

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

應用親和性染料剛果紅於離子液體中萃取

蛋白質

Application of affinity dye congo red in ionic  
liquid for protein extraction

研究生:謝文淵

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十七年六月

# 應用親和性染料剛果紅於離子液體中萃取蛋白質

學生：謝文淵

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, ILs) 因具有不揮發性、低毒性、高熱穩定性、良好導電度、可回收與重複使用等特殊物理與化學性質，近年來已引起廣泛的研究，並用於取代傳統會揮發的有機溶劑，以達到安全與環保的目的。



本實驗嘗試以具親和性的染料剛果紅(Congo Red)將其應用於疏水性離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，以液相/液相萃取的方式來萃取牛血清蛋白，並藉由銀離子交換法合成[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，並將其成功溶於[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，並以此系統對牛血清蛋白作萃取，在 pH 為 4.0 時正向萃取率可達近 100%，並藉由調控 pH 值與鹽類濃度，得知靜電力也為親和性染料能吸引蛋白質的其中一項因素，選用較為溫和的 pH 值，在不破壞系統的穩定性之下，以 pH9.0 並添加 1.0M 的 NaSCN 其蛋白質總回收率約為 50%。

另外本實驗也嘗試萃取其他蛋白質，以進一步探討本系統對蛋白

質間的作用力，在 pH 為 7.0 時，加入萃取劑[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]對牛血清蛋白萃取則無萃取率，而在 pH 為 4.0 或 7.0 萃取核糖核酸酶 A 時，萃取劑的加入與否對萃取率的影響並不顯著，最後在 pH 為 4.0 或 7.0 萃取溶菌酶，結果顯示萃取劑的加入對蛋白質萃取率有顯著提升，綜合以上得知本系統與蛋白質間必須要同時有靜電力與親和力，才會有較好的萃取率。

由於染料配體數量眾多，本實驗期望為離子液體液相/液相萃取蛋白質技術提供一個新的選擇與發展。



# Application of affinity dye congo red in ionic liquid for protein extraction

Student: Wen-Yuen Hsieh

Advisor: Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University

## Abstract

Owing to the special physical and chemical properties, such as non-volatility, minimal toxicity, high thermal stability, good conductivity and recyclability, room temperature ionic liquids (RTILs) have attracted wide research interests. Replacement of traditional volatile organic solvents with RTILs may potentially achieve environmental safety and protection goals.

In this study, we try to dissolve the affinity dye Congo Red in hydrophobic ionic liquid [Bmim][PF<sub>6</sub>] and apply this solution for liquid/liquid extractions of Bovine Serum Albumin (BSA) from aqueous solutions. During the extraction, Congo Red is easily dissolved into the aqueous solution. Thus this solution is inadequate for protein extraction. We then apply a simple ion exchange method to synthesis [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] and dissolve it in [Bmim][PF<sub>6</sub>] to form an extraction solution. The forward extraction efficiency (from the aqueous solution to the RTIL phase) reached almost 100 % while the aqueous solution was at pH 4.0. Protein molecules can be extracted back to another aqueous solution by manipulating the pH and the ionic strength. Under pH 9.0 and 1.0 M NaSCN, the back extraction reached 50%.

In addition, other proteins are extracted using this solution in order to examine the selectivity of this affinity compound. Under pH 7.0, negligible extraction of BSA is found. Addition with [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] to the IL does not significantly improve extraction of Ribonuclease A at either pH 4.0 or 7.0. As for lysozyme, addition of extractant [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] helps promote extraction under pH 4.0 and 7.0. In addition to the affinity of the dye to proteins, the electrostatic force between the dye and the protein is found to influence the extraction.



## 謝誌

兩年的研究生生活要告一個段落了，期間的努力與成長相信都會是我未來成功的基石。首先要感謝的是恩師余艇在學業與實驗上的指導，使我對分析化學的領域有了更深一層的認識。另外也感謝謝有容老師與凌永健老師在百忙之中能抽空前來參加口試，使論文更臻於完整。

再來要感謝的是實驗室成員在實驗與生活上的幫忙，大師姐淑慧，祝你實驗順利並能早日畢業，感謝經緯學長在儀器使用方法上的協助，超可愛學弟妹之有聊帥氣撲克牌魔術很有梗的印從與用頭撞球大美女琬茹；祝你們與淑鈴都能在未來找到明確的實驗方向。感謝大學同學政勳、之誠與盧叔等人常一起出去吃飯並分享研究生的生活；同在新竹的高中同學家豪常一起打球，有你們的陪伴使我的研究生生活更添歡笑。

最後感謝我的父母家人做我背後的最大支柱，使我能更順利的往前衝。謝謝大家!!與你們一起分享我畢業的喜悅。

## 總目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	V
總目錄.....	VI
圖目錄.....	X
表目錄.....	XIII
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 研究背景與理論.....	4
2-1 離子液體的介紹.....	4
2-1-1 離子液體的定義.....	4
2-1-2 離子液體的發展.....	6
2-1-3 離子液體的物理及化學性質.....	7
2-1-4 離子液體的應用.....	11
2-2 蛋白質萃取方法.....	13
2-2-1 雙水相溶劑系統.....	13
2-2-2 反微胞萃取法.....	13



2-2-3 親和層析法.....	16
2-3 染料配體(dye-ligands)的介紹與其應用.....	17
2-3-1 染料配體簡介.....	17
2-3-2 染料配體的應用.....	20
2-4 蛋白質簡介.....	22
2-4-1 蛋白質的組成與結構.....	22
2-4-2 牛血清蛋白簡介.....	22
第三章 實驗部份.....	22
3-1 試藥.....	24
3-1-1 合成 [Bmim][Cl]、[Bmim][PF <sub>6</sub> ]與[Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red] 之藥品.....	24
3-1-2 配製緩衝溶液之試劑.....	25
3-1-3 蛋白質分子.....	26
3-2 儀器.....	26
3-3 實驗流程.....	27
3-3-1 離子液體之合成.....	27
3-3-1-1 合成離子液體[Bmim][Cl]與[Bmim][PF <sub>6</sub> ].....	27
3-3-1-2 合成 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red].....	30
3-3-2 配製緩衝溶液.....	31



3-3-3 蛋白質定量方式.....	31
3-3-4 製備液相/液相萃取系統及萃取牛血清蛋白.....	32
3-3-4-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑萃取牛血清蛋白.....	32
3-3-4-1-1 配置萃取相.....	32
3-3-4-1-2 萃取牛血清蛋白.....	33
3-3-4-1-3 萃取時間對萃取效率的影響.....	33
3-3-4-1-4 pH 值對蛋白質萃取的效應.....	33
3-3-4-2 以 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]作為萃取劑萃取牛血清蛋白....	34
3-3-4-2-1 配置萃取相.....	34
3-3-4-2-2 萃取牛血清蛋白.....	35
3-3-4-2-3 攪拌時間對萃取率的影響.....	36
3-3-4-2-4 pH 值及離子強度對萃取率影響.....	36
3-3-4-2-5 萃取其他蛋白質水溶液.....	37
第四章 結果與討論.....	39
4-1 離子液體的合成.....	39
4-2 製備液相/液相萃取系統.....	46
4-2-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑.....	46
4-2-2 以[Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]為萃取劑.....	48
4-3 萃取牛血清蛋白.....	51

4-3-1 萃取劑濃度對牛血清蛋白萃取的影響.....	52
4-3-1-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑萃取牛血清蛋白.....	52
4-3-1-2 以[Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]為萃取劑萃取牛血清蛋白.....	54
4-3-2 比較萃取時間對萃取率的影響.....	56
4-3-2-1 Congo Red/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響.....	56
4-3-2-2 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響... .....	57
4-4 pH 值對蛋白質萃取的效應.....	58
4-5 離子強度對蛋白質萃取的效應.....	63
4-6 分別萃取其他蛋白質水溶液.....	66
第五章 結論.....	69
參考文獻.....	70



## 圖目錄

### 第二章

圖 2-1 常見離子液體的陽離子.....	5
圖 2-2 離子液體合成步驟.....	6
圖 2-3 常見離子液體陰離子之改變與疏水性變化.....	10
圖 2-4 親和層析法示意圖.....	17
圖 2-5 常見的染料配體.....	18
圖 2-6 剛果紅結構式.....	19

### 第三章

圖 3-1 [Bmim][PF <sub>6</sub> ]的合成示意圖.....	29
---	----



### 第四章

圖 4-1 [Bmim][PF <sub>6</sub> ]之 NMR 圖譜.....	41
圖 4-2 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red] Mass 圖譜.....	42
圖 4-3 [Bmim] <sub>2</sub> [Cl] NMR 圖譜.....	43
圖 4-4 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red] NMR 圖譜.....	44
圖 4-5 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]之 DSC 圖譜.....	45
圖 4-6 萃取劑在[Bmim][PF <sub>6</sub> ]中溶解狀況.....	47

圖 4-7 剛果紅在水相及[Bmim][PF <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> 中的 UV-visible 吸收光譜圖...	47
圖 4-8 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]在 [Bmim][PF <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> 中的 UV-visible 吸收光譜圖.....	49
圖 4-9 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]的校正曲線圖.....	50
圖 4-10 蛋白質萃取過程示意圖.....	51
圖 4-11 加入不同量剛果紅進入萃取相對不同濃度的牛血清蛋白水溶液進行正向萃取的結果.....	53
圖 4-12 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中不同萃取劑濃度對萃取率的影響.....	55
圖 4-13 Congo Red/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響.....	56
圖 4-14 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中反應時間對萃取率的影響...	57
圖 4-15 Congo Red/IL 系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的正向萃取效率.....	59
圖 4-16 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的正向萃取效率.....	60
圖 4-17 Congo Red/IL 系統中不同 pH 值的緩衝溶液的反向萃取結果.....	61
圖 4-18 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的反向萃取結果.....	62
圖 4-19 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中不同 pH 值及加入鹽類 NaSCN	

對牛血清蛋白水溶液的反向萃取效結果.....64

圖 4-20 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中加入鹽類 NaSCN 的濃度對牛  
血清蛋白水溶液的反向萃取效結果.....65



## 表目錄

### 第二章

表 2-1 不同種類氯化物之熔點.....	4
表 2-2 咪唑鹽類的離子液體熔點.....	8
表 2-3 數種 RTILs 的物理及化學性質.....	9
表 2-4 染料分子在親和層析上的應用.....	20
表 2-5 加入金屬離子後的染料分子對不同蛋白質之純化.....	21



### 第四章

表 4-1 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]在萃取相中清洗前後濃度的比較.....	50
表 4-2 [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]/IL 系統中對不同蛋白質的萃取率....	68

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

在分離化合物的過程中，液相／液相萃取是一種常被用來分離化合物的技術，溶劑的選擇一般是使用有機溶劑和水溶液形成不互溶的兩相，再藉由欲分離的化合物在兩相之間分佈上的不同，而達到分離的目的，但一般傳統上對於有機溶劑的選擇，使得萃取的過程中因為使用大量易燃、有毒、高揮發性的有機溶劑，造成實驗人員在操作上許多安全性的考量及限制，另外，產生的有機廢棄物更造成了環境上的污染，使用過後還需依環保法規妥善處理等等，在處於環保意識高漲、永續生存發展概念興起及綠色觀念推廣的現今，尋找降低對環境負擔或設計較安全的分離溶劑來取代危險物質的使用是迫切需要的課題。

室溫離子液體(Room Temperature Ionic Liquids, RTILs)是一種在室溫下為液體有機熔融鹽類，其以離子的型態所組成。可藉由陰離子和陽離子種類上的改變，以調控它們的疏水性、親水性和黏度等性質，因其具有低蒸氣壓、良好的熱穩定性、不可燃性、可溶解有機或無機物質<sup>1</sup>等獨特特質，與傳統有機溶劑相較之下，確實是大大降低了實驗操作上的風險，綜合前述優點，離子液體常被認為是一

種符合環保概念的「綠色溶劑」<sup>2</sup>。

近年來，離子液體的在化學方面上的研究已知被應用在萃取<sup>3</sup>、電化學<sup>4</sup>、催化反應<sup>5,6,7</sup>、有機合成<sup>5,6,8</sup>及高溫氣體感測器<sup>9</sup>等領域。隨著離子液體的研究發展愈來愈廣泛，使其在綠色化學上顯得更為重要。

## 1-2 研究動機

離子液體應用在液相/液相萃取的研究非常廣泛，已有研究發現在較低pH值的環境下，胺基酸會從水層中被萃取進離子液體相<sup>10</sup>，也有文獻指出可直接利用離子液體萃取DNA(dsDNA)<sup>11</sup>，或利用在含有羥基(hydroxyl-group)的疏水性離子液體中添加皇冠醚類(crown ethers)作修飾，來將蛋白質細胞色素c (cytochrome c)從水溶液中萃取到離子液體層<sup>12</sup>。本實驗室也曾利用離子液體1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim][PF<sub>6</sub>])當作萃取劑<sup>13</sup>，在[Bmim][PF<sub>6</sub>]中加入乙酸乙酯(ethyl acetate)和水之後可形成兩相系統，調控水樣品之pH值，可以影響蛋白質表面所帶電荷數目，再藉由蛋白質和離子液體間的靜電吸引力，可以達到萃取目的。但此實驗必須在強酸條件之下才有較好的萃取效果，對蛋白質活性會造成影響，另外本實驗室也曾將親和性染料CB3GA合成為[Bmim]<sub>3</sub>[CB3GA]以增強其在[Bmim][PF<sub>6</sub>]

中的溶解度，並對於萃取溶菌酶具有良好的回收率<sup>14,15</sup>。

由於親和性染料剛果紅和蛋白質牛血清蛋白(BSA)之間具有親和作用力<sup>16</sup>，能提高在萃取蛋白質上的選擇性。因此本實驗將剛果紅應用於離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，並合成[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]當作萃取劑溶於離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]，和蛋白質水溶液形成兩相，利用液相/液相萃取將蛋白質萃取到離子液體相中，期望拓展離子液體在液相/液相萃取方面的應用，並符合環保、安全的目的。



## 第二章 研究背景與理論

### 2-1 離子液體的介紹

#### 2-1-1 離子液體的定義

離子液體是由陰離子和陽離子所構成的有機熔融鹽類，和無機鹽類(如氯化鈉)的主要差異在於離子液體的陽離子為不對稱有機離子，且陰陽離子在大小或形狀上差異甚大，無法形成整齊的晶格排列所以熔點較一般無機鹽類降低許多<sup>24</sup>，如表2-1<sup>6</sup>，一般將熔點低於100°C的熔融鹽類稱為室溫離子液體(Room Temperature Ionic Liquids, RTILs)，簡稱離子液體(ILs)。

Salt	M.p. [°C]
NaCl	803
KCl	772
 Cl <sup>-</sup>	R=R'=methyl ([MMIM]Cl) <sup>[a]</sup> 125 R=methyl, R'=ethyl ([EMIM]Cl) 87 R=methyl, R'=n-butyl ([BMIM]Cl) 65

[a] MMIM=1,3-dimethylimidazolium

表 2-1 不同氯化物之熔點<sup>6</sup>

離子液體可經由特定陰離子和陽離子，透過不同組合方式可高達一兆種，常見陽離子如圖2-1<sup>6</sup>，改變陰離子與陽離子的組成，可得到具有不同性質的離子液體。因此離子液體又被稱作是「具設計性的溶劑」(designer solvent)。一般常見的離子液體陰離子有 bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide  $[(CF_3SO_2)_2N]^-$ 、ethanoate( $CH_3CO_2^-$ )、halide( $Br^-$ ,  $Cl^-$ ,  $I^-$ )、hexafluorophosphate( $PF_6^-$ )、tetrafluoroborate( $BF_4^-$ )、trifluoroethanoate( $CF_3CO_2^-$ )、及 trifluoromethylsulfonate( $CF_3SO_3^-$ )。

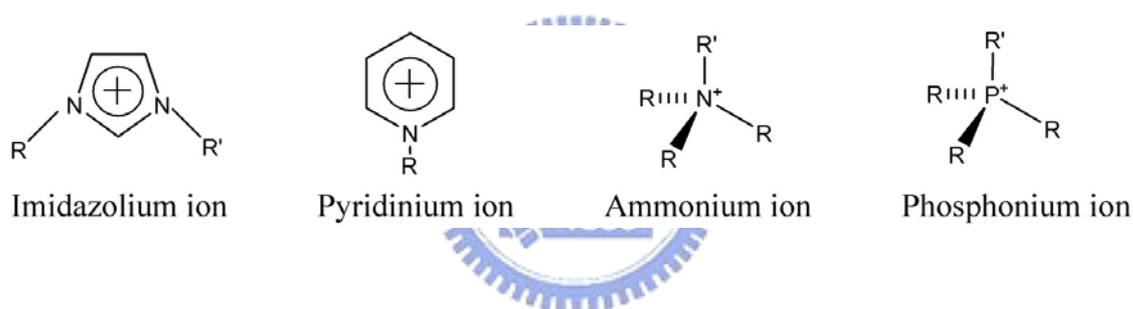


圖 2-1 常見離子液體的陽離子<sup>6</sup>

不同形式的離子液體在物性和化性上有相當大的差異，其基本的合成實驗流程如圖2-2<sup>8</sup>，這些合成的步驟都不算難，經過簡單的合成步驟後即可得到多樣化的離子液體。

