

## 第四章 結果與討論

### 4.1 溶劑系統添加乙酸乙酯之構想

使用陰離子型界面活性劑 AOT 來萃取 cytochrome c，雖然在正向萃取時速率很快；然而當要進行反相萃取時，它的速率就會變的很慢。由韓國的 S. S. Lee 等人的研究<sup>50</sup>指出 cytochrome c 在 pH 值減去 pI 值大於 1 的情況下(pH=11, pI=9.6)，其反向萃取進行 5 小時後，其回收率仍然只有 35%，因此他們使用了一些長碳鏈的醇類作為輔助溶劑，使得在相同時間內反向萃取之回收率提高。之後，我們在實驗的過程中，極偶然的情況下發現到乙酸乙酯似乎可以讓反向萃取之回收率及速率大幅提升，因此針對乙酸乙酯的添加量對反向萃取之回收率的影響進行一連串的實驗。

### 4.2 緩衝溶液的使用

一直以來，本實驗室在反微胞的正向萃取上都是以 0.2M KCl 之水溶液來做為動相，反向萃取則是在 5mL 的 sample loop 中注入同為 0.2M 之 KCl，加入 NaOH 以固定比例調配而成的高 pH 值鹼液，進行反向萃取。

然而此一動相系統在進行乙酸乙酯的添加量對反向萃取之回收率的影響之實驗時卻出現了問題，當我們使用高 pH 值鹼液來反萃反微胞中的 cytochrome c 時，pH 值會由 12 大幅下降到 7，因此雖然就外觀上而言，cytochrome c 的顏色很快會由有機相回到水相中，但是整個水相呈現混濁的狀態，若靜置一段時間使其澄清，會發現 cytochrome c 又回到有機相，故即使使用高 pH 值鹼液，在此實驗中，

無法使 cytochrome c 達成反向萃取。於是我們使用磷酸系列的鈉鹽與 NaOH 依一定的比例配出在正向萃取和反向萃取時，所需的動相系統。

### 4.3 在樣品瓶中的實驗

#### (1) 實驗方法

在 n-hexane/AOT 之有機靜相中分別添加體積比為 0%、5%、10% 及 20% 的乙酸乙酯，分別配製 50mL，並各取 5mL 和等體積的 cytochrome c 水溶液在 20mL 的樣品瓶中以磁石(長 28mm，寬 6mm)攪拌，維持相同的速率進行混合，觀察 cytochrome c 進入反微胞中所需的時間；再以 pH = 11 的緩衝溶液和已含有 cytochrome c 的反微胞混合做反萃，並記錄所需時間。經比較後發現，加入 20% 的乙酸乙酯之有機靜相分別只需 5 秒及 1 分鐘，經 UV-Vis 光譜儀偵測，發現正向萃取及反向萃取之動作已完成，因此選擇 5 秒及 1 分鐘做為含不同乙酸乙酯含量下，正向萃取及反向萃取的反應時間。

#### (2) 實驗結果

在相同的反應時間下，可以得到加入 0%、5%、10% 及 20% 的乙酸乙酯，所得到的回收率如表(一)，可看出當乙酸乙酯在靜相中所佔的比例越多，cytochrome c 的回收率也隨之提高；但是在實驗的過程中卻發現，在反向萃取後，將兩相分開，有加入 EA 的組別，原本已溶於水相的 cytochrome c 在靜置一段時間後，會形成紅色油滴聚集於液面，且測量其 pH 值為 9.3，而原本反向萃取後的 pH 在 10.5 ~ 10.9 之範圍內，因此推測應是溶於水中的乙酸乙酯水解所產生的酸，使得水相之 pH 值降到 pI 值之下，而造成 cytochrome c 脫離水相的情況。

表(一)加入不同含量的 EA 對回收率的影響

| EA 的含量              | 0%    | 5%    | 10%   | 20%    |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|
| 加入 cytochrome c 的濃度 | 226   | 226   | 226   | 226    |
| 回收 cytochrome c 的濃度 | 74    | 131   | 163   | 226    |
| 回收率                 | 32.7% | 58.0% | 72.1% | 100.0% |

\*表(一)之實驗條件:靜相 50mM AOT 溶於含有 0%,5%,10%,20%EA 的 n-hexane 中;動相為 226mg/L 的 cytochrome c 溶於 pH=6.99,0.1M NaCl 的緩衝溶液中,反向萃取之 pH = 11,回收體積為 5mL

#### 4.4 在高速逆流層析儀中的實驗

##### (1)離子濃度對回收率的影響

離子濃度是影響萃取率的因素之一,一般而言,離子濃度越高,蛋白質分子就越難進入反微胞中,這是由於隨著離子濃度的提高,反微胞的粒徑會隨之縮小,而這也使得調整離子濃度可以做為反向萃取的控制條件。在實驗中,將離子濃度作為變異的因素,探討它對回收率的影響,其結果如表(二)及圖(十七)。

表(二)中的 Recovery yield 是收集管中濃度佔所打入樣品的百分比;而 Concentration factor 則是收集管的濃度與原樣品濃度在等體積下的比值。由表(二)的實驗結果可以得知,當 NaCl 濃度由 0.1M 增為 0.2M 時,其回收率會大幅的降低,推測其原因,除了和反微胞的粒徑大小有關,應該也受到靜相滯留量的影響。

