

双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况

戈延茹, 曹恒杰(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 介绍近年来双水相萃取技术在药物提取分离中的应用情况。方法 对近几年国内外文献资料进行总结和归纳, 介绍了双水相萃取技术的基本原理与特点, 综述了近年来该技术在蛋白质、酶、氨基酸类药物, 中药体系及抗生素类药物的提取分离等方面的应用进展。结果 双水相萃取技术广泛应用于药物提取分离中, 取得了较大进展。结论 该技术用于药物提取分离中, 有着广阔的应用前景, 将推动我国医药工业的发展。

关键词: 双水相萃取技术; 药物; 提取; 分离

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)08-0623-05

Application of Aqueous Two Phase Extraction in Drug Extraction and Separation

GE Yanru, CAO Hengjie (*School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the Application of Aqueous two phase extraction in drug extraction and separation in the recent years. **METHODS** Summarize and analyze the literatures and data published in the recent years, review the basic principle of Aqueous two phase extraction technology and features, illustrate the technique application and development in protein, enzyme, amino acids drugs, abstraction and segregation of traditional Chinese medicine system and antibiotic. **RESULTS** The extensive application and development of ATPE have been conducted in recent years. **CONCLUSION** Application of ATPE to the drug extraction and separation has a bright future, and will impulse the development of pharmaceutical industry.

KEY WORDS: aqueous two phase extraction; drug; extraction; separation

双水相萃取是1896年由Beijerinck最早发现的, 1956年瑞典Lund大学的Albertsson第一次用来提取生物物质^[1], 1979年德国的Kula等人将双水相萃取用于生物产品分离纯化。此后, 双水相体系的研究和应用逐步展开, 并取得很大进展。目前双水相萃取技术已被广泛用于蛋白质、酶、核酸、病毒、细胞、细胞器等生物产品及食品、化工、药物等领域的分离和纯化, 并逐步向工业化生产迈进, 展现了巨大应用前景。笔者就双水相萃取技术在药物提取中的应用加以综述。

1 双水相萃取技术概述

1.1 双水相萃取技术的基本原理及常见的双水相系统

双水相萃取是两种水溶性不同的聚合物或者一种聚合物和无机盐的混合溶液, 在一定的浓度下, 体系就会自然分成互不相容的两相。被分离物质进入双水相体系后由于表面性质、电荷间作用和各种作用力(疏水键、氢键和离子键)等因素的影响, 在两相间的分配系数不同, 导致其在上下相的浓度不同达到分离目的。

作者简介: 戈延茹, 女, 教授, 博士生 Tel: (0511)85038170 E-mail: geyanru@tom.com

目前常见的不同种类的双水相体系有五类^[2]：聚合物-聚合物-水；高分子电解质-聚合物-水；高分子电解质-高分子电解质-水；聚合物-低分子量组分-水；聚合物/无机盐。水溶性高聚物有聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、甲基纤维素、聚丙烯乙二醇、吐温、聚氧乙烯类表面活性剂等,聚乙二醇/葡聚糖和聚乙二醇/无机盐是常用的双水相体系,由于葡聚糖价格昂贵,因此聚乙二醇/无机盐体系应用更为广泛。聚乙二醇/无机盐中所用无机盐主要是磷酸盐和硫酸盐。

1.2 双水相萃取技术的特点

双水相萃取技术目前已成为生物工程、医药等领域的提取分离的研究热点,具有如下的特点:①生产能力高,被萃物的分配系数一般大于3,有较高的回收率,耗能较小,速度快;②可以直接从含有菌体的发酵液和培养液中提取所需的蛋白质,不破碎直接提取细胞内酶,省略了破碎或过滤等步骤,降低成本;③分相时间短,一般只有5~15 min;④不存在有机溶剂残留问题,高聚物一般是不挥发性物质,因而操作环境对人体无害;⑤操作条件温和,整个操作过程在常温常压下进行。亲和双水相萃取技术可以提高分配系数和萃取的选择性;⑥各种参数按比例放大后,而产物收率并不降低,易于工艺放大和连续操作实现工业化。设备简单,且可直接与后续提纯工序相连接,无需进行特殊处理;⑦含水量高,在接近生理环境的体系中进行萃取,不会引起生物活性物质失活或变性;⑧由于影响双水相体系的因素比较多,如:聚合物的浓度和分子量、无机盐的种类和浓度、pH以及温度等均能影响被分配物质在两相间的分配,所以在提高选择性或提高收率方面可以采取多种手段。

