

國立交通大學
應用化學研究所
碩士論文

利用毛細管電泳線上濃縮技術
分析古柯鹼、大麻及其相關代謝物

Analysis of cocaine, tetrahydrocannabinol, and their
metabolites by on-line sample concentration techniques in
capillary electrophoresis

研究生：馮蘭英

指導教授：謝有容 博士

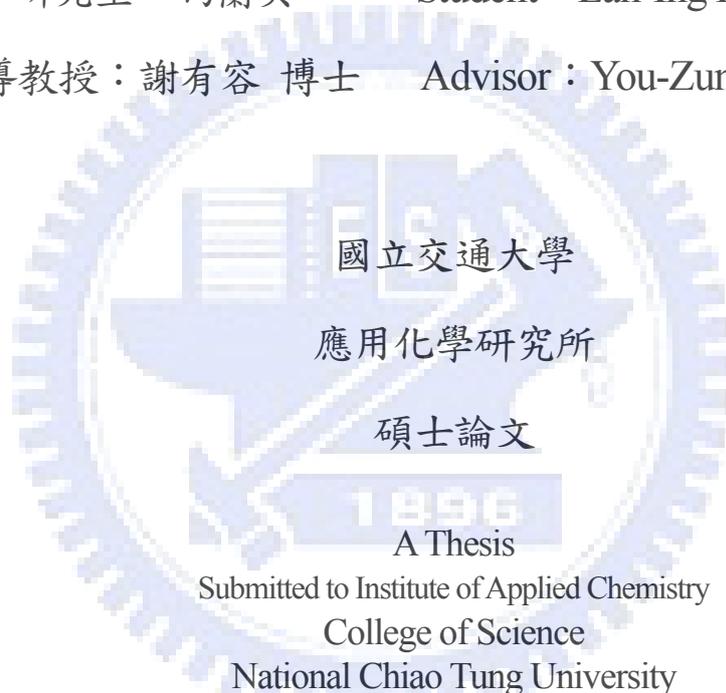
中華民國九十七年三月

利用毛細管電泳線上濃縮技術
分析古柯鹼、大麻及其相關代謝物

Analysis of cocaine, tetrahydrocannabinol, and their
metabolites by on-line sample concentration techniques in
capillary electrophoresis

研究生：馮蘭英 Student：Lan-Ing Feng

指導教授：謝有容 博士 Advisor：You-Zung Hsieh



碩士論文
Submitted to Institute of Applied Chemistry
College of Science
National Chiao Tung University
In Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
In
Applied Chemistry
February 2007
HsinChu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年三月

利用毛細管電泳線上濃縮技術 分析古柯鹼、大麻及其相關代謝物

研究生：馮蘭英 指導教授：謝有容

國立交通大學應用化學系碩士班

摘 要

古柯鹼與大麻類藥物近幾年被濫用的事件層出不窮，因此我們需要一種簡單又方便的方法來分析古柯鹼、大麻與其相關代謝物。毛細管電泳是近年來受重視的分離技術，但受限於毛細管的光徑短，利用紫外光吸收光譜法的偵測，無法有效地降低偵測極限，而毛細管電泳線上樣品濃縮法結合了毛細管電泳良好的分離效率與濃縮的技術，不必改變儀器設備，即可增加靈敏度與降低偵測極限。

在古柯鹼與其代謝物方面，利用陽離子選擇性全注入掃略式線上濃縮法來進行分析。這是一種結合了兩個濃縮步驟的技術，分別是場放大樣品注入和掃略式線上濃縮，應用於偵測正電性的分析物。最佳的分離條件為 100 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 1.8) 中加入異丙醇 10% (v/v) 和四氫呋喃 10% (v/v) 並添加 75 mM SDS 作為微胞背景溶液，而選用的高導電度緩衝溶液則為 150 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 1.8)。樣品溶液以 15 kV 電動注入 900 秒，之後施加 -20 kV 的分離電壓以維持好的分離效率和高靈敏度。在此最佳條件之下，古柯鹼及其代謝物的偵測極限可達到 ppt 的等級。以古柯鹼為例，陽離子選擇性全注入掃略式線上濃縮法的靈敏度較傳統 MEKC 提高

了約 30,000 倍。經過固相萃取去除基質干擾後，此濃縮方法便可成功地應用於尿液樣品中古柯鹼及其代謝物的定量與定性。

在大麻及其代謝物方面，利用掃掠式線上濃縮法進行分析，其最佳分離條件：緩衝溶液為 25 mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液 (pH 2.6) 添加 75 mM SDS 和甲醇 40 % (v/v)，樣品以 0.5 psi 注入 300 秒，施加 -20 kV 之負向電壓進行分離。在此條件下大麻及其代謝物之偵測極限在 3.87~15.2 ppb 之間，放大倍率在 77 倍到 199 倍之間，線性相關係數 (r^2) 在 0.9977 到 0.9989 之間，表示線性關係良好，遷移時間之相對標準差 (RSD) 小於 0.39 %。經過固相萃取去除基質干擾後，也可成功地應用在尿液樣品上。



Analysis of cocaine, tetrahydrocannabinol, and their metabolites by on-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis

Student : Lan-Ing Feng Advisor : You-Zung Hsieh*

Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University

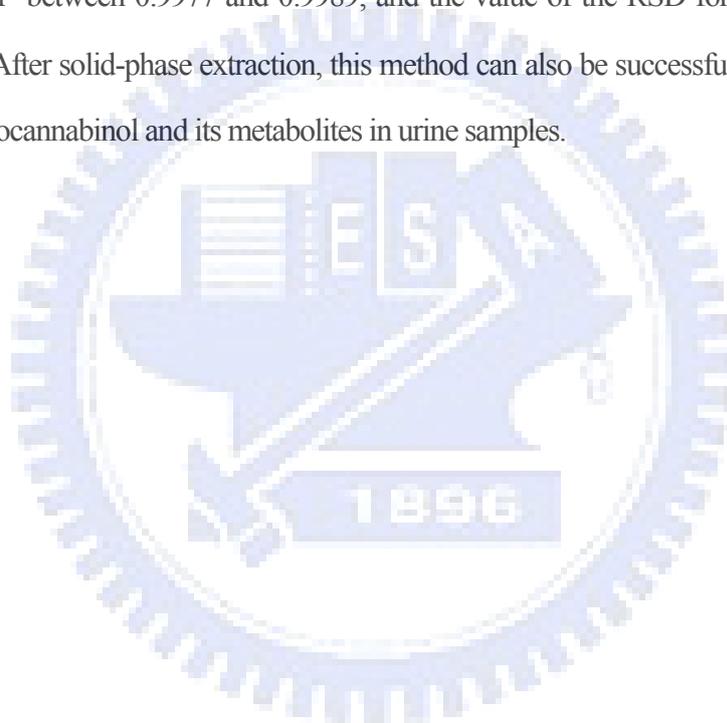
Abstract

Cocaine and tetrahydrocannabinol are usually used abuse drugs recently, so we have developed a simple and convenient method to determine of cocaine, tetrahydrocannabinol, and their metabolites. Capillary electrophoresis is an important separation technique in these years. However, the limit of detection with UV detector is poor owing to the short optical path-length. Using the good separation efficiency of capillary electrophoresis and on-line sample concentration technique, it can provide higher sensitivity and improve the detection limit without changing any instruments.

In case of cocaine and its metabolites, we have used CSEI-sweeping-MEKC technique. The procedure combines two on-line concentration techniques, namely, sample stacking with electrophoresis injection (field-enhanced sample injection, FESI) and sweeping, afforded the detection of positively chargeable analytes. The optimal condition was determined on 100 mM phosphoric acid buffer containing 10 % IPA and 10 % THF with 75 mM SDS and 150 mM phosphoric acid as the high conductivity buffer; electrokinetic injection 15 kV, 900 s; -20 kV separation voltage, which was remained good separation efficiency and sweeping sensitivity enhanced. The detection limits of cocaine and its metabolites were down to ppt level. Comparing MEKC method, the result of CSEI-sweeping-MEKC investigated could increase sensitivity about 30,000-fold for cocaine. After solid-phase extraction, this method can be

successfully applied to quantitative and qualitative analysis of cocaine and its metabolites in urine samples.

In the case of tetrahydrocannabinol and its metabolites, we have used sweeping-MEKC technique. The optimal condition for separation were achieved at pH 2.6 using a 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer, 75 mM SDS, 40 % (v/v) methanol, a 300 s hydrodynamic injection time and -20 kV separation voltage. Using sweeping-MEKC, the detection limits that we obtained were in the range of 3.87~15.2 ppb, and the sweeping efficiency were between 77- and 199-fold. The calibration curves showed a linear relationship with the r^2 between 0.9977 and 0.9989, and the value of the RSD for migration time was < 0.39 %. After solid-phase extraction, this method can also be successfully applied to analysis of tetrahydrocannabinol and its metabolites in urine samples.



謝誌

感謝老師 謝有容教授從大學到研究所這麼多年以來，對於學生在生活及研究上的關心及幫助，使得我能夠順利地完成此碩士論文，進入人生另一個里程碑，在此對老師的諄諄教誨致上最誠摯的謝意。也非常感謝口試委員 陳月枝教授及何佳安教授，在百忙中能夠抽空悉心指導，並給予學生許多寶貴的意見及建議，除了使學生受益良多外，也使本篇論文在內容上得以更加完善，在此衷心感謝。

在碩士求學過程中，感謝實驗室所有夥伴，特別是秀麗學姐在我實驗遇到瓶頸時，給予許多協助，使我能更確定研究方向；感謝冠文學長時常提供我各類資訊。亦感謝同學葉蓁、敏慈及志倫在我沮喪時幫我加油打氣，還有學妹佩潔、豔如、雪怡和婉君總為實驗室帶來了許多的歡笑；珮玲、英子和 kitty 等好朋友，總是在我最低潮脆弱的時候給我鼓勵和幫助，因為有你們的相伴使我的研究生生活過得多采多姿。

最後感謝的是奶奶、父母與弟弟，因為有他們在我的背後默默支持，使我能專心地進行我的研究而無後顧之憂。因為有你們的協助與愛護，使我能夠堅持下去並完成這本論文，謹以此短文表達我心中無限的感謝，願與你們一起分享這份畢業的喜悅與榮耀。

感謝國家科學委員會的計畫 NSC 95-2113-M-009-033-MY3 經費資助。

目錄

頁次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VI
表目錄.....	IX
圖目錄.....	X
一、毛細管電泳.....	1
1.1 毛細管電泳的發展歷史.....	1
1.2 毛細管電泳的分離原理.....	2
二、線上濃縮技術簡介.....	8
2.1 線上堆積.....	9
2.1.1 電場放大樣品堆積.....	10
2.1.2 大體積樣品堆積.....	10
2.1.3 酸鹼值調整修飾堆積.....	11
2.2 掃掠式線上濃縮.....	12
2.2.1 陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮.....	12
2.2.2 陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮.....	13
2.2.3 中性界面活性劑掃掠式線上濃縮.....	14
2.2.4 掃掠式線上濃縮法之濃縮公式.....	14
2.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮.....	16
2.4 複合型掃掠式線上濃縮.....	17
2.4.1 陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮.....	17
2.4.2 陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮.....	18
2.4.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合結合掃掠式線上濃縮.....	19
2.4.4 大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮.....	20
三、中樞神經興奮劑—古柯鹼.....	35
3.1 古柯鹼之性狀與藥理作用.....	35

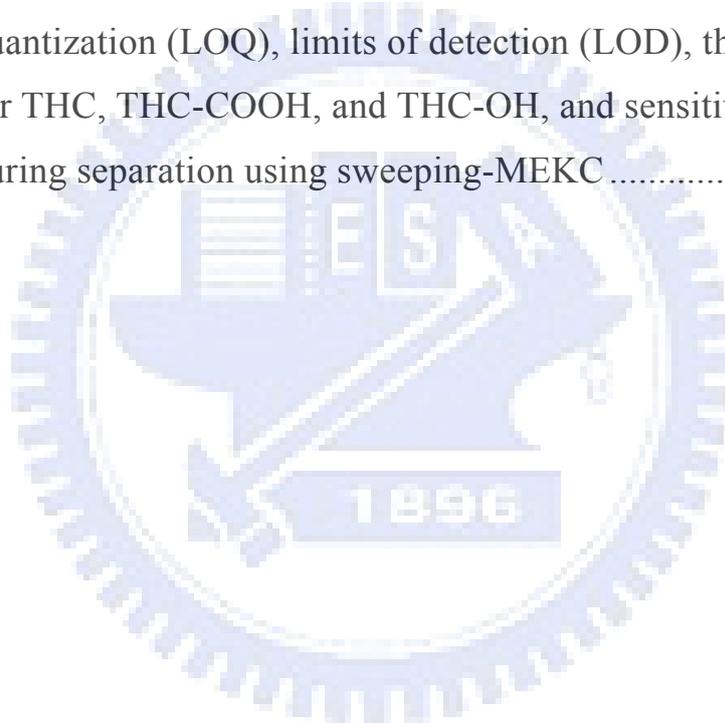
3.2 古柯鹼在體內的吸收與代謝	36
3.3 古柯鹼之相關檢測技術	36
四、利用陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法分析古柯鹼 及其代謝物	38
4.1 線上濃縮方法	38
4.2 儀器裝置	38
4.3 藥品與試藥	39
4.4 固相萃取	39
4.5 實驗方法	40
4.5.1 實驗前、後毛細管的處理	40
4.5.2 標準溶液之配製	40
4.5.3 不同濃縮分離條件的測試	41
4.5.3.1 溶液 pH 值之影響	41
4.5.3.2 不同比例的有機修飾劑之影響	41
4.5.3.3 分離用緩衝溶液含不同濃度 SDS 之影響	41
4.5.3.4 高導電度緩衝液注入長度	42
4.5.3.5 樣品注入時間	42
4.5.3.6 再現性分析及定量校正曲線	42
4.5.3.7 尿液樣品之固相萃取步驟	43
4.5.3.8 固相萃取之回收率	43
4.6 結果與討論	44
4.6.1 溶液 pH 值之影響	44
4.6.2 不同比例的有機修飾劑之影響	44
4.6.3 分離用緩衝溶液含不同濃度 SDS 之影響	45
4.6.4 高導電度緩衝液注入長度	45
4.6.5 樣品注入時間	46
4.6.6 樣品濃縮效果與放大倍率	46
4.6.7 再現性分析及定量校正曲線	47
4.6.8 尿液樣品偵測與回收率之計算	48

4.7 結論.....	49
五、大麻類藥物.....	59
5.1 大麻之性狀與藥理作用.....	59
5.2 大麻在體內的吸收與代謝.....	59
5.3 大麻之相關檢測技術.....	60
六、利用掃掠式線上濃縮法分析大麻及其代謝物.....	62
6.1 線上濃縮方法.....	62
6.2 儀器裝置.....	62
6.3 藥品與試劑.....	63
6.4 實驗方法.....	64
6.4.1 實驗前、後毛細管的處理.....	64
6.4.2 標準溶液之配製.....	64
6.4.3 不同濃縮分離條件的測試.....	64
6.4.3.1 緩衝溶液中甲醇含量之影響.....	64
6.4.3.2 緩衝溶液 SDS 濃度之影響.....	65
6.4.3.3 緩衝溶液pH值之影響.....	65
6.4.3.4 樣品注入時間之影響.....	65
6.4.3.5 樣品濃縮效果與再現性分析.....	66
6.4.3.6 尿液樣品之固相萃取步驟.....	66
6.5 結果與討論.....	68
6.5.1 緩衝溶液中甲醇含量之影響.....	68
6.5.2 緩衝溶液 SDS 濃度之影響.....	68
6.5.3 緩衝溶液pH值之影響.....	69
6.5.4 樣品注入時間之影響.....	69
6.5.5 樣品濃縮效果與再現性分析.....	70
6.5.6 尿液樣品之固相萃取與回收率之計算.....	70
6.6 結論.....	72
七、結論.....	81
八、參考資料.....	83

表目錄

頁次

Table 4.1 Stacking efficiency in term of peak height	57
Table 4.2 Regression equation, Coefficient of variation (r^2), limits of quantization (LOQ), limits of detection (LOD), and values of RSD for cocaine, benzoylecgonine, norcocaine, and cocaethylene during separation using sweeping-MEKC and CSEI-sweeping-MEKC technique.....	58
Table 6.1 Regression equation, Coefficient of variation (r^2), limits of quantization (LOQ), limits of detection (LOD), the values of RSD for THC, THC-COOH, and THC-OH, and sensitivity enhancement during separation using sweeping-MEKC	80



