

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 90-2113-M-009-027-

執行期限：89 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：余 艇 國立交通大學應用化學系

一、中文摘要

關鍵詞：冷媒、超臨界流體萃取、修飾劑、反微胞、螯合劑、螯合物

超臨界流體二氧化碳 (SF-CO₂) 萃取與層析，已經發展出許多頗具價值的應用；針對極性較高的物質，在無極性的超臨界二氧化碳中添加極性修飾劑，也已經證實可大幅提升極性物質的溶解度。

但是，超臨界流體二氧化碳不論添加修飾劑與否，能夠溶解的對象皆為本身可溶於有機相的物質，對於高度親水性 (highly hydrophilic) 物質，例如蛋白質、金屬離子，則沒有溶解能力。利用蛋白質分子在界面活性劑中形成反微胞 (reverse micelle) 的性質，以及有機螯合劑 (chelate agent) 與金屬離子形成穩定錯合物的特性，就可以使用超臨界流體二氧化碳來溶解這些親水性物質。

超臨界流體，可以有效穿透樣品基質並與萃取物充分混合，帶來快速萃取的效益。另外，當萃取完成洩壓後，超臨界流體立即氣化與萃取物分離，相當於對萃取物進行了濃縮的程序。

一般而言，在超過 100 大氣壓的高壓條件下，超臨界流體二氧化碳才能表現出足夠的溶解能力，因此我們嘗試以液態冷媒 R134a (1,1,1,2-Tetrafluoroethane) 取代超臨界流體二氧化碳來進行萃取的工作。液態 R134a 萃取保有超臨界流體萃取後的濃縮特性，而操作壓力卻可以低到 20 大氣壓以下，降低了操作高壓系統時所必須面對的問題，應用潛力值得探討。

過去我們的實驗，已經顯示 R134a 在加入適當的介面活性劑之下，的確可以溶解蛋白質分子。本計畫的研究結果發現，使用液態 R134a 進行金屬萃取的成效對於超臨界流體二氧化碳萃取而言不遑多讓，預期的低壓條件萃取也獲得證實；而且，超臨界流體二氧化碳萃取所使用的螯合劑須要經過選擇性氟化才有理想的溶解度，而液態 R134a 則可以溶解一般未氟化的有機螯合劑-金屬離子錯合物，意味所需螯合劑成本可以顯著地降低。此外，在加入介面活性劑之下，使用本實驗室特有的逆流層析裝置，可以在鐵弗龍管柱中，將親水性物質甲基橙萃取出來。

Abstract

Keywords : refrigerant, supercritical fluid extraction, modifier, reverse micelle, chelate agent, chelate complex

Many applications of extraction and chromatography using supercritical fluid carbon dioxide (SF-CO₂) have been developed. The solubility for compounds of high polarity can be greatly enhanced by adding polar organic modifiers in SF-CO₂.

However, SF-CO₂ is unable to dissolve highly hydrophilic components, like proteins and metal ions, while it can essentially dissolve those that can be dissolved in organic solvents only. Proteins can be solubilized in SF-CO₂ due to formation of reverse micelle with suitable surfactant molecules. Similarly, metals can be dissolved in SF-CO₂ with the presence of certain chelate agents.

SF-CO₂ is able to penetrate matrix rapidly and be well-mixed with analytes due to its greater diffusion rate than general liquid solvents. In addition, analytes are readily concentrated when SF-CO₂ is depressurized after extraction; therefore separation of analytes from SF-CO₂ is completed immediately.

In general, SF-CO₂ shows practical solvent power only when the pressure is above 100 atm. We try to use liquid R134a (1,1,1,2-tetrafluoroethane) instead of SF-CO₂. Extraction using liquid R134a possesses some of the advantages of using SF-CO₂, while the operational pressure can be as low as 20 atm. The apparatus used requires less pressure-resistance than that of SF-CO₂ extraction.

We have proved previously that protein can be solubilized in R134a with surfactant. We further prove in this study that metal extraction using liquid R134a is feasible. As reported in the literature, fluorinated chelate agents are needed for SF-CO₂ extraction because of their higher solubilities in SF-CO₂. However, we find that either un-fluorinated chelate agents or their corresponding complex compounds are readily dissolved in liquid R134a. The solubility results are summarized. In addition, hydrophilic compound – methyl orange can be extracted with surfactant-containing R134a using countercurrent chromatograph equipped with Teflon tube.

