

## 高效液相色谱法测定生物脱硫系统中的含硫化合物

陈郑<sup>1,2</sup>, 杨茂华<sup>1</sup>, 穆廷桢<sup>1</sup>, 苗得露<sup>1</sup>, 赵胥浩<sup>1</sup>, 张建<sup>3</sup>, 邢建民<sup>1,2</sup>

1 中国科学院过程工程研究所 中国科学院绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190

2 中国科学院大学 化学工程学院, 北京 100049

3 中石化节能环保工程科技有限公司, 湖北 武汉 430223

陈郑, 杨茂华, 穆廷桢, 等. 高效液相色谱法测定生物脱硫系统中的含硫化合物. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2181-2192.  
Chen Z, Yang MH, Mu TZ, et al. Determination of sulfur compounds in biological desulfurization system by high performance liquid chromatography. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2181-2192.

**摘要:** 生物脱硫是利用微生物脱除气体和石油中的含硫化合物, 具有操作条件温和、工艺流程简单、脱硫效率高、能量消耗低和环境污染少等优点。但是, 当前仍然缺乏简单高效的分析方法来定量分析生物脱硫过程中的含硫化合物。针对这个问题, 建立了柱前荧光衍生高效液相色谱法同时测定生物脱硫溶液中的亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物的分析方法。该分析方法中含硫化合物的标准曲线具有良好的线性关系, 亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物相关系数分别为 0.999 46、0.999 67 和 0.999 65, 其检测限分别为 0.000 6  $\mu\text{mol/L}$ 、0.000 7  $\mu\text{mol/L}$  和 0.001 1  $\mu\text{mol/L}$ ; 含硫化合物的加标回收率范围分别为 98.17%–101.92%、100.90%–102.60% 和 101.11%–104.22%; 并具有良好的重复性和稳定性。实验证明, 该分析方法预处理简单、分析快速、结果准确, 可用于同时测定不同生物脱硫系统中的含硫化合物。

**关键词:** 柱前荧光衍生, 高效液相色谱, 生物脱硫, 亚硫酸盐, 硫代硫酸盐, 硫化物

## Determination of sulfur compounds in biological desulfurization system by high performance liquid chromatography

Zheng Chen<sup>1,2</sup>, Maohua Yang<sup>1</sup>, Tingzhen Mu<sup>1</sup>, Delu Miao<sup>1</sup>, Xu hao Zhao<sup>1</sup>, Jian Zhang<sup>3</sup>, and Jianmin Xing<sup>1,2</sup>

1 CAS Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2 College of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Sinopec Energy and Environmental Engineering Co. Ltd, Wuhan 430223, Hubei, China

**Abstract:** Biological desulfurization is a process in which sulfur compounds are removed from gas and oil using

**Received:** March 3, 2020; **Accepted:** May 12, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31872633, 31800030, 21878307), National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFA0906800).

**Corresponding author:** Jianmin Xing. Tel: +86-10-62550913; E-mail: jmxing@ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31872633, 31800030, 21878307), 国家重点研发计划 (No. 2020YFA0906800) 资助。

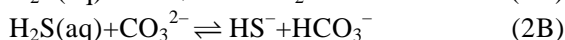
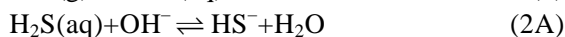
microorganisms. It is a simple process that has mild operating conditions, high desulfurization efficiency, low energy consumption and less environmental pollution. However, there is still a lack of simple and efficient analytical methods for quantitatively analyzing the sulfur compounds in the biological desulfurization process. In order to solve this problem, the analytical method for the simultaneous determination of sulfite, thiosulfate and sulfide in biological desulfurization solutions by pre-column fluorescence derivatization using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The standard curves of sulfur species in this analytical method had good linear relationships with correlation coefficients of 0.999 5, 0.999 7, and 0.999 7 for sulfite, thiosulfate and sulfide, respectively. The detection limits of these sulfur compounds were 0.000 6, 0.000 7 and 0.001 1  $\mu\text{mol/L}$ ; the range of recovery rates were 98.17 to 101.9%, 100.9 to 102.6%, and 101.1 to 104.2%; which had good repeatability and stability. The analytical method was simple, efficient and accurate, and could be used to simultaneously determine the sulfur compounds in different biological desulfurization systems.

**Keywords:** pre-column fluorescence derivatization, high performance liquid chromatography, biological desulfurization, sulfite, thiosulfate, sulfide

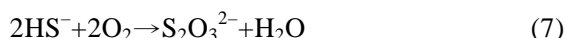
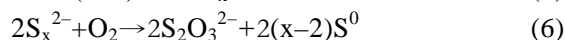
生物脱硫作为一种环境友好型脱硫技术,具有操作条件温和、工艺流程简单、脱硫效率高、能量消耗低、环境污染小和副产生物硫磺等优点<sup>[1]</sup>。另外,生物硫磺相较于化学硫磺水溶性要更好,可用于土壤肥料或杀菌剂<sup>[2]</sup>。因此,生物脱硫技术具有广阔的应用前景<sup>[3-6]</sup>。

生物脱硫过程主要由以下反应组成。

含  $\text{H}_2\text{S}$  的酸性气体进入吸收塔中,与碱性溶液逆流接触,  $\text{H}_2\text{S}$  从气相进入液相并与  $\text{OH}^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  反应生成  $\text{HS}^-$ , 反应式如(1)、(2A)和(2B)所示。



