

# 界面活性劑在逆流層析分離的應用 暨在逆流層析術中溶質分散之研究

學生：沈經緯

指導教授：余艇 博士

國立交通大學應用化學研究所 博士班

## 中文摘要

逆流層析常用的動靜相系統為有機-水相系統，本論文使用界面活性劑分子修飾於動相或是靜相溶劑，應用於逆流層析之分離。本論文的第一部分，是利用含有界面活性劑 sodium 1-heptanesulfonate (SHS) 的正己烷-水相系統，分離類固醇，以正己烷為動相沖提，SHS 的濃度尚未到達臨界微胞濃度以前，類固醇的滯留時間僅微幅增加，反之，在高於臨界微胞濃度之後，類固醇的滯留時間會大幅增加，此外，微胞靜相系統對於極性太低的芳香族化合物無滯留能力，對於酯類也無明顯的滯留效果，微胞對於分離疏水性化合物提供了一種溶劑系統的選擇。

本論文的第二部分，利用界面活性劑 bis(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate 形成反微胞，將含有反微胞的正己烷為逆流層析靜相，分離肌紅蛋白、細胞色素 C 以及溶菌酶，藉由動相中的酸鹼值以及離子強度的梯度變化，能調整蛋白質在水相-微胞相中的分佈，增加分離的解析度，細胞色素 C 的製備回收率約 90%，溶菌酶的回收率約為 82%，利用反微胞靜相製備分離蛋白質，對於蛋白質還有濃縮的

效果，期望可應用於大量的蛋白質製備分離。

本論文的第三部分，是於逆流層析儀中，使用連續萃取法分離銀奈米粒子，銀奈米粒子因表面修飾負電荷，在陽離子界面活性劑 (tetraoctylammonium bromide, TOAB) 的幫助下，由離子對萃取方式，從水中萃取至甲苯/正己烷(1:1)混合溶液，較小的奈米粒子較容易萃取出有機溶液中，我們發現以 0.02 mM TOAB 做為動相萃取，其分離效果最好，原本粒徑分佈為  $15.8 \pm 5.3$  nm 的奈米粒子，經過分離後，可得奈米粒子為  $13.7 \pm 1.9$  nm、 $14.1 \pm 3.5$  nm、 $19.2 \pm 4.3$  nm、 $22.2 \pm 4.9$  nm 分佈的四支收集管，比起批式萃取法，逆流層析連續萃取法可提供較好的分離解析度。

本論文的最後一個部分，則是探討逆流層析儀，轉動螺旋管柱中的流動訊號，藉由觀察一系列分子的流動訊號，包含銀奈米粒子、牛血清蛋白、溶菌酶、抗壞血酸、染料分子、碘化鉀金屬鹽，分析其在轉動螺旋管柱中的運動行為，若樣品的擴散較差，會產生不對稱的波形，稱為 convection peak，再將 CCC 轉速提高，原本不對稱的波形會變成對稱的類高斯波形。我們進一步歸納出，逆流層析轉動之下理論板數的計算方式，可為逆流層析的基本原理以及訊號波形等，提供更詳細的研究資訊。

# Application of surfactants and investigation of effect on solute dispersion in counter-current chromatography

Student: Ching-Wei Shen

Advisor: Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University

## Abstract

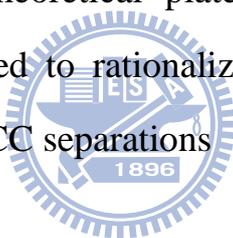
The most commonly used stationary/mobile phase solvent systems in counter-current chromatography (CCC) are organic-water systems. However, we employed surfactant-modified solvent systems in CCC separations. In the first part of this thesis, an *n*-hexane/surfactant-containing water solvent system was developed to separate a steroid sample. Retention times of steroids increased slightly by increasing the sodium 1-heptanesulfonate (SHS) concentration below the critical micellar concentration. However, the retention times increased drastically while the SHS concentrations were above the CMC. Aromatic hydrocarbons were not retained by the stationary phase no matter what the surfactant concentrations were. The retention times of esters, however, were only slightly affected by the surfactant addition even above the CMC. The micellar solvent systems provide an alternative way for hydrophobic sample separations in CCC

In the second part, a protein mixture consisting of myoglobin,

cytochrome *c*, and lysozyme was separated by CCC using a two-phase aqueous/AOT reverse micelle-containing organic solvent system. Separations were manipulated mainly by pH gradients and incorporating an ionic strength gradient along with the pH gradient. The recovery of cytochrome *c* and lysozyme reached 90% and 82%. Furthermore, concentration or enrichment of these two proteins was achieved from a large-volume sample load. This technique can potentially be employed in the recovery and enrichment of proteins from large-volume aqueous solutions.

In the third part, size separation of silver nanoparticles was investigated in CCC based on a continuous extraction process. The aqueous nanoparticles were readily transferred to the organic phase (toluene/hexane = 1:1, v/v) together with the phase transfer catalyst, tetraoctylammonium bromide (TOAB), owing to the ion-pair adduct formation between silver nanoparticle anions and tetraoctylammonium cations. Smaller nanoparticles were found to be more readily transferred to the organic phase compared to larger nanoparticles. It appeared that a concentration of 0.02 mM TOAB was adequate to achieve optimum separation and recovery for the aqueous Ag nanoparticle sample. Samples of  $15.8 \pm 5.3$  nm were separated; the distributions of four fractions collected were  $13.7 \pm 1.9$ ,  $14.1 \pm 3.5$ ,  $19.2 \pm 4.3$ , and  $22.2 \pm 4.9$  nm. Compared with the stepwise extraction performed in this study, the step-gradient extractions using CCC provided much better size discrimination.

In the last part of this thesis, the dispersion behavior of solutes was investigated in a rotating flowing coiled tube. Silver nanoparticles, bovine serum albumin, lysozyme, ascorbic acid, tartrazine, and potassium iodide samples were eluted in a coiled tube of counter-current chromatography (CCC) apparatus with a single phase. Apparent convection peaks of low-diffusivity solutes appeared in the static CCC tube, while Gaussian-like peaks showed up for the high-diffusivity solutes. When the rotation speed of the CCC apparatus was elevated, all solute peak widths became smaller, and the convection peaks of silver nanoparticles and BSA were minimized and formed Gaussian-like peaks. We studied the effect of rotating to the theoretical plate of the signals. The same reasoning could also be used to rationalize other special band shapes encountered in two-phase CCC separations



## 謝誌

當獲悉論文通過的一剎那，心裡悸動的感覺比所有投稿期刊被接受時的總和還來得強烈許多，首先感謝余艇老師的悉心教導，在觀念上、研究的方向以及架構的匡正，使本論文中一系列的研究得以順利發展，同時感謝口試委員陳月枝老師這多年來的意見，直到最終的論文審查，無機領域的翹楚陳登銘老師、分析領域何佳安老師對於本論文內容以及題目的評註、以及白書禎老師獨到的研究觀念及表達方式的見解，使得本論文更臻完備，在此深感謝忱。

在博士班期間的生活點滴，與實驗室裡的成員印從、琬茹一同討論研究方向，解決所遭遇的困難，如何才能有效地提升經驗值等等，寫論文期間時常帶來歡樂的典祐、伶宜、阿國，還有活潑的秀佩、雅容咕噥組，願你(妳)們都能在所屬的研究領域以及未來生活中，實驗順利、披荊斬棘、之後如願地拿到學位且有更好的發展，也希望實驗室淑慧學姐能找到理想的工作，另外謝謝亞玄、振泰夫婦、威佑等前輩(哈哈)的鼓勵以及對於實驗上的心得交流。

感謝親愛的家人及女朋友，其無怨無悔的關懷與照顧，使我可專注於課業上，在背後的支持無疑是最大的動力。

最後，這多年來的最大收穫並不是學位，而是整個研究過程，以及對人的態度、對事情的處理方式，這幾年共同在交通大學的生活，如同一個爐子中的化學連鎖反應，我們大家都是參與反應的重要元素，經過高壓火熱後產生了許多歡笑、分享成就、克服挫折、結晶成果。謝謝你們！

沈經緯

2009年8月於新竹

## 目錄

中文摘要 .....	i
Abstract .....	iii
圖目錄 .....	xi
表目錄 .....	xii
第一章、緒論 .....	1
1-1 前言 .....	1
1-2 研究背景與文獻回顧 .....	2
1-2-1 逆流層析儀 .....	2
1-2-1-1 逆流層析的運作原理 .....	3
1-2-1-2 逆流層析管柱內的動靜相分佈 .....	5
1-2-2 逆流層析之動靜相系統 .....	7
1-2-2-1 有機-水相系統 .....	7
1-2-2-3 含有修飾劑的兩相系統 .....	7
1-3 論文目標 .....	9
第二章、以微胞做為逆流層析之靜相，分離類固醇化合物 .....	10
2-1 前言 .....	10
2-2 研究理論與背景介紹 .....	11
2-2-1 界面活性劑及微胞 .....	11
2-3 實驗 .....	14
2-3-1 實驗藥品 .....	14
2-3-2 實驗儀器 .....	16
2-3-3 實驗步驟與流程 .....	17
2-4 結果與討論 .....	18
2-4-1 類固醇之紫外/可見光譜 .....	18
2-4-2 類固醇之分離結果 .....	19
2-4-3 芳香族化合物之分離結果 .....	22
2-4-4 酯類化合物之分離結果 .....	23

2-5 結論.....	24
第三章、發展以反微胞做為逆流層析之靜相，應用於分離蛋白質.....	26
3-1 前言.....	26
3-2 研究理論與背景介紹.....	27
3-2-1 反微胞與反微胞萃取法.....	27
3-2-2 反微胞萃取蛋白質.....	28
3-3 實驗.....	31
3-3-1 實驗藥品與材料.....	31
3-3-2 實驗儀器.....	33
3-3-3 實驗步驟與方法.....	34
3-3-3-1 CCC 分離蛋白質操作步驟.....	34
3-3-3-2 HPLC 分析收集液實驗步驟.....	35
3-4 結果與討論.....	37
3-4-1 以 HPLC 分析及定量蛋白質.....	37
3-4-2 以 pH 梯度流析對分離效果的影響.....	38
3-4-3 以 pH 結合鹽類濃度流析對分離效果的影響.....	42
3-4-4 利用 CCC 濃縮以及分離蛋白質.....	44
3-5 結論.....	47
第四章、利用離子對萃取法，以逆流層析分離銀奈米粒子.....	48
4-1 前言.....	48
4-2 研究理論與背景介紹.....	48
4-2-1 以界面活性劑萃取法分離奈米物質.....	48
4-2-1-1 萃取金奈米粒子(Au-MSA).....	49
4-2-1-2 萃取銀奈米粒子(Ag-MSA).....	50
4-2-1-3 萃取奈米碳管.....	51
4-3 實驗.....	53
4-3-1 實驗藥品與材料.....	53
4-3-2 實驗儀器.....	54

4-3-3 實驗步驟與方法 .....	56
4-3-3-1 奈米粒子的合成方法 .....	56
4-3-3-2 配製不同酸鹼值下的緩衝溶液 .....	56
4-3-3-3 使用不同溶劑以及界面活性劑萃取奈米粒子 .....	57
4-3-3-4 奈米粒子的分析方法 .....	57
4-3-3-5 以 CCC 分離奈米粒子 .....	58
4-3-3-6 以批式萃取法分離奈米粒子 .....	58
4-4 結果與討論 .....	59
4-4-1 合成的奈米粒子之性質 .....	59
4-4-1-1 紫外可見光光譜 .....	59
4-4-1-2 紅外光光譜 .....	60
4-4-1-3 電子顯微鏡以及 EDX 光譜資訊 .....	60
4-4-2 溶劑與界面活性劑的選擇結果 .....	64
4-4-2-1 不添加界面活性劑的分佈情形 .....	64
4-4-2-2 溶劑以及界面活性劑對萃取效果的影響 .....	64
4-4-2-3 CCC 分離奈米粒子 .....	66
4-4-3 最佳萃取效果與分離效率的討論 .....	70
4-5 結論 .....	72
第五章、逆流層析儀中流動訊號之分析 .....	73
5-2 研究理論與背景 .....	74
5-2-1 樣品在螺旋空管柱中的流動行為 .....	74
5-2-1-1 利用逆流層析儀，在單一液相中分離微米級物質 .....	74
5-2-1-2 奈米粒子在空管中的流動訊號 .....	77
5-3 實驗 .....	84
5-3-1 實驗藥品 .....	84
5-3-2 實驗儀器 .....	84
5-3-3 實驗步驟與方法 .....	86
5-3-3-1 奈米粒子的合成方法 .....	86
5-3-3-2 樣品的配置方法 .....	86
5-3-3-3 逆流層析儀操作步驟 .....	86
5-4 結果與討論 .....	87
5-4-1 樣品在靜止螺旋管柱中的流動行為 .....	87

5-4-1-1 固定流速下的波形討論.....	88
5-4-1-2 改變流速下的波形討論.....	90
5-4-2 樣品在轉動螺旋管柱中的流動行為.....	91
5-4-3 與逆流層析研究文獻的討論.....	97
5-4-3-1 樣品在轉動螺旋管柱內的混合程度.....	97
5-4-3-2 CCC 管徑大小對於分離效果的影響.....	97
5-4-3-3 樣品以及溶劑對於 CCC 層析圖的影響.....	99
5-4-3-4 對於 elution-extrusion CCC 流析方式的討論.....	102
5-5 結論.....	104
第六章、總結.....	105
參考文獻.....	107
期刊論文.....	114



## 圖目錄

圖 1-1 (A)抽取河水的螺旋裝置示意圖；(B)螺旋管柱裝置模型.....	4
圖 1-2 逆流層析的旋轉機構。.....	4
圖 1-3 逆流層析的混合在管柱內的分佈情形.....	6
圖 2-1 由三個環己烷加上一個環戊烷所組成的類固醇基本骨架.....	11
圖 2-2 界面活性劑濃度和溶液的物理性質.....	13
圖 2-3 微胞的結構種類.....	14
圖 2-4、類固醇的紫外/可見光光譜圖.....	18
圖 2-5 以正己烷-SHS 水溶液為溶劑系統，分離三種類固醇的層析圖譜。.....	21
圖 2-6 三種類固醇的 RETENTION FACTOR 與靜相中 SHS 的濃度關係圖。.....	22
圖 2-7 以 CCC 分離四種酯類的層析圖.....	24
圖 3-1 微胞與反微胞環境示意圖.....	28
圖 3-2 CCC 實驗裝置圖.....	36
圖 3-3 HPLC 實驗裝置圖.....	36
圖 3-4 HPLC 分析蛋白質層析圖.....	37
圖 3-5 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 I.....	40
圖 3-6 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 II.....	41
圖 3-7 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 III.....	43
圖 3-8 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 IV.....	46
圖 4-1 利用 CTAB 萃取銀奈米粒子的粒徑分佈圖.....	51
圖 4-2 SWNTs 的平均長度與 TOAB 濃度的關係圖.....	53
圖 4-3 銀奈米粒子在不同酸鹼值下的紫外/可見光吸收光譜.....	61
圖 4-4 銀奈米粒子的紫外/可見光吸收光譜.....	62
圖 4-5 (A) MUA 分子和(B) 銀奈米粒子的紅外光光譜圖.....	62
圖 4-6 銀奈米粒子的(A)粒徑分佈圖，(B)銀奈米粒子的 EDX 光譜。.....	63
圖 4-7 CCC 分離奈米粒子訊號圖.....	69
圖 4-8 收集管中的紫外/可見光譜.....	71
圖 4-9 CCC 分離及批式萃取法，分離效果的比較。.....	71
圖 5-1 場流分離法示意圖.....	76
圖 5-2 以 CTFFF 分離矽砂粒子的流析圖譜.....	76
圖 5-3 WIDE-BORE HYDRODYNAMIC CHROMATOGRAPHY 實驗裝置圖.....	81
圖 5-4 硫化鎘奈米粒子在 SEC(左圖)以及 WDC(右圖)中的流析訊號圖.....	81
圖 5-5 在 HDC 圖譜中，R 值與奈米粒子的尺寸關係圖.....	82
圖 5-6 以電腦模擬不同 T 值之下，樣品波形的變化。.....	82
圖 5-7 聚苯乙烯奈米粒子的流動訊號圖。.....	83
圖 5-8 在靜止螺旋管柱中的流動訊號.....	89

圖 5-9 在靜止螺旋管柱中，不同動相流速下樣品的波形變化.....	91
圖 5-10 AG-MUA(實線)以及 TARTRAZINE(虛線)的流動訊號.....	94
圖 5-11 變異係數的倒數與五種分子的擴散係數關係圖.....	94
圖 5-12 流析圖譜以及 $C_R$ 值與轉速的關係圖.....	96
圖 5-13 利用不同管徑大小的 CCC，分離咖啡因和香草精的層析圖.....	99
圖 5-14 以 BAW 溶劑系統分離胜肽的 CCC 層析圖.....	101
圖 5-15 利用雙水相系統分離蛋白質的 CCC 層析圖.....	101
圖 5-16 EECCC 分離步驟示意圖.....	103

## 表目錄

表 2-1 (A)界面活性劑依電荷分類 (B)界面活性劑親水端基團.....	12
表 4-1 界面活性劑在溶劑下對銀奈米粒子的萃取效果.....	66
表 5-1 碘化物、微胞、以及聚苯乙烯粒子的擴散係數.....	83
表 5-2 Ag-MUA 以及 TARTRAZINE 在不同流速以及轉速下的流動訊號分析結果.....	95



## 第一章、緒論

### 1-1 前言

逆流層析(counter-current chromatography, CCC)最初是由任職於美國衛生研究院 (National Institutes of Health)的 Ito 博士在 1960 年代末期所發明的分離法，它是一種不使用固體支撐靜相(support-free liquid stationary phase)的液相-液相分離技術，有別於一般的高效能液相層析(high performance liquid chromatography ,HPLC)管柱，在 HPLC 靜相填充的步驟中，先將有機分子包覆在矽膠粒子(silica gel)的表面，再將這些矽膠粒子以高壓填入(packing) HPLC 管柱中，因此管柱中的體積有一部分是這些不具分離效果的矽膠粒子所佔據，真正有分離能力的是矽膠粒子表面的靜相分子，因為如此，這些靜相分子的數量不多，通常小於管柱總體積的 10%。且由於以高壓填充 HPLC 管柱，使得填充粒子之間緊密排列，因此 HPLC 的管柱壓力較高，操作壓力往往高達  $100 \text{ kg/cm}^2$  以上。反觀 CCC 是中空的管柱，不使用固體靜相填充的緣故，CCC 內部的靜相佔總管柱體積的比例往往可達 50% 以上，因為 CCC 的管柱中含有大量的靜相，CCC 比起典型的 HPLC 更適合用來分離大量的樣品，加上 CCC 沒有高壓填充固體支撐物，管柱的直徑也比較大，在高流速的情形中不會造成太高的背景壓力，其操作壓力通常小於  $21 \text{ kg/cm}^2$ ，因此 CCC 的管柱長度可以容易地放大，一般 CCC 的管柱長約數十公尺，管柱總體積可達數百毫升，經過管柱加長後的 CCC 管柱，在分離的過程中也不會造成過高的壓力，而且增長管柱除了可以增加分析物的製備量之外，還可以增加分離的解析度，因為分離的解析度與管柱長度的平方根成正比。

因為分離樣品量較大，CCC 目前被定位在製備型的層析儀器，已被廣泛使用在中草藥的分離，能製備大量的中草藥標準品，對於醫學

研究，藥物開發、以及科學中藥的法令制定有相當大的幫助，除了中草藥的製備分離之外，逆流層析也可應用於食品分析、金屬離子以及生物小分子的分離製備上。但是在對於一些親水性大分子的分離，像是蛋白質、親水性的奈米粒子等，因為這些物質極為親水，幾乎不溶於有機相，無法在 CCC 管柱中使用傳統的有機相-水相溶劑系統分離，需要尋找更合適的動、靜相組成才能產生有效的分離，所以本研究的目的是尋找新的溶劑系統，前半段是以界面活性劑為修飾劑，發展成為逆流層析中的動靜相系統。

近年來奈米材料的研究備受重視，在材料的分離方面，利用層析法發展出許多奈米物質的分離技術，但逆流層析儀目前尚未應用在奈米物質的製備分離上，因此本研究成果的後半部分，是關於逆流層析儀分離奈米粒子的研究。此外，我們在研究奈米粒子流動的過程中，發現粒子在空管柱內的流動訊號與一般的物質的高斯波形差異極大。因此，本研究成果中，我們也將探討一系列的分子樣品在 CCC 旋轉機制之下的流動行為。

## 1-2 研究背景與文獻回顧

### 1-2-1 逆流層析儀

早期的逆流層析技術為一種不連續式，由一連串的分液漏斗所組成的液相萃取技術，我們稱此分離原理為逆流分佈(Countercurrent Distribution, CCD)<sup>1, 2</sup>，但因為它操作耗時且儀器複雜龐大，加上容易損壞，Ito 等人對於 CCD 的理論基礎開始深入研究進而發展出離心系統，即離心式行星螺管結構的儀器 (Coil Planet Centrifugal, CPC)。之後 Ito 和 Conway 等人進而發展出多種不同的旋轉結構。在 1980 年代發展出 J 型逆流層析 (J-type Countercurrent Chromatography，

CCC)即是最常見的逆流層析儀之一。

### 1-2-1-1 逆流層析的運作原理

首先我們要介紹一種使靜相液體得以滯留在螺旋管柱中的作用力，這作用力是由希臘數學家阿基米德發現，稱為阿基米德扭力 (Archimedes screw force)，他製作可轉動的螺旋中空管，藉由此作用力將河水取至水壩(圖 1-1)。Ito 將阿基米德扭力的原理應用在 CCC，逆流層析設計原理如圖 1-2 所示，中心軸呈水平方向，一螺管支持物支撐一行星齒輪 (planetary gear)，其和固定在中心軸上的太陽齒輪 (sun gear) 相互咬合。其運動模式為螺管支持物不僅繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉。

若螺旋管柱內存在有輕重兩相，受阿基米德扭力以及重力的作用之下，輕重兩相因為受力不均而在管柱中有不同的分佈，當管柱受阿基米德扭力所影響後，管柱內部較輕的一相會偏向往頭端(head)移動，而較重的一相會傾向往尾端(tail)移動，所以旋轉的 CCC 好比是一個無形的幫浦，在 CCC 內部將較輕的溶液移向頭端，這時如果我們將較重的另一溶液，以機械式幫浦將動相從 CCC 外部的頭端打入，我們所注入的較重的溶液(head-to-tail)會在管柱中，與 CCC 內部較輕的溶液(tail-to-head)遭遇，動靜相在管柱內部變成流動方向相反的兩液體，所以稱為逆向流體(counter-current)。利用此原理可以將較輕的一相滯留在管柱內部，也就是我們這裡的靜相，而從 CCC 外部所打入較重的液體稱之為動相，藉由靜相的滯留與樣品在動靜相之間的分配層析法，稱之為逆流層析(counter-current chromatography)。因為逆流層析中的兩相都是液體，動靜兩相是可以互換的，當我們欲利用較重的作為動相時，其流析方式為頭端往尾端 (head-to-tail)，反之如果

利用較輕的一相作為動相時，流析方式則需更改為尾端往頭端 (tail-to-head)，取決於當時的實驗需求。

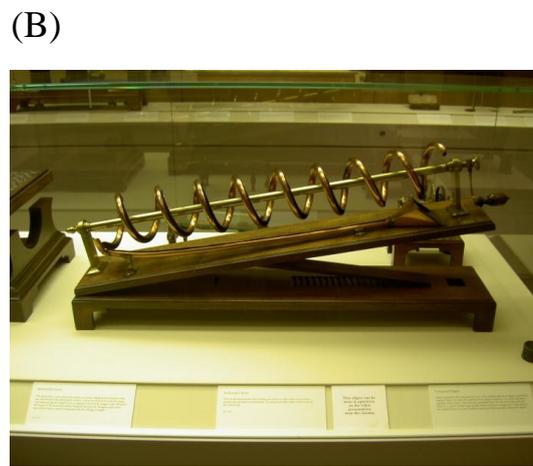


圖 1-1 (A)抽取河水的螺旋裝置示意圖；(B)螺旋管柱裝置模型

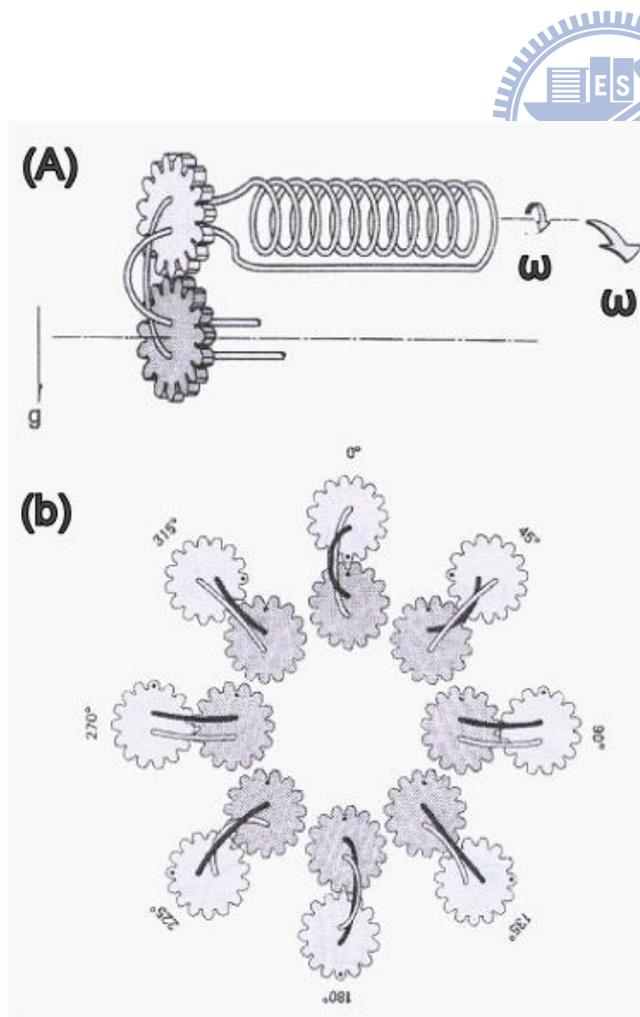


圖 1-2 逆流層析的旋轉機構。

(A)螺管固定物不僅以角速度 $\omega$ 繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉

(B)螺管支持物的同步行星運動，可防止流體導入管與導出管扭轉  
(本圖<sup>3</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A*, 2005)

### 1-2-1-2 逆流層析管柱內的動靜相分佈

如果先將較輕的一相（靜相）填滿 CCC 管柱，接著旋轉 CCC，再打入較重的液體（動相），待兩相達動力平衡後，由頻閃觀測儀可看到管柱內的相分佈情形<sup>3,4</sup>，如圖 1-3 所示。在 M 位置因靠近離心力中心區域，離心力較小，阿基米得扭力帶動兩相使得動靜相劇烈混合，這個區域稱為混合區（mixing zone）；而在 S 位置管柱外側因離心力較大，可蓋過阿基米得扭力使得動靜相之間可存在明顯的界面，較輕的一相在內，較重者在外，稱為澄清區（settling zone）。隨著管柱不斷地公轉與自轉，無論管柱旋轉到任何一個位置，兩相在轉動過程中都持續地產生混合區與澄清區。

在逆流層析中，液體靜相在管柱中滯留的多寡影響了分離的效果。靜相滯留量越高，分離效果越好<sup>3</sup>，在高靜相滯留量下可提高分離的解析度以及對樣品的承載量。影響靜相滯留量及分離的因素可分為下列幾點<sup>5</sup>：



#### (1) 儀器轉速

在較大的轉速下，旋轉所產生的阿基米德扭力較大，靜相較容易滯留在管柱中，且因為轉動速度大，可以提供較大的離心力，因此還可以加速動相與靜相的分層，這兩結果均可提供較高的靜相滯留量，在有關於逆流層析分離效果的研究中，也可以得到靜相滯留量若越大，分離得解析度也較佳，所以在 HSCCC 機械結構可以承受的轉速之下，轉動速度越快，分離效果越好。

#### (2) 動相流速

當動相流速越快時，越容易將靜相推出管柱，因此靜相的滯留量會比較少，分離效果會較差。反之較慢的動相流速，會有較佳的靜相滯留量，可以提高分離解析度，但相對地分離時間會變長。

### (3) 自轉及公轉的半徑比值

除了螺管在不同轉速下會影響兩溶劑的相分佈，因為 HSCCC 管柱會繞著主軸公轉，且管柱本體也以同角速度自轉，離心力與轉速以及旋轉半徑有關，所以公轉與自轉半徑的大小也需考慮，HSCCC 螺管半徑 ( $r$ ) 與公轉半徑 ( $R$ ) 的比值可當作描述儀器的一種參數<sup>6</sup>，這比值稱為  $\beta$  值 ( $\beta = r/R$ )，較大的  $\beta$  值可提供較大的離心力，對於靜相滯留量較佳， $\beta$  值是影響 HSCCC 內部動靜相分佈的重要因素，因此描述一台 CCC 儀器的時候，通常會將  $\beta$  值標出，以便說明此 CCC 的儀器特性。

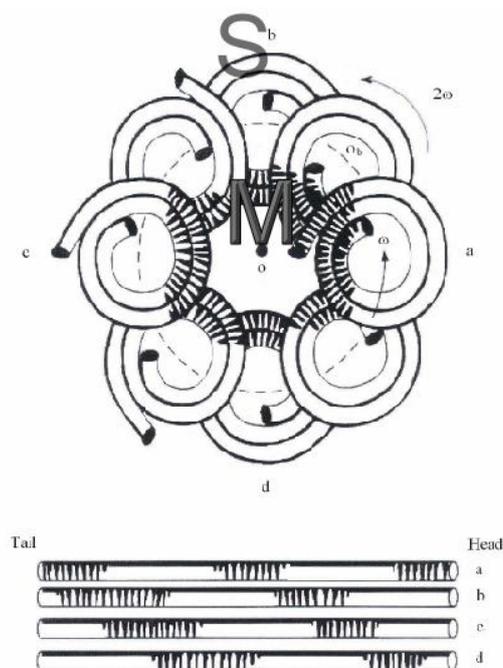


圖 1-3 逆流層析的混合在管柱內的分佈情形

灰色線條表示較重的一相，白色表示較輕的一相，在 S 區兩相分層而澄清，在 M 區兩相彼此混合而混濁，無論 CCC 轉動到 a、b、c、d 何處，S 區與 M 區都不斷地產生。(本圖<sup>3</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A*, 2005)

## 1-2-2 逆流層析之動靜相系統

### 1-2-2-1 有機-水相系統

在逆流層析中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意：(1) 樣品不會被分解和去活性 (2) 樣品有充分的溶解度 (3) 適當的分配係數 (4) 良好的靜相滯留量。

大部分 CCC 使用的溶劑系統中均含有水，再配合其他極性不同的有機溶劑，將水及有機溶劑以恰當的體積比混合後，形成上下分層的兩相，分別取其做為動相與靜相。溶劑的成分要視其分離條件而決定。以有機-水相分成上下兩層，分別當作逆流層析的動靜相系統，除了少部份研究僅利用兩種溶劑混合，例如正丁醇-水<sup>7</sup>，大多數的動靜相系統是採用三種或是四種成分混合而成，使上下兩相的極性能有比較彈性的調整空間，例如正己烷-乙酸乙酯-水<sup>8</sup>作為溶劑系統，分離黃酮類化合物，另外也有以四種溶劑所組成的系統<sup>9</sup>，HEMW 系統就是其中一例，HEMW 這名稱是由四種溶劑的第一個字母組成：分別是正己烷(hexane)- 乙酸乙酯(ethyl acetate) - 甲醇(methanol)- 水(water)，利用 HEMW 系統分離天然物，可依照四種溶劑的組成比例，達到不同極性大小的動靜相系統，因此研究系統化的溶劑比例，可以提供較寬廣的極性範圍，分離中低極性的化合物，逆流層析研究中最常採用且應用最廣的，就是以極性大小分離的有機-水相系統。

### 1-2-2-3 含有修飾劑的兩相系統

如上所述，最常採用的 CCC 動靜相系統是有機-水相系統，有機-水相系統是依靠分析物極性的差異性，不同極性的分析物在動靜兩相中會產生不同的分佈來進行分離，但是針對某些特定物質，譬如金屬離子或是旋光異構物，單靠有機相與水相的比例來調整極性大小，也

無法在有機-水相系統中產生分佈係數(partition coefficient)的差異，因為金屬離子帶有親水性的正電荷，使它極為親水而傾向分佈於下層水相中，無法在上層有機相中有好的分佈，也就是說幾乎所有種類的金屬離子在兩相中的分佈係數沒有差異，幾乎都在水溶液中，於是金屬離子樣品注入 CCC 之後，在層析圖譜中所有的金屬離子都會出現在 solvent front 處，不會產生不同的滯留效果，於是無法被分離。解決的方式是在動靜相系統中添加修飾劑，增加金屬離子在有機相中的分佈<sup>10,11</sup>，這類修飾劑的特性就是具有可以與金屬離子鍵結的磷酸基團，以及擁有相當長度的碳鏈，這類分子的極性不大，容易溶解在有機溶劑中，常見的修飾劑分子為 bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid，這類分子結構上的磷酸配位基可以和金屬離子鍵結，作用力的強度取決於金屬離子的電荷數以及金屬離子的大小，因此水相中不同種類的金屬離子與有機溶劑中的修飾劑分子，會產生大小不同的作用力而造成分佈係數(partition coefficient, K)的不同，藉由經過添加修飾劑的 CCC 溶劑系統，可以成功地製備分離金屬離子(Ni, Co, Mg, Cu 等)。

添加修飾劑除了可分離金屬離子之外，另外一個分離的例子，是光學異構物的分離(chiral separation)，光學異構物無論是在沸點、極性方面的特性都相同，因此若將光學異構物溶解在 CCC 的溶劑系統中，得到的分佈係數將是相同的，只靠著調控有機-水相的比例是無法進行光學異構物的分離，因此 Ito<sup>12</sup>等人在 CCC 的靜相中添加特殊的修飾劑，也就是光學選擇劑(chiral selector, CS)，例如以 N-dodecanoyl-L-proline-3,5-dimethylanil 分子作為光學選擇劑，分離兩種胜肽樣品，樣品中主要含有兩光學異構組成，簡稱為 D<sup>-</sup> 及 D<sup>+</sup>，靠著在 CCC 的靜相溶液中添加 CS，CS 會與分析物產生複合物(CS-D<sup>+</sup> 以及 CS-D<sup>-</sup>)，因為 CS 與分析物中的兩成分(D<sup>-</sup> & D<sup>+</sup>)有立體位向上的差異，

