

小分子双水相浮选高效液相色谱法 测定污水中痕量氯霉素

姚以亮, 关卫省

(长安大学 环境科学与工程学院, 陕西 西安 710054)

摘 要: 用乙醇-磷酸氢二钾双水相体系浮选污水中的氯霉素, 通过对盐的质量分数、有机溶剂的体积、气体流速和浮选时间的选择和优化, 在理想条件下, 氯霉素的平均浮选效率可以达到 94%。该方法用于河水和鱼塘水样品中氯霉素的检测, 检出限为 0.5 ng/mL, 加标回收率为 89.44% ~ 100.16%, 相对标准偏差 RSD 为 1.1% ~ 2.1%, 适用于污水中痕量氯霉素的分离/富集及分析测定。

关键词: 小分子双水相浮选; 高效液相色谱; 氯霉素

中图分类号: X 703 文献标识码: A 文章编号: 1671-3206(2011)04-0717-05

Separation and determination of chloramphenicol in sewage using a small molecules-salt aqueous two-phase flotation system coupled with HPLC

YAO Yi-liang, GUAN Wei-sheng

(College of Environmental Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710054, China)

Abstract C₂H₅OH /K₂HPO₄ two-phase aqueous system was used to float CAP in sewage. By selecting and optimizing mass percentage of salt, volume of organic solvent, gas flow rate and flotation time, under the optimum conditions, the average flotation efficiency was up to 94%. The method used to detect CAP in the samples of river and pond water, the detection limit was 0.5 ng/mL, the relative recovery was 89.44% ~ 100.16% with relative standard deviation RSD = 1.1% ~ 2.1%. The method is applicable to analyze the trace CAP in sewage.

Key words small molecules-salt aqueous two-phase flotation; HPLC; CAP

双水相萃取 (ATPS) 作为一种强大的提取技术, 是 1896 年由 Beijerinck 首次提出的^[1]。由于全过程不使用传统的挥发性有毒溶剂, 组成体系的聚合物和盐被认为是 2 种环保的表面活性剂^[2]。因此, 它吸引了许多领域的重视^[3-5]。其中, 低分子有机物与无机盐所形成的小分子双水相体系是近几年出现的一种新型、高效、廉价的双水相体系。

溶剂气浮 (SS) 是南非学者 Sebba^[6] 于 1962 年作为离子浮选改进方法最早提出。它是一种将目标物分离与富集同时完成的新型浮选分离技术。该方法由于其分离效率高, 富集倍数大, 有机溶剂用量低, 分离条件温和, 操作简单, 目前已广泛应用于表

面活性化合物和疏水化合物的处理, 比如天然产物中的活性成分^[7], 金属离子^[8], 有机污染物^[9]等。为了使小分子双水相系统和溶剂萃取的优点融为一体, 让这 2 种方法的优点互相补充, 本文介绍了小分子双水相浮选的方法。与小分子双水相萃取和溶剂浮选相比, 小分子双水相浮选方法富集系数高, 减少了有机溶剂的消耗量, 不存在有毒有机溶剂 (苯、甲苯等) 带来二次污染问题。

随着氯霉素的广泛应用和研究, 其毒性、副作用也不断地被发现: 氯霉素能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症, 新生儿、早产儿灰色综合症等, 而且即使低浓度药物残留, 也会诱发致病菌的耐

收稿日期: 2011-02-02 修改稿日期: 2011-03-01

基金项目: 教育部博士点基金项目 (200807100004); 陕西省青年自然科学基金项目 (2010JQ7008)

作者简介: 姚以亮 (1983-), 男, 浙江淳安人, 长安大学在读硕士研究生, 师从关卫省教授, 主要从事污水处理和生物化工研究。电话: 13720557566 E-mail: changda_alex@163.com