##### (2)pH 值對回收率的影響

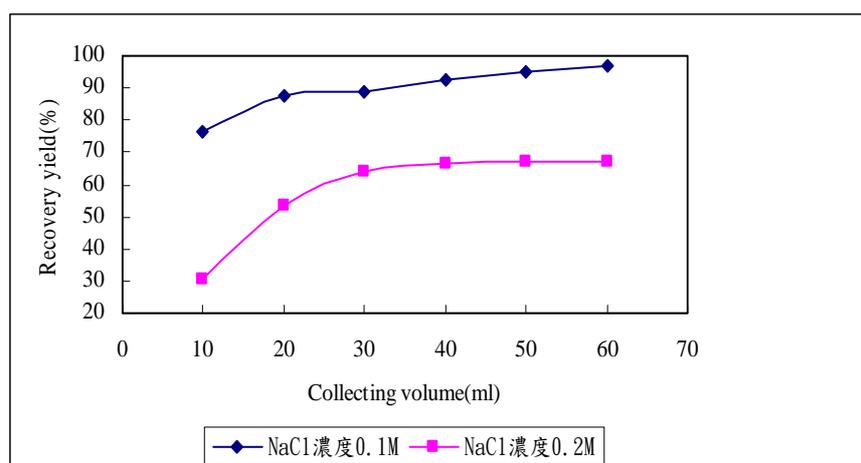
改變 pH 值在本實驗中乃是進行反向萃取的因素,理論上當 pH 值高於 pI 值,反向萃取就會發生,但是若反向萃取不是使用緩衝溶

液，pH 值將大幅的降低，而導致必需使用極高 pH 值之鹼液，才可以維持 pH 值還在 pI 值以上，而有反向萃取的效果。

表(二)不同離子濃度對回收率的影響

| NaCl 濃度 0.1M，靜相滯留量 28mL |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml)   | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)       | 76.4 | 87.3 | 88.7 | 92.4 | 95.0 | 97.0 |
| Concentration factor    | 13.8 | 7.9  | 5.3  | 4.2  | 3.4  | 2.9  |
| NaCl 濃度 0.2M，靜相滯留量 60mL |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml)   | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)       | 30.7 | 53.5 | 63.8 | 66.3 | 67.0 | 67.0 |
| Concentration factor    | 5.5  | 4.8  | 3.8  | 3.0  | 2.4  | 2.0  |

\*表(二)之實驗條件:靜相 50mM AOT 溶於含有 10%EA 的 n-hexane 中;動相為 pH=6.99，0.1M 及 0.2M NaCl 的緩衝溶液；樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 180mL，反向萃取之 pH = 11，回收體積 60mL



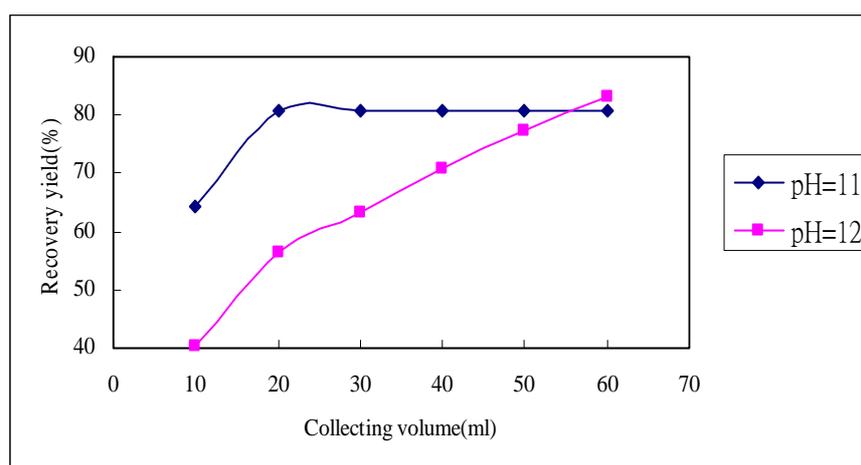
圖(十七)離子濃度對回收率的影響

因此，在本實驗中，使用 pH 值為 7、11 及 12 之緩衝溶液，分別做為正向萃取及反向萃取的動相，其實驗結果如表(三)及圖(十八)。

表(三)pH 值對回收率的影響

| EA 含量為 0%，靜相滯留量 80mL  |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 64.4 | 80.6 | 80.6 | 80.6 | 80.6 | 80.6 |
| Concentration factor  | 11.6 | 7.3  | 4.8  | 3.6  | 2.9  | 2.4  |
| EA 含量為 0%，靜相滯留量 74mL  |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 40.3 | 56.5 | 63.4 | 70.8 | 77.3 | 83.1 |
| Concentration factor  | 7.3  | 5.1  | 3.8  | 3.2  | 2.8  | 2.5  |

\*表(三)之實驗條件:靜相為 50mM AOT/n-hexane；動相為 pH=6.99，0.1M NaCl 的緩衝溶液；反向萃取之動相分別為 pH=11 及 12，0.1M NaCl 的緩衝溶液；樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 180mL



