

第三章 實驗

3.1 試藥

3.1.1 藥品

陰離子型界面活性劑 sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) , FW : 444.6 , purity > 99% , 購自 Sigma (Sigma Chemical Co.,P.O.Box 14508 St. Louis,MO 63178 USA) ; cytochrome c (from bovine heart) , FW : 12,327 , purity > 97% , 購自 Sigma ; NaCl , FW : 58.44 , assay 99.5% , 購自 SHOWA (昭和化學株式會社, 東京都中央区日本橋本町 4-3-8) ; NaOH , FW : 40.00 , assay 96.0% , 購自 SHOWA ; NaH₂PO₄ , FW : 119.98 , assay 98.0% , 購自 SHOWA ; Na₂HPO₄ , FW : 141.96 , assay 99.0% , 購自 SHOWA 。

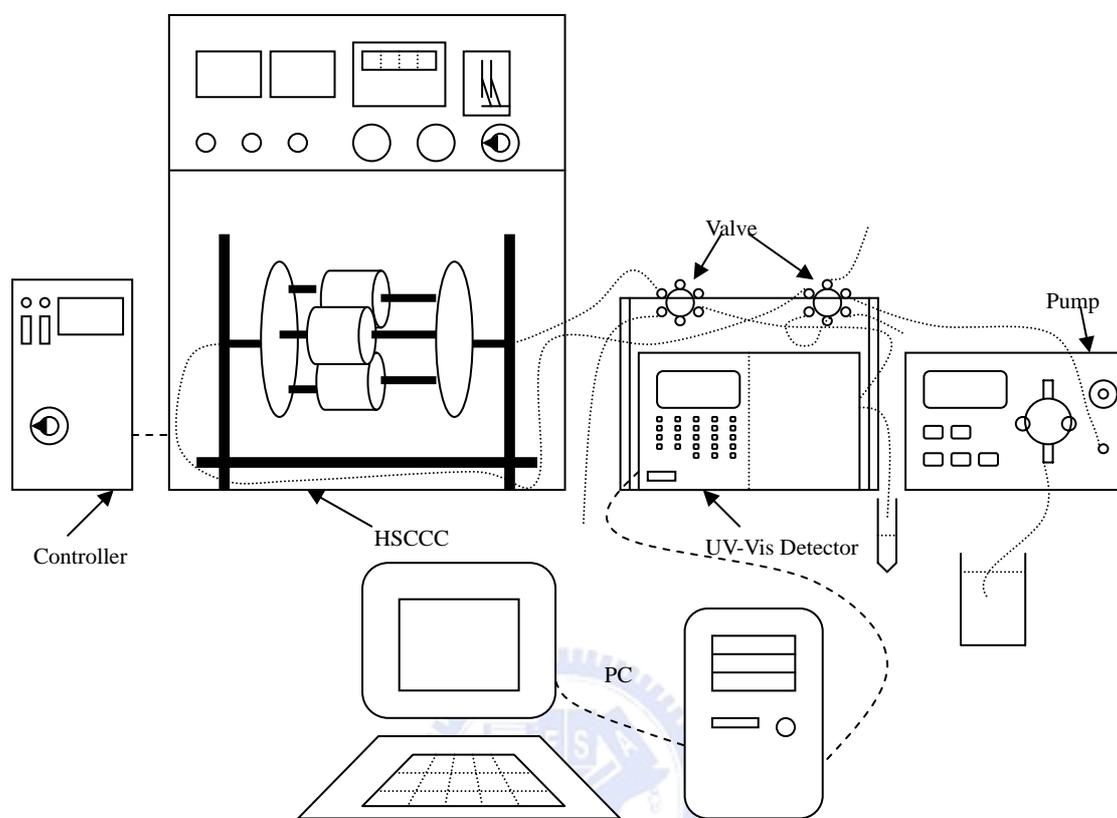
3.1.2 溶劑

n-Hexane , HPLC/Spectro 級 , assay 95% , 購自 TEDIA (Tedia Company Inc.,Fairfield,Ohio,USA) ; Ethyl Acetate (EA) , HPLC/Spectro 級 , assay 99.9% , 購自 TEDIA ; 去離子水 , 經由 Millipore (Bedford,MA,USA)的 Milli-Q plus 處理 。

