

國立交通大學
應用化學研究所

碩士論文

應用親和性染料於離子液體中進行蛋白質
液相/液相萃取

Using Affinity Dye in Ionic Liquid for
Liquid/liquid Extraction of Proteins



研究生:劉霆琪

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十六年六月

應用親和性染料於離子液體中進行蛋白質
液相/液相萃取

Using Affinity Dye in Ionic Liquid for
Liquid/liquid Extraction of Proteins

研究生:劉霆琪

Student: Tin-Chi Liu

指導教授:余艇 博士

Advisor: Dr. Tiing Yu

國立交通大學

應用化學研究所



A Thesis

Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
in Applied Chemistry
June 2007
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十六年六月

應用親和性染料於離子液體中進行蛋白質 液相/液相萃取

學生：劉霆琪

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學所

摘要

室溫離子液體 (Room Temperature Ionic Liquids, RTILs) 由於擁有低蒸氣壓、高熱穩定性及範圍寬廣的極性、導電度等特殊的物理與化學性質，並且對實驗環境較為安全，在近年來引起了廣泛的研究熱潮。染料配體 (affinity dye ligand) 常應用於親和性管柱層析法中，對蛋白質進行純化處理。在本研究中發現，選擇在離子液體BMIM-PF₆中具有良好溶解度的親和性染料Procion Blue MX-R，可成功將溶菌酶 (lysozyme) 從水溶液中萃取進入離子液體；在pH 7的條件下，正向萃取率最高可達 65%。藉由 1 M濃度氯化鈉的添加改變溶液離子強度，溶菌酶被反萃出來回到水溶液中，其回收率約為 40%。本實驗並嘗試以Procion Blue MX-R萃取不同種類蛋白質：細胞色素c，牛血紅素、卵白蛋白，發現皆無萃取效果，由此得知此萃取方法對蛋白質的親和力具有相當程度的擇擇性，或可為蛋白質液相/液相萃取技術提

供了一個新的方式。



Using Affinity Dye in Ionic Liquid for Liquid/liquid Extraction of Proteins

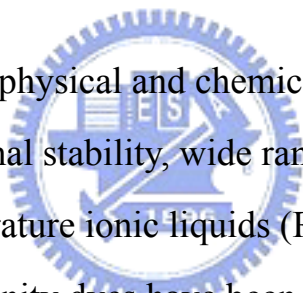
Student: Ting-Chi Liu

Advisor: Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry

National Chiao Tung University

Abstract



Owing to the special physical and chemical properties, such as low vapor pressure, high thermal stability, wide range of polarity and high conductivity, room temperature ionic liquids (RTILs) have attracted wide research interests. The affinity dyes have been employed in affinity chromatography for protein purification. In this study, we explored that lysozyme could be transferred from aqueous phase into an ionic liquid BMIM-PF₆ with the aid of affinity dye procion blue MX-R in BMIM-PF₆. The forward extraction efficiency (from the aqueous solution to the RTIL phase) reached ~65 % while the aqueous solution was at pH 7. The total lysozyme recovery reached ~40 % while a buffer solution with 1 M sodium chloride was used for the back extraction. The same dye-in-RTIL solution was found unable to extract cytochrome c, hemoglobin, and albumin. This technique may provide a new approach for protein liquid/liquid extractions.

謝誌

兩年的研究所生涯終於要結束了，首先要先感謝恩師余艇的指導，讓我學習到如何設計與進行實驗，培養了自己發現問題的邏輯思考能力，並且主動積極地尋求解決的方法。感謝陳月枝教授與凌永健教授在百忙之中抽空前來擔任口試委員，並對我的研究提出許多意見與改善的方向。

接下來要感謝一起走過這兩年的許多人~實驗室的大家長淑慧學姐，妳是一盞明燈、開朗的淑嫻帶給大家歡樂和笑聲、變 man 的好先生國軍 JC、一起為順利畢業的目標打拚努力，並且告訴我許多實驗注意事項的革命伙伴鈺評、出手大方涼爽度第一名的趙士宗、宅女大變身尚未成功同志仍需努力的阿爆、網拍合購夜唱最佳拍擋的培真、熱心幫忙實驗室事務的鈺君、隔壁實驗室的眾男丁們、交大室外場的球友們、漫爵的大家，尤其是總在緊要關頭幫我作法的師父 XD。

還有我那遠在台南的 soulmate 小涂，感謝妳陪我度過與大魔王和大師兄抗爭的黑暗時期，我們要繼續互相扶持下去。喔，老是當我歐兜邁司機的便當、最近剛從三皇外帶窗口隱退的老吳、一張嘴巴行走天下的姜小捲，感謝妳們的陪伴，我的心跟台南的太陽一樣溫暖。

最後要感謝一手把我拉拔長大的劉爸，養了 24 年的米蟲終於要擺脫過去的身份，邁出人生的第一步，請接受我的叩首行禮（咚）。

目錄

中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 背景與理論介紹.....	3
2-1 離子液體.....	3
2-1-1 離子液體的介紹.....	3
2-1-2 離子液體的特性.....	6
2-1-3 離子液體的應用.....	8
2-2 蛋白質萃取方法.....	11
2-2-1 雙水相溶劑系統 (aqueous two phase solvent system)	11
2-2-2 反微胞萃取法 ^{45、46}	12
2-2-3 親和層析法 ⁵³ (affinity chromatography).....	14
2-2-4 利用染料配體萃取蛋白質 ⁵⁸	15

2-3 蛋白質簡介	18
2-3-1 蛋白質的組成與結構	19
2-3-2 溶菌酶(Lysozyme) ⁶⁴	19
第三章 實驗部分	20
3-1 試藥	21
3-1-1 合成BMIM-Cl與BMIM-PF ₆	21
3-1-2 配製緩衝溶液的試劑	21
3-1-3 蛋白質分子	22
3-1-4 染料分子	22
3-2 儀器	23
3-3 實驗流程	23
3-3-1 合成IL BMIM-PF ₆ ⁵⁹	24
3-3-2 配製萃取相	25
3-3-3 比較萃取時間對萃取效率的影響	26
3-3-4 萃取溶菌酶	27
3-3-5 pH值對蛋白質萃取的效應	27
3-3-6 離子液體重覆使用的效率	29
3-3-7 比較不同蛋白質的萃取率	29
3-3-8 萃取蛋白質混合物	29



第四章 結果與討論.....	30
4-1 配製萃取相	30
4-2 比較萃取時間對萃取率的影響	34
4-3 萃取溶菌酶	35
4-4 pH值對蛋白質萃取的效應	41
4-5 離子液體重覆使用的效率	45
4-6 比較不同蛋白質的萃取率	47
第五章 結論.....	51
參考文獻.....	52



圖目錄

圖 1、常見的離子液體陽離子形式.....	3
圖 2、離子液體的合成步驟.....	4
圖 3、染料分子主要的組成構造.....	16
圖 4、常見染料分子的reactive group.....	16
圖 5、常見染料的chromophore	17
圖 6、Procion Blue MX-R的分子構造	18
圖 7、Bmim-PF ₆ 的合成示意圖	25
圖 8、配製萃取相示意圖.....	26
圖 9、Procion Blue MX-R 在水相及BMIM-PF ₆ 中的.....	33
圖 10、Procion Blue MX-R的校正曲線圖 (at 587 nm)	33
圖 11、攪拌時間對萃取率的影響.....	34
圖 12、不同染料濃度含量的萃取相對不同濃度的溶菌酶水溶液.....	36
圖 13、不同染料濃度含量的萃取相進行反向萃取的結果	36
圖 14、比較離子液體相中，清洗前加入的染料含量與經過清洗後真實存在的染料含量.....	38
圖 15、NaCl濃度對溶菌酶反向萃取效果的影響.....	40

圖 16、不同pH值溶菌酶水溶液的正向萃取效率.....	43
圖 17、分別以無鹽類和 1M NaCl不同pH值的緩衝溶液進行	43
圖 18、Procion Blue MX-R在不同pH值水相中的分布，	44
圖 19、離子液體使用次數對溶菌酶萃取效果的影響	46
圖 20、分別對溶菌酶、卵白蛋白、牛血紅素	49
圖 21、將溶菌酶與卵白蛋白混合後進行萃取	49
圖 22、將溶菌酶與牛血紅素混合後進行萃取	50
圖 23、將溶菌酶與細胞色素c混合後進行萃取	50



表目錄

表 一、數種RTILs的結構、性質以及其用途。	5
表 二、不同染料濃度含量的萃取相對不同濃度的溶菌酶水 溶液.....	37
表 三、不同染料濃度含量的萃取相進行反向萃取的結果 ..	37
表 四、萃取相清洗前後濃度的比較.....	38
表 五、離子液體使用次數對溶菌酶萃取效果的影響	46



第一章 緒論

1-1 前言

近年來，離子液體在化學方面的應用非常廣泛。由於離子液體具有低蒸氣壓、低熔點、不可燃性、耐強酸、高熱穩定性、高導電度、電化學性佳及較廣的液體溫度範圍(-96 ~ 400 °C)等特殊性質²⁰，可用來代替一般所使用的揮發性有機溶劑(volatile organic compounds VOCs)，應用在許多化學領域。離子液體可在常壓下操作而不揮發，不但可以降低操作成本，還能消除揮發性有機溶劑對環境的污染，並可避免實驗人員暴露於有機溶劑氣體下的風險，再加上離子液體可被回收後再使用，相當符合“綠色化學”發展的概念，所以離子液體被認為是一種新的綠色溶劑“green solvent”。

液相-液相萃取是一種常被用來分離化合物的技術，傳統上使用有機溶劑和水溶液形成不互溶的兩相，藉由不同化合物在兩相的分佈不同，使得分離/純化的目的可以達到。由於離子液體的種類繁多，其親水性或疏水性質，可利用替換或修飾離子液體的陽離子或陰離子而改變，所以我們可以很容易地找到疏水性較強的離子液體種類與水溶液形成兩相，使用在液相-液相萃取上，進而取代揮發性有機溶劑的使用。

離子液體已知被應用來萃取金屬離子、有機化合物、胺基酸、蛋白質等物質，對於未來分離純化真實生物樣品方面，會有極佳的潛力。

1-2 研究動機

已有研究發現，胺基酸處在較低pH值時，會從水層中被萃取進離子液體相；若在離子液體相中加入特定的萃取劑，還可成功地萃取金屬離子³³⁻³⁵、蛋白質^{39,40}、甚至是雙股DNA(dsDNA)³⁸。

本實驗嘗試在 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate BMIM-PF₆中，加入對蛋白質具有親和力的染料 (affinity dye) 作為萃取劑，期望拓展離子液體在液相/液相萃取方面的應用。

第二章 背景與理論介紹

2-1 離子液體

2-1-1 離子液體的介紹

廣義地說，離子液體(ILs)是一種熔點低於 100°C 的低溫熔融鹽類，亦可說是液體狀的離子鹽類，或是液體狀的電解質。室溫型離子液體(Room-Temperature Ionic Liquids, RTILs)則是指在室溫下即可呈現液態的有機熔融鹽類；由於其特殊的物性、化性、以及組成的多變性，使得離子液體在有機合成、綠色化學、以及分析化學等方面，都成為熱門的研究主題。

常見的室溫離子液體，大多是由具有氮或磷原子和不對稱取代烷基的陽離子(e.g., N,N-dialkylimidazolium、N-alkylpyridinium、Alkylammonium、Alkylphosphonium，結構如下圖 1)¹，

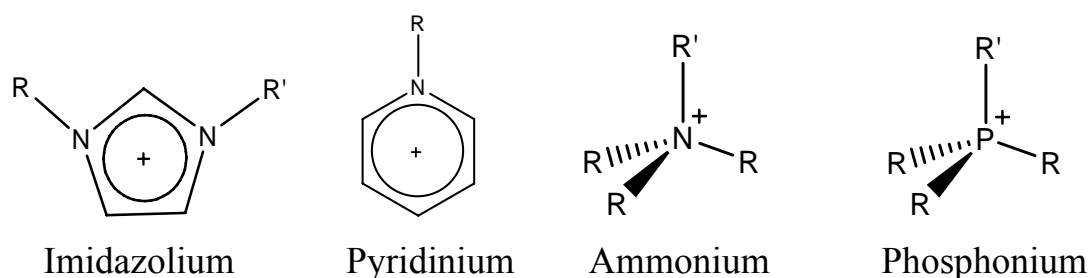


圖 1、常見的離子液體陽離子形式

與無機陰離子，通常是鹵素或含金屬的離子(e.g. Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、

PF₆⁻、AlCl₄⁻、Al₂Cl₇⁻)所構成的。改變陽離子與陰離子的組成，可得到具有不同性質的離子液體；或是單純改變陽離子上的烷基類型，也可影響有機物在離子液體中的溶解度。例如 1-octene對於不同的 tri-n-alkylmethylammonium tosylate melts ()，其溶解度隨著n變大而增加²；而在利用冠狀醚 (crown ether) 萃取鹼金屬到 1-alkyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate (C_nMIM-PF₆) 時，其萃取效果隨著烷基碳鏈長度增加而愈好³。不同的取代烷基可由 alkylation reagent 經反應而得，不同形式的陰離子則可藉由簡單的離子交換步驟得到，如下圖 2：⁴

