

双水相萃取技术的新发展

吴丁丁 穆小静* 易小琦 陈刚
(重庆大学化学化工学院, 重庆 401331)

摘要: 双水相萃取技术是一种易于放大、操作条件温和、可连续化操作的新型分离技术。本文综述了新近发展的不同的双水相体系(聚合物-盐-水、有机溶剂-盐-水、离子液体-盐-水、离子液体-表面活性剂-盐-水)的性质,及萃取(提取)蛋白质、氨基酸、抗生素和中药材中小分子有效成分等的影响因素;总结了双水相萃取与其它技术的联用,展望了双水相体系的应用前景。

关键词: 双水相萃取, 聚合物, 有机溶剂, 离子液体, 联用技术

Progress of aqueous two-phase extraction technique

WU Ding-ding, MU Xiao-jing*, YI Xiao-qi, CHEN Gang

(College of Chemistry and Chemical Engineering of Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Extraction with aqueous two-phase system (ATPS) is a novel separation technique, which shows some advantages including easy scale-up, mild conditions and continuous operation. The properties and applications of newly developed different ATPSs (polymer-salt-water, organic solvent-salt-water, ionic liquid-salt-water, ionic liquid-surfactant-salt-water) in extraction of proteins, amino acids, antibiotics and other small molecules in herbs were reviewed. ATPS extraction combining with other technologies were summarized and the prospect of ATPSs was also discussed.

Key words: aqueous two-phase extraction; polymer; organic solvent; ionic liquid; hyphenated technique

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)08-0395-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.068

双水相体系(aqueous two-phase system, ATPS)由两种互不相溶的水溶液组成,在萃取过程中,分子间氢键、盐析作用、电荷相互作用、范德华力、聚合现象、疏水作用、界面性质作用等都扮演着十分重要的角色。这些作用力导致待萃取物在两相间产生浓度差异,从而实现分离。双水相萃取在提取中兼具分离功能,具有较高的生物相容性、易于放大、可连续化操作、不易引起蛋白质的变性失活。该技术已经被应用于蛋白质、核酸、氨基酸、抗生素、色素以及中药材中的小分子化合物等产品的分离和纯化,必将在生物工程、食品、制药等领域广泛应用。

1956年 Albertsson 首次应用 ATPS 成功分离叶绿素^[1]。目前对 ATPS 分离技术的研究方兴未艾,新的体系层出不穷,应用领域不断拓展。刘磊磊等^[2]综述了近5年来双水相技术在中药黄酮、生物碱、萜类、多酚及其它有效成分的分离中的应用。本文就近年来出现的新 ATPS 体系,阐述影响双水相提取分离的因素如组成双水相体系的聚合物、有机溶剂的种类、离子液体、表面活性剂的种类、盐的种类及浓度、体系的 pH 等;并介绍了新发展的双水相与其它技术的联用。

1 双水相体系的组成及应用

盐是多数 ATPS 组成的重要成分之一,对 ATPS 萃取效果有显著影响。要求盐在水中有较大溶解度和解离度,价格低廉,常见的有: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaH_2PO_4 、 K_2CO_3 、 Na_2SO_4 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、 NaCl 等。萃取酸性化合物时,选择较低 pH,一般用酸性盐或中性盐;反之,若萃取碱性化合物,一般选用碱性 pH,用碱性或中性盐,以保证被萃取的化合物以分子状态存在,被萃取到上相。若被萃取对象以离子状态存在,将加大其在盐水相的分配。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为一种酸性盐,溶解度大,容易操作,且蛋白质能在该盐组成的 ATPS 中不易变性。相比而言, Na_2SO_4 为中性盐,溶解度相对较小,配制的双水相溶液若遇到温度波动容易析出 Na_2SO_4 固体。报道 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组成的双水相体系可以用来分离酚类化合物^[3]、脂肪氧合酶^[4]、黄连生物碱^[5]、黑豆酯酶^[6]、红豆蛋白质^[7] 等物质。在萃取和分离脂肪氧合酶时,研究者比较了多种盐对萃取的影响, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组成的 ATPS 提取的脂肪氧合酶活性高,因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提供了合适的 pH^[4]。PEG4000 与