圖(十八)pH 值對回收率的影響

由表(三)之結果，可以證實當使用 pH 值為 11 之緩衝溶液做反向

萃取，最後的收集液之 pH 值亦在 11 上下，且其回收率可以達到 68.5%，與原先使用一小段 pH 為 12.8 之鹼液做反向萃取，所得到的回收率差不多。

而當我們將緩衝溶液之 pH 值調整到 12，其回收率與 pH 值為 11 之緩衝溶液相比差異不大，有時甚至還會得到較低的回收率如表(五)，在其他的條件都相同的情況下，我們由實驗結果推測，改變 pH 值在本實驗中對回收率並沒有幫助。

### (3)EA 含量對回收率的影響

由於我們在樣品瓶中的實驗可以證實添加 EA 確實可以在相同的時間內，在反向萃取的過程中，提高樣品的回收率；因此我們將此一方法應用在逆流層析上，觀察它對回收率的影響。在實驗中分別配製 EA 所占比例為 0%、5% 及 10% 的有機相，觀察其對回收率的影響。

在表(四)的實驗條件下，可以發現到：當我們使用 EA 比例為 5% 的靜相時，其回收率提高了約 17%，達到約 97%；但是當我們將 EA 的比例提升到 10%，其回收率與 EA 比例為 5% 時相差不大，其結果如圖(十九)。此結果顯示，隨著 EA 含量的增加，靜相滯留量下降，因此  $V_R$  值( $V_R$  值是打入樣品和靜相滯留量的體積比)即隨之上升，導致其回收率提升，但是我們所得到的回收率仍然大於因  $V_R$  值增加所造成回收率提升的幅度，再根據表(一)的實驗結果，我們認為，加入 EA 對反向萃取的回收率，確實有提升的效果，而關於靜相滯留量、 $V_R$  值與回收率的關係如表(五)。

我們可以由 EA 含量不同，在反向萃取時，所得到的反向萃取圖，圖(二十) (a)、(b)、(c)，分別是 EA 含量為 0%、5%、10%，可以發現有添加 EA 的層析峰明顯變寬、變大，吻合回收率提升的實驗結果，

然而其圖形與我們所預期的不同，由於我們在反向萃取時，是使用 pH 為 11 的緩衝溶液不斷進行反向萃取的動作，故原先預期應能達到 100% 的回收率，加入 EA 僅對其回收的速率有影響；但由反向萃取圖看來 EA 在熱力學上的影響比在動力學上顯著，EA 的添加，使原本只能回收 80% 的 cytochrome c 達到 100% 回收。

不過，再進一步的實驗後發現，在某些實驗條件下，增加 EA 在靜相中的含量並不能使回收率增加，表(六)的實驗結果可以說明此一情況。由表(六)的實驗結果，我們可以發現，雖然添加了 5% 的 EA，可以使回收率增加約 10%，但是當 EA 的比例增加到 10% 時，其回收率反而和未添加 EA 的情況差不多。推測其原因，乃是在此一實驗條件下，EA 的比例由 0% 增加到 10%，其  $V_R$  值也只由 1.9 增加到 3，再加上在實驗的過程，EA 在水中溶解度(10%)頗大，EA 的水解在本實驗中是抑制反向萃取的因素，在表(六)的實驗條件下，可能已足以和  $V_R$  值所造成的影響抗衡，因此造成回收率並不隨著 EA 含量上升的情況。

#### (4) 省略空白動相的嘗試

一直以來，本實驗室在正向萃取的步驟之前都會先打一段動相來和靜相先平衡一段時間，再打入樣品；然而，我們的樣品所處的溶劑環境與空白動相完全相同，而且所使用的溶劑系統已經改成在 pH 值改變下比較穩定的緩衝溶液，因此構想出省略空白動相的計畫。

在與表(四)及完全相同的實驗條件下，在靜相已填滿管柱且高速逆流層析儀之轉速也已經穩定後，直接將樣品打入，而得到如表(七)及圖(二十一)所顯示之實驗結果。

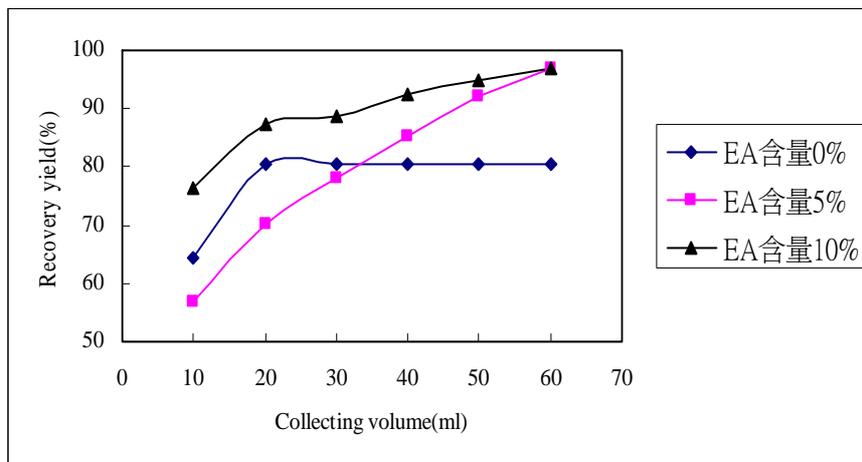
將表(四)及表(七)所得到的實驗結果做比較，未先打一段空白動

相所得到的回收率會變低，由其圖，圖(二十二)(a)及(b)，亦可看出其波峰比先打一段動相之波峰窄，有時甚至沒有波峰出現，在收集上造成困難。造成此一差異，應是未打空白動相時，因為一時之間尚未達到動靜相平衡，在部分靜相被推出的過程中，部分已進入反微胞的 cytochrome c 隨著被推出的靜相一起流失，而造成回收率的