2 双水相萃取技术在药物提取分离中的应用

由于双水相萃取条件较为温和,不会导致被分离物质的失活,该技术已应用于生物物质的分离和纯化,并且在抗生素提取、中药中有效成分提取分离、天然产物纯化等方面得到了广泛的应用。

2.1 双水相体系在蛋白质、酶、氨基酸、激素等的提取分离中的应用

大部分生物制品的原液是低浓度和有生物活性的,需要在低温条件下进行富集、分离,因此,常规的萃取技术在这些领域的应用受到限制,双水相体系由于具有活性损失小、分离步骤少、操作条件温和,且不存在有机溶剂残留的问题等优点,所以

在蛋白质、酶、氨基酸、激素等方面有良好的应用前景。近年来,国内外报道也逐渐增多。

Settu Saravanan 等^[3]采用聚乙二醇/聚丙烯酸双水相萃取体系萃取分离肌红蛋白和卵白蛋白。研究了聚合物的分子量、pH、温度的影响。实验表明,蛋白富集在上相的聚乙二醇相中,随着PEG分子量和温度的增加,分离的蛋白质量减少。当分离条件为PEG 4000-聚丙烯酸、温度20℃、pH 8.0时,蛋白质得到了很好的分离,提取分离到的肌红蛋白和卵白蛋白百分含量分别为95.2%和87.4%。

邓凡政等^[4]建立了由亲水性离子液体四氟硼酸1-甲基-3-丁基咪唑和 KH_2PO_4 形成的双水相体系萃取分离牛血清白蛋白(BSA)的新方法。结果表明离子液体双水相体系对BSA有较高的萃取率。郑楠等^[5]通过聚乙二醇/葡聚糖双水相体系也对牛血清白蛋白的分配特性进行了研究,得出较合适的双水相体系:PEG质量分数9%和葡聚糖质量分数9%的浓度组成。

Porto 等^[6]采用PEG/柠檬酸盐双水相体系从产气荚膜梭状芽胞杆菌发酵液中提取分离蛋白酶,此体系中的柠檬酸盐生物可降解且无毒,不会造成环境污染。通过实验当PEG的摩尔质量 $M_{\text{PEG}}=10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $C_{\text{PEG}}=22\%$, $C_{(\text{柠檬酸盐})}=8.0\%$,pH 8.5时,分离效果最佳。

Madhusudhan 等^[7]采用双水相萃取和沉淀结合的方法从酿酒酵母中分离纯化乙醇脱氢酶,设计了两个方案,方案一是采用硫酸铵沉淀法与双水相结合,方案二是采用聚乙二醇沉淀法与双水相结合。结果表明,方案二优于方案一。整个实验证明双水相萃取与沉淀法相结合将能发展成为一个更有效的提取纯化乙醇脱氢酶的方法。

黄淑霞等^[8]用PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系提取、纯化糖化酶,并研究了影响体系分配系数、回收率和纯化因子的因素,从而确定了萃取糖化酶的最佳条件。在PEG的质量分数 W_{PEG} 为24%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数 $W_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 为8%条件下,即PEG和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度比例为3时,分配系数最小达0.002,回收率为95.6%。

孟玲等^[9]研究了聚乙二醇/硫酸铵双水相体系对植物酯酶的萃取纯化的可行性,选取了最佳分离纯化植物酯酶的条件,考察了影响萃取结果各因素,当萃取体系中PEG 1000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数分别为27%和13%,pH值为7.5时,酶液的分离

纯化效果最好。

陈琪等^[10]研究了不同的双水相体系对天冬氨酸转氨酶的萃取分离效果,对聚乙二醇/无机盐成相系统进行了系统的研究,确定 PEG 1000/ Na_2HPO_4 为研究体系,并考察体系 pH 值、无机盐对双水相体系分配系数和纯化系数的影响。当 PEG 1000 的质量分数为 18%、 Na_2HPO_4 的质量分数为 20% 时,双水相体系对天冬氨酸转氨酶的分离系数和纯化系数分别为 2.36 和 2.94。

龚丽芬等^[11]以聚乙二醇/硫酸钠双水相体系分离提取琼脂糖和胃蛋白酶,并探讨了胃蛋白酶与琼脂糖在双水相中的回收情况及影响条件。结果琼脂糖的回收率高于 90%,胃蛋白酶的回收率约为 50%。

