

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

應用離子液體於蛋白質液相/液相萃取

Liquid/liquid Extraction of Proteins Using an

Ionic Liquid



研究生:陳俊竹

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十四年六月

應用離子液體於蛋白質液相/液相萃取  
Liquid/liquid Extraction of Proteins Using an  
Ionic Liquid

研究生：陳俊竹  
指導教授：余艇 博士

Student: Jin-Chu Chen  
Advisor: Dr. Tiing Yu

國立交通大學  
應用化學研究所  
碩士論文



A Thesis  
Submitted to Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master of Science  
in  
Applied Chemistry  
June 2005  
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十四年六月

# 應用離子液體於蛋白質液相/液相萃取

學生：陳俊竹

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學所

## 摘要

室溫離子液體 (Room Temperature Ionic Liquids, RTILs) 由於擁有高極性、高導電度、低蒸氣壓及高熱穩定性等特殊的化學與物理性質，目前持續吸引廣泛的研究，以探討取代傳統有機溶劑的可行性，包括在液相/液相萃取、有機合成及無機催化等方面的應用。此外由於離子液體對於實驗環境較為安全且可回收再利用，能減低對環境的汙染，因此被視為綠色溶劑。

蛋白質的純化在生物化學及生物技術上是一項相當重要的工作。傳統上，液相/液相萃取分離蛋白質的技術，包括雙水相溶劑系統及反微胞萃取兩種。在本研究中發現，藉由調控水溶液的 pH 值，蛋白質能在水溶液及乙酸乙酯(ethyl acetate)和離子液體  $[C_4mim][PF_6]$  的混合溶液間進行正向及反向萃取。相似於陰離子型界面活性劑的反微胞萃取，蛋白質在較低 pH 值時能正向萃取至離子液體相裡，在 pH 值較高時則反向萃取回水層相。以細胞色素 c (cytochrome c) 為例，

在 pH 2.7 時可完全萃取進入離子液體相中，在 pH 11 時即可全部反向萃取回到水層相；肌紅蛋白(myoglobin)則在 pH 5 時能完全萃取，但是在反向萃取時即使在 pH 13 反向萃取率也只有 50 %；核糖核酸酶 A (ribonuclease A)在 pH 2 時萃取率 60 %，反向萃取時在 pH 11 即可全部反向萃取回水層相。除此之外，正、反向萃取達成平衡的速率皆相當快。此液相／液相萃取技術或許可使用於蛋白質的純化及濃縮，並且開拓離子液體一項新的應用領域。



# Liquid/Liquid Extraction of Proteins Using an Ionic Liquid

Student : Jin-Chu Chen

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University

## Abstract

Due to their unique physicochemical properties, such as high polar, high conductivity, no detectable vapor and relatively high thermal stability, ionic liquids(ILs) continue to attract wide research interests on the capability for replacing traditional volatile organic compounds (VOCs), including in the applications of liquid/liquid extraction, organic synthesis and inorganic catalysis. In addition, ILs are relatively safer than VOCs and recyclable, so they are regarded as green solvents.

Protein purification is an important task in biochemistry and biotechnology. Traditionally, two liquid/liquid extraction techniques, i.e. two-phase aqueous polymer and reverse micelle systems, have been used for protein purification and enrichment. In this study, we explore that protein can be transported between aqueous solutions and a mixture of ethyl acetate and ionic liquid  $[C_4mim][PF_6]$  by manipulation of pH. Proteins can be extracted from one aqueous solution at low pH into IL phases and back-extracted to another aqueous solution at high pH. For example, the forward extraction of cytochrome c molecules reaches to an

almost quantitative completion at pH 2.7 and back-extracted to an aqueous solution at pH 11. Myoglobin can be completely extracted at pH 5, but the recovery is only about 50 % at pH 13. As for ribonuclease A, the forward extraction reaches ~60 % at pH 2 while the recovery reaches to quantitative completion at pH 11. Both the forward and backward processes are found reaching equilibrium in very short time. Therefore, this technique may be applied in purification and enrichment of proteins and thus extends a new field for the application of ILs.



## 謝 誌

在交大的兩年研究生涯，雖是短暫的停靠，但是此後將存在無盡的思念。在這段日子裡，有歡笑喜樂，也有苦悶悲傷。這段歲月的努力與成長，相信必為我以後成功的基石。

在此我要感謝我的恩師余艇教授在學業及實驗上的指導，讓我在研究上能發揮自我的空間，以及讓我體認人生的一些新的思維。此外，也感謝口試委員陳月枝老師及清大談駿嵩老師在論文上給我的評論與指教。在研究過程中亦感謝交大生技所及清大生命科學所在 CD 光譜儀器的協助。

感謝實驗室份量最重的學姐-淑慧，打從進交大校門我就知道妳是一位超級大好人，祝妳事事順遂，順利取得博士學位。謝謝月杏、經緯、俊宏陪我在課業及研究上一起打拼，希望你們未來不管是繼續進修或就業都能有傑出的表現。秀琴、凱傑、淑嫩，實驗繼續加油唷，祝你們實驗順利。謝謝阿棟、大餅、哈比人、阿川、阿嚕咪、立民、吳大、志祥，相信永遠不會忘記我們一起歡樂的時光。也感謝一直在我身邊的若蘭。

最後我要感謝家人給我精神上的支持，今日我才有此成就。

謝謝大家 !!!! 希望大家都能感受我畢業的喜悅 !!!

# 目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	v
目錄.....	vi
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 背景與理論介紹.....	3
2-1 離子液體介紹.....	3
2-1-1 離子液體的種類.....	3
2-1-2 離子液體的性質.....	4
2-1-3 離子液體的應用.....	5
2-2 蛋白質萃取方法.....	7
2-2-1 雙水相溶劑系統.....	7
2-2-2 反微胞萃取法.....	8
2-3 蛋白質簡介.....	10

2-3-1	蛋白質的組成與結構.....	10
2-3-2	影響蛋白質構型的因素.....	10
2-3-3	蛋白質結構分析.....	12
第三章	實驗部份.....	16
3-1	試藥.....	16
3-1-1	合成 Ionic Liquid [C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]之藥品.....	16
3-1-2	配製緩衝溶液的試劑.....	16
3-1-3	蛋白質分子.....	17
3-2	儀器.....	17
3-3	實驗流程.....	18
3-3-1	合成 Ionic Liquid [C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ].....	18
3-3-2	細胞色素 c 正向與反向萃取.....	19
3-3-3	肌紅蛋白 正向與反向萃取.....	21
3-3-4	核糖核酸酶 A 正向與反向萃取.....	22
3-3-5	水溶液中鹽類濃度對蛋白質萃取的效應.....	23
3-3-6	濃縮蛋白質細胞色素 c.....	23
3-3-7	模擬 IL 的性質.....	24
第四章	結果與討論.....	25
4-1	萃取細胞色素 c.....	25

4-1-1	正向萃取.....	25
4-1-2	反向萃取.....	26
4-2	萃取肌紅蛋白.....	27
4-2-1	正向萃取.....	27
4-2-2	反向萃取.....	28
4-3	萃取核糖核酸酶 A.....	28
4-3-1	正向萃取.....	28
4-3-2	反向萃取.....	29
4-4	水溶液中鹽類濃度對蛋白質正向萃取的效應.....	29
4-5	濃縮蛋白質細胞色素 c.....	30
4-6	模擬 IL 的性質.....	30
4-7	IL 萃取蛋白質的機制.....	31
第五章	結論.....	32
	參考文獻.....	33

## 表目錄

表一	陽離子對稱性對於 Ionic Liquids 熔點的影響.....	42
表二	陰離子團大小對於 Ionic Liquids 熔點的影響.....	42
表三	有機溶劑在 20°C 的物理化學性質.....	43
表四	丁醇中不同 TBAB 濃度對於肌紅蛋白萃取的影響.....	44
表五	濃縮蛋白質細胞色素 c.....	44



## 圖目錄

圖一	常見的離子液體陽離子形式.....	3
圖二	離子液體的合成步驟.....	3
圖三	圓二色性原理.....	14
圖四	[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]合成示意圖.....	45
圖五	[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]的 NMR 圖譜.....	46
圖六	細胞色素 c 萃取示意圖及真實實驗進行之相片.....	47
圖七	pH 值對蛋白質細胞色素 c 正向萃取率的效應.....	48
圖八	蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的吸收光譜圖 ( 250 – 450 nm ).....	49
圖九	蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的吸收光譜圖 ( 450 – 750 nm ).....	50
圖十	蛋白質細胞色素 c 在不同相中的吸收光譜圖.....	51
圖十一	pH 值對蛋白質細胞色素 c 反向萃取率的效應.....	51
圖十二	蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的螢光光譜圖.....	52
圖十三	蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖.....	53
圖十四	pH 值對蛋白質肌紅蛋白正向萃取率的效應.....	54
圖十五	蛋白質肌紅蛋白在不同 pH 值水溶液的吸收光譜圖.....	54
圖十六	蛋白質肌紅蛋白在不同相中的吸收光譜圖.....	55
圖十七	pH 值對蛋白質肌紅蛋白反向萃取率的效應.....	55

圖十八	蛋白質肌紅蛋白的在不同 pH 值水溶液的螢光光譜圖.....	56
圖十九	蛋白質肌紅蛋白在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖.....	56
圖二十	pH 值對蛋白質核糖核酸酶 A 正向萃取率的效應.....	57
圖二十一	pH 值對蛋白質核糖核酸酶 A 反向萃取率的效應.....	57
圖二十二	蛋白質核糖核酸酶 A 在不同 pH 值水溶液的螢光光譜圖.	58
圖二十三	蛋白質核糖核酸酶 A 在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖.	58
圖二十四	pH 值及 KCl 濃度對蛋白質細胞色素 c 的萃取效應.....	59
圖二十五	pH 1 時水溶液中不同 KCl 濃度的蛋白質細胞色素 c 吸收光譜圖.....	59
圖二十六	pH 值及 KCl 濃度對蛋白質肌紅蛋白的萃取效應.....	60
圖二十七	pH 2 時 KCl 濃度對蛋白質核糖核酸酶 A 的萃取效應...	60
圖二十八	不同 pH 值時，胺基酸進入[C <sub>6</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]的分佈係數 與胺基酸疏水性的關係.....	61
圖二十九	胺基酸進入[C <sub>6</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]的分佈係數與 pH 值的關係....	61

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

在化合物的分離過程中，液相／液相萃取是常被採用的分離方法。在傳統的溶劑萃取上，使用有機溶劑和水溶液不互溶的兩相，由於化合物在兩相的分佈不同，而可以達成分離的目的。因為在萃取中往往需使用大量高揮發性、易燃、有毒的有機溶劑，由於這些溶劑的高揮發特性，在使用上必須加入許多安全考量；且由於環境污染管制規定，在使用及處理這些反應過後的萃取劑和廢液時亦需注意符合環保法則。面對必要使用但不環保的揮發性溶劑所產生的問題，許多化學家一直想找出對環境無害且安全的分離溶劑，以符合永續經營新觀念的要求。



多年來化學家努力開發回收和再生等技術，有效地減少化學廢棄物。新環保製程開發研究是減少廢棄物或是”零”廢棄物的製程方式。目前，化學家已致力於超臨界流體萃取，利用超臨界二氧化碳取代傳統有機溶劑，有效地應用於低咖啡因咖啡的製成、清除稻米中殘留農藥的程序及半導體工業製程上的清洗，並研究以超臨界流體做為化學溶劑，<sup>1</sup>取代有機溶劑，減少化學廢棄物的產生。

近年來，室溫離子液體(ILs)由於擁有低揮發性、高熱穩定度及可回收使用<sup>2</sup>等實用價值，已引起廣泛的研究，以探討取代傳統有機溶

劑的可能性，包括在液相／液相萃取、<sup>3</sup> 有機合成<sup>4,5,6</sup> 及催化反應<sup>4,5,7</sup> 等方面。此外，藉由適當地修飾 ILs 分子上的陽離子或陰離子即可轉換它們的親水性或疏水性等性質，進而達成溶解有機、有機金屬和無機化合物的目地，此特質也為 ILs 博得"設計者溶劑(designer solvent)"<sup>8</sup> 這個封號，因此目前 ILs 已全面性地被應用於科學的研究，並且在"綠色化學"上亦是相當重要的觀念之一。

## 1-2 研究動機

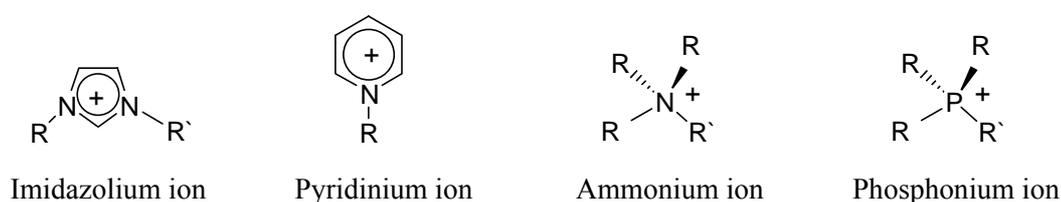
已有研究發現，胺基酸(amino acid)處於較低 pH 值時會從水層中被萃取進入 IL 相中，<sup>60</sup> 因此我們嘗試以 IL 萃取水層中的蛋白質。本實驗是利用 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, ([C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>])當作萃取劑，藉由調控水溶液的 pH 值，蛋白質能在水溶液與乙酸乙酯和[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]的混合溶液間進行正向及反向萃取，此液相／液相萃取技術或許可使用於蛋白質的純化及濃縮，並且開拓了 ILs 一項新的應用領域。

## 第二章 背景與理論介紹

### 2-1 離子液體介紹

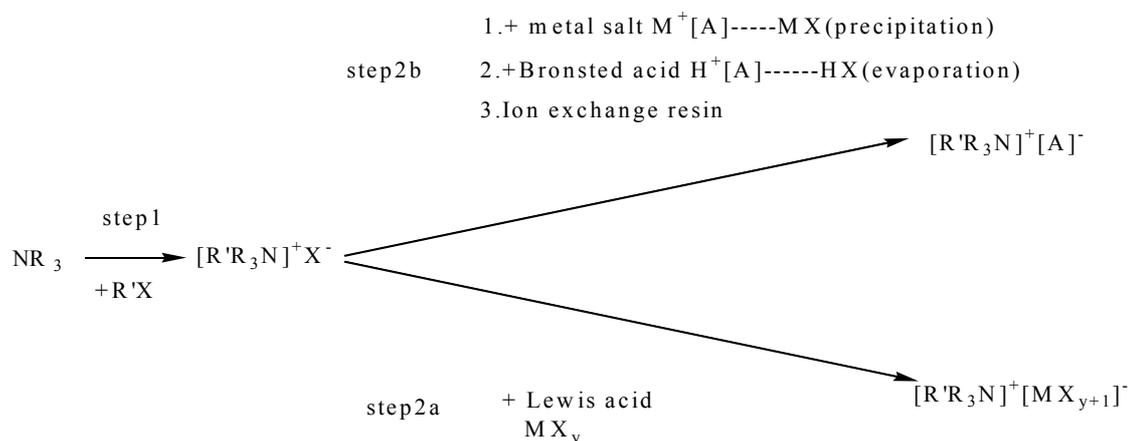
#### 2-1-1 離子液體的種類

ILs 是由一種陽離子與一種陰離子所構成的有機鹽類，存在許多形式，而不同形式的 ILs 其物性與化性亦大不相同，比較重要的陽離子形式如下圖一：<sup>4</sup>



圖一、常見的離子液體陽離子形式

R' 可由 alkylation reagent 經反應而得。同類型的 ILs 在陽離子上的 alkyl group 若不同，可影響有機物在 ILs 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>9</sup>；而在利用 crown ether 萃取鹼金屬到 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate 時，其萃取效果隨著 alkyl group 越長而越好<sup>10</sup>。而陰離子有 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、BF<sub>4</sub><sup>-</sup>、PF<sub>6</sub><sup>-</sup>、AlCl<sub>4</sub><sup>-</sup>、Al<sub>2</sub>Cl<sub>7</sub><sup>-</sup> 等形式，欲得這些特定形式的陰離子可利用下列方法而得，如下圖二：<sup>5</sup>



圖二、離子液體的合成步驟

這些方法在製備上都不算困難，可以輕易的合成出不同形式、性質的 ILs，也因此使 ILs 應用範圍更加廣泛。

### 2-1-2 離子液體的性質

ILs 是離子態的有機物質，具有無毒、低熔點、低揮發性、不易燃、高導電度，高熱穩定與寬廣液態工作範圍(亦即熔點、沸點差異大)等優點。化學家利用 empirical solvent polarity scales 此種方式研究顯示，大部分的 ILs 擁有與短碳鏈醇類相似的極性；<sup>11,12</sup> 此外，不同陰、陽離子所構成的 ILs，其疏水性與親水性並不盡相同；舉[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]與[C<sub>4</sub>mim][Cl]為例，此兩化合物以相同陽離子與不同陰離子化合，[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]與水不互溶，具有相當的疏水性，而[C<sub>4</sub>mim][Cl]可與水以任何比例互溶，則具有相當的親水性。研究結果顯示，ILs 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；<sup>12,13</sup> ILs 的密度則與陽離子團的大小較有關，一般而言，陽離子團越大，密度相對減小；<sup>5</sup> 至於 ILs 的黏度主要取決於 ILs 分子間形成氫鍵的趨勢及凡得瓦爾作用力的強弱而定；<sup>5</sup> ILs 的熔點則與陽離子的對稱性（表一）、陰離子團大小有關（表二）。<sup>5</sup>

ILs 具有許多性質而適合做為研究電化學的溶劑，例如與水溶液相較時有較寬廣的電位窗(potential window)及導電度。在選擇一溶劑來當電化學的探討時，最先考慮的是此溶劑的電位窗範圍是否合適，而電位窗主要決定於溶劑本身是否容易被還原或氧化，就 ILs 來說其

電位窗的負電位受限於組成中陽離子的還原電位，而正電位則受限於陰離子的氧化電位，目前文獻報導中具有最寬廣電位窗的 IL 為  $[\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)_3\text{N}][(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]$ ，用玻璃碳電極掃引時其電位窗可達 5.7V。<sup>14</sup>

另外日本東京大學濱口宏夫(Hiro-o Hamaguchi)教授最新發現一種具有金屬磁性的"磁性離子液體"，<sup>15</sup> 他們推測這有可能是非液體亦非固體之新的物質狀態，假如得以證實，理化教科書上所謂物質三態的說法，將極有可能被重新改寫。

### 2-1-3 離子液體的應用

早在 1914 年就有人合成出 ethylammonium nitrate，在低溫時是液態的離子化合物。1948 年，Hurley 和 Wier 發展第一種 chloroaluminate ion 形式的 ILs 並拿來當電鍍鋁的浸漬液。<sup>16</sup> 但是卻沒有更進一步的相關研究，直到 1970 年代 Osteryoung 和 Wilkes 成功製備出 chloroaluminate melts，<sup>17</sup> 而從此 ILs 被大量的應用在電化學。在 1980 年代，Seddon 和 Hussey 開始使用 chloroaluminate melts，<sup>18,19</sup> 利用其非水溶液、極性溶劑性質做過渡金屬錯合物方面的研究。

ILs 中有機離子有很大的電偶極矩，是吸收微波的優良介質，同微波技術相結合具有快速合成的優點。此外，ILs 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，目前 ILs 已被應用於廣泛的化學領域，