圖目錄

頁次

Figure 1.1 Schematic diagram of a capillary electrophoresis system.....	5
Figure 1.2 Development of the electroosmotic flow	6
Figure 1.3 Electrophoretic mobility of analytes and electroosmotic flow	7
Figure 2.1 Schematic diagrams of the FASS model	22
Figure 2.2 Schematic diagrams of the LVSS model.....	23
Figure 2.3 Schematic diagrams of the pH-mediate stacking model.....	24
Figure 2.4 Schematic diagrams of sweeping with anionic micelles model....	25
Figure 2.5 Schematic diagrams of sweeping with cationic micelles model ..	26
Figure 2.6 Sweeping of a charged analyte in electrokinetic chromatography with a neutral pseudostationary phase	27
Figure 2.7 Evolution of micelles and neutral analyte molecules during sweeping in the presence of high EOF	28
Figure 2.8 Schematic diagrams of a dynamic pH junction model.....	29
Figure 2.9 Schematic diagrams of a reversed dynamic pH junction model ..	30
Figure 2.10 Evolution of analyte zones in CSEI-sweep-MEKC	31
Figure 2.11 Schematic illustration of the ASEI-sweep-MEKC model	32
Figure 2.12 Schematic diagrams of dynamic pH junction-sweeping model .	33
Figure 2.13 The choice of on-line concentration techniques	34
Figure 3.1 The general metabolic pathways of cocaine.....	37
Figure 4.1 The structures of cocaine and its metabolites.....	50
Figure 4.2 Effect of the percentage of THF on CSEI-sweeping-MEKC	51
Figure 4.3 Effect of the concentration of SDS in separation buffer	52
Figure 4.4 Effect of hydrodynamic injection length of high conductivity buffer.....	53
Figure 4.5 Effect of electrokinetic injection time.....	54
Figure 4.6 A comparison between CSEI-sweeping-MEKC, sweeping-MEKC and normal MEKC.....	55

Figure 4.7 CSEI-sweeping-MEKC eletropherogram of extraction urine	56
Figure 5.1 The general metabolic pathways of THC	61
Figure 6.1 The structures of THC and its metabolites	73
Figure 6.2 Effect of proportion of methanol in running buffer	74
Figure 6.3 Effect of the concentration of SDS in running buffer	75
Figure 6.4 Effect of the pH of running buffer.....	76
Figure 6.5 Effect of the injection time.....	77
Figure 6.6 A comparison between sweeping-MEKC and normal MEKC	78
Figure 6.7 Sweeping-MEKC eletropherogram of extraction urine.....	79



一、毛細管電泳

1.1 毛細管電泳的發展歷史

近年來，毛細管電泳在針對快速、有效率地分離微量樣品中已經是主要的選擇，其分離原理是利用外加高電壓，分析物在緩衝溶液中會解離成帶不同電性的型式，並藉由不同電性在電場中受吸引或排斥的力量產生不同的遷移速率，進而達成分離的效果。1937年，Tiselius 率先將電泳發展成一種分離技術，並且成功地利用電泳技術分離人體血清中的球蛋白，因為這項研究使得 Tiselius 在 1948 年獲得諾貝爾化學獎，但 Tiselius 是在自由溶液中進行電泳，分離效率受熱擴散和對流問題的影響，造成譜帶變寬效應[1]。後期的電泳通常在流動性較差的凝膠介質上進行，可降低熱對流，但製備困難且散熱差是平板凝膠電泳的缺點。因此到了 1967 年，Hjertén 提出以直徑 3 mm 的開管毛細管管柱，在高電場之下進行毛細管區帶電泳 (CZE)，成功分離了無機離子、蛋白質和核酸[2]。到 1981 年時，Jorgenson 與 Lukacs 以 75 μ m 內徑的毛細管進行一系列胺基酸的分離，Jorgenson 還闡明了毛細管電泳相關的理論，解釋了操作參數與分離效率之間的關係，進一步開啟了毛細管電泳的應用[3]。到了 1984 年，Terabe 提出微胞電動層析法 (MEKC)，在緩衝溶液中加入界面活性劑，可用來分離中性物質，而不再侷限於帶電分析物，大大地提昇毛細管電泳的應用範圍[4]。

毛細管電泳因為內徑小，管壁內表面積對體積的比值高，使得散熱快，可降低高電場引起的焦耳熱效應，改善了傳統電泳在高電壓分離時，因焦耳熱效應而無法獲得好的分離效果的缺點，除此之外，毛細管電泳還具備分離效率高、分析速度快、所需樣品量少及溶劑消耗量少的優點，使得毛細管電泳迅速成為極有潛力的分離技術。

1.2 毛細管電泳的分離原理

毛細管電泳儀的簡單裝置圖如 Figure 1.1，主要有高電壓供應器（一般輸出的最高電壓為 30 kV）、白金電極、毛細管（常用內徑為 50 μm 和 75 μm ）、偵測器和訊號處理器等部份。毛細管電泳分離的原理主要是根據分析物在適當的條件下會形成帶電荷的物質，當施加電壓時，帶電荷的物質受電場作用的影響，會以不同速度向相反電荷方向移動，依照分析物本身之遷移速度的快慢而形成分離。分析物在電泳中的移動速度通常以公式 (1-1) 表示。

$$v = \mu_e E = \mu_e \frac{V}{L} \quad (1-1)$$

v ：分析物移動速度 (migration velocity)

μ_e ：分析物之移動率 (electrophoretic mobility)

E ：電場強度 (field strength)

V ：外加電壓 (applied potential)

L ：毛細管全長 (length of capillary)

雖然帶電荷物質才會受到電場影響產生移動，但事實上在毛細管電泳中的中性物質也會移動，其移動速度僅次於陽離子，而快於陰離子。這是因為緩衝溶液在分離管柱內受高電壓作用會產生流動現象，此現象稱為電滲流 (electroosmotic flow)。電滲流的產生如 Figure 1.2，毛細管管柱為 fused silica 材質，當毛細管管柱內填充 pH 值大於 2 的緩衝溶液時，內部管壁表面的 SiOH 會開始解離成帶負電荷的 SiO⁻，此時緩衝溶液中的陽離子因為受管壁上之負電荷吸引而在管壁表面形成電雙層，在外加電場作用下，電雙層中擴散層的水合陽離子會帶著管柱內的溶液由正極往負極移動，形成電滲流[5]。電滲流的特色為「平板流(plate flow)」

式的移動，因為電場造成的驅動力是成平板狀，不同於一般壓力驅動所形成的「拋物線流 (parabola flow)」，所以分析物在進行電泳分離時，樣品於毛細管中的分布區帶更為集中，使得分離效率提高。電滲流的移動速度與電場強度及電滲流的移動率 (mobility of electroosmotic flow, μ_{eo}) 有關，以公式 (1-2) 表示。

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \xi E \quad (1-2)$$

v_{eo} ：電滲流移動速度

μ_{eo} ：電滲流之移動率

ε ：緩衝溶液的介電常數

η ：緩衝溶液的黏度

ξ ：則塔電位 (zeta potential)

由公式 (1-2) 可知，電滲流移動率與毛細管中所使用的緩衝溶液性質息息相關，包括緩衝溶液的介電常數與黏度，另外，緩衝溶液的 pH 值及濃度也會影響管壁內的則塔電位，進而影響電滲流的速度。

一般而言，電滲流的速度往往大於分析物本身的移動速度，所以會帶動緩衝溶液中所有的分析物往同一方向移動（即由正極往負極移動），因此位在負極端的偵測器便可以在一次的分析中，同時偵測帶正電、中性和帶負電的分析物。在毛細管中，正離子由於電荷吸引與電滲流同方向，所以向負極的移動速度最快，最先通過偵測器；中性物質的移動速度與電滲流的移動速度相同；負離子因電荷吸引與電滲流反方向，故向負極移動的速度最慢，最晚被偵測到。分析物之有效移動速度的關係圖如 Figure 1.3 所示，而分析物在電場中的有效移動速度則以公式 (1-3) 表示。

$$v_{eff} = (\mu_e + \mu_{eo})E = \mu_{eff}E = \mu_{eff} \frac{V}{L} \quad (1-3)$$

v_{eff} ：分析物之有效移動速度

μ_{eff} ：分析物之有效移動率

由公式 (1-3) 可以估算分析物停留在毛細管內的時間，如公式 (1-4) 所表示，當施加更高電壓及使用管長較短時，分析物移動速度會比較快，而停留在管柱內的時間就會比較短。

$$t = \frac{L}{v_{eff}} = (\mu_e + \mu_{eo}) \frac{L^2}{V} \quad (1-4)$$

t ：分析物之移動時間 (migration time of an analyte)

理論板數 (number of theoretical plates) 是反應物質在固定相和流動相中動力學特性的層析參數，理論板數越高，表示分離效率越好，可用分析物的遷移時間與波峰寬度來表示，如公式 (1-5)：

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad (1-5)$$

如果波峰寬度為半高寬，又可表示為公式 (1-6)

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1-6)$$

N ：理論板數 (number of theoretical plates)

w ：波峰寬度 (peak width)

$w_{1/2}$ ：半高寬 (half peak height)

由公式 (1-5) 和公式 (1-6) 可以看出越窄的波峰寬度與越長的遷移時間，理論板數越高，分離效率越好。

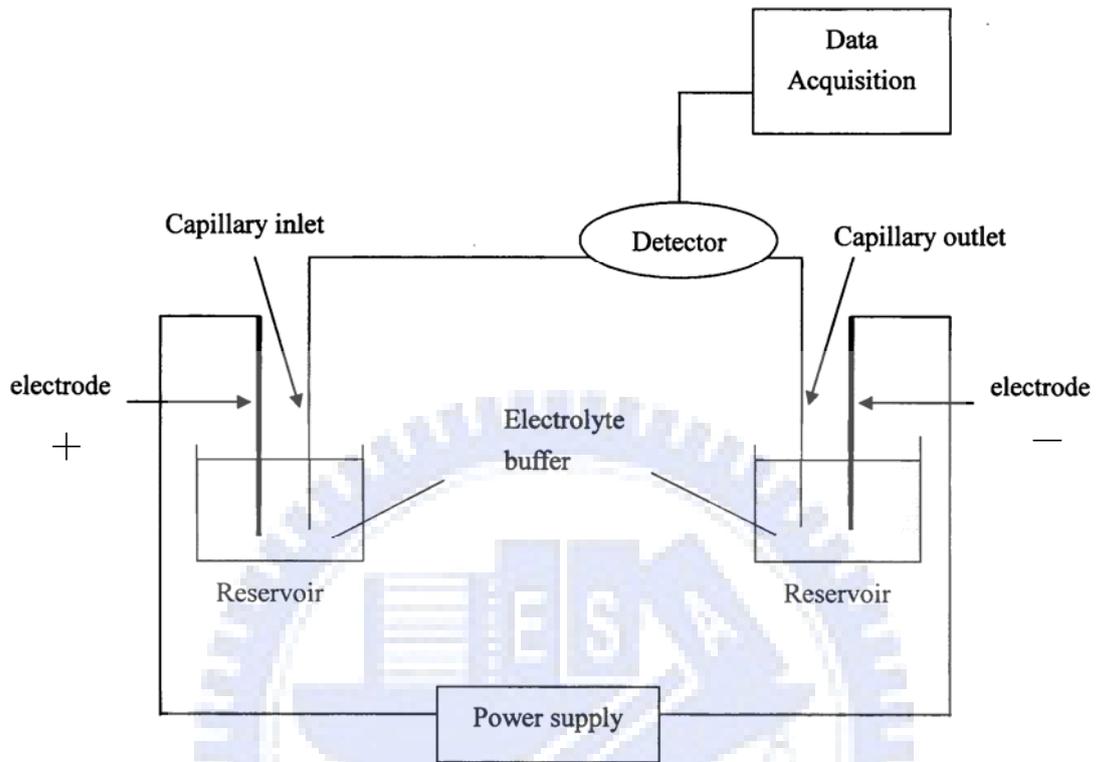


Figure 1.1 Schematic diagram of a capillary electrophoresis system.

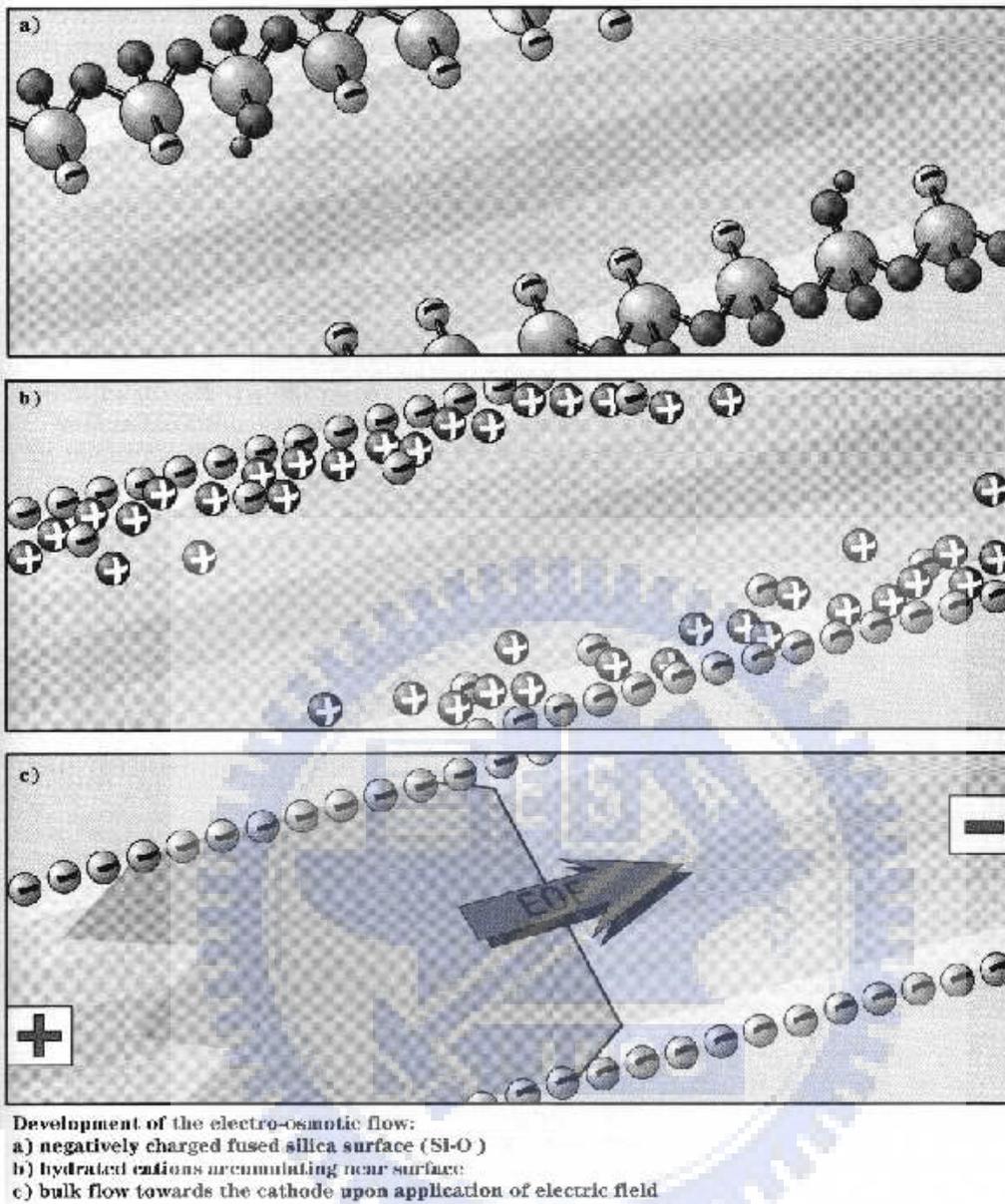


Figure 1.2 Development of the electroosmotic flow [5].

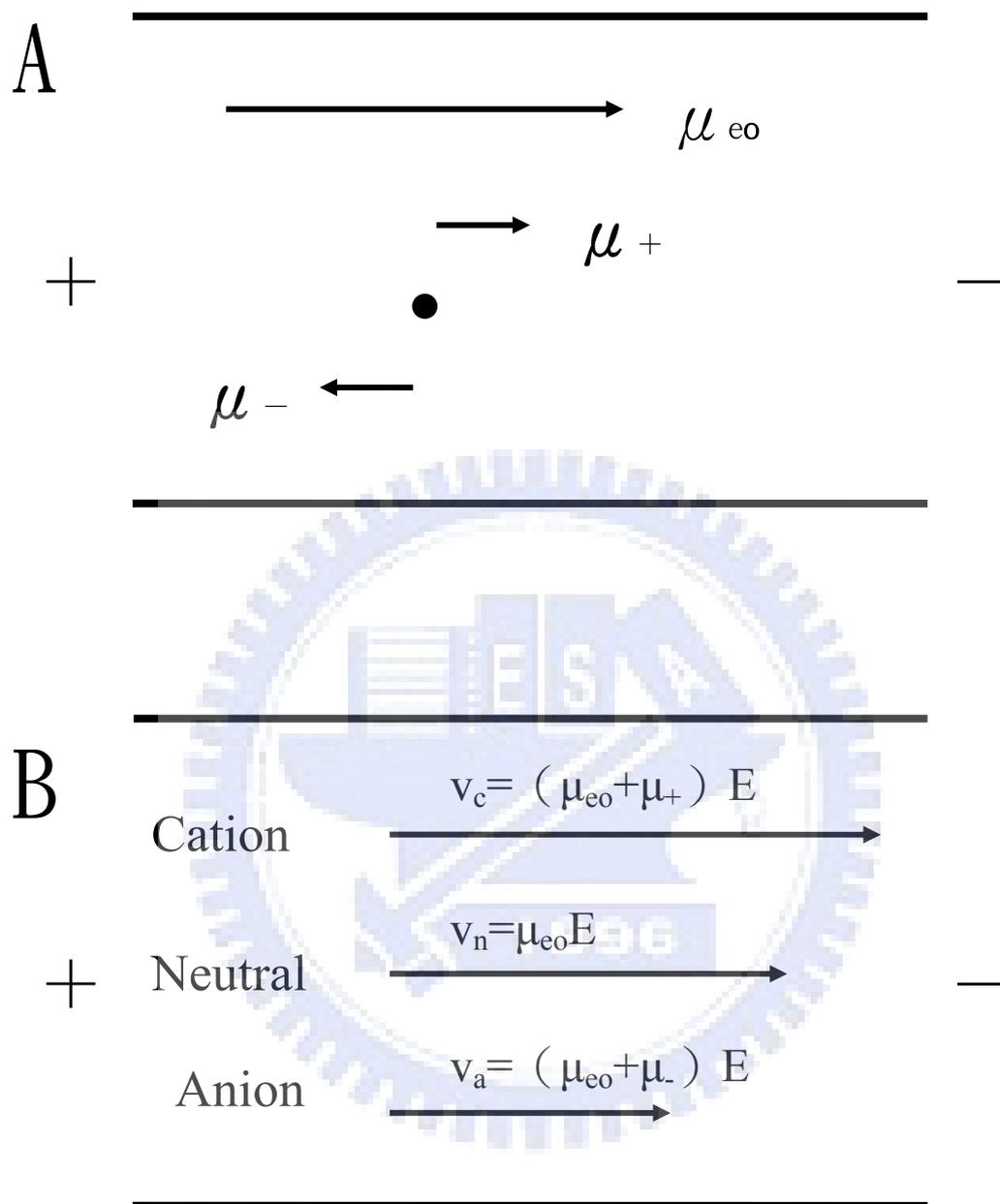


Figure 1.3 Electrophoretic mobility of analytes and electroosmotic flow.