在靜相中產生不同的平衡係數(equilibrium coefficient)，使 $D^-$ 以及 $D^+$ 在HSCCC的動靜兩相中的分佈係數(K)產生差異性，所以可以成功地利用CCC分離光學異構物。

### 1-3 論文目標

本研究旨在以界面活性劑為基礎，藉由界面活性劑具有疏水端、親水端、表面可帶電荷、以及具有自組裝能力等特性，設計新的溶劑系統以及 CCC 的流析方式，因此在本論文中的第一篇研究內容中，期望界面活性劑分子在水溶液中形成微胞，希望藉由界面活性劑增加水溶液對於疏水性物質的溶解能力，並將此含有微胞水溶液做為 CCC 的靜相，有機溶液正己烷做為逆流層析中的動相，分離一系列的疏水性物質。在本論文的第二篇研究內容，同樣是以界面活性劑為基礎，在疏水性的溶劑中形成反微胞，藉由反微胞萃取法的原理，在逆流層析儀中分離蛋白質，有別於傳統逆流層析分離蛋白質所使用的雙水相系統，期望發展一個嶄新、分離帶電荷物質的系統。另在第三篇研究內容中，同樣也是界面活性劑溶劑系統，利用界面活性劑在特定條件下，對於奈米物質具有大小選擇性萃取的特性，加上逆流層析儀特殊的旋轉機制，期望達成一個連續萃取，並能更有效地分離不同大小的奈米粒子。

在本論文的最後一個研究中，原先是嘗試以場流分離法的機制分離奈米物質，雖然實驗結果來看，並無任何分離能力，但是在另一方面，卻有令人驚訝的發現，由於我們分析了奈米粒子、蛋白質及其他小分子等物質在逆流層析儀中的流動訊號，進一步探討訊號產生的原因，期望探討逆流層析的轉動速度對於溶質帶寬的影響，對於逆流層析儀分離的基礎原理會有更進一步的了解。

## 第二章、以微胞做為逆流層析之靜相，分離類固醇化合物

### 2-1 前言

CCC 分離的實驗中，溶劑系統的選擇對於分離而言，是相當重要的一個步驟，一般來說，常用的 CCC 溶劑系統大部分屬於混合多種溶劑的兩相系統(multi-solvent two-phase system)，多溶劑兩相系統包含多種有機溶劑以及水，故又稱為水-有機系統(water-organic system)，有機溶劑種類的選擇繁多，通常混合 3-5 種的溶劑，目的是為了調配出適當極性(polarity)的分離系統，對樣品產生不同的分佈係數(K)，進一步分離不同極性的樣品，例如：醣類的分離<sup>13</sup>、水溶性染料的分離<sup>14</sup>，生物鹼的分離<sup>15</sup>，以及黃酮類化合物的分離<sup>16</sup>等。在對於疏水性物質分離方面，雖然溶劑系統中添加水才容易使 CCC 溶劑系統分為上下兩層，其中一層為靜相，另外一層當作動相，但是添加水之後，整體溶劑系統的極性會增大，疏水性物質在含水系統中的溶解度會變差，若不添加水，因大部分都是有機溶劑，彼此互溶性太高，想要使溶劑系統分為上下兩層就會變得很困難，為了尋找適當的解決辦法，所以本章的研究構想，是想要發展非傳統的多溶劑系統。

界面活性劑擁有一端為親水及另一端是疏水的特性，溶解於水溶液中，當水溶液中的界面活性劑達到臨界微胞濃度(critical micellar concentration, CMC)，會在水溶液中形成微胞(micelle)，再利用微胞在水溶液中可以製造一個疏水環境，可增加非極性物質在水中的溶解度，將微胞做為 CCC 的靜相來分離疏水性化合物，例如類固醇化合物(steroids)等，類固醇是一種以四環為基本結構的脂溶性化合物，基本架構包含了三個環己烷加上一個環戊烷，形成以 17 個碳原子排列而成的骨架，如圖 2-1，在此骨架上的官能基差異，使得類固醇彼此間的性質有所不同，在生物領域中類固醇的種類相當多，像是膽固醇

(cholesterol), 維生素 D(vitamin D)、膽汁酸(bile acid)、抗生素(antibiotic)、性荷爾蒙(sex hormone)等都是屬於類固醇化合物，在生物體中均扮演重要的化合物。類固醇的來源主要分為兩種，分別為天然類固醇與合成類固醇，天然類固醇是從動物或是植物體中萃取出來，可直接做為藥物的原料等，而合成類固醇是由化學反應得來，其純度與產量都比天然類固醇還來得高，因為其中可能含有微量的不純物質，因此對於類固醇的純化以及微量分析就顯得重要，以確保類固醇用藥的品質。

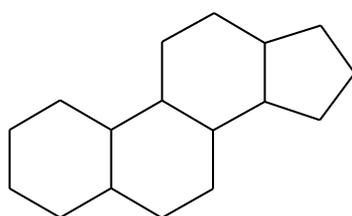


圖 2-1 由三個環己烷加上一個環戊烷所組成的類固醇基本骨架



## 2-2 研究理論與背景介紹

### 2-2-1 界面活性劑及微胞

在界面活性劑的分子結構中，分子的兩端是由疏水基團(hydrophobic group)以及親水性基團(hydrophilic group)所組成，可減低有機與水相間的界面張力。界面活性劑主要依照兩種方法分類：(1)根據親水基的帶電性，可分為陽離子型、陰離子型，兩性型與非離子型界面活性劑(表 2-1)。(2)根據界面活性劑的溶解性，為了描述界面活性劑分子的疏水或親水程度，可參考親水以及疏水基團，區分為較為親水或較為疏水的界面活性劑。

在水溶液中，界面活性劑的疏水基團會盡可能逃離水。當水中的界面活性劑分子濃度升高到一個程度，溶液的物理性質如表面張力、

滲透壓、電導度等會發生明顯的改變(圖 2-2)，這是由於數十至數百個界面活性劑分子在水中聚集在一起，親水基朝外與水分子水合，並將疏水基包圍避免疏水基與水分子直接接觸，形成一個團狀的結構，稱為微胞(micelle)。雖然微胞通常成球形，但實際形狀與大小會隨著界面活性劑濃度與溫度而逐漸改變，形成雙層或是層狀等結構(圖 2-3)，界面活性劑可形成微胞的濃度，稱為臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)。當微胞在水溶液中形成，因為疏水性物質可被包覆在微胞的疏水性碳鏈中，這時候的水溶液對疏水性物質的溶解度也會明顯增大。

表 2-1 (A)界面活性劑依電荷分類 (B)界面活性劑親水端基團

(A)



	依有無帶電荷分類	依電荷種類分類
界面活性劑	離子型界面活性劑	陰離子型界面活性劑
		陽離子形界面活性劑
		兩性界面活性劑
	非離子型界面活性劑	—

(B)

界面活性劑	親水端
陰離子型界面活性劑 (Anionic surfactant)	脂肪酸鹽 $-\text{COONa}$ 磺酸鹽 $-\text{SO}_3\text{Na}$ 磷脂鹽 $-\text{OPO}_3\text{Na}$
陽離子型界面活性劑 (Cationic surfactant)	$\begin{array}{c} \text{R1} \\   \\ \text{R2}-\text{N}^+-\text{R4} \\   \\ \text{R3} \end{array} \quad \text{Cl}^-$
兩性界面活性劑 (Amphoteric surfactant)	$\text{R}_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{COO}^-$
非離子型界面活性劑 (Nonionic surfactant)	$\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$

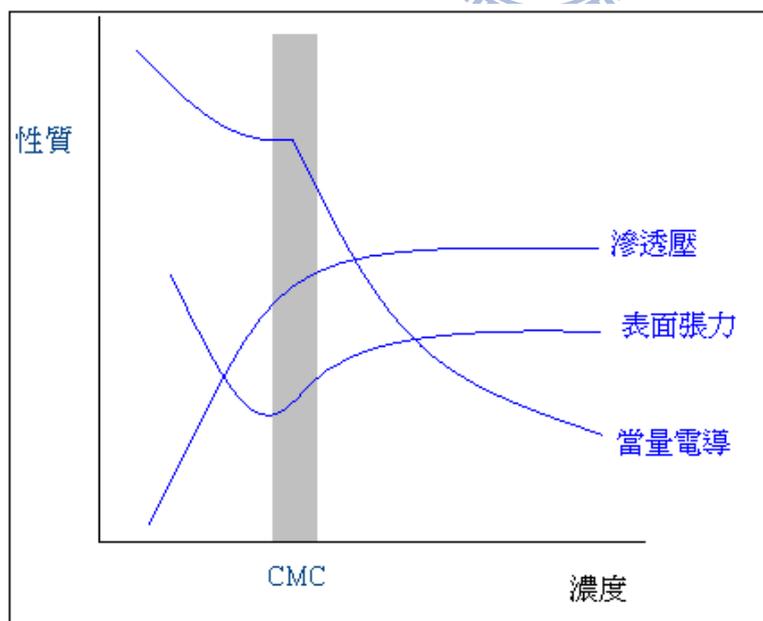


圖 2-2 界面活性劑濃度和溶液的物理性質

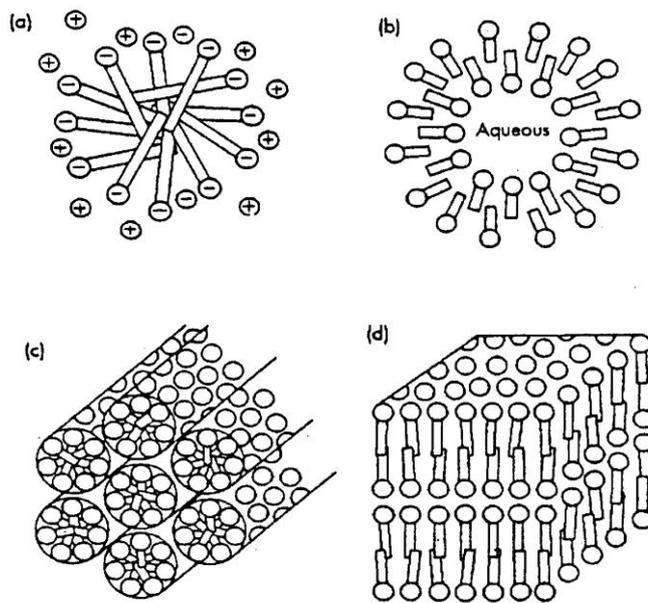


圖 2-3 微胞的結構種類

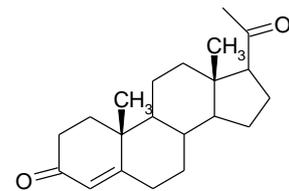
(a)球形結構 (b)雙層結構 (c)柱狀結構 (d)層狀結構

## 2-3 實驗

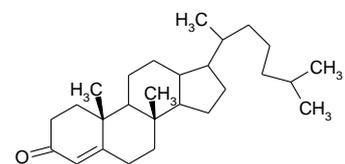
### 2-3-1 實驗藥品

#### 類固醇

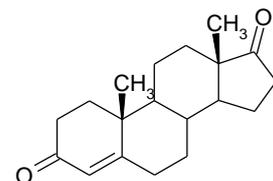
Progesterone, 98%, (TCI, Japan)



(+)-4-cholesten-3-one, 98%, (TCI, Japan)

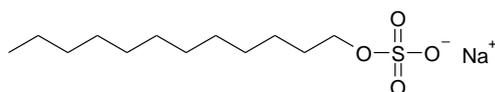


$\Delta^4$ -androstene-3,17-dione, 99%, (TCI, Japan)

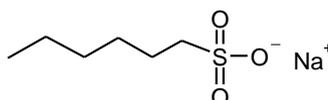


## 界面活性劑

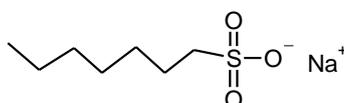
Sodium n-dodecyl sulfate (SDS) , 95% , (Sigma, USA)



Sodium 1-hexanesulfonate , 98% , (TCI, Japan)



Sodium 1-heptanesulfonate (SHS) , 98% , (TCI, Japan)



## 溶劑

*n*-Hexane , HPLC grade , (Mallinckrodt Baker, USA)

Butyl acetate , HPLC grade , (Acros Organics, USA)

Propyl acetate , HPLC grade , (Acros Organics, USA)

Ethyl acetate , HPLC grade , (Acros Organics, USA)

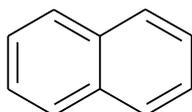
Methyl acetate , HPLC grade , (Acros Organics, USA)

Toluene , 99.9% , (Sigma-Aldrich, USA)

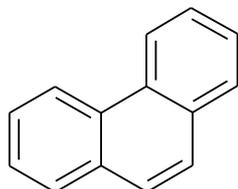
Deionized water , purified from Milli-Q plus , (Millipore, USA)

## 芳香族化合物

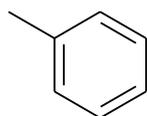
Naphthalene , GR grade , (Sigma-Aldrich, USA)



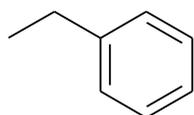
Phenanthrene , GR grade , (Sigma-Aldrich, USA)



Methylbenzene、GR grade、(Sigma-Aldrich, USA)



ethylbenzene, GR grade、(Sigma-Aldrich, USA)



## 2-3-2 實驗儀器

### 1. 逆流層析儀

型號為 Model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA)，儀器主體安置於控溫箱中，溫度控制在 20 °C，主體部分之管柱，其內徑為 1.6 公釐(1/16 英吋)，外徑為 3.2 公釐(1/8 英吋)，管柱材質為鐵氟龍，其耐壓壓力約為 21 kg/cm<sup>2</sup>，耐溫 50 °C，管柱的總長度約為 54 公尺、總體積為 108 毫升，主體外部同樣以鐵氟龍管線與幫浦、偵測器連接，連接管線的總長度約為 1 公尺，其內徑為 0.8 公釐(1/32 英吋)、外徑為 1.6 公釐(1/16 英吋)，儀器主體中的鐵氟龍管柱(內徑 1.6 公釐)以螺旋方式纏繞，平均纏繞半徑為 50 公釐，此距離等同於管柱的自轉半徑，管柱除了自轉之外，同時以半徑為 85 公釐的距離，圍繞著 CCC 主體的中心旋轉(公轉半徑)，因此自轉與公轉半徑的比例( $\beta$  值)為  $50/85 = 0.59$ 。

### 2. 幫浦

型號為 Series II Digital HPLC pump，流速設定可由 0.01 mL/min 到 10.00 mL/min，幫浦購自 Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA。

### 3. 紫外光/可見光線上偵測系統

偵測器型號為Bio-Rad Model 1801 UV-visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，可偵測紫外光波長為190-380 nm，可見光波長為380-800 nm，偵測器外部與電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統SISC (訊華公司，台北市)擇取偵測器之訊號，並加以分析。

### 4. 紫外光/可見光光譜儀

型號為 Agilent 8453 UV-Visible spectrophotomer (Waldronn, Germany)。

## 2-3-3 實驗步驟與流程

### 1. 類固醇樣品配製

將三種類固醇 Progesterone (PS)、(+)-4-cholesten-3-one (CS)以及 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione (AS)分別溶解在正己烷中，各取適量測量三者的紫外/可見光譜，再將這三種類固醇混合在一起，類固醇混合物中的濃度分別為300 mM(PS)、200 mM(CS)、以及400 mM(AS)，

### 2. 溶劑系統平衡

依照溶劑比例配方，例如不同濃度的界面活性劑的水溶液，置於分液漏斗中，與一定體積比例的正己烷混合，待其靜置分層之後，分別取出上層有機相與下層水相。

### 3. 逆流層析儀操作步驟

(a) 使用幫浦以流速 3 mL/min 將靜相(下層水溶液)填滿整個管柱。

(b) 啟動逆流層析儀，使其轉速達到 800 rpm，溫度控制在 20 °C。

(c) 待其轉速穩定之後，以流速 2 mL/min 將動相(上層有機相)，以

tail-to-head 的方向打入 CCC，這時會有靜相從 CCC 的頭端(head)

流出，待動相與靜相液體在 CCC 內部達到一個動力平衡，一直到靜相不再繼續被推出時，紀錄被推出的靜相，由被推出的靜相體積可以推算此溶劑系統的靜相滯留量。

- (d) 紫外/可見光偵測器的偵測波長設定在 230 nm，偵測流出 CCC 的動相液體，待訊號穩定之後，再注入體積為 0.1 mL 的樣品溶液。
- (e) 待分離結束後，以氮氣將 CCC 管柱中的液體(包含動相與靜相)推出，測量動相與靜相的體積。
- (f) 分別以 200 mL 的甲醇以及同樣體積的水清洗 CCC 的管柱，最後以氮氣推出甲醇以及水，並吹乾管柱，避免不純物及殘餘溶劑影響下一次實驗。

## 2-4 結果與討論

### 2-4-1 類固醇之紫外/可見光譜

將類固醇 PS、CS 以及 AS 溶解於正己烷中，濃度分別為 33 mg/L、33 mg/L 以及 27 mg/L，三種類固醇的紫外/可見光譜列於圖 2-4 中，由圖中可知 PS、CS、AS 等三種類固醇在 230 nm 均有吸收峰，因此 CCC 中的線上偵測器均選用 230 nm 為偵測波長。

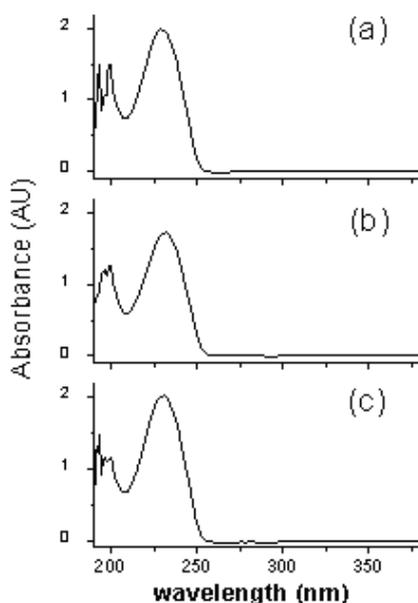


圖 2-4、類固醇的紫外/可見光光譜圖

(a)類固醇 PS、濃度為 33 mg/L

(b)類固醇 CS、濃度為 33 mg/L

(c)類固醇 AS、濃度為 27 mg/L

## 2-4-2 類固醇之分離結果

界面活性劑 SDS 是一種水溶性、陰離子型界面活性劑，在分析化學中，常添加在液相層析的動相中幫助分離，稱為 micellar liquid chromatography<sup>17-19</sup>。我們一開始選用 SDS 水溶液做為 CCC 的靜相，SDS 的臨界微胞濃度 CMC 值約為 8 mM，但在這個 SDS 濃度(8 mM)下，上層的正己烷與下層 SDS 水溶液不易分層，整體的溶劑系統嚴重乳化以及攪拌後容易產生泡沫，將此系統應用在 CCC 內部，因為分層不易所以無法得到穩定的動靜相平衡，靜相液體會不斷被帶出，只有在將 SDS 濃度降低為 0.83 mM 時，有機相與水相才容易澄清地分層，但這時的 SDS 濃度太低，無法產生微胞，對於疏水性物質也幾乎無任何滯留的效果，因此我們轉向尋找其他種類的界面活性劑。

若將界面活性劑的碳鏈縮短，SDS 的疏水基多達 12 個碳，而像是 sodium 1-heptanesulfonate (SHS) 的疏水基中只有 7 個碳，它的 CMC 值為 300 mM<sup>20</sup>，sodium 1-hexanesulfonate 有 6 個碳，其 CMC 值增為 540 mM<sup>20</sup>，這兩界面活性劑的水溶液分別與正己烷混合之後，均可以達到良好的分層，但考量到碳鏈越多，疏水性的作用力較好，以及 SHS 的 CMC 值較小，對於實驗來說，使用 SHS 會比較容易達到界面活性劑的 CMC 濃度，因此在 CCC 實驗中，選用 SHS 做為探討微胞做為 CCC 靜相之可行性的界面活性劑分子。

我們使用了 7 種不同 SHS 濃度的水溶液做為 CCC 的靜相，濃度從最低的 20 mM 逐漸增加到 600 mM，其中最高的濃度(600 mM)幾乎是兩倍的 CMC 值，圖 2-5 是利用含有 SHS 的水溶液做為 CCC 靜相，以正己烷為動相，分離三種類固醇(PS, CS, AS)的層析圖，實驗完畢測量管柱中靜相的含量，靜相滯留量約為 94 mL，在管柱總體積 108 mL 中約有 14 mL 的靜相被推出，因此管柱內的動相體積也為 14

mL，動相流速為 2 mL/min，所以 CS 與 PS 在圖 2-5A 中，兩者同時流出的波峰約在 7 min，亦為 solvent front 的位置，顯示出 CS 與 PS 在 20 mM 的 SHS 水溶液中無任何的分佈，所以不會有滯留效果，在 SHS 濃度為 20 mM 到 200 mM，未達 CMC 濃度之前，類固醇 AS 的滯留時間有微幅的增加(約為 3 min)，是因為 SHS 分子在水中彼此聚集，同樣也是疏水端會彼此吸引<sup>21</sup>，雖然還未形成微胞狀態，但是對於較高極性的類固醇 AS 而言，產生了部分的溶解能力所導致，但是 CS 與 PS 依舊無滯留能力也無法分離。若將 SHS 的濃度增加至 CMC (300 mM)以上，在圖 2-5D 中可以看出 CS 與 PS 兩波峰分離，但未完全解析開來，隨著 SHS 的濃度逐漸增加到 600 mM 的過程，CS 與 PS 可完全被分離，如圖 2-5F 所示，當 SHS 的濃度越高，對於 PS 以及 AS 的滯留能力就越強，為了表達靜相對於分析物的滯留能力，我們計算每個分離條件中，三種類固醇的滯留因子 retention factor (k)，計算的公式如式 2-1



$$k = \frac{(V_R - V_M)}{V_M} \quad (\text{式 2-1})$$

$V_R$  是樣品滯留體積， $V_M$  是管柱內動相的體積、也就是 solvent front 出現的位置，將分離類固醇的層析圖數據處理過後，將 retention factor 對 SHS 的濃度做圖，如圖 2-6 所示，實驗結果顯示如果 SHS 濃度在 300 mM (CMC)以下，retention factor 幾乎沒有改變，直到 SHS 濃度高於 300 mM 對於分析物才有明顯的滯留，另有研究顯示在 CMC 值以上，界面活性劑的濃度越大，形成的微胞也就越大，增加對疏水性物質的溶解能力<sup>21</sup>，這可解釋在我們的 CCC 層析圖中，retention factor 增加的幅度幾乎為直線上升，說明了 SHS 微胞的存在對於類固醇分

子滯留的效應。

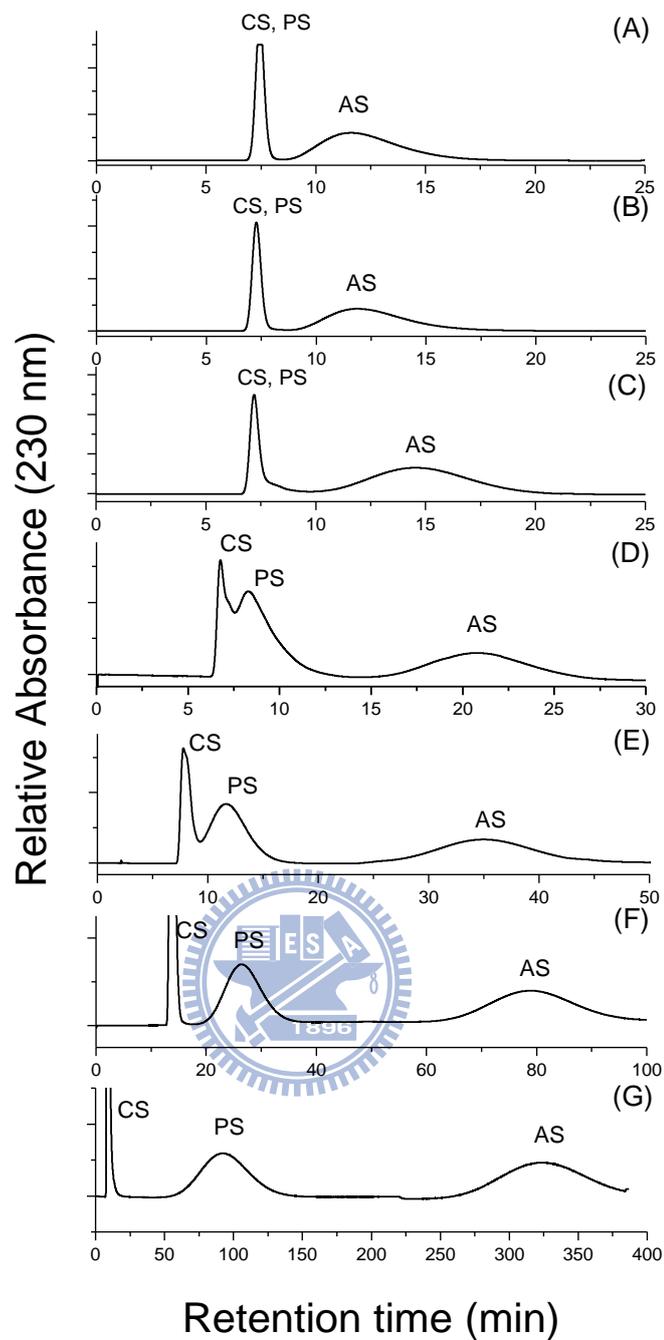


圖 2-5 以正己烷-SHS 水溶液為溶劑系統，分離三種類固醇的層析圖譜。  
三種類固醇濃度為 CS (200 mM)、PS (300 mM)、AS (400 mM)，SHS 的濃度分別  
為(A) 20 mM、(B) 50 mM、(C) 200 mM、(D) 300 mM、(E) 350 mM、(F) 400 mM。  
管柱總體積為 108 mL，靜相滯留比例約為 87%，動相正己烷的流度為 2 mL/min，  
CCC 轉動速度為 800 rpm，溫度控制在 20 °C，偵測器波長為 230 nm，樣品注入  
量為 0.1 mL。

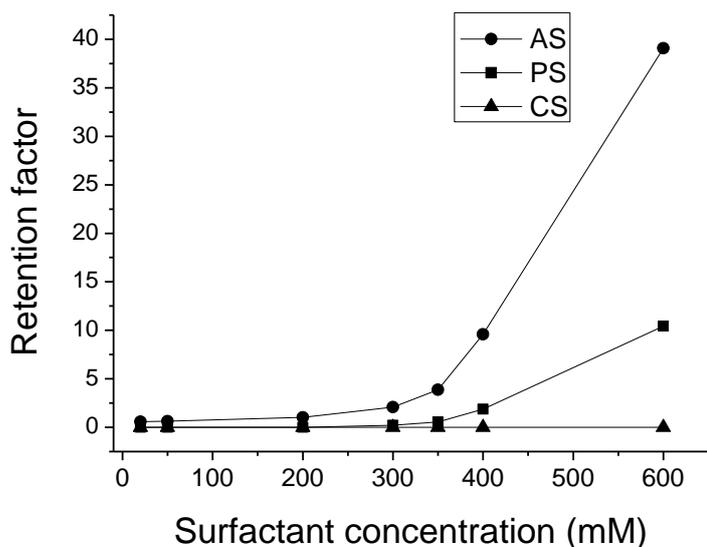


圖 2-6 三種類固醇的 retention factor 與靜相中 SHS 的濃度關係圖。

### 2-4-3 芳香族化合物之分離結果

除了類固醇化合物之外，我們嘗試以 SHS 微胞系統分離芳香族化合物(aromatic hydrocarbons)，我們選用了四種芳香族化合物，分別為 naphthalene、phenanthrene、methylbenzene、以及 ethylbenzene，這類的化合物極性非常低，過去研究分別利用陰離子型及陽離子型界面活性劑所形成的微胞，成功地萃取芳香族化合物<sup>22-25</sup>，表示微胞溶液可以溶解這些低極性的分子，但是經我們 CCC 流析的實驗結果顯示(這裡不顯示層析圖，以文字說明之)，靜相中的 SHS 無論在高濃度時，即使 SHS 濃度已經高達 600 mM，這四種芳香族化合物皆不會產生明顯的滯留，同時出現在 solvent front 處(~7 min)。因此我們推論：雖然微胞對於芳香族這類低極性的化合物有溶解能力，但是在有機溶劑與微胞水溶液並存的兩相系統中，芳香族化合物的分佈還是會偏向有機溶劑，在 micellar chromatography 的研究中<sup>17</sup>，也發現這類低極性的化合物，因芳香族化合物與管柱中的碳鏈作用力太強，只靠微胞水溶

液做為動相，也很難將這類的化合物從 reversed-phase HPLC 中的  $C_{18}$  管柱沖提出來，

#### 2-4-4 酯類化合物之分離結果

除了上述的類固醇化合物，以及芳香族化合物之外，我們另外以極性較高的酯類化合物為樣品，希望藉由樣品在 CCC 中的層析圖譜，了解正己烷-微胞系統對於不同種類的化合物，是否會產生不同的滯留現象，並對探討分離結果，我們所選用的酯類化合物分別為 methyl acetate (MA)、ethyl acetate (EA)、propyl acetate (PA)、以及 1-butyl acetate (BA)，酯類化合物的層析圖如圖 2-7 所示，沒有添加任何 SHS，僅只有水做為靜相的情形下，EA 與 MA 已經可被分離開來，在靜相中的 SHS 濃度提高到 200 mM，尚未達到 CMC 值時，靜相對於四種酯類化合物的滯留效果與無添加界面活性劑的水相似，即使 SHS 的濃度已經達到 CMC 值的兩倍(濃度為 600 mM)，四種酯類也並無明顯的滯留與分離效果，我們推測，SHS 微胞的形成對於酯類這類極性較高的化合物，這些物質本身較容易溶解於水中，不需要微胞提供疏水環境，因此無論微胞在水溶液形成與否，酯類化合物都不會在 CCC 中產生較明顯的滯留。

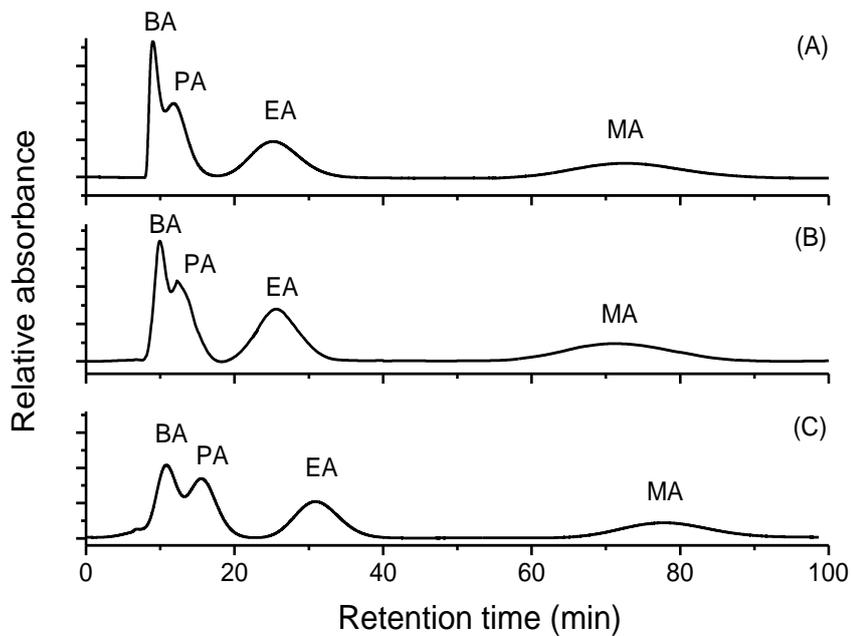


圖 2-7 以 CCC 分離四種酯類的層析圖

酯類化合物分別為 methyl acetate (MA)、ethyl acetate (EA)、propyl acetate (PA)、以及 1-butyl acetate (BA)。SHS 的濃度分別為(A) 0 mM、(B) 200 mM、(C) 600 mM。管柱總體積為 108 mL，靜相滯留比例約為 87%，動相正己烷的流度為 2 mL/min，CCC 轉動速度為 800 rpm，溫度控制在 20 °C，偵測器波長為 230 nm，樣品注入量為 0.1 mL。

## 2-5 結論

在本章節的研究中，首先以微胞做為 CCC 的靜相，嘗試分離多種類固醇等疏水性物質，而不使用一般常用的有機溶劑-水相系統。在 CCC 的溶劑系統中，添加長碳鏈的界面活性劑(SDS)，會形成不穩定的乳液態，將界面活性劑的碳鏈縮短，以及修飾親水基，發現以 SHS 界面活性劑所形成的微胞系統，可在正己烷與水之間形成穩定且分層的系統，在靜相水溶液形成 SHS 微胞之後，對於類固醇物質有顯著的滯留與分離效果，且滯留的能力可以藉由 SHS 的濃度來做調

整。但是對於極性極低的四種芳香類化合物而言，無論 SHS 形成微胞與否，或是 SHS 的濃度高低，對於這些化合物都沒有明顯的滯留效果，可能是芳香族化合物的極性太低，因此不會進入含有微胞的水溶液中。另一方面，實驗中這四種酯類化合物的極性較高，即使在沒有界面活性劑的條件下，四種酯類化合物也可溶入水中，在 CCC 層析圖中產生滯留，添加 SHS 對於這四種酯類化合物而言，只能微幅地增加滯留效果，即使靜相中已經形成微胞，酯類化合物的滯留現象也不會因此大幅增加。由此可知，若做為一個新的逆流層析溶劑系統，對於特定物質像是類固醇化合物等，微胞靜相系統能產生有選擇性的滯留與分離效果。