含  $\text{HS}^-$  的碱液进入生物反应器中,由于微生物的氧化作用,  $\text{HS}^-$  在限氧的条件下被生物氧化为硫单质,在氧气充足的条件下生成副产物硫酸盐,反应式如(3)和(4)所示<sup>[7-8]</sup>;另外,  $\text{HS}^-$  与生成的硫单质  $\text{S}^0$  反应生成  $\text{S}_x^{2-}$ , 反应式如(5)所示<sup>[9]</sup>;  $\text{S}_x^{2-}$  在溶解氧的作用下被氧化为  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , 反应式如(6)所示<sup>[10]</sup>;  $\text{HS}^-$  发生非生物氧化生成  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , 反应式如(7)所示<sup>[11-12]</sup>。



通过以上反应可知,  $\text{HS}^-$  和  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  分别是生物脱硫过程中主要的中间产物和副产物,而且溶液中的  $\text{HS}^-$  对微生物具有毒性。因此,为了研究分析生物脱硫系统中含硫化合物的含量,同时降低副产物  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的生成和提高  $\text{HS}^-$  反应速率,需要建立一套测量准确快速、重现性高且高效的含硫化合物分析方法。

生物脱硫溶液中的含硫化合物主要是  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  和硫化物,对于硫氧阴离子,  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ , 可通过离子色谱法<sup>[13]</sup>同时测定 3 种阴离子的含量;对于硫化物,生物脱硫系统中主要是  $\text{HS}^-$  和少量的  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{S}^{2-}$ , 测定硫化物的方法主要有分光光度法、荧光法和色谱法。

Haddad 等<sup>[14]</sup>基于硫化物与 N,N-二甲基对苯二胺于酸性介质中生成亚甲基蓝的原理,通过离子交换色谱测定水中 nmol 级的硫化物。Bramant 等<sup>[15]</sup>基于硫化物与对羟基汞苯甲酸盐 (p-Hydroxymercurybenzoate, PHMB) 生成稳定的络合物,利用 PHMB 作为荧光探针,采用液相色谱-原子荧光光谱法联用技术测定硫化物。Liu 等<sup>[16]</sup>利用高效液相色谱与质谱联用技术并结合亚甲基蓝柱前衍生,可测定 nmol 级的硫化物。

但是,以上提到的测定方法均满足不了同时测定生物脱硫溶液中的含硫化合物。目前,同时测定亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物的主要方法有滴定

法、分光光度法和极谱法<sup>[17-20]</sup>。这几种方法通常涉及差异测定,如样品与碘在不同条件下反应,样品容易受到氧气的影响,而且多个样品测定需要大量时间给这些方法造成了局限性。因此,需要可以同时测定且简单、高效、灵敏的分析方法。

随着研究的深入,我们发现一种荧光探针单溴二胺 (Monobromobimane, mBBr)<sup>[21-22]</sup>,可与不具有荧光的硫醇、还原性含硫化物反应生成稳定且带有荧光的衍生物。Fahey 等<sup>[23-26]</sup>基于单溴二胺 (Monobromobimane, mBBr)、单溴 (三甲基铵) 二溴 (Monobromo(trimethylammonio)bimane, qBBr) 与硫醇反应生成稳定荧光衍生物的原理,采用电泳、阳离子交换色谱和反相高效液相色谱并结合柱前荧光衍生可测定 pmol 级的生物硫醇。Chinn 等<sup>[27]</sup>利用硫醇特异性试剂 mBBr 与硫氧还原蛋白反应形成稳定的荧光衍生物,通过反相高效液相色谱可测定 pmol 级的硫氧还原蛋白,该测定方法灵敏度高、选择性好,可用来确定大肠杆菌细胞内硫氧还原蛋白的水平。Togawa 等<sup>[28]</sup>利用反相高效液相色谱法分离亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物与荧光探针 mBBr 反应生成的荧光衍生物,该方法用于测定浓度在 1  $\mu\text{mol/L}$  下正常人类血清中的硫代硫酸盐、亚硫酸盐和结合硫化物。Gru 等<sup>[29]</sup>利用反相高效液相色谱并结合柱前 mBBr 荧光衍生定量分析海水和体液中的硫化物、亚硫酸盐、硫代硫酸盐、半胱氨酸和谷胱甘肽。

综上所述,前人主要利用该方法进行了生物硫醇、人类血清、海水和体液中极低浓度的含硫化物检测,尚未见利用该方法针对较高浓度含硫化物检测的报道,也未见在微生物转化体系利用该方法进行检测的报道。因此,我们研究了该方法用于测定较高浓度含硫化物,比较了不同高效液相色谱分离柱对含硫化物的分离效果,同时对流动相流速和柱温两项参数进行优化,并利用该反应通过柱前荧光衍生高效液相色谱法

同时测定了生物脱硫系统中的各种含硫化物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

无水亚硫酸钠(ACS $\geq$ 98%, RT), 0.100 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液, 九水合硫化钠 (ACS), 购于上海阿拉丁生化科技公司; N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES,  $\geq$ 99.5%), 冰乙酸 (HPLC,  $\geq$ 99.5%), 购于上海麦克林生化科技公司; 氢氧化钠, 乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 购于国药集团化学试剂公司; 乙腈 (色谱纯), 单溴二胺(mBBr,  $\geq$ 95%), 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 仪器与设备

LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; ZORBAX SB-Aq C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ) 液相色谱柱, 美国 Agilent 公司; Shim-pack GIST C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ) 液相色谱柱, 日本 Shimadzu 公司; YMC-Triart C18 液相色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ), 日本 YMC 公司; 超纯水机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 移液枪、分析天平、FiveEasy 实验室 pH 计, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器公司。

### 1.3 标准溶液与缓冲溶液配制

10 mmol/L 亚硫酸钠标准溶液: 称取 0.126 g 无水亚硫酸钠溶于少量水中, 移入 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至标线, 摇匀。亚硫酸钠标准溶液需要现配现用。

