 nm 下的同步荧光光谱, 再采集 80 min、同步波长差 150 nm 下的同步荧光光谱。

1.4 荧光光谱仪参数设置

使用 Cary Eclipse 荧光分光光度计采集时间分辨同步荧光光谱。采集参数如下: 同步激发波长扫描范围 230~400 nm, PMT 探测器电压为 700 V, 激发和发射狭缝为 10 nm, 扫描速度为 $210 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 平滑方式为 Moving average。每个样品均重复测量 5 次。

1.5 数据分析

光谱预处理方法: 采用 The Unscrambler X 10.4 对试验数据进行处理, 将采集的原始荧光光谱数据导入此软件进行基线偏移操作。

同步荧光衰变曲线数据处理: 提取 1~50 min 内 NEO 与邻苯二甲醛衍生物 335 nm 波长处的同步激发特征峰, 以时间 (min) 为 X 轴、同步波长差 (nm) 为 Y 轴、同步激发特征峰强度 (a.u.) 为 Z 轴, 在 Origin 2018 中建立 NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光衰变曲线; 提取 1~80 min 内 SM2 与邻苯二甲醛衍生物 291 nm 波长处的同步激发特征峰, 以时间 (min) 为 X 轴、同步波长差 (nm) 为 Y 轴、同步激发特征峰强度 (a.u.) 为 Z 轴, 在 Origin 2018 中建立 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光衰变曲线。

训练集数据处理: 在 10 个样本中挑选 5 个样本作为训练集样本, 以水溶液质量浓度 $X (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标、同步激发特征峰的强度 $Y (\text{a.u.})$ 为纵坐标, 在 Origin 2018 中绘制水溶液中 NEO 和 SM2 的工作曲线, 并进行线性回归分析。

预测集数据处理: 取样本集中剩下的 5 个样本作为测试集样本, 以真实值 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标、预测值 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为纵坐标, 分别在 Origin 2018 中绘制水溶液中 NEO 和 SM2 的真实值与预测值之间的关系曲线。

2 结果与分析

2.1 时间分辨同步荧光图谱

图 2-A、B 分别是采集时间为 1 min、同步波长差为 120 nm 的时间分辨同步荧光图谱和采集时间为 80

min,同步波长差为 150 nm 的时间分辨同步荧光图谱。在同步波长差为 120 nm 时,NEO 衍生体系的同步激发特征峰是位置在 335 nm 波长处的宽谱峰;在同步波长差为 150 nm 时,SM2 衍生体系的同步激发特征峰是位置在 291 nm 波长处的宽谱峰。

在 1 min 的时间分辨同步荧光图谱中超纯水体系、NEO 水溶液、SM2 水溶液、NEO 与 SM2 水溶液和 SM2 衍生体系均无明显的荧光峰,NEO 衍生体系和 NEO 与 SM2 衍生体系具有 335 nm 波长处的荧光峰

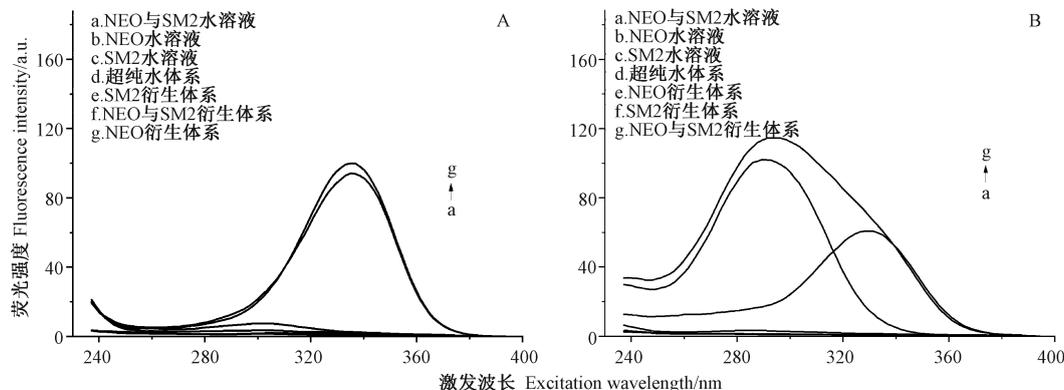


图 2 1 min 时间分辨同步荧光图谱 (A) 与 80 min 时间分辨同步荧光图谱 (B)

Fig.2 Time-resolved synchronous fluorescence spectra at 1 min (A) and 80 min (B)