药性。因此,氯霉素残留问题引起了国际组织和世界上许多国家和地区的高度重视^[10]。

关于氯霉素残留量的检测方法,国内外文献报道的主要有酶免疫法^[11-13]、放射免疫法^[14-15]、气相色谱法^[16]和气质联用法^[17-18]。虽然这些检测方法的检测限基本都达到了 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 左右,然而这些方法在对样品的预处理方面均有较高的要求,预处理时间长,设备花费高而且操作相对较复杂。痕量氯霉素的定量分析仍是一个重大的挑战,这要求在药品分析前有一个快速高效的样品预处理过程。本文将小分子双水相浮选和高效液相色谱法联用,可以有效分离和检测环境中的痕量氯霉素。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯霉素标准品、无水乙醇、三水磷酸氢二钾、硫酸铵、氢氧化钾、甲醇、NaOH、HCl均为分析纯;去离子水。

AB204-N型电子天平;TG328A型分析天平;Agilent 1200系列高效液相色谱仪;HHS-3B型pH计。

1.2 样品前处理

1.2.1 河水 用 2 500 mL 的棕色玻璃瓶在渭河中取水样。水样在转速 2 000 r/min 的条件下离心分离 15 min, 取上层清液。加入氯霉素溶液, 用滤径 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 并在 4°C 条件下保存。

1.2.2 鱼塘水 取自不同商业饲养标准的鱼塘。水样在转速 2 000 r/min 的条件下离心分离 15 min, 取上层清液。加入氯霉素溶液, 通过孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 的生物膜过滤去除变性的蛋白质, 在 4°C 条件下保存。

1.3 工作原理

用无机盐调节待测体系的离子强度, 无机盐电离出的阴阳离子在水化过程中结合大量水分子, 使亲水有机溶剂由于体系中没有自由水分子可以结合, 脱水成为疏水溶剂, 体系定量分成上下两相。然后, 在浮选池中通入氮气, 氯霉素能够吸附在上升气泡的表面上, 随着气泡通过水和有机溶剂的界面, 之后气泡的破碎, 氯霉素释放并溶解在有机溶剂中。用高效液相色谱测定两相中氯霉素的含量。

1.4 实验方法

双水相气浮浮选实验装置见图 1。

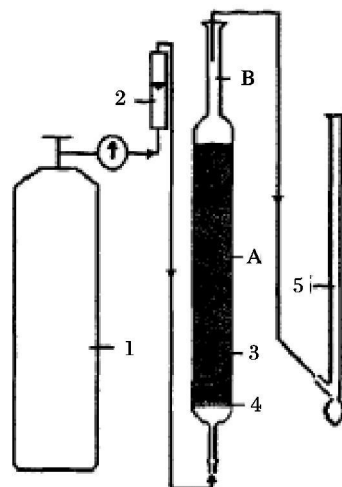


图 1 溶剂浮选装置

Fig 1 Solvent flotation apparatus

1 氮气钢瓶; 2 转子流量计; 3 溶剂浮选柱;
4 玻砂滤板; 5 皂膜流量计

在 50 mL 的比色管中加入一定量的氯霉素工作液和一定量的 K_2HPO_4 (K_2HPO_4 质量百分数为 45%)。将溶液振荡 20 min 后转移到浮选池中。在浮选池上端加入 5 mL 无水乙醇。从底部通入 N_2 气体流速为 $25 \text{ mL}/\text{min}$, 分离时间为 50 min, 氯霉素随气泡进入溶液上层的乙醇相中。所有的分离过程都是在室温下操作的。

将有机相和水相 (不经过任何处理) 用高效液相色谱测定两相中氯霉素的含量。在高效液相色谱分析中, 选择 XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , Serial G1314B), 流动相水与甲醇的比 55:45 (v/v), 流动速度 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$, 进样量为 20 μL , 在波长 278 nm 的条件下检测。选用分配系数 K 、富集系数 α 和分离效率 E 作为评价参数。

$$\text{氯霉素在各相间的分配系数 } K = \frac{C_o}{C_w}$$

$$\text{富集系数 } \alpha = \frac{C_o}{C_{w_i}}$$

$$\text{分离效率 } E = \frac{V_o C_o}{M_s} \times 100\%$$

式中 C_o, C_w ——分别是有机相和水相中氯霉素的平衡浓度, ng/mL ;

C_{w_i} ——最初水相中氯霉素的浓度, ng/mL ;

V_o ——达到平衡时有机溶剂的体积, mL ;