表(四)EA 含量對回收率的影響

| EA 含量為 0%，靜相滯留量 80mL  |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 64.4 | 80.6 | 80.6 | 80.6 | 80.6 | 80.6 |
| Concentration factor  | 11.6 | 7.3  | 4.8  | 3.6  | 2.9  | 2.4  |
| EA 含量為 5%，靜相滯留量 46mL  |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 56.9 | 70.1 | 78.1 | 85.3 | 92.1 | 96.9 |
| Concentration factor  | 10.2 | 6.3  | 4.7  | 3.8  | 3.3  | 2.9  |
| EA 含量為 10%，靜相滯留量 28mL |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 76.4 | 87.3 | 88.7 | 92.4 | 95.0 | 97.0 |
| Concentration factor  | 13.8 | 7.9  | 5.3  | 4.2  | 3.4  | 2.9  |

\*表(四)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 0%，5%，10%EA 之 n-hexane 中；動相為 pH=6.99，0.1M NaCl 的緩衝溶液；反向萃取之動相為 pH=11，0.1M NaCl 的緩衝溶液；樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 180mL



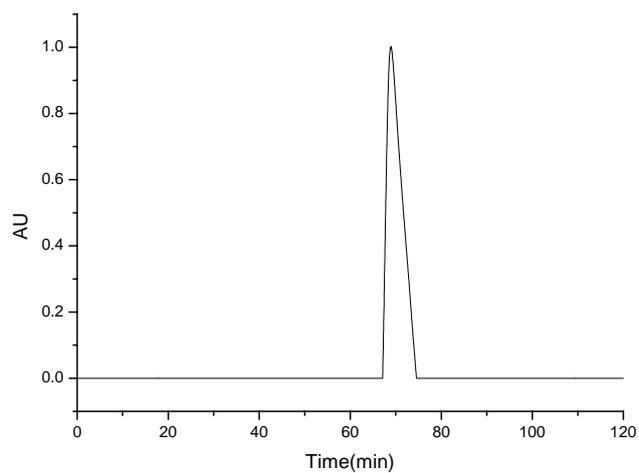
圖(十九)EA 含量對回收率的影響

下降，然而觀察整個實驗的過程中，系統的靜相滯留量與先打一段空白動相時相比，差異並不大，因此在可行性的考量上，此一方法是可行的;然而，若就回收率來考量，此一方法仍然需要進一步的改善。不過之前在表(四)中所觀察到回收率隨 EA 含量增高而隨之增高的趨勢，在表(七)中也可以觀察到，而且從表(七)的實驗條件下，EA 含量對回收率的影響力提高了。

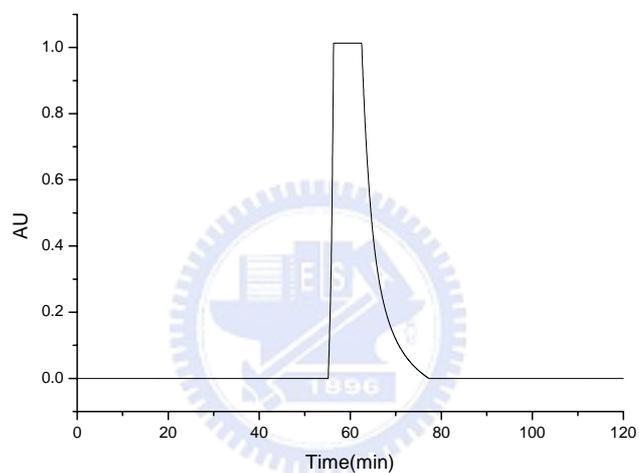
#### (5)大量萃取的實驗

高速逆流層析儀是可以用於製備上的儀器，因此系統是否具有大量萃取的能力，是我們評估此一溶劑系統是否具有應用價值的一個重要依據。因此，我們將打入的樣品體積增為原本的三倍，觀察其回收率及濃縮倍率，其實驗結果參見表(八) 及圖(二十三)。

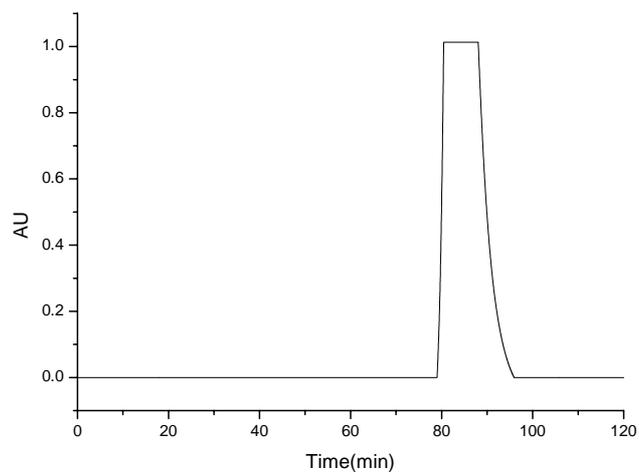
表(八)和表(四)中之實驗，相同實驗條件下之結果做比較，兩者間的差異，僅在打入的樣品體積不同;在表(四)中是打入 180mL，而