2.2 荧光衍生化时间及同步波长差对水中 NEO 和 SM2 的同步荧光强度的影响

NEO、SM2 与邻苯二甲醛反应生成异吡啶衍生物。显然,荧光衍生化时间会影响异吡啶衍生物的生成量。在同步扫描过程中,同步波长差的选择将直接影响同步荧光光谱的信号强度。由图 3 可知,1~50 min 内随着荧光衍生化时间的延长,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈快速减弱的趋势。由图 4-A 可知,随着同步波长差的增加,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈先波动增强后波动减弱的趋势,在同步波长差 120 nm 时最强。

由图 3 可知,在 1~80 min 内 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度变化趋势与 NEO 与邻苯二甲醛衍生物的趋势相反,呈快速增强的趋势,在 80 min 时最强。由图 4-B 可知,随着同步波长差增加,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度与 NEO 与邻苯二甲醛衍生物的趋势相同,呈先波动增强后波动减弱的趋势,在同步波长差 150 nm 时最强。

综合分析,NEO 与邻苯二甲醛衍生物和 SM2 与邻苯二甲醛衍生物在合适的荧光衍生化时间均具有很强的荧光信号,而它们的荧光衰变趋势相反,可以利用这个特性在时间上对两种物质进行分辨。本研

(图 2-A)。

在 80 min 的时间分辨同步荧光图谱中超纯水体系、NEO 水溶液、SM2 水溶液和 NEO 与 SM2 水溶液均无明显的荧光峰,SM2 衍生体系和 NEO 与 SM2 衍生体系具有 291 nm 波长处的荧光峰;NEO 衍生体系的荧光强度远弱于 SM2 衍生体系的荧光强度,且两者间的特征峰峰位相差很大(图 2-B)。

综合分析,可以应用时间分辨同步荧光法测定 NEO 与 SM2 衍生体系中的 NEO 和 SM2 含量。

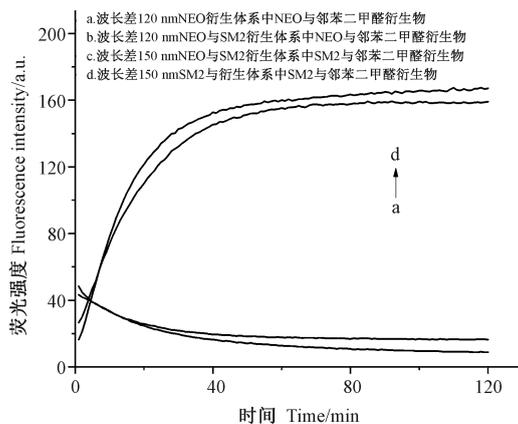


图 3 NEO 衍生体系和 SM2 衍生体系分别在 120 和 150 nm 波长差下的同步荧光衰变曲线以及 NEO 与 SM2 衍生体系在 120 和 150 nm 波长差下同步荧光衰变曲线

Fig.3 Synchronous fluorescence decay curves of NEO-derived and SM2-derived systems at wavelength differences of 120 and 150 nm, respectively, and synchronous fluorescence decay curves of NEO and SM2 derived systems at wavelength differences of 120 and 150 nm

究选择 NEO 采集时间 1 min、同步波长差 120 nm; SM2 选择采集时间 80 min、同步波长差 150 nm,进行后续试验。

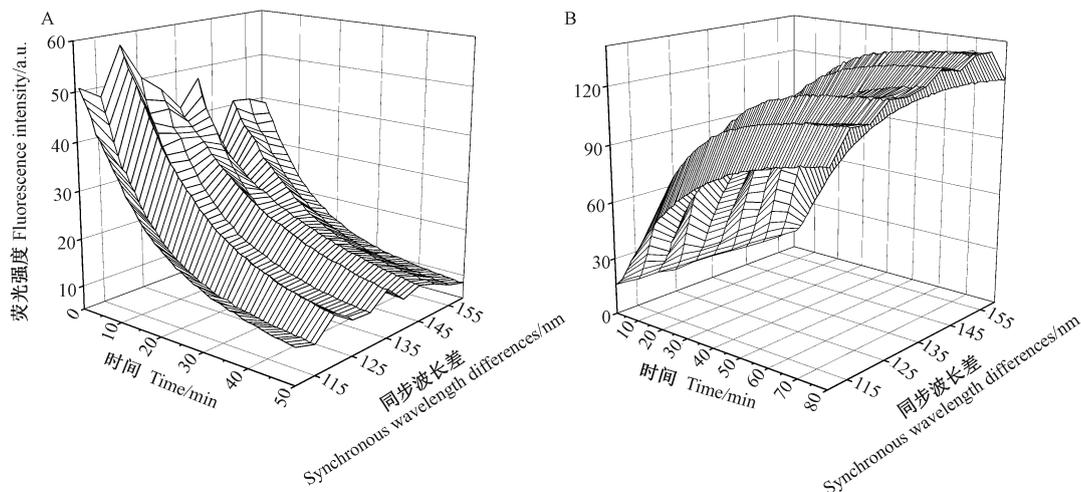


图4 不同同步波长差下 NEO 衍生体系同步荧光衰变曲线 (A) 与 SM2 衍生体系同步荧光衰变曲线 (B)