收稿日期: 2016-08-12

作者简介: 吴丁丁(1990-),女,硕士研究生,研究方向:分析化学, E-mail: 18883724367@163.com。

* 通讯作者: 穆小静(1973-),女,博士,副教授,研究方向:药物分析, E-mail: muxiaojingcn@aliyun.com。

基金项目: 重庆市重点产业共性关键技术创新专项(cstc2016zdcy-ztzx10001); 重庆市科技支撑示范工程(cstc2014zktjccxyBX0025)。

(NH_4)₂SO₄ 组成的 ATPS 从马铃薯中提取的 β -D-呋喃果糖苷酶^[8], 比活度、纯化倍数和萃取率均较低; 而 Na₂SO₄ 构成的 ATPS 提取的 β -D-呋喃果糖苷酶的比活度及纯化倍数较高。目前报道的中性盐 Na₂SO₄ 组成的 ATPS 萃取分离脂肪酶 A₂^[9]、转化酶^[8]、丁酸^[10] 等有较好的效果。由 MgSO₄ 组成的 ATPS 较为少见, 由 21% PEG4000 与 16% MgSO₄ 组成的 ATPS 萃取苦苣皂甙, 萃取率为 95.12%^[11]。O[mim]Br-十二烷基硫酸钠(SDS)-盐 ATPS 提取三种抗生素(四环素、土霉素、氯霉素), 发现 NaCl 组成的 ATPS 比 K₂CO₃、(NH₄)₂SO₄、K₂HPO₄ 形成的 ATPSs 更稳定, 且 NaCl 和 O[mim]Br 的需要量都较少^[12]。

盐的浓度对分配系数和纯化因子也有影响。B[mim]BF₄ 离子液体与不同种类的盐(NaH₂PO₄、K₂HPO₄、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄) 组成的 ATPS 提取小麦酯酶, 发现 NaH₂PO₄ 优于其它种类的盐; 并且随着 NaH₂PO₄ 质量分数不断增大, 小麦酯酶在双水相中的分配系数不断增大。当盐的质量分数从 15% 增大至 25% 时, 分配系数 K 由 1.86 ± 0.01 增大到 7.27 ± 0.06, 当盐的质量分数继续增大, 小麦酯酶在双水相中的 K 缓慢增大至 8.62 ± 0.09, 但是小麦酯酶的纯化因子在 NaH₂PO₄ 的质量分数为 25% 时达到最大(4.23 ± 0.04), NaH₂PO₄ 质量分数增大至 30% 时, 纯化因子降低至 1.97 ± 0.04^[13]。

在 ATPS 中加入两种或两种以上的盐, 能够改变被萃取化合物在两相中的分配, 加快相分离的速度。如丙醇-K₂HPO₄/KH₂PO₄ 组成的 ATPS 中樱桃芦丁的 K 值为 42.76; 当加入 2.5% NaCl 时, K 值提高到 51.47^[14]。丙醇-(NH₄)₂SO₄ ATPS 在 pH2.0 时萃取分离蒜氨酸((S)-3-(烯丙基亚磺酰)-L-丙氨酸), 加入 8.54% NaCl 后, K 值从 0.060 减小至 0.042, 提取率增大^[15]。芦荟中的多糖和蛋白质在由 (NH₄)₂SO₄、NaH₂PO₄ 分别与 B[mim]BF₄ 离子液体组成的双水相体系中的萃取率分别低于 70% 和 90%, 但向体系中加入 1.33 mol/L NaCl, 多糖和蛋白质在这两种体系中的萃取率高于 90%^[16]。

可见, 盐对 ATPS 的性质以及萃取的结果有重要影响, 但影响的原因尚待研究者们进一步从理论上深入解析。组成 ATPS 的其它组分对萃取的结果影响较大。

除了盐以外, 按照 ATPS 的其他组分对其进行分类, 通常有以下几类: 聚合物-盐-水^[6, 17]、有机溶剂-盐-水^[4, 18]、离子液体-盐-水^[19]、离子液体-表面活性剂-水^[20-21]、其他体系如聚合物₁-聚合物₂-水^[22]等。

1.1 聚合物-盐-水体系

由于聚合物黏度较大, 相比于两种聚合物形成的双水相体系, 聚合物-盐体系得到更多的应用。而在聚合物-盐体系中, 聚乙二醇-盐-水体系的应用最为广泛。

1.1.1 聚乙二醇-盐-水体系 PEG 是平均分子量从 200 到 20000 的乙二醇高聚物的总称。PEG 的分子量对形成的 ATPS 性质有较大影响, 构成 PEG-盐-