二、緣由與目的

拜近二十年來超臨界流體二氧化碳的發展之賜，層析及萃取的選擇性和應用領域已提升至另一境界，跳脫出傳統有機溶劑的使用，尤其是超臨界萃取技術，無論在樣品前處理或是工業生產方面，都已經有真正實用的價值，在環保聲浪高漲的今日，更顯得前景看好。由於超臨界流體二氧化碳無極性，只能溶解較低極性的物

質，如果要溶解高極性的物質，一般會加入一些具有極性的有機溶劑如甲醇或乙醇，來修飾臨界流體二氧化碳的極性和溶解能力，以便能夠萃取較高極性的化合物；但是，即便如此，對於像蛋白質分子或是金屬離子這些高度親水性的物質，還是束手無策。

過去十年之間，有許多研究試圖尋找或是合成一些介面活性劑和螯合劑，使得蛋白質分子在介面活性劑中形成反微胞 (reverse micelle) 而可以溶解於超臨界流體二氧化碳。報導顯示一些氟化物，例如 polyperfluoroether, PFPE，介面活性劑在超臨界流體二氧化碳中有相當的溶解度，而且已經證實可以包住蛋白質分子於反微胞相中，進而溶於超臨界流體二氧化碳；最近又有研究室合成螯合狀的介面活性劑，可以將甲基橙 (methyl orange) 分子從水溶液中萃取到超臨界流體二氧化碳裡面。此外，一些新合成含氟的螯合劑，也證實可以將一些金屬離子如汞、鎘、銅等等予以捕捉，溶於超臨界流體二氧化碳，可說開啓了超臨界流體二氧化碳的新用途，亦即作為親水性物質的溶劑。使用超臨界流體二氧化碳作為萃取溶劑，有一些獨特的優點與價值：此流體黏度小、擴散速率高，可以更有效穿透樣品基質，而達到萃取的目的；此外，在萃取完成後高壓流體回到常壓時，超臨界流體二氧化碳直接氣化，和欲萃取的物質分離，因而不像使用一般液態的萃取流體，萃取過程結束後，還要進一步將萃取物質和萃取流體分開，所以可以節省濃縮的步驟。

除了超臨界流體二氧化碳之外，液態二氧化碳也可以扮演類似角色，所不同的是擴散速率略小於超臨界流體二氧化碳，不過如果萃取的對象是液體的基質，擴散速率相對而言就不太重要，因為可以用攪拌達到混合的目的。

在超臨界流體或液態二氧化碳之外，也有研究探討使用超臨界氫氟碳

(hydrofluorocarbons, HFCs)、氟碳 (fluorocarbons)、以及氫氟碳 (hydrochlorofluorocarbons, HCFCs) 化合物作為萃取或層析流體之用，這一些合成的冷媒是用來代替原本會破壞臭氧層的氟氯碳化物，例如三氟甲烷曾被用為環境樣品前處理之萃取流體，氯二氟甲烷 (chlorodifluoromethane, R22) 被用於超臨界流體層析，也可以作為環境樣品 (如多氯聯苯、多環芳香碳氧化物) 前處理之用；最近也有人使用超臨界流體 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) 作為萃取及層析之用，它同時亦可以作為超臨界流體二氧化碳之修飾劑，文獻顯示它和超臨界流體二氧化碳的選擇性不盡相同，有潛力使用於製藥工業或是廢水處理。如同前述，若是在 R134a 中加入介面活性劑，也可以像在超臨界流體二氧化碳裡一樣形成微乳態 (microemulsion)。根據文獻記載，在 102.3°C、200bar 條件之下，當有某些特定的介面活性劑如 sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) 存在時，蛋白質 cytochrome c 便可以溶解於超臨界態 R22。