Fig.4 Synchronous fluorescence decay curve of NEO-derived system (A) as well as SM2-derived system (B) under different synchronous wavelength differences

2.3 邻苯二甲醛溶液加入量对水中 NEO 和 SM2 的同步荧光强度的影响

邻苯二甲醛是常用的荧光衍生试剂,它在强还原剂存在的条件下会与 NEO 和 SM2 的反应生成异吡啉衍生物^[26]。因此,为提高水中 NEO 和 SM2 的荧光信号,需要分析邻苯二甲醛溶液加入量以获得较优的荧光信号。由图 5 可知,随着邻苯二甲醛溶液加入量的增加,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈先增强后减弱的趋势,在邻苯二甲醛溶液加入量为 1.0 mL 时,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度最佳,但稍弱于 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度。随着邻苯二甲醛溶液加入量的增加,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度则呈快速减弱的趋势,在邻苯二甲醛溶液加入量为 0.25 mL 时,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度最佳,但此时 NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度较弱。在分析单一组分时,选择邻苯二甲醛溶液加入量的主要依据是获得该组分的最佳荧光强度;但在同时分析两组分时,不仅要考虑各组分单一的荧光强度,还需要考虑各组分同时的荧光强度。综合分析,在邻苯二甲醛溶液加入量为 1.0 mL 时,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度最佳,且 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度强于 NEO 与邻苯二甲醛衍生物,因此,本研究选择邻苯二甲醛溶液加入量为 1.0 mL。

有报道称,NEO 与邻苯二甲醛在碱性环境下反应更加充分,其最适宜反应的 pH 值在 10.5 左右^[27]。而 SM2 与邻苯二甲醛在强酸性环境下反应更加充分,其最适宜反应的 pH 值在 1.5 左右^[21]。因此,体系的 pH

值升高会促进 NEO 与邻苯二甲醛反应,但会抑制 SM2 与邻苯二甲醛反应。综合考虑,本研究用 BR 缓冲液将体系调至偏酸性。在室温下,邻苯二甲醛溶液呈中性,加入到体系中,体系的 pH 值会逐渐升高接近中性。

邻苯二甲醛溶液加入量为 0.25~1.0 mL 时,随着邻苯二甲醛溶液加入量增加,体系的邻苯二甲醛含量及 pH 值均升高,共同促进 NEO 与邻苯二甲醛的反应。因此,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈上升趋势;邻苯二甲醛溶液加入量为 1.0~1.75 mL 时,体系的 pH 值变化趋于稳定,同时 NEO 与邻苯二甲醛基本得到充分反应,此时邻苯二甲醛溶液的增加会降低 NEO 与邻苯二甲醛衍生物的浓度,进而减弱了 NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度。

此外,邻苯二甲醛溶液加入量为 0.25~1.75 mL 时,随着邻苯二甲醛溶液加入量增加,体系邻苯二甲醛含量升高,促进了 SM2 与邻苯二甲醛反应,但是体系 pH 值升高,抑制了 SM2 与邻苯二甲醛反应(图 5),SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈下降趋势,此时抑制作用占据主导地位。

2.4 2-巯基乙醇溶液加入量对水中 NEO 和 SM2 的同步荧光强度的影响

本研究涉及的荧光衍生反应是以邻苯二甲醛为衍生剂,2-巯基乙醇为还原剂,NEO 和 SM2 与邻苯二甲醛反应生成具有荧光特性的异吡啉衍生物^[20]。因此,优化 2-巯基乙醇溶液加入量有助于增强 NEO 和 SM2 水溶液衍生体系的荧光信号。由图 6 可知,随着 2-巯基乙醇溶液加入量的增加,NEO 与邻苯二甲醛

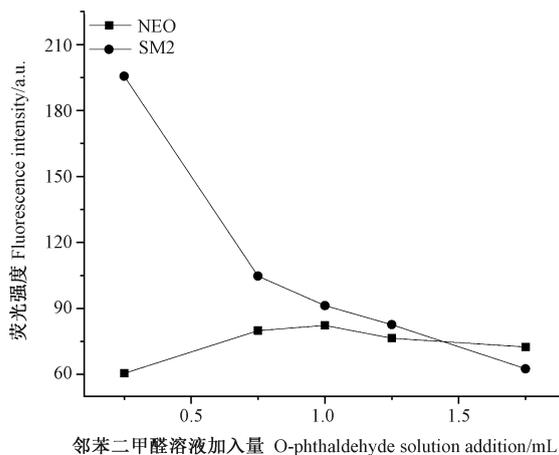


图 5 不同邻苯二甲醛溶液加入量对同步荧光强度的影响

Fig.5 Effect of different o-phthalaldehyde solution additions on synchronous fluorescence intensity

