

双水相萃取抗生素的应用研究进展

王良*, 荆雨众

(吉林师范大学化学学院, 吉林四平 136000)

摘要:概述了双水相萃取及抗生素, 综述了离子液体双水相、聚合物双水相、小分子有机溶剂双水相对抗生素的萃取分离, 展望了双水相萃取的发展前景。

关键词:双水相萃取; 抗生素; 研究进展

中图分类号:TQ028.8

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)02-0034-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.02.009

Research progress of aqueous two-phase extraction of antibiotics

WANG Liang*, JING Yu-zhong

(College of Chemistry, Jilin Normal University, Siping 136000, China)

Abstract: The aqueous two-phase extraction technique and antibiotics are introduced. The applications of ionic liquids aqueous two-phase, polymer aqueous two-phase and small molecular organic solvent aqueous two-phase techniques in extraction of antibiotics are reviewed. The prospects of aqueous two-phase extraction in the future are also proposed.

Key words: aqueous two-phase extraction; antibiotics; research progress

双水相萃取 (aqueous two-phase extraction, ATPE) 是 2 种聚合物、1 种聚合物与 1 种亲液盐或者 2 种盐在适当条件下混合在一起形成的双水相系统。在 20 世纪 60 年代, Albertsson 成功地分离了叶绿素, 开创了双水相萃取技术应用的先例^[1], 双水相成相物质简单环保、能够回收再使用、操作简便, 能够易于扩大规模的工业化操作。目前, 该技术已成功应用于生物工程^[2-3]、药物分析^[4]、金属分离等方面^[5]。

抗生素 (antibiotics) 是由细菌、真菌、放线菌属微生物或高等动植物在生活过程中所产生的, 其具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物, 通过影响其他生活细胞发育功能对病原体有抑制和杀菌作用^[6]。随着抗生素领域的快速发展, 仅在 2006—2007 年间, 抗菌药物在全国医院年使用率可高达 74%。抗生素的滥用成为医药使用的问题之一。近年来, 抗生素的出现、迁移以及潜在的生态危害更是引发了人们的关注^[7-8], 因此亟需找到一种高效、无污染的分离分析方法来萃取分离抗生素。

1 离子液体双水相萃取抗生素

离子液体双水相是近年来发展起来的萃取技术。具有高回收率、实验条件温和简单、不易挥发、不易发生乳化现象等优点, 是一种绿色无污染且较为理想的萃取技术。

Li 等^[9]用亲水性离子液体 [Bmim]BF₄/Na₂CO₃

形成的双水相体系萃取分离了水样中的罗红霉素, 考察了盐的种类、浓度及萃取温度对萃取率的影响, 在优化的条件下, 平均萃取率可达 90.7%, 通过红外光谱和紫外可见光谱观察到离子液体和罗红霉素的性质并未发生改变。检出限为 0.03 μg/mL, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.9% (n = 13), 线性范围为 1.00 ~ 20.00。结果表明, 该方法不仅成功地萃取分离了水中的罗红霉素, 对其他生物小分子也适用。

刘庆芬等^[10]建立的 [Bmim]BF₄/NaH₂PO₄·2H₂O 双水相体系萃取青霉素, 研究了成相盐的浓度、pH、目标物浓度、离子液体浓度后, 在 NaH₂PO₄·2H₂O 质量分数为 36% ~ 38%, [Bmim]BF₄ 体积分数为 40% ~ 45%, 青霉素浓度为 50 000 μg/mL, pH = 4 ~ 5 时, 萃取率较好, 可达 93.7%。萃取过程中不出现乳化现象。结果证明, 离子液体双水相能够绿色、高效分离青霉素。

Yang 等^[11]用离子液体 [C₈mim]Br 和 NaCl 形成的双水相体系萃取了蜂蜜中的四环素、土霉素和氯霉素, 研究了离子液体的体积、盐的种类和浓度、pH、提取时间、温度对萃取率的影响, 四环素、土霉素和氯霉素的检出限分别为 5.8、8.2、4.2 μg/kg, 回收率 85.5% ~ 110.9%, 相对标准偏差低于 6.9%, 结果表明, 该方法成功地应用于蜂蜜样本的检测。

Han 等^[12]用离子液体 [C₄mim]Cl 和 K₂HPO₄ 双水相体系萃取分离了环境和食品中的氯霉素 (CAP), 考察了 K₂HPO₄ 的类型、浓度、离子液体的

