

外电场对苯丙氨酸在双水相体系中分配的影响

刘 蕾, 骆广生, 吕阳成

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘 要: 为减小电极反应和电极距离过大对于两相电泳的影响, 设计了微小型多通道两相电泳设备, 并以苯丙氨酸为对象开展了双水相电泳的研究工作. 较系统地研究了时间、电流密度、料液初始浓度等因素对葡聚糖-聚乙二醇-水体系中的苯丙氨酸上下相浓度比、萃取率、总传质量以及电流效率的影响. 基于分析, 给出了计算最大总传质量的半经验式.

关键词: 双水相; 电泳; 苯丙氨酸

中图分类号: TQ151.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)04-0317-06

1 前 言

双水相体系水份含量高, 界面张力小, 具有良好的生物相容性, 对氨基酸、蛋白质等生物活性物质无毒害, 并有稳定保护作用, 在分离氨基酸等在有机溶剂中易失活和变性的有生物活性的物质方面具有很大的优势^[1-4]. 但对小分子氨基酸, 由于其分配系数较小, 而使得其应用受到限制.

双水相电泳技术将双水相萃取与电泳分离相结合, 一方面利用了双水相体系萃取分离的优点, 同时又利用电场强化传质分离过程. 另外液-液相界面还可以克服对流对于电泳分离的影响^[5-8]. Marando 等^[5]采用聚乙二醇和葡聚糖水溶液组成双水相体系, 将两相电泳技术应用于蛋白质(血红素、白朊)的萃取过程以及血红素与白朊的生物混合物体系的分离过程. 结果表明两相电泳技术的分离效果比相同条件下的萃取和电泳分离效果都好得多. 翟素玲等^[6-8]在间歇式设备内研究了将电场直接加入到双水相体系的氨基酸分离, 发现双水相电泳可以有效地提高分离氨基酸的能力. 但研究中由于没有电极室, 且两电极的距离很远, 造成分离过程的效率较低, 且电极反应和 pH 变化等因素也会对分离过程产生影响.

本文在前人研究工作的基础上, 设计了新型多通道两相电泳设备, 并在该设备内以苯丙氨酸为对象, 较系统地研究了时间、电流密度、料液初始浓度等因素对于两相浓度比、萃取率、总传质量以及电流效率的影响.

2 实验装置及实验方法

实验装置如图 1 所示, 主体实验设备用有机玻璃加工而成. 主体设备由 4 个腔室构成, 分别为阳极室、阴极室、上相室和下相室. 主要尺寸为: 电极室 110 mm×30 mm×5 mm, 两相室 150 mm×2 mm×2 mm, 电极使用直径 0.3 mm、长 100 mm 的铂丝, 提供近似均匀电场. 两相室之间以 0.1 μm 的微孔 PTFE 膜隔开. 上相室与阳极室相邻, 中间用阳离子交换膜隔开. 下相室与阴极室相邻, 两室用阴离子交换膜隔开. 两电极间距 14 mm. 电极液由下向上流动, 产生的气泡随电极液流动带出. 电场由 DYY-III 型电泳仪提供.

收稿日期: 2003-03-27, 修回日期: 2003-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 29476243)

作者简介: 刘蕾(1977-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士研究生, 化学工程专业; 骆广生, 通讯联系人.