圖(二十)(a) EA 含量 0%之反向萃取圖



圖(二十)(b) EA 含量 5%之反向萃取圖



圖(二十)(c) EA 含量 10%之反向萃取圖

表(五) 靜相滯留量、 $V_R$  值與回收率的關係

|                   |      |      |      |
|-------------------|------|------|------|
| EA 含量(%)          | 0    | 5    | 10   |
| 靜相滯留量(ml)         | 80   | 46   | 28   |
| $V_R$             | 2.3  | 3.9  | 6.4  |
| Recovery yield(%) | 80.6 | 96.9 | 97.0 |

\*表(五)根據表(四)製成

表(六) EA 含量對回收率的影響

| EA 含量為 0%，靜相滯留量 96mL  |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 35.0 | 50.6 | 58.2 | 63.1 | 66.5 | 68.5 |
| Concentration factor  | 6.3  | 4.5  | 3.5  | 2.8  | 2.4  | 2.1  |
| EA 含量為 5%，靜相滯留量 70mL  |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 48.5 | 61.1 | 68.2 | 73.0 | 77.2 | 78.9 |
| Concentration factor  | 8.7  | 5.5  | 4.1  | 3.3  | 2.8  | 2.4  |
| EA 含量為 10%，靜相滯留量 60mL |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 30.7 | 53.5 | 63.8 | 66.3 | 67.0 | 67.0 |
| Concentration factor  | 5.5  | 4.8  | 3.8  | 3.0  | 2.4  | 2.0  |

\*表(六)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 0%，5%，10%EA 之 n-hexane

中；動相為 pH=6.99，0.1M NaCl 的緩衝溶液；反向萃取之

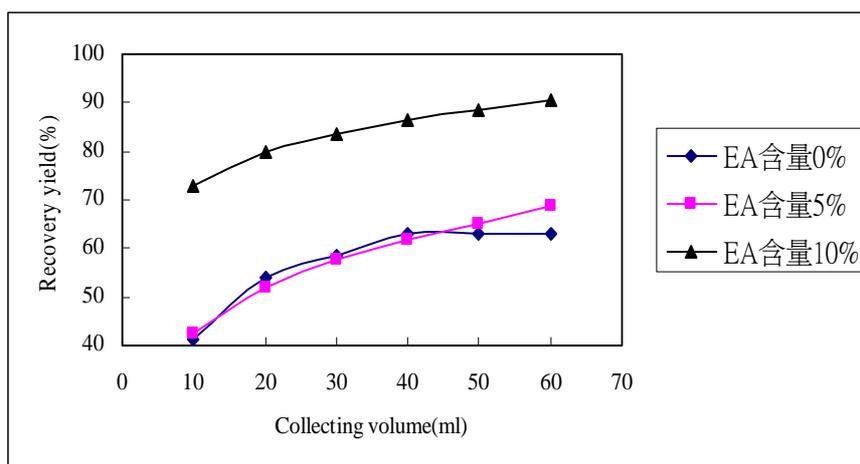
動相為 pH=11，0.2M NaCl 的緩衝溶液；樣品為 20mg/L 之

cytochrome c 180mL

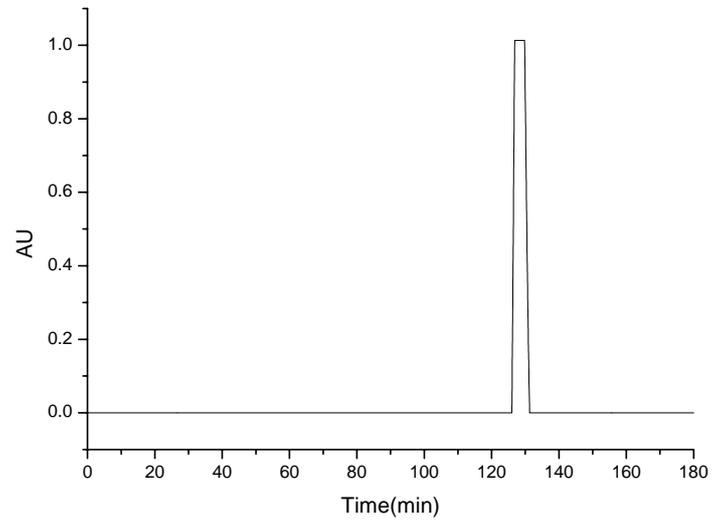
表(七) 省略空白動相對回收率的影響

| EA 含量為 0% ，靜相滯留量 84mL  |      |      |      |      |      |      |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml)  | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)      | 41.3 | 54.1 | 58.4 | 63.1 | 63.1 | 63.1 |
| Concentration factor   | 7.4  | 4.9  | 3.5  | 2.8  | 2.3  | 1.9  |
| EA 含量為 5% ，靜相滯留量 44mL  |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml)  | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)      | 42.3 | 51.9 | 57.8 | 61.9 | 65.2 | 68.7 |
| Concentration factor   | 7.6  | 4.7  | 3.5  | 2.8  | 2.3  | 2.1  |
| EA 含量為 10% ，靜相滯留量 20mL |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml)  | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)      | 72.7 | 80.0 | 83.5 | 86.6 | 88.4 | 90.4 |
| Concentration factor   | 13.1 | 7.2  | 5.0  | 3.9  | 3.2  | 2.7  |

