

國立交通大學

應用化學研究所

博士論文

以全管柱偵測法探討液相層析之分離

Separations in Liquid Chromatography

Observed by Whole-Column Detection

研究生：林淑慧

指導教授：余艇 博士

中華民國九十八年三月

以全管柱偵測法探討液相層析之分離
Separations in Liquid Chromatography
Observed by Whole-Column Detection

研究生：林淑慧
指導教授：余艇 博士

Student: Shu-Hui Lin
Advisor: Dr. Tiing Yu



A Thesis
Submitted to Department of Applied Chemistry
College of Science
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Ph.D.
In
Applied Chemistry
March 2009
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國 九十八 年 三 月

以全管柱偵測法探討液相層析之分離

學生：林淑慧

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學研究所

摘要

液相層析法是一種可以應用到各科學部門的有力分離方法，由於傳統偵測方式之限制，導致層析理論方面有時會有錯誤之陳述，本研究以全管柱型偵測系統觀察層析管柱內的樣品流動訊號，藉著獲得空間及時間的實驗數據，來對部分有疏失的層析理論進行修正。

根據實驗結果顯示，本研究可釐清數項容易被忽略或者誤導的層析觀念：第一，以 15 組不同組成之動相沖堤樣品，使獲得 15 組滯留因子 (k) 的實驗結果，層析圖譜中， $k=7.27$ 的波峰寬度約為 $k=0.54$ 樣品的 4.6 倍，然而，兩組分析物在管柱內的空間分佈寬度卻幾乎相同，此結果讓我們清楚地了解，層析圖譜上影響波峰變寬的真正原因是樣品釋放出管柱的速度，換句話說，層析圖譜上波峰寬度的變化並不能直接反應出樣品在管柱內的真正空間分佈寬度；第二，藉著階梯式梯度沖堤的實驗，讓我們了解在非線性層析條件中，傳統計算理論板數以及板高的公式，不能用來處理非線性條件的實驗數據；第三，藉著觀察階梯式梯度沖堤非線性層析實驗之管柱內樣品遷移情形，讓

我們更清楚的知道梯度沖提條件對分離實驗的影響，並成功的觀察到分析物在管柱內所產生的滯留順序交錯現象。

藉由本研究室所設計研發之全管柱型偵測系統的應用，使我們更全面性地觀察樣品在層析管柱中的分離行為，進而成功地修正一些容易被層析操作者所忽略的錯誤層析觀念。



Separations in Liquid Chromatography Observed by Whole-Column Detection

Student : Shu-Hui Lin

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

Liquid chromatography is a powerful separation method that finds applications to all branches of science. There are, however, some mistaken statements in chromatographic theory caused owing to the limitation of using conventional detection techniques. We designed a whole-column detection (WCD) system which enabled monitoring of whole on-column chromatographic peaks during the elution process on both spatial and time coordinate in order to clarify the shortcomings.

In the first part, a single-compound sample was eluted under mobile phases of fifteen different compositions, generating chromatograms of 15 different retention factors (k). The bandwidth of the peak ($k=7.27$) increased by almost 4.6 folds compared with the peak ($k=0.54$). However, the bandwidths of these two peaks remained almost the same on the spatial coordinate in the column. The peak width was found linearly dependent on the solute releasing speed from the column outlet to the attached post-column detector. In other words, the peak widths obtained using the post-column detector cannot reflect the true widths in the column. In the second part, stepwise gradient elutions were carried out. The theoretical plate number and the plate height were erroneously

obtained using the traditional equations. It revealed the incompetence of the theoretical plate number and plate height definition while non-linear chromatographies are performed. In the third part, solute migrations were clearly monitored in the column. Peak crossover phenomenon was observed during the entire migration course using the WCD system.

In conclusion, we fabricated a WCD system in this study to comprehensively observe the elution process in liquid chromatography. Several misconceptions were clarified by the spatial data. The detailed on-column observations obtained using the WCD system may further provide useful information to uncover hidden aspects which may have been ignored by chromatographers.



誌謝

終於，搞定了！

這些年來，衷心感謝恩師 余艇教授不厭其煩的教誨與鼓勵，讓我除了在學術領域中有所成長以外，更甚讓淑慧體悟到相當多人生中圓滿與自在的道理；感謝 白書禎老師一直以來的大力支持，您做學問的態度與生活的熱情讓淑慧極度佩服；感謝 陳月枝老師、謝有容老師多年來對淑慧的細心叮嚀與打氣；感謝 王少君老師在口試以及往年分析年會中給予淑慧的鼓舞與指導。

數不清的日子，朋友來來去去，每個時期的夥伴都是我生命中的貴人，因為，如果沒有你當年的一句“加油”，淑慧一定撐不到現在，阿柚子、靜玟、志謙、誠明學長、霹靂創弘貓、恩瑋、育錚、芳卿、坤展、志強、基育、安吉拉慧婷、凱傑、淑嫩、霆琪、鈺評、士宗、鈺君、大秉、哈比人、阿爆、阿嚕咪、周玉棟、阿川、立民、小昕昕、親愛的寶貝阿仁，心中的謝意滿滿滿滿，整個無法用文字言喻，雖然有些朋友平日鮮少聯絡，但是，套一句當年對育錚說過的話：沒打電話給你並不代表我不想你喔！朋友是一輩子的，未來日子裡，淑慧一定一定會用行動表現對你們的愛唷，啾！感謝實驗室學弟妹幫我打點口試的瑣事，琬茹、印從、伶宜、典祐、育國，尤其是 **經緯**，你.....

最後，感謝永遠火力全開、在背後無條件支持我的家人，老爹、阿母、大姐、角子，阿慧終於畢業了！接下來，讓我們開始環遊世界吧！哇哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈
哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈哈！

目錄

中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
誌謝.....	vi
目錄.....	vii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xiv
第一章 簡介.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 全管柱型偵測 (WCD) 系統介紹.....	3
第二章 儀器設計及裝置.....	9
2.1 實驗.....	9
2.1.1 儀器裝置.....	9
2.1.1.1 自製HPLC管柱.....	10
2.1.1.2 WCD系統.....	11
2.1.1.3 WCD系統操作界面設定.....	14
2.1.2 藥品.....	16
2.1.3 數據類型定義.....	16
2.1.4 波型指標參數.....	18
2.1.5 實驗流程.....	19
2.1.6 實驗條件.....	20
2.1.6.1 管柱耐壓性測試.....	20
2.1.6.2 比耳定律測試.....	21
2.1.6.3 WCD系統再現性測試.....	22
2.2 實驗結果與討論.....	23

2.2.1 管柱耐壓性測試.....	23
2.2.2 比耳定律測試.....	23
2.2.3 WCD系統再現性測試.....	23
2.3 結論.....	24
第三章 影響層析波峰變寬原因之探討.....	45
3.1 研究背景與理論介紹.....	45
3.2 實驗.....	48
3.2.1 儀器裝置.....	48
3.2.2 藥品.....	49
3.2.3 實驗步驟.....	49
3.3 結果與討論.....	50
3.3.1 空圖數據之探討.....	51
3.3.2 空時圖數據比較.....	53
3.3.3 時間效應.....	56
3.4 結論.....	58
第四章 層析實驗中理論板高、板數誤用現象之探討.....	80
4.1 研究背景與理論介紹.....	80
4.2 實驗.....	83
4.2.1 儀器裝置.....	83
4.2.2 藥品.....	83
4.2.3 實驗步驟.....	83
4.2.3.1 模式一.....	84
4.2.3.2 模式二.....	84
4.2.3.3 模式三.....	85
4.3 結果與討論.....	85

4.3.1 三種模式之比較.....	85
4.3.2 空間波峰寬度變化.....	89
4.4 結論.....	90
第五章 非線性沖堤中層析峰滯留順序交錯現象之探討.....	106
5.1 研究背景與理論介紹.....	106
5.2 實驗.....	108
5.2.1 儀器裝置.....	108
5.2.2 藥品.....	108
5.2.3 實驗步驟.....	109
5.2.3.1 第一階段.....	110
5.2.3.2 第二階段.....	111
5.2.3.3 第三階段.....	112
5.3 結果與討論.....	114
5.3.1 第一階段.....	114
5.3.2 第二階段.....	117
5.3.3 第三階段.....	119
5.4 結論.....	122
第六章 結論.....	139
參考文獻.....	141

圖目錄

圖 2-1 實驗裝置圖	25
圖 2-2 自製HPLC管柱結構圖	26
圖 2-3 詳細實驗裝置圖	27
圖 2-4 燈源的放射圖譜	28
圖 2-5 全管柱偵測系統實物照片	29
圖 2-6 擴散反射穿透 (diffuse-reflection transmittance) 現象	30
圖 2-7 電腦操作界面圖	31
圖 2-8 數據取點時間說明圖	32
圖 2-9 實驗所得之吸光值空時矩陣	33
圖 2-10 管外時圖和管內空圖的定義	34
圖 2-11 管內時圖的定義	35
圖 2-12 遷移路徑圖與遷移曲線之定義	36
圖 2-13 積分法求波形面積的示意圖	37
圖 2-14 光源最佳化狀態	38
圖 2-15 <i>Tartrazine</i> 之檢量線	39
圖 2-16 (a)-(e)為WCD系統再現性測試等 5 組實驗中，當樣品 抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波 形 40	
圖 2-17 (a)-(e)為WCD系統再現性測試等 5 組實驗中，當樣品	

抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空圖波峰面積	41
圖 3-1 教科書中，對三種物質於層析管柱內進行分離的解釋示意圖	60
圖 3-2 15 組動相等位沖堤之層析結果圖	61
圖 3-3 15 組動相以線性層析之模式沖堤樣品，當樣品抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形	62
圖 3-4 k 值與各公式之趨勢關係圖	65
圖 3-5 15 組等位沖堤實驗中，管外層析時圖與管內 17 公分處空圖波寬增加比例關係圖	66
圖 3-6 (a)、(b)分別表現出空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與樣品注入管柱後移動至管柱末端偵測點所需的時間 t_R 及時圖波峰寬度 $W_{(t)}$ 之意義	67
圖 3-7 15 組等位沖堤實驗中，溶劑與樣品之遷移路徑圖	68
圖 3-8 15 組遷移曲線之斜率與層析時圖所計算而得之樣品移速的比較關係圖	69
圖 3-9 15 組等位沖堤實驗中，樣品移動速度倒數與時圖波峰半高寬之關係圖	70
圖 3-10 15 組等位沖堤實驗中，管外層析時圖與管內時圖（以管柱 17 公分位置為固定偵測點）波峰寬度增加比例關係圖	71
圖 3-11 層析系統中時間效應之定義	72
圖 3-12 三種物質於填充效率高之層析管柱內進行分離的正確解釋圖	73
圖 3-13 三種物質於效率較差之層析管柱內進行分離的正確解釋圖	74

圖 4-1 模式一階梯式梯度沖堤實驗之層析圖譜.....	92
圖 4-2 模式一階梯式梯度沖堤實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、 11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形.....	93
圖 4-3 模式一階梯式梯度沖堤實驗所得之樣品遷移路徑圖.....	94
圖 4-4 模式二階梯式梯度沖堤實驗之層析圖譜.....	95
圖 4-5 模式二階梯式梯度沖堤實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、 11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形.....	96
圖 4-6 模式二階梯式梯度沖堤實驗所得之樣品遷移路徑圖.....	97
圖 4-7 模式三階梯式梯度沖堤實驗之層析圖譜.....	98
圖 4-8 模式三階梯式梯度沖堤實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、 11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形.....	99
圖 4-9 模式三階梯式梯度沖堤實驗所得之樣品遷移路徑圖.....	100
圖 4-10 模式一階梯式梯度沖堤，樣品空間波寬與管柱位置之關係圖	101
圖 5-1 (a)動相A _{50:50} 與(b)動相B _{50:50} 以 1 mL min ⁻¹ 的流速對 <i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i> 進行線性沖堤後所得之層析時圖.....	123
圖 5-2 A _{50:50} 和B _{50:50} 以流速 (a) 1 mL min ⁻¹ (b) 0.5 mL min ⁻¹ 的流速分別對樣品 <i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i> 進行線性沖堤，WCD系統所得之遷移路徑圖.....	124
圖 5-3 化合物(a) <i>New Coccine</i> 與(b) <i>Carmoisine</i> 在沖堤流速 0.5 mL min ⁻¹ 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD系統所得之樣品遷移路徑圖整理。圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 1、2、3 分鐘內，將動相由 100% B _{50:50} 逐步轉換成 100% A _{50:50} 之實驗條件所得結果.....	125
圖 5-4 初始動相 100% B _{50:50} 以流速 0.5 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進	

行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後(a)1(b)2(c)3分鐘內，逐步將動相轉換成100% A _{50:50} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	126
圖 5- 5 初始動相 100% B _{50:50} 以流速 0.5 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後(a)0(b)1(c)2分鐘時，瞬間將動相轉換成100% A _{50:50} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	127
圖 5- 6 (a) 動相A _{45:55} 與(b) 動相B _{45:55} 以 1 mL min ⁻¹ 的流速對 <i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i> 進行線性沖堤後所得之層析時圖	128
圖 5- 7 化合物(a) <i>New Coccine</i> 與(b) <i>Carmoisine</i> 在沖堤流速 1 mL min ⁻¹ 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD系統所得之樣品遷移路徑圖整理。圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 2、4、6、8、10、12、14、17、30分鐘內，將動相由 100% B _{45:55} 逐步轉換成100% A _{45:55} 之實驗條件所得結果.....	129
圖 5- 8 初始動相 100% B _{45:55} 以流速 1 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後(a)2(b)4(c)6分鐘內，逐步將動相轉換成 100% A _{45:55} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	130
圖 5- 9 初始動相 100% B _{45:55} 以流速 1 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後(a)2(b)2.5分鐘時，瞬間將動相轉換成 100% A _{45:55} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	131
圖 5- 10 兩化合物注入管柱後 2分鐘時，瞬間將初始動相B _{45:55} 改變為A _{45:55} ，WCD系統所得之樣品完整遷移路徑圖	132
圖 5- 11 (a) 動相A _{40:60} 與(b) 動相B _{40:60} 以 1 mL min ⁻¹ 的流速對 <i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i> 進行線性沖堤後所得之層析時圖	133
圖 5-12 化合物(a) <i>New Coccine</i> 與(b) <i>Carmoisine</i> 在沖堤流速 1 mL min ⁻¹ 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD系統所得之樣品遷移路徑圖整理。圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 6、8、10、14、20、30分鐘內，將動相由 100% B _{40:60} 逐步轉換成 100% A _{40:60} 之	

實驗所得結果	134
--------------	-----

圖 5- 13 初始動相 100% B _{40:60} 以流速 1 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後(a)10(b)14分鐘內，逐步將動相轉換成 100% A _{40:60} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	135
--	-----

圖 5- 14 初始動相 100% B _{40:60} 以流速 1 mL min ⁻¹ 沖堤管柱，進行管柱平衡，在樣品(<i>New Coccine</i> 與 <i>Carmoisine</i>)進樣後 4 分鐘時，瞬間將動相轉換成 100% A _{40:60} ，WCD系統所得之分析物遷移路徑圖	136
---	-----

圖 5- 15 (a)-(d)分別為當混合樣品(<i>New Coccine</i> + <i>Carmoisine</i>) 注入管柱後 3.5、3.75、4、5 分鐘，瞬間將動相由 100% B _{40:60} 改變為 100% A _{40:60} ，WCD所得之樣品空間濃度分佈圖	137
---	-----

圖 5- 16 觀察分析物滯留順序交錯現象之最佳條件下所獲得的管柱內樣品濃度空間分佈圖	138
---	-----

表目錄

表 2- 1 WCD系統曝光時間對照表	42
表 2- 2 實驗所得波形指標參數符號表	43

表 2-3	WCD再現性測試條件實驗中，樣品達管柱 13 公分處的空圖訊號波形指標	44
表 3-1	動相組成比例與數據取點間距時間	75
表 3-2	15 組等位沖堤層析之管外層析時圖波型指標	76
表 3-3	15 組等位沖堤層析實驗之時圖層析波寬與樣品移動至管柱 17 公分處的空圖波峰寬度比較	77
表 3-4	理論方程式參數符號表	78
表 3-5	15 組等位沖堤層析實驗之時圖層析波高與樣品移動至管柱 17 公分處的空圖波峰高度 $\times \frac{l}{k+1}$ 數據	79
表 4-1	模式一階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標	102
表 4-2	模式二階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標	103
表 4-3	模式三階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標	104
表 4-4	空時圖理論板數、板高計算結果	105

第一章 簡介

1.1 研究動機

在二十世紀中期以前，混合物之分離大都是以傳統的方法如沉澱、蒸餾及萃取來實現[1]。至今，則常以層析和電泳法來進行，尤其是多成份且複雜的樣品，層析法（chromatography）是一種可應用到各科學部門的有力分離方法，由於有許多新型層析技術的發展，使得其應用在過去五十年間有巨幅的成長。這些方法對科學界的巨大衝擊，可由 1952 年諾貝爾獎頒發給 Martin 和 Synge 以獎勵他們在此領域的貢獻而得到佐證，更令人印象深刻的是，在 1937 年到 1972 年間可列出 12 個諾貝爾獎，在他們的研究工作中層析法扮演重要的角色 [2]，可以見得層析法對科學界的重要性。

對於層析法的應用與技術設計而言，透過層析理論可以適當地選擇解析能力或分離速度等條件。為人熟知的有：隔板理論（Plate Theory）與速率理論（Rate Theory）。

隔板理論[3]係來自蒸餾塔的概念，以動靜兩相間的平衡推導出管柱效率的表現方法，如波峰寬度、滯留時間（retention time）、解析能力以及最重要的理論板數（theoretical plates）與板高（height equivalent to one theoretical plate, HETP 或以 H 代表）等觀念。

速率理論以荷蘭科學家 van Deemter 等人提出的方程式最為著名。1952 年，Lapidus 和 Amundson 提出了速率理論，到 1956 年，van Deemter 等人又將該理論擴展[4]，這項理論考慮到了分子擴散效應及擴散所控制的質量轉移，討論範圍相當廣泛。

除了以上兩大理論之外，1959 年 Giddings 發展的通用不平衡理論 (Generalized nonequilibrium theory) [5]，更進一步地考慮到分子擴散之質量轉移動力學。

根據以上這些理論所發展出來的研究，在多數的情況下，都能滿足層析的實驗結果[6-10]。

Pai 於 2002 年發表之 Tailography [11]，以及 2003 年發表於同一期刊之 Parcel model[12] 皆指出：「由傳統單一通道偵測器 (single-channel detector) 所獲得之以時間單位為橫軸的圖譜結果，並非流析管路中樣品的真實空間分佈」，在忽略時間效應 (temporal effect) 的情況下，會對傳統偵測器所收集到的訊號產生錯誤的解釋，此類型之疏失不僅發生在流動注入分析 (flow injection analysis, FIA) 系統中[13-16]，也會發生於被廣泛使用的層析系統裡。在 Pai 所發表之文獻中暗示傳統層析理論需要做修正，並且，在後來的研究中，其陸續發展出一系列模擬層析行為之理論公式，要證實這些公式的正確

性，除了必須得到傳統之樣品流經管柱後的層析圖譜訊號，還必須獲得在沖堤過程中，於管柱內的樣品空間分佈訊號，有鑑於此，本研究室開始著手設計有別於傳統的偵測系統，我們使用光學掃描器之零件，組裝成全管柱型偵測（whole-column detection, WCD）系統，以便得到大範圍觀測視窗（長達 21 公分），完整記錄層析管柱內樣品波型分佈，結合傳統單一光徑吸收光譜偵測器，組成一套完整的多功能偵測系統，能同步觀察管柱內、外之樣品流析訊號，期望以此系統所獲得的實驗數據來驗證 Pai 所提出之相關層析理論學說。

1.2 全管柱型偵測（WCD）系統介紹

在進行各類的流體實驗如流動注入分析法，液相層析（liquid chromatography, LC）、氣相層析（gas chromatography, GC）和毛細管電泳（capillary electrophoresis, CE）時，傳統常見的單通道偵測器，通常銜接於管柱出口來對通過之樣品進行偵測。流經偵測器的樣品訊號通常以「時間對訊號強度值」的方式記錄，然後再對所得訊號進行研究與探討。然而，有些科學家認為以上所述的單通道偵測器並非唯一一種可以觀察流體行為的偵測系統，所以，便開始發展所謂的多通道偵測（multi-channel detection, MCD）系統，亦即全管柱偵測系統，這種系統可以瞬間同時的偵測大範圍的樣品訊號，若要完整的研究層析分離行為的話，全管柱型的偵測器比單通道偵測器更為洽當。

第一篇有關多通道偵測系統的文獻於1988年發表[17]，Evans和McGuffin使用雙通道偵測器來觀察螢光樣品在毛細管中的流動行為，藉著觀察分析物在2偵測點間的趨勢，可排除分析管柱中所謂的管外效應（extracolumn effect）對樣品產生的影響。之後，Rowlen等人設計了一組解析度更高的多通道偵測系統[18,19]，將14組紫外光感二極體（UV-sensitive photodiode）架設在玻璃材質的層析管柱外，用來即時觀察樣品在層析管柱中進行沖堤時的遷移分佈情形，對這種偵測系統，作者命名其為全管柱偵測（WCD）系統，但在這套偵測系統開發出來前，作者在1986年便以電腦模擬的方法來表現全管柱偵測器觀察流體行為的結果[20]，並且提出使用全管柱偵測系統的優點及其潛力等論述；延續電腦模擬的研究之後，作者著手開發WCD系統，並且以實驗數據來證實使用WCD的確對高效能液相層析（high-performance liquid chromatography, HPLC）有相當地優勢與價值，其列舉出來可能的優勢如下：

1. WCD系統可以真實的記錄樣品於管柱前端、尾端等不同位置的分佈與流析時間。
2. 藉由WCD系統所獲得的數據，可在尚未進行樣品沖堤前幫助準確預測實驗結果。

3. 更精確的得到滯留因子 (retention factor)。
4. 可測量動靜相間平衡的速度。
5. 可以實驗證明滯留因子在線性層析 (linear chromatography) 或者非線性層析 (non-linear chromatography) 過程中的改變狀況。

當WCD系統的用法及優勢被提出後，相當多的分離科學者開始改良這套偵測系統，捨棄先前所使用的分離式光能轉換器 (discrete photon transducer)，改以電荷耦合元件 (charge-coupled device, CCD) 為訊號接受器，這是一種陣列式的光電耦合檢像器，上有許多排列整齊的電容能感應光線，並將影像轉變成數位訊號，在擷取影像時，有類似傳統底片的感光作用，常被應用於數位相機、光學掃描器與攝影機等感光元件。CCD的使用大幅增進了WCD系統的效能，其陣列式的電路排列除了大幅提升偵測器空間解析度以外，影像擷取的效果還可以讓使用者觀察到更生動真實的樣品分析過程，但是由於市售CCD尺寸上的限制，所以在這套技術發展初期，是用於觀察小範圍毛細管內的樣品流動情形。一般毛細管的管柱材質是融熔二氧化矽 (fused-silica)，具透光性，而管的外壁於拉管時會塗布保護性的聚醯亞胺以增加其強度，在毛細管電泳分離技術中就是使用這類的管路，

只要將塗布於外層的聚醯亞胺除去，便可使光線穿透過玻璃進而觀察到管柱內樣品移動情形，所以當WCD這類偵測系統開始受到關注後，便有很多科學家將這樣的技術用來觀察毛細管電泳中樣品移動分佈的情形，其中又以觀察毛細管導電聚焦（capillary isoelectric focusing, CIEF）實驗中樣品流體行為等研究最為常見，當具有不同等電點的物質被注入管柱後，其分離可藉著管中的緩衝混合液沿著管柱連續地改變酸鹼值來完成，分析物則會停留在其特定的管柱位置而形成狹窄的區帶，等電聚焦分離是基於分析物的平衡性質的差異，而不是遷移速率的差異，所以一旦分析物遷移至特定管柱位置時，其區帶位置則會保持一定且不再隨時間改變[1]，這樣的分離機制如果以WCD系統來當做偵測系統的話，可以不必等到樣品遷移至管外之前，便能得到分析分離結果，而且還可以直接觀察分析物遷移的整個平衡過程，這些資訊都可以更迅速的幫助實驗操作者找到適當的操作條件來提升分離效率。

第一次將WCD系統運用來觀察毛細管等電聚焦系統的科學家是Wu等人[21]，作者以雷射光源激發管內樣品使其放光，然後以全管柱影像偵測（whole-column imaging-detection, WCID）技術獲得樣品在毛細管內的分佈影像，隨後，作者以不同的偵測機制來觀察CIEF的實驗結果，以提升WCID的應用性，例如螢光偵測法及吸收光偵測法

[22-27]。在WCD系統的發展史中，CCD的裝置與使用方法多有不同，有些學者是以CCD直接收集光訊號然後轉換成電訊號來進行研究分析，有些則是將CCD搭配光學設計的零件來使獲得更寬廣之觀察範圍的訊號，例如使用數位攝影鏡頭來收集樣品移動影像，Nilsson等人就是以CCD攝影機來記錄毛細管電泳實驗中的DNA片段的螢光影像[28,29]。甚至有科學家使用WCD系統來獲得部分實驗參數後，便可預測在CIEF實驗中分離150種樣品之混合物的分析結果[30]。

除了以具透光性的熔融二氧化矽運用於毛細管電泳外，在液相層析的發展初期，其實也是以具透光性之玻璃材質的層析管柱來進行分離實驗的，所以在WCD技術開始發展後，便有科學家使用錄影影像（video-imaging）擷取的偵測方法來觀察填充靜相後的玻璃管柱內樣品移動的情形。Tamura等人以CCD攝影鏡頭來直接記錄發螢光樣品在逆相高效能層析（reversed-phase high performance liquid chromatography）玻璃管柱中的分離過程影像[31,32]。Guiochon等人也設計了一套WCD系統，用來收集層析系統中樣品沖堤過程中的影像訊號[33-35]，並且點出一般HPLC管柱中常用來防止靜相流失的擋板（frit）也會對樣品在空間上的波形產生影響。以上所介紹的這些WCD系統，都是以影像收集的方法獲得在玻璃管柱內樣品移動過程中的空間濃度分佈，然後再進一步地將影像結果透過軟體轉換成數位

訊號來進行分析處理，這樣的技術較先前所提的以光能轉換器為訊號收集器的偵測方法，大幅提升了其空間解析度，並且可以獲得物質遷移過程中的三維資訊：樣品遷移時間、樣品濃度強度 (peak height)、樣品分佈範圍 (peak width) 藉由獲得更多樣品在層析過程中的動態層析資訊 (dynamic chromatography information)，將有助於分析管柱內所發生的層析流體行為，進而改善實驗條件來達到分離效率提升的目標。

雖然以上已經介紹多組WCD系統，但是這些系統都沒有同時整合「直接獲取分析訊號」、「高解析度」、「大範圍觀測視窗」等裝置優勢，所以本實驗室組裝設計了一套WCD系統與耐高壓玻璃管柱，結合兩者，可大範圍 (21 cm) 的觀察分析物在一般常用的HPLC實驗條件下之分離過程，藉由對管柱內樣品行為的了解，本研究將修正一些平常容易被忽視的錯誤層析觀念，以及發掘一些隱藏於管柱內不易被關注到的層析現象，供未來層析學者進行更深入的探討。

第二章 儀器設計及裝置

本章節將詳細介紹WCD系統與耐高壓玻璃管柱之組裝過程、管柱耐壓性測試、WCD系統比耳定律（Beer's law）測試與再現性測試。

2.1 實驗

2.1.1 儀器裝置

本實驗所使用的層析系統包含傳統往復式梯度沖提（gradient elution）幫浦（型號 Series 4，購自 Lab Alliance, PA, USA）、內體積 20 μL 的樣品迴圈（sample loop）、HPLC 管柱、WCD 系統（包含光學盒、燈源、濾波片、XYZ 軸調整機座以及連接用來處理訊號之個人電腦）和傳統 UV/Vis 偵測器（型號 Waters 486，購自 Milford, MA, USA），實驗裝置圖如圖 2-1 所示。

HPLC 管柱又分為兩種，一為長度 40 公分、外徑 6 毫米、內徑 3 毫米的玻璃管柱，二為長度 25 公分、內徑 3 毫米的自製 HPLC 管柱。

自製 HPLC 管柱的耐壓測試是使用針式幫浦（其型號 ISCO Model 260D，購自 Lincoln, NE, USA），最高輸出壓力為 7500 psi。自製 HPLC 管柱與 WCD 系統的製造過程詳述如下：

2.1.1.1 自製 HPLC 管柱

本研究初期所使用的 HPLC 管柱是長度達 40 公分的玻璃管柱，但是由於其接頭零件屬高分子材質，耐壓能力不足，導致實驗條件大幅受限，例如，將 10 μm octadecylsilane (ODS) 在常壓下填充入玻璃管柱內做為靜相，接著將樣品注入此管柱來進行層析沖提時，實驗流速只能達 0.3 mL min^{-1} ，倘若提供更高的幫浦流速進行實驗時，管柱入口端或出口端之線路接合處，便可能會因為動相所造成的過高背壓 (backpressure) 而產生洩漏的問題，故為了使管柱可以進行傳統 HPLC 條件 (例如流速可至 1 mL min^{-1} 以上) 的實驗，必須特製管柱使其可以達到既透光、又耐高壓、耐酸鹼等特性，所以本實驗室委託彥宏開發科技有限公司[36]設計製造此管柱，使其盡量吻合一般 HPLC 不鏽鋼管柱之使用範圍，管柱結構如圖 2-2 所示。首先將一長度 20 公分、外徑 2 公分、內徑 8 毫米、耐酸鹼的不鏽鋼管柱兩側切割出長 15 公分寬 4 毫米的開口，然後將長 18 公分、外徑 8 毫米、內徑 3 毫米的玻璃管柱放入上述之不鏽鋼管柱中，在這樣的設計下，光線可以從不鏽鋼管其中一側的開口進入，穿透過玻璃管柱後，再從另外一側的開口出來，抵達偵測器。玻璃管與外接不鏽鋼管接合方式是在玻璃管兩端末端切面處放置 Viton 材質的 O 型環 (內徑 4.47 毫米，厚度 1.78 毫米)，然後兩旁鎖上 Swagelok 的 male nuts (內徑 6.35 毫

米，如圖 2-2A)，此 male nuts 內嵌有一外徑 6.35 毫米、內徑 3 毫米的不鏽鋼管，當 male nuts 擠壓 O 型環時，此不鏽鋼管會透過 O 型環與玻璃管連結成一內徑 3 毫米、長度 25 公分之空心管路，如此一來，便可將層析系統中所使用之靜相填充於其內；而為了使靜相不會流失，不鏽鋼管末端必需先接上一 Swagelok nut (圖 2-2B)，然後連接內含擋板 (frit, 0.45 μm) 的 external column end connector (圖 2-2C)，此即完成自製 HPLC 管柱本體。此管柱前後端加上欲連接至梯度沖提幫浦 (前) 以及 UV/Vis 偵測器 (後) 的中間不鏽鋼線路後，一套耐高壓、耐酸鹼、又具有透光性質的 HPLC 管柱便完成。

當管柱完成後，以針式幫浦測試其耐壓程度，確定能承受一般 HPLC 實驗之所需後，便委託建宏層析企業股份有限公司[37]以高壓填充的方法將 10 μm ODS 靜相注入管柱中，使之成為一逆相高效能層析管柱。由於靜相是填充於兩組擋板之間，所以整個管柱長度即兩擋板間的距離，也就是 25 公分；靜相 10 μm ODS、內徑 3 毫米、長度 25 公分的管柱是相當常見的 HPLC 管柱規格。

2.1.1.2 WCD 系統

WCD 系統包含光學盒、燈源、濾波片、XYZ 軸調整機座以及連接用來處理訊號之個人電腦[13,38,39]。光學盒從虹光精密工業股份有限

公司[40]所提供的光學掃描器（型號 CanoScan 5000）拆解下來，其內部包含三組平面鏡和一片聚焦的透鏡，透過這個光學盒簡單設計的光學路徑，21 公分寬的光線可以被收集在一組寬度 6 公分的 CCD(型號 Toshiba models T8E21) 上，然後轉換成電訊號於銜接的個人電腦（如圖 2-3 所示），連接光學盒與個人電腦之線路以及操作界面由虹光公司的 楊得志 先生設計；燈源亦拆解自同一光學掃描器，其放射光譜如圖 2-4 所示，燈源屬冷陰極螢光燈管（cold cathode fluorescence lamp），具高發光效率、管徑細等優點，廣泛應用於平面顯示器中，由於其在 435 nm 及 540 nm 左右有相當強的放射，我們以這兩波段分別為光源進行吸收光譜實驗，請裕群光電科技股份有限公司[41]製作適用之濾波片，在不同實驗中，使用特定波長的濾波片，置放於燈源後、偵測器前，以避免多餘的不必要波長之光線進入偵測器中，濾波片之一是 435 奈米干涉型濾波片（interference filter），穿透波長中心 435 nm，可穿透之波峰寬度範圍約 50 nm，穿透度約 90%，另一是 540 奈米濾波片，穿透波長中心 540 nm，可穿透之波峰寬度範圍約 70 nm，穿透度約 95%。XYZ 軸調整機座分為兩個部分，第一部份可架設燈源、管柱，第二部份架設光學盒（含濾波片），兩個部份總共可以五種方向來調整彼此間的距離與高度，以及調整燈源之光線穿透管柱後射入光學盒的角度，此機台委託彥宏開發科技有限公司設計製

造，待完成後，XYZ 軸調整機座置放於光學桌面上，以避免實驗操作時之震動影響實驗準確度，實物照片見圖 2-5。

在本實驗中，光線必須通過有填充靜相的管柱後抵達位於光學盒內的 CCD 上，雖然填充之靜相並不透明，光線可以擴散反射 (diffuse-reflection) 的方式穿越於靜相空隙間 (如圖 2-6)，雖然以此方式所收集的穿透 (transmittance) 光線來進行分析並不是一般常見的吸收光譜測量之方法，但是根據文獻[18,19]，仍有不少研究團隊以此種模式進行管內分離行為的觀察，此即表示以此種方式進行分析，亦可以精確地表現樣品於管柱內之移動行為。

樣品吸收訊號的處理方法如下：樣品尚未注入管柱前，先收集光源通過含有初始條件 (initial condition) 動相之管柱後抵達 CCD 的訊號，令其為 P_0 ，樣品注入的同時，再次啟動 WCD 系統收集樣品在通過管柱過程中所有光線強度訊號，令其為 P ，吸收值 $A = \log(P_0/P)$ ，此為根據 CCD 所收集之電訊號來計算樣品通過管柱過程中之吸收訊號的方法。在稍後論文中將會提到，本系統在校正樣品訊號時，其訊號值與樣品濃度遵守吸收光譜學中所提之比耳定律，故本研究接下來將以吸收光譜操作方法進行後續章節之實驗。

2.1.1.3 WCD 系統操作界面設定

進行實驗前，必須先設定好銜接 WCD 之個人電腦中的操作界面（圖 2-7），例如：樣品取樣時間、曝光時間等參數，使 WCD 獲得樣品吸收訊號，以下會逐一介紹操作界面之設定原則。

(a) 取樣時序 (sampling timing)

擷取樣品所需花費之時間包含三個部份（圖 2-8），第一是數據取點間距時間（A），第二是偵測器曝光時間（B），第三是電腦取數據所需時間（C）。A 數值所佔之比例相當大，同時也是唯一在每次實驗操作前都必須重新設定之 WCD 系統參數。本研究中，由於數據處理軟體（microsoft excel）的欄數最大值為 256 欄，故為了避免擷取過量的實驗數據，導致數據處理效率降低，在每次沖堤實驗啟動前，必須根據樣品受靜相滯留程度與幫浦流速等實驗條件，輸入適當的數據取點間距時間，使 WCD 系統隨固定時間間隔取點，最後獲得總量不超過 200 組的樣品吸收訊號數據。例如，若一組層析實驗所需沖堤時間約 10 分鐘的話，則可設定數據取點間距時間為 3 秒，如此一來，整個流析過程的數據取點數量便不會超過 200 組。B 數值是以百分比（%）為單位，輸入不同的數值會對應到不同的曝光時間（表 2-1），本研究中，WCD 系統之最短曝光時間為 3.6 ms，但由於管柱內填充

靜相會導致光源訊號大幅減弱，進而影響訊號解析度，故本研究所選擇的曝光時間長度（B 數值）固定為最大值 1600%（57.6 ms）。A 數值與 B 數值為操作者在實驗開始前所設定之參數，在同一次流析實驗中，此兩數值之總和為固定值，但電腦擷取數據時間 C 則會受到處理環境的干擾所影響，若取樣過程中電腦內其他運作軟體過多的話，C 數值便會增大且浮動程度亦會增加，不過由於每次取點的時間皆會被電腦確實地記錄下來，故即便擷取樣品所需花費之時間會隨著電腦穩定度而稍有差異，依舊不會影響到訊號分析的正確性。

(b) 取樣點數(sampling points)



此欄可以選擇訊號收集點的數量，總共有五個選項：670、1340、2680、5360、10720，觀察範圍達 21 公分的 WCD 系統裡，其光學盒內線形 CCD 上有 10720 個像素（即 10720 個訊號收集點），若以相鄰 2 點做平均積分處理，會得到 5360 個訊號收集點；以相鄰 4 點、8 點、16 點做平均積分，分別會有 2680、1340、670 個訊號收集點。本實驗的每一組訊號波形皆由 670 個點所組成，其空間解析度為 0.3 mm（21 cm/670 個點），對本實驗所需已足夠，並且，以相鄰 16 點做平均積分，可以達到加強訊雜比(S/N)的效果。