衍生物同步荧光强度呈先增强后减弱的趋势,在 2-巯基乙醇溶液加入量为 0.2 mL 时,NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度最佳,此时 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度约是其四分之三;随着 2-巯基乙醇溶液加入量增加,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈快速增强趋势,在邻苯二甲醛溶液加入量为 0.4 mL 时,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度最佳,但此时 NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度较弱。在 2-巯基乙醇溶液加入量为 0.25~0.3 mL 时,二者的同步荧光强度曲线相交,此时这两种衍生物同步荧光强度相差不多。综合分析,在 2-巯基乙醇溶液加入量为 0.25~0.3 mL 时,这两种衍生物同步荧光强度相近;又因同步荧光强度曲线交点更靠近 0.25 mL,所以本研究选择 2-巯基乙醇溶液加入量为 0.25 mL。

在室温下,2-巯基乙醇溶液呈酸性,pH 值介于 4.5~6.0 之间。2-巯基乙醇溶液加入到体系中,体系的 pH 值降低,进而抑制 NEO 与邻苯二甲醛反应,但会促进 SM2 与邻苯二甲醛反应。

2-巯基乙醇溶液加入量为 0.1~0.2 mL 时,随着 2-巯基乙醇溶液加入量的增加,体系的 2-巯基乙醇含量升高,促进 NEO 与邻苯二甲醛的反应,但同时体系 pH 值降低,抑制了 NEO 与邻苯二甲醛的反应(图 6),NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈上升趋势,此时促进作用占据主导地位;2-巯基乙醇溶液加入量为 0.2~0.4 mL 时,随着 2-巯基乙醇溶液加入量的增加,体系 pH 值持续降低引起 NEO 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈下降趋势,此时抑制作用占

主导地位。

此外,2-巯基乙醇溶液加入量为 0.1~0.4 mL 时,随着 2-巯基乙醇溶液加入量的增加,体系的 2-巯基乙醇含量升高及 pH 值降低,共同促进了 SM2 与邻苯二甲醛的反应,因此,SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度呈上升趋势。

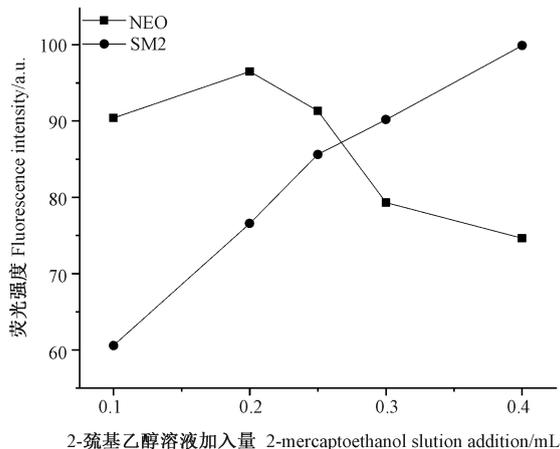


图 6 不同 2-巯基乙醇溶液加入量对同步荧光强度的影响

Fig.6 Effect of different 2-mercaptoethanol solution additions on synchronous fluorescence intensity

2.5 BR 缓冲液加入量对水中 NEO 和 SM2 的同步荧光强度的影响

溶液 pH 值会在很大程度上影响荧光强度^[28],因此,优化 BR 缓冲液加入量有助于增强 NEO 和 SM2 水溶液衍生体系的荧光信号。由图 7 可知,随着 BR 缓冲液加入量的增加,NEO 与邻苯二甲醛衍生物和 SM2 与邻苯二甲醛衍生物同步荧光强度均呈减弱趋势。因此,综合考虑同步荧光光谱情况,本研究选择 BR 缓冲液加入量为 0.025 mL。

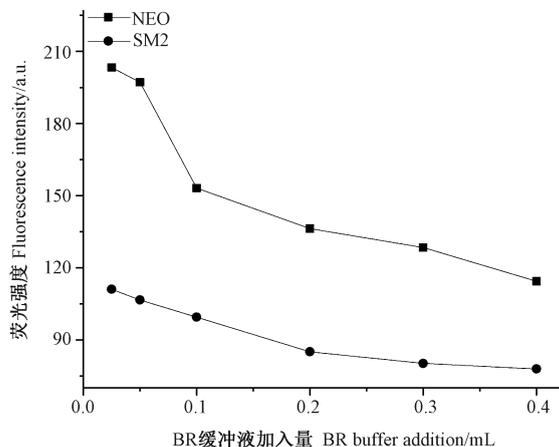


图 7 不同 BR 缓冲液加入量对同步荧光强度的影响

Fig.7 Effect of different BR buffer additions on synchronous fluorescence intensity

