

中文摘要

隨著生命科學從基因體時代進入蛋白體時代，大量的蛋白質急待大規模工業化生產。在製藥工業中，蛋白質藥物也逐漸替代傳統的化學合成藥物。開發新型的蛋白質分離技術就顯得格外重要。反(逆)相高效液相色譜層析法(RP-HPLC)由於具有優良的選擇性和分辨率，目前已被廣泛地應用在蛋白質、peptide 和諸多生物物質的製備過程中。乙腈-水(Acetonitrile-water)系統為最常用的 RP-HPLC 緩沖相之一。蛋白質通常伴隨著較高的乙腈濃度(40-60%)及 0.1% (v/v)的 Trifluoroacetic acid (TFA)而流出 RP-HPLC 色譜柱。有機溶劑可通過傳統的膜分離或冷凍乾燥等技術得以去除。然而，過高的乙腈濃度會大大降低用於蛋白質分離之精密膜材料的壽命，也會損壞冷凍乾燥系統，也因此 RP-HPLC 在實際應用時就倍受限制。利用低溫環境(-17°C)使乙腈-水系統相分層機制的研究已被報導，實驗證實此方法可移除大部份的乙腈有機溶劑，同時也進一步濃縮了蛋白質。但是在零度以下，乙腈-水系統有時會產生結冰現象，進而使蛋白質因重複的凍結與融化而使其喪失活性。故本研究結合了低溫環境與鹽類誘導之相分離機制，除了探討鹽的種類、鹽的添加量、初始乙腈濃度和溫度效應對乙腈-水系統之相分層效率的影響外；亦探討系統之乙腈去除率、時間效應、pH 值和電導度之評估，與蛋白質於乙腈-水系統之分配效應與回收率分析。實驗結果顯示，經由添加

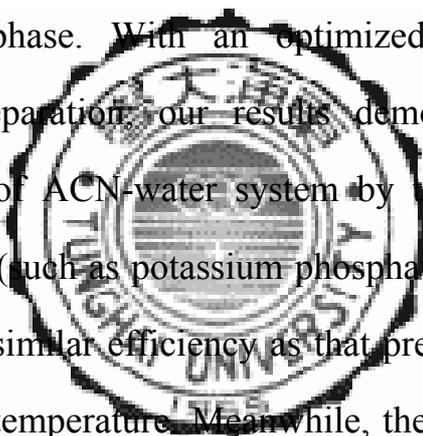
磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)之鹽類，鹽濃度介於 150mM 與 300mM 之間，使乙腈-水系統於 4°C 下產生相分層，系統不但可達同於低溫下 (-17°C) 之相分層效率，50% 以上的乙腈有機溶劑可被去除，且 90% 以上的蛋白質與氨基酸亦可有效地收集於乙腈-水系統之下層-水相中。而系統溶液 pH 值為 7.4，對於蛋白質亦有穩定之作用。因此，藉由鹽類添加和低溫下的進階相分層機制，不但能簡便快速地除去蛋白質樣品中的大部份有機溶劑，從而簡化蛋白質分離步驟；同時，達到濃縮蛋白質及維持蛋白質活性的功能。再者，相對於低溫誘導相分離機制而言，亦可降低由於低溫轉換過程所產生之能源消耗及環境污染。故此進階相分層機制在大規模蛋白質純化實際過程中，有其潛在的應用價值。



英文摘要

Because of its extremely powerful resolution, reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) has been widely employed in the preparative- and large-scale of separation and purification for enormous proteins, peptides, and amino acids. But its application is hindered by the involvement of high concentration of organic solvents that might affect the protein stability and activity. Acetonitrile (ACN)-water system is the most commonly used mobile phase in RP-HPLC. Normally, proteins are eluted from RP-HPLC columns with relatively high concentrations of ACN (> 60%v/v), in which have to be removed by either buffer exchange or lyophilization in the following stages. For the chemical safety considerations and their influences on the separation membrane, chromatography resins, and vacuum evaporator system during lyophilization, people are sometimes hesitated to apply the RP-HPLC technique in their purification processes. It has been demonstrated that the phase separation occurring under sub-zero temperature could remove the majority ACN. However, the sub-zero operation temperature may provoke sample freeze and the severe temperature shift will affect the protein properties. In this study, we combined the salt addition and cooling procedures to improve the efficiency at the above-zero temperature. We found that by the addition

of property salts, such as potassium phosphate buffer (pH=7.0), phase separation of ACN-water could come about effectively at 4°C, whereas the protein purification process are normally carried out. We investigated the percentage of ACN removal and the recovery of protein from the ACN solution by altering the concentrations of salt, initial ACN, as well as sample protein, respectively. We also examined the effects of the proteins natures, such as proteins with different hydrophobicity, on the protein distribution between the ACN-rich phase and the water-rich phase. With an optimized condition for this salt-induced phase separation, our results demonstrated that phase separation efficiency of ACN-water system by the addition of small amount of proper salts (such as potassium phosphate buffer, pH=7.0) at 4°C could achieve the similar efficiency as that previously described by cooling to a sub-zero temperature. Meanwhile, the greater than 50% of ACN could be simply removed, while more than 90% of protein could be easily recovered. Therefore, the modified phase separation technique by coupling cooling and salt addition procedure offers us the more economic, more effective, and more reliable approach to achieve the buffer exchange, removing at concentrating protein extent for proteins, as well as maintaining protein stability and activity in general protein purification processes.



誌謝

這本論文的完成，首先要感謝的是吾師 顧野松 教授，感謝老師在這兩年來耐心的指導，在專業知識上的傳授、研究方法的訓練、論文的殷切指導和為人處世的啟發，並訓練我獨立思考的能力，引導我進入一個新的世界，使我如沐春風，獲益良多。師恩浩蕩，感恩之情實非筆墨可以形容，只有在此致上最高的敬意和由衷的謝忱。同時也要感謝 楊芳鏘 教授以及 蔡明瞭 教授在口試期間所給予的指導和寶貴建議，使論文更加完備。另外，也感謝東海化工系上所有老師們在化工課業上的指導與解惑，為我奠定化工領域的基礎。

在研究所求學的兩年生涯中，感謝化工所的各位同學，純淵、子文與玟憲在生活上與精神上的鼓勵。實驗研究及口試準備期間承蒙 104 實驗室同學，富山、建中、東柏與華良在儀器和實驗問題上的協助，以及在研究所生活上的包容和照顧，使論文得以順利完成，在此致上最誠摯的謝意。另外，也要特別感謝好友德娟，無時無刻所給予的支持與幫助。

最後要謝謝永遠支持我的家人及親友，在生活上的照顧與關懷，尤其是雙親這些年來對我的培育之恩，謹將此論文獻給我最珍貴的家人以及我的朋友。

在撰寫過程中，回顧本文從無到有的點點滴滴，常常覺得這篇論文其實是對自己研究所兩年生活的一種記錄。回想起來在這段期間一路顛簸地走來，受到許多人的關心與幫助，這些有形無形的助力也就是支持我繼續前進的最大動力，在此我想要說：謝謝大家！

目錄

中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
誌謝.....	VII
目錄.....	VIII
表目錄.....	XII
圖目錄.....	XV
第一章 緒論	1
第二章 文獻回顧	5
2-1 生化工程與蛋白質分離純化技術的重要性.....	5
2-2 常見蛋白質分離純化技術.....	9
2-2-1 蛋白質分離純化策略.....	9
2-2-2 細胞破碎.....	12
2-2-3 固-液分離.....	14
2-2-4 蛋白質濃縮(Protein Concentration).....	16
2-2-4-1 沉澱法(Precipitation).....	17
2-2-4-2 萃取(Extraction).....	20
2-2-5 液相層析法(Liquid Chromatography).....	21



2-2-6 蛋白質之精製程序(Polishing Process).....	22
2-2-7 蛋白質純化步驟之整合	25
2-3 Reversed-Phase HPLC 法	26
2-3-1 RP-HPLC 的原理與應用	26
2-3-2 RP-HPLC 之後處理程序	29
2-4 相分層作用(Phase Separation).....	30
2-4-1 低溫環境誘導相分離機制.....	31
2-4-2 鹽類誘導相分層作用.....	33
第三章 實驗材料與分析方法.....	41
3-1 實驗目的	41
3-2 乙腈-水系統相分層影響之實驗流程.....	43
3-3 實驗藥品	44
3-4 實驗儀器與設備	45
3-5 實驗步驟	46
3-5-1 ACN-Water-Salts 溶液配置：	46
3-5-2 相分層效率(efficiency of phase separation)分析	47
3-5-3 移除 ACN 效率(% of ACN Removal)	48
3-5-4 蛋白質於 ACN-Water 系統分佈情形.....	49



3-6 分析方法	52
3-6-1 pH 值測定	52
3-6-2 電導度測定	53
3-6-3 Acetonitrile 含量測試	53
3-6-4 蛋白質定量測定	53
第四章 結果與討論	56
4-1 鹽類對乙腈-水系統相分層之影響	56
4-1-1 鹽類對乙腈-水系統在零度環境以上之相分層影響	56
4-1-2 鹽類添加對乙腈去除率之影響	62
4-1-3 鹽類於乙腈-水系統之分配情形	66
4-1-4 乙腈-水系統之 pH 值	70
4-2 溫度對相分層的影響	73
4-3 不同初始乙腈濃度之相分層	84
4-4 蛋白質於乙腈-水系統之分配情形	89
4-5 時間對蛋白質回收之影響	92
4-6 磷酸鹽緩衝液應用於乙腈-水系統之相分層	93
第五章 結論與展望	98
5-1 結論	98



5-2 建議	100
參考文獻.....	101
附錄 實驗數據	113
簡歷.....	120



表目錄

第二章

表 2.1 細胞破碎的方法與其優缺點.....	13
表 2.2 常用沉澱蛋白質之方法.....	18
表 2.3 常見的層析純化方法.....	23

第四章

表 4.1 各種鹽類對 50%(v/v) 乙腈-水系統於 25°C 環境下產生的相分層效率.....	59
表 4.2 各種鹽類對 50%(v/v) 乙腈-水系統於 4°C 環境下產生的相分層效率.....	60
表 4.3 不同 NaCl 濃度之乙腈去除率.....	64
表 4.4 不同 K ₂ HPO ₄ 濃度之乙腈去除率.....	65
表 4.5 不同 KCl 濃度之乙腈去除率.....	65
表 4.6 不同 KH ₂ PO ₄ 濃度之乙腈去除率.....	65
表 4.7 不同 NH ₄ HCO ₃ 濃度之乙腈去除率.....	66
表 4.8 乙腈初始濃度對 60%(v/v) 乙腈-水系統於 4°C 產生相分層後，上層乙相與下層水相之電導度的影響.....	69

表 4.9 不同 ACN 初始濃度在[NaCl]=150mM 及不同溫度下 的相分層效率.....	84
表 4.10 不同 ACN 初始濃度在[K ₂ HPO ₄]=150mM 及不同溫度 下的相分層效率.....	85
表 4.11 不同 ACN 初始濃度在[NH ₄ HCO ₃]=150mM 及不同溫 度的相分層效率.....	85
表 4.12 磷酸鹽類在 50%(v/v) 乙腈-水系統中 4°C 環境下的相 分層效率.....	95

附錄

表 A.1 乙腈莫耳分率與體積比對照表.....	113
表 A.2 配置磷酸鉀緩衝液表.....	113
表 A.3 各種鹽類在 30%(v/v) 乙腈-水系統中 4°C 環境下的相 分層效率.....	114
表 A.4 各種鹽類在 40%(v/v) 乙腈-水系統中 4°C 環境下的相 分層效率.....	114
表 A.5 各種鹽類在 60%(v/v) 乙腈-水系統中 4°C 環境下的相 分層效率.....	115
表 A.6 各種鹽類在 70%(v/v) 乙腈-水系統中 4 環境下的相	

分層效率.....	115
表 A.7 K_2HPO_4 在 50%(v/v) 乙腈-水系統中於不同溫度的相	
分層效率.....	116
表 A.8 $NaCl$ 在 50%(v/v) 乙腈-水系統中於不同溫度的相	
分層效率.....	117
表 A.9 KH_2PO_4 在 50%(v/v) 乙腈-水系統中於不同溫度的相	
分層效率.....	117
表 A.10 KCl 在 50%(v/v) 乙腈-水系統中於不同溫度的相	
分層效率.....	118
表 A.11 NH_4HCO_3 在 50%(v/v) 乙腈-水系統中於不同溫度的	
相分層效率.....	118
表 A.12 磷酸鹽緩衝液(pH=7.0)在 50%(v/v) 乙腈-水系統中	
於不同溫度的相分層效率.....	119



圖目錄

第二章

圖 2-1 人體生長激素類似物分離純化流程圖32

圖 2-2 乙腈-水系統相分離的臨界溫度與乙腈莫耳分率32

第三章

圖 3.1 乙腈-水系統相分層機制建立之實驗流程43

圖 3.2 相分層效率示意圖48

圖 3.3 BSA 檢量曲線54

圖 3.4 Myoglobin 檢量曲線55

圖 3.5 Poly-(L)-Arginine 檢量曲線55

第四章

圖 4.1 各種鹽類對乙腈-水系統在 4 °C 下產生相分層的影響 ..61

圖 4.2 鹽類添加對移除上層相中乙腈之影響63

圖 4.3 K_2HPO_4 鹽類對 60%(v/v) 乙腈-水系統於 4 °C 產生相分層後，上層乙腈相與下層水相之電導度測定68

圖 4.4 乙腈初始濃度對 60%(v/v) 乙腈-水系統於 4 °C 產生相分層後，上層乙腈相與下層水相之電導度影響69

圖 4.5 60%(v/v) 乙腈-水系統經由 K_2HPO_4 誘導產生相分層 後，下層水相之 pH 值.....	71
圖 4.6 乙腈初始濃度與 60%(v/v) 乙腈-水系統之下層相 pH 值的關係.....	72
圖 4.7 溫度對誘導乙腈-水系統產生相分層之影響.....	74
圖 4.8 NaCl 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影 響.....	78
圖 4.9 K_2HPO_4 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之 影響.....	79
圖 4.10 KH_2PO_4 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層 之影響.....	80
圖 4.11 磷酸鹽緩衝液 (pH=7.0) 濃度和溫度對乙腈-水系統 產生相分層之影響.....	81
圖 4.12 KCl 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影 響.....	82
圖 4.13 NH_4HCO_3 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分 層之影響.....	83
圖 4.14 乙腈初始濃度對乙腈-水系統產生相分層之影響-1....	87



圖 4.15 乙腈初始濃度對乙腈-水系統產生相分層之影響-2....	88
圖 4.16 K_2HPO_4 鹽類對親水性蛋白質回收率之影響	90
圖 4.17 K_2HPO_4 鹽類對疏水性氨基酸於乙腈-水系統相分層 後回收率之影響.....	91
圖 4.18 時間效應對蛋白質回收比例之影響	92
圖 4.19 磷酸鹽類誘導 50%(v/v)乙腈-水系統在 4 環境下產 生相分層情形.....	96
圖 4.20 磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)對蛋白質回收率之影響.....	97



第一章 緒論

由於具有優良的選擇性和分辨率，反（逆）相高效液相色譜層析法（reversed-phase high performance liquid chromatography，以下簡稱為 RP-HPLC）目前已被廣泛地應用在蛋白質、氨基酸、peptide 和諸多生物物質的製備及大規模的分離純化過程中[Hancock, 1983; Chicz and Regnier, 1990; Mant, 1991; Vissers, 1992; Gu and Zheng, 1994]。乙腈 - 水（Acetonitrile-water，以下簡稱 ACN-Water）和甲醇 - 水（methanol-water）系統為最常用的 RP-HPLC 緩衝相[Pence and Gu, 1996]。當用乙腈作為 RP-HPLC 緩衝相之有機溶劑時，蛋白質通常會伴隨著較高的乙腈濃度(40-60%)(v/v)及 0.1% (v/v)的 Trifluoroacetic acid (TFA)而流出 RP-HPLC 色譜柱[Gu and Zheng, 1994; Gu *et al.*, 1995]。而這些有機溶劑一般可經過下游的分離步驟，如傳統的膜分離、緩衝液交換(buffer exchange)或冷凍乾燥(lyophilization)，得以去除。但是，過高的乙腈濃度和其化學毒性，常常會大大減低用於蛋白質分離之精密薄膜材料的壽命，或對緩衝液交換樹脂之不利影響，以及損壞冷凍乾燥系統。同時，根據勞工作業環境空氣中有害物容許濃度之標準，乙腈的八小時日時量平均容許濃度為 40 ppm。而且目前全球乙腈平均濃度已達相當高的水準，因此因乙腈引起的空氣污染就得到格外的重視。由於以上這些不良因素的考量，使得 RP-HPLC 在蛋白質分離純化實際之應用上受到一定的限制。

所幸1995年Gu等研究學者在為人體生長激素類似物(Human Growth Hormone Antagonist)設計大規模分離純化過程中，發現利用相分離(phase separation)之技術，即ACN-Water系統在攝氏零度以下環境(如-17)時可發生相分層現象，形成乙腈和水兩相。而進一步的分析顯示，上層相(乙腈相)中含有大約88%(v/v)的乙腈，但卻只有低於1%的人體生長激素蛋白質類似物，而下層相(水相)中含有低於35%(v/v)的乙腈，並富含99%的人體生長激素蛋白質類似物。因此此研究之實驗證明利用低溫環境下相分離的機制很容易地去除了大約80%的乙腈，同時也進一步濃縮了蛋白質溶液[Gu *et al.*, 1995]。再者，更有研究顯示在零度以下，ACN-Water系統相分離的臨界條件為溫度範圍介於-1.32°C至-18.6°C之間，及乙腈的莫耳分率須在 $0.12 < X_{ACN} < 0.78$ 的範圍裡[Pence and Gu, 1996]。

另外一方面，許多學術研究通常在零度以上的環境裡研究ACN-Water系統的液-液平衡現象。在此環境下，由於乙腈為非質子溶劑，乙腈可以以任意的比例溶於水中。有研究報告指出，利用鹽類(如NaCl)誘導(Salt-induced)的方式，亦可使ACN-Water系統在室溫下產生相分層作用效果，進而形成乙腈相與水相[Takamuku *et al.*, 2001]。鹽類誘導相分層之技術可應用於蛋白質的萃取[Le *et al.*, 2001]。然而由於利用此種在室溫下(如25°C)鹽類誘導機制，需要添加大量的鹽類，而過高的鹽濃度對蛋白質的穩定性會產生不利的影響，因此難以實際應用於大規模RP-HPLC純化後蛋白質溶液的後處理

程序。

本論文研究的目的(objectives)為解決經由 RP-HPLC 分離純化蛋白質後，所沖提出之溶液中含有大量有機溶劑之問題，且藉由有機溶劑之移除，達到進一步濃縮蛋白質之效果。期望藉由新的相分離機制除了可降低因製冷所需的能耗，以及縮短達到兩相分層所需的時間外，亦可減低蛋白質因潛在凍結與融化而喪失活性的機會。由於乙腈 (ACN) 為 RP-HPLC 緩沖相中常添加的有機溶劑。因此，ACN-Water 系統為本論文之研究對象，研究中建立了有關低溫環境下和鹽類誘導 ACN-Water 系統相分層作用情形，包括許多影響相分層效率因素之探討，如鹽的種類、鹽的添加量、乙腈的初始濃度和溫度效應等。本實驗之研究項目為：

- 1、藉由添加各種不同鹽的種類，評估各鹽類與其鹽濃度對 ACN-Water 系統相分層效率之影響。
- 2、研究初始乙腈濃度、溫度效應與時間效應對 ACN-Water 系統相分層效率之影響。
- 3、研究 ACN-Water 系統透過低溫環境和添加鹽類誘導相分層後，系統之乙腈之去除率測量。
- 4、研究 ACN-Water 系統於添加鹽類產生相分離後，系統之 pH 值與電導度之評估。
- 5、研究蛋白質與氨基酸於 ACN-Water 系統相分層後之分配效應，與蛋白質回收率分析。

本論文將分四個部份，第一部份（第二章）為文獻回顧：討論生物工程與蛋白質分離純化技術的重要性與目前蛋白質之分離純化技術相關的問題、常見蛋白質分離純化技術、RP-HPLC 的應用，以及兩種相分層機制（低溫環境機制與鹽類誘導機制）。其中蛋白質分離純化技術包括蛋白質分離純化策略、細胞破碎、固-液分離、蛋白質濃縮、液相層析法（如 RP-HPLC 的原理與應用及去除有機溶劑之探討）、蛋白質之結晶程序、蛋白質純化步驟之整合等。第二部份（第三章）闡述了本研究之實驗目的、步驟及分析方法，包括 ACN-Water 溶液的物理化學性質：電導度和 pH 值、相分層效率的分析、蛋白質分析測定及有機溶劑去除率的分析。第三部份（第四章）為實驗結果與討論：包括不同鹽類及其濃度對 ACN-Water 系統在零度環境以上相分層作用的影響、系統之電導度和 pH 值分析、鹽類誘導相分層後的乙腈去除率、溫度對相分層的影響、不同初始乙腈濃度之相分層、蛋白質添加之分配效應與時間效應對相分層的影響。本論文則於第四部份（第五章）結束，其包含了一些對整個進階之相分層機制扼要性的總結及其討論，並對於未來從事研究此主題的相關分離機制之建議及未來展望。

第二章 文獻回顧

本章節涵蓋了有關於蛋白質分離純化技術的基本介紹與近況，以及相分層機制於蛋白質純化上的應用。其中包括生技產程的技術與產品的近況及展望、蛋白質分離純化技術、RP-HPLC 之原理與應用，及 ACN-Water 系統相分層的機制與應用。

2-1 生化工程與蛋白質分離純化技術的重要性

生物科技(Biotechnology)乃是一項融合生物科學與工程，利用生物或其衍生物製造產品，以直接或間接貢獻人類、造福人群的科技，其所帶動的工業將成為廿一世紀最重要的明星工業之一，已是眾所皆知的事實。而生化工程(Biochemical Engineering)更是生物科技中重要的領域之一，其目的是負責開發製程，將生物科學領域中所新發現的技術，實際的變為有經濟效應的結果。而在現今經濟非常競爭的情勢下，如何快速的將產品商業化，是決定生物科技產業成敗的一項重大因素。由此可知生化工程對整個生物科技發展的重要性。

生化工程之應用非常廣泛，不僅包括目前最受注目且發展迅速的生物醫藥工業，亦涵蓋現今以數億美元計算的發酵工業，以及應用於環境工程的產品生產。而依生化工程所開發的技術與產品，可分為三大類：(一) 生物藥劑：其中包括藥用蛋白質、藥用多醣類、疫苗及試劑。(二) 特殊工業化學品：包括抗生素、高附加價值食品、農產

品與燃料等。(三) 與環境有關的產品：其應用包括污染控制、生物殺蟲劑與冶金煉油等。其中對於現今生物藥劑產品的發展而言，由於基因工程、遺傳工程、細胞融合、分子模擬、蛋白質工程、生化工程系統、peptide 與 DNA 合成之能力等關鍵技術的建立及整合，近幾十年來，以蛋白質分子作為生技醫藥產品的項目逐年在增加。其技術乃利用基因重組技術，利用細菌、植物、昆蟲及哺乳動物細胞為宿主細胞，以表現基因生產藥用蛋白質，在學術上均有很廣泛且成功的研究。其中在美國已上市之生技醫藥產品開發及製造的公司，最早上市成功具備跨世代意義的產品，為 1982 年以基因工程方式製造出來的胰島素分子(r-insulin)，及 1986 年 Merck & Co. Inc. 所生產的酵母菌 B 型肝炎疫苗。其後隨著在動物細胞培養技術的發展，一些微生物無法表現的蛋白質醫藥產品，也成功地以動物細胞體外培養來生產上市，如 Amgen Inc. 之 Epoprostenol (Iloprost) 及 Neupogen. G-CSF Genetech Inc. 之 Activase.(tissue plasminogen activator) 等。其它更有上百種以蛋白質分子作為生技醫藥之產品，正在臨床試驗中，預計將有一連串的新藥獲准上市，前景非常看好。另外，蛋白質分子在目前製藥工業上，亦有慢慢取代傳統化學分子的趨勢，使得蛋白質之生物化學相關產品的大量製造、開發與純化，將在生物製藥工業中扮演其重要的角色。

隨著藥用蛋白質經各項技術成功製造後，分離與純化成為最終產品，是生化工程的一項重要工作。其中，以生產蛋白質為目的之生化製程有以下一些有別於傳統化工製程之特殊要求，使得蛋白質不易獲

得，純化過程困難，造成蛋白質在應用回收上相當不易，如（一）反應中之條件要求高：由於生化反應黏度較高，微生物細胞脆弱，易被強的剪切力破壞、反應中需要高氧氣之傳送，故對反應器之設計要求高。（二）高變異性的生化反應：由於生化物質均在非穩定狀態下進行反應，加上本身變異性高，因此對反應之模擬控制較為困難。（三）生化廠設計有別於一般化學工廠：由於要求無菌以避免污染，所以在殺菌系統、空氣過濾系統、去離子水處理系統、無菌室之設計等，在性質與設備要求上均有其特殊處，且在工廠法規限制上一般均比化學工廠之要求嚴苛許多。（四）蛋白質分離純化技術要求高：由於在醫藥用產品純度之要求嚴苛，分離技術需較多花費且困難[Walsh, 2002]。

另外，蛋白質之生化物質亦具有一些與傳統化學物質不同的特性，包括（一）純度要求較高：生化產品絕大多數均為醫藥或食品用，所以其純度之要求較高，不然一有些疏忽，即會對生命產生重大影響。（二）穩定性較差：蛋白質之穩定性較差等不利因素，均使蛋白質的分離過程比一般生化學品較為困難。再者，雖然一般生化產品包括蛋白質，可藉由微生物或動、植物等生物體發酵或酵素反應生產製造，但由於酵素之高價，觸媒均需回收再使用，因此其反應液均須十分乾淨，而且還需顧慮蛋白質的穩定性、回收純化之處理方式，因酵素反應而有高度的選擇性。然而，由生物體產生之情況則顯得複雜許多，需要考慮到以下的特性，以避免後續之純化操作有嚴重之影響。如（一）蛋白質之產物回收濃度低。（二）生物體生產之蛋白質產品

中，不純物之種類和數量較多，且其與產物構造類似，使分離程序之選擇有其困難存在。(三) 生物體之固體壓縮性與變異性大等。

蛋白質之回收純化，有如大海撈針，困難不可言喻。因此純化是產程中最主要，且最昂貴的一項步驟。純化過程的主要目的是去除宿主細胞體內的一些雜質（包括其他雜蛋白質、DNA、醣類等）；去除蛋白質的變質物或衍生物；去除或防止內毒素(endotoxin)的滲入；使過濾性毒菌失去活性；避免過程中引起可能蛋白質化學上的變異。最後如何使蛋白質產品穩定且容易使用，亦是生化工程非常重要的一環，也是過去常被忽略的一點。過去基因重組的產品均採用冷凍乾燥法製成粉狀，其雖穩定，但不方便製配，其需要非常嚴謹的控制、冷凍、乾燥、加蓋等，設備頗為複雜困難。近年來已逐漸採用液狀生產，但為求穩定，其藥劑及選用配方則困難許多且產品的純度要提高很多，防止可能分解的雜質存在。故蛋白質分離製程，將要是一可靠、一貫又有經濟效應的純化方法。整個生產系統始自基因重組發酵至回收，純化是一個整體，每一階段均要相互考慮，才能使產品達到理想的品質，整個生產成本達到最經濟的程度。

因此，儘管近年來在生物技術領域上的進步，大多以分子生物學之基因工程和生化反應器居多，而佔生技產品整體成本之一大部分的下游生化工程則常常被忽略。然而在日新月異的生物科技領域中，生化科技的發展卻不能沒有分離純化技術的貢獻與支持[Ersson *et al.*,

1989]。有效的分離與純化技術在大規模蛋白質的製程發展上中往往是扮演著重要的角色。

2-2 常見蛋白質分離純化技術

在目前工業大規模蛋白質分離純化的實際應用上，若欲將目標蛋白質從血液、天然動、植物之萃取液或培養發酵液中萃取出，而成為特定功能用途的單一物質，需經過一連串複雜的純化、分離、回收、品質分析等程序才能達成。正因其步驟複雜，故蛋白質純化之製程所需花費，往往佔整個成本的 50-70% 以上。因此蛋白質的分離純化設計，和操作處理是否得當，是非常重要的[Keller *et al.*, 2001]。蛋白質分離純化步驟，包括細胞破碎、菌體去除、初步純化、高解析層析分離、冷凍乾燥等一系列之特定蛋白質純化過程。其最主要的目的就是要去除雜質、濃縮純化蛋白質，使其成為一穩定且可立即使用之形式。而為了達到此目的，需依據蛋白質分離純化策略，設計一系列最適當的分離純化方法。

2-2-1 蛋白質分離純化策略

首先，是所欲分離蛋白質源於何處，其次是對蛋白質本身和雜質之物理化學特性，如分子量、溶解度、等電點、親水性和酸鹼值等有一些基本特性的認識與瞭解。最後，根據此純化之蛋白質的應用，設計最適當的分離純化方法。

因為在蛋白質分離純化時會牽涉到上千種或更多的蛋白質之來源，因此若欲分離出其中一特定目標的蛋白質，必須根據蛋白質不同之特性，作為區別各個蛋白質的基準。蛋白質是由 20 種不同氨基酸，經由 peptide 連接而成的有機大分子，不同的蛋白質就有不同的氨基酸序列。有些蛋白質除了氨基酸的組成外，還結合了一些其他有機或無機成分，例如脂蛋白(lipoprotein)、醣蛋白(glycoprotein)，有時某些氨基酸支鏈上又結合了不同的輔基(prosthetic group)，使得每一蛋白質皆具不同的特性，例如帶脂肪族和芳香族支鏈的氨基酸可能會使蛋白質較具疏水性；若帶鹼性的氨基酸，則其易帶正電荷；反之若帶酸性支鏈多者，則易帶負電荷。另外若帶有很多含硫成分或氫氧支鏈的蛋白質，則易形成分子間的鍵結。而這些蛋白質之不同特性，包括溶解度、電荷、疏水性、親水性、分子間鍵結、分子量、密度等，亦是蛋白質分離純化的基本準則和依據[Shuler *et al.*, 1992]。

另外，蛋白質之變性(denaturation)和穩定性(stability)亦是分離純化過程中需要考慮的因素。蛋白質之變性作用會導致其活性降低，即所謂之失活現象(inactivation)。蛋白質溶液激烈地攪拌、振盪則會造成蛋白質變性，此乃由於表面張力所引起的現象。一般而言，蛋白質具有表面活性，在表面上盡量擴張其表面積而使得水的表面張力降低。而激烈地攪拌蛋白質溶液，易產生泡沫而使其活性降低。而蛋白質的穩定性(stability)隨著種類之不同有很大的差異，大體上，分泌於細胞外之蛋白質穩定性較高，細胞內蛋白質穩定性較易失活。而失活又可