### 第三章、發展以反微胞做為逆流層析之靜相，應用於分離蛋白質

#### 3-1 前言

在生物化學領域中，蛋白質分子的種類以及功用相當繁多且複雜，蛋白質影響了生物體的許多功能表現，在蛋白質的純化方面，常使用的純化方式有沉澱法、鹽析法、過濾法以及各種層析法等，過去在逆流層析儀分離蛋白質的研究中，一般應用雙水相系統(two-aqueous phase)分離蛋白質<sup>26,27</sup>，主要是因為蛋白質通常分佈於有水的環境中，因此一般的有機溶劑對蛋白質的溶解度極低，有機溶劑也容易讓蛋白質結構改變而變性，雙水相系統所分成的上層與下層兩水相，可提供蛋白質良好的分佈係數，但雙水相系統的黏度較高，流析過程中會使管柱中的壓力增高，因此我們想嘗試開發出新的溶劑系統，可在 CCC 中應用於對於蛋白質的分離。近二十年來，關於反微胞萃取蛋白質的研究陸續被發表，美國麻省理工學院的多位著名學者成功利用 sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT)反微胞萃取蛋白質<sup>28</sup>，因此本研究希望以特定的界面活性劑在有機溶劑中形成反微胞，將反微胞做為逆流層析的靜相，再改良其流析方式，為逆流層析提供一個嶄新的溶液系統，能分離並濃縮表面帶有電荷且親水性的蛋白質。

## 3-2 研究理論與背景介紹

### 3-2-1 反微胞與反微胞萃取法

當疏水型的界面活性劑處於有機溶劑之中，也能產生類似水中微胞的聚集結構<sup>29</sup>，因為這個環境之中，界面活性劑的兩端與水中微胞的排列方向相反，疏水端碳鏈朝外溶於有機溶劑，親水端朝內，這種聚集結構稱為反微胞(reverse micelle)(圖 3-1)。反微胞中心是一個極性高的親水環境，稱為水池(water pool)，因為水核存在於有機溶劑之中，我們稱之為 water-in-oil 的狀態。利用反微胞可將親水性物質萃取至有機溶劑中，其萃取的作用力主要包含下列兩種：

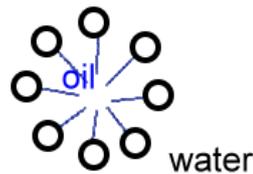
#### (1) 靜電作用力(electrostatic interactions)

離子型界面活性劑帶有正(負)電荷，利用界面活性劑聚集而成的反微胞萃取親水性物質，離子型界面活性劑和水溶液中的帶電物質之間的靜電力是重要的關鍵所在<sup>30</sup>。譬如從反微胞有機相萃取水溶液中的染料分子，對於帶負電荷的染料分子，需採用陽離子型的界面活性劑，相反地，萃取帶正電的染料分子需要用到陰離子型的界面活性劑<sup>31</sup>，最常用於反微胞萃取法的陰離子型界面活性劑是 bis(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate (AOT)，藉由正負電荷相互吸引的力量達成萃取效果，是萃取過程最主要的作用力。

#### (2) 疏水性作用力(hydrophobic interactions)

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面活性劑的疏水基之間的凡得瓦耳力是影響這一類界面活性劑的最主要因素<sup>32</sup>。

(a) 微胞



(b) 反微胞

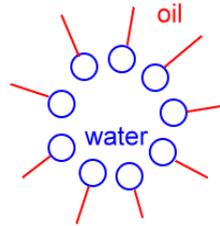


圖 3-1 微胞與反微胞環境示意圖

(a)微胞：界面活性劑親水端向外 (oil-in-water)，(b)反微胞：界面活性劑疏水端向外 (water-in-oil)

### 3-2-2 反微胞萃取蛋白質

在適當的實驗條件下，例如調控酸鹼值，反微胞可將水中的蛋白質萃取到有機溶劑中，此過程稱之為正向萃取(forward extraction)，之後再破壞蛋白質與反微胞之間的吸引力，像是改變蛋白質的電荷等，這時蛋白質可從有機溶劑再度回到水溶液中，稱之為反向萃取(back extraction)，在 1987 年 Hatton 利用反微胞萃取法<sup>28</sup>，純化蛋白質細胞色素 C (cytochrome c)，之後陸續對於反微胞純化蛋白質的研究發表<sup>33</sup>，顯示出反微胞萃取蛋白質，是一種價格低廉、操作簡便的蛋白質初步純化方法。影響反微胞萃取蛋白質的因素有：

#### (1) 水溶液的酸鹼值(pH)

蛋白質由許多氨基酸組成，是一種具有許多離子基團的帶電大分子，每一種蛋白質都有它的等電點(isoelectric point, pI)，在酸鹼值小於 pI 的環境中，蛋白質表面淨電荷為正電，相反地，在酸鹼值大於 pI 值的環境中，蛋白質表面靜電荷為負電。離子型界面活性劑的親水端帶電，於有機溶劑中形成反微胞，想要使蛋白質能被萃取進入反微胞，則蛋白質必須和反微胞帶相反電荷，產生靜電吸引力，為正向萃

取的過程。而當在另一個相反的 pH 環境之下，蛋白質表面淨電荷轉變成和反微胞帶相同電荷，產生靜電排斥力，蛋白質從反微胞相回到水相<sup>28, 34, 35</sup>，為反向萃取的過程。我們可說 pH 值和萃取主要機制(靜電作用力)的關係為：pH 值影響蛋白質帶正電或負電、決定萃取的排斥力或吸引力。

## (2) 水溶液中的離子強度(ionic strength)

水溶液中帶電粒子之間的靜電作用力，會因為溶液中的離子強度增加，造成靜電吸引或排斥力降低<sup>34</sup>，稱為 Debye screening effect，此效應可減低蛋白質和界面活性劑之間的靜電力。在一個以 AOT 反微胞萃取細胞色素 C (cytochrome c) 的實驗中，固定水溶液的 pH 值，使細胞色素 C 和反微胞之間電荷相反，故兩者之間會存在靜電吸引力，以含有不同 KCl 離子濃度的水溶液測試萃取效果，發現在 0.1 M KCl 的環境下，細胞色素 C 分子很容易地藉由反微胞萃取到有機相中，而提高水溶液中的離子強度之後，在 KCl 濃度高達 1 M 的情況下，細胞色素 C 分子無法以反微胞萃取。同時又有研究發現，KCl 濃度過低也不適合萃取蛋白質，當是水中的離子強度不高時(濃度 < 0.1 M)，含有界面活性劑的有機相和水溶液兩相不容易分層，會形成乳液態，便無法有效萃取蛋白質<sup>36</sup>，離子強度雖無法像酸鹼值可改變蛋白電荷的多寡，但其濃度可調整靜電作用力大小，而影響蛋白質的萃取效果。

## (3) 離子種類(Type of Electrolyte)

水溶液中的鹽類種類也會影響蛋白質的萃取效果，鹽類解離之後產生的離子會產生遮蔽效應(screening effect)，有文獻敘述在 AOT/isooctane 系統下只改變離子種類<sup>37</sup>，對蛋白質的萃取效果與水溶液中金屬離子的種類有關，金屬離子對於蛋白質萃取效果的強弱來排序，萃取效果分別是  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+$ ，推測萃取過程會受

到這些金屬的水合離子電荷的遮蔽效果所影響，鉀離子遮蔽的效果最大導致萃取率不高。鋰離子的遮蔽效果最差，所以對於蛋白質的正相萃取效果最好。

#### (4) 界面活性劑種類

界面活性劑種類的選擇在對蛋白質的萃取上是非常關鍵的一部分<sup>38</sup>，目前常見用在反微胞萃取的陰離子型界面活性劑有 sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT)以及 di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid (DEHPA)兩種<sup>39</sup>，AOT 是屬於磺酸型陰離子界面活性劑，DEHPA 則是磷酸型陰離子，除了這兩種陰離子型界面活性劑之外，尚有一些研究試圖合成不同種類的界面活性劑<sup>40</sup>，目的就是為了達到更有效、迅速、選擇性高的蛋白質萃取。Trioctyl methyl ammonium chloride (TOMAC)和 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)則是常用在蛋白質萃取的陽離子界面活性劑，它們都是屬於四級銨鹽，在有機溶劑中形成帶正電荷的反微胞<sup>41,42</sup>。此外，增加界面活性劑的濃度可增加有機相對於蛋白質的萃取量<sup>43</sup>，濃度高的界面活性劑雖然有利於正向萃取，但將會使蛋白質的反向萃取變得更困難，因此如何調整界面活性劑濃度，在正向-反向萃取率之間達到最佳化，也是設計萃取條件的參考之一。

#### (5) 蛋白質種類

因為蛋白質是一種複雜的巨大分子，不同的蛋白質除了 pI 值、分子量不同之外，它們的表面電荷分佈也不相同。不同的 pI 值可造成在同樣的 pH 值環境下，一種蛋白質帶正電、另一種則帶負電。反微胞的水池大小有限，比較容易萃取低分子量的蛋白質，反之，高分子量的蛋白質(分子量大於 100,000)因為過於巨大造成萃取效果不佳<sup>44</sup>，所以需要用到較高的界面活性劑濃度，但高濃度的界面活性劑會

使有機-水兩相不容易分層。

## (6) 共界面活性劑(cosurfactant)和共溶劑(cosolvent)

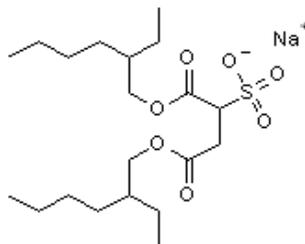
一般來說，正相萃取的速率較快，攪拌 3-10 min 後的萃取率已相當高，但反向萃取的速率緩慢，往往長達數十個小時，於是在反微胞系統中，在主要的界面活性劑加入非離子型界面活性劑或是共溶劑<sup>45</sup>，可改變反微胞的電荷分佈或是反微胞形狀，期望減低蛋白質和反微胞的電荷作用力，減低反萃取時間，所以加入這類添加物的目的是為了加強反萃取效果。另外有研究使用破壞反微胞結構的方法，在使用陰離子界面活性劑的情況之下，加入陽離子型界面活性劑會瓦解破壞反微胞<sup>46</sup>，使離子型的界面活性劑產生電荷中和，蛋白質便迅速回到水相。

### 3-3 實驗

#### 3-3-1 實驗藥品與材料

##### 陰離子型界面活性劑

sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) ，99% ，(Sigma-Aldrich, USA)



##### 蛋白質標準品

細胞色素 C ， cytochrome c ， from horse heart

FW : 12,361 ， pI = 9.6 ， purity 97 % ， (Sigma-Aldrich, USA)

肌紅蛋白 ， myoglobin ， form equine skeletal muscle

FW : 16952 ， pI = 7.0 ， purity 95 % ， (Sigma-Aldrich, USA)

溶菌酶，lysozyme，from chicken egg

FW : 14307，pI = 11，purity 97 %，(Sigma-Aldrich, USA)

### 藥品

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

Potassium chloride，KCl，GR grade (Showa, Japan)

Potassium hydroxide，KOH，GR grade，96.0 %，(Showa, Japan)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane，ACS grade，(Tedia, USA)

Dipotassium phosphate， $K_2HPO_4$ ，GR grade，99.0 %，(Showa, Japan)

### 溶劑

*n*-Hexane，HPLC grade，95 %，(Tedia, USA)

Acetonitrile (ACN)，HPLC grade，99.9 %，(Tedia, USA)

Trifluoroacetic acid (TFA)，HPLC grade，(Alfa-Aesar, USA)

Deionized water，purified from Milli-Q plus，(Millipore, USA)

### 緩衝溶液與動相組成



#### 1. Tris-HCl (pH 7.35)：

由 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 與 HCl 配置成中性的緩衝溶液

#### 2. $K_2HPO_4$ (pH 12)：

$K_2HPO_4$  與 KOH 配置成鹼性的緩衝溶液：

3. 動相 A<sub>1</sub>：0.05 M Tris-HCl、0.1 M KCl、pH 7.35

4. 動相 A<sub>2</sub>：0.05 M Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7.35

5. 動相 B<sub>1</sub>：0.05 M  $K_2HPO_4$ 、0.1 M KCl、pH 12.00

6. 動相 B<sub>2</sub>：0.05 M  $K_2HPO_4$ 、0.2 M KCl、pH 12.00

7. 動相 B<sub>3</sub>：0.05 M  $K_2HPO_4$ 、0.5 M KCl、pH 12.00

## 高效能液相層析動相溶液

動相 C：含有 0.1 % TFA、20 % acetonitrile (ACN)的水溶液

動相 D：含有 0.1 % TFA、80 % acetonitrile (ACN)的水溶液

## 蛋白質樣品溶液

取肌紅蛋白、細胞色素 C 和溶菌酶溶解在動相 A<sub>2</sub>(50 mM Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7.35 緩衝溶液)中，蛋白質濃度均為 5 mg/mL，視實驗需求再以緩衝溶液稀釋後使用。

### 3-3-2 實驗儀器

#### 1. 逆流層析儀

型號為 Model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA)，儀器主體安置於控溫箱中，溫度控制在 20 °C，主體部分之空心管柱，其內徑為 1.6 公釐(1/16 英吋)，外徑為 3.2 公釐(1/8 英吋)，管柱材質為鐵氟龍，其耐壓壓力約為 21 kg/cm<sup>2</sup>，耐溫 50 °C，管柱的總長度約為 57 公尺，纏繞在 3 個線軸上(3 spools)，總體積為 114 毫升，在本章節的實驗中，只有使用其中一個線軸上的管柱，因此總長縮減為 19 公尺，管柱總體積為 38 毫升，儀器主體中的鐵氟龍管柱，自轉與公轉半徑的比例( $\beta$  值)為 0.59。主體外部以鐵氟龍管線與幫浦、偵測器相互連接，其內徑為 0.8 公釐(1/32 英吋)、外徑為 1.6 公釐(1/16 英吋) 連接管線的總長度約為 1 公尺。

#### 2. 梯度沖提幫浦

型號為 LabAlliance Series III (State College, PA, USA)，流速設定可由 0.01 mL/min 到 10.00 mL/min，可設定兩種動相溶液，依比例梯度沖提，

### 3. 紫外光/可見光線上偵測系統

偵測器型號為Bio-Rad Model 1801 UV-visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，可偵測紫外光波長為190-380 nm，可見光波長為380-800 nm，偵測器外部與電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統SISC (訊華公司，台北市)擇取偵測器之訊號。

### 4. 高效能液相層析管柱

使用的 reversed phase HPLC 管柱型號是 PLRP-S column (150 mm × 4.6 mm, 30 nm, 15 μm)，購自 Polymer Laboratories (Amherst, MA, USA)。

#### 3-3-3 實驗步驟與方法

##### 3-3-3-1 CCC 分離蛋白質操作步驟

CCC 實驗裝置如圖 3-2 所示：

- (a) 使用幫浦以流速 3 mL/min 將靜相(100 mM AOT 的正己烷溶液)填滿整個管柱。
- (b) 啟動逆流層析儀，使其轉速達到 800 rpm，溫度控制在 20 °C。
- (c) 待其轉速穩定之後，以流速 1 mL/min 將動相(A<sub>1</sub> 或 A<sub>2</sub>)，以 head-to-tail 的方向打入 CCC，這時會有靜相從 CCC 的尾端(tail)流出，動相與靜相液體在 CCC 內部達到一個體積平衡，一直到靜相不再繼續被推出時，紀錄被推出的靜相，由被推出的靜相體積可以推算此溶劑系統的靜相滯留量。
- (d) 當有機相不再流出，表示動靜相達到平衡，打開 UV 偵測器(280 nm)，等待訊號趨於穩定。
- (e) 注入蛋白質樣品溶液，利用動相 A 以及動相 B 的梯度沖提分離之，並在注入樣品的同時紀錄層析訊號。

- (f) 每 5 分鐘收集一管，即每管中含有 5 mL 收集液。測量各收集管中的 pH 值。
- (g) 實驗完成後，逆流層析停止轉動，以氮氣將管柱內的液體吹出並收集，記錄有機相和水相的體積，上層有機相的體積就是靜相滯留量。
- (h) 以丙酮與甲醇(1:2)混合物 60 mL 沖洗管柱，再以 60 mL 去離子水清洗。最後再用氮氣吹乾管柱、避免不純物及殘餘溶劑影響下一次實驗。

### 3-3-3-2 HPLC 分析收集液實驗步驟

HPLC 實驗裝置如圖 3-3 所示

- (a) 使用 reversed phase HPLC 系統，先以動相 C 沖提管柱 15 分鐘。
- (b) 每支收集管以 3000 rpm 離心 5 分鐘，再分別注入 HPLC 分析。
- (c) 以動相 C 以及動相 D 進行梯度沖提，線性梯度沖提時間為 20 分鐘，起始以及結束條件分別為(0 min、100% C、0% D) ，(20 min、0% C、100% D)，UV 偵測器波長設定在 280 nm。
- (d) 以濃度為 0、25、50、100 ppm 的蛋白質標準品做檢量線，定量各收集管中的蛋白質濃度。

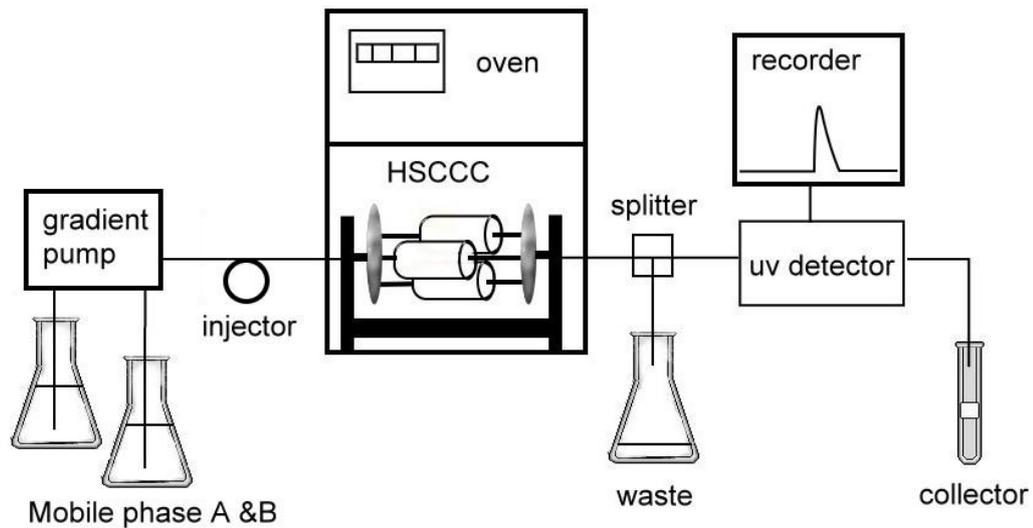


圖 3-2 CCC 實驗裝置圖

包含了兩動相 A&B、梯度幫浦、CCC 儀器、紫外光偵測器、以及收集器等。

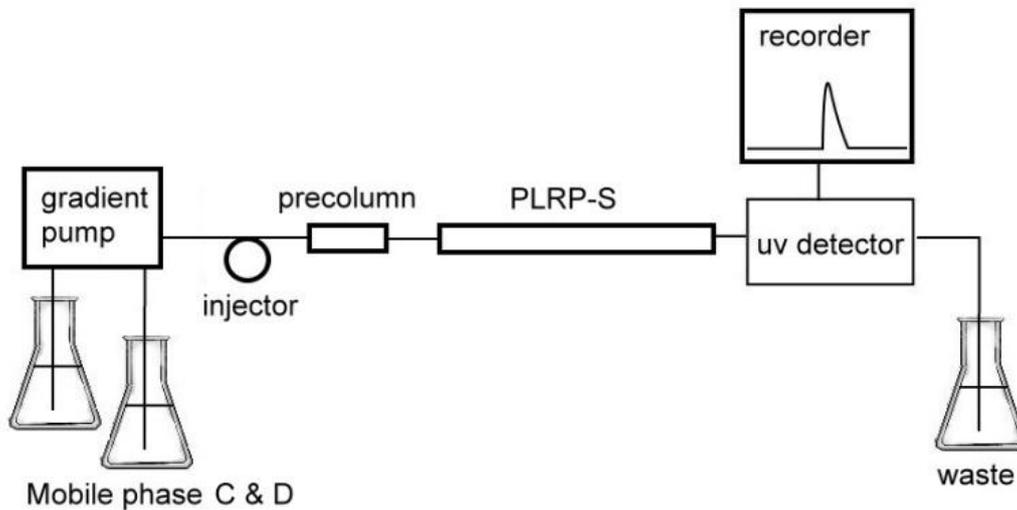


圖 3-3 HPLC 實驗裝置圖

包含了兩動相 C&D、梯度幫浦、HPLC 管柱、紫外光偵測器。

### 3-4 結果與討論

#### 3-4-1 以 HPLC 分析及定量蛋白質

利用HPLC在20分鐘之內可分析肌紅蛋白、細胞色素C 以及溶菌酶等蛋白質混合物。我們以波長為280 nm 的偵測器偵測，蛋白質混合物層析圖(圖3-4)出現4個明顯的波峰A、B、C、D，經過和標準品比對之後，波峰A(8.1 min)為細胞色素C，波峰B(9.4 min)是溶菌酶，波峰C(14.7 min)是失去heme分子的肌紅蛋白，波峰D(16.0 min)是肌紅蛋白中的heme分子<sup>47</sup>，因此我們在蛋白質定量上，選用波峰A(細胞色素C) 波峰B(肌紅蛋白)以及波峰C(無heme的肌紅蛋白)，利用0、25、50、100 ppm四種不同濃度的蛋白質標準品做檢量線，再對各收集管中的蛋白質濃度進行定量。

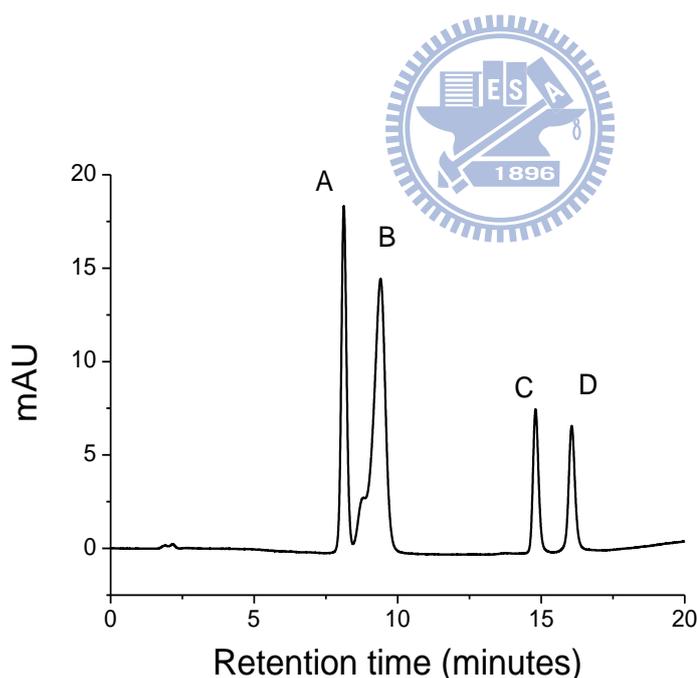


圖 3-4 HPLC 分析蛋白質層析圖

動相：20 % ACN – 80 % ACN 梯度沖提(流速：1 mL/ min)，樣品：蛋白質混合溶液 200 ppm，UV 偵測器：280 nm，各波峰分別為(A)細胞色素 C (B)溶菌酶 (C)肌紅蛋白 (D)heme 分子

### 3-4-2 以 pH 梯度流析對分離效果的影響

首先我們嘗試以 pH 梯度沖提法，若提高水溶液中的酸鹼值，能改變蛋白質表面的電荷，表面電荷的多寡會影響蛋白質與反微胞之間的靜電作用力，利用作用力的差異，進一步分離這三種蛋白質樣品，實驗一開始使用的動相 A<sub>1</sub>，pH 值為 7.35，另外還添加了 0.1 M 的氯化鉀，添加氯化鉀的原因是要增強水中的離子強度，有文獻指出如果離子強度小於 0.1M<sup>36</sup>，水溶液與有機相中的反微胞容易乳化而使兩相很難分層，另有文獻報導鉀離子可減少有機-水相的分層時間<sup>48</sup>，兩相分層時間越短，CCC 內部的靜相會越容易滯留在管柱中，較高的靜相滯流率對於分離是有正面的幫助，因此我們在這裡除了以緩衝溶液逐漸增加 pH 值之外，還會添加濃度為 0.1 M 的氯化鉀。

利用 pH 梯度分離的層析圖，以及每支收集管中蛋白質含量的分析結果如圖 3-5 所示，在層析圖 20-35 分鐘處有單根波峰，同時也是 solvent front 出現的位置，這時候流出的動相中的蛋白質，對應收集到第 4-7 收集管，從 HPLC 的結果顯示這段時間收集的蛋白質，主要的成分是肌紅蛋白，肌紅蛋白的濃度從 40-58 mg/L 不等。另外我們觀察層析圖從 60-90 分鐘的訊號極為不穩，這是因為這段期間內，有部分的靜相流失，有機溶劑(靜相)伴隨著動相一塊流出，流體中有不互溶的兩相，所以使偵測器在偵測時候產生不穩定的訊號。我們進一步測量每個收集管中的酸鹼值，可以發現這時已經達到 pH 10 以上，再藉由 HPLC 的分析結果顯示細胞色素 C 出現在第 14-17 支收集管中，在第 15 支收集管中，細胞色素 C 有最高的含量約為 80 mg/L，但每支收集管仍可偵測到些許的肌紅蛋白與溶菌酶，表示分離的效果並不理想，甚至在溶菌酶的收集總量中發現我們只有收集到少部分的溶菌酶，大多數的溶菌酶仍滯留於 CCC 的靜相中，或是隨著靜相流失而

流出管外，在這裡所提及的靜相流失問題，也是造成分離效果不佳的因素，都是亟待克服的實驗問題。

有鑑於靜相的滯留能力不佳，我們增加了動相的離子強度，將水溶液中的氯化鉀的濃度由原本的 0.1 M 提升至 0.2 M，也就是動相 A<sub>2</sub> 的組成，水相中較高的氯化鉀濃度可以減少有機相-水相的分層時間，使兩相之間比較不容易乳化，再加上 pH 值的梯度沖提，對蛋白質的分離結果如圖 3-6 所示，從層析圖中可看出在大部分的流析過程中，從 CCC 管柱流出的流體較為澄清，紊亂的訊號已經大幅減少，除了在 65 min 出現些許的不穩定訊號之外，CCC 流析訊號較之前穩定許多，在同樣的動相流速(1 mL/min)以及 CCC 轉速下(800 rpm)，靜相的滯留量增加至 19 mL (50%)，在層析圖中 20 分鐘處，也就是 solvent front 有一支波峰出現，經 HPLC 分析之後，這支波峰含有大量的肌紅蛋白(200 mg/L)，但仍伴隨著部分的細胞色素 C(~50 mg/L)，以及極少量的溶菌酶(<10 mg/L)。在含有較高氯化鉀的動相中，可以發現所有蛋白質的回收率增加，蛋白質也比較不容易進入反微胞靜相，尤其是細胞色素 C 的滯留時間縮短為 40-55 min，這可能是較高濃度的離子強度可以遮蔽帶正電荷的蛋白質與 AOT 陰離子之間的作用力<sup>49</sup>，降低蛋白質在有機溶液(反微胞靜相)中的分佈係數，大幅減低了細胞色素 C 分子的滯留時間，而進一步使細胞色素 C 與溶菌酶分子分離。由此可得知，增加離子強度後的動相 B<sub>2</sub>，不僅可以增加溶劑系統在實驗中的穩定度，還可以調整蛋白質在兩相中的分佈，增加分離上的解析度。美中不足的是溶菌酶的回收率(收集管中溶菌酶的總量)仍然偏小，從第 14-20 支收集管中得到的溶菌酶總量約只有注入量的 30%，我們期望能在往後的實驗中，增加溶菌酶的回收率。

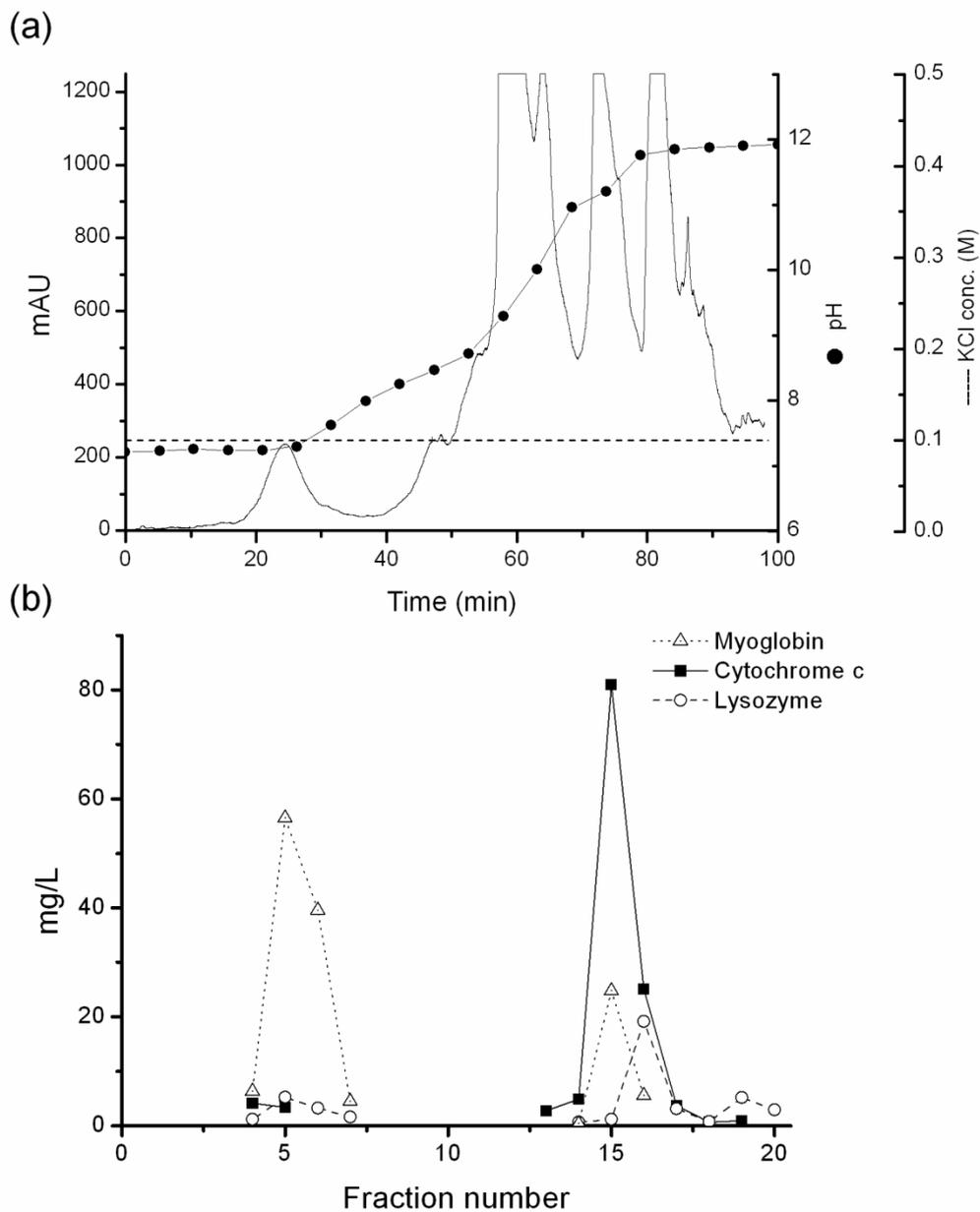


圖 3-5 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 I

(a) 以 pH 梯度分離蛋白質的逆流層析圖，靜相是 100 mM AOT 的正己烷溶液，以動相 A<sub>1</sub>(0.05 M Tris-HCl、0.1 M KCl、pH 7.35)與動相 B<sub>1</sub>(0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1 M KCl、pH 12)梯度沖提，動相流速 1 mL/min，樣品是 5 mL、濃度皆為 500 mg/L 的 myoglobin、cytochrome c 與 lysozyme 的混合溶液，CCC 管柱總體積 38 mL，靜相滯留量約 16 mL (42%)。(b)每支收集管中的體積皆為 5 mL，經過 HPLC 分析，在 20 支收集管中三種蛋白質的含量。