例如 Diels-Alder 反應在 IL 中進行以產生選擇性反應而生成 endo 產物；<sup>4</sup> 將 IL 當作 biphasic catalysis system 中的有機層，而再把催化劑從 IL 中回收；在 chloroaluminate(III) liquids 中進行有機及有機金屬反應；<sup>4</sup> 將陽離子固定為 1-Butyl-3-methylimidazolium，而陰離子為 Cl<sup>-</sup>、PF<sub>6</sub><sup>-</sup> 填充在不同的 GC column 中作為靜相，以有 proton 和各種極性的溶質打入管柱中以探討不同陰離子型態的 IL 對不同 solute 的作用力大小；<sup>20</sup> 在 CE 中填充為靜相作 non-aqueous 分離；<sup>21</sup> 把三十幾種 ILs 作為 MALDI 的基質；<sup>22</sup> 在萃取應用方面，利用 crown ether 萃取鹼金屬到 IL 中；<sup>23,24</sup> 合成出具有 O、S、N<sup>25</sup> 的 ionic liquid 當金屬螯合劑去萃取水層中的 Hg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>；用 IL 當介質，將金奈米及金奈米棒做水相至 IL 相的轉移；<sup>26</sup> 亦有合成出陰離子中不含鹵素原子所謂“greener”的 ionic liquid，<sup>27</sup> 減少 ionic liquid 的毒性；除了無機離子之萃取外，有利用 IL 及 CO<sub>2</sub> 萃取有毒的有機物(多環芳香族)後再回收 IL 的具綠色觀念的分離方法。<sup>28</sup>

近來，研究者開拓了應用 ILs 當作生化催化反應介質的新領域。<sup>29,30</sup> 酵素能在 IL 中保有相當好的催化活性<sup>31,32</sup> 且能在高溫時展現好的熱穩定性。<sup>33</sup> 由於 ILs 的重要性，在 Chemical & Engineering News<sup>34</sup> 中更以專題方式介紹綠色化學(Green Chemistry)，而 ILs 的應用即為綠色化學觀念的一部分。在美國 Alabama 和北愛爾蘭也分別成立 ILs 研究中心來研究及推廣 ILs 的應用，由此可見其未來的發展性。

## 2-2 蛋白質萃取方法

近年來由於生物科技的進步，藉由 DNA 重組技術 (recombinant DNA technique) 及蛋白質工程 (protein engineering)，人類可以生產製造一些重要的生物分子，然而如何從細胞培養基 (cell culture media) 中，分離、純化及濃縮這些生物分子就成為一個重要的課題。傳統上分離生物分子的方法，是先將細胞培養基中的細胞先打碎，利用離心粗略分離雜質，然後利用層析法 (chromatography) 或傳統凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 進行樣品的分離，可是這種方法只能分離少量的樣品，並無法分離大量的樣品。此後才漸漸發展出雙水相溶劑系統及反微胞萃取此兩種能提供大量分離純化生物分子的技術。

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

雙水相溶劑系統是 Albertson 於 1958 年所提出，<sup>35</sup> 所謂的雙水相溶劑系統是將兩種結構不同的高分子聚合物 (如：polyethylene glycol、Dextran 等) 混合，或是混合高濃度的鹽 (如磷酸鹽、檸檬酸鹽等) 與高分子聚合物，使其形成兩相。由於不同的化合物其表面性質不同 (例如；charge、hydrophobicity 等)，因此在兩相間會有不同的分配情形，根據其分配係數的不同而予以分離。雙水相溶劑系統也已被大量應用在蛋白質和細胞的萃取分離及純化上。<sup>36</sup>

一般來說，分子在兩相的分配情形受許多因素所影響，主要受所使用的高分子聚合物種類、<sup>36</sup> buffer 濃度、<sup>37,38</sup> pH 值<sup>38</sup> 及溫度<sup>37</sup> 所決定。雙水相溶劑系統也被應用於逆流層析儀 (countercurrent chromatography) 中進行蛋白質的製備分離。<sup>39,40</sup>

### 2-2-2 反微胞萃取法<sup>41,42</sup>

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反微胞，藉由反微胞將溶於水溶液中極性大的分子萃取至有機溶劑中，然後再反萃取至另一水溶液中，以達到分離純化的目的；除了能分離水溶液中的極性物質外，反微胞萃取法亦能從固相基質中萃取極性物質。<sup>43</sup> 另外，反微胞萃取法除了具有分離大量樣品的能力外，分離後能保有甚至增進生物分子的活性，是其最受矚目之處，因此已有一些文獻發表利用反微胞萃取法來分離胺基酸<sup>44,45</sup> 或蛋白質。<sup>41,42</sup>

反微胞萃取法主要有兩個步驟，正向萃取 (forward extraction) 與反向萃取 (backward extraction)。正向萃取是將萃取物從水溶液或固相基質萃取至反微胞相中，而反向萃取是將反微胞相中的萃取物萃取回另一水溶液。

萃取物分佈在水相及反微胞相會受到水溶液的狀態，如水溶液的 pH 值、離子種類、或離子強度 (ionic strength) 所影響。此外，萃取物 (如蛋白質或胺基酸) 的性質，或是萃取時系統的溫度，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 (electrostatic interaction) 決定了反微胞萃取法的效率，因此若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>46</sup> 反之，若使用陽離子型界面活性劑，則水溶液 pH 值需要大於蛋白質的等電點。<sup>47</sup> 當蛋白質處於過酸或過鹼的水溶液中，會造成蛋白質產生變性作用 (denaturation)，而造成反微胞萃取上的困難<sup>41</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，在蛋白質表面與界面活性劑親水基之間產生遮蔽效應 (Debye screening effect)，造成蛋白質與界面活性劑間的靜電作用降低，而且會產生較小的反微胞，因此降低反微胞萃取的效率<sup>48,49</sup>。一般而言，當離子的電荷相同時，離子半徑越大，則遮蔽效應越明顯；當離子半徑相同時，其電荷越大，則遮蔽效應越強。離子強度增加會造成正向萃取效率下降，但是卻會造成反向萃取效率增加。另外，當水溶液中的離子強度過低時，界面活性劑、水溶液及有機溶劑就會產生乳化狀態，導致反微胞無法形成，並且水溶液及有機溶劑無法分離，造成反微胞萃取上的困難。

## 2-3 蛋白質簡介

### 2-3-1 蛋白質的組成與結構

蛋白質是生物體內重要的生化分子之一，生物體內的許多生化反應也是藉由蛋白質的作用才能順利完成，例如可催化各物種代謝的酵素、參與生物體內的免疫球蛋白，荷爾蒙所進行的訊息傳遞與生理調節等，皆顯示蛋白質在生物體內的重要性。蛋白質在生物體內部不僅種類繁多且其功能與性質也不盡相同，蛋白質的功能與其結構有相當密切的關聯。因此有關蛋白質結構的研究能幫助我們了解蛋白質在各種反應中的反應機制。

蛋白質是由胺基酸之間的氨基與羧基進行脫水反應之後所形成的胜肽鍵所連接而成，因此不同的蛋白質除了組成的胺基酸數量不同之外，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，這些不同構形 (conformation) 的蛋白質由於具有特殊的三度空間結構，因此具有特殊的生理活性。而蛋白質的立體結構主要可分為四級結構加以區分，包括第一級結構(primary structure)、第二級結構(secondary structure)、第三級結構 (tertiary structure) 及第四級結構 (quaternary structure)。

### 2-3-2 影響蛋白質構型的因素

蛋白質在生物體內必須維持其特殊的三度空間結構才能具有生

化活性，而造成蛋白質具有特殊三度空間結構的主要因素取決於一級結構的胺基酸序列，一級結構的排列會使某幾個胺基酸行成如  $\alpha$ -螺旋或  $\beta$ -摺頁等二級結構，而蛋白質一般都存在於以水為主要成份的環境之中，因此除了蛋白質本身的二級結構外，這些存在水中的蛋白質分子也必須與水產生交互作用，才能溶解於水溶液中。

水是極性較強的溶劑，因此蛋白質分子中具有較高極性、親水性質的胺基酸會暴露在蛋白質分子外側，直接與水分子接觸；而極性較低，屬於疏水性質的胺基酸則傾向於減少與水分子接觸，因此通常是聚集在蛋白質分子的內部，增加彼此之間疏水性質的作用力以降低能量讓蛋白質分子能穩定存在水溶液之中，因此形成一個疏水性的核心 (hydrophobic core)，至於蛋白質分子中沒有直接與水分子接觸的極性胺基酸則大多以分子內氫鍵的形式存在。

蛋白質分子的三度空間結構是以分子內的非共價鍵作用力而形成，但當蛋白質所處的環境中含有變性劑時，這些非共價鍵的力量遭到破壞，蛋白質的三度空間結構會因此瓦解，但並不涉及到一級結構的變化，此種現象稱為蛋白質的變性 (denaturation)；而當蛋白質變性之後，由於不再具有原本的三度空間結構，因此蛋白質所具有的生物活性也遭到破壞，造成例如酵素失去催化活性、激素對生物體調節的功能喪失等現象。導致蛋白質變性的因素主要可分為物理及化學等兩類因素，物理因素包括溫度、攪拌、震盪等，而化學因素則有 pH 值、變性劑 (尿素、鹽類、有機溶劑) 等。化學因素中 pH 值改變時，

使溶液中 pH 值與蛋白質的 pI 值之間差值增加，使蛋白質上帶電荷所造成的靜電斥力增加，導致蛋白質構型發生改變。而當蛋白質溶液中出現有機溶劑時，由於有機溶劑的極性較水溶液為低，因此增加了蛋白質內部疏水性核心的溶解度，使得構成蛋白質三度空間結構的非共價力量遭到破壞，同時改變了蛋白質的三度空間構形。

### 2-3-3 蛋白質結構分析

進行蛋白質結構分析的方法有X光繞射法、圓形二相色性分光光譜 (circular dichroism, CD)、UV/Vis 吸收光譜法、螢光光譜法 (fluorescence)，以及核磁共振光譜法 (NMR) 等方法。



#### (1) X光繞射法

X光繞射分析的對象是固體蛋白質結晶三度空間結構的訊息。因此此種方法得到的結構與蛋白質真正存在水溶液中的結構可能有些微的差距，而且當分析物蛋白質無法順利產生結晶時，便無法以X光繞射的方式分析蛋白質的結構。而除了X光繞射法之外，其他方法則是針對存在溶液狀態的蛋白質進行結構分析。

#### (2) 螢光光譜法

早期對於蛋白質在溶液中結構的探討，主要是以光譜分析為主，以螢光光譜法為例，主要是利用蛋白質分子特定的胺基酸所放出的螢光訊號作為偵測，由於這些胺基酸的螢光訊號，如波長、螢光強度受

到其所處的化學環境影響。所以這些胺基酸與溶液接觸與否、附近是否有帶電荷的官能基等種種因素，均會造成螢光訊號的變化，而這些特性也使得我們可藉由改變溶劑組成，添加螢光抑止試劑等實驗參數的改變，再經由觀察螢光訊號的變化情形，以推演蛋白質變性過程的結構轉變，或者蛋白質在酵素催化反應中與受質作用的區域等資訊，對於蛋白質三度空間結構的早期研究有相當大的幫助。

### (3) UV/Vis 吸收光譜法

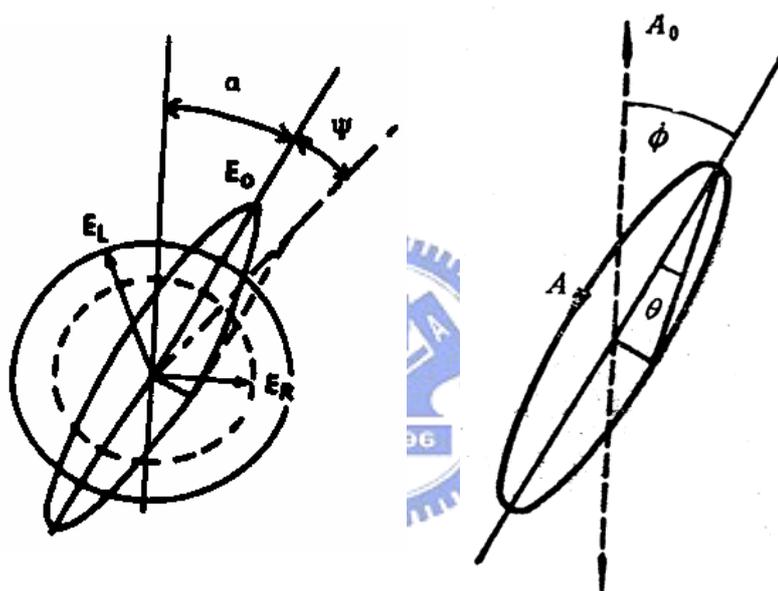
複雜的蛋白質分子可以吸收廣泛波長範圍的輻射，因此紫外光-可見光吸收光譜亦可提供蛋白質結構上的一些資訊。當蛋白質處於變性或極性不同的環境時，分子電子能階會產生變化，導致所吸收的能量不同，從光譜上可看出吸收波峰產生位移的現象。因此比對吸收光譜，即可了解蛋白質是否在立體結構上產生變異。

### (4) 核磁共振光譜法 (NMR)

近年來由於NMR技術的發展，使用NMR分析蛋白質三度空間結構<sup>50</sup>也受到相當程度的重視。當蛋白質分子的三度空間結構發生變化時，分子內原子所處的化學環境不同，在NMR圖譜上可明顯看出差異，因此目前蛋白質三度空間結構的研究中，NMR也提供了許多的資訊，但NMR技術對於所偵測分析物濃度的要求較高，因此也成為一項較為不利的因素。

(5) 圓形二相色性分光光譜 (circular dichroism, CD)

CD光譜的光源是由左、右圓偏振光所組成的平面偏振光，當此平面偏振光通過光學活性分子時，由於光學活性分子對左、右圓偏振光的吸收不同，使左、右圓偏振光透過後變成橢圓偏振光，這種現象稱為圓二色性，如下圖一所示。在CD光譜上所得到的資訊主要是光學活性分子對於各波長所產生的橢圓度 ( $\theta$ ) 值。



圖三、圓二色性原理。 $E_L$ 、 $E_R$  分別表示左、右圓偏振光；

$\phi$  為旋光度； $\theta$  為橢圓度

Circular dichroism (CD) spectroscopy 已經被廣泛地運用於分析蛋白質及核酸的二級結構。在過去的三十年間，許多分析蛋白質CD光譜圖二級結構之組成比例的方法紛紛出爐<sup>51,52</sup>。在這些方法中，有的是利用 polypeptides 為模型，有的則是以已知其晶體結構的參考蛋白質為參考標準，依此分析待測的蛋白質CD光譜圖中二級結構組成份

的線性結合，進而求得各二級結構組成之比例。在分析蛋白質時，其CD光譜圖和二級結構的部分，利用least-squares-based methods 或其他專利的方法構成一組線性方程式，對照於CD光譜圖後，蛋白質的二級結構便可以決定出來。

CD光譜中180 nm—250 nm的遠紫外光區可觀察蛋白質的二級結構；250 nm—350 nm的近紫外光區則可監測蛋白質的三級結構；當蛋白質變性導致三度空間構形改變時，二級結構及三級結構皆會發生變化，在CD光譜可直接觀測到。

在本研究中，主要是以UV/Vis吸收光譜、螢光光譜及圓形二相色性分光光譜來分析蛋白質分子的構形在萃取過程中是否產生變異。



## 第三章 實驗部份

### 3-1 試藥

#### 3-1-1 合成 $[C_4mim][PF_6]$ 之藥品

1-chlorobutane, 99%,  $C_4H_9Cl$ , GR grade (Janssen Chimica, USA)

1-methylimidazole, 99%,  $C_4H_6N_2$ , GR grade (Acros, USA)

Ethyl Acetate,  $CH_3COOC_2H_5$ , HPLC/spectro grade (Mallinckrodt, USA)

Potassium hexafluorophosphate, 99%,  $KPF_6$ , GR grade (Showa, Japan)

Magnesium sulfate anhydrous, 99%,  $MgSO_4$ , GR grade (Showa, Japan)

#### 3-1-2 配製 Buffer solution 的試劑

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

Potassium chloride,  $KCl$ , GR grade (Riedel-de Haën, Germany)

Glycine,  $C_2H_5NO_2$ , GR grade (Riedel-de Haën, Germany)

Citric Acid, 100%,  $HOC(COOH)(CH_2COOH)_2$  (Anhydrous, Powder), ACS grade (J.T.Baker, USA)

Sodium Citrate, 99.6%,  $HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \cdot 2H_2O$ , ACS grade (J.T.Baker, USA)

Acetic Acid,  $CH_3COOH$ , HPLC/spectro grade (Mallinckrodt, USA)

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

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

Tris(hydroxymethyl) aminomethane,  $(HOCH_2)_3CNH_2$ , ACS grade (TEDIA, USA)

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

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

### 3-1-3 蛋白質分子

Cytochrome c from Horst Heart, M.W. 12361, 97% (SIGMA, USA)

Myoglobin from equine skeletal muscle, M.W. 16952, 95-100% (SIGMA, USA)

Ribonuclease A from Bovine Pancreas, M.W. 13700, 90% (SIGMA, USA)

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

### 3-2 儀器

(1)核磁共振儀 (Bruker-DRX-300 MHz NMR)

(2)酸鹼度計 Microprocessor pH Meter SP-2200 (Suntex)

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

(4)螢光光譜儀 Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi F-4500 (Tokyo, Japan)

(5)圓形二相色性分光光譜儀 Circular Dichroism Spectrometer, Aviv Model 62ADS (Lakewood, N.J.)