無論是液態或是超臨界態的二氧化碳，或是上述之超臨界溶劑都須要在高壓 (例如 100 大氣壓左右) 之下操作，對很多物質才有溶解能力，因此我們嘗試使用液態的 R134a 作為萃取之用。液態的 R134a 也具備了超臨界流體之特性，亦即萃取完成回到常壓時，即刻氣化與萃取物分離，至於操作的壓力卻遠低於一般超臨界流體以及液態二氧化碳所需之壓力，值得探討其實際應用的潛力。過去我們曾研究使用 R134a 為逆向流層析 (countercurrent chromatography) 動相之可行性，成功地分離了中藥當歸的一些主成分 (見文獻二)。本計畫將探討使用液態的 R134a 為溶劑，在介面活性劑和螯合劑存在之情形下，萃取蛋白質分子 (或其他高度親水性物質) 及金屬離子。

綜合以上所述，本研究計畫之目的在

於使用冷媒萃取親水性物質，可能可以提供一個新的萃取方法，用於分析或大量製備之用。

三、結果與討論

對於金屬離子的萃取方面，我們選擇了對環境傷害甚劇的汞 (Hg) 和鎘 (Cd) 以及鏷系和稀土金屬當作萃取的對象。首先我們嘗試了十餘種適合捕捉重金屬的螯合劑，其中可以溶於液態 R134a 的僅剩下六種。接著透過加熱攪拌的步驟，合成出預定的金屬螯合物。在改變壓力與溫度的情形下，我們讓 R134a 與金屬螯合物在萃取槽中充分混合，最後以光譜法對收集液定量分析，計算溶解度。將不同條件下的溶解度圖表化，部分數據見附表一。

文獻中指出氟化與長鍊型的有機螯合劑較易溶於超臨界流體二氧化碳中，但是在我們的實驗中發現，未氟化的有機螯合劑在液態 R134a 裡也表現出足夠的溶解度，而且含芳香環的螯合劑類型似乎更適合溶於 R134a 中。超臨界流體二氧化碳中添加修飾劑可以使溶解度產生提升效果，我們也嘗試在 R134a 中添加某些修飾劑，部分結果，列於附表二。此外，我們也嘗試從水相中以 R134a 萃取金屬螯合物，也得到不錯的效果。

除了金屬螯合物的萃取之外，我們也試驗了加入介面活性劑以萃取其他的親水性物質，為了彰顯 R134a 可以在低壓下操作，我們特別使用逆流層析儀 (未顯示儀器裝置圖) 來操作萃取，整個過程在鐵弗龍管中進行，可以將甲基橙從水溶液中萃取出來，在加入 0.8 mL 陽離子介面活性劑 trioctylmethylammonium chloride (TOMAC) 之下，以 50 mL R134a 來萃取 28 mL 5mg/L 的甲基橙水溶液，於 17 bar 壓力之下，回收率為 32%，於 8 bar 壓力之下，回收率為 27%。除此之外，我們會進一步嘗試大分子，如蛋白質之萃取。

四、計畫成果自評

我們已經成功的顯示使用 R134a，加入適當的螯合劑可以溶解某些金屬，包括稀土族金屬。加入修飾劑時，的確能夠再提升液態 R134a 的萃取能力；除了使用螯合劑以萃取金屬之外，在含有介面活性劑時，也可以用來萃取其他親水性物質，例如甲基橙分子，並有潛力可萃取蛋白質分子。我們相信這項萃取技術，有其發展空間，本實驗室也將會持續這方面的研究。

