



温敏聚合物双水相技术及其研究进展

解雪乔¹, 韩 娟², 汤俊梅¹

(1. 苏州健雄职业技术学院医药科技学院, 太仓 215400;

2. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

摘要:温敏聚合物双水相体系作为一种新型的绿色分离/富集技术, 具有条件温和、选择性强、萃取效率高、操作时间短、成相物质可回收利用等优点, 可简单地改变环境温度, 实现成相聚合物与目标分离物的分离, 该技术已被广泛地应用于生物分离、金属离子分离、天然产物有效成分提取、药物分离等领域。本文简要介绍了温敏聚合物双水相体系的形成原理, 双水相液液相平衡理论的研究进展及应用研究, 希望对进一步的研究工作有所帮助和启发。

关键词:温敏聚合物; 双水相体系; 液液相平衡

双水相萃取(又称浊点萃取, Aqueous Two-Phase Extraction, ATPE)技术始于 20 世纪 50 年代, 是在溶剂萃取的基础上发展起来的从一水相传质到另一水相的一种新型液液萃取分离技术, 已广泛应用于医药、食品、环境化学和生物工程等领域中^[1~4]。早期的双水相体系(Aqueous Two-Phase System, ATPS)研究主要集中在聚合物-聚合物 ATPS^[5,6], 该体系具有良好的生物相容性, 但是相分离时间长, 目标产品与聚合物分离困难, 聚合物难以回收利用, 生产成本较高, 所以长期以来寻找廉价高效的双水相体系成为推动双水相萃取技术发展的关键。

智能聚合物(Smart polymers), 又称刺激响应性聚合物(Stimulus-responsive polymers), 是近年来发展起来的一种新型成相材料^[7]。此类物质的特性是当外界环境(如温度、pH 值、光、电场或磁场等)发生微小变化时, 聚合物分子微观结构, 尤其是功能性聚合物嵌段会发生可逆的转变, 这种转变在宏观上表现为水溶液中溶解度的变化, 利用这一特性可以实现成相聚合物的分离回收。将智能聚合物应用于双水相体系中, 形成智能聚合物 ATPS, 是解决双水相体系成相成本高、目标物和成相聚合物回收困难的有力途径。目前智能聚合物 ATPS 的研究主要集中在温敏聚合物 ATPS^[8,9]。由于温度变化易于控制, 且不会改变体系化学组成, 温敏聚合物种类较多, 而且理论上可合成具有任意临界溶解温度的温敏聚合物, 因此温敏聚合物 ATPS 得到广泛的应用。近年来, 以温敏聚合物为新型成相材料的双水相体系在生物分子、金属离子、天然产物有效成分提取、药物分离纯化的研究发展迅速。本文综述了温敏聚合物双水相体系的液液相平衡理论及应用研究进展。

1 温敏聚合物双水相体系形成原理

ATPS 是指将两种可以互溶的物质相混合, 当体系中两种物质的浓度达到(或超过)临界浓度以后, 原来的均一相体系会分成互不相容的两相体系。按组成物质不同, ATPS 可以分为聚合物 ATPS^[10]、小分子有机溶剂 ATPS^[11]、表面活性剂 ATPS^[12]和离子液体 ATPS^[13]。各种 ATPS 在具有共同特点的同

10.14028/j.cnki.1003-3726.2018.10.001

收稿: 2018-03-08; 修回: 2018-04-23;

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(16KJB550010), 苏州健雄职业技术学院“三级联动”科研基金项目(2017SJLD19);

作者简介: 解雪乔(1984-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事绿色分离技术以及天然产物中生物活性物质的提取分离方向的研究。E-mail: qiao_84122@163.com.

时,还由于不同的双水相体系的成相组成不同,它们性质也不一样。因此,在选择 APTS 分离目标物时,应深入研究各种体系的特点、目标物性质、操作条件及成本等因素。

随着研究者对双水相体系的不断深入,新型功能型双水相体系也相继被提出及应用。温敏聚合物双水相体系,是在双水相体系中加入温敏聚合物,聚合物通常同时具有亲水基团和疏水基团,在水中溶解通常是与水分子形成氢键。当升高温度时聚合物分子内和分子间的疏水作用将增强,从而使聚合物分子相互聚集,产生沉淀或絮状物从而与水相分离。

1.1 温敏聚合物温敏机理

1968 年, Heskins 等^[14]发现聚异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)具有温敏性,其水溶液在很窄的温度范围内溶解度会发生显著变化,而且温度升高,溶解度降低。这种因环境温度变化,自身溶解性发生改变的性质,称之为温敏性。温敏聚合物作为智能聚合物中重要的一类,由于其操控简便、无污染、易回收,应用范围广,而且受到了人们的广泛关注。在对温敏聚合物的研究中,温敏聚合物温敏特性的机理是当前研究的重点。通常温敏聚合物的水溶液当达到一定的温度时,会与水形成两相,这个温度叫做最低临界温度(Lower Critical Solution Temperature, LCST)。温敏聚合物同时具有亲水基团和疏水基团,水溶液温度低于 LCST 时,与水分子形成氢键,成为均一溶液;温度升高会减弱氢键的作用,当体系温度达到或高于 LCST 时,聚合物分子内和分子间的疏水作用增强,氢键作用已经不足以维持聚合物分子的可溶性,从而使聚合物分子相互聚集产生沉淀或絮状物,与水相分离形成两相;而当温度重新降低到 LCST 以下时,聚合物又能发生可逆溶解,形成均一溶液。目前研究和应用最多温敏聚合物有两类,即丙烯酸酰胺聚合物类(最具代表性的是 PNIPAAm)和嵌段共聚物[最有代表性的是聚环氧乙烷/聚环氧丙烷/聚环氧乙烷三嵌段共聚物(PEO-PPO-PEO)]。

