

## 第二章 研究背景與理論

### 2.1 反微胞萃取法

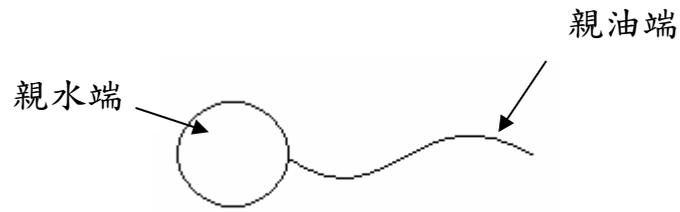
#### 2.1.1 簡介界面活性劑

界面活性劑(surfactant)是一種具有親水基(hydrophilic groups)及親油基(hydrophobic groups)的物質，由於它具有兩種極性大小不同的基團，因此可以降低兩相間的表面張力。界面活性劑可依其性質的不同分為離子型和非離子型，其中離子型的界面活性劑又可再區分為陽離子型和陰離子型兩大類，而根據一個界面活性劑較為親水或親油可分別應用於微胞(micelle)或反微胞系統中，本實驗即是使用較親油性的界面活性劑在有機相中形成反微胞來進行實驗。

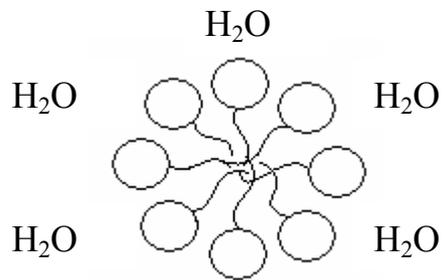
#### 2.1.2 反微胞系統

界面活性劑的結構如圖(一)(a)所示，較溶於水的界面活性劑在水中的表面張力會隨著濃度的提高而下降直到某一濃度時即在水中形成微胞，其結構如圖(一)(b)，而此一微胞形成的濃度被稱為臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)，相對的當較不具極性的界面活性劑溶於有機相時會形成反微胞的結構如圖(一)(c)，在此結構中界面活性劑的親水端會朝內聚集成一個可以溶解水分子的極性核心(polar core)，又稱做水核。此反微胞系統可以因為水相中 pH 值的改變、離子濃度的改變，或加入其它的界面活性劑等方法，使得原本溶於水相不溶於有機相的物質可以被反微胞萃取，也可以再由反微胞中反萃回到水相;此系統目前主要應用在水溶性的金屬離子、酵素、

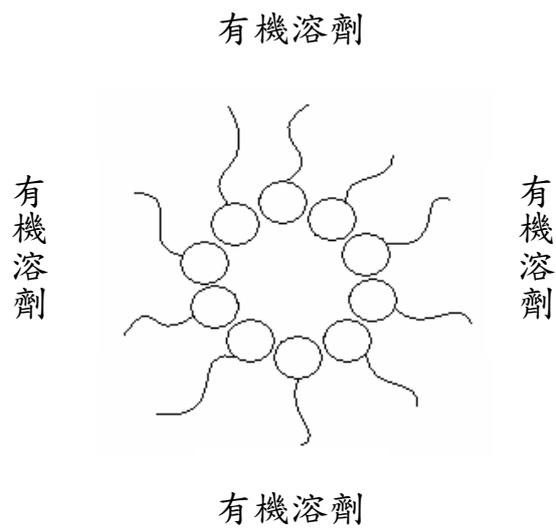
(a) 界面活性劑分子



(b) 微胞



(c) 反微胞



圖(一)(a)界面活性劑、(b)微胞與(c)反微胞的示意圖。

蛋白質，和氨基酸等的萃取，最大的優點是使上述的物質不會因為處於有機相中而改變本身的性質，因此反微胞可做為使極性分子在兩相間轉移的工具。

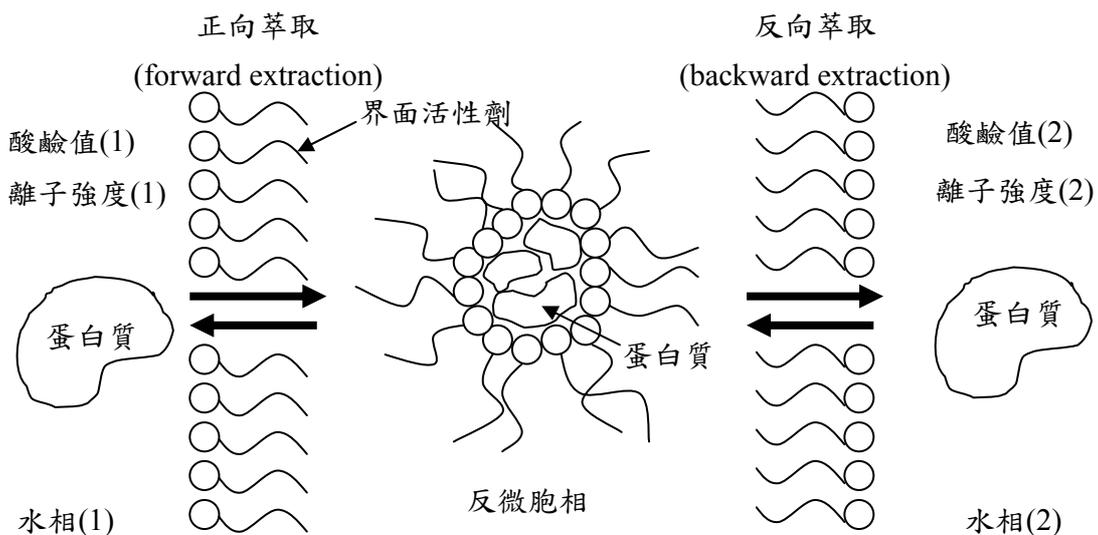
### 2.1.3 反微胞的萃取機制

#### (1) 靜電作用力 (electrostatic interactions)<sup>12,13</sup>

離子型的界面活性劑由於有帶電，故欲使水溶性的分子進入此類型的反微胞系統必需要讓水溶性的分子和反微胞帶相反的電荷；相對的當水溶性的分子和反微胞帶相同的電荷時，水溶性的分子就會由反微胞系統回到水相，通常我們可以藉由改變水相的 pH 值來達到此一目的地。

#### (2) 疏水性作用力 (hydrophobic interactions)<sup>14,15</sup>

而對非離子型的界面活性劑而言，改變 pH 值對其萃取的效果影響不大，亦即上述所提到的靜電作用力對非離子型的界面活性劑並非影響其萃取的主要因素，因此有些學者認為水溶性分子的疏水基與界



圖(二)反微胞萃取示意圖

面活性劑的疏水基之間的凡得瓦耳力才是影響這一類界面活性劑的最主要因素。

#### 2.1.4 常見的反微胞萃取法<sup>16</sup>

##### (1)相穿越法(phase transfer method)

在此方法中溶有蛋白質的水溶液與後來加入的含有界面活性劑的有機相以磁石加以攪拌，而使得原本存在水相中的蛋白質漸漸穿越到反微胞內，再測量蛋白質在兩相之中個別的吸收值，藉以觀察蛋白質在兩相間的轉移情況，其簡圖如圖(三)(a)所示。

##### (2)注射法(injection method)

此方法如圖(三)(b)所示，將含有高濃度蛋白質的水溶液注射到含界面活性劑的有機相中，若注射過量的蛋白質，則溶液會因飽和而不穩定，過量的蛋白質逐漸沈澱析出，使其溶解度隨時間而降低，此方法最大的優點就是快速。