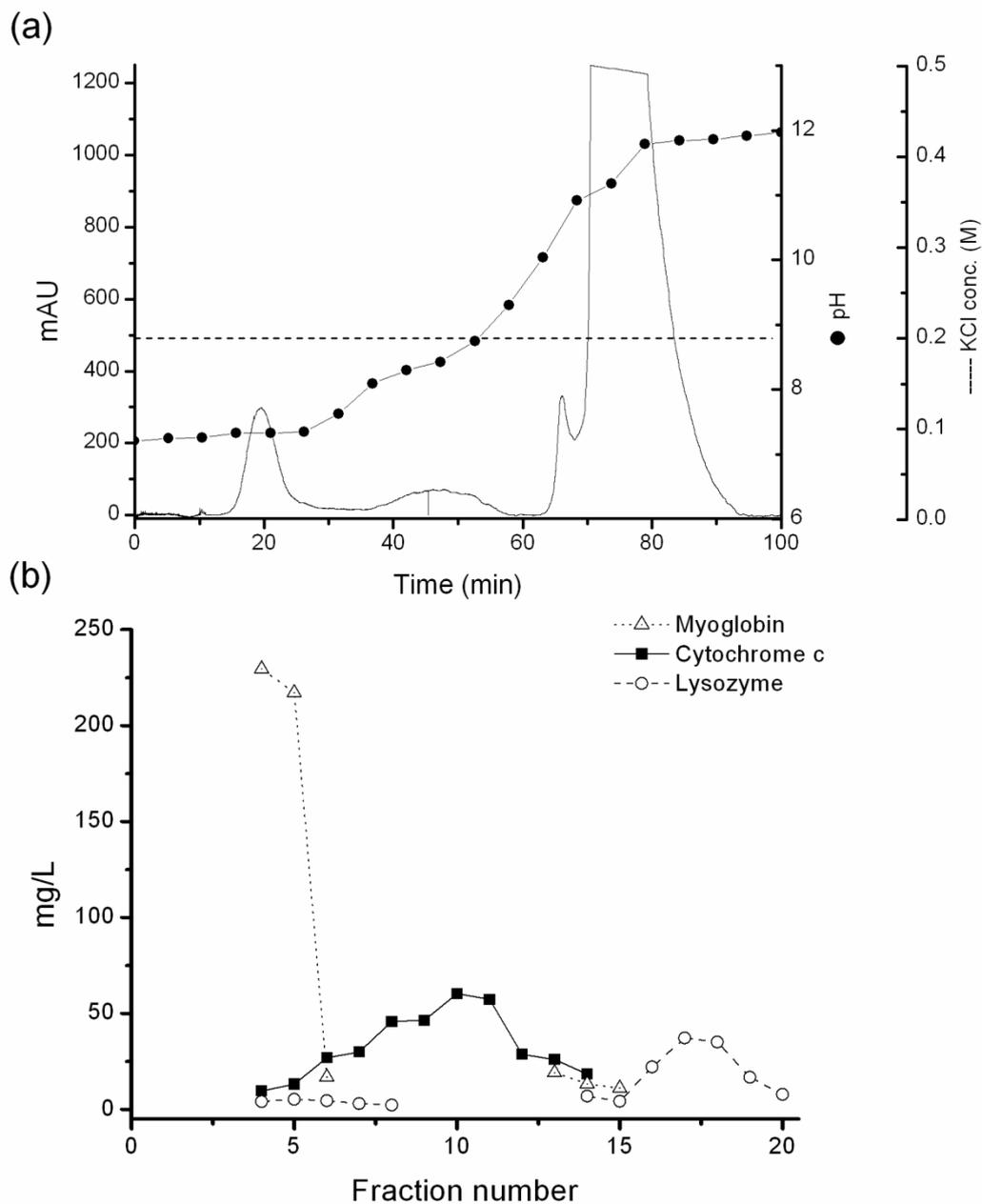


圖 3-6 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 II

(a) 以 pH 梯度分離蛋白質的逆流層析圖，靜相是 100 mM AOT 的正己烷溶液，以動相 A<sub>2</sub>(0.05 M Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7.35)與動相 B<sub>2</sub>(0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2 M KCl、pH 12)梯度沖提，動相流速 1 mL/min，樣品是 5 mL、濃度皆為 500 mg/L 的 myoglobin、cytochrome c 與 lysozyme 的混合溶液，CCC 管柱總體積 38 mL，靜相滯留量約 19 mL (50%)。(b) 每支收集管中的體積皆為 5 mL，經過 HPLC 分析，在 20 支收集管中三種蛋白質的含量。

### 3-4-3 以 pH 結合鹽類濃度流析對分離效果的影響

因為較高的氯化鉀濃度可改變蛋白質在上下層相的分佈係數，以及增加分離的解析度，也能增加動相與靜相的分層效果，抑制流體中的雜訊，所以我們除了採用 pH 梯度沖提之外，也逐漸增加了氯化鉀的濃度，沖提動相從 pH 7.3 增加到 pH 12.0，氯化鉀濃度則從 0.2 M 增加到 0.5 M，即是由動相 A<sub>2</sub> 與動相 B<sub>3</sub> 的線性梯度，分離的層析圖如圖 3-7 所示，層析圖中出現了三支分離波峰，流體的訊號也相當清晰，分離過程中不會有因為靜相的不穩定而產生過大的雜訊。各管中的 pH 值是收集之後分別測得，氯化鉀的濃度則是由兩動相中的濃度 (0.2-0.5 M)，依照梯度的混合比例計算而得，在 HPLC 分析結果中，第一支波峰的主要成分是肌紅蛋白，濃度約為 230 mg/L，夾帶著少量的細胞色素 C 與溶菌酶，濃度皆小於 25 mg/L。第二支波峰主要成分為細胞色素 C，分佈在第 7-13 收集管中，收集管平均的 pH 值約為 8，氯化鉀濃度約為 0.3 M。第三支波峰中的蛋白質幾乎是溶菌酶，分佈在第 15-20 收集管中，pH 值平均約為 12，氯化鉀濃度約為 0.5 M，相當於動相 B<sub>3</sub> 的組成，在上一組未增加氯化鉀濃度梯度的分離實驗，溶菌酶的回收率只有 30%，增加氯化鉀濃度之後，溶菌酶的回收率可達 90% 以上，對於製備型的分離來說，已經達到相當好的回收率。

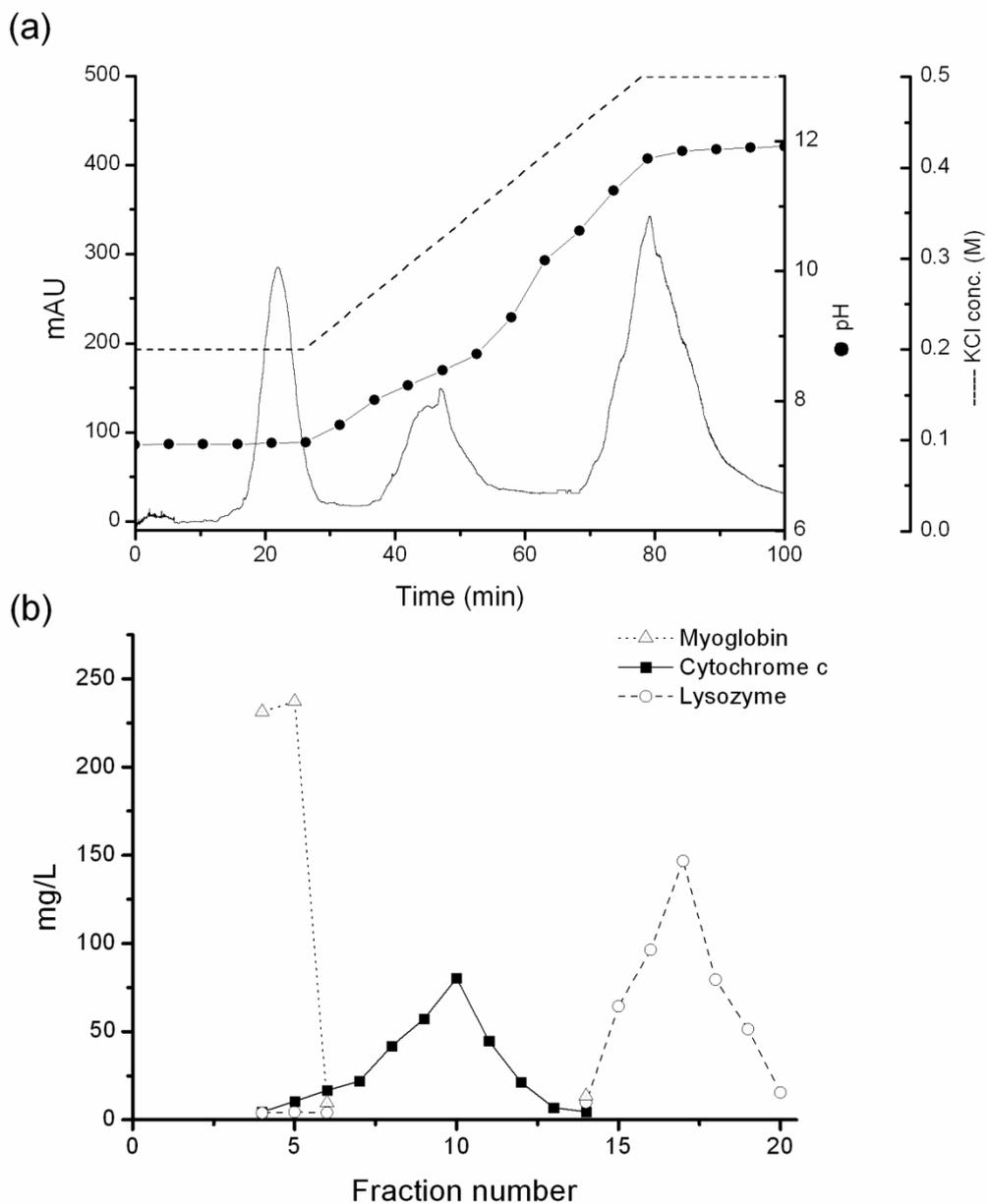


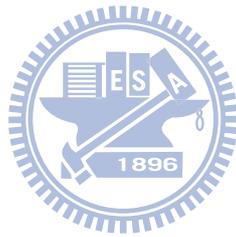
圖 3-7 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 III

(a) 以 pH 梯度分離蛋白質的逆流層析圖，靜相是 100 mM AOT 的正己烷溶液，以動相 A<sub>2</sub>(0.05 M Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7.35)與動相 B<sub>3</sub>(0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5 M KCl、pH 12)梯度沖提，動相流速 1 mL/min，樣品是 5 mL、濃度皆為 500 mg/L 的 myoglobin、cytochrome c 與 lysozyme 的混合溶液，CCC 管柱總體積 38 mL，靜相滯留量約 19 mL (50%)。(b) 每支收集管中的體積皆為 5 mL，經過 HPLC 分析，在 20 支收集管中三種蛋白質的含量。

### 3-4-4 利用 CCC 濃縮以及分離蛋白質

由於我們利用反微胞萃取的原理以及 pH、鹽類濃度為沖提動相，蛋白質混合物的分佈係數受動相組成的影響很大，在上一節實驗中，A<sub>2</sub>-B<sub>3</sub>動相的梯度組成能有效地分離體積為 5 mL，濃度皆為 300 mg/L 的肌紅蛋白、細胞色素 C 以及溶菌酶三種蛋白質混合溶液，我們將樣品注入量從 5 mL 到 38 mL，這時樣品注入體積已經相當於管柱的總體積，以同樣的動相組成(動相 A<sub>2</sub>-B<sub>3</sub>)梯度沖提，分離結果與層析圖如圖 3-8 所示，層析圖中的肌紅蛋白訊號出現在第 17-65 分鐘處，且訊號呈現高原形狀(plateau-like)而非我們常見的類高斯單峰波形，這是因為 38 mL 的混合溶液中的肌紅蛋白幾乎完全不會滯留於 CCC 管柱中，當樣品注入之後隨著 solvent front 再流出，因為樣品在管柱內會擴散，可看出流出後的訊號寬度略大於 40 mL，但是訊號中心的濃度高達在 300 mg/L，相當於在蛋白質混合溶液樣品當中，肌紅蛋白的起始濃度。層析圖中第二及第三支波峰分別為細胞色素 C 以及溶菌酶，從圖中可看出這兩支波峰的分離解析度相當良好，細胞色素 C 在第 15-17 號收集管中的濃度分別為： $4.39 \times 10^2$ 、 $1.03 \times 10^3$ 、以及  $3.61 \times 10^2$  mg/L，三個收集到的濃度皆高於注入時細胞色素 C 的濃度 (300 mg/L)，表示利用反微胞靜相不僅可以分離蛋白質，可應用處理大量體積的樣品，還具有部分濃縮的效果。在對於溶菌酶的分離中，除了第 20 支收集管有少許蛋白質(細胞色素 C、肌紅蛋白)之外，我們可以從第 21-24 得到幾乎為單一蛋白質、溶菌酶的溶液，在第 21 以及 22 支收集管中的溶菌酶濃度，約為分離前樣品中溶菌酶濃度的兩倍，反微胞靜相應用於溶菌酶的分離上也會產生濃縮的效果。計算收集管中的蛋白質濃度的總合，與分離前的樣品比較，可計算蛋白質回收率，分離後的肌紅蛋白回收率約為 83 %、細胞色素 C 約為 90%、

溶菌酶約為 82%，推測少許的蛋白質還是會因為有機溶劑或是界面活性劑的存在，產生去活化的現象，形成不溶於水的沉澱物。當實驗結束，以氮氣將 CCC 管柱內的液體推出，仍可發現少量的蛋白沉澱物存在於有機-水相的介面，在 pH 以及鹽類梯度的條件下，這些沉澱物的量明顯少於其他分離條件，就 HPLC 定量結果來統計，蛋白質總回收率也明顯高於無鹽類梯度變化的實驗。



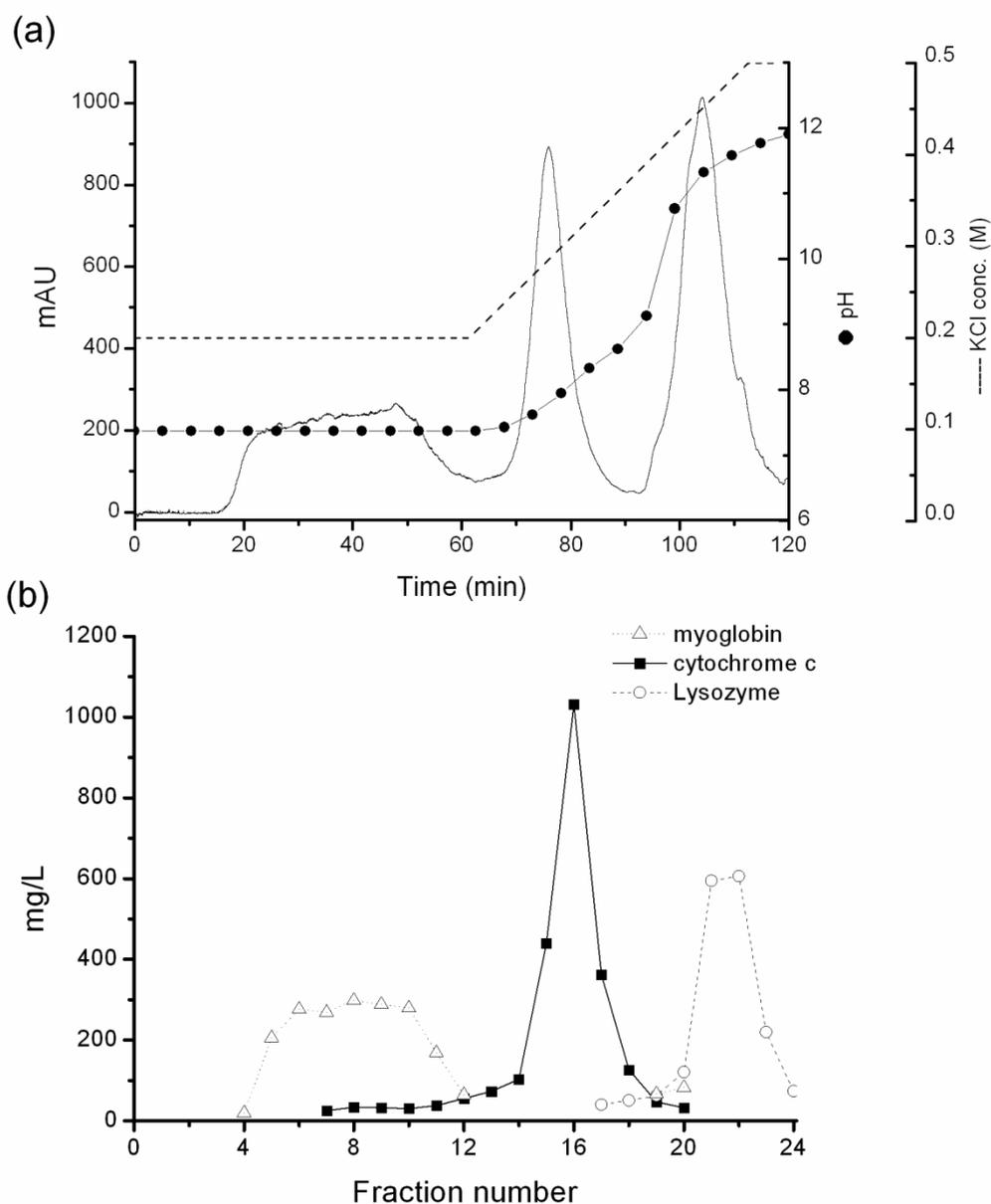


圖 3-8 蛋白質分離層析圖及收集管濃度 IV

(a)以 pH 梯度分離蛋白質的逆流層析圖，靜相是 100 mM AOT 的正己烷溶液，以動相 A<sub>2</sub>(0.05 M Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7.35)與動相 B<sub>3</sub>(0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5 M KCl、pH 12)梯度沖提，動相流速 1 mL/min，樣品是 38 mL、濃度皆為 300 mg/L 的 myoglobin、cytochrome c 與 lysozyme 的混合溶液，CCC 管柱總體積 38 mL，靜相滯留量約 19 mL (50%)。(b) 每支收集管中的體積皆為 5 mL，經過 HPLC 分析，在 20 支收集管中三種蛋白質的含量。

### 3-5 結論

我們利用 AOT 反微胞為靜相，動相變化包含為 pH 梯度以及氯化鉀濃度梯度的變化，可依序製備分離三種不同等電點的蛋白質(肌紅蛋白、細胞色素 C、溶菌酶)，因為水溶液中的酸鹼值影響蛋白質與靜相間的靜電作用力，氯化鉀的濃度影響動靜相的分層以及流體訊號的穩定度，並進一步調整了蛋白質的分佈係數，在逆流層析實驗中增加分離蛋白質的解析度，以及增進蛋白質的回收率。此外，針對大量體積的蛋白質溶液時，以反微胞做為 CCC 靜相分離蛋白質，還附加了濃縮的效果。對於 1~3 種蛋白質的分離純化上，我們成功地發展反微胞分離蛋白質的方法，為逆流層析領域提供一個新的溶劑系統，以及含有酸鹼值及鹽類梯度變化的動相沖提方法。



## 第四章、利用離子對萃取法，以逆流層析分離銀奈米粒子

### 4-1 前言

過去十多年來，許多化學分析方法陸續應用在奈米粒子的分離上，包含了大小排除層析法(size-exclusion chromatography)<sup>50, 51</sup>，離子對層析法(ion-pair chromatography)<sup>52</sup>，場流分離法(field-flow fraction)<sup>53</sup>，膠體電泳法(gel electrophoresis)<sup>54</sup>，以及透析法(diafiltration)<sup>55</sup>等。但尚未應用逆流層析法分離奈米粒子，逆流層析儀是一種製備分離的技術，CCC 的優點有：較容易分離大量分析物，無固體靜相填充等。過去 CCC 曾用於細胞、蛋白質<sup>56-58</sup>等粒子的分離，因此就儀器發展來說，已有對於分離粒子的先例研究，對於分離奈米粒子，成功的關鍵，在於如何選擇適當的動相與靜相。

有研究指出，對奈米粒子的萃取效果，取決於界面活性劑的濃度等實驗條件，以及奈米粒子的大小<sup>59, 60</sup>，藉由離子對萃取機制，能使大小不同的奈米粒子在有機相-水相中的分佈產生差異性，因此本章節的研究中，利用界面活性劑為基礎，在有機溶劑中添加陽離子型界面活性劑，做為沖提之動相，希望藉由離子型界面活性劑之萃取，將水溶液中帶有負電荷的銀奈米粒子萃取到有機相，嘗試讓大小不同的粒子在有機-水相中的分佈產生差異性，便可利用逆流層析儀分離奈米粒子。

### 4-2 研究理論與背景介紹

#### 4-2-1 以界面活性劑萃取法分離奈米物質

萃取(extraction)在化學上是一種常見的分離方法，步驟簡單而且容易操作，比起其他的分離方式，萃取量更可以較容易地放大，近年來關於奈米物質的研究，萃取法可應用於不同大小奈米物質的初步分

離，一般採用離子對萃取法(ion-pair extraction)，簡述如下：

#### 4-2-1-1 萃取金奈米粒子(Au-MSA)

在 1999 年，日本學者 Kimura 利用化學還原法<sup>61</sup>，以高濃度的硼氫化鈉(0.2 M NaBH<sub>4</sub>)做為還原劑，將水溶液中的四氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>)及硫醇分子 mercaptosuccinic acid(MSA)合成出表面帶有羧酸(carboxyl acid)的金奈米粒子，由 0.5 mmol 的 MSA 與 0.5 mmol 的 HAuCl<sub>4</sub>(莫耳數為 1:1)所反應得到金奈米粒子的大小約  $4.36 \pm 0.89$  nm，合成的反應相當簡便而且產量大，得到的金奈米粒子因表面佈滿了 MSA 分子，在中性或是鹼性環境下為親水性且粒子表面帶有負電荷。Kimura 在 2001 年所發表的文章中指出<sup>59</sup>，這些帶負電荷的親水性金奈米粒子，可以在相轉移試劑 TOAB(tetraoctylammonium bromide)的幫助下，由水相轉移到甲苯中，作者首先以含有 TOAB 濃度為  $5.0 \times 10^{-5}$  M 的甲苯溶液萃取 5 mg 的 Au-MSA，實驗分成三次萃取，每次萃取分別使用 40 mL 的甲苯溶液，一共使用 120 mL 的甲苯溶液，萃取物經過穿透式電子顯微鏡(測量，平均粒徑大小依萃取順序分別為  $2.61 \pm 0.33$  nm； $3.01 \pm 0.55$  nm； $4.29 \pm 0.96$  nm，測量結果顯示出第一次萃取溶液中的奈米粒子較小，第三次(最後一次)萃取的金奈米粒子的粒徑較大，結果發現利用含有低濃度的 TOAB 有機溶劑，經過數次的萃取後，對於金奈米粒子有些許的分離能力。但是若我們將 TOAB 的濃度增加為三倍，也就是以 TOAB 濃度為  $1.5 \times 10^{-5}$  M 的甲苯溶液(40 mL)作為萃取溶液，則只需一次萃取，即將所有的金奈米粒子相轉移到甲苯溶液中，所以使用過高濃度的 TOAB 萃取，對奈米粒子不會有分離效果。

由於實驗中的金奈米粒子極為親水，帶電荷的金奈米粒子極不容

易溶解於有機溶劑中，如果沒有添加 TOAB 的甲苯溶液，對水中的金奈米粒子的萃取實驗發現並無任何萃取能力，當 TOAB 界面活性劑量為有限情況下，越小的奈米粒子越容易萃取到有機溶劑中，越大的奈米粒子在有機溶劑中的分佈係數越小，即越難萃取到有機溶劑。

#### 4-2-1-2 萃取銀奈米粒子(Ag-MSA)

在 2006 年日本學者 Kimura 以還原法合成表面修飾 MSA 的銀奈米粒子<sup>60</sup>，粒子的直徑範圍約為 2~10 nm，平均大小為 4.9 nm，因為表面修飾 MSA 的銀奈米粒子也極為親水，若無界面活性劑的幫助，無法將銀奈米粒子萃取到有機溶劑中，因此作者以 3.65 mg ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol) 的陽離子界面活性劑 cetyltrimethylammonium (CTAB) 溶解於 10 mL 的有機溶劑中，有機溶劑分別選用二甲苯，甲苯，四氯化碳，二氯甲烷，還有氯仿等五種溶液。原本親水性(hydrophilic)的銀奈米粒子表面上帶有負電荷，使得粒子與陽離子界面活性劑 CTAB 會有靜電吸引力，因此，奈米粒子在界面活性劑 CTAB 的包覆之下會轉成疏水性(hydrophobic)。這時有機溶劑對於包覆著 CTAB 的奈米粒子的溶解能力，是決定奈米粒子萃取效果的因素，有研究發現顆粒較小的奈米粒子，其表面比較容易產生疏水性作用力，所以比起顆粒較大的奈米粒子，粒徑較小的粒子會更為疏水，因此分別以含有相同濃度 CTAB 的甲苯，四氯化碳以及氯仿等三種有機溶劑作為萃取溶液，萃取平均粒徑為 5.1nm 的銀奈米粒子，得到三次萃取產物，結果顯示於圖 4-1 中，萃取結果可從 TEM 圖中看出萃取溶劑對於萃取結果的影響，若以甲苯為溶液，因為甲苯的極性是三者中最低的，因此容易萃取較疏水性、粒徑較小的銀奈米粒子，相反地，氯仿的極性較大，可萃取到較大顆的奈米粒子。由此可見，不僅可以藉由改變界面活性劑的濃度，

改變溶劑種類也可有選擇性地分離大小不同的銀奈米粒子。

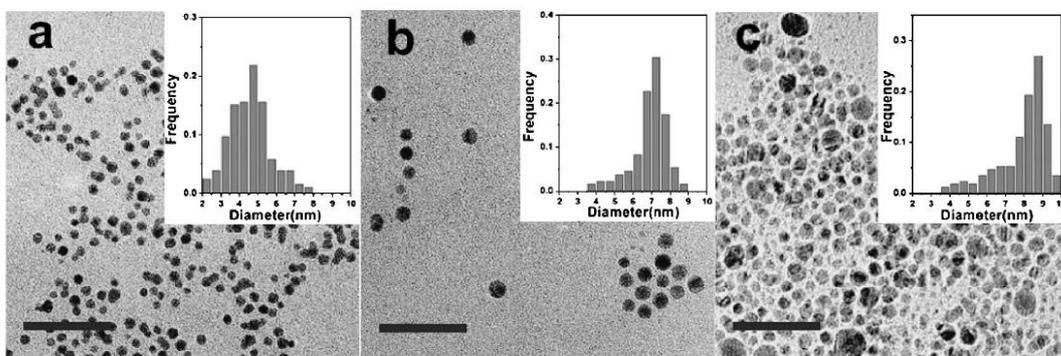


圖 4-1 利用 CTAB 萃取銀奈米粒子的粒徑分佈圖

有機溶劑萃取順序分別為(a)甲苯、(b)四氯化碳、(c)氯仿。圖中的比例尺(scale bar)為 50 nm。(本圖<sup>60</sup>摘錄自 *Chem. Lett.* 2006)



#### 4-2-1-3 萃取奈米碳管

2004年美國學者Tour研究以官能基修飾單壁奈米碳管(single wall carbon nanotubes, SWNTs)的方法<sup>62</sup>，可將碳管表面功能化(functionalization)，使SWNTs的表面可帶有 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{NO}_2$ 或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 親水基，因此SWNTs變得容易溶解於水中，或是高極性的溶劑，像是甲醇、乙醇等。美國學者Smalley等人在2005年所發表的研究中<sup>63</sup>，敘述這些藉由表面修飾後的SWNTs，因為表面帶負電荷的關係，在TOAB分子的幫助之下，SWNTs可由水相轉移到有機溶劑中，有機溶劑種類使用甲苯(toluene)或是乙酸乙酯(ethyl acetate)，實驗方式採用批式萃取法，首先將一固定量的SWNTs加到水中，SWNTs表面含有 $\text{SO}_3^-$ 磺酸基，再將SWNTs的水溶液與含有不同濃度TOAB的有機溶液(甲苯或是乙酸乙酯)，以體積比1:1之比例置於同一個樣品瓶中，接著

再以手搖此樣品瓶30秒鐘，使上下兩相劇烈混合，搖晃完畢之後再靜置一段時間，讓瓶中的兩相分層，無論是甲苯或是乙酸乙酯萃取之後，搖晃之後都會形成乳液態(emulsion)，但是甲苯溶液會在幾分鐘內恢復成為不互溶的兩相，如果使用的是乙酸乙酯做為溶劑，則需要比較長的時間過後，乳液狀態才會消失，這可能是因為甲苯溶液對於TOAB及SWNTs的溶解度較大，所以在短時間內就可將乳液態溶解，將SWNTs溶入上層相。

比較不同濃度TOAB的萃取結果，若無添加TOAB的有機溶劑，對於SWNTs幾乎無萃取能力，如果TOAB與碳管上的 $\text{SO}_3^-$ 濃度定義為離子配對比(ion-pairing)，因為TOAB與 $\text{SO}_3^-$ 的電荷配對比例為1:1，當所加入的TOAB與 $\text{SO}_3^-$ 濃度相等時，這時的離子配對百分比即為100%，當TOAB濃度微幅增加，可以從界面中看出有些微的黑色沉澱，這時的TOAB與 $\text{SO}_3^-$ 的濃度比小於30%，表示這些含有低濃度TOAB的有機溶劑，對於SWNTs的萃取能力並不高。相對地，在含有TOAB與 $\text{SO}_3^-$ 的濃度為60%以上，則上層相有較多的SWNTs，若TOAB與 $\text{SO}_3^-$ 的濃度比為100~200%，則幾乎所有的SWNTs都被萃取到有機溶劑中。再利用原子力顯微鏡(atomic force microscope；AFM)對測量在各不同濃度TOAB所萃取到的SWNTs(圖4-2)，發現隨著TOAB的濃度增加，不僅是SWNTs的萃取量變多，其碳管長度也會隨之增加，表示以低濃度的TOAB萃取SWNTs樣品，容易萃取長度比較短的SWNTs，而比較不容易萃取長度較大的SWNTs，當離子配對比例達到100%以上時，在水溶液中的SWNTs，無論較長或較短的SWNTs都會轉移(transfer)到有機溶劑。此奈米碳管萃取實驗即是靠著調控TOAB的濃度，可以選擇性地萃取不同長度的奈米碳管。

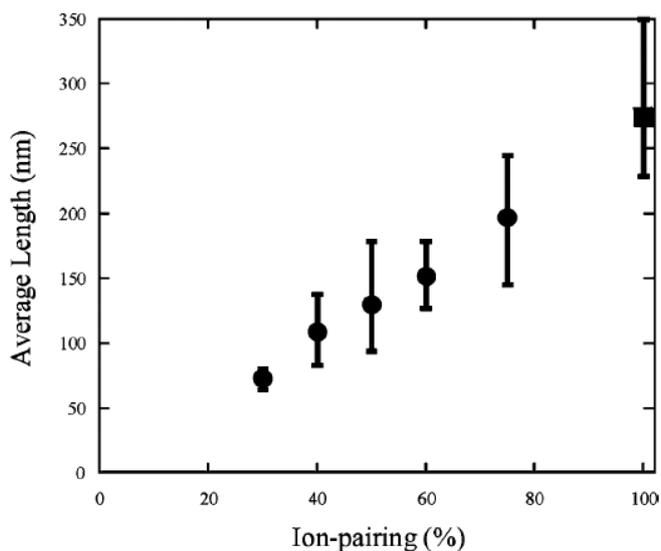
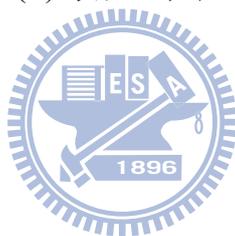


圖 4-2 SWNTs 的平均長度與 TOAB 濃度的關係圖

(●)是經過 TOAB 萃取後的長度，(■)為樣品原本的平均長度。(本圖<sup>63</sup>摘錄自 *Nano Lett.* 2005)



### 4-3 實驗

#### 4-3-1 實驗藥品與材料

##### 合成奈米粒子之試藥

Silver nitrate, 99.8 %, (Showa, Japan)

Sodium borohydride, 98 %, (Alfa Aesar, USA)

11-mercaptoundecanoic acid (MUA), 95%, (Sigma-Aldrich, USA)

##### 配製緩衝溶液之試藥

Sodium acetate, GR grade, (Showa, Japan)

Potassium dihydrogenphosphate, GR grade, (Showa, Japan)

Tris(hydroxymethyl) aminomethane, ACS grade, (Tedia, USA)

Dipotassium phosphate, GR grade, (Showa, Japan)

## 界面活性劑

Tetraoctylammonium bromide (TOAB) , GR grade , (Fluka, USA)

Trioctylmethylammonium bromide (TOMAB) , GR grade , (TCI, Japan)

Dimethyldioctylammonium bromide (DMOAB) , GR grade , (TCI, Japan)

Trimethyloctylammonium bromide (TMOAB) , GR grade , (TCI, Japan)

Tetrapropylammonium bromide (TPAB) , GR grade , (TCI, Japan)

## 溶劑

*n*-hexane , HPLC grade , (Tedia, USA)

Toluene , HPLC grade , (Tedia, USA)

Deionized water , purified from Milli-Q plus , (Millipore, USA)

## 4-3-2 實驗儀器

### 1. 逆流層析儀

型號為 Model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA), 儀器主體安置於控溫箱中, 溫度控制在 20 °C , 主體部分之空心管柱, 其內徑為 1.6 公釐(1/16 英吋), 外徑為 3.2 公釐(1/8 英吋), 管柱材質為鐵氟龍, 其耐壓壓力約為 21 kg/cm<sup>2</sup>, 耐溫 50 °C , 管柱的總長度約為 57 公尺, 纏繞在 3 個線軸上(3 spools), 總體積為 114 毫升, 在本章節的實驗中, 只有使用其中一個線軸上的管柱, 因此總長縮減為 19 公尺, 管柱總體積為 38 毫升, 儀器主體中的鐵氟龍管柱, 自轉與公轉半徑的比例( $\beta$  值)為 0.59。主體外部以鐵氟龍管線與幫浦、偵測器相互連接, 其內徑為 0.8 公釐(1/32 英吋)、外徑為 1.6 公釐(1/16 英吋) 連接管線的總長度約為 1 公尺。

### 2. 幫浦

型號為 Series II Digital HPLC pump , 流速設定可由 0.01 mL/min 到 10.00 mL/min, 幫浦購自 Pharma-Tech Research Company, Baltimore,

MD, USA。

### 3. 紫外光/可見光線上偵測系統

偵測器型號為Bio-Rad Model 1801 UV-visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，可偵測紫外光波長為190~380 nm，可見光波長為380~800 nm，偵測器外部與電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統SISC (訊華公司，台北市)擇取偵測器之訊號。

### 4. 紫外光/可見光光譜儀

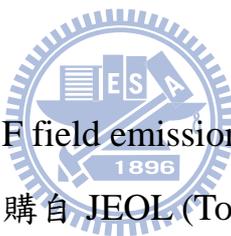
型號為 Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer (Waldronn, Germany)。

### 5. 紅外光光譜儀

型號為 Bio-Rad FTS 165 infrared spectrophotometer (Philadelphia, PA, USA)。

### 6. 掃描式電子顯微鏡

型號為 JEOL JSM-7401F field emission scanning electron microscopy (SEM) system，購自 JEOL (Tokyo, Japan)，附有 energy dispersive X-ray (EDX) 偵測系統，加速電壓為 10 KeV。



### 7. 分管收集器

型號為 Advantec CHF 121SA fraction collector (Tokyo, Japan)，最多可收集 100 支收集管，每管體積最多可設定為 10 mL。

### 8. 離心機

由德國 Hettich 生產，型號為 EBA20，最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g。