(6)高效能液相層析管柱:由 Polymer Laboratories 製造的 PLRP-S, 300Å, 15µm 屬於 Reversed phase column, 用於蛋白質的分析與定量

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

### 3-3 實驗流程

#### 3-3-1 合成 IL [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]

1. 取 0.3 莫耳 1-chlorobutane 和等莫耳數的 1-methylimidazole 放入以設有迴流裝置的 250 ml 圓底燒瓶中並混合攪拌加約到 80°C，持續 24~48 小時，直到生成金黃色黏稠狀液體 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, [C<sub>4</sub>mim]Cl。
2. 加入 50 ml 乙酸乙酯洗濯此液體並倒入分液漏斗中，取出下層液體。
3. 取 0.3 莫耳 KPF<sub>6</sub> 加入 150 ml 去離子水中，攪拌直至完全溶解。
4. 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，以冰浴且利用磁石攪拌約 30 分鐘，在室溫下再攪拌約 30 分鐘。
5. 攪拌後，將上述水層倒出並加入去離子水攪拌再將水層倒出，再加入新的去離子水攪拌並倒出，重複此步驟直至水層成中性。
6. 將上層水溶液倒出後，加入硫酸鎂進行除水，再將有機層作旋轉濃縮移除乙酸乙酯，所最後得到即為 1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate, [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]。
7. 合成示意圖如圖四，最後將產物拿去做 NMR 鑑定<sup>12</sup>(圖五)。

### 3-3-2 細胞色素 c 正向與反向萃取

#### 1. 配製緩衝溶液：

0.2M KCl / 0.2M HCl 調配 pH 範圍 1.0-2.1

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

0.1M CH<sub>3</sub>COOH / 0.1M CH<sub>3</sub>COONa 調配 pH 範圍 3.6-5.0

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

0.1M 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 10.0-11.0

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

#### 2. 配製 pH 範圍 1.0-9.0 的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液，測量 UV-Visible 吸收光譜、螢光光譜、CD 光譜，觀察細胞色素 c 是否變性。

#### 3. 正向萃取：

(a) 將 pH 範圍 11.0-1.0 的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液分別取 4 ml 與含有 1 ml [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]和 2 ml 乙酸乙酯的有機相置入 20 ml 樣品瓶中，以手搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以標準添加法校正之。此外也利用磁石攪拌 1 小時，比較萃取時間對萃取率的效應。

(b) 定量方法：使用標準添加法 (Standard Addition)，取上層水溶液各 0.3 ml 放入五個樣品瓶中，依序添加 0、0.15、0.3、0.45、

0.6 ml 此樣品 pH 值的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液，再全部稀釋至 3 ml，接著測量 UV-visible 吸收值，pH1.7 以下的水溶液取 396 nm(因為 acid- denatured state)，其它 pH 值水溶液取 409 nm 的吸收值，以線性迴歸方程式算出未知物濃度，推算萃取率。

#### 4. 反向萃取：

- (a) 取 pH 2.7 的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液 4 ml 與 1ml  $[C_4mim][PF_6]$  和 2 ml 乙酸乙酯 的有機相在 20 ml 樣品瓶中搖晃混合 10 秒，靜置 10 分鐘澄清分層後，將上層水相移走，再加入 4 ml pH 範圍 2.7-12.0 的水溶液以手搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以標準添加法校正之。並將反向萃取的水溶液通過 Desalting column (HiTrap, column volume: 5 ml, void volume: 1.5 ml) 後，進行光譜分析。在此亦利用磁石攪拌 1 小時，比較萃取時間對反向萃取率的效應。
- (b) 定量方法：使用標準添加法，取上層水溶液各 0.3 ml 放入五個樣品瓶中，依序添加 0、0.15、0.3、0.45、0.6 ml 此樣品 pH 值的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液，再全部稀釋至 3 ml，接著測量 UV-visible 吸收光譜，取各水溶液 409 nm 的吸收值，以線性迴歸方程式算出未知物濃度，推算反向萃取率。

### 3-3-3 肌紅蛋白正向與反向萃取

1. 緩衝溶液 如 3-3-2 所述，但 pH 2 改以 Glycine/HCl 配製。
2. 各取 8 mg 的肌紅蛋白溶解於 pH 範圍 1.0-9.0 的 20 ml 水溶液中，由於在 pH 4.0-7.0 間肌紅蛋白不易完全溶解，因此用校正曲線校正濃度。測量水溶液 UV-Visible 吸收光譜、螢光光譜、CD 光譜，觀察肌紅蛋白是否變性。
3. 正向萃取：

(a) 將上述步驟 2 中所調配的肌紅蛋白水溶液分別取 4 ml 與含有 1 ml  $[C_4mim][PF_6]$  和 2 ml 乙酸乙酯的有機相置入 20 ml 樣品瓶中，以手充分搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以標準添加法校正之。

(b) 定量方法：使用標準添加法，取上層水溶液各 0.3 ml 放入五個樣品瓶中，依序添加 0、0.15、0.3、0.45、0.6 ml 此樣品 pH 值的肌紅蛋白水溶液，再全部稀釋至 3 ml，接著測量 UV-visible 吸收值，pH 3 以下的水溶液取 370 nm (因為 acid-denatured state)，其它 pH 值水溶液取 409 nm 的吸收值，以線性迴歸方程式算出未知物濃度，推算萃取率。

#### 4. 反向萃取：

(a) 取步驟 2 中配製的 pH 5 肌紅蛋白水溶液 4 ml 與 1ml  $[C_4mim][PF_6]$  和 2 ml 乙酸乙酯 的有機相在 20 ml 樣品瓶中搖晃混合 10 秒，靜置 10 分鐘澄清分層後，將上層水相移走，

再加入 4 ml pH 範圍 5.0-13.0 的水溶液以手充分搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以標準添加法校正之。並將反向萃取的水溶液通過 Desalting column 後，進行光譜分析。

- (b) 定量方法：使用標準添加法，取上層水溶液各 0.3 ml 放入五個樣品瓶中，依序添加 0、0.15、0.3、0.45、0.6 ml 此樣品 pH 值的肌紅蛋白水溶液，再全部稀釋至 3 ml，接著測量 UV-visible 吸收光譜，取各水溶液 409 nm 的吸收值，以線性迴歸方程式算出未知物濃度，推算反向萃取率。

### 3-3-4 核糖核酸酶 A 正向與反向萃取

1. 緩衝溶液 如 3-3-2 所述，但 pH 2 改以 Glycine/HCl 配製。
2. 配製 pH 範圍 1.0-5.0 的 200 ppm 核糖核酸酶 A 水溶液，測量 UV-Visible 吸收光譜、螢光光譜、CD 光譜，觀察核糖核酸酶 A 是否變性。
3. 正向萃取：

將 pH 範圍 1.0-5.0 的 200 ppm 核糖核酸酶 A 水溶液分別取 4 ml 與含有 1 ml [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]和 2 ml 乙酸乙酯的有機相置入 20 ml 樣品瓶中，分別搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以 HPLC 分析之。

#### 4. 反向萃取：

取 pH 2 的 200 ppm 核糖核酸酶 A 水溶液 4 ml 與 1 ml [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 和 2 ml 乙酸乙酯 的有機相在 20 ml 樣品瓶中搖晃混合 10 秒，靜置 10 分鐘澄清分層後，將上層水相移走，再加入 4 ml pH 範圍 2.0-13.0 的水溶液以手充分搖晃混合 10 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以 HPLC 分析之。並將反向萃取的水溶液通過 Desalting column 後，進行光譜分析。

#### 3-3-5 水溶液中鹽類濃度對蛋白質萃取的效應

調配不同 pH 值且 KCl 濃度分別為 0.1 M、0.2 M、0.4 M、0.6 M、0.8 M、1 M 的細胞色素 c、肌紅蛋白及核糖核酸酶 A 水溶液，探討水溶液中鹽類濃度對蛋白質正向萃取的影響。

#### 3-3-6 濃縮蛋白質細胞色素 c

取 pH 2.7 的 200 ppm 細胞色素 c 水溶液 4 ml 與 1 ml [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 和 2 ml 乙酸乙酯 的有機相在 20 ml 樣品瓶中搖晃混合 10 秒，靜置 10 分鐘澄清分層後，將上層水相移走，再分別加入 0.5 ml、1 ml、2 ml 的 pH 11 水溶液以手搖晃混合 30 秒，混合完靜置 10 分鐘澄清分層後，上層水相濃度以標準添加法校正之，並估算回收率。

### 3-3-7 模擬 IL 的性質

此實驗在與[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]極性相近的丁醇(表三<sup>53</sup>)裡添加濃度分別為 2000 ppm、4000 ppm、6000 ppm、8000 ppm 的 tetrabutylammonium bromide (TBAB)模擬 IL 的性質，以驗證 IL 能萃取蛋白質可能由於其擁有近似醇類的極性<sup>11,12</sup>與鹽類的特性。



## 第四章 結果與討論

### 4-1 萃取細胞色素 c

#### 4-1-1 正向萃取

一開始嘗試利用純的[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]溶解細胞色素 c，結果顯示細胞色素 c 無法溶解，文獻上記載需將細胞色素 c 做修飾才能溶於有機溶劑中進行催化反應，<sup>54,55</sup> 然而文獻上亦記載許多酵素能溶解於純的 ILs 中。<sup>29,30</sup> 之後再利用純的[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]與一系列不同 pH 值的細胞色素 c 水溶液搖晃混合，發現亦無法萃取細胞色素 c。最後嘗試在[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]中加入共溶劑，發現加入乙酸乙酯或正丁醇時，即可幫助[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相在低 pH 值水溶液時正向萃取細胞色素 c (圖六 a→b)。

萃取結果如圖七所示，在大約 pH 3 時萃取率突然增加，但是在 pH 2 左右時萃取率又劇然下降，不過在 pH 1.7 以下又再達到幾乎 100% 萃取。細胞色素 c 屬於珠狀蛋白(globular protein)的一種，且在低 pH 值時可被鹽類誘導為所謂的“熔珠”態(Molten Globule state)，尤其在 pH 2 時。<sup>56</sup> 熔珠態一般可被溫和的變性條件所誘導成，<sup>57</sup> 並被視為部分折疊的蛋白質。由圖八、圖九 UV/Vis 圖譜中與文獻<sup>58</sup> 相互比較可得知，本實驗中用 HCl/KCl 所配製的 pH 2 細胞色素 c 水溶液確實處於熔珠態。在此熔珠態時，細胞色素 c 中 heme 的 Fe 離子配位

呈現 mixed spin (both high spin and low spin)，因此 UV/Vis 吸收圖譜與原始態及酸變性態皆相異。在 pH 2 左右不能被萃取的原因，初步猜測可能為蛋白質處於熔珠態時具有一個疏水核心，導致分子表面親水性增強，不易被萃取進疏水性的[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相裡，不過仍然需有更進一步的研究解釋此現象。但是最後發現，用 Glycine/HCl 所配製的 pH 2 細胞色素 c 水溶液則可達完全的萃取，因為無金屬鹽類存在而誘導成熔珠態。

在此實驗中也比較了萃取時間對萃取率的影響，結果顯示以手搖晃混合 10 秒與用磁石攪拌 1 小時所得到的萃取率相近(圖七)，表示此正向萃取過程能很快達到平衡。

當細胞色素 c 被萃取進入[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相(圖六 b)後，利用光譜觀察細胞色素 c 在[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相裡構形是否產生變化，因為文獻上指出有機溶劑容易導致蛋白質變性而影響活性<sup>56</sup>。圖十為細胞色素 c 在 pH 7 水溶液中與在 pH 2.7 萃取進入[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相中的 UV/Vis 吸收圖譜比較，可看出細胞色素 c 在此兩種溶液中的 UV/Vis 吸收沒有太大差異。不過由於[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]對於細胞色素 c 的螢光光譜及 CD 光譜有很大的干擾，目前無法進一步得到細胞色素 c 在[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]相中的其他光譜資訊。

#### 4-1-2 反向萃取

如圖十一所示，在 pH 3-4 之間細胞色素 c 回收率快速地增加，

pH 4-9 之間則是緩慢地上升，最後在 pH 10 以上達到幾乎 100% 的回收率。以手搖晃混合 10 秒及用磁石攪拌 1 小時所得的回收率相近，顯示反向萃取達平衡的速率與正向萃取一樣快。

將反萃出的細胞色素 c 水溶液通過 Desalting column 後(去除水溶液中  $[C_4mim][PF_6]$  和乙酸乙酯對光譜的干擾)，做光譜分析。圖十二螢光光譜中可看出，pH 1 的細胞色素 c 水溶液由於變性，導致 Tryptophan 此胺基酸外翻而增強螢光強度；<sup>59</sup> 而以 pH 11 反萃出的細胞色素 c 水溶液與未萃取前 pH 2.7、原始態 pH 7 的細胞色素 c 水溶液螢光強度皆很弱，顯示細胞色素 c 經由正向與反向萃取後，構形仍能維持不變。圖十三 CD 光譜中亦顯示經由 pH 11 反萃出的細胞色素 c 仍保有原本的二級及三級結構，再次證明細胞色素 c 在此相轉移的過程不會破壞其原有的構形。



## 4-2 萃取肌紅蛋白

### 4-2-1 正向萃取

結果如圖十四所示，肌紅蛋白在 pH 5 以下能達到幾乎 100% 萃取，且從圖十五的 UV/Vis 吸收光譜可得知肌紅蛋白在 pH 3 以下由於過酸而導致變性。此外圖十四中的 pH 2 緩衝溶液是由 Glycine/HCl 所調配，如轉換以 KCl/HCl 調配 pH 2 的緩衝溶液則發現萃取率下降為 50%，原因可能為肌紅蛋白也是屬於珠狀蛋白，在低 pH 值下也會

被金屬鹽類誘導為熔珠態進而影響萃取效果。

另外也利用 UV/Vis 吸收光譜觀察肌紅蛋白萃取進入 IL 相後構形是否產生變化，從圖十六中可得知，409 nm 此波峰無 shift，不過原本的 280 nm 及 500 nm 此兩波峰皆有 shift 的現象，原因或許與 IL 的高極性環境有關。

#### 4-2-2 反向萃取

如圖十七所示，肌紅蛋白在 pH 5 至 12 的回收率相當低，到了 pH 13 的回收率也不到 50%，猜測不易回收的原因可能為肌紅蛋白屬於較疏水性的蛋白質，不易返回水層中，因為把肌紅蛋白水溶液與正丁醇混合分層後，即發現大約 75% 的肌紅蛋白會被萃取進正丁醇裡，顯示肌紅蛋白有一定的疏水性。我們也嘗試在反向萃取的水溶液添加 KCl 濃度分別為 1 M 及 2 M，探討是否能增加反向萃取率，但發現並無效果。將反萃取出的 pH 13 水溶液通過 Desalting column 後做光譜分析，結果顯示在螢光光譜(圖十八)與 CD 光譜(圖十九)皆產生了變異，表示肌紅蛋白在經過此相轉移過程後，立體構形已遭破壞。

#### 4-3 萃取核糖核酸酶 A

##### 4-3-1 正向萃取

結果如圖二十所示，核糖核酸酶 A 在 pH 3 至 pH 2 時萃取率大幅度地增加，但是沒辦法達到 100% 萃取，就算在 pH 1 萃取率也只有 60

%。利用 HCl/KCl 配製 pH 2 的緩衝溶液進行萃取測試，發現無萃取效果，此結果可能也是蛋白質熔珠態所致，因為核糖核酸酶 A 亦是屬於珠狀蛋白的一種。

#### 4-3-2 反向萃取

如圖二十一所示，核糖核酸酶 A 從 pH 3 開始即可慢慢被反萃回水相中，到了 pH 13 的回收率約為 60 %，表示可以將正向萃取的核糖核酸酶 A 全部回收至水相。從螢光光譜(圖二十二)及 CD 光譜(圖二十三)可觀察出，回收從 pH 10 開始，核糖核酸酶 A 的光譜即產生了變化。



#### 4-4 水溶液中鹽類濃度對蛋白質正向萃取的效應

此實驗是為了探討水溶液中鹽類的存在，對於利用 IL 正向萃取蛋白質是否也會跟利用反微胞萃取蛋白質一樣有遮蔽效應( screening effect )而影響蛋白質萃取。圖二十四為不同 pH 值下，不同 KCl 濃度對於細胞色素 c 正向萃取的影響，可得知 KCl 濃度越高，萃取率越低，顯示水溶液中鹽類對於細胞色素 c 的萃取會有遮蔽效應的存在，且在 pH 1 的影響大於在 pH 2.7，原因為在 pH 1 時，KCl 濃度越大，細胞色素 c 即漸漸由酸變性態被誘導成熔珠態（由圖二十五 UV/Vis 光譜可觀察出，因為波峰有紅位移的趨勢），進而更影響萃取效果。圖二十六為水溶液 KCl 濃度對於萃取肌紅蛋白的效應，由結果可知水溶液

中鹽類的存在，並不會影響肌紅蛋白的萃取，可能由於肌紅蛋白疏水程度強的原因。圖二十七為在 pH 2 不同 KCl 濃度對於核糖核酸酶 A 萃取影響的結果，發現在 KCl 0.1 M 即無萃取效果，表示 KCl 的存在明顯地干擾核糖核酸酶 A 的萃取。

#### 4-5 濃縮蛋白質 細胞色素 c

在此理論的濃縮倍數分別為 2、4、8 倍，結果如表五，濃縮倍數越大回收率漸趨減少，因為濃縮倍數越大即加入新的水相體積要越小，會造成與 IL 相較不易均勻混合攪拌，導致回收率降低。不過此實驗證明了以 IL 當萃取劑濃縮蛋白質的可行性。



#### 4-6 模擬 IL 性質

在參考文獻[26]關於金奈米及金奈米棒相轉移的研究發現，當 10-undecen-1-ol 中添加 TBAB 此鹽類濃度越高時，金奈米及金奈米棒相轉移的效率越好，以驗證 IL 能直接完全將金奈米及金奈米棒做水相至 IL 相的轉移主要原因可能為 IL 其近似醇類的極性及鹽類的特性。

我們初步實驗發現將 pH 5 的肌紅蛋白水溶液與正丁醇混合分層後，大約 75 % 的肌紅蛋白會被萃取進入正丁醇。而且正丁醇的極性

與 IL  $[C_4mim][PF_6]$  相近(表三)，因此在正丁醇添加不同濃度的 TBAB 後發現，TBAB 的濃度越高，對於肌紅蛋白的萃取效果越好，如表四所示，當添加 TBAB 濃度到 8000 ppm 時，萃取率增加了 15%。由以上結果可驗證，IL 能萃取蛋白質，亦可能由於其擁有近似醇類的極性及鹽類的特性所致。

#### 4-7 IL 萃取蛋白質的機制

有文獻研究胺基酸在 IL 與水之間的分佈行為，<sup>60</sup> 他們指出當胺基酸的疏水性越強，以及水溶液的 pH 值越低時，胺基酸的分佈係數即越大(圖二十八及圖二十九)，而導致此現象的原因他們推測為胺基酸在低 pH 值是呈現正電性，會與 IL 中的陰離子有靜電吸引力而偏向分佈於 IL 中。在本研究中，我們推測萃取機制也是由於蛋白質在低 pH 值時呈現較強的正電性，因此被  $[C_4mim][PF_6]$  的陰離子， $PF_6^-$ ，由於靜電吸引力而萃取至 IL 相中；當處在比正向萃取的 pH 值高時，蛋白質的陰電性增強，此時蛋白質與  $PF_6^-$  的靜電斥力增強，導致蛋白質慢慢被釋放至水層中。此結果也與文獻[29],[61]所提及的解釋相符，ILs 能溶解物質主要是與其陰離子與物質間的作用力有關。

## 第五章 結論

本研究是利用[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]當作萃取劑，藉由調控水溶液的 pH 值，蛋白質能在水溶液與乙酸乙酯和[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]的混合物間進行正向及反向萃取，並發現珠狀蛋白在低 pH 值且有金屬鹽類存在所呈現的熔珠態會明顯地影響蛋白質在低 pH 值時的萃取；不過如果無金屬鹽類存在，則不會在低 pH 值時有影響萃取的現象發生。

另外，本實驗測試了水溶液中 KCl 對於蛋白質萃取的影響，由結果可知，水溶液中的 KCl 對細胞色素 c 及核糖核酸酶 A 存在遮蔽效應而影響蛋白質的萃取，但是對於較疏水性的肌紅蛋白則無干擾的情形產生。此外，嘗試在正丁醇裡加入有機鹽類 TBAB 以模擬 IL 的性質，當 TBAB 濃度越高，肌紅蛋白萃取率越大，顯示 IL 能萃取蛋白質或許是由於其近似醇類的極性及鹽類的特性。

至於萃取機制主要是蛋白質與 IL 之間的靜電作用力所致，但是其他如蛋白質的疏水性、蛋白質與 IL 間的其他作用力等等，可能也是影響 IL 萃取蛋白質的因素。此液相／液相萃取技術或許可使用於蛋白質的純化及濃縮，並且開拓 ILs 新的應用領域。

## 參考文獻

1. D. Sterzenbach, B. W. Wenclawiak, V. Weigelt, “Determination of Chlorinated Hydrocarbons in Marine Sediments at the Part-per Trillion Level with Supercritical Fluid Extraction” *Anal. Chem.* 69 (1997) 831.
2. L. A. Blanchard, D. Hancu, E. J. Beckman, J. F. Brennecke, “Green processing using ionic liquids and CO<sub>2</sub>” *Nature* 399 (1999) 28.
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.* (1998) 1765.
4. T. Welton, “Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis” *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071.
5. P. Wasserscheid, W. Keim, “Ionic Liquids-New “Solutions” for Transition Metal Catalysis” *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772.
6. C. J. Adams, M. J. Earle, G. Roberts, K. R. Seddon, “Friedel-Crafts reaction in room temperature ionic liquids” *Chem. Commun.* (1998) 2097.
7. R. A. Sheldon, “Catalytic reactions in ionic liquids” *Chem. Commun.* (2001) 2399.
8. M. Fremantle, *Chem. Eng. News*, March 30, 1998, p. 32; M.