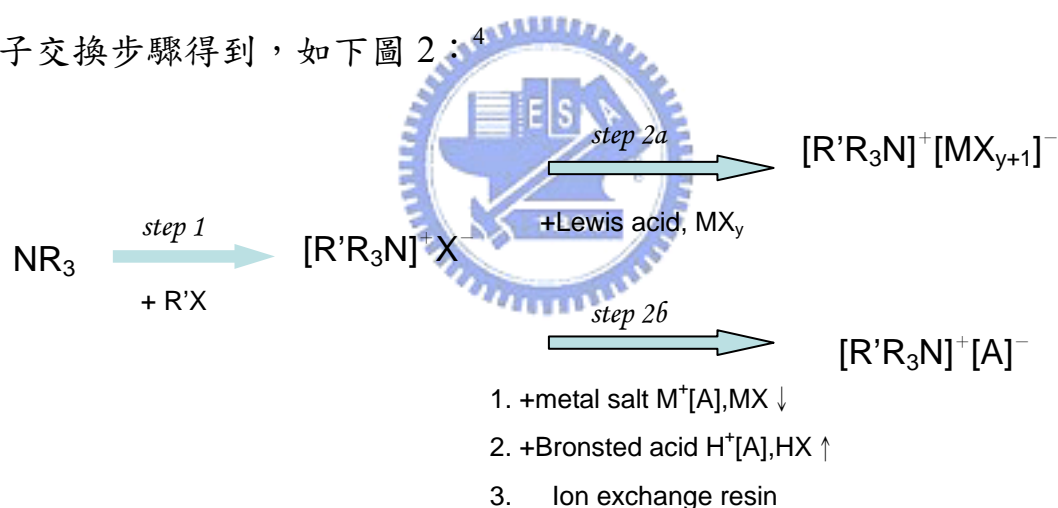
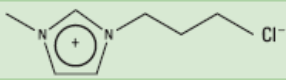
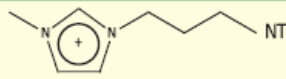
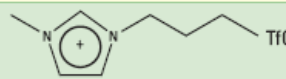
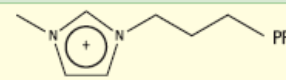
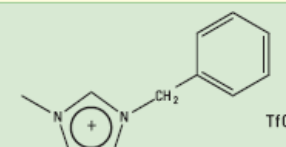
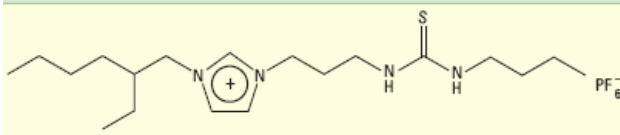
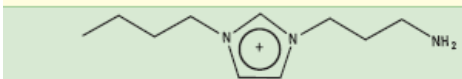
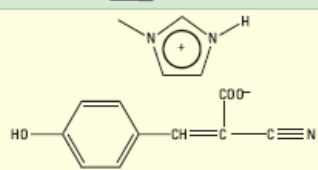
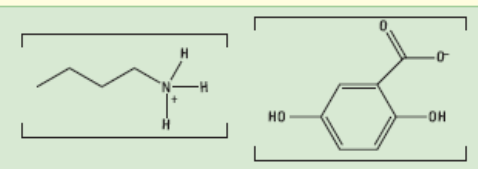
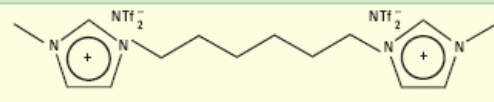
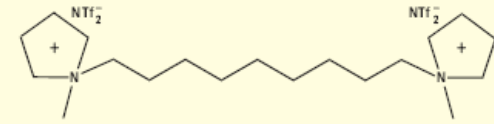
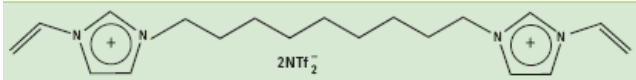


圖 2、離子液體的合成步驟

這些方法在製備上都不算困難，所以可以輕易合成出不同形式、性質的離子液體(表一)⁵，也因此使離子液體的應用範圍更加廣泛。

表一、數種 RTILs 的結構、性質以及其用途。

Structure	Name or function	Mp (°C)	Density (g/cm ³)
	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIM-Cl)	65	1.10
	1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethyl)sulfonylimide (BMIM-NTf ₂)	-4	1.43
	1-Butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate (BMIM-TfO)	16	1.29
	1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIM-PF ₆)	-8	1.36
	1-Benzyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate (triflate)	27	1.30 (30 °C)
	Task-specific IL	-17.4 glass transition	NA
	Task-specific IL	NA	NA
	MALDI matrices Methylimidazolium α-Cyano-4-hydroxycinnamate	NA	NA
	MALDI matrix 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine	NA	NA
	C ₆ (mim) ₂ -NTf ₂	>-14, <-4	1.52
	C ₆ (mpy) ₂ -NTf ₂	>-8, <0	1.41
	Unnamed	NA	1.47

2-1-2 離子液體的特性

離子液體是熔融態的有機鹽類，熔點低、在室溫下的揮發性很低、不易燃、有高導電度、具有範圍很廣的黏性與工作範圍（亦即熔點、沸點差異大）、並可與不同類型的化合物進行媒合作用(solvation interaction)。

離子液體具有許多性質而適合做為研究電化學的溶劑，例如與水溶液相較時，有較寬廣的電位窗（potential window）及導電度。在選擇一溶劑來當電化學的探討時，最先考慮的是此溶劑的電位窗是否合適，而電位窗主要決定於溶劑本身是否容易被還原或氧化，就離子液體來說，其電化窗的負電位受限於組成中陽離子的還原電位，而正電位則受限於陰離子的氧化電位，目前文獻報導中具有最寬廣電位窗的離子液體⁶為 $[\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)_3\text{N}][(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2]$ ，用玻璃碳電極掃描時，其電位窗可達 5.7 V。

離子液體的密度與陽離子團的大小較有關，一般而言，陽離子團愈大，密度相對減小；至於離子液體的黏度主要取決於要取決於離子液體分子間形成氫鍵的趨勢，及凡得瓦耳力的強弱而定；離子液體的熔點則與陽離子的對稱性、陰離子團大小有關^{4、5}。

雖然離子液體的結構與其性質之間的關聯性，尚未被完全了解，但是化學家利用 empirical solvent polarity scales 此種方式研究，初步顯

示大部分的離子液體擁有與與短碳鏈醇類相似的極性^{7,8}。然而，不同陰、陽離子所構成的離子液體，其疏水性與親水性並不盡相同。舉BMIM-PF₆與BMIM-Cl為例，此兩化合物以相同陽離子與不同陰離子化合，BMIM-PF₆與水不互溶，具有相當的疏水性，而BMIM-Cl卻可與水以任何比例互溶，具有相當的親水性。研究結果顯示，離子液體的陰離子主要決定與水的互溶性，但陽離子則會影響疏水性的程度^{8,9}。

由於單純使用極性來解釋離子液體的特性，並無法說明為何不同組合的陰陽離子所構成的離子液體，會表現出不同的行為^{7,10,19,59}，於是便有學者試著用Abraham solvation-parameter model來解釋^{10,11}，在這個model裡，每一種媒合作用力參數都被考慮進去了，其方程式如下：

$$\ln k = c + rR_2 + s\pi_2^H + a\alpha_2^H + b\beta_2^H + l \log L$$

r 、 s 、 a 、 b 、 l 分別代表離子液體與溶質的 π 電子和未鍵結電子的作用力、離子液體的偶極矩（dipolarity）或極化程度（polarizability）、氫鍵鹼度（hydrogen-bond basicity, 接受氫鍵的能力）、氫鍵酸度（hydrogen-bond acidity, 提供氫鍵的能力）、分散力（dispersion forces）。藉由個別的作用力參數，可以較為成功地描述離子液體的

特性，有助於了解離子液體的結構與其性質之間的關聯性¹⁰，進而依研究者的期望，選擇或合成出特定性質的離子液體來作應用；所以離子液體也被稱為“設計者溶劑（designer solvents）”¹²。

2-1-3 離子液體的應用

離子液體近年來引起熱烈的研究與討論，主因除了其多樣的性質與廣泛的應用範圍外，環保意識的覺醒，使得學者們開始致力於“綠色化學”的發展，也是因素之一。所謂綠色化學，就是設計較安全的化學品或化學反應過程來取代危險物質的使用，或是盡可能減少與消除這些危險物質對環境的衝擊。

傳統有機溶劑(volatile organic compounds, VOCs)的高揮發性與可燃性極易造成環境污染與危險，在使用上必須加上許多安全性考量。離子液體的特性包括極低的蒸氣壓力，具熱穩定性且不可燃，以及對大部分有機或無機金屬化合物都有極佳的溶解度，傳統有機溶劑則常使化學家受限於溶解度的問題，對此，離子液體提供了一種完全不同的選擇。又由於熱穩定性佳，把產物蒸餾出來後，離子液體還可以重複使用，達到溶劑減量的目的，有效減少化學廢棄物的產生。目前離子液體在電化學、分離技術、合成化學、材料化學等方面，都有大量的應用。

早在 1914 年就有人合成出在低溫時是液態的離子化合物，ethylammonium nitrate。1948 年，Hurley和Wier發展出第一種chloroaluminate ion形式的離子液體，並拿來當作電鍍鋁的浸漬液¹³，但是卻沒有更進一步的相關研究。直到 1980 年代，Osteryoung利用aluminum chloride 和 1-alkylpyridinium chlorides的混合物^{14、15}，和Wilkes成功製備出chloroaluminate melts後¹⁶，離子液體就被大量的應用在電化學。Seddon和Hussey則開始使用chloroaluminate melts^{17、18}，利用其非水溶液、極性溶劑性質做過渡金屬錯合物方面的研究。

有機合成方面，離子液體具有提高有機反應選擇性和產率的特性，以及可與催化劑形成共催化劑，增加催化的活性、選擇性與穩定性等特點，例如將離子液體作為兩相催化系統（biphasic catalysis system）中的有機層，在離子液體中進行Diels-Alder反應，可選擇性地反應生成endo產物，再把催化劑從離子液體中回收，可繼續進行催化¹。有些酵素在離子液體中能保有相當好的催化活性^{21、22}，且能在高溫時展現優良的熱穩定性²³，開拓了應用離子液體當作生化催化反應介質的新領域^{20、24、25}。

離子液體具有熱穩定性、高黏度、容易填充在管柱中等作為GC靜相所需的條件^{10、26}，並具有可分離極性與非極性物質的雙重性質（dual-nature）^{26、27}；選擇適當的離子液體作靜相，甚至可有效分離

chiral alcohols、chiral sulfoxides、acetylated amines、chiral epoxides等鏡像異構物^{28、29}。

應用於質譜方面，離子液體的低蒸氣壓、可吸收雷射光而不分解、對分析物的溶解度高於一般固態基質等優點，使其可用來作為MALDI的基質。雖然使用傳統的imidazolium-based ILs為基質無法偵測到蛋白質訊號，利用傳統MALDI基質CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)形成的離子液體，可有效提高訊號強度、降低偵測極限³⁰；對低分子量的DNA oligomers、oligonucleotides、peptides、small proteins，還可進一步作定量偵測^{31、32}。

在萃取應用方面，利用crown ether可將金屬離子萃取到離子液體中³³⁻³⁵；合出具有O、S、N的離子液體當金屬螯合劑，萃取水層中的Hg²⁺、Cd²⁺³⁶；用離子液體當介質，將金奈米及金奈米棒由水相轉移至離子液體相³⁷；含有方盃化合物(calixarenes)的RTIL可萃取Ce⁺和Ag⁺^{34、35}；近來，則有研究者成功應用離子液體萃取胺基酸⁶¹、雙股DNA³⁸與蛋白質細胞色素c^{39、40}。

2-2 蛋白質萃取方法

近年來由於生物科技的進步，藉由 DNA 重組技術及蛋白質工程，人類可以生產製造一些重要的生物分子，然而如何從細胞培養基中分離、純化及濃縮這些生物分子就成為一個重要的課題。傳統上分離生物分子的方法，是先將細胞培養基中的細胞先打碎，利用離心粗略分離雜質，然後利用層析法 (chromatography) 或傳統凝膠電泳 (SDS-PAGE) 進行樣品的分離，可是這種方法只能分離少量的樣品，並無法分離大量的樣品。此後才漸漸發展出雙水相溶劑系統、反微胞萃取及親和管柱層析法等，能提供大量分離純化生物分子的技術。



2-2-1 雙水相溶劑系統 (aqueous two phase solvent system)

雙水相溶劑系統是Albertson⁴¹於1958年所提出的，雙水相溶劑系統之形成為：在水溶液中加入兩種物化性質相異之高分子聚合物 (如：polyethylene glycol、Dextran) 或鹽類 (如：磷酸鹽、檸檬酸鹽)，這些不同性質之大分子分別與水分子產生交互作用力而形成兩相。利用目標物與兩水相分子間不同作用力產生分配(partition)行為而達純化分離的效果。一般來說，分子在兩相的分配受許多因素影響⁴²⁻⁴⁴，主要受所使用的高分子聚合物種類、緩衝溶液濃度、pH值及溫度所