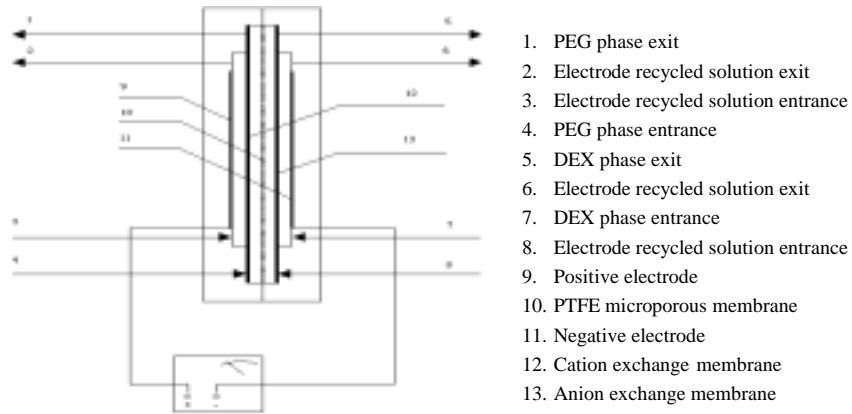


图 1 多通道连续电泳设备图

Fig.1 Multi-channel continuous electrophoresis apparatus

双水相体系为质量组成均为 5% 的聚乙二醇和葡聚糖的水溶液, 摇匀、离心分相后, 得到备用空白双水相体系, 加入一定量的苯丙氨酸, 预平衡后分相待用. 上相称为 PEG 相, 下相称为 DEX 相. 双水相体系的 pH 值用磷酸-磷酸氢二钠缓冲溶液调控为 6.00. 电极室液为磷酸-磷酸氢二钠缓冲溶液.

实验主要研究外电场对双水相单级萃取能力的影响, 因此采用料液循环的方式, 在室温下进行. 实验开始时, 首先启动用于输送电极液的恒流泵, 待充满电极室后再启动用于输送上下相流体的恒流泵, 调节两泵流速达到预定值. 待系统流动稳定后打开电泳仪, 施加一定的电流, 并开始计时. 经不同的电泳萃取时间, 从 PEG 相出口处取样, 分析其浓度, 得到 PEG 相浓度随电泳萃取时间变化的规律, 并计算得出萃取率及传质通量随电流强度变化的关系. 采用紫外分光光度法测定苯丙氨酸含量.

3 实验结果及讨论

3.1 时间对电泳萃取的影响

由于双水相体系的 pH 值为 6.00, 因此在该体系中苯丙氨酸主要以负离子形式存在, 在电泳过程中向正极方向迁移, 即向上相迁移. 实验中, 料液采用并流非循环操作. 图 2 和 3 为 PEG 相平衡浓度为 4.55×10^{-4} mol/L, DEX 相平衡浓度为 3.95×10^{-4} mol/L 时, PEG 相流速 0.2 ml/min 及 DEX 相流速 0.1 ml/min 条件下, 时间对于两相间传质性能的影响.

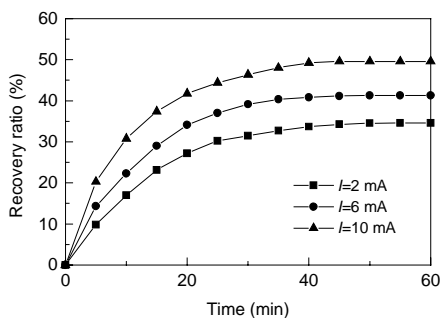


图 2 时间对萃取率的影响

Fig.2 Influence of time on the recovery ratio

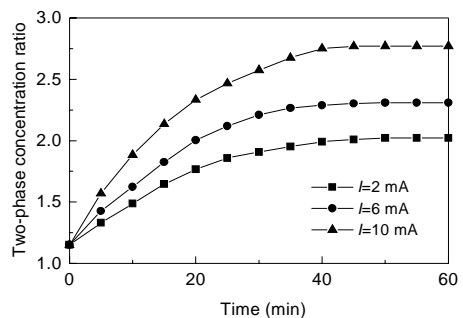


图 3 电泳时间对两相浓度比的影响

Fig.3 Influence of time on the two-phase concentration ratio

在其它实验条件不变的情况下,随着时间的延长,PEG 相中的苯丙氨酸浓度不断增加,萃取率、两相浓度比以及总传质量均随着时间的增长而增加.在两相电泳的初始阶段,苯丙氨酸的 PEG 相浓度、萃取率的变化较快;经过一段时间后,变化趋势逐渐趋于缓和.这主要是由于两相电泳的不断进行,两相间浓度差逐渐增大,形成了反向的浓差扩散;另外,随着时间的增加,界面处的苯丙氨酸浓度不断增大,在界面处形成了反向电场,使穿过界面的苯丙氨酸的速度降低.在达到一定时间之后,在电场推动下的苯丙氨酸的迁移数量与反向浓差扩散的苯丙氨酸数目达到相同,苯丙氨酸的 PEG 相浓度不再变化,两相电泳达到一个相对平衡的操作稳态.由此可以看出,当电极距离减小后,即使在很小的电流强度下,单级萃取率也可以达到 30% 以上.而且由两相浓度比可以看出,外电场可以有效地提高苯丙氨酸在两相的分配,提高双水相体系的传质分离能力.在没有外加电场时,两相的分配比仅为 1.15,而当施加外电场时,则可以提高到 2,甚至 3 左右.由图 2 和 3 也可以看出,在本实验装置内,两相的动态平衡时间可以在 60 min 内完成,即当两相电泳时间达到 60 min 后,苯丙氨酸在两相的浓度基本不发生变化,处于操作稳态状态.