M_s ——总的氯霉素加入量, mg

2 结果与讨论

2.1 小分子双水相浮选中有有机溶剂、盐的分相行为

2.1.1 有机溶剂类型对分相行为的影响 在小分

子双水相浮选体系中, 我们研究了乙醇、异丙醇、正丙醇几种有机溶剂。结果表明, 乙醇具有较好的分相能力, 容易形成两相; 异丙醇和正丙醇遇到合适的盐也具有较好的分相能力, 但是其分相后的两相体积比接近于 1:1, 这个比例适合于萃取, 却并不适合浮选, 因为浮选需要较高的富集比, 而上相体积过大, 显然目标产物在有机相的富集浓度会偏低。

选择乙醇作为有机溶剂的另一个原因是, 乙醇可以降低水的表面张力, 产生更多的小气泡^[19,20]。小气泡增加了单位体积气体的表面积, 从而使气液之间的传质能力增强。乙醇作为浮选溶剂的缺点是具有挥发性, 然而, 在一定时间内, 有机溶剂随气泡的少量挥发, 使得有机相体积变小。在双水相体系中, 上相体积的减小, 正好增加了目标产物的富集倍数, 因此更有利于痕量物质的检出。

2.1.2 盐的组成对分相行为的影响 为了和无水乙醇组成小分子双水相系统, 我们用一系列的无机盐做实验。实验结果显示, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KOH 均能与乙醇分成两相, 而其它 $CaCl_2$, KCl , $NaCl$, NH_4Cl , Na_2SO_4 , Na_2SO_3 , KH_2PO_4 , $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$, Na_2HPO_4 , K_2SO_4 10 种类型的盐均不能使乙醇和水形成双水相体系。

为了进一步研究 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KOH 的分相能力大小, 固定乙醇和水的体积分别为 4 mL 和 5 mL, 逐渐增加盐的含量, 体系分相情况见图 2。

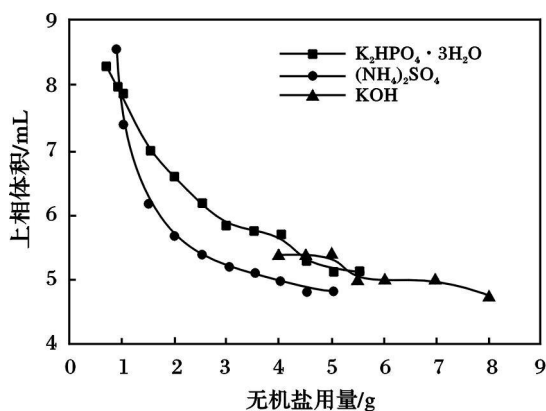


图 2 乙醇体系 KOH , $(NH_4)_2SO_4$ 和 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 分相能力的差异

Fig. 2 Differences between KOH , $(NH_4)_2SO_4$ and $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ in two phases

由图 2 可知, 在相同的加盐量条件下, $(NH_4)_2SO_4$ 得到的上相体积均比 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 和 KOH 得到的上相体积小; 也就是说若上相体积相同, $(NH_4)_2SO_4$ 的加入量要比 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, KOH 加入量少。据此可知, $(NH_4)_2SO_4$ 的分相能力比

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 和 KOH 好。然而, 在乙醇双水相体系中, 加入少量 $(NH_4)_2SO_4$, 体系就会出现盐析现象, 沉淀的无机盐会堵塞浮选池下端的玻砂滤板, 从而影响气流通过。因此, 在乙醇双水相浮选体系中, 分相用盐选择 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 。

