

聚乙二醇/盐双水相萃取



L-苯丙氨酸的研究



孙 晨,刘文举,刘宁宁

(河南工业大学化学与化工学院,河南郑州 450001)

摘 要:研究了聚乙二醇/盐双水相体系的成相行为及L-苯丙氨酸在双水相中的分配规律,其中包括聚乙二醇的分子量、聚乙二醇质量分数、盐的种类及加入量、L-苯丙氨酸初始浓度和 pH 对萃取分离的影响。当聚乙二醇 1000 的质量分数为 27%,磷酸氢二钾的质量浓度为 0.15g/mL,L-苯丙氨酸的质量浓度为 10g/L,体系的 pH 为 8.5 时,L-苯丙氨酸的萃取率最高为 99.5%,分配系数最大为 186.5。

关键词:双水相萃取,聚乙二醇,L-苯丙氨酸

Study on aqueous two-phase extraction of L-phenylalanine by polyethylene glycol/salt system

SUN Chen, LIU Wen-ju, LIU Ning-ning

(Chemistry and Chemical Engineering College of Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: An aqueous two-phase system of polyethylene glycol (PEG)/salt with the behavior of forming aqueous two-phase and the distribution rules of L-phenylalanine in the aqueous two-phase system were studied. Effects of the molecular weight of polyethylene glycol, the mass fraction of polyethylene glycol, the types and concentrations of salts, the initial concentration of L-phenylalanine and pH value were investigated. When the mass fraction of PEG1000 was 27%, the mass concentration of K_2HPO_4 was 0.15g/mL, the initial concentration of L-phenylalanine was 10g/L and pH value was about 8.5, the highest extraction yield of L-phenylalanine could reach 99.5%, partition coefficient of L-phenylalanine could reach 186.5.

Key words: aqueous two-phase extraction; polyethylene glycol; L-phenylalanine

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)06-0324-04

苯丙氨酸是人体的一种必需氨基酸,可以作营养强化剂、复合氨基酸制剂的成分,同时也是食品甜味剂和抗癌药物的原料。L-苯丙氨酸的分离纯化方法有树脂吸附法,溶剂萃取法等^[1]。由于常规的分离技术在处理生物活性物质如蛋白质、氨基酸等时会有处理量小、流程长、成本高、易失活和收率低等缺点。而在双水相系统中这些生物活性物质能在平衡两相中保持活性,避免了以上的缺点,所以双水相体系在生物工程领域的应用也越来越广泛,主要用于萃取分离抗生素、酶、蛋白质及其他生物活性物质^[2-4]。本课题主要研究聚乙二醇(PEG)与无机盐双水相体系成相行为并通过一些可调节的因素,研究L-苯丙氨酸在双水相中的分配及萃取分离特性,其中包括 pH、苯丙氨酸初始浓度、聚乙二醇质量分

数及分子量、盐的加入量等对萃取分离的影响。最后确定双水相萃取 L-苯丙氨酸的最佳工艺条件,为开发双水相萃取法分离 L-苯丙氨酸的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-苯丙氨酸 北京索莱宝科技有限公司;磷酸氢二钾、无水硫酸钠、硫酸铵、氢氧化钠、盐酸、聚乙二醇 1000、聚乙二醇 2000、聚乙二醇 4000 均为国产分析纯。

UV-2460 SHIMADZU 紫外可见分光光度计 日本岛津;PL203 电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;KQ-100E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;PHS-25B 数字酸度计 上海大普仪器有限公司。

1.2 实验方法

采用紫外-可见分光光度法,在 280nm 处检测 L-苯丙氨酸的吸光度,并由标准曲线计算出其质量

收稿日期:2011-06-24

作者简介:孙晨(1979-),女,博士,讲师,研究方向:生物化工。

基金项目:校引进人才专项基金(2009BS002)。

浓度。当L-苯丙氨酸的浓度在0~10g/L的范围区间,吸光度Y与浓度X之间具有良好的线性关系。线性回归方程为: $Y = 0.0396X + 0.018$, 线性相关性 $R^2 = 0.9991$ 。