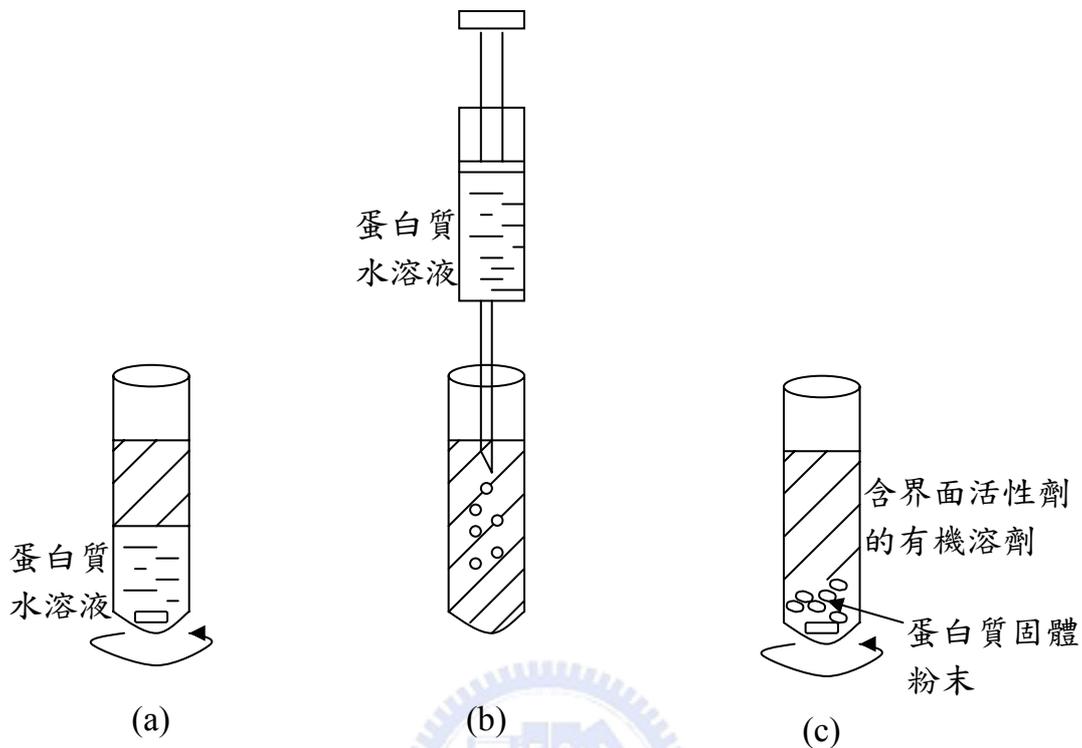
##### (3)固相萃取(solid-state extraction)

此方法乃是針對對水溶解度不佳的物質所設計，將固體的欲萃取物直接加入含有定量水的反微胞有機相中攪拌如圖(三)(c)所示，因為在此方法中的水相與一般水相物理性質有所差異，所以溶解能力也會有所不同。

#### 2.1.5 影響蛋白質萃取的因素<sup>17</sup>

##### (1)水溶液之離子強度(ionic strength)

隨著離子強度的增加會造成 Debye Screening Effect 的出現而導致界面活性劑的親水端與水溶性分子之間的淨電作用力降低，使得反



圖(三)常見反微胞萃取方式(a)相穿越法(b)注射法(c)固相萃取

微胞的體積變小，亦即有機相溶解水分子以及水溶性分子的能力變小。反微胞內所含水分子的多寡可由  $W_0$  值看出，此一數值乃是反微胞相中水與界面活性劑的莫耳數比( $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{surfactant}]$ )，也是量度反微胞內水核的指標。

相反的，當離子濃度減少時，兩相之間在混合後不易回復澄清的狀態；甚至在低到某一極限值時，反微胞就不會形成，兩相因此形成一穩定的乳化態。

## (2) 蛋白質表面的電荷分布

Wolbert 等人曾在 1989 年對此一因素進行研究，結果發現在陽離子型界面活性劑 TOMAC 所形成的反微胞系統中，有著高不對稱性電

荷(high charge asymmetry)的蛋白質較易被萃取，也發現到正向萃取率正比於電荷不對稱程度的情況。

### (3)水溶液之 pH 值

蛋白質由氨基酸所組成，因此可以形成正離子和負離子，而每一個蛋白質都具有在某一特定的 pH 值下淨電荷為零的特性，我們把此一特定的 pH 值稱為蛋白質的等電點，一般我們也以 pI 點稱之。而當蛋白質溶於水溶液時，若其  $\text{pH} < \text{pI}$ ，則蛋白質會帶正電<sup>18,19</sup>；反之，當  $\text{pH} > \text{pI}$  時，蛋白質會帶負電。對離子型的界面活性劑而言，水溶液之 pH 值是使其能夠進行萃取的重要驅動力，當蛋白質與反微胞電性相反時<sup>20,21</sup>，蛋白質會進入反微胞中，我們稱此一現象為正向萃取；而當蛋白質與反微胞電性相同時，蛋白質會被反微胞釋放而回到水相，此一情況被我們稱為反向萃取。

### (4)界面活性劑

離子型的界面活性劑由於和蛋白質分子之間有強靜電作用力的存在，對於反微胞萃取蛋白質是一項有利的因素；非離子型的界面活性劑則因為靜電作用力微弱，所以帶電性的改變對其影響不大。

不過，非離子型的界面活性劑對蛋白質的活性影響較小，在 1999 年，日本的 K. Naoe 等人以非離子型界面活性劑 DK-F-110 和 AOT 做比較<sup>22</sup>，發現 DK-F-110 形成的反微胞，在 pH 為 8 時，可以得到最大的正向萃取率，在反向萃取時，則加入異丙醇，可以得到 80% 的回收率，且反向萃取後之蛋白質活性，比使用 AOT 所得到的實驗結果高，因此較適合用於生物分子上。

界面活性劑的濃度增加對於正向萃取而言是一項有利的因素，但是對於反向萃取卻是不利的<sup>23</sup>，根據本實驗室之前的研究成果可以發

現到:當我們欲萃取並濃縮蛋白質時，隨著界面活性劑的濃度增加，蛋白質的回收率會隨之下降。因此我們必需選擇能達到最大正向萃取量的最低界面活性劑濃度，以兼顧到反向萃取的速率。

界面活性劑的濃度對不同的蛋白質有選擇性，例如:在較低的界面活性劑濃度下，分子量小的蛋白質比分子量大的蛋白質容易進入反微胞系統中。

#### (5)共界面活性劑(cosurfactant)與輔助溶劑(cosolvent)

傳統上，大都是以改變 pH 值或離子強度來達到反向萃取的目的地，但近年來的一些研究開始注意到其他可以應用在反向萃取上的因素，例如:加入輔助溶劑於反微胞系統中，可以使反微胞系統變的不穩定而釋出蛋白質;或是加入共界面活性劑<sup>24</sup>，此一動作可以改變反微胞的形狀與性質，以離子型的界面活性劑為例，當我們在其所形成的反微胞系統中，加入電性相反的界面活性劑，兩種界面活性劑會因靜電作用力而互相吸引造成反微胞系統破壞;若是加入非離子型的界面活性劑做為共界面活性劑，則可以減低蛋白質因電荷作用失去活性的現象。

#### (6)生物型親和基(biospecific ligands)的使用

此一親和基主要是加入有機相中，當蛋白質和親和基的結合常數越高、親和基在兩相間的分佈系數越高或蛋白質中的可結合點越多，蛋白質在反微胞中的溶解度會隨之提升，並且在蛋白質的萃取上具有良好的選擇性萃取效果。此外若在反微胞中加入少量的親和性共界面活性劑將可擴大水中 pH 值和離子強度在蛋白質萃取上的使用範圍。