100 mmol/L 硫代硫酸钠标准溶液: 购买于上海阿拉丁生化科技公司。

10 mmol/L 硫化钠标准溶液: 取一定量结晶状的九水合硫化钠于布氏漏斗或小烧杯中, 用水淋洗除去表面杂质, 用干滤纸吸干水分后, 称取 0.24 g 溶于少量水中, 移入 100 mL 容量瓶, 用水

稀释至标线, 摇匀后标定其准确浓度。

20 mmol/L mBBr 溶液: 将 mBBr 溶于乙腈, 放于-20 °C 避光保存。

HEPES 缓冲液: 称取 0.596 g HEPES 粉末和 0.093 g EDTA 于 50 mL 的超纯水中, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调溶液 pH 至 8.0。

#### 1.4 样品预处理

取待测样品 200  $\mu$ L 于 1.5 mL 离心管中, 加入 15  $\mu$ L mBBr 溶液和 200  $\mu$ L HEPES 缓冲液, 在室温且避光反应 1 h 后, 加入 200  $\mu$ L 超纯水稀释, 并在 1-3 h 内完成分析。

#### 1.5 高效液相色谱参数

高效液相色谱参数如表 1 所示, 其中流动相 A 和 B 使用前经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 并经 30 min 超声去除气泡; 另外, 每次仪器开机后, 先用流动相冲洗色谱柱 30 min, 每次分析后用流动相冲洗色谱柱 10 min, 以保持保留时间和峰面积具有良好的重现性。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效液相色谱方法优化

#### 2.1.1 进样量的选择

进样量的大小决定响应信号的强度。进样量大可增强信号强度, 同时增加色谱峰的峰高, 提高色谱柱的灵敏度, 但进样量大会降低谱峰的分度度,

同时也会污染色谱柱, 降低色谱柱寿命。进样量小会受噪音的影响较大, 也可能会低于检出限, 影响分析结果, 但进样量小对色谱柱寿命有好处。本研究拟采用 10  $\mu$ L 为进样量, 实验结果表明含硫化化合物的出峰效果良好, 均可以得到很好的分离, 因此最终选取 10  $\mu$ L 为进样量。

#### 2.1.2 流动相的选择

反相高效液相色谱的流动相一般包括水相和有机相。水相一般采用纯水作流动相, 但对于弱酸或者弱碱化合物, 一般需要通过在水中加入弱酸或弱碱调节水相 pH 值来抑制样品组分的解离, 增加组分在固定相上的保留, 进而改善组分峰形, 使目标化合物能得到很好的分离。通常分离碱性化合物时, 水相 pH 值应该在  $pK_b \pm 2$  以外进行调节, 并且优先选择高于  $pK_b$  值 2 个单位。对于生物脱硫溶液中的含硫化合物, pH 通常在 8.0-9.5 范围内, 所以在配制水相时, 在每升水中加入 2.5 mL 的乙酸调水相的 pH 为 4.0。有机相一般选择甲醇或乙腈作为有机相。由于乙腈洗脱能力比甲醇强, 因而本研究采用纯乙腈作为有机相。

#### 2.1.3 色谱柱的选择

生物脱硫溶液中含硫化合物大多为非极性碱性盐和低极性碱性盐, 由于反相 C18 色谱柱适于分离非极性和极性较弱的化合物, 因此选择反相 C18 色谱柱对含硫化合物进行分离。但是, 采用

表 1 高效液相色谱参数

Table 1 The parameters of high performance liquid chromatography

Names	Parameters
Reverse-phase column	Agilent ZORBAX SB-Aq C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 $\mu$ m)
Column temperature	25 °C
Mobile phase A	0.25% acetic acid/water
Mobile phase B	Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Excitation wavelength	395 nm
Emission wavelength	480 nm
Injected volume	10 $\mu$ L
Elution gradient	0 min, 10% B; 10 min, 30% B; 18 min, 75% B; 20 min, 100% B

不同的色谱柱分析样品时,由于色谱柱选择性的差异,目标化合物的保留值、色谱峰之间的分离度甚至色谱峰顺序都可能出现较大的差异<sup>[30-31]</sup>,因此要选择柱效高、选择性好、分析速度快的色谱柱。

本实验研究不同的反相高效液相色谱柱,其他色谱条件相同的情况下,对空白试剂、亚硫酸钠标准液、硫代硫酸钠标准液、硫化钠标准液和3种标准液各的混合液进行测定,以停留时间为横坐标、响应值为纵坐标,比较不同的色谱柱对含硫化合物的分离效果。

Shim-pack GIST C18 色谱柱是在新型的更高惰性硅胶基质上键合十八烷基的色谱柱,由于色谱柱的高惰性,大幅度提高了分析的精确度和色谱柱的重现性。此外,该色谱柱采用新型硅胶,可以耐受 pH 为 1.0-10.0 的流动相,在碱性的分析条件下也能得到稳定的分离。如图 1 所示,该色谱柱峰形很好,存在轻微漂移,但  $S_2O_3^{2-}$  色谱峰与相邻空白峰之间存在部分重叠,分离度低。

YMC-Triart C18 色谱柱采用有机杂化硅胶为基质,对基质、颗粒和表面修饰 3 个方面进行革新,具有很强的耐受性、适度的疏水性和亲水性、良好的峰形和再现性等特点,适用于各种化合物的分离。如图 2 所示,该色谱柱相较于前者

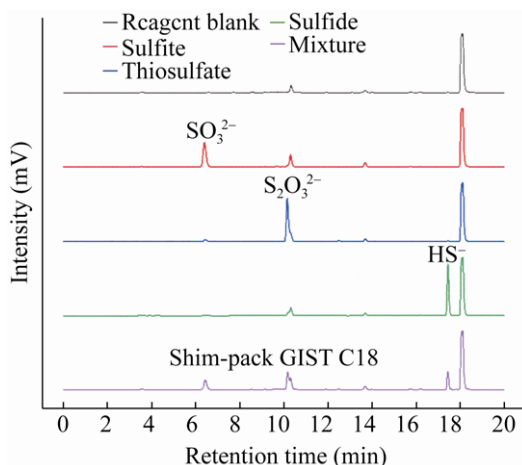


图 1 利用 Shim-pack GIST C18 色谱柱测定含硫化合物  
Fig. 1 Determination of sulfur compounds with Shim-pack GIST C18 column.