水体系的双水相所使用 PEG 分子量一般介于 300~6000 之间, 但最常用的体系或萃取效率较好的双水相体系使用的 PEG 分子量在 1500~6000 之间。PEG 分子量太小, 上相的极性太大; 两相的极性差异小, 不利用分配系数的提高; 若 PEG 分子量太大, 其疏水性强, 水中溶解度小, 形成双水相的 PEG 浓度降低, 也不易于获得较高的提取效率。不同分子量的 PEG 对双水相的形成和性质有以下三个方面的差异: PEG 及盐在形成双水相时所需的质量分数。如在提取分离丁酸^[10]和红豆蛋白质^[7]时, 发现不同的 PEG 分子量对相图有影响, 当所选的盐质量分数一定时, 随着 PEG 相对分子质量的增大, 憎水程度越强, 加大了相分离的动力, 因此形成双水相体系所需 PEG 的浓度降低。PEG 分子量对萃取率有影响。萃取丁酸^[10]时, 分子量为 6000 形成双水相的萃取率达到最大。但当萃取对象为红豆蛋白质^[7]时, PEG6000 形成的双水相萃取率较低, 可能是由于 PEG 相对分子质量高, 疏水性较大, 红豆蛋白不易向上相分配。PEG 分子量对分配系数有影响。从马铃薯中提取转化酶^[8]时发现随着 PEG 分子量的增大, 分配系数增大。当分子量超过 4000, 体积排阻效应变大, 分配系数反而减小。因此, 选择 PEG 分子量的大小时需要综合考虑上述几个因素的影响。

聚乙二醇(PEG)-盐-水体系含水量高^[3, 23]且两相容易分离, 蛋白质不易变性失活, 因此研究者将这一体系用以提取生物活性的蛋白质。后来发现该体系可以用来提取小分子物质, 如酚类化合物^[3]、丁酸^[10]、黄连生物碱^[5]等能获得较好的收率, 成本低, 污染小。

1.1.2 其他聚合物-盐-水体系 除了聚乙二醇以外, 质量分数为 50% 氧化乙烯和质量分数为 50% 氧化丙烯组成的共聚物 EO50PO50 构成的 ATPS 分离溶菌酶^[24]。相对于 PEG-盐体系, 该体系成本更低, 适合工业化生产。

1.2 有机溶剂-盐-水体系

与聚合物-盐-水体系相比, 有机溶剂组成的 ATPS 黏度小, 溶剂和萃取物易回收。组成 ATPS 的有机溶剂一般与水可以混溶, 有机溶剂的极性小, 则其相应的 ATPS 体系的上相极性小; 反之, 有机溶剂的极性大则其相应的 ATPS 体系的上相极性大。这些体系一般不适合分离蛋白质、多肽, 而用来提取分离小分子化合物。如: 花青素^[25]、白藜芦醇^[26]、辣椒素^[27]、绿原酸^[28]等化合物, 提取时应选择适合的 pH。例如乙醇-NaH₂PO₄ ATPS 萃取和分离花青素时, pH > 3.31 花青素的回收率将会降低, pH > 4.20 NaH₂PO₄ 将会沉淀。当萃取生物碱^[29]等碱性化合物时, 体系的 pH 调节在碱性范围内。总之, pH 的选择依据是萃取的化合物在双水相中能够以分子状态存在。

乙醇-(NH₄)₂SO₄ 组成的 ATPS 中加入环糊精, 色氨酸光学对映体在上相与下相中的分配系数有明显差异, 从而实现对其分离^[23]。pH 对 ATPS 萃取分离色氨酸对映体具有显著影响, 随着 pH 增大, D-色氨酸与 L-色氨酸在双水相中的分配系数先增

大后下降,在 pH = 3 时, D-色氨酸与 L-色氨酸的分配系数差异最大,色氨酸对映体的分离效果最好,分离系数($\alpha = K_D/K_L$)为 1.38。该法为手性化合物的分离纯化提供了一种便捷、新颖的方法。