浓度、溶液的 pH、氮流量、分离时间对萃取率的影响,优化的条件下,平均分离效率为 98.5%,高效液相色谱分析后,呈现良好的线性关系,线性范围 0.5 ~ 500 ng/mL,定性检出限(LOD)为 0.1 ng/mL,定量检出限(LOQ)为 0.3 ng/mL,平均回收率为 97.1% ~ 101.9%,结果表明,该方法成功地应用于在湖水、自来水、牛奶和蜂蜜样品中 CAP 的萃取,与传统的液-液萃取相比,离子液体双水相萃取有较高的分离效率,减少了对离子液体的浪费,这种技术更加快速环保,也适用于其他小生物分子分离。

Shao 等^[13]用 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐和柠檬酸钠建立的离子液体双水相萃取分离了牛奶中的 6 种磺胺类药,考察了不同类型的盐和加入量、离子液体的类型和数量、超声时间和样品溶液的 pH 对萃取率的影响,在最佳实验条件下,高效液相色谱测定分析,得到良好的线性范围 8.55 ~ 1 036.36 ng/mL。定性检出限和定量检出限分别为 2.04 ~ 2.84、6.73 ~ 9.37 ng/mL,结果表明,该方法成功应用于萃取分离牛奶中的磺胺类药,并且该方法具有快速、环保等优点,回收率为 72.32% ~ 108.96%,相对标准偏差为 0.56% ~ 12.20%。

He 等^[14]用亲水性 [Bmim] Cl/K₂HPO₄ 建立的离子液体双水相系统萃取分离了尿液中的睾酮激素和表睾酮,在优化条件下,萃取率为 80% ~ 90%,RP-HPLC 测定,检出限为 1 ng/mL,线性范围为 10 ~ 500 ng/mL,结果表明,该方法成功应用于人类尿液中睾酮激素和表睾酮萃取分离,与传统的液液萃取或固相萃取相比,由于不使用挥发性有机溶剂,因此这种新方法更环保,为提取分离其他药物开辟了新的可能性。

Li 等^[15]建立了由离子液体 [Bmim] BF₄/(NH₄)₃C₆H₅O₇ 形成的双水相体系对水样和水产品中的磺胺嘧啶(SD)和新诺明(SMX)检测的高效液相色谱法,考察了盐的种类与浓度、温度、SD 和 SMX 的浓度以及萃取时间对萃取效率的影响,结果表明,当 (NH₄)₃C₆H₅O₇ 的质量浓度为 0.56 g/mL,SD 和 SMX 质量浓度为 100 ng/mL,萃取 30 min,室温条件下,SD 和 SMX 的回收率分别为 98.29% ~ 99.55%、92.09% ~ 99.82%,检出限分别为 0.9、1.8 ng/mL。

Han 等^[16]用离子液体 [Bmim] BF₄/Na₃C₆H₅O₇ 萃取测定自来水、牛奶、蜂蜜中的氯霉素,研究了盐的种类和浓度、pH、[Bmim] BF₄ 的加入量、萃取温度对萃取率的影响,在优化的条件下,HPLC 分析,单次萃取率可达到 90.1%,线性范围为 2 ~ 1 000 ng/mL,检

出限为 0.3 ng/mL,最低检出限为 1.0 ng/mL,回收率为 90.4% ~ 102.7%,该方法能够快速、无污染萃取分析自来水、牛奶、蜂蜜中的氯霉素。

Tan 等^[17]建立了 [C₄mim] BF₄/Na₂SO₄ 形成的双水相体系萃取芦荟蒽醌类,探讨了盐的种类和加入量、pH、萃取温度、平衡时间等对芦荟蒽醌类分配行为的影响。实验表明,当系统温度为 25℃,pH 为 4 时,萃取率为 92.1%,在优化的实验条件下,HPLC 分析后,反向萃取离子液体,以便回收再次利用。

张中杰等^[18]建立了醇与离子液体二元双水相体系萃取四环素,异丙醇和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸([Bmim] BF₄)/NaH₂PO₄ 为萃取体系,考察了离子液体和 NaH₂PO₄ 的加入量、pH、四环素的浓度对萃取结果的影响,在最优的条件下,当体系的 pH 为 4.0 ~ 5.0,磷酸二氢钠的质量分数为 36%,四环素在 65 ~ 95 mg/L 时,该二元体系对四环素的萃取率为 91.98% ~ 94.98%,分配系数为 82.135 ~ 130.315。