1.2.1 聚乙二醇/磷酸氢二钾的双水相体系建立 配制一定质量分数的聚乙二醇溶液,然后逐渐增加磷酸氢二钾的质量,振荡试管使磷酸氢二钾溶解,并观察溶液现象,直到恰好出现清晰的相界面,溶液分成两相。记下此时磷酸氢二钾的质量浓度,则该点为双水相的下界。继续向该体系中加入磷酸氢二钾直到使上相成凝固状,记下此时磷酸氢二钾的质量浓度作为双水相的上界。如此再配制不同质量分数的聚乙二醇溶液,用上述方法找出一系列双水相的上下界,并按照记录数据做出聚乙二醇与磷酸氢二钾成双水相的范围图。

1.2.2 聚乙二醇分子量对双水相萃取率的影响 采用聚乙二醇1000、聚乙二醇2000、聚乙二醇4000配制15%、18%、23%、25%、27%不同质量分数的聚乙二醇溶液与0.15g/mL的磷酸氢二钾制成双水相体系,然后向各配制好的双水相中移入6mL $10g \cdot L^{-1}$ 的L-苯丙氨酸标准溶液,振荡使其混合均匀,静置4h,读取上下相的体积,并取上相测其吸光度值(L-苯丙氨酸大部分分布于上相中),并绘制相应的曲线。

1.2.3 盐的种类对双水相萃取率的影响 本实验采用的盐分别为硫酸钠、硫酸铵、磷酸氢二钾三种,与不同质量分数的聚乙二醇1000溶液配制成双水相体系。向各配制好的双水相中移入6mL, $10g \cdot L^{-1}$ 的L-苯丙氨酸溶液,振荡使其混合均匀,静置4h,读取上下相的体积,取上相测其吸光度值。

1.2.4 盐的质量浓度对萃取率的影响 固定质量分数27%的聚乙二醇1000,改变盐的加入量,配制出0.1、0.12、0.14、0.15、0.18 $g \cdot L^{-1}$ 不同盐浓度的聚乙二醇/盐双水相体系。向配制好的双水相中加入6mL,质量浓度为 $10g \cdot L^{-1}$ 的L-苯丙氨酸溶液,充分振荡使其混合,静置4h后,读取上下相的体积,取上相测其吸光度值。

1.2.5 L-苯丙氨酸的初始浓度对萃取率的影响 配制聚乙二醇1000的质量分数为27%,磷酸氢二钾的质量浓度为0.15g/mL的高聚物的双水相体系,同时配制3、4、5、6、8、10、11、12 $g \cdot L^{-1}$ 不同浓度的L-苯丙氨酸标准溶液,在配好的双水相中依次加入不同浓度的L-苯丙氨酸标准溶液各6.00mL,振荡混合后静置4h,读取上下相的体积,并取上相测其吸光度值。

1.2.6 pH对双水相萃取率的影响 配制聚乙二醇1000的质量分数为27%,磷酸氢二钾的质量浓度为0.15g/mL的高聚物的双水相体系,向体系中加入6mL $10g/L$ 的L-苯丙氨酸溶液,并向各个双水相体系中加入相同体积不同浓度的盐酸或氢氧化钠溶液,充分振荡,静置4h后读出上下相的体积,之后用酸度计测出各个双水相系统的pH,取出上相测其吸光度值,计算得出分配系数和回收率与pH之间的关系曲线。