決定。

以雙水相溶劑系統這種技術，可萃取分離天然物中之活性成分，用以製備藥效確實，高度有效活性成分的天然活性組合物；此系統也已被大量應用在蛋白質和細胞的萃取分離及純化上⁴²。

2-2-2 反微胞萃取法^{45、46}

所謂反微胞萃取法，是利用界面活性劑溶於有機溶劑後形成親水端朝內的反微胞，藉由反微胞將溶於水溶液中極性大的分子萃取至有機溶劑中，然後再反萃取至另一水溶液中，以達到分離純化的目的；反微胞萃取法除了具有分離大量樣品的能力外，分離後能保有生物分子的活性，是其最受矚目之處，因此已有文獻發表利用反微胞萃取法來分離胺基酸^{47、48}或蛋白質^{45、46}。

萃取物在水相及反微胞的分佈，會受到水溶液的狀態所影響，如pH值、離子種類、或離子強度（ionic strength）。此外，萃取物的性質，或是萃取時的溫度，亦會影響反微胞萃取的效率。

(1) pH值

水溶液的pH值會影響蛋白質表面的電荷分佈（charge distribution over the protein surface），而蛋白質表面電荷與界面活性劑親水基之間的庫倫靜電力決定了反微胞萃取法的效率。使用陰離子型界面活性劑

萃取蛋白質，水溶液的pH值需要小於蛋白質的等電點(isoelectric point, pI)⁴⁹；反之，使用陽離子型界面活性劑，水溶液pH值則需要大於蛋白質等電點⁵⁰。當蛋白質處於過酸或過鹼的水溶液中，會使蛋白質變性(denaturation)，造成反微胞萃取上的困難⁴⁵，並且導致蛋白質的活性喪失。

(2) 離子種類及離子強度

當水溶液的離子強度增加時，在蛋白質表面與界面活性劑親水基之間產生遮蔽效應(Debye screening effect)，造成蛋白質與界面活性劑間的靜電作用力降低，並且會產生水核較小的反微胞，因此降低反微胞萃取的效率^{51、52}。一般而言，當離子的電荷相同時，離子半徑越大，則遮蔽效應越明顯；當離子半徑相同時，其電荷越大，則遮蔽效應越強。離子強度增加會造成正向萃取率下降，但是卻會造成反向萃取效率增加。另外，當水溶液中的離子強度過低時，界面活性劑、水溶液及有機溶劑就會產生乳化分狀態，導致反微胞無法形成，並且水溶液及有機溶劑無法分離，造成反微胞萃取上的困難。

2-2-3 親和層析法⁵³(affinity chromatography)

親和層析 (affinity chromatography) 也稱為功能層析 (function chromatography)、生物專一性吸附 (biospecific adsorption) 或是選擇性層析 (selective chromatography)。所謂的親和力，乃是指生物大分子和其配體 (ligand) 之間形成可逆結合的能力，如酵素和它的受質 (substrate)、抗體和抗原、激素和受體 (receptor)、RNA 和其互補的 DNA 等，親和層析就是根據這種親和力發展出來的純化方法，例如將酵素的 substrate 接在固體支持物上，再用此支持物填裝管柱，當含有這種酵素的樣品溶液通過管柱時，酵素便被吸附在管柱上，其它的蛋白質及雜質不被吸附，全部從層析柱流出，最後使用適當的緩衝溶液，將欲分離的酵素從柱中洗出來，通常採用改變 pH 值、離子濃度或緩衝液的組成，使其親和力降低，或用較高濃度的配體溶液亦可將管柱上所吸附的物質洗出，此配體可以與管柱上的相同或相異；經過以上這些處理步驟便能得到純化的酵素。

欲進行親和層析，配體的選擇相當重要，配體可以是輔酶、酶的抑制劑或抗體，具備的條件如下：

1. 能與欲分離的物質進行專一性的結合，親和力愈大愈好。
2. 配體與分子結合後，在一定的條件下又能解離，而且不會因解離破壞原本的生物活性。

3. 配體上具有能連結到固體支持物上的團基，結合後不影響它與
欲分離物質的結合專一性。

使用染料作為親和力配體，其優勢在於價格便宜，取得方便，選擇多樣⁵⁴，而且經過修飾作用將其固定在吸附的基質上，即可應用在親和層析法⁵⁴⁻⁵⁷或雙水相系統⁵⁸上來進行酵素或蛋白質分離純化。

2-2-4 利用染料配體萃取蛋白質⁵⁸

(1) 親和分配原理(principle of affinity partition)

親和力的構成因素主要可分為兩種，第一種為兩分子間因構形互補所造成的吸引力，這是由凡得瓦爾力所貢獻；第二種為蛋白質本身構造所能提供給配體的氫鍵鍵結、親疏水性、靜電吸引力等，若將蛋白質在雙水相系統中的分配以係數來表示的話，式子如下：

$$\ln K_p = \ln K_{el} + \ln K_{conf} + \ln K_{hphob} + \ln K_{hphil} + \ln K_{lig} + \dots$$

分別代表靜電作用力 (electrostatic effect)、蛋白質構形的影響 (conformational state of protein)、疏水性作用力 (hydrophobic interactions)、親水性作用力 (hydrophilic interactions) 以及配體所提供的吸引力 (specific ligand interactions)。當蛋白質與配體間的作用力夠強時，蛋白質在萃取相中的分布，主要貢獻是來自於配體與蛋白質

質錯合物的形成。

染料配體由於其整體構形（親疏水性基團、帶電荷區域、結構的易曲性）類似於可與蛋白質的部分區域（如：nucleotide-binding domain）進行鍵結的輔酶或受質，使其成為類生物專一性

（pseuso-biospecific ligands）的親和性物質。常用的染料構造通常如下圖 3：

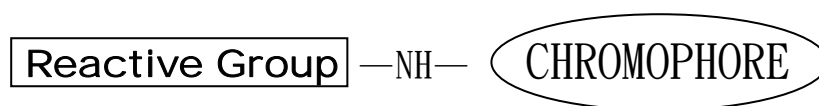


圖 3、染料分子主要的組成構造

Reactive group 有 Monochlorotriazine（Procion H, and Cibacron）、Dichlorotriazine（Procion MX）、Vinylsulfone（Remazol）等（圖 4）：

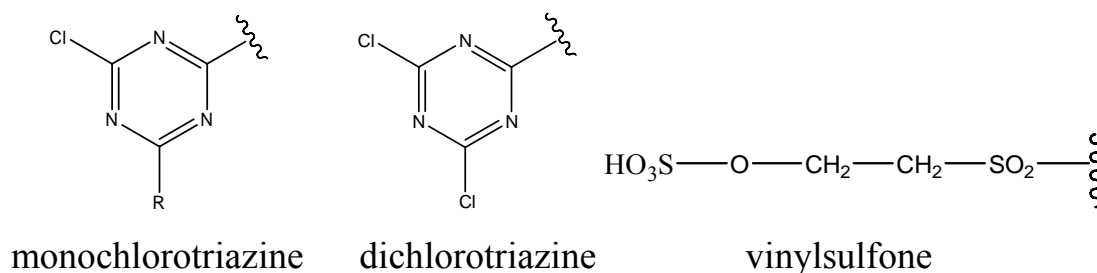


圖 4、常見染料分子的 reactive group

chromophore 則有Cibacron Blue F3G-、Procion Red H-3B、Procion Green H-4G等（圖 5）。所以從染料分子的名稱，可以得知此分子的化學結構是由那些特定的reactive group與chromophore所組成。本實驗

使用的親和性染料為Procion Blue MX-R，其完整構造如圖 6 所示；此種親和性染料已知被應用在雙水相系統以及親和管柱層析等方面，可進行多種酵素與蛋白質的分離純化，如磷酸果糖激酶、乳酸脫氫酶、丙酮酸激酶、溶菌酶，人類血清蛋白^{55、62、63}等，其應用範圍極廣。

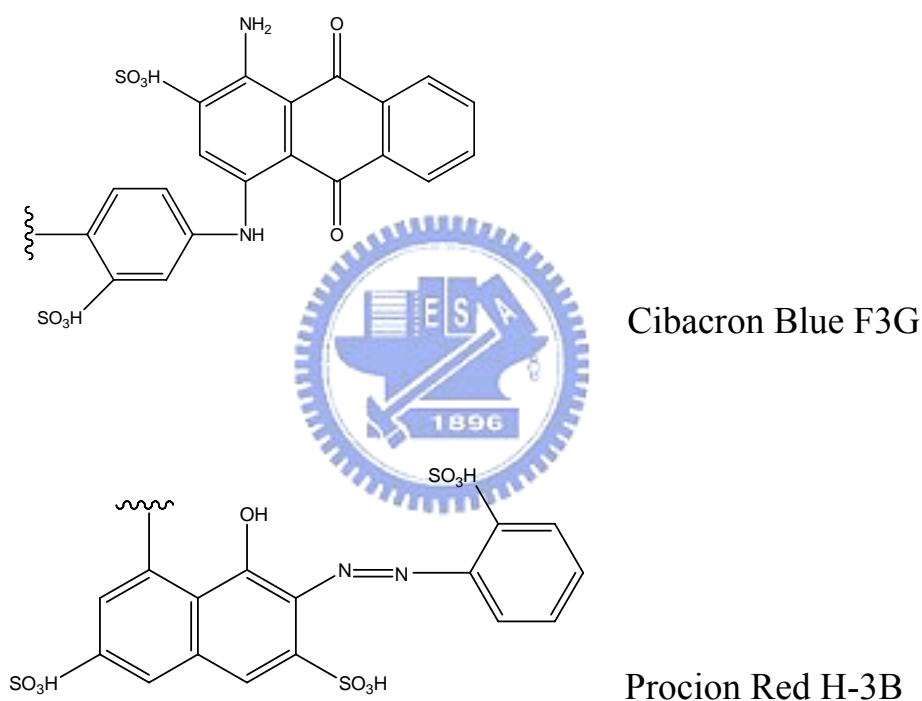


圖 5、常見染料的 chromophore

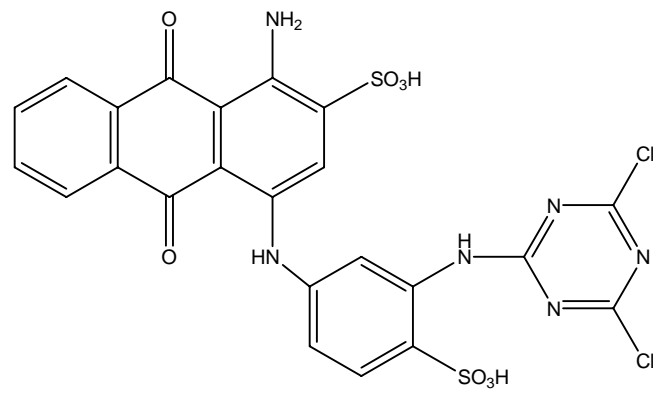


圖 6、Procion Blue MX-R 的分子構造



2-3 蛋白質簡介

2-3-1 蛋白質的組成與結構

蛋白質是由胺基酸之間的胺基酸之間的氨基與羧基進行脫水反應之後所形成的肽鍵所連接而成，因此不同的蛋白質除了組成的胺基酸數量與種類不同外，不同的胺基酸排列順序也造成這些蛋白質在結構上的差異。蛋白質的二級結構(secondary structure)、三級結構(tertiary structure)、四級結構(quaternary structure)決定了蛋白質特殊的立體空間結構，由於這些不同構形(conformation)的差異，使得蛋白質具有特殊的生理活性。



2-3-2 溶菌酶(Lysozyme)⁶⁴

溶菌酶又稱胞壁質酶，由於結構中具有四個雙硫鍵因此具有高熱安定的特性，其廣泛存在於自然生物中，包括雞蛋蛋白、植物、動物中的淚水、口水及乳汁等；以人體為例，溶菌酶普遍存在於分泌物(如唾液、汗及黏液等)、白血球及腎臟中，能解離細菌的細胞壁，而摧毀很多進入上呼吸系統和眼睛周圍的細菌，有抗菌、抗病毒效果。它具有抗血纖蛋白溶解作用。能防止毛細血管出血、強化血管壁，用於鼻出血、血痰、血尿及術後出血等場合；溶菌酶對革蘭氏陽性(Gram positive)細菌有殺傷力，它與抗生素合用可增強療效，常用於難治的感染病症。它也能影響消化道細菌及皮層的滲透力，用於治療潰瘍性

結腸炎；同時也可抑制腺病毒生長，可用於帶狀皰疹、腮腺炎、雞水痘、肝炎及流感等病毒性疾患的治療。其中以雞蛋中的含量較為豐富，為純化溶菌酶之最佳來源。純化分離方面，直接結晶法、吸附法、離子交換法、超過濾法、親和性層析法、兩相萃取法、膠過濾法、逆微胞萃取法等方法都曾被用來分離、純化該酵素。



第三章 實驗部分

3-1 試藥

3-1-1 合成BMIM-Cl與BMIM-PF₆

1-chlorobutane 99 %, C₄H₉Cl, GR grade(Janssen Chimica, Geel, Belgium)