2.2 氯霉素在乙醇-磷酸氢二钾双水相浮选中的分离和富集

2.2.1 K_2HPO_4 质量分数的影响 K_2HPO_4 的质量分数对氯霉素的分离效率和富集系数的影响比较大 (见图 3)。

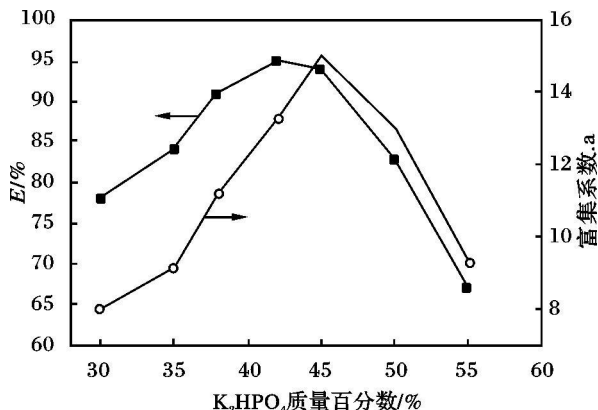


图 3 K_2HPO_4 对双水相浮选氯霉素分离效率和富集效率的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of K_2HPO_4 on flotation efficiency and concentration coefficient of CAP

由图 3 可知, 随着 K_2HPO_4 质量分数的增加, 氯霉素分离效率增加, 并且保持在 94% 左右。然而, 随着 K_2HPO_4 溶液浓度的持续增加, 分离效率急剧降低。这是由于随着浓度的增加, 溶液的高粘度减少了转移到上升气泡表面的氯霉素的量, 导致氯霉素分离效率降低。实验结果还显示, 随着体系 K_2HPO_4 质量分数的增加, 富集系数也是先增后减。在本实验中, 我们选择 K_2HPO_4 的质量分数是 45%。

2.2.2 pH 值的影响 通过向溶液中加入盐酸溶液或氢氧化钠溶液, 使 pH 值在 7.01~11.85 之间变化。结果表明, 当溶液 pH 值 < 7.0 时, 溶液是均质的不能用于浮选; 当溶液 pH 值在 7.01~10.30 之间变化时, 分离系数逐渐增大, 在 10.30 时达到极值, 分离系数为 95.5%; 当溶液的 pH 值大于 10.30 时, 氯霉素的分离效率降低, 这是由于在强碱条件下氯霉素会分解, 不能以分子状态存在。因此, 在离子液体双水相浮选系统中我们选定 pH 值为 10.30 作为理想条件。而 45% 的 K_2HPO_4 溶液其本身初始 pH 值为 10.23, 故该乙醇/ K_2HPO_4 双水相体系可

以不调整 pH 值直接用于浮选。

2.2.3 气体流速和浮选时间的影响 在气泡半径不变的情况下, 气体流速越大气液交界面的面积越大。氯霉素随着高速气流粘附在气液界面或者进入有机相, 有利于提高浮选效率。但是当气体流速过高时, 水和有机溶剂的界面会剧烈扰动, 导致上相的部分小液滴又返回到水相, 从而降低了浮选效率。实验结果显示, 当气体流速为 25 mL/min 浮选时间为 50 min 时, 氯霉素分离效果最好, 分离效率可以到达 94.5%。

2.2.4 有机溶剂体积的影响 有机溶剂的体积直接影响双水相浮选体系的分相和比和产物在有机相的富集倍数。随着无水乙醇体积的增大, 氯霉素的浮选效率提高, 但是富集系数降低。实验结果显示, 当无水乙醇的体积超过 5 mL 时, 分离效率保持在 90% 以上, 通常, 对痕量物质的检测分离效率和合适的富集系数都很重要。考虑到这两方面的因素, 实验中使用 5 mL 无水乙醇, 此时氯霉素的富集系数为 15.06 分离效率 94.2%。

2.2.5 共存物质的影响 按实验方法进行操作, 当相对误差 $\leq 5\%$ 时, 以下共存物不干扰测定: 1000 倍的乳糖、蔗糖和淀粉, 500 倍的葡萄糖、果糖, 200 倍的硬脂酸镁, 15 倍的 Cl^- 、 Na^+ 、 NO_3^- 、 K^+ 、 SO_4^{2-} 。这一结果表明了该方法在监测环境和食品中的氯霉素时具有较好的选择性。