Fremantle, Chem. Eng. News, May 15, 2000, p. 37; M. Fremantle, Chem. Eng. News, January 1, 2001, p. 21.

9. H. Waffenschmidt, Dissertation, Institut für Technische Chemie und Makromolekulare Chemie, RWTH Aachen, Germany, 2000.
10. A. E. Visser, R. P. Swatloski, W. M. Reichert, S. T. Griffin, R. D. Rogers, "Traditional Extractants in Nontraditional Solvents: Groups 1 and 2 Extraction by Crown Ethers in Room-Temperature Ionic Liquids" *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 3596.
11. S. N. Aki, J. F. Brennecke, A. Samanta, "How polar are room temperature ionic liquids?" *Chem. Commun.* (2001) 413.
12. P. Bonhote, A. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, "Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts" *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168.
13. 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.
14. 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.* (2000) 922.

15. S. Hayashi, H. Hamaguchi, "Discovery of a Magnetic Ionic Liquid [bmim]FeCl<sub>4</sub>" Chem. Lett. (2004) 1590.
16. F. H. Hurley, T. P. Wier, J. Electrochem. Soc. 98 (1951) 207.
17. 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.
18. T. B. Scheffler, C. L. Hussey, K. R. Seddon, C. M. Kear, P. D. Armitage, "Molybdenum Chloro Complexes in Room-Temperature Chloroaluminate Ionic Liquids: Stabilization of [MoCl<sub>6</sub>]<sup>2-</sup> and [MoCl<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>" Inorg. Chem. 22 (1983) 2099.
19. T. M. Laher, C. L. Hussey, "Copper( ) and Copper( ) Chloro Complexes in the Basic Aluminum Chloride-1-Methyl-3-ethylimidazolium Chloride Ionic Liquid" Inorg. Chem. 22 (1983) 3247.
20. 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.
21. E. G. Yanes, S. R. Gratz, M. J. Baldwin, S. E. Robison, A. M. Stalcup, "Capillary Electrophoretic Application of 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Based Ionic Liquids" Anal. Chem.

- 73 (2001) 3838.
22. D. W. Armstrong, L. Zhang, L. He, M. L. Gross, "Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* 73 (2001) 3679.
23. H. Luo, S. Dai, P. V. Bonnesen, A. C. Buchanan, J. D. Holbrey, N. J. Bridges, R. D. Rogers, "Extraction of Cesium Ions from Aqueous Solutions Using Calix[4]arene-bis(tert-octylbenzo crown-6) in Ionic Liquids" *Anal. Chem.* 76 (2004) 3078.
24. H. Luo, S. Dai, P. V. Bonnesen, "Solvent Extraction of  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Cs}^{2+}$  Based on Room-Temperature Ionic Liquids Containing Monoaza-Substituted Crown Ethers" *Anal. Chem.* 76 (2004) 2773.
25. A. E. Visser, R. P. Swatloski, W. M. Reichert, R. Mayton, S. Sheff, A. Wierzbicki, J. H. Davis, R. D. Rogers, "Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions" *Chem. Commun.* (2001) 135.
26. G. T. Wei, Z. S. Yang, C. Y. Lee, H. Y. Yang, C. R. C. Wang, "Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold Nanoparticles and Gold Nanorods Using an Ionic Liquid" *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5036.
27. P. Wasserscheid, R. van Hal, A. Bösmann, "1-n-Butyl-3-methylimidazolium ([bmim]octylsulfate—an even 'greener' ionic liquid" *Green Chem.* 4 (2002) 400.

28. L. A. Blanchard, J. F. Brennecke, "Recovery of Organic Products from Ionic Liquids Using Supercritical Carbon Dioxide" *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287.
29. R. Madeira Lau, M. J. Sorgedraeger, G. Carrea, F. van Rantwijk, F. Secundo, R. A. Sheldon, "Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid: effects on structure and activity" *Green Chem.* 6 (2004) 483.
30. R. A. Sheldon, R. Madeira Lau, M. J. Sorgedraeger, F. van Rantwijk, K. R. Seddon, "Biocatalysis in ionic liquids" *Green Chem.* 4 (2002) 147.
31. J. L. Kaar, A. M. Jesionowski, J. A. Berberich, R. Moulton, A. J. Russell, "Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability" *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125.
32. M. Erbedinger, A. J. Mesiano, A. J. Russell, "Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid— An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents" *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 1129.
33. S. N. Baker, T. M. McCleskey, S. Pandey, G. A. Baker, "Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids" *Chem. Commun.* (2004) 940.
34. *Chemical and Engineering News*, July, 16, 2001, 27-34.

35. C. Larsson, "Isolation of membranes and organelles from plant cells" Academic Pr, New York chapter11 (1983) 277.
36. N. L. Abbott, D. Blankschein, 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.
37. M. Carlsson, P. Linse, F. Tjerneld, "Temperature-Dependent Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems" *Macromolecules* 26 (1993) 1546.
38. 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.
39. 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.
40. 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.

41. M. J. Pires, M. R. Aires-Barros, J. M. S. Cabral, "Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reverse Micelles" *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 290.
42. K. E. Goklen, T. A. Hatton, "Protein Extraction Using Reverse Micelles" *Biotechnol. Prog.* 1 (1985) 69.
43. D. G. Hayes, "Mechanism of Protein Extraction from the Solid State by Water-in-Oil Microemulsions" *Biotechnol. Bioeng.* 53 (1997) 583.
44. 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.
45. M. Adachi, M. Harada, A. Shioi, Y. Sato, "Extraction of Amino Acids to Microemulsion" *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 7925.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. G. Wanger, K. Wüthrich, “Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution: studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance” *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 343.
51. G. Bohm, R. Muhr, R. Jaenicke, “Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks” *Protein Eng.* 5 (1992) 191.
52. N. Sreerama, R. W. Woody, “A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism” *Anal. Biochem.* 209 (1993) 32.
53. <http://www.mariecurie.org/annals/volume3/berthod.pdf>
54. D. Paul, A. Suzumura, H. Sugimoto, J. Teraoka, S. Shinoda, H. Tsukube, “Chemical Activation of Cytochrome c Proteins via Crown Ether Complexation: Cold-Active Synzymes for Enantiomer Selective Sulfoxide Oxidation in Methanol” *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11478.

55. R. Vazquez-Duhalt, P. M. Fedorak, D. W. S. Westlake, "Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents" *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 837.
56. M. Ohgushi, A. Wada, "Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains" *FEBS Lett.* 164 (1983) 21.
57. G. Riddihough, *Nat. Struct. Biol.* 367 (1994) 98.
58. J. G. Lyubovitsky, H. B. Gray, J. R. Winkler, "Structural Features of the Cytochrome *c* Molten Globule Revealed by Fluorescence Energy Transfer Kinetics" *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14840.
59. A. K. Bhuyan, J. B. Udgaonkar, "Multiple Kinetic Intermediates Accumulate during the Unfolding of Horse Cytochrome *c* in the Oxidized State" *Biochemistry* 37 (1998) 9147.
60. J. Wang, Y. Pei, Y. Zhao, Z. Hu, "Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media" *Green Chem.* 7 (2005) 196.
61. J. L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D. W. Armstrong, "Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions" *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14247.

表一、陽離子對稱性對於 Ionic Liquids 熔點的影響<sup>5</sup>

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

[a] MMIM = 1,3-dimethylimidazolium.



表二、陰離子團大小對於 Ionic Liquids 熔點的影響<sup>5</sup>

Imidazolium salt	M. p. [°C]	Ref.
[EMIM]Cl	87	[6c]
[EMIM]NO <sub>2</sub>	55	[14]
[EMIM]NO <sub>3</sub>	38	[14]
[EMIM]AlCl <sub>4</sub>	7	[40]
[EMIM]BF <sub>4</sub>	6 <sup>[a]</sup>	[17d]
[EMIM]CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	-9	[16a]
[EMIM]CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	-14	[16a]

[a] Glass transition.

表三、有機溶劑在 20°C 的物理化學性質

Solvent	Molecular weight	Density g/cm <sup>3</sup>	Viscosity cP	Melting point °C	Boiling point °C	Refractive index	Dipole moment debye	Dielectric constant	Solubility %w/w		Log <i>P</i> <sub>act</sub>	Polarity Reichardt
									Solvent in water	Water in solvent		
Acetic acid	60	1.049	1.1	16.7	118	1.3719	1.74	6.15	∞	∞	-0.20	65
Acetone	58	0.790	0.33	-94.7	56.1	1.3587	2.69	20.7	∞	∞	-0.22	35.5
Acetonitrile	41	0.782	0.36	-43.8	81.6	1.3441	3.44	37.5	∞	∞	-0.34	46
Benzene	78	0.876	0.65	5.5	80.1	1.5011	0	2.28	0.18	0.063	2.15	11
1-butanol	74	0.810	2.95	-88.6	118	1.3993	1.75	17.5	7.8	20.1	0.88	60
2-butanol	74	0.807	3.78	-115	99.5	1.3970	1.64	15.8	12.5	44.1	0.78	50.5
chloroform	119	1.489	0.58	-63.5	61.2	1.4892	1.15	4.9	0.815	0.056	1.97	26
diethyl ether	74	0.713	0.23	-116	34.4	1.3524	1.15	4.34	6.9	1.3	0.83	11.5
dimethylformamide	73	0.949	2	-60.4	153	1.4305	3.86	36.7	∞	∞	-1.00	40.5
dimethyl sulfoxide	78	1.095	2.2	18.5	189	1.4793	4.30	48.7	∞	∞	-1.30	44.5
ethanol	46	0.789	1.2	-114	78.3	1.3610	1.66	26.6	∞	∞	-0.70	65.5
ethyl acetate	88	0.901	0.45	-83.5	77.1	1.3724	1.88	6.0	8.7	3.3	0.78	23
heptane	100	0.684	0.41	-90.6	98.4	1.3876	0	1.92	0.0003	0.01	4.28	1.2
hexane	86	0.659	0.32	-95.3	68.7	1.3749	0.08	1.88	0.001	0.01	3.52	0.9
methanol	32	0.791	0.55	-98	64.5	1.3284	2.87	32.7	∞	∞	-0.80	76
methyl ethyl ketone	72	0.805	0.43	-86.7	79.6	1.3788	2.76	15.2	24	10	0.30	33
methyl isobutyl ketone	100	0.801	0.60	-84	116	1.3597	2.70	13.1	1.7	1.9	1.30	27
methyl- <i>t</i> -butyl ether	88	0.741	0.27	-108	55.2	1.3689	1.32	4.5	4.8	1.5	1.38	15
octanol	130	0.827	7.2	-16.7	194.5	1.4295	1.76	10.3	0.054	4.1	3.18	34
1-propanol	60	0.804	2.3	-126	97.1	1.3856	3.10	20.3	∞	∞	0.34	62
tetrahydrofuran	72	0.888	0.55	-108	66	1.4072	1.75	7.6	∞	∞	0.54	20.5
toluene	92	0.867	0.59	-95	111	1.4969	0.31	2.38	0.074	0.03	2.70	10
water	18	0.998	1.0	0	100	1.3330	1.87	80.1	-	-	-1.48	100
BMIM-PF <sub>6</sub> ionic liquid	284	1.362	300*	-8	dec.	1.4110	ions	cond.	1.8	1.4	-0.69	65

BMIM = butyl imidazolium hexafluorophosphate, \* dry ionic liquid, dec. = decomposes, cond. = conduct electrical current.

資料來源: <http://www.mariecurie.org/annals/volume3/berthod.pdf>

表四、丁醇中不同TBAB濃度對於肌紅蛋白萃取的影響

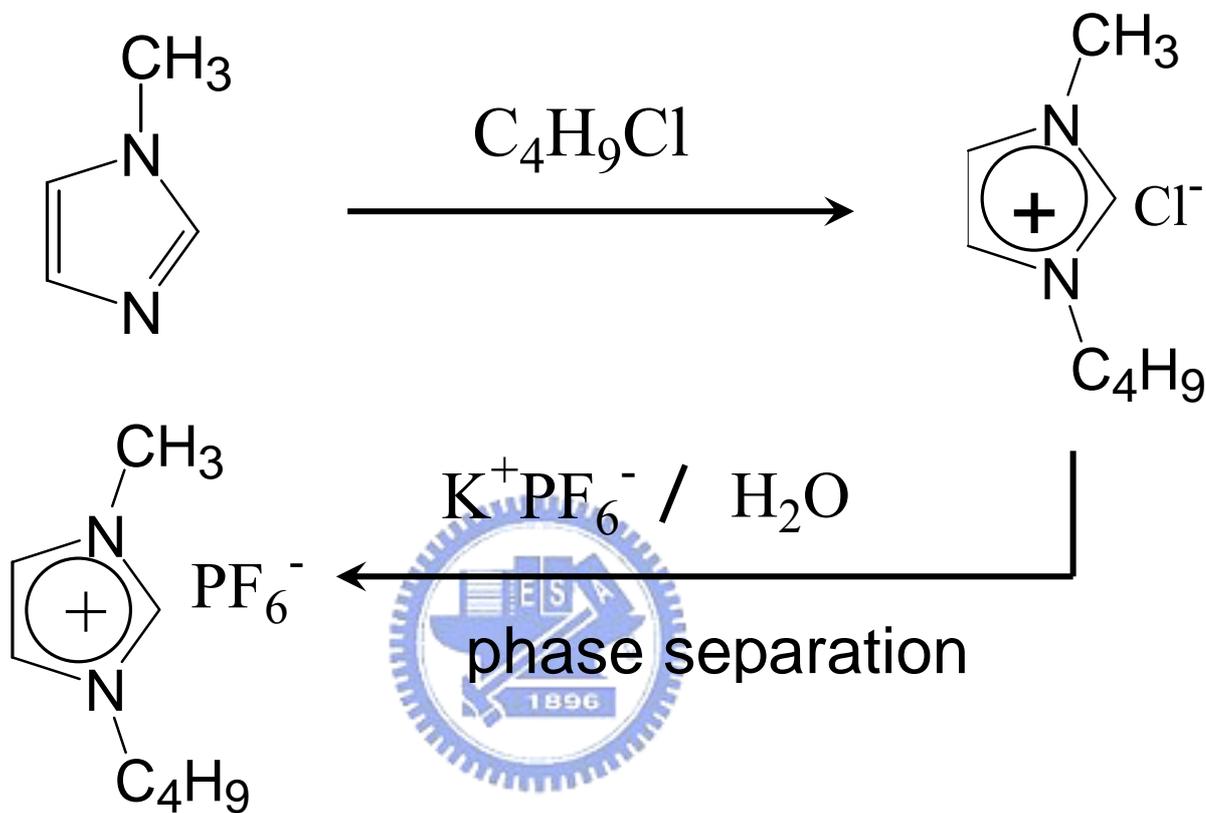
TBAB = [tetrabutylammonium bromide]

[TBAB] added	Extraction efficiency increased (%)
2000 ppm	6.6
4000 ppm	9.8
6000 ppm	11.5
8000 ppm	15.1



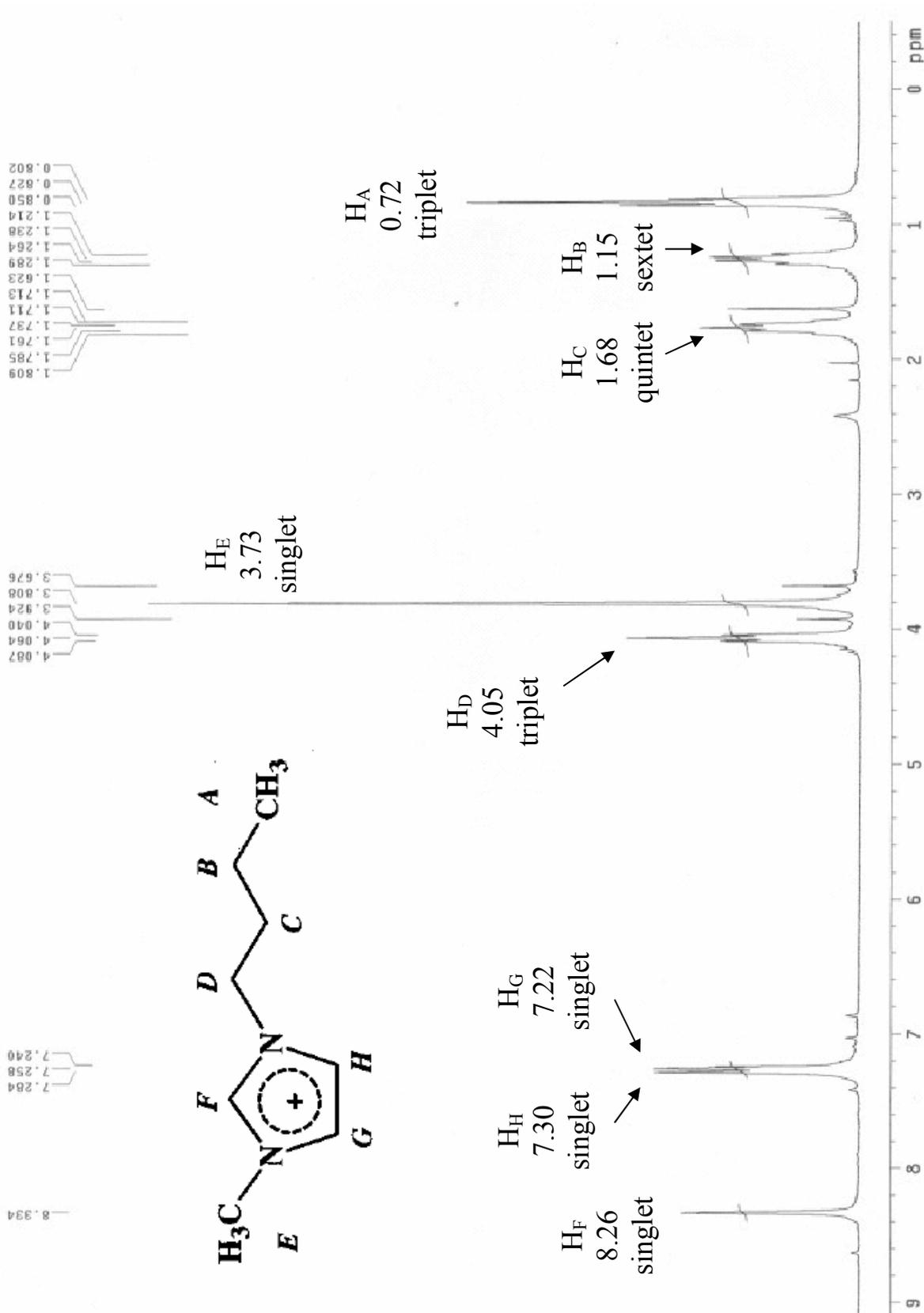
表五、濃縮蛋白質 細胞色素c

Backward Extraction volume	Concentration Factor	Theoretical Value (ppm)	Experimental Value (ppm)	Recovery (%)
2	2	400	382	95.5
1	4	800	722	90.2
0.5	8	1600	1321	82.6