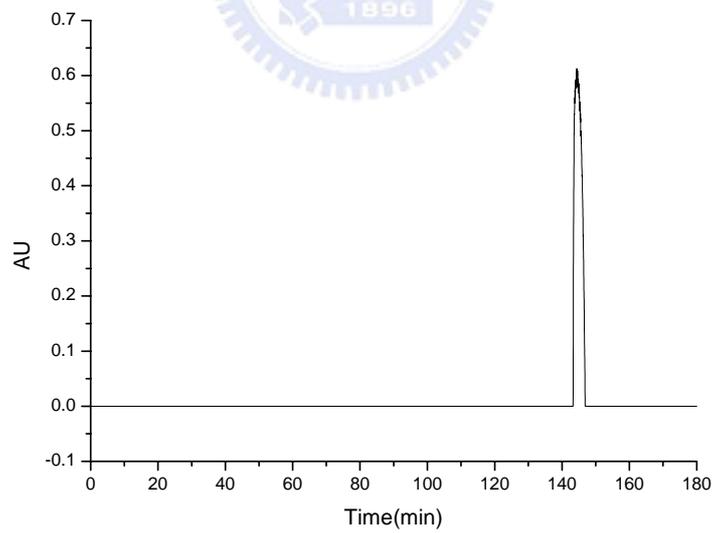
\*表(七)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 0% ， 5% ， 10%EA 之 n-hexane 中；動相為 20mg/L 之 cytochrome c 溶於 180mL ， pH=6.99 ， 0.1M NaCl 的緩衝溶液；反向萃取之動相為 pH=11 ， 0.1M NaCl 的緩衝溶液



圖(二十一) 省略空白動相對回收率的影響



圖(二十二)(a) EA 含量 5% 之反向萃取圖



圖(二十二)(b) EA 含量 10% 之反向萃取圖

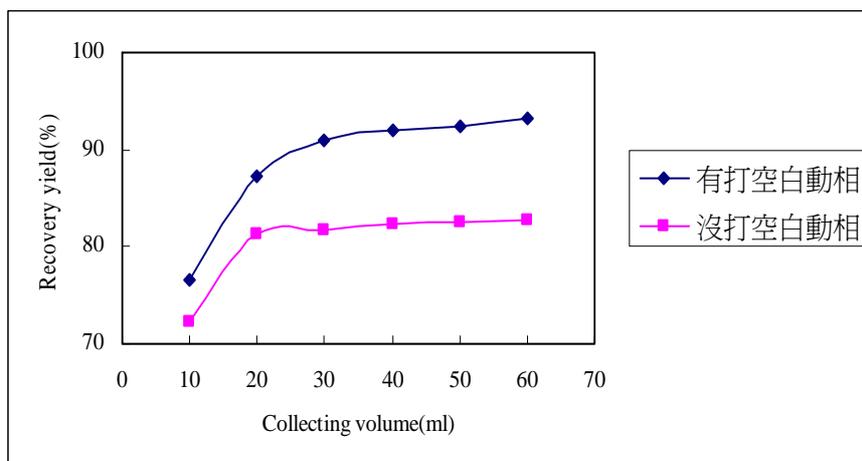
表(八)的實驗則是打入 540mL，兩相比較後可以發現，樣品體積的增加，在有先打一段動相時，對整體的回收率並沒有太大的影響。

此外，對先打一段空白動相的影響，再做進一步的探討。在相同的實驗下，省略先打一段空白動相與靜相平衡之過程，同樣打入 540mL 的樣品，得到其實驗結果如表(八)所示。

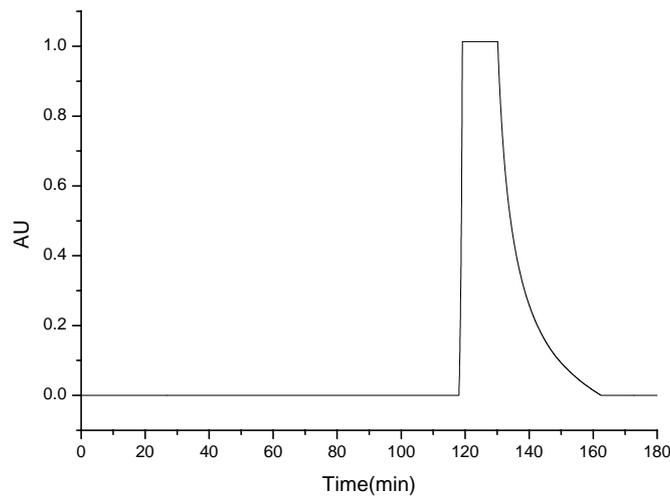
表(八) 大量萃取對回收率的影響

| 先打一段動相，靜相滯留量 46mL     |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 76.5 | 87.2 | 91.0 | 92.0 | 92.5 | 93.2 |
| Concentration factor  | 41.3 | 23.5 | 16.4 | 12.4 | 10.0 | 8.4  |
| 未先打一段動相，靜相滯留量 40mL    |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 72.2 | 81.2 | 81.8 | 82.4 | 82.6 | 82.7 |
| Concentration factor  | 39   | 21.9 | 14.7 | 11.1 | 8.9  | 7.4  |