1-methylimidazole 99 %, C₄H₆N₂, GR grade(Acros, Geel, Belgium)

Ethyl Acetate, CH₃COOC₂H₅, HPLC/spectro grade(Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Potassium hexafluorophosphate 99 %, KPF₆, GR grade(showa, Tokyo, Japan)

Magnesium sulfate anhydrous 99 %, MgSO₄, GR grade(showa, Tokyo, Japan)



3-1-2 配製緩衝溶液的試劑

Hydrochloric Acid, HCl, GR grade(Showa, Tokyo, Japan)

Sodium hydroxide, 96 %, NaOH, GR grade(Showa, Tokyo, Japan)

Glycine, C₂H₅NO₂, GR grade(Riedel-de Haen, Seelze, Germany)

Citric acid, 100 %, HOC(COOH)(CH₂COOH)₂ (Anhydrous, powder), ACS grade(Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Sodium citrate, 99.6 %, HOC(COONa)(CH₂COONa)₂ · 2H₂O, ACS grade(Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Acetic Acid, CH_3COOH , HPLC/spectro grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Sodium acetate, 98.5 %, CH_3COONa , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Sodium dihydrogenphosphate anhydrous, 98.0 %, NaH_2PO_4 , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, ACS grade (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

Sodium hydrogen carbonate, 99.5 %, NaHCO_3 , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Sodium chloride, NaCl , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Potassium chloride, KCl , GR grade (Riedel-deHaen, Seelze, Germany)



3-1-3 蛋白質分子

Lysozyme from hen egg white, M.W.14400 pI=10.7 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Albumin from egg white, M.W.44300 pI=4.3 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Hemoglobin from bovine serum, M.W.64500 pI=6.8 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Cytochrome c from horse heart, M.W.12361, pI=10.5 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

3-1-4 染料分子

Procion Blue MX-R, $C_{23}H_{14}C_{12}N_6O_8S_2$, (Fluka, Buchs SG, Switzerland)

實驗中使用的水為 Milipore Milli-Q (Bedford, MA, USA) 所製造之去離子水

3-2 儀器

(1) 紫外光-可見光光譜儀 UV-Visible Spectrophotometer, Hewlett Packard 8453 (Waldronn, Germany)

(2) 高效能液相層析管柱: Reverse-Phase HPLC Column, Vercopak Inertsil 7 octadecyl silica-3 (ODS-3)

(3) 梯度幫浦: 梯度控制器 LabGrad 是由 Lab Alliance 公司製造，結合 series III pump, 最多可做四種動相組成的混合梯度

3-3 實驗流程

3-3-1 合成IL BMIM-PF₆⁵⁹

1. 取 0.3 莫耳 1-chlorobutane(31.3 ml)和 0.3 莫耳 1-methylimidazole (23.9 ml)，放入設有迴流裝置的 250 ml 圓底瓶混合攪拌，並加溫至 80°C，持續 48~72 hr，直至生成金黃色黏稠狀液體，
1-butyl-3methylimidazolium chloride, BMIM-Cl。
2. 倒入 250 ml 分液漏斗，加入 50 ml 乙酸乙酯搖晃洗濯後，靜置分層，取出下層液體置於小圓底瓶。
3. 將所得金黃色黏稠狀液體加熱至 100°C 攪拌隔夜，去除乙酸乙酯。
4. 取 0.3 莫耳 KPF₆ 加入 150 ml 去離子水中，攪拌至完全溶解。
5. 將所得金黃色黏稠狀液體加入裝有 KPF₆ 溶液的燒杯中，以磁石攪拌 3 小時。
6. 攪拌後，將上述水層倒出，並加入去離子水攪拌再將水層倒出，再加入新的去離子水攪拌並倒出，重覆此步驟直至水層呈中性。
7. 將上層水溶液倒出後，加入硫酸鎂除水，再用濾紙過濾
8. 所得即為 1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate, BMIM-PF₆。
9. 合成示意圖如圖 7。

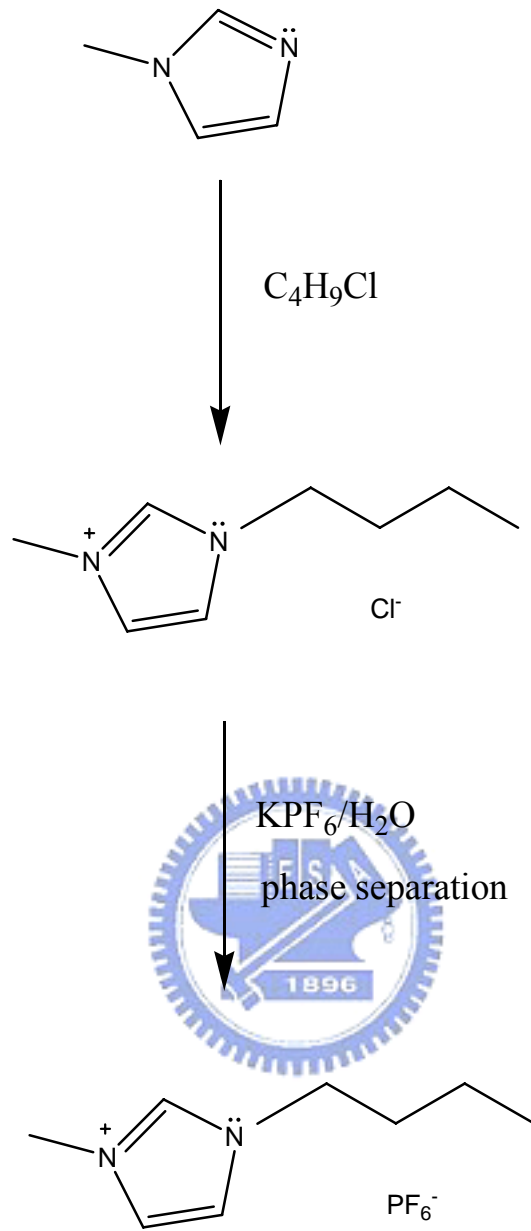


圖 7、Bmim-PF₆的合成示意圖

3-3-2 配製萃取相

1. 以 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml 的比例，將 Procion Blue MX-R 粉末加入 BMIM-PF₆ 中，在室溫下攪拌 24 小時使其溶解，再加入等體積的去離子水攪拌 30 分鐘，將懸浮在 BMIM-PF₆ 中未溶解的染料粉末清洗至水層；靜置 30 分鐘待澄清分層，移去水相，加入新的去離子水清洗，重覆步驟兩次，如圖 8。實際溶於 BMIM-PF₆ 中的染料濃度，由 UV-Vis spectrometer 定量。
2. 定量方法；分別在 0.2、0.5、1、2 mg/ml (dye/IL) 未水洗過的萃取相中，加入相同比例的甲醇稀釋 20 倍 (1 ml 萃取相 + 19 ml 甲醇)，接著測量 UV-visible 吸收值。取 587 nm 的吸收值對 dye 的濃度作校正曲線，清洗過的萃取相中，Procion Blue MX-R 的真實濃度即可推算得知。

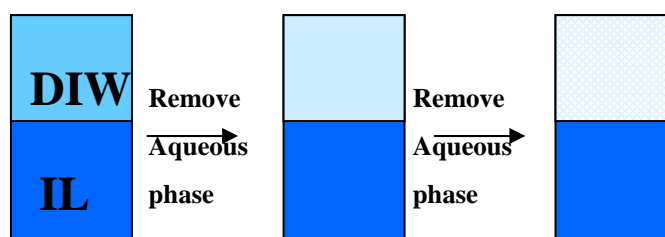


圖 8、配製萃取相示意圖

3-3-3 比較萃取時間對萃取效率的影響

將等體積 pH 7.0 的 200 mg/L 溶菌酶水溶液與萃取相 (2 mg/ml，

washed, Procion Blue MX-R/BMIM-PF₆) 置入 20 ml 樣品瓶中，分別以磁石攪拌 5、10、20、30、45、60 分鐘，探討攪拌時間對蛋白質正向萃取的影響。

3-3-4 萃取溶菌酶

1. 正向萃取：

用 50 mM Tris-HCl (pH=7.0) 緩衝溶液配製 200、500、1000 mg/L 的溶菌酶水溶液，取 5 ml 溶菌酶水溶液與 5 ml 3-3-2 的萃取相置於 20 ml 樣品瓶中，在室溫下攪拌 30 分鐘後，靜置分層，取出上層水相以 HPLC 定量。



2. 反向萃取：

取出下層離子液體相 3 ml 置於另一 20 ml 樣品瓶中，加入 3 ml 的 1 M NaCl/50 mM Tris-HCl (pH=7.0) 緩衝溶液，同樣置於室溫下攪拌 30 分鐘，靜置分層，取出上層水相以 HPLC 定量。

3-3-5 pH 值對蛋白質萃取的效應

1. 配製緩衝溶液：

0.2 M KCl/0.2 M HCl 調配 pH 範圍 1.0~2.1

0.1 M Glycine/0.2 M HCl 調配 pH 範圍 2.2~3.5

0.1 M CH₃COOH/0.1 M CH₃COONa調配pH範圍 3.6~5.0

0.1 M Citric acid/0.1 M Sodium citrate 調配 pH 範圍 5.1~6.0

0.1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethane/0.1 M HCl 調配 pH 範圍
7.0~9.0

0.05 M NaHCO₃/0.1 M NaOH 調配pH範圍 10.0~11.0

0.2 M NaOH/0.2 M KCl 調配 pH 範圍 12.0~13.0

2. 配製 pH 範圍 2.0~12.0 的 200 mg/L 溶菌酶水溶液

3. 正向萃取：

將pH範圍 2.0~12.0 的 200 mg/L溶菌酶水溶液分別取 5 ml與 5 ml

3-3-2 配製的萃取相(2 mg/ml, Proncion Blue MX-R/BMIM-PF₆)

置入 20 ml樣品瓶中，以磁石攪拌 30 分鐘，混合完靜置分層，

取出上層水相以HPLC定量。

4. 反向萃取：

取pH 7.0 的 200 mg/L 溶菌酶水溶液 3 ml與 3 ml 3-3-2 配製的萃取

相(2 mg/ml, washed, Procion Blue MX-R/BMIM-PF₆)置入 20 ml

樣品瓶中，以磁石攪拌 30 分鐘，靜置分層後，取出下層離子液

體相置於另一 20 ml樣品瓶中，加入等體積pH範圍 2.0~12.0 的緩

衝溶液，同樣置於室溫下攪拌 30 分鐘，靜置分層，取出上層水

相以HPLC定量。

3-3-6 離子液體重覆使用的效率

取 10 ml pH 7.0 的 200 mg/L 溶菌酶水溶液與 10 ml 萃取相(2 mg/ml, washed, Procion Blue MX-R/BMIM-PF₆) 置入 20 ml 樣品瓶中，以 3-3-3 相同的實驗條件進行第一次正向及反向萃取後，移除水相，加入新的 10 ml 反向萃取緩衝溶液，進行第二次反向萃取，移除水相，加入 10 ml 去離子水清洗萃取相。取出下層離子液體萃取相，置於另一 20 ml 樣品瓶中，加入新的等體積 200 ppm 溶菌酶水溶液，接著進行正向及反向萃取；重覆以上步驟四次，觀察離子液體重覆使用的可行性。



3-3-7 比較不同蛋白質的萃取率

用 50 mM tris (pH=7.0) 緩衝溶液分別配製 200 mg/L 的 albumin、hemoglobin、cytochrome c 水溶液，分別取 5 ml 的蛋白質水溶液與 5 ml 萃取相(2 mg/ml, washed, Procion Blue MX-R/BMIM-PF₆) 置於 20 ml 樣品瓶中，以與 3-3-3 相同的實驗條件進行正向及反向萃取。

3-3-8 萃取蛋白質混合物

1. 以 50 mM Tris-HCl (pH=7.0) 緩衝溶液分別配製 lysozyme +

albumin、lysozyme + hemoglobin、lysozyme + cytochrome c 200 mg/L 混合蛋白質水溶液。

2. 正向萃取：

取 5 ml 混合蛋白質水溶液與 5 ml 萃取相置於 20 ml 樣品瓶中，在室溫下攪拌 30 分鐘後，靜置分層，取出上層水相以 HPLC 定量。

3. 反向萃取：

取出 3 ml 下層離子液體相置於另一 20 ml 樣品瓶中，加入 3 ml 的 1 M NaCl/50 mM Tris-HCl(pH=7.0)緩衝溶液，同樣置於室溫下攪拌 30 分鐘，靜置分層，取出上層水相以 HPLC 定量。

4. 比較 Procion Blue MX-R 在其他蛋白質存在下，對溶菌酶的選擇性是否受影響。

第四章 結果與討論

4-1 配製萃取相

從文獻中得知，已有關於利用離子液體BMIM-PF₆直接萃取雙股DNA³⁸，或是在離子液體中加入冠狀醚作為萃取劑，與生物分子（胺基酸⁶¹、蛋白質^{39、40}等）螯合後，將其由水相轉移至離子液體相中，這些液相/液相萃取方面的研究。本實驗一開始嘗試利用未加入任何萃取劑的離子液體BMIM-PF₆來萃取溶菌酶，發現並無法達到萃取的效果。