关卫省等^[19]建立了正丙醇和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸([Bmim] BF₄)/硫酸铵二元双水相体系,研究了该体系对萃取盐酸多西环素的最优化条件,通过对正丙醇的用量、pH、离子液体加入量以及盐酸多西环素的浓度的考察,结果表明,pH 4.0 ~ 5.0,质量分数 34% 的硫酸铵,25 ~ 95 mg/L 的盐酸多西环素,萃取率可达 90.26% ~ 95.71%,分配系数可达 62.452 ~ 149.401。

2 聚合物双水相萃取抗生素

Xie 等^[20]建立了一种绿色、经济、高效的聚丙二醇-400/盐双水相系统进行样品前处理磺胺甲噁唑,高效液相色谱分离检测,考察了盐的种类、盐的用量、pH、温度的影响。在最佳的条件下,萃取率为 99.2%,且该技术成功应用于水样分析,回收率为 96.0% ~ 100.6%,检出限为 0.1 μg/L,线性范围为 2.5 ~ 250.0 μg/L。

Jorge 等^[21]用聚乙二醇及胆碱盐组成的双水相体系从发酵液中萃取四环素,与传统聚合物/盐、盐/盐双水相体系相比较,该体系能够直接萃取出四环素,萃取率达 80% 以上。结果表明,该方法成功应用于复杂混合物抗生素的提取,为制药工业提供了有效的参考价值。

Jorge 等^[22]用聚乙二醇和聚丙烯酸钠/Na₂SO₄ 双水相体系纯化发酵液中的克拉维酸,在 25℃,考察了 PEG 的分子大小、聚合物的浓度、盐的种类对分配系数的影响后,发现在质量分数为 10% 的

PEG-4000、20% 的 NaPA-8000、6% 的 Na_2SO_4 的条件下,分配系数是 9.15 ± 1.06 ,结果表明,该方法能够成功地纯化发酵液中的克拉维酸,为以后的工业生产提供了新的方法。

3 小分子有机溶剂双水相萃取抗生素

Tan 等^[23]用乙醇/ NaH_2PO_4 建立的双水相体系分离提纯了苕麻叶中的绿原酸,首先用乙醇从苕麻叶粉末中萃取,然后加入到该双水相体系中进一步提纯,考察了盐的种类与浓度、萃取温度、pH、热力学与动力学的影响后,优化条件下,绿原酸被萃取到乙醇相,杂质在盐相,因此此次实验可以更加简单、环保、低消耗地进行,所以为大规模生产应用提供了可能。

关卫省等^[24]建立了丙酮和无水乙醇/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 二元双水相体系萃取盐酸多西环素,考察了丙酮和无水乙醇的加入量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度、pH、温度、盐酸多西环素浓度对萃取率的影响,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 41%,pH 在 4.5~5.0,温度 25℃,丙酮 0.5 mL 和无水乙醇 1 mL,盐酸多西环素质量浓度为 40~70 mg/L 时,萃取率可达 93.61%,分配系数可达 83.081,结果表明,该二元体系具有成本较低、操作简单、无乳化、低黏度等优点,能够成功地应用于盐酸多西环素的萃取,为抗生素的萃取提供了新的发展方向。

关卫省等^[25]还建立了二元双水相分离萃取盐酸四环素,体系为(乙醇+丙酮)-硫酸铵组成,结果表明,在无水乙醇与丙酮体积比为 2:1,硫酸铵的质量分数为 41%,pH 为 4.5~5.0,25℃时,体系对四环素的萃取率可达 90%,分配系数 57。在此条件下,改变二元体系中小分子有机溶剂的种类,无水乙醇、正丙醇、异丙醇与丙酮、乙醚分别组合,形成 6 组体系进行试验,结果发现,乙醇与丙酮对盐酸四环素分离效果最好,质量分数 41% 的硫酸铵,分配比可达 57.95,萃取率达 90% 以上,所以选择最优的萃取体系对萃取率的提高有着一定的影响。