### 4-3-3 實驗步驟與方法

#### 4-3-3-1 奈米粒子的合成方法

所有反應瓶先以  $\text{HNO}_3$ (0.1M) 以及去離子水清洗，將  $\text{NaBH}_4$ (19 mg) 溶於 25 mL 去離子水中，再加入 MUA(1.7 mg) 於  $\text{NaBH}_4$  中，攪拌 5 分鐘待 MUA 完全溶解後，在劇烈攪拌下逐滴加入  $\text{AgNO}_3$  水溶液(21 mg 溶於 25 mL 去離子水中)至上述含有還原劑  $\text{NaBH}_4$  以及保護劑 MUA 的混合溶液，反應約 1 分鐘後溶液顏色由透明轉黃色，再由淡黃色逐漸轉為深褐色，持續攪拌 24 小時之後，即完成反應，以  $\text{HCl}$ (0.1 M) 調整到 pH 2 之後，以低速離心(6000 rpm, 10 min) 奈米粒子，以去離子水清洗後再次離心，清洗重覆 3 次之後，離心後的沉澱物重量約 15 mg，加入 50 mL 的緩衝溶液(20 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 11) 保存，作為待分離的樣品，須注意這裡保存用緩衝溶液的離子強度不能過高，太高的離子強度會使奈米粒子不穩定而產生聚集現象<sup>64</sup>。

#### 4-3-3-2 配製不同酸鹼值下的緩衝溶液

將合成好的奈米粒子離心(6000 rpm, 10min) 過後，分別溶解在不同酸鹼值的緩衝溶液，緩衝溶液配置方法如下：

- (a) 20 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  / 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  調配 pH 5.0
- (b) 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 0.1 M  $\text{NaOH}$  調配 pH 範圍 6.0
- (c) 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethane / 0.1M  $\text{HCl}$  調配 pH 範圍 7.0-9.0
- (d) 20 mM  $\text{KHCO}_3$  / 0.1M  $\text{KOH}$  調配 pH 範圍 10.0
- (e) 20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  / 0.1M  $\text{KOH}$  調配 pH 範圍 11.0-12.0

奈米粒子的濃度約為 300 mg/L，再將不同酸鹼值下的奈米粒子稀釋約 30 倍之後，測量各瓶中的可見光吸收光譜。

### 4-3-3-3 使用不同溶劑以及界面活性劑萃取奈米粒子

配製濃度為 300 mg/L 的奈米粒子於緩衝溶液中(20 mM,  $K_2HPO_4$ , pH 11)，萃取相的溶劑使用甲苯、甲苯/正己烷(體積比為 1:1)、正己烷等三種有機溶劑，將界面活性劑 TOAB、TOMAB、DMOAB、TMOAB、及 TPAB 分別溶解在上述三種有機溶劑中(若界面活性劑無法溶解於有機溶劑中，則需紀錄之)，界面活性劑的濃度皆固定為 0.5 mM。再將含有不同有機溶劑及界面活性劑的萃取相，以體積 1:1 的比例與奈米粒子溶液混合並劇烈攪拌 20 分鐘，選出萃取效果最佳而且不會產生沉澱的有機溶劑/界面活性劑組合。

### 4-3-3-4 奈米粒子的分析方法

#### 1. 奈米粒子在有機相的可見光吸收光譜

將原本銀奈米粒子的水溶液稀釋 30 倍，濃度約變為 10 mg/L，以水溶液做為紫外可見光譜的背景吸收值，測得奈米粒子在水中的吸收光譜。有機相中的光譜，則是先將 10 mL 的奈米粒子溶液(300 mg/L)與 10 mL 含有 1mM 的 TOAB 有機溶液(體積比為甲苯: 正己烷 = 1:1)劇烈混合 20 分鐘，再將上層深黃色的有機相取出，以同樣比例的甲苯/正己烷(體積比 1:1)混合溶液稀釋 15 倍，可測得奈米粒子在有機相中的吸收光譜。

#### 2. 奈米粒子的紅外光光譜

將合成好的銀奈米粒子以及 MUA 粉末置於真空中乾燥，乾燥之後的粉末加入 KBr 之後壓製成鹽片，分別測量紅外光光譜。

#### 3. 電子顯微鏡樣品之前處理

將合成好的奈米粒子以水稀釋 100 倍左右，滴於平滑玻璃表面，再將其至於真空烘箱中乾燥 24 小時，為了增加掃描式電子顯微鏡的影像解析度，表面再鍍上約 2 nm 的鉑(Pt)，EDX 光譜之加速電壓固

定為 10 keV。

#### 4-3-3-5 以 CCC 分離奈米粒子

- (a) 以幫浦將甲苯/正己烷(1:1)混合溶液打入 CCC，將 38 mL 的管柱填滿有機溶劑。
- (b) 將 CCC 轉速調至 700 rpm，溫度控制在 20 °C，UV 偵測器波長調至 427 nm。
- (c) 以 CCC 的 tail-to-head 方向，注入 5 mL 的奈米粒子樣品，奈米粒子的濃度為 300 mg/L。
- (d) 樣品一注入之後，立即將動相更換為含有濃度為 0.1 ~0.01mM 不等的 TOAB 有機溶液(甲苯/正己烷 = 1:1)，動相流速皆設定在 1 mL/min。
- (e) 固定每 2 mL 收集一次，再參考流析訊號圖，將有波峰出現的收集管處理之後，測量紫外-可見光光譜圖以及拍攝電子顯微鏡圖片。
- (f) 實驗完成後，逆流層析停止轉動，以氮氣將管柱內的液體吹出並收集，並可觀察推出的液體中是否有沉澱。
- (g) 以 80 mL 的甲苯與正己烷(1:1)混合溶液沖洗管柱，再以 80 mL 丙酮以及去離子水清洗。最後再用氮氣吹乾管柱。

#### 4-3-3-6 以批式萃取法分離奈米粒子

- (f) 先將 1.5 mg 的銀奈米粒子溶解於 5 mL 緩衝溶液中(20 mM,  $K_2HPO_4$ , pH 11)。
- (g) 再把上述奈米粒子水溶液，加入含有 10 mL TOAB 的有機溶劑(甲苯:正己烷 = 1:1)並攪拌 20 分鐘。
- (h) 以滴管小心吸取並移走上層相，加入新鮮配製好的 10 mL TOAB 的甲苯/正己烷(1:1)溶液，再將有機溶液與奈米粒子水溶液劇烈攪拌 20 分鐘。

(i) 重複以上步驟 4 次，將每次萃取後的有機溶劑收集，再進行電子顯微鏡的量測。

## 4-4 結果與討論

### 4-4-1 合成的奈米粒子之性質

#### 4-4-1-1 紫外可見光光譜

將離心之後的沉澱物溶解於不同酸鹼值下的緩衝溶液，奈米粒子的紫外/可見光光譜如圖 4-3 所示，反應完成後的銀奈米粒子，因為其合成環境中有過量的  $\text{NaBH}_4$ ，溶液呈弱鹼性，從奈米粒子的吸收光譜中，在波長為 416 nm 處有很強的表面電漿共振吸收。若將奈米粒子置於 pH 5 及 pH 6 的環境中，發現奈米粒子的分散效果極差，幾乎不溶於弱酸性的水溶液，這與奈米粒子的表面性質有關，我們在奈米粒子的表面修飾上 MUA 分子，根據文獻指出，MUA 的 pKa 值約為 5.7 左右<sup>65</sup>，因此在水溶液的酸鹼值為 pH 5 以及 pH 6 的條件下，奈米粒子表面的 MUA 分子不容易解離，於是奈米粒子在水中的分散能力變得極差，在吸收光譜中也無法測得波長在 416 nm 左右的訊號。若將水溶液中的酸鹼值提高到 pH 7 以上，則可以明顯偵測到 416 nm 左右的表面電漿吸收訊號，顯示在 pH 值較高的情形下，奈米粒子表面電荷越多，粒子之間因為帶相同電荷而互相排斥，在溶液中分散情形也就越好。

奈米粒子在緩衝溶液中 (20 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 11) 以及 1 mM TOAB 的甲苯/正己烷溶液中的吸收光譜如圖 4-4 所示，我們可從圖 4-4 中看到銀奈米粒子在萃取前後的吸收光譜變化，奈米粒子的最大吸收值波長由 416 nm 位移到 446 nm，從光譜中可發現在萃取後，奈米粒子的

吸收光譜產生 30 nm 的紅位移，在其他研究中，例如金奈米粒子也有類似現象，當金奈米粒子由水溶液萃取至有機溶劑後，吸收波長也產生 4~22 nm 紅位移的情形<sup>66</sup>，紅位移的產生是因為環境受到改變，當粒子周圍物質的介電係數發生改變時，表面電漿共振吸收也會產生變化。

#### 4-4-1-2 紅外光光譜

為進一步鑑定奈米粒子的表面分子，分別將乾燥後的奈米粒子粉末以及 MUA 分子與溴化鉀壓製成鹽片之後，測量紅外光光譜(見圖 4-5)，銀奈米粒子的紅外光光譜上有明顯的羧酸 COOH 振動吸收峰<sup>67</sup>( $1740\text{ cm}^{-1}$ )以及碳鏈 CH 的吸收峰( $\sim 2917\text{ cm}^{-1}$ )，與 MUA 分子上這兩種官能基的吸收波數吻合，但最大的不同處在於 MUA 分子上可看見硫醇 SH 的振動吸收( $2550\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ )，但是在銀奈米粒子的光譜中卻無 SH 的振動吸收，這是因為在銀奈米粒子中，MUA 分子上的硫醇基 SH 與銀原子形成 Ag-S 共價鍵結<sup>68</sup>，由以上紅外光譜的資訊，進一步確認銀奈米粒子的表面修飾 MUA 分子。

#### 4-4-1-3 電子顯微鏡以及 EDX 光譜資訊

將稀薄的奈米粒子置於平滑玻璃表面，以掃描式電子顯微鏡測量粒子的分佈結果如圖 4-6 所示，計算 300 顆奈米粒子的平均尺寸為  $15.8\pm 5.3\text{ nm}$ ，可知奈米粒子的分佈相當廣，為非均一的粒徑分佈。在 EDX 光譜圖中可測得元素 C、Ag、O、S、Si、以及 Pt 的訊號，其中 O 以及 Si 的訊號來自背景物質(玻璃)，計算 S/Ag 原子的比例約為 0.07，因此可推算出在銀奈米粒子中(銀核心加上表面上的 MUA 分子)，MUA 分子的重量百分比為 12.4%，銀奈米粒子的密度約  $58\text{ atom/nm}^3$ ，這數值與金奈米粒子的密度  $59\text{ atom/nm}^3$  相近<sup>61</sup>，以一顆粒徑為 10 nm 的球體銀粒子而言，銀粒子重量約為 3272,000 (amu)，若 S/Ag 的比

例為 0.07，則表面的 MUA 分子重量為 463,000 (amu)，兩者之總和即為奈米粒子的分子量 3735,000 (amu)。

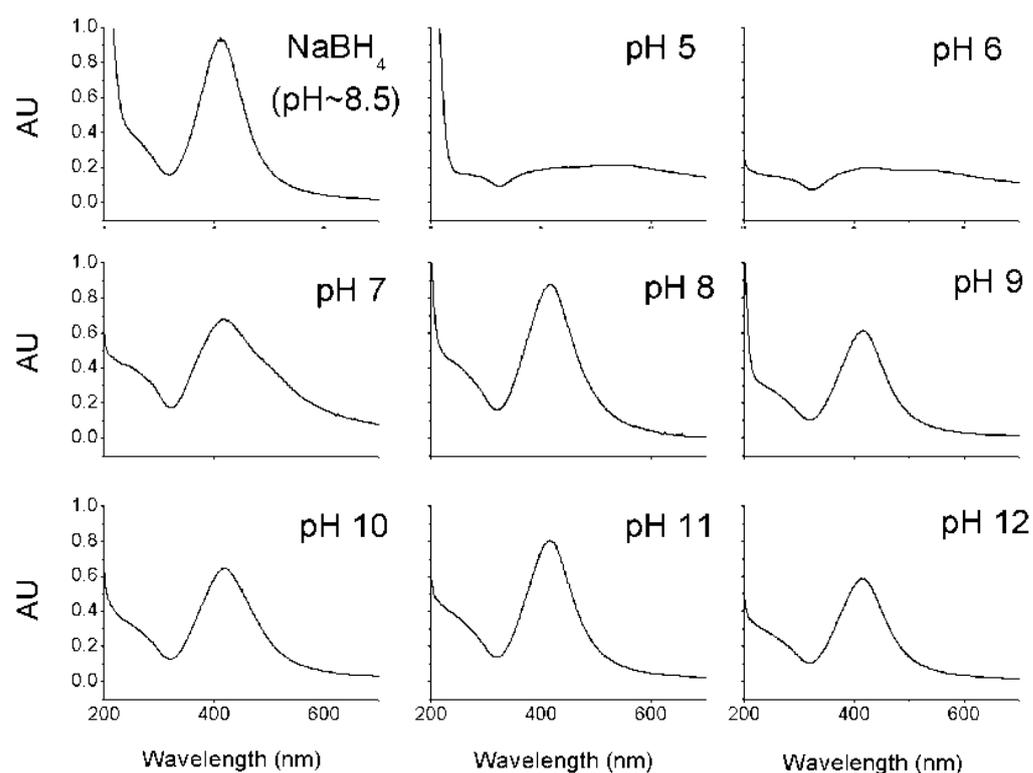


圖 4-3 銀奈米粒子在不同酸鹼值下的紫外/可見光吸收光譜

左上角是與 NaBH<sub>4</sub> 反應完之後、尚未經過離心的奈米粒子，其餘的光譜是將離心沉澱後的奈米粒子，再溶回到緩衝溶液中，在各溶液中緩衝溶液濃度皆為 20 mM，奈米粒子的濃度約為 10 mg/L。

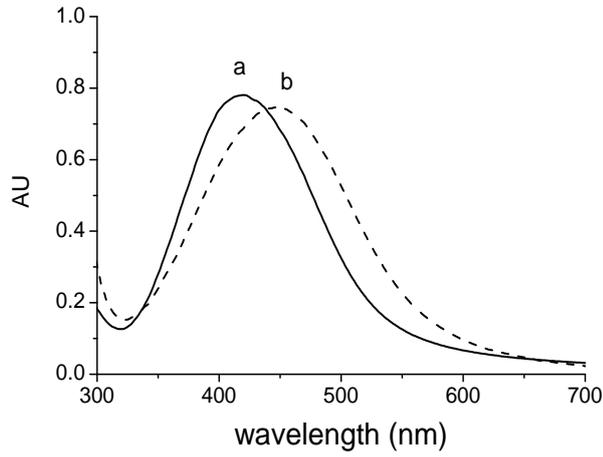


圖 4-4 銀奈米粒子的紫外/可見光吸收光譜

(a) 在磷酸鉀水溶液(20 mM,  $K_2HPO_4$ , pH 11)中，最大吸收波峰的波長約 416 nm

(b) 在 1 mM TOAB 的甲苯/正己烷溶液中，最大吸收波峰的波長約 446 nm

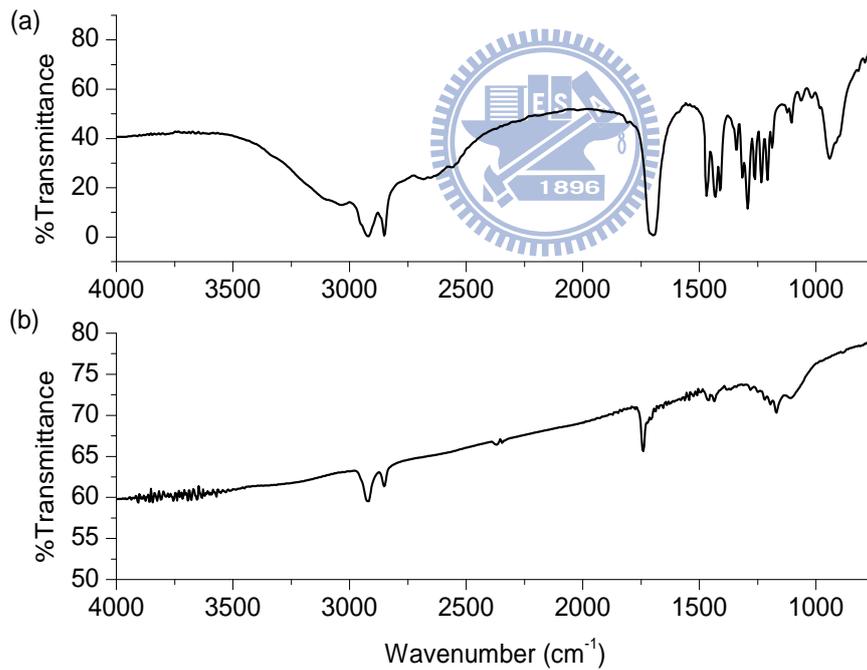


圖 4-5 (a) MUA 分子和(b) 銀奈米粒子的紅外光光譜圖

COOH 振動吸收( $1740\text{ cm}^{-1}$ ), CH 振動吸收( $2917\text{ cm}^{-1}$ ), SH 的振動吸收( $2550\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ )。

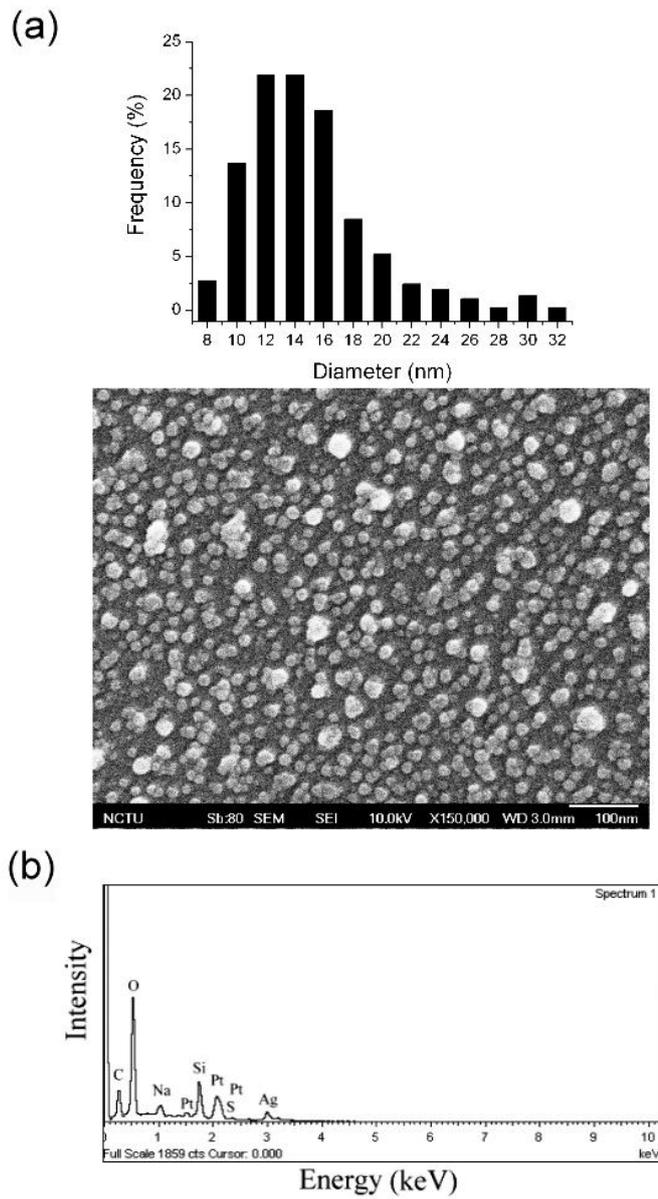


圖 4-6 銀奈米粒子的(a)粒徑分佈圖，(b)銀奈米粒子的 EDX 光譜。

電子顯微鏡加速電壓為 10 keV，可得 C、Ag、O、S、Si、以及 Pt 的訊號。

## 4-4-2 溶劑與界面活性劑的選擇結果

### 4-4-2-1 不添加界面活性劑的分佈情形

當我們一開始以 CCC 分離奈米粒子，先嘗試常用在 CCC 的有機-水相溶劑系統，使用甲苯-正己烷-水等三種溶劑，看是否能利用極性的差異分離奈米粒子，奈米粒子表面的 MUA 分子 pKa 值約為 5.7<sup>65</sup>，在酸性條件下(pH 2 ~ 5)奈米粒子的表面較為疏水，雖然在酸性條件下奈米粒子在水中的溶解能力很差，但這疏水性的奈米粒子也不會溶解於甲苯/正己烷溶液，因為均無法溶解於這些溶液中，奈米粒子最終會沉澱或是吸附在管柱、玻璃瓶壁上。若溶液的酸鹼值提高到 pH 6 以上，奈米粒子因為帶電荷的因素，幾乎分佈於水溶液中，而不會進入有機溶劑，這實驗使我們了解，想要改變奈米粒子的分佈係數，不能僅僅靠著改變溶劑種類，而需要尋找其他的方式，例如加入可穩定並且增加奈米粒子分佈的修飾劑，界面活性劑便是其中一種選擇，可穩定地將粒子從水相萃取到有機相。



### 4-4-2-2 溶劑以及界面活性劑對萃取效果的影響

我們進一步探討溶劑以及界面活性劑對萃取效果的影響，因為銀奈米粒子在溶液中呈現黃色，萃取效果可以簡單的由顏色來判斷，經過萃取之後，若下層水相的黃色消失，有機相由無色轉為深黃色，我們可以藉由這樣的顏色改變，判斷其萃取能力較佳，若是經過與有機溶劑混合之後，下層水相仍呈黃色，上層有機溶液也略帶黃色，判斷為較弱的萃取能力。如果下層相呈現深黃色，與萃取前的顏色並無太大改變，有機相仍為無色透明，判斷為無萃取能力。配製不同萃取相的萃取結果請見表 4-1。因為 TOAB 有四條長碳鍊、TOMAB 則有三條長碳鍊，這兩種界面活性劑在甲苯中的溶解度都相當好，對於奈米

粒子也有最佳的萃取效果。當我們使用同一種有機溶劑(甲苯)時，可明顯地看出，隨著長碳鍊數目的減少，界面活性劑在有機溶劑中的溶解度，以及對於奈米粒子的萃取能力皆逐漸下降，DMOAB 僅有兩條長碳鍊，對奈米粒子的萃取能力低於 TOAB 以及 TOMAB，而 TMOAB 只有一條長碳鍊，TPAB 雖然有四條碳鍊，但碳數不夠多，所以 TMOAB 以及 TPAB 這兩者皆無法溶解於甲苯中，無法以這兩個界面活性劑萃取奈米粒子。

除了界面活性劑之外，有機溶劑中發現以甲苯為最好的溶劑，可能是因為甲苯對於界面活性劑的溶解能力較佳，在過去對於奈米材料的萃取研究中，除了四氯化碳以及氯仿之外，最常用的溶劑也就是甲苯<sup>59</sup>，除了甲苯之外，我們另外測試了正己烷的溶解能力以及萃取效果，正己烷是一種常用於 CCC 使用的溶劑，但是經過萃取結果發現：TOAB、TOMAB 以及 DMOAB 在正己烷中的溶解度不佳，除了 TOMAB 之外，另外兩種界面活性劑幾乎沒有萃取效果。所以可知，正己烷對於萃取效果來說，並不是一種好的溶劑。但為了減少甲苯的使用，我們在這裡採取折衷的方式，將甲苯以及正己烷以體積比 1:1 的方式混合，既可以提供足夠的溶解能力以及萃取效果，又可減少甲苯的使用量。由上述實驗結果，我們選用 TOAB 做為萃取用之界面活性劑，甲苯與正己烷(1:1)的混合溶液做為溶劑，進行之後的奈米粒子萃取實驗。

表 4-1 界面活性劑在溶劑下對銀奈米粒子的萃取效果

極佳萃取效果(○○)、有部分萃取效果(○)、無法溶解且無萃取效果(×)

	TOAB	TOMAB	DMOAB	TMOAB	TPAB
Toluene	○○	○○	○	×	×
Toluene/hexane	○○	○○	○	×	×
Hexane	×	○	×	×	×

#### 4-4-2-3 CCC 分離奈米粒子

圖 4-7 是以 0.01 ~ 0.1 mM TOAB 的甲苯/正己烷溶液為萃取動相，在 CCC 中萃取 5 mL 奈米粒子(300 mg/L)的訊號圖，以 0.1 mM TOAB 為萃取動相，在流析時間約 50 分鐘處，得到訊號極大的單支波峰，因為流出的奈米粒子濃度極高，我們已經無法從偵測訊號中得到波峰頂點，形成了一個 off-scale 的訊號，在流析時間 75 分鐘過後，訊號幾乎為回到基線，此時的波峰的體積總流量約有 35 mL，以 TOAB 的流析總量來計算，這 35 mL 的動相含有大約 3.5  $\mu\text{mole}$  的 TOAB 分子，而樣品中奈米粒子表面的 MUA 數量，可由奈米粒子濃度(300 mg/L)以及 MUA 在奈米粒子中的重量百分比(12.4%)來計算，再扣除存在樣品中的不純物以及水分子<sup>61</sup>，樣品中的 MUA 總量估計值約 0.75  $\mu\text{mole}$ ，由於 TOAB 與 MUA 分子是以 1:1 的比例進行離子配對<sup>59</sup>，所以 35 mL 中含有的 TOAB 總量已經高於奈米樣品中的 MUA 分子，且超過 4 倍之多，將我們得到的單一波峰中的四支收集管，收集的相對位置可參考圖 4-7a 中的箭頭部分，收集時間分別為 42、50、58、62 分鐘，經過電子顯微鏡分析，發現在這四支收集管中奈米粒子大小分別為 15.6

$\pm 3.1 \text{ nm}$ 、 $16.0 \pm 3.5 \text{ nm}$ 、 $15.9 \pm 4.0 \text{ nm}$ 、 $16.1 \pm 4.2 \text{ nm}$ ，結果說明這支波峰的前緣(fraction 1~2)以及尾部所收集到的粒子(fraction 3, 4)，其大小分佈並無明顯不同，相當接近於原始樣品的大小( $15.8 \pm 5.3 \text{ nm}$ )。

於是我們降低 TOAB 的濃度至  $0.03 \text{ mM}$ ，再萃取同樣的奈米粒子，在圖 4-7b 萃取訊號圖中可看到兩支尚未完全分離的波峰，而且波峰寬度也較寬，約從 40 分鐘到 110 分鐘左右，流析體積增長為  $60 \text{ mL}$ ，使用 TOAB 濃度為  $0.03 \text{ mM}$  的萃取液，萃取平均粒徑為  $15.8 \pm 5.3 \text{ nm}$  的奈米粒子，雖然在 60 分鐘處出現第一支波峰，我們收集第一支波峰的前緣(fraction 1, 58 - 60 分鐘)，以及此波峰最大值(fraction 2, 62 - 64 分鐘)，接著再取第二支波峰出現最大值(fraction 3, 78 - 80 分鐘)以及第二支波峰的尾端(fraction 4, 90 - 92 分鐘)，經過電子顯微鏡測量分析四個流析時間所收集的樣品，四支收集管中奈米粒子的分佈範圍分別是  $13.8 \pm 2.5 \text{ nm}$ 、 $15.4 \pm 3.3 \text{ nm}$ 、 $16.2 \pm 4.1 \text{ nm}$ 、 $19.2 \pm 5.0 \text{ nm}$ ，以平均粒徑來看，降低 TOAB 濃度後的動相，對於不同尺寸的奈米粒子逐漸產生分離的能力。

將 TOAB 濃度降低至  $0.02 \text{ mM}$ ，分離奈米粒子得到萃取訊號圖 4-7c，圖中的訊號雖然沒有明顯分離的波峰，而且訊號寬度也相當大 (50 - 170 min)，這是因為使用的 TOAB 濃度已經很低( $0.02 \text{ mM}$ )，需要流析更多的動相才能萃取所有的奈米粒子，奈米粒子的訊號也因此廣佈在 120 分鐘內，分析在 60 - 62、74 - 76、88 - 90、110 - 112 分鐘處所流出的粒子，粒子大小分別為  $13.7 \pm 1.9 \text{ nm}$ 、 $14.1 \pm 3.5 \text{ nm}$ 、 $19.2 \pm 4.3 \text{ nm}$ 、 $22.2 \pm 4.9 \text{ nm}$ ，直到目前的萃取結果，發現動相中 TOAB 的濃度越低，對於奈米粒子的分離效果越好。

若將動相中的 TOAB 濃度再度減至  $0.01 \text{ mM}$ ，流析結果顯示於圖

4-5d, 含有濃度為 0.01 mM TOAB 的有機相對於奈米粒子的萃取效率極差, 與 0.02 至 0.1 mM TOAB 為動相的實驗相較之下, 奈米粒子的萃取訊號面積大幅縮小, 即使經過長時間的流析(約有 200 分鐘), 也無法將奈米粒子從水溶液中萃取出來, 這表示僅含有 0.01 mM TOAB 的有機溶劑對於奈米粒子的溶解度已經明顯不足, 即使經過長時間不斷地沖提, 也無法完全地將粒子萃取到有機相, 因此, 我們歸納以上的實驗結果, 降低有機溶劑中 TOAB 的濃度(0.1mM 降至 0.02 mM) 雖然可增加分離的解析度, 但 TOAB 的濃度卻不能大幅地降低, 還需要考慮有機溶液對於奈米粒子的溶解能力, 避免奈米粒子聚集產生沉澱。



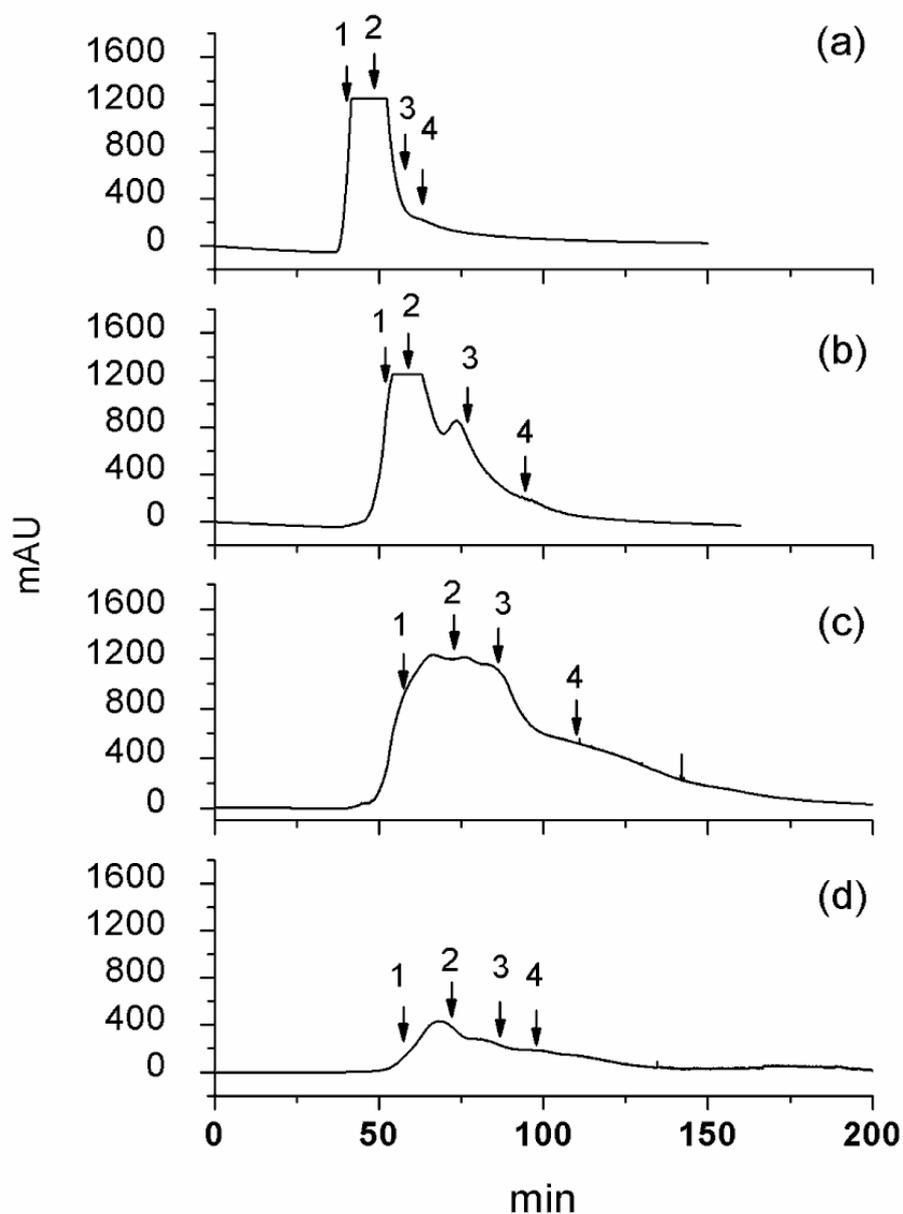


圖 4-7 CCC 分離奈米粒子訊號圖

在 CCC 儀器管柱內使用 TOAB/甲苯/正己烷為動相，動相流速 1 mL/min，萃取樣品是 5 mL 的銀奈米粒子，TOAB 濃度分別為(a) 0.1mM、(b) 0.03 mM、(c) 0.02 mM、(d) 0.01 mM。箭頭表示收集液的順序，每次收集 2 mL，各訊號圖中的依序為(a)42、50、58、62 分鐘，(b) 60、74、88、110 分鐘，(c) 60、74、88、110 分鐘，(d) 60、74、88、90 分鐘。

#### 4-4-3 最佳萃取效果與分離效率的討論

由上一節的實驗中，發現以 TOAB 濃度為 0.02 mM 的甲苯/正己烷混合溶液為萃取動相，得到的分離效果最好，因此我們再進一步探討這一個條件下，對奈米粒子的分離程度，以 CCC 儀器加上離子對萃取機制，分離效果與一般批式萃取的差異性有多大。首先我們測量在最佳 TOAB 濃度的實驗(0.02 mM)中四支收集管的吸收光譜，如圖 4-8 所示，最大吸收值的波長分別為 457、450、449、447 nm，可以看出隨著流析時間的增加，吸收波長有些微藍位移的現象，有研究指出在有機相中的奈米粒子，當粒子變大時，吸收波長也會有藍位移的現象<sup>69,70</sup>，因此我們由吸收光譜上的資訊，也可觀測到奈米粒子的粒徑會隨著流析時間而增加。再對照於批式萃取法的效率，我們同樣是使用濃度為 0.02 mM TOAB 的甲苯/正己烷混合溶液做為萃取相，奈米粒子樣品中的 MUA 量約為 0.75  $\mu\text{mole}$ ，如果 MUA 與 TOAB 分子以 1:1 的離子對結合，且達到熱力上完全平衡，約需要 39 mL 的萃取溶液(0.02 mM TOAB)，於是將批式步驟分為四次萃取，每次萃取各使用 10 mL、0.02 mM TOAB 的甲苯/正己烷混合溶液，每次萃取後分別將上層有機相取出，萃取液以電子顯微鏡分析，四次萃取的粒徑大小分別為  $14.2 \pm 3.0$  nm、 $15.1 \pm 3.3$  nm、 $15.9 \pm 4.1$  nm、 $17.5 \pm 4.4$  nm，圖 4-9 是綜合 CCC 分離與批式萃取法分離效率的比較，比較使用 TOAB 濃度(0.01 - 0.1 mM)在 CCC 分離結果，最佳 TOAB 濃度(0.02 mM)在 CCC 連續萃取的分離結果，明顯地優於同一 TOAB 濃度下四次批式操作的分離結果，甚至次佳 TOAB 濃度(0.03 mM)在 CCC 連續萃取的分離結果，也比 0.02 mM TOAB 批式萃取的結果還理想，另外在兩個 TOAB 濃度(0.01 以及 0.1 mM)下的分離結果，因為含有過濃或是太稀薄的 TOAB，過濃的 TOAB 濃度下，造成所有的奈米粒子太