由於染料在親和性管柱層析法中，常應用來作為與蛋白質結合的配體 (ligand)⁵⁴，而且親和性染料的種類繁多，提供了多樣性的選擇。於是本研究便試著尋找出可溶解並穩定存在於離子液體中的染料，作為蛋白質的萃取劑。實驗發現，藍色染料Procion Blue MX-R可成功的溶解於離子液體Bmim-PF₆中，並可用來萃取溶菌酶。

將純離子液體BMIM-PF₆、1 mg/ml的萃取相與 0.5 mg/ml的染料水溶液分別以甲醇稀釋 20 倍，量測其UV-Vis吸收光譜。如圖 9 所示，350 nm以下的吸收是由離子液體BMIM-PF₆所貢獻。比較Procion Blue MX-R溶於水相與離子液體相中的UV-Vis吸收光譜圖，發現其最大吸收波長與吸收光譜圖形皆無變化 ($\lambda_{\max} = 375 \text{ nm}、587 \text{ nm}、625 \text{ nm}$)，可知Procin Blue MX-R經過長時間的攪拌與加水清洗的步驟後，並不會產生分解斷鍵的現象，而可穩定存在於離子液體相中。

定量實際溶於離子液體相中染料濃度的方法，是將不同已知濃度

的 dye/IL 以甲醇稀釋後，量測其 UV-vis 吸收光譜圖，取其在 587 nm 的最大吸收值對濃度作校正曲線，如圖 10 所示。將使用去離子水清洗完成的萃取相加入相同比例的甲醇稀釋 20 倍 (1 ml dye/IL + 19 ml 甲醇)，量測其在 587 nm 的吸收值。即可由校正曲線方程式反推求得 Procion Blue MX-R 溶在離子液體中的含量。



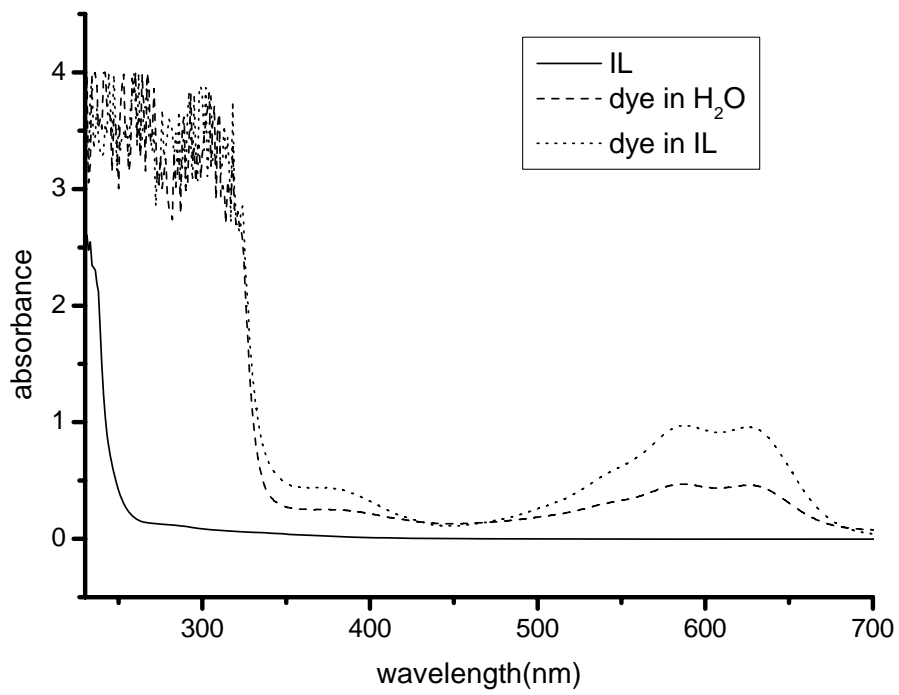


圖 9、Procion Blue MX-R 在水相及BMIM-PF₆中的
UV-visible 吸收光譜圖

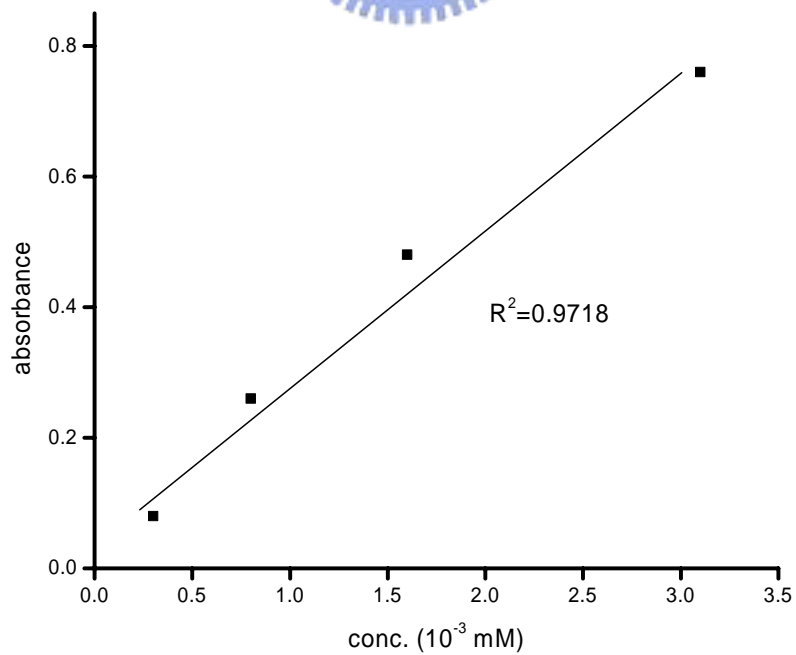


圖 10、Proncion Blue MX-R 的校正曲線圖 (at 587 nm)

4-2 比較萃取時間對萃取率的影響

如圖 11 所示，在室溫下以磁石攪拌 20 分鐘即可達到萃取率極大值，顯示在本研究 30 分鐘的攪拌時間條件下，足以使萃取充分達到平衡。

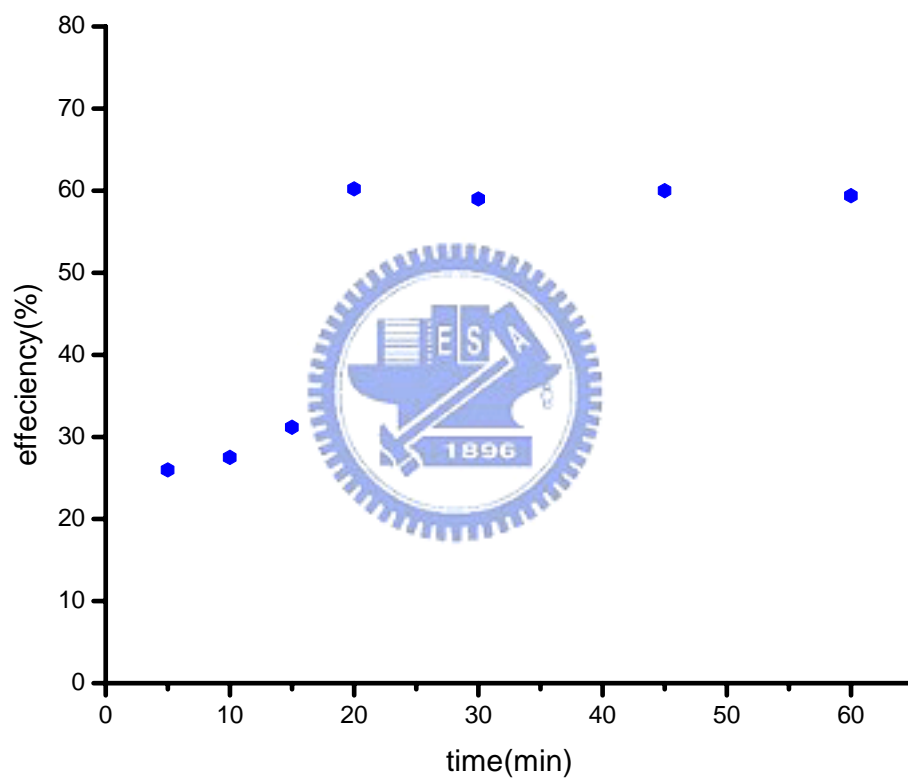


圖 11、攪拌時間對萃取率的影響

4-3 萃取溶菌酶

如圖 12、表二所示，當離子液體相中 Procion Blue MX-R 的含量增加，正向萃取率隨之提高，最高可達到 65 %。隨著蛋白質濃度增加，正向萃取率下降，由此可知每單位的 Procion Blue MX-R 對蛋白質進行親和力結合的能力有限。

圖 13、表三為反向萃取的結果，如圖所示，最高可達到 40 % 的總回率。

另外，可以發現以 2 mg/ml 與 3 mg/ml 兩種濃度配製的萃取相，經過去離子水清洗的步驟後，兩者實際存在於離子液體相中的量並無明顯差異（見圖 14、表四）；換句話說，Procion Blue MX-R 在離子液體 BMIM-PF₆ 中的溶解度有限，即使加入大量，當濃度達到飽和後，大部分未溶解的染料粉末都會被清洗掉，所以接下來的實驗皆以 2 mg/ml 的萃取相來進行。

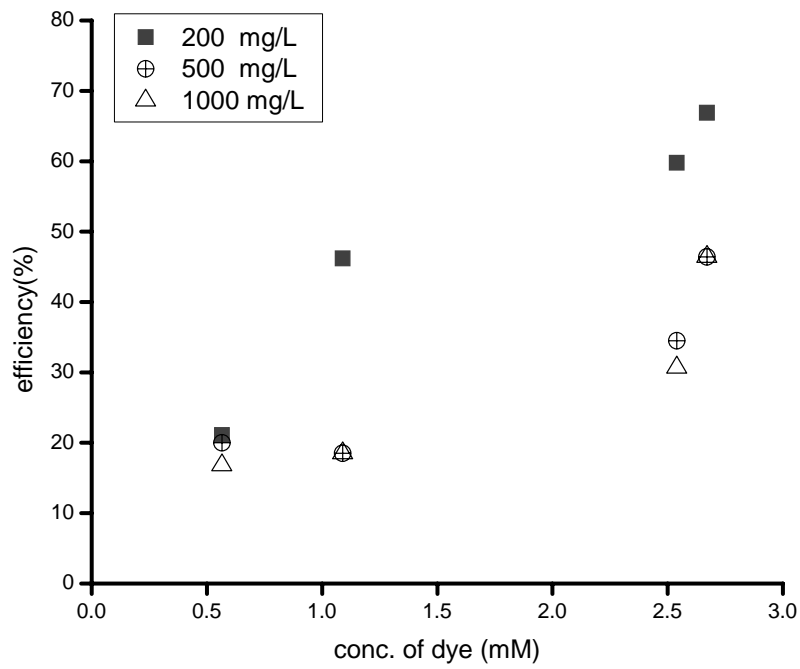


圖 12、不同染料濃度含量的萃取相對不同濃度的溶菌酶水溶液



進行正向萃取的結果

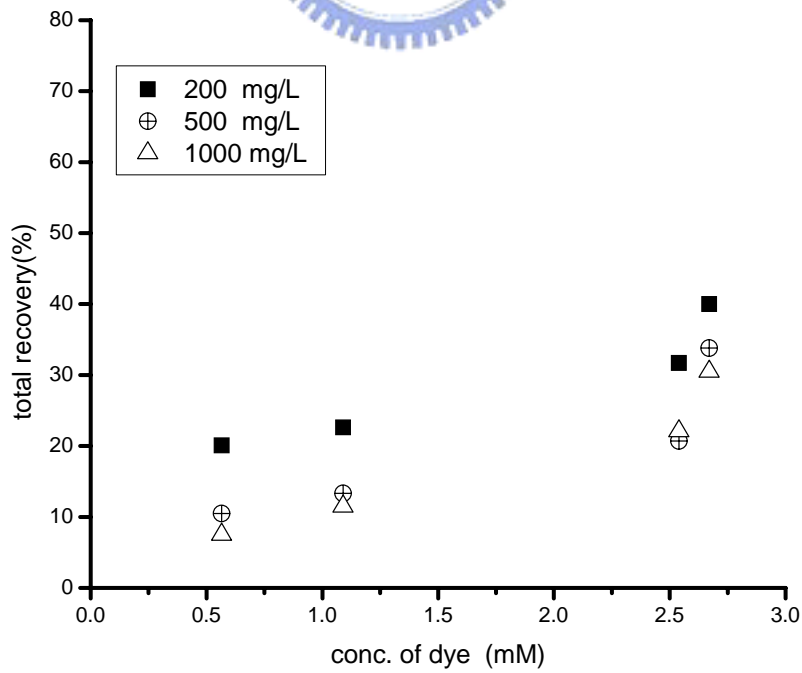


圖 13、不同染料濃度含量的萃取相進行反向萃取的結果

表二、不同染料濃度含量的萃取相對不同濃度的溶菌酶水溶液

進行正向萃取的結果

efficiency(%)				
conc. of dye(mM)	0.57	1.09	2.54	2.67
conc. of lysozyme(mg/L)				
200	21.1	46.2	59.8	66.9
500	20.0	18.5	34.5	46.4
1000	16.8	18.5	30.7	16.4