$S_2O_3^{2-}$  色谱峰与相邻空白峰得到基本分离,分离度大于前者,且峰形和重现性良好,但出峰时间略迟于前者。

ZORBAX SB-Aq C18 色谱柱具有亲水性的表面,即使是使用水溶液流动相,也可以有效地防止固定相的塌陷;适用于增加难以分离的酸性、碱性和极性化合物的保留值。保留作用要比许多传统的 C18 高效液相色谱柱要强。因此,分析极性化合物仍可以获得良好的重复性、稳定性和峰形。如图 3 所示,  $S_2O_3^{2-}$  色谱峰与相邻空白峰得

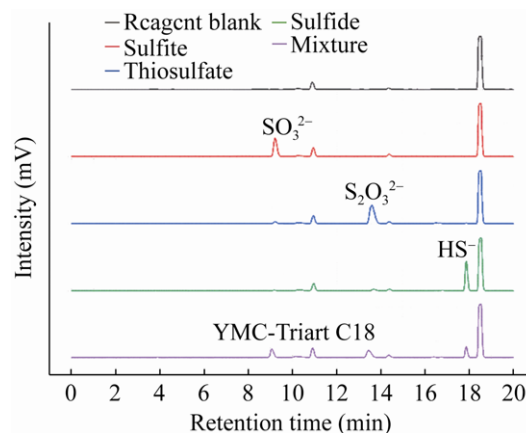


图 2 利用 YMC-Triart C18 色谱柱测定含硫化合物  
Fig. 2 Determination of sulfur compounds with YMC-Triart C18 column.

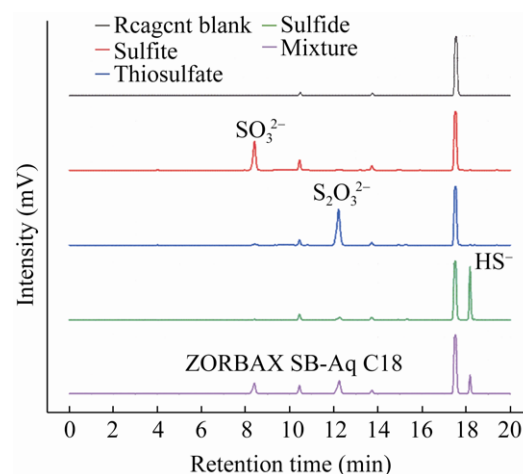


图 3 利用 ZORBAX SB-Aq C18 色谱柱测定含硫化合物  
Fig. 3 Determination of sulfur compounds with ZORBAX SB-Aq C18 column.

到完全分离, 分离度大于前两者, 且峰形与重现性良好, 但与前两者相比出峰顺序发生了变化。

另外, 研究了 3 种色谱柱测定含硫化合物的保留时间, 如表 2 所示, Shim-pack GIST C18 色谱柱各组分的出峰时间最早; YMC-Triart C18 色谱柱和 ZORBAX SB-Aq C18 色谱柱的各组分保留时间很接近, 但后者的 HS<sup>-</sup>组分最后出峰。

通过以上对不同的色谱柱的分析比较可得, ZORBAX SB-Aq C18 色谱柱对含硫化合物的分离度最大但出峰时间一般, YMC-Triart C18 色谱柱的分离度一般但出峰时间最迟, Shim-pack GIST C18 色谱柱的出峰时间最早但分离度最小; 3 种色谱柱的重现性均良好且存在信号漂移。综合考虑, 本实验研究采用 ZORBAX SB-Aq C18 作为反相高效液相色谱柱。

#### 2.1.4 流动相流速的选择

反相高效液相色谱中流动相流速也是影响分离度和出峰时间的一个重要因素, 流速大出峰时间短但分离度可能小; 流速小分离度大但出峰时间长。因此, 本实验研究了 0.4–1.2 mL/min (不同

表 2 不同色谱柱下 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>、HS<sup>-</sup>的保留时间  
Table 2 Retention time of SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> at different chromatographic columns

Compound	Retention time (min)		
	Shimadzu	YMC	Agilent
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	6.437	9.070	8.393
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	10.311	13.455	12.242
HS <sup>-</sup>	17.443	17.877	18.174

流速对应的洗脱梯度见表 3) 范围内流动相流速对 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>和 HS<sup>-</sup>测定效果的影响。

由表 4 可知, 3 种含硫化合物的保留时间和其峰面积随着流动相流速的增加均呈减小趋势; 由图 4、图 5 和图 6 可知, 流动相流速对 3 种含硫化合物的分离度影响不大, 3 种含硫化合物均可以得到很好的分离。因此, 拟定流动相流速 1.0 mL/min 为理想的操作条件, 同时实验表明在该条件下 3 种含硫化合物均可以得到很好的分离, 整个分析过程可以在 20 min 内完成。

表 3 不同流速下流动相洗脱梯度

Table 3 Elution gradients of mobile phase at different flow rates

Flow rate (mL/min)	Time (min)	Acetonitrile (%)	Water (%)
0.4	0	10	90
	25	30	70
	45	75	25
	50	100	0
	0	10	90
0.6	17	30	70
	30	75	25
	33	100	0
	0	10	90
	12.5	30	70
0.8	22.5	75	25
	25	100	0
	0	10	90
	10	30	70
	18	75	25
1.0	20	100	0
	0	10	90
	8.5	30	70
	15	75	25
	17	100	0