L-苯丙氨酸萃取率和分配系数的计算:

$$\text{萃取率 } Y(\%) = \frac{\text{分相后上相中苯丙氨酸的质量}}{\text{分相前苯丙氨酸的初始质量}} \times 100\%$$

$$\text{分配系数 } K = \frac{\text{上相中苯丙氨酸的浓度}}{\text{下相中苯丙氨酸的浓度}}$$

2 结果与讨论

2.1 聚乙二醇/磷酸氢二钾的成相行为

按照1.2聚乙二醇/磷酸氢二钾双水相体系的建立双水相的实验步骤,得出不同分子量的聚乙二醇与磷酸氢二钾形成双水相的关系见图1。

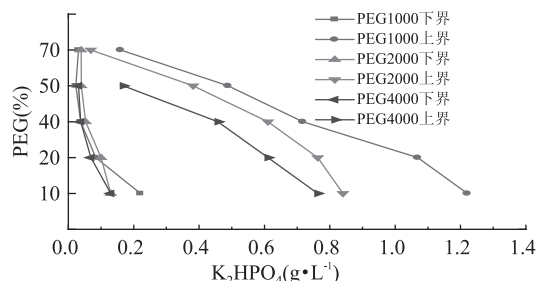


图1 聚乙二醇与磷酸氢二钾的成相关系图

Fig.1 Aqueous two-phase relation between PEG and K_2HPO_4

从图1中可以看出不同分子量的聚乙二醇与磷酸氢二钾之间的成相关系。其中左边的三条线代表这三种不同分子量聚乙二醇与磷酸氢二钾形成双水相时所需盐的质量浓度和聚乙二醇质量分数的最小值,若小于左侧曲线处的值则无法形成双水相。右边的三条线代表聚乙二醇与磷酸氢二钾形成双水相时质量分数的最大值,如果配比超过右侧曲线所对应的值,则得到的双水相中上相成为固态,没有实际的研究价值。从图1的成相范围上可以看出,聚乙二醇1000的成双水相的范围最大,聚乙二醇4000的最小。而在相同的质量分数下,聚乙二醇4000形成双水相时所需的磷酸氢二钾的浓度最小,由此得出高聚物的分子量越大,形成双水相时所需的盐的浓度越低。

2.2 聚乙二醇相对分子量对萃取率的影响

用不同质量分数的聚乙二醇溶液与磷酸氢二钾构成双水相体系,分别加入相同体积浓度的L-苯丙氨酸溶液,测定L-苯丙氨酸在不同的双水相体系中的萃取率,实验结果如图2所示。

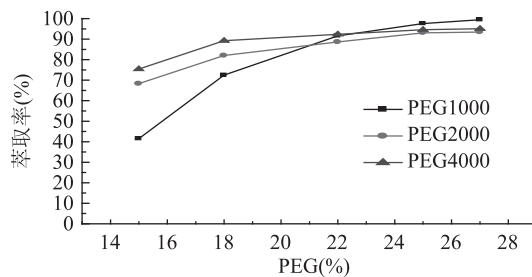


图2 聚乙二醇分子量及质量分数与萃取率的关系

Fig.2 Relation between extraction yield and mass fraction or molecular weight of PEG

从图2中可以看出,增加聚乙二醇的浓度,萃取率随之上升,尤其是聚乙二醇1000/盐双水相体系的

变化趋势更为显著。聚乙二醇在较低的浓度下,相对分子量 4000 的双水相体系比相对分子量为 2000 和 1000 的双水相可以获得较高的萃取率。随着聚乙二醇的浓度增大,这种情况变为在聚乙二醇 1000 的双水相体系中获得高的萃取率。这种现象可以解释为聚乙二醇分子量越大,浓度越高,上相的极性就越小,而苯丙氨酸是具有部分极性的非极性物质,因而溶解度增加,萃取率提高^[5-6]。当聚乙二醇 1000 的质量分数为 27%,磷酸氢二钾的质量浓度为 0.15g/mL 时,得到萃取率最高为 99.5%。分配系数与萃取率变化趋势一致,当萃取率最高时分配系数最大为 186.5。综上考虑到最大萃取率和成相的范围,选择聚乙二醇 1000 作为以后双水相系统中成相的高聚物。