#### (7)其他的影響因素

除了上述的因素之外，其他像是水溶液中電解質的種類、有機溶

劑的種類以及溫度等因素皆或多或少的對反微胞萃取蛋白質有所影響，雖然到目前為止已有許多關於反微胞的研究成果被發表，但是仍然有許多未知的領域等待研究者們去發現。

### 2.1.6 反微胞萃取蛋白質的發展

利用反微胞來萃取蛋白質，已是眾所皆知的技術，因此使用各式各樣的反微胞來萃取各種蛋白質的研究，也是多不勝數。M. Goto 等人將 cytochrome c 與 O-methylisourea，在 pH = 10.5 的情況下，反應形成 G-cytc，而他們所使用的界面活性劑為 DOLPA，cytochrome c 可以與此界面活性劑形成 protein-surfant 之錯合物，在他們的研究中指出：G-cytc 與一般的 cytochrome c 相比較，G-cytc 在 DOLPA 的濃度很低，以及鹽類濃度很高的情況下，仍然可以被反微胞萃取，其萃取率遠高於原來的 cytochrome c<sup>25</sup>。

此外，T. Nishiki 等人以 AOT/isooctane 之反微胞系統來萃取 lysozyme<sup>26</sup>，發現其正向萃取的速率約是反向萃取的 100 倍；而 M. E. Leser 等人則加入 silica 來做反向萃取的動作，此一方法在做蛋白質  $\alpha$ -chymotrypsin 的萃取時，其回收率可達 80%，其活性仍有原來的 80% 左右<sup>27</sup>。

而 J. H. Vera 等人則對親水端不同的三個界面活性劑：NaPOO、NaPSO 及 NaPSS，用來萃取 L-lysine 時，所呈現的結果做探討<sup>28</sup>，發現：當 pH 值與離子濃度皆相同的情況下，可以得到，對 L-lysine 的萃取率：NaPSS > NaPSO > NaPOO 之結果。

### 2.1.7 反微胞技術的其他應用

## (1) 奈米技術<sup>29,30,31</sup>

奈米科技的發展在近年來成為最受矚目的焦點，而利用反微胞來合成奈米粒徑的金屬粒子的方法也已被發展出來。反微胞的水核提供了奈米粒子合成所需適當且穩定的化學反應環境，合成的粒子亦具有均勻的粒徑大小。

其合成的過程乃是反微胞之間藉由融合及再擴散的過程來交換水核內部的成分物質，因此反微胞中金屬鹽類的還原反應就能夠促進奈米金屬粒子的長成，由此可知利用反微胞的系統來製備奈米粒子，除了取決於化學反應的速率外也和分子間交換速率有關。

## (2) 蛋白質再摺疊(protein refolding)<sup>32,33,34,35,36</sup>

是一種使變性蛋白質的高維結構重新建構，而使得蛋白質重新恢復活性的方法。起初，蛋白質的再摺疊是透過稀釋的方法來完成，先將變性蛋白質的聚合體溶解在高濃度的去活性劑中，再以適當的再摺疊用緩衝溶液稀釋。此方法的優點是其操作簡單，然其缺點包括：無法同時處理大量的蛋白質以及需消耗大量昂貴的氧化還原劑。為了解決傳統方法的問題，Hagen 等人利用反微胞來作為蛋白質再摺疊的新工具。

此一新技術如圖(四)所示，蛋白質聚合分子以高濃度的去活性劑溶解，再藉由液-液萃取的過程使變性蛋白質溶解在反微胞水核中，蛋白質分子在水核中自發的摺疊成正確的結構。然而，Hagen 等人發現高濃度的去活性劑使得變性蛋白質難以進入反微胞中，於是別的研究者，Hashimoto 等一群人使用固-液萃取來取代液-液萃取，最後終於成功的使變性蛋白質-固體核糖核酸酵素進入反微胞之中。

而想要使蛋白質回復原態構形及活性，通常是利用將被還原的

-SH 再氧化之方法，藉由雙硫鍵的形成與重整來促成蛋白質的再摺疊。在此一般使用氧化態和還原態的穀胱甘縮氨酸(reduced and oxidized glutathione, GSH and GSSG)作為用做 thiol/disulfide 試劑的化合物，其反應如圖(五)，GSSG 負責中間產物的形成;而 GSH 負責重整不正確的雙硫鍵組態。

### (3)感測器(sensor)

生物感測器在醫學研究的重要性日漸升高，而在感測電極表面固定適當的酵素成為生物感測器製程中的重要步驟，有學者使用反微胞來作為固定酵素的新方法，不但解決了酵素不容易固定在玻璃電極上的問題，酵素的活性和穩定性都比用其他的方法時高出數倍以上。

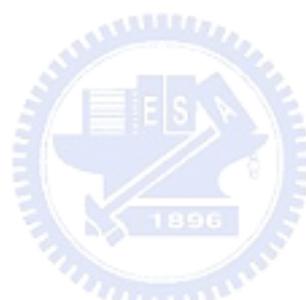
## 2.2 逆流層析

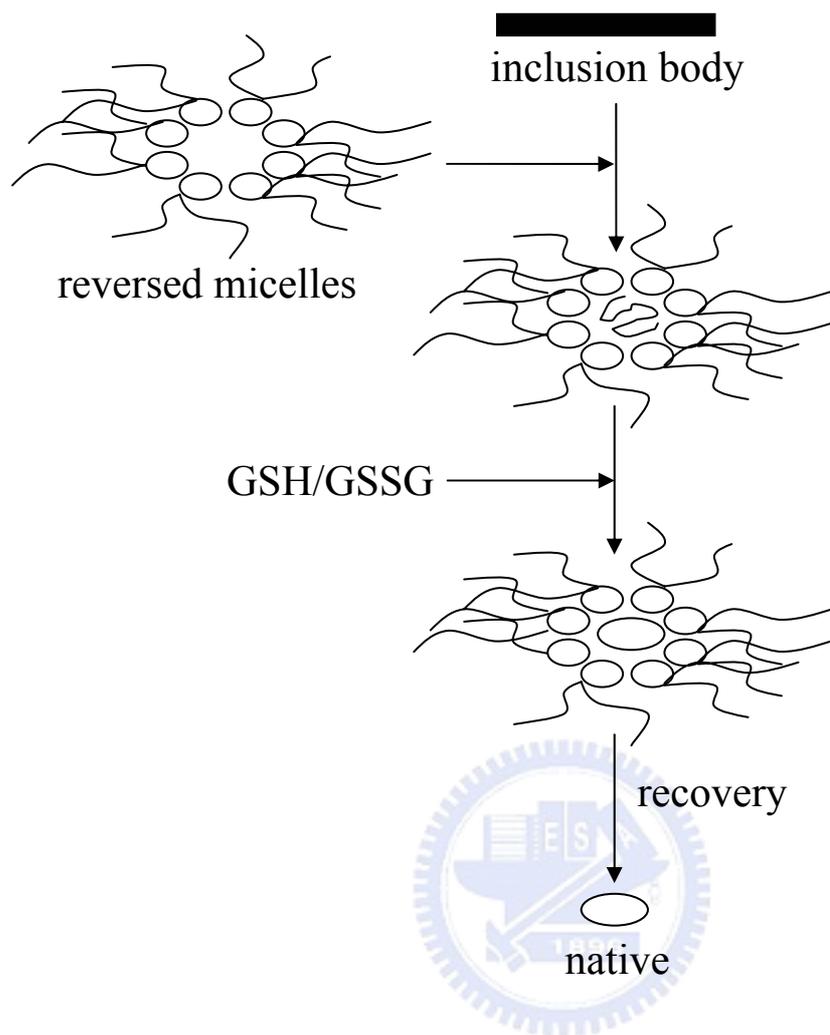
### 2.2.1 簡介

逆流層析<sup>37</sup>是一種不需要固體支持物的液相-液相分配層析法，其原理是利用在管柱轉動下所產生的離心力，而使靜相能夠滯留在管柱中，又由於靜相滯留的體積很大，因此可以分離大量的樣品，為具有製備能力的層析技術。除此之外，此技術和其他液相層析法相比較下，還具有樣品回收率高、沒有不可逆的吸附現象、樣品不易變性、靜相與動相可互換等優點。