容易進入有機溶液，沒有分離效果的萃取，太稀薄的 TOAB 濃度下，或是無法進入有機溶液中，無法有效分離奈米粒子。

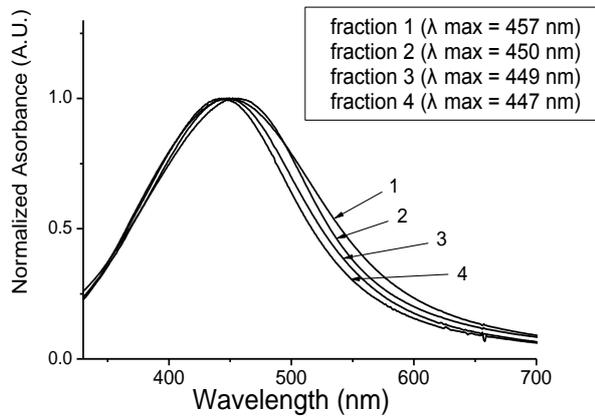


圖 4-8 收集管中的紫外/可見光譜

以 0.02 mM TOAB 有機溶液為萃取相，層析圖如圖 4-5c，在 CCC 中萃取奈米粒子，四個收集管(的的紫外/可見光譜，令各光譜中最高吸收強度為 1，方便比較最大吸收值的波長，最大吸收波長從 457 nm 減少到 447 nm，隨著收集時間增加而有藍位移(~10 nm)的現象。

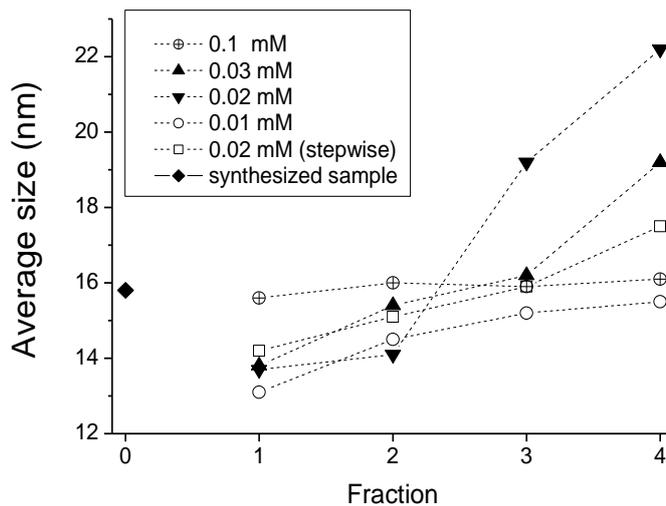


圖 4-9 CCC 分離及批式萃取法，分離效果的比較。

## 4-5 結論

以陽離子界面活性劑萃取表面負電荷奈米粒子的原理，利用批式萃取法分離奈米粒子，多次的萃取可以提升大小分離的解析度，首先嘗試將有機萃取相應用於 CCC 的動相系統，在有機溶劑的選擇上，使用甲苯/正己烷混合溶液，陽離子界面活性劑則選用 TOAB，且找出 TOAB 最適合的濃度來增加分離能力，利用 CCC 儀器分離的過程，可視為一種連續式萃取法，而非層析分離原理，我們介紹並發展了這一種特殊的萃取流析法，可成功地利用 CCC 分離奈米粒子。



## 第五章、逆流層析儀中流動訊號之分析

### 5-1 前言

螺管式場流分離儀(Coiled Tube Field-Flow Fractionation, CTFFF)可分離微米級物質<sup>71</sup>，靠著 CCC 旋轉產生的離心力分離矽砂粒子，在 CTFFF 實驗中，小於 1  $\mu\text{m}$  的粒子幾乎沒有滯留能力，越大的粒子會越慢流出管柱，實驗中 CTFFF 轉速僅只有每分鐘數十轉，但大多數的 CCC 轉速約 700~900 rpm，所以我們嘗試著提高 CCC 的轉動速度，看是否能對於奈米粒子產生滯留，分析樣品是使用第四章內容中所製備的銀奈米粒子，大小約  $15.8 \pm 5.3 \text{ nm}$ ，利用線上偵測器紀錄奈米粒子的流析訊號，在 CCC 轉速為 0 rpm 時，訊號的波形非常不對稱，若將 CCC 轉速提高，離心力越強，理論上會產生類似場流的分離機制，但實驗結果顯示非並非如此，奈米粒子訊號反而會更集中、更對稱、更趨近高斯形狀，雖然我們無法利用 CTFFF 機制來分離奈米粒子，但就波形改變的現象而言，引起了我們的研究興趣，進一步探討使波形改變的參數，諸如動相流速、分子擴散的大小、CCC 轉速等。

## 5-2 研究理論與背景

### 5-2-1 樣品在螺旋空管柱中的流動行為

#### 5-2-1-1 利用逆流層析儀，在單一液相中分離微米級物質

自從 1966 年，由 Ito 等人發展螺管行星式離心儀(Coil Planet Centrifuge)<sup>72</sup>，直到今日的這數十年來，關於逆流層析的文獻，無論是在機械結構上的改進<sup>73</sup>、行星式轉動的探討<sup>1,2</sup>、管柱的纏繞方式與動靜相系統的發展<sup>6,74,75</sup>方面的研究，其目的都在於增進靜相的滯留能力，以及尋找合適的分佈係數(K)，這些都是促進逆流層析發展的重要研究。靠著分析物在動靜相的分佈係數不同，可逐一分離分析物中的成分。

如果管柱內只存在單一相液體，沒有層析系統中的動相與靜相，並且在轉動的情形下，這樣的逆流層析儀(行星式轉動的螺管)，會對分析物的流動行為會產生怎樣的變化呢？在 2000 年俄國學者 Shkinev 發展出以單一水相，於逆流層析儀中分離微米級粒子<sup>76</sup>，在這研究中，雖然使用的逆流層析儀器，在名稱上是屬於層析儀器的一種，但分離的基礎原理並非屬於層析的範疇，反而相近於另外一種分離機制，稱為場流分離儀(Field-Flow Fractionation, FFF)，FFF 是一種利用物理作用力於流體中來分離粒子的技術<sup>77-79</sup>，可以運用的力場包含重力場(gravitational field)，離心力場(centrifugal field)，電力場(electrical field)，與磁力場(magnetic field)，分離的原理，如圖 5-1 所示，可以簡述如下：以幫浦推動的流體中，整體而言雖然是以幫浦的推動速度在前進(平均速度)，但就微觀而論，靠近管壁附近的流體會因摩擦力等因素，所以流速較慢，而靠近管柱中心的流速較快。若一物質在此流體中不受其他物理力場干擾，此物質會因為擴散而均勻分布在管柱的截面，最後流出管柱的時候，物質的流速等同於幫浦推動的速度，但我們若

在垂直管壁的方向，施加一個物理力場使此物質在管柱中無法隨機擴散，因為受這些作用力的關係，例如帶電粒子會受電場吸引，磁性粒子受磁場吸引，不同大小、不同密度的物質所受的離心力不同，所以受力的物質會變得比較偏向管壁集中，在靠近管壁之處的流動速度是比較慢的，因此最後當此物質流出管柱的時候，會比平均流速還來得慢，產生類似層析管柱中的滯留現象，因此，雖然力場作用的方向與流體流動方向垂直，但因為改變了物質在管柱中的截面座標，受作用力影響較大的物質會偏向管壁，流動速度因而較慢，造成在流體中前進的速度不同而分離物質。所以 FFF 是一種可應用在分離微米粒子、生物細胞、以及奈米粒子的技術。

根據以上 FFF 的分離原理，以 J-type 型逆流層析儀為實驗裝置，因為逆流層析儀是以行星方式轉動，使儀器內部的螺旋管柱產生一個不均勻的離心力場，稱之為螺管式場流分離儀(Coiled Tube Field-Flow Fractionation, CTFFF)，可以利用 J 型 CCC 儀器，逐漸降低轉動速度，同時增加動相的流速<sup>71</sup>，依大小分離 1~10  $\mu\text{m}$  的矽砂粒子，經分離後的粒子分佈結果以圖 5-2 說明之。

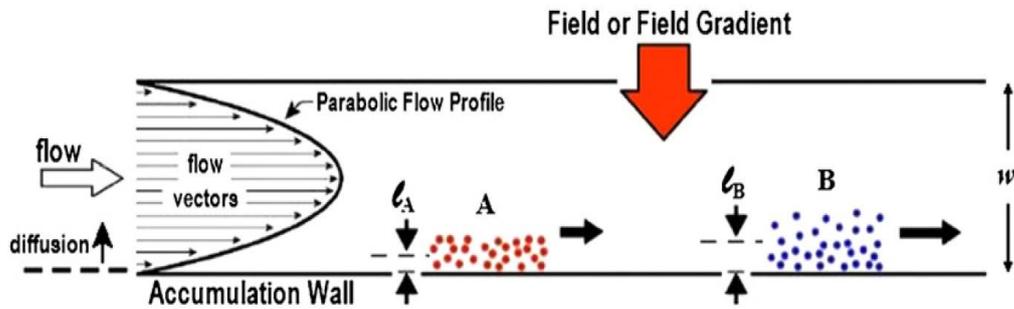


圖 5-1 場流分離法示意圖

粒子 A 以及粒子 B 因為受到物理力場的作用力大小不同，A 受到較大作用力，因此分佈比較接近管壁，在層流中 A 的流速較慢，B 受到較小的作用力，在管柱徑向的分佈比較廣，故 B 流速較快，與 A 分離。

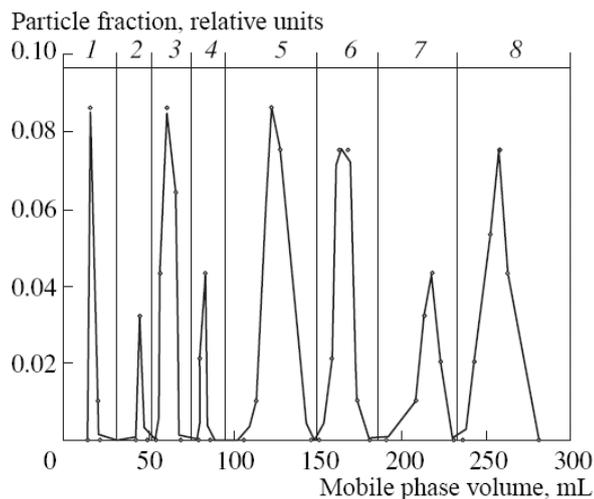


圖 5-2 以 CTFFF 分離矽砂粒子的流析圖譜

樣品為 10  $\mu\text{g}$  的 silica gel(1~15 $\mu\text{m}$ )，CTFFF 轉速為 70 rpm，初始動相流速 0.15 mL/min，每個 fraction 的流速以及 silica gel 尺寸分別為：(1) 0.15 mL/min; < 1  $\mu\text{m}$ ，(2) 0.35 mL/min; 1-2  $\mu\text{m}$ ，(3) 0.67 mL/min; 2-3  $\mu\text{m}$ ，(4) 1.0 mL/min; 3-4  $\mu\text{m}$ ，(5) 3.5 mL/min; 5-7 $\mu\text{m}$ ，(6) 6.7 mL/min; 7-8  $\mu\text{m}$ ，(7) 10 mL/min; 10 $\mu\text{m}$ ，(8) 15 mL/min; > 10 $\mu\text{m}$ 。(本圖<sup>71</sup>摘錄自 *J. Anal. Chem.* 2003)

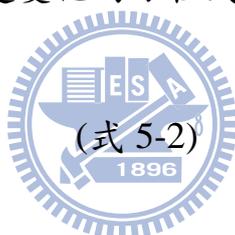
### 5-2-1-2 奈米粒子在空管中的流動訊號

首先，為了要界定流體的性質，雷諾數(Reynolds number, Re)是一個參考的指標，計算雷諾數公式為式 5-1：

$$\text{Re} = \frac{ul\rho}{\eta} \quad (\text{式 5-1})$$

其中  $u$  是線性流速(linear flow rate),  $l$  是管長(characteristic length),  $\rho$  是流體介質的密度(density of the medium),  $\eta$  是流體介質的黏度(viscosity of the medium), 當雷諾數小於 2000, 此流體可視為穩定的層流(laminar flow), 若雷諾數大於 2000 以上, 則會產生紊流(turbulent flow)。當樣品經過中空轉柱時, 若流體性質屬於層流, 管柱內產生拋物線型的流速分佈, 流速變化的方程式如式 5-2：

$$u(r) = 2u_{av} \left(1 - \frac{r^2}{a^2}\right)$$



在管柱不同位置中的流體流速是平均線性速度( $u_{av}$ ), 管柱半徑( $a$ ), 與距離軸心的位置( $r$ )的函數, 管柱中心位置的樣品分子的流動速度較快, 流體的最快速度可能是平均線性速度的兩倍(當  $r=0$ ), 相反地、在管壁附近的樣品分子的流動速度較慢(當  $r$  趨近  $a$ )。一般情況而言, 若分子的擴散極差, 則分子在徑向(radial direction)的運動可視為零, 因此以一個擴散(diffusion)極差的分子而言, 因為不容易藉由擴散而移動, 處在同一個徑向座標上, 則會維持同樣的速度前進, 位於管柱中心的分子會持續以高線性流速前進, 相反地、在管壁附近的分子則維持極慢的前進速度。因此, 當一個擴散極差的物質在流體中, 受拋物線型的流速差異的影響, 所以其樣品的延散(dispersion)也會變大。

相反地，若樣品分子是一個擴散極佳的物質，雖然在縱向(longitudinal direction)的運動也會變快，但如果我們比較分子的擴散速度與流體流速，分子的擴散速度遠小於流速，所以藉由分子擴散行為所造成的縱向延散(axial/longitudinal dispersion)並不明顯，反觀溶質在橫向(radial direction)上的運動，因為分子擴散能力佳，分子在管柱內的徑向可較快速地運動，因此雖然此樣品是在拋物線型流速分佈的層流中運動，因為徑向方向的運動性較好，使得每個樣品分子的流速不會相差太大，接近流體的平均線性流速，所以在流體中的延散也就相對較小。

奈米粒子的體積比一般的分子還要巨大，是一種擴散能力很差的物質，在 1994 年由德國學者 Fischer<sup>80</sup> 首先研究奈米粒子在空管柱中的流動波形，他發現奈米粒子波峰出現的位置與強度，會隨著粒子的大小而改變，因此可藉由觀測流動的波形，簡單地估計出奈米粒子的尺寸，他們稱此為 Wide-Bore hydrodynamic chromatography(HDC)，實驗中使用的空心螺旋管與普遍應用於流動注入分析(flow injection analysis; FIA)的儀器相同，裝置見圖 5-3，儀器主要組成部分的包含幫浦、樣品注入器、中空螺旋管柱，以及紫外可見光偵測器。注入 HDC 的樣品是直徑為 3.5~27.0 nm 硫化鎘 CdS 奈米粒子，除了觀察 HDC 的圖譜之外，作者同時利用大小排除層析法(Size-exclusion chromatography, SEC)偵測 CdS 奈米粒子，再比較這兩種層析圖形，從圖 5-4 中可看出，在 SEC 圖譜中，27.0 nm 大小的 CdS 的滯留時間約 2.8 min，隨著注入樣品的尺寸越來越小，滯留時間逐漸增加到約 4 min。但是在 HDC 圖譜中，無論是樣品波峰出現的時間或是波形，與 SEC 圖譜全然不同，在 HDC 中，若奈米粒子樣品的粒徑越小(3.5 nm)，則波形會變得類似高斯形狀，且波峰出現時間則是所有不同大小的奈米粒子中最久的一個，當奈米粒子的粒徑越來越大，波形會逐

漸向前傾，逐漸分裂成為兩波峰的型態。除了以 CdS 奈米粒子作為 HDC 樣品之外，另外以 HDC 分析粒徑分別為 3 - 15 nm 的金奈米粒子，也可得到 convection peak 與 diffusion peak。對於奈米粒子之所以會產生兩波峰的原因，是因為樣品在拋物線的流速中，無論是在位置與流速上，都是呈現不均勻分佈的狀態，因此樣品分子會在靠近管柱中心處出現一個速度較快的群體，跑在流體的前緣，流出管柱的時間也就較短，流析時間較短的波峰稱為 convection peak，另一個較晚出現的波峰稱為 diffusion peak，為了比較兩波峰的消長，首先定義 convection peak 的波峰強度為  $h_1$ ，diffusion peak 的波峰強度為  $h_2$ ，參考兩波峰強度的比值  $R = h_1/h_2$ ，可以利用  $R$  值用來描述同時具有這兩波峰的訊號，如圖 5-5 所示，若樣品的粒徑越大，得到的  $R$  值也就越大，代表 convection peak 的強度越強，diffusion peak 的程度越弱，相反地，若樣品粒徑小於 3nm， $R$  值幾乎為零，無法觀測到 convection peak 的產生，這時的波形也會偏向高斯分佈。

2005 年，日本教授 Okada 博士<sup>81</sup>，為了更進一步解釋並量化奈米粒子在空管柱中的波形，以 Taylor 在 1954 年提出的方程式(式 5-3)為基礎，模擬波形與實驗參數的關係，其模擬的方法如下：

$$D\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r}\right) = \frac{\partial C}{\partial t} + u(r) \frac{\partial C}{\partial x} \quad (\text{式 5-3})$$

$D$  是樣品擴散係數(diffusion coefficient of a solute)， $C$  是濃度，將此關係式以數解方式(numerical solution)表現，簡單地描述，是藉由數值模擬的方式，在空間上描繪出 9600 個單位點(cells)，這 9600(40 × 240)個單位點分別是 40 個 cell 在徑向(radial direction)，240 個點分佈在縱向(axial direction)，由式 1-7 可推算樣品這些交織而成的座標格

(meshes)中濃度的變化，所模擬出的訊號圖譜是一種流體通量(flux)，根據縱向距離管柱前源(inlet)處第 236 排的点(40 個點為一排)為偵測位置(detector response)，進而模擬出樣品在流析體積上(elution volume)的分佈形狀。相關的實驗參數包含了樣品擴散係數  $D$ 、偵測管長  $L$ 、管柱半徑  $a$ 、以及平均線性流速  $u_{av}$ ，這些實驗參數的關係式以  $\tau$  表示(式 5-4)，

$$\tau = \frac{DL}{a^2 u_{av}} \quad (\text{式 5-4})$$

圖 5-6 為模擬不同  $\tau$  值下的訊號圖譜，因為流速不同等因素，流析時間會有所不同，所以為了能比較圖譜之間的變化量，故須將流析時間改為流析體積，並採用相對流析體積(relative elution volume)為座標軸，來比較各條件下訊號圖譜的變化程度。從模擬圖中可以看出：當  $\tau$  越小，convection peak 的強度會越高，diffusion peak 的強度則會減弱甚至消失；當  $\tau$  接近 1，convection peak 將會消失，訊號的波峰變得以 diffusion peak 為主；當  $\tau$  大於 1，diffusion peak 的強度越來越大，相對訊號寬度也會越來越窄。

當 Okada 模擬出此關係式之後，他以聚苯乙烯奈米粒子(polystyrene nanoparticle, PS)，微胞(micelle)以及碘離子為樣品，這些樣品的擴散係數見表 5-1，以及不同粗細的直線型毛細管，將樣品注入毛細空管後紀錄下波形的變化，探討樣品的擴散係數、動相流速、以及管柱直徑對於波形的影響程度，發現 PS 的尺寸越大，也就是分子擴散係數很小的時候(見圖 5-7)，所得到的波形中的 convection peak 強度會越強，其實驗中所得到的波形，也近似於電腦模擬  $\tau$  值之後的形狀。並驗證出實驗參數如流速，管徑的改變，對於波形影響的程度，

這些實驗證明以 advection-diffusion equation 所導出的  $\tau$  值，可說明波形產生的原因，或是預測波形變化的趨勢，並推算與實驗參數(樣品擴散係數、流速、管徑)之間的關係。

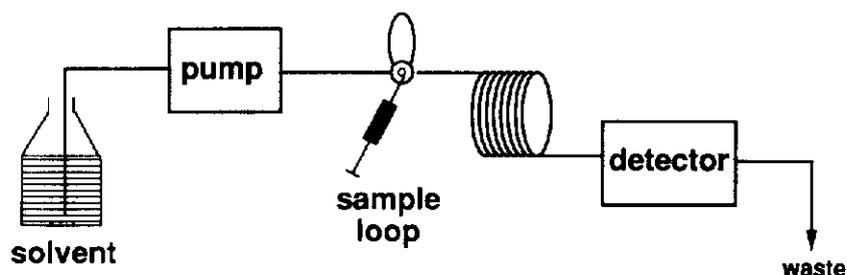


圖 5-3 wide-bore hydrodynamic chromatography 實驗裝置圖

儀器組成包含幫浦、樣品注入器、中空螺旋管柱，以及紫外可見光偵測器。

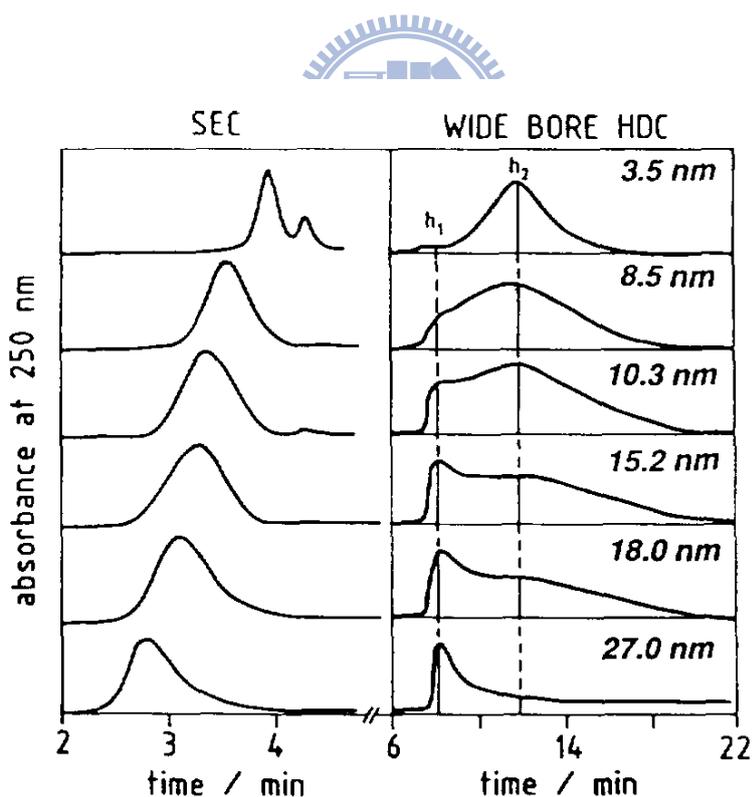


圖 5-4 硫化鎘奈米粒子在 SEC(左圖)以及 WDC(右圖)中的流析訊號圖

(本圖<sup>80</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A* 1994)

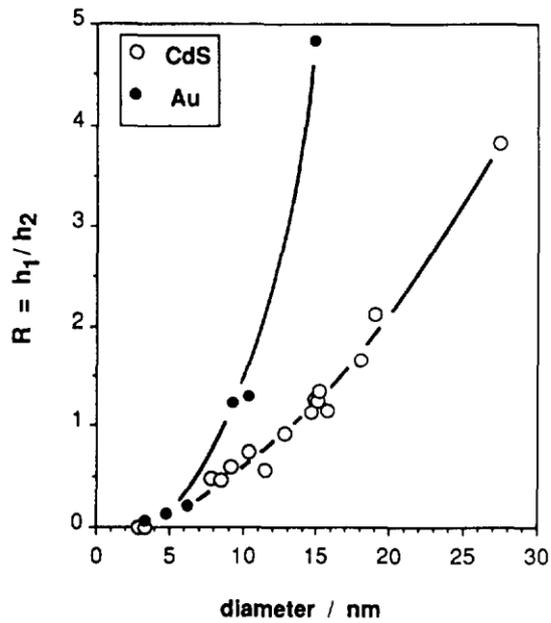


圖 5-5 在 HDC 圖譜中，R 值與奈米粒子的尺寸關係圖

使用的奈米粒子分別為硫化鎘奈米粒子(●)以及金奈米粒子(○)。當注入 HDC 的奈米粒子越大，所得到的 R 值也就越大。(本圖<sup>80</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A* 1994)

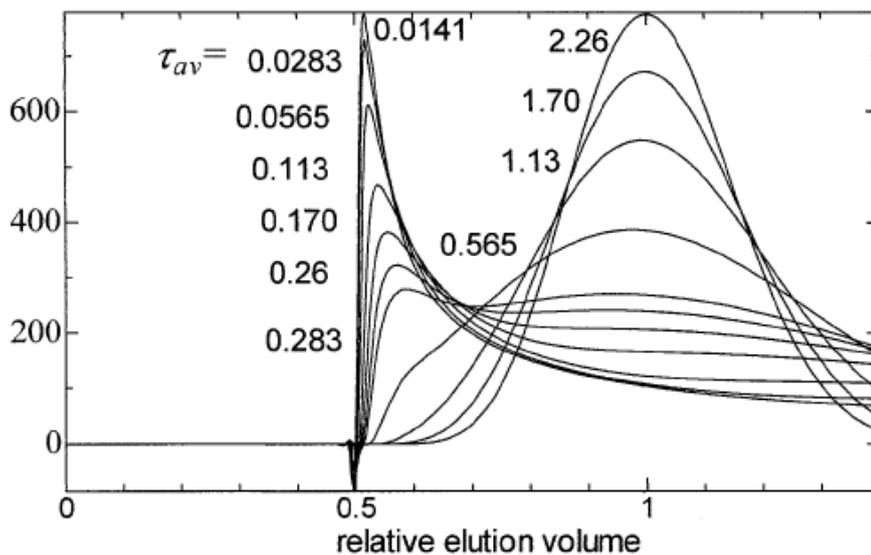


圖 5-6 以電腦模擬不同  $\tau$  值之下，樣品波形的變化。

$\tau$  值為樣品擴散係數、流速、管徑、管長等實驗參數的函數。

(本圖<sup>81</sup>摘錄自 *Anal. Sci.* 2005)

表 5-1 碘化物、微胞、以及聚苯乙烯粒子的擴散係數  
(本表格<sup>81</sup>摘錄自 *Anal. Sci.* 2005)

Solute	Concentration	D/ m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
Iodide	Limiting dilution	2.04 × 10 <sup>-9</sup>
SDS micelle	15 mM	8.31 × 10 <sup>-11</sup>
	50 mM	7.52 × 10 <sup>-11</sup>
PS particle 0.2μm	—	1.90 × 10 <sup>-12</sup>
1μm	—	3.64 × 10 <sup>-13</sup>

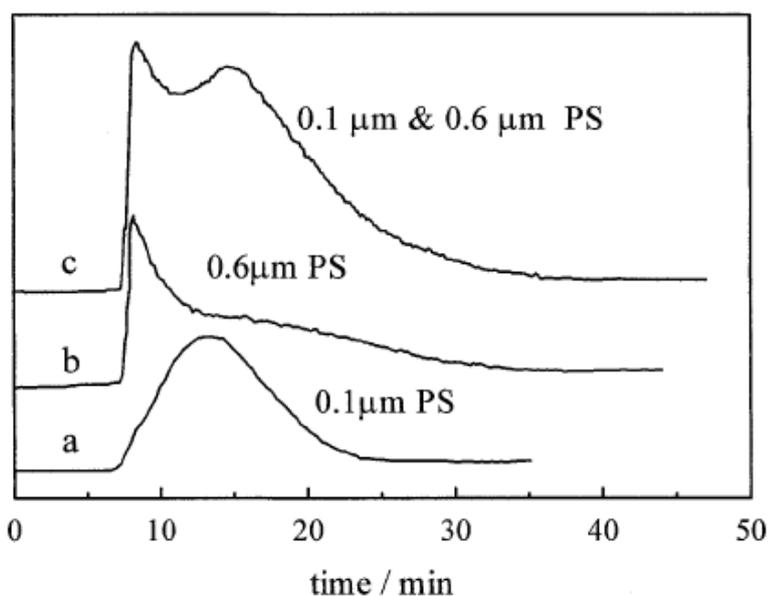


圖 5-7 聚苯乙烯奈米粒子的流動訊號圖。

粒子大小為 0.6 μm 以及 0.1 μm，毛細管內徑為 150 μm，長度為 30 cm，動相流速 1.44 μL/min，樣品注入量為 0.15 μL，偵測器波長設定在 220 nm。(本圖<sup>81</sup>摘錄自 *Anal. Sci.* 2005)

## 5-3 實驗

### 5-3-1 實驗藥品

Silver nitrate , 99.8 % , (Showa, Japan)

Sodium borohydride , 98 % , (Alfa Aesar, USA)

11-mercaptoundecanoic acid (MUA) , 95% , (Sigma-Aldrich, USA)

Tartrazine , GR grade , (Sigma-Aldrich, USA)

Sodium borohydride , GR grade , (Sigma-Aldrich, USA)

Ascorbic acid , GR grade , (Sigma-Aldrich, USA)

Lysozyme , 97% , (Sigma-Aldrich, USA)

Bovine serum albumin (BSA) , 97% , (Sigma-Aldrich, USA)

Potassium iodide (KI) , GR grade , (Showa, Japan)

Dipotassium phosphate , GR grade , (Showa, Japan)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) , GR grade , (Tedia, USA)

Deionized water , purified from Milli-Q plus , (Millipore, USA)



### 5-3-2 實驗儀器

#### 1. 逆流層析儀

型號為 Model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA), 儀器主體安置於控溫箱中, 溫度控制在 20 °C , 主體部分之空心管柱, 其內徑為 1.6 公釐(1/16 英吋), 外徑為 3.2 公釐(1/8 英吋), 管柱材質為鐵氟龍, 其耐壓壓力約為 21 kg/cm<sup>2</sup>, 耐溫 50 °C , 管柱的總長度約為 57 公尺, 纏繞在 3 個線軸上(3 spools), 總體積為 114 毫升, 在本章節的實驗中, 只有使用其中一個線軸上的管柱, 因此總長縮減為 19 公尺, 管柱總體積為 38 毫升, 儀器主體中的鐵氟龍管柱, 自轉與公轉半徑的比例( $\beta$  值)為 0.59。主體外部以鐵氟

龍管線與幫浦、偵測器相互連接，其內徑為 0.8 公釐(1/32 英吋)、外徑為 1.6 公釐(1/16 英吋) 連接管線的總長度約為 1 公尺。

## 2. 幫浦

型號為 Series II Digital HPLC pump，流速設定可由 0.01 mL/min 到 10.00 mL/min，幫浦購自 Pharma-Tech Research Company, Baltimore, MD, USA。

## 3. 紫外光/可見光線上偵測系統

偵測器型號為Bio-Rad Model 1801 UV-visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，可偵測紫外光波長為190-380 nm，可見光波長為380-800 nm，偵測器外部與電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統SISC (訊華公司，台北市)擇取偵測器之訊號。

## 4. 導電度線上偵測器

型號為Alltech Model 650 conductivity detector (Alltech, Deerfield, IL, USA)，偵測時以去離子水做為base line，外部與電腦連接，同樣利用色層分析儀數據處理系統SISC (訊華公司，台北市)擇取偵測器之訊號。

## 5. 掃描式電子顯微鏡

型號為 JEOL JSM-7401F field emission scanning electron microscopy (SEM) system，購自 JEOL (Tokyo, Japan)，附有 energy dispersive X-ray (EDX) 偵測系統，加速電壓為 10 KeV。

## 6. 離心機

由德國 Hettich 生產，型號為 EBA20，最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g。

### 5-3-3 實驗步驟與方法

#### 5-3-3-1 奈米粒子的合成方法

所有反應瓶先以  $\text{HNO}_3$ (0.1M) 以及去離子水清洗，將  $\text{NaBH}_4$ (5.7 mg) 溶於 75 mL 去離子水中，再加入 MUA(5.1 mg) 於  $\text{NaBH}_4$  水溶液中，攪拌 5 分鐘待 MUA 完全溶解後，在劇烈攪拌下，逐滴加入  $\text{AgNO}_3$  水溶液(63 mg 溶於 75 mL 去離子水中)至上述含有還原劑  $\text{NaBH}_4$  以及保護劑 MUA 的混合溶液，反應約 1 分鐘後溶液顏色由透明轉黃色，再由淡黃色逐漸轉為深褐色，持續攪拌 24 小時之後，即完成反應，以  $\text{HCl}$ (0.1 M) 調整到 pH 2 之後，以低速離心(6000 rpm, 10 min) 奈米粒子，以去離子水清洗後再次離心，清洗重覆 3 次之後，離心後的沉澱物重量約 45 mg，加入 150 mL 的緩衝溶液(20 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 11) 保存，作為待分離的樣品，



#### 5-3-3-2 樣品的配置方法

合成的銀奈米粒子樣品濃度為 300 mg/L，將 tratarzine 溶解於磷酸鉀緩衝溶液(20 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 11)，tratarzine 樣品濃度為 200 mg/L，蛋白質樣品溶解於 Tris-HCl 緩衝溶液(20 mM, pH 8)，其蛋白質濃度分別是牛血清蛋白 BSA (500 mg/L)，溶菌酶 lysozyme (500 mg/L)，抗壞血酸(30 mg/L) 以及碘化鉀 KI(3000 mg/L) 則是以去離子水溶解，蛋白質樣品以及抗壞血酸皆需新鮮配製，配製後 12 小時之內使用。