(A) The electrophoretic mobility of analytes and electroosmotic flow in capillary;

(B) The effective electrophoretic mobility of analytes.

二、線上濃縮技術簡介

毛細管電泳具有高解析度與分離時間短的優點，但毛細管電泳卻受因內徑小所導致的光徑短和注入樣品體積小的限制，使得應用在 UV 吸收偵測器上的靈敏度較差，因此在改善毛細管電泳之偵測極限上，已有研究者利用延長毛細管光徑的設計（如 bubble cell, Z-shaped, multiple-reflection），或是以靈敏度較高的電化學法、雷射誘發螢光法、電導度法和質譜法取代傳統 UV 偵測器；但不論是毛細管光徑設計的改變或是選擇不同的偵測器，都受限於現行商業化毛細管電泳儀硬體的配合度和經濟上的考量，所以在不改變也不增加任何儀器設備之條件下，以最簡單且經濟的線上樣品濃縮技術來降低偵測極限，提高靈敏度。

線上樣品濃縮技術最早是在 1979 年時，由 Mikkers 在實驗中發現樣品堆積（sample stacking）的現象，即提高樣品注射時間，樣品區帶會隨之增加，因為樣品溶液和緩衝溶液之間的電導度不同，因而產生電場強度的差異，使得分析物在此二種環境中的遷移速度有所改變，造成樣品區帶聚集堆積，此方法稱為樣品堆積技術[6]。到了 1989 年，Chien 和 Burgi 等人進一步研究，樣品堆積才成為毛細管電泳線上濃縮的重要技術[7-9]。

所有的分析物，可分為帶電荷與不帶電荷兩種，使用的濃縮方法則是依據分析物特性來決定之。帶電荷分析物的堆積方法最早是利用分析物在電導度不同的溶液中會產生不同的遷移速度，而形成堆積，這類的濃縮方法包括電場放大樣品堆積（field-amplified sample stacking, FASS）[10, 11]、大體積樣品堆積（large-volume sample stacking, LVSS）[12, 13]、酸鹼值調整修飾堆積（pH-mediated stacking）[14, 15]。在中性不帶電荷分析物的堆積模式下，因為分析物不帶電荷，所以改變電場強度並不會

造成分析物遷移速度的變化，必須結合 Terabe 教授的研究，發展出在 MEKC (micellar electrokinetic chromatograph) 的模式下，對中性不帶電荷分析物進行樣品堆積[16]，除此之外，Shihabi 等人、Beckers 等人和 Lunte 等人也在這個領域裡發表了很多代表性的文獻[17-19]。

另外，針對中性不帶電分析物，掃掠式線上濃縮 (sweeping-MEKC) 也是一種常被使用的技術。掃掠式線上濃縮是利用分析物在含有界面活性劑微胞溶液與不含有界面活性劑微胞溶液中的遷移速度不同，而形成樣品堆積，Terabe 等人已提出相關的理論計算與實驗數據[20-22]。爾後，也出現了陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮 (cation-selective exhaustive inject-sweeping-MEKC) 和陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮 (anion-selective exhaustive inject-sweeping-MEKC) 技術[23-26]，這兩種濃縮技術能夠非常有效地提升靈敏度和降低偵測極限。還有利用分析物在不同酸鹼度值的緩衝溶液中所帶的電荷數會有所不同來進行濃縮的機制，稱為不同酸鹼度值緩衝溶液接合濃縮 (dynamic pH junction) [27]；若添加了界面活性劑，則稱為不同酸鹼度值緩衝溶液接合結合掃掠式線上濃縮 (dynamic pH junction-sweeping)。

現今已發表的線上濃縮方法有許多不同的模式，須依據分析物的特性選擇最適當的方法，用不同的濃縮機制來分析，以下將針對線上樣品濃縮技術常用模式做簡單的介紹。

2.1 線上堆積 (sample stacking)

線上堆積是利用分析物在樣品溶液與緩衝溶液間電導度的不同產生了電場強度差異，造成分析物在兩種環境中的遷移速度改變，而在溶液交界處聚集堆積。

2.1.1 電場放大樣品堆積 (FASS) [28]

此為最簡便的線上樣品濃縮技術。在此方法中，樣品必須製備於低電導度的緩衝溶液中，背景緩衝溶液 (background solution) 則為高電導度的溶液，通常樣品也會使用稀釋百倍或千倍背景緩衝溶液或水來配製。其操作圖如 Figure 2.1 所示，首先將毛細管充滿高電導度的背景緩衝溶液，然後注入分析物，外加一正向高電壓，根據歐姆定律，樣品區帶低電導度 (高電阻) 的溶液感受到的電場強度較強，分析物會快速移動通過樣品區帶，當進入到緩衝溶液區帶時，因為緩衝溶液為高電導度 (低電阻)，感受到的電場強度變弱，分析物的遷移速度也大幅降低，遷移速度由快到慢的變化，促使分析物在樣品區帶與緩衝溶液區帶之間的界面發生堆積濃縮，最後再以毛細管電泳的分離機制進行分離。電場放大樣品堆積應用在濫用藥物鴉片類[29]與分析中藥類成分[30]，其濃縮倍率為 1,000-10,000 倍，偵測極限在 0.7-0.9 ppb 之間；也有將 FASS 應用於微晶片上的實驗，例如 Lichtenberg 等人描述了一個六向流道的注入裝置 (six-channeled injector) 搭配 FASS 應用於晶片上，可達到 20 倍的訊號放大效果[31]，還有以質譜儀作為偵測器的也有 50 倍的濃縮效率[32]，後來更有利用電化學法在微晶片上分析水中酚類化合物得到 5,200 倍的放大倍率，偵測極限在 100-150 pM[33]。

2.1.2 大體積樣品堆積 (LVSS) [28]

大體積樣品堆積法其樣品溶液和背景緩衝溶液的配製與電場放大樣品堆積法類似，操作機制如 Figure 2.2，以分析帶負電的分析物為例，毛細管導入高電導度的背景緩衝溶液後，以壓力注入一大段樣品溶液，加一負向電壓，此時電滲流會往入口端 (inlet) 方向移動，而帶負電的分析物則往出口端 (outlet) 方向移動，在樣品區帶與背景緩衝溶液區

帶間的界面堆積，同時電滲流會將樣品溶液中的基質干擾（帶正電及中性物質）帶出毛細管外（如 Figure 2.2 (B)）。當樣品區帶被壓縮時，電流值會有所改變，若偵測到電流值為初始最大電流值的 95-99 % 時，需將電極極性反轉為正向電壓（如 Figure 2.2 (C)），使已濃縮的負電分析物被電滲流帶至出口端，最後以毛細管電泳分離機制進行分離與偵測（如 Figure 2.2 (D)）。與 FASS 比較，LVSS 可提供至少二分之一毛細管體積的樣品注入量，而且只要電流監控得當，就可獲得良好的再現性，唯一缺點是只能單獨偵測陽離子或陰離子。此方法應用範圍很廣泛，包括食品中色素含量的分析[34]；飲用水中的萘磺酸類化合物（naphthalenesulfonate compound），在訊雜比等於 10 的條件下，偵測極限為 4 $\mu\text{g/L}$ [35]；鐵離子錯合物分析相較於傳統毛細管電泳，濃縮了約 50 倍以上[36]；還有胜肽類（peptides）的研究，在 picomolar 的等級下測到螢光標定的胜肽分析物[37]。

2.1.3 酸鹼值調整修飾堆積（pH-mediated stacking）[19]

上述的兩種濃縮法，分析物都必須溶解於低電導度的溶液中，但是很多生物檢體，如血液和尿液，大部分都含有高濃度的鹽類，造成樣品溶液的電導度高於背景緩衝溶液的電導度，而不利堆積濃縮的操作。酸鹼值調整修飾堆積法其原理簡言之就是將強酸或強鹼以電泳移動的方式逐漸進入樣品溶液，使之中性化，降低其電導度而形成高場強區域，其操作機制如 Figure 2.3（濃縮示意圖上方為電場強度示意圖），在充滿背景緩衝溶液的毛細管中，以電動注入方式導入一大段高電導度的樣品溶液，再注入一段強酸，然後施予一正向電壓。此時強酸在移動的過程中會慢慢中和樣品溶液，使其電導度降低，由 Figure 2.3 (C) 上方的電場強度示意圖可以看出被作用的部分已形成高電場，在高電場強度的作

用之下，分析物遷移速度加快，追趕上前方速度慢的分析物，達到濃縮的目的，再以毛細管電泳的分離機制進行分離。其應用有胜肽類分析[38]和香豆精代謝物（coumarin metabolites）的研究[39]，以傳統 UV 吸收光譜儀作為偵測器，可達到 0.1 μM 的偵測極限。

2.2 掃掠式線上濃縮（sweeping-MEKC）

掃掠式線上濃縮法除了可應用在帶電分析物上，更可作為中性不帶電荷分析物的濃縮法，是利用分析物在含有界面活性劑微胞溶液與不含界面活性劑微胞溶液中的遷移速度不同，而形成樣品堆積濃縮。此方法可以有效地改善 FASS 和 LVSS 樣品必須是帶電荷分析物的缺點，也不用考慮樣品溶液與緩衝溶液之間電導度的差異，方便實際應用於真實樣品的檢測。掃掠式線上濃縮法可使用不同種類的界面活性劑做為微胞溶液，以下將依據界面活性劑的種類作介紹。

2.2.1 陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮（sweeping with anionic micelles）[40]

陰離子界面活性劑（如 sodium dodecyl sulfate, SDS）是最早被應用發展的掃掠式線上濃縮法，其機制如 Figure 2.4 所示，在此方法中，先將毛細管內充滿含有陰離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液，其酸鹼值必須小於 2 用以抑制電滲流，爾後再以壓力注入一大段和背景緩衝溶液離子強度相近但不含微胞的樣品溶液，最後將毛細管兩端置於含有陰離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液中，在施加負向電壓時，分析物接觸到陰離子界面活性劑的微胞並且與之結合後，會受電極的吸引往出口端的方向移動，追趕上前方的分析物，造成樣品區帶濃縮，因為不同的分析物與微胞的親和性各有不同，因而產生分離。利用此模式在紅葡萄酒

中偵測白藜蘆醇 (trans-resveratrol) 的含量，搭配使用低溫螢光儀偵測器 (low-temperature fluorescence spectroscopy)，與傳統 MEKC 比較，使用掃掠式線上濃縮法的靈敏度可提升 1500 倍，偵測極限也比使用液相層析儀得到的偵測極限來的低[41]。當面臨壓力或生氣、緊張時，我們的身體會產生一種賀爾蒙叫做皮質酮 (corticosterone)，促使腦幹皮層多巴胺(dopamine)和正腎上腺素(norepinephrine)的釋出，使生物體對環境的變遷產生高度適應的效果，有研究團隊對於血液與尿液中皮質酮的濃度做檢測，結果指出 MEKC 模式下的偵測極限為 7 ppm，而 sweeping-MEKC 的偵測極限為 3 ppb [42]。

2.2.2 陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮 (sweeping with cationic micelles) [43]

此模式不同於陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮，整個分離過程不需調整 pH 值來抑制電滲流，但是使用陽離子界面活性劑會使電滲流反向，所以必須施加負向電壓，使分析物與電滲流的移動方向相同。其機制如 Figure 2.5 所示，先毛細管中充滿含有陽離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液，接著注入一段不含陽離子界面活性劑的樣品溶液，最後將毛細管兩端置於含有陽離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液中，並施加一個負向電壓，毛細管中的陽離子界面活性劑微胞因與電極電性相斥，所以遷移方向與電滲流相反，因此當前方分析物接觸到微胞，並與微胞結合後，會使得本身遷移速度變慢，而形成堆積 (如 Figure 2.5 (B))，之後分析物會與陽離子界面活性劑微胞一起往偵測器方向移動，以 MEKC 的分離機制進行分離。Terabe 研究團隊利用 TTAB 和 CTAC 兩種陽離子界面活性劑在濃縮類固醇上，得到最大 150 倍的倍率[44]。而之前有文獻指出[21, 45]，不論是 stacking 或 sweeping，抑制電滲流比

存在電滲流可得到更大的濃縮倍率，因此 Terabe 研究團隊使用塗佈聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 的毛細管抑制電滲流，同樣分析類固醇[46]，其訊號比 MEKC 的訊號放大了近 370 倍。

2.2.3 中性界面活性劑掃掠式線上濃縮 (sweeping with nonionic micelles)

中性界面活性劑掃掠式線上濃縮法應用於帶負電的分析物，在毛細管中充滿中性界面活性劑微胞的緩衝溶液後，注入一段樣品溶液，施加正向電壓後，電滲流的方向由正極朝向負極，中性微胞移動方向及移動速度與電滲流相同，而負電分析物因電極同性相斥的關係朝負極移動速度減慢，當樣品區帶後方的負電分析物接觸微胞後，與微胞結合使之遷移速度變快，追趕上前方未受中性微胞作用的分析物，以至於在界面處形成濃縮，最後分析物會與微胞一起往偵測器方向移動並且依 MEKC 機制進行分離，詳細圖型如 Figure 2.6 所示。中性界面活性劑微胞因為不帶電荷，故其濃度並不影響電流值，因此在高濃度時不會有焦爾熱的影響，減低了在高界面活性劑濃度時波峰變寬的現象。在分析酚類化合物上，以 Brij35 做為中性界面活性劑，其濃縮倍率為 54-100 倍，偵測極限則在 19-28 ppb 的範圍[47]。

2.2.4 掃掠式線上濃縮法之濃縮公式[21]

以界面活性劑掃掠濃縮中性分析物為例推論公式，Figure 2.7 為理論操作圖，假設被掃掠過後的長度為 l_{sweep} ，則

$$l_{\text{sweep}} = d(a_c) - d(m_c) \quad (2-1)$$

a_c 與 a_a 分別代表在負極端 (cathodic end) 與正極端 (anodic end) 的分析物樣品溶液與緩衝溶液界面的分析物， m_c 與 m_a 則分別代表位於負極端與正極端界面活性劑。Figure 2.7 (A-C) 的虛線表示 a_c 和 m_c 的起

始位置，當 a_a 接觸到 mc_c 時， mc_c 所移動的距離 ($d(mc_c)$) 與 a_c 所移動的距離 ($d(a_c)$) 可以公式 (2-2) 和公式 (2-3) 表示

$$d(mc_c) = v_{mc} t_{\text{sweep}}; v_{mc} = v_{ep}(mc) + v_{eof} \quad (2-2)$$

$$d(a_c) = v_a(\text{MEKC}) t_{\text{sweep}}; v_a(\text{MEKC}) = v_{ep}^*(a) + v_{eof} \quad (2-3)$$

v_{mc} ：微胞的遷移速率

$v_a(\text{MEKC})$ ： a_c 與微胞結合後的遷移速率

$v_{ep}(mc)$ ：微胞自身的電泳速率

$v_{ep}^*(a)$ ：分析物的有效電泳速率

t_{sweep} ：當 a_a 接觸到 mc_c 所經過的時間

$$v_{ep}(mc) = \mu_{ep}(mc)E \quad (2-4)$$

$$v_{ep}^*(a) = [k/(1+k)] \mu_{ep}(mc)E \quad (2-5)$$

$$t_{\text{sweep}} = l_{inj}/(v_{eof} - v_{mc}) \quad (2-6)$$

$$v_{eof} = \mu_{eof}E \quad (2-7)$$

$\mu_{ep}(mc)$ ：微胞的電泳淌度

E ：電場強度

k ：滯留因子 (retention factor) 為分析物分佈於微胞相與溶液相中的比例

μ_{eof} ：電滲流的電泳淌度

將上述所有公式加以整合，可以得到

$$l_{\text{sweep}} = l_{inj}(1/(1+k)) \quad (2-8)$$

公式 (2-8) 也可應用於帶電荷分析物上。由公式 (2-8) 得知，當注入長度 (l_{inj}) 固定時，分析物的滯留因子 k 越大， l_{sweep} 就會變得越短，表