1.2 温敏聚合物双水相体系

温敏聚合物水溶液在低于某个温度时,溶液澄清透明;当高于此温度时,溶液变得浑浊发生明显的相分离。溶液由澄清变为浑浊的温度为相转变温度,亦称为浊点(Clouding Point, CP),主要取决于温敏聚合物的结构和浓度,还受电解质、氨基酸、葡萄糖、乙醇和甘油等添加物的影响。当实验温度高于浊点时,静止放置一段时间,温敏聚合物水溶液会分为两相(水相和聚合物相)。

温敏聚合物分子中同时含有亲水基团和疏水基团,使其具有温敏性。首先,不同 LCST 的温敏聚合物可以适应不同需要,可以改变聚合物分子中亲水和疏水基团的比例,改变聚合物的 LCST;其次,在聚合物合成过程中会引入一些其它具有不同亲水性、疏水性的单体,例如甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸、丙烯醇、酰胺类等来提高聚合物回收率;最后,考虑到聚合物的成相,可以调整单体比例和添加空间结构差异度较大的单体以保证形成良好的双水相体系。聚合物水溶液温度高于 LCST 会形成新的双水相体系,发生温度诱导相分离,目标物分配在含水的上相,而聚合物的富集在下相,沉淀后的温敏聚合物可以重新溶解或者回收,用于再次形成双水相。目前温敏聚合物双水相技术已被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域的产品分离和提取,可用于形成双水相体系的温敏聚合物包括 PNIPAAm、聚乙烯基己内酰胺(PVCL)、纤维素醚类(例如乙基纤维素和羟乙基纤维素)、环氧乙烷(EO)和环氧丙烷(PO)的随机共聚物即 EOPO 等。该体系具有以下优点:(1)体系含水量高,条件温和;(2)选择性强,萃取效率高;(3)操作时间短,所需设备简单;(4)易于放大,可进行连续性操作;(5)成相物质可回收利用等。温敏聚合物 APTS 既保留了双水相体系温和易于操作的优点,又可以利用温敏聚合物改变温度,从而达到回收相组分的特性,降低了经济成本,实现了体系的绿色可循环利用。

2 温敏聚合物双水相液液相平衡理论的研究进展

液-液相平衡理论研究是双水相技术应用的前提。测定体系的双节线数据和系线数据,建立经验或半经验拟合方程,探索液-液相平衡性质,构建热力学模型,对于判断体系优劣,研究成相机理和设计及优

化工艺具有重要的理论意义。

最新研究报道,温敏聚合物双水相体系存在相倒转现象^[15,16],即上下两相的位置随成相聚合物和盐的浓度的变化而变化。在盐浓度较低的双水相体系中,聚合物相在下相,当盐浓度增加到一定量时,上下两相的密度发生改变,聚合物相慢慢从下相转移到上相,发生相倒转。相倒转现象是温敏聚合物的一个重要的物理性质,为双水相体系的分相行为提供了理论支持和实验基础。

温敏聚合物双水相体系的双节线数据一般是通过浊点滴定法测得,将浊点连线可绘成相图。电解质对温敏聚合物溶液有重要的作用,具有盐溶作用或盐析作用的盐可导致温敏聚合物的浊点有不同程度的提高和降低,因此,不同的电解质改变浊点的能力是不一样的;系线数据可以通过实验测得(其中上下相中温敏聚合物含量常用折光率法、紫外可见分光光度法和高效液相色谱法测定;盐含量常用原子吸收分光光度法、滴定法、电导率法和密度法等方法测定),也可以利用“杠杆原则”结合双节线最优拟合公式计算得到。研究人员测定了大量液液相平衡的数据,关联相图中的双节线,得出一些经验拟合方程,为双水相体系的应用提供了重要的理论依据。

构成温敏聚合物双水相体系的温敏聚合物有随机共聚物 EOPO(商品名 UCON)、三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO(常见的有 L31、L64 和 F68 等)、曲拉通(Triton)和吐温(Tween)等非离子表面活性剂。另一种成相物质种类较多,如价格昂贵的葡聚糖(dextran)和羟丙基淀粉(PES);一些成本低廉聚合物如麦芽糊精(Mdx)和支链淀粉;也可使用磷酸盐、硫酸铵、柠檬酸钠等无机盐。表 1 列出了近些年来文献中已经报道的温敏性聚合物双水相体系。从表 1 可以看出,对于温敏聚合物 ATPS 的基础数据还不够完整。因此,完善目前已知体系的相图数据和构建新的温敏聚合物 ATPS 对于 ATPS 的发展具有一定的实际意义。

3 温敏聚合物双水相体系应用

双水相萃取技术(ATPE)的萃取效果受诸多因素的影响,包括温敏聚合物种类和浓度、成相盐种类和浓度、体系的 pH 值、平衡温度和时间、目标物浓度等。因此,在对目标物质进行分离、富集时,需要根据目标物的性质选用合适的 ATPS,并对影响分配系数和萃取效率的各因素进行优化,才能得到理想的萃取条件。