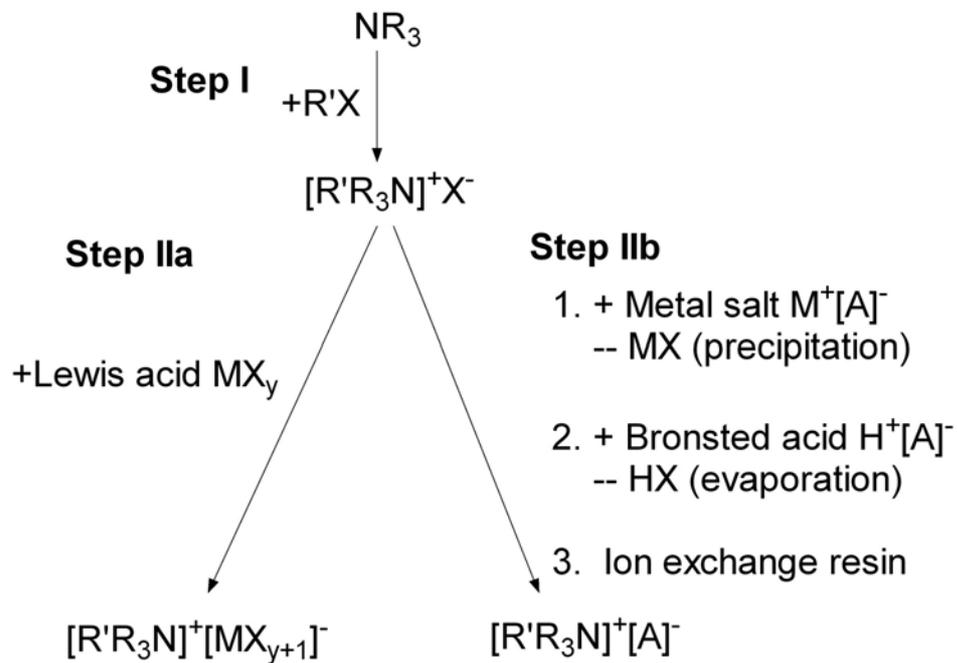


圖 2-2 離子液體合成步驟<sup>8</sup>



### 2-1-2 離子液體的發展

第一個被發現的離子液體是 ethylammonium nitrate ( $[\text{EtNH}_3]\text{NO}_3$ )，在 1914 年時被合成出來<sup>26</sup>，然而，其本身容易潮解，無法在普通環境下安定存在，所以在其後數十年離子液體的發展並未有重大突破，之後在 1951 年時 Hurley 發展出有機鋁離子液體 *N*-ethylpyridinium bromide- aluminium chloride ( $[\text{EtPy}]\text{Br}\text{-AlCl}_3$ )，並拿來當作電鍍鋁的浸漬液<sup>17</sup>，到了 1970 年代 Osteryoung 和 Wilkes 成功製備出一系列氯化鋁陰離子的融鹽(chloroaluminate melts)<sup>18</sup>，開啟了離子液體被大量應用在電化學的領域，陸續有離子液體的應用被發展

出來。直到 1992 年，Wilkes 研究團隊將  $\text{AgBF}_4$  加入  $[\text{Emim}][\text{I}]$  反應後，發展出咪唑(imidazolium)型陽離子所組成的離子液體  $[\text{Emim}][\text{BF}_4]$ <sup>19</sup>，這種離子液體在空氣及水中都相當安定，使得由此類陽離子所組成的離子液體在應用方面引起重視<sup>20</sup>，而往後所發展的離子液體也皆以此種類為主，近二十年來離子液體的相關文獻逐年快速成長，所以離子液體也被稱為二十一世紀新興的有機溶劑。

### 2-1-3 離子液體的物理及化學性質

離子液體是離子態的有機鹽類，具有熔點低、蒸氣壓極低、不可燃性、可設計性、寬廣的電化學電位窗口(potential window)、良好的導電與導熱性、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)等特殊性質，使得離子液體應用範圍非常廣泛。

在應用離子液體時，熔點是一個很重要的參考指標，而離子液體的熔點受陽離子的對稱性影響很大，對稱性差會使得晶體無法整齊的排列，而造成熔點下降，若分子間有氫鍵作用力則會使熔點增高。另外，陰離子的種類也會影響熔點，一般來說，陰離子團愈大則晶格愈無法整齊排列，而造成熔點愈低。常用咪唑鹽類(imidazolium)的離子液體熔點，如表 2-2<sup>7</sup>。



表 2-2 咪唑鹽類的離子液體熔點<sup>7</sup>



離子液體的性質會隨著陽離子和陰離子形式而有所不同，若單純改變陽離子上烷基的碳鏈長度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<sup>76</sup>；另外在利用冠狀醚(crown ether)萃取鹼金屬到 1-alkyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate 時，其萃取效果會隨著烷基碳鏈長度愈長而愈好<sup>74</sup>。離子液體的密度與陽離子團的大小較有關，一般來說，陽離子團愈大，密度相對減小，而離子液體的密度範圍則在 1.0 到 1.6 g/cm<sup>3</sup> 之間<sup>1</sup>；至於離子液體的黏度主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，當陽離子上碳鏈越長則凡得瓦耳力越大，造成黏度越大，而在陽離子相同情況下，不同陰離子的離子液體其黏度順序如下  $Cl^- > PF_6^- > BF_4^- > NO_3^- > (CF_3SO_3)_2N^-$ <sup>22</sup>。；離子液體的熔點則與陰離子團大小、陽離子的對稱性有關<sup>6,21</sup>。

ILs	Melting Point (°C)	Density (g/mL)	Viscosity (mPas)	Water solubility (g/100mL)
[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	10,-8	1.36(25 <sup>0</sup> C)	148(25 <sup>0</sup> C)	1.88
[C <sub>6</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	-61	1.29(25 <sup>0</sup> C)	560(25 <sup>0</sup> C)	0.75
[C <sub>8</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]		1.20(25 <sup>0</sup> C)	682(25 <sup>0</sup> C)	0.20
[Cmim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	22	1.56	44	
[C <sub>2</sub> mim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	-3	1.50	34	1.77
[C <sub>4</sub> mim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	-4	1.42	52	0.80
[C <sub>6</sub> mim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]		1.33		0.34
[C <sub>8</sub> mim][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]		1.31		0.21
[C <sub>4</sub> mim][Cl]	65	1.10(25 <sup>0</sup> C)		Miscible
[C <sub>2</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	15	1.28(25 <sup>0</sup> C)	37(25 <sup>0</sup> C)	Miscible
[C <sub>4</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	-81	1.21(25 <sup>0</sup> C)	180(25 <sup>0</sup> C)	Miscible
[C <sub>6</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]			314(20 <sup>0</sup> C)	Miscible
[C <sub>4</sub> mim][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	16	1.29	90(20 <sup>0</sup> C)	Miscible

表 2-3 數種 RTILs 的物理及化學性質<sup>1</sup>。

在親水性方面，[Bmim][Cl]這種離子液體可與水以任何比例互溶，具有相當的親水性，若將陰離子置換成[PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup>，形成的離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]則具有相當的疏水性，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，陽離子上的烷基碳鏈越長會造成離子液體疏水性越強<sup>22,23</sup>，圖 2-4 表示常見離子液體之陰離子對其在水中溶解度的影響<sup>1</sup>。

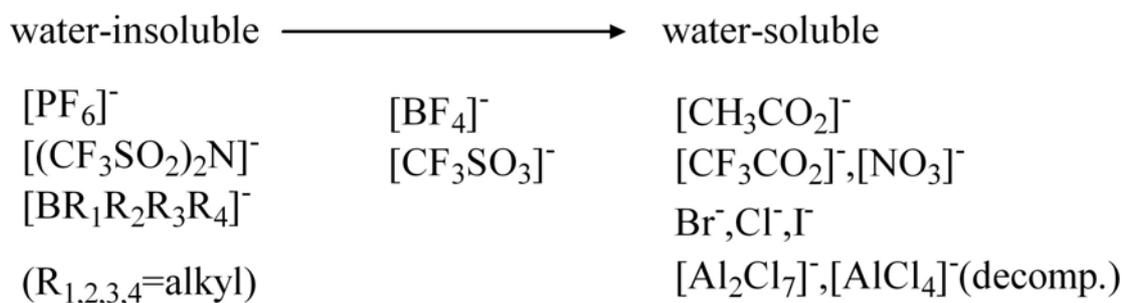


圖 2-3 常見離子液體陰離子之改變與疏水性變化<sup>24</sup>

化學家利用 empirical solvent polarity scales 此種方式可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<sup>22,25</sup>。由於單純使用極性來解釋離子液體的特性，並無法解釋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<sup>5,25,27</sup>，於是便有學者試著用 Abraham 提出的“溶劑化參數模型”(solvation parameter model)<sup>28</sup>，來表示離子液體和溶質之間的作用力<sup>28</sup>，在這個 model 裡，考慮到了每一種媒合作用力的參數，其方程式如下：

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

$r$ 、 $s$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $l$  分別代表離子液體和溶質  $\pi$  電子和非鍵結電子之間作用的能力、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，以期將離子液體應用在不同的領域。

近年來，一些具有特殊功能性的離子液體也陸續被合成出來，例如：利用胺基酸作為陰離子的離子液體<sup>29</sup>以及含DNA離子液體等等<sup>30</sup>。也有文獻提出帶有金屬磁性的離子液體<sup>31</sup>，他們推測此種物質為非固體亦非液體的狀態，若進一步獲得證實，此種新物質狀態可能推翻一般所認為的物質三態。

#### 2-1-4 離子液體的應用

離子液體是由離子鍵所形成的化合物，大部分的離子液體都具有不錯的導電度及寬廣的電位窗(potential window)，可將其應用在電化學領域， $[C_3H_7(CH_3)_3N][(CF_3SO_2)_2N]$ 用玻璃碳電極掃引時其電位窗可達  $5.7 V^4$ ，算是具有相當寬廣的電位窗。

離子液體具有高黏度、高熱穩定性、對化合物有多種作用力及容易填充在管柱中等作為 GC 靜相所需的條件<sup>26,32</sup>，具有可分離極性與非極性物質的雙重性質 (dual-nature)<sup>32,33</sup>；選擇適當的離子液體作靜相，甚至可有效分離 acetylated amines、chiral alcohols、chiral epoxides、chiral sulfoxides 等鏡像異構物<sup>34,35</sup>。應用於質譜方面，離子液體的不揮發性、可吸收雷射光而不分解、可溶解生物樣品寡糖、蛋

白質和高分子等優點，使其可用來作為 MALDI 的基質，以提升離子化的效果。利用傳統 MALDI 基質 CHCA ( $\alpha$ -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<sup>36</sup>。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<sup>5</sup>。

離子液體可藉由陰離子的改變而調整成其疏水性，在液相/液相萃取佔有很大優勢。在離子液體中加入冠醚類(crown ether)分子作為萃取劑，萃取重金屬離子<sup>37</sup>、胺基酸<sup>40</sup>以及蛋白質細胞色素 c<sup>12,39</sup>；也有研究直接在陽離子上修飾上硫醚、硫脲等官能基，形成帶有特定功能的離子液體來萃取  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ <sup>41</sup>，這類的離子液體又稱為 task-specific ILs。用離子液體當介質，可將奈米金和奈米棒從水相轉移到離子液體相<sup>42</sup>。

離子液體的應用已是綠色化學研究的一環，其多樣的性質與廣泛的應用範圍再加上環保意識的覺醒，使得近年來各界關於離子液體的研究與日俱增，在未來具有良好的發展性。

## 2-2 蛋白質萃取方法

### 2-2-1 雙水相溶劑系統

雙水相溶劑系統是瑞典的 Albertson 於 1958 年所提出<sup>43</sup>，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。利用化合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。化合物分子在兩相的分配情形受許多因素所影響，主要包括緩衝液濃度<sup>44,45</sup>、溶液酸鹼值<sup>46</sup>、溫度<sup>45</sup>、高分子聚合物種類<sup>44</sup>等。

雙水相溶劑系統因操作方法簡單、所需成本低廉、操作條件溫和、分離步驟少、生物分子活性保存佳，且不需使用有機溶劑，所以廣泛的被應用在蛋白質、核酸等生物分子的萃取分離及純化上<sup>44</sup>；另外也曾在逆流層析儀(countercurrent chromatography)中使用，進行製備型的分離<sup>47,48</sup>。

### 2-2-2 反微胞萃取法

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疏水基團朝外，親水端朝內的反微胞，為一個可包圍水分子的團狀結構，

中央形成水核，再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；反微胞萃取法具有分離大量樣品的能力外及分離後能保有生物分子的活性，使其備受矚目，因此已有文獻發表利用反微胞萃取法來分離蛋白質<sup>49,50</sup>或胺基酸<sup>51,52</sup>。

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靜電作用力 (electrostatic interactions) 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)<sup>53</sup>；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<sup>54</sup>。若使用非離子型的界面活性劑，靜電作用力的影響便不大，一般認為是水溶性分子疏水基部分和界面活性劑上的疏水基之間產生凡得瓦爾作用力，而達到萃取目的<sup>55,56</sup>，所以在萃取時較不受 pH 值影響，對蛋白質傷害也比較小

<sup>57</sup>，因此適合用在生物分子上。另外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<sup>49</sup>，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，界面活性劑親水基與蛋白質表面之間產生遮蔽效應 (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<sup>58,59</sup>。但是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態 (microemulsion) 而無法分層，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，因此鹽類濃度必須控制在一定範圍內，方能有良好的萃取效果。另外不同離子種類所造成的影響亦有所差異，當離子半徑相同時，其電荷越大，則遮蔽效應越強；當離子的電荷相同時，離子半徑越大，則遮蔽效應越明顯<sup>60</sup>。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，另外也有文獻提出鹽類 NaSCN 在對牛血清蛋白進行脫附時，陰離子 SCN<sup>-</sup>除了本身帶負電而能產生遮蔽效應外，其 SCN<sup>-</sup>的結構還能有效與牛血清蛋白產生作用<sup>38</sup>，以提升脫附的效率。

### 2-2-3 親和層析法<sup>61</sup>(affinity chromatography)

親和層析也稱為選擇性層析 (selective chromatography)，常用於純化蛋白質，簡單的示意圖如圖 2-4<sup>62</sup>，方法是將欲分離物的 substrate 接在固體支持物上，再用此支持物填裝管柱，當含有欲分離物的樣品溶液通過管柱時，欲分離物會被吸附在管柱上，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，將欲分離物從管柱中沖提出來，通常採用改變 pH 值、離子強度或緩衝液的組成，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欲分離物。而所謂的親和力，乃是指生物大分子和其配體 (ligand) 之間形成可逆結合的能力，如抗體和抗原、酵素和它的受質 (substrate)、RNA 和其互補的 DNA、激素和受體 (receptor)<sup>63</sup> 等，親和層析就是根據這種親和力發展出來的純化方法，另外，親和層析也可在管柱內嵌合住金屬離子，形成固定化金屬親和層析法，用來純化分離蛋白質<sup>64, 65</sup>。

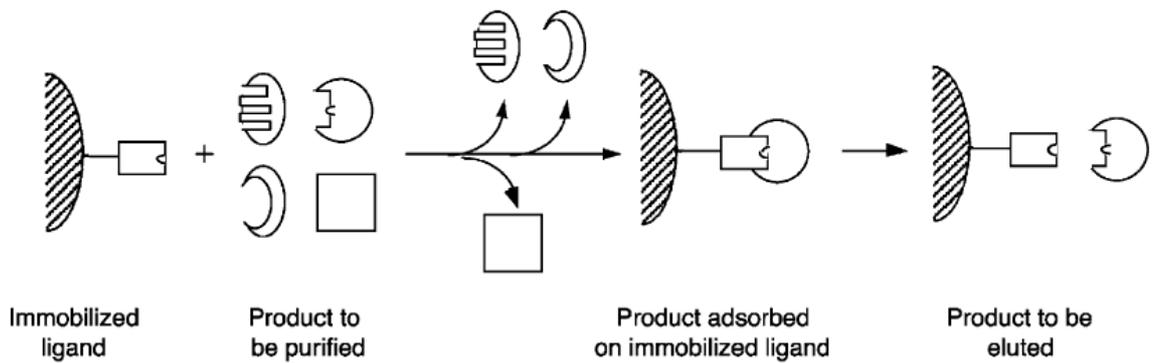


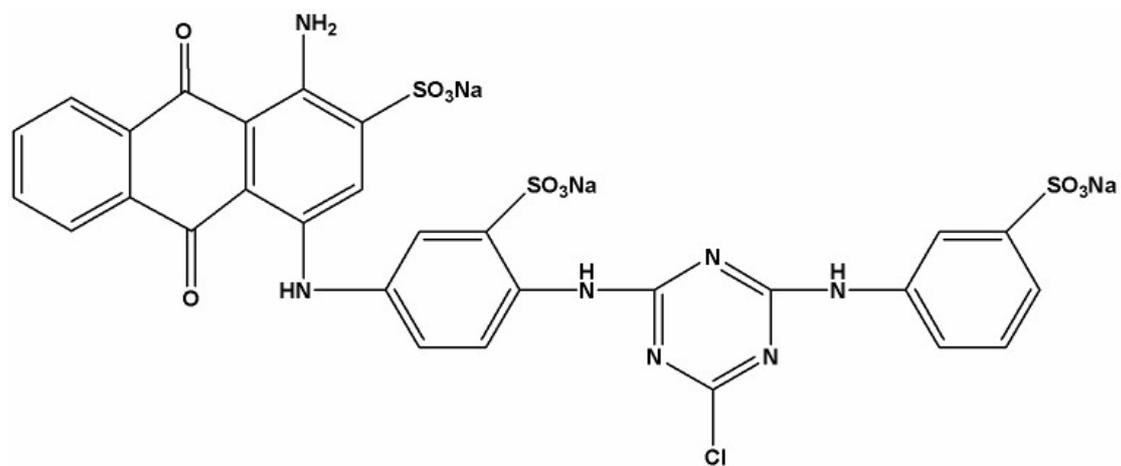
圖 2-4 親和層析法示意圖<sup>62</sup>

## 2-3 染料配體(dye-ligands)的介紹與應用

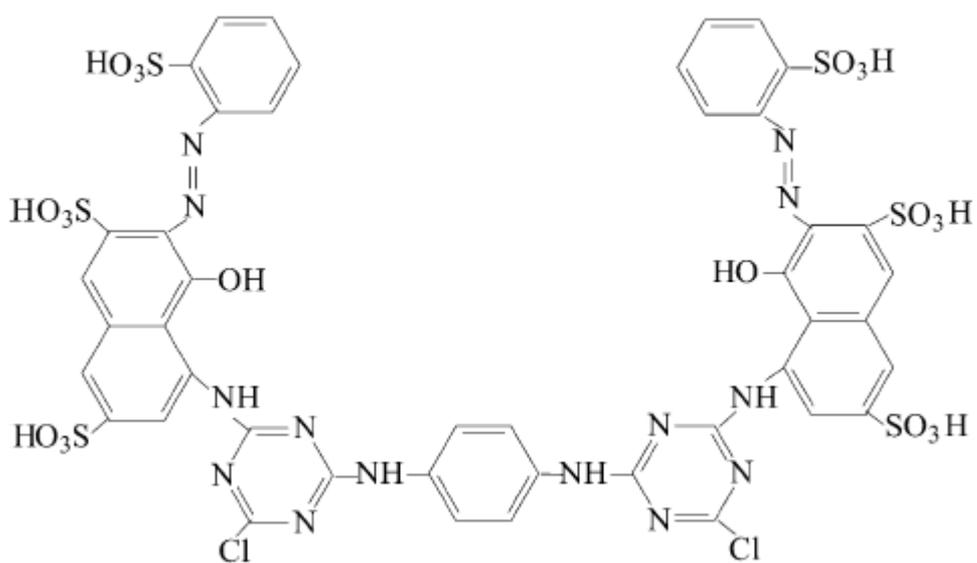
### 2-3-1 染料配體簡介

染料配體應用在親和層析上具有穩定、合成容易、純化步驟簡單、價格低廉、活性部位可輕易和管柱填充物反應而固定於管柱上等優點，因此常用來取代天然配體純化生物分子。這種染料原先是在紡織業上的染色，和棉質布料間可形成共價鍵，因意外發現Blue dextran和特定的激酶(kinase)之間會產生作用力結合<sup>66</sup>。在1972年，Roschlau和Hess首次將Cibacron Blue這種藍色染料利用共價鍵固定到層析管柱中的Sephadex G-200上，純化yeast pyruvate kinase<sup>67</sup>。自此之後這樣的觀念便廣泛的使用在蛋白質純化上。