表 4 不同流动相流速下 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>、HS<sup>-</sup>的保留时间和峰面积

Table 4 Retention time and peak area of SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> at different mobile phase flow rates

Flow rate (mL/min)		0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
Retention time (min)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	19.402	12.703	10.163	8.122	6.784
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	28.784	19.752	14.781	11.899	10.169
	HS <sup>-</sup>	44.875	30.283	22.573	18.104	15.248
Peak area (mV·min)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	126 434	86 550	72 352	55 752	45 011
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	114 391	81 873	60 478	49 521	42 264
	HS <sup>-</sup>	69 534	51 498	41 302	35 256	30 386

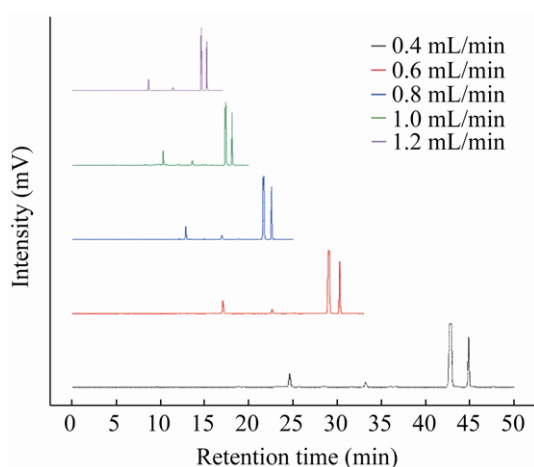


图 4 流动相流速对  $\text{SO}_3^{2-}$  测定结果的影响

Fig. 4 Effect of mobile phase flow rates on the determination results of  $\text{SO}_3^{2-}$ .

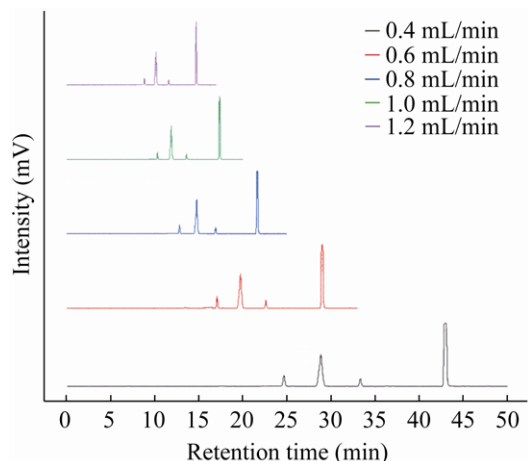


图 5 流动相流速对  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  测定结果的影响

Fig. 5 Effect of mobile phase flow rates on the determination results of  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

表 5 不同柱温下  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{HS}^-$  的保留时间和峰面积

Table 5 Retention time and peak area of  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{HS}^-$  at different column temperatures

Column temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )		25	30	35	40	45
Retention time (min)	$\text{SO}_3^{2-}$	8.163	8.053	8.087	7.757	7.681
	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	11.887	11.687	11.527	11.368	11.250
	$\text{HS}^-$	18.107	18.058	18.006	17.962	17.900
Peak area (mV·min)	$\text{SO}_3^{2-}$	56 292	55 717	56 569	57 750	55 627
	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	49 807	50 511	49 717	50 062	49 844
	$\text{HS}^-$	36 842	35 087	34 758	33 426	33 059

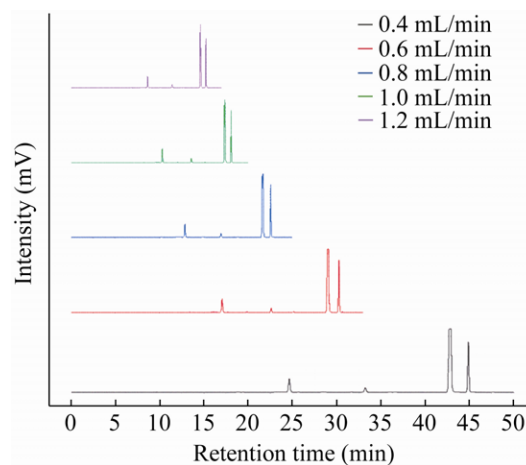


图 6 流动相流速对  $\text{HS}^-$  测定结果的影响

Fig. 6 Effect of mobile phase flow rates on the determination results of  $\text{HS}^-$ .

### 2.1.5 柱温的选择

对反相高效液相色谱来说,柱温对分析工作的质量影响较小,但是合适且稳定的柱温有利于提高色谱柱的灵敏度,改善谱峰的分度,缩短分析时间,确保分析结果的准确性和再现性。通常柱温升高可加快分离过程,但分离度也可能下降;相反,柱温降低可提高分离度,但会延长分析时间。因此,本实验研究了  $25^{\circ}\text{C}$ – $45^{\circ}\text{C}$  范围内柱温对  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  和  $\text{HS}^-$  测定效果的影响。

由表 5 可知,含硫化合物的保留时间随着柱温的增加呈减小趋势,其峰面积基本保持不变;由图 7、图 8 和图 9 可知,柱温对含硫化合物的分离度影响不大,含硫化合物在不同的柱温条件下均可以得到很好的分离。因此,拟定柱温  $25^{\circ}\text{C}$

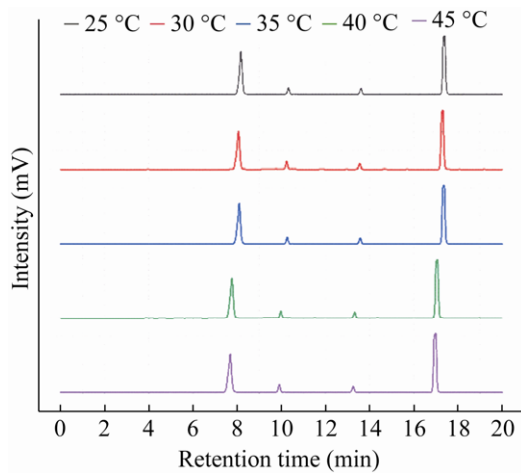


图7 柱温对  $\text{SO}_3^{2-}$  测定结果的影响

Fig. 7 Effect of column temperatures on the determination results of  $\text{SO}_3^{2-}$ .