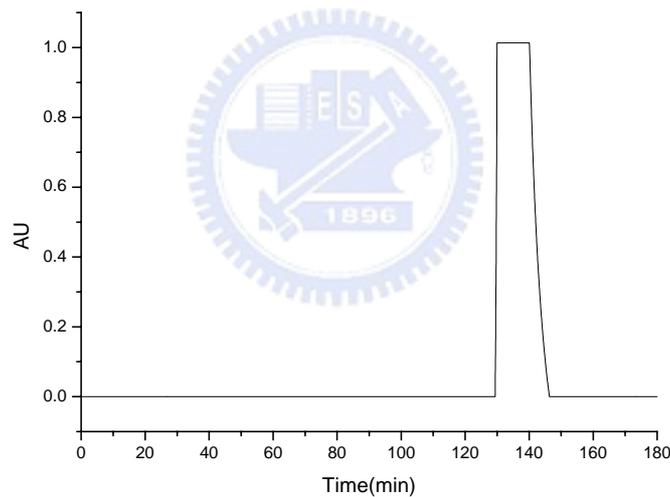
\*表(八)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 0%，5%，10%EA 之 n-hexane 中；動相為變異數；反向萃取之動相為 pH=11，0.1M NaCl 的緩衝溶液；樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 540mL



圖(二十三) 大量萃取對回收率的影響



圖(二十四)(a)先打一段動相，樣品 540mL 之反向萃取圖



圖(二十四)(b)未先打一段動相，樣品 540mL 之反向萃取圖

將表(八)中所得到的結果和表(四)做比較，可以發現即使未先打入一段空白動相，可以得到回收率隨  $V_R$  值提高而增加的結果，我們推測應是，隨著靜相流失的 cytochrome c 是固定的，因此打入的樣品體積越高，流失部分所占的體積就越少，回收率因而提高；而表(八)的兩組數據做比較，亦能符合之前，打入樣品體積為 180mL 時，有

先打一段空白靜相時，可以得到較高回收率的現象，我們由這兩組數據的圖，圖(二十四)(a)及(b)可以佐證我們的實驗結果。

此外，在表(八)的實驗條件下， $V_R$  值已達到 11.7，由之前的實驗結果，顯示在表(八)的實驗條件下，其回收率除了  $V_R$  值以外，還受到離子濃度及 EA 含量的影響，因此在相同的  $V_R$  值下，可以得到比本實驗室之前的研究更高的回收率。故我們推測在表(八)的實驗條件下，應該可以得到 100% 的回收率，但是實驗結果卻只有 93.2%，我們推測可能反微胞已達到飽和，而使部分樣品無法進入反微胞中。

為了證實我們的推論，又由早期的資料<sup>51</sup>顯示，所使用的蛋白質 cytochrome c 在  $V_R$  值 = 10 時仍未達到飽和，因此在與表(八)相同的實驗條件下，打入 400mL 的樣品，觀察其回收情況。我們將實驗的結果列為表(九) 及圖(二十五)，發現其回收率與表(八)的結果差不多，其圖，圖(二十六)之波峰形態亦與圖(二十四)(a)相似，而將正向萃取的流析液及反向萃取後的反微胞做 UV 偵測，皆無訊號出現，顯示 cytochrome c 並沒有流失及殘留的現象，故可能是定量上的誤差，造成回收率不到 100%。對此實驗結果，我們推測，在相同的實驗條件下，不管打入多少體積的樣品，其最終之回收率都差不多；但是對於較大量的樣品，在反微胞濃度相同的情況下，在正向萃取可以占據較多的反微胞水核，因此在反向萃取時，由於動力學因素佔優勢，在最初的一段時間裡，可以得到相對較高的回收率；而最後不管對於是大量或少量的樣品，最後皆趨向動力學平衡，因此最後的回收率會差不多。