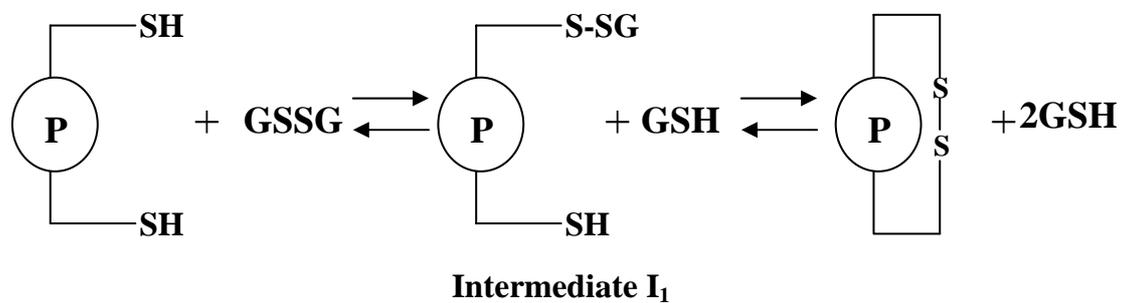
### 2.2.2 起源與發展<sup>38</sup>

最初的設計，是 Jantzen 在 1932 年製作的 U 形管裝置的液相-液相分配系統，到了 1944 年，Lyman Craig 發現了不連續的逆流分布





圖(四)利用反微胞技術進行蛋白質再摺疊



圖(五)利用 GSH/GSSG 氧化還原系統完成蛋白質雙硫鍵合成

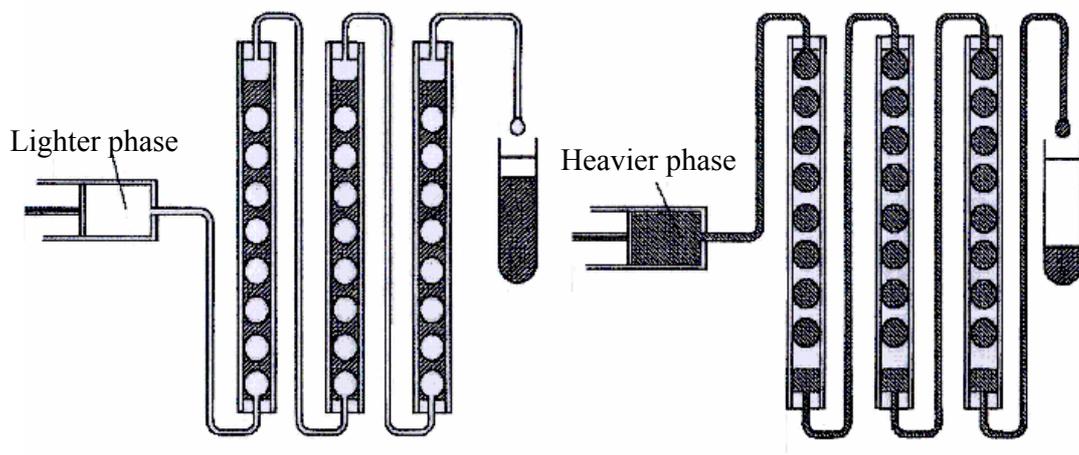
(Countercurrent Distribution, CCD)原理，是一種不連續式分液漏斗的液相萃取，其不僅可用於製備方面，也可用於分離包括單體、高分子、細胞和粒子等各種型態的分子，然而由於其有著操作耗時、儀器龐大易損壞的缺點，而在 1960 年代後漸為液相層析 (Liquid Chromatography, LC) 所取代，而近年來高效能液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC)，因其具有操作容易、適用於分析級的分離以及分析時間短的優點而蔚為流行，但是在樣品的吸附和去活性的問題上，CCD 仍比 HPLC 具有優越性。

因此對於逆流層析的研究仍持續的在進行，到了 1951 年，終於出現了新的突破，以 Kies 和 Davis 為首的一群人開發出液滴式逆流層析 (Droplet CCC, DCCC)<sup>39</sup>，之後，Tanimura 和 Ito 等人針對此一技術發展出改良式儀器<sup>40</sup>，是利用重力場來保留動相，分為上升模式及下降模式，其原理如圖(六)(a)及(b)，在圖(六)(a)中密度較大的靜相填滿管柱，動相由管柱下端注入因浮力的作用由下而上穿越靜相，故稱為上升模式；而在圖(六)(b)中則是動相密度大於靜相，因此由管柱上端注入的動相會由上而下穿越靜相，即為下降模式。

在 1970 年代，由於 Yoichiro Ito 等人的努力，逆向流層析的技術又有了革命性的突破，此一新技術被稱為離心式行星螺管結構 (Coil Planet Centrifuge, CPC)，之後 Ito 和 Conway 等人又以此結構為基礎，發展出多種不同的儀器，1981 年出現的 High-speed CCC 即為其中之一。

### 2.2.3 基礎理論

逆流分布 (CCD) 是 CCC 最基礎的形態，其過程可以用圖(七)(a)



圖(六)液滴式逆流層析(DCCC)示意圖<sup>2,34</sup>，依動相與靜相的密度大小，區分為(a)上升模式及(b)下降模式

來說明<sup>41</sup>，將一連串的分液漏斗由左至右標記為 0、1、2...r，而  $U_0$ 、 $U_1$ ... $U_r$  與  $L_1$ 、 $L_2$ ... $L_r$  分別是不含分析物亦不互溶的兩相( $U$  是指上層相; $L$  則是下層相)，原來存在於  $L_0$  中的分析物在  $U_0$  和  $L_0$  混合平衡後，會在兩相中進行分配，使得部份分析物被  $U_0$  所萃取，接著  $U_0$  再分別和  $L_1$ 、 $L_2$ ... $L_r$  混合，而  $U_1$ 、 $U_2$ ... $U_r$  則跟隨著  $U_0$  依序與下層相混合。根據二項式定理，分析物的分配可以下列公式表示：

$$(x + y)^n = 1 \quad (1)$$

在此式子中， $x$  指的是分析物仍存在於下層相的分率， $y$  則是分析物被轉移到上層相的分率， $n$  則為分析物被轉移的次數。而分配係數  $K_D$  是上下層相中分析物的濃度比，故可寫成  $K_D = y/x$ ，又已知  $x + y = 1$ ，而計算求得：

$$x = \frac{1}{1 + K_D} \quad (2)$$

$$y = \frac{K_D}{1+K_D} \quad (3)$$

根據以上兩個式子繪圖，可以得到一高斯曲線(Gaussian Curve)，當我們假設  $K_D = 1$  時，可以得到如圖(七)(b)的連續萃取實驗之情況，而隨著  $K_D$  值的不同，其所繪出的高斯曲線如圖(七)(c)所示。因此最後分析物大部分會集中在某萃取槽中，此過程即為逆流分布(CCD，如圖(八)(a)所示)或逆流萃取(Countercurrent Extraction, CCE)。