李丽敏^[12]研究了单一氨基酸及混合氨基酸在乙醇/磷酸氢二钾双水相体系中分离行为。实验表明 pH 值和氨基酸的支链结构对氨基酸在此双水相体系中分配系数影响较大。通过调节适当的 pH、 K_2HPO_4 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的质量分数,从混合氨基酸中分离出了苯丙氨酸和半胱氨酸。此有机溶剂/无机盐双水相体系简单、易得且低成本,可用于分离混合氨基酸,也可以用来预测一些表面结构中含有这五种氨基酸的蛋白质分子在双水相体系中的分离情况。

陈风义等^[13]探讨了采用 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系纯化红细胞生成素 EPO 的可行性和工艺条件,考察了 PEG 相对分子质量、成相物质质量分数、pH 值和 NaCl 质量分数对 EPO 分配的不同影响。实验证明双水相方法可以有效地用于 EPO 的分离,通过研究各种因素对纯化过程的影响,在单步操作过程中可以实现纯化,除去部分杂蛋白。

2.2 双水相萃取技术在中药及天然产物中提取与分离的应用

中药中含有大量的有机化合物且成分十分复杂,提高中草药中有效成分提取及分离技术对我国中医中药进入国际市场有很大的促进作用。中草药有效成分分子中多具有疏水性结构,因此双水相萃取技术在中草药有效成分分离纯化中具有一定的应用价值。

甘草是一种应用价值很高的中草药,甘草的主要成分是具有甜味的皂苷——甘草皂苷。基于与水互溶的有机溶剂和盐水相的双水相萃取体系具有价廉、低毒、较易挥发等特点,林强等^[14-15]采用与水互溶的有机溶剂的新型双水相体系萃取研究从

甘草中提取甘草酸盐的新工艺,结果提取甘草酸盐的最佳溶剂为乙醇/磷酸氢二钾双水相体系,此体系的两相分配完全,分配系数达 12.8,收率为 98.3%。此双水相体系具有无需反萃取和避免使用黏稠水溶性高聚物等特点,易回收、易处理、操作简便。

赵晓莉^[16]采用双水相体系精制柿叶黄酮,确定了最佳双水相体系为 25%PEG600/25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,最优的萃取条件是: pH11.0, MgCl_2 的添加量为 3%,温度为 25 °C,萃取率可达 96%。

白藜芦醇又称芪三酚,存在于许多植物中,是植物体内用于抵抗病原侵染的多酚物质。传统的从虎杖中粗提白藜芦醇方法多用毒性较大的有机溶剂进行萃取,李梦青等^[17]采用乙醇-硫酸铵-水双水相体系提纯白藜芦醇,使虎杖提取液中的各物质按极性不同在两相中得到分离。双水相萃取时,白藜芦醇的含量远高于有机溶剂萃取,达 34.29%。可见双水相技术可以完全代替有机溶剂提纯白藜芦醇,产品纯度高,且具有工艺简单,毒性小,成本低等优点。

中药黄芩是一种疗效确切的传统中药,黄芩苷是黄芩主要有效成分,赵爱丽等^[18]通过采用非离子表面活性剂聚乙二醇-磷酸氢二钾-水双水相体系分离纯化黄芩苷,萃取率为 98.6%。此方法所形成双水相体系操作简便,萃取率高,方法重复性好,可适用工业化生产。

郭丽等^[19]采用微胶囊与双水相联合萃取技术提取柑桔精油。通过调整 β -环糊精和硫酸钠的浓度比,可有效控制囊化萃取物中柑桔精油的质量,总收率高达 96% 以上。将微胶囊技术和双水相萃取技术相结合用于提取柑桔精油,不仅能提高柑桔精油的提取率和纯度,而且还能避免提取过程中的高温、氧化、聚合等情况的发生,有效地保护柑桔精油的天然组分。

李中华等^[20]研究了葛根素在环氧乙烷-环氧丙烷共聚物(EOPO)/磷酸氢二钾(K_2HPO_4)体系中的分配行为。利用温度诱导相双水相体系,结果当 EOPO 型号为 EOPO SDP30,诱导温度为 70 °C,诱导时间为 60 min,EOPO 质量分数为 28%, K_2HPO_4 质量分数为 24% 时,葛根素最大总收率可达 42.26%。该方法解决了传统双水相萃取技术中聚合物回收的难题,可以使 EOPO 循环使用,且方法设备投资少、操作简单,为工业化提取葛根黄酮提供了一条新途径。

Chethana 等^[21]采用 PEG 6000/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系对甜菜红碱进行了提纯浓集。双水相萃取作为一种具有吸引力的技术在甜菜红碱的下游加工中第一次应用, 主要是为了除去糖, 使糖与甜菜红碱得到了很好的分离。