丙醇-盐-水、丙酮-盐-水 ATPS 也是常用的萃取体系,如萃取葱醌类化合物^[30]、蒜氨酸^[15]、盐酸土霉素^[31]、琥珀酸^[32]等。

一般情况下,采用双水相萃取的有机化合物会富集在上相,分配系数大,但是也有例外。当萃取的对象与盐之间有相互作用时,可能会使萃取对象向盐相(下相)富集。以丙醇-(NH₄)₂SO₄ ATPS 萃取分离蒜氨酸((S)-3-(烯丙基亚磺酰)-L-丙氨酸),若体系的 pH 小于 pI(4.86),则蒜氨酸与质子结合带正电荷,与 SO₄²⁻ 之间的静电作用使得其在盐相富集。当体系的 pH > pI 时,蒜氨酸结合的质子消失而向上相移动。体系的 pH > 3.0(pH 介于 2.0~6.0 之间)时,蒜氨酸的分配系数从 0.06 增大到 0.09^[15]。

1.3 离子液体-盐-水体系

离子液体(ionic liquid, IL)一般由有机阳离子和阴离子组成。常见的有机阳离子有咪唑盐离子、季铵盐离子、N-烷基吡啶离子等。阴离子分为有机阴离子和无机阴离子,常用的有卤素离子、四氟硼酸根离子、六氟砷酸根离子、硝酸盐及醋酸盐等。离子液体蒸汽压低、较高的热化学稳定性。相对于由 PEG 组成的 ATPS,离子液体的 ATPS 黏度低、不易乳化、相分离速度快。

IL-盐-水体系常被用来分离大分子物质(如蛋白质、多肽、酶等)。例如有三个课题组采用 IL-盐-水体系来分离牛血清白蛋白(BSA)^[33-35]。选用 K₂HPO₄ 是因为其溶解度大且具有提取 BSA 适宜的 pH。在 ATPS 中 IL 的种类对萃取 BSA 的分配系数、提取效率等有较大影响。BSA 在 [bmim][Br]、[bmim][Cl]、[OH-mim][Cl] 组成的 ATPS 中 K 值在 1.97~3.04 之间,而类胆汁离子液体组成的 ATPS 中 BSA 的分配系数达到 7.68,提高了 2~3 倍^[33]。Chen 等^[35]则比较了 8 种 IL 形成的 ATPS 对 BSA 萃取率的影响。这 8 种 IL 分别由两种阳离子 N,N-二甲基乙醇胺(DMEA)、二乙基乙醇胺(DEEA)和 4 种阴离子丙酸(Pr)、丁酸、戊酸、己酸构成。若 IL 的阳离子为 DMEA,随着阴离子链长增加,双水相对 BSA 萃取率从 99.47% 下降到 64.80%;若阳离子为 DEEA,阴离子随着链长增加萃取率则是从 89.43% 下降到 58.70%。这表明 IL 的阳离子相同时,随着阴离子烷基链的不断增长,离子液体的疏水性增强,BSA 的萃取率降低。当 IL 的阴离子相同时,烷基链长的阳离子,IL 的水溶性低,溶液的黏度增加,体系对 BSA 的萃取率降低。因此 [DMEA][Pr] 是这 8 种离子液体中萃取 BSA 最佳的离子液体。由 1,1,3,3-四甲基胍(1,1,3,3-tetramethylguanidine, TMG) 阳离子与 8 种不同的阴离子(醋酸盐、山梨酸盐、衣康酸盐、丙烯酸盐、甲基丙烯酸盐、乳酸盐、肉桂酸盐、马来酸盐)组成的 ATPS 在萃取分离 BSA 时, TMG 与丙烯酸盐组成的离子液体(TMGA)对 BSA 的萃取率

高达 99.46%^[34]。

四种离子液体 [C₄mim][N(CN)₂]、[C₄mpyr]Cl、[C₄mim]Cl 和 [C₈mim]Cl 分别与磷酸盐缓冲液构成的 ATPS 提取脂肪分解酶^[36],在 pH = 7.0 时,脂肪酶(pI = 3.0)带负电荷,使得亲水性增加,脂肪酶向盐相转移。[C₄mim][N(CN)₂]-磷酸缓冲液体系对脂肪酶的提取效果好,分配系数 K = 0.049 ± 0.003。不仅如此,离子液体-盐-水体系还能被用来分离小分子物质,如磺酰胺类化合物^[37]、五倍子酸^[38]等。