(c) 取樣模式(sampling mode)

光學盒內的 CCD 有塗佈材料，可以過濾掉不同波長的光線，因此，由取樣模式可以選擇光源通過 CCD 的波段，選擇模式有 5 種，分別為 Red、Green、Blue、Color、Gray，在本實驗中，因光學盒已加上適當的濾波片，使符合樣品吸收波長之波段的光線通過，所以，本研究中選擇“Gray”為取樣模式，即 CCD 不需濾掉任何波長的光，盡可能讓所有可用的光線都能到達偵測器，提高偵測訊號的靈敏度。

2.1.2 藥品

Tartrazine(黃色四號合成色素)，dye content approx. 90%，分子量 534.36，最大吸收波長 430 nm，購自於 SIGMA(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)。

Anthrurufin，購自於 Aldrich (WI, USA)，其分子量 240.41，最大吸收波長 425 nm，溶於丙酮中使成為樣品溶液。動相組成為甲醇與水。甲醇與丙酮皆屬 HPLC 級溶劑，亦購自 Aldrich。實驗用水為經過 Millipore(Beford, MA, USA) Milli-Q 處理的 18.2 M Ω 去離子水。

2.1.3 數據類型定義

以 WCD 系統收集樣品於管柱中之吸收訊號值，每一次實驗都可得一吸光值空時矩陣(圖 2-9)，將此富含大量數據之矩陣進行詳細的

分析，便可得數種不同的實驗數據類型，此段落將對本研究中所獲得的各種類圖譜進行定義。

由於本研究當中使用 2 組偵測系統 (WCD 與傳統 UV/Vis 偵測器)，所以在這裡我們先定義(圖 2-10):以 UV/Vis 偵測器收集訊號時，為固定一個偵測管柱出口的位置，隨時間來擷取樣品通過偵測位置的訊號，故所得的圖形橫座標單位為時間、縱座標單位為訊號強度，此類型數據即稱之為時圖 (temporal profile)，且由於此組數據是在管柱外之環境所收集而得，故又稱管外 (post-column) 時圖。使用 WCD 系統時，可以同時偵測大範圍的樣品分佈，如同瞬間拍照的技術，獲取樣品在一維管柱空間中的訊號強度值，獲得的圖譜橫座標為管柱位置、縱座標為訊號強度，此類型之數據稱為空圖 (spatial profile)，且由於此數據是在管柱內之環境所獲得，故亦可稱之為管內 (on-column) 空圖。

WCD 系統除了可以獲得管柱內樣品的空圖訊號，若將固定一訊號收集點所獲得的訊號強度隨著時間累積起來的話，亦可獲得橫座標單位為時間的管內時圖數據 (圖 2-11)。

根據 WCD 系統所獲得的管內空圖數據，又可繪製出樣品在管內沖提移動過程中的遷移路徑圖 (migration route) (圖 2-12): WCD 在

T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 等流析時間時“拍攝”到樣品於管柱內的空圖波峰訊號 $Peak_1$ 、 $Peak_2$ 、 $Peak_3$... $Peak_n$ ，找出以上空圖波峰之頂點分別位於管柱位置 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 處，再將 T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 與 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 等數據同時表現於同一張關係圖上，此樣品流析時間與空圖波峰頂點位置關係圖即稱之為樣品遷移路徑圖，遷移路徑圖中所繪製出的數據趨勢線則稱為遷移曲線 (migration curve)。

2.1.4 波型指標參數

空圖與時圖波形的指標參數為：

(1)波高：實驗波形的最大訊號值，空圖波高之對應符號為 $h_{(s)}$ 、時圖波高之對應符號為 $h_{(t)}$ 。

(2)波峰半高寬：實驗波形最大值之 1/2 高度處，波峰左右兩側的寬度，空圖半高寬所對應之符號為 $W_{1/2(s)}$ 、時圖半高寬所對應之符號為 $W_{1/2(t)}$ 。

(3)波峰面積：本實驗採用積分法來估計波形下所涵蓋的波面積，此方法將兩組訊號值以及兩訊號值的時間或距離差距以梯形面積相加 (圖 2-13)，計算公式為

$$A = \frac{\sum (y_m + y_{m+1}) \times (x_{m+1} - x_m)}{2} \quad (2-1)$$

其中 y_m 代表第一個訊號值， x_m 為 y_m 對應的位置； y_{m+1} 代表第二個訊號值， x_{m+1} 為 y_{m+1} 對應的位置，若 x_m 與 x_{m+1} 間隔差距越小，則累加結果會越接近真實面積，空圖面積所對應之符號為 $A_{(s)}$ 、時圖面積所對應之符號為 $A_{(t)}$ 。

(4)空圖數據取點時間：WCD 系統獲得空圖波峰時的電腦記錄時間，其所對應之符號為 t_p' 。

(5)時圖波峰位置：時圖波峰最高點所對應的樣品流析時間，其所對應的符號為 t_p^* 。

實驗波形（包含管內空圖波形、管內時圖波形、管外時圖波形）所得的各項指標參數之符號的定義整理於表 2-2。

2.1.5 實驗流程

實驗裝置架設完畢之後，先調整機台與多通道偵測器的相關位置與角度，使燈源之光線能夠通過填充管柱並進入偵測器，然後根據電腦操作界面上呈現的光訊號強度，進行機台之 XYZ 軸微調，以達最佳化狀態（如圖 2-14），所謂最佳化狀態是指光源強度穩定且左右兩端強度對稱；機台調整完畢後測量偵測點所對應的管柱位置；上述步驟執行完畢後，進行接下來的實驗步驟：

(1) 每次層析實驗操作前，以約 30 mL 之 HPLC 級甲醇清洗填

充靜相之管柱。

- (2) 依照實驗條件設定幫浦沖堤程式。
- (3) 設定電腦操作界面。
- (4) 注入樣品，並將儀器蓋上黑布避免受其他光源干擾。
- (5) 開動幫浦進行實驗並同時以 2 組偵測系統收集樣品訊號。
- (6) 從電腦操作界面上看到訊號恢復至原本狀態即表示樣品已流出管路，此時停止收集訊號。

- (7) 進行數據處理。



2.1.6 實驗條件

2.1.6.1 管柱耐壓性測試

管柱尚未填充靜相前進行以下測試實驗：以不鏽鋼管路連接針式幫浦與管柱，首先將去離子水灌入針式幫浦中，然後填入特製耐高壓管柱中，待管柱內充滿去離子水後，將管柱另外一端出口密閉，使管柱內環境形成一密閉空間，然後以定壓操作的方法逐步緩慢地提升管柱內壓力並記錄壓力值，待最高耐壓數值確定後，先緩慢地回復管內壓力至常壓，然後再以定壓操作的方式使管內壓力瞬間提升至最高耐壓數值，檢查管柱是否有損害洩漏，若無洩漏則可確定管柱在操作過

程中，動相所產生的背壓只要低於此最高耐壓數值以下，玻璃管柱便不會壞損。

2.1.6.2 比耳定律測試

在一般的分子吸收測量實驗中，物質之吸收訊號強度會遵守比耳定律：

$$A = abc \quad (2-2)$$

a 為吸光係數 (absorptivity)， b 為光線通過樣品溶液之路徑長度， c 為樣品濃度。由於，在本研究中所使用來計算吸收值的光線其實屬於擴散反射穿透光線，分析方法並非一般常見的吸收光譜法，故需進行比耳定律測試實驗，以確保本研究中 WCD 系統所獲得的實驗數據為可採用之吸收訊號。

將 *Tartrazine* 溶於甲醇：水=1：1 (V/V) 的溶液中，配製成 10、50、100、150、200、250、300、350、400、500、750、1000、1500、2000 mg L⁻¹ 的樣品溶液，在注入樣品前先將管柱內打滿甲醇：水=1：1 的溶液，測量光線穿過管柱後抵達偵測器之光強度 P_0 ，然後再分批將 *Tartrazine* 樣品溶液打入管柱內，收集光線通過後之訊號 P ，將此數據做指數運算即可得此濃度樣品在管柱內的吸收度 $A=\log(P_0/P)$ ；本研究之全管柱偵測系統設定的取樣點數為 670 個點，據圖 2-12 可

看出，靠近自製管柱上可觀測視窗之兩側的光源訊號較弱較不穩定，故在此比耳定律測試實驗中，我們選擇第 250-450 個偵測點位置所獲得的樣品吸收值來做平均，使獲得樣品在管柱內的平均吸收值，再將樣品濃度與平均吸收值關係作圖，便可得檢量線，以測試本 WCD 系統所獲得之吸收訊號是否合乎比耳定律。本實驗中，WCD 系統所使用的濾波片為 435 nm 濾波片。

2.1.6.3 WCD 系統再現性測試

為測量機台之穩定性與再現性，將 *Anthrarin* 溶於丙酮中，配製成濃度 150 mg L^{-1} 的樣品溶液，注入管柱之樣品體積為 $20 \mu\text{L}$ ，以組成比例為甲醇：水=93：7 (V/V) 的動相對樣品進行等位沖堤 (isocratic elution)，沖堤流速 1 mL min^{-1} ，樣品進樣後立即開啟 WCD 偵測系統收集樣品於管柱中移動過程之樣品空間分佈訊號，數據取點間距時間為 1.3 秒，並同時開啟 UV/Vis 偵測器收集樣品流出管柱後的吸收度訊號 (偵測器波長選擇為 435 nm)，重複 5 次實驗後，選擇樣品移動至管柱位置約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處的五組空圖訊號波形指標 (波高、波峰半高寬、波峰取點時間與波峰面積) 來進行再現性討論。本實驗中，WCD 系統所使用的濾波片為 435 nm 濾波片。

2.2 實驗結果與討論

2.2.1 管柱耐壓性測試

測試結果是此特殊設計之玻璃管柱能承受至少 200 kg cm^{-2} 的壓力而不產生損壞洩漏，甚至以瞬間加壓的方式使管內壓力飆升至 200 kg cm^{-2} 後再瞬間洩壓，都不會對玻璃管柱造成損壞，一般常用的 HPLC 實驗條件中，壓力鮮少超過此限，故確定此特殊設計之玻璃管柱可進行往後之層析實驗。

2.2.2 比耳定律測試

本實驗所得之檢量線如圖 2-15 所示，在低濃度條件下 (300 mg L^{-1} 以下)，樣品吸收度與濃度成線性正比關係（趨勢線迴歸係數 $R^2=0.986$ ），但於高濃度條件下，偵測系統所觀察到的樣品吸收度與濃度之線性關係會產生偏差，所以在往後進行實驗時，所使用的樣品濃度不可過高，避免收集到偏離比耳定律的樣品吸收訊號，而造成實驗結果的討論方向發生錯誤。

2.2.3 WCD 系統再現性測試

圖 2-16 分別表示 5 組重複實驗中，樣品之波峰頂點移動到管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處的空間波峰，根據以上實驗結果，將每張空圖波峰計算所得之波形面積整理於圖 2-17，並且計算出在移

動過程中其波形面積變化之相對標準偏差值 (RSD)。結果顯示，5 組重複實驗中，樣品在移動過程中之空圖波峰面積相對標準偏差值約 0.90%-1.41%。接下來，進一步地選出 5 組重複實驗中，樣品移動到管柱 13.0 公分處之空圖波峰數據來詳細探討，分別將其波高 $h_{(s)}$ 、波峰半高寬 $W_{1/2(s)}$ 、波峰數據取點時間 t_p' 與空圖波峰面積 $A_{(s)}$ 數據進行 RSD 值計算，所得結果列於表 2-3。計算結果顯示，空圖波形指標 RSD 值皆小於 1.24%，以上結果表示機台穩定性良好，允許繼續進行往後實驗。

2.3 結論



本研究所使用之偵測系統屬於一穩定性高、再現性好的大範圍觀測系統，搭配自製的玻璃管柱，讓我們可以清楚的觀察到樣品在有填充靜相之管柱內的移動行為。接下來的章節中，將介紹多種在層析管柱中發生的分離行為，藉以釐清一些現有錯誤的層析觀念，對層析領域之理論研究與教學提供一己之力。

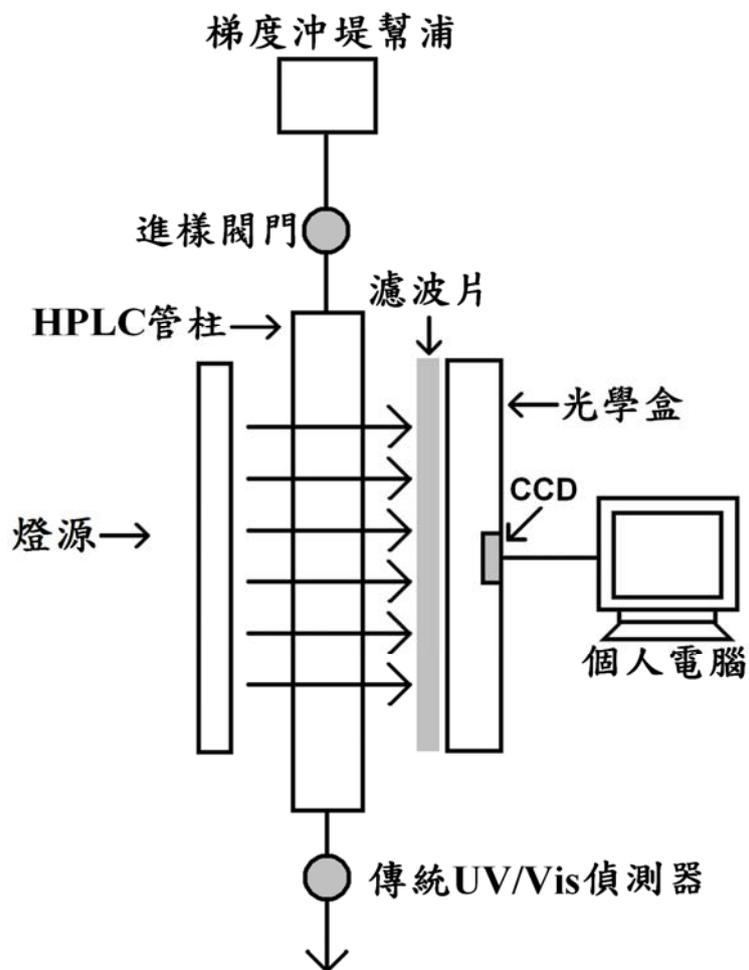


圖 2-1 實驗裝置圖

其中，燈源、濾波片、光學盒等零件架設於 XYZ 軸調整機座上，包含個人電腦的話，即為全管柱偵測系統。

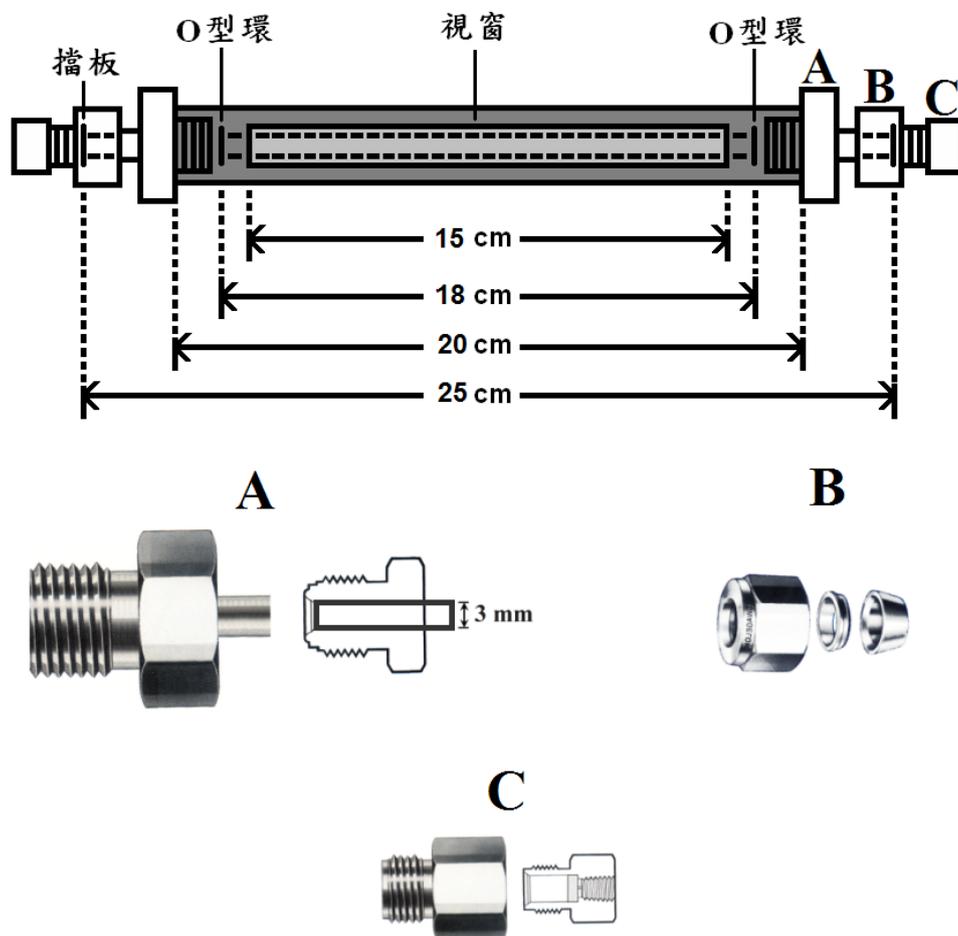


圖 2-2 自製 HPLC 管柱結構圖

管柱規格：總長度 25 公分、內徑 3 毫米。其中，中間 18 公分長度範圍屬玻璃材質，另外 7 公分的長度範圍屬不鏽鋼材質。

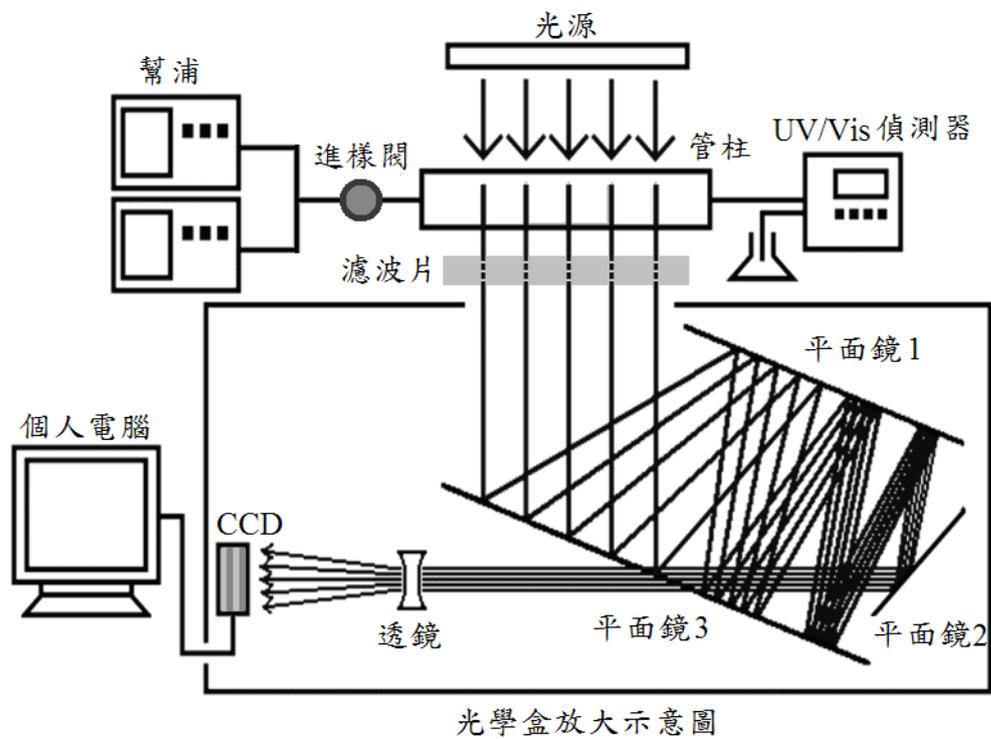


圖 2-3 詳細實驗裝置圖

光學盒內部包含三組平面鏡和一片聚焦透鏡，透過圖示內之光學路徑，21 公分寬的光線可以被收集在一組寬度 6 公分的 CCD 上，然後轉換成電訊號於個人電腦以供數據處理。

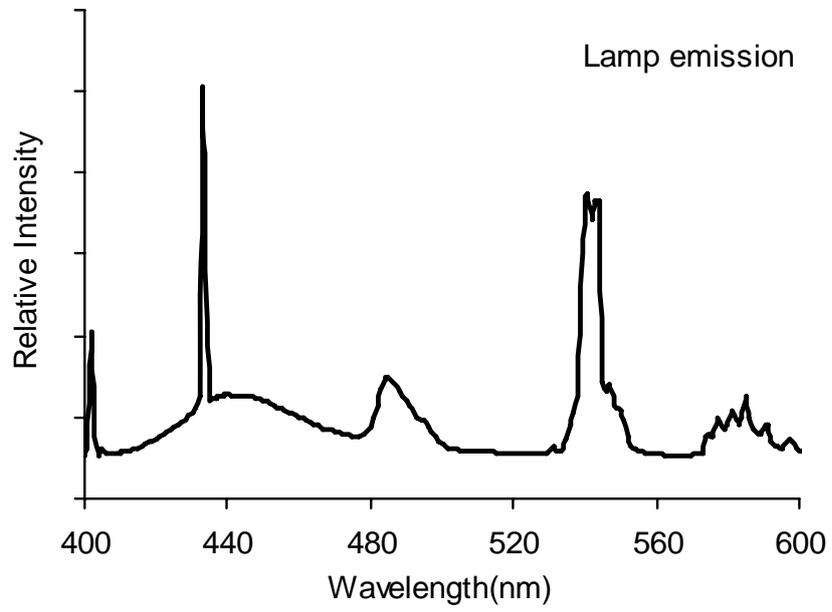


圖 2-4 燈源的放射圖譜

燈源屬冷陰極螢光燈管，拆解自光學掃描器，其在 435 nm 及 540 nm 左右有相當強的放射。

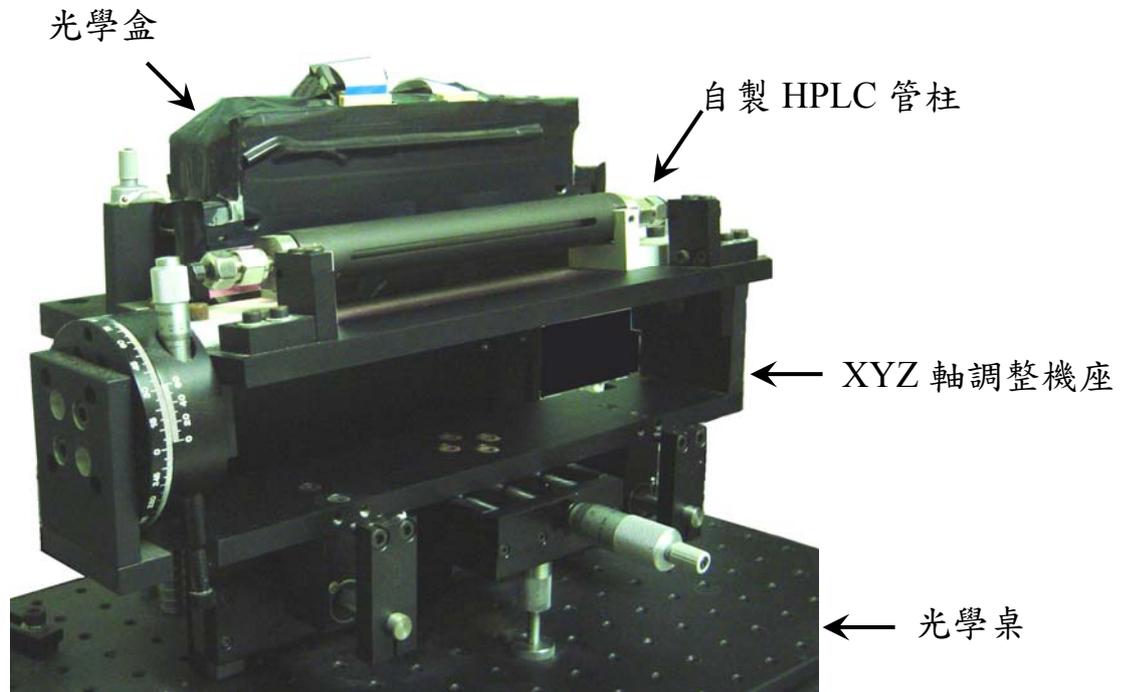


圖 2-5 全管柱偵測系統實物照片

全管柱偵測系統包含光學盒、燈源、濾波片、XYZ 軸調整機座以及處理訊號之個人電腦，除個人電腦以外，其餘零件皆架設於光學桌面上，以降低實驗操作時之震動所造成的實驗誤差。燈源及濾波片由於零件較不明顯，故於本圖中並未以箭頭指出其位置。

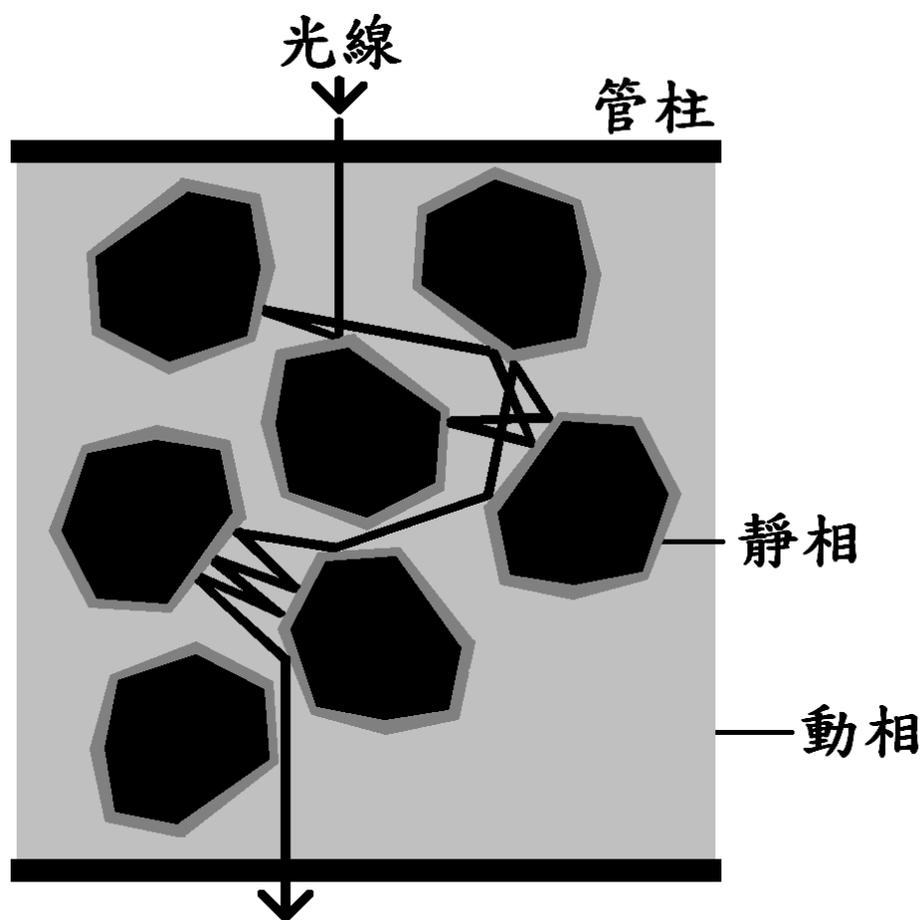


圖 2-6 擴散反射穿透 (diffuse-reflection transmittance) 現象

由於管柱內所填充的靜相屬不透光物質，故光線穿過管柱抵達光學盒的模式，屬擴散反射穿透現象。

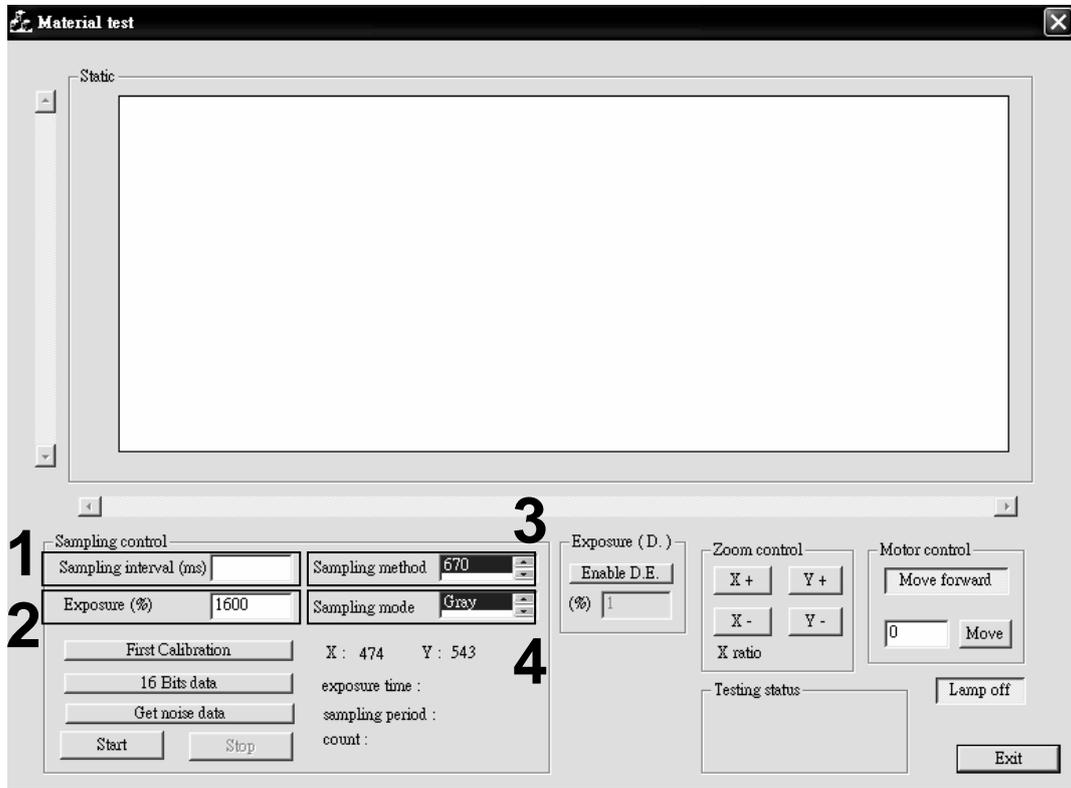


圖 2-7 電腦操作界面圖

操作界面上可設定之參數包含：1.數據取點間距時間；2.偵測器曝光時間；3.取樣點數；4.取樣模式。除了數據取點間距時間於每次實驗前須重新輸入以外，在本研究中，偵測器曝光時間固定為 1600%(57.6 ms)、取樣點數固定為 670 個、取樣模式固定為 “Gray”。

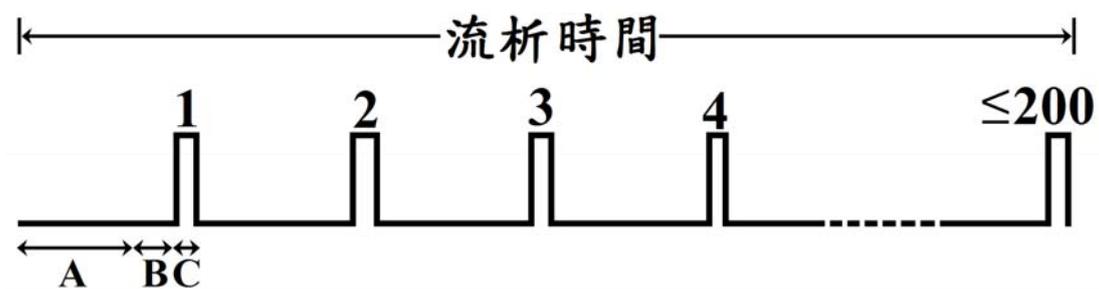


圖 2-8 數據取點時間說明圖

A：數據取點間距時間（實驗設定參數）

B：偵測器曝光時間（實驗設定參數）

C：電腦取數據所需時間（浮動值）

A 數值與 B 數值為操作者在實驗開始前所設定的固定參數，C 數值受電腦內部處理環境影響而有浮動不固定之特性。

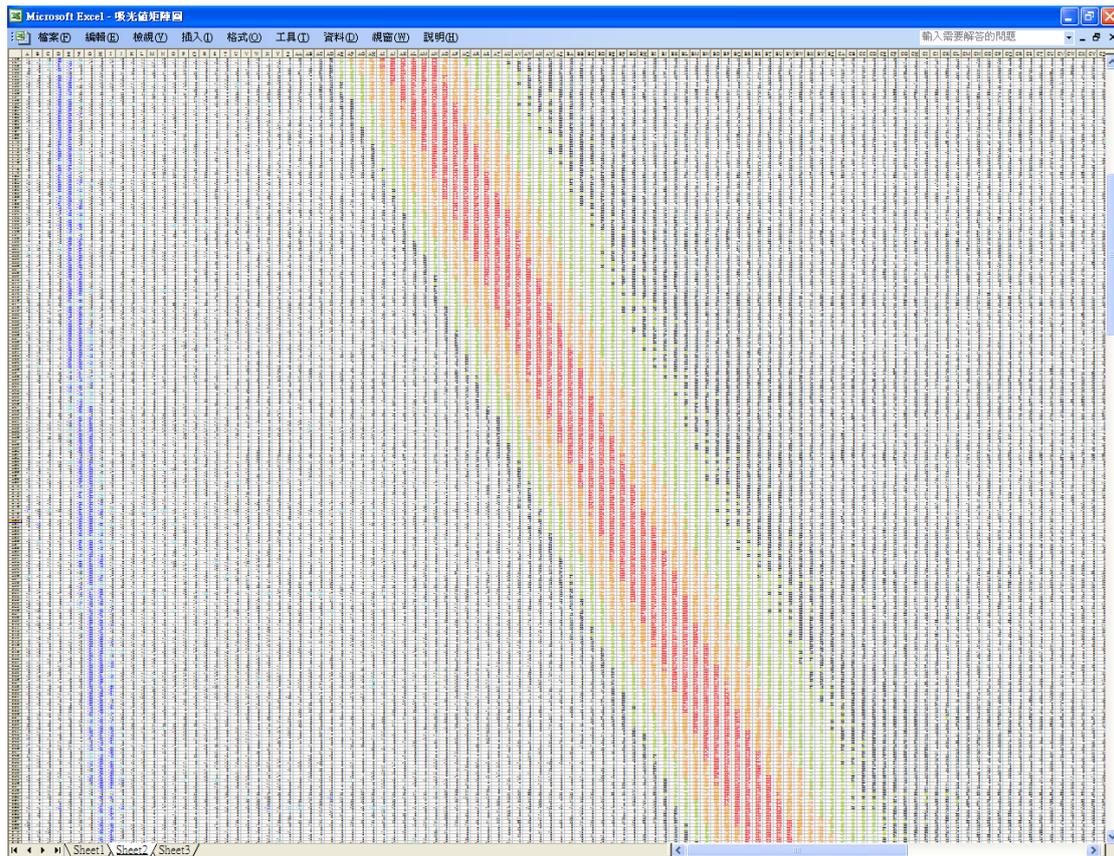


圖 2-9 實驗所得之吸光值空時矩陣

WCD 包含 670 個偵測點，若記錄 150 組線性層析實驗數據的話，便共有約 10 萬個數值 ($670 \times 150 = 100,500$)，全部放在 excel 的 worksheet 中，縱軸代表管柱空間位置，橫軸代表 WCD 擷取數據時間，字型選用 9 號字，欄寬降為 3，列高降為 7，螢幕 display 下降到 40%，如此一來，可將大部分數據同時呈現在螢幕上。由圖上的明暗（樣品吸收度介於 0.03-0.1 為綠色、0.1-0.25 為橘色、0.25 以上為紅色，藍色部份為溶劑之吸收訊號）可看到樣本在空間與時間數據之矩陣中展開的圖譜，在線性層析系統中，其質量中心（紅色部分）在管柱內直線前進。

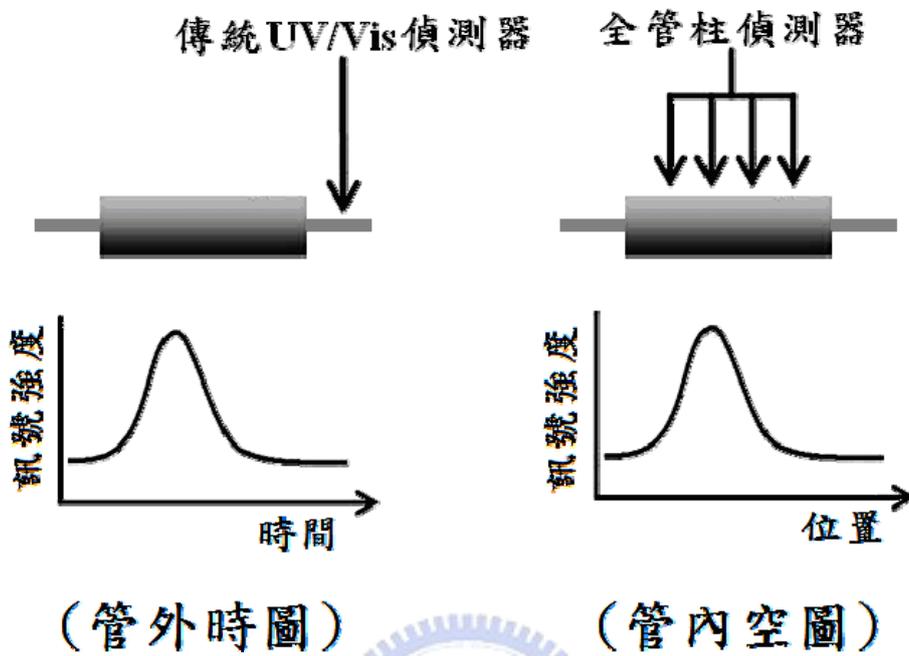


圖 2-10 管外時圖和管內空圖的定義

管外時圖是以傳統單通道偵測器收集樣品流出管柱後的訊號結果，所得圖表橫座標單位為時間；管內空圖是以 WCD 系統同時偵測大範圍的管柱內樣品空間分佈訊號，所得圖表橫座標單位是空間。