4 结语

在萃取过程中,萃取率受成相物质的种类与加入量、盐的种类与浓度、pH、温度等的影响,而选择最优的成相物质,对目标物的分离分析更加重要,从现在的发展状况来看,离子液体双水相虽具有条件温和、不容易挥发、不易发生乳化现象等优点,但是离子液体的种类选择较为受限,而且价格较高,盐的使用量较大,不易扩大生产。聚合物双水相萃取存

在聚合物成本高、黏度大、后续工作困难的问题。而小分子有机溶剂虽然简单易得,却较易挥发,但新型的二元双水相萃取减少了离子液体聚合物的加入量,降低了成本,减少了小分子有机溶剂的挥发,更加环保,又具有其他双水相萃取的优点,为今后双水相萃取的发展提供了良好的发展前景。

参考文献

- [1] Albertsson P A. Partition of cell particles and macromolecules; Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology[M]. New York: John Wiley and Sons, 1986.
- [2] Du Zhuo, Yu Yong-liang, Wang Jian-hua, et al. Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system[J]. Chem Eur J, 2007, 13(7): 2130-2137.
- [3] 王军,张艳,时召俊,等. *N*-乙基-*N*-丁基吗啉离子液体双水相体系萃取分离蛋白质[J]. 应用化工, 2009, 38(1): 70-72.
- [4] 樊静,邵小静,魏娅方,等. 吡虫啉和啉虫脒的离子液体双水相萃取顺序注射光度分析研究[J]. 分析化学, 2008, 36(10): 1411-1414.
- [5] 邓凡政,傅东祈,朱陈银. 离子液体双水相萃取分光光度法测定[J]. 冶金分析, 2008, 28(6): 29-32.
- [6] Hou F L. Outline of feed additive application[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 1-45.
- [7] Daughton C G, Temes T A. Pharmaceuticals personal products of subtle 6: Environment: Agents change[J]. Environ Health Perspect, 1999, 107: 907-938.
- [8] Halling-Sørensen B, Nielsen S N, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review[J]. Chemosphere, 1998, 36(2): 357-393.
- [9] Li Chun-xiang, Han Juan, Wang Yun, et al. Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic liquid-salt aqueous two-phase system[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 653(2): 178-183.
- [10] 刘庆芬,胡雪生,杨屏,等. 离子液体双水相萃取分离青霉素[J]. 科学通报, 2005, 50(8): 756-759.
- [11] Yang Xiao, Zhang Shaohua, Yu Wei, et al. Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography[J]. Talanta, 2014, 124: 1-6.
- [12] Han Juan, Wang Yun, Yu Cuilan, et al. Separation, concentration and determination of chloramphenicol in environment and food using an ionic liquid/salt aqueous two-phase flotation system coupled with high-performance liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 685(2): 138-145.
- [13] Shao Mingyuan, Zhang Xuli, Li Na, et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase system extraction of sulfonamides in milk Original Research Article[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 961: 5-12.
- [14] He Chiyang, Li Shehong, Liu Huwei, et al. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1082(2): 143-149.

菌株对烷烃的降解能力依次为短链正构烷烃 > 长链正构烷烃 > 异构烷烃, 28 d 后, 正构和异构组分完全降解, 说明该混合菌种具有良好的生物降解能力。对渗透率为 0.3D 的岩心的室内模拟微生物驱油实验表明, 原油采收率能提高 15.9%。但作者发现辽河油田现场水配置的菌液的驱油采收率较低, 具体机理有待研究。Hemalatha^[8] 从尼日利亚油田污染土壤中分离得到 2 种石油烃降解菌属—假单胞菌属和黄杆菌属。其中在 pH = 6 ~ 7, 温度小于 15℃ 时, 假单胞菌属使石油降解率提升了 40%; 黄杆菌属烃降解率提高了 45%。另外, 还发现 2 种菌属均具有高效耐药性和抗重金属性。作者建议这 2 类菌种可运用于探井采油, 具有良好的发展前景。Hassanshahian 等^[9] 针对石油产品泄露的问题, 进行微生物驱油研究。结果表明, 分离出 8 种烃降解菌菌群—红球菌属、铜绿假单胞菌属等, 它们以十六烷为唯一碳源, 碳源最佳质量分数 2.5%, 7 d 后都能降解十六烷 50% 以上, 可见该 8 种烃降解菌群都具有良好的烃降解效果。张洁等^[10] 研究了从长庆、延庆油田油泥中分离出的高效石油烃氧化菌 PDA2 (红球菌属) 和 PDB3 (假单胞菌属) 降解正十六烷的特性。PDA2 在温度为 30℃, 初始 pH = 7, 最高可降解 89.4% 正十六烷。PDB3 在最适温度 30℃, pH = 7, 正十六烷降解度最高可达到 98.5%。PDB3 具有耐受性。但 PDA2 在产生表面活性剂的同时菌种表面疏水性未变化, 具体机理有待研究。张莹等^[11] 对来自四川省普光气田和湖北省江汉油田的土壤样品中