温敏聚合物双水相萃取时常采用两次双水相萃取法。第一次萃取过程与传统的双水相萃取相同,即温敏聚合物加入到含有待分析物的水溶液中,创造条件使待分析物和其它的疏水性干扰物质都被萃取入温敏聚合物富集相。与传统双水相萃取不同的是,这时没有直接进行含量分析,而是取温敏聚合物富集相通过改变温度进行第二次双水相萃取,改变实验参数,使目标物由温敏聚合物富集相转移到水相,然后进样分析。两次双水相萃取在一定程度上克服了普通双水相萃取的一些不足,实现了温敏聚合物和目标物的有效分离。作为分离纯化方法,可与微波辅助、超声波辅助、溶剂浮选技术等联用;作为样品前处理方法可与高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、流动注射分析(FIA)和毛细管电泳(CE)等后序仪器分析方法联用。

3.1 在生物分离技术中的应用

随着现代生物技术与生物产业的迅速发展,生物分离纯化已成为现代生物工程的关键技术。双水相萃取虽在 1956 年 Albertsson^[39]首次将 ATPE 应用于蛋白质的选择性分离,为分离蛋白质等生物活性物质提供了新的技术手段,但无法实现目标蛋白与成相聚合物高效分离。采用温敏聚合物构建双水相萃取只需简单地改变温度,便可将成相聚合物沉淀下来,实现相分离,蛋白质留在上清液。然后将沉淀的聚合物重新溶解,可再次使用,从而为解决上述问题提供一条高效途径。温敏聚合物双水相体系作为一种新型的生物分离技术,可以避免生物物质失活变性,可实现聚合物可循环使用,节约成本,且容易放大,目前该体系已广泛应用于蛋白质^[40~42]、生物酶^[43]、细胞^[44]、氨基酸^[45]等的分离纯化。

表 1 温敏聚合物双水相体系相图测定

Table 1 Determination of phase diagrams for thermo-sensitive polymer aqueous two-phase system

成相温敏聚合物	另一成相物质	温度/K	参考文献
L31	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 Li_2SO_4 、 $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5$	288. 15、293. 15、293. 15	17
L35	NaOH 、 KOH	283. 15、293. 15、303. 15、313. 15	18
L35	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	288. 15、308. 15、318. 15	19
	NaHSO_3	283. 15、288. 15、298. 15、308. 15、318. 15	
L61	K_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	298. 15、303. 15、308. 15	15
L64	K_2SO_4 、 Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2CO_3 、 K_2HPO_4	318. 15	16
L64	Li_2SO_4 、 MgSO_4 、 Na_2SO_4 、 ZnSO_4	278. 15、288. 15、298. 15	20
L31、L61	K_2CO_3 、 $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2$	273. 15、278. 15、283. 15	21
L31、L61	K_2SO_4 、 K_2CO_3 、 KCl 、 KNO_3 、 KBr	283. 15	22
L35	Na_2SO_4 、 Li_2SO_4	298. 15、313. 15	23
L35、F68	MgSO_4	283. 15、298. 15、313. 15	
L62、L64、F68	KH_2PO_4 、 K_2HPO_4	283. 15、298. 15	24
17R4、L64	$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	278. 15、283. 15、288. 15	25
F68	$(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	278. 15、288. 15、298. 15	26
	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 、 Na_2CO_3 、 $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	283. 15、298. 15、313. 15	
F68	Li_2SO_4 、 Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 ZnSO_4	278. 2、288. 2、298. 2	27
L35	$\text{KOH}/\text{K}_3\text{PO}_4$ 、 K_3PO_4	283. 15、298. 15、313. 15	28
F68	K_3PO_4		
UCON	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	278. 15、293. 15、308. 15	29
	Na_2SO_4 、 K_2SO_4	293. 15、308. 15	
UCON	$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 NaHCO_2 、 KHCO_2	296. 15	30
UCON	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	278. 15、293. 15、313. 15	31
EOPO (1:1)	Na_2SO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4	298. 15	32
EOPO2500、EOPO12000	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	298. 15、303. 15、313. 15	33
EOPO4000、EOPO2000、EOPO800	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	298. 15	34
PNBAa	PNDB	298. 25	35
TritonX-100	MgSO_4 、 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	298. 15	36
Triton X-114	Sucrose(蔗糖)	288、293、298	37
LS54	Dextran(葡聚糖)	288. 15/293. 15/298. 15	38

气浮溶剂浮选技术是基于双水相萃取技术的放大,越来越受到广泛关注的一种新型分离富集技术。在气浮分离过程中,由于气泡和萃取剂的非极性特征,目标物质必须首先吸附于气泡表面,进而与萃取剂缔合形成疏水性物质。Show 等^[46,47]应用温敏聚合物 EOPO 构建双水相萃取技术(ATPE)和双水相浮选技术(aqueous two-phase flotation,ATPF)直接从发酵液中分离洋葱伯克霍尔德氏菌 ST8 脂肪酶。应用 ATPF 浮选脂肪酶^[46],实验探讨了聚合物分子量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度、pH、粗原料的加入量、EOPO 相的初始体积及浓度、水相的初始体积、 N_2 流量和浮现时间对 ATPF 的影响。在最优条件下,平均分离效率和纯化倍数分别为 76%和 13%,成功地将成相物质回收利用,减少了有机试剂和盐的用量。ATPF 体系中 EOPO 相的回收率达 75%。应用 ATPE 萃取脂肪酶^[47],在第一次双水相萃取时脂肪酶被成功地萃取到聚合物(EOPO 3900)富集相,该相系线聚合物含量为 48.5%(w/w),体积比为 2.3,pH 为 7,粗原料

加入量 20% (w/w)。二次萃取中,通过温度诱导,EOPO 富集与下相,脂肪酶被萃取到水相。将二次双水相中聚合物和首次萃取的磷酸盐浓缩后回收利用。脂肪酶的平均纯化倍数和四次连续纯化后的产率分别为 14 和 99%。