分成因蛋白質變性引起者，與活性部位之變化而導致者兩類。變性大抵是由於物理的環境之改變，如熱、壓力、音波、振動、紫外線、凍結等；或由於化學藥劑的添加所引起的，如酸、酒精、尿素、表面活性劑、重金屬鹽、氧化劑等。再者，蛋白質之最適酸鹼值(optimal pH)和最適溫度(optimal temperature)亦影響蛋白質之穩定性。

蛋白質之最適酸鹼值，乃由於其構成部分之氨基酸含有羧基團(carboxyl group)及胺基團(amino group)，使得蛋白質分子的離子化狀態因 pH 而變。適度的 pH 變化會影響蛋白質分子的離子化狀態，而表現出最大之活性。蛋白質反應常在其最適 pH 的緩衝液(buffer solution)中進行。而蛋白質之等電點性質(isoelectric point)亦會影響其在溶液中的 pH 值。蛋白質之 pI 值即代表其陰陽電荷相等而成電荷中性，置於電場中不產生泳動之 pH 值。另外，蛋白質之最適溫度為蛋白質最大反應速率之溫度。超過此溫度，則反應速率將由於蛋白質之熱變性而急速降低。多數蛋白質的最適溫度都和生化合成此蛋白質之生物體內環境溫度相近。

目前較常使用的蛋白質分離純化技術，有透析(dialysis)、超過濾(ultrafiltration)、離心法(centrifugation)、沉澱法(precipitation)、電泳(electrophoresis)和液相層析(chromatography)。上述這些方法中除了液相層析法具有高分離倍數之外，其他的分離方法因前處理步驟繁雜，往往在處理時會造成蛋白質樣品的損失。

2-2-2 細胞破碎

因為許多的蛋白質是存在微生物細胞或動植物細胞之宿主細胞內，必須經由打破的程序才能取得細胞內的物質，此純化步驟即為細胞破碎。由於不同微生物其細胞壁組成不同、大小有所不同，因此選擇打破方法及條件亦不相同，但最重要的原則是釋放出最大量的欲純化物質，但仍保有蛋白質原有的活性。表 2-1 列出各種破碎細胞的優缺點。一般打破細胞的方法可分為物理方式和化學方式兩大類。物理方式中可採用剪應力、高壓衝擊或超音波等形式[Schutle and Kula, 1990; Garcia, 1993]。而化學方式則可調整酸鹼值、溫度或壓力、添加有機溶劑、特殊酵素等形式[Engler, 1990]。一般而言，在大規模蛋白質純化製程中，化學方式進行細胞破碎較具特异性，但在大量操作時需考慮成本的問題。故目前細胞破碎仍以高壓均質機和球磨破碎機較為可行。但在此法進行中目標蛋白質產品會因細胞破碎後，所有胞內物質會釋出，而此物質會與一些蛋白分解酵素(Protease)接觸，造成對蛋白質不利之影響，故需將 protease 變性、添加抑制劑及低溫操作等。

表 2.1 細胞破碎的方法與其優缺點[Garcia *et al.*, 1999; Walsh, 2002]

	原理	分離機制	應用	優點	缺點
物理方法	剪力破碎	球磨破碎機、旋轉均質機	酵母菌	破碎速率佳、冷凍效果好	操作時間長
	高壓衝擊	高壓均質機	<i>E.coli</i>	放大容易、破碎速率佳、操作滯留時間短	熱轉換不易
	超音波	震盪	<i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i>	機器精密	不利於大量操作、熱轉換不易
化學方法	溫度	高低溫凍/解凍	冷動物細胞	操作簡單、經濟便宜	蛋白質易失活
	特殊酵素	水解酶、溶菌酶	細菌	專一性強	大量操作成本高
	滲透壓	滲透衝擊	血球		
	化學物質	調節溶液酸鹼值、有機溶劑	細菌、酵母菌	專一性強	蛋白質易失活、加入有機溶劑具毒性需額外移除

2-2-3 固-液分離

若蛋白質分泌於細胞體外者，則純化時需進行固液菌體分離與回收之步驟，得以濃縮蛋白質及便於往後分離步驟之進行。一般固液分離與回收方法有離心(centrifugation)和薄膜過濾(membrane filtration)，分別根據蛋白質之密度與大小作為分離的機制，最主要目的是期望收集欲純化的特定蛋白質，使其集中於某一相，而將發酵液中許多雜蛋白質和不溶的雜質移除，使蛋白質溶液更澄清以利於後階段的處理。一般而言，離心為一溫和，不影響蛋白質活性與回收率的技術。在一定的離心力下，不同大小的物質因其沉降係數不一樣，而達到分離的效果。然而，從破碎液中去除細胞碎片可以說是回收蛋白質產品中相當難處理的一環；原因乃是細胞碎片非常小(0.1-0.5 μ m)，離心要很高的轉速和很長的時間才能有效去除，以大型工業離心機而言，並不易滿足去除的效果及上清液澄清度的要求。

另外，薄膜過濾是另一種傳統的固-液分離技術，屬於可供大容量(high capacity)、低分辨力(low resolution)、成本低(low cost)的分離方法。其分離的機制是依據蛋白質分子量與薄膜孔徑大小的差別。大於孔徑的物質仍留在薄膜上成為濃縮液(retentate)，小於孔徑的物質則穿過濾膜成為濾液(filtrate)。因此經由不同濾膜的選擇，人們可以在filtrate 或 retentate 部分得到人們想要的物質。膜分離應用於醫藥與生物物質之純化製程上的重要性，近年內已得到廣泛的運用且被重視

[Michaels, 1983]。包括蛋白質與酵素的濃縮[Blatt *et al.*, 1965; Wang *et al.*, 1970; Porter, 1972; Michaels, 1983]，以及收集實驗級或工業級大規模發酵液的生化產品[Blijham and Vaneerde, 1985; Ricketts *et al.*, 1985]。微過濾(microfiltration)可應用於懸浮粒子的去除，發酵液中細胞與蛋白質的回收、清洗[Singhvi and Schorr, 1996]；超過濾(ultrafiltration)可應用於濃縮分離不同分子大小的物質及緩衝液之交換；直交流式過濾(crossflow ultrafiltration)法可應用於酵素、牛痘疫苗、發酵液的純化和收集單株抗體與原生質(Plasma fractionation)[Kroner *et al.*, 1984]。

膜分離的優點有（一）濾膜的材質多樣。（二）可密閉式、自動化連續之操作和放大容易。（三）相對於傳統分離技術，膜分離可提供分子量範圍從 500 到 1,000,000 daltons 的生化物質（蛋白質），是一個簡便且耗費低的純化製程。（四）分離過程中無相變化(phase change)、無化學物質添加(chemical addition)與無熱量(thermal stress)[Bruin *et al.*, 1980; Cheryan, 1986]的產生。所以，膜分離為蛋白質常見的純化步驟但是膜分離的缺點有（一）在分離純化之程度上，相對於液相層析法(liquid chromatography)而言，膜分離明顯地低許多，其原因為膜分離法只能分離出兩種不同種(fractions)的溶液，即大分子量的濃縮液(retentate)和小分子量的濾液(filtrate)，不可再進一步地精製純化。因此，蛋白質分離製程中若只有單一的超過濾步驟，不容易有較高的蛋白質分辨力。再者，（二）由於操作液體中之某些成

份，使得膜垢逐漸累積，最後造成 concentration polarization 現象和濾膜剝落的結果[Maa and Hsu, 1996]，縱使此問題用 crossflow ultrafiltration 法可被稍微的控制，但在許多情況中，膜分離隨著時間遞增其滲透作用遞減，對 concentration polarization 之問題仍未解決，因此欲使膜分離的效率提高，如何減低 concentration polarization 是個關鍵[Gill *et al.*, 1988]。(三) 在處理大腸桿菌時，原宿主細胞尚有會自行死亡溶解(lysis)的情形，會對膜過濾操作之效果及濾膜造成不利，有膜結垢的潛在危險。尤其是 secondary membrane 在膜面形成時，欲分離之產品常會喪失通過率；因此膜分離中往往需要利用多次排出濃縮液，才得以確保良好的產品回收率。

2-2-4 蛋白質濃縮(Protein Concentration)

在經過了細胞破碎及固液分離後，一般欲純化物質所在的環境體積仍相當龐大，且蛋白質濃度亦不高；因此在進入正式純化步驟前，常會利用一個或兩個初步純化步驟，希望能迅速地將操作體積降低、去除最主要的雜質和提高蛋白質濃度，以利後續之純化。蛋白質初步純化的方法有沈澱法 (precipitation)、萃取 (extraction)、吸附 (adsorption)、蒸發 (evaporation) 等。通常影響初步純化步驟成效的因素為雜質的種類，不宜從蛋白質產品的物理化學性質來思考。由於整個細胞內容物種類非常多，到底何種不純物主導分離行為並未明確，造成純化困難。但綜合來說，蛋白質濃度高者以沈澱為主，萃取為輔。

濃度低者以吸附為佳；濃度高低亦可透過超過濾來調整。

2-2-4-1 沉澱法(Precipitation)

沉澱是一種利用添加沉澱劑或改變溫度、pH 值，使得溶液中蛋白質或不純物溶解度降低，形成固相而達成分離效果的方法。其分離乃根據蛋白質在溶液中有不同溶解度作為分離之機制，在分離純化上屬於可供高容量、低分辨力及低成本的方法。表 2-2 列出一些常用的沉澱方法，包括添加無機鹽類(鹽析)、有機溶劑、非離子高分子(nonionic polymer)、金屬離子、親合性物質或調整蛋白質溶液中之溫度或 PH 值等。選擇適當的物質濃度及沉澱劑濃度，在某一溫度及 pH 操作條件下，達到從混合溶液中沉澱蛋白質之作用，使沉澱得以產生。

其中，添加鹽類的沉澱方法為 Hofmeister [1887, 1890] 所提出來，乃藉由添加中性鹽類（如最常見的碳酸銨鹽, NH_4HCO_3 ）的方式。改變離子濃度，使蛋白質沉澱的方法，亦稱鹽析作用(salt-out)。其中最常見的鹽類為碳酸銨鹽，其為一種便宜、極溶於水、對蛋白質較無傷害之鹽類（例如可防止蛋白質水解作用(proteolysis)與細菌(bacterial)的作用）[Scopes, 1982]。添加鹽類的沉澱法通常可廣泛地應用在實驗級或是工業型初期分離純化中，使蛋白質達到濃縮的目的[Bentley *et al.*, 1973]。且約有超過 80% 的蛋白質分離程序中均牽涉至少一個鹽析作用(Salting-out process)[Englard and Seifter, 1990]。

表 2.2 常用沉澱蛋白質之方法[Garcia *et al.*, 1999]

沉澱方法	分離機制	實例
添加鹽類	鹽析(salt-out)	NH ₄ HCO ₃ 、KCl
pH	蛋白質等電點時電荷降低	酸性溶液
溫度	失活凝聚	加熱
極性溶劑	Salt-in	water
有機溶劑	降低水之活性	ethanol
親合性配位體	親合作用	ligand、inhibitor
多價金屬離子	官能基結合	Mg ²⁺ 、Ca ²⁺
離子性聚合物	電荷靜電力	PEI(polyethylene imine)
非離子性聚合物	Salt-out	PEG(polyethylene glycol)

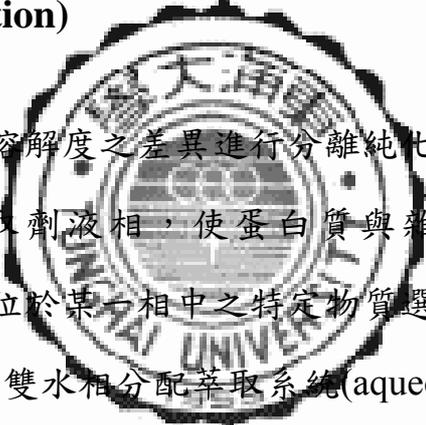
再者，在沉澱法中藉由添加溶於水的有機溶劑(如乙醇、丙酮)，使水活性降低，亦可使蛋白質發生沉澱。此法在早期即應用於蛋白質的純化分離上[Scopes, 1982]，如工業級分離 blood-plasma protein fractions 的純化製程上[Watt, 1970]；而缺點則為對於醫藥用的蛋白質

產品有安全性的顧慮，有機溶劑對蛋白質會有變性之可能性，因此對不管是在實驗級或工業級的蛋白質純化過程，利用添加有機溶劑造成蛋白質沉澱，相對於添加硫酸銨鹽之沉澱法，則顯得非必要性。另外，沉澱法中以調整溫度或 pH 值的方式，僅只能提供小規模的蛋白質分離，且在調整溶液溫度或 pH 值時，溶液會有 protease 變性的作用，使蛋白質之活性喪失。故此形式的沉澱方法通常只作為提高經鹽類、有機溶劑與聚合物高分子等沉澱法分離後的沉澱效率。基本上，分離效果會隨著改變溶液 pH 值而改變，通常減少溶液離子強度或增加其溫度，會有較佳的沉澱效果。

沉澱法雖然古老但實用，因此在應用上經常被利用於從混合溶液中濃縮不同蛋白質的分離純化[Bjurstrom, 1985]；亦經常作為基因重組細胞培養之蛋白質分離程序中的初始階段[Scopes, 1982; Bailey and Ollis, 1986; Nakayama *et al.*, 1987; Michaels, 1990]；有時沉澱法亦應用於固態培養之產物，在進行冷凍乾燥前形成最終產物的一步驟[Bell *et al.*, 1983]。沉澱通常用於減少製程的體積，然後濃縮蛋白質，但是通常會導致形成非結晶狀態的沉澱[Iyer and Przybycien, 1994]。而對於相對溶解度區別大之蛋白質者，沉澱法亦可以達到分離的目的[Fisher *et al.*, 1986; Niktari *et al.*, 1990; Rothstein, 1991]。而在沉澱法中，也可應用高選擇性的親合沉澱法於蛋白質純化上[Schneider, 1981; Senstad and Mattiasson, 1989; Moris, 1993]。

沉澱法的主要優點有（一）操作簡單，成本低廉，並有濃縮的效果；（二）可適當選擇的操作條件與沉澱劑種類，使其對蛋白質不會造成變性與影響其生物活性；（三）一般蛋白質以沉澱之形式比溶液更為穩定。但缺點則包括（一）相對於高純化倍數的管柱液相層析法，僅提供較小純化程度[Scott, 1991; Thomson, 1984]，沉澱法不能在一步中達到非常高的純化倍數；（二）添加沉澱劑後需額外的後處理步驟，造成成本增加，且蛋白質亦有可能會有變性失活的問題。

2-2-4-2 萃取(Extraction)



另一種以蛋白質溶解度之差異進行分離純化的方法是萃取。萃取乃藉由引入另一萃取劑液相，使蛋白質與雜質在兩相中之分配(partition)不同，而將位於某一相中之特定物質選擇性地置換出來，達到萃取的目的。通常，雙水相分配萃取系統(aqueous two phase partition extraction)中含有兩種介面，包含密度較小的上層相，含疏水性較高之聚合物（如 PEG）；及密度較大的下層相，含親水性好的鹽。而蛋白質在兩相中的分配會隨著物質本身的特性及雙水相萃取劑的特性而有所不同；一般而言，離子性大的蛋白質會出現在下層鹽相，而疏水性較大的蛋白質則在上層聚合物相。常見的雙水相分配萃取系統有：PEG/dextran(10%/15%)、PEG/phosphate(15%/15%)等組合。

雙水相分配萃取系統的優點有（一）可以濃縮和作初步純化之

用，亦可作細胞破碎片之去除，使其顆粒控制在介面或某一相(通常是下層)[Alvertsson, 1986]；(二) 疏水性 PEG 高分子在溶液中沉澱蛋白質時，並不造成蛋白質變性，或與蛋白質產生相互的作用，其溶解度不易受溫度影響，可於低溫環境下操作；(三) 常應用於實驗級或大規模級之分離純化上[Foster *et al.*, 1973]，只需低濃度的疏水性 PEG 高分子即可沉澱大部分的蛋白質[Ingham, 1984]。但是，若欲純化之蛋白質存在於上層聚合物相，雙水相萃取系統卻有一缺點，即無法完全地去除 PEG 高分子。因為蛋白質經過重溶後會與 PEG 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 共溶於溶液中，而進入高純化步驟前一般會以超過濾膜來濃縮產品及去除不必要的成分。但 PEG 的去除並不如想像中容易；而且 Secondary membrane 的形成會造成 PEG 分子的殘留導致局部沉澱。因此要小心地控制 Secondary membrane；另外重溶時，並非所有沉澱物會可逆式的再溶解，因此會造成一些很微細不溶性顆粒，使後續分離相當困難。

2-2-5 液相層析法(Liquid Chromatography)

初步純化步驟後，含量最多的雜質大都被去除，此時分離需要更高選擇性及高解析度的純化方法，使蛋白質達到高純度的品質。一般認為液相層析是最常見、最早被發展並廣泛應用的層析技術。相對於先前的沉澱法與膜過濾，其屬於可供低容量、高分辨力、高解析度及低成本的方法。高效能液相層析法其主要分析原理為利用分析物的各個

成分藉由一靜止相的凝膠及一流動相的緩衝液搭配，使產物及不純物能因相互作用之差異，而達到分離純化效果的方法。此方法的靈敏度極高，對於準確地定量，分離熱揮發性或熱不安定性的物質有相當的適用性。液相層析法的種類有分子篩排斥(size exclusion chromatography)、離子交換層析(ion exchange chromatography)、疏水性作用層析(hydrophobic interaction chromatography)、親和性層析(affinity chromatography)、金屬螯合作用層析(metal chelate interaction chromatography)、等電點聚焦(chromatofocusing)及反(逆)相高效液相色譜層析法(reversed-phase HPLC)等[Bidlingmeyer, 1980; Lewis *et al.*, 1989]，分別以蛋白質的分子量大小、電價、疏水性、特殊之親和性(如抗體-抗原及酵素-基質)等特性之不同，進行分段純化(Fractionation)。表 2-3 列出較常見的液相層析法。

液相層析法中，不同種類的凝膠，在不同材質上有其不同的官能基，其官能基可與蛋白質間經由氫鍵、離子鍵、凡得爾瓦力、疏水作用等產生相互作用，而這些作用可以藉著特定的流動緩衝液相之變化而改變。改變的參數包括 pH 值、鹽濃度、表面活性劑、還原劑、金屬離子和螯合劑等。最佳緩衝液的選擇是以在純化物最穩定的狀態下，能將其和不純物或凝膠分離的組合。而進入此層析純化步驟前，

蛋白質產品之純度已達到一定的程度，應就蛋白質的特性來設計本層析之純化方式。

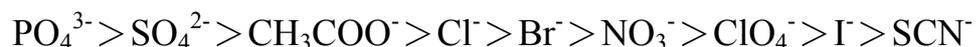
表 2.3 常見的層析純化方法[Janson and Ryden, 1997; Garcia *et al.*, 1999; Walsh, 2002]

層析種類	分離機制	操作參數	處理量 (capacity)	功能	在回收蛋白質常見的位置
離子交換 (ion exchange)	蛋白質離子 電荷差異	pH 值，離子 強度	非常高	降低體積、去除特別雜質、細微純化、	起始位置
疏水作用 (hydrophobic interaction)	分子表面的 疏水作用不 同	極性，離子 強度	高	去除關鍵雜質、細微純化	起始位置
分子篩排斥 (size exclusion) 或凝膠過濾 (gel filtration)	分子量、粒 徑大小	管柱長度 進樣體積	低、中	緩衝液轉換，最後純化	最後步驟
等電點聚集 (chromatofocusing)	等電點	pH 值	非常高	細微純化	
親和層析 (affinity)	特殊之親和 性，如抗體- 抗體及酵素- 基質	配位體，解 析液		去除特別雜質，細微與最後純化	
逆相層析 (RP-HPLC)	極性	疏水性作用	中	最後純化	最後步驟

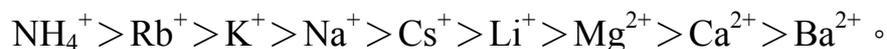
在液相層析法中，離子交換管柱層析(ion exchange chromatography)為常用於純化的起始步驟，其可處理大量的蛋白質，快速降低體積，去除主要關鍵雜質，並可視蛋白質溶液之等電點及 pH 之不同，來採用陰離子或陽離子交換樹脂管柱層析。

另外，疏水性層析(hydrophobic interaction chromatography)的分離方法乃依其蛋白質之疏水性作用力 (hydrophobic interaction)不同而進行分離純化。由於非極性物質與極性環境之間的排斥作用不同，非極性物質存於極性環境中會自然形成聚集(aggregation)的現象。一般添加鹽類於某蛋白質溶液後，使鹽離子強度增加後可使疏水性作用提升。其處理方式是在高鹽濃度下進行吸附；而在低鹽濃度下進行脫附。其中不同離子種類會影響蛋白質不同之沉澱效應，此為 Hofmeister series：

陰離子對疏水性作用力的大小順序是：



陽離子對疏水性作用力的大小順序是：



基本上，一價陽離子(Monovalent cations)較二價陽離子對於促進蛋白質沉澱更有效率；而疏水性作用管柱層析，則可用於當蛋白質溶液與主要不純物之離子或電價相似之純化時，不過採取疏水性層析時

移動相緩衝溶液的載入及沖提條件要盡量溫和，否則常會有造成蛋白質活性喪失的狀況。

再者，分子篩排斥層析(size exclusion chromatography, SEC)是一種能將蛋白質依其分子大小分離的方法，分子大的首先被沖提出來，而分子較小的則較慢被沖提出來，因而達成分離的效果。SEC 的優點有（一）因蛋白質較不易吸附於管柱上，分離時可免於蛋白質的漏失，故為一種較溫和的層析分離方法；（二）沒有管柱之 inactivation 的問題；（三）放大容易且可預測分離時間，亦可由滯留時間推知樣品中蛋白質之大小或結構；（四）不需梯度沖提。但 SEC 的缺點卻有（一）操作時間要足夠長才會有好的解析度；（二）為避免不當的吸附，需找到適當的移動相緩衝溶液；（三）若樣本成分大小相近或同為異構物，則此蛋白質混合物不適合用 SEC 作分離純化。從層析分離的功能上，SEC 雖為測定蛋白質分佈的一種良好技術，但由於其解析能力較差，沖提所得的部份可能存在許多雜質，因此此技術一般只能作為分離蛋白質混合物多重步驟的初始階段[Mant and Hodges, 1986]。

另外，對於反相高效液相色譜層析法(RP-HPLC)而言，此技術對於蛋白質與 peptides 的分離，相對於 SEC，卻可顯示出快速、高解析度及高回收率的能力。因此 RP-HPLC 常被選用為蛋白質或 peptides 和諸多生物物質的分離或純化步驟中的最後階段，[Regnier and Gooding, 1980; Hancock, 1983; Fallon, 1987; Chicz and Regnier, 1990;

Gu and Zheng, 1994]。RP-HPLC 的理論及實際應用會於本章第三節再加以敘述說明。

一般的蛋白質純化過程中常會選擇一種以上的層析方法使用，如親和性管柱層析後，再接上分子篩排斥層析。而為了有效分離蛋白質與節省操作時間和成本，人們常會考慮較合邏輯的連接順序，將各種不同功能與特性的層析技術予以結合，分離步驟常常甚至要 3~4 個，才達到足夠的純度。例如利用硫酸銨沉澱的蛋白質重溶物，可直接接上疏水性作用層析，再接上離子交換層析，如此則不必做緩衝液更換；另外離子交換層析之後接親和性層析或反相高效液相層析，如此則可減少凝膠的消耗。再者，以蛋白質的分離而言，一種常見及可行的方法是，首先利用適合分離蛋白質大範圍之分子量的 SEC，將蛋白質分離，然後收集某一特定分子量區域的溶液，再將其導入第二種層析方法，如針對小範圍分子量和有極高解析力的 RP-HPLC 予以分離。由於樣本中兩種蛋白質同時擁有相同的分子量與疏水性之可能性很小，因此藉由類似此結合兩種或以上之液相層析方法，相對於先前所提的任何一種單一技術，可得到較好的蛋白質分離效果[Gregory and James, 1997]，其中 RP-HPLC 亦常是分離純化過程中的核心步驟。

2-2-6 蛋白質之精製程序(Polishing Process)

蛋白質溶液在經過一系列的純化步驟後，最後由高解析純化之管

柱層析分離(如 RP-HPLC)沖提後的溶液，其濃度通常為稀釋的狀態，且含有大量的有機溶劑(如乙腈)和較低的 pH 值，此狀態的蛋白質純化產物，不利於長久保存或運送，因此蛋白質之精製程序是在純化過程中是必要的，特別是對醫藥用途的蛋白質產物更是常見，如去除 Pyrogen。一般而言，常見的蛋白質精製步驟有緩衝液交換(buffer exchange)、蛋白質濃縮法(Protein concentration)、噴霧乾燥(drying)和冷凍乾燥(lyophilization)等。

緩衝液交換(buffer exchange)經常可透過幾種蛋白質濃縮的方式達成，如 dialysis、分子篩排斥層析(SFC)和超過濾(ultrafiltration)等。相較之下，超過濾是常見快速和簡單的方法，其可改變蛋白質樣品之緩衝組成，使溶液 pH 值由較低的狀態調整到中性。但超過濾法中如先前提到的，有使用上的缺點，使其在大規模蛋白質純化上受到限制。

再者，冷凍乾燥法(lyophilization)乃是利用蛋白質溶液中的水或有機溶劑，在低溫低壓下會由固態直接昇華成氣態現象，將有機溶劑經冷凍後，降低壓力，使冰晶昇華成氣體分子而達到乾燥狀態的一種使蛋白質結晶，並去除水份或有機溶劑的方法[Pikal, 1990a&b]。水溶液是許多藥物製劑常用的劑型，其優點是成本低，易於包裝且便於使用。但對蛋白質大分子物質而言，水溶液劑型通常是不安定的[Randolph, 1997]，因為在液態溶液中大分子容易發生聚集(aggregation)及碰撞(collision)，且水分子會參與許多化學分解反應(chemical

degradation)，使得蛋白質失去活性[Middaugh *et al.*, 1998]。

冷凍乾燥之優點為對生化物質之還原性良好，乃因其屬於低溫乾燥並無熱變化過程，所以對蛋白質幾乎不會引起任何化學的變化。其顯著的因素是當昇華作用產生時，被冷凍的蛋白質於結構上可產生固定的完整性，如此可避免一些脆弱之蛋白質在乾燥後造成瓦解崩潰。若水份稍後再加入時，極易與水復原，其浸潤水後的蛋白質仍可維持大部分原來的結構型態，因此還原性良好，且其乾燥後呈現收縮狀態並且其不溶物不會凝集於蛋白質表面，很適合成為熱敏感的蛋白質之乾燥處理方式。但是，冷凍乾燥之缺點有（一）乾燥速率很慢：為了將真空冷凍中的蛋白質之水分昇華成氣態再將之移除，需真空幫浦或水蒸氣噴去水器才得以去除；（二）在冷凍乾燥過程中，須加冷凍乾燥保護劑，防止因低溫乾燥對蛋白質產生破壞[Arakawa *et al.*, 1993]，故增加其純化成本；（三）能源消耗過大，對於現今大力提倡節約能源之工業策略下，為不利的因素。

基本上，蛋白質大分子之精製步驟為一困難過程。經超高速離心或管柱層析純化沖提後之稀釋液還要以超過濾濃縮，以濃縮及濾析，去除有機溶劑，再以適當之緩衝液以無菌過濾得最終蛋白質產品。或因對長期儲存溫度較為敏感，故再經冷凍乾燥或噴霧乾燥的步驟，製成為固體粉末的形式以利於長久保存或運送。

2-2-7 蛋白質純化步驟之整合

在整個大規模分離純化蛋白質之製程中，包括細胞破碎、固液分離、初步純化、高解析度的純化及最後的冷凍乾燥保存其產物。其整個分離製程均需要考慮三項重要的目標(Objectives)，即為蛋白質之最大產率(Maximum yield)、最大酵素或蛋白質活性(Maximum catalytic activities)與一致性(identity)、最大純度(Maximum purity)[Anicetti and Hancock, 1994]。而在針對不同蛋白質的大規模分離純化步驟、製程和方法上，則有不同的設計空間，與研究探討的必要性。當人們對於欲純化蛋白質的物化性及最終的產品規格有所了解後，根據這些資訊，即可明確地設計選擇最合適的分離純化方法，將欲成為產品的蛋白質純化出。在選擇方法的過程中有幾個重要的原則應掌握[Asenjo and Patrick, 1990; Prokopakis and Asenjo, 1990]：

- 1、 儘量結合不同物性、化學性分離原理之方法。
- 2、 儘快將含量多極不穩定的雜質去除，使操作體積減少。
- 3、 具高分離純化效果的步驟儘早進行，而將最困難的步驟後操作。
- 4、 若非必要，避免再加外來物質至欲分離之蛋白質溶液中，若是使用了則要儘快分離去除外加物質。
- 5、 避免使用極端條件之方法。

若能掌握上述幾項操作原則，使每一純化步驟發揮最大效益，則整個蛋白質分離純化步驟少，回收率會增加，相對製造成本也就減少了。

2-3 Reversed-Phase HPLC 法

2-3-1 RP-HPLC 的原理與應用

逆（反）相高效液相色譜層析法(RP-HPLC)，是一種能將蛋白質和 peptides 依其極性大小加以分離的方法[Boscott, 1947]。原理是利用蛋白質樣本各個成份，藉由移動相(mobile phase)攜帶通過帶有非極性官能基之固定相(stationary phase)，透過蛋白質在非極性固定相之間不同的疏水性之交互作用，而達到分離的效果。其固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質，通常是鍵結很強的非極性官能基團，如由 C₄、C₈、C₁₈ 所組成的長烷鏈、苯環與近來常用的填充物質 silica gel。其所適用之 pH 值範圍為 2-8。而移動相沖提液則是偏中至極性的溶劑，如乙腈（氰甲烷）、甲醇等與水所組成的混合物。RP-HPLC 之分離機制係利用蛋白質與固定相之間相互疏水作用力(hydrophobic interaction)不同，使樣本於層析管柱之滯留時間不同而分離出來的，極性最大的物質與管柱填充物表面間作用力最小，故最早被沖提出；反之，極性越小的物質與管柱填充物表面間作用力越強，故越晚被沖提出。而蛋白質在固定相之吸收強度會隨著緩衝液的添加而增加，隨