表三、不同染料濃度含量的萃取相進行反向萃取的結果

total recovervry(%)				
conc. of dye(mM)	0.57	1.09	2.54	2.67
conc. of lysozyme(mg/L)				
200	20.1	22.6	31.7	40
500	10.5	13.3	20.7	33.8
1000	7.5	11.5	22.1	30.5

表 四、萃取相清洗前後濃度的比較

concentration of dye				
before being washed				
dye/IL(mg/ml)	0.5	1	2	3
dye/IL(mM)	0.78	1.57	3.14	4.71
after being washed				
real conc.(mM)	0.57	1.09	2.54	2.67

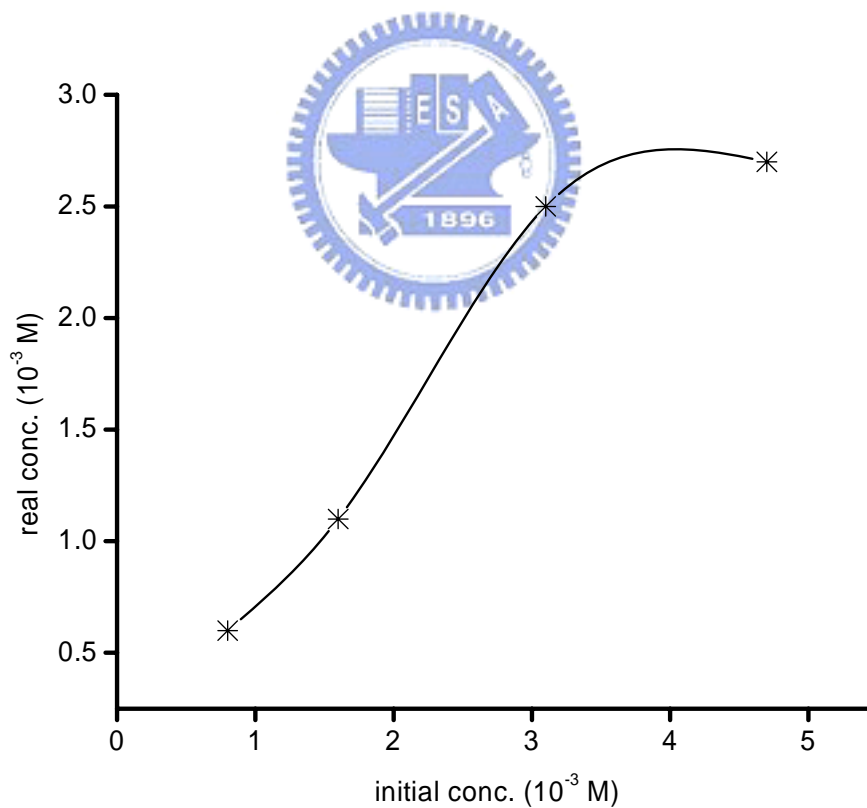


圖 14、比較離子液體相中，清洗前加入的染料含量與經過清洗後真實存在的染料含量

蛋白質的三級結構主要是受下列四種作用力的影響而能穩定存在：(1)胺基酸序列本身親疏水性的差異(hydrophobic bonds) (2)氫鍵作用力(H-bonds) (3)雙硫鍵的存在與否(disulfide bonds) (4)帶電荷的 R'group 彼此之間的離子吸引力(salts bonds)。本實驗藉由添加鹽類改變溶液中的離子強度，產生遮蔽效應，使得蛋白質 R'group 彼此之間的離子吸引力減弱，蛋白質的三級結構在鹽類存在的環境下產生變形，此時親和性染料與蛋白質之間因構形互補所貢獻的親和力，因著蛋白質的變形而減弱，蛋白質可被成功反向萃取出來。圖 15 為在 pH 7 不同 NaCl 濃度對於溶菌酶反向萃取影響的結果，發現隨著 NaCl 濃度的增加，反向萃取效果增加，所以離子強度確實可影響蛋白質與親和性染料之間的親和力作用。



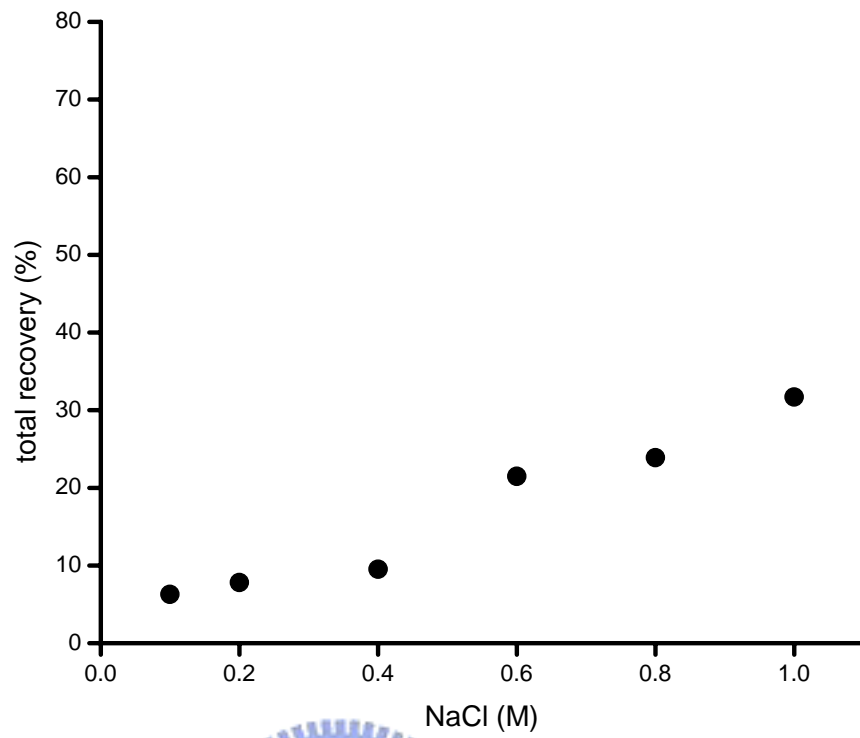


圖 15、NaCl 濃度對溶菌酶反向萃取效果的影響



4-4 pH 值對蛋白質萃取的效應

文獻中曾經以MALDI探討蛋白質與磺酸類親和性染料之間的作用力，提出兩者之間的主要吸引力應為庫倫靜電力⁶⁰。由於染料上磺酸根的pKa值極低，在一般的實驗條件下，磺酸根上所帶的氫會游離，使得親和性染料本身帶有負電，可和蛋白質上的protonated site 結合(deprotonated SO₃ group-NH₂ terminus)。為了進一步確認親和性染料與蛋白質之間的作用力機制為何，本實驗藉由改變蛋白質正向及反向萃取時緩衝溶液的pH值，觀察其萃取率的變化。溶菌酶的等電點(pI)~11.0，在pH值為 7.0 的緩衝溶液中，是以帶正電荷的形式存在，假設Procion Blue MX-R是以負電荷形式與蛋白質互相吸引而結合，蛋白質基團上所帶的電荷隨著pH值改變而變化，在低pH值時可得到最佳正向萃取率，反之在高pH值時，由於靜電排斥力的作用，蛋白質可脫離親和性染料而得到最好的回收效果；正向萃取的實驗結果如圖 16 所示，隨著pH值的增加，溶菌酶的正向萃取率大致上是隨著pH值增大而降低，在pH值 12 時甚至沒有萃取效果，然而其變化趨勢並不完全與pH值變化吻合，在圖中可以發現，pH值 7~8 與pH值 2~3 的萃取效果相近，顯示pH值並不是影響Procion Blue MX-R與溶菌酶互相結合的唯一條件。圖 17 為反向萃取的圖形，比較以無鹽類存在和添加了 1M NaCl的緩衝溶液進行反向萃取的回收率效果，從實驗結

果可以發現，當沒有鹽類存在時，即使將緩衝溶液pH值提高至 12，仍然無法將溶菌酶從萃取相中回收；而在相同 1M NaCl的條件下，溶菌酶的回收率也不如預期中會隨著pH值的增加的提升，反而隨之下降。由此推論在本實驗條件下，親和性染料Procion Blue MX-R與溶菌酶的結合作用力主要貢獻並非來自庫倫靜電力。圖 18 為在不同pH值下進行萃取後，染料在水相中分布的情形；由於此類磺酸類染料的水溶性與其所帶的磺酸根基團數目以及解離程度有關，本實驗所選用的染料Procion Blue MX-R之所以能在離子液體中有良好的溶解度，除了因為其只帶兩個磺酸根基團，與常用的CB dye相比水溶性較差之外，Procion Blue MX-R在離子液體Bmim-PF₆中能以非解離狀態穩定存在，也是使得染料傾向分布在離子液體中的原因之一。如圖 18 所示，在不同pH值下經過攪拌萃取的步驟後，離子液體相中的染料隨著pH值提高發生解離，會傾向溶於水相中，可以觀察到水相的染料顏色逐漸加深。而親和性染料Procion Blue MX-R在離子液體Bmim-PF₆中以非解離狀態穩定存在，使得染料上的磺酸根基團不帶負電，這是造成庫倫靜電力在本實驗中並非為主要作用力的主因，在此，染料的結構提供類似輔酶NAD⁺的構形，才是溶菌酶與染料之間親合力的主要來源。

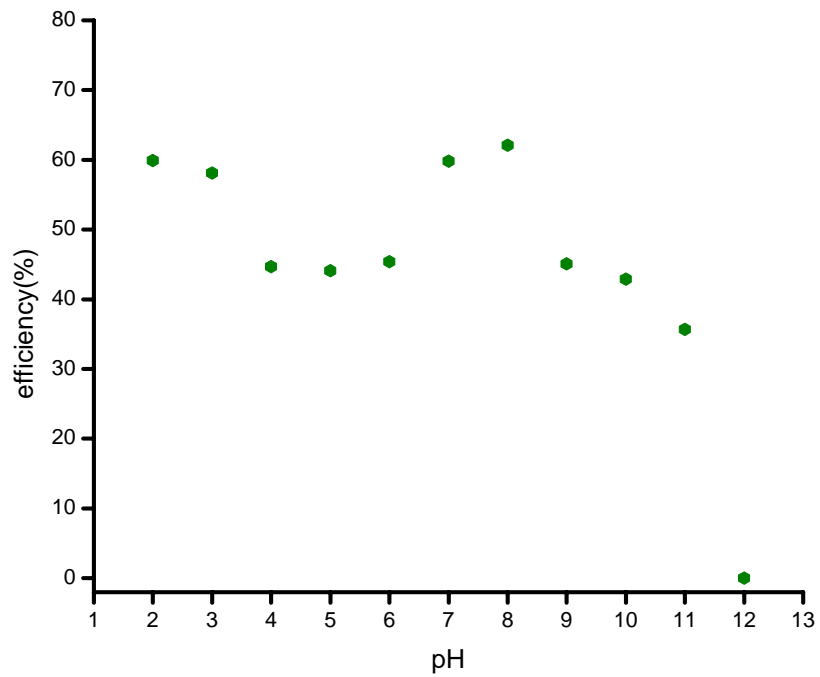


圖 16、不同 pH 值溶菌酶水溶液的正向萃取效率

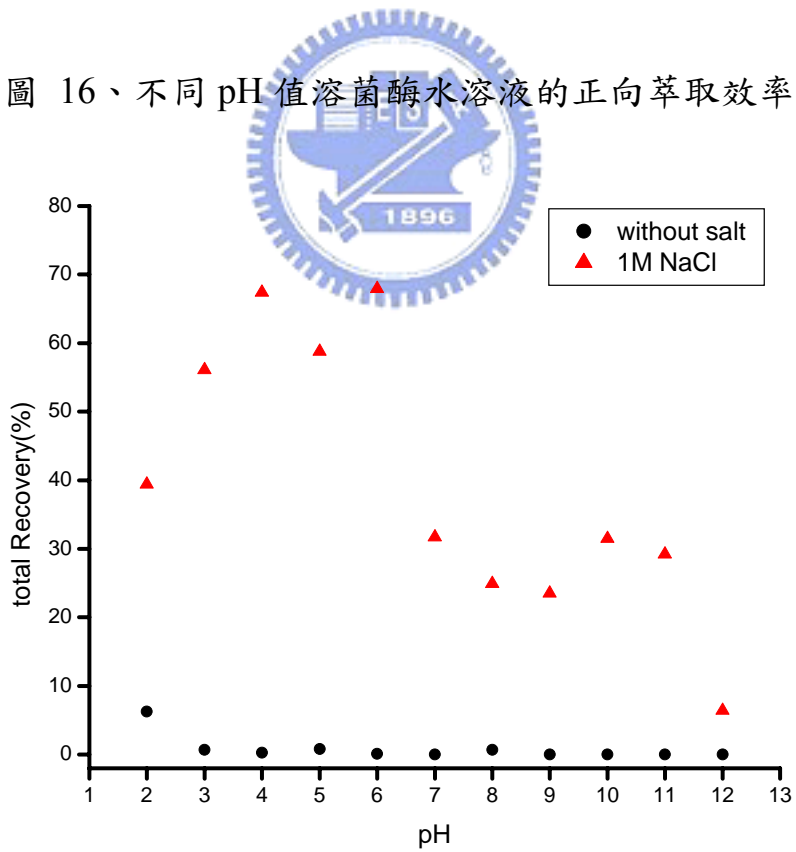


圖 17、分別以無鹽類和 1M NaCl 不同 pH 值的緩衝溶液進行

反向萃取



圖 18、Procion Blue MX-R 在不同 pH 值水相中的分布，

由左到右的 pH 值依序為 5~10

4-5 離子液體重覆使用的效率

由於離子液體相對於傳統揮發性有機溶劑來說，具有幾乎可忽略的蒸氣壓和可以重覆使用的優點，本實驗嘗試將使用過的離子液體回收後再使用，了解其重覆使用的可行性。結果如圖 19 所示，經過兩次反向萃取的步驟，總回收率可從 31.7 % 提高到 45.6 %，但仍未達到百分百，使得離子液體相中仍殘留有未被反向萃取出來的溶菌酶，且已知每單位的 Procion Blue MX-R 對蛋白質進行親和性結合的能力有限，隨著使用次數的增加，離子液體對溶菌酶的萃取效率遂逐漸降低。另外，已知鹽類的存在會影響親和性染料萃取蛋白質的效率，所以在每次重覆使用萃取相之前，都會以去離子水進行清洗，再進行下一次萃取的步驟，然而此步驟並未能將萃取相中的鹽類完全清洗乾淨，這也是造成萃取效率隨著使用次數增加而降低的原因之一。