Dembczyński 等^[48]应用温敏聚合物 EOPO-K₂HPO₄ 双水相体系萃取鸡蛋蛋白中的溶解酵素。在第一步萃取过程中溶解酵素被成功的萃取到了聚合物富集相,该相中 pH9.0 含 40% (w/w) EO₅₀ PO₅₀, 10% (w/w) K₂HPO₄ 和 0.85M 的 NaCl;稀释 3 倍体积的粗鸡蛋蛋白,其中含有的蛋白质被萃取下相磷酸盐富集相中。第一次萃取结束后分离出上相 EO₅₀ PO₅₀ 相,置于 65℃ 诱导相分离,将溶解酵素萃取到上相水相。该萃取体系的萃取效率高达 85%,蛋白质的比活度为 32,300U/mg,净化因子 16.9,两步萃取后溶解酵素在水相中的浓度为 2.3g/L。

Jiang 等^[49]应用 UCON/磷酸盐 ATPS 从乳清分离蛋白(WPI)的胃蛋白酶水解物中萃取抗氧化肽。实验探讨了一些因素对抗氧化肽萃取率影响。在 pH 为 4.0, 4mL UCON 溶液(40%, w/w), 4mL KH₂PO₄ 溶液(15.5%, w/w), 2mL 的 WPI 和 0.40g/10mL NaCl 构成的 ATPS 萃取得到最优。ATPS 分离纯化的多肽含量应用 RP-HPLC、自动氨基酸分析仪和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)表征。上相中多肽的极性小于下相。ATPS 将大部分抗氧化和疏水性的氨基酸提取到上相,并将具有抗氧化活性的氨基酸序列肽也一起萃取到上相中。总之,UCON/磷酸盐 ATPS 能成功地将抗氧化肽从 WPI 水解物中分离出来。

Xu 等^[50]合成了两种可回收温敏物质 P_{VBAm} 和 P_N 构建 ATPS。P_{VBAm} 和 P_N 的 LCST 分别为 45.0℃ 和 33.5℃。研究了 P_{VBAm}/P_N ATPS 的分相行为及成相机理。应用低场核磁共振(LF-NMR)来研究成相机理。结合表面张力分析结果、透射电子显微镜法和动态光散射证明了 P_{VBAm}/P_N ATPS 形成。应用 2% P_{VBAm}/2% P_N (w/w) ATPS 萃取 ε-聚赖氨酸,结果表明,ε-聚赖氨酸被萃取到 P_N 富集相中,分配系数(1/K)和萃取率分别为 6.87 和 96.36%。在室温条件性下,加入 50mM (NH₄)₂SO₄ 对 ε-聚赖氨酸发酵液的分配系数(1/K)和萃取率分别为 7.41 和 97.85%。当在 ATPS 中加入 (NH₄)₂SO₄ 时,该方法能有效地去除发酵液中的大部分杂质。因此,温敏可回收 ATPS 在生物分离领域有良好的应用前景。

3.2 在金属离子分离富集中的应用

1984 年, Zvarova^[51]首次提出将双水相体系应用于金属离子的分离,自此金属离子在双水相体系中的分配行为研究才逐渐发展起来。对于样品中痕量金属的分离富集,常在体系中加入显色剂作为萃取剂^[52~55],与金属离子形成不溶于水的络合物或离子缔合物;而研究表明温敏聚合物双水相不加任何萃取剂,也可实现金属的分离富集。萃取后可与多种检测技术联用,包括紫外-可见分光光度法、原子吸收光谱法、原子荧光光谱法和电感耦合等离子体原子发射光谱法等,进行痕量金属元素总量及其形态的分析。

Zhang 等^[56]研究了在不加任何萃取剂的情况下,应用 Triton X-100-(NH₄)₂SO₄-H₂O ATPS 从水溶液中萃取钨(VI)。探讨了溶液 pH、(NH₄)₂SO₄ 浓度、Triton X-100 浓度、钨浓度、萃取温度对金属钨萃取的影响。在 pH=1.0~7.0 范围内,萃取率与 pH 有显著关系且在 pH=1.0~3.0 之间时萃取率高于 90%。萃取率随着 Triton X-100 浓度的增加逐渐增加,但随着 (NH₄)₂SO₄ 浓度的增加而略有下降。钨的萃取率与温度关系不大,但其分配系数随温度的升高(303.15~343.15K)而呈现线性增长。钨的分配系数随着初始钨浓度(0.1%~3%)和温度(303.15~333.15K)增加而增大。钨在 Triton X-100 胶束相中的增溶能力与温度无关。红外光谱分析表明,聚钨酸根离子与 Triton X-100 中的醚氧单元之间没有明显的相互作用。DLS 表明, Triton X-100 胶束相的 Zeta 电位在萃取钨后,有一从正到负的微小变化。基于上述研究结果,聚钨酸根离子由于其相对高疏水性,通过静电吸引力溶解在 Triton X-100 胶束的亲水外壳中,成功地将钨(VI)从含 Fe(III)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)、Al(III)、Cr(III) 和 Mn(II) 溶液中分离出来。

Wang 等^[57,58]建立了一种简单的可循环利用的非配位基双浊点萃取(即二次双水相萃取)预处理方法提取分离富集了食品中的 Cd(II) 和 Pb(II)。首次双水相萃取后,金属离子以氢氧化物被萃取到温敏

聚合物富集相,而将亲水性杂质留在水相中。然后,将聚合物富集相取出,调节 pH 值使金属氢氧化物溶解,以金属离子形式被萃取到水相中,而将疏水性杂质仍留在聚合物富集相中。实验实现了聚合物回收利用,节约了实验成本。