著有機溶劑濃度的增加而減小。當移動相之有機溶劑濃度漸漸增加，蛋白質相對之疏水性會漸漸減小，最後蛋白質則會被沖提出來。

RP-HPLC 在分離過程中，通常在移動相中加入一離子對試劑 (ion-pairing reagent)，此離子對試劑對於欲分離的物質而言，形成一相對電子對(counter-ions)，其可與離子化合物形成疏水性之離子對，使欲分離物質可被滯留於管柱中，再經由梯度沖提之方式流出。一般分離帶正電、酸性物質所添加之離子對試劑為陽離子對試劑，如 Triethylammonium phosphate；反之若欲分離帶負電、鹼性物質，則須加入陰離子對試劑，如 Trifluoroacetic acid (TFA) [Kissinger, 1997]。

RP-HPLC 法之優點[Bennett, 1983]有 (一) 分離效率高：RP-HPLC 藉由改變沖提液參數 (包括沖提液之 pH、有機溶劑之極性等，可大大提高分離效率，獲得較高之解析能力(resolution)；(二) 應用範圍廣：由於乙腈-水系統為 RP-HPLC 常用緩沖相[Pence and Gu, 1996]，而且乙腈相較於其他有機溶劑具有令人滿意的特性，如低紫外光密度(low ultraviolet strength)、低溶氧度(low oxygen solubility)和沖提强度高(elution strength)等[Rubinstein, 1979; Gu and Zheng, 1994]，使 RP-HPLC 分離純化蛋白質中具有很高分辨與解析能力；再者，RP-HPLC 在蛋白質與 peptides 的分離上，相對於 SEC 或上述其他的層析分離方法，為一具有快速和高回收率之蛋白質分離方法。因此 RP-HPLC 常被選用為蛋白質或 peptides 和諸多生物物質的分離或純化步驟中的最後一階

段[Hearn, 1983; Dolan, 1987; Guo, 1990; Mant, 1991; Vissers, 1992]。其應用範圍廣泛，包括可應用於生化、製藥、食品、工業化學品、環境污染物及臨床醫學等。例如 Analytical RP-HPLC 應用在生化物質分析純化之基礎學術的研究已非常廣泛，如應用在高純度的人類生長激素 [Li and Chung, 1984]；人類用胰島激素 [Dimarch *et al.*, 1990]； Human Enfothelin-1 [Fassina *et al.*, 1994]；Peptides [Kalman *et al.*, 1996; Huhmer *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2000]；Fatty acids [Li *et al.*, 2001]；Oligomers [Vonk *et al.*, 2001]；在生醫疾病上 RP-HPLC 也為一常用的純化方法，如可從病人的血液中純化有關於 Eales 疾病的蛋白質 [Sulochana *et al.*, 2001]。另外一方面，Analytical RP-HPLC 的分析結果也提供了製備級(Preparative)的 RP-HPLC 相當多有用的結果與資訊，使製備級的 RP-HPLC 在下游生化工業之蛋白質分離純化技術中，成為相當重要的工具。RP-HPLC 也由於具有高解析與分辨能力的優點，常是純化製程中重要的核心步驟。Adams 等人更是成功地使用單一 RP-HPLC 純化步驟，從大腸桿菌中純化出綿羊生長荷爾蒙激素(ovine growth hormone, oGH) [Adams *et al.*, 1992]；分離程序上包含 RP-HPLC 層析方法的還有人類胰島素 [Frank *et al.*, 1981; Kroeff, 1989]、人類生長激素 [Olson *et al.*, 1981]、人類白血球干擾素 [Staehelin *et al.*, 1981]、膜蛋白 (membrane proteins) 與病毒外蛋白 (virus envelope proteins) [Heukeshoven and Dernick, 1985] 等等。

但 RP-HPLC 之缺點為，在進行蛋白質分離純化之過程中，會使

用有毒之有機溶劑，如乙腈。其更會導致某些蛋白質發生變性 (denaturation)[Bennett, 1983]，所以在蛋白質分離純化中之結晶程序階段或 RP-HPLC 之後處理中，去除有機溶劑乃為一相當重要步驟且值得探討的工作。由於乙腈-水系統為 RP-HPLC 常用緩沖相[Pence and Gu, 1996]，故乙腈無疑是 RP-HPLC 中最常使用的有機溶劑[Snyder and Kirkland, 1979; Pence and Gu, 1996]。蛋白質溶液在經過 RP-HPLC 純化後，通常伴隨著較高的乙腈濃度(40-60%)及 0.1%(v/v)的 TFA 而沖提出 RP-HPLC 色譜柱。但由於乙腈是一具有毒性之化學有機溶劑，會導致某些蛋白質發生變性，對於蛋白質之 conformation[Timasheff, 1995]、穩定性[Gekko *et al.*, 1981]、活性[Timasheff *et al.*, 1968; Nozaki *et al.*, 1971; Gekko *et al.*, 1984]、crystallizations[Pittz and Timasheff, 1978; Lee *et al.*, 1981; Arakawa *et al.*, 1985]，造成不良的影響，故蛋白質在分離純化後，乙腈之去除是必須且值得討論的因素[Pence and Gu, 1996]，以下章節為介紹一般常見之有機溶劑去除的方法。

2-3-2 RP-HPLC 之後處理程序

蛋白質溶液在蛋白質分離純化過程裡，經過高解析度的 RP-HPLC 層析步驟後，溶液常會含有高濃度的有機溶劑，如乙腈濃度(40-60%)(v/v)及 0.1%(v/v)的 TFA，且溶液 pH 值經常呈現較低的狀態。大量從 RP-HPLC 管柱沖提出之有機溶劑，如 40-60%(v/v)ACN、0.1%(v/v)TFA 等等均必須被移除，才不會影響其蛋白質之穩定性。而對於

RP-HPLC 純化蛋白質後之處理程序，即移除有機溶劑的方法有先前章節提到的膜分離、層析管柱、冷凍乾燥法，和緩沖液交換法。其中利用薄膜分離技術去除有機溶劑雖有先前提到之特點，如薄膜種類、材質多與放大容易等。但薄膜分離於實際大規模蛋白質純化時之問題卻有待加以改進，如（一）易結膜垢堵塞（為 gel-polymerization 問題）；（二）產品失去活性且回收率不穩定；（三）過高濃度之有機溶劑(如乙腈)對於膜分離之影響、減低精密薄膜材料的壽命。

由於以上這些不利因素的考量，儘管 RP-HPLC 對蛋白質擁有高解析之分離能力，其應用將會有所限制。故在未來去除有機溶劑之學術研究發展上，除了膜分離或是冷凍乾燥法外，尚有改善及發明新方法的空間。例如先前章節提到雙水相萃取系統。另外一方面，1995 年 Gu 等研究學者在設計人體生長激素類似物(Human Growth Hormone Antagonist)大規模分離純化製程時，將相分離技術應用於 RP-HPLC 之後去除有機溶劑的處理程序，此研究證明利用相分離機制可以很容易地去除大部分的乙腈有機溶劑，同時也進一步濃縮了蛋白質溶液[Gu *et al.*, 1995]。

2-4 相分離作用(Phase Separation)

由上一節可知有機溶劑溶液會使蛋白質產生變性作用，或在低溫冷凍乾燥的過程中對真空蒸發系統造成傷害，因此，在蛋白質經

RP-HPLC 分離後，去除有機溶劑是必要的。而在蛋白質純化過程中，從 RP-HPLC 經沖提作用所得的蛋白質溶液，即 40-60%(v/v) 乙腈-水溶液，由先前文獻報導指出，可藉由相分層機制(phase separation)的過程，去除溶液中的乙腈有機溶劑。其中相分層作用可藉由兩種不同的機制所造成，分別為低溫環境誘導相分離機制(Cooling process induced phase separation)與鹽類誘導機制(Salt-induced phase separation)。

2-4-1 低溫環境誘導相分離機制

1995 年 Gu 等研究學者在為人體生長激素類似物(Human Growth Hormone Antagonist)設計大規模分離純化過程中，發現利用相分離之技術，可去除蛋白質溶液伴隨著製備級 RP-HPLC 後所含有的乙腈，以達到進一步濃縮蛋白質的目的。圖 3-1 為其整個人體生長激素類似物之分離純化流程圖。此研究重要的相分層作用結果指出，人體生長激素類似物溶液 (hGHG120R) 經 RP-HPLC 純化後，蛋白質伴隨著 40-60%(v/v) 乙腈-水溶液及 0.1%(v/v) 的 TFA 沖提出 RP-HPLC 色譜柱。若將此系統置於-17 冰箱環境中數小時後，乙腈-水溶液可發生相分層現象，而進一步的 HPLC 分析的結果表明，上層相 (乙腈相) 中含有大約 88%(v/v) 的乙腈，但卻只有低於 1% 的人體生長激素蛋白質；而下層相(水相)中含有低於 35%(v/v) 的乙腈並富含 99% 的人體生長激素蛋白質類似物。其他蛋白質如 poly-leucine、BSA、myoglobin、ovalbumin、Polylysine 和 lysozyme 等，也會產生相同相分離的結果。

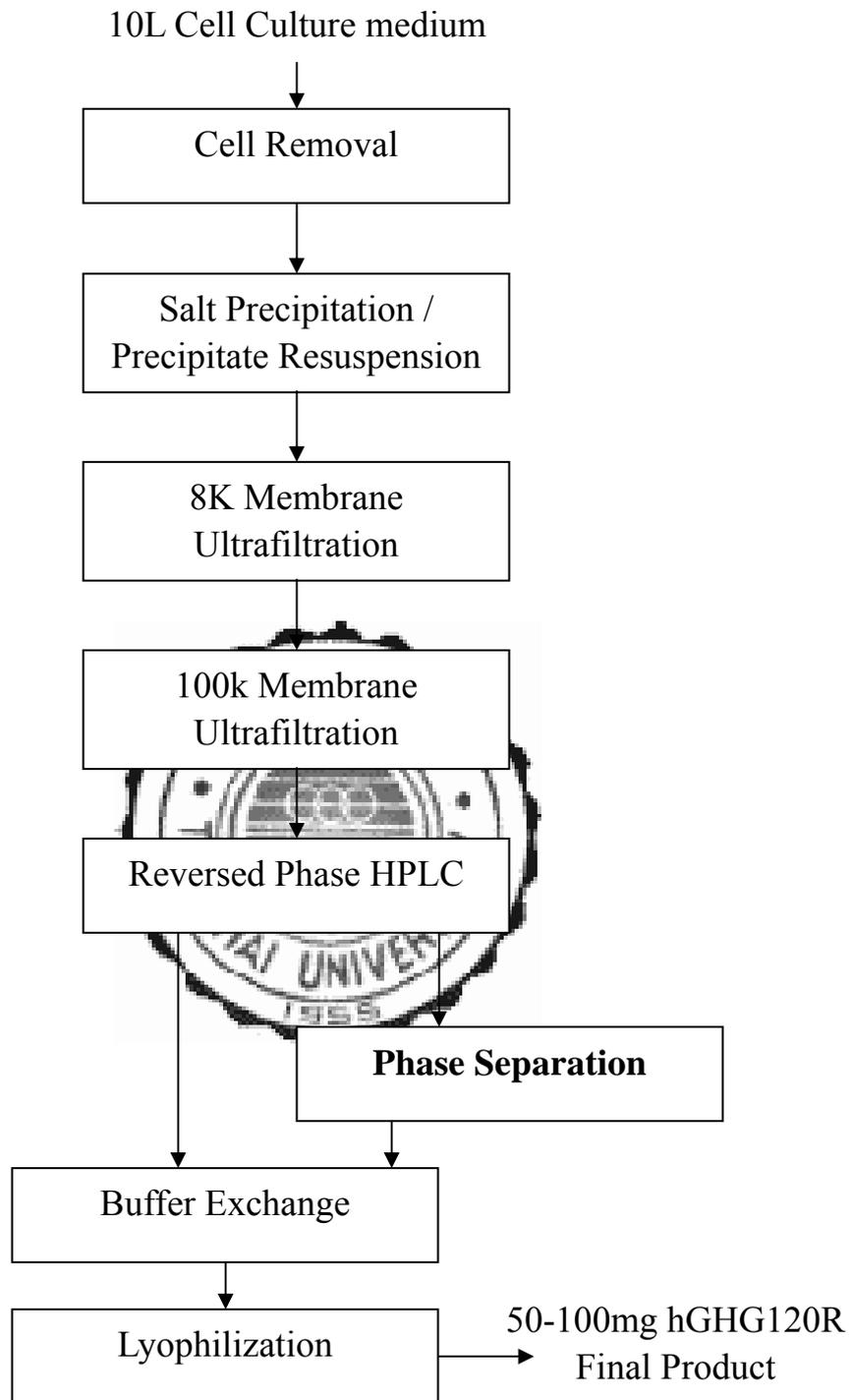


圖 2.1 人體生長激素類似物(hGHG120R)之分離純化流程圖
[Gu *et al.*, 1995]

此研究並提到若整個人體生長激素類似物之純化步驟中，省略相分離作用，直接利用 centrifugal solvent evaporator，進行 lyophilization 作用，則會因 TFA 之濃度增加，而對 hGHG120R 造成傷害，故 phase separation 在大規模純化 hGHG120R 溶液時，扮演著非常重要角色，即去除大部分之有機溶劑。而乙腈與 TFA 爾後再配合 buffer exchange 方法(10K 薄膜)，將全部之乙腈與 TFA 完全移除，以利 lyophilization 進行 [Gu and Zheng, 1994; Gu *et al.*, 1995; Pence and Gu, 1996]。而在其它研究中更有實驗揭示，如圖 3-2 顯示在零度以下，乙腈-水系統相分離的臨界條件為溫度範圍介於-1.32°C 至-18.6°C 之間，同時乙腈的莫耳分率須在 $0.12 < X_{ACN} < 0.78$ 的範圍裡，才可導致相分層之產生 [Schneider, 1964]。

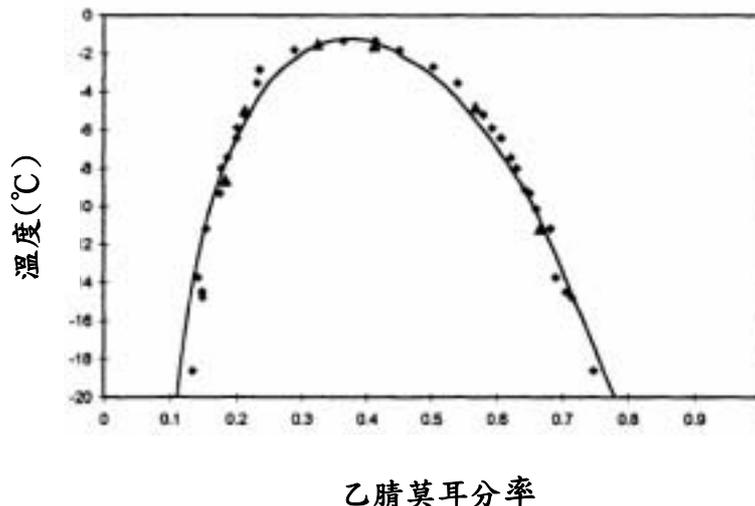


圖 2.2 乙腈-水系統相分離的臨界溫度與乙腈莫耳分率
[Pence and Gu, 1996]

故經以上研究結果證明了在蛋白質大規模分離純化程序上，從 RP-HPLC 經沖提作用所得的產物，藉由低溫環境誘發產生相分離作用，一方面可去除大約 80% 的有機溶劑，另一方面也對蛋白質產生濃縮的作用。此外這對減少低壓凍乾的時間和經濟上的花費是有益的。因此，藉由相分離技術的發現，對 RP-HPLC 進行蛋白質分離純化後的程序，提供了進一步的作用，特別是去除有機溶劑。

2-4-2 鹽類誘導相分層作用

到目前為止，乙腈-水之混合物，除了利用低溫的環境，使混合物發生相分層作用，分成乙腈相和水相兩層外。也可藉由鹽類的添加，如氯化鈉(NaCl)，使乙腈-水之混合物發生相分層現象[Le, 2001; Takamuku *et al.*, 2001]。而藉由鹽類添加誘導相分層產生的方式，除了使乙腈-水系統在常溫下即可產生相分離作用，避免蛋白質在低溫環境下會有由 4 轉換至-17 之過程，或冷凍於攝氏零度以下溫度所可能發生之影響，進而保持蛋白質本身之活性和穩定性。此系統近年來也應用到均質之液-液萃取上，如能溶於水且帶有高電荷的 metalloporphyrin，原本無法利用一般溶劑，如三氯甲烷和四氯化碳，進行萃取而得到的，現在利用添加鹽類誘導乙腈-水體系之機制即可產生相分離，達到分離的效果[Takamuku, 2001]。

乙腈-水系統中的相分離機制，乃由於乙腈-水系統中，水和乙

腈分別為極性和非極性溶液，故乙腈-水系統隨著鹽類之添加，使鹽濃度提升，由於鹽離子對於水分子之間的作用力會比乙腈分子與水分子之間作用力強，因此不但造成所謂的分層現象，分層之效果也會隨著鹽濃度增加而增加。再者，其它目前大部分有關於鹽類誘導相分層機制的研究，均以巨觀或微觀的角度為基礎，包括靜電學 (electrostatics)[Takamuku, 2001]、熱力學(thermodynamics)[Debye *et al.*, 1925; McDevit *et al.*, 1952; Aveyard *et al.*, 1975; Fromon *et al.*, 1979; Conway *et al.*, 1985; Tabata *et al.*, 1996]和統計力學 (statistical-mechanics)[Haugen *et al.*, 1963; Hall *et al.*, 1971; Krishnan *et al.*, 1974]等等。其中熱力學的探討，常常以 Setschenow 關係式表示：



$$k_s = 1/m \left(\log \frac{S_0}{S} \right) \dots \dots \dots \text{Setschenow 關係式}$$

- S_0 ：有機溶劑對水的溶解度
- S ：有機溶劑對電解質(electrolyte)之溶解度
- m ：溶質之重量莫爾濃度

當 $k_s > 1$ ，相分離的發生隨著鹽類莫爾數增加而增加[Takamuku, 2001]。

McDevit 和 Long 對鹽類添加而導致相分離產生的闡釋，為隨著部份鹽類莫爾數之加入，有機溶劑相互間有產生靜電拉緊 (electrostriction)的作用[McDevit *et al.*, 1952]。另外，Masterton 和 Lee

在 scaled particle 理論上，以 1:1 電解質(如鹵化鹼)之探討，解釋鹽類添加誘導相分層的關係[Masterton *et al.*, 1970]。Hawlicka 也根據自發性擴散(self-diffusion)和黏度的數據，了解 NaCl 加入於乙腈-水之混合物中，帶正電之鈉離子與水分子具有優先媒合(preferential salvation)的作用，換句話說，水比乙腈在誘導相分離產生上，有較佳提供電子對的能力，使水與誘體(NaCl) 優先作用，使鹽類可快速產生誘導相分層反應[Hawlicka *et al.*, 1987 & 1988]。最近 Toshiyuki.. 等人更利用 Large-Angle X-ray scattering(LAXS) 和 small-angle neutron scattering(SANS)方法，在分子的層次上，探討乙腈-水-氯化鈉系統之相分離關係，包括混合物中微小異質性(microheterogeneity)、優先水解作用(preferential hydration)及各個原子聚集(aggregation)的關係 [Takamuku, 2001]。

因此，本研究因而期望進一步探討相分離作用的機制，包括鹽類誘導相分層作用(salt-induced phase separation)和 Cooling process induced phase separation，以便於未來工業上大規模純化蛋白質應用；在實際應用時，本研究希望建立更溫和的操作條件來達到同樣的分離濃縮效果，從而降低因制冷所需的能耗或縮短達到兩相分層所需的時間。因為，在低溫環境以下(如-17)，乙腈-水體系有時會產生結冰現象。重複的融化與凍結會影響蛋白質的活性。另外一方面，雖然鹽類也會提高相分離的效果，本研究希望加入的鹽會隨著剩餘的乙腈在緊接的過程中易被去除。若選用膜分離技術，由於鹽

的分子量很小則很容易通過膜而被去除。可是，若選擇使用冷凍乾燥除去剩餘的乙腈，NaCl 等不揮發性鹽類則不能直接被去除，而須借助額外的分離步驟，反而會增加操作費用。故本研究為了要將實際相分離操作時的溫度提高一點，以降低因制冷所需的能耗或縮短達到兩相分層所需的時間，實驗中決定加入數種的鹽類來誘導乙腈水溶液產生相分層作用，至於鹽類的選擇，是以能溶於水為原則，並且不會和乙腈反應，而且還要特別注意到鹽類是否能夠在分離的過程中完全地去除。若是所加入誘導的鹽類不易去除的話，那麼還需要借助額外的分離步驟才能夠把鹽類去除乾淨，如此一來，不但浪費了寶貴的時間、能源，而且還會增加額外的操作成本、費用。

先前的報道指出蛋白質對乙腈-水體系在低溫下的分層現象之影響不大[Pence and Gu, 1996]，但並未對蛋白質在乙腈相和水相中的分配情形加以說明。本論文將探討蛋白質的特性，如疏水性對其在兩相中的分配係數的影響，以便歸納出本技術適用之蛋白質及 peptide 的種類。同時，與先前的實驗步驟不同，本論文還將進一步探討蛋白質濃度對乙腈-水體系在低溫下分層現象的影響。

利用低溫下乙腈-水系統分層的現象，不但能簡便快速地除去蛋白質樣品中的大部份有機溶劑，從而簡化蛋白質分離步驟並降低過程能耗，減少環境污染；同時，達到濃縮蛋白質及維持蛋白質活性的功能。因此在實際過程中有其潛在的應用價值。此外，隨著生命科

學從基因體時代進入蛋白體時代，大量的蛋白質急待大規模工業化生產。在製藥工業中，蛋白質藥物也逐漸替代傳統的化學合成藥物。開發新型的蛋白質分離技術就顯得格外重要。同時，隨著蛋白體研究的進展，人們對蛋白質體系之熱力學特性也越來越感興趣。故本研究結合低溫誘導與鹽類添加之相分層機制，期望可應用於未來之蛋白質分離純化上。



第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗目的

根據[Pence and Gu, 1996; Takamuku, 2001]之研究結果，本研究結合利用低溫環境和添加鹽類誘導 ACN-water 系統產生相分層的機制，達到去除 RP-HPLC 蛋白質流出物的有機溶劑之目的。由於溶液分子間的作用力反映出熱力學表現性質，而作用力受所處環境的影響。pH 值直接影響蛋白質表面電荷的帶電性，且鹽析過程的分離效果會隨著 pH 值的改變而改變；而鹽類離子則會遮蔽粒子間的靜電作用，且不同陰陽離子種類對疏水性作用力有不同的大小，會影響相分層效率和蛋白質不同之沉澱效應。故藉由改變鹽類濃度、溫度、鹽類種類，可進一步了解由蛋白質、鹽類、乙腈和水所形成的系統，不管是利用溫度效應 (cooling process) 或是鹽類誘導 (salt-induced process) 所產生相分層之不同機制。

為了避免蛋白質的溫度轉換過程(4 至-20)，使蛋白質在大規模純化過程中保持恆定的溫度環境，進而減少蛋白質本身活性和穩定性之降低，本研究利用添加鹽類和低溫環境之雙重機制，促使相分離產生。由於添加之鹽類在相分層作用後均須與蛋白質共存，或在爾後須被完全地去除。所以鹽類的選擇，除了以能溶於水，不與乙腈產生反應，而且還需特別注意到鹽類是否能夠在後階段的分離過程中容易被移除。因為若所加入誘導的鹽類不易去除，則還需額外的分離方法將鹽類移除，或鹽類所形成的溶液會對蛋白質活性和

結構造成影響，如此將浪費資源，而且增加額外的操作成本和分離步驟。

因此，本論文希望所加入的鹽類會隨著剩餘的乙腈，在後階段的分離過程中容易地移除。如若是利用『膜分離技術』，由於本研究採用的鹽類，包括 NaCl、KCl 和 NH_4HCO_3 分子量不大，很容易通過薄膜而被去除，而且其中 NH_4HCO_3 (碳酸氫銨) 亦為可揮發性，更可以因容易揮發而被去除；而 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 本身亦為蛋白質儲存常用的緩衝溶液，故對蛋白質的穩定和活性具有更進一步地保護作用。最後則是希望本實驗所得到的成果，能夠找到某一種新的鹽類取代原先的 NaCl，並能更有效地誘導乙腈-水系統產生相分層現象，期望能在未來使用 RP-HPLC 時，能以此新的方法來分離並去除乙腈，還能避免蛋白質的失活 (inactivation) 與降解作用 (degradation) 和 peptides 在分離過程中破壞了原有的活性與機制，並防止乙腈對環境的污染與破壞。

本研究中利用氣相層析儀觀察 ACN-Water 系統相分離作用形成後，乙腈在上層相 (ACN-rich phase) 和下層相 (water-rich phase) 的分佈情形，得以計算 ACN-Water 系統透過相分層後去除有機溶劑的比例。再者，利用電導度儀測得，鹽類於 ACN-Water 系統上-下層分佈情形。同時，利用蛋白質定量測定和分光光度儀測量溶液中之蛋白質，了解不同蛋白質或 peptides 在鹽類-乙腈-水系統的分佈狀況。

3-2 乙腈-水系統相分層影響之實驗流程

在本研究中，首先針對鹽的種類與其濃度對 ACN-Water 系統產生相分離效率之影響進行研究分析，並探討溫度效應、初始乙腈濃度等影響系統產生相分層之因素，及相分層後之乙腈去除率、pH 值和電導度等，ACN-water 系統相分層影響之實驗流程實驗流程如圖 3-1 所示。實驗設計中，先透過相分層效率分析，評估鹽的種類和溫度對 ACN-water 系統相分層效率的優劣後，探討蛋白質於系統中之分配效應、乙腈去除率與系統之 pH 值評估。

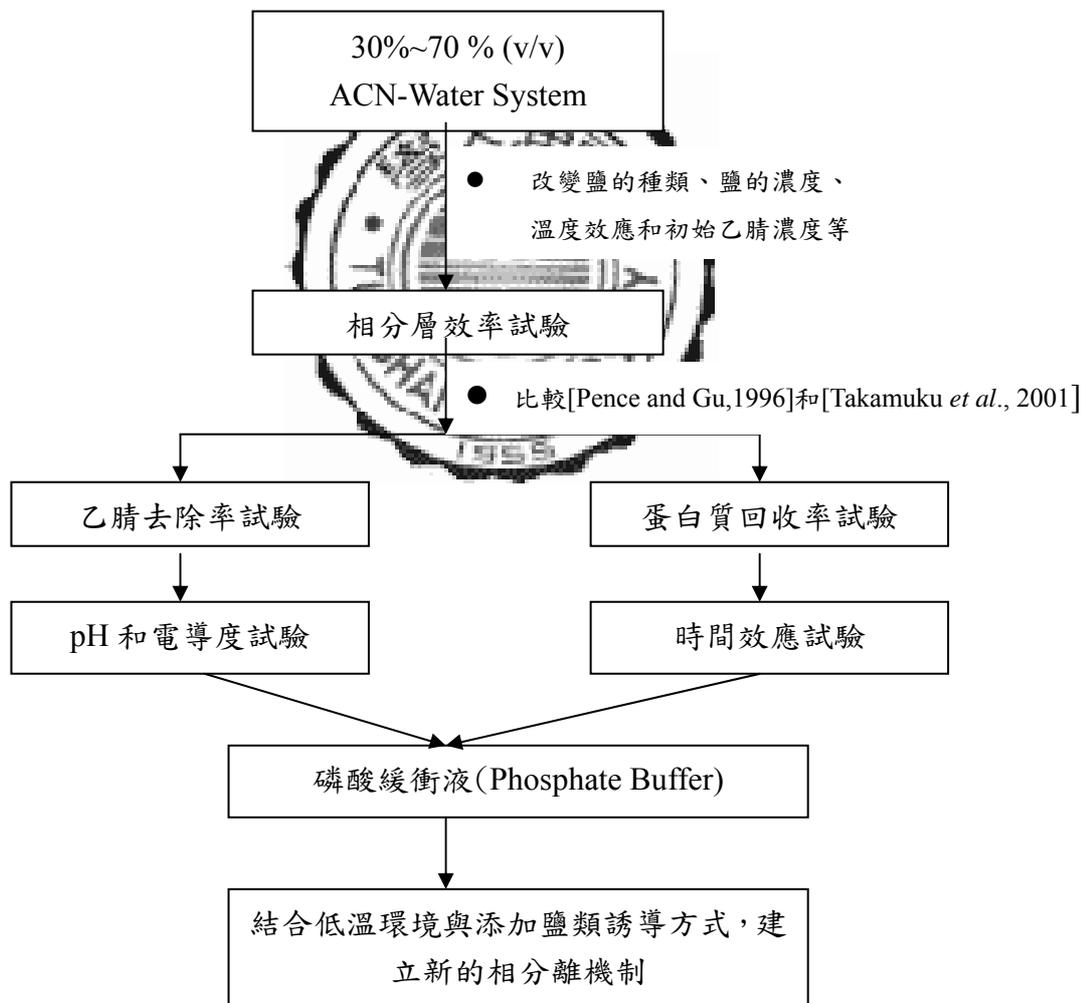


圖 3.1 ACN-water 系統相分層機制建立之實驗流程圖

3-3 實驗藥品

本實驗所使用藥品之廠商與規格特性如下：

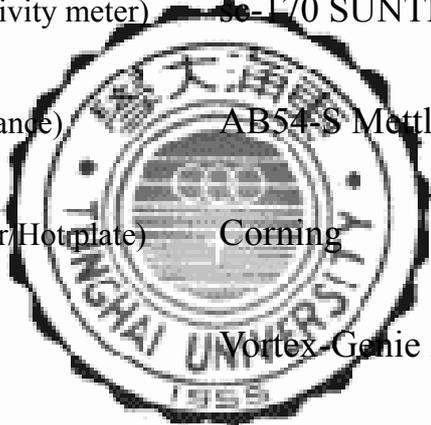
藥品名稱	廠商	特性
乙腈(CH ₃ CN) (Acetonitrile, ACN)	Sigma HPLC grade	MW=41.05g/mole , d=0.78 g/cm ³
磷酸氫鉀(K ₂ HPO ₄) (Potassium phosphate, dibasic)	SHOWA JAPAN	MW=174.1 g/mole)
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄) (Potassium phosphate, monobasic)	SHOWA JAPAN	MW=136 g/mole, d=2.338 g/cm ³
碳酸氫銨(NH ₄ HCO ₃) (Ammonium bicarbonate)	Sigma °	MW=79 g/mole, d=1.586 g/cm ³
氯化鉀(KCl) (Potassium chloride)	SHOWA JAPAN	MW=74.6 g/mole, d=1.987 g/cm ³
氯化鈉(NaCl) (Sodium chloride)	林純藥 JAPAN	MW=58.5 g/mole, d=2.165 g/cm ³)
牛血清蛋白(BSA) (Albumin from bovine serum)	Sigma A1516	
肌血紅素(Myoglobin) (from equine skeletal muscle)	Sigma P 7762	
聚精胺酸 (poly-(L)-arginine)	Sigma M 0630	mol wt 15,000~70,000
聚白胺酸 (poly-(L)-Leucine)	Sigma P 2020	mol wt 100,000~150,000