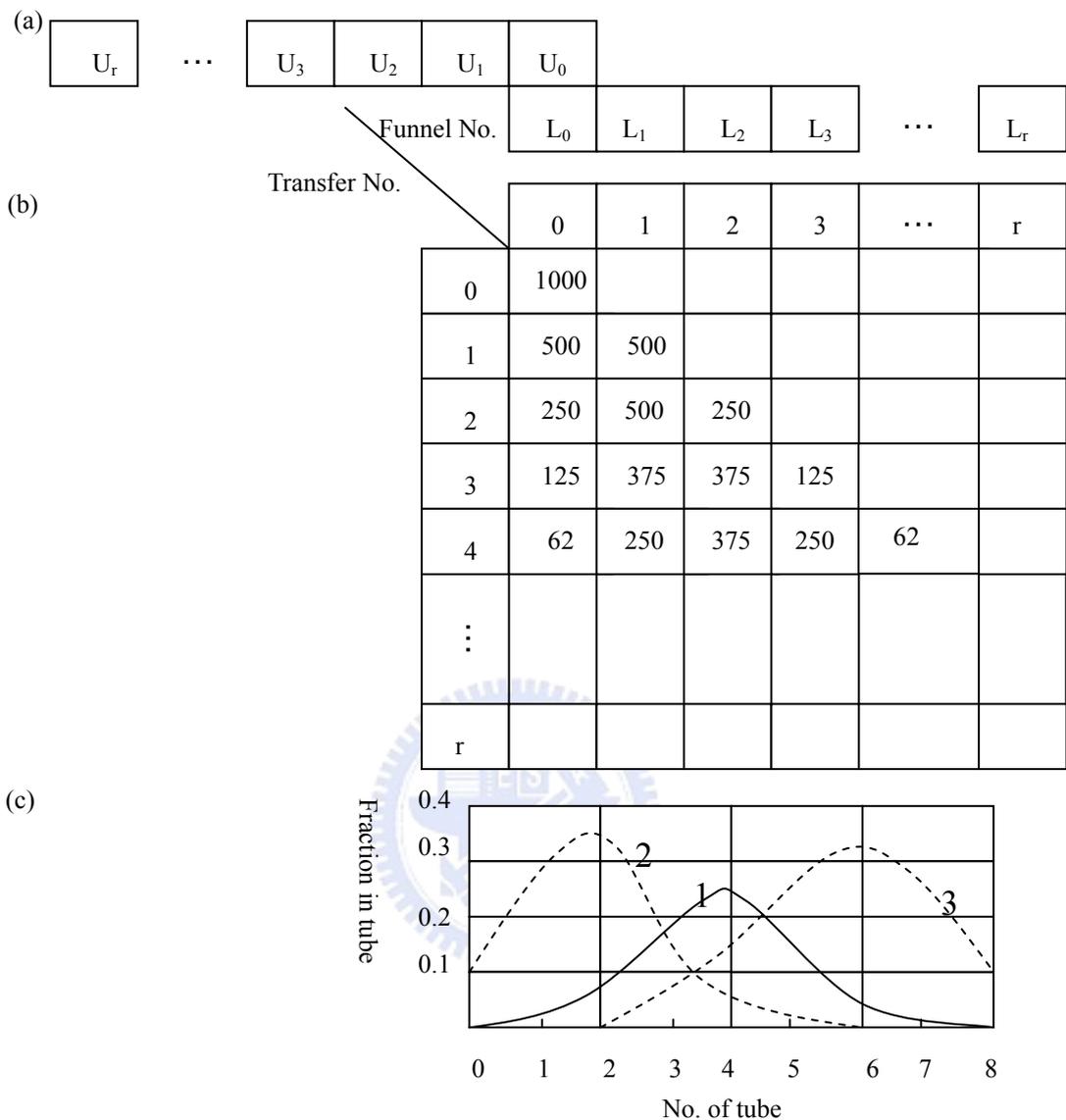
以此原理為基礎來做進一步的發展，若使用無限多個萃取槽使混合物在其中連續進行分配，各物質會因分配係數不同而分開，此外增加萃取槽的數目可以提高分離的解析度，如圖(九)。然而萃取次數的增加會相對的造成分析物的分布變寬廣，上述敘述之簡圖可以參照圖(八)(b)。而液相層析則如圖(八)(c)所顯示，管柱中填充了固體支持物，靜相則以物理吸附或化學鍵結的方式滯留，但是固體支持物若未完全被靜相所覆蓋，會有層析峰拖尾的現象產生。而本實驗所使用的逆向流層析法，其原理如圖(八)(d)，其特點在不需使用固體支持物，而是利用重力場或離心力場來讓靜相滯留。

#### 2.2.4 儀器的基本結構

因螺旋分離管柱本身轉動方式的不同可分為：流體靜力學平衡(hydrostatic equilibrium system, HSES)以及流體動力學平衡(hydrodynamic equilibrium system, HDES)。

##### (1) HSES 系統

在此系統中管柱每一部分所受力的的大小皆相等，靜相因重力或離心力而滯留在管柱中，圖(十)(a)、(b)為此系統的示意圖，圖(十)(a)

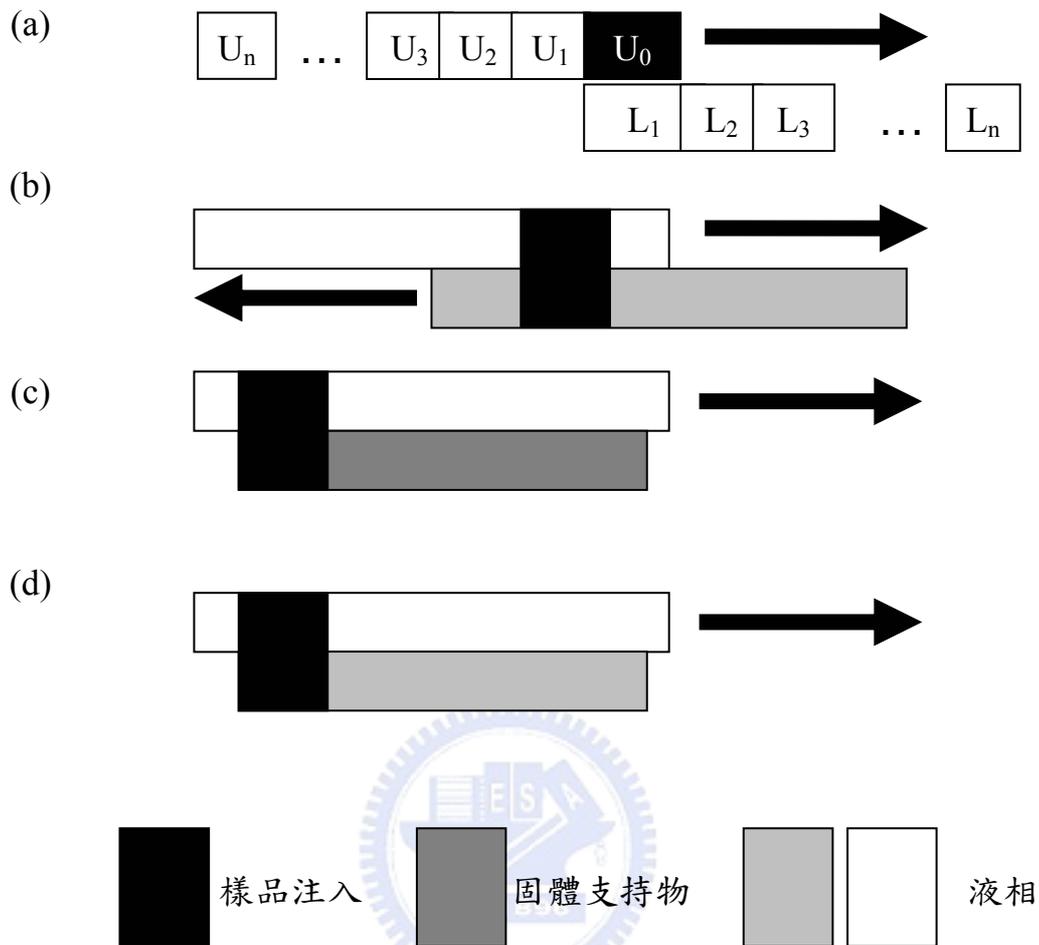


圖(七)逆向流分布(CCD)<sup>41</sup>

(a)U 表示上層相;L 表示下層相。當  $U_0$  和  $L_0$  混合後， $U_0$  會萃走  $L_0$  中的部份分析物，再依序與  $L_1$ 、 $L_2$ ... $L_r$  混合;  $U_1$ 、 $U_2$ ... $U_r$  則隨著  $U_0$  做相同的混合步驟