3.2 电流强度对电泳萃取的影响

进一步研究电流强度对双水相电泳过程的影响,在 PEG 相平衡浓度 1.89×10^{-3} mol/L, DEX 相平衡浓度 64×10^{-3} mol/L, PEG 相流速 0.2 ml/min 和 DEX 相流速 0.1 ml/min 的实验条件下,改变电流强度,在电泳时间 60 min 后,即待两相达到动态平衡后,分别测定各条件下的 PEG 相浓度,从而计算得出苯丙氨酸的萃取率及两相浓度比,如图 4 和 5 所示.

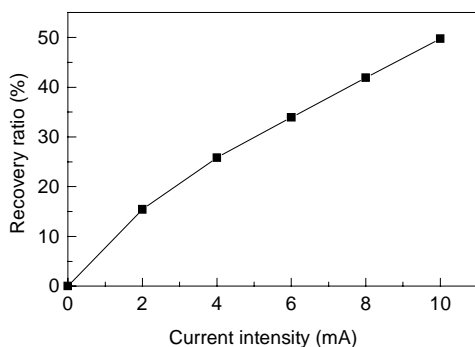


图 4 电流强度对萃取率的影响
Fig.4 Influence of current on the recovery ratio

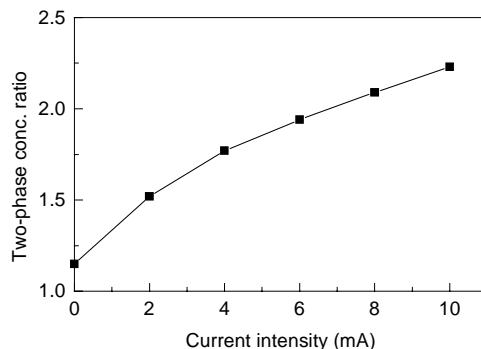


图 5 电流强度对两相浓度比的影响
Fig.5 Influence of current on the two-phase conc. ratio

由图可见,随电流强度的增大,苯丙氨酸的 PEG 相浓度显著增加,萃取率和总传质量均随电流强度的增大而增大.这是因为电流强度增大,使溶液中参与电场作用下的迁移过程的苯丙氨酸离子增多,穿过界面的苯丙氨酸数量增加;同时,相内参与电迁移过程的苯丙氨酸离子数量增多,也使得界面处的苯丙氨酸浓度上升,因此会有更多的苯丙氨酸穿过界面进入另一相,从而增大萃取率.同样原因会使苯丙氨酸在两相的浓度比随着电流强度的增加而增大.

3.3 初始浓度对电泳萃取的影响

在 PEG 相流速 0.2 ml/min, DEX 相流速 0.1 ml/min, 电流强度和电泳时间等其它条件不变的情况下,改变料液的初始浓度,在两相电泳 60 min 后,测定苯丙氨酸的 PEG 相浓度,得出萃取率及两相浓度比与初始浓度的关系,如图 6 和 7 所示.

在其它实验条件不变的情况下,苯丙氨酸的萃取率随着初始浓度的增大而增大.这主要是由

于当苯丙氨酸的初始浓度增大时,溶液中的氨基酸数目增多,从而导致有更多的苯丙氨酸离子参与到电迁移过程中来,所以有更多的苯丙氨酸迁移到 PEG 相中来.另外,溶液主体中的苯丙氨酸浓度增加,也使得界面处的苯丙氨酸数量有所增加.值得注意的是,当初始浓度增加时,在相同的实验条件下,上下相浓度比亦随之增加,由此可以看出,双水相电泳过程对于高浓度分离过程是十分有利的.