3.2 實驗儀器

在實驗中所使用到的儀器包括高速逆流層析儀、往復式幫浦、線上偵測所使用的 UV-Vis 偵測器、定量用的 UV-Vis 光譜儀以及酸鹼度計(pH meter) 。

3.2.1 儀器裝置圖

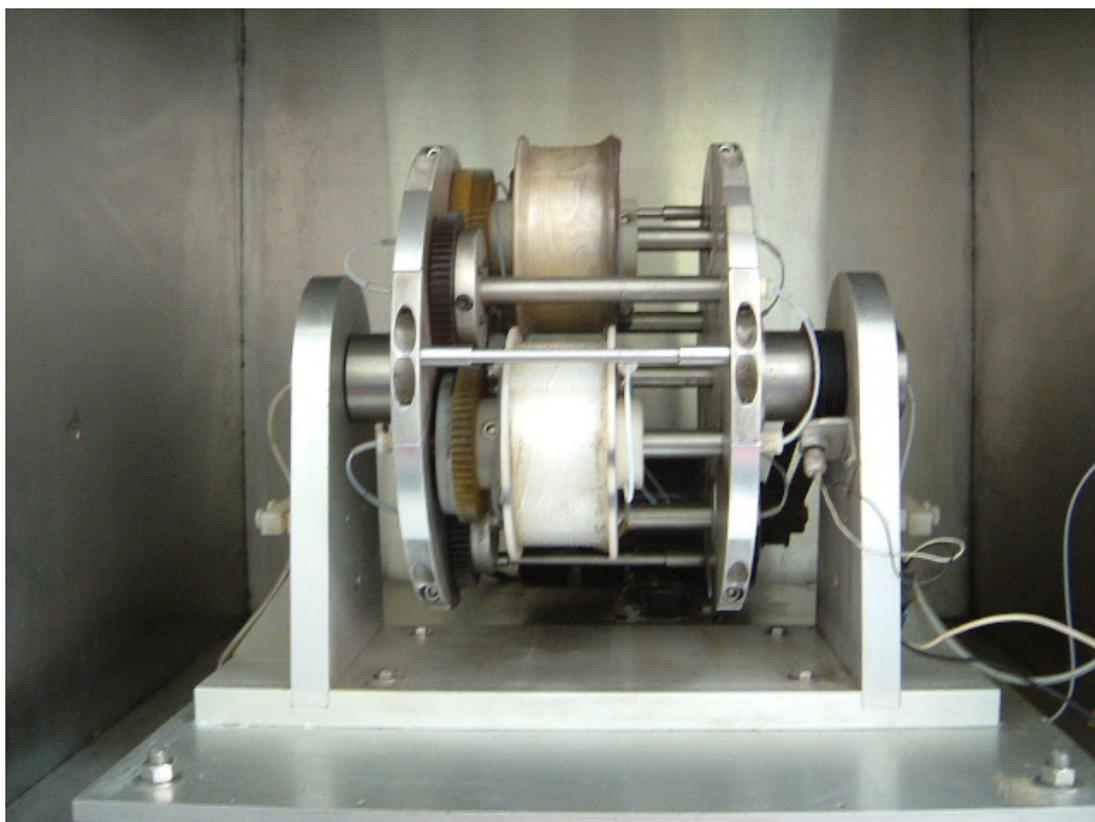


圖(十五) 儀器裝置圖

3.2.2 儀器設備說明

(1) 高速逆流層析儀

屬於 Model CCC 1000，由 Pharma-Tech Research Company (Baltimore, Maryland, USA) 所製造。管柱是鐵氟龍(Teflon)材質，主體部分之管柱，其內徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，外徑為 1/10 英吋(2.54 公釐)，耐壓為 300psi(21bar)以下，耐溫 50°C，管柱總長度為 29.5 公尺，共纏繞三層，總容積為 162 毫升，其主體如圖(十六)，而外接之導出管及導入管，其內徑為 1/32 英吋(0.8 公釐)，外徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，而為了避免因壓力的變化產生氣泡而干擾偵測，在



圖(十六)高速逆流層析儀

UV-Vis 偵測器的出口接上長半公尺，內徑 0.3 公釐的鐵氟龍管，以上管線皆購自 Chemical Research Supplies(Fairbanks • Addison,IL60101,USA)。此儀器轉速可以控制在 0 ~ 1000 rpm，安置在一溫控箱中，溫控箱是由新竹盟利公司(新竹市南大路 130 號)製造，溫控誤差在正負一度以內。

(2)往復式幫浦

Series II Digital HPLC Pump，流速可由 0.01mL/min ~ 9.99 mL/min，購自 Pharma-Tech Research Company (Baltimore, Maryland, USA)。