Leite 等^[59]应用双水相萃取技术从废锂离子电池中萃取 Cu(II)和 Co(II)。讨论了萃取剂种类[1-(2-吡啶偶氮)-2-萘酚(PAN)]、1-亚硝基-2-萘酚(1N2N)和二(2,4,4-三甲基戊基)次磷酸(Cyanex 272))和浓度、pH(1.00, 6.00, 11.0)电解质(Na_2SO_4 、 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、系线长度、上下相质量比($m_{\text{TP}}/m_{\text{BP}}$)的影响,并确定了 L64/ Na_2SO_4 ATPS, pH=6.00, TLL=50.3% (w/w), $m_{\text{TP}}/m_{\text{BP}}=1$, PAN 作为萃取剂, $\beta_{\text{Cu,Co}}=3.22\times 10^2$ 。该方法随后被应用到锂离子电池样品,先用盐酸和硝酸浸出,在上述最优条件下, $\beta_{\text{Cu,Co}}=5.40\times 10^5$ 。

Rodriguesa 等^[60]研究了在加入萃取剂(SCN^- 、 I^- 、1N2N)条件下, Ni(II)、Co(II)、Fe(III)、Zn(II)、Cd(II)和 Cu(II)金属离子在 L35/ Na_2SO_4 ATPS 中的分配行为。加入 SCN^- 作为萃取剂,萃取金属的顺序为 $\text{Zn(II)}\cong\text{Co(II)}>\text{Cd(II)}>\text{Cu(II)}>\text{Fe(III)}>\text{Ni(II)}$ 、Zn(II)、Co(II)和 Cd(II)几乎都是全被萃取,而 Cu(II)萃取率达到 80%。加入样品 I^- 作为萃取剂,除 Cd(II)和 Cu(II),其余金属仍留在盐富集相,进而为从 Ni(II)、Co(II)和 Fe(III)中选择性分离 Cd(II)离子提供了有利条件。研究还表明,以 1N2N 为萃取剂,在 pH=7.2 时 L35/ Na_2SO_4 ATPS 中,可以将 Co(II)从 Fe(III)、Zn(II)和 Cd(II)配合物中分离出来。以 1N2N 为萃取剂时,除 Cd(II)和 Zn(II)外,随着 pH 值的增加,其它金属萃取量显著增加。L35 胶束的存在使上相的疏水性增强,进而提高了金属离子的萃取效率和选择性。

3.3 在天然产物有效成分提取中的应用

天然产物有效成分是天然产物中具有一定独特功能和生物活性的化合物,主要包括多糖、多酚、黄酮、生物碱、皂苷类化合物等。与传统的提取技术如超声波辅助提取、溶剂萃取、压榨法、浸渍法相比,温敏聚合物双水相萃取技术在有效成分得率、产品纯度和操作时间显示出巨大的优越性,该方法具有良好的应用前景。

Fan 等^[61]建立了 16.3% UCON 50-HB-5100/10% K_2HPO_4 /1%乙醇双水相体系,并结合 HPLC,萃取检测辣椒油树脂中的辣椒素。辣椒素被富集到上相聚合物富集相。为了确定最优实验条件,考察了 ATPS 萃取辣椒素的单因素影响实验,包括盐浓度、聚合物浓度、缓冲液 pH、乙醇浓度、样品加入量和萃取时间的影响。响应面法研究了聚合物的浓度的影响,缓冲液 pH 值和样品加入量对辣椒素萃取的影响,确定了最优条件为 16.3% UCON 50-HB-5100/10% K_2HPO_4 /1%乙醇,缓冲液 pH4.35,辣椒油树脂的加入量为 0.24,该体系对辣椒素的萃取率达 95.5%。应用两步大孔吸附树脂法(MAR)从辣椒素类提取物中纯化了辣椒素。采用非极性 MAR ADS-17 纯化后,辣椒素的回收率和纯度分别为 83.7%和 50.3%。采用弱极性的 MAR AB-8 纯化后,辣椒素的回收率和纯度分别为 88.0%和 85.1%。

Han 等^[62]研究了温敏三嵌段共聚物 L44[($\text{PEO}_{10}\text{PPO}_{23}\text{PEO}_{10}$), $M_n=2200$]双水相萃取枸杞多糖(LBP)。凝聚胶束-蛋白质复合物的形成,且凝聚胶束和多糖之间的具有不相容性,这使 ATPS 其成为蛋白质和 LBP 的理想分离系统。研究了聚合物浓度、LBP 粗品的溶液加入量、pH 因素的影响。第一步萃取, LBP 优先萃取到水相,萃取率高达 82%,而 87%蛋白质被分配到凝聚相。通过改变温度和控制界面电位使聚合物 L44 从蛋白质中分离出来。Wang 等^[63]建立了温敏聚合物 EOPOEO/ NaH_2PO_4 ATPS 萃取 LBP。探讨了盐种类及浓度、EOPOEO 浓度、LBP 粗品的溶液加入量和温度的影响。第一次萃取后, LBP 被萃取到下相(盐富集相),萃取率为 96.3%,而大部分蛋白质被萃取到上相(EOPOEO 聚合物富集相),萃取率为 94.4%。而且大部分的色素也被萃取到上相中。相分离后,将下相的 LBP 通过透析膜进一步纯化,以除去盐和其它小分子杂质, LBP 的纯度达到 64%。