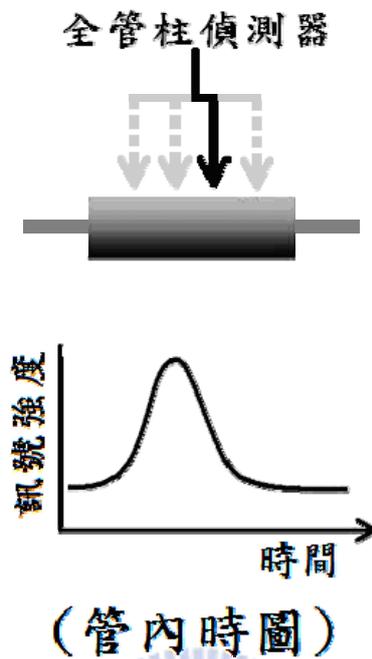


圖 2-11 管內時圖的定義

沖堤過程中，WCD 系統持續收集大範圍之樣品空間分佈訊號，但選擇其中一固定管柱位置為偵測點，累積隨時間而得的訊號，可得此橫座標單位為時間的管內時圖。

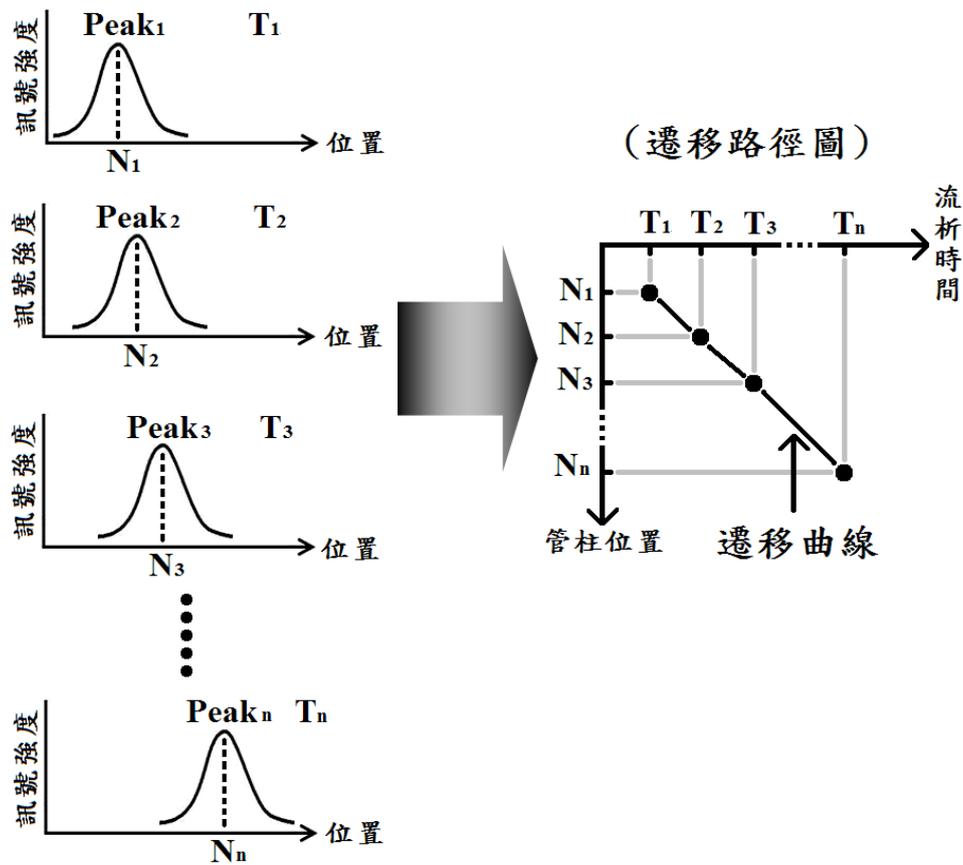


圖 2-12 遷移路徑圖與遷移曲線之定義

WCD 在 T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 等流析時間時獲得樣品於管柱內的空圖波峰訊號 $Peak_1$ 、 $Peak_2$ 、 $Peak_3$... $Peak_n$ ，找出以上空圖波峰之頂點分別位於管柱位置 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 處，再將 T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 與 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 等數據同時表現於同一張關係圖上，此關係圖即為樣品遷移路徑圖，遷移路徑圖中的數據趨勢線則為遷移曲線。

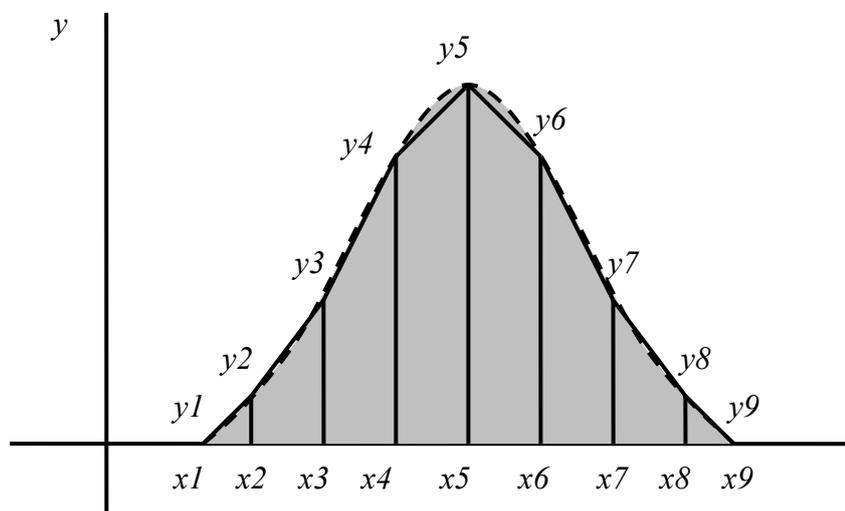


圖 2-13 積分法求波形面積的示意圖

計算波形下涵蓋的面積，將 (x_m, y_m) 與 (x_{m+1}, y_{m+1}) 所涵蓋的梯形面積算出，再將梯形面積累加即可逼近波形面積，若 x_m 與 x_{m+1} 間隔差距越小，則經由累加得到的面積越接近真實面積。

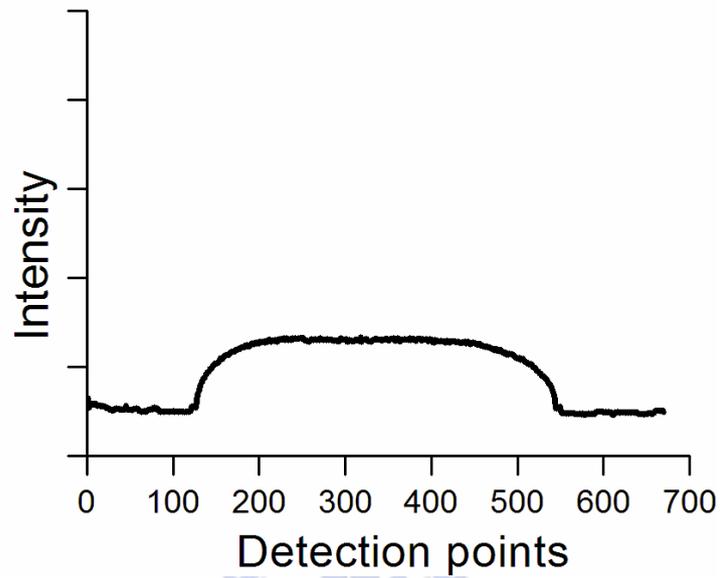


圖 2-14 光源最佳化狀態

實驗裝置架設完畢後，根據電腦操作界面上所呈現的光訊號強度來微調機台的角度與方向，使獲得最佳化狀態：光源強度穩定且左右兩端強度對稱。

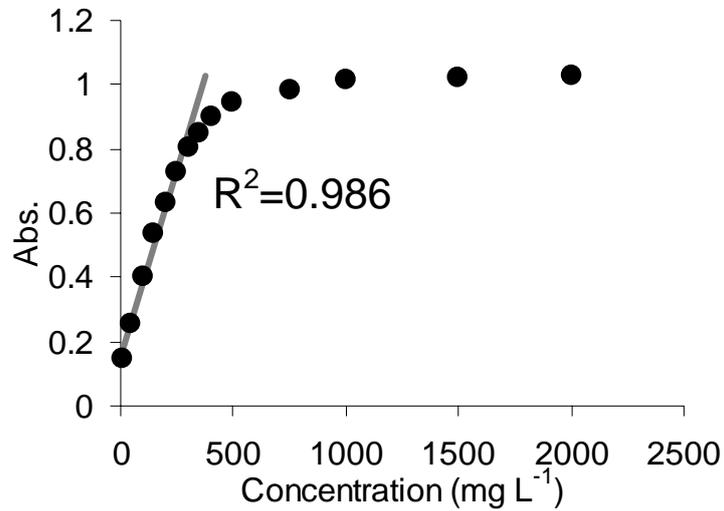


圖 2-15 *Tartrazine* 之檢量線

樣品配製成 10-2000 mg L⁻¹ 等 14 組不同濃度的樣品溶液，注入管柱，以全管柱偵測系統測量其管內平均吸收值（WCD 中，第 250-450 個偵測點位置之平均吸收度），將樣品濃度與其平均吸收值做圖，便可得此檢量線，300 mg L⁻¹ 以下濃度之吸收訊號呈良好線性關係（ $R^2=0.986$ ）。

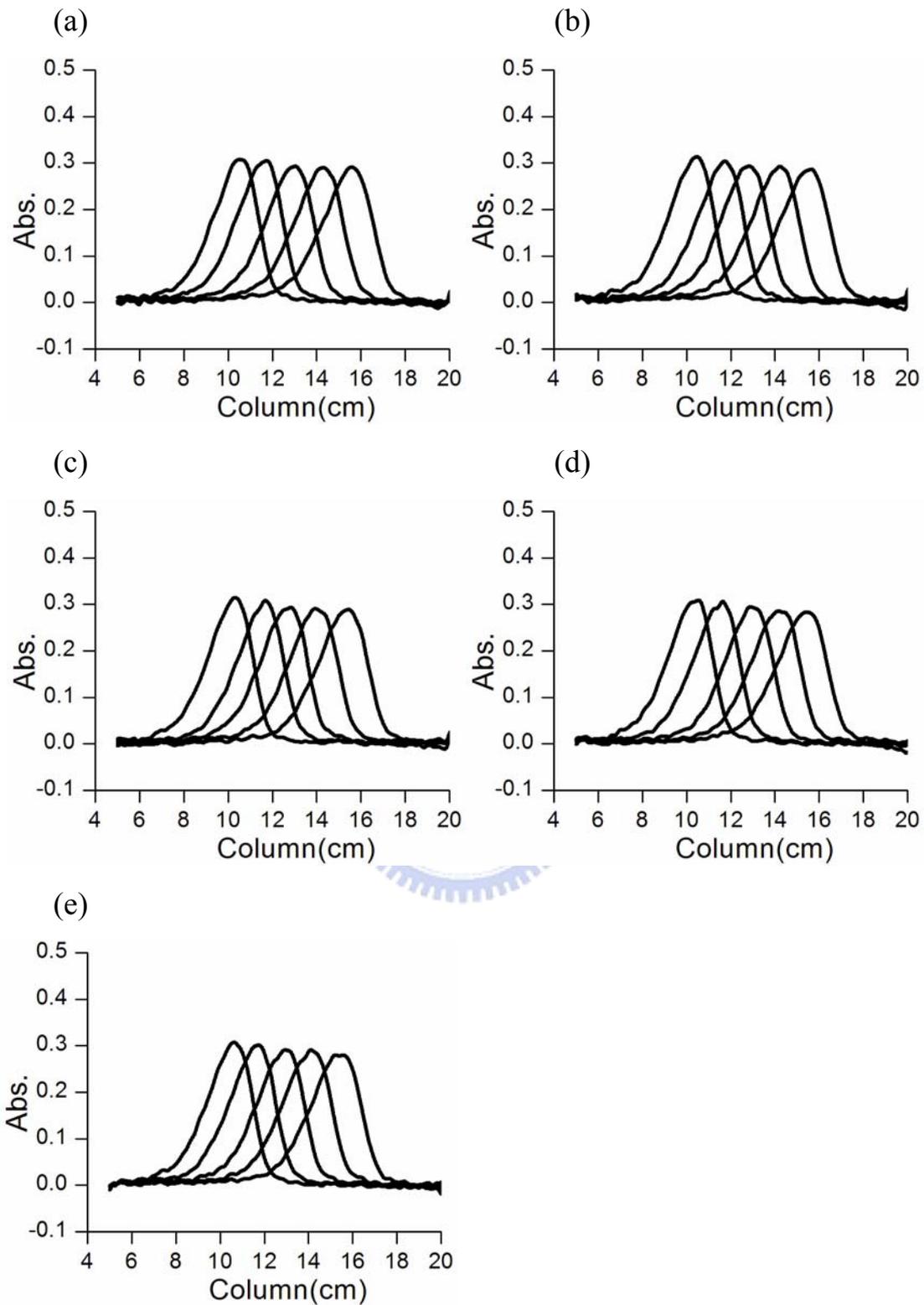


圖 2- 16 (a)-(e)為 WCD 系統再現性測試等 5 組實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

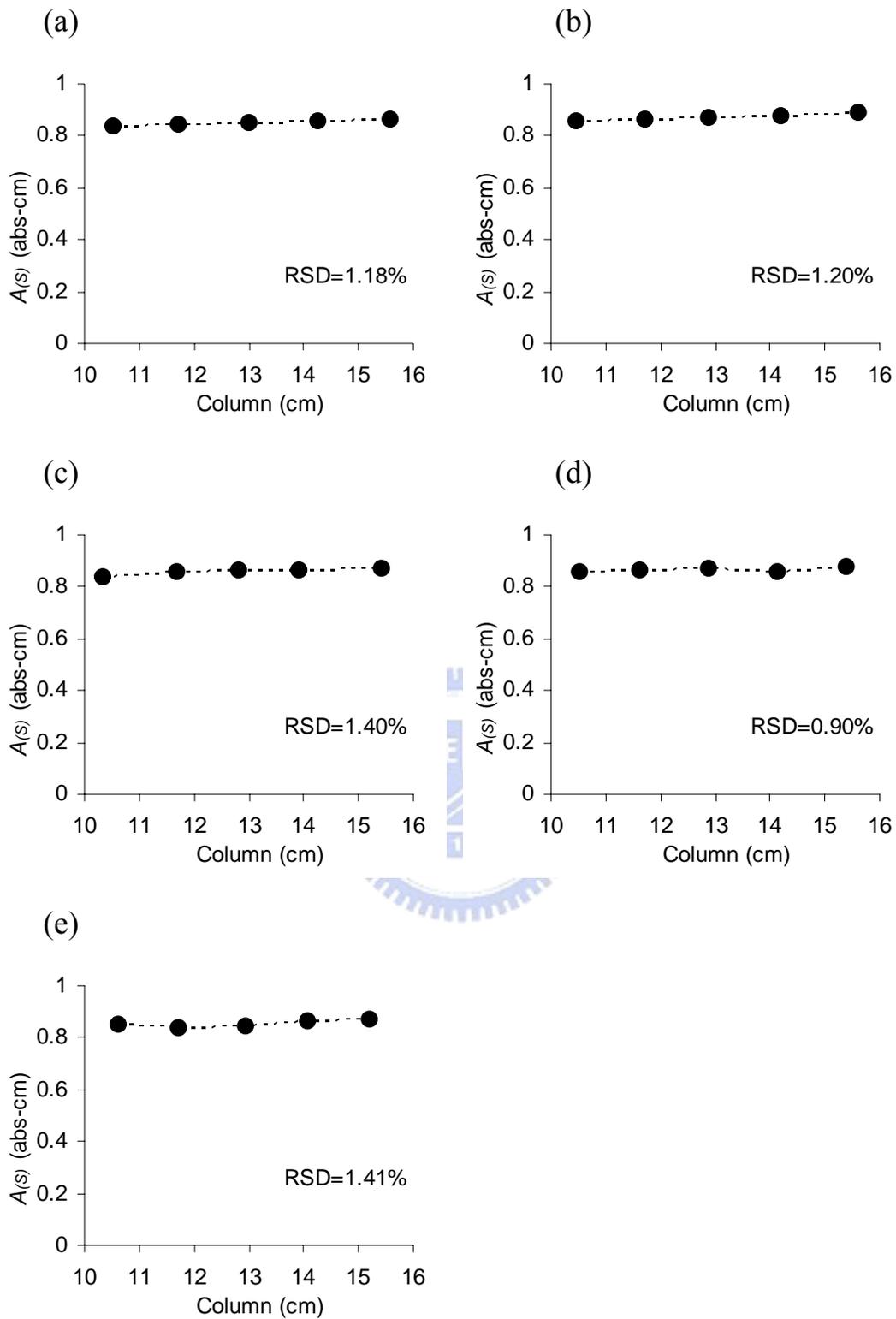


圖 2- 17 (a)-(e)為 WCD 系統再現性測試等 5 組實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空圖波峰面積

表 2- 1 WCD 系統曝光時間對照表

Exposure (%)	time (ms)
100	3.6
200	7.2
300	10.8
400	14.4
500	18.0
600	21.6
700	25.2
800	28.8
900	32.4
1000	36.0
1100	39.6
1200	43.2
1300	46.8
1400	50.4
1500	54.0
1600	57.6

表 2-2 實驗所得波形指標參數符號表

管內空圖波形

符號	定義	單位
t_p'	空圖數據取點時間	min
$h_{(s)}$	空圖波峰頂點所對應的波高	Abs
$W_{1/2(s)}$	空圖波峰半高寬度	cm
$W_{1/2(s)17}$	於管柱 17 公分處之空圖波峰半高寬度	cm
$A_{(s)}$	由積分法算出的空圖波峰面積	Abs-cm

時圖波形

符號	定義	單位
t_p^*	時圖波峰頂點位置	min
$h_{(t)}$	時圖波峰頂點所對應的波高	Abs
$W_{1/2(t)}$	時圖波峰半高寬度	min
$A_{(t)}$	由積分法算出的時圖波峰面積	Abs-min

表 2-3 WCD 再現性測試條件實驗中，

樣品達管柱 13 公分處的空圖訊號波形指標

波形指標

	波高 $h_{(s)}$ (Abs)	波峰半高寬 $W_{1/2(s)}$ (cm)	波峰取點時間 t_p' (min)	波峰面積 $A_{(s)}$ (Abs-cm)
Run 1	0.293	2.54	1.55	0.850
Run 2	0.294	2.54	1.53	0.868
Run 3	0.294	2.54	1.52	0.864
Run 4	0.295	2.54	1.55	0.868
Run 5	0.291	2.57	1.53	0.842
RSD	0.430%	0.578%	0.687%	1.24%

第三章 影響層析波峰變寬原因之探討

3.1 研究背景與理論介紹

層析是利用混合物中各別物質在流動相與靜止相中分佈不同而造成分離的分析技術，一般流動相可是氣體或液體，靜止相則為液體或固體。回溯層析的歷史至 1903 年[42]，蘇俄植物學家 Mikhail Tswett，第一次發表了有關層析的演說，說明他利用白堊柱將綠色葉子中的各種植物色素分離的情形，當時他的實驗操作方法為，將混合這些化合物的樣品溶液通過一根玻璃管柱，其內已填充了細顆粒的碳酸鈣，被分離的物種在管柱中顯現有顏色的層帶，這也是它命名此法為「層析法」的由來，在當時，由於線上偵測（on-line detection）技術尚未發展，故當時的科學家必須倚靠肉眼來觀察樣品於玻璃管柱中分離的情形。

早期的液相層析法，包括 Tswett 原先的研究[43]，是用直徑 1 到 5 公分，長度 50 到 500 公分的玻璃管柱進行分析操作，為確保合理的流速，固體靜相中的粒子之直徑通常在 150 到 200 μm 的範圍，雖然科學家們早已了解減小填充物粒子的大小可以增加管柱效率，然而，到了 1960 年末，製造及使用直徑小至 3-10 μm 填充物粒子的技術才被發展出來[44-46]。這種技術需要可以在高壓力下操作的設備，

因而，古典液相層析法所使用的簡單玻璃管柱便必須以不鏽鋼管等耐高壓管柱取代[47-49]，同時，線上偵測樣品流動訊號的偵測系統便也開始發展起來[50]。層析法所用的偵測器，是一種將管柱流出物中樣品成份含量與含量變化轉換成訊號輸出的裝置。在以上所述的耐高壓不鏽鋼管柱開始使用後，從此，層析管柱就如同個黑盒子似的，將樣品與動靜相包覆於其內，分離的結果仰賴樣品流出管柱抵達管外偵測器時所接收到的訊號，樣品在管內的真實流動情形便無法被直接觀察到了。這樣的狀況不僅發生在液相層析管柱中，承襲液相層析法所發展出來的氣相層析所使用的分析管柱，大多為外壁塗佈聚醯亞胺的熔融二氧化矽毛細管柱，也是屬於不透光的材質，所以樣品在毛細管柱內的移動情形亦無法被觀察到，而在層析操作者無法直接觀察到層析管柱中的分離情形之後，爾後所發展出來解釋樣品分離現象的說法，可能因此而產生錯誤。

圖 3-1 說明了三種物質 A、B、C 是如何在管柱中藉著以液體為動相的層析法來分離。假設三物質之濃度相同，而對偵測器之訊號靈敏度也一樣，在樣品注入的同時，傳統單通道偵測器便開始啟動，利用連續添加新的動相將物種沖提出管柱，再由偵測器收集樣品在整個沖提過程中隨時間而變化的訊號，由於三種物質對靜相有不同的滯留作用力，可得到如圖 3-1 下方的層析圖譜，滯留時間較短的樣品之波峰

寬度較窄、波高較高，反之，滯留時間較長的樣品，其所得的層析波峰寬度較寬，而波峰高度較小，在闡述層析波形差異如此劇烈的原因時，有些文獻或者教科書是以圖 3-1 上方的圖示方法來做進一步說明 [1,51,52]：樣品在管柱內移動過程中，波峰寬度變寬的程度與其整體流析時間長度成正比，滯留時間越長的樣品，在管柱內允許產生更多的擴張 (dispersion)，故空間上波峰寬度變寬程度越是顯著，因此，在圖 3-1 內，三種物質在沖堤過程中，對靜相滯留作用力小的樣品 A，由於停留在管柱內時間較短，故空間波峰較窄，被沖堤出管柱後所得之層析波形亦相對的較窄、波高較高，而對靜相滯留作用力大的樣品 C 來說，由於停留在管柱內時間較長，樣品擴張導致其空間波型較寬，故被沖堤出管柱後所得之層析波形便較矮較寬，這樣的解釋方法看似合理，但事實上，這並不是層析圖譜上波峰波型會產生差異的真正原因。根據 Pai 所發表的文獻中曾經提過[12]，在數據處理試算表 (excel) 中可輸入假想之層析參數來模擬樣品於層析管柱內所發生的行為，在數組模擬結果中我們發現，不管樣品在管柱內受到靜相滯留的力量是大是小，其樣品於管柱內的空間分佈幾乎都相同，並沒有如上述之教科書內所言：『The breadth of a band increases as it moves down the column because more time is allowed for spreading to occur. Thus, the zone breadth is directly related to residence time in the

column.』 [1]；究竟哪一種說法才是正確的解釋呢？為了找出答案，在本章節之研究中，我們設計一系列實驗，藉著詳細且完整的實驗數據討論來找出影響層析波峰變寬的真正主因。

針對本研究欲探討的議題，其實在以往文獻中便已有線索可循：Gelderloos 等人曾在文獻中指出[20]，樣品空間上波峰寬度變寬的程度與管柱位置有較直接相關，而非滯留因子之大小。根據 Tamura 等人所發表文獻[31,53]中的實驗數據可看出，隨著樣品沖堤距離增加，樣品確實是會受到擴張現象影響而導致其空間波峰寬度變大，但是，不同 k 值（滯留因子）樣品間的差異並不大[54]，甚至，若管柱內所填充的靜相顆粒太大，管柱效率較差，則不同 k 值樣品間的空圖波型則幾乎相同，且樣品從管柱前端移動至管柱末端之沖堤過程中波峰寬度變寬程度更為顯著，這些蛛絲馬跡都在暗喻，一般傳統所得到的管外時圖（層析圖）並不能直接反應樣品於管柱內的空間分佈情形，但是由於並無文獻提出數據針對此議題做詳細探討，故啟發了本研究之實驗動機。

3.2 實驗

3.2.1 儀器裝置

本實驗之層析系統，使用往復式梯度沖堤幫浦、內體積 20 μL 的

樣品迴圈、自製之 HPLC 管柱、WCD 系統[13,38,39]和 UV/Vis 偵測器（偵測器波長選擇為 435 nm）。本實驗中 WCD 系統內所使用的濾波片為 435 nm 濾波片。

3.2.2 藥品

本研究選擇的染料樣品是 *Anthrurufin*，購自 Aldrich (WI, USA)，其分子量 240.41，最大吸收波長 425 nm，溶於丙酮中使成為樣品溶液，濃度為 150 mg L⁻¹。動相組成包含 HPLC 級甲醇溶劑跟去離子水，甲醇溶劑與丙酮皆購自 Aldrich，去離子水為經過 Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q 處理之 18.2 MΩ 水。

3.2.3 實驗步驟

動相以甲醇和去離子水做 15 種不同比例混合（列於表 3-1），然後再以 1 mL min⁻¹ 的流速對 20 μL 的樣品進行等位沖堤，在樣品注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的波峰訊號（包含管內空圖和管內時圖）以及管外訊號（管外時圖），在不同動相沖堤樣品的條件下，樣品停留於管柱內所需的總滯留時間長度不同，為了收集適量的數據來進行往後的分析處理，則 WCD 系統所需之數據取點間距時間亦不相同，極性較大的動相在沖堤過程中會使樣品對靜相的滯留作用力提升，則樣品移速變慢，樣品

在管柱內停留的時間也就越長，如此一來，數據取點間距時間亦必須拉長，15 種動相沖堤實驗所分別搭配的數據取點間距時間列於表 3-1，分別以編號 1 到 15 表示。

3.3 結果與討論

15 組動相以 1 mL min^{-1} 的流速對樣品進行等位沖堤後，傳統單通道偵測器所收集到的管外層析圖譜如圖 3-2 所示，15 組實驗所得之 k 值範圍介於 0.54-7.27，據層析圖譜結果所計算而得的 k 值、樣品移動速度以及其時圖波型指標結果皆詳列於表 3-2。由以上結果可看出，在逆相層析管柱中，動相極性越大，樣品對靜相的滯留作用力便越強、樣品移速減緩、滯留時間加長，此結果吻合傳統認知：樣品 k 值越大，其層析圖譜上之波峰的波寬越寬、波高越矮。

15 組沖堤實驗過程中，以 WCD 系統觀察所得之樣品移動至管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處的空圖波峰取出來作討論比較，結果如圖 3-3(a)-(o)所示，由圖可見，樣品在管柱中，不管滯留時間差異有多顯著，其空間波形的變化似乎不大，並沒有類似層析時圖所得之趨勢： k 值越大，波型越趨矮寬。甚至，當樣品對靜相的滯留作用力越強時，其空圖實驗波形有些微變窄變高的趨勢。將 15 組實驗所得之管外時圖層析波峰半高寬度 $W_{1/2(t)}$ 與樣品移動到接近管柱

末端處 (17 公分) 的樣品空圖波峰半高寬度 $W_{1/2(s)17}$ 列表比較 (表 3-3)，由這些數據便可看出，層析圖譜所表現之波峰寬度趨勢並不能直接反應樣品真正在管柱中的空間寬度。接下來，將詳細探討空圖數據與時圖數據之關係。

3.3.1 空圖數據之探討

空圖波峰寬度隨 k 值增加而變窄之現象的成因相當複雜，其中一原因，是由於樣品受靜相滯留的力量不同，導致樣品初進入填有靜相的層析管柱時，其被靜相「壓縮」的程度不同，當樣品對靜相滯留作用力越大 (k 值越大)，其壓縮程度則越為顯著，故在空間上所產生的波峰形狀越窄越高；曾有文獻指出[19,55]，樣品在進入填充有靜相的層析管柱後，其瞬間在空間上的分佈範圍會不同，在管柱入口端處，不同 k 值之物質的空間波峰寬度會與 $\frac{l}{k+1}$ 成正比， k 與 $\frac{l}{k+1}$ 的關係如圖 3-4 所示，本研究中， k 值大於 1 的實驗數據確實有近似這樣的趨勢：隨 k 值增加、樣品空間波峰寬度變窄。據 Pai 實驗室畢業學生所提之碩士論文內容[55]，層析樣品於管柱內空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與管柱長度 L 之關係式如下：

$$\frac{\sigma_{(s)}^2}{L} = \frac{\sigma_{(s_0)}^2}{L} + \frac{2D}{u} + \frac{k\Delta t}{(k+1)^2}u \quad (3-1)$$

$\sigma_{(s_0)}$ 代表樣品一進入管柱後的初始空間標準偏差，其應與 $\frac{l}{k+1}$ 成正比關係； D 為樣品之擴張係數 (dispersion coefficient)； Δt 為偵測器之解析度代表符號，在使用同一組偵測系統的實驗條件下，此值為定值； u 為動相沖堤流速。本章節裡，理論公式中所使用的各項參數，其符號之定義整理於表 3-4。公式 (3-1) 點出，樣品在層析管柱內遷移過程中，其空間波峰寬度變化至少受 3 種力量所影響：第一，樣品注入管柱的起始狀態；第二，樣品受擴張效應之影響；第三，樣品受滯留效應之影響。本實驗中，以 WCD 系統所獲得的 15 組空圖數據與 $\frac{l}{k+1}$ 、 D 或 $\frac{k}{(k+1)^2}$ 皆不成正比關係，這是由於，樣品在管柱內移動過程中，其空間波寬最初是受初始狀態之影響，但隨著樣品在管柱內持續遷移，其受另外兩種力量影響漸趨增加；在填充良好的層析管柱中，由於樣品受擴張效應影響程度小（本章節之 15 組實驗所得的擴張係數皆小於 $0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ，遠小於 FIA 系統中流動樣品之擴張係數，動輒 $100 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 以上），導致波峰寬度變化逐漸遠離 $\frac{l}{k+1}$ ，而漸趨向 $\frac{k}{(k+1)^2}$ 之關係式(見圖 3-4)，此結果與本研究所得數據相符，即 $k=1$ 時，空間波寬有最大值之趨勢出現；我們認為，若使用填充效率差的層析管柱進行實驗的話，則樣品在管柱內遷移過程中受擴張影響程度大，其空間波寬便有可能從 $\frac{l}{k+1}$ 之趨勢逐漸轉變為與 D 值呈正比之關係，如此一來， k 值越大的樣品，由於其在管柱內停留時間越長，則

空間波峰寬度便可能較 k 值小的樣品略寬一些。不管如何，可以確定的是，空圖所表現出來的趨勢與層析時圖所表現出來的趨勢是完全不同的，所以，接下來進行兩種類型之圖表的數據探討。

3.3.2 空時圖數據比較

為了彰顯空時圖數據之明顯差異，將表格 3-3 中，實驗編號 1-15 等 15 組時圖波寬與空圖波寬分別除上實驗編號 1 之時圖波寬與空圖波寬，藉此數據觀察當實驗條件從 $k=0.54$ 增加至 $k=7.27$ 時，管外時圖波寬增加程度與管內空圖波寬增加程度之差異，兩者比較結果整理於圖 3-5， $k=7.27$ 的管外時圖層析波峰半高寬度約為 $k=0.54$ 樣品之波峰的 4.6 倍，但是管內空圖波寬的差異卻在 20% 以內，以上結果便已顯露出，圖 3-1 用來解釋層析波峰變寬的說法是不完全正確的，層析波峰變寬的原因並非因為樣品在管柱中擴張成較寬之波型而導致。那麼，真正影響層析波峰變寬的原因是什麼呢？答案是樣品從含有靜相的管柱中被釋放出管外的速度。傳統偵測器在獲得訊號的過程中，是透過一偵檢器之容槽（例如吸收光譜之流動容槽）來收集樣品存在於動相中的吸收訊號，當樣品對靜相的滯留作用力提升時，其整體平均移動速度會變慢，則樣品從填滿靜相的管柱內被釋放至只有動相的容槽速度便會減緩，相同樣品量所需釋放進容槽的時間便加長，亦即，樣品通過管外偵測器之偵測點所需的總時間加長，管外時圖波峰即變

寬。至於，當 k 值增加層析時圖波峰之高度降低的原因也可以此類推，當樣品釋放至偵測容槽的速度變慢，每單位時間內釋放的量便會減少，則樣品訊號強度即產生減弱的趨勢。接下來將以完整的數據討論來嚴謹地證實此說法之正確性。

據文獻指出[1]，樣品在抵達層析管柱末端（單通道偵測點位置）時，其空間上之波峰寬度標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與所獲得的層析波峰寬度標準偏差值 $\sigma_{(t)}$ 之關係如下列公式所示：

$$\sigma_{(t)} = \frac{\sigma_{(s)}}{L/t_R} \quad (3-2)$$

其中符號所代表之意義見圖 3-6，其中 L 為管柱長度， t_R 為樣品注入管柱後移動至管柱末端偵測點所需的時間，稱為滯留時間，而 t_M 稱為無感時間（dead time），即對靜相無滯留力量的溶劑抵達管柱出口端偵測點所需時間， L/t_R 代表樣品移動速度，據公式（3-2）所示，當樣品之空間波寬標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 值固定時，其層析時圖之波寬標準偏差 $\sigma_{(t)}$ 會與樣品移動速度成反比。根據圖 3-3 之空圖數據，可將樣品在管柱移動過程中的遷移路徑圖畫出，結果如圖 3-7，其遷移曲線（於此例中為直線）之斜率即為樣品在管柱中的移動速度，此數據與根據層析時圖所得之樣品移動速度結果 u_m （見表 3-2）大致相同，結果見圖 3-8。而由於 15 組實驗中，其分別之空圖波寬差異並不大（ $<20\%$ ），

故為了證實層析時圖之波寬確實會與樣品移動速度成反比，將樣品移動速度的倒數對實驗所得之層析時圖的波峰半高寬作圖，結果如圖 3-9，由圖可證，層析時圖波峰之寬度確實與移動速度成反比關係，當樣品之移動速度慢（ u_m 值小）的時候，由於樣品通過單通道管外偵測器所需時間長，故實驗所得之層析時圖波峰寬度亦來的較寬；當樣品之遷移速度快（ u_m 值大）時，由於樣品在較短時間內便可以完全通過管外偵測器，故實驗所得之層析時圖波峰寬度便來的較窄，且這個趨勢不僅從管外層析時圖數據可看出，管內時圖數據亦有相同趨勢：將管柱 17 公分位置視為一固定偵測點，以 WCD 系統收集流析過程中樣品通過此偵測點時之訊號，可獲得管內時圖，接著將 k 值從 0.54 至 7.27 等 15 組實驗條件所獲得的管內時圖波寬分別除上 $k=0.54$ 之管內時圖波寬，藉此計算結果觀察當樣品 k 值從 0.54 增加至 7.27 時之管內時圖波寬增大程度，再將此數據與圖 3-5 所計算而得之管外時圖波寬增加程度做對照，結果見圖 3-10，可以發現，不管是管外時圖或者是管內時圖，其波峰皆隨著樣品移動速度變慢而有相同程度變寬的趨勢。

由 WCD 系統所觀察到的空圖訊號實代表樣品存在靜相（ m_s ）＋動相（ m_m ）的質量訊號總和（ m_t ），樣品單獨存在於動相及靜相的質量關係如下列公式所示[1]:

$$m_s = \frac{k}{k+1} m_t \quad (3-3)$$

$$m_m = \frac{1}{k+1} m_t \quad (3-4)$$

m_s 代表樣品存在於靜相中的質量、 m_m 代表樣品存在動相中的質量、 m_t 即為兩者總和。由於樣品在抵達傳統單通道偵測器時，樣品是存在於只有動相溶劑系統的偵檢器容槽中，故將所得之管內空圖波峰數據乘上 $\frac{1}{k+1}$ 值便可發現，此值與管外層析時圖之波峰高度趨勢相同（見表 3-5，括弧內數字之變化趨勢），此即表示，在管外層析時圖譜中，樣品波峰高度會隨著 k 值改變而有不同的訊號強度。雖然說，由於樣品存在於動相溶液與靜相溶液中的吸光靈敏度不同，兩相所得之吸收值並沒有加成性，所以並不能以管內訊號波高乘上 $\frac{1}{k+1}$ 所得之值來代表樣品存在動相中的絕對質量，但若僅探討樣品隨 k 值變化的程度的話，此法應仍屬有效的討論方式。

3.3.3 時間效應

在第一章曾經提及，層析系統中亦存在「時間效應」（圖 3-11），層析圖譜中所展現的時間效應與在流動注入法（FIA）中所展現的時間效應不同[11,13-16]，其廣泛定義為：「由傳統單一通道偵測器所得之時圖波型與流析管路中樣品空間分佈不同，造成兩者之差異原因即

