

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

以超臨界流體萃取及逆流層析技術分離親水性物質(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2113-M-009-026-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立交通大學應用化學系

計畫主持人：余艇

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 26 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫結案報
告

※※※

※

※ 以超臨界流體萃取及逆流層析技術

※

※ 分離親水性物質(1/3)

※

※

※

※※※

※

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2113-M-009-026-

執行期間： 91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：余 艇

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立交通大學應用化學系

中 華 民 國 92 年 5 月 26 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫結案報告

計畫編號：NSC 91-2113-M-009-026-

執行期限：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

主持人：余 艇 國立交通大學應用化學系

中文摘要

關鍵詞：蛋白質，金屬離子，超臨界流體萃取，逆流層析，反微胞，介面活性劑

第一年度，我們的進度包括兩部分，其一是以逆流層析結合反微胞萃取並濃縮蛋白質分子，另一部分是在超臨界二氧化碳中加入介面活性劑，以萃取親水性物質。在第一個部分，我們成功的萃取並濃縮了蛋白質分子 cytochrome c，其萃取回收率，最高可達 95%，而且體積可以濃縮十幾倍。在第二部分，我們測量了七種商用離子型介面活性劑在修飾過的超臨界二氧化碳中之溶解度，當修試劑乙醇之比例為 20% 時，didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) 及 sodium bis-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT) 兩種介面活性劑之溶解度於二氧化碳(225 bar and 35⁰C)中高於 1.8×10⁴ mg/L，可以形成反微胞，嘗試以此反微胞相萃取親水性物質，結果發現可以萃取出離子性染料亞甲藍和甲基橙，但是無法萃取出蛋白質分子 cytochrome c。

以下正文都分為上述兩個研究分別敘述之。

英文摘要

Key Words: Protein, Metal ions, Supercritical fluid extraction, Reverse micelle, Surfactant
Countercurrent chromatography

This first-year progress report of this three-year research will be described in two parts. The first part involves concentration of proteins using reverse micelle phase in a countercurrent chromatograph, while the second part involves hydrophilic components extraction using surfactant-containing supercritical fluid carbon dioxide (SFCO₂). We successfully extracted and concentrated protein

cytochrome c using countercurrent chromatograph. The highest recovery yeild reached 95% and the sample volume was reduced more ten-folds. In addition, we measured solubilities of seven commercially available ionic surfactants in solvent-modified SFCO₂. When carbon dioxide (225 bar and 35⁰C)modified with 20% (v/v) ethanol, solubilities of didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) and sodium bis-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT) were as high as 1.8×10⁴ mg/L which exceeded the concentration required in forming reverse micelle. Three hydrophilic compounds were examined in the AOT-containing SFCO₂. Methylene blue and methyl orange were found solubilized in SFCO₂, while cytochrome c was found insoluble.

The progress will be expressed in two parts throughout the entire text.

一 前言

(一) 隨著基因重組與遺傳工程的發展，研發如何能夠有效地在發酵液及細胞培養基質中進行大量且連續分離、純化蛋白質的技術是愈來愈受到重視。近年來發展出以形成反微胞的方法，來萃取水基質中的蛋白質，可是在純化以及濃縮方面，並未發展出有實用的價值。

(二) 反微胞的形成為改善超臨界二氧化碳萃取極性物質的一個策略，但是幾乎所有商業上可購買到的介面活性劑在超臨界二氧化碳中溶解度皆不理想。然而，在超

臨界二氧化碳中加入有機修飾劑可以有效改善這些界面活性劑的溶解度，當溶解度到達臨界微胞濃度時，界面活性劑於超臨界二氧化碳中會形成反微胞，進而溶解親水性物質。

二 研究目的

(一) 逆流層析是一種分析型與製備型兼具的分離兼濃縮技術。其應用包括了農業化學、食品化學、藥物研發、生化等方面。由早期發展到現在，高轉速逆流層析儀(HSCCC)是目前最常用的製備型 CCC 儀器，其優點是可提高分離效率且縮短分離時間。除了可應用於層析之外，CCC 儀器也可作為一具高效能的萃取設備，此研究即是使用此一特性。

與傳統反微胞萃取法不同的地方是，本實驗的主要目標是將較低濃度且大量的蛋白質水溶液，利用分離管柱內的反微胞相萃取並濃縮成小體積且高濃度的蛋白質水溶液。藉著逆流層析儀的特點，提供反微胞萃取技術研究學者另外一種構思及應用的空間。