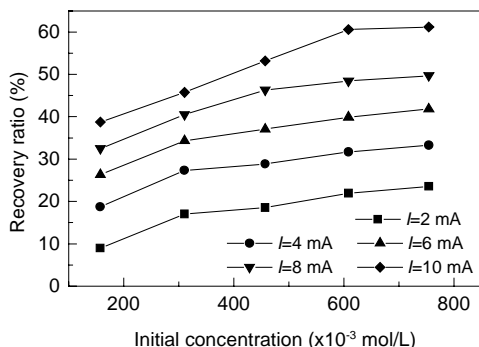


图 6 初始浓度对萃取率的影响
Fig.6 Influence of initial conc. on the recovery

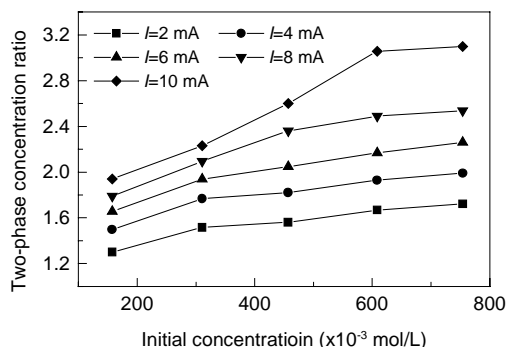


图 7 初始浓度对两相浓度比的影响
Fig.7 Influence of initial conc. on the two-phase conc. ratio

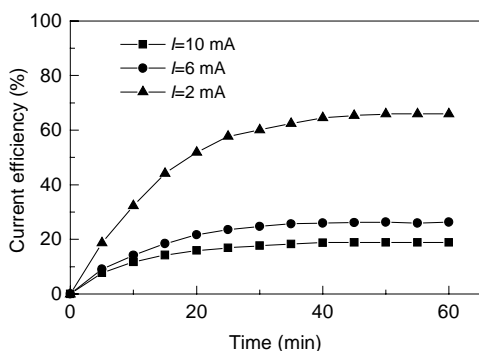


图 8 电泳时间对电流效率的影响
Fig.8 Influence of time on the current efficiency

3.4 操作条件对电流效率的影响

图 8 为当 PEG 相浓度为 1.89×10^{-3} mol/L, DEX 相浓度 1.64×10^{-3} mol/L, PEG 相流速 0.2 ml/min 和 DEX 相流速 0.1 ml/min 连续操作条件下,采用并流非循环操作时,电泳时间及电流强度对电流效率的影响.由图可看出,当采取非循环操作时,随着两相电泳的进行,电流效率逐渐升高,而电流强度增大,反而会降低电流效率.电流效率的变化规律与萃取率的变化规律相同,这是因为随着两相电泳的进行,不断有待分离组份进入 PEG 相,使得 PEG 相中的苯丙氨酸离子浓度

不断上升;同时,两相间的反向浓差扩散也随之增大,在一定程度上抵消了电泳的正向迁移作用,从而造成电流效率增大的幅度减小.在相同的两相电泳条件下,电流强度的增大则会导致电流效率的下降.在相同的电泳时间下,有更多的待分离组份进入 PEG 相,从而使反向扩散在较低电流密度时明显增大,因而电流效率低.

3.5 传质总量的极限值预测

由前面的研究可知,在双水相两相电泳过程中,传质量受到电流强度、初始浓度以及传质时间的影响.当在单级设备内两相接触时间足够长时,传质总量也是有一个限度的,它主要受电流强度和初始浓度的影响.图 9 给出了传质总量与初始浓度及电流强度的关系,可以看出总传质量基本上与初始浓度成正比,与电流强度成正比.所以可近似用下式来进行计算:

$$Q_{\max} = (aI + bI^2)C_0,$$

其中 Q_{\max} 为传质量的极大值(mg), I 为电流强度(mA), C_0 为初始上相浓度(mol/L). 经拟合计算, 得出 $Q_{\max}=(3.3\times 10^{-1}I - 1.2\times 10^{-2}I^2)C_0$. 根据该式计算结果与实验值进行比较, 如图 10 所示. 可以看出该半经验式可以较为准确地预测实验结果.

