

# 亲水有机溶剂/无机盐双水相萃取技术在 分离提纯生物物质中的应用<sup>①</sup>

李丽敏<sup>a, b</sup> 尚庆坤<sup>②b</sup>

<sup>a</sup>(北华大学分析测试中心 吉林省吉林市滨江东路 3999 号 132013)

<sup>b</sup>(东北师范大学化学学院 长春市人民大街 5268 号 130024)

**摘 要** 亲水有机溶剂/无机盐双水相萃取技术是一种高效温和的新分离技术,具有传统双水相萃取技术所不具备的诸多优点。综述了亲水有机溶剂/无机盐双水相萃取技术的基本原理以及该技术在分离提纯蛋白质、酶、氨基酸、维生素及天然产物活性成分中的应用,并对其在生物物质提纯应用方面的未来发展趋势作了展望。

**关键词** 双水相萃取技术; 亲水有机溶剂/无机盐; 分离提纯; 生物物质; 综述

**中图分类号:** O658.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-8138(2011)06-3073-06

## 1 引言

随着近年来生物工程技术的飞速发展,各种新型的萃取技术应运而生,双水相体系萃取技术(Aqueous Two Phase Extraction, ATPE)就是其中的一种高效而温和的生物分离新技术,自 1956 年瑞典伦德大学的 Albertsson<sup>[1]</sup>将双水相体系成功用于分离叶绿素到 1979 年德国 GBF 的 Kula 等人<sup>[2]</sup>将双水相萃取分离技术应用于生物产品的分离,及国内 20 世纪 80 年代开始对 ATPE 技术的研究,ATPE 法以其操作方便,分离效率高,不会导致被分离物质的破坏和失活等特性,被广泛应用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域的产品分离和提取<sup>[3]</sup>。过去对 ATPE 的研究大部分限于高聚物双水相体系<sup>[4,5]</sup>,有关离子液体<sup>[6]</sup>和表面活性剂<sup>[7]</sup>的 ATPE 体系也时有报道。事实上,某些能与水互溶的有机溶剂在无机盐作用下也可形成稳定的双水相平衡体系<sup>[8]</sup>,这类萃取体系的显著优点是传质和相分离速度快,原料成本低,所使用有机溶剂无毒或低毒、粘度低、易回收处理,操作简便,同时,该体系温和的环境也不会引起生物物质的损伤和破坏<sup>[9]</sup>。将其用于生物物质的分离和纯化的研究,国内外刚刚起步,但已表现出良好的分离性能<sup>[10,11]</sup>。

## 2 亲水有机溶剂/无机盐双水相萃取技术的原理

### 2.1 亲水有机溶剂/无机盐双水相体系的形成

在适当条件下,当一定浓度的某种有机物水溶液与某些无机盐水溶液按一定比例混合时,形成具有清晰界面而平衡共存的两个液相,这种现象的产生不仅与成相有机溶剂和无机盐的性质有关,还与体系的 pH 值、温度等外界条件有关<sup>[12,13]</sup>,并且此体系在一定条件下能稳定存在。目前对这一体系的相分离现象的解释主要是无机盐、有机溶剂与水分子缔合竞争的结果。由于相分离影响因素

① 吉林省科技发展项目(20090593)

② 联系人,手机:(0)13500435807; E-mail: lilm012@yahoo.com.cn

作者简介:李丽敏(1976—),女,吉林省吉林市人,讲师,硕士,主要从事分离科学研究工作。

收稿日期:2011-02-24;接受日期:2011-03-18

很多,这类体系具体形成机理和溶液理论有待于进一步探索。目前报道的亲水有机溶剂/无机盐双水相体系见表 1。

表 1 亲水有机溶剂/无机盐双水相体系类型

| 成相有机物 |       |     | 成相无机盐 |     |     |     |
|-------|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| 乙醇    | 磷酸氢二钾 | 碳酸钠 | 硫酸铵   | 碳酸钾 | 氯化钠 | 硫酸铯 |
| 异丙醇   | 磷酸氢二钾 | 氯化钠 | 硫酸铵   | 硫酸镁 |     |     |
| 正丙醇   | 氯化钠   | 氯化钾 |       |     |     |     |
| 丙酮    | 磷酸氢二钾 | 硫酸铵 | 氯化钠   |     |     |     |

2.2 亲水有机溶剂/无机盐双水相体系的特点

亲水有机溶剂/无机盐双水相体系除了具备高聚物/无机盐等双水相体系的特点之外,更具备生物技术产品的分离和纯化的独特之处:

- (1) 体系具有生物亲和性,含水量高,所用的磷酸盐、硫酸盐等无机盐对蛋白质、核酸等生物质无毒害作用,且在接近生理环境温度和体系中进行萃取,不会引起生物质的失活或变性;
- (2) 无机盐的种类和浓度、有机溶剂的种类、pH 以及温度等都能影响目标产物的分配,通过控制操作条件可以获得较高的萃取率;
- (3) 成相的有机溶剂与高聚物相比价格相对便宜,使原料成本大大降低;
- (4) 有机溶剂无毒或低毒,挥发性比高聚物大,不存在溶剂残留问题,目标产物较容易分离出来,简化操作步骤,使整个分离过程更经济;
- (5) 有机溶剂比高聚物粘度低,传质效率提高,分相速度快,降低操作费用;
- (6) 能进行萃取性的生物转化。生物反应和生物产物的提取同时进行,适于连续生产。

2.3 亲水有机溶剂/无机盐双水相体系相图

双水相体系相平衡一般由三角形相图或直角坐标相图表示。图 1 是 25℃ 下乙醇/磷酸氢二钾体系的直角坐标相图,它由一条双节线(曲线 TCB)、系线 TMB、临界点 C 组成。双节线上方是两相区,下方是单相区,即当乙醇和磷酸氢二钾的组成在曲线 TCB 的上方时,体系就会分成两相,上相(轻相 T)主要含乙醇,下相(重相 B)主要含有水,两相系统组成体现在系线 TMB 上各点处并服从杠杆定律。在临界点 C 处,两相的差别消失,此时系统很不稳定。一般采用浊度滴定法绘制相图。

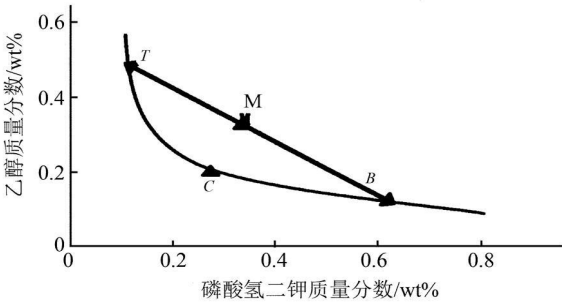


图 1 乙醇/磷酸氢二钾双水相体系相图

在临界点 C 处,两相的差别消失,此时系统很不稳定。一般采用浊度滴定法绘制相图。

2.4 亲水有机溶剂/无机盐双水相体系萃取原理

亲水有机溶剂/无机盐双水相体系的萃取与常见的水/有机相萃取的原理相似,都是通过溶质在两相间分配系数的差异进行萃取。当物质进入双水相体系后,由于存在各种相互作用,如静电作用、疏水作用、生物亲和作用,被分离物质在两相间进行选择分配。分配系数  $K$  等于物质在两相的浓度比,即  $K = C_i / C_b$ , 式中:  $C_i$ 、 $C_b$ ——分别代表溶质在上相、下相中的浓度。该体系的分配系数不是一个固定值<sup>[14]</sup>,取决于被分离物质本身的性质和特定的双水相体系的性质。影响被分离物质分配的主要因素:

- (1) pH 的影响: 体系的 pH 值变化能改变盐的解离程度,进而改变两相的电位差。而且, pH 的改变还导致生物物质(蛋白质,氨基酸)带电性质的变化, pH 与蛋白质的等电点相差越大,则蛋白质

在两相中分配越不均匀。

(2) 离子环境的影响: 加入电解质时, 其阴阳离子在两相间分配系数不同, 在相界面存在电势差, 影响带电粒子在两相的分配, 故只要设法改变界面电势, 就能控制蛋白质等电荷大分子转入某一相。

(3) 温度的影响: 温度影响双水相的相图, 进而影响溶质的分配系数。但一般来说, 当双水相体系离双节线足够远时, 温度的影响很小, 1—2℃ 的温度改变不影响目标产物的萃取分离, 但升高温度还是有利于降低体系黏度, 利于分相并节省能源开支。

(4) 被分离物质本身的特性。被分离物质的电荷、大小、形状对分配系数也有一定的影响。李丽敏等<sup>[15]</sup>考察了谷氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸 5 种氨基酸在乙醇/ 磷酸氢二钾双水相体系中分配行为, 发现氨基酸的支链结构对其分配系数影响较大, 含有非极性支链的苯丙氨酸因为有很强的憎水性, 所以倾向于分配在乙醇富集相, 分配系数大于其他 4 种氨基酸; 带正电荷的氨基酸亲水性强易分在富盐相。