常見的染料配體及其結構如圖2-5，而本實驗所選擇的染料配體是剛果紅，其結構如圖2-6。



Cibacron Blue F3G-A(CB3GA)



Procion red H-E3B



圖 2-5 常見的染料配體

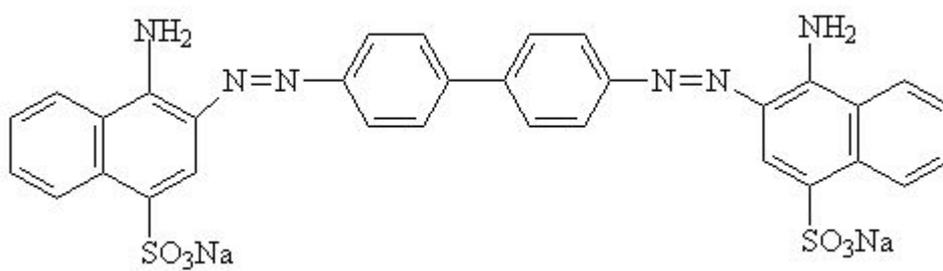
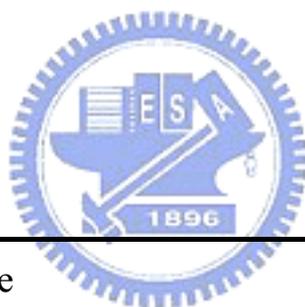


圖 2-6 剛果紅結構式

剛果紅已知被應用及親和管柱層析，並可進行多種酵素與蛋白質的分離純化<sup>68,69</sup>。

### 2-3-2 染料配體的應用

染料配體最早曾被應用在親和層析<sup>70,71</sup>或雙水相系統<sup>72</sup>，而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<sup>73</sup>，利由不同管柱基質作探討，而不同的染料分子可用來純化不同的蛋白質，如下頁表 2-4 所示<sup>61</sup>。也有研究另外加入金屬離子，幫助吸附蛋白質，如表 2-5<sup>62</sup>。



Enzyme	Dye
Glycerol kinase	Procion Blue MX-3G
Glucose kinase	Procion Brown H-3R
Glycerol dehydrogenase	Procion Red HE-3B
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	Procion Blue MX-4G
Malate dehydrogenase	Procion Red H-3B
Tryptophanyl tRNA synthetase	Procion Brown MX-5BR
Human serum albumin	Procion Blue HB
Carboxypetidase G <sub>2</sub>	Procion Red H-8BN

表 2-4 染料分子在親和層析上的應用<sup>61</sup>

Protein	Promoting metal ion	Dye
Carboxypeptidase G <sub>2</sub>	Zn <sup>2+</sup>	Procion Red H-8BN
Alkaline phosphatase	Zn <sup>2+</sup>	Procion Yellow H-A
Hexokinase	Mg <sup>2+</sup>	Procion Green H-4G
Tyrosinase	Cu <sup>2+</sup>	Procion Blue HE-RD
Ovalbumin	Al <sup>3+</sup>	Cibacron Blue F3GA
Catalase	Fe <sup>3+</sup>	Cibacron Blue F3GA
	Fe <sup>3+</sup>	Congo Red
Albumin	Cu <sup>2+</sup>	Congo Red
	Zn <sup>2+</sup>	Cibacron Blue F3GA
Glucose oxidase	Fe <sup>3+</sup>	Cibacron Blue F3GA
Lysozyme	Cu <sup>2+</sup>	Cibacron Blue F3GA

表 2-5 加入金屬離子後的染料分子對不同蛋白質之純化<sup>62</sup>

染料上的磺酸基 pKa 值低於零，在 pH1~14 都帶負電。大部分的染料配體上都帶有磺酸基，而精氨酸是所有胺基酸中 pKa 值最高。因此推測精氨酸-磺酸基(arginine-sulfonate)這種特定的靜電作用力能促進染料和蛋白質的結合。靜電吸引力也在此被歸為染料-蛋白質作用力主要因素，另外染料分子結構類似生物配體，便可和特定蛋白質的活性部位專一性結合，其他如蛋白質疏水性和氫鍵作用力則為次要因素。染料配體價格便宜且穩定，因此已許多研究將其固定在不同材料純化不同蛋白質。

## 2-4 蛋白質簡介

### 2-4-1 蛋白質的組成與結構

蛋白質的基本組成為胺基酸，相鄰胺基酸之間藉由氨基與羧基進行脫水反應之後以線性排列的方式形成胜肽鍵(peptide bond)，再經雙硫鍵與非共價鍵的作用力結合，形成立體結構的蛋白質，不同的蛋白質除了組成的胺基酸種類與數量不同外，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。

### 2-4-2 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin)簡介

牛血清蛋白為牛血清中的簡單蛋白，是血液的主要成分(38g/100ml)，分子量 63kD。等電點 4.6。含氮量 16%，含糖量 0.08%，僅含己糖和己糖胺，含脂量只有 0.2%。蛋白由 581 個胺基酸殘基組成，其中 35 個半胱氨酸組成 17 個雙硫鍵。牛血清蛋白可與多種陽離子、陰離子和其他小分子物質結合。血液中的牛血清蛋白主要

維持滲透壓作用、pH 緩衝作用、載體作用和營養作用。在動物細胞無血清培養中，添加白蛋白可起到生理和機械保護作用和載體作用。



## 第三章 實驗部份

### 3-1 試藥

#### 3-1-1 合成[Bmim][Cl]、[Bmim][PF<sub>6</sub>]與[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]

##### 之藥品

1-chlorobutane, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>Cl, 99 %, GR grade (Janssen Chimica, USA)

1-methylimidazole, C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>, 99 %, GR grade (Acros, USA)

Ethyl Acetate, CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, HPLC/spectro grade (Mallinckrodt, USA)

Potassium hexafluorophosphate, KPF<sub>6</sub>, 99 %, GR grade (Showa, Japan)

Magnesium sulfate anhydrous, MgSO<sub>4</sub>, 99 %, GR grade (Showa, Japan)

Congo Red , C<sub>32</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>, 85% (Sigma, USA)

Silver nitrate, AgNO<sub>3</sub>, GR grade, 99.8 % (Showa, Japan)

Acetone Nitrile, HPLC grade, 99.9 % (TEDIA, USA)

### 3-1-2 配製緩衝溶液之試劑

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

Potassium chloride, KCl, GR grade (Scharlau, Barcelona, Spain)

Glycine, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>, GR grade (Riedel-de Haën, Germany)

Acetic Acid, CH<sub>3</sub>COOH, analytical grade (Scharlau, Barcelona, Japan)

Sodium acetate, CH<sub>3</sub>COONa, 98.5 %, GR grade (Showa, Japan)

Sodium dihydrogenphosphate anhydrous, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98.0 %, GR grade (Showa, Japan)

Potassium dihydrogenphosphate, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 99%, GR grade, (Showa, Japan)

Tris(hydroxymethyl) aminomethane, (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>, ACS grade (TEDIA, USA)

Sodium hydrogen carbonate, NaHCO<sub>3</sub>, 99.5 %, GR grade (Showa, Japan)

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

Citric acid, 100 %, HOC(COOH)(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> (Anhydrous, powder), ACS grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Sodium citrate, 99.6 %, HOC(COONa)(CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, ACS grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Sodium chloride, NaCl, 99.6%, GR grade (Scharlau, Barcelona, Spain)

Sodium Thiocyanate, NaSCN, 99%, (Hanawa, Japan)

D.I.W. 去離子水，經由 Millipore (Bedford MA, USA) 的 Milli-Q plus 處理

### 3-1-3 蛋白質分子

Bovine serum albumin (牛血清蛋白), 簡稱 BSA, M.W. : 63000, 98%,  
pI : 4.6, (Sigma,USA),

Ribonuclease A from Bovine Pancreas, M.W.13700 pI=9.45 (Sigma,,  
USA)

Lysozyme (溶菌酶) from chicken egg white, M.W. : 14400, 97%,  
pI : 10.7, (Sigma,USA)

### 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(reversed-phase HPLC column): Vercopak  
Inertsil 7 octadecyl silica-3 (ODS-3), (建宏層析, 台北)  
管柱尺寸為 4.6×250 mm, 孔徑大小為 10 μm, 用於蛋白質的分  
析與定量。

(3)梯度幫浦(Gradient Pump): Degasys DG 2410, (Lab Alliance, USA)  
結合 Series III pump, 最多可做四種動相組成的梯度混合。

(4)核磁共振儀(Nuclear Magnetic Resonance, NMR): DRX-300,  
(Bruker, Germany); Uniytinova-500, (Varian, USA)

(5)酸鹼度計(pH meter): Microprocessor pH Meter SP-2200, (Suntex)

(6)離心機(Centrifuges): EBA20, (Hettich, Germany)

最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g

(7)電子天秤(Electronic Balance): Bruker Daltonic Esuire 2000, (Leipzig, Germany)

(8)質譜儀(Mass Spectrometer): Quattro Micro, (Waters,USA)

(9)微差掃描卡計(Differential Scanning Calorimetry, DSC):

使用 Du Pont TA 2000 及 Computer/Thermal Analyzer。

### 3-3 實驗流程

#### 3-3-1 合成離子液體[Bmim][Cl]與[Bmim][PF<sub>6</sub>]<sup>27</sup>

1.將 0.9 mole (94.05 ml) 1-chlorobutane 和 0.9 mole (71.7ml)

1-methylimidazole 加入至 250 ml 圓底瓶中，並架設迴流裝置，加熱至 80°C 後，持續攪拌約 48 hr，可得一金黃色黏稠液體

1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl])。

2.將此黏稠液體到入 500ml 分液漏斗中，加入 75 ml 的乙酸乙酯洗去未反應物，取出下層液於圓底瓶中，並再重覆此步驟一次。

3. 將所得金黃色黏稠狀液體加熱至 90°C 攪拌一天，去除乙酸乙酯。

4. 取 0.9 莫耳 KPF<sub>6</sub> 加入 450 ml 去離子水中，室溫下攪拌至溶解。

5. 將所得金黃色黏稠狀液體加入裝有 KPF<sub>6</sub> 溶液的燒杯中，以磁石攪拌 1 小時。

6. 將溶液倒入分液漏斗中，取出水層，再加入少許去離子水，除去水層，重覆此步驟數次直到水層成中性。
7. 取出下層離子液體，加入硫酸鎂除去離子液體層中的水，經重力過濾後，即可得到 1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate ([Bmim][PF<sub>6</sub>])。
8. 合成示意圖如圖 3-1，最後將產物送測 <sup>1</sup>H-NMR，以鑑定之。



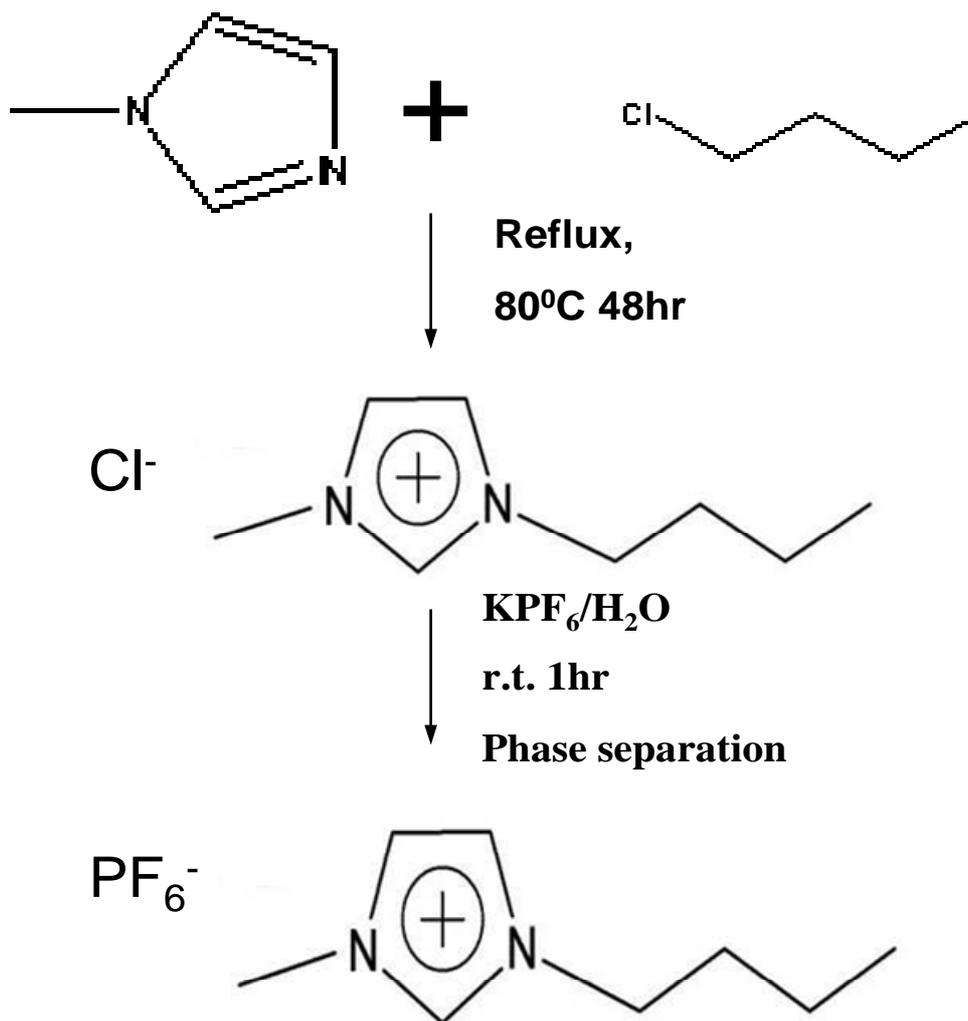
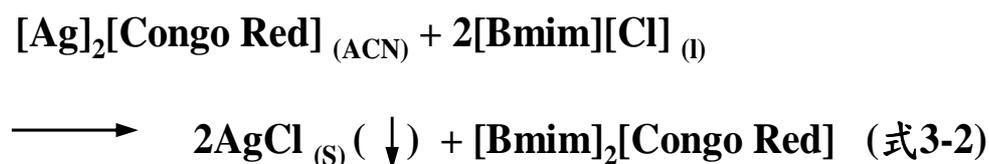
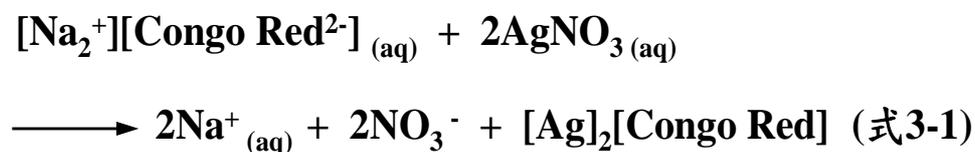


圖 3-1、[Bmim][PF<sub>6</sub>]的合成示意圖

### 3-3-1-2 合成 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]

1. 取  $5 \times 10^{-4}$  mole (0.3485 g) 剛果紅，溶於 100 ml 去離子水，再加入  $5 \times 10^{-3}$  mole (0.85 g)  $\text{AgNO}_3$ ，室溫下攪拌 24 hr。
2. 將所得溶液以 6000 rpm 轉速離心 5 min，將水相去除後，以 10 ml 冰水清洗沉澱物，並再重複清洗兩次。
3. 將沉澱物置於烘箱， $60^\circ\text{C}$  條件下，烘 72hr，可得到暗紅色固體  $[\text{Ag}]_2[\text{Congo Red}]$ 。
4. 將步驟 3. 所得的  $[\text{Ag}]_2[\text{Congo Red}]$ ，加入 50 ml 乙晴溶解之，再加入兩倍莫耳數的  $[\text{BMIM}][\text{Cl}]$ ， $40^\circ\text{C}$  攪拌 72 hr。
5. 將所得溶液以 6000 rpm 轉速離心 5 min，去除沉澱物  $\text{AgCl}$ ，再以旋轉濃縮機去除乙晴。
7. 合成反應式如式 3-1、3-2，產物以 UV-vis、Mass、DSC 鑑定之。



### 3-3-2 配製緩衝溶液

0.05 M KCl / 0.1 M HCl 調配 pH 範圍 1.0-2.2

0.05M Glycine / 0.1M HCl 調配 pH 範圍 2.3-3.5

(用於 Congo Red/IL 系統)

0.05M Citric acid/0.05M Sodium citrate 調配 pH 3.0

(用於[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統)

0.05 M CH<sub>3</sub>COOH / 0.05 M CH<sub>3</sub>COONa 調配 pH 範圍 3.6-5.0

0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0.1 M NaOH 調配 pH 範圍 5.8-6.9

0.05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethane / 0.1M HCl 調配 pH 範圍

7.0-9.0

0.05M NaHCO<sub>3</sub> / 0.1M NaOH 調配 pH 範圍 9.6-11.0

0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0.1M NaOH 調配 pH 範圍 10.9-12.0

### 3-3-3 蛋白質定量方式

本實驗將萃取過後的蛋白質水溶液用 HPLC 分析，以紫外光偵測器作為訊號偵測。蛋白質中的胺基酸具有芳香基團，在波長 280 nm 會吸光，所以本實驗選擇 280 nm 光源對蛋白質作定量。

#### 3-3-3-1 利用 HPLC 定量蛋白質水溶液

1. 用動相 A (含有 20 % ACN、0.1 % TFA 的水溶液)沖提 reverse phase

HPLC 使平衡 10 分鐘。

2. 注入 20  $\mu$ L 樣品。
3. 以動相 A+B(含有 80 % ACN、 0.1 % TFA 的水溶液)，做梯度沖提  
並以所得積分面積定量。