1.4 离子液体-表面活性剂-盐-水体系

在离子液体-盐-水体系中加入表面活性剂形成新型 ATPS。当加入 2.33% 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)时, C₆[mim]BF₄ 和 C₈[mim]BF₄ 与 (NH₄)₂SO₄ 溶液形成的 ATPS 遭破坏,而 C₄[mim]BF₄-(NH₄)₂SO₄-水体系中, SDBS 加入使形成 ATPS 需要的 IL 量极少(0.1%),该体系可以提取糖果中的苏丹红 I-IV^[39]。C₄[mim]Cl-PEG300-Na₂SO₄ 双水相体系提取没食子酸、香草酸、丁香酸时,分配系数大于 30.0,而在 PEG300-Na₂SO₄ 中,三种化合物的分配系数低于 20.0^[40]。

1.5 其他体系

根据双水相形成的基本原理,研究者以聚合物代替盐,发展了聚合物-有机溶剂-水和聚合物-聚合物-水体系。右旋糖苷(Dx)-乙腈-水 ATPS 体系中右旋糖苷与水分子形成氢键,与有机溶剂竞争水而形成双水相,右旋糖苷主要分布在下层,乙腈在上层,香草醛被提取到上层,分配系数 K = 11.30,萃取率达 95%^[41]。Wu 等^[42]从人体血清白蛋白中提取免疫球蛋白 G 时比较了四种 ATPS 对其回收率的影响,分别为聚合物-聚合物-水体系(PEG-HPS(羟丙基淀粉)-水、PEG-Dx-水体系)和聚合物-盐-水体系(PEG-硫酸盐-水、PEG-磷酸盐-水), K < 1; 向体系中加入 15% NaCl,免疫球蛋白 G 由原本向下相富集转变为向 PEG 相富集, K > 1,且在 PEG-HPS-水体系中的回收率最高(高于 90%)。以表面活性剂-木糖醇-水组成的 ATPS 从南瓜种子中提取和纯化脂肪酶,这三种表面活性剂组成的 ATPS 对脂肪酶的纯化因子大小顺序: TritonX-100(PF > 7.31) > Tween-80(PF < 3.33) > SDS^[43]。

2 双水相萃取技术与其他技术的联用

ATPS 萃取方法相对于传统的提取方法而言,不使用或少量使用有机溶剂,并且在适宜条件下选择性较好。但该方法与传统的液-液萃取技术一样,从成分复杂的固体样品中萃取目标组分受基质状态、传质的影响较大,相分离的时间长。与其他技术如微波辅助^[29,44-45]、超声波辅助^[46-49]、溶剂浮选^[50]等联用能使 ATPS 的分离时间短、选择性高,如表 1。

微波辅助的 ATPS 比单一的微波萃取或热回流提取的方法的萃取时间短,萃取率更高。例如:从苦参中分离生物碱^[29],从降香黄檀叶中提取染料木黄酮和鹰嘴豆芽素 A^[44]以及从葡萄种子中分离酚醛树脂^[45]等。超声波辅助的 ATPS 技术从花椒中分离木脂素^[46],比传统的热回流法萃取率高,木脂素的纯度

表1 双水相技术与其他技术的联用

Table 1 Aqueous two-phase extraction technique combined with other technologies

萃取物	双水相体系	联用技术	主要条件	结果	参考文献
生物碱	乙醇-硫酸铵	微波辅助	780 W	90 °C 5 min	回收率为 92.09% ± 0.14% [29]
染料木黄酮 鹰嘴豆芽素 A	乙醇-磷酸氢二钾	微波辅助	300 W	45.5 °C 10 min	萃取率为 0.1034% 萃取率为 0.2023% [44]
酚醛树脂	丙酮-柠檬酸铵	微波辅助		75 s	总酚的萃取率 97.10% ,黄酮类 97.90% ,原花色素 99.30% [45]
(-)-辛夷脂素	正丁醇-硫酸铵	超声辅助		40 °C 55 min	萃取率为 15.12% [46]
多酚	丙酮-硫酸铵	超声辅助	200 W	60 °C 100 min	萃取率为 11.56% [47]
茶多酚	乙醇-硫酸铵	超声辅助		45 °C 16 min	萃取率 17.58% [48]
茄肉总黄酮	乙醇-硫酸铵	超声辅助	640W	50 °C 20 min	萃取率为 1.81% [49]
黄芩苷	PEG4000-硫酸铵	溶剂浮选: 氮气流速 30 mL/min		室温 30 min	回收率大于 90% [50]