(二) 應用界面活性劑於超臨界二氧化碳萃取親水性物質，我們發現界面活性劑 DDAB 和 AOT 在壓力高於 225 bar、修飾劑乙醇濃度 20% v/v 之下溶解度甚高，應該可以於超臨界二氧化碳中形成反微胞，進而萃取親水性物質。因此，我們進行系統化，介面活性劑於超臨界二氧化碳溶解度之研究，並嘗試一些親水性物質之萃取。

三 文獻探討

(一) 1941 年，逆流層析的技術已經應用在層析以及萃取，直到 70 年代，Ito 和 Conway 等人對於這項技術的理論基礎加以研究探討，進而開發出多樣的儀器結構後，並大幅改進其分離效能，其主要應用於樣品的分離、純化、萃取與製備。

高速逆流層析 (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)

在高轉速之下可使得動靜相之間可充分混和；同時高轉速的旋轉使得動相的流速既能增快又能保持比傳統逆流層析還高的靜相滯留量，因而增加樣品分離時的解析度及效率。

反微胞技術發展至今，絕大多數的文獻仍然採用單一成分的蛋白質為萃取的樣品，而且實用之分離效果不佳。尤其若將反微胞技術推廣至工業界實際應用的層面，所處理的樣品組成必須更複雜和多樣化，例如從真實的發酵液當中萃取出某種對於生物醫學上有幫助的蛋白質。

本實驗室，將逆流層析和反微胞技術結合，尚未見諸文獻，我們希望能將反微胞萃取技術實用化。

(二) 上個世紀末，研究人員發現，一些含氟的介面活性劑在超臨界二氧化碳中有很高的溶解度，他們並且證實，此溶劑系統甚至可以溶解分子量很大的蛋白質。除此之外，Ihara 等人證實了在二氧化碳中加入乙醇為輔助溶劑可以溶解商業上可購得的界面活性劑 AOT，Hutton 更進一步證實了 AOT 可在超臨界二氧化碳中形成反微胞，溶解甲基橙 (methyl orange) 與核黃素 (riboflavin)。但是我們仍然缺乏 AOT 這類在商業上可購得的界面活性劑於修飾極性後二氧化碳中的溶解度資訊。而且，大量文獻只報導親水性物質可溶解於超臨界二氧化碳中，少見有實質探討親水性物質萃取之研究。

四 研究方法

(一) 包含正向萃取與反向萃取之完整反微胞萃取。簡單說明實驗步驟，先將含介面活性劑 AOT 的有機溶劑 (例如正己烷) 和含鹽類分子 (例如氯化鉀) 之水溶液互相飽和之後靜置分離。之後將反微胞相 (有機相) 注入逆流層析轉體中，之後，將含有蛋白質分子 (例如 cytochrome c) 的水溶液，以一般逆流層析注入動相的模式注入管柱中，在適當的酸鹼度之下，蛋白質會從水樣品轉移至有機反微胞相中，此即

是所謂正向萃取，之後從樣品閥門注入一段(例如 10 mL)不同酸鹼度(例如 pH 12)之水溶液進入管柱，在這個酸鹼度中，蛋白質分子會傾向於回到水相中，此即是反向萃取。經過正反向萃取，可以達到純化以及濃縮的。

(二) 本實驗測量了數種介面活性劑在加入有機修飾劑後之溶解度。由於溶解度大於可形成反微胞之濃度，因此我們也嘗試了使用這個系統來測試，是否可以用來溶解親水性物質。實驗條件大致如下：臨界二氧化碳壓力 225 bar、溫度 35 °C、20 % v/v 乙醇為修飾溶劑。

五 結果與討論

(一) 本實驗的第一部分將實驗室過去所選用的 10mg/L cytochrome c 樣品濃度進而提升至 20、50 直到 100mg/L，同時配合蛋白質濃度的變化，也選用由 50、70 及 90mM 不同濃度的陰離子型介面活性劑所形成的反微胞相，結合上述兩項變因歸納出以下結論：在固定介面活性劑濃度的情況下，若提高欲萃取之蛋白質濃度，在進行正向萃取時能夠從水溶液中被萃取進入反微胞內的蛋白質量會相對的增加，因此回收率大致上也會相對地提昇；若固定欲萃取之蛋白質濃度，發現反向萃取過後之樣品回收率與介面活性劑濃度呈現反比的關係。