### 3-3-4 製備液相/液相萃取系統及萃取牛血清蛋白

在本實驗中萃取系統分為兩種方式，一種是將親和性染料剛果紅直接溶入[Bmim][PF<sub>6</sub>]攪拌作用，使部分剛果紅轉移到離子液體層，再加入去離子水形成液相/液相萃取系統。另一種方式則是將親和性染料先合成為離子液體[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，在將其作為萃取劑加到萃取相中。



#### 3-3-4-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑萃取牛血清蛋白

##### 3-3-4-1-1 配置萃取相

1. 分別將 5.0 mg、10.0 mg、20.0 mg、30.0 mg 剛果紅粉末加入 10ml[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，在室溫下攪拌 20 分鐘使其溶解，再加入等體積的去離子水攪拌平衡一天後，將懸浮在[Bmim][PF<sub>6</sub>]中未溶解的染料粉末清洗至水層；並移去水相，加入新的去離子水清洗，重覆步驟兩次。

##### 3-3-4-1-2 萃取牛血清蛋白

### 1. 正向萃取：

以 50mM CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH buffer (pH=4)，緩衝溶液配製 2.0\*10<sup>2</sup>、5.0\*10<sup>2</sup>、1.0\*10<sup>3</sup> mg/L 的牛血清蛋白水溶液，取 1.0 ml 牛血清蛋白水溶液與 1.0 ml 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。

### 3-3-4-1-3 比較萃取時間對萃取效率的影響

將等體積 pH 4.0 的 2.0\*10<sup>2</sup> mg/L 牛血清蛋白水溶液與萃取相(將 20.0 mg 剛果紅粉末加入 10ml[Bmim][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub> 中，清洗過後)置入 20 ml 樣品瓶中，分別以磁石攪拌 1、5、10、20、30、60 分鐘，探討攪拌時間對蛋白質正向萃取的影響。

### 3-3-4-1-4 pH 值對蛋白質萃取的效應

#### 1. 配製 pH 範圍 1.0~12.0 的 200 mg/L 牛血清蛋白水溶液

#### 2. 正向萃取：

將 pH 範圍 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的 2.0\*10<sup>2</sup>mg/L 牛血清蛋白水溶液分別取 1.0 ml 與 1.0 ml 配製的萃取相(將 20.0 mg 剛果紅粉末加入 10ml[Bmim][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub> 中，清洗過後)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。

### 3. 反向萃取：

取 pH 4.0 的  $2.0 \times 10^2$  mg/L 牛血清蛋白水溶液 1.0 ml 與 1.0 ml 的萃取相(將 20.0 mg 剛果紅粉末加入 10ml[Bmim][PF<sub>6</sub>] 中，清洗過後)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 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的緩衝溶液，置於室溫下攪拌 30 分鐘，靜置分層，取出上層水相以 HPLC 定量。



#### 3-3-4-2 以 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]作為萃取劑萃取牛血清蛋白

##### 3-3-4-2-1 配置萃取相

1.分別將 30.0、50.0、100.0、150.0、200.0 mg [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]溶入 10ml 的[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，加入等體積去離子水，長時間攪拌，使萃取系統能充分與水相平衡，之後移除水相，再加入新的等體積的去離子水。

2.定量方法:將[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]溶於[Bmim][PF<sub>6</sub>]，配製成濃度分別為 3.0、5.0、10.0、15.0、20.0 mg/ml，各取 20 μl 並加入 3.0 ml 甲醇，由紫外光-可見光光譜儀針對波長 497 nm 吸收值做

出檢量線。再將步驟 1.平衡過後的萃取相各取  $20\mu\text{l}$  並加入  $3.0\text{ ml}$  甲醇，測出波長  $497\text{nm}$  吸收值，帶入檢量線後，即可得到萃取相中  $[\text{Bmim}]_2[\text{Congo Red}]$  的濃度。

3.萃取相之 K 值:將步驟 1.配好的濃度為  $9.6\text{mM}$  的萃取系統，取出上層相體積  $20\mu\text{l}$  並加入  $3.0\text{ ml}$  甲醇，由紫外光-可見光光譜儀針對波長  $497\text{ nm}$  測量其吸收值，再取出下層相體積  $20\mu\text{l}$  並加入  $3.0\text{ ml}$  甲醇，並測量其在波長  $497\text{ nm}$  的吸收值，再將由上層相得到的吸收值除以由下層相得到的吸收值，即可求出 K 值。



#### 3-3-4-2-2 萃取牛血清蛋白

正向萃取: 將配置好的  $2.7$ 、 $5.3$ 、 $9.6$ 、 $15.7$ 、 $19.7\text{ mM}$  濃度的萃取相  $1.0\text{ ml}$  分別加入  $2.0 \times 10^2$ 、 $5.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^3\text{ mg/L}$ 、 $\text{pH } 4.0$  的牛血清蛋白溶液  $1.0\text{ml}$ ，攪拌  $30$  分鐘，靜置分層，取上層水溶液做定量。

#### 3-3-4-2-3 攪拌時間對萃取率影響

正向萃取:取含有  $9.6\text{mM}$  濃度的萃取相  $1.0\text{ ml}$  分別加入  $2.0 \times 10^2\text{ mg/L}$ 、 $\text{pH } 4.0$  的牛血清蛋白水溶液  $1.0\text{ml}$ ，攪拌  $0.5$ 、 $1$ 、 $5$ 、

10、20、30、60 分鐘，靜置 30 分鐘，取上層水溶液做定量。

#### 3-3-4-2-4 改變 pH 值及離子強度對萃取率影響

##### (a)對正向萃取之影響

正向萃取: 取含有 9.6mM 濃度的萃取相 1.0 ml 分別加入  $2.0 \times 10^2$  mg/L、pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的牛血清蛋白水溶液 1.0ml，攪拌 30 分鐘，靜置分層，取上層水溶液做定量。

##### (b) 對反向萃取之影響

正向萃取: 取含有 9.6mM 濃度的萃取相 1.0 ml 加入  $2.0 \times 10^2$  mg/L、pH 4.0 的牛血清蛋白水溶液 1.0ml，攪拌 30 分鐘，靜置分層，取上層水溶液做定量。

反向萃取:取正向萃取完的離子液體層，加入等體積 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的緩衝溶液，攪拌 30 分鐘，靜置分層，取上層水溶液做定量。

##### (c) 離子強度對反向萃取之影響

正向萃取: 取含有 9.6mM 濃度的萃取相 1.0 ml 加入  $2.0 \times 10^2$ mg/L、pH 4.0 的牛血清蛋白水溶液 1.0ml，攪拌 30 分鐘，靜置分層，

取上層水溶液做定量。

反向萃取:取正向萃取完的離子液體層，加入含等體積 1.0M NaSCN  
pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的緩衝溶液，攪拌 30  
分鐘，靜置分層，取上層水溶液做定量。

#### (d) 鹽類濃度對反向萃取之影響

正向萃取: 取含有 9.6mM 濃度的萃取相 1.0 ml 加入等體積  $2.0 \times 10^2$   
mg/L、pH 4.0 的牛血清蛋白水溶液，攪拌 30 分鐘，靜置  
分層，取上層水溶液做定量。

反向萃取:取正向萃取完的離子液體層，加入等體積不同濃度 NaSCN  
pH 9.0 的緩衝溶液，攪拌 30 分鐘，靜置分層，

#### 3-3-4-2-5 萃取其他蛋白質水溶液

除了牛血清蛋白水溶液外，本實驗也對其他 pI 值差異較大的蛋  
白質作初步的萃取測試，探討以  $[\text{Bmim}]_2[\text{Congo Red}]$  為萃取劑時靜電  
力在此系統中的影響。

(a) 無添加萃取劑: 取  $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$  1.0ml 分別加入  $2.0 \times 10^2$  mg/L, pH  
4.0 與 7.0 的蛋白質溶液，攪拌 30 分鐘，靜置分  
層，取上層水溶液做定量。

(b) 添加萃取劑: 取含有 9.6mM 濃度的萃取相 1.0 ml 分別加入  $2.0 \times 10^2$  mg/L, pH 4.0 與 7.0 的蛋白質水溶液, 攪拌 30 分鐘, 靜置分層, 取上層水溶液做定量。



## 第四章 結果與討論

### 4-1 離子液體的合成

本實驗所合成的離子液體包括[Bmim][PF<sub>6</sub>]、[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，室溫之下的[Bmim][PF<sub>6</sub>]為金黃色黏稠液體，與水不互溶。合成產物[Bmim][PF<sub>6</sub>]的<sup>1</sup>H-NMR如圖4-1所示，<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CH<sub>3</sub>Cl-*d*) δ: 8.36 (1H, s, NCHN), 7.30 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 7.27 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 4.08 (2H, t, J=12Hz, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.77 (2H, quintet, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (2H, sextet, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, t, J=12 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>). [BMIM][PF<sub>6</sub>]已是被廣泛使用的一種離子液體，其性質也已被鑑定出來<sup>75</sup>。

[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]為暗紅色黏稠液體，合成步驟中先利用AgNO<sub>3</sub>和Congo Red反應形成[Ag]<sub>2</sub>[Congo Red]，產率約53%。[Ag]<sub>2</sub>[Congo Red]以乙晴溶解後，再加入[Bmim][Cl]攪拌，產生AgCl沉澱，移除AgCl和溶劑之後，即可得到[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，產率約26%。而以ESI作為質譜儀的游離方式時，可得([Bmim][Congo Red])<sup>+</sup>的m/z=789.2，而從263.1開始有m/z=201的間隔出現則推測是由鹽類[Bmim][NO<sub>3</sub>]所造成。而由圖4-2的UV-vis吸收圖譜中顯示Congo Red的發光團在497 nm時有吸收，[Bmim][PF<sub>6</sub>]陽離子部分在

210 nm 有吸收，而[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]則同時兼具有這兩個波段的吸收。另外由[Bmim][Cl]和[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的 <sup>1</sup>H-NMR 圖譜比對，可看出化學位移的現象，與文獻中指出離子液體陰離子不同時，陽離子上的氫會有化學位移產生相符<sup>22</sup>。[Bmim][Cl]的 <sup>1</sup>H-NMR 如圖 4-3，(500 MHz, CH<sub>3</sub>Cl-*d*) δ: 9.81 (1H, s, NCHN), 7.67 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 7.64 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 4.25 (2H, t, J=12.0 Hz, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.33 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.80 (2H, quintet, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (2H, sextet, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, t, J=12.0 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>). 而 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 的 <sup>1</sup>H-NMR 如圖 4-4，(500 MHz, CH<sub>3</sub>OH-*d*) δ: 8.81 (1H, s, NCHN), 7.43 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 7.39 (1H, s, CH<sub>3</sub>NCHCHN), 4.15 (2H, t, J=12.0 Hz, NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.80 (2H, quintet, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 (2H, sextet, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, t, J=12.0 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>). 而由圖 4-5，DSC 圖譜中可看出[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的熔點為 4.5°C，