2.3 盐的种类对 L-苯丙氨酸萃取分离的影响

选用磷酸氢二钾(质量浓度为 0.15g/mL)、硫酸钠(质量浓度为 0.11g/mL)和硫酸铵(质量浓度为 0.16g/mL)考察盐的种类的影响。L-苯丙氨酸的初始浓度为 10g/L,萃取率与盐的种类的关系如图 3 所示。

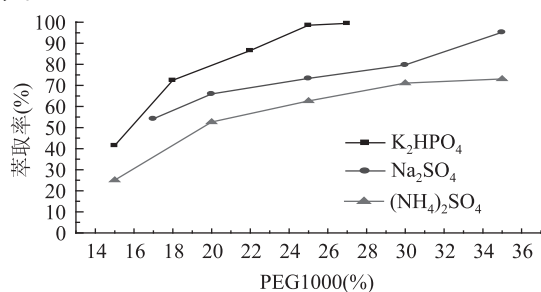


图3 盐的种类及聚乙二醇浓度与萃取率的关系

Fig.3 Relation between extraction yield and mass fraction of PEG or salts

从图3可以看出,随着聚乙二醇 1000 质量分数的增加,L-苯丙氨酸的萃取率上升。不同盐的萃取能力差异很大,聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾体系的萃取效果较其它两个体系的好。因为无机盐/亲水性有机溶剂双水相体系的分相机理尚不明了,但初步推断是无机盐争夺溶液中的水分子造成的,因此,水合作用强的盐其分相能力相应的也强。高价盐的水合作用大于低价盐,因而高价盐体系较低价盐体系的分相分离效果好^[7]。综上考虑选择聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相系统萃取 L-苯丙氨酸的效果好。

2.4 磷酸氢二钾的浓度对萃取分离的影响

选择 27% 质量分数的聚乙二醇 1000,改变聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相体系中磷酸氢二钾的质量浓度,同时 L-苯丙氨酸的初始浓度为 10g/L,测定 L-苯丙氨酸在不同的双水相体系中的萃取率如图 4 所示。

由图 4 可知,在聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相体系中,随着磷酸氢二钾浓度的增大,萃取率也随之增大。在此条件下,当磷酸氢二钾的浓度达到 0.15g/mL 时,L-苯丙氨酸在该双水相中的萃取率为 99.5%,分配系数为 186.5。林强等^[8]在利用双水相体系萃取甘草酸盐的研究中也发现,随着盐浓度的

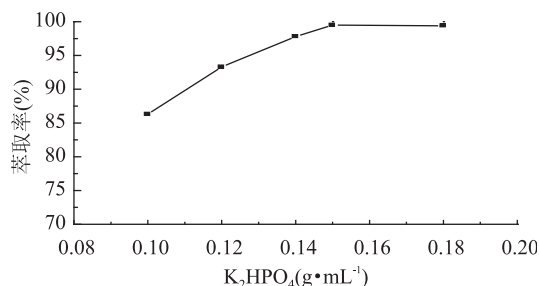


图4 磷酸氢二钾的浓度与萃取率的关系

Fig.4 Relation between extraction yield and mass concentration of K₂HPO₄

升高,盐夺取了体系中的水分子,有机溶剂分子被释放出来,使甘草酸盐在上相中的浓度增大,从而提高了分配系数和萃取率。

2.5 L-苯丙氨酸的初始浓度对萃取分离的影响

在聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相体系中,聚乙二醇 1000 的质量分数为 27%,磷酸氢二钾的质量浓度为 0.15g/mL,L-苯丙氨酸在不同的初始浓度的条件下与萃取率之间的关系,如图 5 所示。