Xing 等^[64]针对分离过程中芦荟多糖中蛋白质去除难的问题,采用 triton X-114 双水相萃取分离技术对芦荟多糖提取分离纯化,探讨了 pH 值、温度、分相剂及各种添加剂等因素对体系中多糖和蛋白质分配行为的影响,建立最佳分离工艺条件;通过双水相萃取制备得了芦荟多糖,考察了其抗氧化性能。

傅海珍等^[65]以温敏性的 PE6400 为提取溶剂,研究了 PE6400 浓度、提取时间、提取次数、固液比等对白藜芦醇苷提取率的影响,考察了其最佳工艺为 25 倍 8%PE6400 超声提取二次,提取 30min/次,白藜芦醇苷的提取率达到 17.74mg/g;在富集分离时,考察不同 pH、料液比对白藜芦醇苷在温度诱导双水相体系中分配行为的影响,在料液比为 1:11,pH 为 12 的缓冲溶液,90℃水浴下加热 45min,83.3%白藜芦醇苷富集分离于水相中。本实验方法操作方便,提取率较高,对环境和人体毒害低,是一种便捷、高效的提取分离方法。

Ng 等^[66]建立了温敏聚合物 EOPO 2500/硫酸盐双水相体系萃取茶叶中的多酚。实验确定 EOPO/硫酸盐 ATPS 最佳条件,pH=7.0, $TLL=41.4\%$ (w/w), $V_R=1.0$ 、样品加入量为 0.3%(w/w)、萃取时间为 12.5min,分配系数为 26.93 ± 0.76 ,最大收率为 $96.54\pm0.09\%$ 。温度诱导 EOPO 2500 的回收率为 95.2%。研究证明了温敏性 ATPS 在植物中分离富集抗氧化剂的可行性。

3.4 在药物分离中的应用

随着双水相萃取技术研究的深入和完善,其在药物分离富集方面的报道也越来越多。Chen 等^[67]研究温敏聚合物 EOPO/磷酸盐 ATPS 用于分离富集环丙沙星(CIP)。在第一步萃取时,探讨了单因素对萃取率的影响,研究发现 pH=11.3.0mL 80%(w/w)EOPO 和 7.0mL 55%(w/w) K_2HPO_4 CIP 的萃取率为 97.7%。成相物质回收进行二次萃取中,在温度诱导下,CIP 的萃取率为 85.6%。该方法成功地应用于鸡蛋、牛奶和虾等实际样品中的 CIP,检测限达 $6.8ng\cdot g^{-1}$ 。

Hou 等^[68]研究了两种温敏聚合组成的 P_{NE}/P_{VAm} ATPS。 P_{NE} 由 N-异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸乙酯为单体共聚得到, P_{VAm} 由 N-乙烯基己内酰胺和丙烯酰胺单体合成。 P_{NE} 和 P_{VAm} 的 LCST 分别为 28.7℃和 35.6℃。头孢丙烯的分配系数最大值和最小值分别为 0.33(50mM NH_4F)和 6.55(70mM LiCl)。用两个经验方程关联了双节线数据,头孢丙烯在 ATPS 中的分配系数与系线长度相关,并计算了分配系数。

王良等^[69]建立了温敏性聚合物 EOPO- K_2HPO_4 双水相浮选技术,并结合 HPLC-UV,分离检测了日常食物中的痕量环丙沙星(CIP),讨论了盐浓度、EOPO 浓度、pH 值、浮选时间、浮选速率对浮选率的影响,并采用响应曲面法(RSM)对实验条件进行了优化,在最优条件 CIP 的萃取率达到了 98.9%。在二次萃取中,随着温度的诱导,CIP 的萃取率高达 87.6%,双水相组分被成功回收利用达到两次以上。Lu 等^[70]建立了 EOPO/ $(NH_4)_2SO_4$ 双水相浮选技术分离富集鸡蛋饼、牛奶和猪肉中痕量环丙沙星(CIP)和洛美沙星(LOM)。在最优条件下,环丙沙星和洛美沙星浮选率分别为 94.50%和 98.23%。LOM 的检出限与定量限分别为 $6.0ng\cdot g^{-1}$ 和 $20.5ng\cdot g^{-1}$,CIP 的检出限与定量限分别为 $3.8ng\cdot g^{-1}$ 和 $12.5ng\cdot g^{-1}$ 。实现了温敏聚合物 EOPO 回收利用,降低了未来应用成本。

4 结论与展望

双水相萃取技术作为一种新型的分离、纯化、浓缩于一体的样品前处理方法,以其独特的萃取模式在分离纯化领域深受研究者喜爱。温敏聚合物双水相萃取技术是双水相萃取体系的发展方向,在某种程度上实现了双水相中成相物质的回收利用及聚合物与目标物的分离,目前研究较多的主要涉及新成相系统开发、相图制作、基础物性数据、热力学性质及模型、传质行为、聚合物回收、工艺研究及应用等。为了提高双水相萃取技术的专一性和选择性,越来越多的温敏聚合物,包括双重功能聚合物将得到进一步开发与利用。此外,温敏聚合物与双水相萃取的结合,以及与其它相关技术的集成和联用,将促进生物工程、有效成分提取、金属分离的分离纯化规模化和产业化发展。

参考文献:

- [1] Tan T W, Huo Q, Ling Q. Biotechnology Letters, 2002, 24(17): 1417~1420.
- [2] Duarte S P, Fotes A G, Prazeres D M F, Marcos J C. J Chromatogr A, 2007, 1164(1/2): 105~112.