因此, 只要选择合适的双水相体系, 调节各个影响因素, 可以极大地提高被萃取物质的选择性, 达到向同一相富集目的, 进而对物质进行分离和提纯。

### 3 亲水有机溶剂/ 无机盐双水相体系的应用

#### 3.1 在蛋白质、酶提取中的应用

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, 亲水有机溶剂/ 无机盐双水相萃取作为一种新型的生物分离技术, 可以避免物质失活变性, 且容易放大, 因此被生物工程作为中下游产物分离的一种新手段, 目前已应用于 BSA,  $\alpha$ -酪蛋白, 核糖核酸酶等生物物质的分离、纯化<sup>[9]</sup>。

白海鑫等人<sup>[16]</sup>选用人血清白蛋白(HAS)、 $\gamma$ -球蛋白和玉米醇溶蛋白作为模型蛋白来研究在正丙醇/ 氯化钠双水相体系中的分离行为, 考察了影响蛋白质分配因素, 如 pH、成相物质的影响及蛋白质浓度, 当蛋白质浓度大于 0.4mg/mL 时 3 种蛋白可以初步分离, 该方法简单、快速、成本低, 并具有生物相容性, 在进行电泳分析前也无须(或易于)将蛋白与成相试剂分离, 此预分离方法的建立对蛋白质组蛋白的提取和分离以及方法学等方面均有重要意义。

Chien 等<sup>[17]</sup>考察了利用醇(乙醇、正丙醇、异丙醇)/ 无机盐(硫酸铵、磷酸钾、柠檬酸钠) 双水相体系从类鼻祖伯克氏菌中提纯脂肪酶, 对 9 组双水相体系参数进行测定并考察每一体系对脂肪酶的提取能力, 当异丙醇质量分数为 16%, 磷酸盐质量分数为 16%, 外加 4.5%(w/v) 氯化钠时, 脂肪酶的分配系数可达 13.5, 回收率 99%。Zhang 等<sup>[18]</sup>对异丙醇/ 氯化钠双水相体系中酪蛋白在木瓜蛋白酶催化水解成 3 种氨基酸进行了研究, 当异丙醇质量分数为 44%, 60g/L 氯化钠体系, 加入 0.15g/L 木瓜蛋白酶, 13g/L 酪蛋白, 在 55℃, pH5.6 时转化率可以达到 99.5%, 比单纯用有机溶剂丙醇、正己烷提取及用 PEG/ 磷酸盐体系提取率高。因此可以利用这种新颖的双水相体系进行不同的酶促反应。

#### 3.2 在氨基酸、维生素及生物活性药物提取中的应用

谭平华等<sup>[10]</sup>, 用  $K_2HPO_4$  25%(质量分数)、 $C_2H_5OH$  20%(质量分数), 在 pH 13 时萃取分离 L-赖氨酸, 得出分配系数  $K$  可达 12.8, 并考察磷酸氢二钾的初始浓度和 pH 值及外加盐 NaCl 对分配系数的影响, 利用简单、易得、低成本、安全的乙醇/ 磷酸氢二钾体系, 为分离赖氨酸提供了一种新的可能。李丽敏等<sup>[15]</sup>也考察了谷氨酸, 半胱氨酸, 苯丙氨酸, 赖氨酸, 精氨酸 5 种结构和性质各异的氨基酸在乙醇/ 磷酸氢二钾体系中的分配行为及影响因素, 发现双水相体系 pH 值及氨基酸支链结

构对其分配系数影响较大。

龙文清<sup>[19]</sup>研究了丙酮/盐/水和乙醇/盐/水双水相体系萃取、荧光测定痕量维生素 B<sub>2</sub> 的新方法,该方法已成功用于片剂和注射液中维生素 B<sub>2</sub> 的测定。同时,该作者也提出一种基于乙醇/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O 双水相萃取、荧光法测定痕量  $\alpha$ -萘乙酸的新颖而简便的方法<sup>[20]</sup>,用于强化水样和米样品中痕量  $\alpha$ -萘乙酸的测定,回收率 95%—103%,相对标准偏差 2.2%—4.3%。柴化鹏等<sup>[21]</sup>提出了异丙醇-硫酸铵双水相萃取、荧光法测定微量维生素 B<sub>6</sub> 的新方法,与传统的液-液萃取和固相萃取相比,该方法具有简便、萃取率高、干扰小、低毒等显著特点。