示濃縮的效果越好；當 l_{inj} 增加時，被掃掠的區間越長，所能進入毛細管內分析的樣品量也越大，其偵測極限就越低。

2.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮 (dynamic pH junction)

不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮主要是與分析物本身電性轉變有關，通常帶電分析物不會在任何情況都保有電性，電荷的強弱與性質非常容易受到外在環境的酸鹼值影響（如兩性物質、蛋白質、胺基酸等）。在電場中，一旦分析物的電荷強弱或電性發生改變，其遷移速率一定也會產生變化[48]，而不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮法就是利用這個原理，改變樣品區帶和背景緩衝溶液區帶的酸鹼值，讓兩性物質或弱酸鹼性的分析物在這兩種不同酸鹼值的環境中，產生速度變化，以進行樣品濃縮。操作圖如 Figure 2.8 所示，毛細管內先填充高 pH 值的背景緩衝溶液，接續注入一段低 pH 值的樣品溶液，分析物由樣品溶液進入背景緩衝溶液時，其電性會從中性慢慢變為帶負電性，當施加正向電壓，分析物因電性的轉變使得移動速率減慢，滯留於樣品區帶前端與背景緩衝溶液的交界處，達到濃縮的效果。此濃縮法與 stacking 的不同點在於樣品溶液的電導度無關濃縮效率的好壞，在不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮法中，樣品溶液的電導度可低於或高於背景緩衝溶液的電導度。原本此濃縮法只能應用於負電性分析物，後來藉由添加陽離子界面活性劑修飾管壁，使電滲流反向，應用在正電性分析物上也有很好的效果[27]。如 Figure 2.9 (A)，管內先充滿 pH 4.5 且含有陽離子界面活性劑 (CTAC) 的背景緩衝溶液，爾後導入一段低酸鹼值的樣品溶液，在此樣品溶液內分析物帶正電。Figure 2.9 (B) 中施加一負向電壓，因為添加 CTAC 的緣故，造成電滲流方向逆轉，此時正電分析物將受到入口端負極的吸引，抵抗電滲流之推力，致使朝出口端移動的速率減緩，而樣品區帶之

左側界面因接觸高 pH 值的背景緩衝溶液，受其影響的分析物會失去正電荷呈現中性化，中性化後的分析物移動速度和方向與電滲流一致，逐漸追上前方的正電分子產生濃縮效應。最後在 Figure 2.9 (C) 以 MEKC 方式分離濃縮後的分析物。在核苷酸分析上，靈敏度提升了 50 倍，偵測極限則降低至 4×10^{-8} M，且應用此法可節省在細胞萃取液中去鹽 (desalting) 的時間，並得到良好的濃縮效率[49]。

2.4 複合型掃掠式線上濃縮

複合型掃掠式線上濃縮技術是以前述之掃掠式線上濃縮法為核心，再結合其他線上濃縮技術，以獲得更高濃縮倍率的濃縮方法。此一概念最早是由 Terabe 教授於 2000 年所提出的陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法開始[23]，隨後於 2002 年 Hian Kee Lee 以類似的想法提出陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮[26]，有了這兩位的概念，促使掃掠式線上濃縮的技術更精進，以傳統 UV 偵測器進行偵測，無任何螢光衍生試劑及其他設備的輔助，整體放大倍率高達十萬倍，偵測極限低至 ppt 的等級。此外也有不同酸鹼值緩衝溶液接合結合掃掠式線上濃縮法和大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法，以下會逐一介紹這些方法的濃縮原理。

2.4.1 陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮 (cation-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography, CSEI-sweeping-MEKC)

以掃掠式線上濃縮法為核心，在使用界面活性劑溶合分析物之前，先設計一個適合陽離子分析物執行場放大樣品電動注入 (field-enhanced sample injection, FESI) 的環境，對陽離子分析物做第一步濃縮，然後再

以陰離子界面活性劑溶合分析物做第二步的掃掠式濃縮，以產生放大相乘之效。濃縮步驟如 Figure 2.10 所示，在 Figure 2.10 (A) 中先將不含微胞的酸性緩衝溶液充滿毛細管，再注入一大段較高離子強度的酸性緩衝溶液，高離子強度酸性緩衝液的目的在製造管柱前端低電場環境，用以攔截大量電動注入的陽離子，然後再注入一小段純水，這一小段純水的目的反而是希望利用最前端的高電場吸引更多陽離子分析物進入毛細管。Figure 2.10 (B) 中，將配製於低電導度基質內的陽離子分析物以正向電壓電動注入毛細管，此時正電荷分析物將受電場驅動，而快速地通過高電場純水區，並且滯留於低電場之酸性緩衝溶液中，完成第一次濃縮，詳如 Figure 2.10 (C)。後續程序就是負電微胞作用的時刻，如 Figure 2.10 (D)，為了避免負電微胞進入毛細管時遇到電滲流的阻礙，先前使用酸性緩衝溶液已經對電滲流產生一定程度之抑制作用了，將含有負電微胞的緩衝液置於毛細管的兩端，並且施壓負向電壓，讓負電微胞以掃掠式濃縮法通過陽離子分析物堆積層，完成第二次濃縮，最後再依 MEKC 分離機制進行分離。在毒品的分析上，分別在尿液[50]與頭髮[51]中都有文獻應用此法做濃縮，甲基安非他命 (methamphetamine) 於尿液中的偵測極限為 5 ppb，而每毫克頭髮中最低可偵測到 50 pg 的甲基安非他命。

2.4.2 陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮 (anion-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography, ASEI-sweeping-MEKC)

關於 Hian Kee Lee 所提的陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法，其概念是以 CSEI-sweeping-MEKC 為藍本，在步驟上加以修飾調整成適用陰離子分析物。機制如 Figure 2.11 所示，Figure 2.11 (A) 與上

述方法相同，先注入不含微胞的酸性緩衝溶液，然後注入一大段純水，以建立毛細管前端的高電場區域，施加負向電壓電動注入陰離子分析物，帶負電荷之分析物會快速通過高電場的純水區，而滯留在不含微胞的酸性緩衝溶液內 (Figure 2.11 (B) (C))，由於陰離子分析物在酸性緩衝溶液中會抑制解離而形成中性分子，進而達到低速滯留的目的，故此法不需額外加注一段高電導度的緩衝溶液作為滯留離子性分析物之用。Figure 2.11 (D) (E) (F) 完成第一次濃縮後，後續過程與上述方法相同，導入界面活性劑，讓微胞以掃掠濃縮方式通過陽離子分析物堆積層，進行第二次濃縮，獲得更高的濃縮倍率。最後依 MEKC 模式進行分離。

2.4.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合結合掃掠式線上濃縮 (dynamic pH junction-sweeping)

此方法與不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮 (dynamic pH junction) 相似，只是多加了界面活性劑，加乘兩種線上濃縮技術，可改善傳統掃掠式線上濃縮波形不佳的缺點。操作程序如 Figure 2.12 所式，首先將毛細管充滿高 pH 值含有界面活性劑 (如 SDS) 的背景緩衝溶液，注入一長段非微胞及低 pH 的樣品溶液，接著施加一正向電壓，分析物進入背景緩衝溶液後會改變電性，加上界面活性劑的作用，使之滯留於樣品區帶與背景緩衝溶液的交界處，因而得到濃縮的效果，當分析物已完全濃縮後，再依 MEKC 模式進行分離。在血液與尿液中啞黃素 (Flavins) 的含量分析上[52]，應用此法搭配螢光偵測儀，可得到 pM 的偵測極限。爾後也有針對類固醇類分析物比較三種不同濃縮法 (dynamic pH junction, sweeping and dynamic pH junction-sweeping) 的研究[53, 54]。

2.4.4 大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮 (LVSS-sweeping-MEKC)

大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法改善了 CSEI-sweeping-MEKC 以電壓注入導致電性不同的分析物進入毛細管中濃度不一的情況，以壓力注入方式較能固定樣品注入量，也不容易受樣品溶液電導度的影響。此方法先利用大體積樣品堆積的原理將分析物滯留於毛細管入口端，再以掃掠式線上濃縮法進行樣品堆積。將毛細管內充滿低 pH 的非微胞緩衝溶液降低電滲流，再以壓力注入一大段樣品，施加負向電壓，此時電滲流會往入口端移動，而帶負電的分析物則往出口端移動，在樣品區帶與背景緩衝溶液區帶間的界面堆積，當電流值為起始最大電流的 95-99% 時，將毛細管兩端置入含有陰離子界面活性劑微胞的緩衝溶液中，施加負向電壓，以陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮的方式進行二次濃縮的動作。

綜合以上各種濃縮技術，在各種模式的開發裡有幾個重要的參數，包括電場強度的差異、pH 值的變化、界面活性劑微胞與電極極性對帶電分析物的影響。

電場強度的差異是因為分析物的遷移速度與所處的電位成正比，在遵守歐姆定律之下，毛細管內的電流為一定值，因此管內任何一點的電位與該點的電阻成正比，所以電阻越大之處，電位也越大，分析物在該點的移動速度就越快。藉由調整各區帶的電導度（調整電阻）可以改變分析物的遷移速率，例如在毛細管前端注入高電導度的緩衝溶液，而分析物配製於低電導度的樣品溶液內，處於低電導度溶液中的分析物感受到的電場較大，所以會快速通過樣品區帶，當分析物一接觸高電導度的緩衝溶液後，其移動速度會減緩，使後方的分析物追趕上前方的分析物，形成堆積濃縮效應。

分析物因為處在不同的 pH 值緩衝溶液中，所以帶的電荷數也不同，造成遷移速度的改變。例如酚類化合物在高 pH 值的環境中是帶負電荷的，而在低 pH 的環境則為中性物質，此時若施加正向電壓，當分析物由低 pH 緩衝溶液進入高 pH 緩衝溶液時，會因為帶有負電荷而與出口端的負極電性相斥，使得移動速度變慢，後方分析物會追趕上前方分析物，形成樣品堆積。

界面活性劑微胞的種類繁多，當其與分析物結合之後，會改變分析物的電性及遷移速度。最常應用在掃掠式線上濃縮技術，藉由微胞的作用使線上濃縮技術能擴展至中性不帶電的分析物。

利用分析物所帶的電荷與電極相斥，導致分析物遷移速度小於電滲流，而產生樣品堆積濃縮效應。當分析物帶負電荷，在施加負向電壓時，樣品基質會隨電滲流而流出毛細管，帶有負電荷的分析物因移動速度慢而堆積於毛細管末端，此時再施加正向電壓，分析物便會往出口端移動。以上四點為分析物產生速度改變的基本原理，線上濃縮技術大都利用上述一至兩種基本原理進行設計。而每種濃縮技術適用的分析物都不盡相同，可依據 Figure 2.13 所整理的，為分析物選擇合適的線上濃縮技術。

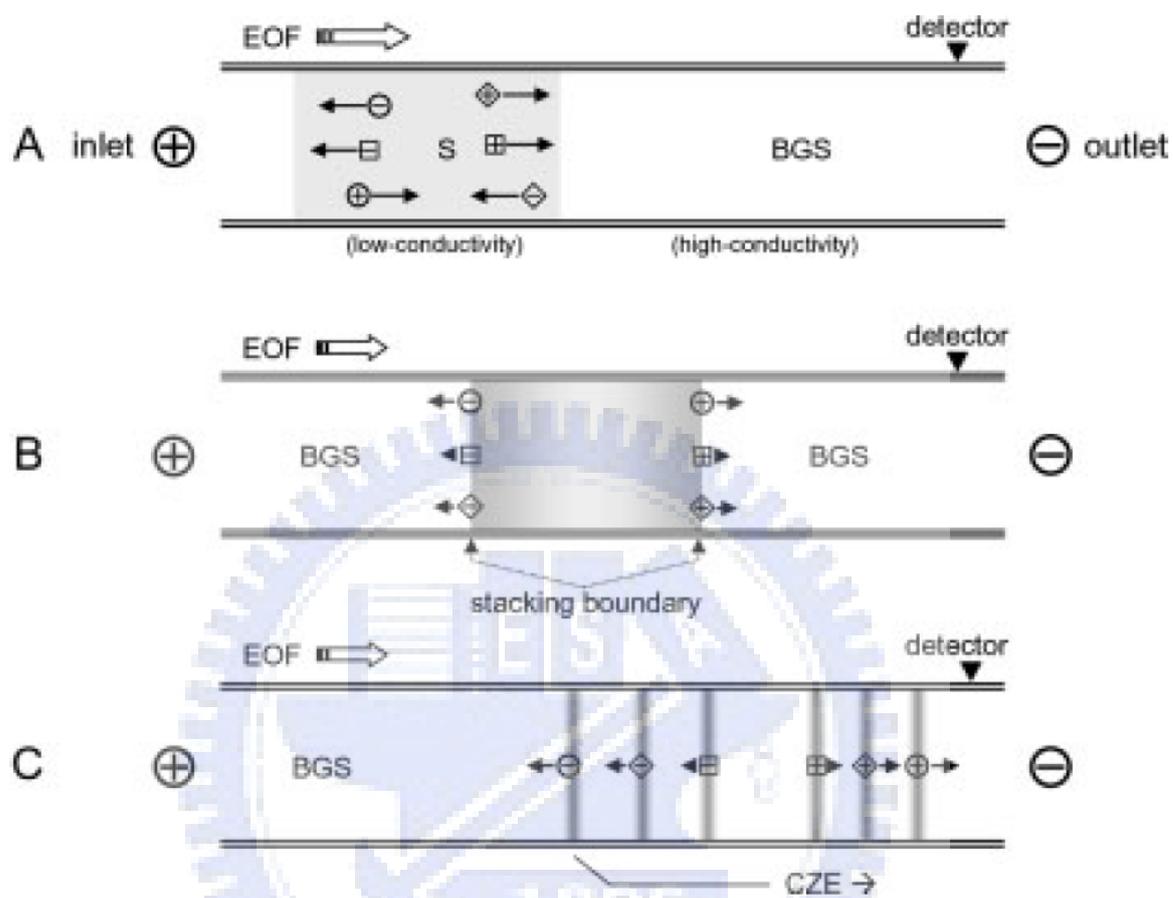


Figure 2.1 Schematic diagrams of the FASS model [28].

(A) The capillary is conditioned with a BGS (a high conductivity buffer), the sample, prepared in a low-conductivity matrix, is then injected to a certain length, and a high positive voltage is applied; (B) focusing of the analytes occurs near the boundaries between the sample zone and the BGS; (C) stacked analytes are separated by the CZE mode.

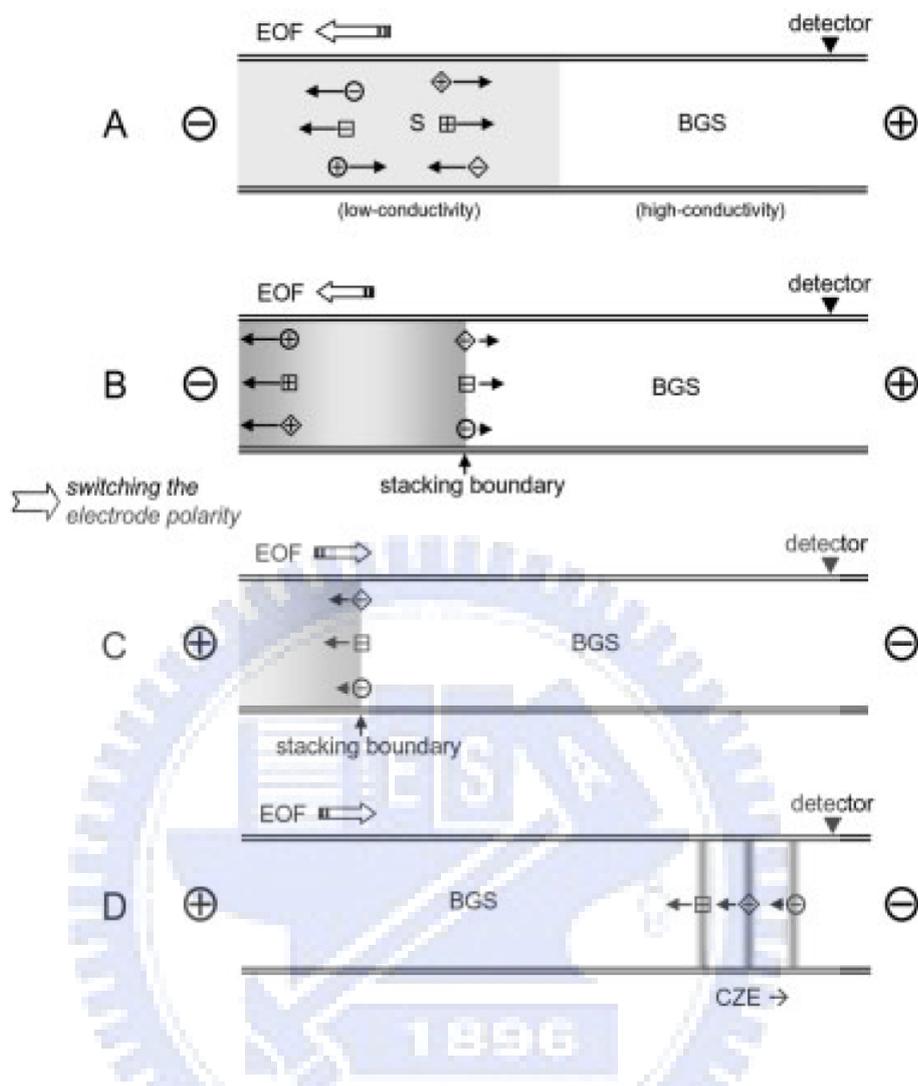


Figure 2.2 Schematic diagrams of the LVSS model [28].