- [3] Han J, Tang X, Wang Y, Li J, Ni L, Wang L. *Water Environ Res*, 2017, 3:281~287.
- [4] Leong Y K, Show P L, Lan John C W, Loh H S, Yap Y J, Ling T C. *J Polym Res*, 2017, 24: 158~167.
- [5] Albertsson P Å. *Nature*, 1956, 177: 771~774.
- [6] Albertsson P Å. *New York etc. : Wiley*, 1986.
- [7] Kumar A, Srivastava A, Galaev I Y, Mattiasson B. *Prog Polym Sci*, 2007, 32: 1205~1237.
- [8] Show P L, Tan C P, Anuar M S, Ariff A, Yusof Y A, Chen S K, Ling T C. *Bioresour Technol*, 2012, 116: 226~233.
- [9] Moreira S, Silvério S C, Macedo E A, Milagres A M F, Teixeira J A, Mussatto S I. *J Chromatogr A*, 2013, 1321: 14~20.
- [10] Villalobos I, Barrueto Y, Garnica K, Jimenez Y P. *J Mol Liq*, 2017, 237:372~379.
- [11] Pimentel J G, Bicalho S F, Gandolfi O R R, Verissimo L A A, Castro S S, Souza E A, Veloso C M, Fontan R C, Sampaio V S, Bonomo R C F. *Fluid Phase Equilibr*, 2017, 450:184~193.
- [12] Liu L L, Liu Y, Du L P, Zhao Y J, Du H. *Fluid Phase Equilibr*, 2016, 415:25~33.
- [13] Yao T, Huang X X, Zang H M, Song H, Yao S. *J Mol Liq*, 2017, 231:411~418.
- [14] Heskins M, Guillet J E. *Macromol Sci Chem*, 1968, 2(8):1441~1445.
- [15] Rao W W, Wang Y, Han J, Wang L, Chen T, Liu Y, Ni L. *J Phys Chem B*, 2015, 119, 8201~8208.
- [16] Wang Y, Li Y Y, Han J, Xia J C, Tang X, Chen T, Ni L. *Fluid Phase Equilibr*, 2016, 409:439~446.
- [17] Wang Y, Mao Y L, Chen C, Han J, Wang L, Hu X W, Chen T, Ni L, Hu Y T. *Fluid Phase Equilibr*, 2015, 387:12~17
- [18] Virtuoso L S, Silva L M S, Malaquias B S, Vello K A S F, Cindra C P R, da Silva L H M, Mesquita M F, da Silva M C H, da Carvalho R M M. *J Chem Eng Data*, 2010, 55:3847~3852.
- [19] Virtuoso L S, Vello K A S F, de Oliveira A A, Junqueira C M, Mesquita A F, Lemes N H T, de Carvalho R M M, da Silva M C H, da Silva L H M. *J Chem Eng Data*, 2012, 57: 462~468.
- [20] Rodrigues G D, da Silva M C H, da Silva L H M, Teixeira L S, de Andrade V M. *J Chem Eng Data*, 2009, 54:1894~1898.
- [21] An B D, Mao Y L, Zhang W L, Han J, Wang Y, Ni L. *Fluid Phase Equilibr*, 2016, 425:57~64.
- [22] An B D, Zhang W L, Han J, Wang Y, Ni L. *J Solution Chem*, 2016, 45:1811~1825.
- [23] da Silva M C H, da Silva L H M, Júnior J A, Guimarães R O, Martins J P. *J Chem Eng Data*, 2006, 51:2260~2264.
- [24] Haraguchi L H, Mohamed R S, Loh W, Filho P A P. *Fluid Phase Equilibr*, 2004, 215:1~15.
- [25] Dong J, Han J, Wang Y, Tang X, Ni, L, Zhang W L, Wang L. *J Dispersion Sci Technol*, 2017, 38(10):1388~1395.
- [26] Rodrigues G D, Teixeira L S, Ferreira G M D, da Silva M C H, da Silva L H M, de Carvalho R M M. *J Chem Eng Data*, 2010, 55: 1158~1165.
- [27] Martins J P, da Silva M C H, da Silva L H M, Senra T D A, Ferreira G M D, Coimbra J S R, Minim L A. *J Chem Eng Data*, 2010, 55:1618~1622.
- [28] da Silva L H M, da Silva M C H, Mesquita A F, Nascimento K S, Coimbra J S R, Minim L A. *J Chem Eng Data*, 2005, 50:1457~1461.
- [29] Xiana R C, Marlen G A, Ana S, Oscar R. *J Chem Thermodyn*, 2017, 108: 136~142.
- [30] Lladosa E, Silvério S C, Rodríguez O, Teixeira J A, Macedo E A. *J Chem Thermodyn*, 2012, 55:166~171.
- [31] Tubio G, Nerli B B, Picó G A, Venâncio A, Teixeira J. *Sep Purif Technol*, 2009, 65(1): 3~8.
- [32] Li M, Wang Y X, Zhu Z Q. *J Chem Eng Data*, 1998, 43:93~96.
- [33] Ghahremani R, Rahimpour F. *J Chem Eng Data*, 2014, 59:218~224.
- [34] Li W, Zhu Z Q, Lin D Q. *J Chem Eng Data*, 1999, 44: 921~925.
- [35] Hou D S, Li Y J, Cao X J. *Sep Purif Technol*, 2014, 122: 217~224.
- [36] Salabat A, Moghadam S T, Far M R. *Calphad*, 2010,34:81~83.
- [37] Ramalakshmi S, Ramanan R N, Ariff A B, Ooi C W. *J Chem Eng Data*, 2014, 59:2756~2762.
- [38] Mutalib F A A, Jahim J M, Bakar F D A, Mohammad A W, Hassan O. *Sep Purif Technol*, 2014, 123:183~189.
- [39] Albertsson P A. *Nature*, 1956, 177:771~774.
- [40] Jönsson M, Olof Johansson H. *J Chromatogr A*, 2003, 983:133~144.
- [41] Everberg H, Sivars U, Emanuelsson C, Persson C, Englund A K, Haneskog L, Lipniunas P, Karlsson M J, Tjerneld F. *J Chromatogr A*, 2004, 1029:113~124.
- [42] Bolognese B, Nerli B, Picó G. *J Chromatogr B*, 2005, 814(2):347~353.
- [43] Moreira S, Silvério S C, Macedo E A, Milagres A M F, Teixeira J A, Mussatto S I. *J Chromatogr A*, 2013,1321:14~20.
- [44] Ferreira I F, Azevedo A M, Rosa P A J, Aires-Barros M R. *J Chromatogr A*, 2008, 1195(1/2):94~100.
- [45] Svensson M, Joabsson F, Linse P, Tjerneld F. *J Chromatogr A*, 1997, 761(1/2):91~101.