#### 5-3-3-3 逆流層析儀操作步驟

(a) 以幫浦將緩衝溶液或是去離子水打入 CCC，使用緩衝溶液或是水取決於樣品種類，若樣品是奈米粒子或是蛋白質，則使用與樣品溶劑相同的緩衝溶液作為動相，如果樣品是抗壞血酸或是碘化鉀，

則使用水當作動相，將 38 mL 的管柱填滿。

- (b) CCC 轉速設定值分別為 0、100、300、500、700、900 rpm，當固定某一轉速之後，儀器轉速的誤差值不會超過 5 rpm，溫度控制在 20 °C，UV 偵測器波長選擇依照樣品種類而決定，分別為 Ag-MUA (420 nm)、tartrazine (420 nm)、ascorbic acid (265 nm)、BSA (220 nm)、lysozyme (220 nm)，使用導電度偵測器偵測碘化鉀 KI 的流動訊號。
- (c) 待偵測器訊號以及 CCC 轉速皆穩定之後，從 CCC 的 head-to-tail 方向，注入 1 mL 的樣品，開始記錄訊號。
- (d) 實驗完成後，CCC 停止轉動，以氮氣將管柱內的液體吹出，以 80 mL 去離子水沖洗。



## 5-4 結果與討論

### 5-4-1 樣品在靜止螺旋管柱中的流動行為

首先我們估算在 CCC 螺旋管柱中，樣品流動的性質是否屬於層流，因此以雷諾數公式來計算，管柱內徑分別是 1.6 mm 以及 0.8 mm，流速範圍為 0.5 -3.0 mL/min，我們採用 20 °C 時水的黏滯係數，這數值約為 0.6 cm<sup>2</sup>/min<sup>82</sup>，計算兩種管徑以及各流速下的雷諾數均不超過 100，表示管柱內部流體性質為層流。並根據 Taylor 以及 Aris 對於流體延散(dispersion)的研究<sup>83-85</sup>，以理論板數(theoretical plate, N)的表示方式，將流析訊號以式 5-5 中理論板數的計算方式來表示<sup>86</sup>：

$$N = \frac{L}{H} = \frac{D_m \times L}{\kappa \times a^2 \times u_{av}} \quad (\text{式 5-5})$$

在式 5-1 中， $a$  是管柱半徑(cm)， $u_{av}$  是流體的平均線性流速(cm/sec)， $D_m$  是分子擴散係數(cm<sup>2</sup>/sec)， $L$  是管長(cm)， $\kappa$  是 secondary flow 的修正參數，因為在不同流速下，當流體經過螺旋迴圈之後，原本依切線方向的流體會撞上管壁，破壞層流，產生不同程度的徑向混合效果，這方向流動稱為 secondary flow<sup>86</sup>，在徑向上的流動可幫助層流的混合。而從訊號流析圖譜中，我們可以由式 5-6，式 5-7 計算出任一個訊號的理論板數，

$$N = \left(\frac{T}{\sigma}\right)^2 \quad (\text{式 5-6})$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\int y(t-T)^2 dt}{\int y dt}} \quad (\text{式 5-7})$$

在式 5-2 以及式 5-3 中， $T$  是樣品訊號的質量中心(mL)，也就是這訊號在統計上的平均值， $y$  是訊號強度(mAU)， $t$  是流體的流量(mL)， $\sigma$  是訊號的標準差 standard deviation (mL)。

#### 5-4-1-1 固定流速下的波形討論

圖 5-8 是六個樣品的流析訊號，動相流速皆固定在 2 mL/min，圖譜中的 Y 軸是將紫外/可見光訊號，或是導電度訊號轉為相對訊號值 (relative intensity)，以方便比較，X 軸則是將流析時間乘以流速，得到流析體積 elution volume (mL)，依照式 5-6、式 5-4 計算六個訊號的理論板數分別為：Ag-MUA (N = 13.2)、BSA (N = 22.7)、lysozyme (N = 29.4)、tartrazine (N = 88.0)、ascorFelnj4bic acid (N = 138.0)、KI (N = 316.9)，可以從圖形中看出 Ag-MUA 以及 BSA 的波形寬度相當大，

這時兩個樣品的理論板數皆很小，此兩樣品的分子擴散能力不佳，無法在管柱截面上有良好的分佈，呈現出極度不對稱的 convection peak<sup>80</sup>，lysozyme (N = 29.4) 的波形是較為接近高斯形狀，在 Golay 的研究中指出<sup>87</sup>，當理論板數大於 30，則波形會趨近高斯對稱，其餘三個小分子(tartrazine、ascorbic acid、KI)的理論板數都大於 30，形狀也更加對稱。

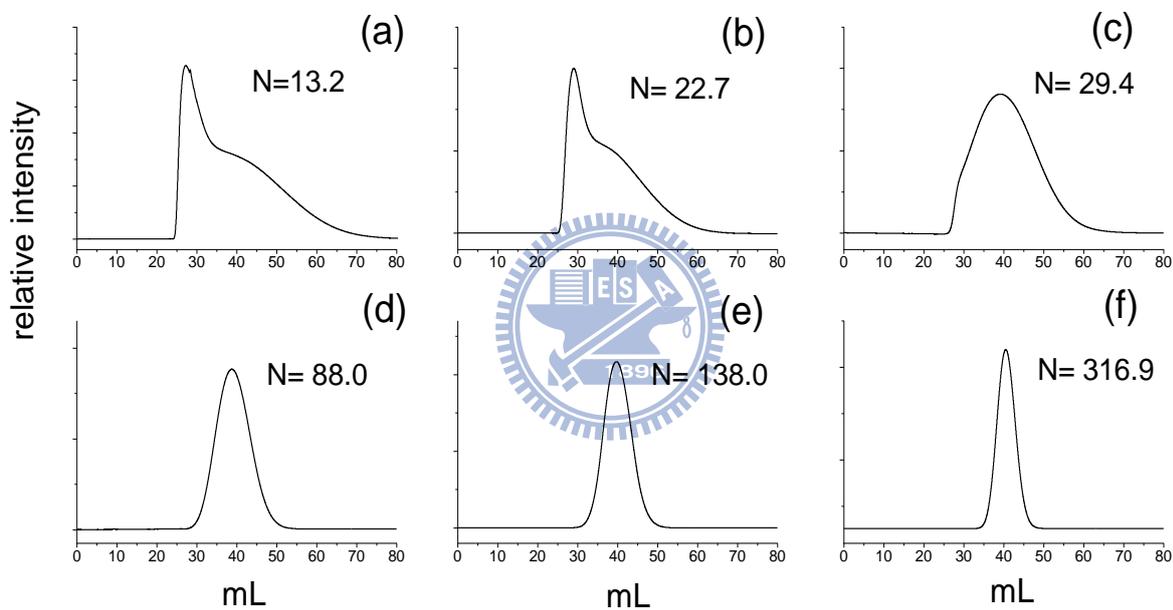


圖 5-8 在靜止螺旋管柱中的流動訊號

樣品分別為(a) Ag-MUA、(b) BSA、(c) lysozyme、(d) tartrazine、(e)ascorbic acid、(f) KI。動相流速固定在 2 mL/min，偵測器為紫外/可見光訊號、或是導電度偵測器訊號(for KI)，樣品注入體積為 1 mL。

### 5-4-1-2 改變流速下的波形討論

我們以 Ag-MUA 樣品做為 convection peak 的代表，tartrazine 做為高斯(Gaussian 或是 non-convection peak)的代表，將流速從 0.5 mL/min 逐漸提高到 3 mL/min，重疊這兩種代表波形，觀察形狀上的變化，波形變化請見圖 5-9，圖中 X 軸的單位以流析體積表示，可從 tartrazine 的圖形中看到，隨著流速增加，理論板數從 251.3 降到 73.1，波峰寬度明顯變大且波峰高度變矮，這是因為高流速下使得樣品的延散 (dispersion) 變大，相對於 tartrazine 的變化情形，Ag-MUA 的波形變化則不完全相同，Ag-MUA 在低流速的時候比較接近對稱波形，流速為 0.5 mL/min 時的理論板數為 27.8，當流速提高到 3 mL/min 之後，理論板數降到 11.9，增加流速的過程中，convection peak 的強度越來越大，所以波峰會越來越高，但是波峰尾部也會越來越長，波形漸趨不對稱，波形的範圍寬度也因此增大。以統計上的平均結果來看，儘管波形差異很大，六個樣品中的質量中心位置都是相同的，位於流析體積約 39 mL 處，說明了在流析過程中，造成了波形產生不對稱的 convection peak，同時也造成嚴重的拖尾，但管柱對於所有的樣品並沒有產生滯留現象(retention)，也沒有物理、化學上的吸附(physical or chemical adsorption)。

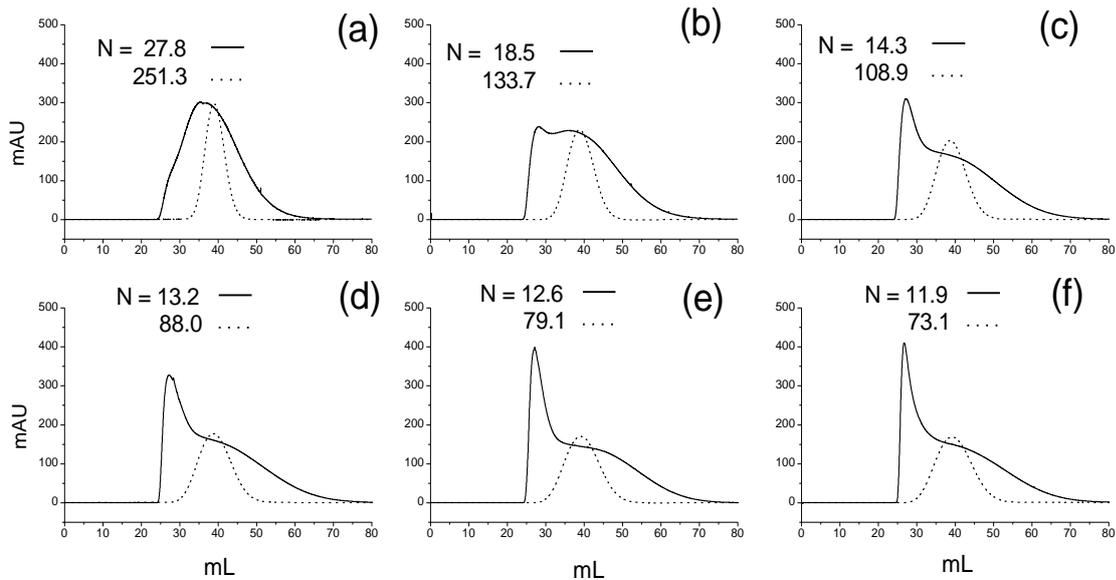


圖 5-9 在靜止螺旋管柱中，不同動相流速下樣品的波形變化

實線是 Ag-MUA 樣品，虛線是 tartrazine 樣品，流速分別為(a) 0.5 mL/min、(b) 1.0 mL/min、(c) 1.5 mL/min、(d) 2.0 mL/min、(e) 2.5 mL/min、(f) 3.0 mL/min。偵測波長為 420 nm，樣品注入量為 1 mL。



#### 5-4-2 樣品在轉動螺旋管柱中的流動行為

上一節是研究靜止的 CCC 管柱，接續著我們轉動 CCC 儀器，使 Ag-MUA 以及 tartrazine 在轉動的螺旋管柱中流動，兩樣品在轉動下的流析訊號如圖 5-10 所示，詳細的分析數值紀錄在表 5-2，當動相流速固定，CCC 轉速逐漸提高，從原本 0 rpm 提高到 900 rpm 的過程中，無論是 Ag-MUA 或是 tartrazine 的 N 值都會提高，理論板數 N 值可提升到四倍之多，Ag-MUA 的 N 值逐漸接近 30，可以觀察到 Ag-MUA 的波形從 convection peak 形狀轉變成高斯波形。說明理論板數在轉動的情形下，仍然可做為判斷波形是否為類高斯的指標。

在流析過程中，X 軸上波峰的頂點位置(peak summit)一直都是小於質量中心位置(peak mass center)，而質心位置始終保持不變(39 mL)，在

N 值小於 30 的時候，波峰的頂點位置與質心位置差距甚遠，這時候的頂點位置是 convection peak 的位置，隨著 N 值逐漸增加，頂點位置會逐漸變大，漸漸地靠近質心位置，若圖形是完美的高斯波形，頂點位置等於質心位置，從分析結果來看，無論動相流速再慢，CCC 轉速再高，N 值不斷地增大，波峰的頂點位置與質心位置會越來越靠近，稱為類高斯波形。

標準偏差(standard deviation)是一個能夠表達群體疏密程度的一個參考值，可用來描述訊號延散的程度，在固定一流速下，我們以轉速為 0 rpm 的波形的標準差為基準，這時候的標準差也是最大值，將每個轉速條件下的標準差(0 - 900 rpm)除以最大標準差(0 rpm)的數據後，可以計算出 CCC 轉速對於標準差的影響。以正規化標準差(normalized standard deviation)來表示，可以從正規化標準差的數據得知：無論使用何種動相流速，CCC 轉速對於樣品的影響比例都是一樣的，比如將轉速從靜止提高到 900 rpm，標準差約減少一半左右。

我們再進一步探討，不同的樣品擴散係數的影響，我們可從文獻得知五個樣品的擴散係數分別為：BSA<sup>88</sup> =  $6.38 \times 10^{-7}$  (cm<sup>2</sup>/s)、lysozyme<sup>89</sup> =  $1.11 \times 10^{-6}$  (cm<sup>2</sup>/s)、tartrazine<sup>90</sup> =  $3.8 \times 10^{-6}$  (cm<sup>2</sup>/s)、ascorbic acid<sup>91</sup> =  $6.8 \times 10^{-6}$  (cm<sup>2</sup>/s)、KI<sup>81</sup> =  $2.04 \times 10^{-5}$  (cm<sup>2</sup>/s)，圖 5-11 說明擴散係數與變異係數倒數有著相當好的線性關係，無論 CCC 是靜止或是旋轉的情形之下，樣品擴散係數與標準差的關係，都遵守 Taylor 等人提出的關係(式 5-5)，但這關係式未能解釋轉動對於樣品延散行為的影響，因此我們在公式中導入了另外一個轉動參數  $c_r$ ，產生了旋轉空管中的理論板數關係式(式 5-8)

$$N = \frac{c_r \times D_m \times L}{\kappa \times a^2 \times u_{av}} = \left(\frac{T}{\sigma}\right)^2 \quad (\text{式 5-8})$$

當轉速為 0 時，令  $c_r = 1$ ，再由每一個轉速下的正規化標準差來計算  $c_r$  值，進一步將 Ag-MUA 等六個樣品的流析圖譜(只顯示 0、300、600 rpm)，以及各物質在不同轉速下(0、100、300、500、700、900 rpm)的  $c_r$  值對轉動速度做圖，結果如圖 5-12 所示，在波形方面的探討，無論是擴散能力較好或是較差的物質，其波形產生 convection peak 或是產生類高斯，轉速的改變所對應到的  $c_r$  都是相似的，各轉速下  $c_r$  平均值為 1.37 (100 rpm)、2.05 (300 rpm)、2.85 (500 rpm)、3.7 (700 rpm)、4.16 (900 rpm)，除了  $c_r$  值在固定轉速下為定值之外，另外發現  $c_r$  與轉速有著線性的關係，我們還可估算某一轉速下的  $c_r$  值。以上實驗說明，提高轉速對於理論板數而言，是呈線性的增加，轉速越高可增加溶質在管柱內的混合能力，減少在管柱中的延散，使波寬變窄。



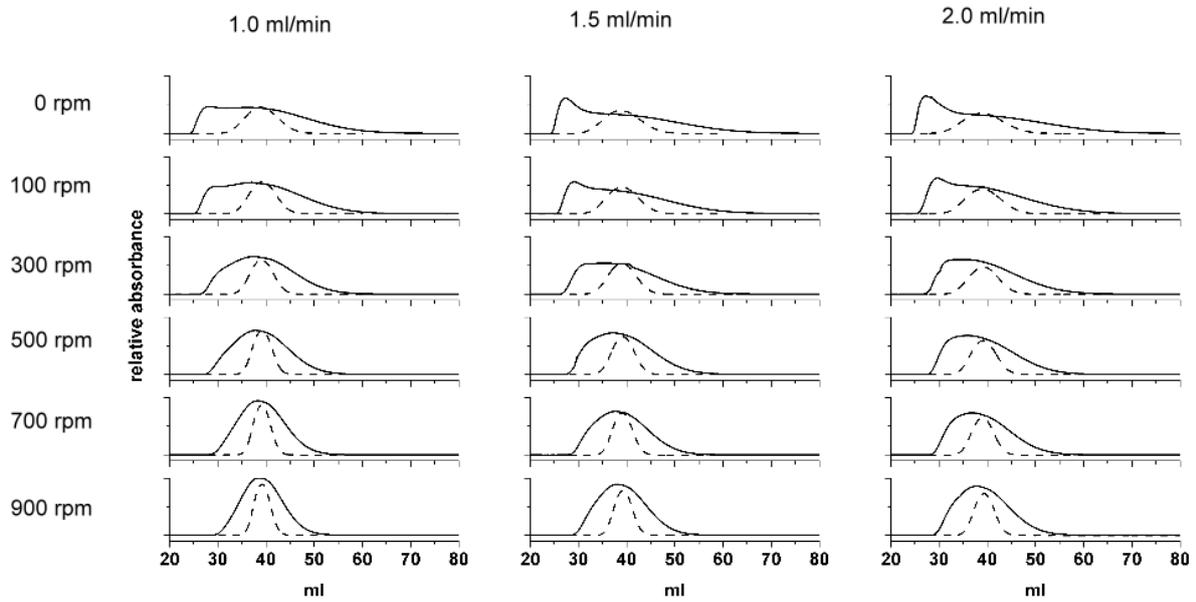


圖 5-10 Ag-MUA(實線)以及 tartrazine(虛線)的流動訊號

動相流速設定範圍為 1.0 - 2.0 mL/min，CCC 儀器轉動速度設定範圍為 0-900 rpm，紫外/可見光偵測器波長為 420 nm。

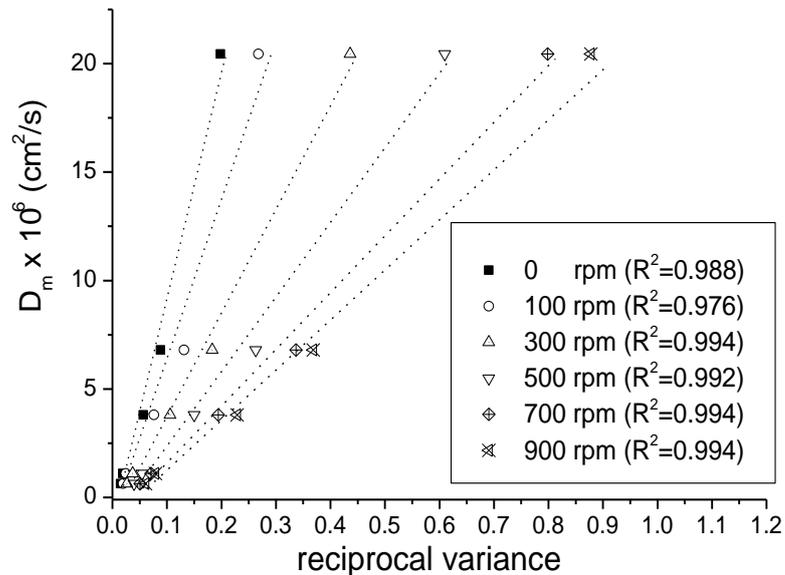


圖 5-11 變異係數的倒數與五種分子的擴散係數關係圖

在任一轉速下皆為線性，動相流速固定在 2 mL/min。

表 5-2 Ag-MUA 以及 tartrazine 在不同流速以及轉速下的流動訊號分析結果

	Rotation speed (rpm)	Peak height (mAU)	Peak summit (mL)	Mass center (mL)	Calculated $\sigma$ (mL)	Normalized N	Normalized $\sigma$
Tartrazine (1mL/min)	0	230.13	38.93	39.20	3.39	133.7	1.00
	100	280.58	39.14	39.34	2.75	204.6	0.81
	300	301.07	39.07	39.17	2.40	266.4	0.71
	500	386.24	39.16	39.24	1.97	396.8	0.58
	700	435.57	39.14	39.18	1.78	484.5	0.53
	900	445.72	39.19	39.24	1.70	532.8	0.50
Ag-MUA (1mL/min)	0	237.80	28.18	39.27	9.12	18.5	1.00
	100	277.40	37.08	39.22	8.00	24.0	0.88
	300	327.82	37.40	39.22	6.34	38.3	0.70
	500	385.27	37.90	39.16	5.39	52.8	0.59
	700	473.02	38.26	39.28	4.56	74.2	0.50
	900	502.73	38.47	39.37	4.08	93.1	0.45
Tartrazine (1.5 mL/min)	0	202.01	38.69	39.24	3.76	108.9	1.00
	100	234.20	38.88	39.25	3.31	140.6	0.88
	300	271.35	39.00	39.11	2.85	188.3	0.76
	500	331.25	39.20	39.27	2.32	286.5	0.62
	700	369.20	39.11	39.17	2.04	368.7	0.54
	900	390.64	39.24	39.30	1.89	432.4	0.50
Ag-MUA (1.5 mL/min)	0	309.59	27.28	39.02	10.33	14.3	1.00
	100	279.20	29.11	39.23	8.58	20.9	0.83
	300	271.89	35.28	39.13	7.16	29.9	0.69
	500	364.28	37.15	39.30	6.06	42.1	0.59
	700	380.17	37.74	39.15	5.20	56.7	0.50
	900	445.70	37.93	39.26	4.71	69.5	0.46
Tartrazine (2 mL/min)	0	176.29	38.82	39.30	4.19	88.0	1.00
	100	217.09	38.86	39.27	3.62	117.7	0.86
	300	237.86	39.14	39.31	3.07	164.0	0.73
	500	295.20	39.12	39.28	2.58	231.8	0.62
	700	325.76	38.98	39.07	2.27	296.2	0.54
	900	365.55	39.34	39.38	2.09	355.0	0.50
Ag-MUA (2 mL/min)	0	327.35	27.20	39.16	10.76	13.2	1.00
	100	312.64	29.62	39.31	8.78	20.0	0.82
	300	303.15	35.12	39.54	7.36	28.9	0.68
	500	340.80	35.88	39.25	6.26	39.3	0.58
	700	369.15	36.86	39.18	5.54	50.0	0.51
	900	428.85	37.74	39.44	5.24	56.7	0.49

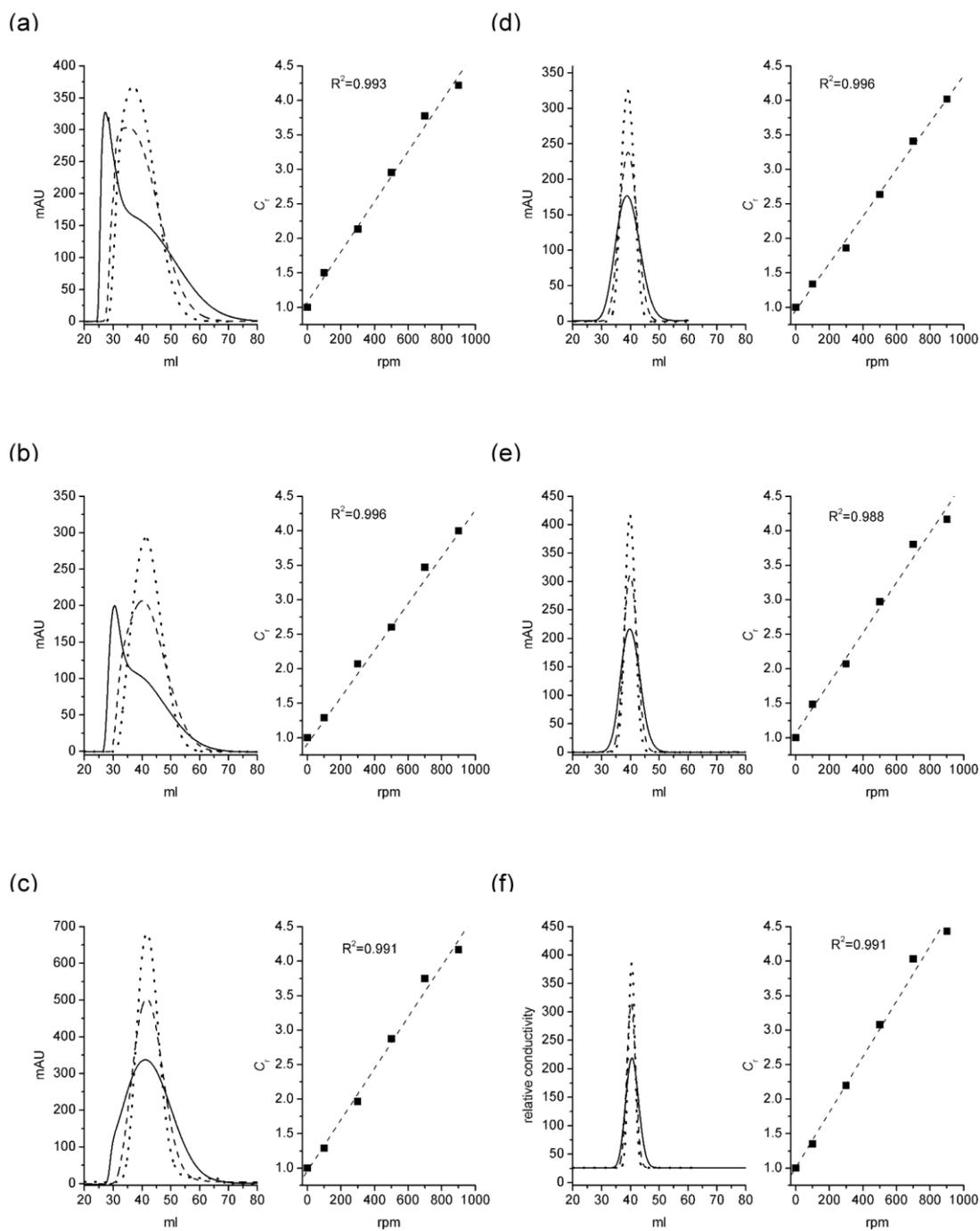


圖 5-12 流析圖譜以及  $C_r$  值與轉速的關係圖

左圖為六個樣品的流析圖譜，轉速分別為 0(—)、300(---)、600(...) rpm，右圖為  $C_r$  值與轉速的關係圖。樣品分別為(a)Ag-MUA、(b)BSA、(c)lysozyme、(d)tartrazine、(e)ascorbic acid、(f)KI。

### 5-4-3 與逆流層析研究文獻的討論

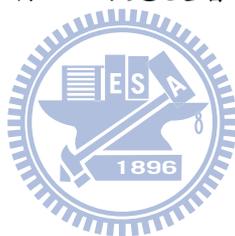
#### 5-4-3-1 樣品在轉動螺旋管柱內的混合程度

過去在對於逆流層析的研究中，Ito 和 Sutherland 等人提出在轉動螺旋管柱內部，靠近公轉轉軸處產生動靜兩相的混合區(mixing zone)，在遠離公轉轉軸處則是澄清區(settling zone)，若在其中一相中添加色素使其顯色，利用閃頻顯微鏡(stroboscopy)拍照，可以觀察到管柱內部兩相的混合情形<sup>3</sup>，當轉速越高，產生的混合區以及澄清區的頻率就越頻繁，例如在 800 rpm 的轉速下，混合以及澄清區的產生頻率為每秒 13 次<sup>3</sup>，將轉速提高到 1000 rpm 之後，混合以及澄清區產生的頻率增加到每秒 16 次<sup>4</sup>。但如果管柱內部只存在單一相，無法利用閃頻觀測儀對管柱內的流體進行拍攝，也就無法得知是否會產生混合區，在本實驗中，我們測得了樣品在轉動管柱中的理論板數，即使在單一相中，旋轉的 CCC 管柱內部的流體依然會產生混合(radial mixing)，另一方面，有研究指出螺旋管柱的質傳能力比直線管柱還來得大，這是因為流體流經過纏繞的螺旋管柱時，產生的離心力會增加液體的徑向質傳能力(radial mass transfer)<sup>91</sup>，經過我們的研究說明，藉由 CCC 旋轉產生的離心力也可作用於流體上，增加了流體內部溶質的質傳能力，而且驗證了管柱中流體的混合程度越大，樣品流出管柱的寬度會越窄。

#### 5-4-3-2 CCC 管徑大小對於分離效果的影響

在 CCC 的發展過程中，其管徑粗細與其用途有相關性，比如分析型的(analytical) CCC 使用內徑為 0.8 mm 的空心管柱<sup>15</sup>，半製備的(semi-preparative) CCC 使用內徑為 1.6 mm 的空心管柱<sup>92</sup>，而大量製備型的(large-scale preparation) CCC 則是使用內徑為 2.6 mm 的空心管

柱<sup>93</sup>，在所有的管柱大小中，以分析型的 CCC 分離效率最好，在討論有關 CCC 分離效率的研究中，通常是以靜相滯留率(stationary-phase retention ratio, Sf)來討論，所以在 CCC 實驗中，其他條件不變的話，若提高靜相滯留率，分離效率也會變好，在 Berthod 等人的研究中，將粗管柱以及細管柱的分離效率做了一系列的比較<sup>94</sup>，如圖 5-13 所示，他們使用同一種動相與靜相組成(K 值相同)分離咖啡因和香草精兩物質，藉由改變 CCC 轉速以及流速，找出分離解析度(resolution)同樣為 2.0 的分離條件，在較細的 CCC 管柱中的靜相滯留率較低，但是分離效率卻不亞於較粗管柱的 CCC，表示除了 Sf 這個參數之外，還有其他因素影響了分離解析度。根據本研究中的式 5-8，細管柱擁有比較小的管柱半徑，又擁有較高轉速，因此我們可解釋為樣品在細管柱中的延散比較小，意即樣品的寬度會比較窄，得到比較好的理論板數。



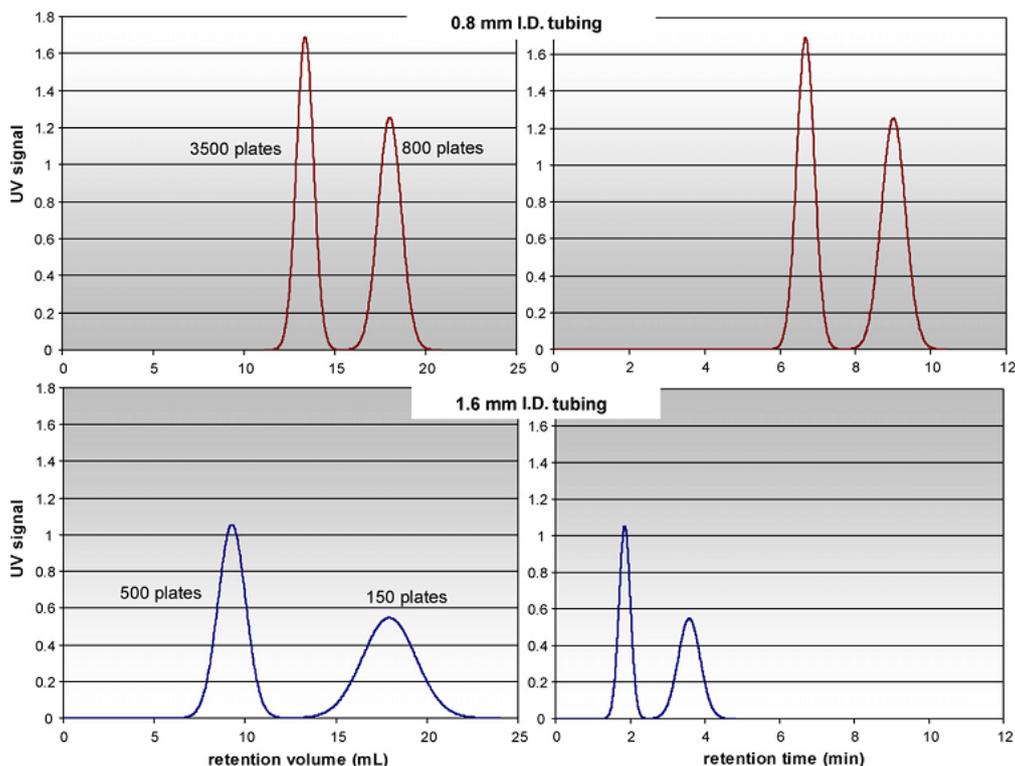


圖 5-13 利用不同管徑大小的 CCC，分離咖啡因和香草精的層析圖  
 上圖是使用直徑 0.8 mm 的管柱，下圖是使用直徑 1.6 mm 的管柱。溶劑系統組成  
 為 heptane-ethyl acetate-methanol-water 2:3:2:3 (v/v)，皆使用下層相做為動相，  
 紫外光偵測器波長為 254 nm，CCC 儀器參數如下：

圖譜	管柱總體積	管柱內徑	動相流速	靜相滯留率	分離解析度
上圖	19.6 mL	0.8 mm	2 mL/min	38%	2.0
下圖	20.8 mL	1.6 mm	5 mL/min	66%	2.0

(本圖<sup>94</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A* 2009)

### 5-4-3-3 樣品以及溶劑對於 CCC 層析圖的影響

當流體的黏度(viscosity)變大，溶解在流體中的物質變得不容易移動，導致溶質的擴散能力變差，日本 Korenaga 等學者<sup>95</sup>將染料小分子溶解在高黏度的動相中，在空心玻璃管柱觀察到染料的流析訊號也會產生 convection peak，所以，若溶液的黏度越大，樣品的延散也就越大，在 CCC 的研究中，有研究發現以溶劑系統 butanol-acetic acid-water(BAW)分離胜肽分子<sup>96</sup>，BAW 是一種黏度較高的溶劑系統，