注:回收率指富集中萃取物的质量与投入原料粗提液中目标物质的质量之比;萃取率指富集中目标萃取物的质量与投入原料的质量之比。

高、选择性好,萃取时间也大大缩短。双水相浮选的方法从黄芩中分离黄芩苷^[50],黄芩苷浓集系数大、以及所需的有机溶剂量少。

3 结论及展望

ATPS 用于提取蛋白质等生物活性物质时,操作简单,体系含水量高,在萃取过程中保持物质的构象稳定,蛋白不易失活并获得高的萃取率。ATPS 萃取方法用来从中药材等固体基质中提取小分子化合物的起步较晚,它兼具固液萃取的功能和液-液萃取的分离的功能,通过选择合适的 pH、盐、有机溶剂、聚合物、离子液体或表面活性剂的种类和浓度,使萃取有较强的选择性和良好的提取效率。但是,构成 ATPS 体系的两相极性均较强,所以该法仅适合于提取分离极性较强的组分。在中药材提取中,由于多种有效成分极性跨度较大,因此该技术在多组分同时提取的应用中有较强局限性。未来,可以在双水相技术的基础上,构建三相体系或多相体系,从而实现多组分的高效同时提取和初步分离。这一技术因绿色环保将在生物工程、食品、中药制药、健康产品等领域有广泛应用。

参考文献

- [1] Albertsson P A. Chromatography and partition of cells and cell fragments [J]. *Nature*, 1956, 177(4513): 771-774.
- [2] 刘磊磊,李秀娜,赵帅. 双水相萃取在中药活性成分提取分离中的应用进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(5): 766-773.
- [3] Xavier L, Freire M S, Vidal-Tato I. Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2014, 89(11): 1772-1778.
- [4] Lakshmi M C, Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S. Extraction and purification of lipoxygenase from soybean using aqueous two-phase system [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2009, 5(1): 193-199.
- [5] 王凤薇,王道武,郭青锋,等. 双水相萃取黄连生物碱 [J].

精细化工 2015(6):642-645.

- [6] Pimentel M C B, Araujo A I, Figueiredo Z M B, et al. Aqueous two-phase system for citrinin extraction from fermentation broth [J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 110: 158-163.
- [7] 孙亚莉,张喜峰. 双水相萃取分离红豆蛋白质 [J]. *中国酿造*, 2013(6): 114-118.
- [8] Yuzugullu Y, Duman Y A. Aqueous two-phase (PEG4000/Na₂SO₄) extraction and characterization of an acid invertase from potato tuber (*Solanum tuberosum*) [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 45(7): 696-711.
- [9] Da Silva R M M, Coimbra J S D R, Da Silva C A, et al. Green extraction by aqueous two-phase systems of porcine pancreatic and snake venom phospholipase A2 [J]. *Separation and Purification Technology*, 2015, 141: 25-30.
- [10] Wu X T, Li G X, Yang H L, et al. Study on extraction and separation of butyric acid from clostridium tyrobutyricum fermentation broth in PEG/Na₂SO₄ aqueous two-phase system [J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2015, 403: 36-42.
- [11] 郑晓杰,叶兴乾,吴祥庭. 苦苣皂甙的 PEG/MgSO₄ 双水相萃取优化及其抗氧化评价 [J]. *中国食品学报*, 2015(6): 110-116.
- [12] Yang X, Zhang S, Yu W, 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.
- [13] Jiang B, Feng Z B, Liu C H, et al. J. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(5): 2878-2885.
- [14] Reis I A O, Santos S B, Pereira F D S, et al. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems [J]. *Separation Science and Technology*, 2014, 49(5): 656-663.
- [15] Jiang X M, Lu Y M, Tan C P, et al. Combination of aqueous two-phase extraction and cation-exchange chromatography: new strategies for separation and purification of alliin from garlic