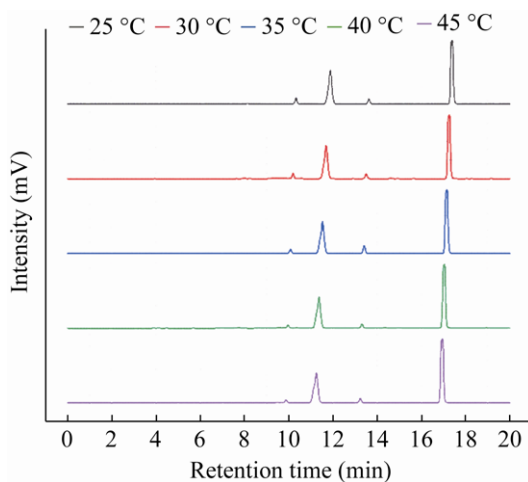


图8 柱温对  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  测定结果的影响

Fig. 8 Effect of column temperatures on the determination results of  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

为理想的的操作条件,同时实验表明在该条件下,3种含硫化合物均可以得到很好的分离。

## 2.2 方法学质量控制

### 2.2.1 标准曲线

同样的色谱条件下,配制不同浓度的亚硫酸钠、硫代硫酸钠和硫化钠标准液,测定其峰面积。以标准液浓度为横坐标 ( $x$ ),峰面积 ( $y$ ) 为纵坐标绘制标准曲线,测定结果如图 10 和表 6 所示。

### 2.2.2 检测限与定量限

通过岛津 LC-20A 工作站中的批处理再解析功能处理 3 种含硫化合物不同浓度的数据,根据最低出峰浓度信号强度 ( $S$ ) 是噪音 (或背景信号) 强度 ( $N$ ) 的 3 倍和 10 倍分别计算得出 3 种含硫化合物的检测限 (Limit of detection, LOD) 和定量限 (Limit of quantitation, LOQ)。表 7 记录了 3 种含硫化合物的标准曲线方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限,可见 3 种含硫化合物的标准曲线具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999,能够很好地满足实验分析需要。

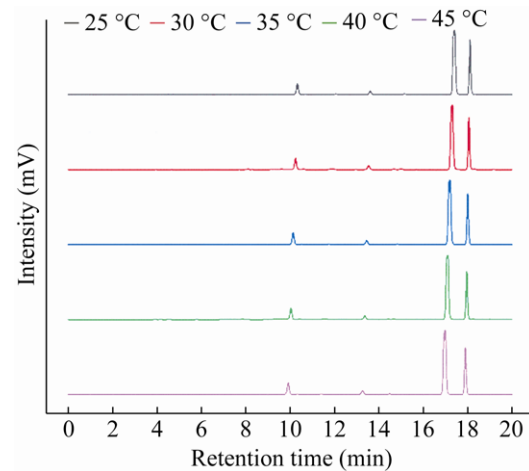


图9 柱温对  $\text{HS}^-$  测定结果的影响

Fig. 9 Effect of column temperatures on the determination results of  $\text{HS}^-$ .

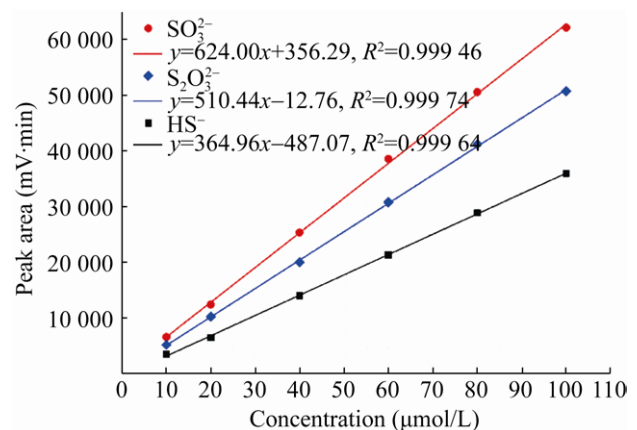


图10  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{HS}^-$  标准曲线

Fig. 10 Standard curves of  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  and  $\text{HS}^-$ .



### 2.3 稳定性实验

在 0、3、6、9、12 h 时平行测定 5 次已知浓度的硫化钠标准液、亚硫酸钠标准液和硫代硫酸钠标准液的保留时间和峰面积并计算 12 h 内其平均值和相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD)。由表 8 可知, 3 种含硫化合物在 12 h 内保留时间的相对标准偏差分别为 0.56%、0.25% 和 0.02%; 峰面积的相对标准偏差为 0.84%、2.82% 和 0.99%。因此, 实验结果表明衍生溶液在 12 h

内是稳定的, 能够满足分析测定需要。

### 2.4 重复性实验

平行测定 5 次已知浓度的硫化钠标准液、亚硫酸钠标准液和硫代硫酸钠标准液的保留时间和峰面积并计算其平均值和相对标准偏差。由表 9 可知, 3 种含硫化合物保留时间的相对标准偏差分别为 0.03%、0.04% 和 0.01%, 峰面积的相对标准偏差分别为 0.50%、0.85% 和 0.68%。因此, 实验测定结果表明重复性良好。