2.6 模型的预测与分析

分析采集的含有不同 NEO 和 SM2 质量浓度的样本荧光光谱发现,随着 NEO 和 SM2 质量浓度的增加,两者的同步荧光强度随之增强。因此,以同步激发特征峰强度为依据分别对水中 NEO 和 SM2 的含量进行定量分析。

分析含不同 NEO 质量浓度为 $0.5 \sim 14.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样本荧光光谱强度,不同 NEO 浓度与其对应浓度在 335 nm 波长处同步激发特征峰强度的关系曲线如图 8-A 所示,呈良好的线性关系,线性方程为 $Y = 14.73X$

$+ 6.14$, 训练集决定系数 (R_c^2) 为 0.9975 , 检出限为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为验证研究的可靠性并进一步预测分析,对含不同 NEO 浓度 ($2.0, 3.0, 6.0, 7.0$ 和 $13.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的样本进行回收试验,由图 8-C 可知,预测集样本中 NEO 含量的真实值与预测值之间的决定系数 (R_p^2) 为 0.9982 , 均方根误差 (root mean square error of prediction, RMSEP) 为 $0.3803 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对预测样本进行回收试验,样本回收率处于 $101.8\% \sim 114.0\%$ 之间,相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 $4.0\% \sim 8.4\%$ ($n=5$) (表 1)。

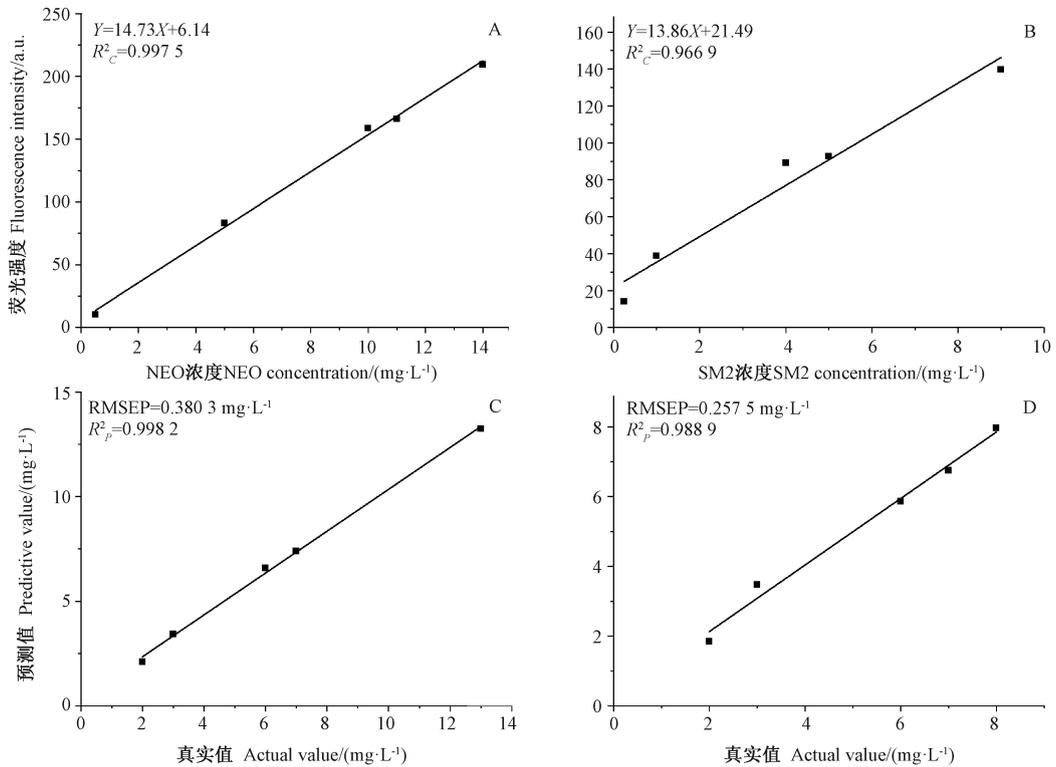


图 8 水中 NEO (A、C) 和 SM2 (B、D) 的工作曲线和预测集样本关系图

Fig.8 Working curves aqueous solutions and sample relation of prediction set diagrams of NEO (A, C) and SM2 (B, D)

表 1 水中 NEO 和 SM2 的回收率与精密度

Table 1 Recovery rate and precision degree of neomycin and sulfadimidine in water