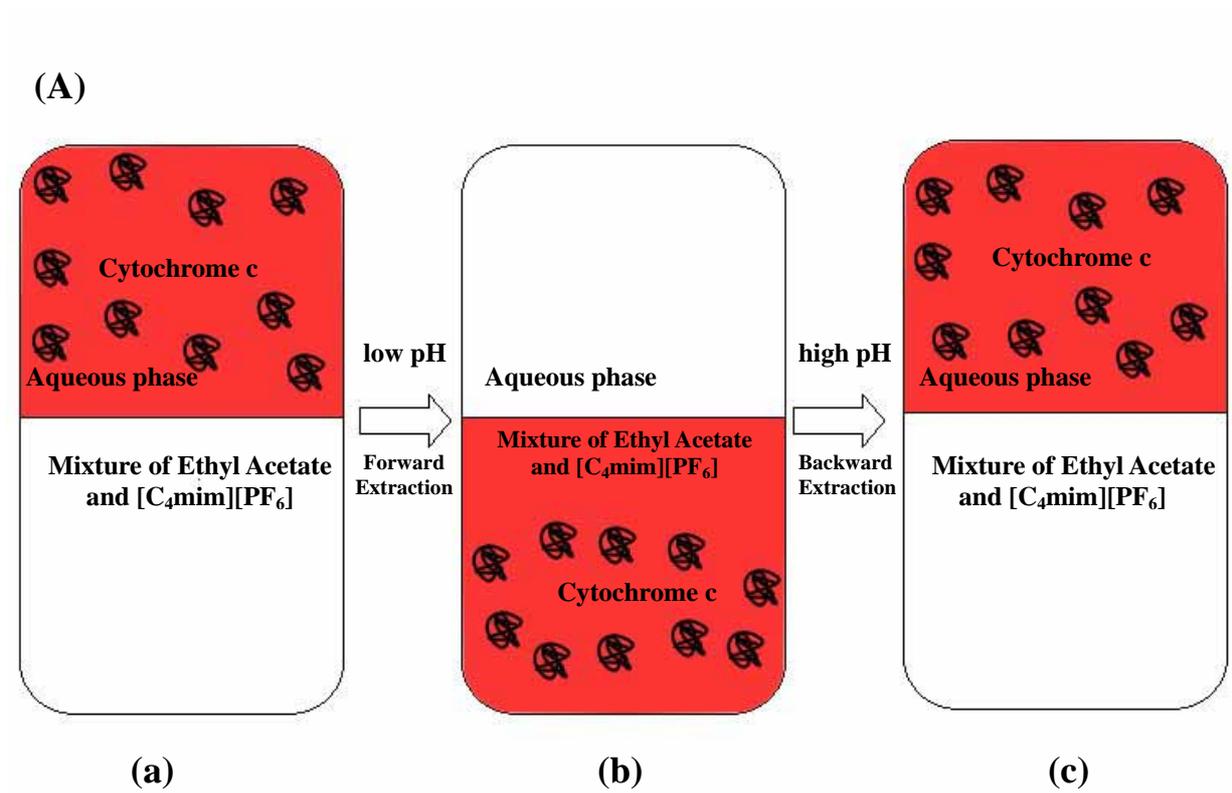


圖四、1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate, ( $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ )

合成示意圖



圖五、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] NMR 圖譜



(B)



(a)

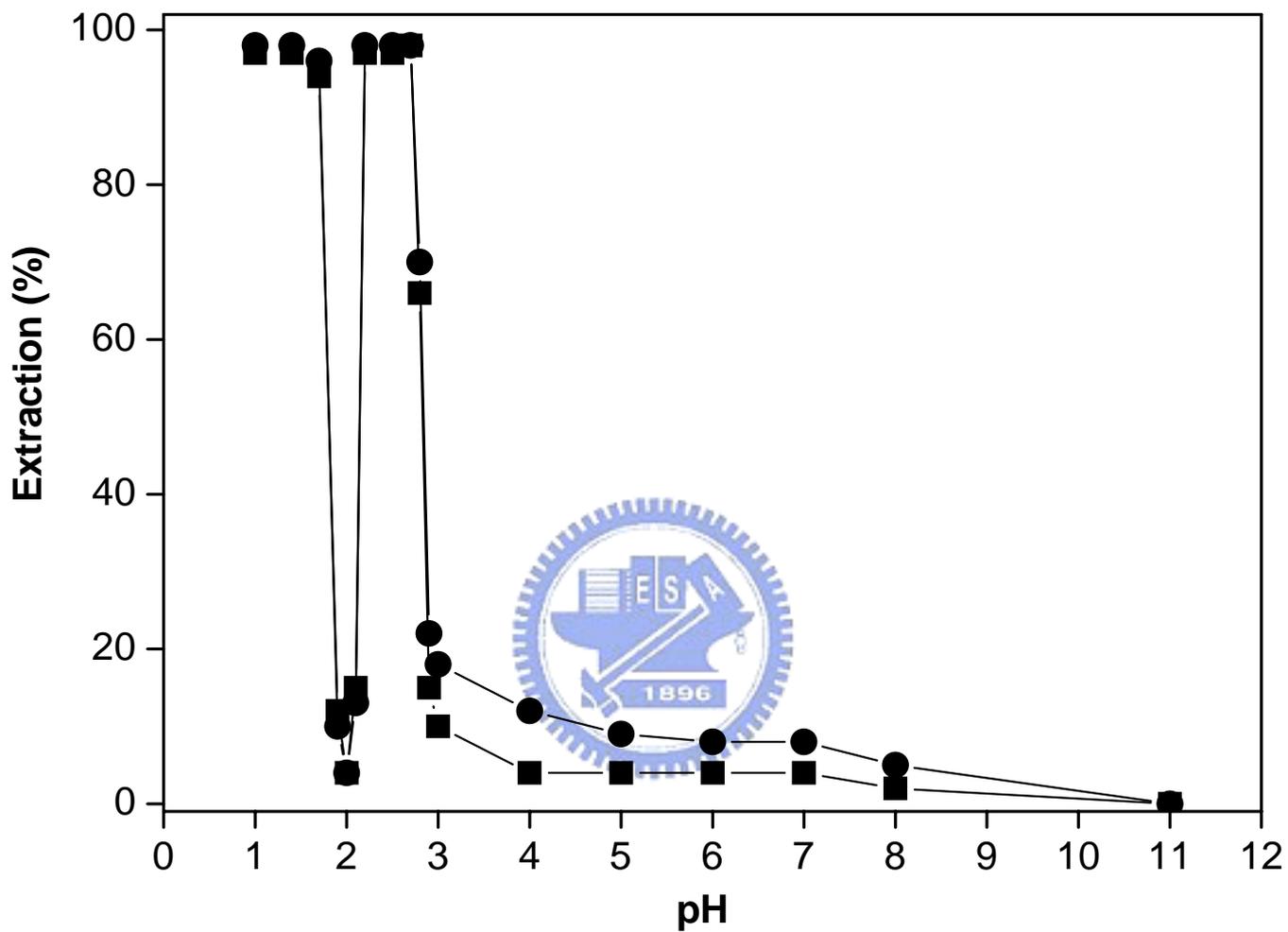
(b)

(c)

圖六、細胞色素 c 萃取示意圖(A)及真實實驗進行之相片(B)

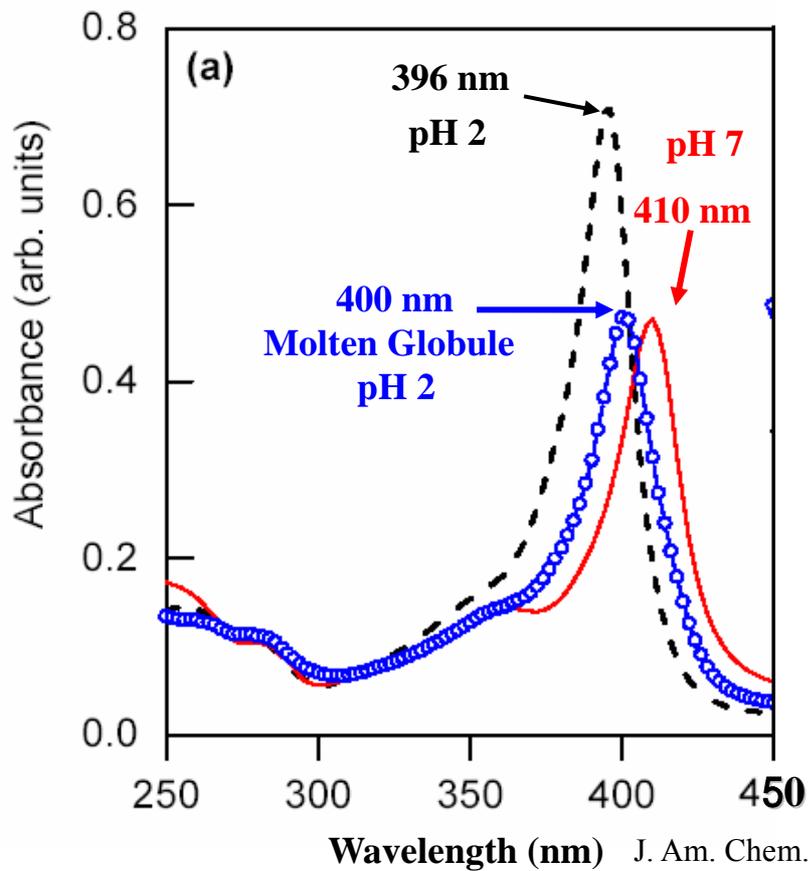
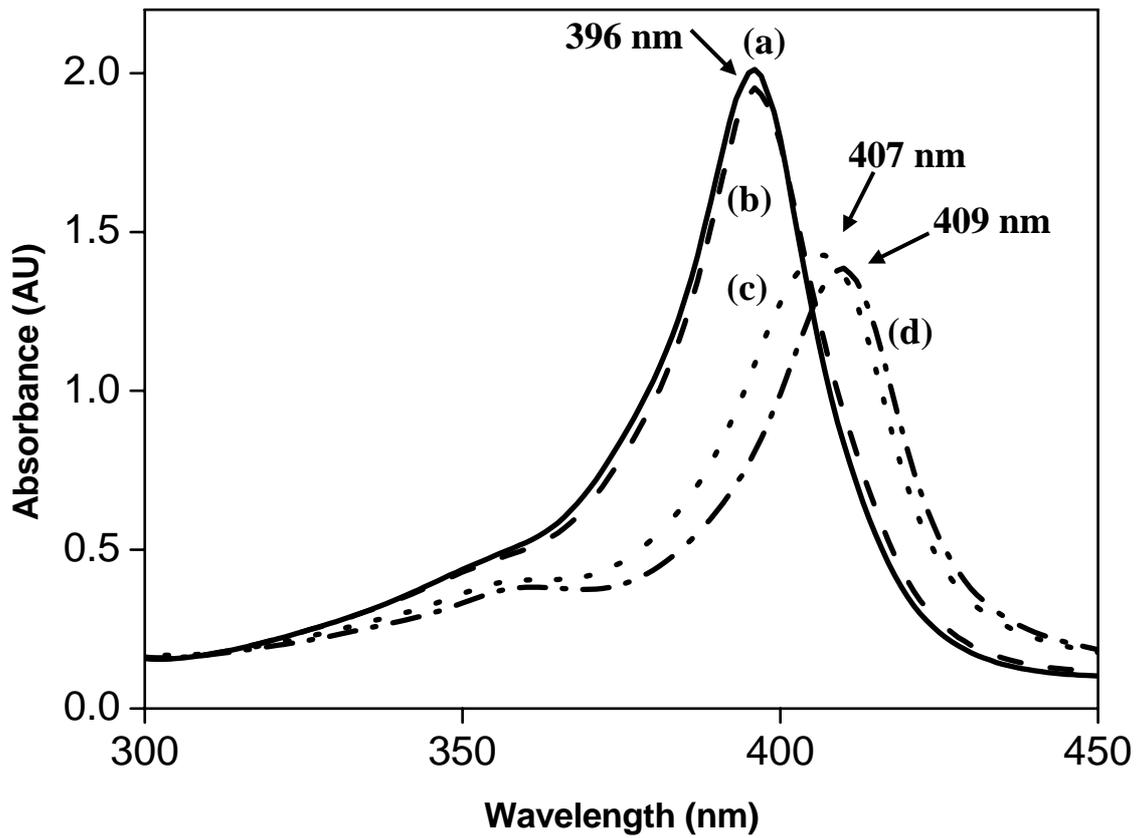
實驗條件: 上層相 4 ml 水溶液, 下層相 1 ml  $[C_4mim][PF_6]$ 和 2 ml 乙酸乙酯

(a) 萃取前 (pH 11) (b) 正向萃取 (pH 2.7) (c) 反向萃取 (pH 11)



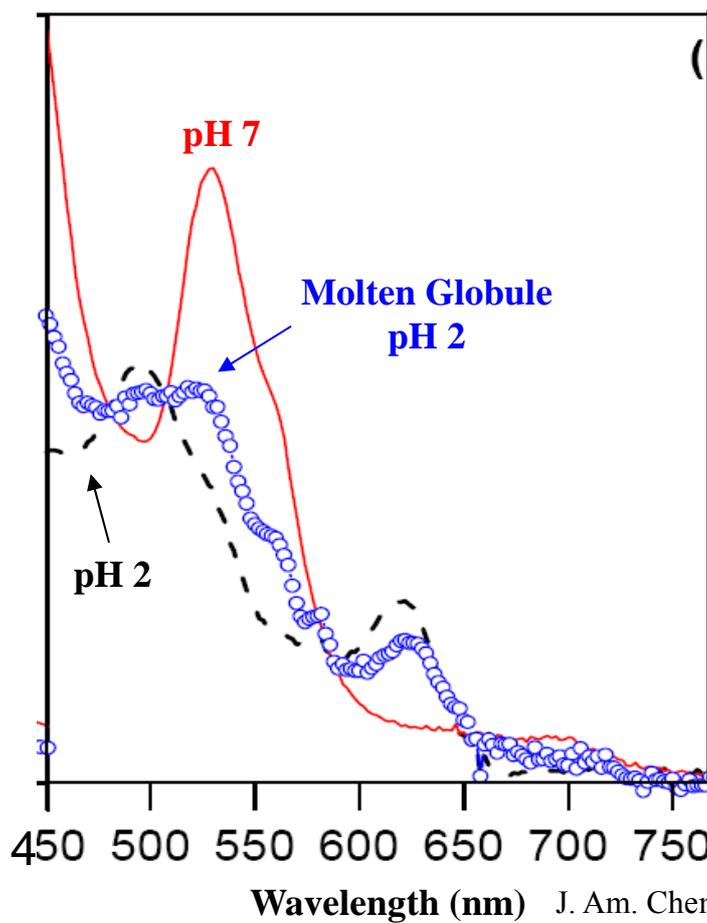
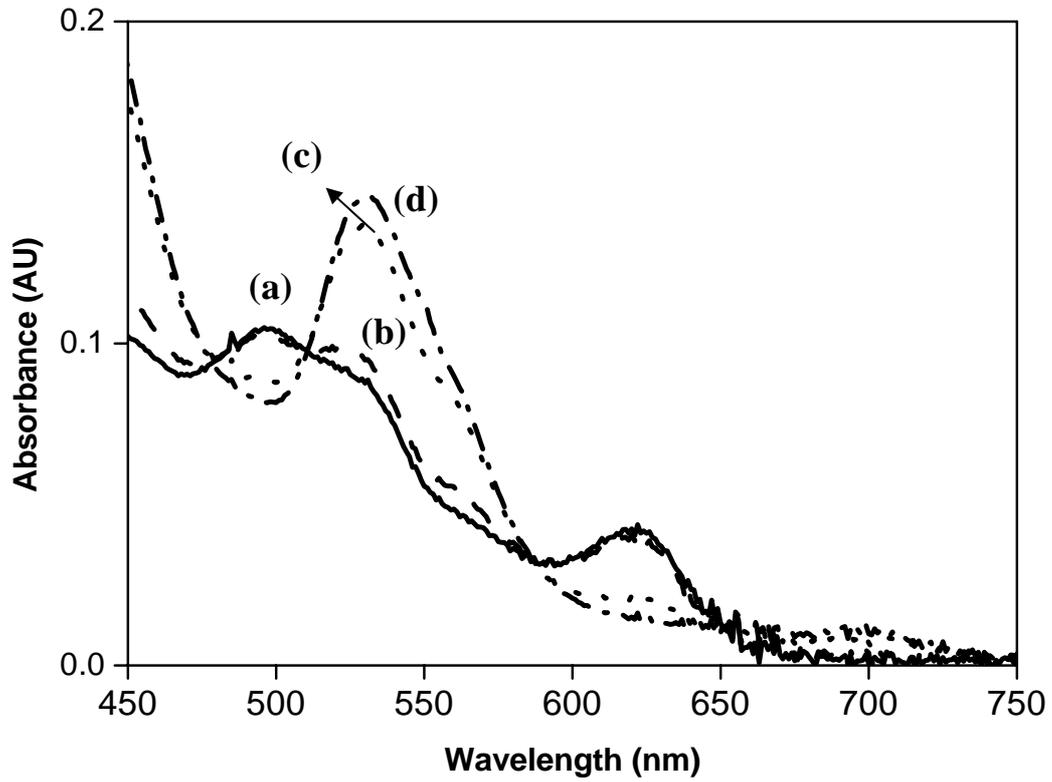
圖七、pH 值對蛋白質細胞色素 c 正向萃取率的效應

(■) 以手搖晃混合 10 秒 (●) 以磁石攪拌 1 小時



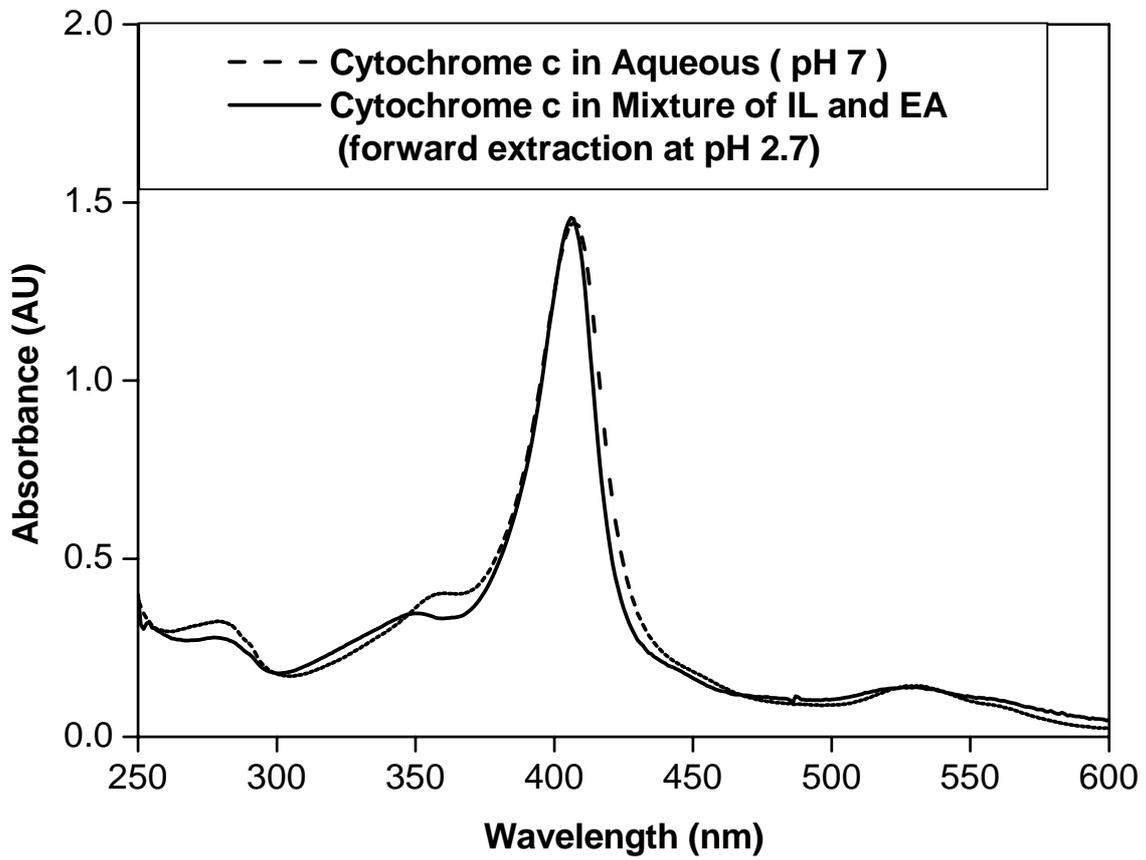
圖八、蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的吸收光譜(250-450 nm)。