表 6  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{HS}^-$  标准曲线的测定

Table 6 Determination of  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{HS}^-$  standard curve

Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )		10	20	40	60	80	100
Peak area ( $\text{mV}\cdot\text{min}$ )	$\text{SO}_3^{2-}$	6 568	12 396	25 322	38 586	50 570	62 137
	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	5 158	10 217	20 014	30 823	41 194	50 754
	$\text{HS}^-$	3 500	6 469	14 039	21 340	28 920	35 946

表 7 标准曲线、检测限与定量限

Table 7 Standard curve, limit of detection and limit of quantitation

Compound	Standard equation	Correlation coefficient	Linear range ( $\mu\text{mol/L}$ )	Limit of detection ( $\mu\text{mol/L}$ )	Limit of quantitation ( $\mu\text{mol/L}$ )
$\text{SO}_3^{2-}$	$y=624.00x+356.29$	0.999 46	10–100	0.000 6	0.001 9
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$y=510.44x-12.76$	0.999 74	10–100	0.000 7	0.002 3
$\text{HS}^-$	$y=364.96x-487.07$	0.999 64	10–100	0.001 1	0.003 6

表 8 稳定性实验结果

Table 8 Experimental results of stability

Time (h)	Retention time mean (min)			Peak area mean ( $\text{mV}\cdot\text{min}$ )		
	$\text{SO}_3^{2-}$	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$\text{HS}^-$	$\text{SO}_3^{2-}$	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$\text{HS}^-$
0	8.461	12.257	18.145	27 634	30 729	14 461
3	8.395	12.222	18.138	27 569	29 827	14 304
6	8.380	12.181	18.139	27 345	29 191	14 616
9	8.369	12.187	18.142	27 188	29 085	14 667
12	8.334	12.211	18.139	27 106	28 562	14 461
RSD (%)	0.56	0.25	0.02	0.84	2.82	0.99

表 9 重复性实验结果

Table 9 Experimental results of repeatability

Compound	Retention time mean (min)		Peak area mean ( $\text{mV}\cdot\text{min}$ )	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
$\text{SO}_3^{2-}$	8.394	0.03	27 540	0.50
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	12.186	0.04	29 449	0.85
$\text{HS}^-$	18.142	0.01	14 446	0.68

## 2.5 实际样品测定实验和加标回收率实验

实际样品取自实验室生物脱硫反应器，离心后取上清液 1 mL，稀释一定倍数并进行样品预处理，平行测定 5 次。根据稀释倍数及测定值计算实际样品中的含硫化合物水平，同时对该样品进行加标回收实验并计算加标回收率。

由表 10 可知，实际样品中含硫化合物的相对标准偏差分别为 0.67%、1.01% 和 1.24%，均小于 2%，可用于实际物系中样品测定；加标后样品中含硫化合物的相对标准偏差分别为 0.94%、0.59% 和 0.95%，均小于 2%；含硫化合物的加标回收率均在 95%–105% 范围内；表明该法准确性高。

Daunoravicius 等<sup>[32]</sup>建立了一种新型毛细管电泳方法，用于快速、简单和选择性地测定硫代硫酸盐、硫化物和亚硫酸盐；该方法可用于监测电

解氧化过程中废液的硫阴离子含量。与该方法相比，本研究方法中荧光衍生的产物稳定不易被氧化，稳定性良好；标准曲线的相关系数要更好；而且检出限要更低，更有利于分析测定。

## 3 结论

本研究建立了柱前荧光衍生高效液相色谱法同时测定生物脱硫系统中含硫化合物的分析方法。待测样品经过与荧光探针 mBBr 预处理，在 ZORBAX SB-Aq C18 (4.6 mm×250 mm×5 μm) 液相色谱柱；柱温 25 °C；激发波长 395 nm，发射波长 480 nm；流动相为纯乙腈和 0.25% 乙酸水溶液；流速 1.0 mL/min；进样量为 10 μL 的条件下，于 20 min 内完成分析检测。

该分析方法中亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物的检测限分别为 0.000 6 μmol/L、0.000 7 μmol/L

表 10 样品测定和加标回收率实验结果

Table 10 Experimental results of sample determination and recovery rates

Times of determination		1	2	3	4	5
Determined value (μmol/L)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	18.59	18.38	18.60	18.33	18.52
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	16.62	16.40	16.80	16.64	16.42
	HS <sup>-</sup>	14.47	14.29	14.31	14.73	14.52
RSD (%)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			0.67		
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			1.01		
	HS <sup>-</sup>			1.24		
Added (μmol/L)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			12.00		
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			10.00		
	HS <sup>-</sup>			9.00		
Determined value after added (μmol/L)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	30.75	30.16	30.73	30.30	30.75
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	26.71	26.55	26.96	26.85	26.68
	HS <sup>-</sup>	23.85	23.39	23.67	23.97	23.85
RSD (%)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			0.94		
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>			0.59		
	HS <sup>-</sup>			0.95		
Recovery rate (%)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	101.33	98.17	101.08	99.75	101.92
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	100.90	101.50	101.60	102.10	102.60
	HS <sup>-</sup>	104.22	101.11	104.00	102.67	103.67

和  $0.001\ 1\ \mu\text{mol/L}$ ; 定量限分别  $0.001\ 9\ \mu\text{mol/L}$ 、 $0.002\ 3\ \mu\text{mol/L}$  和  $0.004\ 6\ \mu\text{mol/L}$ ; 含硫化物的加标回收率分别在  $98.17\%\text{--}101.92\%$ 、 $100.90\%\text{--}102.60\%$  和  $101.11\%\text{--}104.22\%$  范围内; 并具有良好的线性关系、重复性和稳定性。经实验证明, 该分析方法预处理简单、分析快速、结果准确, 可用于同时测定不同生物脱硫系统中的含硫化物。