序号 No.	浓度 Concentration/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		回收值 Recovery amount/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		回收率 Recovery rate/%		相对标准偏差 RSD/($n=5, \%$)	
	NEO	SM2	NEO	SM2	NEO	SM2	NEO	SM2
1	2.0	2.0	2.10	1.85	104.9	92.3	6.4	3.7
2	3.0	3.0	3.42	3.47	114.0	115.8	8.4	3.6
3	6.0	6.0	6.58	5.86	109.6	97.7	5.5	6.6
4	7.0	7.0	7.39	6.75	105.5	96.4	4.0	5.8
5	13.0	8.0	13.23	7.96	101.8	99.5	6.0	5.9

分析含不同 SM2 质量浓度为 $0.25 \sim 9.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样本的荧光光谱强度,不同 SM2 浓度与其对应浓度在 291 nm 波长处同步激发特征峰强度的关系曲线(图 8-B),呈良好的线性关系,线性方程为 $Y = 13.86X + 21.49$, R_c^2 为 0.9669 ,检出限为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对含不同 SM2 浓度($2.0, 3.0, 6.0, 7.0$ 和 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的样本进行回收试验。由图 8-D 可知,预测集样本中 SM2 含量的真实值与预测值之间的 R_p^2 为 0.9889 ,RMSEP 为 $0.2575 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对预测样本进行回收试验,样本回收率处于 $92.3\% \sim 115.8\%$ 之间,RSD 为 $3.6\% \sim 6.6\%$ ($n = 5$)(表 1)。

由检测结果可知,基于本研究的时间分辨同步荧光法应用于同时检测水中 NEO 和 SM2 含量,能得到较好的准确度和精密度。

3 讨论

随着我国抗生素生产和使用量的持续增长,水中抗生素的污染越来越严重。目前,国内外研究水中 NEO 和 SM2 含量检测的方法主要采用液相色谱法,如王欣梅等^[29]以液相色谱和串联质谱法检测了环境水样中 SM2 的含量,检出限为 $0.06 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$;Miao 等^[30]以微内径柱高效液相色谱和串联质谱法检测了污水处理厂出厂水中 NEO 含量,检出限为 $2.0 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。虽然本检测方法的检出限高于液相色谱法的检出限,但本研究所采用的方法操作更加方便、快捷,且设备体积较小,具有现场检测的发展潜力。

由于各组分荧光光谱常会产生重叠,普通荧光法在混合体系中的检测应用难以用于定量分析。与普通荧光法相比,同步荧光法在分析一些光谱重叠、难以分辨的复杂混合物中更具有优势。目前,同步荧光分析在混合体系荧光分析中已有较多应用。如庄宇等^[31]提出了基于同步荧光结合神经网络同时测定 3 种抗生素(乳酸环丙沙星、乳酸左氧氟沙星、盐酸左氧氟沙星)的方法;张晶玉等^[32]进行了基于同步、导数和卡尔曼滤波荧光法的罗丹明 B 和罗丹明 6G 同时测定的比较研究,发现应用同步荧光法效果最佳。此外,对于光谱重叠但荧光寿命有差异的混合体系还可以采用时间分辨荧光法进行检测。如 Leivo 等^[33]以时间分辨荧光和荧光免疫法检测了牛奶中氟喹诺酮含量;张笑河等^[34]提出了一种时间分辨荧光法同时测定混合液(己酸乙酯和乙酸乙酯)中各组分浓度的方法。本研究结合同步荧光法和时间分辨荧光法,针对水中 NEO 和 SM2 的含量建立了时间分辨同步荧光检测方法,为荧

光分析法实现水中 NEO 和 SM2 含量的快速、在线和精确检测提供了一定的借鉴。荧光分析法在检测水中 NEO 和 SM2 含量中的应用仍存在一定的局限性,本研究所达到的灵敏度、准确度有限,还需要对试验进行完善和优化,有待进一步深入研究。