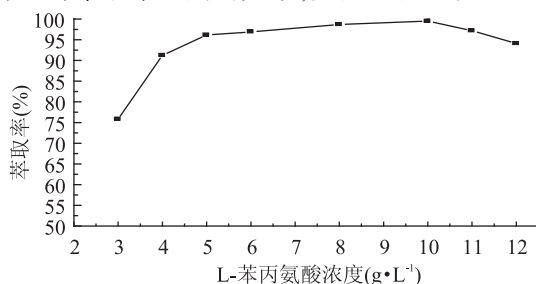


图5 L-苯丙氨酸的浓度与萃取率之间的关系

Fig.5 Relation between extraction yield and mass concentration of L-phenylalanine

从图5可以看出,萃取率随着 L-苯丙氨酸初始浓度的增大有先增后降的趋势。在此条件下,当 L-苯丙氨酸的质量浓度为 10g/L 时,得到最大萃取率为 99.5%,之后降低。可能是因为 L-苯丙氨酸的初始浓度达到 10g/L 后,体系的萃取达到饱和,导致萃取率降低。

2.6 pH 的变化对萃取分离的影响

在配制聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相体系时,加入相同体积不同浓度的盐酸或氢氧化钠溶液,充分振荡,静置 4h 后读出上下相的体积,之后用酸度计测出各个双水相系统的 pH。当聚乙二醇 1000 的质量分数为 27%,磷酸氢二钾的质量浓度为 0.15g/mL,L-苯丙氨酸的初始浓度为 10g/L 时考察不同 pH 对 L-苯丙氨酸萃取率的影响,所得结果如图 6 所示。

从图 6 可以看出,pH 的变化范围很小,对萃取率的影响是先增后降的趋势。当 pH 过小,双水相消失。而在 pH 高于 8.8 时,L-苯丙氨酸在碱性条件下不稳定。因为 pH 会影响氨基酸分子中可解离基团的解离程度,因而改变氨基酸所带电荷的性质和大小。当聚乙二醇/磷酸氢二钾体系的 pH 为 8.5 时,萃

(下转第 331 页)

光合速率、离子吸收和甜菜碱含量的影响[J].植物生理学通讯,2003,39(1):13-16.

[3]玄永浩,金银哲,刘旭,等.莧菜药理作用研究进展[J].长江蔬菜,2010(22):1-4.

[4]李金凤,段玉清,马海乐,等.板栗壳中多酚的提取及体外抗氧化性研究[J].林产化学与工业,2010,30(1):53-58.

[5] Morton LW, Abu - Amscha Caccetta R, Puddey IB, et al. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000, 27(3): 152-159.

[6] Tian S, Nakamura K, Kayahara H. Analysis of phenolic compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(15): 4808-4813.

[7] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols [J]. J Nutr, 2000, 130(8): S 2073-2085.

[8] 李安平, 谢碧霞, 陶俊奎, 等. 竹笋抗氧化活性比较研究 [J]. 营养学报, 2008, 30(3): 321-323.

[9] 刘清, 李玉, 姚惠源. 大麦提取物的体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 131-133.

[10] Cai Y Z, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal associated with anticancer [J]. Life Science, 2004, 74(17): 2157-2184.

[11] 赵文红, 邓泽元, 范亚苇, 等. 儿茶素体外抗氧化作用的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(12): 278-282.

[12] 王桃云, 陈娟, 彭志任, 等. 海金沙黄酮体外抗氧化活性

研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 193-196.

[13] 陈志科, 黎深. 荔枝核活性成分分析及其提取物抗氧化性能研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(23): 110-114.

[14] 汪海波, 肖建青, 留锡葵. 核桃花抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(10): 140-142.

[15] 蔡为荣, 周慧超. 荷叶多酚提取优化及其清除 DPPH 自由基的研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 186-189.

[16] 耿中华, 秦卫东, 马利华, 等. 梨皮多酚的提取工艺优化的研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 233-238.

[17] 欧阳玉祝, 陈小东, 唐红玉, 等. 路边青中总多酚的提取与分离研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(16): 44-47.

[18] 徐胜龙, 杨建雄. 柿叶醇提取物的体外抗氧化研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(4): 131-134.