(A) The capillary is conditioned with a BGS (a high conductivity buffer), the sample, prepared in a low-conductivity matrix, is then injected to a certain length, and then a high negative voltage is applied; (B) the anionic analytes move toward the detection end (outlet) and stack at one side of the boundary, whereas the cations and neutral species move and exit the capillary at the injection end (inlet); (C) when the electrophoresis current reaches 95-99% of its original value, and the polarity is quickly switched to positive polarity; (D) the following separated by CZE mode.

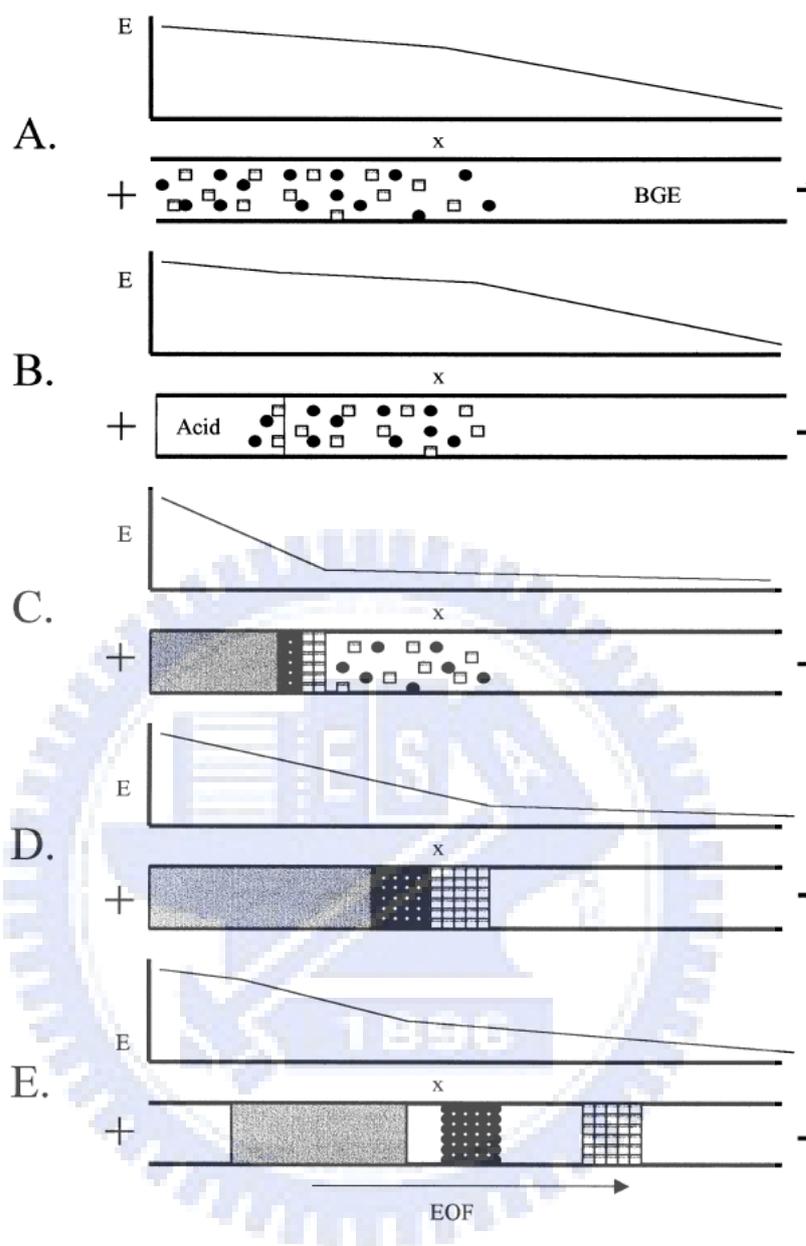


Figure 2.3 Schematic diagrams of the pH-mediate stacking model [19].

(A) The analytes dissolved in a high-conductivity matrix are electrokinetic injected into the capillary; (B) a plug of strong acid is also injected, and a positive separation voltage is applied; (C) the strong acid titrates the sample zone to neutral, creating a high resistance zone; (D) causing the ions to migrate faster and become stacked; (E) the electrophoretic separation proceeds through the remainder of the capillary.

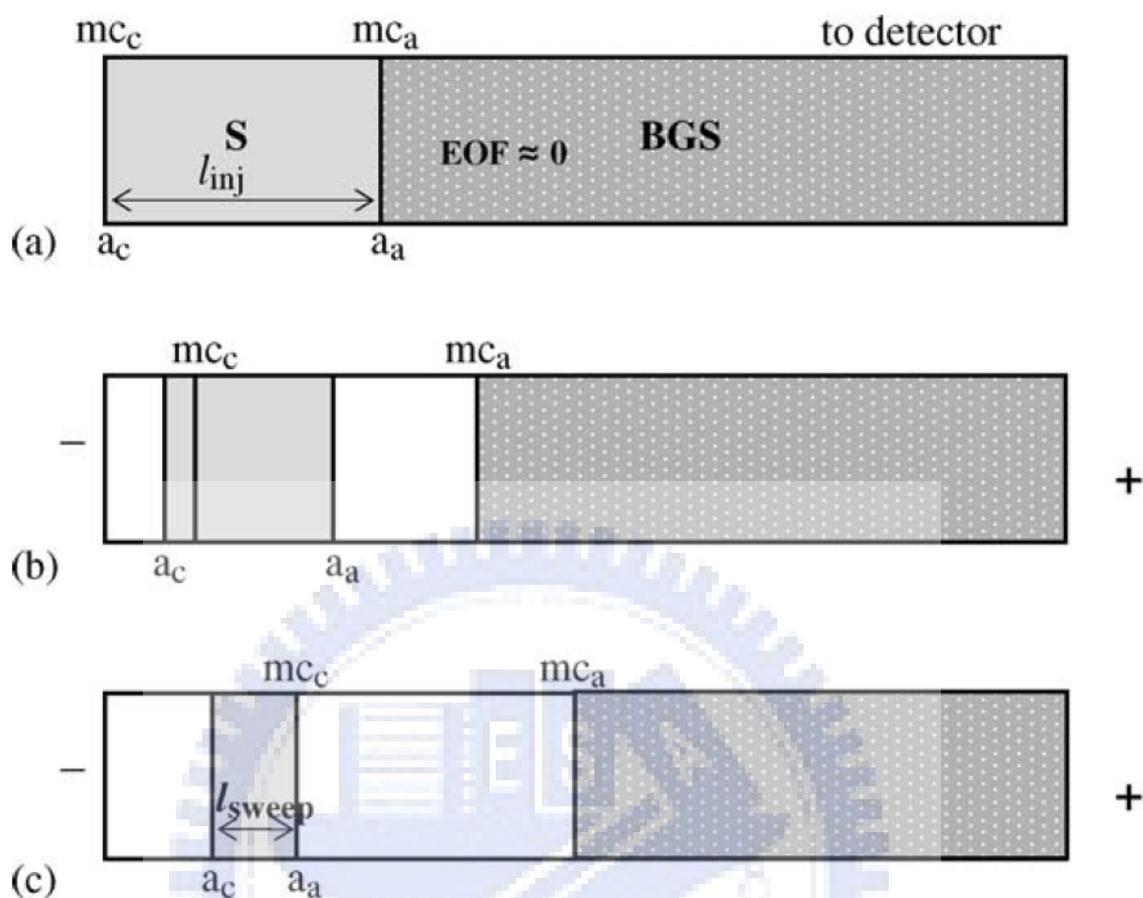
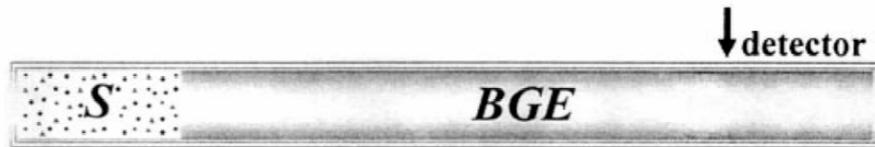


Figure 2.4 Schematic diagrams of sweeping with anionic micelles model [40].
 (a) Injection of sample (S) prepared in a matrix having a conductivity similar to that of the BGS; (b) application of voltage at negative polarity, micelles emanating from the cathodic side sweeping analyte molecules; (c) the injected analyte zone is assumed completely swept.

A. Sample injection



B. Stacking of analytes



C. Separation after sweeping



Figure 2.5 Schematic diagrams of sweeping with cationic micelles model [43]. (A) The capillary is initially filled with BGS; (B) A sample zone containing nonmicellar sample matrix or water is injected for a period much longer than usual. By application of voltage at negative polarity the electroosmotic flow is directed toward the anode (as cationic micelles is adsorbed on the capillary wall) and the micelles migrate toward the cathode; (C) The separation is then achieved by MEKC.

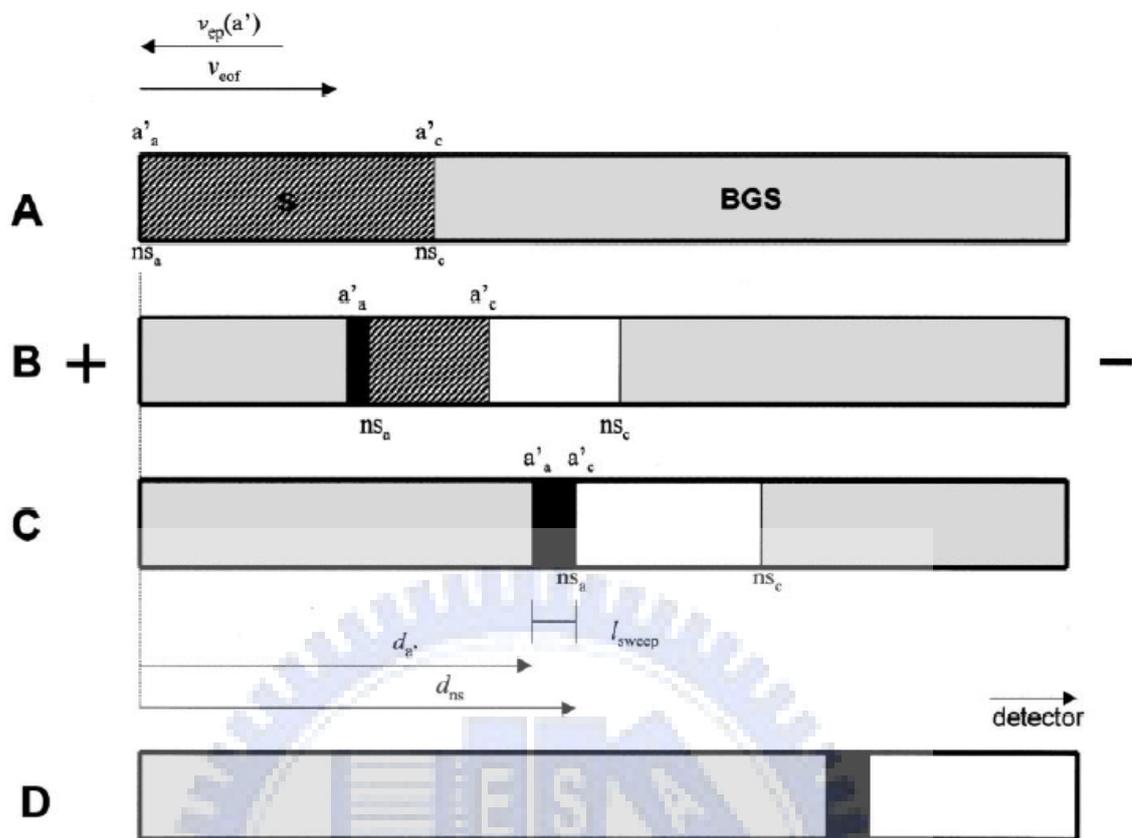


Figure 2.6 Sweeping of a charged analyte in electrokinetic chromatography with a neutral pseudostationary phase [47].

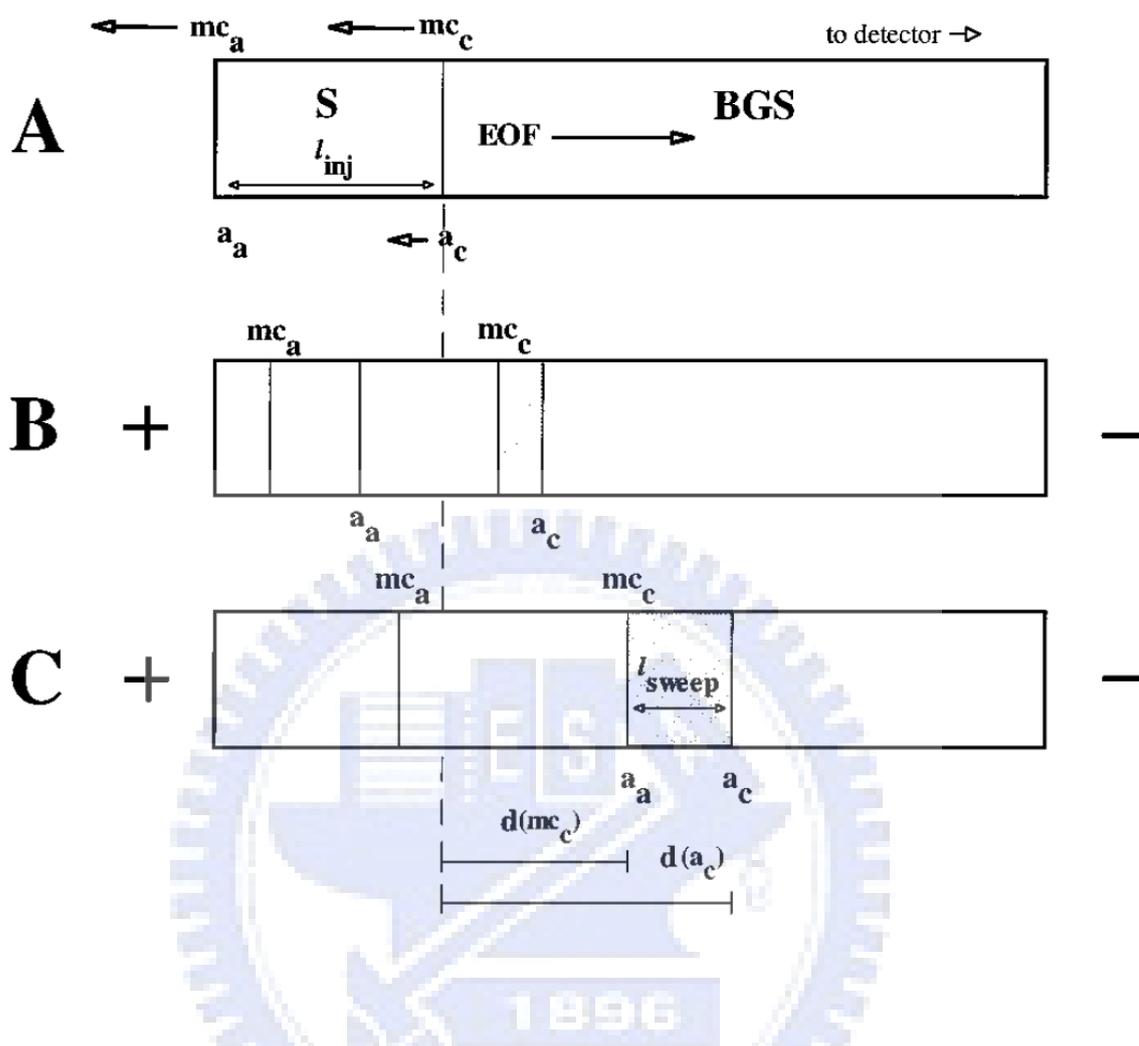


Figure 2.7 Evolution of micelles and neutral analyte molecules during sweeping in the presence of high EOF [21].

(A) Starting situation, injection of S prepared in a matrix having a conductivity similar to that of the BGS; (B) application of voltage at positive polarity, micelles emanating from the cathodic side sweeping analyte molecules; (C) the injection analyte zone is assumed completely swept.