實驗的第二部分，採用未事先平衡處理之動/靜相溶劑系統進行反微胞萃取，我們發現：此溶劑系統所得到的萃取回收率，高於過去所使用經過平衡的溶劑系統，同時，系統的靜相滯留量雖然降低約 10mL，但是對萃取效果不會造成負面的影響。由於實驗數據過多，我們在此將一部份數據列出，作為代表，見表一。

接下來，我們計畫從發酵槽中，實際的來嘗試是否可以萃取出生產出來的酵素，並且測試以此種方法所分離出來的酵素，是否能夠維持活性。

(二) 我們測量了七種商用介面活性劑，其中，DDAB 和 AOT 兩種之溶解度高過於形成反微胞之濃度，其實驗結果，列表於表二及表三。此外，我們也嘗試應用離子型介面活性劑來進行染料及蛋白質的萃取，結果染料可成功萃取出來，蛋白質在本實驗中沒有被萃取出來。我們也嘗試利用在二氧化碳中溶解度較好的非離子型介面活性劑來進行染料及蛋白質的萃取。結果蛋白質沒有被萃取出來，但是可以成功地將染料萃取出來。

六 參考文獻

1. T. Ihara, N. Suzuki, T. Maeda, K. Sagara and T. Hobo, "Extraction of water-soluble vitamins from pharmaceutical preparations using AOT (sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate) / pentane reversed micelles." *Chem. Pharm. Bull.*, 43 (1995) 626-630.
2. B. H. Hutton, J. M. Perera, F. Grieser and G. W. Stevens, "Investigation of AOT reverse microemulsions in supercritical carbon dioxide." *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, 146 (1999) 227-241.
3. B. H. Hutton, J. M. Perera, F. Grieser and G. W. Stevens, "AOT reverse microemulsions in ScCO₂ – a further investigation." *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, 189 (2001) 177-181.
4. E. G. Ghenciu, A. J. Russell, E. J. Beckman, L. Steele and N. T. Becker, "Solubilization of subtilisin in CO₂ using fluoroether-functional amphiphiles." *Biotechnol. Bioeng.*, 58 (1998) 572-580.
5. G. J. McFann, K. P. Johnston and S. M. Howdle, "Solubilization in nonionic reverse micelles in carbon dioxide." *AIChE J.*, 40 (1994) 543-555.
6. J. C. Liu, B. X. Han, G. Z. Li, X. G. Zhang, J. He and Z. M. Liu, "Investigation of nonionic surfactant Dynol-604 based reverse microemulsions formed in supercritical

- carbon dioxide.” *Langmuir*, 17 (2001) 8040-8043.
7. K. Soni and D. Madamwar, “Reversed micellar extraction of an extracellular acid phosphatase from fermentation broth.” *Process Biochem.*, 36 (2000) 311-315.
 8. M.J. Pires, M.R. Aires-Barros and J.M.S. Cabral, “Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles.” *Biotechnol. Prog.*, 12 (1996) 290-301.
 9. K.E. Göklen and T.A. Hatton, “Protein extraction using reverse micelles.” *Biotechnol. Prog.*, 1 (1985) 69-74.
 10. G.A. Krei and H. Hustedt, “Extraction of enzymes by reverse micelles.” *Chem. Eng. Sci.*, 47 (1992) 99-111.
 11. K.E. Göklen and T.A. Hatton, “Liquid-liquid extraction of low molecular-weight proteins by selective solubilization in reversed micelles.” *Sep. Sci. Tech. nol.*, 22 (1987) 831-841.
 12. S. Qutubuddin, J.M. Wiencek, A. Nabi and J.Y. Boo, “Hemoglobin extraction using co-surfactant-free nonionic Microemulsions.” *Sep. Sci. Tech nol.*, 29 (1994) 923-929.
 13. G.J. Lye, J.A. Asenjo and D.L. Pyle, “Extraction of lysozyme and ribonuclease-a using reverse micelles : limits to protein solubilization.” *Biotechnol. Bioeng.*, 47 (1995) 509-519.
 14. T. Ono, M. Goto, F. Nakashio and T.A. Hatton, “Extraction behavior of hemoglobin using reversed micelles by dioleoyl phosphoric acid.” *Biotechnol. Prog.*, 12 (1996) 793-800.
 15. K. Shiomori, N. Ebuchi, Y. Kawano, R. Kuboi and I. Komasa, “Extraction characteristic of bovine serum albumin using sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles.” *J. Ferment. Bioeng.*, 86 (1998) 581-587.
 16. 李心怡, “利用反微胞相在高速逆向流層析儀上萃取蛋白質”, 國立交通大學, 碩士論文, 民國 90 年 6 月。
 17. Y. Ito and W.D. Conway, “High-Speed Countercurrent Chromatography” John Wiley & Sons, New York, 1995.
 18. A.P. Foucault , “Countercurrent Chromatography” *Anal.Chem*, 63 (1991) 569-579.
 19. Y. Ito and W.D. Conway, “Development of countercurrent chromatography.” *Anal. Chem.*, 56 (1984) 534A-551A.