(b)假設分配係數  $K_D = 1$

(c)曲線 1，根據(b)所繪出的高斯曲線; 曲線 2，分配係數  $K_D < 1$  的情形; 曲線 3，分配係數  $K_D > 1$  的情形



圖(八) 液相-液相層析<sup>5</sup>

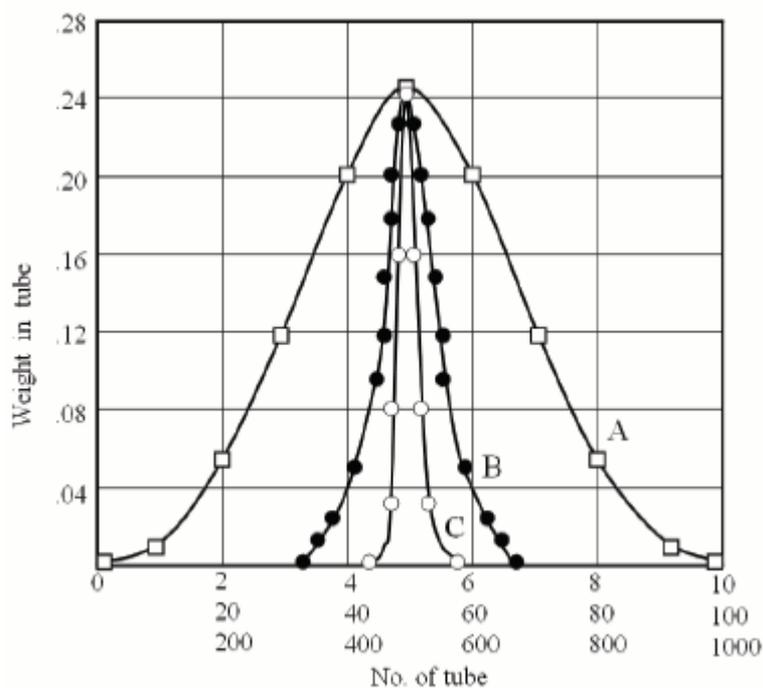
(a)逆相流分布(CCD) ，不連續的萃取方式

(b)逆相流萃取(CCE) ，兩液相分別往反方向移動，樣品由管柱的中間或一端注入

(c)液相-液相層析(LLC) ，靜相是以固體支持物滯留在管柱中

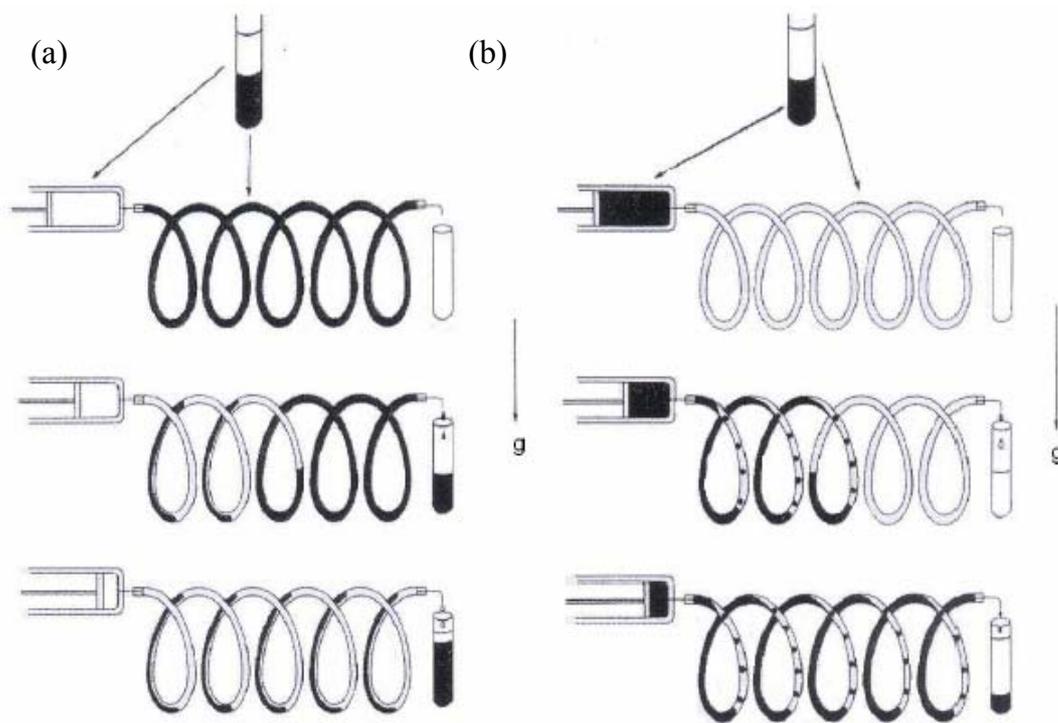
(d)逆相流層析(CCC) ，靜相不需要固體支持物，是以重力場或離心力場將靜相滯留在管柱中

中是先將較重的下層相充滿整個螺管，再將較輕的上層相注入，因為重力場的作用，上層相會往上穿越下層相，因此每一圈螺管會有一半



圖(九)表示萃取次數與分離效果的關係<sup>35</sup>，曲線 A、B、C 分別表示萃取次數由小到大，解析度愈佳

的部分保留住下層相，圖(十)(b)則和圖(十)(a)相反，而不管選擇的是(a)或(b)的形態，流體靜力學平衡皆可以被建立。此外由圖(十)亦可以發現，液體和管壁間的作用力較強，動相會如圖(十)(a)所示平滑的延管壁穿流形成一連續的流動;當液體和管壁間的作用力較弱，動相會形成液滴的狀態穿透至靜相部分，如圖(十)(b)。因此每一圈螺管將成為一半是純動相區，一半是動靜相混合區的形態，純動相區的形成將降低靜相滯留量，且增大了分離時的無效空間。為了改善此缺點，可以改用較細的管子以減小純動相的體積，或以增加分離管柱的內徑來增加混合的區域。