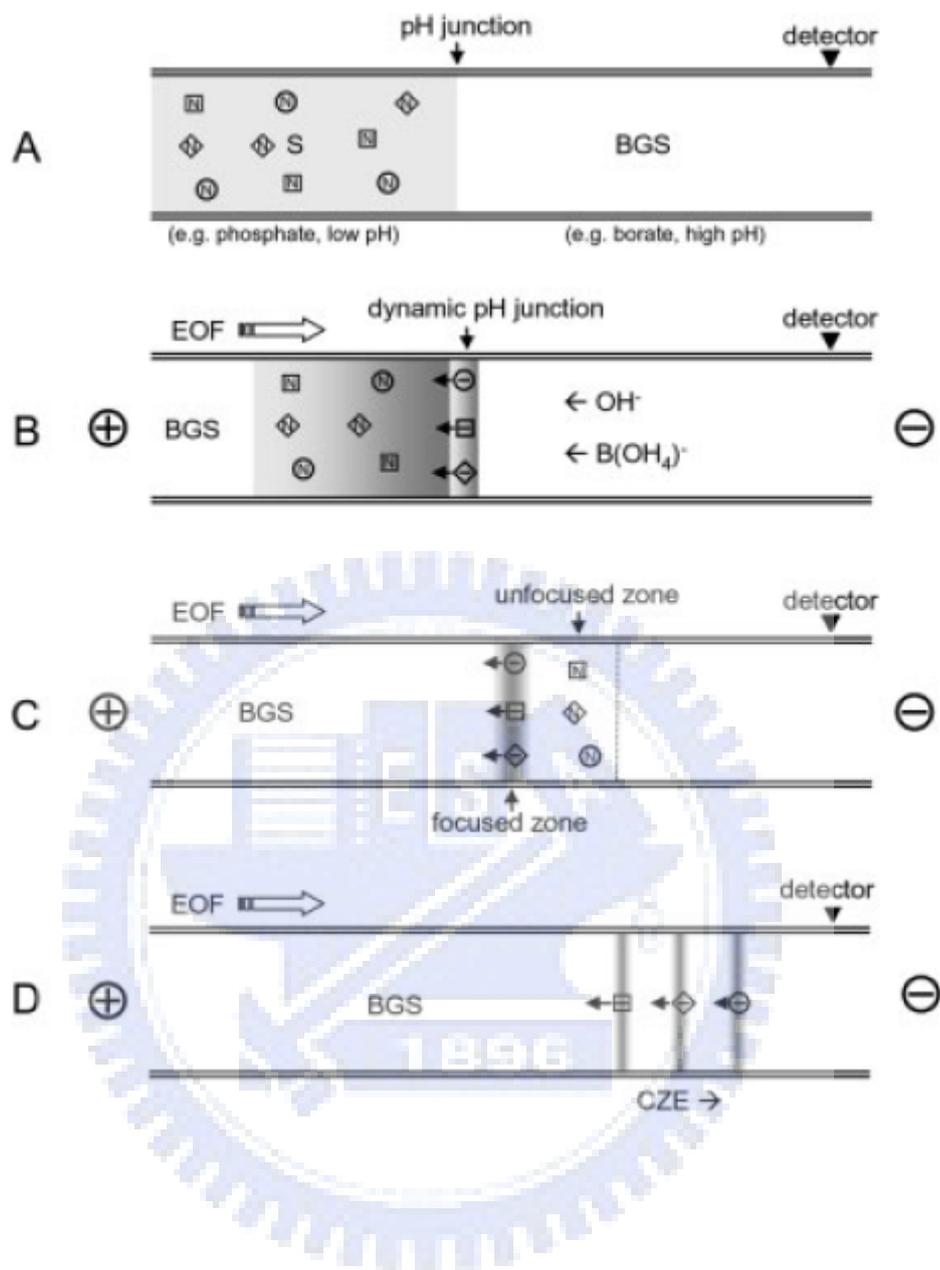


Figure 2.8 Schematic diagrams of a dynamic pH junction model [28].

(A) The capillary is filled with a high pH-BGS and a section of low pH-sample solution; (B) a high positive voltage is applied; (C) the anionic analytes are focused on the boundary of the pH junction; (D) separation occurs by the CZE mode.

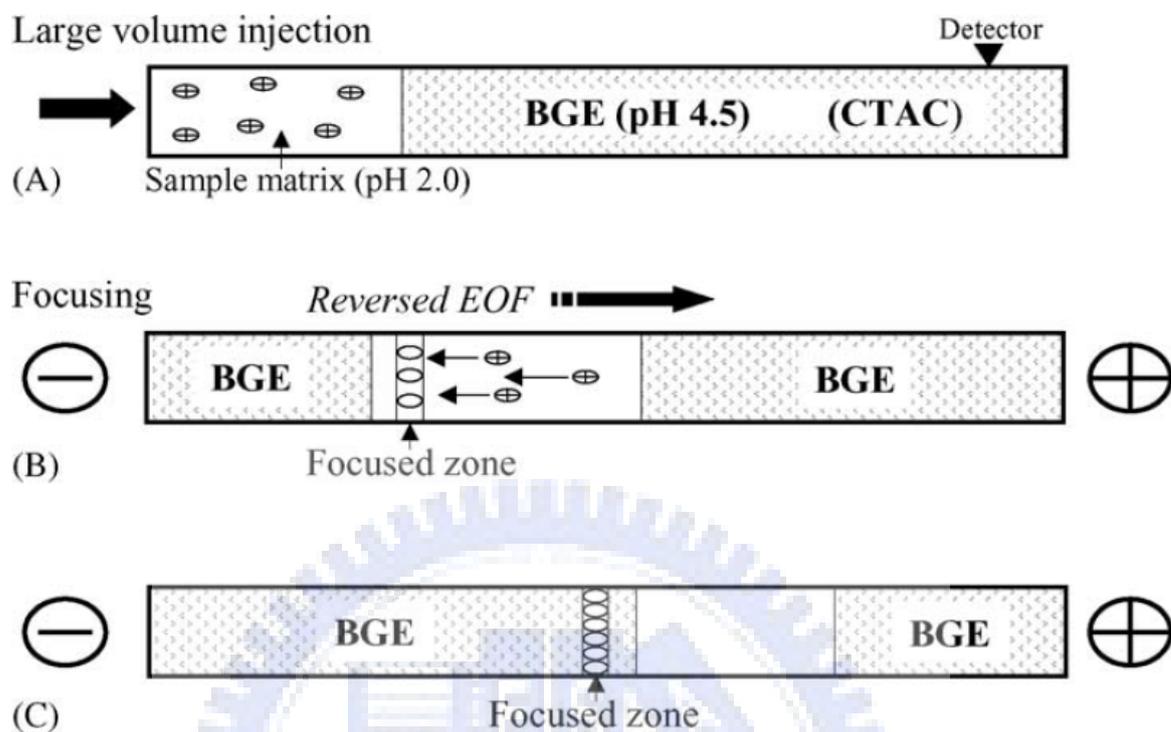


Figure 2.9 Schematic diagrams of a reversed dynamic pH junction model [27].
 (A) Capillary is conditioned with a BGS (pH 4.5), then the analyte prepared in sample matrix (pH 2.0) is injected; (B) focusing of the analyte occurs because of its mobility changes in two zones; (C) focusing analyte zone migrates independently of the sample matrix.

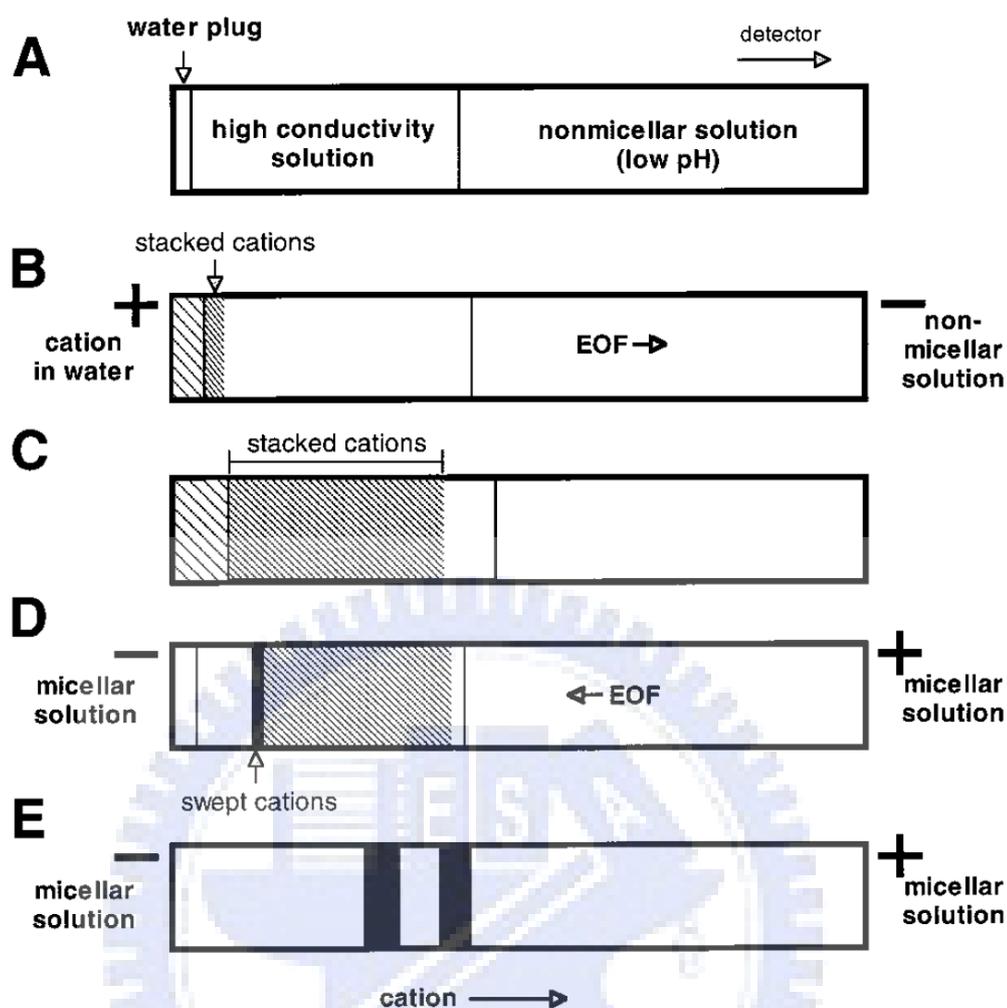


Figure 2.10 Evolution of analyte zones in CSEI-sweep-MEKC [23]:
 (A) Starting situation, conditioning of the capillary with a nonmicellar background buffer, injection of a high-conductivity buffer void of organic solvent, and injection of a short water plug; (B) electrokinetic injection at positive polarity (FESI) of cationic analytes prepared in a low-conductivity matrix or water, then cationic analytes focus or stack at the interface between the water zone and high-conductivity buffer; (C) injection is stopped and the micellar background solutions are placed at both ends of the capillary; (D) application of voltage at negative polarity that will permit entry of micelles from the cathodic and sweep the stacked and introduced analytes to narrower bands; (E) separation of zones based on MEKC.

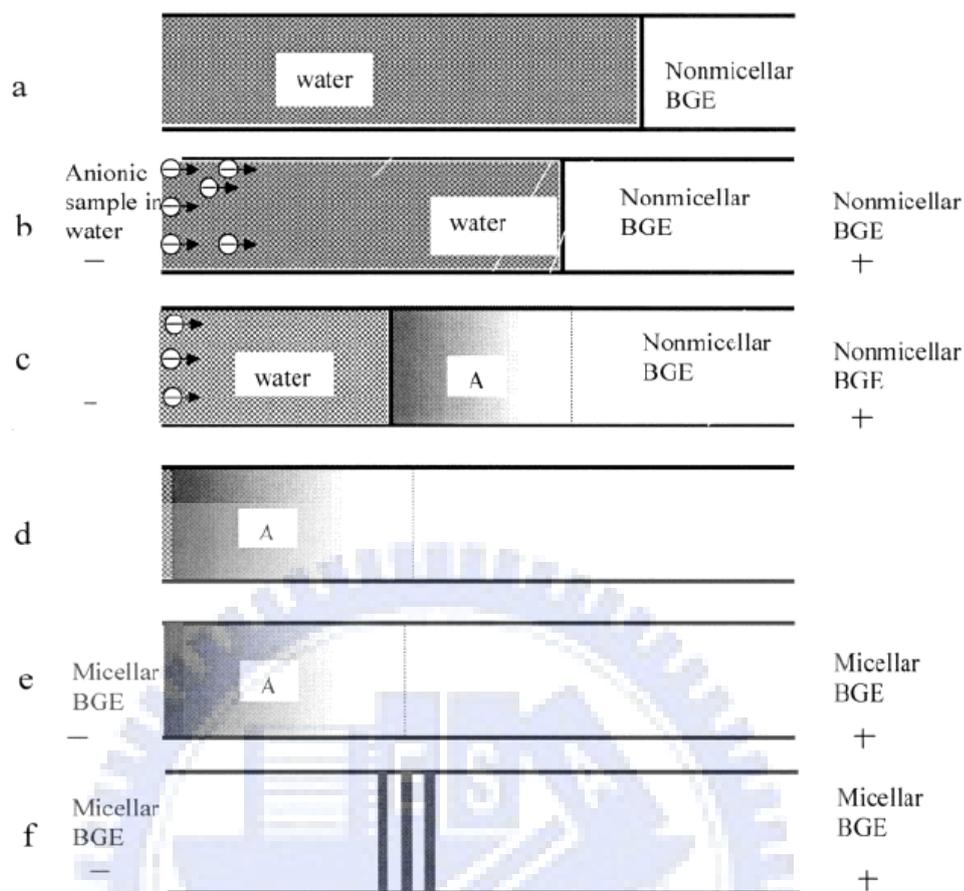


Figure 2.11 Schematic illustration of the ASEI-sweep-MEKC model [26].

(a) After filling the capillary with low-pH nonmicellar electrolyte, a water plug is injected into the capillary; (b) negative voltage is applied, and the sample is electrokinetically injected into the capillary. Due to the high electric field, the anions move rapidly toward the outlet. At the same time, the water plug is moving out of the inlet of the capillary; (c) when the sample anions enter the boundary of water and low-pH BGS, they are neutralized and cease moving. A focused sample zone is formed (shaded area A); (d) injection is halted and both vials at inlet and outlet are changed to low-pH micellar BGE; (e) negative potential is applied and sweep the focused sample zone as a narrow band; (f) subsequent separation is achieved under MEKC mode.

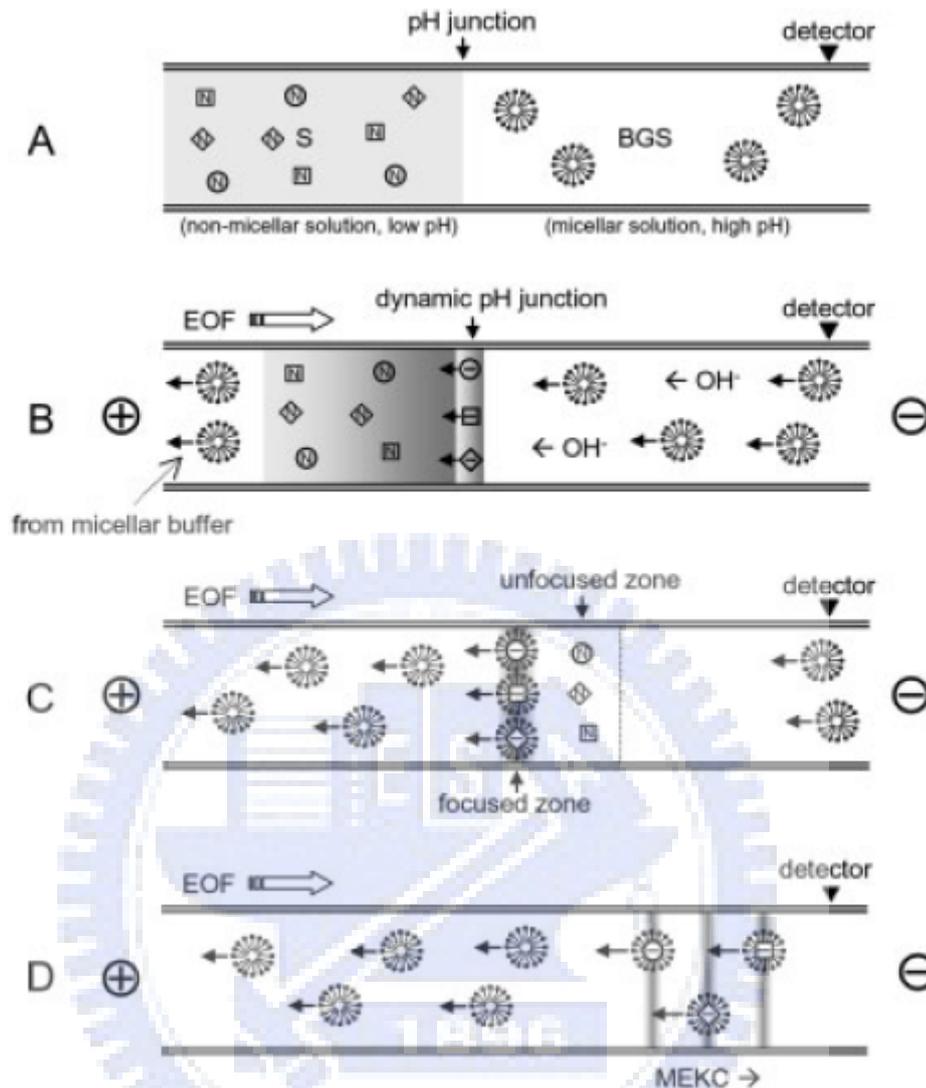


Figure 2.12 Schematic diagrams of dynamic pH junction-sweeping model [28]. (A) The micellar (such as SDS) BGS and the sample solution (a nonmicellar buffer) are injected into the capillary, respectively; (B) a positive polarity is applied to power the CE separation; (C) the neutral analytes are converted to anions and are swept by the SDS micelles; (D) separation occurs by the MEKC mode.