會降低溶質的擴散係數，由於在 CCC 分離過程中，通常都會先在式試管中估計 K 值，可以利用 K 值來預測物質在 CCC 中的流析時間，但在低轉速情形下，胜肽的波峰訊號比預期還來得早出現，如圖 5-14 所示，但也會有很長的拖尾訊號，在高轉速的情形下，胜肽的波峰訊號就會出現在預期的流析時間，訊號的形狀也會趨於高斯，這是提高轉速之後，增加管柱內質傳能力，改變了樣品流動訊號的影響，這現象可從我們研究中，對於轉速對波形(convection peak/diffusion peak)的影響來說明。

另一種 CCC 的溶劑系統，稱為雙水相系統，它是一種利用水溶性高分子配成的溶劑系統，黏度相當大，由於 CCC 的雙水相系統常用於分離蛋白質，蛋白質本身就是一種擴散能力很差的物質，於是，我們可從典型的 CCC 分離蛋白質的層析圖中<sup>26,97</sup>，如圖 5-15 所示，發現蛋白質的訊號寬度都非常大，分離蛋白質的儀器參數，像是分佈係數 K 值、CCC 轉速、動相流速、流析時間等，都是在一般常用範圍之內，但是蛋白質的波峰寬度與分離一般小分子的波峰相比，相對來得較大，這點可從我們的研究中，以分子擴散係數影響波峰寬度的觀點來加以解釋。

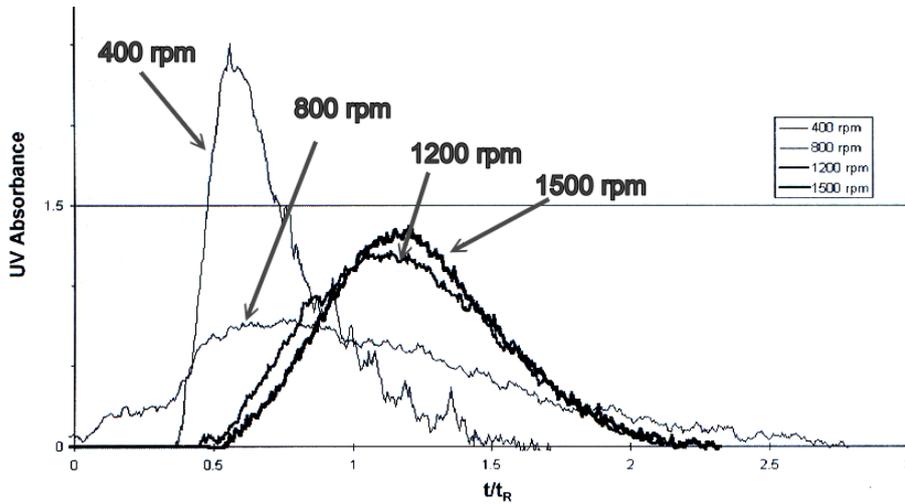


圖 5-14 以 BAW 溶劑系統分離胜肽的 CCC 層析圖

以溶劑系統的上層相做為動相，動相流速皆為 15 mL/min，轉速設定在 400-1500 rpm。(本圖<sup>96</sup>摘錄自 Elsevier, Amsterdam. 2002)

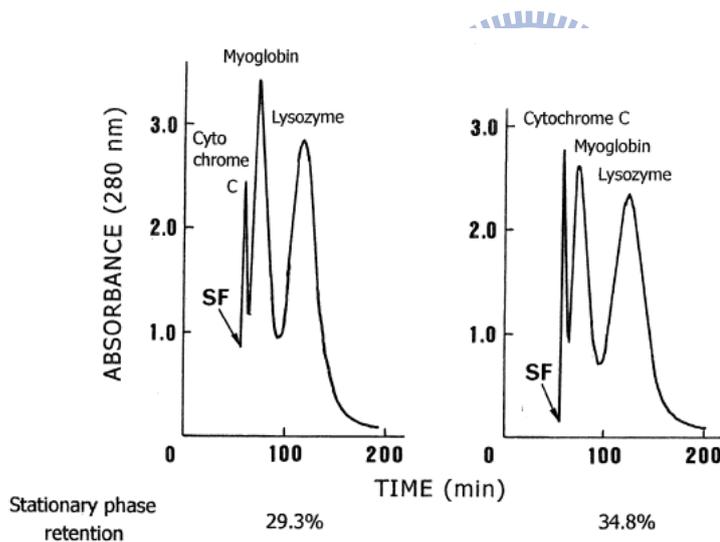


圖 5-15 利用雙水相系統分離蛋白質的 CCC 層析圖

雙水相組成：12.5% (w/w) polyethylene glycol (MW 1000) – 12.5% (w/w)  $K_2HPO_4$  – 75% (w/w) water，下層相當作動相沖提，動相流速 0.2 mL/min，儀器轉速為 800 rpm，左圖為靜相滯留率 29.3%的層析圖，右圖為靜相滯留率 34.8%的層析圖，樣品為 cytochrome c (2 mg)、myoglobin (8 mg)、lysozyme (10 mg)的混合物，溶解在 1 mL 的動相中。(本圖<sup>97</sup>摘錄自 *J. Chromatogr. A* 2007)

#### 5-4-3-4 對於 elution-extrusion CCC 流析方式的討論

法國學者 Berthod 在 2003 年所提出的 Elution-extrusion counter-current chromatography (EECCC)<sup>92, 98</sup>，是一種可減少分離時間、減少溶劑使用量的流析方法，因為 CCC 的動相以及靜相都是液體，我們可從樣品的 K 值、以及動靜相的體積，來推測樣品在管柱內的分佈情形，如果分析物的 K 值很大，則容易滯留在管柱內部，需要大量的動相才能將分析物帶出管柱，當 K 值很大的這些分析物在管柱內已經分離開來，其實並不需要以原本的動相來沖提，可以用幫浦打入原系統中的靜相溶液，而將靜相中 K 值較大的分析物推擠 (extrusion) 帶出。因此，EECCC 的操作分成三步驟，如圖 5-16 所示：分別是 classical elution (步驟一)、sweeping (步驟二)、extrusion process (步驟三)，步驟一的情形與一般的 CCC 流析方式相同，皆是要先填入靜相，再以 CCC 動相沖提，分離 K 值較小的分析物。接著在步驟二中，將原本幫浦中的溶液改為 CCC 靜相，這時從 CCC 流出的液體會從動相液體逐漸轉變成靜相液體，此過程中的偵測器訊號會極不穩，等到動相液體全部都流出，再進行步驟三的程序，在步驟三的過程中，CCC 內部只有存在單一相，也就是原本的靜相溶液，將靜相完全推擠出來，即可以得到還留在管柱中，未沖提出來的各分析物，但是在步驟三操作過程中，文獻上敘述幫浦流速以及 CCC 轉速仍維持不變<sup>99</sup>，但這時候的 CCC 管柱內部，僅有單一相溶液，不需要轉動 CCC 也可以將樣品推擠出管柱。藉由本論文研究可對於 EECCC 的步驟三的操作方式加以解釋，根據本論文的公式 5-8，若在靜止的情形下將 CCC 內部的液體推出，其波峰寬度將會是在 900 rpm 轉速下流析訊號的兩倍，計算方式是兩個  $c_r$  值比的平方根 =  $(4.16/1)^{0.5} \doteq 2$ ，因此，即使在只有單一相的環境中，轉速仍然要維持

不變，如此一來，便可減少樣品在管柱內的延散，使樣品寬度盡量維持狹窄，不讓延散的情形大幅減少分離解析度。

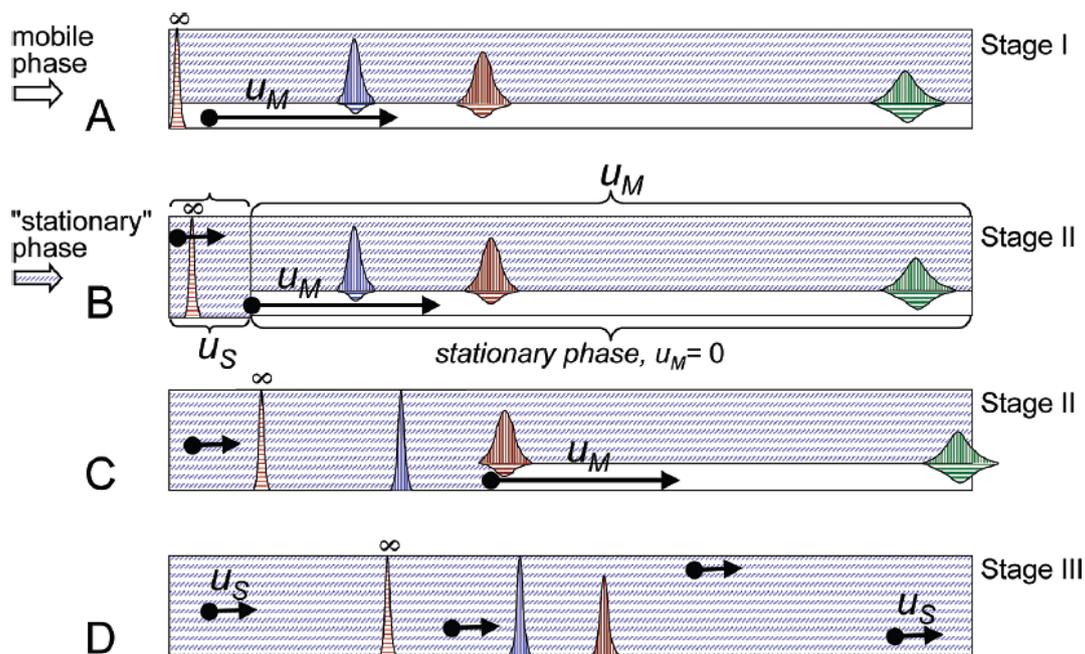


圖 5-16 EECCC 分離步驟示意圖

在步驟一(stage I)中，以下層相為動相沖提，在步驟二(stage II)中，打入的是 CCC 的靜相液體，這時管內殘餘動相會繼續被推出，但樣品仍滯留於管柱內，在步驟三(stage III)中，管柱內部全是靜相，樣品會依序被注入的靜相流體推出。

(本圖<sup>92</sup>摘錄自 *Anal. Chem.* 2007)

## 5-5 結論

在研究初期，我們發現無法利用 CCC 分離奈米粒子，樣品的訊號圖譜會產生分裂情形，促使我們研究溶質在 CCC 的螺旋管柱單一流體中的流析波形、延散程度，以及轉速對於延散程度的影響等，無論是奈米粒子、蛋白質、有機小分子、金屬鹽類離子等，都遵守著經過我們修正後的關係式，利用此關係式，可進一步解釋 CCC 文獻中所產生的現象，例如低轉速下，擴散係數低的物質，因為理論板數很小，使得樣品的延散增大，容易產生不對稱波形。CCC 的管柱的粗細會影響到樣品延散程度，樣品在越粗的管徑中，其延散會越大，導致分離效率降低，所以在探討分離效率時，尚需要考慮管徑因素。在 CCC 分離蛋白質的圖譜中，因為蛋白質分子不容易擴散，使蛋白質樣品在管柱中的延散會較高，於是蛋白質樣品的波寬會較大。在 EECCC 中的第一與第二步驟中，CCC 的轉動會增加徑向質傳，抑制樣品的波寬，但在第三步驟中，即使管柱內只存在單一相液體，EECCC 仍須保持固定轉速，保持樣品的帶寬，才可得到較好的分離解析度。因此本論文對於以上的研究，在 CCC 基礎研究上能提供更多的資訊。

## 第六章、總結

過去在 CCC 之研究領域，並無利用界面活性劑做為逆流層析的溶劑系統，本論文首次成功地發展以界面活性劑為主的溶劑系統，應用於逆流層析的分離研究，在第一部分的研究中，利用 SHS 微胞做為逆流層析的靜相增加類固醇分子的溶解度，從滯留因子(k)對於分離效果的影響來看，發現 SHS 濃度在其臨界微胞濃度(CMC)值以上，對於類固醇有較顯著的分離能力，此外更進一步地探討 SHS 微胞對於較疏水性的芳香族化合物，以及對於較親水性的酯類化合物的分離能力，從層析圖譜中發現，SHS 微胞做為逆流層析靜相，無法對於芳香族化合物產生滯留能力，SHS 微胞靜相對於酯類化合物的滯留能力，主要是來自靜相的水分子對於酯類的溶解度，而非 SHS 微胞對於酯類的溶解度所致，經過上述的研究，對於微胞靜相的應用性以及滯留的機制，可以為逆流層析提供更多的靜相選擇與分離上的應用，期望未來可分離疏水性化合物，或是與微胞之間會產生較強作用力的物質。

過去以逆流層析分離蛋白質的文獻中，都是利用雙水相系統，本論文第二部分，首次利用反微胞對蛋白質的萃取能力，將反微胞做為逆流層析的靜相，藉由反微胞表面的電荷吸引力分離肌紅蛋白、細胞色素 C 以及溶菌酶，調控水溶液的酸鹼值以及鹽類梯度等條件，逐漸地改變蛋白質在動相與靜相之間的分佈係數，利用逆流層析純化並且濃縮蛋白質，並期望未來能將此技術應用於分離真實樣品中。

在本論文的第三部分，是希望找到合適的界面活性劑以及萃取溶劑，利用連續的萃取法分離奈米粒子，經過實驗發現，TOAB 界面活性劑對於奈米粒子的萃取能力較佳，以含有 TOAB 的甲苯/正己烷的

混合溶液可有效地萃取銀奈米粒子，經過電子顯微鏡以及紫外/可見光譜的鑑定之後，以 0.02 mM 的 TOAB 的分離能力最好，並期望未來可以藉由改變界面活性劑以及溶劑的種類，能利用逆流層析儀分離更多的奈米材料，像是奈米碳管、奈米線、或是表面具有不同修飾劑的奈米粒子等。

在最後一章節的研究中，探討了包含奈米粒子、蛋白質、有機小分子、以及鹽類在逆流層析中的訊號，以 Taylor 等人對於樣品在管柱中的流動及延散等研究為基礎，以理論板數的概念來描述樣品的延散，經過我們分析一系列溶質在逆流層析儀中的訊號數據，歸納出轉動速度對於樣品延散行為的修正參數，當轉速越快、樣品的延散就會越小，對於逆流層析儀的基礎研究，例如逆流層析的分離解析度、樣品在管柱中的帶寬、波形的成因等理論有更一步的詮釋，並期望在未來的研究中，研究另一種型式的逆流層析(centrifugal partition chromatograph)中的延散行為，並進一步研究樣品在兩相(動相/靜相)系統中的延散行為，考慮動相流速、儀器轉速、管徑長度與粗細、樣品分佈係數 K 值、靜相滯留量等參數的影響。

## 參考文獻

1. Conway, W. D., *Countercurrent Chromatography: Apparatus Theory and Applications*. VCH Publishers, Inc.: 1990.
2. Ito, Y.; Conway, W. D., *High-Speed Countercurrent Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.: 1996.
3. Ito, Y., Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1065* (2), 145-168.
4. Sutherland, I. A.; Muytjens, J.; Prins, M.; Wood, P., A new hypothesis on phase distribution in countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23* (15), 2259-2276.
5. Conway, W. D.; Ito, Y., Resolution in Countercurrent Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1985**, *8* (12), 2195-2207.
6. Ito, Y.; Sandlin, J.; Bowers, W. G., High-speed preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge. *J. Chromatogr* **1982**, *244*, 247-258.
7. Lu, H. T.; Yue, J. A.; Chen, F., Application of high-speed counter-current chromatography to the preparative separation and purification of baicalin from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis*. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1017* (1-2), 117-123.
8. Du, Q. Z.; Cai, W. J.; Xia, M.; Ito, Y. C., Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns. *J. Chromatogr. A* **2002**, *973* (1-2), 217-220.
9. Oka, H.; Ito, Y.; Yamada, S.; Kagami, T.; Hayakawa, J.; Harada, K.; Atsumi, E.; Suzuki, M.; Suzuki, M.; Odani, H.; Akahori, S.; Maeda, K.; Nakazawa, H.; Ito, Y., Separation of lac dye components by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *813* (1), 71-77.
10. Kitazume, E.; Sato, N.; Saito, Y.; Ito, Y., Separation of Heavy-Metals by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (17), 2225-2228.
11. Jin, Y. R.; Zhang, L. Z.; Han, S. J.; Zhang, L. X.; Zhang, J. M.; Zhou, G. Q.; Dong, H. B., Behavior of lanthanides in countercurrent chromatography using dihexyl-N,N-diethylcarbonyl methylene phosphonate as stationary phase. *J. Chromatogr. A* **2000**, *888* (1-2), 137-144.
12. Ma, Y.; Ito, Y., Chiral Separation by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (17), 3069-3074.
13. Shinomiya, K.; Kabasawa, Y.; Ito, Y., Countercurrent chromatographic separation of sugars and their p-nitrophenyl derivatives by cross-axis coil planet centrifuge. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1999**, *22* (4), 579-592.
14. Freeman, H. S.; Hao, Z.; McIntosh, S. A.; Mills, K. P., Purification of Some

- Water-Soluble Azo Dyes by High-Speed Countercurrent Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11* (1), 251-266.
15. Yang, F. Q.; Ito, Y., Preparative separation of lappaconitine, ranaconitine, N-deacetylappaconitine and N-deacetylranaconitine from crude alkaloids of sample *Aconitum sinomontanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *943* (2), 219-225.
  16. Ma, X. F.; Tu, P. F.; Chen, Y. J.; Zhang, T. Y.; Wei, Y.; Ito, Y., Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *992* (1-2), 193-197.
  17. Ruiz-Angel, M. J.; Caballero, R. D.; Simo-Alfonso, E. F.; Garcia-Alvarez-Coque, M. C., Micellar liquid chromatography: suitable technique for screening analysis. *J. Chromatogr. A* **2002**, *947* (1), 31-45.
  18. Bermudez-Saldana, J. M.; Escuder-Gilabert, L.; Medina-Hernandez, M. J.; Villanueva-Camanas, R. M.; Sagrado, S., Modelling bioconcentration of pesticides in fish using biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1063* (1-2), 153-160.
  19. Martinez-Pla, J. J.; Martin-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camanas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J., Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047* (2), 255-262.
  20. Annunziata, O.; Costantino, L.; D'Errico, G.; Paduano, L.; Vitagliano, V., Transport properties for aqueous sodium sulfonate surfactants - 2. Intradiffusion measurements: Influence of the obstruction effect on the monomer and micelle mobilities. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *216* (1), 16-24.
  21. Malliaris, A.; Lang, J.; Zana, R., Micellar Aggregation Numbers at High Surfactant Concentration. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *110* (1), 237-242.
  22. Guha, S.; Jaffe, P. R.; Peters, C. A., Solubilization of PAH mixtures by a nonionic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32* (7), 930-935.
  23. Paterson, I. F.; Chowdhry, B. Z.; Leharne, S. A., Polycyclic aromatic hydrocarbon extraction from a coal tar-contaminated soil using aqueous solutions of nonionic surfactants. *Chemosphere* **1999**, *38* (13), 3095-3107.
  24. Yeom, I. T.; Ghosh, M. M.; Cox, C. D.; Robinson, K. G., Micellar Solubilization of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons in Coal Tar-Contaminated Soils. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29* (12), 3015-3021.
  25. Vitha, M. F.; Dallas, A. J.; Carr, P. W., Study of water-sodium dodecyl sulfate micellar solubilization thermodynamics for several solute homolog series by headspace gas chromatography. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (12), 5050-5062.
  26. Shinomiya, K.; Kabasawa, Y.; Yanagidaira, K.; Sasaki, H.; Muto, M.; Okada, T.; Ito, Y., Protein separation by nonsynchronous coil planet centrifuge with

- aqueous-aqueous polymer phase systems. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1005 (1-2), 103-112.
27. Shinomiya, K.; Ito, Y., Effects of the planetary motion of a coiled column on protein separation by the nonsynchronous coil planet centrifuge. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, 27 (20), 3243-3255.
28. Goklen, K. E.; Hatton, T. A., Liquid-Liquid-Extraction of Low-Molecular-Weight Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles. *Sep. Sci. Technol.* **1987**, 22 (2-3), 831-841.
29. Kotlarchyk, M.; Huang, J. S.; Chen, S. H., Structure of Aot-Reversed Micelles Determined by Small-Angle Neutron-Scattering. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89 (20), 4382-4386.
30. Luisi, P. L.; Magid, L. J., Solubilization of Enzymes and Nucleic-Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1986**, 20 (4), 409-474.
31. Pandit, P.; Basu, S., Removal of ionic dyes from water by solvent extraction using reverse micelles. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38 (8), 2435-2442.
32. Leodidis, E. B.; Hatton, T. A., Amino-Acids in Aot Reversed Micelles .1. Determination of Interfacial Partition-Coefficients Using the Phase-Transfer Method. *J. Phys. Chem.* **1990**, 94 (16), 6400-6411.
33. Pires, M. J.; AiresBarros, M. R.; Cabral, J. M. S., Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. *Biotechnol. Progr.* **1996**, 12 (3), 290-301.
34. Goto, M.; Hashimoto, Y.; Fujita, T.; Ono, T.; Furusaki, S., Important parameters affecting efficiency of protein refolding by reversed micelles. *Biotechnol. Progr.* **2000**, 16 (6), 1079-1085.
35. Chen, W. Y.; Lee, Y. W.; Lin, S. C.; Ho, C. W., Renaturation and interaction of ribonuclease A with AOT surfactant in reverse micelles. *Biotechnol. Progr.* **2002**, 18 (6), 1443-1446.
36. Goklen, K. E.; Hatton, T. A., Protein Extraction Using Reverse Micelles. *Biotechnol. Progr.* **1985**, 1 (1), 69-74.
37. Kinugasa, T.; Kondo, A.; Mouri, E.; Ichikawa, S.; Nakagawa, S.; Nishii, Y.; Watanabe, K.; Takeuchi, H., Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution. *Sep. Purif. Technol.* **2003**, 31 (3), 251-259.
38. Regalado, C.; Asenjo, J. A.; Pyle, D. L., Protein Extraction by Reverse Micelles - Studies on the Recovery of Horseradish-Peroxidase. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 44 (6), 674-681.
39. Hu, Z. Y.; Gulari, E., Protein extraction using the sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) reverse micellar system. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 50 (2), 203-206.
40. Goto, M.; Ono, T.; Nakashio, F.; Hatton, T. A., Design of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 54 (1), 26-32.

41. Wolbert, R. B. G.; Hilhorst, R.; Voskuilen, G.; Nachtegaal, H.; Dekker, M.; Vantriet, K.; Bijsterbosch, B. H., Protein Transfer from an Aqueous Phase into Reversed Micelles - the Effect of Protein Size and Charge-Distribution. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184* (3), 627-633.
42. Pires, M. J.; Cabral, J. M. S., Liquid-Liquid-Extraction of a Recombinant Protein with a Reverse Micelle Phase. *Biotechnol. Progr.* **1993**, *9* (6), 647-650.
43. Hentsch, M.; Menoud, P.; Steiner, L.; Flaschel, E.; Renken, A., Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process. *Biotechnol. Tech.* **1992**, *6* (4), 359-364.
44. Ishikawa, H.; Noda, K.; Oka, T., Kinetic-Properties of Enzymes in Aot-Isooctane Reversed Micelles. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, *70* (6), 381-385.
45. Lee, S. S.; Lee, B. K.; Choi, J. S.; Lee, J. P., Effect of alcohol addition on back-extraction of BSA and cytochrome c using AOT reverse micellar system. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2001**, *22* (8), 897-902.
46. Jarudilokkul, S.; Poppenborg, L. H.; Stuckey, D. C., Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62* (5), 593-601.
47. 沈經緯, 於逆流層析中以反微胞製備分離蛋白質. 國立交通大學應用化學所, 碩士論文 **2005**.
48. Andrews, B. A.; Pyle, D. L.; Asenjo, J. A., The Effects of Ph and Ionic-Strength on the Partitioning of 4 Proteins in Reverse Micelle Systems. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43* (11), 1052-1058.
49. Shin, Y. O.; Weber, M. E.; Vera, J. H., Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate. *Biotechnol. Progr.* **2003**, *19* (3), 928-935.
50. Wei, G. T.; Liu, F. K.; Wang, C. R. C., Shape separation of nanometer cold particles by size-exclusion chromatography. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (11), 2085-2091.
51. Novak, J. P.; Nickerson, C.; Franzen, S.; Feldheim, D. L., Purification of molecularly bridged metal nanoparticle arrays by centrifugation and size exclusion chromatography. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (23), 5758-5761.
52. Choi, M. M. F.; Douglas, A. D.; Murray, R. W., Ion-pair chromatographic separation of water-soluble gold monolayer-protected clusters. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (8), 2779-2785.
53. Latham, A. H.; Freitas, R. S.; Schiffer, P.; Williams, M. E., Capillary magnetic field flow Fractionation and analysis of magnetic nanoparticles. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (15), 5055-5062.
54. Xu, X. Y.; Caswell, K. K.; Tucker, E.; Kabisatpathy, S.; Brodhacker, K. L.; Scrivens, W. A., Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1167* (1), 35-41.

55. Sweeney, S. F.; Woehrl, G. H.; Hutchison, J. E., Rapid purification and size separation of gold nanoparticles via diafiltration. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (10), 3190-3197.
56. Ito, Y.; Carmeci, P.; Sutherland, I. A., Nonsynchronous Flow-through Coil Planet Centrifuge Applied to Cell-Separation with Physiological Solution. *Anal. Biochem.* **1979**, *94* (2), 249-252.
57. Sutherland, I. A.; Ito, Y., Cell-Separation Using 2-Phase Polymer Systems in a Nonsynchronous Flow-through Coil Planet Centrifuge. *Anal. Biochem.* **1980**, *108* (2), 367-373.
58. Okada, T.; Metcalfe, D. D.; Ito, Y., Purification of mast cells with an improved nonsynchronous flow-through coil planet centrifuge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1996**, *109* (4), 376-382.
59. Yao, H.; Momozawa, O.; Hamatani, T.; Kimura, K., Stepwise size-selective extraction of carboxylate-modified gold nanoparticles from an aqueous suspension into toluene with tetraoctylammonium cations. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (12), 4692-4697.
60. Yang, Y.; Kimura, K., Stepwise size-selective extraction of aqueous silver nanoparticles by a series of organic solvents. *Chem. Lett.* **2006**, *35* (4), 462-463.
61. Chen, S. H.; Kimura, K., Synthesis and characterization of carboxylate-modified gold nanoparticle powders dispersible in water. *Langmuir* **1999**, *15* (4), 1075-1082.
62. Hudson, J. L.; Casavant, M. J.; Tour, J. M., Water-soluble, exfoliated, nonroping single-wall carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (36), 11158-11159.
63. Ziegler, K. J.; Schmidt, D. J.; Rauwald, U.; Shah, K. N.; Flor, E. L.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E., Length-dependent extraction of single-walled carbon nanotubes. *Nano Lett.* **2005**, *5* (12), 2355-2359.
64. Das, K.; Uppal, A.; Gupta, P. K., Hyper-Rayleigh scattering and continuum generation of salt induced aggregates of Silver nanoparticles: The effect of cation size (Li<sup>+</sup>, N<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>). *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *426* (1-3), 155-158.
65. Smalley, J. F.; Chalfant, K.; Feldberg, S. W.; Nahir, T. M.; Bowden, E. F., An indirect laser-induced temperature jump determination of the surface pK(a) of 11-mercaptoundecanoic acid monolayers self-assembled on gold. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (10), 1676-1685.
66. Cheng, W. L.; Wang, E., Size-dependent phase transfer of gold nanoparticles from water into toluene by tetraoctylammonium cations: A wholly electrostatic interaction. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (1), 24-26.
67. Frey, B. L.; Corn, R. M., Covalent attachment and derivatization of poly(L-lysine) monolayers on gold surfaces as characterized by polarization-modulation FT-IR spectroscopy. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (18), 3187-3193.
68. Shi, W. L.; Sahoo, Y.; Swihart, M. T., Gold nanoparticles surface-terminated, with

- bifunctional ligands. *Colloids Surf., A* **2004**, *246* (1-3), 109-113.
69. Taleb, A.; Petit, C.; Pileni, M. P., Synthesis of highly monodisperse silver nanoparticles from AOT reverse micelles: A way to 2D and 3D self-organization. *Chem. Mater.* **1997**, *9* (4), 950-959.
70. Wilcoxon, J. P.; Martin, J. E.; Provencio, P., Optical properties of gold and silver nanoclusters investigated by liquid chromatography. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (2), 998-1008.
71. Katasonova, O. N.; Fedotov, P. S.; Spivakov, B. Y.; Filippov, M. N., Behavior of solid microparticles in their fractionation on a rotating coiled column. *J. Anal. Chem.* **2003**, *58* (5), 473-477.
72. Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, T.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K., *Nature* **1966**, *212*, 985.
73. Ito, Y., Development of Countercurrent Chromatography. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 534-551.
74. Ito, Y.; Bowman, R. L., Horizontal flow-through coil planet centrifuge without rotating seals. *Anal. Biochem* **1977**, *82*, 63-68.
75. Ito, Y.; Bramblett, G. T.; Bhatnagar, R.; Huberman, M.; Leive, L.; Cullinane, L. M.; Groves, W., Improves nonsynchronous flow-through coil planet centrifuge without rotating seals: Principle and application. *Sep. Sci. Tech.* **1983**, *18* (1), 33-48.
76. Fedotov, P. S.; Spivakov, B. Y.; Shkinev, V. M., Possibility of field-flow fractionation of macromolecules and particles in a rotating coiled tube. *Anal. Sci.* **2000**, *16* (5), 535-536.
77. Giddings, J. C., Future Pathways for Analytical Separations. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (8), A945-&.
78. Koch, T.; Giddings, J. C., High-Speed Separation of Large (Greater-Than-1  $\mu\text{m}$ ) Particles by Steric Field-Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (6), 994-997.
79. Wahlund, K. G.; Winegarner, H. S.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C., Improved Flow Field-Flow Fractionation System Applied to Water-Soluble Polymers - Programming, Outlet Stream Splitting, and Flow Optimization. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (3), 573-578.
80. Fischer, C. H.; Giersig, M., Analysis of Colloids .7. Wide-Bore Hydrodynamic Chromatography, a Simple Method for the Determination of Particle-Size in the Nanometer-Size Regime. *J. Chromatogr. A* **1994**, *688* (1-2), 97-105.
81. Harada, M.; Kido, T.; Masudo, T.; Okada, T., Solute distribution coupled with laminar flow in wide-bore capillaries: What can be separated without chemical or physical fields? *Anal. Sci.* **2005**, *21* (5), 491-496.
82. Website, [http://en.wikipedia.org/wiki/Viscosity#Dynamic\\_viscosity](http://en.wikipedia.org/wiki/Viscosity#Dynamic_viscosity).
83. Aris, R., On the Dispersion of a Solute by Diffusion, Convection and Exchange between Phases. *Proc. Roy. Soc. A* **1959**, *252*, 538-550.

84. Taylor, G., Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube. *Proc. Roy. Soc. A* **1953**, *219*, 186-203.
85. Taylor, G., The Dispersion of Matter in Turbulent Flow through a Pipe. *Proc. Roy. Soc. A* **1954**, *223* (446-468).
86. Ibrahim, M.; Zou, G. W.; Zhu, J. J., Determination of diffusion coefficients of proteins by flow injection analysis and its application to estimation of molecular masses of proteins. *Instrum. Sci. Technol.* **1998**, *26* (4), 333-341.
87. Atwood, J. G.; Golay, M. J. E., Dispersion of Peaks by Short Straight Open Tubes in Liquid-Chromatography Systems. *J. Chromatogr.* **1981**, *218* (1-3), 97-122.
88. Culbertson, C. T.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M., Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta* **2002**, *56* (2), 365-373.
89. Brune, D.; Kim, S., Predicting Protein Diffusion-Coefficients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (9), 3835-3839.
90. Abad, A.; Cardona, S. C.; Torregrosa, J. I.; Lopez, F.; Navarro-Laboulais, J., On transfer function formalism for chemical reactor monitoring by continuous flow techniques. *J. Math. Chem.* **2005**, *38* (4), 541-564.
91. Zou, G. W.; Liu, Z.; Wang, C. X., Flow injection analysis methods for determination of diffusion coefficients. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *350* (3), 359-363.
92. Berthod, A.; Friesen, J. B.; Inui, T.; Pauli, G. F., Elution-extrusion countercurrent chromatography: Theory and concepts in metabolic analysis. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (9), 3371-3382.
93. Zanatta, C. F.; Cuevas, E.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z., Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53* (24), 9531-9535.
94. Berthod, A.; Ignatova, S.; Sutherland, I. A., Advantages of a small-volume counter-current chromatography column. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (19), 4169-4175.
95. Korenaga, T.; Shen, F. H.; Yoshida, H.; Takahashi, T., Dispersion Behavior of Solutes in an Ideal Laminar-Flow with Small-Bore Glass Tubes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62* (5), 1492-1500.
96. Berthod, A., Counter-Current Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase, in: *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 38, Elsevier, Amsterdam. **2002**.
97. Ruiz-Angel, M. J.; Pino, V.; Carda-Broch, S.; Berthod, A., Solvent systems for countercurrent chromatography: An aqueous two phase liquid system based on a room temperature ionic liquid. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1151* (1-2), 65-73.
98. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S., Elution-extrusion countercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase to extend the hydrophobicity window. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (21), 5886-5894.

99. Lu, Y. B.; Liu, R.; Berthod, A.; Pan, Y. J., Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution-extrusion counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1181* (1-2), 33-44.

## 期刊論文

1. Shen, C. W.; Boon, S. K.; Chang, Y. P.; Yu, T., Counter-current chromatography using hexane/surfactant-containing water solvent systems. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123* (1), 66-70.
2. Shen, C. W.; Yu, T., Protein separation and enrichment by counter-current chromatography using reverse micelle solvent systems. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1151* (1-2), 164-168.
3. Tzeng, Y. P.; Shen, C. W.; Yu, T., Liquid-liquid extraction of lysozyme using a dye-modified ionic liquid. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1193* (1-2), 1-6.
4. Shen, C. W.; Yu, T., Size-fractionation of silver nanoparticles using ion-pair extraction in a counter-current chromatograph. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5962-5967.
5. Shen, C. W.; Yu, T., Peak shape and dispersion behavior of solutes in counter-current chromatography with a single phase. *J. Chromatogr. A* **2009**, *in press*.