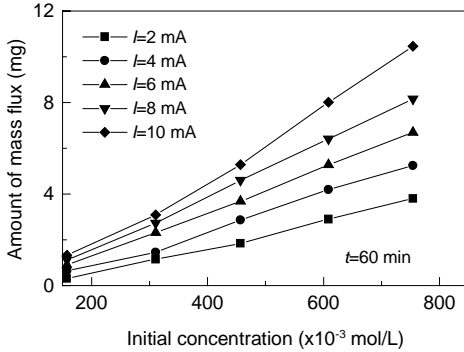


图 9 初始浓度对传质总量的影响

Fig.9 Influence of initial conc. on the amount of mass flux

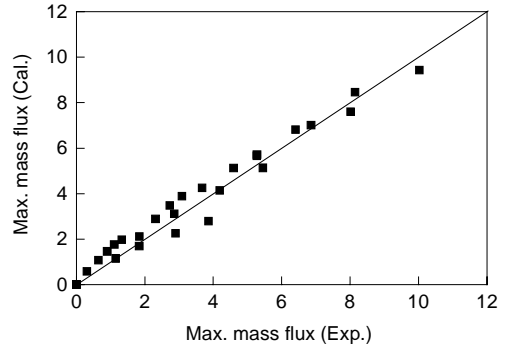


图 10 最大传质总量计算值与实验值的比较

Fig.10 Comparison of cal. value and exp. value on the max mass flux

4 结论

利用多通道两相电泳设备, 通过减小两电极距离, 并利用电极室克服电极反应对于双水相电泳分离过程的影响, 可以有效地提高双水相电泳分离苯丙氨酸的能力. 在本实验装置内, 通过外加电场可以使苯丙氨酸的单级萃取能力达到 50%. 通过延长分离时间或提高电流强度可以显著提高苯丙氨酸的萃取率. 研究发现, 由于在双水相电泳过程中存在着电泳正向迁移和浓度差引起的反向扩散, 因此在单级萃取设备内, 苯丙氨酸在两相的最终浓度比趋于一定值, 该值与初始料液浓度及电流强度有关, 该两相浓度比为双水相两相电泳的动态平衡值. 该值的大小会限制总传质量, 即在一定的操作条件下, 在单级设备内传质总量是有一定极限值的, 该值可用式 $Q_{\max}=(aI+bI^2)C_0$ 来进行预测.

参考文献:

- [1] Stichlmair J, Schmidt J, Proplesch R. Electro-extraction: "A Novel Separation Technique" [J]. Chem. Eng. Sci., 1992, 47(12): 3015-3022.
- [2] 骆广生, 周双杰, 汪家鼎. 溶剂萃取与电泳分离的耦合—电泳萃取技术 [J]. 化工进展, 1996, 2: 9-12.
- [3] Luo G S, Lu Y C, Zhu S L, et al. Recovery of Dyestuffs from Dilute Solution with Two-phase Electrophoresis [J]. Chinese J Chem. Eng., 2000, 8(1): 80-84.
- [4] Serga V E, Kulikova L D, Purin B A. Extraction of Nickel by Liquid Membranes in an Electric Field [J]. Sep. Sci. Technol., 2000, 35(2): 299-313.
- [5] Marando M A, Clark W M. Two-phase Electrophoresis of Proteins [J]. Sep. Sci. Technol., 1993, 28(8): 1562-1577.
- [6] Cheos C W, Clark W M. Electroextraction Two-phase Electrophoresis [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1995, 54: 143-157.
- [7] Oehler R D, Clark W N. β -Lactamase Recovery from *E. coli* cell Lysate via Two-phase Electrophoresis [J]. Biotechnol. Prog., 1996, 12: 873-876.
- [8] Zhai S L, Luo G S, Liu J G. Selective Recovery of Amino Acids by Aqueous Two-phase Electrophoresis [J]. Chem. Eng. J., 2001, 83(1): 55-59.
- [9] Zhai S L, Luo G S, Liu J G. Aqueous Two-phase Electrophoresis for Separation of Amino Acid [J]. Sep.Purif. Technol., 2001, 21(3): 197-203.

Influence of External Electric Field on Distribution of Phenylalanine in an Aqueous Two-phase System

LIU Lei, LUO Guang-sheng, LU Yang-cheng

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In order to overcome the influences of electrode reactions and the long distance between two electrodes on two-phase electrophoresis, a mini-multi-channel aqueous two-phase electrophoresis (mini-MATPE) equipment was designed, and the separation of phenylalanine in this equipment was investigated with dextran-polyethylene glycol-water as a working system. The influences of time, current intensity, initial solute concentration on two-phase concentration ratio, recovery ratio, total mass flux, and electric current efficiency was discussed. Based on the study, a semi-empirical correlation for predicting the maximum mass flux is suggested.

Key words: aqueous two-phase; electrophoresis; phenylalanine