3-4 實驗儀器與設備

本實驗所使用儀器之出廠公司與型號如下：

儀器名稱	型號
氣相層析儀(Gas chromatography)	GC-14A Shimadzu
紫外光光度儀(UV Spectronic)	GENESYS 2
酸鹼測定儀(pH meter)	sp-701 SUNTEX
電導度測度儀(Conductivity meter)	sc-170 SUNTEX
電子天平(Electronic balance)	AB54-S Mettler Toledo
電磁加熱攪拌器(Stirrer/Hotplate)	Corning
試管振盪混合器	Vortex-Genie 2
高速離心機(Centrifuge)	Sepectrofuge 16M
低溫溫水槽(Refrigerate circulation bath)	



3-5 實驗步驟

3-5-1 ACN-Water-Salts 溶液配置：

由於利用 RP-HPLC 方法作大規模分離純化時，蛋白質或 peptides 通常伴隨著較高的乙腈濃度(40-60%)及 0.1%(v/v)的 Trifluoroacetic acid (TFA)而流出 RP-HPLC 色譜柱。故本實驗分別配製不同莫耳分率的數種鹽類添加至不同體積濃度的 ACN-Water 系統(30%、40%、50%、60%、70%)(v/v)中，系統總體積為 12ml。

實驗藥品：ACN、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、KCl、NaCl、 NH_4HCO_3 和 ddH₂O。

實驗步驟(以 50%(v/v)ACN-Water 系統為例)：

- 1、分別將 15ml 離心管編號，並紀錄實驗日期、和系統名稱。
- 2、依不同「莫耳分率」所需的重量秤取五種鹽類，分別加入已標示的離心管中，並記錄所秤取鹽類的重量和加入離心管後秤量紙的重量，計算鹽類在系統中的「實際濃度」。
- 3、利用 pipette-aid 依比例添加 ddH₂O(6ml)於裝有鹽類的離心管中，並利用 gentle vortex 使鹽類均勻溶解於 ddH₂O，成一混合溶液(solution)。
- 4、再利用 pipette-aid 依比例添加 ACN(6ml)於鹽類溶液中，並用微量吸取管重覆吸取下層溶液到上層溶液使系統充分混合，或以較輕微的震盪使 ACN-Water-Salts 系統成為均一相的狀態(Homogeneous State)。

3-5-2 相分層效率(efficiency of phase separation)分析

由於低溫誘導(cooling process)和鹽類誘導(salt-induced)兩種機制均可導致 ACN-Water 系統產生相分離，但其相分層之效率卻不一致。故利用不同的恆溫環境，改變不同鹽類濃度和種類，探討兩種不同機制對 ACN-Water 系統之相分層的影響。

實驗步驟：

- 1、 將配製已妥的 50%(v/v)ACN-Water-Salts 系統，包括不同鹽類和不同鹽濃度、置於低溫恆溫循環水槽。
- 2、 依次設定恆溫槽溫度：25°C、10°C、8°C、6°C、4°C、2°C、-20 ，ACN-Water-Salts 系統於各溫度環境之相分層時間，設定為兩小時(註)。而系統於溫度轉換之間(如 6°C 換置到 4°C)，溶液均要以微量吸取管重覆吸取下層溶液到上層溶液，使系統充分混合成為一均相的狀態(Homogeneous State)後，再進行下一個溫度測試。
- 3、 相分層現象出現後，觀察記錄系統中上層(乙腈相)體積與下層(水相)體積，並計算兩者比值(V_{up}/V_{low})，如圖 3.2 所示。
- 4、 將樣本改為 30%、40%、60%和 70%(v/v)ACN-Water 系統，重複步驟 1-3。

(註)本研究中相平衡效率試驗中，ACN-water 系統相平衡時間之設定為兩小時，乃基於在預試驗中，發現將系統放置兩小時後至隔夜，其兩小時的相分層效率與隔夜的相分層效率無差別，故往後實驗一律採兩小時為標準。

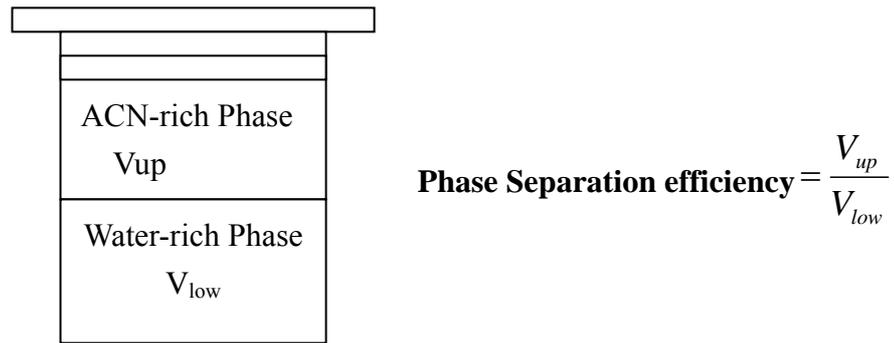


圖 3.2 相分層效率示意圖

3-5-3 移除 ACN 效率(% of ACN Removal)

由於乙腈(ACN)為有機溶劑，對蛋白質的活性和穩定性有時會造成不良影響，故本研究透過相分層技術，達到去除乙腈的目的。實驗中利用氣相層析儀(Gas Chromatography, GC)，測量經由低溫下鹽類誘導 ACN-Water 系統產生相分層後，上層相(upper phase)中之乙腈含量，進而計算乙腈之去除率。

實驗步驟：

- 1、 本試驗首先先注入純乙腈(HPLC grade Sigma) 管柱中進行偵測，得到純乙腈之積分值 a。
- 2、 ACN-Water 系統產生相分層，將利用 pipet 分出上、下層兩相，使用 GC 注射針抽取上層（乙腈相）約 10 μ l，注入 GC 管柱中進行偵測，得到上層乙腈相中乙腈有機溶劑比例，以積分值 b 表示之。
- 3、 上層乙腈相中乙腈有機溶劑比例可以積分值 b/a 表示之，得到上層之乙腈濃度 A。
- 4、 將上述數值帶入公式 3.1，換算得到乙腈之去除率

$$\% \text{ ACN removed} = \frac{A \times V_{up}}{V_{initialACN}} \dots\dots\dots \text{公式 3.1}$$

A : in upper phase measured by gas chromatography(%)

V_{up} : 相分層後之上層體積(ml)

$V_{Initial ACN}$: 初始乙腈體積(ml)

5、 GC 條件設定：

- (1) 氣體流量設定：氮氣(N_2) = 1.49 Kg/cm^2 ；空氣(Air) = 0.3 Kg/cm^2 ，點火後為 0.6 Kg/cm^2 ；氫氣(H_2) = 1 Kg/cm^2 ，點火後為 0.65 Kg/cm^2 。
- (2) 溫度控制設定：Injection temperature 為 140°C；Detector temperature 為 140°C；Column temperature 為 120°C。
- (3) Sample 滯留時間：注射後的等待時間為五分鐘。



3-5-4 蛋白質於 ACN-Water 系統分佈情形

由於蛋白質具有不同的特性，如親水性或疏水性，故在不同溶劑中會有不同的分佈情形。在 ACN-Water 系統中，如較具親水性的蛋白質或 peptide，則大部分會選擇分佈於屬於極性的水相（下層相）。本研究以較偏親水性的三種蛋白質或 peptide，包括 BSA、Myoglobin 和 poly-(L)-arginine；以及偏疏水性的 poly-(L)-Leucine 為對象，藉由相分層機制，探討蛋白質在 ACN-Water 系統中的分佈情形，並藉由蛋白質分析方法，測定兩相中蛋白質的濃度。

蛋白質定量分析實驗(Bio-Rad Bradford):利用 Bio-Rad Bradford 方法來測定溶液中之蛋白質含量(mg/ml)[Bradford, 1976]。

實驗步驟:

1、標準曲線及待測樣品分析實驗步驟：

A. 標準分析方法(0.2mg/ml~1.4mg/ml)之標準曲線製作：每次分析前皆要作一條標準曲線

a. 配置新鮮的 Stock Solution：取 1 體積 Dye reagent concentrate 加 3 體積去離子水稀釋混勻。

b. 蛋白質標準樣品製備

(a) 10mg/ml: 將 0.1g bovine serum albumin(BSA)溶液溶在 5ml 緩衝液中，然後將體積調到 10ml。

(b) 1mg/ml: 取 50ml 之 10mg/ml 的 BSA 溶液加到 450ml 緩衝液中日混合均勻。

(c) 0.45mg/ml: 取 90ml 之 10mg/ml 的 BSA 溶液加到 110ml 緩衝液中日混合均勻。

(d) 0.4mg/ml: 取 80ml 之 10mg/ml 的 BSA 溶液加到 120ml 緩衝液中日混合均勻。

(e) 0.3mg/ml: 取 60ml 之 10mg/ml 的 BSA 溶液加到 140ml 緩衝液中日混合均勻。

(f) 0.2mg/ml: 取 40ml 之 10mg/ml 的 BSA 溶液加到 160ml 緩衝液中日混合均勻

B. 標準樣品與待測樣品分析

a. 取 0.1ml 之蛋白質標準品(1mg/ml、0.45mg/ml、0.4mg/ml、

0.3mg/ml、0.2mg/ml)及 0.1ml 待測樣品(適當的稀釋)分別放入乾淨且乾燥的試管中，再加入 0.9 ml 去離子水。另外將 0.1ml 的緩衝液放入管中當作空白試驗 (blank)。

- b. 加 4ml Stock Solution 稀釋試劑，使染液與蛋白質樣品體積比為 4：1(步驟 A 之 a)到各試管中。
- c. 將反應試劑與樣品充分混合均勻，避免泡沫產生。
- d. 在室溫下靜置 15 分鐘。
- e. 以空白試驗標定零點利用分光光譜儀測量各樣品於 O.D_{595nm} 之吸光值。
- f. 利用線性回歸方法求出標準曲線，然後由標準曲線計算待測樣品中之蛋白質濃度，其中標準樣品及待測樣品之分析最少需要重複做 3 次，並取其平均值來計算，再者實驗中需控制每一個分析樣品中反應試劑與待測樣品的反應時間相同；最後利用畫圖軟體 sigma plot 軟體畫圖。

2、蛋白質於 ACN-Water 系統分佈情形的實驗步驟：

- A. 蛋白質溶液配置：分別配置濃度為 10mg/ml 的四種蛋白溶液 10ml，包括 BSA、Myoglobin 和 poly-(L)-arginine 和 poly-(L)-Leucine 等，先以 ddH₂O 稀釋成 1mg/ml，並分裝於已標示蛋白質種類、濃度和日期的 eppendorf 中，儲存於-20°C 冰箱，以供下階段之實驗使用。
- B. ACN-Water-Salts-Protein 溶液配置：同理 3-5-1 節之實驗步驟，配製微量的 60%(v/v)ACN-Water 系統，系統總體積為 1ml 於 eppendorf 中。首先依照各個不同比例加入 0.2ml 的鹽溶液，從-20 冰箱取出濃度為 1mg/ml 的蛋白質溶液，並先稀釋成 200μg/ml，再加入 200μl 於各鹽溶液中。最後加入 0.6ml ACN，並充分混合後，使系統成為總體積為 1ml 的

ACN-Water-Salts- Protein 溶液。

- C. 相分層作用：將配置已妥的 ACN-Water-Salts-Protein 溶液，放置於 4 環境中，進行 Incubation，產生相分層後，利用 pipette 將上層（乙腈相）取出至另一個 eppendorf。
- D. 蛋白質分析：取系統相平衡後之上、下層相（含有蛋白質）100 μ l，並與 200 μ l ddH₂O 和 1.2ml 之 Coomassie Brilliant Blue G-250 染液進行 gentle vortexing 後，於室溫下 Incubation 15 分鐘，最後於 Spectrophotometer 之吸收波長為 O.D._{595nm} 測試其吸光值。
- E. 蛋白質回收率：先將測試後吸收值與預先作好的各蛋白質之標準曲線對照，換算成濃度值。並利用下列公式計算利用相分層分離機制之蛋白質回收率。

$$\text{Protein Recovery (\%)} = C_f * V_f / C_i * V_i \dots \dots \dots \text{(式 3.1)}$$

C_f：利用 UV O.D._{595nm} 測試其吸光值，並與標準曲線換算的濃度值，即蛋白質經相分離後之濃度(mg/ml)。

V_f：相分層後富有蛋白質的該相體積(ml)。

C_i：加入於 ACN-Water 系統中的蛋白質初始濃度(mg/ml)。

V_i：加入於 ACN-Water 系統中的蛋白質初始體積(ml)。

3-6 分析方法

3-6-1 pH 值測定

利用酸鹼度計（SUNTEX, Taiwan）測量 ACN-Water 系統之上、下層溶液 pH 值。待系統產生相分層後，實驗時利用微量吸取管將上、下層溶液吸出，稀釋 1000 倍後，用酸鹼度計測量其 pH 值。

3-6-2 電導度測定

利用電導度儀器(SUNTEX, Taiwan)測量 ACN-Water 系統之上、下層相溶液中之鹽類電導度。待系統產生相分層後，實驗時利用微量吸取管將上、下層溶液吸出，稀釋 1000 倍後，用電導度計測量其電導度值。

3-6-3 Acetonitrile 含量測試

本研究利用 GC-9A 之氣相層析儀(Gas Chromatography)，積分儀為 Shimadzu Data processor Model C-R6A，測試鹽類誘導乙腈-水體系產生相分層後，上層相(upper phase)中之乙腈含量。氣相色層分析法主要適用於分離熱穩定，具揮發性之有機物質與無機物質。簡單原理為樣本進入射口後，被加熱成氣體流，利用惰性載體氣體，將此氣流以一定的速率吹進層析管柱中，而層析管柱內裝有惰性固體填充料，此填充料上面覆蓋一層液體薄膜，當作靜止相，即液相，而分離作用乃利用樣品同時分佈分配於兩相之間所致，每樣品成分分配比並不同，造成滯留於層析管時間不同而分離。本研究採用之偵測器為火焰游離偵測器(FID)，積分儀採用方法為面積百分率法(Area Normalization Method: Method)。

3-6-4 蛋白質定量測定

本研究蛋白質定量測定為 Bradford Method。此測定蛋白質含量多寡的方法。最早是 1976 年由 Bradford, M.M 等人提出，原理是利用

Coomasie Brilliant Blue G-250 染液與蛋白質產生結合，其主要產生鍵結是帶有鹼性與芳香性殘基的位置，特別是精胺酸(arginine)，結合後會形成結構上的變化，產生呈色強度的變化，經由紫外光分光光度儀測量後，對照標準曲線，即可得知蛋白質含量多寡。

(1)BSA 檢量曲線

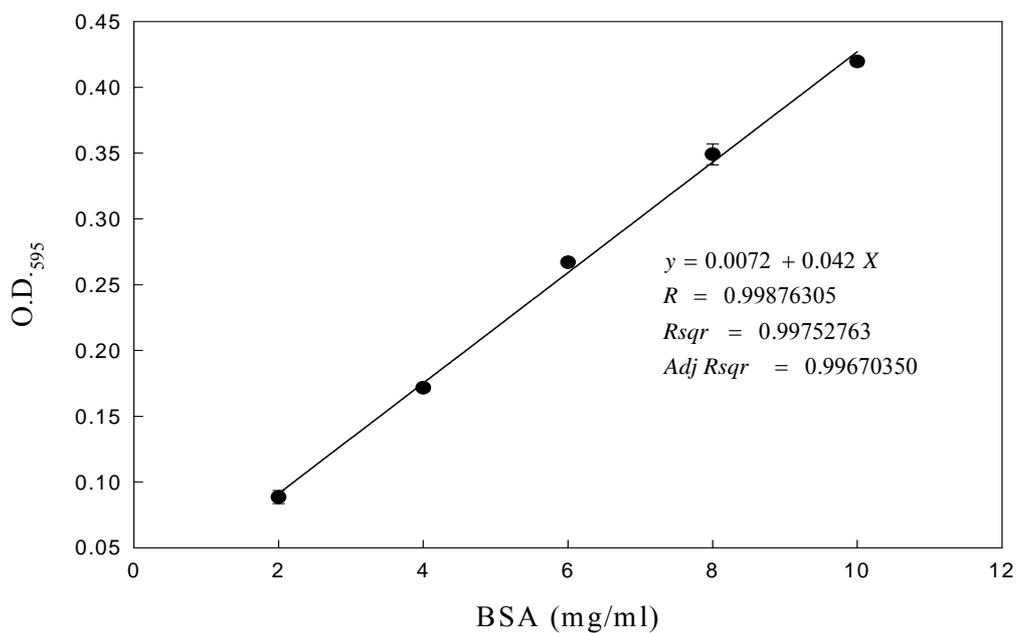
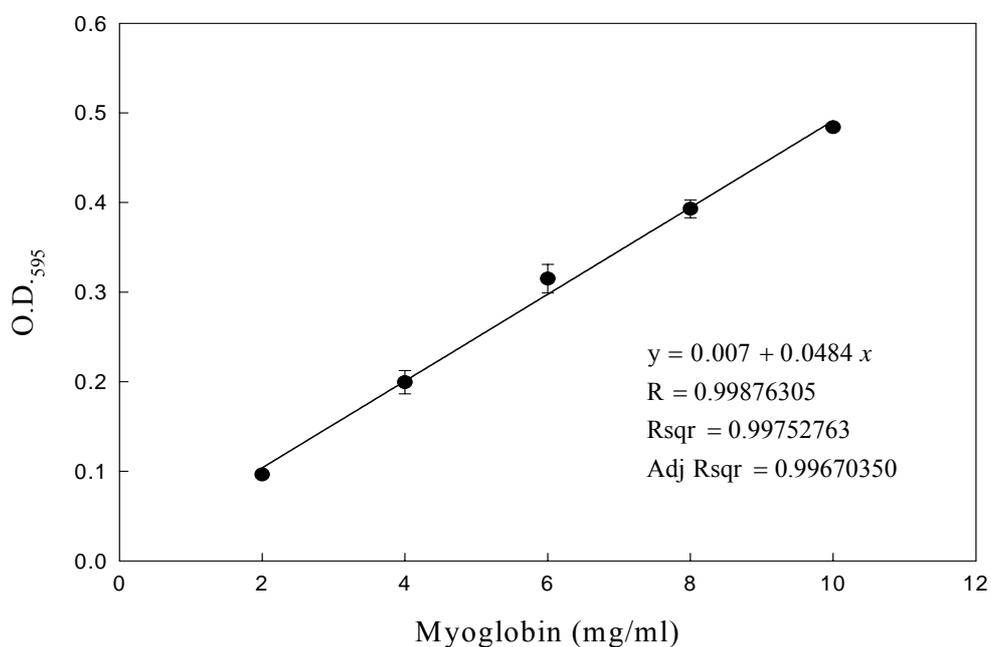


圖 3-3 BSA 檢量曲線

(2) Myoglobin 檢量曲線



(3) Poly-(L)-Arginine 檢量曲線

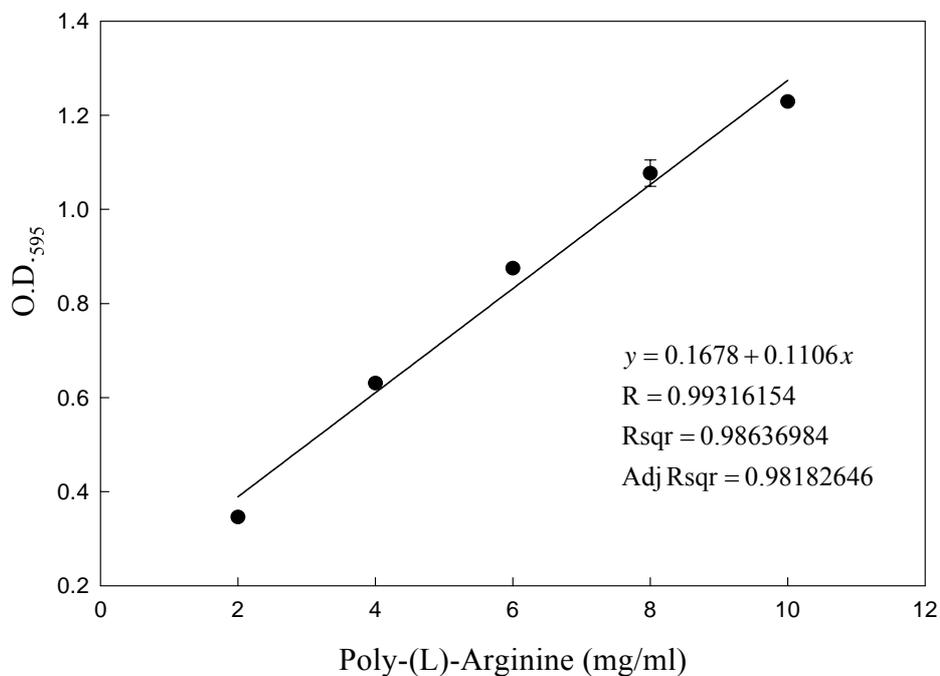


圖 3.5 Poly-(L)-Arginine 檢量曲線)-Arginine 檢量曲線

第四章 結果與討論

4-1 鹽類對乙腈-水系統相分層之影響

4-1-1 鹽類對乙腈-水系統在零度環境以上之相分層影響

利用 preparative-RP-HPLC 方法進行蛋白質之大規模分離純化時，由於乙腈具有低紫外光(UV)密度、低氧溶解度低和高沖提強度等優點[Gu and Zheng, 1994; Rubinstein, 1979]，所以乙腈無疑是 RP-HPLC 移動相中最常使用的有機溶劑[Snyder and Kirkland, 1979; Pence and Gu, 1996]。同時，乙腈(ACN)為不產生質子或不接受質子的非質子溶劑，具有質子惰性、介電常數高、有助於電荷之分離等特性，使乙腈可以任何的比例溶於水中，形成乙腈-水(ACN-water)溶液。通常蛋白質經 RP-HPLC 分離後，其溶液中含有 40%~60%(v/v) 的 ACN。為了瞭解 ACN-water 溶液之相分層作用，本研究首先配製不同比例的 ACN-water 系統，藉由添加不同的鹽類和改變鹽的濃度，探討鹽類誘導相分層機制(salt-induced phase separation)中，鹽類對 ACN-water 系統產生相分層的影響。而相分層作用中，則以相分層效率(phase separation efficiency)－即上層(乙腈相)與下層(水相)之體積比($V_{\text{ACN-rich}}/V_{\text{water-rich}}$ 或 $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)，表示其鹽類誘導相分層之優劣， $V_{\text{ACN-rich}}/V_{\text{water-rich}}$ 比值愈大，即代表鹽類誘導相分層情況愈好。本研究之實驗結果揭示，ACN-water 溶液不僅在常溫(25°C)時可

藉由 NaCl 或其他鹽類產生相分層；另外一方面，亦可通過降低溫度（4°C）達到進一步提高 ACN-water 系統的分層效應。

由於先前研究結果顯示， $X_{ACN}=0.25$ （即大約 50% (v/v)）之 ACN-Water 系統在室溫下（25°C）時，當 X_{NaCl} 大於臨界值 0.009 時，即會誘導 ACN-Water 系統在室溫下（25°C）產生相分層 [Takamuku *et al.*, 2001]。而本實驗結果如表 4-1 顯示亦有相同的結果。各種鹽類分別加入超過 $X_{K_2HPO_4} > 0.004$ （或 146mM）、 $X_{K_2HPO_4} > 0.005$ （或 184mM）、 $X_{NaCl} > 0.009$ （或 331mM）、 $X_{NH_4HCO_3} > 0.011$ （或 405mM）和 $X_{KCl} > 0.012$ （或 443mM）的濃度之 50% (v/v) ACN-Water 系統於 25°C 環境即會產生相分層作用。其中， K_2HPO_4 為添加較少量即可產生相分離之鹽類。

而表 4-2 則顯示各種鹽類對 50% (v/v) ACN-water 系統在 4°C 環境下誘導產生相分層的情形。當 NaCl 濃度大於 110mM ($X_{NaCl}=0.003$) 時，用更少的 NaCl 即可誘導系統於 4°C 下產生相分層，其所產生相分層效率 (V_{up}/V_{low} 比值)，同於系統在 25°C 下加入 414.5mM 的 NaCl ($X_{NaCl}=0.009$) 所產生的相分層效率。依此類推，當系統分別加入 $X_{K_2HPO_4} > 0.00098$ （或 37mM）、 $X_{KH_2PO_4} > 0.002$ （或 73mM）、 $X_{NH_4HCO_3} > 0.003$ （或 109mM）和 $X_{KCl} > 0.003$ （109mM）時，均可於 4°C 產生相分離現象。而在另一方面，在 $X_{K_2HPO_4}=0.002$ （或 73mM）時，分層效果也比在 $X_{NaCl}=0.014$ （或 517mM）時更佳。另外， NH_4HCO_3

和 KH_2PO_4 鹽類經實驗結果證實，相分層的誘發作用亦較 NaCl 鹽類理想，同時在低鹽濃度時 KH_2PO_4 相分層相效率又比 NH_4HCO_3 佳。然而， KCl 鹽類卻沒有類似的結果，因此欲要得到相同的相分層效率，反而需要加入比 NaCl 更多的 KCl 鹽類。

圖 4-1 表示 50%(v/v)ACN-Water 系統在 4°C 環境下，不同鹽類和濃度對相分層效率的影響。由圖中可看出在初始時，相分層效率 ($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$) 會隨著各鹽類增加而顯著的增高；然而隨著添加鹽類之量達到一固定值時， $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值則漸趨平緩，即再加入更多的鹽類，相分層效率也不會有明顯的變化。由表 4-2 亦可看出此現象， K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 在大於 184mM (或其莫耳分率大於 0.005)， NaCl 、 NH_4HCO_3 和 KCl 等鹽類在大於 294mM (或其莫耳分率大於 0.008) 時， $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值趨於緩和，相分層效率不易改變。

本實驗透過多種的鹽類添加一系統於 4°C 環境下時 $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值大部份均低於 0.6，但是唯獨 K_2HPO_4 此鹽類，在 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4}=0.007$ (或 257mM)，可達到 0.9，此也顯示 K_2HPO_4 鹽類相較於其他鹽類，對於相分層之誘導，有較明顯的作用與貢獻。而不同鹽類所造成相分層效果的順序，分別為：



由此可知，鹽類添加多寡會直接影響相分層的結果，而鹽類的選擇不同亦會有不同相分層的效果。

表 4.1 各種鹽類對 50%(v/v) 乙腈-水系統於 25°C 環境下產生的相分層效率

$X_{\text{salts}}(\times 10^3)$	C_{salts} (mM)	Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)				
		K_2HPO_4	KH_2PO_4	NaCl	NH_4HCO_3	KCl
1	38	-	-	-	-	-
2	73	-	-	-	-	-
3	109	-	-	-	-	-
4	146	0.96	-	-	-	-
5	184	1.08	0.45	-	-	-
6	220	1.03	0.54	-	-	-
7	257	1.11	0.72	-	-	-
8	294	1.14	0.79	-	-	-
9	331	1.13	0.82	0.19	-	-
10	368	1.17	0.80	0.22	-	-
11	405	1.11	0.82	0.25	0.40	-
12	443	1.15	0.80	0.30	0.51	0.27
13	480	1.16	0.85	0.38	0.53	0.35

X_{salts} : 各鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的莫耳分率

C_{salts} : 各鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的濃度

"-": 代表未產生相分層現象

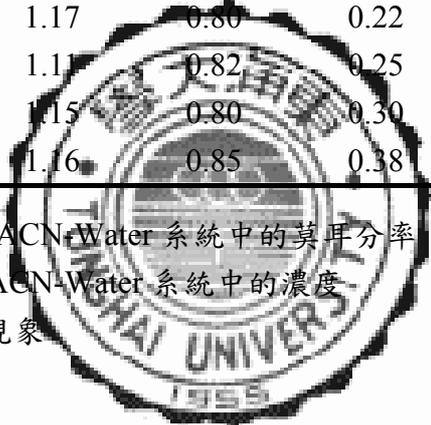


表 4.2 各種鹽類對 50%(v/v) 乙腈-水系統於 4°C 環境下產生的相分層效率

$X_{\text{salts}}(\times 10^3)$	C_{salts} (mM)	Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)				
		K_2HPO_4	KH_2PO_4	NaCl	NH_4HCO_3	KCl
1	38	0.23	-	-	-	-
2	73	0.54	0.28	-	-	-
3	109	0.73	0.40	0.20	0.13	0.13
4	146	0.82	0.52	0.27	0.33	0.27
5	184	0.85	0.51	0.32	0.33	0.28
6	220	0.87	0.50	0.37	0.34	0.34
7	257	0.90	0.50	0.41	0.50	0.40
8	294	0.94	0.50	0.46	0.52	0.44
9	331	0.92	0.50	0.47	0.53	0.46
10	368	0.93	0.50	0.48	0.57	0.47
11	405	0.95	0.50	0.51	0.57	0.48
12	443	0.97	0.50	0.51	0.59	0.51
13	480	0.95	0.5	0.53	0.60	0.52
14	517	1.00	0.51	0.54	0.61	0.53