稱之為時間效應」，由於此效應之存在，故據文獻指出[55,56]，在層析系統中應會產生時移（temporal shift， Φ ）等空時波峰質量中心產生差距之現象，時移公式：

$$\Phi \approx \frac{k\Delta t}{2} + \frac{D(k+1)^2}{u^2} \quad (3-5)$$

其中，擴張係數的計算方法為[16,55,57]：

$$D = \frac{u_m^2 \sigma_{(t)}^2 - \sigma_{(s_0)}^2}{2t} = \frac{u_m^2 W_{(t)}^2 - 16\sigma_{(s_0)}^2}{32t} \quad (3-7)$$

$W_{(t)}$ 之定義見圖 3-6，為層析峰底部寬度。由於唯有溶劑前緣不受滯留效應之影響（參考公式 (3-1)），故擴張係數必須以溶劑訊號的管外時圖結果來計算，故公式 (3-7) 中， $u_m = u$ ，及 $t = t_M$ 。

偵測器解析度 Δt 的計算方法為[55]：

$$\Delta t = \left[\sigma_{(t)}^2 - \frac{\sigma_{(s_0)}^2}{u_m^2} - \frac{2Dt_R}{u_m^2} \right] \times \frac{1}{kt_R} \quad (3-7)$$

將本研究中 15 組數據所得之結果拿來計算時移， $\sigma_{(s_0)}$ 的計算方法可參考文獻[55]；由於計算 D 值與 Δt 值必須仰賴不受靜相滯留力量的溶劑波峰訊號，此訊號相當微弱，導致最後所獲得之 D 值與 Δt 值相當小，所以，最後 15 組 k 值實驗所得之 Φ 亦極小且有些微差異，無法看出時移 Φ 與 k 之間的趨勢關係，所以，我們認為，在層析系統中，

即便時間效應對管外層析時圖波型影響很大，但由於管柱內樣品擴張程度很小，故時移在層析系統中仍不明顯。

3.4 結論

根據以上實驗數據證實，圖 3-1 中，說明層析時圖波寬變寬的原因是來自於樣品在空間上產生擴張之說法並非完全正確，正確的解釋方法應該如圖 3-12 與 3-13 所示，樣品在填充效率高之管柱內的移動過程中，空間上波峰幾乎沒有產生寬度變化，且 k 值最小的樣品與 k 值最大的樣品在移動至管柱相同位置時，其空間上波峰寬度差異亦不大，但是由於樣品移動速度受動相極性改變影響，使得管外層析時圖波峰寬度截然不同，而在管柱效率較差的層析管柱（例如填充顆粒較大或者填充壓力較小等層析管柱[53]）內進行樣品分離，樣品在管柱中的移動狀態如圖 3-13 所示，同一樣品在管柱內移動過程中之波峰寬度變化較大，但是由於管柱效率較差，不同 k 值的樣品在管柱內的空間波寬差異更小，甚至，若管柱填充效能太差，導致樣品在管柱內所產生之擴張情形相當嚴重的話，樣品空間寬度變化趨勢會與其停留時間稍成正比關係（見公式 3-1），即 k 值越大、樣品空間波寬亦稍為變寬，不過在流析出管柱後，單通道偵測器所收集到的層析圖譜，仍會由於樣品移速不同而產生波峰寬度差異很大之關係。雖然說樣品在空間上的寬度亦會影響其在時圖中波寬的表現，但由於流速對時圖波

寬造成的影響實在太大，導致樣品在空間上的任何作用力量都會在樣品釋放出管柱後被忽略。

本研究所提之解釋層析圖譜寬度變化的說法，可以用來解釋一些非線性層析實驗中難以理解的實驗結果，在某些非線性層析條件下，滯留時間較長的樣品之層析波峰寬度卻較那些滯留時間短的樣品來的窄[1,58-60]，根據本研究所提出的實驗結果來看，其原因是來自於，當改變動相組成使較晚流析出來的樣品移速增加時，增加的程度大於那些原本滯留時間短的樣品，也就是樣品移動速度忽然大幅提升，而由於樣品移速與層析波峰寬度成反比關係（見圖 3-9），此即表示，這類樣品的層析波峰寬度會極小，如此一來，便造成這種『較晚出來的樣品之波寬卻更窄』的假象了。

不可否認的，會影響層析波峰寬度變化的原因是相當廣泛的，舉凡所有會發生在動靜兩相間的物理作用力、化學作用力都會對樣品之層析行為產生變化，諸如此類的研究已發展數十年，相當完備，雖然本研究中探討的方法與以往不同，但我們相信，未來層析教育工作者在討論影響層析波峰寬度變化的原因時，本章節的內容將是不可忽視的說法之一[39]。

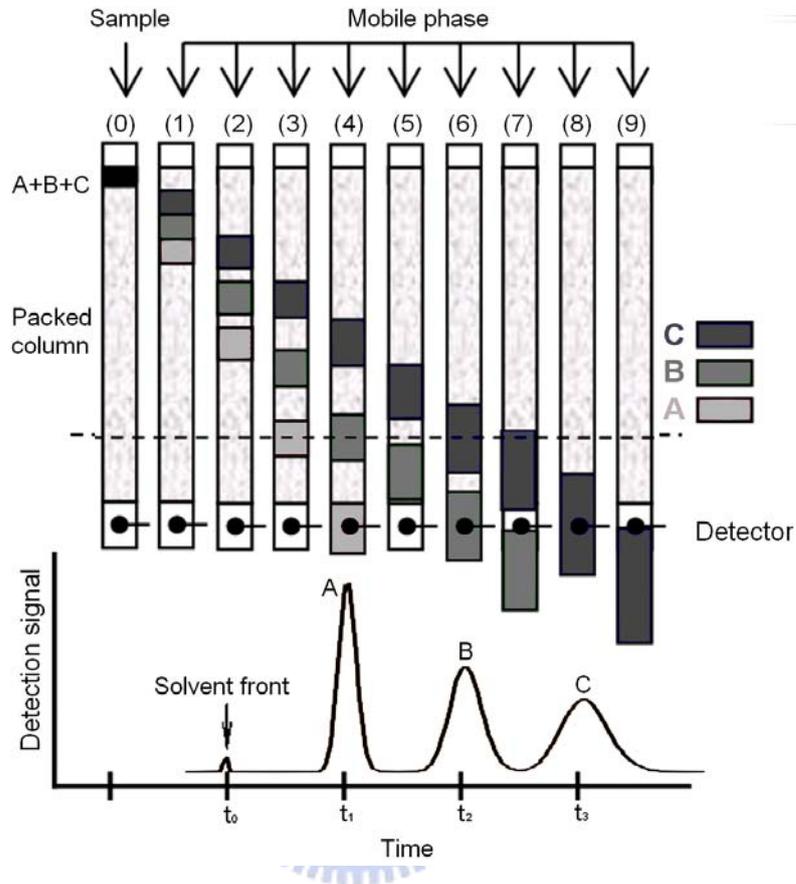


圖 3-1 教科書中，對三種物質於層析管柱內進行分離的解釋示意圖[1]

受靜相滯留作用力較小的樣品，由於停留管柱內時間較短，樣品擴張時間較少，導致其空間波峰寬度較窄，最後流出管柱後，傳統偵測器所收集到的層析時圖波寬亦較窄；反之，受靜相滯留作用力較大的樣品，由於停留管柱內的時間較長，故空間波峰寬度較寬，最後流出管柱後，傳統偵測器所收集到的層析時圖亦較寬。

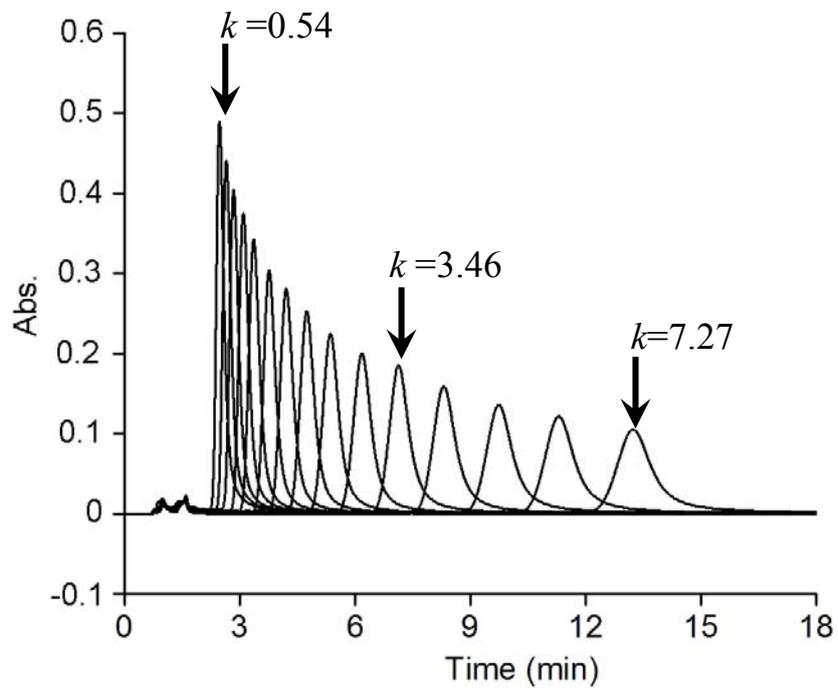
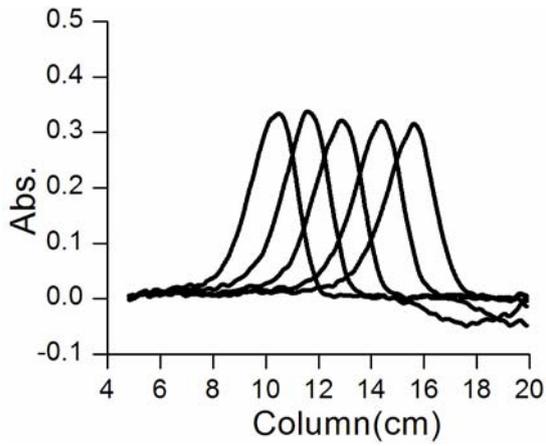


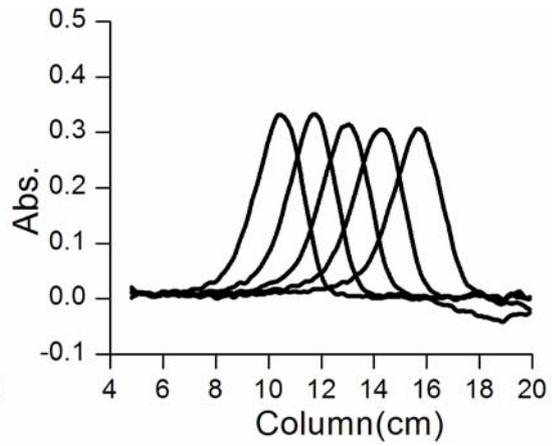
圖 3-2 15 組動相等位沖堤之層析結果圖

15 組實驗所得之 k 值範圍介於 0.54-7.27，樣品 k 值越大，層析波峰寬度越寬、波高越矮。

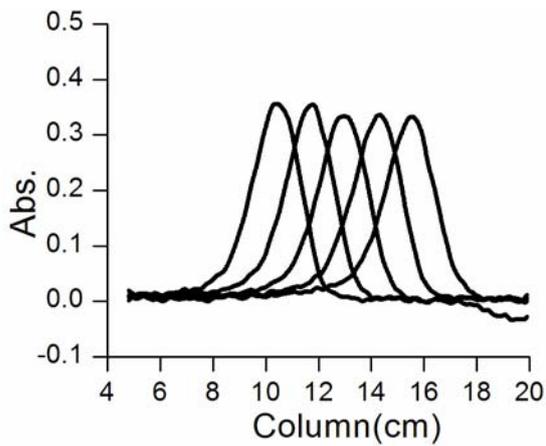
(a) $k=0.54$



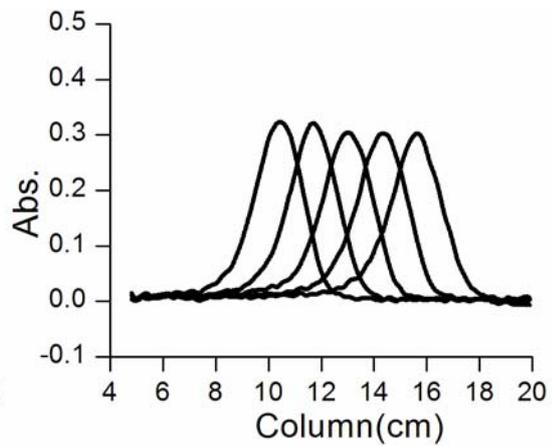
(b) $k=0.65$



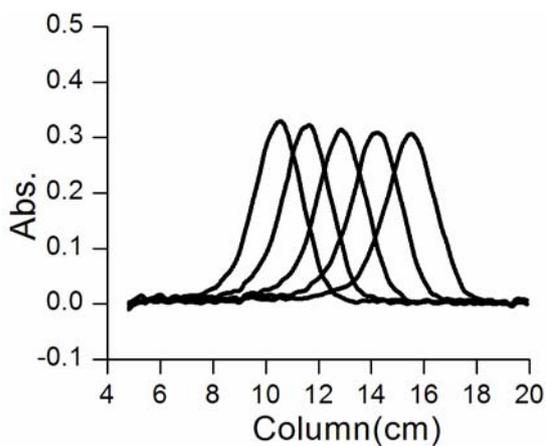
(c) $k=0.77$



(d) $k=0.93$



(e) $k=1.10$



(f) $k=1.35$

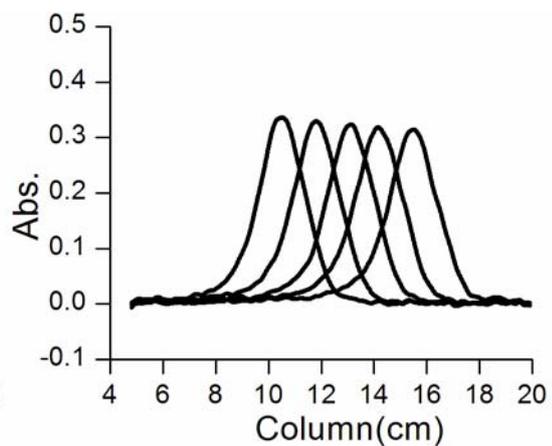
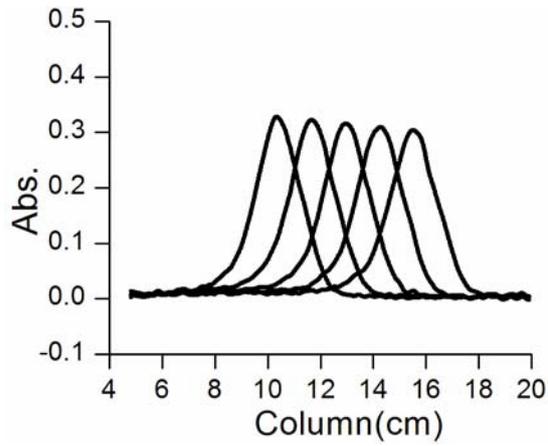
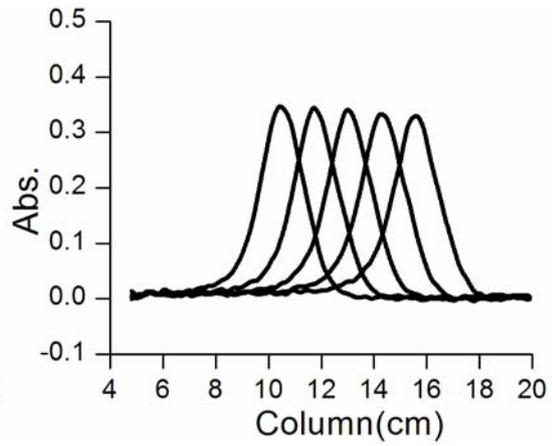


圖 3- 3(1) 15 組動相以線性層析之模式沖提樣品，當樣品抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

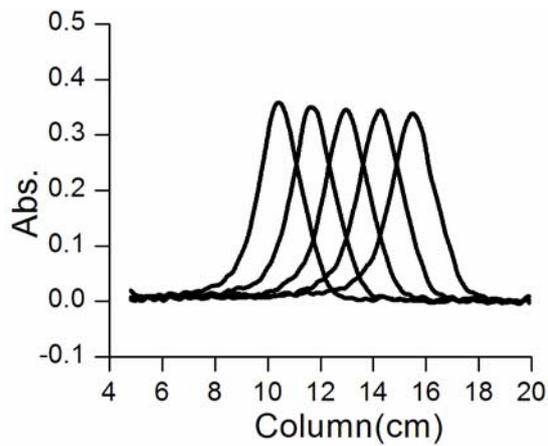
(g) $k=1.63$



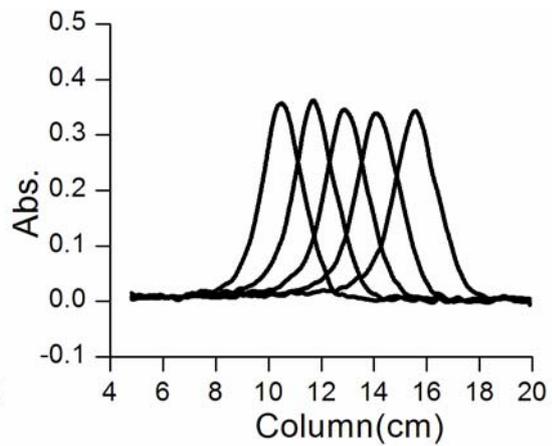
(h) $k=1.97$



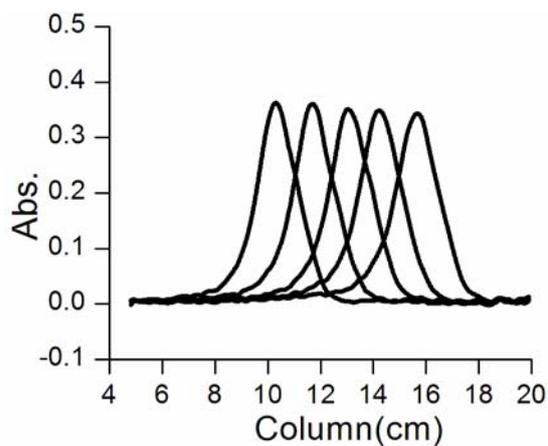
(i) $k=2.35$



(j) $k=2.86$



(k) $k=3.46$



(l) $k=4.19$

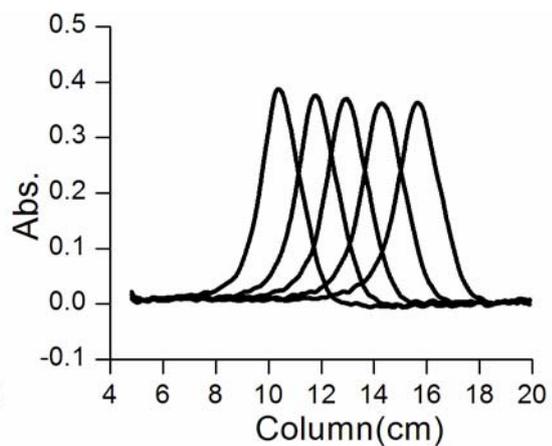
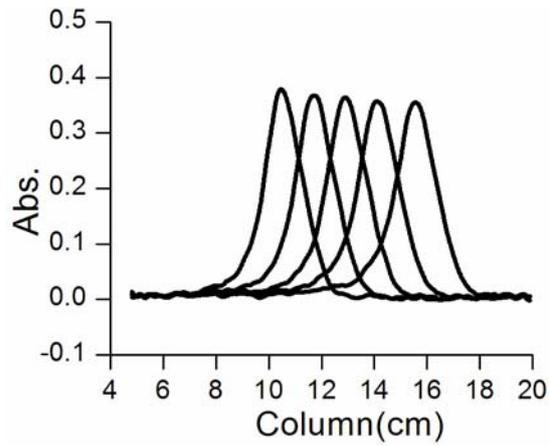


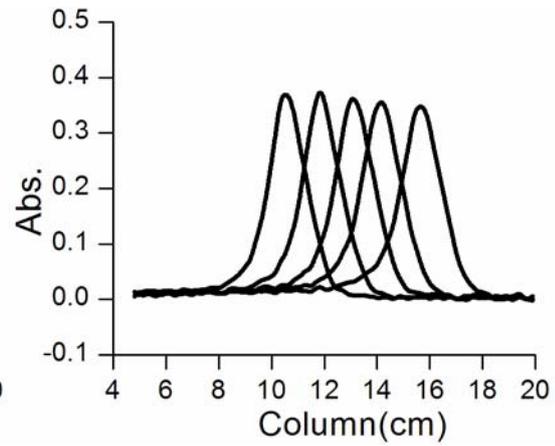
圖 3-3(2) 15 組動相以線性層析之模式沖提樣品，當樣品抵達管柱

約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

(m) $k=5.09$



(n) $k=6.06$



(o) $k=7.27$

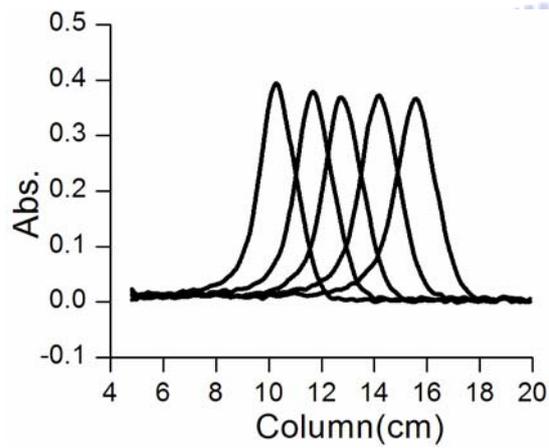


圖 3-3(3) 15 組動相以線性層析之模式沖提樣品，當樣品抵達管柱

約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

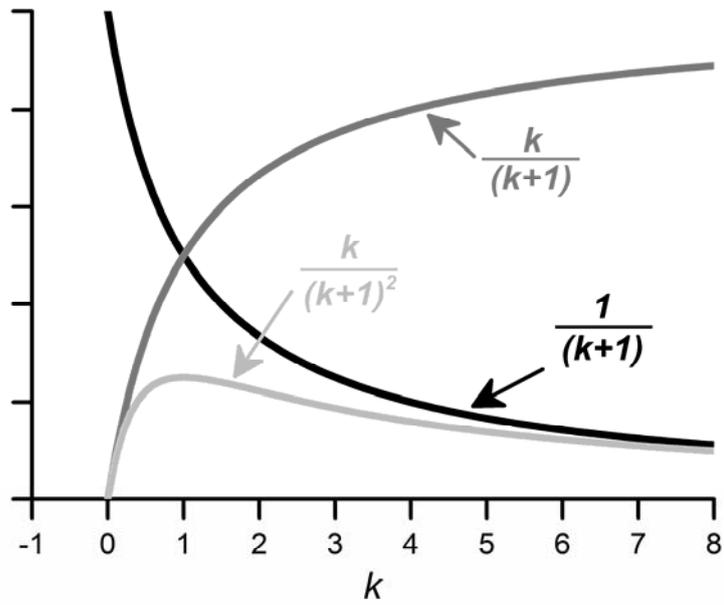


圖 3-4 k 值與各公式之趨勢關係圖

k 值越小， $\frac{1}{k+1}$ 值越大；但是對 $\frac{k}{(k+1)^2}$ 而言，其值在 $k=1$

有一最大值之趨勢。

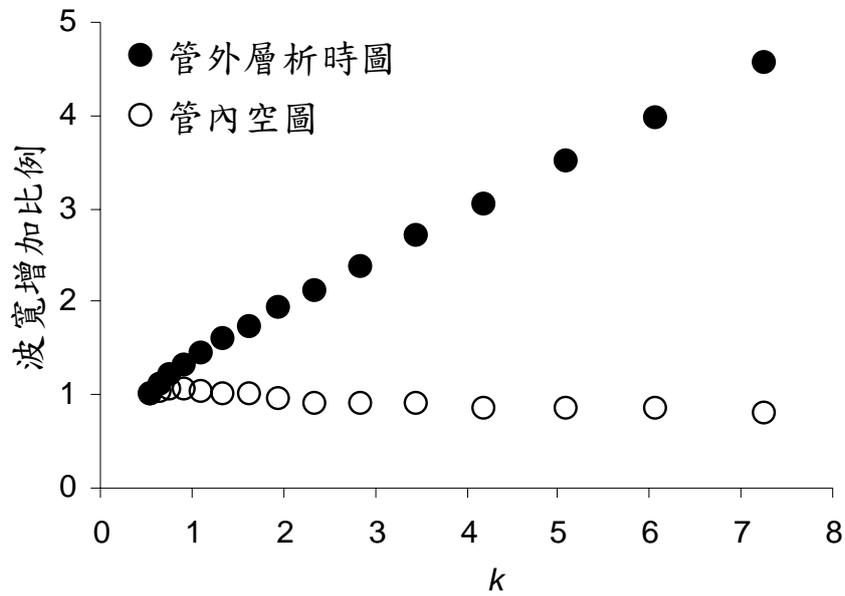


圖 3- 5 15 組等位沖堤實驗中，管外層析時圖與管內 17 公分處空圖波寬增加比例關係圖

波寬增加比例之計算公式為
$$\frac{W_{1/2(k=0.54-7.27)}}{W_{1/2(k=0.54)}}$$

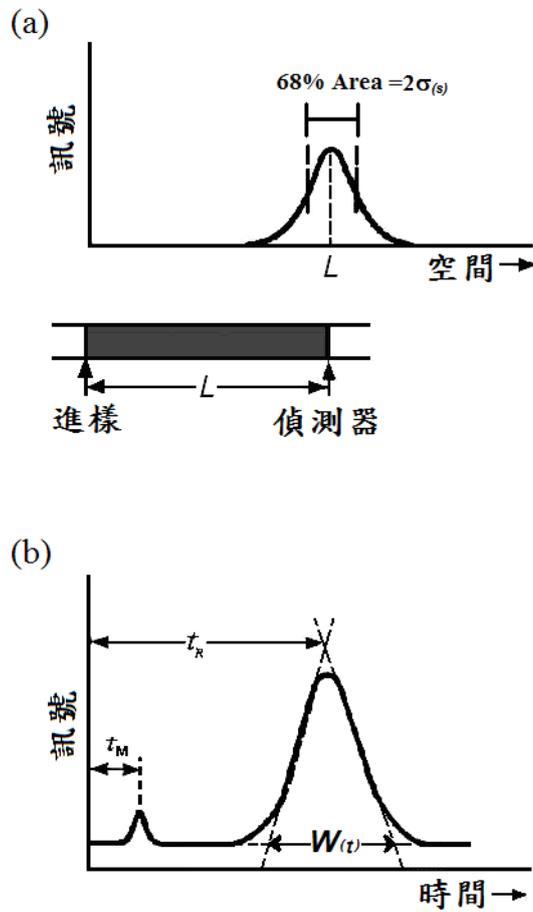


圖 3-6 (a)、(b)分別表現出空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與樣品注入管柱後移動至管柱末端偵測點所需的時間 t_R 及時圖波峰寬度 $W_{(t)}$ 之意義

L 為管柱長度； $\sigma_{(s)}$ 為空間波峰之標準偏差值； t_R 為樣品滯留時間； t_M 為對靜相無滯留力量的溶劑抵達管柱出口端偵測點所需時間；在層析峰的兩側轉折點做切線延長，其與層析峰之基線交會長度即為 $W_{(t)}$ ，且 $W_{(t)}=4\sigma_{(t)}$ ， $\sigma_{(t)}$ 為時圖波峰標準偏差值。

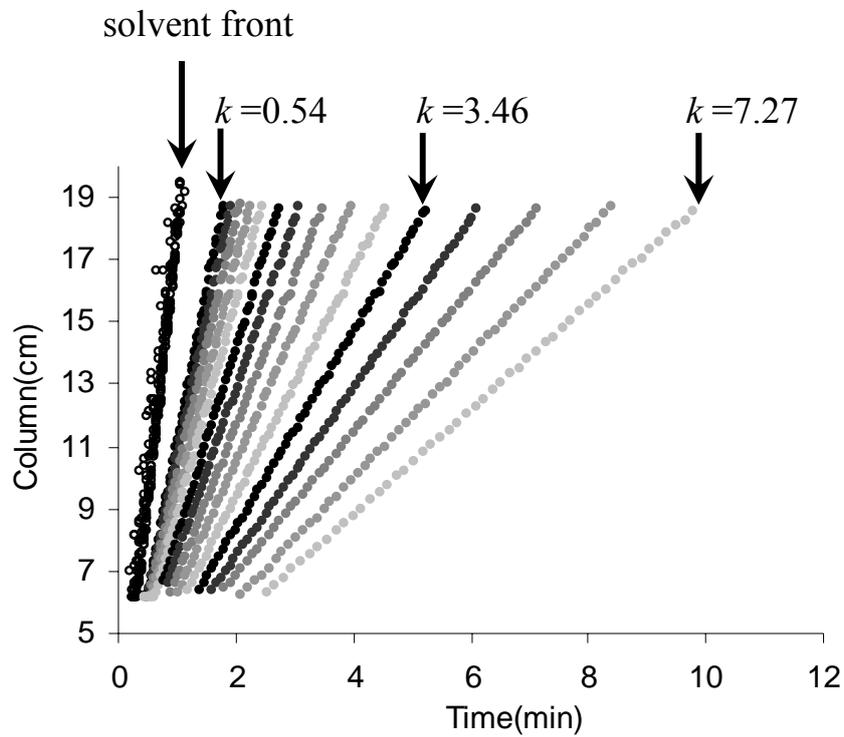


圖 3-7 15 組等位沖堤實驗中，溶劑與樣品之遷移路徑圖

最左方那組重疊了多組數據的直線，為 15 組實驗中對靜相無滯留力量的溶劑之遷移曲線；右方 15 條直線，由左而右分別是 $k=0.54$ 至 $k=7.27$ 等 15 組實驗所得之樣品遷移曲線。

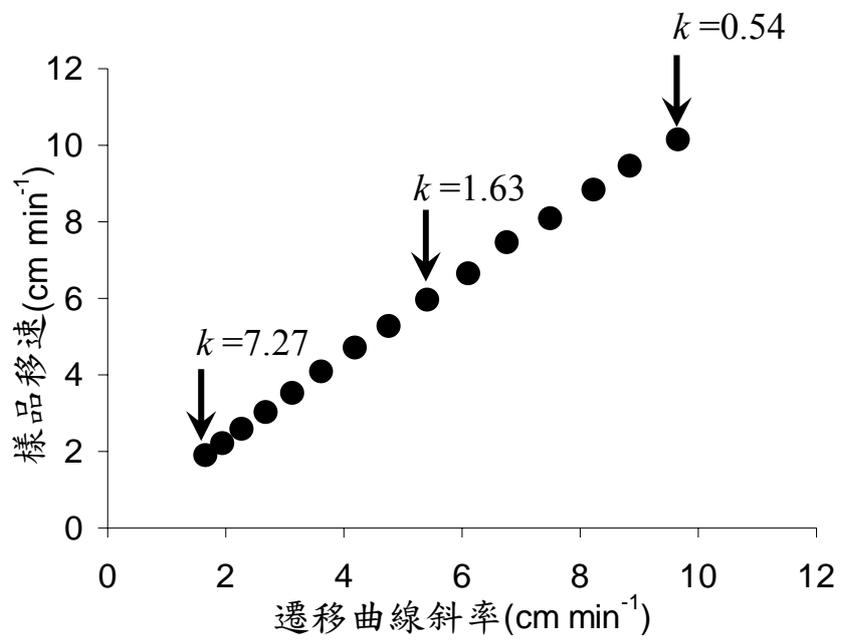


圖 3- 8 15 組遷移曲線之斜率與層析時圖所計算而得之樣品移速的比較關係圖

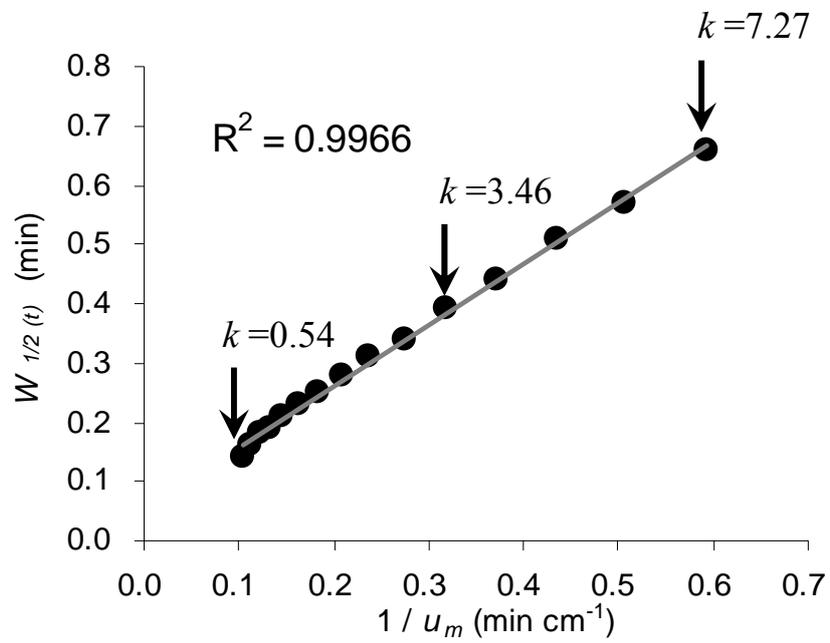


圖 3-9 15 組等位沖堤實驗中，樣品移動速度倒數與時圖波峰半高寬之關係圖

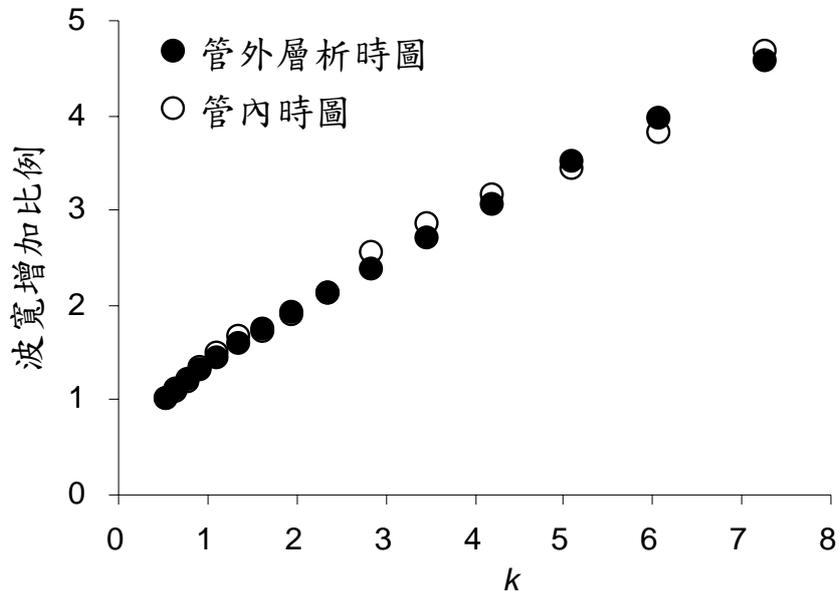


圖 3-10 15 組等位沖堤實驗中，管外層析時圖與管內時圖（以管柱 17 公分位置為固定偵測點）波峰寬度增加比例關係圖

波寬增加比例之計算公式為
$$\frac{W_{1/2(t)(k=0.54-7.27)}}{W_{1/2(t)(k=0.54)}}$$

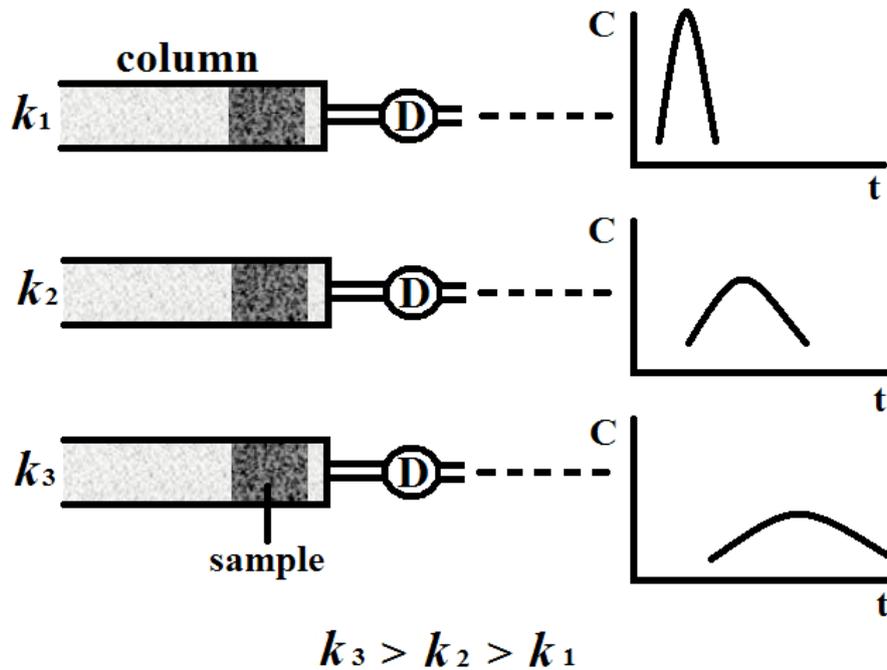


圖 3-11 層析系統中時間效應之定義

D 表管外偵測器，右方圖譜則為管外偵測器所收集到的樣品層析圖。當空間上分佈完全相同的三組樣品流出管外被偵測到訊號時，由於其分別對靜相滯留作用力不同（ k 值不同），導致樣品在管柱內移動速度及通過管外偵測器所需時間皆不同，所以最後所獲得的管外層析時圖亦大不相同，造成空時圖趨勢相異的原因即稱之為時間效應。