#### (6)反微胞再利用的測試

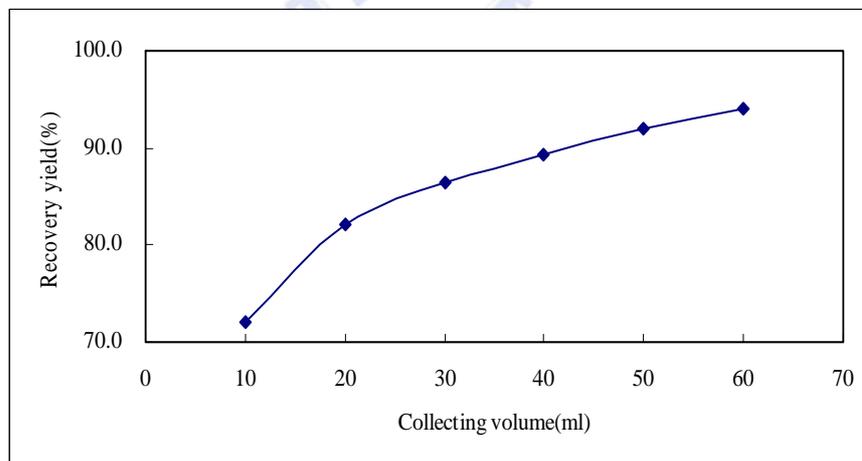
在本篇論文中，反微胞在經過反向萃取後，能否再度被使用，也

是我們研究的重點之一;因此在表(十)及圖(二十七)中所得到的實驗結果是連續進行三次正向以及反向萃取，並觀察其回收的情況。

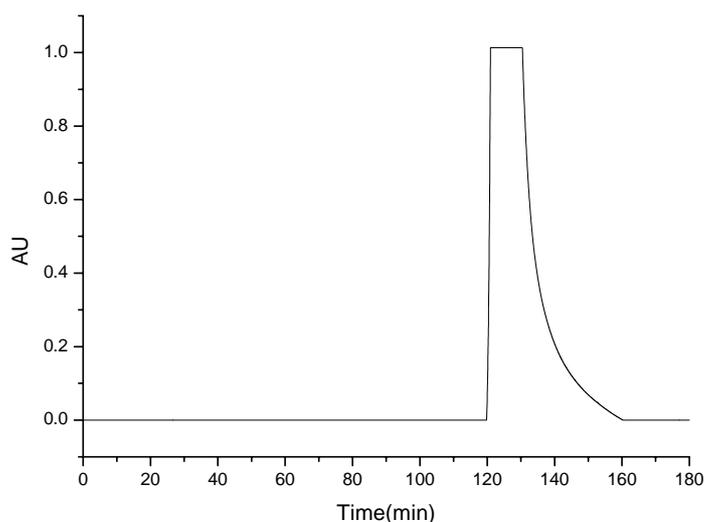
表(九) 大量萃取的回收率

|                       |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 72.0 | 82.2 | 86.4 | 89.4 | 91.9 | 94.1 |
| Concentration factor  | 28.8 | 16.4 | 11.5 | 8.9  | 7.4  | 6.3  |

\*表(九)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 5%EA 之 n-hexane 中 ; 動相為 pH=6.99 , 0.1M NaCl 的緩衝溶液 ; 反向萃取之動相為 pH=11 , 0.1M NaCl 的緩衝溶液 ; 樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 400mL , 靜相滯留量 44mL



圖(二十五) 大量萃取的回收率

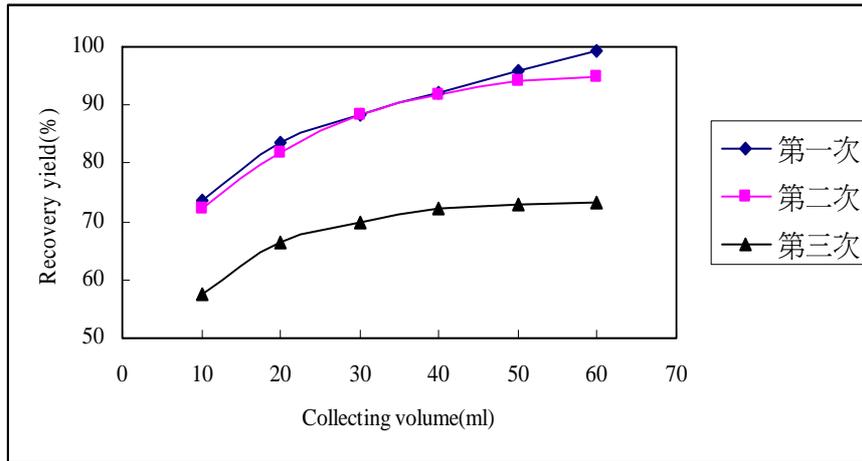


圖(二十六) 先打一段動相，樣品 400mL 之反向萃取圖

表(十) 連續三次正向以及反向萃取之結果

| 第一次正向及反向萃取            |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 73.7 | 83.7 | 88.4 | 92.1 | 96.0 | 99.3 |
| Concentration factor  | 13.3 | 7.5  | 5.3  | 4.1  | 3.5  | 3.0  |
| 第二次正向及反向萃取            |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 72.3 | 82.0 | 88.3 | 91.9 | 94.1 | 94.8 |
| Concentration factor  | 13.0 | 7.4  | 5.3  | 4.1  | 3.4  | 2.8  |
| 第三次正向及反向萃取            |      |      |      |      |      |      |
| Collecting volume(ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   |
| Recovery yield(%)     | 57.5 | 66.3 | 69.9 | 72.3 | 73.1 | 73.2 |
| Concentration factor  | 10.3 | 6.0  | 4.2  | 3.3  | 2.6  | 2.2  |

\*表(十)之實驗條件:靜相為 50mM AOT 溶於含有 5%EA 之 n-hexane 中 ; 動相為 pH=6.99 , 0.1M NaCl 的緩衝溶液 ; 反向萃取之動相為 pH=11 , 0.1M NaCl 的緩衝溶液 ; 樣品為 20mg/L 之 cytochrome c 180mL



圖(二十七)連續三次萃取的回收率

由實驗結果可以看出，在第二次萃取時，其回收率比第一次萃取時雖略有下降，仍然有 94.8% 的回收率；但是在第三次萃取時，其回收率大幅下降，顯示在三次的反向萃取後，可能 AOT 已有一部分遭到水解，因此在表(十)的實驗條件下，反微胞雖然可以進行三次的萃取(如圖(二十七))，但在實際應用上，同一個反微胞系統可使用兩次。