## REFERENCES

- [1] van den Bosch PLF, van Beusekom OC, Buisman CJN, et al. Sulfide oxidation at halo-alkaline conditions in a fed-batch bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(5): 1053–1063.
- [2] Janssen AJH, de Keizer A, Lettinga G. Colloidal properties of a microbiologically produced sulphur suspension in comparison to a LaMer sulphur sol. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1994, 3(1/2): 111–117.
- [3] Cheng R, Zhou W, Lin L, et al. Removal of high concentrations of  $\text{H}_2\text{S}$  from simulated natural gas by *Acidithiobacillus ferrooxidans* immobilized on polyurethane foam. *J Chem Technol Biotechnol*, 2013, 88(5): 975–978.
- [4] Nazari F, Kefayati ME, Raheb J. Isolation, identification, and characterization of a novel chemolithoautotrophic bacterium with high potential in biodesulfurization of natural or industrial gasses and biogas. *Energy Sources Part a Recov Utilizat Environ Eff*, 2017, 39(10): 971–977.
- [5] Fernández M, Ramírez M, Gómez JM, et al. Biogas biodesulfurization in an anoxic biotrickling filter packed with open-pore polyurethane foam. *J Hazard Mater*, 2014, 264: 529–535.
- [6] Rodriguez G, Dorado AD, Fortuny M, et al. Biotrickling filters for biogas sweetening: Oxygen transfer improvement for a reliable operation. *Process Saf Environ Prot*, 2014, 92(3): 261–268.
- [7] Kuenen JG. Colourless sulfur bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant Soil*, 1975, 43(1/3): 49–76.
- [8] Buisman C, Post R, Ijspeert P, et al. Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. *Acta Biotechnol*, 1989, 9(3): 255–267.
- [9] Steudel R. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization Processes. *Ind Eng Chem Res*, 1996, 35(4): 1417–1423.
- [10] Steudel R, Holdt G, Nagorka R. On the autoxidation of aqueous sodium polysulfide. *Zeitschrift für Naturforschung B Anorganische Chemie, organische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie*, 1987, 42(12): 1519–1522.
- [11] Kleinjan WE, De Keizer A, Janssen AJH. Kinetics of the chemical oxidation of polysulfide anions in aqueous solution. *Water Res*, 2005, 39(17): 4093–4100.
- [12] Chen KY, Morris JC. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ Sci Technol*, 1972, 6(6): 529–537.
- [13] Sunden T, Lindgren M, Cedergren A, et al. Separation of sulfite, sulfate, and thiosulfate by ion chromatography with gradient elution. *Anal Chem*, 1983, 55(1): 2–4.
- [14] Haddad PR, Heckenberg AL. Trace determination of sulfide by reversed-phase ion-interaction chromatography using pre-column derivatization. *J Chromatogr A*, 1988, 447: 415–420.
- [15] Bramanti E, D'Ulivo L, Lomonte C, et al. Determination of hydrogen sulfide and volatile thiols in air samples by mercury probe derivatization coupled with liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2006, 579(1): 38–46.
- [16] Liu LJ, Chen ZC, Yang SM, et al. A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. *Sens Actuators B: Chem*, 2008, 129(1): 218–224.
- [17] Kilroy WP. Analysis of mixtures of sulphide, thiosulphate, dithionite and sulphite. *Talanta*, 1983, 30(6): 419–422.
- [18] Koh T, Okabe K. Separation and spectrophotometric determination of thiosulfate, sulfite and sulfide in their mixtures. *Anal Sci*, 1992, 8(3): 285–291.
- [19] Koh T, Okabe K. Spectrophotometric determination of sulfide, sulfite, thiosulfate, trithionate and tetrathionate in mixtures. *Analyst*, 1994, 119(11): 2457–2461.
- [20] Luther III GW, Giblin AE, Varsolona R. Polarographic

analysis of sulfur species in marine porewaters. *Limnol Oceanogr*, 1985, 30(4): 727–736.

- [21] Kosower NS, Kosower EM. Thiol labeling with bromobimanes. *Methods Enzymol*, 1987, 143: 76–84.
- [22] Kosower EM, Kosower NS. Bromobimane probes for thiols. *Methods Enzymol*, 1995, 251: 133–48.
- [23] Fahey RC, Newton GL, Dorian R, et al. Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal Biochem*, 1981, 111(2): 357–365.
- [24] Newton GL, Dorian R, Fahey RC. Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1981, 114(2): 383–387.
- [25] Fahey RC, Newton GL, Dorian R, et al. Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem*, 1980, 107(1): 1–10.
- [26] Fahey RC, Newton GL. Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymol*, 1987, 143: 85–96.
- [27] Chinn PC, Pigiet V, Fahey RC. Determination of thiol proteins using monobromobimane labeling and high-performance liquid chromatographic analysis: application to *Escherichia coli* thioredoxin. *Anal Biochem*, 1986, 159(1): 143–149.
- [28] Togawa T, Ogawa N, Nawata M, et al. High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and sulfite and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(11): 3000–3004.
- [29] Gru C, Legoff H, Narcon S, et al. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*. *Analyst*, 1998, 123(6): 1289–1293.
- [30] Vervoort RJM, Debets AJJ, Claessens HA, et al. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals. *J Chromatogr A*, 2000, 897(1/2): 1–22.
- [31] Bergés R, Sanz-Nebot V, Barbosa J. Modelling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase. *J Chromatogr A*, 2000, 869(1/2): 27–39.
- [32] Daunoravicius Z, Padarauskas A. Capillary electrophoretic determination of thiosulfate, sulfide and sulfite using in-capillary derivatization with iodine. *Electrophoresis*, 2002, 23(15): 2439–2444.

(本文责编 郝丽芳)