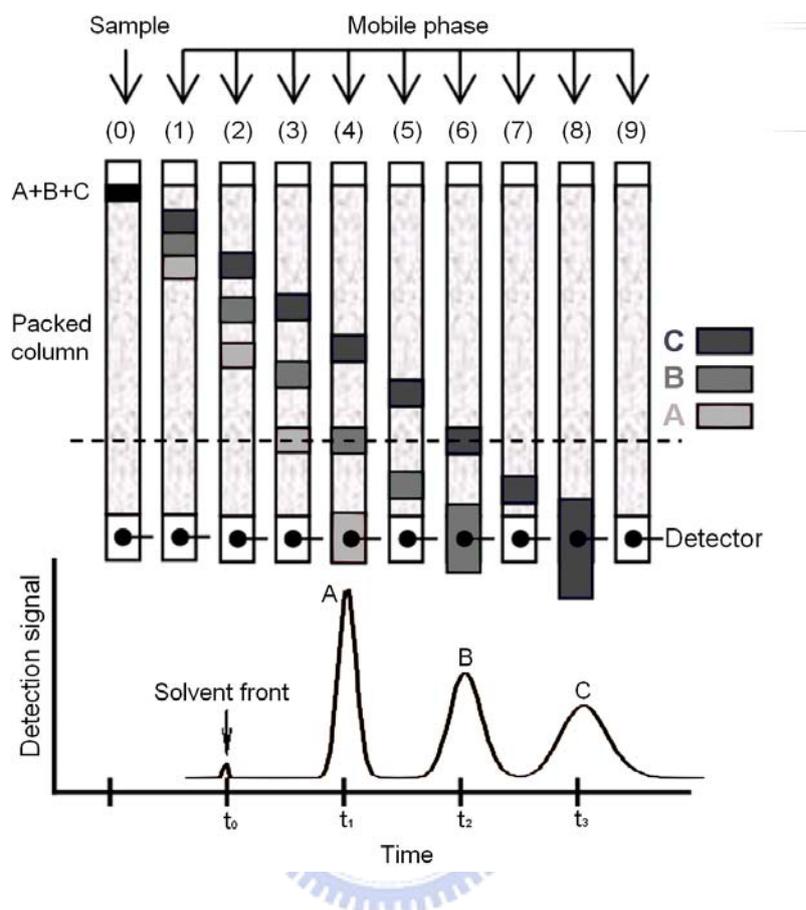


圖 3- 12 三種物質於填充效率高之層析管柱內進行分離的正確解釋圖

三組樣品在管柱內遷移過程中，其在空間上波峰寬度幾乎沒有產生變化，且受靜相滯留力量不同的樣品，當移動到管柱內相同位置時，其空間上波峰寬度差異不大，但是由於樣品移動速度不同，所以，最後樣品釋放出管柱外速度仍然有所不同，導致最後管外偵測器所收集到的層析波峰寬度也會大不相同。

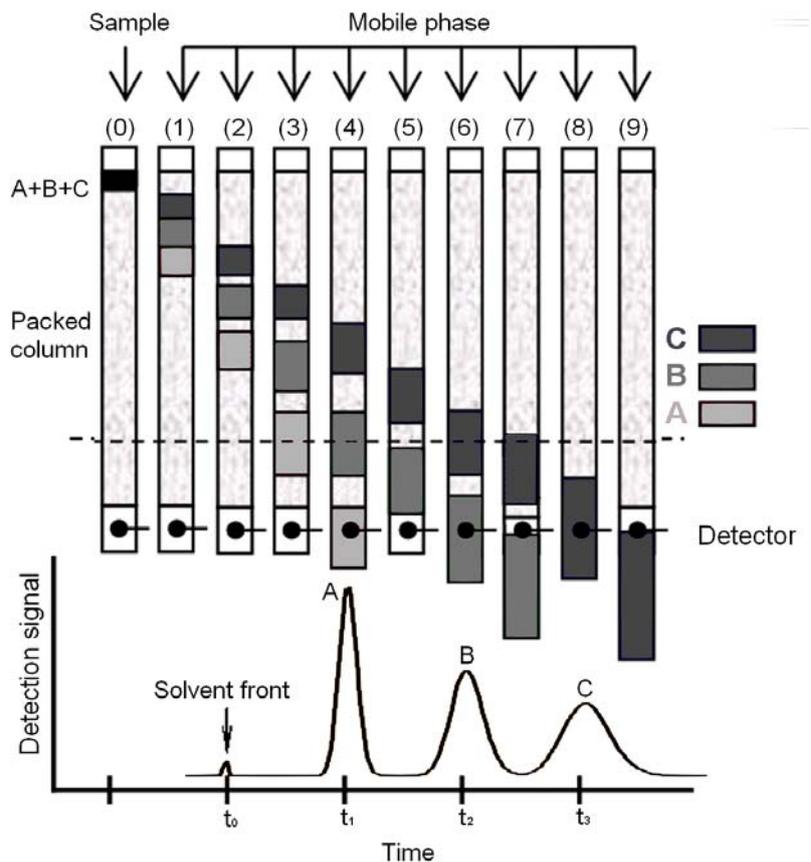


圖 3-13 三種物質於效率較差之層析管柱內進行分離的正確解釋圖

三組樣品在管柱內移動過程中，其各自的波峰寬度變化較大，但是由於管柱效率較差，不同 k 值的樣品在管柱內的空間波寬差異更小，不過，在流析出管柱後，單通道偵測器所收集到的層析圖譜，仍會由於樣品移速不同而產生波峰寬度差異很大之關係。

表 3-1 動相組成比例與數據取點間距時間

編號	動相比例 (V/V)		數據取點間距時間 (ms)
	甲醇 (%)	去離子水 (%)	
1	99	1	1000
2	97	3	1150
3	95	5	1300
4	93	7	1500
5	91	9	1700
6	89	11	1950
7	87	13	2200
8	85	15	2500
9	83	17	2850
10	81	19	3200
11	79	21	3600
12	77	23	4200
13	75	25	5300
14	73	27	6600
15	71	29	8500

表 3-2 15 組等位沖堤層析之管外層析時圖波型指標

編號	k	樣品移速 u_m (cm min ⁻¹)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波高 $h(t)$ (Abs)	波峰頂點位置 t_p^* (min)
1	0.54	9.92	0.144	0.489	2.47
2	0.65	9.26	0.160	0.441	2.65
3	0.77	8.64	0.175	0.404	2.84
4	0.93	7.93	0.191	0.375	3.09
5	1.10	7.29	0.209	0.342	3.36
6	1.35	6.52	0.231	0.305	3.76
7	1.63	5.82	0.251	0.281	4.21
8	1.97	5.17	0.277	0.253	4.74
9	2.35	4.57	0.306	0.225	5.36
10	2.86	3.97	0.344	0.201	6.18
11	3.46	3.43	0.391	0.186	7.13
12	4.19	2.95	0.440	0.159	8.31
13	5.09	2.51	0.506	0.136	9.74
14	6.06	2.17	0.573	0.122	11.3
15	7.27	1.85	0.659	0.105	13.2

表 3-3 15 組等位沖堤層析實驗之時圖層析波寬與

樣品移動至管柱 17 公分處的空圖波峰寬度比較

編號	時圖半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	空圖半高寬 $W_{1/2(s)17}$ (cm)
1	0.144 (100) ^註	2.13 (100)
2	0.160 (111)	2.21 (103)
3	0.175 (122)	2.24 (105)
4	0.191 (132)	2.24 (105)
5	0.209 (145)	2.21 (103)
6	0.231 (160)	2.17 (102)
7	0.251 (174)	2.13 (100)
8	0.277 (192)	2.06 (97)
9	0.306 (212)	1.95 (91)
10	0.344 (238)	1.91 (90)
11	0.391 (271)	1.91 (90)
12	0.440 (305)	1.80 (84)
13	0.506 (351)	1.80 (84)
14	0.573 (397)	1.80 (84)
15	0.659 (457)	1.73 (81)

註：括弧內之數值計算方法為 $\% = 100 \times \frac{W_{1/2(t)(n=1-15)}}{W_{1/2(t)(n=1)}}$ 以及

$$\% = 100 \times \frac{W_{1/2(s)17(n=1-15)}}{W_{1/2(s)17(n=1)}}, \text{ n 為實驗編號。}$$

表 3-4 理論方程式參數符號表

符號	定義
$\sigma_{(s)}$	空圖波峰標準偏差值
$\sigma_{(s_0)}$	樣品一進入管柱後的初始空間標準偏差
$\sigma_{(t)}$	時圖波峰標準偏差值
$W_{(t)}$	時圖波峰底部寬度， $W_{(t)}=4\sigma_{(t)}$
L	管柱長度
D	擴張係數
Δt	偵測器之解析度
u	動相沖堤速度
u_m	樣品移動速度
k	滯留因子
t	物質注入管柱後移動至管柱末端偵測點所需的時間
t_R	樣品抵達管柱出口端偵測點所需時間
t_M	溶劑抵達管柱出口端偵測點所需時間
m_s	管柱內樣品存在於靜相之質量
m_m	管柱內樣品存在於動相之質量
m_t	樣品進樣總質量

表 3-5 15 組等位沖堤層析實驗之層析時圖波峰高度與

樣品移動至管柱 17 公分處的空圖波峰高度 $\times \frac{I}{k+1}$ 數據

編號	k	時圖波高 $h_{(t)}$ (Abs)	空圖波高 $\times \frac{I}{k+1}$ $h_{(s)17}$ (Abs) $\times \frac{I}{k+1}$
1	0.54	0.489 (100) ^註	0.207 (100)
2	0.65	0.441 (90)	0.185 (90)
3	0.77	0.404 (83)	0.185 (89)
4	0.93	0.375 (77)	0.159 (77)
5	1.10	0.342 (70)	0.145 (70)
6	1.35	0.305 (62)	0.135 (65)
7	1.63	0.281 (57)	0.116 (56)
8	1.97	0.253 (52)	0.107 (52)
9	2.35	0.225 (46)	0.100 (48)
10	2.86	0.201 (41)	0.086 (41)
11	3.46	0.186 (38)	0.076 (37)
12	4.19	0.159 (32)	0.070 (34)
13	5.09	0.136 (28)	0.057 (28)
14	6.06	0.122 (25)	0.049 (24)
15	7.27	0.105 (21)	0.044 (21)

註：括弧內之數值計算方法為 $\% = 100 \times \frac{h_{(t)(n=1-15)}}{h_{(t)(n=1)}}$ 以及

$$\% = 100 \times \frac{h_{(s)17(n=1-15)} \times \frac{I}{k+1}}{h_{(s)17(n=1)} \times \frac{I}{k+1}}, \text{ n 為實驗編號。}$$

第四章 層析實驗中理論板高、板數誤用現象之探討

4.1 研究背景與理論介紹

在層析的發展史中，有許多解釋區帶擴張的理論被提出來，其中包括 1941 年諾貝爾獎得主 Martin 和 Synge 所提的隔板理論[3]，他們將層析管柱視為類似蒸餾塔由許多不連續但相鄰的薄層所組成，此薄層之高度即為理論板高 (H)，此參數與另一相關參數理論板數 (N) 普遍使用於層析管柱效率的定量衡量，板高與板數的關係如下：

$$N = \frac{L}{H} \quad (4-1)$$

其中 L 是填充管柱的長度（通常以空間單位：公分表示），層析管柱的效率隨板數的增加和板高的減小而增加，通常管柱效率會有明顯的差異，其原因來自於管柱形式、動相、靜相使用的不同[1]。

板高的定義如下（見圖 3-6）：

$$H = \frac{\sigma_{(s)}^2}{L} \quad (4-2)$$

但由於一般常見的傳統偵測器是以時間為單位收集樣品流出管柱後的訊號，所以所得到的典型層析圖則是以時間為橫軸，則板高也可以下式算出：

$$H = \frac{LW_{(t)}^2}{16t_R^2} \quad (4-3)$$

另一種求得 H 值的方法為使用 $W_{1/2}$ 這個參數，這是波峰最大高度之
一半位置處的兩側波峰寬度總和。板高可由下式求得：

$$H = \frac{L}{5.54} \left(\frac{W_{1/2(t)}}{t_R} \right)^2 \quad (4-4)$$

理論板數 N 和板高 H 常被文獻及儀器製造商廣泛使用，以評估管柱
效能。

提升層析分離效能的方法除了改善管柱填充條件以外，可對樣品
之 k 值做最適化調整，對液體動相而言，藉由改變溶劑成份來操控 k
值大小，操控過程可搭配等位沖堤或者梯度沖堤等不同的沖堤模式，
來達到提升分離效率的目標。但是，根據本研究第三章內容可得知，
樣品在層析圖中的波峰寬度與其本身在管柱中的移動速度成反比的
關係，而樣品的移動速度即反應樣品在管柱中對靜相滯留的力量，在
梯度沖堤中，樣品分子對靜相之滯留作用力會隨時間不停改變，此即
表示，樣品在通過傳統偵測器之偵測點位置時，其移動速度隨著時間
不停地在變化，故層析圖譜上所得到的波峰寬度就成了不停地累積樣
品移速改變所得的結果，也就是說，層析圖上所得的時圖波峰，是樣
品在「通過傳統偵測器之單一偵測點」的位置時，累積移動速度變化

所得到的總訊號結果，如此一來，上述的管柱效能 (H 與 N) 之定義，便不適用於梯度沖堤等非線性層析實驗，更進一步地說，就是指稱傳統的基礎層析理論公式並不能用來處理非線性層析系統所得實驗結果。這樣的觀念已有部分研究提出關注，Snyder等人發表了一系列有關梯度液相層析法的理論模擬系統[61-64]，其中除了對層析波峰標準偏差做修正以外，也有使用一些傳統偵測器所得結果來佐證其模擬數據。最早於1967年時，Horvath和Lipsky曾針對在梯度沖堤條件中的峰容量 (peak capacity) 改變的議題發表了簡短的說明[65]，後來也有其他科學家對相同的議題進行更進一步探討[66]。Yamamoto於1995年發表文獻指出，在離子交換層析系統中，以梯度沖堤模式對蛋白質進行分離時，板高可藉由一系列實驗參數來進行修正[67]，並於往後提出更多在不同沖堤模式下的板高修正理論[68-70]。雖然已有相當多科學家對這個議題產生關注，但是由於文獻發表時，修正模式類的文獻中包含大量的公式運用，相當複雜且艱深難懂，而很多分析化學領域的學者專心致力於開發新的分析技術、新的應用、或者改善分析效率等議題，對於理論公式的發展或推導並不熟稔，所以導致傳統公式定義在這方面的疏失，仍有相當多人沒有注意到，仍舊有相當多的分析學者，使用傳統板高或者板數之定義方法來計算非線性沖堤條件下的實驗結果，以表現管柱效率[71-78]。故本研究設計一層析梯度沖堤實驗

條件，然後以全管柱偵測 (WCD) 系統觀察管柱內樣品之層析行為，藉實驗數據直接地說明傳統層析理論不適用於非線性層析的原因，以期避免爾後的分析學者再犯同樣的錯誤。

4.2 實驗

4.2.1 儀器裝置

本實驗之層析系統，使用往復式梯度沖提幫浦、內體積 20 μL 的樣品迴圈、自製之 HPLC 管柱、WCD 系統和 UV/Vis 偵測器 (偵測器波長選擇為 435 nm)。本實驗中 WCD 系統內所使用的濾波片規格為 435 nm 濾波片。



4.2.2 藥品

本研究選擇的染料樣品是 *Anthrurufin*，購自 Aldrich(WI, USA)，其分子量為 240.41，最大吸收波長 425 nm，溶於丙酮中使成為樣品溶液，樣品濃度為 200 mg L^{-1} 。動相組成包含 HPLC 級甲醇溶劑跟去離子水，甲醇溶劑與丙酮皆購自 Aldrich，去離子水為經過 Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q 處理之 18.2 $\text{M}\Omega$ 水。

4.2.3 實驗步驟

實驗以 3 種階梯式 (stage-wise) 梯度沖提模式對樣品進行沖提。

4.2.3.1 模式一

配製兩種極性不同之動相，甲醇與水以 71：29 (V/V) 等比例混合，此溶液為動相 A；甲醇與水以 99：1 (V/V) 等比例混合，此溶液為動相 B，階梯式梯度沖提模式啟動前，先以 100%的動相 A 流速 1 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 2、3、4、5、6 分鐘時，瞬間將動相變為 100%的 B，在這樣的切換動相模式實驗中，我們稱動相 A 為第一動相，動相 B 則為第二動相，在往後的模式二與三亦以此類推。樣品一注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號以及管外訊號。在不同的動相變換時間條件下，樣品於沖提過程中，停留於管柱內所需的總滯留時間長度不同，故 WCD 系統之數據取點間距時間亦不相同，極性較大的動相在沖提過程中會使樣品對靜相的滯留作用力提升，則樣品移速慢，故當程式越慢切換成極性較小之動相時，樣品在管柱內停留的時間也就越長，則數據取點間距時間亦必須拉長，5 種切換動相時間的實驗分別搭配的 WCD 系統數據取點間距時間為 1.5、2、3、3.5、4 秒。

4.2.3.2 模式二

配製兩種極性不同之動相，甲醇與水以 71：29 等比例混合，此

溶液為動相 A；甲醇與水以 91：9 (V/V) 等比例混合，此溶液為動相 C，階梯式梯度沖提模式啟動前，先以 100%的動相 A 流速 1 mL min⁻¹ 的條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 2、3、4、5、6 分鐘時，瞬間將動相變為 100%的 C，在樣品一注入的同時，立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號以及管外訊號，5 種切換動相時間的實驗分別搭配的 WCD 系統數據取點間距時間為 2、3、3.5、3.5、4 秒。

4.2.3.3 模式三

配製兩種極性不同之動相，甲醇與水以 71：29 等比例混合，此溶液為動相 A；甲醇與水以 81：19 (V/V) 等比例混合，此溶液為動相 D，階梯式梯度沖提模式啟動前，先以 100%的動相 A 流速 1 mL min⁻¹ 的條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 2、3、4、5、6 分鐘時，瞬間將動相變為 100%的 D，在樣品一注入的同時，立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號以及管外訊號，5 種切換動相時間的實驗分別搭配的 WCD 系統數據取點間距時間為 2.5、3.5、4、5、5.5 秒。

4.3 結果與討論

4.3.1 三種模式之比較

在模式一的階梯式梯度沖堤實驗中，傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 4-1 所示，圖 4-1(a)為基線校正前結果，圖 4-1(b)為基線校正後結果，校正前後的層析時圖波峰指標參數列於表 4-1 中。沖堤過程中，選擇樣品移動至管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處的空圖波峰出來觀察比較，結果如圖 4-2(a)-(e)，根據以上結果畫出樣品於管柱內的遷移路徑圖於圖 4-3(a)-(e)，灰色線條分別代表樣品以動相 A 及動相 B 進行等位沖堤實驗時所得之遷移曲線（數據來自於第三章中 $k=7.27$ 與 $k=0.54$ 等條件之實驗結果），黑色線即代表樣品於模式一的階梯式沖堤條件下所得之樣品遷移曲線。

模式二的階梯式梯度沖堤實驗中，傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 4-4 所示，圖 4-4(a)為基線校正前結果，圖 4-4(b)為基線校正後結果，校正前後的層析圖波峰指標參數列於表 4-2 中。沖堤過程中，WCD 系統所觀察到的樣品空圖波峰結果如圖 4-5(a)-(e)，根據以上結果畫出樣品於管柱內的遷移路徑圖於圖 4-6(a)-(e)，灰色線條分別代表樣品以動相 A 及動相 C 進行等位沖堤實驗時所得之遷移曲線（數據來自於第三章中 $k=7.27$ 與 $k=1.10$ 等條件之實驗結果），黑色線即代表樣品於模式二的沖堤條件下所得之樣品遷移曲線。

模式三的階梯式梯度沖堤實驗中，傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 4-7 所示，圖 4-7(a)為基線校正前結果，圖 4-7(b)為基

線校正後結果，校正前後的層析圖波峰指標參數列於表 4-3 中。沖堤過程中，WCD 系統所觀察到的樣品空圖波峰結果如圖 4-8(a)-(e)，根據以上結果畫出樣品於管柱內的遷移路徑圖於圖 4-9(a)-(e)，灰色線條分別代表樣品以動相 A 及動相 D 進行等位沖堤實驗時所得之遷移曲線（數據來自於第三章中 $k=7.27$ 與 $k=2.86$ 等條件之實驗結果），黑色線即代表樣品於模式三的沖堤條件下所得之樣品遷移曲線。

由以上三種模式的空圖結果可看出（見圖 4-2、4-5、4-8），動相於 2、3、4 分鐘時做變化的這三組條件，由於動相較早做切換，故當樣品移動到 WCD 系統的觀察視窗範圍內時，其波峰之波形已漸趨穩定，據樣品在觀察範圍內所有得到的空圖結果，可得到波峰寬度與管柱位置之關係圖，結果顯示，在空圖波型穩定的條件範圍內，樣品空間波寬與管柱位置呈線性關係，於是便可以外插法求出樣品移動到管柱 25 公分時的波峰寬度為何，然後再根據公式(4-2)與(4-1)計算三種沖堤模式中空圖波峰理論板高 H' 與板數值 N' ，結果列於表 4-4。但是在動相 5、6 分鐘做切換的這兩組條件下，由於樣品移動到 WCD 系統觀察範圍內時，適逢於動相切換等混合階段，故波峰之波形較為混亂，故無法計算求出此 2 條件中的空圖波峰理論板高與板數。

從以上 3 種模式的遷移路徑圖結果來看（見圖 4-3、4-6、4-9），樣品在接觸到第二動相後，其移動速度（遷移路徑圖上的斜率）都會

與使用第二動相進行等位沖堤樣品所得之結果相同，也就是說，在本研究中對任一種階梯式沖堤模式而言，不管動相改變的時間快慢，樣品抵達傳統單通道 UV/Vis 偵測器時的速度會一致，皆等於使用第二動相等位沖堤樣品之移速，故其時圖波峰寬度皆相同（見圖 4-1、4-4、4-7），但是切換時間快慢卻大大影響了樣品最後流出管柱所需的流析時間，切換動相時間越慢，樣品所需之沖堤時間就越長，根據公式(4-4)來計算 3 種階梯式梯度沖堤模式所有實驗所得之時圖理論板高 H 與板數 N ，結果列於表 4-4。將動相轉換時間 2、3、4、5、6 分鐘等五組條件所得之空圖板數或者時圖板數除上動相轉換時間 2 分鐘條件之空圖板數或者時圖板數，此倍率值再乘上 100 即為板數或者板高增加程度之百分比。根據表 4-4 中括弧內的百分比結果，可清楚的看出，在同一模式但動相切換時間不同等實驗條件中，以空圖數據所計算而得的理論板數差異並不大，但是由時圖數據所計算而得的理論板數差異卻可大至近 300%，甚至，時圖所計算而得的理論板數與空圖理論板數之平均值有達 450% 的差異（ $100 \times 3497 \div 777 = 450\%$ ），由不同參數（空間與時間）等實驗結果所計算而得的理論板數竟會有如此大的差異，原因即在於，計算理論板數的方法（公式(4-3)或公式(4-4)），是來自於使用空間數據獲得理論板高的公式(4-2)的衍生，而以空間為處理單位的公式(4-2)與以時間為處理單位的公式(4-3)在做轉換時，中間

加入一「樣品移動速度」參數（如公式（3-1）所述），意即表示，公式(4-3)是一建構在「樣品移動速度固定」的原則下延續發展而得的結果，但是在非線性層析實驗中，由於動相組成隨著時間在改變，所以管柱內樣品的移動速度便會在不同流析時間下受到不同動相之溶劑強度的影響，而致使樣品之移動速度有所改變，如此一來，公式(4-3)便無法成立，自然也就不能被使用來計算板數或者板高了，所以在進行層析實驗時，只要用點“詭計”，藉由延緩改變動相的時間來使樣品滯留在管柱內的時間加長，如此一來，公式(4-4)中的 t_R 增加且可保持 $W_{1/2(t)}$ 不變，則時圖之理論板數便會大幅增加，管柱效率便會看似大幅提升了，但實際上，從觀察管柱內流體行為所得之實驗結果使我們可以很清楚地認知到，這些都是『假象』而已，管柱本身所能提供的效能不會隨著動相改變而有太大的變化的，就如同蒸餾塔原理般，在製作層析管柱過程中，以高壓填充方式將靜相填入管柱的這個步驟完成的當下，代表管柱效率的理論板數值便已大致固定，雖然在不同動相沖堤或者選擇不同的分析樣品會導致其板數 N 以及板高 H 有些許差異，但此值之差異應不大才是。

4.3.2 空間波峰寬度變化

根據圖 4-2、4-5、4-8 等空圖結果可觀察到，在第二動相尚未接觸樣品前，樣品之波峰寬度隨著流析時間加長而變寬，當第二動相剛

接觸波峰之左方部分的樣品(波峰左方之樣品為較接近管柱進樣入口處之樣品)，由於動相極性小，能使樣品對靜相之滯留作用力大幅縮減，故此區域樣品之移速便會劇烈增加，加快樣品往管柱出口方向前進的速度，如此一來，會使樣品在動相接觸等短暫時間內產生類似濃縮的波寬變窄之現象，待穩定後，其波峰才會又繼續的隨流析時間加長而變寬。將模式一階梯式梯度沖堤實驗中，動相於 2、3、4 分鐘做切換的這 3 組條件之樣品空間波峰寬度與管柱位置關係作圖(圖 4-10)，圖中可明顯的看到樣品波峰變窄然後再漸漸變寬的現象，這樣的現象於文獻中亦曾經有人提及[31]，因為這種作用力，所以三種模式下所得之空圖波峰寬度皆不相同，模式中兩種動相之極性差異越大者(如模式一)，樣品空間波峰寬度濃縮之現象便較為明顯，則樣品之空圖波峰寬度便會較窄，而以管內空間波峰寬度值所計算而得之理論板高便亦會較小(如表 4-4 所示)；而模式中兩種動相之極性差異較小時(如模式三)，由於濃縮效果較不明顯，則樣品之空圖波峰寬度便會較寬，故以樣品於管內空間寬度值所計算而得之理論板高便會較模式一所得結果來的更大些($0.0437 > 0.0322$)。

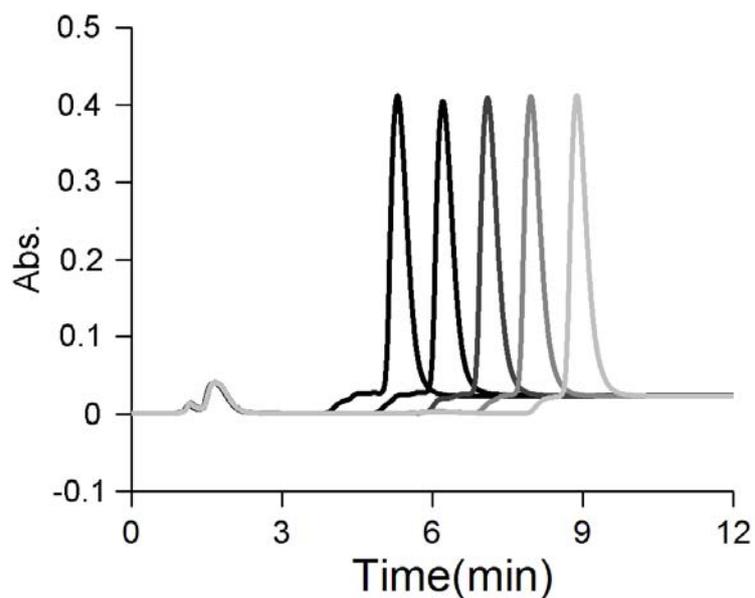
4.4 結論

在本研究中，藉著設計一系列的特殊階梯式梯度沖堤實驗條件，我們可以很清楚的觀察到，不管在任何條件下進行實驗，WCD 系統

獲得管柱內樣品空間波峰寬度差異都極小，故以空間波峰數據所計算而得的 H' 值差異皆不大，但是，若以傳統管柱外單通道偵測器所獲得的層析圖譜之數據來計算 H 值的話，在不同的非線性層析條件下，其差異可達 3 倍以上。甚至，以時圖結果所計算而得的 N 值可能會與以空圖數據計算所得的 N' 值差異達到 4 倍以上，只要在沖提過程中加入越多“把戲”，這個誤差值可以使之越大，但是因為直接觀察管柱內樣品空間波峰訊號是最真實的流體行為表現方法，所使用的公式也是所有計算理論板數方法的最根源，就會避免了公式推導過程中的定義疏失，所以層析操作者應該是以空圖計算所得之 N' 值為參考，而不能以時圖計算所得結果為準，也就是說：在任何非線性層析條件下，理論板數或者板高並不會隨著動相比例變化而使此數值產生太大的改變。

本研究所得結論就是，在非線性層析系統中，並不能使用公式 (4-3) 或公式 (4-4) 來處理非線性層析數據，層析操作者爾後需避免犯下同樣的錯誤。至於在非線性層析條件下要如何計算理論板數與板高，還需作進一步的研究。

(a) 基線校正前



(b) 基線校正後

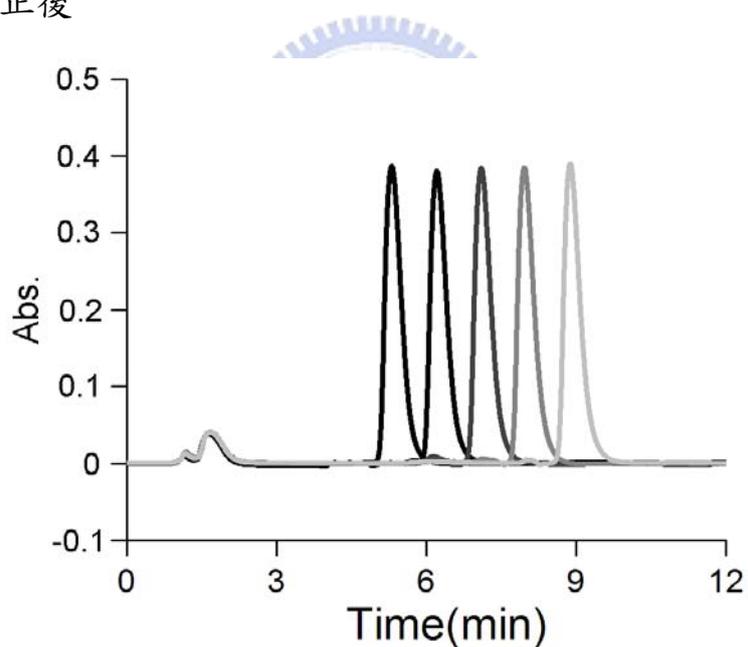
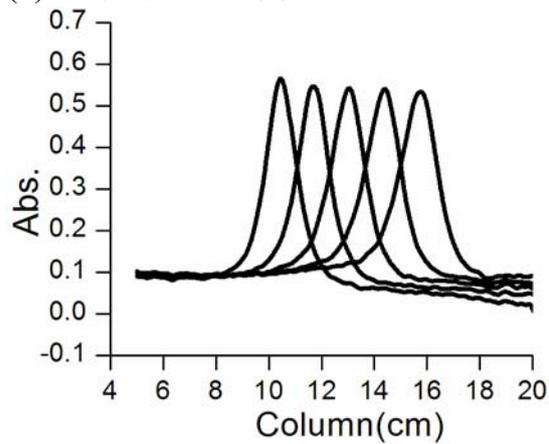


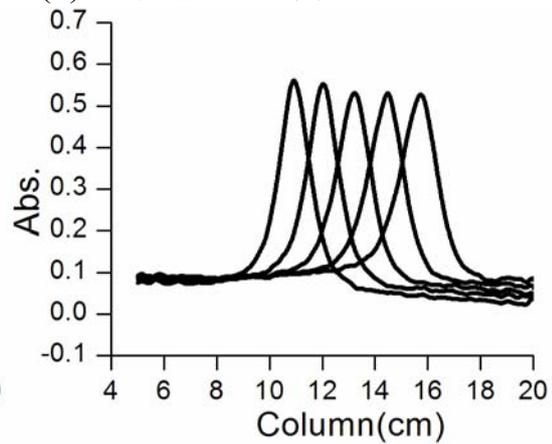
圖 4-1 模式一階梯式梯度沖提實驗之層析圖譜

模式一：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，第二動相-甲醇：水=99：1 (V/V)。圖中由左至右分別為動相於 2、3、4、5、6 分鐘做變化所得的結果。

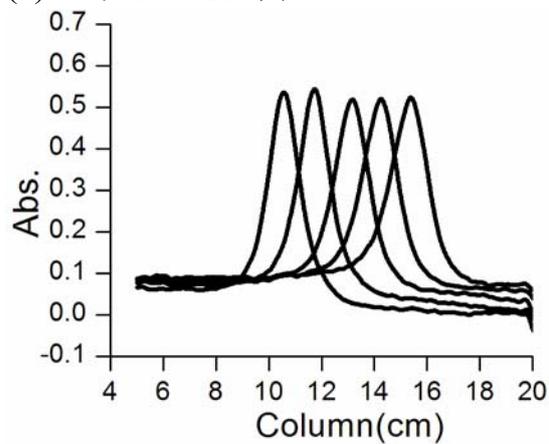
(a) 2 分鐘切換動相



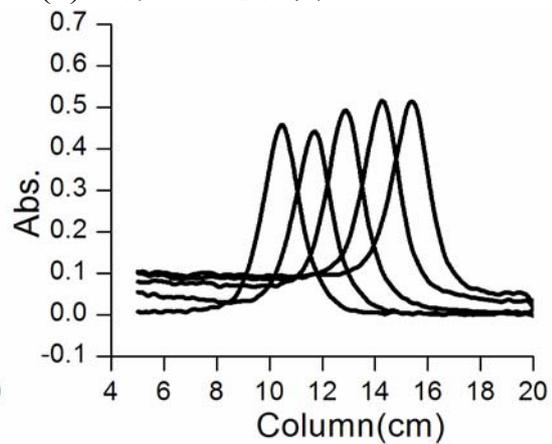
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

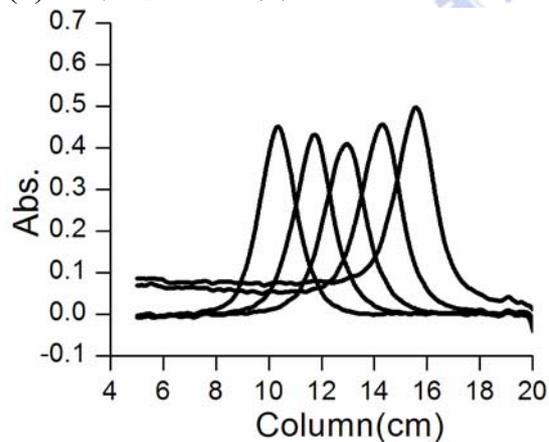


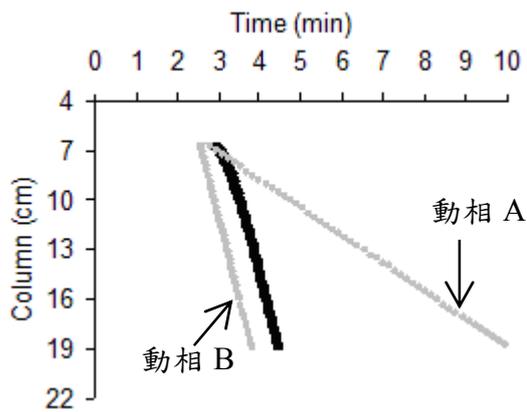
圖 4-2 模式一階梯式梯度沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、

11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

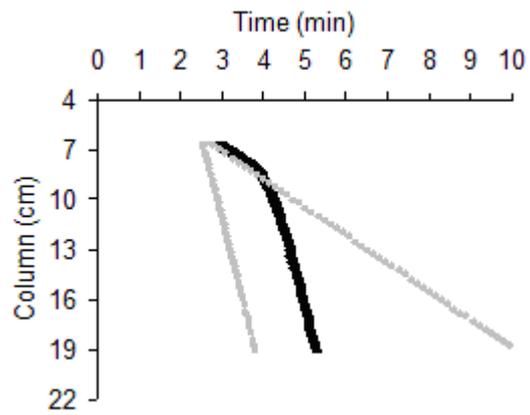
模式一：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘

時改變動相組成為甲醇：水=99：1 (V/V)。

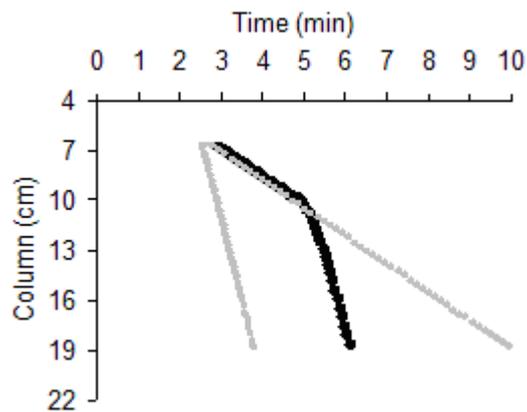
(a) 2 分鐘切換動相



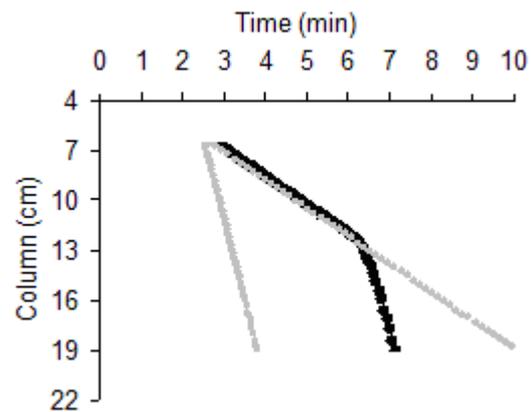
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