Liu 等<sup>[22]</sup>将异丙醇-盐-水双水相体系结合高效液相色谱法成功用于人类尿液中的睾丸激素 (T) 和表睾 (甾) 酮 (ET) 的定量分析,此方法选用无毒无害低消耗的体系优于传统的液液萃取体系和固相萃取体系,为其他生物活性药物的提取分析开创新的前景。

### 3.3 在天然产物有效成分的分离提取中的应用

对于天然产物中有效特定成分的分离提取,传统的提取分离技术如溶剂浸提法、回流法、渗滤法存在成本高、产品回收率小、纯度低等问题。从有效利用资源角度而言,采用亲水有机溶剂/无机盐双水相体系萃取技术在有效成分得率、产品纯度和操作时间等方面都显示出巨大的优越性,这种高收率、低成本、操作安全的新型分离技术在提取天然产物有效成份领域中已显示出良好的应用前景。

林强和霍清<sup>[23]</sup>通过对比乙醇/硫酸铵、乙醇/磷酸氢二钾两种双水相体系,得出萃取甘草中有效成分甘草酸铵盐最佳的体系是乙醇/磷酸氢二钾体系,分配系数最大为 12.80,收率高达 98.3%;同时,也对我国传统名贵中药杜仲的主要活性成分之一的绿原酸在普通有机溶剂/无机盐体系中的分配行为进行了研究,当体系总量为 10 mL,  $V_{\text{丙酮}}$  8 mL、 $V_{\text{水}}$  2 mL、磷酸氢二钾的质量 0.8 g 时,绿原酸的收率达 99.94%,本法操作简单,溶剂易回收处理<sup>[24]</sup>。

郝志云和高云涛<sup>[25]</sup>用丙醇/硫酸铵双水相技术提取甘蔗汁中活性成分,甘蔗汁中含有大量多酚物质,具有独特的药理活性。甘蔗榨汁提取物具有良好的清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧自由基( $\text{O}_2\cdot$ )及抗脂质氧化、抑制  $\cdot\text{OH}$  对 DNA 氧化损伤作用,为甘蔗药用保健价值研究提出了有益的启示。

卢俊彩等<sup>[26]</sup>用丙酮/硫酸铵双水相体系分离纯化红花红色素,根据逆流分配原理,以补充新鲜下相的方式进行多次萃取得到了高纯度红色素。李安林等<sup>[27]</sup>研究了乙醇-硫酸铵体系用于番茄红素、迎春花黄色素和桔皮黄色素的分离,也取得较好的效果。梁华正等<sup>[28]</sup>以乙醇/磷酸氢二钾体系萃取栀子黄废液中的栀子苷,所得栀子苷纯度可达 62.12%,收率可达 96.32%,萃取后的栀子苷经  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解精氨酸显色后得到栀子蓝色素。

此外,集成化概念<sup>[29,30]</sup>为开发新型先进分离提取技术注入了新的生命力,将双水相技术与其他技术进行集成,促进了不同分离技术的交叉、渗透和融合,有效地提高了分离效率。将超声波技术与亲水有机溶剂/无机盐双水相技术耦合用于提取灯盏花中总黄酮<sup>[31]</sup>,葡萄籽抗氧化活性物质<sup>[32]</sup>及桑叶中植物多酚<sup>[33]</sup>也取得较高的萃取率。

## 4 展望

亲水有机溶剂/无机盐双水相萃取作为一种新型的、具有潜在应用价值的分离技术,以其独特的技术优势应用在生物活性物质的分离纯化领域已取得一些阶段性的成果。由于该技术还处于起步和发展阶段,还存在一定的缺陷,如两相间界面张力小易乳化问题,缺乏基础理论研究。因此本文认为未来双水相萃取技术的发展方向应集中以下几点:(1) 尽快建立一套较为完整的理论和方法

来解释和预测物质在双水相体系中的分配行为; (2) 开发更加廉价高效、环境友好、可循环利用的新型双水相体系; (3) 注重对双水相过程的工程放大及设备研究, 解决大规模萃取生物活性物质的工艺条件和设备问题, 实现工业化推广; (4) 双水相萃取技术与相关技术的耦合, 实现集成化、促进相互间的交叉、渗透和融合, 优势互补, 有效提高分离效率, 扩展双水相萃取测定应用领域。随着生物技术的发展, 必将促进双水相萃取体系的完善, 更显示出双水相分离技术在生物物质分离领域的独特优势。