4 结论

利用同步荧光光谱法结合时间分辨、化学计量学等方法,建立了线性模型预测水中 NEO 和 SM2 的含量,并对同步波长差、荧光衍生化时间、邻苯二甲醛溶液加入量、2-巯基乙醇溶液加入量和 BR 缓冲液加入量进行了优化,结果得到水中不同浓度的 NEO 回收率 $101.8\% \sim 114.0\%$,RSD 为 $4.0\% \sim 8.4\%$;水中不同浓度的 SM2 回收率为 $92.3\% \sim 115.8\%$,RSD 为 $3.6\% \sim 6.6\%$ 。表明采用时间分辨同步荧光法可有效分辨 NEO 和 SM2 的邻苯二甲醛衍生物之间的同步荧光光谱,可有效筛选出同步激发特征峰,使水中 NEO 和 SM2 含量同时被检测,同时简化了检测步骤,为水中 NEO 和 SM2 含量同时快速检测提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] 王大鹏,张娴,颜昌宙. 高效液相色谱串联质谱法测定污水污泥中 4 种磺胺类药物及其乙酰化代谢物[J]. 环境化学, 2018, 37(10): 53-61
- [2] 黄原飞, 姜晓祎, 周哲, 汪洋, 孔聪, 黄冬梅, 蔡友琼, 于慧娟. 分子印迹聚合物固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中 11 种氨基糖苷类药物残留[J]. 分析化学, 2018, 46(3): 167-174
- [3] 赵涛, 丘锦荣, 蒋成爱, 王秀娟. 水环境中磺胺类抗生素的污染现状与处理技术研究进展[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(10): 1147-1152
- [4] 张红, 程寒飞. 水环境中氨基糖苷类抗性基因污染及研究进展[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(10): 121-130
- [5] 闭凤丽, 李志广, 张凌云, 刘波, 刘嘉祺, 谭美凌. 饮用水水处理工艺之抗生素去除效果初探[J]. 环境化学, 2018, 37(5): 1172-1174
- [6] 朱学武, 成小翔, 甘振东, 谢柏明, 邱晖, 陈潜, 王立彪, 李圭白, 梁恒. 饮用水中抗生素去除技术研究进展[J]. 给水排水, 2017, 53(5): 135-141
- [7] 王瑾瑾, 郭照冰, 赵永富, 祝胜男, 沈潇雨, 柏杨, 任杰. γ 射线辐照降解水中磺胺甲恶唑的效应及降解机理研究[J]. 核农学报, 2018, 32(6): 1180-1185
- [8] 漆晴, 倪先哲, 王刚, 周彩云, 桂波. 液相色谱/串联质谱法测定原水中多种抗生素残留[J]. 中国给水排水, 2018, 34(1): 128-130, 134
- [9] 祁彦洁, 刘菲. 地下水中抗生素污染检测分析研究进展[J]. 岩矿测试, 2014, 33(1): 1-11

- [10] 张金, 宗栋良, 常爱敏, 孟凡花, 王路, 邓吴斌, 管运涛. 水环境中典型抗生素 SPE-UPLC-MS/MS 检测方法的建立[J]. 环境化学, 2015, 34(8): 1446-1452
- [11] 周志洪, 黄卓尔, 吴清柱, 刘叶新, 区晖, 刘茂胜, 徐丽莉, 张爱萍. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定环境水体中抗生素[J]. 分析试验室, 2016, 35(9): 1092-1098
- [12] Esponda S M, Padrón M E T, Ferrera Z S, Rodríguez J J S. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 394(4): 927-935
- [13] Kumar K, Thompson A, Singh A K, Chander Y, Gupta S S C. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples [J]. Journal of Environmental Quality, 2004, 33(1): 250-256
- [14] Meyer M T, Bumgarner J E, Varns J L, Daughtridge J V, Thurman E M, Hostetler K A. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Science of the Total Environment, 2000, 248(2): 181-187
- [15] 周靖雯, 吴友谊, 殷斌. 中空纤维膜液相微萃取-毛细管电泳法测定环境水样中的 4 种磺胺类药物[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(6): 627-633
- [16] Ferding M, Kaleta A, Thanhvo T D, Buchberger W. Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro) quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1047(2): 305-311
- [17] 徐将, 刘木华, 袁海超, 肖海斌, 赵进辉. 荧光法检测鸭肉中新霉素残留的研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 635-640
- [18] Tang H N, Geng W D, Wang Q, Yang C Z, Liu M S, Yang Y L. Fluorimetric determination of trace sulfonamides in milk samples[J]. Asian Journal of Chemistry, 2012, 24(10): 4657-4660
- [19] Roth M. Fluorescence reaction for amino acids [J]. Analytical Chemistry, 1971, 43(7): 880-882
- [20] 赵进辉, 袁海超, 刘木华, 徐将, 肖海斌. 导数同步荧光光谱-小波-SGA-LSSVR 联用快速测定鸭蛋蛋清中新霉素残留含量[J]. 分析化学, 2013, 41(4): 89-95
- [21] 邓櫻花, 李政青, 苏明伟, 陈功轩. 荧光衍生化法测定蛋清和牛奶中的磺胺类药物残留[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2016, 50(6): 875-879
- [22] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 2006
- [23] 董嘉, 胥顺, 郑成斌. 时间分辨荧光免疫法测定肉类食品中的沙丁胺醇[J]. 化学研究与应用, 2018, 30(5): 802-807
- [24] Zhou B, Zhang K, Zhang J, Wang K, Zhao L L, Jin J, Huang B. A novel and sensitive method for the detection of enrofloxacin in food using time-resolved fluoroimmunoassay [J]. Informa Healthcare, 2013, 23(5): 323-328
- [25] Barakat C, Patra D. Combining time-resolved fluorescence with synchronous fluorescence spectroscopy to study bovine serum albumin-curcumin complex during unfolding and refolding processes [J]. Luminescence, 2013, 28(2): 149-155
- [26] 许春向, 邹学贤. 现代卫生化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999
- [27] 鲍会梅. 冷鲜肉中新霉素残留快速检测法的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(4): 119-123
- [28] 张翼. 石油石化工业污水分析与处理[M]. 北京: 石油工业出版社, 2006
- [29] 王欣梅, 徐桂菊, 王晓利, 王霞, 王明林, 赵汝松, 林金明. 三聚氰胺/邻苯二甲醛共价有机骨架材料结合固相萃取-液相色谱串联质谱检测环境水样中痕量磺胺类抗生素[J]. 分析化学, 2018, 46(12): 1990-1996
- [30] Miao X S, Metcalfe C D. Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2003, 38(1): 27-34
- [31] 庄宇, 马超群, 王小晗, 陶悦, 任芮, 那明珠, 陈国庆. 同步荧光结合神经网络同时测定 3 种抗生素 [J]. 激光技术, 2017, 41(4): 31-35
- [32] 张晶玉, 杨金夫, 任英, 张岩, 符连社, 雷中利. 同步荧光、导数荧光与卡尔曼滤波荧光光度法用于混合荧光染料同时测定的比较研究[J]. 光谱学与光谱分析, 1994, 14(4): 119-122
- [33] Leivo J, Lamminmäki U, Lövgren T, Vehniäinen M. Multiresidue detection of fluoroquinolones: specificity engineering of a recombinant antibody with oligonucleotide-directed mutagenesis.[J]. Pubmed, 2013, 61(49): 11981-11985
- [34] 张笑河, 马超群, 陈国庆, 刘怀博, 朱纯, 宋鑫澍, 朱从海. 基于时间分辨荧光光谱法同时测定己酸乙酯与乙酸乙酯[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(2): 176-179