- powder [J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2014, 957: 60–67.
- [16] Tan Z J, Li F F, Xu X L, et al. Simultaneous extraction and purification of aloe polysaccharides and proteins using ionic liquid based aqueous two-phase system coupled with dialysis membrane [J]. *Desalination* 2012, 286: 389–393.
- [17] Reschke T, Brandenbusch C, Sadowski G. Modeling aqueous two-phase systems: II. Inorganic salts and polyether homo- and copolymers as ATPS former [J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2014, 375: 306–315.
- [18] Reis I A O, Santos S B, Santos L A, et al. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds [J]. *Food Chemistry* 2012, 135(4): 2453–2461.
- [19] Berton P, Monasterio R P, Wuilloud R G. Selective extraction and determination of vitamin B-12 in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography [J]. *Talanta* 2012, 97: 521–526.
- [20] Wang Y, Han J, Liu J, et al. Liquid-liquid equilibrium phase behavior of iminazolium-based ionic liquid aqueous two-phase systems composed of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and different electrolytes $ZnSO_4$, $MgSO_4$ and Li_2SO_4 at 298.15 K: Experimental and correlation [J]. *Thermochimica Acta* 2013, 557: 68–76.
- [21] Wang X H, Wei X L, Liu J, et al. Study on the aqueous two-phase systems composed of surfactant, ionic liquid and water [J]. *Fluid Phase Equilibria* 2013, 347: 1–7.
- [22] Sarubbo L A, Oliveira L A, Porto A L F, et al. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol) [J]. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2000, 743(1–2): 79–84.
- [23] Chen X Q, Dong Q L, Yu J G, et al. Extraction of Tryptophan enantiomers by aqueous two-phase systems of ethanol and $(NH_4)_2SO_4$ [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2013, 88(8): 1545–1550.
- [24] Dembczynski R, Bialas W, Jankowski T. Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the $EO50PO50/K_2HPO_4$ aqueous two-phase system [J]. *Biochemical Engineering Journal* 2010, 51(1–2): 24–31.
- [25] Wu Y C, Wang Y, Zhang W L, et al. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system [J]. *Separation and Purification Technology* 2014, 124: 170–178.
- [26] He Y Z, Wang B, Zhuang Y, et al. Study on separation and purification of resveratrol in wine grape residue with aqueous two-phase extraction method [J]. *Advanced Materials Research* 2012, 550–553: 1743–1746.
- [27] Zhao P P, Lu Y M, Tan C P, et al. Aqueous two-phase extraction combined with chromatography: new strategies for preparative separation and purification of capsaicin from capsicum oleoresin [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015, 175(2): 1018–1034.
- [28] Tan Z J, Wang C Y, Yi Y J, 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.
- [29] Zhang W, Zhu D, Fan H J, et al. Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system [J]. *Separation and Purification Technology*, 2015, 141: 113–123.
- [30] Tan Z J, Li F F, Xu X L. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2013, 36(8): 1105–1113.
- [31] Han J, Hu S P, Wang Y. Extraction of oxytetracycline hydrochloride in aqueous two-phase system of acetone and ammonium sulfate [J]. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 2013, 35(1): 11–16.
- [32] Gu B H, Zheng P, Yan Q, et al. Aqueous two-phase system: An alternative process for recovery of succinic acid from fermentation broth [J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 138: 47–54.
- [33] Huang S Y, Wang Y Z, Zhou Y G, et al. Choline-like ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins [J]. *Analytical Methods* 2013, 5(13): 3395.
- [34] Zeng Q, Wang Y Z, Li N, et al. Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid [J]. *Talanta* 2013, 116: 409–416.
- [35] Chen J, Wang Y Z, Zeng Q, et al. Partition of proteins with extraction in aqueous two-phase system by hydroxyl ammonium-based ionic liquid [J]. *Analytical Methods* 2014, 6(12): 4067.
- [36] Ventura S P M, De Barros R L F, De Pinho Barbosa J M, et al. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems [J]. *Green Chemistry* 2012, 14(3): 734.
- [37] Shao M Y, Zhang X L, Li N, et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase system extraction of sulfonamides in milk [J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2014, 961: 5–12.
- [38] Cláudio A F M, Ferreira A M, Freire C S R, et al. Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems [J]. *Separation and Purification Technology* 2012, 97: 142–149.
- [39] Yu W, Liu Z L, Li Q, et al. Determination of Sudan I–IV in candy using ionic liquid/anionic surfactant aqueous two-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography [J]. *Food Chemistry* 2015, 173: 815–820.
- [40] Almeida M R, Passos H, Pereira M M, et al. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems [J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 128: 1–10.
- [41] De Brito Cardoso G, Souza I N, Pereira M M, et al. Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile [J]. *Separation and Purification Technology* 2014, 136: 74–80.