## 参考文献

- [1] Albertsson P A. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments[J]. *Nature*, 1956, **177**(4513): 771—774.
- [2] Kula M R, Kroner K H, Hustedt. *Advances in Biochemical Engineering* [M]. Berlin, Heidelberg, New York: Fiechte A, 1982. 73—118.
- [3] Zaslavsky B Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications* [M]. New York: M Dekker, 1995. 447—449.
- [4] 邓凡政, 魏迎, 陈影等. 双水相体系中 Cu(II), La(III), U(VI), Ce(IV) 光谱行为及萃取分离[J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, **24**(12): 1637—1639.
- [5] Yoshikuni N, Baba T, Tsunod N *et al.* Aqueous Two-Phase Extraction of Nickel Dimethylglyoximate Complex and Its Application to Spectrophotometric Determination of Nickel in Stainless Steel[J]. *Talanta*, 2005, **66**(1): 40—44.
- [6] Gutowski E K, Broker A G, Willaue D H *et al.* Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**(22): 6632—6633.
- [7] 龙文清. 油点萃取胶束增稳室温 光法测定水样中痕  $\alpha$ -萘乙酸[J]. *分析化学*, 2005, **33**(7): 1013—1015.
- [8] 林金清, 金春英, 谭平华等. 亲水有机相-含盐水两相体系的形成机理与分相能力[J]. *应用化学*, 2005, **22**(11): 1203—1207.
- [9] Louwrier A. Model Phase Separation of Proteins Using Aqueous/Ethanol Components[J]. *Biotechnology Techniques*, 1998, **12**(5): 363—365.
- [10] 谭平华, 林金清, 陈培钦等. 亲水有机相/含盐水体萃取 L-赖氨酸[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2004, **25**(1): 71—74.
- [11] 刘奇, 李全民, 李广勋等. 乙醇-盐-水-液液萃取分离 PAR 的研究[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 1998, **26**(4): 44—47.
- [12] 王志华, 马会民, 马泉莉等. 双水相萃取体系的研究[J]. *应用化学*, 2001, **18**(3): 173—175.
- [13] 陆九芳, 李总成, 包铁竹. 分离过程化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1993. 131.
- [14] 孙彦编. 生物分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998. 59.
- [15] 李丽敏, 尚庆坤, 吕 等. 氨基酸在乙醇/磷酸氢二钾双水相体系中分配行为[J]. *分析化学*, 2007, **35**(9): 1355—1358.
- [16] 白海鑫, 刘小花, 杨帆等. 通过进一步萃取将组蛋白分为多个亚组分的蛋白质组预分离方法的建立[J]. *高等学校化学学报*, 2010, **31**(7): 1314—1321.
- [17] Chien W O, Beng T T, Siew L H *et al.* Purification of Lipase Derived from Burkholderia Pseudomallei with Alcohol/Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems[J]. *Process Biochemistry*, 2009, **44**(10): 1083—1087.
- [18] Zhang Y, Shi G Q, Zhao F S. Hydrolysis of Casein Catalyzed by Papain in *n*-Propanol/NaCl Two-Phase System[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, **46**(6): 438—443.
- [19] 龙文清. 丙酮和乙醇双水相萃取、荧光法测定痕量维生素 B<sub>2</sub>[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(10): 2098—2101.
- [20] 龙文清, 黄春芳, 刘利民等. 乙醇-硫酸铵双水相萃取荧光法测定痕量  $\alpha$ -萘乙酸[J]. *分析实验室*, 2007, **26**(5): 23—26.
- [21] 柴化鹏, 乔燕霞, 陈泽中等. 异丙醇-硫酸铵双水相萃取荧光法测定微量维生素 B<sub>6</sub>[J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2009, **25**(1): 34—37.
- [22] Liu H L, He C Y, Wen D W *et al.* Extration of Testosterone and Epitestosterone in Human Urine Using 2-Propanol-Salt-H<sub>2</sub>O System[J]. *Analitica Chimica Acta*, 2006, **557**(1—2): 329—336.
- [23] 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.
- [24] 霍清, 林强. 利用丙酮-磷酸氢二钾双水相体系分离纯化绿原酸的研究[J]. *食品科学*, 2008, **29**(11): 234—236.
- [25] 郝志云, 高云海. 甘蔗丙醇-硫酸铵双水相提取物清除活性氧及抗 DNA 氧化损伤作用研究[J]. *广西轻工业*, 2007, (7): 1—2.
- [26] 卢俊彩, 崔岩岩, 陈火林等. 丙酮-硫酸铵双水相体系分离纯化红花红色素[J]. *化学研究与应用*, 2007, **19**(6): 679—682.