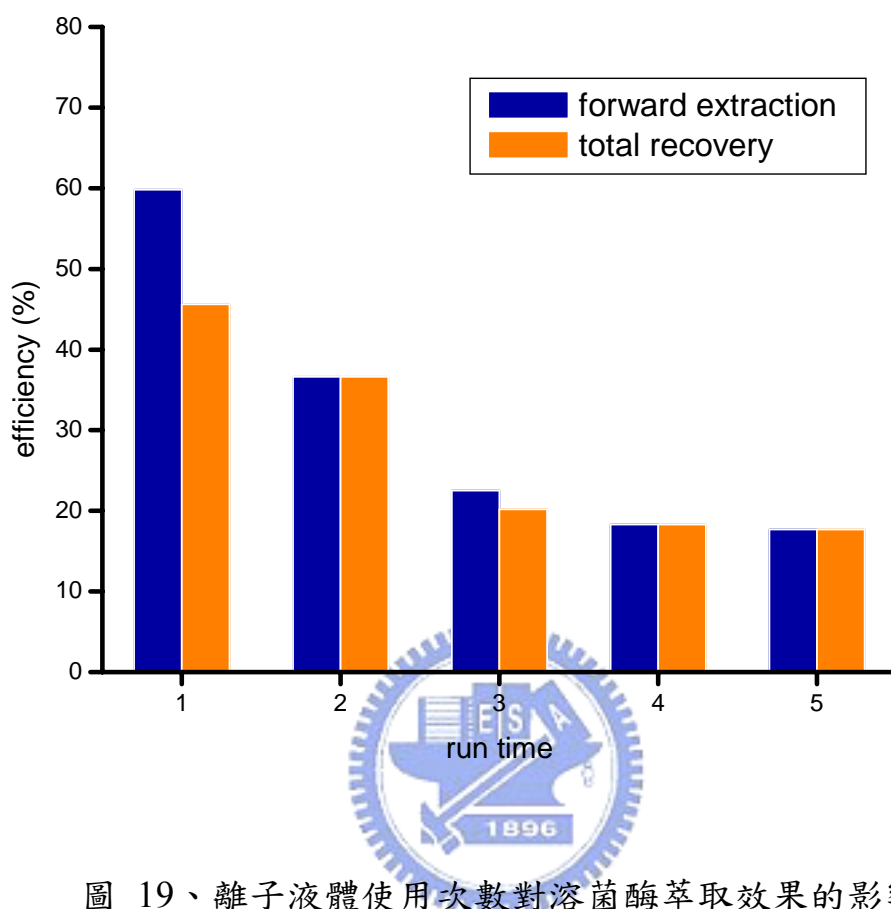


圖 19、離子液體使用次數對溶菌酶萃取效果的影響

表 五、離子液體使用次數對溶菌酶萃取效果的影響

run time	forward extraction(%)	total recovery(%)
1	59.8	45.6
2	36.6	36.6
3	22.5	20.2
4	18.3	18.3
5	17.7	17.7

4-6 比較不同蛋白質的萃取率

由於親和性染料是一種 group-specific ligand，對蛋白質的結合並不是絕對的專一性，所以本實驗選擇了數種不同的蛋白質進行實驗，觀察其萃取效果如何。溶菌酶 (pI=10.7)、卵白蛋白 (pI=4.3)、牛血紅素 (pI=6.8)、細胞色素 c (pI=10.5) 具有不同的 pI 值，在 pH=7 的環境下，溶菌酶與細胞色素 c 皆帶正電，卵白蛋白與牛血紅素則帶負電。如圖 20 所示，發現僅有溶菌酶可被成功萃取；細胞色素 c 雖然與溶菌酶帶有相同的電性，卻不與 Procion Blue MX-R 親和，實驗結果再次證明庫倫靜電力並不是決定親和性染料與蛋白質之間結合與否的唯一作用力。



為了測試本實驗的選用的染料 Procion Blue MX-R 在蛋白質混合物中萃取純化溶菌酶的能力，分別將卵白蛋白、牛血紅素、以及細胞色素與溶菌酶混合（皆為 200 ppm），以相同實驗條件進行萃取。實驗結果如圖 21、22、23 所示，在其他蛋白質存在的情況下，溶菌酶的萃取效果受到影響略為降低，而原本不與染料結合的卵白蛋白以及牛血紅素，在此卻有明顯的萃取效果；會造成這種現象的原因，是由於帶正電的溶菌酶會吸引混合溶液中帶負電的蛋白質基團，卵白蛋白與牛血紅素皆帶正電，而卵白蛋白的電性又大於牛血紅素，使得大約 55% 的卵白蛋白會受到溶菌酶的吸引而隨之萃取到離子液體相中，牛

血紅素僅有 10 % 左右；細胞色素 c 與溶菌酶因相同電性互斥，所以萃取結果不受影響；蛋白質之間的極性相吸也有一部分的貢獻，但較為次要。



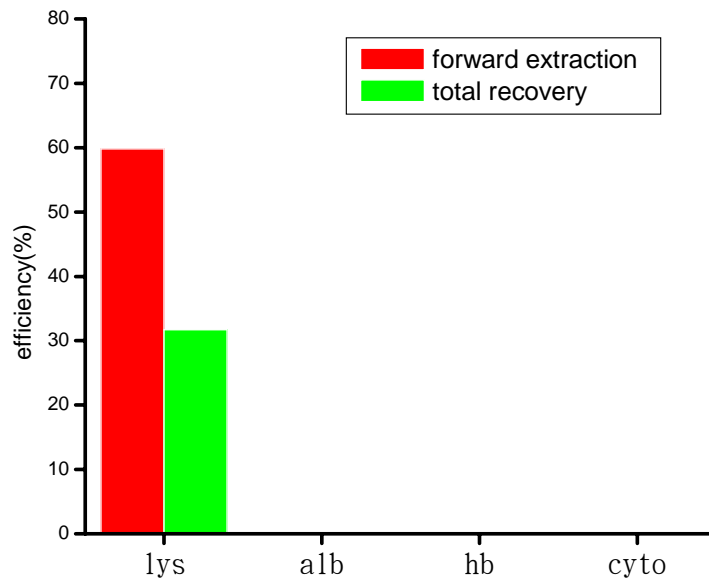


圖 20、分別對溶菌酶、卵白蛋白、牛血紅素
以及細胞色素 c 進行萃取

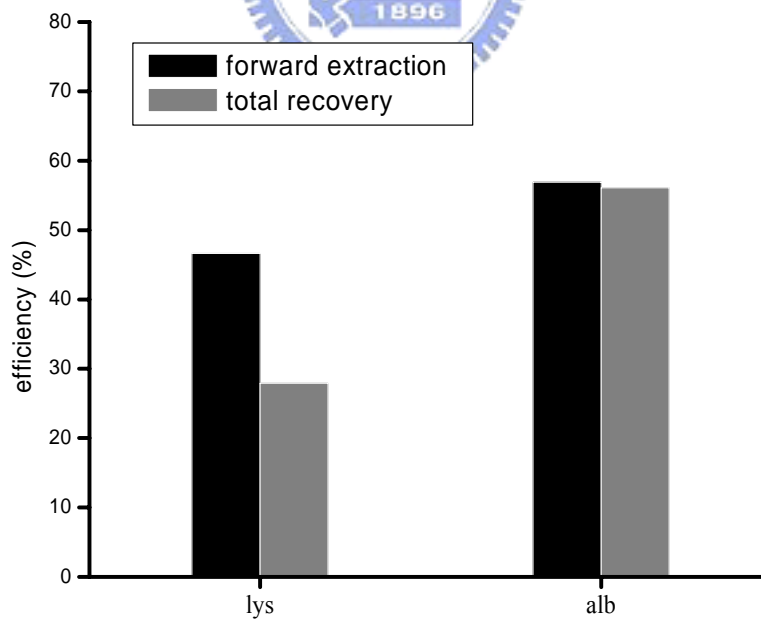


圖 21、將溶菌酶與卵白蛋白混合後進行萃取

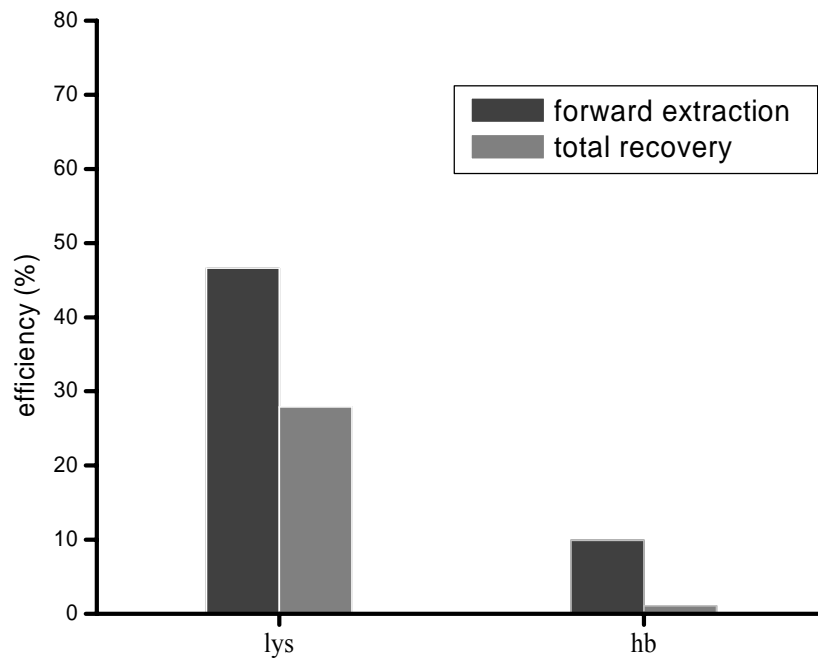


圖 22、將溶菌酶與牛血紅素混合後進行萃取

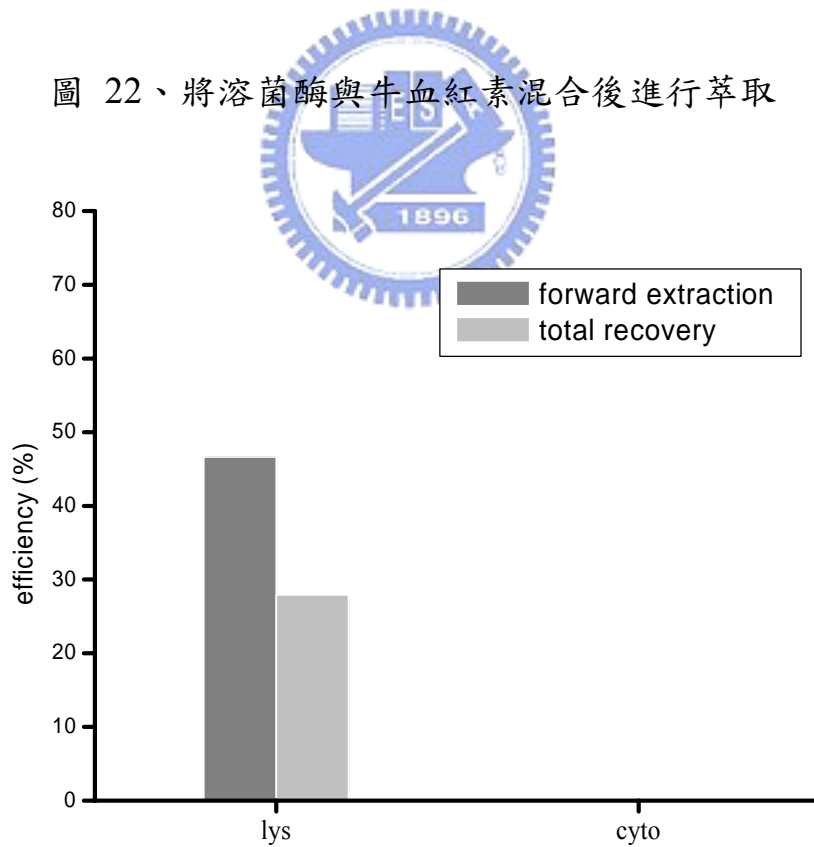


圖 23、將溶菌酶與細胞色素 c 混合後進行萃取

第五章 結論

本研究使用在離子液體BMIM-PF₆的分布大於水相的染料

Procion Blue MX-R當作萃取劑，可對與其有親和力作用的溶菌酶進行正向及反向萃取。當離子液體相中的親和性染料濃度愈高時，對蛋白質的萃取效果隨之提升。此方法與傳統雙水相系統相較之下，由於染料配體省略了在高分子聚合物上進行修飾 (modification)的步驟，因此較為簡易；同時使用離子液體取代傳統有機溶劑作為萃取相，減少化學溶劑的揮發，降低了對環境的影響。