"-": 代表未產生相分層現象



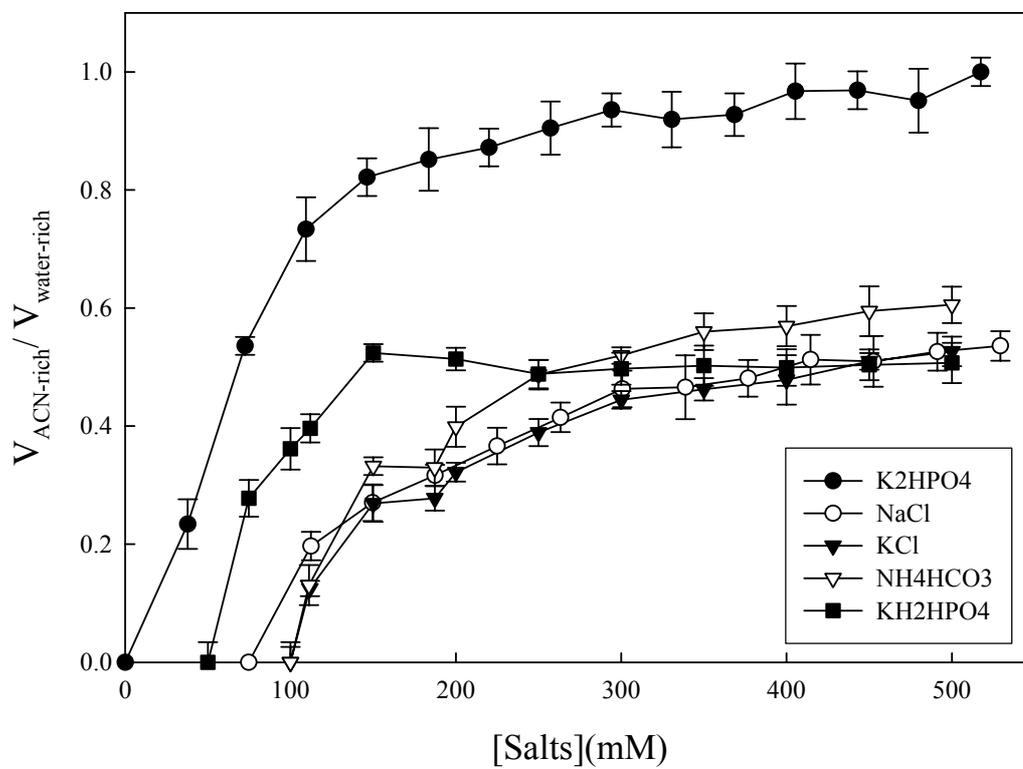


圖 4.1 各種鹽類對 50%(v/v)乙腈-水系統在 4°C 下產生相分層的影響。鹽類包括： K_2HPO_4 (●)、NaCl (○)、KCl (▼)、 NH_4HCO_3 (▽) 和 KH_2HPO_4 (■)，依不同鹽類濃度均勻地溶於 50%(v/v)ACN-water 系統中，靜置於 4 環境中 2 小時。待至相平衡後，記錄 ACN-rich phase 之 $V_{ACN-rich}$ 和 water-rich phase 之 $V_{water-rich}$ ，並計算體積比 ($V_{ACN-rich} / V_{water-rich}$)。 $V_{ACN-rich} / V_{water-rich}$ 對 [Salts](mM) 作圖。

4-1-2 鹽類添加對乙腈去除率之影響

乙腈為一有機溶劑，其會導致蛋白質變性或活性減小，故蛋白質經 RP-HPLC 分離純化後，溶液中的乙腈溶劑需被去除。在本研究中，為了解釋 ACN-Water 系統經鹽類誘導產生相分層後，乙腈於兩相中的分配情形，藉由氣相層析儀(gas chromatography)，測量上層相(Upper phase, ACN-rich phase)之乙腈實際濃度。

先前有研究顯示，50%(v/v)之 ACN-Water 系統在低溫環境下(如 -20°C)數小時產生相分層後，可由上層乙腈相中移除掉大約 51%之乙腈。而在本研究中如圖 4-2 顯示，50%(v/v)之 ACN-Water 系統於 4°C 環境下，添加愈多的鹽類，有愈多之乙腈可被移除。同時， K_2HPO_4 比 NaCl 可去除較多的乙腈。另一方面，利用添加 K_2HPO_4 ($X_{\text{K}_2\text{HPO}_4} > 0.003$)，所造成之乙腈移除效率，優於利用在 -20°C 之冷卻作用 (cooling process)，如 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = 0.003$ 時(110mM)，乙腈去除率可達 57%。因此，對於去除有機溶劑而言，相較於低溫環境機制，利用鹽類(如 K_2HPO_4)誘導相分層之機制，可提供一較簡單便利，且較少能源耗費之去除有機溶劑方法。

再者，由表 4-3~4-7 顯示，50%(v/v)之乙腈-水體系於 4°C 環境下，藉由各種鹽類，如 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NH_4HCO_3 、 NaCl 和 KCl 的添加使相分層產生後，當 $X_{\text{salts}} < 0.007$ 時，上層相中的乙腈濃度為 60%~80%；反之，當 $X_{\text{salts}} > 0.007$ 時，會有濃度 80%~90%之乙腈

會聚集於 ACN-rich 相。但隨著添加的鹽愈多，造成 ACN-water 系統之相分層相效率愈佳， V_{up}/V_{low} 比值愈高，可移除實際乙腈的量則越多。故鹽類誘導系統所表現的相分層效率(V_{up}/V_{low} 比值)，與實際的乙腈去除率，屬於正比的關係。

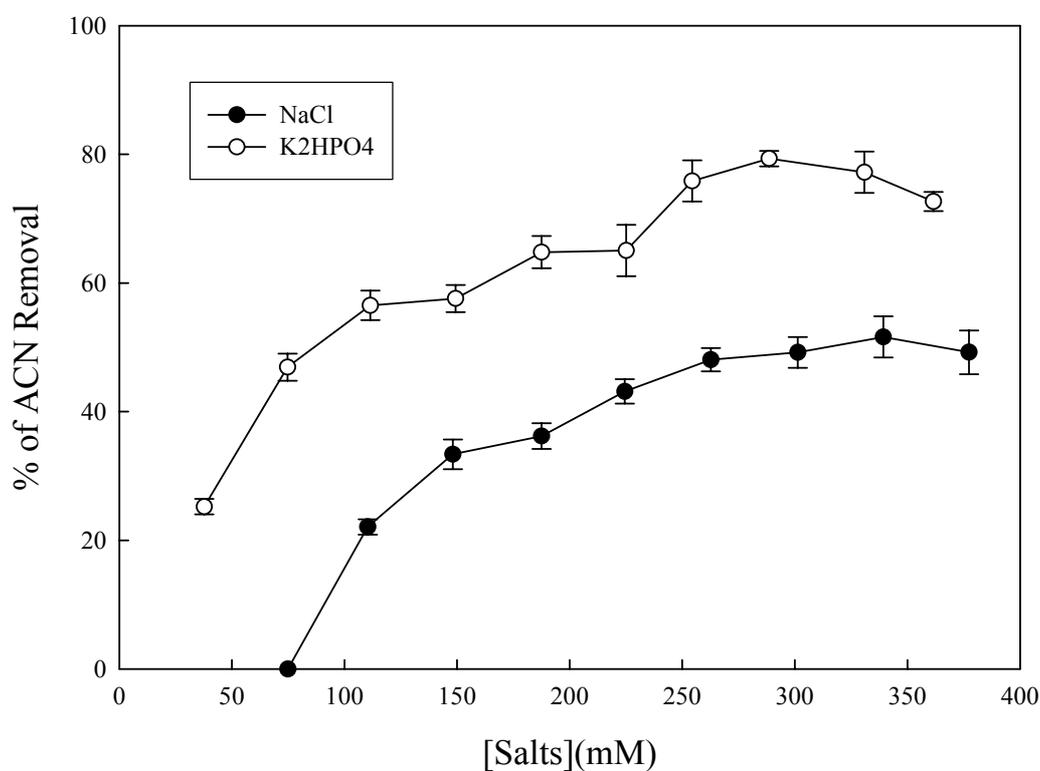


圖 4.2 鹽類添加對移除上層相中乙腈之影響。鹽類包括 NaCl (●)和 K₂HPO₄ (○) 添加於 50% (v/v) ACN-water 系統於 4 溫度下產生相分層。上層相之乙腈濃度藉由氣相層析儀 (gas chromatography) 測得。

表 4.3 不同 NaCl 濃度之乙腈去除率(50%(v/v)ACN-Water, 4°C)

X_{NaCl} ($\times 10^3$)	C_{NaCl} (mM)	#	V_T	Upper phase		Low phase	$V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$	ACN removed (%)
				C_{ACN} (%)	V_{up}	V_{low}		
1	37	-	11.85	-	-	-	-	-
2	75	-	11.55	-	-	-	-	-
3	110	+	11.85	67	1.95	9.90	0.20	22
4	148	+	11.75	78	2.50	9.25	0.27	33
5	188	+	11.85	74	2.85	9.00	0.32	36
6	224	+	11.75	81	3.15	8.60	0.37	43
7	263	+	11.70	83	3.43	8.27	0.41	48
8	301	+	11.85	83	3.75	8.10	0.46	49
9	339	+	11.80	83	3.75	8.05	0.47	52
10	377	+	11.70	82	3.80	7.90	0.48	49

X_{NaCl} : NaCl 鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的莫耳分率

C_{NaCl} : NaCl 鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的濃度

中的 "+" : 代表 ACN-water 系統有產生相分層現象

"-": 代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

V_T : ACN-water 系統總體積

C_{ACN} : ACN 在 ACN-Water 系統相分離後上層-乙腈相的濃度

V_{up} : ACN-Water 系統相分離後上層-乙腈相之體積

V_{low} : ACN-Water 系統相分離後下層-水相之體積

$V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$: ACN-Water 系統相分離後上-下層相之體積比

表 4.4 不同 K₂HPO₄ 濃度之乙腈去除率 50%(v/v)ACN-Water, 4°C

X _{K₂HPO₄} (×10 ³)	C _{K₂HPO₄} (mM)	#	V _T	Upper phase		Low phase	V _{up} /V _{low}	ACN removed (%)
				C _{ACN} (%)	V _{up}	V _{low}		
1	36	+	11.7	67	2.20	9.50	0.23	25
2	73	+	11.75	77	4.10	7.65	0.54	47
3	109	+	11.65	77	4.93	6.72	0.73	57
4	146	+	11.75	71	5.30	6.45	0.82	58
5	184	+	11.85	80	5.45	6.40	0.85	65
6	220	+	11.85	79	5.52	6.33	0.87	65
7	257	+	12	88	5.70	6.30	0.90	76
8	294	+	12	88	5.80	6.20	0.94	79
9	331	+	11.9	83	5.70	6.20	0.92	77
10	368	+	11.95	87	5.75	6.20	0.93	73

中的 "+" : 代表 ACN-water 系統有產生相分層現象
 "-" : 代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 4.5 不同 KCl 濃度之乙腈去除率(50%(v/v)ACN-Water, 4 °C)

X _{KCl} (×10 ³)	C _{KCl} (mM)	#	V _T	Upper phase		Low phase	V _{up} /V _{low}	ACN removed (%)
				C _{ACN} (%)	V _{up}	V _{low}		
1	37	-	11.20	-	-	-	-	-
2	74	-	11.20	-	-	-	-	-
3	112	+	11.25	75	1.25	10.00	0.13	16
4	149	+	11.45	73	2.30	9.15	0.25	28
5	187	+	11.50	70	2.50	9.00	0.28	29
6	224	+	11.25	74	2.65	8.60	0.31	33
7	263	+	11.40	77	2.92	8.48	0.34	37
8	300	+	11.50	90	3.00	8.50	0.36	45
9	338	+	11.50	91	3.10	8.40	0.37	47
10	376	+	11.50	86	3.35	8.15	0.41	48

中的 "+" : 代表 ACN-water 系統有產生相分層現象
 "-" : 代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 4.6 不同 KH_2PO_4 濃度之乙腈去除率(50%(v/v)ACN-Water, 4°C)

$X_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ ($\times 10^3$)	$C_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ (mM)	#	V_T	Upper phase		Low phase	$V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$	ACN removed (%)
				C_{ACN} (%)	V_{up}	V_{low}		
1	37	-	11.20	-	-	-	-	-
2	75	+	11.50	71	2.50	9.00	0.28	30
3	112	+	11.45	73	3.25	8.20	0.40	40
4	150	+	11.50	79	3.52	7.98	0.44	46
5	187	+	11.40	71	3.40	8.00	0.43	40
6	225	+	11.20	77	3.20	8.0	0.40	41
7	254	+	11.50	72	3.50	8.00	0.44	42
8	288	+	11.50	73	3.30	8.20	0.40	40
9	330	+	11.50	75	3.25	8.25	0.39	41
10	361	+	11.60	79	3.12	8.8	0.37	41

中的 "+" : 代表 ACN-water 系統有產生相分層現象

"-" : 代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 4.7 不同 NH_4HCO_3 濃度之乙腈去除率 5(0%(v/v)ACN-Water, 4°C)

$X_{\text{NH}_4\text{HCO}_3}$ ($\times 10^3$)	$C_{\text{NH}_4\text{HCO}_3}$ (mM)	#	V_T	Upper phase		Low phase	$V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$	ACN removed (%)
				C_{ACN} (%)	V_{up}	V_{low}		
1	37	-	11.20	-	-	-	-	-
2	74	+	11.20	-	-	-	-	-
3	111	+	11.25	57	1.30	9.95	0.13	12
4	149	+	11.45	59	2.47	8.98	0.28	24
5	187	+	11.30	83	2.80	8.50	0.33	39
6	224	+	11.45	85	3.05	8.40	0.36	43
7	254	+	11.10	84	2.85	8.25	0.35	40
8	289	+	11.20	88	3.15	8.05	0.39	46
9	330	+	11.50	87	3.50	8.00	0.44	51
10	361	+	11.20	91	3.40	7.80	0.44	52

中的 "+" : 代表 ACN-water 系統有產生相分層現象

"-" : 代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

4-1-3 鹽類於乙腈-水系統之分配情形

本研究藉由兩相電導度(conductivity)的測定，瞭解鹽類於 ACN-water 溶液相分層後之分配情形。實驗結果顯示如圖 4-3 顯示， K_2HPO_4 對 60%(v/v)ACN-water 系統於 4°C 產生相分層後，大部份的 K_2HPO_4 鹽類均會聚集於下層水相中。而由圖 4-4 亦顯示，乙腈初始濃度的增加並不會改變鹽類的分配情形，或促使鹽類遷移至 ACN-rich 相中，大部份之鹽類均保持在水相。此結果亦與先前研究結果相同[Takamuku *et al.*, 2001]。但值得注意的是，由表 4-8 表示，乙腈初始濃度愈高，使 ACN-rich 相中之電導度有微弱的遞減，這主 Water-rich 相有愈高的電導度，即代表 Water-rich 相之鹽濃度愈高，這主要是由於上層相之體積減少的緣故。



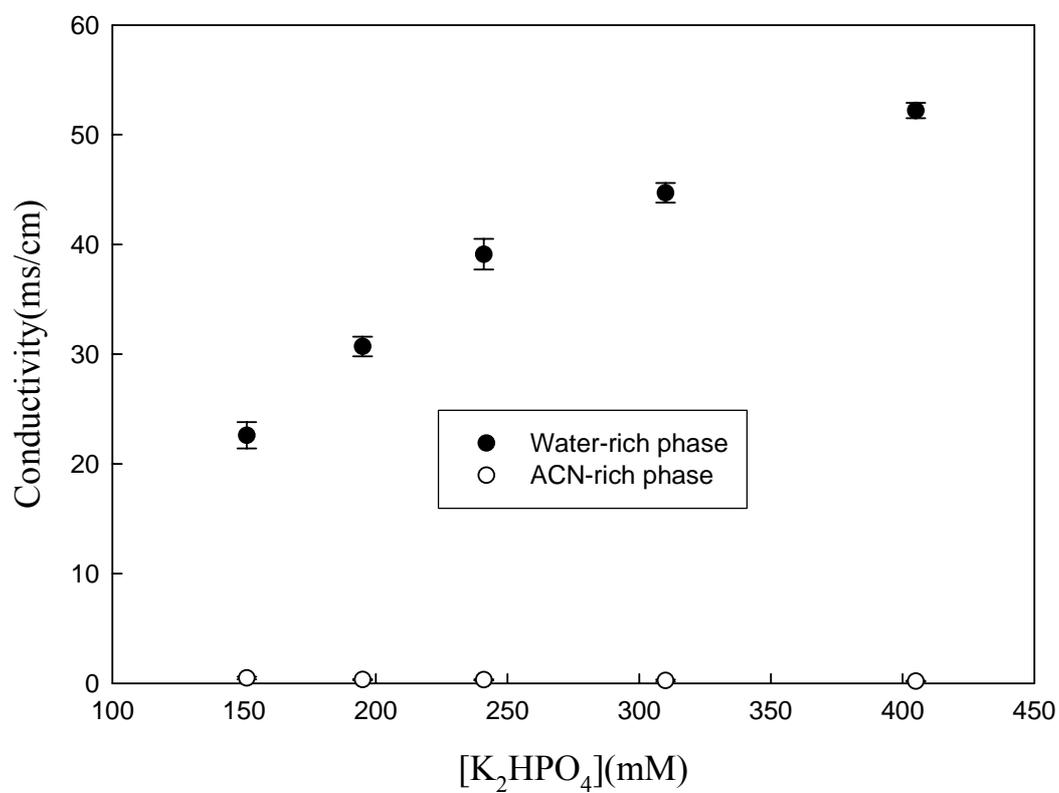


圖 4.3 K₂HPO₄ 鹽類對 60%(v/v)乙腈-水系統於 4 產生相分層後，上層乙腈相與下層水相之電導度(conductivity)的測定。

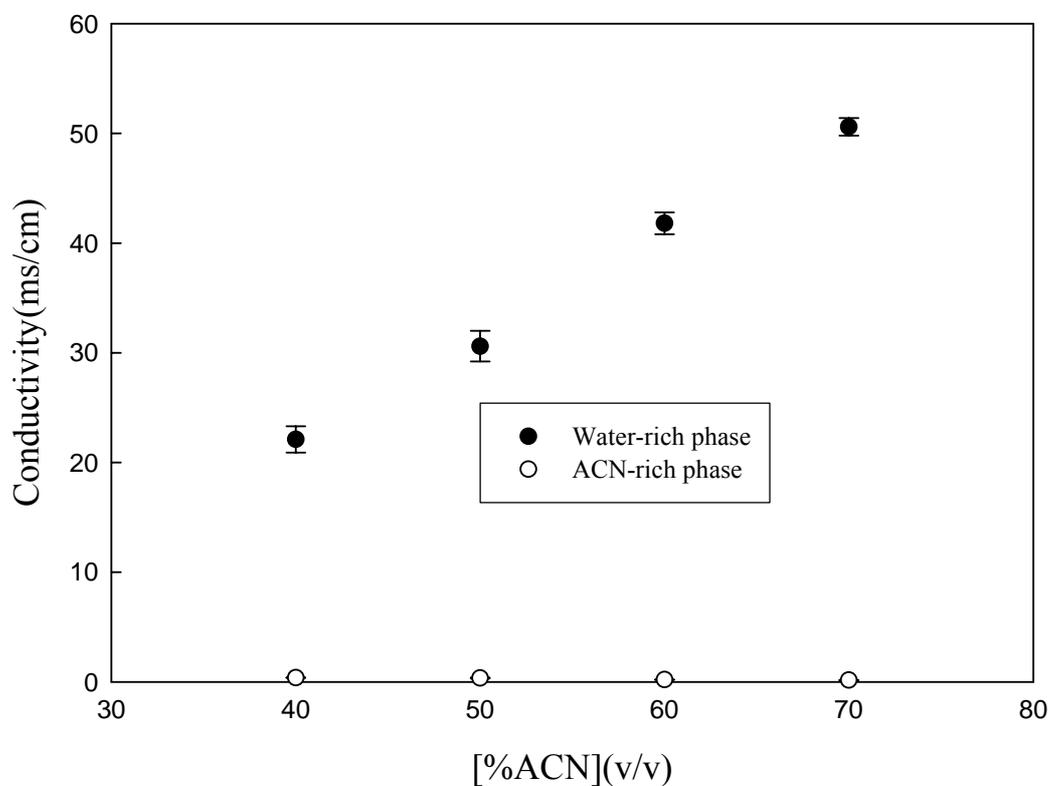


圖 4.4 乙腈初始濃度對 60%(v/v)乙腈-水系統於 4℃ 產生相分層後，上層乙腈相與下層水相之電導度(conductivity)的影響。[K₂HPO₄]=241mM。

表 4.8 乙腈初始濃度對 60%(v/v)乙腈-水系統於 4℃ 產生相分層後，上層乙相與下層水相之電導度(conductivity)的影響。([K₂HPO₄]=241mM)

[%ACN](v/v)	Water-rich phase (ms/cm)	ACN-rich phase (μ s/cm)
40	22.1	0.384
50	30.6	0.352
60	41.8	0.206
70	50.6	0.155

4-1-4 乙腈-水系統之 pH 值

由先前的結果顯示， K_2HPO_4 相較於先前鹽類，對於 ACN-Water 系統的相分層作用，有較多的貢獻。因為蛋白質分離純化過程中，蛋白質所處的環境，其 pH 值會影響蛋白質的穩定性與活性。故本研究實驗探討 ACN-Water 系統經由 K_2HPO_4 誘導相分層後，其兩相中的 pH 值。由圖 4-5 顯示，60%(v/v) ACN-Water 系統於 $4^\circ C$ 環境下，經由 K_2HPO_4 誘導產生相分層後，下層水相為富含鹽類的溶液，其 pH 值約為 9.4。而由圖 4-6 顯示，相同系統之下層相 pH 值不會受乙腈始濃度的影響。



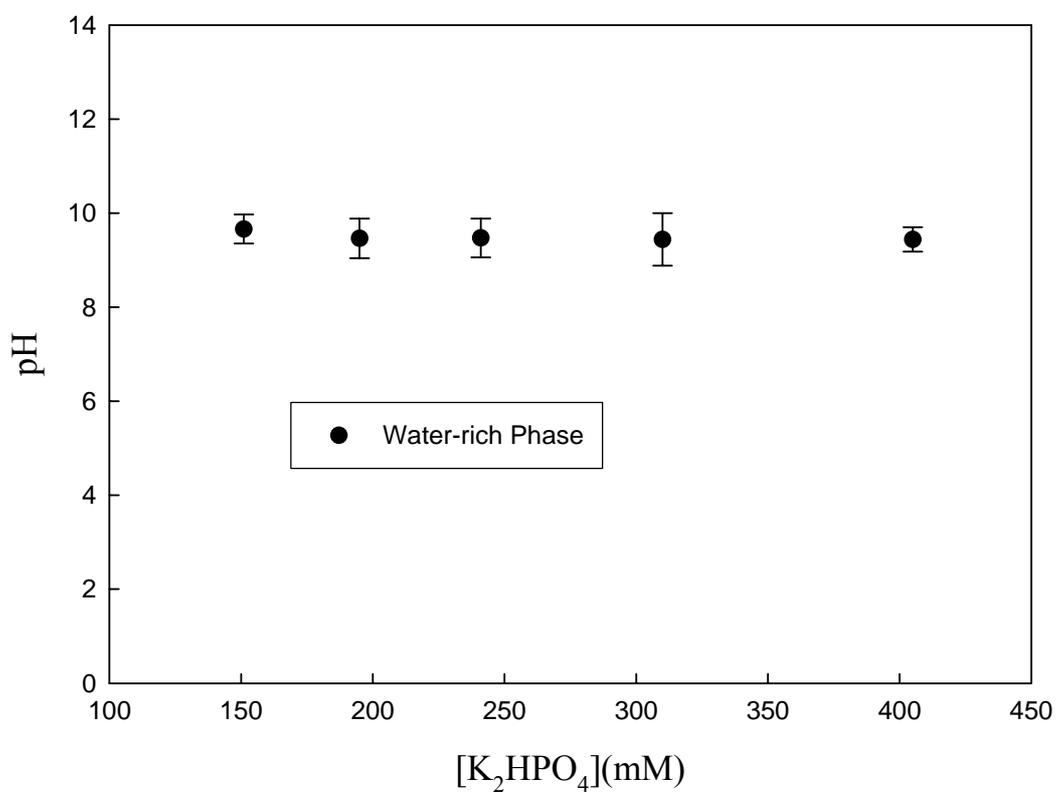


圖 4.5 60%(v/v)乙腈-水系統經由 K_2HPO_4 誘導產生相分層後，下層水相之 pH 值。



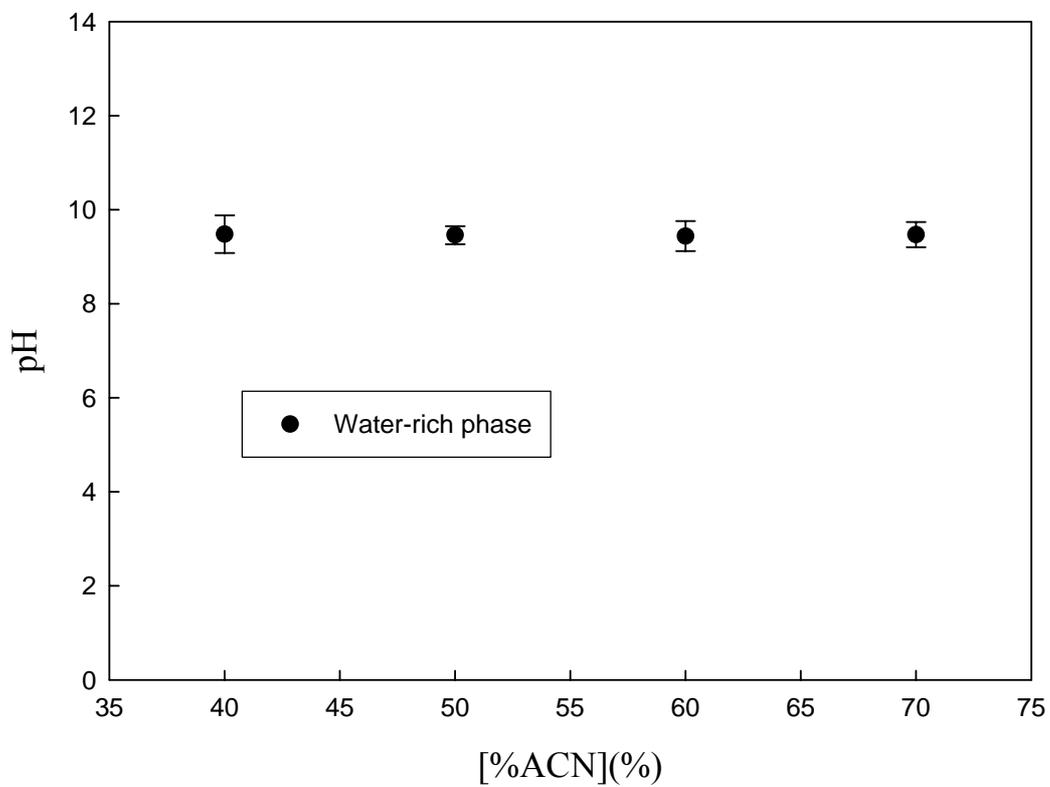


圖 4.6 乙腈初始濃度與 60%(v/v) 乙腈-水系統之下層相 pH 值的關係。系統相分層於 4 下， $[K_2HPO_4]=241mM$ 。

4-2 溫度對相分層的影響

在影響相分層的因素中，除了藉由鹽類誘導的方式之外，溫度冷卻效應(cooling effect)亦是另一項影響相分層的重要因素。先前有研究報告顯示出在 ACN-Water 系統中當環境溫度介於 $-1.32^{\circ}\text{C}\sim-18.6^{\circ}\text{C}$ ， X_{ACN} 在 0.134 至 0.738 範圍內時，均會有相分離的產生[Pence and Gu, 1996]。而在本研究實驗觀察發現，除了 NaCl 以外，其他鹽類如 K_2HPO_4 ，亦可產生相同的情況。但 ACN-Water 系統有時會由於低溫的環境(如 -17°C)，產生結冰現象，而且重複融化的過程亦會影響蛋白質的活性。故在本研究中除了利用鹽類的添加外，實驗中藉由提高一些溫度(如 $4^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$)，探討溫度和 ACN-Water 系統相分層的關係。實驗結果顯示，利用添加鹽類的方式，除了可誘使 ACN-Water 系統於零度環境以上(如 $4^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$)產生分層外，其相分層效率，可同於或高於其系統不加鹽類僅以低溫環境(如 -17°C)的方式所產生的相分層效率，且達到相同的蛋白質濃縮效果，從而降低因制冷所需的能耗，或縮短達到兩相相分層的時間。

由圖 4-7 顯示，在添加三個固定濃度的鹽類，依序為 $X_{\text{salts}}=0.002(74\text{mM})$ 、 $0.004(146\text{mM})$ 和 $0.006(220\text{mM})$ 的 K_2HPO_4 和 NaCl 之下，溫度對促使 ACN-Water 系統產生相分層的影響。首先，對於 K_2HPO_4 而言，當 $[\text{K}_2\text{HPO}_4]=74\text{mM}(X_{\text{K}_2\text{HPO}_4}=0.002)$ ，50 % (v/v)ACN-Water 系統的相分層，不會很明顯地受溫度從 -20°C 提高至

10 的改變所影響，其相分層效率介於 0.42~0.57，但在 25°C 下，系統無相分層產生。其次，在相同情況下對於 NaCl 而言，相分層效率則大大地受溫度從 -20°C 提高至 2°C 的影響，其相分層率效從 -20°C 的 0.5 劇烈地減少至 2°C 的 0.1，同時在 4°C 以上時，系統無相分層產生。相同的實驗結果亦出現 K₂HPO₄ 和 NaCl 濃度為 149mM 和 220mM 之情況($X_{K_2HPO_4}=0.004$ 和 0.006)，如圖 4-7 所顯示。

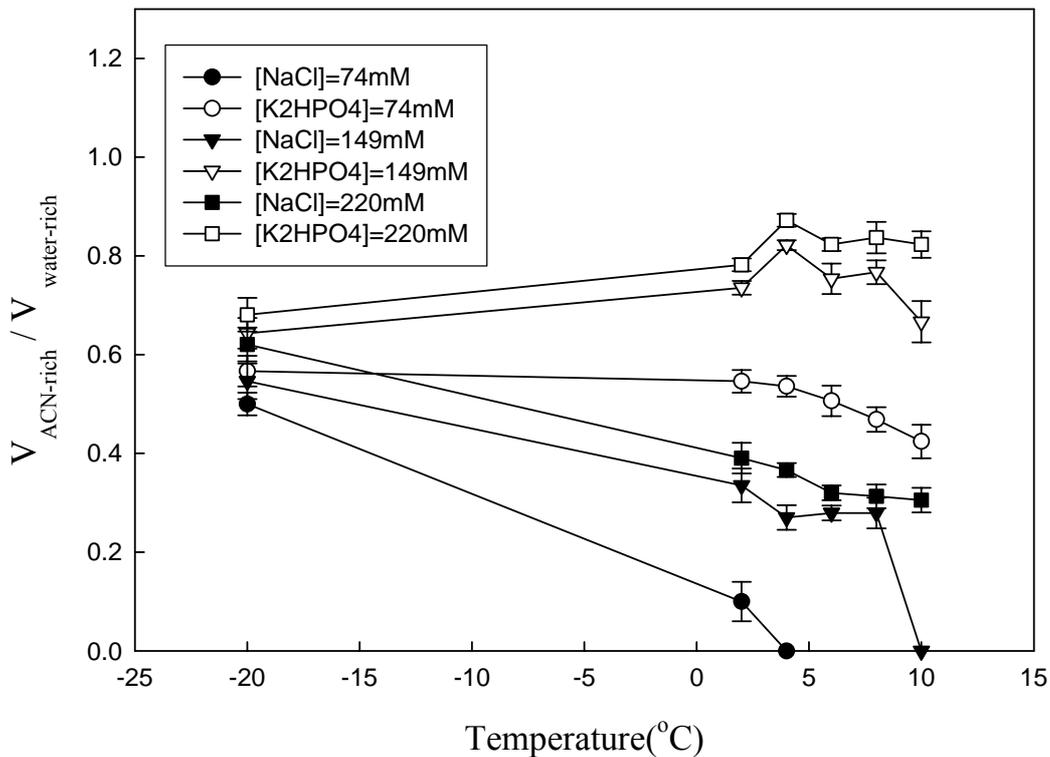


圖 4.7 溫度對誘導乙腈-水系統產生相分層之影響。鹽類分別為 K₂HPO₄ (●、▼和■)、NaCl (○、◻和◻)，鹽類濃度設定約為 74mM (●與○)、149mM (▼與◻)、220mM (■與◻) 在 50%(v/v)乙腈-水系統中。溫度設定為-20、-10、0、2、4、6、8、10、12、14、16。