上圖中(a) pH 1(b) pH 2 (c) pH 2.7 (d) pH 7 (原始態)。下圖為文獻圖譜。

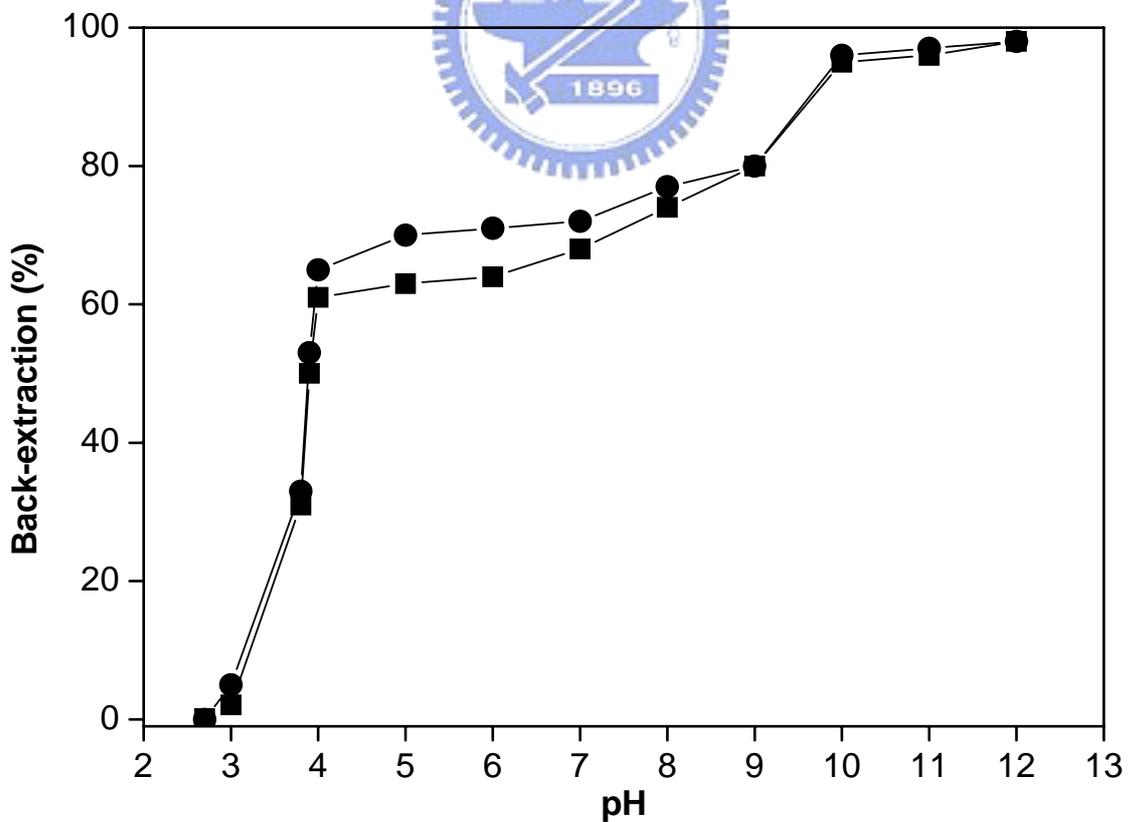


圖九、蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的吸收光譜(450-750 nm)。

上圖中(a) pH 1 (b) pH 2 (c) pH 2.7 (d) pH 7 (原始態)。下圖為文獻圖譜。

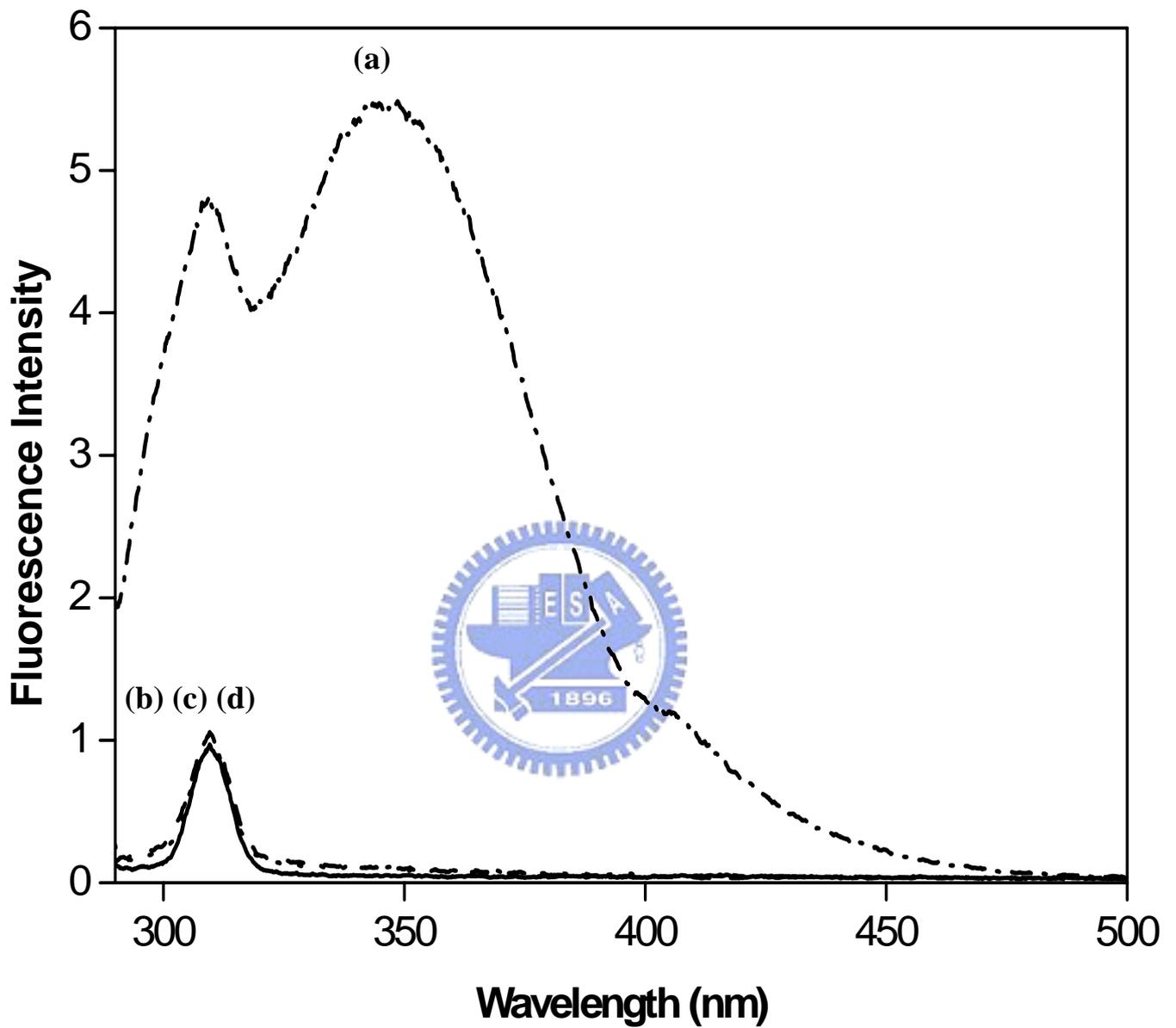


圖十、蛋白質細胞色素 c 在不同相中的吸收光譜圖



圖十一、pH 值對蛋白質細胞色素 c 反向萃取率的效應

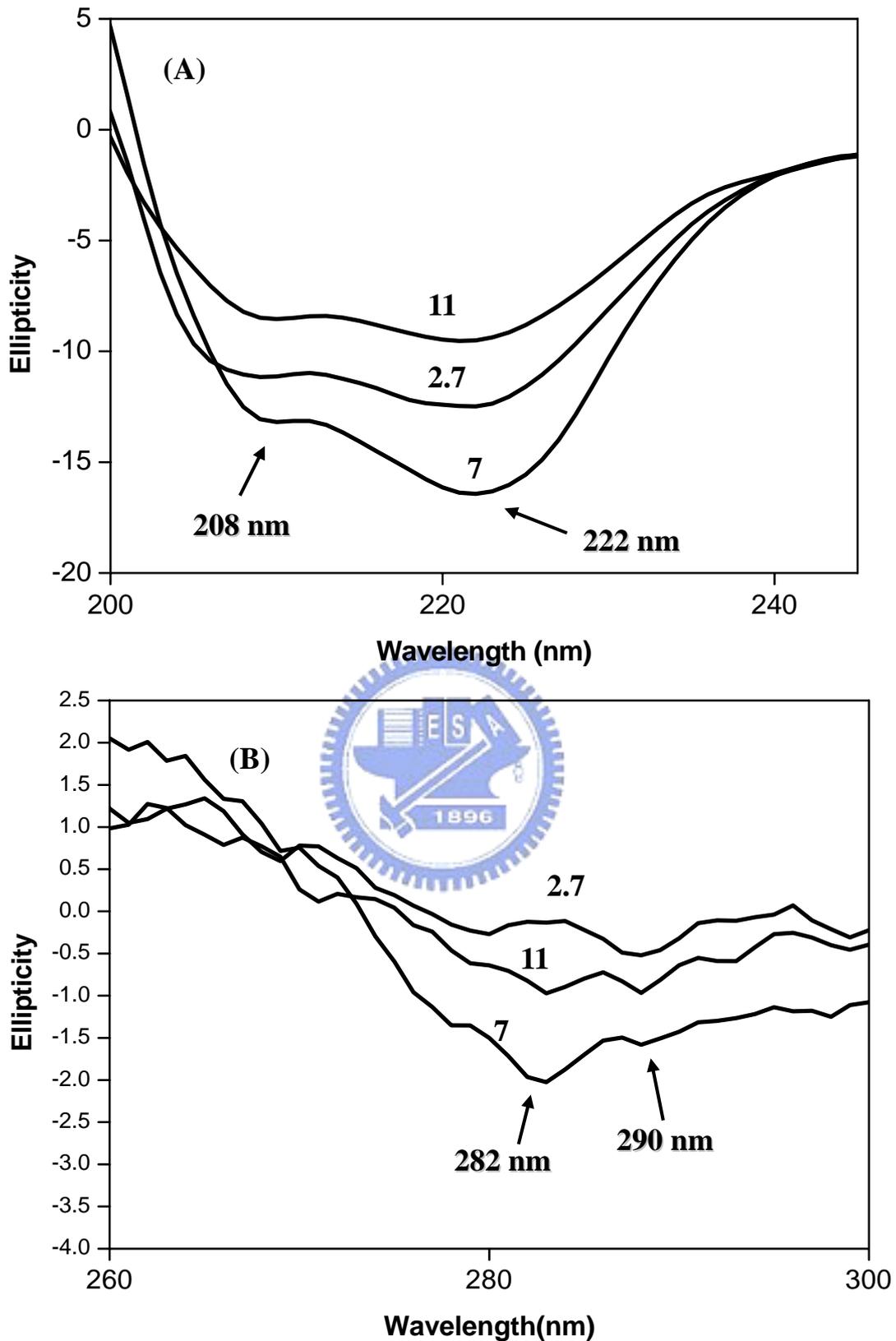
(■) 以手搖晃混合 10 秒 (●) 以磁石攪拌 1 小時



圖十二、蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的螢光光譜圖

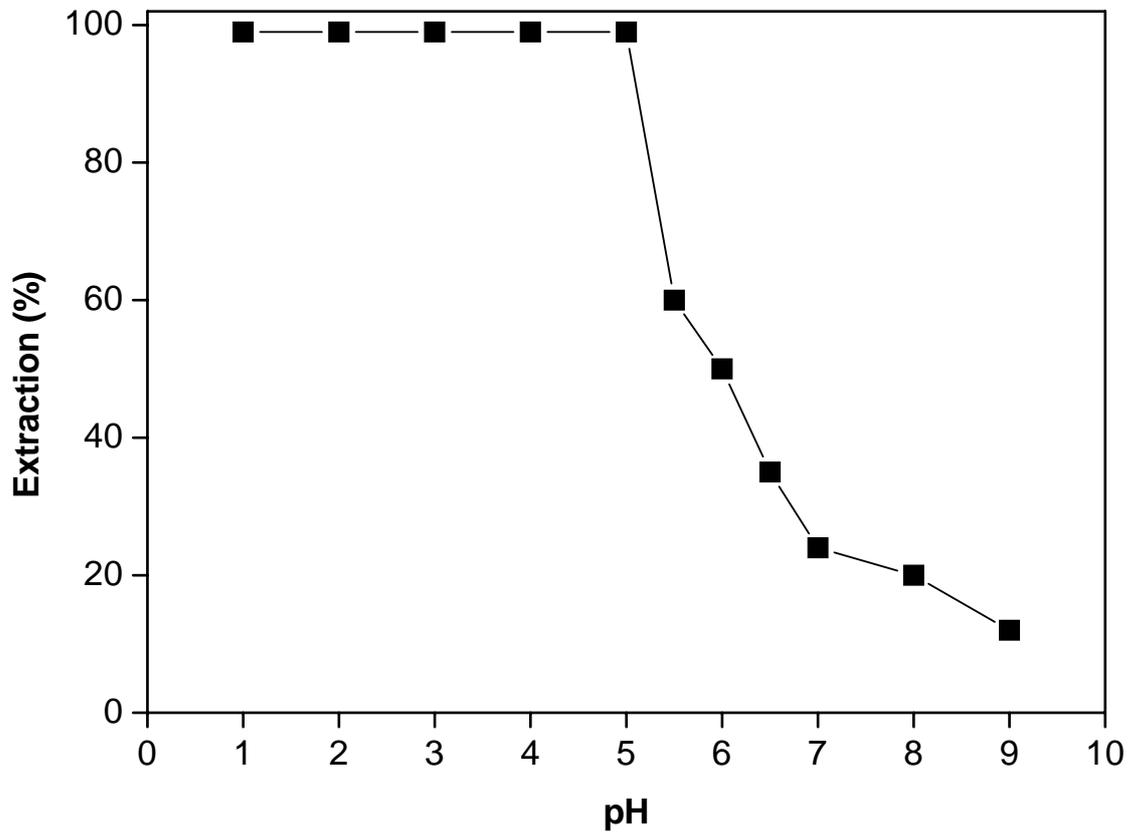
(a) pH 1 (b) pH 2.7 (c) pH 7 (原始態) (d) pH 11

激發波長: 280 nm

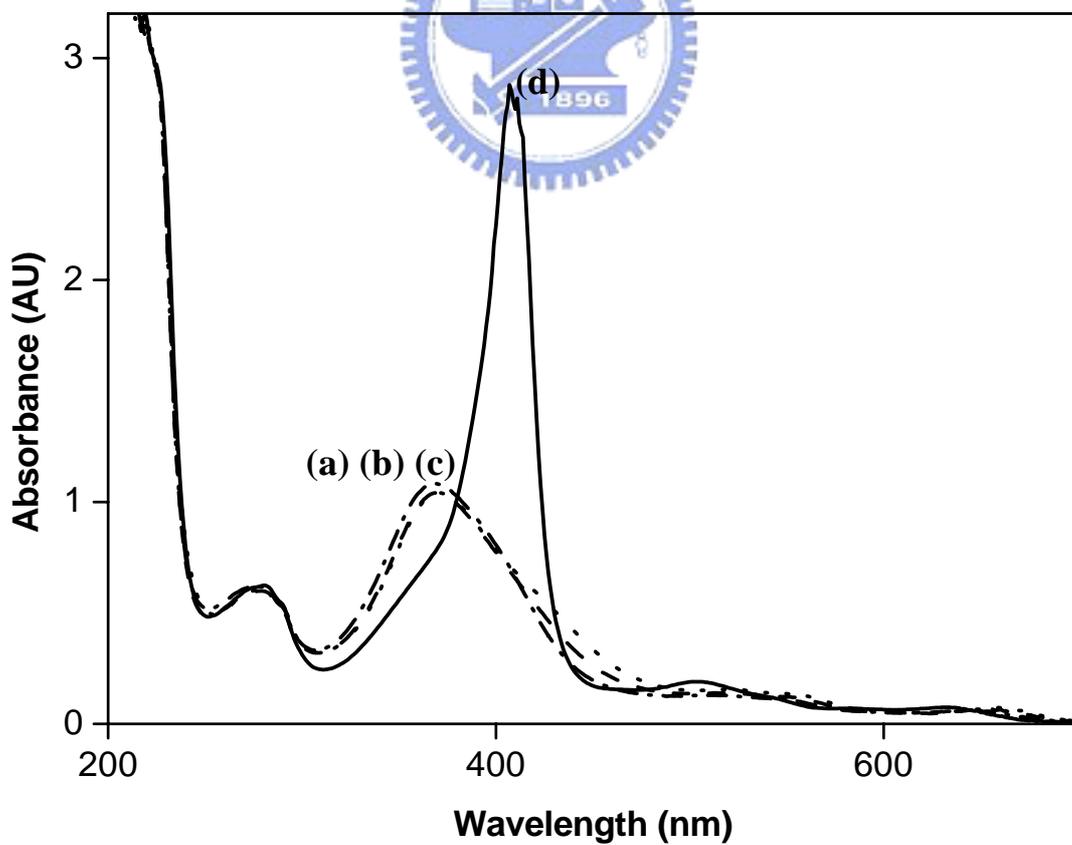


圖十三、蛋白質細胞色素 c 在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖

(A) 遠紫外光區 (B) 近紫外光區 (pH 7 為原始態)