2.3 双水相萃取技术在抗生素及其他药物提取分离与制备中的应用

泰乐菌素是禽畜专用的大环内酯类抗生素, 但是泰乐菌素发酵液呈黏稠的流体态, 过滤很困难。张咏梅等^[22]研究了采用双水相法从未过滤的全发酵液中萃取泰乐菌素。结果表明, 以 14%PEG 4000 和 20% Na₂HPO₄ 构成的双水相萃取泰乐菌素的总收率是 52.4%, 工艺省略了过滤, 只需调节一次 pH, 简化了提取过程, 提高了泰乐菌素的活性。

范小娜等^[23]采用非离子表面活性剂 PEG-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相体系对盐酸氯丙嗪(CPZ)分配行为进行了研究。研究药物在 PEG 800-(NH₄)₂SO₄-H₂O 及 PEG 2000-(NH₄)₂SO₄-H₂O 双水相体系中的分配行为。结果 CPZ 在两种体系中的一次萃取率分别为 92.8%、90.5%。此双水相体系无需使用震荡器, 操作简便, 萃取率高, 方法重复性好, 适用范围广。

刘庆芬等^[24]建立了由亲水性离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼和磷酸二氢钠形成的双水相体系萃取青霉素 G 的新方法。结果表明, 离子液体双水相可以有效萃取青霉素, 轻相中青霉素萃取率可达 93.7%。离子液体双水相体系的 pH 值在 4~5 内, 在该条件下萃取过程不发生乳化现象。

Mokhtarani 等^[25]用聚乙二醇-硫酸钠-水双水相体系分离环丙沙星, 实验中运用正交设计的方法考察了温度、盐的浓度、聚合物浓度和聚合物分子量的影响。结果表明环丙沙星的分离情况受到盐浓度的很大影响。温度和聚合物浓度影响较小, 聚合物分子量大小没有任何影响。

3 展望

综上所述, 双水相萃取技术已被广泛用于蛋白质、酶、氨基酸、中药及天然产物、抗生素等药物的分离和研究中, 显示出良好的应用前景。但是我国较国外的研究还有一段距离, 特别是天然产物的研究也较少, 我国是天然植物资源的大国, 中药是我国的国宝, 所以有很多工作还需要我们去。

在传统的双水相萃取技术的基础上, 可以注重开发新型双水相萃取技术, 包括廉价双水相体系、

双水相体系与其他分离技术相结合、热分离双水相体系、正、负离子混合表面活性剂双水相体系、静电相互作用主导的双水相胶束系统、亲和双水相萃取技术等等^[26-27]。双水相与其他技术结合有与温度诱导相分离、磁场作用、超声波作用、气溶胶技术等结合, 与亲和沉淀、高效层析等新型生化分离技术结合, 与电泳结合等等^[20,28-30]。这些技术较传统的双水相萃取体系有很大的优点, 将逐步成为双水相体系发展的主流。相信双水相萃取技术研究和应用必将推动我国医药工业的发展, 带动医药行业的进步。

REFERENCES

- [1] ALBERTSSON P A. Chromatography and partition of cells and cell fragments [J]. Nature, 1956, 177(4513): 771-774.
- [2] LI W, CHAI J L, GU X X. Aqueous two-phase extraction, a new extraction technique [J]. J Chem Edu (化学教育), 2005, 3(3): 7-9.
- [3] SARAVANAN S, RAO J R, NAIR B U, et al. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature [J]. Process Biochem, 2008, 43(9): 905-911.
- [4] DENG F Z, GUO D F. Extraction separation of bovine serum albumin in ionic liquid aqueous two-phase system [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2006, 36(10): 1451-1453.
- [5] DENG N, ZHU J H, LIU J. The partition properties of bovine serum albumin in polyethyleneglycol(PEG)/dextran aqueous two-phase system [J]. Amino Acids Biotic Resour(氨基酸和生物资源), 2006, 28(3): 56-59.
- [6] PORTO T S, MEDEIROS E SILVA G M, PORTO C S, et al. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system [J]. Chem Eng Process, 2008, 47(4): 716-721.
- [7] MADHUSUDHAN M C, RAGHAVARAO K S M S, NENE S. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction [J]. Biochem Eng J, 2008, 38(3): 414-420.
- [8] HUANG S X, WU X L, YIN Z R. Extraction and purification of saccharifying enzymes by PEG/(NH₄)₂SO₄ double aqueous phases system [J]. Liquor-making Sci Technol(酿酒科技), 2003, (2): 24-25.
- [9] MENG L, YANG D, ZHU J X. Extraction of plant esterase by polyethylene glycol ammonium sulfate aqueous two-phase system [J]. J Shenyang Institute Chem Technol(沈阳化工学院学报), 2006, 20(4): 254-256.
- [10] CHEN Q, ZHOU H, SUN G H, et al. Study on extraction of aspartate aminotransferase by aqueous two phase system [J]. J Nanjing Univ(南京工业大学学报), 2004, 26(1): 19-22.
- [11] GONG L F, GONG W X. Primary studies on the separation and extraction of agarose and pepsin by aqueous two-phase system [J]. Chem Bioeng(化学与生物工程), 2006, 23(11): 36-38.
- [12] LI L M. The separation behavior of amino acids in aqueous two-Phase systems containing ethanol and hydrogen phosphate