[19] 韩林, 黄玉林, 张海德, 等. 槟榔籽中抗氧化成分的提取及活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 157-160.

[20] 韩林, 张海德, 李国胜, 等. 槟榔籽总酚提取工艺优化与抗氧化活性实验 [J]. 农业机械学报, 2010, 41(4): 134-139.

[21] 李伟, 张应团. 火棘多酚类物质的体外抗氧化作用 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 121-123.

[22] 高畅, 程大海, 高欣, 等. 蓝莓果渣提取物总酚含量及抗氧化活性研究 [J]. 植物研究, 2010, 30(2): 253-256.

[23] 屏锐, 库尔班, 苟萍, 等. 火绒草提取物抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(3): 153-159.

[24] 李莺, 籍保平, 周峰, 等. 燕麦提取物清除自由基及抑制低密度脂蛋白氧化能力研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(6): 75-78.

(上接第 326 页)

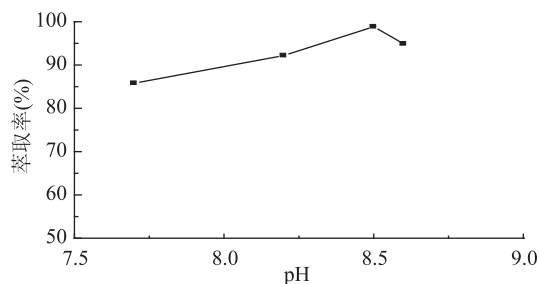


图 6 pH 与萃取率之间的关系

Fig6 Relationship between extraction yield and pH

取率和分配系数达到该体系下的最大值分别为 99.5% 和 186.5。而该点恰好是对应双水相系统没有加任何酸或碱,以水做参比所得到的。

3 结论

聚乙二醇/盐双水相体系萃取 L-苯丙氨酸的结果表明,聚合物的相对分子质量,聚合物的质量分数,盐的种类及浓度, L-苯丙氨酸的初始浓度和 pH 等对双水相体系的萃取效果影响很大。在聚乙二醇 1000/磷酸氢二钾双水相体系中,萃取率随着聚乙二醇质量分数和磷酸氢二钾浓度的增加而增大,随着 L-苯丙氨酸初始浓度的增加和 pH 的增大先增大后减小。当聚乙二醇 1000 的质量分数为 27%,磷酸氢二钾的质量浓度为 0.15g/mL, L-苯丙氨酸的初始浓度为 10g/L,体系的 pH 为 8.5 时,萃取率最高为

99.5%,分配系数最大为 186.5。因此可以进一步应用聚乙二醇/盐双水相体系分离小分子氨基酸等物质的研究。

参考文献

[1] 严群芳,王恬,张莉莉.酸水解大豆蛋白制取复合氨基酸水解液的研究 [J]. 饲料工业, 2006(11): 29-31.

[2] Salabat A, Abnosi M H, Motahari A. Investigation of amino acid partitioning in aqueous two - phase systems containing polyethylene glycol and inorganic salts [J]. J Chem Eng Data, 2008, 53(9): 2018-2021.

[3] 孙晨, 赵培霞. 双水相萃取大豆苯丙氨酸研究 [J]. 粮食与油脂, 2010(3): 24-25.

[4] 甘林火, 翁连进. 双水相体系萃取分离 L-组氨酸的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(7): 165-167.

[5] 冯自立, 马娜. 无花果蛋白酶在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系中的分配行为 [J]. 食品科学, 2010, 31(19): 67-70.

[6] 涂绍勇, 李路, 杨爱华, 等. 双水相萃取法提取木瓜蛋白酶的研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 220-222.

[7] 李梦青, 耿艳辉, 刘桂明, 等. 双水相萃取技术在白藜芦醇提纯工艺中的应用 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 647-649.

[8] 林强, 霍清. 双水相体系萃取甘草酸盐的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 702-704.