計畫成果自評

依照目前的進度，大體上都合乎第一年的規劃。本實驗室兩種技術都有相當的進展，其一，是使用逆流層析儀來純化蛋白質，的確可以達到純化和濃縮於同一設備，之後有兩方面研究需要確認，其一是，此方法是否有普遍性，亦即可使用於不同蛋白質樣品，其二是，是否真的有實用價值，亦即應用於發酵槽中酵素之萃取。

另一技術是超臨界流體萃取，我們的確可以使用含介面活性劑之二氧化碳萃取出甲基藍和甲基橙，但是尚無法溶解蛋白質分子，可能需要修飾一些條件來達成。

此兩部分之研究，略做調整以及補做數據之後，將寫成論文，投稿至 SCI 期刊。

表(一) 分別以 50、70、90 mM AOT / n-hexane 萃取濃縮
100 mg/l cytochrome c

50 mM AOT / n-hexane 萃取濃縮 100 mg/l cytochrome c

Volume(ml)	10	20	30	40	50	60
Recovery(%)	33.7	92.5	93.8	94.5	94.9	95.4
Conc. factor	10.1	13.9	9.4	7.1	5.7	4.8

70 mM AOT / n-hexane 萃取濃縮 100 mg/l cytochrome c

Volume(ml)	10	20	30	40	50	60
Recovery(%)	24.9	84.3	85.6	86.3	87.5	87.9
Conc. factor	7.5	12.6	8.6	6.5	5.2	4.4

90 mM AOT / n-hexane 萃取濃縮 100 mg/l cytochrome c

Volume(ml)	10	20	30	40	50	60
Recovery(%)	17.4	82.3	85	86.4	87.5	87.9
Conc. factor	5.2	12.3	8.5	6.5	5.2	4.4

*表(一)實驗條件：靜相為 70~90 mM AOT/n-Hexane；動相為 0.2 M KCl；
樣品為 100 mg/l cytochrome c/0.2 M KCl 水溶液；流速
為 1 ml/min；靜相滯留率約 65%；每組數據測定 1 次。

表（二） AOT 在不同條件下於超臨界二氧化碳的溶解度

AOT					
	Pressure (bar)	Temperature ()	modifier	Mean solubility (mg/L)	RSD (%)
1	200	35	Ethanol 20% v/v	1.99×10^1	21.3
2	200	35	Ethanol 40% v/v	1.39×10^4	14.8
3	200	35	Methanol 20% v/v	2.64×10^1	15.4
4	225	35	Ethanol 20% v/v	1.85×10^4	9.78
5	250	35	Ethanol 20% v/v	2.05×10^4	2.32
6	250	35	Ethanol 10% v/v	1.16×10^4	0.860

註：Mean solubility 為三次實驗平均

表（三） DDAB 在不同條件下於超臨界二氧化碳的溶解度

DDAB					
	Pressure (bar)	Temperature ()	modifier	Mean solubility (mg/L)	RSD (%)
1	200	35	Ethanol 20% v/v	8.97×10^1	3.96
2	200	35	Ethanol 40% v/v	2.04×10^4	4.83
3	200	35	Methanol 20% v/v	9.77×10^1	0.830
4	225	35	Ethanol 20% v/v	2.09×10^4	9.63
5	250	35	Ethanol 20% v/v	2.18×10^4	2.92
6	250	35	Ethanol 10% v/v	3.37×10^3	1.83

註：Mean solubility 為三次實驗平均