(3)UV-Vis 偵測器

Shimadzu(Tokyo,Japan)SPD-10Avp 型，與個人電腦連接，個人電腦中則安裝了色層分析儀數據處理系統(訊華公司，臺北市)，此系統可擇取實驗訊號，對流析出來的分析物做線上的偵測。

(4)UV-Vis 光譜儀

其型號為 Agilent 8453，購自 Agilent Technologies(Waldronn, Germany)，此儀器乃是作為定量流析出來的分析物收集液之用。

(5)酸鹼度計(pH meter)

型號為 Microprocessor pH meter SP-2200，購自上泰儀器股份有限公司，其電極是使用 Mettler Toledo InLab[®]422，可偵測之 pH 範圍為 0~14。

3.3 實驗流程



3.3.1 溶劑系統的製備

一般逆流層析動靜相之配製，是先將溶劑在分液漏斗中混合平衡，分層後作為動靜相，但根據本實驗室賴雋仁⁴⁹的論文指出，動靜相的預先平衡是可以省略的，因此在本篇論文中的所有實驗，都省略了預先平衡的過程，而直接配製動靜相。

(1)靜相溶劑-反微胞有機相

本實驗室過去幾年來都是使用 AOT/n-hexane 做為靜相，但為了研究添加了 EA 對反向萃取速率的影響，將陰離子型界面活性劑 AOT 分別溶解在添加 0%、5%、10%EA 的正己烷-乙酸乙酯之混合溶液中，AOT 之濃度為 50mM。

(2)動相溶液-水溶液相

動相為 pH 值分別為 7 及 11 的緩衝溶液，其目的是使在正向萃取及反向萃取的過程，pH 值能保持一定，pH 為 7 之緩衝溶液是以 0.05M 的 NaH_2PO_4 與 0.1M 的 NaOH 調配而成；而 pH 為 11 之緩衝溶液則是 0.05M 的 Na_2HPO_4 與 0.1M 的 NaOH 調配而成。

(3) 樣品溶液-蛋白質水溶液

使用 pH 為 7 的緩衝溶液做為溶劑來溶解 cytochrome c，配製成濃度為 20ppm 之樣品溶液。

3.3.2 實驗步驟

- (1) 使用往復式幫浦以 5mL/min 將有機靜相填滿整個管柱。
- (2) 起動高速逆流層析儀，使其轉速達到 800rpm。
- (3) 當轉速穩定後，以 2mL/min 之流速將 pH = 7 之動相水溶液打入管柱中。
- (4) 待靜相不再流出，表示動靜相達到平衡，將動相水溶液換成蛋白質樣品溶液，以 2mL/min 之流速打入管柱中。
- (5) 打開 UV-Vis 偵測器並開啟色層分析儀數據處理系統，擇取數據。
- (6) 當樣品完全注入後，改打入 pH = 11 之動相水溶液，將流速改為 1mL/min，同時轉動六向閥，使流析出來的分析物進入 UV-Vis 偵測器中來做線上偵測。
- (7) 等到訊號出現後，即以每十毫升為一管收集被萃取並濃縮的回收液，共收集六管。
- (8) 完成實驗後，慢慢將轉速降到零，再關掉溫控箱、UV-Vis 偵測器及色層分析儀數據處理系統。
- (9) 使用氮氣將管柱內的溶液推出以獲得靜相滯留量。

(10)先以甲醇以 3mL/min 之流速清洗管柱，再以 5mL/min 之流速打入去離子水，最後再以氮氣推出清洗的溶劑，並以較低的氮氣流速吹乾管柱。

3.3.3 定量的方法

在實驗中，乃是採用標準添加法來做定量的工作。在此方法中，所使用的標準溶液為已知濃度為 100ppm 的蛋白質水溶液，其步驟為先取四個 5mL 之定量瓶，每一瓶中分別加入 1mL 之回收液，再分別加入 0、1、2、3mL 之標準溶液，再以 pH = 7 的動相水溶液稀釋到刻度線。接著以 UV-Vis 光譜儀偵測四瓶溶液在 408nm 的個別吸收度，並根據此四個吸收值及所分別添加的標準溶液體積為軸做圖，再將圖形趨勢線的斜率和截距，代入公式中，重覆上述步驟五次，即可得到每一管回收液的濃度；再進而求得樣品的回收率及濃縮倍率。