的丁烷氧化菌进行丁烷选择培养法探讨烃氧化菌数量等差异。该菌以丁醇为唯一碳源, 在 30℃ 下的固体培养基分离进行纯培养。纯化丁烷氧化菌的 16S rRNA 经 PCR 扩增实验后表明, 相关种属细菌相似性均接近 100%。可见该菌对两地区的地理环境具有较好的适应能力, 可应用于微生物勘探。Hassanshahian 等^[12] 通过研究烃氧化菌的疏水化过程, 发现有效的氧化烃类细菌固定化可为微生物提供营养物质。该菌群对正十六烷氧化效率为 51%, 生长 10 d 就能增加油层疏水性和流动性, 扩大扫油面积, 增加驱油效率。

烃降解菌能够有效降解长碳链烃, 降低原油黏度, 增加原油流动性, 进而提高原油采收率。该菌自发合成的表面活性物质具有吸附滞留量小、稳定性高、部分菌种具有耐盐及抗污染等优点, 能够提高原油采收率主要是由于菌种使烃类乳化, 增加水相和油包水乳液液滴接触面积, 降低张力, 改变岩石表面憎水性, 扩大油层孔隙, 但培养优势菌种的过程复杂, 有待研发。

2 产表面活性剂菌

产表面活性剂菌是指一类可以产生表面活性剂的微生物。于晓明^[13] 从油田污染土壤中获得产表面活性剂能力较强的菌株 BS8-17, 并鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌。该菌种以原油为唯一碳源, 在 37℃, 摇床振荡 96 h 后经过离心、沉淀、萃取、蒸发, 最终带电性测定表明, 该菌种的产物是脂肽类生物

(上接第 36 页)

[15] Li Yanfang, Han Juan, Yan Yongsheng, *et al.* Simultaneous extraction and determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in water samples and aquaculture products using [Bmim] BF₄ / (NH₄)₃ C₆ H₅ O₇ aqueous two-phase system coupled with HPLC [J]. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2010, 96: 150 - 157.

[16] Han Juan, Wang Yun, Yu Cui-lan, *et al.* Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399 (3): 1295 - 1304.

[17] Tan Zhijian, Li Fenfang, Xu Xuelei. Isolation and purification of alio anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system [J]. *Separation and Purification Technology*, 2012, 98: 150 - 157.

[18] 张中杰, 卢昶雨, 黄威, 等. 醇与离子液体二元双水相体系萃取四环素[J]. *应用化工*, 2014, 43(1): 37 - 41.

[19] 关卫省, 黎文娟, 韩娟. 醇与离子液体二元双水相体系萃取盐酸多西环素[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(5): 600 - 604.

[20] Xie X, Wang Y, Han J, *et al.* Extraction mechanism of sulfamethoxazole in water samples using aqueous two-phase systems of poly(propylene glycol) and salt [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 687(1): 61 - 66.

[21] Jorge F B Pereira, Filipa Vicente, Valéria C Santos-Ebinuma. Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(4): 716 - 722.

[22] Jorge F B Pereira, Valéria C Santos, Hans-Olof Johansson, *et al.* A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems [J]. *Separation and Purification Technology*, 2012, 98: 441 - 450.

[23] Tan Zhijian, Wang Chaoyun, Yi Yongjian, *et al.* Extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) leaf using an ethanol/salt aqueous two-phase system [J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 132: 396 - 400.

[24] 关卫省, 邓江华, 韩娟. 醇和小分子有机物二元双水相体系萃取盐酸多西环素[J]. *应用化工*, 2012, 41(6): 995 - 999.

[25] 关卫省, 邓江华, 韩娟. (乙醇 + 丙酮) - 硫酸铵二元双水相分离萃取盐酸四环素[J]. *环境化学*, 2013, 32(3): 513 - 517. ■