另外一方面，圖 4-8~4-13 亦表示溫度對 50%(v/v)ACN-Water 系統相分層之影響。圖 4-8 顯示在 -20°C 下，NaCl 之添加， $[\text{NaCl}]$ 從 38mM 到增加到 491mM(或 X_{NaCl} : 0.001 至 0.013)並未對系統之相分層效率，產生明顯的效果($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$: 0.5 至 0.58)，但在零度環境以上($2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$)時，相分層則明顯地受 NaCl 的濃度所影響，添加 NaCl 愈多， $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 愈大；同時，溫度愈高，欲使系統達到相同的相分層效率，則需要添加愈多的 NaCl。然而， K_2HPO_4 鹽類的實驗結果卻是不同於 NaCl，如圖 4-9 顯示， K_2HPO_4 的添加， $[\text{K}_2\text{HPO}_4]$ 從 36mM 到增加到 480mM(或 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4}$: 0.001 至 0.013)，對 ACN-Water 系統於 -20°C 下相分層產生的作用，相較於 NaCl，具有更加強的效果，其相分層效率從 0.51 至 0.75。而系統在零度環境以上($2^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$)時，系統之相分層亦明顯地受 K_2HPO_4 的濃度增加而增加。

而本研究發現一有趣的現象是，當 $[\text{K}_2\text{HPO}_4] < 109\text{mM}$ (或 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4} < 0.003$)時，50%(v/v)ACN-water 系統在 -20°C 下的相分層效率(或分層後之乙腈相體積)，大於系統在 0°C 以上所形成的；而當 $[\text{K}_2\text{HPO}_4] > 109\text{mM}$ (或 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4} > 0.003$)，則是相反的結果，即系統在 0°C 以上($2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$)的相分層效率大於系統在 -20°C 下造成的。造成此現象的原因，初步認為是由於 K_2HPO_4 鹽類在不同溫度下之溶解度不同所致，因而在 0°C 上下不同的溫度環境中，導致 K_2HPO_4 鹽類對 ACN-water 系統之相分層有貢獻度不同的結果。若假設相分層作用是同時由鹽類誘導和低溫效應兩個機制一起所貢獻的。在低

鹽濃度下，溶解度不會因降低溫度而有明顯的減少，則鹽類誘導和低溫效應兩個相分層機制具有相乘的效果；相反地，在高鹽濃度情形下，溶解度會在低溫下大大減少，減低鹽類對相分層作的誘導作用，自然而然，相分層效率會出現反比的關係。

同時，由圖 4.10~圖 4.13 顯示其他鹽類（ KH_2PO_4 、磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)、 KCl 和 NH_4HCO_3 ）的濃度與系統溫度對 ACN-Water 系統產生相分層之影響。其中磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)（圖 4.11）對於鹽類誘導相分層機制(salt-induced separation)中，就系統於 -20°C 下與 0°C 以上($2^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$)造成相分離後之相分層效率或乙腈相體積而言，在不同溫度和鹽濃度下，是以較不規則呈現，類似於上述之 K_2HPO_4 作之分層行為。而 NaCl （圖 4.8）、 KCl （圖 4.12）和 NH_4HCO_3 （圖 4.13）等則是相反的作用。

但是，由圖 4.9~圖 4.11 和附錄的表 A.7、A.9 和 A.12 卻發現，當溫度上升至 25°C ，利用 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)誘導 50%(v/v)ACN-Water 系統產生相分離中，其效率，明顯不同於在 $2^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 下所產生的相分層效率。以 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4}=0.006$ (或 220mM)而言， 25°C 下系統的 $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值(1.03)，高於在 4 下的系統的 $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值(0.87)，亦明顯高於在 -20°C 下系統的 $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值(0.68)。相反地， NaCl 、 KCl 和 NH_4HCO_3 則不會有此現象，基本上是相分層效率是隨著溫度下降而漸漸增加的，這與高低溫環境關

係，定義為「正相關」，即相分層效率隨著溫度降低而增加。而 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)等鹽類在低鹽濃度與高鹽濃度，在溫度高與溫度低之環境下的相分層情況是不一致的，將之定義為「負相關」。即相分層效率與溫度之關係並非為溫度愈低，則相分層效率愈佳。

因此，可藉由圖 4-8~圖 4-13 更進一步推論，基本上，藉由添加鹽類方式誘導 ACN-water 系統產生相分層之機制，系統於零度環境以上之相分層效率，優於零度環境以下的。此結果意味著冷卻效應 (cooling process) 和添加不同鹽類之誘導作用 (salt-inducing process)，對於 ACN-Water 系統相分層作用，乃是基於不同之分層機制。此外，對於促使系統產生相分層較好的鹽類，如 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)等鹽類，相分層效率雖隨著溫度由 0°C 增加到 25°C 而增加，但基於大部份之蛋白質純化均於低溫環境下（如 4°C ）進行，故仍建議 ACN-Water 系統於 4°C 之環境是較佳的相分層溫度。

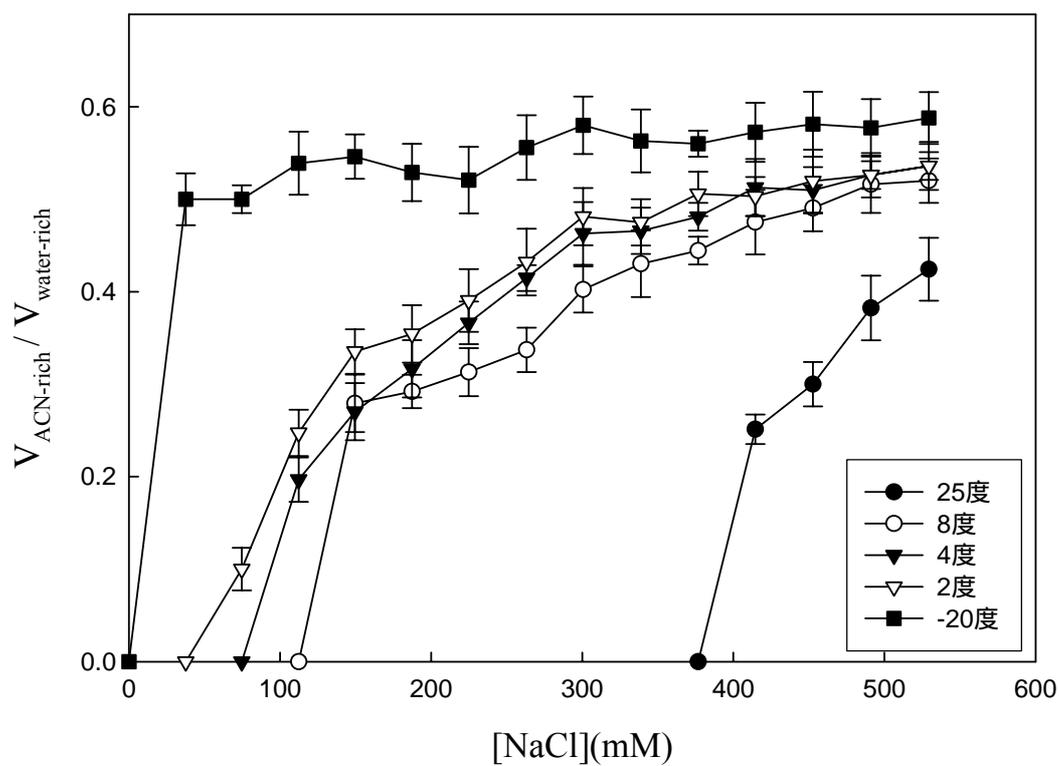


圖 4.8 NaCl 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影響。X_{ACN}≈0.25，相當於 50%(v/v)ACN-Water 系統。

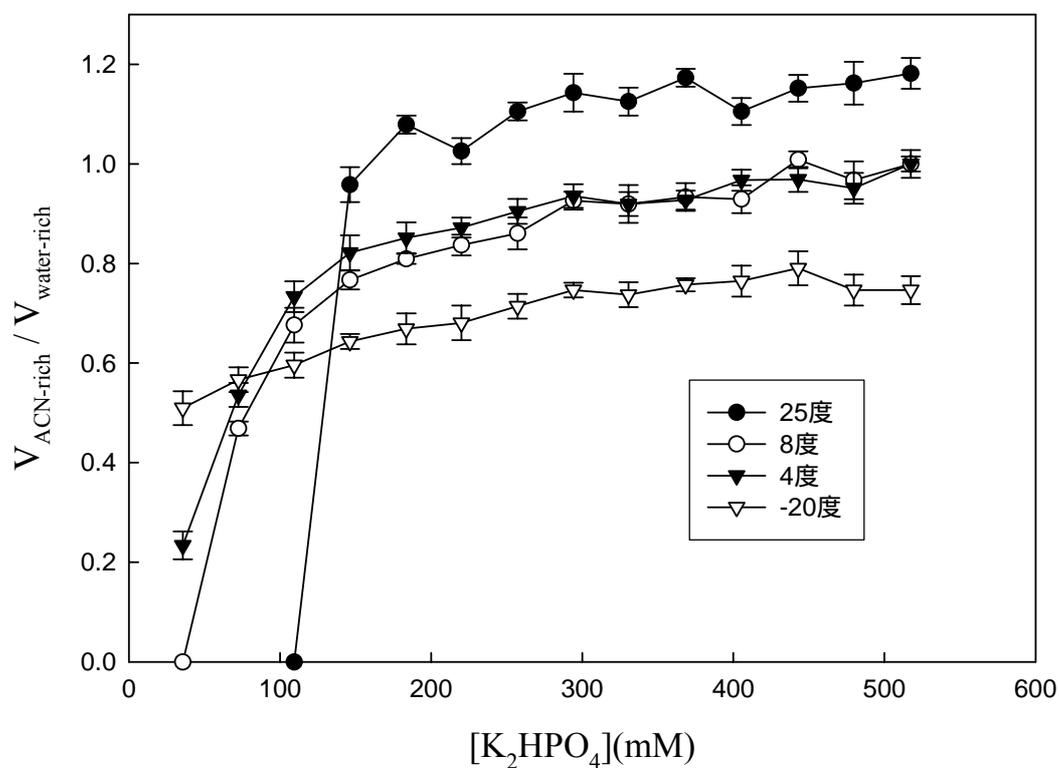


圖 4.9 K_2HPO_4 鹽類濃度和溫度對乙腈-冰系統產生相分層之影響。
 $X_{\text{ACN}} \approx 0.25$ (相當於 50% (v/v) ACN-Water 系統)。

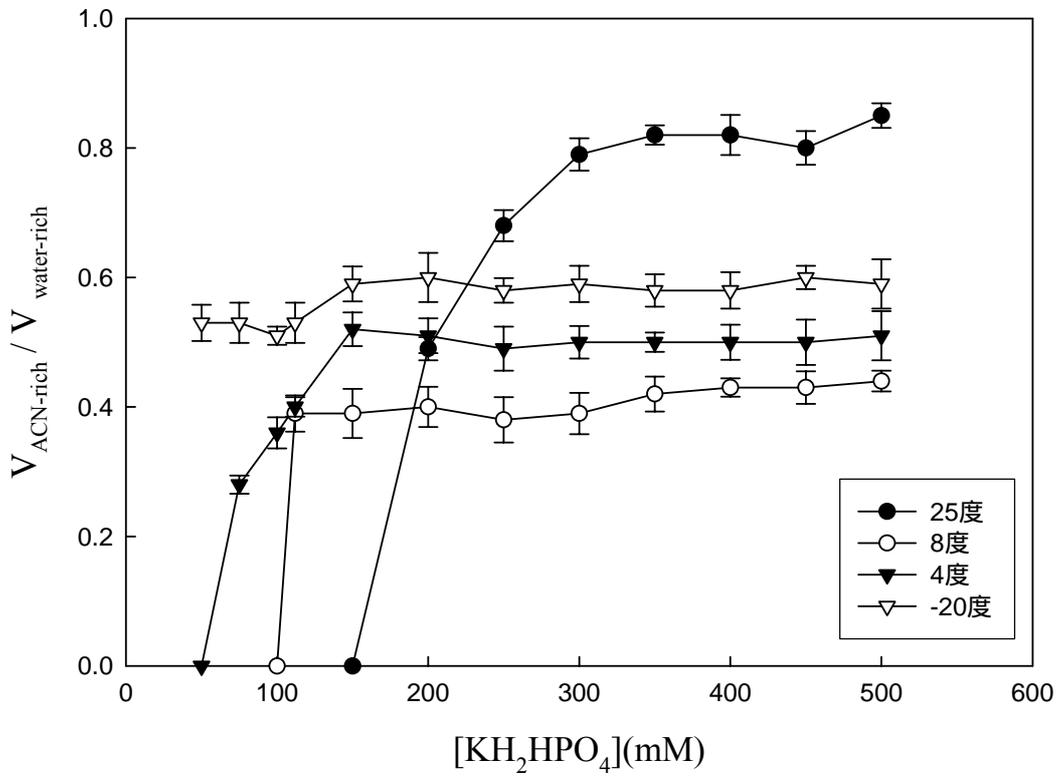


圖 4.10 KH₂PO₄ 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影響。
 $X_{ACN} \approx 0.25$ (相當於 50% (v/v) ACN-Water 系統)。

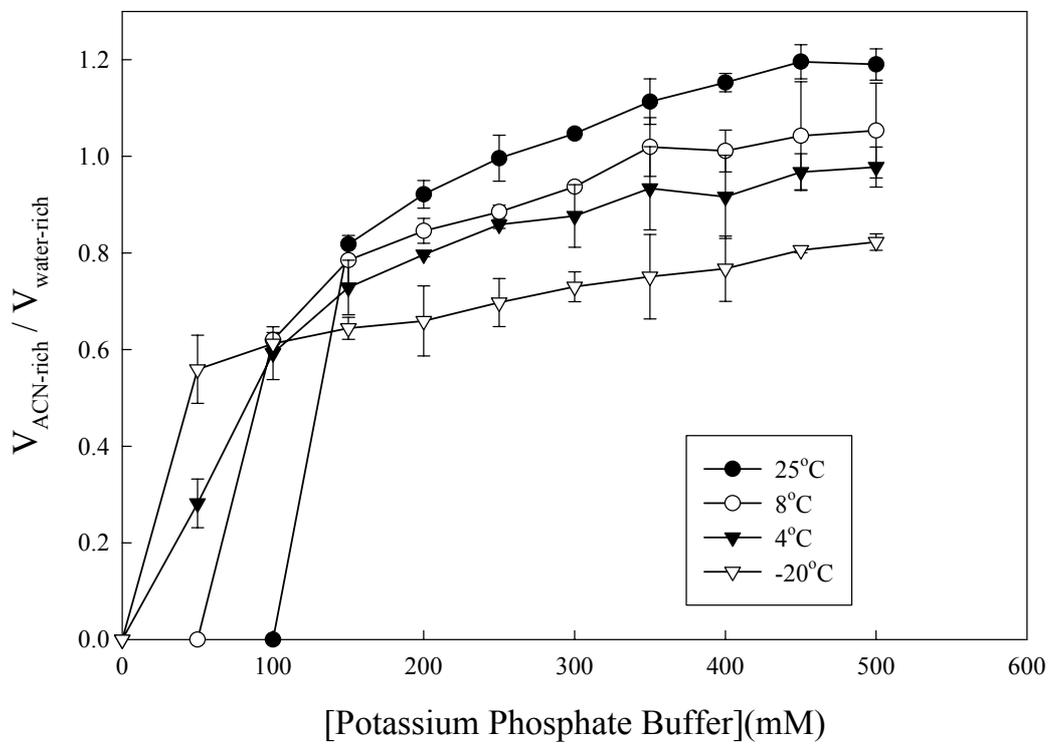


圖 4.11 磷酸鉀緩衝液 (Potassium Phosphate Buffer pH=7.0) 濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影響。X_{ACN}≈0.25(相當於 50%(v/v)ACN-Water mixture)。

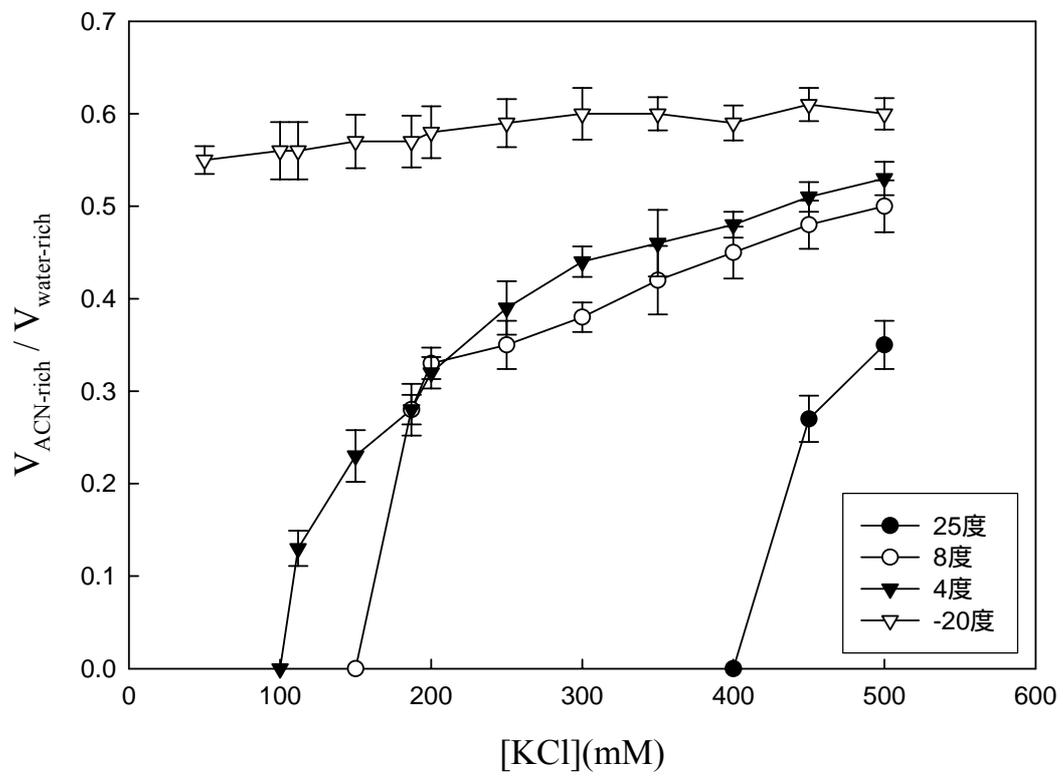


圖 4.12 KCl 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影響。
 $X_{ACN} \approx 0.25$ (相當於 50% (v/v) ACN-Water mixture)。

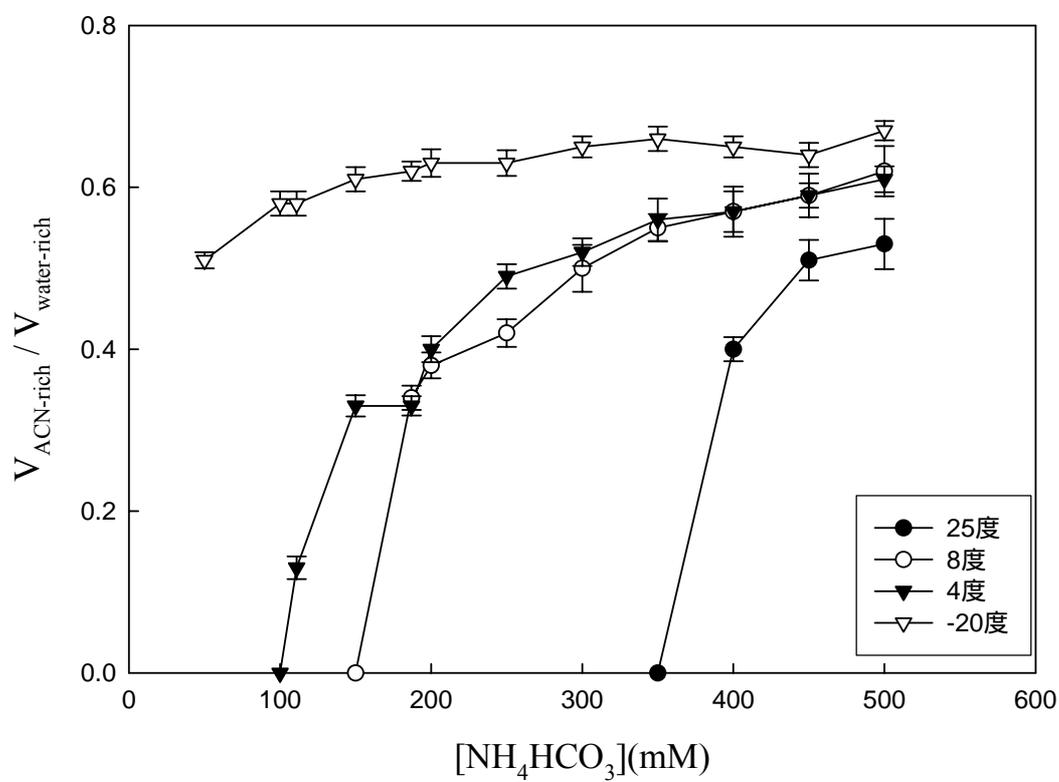


圖 4.13 NH_4HCO_3 鹽類濃度和溫度對乙腈-水系統產生相分層之影響。
 $X_{\text{ACN}} \approx 0.25$ (相當於 50% (v/v) ACN-Water mixture)。

4-3 不同初始乙腈濃度之相分層

先前已有研究報告指出，相分層後之上層乙腈相體積會隨著初始乙腈濃度增加而增加[Pence and Gu, 1996]。同時初始乙腈濃度愈高，則須添加愈少鹽類(如 NaCl)即可誘導系統相分層的產生。在本研究將更進一步經實驗證實，ACN-Water 系統之相分層在添加鹽類之作用下，上下層之體積比(V_{up}/V_{low})會隨著乙腈初始濃度增加而增加。而本研究中，如表 4-9~表 4-11 所顯示，藉由 K_2HPO_4 、NaCl 和 NH_4HCO_3 的添加下($[salts]=150mM$)，系統在任何溫度下之相分層效率亦隨著乙腈初始濃度增加而增加。

表 4.9 不同 ACN 初始濃度在 $[NaCl]=150mM$ 及不同溫度下的相分層效率。

$X_{ACN}(\times 10)$	$[ACN]\%(v/v)$	Temperature($^{\circ}C$)					
		25	10	8	6	4	2
		Phase efficiency(V_{up}/V_{low})					
0	0	-	-	-	-	-	-
0.37	10	-	-	-	-	-	-
0.79	20	-	-	-	-	-	-
1.3	30	-	-	-	-	-	-
1.8	40	-	-	-	-	-	-
2.5	50	-	-	0.30	0.30	0.30	0.31
3.4	60	-	-	0.98	0.98	0.98	1.00
4.4	70	-	3.03	2.41	2.41	2.41	2.41
5.7	80	11.00	7.50	5.61	5.61	5.61	5.56
7.5	90	22.40	22.40	18.17	17.25	17.25	18.17

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

X_{ACN} :代表 ACN 在系統中的莫耳分率

$[ACN]$:代表 ACN 在系統中之體積比(%)

表 4.10 不同 ACN 初始濃度在 $[K_2HPO_4]=150mM$ 及不同溫度下的相分層效率

$X_{ACN}(\times 10)$	[ACN]%(v/v)	Temperature($^{\circ}C$)					
		25	10	8	6	4	2
		Phase efficiency(V_{up}/V_{low})					
0	0	-	-	-	-	-	-
0.37	10	-	-	-	-	-	-
0.79	20	-	-	-	-	-	-
1.3	30	-	-	-	-	-	-
1.8	40	-	-	0.17	0.17	0.17	0.19
2.5	50	1.58	-	0.69	0.68	0.68	0.72
3.4	60	3.21	2.44	1.51	1.51	1.51	1.52
4.4	70	6.67	5.39	3.38	3.96	3.38	3.38
5.7	80	11.78	10.50	7.44	7.44	7.44	7.77
7.5	90	28.00	22.20	24.56	24.56	24.56	27.75

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 4.11 不同 ACN 初始濃度在 $[NH_4HCO_3]=150mM$ 及不同溫度的相分層效率

$X_{ACN}(\times 10)$	[ACN]%(v/v)	Temperature($^{\circ}C$)					
		25	10	8	6	4	2
		Phase efficiency(V_{up}/V_{low})					
0	0	-	-	-	-	-	-
0.37	10	-	-	-	-	-	-
0.79	20	-	-	-	-	-	-
1.3	30	-	-	-	-	-	-
1.8	40	-	-	-	-	-	-
2.5	50	-	-	0.31	0.31	0.31	0.29
3.4	60	-	-	1.05	1.05	1.05	1.05
4.4	70	11.78	2.83	2.54	2.54	2.54	2.59
5.7	80	18.17	10.40	7.07	6.79	6.79	5.05

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

此外，如圖 4.14 所表示，在 X_{ACN} 為 0.18 至 0.75 之範圍內， K_2HPO_4 比 NaCl 和 NH_4HCO_3 顯示出對系統相分層有較多的誘導作用。而相分層在由鹽類誘導和低溫效應的比較，如圖 4.15，當 $X_{ACN} < 0.6$ ，系統於 $-20^\circ C$ 下所產生之相分層效率，僅僅些許優於系統於 $4^\circ C$ 經由 NaCl 鹽類添加下 ($[NaCl]=150mM$) 所產生之相分層；然而卻明顯劣於系統在 $4^\circ C$ 下經由 K_2HPO_4 添加下 ($[K_2HPO_4]=150mM$) 所產生之相分層。相反地，當 $X_{ACN} > 0.6$ ，系統單單在 $-20^\circ C$ 下不加鹽類所產生之相分層效率，均是優於系統經由 NaCl 和 K_2HPO_4 鹽類之添加，於 $4^\circ C$ 下產生之相分層效率。而以上之實驗結果，更進一步反映出，冷卻作用 (cooling process) 和添加鹽類 (salts-induced)，對於 ACN-Water 系統相分層的誘導作用，乃是基於不同之機制。而在蛋白質純化過程中，經 RP-HPLC 沖提出之蛋白質溶液，一般乙腈濃度大約在 40%-60% (v/v)，即 $X_{ACN} < 0.6$ ，因此根據我們的實驗結果， K_2HPO_4 相較於其他鹽類如 KH_2PO_4 、 NH_4HCO_3 、NaCl 和 KCl 是較適合於實際蛋白質純化應用之鹽類。

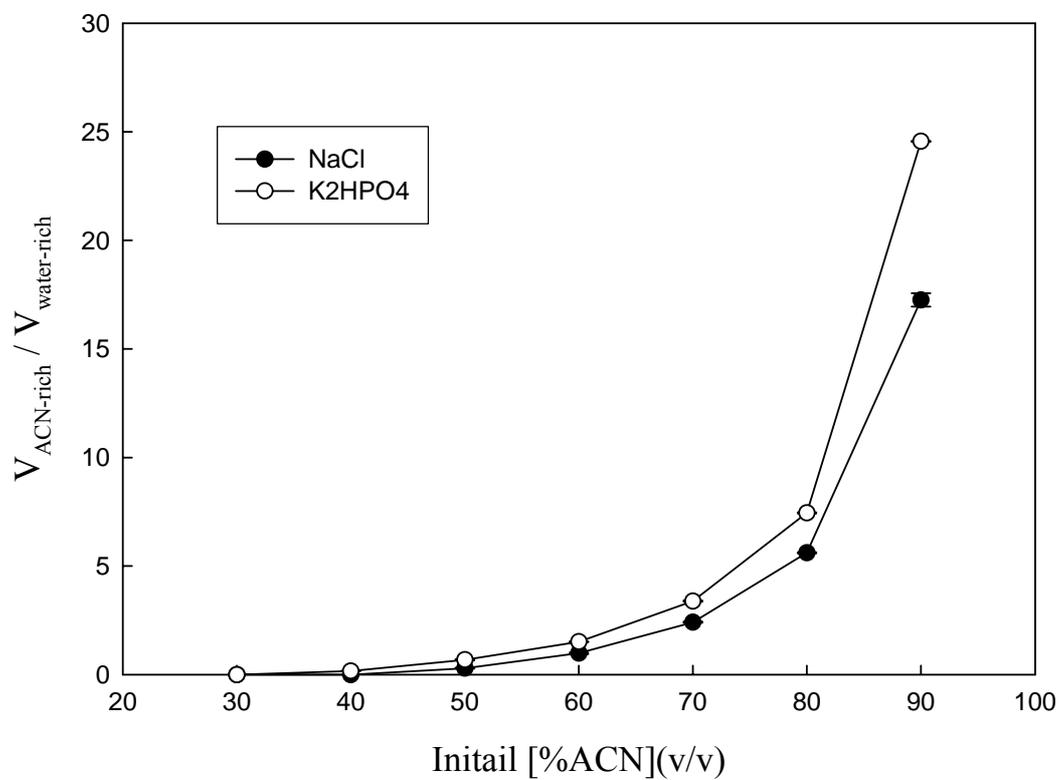


圖 4.14 乙腈初始濃度對乙腈-水系統產生相分層之影響。相分層分別由鹽類所誘導產生，包括 150mM NaCl (●) 和 K₂HPO₄ (○) 在 4 環境下。