2.3 方法可靠性评价

通过向乙醇/ K_2HPO_4 双水相浮选溶液中加入 6 组不同浓度 (1~1000 ng/mL) 的氯霉素溶液, 重复实验 3 次, 获得标准曲线。浮选后, 检测上相中氯霉素的浓度。获得标准曲线和相关系数: $A = 0.638 \times C - 1.532$ ($r = 0.9992$), 这里 C 是氯霉素的浓度 (单位为 ng/mL)。连续 6 次浮选和检测浓度为 10 ng/mL 的 CAP 标准溶液, 相对标准偏差是 3.9%, 分析准确度为 8.6%。根据欧盟的规定分析准确度低于 23%, 通过 HPLC 方法获得的数据是准确的。

根据 IUPAC 定义, 检出限 $\text{LOD} = 3S_b/b$ 其中 S_b 为 10 次空白实验的标准偏差, b 为标准曲线的斜率, 可得本方法对氯霉素的检出限为 0.5 ng/mL。

2.4 样品分析

在前面讨论的最优条件下, 利用乙醇/磷酸氢二钾双水相浮选体系分离并检测了河水和鱼塘水样品中的氯霉素。结果均没有氯霉素检出。向样品中分别加入 20、50、100 ng/mL 的氯霉素, 小分子双水相浮选分离之后, 用 HPLC 的方法测定含量, 结果见图 4 和表 1。

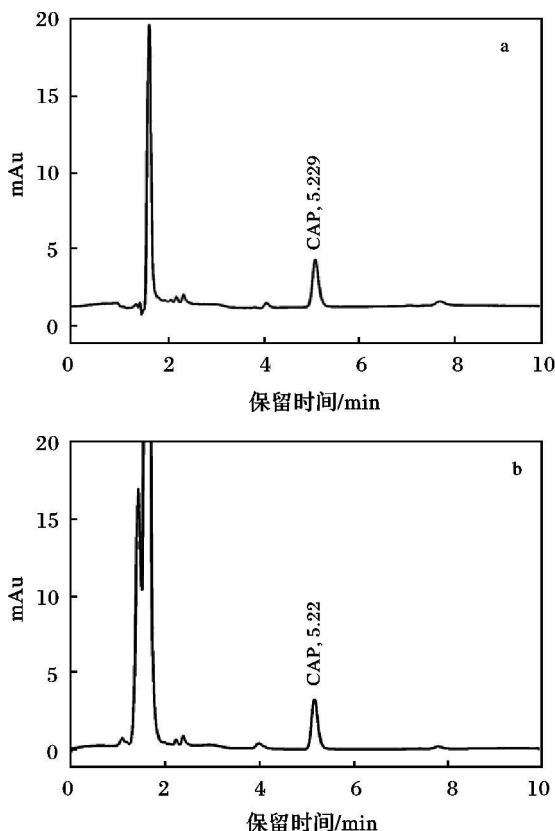


图 4 HPLC 紫外检测图谱

Fig 4 HPLC chromatograms with UV detection
a 加标后 CAP 含量 100 ng/mL 的渭河水样品;
b 加标后 CAP 含量 100 ng/mL 的鱼塘水样品

表 1 样品中氯霉素含量的检测及加标实验结果

Table 1 Detection of CAP content in the samples and the results of standard addition

样品	加标量 I (ng·mL ⁻¹)	检测值 I (ng·mL ⁻¹)	回收率 /%	RSD /%
渭河水	0	ND		
	20	18.43	92.15	1.6
	50	50.08	100.16	1.4
	100	96.34	96.34	1.1
鱼塘水	0	ND		
	20	18.56	92.80	1.7
	50	44.72	89.44	2.1
	100	91.28	91.28	1.3

由表 1 可知, 体系加标回收率为 89.44% ~

100.16%, 相对标准偏差 RSD 为 1.1% ~ 2.1%, 这显示了目前的分离方法有较好的可重复性和较广泛的测定范围, 该方法可以应用于水环境中氯霉素的测定。

3 结论

(1) 通过对小分子双水相体系无机盐和有机溶剂分相行为的研究, 筛选出乙醇-磷酸氢二钾双水体系, 该体系分相范围广泛, 分相时间短, 无盐析现象, 是适合浮选的有效双水相体系。