- dipotassium [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2006.
- [13] CHEN F Y, LIN Y, LIU L. Partition behavior of EPO in PEG/(NH₄)₂SO₄ ammonium sulfate aqueous two phase systems [J]. Hebei J Ind Sci Technol(河北工业科技), 2008, 25(2): 79-81.
- [14] LIN Q, HUO Q. Separation of glycyrrhetate by aqueous two-phase extraction system [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(8): 702-704.
- [15] HUO Q, LIN Q, ZHAO Y E. Separation of glycyrrhizic acid by aqueous two-phase extraction with EtOH-K₂HPO₄ [J]. Fine Chem(精细化工), 2002, 19(2): 65-67.
- [16] ZHAO X L. Studies on the separation and extraction of persimmon flavonoids by aqueous two-phase system [D]. Xian:Northwestern Polytechnical University, 2005.
- [17] LI M Q, GENG Y H, LIU G M, et al. Application of aqueous two phase extraction technique in separation and purification of resveratrol [J]. Nat Prod Res and Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18(4): 647-649.
- [18] ZHAO A L, CHEN X Q, JIANG X Y. The separation of baicalin by aqueous two-phase extraction system [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2008, 30(4): 498-500.
- [19] GUO L, ZHU L, DU X F. Optimization of the technology for the extraction of citrus essential oil by microcapsule and aqueous two-phase system [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报), 2007, 23(1): 229-232.
- [20] LI Z H, ZHANG L, LIN Y. Partition characteristics of puerarin in EOPO/K₂HPO₄ systems [J]. J China Pharm(中国药房), 2007, 18(15):1138-1140.
- [21] CHETHANA S, NAYAK C A, RAGHAVARAO K S M S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains [J]. J Food Eng, 2007, 81(4): 679-687.
- [22] ZHANG Y M, CUI H W. Study on extracting tylosin with ATPS [J]. J Shandong Institute Light Ind(山东轻工业学院学报), 2003, 17(1): 38-41.
- [23] FAN X N, CHENG GENG J S, DING Y C. The study about PEG-(NH₄)₂SO₄-H₂O two aqueous phase system and the distributing act of medication [J]. J Gannan Med Coll(赣南医学院学报), 2005, 25(4): 432-434.
- [24] LIU Q F, HU X S, WANG Y H, et al. Extraction separation of penicillin in ionic liquid aqueous two-phase system [J]. Chin Sci Bull(科学通报), 2005, 50(8): 756-759.
- [25] MOKHTARANI B, KARIMZADEH R, AMINI M H, et al. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate [J]. Biochem Eng J, 2008, 38(2): 241-247.
- [26] TEOTIA S, LATA R, GUPTA M N. Chitosan as a macroaffinity ligand: Purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions [J]. J Chromatogr A, 2004, 1052(1-2): 85-91.
- [27] DENG G. Study on the electrostatic interaction-dependent aqueous micellar two-phase systems [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [28] LI L, YANG X Y, GAO Y T. Research on the extraction of antioxidant active substances from grape seeds by two aqueous phases separation associated with ultrasonic extraction [J]. Liquor-Making Sci Tech(酿酒科技), 2008, 5(5): 27-30.
- [29] TRINDADE I P, DIOGO M M, PRAZERES D M F, et al. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1082(2): 176-184.
- [30] LIU L, LUO G S, LV Y C. Influence of external electric field on distribution of phenylalanine in an aqueous two-phase system [J]. Chin J Process Engineering(过程工程学报), 2003, 3(4): 317-321.