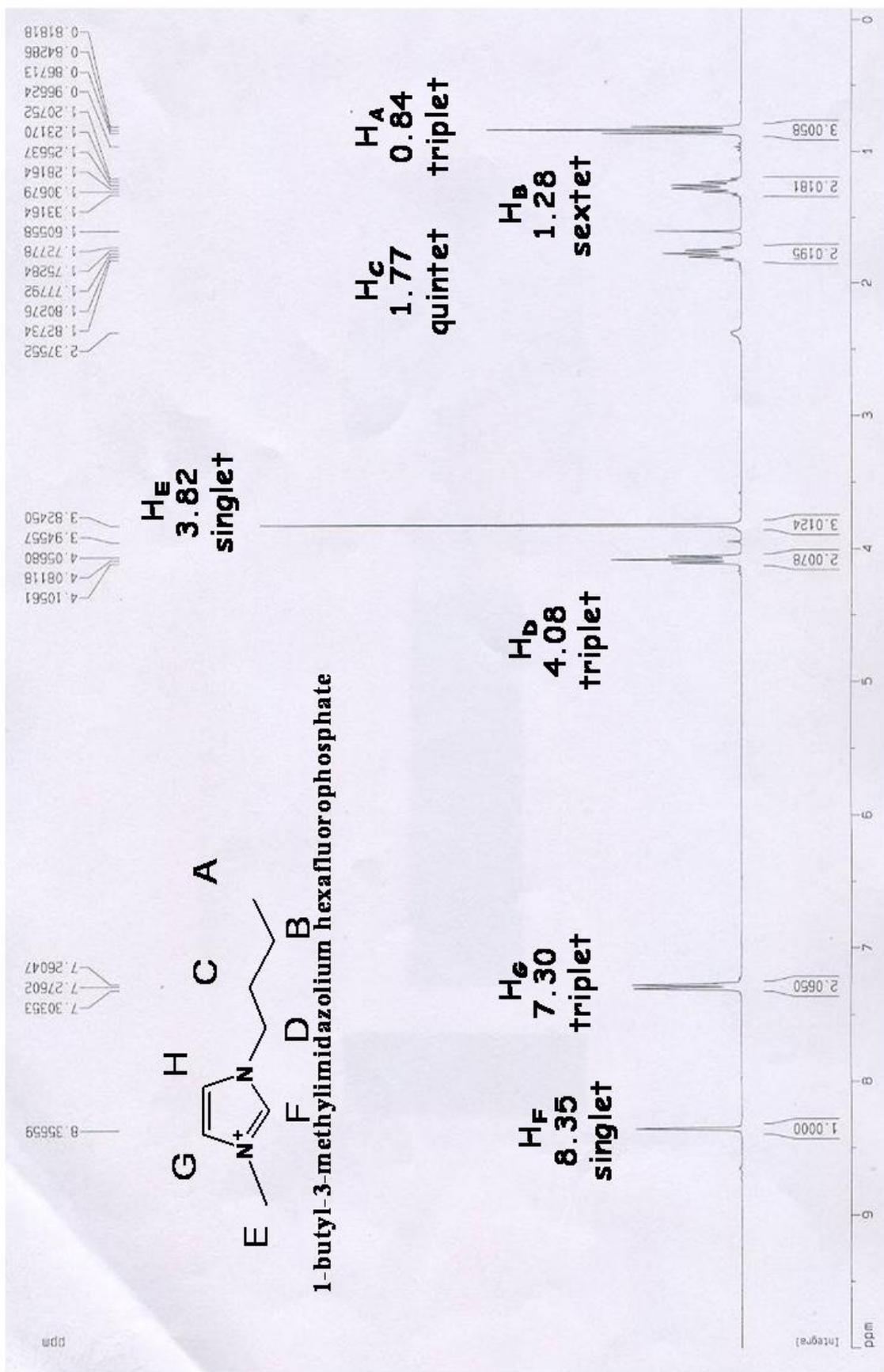


圖 4-1 [Bmim][PF<sub>6</sub>] NMR 圖譜

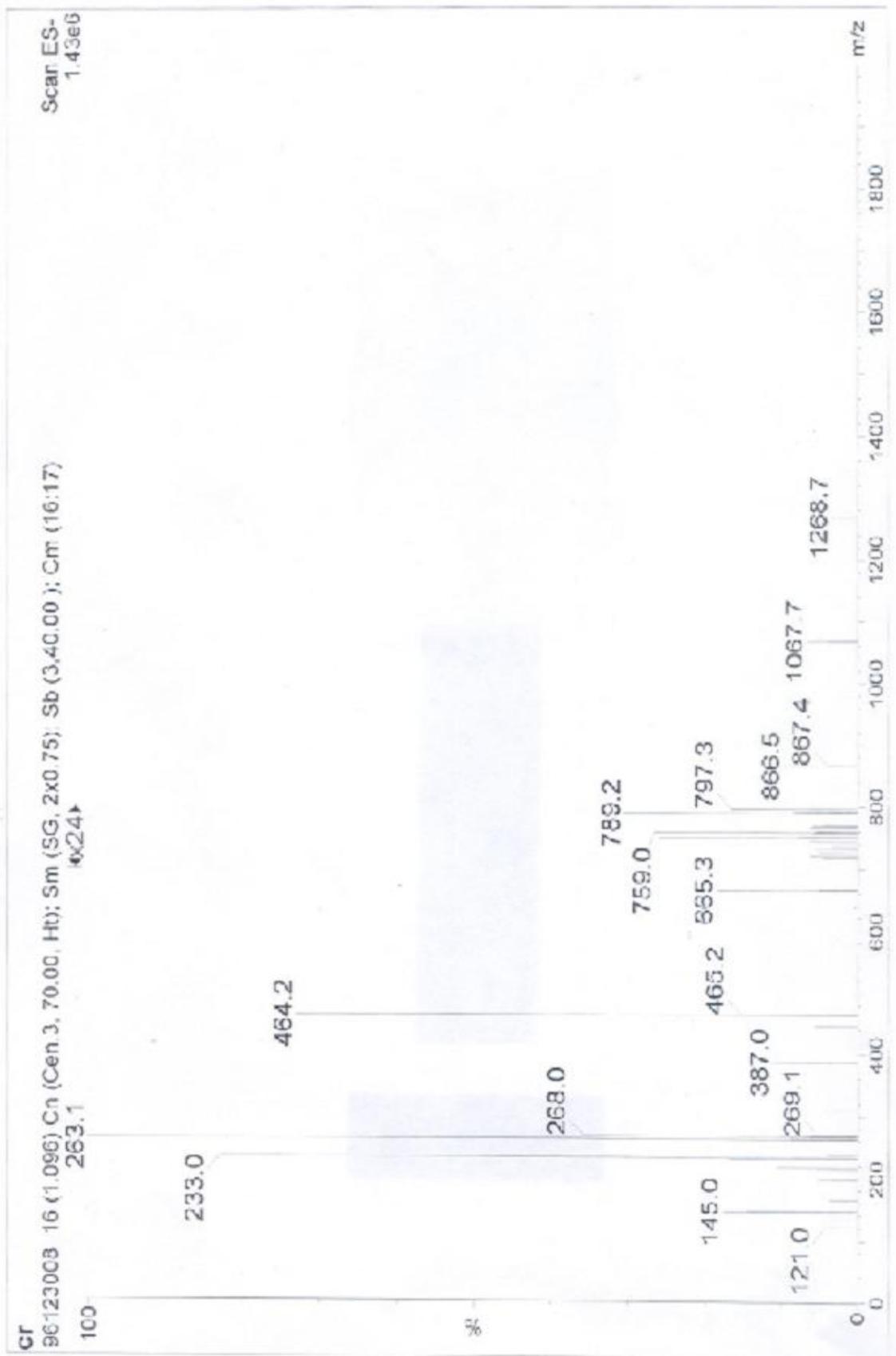


圖 4-2 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] MASS 圖譜

圖 4-3 [Bmim]<sub>2</sub>[Cl] NMR 圖譜

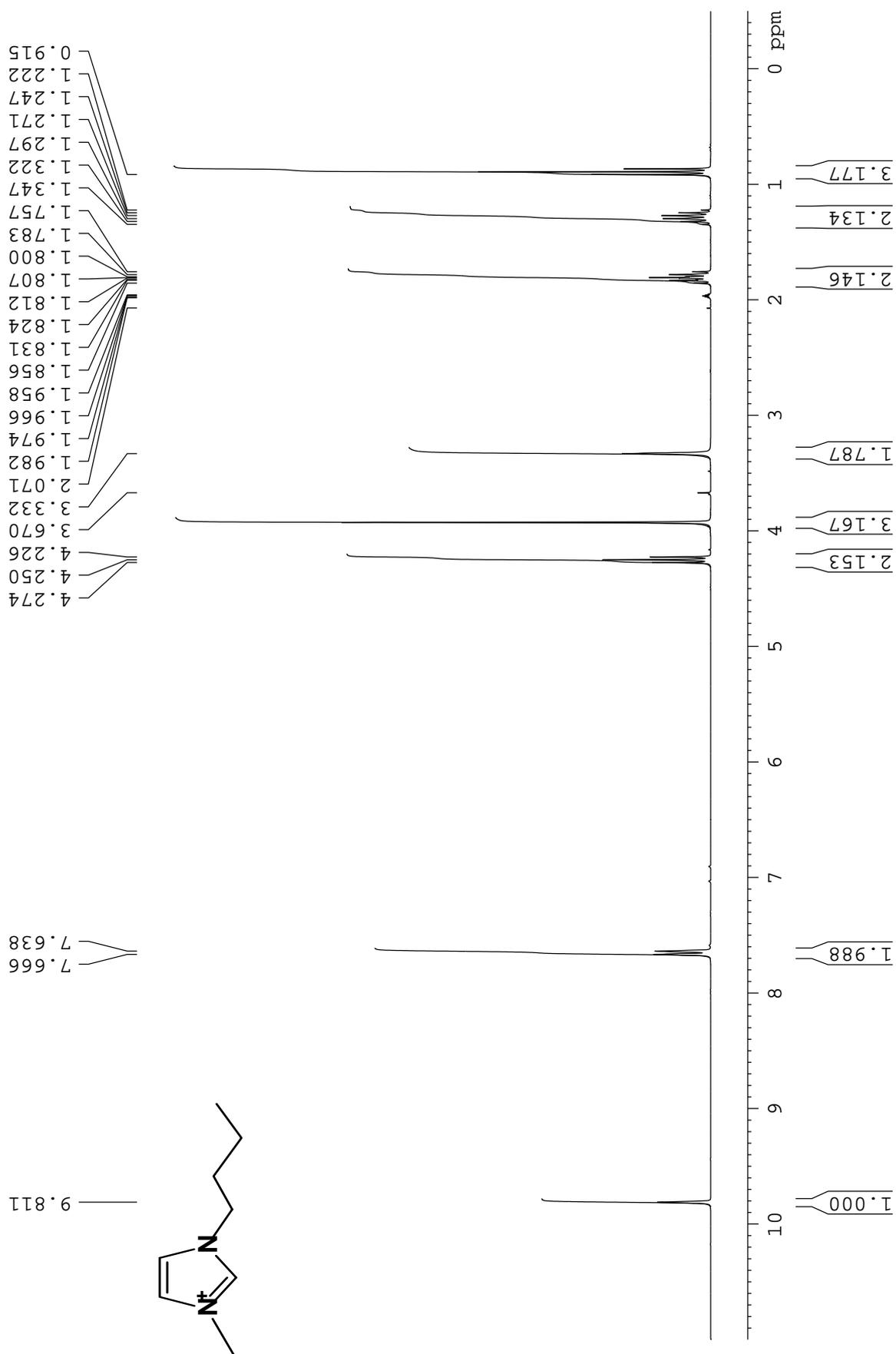
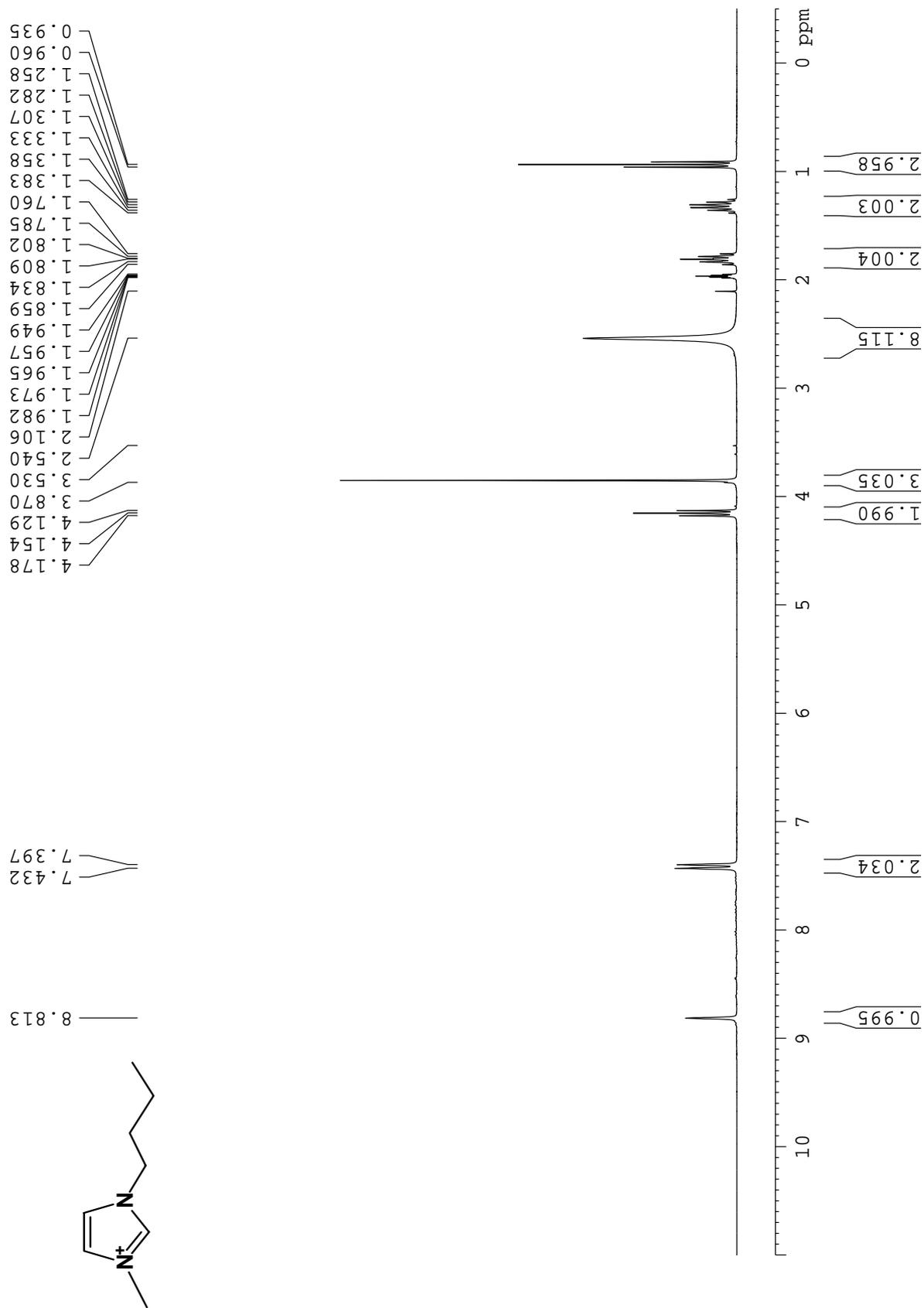


圖 4-4 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] NMR 圖譜



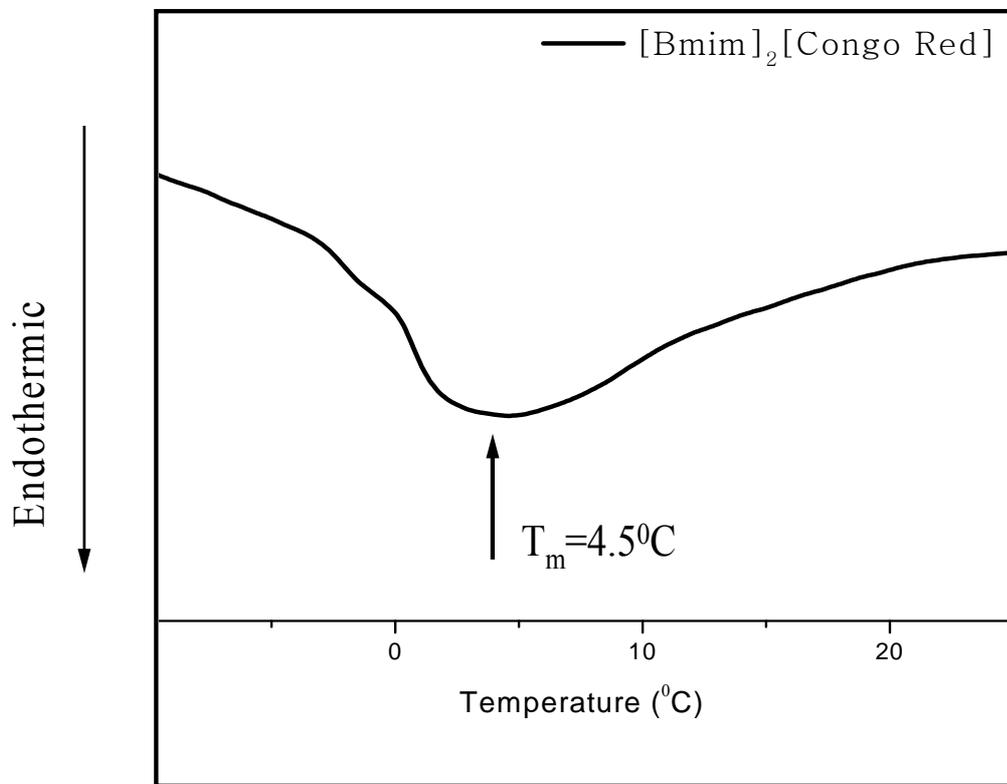


圖 4-5 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]之 DSC 圖譜

## 4-2 製備液相/液相萃取系統

### 4-2-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑

本實驗使用疏水性的離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]作為萃取相，其在水中溶解度為 0.13% v/v<sup>27</sup>，和水溶液攪拌後可快速分層，在 25<sup>0</sup>C 時的密度為 1.36(g/ml)<sup>1</sup>，在兩相中位於下層，水溶液在上層。首先利用未加入任何萃取劑的離子液體 [Bmim][PF<sub>6</sub>]來萃取牛血清蛋白，對 2.0\*10<sup>2</sup> mg/L 牛血清蛋白水溶液的萃取率為 27.9%

再來，將紅色染料剛果紅直接溶入[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，在與水平衡後，結果發現離子液體相由原先金黃色轉為橘紅色(如圖 4-6 所示)，其 UV-vis 吸收光譜圖如圖 4-7，在 497nm 有吸收。



(a) (b) (c)

圖 4-6 萃取劑在 [Bmim][PF<sub>6</sub>] 中溶解狀況

(a) [Bmim][PF<sub>6</sub>], (b) 剛果紅溶於 [Bmim][PF<sub>6</sub>] 中,

(c) [Bmim]<sub>2</sub> [Congo Red] 溶於 [Bmim][PF<sub>6</sub>] 中。

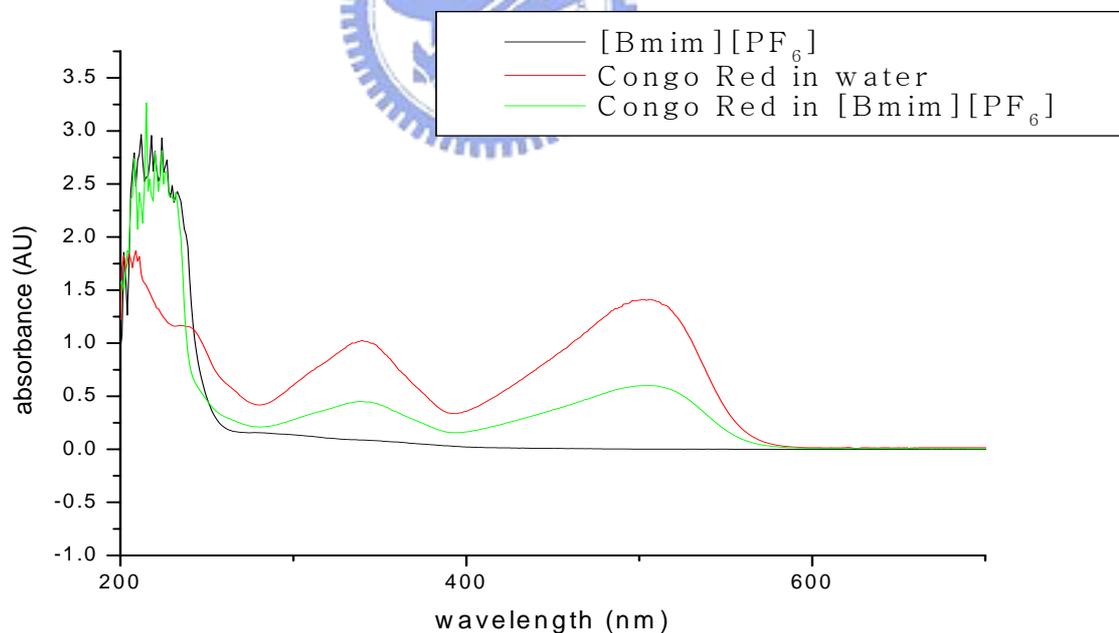


圖 4-7 剛果紅在水相及 [Bmim][PF<sub>6</sub>] 中的 UV-visible 吸收光譜圖

#### 4-2-2 以[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]為萃取劑

由於剛果紅能進入離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]的量有限，因此便利用銀離子交換法合成出[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，希望藉由陽離子之間的 $\pi$ - $\pi$ 電子間作用力讓大量的[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]溶於[Bmim][PF<sub>6</sub>]中，其外觀如圖 4-6 所示，UV-vis 吸收光譜圖如圖 4-8，在 497 nm 時有吸收，證實[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的確能溶於萃取相，加入去離子水平衡後，[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]較偏向於存在於離子液體層，[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]在水相和離子液體相之間的分佈係數  $K_{U/L} = 0.01$ 。而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[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]以甲醇稀釋後，取其在 497 nm 的最大吸收波長對濃度作校正曲線，如圖 4-9 所示，而由表 4-1 所示，可進入離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]的[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]大增，且不易被水洗出，並能長時間存在於離子液體相。

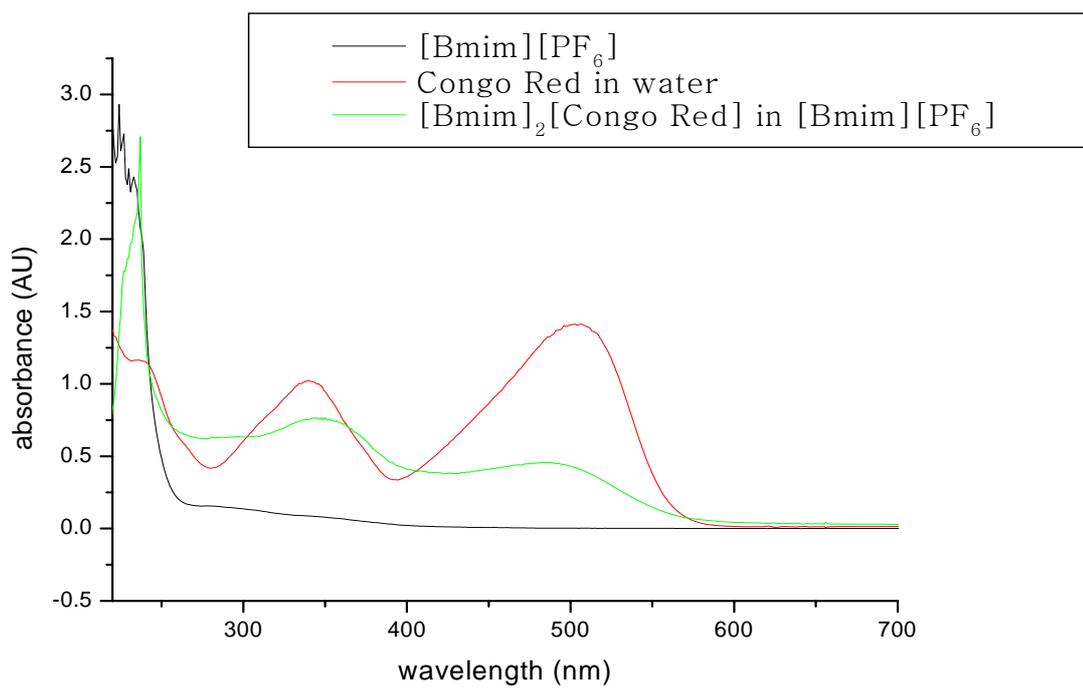


圖 4-8 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]在 [Bmim][PF<sub>6</sub>]中的  
UV-visible 吸收光譜圖



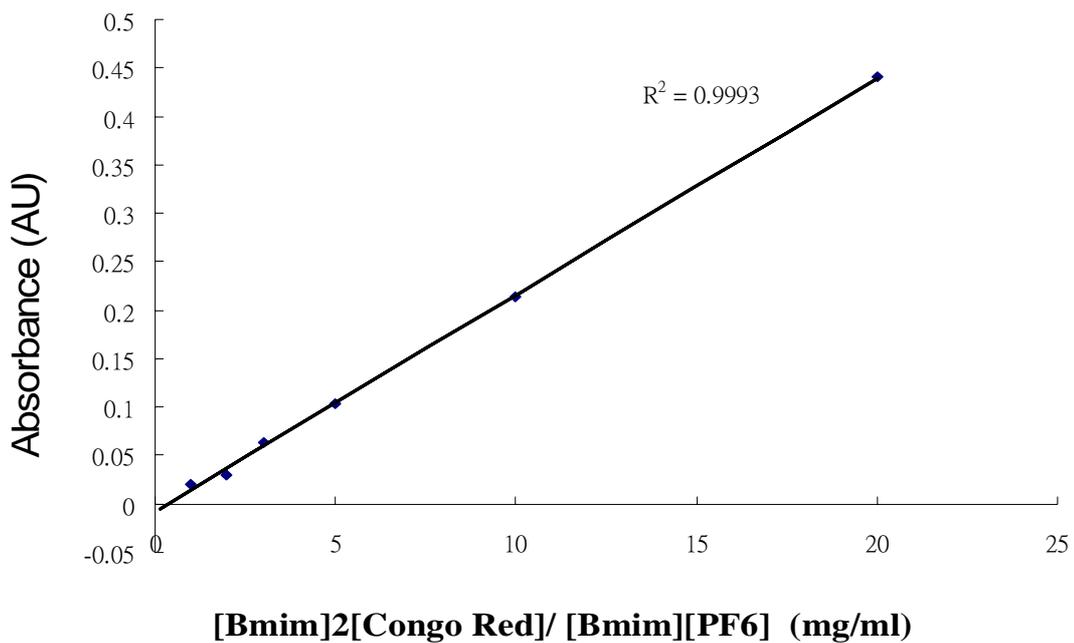


圖 4-9 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的校正曲線圖 (at 497 nm)

[Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red]在[Bmim][PF <sub>6</sub> ]中的濃度					
清洗前					
dye/IL(mM)	3.2	5.4	10.8	16.1	21.5
清洗後					
real conc. (mM)	2.7	5.3	9.6	15.7	19.7

表 4-1 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]在萃取相中清洗前後濃度的比較

### 4-3 萃取牛血清蛋白

本實驗萃取牛血清蛋白之示意圖如圖 4-11，分為正向萃取及反向萃取兩步驟，正向萃取率(forward extraction efficiency,  $E_f$ )和蛋白質回收率(total efficiency, recovery,  $E_t$ )的定義如下。

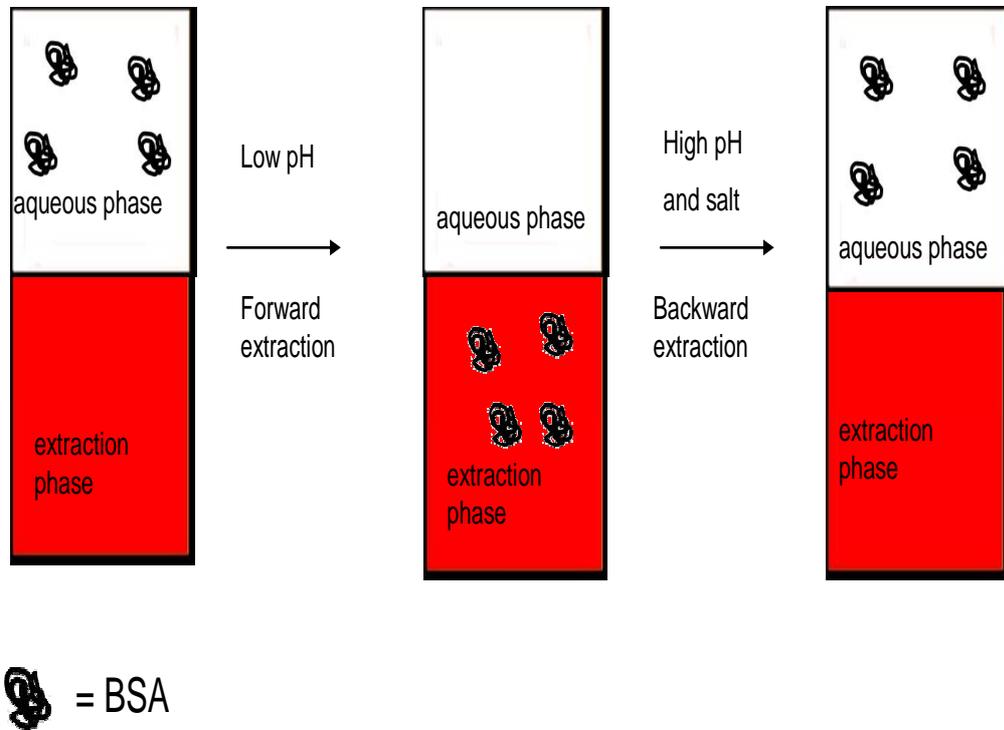


圖 4- 10、蛋白質萃取過程示意圖



#### 4-3-1 萃取劑對牛血清蛋白萃取的影響

##### 4-3-1-1 以親和性染料剛果紅為萃取劑萃取牛血清蛋白

如圖 4-12、表 4-5 所示，在 pH 為 4.0 時萃取牛血清蛋白，當離子液體相中 Congo Red 的含量增加，正向萃取率隨之提高，最高可達到 75%。隨著蛋白質濃度增加，正向萃取率下降，由此可知每單位的 Congo Red 對蛋白質進行親和力結合的能力有限。

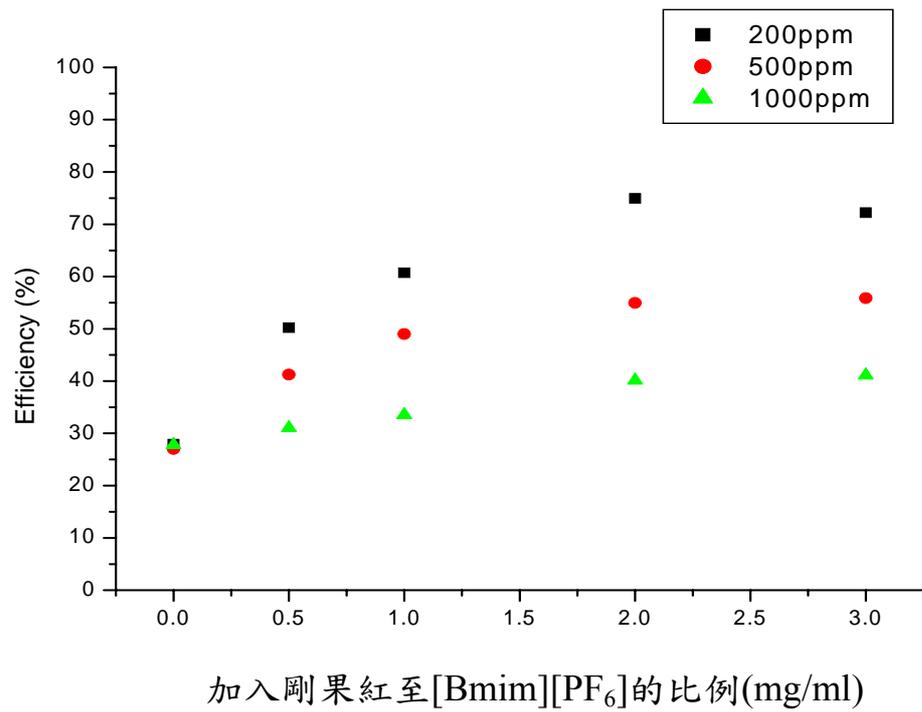


圖 4-11 加入不同量剛果紅進入萃取相對不同濃度的牛血清蛋白水溶液進行正向萃取的結果

#### 4-3-1-2 以[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]為萃取劑萃取牛血清蛋白

利用[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]為萃取劑，在 pH 為 4.0 時，萃取  $2.0 \times 10^2$  mg/L 牛血清蛋白水溶液時，萃取率會隨[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]濃度增加而提高，當濃度增加到 9.6mM 時，萃取率達到定值(如圖 4-13)，未加入[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]時，有 28 %的牛血清蛋白被萃取到離子液體層，在加入[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]後，能達到近 100%的高萃取率，顯示能達到高萃取率是因為萃取劑[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的加入，因此選用含 9.6mM [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]的離子液體作為實驗條件，另外，因為在[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中萃取劑可較為穩定且大量存在於離子液體相，所以在萃取劑的量加的夠多時，對  $5.0 \times 10^2$  mg 及  $1.0 \times 10^3$  mg/L 的牛血清蛋白水溶液作萃取，也可達到近 100%的萃取率。

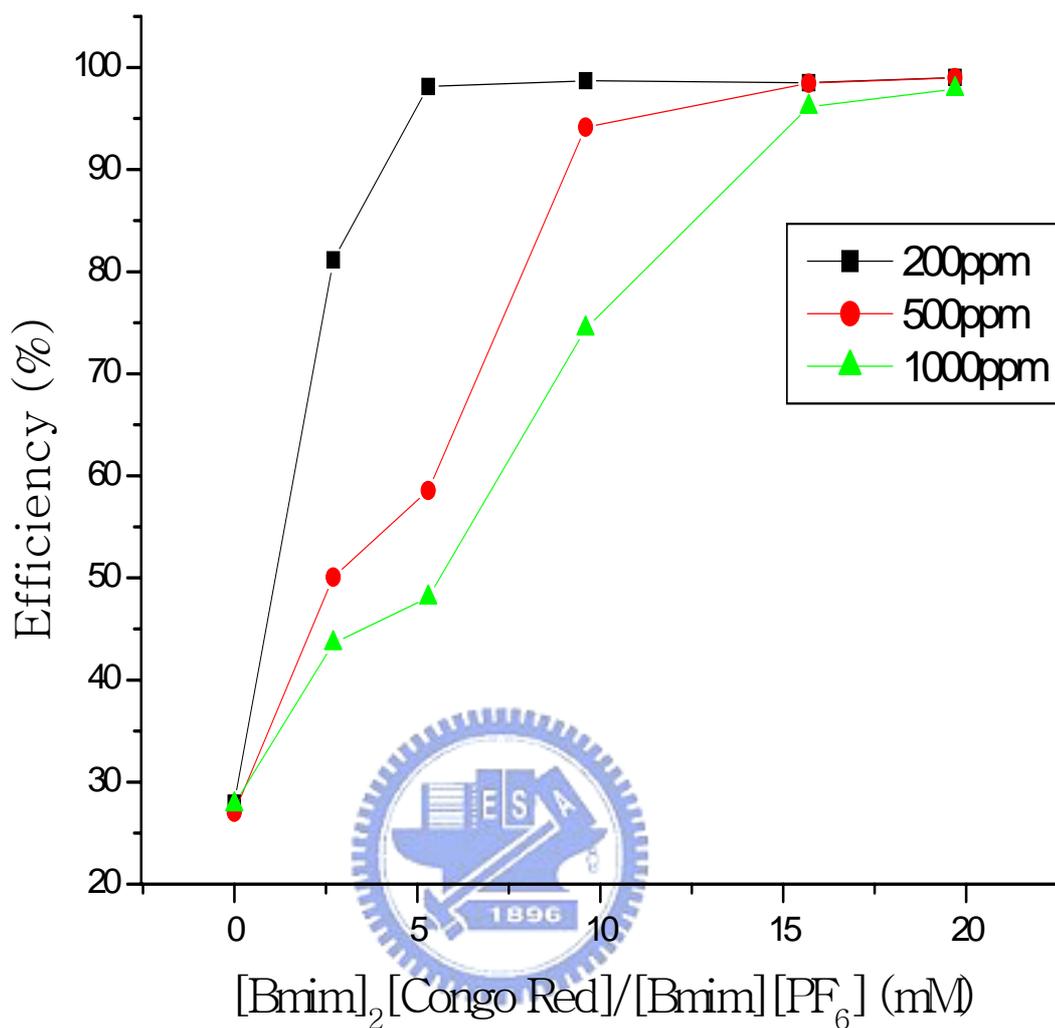


圖 4-12 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中不同萃取劑濃度對萃取率的影響

### 4-3-2 比較萃取時間對萃取率的影響

#### 4-3-2-1 Congo Red/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響

如圖 4-13 所示，在室溫下以磁石攪拌 30 分鐘的攪拌時間條件下，足以使萃取充分達到平衡。

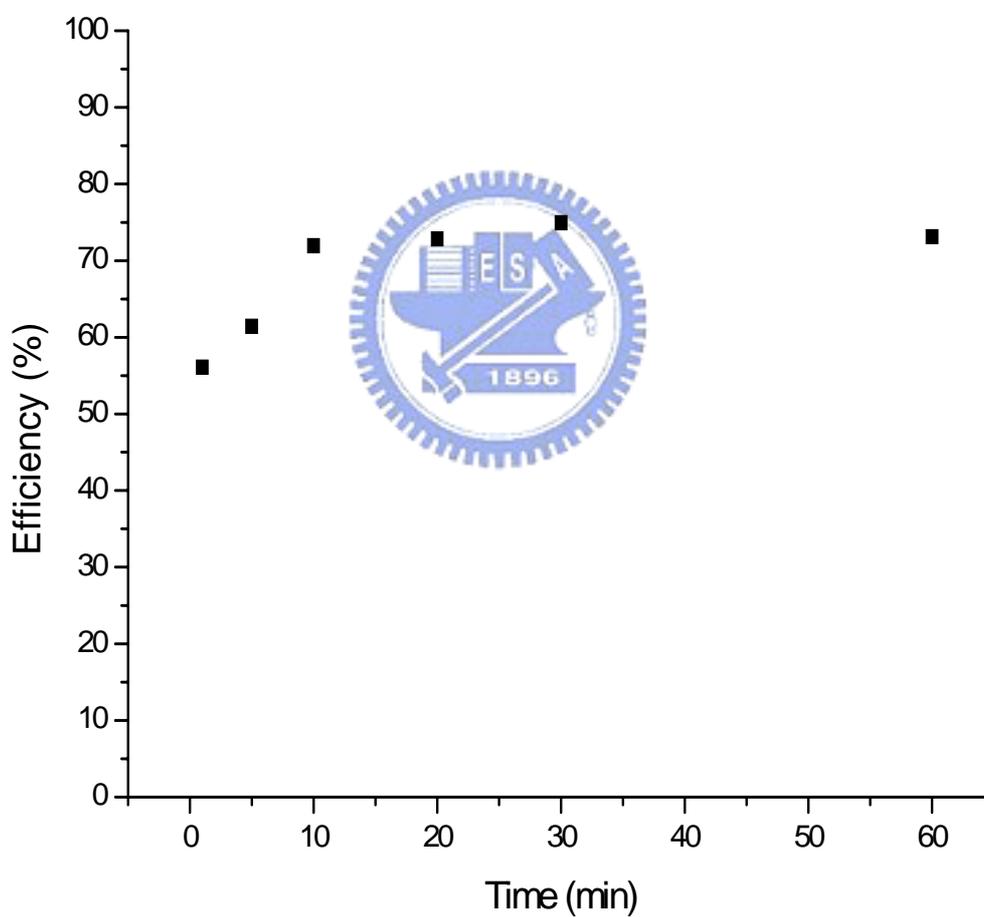


圖 4-13 Congo Red/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響

#### 4-3-2-2 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中攪拌時間對萃取率的影響

圖 4-14 顯示萃取牛血清蛋白時攪拌時間對萃取率的影響，從圖中可看出牛血清蛋白從水相到離子液體相，在 5 分鐘時萃取率即達到 85%，20 分鐘後可達到 95% 以上，而 30 分鐘足以使萃取充分達到平衡，因此實驗條件將萃取時間設定於 30 分鐘。

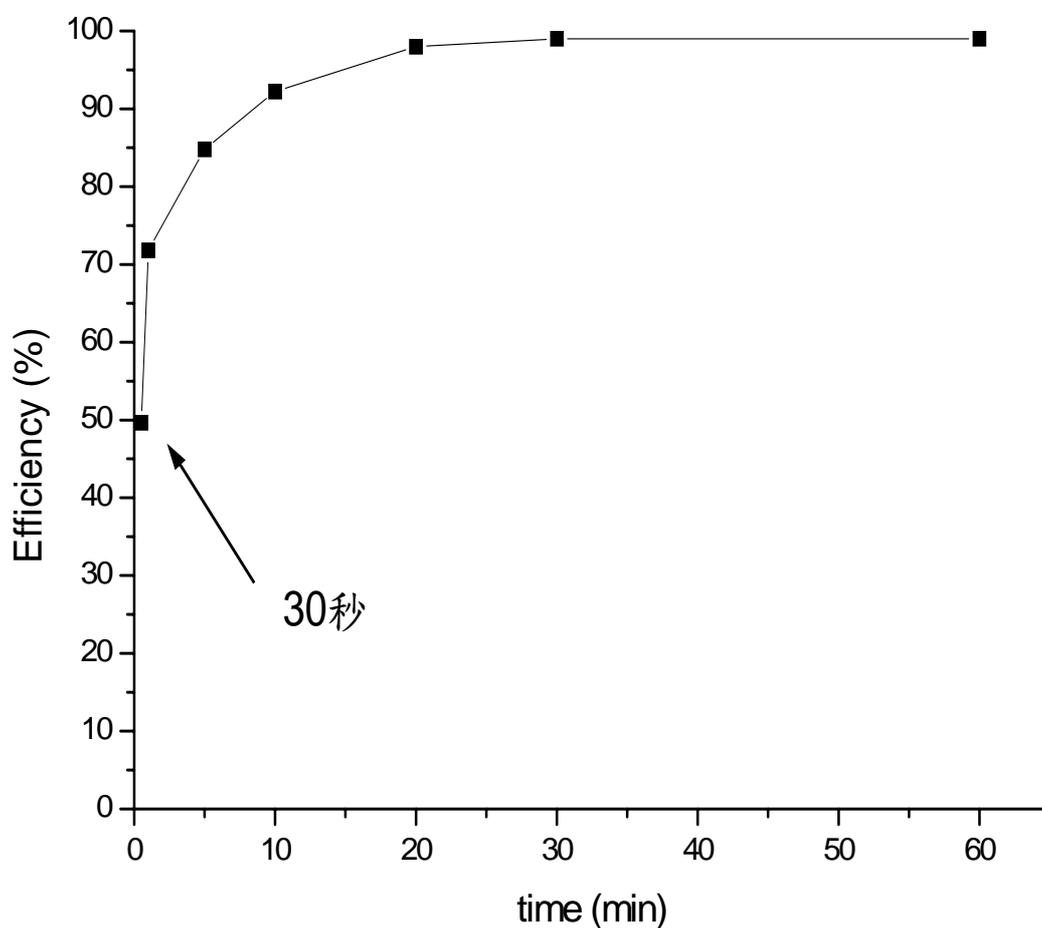


圖 4-14 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中反應時間對萃取率的影響

#### 4-4 pH 值對蛋白質萃取的效應

一般親和性染料在結構上都帶有磺酸根, 並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 SO<sub>3</sub> group-NH<sub>2</sub> terminus)。文獻中也曾經以 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<sup>75</sup>。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。牛血清蛋白的等電點(pI)為 4.6, 在 pH 值為 4.0 的緩衝溶液中, 是以帶正電荷的形式存在, 由本實驗結果中可看出, 不論是在 Congo Red/IL 系統或是在 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中, 牛血清蛋白的萃取率受到靜電吸引力所影響, 結果顯示剛果紅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, 牛血清蛋白上所帶正電荷越多, 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較好的回收效果; Congo Red/IL 系統與 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統的正向萃取的實驗結果分別如圖 4-15 及圖 4-16 所示, 牛血清蛋白的正向萃取率是隨著 pH 值的提升而降低, 且由於牛血清蛋白的 pI 值為 4.6, 所以在 pH4.0