(2) 首次利用小分子双水相相对污水中痕量氯霉素进行浮选, 分离富集效果良好。选用乙醇-磷酸氢二钾体系, 在自制的 50 mL 浮选池中, 当磷酸氢二钾的质量分数为 50%, 乙醇的加入量为 5 mL, 保持 N_2 流速为 25 mL/min, 浮选 50 min 后, 氯霉素的富集系数为 15.06, 分离效率高达 94.2%。

(3) 乙醇-磷酸氢二钾双水相浮选与高效液相色谱联用, 测定渭水和鱼塘水中氯霉素的含量, 结果均没有氯霉素检出。实验加标回收率为 89.44% ~ 100.16%, 相对标准偏差为 1.1% ~ 2.1%, 结果重复性较好。

参考文献:

- [1] Albertsson P A. Partitioning of Cell Particles and Macromolecules[M]. New York: John Wiley & Sons, 1986: 21-39
- [2] Yin H, Mao M, Huang J et al. Two-phase region in the DTA B/SL mixed surfactant system[J]. *Langmuir*, 2002, 18(24): 9198-9203
- [3] Balasubramanian D, Wilkinson C, Van Cott K. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction[J]. *Chromatogr A*, 2003, 989(1): 119-129
- [4] Gomes G A, Azevedo A M, Aires-Barros M R, et al. Purification of plasmid DNA with aqueous two-phase systems of PEG 600 and sodium citrate[J]. *Sep Pur Technol*, 2009, 65: 22-30
- [5] Mokhtariani B, Karimzadeh R, Aminim H, et al. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate[J]. *Biochemical Eng Journal*, 2008, 38: 241-247
- [6] Sebba F. Ion Flotation[M]. New York: American Elsevier, 1962: 112-116
- [7] 董蕙茹, 王士辉. 溶剂浮选分离富集麻黄草中有效成分[J]. *分析化学*, 2004, 32(4): 503-206
- [8] 闫永胜, 王香, 李春香, 等. 溶剂浮选光度法测定痕量铜[J]. *分析实验室*, 1999, 18(3): 93-95
- [9] 李保山. 溶剂浮选吸光光度法测定工业废水中痕量酚[J]. *中国环境监测*, 1994, 10(6): 28-30
- [10] Allen E H. Review of chromatographic method for chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues from food producing Animals[J]. *J Assoc Anal Chem*, 1985, 68(5): 990-999
- [11] 王太全, 于伯华, 徐帮兴, 等. 肠衣中氯霉素残留量检测的研究[J]. *肉类工业*, 2003(10): 38-39
- [12] 沈美芳, 赵文亚, 费志良, 等. 用酶联免疫法测定水产品中氯霉素的残留量[J]. *南京师范大学学报: 工程技术版*, 2003, 3(2): 1-4
- [13] 刘莹, 高世同, 吴丽明, 等. 定量 ELISA 法检测蜂蜜中氯霉素残留量研究[J]. *中国公共卫生管理*, 2004, 20(3): 265-266
- [14] A mold Somogyi Trace analysis of chloramphenicol residues in egg milk and meat Comparison of gas chromatography and radioimmunoassay[J]. *Assoc off Anal Chem*, 1985, 68(5): 984-989
- [15] 黄晓蓉, 郑晶, 杨方, 等. 放射性受体免疫分析方法快速筛检烤鳗中氯霉素残留[J]. *水产养殖*, 2003, 24(4): 16-18
- [16] 赵文亚, 沈美芳, 徐幸莲, 等. 气相色谱法测定水产品中氯霉素残留[J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 278-282
- [17] 岳振峰, 陈小霞, 郑卫平, 等. 高效液相色谱-电喷雾三级四极杆质谱测定鸡肉组织中氯霉素残留的研究[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(1): 80-82
- [18] Orteili D, Edder P, Corvi C. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatographia*, 2004, 59: 61-64
- [19] Fortz L K, Carter K N, Wilson D J. Removal of refractory organics by aeration. VII. Solvent sublation of indene and aldrin[J]. *Separation Science and Technology*, 1986, 21(1): 57-78
- [20] Adamson A W. Physical chemistry surface[J]. 3rd New York Wiley-Interscience, 1976(1): 67-68