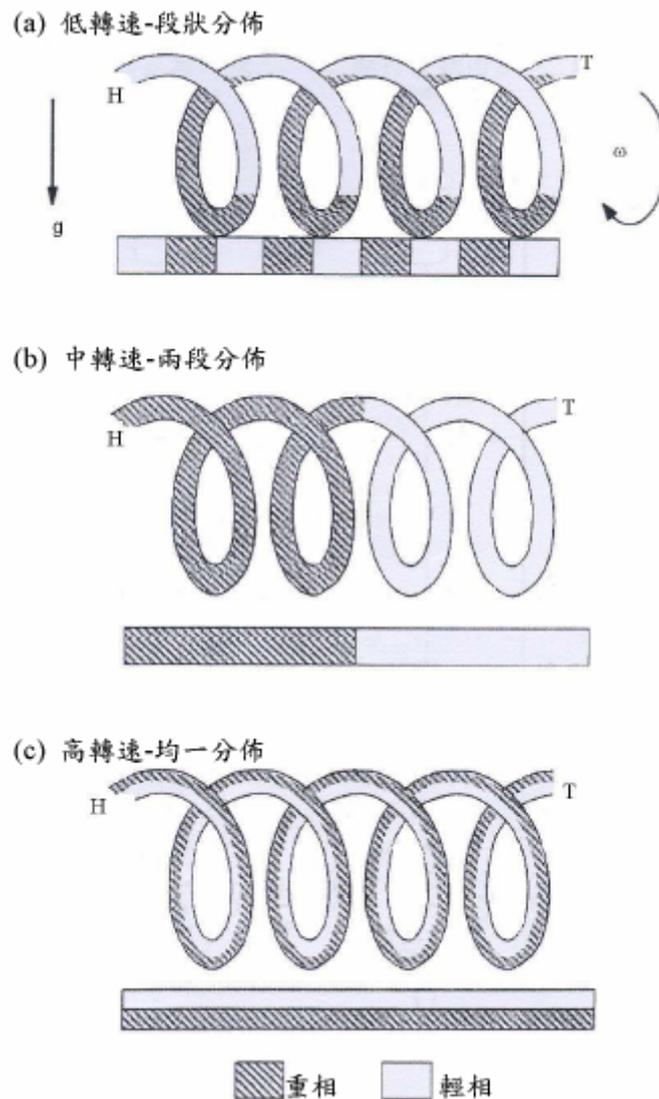
圖(十)流體靜力學平衡(HSES) 示意圖 <sup>32,36</sup>

(a)靜相為下層相，動相為上層相

(b)靜相為上層相，動相為下層相

## (2) HDES 系統

在此系統中，靜相藉由自轉或公轉所產生的離心力而能夠滯留在管柱中，而管柱每一部分所受力的方向與大小皆不斷在改變。此外因管柱轉動而產生的阿基米得扭轉力(Archimedean screw force)，會使動靜相皆往管柱的一端流動，此端稱為頭端(head)，另一端則稱為尾端(tail)。Ito 認為阿基米得扭轉力和離心力的合力是螺管在不同轉速下會影響兩不互溶溶劑之相分布的主要原因<sup>42,43</sup>，在低轉速時，離心力的影響可忽略，兩不互溶相會交錯分布在管柱中，如圖(十一)(a)，此種分布被稱為段狀分佈(segmented distribution)；而圖(十一)(b)則是



圖(十一)螺管在不同轉速下兩不互溶溶劑的相分布<sup>5</sup>

(a)低轉速時呈段狀分布

(b)中轉速時呈兩段分布

(c)高轉速時呈均一分布

在中轉速的情況下，較重的一相傾向往管柱的頭端，較輕的一相往管柱的尾端，形成兩段分佈(unilateral distribution)；而當轉速增加到高轉速時，在離心力的作用下，使得兩相在管柱中產生相對運動而分成內

外兩層，較重的一相在外層，較輕的一相在內層，如圖(十一)(c)所示，是為均一分佈(uniform distribution)。

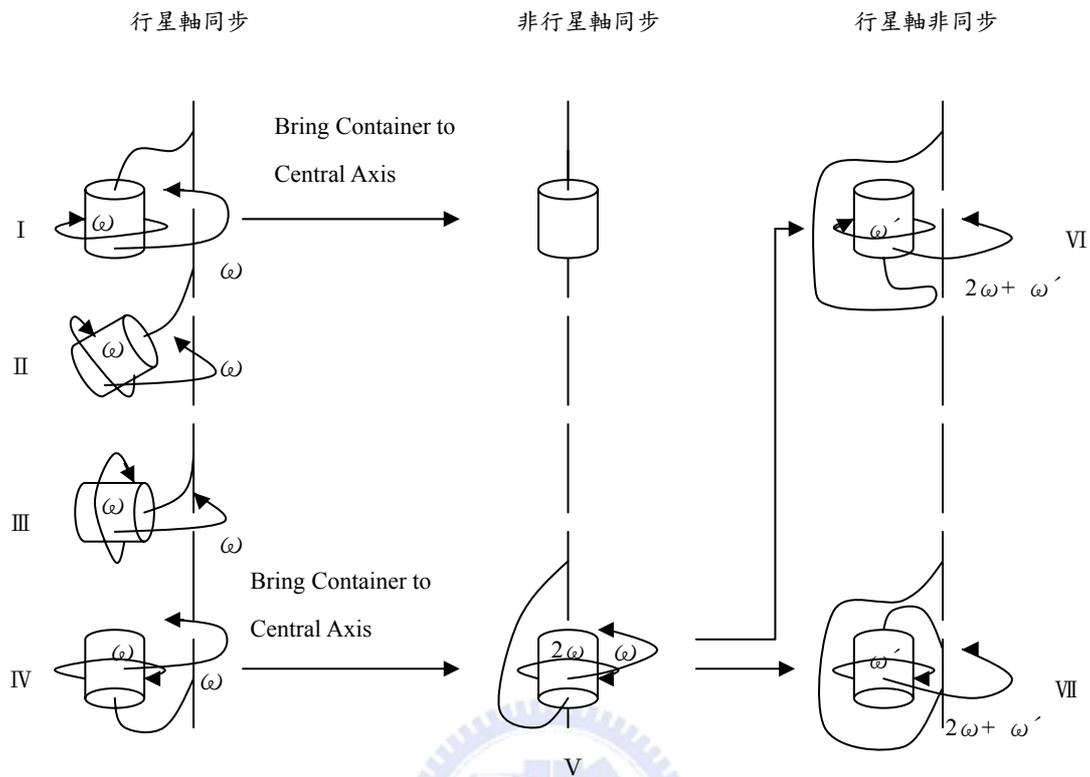
管柱的旋轉雖然可以提供能使動相滯留之離心力場，卻會造成管柱扭曲糾結的後果。為了防止管柱扭曲糾結的情況發生，早期是加裝旋轉栓(rotating seal)來解決，然而，旋轉栓會因為摩擦所產生的熱效應而磨損或旋轉栓的腐蝕、洩漏造成樣品的污染。因此，在1975年，Ito 等人引入一方法，使用所謂的反扭轉機構來代替旋轉栓，此一機構的基本架構如圖(十二)，依據管柱支持物的相對位置及運動軌跡可以分為三大模式：

#### (1)行星軸同步(planetary synchronous)

在此種模式的系統中，螺管的支持物不但本身以  $\omega$  之角速度自轉，也同時以  $\omega$  之角速度繞著主軸做公轉。此外，根據螺管支持物放置的位置與主軸所夾角度的不同，又可分為 I、II、III、IV 型，其中 I 型是最簡單的型態，管柱支持物與主軸平行，在自轉的同時，維持一固定的公轉半徑，以與自轉相同的速度、相反的方向繞主軸做公轉，此一設計使得管柱支持物本身相對並不旋轉，可以防止外接管線的扭曲。而 II 型及 III 型則是為了因應個別的需要而使管柱支持物與主軸夾一角度，甚至呈一直角。IV 型則是將管柱支持物反轉，使管柱支持物自轉與公轉的速度、方向都相同，此形態用於高速逆流層析儀上，而能夠得到良好的靜相滯留量。

#### (2)非行星軸同步(nonplanetary synchronous)

此種模式是將自轉軸與公轉軸重合，會有兩種可能的狀況，如果是源自於 I 型，則公轉與自轉的角速度互相抵消，如同完全沒有旋轉，如此一來，將無法提供任何離心力場；若是源自於 IV 型的 V 型，



圖(十二)反扭轉機構的七個模式

由於自轉與公轉的角速度相加，而產生與傳統離心機相同的徑向力場，由於消去了旋轉栓的干擾，因此用在製備級上可以做到有效的分離，若能加上環形螺旋的結構，可以在細管柱中得到很好的靜相滯留量，而可用於分析級的工作上。