到 5.0 間可看出萃取率明顯的下降。

圖 4-17 與圖 4-18 分別為兩系統的反向萃取的圖形，從實驗結果可以發現，將緩衝溶液 pH 值提高，萃取率確實隨 pH 值提升而增加，在 Congo Red/IL 系統中回收率最高可達約 30% 左右，而在 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中則可達近 50%，由此推論在本實驗條件下，庫倫靜電力為其中一種親和性染料剛果紅與牛血清蛋白的結合作用力。

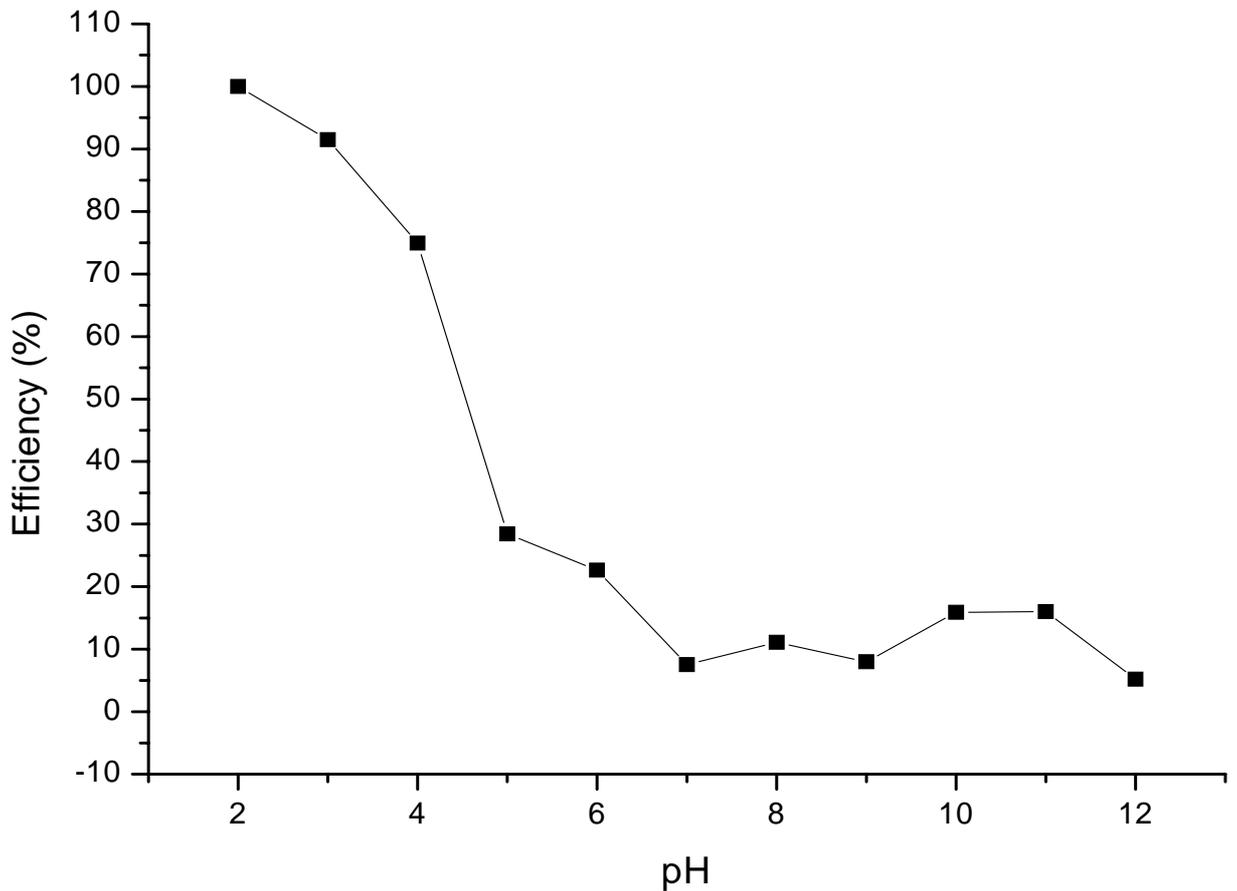


圖 4-15 Congo Red/IL 系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的正向萃取效率

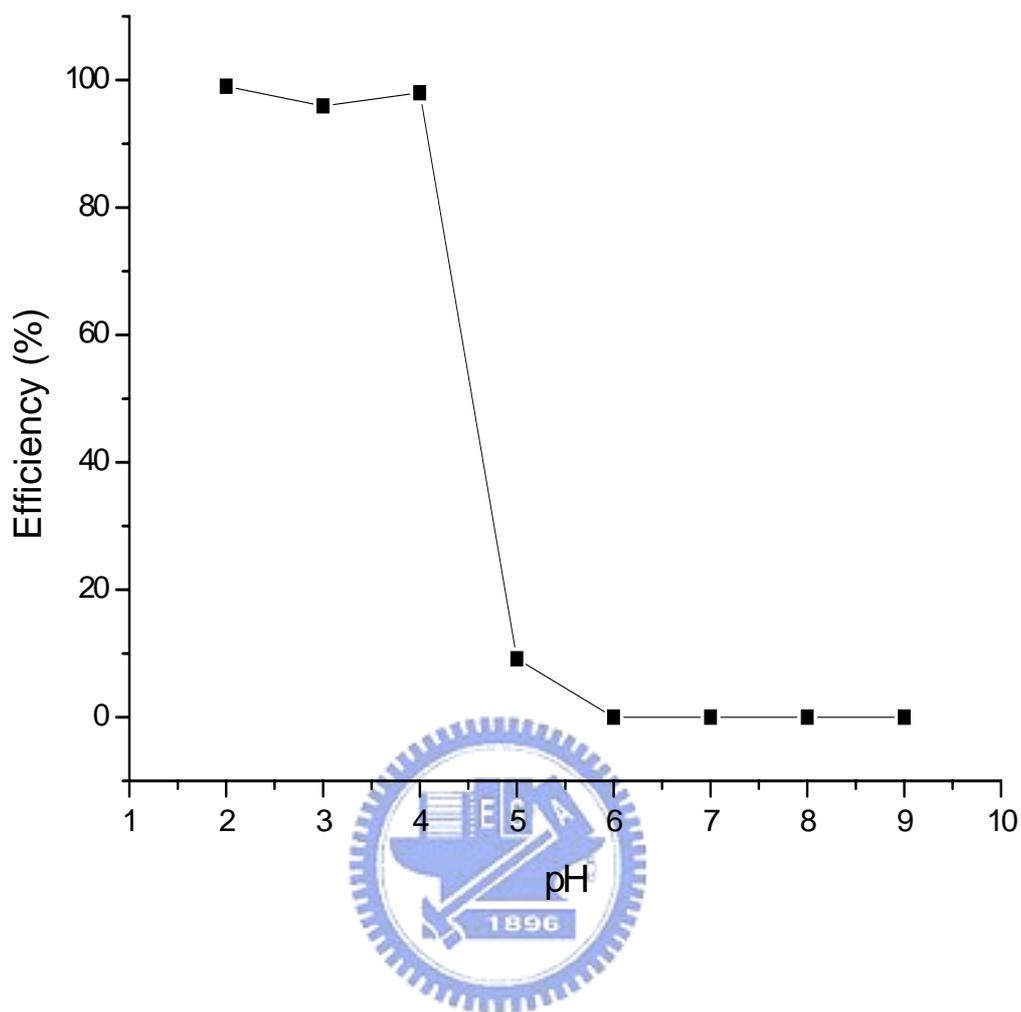


圖 4-16  $[\text{Bmim}]_2[\text{Congo Red}]/\text{IL}$  系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的正向萃取效率

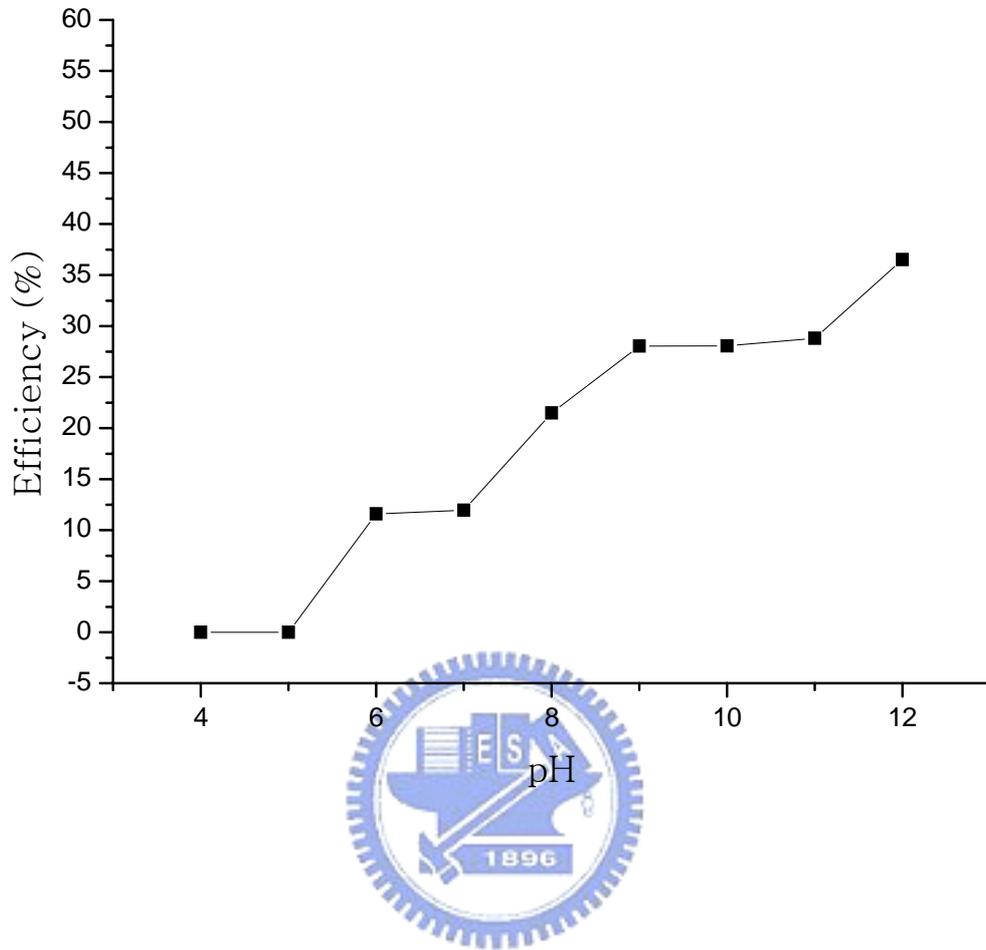


圖 4-17 Congo Red/IL 系統中不同 pH 值的緩衝溶液的反向萃取結果

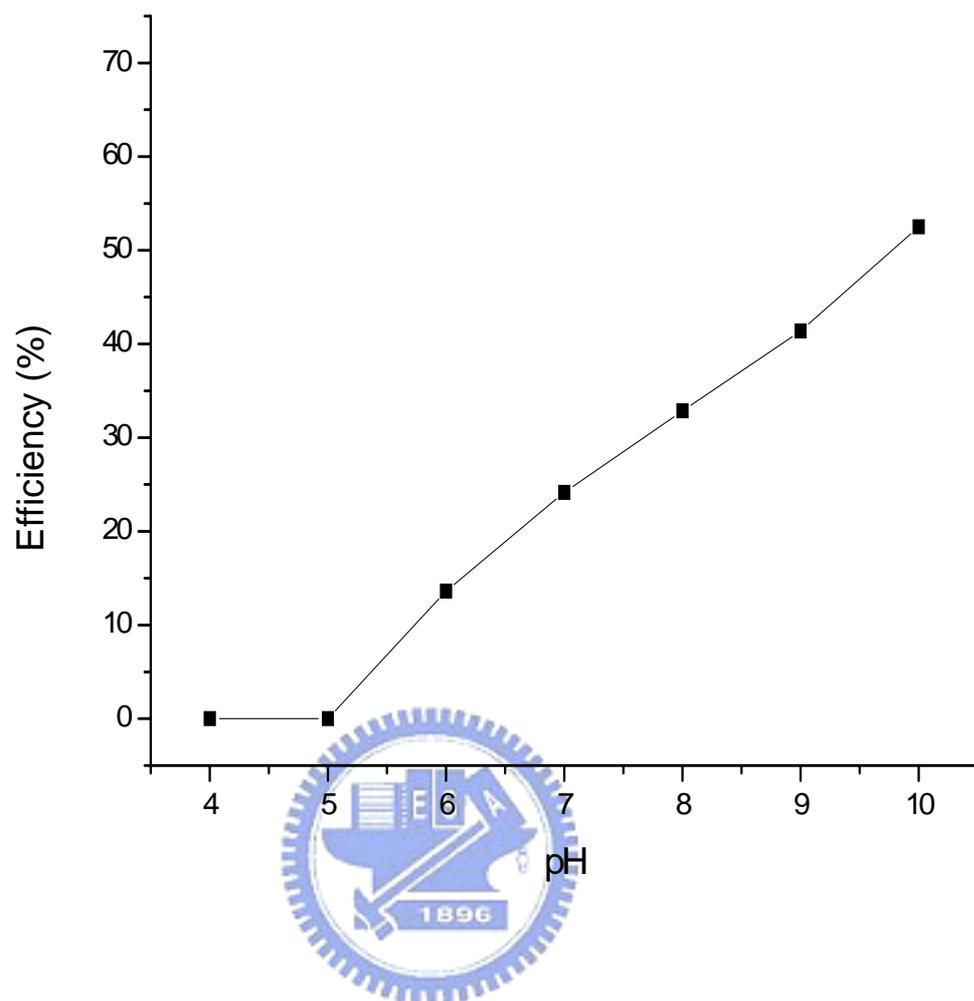


圖 4-18 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中不同 pH 值對牛血清蛋白水溶液的反向萃取結果

#### 4-5 離子強度對蛋白質萃取的效應

蛋白質的三級結構主要會受到下列四種作用力的影響：(1) 雙硫鍵的存在與否 (2) 胺基酸序列本身疏水性的差異 (3) 氫鍵作用力 (4) 帶電荷的蛋白質彼此之間的離子吸引力。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。

一般親和性層析在吸附目標物後，會利用含有高鹽類濃度的水溶液使將目標物從靜相脫附而被沖提出來，本實驗在反向萃取中分別以加入 1.0M NaSCN 的不同 pH 值的緩衝溶液及在 pH9.0 的條件下利用不同濃度的 NaSCN 作為實驗條件，探討遮蔽效應破壞牛血清蛋白和 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 陰離子磺酸基之間的靜電作用力，使牛血清蛋白回到水相。由圖 4-19 可看出加入 1.0 M 的 NaSCN 在不同 pH 條件下反向萃取率只能略為提升，固進一步嘗試在 pH 9.0 為條件下增加 NaSCN 的濃度，結果如圖 4-20 所示，隨著離子強度的增強，遮蔽效應愈明顯，使得蛋白質回收率有所提升，最高可達約 60%，但在實驗過程中也發現，加入 NaSCN 的濃度越高則水相愈成紅色，顯示萃取

劑會被大量洗出，所以實驗過程中還是選用 1.0M NaSCN 作為實驗條件。

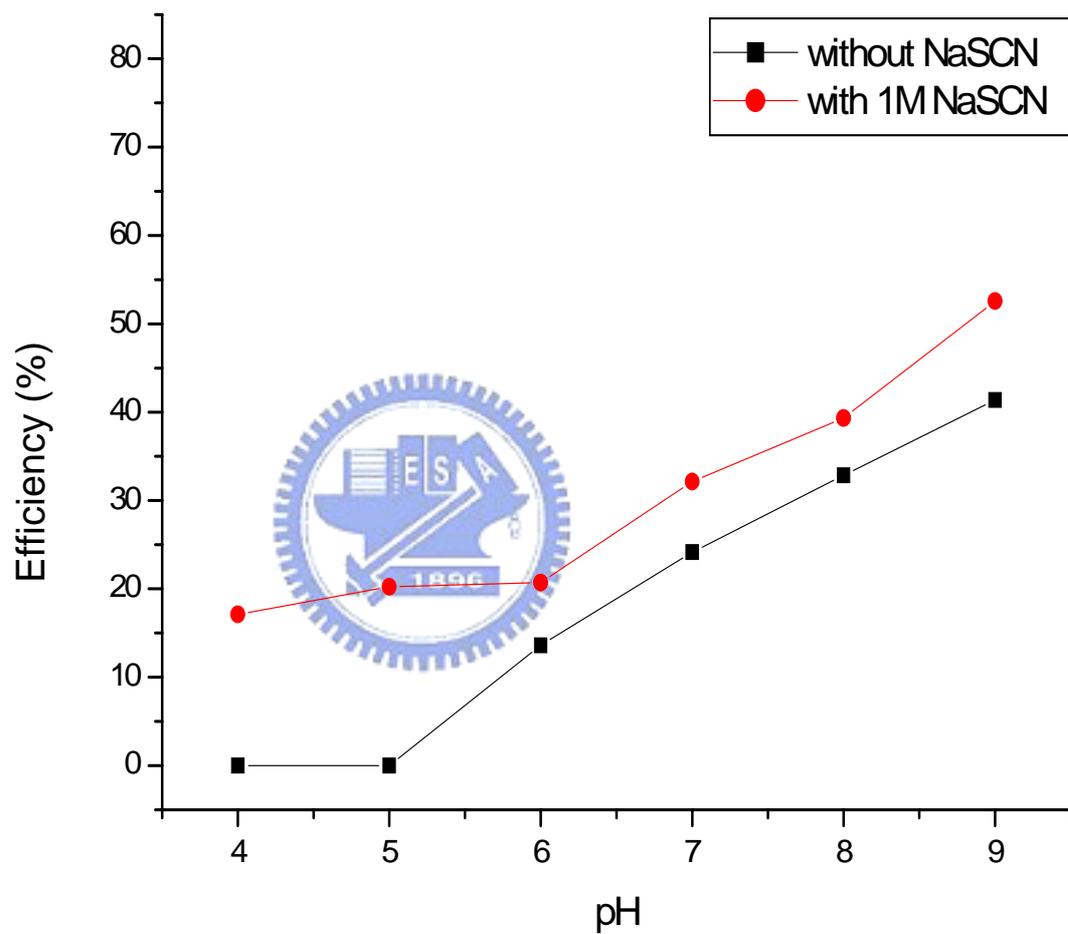


圖 4-19  $[\text{Bmim}]_2[\text{Congo Red}]/\text{IL}$  系統中不同 pH 值及加入鹽類 NaSCN 對牛血清蛋白水溶液的反向萃取效結果