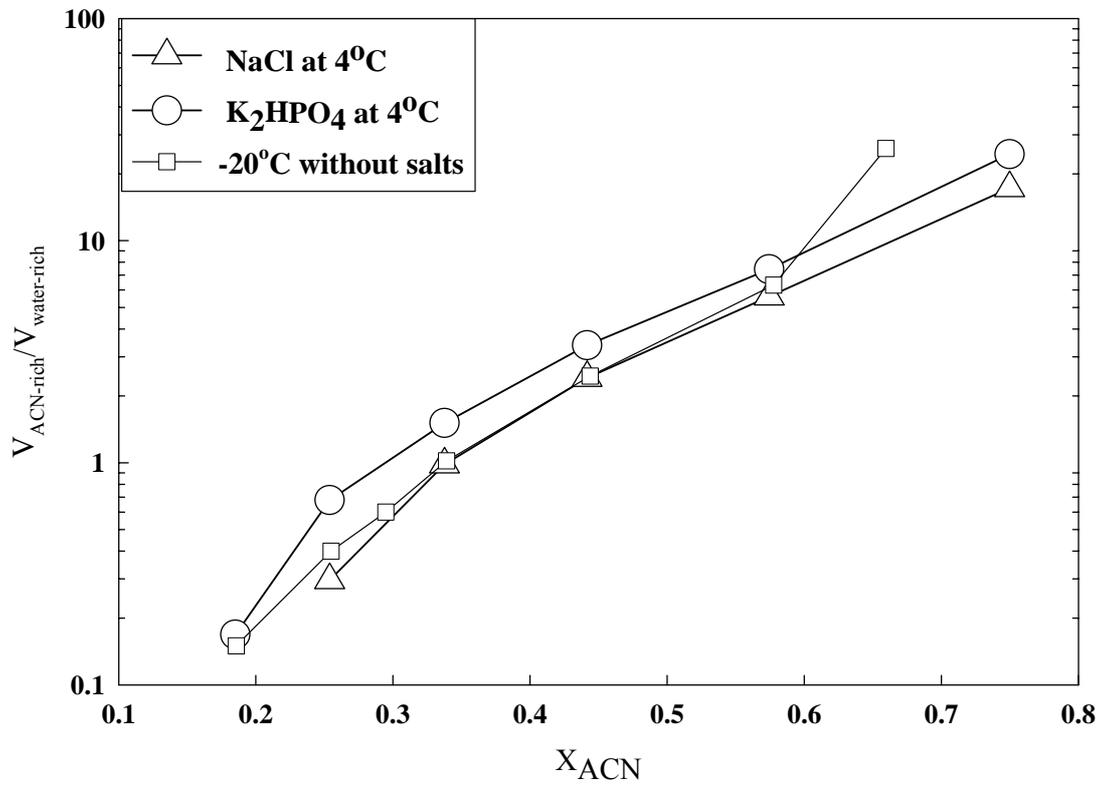


圖 4.15 乙腈初始濃度對乙腈-水系統產生相分層之影響²。相分層分別由鹽類所誘導產生，包括 150mM NaCl (△) 和 K₂HPO₄ (○) 在 4 °C，以及低溫誘導不添加鹽類之機制(□)在 -20 °C。

4-4 蛋白質於乙腈-水系統之分配情形

為了將鹽類誘導 ACN-water 系統產生相分層作用之分離方法，應用於蛋白質分離純化上，並達到最佳化程序。本研究中藉由蛋白質添加於 ACN-water 系統中，系統經鹽類添加產生相分層後，蛋白質在兩相間透過此相分離機制而有不同的分佈情形，再由蛋白質濃度分析法測得蛋白質於兩相間的濃度，進而可得知蛋白質透過相分層機制之回收比率。實驗結果發現，如圖 4.16 所顯示數種蛋白質和 poly-peptide，包括 BSA、Myoglobin 和 poly-(L)-Arginine 等，添加至 60% (v/v) ACN-Water 系統中，透過低濃度 K_2HPO_4 ($X_{K_2HPO_4}=0.0035$ 或 150mM) 之誘導使系統產生相分層後，傾向於親水性之蛋白質，如 BSA、Myoglobin 和 poly-Arginine，大部份可分配於下層-水相中，且回收比例均可超過 90% 以上。而失去的蛋白質乃由於本身部分之疏水性殘基 (hydrophobic residues)，可能聚集於 ACN-Water 系統之兩相界面間。故由於實驗進行中以微量吸取管分開兩相，故難免造成實驗上少量之誤差，因而造成蛋白質之損失。另外，由圖 4.17 顯示，屬疏水性且難溶於水之 poly-leucine，於同樣情況下系統形成相分層後，則會選擇分佈於上層之乙腈相中。故本研究之相分層方法，初步可歸納，親水性較強之蛋白質或 poly-peptide，經相分層後會分配於水相；而疏水性較強的蛋白質則會選擇分配於上層乙腈相中。而考慮相分層作用除了作為純化蛋白

質之功用外，去除乙腈有機溶劑亦是主要的目的。故本研究之鹽類誘導相分層之方法，較適用於親水性較強之蛋白質。

雖然由圖 4.16 中亦可看出，BSA 和 Myoglobin 隨著鹽類濃度增加，而有更多蛋白質聚集於下層-水相，使蛋白質溶液進一步提高濃縮之目的。但居於蛋白質於低鹽濃度下，其穩定性較佳之考量下，鹽類濃度應選擇於 100~300 mM 範圍中較適當。

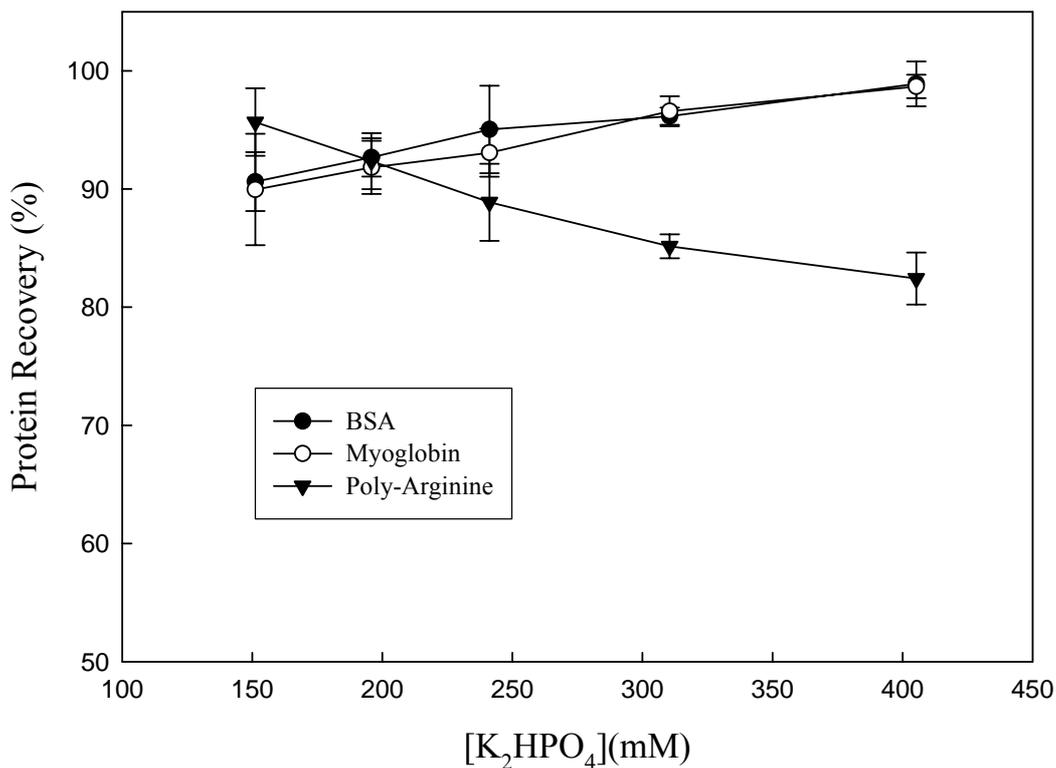


圖 4.16 K₂HPO₄ 鹽類對親水性蛋白質和 peptide 回收率之影響。蛋白質分別為 BSA(●)、Myoglobin(○)和 Poly-Arginine(▼)在 60%(v/v)ACN-Water 系統，於 4 環境下分佈於水相之情形。

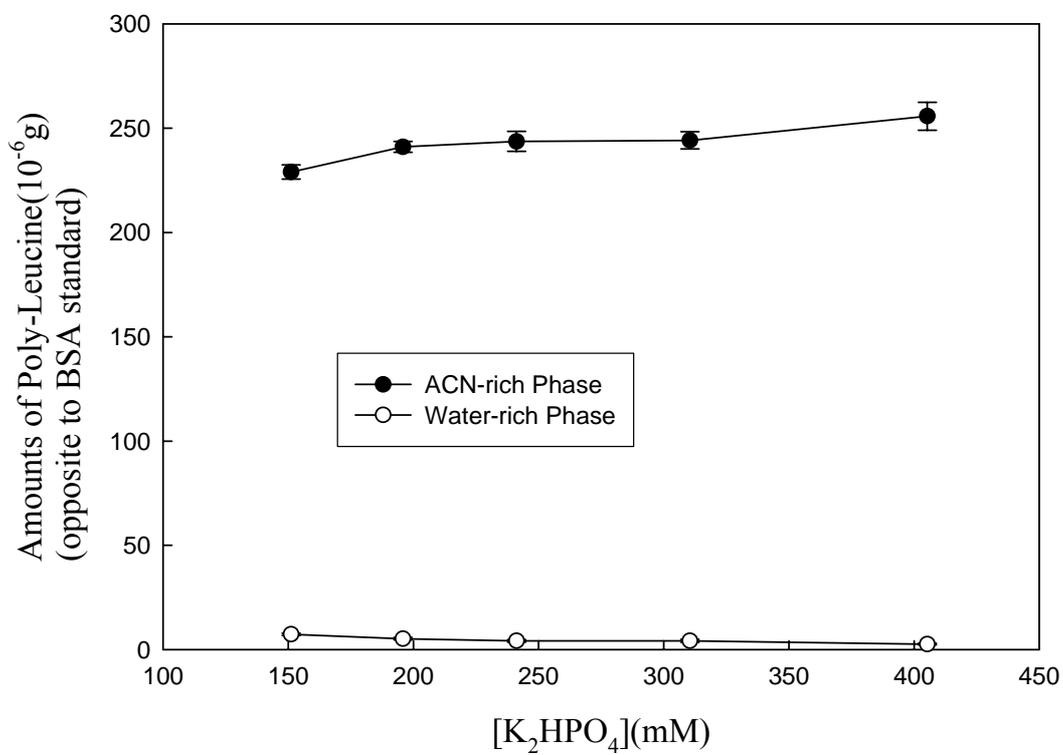


圖 4.17 K_2HPO_4 鹽類對疏水性 peptide 於系統中分配情形之影響。peptide 為 Poly-Leucine 分別於乙腈相 (●) 及水相 (○) 在 60% (v/v) ACN-Water 系統，於 4 環境下分佈水相之情形。

4-5 時間對蛋白質回收之影響

圖 4.18 顯示出時間效應對蛋白質回收率影響，實驗結果顯示，在 60% (V/V) 乙腈-水體系、218mM 濃度之 K_2HPO_4 、4°C 環境之下，BSA 蛋白質可於 5 小時相平衡之後，將達到我們所需之回收比例（約超過 95%）。

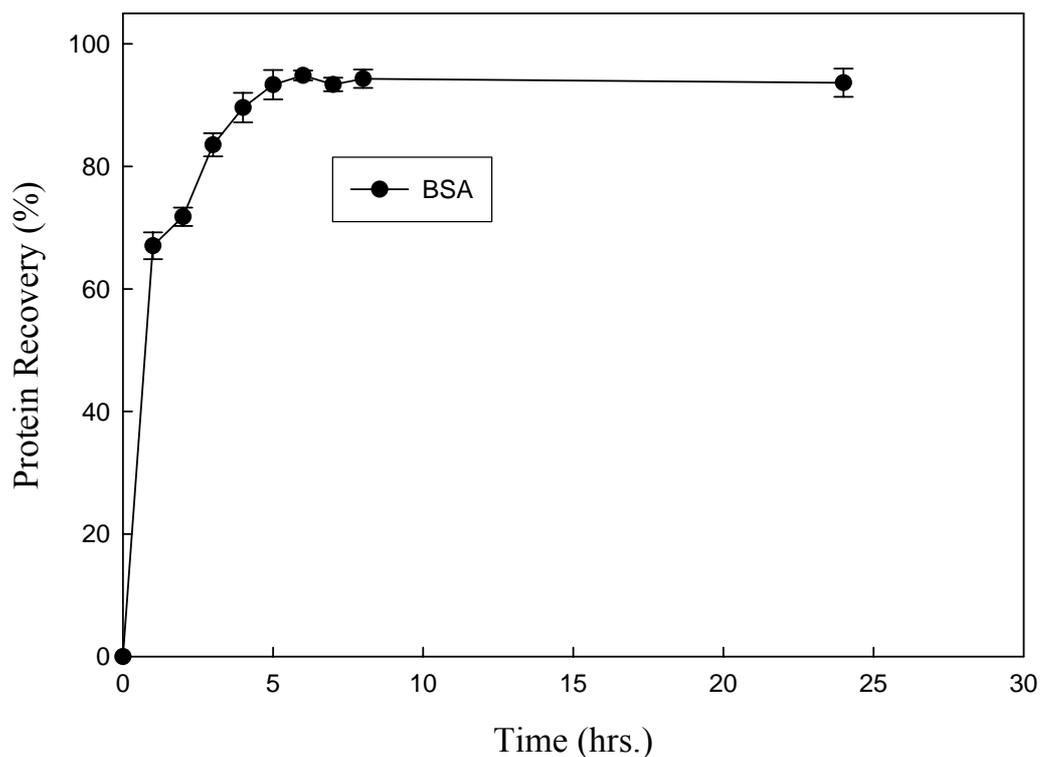


圖 4.18 時間效應對蛋白質回收比例之影響。系統為約 170mM 之 K_2HPO_4 ，60% (v/v) 乙腈-水系統，蛋白質為 200 μ g/ml 之 BSA，於 4°C 環境下。

4-6 磷酸鉀緩衝液應用於乙腈-水系統之相分層

由以上結果顯示，相較於其他鹽類包括 KH_2PO_4 、 NH_4HCO_3 、 NaCl 和 KCl 等， K_2HPO_4 雖然可以有效地誘導 50%(v/v)ACN-Water 系統產生相分層(在 $[\text{K}_2\text{HPO}_4]=257\text{mM}$ 時， $V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$ 比值即可達到 0.9)，或在去除有機溶劑上， K_2HPO_4 一方面比 NaCl 可去除較多的乙腈；另一方面，當 $X_{\text{K}_2\text{HPO}_4} > 0.003$ ，所造成之乙腈移除效率，亦優於利用在 -20°C 之冷卻作用 (cooling process) 所造成的。而且利用添加 K_2HPO_4 對系統產生相分層作用後之蛋白質回收率亦已可達 90%。但是， K_2HPO_4 也會造成蛋白質所在溶液的 pH 值明顯地增加，分層後下層-水相之 pH 值平均約為 9.4，此過高的 pH 值對於蛋白質之穩定而言並不是最佳的環境。因此，本研究進一步利用磷酸鉀緩衝液(Potassium Phosphate Buffer(pH=7.0))替代 K_2HPO_4 鹽類，期望藉由緩衝液之特性，對蛋白質穩定性和活性提供一較佳的作用。實驗結果如預期，藉由磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)誘導 50%(v/v)ACN-Water 系統產生相分層後下層-水相溶液之 pH 值，即可維持在 7.4。此外，TFA 為 RP-HPLC 純化蛋白質時，移動相中常見的 modifier 其經常會降低移動相的 pH 值。故蛋白質從 RP-HPLC 沖提出來的溶液通常處於酸性的狀態，而藉由磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)的加入，ACN-Water 系統產生相分層後的蛋白質之 pH 值，同樣會調整至中性 (約為 7.4)，故對蛋白質更有進一步穩定的作用。

在者，在相分層效率方面，由 4.12 和圖 4.19 表表示磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)在 50%(v/v)ACN-Water 系統中 4°C 環境下的相分層效率，介於 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 之間，在 [磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)]=250mM 時， V_{up}/V_{low} 比值亦可達 0.86。此外，實驗結果也證明先前一般鹽類對相分層效率的關係，即 V_{up}/V_{low} 比值在初期時會隨著鹽類的添加大幅的提昇，然後在鹽類濃度高的情況 ($X_{\text{磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)}}=0.066$ (或 250mM)) 時，同於其他鹽類 V_{up}/V_{low} 比值亦趨於平緩。

另外在蛋白質的分配情形方面，由圖 4.20 顯示，蛋白質包括 BSA、Myoglobin 和 Poly-Arginine，在經過磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)的添加使 60% (v/v) ACN-Water 系統於 4°C 環境下產生相分層後，蛋白質於下層-水相之比例亦可達 90%，故磷酸鹽緩衝液對於蛋白質回收，與前前提到的 K_2HPO_4 鹽類一樣，具有蛋白質濃縮效果。

因此在本研究中，包括 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NH_4HCO_3 、NaCl、KCl 和磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)等數種鹽類中，對 ACN-Water 系統相分層而言，磷酸鉀緩衝液(pH=7.0) 是最好的鹽類選擇。一方面可達良好的相分層效率；另一方面系統經磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)誘導相分層後，除了有效去除大部份乙腈有機溶劑外，對於蛋白質經 RP-HPLC 沖提後之溶液，提供一較溫和的環境，其 pH 值可維持在中性，因而對蛋白質之活性有更穩定的作用。

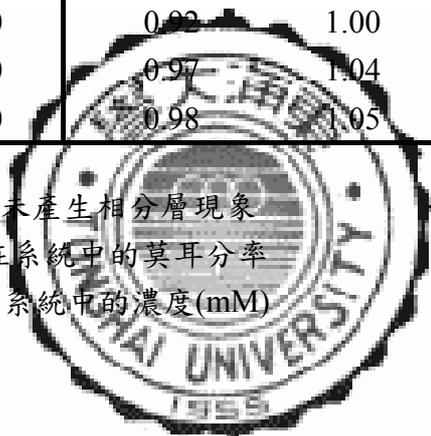
表 4.12 磷酸鹽類在 50%(v/v)乙腈-水系統中 4°C 環境下的相分層效率

$X_{\text{salts}}(\times 10^3)$	C_{salts} (mM)	Phosphate buffer (pH=7.0)	K_2HPO_4	KH_2PO_4
		Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)		
1.3	50	0.28	0.36	-
2.7	100	0.59	0.71	0.36
4.0	150	0.73	0.81	0.52
5.3	200	0.80	0.87	0.51
6.7	250	0.86	0.90	0.49
8.0	300	0.88	0.95	0.50
9.3	350	0.93	1.01	0.50
10.6	400	0.92	1.00	0.50
11.9	450	0.97	1.04	0.50
13.2	500	0.98	1.05	0.51

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

X_{salts} : 代表磷酸鉀鹽類在系統中的莫耳分率

C_{salts} : 代表磷酸鉀鹽類在系統中的濃度(mM)



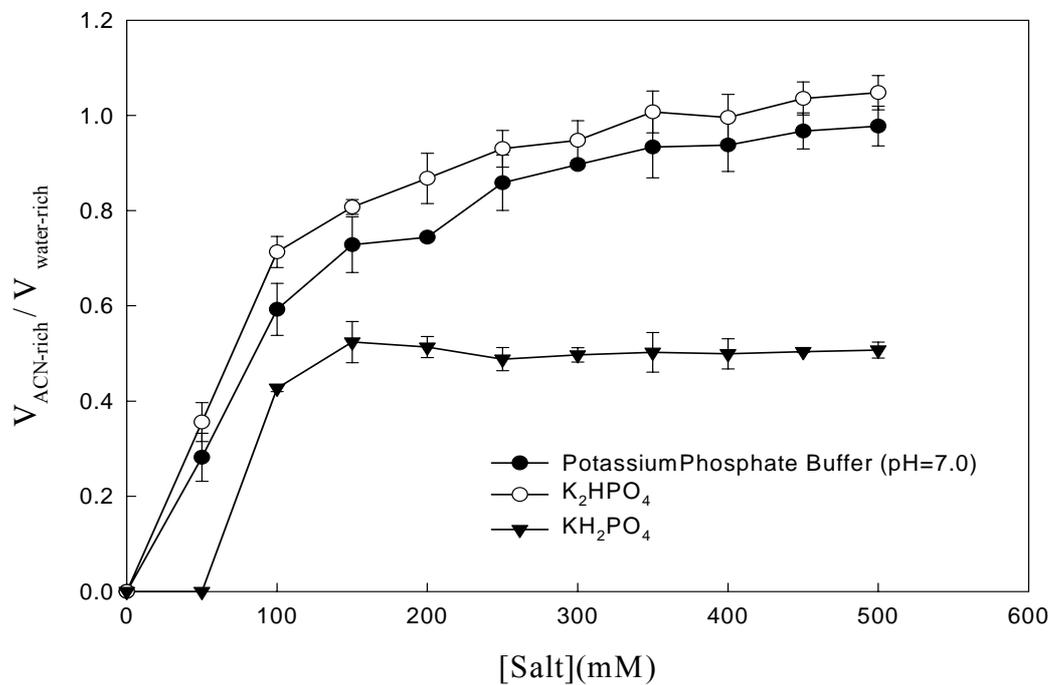


圖 4.19 磷酸鹽類誘導 50%(v/v)乙腈-水系統在 4 °C 環境下產生相分層情形。鹽類包括 Phosphate buffer(pH=7.0)(●)、K₂HPO₄ (○)、KH₂PO₄ (▼)。



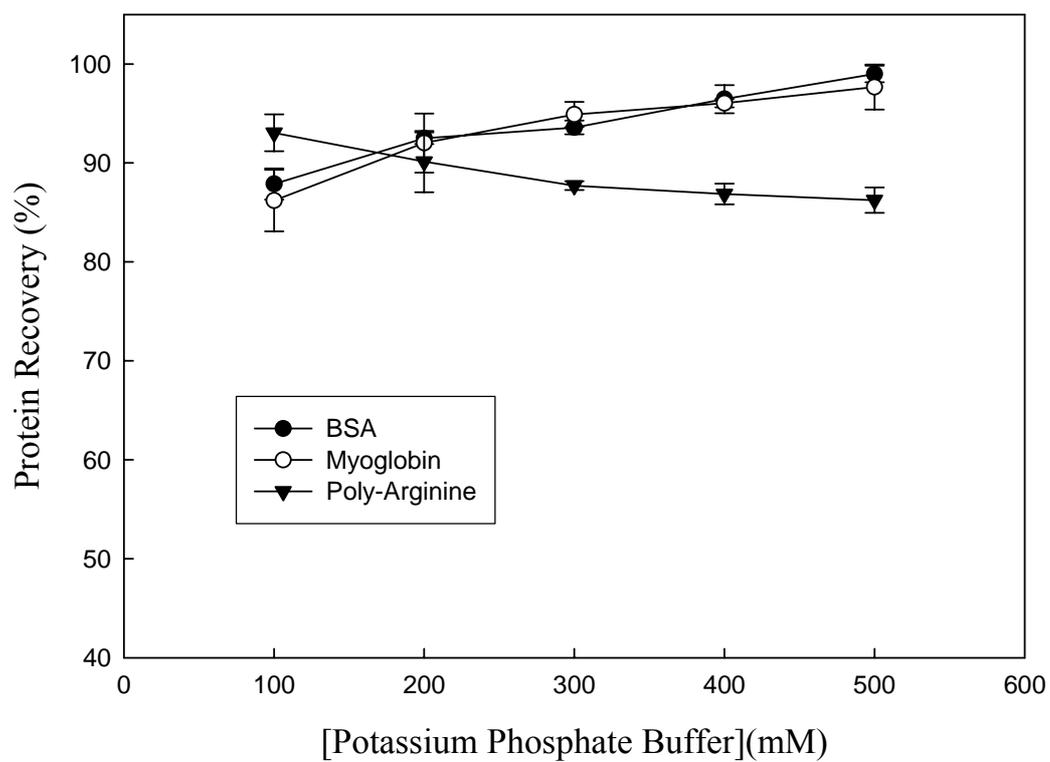


圖 4-20 磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)對蛋白質回收率之影響。蛋白質分別為 BSA (●)、Myoglobin (○) 和 Poly-Arginine (▼) 在 60% (v/v) ACN-Water 系統，於 4 環境下分佈水相之情形。

第五章結論與展望

5-1 結論

在蛋白質純化過程上，由於考慮過高乙腈濃度會對蛋白質或 polypeptides 產生失活等不利影響，蛋白質經 RP-HPLC 沖提後溶液中之乙腈有機溶劑需被移除。本研究利用結合低溫環境 (cooling process) 和鹽類誘導 (salt-induced) 之相分層機制，除了可有效移除大部分乙腈外，亦可達到進一步蛋白質濃縮之目的。本研究之實驗結果可歸納為：

1. 不同鹽類所造成 ACN-water 系統之相分層效率的順序，分別為： $K_2HPO_4 > \text{Potassium Phosphate Buffer (pH=7.0)} > KH_2PO_4 > NH_4HCO_3 \approx NaCl > KCl$
2. 本論文之結果與先前研究比較，透過調整系統所處環境溫度，從 $25^\circ C$ 降低至 $4^\circ C$ ，此可減少鹽類之添加量，使蛋白質更穩定地處於低鹽溶液外，亦可達到相同甚至較佳之相分層效率，如 V_{up}/V_{low} 在 $4^\circ C$ 和 $[NaCl]=110mM$ 時的值相當於 V_{up}/V_{low} 在 $25^\circ C$ 和 $[NaCl]=331mM$ 的值。
3. 磷酸鉀緩衝液 (pH=7.0) 較 K_2HPO_4 可提供蛋白質一較溫和 (pH=7.0) 的環境，使蛋白質之活性不易受到影響。
4. 利用添加鹽類誘導相分離機制可有效去除 50% 以上之乙腈

有機溶劑，其中 K_2HPO_4 為去除乙腈較較多的鹽類。
 $X_{K_2HPO_4}=0.003$ 時(110mM)，乙腈去除率可達 57%。此結果優於先前研究結果，即 50%(v/v)之 ACN-Water 系統在低溫環境下(如-20°C)數小時產生相分層後，可由上層乙腈相中移除掉大約 51%之乙腈。

5. K_2HPO_4 雖然相分離效率會隨著溫度由 0°C~25°C 增加而增加，但基於大部份之蛋白質純化均低於低溫環境下(如 4°C)進行，故本研究仍建議 ACN-Water 系統於 4°C 之相分層可於 4 環境下操作。
6. 在蛋白質添加方面，屬親水性之蛋白質，如 BSA 和 Myoglobin 雖然隨著磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)濃度增加，有更多蛋白質聚集於下層水相，使蛋白質溶液進一步提高濃縮之目的。但居於蛋白質於低鹽濃度下，其穩定性較佳之考量下，鹽類濃度應選擇於 100~300 mM 範圍中較適當。
7. 當 $[K_2HPO_4]= 218mM$ ，60% (v/v) ACN-water 系統於 4°C 環境之下，BSA 可於 5 小時相平衡之後，將達到超過 95% 之蛋白質所需之回收率。

綜合考慮鹽類對 ACN-water 系統所產生之相分層效率，乙腈去除率、蛋白質回收率和分層後下層水相之 pH 值對蛋白質穩定性之影響，本論文建議濃度約 150mM 之磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)可提供比

NaCl 或是由低溫誘導(-17 之 cooling process)所產生的相分層效率更佳，去除更多有機溶劑之目的，從而降低在低溫誘導相分層機制中，因制冷所需的能耗，或縮短達到兩相分層所需的時間，或重複的融化與凍結會影響蛋白質的活性，且保持同樣的分離濃縮效果。

5-2 建議

1. 本研究透過添加鹽類誘導 ACN-water 系統於零度以上之產生相分層實驗，已獲得初步之結論，未來或許可以嘗試選擇更多不同蛋白質的添加應用於此相分層機制中，並探討蛋白質於相分離後之活性影響。
2. 經由本實驗結果初步推論，低溫誘導和鹽類誘導相分層乃基於不同的機制。未來亦可縮小 ACN-water 系統之溫度範圍，如 10°C~25°C 等，進行更進一步溫度效應之試驗；或可透過化學分析方法及利用熱力學觀點，進一步用實驗證明系統相分層詳細之分離機制。
3. 同時隨著蛋白體研究的進展，人們對蛋白質體系之熱力學特性也越來越感興趣。故未來可利用數學模型對含蛋白質的體系之熱力學特性進行模擬，以便對分層現象有更深入的理解，為開創蛋白質熱力學研究之新領域作出貢獻。

參考文獻

Adams, T. E., B. Macintosh, M. R. Brandon, P. Wordsworth and N. K. Puri, "Production of Methionyl-Minus Ovine Growth Hormone in *Escherichia coli*. and One-Step Purification," *Gene*, **122**, 371-375 (1992).

Andrew, P., "Molecular weights of prolactin and pituitary growth hormones estimated by gel filtration," *Nature*, **209**: 155-157 (1966).

Anicetti, V. and W. S. Hancock, "Analytical considerations in the development of protein purification processes," *Bioprocess Technol.* **18**, 11-36 (1994).

Alvertsson, P. A., *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed., Wiley New York (1986).

Arakawa, T. and S. N. Timasheff, "Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins," *Biochemistry*, **24**, 6756-6762, (1985).

Arakawa, T., S. Prestrelski, W. Kinney and J. F. Carpenter, "Factors affecting short-term and long-term stabilities of protein," *Adv. Drug Del. Rev.* **10**: 1-28 (1993)

Asenjo, J. A. and I. Patrick, "Large-Scale Protein Purification," in *Protein Purification Applications A Practical Approach*, 1-20, edited by E. L. V. Harris and S. Angal, IRL Press, Oxford (1990).

Asenjo, J. A., "Selection of Operations in Separation Processes," in *Separation Process in Biotechnology*," 3-16, edited by A. A. Juan, Marcel Dekker, New York (1990).

Aveyard, R. and R. Heselden, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1**, 71, 312 (1975).

Bailey, J. E. and D. F. Oilis, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p.721, McGraw-Hill, New York (1986).

Baumann G., "Circulating Binding Proteins for Human Growth

Hormone,” in *Advanced in Growth and Growth Factor Research*, 69-83, edited by E. E. Muller, D. Cocchi, and V. Locatelli, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (1989).

Beck, A., N. Zom, M. -C. Bussat, J. -F. Haeuw, N. Corvaia, T. -N. Nguyen, J. Y. Bonnefoy and A. Van Dorsselaer, “Synthesis and characterization of Respiratory Syncytial Vims protein G related peptides containing two disulfide bridges,” *J. PEPTIDE RESEARCH*, **55**(1): 24-35 JAN (2000).

Bell, D. J., M. Hoare, and P. Dunnill, “The Formation of Protein Precipitates and their Centrifugal Recovery,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **26**, 1-72 (1983).

Bentley, P., F. M. Dickinson, and I. G. Jones, “Purification and Properties of Rabbit Muscle L Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase,” *J. Biochem.*, **135**, 853-859 (1973).