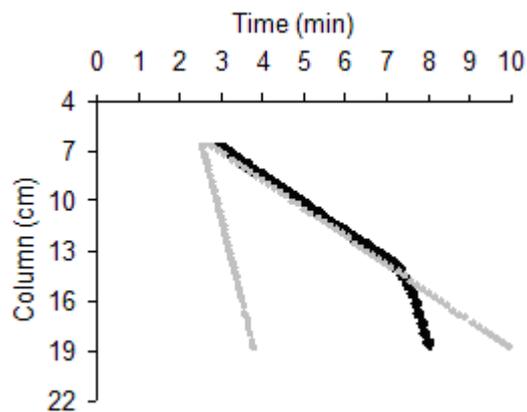
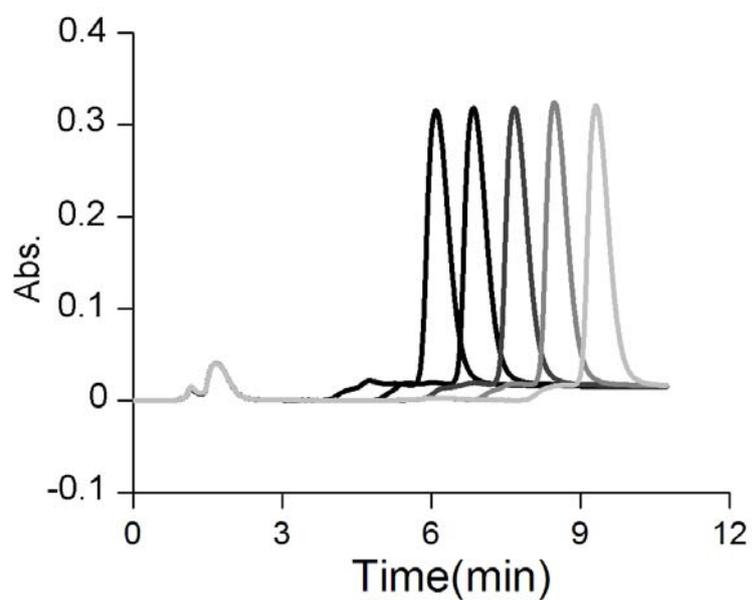


圖 4-3 模式一階梯式梯度沖提實驗所得之樣品遷移路徑圖

模式一：初始動相 A- 甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘時改變動相組成為 B- 甲醇：水=99：1 (V/V)。

(a) 基線校正前



(b) 基線校正後

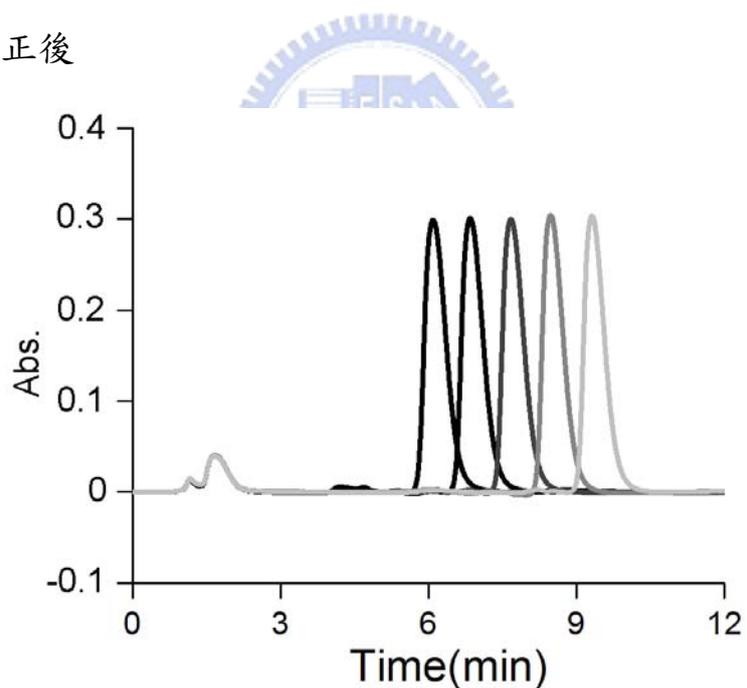
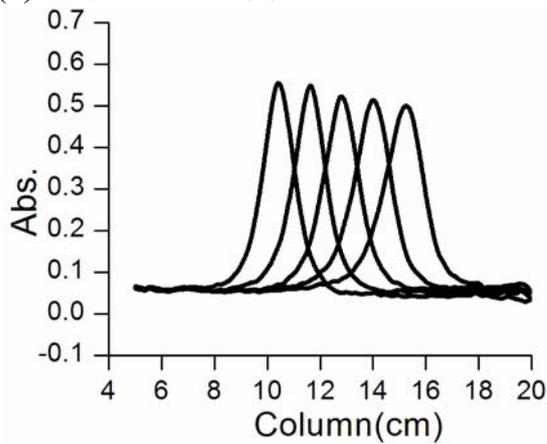


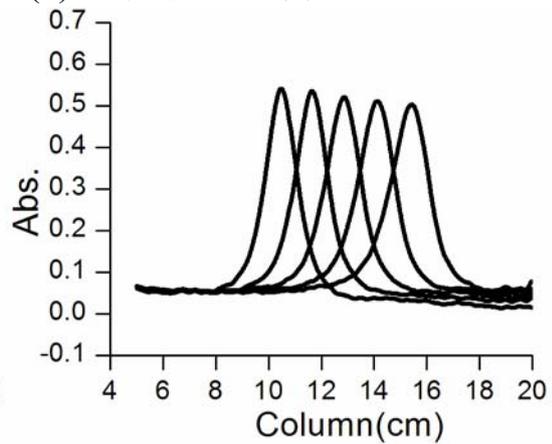
圖 4-4 模式二階梯式梯度沖提實驗之層析圖譜

模式二：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，第二動相-甲醇：水=91：9 (V/V)。圖中由左至右分別為動相於 2、3、4、5、6 分鐘做變化所得的結果。

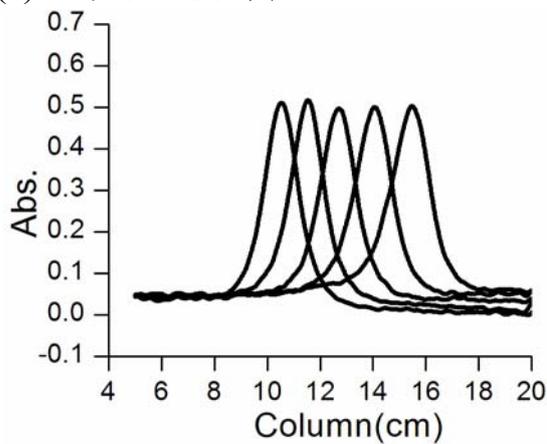
(a) 2 分鐘切換動相



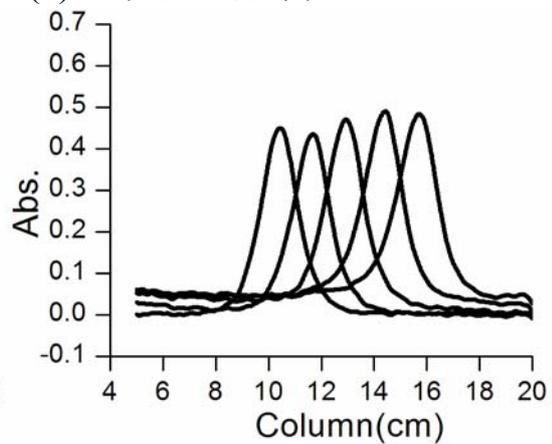
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

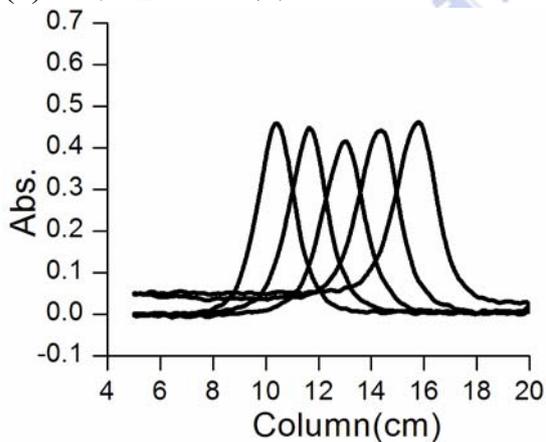


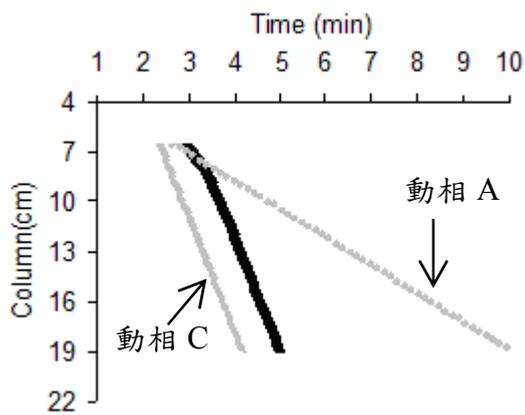
圖 4- 5 模式二階梯式梯度沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、

11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

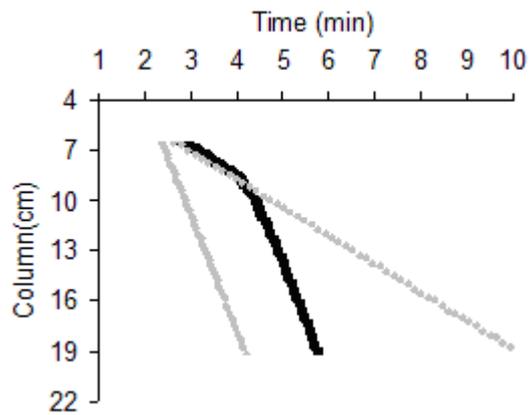
模式二：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘

時改變動相組成為甲醇：水=91：9 (V/V)。

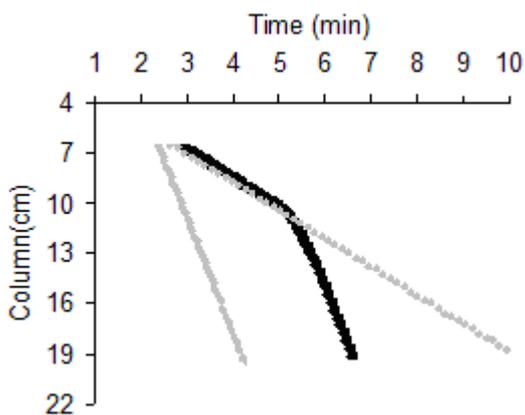
(a) 2 分鐘切換動相



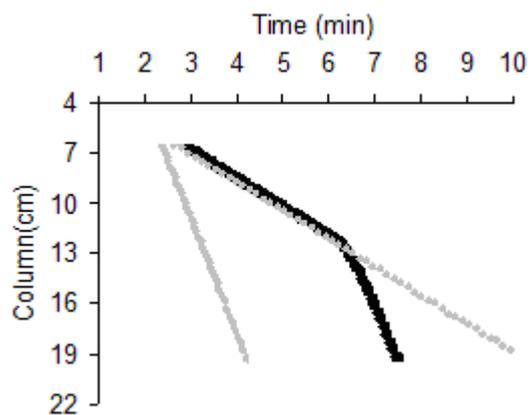
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

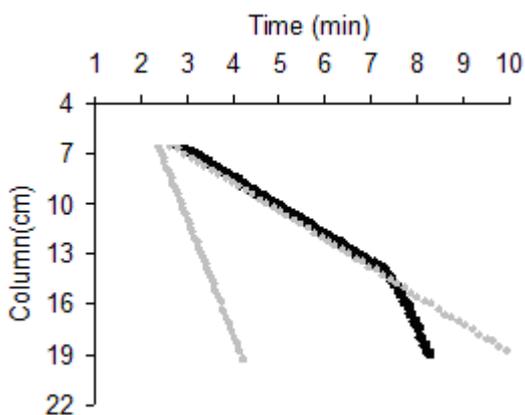
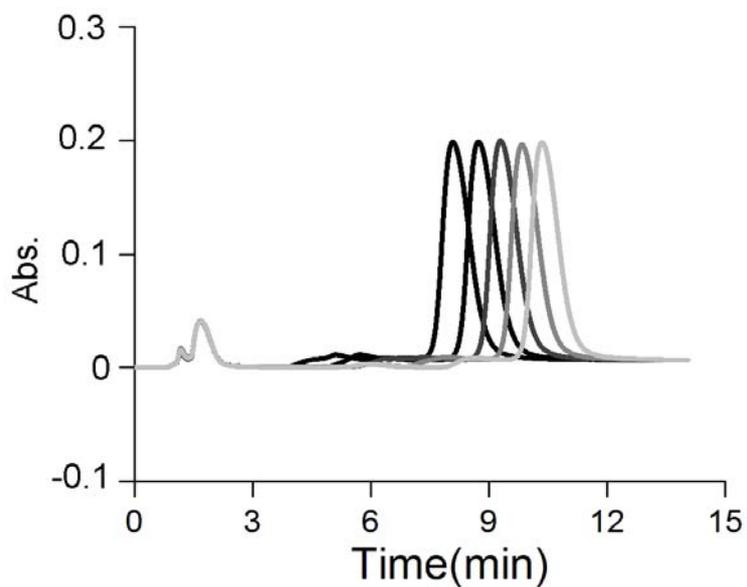


圖 4-6 模式二階梯式梯度沖提實驗所得之樣品遷移路徑圖

模式二：初始動相 A-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘時改變動相組成為 C-甲醇：水=91：9 (V/V)。

(a) 基線校正前



(b) 基線校正後

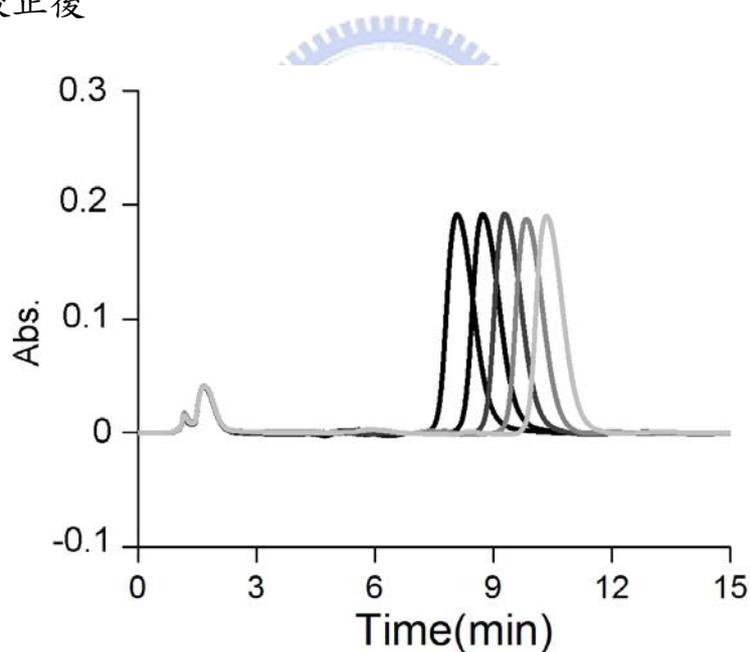
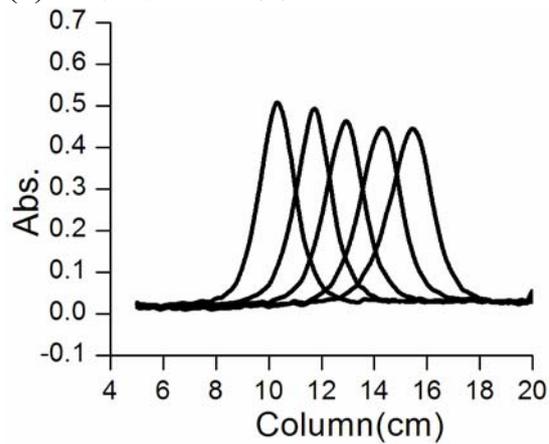


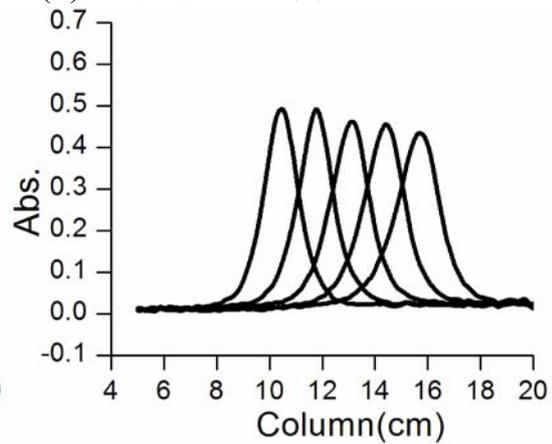
圖 4-7 模式三階梯式梯度沖提實驗之層析圖譜

模式三：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，第二動相-甲醇：水=81：19 (V/V)。圖中由左至右分別為動相於 2、3、4、5、6 分鐘做變化所得的結果。

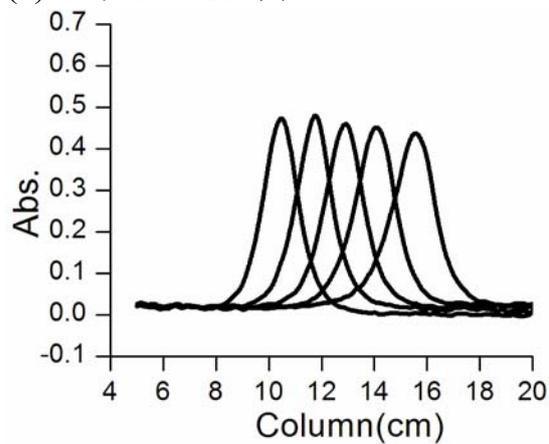
(a) 2 分鐘切換動相



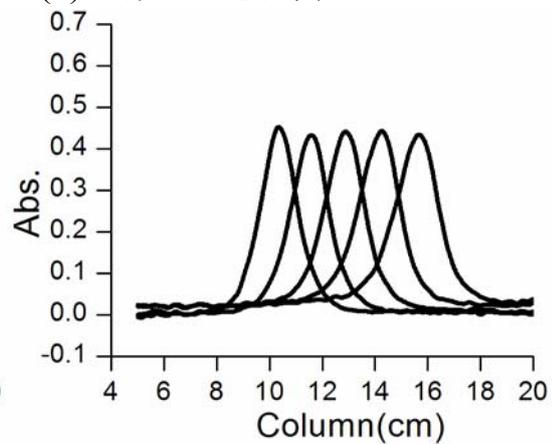
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

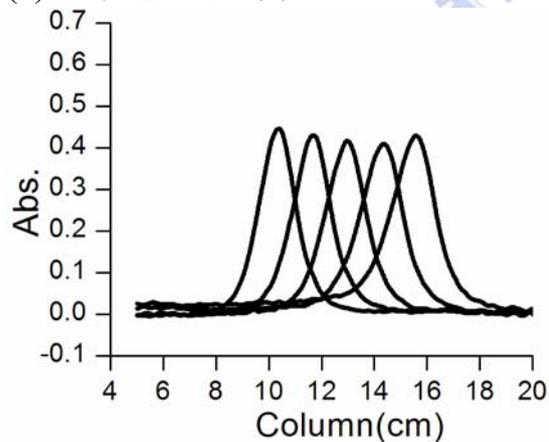
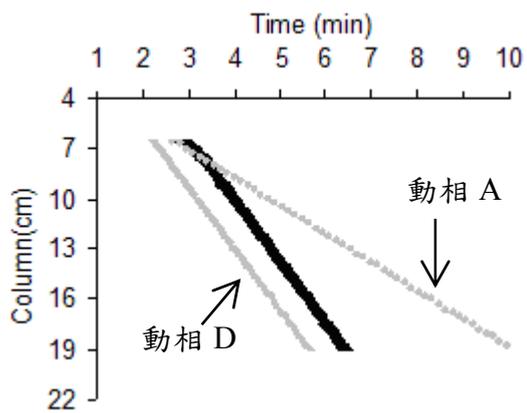


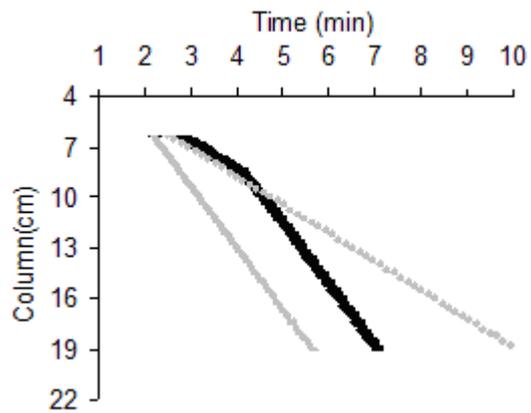
圖 4- 8 模式三階梯式梯度沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 10.4、11.7、13.0、14.3、15.6 公分處之管內空間波形

模式三：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘時改變動相組成為甲醇：水=81：19 (V/V)。

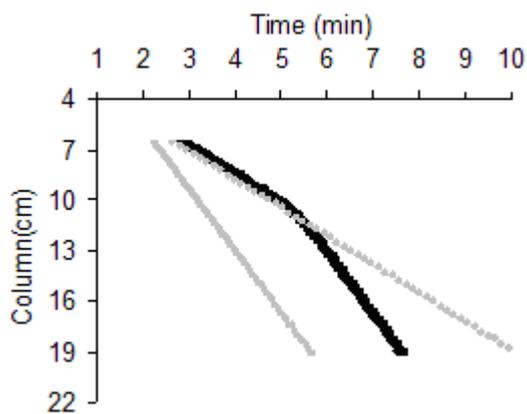
(a) 2 分鐘切換動相



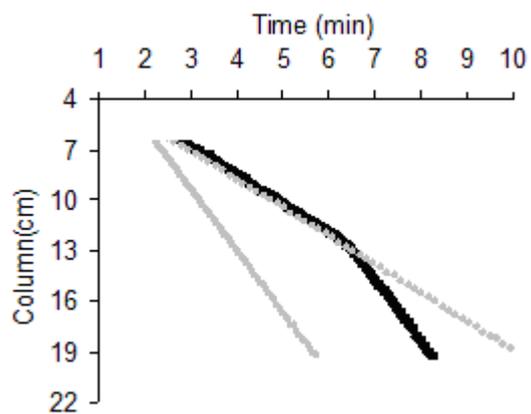
(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相



(e) 6 分鐘切換動相

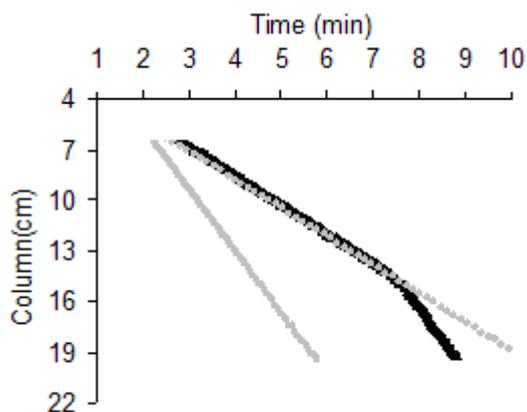
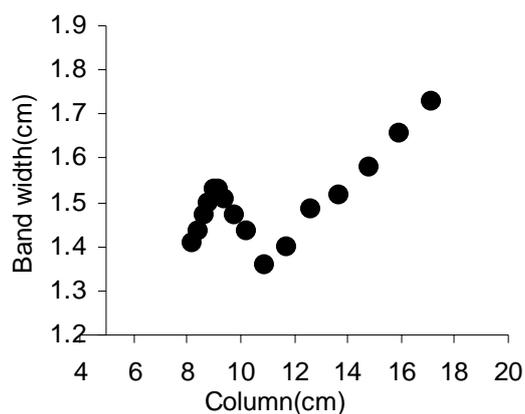


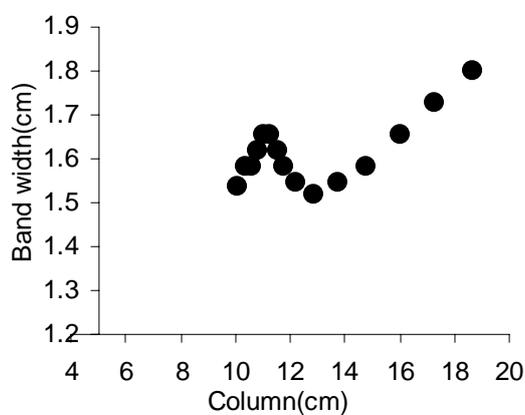
圖 4-9 模式三階梯式梯度沖堤實驗所得之樣品遷移路徑圖

模式三：初始動相 A-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-6 分鐘時改變動相組成為 D-甲醇：水=81：19 (V/V)。

(a) 2 分鐘切換動相



(b) 3 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相

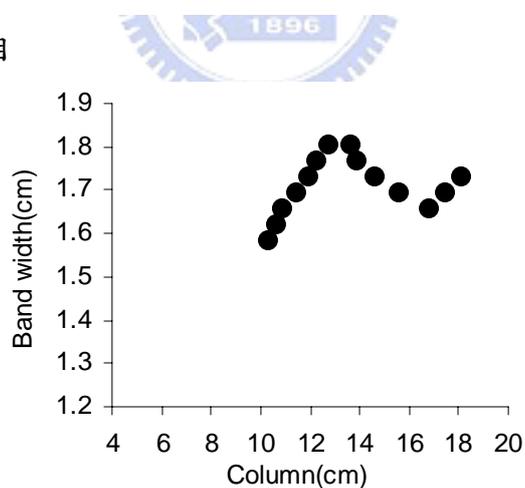


圖 4-10 模式一階梯式梯度沖提，樣品空間波寬與管柱位置之關係圖

模式一：初始動相-甲醇：水=71：29 (V/V)，樣品進樣後於 2-4 分鐘

時改變動相組成為甲醇：水=99：1 (V/V)。

表 4-1 模式一階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標

波峰基線校正前

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)
Peak 1	0.412	0.377	5.30
Peak 2	0.405	0.377	6.20
Peak 3	0.409	0.377	7.09
Peak 4	0.411	0.370	7.96
Peak 5	0.412	0.370	8.88

波峰基線校正後

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)	波面積 $A_{(t)}$ (Abs-min)
Peak 1	0.387	0.363	5.30	0.174
Peak 2	0.380	0.363	6.20	0.176
Peak 3	0.384	0.360	7.09	0.174
Peak 4	0.385	0.357	7.96	0.177
Peak 5	0.390	0.353	8.88	0.174

表 4-2 模式二階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標

波峰基線校正前

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)
Peak 1	0.316	0.500	6.09
Peak 2	0.318	0.497	6.84
Peak 3	0.318	0.490	7.66
Peak 4	0.324	0.488	8.47
Peak 5	0.321	0.487	9.31

波峰基線校正後

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)	波面積 $A_{(t)}$ (Abs-min)
Peak 1	0.299	0.480	6.09	0.173
Peak 2	0.301	0.480	6.84	0.176
Peak 3	0.300	0.473	7.66	0.175
Peak 4	0.304	0.463	8.47	0.173
Peak 5	0.304	0.470	9.31	0.176

表 4-3 模式三階梯式梯度沖堤之層析時圖波型指標

波峰基線校正前

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)
Peak 1	0.199	0.780	8.08
Peak 2	0.199	0.777	8.72
Peak 3	0.200	0.773	9.28
Peak 4	0.196	0.770	9.83
Peak 5	0.198	0.760	10.3

波峰基線校正後

	波高 $h_{(t)}$ (Abs)	半高寬 $W_{1/2(t)}$ (min)	波峰頂點位置 t_p^* (min)	波面積 $A_{(t)}$ (Abs-min)
Peak 1	0.192	0.760	8.08	0.178
Peak 2	0.192	0.760	8.72	0.181
Peak 3	0.192	0.753	9.28	0.177
Peak 4	0.188	0.747	9.83	0.178
Peak 5	0.190	0.743	10.3	0.176

表 4-4 空時圖理論板數、板高計算結果

	動相切換 時間(min)	空圖板高 H' (cm)	空圖板數 N'	時圖板高 H (cm)	時圖板數 N
模 式 一	2	0.0325	770 (100) ^註	0.0212	1178 (100)
	3	0.0317	788 (102)	0.0155	1615 (137)
	4	0.0324	772 (100)	0.0116	2151 (183)
	5			0.0091	2757 (234)
	6			0.0071	3497 (297)
	Average	0.0322	777		
模 式 二	2	0.0395	633 (100)	0.0281	891 (100)
	3	0.0396	632 (100)	0.0222	1125 (126)
	4	0.0387	647 (102)	0.0172	1452 (163)
	5			0.0135	1852 (208)
	6			0.0115	2172 (244)
	Average	0.0392	637		
模 式 三	2	0.0436	573 (100)	0.0400	626 (100)
	3	0.0437	572 (100)	0.0343	730 (117)
	4	0.0438	570 (100)	0.0297	841 (134)
	5			0.0260	960 (153)
	6			0.0233	1071 (171)
	Average	0.0437	572		

註：括弧內之數值計算方法為 $\% = 100 \times \frac{N_{2,3,4,5,6}}{N_2}$

第五章 非線性沖堤中層析峰滯留順序交錯現象之探討

5.1 研究背景與理論介紹

在層析系統中，若想在合理的時間內完成良好的分配層析分離的話，動相、靜相的成份選擇與其對分析物作用力之影響必須小心的配合，但是由於通常管柱的靜相條件固定，所以要改進分離效率大多倚靠動相極性的調整來達到目標。在液相層析中，要改變溶質滯留強度最簡單的方法就是更換動相組成，不同動相具有不同溶劑強度 (solvent strength)，所謂溶劑強度是指溶劑與溶質間的作用力強度，當動相的溶劑強度大時，即表示沖堤樣品受到動相的作用力大，樣品較不易受靜相滯留，當變換動相組成使其溶劑強度改變時，沖堤樣品的滯留時間也會有所變化，甚至根據一些文獻指出[1,54,79-82]，部份特殊動相與樣品的組合，加強其溶劑強度不但會使樣品的滯留時間縮短，還會導致混合樣品間彼此的滯留順序產生反轉，這樣的例子並不多，所以鮮少被提出來做討論，但為了廣泛的了解所有層析行為，我們仍將針對這樣的層析案例進行探討。

所謂的層析峰滯留順序交錯 (crossover) 現象是指，在梯度沖堤非線性層析實驗條件中，若混合樣品其中之一成份對動相溶劑作用力之改變程度變化很大，可能導致其在動相組成改變前原本移速較另一

成份慢，可是當動相組成改變後，成份移速大幅提升，甚至速度快到足以追趕上另一原本已超前距離之成份，導致在整個流析過程中，兩成份在管柱內會發生以下三步驟行為：兩成份逐漸分離--原本移速慢之成份因移速增加而追趕上另一成份--兩成份再度逐漸分離等情形，這樣的現象即稱之為滯留順序交錯現象。如果把兩成份在管柱中的遷移路徑畫在同張遷移路徑圖上的話，便可以看到兩條有交會點的線。滯留順序交錯現象最早出現在 1986 年 Gelderloos 等人所發表的文獻中[20]，當時作者為了介紹 WCD 可能產生的優勢，便以電腦模擬的方式畫出各種可能的流析條件的遷移路徑圖，其中一組電腦模擬遷移路徑圖就可約略的看出，其中兩條遷移曲線有交會現象。雖然已有科學家預測模擬出在層析管柱中有機會發生這種特殊的分離行為，但是由於當時 WCD 系統發展尚未成熟，所以始終仍未有研究團隊提出直接觀察樣品滯留順序交錯現象的實驗數據。

Kiseleva 等人曾在 2003 年發表有關染料分離的文獻成果[80]，其中提到當化合物 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 以不同比例組成的動相分別進行線性沖提時，其滯留順序會有機會產生對調，也就是說，對於文中所提之特定樣品，如果調整動相沖提的比例，便可能控制使之對靜相滯留作用力大或者小，進而產生樣品移動速度緩慢或者大幅加快等結果，我們推測，如果把以上所述的實驗條件運用在非線性層析系

統中來對樣品進行沖堤，極有可能利用 WCD 系統在一次非線性層析沖堤過程中，完整觀察到層析波峰滯留順序交錯之現象，故本研究便嘗試以此樣品進行非線性梯度沖堤，用 WCD 系統記錄樣品在管柱內遷移過程，試圖觀察到本文所提之滯留順序交錯現象，藉由觀察此類有趣的層析行為來對非線性層析系統有更進一步的了解。

5.2 實驗

5.2.1 儀器裝置

本實驗之層析系統，使用往復式梯度沖堤幫浦、內體積 20 μL 的樣品迴圈、自製之 HPLC 管柱、WCD 系統和 UV/Vis 偵測器（偵測器波長選擇為 540 nm）。本實驗中 WCD 系統內所使用的濾波片規格為 540 nm 濾波片。

5.2.2 藥品

本研究選擇的染料樣品是 *New Coccine*（俗稱食用紅色六號色素）與 *Carmoisine*（俗稱藍光酸性紅染料），皆購自 Aldrich(WI, USA)；*New Coccine* 分子量 604.47，最大吸收波長 506 nm；*Carmoisine* 分子量 502.43，最大吸收波長 515 nm。

動相組成包含 Acetonitrile (ACN)，sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)，phosphoric acid (H_3PO_4)，和 tetrabutylammonium

dihydrophosphate (TBA)，這些材料都購自 Aldrich。實驗用水為經過 Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q 處理之 18.2 M Ω 去離子水。

5.2.3 實驗步驟

為了觀察到管柱內明顯的樣品滯留順序交錯現象，本研究先選用幾組不同極性大小的動相來各別對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性等位沖堤、連續式 (continuous) 梯度沖堤、階梯式梯度沖堤。由線性等位沖堤結果，可簡單判斷兩化合物之滯留順序在不同動相組成的沖堤條件下是否發生對調，若順序對調情形發生，則先進行連續式梯度沖堤，分別觀察兩化合物在此實驗條件下，其滯留順序是否會對調，若由於樣品移速變化不夠劇烈，導致仍無法明顯觀察到滯留順序對調的現象的話，最後則以階梯式梯度沖堤，改變溶劑強度較為劇烈的實驗條件來對樣品進行沖堤，以期觀察到兩樣品在 HPLC 管柱中的滯留順序對調現象。待最佳觀察滯留順序對調現象之實驗條件找到後，再將 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 混合並注入管柱，以上述條件進行沖堤，便能藉由 WCD 系統來完整的觀察到層析峰滯留順序交錯之現象。由於動相的極性以及組成比例不同皆會影響樣品在管柱中的滯留程度，所以本研究以三階段實驗來漸進式的尋找最佳觀察滯留順序交錯現象之層析沖堤條件。

5.2.3.1 第一階段

將 5 mM 的磷酸鈉緩衝液 (pH 4.2) 與 ACN 以 50 : 50 (V/V) 比例混合，再以此溶液配製成 0.5 mM TBA 的動相溶液，命名為動相 A_{50:50}。將 5 mM 的磷酸鈉緩衝液 (pH 4.2) 與 ACN 以 50 : 50 比例混合，再以此溶液配製成 8 mM TBA 的動相溶液，命名為動相 B_{50:50}。New Coccine 與 Carmoisine 溶於去離子水中配製成各別為 500 mg L⁻¹ 的樣品溶液。首先各將 20 μL 的樣品注入管柱中，分別將 A_{50:50} 和 B_{50:50} 二組動相以流速 1 mL min⁻¹ 與 0.5 mL min⁻¹ 進行線性沖堤，在樣品注入的同時，啟動 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號及管外訊號。當 A_{50:50} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖堤 New Coccine 與 Carmoisine 時，WCD 系統之數據取點間距時間為 1 秒；當 B_{50:50} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖堤 New Coccine 與 Carmoisine 時，WCD 系統之數據取點間距時間為 1.5 秒。當 A_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 沖堤樣品 New Coccine 與 Carmoisine 時，WCD 系統之數據取點間距時間為 2 秒；當 B_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 沖堤樣品 New Coccine 與 Carmoisine 時，WCD 系統之數據取點間距時間為 3 秒。

連續性梯度沖堤步驟，初始動相 100% 的 B_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 1、2、3 分鐘內，動相組成逐步轉換為 100% 的 A_{50:50}，隨著梯度完成所需時間越短，動相

轉換速度越快，由於動相從梯度沖堤幫浦要進入到管柱內影響樣品需要一段時間（這段時間造成的原因來自於幫浦到管柱間的空隙體積，例如管外線路以及幫浦內混合槽體積），所以即便樣品注入後，就立即改變動相組成，改變後的動相仍會在約 0.34 分鐘後才進入管柱內對樣品產生影響。樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器，收集樣品流經管柱過程的空間波峰訊號及管外時間訊號，WCD 系統之數據取點間距時間為 2 秒。

階梯式梯度沖堤步驟，初始動相 100% 的 B_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 1、2 分鐘時，瞬間將動相組成變為 100% 的 A_{50:50}，樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集訊號，WCD 系統之數據取點間距時間為 2 秒。

5.2.3.2 第二階段

將 50 mM 的磷酸鈉緩衝液（pH 4.2）與 ACN 以 45：55 (V/V) 比例混合，再以此溶液配製成 10 mM TBA 的動相溶液，命名為動相 A_{45:55}。將 5 mM 的磷酸鈉緩衝液（pH 4.2）與 ACN 以 45：55 比例混合，再以此溶液配製成 10 mM TBA 的動相溶液，命名為動相 B_{45:55}。*New Coccine* 與 *Carmoisine* 溶於去離子水中配製成各別為 300 mg L⁻¹ 的樣品溶液。首先各將 20 μL 的樣品注入管柱中，分別將 A_{45:55} 和 B_{45:55}