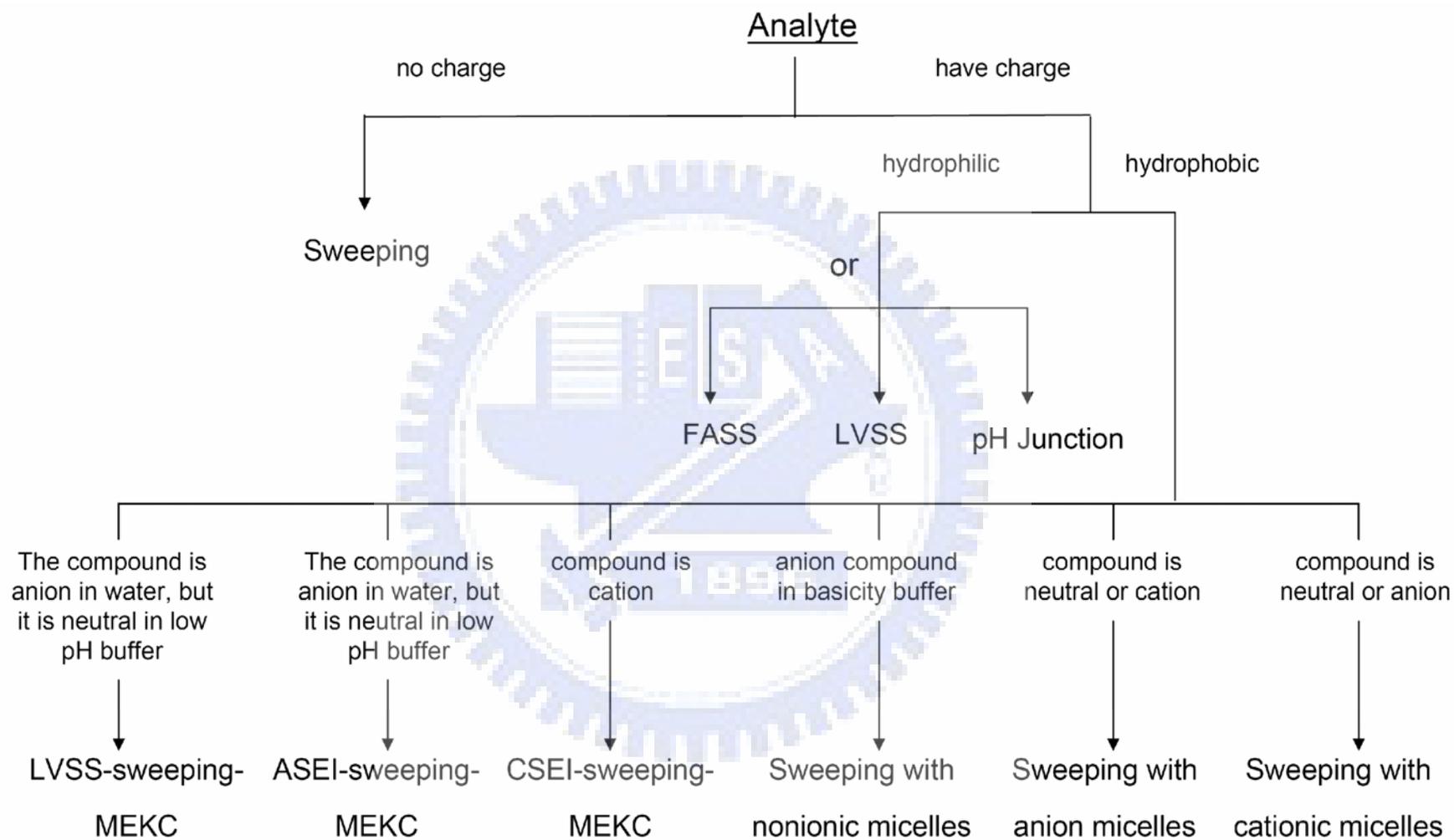


Figure 2.13 The choice of on-line concentration techniques [55].

三、中樞神經興奮劑--古柯鹼

古柯鹼 (cocaine) 屬於管制藥品管理條例列管的高根類麻醉藥品，做為局部麻醉劑及血管收縮劑，具有強烈的中樞神經興奮劑的作用，古柯葉加工後其萃取液可提煉成白色粉末狀之古柯鹼。古柯鹼又俗稱可卡因、可可精、crack 和 coke 等，濫用者使用方式通常以鼻吸入，亦有將藥物加熱後吸入其煙霧，也有使用皮膚、肌肉或靜脈注射的方式。在美國，以吸煙方式蔚為風行，由於古柯鹼經吸煙後幾乎迅速地通過血腦障壁，造成其藥理作用增加，危害性相對的加重，濫用古柯鹼已在美國造成嚴重的社會問題，現今在我國也將古柯鹼列入第一級管制藥品（毒品）。

3.1 古柯鹼之性狀與藥理作用

古柯鹼為白色結晶粉末，味苦，服用後舌頭會產生麻痺感，可溶於水、酒精、甘油，不溶於乙醚，能使敏感的末梢神經暫時麻痺，阻斷神經傳導性，誘發局部缺血，吸收後會刺激中樞神經，接著產生興奮、發抖、心跳加速、血壓上升、被害妄想和幻覺，5~10%水溶液即可作為局部麻醉劑。古柯鹼作用在鼻黏膜及口腔黏膜時，會引起強烈之血管收縮而影響嗅覺和味覺，此乃因古柯鹼阻礙了腦部神經傳遞質多巴胺 (dopamine)，且影響正腎上腺素和血清素的正常攝取，產生血管及瞳孔收縮等中樞神經興奮的現象，大量使用引起精神錯亂思想障礙，長期使用引起失眠、躁動或妄想性神經病，過量引起呼吸抑制。停藥之脫癮症狀與安非他命類似，包括精神呆滯、昏睡、易怒、煩躁不安、憂鬱，有自殺的傾向。

3.2 古柯鹼在體內的吸收與代謝

古柯鹼因具血管收縮作用，故吸收速率較慢，雖然如此，古柯鹼之吸收速率依然遠超過解毒速率和排泄速率，因此常發生吸食古柯鹼中毒的現象。吸入古柯鹼後會迅速地由血液傳送及肝臟代謝，在體內的代謝途徑如 Figure 3.1[56]，主要的兩種代謝物為 benzoylecgonine 和 ecgonine methyl ester，尿液中的古柯鹼有 35~54% 是經由自發性水解 (spontaneous hydrolysis) 或肝臟中的羧基酶 (carboxyesterase) 代謝成主要代謝物 benzoylecgonine；古柯鹼去甲基化會生成 norcocaine；伴隨酒精一起使用古柯鹼的話，在尿液中會發現高濃度的 cocaethylene，而原形古柯鹼經由腎臟排出到尿液中，依據酸鹼值的不同，約只剩下 1~9% 左右。

3.3 古柯鹼之相關檢測技術

目前研究分析古柯鹼及其代謝物的方法有免疫技術 (immunoassays) [57, 58]、高效能液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC) [59-62]、氣相層析 (gas chromatography) [63, 64]、液相層析質譜儀 (high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) [65] 和氣相層析質譜儀 (gas chromatography/ mass spectrometry, GC/MS) [66-70]。以上的方法中，GC/MS 是最常被用於毒品分析的檢測技術，缺點是分析前需要衍生，而衍生所需時間長，所以不適用於大量樣品的分析。而毛細管電泳的優點為分離效率高與分析所需的時間短，若搭配雷射誘發螢光偵測器 (laser-induced fluorescence detector) [71] 可降低偵測極限，但缺點是儀器較昂貴，且大部分的分析物是不含螢光基團的，需要先行衍生上螢光物質才能進行偵測。為了克服以上缺點，便發展出線上樣品濃縮技術，不需複雜的衍生步驟，不用複雜的儀器硬體設備，在毛細管電泳中使用簡單的 UV 偵測器也能有效降低偵測極限。

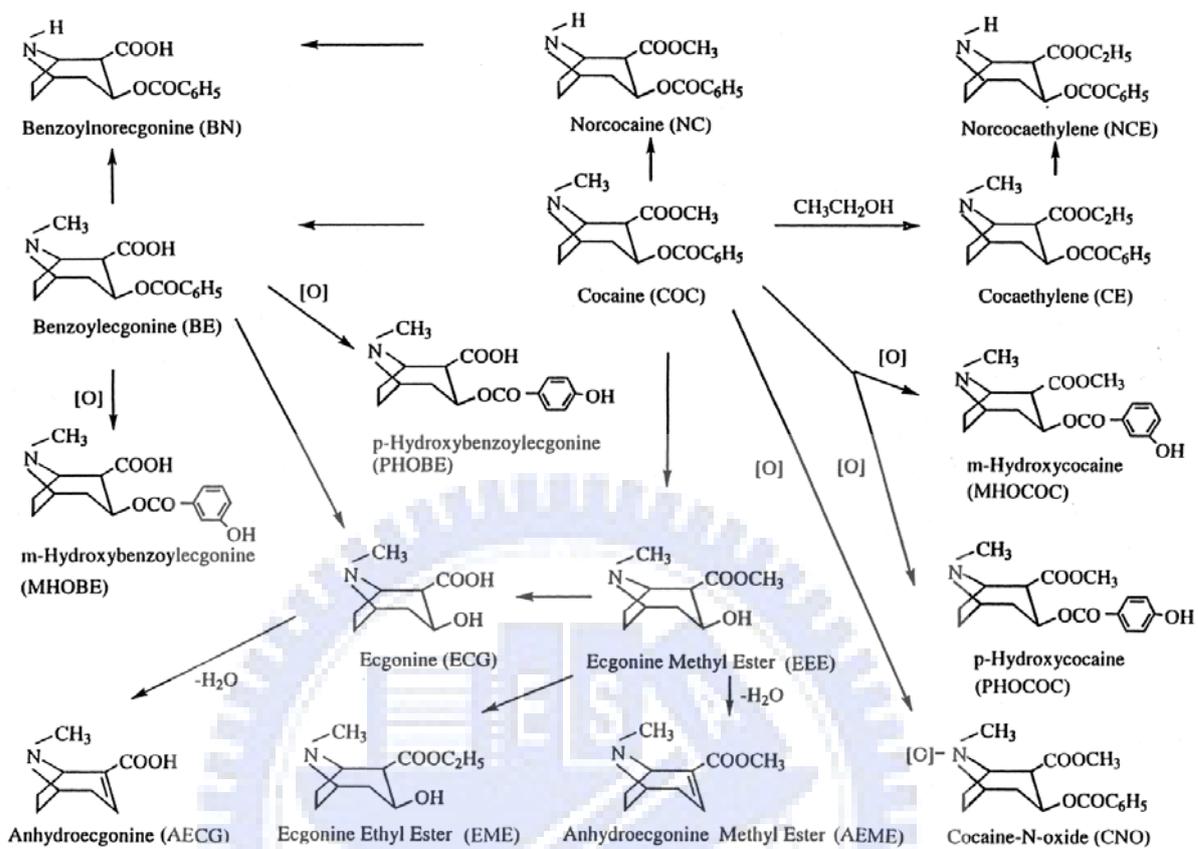


Figure 3.1 The general metabolic pathways of cocaine [56].

四、利用陽離子選擇性全注入結合掃略式線上濃縮法

分析古柯鹼及其代謝物

4.1 線上濃縮方法

本實驗是以陽離子選擇性全注入結合掃略式線上濃縮法分析古柯鹼及其代謝物。首先以不含微胞相的背景緩衝溶液沖提毛細管，爾後注入一段高導電度緩衝溶液，接著以正向電壓電動注入方式長時間導入配製在低導電度基質的陽離子分析物，此時陽離子分析物在外加電場的驅使之下，會快速通過低導電度區帶，而聚集在低導電度與高導電度緩衝溶液的交界處，完成第一次的濃縮。之後轉換負向電壓並將毛細管兩端置於含有陰離子界面活性劑的緩衝溶液當中，此時陽離子分析物因電場吸引力作用會往負極（入口端）移動，而帶負電的微胞則會往正極（出口端）移動，當分析物與微胞接觸時，會受微胞影響並且以較慢的速度往正極方向移動，同時形成第二次濃縮。最後以 MEKC 機制進行分離。

4.2 儀器裝置

以貝克曼公司（Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA）所製造的毛細管電泳儀，P/ACE MDQ 進行實驗，紫外光-可見光光二極體陣列（UV-VIS diode array）做為偵測器，儀器與分析數據由 Beckman Coulter MDQ 32 Karat software 控制與處理；使用之二氧化矽毛細管（fused-silica capillary, Polymicro Technologies Inc., Phoenix, AZ, USA）為內徑 50 μm ，外徑 360 μm ，總長 60 公分（有效長度 50 公分）。毛細管外層塗佈之聚醯亞胺（polyimide）以火焰燒灼 0.2 公分，再以乙醇輕微擦拭燒灼處，去除聚醯亞胺作為偵測窗口。管柱溫度控制在 25 $^{\circ}\text{C}$ 。偵測波長設於分析物最大吸收波長 230 nm。

4.3 藥品與試劑

Cocaine (CC, 1000 ppm in acetonitrile)、benzoylecgonine (BE, 1000 ppm in methanol)、norcocaine-HCl (NC, 1000 ppm in acetonitrile)、cocaethylene (CE, 1000 ppm in acetonitrile) 皆購自 Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA)。甲醇 (Methanol, 99.9%) 購自 Echo 公司 (Miaoli, Taiwan)。鹽酸 (Hydrochloric Acid, 37%)、氫氧化鈉 (Sodium Hydroxide)、氨水 (Ammonium Hydroxide, 33%) 皆購自 Riedel-deHaën (Seelze, Germany) 公司。異丙醇 (Isopropyl Alcohol) 購自 Mallinckrodt 公司 (Phillipsburgh, Nj)。四氫呋喃 (Tetrahydrofuran, 99.7%)、二氯甲烷 (Dichloromethane) 購自 BDH (Poole, Dorset, England) 公司。十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)、磷酸 (Phosphoric Acid, 85.5%) 皆購自 J. T. Baker (Phillipsburgh, Nj) 公司。所有試藥均為分析級。實驗中所用之去離子水是由 Milli-Q 水系統 (Millipore, Miltord, MA, USA) 所提供。

4.4 固相萃取

萃取的目的是希望藉由萃取步驟將樣品中會干擾分析的雜質去除，進而達到純化與濃縮。常用的萃取法有包括固相萃取法 (solid phase extraction, SPE) 和液相萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE)。本實驗所使用的生物檢體為尿液，萃取的方式是固相萃取法，與液相萃取法相比，其優點有：(1) 使用較少的有機溶劑；(2) 縮短樣品前處理時間；(3) 其干擾物較少；(4) 可提高分析物濃度及回收率。固相萃取管管柱內部成分主要為異分子聚合層 (copolymerize phase) 與矽膠凝體 (silica gel)，使管柱同時具有疏水性與離子交換之官能基。在萃取機制方面，藉著調節溶液的酸鹼度值來改變分析物的帶電性，使分析物與填充於管

柱內的物質互相吸附，讓不純物通過管柱，之後以少量適當溶劑沖提所吸附之待測物，藉以達到濃縮及純化樣品之前處理方法。

本實驗所使用的固相萃取管為 Oasis[®] MCX solid phase extraction cartridges (3 cc/60 mg) 購自 Waters 公司 (Milford, MA, USA)，並搭配 Supelco 公司 (Bellefonte, PA, USA) 所生產之 12 port Vacuum Manifold 固相萃取裝置以重力流析方式萃取。

4.5 實驗方法

4.5.1 實驗前、後毛細管的處理

新的毛細管在使用前先以甲醇沖洗 10 分鐘，接著用 1.0 M 鹽酸水溶液沖洗 10 分鐘，再的去離子水沖 5 分鐘去除管壁油污；為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化並達到穩定，再以 1.0 M 之氫氧化鈉水溶液活化管壁 10 分鐘，最後以去離子水沖洗 5 分鐘。

每次的實驗進行之前都先導入不含微胞的背景緩衝溶液 5 分鐘，再以高導電度緩衝溶液沖洗後注入樣品溶液進行分析實驗。完成電泳分離後，使用甲醇沖洗管柱 3 分鐘，接著以去離子水沖洗 7 分鐘，避免因為高濃度界面活性劑吸附管壁而導致毛細管阻塞的現象發生。另外，每日實驗結束前必須依序以甲醇洗 20 分鐘後再用去離子水洗 20 分鐘，徹底清洗毛細管內壁，以延長使用壽命。

4.5.2 標準溶液之配製

cocaine、benzoylecgonine、norcocaine 和 cocaethylene 標準品為各自配製在甲醇或乙腈的溶液，各為 1000 ppm 保存於-4°C 的冰箱中，結構圖如 Figure 4.1。在進行分析實驗時，先將前述母液以去離子水溶液各稀釋至 10 ppm，分析時再依所需濃度以去離子水稀釋。

4.5.3 不同濃縮分離條件的測試

4.5.3.1 溶液 pH 值之影響

溶液的酸鹼度值的改變會影響電滲流的大小，亦會影響分析物的帶電荷數。電滲流大小會影響分析物的移動時間，而分析物帶電荷數則會影響與陰離子界面活性劑微胞親合的效果，進而影響濃縮效率。改變緩衝溶液的 pH 值從 pH 1.8, 2.8, 3.8 至 4.8，觀察緩衝溶液的 pH 值對古柯鹼及其代謝物的濃縮效率之影響。