Simultaneous Determination of Neomycin Sulfate and Sulfadimidine in Water by Time-resolved Synchronous Fluorescence Spectrometry

CHEN Jian LIU Muhua YUAN Haichao HUANG Shuanggen ZHAO Jinhui*

XU Ning WANG Ting HU Wei

(Jiangxi Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment, Jiangxi Agricultural University/
Jiangxi Provincial Collaborative Innovation Center of Key Technologies and Quality and Safety in Post-Harvest Processing of
Fruits and Vegetables, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract: In order to explore a new method for the simultaneous determination of neomycin sulfate (NEO) and sulfamethazine (SM2) in water, according to in the presence of 2-mercaptoethanol, derivatives that NEO or SM2 reacted with o-phthalaldehyde to form have fluorescent properties. Based on this, a time-resolved synchronous fluorescence method was developed for the simultaneous determination of NEO and SM2 in water. The time-resolved synchronous fluorescence spectra of different components were studied. The synchronous excitation peaks of derivatives that NEO or SM2 reacted with o-phthalaldehyde to form were 335 and 291 nm, respectively. Their optimum acquisition times were 1 and 80 min with their optimum synchronization wavelength differences of 120 and 150 nm, respectively. The addition amounts of o-phthalaldehyde solution, 2-mercaptoethanol solution and BR buffer on the fluorescence intensities were investigated by using the single factor experiment. Optimum addition amounts were as follows: o-phthalaldehyde solution of 1.0 mL, 2-mercaptoethanol solution of 0.25 mL, and BR buffer of 0.025 mL. On the basis of these conditions, the linear regression equation was established between NEO concentrations and fluorescence intensities and the linear equation was $Y = 14.73X + 6.14$ when the concentration range was $0.5 \sim 14.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. At the same time, the linear regression equation was established between SM2 concentrations and fluorescence intensities and the linear equation was $Y = 13.86X + 21.49$ when the concentration range was $0.25 \sim 9.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The detection limits of NEO and SM2 were 0.5 and $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The determination coefficient (R_C^2) were 0.9975 and 0.9669 in the training set, respectively. The determination coefficient (R_p^2) between the true values and predictive values of NEO and SM2 contents in water were 0.9982 and 0.9889 in the prediction set, respectively. Their root mean square errors for the prediction set (RMSEP) were 0.3803 and $0.2575 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with the recoveries of $101.8\% \sim 114.0\%$ and $92.3\% \sim 115.8\%$ as well as the relative standard deviation (RSD) of $4.0\% \sim 8.4\%$ and $3.6\% \sim 6.6\%$ respectively. The results showed that there was a good linear relationship and the method could achieve simultaneous determination of NEO and SM2 in water.

Keywords: neomycin sulfate, sulfadimidine, time-resolved synchronous fluorescence