二組動相以流速 1 mL min^{-1} 進行線性沖堤，在樣品注入的同時，啟動 UV/Vis 偵測器收集樣品管外訊號。

連續性梯度沖堤步驟，初始動相 100% 的 $B_{45:55}$ 以流速 1 mL min^{-1} 的實驗條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 2、4、6、8、10、12、14、17、30 分鐘內，動相組成逐步轉換為 100% 的 $A_{45:55}$ ，隨著梯度完成所需時間越短，動相轉換速度越快。樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集訊號。在動相轉換完成所需時間為 2、4、6 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間約為 3 秒；動相轉換完成所需時間為 8 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為 3.5 秒；動相轉換完成所需時間為 10、12、14、17、30 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間約為 3.8 秒。

階梯式梯度沖堤步驟，初始動相 100% 的 $B_{45:55}$ 以流速 1 mL min^{-1} 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 2、2.5 分鐘時，瞬間將動相組成變為 100% 的 $A_{45:55}$ ，樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集訊號，WCD 系統之數據取點間距時間為 3 秒。

5.2.3.3 第三階段

將 50 mM 的磷酸鈉緩衝液 (pH 4.2) 與 ACN 以 40 : 60 (V/V) 比例混合，再以此溶液配製成 10 mM TBA 的動相溶液，命名為動相

$A_{40:60}$ 。將 5 mM 的磷酸鈉緩衝液 (pH 4.2) 與 ACN 以 40 : 60 比例混合，再以此溶液配製成 10 mM TBA 的動相溶液，命名為動相 $B_{40:60}$ 。*New Coccine* 與 *Carmoisine* 溶於去離子水中配製成各別為 300 mg L⁻¹ 的樣品溶液。首先各將 20 μ L 的樣品注入管柱中，分別將 $A_{40:60}$ 和 $B_{40:60}$ 二組動相以流速 1 mL min⁻¹ 進行線性沖提，在樣品注入的同時，啟動 UV/Vis 偵測器收集樣品管外訊號。

連續性梯度沖提步驟，初始動相 100% 的 $B_{40:60}$ 以流速 1 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著分別在樣品注入 6、8、10、14、20、30 分鐘內，動相組成逐步轉換為 100% 的 $A_{40:60}$ ，隨著梯度完成所需時間越短，動相轉換速度越快。樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集訊號。在動相轉換完成所需時間為 6、8 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為約 5.2 秒；動相轉換完成所需時間為 10 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為 5.4 秒；動相轉換完成所需時間為 14 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為 5.6 秒；動相轉換完成所需時間為 20 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為 5.8 秒；動相轉換完成所需時間為 30 分鐘的實驗中，WCD 系統之數據取點間距時間為 6 秒。

階梯式梯度沖提步驟，初始動相 100% 的 $B_{40:60}$ 以流速 1 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 4 分鐘時，瞬間將動相

組成變為 100%的 A_{40:60}，樣品注入後立即開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器收集訊號，WCD 系統之數據取點間距時間為 5 秒。

根據以上三階段實驗的結果，找到最佳觀察分析物滯留順序對調現象之條件後，將 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 混合溶於去離子水中配製成濃度 100 mg L⁻¹ 的樣品溶液。初始動相 100%的 B_{40:60} 以流速 1 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 3.5、3.75、4、5 分鐘時，瞬間將動相組成變為 100%的 A_{40:60}，樣品注入後立即開啟 WCD 系統收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號，WCD 系統之數據取點間距時間皆為約 5 秒。



5.3 結果與討論

5.3.1 第一階段

動相 A_{50:50} 和 B_{50:50} 以 1 mL min⁻¹ 的流速對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後，傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 5-1(a)與圖 5-1(b)所示。A_{50:50} 沖提 *New Coccine* 時，樣品滯留時間為 2.44 分鐘；B_{50:50} 沖提 *New Coccine* 時，樣品滯留時間為 4.93 分鐘；A_{50:50} 沖提 *Carmoisine* 時，樣品滯留時間為 2.68 分鐘；B_{50:50} 沖提 *Carmoisine* 時，樣品滯留時間為 4.59 分鐘。動相 A_{50:50} 和 B_{50:50} 以 1 mL min⁻¹ 的流速分別對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後，

WCD 系統所得之所有樣品的遷移路徑圖統整於圖 5-2(a)中，可明顯的看出，*New Coccine* 在兩種動相分別沖堤的情況下，其滯留時間變化程度較 *Carmoisine* 劇烈，這樣的變化導致兩化合物之滯留順序對調，但由於樣品整體滯留時間相當短（皆小於 5 分鐘），WCD 系統所得遷移路徑圖之間隔距離小，未來要觀察到管柱內混合樣品之滯留順序交錯現象恐怕不易，所以縮小動相流速成 0.5 mL min^{-1} ，以期加長滯留時間，增加在管內觀察到交換現象之可能性，故在開始連續式梯度沖堤實驗前，先將動相 $A_{50:50}$ 和 $B_{50:50}$ 以 0.5 mL min^{-1} 的流速對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖堤，觀察 WCD 系統所得之所有樣品的遷移路徑圖（圖 5-2(b)），接著以連續式梯度沖堤的條件進行實驗，期望在單一組沖堤實驗中可以完整觀察到分析物滯留順序對調現象。

圖 5-3 為 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 連續式梯度沖堤實驗中，WCD 系統所得之所有的樣品遷移路徑圖，圖 5-3(a)為 *New Coccine* 之遷移路徑圖，圖 5-3(b)為 *Carmoisine* 之遷移路徑圖，由圖可看出，在動相持續變化的同時，遷移曲線在每個時間點的切線斜率亦皆持續在改變，也就是樣品移速時時刻刻都在改變中，而隨著改變動相變化的程度越劇烈（動相變化所需之總時間越短），樣品遷移曲線向下彎曲程度越大，即表示樣品移動速度更為顯著地加快。分別將兩化合物的遷

移曲線取出作比較，結果如圖 5-4，3 種連續式梯度沖堤實驗中，皆未出現分析物滯留順序反轉（兩線條產生交會點），故接下來嘗試階梯式梯度沖堤來進行實驗，實驗結果如圖 5-5 所示，亦無法在管柱內觀察到樣品滯留順序交錯現象的產生，原因可能有二：其一，由於兩化合物對本實驗中所選擇之動相的溶劑強度差異太小，不管動相做怎樣的變化，兩種化合物的滯留程度始終十分相近，所以在連續式梯度沖堤這種漸進式的緩慢改變動相實驗中，兩化合物之滯留順序的反轉現象便很難被觀察到；其二，由於管外空隙體積的存在，動相在進入管柱前必須先花一段時間通過這段管外空隙體積，而在本段落連續式梯度沖堤實驗中，由於兩化合物本身對靜相的滯留作用力小，滯留時間短，即表示上述管外空隙影響程度相對的就增大許多。舉例來說，當我們設定幫浦使其在樣品注入後 2 分鐘內改變動相，可是實際上動相要通過管外空隙體積抵達管柱就需要花約 0.5 分鐘時間，再加上動相進入管柱後，又需花費一定的時間抵達管內當時分析物所在的位置，如此一來，當動相真正要開始對樣品產生滯留作用力變化時，樣品可能已經抵達管柱末端或者離開管柱可觀察之視窗範圍內，導致滯留順序交錯現象便無法被觀察到。

所以，接下來的實驗將提升動相的極性，使樣品在逆相層析管柱中的滯留作用力增大、滯留時間加長，藉此改變以期觀察到管柱內混

合樣品滯留順序交錯之現象。

5.3.2 第二階段

動相 A_{45:55} 和 B_{45:55} 以 1 mL min⁻¹ 的流速對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後，傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 5-6(a)與圖 5-6(b)所示。A_{45:55} 沖提 *New Coccine* 時，樣品滯留時間為 4.16 分鐘；B_{45:55} 沖提 *New Coccine* 時，樣品滯留時間為 9.49 分鐘；A_{45:55} 沖提 *Carmoisine* 時，樣品滯留時間為 5.29 分鐘；B_{45:55} 沖提 *Carmoisine* 時，樣品滯留時間為 8.28 分鐘。增加動相極性確實增大樣品整體滯留時間，並且使兩化合物之滯留時間差異有些微的增加，如此一來，分析物滯留順序調換情形預期將更容易被觀察到。

圖 5-7(a)、5-7(b)分別為 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 連續式梯度沖提實驗中 WCD 系統所得之所有的樣品遷移路徑圖，由左至右的曲線分別代表樣品在 2、4、6、8、10、12、14、17、30 分鐘內完成動相梯度變化的實驗結果，由圖可看出，在動相持續變化的同時，遷移曲線在每個時間點的切線斜率亦皆持續在改變，也就是樣品移速時時刻刻都在改變中，而隨著改變動相變化的程度越劇烈（動相變化所需之總時間越短），樣品遷移曲線向下彎曲程度越大，且 *New Coccine* 對動相梯度變化後所感受到的移速變化差異較為明顯，此趨勢有助於分

析物滯留順序交錯現象的觀察。分別將兩化合物的遷移曲線取出作比較，由於實驗條件相當多，故選出最有機會看到滯留順序交錯現象的幾組實驗結果即可，即動相梯度變化完成時間 2、4、6 分鐘等 3 組條件，如圖 5-8 所示，2、4 分鐘內完成梯度變化速度似乎太快（遷移曲線交會點在近管柱入口處），所以導致當化合物初抵達管柱內可觀測範圍時，*New Coccine* 便已追趕上 *Carmoisine*，並且開始進行順序交錯現象末期的分離動作；6 分鐘內完成梯度變化速度又稍嫌太慢（遷移曲線交會點在近管柱出口處），當樣品已抵達近管柱末端時，才看得出 *New Coccine* 追趕上 *Carmoisine* 的情形，不過，值得注意的是，3 種連續式梯度沖提實驗中，已可稍微觀察看出分析物滯留順序交錯現象的雛型，但是由於兩化合物滯留時間差距亦不大，所以即便再嘗試更多連續式梯度沖提條件，滯留順序交錯現象亦不明顯，故接下來嘗試階梯式梯度沖提來進行實驗。

階梯式梯度沖提實驗結果如圖 5-9 所示，兩化合物在注入 2 分鐘時瞬間改變動相組成的條件下，可明顯看出兩化合物的分離-混合-分離之現象，且從圖中可看出，雖然實驗操作條件是在樣品注入 2 分鐘時改變動相，但是分析物的遷移曲線卻是在將近 3 分鐘的時候才出現移速變化的折點，此即表示在液相層析系統中，梯度變化無法像在操作氣相層析控溫程式（temperature programming）的即時效果，溶劑

在管柱內移動時會有所謂的樣品延遲時間出現(於 5.3.1 所述)。雖然說從以上遷移曲線結果來看,我們已經可以明顯的觀察到樣品滯留順序交錯現象,但是如果我們將兩化合物的完整遷移路徑圖列出的話(如圖 5-10,實線所表現的是波峰頂點之位置與時間關係、虛線則表示波峰兩側十分之一高度處的位置與時間關係。),可以發現,兩化合物在管柱內移動過程中,其波峰重疊的部份相當多,如果打入混合兩種化合物之樣品溶液,再以本章節中所使用的階梯式梯度沖提條件進行實驗,則可能從頭到尾只觀察到一個結合 2 化合物的混合波峰在管柱內移動,無法分辨出兩化合物出現分離-混合-分離等滯留順序交錯現象,故接下來再繼續提升動相極性,使兩動相對樣品之溶劑強度差異增大,以期觀察到管柱內的層析峰滯留順序交錯現象。

5.3.3 第三階段

動相 $A_{40:60}$ 和 $B_{40:60}$ 以 1 mL min^{-1} 的流速對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後,傳統單通道偵測器所收集到的層析圖譜如圖 5-11(a)與圖 5-11(b)所示。 $A_{40:60}$ 沖提 *New Coccine* 時,樣品滯留時間為 7.03 分鐘; $B_{40:60}$ 沖提 *New Coccine* 時,樣品滯留時間為 16.1 分鐘; $A_{40:60}$ 沖提 *Carmoisine* 時,樣品滯留時間為 9.23 分鐘; $B_{40:60}$ 沖提 *Carmoisine* 時,樣品滯留時間為 14.5 分鐘。

圖 5-12(a)與圖 5-12(b)分別為 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 連續式梯度沖提實驗中，WCD 系統所得之所有的樣品遷移路徑圖，由左至右的曲線分別代表樣品在 6、8、10、14、20、30 分鐘內完成動相梯度變化的實驗結果，由圖可看出，在動相持續變化的同時，遷移曲線在每個時間點的切線斜率亦皆持續在改變，也就是樣品移速時時刻刻都在改變中，而隨著改變動相變化的程度越劇烈（動相變化所需之總時間越短），樣品遷移曲線向下彎曲程度越大，且 *New Coccine* 對動相梯度變化後所感受到的移速變化差異較為明顯，此趨勢有助於觀察分析物滯留順序交錯現象。分別將兩化合物的遷移曲線取出作比較，選出最能看到滯留順序調換現象的 2 組實驗結果，即動相梯度變化完成時間 10、14 分鐘等條件，如圖 5-13 所示，2 組條件之實驗結果皆可看出，*New Coccine* 與 *Carmoisine* 在沖提過程中，初期是分離狀態，但是隨著沖提過程中動相的改變，兩化合物的滯留時間發生重疊，接著再度分離，兩者之滯留順序產生調換，但是由於兩化合物滯留時間差距相當小，若注入混合樣品然後以此連續式梯度沖提條件進行實驗的話，應該會在整個沖提過程中只觀察到一組混合波峰在管柱內移動，故接下來嘗試以階梯式梯度沖提條件來進行實驗。

階梯式梯度沖提實驗結果如圖 5-14 所示，兩化合物在注入 4 分鐘時瞬間改變動相組成的條件下，可明顯看出樣品的分離-混合-分離等

滯留順序調換現象，且由於本條件中所使用之動相極性較第二階段所使用之動相極性來的大，故樣品受靜相滯留作用力的程度較第二階段所使用之條件來的更大，導致樣品之空間波峰寬度較窄（參考第 3 章實驗之結果與討論），如此一來，即便圖 5-14 與圖 5-10 等樣品遷移路徑圖結果看似相同，但其實在第三階段的條件下，混合樣品之滯留順序交錯的現象將會更容易被觀察到，故接下來打入混合樣品，以上述之階梯式梯度沖堤的條件對混合樣品進行沖堤，以期觀察到兩組層析峰滯留順序交錯之現象。

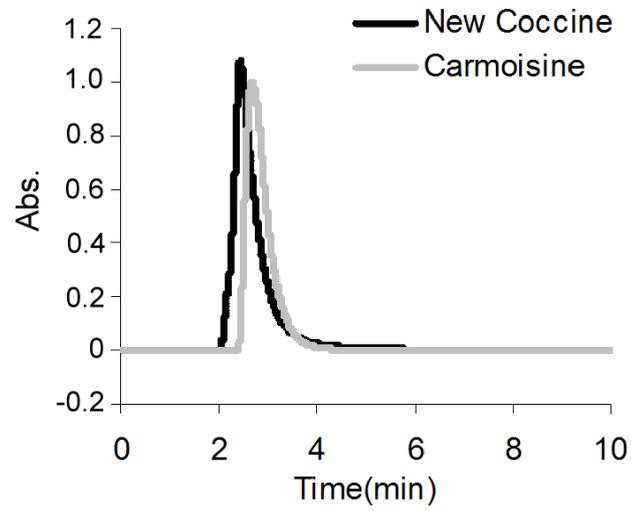
圖 5-15 為將混合樣品注入管柱後，以第三階段之階梯式梯度沖堤條件對樣品進行沖堤，WCD 系統所得的沖堤過程中管內樣品空間濃度分佈圖，由圖 5-15(a)-(c)可見，樣品注入後 3.5、3.75、4 分鐘時瞬間改變動相，皆可使混合樣品在管內產生分析物滯留順序交錯現象（化合物分離-混合-再分離），但若更慢改變動相的話（樣品注入後 5 分鐘時瞬間改變動相），則無法在流析過程中看到順序交錯現象後期的分離情形（如圖 5-15(d)），雖然可以更清楚看到交錯現象初期的分離-混合情形，但是由於本研究之目標是在一次流析過程中觀察到完整的現象，所以，在此可以做個結論：經過以上測試，最佳觀察樣品滯留順序交錯現象的實驗條件是，*New Coccine* 與 *Carmoisine* 混合溶於去離子水中配製成濃度各 100 mg L^{-1} 的樣品溶液，初始動相 100%

的 B_{40:60} 以流速 1 mL min⁻¹ 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 4 分鐘時，瞬間將動相組成變為 100% 的 A_{40:60}，這樣的沖堤條件可完整的觀察到兩化合物出現分離-混合-分離等滯留順序交錯現象（如圖 5-16）。

5.4 結論

梯度沖堤是液相層析系統經常使用的一種改進分離效率的方法，層析法最理想的分析狀態是：以最短的使用時間使分析物得到最高的分離解析度，當分析物滯留時間過長時，層析學者以改變沖堤動相組成使樣品之整體滯留時間縮短，便可提升分離效率。在本研究中，藉由直接的觀察到樣品在管柱中發生的滯留順序交錯現象，使我們更清楚的了解，只要選擇特定的動相來對樣品進行梯度沖堤，其所能改變的不只是讓沖堤時間縮短等作用，由於不同動相會對分析物產生的不同的分離競爭力，這樣的競爭現象會致使梯度沖堤亦可以有機會對兩分析物的滯留順序產生變化，而這樣的作用力是以往層析學者較易忽略的。使用全管柱偵測方法，可以直接觀察層析管柱內樣品的整個分離過程，而不只是樣品最後流出管柱後的結果，藉由本研究成果，讓我們對液相層析中的梯度沖堤有更全面性的了解。

(a)



(b)

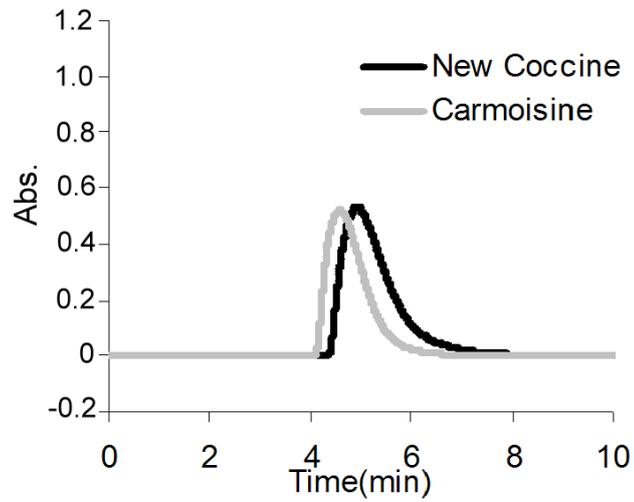
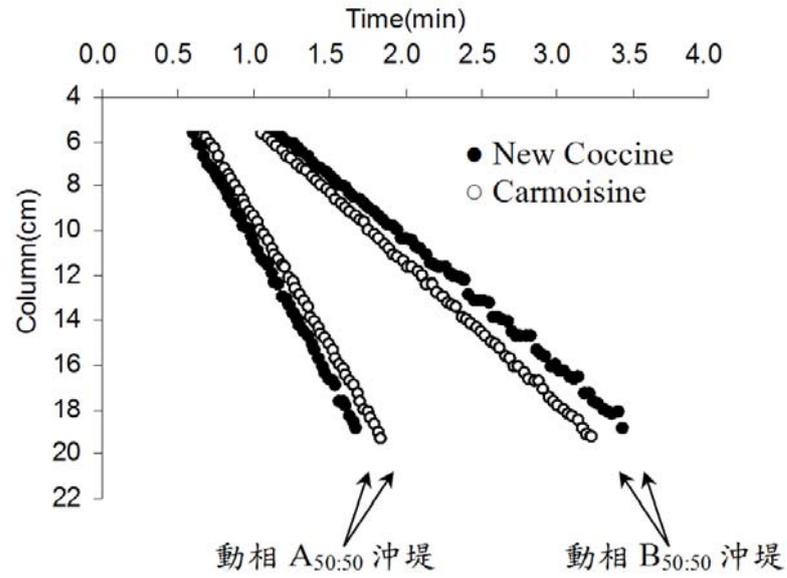


圖 5- 1 (a)動相 A_{50:50} 與(b)動相 B_{50:50} 以 1 mL min⁻¹ 的流速對 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後所得之層析時圖

(a)



(b)

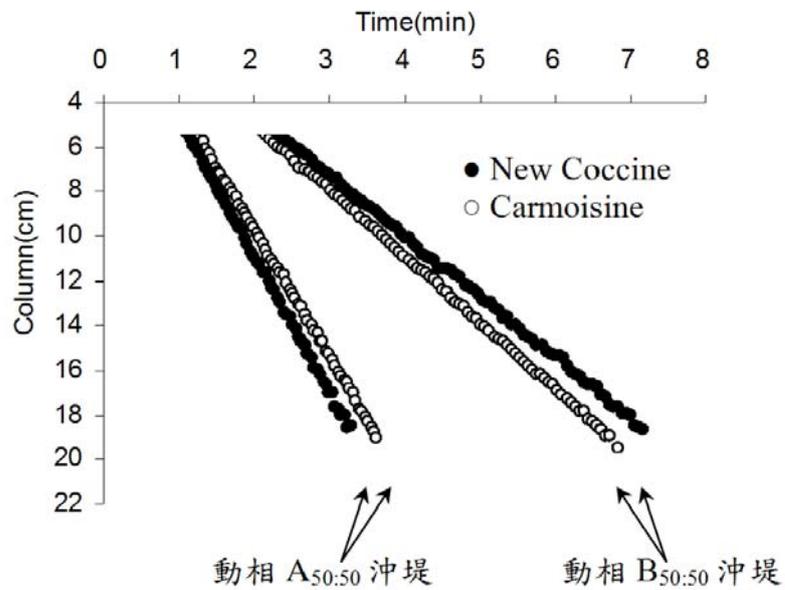


圖 5-2 A_{50:50} 和 B_{50:50} 以流速 (a) 1 mL min⁻¹ (b) 0.5 mL min⁻¹ 的流速分別對樣品 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖堤，WCD 系統所得之遷移路徑圖

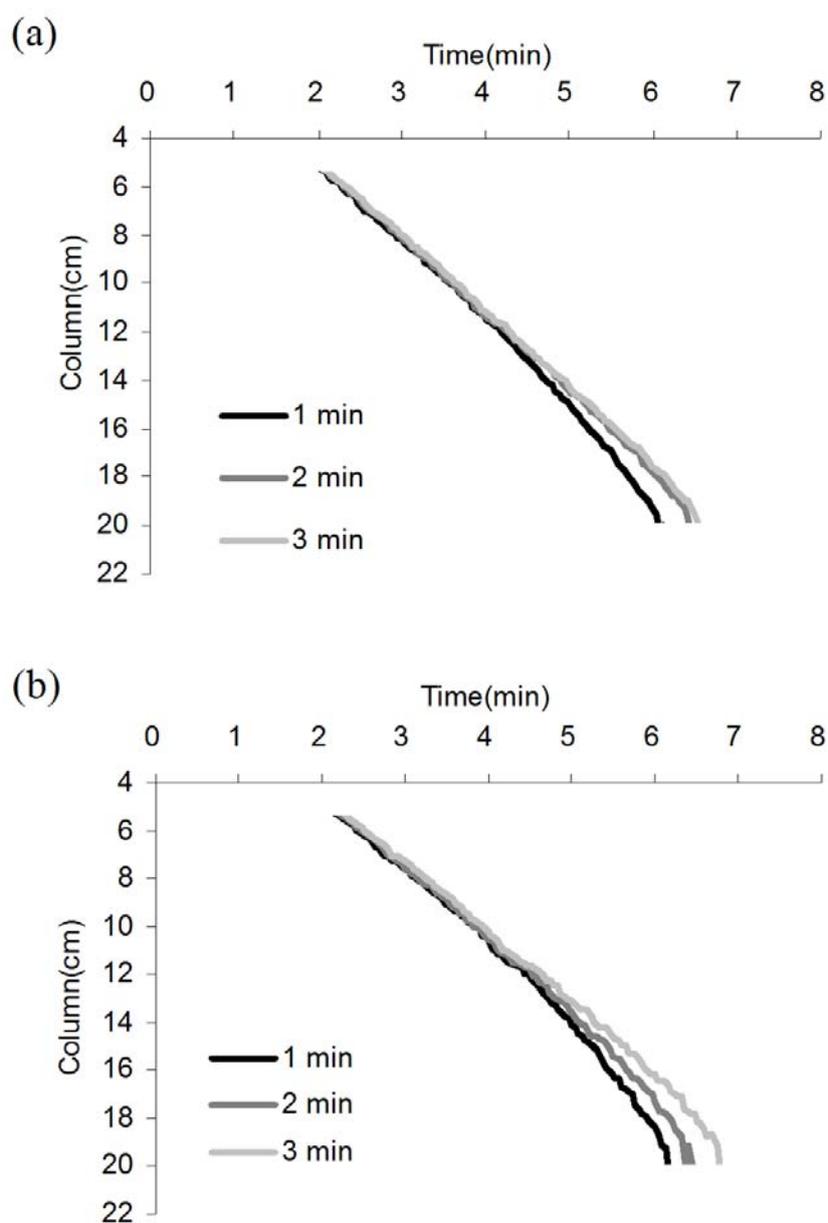


圖 5- 3 化合物(a)*New Coccine* 與(b)*Carmoisine* 在沖堤流速 0.5 mL min^{-1} 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD 系統所得之樣品遷移路徑圖整理。

圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 1、2、3 分鐘內，將動相由 $100\% \text{ B}_{50:50}$ 逐步轉換成 $100\% \text{ A}_{50:50}$ 之實驗條件所得結果

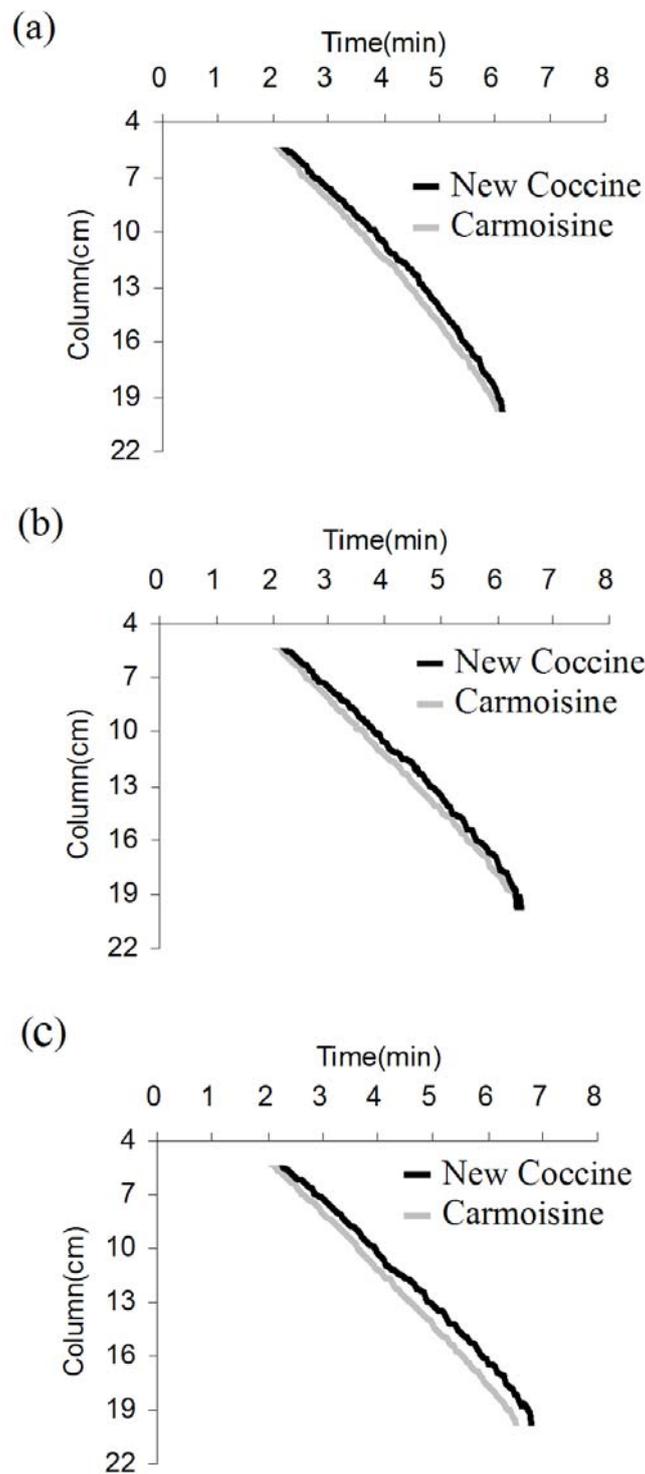


圖 5-4 初始動相 100% B_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*)進樣後(a)1(b)2(c)3 分鐘內，逐步將動相轉換成 100% A_{50:50}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

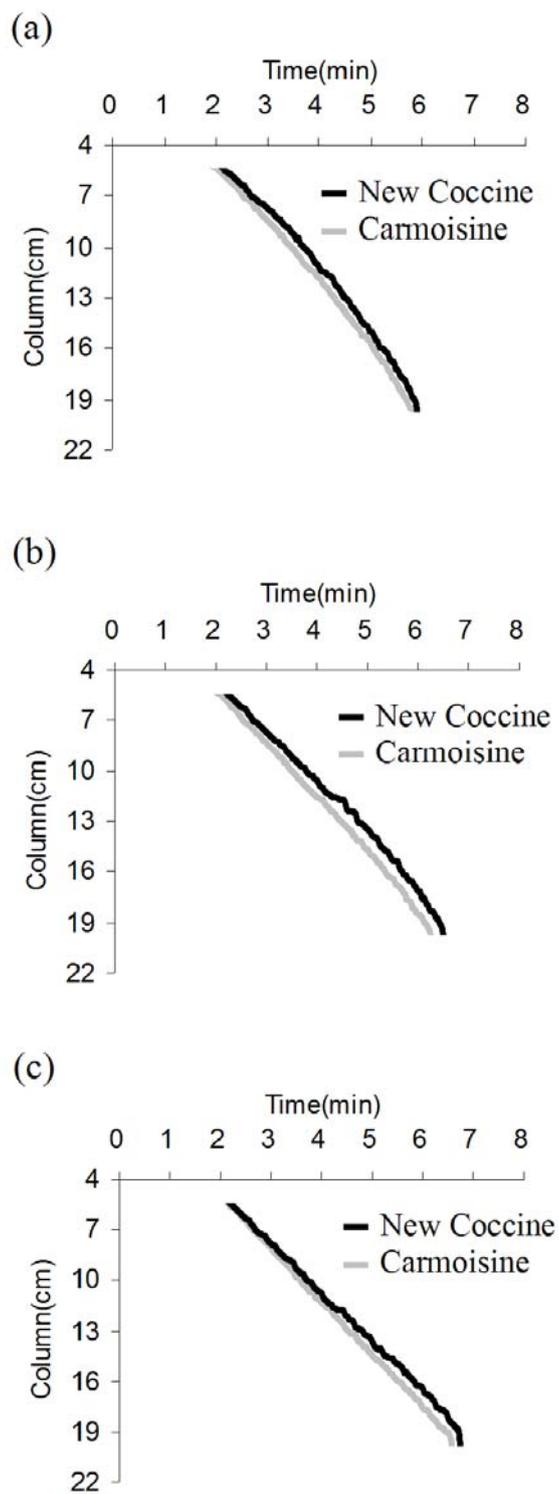


圖 5-5 初始動相 100% B_{50:50} 以流速 0.5 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*)進樣後(a)0(b)1(c)2 分鐘時，瞬間將動相轉換成 100% A_{50:50}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

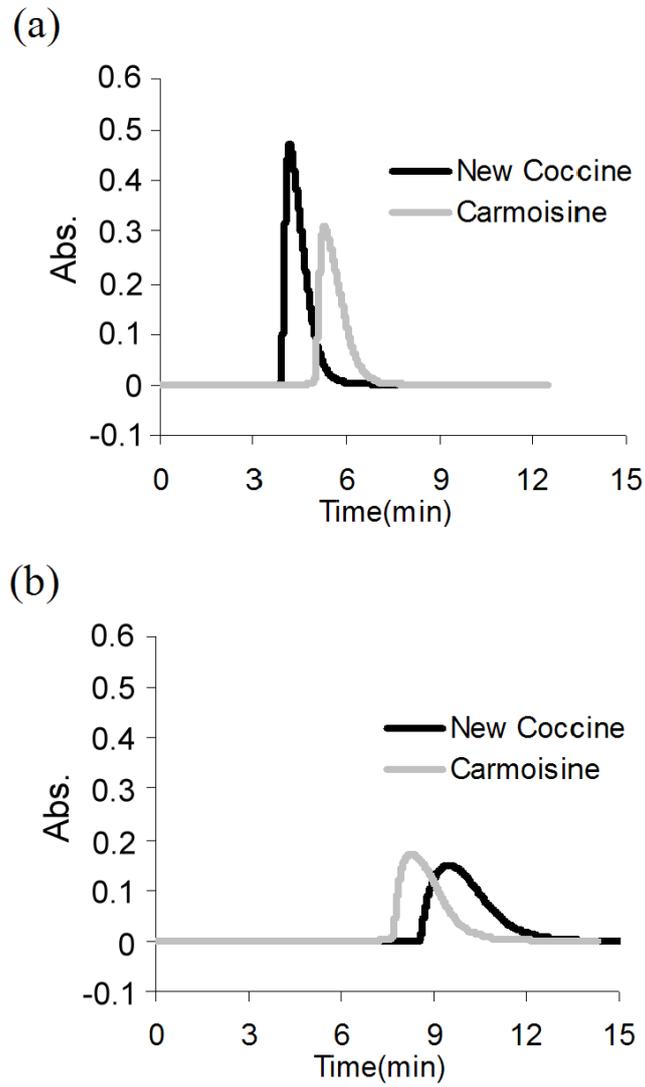


圖 5- 6 (a) 動相 $A_{45:55}$ 與(b) 動相 $B_{45:55}$ 以 1 mL min^{-1} 的流速對 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後所得之層析時圖

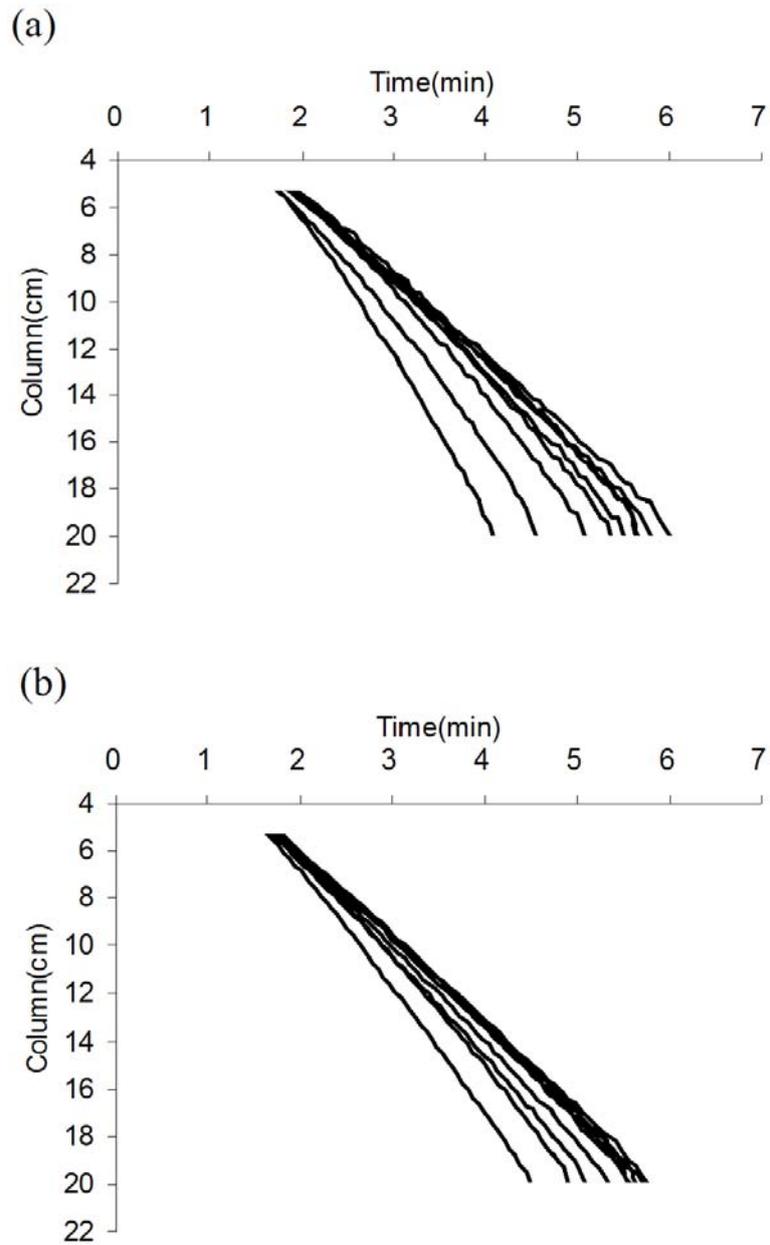


圖 5-7 化合物(a)*New Coccine* 與(b)*Carmoisine* 在沖堤流速 1 mL min^{-1} 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD 系統所得之樣品遷移路徑圖整理。圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 2、4、6、8、10、12、14、17、30 分鐘內，將動相由 100% $B_{45:55}$ 逐步轉換成 100% $A_{45:55}$ 之實驗條件所得結果