Bidlingmeyer, B. A., *J. Chromatogr.*, **18**, 525 (1980).

Bills, G. J., E. Marler, H. C and Chen, A. E. Wilhelm, “Molecular weight of bovine, porcine and human growth hormone by sedimentation equilibrium,” *Fed. Proc.*, **25**, 348 (1966).

Bjurstrom, E., “Biotechnology: Fermentation and Downstream Processing,” *Chem. Eng.*, **92**. 126-158 (1985).

Blatt, W. P., M. P. Feinberg, M. P. Hopfenberg, and C. A. Saravis, “Protein Solutions, Concentration by a Rapid Method,” *Science*, **150**, 224-226 (1965).

Blijham, J. M. and P. Vaneerde, “Treatment of Tank Sediment by Membrane Ultra-Filtration,” *J. Inst. Brew.*, **91**, 180-183 (1985).

Boscott, R. J., “Solvent-Treated Cellulose Acetate as the Stationary in Partition Chromatography,” *Nature*, **159**, 342 (1947).

Bruin, S. A., J. A. Kikkert, G. Weldring and J. Hiddink, “Overview of Concentration Polarization in Ultrafiltration,” *Desalination* **35**, 223-232 (1980).

Cheryan, M., *Ultrafiltration Handbook*, Technomic Publishing, Lancaster, PA (1986).

Chicz, R. M. and F. E. Regnier, "High-performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes," *Methods Enzymol.*, **182**, 392-421 (1990).

Debye, P. and J. Z. MacAulay, *Phys. Chem.*, **26**, 22 (1925).

Dellacha, J. M., J. A. Santome and L. Faiferman, "Molecular weight of bovine growth hormone," *Experientia*, **22**, 16-17 (1966).

Dimarch, R. D., H. B. Long, E. P. Kroeff, and R. E. Chance, "Utilization of Analytical Reversed-Phase HPLC in Biosynthetic Insulin Production," in *High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology*, pp.181-189, edited by S. H. William, John Wiley & Sons, New York (1990).

Dolan, J. W. and Snyder, L. R., *LC. GC.*, **5**, 970-978 (1987).

Ersson, B., R. Lars, and J. C. Janson, "Introduction to Protein Purification," in *Protein Purification: Principle, High Resolution Methods, and applications*, 3-32, edited by J.C. Janson and L. Ryden, VCH Publishers, New York (1989).

Engler, C. R., *Disruption of Microbial Cells*, in *Comprehensive Biotechnology*, **2**, 305-324, Marcel Dekker New York (1990).

Englard, S. and S. Seifter, "Precipitation Techniques," *Meth. Enzymol.*, **182**, 285 (1990).

Fallen, A., R. F. G. Booth and L. D. Bell, *Application of HPLC in Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam (1987).

Fassina, G., S. Merit, S. Germani, G. Coloberto and G. Cassani, "High Yield Expression and Purification of Human Endothelin-1," 559-568 (1994).

Fisher, R. R., C. E. Glatz, and P. A. Murphy, "Effects of Mixing During Acid Addition on Fractionally Precipitated Protein," *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1056-1063 (1986).

Foster, P. R., P. Dunnill, and M. D. Lilly, "The Precipitation of Enzymes from Cell Extracts of *Saccharomyces Cerevisiae* by Polyethylene Glycol," *Biochim. Biophys. Acta.*, **317**, 505-510 (1973).

Fromon, M. and C. J. Treiner, *Chem. Soc., Faraday Trans.* **1**, 75, 1837 (1979).

Frank, B. H., J. M. Pettee, R. E. Zimmerman. and P. J. Burck, "The Production of Human Proinsulin and Its Transformation to Human Insulin and C-peptide," in *peptides: Synthesis, Structure and Function*, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium. 729-737, edited by D.H. Rich and E. Gross, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1981).

Garcia, A. A., M. R. Bonen, J. Ramirez-Vick, M. Sadaka and A. Vuppu, *Bioseparation process science*, Blackwell Science, Malden, MA 178-229(1999).

Garcia, FAP, "Cell wall disruption," In Kennedy, J. F. & Calral, JMS (eds) *Recovery Process for Biological Material*, p147-66. J. Wiley, New York (1993).

Gekko, K. and S. Koga, "The stability of protein structure in aqueous propylene glycol: amino acids solubility and preferential salvation of protein," *Biochem. Biophys. Acta*, **786**, 151-160 (1984).

Gekko, K. and S. N. Timashedd, "Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures," *Biochemistry*, **20**, 4667-4676 (1981).

Gekko, K. and T. Morikawa, "Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures," *J. Biochem.* **90** 39-50 (1981).

Gekko, K., "Mechanism of polyol-induced protein stabilization: solubility of amino acids and diglycine in aqueous polyol solutions," *J. Biochem.*, **90**, 1633-1641 (1984).

Gill, W. N., D. E. Wiley, C. J. D. Fell, and A. G. Fane, "Effect of Viscosity on Concentration Polarization in Ultrafiltration," *AIChE J.*,

34(9), 1563-1567, (1988).

Gu, T., Y. Gu and Y. Zheng, "Phase-Separation Of Acetonitrile-Water Mixture In Protein-Purification," *Separ. Technol.* **4**(4), 258-260 (1994).

Gu, T., Y. Zheng, Y. Gu, R. Haldankar, N. Bhalerao, D. Ridgway, P. Wiehl, W. Chen and J.H. Kopchick, "Purification Of A Pyrogen-Free Human Growth-Hormone Antagonist," *Biotechnol. Bioeng.* **48**(5), 520-528 (1995).

Guo, D., C. T. Mant, and R. S., Hodges, *Pept. Res.*, **3**, 8-15 (1990).

Hall, D. G. *Trans. Faraday Soc.*, **67**, 2516 (1971).

Hancock, W. S., Sparrow, J. T. m. Cs. Harvath (Editor), *High-Performance Liquid Chromatography*, Vol. **3**, Academic Press, New York, p.49 (1983).

Haugen, G. R. and H. L. Friedman, *J. Phys. Chem.*, **67**, 1757 (1963).

Hawlicka, E. Z. *Naturforsch.*, **42a**, 1014 (1987).

Hawlicka, E. Z. *Naturforsch.*, **43a**, 769 (1988).

Hearn, M. T. W., in Cs. Harvath (Editor), *High- Performance Liquid Chromatography*, Vol. 3, Academic Press, New York, p.87 (1983).

Hearn, M. T. W., "High Resolution Reversed Phase Chromatography," in *Protein Purification: Principle High Resolution Methods, and Application*, 175-206, edited by J. C. Janson and L. Ryden, VCH Publishers, New York (1989).

Heukeshoven, J. and R. Dernick, "Characterization of a solvent System for Separation of Water-Insoluble Poliovirus Protein by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," *J. Chromatogr.*, **326**, 91-101 (1985).

Hofmeister, F., "Uber die Darstellung von Krystallisiertem Eiralbumin und die Krystallisirbarkeit Colloider Stoffe," *Z. Physiol. Chem.*, **14**, 165-170 (1890).

Horvath, C., W. Melander, I. Molnar, and P. Molnar, *Anal chem.*, **125**,

129 (1976).

Huhmer, Andress F. R., Gabi I. Aced, Melissa D. Perkins, R. Neslihan Gursoy, D. S. Seetharama Jois, Cynthia Larvi, Tenma J. Siahaan, and Christian Schoneich, "Separation and Analysis of Peptides and Proteins," *Anal. Chem.*, **69**, 29R-57R (1997).

Ingham, K. C., "Protein Precipitation with Polyethylene Glycol," *Meth. Enzymol.*, **104**, 351-356 (1984).

Iyer, H. V. and T. M. Przybycien, "Protein Precipitation: Effects of Mixing on Protein Solubility," *AIChE J.*, **40**(2), 349-360 (1994).

Janson, J.-C. and L. Ryden, *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*, 2nd ed., Wiley, New York(1997).

Kalman, A., F. Thunecke, R. Schmidt, P. W. Schiller and C. Horvath, "Isolation and identification of peptide conformers by reversed-phase high-performance liquid chromatography and NMR at low temperature," *J. Chromatogr. A*, **729** (1-2), 155-171, APR 5 (1996).

Keller, K., T. Friedmann and A. Boxman, "The bioseparation needs for tomorrow," *TRENDS in Biotechnology* Vol. 19, No. 11 November (2001).

Kissinger, Peter. I., "Reverse-phase ion-pair partition chromatography. Comments," *Anal Chem.*, **49**, 883 (1977).

Kroeff, E. P., R. A. Owens, E. Campbell, R. D. Johnson, and H. Marks, "Production Scale Purification of Biosynthetic Human Insulin by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography," *J. Chromatogr*, **461**, 45- 61 (1989).

Krishnan, C. V. and H. L. Friedman, *J. Solution Chem.*, **3**, 727 (1974).

Kroner, K. H., H. Schutte, H. Hustedt, and M. R. Kula, "Cross-flow Filtration in the Downstream Processing of Enzymes," *Process Biochem.*, **19**, 67-74 (1984).

Le, Q., S. Longlin, S. Yumhai, "Extraction of erythromycin from fermentation broth using salt-induced phase separation processes". *Separation and Purification Technolog* **24**, 85-91 (2001).

Lee, J. C. and L. L. Y. Lee, "Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols," *Bio. Chem.*, **256**, 625-631 (1981).

Lewis, V. D., S.H. Nam, and I. T. Urasa, *J. Chromatogr.*, **27**, 468 (1989).

Li, C. H. and D. Chung, in *Handbook of HPLC for the Separation of Ammo Acids, Peptides and Proteins*, edited by W. S. Hancock. CRC Press, Boca Raton (1984).

Li, Z., T. Gu. B. Kelder and J. J. Kopchick, "Analysis of Fatty Acids in Mouse Cells Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," *Chromatographia*, **54** (2001).

Maa, Y. F. and C. C. Hsu, "Membrane fouling in sterile filtration of recombinant human growth hormone," *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 319-328 (1996).

Mant, C. T., "High-performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation," Alberta, Canada (1991).

Mant, C. T., and R. S. Hodges, Requirement for Peptide Standards in Reversed-Phase HPLC., **4**, 250 (1986).

Maxter, "Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA," *J. Biol. Chem.* **255**, 7521-7524 (1980).

McDevit, W. F. and F. A. Long, *Chem. Rev.* **51**, 119 (1952).

Michaels, A. S., "Frontiers of Bioseparations Technology: Unsolved Problems and Novel Process Concepts," *Int. Conf. on Separations for Biotechnology*, UK, 3-8 (1990).

Michaels, A. S., "Membranes in Biotechnology - Current Status and Future Prospects," in *4th Symp. on Synthetic Membranes in Science and Technology*, Tiibingen (1983).

Middaugh, C. R., R. K. Evans, D. L. Montgomery, and D. R. Casimiro, "Analysis of Plasmid DNA from a Pharmaceutical Perspective," *J. Pharm. Sci.*, **87**(2): 130-146 (1998).

Miller, W. L., J. A. Martial, J. D. B McDevit, W. F. and Long, F. A. *Chem. Rev.*, **51**, 119 (1952).

Moris, J. E., Hoffman, A. S. and Fisher, R. R., "Affinity precipitation of proteins by polyligands," *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 991-997 (1993).

Nakayama, A., K. Kawamura, H. Shimada, A. Akaoka, I. Mita, M. Honjo, and Y. Furutani, "Extracellular Production of Human Growth Hormone by Head Portion of the Prepropeptide Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* Neutral Protease in *Bacillus subtilis*," *J. Biotechnol.*, **5**, 171-180 (1987).

Niktari, M., S. Chard, P. Richardson, and M. Hoare, "The Monitoring and Control of protein Purification and Recovery Processes," *Int. Conf. on Separations for Biotechnology*, UK, p. 622 (1990)

Nozaki, Y., C. Tanford, "The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions: establishment of a hydrophobicity scale," *J. Biol. Chem.* **246** 2211-2217 (1971).

Olson, K. C., J. Fenno, N. Lin, R. N. Harkins, C. Sinder, W H. Kohr, M. J. Ross, D. Fodge, G. Plender and N. Stebbing, "Purification Human Growth Hormone from E. Coli is Biologically Active," *Nature*, **293**, 408-411 (1981).

Opiteck, Gregory J. and James W. Jorgenson, "Two-Dimensional SEC/RPLC Coupled to Mass Spectrometry for the Analysis of Peptides," *Anal. Chem.*, **69**, 2283-2291 (1997).

Pence, David N. and Tingyue Gu, "Liquid-Liquid equilibrium of the acetonitrile-water system for protein purification," *Separation Technology* **6**, 261-264 (1996).

Pikal, M. J., "Freeze-drying of proteins. Part I : Process design," *Biopharm.* **3**(8): 18-27 (1990a).

Pikal, M. J., "Freeze-drying of proteins. Part II : formulation selections," *Biopharm.* **3**(9): 26-30 (1990b).

Pittz, E. P. and S. N. Timasheff, "Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2, 4-pentanedioic acid at pH 5.8," *Biochemistry*, **17**, 615-623 (1978).

Porter M. C., "Concentration Polarization with Membrane Ultrafiltration," *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, **11**(3), 234-243 (1972).

Porter, M. C., "Recent Advances in Separation Techniques," *AIChE Symp. Ser.*, **68**, 120-124 (1972).

Prokopakis, G. J. and J. A. Asenjo, "Synthesis of Downstream Processes, in Separation Processes in Biotechnology," p. 571, edited by J. A. Asenjo, Marcel Dekker, New York (1990).

Randolph, "Phase separation of excipients during lyophilization: effect on protein stability," *J. Pharm. Sci.*, **86**(11): 1198-1203 (1997).

Regnier, F. E. and K. M. Gooding, "High-performance liquid chromatography of proteins," *Anal. Biochem.*, **103**, 1-25 (1980).

Ricketts, R. T., W. B. Leberer, III, F. Klein, M. E. Gustafson, and M. C. Flickinger, "Application, Sterilization and Decontamination of U. F. Systems for Large-scale Production of Biomaterial," in *Purification and Fermentation of Products*, 21-49, edited by D. LeRoith, J. Shiloach, and T. J. Leahy, American Chemical Society, Washington, D.C. (1985).

Rothstein, F., "Production Scale Issue in Protein Precipitation and Solid/Liquid Separation," *BioPharm. Proc.*, Aster Publishing Corp., Eugene (1991).

Rubinstein, M., "Preparative high-performance liquid partition chromatography of proteins," *Anal Biochem.* **98**, 1-7 (1979).

Schneider, M., Guillot, C. and Lamy, B., "The affinity precipitation technique." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **369**, 257-263 (1981.)

Schutle, H. and M.-R. Kula, "Pilot and process-scale techniques for cell disruption," *Biotechnology and Applied Biochemistry* **12**, 599-620

(1990).

Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin (1982).

Scott, M. W., *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*, Hanser Publisher, New York (1991).

Senstad, C. and B. Mattiasson, "Affinity precipitation using chitosan as ligand carrier," *Biotechnology and Bioengineering* **33**, 216-220 (1989).

Shuler, Michael L., Fikret Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* Prentice-Hall, Inc A Simon & Schuster Company Englewood Cliffs, New Jersey (1992).

Singhvi, R. and C. Schorr, "Charification of animal cell culture process fluids using depth microfiltration," *Biopharm*, April 35-41 (1996).

Staehelin, T., D. S. Hobbs, H. F. Kung, C. Y. Lai, and S. Pestka, "Purification of Recombinant Human Leukocyte Interferon (IFLRA) with Monoclonal Antibodies," in *Methods of Enzymology*, **78**, 505-512, edited by S. Pestka, Academic Press, New York (1981).

Staehelin, T., D. S. Hobbs, H. F. Kung, C. Y. Lai, and S. Pestka, "Purification and Characterization of Recombinant Human Leukocyte Interferon (IFLRA) with Monoclonal Antibodies," *J. Biol. Chem.*, **256**, 9750-9754 (1981).

Snyder, L. R. and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 250 (1979).

Sulochana, K. N., M. Rajesh and S. Ramakrishnan, "Purification and characterization of a novel 88 kDa protein from serum and vitreous of patients with Bales' disease," *EXPERIMENTAL EYE RESEARCH*, **73** (4): 547-555 OCT (2001).

Tabata, M., M. Kumamoto and J. Nishimoto, "Ion-Pair Extraction of Metalloporphyrins into Acetonitrile for Determination of Copper (II)," *Anal. Chem.*, **68**, 758-762 (1996).

Takamuku, T., Yamaguchi A, Matsuo D, Tabata M, Kumamoto M,

Nishimoto J, Yoshida K, Yamaguchi T, Nagao M, Otomo T, Adachi T., "Large-angle X-ray scattering and small-angle neutron scattering study on phase separation of acetonitrile-water mixtures by addition of NaCl," *Phys. Chem. B*, **105** (26), 6236-6245 (2001).

Takamuku, T., A. Yamaguchi, D. Matsuo, M. Tabata, T. Yamaguchi, T. Otomo and T. Adachi, "NaCl-induced phase separation of 1, 4-dioxane-water mixtures studied by large-angle X-ray scattering and small-angle neutron scattering techniques," *J. Phys. Chem. B*, **105** (41), 10101-10110 (2001).

Timasheff, S. N., *Preferential interactions of water and cosolvents with proteins*, in: R. B. Gregory (Ed.), Protein-Solvent Interactions, Marcel Dekker, New York, pp. 445-482 (1995).

Timasheff, S. N., H. Inoue, "Preferential binding of solvent component to proteins in mixed water-organic solvent system," *Biochemistry*, **7**, 2501-2513 (1968).

Thomson, A. R., "Recent Developments in Protein Recovery and Purification," *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **34B**, 190-198 (1984).

Vissers, J. P. C., "Recent developments in microcolumn liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, **856**, 117-143 (1999).

Vonk, E. C., B. M. W. Langeveld-Voss, J. L. J. van Dongen, R. A. J. Janssen, H. A. Claessens, C. A. Cramers, "Separation and characterization of oligomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography; a study on well-defined oligothiophenes," *J Chromatogr. A*, **911** (I): 13-26 MAR 9 (2001).

Wang, D. I. C., A. J. Senskiy, and T. A. Butterworth, "Enzyme Processing Using Ultrafiltration Membranes," in *Membrane Science and Technology*, 98-119, edited by J. E. Flinn, Plenum Press, New York (1970).

Watt, J. G. "Automatically Controlled Continuous Recovery of Plasma Protein Fractions for Clinical Use," *Vox Sang.*, **18**, 42-61 (1970).

Walsh, G., *Proteins: biochemistry and biotechnology*, J. Wiley, New

York, p116-143 (2002).



附錄 實驗數據

表 A.1 乙腈莫耳分率與體積比對照表

[ACN]%(v/v)	X_{ACN}
10	0.04
20	0.09
30	0.13
40	0.18
50	0.25
60	0.34
70	0.44
80	0.57
90	0.76

表 A.2 配置磷酸鉀緩衝液表

Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25°C		
pH	Volume of 1 M K_2HPO_4 (ml)	Volume of 1 M KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
3.2	19.2	80.8
3.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

表 A.3 各種鹽類在 30%(v/v)乙腈-水系統中 4°C 環境下的相分層效率

X_{salts} (*10 ³)	C_{salts} (mM)	Phase efficiency ($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)				
		K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	NaCl	NH ₄ HCO ₃	KCl
0	0	-	-	-	-	-
0.6	26	-	-	-	-	-
1	44	-	-	-	-	-
4	179	-	-	-	-	-
6	269	-	-	-	-	-
8	360	-	-	-	-	-
10	450	-	-	-	-	-
20	910	0.14	-	-	0.03	-
40	1858	0.28	-	0.11	0.07	0.06
60	2846	0.37	0.15	0.14	0.09	0.09

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 A.4 各種鹽類在 40%(v/v)ACN-Water 系統中 4°C 環境下的相分層效率

X_{salts} (*10 ³)	C_{salts} (mM)	Phase efficiency ($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)				
		K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	NaCl	NH ₄ HCO ₃	KCl
1	41	-	-	-	-	-
2	82	0.22	-	-	-	-
3	123	0.28	0.18	-	0.13	-
4	164	0.28	0.24	0.06	0.16	0.11
5	206	0.29	0.32	0.16	0.16	0.13
6	247	0.32	0.35	0.21	0.22	0.15
7	289	0.36	0.38	0.22	0.22	0.16
8	330	0.40	0.38	0.25	0.31	0.17
9	372	0.41	0.38	0.30	0.38	0.27
10	413	0.42	0.39	0.30	0.40	0.21
20	835	0.47	0.42	0.32	0.42	0.29
40	1706	0.48	0.43	0.33	0.43	0.31

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 A.5 各種鹽類在 60%(v/v)乙腈-水系統中 4°C 環境下的相分層效率

X _{salts} (*10 ³)	C _{salts} (mM)	Phase efficiency(V _{up} /V _{low})		
		K ₂ HPO ₄	NaCl	NH ₄ HCO ₃
1	33	1.45	-	-
2	67	1.51	0.84	-
3	100	1.88	0.90	1.07
4	133	1.88	0.95	1.19
5	166	1.80	1.09	1.15
6	200	1.88	1.11	1.13
7	233	1.88	1.13	1.21
8	267	1.90	1.07	1.17
9	301	1.90	1.09	1.23
10	305	1.93	1.09	1.17

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 A.6 各種鹽類在 70%(v/v)乙腈-水系統中 4°C 環境下的相分層效率

X _{salts} (*10 ³)	C _{salts} (mM)	Phase efficiency(V _{up} /V _{low})		
		K ₂ HPO ₄	NaCl	NH ₄ HCO ₃
1	29	2.16	2.23	1.98
2	59	2.22	2.20	2.00
3	89	2.24	2.23	2.00
4	118	2.37	2.23	1.98
5	148	2.43	2.39	2.00
6	178	2.43	2.42	1.78
7	208	2.43	2.44	2.00
8	238	2.43	2.73	2.00
9	268	2.46	2.77	2.00
10	298	2.43	3.58	1.98

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

表 A.7 K_2HPO_4 在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

$X_{K_2HPO_4}$ (*10 ³)	$C_{K_2HPO_4}$ (mM)	V_T	Temperature(°C)						
			25	10	8	6	4	2	-20
			Phase efficiency(V_{up}/V_{low})						
1	36	12	-	-	-	0.23	0.23	0.23	0.51
2	73	12	-	0.42	0.47	0.51	0.54	0.55	0.57
3	109	12.05	-	0.57	0.68	0.69	0.73	0.68	0.60
4	146	12	0.96	0.67	0.77	0.75	0.82	0.74	0.64
5	184	11.95	1.08	0.76	0.81	0.78	0.85	0.76	0.67
6	220	11.9	1.03	0.82	0.84	0.82	0.87	0.78	0.68
7	257	12	1.11	0.86	0.86	0.85	0.90	0.82	0.71
8	294	12	1.14	0.88	0.93	0.77	0.94	0.88	0.75
9	331	11.85	1.13	0.90	0.92	0.91	0.92	0.89	0.74
10	368	11.85	1.17	0.93	0.93	0.92	0.93	0.91	0.76
11	405	11.75	1.11	0.89	0.92	0.82	0.97	0.92	0.76
12	443	11.65	1.15	0.93	1.01	0.94	0.97	1.01	0.79
13	480	11.75	1.16	0.93	0.97	0.92	0.95	0.94	0.75

"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

$X_{K_2HPO_4}$: K_2HPO_4 鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的莫耳分率

$C_{K_2HPO_4}$: K_2HPO_4 鹽類在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的濃度

V_T : ACN-water 系統總體積

V_{up}/V_{low} : ACN-Water 系統相分離後上-下層相之體積比

表 A.8 NaCl 在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

X_{NaCl} (*10 ³)	C_{NaCl} (mM)	V_T	Temperature(°C)						
			25	10	8	6	4	2	-20
			Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)						
1	38	11.75	-	-	-	-	-	-	0.50
2	75	11.75	-	-	-	-	-	0.10	0.50
3	112	11.7	-	-	-	0.19	0.20	0.25	0.54
4	150	11.95	-	-	0.28	0.28	0.28	0.34	0.55
5	187	11.7	-	-	0.29	0.30	0.32	0.35	0.53
6	225	11.8	-	0.31	0.31	0.32	0.37	0.39	0.52
7	263	11.85	-	0.38	0.34	0.38	0.41	0.43	0.56
8	301	11.7	-	0.44	0.40	0.44	0.46	0.48	0.58
9	339	11.75	-	0.44	0.43	0.43	0.47	0.48	0.56
10	377	11.85	-	0.47	0.44	0.48	0.48	0.51	0.56
11	415	11.75	0.25	0.47	0.48	0.48	0.51	0.50	0.57
12	453	11.85	0.30	0.48	0.49	0.50	0.51	0.52	0.58
13	491	11.55	0.38	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.58

表 A.9 KH₂PO₄ 在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

$X_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ (*10 ³)	$C_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ (mM)	V_T	Temperature(°C)						
			25	10	8	6	4	2	-20
			Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)						
1.3	50	11.76	-	-	-	-	-	0.20	0.53
2.0	75	11.75	-	-	-	-	0.28	0.28	0.53
2.7	100	11.81	-	-	-	0.30	0.36	0.40	0.51
3.0	112	11.77	-	0.14	0.39	0.40	0.40	0.40	0.53
4.0	150	11.76	-	0.35	0.39	0.48	0.52	0.55	0.59
5.3	200	11.74	0.49	0.33	0.40	0.44	0.51	0.55	0.60
6.7	250	11.78	0.68	0.33	0.38	0.45	0.49	0.52	0.58
8.0	300	11.88	0.79	0.35	0.39	0.45	0.50	0.53	0.59
9.3	350	11.84	0.82	0.35	0.42	0.47	0.50	0.54	0.58
11	400	11.79	0.82	0.35	0.43	0.47	0.50	0.54	0.58
12	450	11.92	0.80	0.33	0.43	0.47	0.50	0.53	0.60
13	500	11.85	0.85	0.36	0.44	0.48	0.51	0.54	0.59

表 A.10 KCl 在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

X_{KCl} (*10 ³)	C_{KCl} (mM)	V_T	Temperature(°C)							
			25	10	8	6	4	2	-20	
			Phase efficiency(V_{up}/V_{low})							
1.3	50	11.7	-	-	-	-	-	-	-	0.55
2.7	100	11.63	-	-	-	-	-	0.13		0.56
3.0	112	11.7	-	-	-	-	0.13	0.18		0.56
4.0	150	11.7	-	-	-	0.22	0.23	0.30		0.57
5.0	187	1.7	-	-	0.28	0.24	0.28	0.32		0.57
5.3	200	11.5	-	-	0.33	0.32	0.32	0.36		0.58
6.7	250	11.6	-	0.23	0.35	0.39	0.39	0.41		0.59
8.0	300	11.7	-	0.34	0.38	0.38	0.44	0.46		0.60
9.3	350	11.7	-	0.40	0.42	0.46	0.46	0.50		0.60
11	400	11.9	-	0.43	0.45	0.48	0.48	0.49		0.59
12	450	11.7	0.27	0.47	0.48	0.51	0.51	0.53		0.61
13	500	11.8	0.35	0.50	0.50	0.52	0.53	0.53		0.60

表 A.11 NH₄HCO₃ 在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

$X_{KH_2PO_4}$ (*10 ³)	$C_{KH_2PO_4}$ (mM)	V_T	Temperature(°C)							
			25	10	8	6	4	2	-20	
			Phase efficiency(V_{up}/V_{low})							
1.3	50	11.65	-	-	-	-	-	-	-	0.51
2.7	100	11.75	-	-	-	-	-	0.24		0.58
3.0	111	11.7	-	-	-	-	0.13	0.28		0.58
4.0	150	11.75	-	-	-	0.33	0.33	0.38		0.61
5.0	187	1.7	-	-	0.34	0.34	0.33	0.39		0.62
5.3	200	11.75	-	-	0.38	0.40	0.40	0.43		0.63
6.7	250	11.6	-	-	0.42	0.49	0.49	0.52		0.63
8.0	300	11.7	-	0.47	0.50	0.52	0.52	0.56		0.65
9.3	350	11.7	-	0.54	0.55	0.56	0.56	0.56		0.66
11	400	11.77	0.40	0.57	0.57	0.57	0.57	0.59		0.65
12	450	11.8	0.51	0.59	0.59	0.59	0.59	0.62		0.64
13	500	11.8	0.53	0.62	0.62	0.61	0.61	0.64		0.67

表 A.12 磷酸鉀緩衝液(pH=7.0)在 50%(v/v)乙腈-水系統中於不同溫度的相分層效率

$X_{\text{pho. buf.}}$ (*10 ³)	$C_{\text{phos.}}$ (mM)	V_T	Temperature(°C)						
			25	10	8	6	4	2	-20
			Phase efficiency($V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$)						
1.3	50	11.6	-	-	-	-	0.28	0.35	0.28
2.7	100	11.7	-	0.59	0.62	0.57	0.59	0.62	0.59
4.0	150	11.7	0.82	0.89	0.79	0.69	0.73	0.72	0.73
5.3	200	11.5	0.92	0.92	0.85	0.77	0.80	0.74	0.80
6.7	250	11.5	1.00	0.95	0.89	0.82	0.86	0.81	0.86
8.0	300	11.7	1.05	1.01	0.94	0.87	0.88	0.87	0.88
9.3	350	11.65	1.11	1.06	1.02	0.95	0.93	0.93	0.93
11	400	11.65	1.15	1.05	1.01	0.93	0.92	0.89	0.92
12	450	11.72	1.20	1.12	1.04	0.97	0.97	0.95	0.97
13	500	11.7	1.19	1.10	1.05	1.01	0.98	0.95	0.98

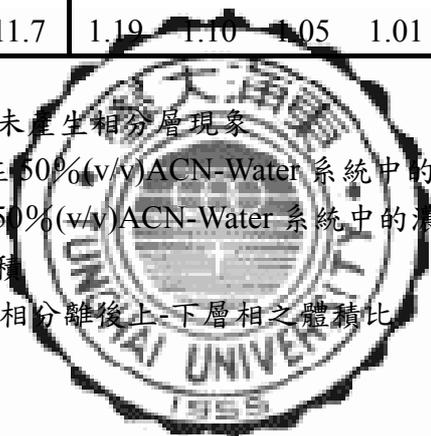
"-":代表 ACN-water 系統未產生相分層現象

$X_{\text{pho. buf.}}$: 磷酸鉀緩衝液在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的莫耳分率

$C_{\text{phos.}}$: 磷酸鉀緩衝液在 50%(v/v)ACN-Water 系統中的濃度

V_T : ACN-water 系統總體積

$V_{\text{up}}/V_{\text{low}}$: ACN-Water 系統相分離後上-下層相之體積比



簡歷

姓 名：施柏宏

籍 貫：台灣省台南市

出生年月日：民國 67 年 4 月 6 日

學 歷：私立東海大學化工所