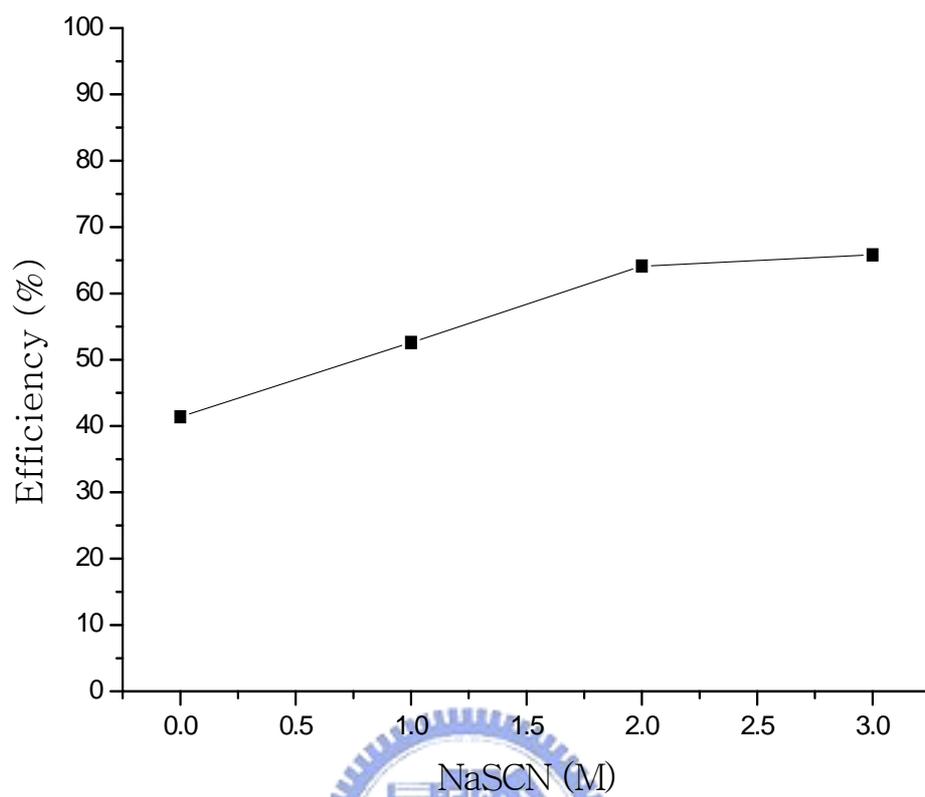


圖 4-20 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL系統中加入鹽類NaSCN的濃度對牛血清蛋白水溶液的反向萃取結果

#### 4-6 分別萃取其他蛋白質水溶液

由於親和性染料為 group-specific ligand，並非對單一蛋白質才具有親和性，故為了探討[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]與其他蛋白質之間作用力，除了牛血清蛋白，本實驗也嘗試萃取其他等電點差異較大的其他蛋白質，包含溶菌酶(lysozyme)與核糖核酸酶 A(Ribonuclease A)，以探討此系統對其他蛋白質間作用力的影響。

當利用[Bmim][PF<sub>6</sub>] 在 pH 4.0 條件下分別萃取這三種蛋白質時，其萃取效率分別為對牛血清蛋白 27.9%，對核糖核酸酶 A 28.1%，對溶菌酶 28.0%(如表 4-2)，而使用濃度為 9.6mM 的 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統的萃取相，同樣在 pH 4.0 條件下分別萃取這三種蛋白質水溶液時，發現 pI 值最低的牛血清蛋白有近 100% 的萃取率，而 pI 值在中間的核糖核酸酶 A 只有 35.2 % 的萃取率，但對 pI 值最高的溶菌酶又為近 100%，而使用含[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]萃取劑的系統中會因萃取劑帶有磺酸基 SO<sub>3</sub><sup>-</sup>而帶有對正電蛋白質的吸引力，在 pH 4.0 時核糖核酸酶 A 雖為帶正電而萃取率卻並未明顯提升，故推測靜電力在此系統中並非唯一與蛋白之間的作用力，蛋白質與染料間的親和力也為另一項主要因素，曾有研究顯示以剛果紅做為親和性染料時對溶菌酶也有所吸附只是吸附的量較牛血親蛋白來的少<sup>68</sup>，而由實驗結果顯示萃取劑[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]在 pH 為 4.0 的條

件下對溶菌酶的萃取率也為近 100%，因此推測雖然溶菌酶對剛果紅的親和力較牛血清蛋白來的小，但因溶菌酶 pI 值過高造成在酸性環境下帶有較多正電荷，靜電力的影響也較大，故也能達到近 100% 的萃取率。

而在 pH7.0 的條件下萃取三種蛋白質，實驗結果發現對核糖核酸酶 A 萃取時，加入萃取劑 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 對萃取率並無影響，顯示萃取劑 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 對核糖核酸酶 A 無親和力的作用，而對牛血清蛋白作萃取時不論是否加入加入萃取劑 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 都沒有任何萃取率，而對溶菌酶作萃取時則發現加入萃取劑 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 可使萃取率由原先 11.3% 提升至 83.6%，綜合以上結果以 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統萃取蛋白質時，萃取率會深受蛋白質與萃取劑的親和力與靜電力所影響，且若少了其中一種作用力則萃取劑 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red] 對蛋白質的萃取率就無顯著影響，另外親和力或靜電力越強時，蛋白質的萃取率也越高。

		牛血清蛋白	核糖核酸酶 A	溶菌酶
等電點 (pI)		4.6	9.5	10.7
pH4	[BMIM][PF <sub>6</sub> ] E <sub>f</sub> (%)	27.9	28.1	28.0
	[Bmim][PF <sub>6</sub> ]+ [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red] E <sub>f</sub> (%)	98.6	35.2	97.6
pH7	[BMIM][PF <sub>6</sub> ] E <sub>f</sub> (%)	--	24.0	11.3
	[Bmim][PF <sub>6</sub> ]+ [Bmim] <sub>2</sub> [Congo Red] E <sub>f</sub> (%)	--	24.8	83.6

表 4-2 [Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中對不同蛋白質的萃取率



## 第五章 結論

本實驗使用親和性染料剛果紅應用於離子液體[Bmim][PF<sub>6</sub>]  
，發現親和性染料剛果紅對牛血清蛋白具有一定的親和力。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。並  
利用將染料配體剛果紅經由簡單的離子交換過程，合成為具有親和性  
的離子液體[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]，提升了對牛血清蛋白的萃取率。

染料配體在純化蛋白質時除了結構類似天然配體之外，其磺酸基  
在一般條件下會解離帶負電荷，和蛋白質之間可經由靜電作用力達到  
吸附效果，本實驗藉由調控牛血清蛋白水溶液的 pH 值，印證蛋白質  
上所帶電荷越多，在正向萃取時越容易被萃取到離子液體層，且離子  
強度愈強時，反萃後的蛋白質回收率則愈高，所以靜電作用力也是其  
中一種能影響萃取率的因素，而由萃取其他蛋白質時可發現在  
[Bmim]<sub>2</sub>[Congo Red]/IL 系統中，親和力與靜電力都為此系統與蛋白質  
間的主要作用力。

染料配體因其結構不同，則純化的蛋白質種類亦有所差異，未  
來可嘗試其他不同種類的染料應用於離子液體，針對其他不同蛋白質  
做萃取，而結合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，降低了對環境的汙染，符合環保的概念。

## 參考文獻

1. J.-f. Liu, J. A. Jonsson, G.-b. Jiang, "Application of ionic liquids in analytical chemistry" *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20-27.
2. P. T. Anastas, J. B. Zimmerman, "Design through the 12 principles of green engineering" *Environ. Sci. Technol. A*-Pages 37 (2003) 94A-101A.
3. J. G. Huddleston, H. D. Willauer, R. P. Swatloski, A. E. Visser, R. D. Rogers, "Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction" *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
4. 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.* 29 (2000) 922-923.
5. T. Welton, "Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis" *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2084.
6. P. Wasserscheid, W. Keim, "Ionic Liquids-New "Solutions" for Transition Metal Catalysis" *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772-3789.

7. R. A. Sheldon, "Catalytic reactions in ionic liquids" *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
8. C. J. Adams, M. J. Earle, G. Roberts, K. R. Seddon, "Friedel-Crafts reaction in room temperature ionic liquids" *Chem. Commun.* 19 (1998) 2097-2098.
9. X. Jin, L. Yu, D. Garcia, R. X. Ren, and X. Zeng, "Ionic Liquid High-Temperature Gas Sensor Array" *Anal. Chem.* 78( 2006) 6980-6989.
10. J. Wang, Y. Pei, Y. Zhao and Z. Hu, "Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media" *Green Chem.*, 7(2005), 196-202.
11. J.-H. Wang, D.-H. Cheng, X.-W. Chen, Z. Du, and 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.
12. 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.

13. 陳俊竹，“應用離子液體於蛋白質液相/液相萃取”，國立交通學，  
碩士論文，民國九十四年六月。
14. Y.-P. Tzeng ,C. W. Shen, T. Yu “liquid-liquid extraction of lysozyme  
using a dye-modified ionic liquid” J. Chromatogr. A 1193(2008)1-6
15. 曾鈺評，“應用親和性離子液體於溶菌酶液相/液相萃取”，國立交  
通大學，碩士論文，民國九十六年六月。
16. A.Denizli, B.Salih, E.Piskin, “Congo Red and Cu (II) carrying  
poly(ethylene glycol dimethacrylate-hydroxyethyl methacrylate)  
microbeads as specific sorbents Albumin  
adsorption/desorption” J. Chromatogr. A 731 (1996) 57-63.
17. F. H. Hurley, T. P. Wier, J. Electrochem. Soc. 98 (1951) 207-212.
18. H. L. Chum, V. R. Koch, L. L. Miller, R. A. Osteryoung, “An  
Electrochemical Scrutiny of Organometallic Iron Complexes and  
Hexamethylbenzene in a Room Temperature Molten Salt” J. Am.  
Chem. Soc. 97 (1975) 3264-3265.
19. J. S. Wilkes, M. J. Zaworodtko, “Air and Water Stable  
1-Ethyl-3-methylimidazolium Based Ionic Liquids” J. Chem. Soc.,  
Chem. Commun. 13 (1992) 965-967.
20. J. H. Davis, P. A. Fox., “ From curiosities to commodities: ionic

- liquids begin the transition” Chem. Commun. 11 (2003) 1209-1214.
21. J.L. Anderson, D.W. Armstrong, G.T. Wei, “Ionic Liquids in Analytical Chemistry” Anal. Chem. 78 (2006) 2892-2902.
22. P. Bonhote, A. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, “Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts” Inorg. Chem. 35 (1996) 1168-1178.
23. 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.
24. J. S. Wilkes, J. A. Levisky, R. A. Wilson, C. L. Hussey, “Dialkylimidazolium Chloroaluminate Melts: A New Class of Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemistry, Spectroscopy, and Synthesis” Inorg. Chem. 21 (1982) 1263-1264.
25. S.N. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, “How polar are room temperature ionic liquids?” Chem. Commun. 5 (2001) 413-414.
26. P. Walden, Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg), 1914, 1800
27. 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.

28. M.H. Abraham, "Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes" *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73-81.
29. K. Fukumoto, M. Yoshizawa, H. Ohno, "Room Temperature Ionic Liquids from 20 Natural Amino Acids" *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2398-2399.
30. A. M. Leone, S. C. Weatherly, M. E. Williams, H. H. Thorp, R. W. Murray, "An Ionic Liquid Form of DNA: Redox-Active Molten Salts of Nucleic Acids" *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), 218-222.
31. S. Hayashi, H. Hamaguchi, "Discovery of a Magnetic Ionic Liquid [bmim]FeCl<sub>4</sub>" *Chem. Lett.* 33 (2004) 1590-1591.
32. 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.
33. 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.
34. A. Berthod, D.W. Armstrong, "Ionic Liquids as Stationary Phase Solvents for Methylated Cyclodextrins in Gas Chromatography"

Chromatographia 53 (2001) 63-68.

35. J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, "Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography" *Anal. Chem* 76 (2004) 6819-6822.
36. 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.
37. H. Luo, S. Dai, P. V. Bonnesen, "Solvent Extraction of  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Cs}^+$  Based on Room-Temperature Ionic Liquids Containing Monoaza-Substituted Crown Ethers" *Anal. Chem.* 76 (2004) 2773-2779.
38. A. Denizli, G. Kokturk, H. Yavuz, E. Piskin, "Dye-Ligand Column Chromatography: Albumin Adsorption from Aqueous Media and Human Plasma with Dye-Affinity Microbeads" *J. Appl. Polymer. Sci.* 74 (1999) 2803-2810.
39. 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.
40. S. V. Smirnova, I. I. Torocheshnikova, A. A. Formanovsky, I. V. Pletnev, "Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6" *Anal. Bioanal. Chem.*

378 (2004) 1369-1375.

41. A.E. Visser, "Task-Specific Ionic Liquids Incorporating Novel Cations for the Coordination and Extraction of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ : Synthesis, Characterization, and Extraction Studies" *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2523-2529.
42. G.-T. Wei, Z. Yang, C.-Y. Lee, H.-Y. Yang, C. R. Chris Wang "Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold Nanoparticles and Gold Nanorods Using an Ionic Liquid" *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5036-5037.
43. C. Larsson, "Isolation of membranes and organelles from plant cells" *Academic Pr, New York* chapter 11 (1983) 277.
44. N. L. Abbott, D. Blankschtein, T. A. Hatton, "Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems. 5. Decoupling of the Effects of Protein Concentration, Salt Type, and Polymer Molecular Weight" *Macromolecules* 26 (1993) 825-828.
45. M. Carlsson, P. Linse, F. Tjerneld, "Temperature-Dependent Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems" *Macromolecules* 26 (1993) 1546-1554.
46. A. P. B. Rabelo, E. B. Tambourgi, A. Pessoa, "Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers" *J. Chromatogr. B* 807 (2004) 61-68.

47. M. L. Magri, R. B. Cabrera, M. V. Miranda, H. M. Fernández-Lahore, O. Cascone, “Performance of an aqueous two-phase-based countercurrent chromatographic system for horseradish peroxidase purification” *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1701-1706.
48. K. Shinomiya, Y. Kabasawa, K. Yanagidaira, H. Sasaki, M. Muto, T. Okada, Y. Ito, “Protein separation by nonsynchronous coil planet centrifuge with aqueous–aqueous polymer phase systems” *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 103-112.
49. 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.
50. K.E. Goklen, T.A. Hatton, “Protein Extraction Using Reverse Micelles” *Biotechnol. Prog.* 1 (1985) 69-74.
51. 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.
52. M. Adachi, M. Harada, A. Shioi, Y. Sato, “Extraction of Amino Acids to Microemulsion” *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 7925.
53. 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.

54. R. B. G. Wolbert, R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. van't Riet, B. H. Bijsterbosch, "Protein Transfer from an Aqueous Phase into Reversed Micelles-The Effect of Protein Size and Charge Distribution" *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 627-631.
55. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "Amino Acids in AOT Reversed Micelles. Determination of Interfacial Partition Coefficients Using the Phase-Transfer Method." *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 6400-6411.
56. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "Amino Acids in AOT Reversed Micelles. The Hydrophobic Effect and Hydrogen Bonding as Driving Forces for Interfacial Solubilization." *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 6411-6420.
57. K. Naoe, M. Nishino, T. Ohsa, M. Kawagoe, M. Imai, "Protein extraction using sugar ester reverse micelles." *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 221-226.
58. 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  $\alpha$ -Chymotrypsin and Its Activity " *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 1239-1246.

59. E.M. Leser, G. Wei, P.L. Lysis, M. Maestro, "Application of Reversed Micelles for the Extraction of Proteins" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135 (1986) 629-635.
60. T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution." *Sep. Pur. Technol.* 31 (2003) 251-259.
61. K. Jones, M. J. Berry, M. D. Scawen, "Affinity chromatography" *Anal. Process.* 28 (1991) 140-142.
62. A. Denizli, E. Piskin, "Dye-ligand affinity systems" *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 391-416.
63. C. R. Lowe, "Combinatorial approaches to affinity chromatography" *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 248-256.
64. Y. P. Tan , T. C. Ling , W. S. Tan , K. Yusoff , B. T. Tey "Recovery of histidine-tagged nucleocapsid protein of Newcastle disease virus using immobilised metal affinity chromatography" *Process biochemistry* 41(2006)874-881.
65. Y. Li , A. Agrawal, J. Sakon, R. R. Beitlea "Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography" *Journal of chromatography A.* 909(2001)183-190.

66. R. Haeckel, B. Hess, W. Lauterborn, K.-H Wurster, "Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase" Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349 (1968) 699-714.
67. P. Roschlau, B. Hess, "Affinity chromatography of yeast pyruvatekinase with Cibacron blau bound to Sephadex G-200" Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 441-443.
68. A. Denizli , H. Yavuz , Y. Arica " Monosize and non-porous p(HEMA-co-MMA) microparticles designed as dye- and metal-chelate affinity sorbents" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 174 (2000) 307–317
69. A.Denizli,B.Salih,E.Piskin" Congo Red and Cu(II) carrying poly(ethylene glycol dimethacrylate-hydroxyethyl methacrylate) microbeads as specific sorbents Albumin adsorption/desorption" J. Chromatogar. A 731 (1996)57-63.
70. Y. D. Clonis, N. E. Labrou, V. Ph. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, "Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification" J. Chromatogr. A 891 (2000) 33-44.

71. C. R. Lowe, S. J. Burton, N. P. Burton, W. K. Alderton, J. M. Pitts, J.A. Thomas, "Designer dyes: 'biomimetic' ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography" Trends. Biotechnol. 10 (1992) 442-448.
72. G. Kopperschlager, "Methods in Enzymology, Aqueous Two-Phase Systems" Section II, Chapter 11, 121-129.
73. M.D. Scawen, "Dye Affinity Chromatography" Anal. Process. 28 (1991) 143-144.
74. 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.
75. B. Salih, R. Zenobi, "MALDI Mass Spectrometry of Dye-Peptide and Dye-Protein Complexes" Anal. Chem. 70 (1998) 1536-1543.
76. H. Waffenschmidt, Dissertation, Institute für Technische Chemie und Makromolekulare Chemie, RWTH Aachen, Germany, 2000.