本實驗同時測試了 Procion Blue MX-R 對其他種類蛋白質是否具有萃取效果，結果發現，當分別萃取各個蛋白質水溶液時，僅溶菌酶可被成功萃取，可知本實驗所選擇的染料與蛋白質的作用力具有一定程度的選擇性。

由於親和性染料和離子液體的種類繁多，選擇適當的染料與疏水性離子液體，預期能萃取的蛋白質種類將大為增加，為離子液體應用在蛋白質萃取方面，提供了新的研究方向。

參考文獻

1. T.Welton, "Room-Temperature Ionic Liquids.Solvents for Synthesis and Catalysis" Chem. Rev. 99 (1999) 2071-2084.
2. H. Waffenschmidt,Dissertation,Institute fur Technische Chemie und Makromolekulare Chemie,RWTH Aachen,Germany, 2000.
3. A.E.Visser,R.P. Swatloski,W.M. Reichert,S.T.Griffin,R.D. Rogers,"Traditional Extraction in Nontraditional Solvents:Groups 1 and 2 Extraction by Crown Ethers in Room-Temperature Ionic Liquid" Ind. Eng. Chem. Res. 39 (2000) 3596-3604.
4. P.Wasserscheid,W.Keim,"Ionic Liquids-New "Solutions" for Transition Metal Catalysis" Angew .Chem. Int. Ed. 39 (2000) 3772-3789.
5. J.L. Anderson,D.W. Armstrong,G.T. Wei,"Ionic Liquids in Analytical Chemistry" Anal. Chem. 78 (2006) 2892-2902.
6. H. Matsumoto,M. Yanagida,K. Tanimoto,M. Nomura, Y. Kitagawa, Y. Miyazaki, "Highly Conductive Room Temperature Molten Salts Based on small Trimethylalkylammonium Cations and Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide" Chem. Lett. 31 (2000) 922-923.
7. S.N. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, "How polar are room temperature ionic liquids?" Chem. Commun. 5 (2001) 413-414.
8. P. Bonhote, A.Dias, N. Papageorgious, K. Kalyanasundaram, M.

- Gratzel, "Hydrophobic, highly conductive Ambient-Temperature Molten Salts" *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168-1178.
9. J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, "Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation" *Green Chem.* 3 (2001) 156-164.
10. J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong "Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions" *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14247-14254.
11. M.H. Abraham, "Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes" *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73-81.
12. M. Freemantle, *Chem. Eng. News* 76 (1998) 32.
13. F.H. Hurley, T.P. Fwiler, *J. Electrochem. Soc.* 98 (1951) 207.
14. H.L. Chum, V.R. Koch, L.L. Miller, R.A. Osteryoung, "Electrochemical Scrutiny of Organometallic Iron Complexes and Hexamethylbenzene in a Room Temperature Molten Salt" *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 3264-3265.
15. R.A. Osteryoung, "General Review: Molten Salt Chemistry: An Introduction and Selected Applications" 202 (1987) 329-364.
16. J.S. Wilkes, "Dialkylimidazolium Chloroaluminate Melts: A New

- Class of Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemistry, Spectroscopy, and Synthesis” *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263-1264.
17. T.B. Scheffler, C.L. Hussey, K.R. Seddon, C.M. Kear, P.D. Armitage, “Molybdenum Chloro Complexes in Room-Temperature Chloroaluminate Ionic Liquids: Stabilization of $[\text{MoCl}_6]^{2-}$ and $[\text{MoCl}_6]^{3-}$ ” *Inorg. Chem.* 22 (1983) 2099-2100.
18. T.M. Laher, C.L. Hussey, “Copper(I) and Copper(II) Chloro Complexes in the Basic Aluminum Chloride-1-Methyl-3-ethylimidazolium Chloride Ionic Liquid” *Inorg. Chem.* 22 (1983) 3247-3251.
19. T. Welton, “Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis” *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2033.
20. K.R. Seddon, R.D. Rogers “Ionic liquids :industrial applications for green chemistry ” *ACS Symposium Series* 818 (2002).
21. J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell, “Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability” *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125-4131.
22. M. Erbeldinger, A.J. Mesiano, A.J. Rusell, “Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid—An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents” *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 1129-1131.

23. S.N. Baker, T.M. McCleskey, S. Pandey, G.A. Baker, "Fluorescence Studies of Protein Thermostability in Ionic Liquids" *Chem. Commun.* (2004) 940-941.
24. R. Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, G. Carrea, F. van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon, "Dissolution of *Candida Antarctica* Lipase B in Ionic Liquid: Effects on Structure and Activity" *Green Chem.* 6 (2004) 483-487.
25. R.A. Sheldon, R.Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, F. van Rantwijk, K.R. Seddon, "Biocatalysis in Ionic Liquids" *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
26. D.W. Armstrong, L. He, Y.S. Liu, "Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules, When Used as Stationary Phases in Gas Chromatography" *Anal. Chem.* 71 (1999) 3873-3876.
27. J.L. Anderson, D.W. Armstrong, "Immobilized Ionic Liquids as High-Selectivity/High-Temperature/High-Stability Gas Chromatography Stationary Phases" *Anal. Chem.* 77 (2005) 6453-6462.
28. A. Berthod, D.W. Armstrong, "Ionic Liquids as Stationary Phase Solvents for Methylated Cyclodextrins in Gas Chromatography" *Chromatographia* 53 (2001) 63-68.
29. J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, "Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography" *Anal. Chem.* 76 (2004) 6819-6822.

30. L.K. Zhang, L. He, M.L. Gross, D.W. Armstrong, "Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* 73 (2001) 3679-3686.
31. S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong "Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 553-560.
32. L.Y. Li, M.L. Gross, "Ionic-liquid matrices for quantitative analysis by MALDI-TOF mass spectrometry" *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1833-1837.
33. K. Shimojo, M. Goto, "First Application of Calixarenes as Extractants in Room-temperature Ionic Liquids" *Chem. Lett.* 33 (2004) 320-321.
34. H. Luo, S. Dai, P.V. Bonnesen, "Solvent Extraction of Sr^{2+} and Cs^+ Based on Room-Temperature Ionic Liquids Containing Monoaza-Substituted Crown Ethers" *Anal. Chem.* 76 (2004) 2773-2779.
35. K. Shimojo, M. Goto, "Solvent Extraction and Stripping of Silver Ions in Room-Temperature Ionic Liquids Containing Calixarenes" *Anal. Chem.* 76 (2004) 5039-5044.
36. A.E. Visser, "Task-Specific Ionic Liquids Incorporating Novel Cations for the Coordination and Extraction of Hg^{2+} and Cd^{2+} : Synthesis, Characterization, and Extraction Studies" *Environ. Sci.*

- Technol. 36 (2002) 2523-2529.
37. G.T. Wei, Z.S. Yang, C.Y. Lee, H.Y. Yang, C.R. Wang,
“Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold Nanoparticles and Gold
Nanorods Using an Ionic Liquid” J. Am. Chem. Soc. 126 (2004)
5036-5037.
38. J.H. Wang, D.H. Cheng, X.W. Chen, Z. Du, Z.L. Fang , “Direct
Extraction of Double-Stranded DNA into Ionic Liquid
1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate and Its
Quantification“ Anal. Chem. 79 (2007) 620-625.
39. K. Shimojo, K. Nakashima, N. Kamiya, M. Goto, “Crown
Ether-Mediated Extraction and Functional Conversion of Cytochrome
c in Ionic Liquids” Biomacromolecules 7 (2006) 2-5.
40. K. Shimojo, N. Kamiya, F. Tani, H. Naganawa, Y. Naruta, M. Goto.
“Extractive Solubilization, Structural Change, and Functional
Conversion of Cytochrome c in Ionic Liquid via Crown Ether
Complexation” Anal. Chem. 78 (2006) 7735-7742.
41. C. Larsson, “Isolation of Membranes and Organelles from Plant
Cells” Academic Pr, New York Chapter11 (1983) 277.
42. N.L. Abbott, D. Blankschtein, T.A. Hatton, “Protein Partitioning in
Two-Phase Aqueous Polymer Systems: Decoupling of the Effects of
Protein Concentration, Salt Type, and Polymer Molecular Weight”
Macromolecules 26 (1993) 825-828.

43. M. Carlsson, P. Linse, F. Tjerneld, "Temperature-Dependent Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems" *Macromolecules* 26 (1993) 1546-1554.
44. A.P. B.Rabelo, E.B. Tambourgi, A. Pessoa, "Bromelain Partition in Two-Phase Aqueous Systems Containing PEO-PPO-PEO Block Copolymers" *J. Chromatogr. B* 807 (2004) 61-68.
45. M.J. Pires, M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral, "Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reverse Micelles" *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 290-301.
46. K.E. Goklen, T.A. Hatton, "Protein Extraction Using Reverse Micelles" *Biotechnol. Prog.* 1 (1985) 69.
47. E.B. Leodidis, T.A. Hatton, "Effect of Average Molecular Charge on Amino Acids Interfacial Partitioning in Reversed Micelles" *J. Colloid Interface Sci.* 147 (1991) 163-177.
48. M. Adachi, M. Harada, A. Shioi, Y. Sato, "Extraction of Amino Acids to Microemulsion" *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 7925.
49. K.E. Goklen T.A. Hatton, "Liquid-Liquid Extraction of Low Molecular Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles" *Sep. Sci. Technol.* 22 (1987) 931.
50. T.B.G. Wolbert, R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. Van't Riet, B.H. Biusterbosch, "Protein Transfer from an Aqueous Phase into Reversed Micelles-The Effect of Protein Size and Charge

Distribution“ Eur. J. Biochem. 184 (1989) 627-633.

51. G. Marcozzi, N. Correa, P.L. Luisi, M. Caselli, “Protein Extraction by Reverse Micelles:A study of the Factors Affecting the Forward and Backward Transfer of α -Chymotrypsin and Its Activity ” Biotechnol. Bioeng. 38 (1991) 1239-1246.
52. E.M. Leser, G. Wei, P.L. Luisi, M. Maestro, “Application of Reversed Micelles for the Extraction of Proteins“ Biochem. Biophys. Res. Commun. 135 (1986) 629-635.
53. K. Jones, “Affinity chromatography—An Overview” Anal. Process. 28 (1991) 140-142.
54. M.D. Scawen, “Dye Affinity Chromatography” Anal. Process. 28 (1991) 143-144.
55. D.C. Nash, H.A. Chase, “Modification of polystyrene matrices for the purification of proteins II . Effect of the degree of glutaraldehyde-poly(vinyl alcohol) crosslinking on various dye ligand chromatography systems” J. Chromatogr. A 776 (1997) 55-63.
56. A. Denizli, “Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed-bed column with Cibacron Blue F3GA-Zn(II) attached poly(EGDMA-HEMA) microbead” Reactive & Functional Polymers 40 (1999) 195-203.
57. A. Denizli, E. Piskin, “Dye-ligand affinity systems” J. Biochem. Biophys. Methods. 49 (2001) 391-416.



58. Gerhard Kopperschlager, "Methods in Enzymology, Vol.228-Aqueous Two-Phase Systems " Section II ,Chapter11,121-129.
59. S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong, "Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid" Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 191-199.
60. B. Salih, R. Zenobi, "MALDI Mass Spectrometry of Dye-Peptide and Dye-Protein Complexes" Anal. Chem. 70 (1998) 1536-1543.
61. S.V. Smirnova, I.I. Torocheshnikova, A.A. Formanovsky, I.V. Pletnev, "Solvent Extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohenano-18-crown-6" Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1369-1375.
62. G. Kopperschlager, G. Lorenz, E. Usbeck, "Application of affinity partitioning in an aqueous two-phase system to the investigation of triazine dye—enzyme interactions" J. Chromatography. A 259 (1983) 97-105.
63. G. Johansson, M. Joelsson, "Liquid-liquid extraction of lactate dehydrogenase from muscle using polymer-bound triazine dyes" Appl. Biochem. Biotechnol. 13 (1986) 15-27.
64. J. Kovacs-Nolan, M. Phillips, Y. Mine "Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health" J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 8421-8431.