- [ 27] 李安林, 杜慧, 张换平. 水-乙醇-硫酸铵体系及在分离提取天然产物中的应用[ J]. 安徽农业科学, 2007, **35**( 12): 3563—3564, 3625.
- [ 28] 梁华正, 李媛, 杨水平. 利用双水相萃取栀子黄废液中的栀子苷酶法生产栀子蓝色素的研究[ J]. 食品科学, 2009, **30**( 3): 155—158.
- [ 29] 林东强, 朱自强, 姚善泾等. 生化分离过程的新探索双水相分配与相关技术的集成化[ J]. 化工学报, 2000, **51**( 1): 1—6.
- [ 30] Hu X L, You J Y, Bao C L *et al.* Determination of Total Flavonoids in Scutellaria Barbata D. Don by Dynamic Ultrasonic Extraction Coupled with on-Line Spectrophotometry[ J]. *Analytical Chimica Acta*, 2008, **610**( 2): 217—223.
- [ 31] 那吉, 董学畅, 王雪梅等. 超声波协同丙醇-硫酸铵双水相体系提取灯盏花总黄酮的研究[ J]. 化学与生物工程, 2007, **24**( 12): 51—53.
- [ 32] 李羚, 杨雪滢, 高云涛. 双水相分离与超声提取耦合法从葡萄籽中提取抗氧化活性物质研究[ J]. 酿酒科技, 2008, ( 5): 27—33.
- [ 33] 李羚, 杨雪滢. 丙醇-硫酸铵双水相体系集成提取桑叶中植物多酚的研究[ J]. 安徽农业科学, 2008, **36**( 22): 9593—9594, 9606.

## Application of Hydrophilic Organic Solvent/ Inorganic Salt Aqueous Two-Phase Extraction Technique in Separation and Purification Biologic Substance

LI Li-Min<sup>a,b</sup> SHANG Qing-Kun<sup>b</sup>

*a*( Center of Analysis and Testing, Beihua University, Jilin, Jilin 132013, P. R. China)

*b*( Faculty of Chemistry, Northeast Normal University, Changchun 130024, P. R. China)

**Abstract** A novel extraction and separation technique, hydrophilic organic solvent/salt aqueous two-phase extraction technique, is kindly and efficiency, that has many advantages comparison with some traditional methods. The basic principle of the technique and it was applied in the fields such as separation and putification of protein, enzyme, amino acid, vitamine and natural products that were summarized, meanwhile, the development of separation and purification biologic substances in the future was introduced.

**Key words** Aqueous Two-Phase Extraction; Hydrophilic Organic Solvent/Inorganic Salt; Separation and Purification; Biologic Substances; Summary

### 版面费和赠书(刊)招认的通知

1. 本刊到帐的版面费,现有多笔不知道是谁的,因为没有收到作者的《版面费已经汇出的通知》。不知道是谁交的版面费,就无法使这些作者的稿件进入编辑出版程序,从而影响论文出版。因此,请没有发出《版面费已经汇出的通知》的作者,尽快发出《版面费已经汇出的通知》,以便本刊确认。

本刊在收到作者的《版面费已经汇出的通知》和版面费后,会立即回复《版面费已经收到的通知》。因此,没有收到本刊发出的《版面费已经收到的通知》的作者,请再次发出《版面费已经汇出的通知》,一直到收到本刊发出的《版面费已经收到的通知》为止。

发出《版面费已经汇出的通知》的重要性,本刊在《录取通知》的附件《版面费已经汇出的通知》中就已声明。因为有的银行只通知汇款人的汇款日期和汇款金额,不告知汇款人的姓名,所以没有收到作者发出的《版面费已经汇出的通知》,本刊就不知道来款是谁的。特此再次说明。

2. 本刊收到多份赠书(刊)邮寄所需的邮票,但作者未告知收件人的姓名,或详细地址,或赠书(刊)的种类,无法邮寄。因此,凡没有收到赠书(刊)的作者请速与编辑部联系(邮箱: gpsyys@periodicals.net.cn)。

光谱实验室编辑部