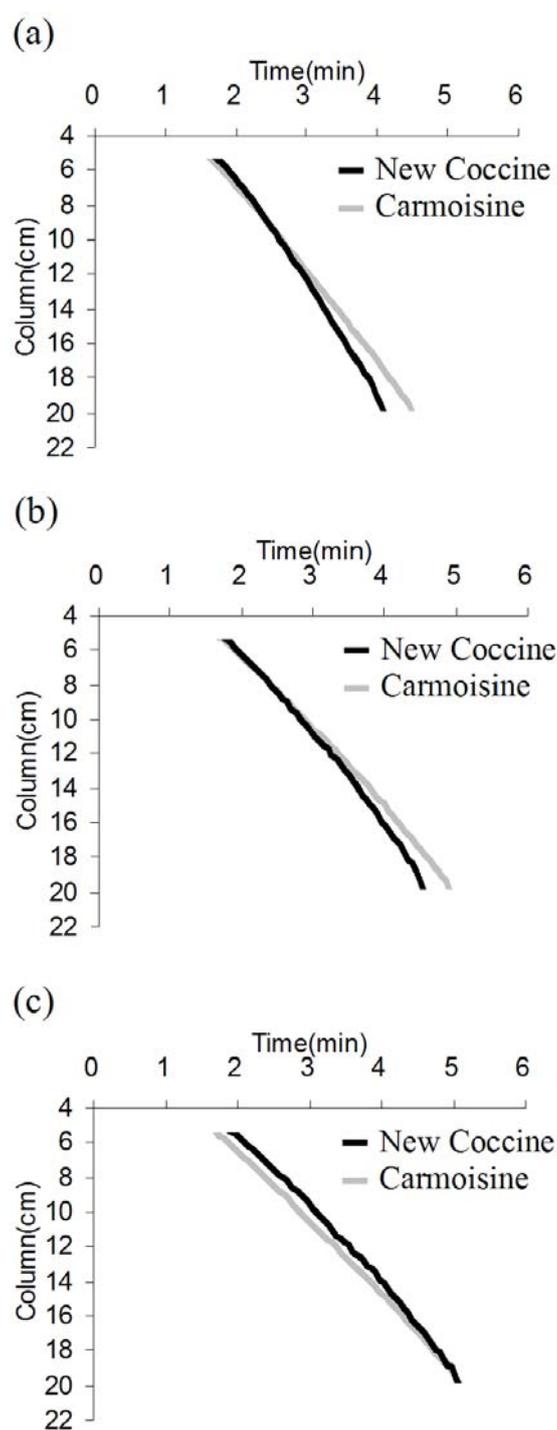


圖 5- 8 初始動相 100% B_{45:55} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*)進樣後(a)2(b)4(c)6 分鐘內，逐步將動相轉換成 100% A_{45:55}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

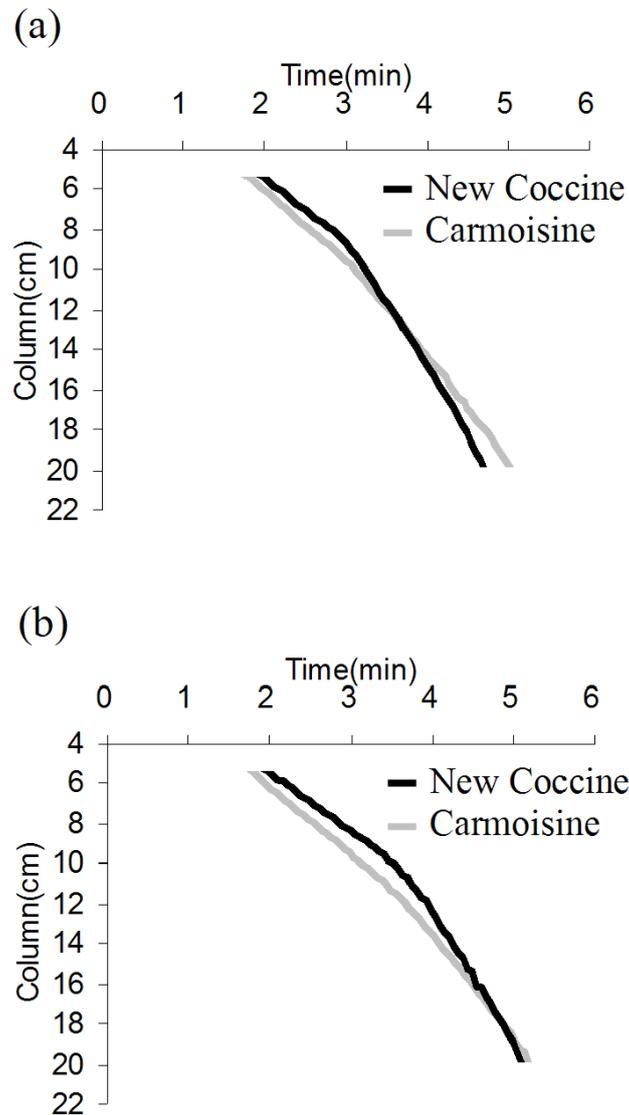


圖 5-9 初始動相 100% B_{45:55} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*)進樣後(a)2(b)2.5 分鐘時，瞬間將動相轉換成 100% A_{45:55}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

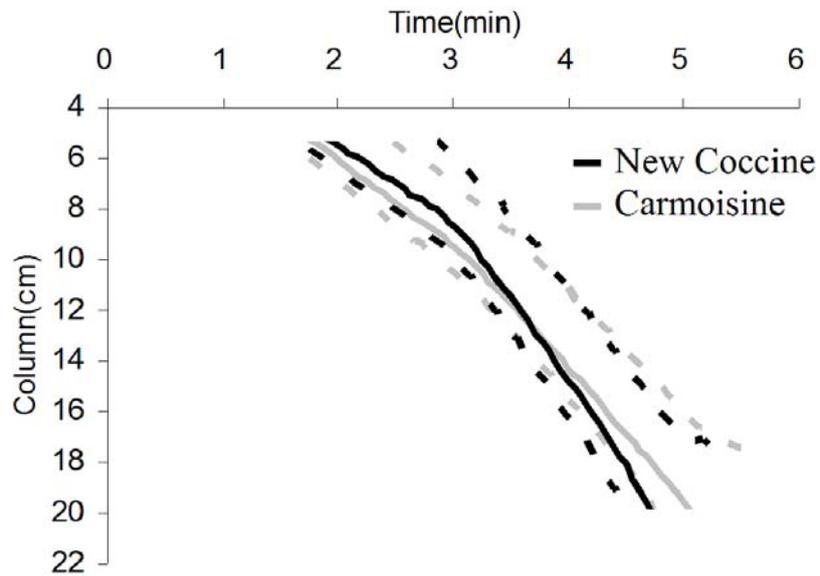


圖 5-10 兩化合物注入管柱後 2 分鐘時，瞬間將初始動相 $B_{45:55}$ 改變為 $A_{45:55}$ ，WCD 系統所得之樣品完整遷移路徑圖

實線所表現的是波峰頂點之位置與時間關係、虛線則表示波峰兩側十分之一高度處的位置與時間關係。

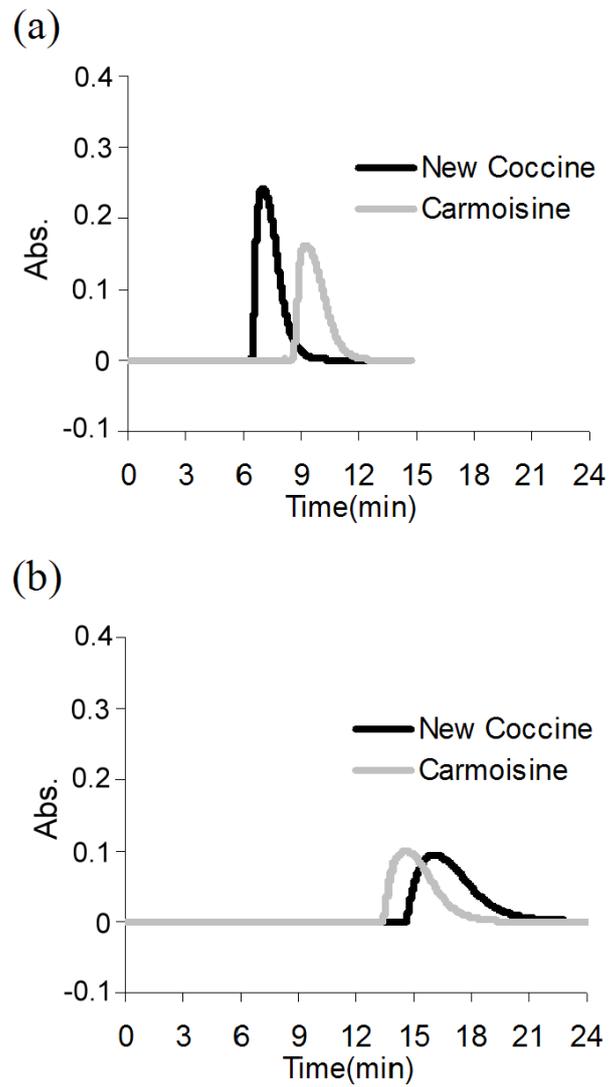


圖 5-11 (a) 動相 A_{40:60} 與 (b) 動相 B_{40:60} 以 1 mL min⁻¹ 的流速對 *New Coccine* 與 *Carmoisine* 進行線性沖提後所得之層析時圖

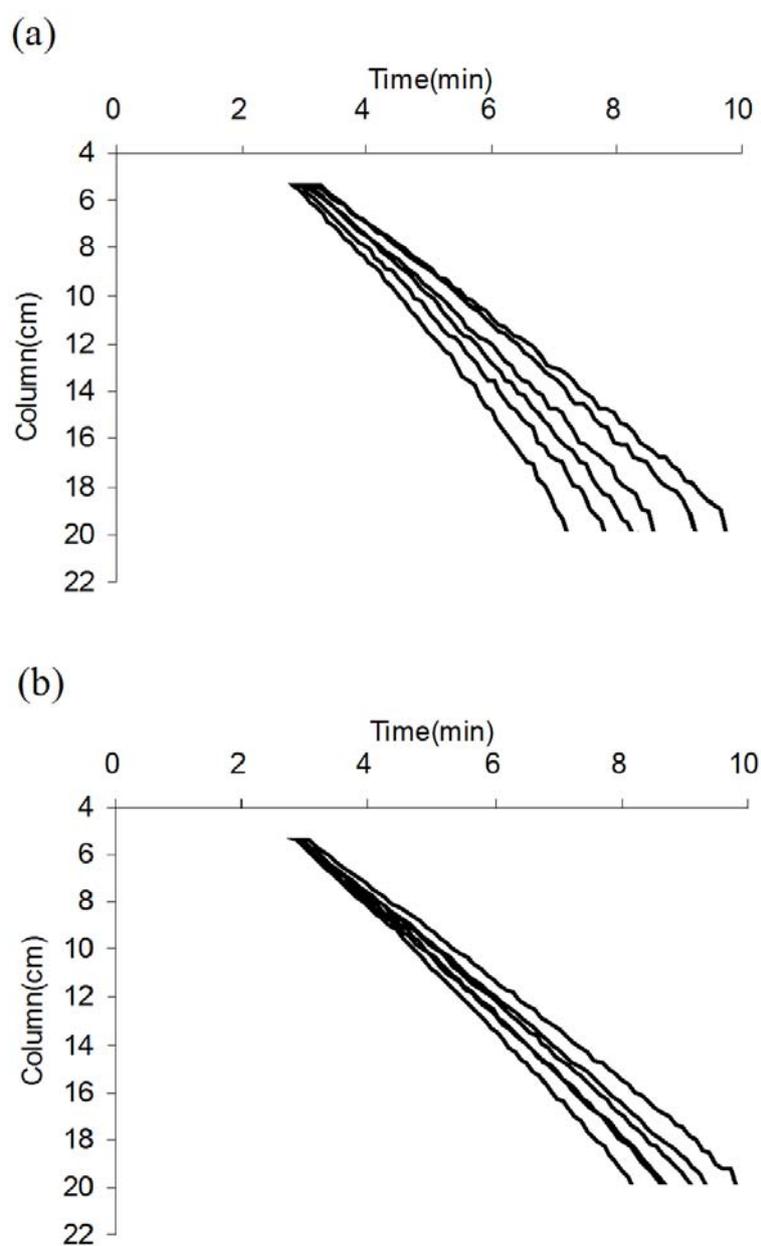


圖 5-12 化合物(a)*New Coccine*與(b)*Carmoisine*在沖堤流速 1 mL min^{-1} 的連續式梯度沖堤實驗中，WCD 系統所得之樣品遷移路徑圖整理。圖表內由左至右之曲線分別是樣品注入 6、8、10、14、20、30 分鐘內，將動相由 100% $B_{40:60}$ 逐步轉換成 100% $A_{40:60}$ 之實驗所得結果

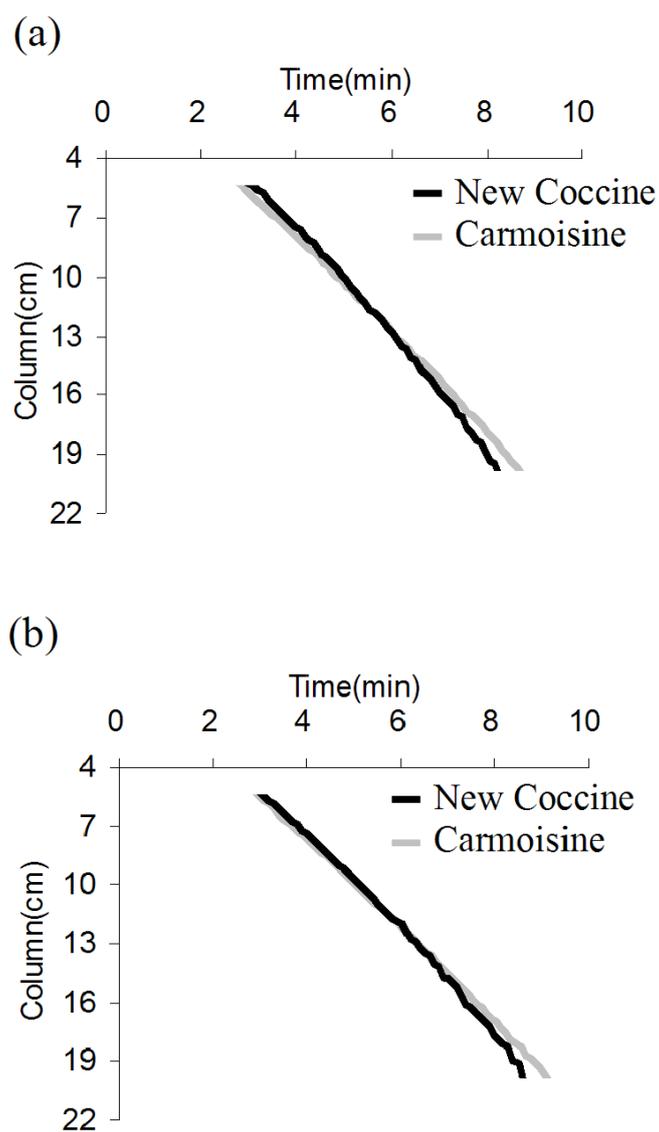


圖 5- 13 初始動相 100% B_{40:60} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*)進樣後(a)10(b)14 分鐘內，逐步將動相轉換成 100% A_{40:60}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

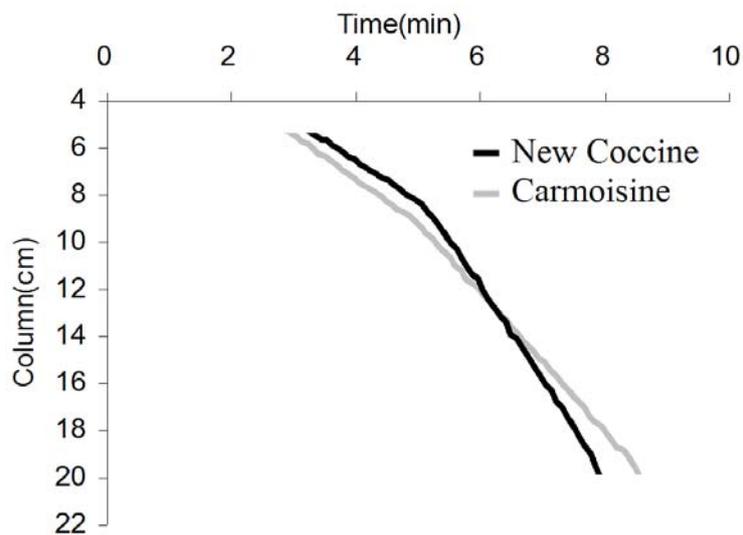
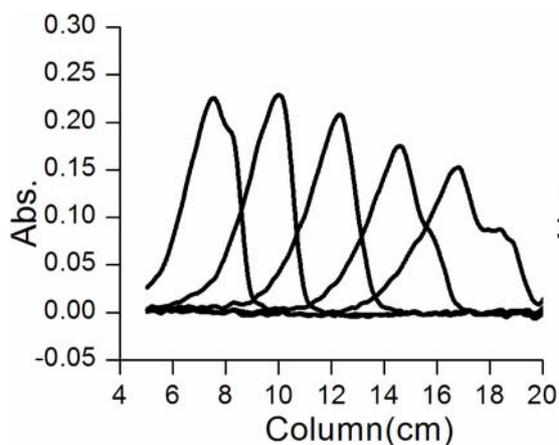
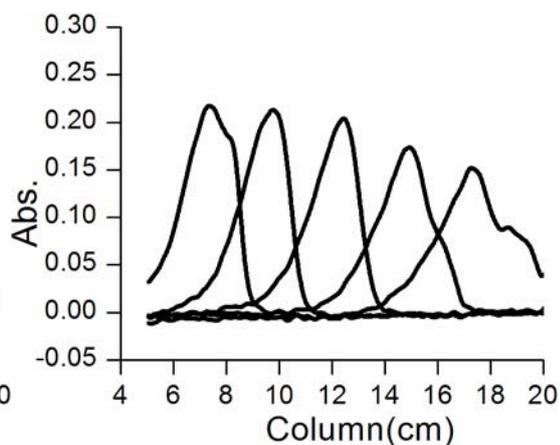


圖 5-14 初始動相 100% B_{40:60} 以流速 1 mL min⁻¹ 沖提管柱，進行管柱平衡，在樣品(*New Coccine* 與 *Carmoisine*) 進樣後 4 分鐘時，瞬間將動相轉換成 100% A_{40:60}，WCD 系統所得之分析物遷移路徑圖

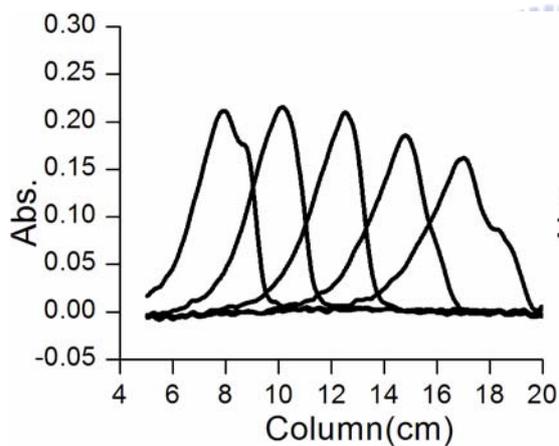
(a) 3.5 分鐘切換動相



(b) 3.75 分鐘切換動相



(c) 4 分鐘切換動相



(d) 5 分鐘切換動相

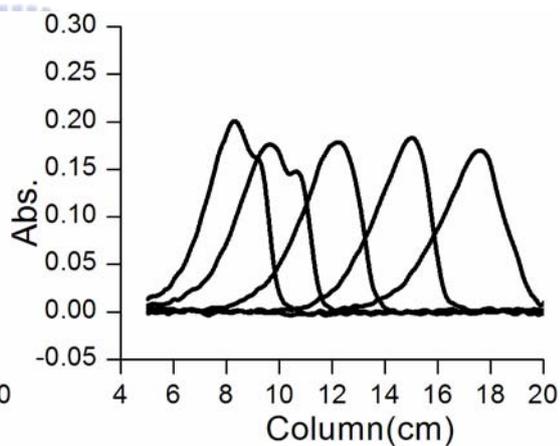


圖 5- 15 (a)-(d)分別為當混合樣品(*New Coccine* + *Carmoisine*) 注入管柱後 3.5、3.75、4、5 分鐘，瞬間將動相由 100% B_{40:60} 改變為 100% A_{40:60}，WCD 所得之樣品空間濃度分佈圖

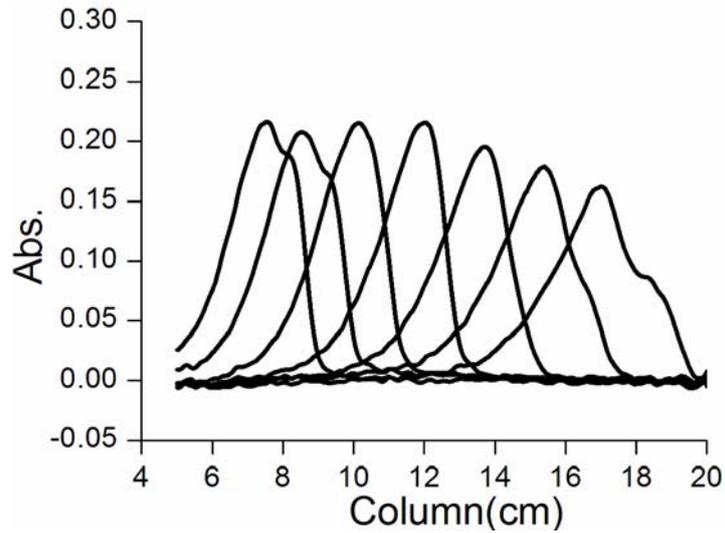


圖 5-16 觀察分析物滯留順序交錯現象之最佳條件下所獲得的管柱內樣品濃度空間分佈圖

最佳條件：*New Coccine* 與 *Carmoisine* 混合溶於去離子水中配製成濃度各 100 mg L^{-1} 的樣品溶液，初始動相 100% 的 $B_{40:60}$ 以流速 1 mL min^{-1} 的實驗條件進行管柱平衡，接著在樣品進樣後 4 分鐘時，瞬間將動相組成變為 100% 的 $A_{40:60}$ 。

第六章 結論

據 Pai 所發表的一系列文獻，讓我們注意到在層析理論中存在一些有爭議的說法，為了探討這些層析現象之緣由，本論文中使用全管柱分析的實驗數據來釐清此等層析觀念。在第三章裡，改變動相組成沖堤一樣品，使獲得 15 組滯留因子介於 0.54-7.27 的層析實驗結果，15 組實驗所得之管外層析時圖波峰寬度差異可達 4.6 倍，但樣品在管柱內空間分佈寬度卻幾乎相同，此結果讓我們清楚地了解，影響層析圖譜上波峰變寬的最主要原因是樣品釋放出管柱的速度，而非一般教科書上所提之樣品在管柱內產生區帶擴張等說法導致；在第四章裡，設計 3 組模式之階梯式梯度沖堤的非線性層析實驗，然後以管外層析時圖波峰指標參數結果來計算理論板數，接著再以 WCD 系統所獲得的管內空圖波峰指標參數結果來計算理論板數，兩者所得之計算結果差異相當大，此現象讓我們明白，在非線性層析系統中，傳統用來計算理論板數或者板高的公式不能拿來處理實驗數據；在第五章裡，藉著觀察非線性層析系統中樣品於管柱內的遷移情形，讓我們認知到梯度沖堤條件不僅能幫助縮短樣品滯留時間，亦可能由於動相組成改變而使樣品對靜相產生不同的滯留作用力，導致分析物產生滯留順序調換等非預期現象，並成功的觀察到 2 個分析物在管柱內由於受到不同溶劑強度之影響而使其產生的滯留順序交錯現象。藉由本研究室所設

計研發之 WCD 系統的應用，使我們更全面性地觀察樣品在層析管柱中的分離行為，進而修正一些容易被層析操作者所忽略的理論說法。

未來，本研究室將利用 WCD 系統來觀察更多存在於層析管柱中的分離行為；舉例說明，在章節 3.3.1 中所提，樣品進入填充有靜相的層析管柱後，由於受靜相滯留作用力相異，不同 k 值的樣品瞬間在空間上的分佈範圍 $\sigma_{(s_0)}$ 會與 $\frac{l}{k+1}$ 成正比，在管柱中繼續沖提時，這些物質之間的空間波峰寬度比例會改變，其改變之程度受擴張效應以及滯留效應等因素影響，然而這些因素，卻無法透過管柱外單通道偵測器做觀察，利用 WCD 系統來研究，應該可以了解這些現象會如何影響分離效率。總之，以全管柱偵測的方法，可以彌補傳統層析偵測器之不足，對於層析分離現象可以提供更入微的觀察。

參考文獻

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, 5th Ed, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College, Philadelphia, 1998.
- [2] L.S. Ettre, "High-Performance Liquid Chromatography", New York: Academic Press 1 (1980).
- [3] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, "A new form of chromatogram employing two liquid phases", Biochem. J. 35 (1941) 1358.
- [4] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography", Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271.
- [5] J.C. Giddings, "Nonequilibrium kinetics and chromatography", J. Chem. Phys. 31 (1959) 1462.
- [6] J.C. Giddings, "The random downstream migration of molecules in chromatography", J. Chem. Educ. 35 (1958) 588.
- [7] J.C. Giddings, Dynamics of Chromatography, Part I, New York: Marcel Dekker, 1965.
- [8] J.C. Giddings, "Physico- Chemical Basis of Chromatography", J. Chem. Educ. 44 (1967) 704.
- [9] R.P.W. Scott, Contemporary Liquid Chromatography, Chapter 2, New York: Wiley, 1976.
- [10] J.C. Giddings, Unified Separation Science, New York: Wiley, 1990.
- [11] S.C. Pai, "Evaluation of the temporal effect to the peak tailing in flow injection analysis", J. Chromatogr. A 950 (2002) 271.
- [12] S.C. Pai, "Parcel model for peak shapes in chromatography Numerical verification of the temporal distortion effect to peak", J. Chromatogr. A 988 (2003) 233.
- [13] S.H. Lin, K.C. Chang, Y.C. Chen, T. Yu, S.C. Pai, "Examination of the temporal effect in a flow injection analysis system using multi-channel absorbance detection", J. Chromatogr. A (2008) In Press.
- [14] 張凱傑, 以多通道偵測器觀察流動注入訊號之空時差異, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十五年.
- [15] 趙士宗, 以多通道偵測器觀察流動訊號在毛細管柱之時間效應, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十五年.

- [16] 陳鈺君, 流動訊號在微管路中時間效應之探討, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十六年.
- [17] C.E. Evans, V.L. McGuffin, "Dual on-column fluorescence detection scheme for characterization of chromatographic peaks", *Anal. Chem.* 60 (1988) 573.
- [18] K.L. Rowlen, K.A. Duell, J.P. Avery, J.W. Birks, "Whole column detection: application to high-performance liquid chromatography", *Anal. Chem.* 61 (1989) 2624.
- [19] K.L. Rowlen, K.A. Duell, J.P. Avery, J.W. Birks, "Measurement of column efficiency in whole column detection chromatography", *Anal. Chem.* 63 (1991) 575.
- [20] D.G. Gelderloos, K.L. Rowlen, J.W. Birks, J.P. Avery, C.G. Enke, "Whole column detection chromatography: computer simulations", *Anal. Chem.* 58 (1986) 900.
- [21] J. Wu, J. Pawliszyn, "Universal detection for capillary isoelectric focusing without mobilization using concentration gradient imaging system", *Anal. Chem.* 64 (1992) 224.
- [22] J. Wu, J. Pawliszyn, "Capillary isoelectric focusing with a universal concentration gradient imaging system using a charge-coupled photodiode array", *Anal. Chem.* 64 (1992) 2934.
- [23] J. Wu, J. Pawliszyn, "Dual Detection for Capillary Isoelectric Focusing with Refractive Index Gradient and Absorption Imaging Detectors", *Anal. Chem.* 66 (1994) 867.
- [24] J. Wu, J. Pawliszyn, "Diode laser-based concentration gradient imaging detector for capillary isoelectric focusing", *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 337.
- [25] J. Wu, J. Pawliszyn, "Absorption Spectra, Multicapillary Imaging Detection for Capillary Isoelectric Focusing Using a CCD Camera", *Analyst* (Cambridge, UK) 120 (1995) 1567.
- [26] X.Z. Wu, J. Wu, J. Pawliszyn, "Fluorescence imaging detection for capillary isoelectric focusing", *Electrophoresis* 16 (1995) 1474.
- [27] J. Wu, C. Tragas, A. Watson, J. Pawliszyn, "Anal. Chim. Acta 383 (1998) 67.
- [28] S. Nilsson, J. Johansson, M. Mecklenburg, S. Birnbaum, S. Svanberg, K.G. Wahlund, K. Moasbach, A. Miyabashi, P.O. Larsson, "Real-time fluorescence imaging of capillary

- electrophoresis: Separation of nucleic acids", *J. Capillary Electrophor* 2 (1995) 46.
- [29] J. Johansson, D.T. Witte, M. Larsson, S. Nilsson, "Real-Time Fluorescence Imaging of Isotachophoretic Preconcentration for Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 68 (1996) 2766.
- [30] Q. Mao, J. Pawliszyn, W. Thormann, "Dynamics of Capillary Isoelectric Focusing in the Absence of Fluid Flow: High-Resolution Computer Simulation and Experimental Validation with Whole Column Optical Imaging", *Anal. Chem.* 72 (2000) 5493.
- [31] A. Tamura, K. Tamura, S. Razei, T. Masujima, "Direct Imaging of the Stepwise Elution Process in High-Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 68 (1996) 4000.
- [32] A. Tamura, M. Khademizadeh, K. Ozawa, T. Masujima, "Direct observation of sample trapping process onto internal-surface reversed-phase pre-column", *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 115.
- [33] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, "Visualization of solute migration in liquid chromatography columns ", *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 1.
- [34] B.S. Broyles, R.A. Shalliker, G. Guiochon, "Visualization of sample introduction in liquid chromatography columns. The effect of the frit diameter", *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 367.
- [35] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, "On-Column Visualization of Sample Migration in Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 72 (2000) 323.
- [36] 彥宏開發科技有限公司, 台北縣新莊市化成路 63 巷 71 號.
- [37] 建宏層析企業股份有限公司, 台北縣新店市安興路 7-1 號 6 樓.
- [38] S.H. Lin, T. Yu, A. Sheu, D.J. Yang, S.C. Pai, "Peak crossover in high-performance liquid chromatography elution monitored using whole-column detection", *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 128.
- [39] S.H. Lin(林淑慧), T. Yu*(余艇), S.C. Pai(白書禎), "Interpretation on Band-broadening in Chromatography with Spatial Peak Profiles Obtained Using Whole-column Detection", *The Journal of the Chinese Chemical Society* (2009) In Press.
- [40] 虹光精密工業股份有限公司, 新竹科學工業園區研新一路 20

號.

- [41] 裕群光電科技股份有限公司, 桃園縣龍潭鄉中豐路 618 號.
- [42] M. Tswett, "Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci, Biol. Sec. 14 (1903) 6.
- [43] M. Tswett, "On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis", Ber. Deut. Botan. Ges. 24 (1906) 316.
- [44] C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, "Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers", Anal. Chem. 39 (1967) 1422.
- [45] J.F.K. Huber, J.A.R.J. Hulsman, "A study of liquid chromatography in columns. The time of separation", Anal. Chim. Acta 38 (1967) 305.
- [46] J.J. Kirkland, "High-speed liquid chromatography with controlled surface porosity supports", J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 7.
- [47] J.F.K. Huber, "private communication", (December 1971).
- [48] B.L. Karger, H. Barth, "Influence of Column Material on Efficiency in High Speed Liquid Chromatography ", Anal. Letters 4 (1971) 595.
- [49] J.J. Kirkland, "Techniques for high-performance liquid-liquid and ion exchange chromatography with controlled surface porosity column packings", J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 361.
- [50] R.P.W. Scott, Liquid Chromatography Detectors, J. Chromatogr. Library Series, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- [51] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques, Kluwer Academic, Dordrecht, 1991.
- [52] K. Robards, P.R. Haddad, P.E. Jackson, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Academic Press, London, 1994.
- [53] A. Tamura, M. Khademizadeh, K. Tamura, T. Masujima, "Direct observation of the separation process by the chromato-videoscope", J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1477.
- [54] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, 6th Ed, Principles of Instrumental Analysis, Thomson, 2006.

- [55] 賴俊傑, 以因次化郵包模型模擬層析管分離作用之研究, 國立台灣大學, 海洋研究所碩士論文, 民國九十三年.
- [56] S.C. Pai, L.Y. Chiao, "Temporal shifting: A hidden key to the skewed peak puzzle", *Journal of Chromatography A* 1139 (2007) 104.
- [57] S.C. Pai, Y.H. Lai, L.-Y. Chiao, T. Yu, "Dispersion-convolution model for simulating peaks in a flow injection system", *Journal of Chromatography A* 1139 (2007) 109.
- [58] T. Iida, H. Matsunaga, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, K. Imai, "Complete Enantiomeric Separation of Phenylthiocarbamoylated Amino Acids on a Tandem Column of Reversed and Chiral Stationary Phases", *Anal. Chem.* 69 (1997) 4463.
- [59] L.D. Payne, V.R. Mayo, L.A. Morneweck, M.B. Hicks, T.A. Wehner, "HPLC-Fluorescence Method for the Determination of Eprinomectin Marker Residue in Edible Bovine Tissue", *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3501.
- [60] J.K. Lin, C.L. Lin, Y.C. Liang, S.Y. Lin-Shiau, I. Juan, "Survey of Catechins, Gallic Acid, and Methylxanthines in Green, Oolong, Pu-erh, and Black Teas", *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3635.
- [61] J.W. Dolan, J.R. Gant, L.R. Snyder, "Gradient elution in high-performance liquid chromatography. II. Practical application to reversed-phase systems", *J. Chromatogr.* 165 (1979) 31.
- [62] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, "Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversed-phase systems", *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
- [63] L.R. Snyder, J.W. Dolan, "The linear-solvent-strength model of gradient elution", *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
- [64] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder, "Peak compression in reversed-phase gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 32.
- [65] C.G. Horvath, S.R. Lipsky, "Peak capacity in chromatography", *Anal. Chem.* 39 (1967) 1893.
- [66] U.D. Neue, "Theory of peak capacity in gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 153.
- [67] S. Yamamoto, "Plate height determination for gradient elution chromatography of proteins", *Biotechnol. Bioeng.* 48 (1995) 444.

- [68] T. Ishihara, T. Kadoya, N. Endo, S. Yamamoto, "Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data Reducing residual protein A by cation-exchange chromatography in monoclonal antibody purification ", *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 97.
- [69] S. Yamamoto, A. Kita, "Rational design calculation method for stepwise elution chromatography of proteins", *Food Bioprod. Process* 84 (2006) 72.
- [70] T. Ishihara, T. Kadoya, S. Yamamoto, "Application of a chromatography model with linear gradient elution experimental data to the rapid scale-up in ion-exchange process chromatography of proteins", *J. Chromatogr. A* 1162 (2007) 34.
- [71] E.L. Harry, D.J. Weston, A.W.T. Bristow, I.D. Wilson, C.S. Creaser, "An approach to enhancing coverage of the urinary metabonome using liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry", *J. Chromatogr. B* In Press, Corrected Proof (2008).
- [72] R.B. Shah, A. Bryant, J. Collier, M.J. Habib, M.A. Khan, "Stability indicating validated HPLC method for quantification of levothyroxine with eight degradation peaks in the presence of excipients", *International Journal of Pharmaceutics* In Press, Corrected Proof (2008).
- [73] Y.G. Li, H. Liu, Z.T. Wang, "A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 82.
- [74] B.M. Rao, M.K. Srinivasu, G. Sridhar, P.R. Kumar, K.B. Chandrasekhar, A. Islam, "A stability indicating LC method for zolmitriptan", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 503.
- [75] X. Yuan, H.L. Koh, W.K. Chui, "A high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of arctiin, chlorogenic acid and glycyrrhizin in a Chinese proprietary medicine", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 697.
- [76] M.R. Hakkinen, T.A. Keinanen, J. Vepsalainen, A.R. Khomutov, L. Alhonen, J. Janne, S. Auriola, "Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 625.

- [77] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, "High-throughput HPLC assay of acyclovir and its major impurity guanine using a monolithic column and a flow gradient approach", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1526.
- [78] G.F. Barbero, A. Liazid, M. Palma, C.G. Barroso, "Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column", *Food Chem.* 107 (2008) 1276.
- [79] C. Horvath, W.R. Melander, *Chromatography : fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. Part A-B. Fundamentals and techniques*, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [80] M.G. Kiseleva, V.V. Pimenova, K.I. Eller, "Optimization of Conditions for the HPLC Determination of Synthetic Dyes in Food", *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 685.
- [81] J.H. Knox, J.N. Done, A.F. Fell, M.T. Gilbert, A. Pryde, R.A. Wall, *High-performance liquid chromatography*, Edinburgh University Press, 1978.
- [82] C.S. Wu, *Practice on High Performance Liquid Chromatography*, Vercotech Inc., Hsin Tien, Taipei, Taiwan 2003.