### (3) 行星軸非同步(planetary nonsynchronous)

將V型中的支持物在往內移即成為所謂的VI型，若將VI型加以反轉則成為VII型，此模式的特點是在固定的公轉轉速下，可以任意的改變自轉轉速，因此可用於雙水相系統中分離大分子或細胞之類的物質，由於雙水相溶劑系統中，兩相界面張力很小，高轉速下會有乳化的現象發生，若使用此種模式的反扭轉機構，則可利用低自轉轉速提

供較緩和的攪拌，而高公轉轉速則提供了離心力場，以達到分離所需的靜相滯留量。

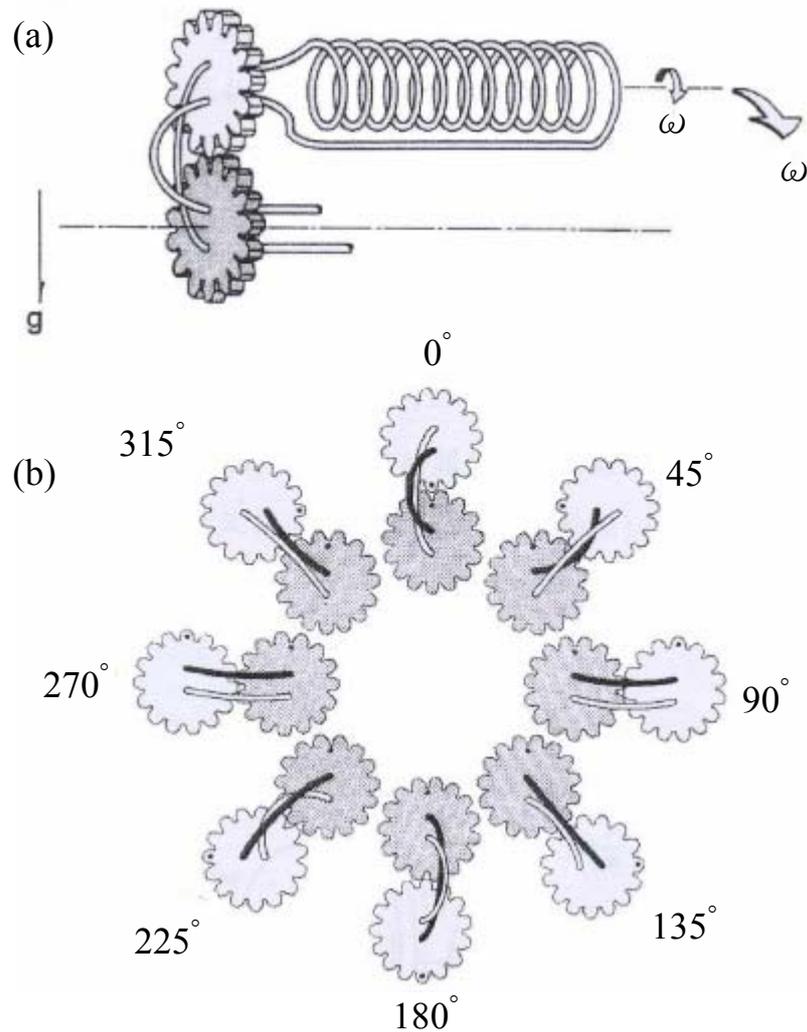
### 2.2.5 高速逆流層析

其所使用的反扭轉機構是由IV型加以改良而成，被稱為 J-type，在高轉速的情況下可使動靜相充分混合，與傳統的逆流層析做比較，高速逆流層析能使用較快的動相流速、有較高的靜相滯留量、能夠增加樣品分離時的解析度及效率。

其設計原理<sup>44</sup>為中心軸呈水平方向，螺管支持物與一行星齒輪(planetary gear)相連接與中心軸上的太陽齒輪(sun gear)互相咬合，因此螺管支持物不僅以一角速度自轉，同時也以相同角速度且相同的方向繞中心軸旋轉，如圖(十三)所示，其目地在於防止外接的導出管及導入管發生扭曲的情況。

在實驗的過程中，先使靜相充滿管柱，接著使儀器開始旋轉，當轉速穩定後再打入動相，當兩相達到動態平衡時，我們可經由頻閃觀測器，觀察動靜相在管柱中分布的情況。如同圖(十四)<sup>45</sup>所顯示，以 I 的區域為例，靠近中心的區域，由於離心力較小，阿基米得扭轉力使得動靜相劇烈的混合，稱為混合區(mixing zone);而位在外側的管柱部分，因為離心力夠大足以蓋過阿基米得扭轉力，使得動靜相可以分層形成內外兩層，我們稱此一區域為澄清區(settling zone)。相同的情況也發生在圖(十四)中的 II、III、IV位置上，顯示在整個實驗的過程中，兩相都不停的進行混合與澄清的動作，而這樣的動作，正好提供了分析物分離的機制。

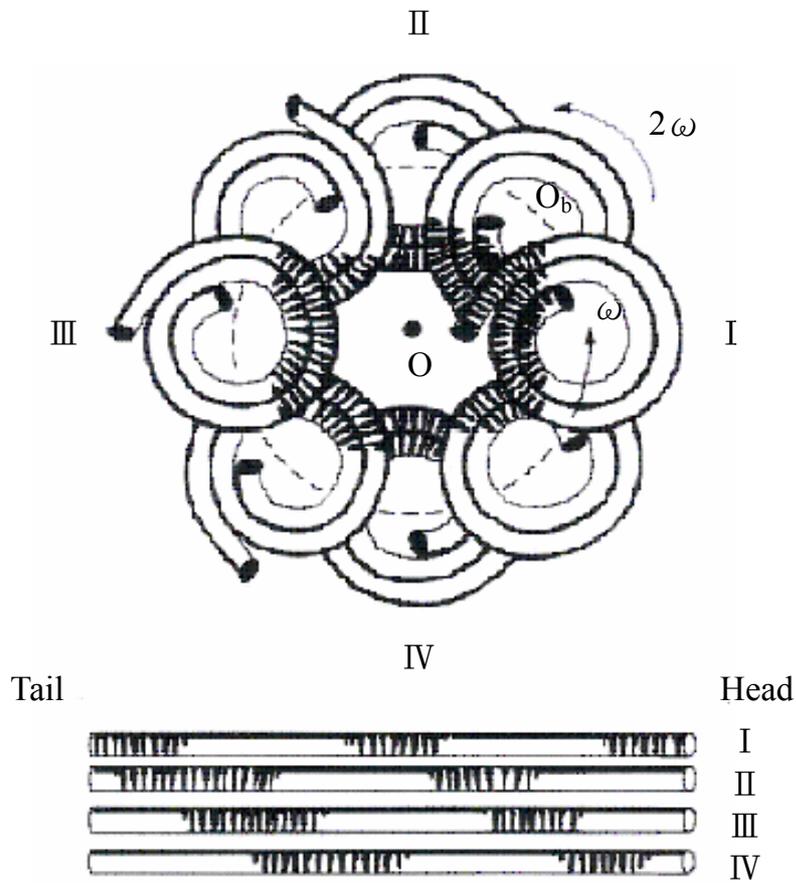
### 2.2.6 逆流層析的應用



圖(十三)高速逆流層析之旋轉機構<sup>44</sup>

(a)螺管支持物不僅本身以一角速度旋轉，同時也以相同的速度及方向繞著中心軸旋轉

(b)螺管支持物的同步行星運動可防止外接的導出管及導入管發生扭曲的現象



圖(十四)IV型同步行星式逆流層析管柱內部混合液的分布情形<sup>45</sup>

逆流層析由於具有分析及製備的功能，因此在農業化學、食品化學、藥物研發、生物等領域<sup>46,47,48</sup>中，皆有其研究的價值存在。目前，在中國大陸的研究者則是將逆流層析的技術應用在中藥的萃取上，而本實驗室主要是用在結合反微胞來萃取並濃縮蛋白質，或是結合微胞來分離油溶性的化合物。