五、參考文獻

1. Jie-Ren Li, Yu-Mei Lee, Tiing Yu
“Solubilization of Hydrophilic Compounds in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane with A Cationic Surfactant” *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1348-1351.
2. Ya Ling Tsai and Tiing Yu* “Feasibility Study of Using Refrigerant 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Mobile Phase in High-Speed Counter-current Chromatography” *J. Chromatogr. A*, **1999**, *835*, 237-242.
3. Johnston, K. P.; Harrison K. L.; Clarke, M. J.; Howdle, S. M.; Heitz, M. P.; Bright, F. V.; Carlier, C.; Randolph, T. W. *Science* **1996**, *271*, 624-626.
4. Randolph, T. W.; Clarke M.J.; Harrison K.L.; Johnston, K.P.; Howdle, S.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6399-6406.
5. Heitz, M. P.; Carlier, C.; deGrazia J.; Harrison K. L.; Johnston, K. P.; Randolph, T. W.; Bright, F. V. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 6707-6714.
6. Cooper, A. I.; Londono, J. D.; Wignall, G.; McClain, J. B.; Samulski, E. T.; Lin, J. S.; Dobrynin, A.; Rubinstein, M.; Burke, A. L. C.; Frechet, J. M. J.; DeSimone, J. M. *Nature* **1997**, *389*, 368-371.
7. Wai, C. M.; Wang, S. F.; Liu, Y.; Lopez-Avila, V.; Beckert, W. F. *Talanta*, **1996**, *43*, 2083-2091.
8. Wang, J.; Marshall, W. D. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1971-1975.
9. Wai, C. M.; Wang, S. F. *J. Chromatogr. A*. **1997**, *785*, 369-383.
10. Lin, Y.; Wai, C. M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1658-1975.
11. Hawthorne, S.B.; Langenfeld, J.J.; Miller, D.J.; Burford, M.D. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1614-1622.
12. Cantrell, G.O.; Blackwell, J.A. *J. Chromatogr. A*. **1997**, *782*, 237-246.
13. Blackwell, J.A.; Stringham, R.W. *J. Chromatogr. A*. **1998**, *796*, 355-366.
14. Blackwell, J.A.; Stringham, R.W. *Chirality* **1997**, *9*, 693-698.
15. Blackwell, J.A.; Schallinger, L.E. *Microcolumn Sep.* **1994**, *6*, 551-556.
16. Blackwell, J.A.; Stringham, R.W. *HRC-J High Res. Chrom.* **1997**, *20*, 631-637.
17. Blackwell, J. A.; Stringham, R.W. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4608-4614.
18. Lagalante, A.F.; Clarke A.M.; Bruno, T.J. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8889-8892.
19. Jackson, K.; Fulton, J. L. *Langmuir* **1996**, *12*, 5289-52952.
20. Carroll, M. K.; Unger M. A.; Leach, A. M.; Morris, M. J.; Ingersoll, C. M.; Bright, F. V. *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 780-784.
21. Catchpole O. J.; Proells K. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, *40*, 965-972
22. Simões P.C., Catchpole O. J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, *41*, 267-276.

表一 金屬螯合物之溶解度

Cd-3-Formylchromone	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.196
	15	45	0.239
	15	65	0.449
	15	25	0.196
	55	25	0.245
Cd-Triphenylphosphine oxide	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.375
	15	45	0.489
	15	65	0.513
	15	25	0.375
	55	25	0.591
Hg-1-Benzoylacetone	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.178
	15	45	0.154
	15	65	0.107
	15	25	0.178
	55	25	0.276
Cd-1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.120
	15	45	0.090
	15	65	0.069
	15	25	0.120
	55	25	0.040

Cd-Thenoyltrifluoroacetone	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.475
	15	45	0.431
	15	65	0.425
	15	25	0.475
	35	25	0.488
La-Triphenylphosphine oxide	55	25	0.500
	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.507
	15	45	0.722
	15	65	1.023
	15	25	0.507
Ce-3-Formylchromone	35	25	0.524
	55	25	0.552
	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.0995
	15	45	0.356
	15	65	0.545
Eu-Thenoyltrifluoroacetone	15	25	0.0995
	35	25	0.103
	55	25	0.128
	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	7.81×10^{-4}
	15	45	1.58×10^{-3}
U-1-Benzoylacetone	15	65	1.91×10^{-3}
	15	25	7.81×10^{-4}
	35	25	1.20×10^{-3}
	55	25	1.65×10^{-3}
	P (bar)	T (°C)	S (g/100mL)
	15	25	0.098
U-1-Benzoylacetone	15	45	0.071
	15	65	0.059
	15	25	0.098
	35	25	0.146
	55	25	0.162

表二 修飾劑對螯合物於 R134a 之溶解效應

	Triphenylphosphine oxide (g/100mL)
R134a	0.46
R134a + 3%(v/v) MeOH	6.86
R134a + 3%(v/v) EtOH	5.64
R134a + 3%(v/v) IPA	2.75