- [46] Show P L, Tan C P, Anuar M S, Ariff A, Yusof Y A, Chen S K, Ling T C. Sep Purif Technol, 2011, 80(3):577~584.
- [47] Show P L, Tan C P, Anuar M S, Ariff A, Yusof Y A, Chen S K, Ling T C. Biochem Eng J, 2012, 60:74~80.
- [48] Dembczynski R, Białas W, Regulski K, Jankowski T. Process Biochem, 2010, 45(3):369~374.
- [49] Jiang B, Zhang X Q, Yuan Y Q, Qu Y X, Feng Z B. Sci Rep, 2017, 7:13320~13321.
- [50] Xu C N, Dong W Y, Wan J F, Cao X J. J Chromatogr A, 2016, 1472:44~54.
- [51] Zvarova T I, Shkinev V M, Vorobeva G A, et al. Microchimica Acta, 1984,3:449~458.
- [52] Hamta A, Dehghani M R. J Mol Liq, 2017, 231:20~24.
- [53] Oshima T, Oshima C, Baba Y. J Chromatogr B, 2015, 990:73~79.
- [54] Bulgariu L, Bulgariu D. Sep Purif Technol, 2013, 118:209~216.
- [55] de Oliveira W C M, Rodrigues G D, Mageste A B, de Lemos L R. Chem Eng J, 2017,322:346~352.
- [56] Zhang Y Q, Sun T C, Lu T Q, Yan C H. J Chromatogr A, 2016, 1474:40~46.
- [57] Wang Y, Han J, Liu Y Y, Wang L, Ni L, Tang X. Food Chem, 2016, 190:1130~1136.
- [58] Wang Y, Chen H, Han J, Wang L, Ni L, Wang T T, Tang X. New J Chem, 2015, 39:9116~9123.
- [59] Leite D S, Carvalho P L G, de Lemos L R, Mageste A B, Rodrigues G D. Hydrometallurgy, 2017, 169:245~252.
- [60] Rodrigues G D, da Silva M C H, da Silva L H M, Paggioli F J, Minim L A, Coimbra J S R. Sep Purif Technol, 2008, 62(3):687~693.
- [61] Fan Y, Lu Y M, Yu B, Tan C P, Cui B. J Chromatogr B, 2017, 1063:11~17.
- [62] Han J, Wang Y, Chen T, Hu X W, Gu L, Tang X, Wang L, Ni L. Can J Chem, 2017, 95: 837~844.
- [63] Wang Y, Hu X W, Han J, Ni L, Tang X Hua Y T, Chen T. Food Chem, 2016,194:257~264.
- [64] Xing J M, Li F F. Nat Prod Res, 2009, 23(15):14~20.
- [65] 傅海珍, 陶青兰, 杨蕾, 张艳, 戚雪勇. 天然产物研究与开发, 2014, 26:1004~1008.
- [66] Ng H S, Teoh A N, Lim J C W, Tan J S, Wan P K, Yim H S, Show P L, Lan J C W. J Taiwan Inst Chem Eng, 2017, 79:151~157.
- [67] Chen B, Han J, Wang Y, Sheng C Z, Liu Y, Zhang G C, Yan Y S. Food Chem, 2014, 148:105~111.
- [68] Hou D S, Cao X J. J Chromatogr A, 2014, 1349:30~36.
- [69] 王良, 荆雨众, 逯洋, 马春宏, 郭东刚, 闫永胜. 分析化学, 2015, 43(6):886~892.
- [70] Lu Y, Chen B, Yu M, Han J, Wang Y, Tan Z J, Yan Y S. Food Chem, 2016, 210:1~8.

Thermo-sensitive Polymer Aqueous Two-Phase Technology and Its Research Progress

XIE Xue-qiao¹, HAN Juan², TANG Jun-mei¹

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Suzhou Chien-shiung Institute of Technology, Taicang 215400, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Thermo-sensitive polymer aqueous two-phase extraction is a new and green separation and enrichment technology, this system has the advantages of mild conditions, strong selectivity, high extraction efficiency, short operation time. Recyclable materials simply changing the ambient temperature, the phase forming polymer can be separated from the target separation. It has been used in biological separation, metal ion separation, extraction of active components from natural products, drug separation and so on. In this paper, the formation principle of thermo-sensitive polymer aqueous two-phase system, the research progress of liquid-liquid equilibrium theory of two-phase aqueous phase and its application are briefly introduced. It is hoped that this paper will be helpful and enlightening to further research work.

Key words: Thermo-sensitive polymer; Aqueous two-phase system; Liquid-liquid equilibrium