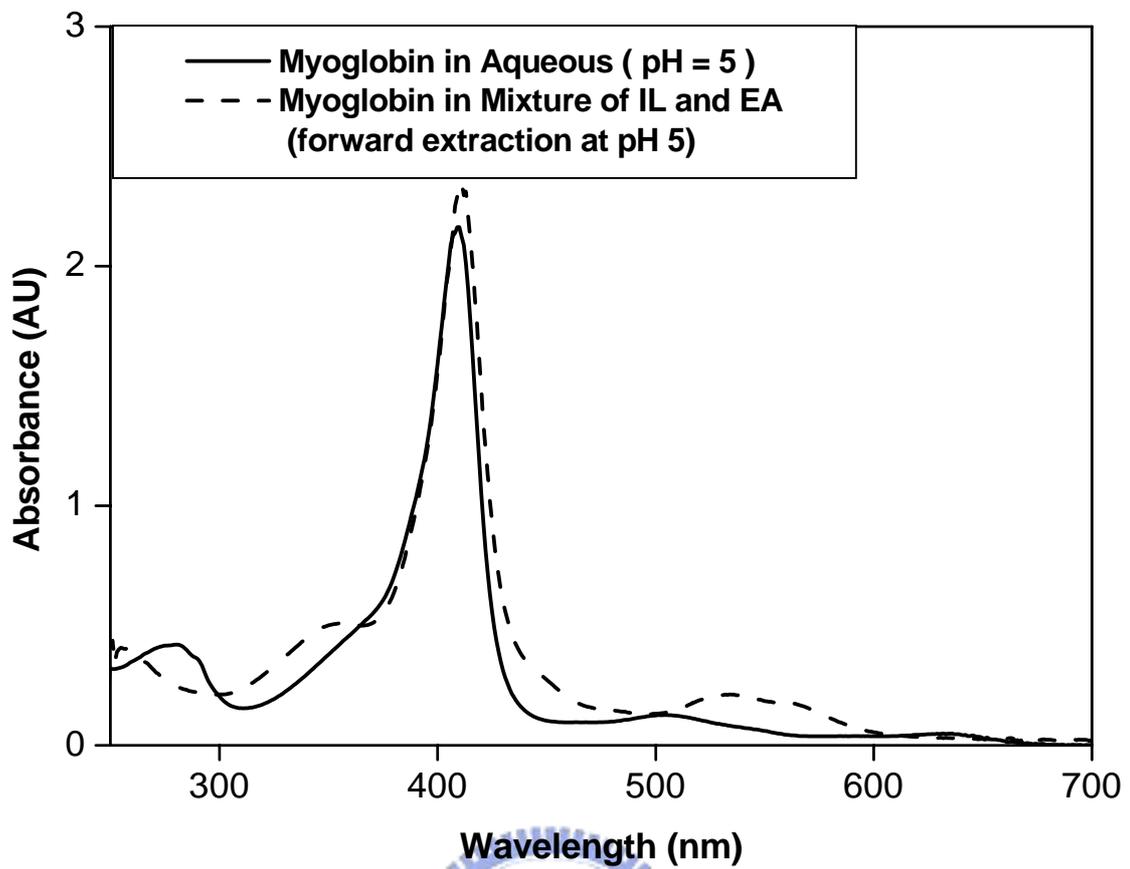


圖十四、pH 值對蛋白質肌紅蛋白正向萃取率的效應

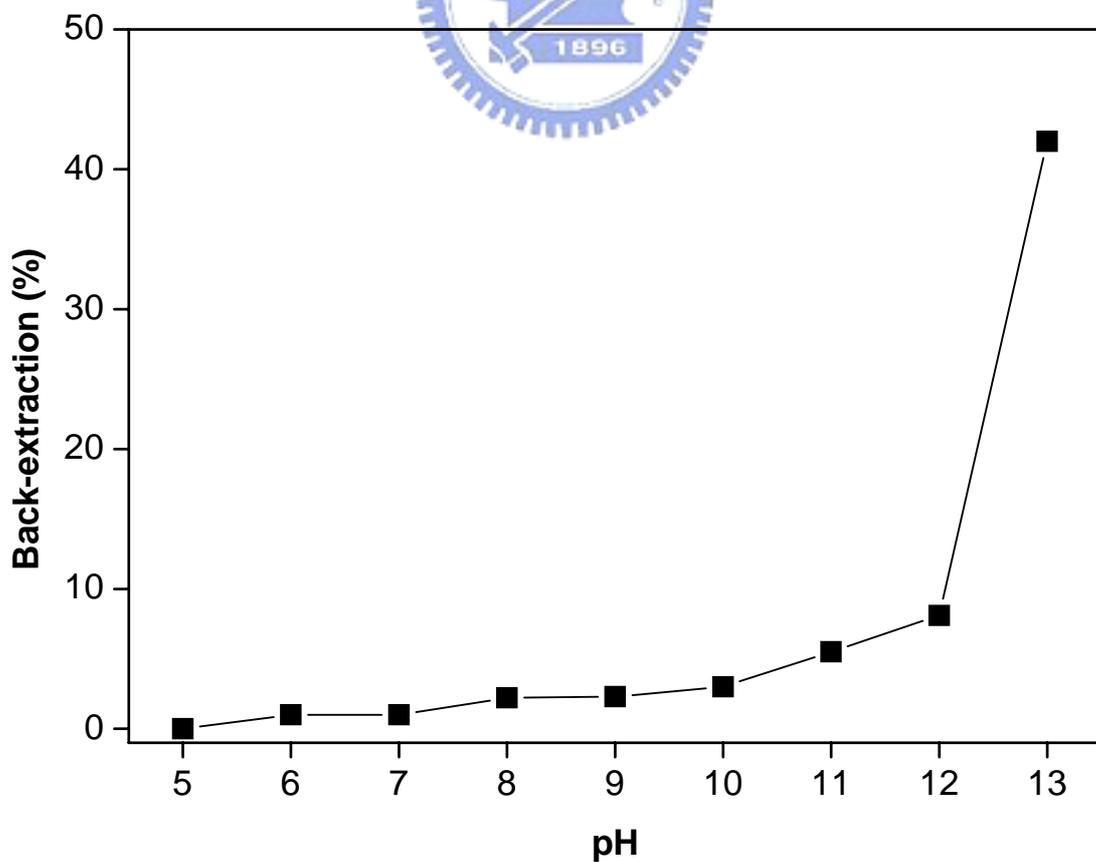


圖十五、蛋白質肌紅蛋白在不同 pH 值水溶液的吸收光譜圖

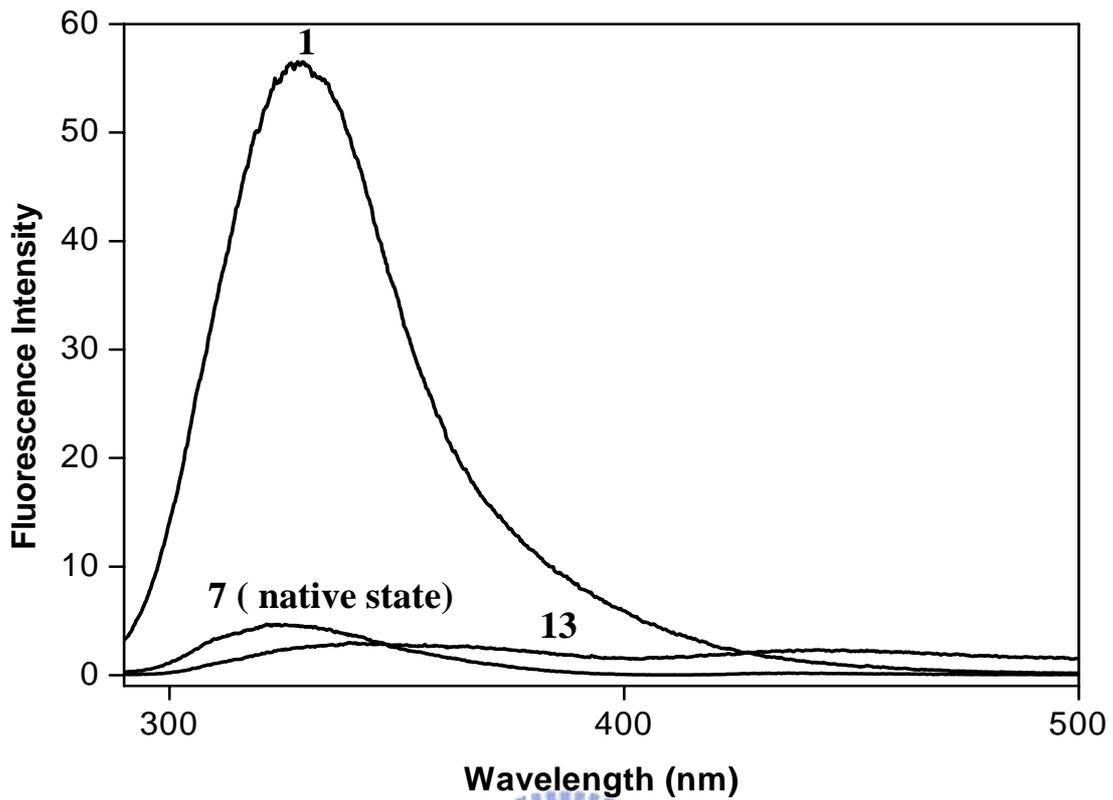
(a) pH 1 (b) pH 2 (c) pH 3 (d) pH 7 (原始態)



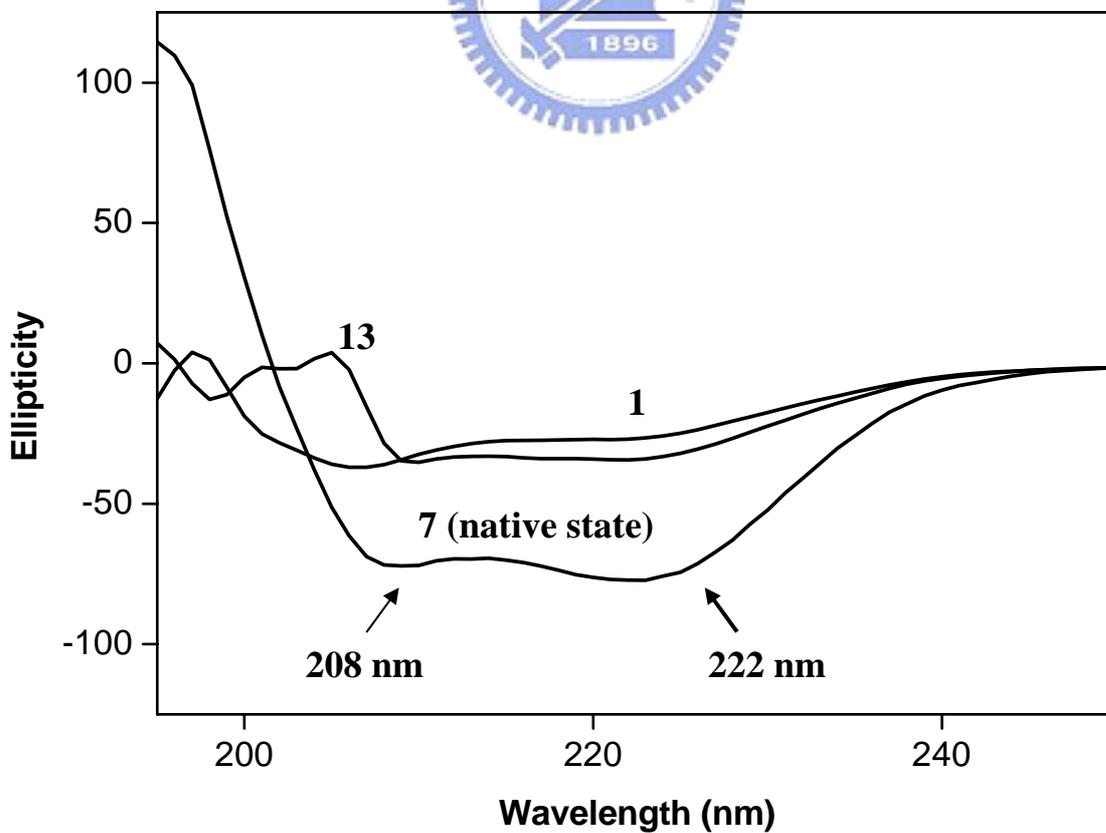
圖十六、蛋白質肌紅蛋白在不同相中的吸收光譜圖



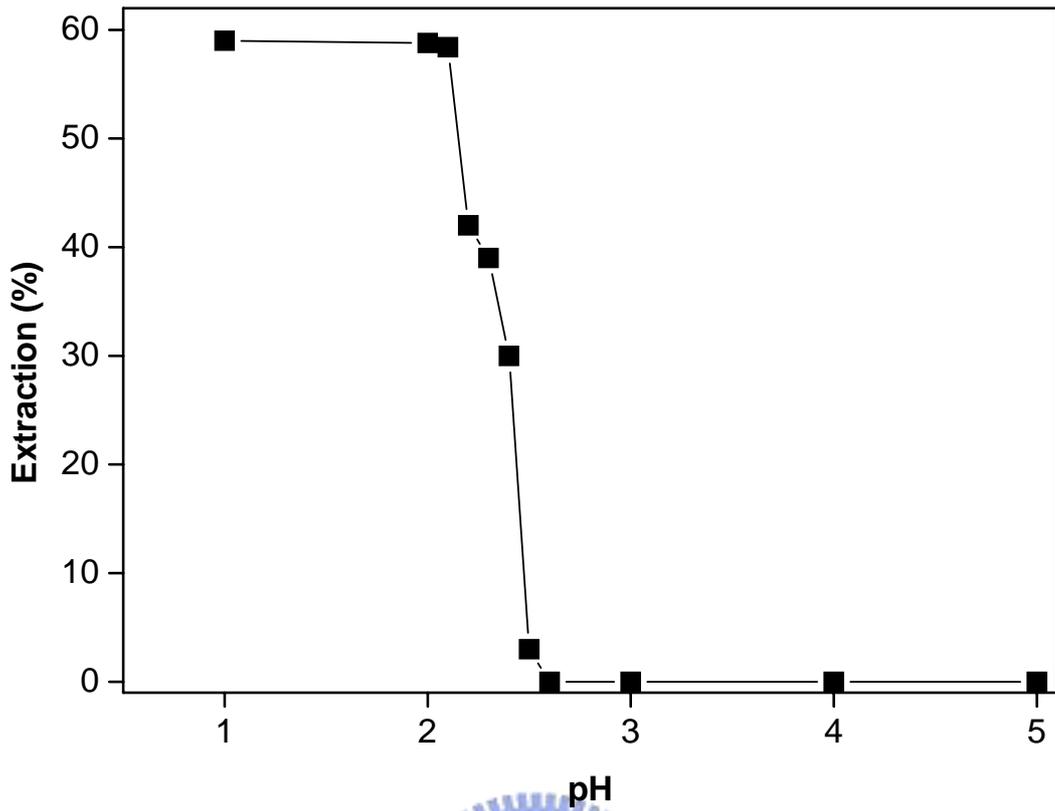
圖十七、pH 值對蛋白質肌紅蛋白反向萃取率的效應



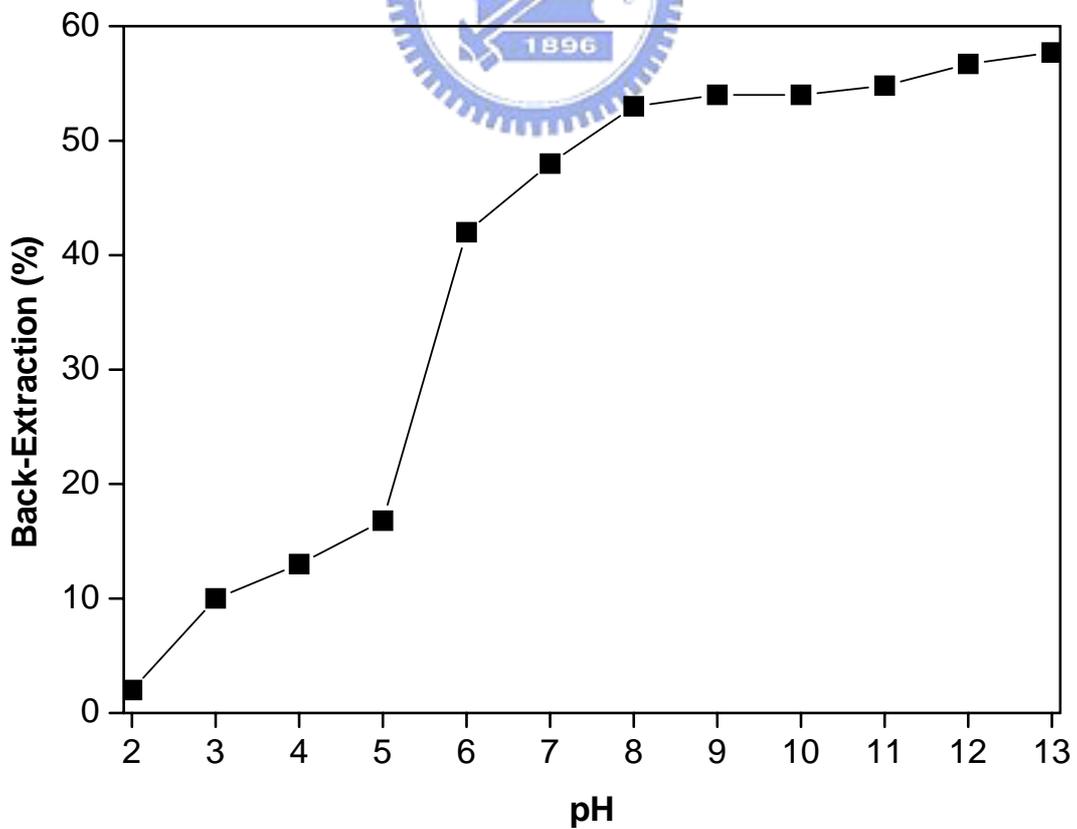
圖十八、蛋白質肌紅蛋白在不同 pH 值水溶液的螢光光譜圖，激發波長: 280 nm



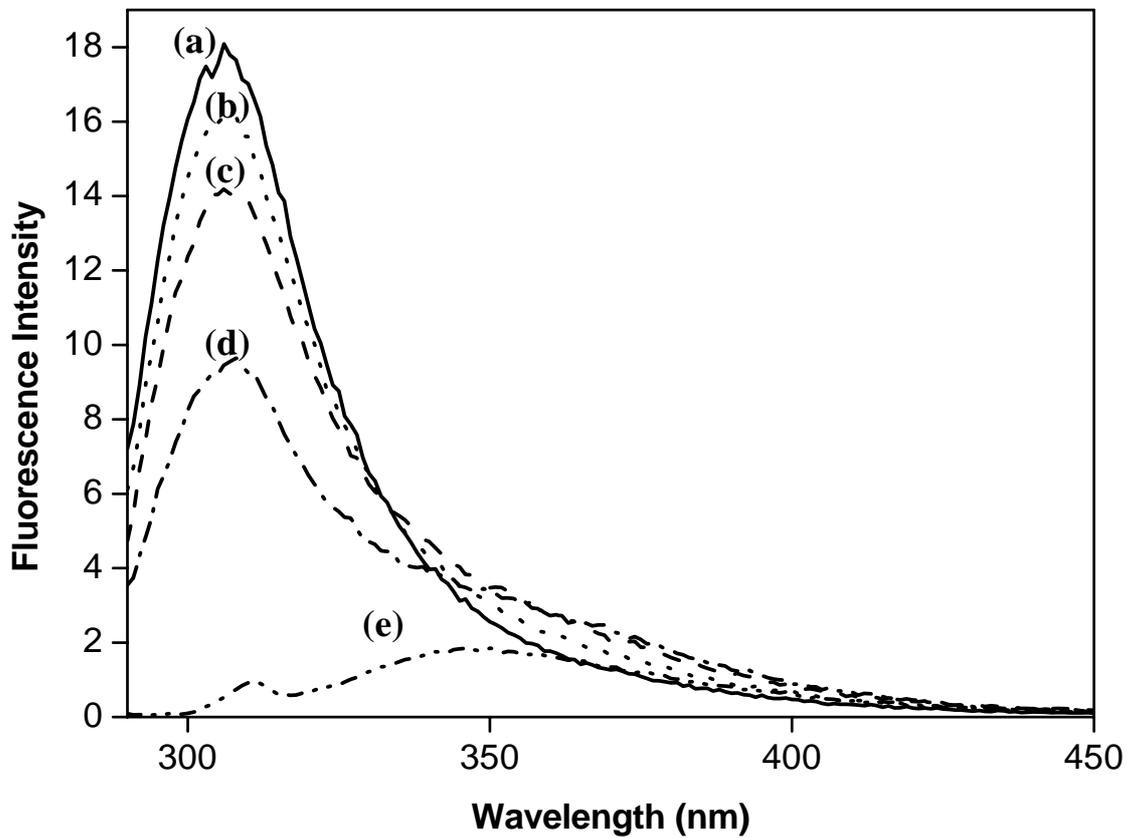
圖十九、蛋白質肌紅蛋白在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖



圖二十、pH 值對蛋白質核糖核酸酶 A 正向萃取率的效應

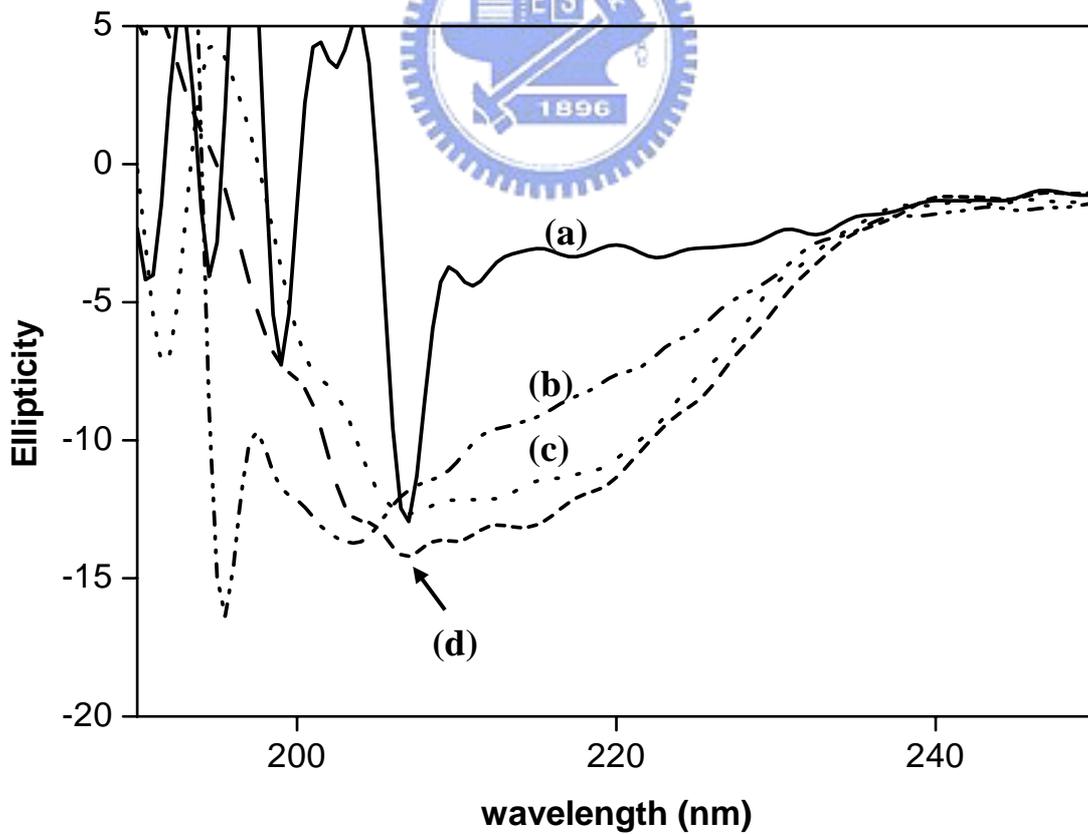


圖二十一、pH 值對蛋白質核糖核酸酶 A 反向萃取率的效應



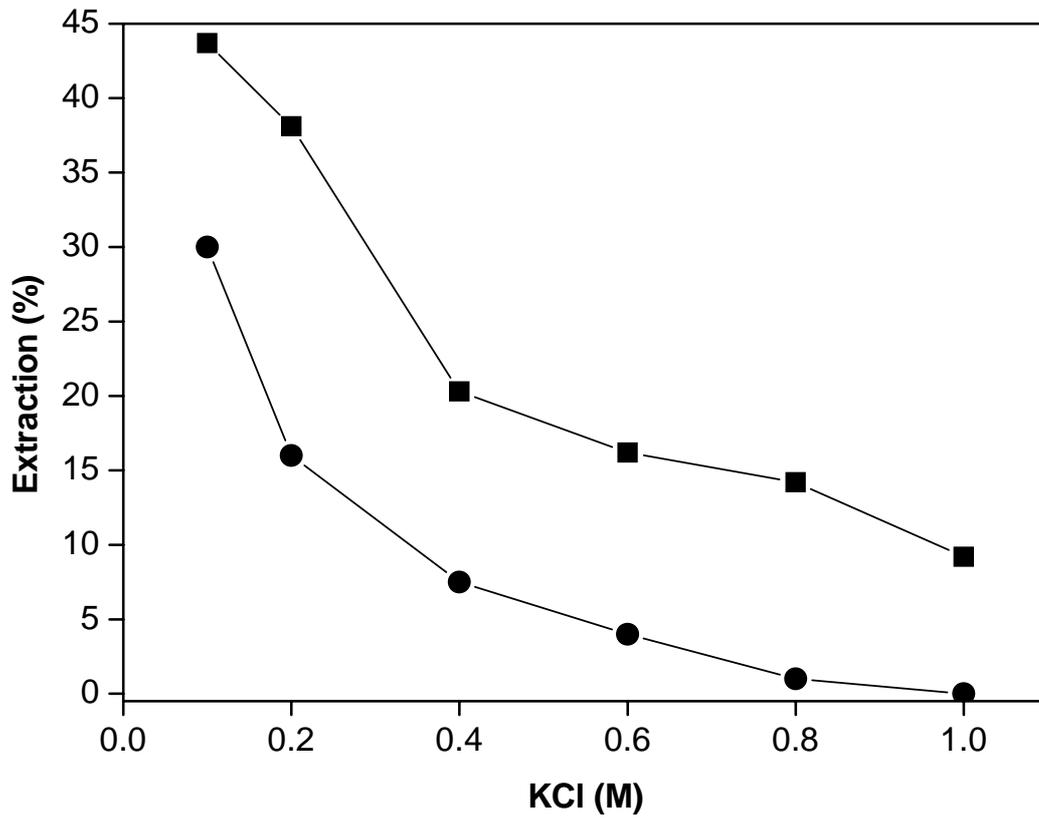
圖二十二、蛋白質核糖核酸酶 A 在不同 pH 值水溶液的螢光光譜，激發波長: 280 nm

(a) pH 1 (b) pH 2 (c) pH 7 (原始態) (d) pH 10 (e) pH 13



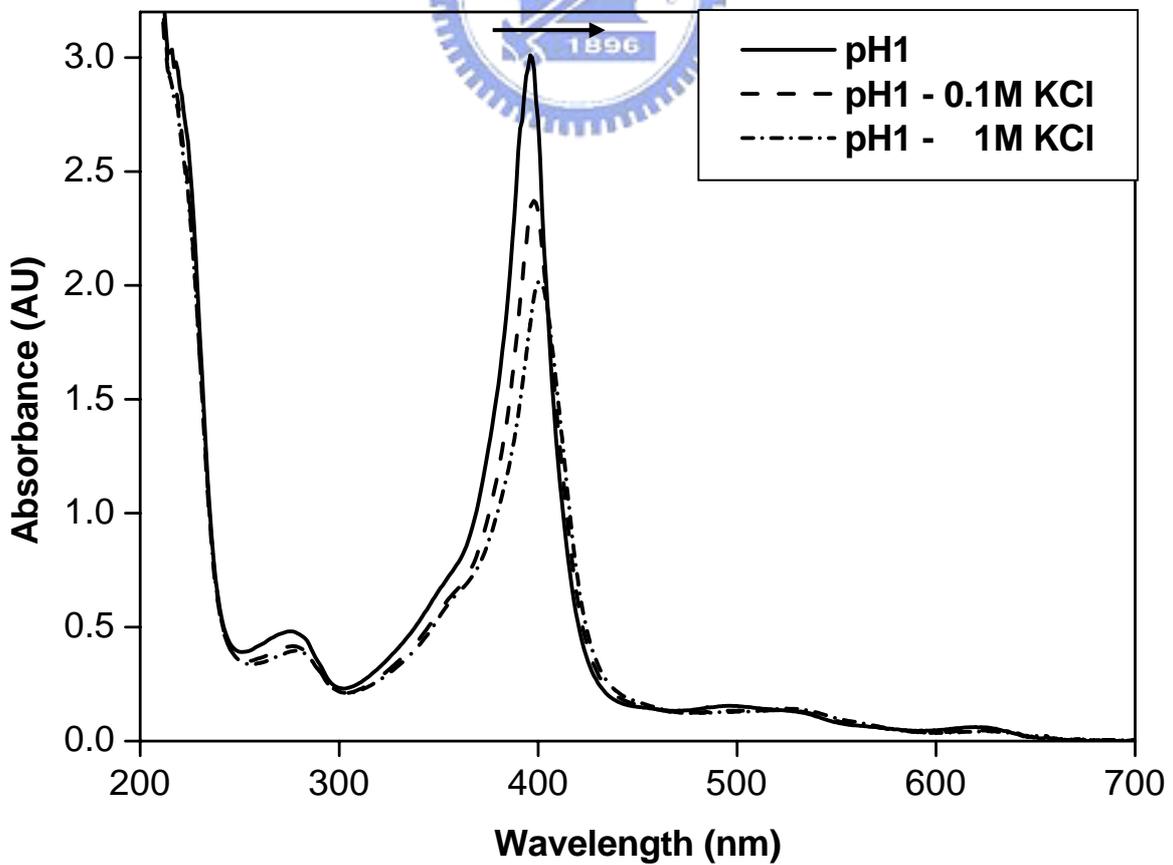
圖二十三、蛋白質核糖核酸酶 A 在不同 pH 值水溶液的 CD 光譜圖

(a) pH 13 (b) pH 1 (c) pH 7 (原始態) (d) pH 10

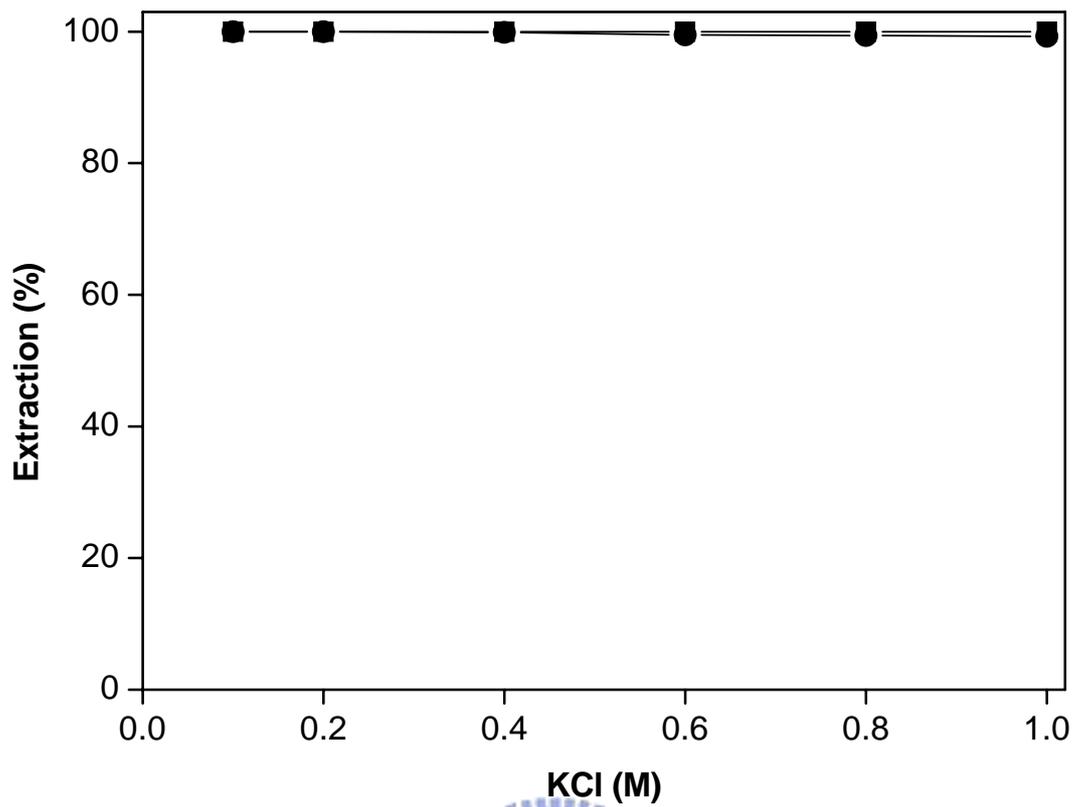


圖二十四、pH 值及 KCl 濃度對蛋白質細胞色素 c 的萃取效應

(■) pH 2.7 (●) pH 1

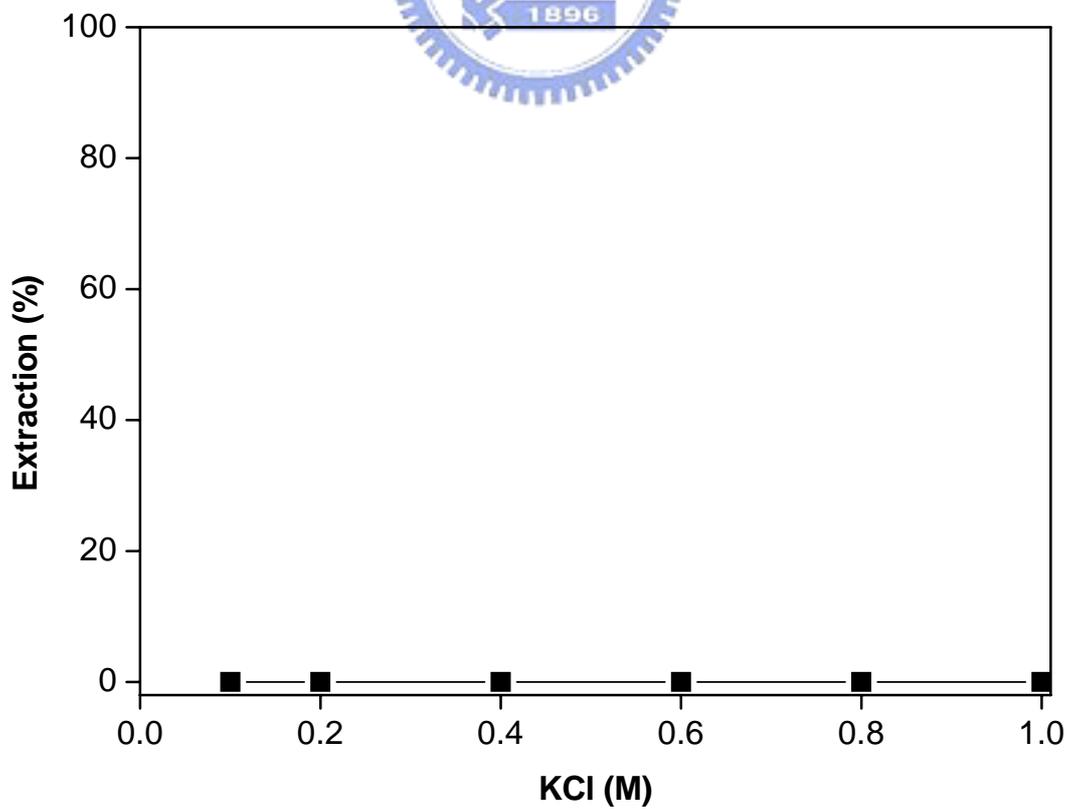


圖二十五、pH 1 時水溶液中不同 KCl 濃度的細胞色素 c 吸收光譜圖

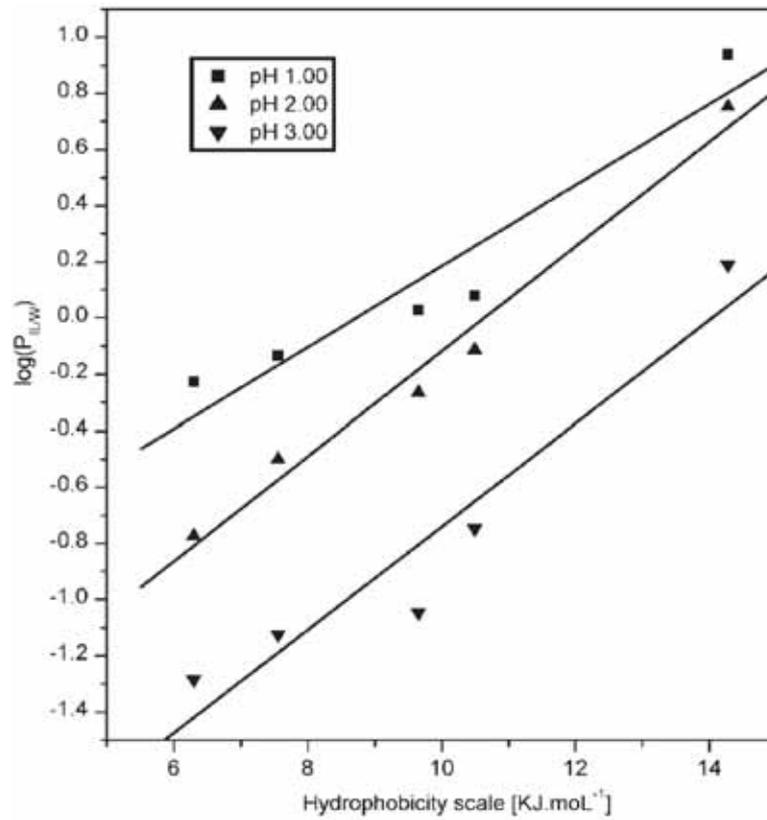


圖二十六、pH 值及 KCl 濃度對蛋白質肌紅蛋白的萃取效應

(■) pH 5 (●) pH 1

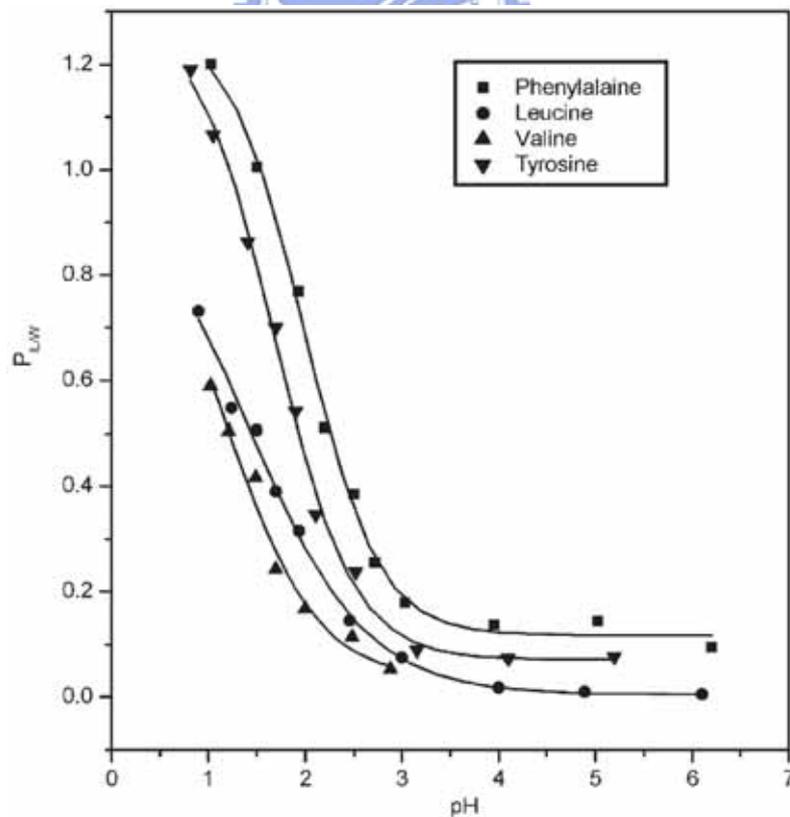


圖二十七、pH 2 時 KCl 濃度對蛋白質核糖核酸酶 A 的萃取效應



圖二十八、不同 pH 值時，胺基酸進入[C<sub>6</sub>mim][BF<sub>4</sub>]的分佈係數

與胺基酸疏水性的關係。資料來源: Green. Chem. 7 (2005) 196.



圖二十九、胺基酸進入[C<sub>6</sub>mim][BF<sub>4</sub>]的分佈係數與 pH 值的關係

資料來源: Green. Chem. 7 (2005) 196.