4.5.3.2 不同比例的有機修飾劑之影響

添加有機溶液會改變分析物在微胞相與溶液相的分配情況，固定 10% 異丙醇 (IPA) 的含量，改變四氫呋喃 (THF) 由 0% 增加至 10%，探討不同比例之有機溶劑對整體的遷移速度和分離效果的影響。其餘分離條件，背景緩衝溶液濃度 (100 mM 磷酸；pH 1.8)，高導電度緩衝溶液 (150 mM 磷酸；pH 1.8) 以壓力 3 psi 注入兩分鐘，分離用緩衝溶液 (100 mM 磷酸；SDS 100 mM，pH 1.8)，樣品濃度為 50 ppb，15 kV 電動注入 900 秒，分離電壓 -20 kV。

4.5.3.3 分離用緩衝溶液含不同濃度 SDS 之影響

藉由改變緩衝溶液中的陰離子界面活性劑之濃度，以瞭解負電微胞數目對濃縮效果之影響，實驗探討分離用緩衝溶液中的 SDS 濃度由 50 mM 至 125 mM。其餘分離條件，背景緩衝溶液濃度 (100 mM 磷酸；10% IPA & 10% THF；pH 1.8)，高導電度緩衝溶液 (150 mM 磷酸；pH 1.8) 以壓力 3 psi 注入兩分鐘，分析物濃度為 cocaine, norcocaine, 及 cocaethylene 25 ppb，benzoylecgonine 50 ppb，樣品注入電壓 15 kV, 900 sec，分離電壓 -20 kV。

4.5.3.4 高導電度緩衝液注入長度

高導電度緩衝溶液區帶長度會影響濃縮效率與分離效率，藉由改變高導電度緩衝液的注入時間，以觀察濃縮效率的變化。實驗探討 150 mM 高導電度緩衝溶液以 3 psi 壓力注入的時間，由 30 秒至 180 秒，對照高導電度緩衝溶液的注入長度分別是 90.65 mm 至 543.9 mm。其餘分離條件，固定背景緩衝溶液濃度（100 mM 磷酸；10% IPA & 10% THF；pH 1.8），分離用緩衝溶液（100 mM 磷酸；10% IPA & 10% THF；pH 1.8）含有 75 mM SDS。分析物濃度為 cocaine, norcocaine, 及 cocaethylene 10 ppb，benzoylecgonine 50 ppb，樣品注入電壓 15 kV, 900 sec，分離電壓 -20 kV。

4.5.3.5 樣品注入時間

延長注入時間可直接增加樣品進入毛細管的量，但是濃縮的效果是有極限的，注射秒數太長會使得樣品區帶過寬無法濃縮，分析物解析度變差甚至造成波峰重疊的現象，因此有一最佳樣品注入量。改變樣品注入時間以探討注入量對解析度與濃縮效率之影響。固定背景緩衝溶液濃度（100 mM 磷酸；10% IPA & 10% THF；pH 1.8），高導電度緩衝溶液（150 mM 磷酸；pH 1.8）以壓力 3 psi 注入兩分鐘，分離用緩衝溶液（100 mM 磷酸；10% IPA & 10% THF；pH 1.8）含有 75 mM SDS，分析物濃度為 cocaine, norcocaine, 及 cocaethylene 10 ppb，benzoylecgonine 50 ppb，改變樣品以 15 kV 電壓注入的時間，由 300 秒到 1200 秒，分離電壓 -20 kV。

4.5.3.6 再現性分析及定量校正曲線

製備 cocaine, norcocaine, 及 cocaethylene 濃度為 0.2-10 ppb，benzoylecgonine 濃度為 1-50 ppb 進行電泳分離實驗，以前述所獲得之最

佳濃縮分離條件進行陽離子選擇性全注入結合掃略式線上濃縮法分析三次。將四種分析物之波峰面積對濃度作圖，得到標準校正曲線。另外再針對分析物遷移時間、波峰積分面積和高度進行再現性比較分析，計算個別之相對標準偏差值 (RSD %)，並計算古柯鹼及其代謝物之偵測極限。以相同條件進行掃掠式線上濃縮法分析五次，樣品濃度範圍為 0.2-5 ppm，製作標準校正曲線，並計算四種分析物的偵測極限，做為與陽離子選擇性全注入結合掃略式線上濃縮法比較之用。

4.5.3.7 尿液樣品之固相萃取步驟

取 2 mL 空白尿液樣品添加 10 ppm 的 cocaine, norcocaine, cocaethylene 各 4 μ L 及 10 ppm 的 benzoylecgonine 20 μ L，首先用 2 mL 甲醇和 2 mL 去離子水沖洗全新的固相萃尿管，接續加入配製好的 2 mL 尿液樣品，之後再用 2 mL 0.1 M 的鹽酸溶液及 3 mL 的甲醇沖洗萃尿管，等萃尿管內溶液完全通過後，以 3 mL 二氯甲烷/異丙醇/氨水體積比為 78/20/2 的混合溶液沖提，最後的沖提液在 40°C 下以氮氣吹乾，乾燥後的物質再以 4 mL 去離子水回溶，以毛細管電泳分離。

4.5.3.8 固相萃取之回收率 (Recovery)

取 2 mL 空白尿液同前述之固相萃取步驟萃取，沖提液以氮氣吹乾，加入標準品 10 ppm 的 cocaine, norcocaine, cocaethylene 各 4 μ L 及 10 ppm 的 benzoylecgonine 20 μ L 後回溶至 4 mL (blank urine)，進入毛細管分離，與空白尿液樣品在萃取前加入標準品 (sample urine) 之分析結果比較，計算波峰面積百分比，運算公式如下

$$Recovery = \frac{Peak Area_{sample\ urine}}{Peak Area_{blank\ urine}} \times 100\% \quad (4-1)$$

4.6 結果與討論

4.6.1 溶液 pH 值之影響

緩衝溶液的 pH 值會影響電滲流的大小，也會影響分析物的帶電性，因為施加反向電壓時，電滲流（往入口端）與負電微胞（往出口端）前進的方向是相反的，所以 pH 值越大，電滲流越大，與微胞結合的分析物的移動時間就會越長。此外，實驗發現當 pH 值高於 1.8 以上時，古柯鹼主要代謝物之一：benzoylecgonine 的高度會大幅減少，因為其分析物隨著 pH 值的增加會慢慢解離為陰電性，不但不利於陽離子選擇性全注入掃略式線上濃縮法，也不利於分析物與 SDS 微胞的結合，會降低訊號高度，同樣也會降低濃縮效率。因此降低緩衝溶液的 pH 值除了可抑制電滲流的產生，也可以使其質子化能力增強，促使分析物帶正電性，增加分析物的進樣量。而且越帶正電性的分析物與負電微胞的作用力越強，可提昇濃縮效率，故選擇以 pH 1.8 的磷酸溶液做為往後實驗的條件。

4.6.2 不同比例的有機修飾劑之影響

添加有機溶劑於緩衝溶液當中可以改變其極性，使分析物在溶液相和微胞相的分配係數有所不同，因而增加分離效率。實驗在完全不含有機溶劑修飾劑之緩衝溶液中，古柯鹼與其代謝物是無法單由界面活性劑做分離，必須添加有機溶劑修飾劑改變分析物在微胞相與溶液相分配情形，以改善分離效果。嘗試過甲醇、乙腈、異丙醇和四氫呋喃四種有機溶劑，皆無法得到有效的分離，最後選擇以共溶劑系統來幫助分離。Figure 4.2 是固定 10% IPA 的含量，改變 THF 含量由 0% 增加至 10%，當完全不添加 THF 時，norcocaine 和 cocaine 是分不開的，隨著 THF 添加量的增加，溶液相與微胞相的疏水性越相似，則分析物停留於溶液相

的時間越長，分離效果也越好，但若再往上增加 THF 含量，會使得分析時間過長，因此最後選擇固定有機修飾劑為 10% IPA 和 10% THF，再調整陰離子界面活性劑的濃度以獲得最佳分離條件。

4.6.3 分離用緩衝溶液含不同濃度 SDS 之影響

本實驗藉由分析物與負電性微胞的作用形成二次濃縮，以增加分析物的訊號強度。陰離子界面活性劑 (SDS) 為負電性微胞，在施加反向電壓的作用下，SDS 會往出口端 (正電極) 方向移動，而電滲流會往入口端 (負電極) 方向移動。因為將 pH 值控制在 1.8，可以抑制電滲流的產生，所以分析物會與 SDS 結合一起往出口端移動。由 Figure 4.3 可瞭解當負電性微胞 SDS 濃度越大時，與帶正電之分析物間的作用力越強，使得滯留因子 (k) 越大， I_{sweep} 就會變得越短，濃縮效率也會更好，且分析物與越多的負電性微胞結合，受到毛細管入口端負電壓排斥影響越大，其移動的速度就越快，移動所需的時間就越短；雖然在高濃度 SDS 的條件下，分析物的濃縮效率會增加，但是當 SDS 濃度過大時，產生的電流也越大，導致在毛細管中層流的變化，焦耳熱效應也越明顯，破壞了解析度。因此在濃縮效率與解析度之間取得平衡，故選擇 SDS 濃度為 75 mM 作最佳條件。

4.6.4 高導電度緩衝液注入長度

導入一段高電導度緩衝液對分離效果沒有絕對的必要性，但是可增加濃縮效率。由 Figure 4.4 發現，隨著高導電度緩衝溶液的注入長度增加，訊號強度越大表示濃縮的效果越好，但是解析度卻下降了，因為長區帶的 HCB 注入會使得有效分離長度變短，因此造成分離效果不佳。所以最後選擇以 3 psi 壓力注入高導電度緩衝溶液 2 分鐘為最佳條件。關於在高導電度緩衝溶液之後注入的一小段水的效果，有許多文獻做相

關的研究[72-74]，其中 Chien 等人指出注入一小段水可在毛細管前端提供一個高電場區域，能幫助樣品堆積，如果沒有這一小段水，樣品會堆積於注入端，使得前端電場強度下降。然而，在本實驗中注入一小段水卻不是必要的，因為在低 pH 值環境之下，毛細管內的電滲流流速小至可以忽略，注入的低導電度樣品溶液亦可提供高電場使樣品進入管內並完成堆積。但是當樣品基質中離子濃度較高時，注入一小段水是有助於維持高電場強度的[23]。

4.6.5 樣品注入時間

一般毛細管電泳實驗之樣品注射時間不能過長，否則會造成樣品區帶變寬，訊號的解析度及分離效率變差；而本實驗是藉由增加電動注入的時間來提高樣品進樣量，並經由濃縮的技術縮短帶寬提昇解析度和降低偵測極限。但是在增加注入時間以提高進樣的考量之外，還必須顧慮到分析物在陽離子選擇性全注入掃略式線上濃縮法的濃縮極限，當進樣量超過了濃縮極限，再加長注入時間並不會增加濃縮效率，反而會使得積分面積增加，但高度卻不再增加，導致訊號變寬、解析度及分離效率變差。由 Figure 4.5 注入時間對分析物高度的折線圖可以發現從 600 秒到 900 秒訊號高度急劇地增加，而從 900 秒到 1200 秒所增加的幅度則趨於平緩，因此再考慮濃縮效果與實驗整體所需時間之後，選擇電動注入樣品時間為 900 秒作最佳條件。

4.6.6 樣品濃縮效果與放大倍率

由 Figure 4.6 (A) 所示，在 CSEI-sweeping-MEKC 所探討的最佳分離濃縮條件（背景緩衝溶液為 pH 1.8、100 mM 磷酸含有 10% 異丙醇和 10% 四氫呋喃，高電導度緩衝溶液為 pH 1.8, 150 mM 磷酸，分析物以去離子水稀釋，15 kV 電壓注入 900 秒，樣品濃度 cocaine, norcocaine, cocaethylene

為10 ppb，benzoylecgonine為50 ppb，分離用緩衝溶液pH 1.8、100 mM磷酸含有75 mM SDS和10%異丙醇和10%四氫呋喃，施加-20 kV分離電壓) 之下，與傳統MEKC (Figure 4.6 (B) 100 ppm，0.5 psi壓力注入3秒，分離條件為pH 1.8、100 mM磷酸含有75 mM SDS和10%異丙醇和10%四氫呋喃，分離電壓-20 kV) 及sweeping-MEKC模式 (Figure 4.6 (C) 5 ppm，0.5 psi壓力注入120秒，分離條件為pH 1.8、100 mM磷酸含有75 mM SDS和10%異丙醇和10%四氫呋喃，分離電壓-20 kV) 比較，可以看出CESI-sweeping-MEKC能有效地濃縮低濃度的樣品溶液。

以波峰高度訊號之堆積效率(stacking efficiency in term of peak height, SE_{height}) 來計算放大倍率。

$$SE_{\text{height}} = \frac{h_{\text{stack}}}{h} \times \frac{C}{C_{\text{stack}}} \quad (4-2)$$

h_{stack} : 為使用線上濃縮技術後所得的分析物波峰高度

h : 為一般層析法所得的分析物波峰高度

C_{stack} : 為使用線上濃縮技術時，所使用的分析物濃度

C : 為一般層析法所使用的分析物濃度

經計算之後從 Table 4.1 得到 cocaine, norcocaine 與 cocaethylene 於 CSEI-sweeping-MEKC 模式的放大倍率與傳統 MEKC 模式比較均在 20,600 倍之上，而進樣量較少的 benzoylecgonine 亦有 1,750 倍左右；而古柯鹼及其代謝物在 CSEI-sweeping-MEKC 模式的放大倍率與 sweeping 比較中，也有近 1,000 倍的訊號放大。

4.6.7 再現性分析及定量校正曲線

在最佳分離條件下，重複三次實驗，針對四種分析物的遷移時間、積分面積和訊號高度作觀察，如 Table 4.2 所示。四種分析物的遷移時間相對標準偏差(RSD%) 均小於 4.71%；積分面積相對標準偏差與訊號

高度相對標準偏差值較大的關係可能是因為 CSEI-sweeping-MEKC 是利用長時間的電動注入[23, 24]，造成樣品面積跟高度的偏差值會比一般傳統 MEKC 模式以壓力注入的偏差值來的大，若使用內標準品則可以有效改善遷移時間、積分面積和訊號高度再現性差的問題。

將四種分析物以去離子水稀釋配製成不同濃度後，以最佳分離條件實驗，並且製作積分面積對濃度的校正曲線圖，校正曲線之線性方程式如 Table 4.2 所示，線性相關係數 (r^2) 介於 0.9958~0.9994 之間，表示線性關係良好。與 sweeping-MEKC 比較，雖然遷移時間與高度的再現性較差，但使用上述實驗方法之最佳分離濃縮條件所得到的偵測極限 ($S/N=3$) 在 29.71 ~236.2 ppt 之間，比 sweeping-MEKC 之偵測極限低兩到三個級數。

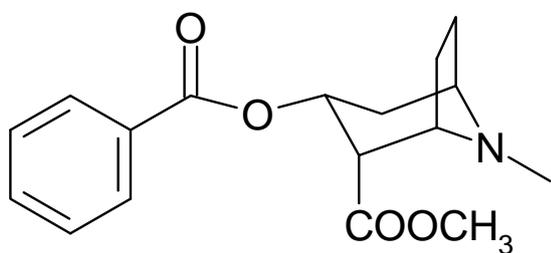
4.6.8 尿液樣品偵測與回收率之計算

在 Figure 4.7 中為比較空白尿液萃取後不添加古柯鹼及其代謝物的層析圖與樣品尿液萃取後的層析圖，本實驗透過固相萃取前處理步驟除去基質干擾，再配合陽離子選擇性全注入掃略式線上濃縮法，便能順利看到分析物的訊號。以相同的萃取步驟（參照 4.5.3.7 節）重複五次，做五組空白尿液（blank urine）與樣品尿液（sample urine）的比較，帶入公式 (4-1) 計算回收率，cocaine 及其代謝物 norcocaine, cocaethylene, benzoylecgonine 的回收率分別為 74.9%, 77.5%, 75.5%, 和 87.6%。

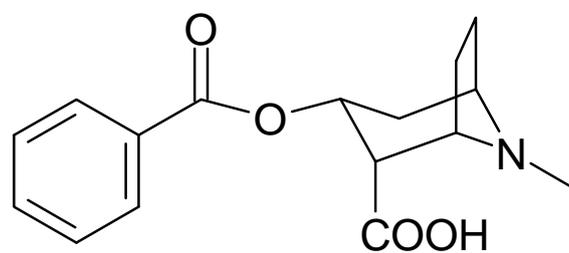
4.7 結論

本實驗利用陽離子選擇性全注入結合掃略式線上濃縮法 (CSEI-sweeping-MEKC)，針對古柯鹼及其代謝物進行線上濃縮的研究，並且藉由固相萃取的前處理，成功地在尿液基質中看見古柯鹼及其代謝物的訊號。此線上濃縮法最大特色是結合了兩種濃縮技術，首先以場放大樣品電動注入陽離子分析物，利用分析物在不同電導度的溶液區帶間會產生電場強度的差異，而造成堆積，達成第一步濃縮，然後再以陰離子界面活性劑溶合分析物作第二步的掃掠式濃縮，最後再依 MEKC 分離機制進行分離。

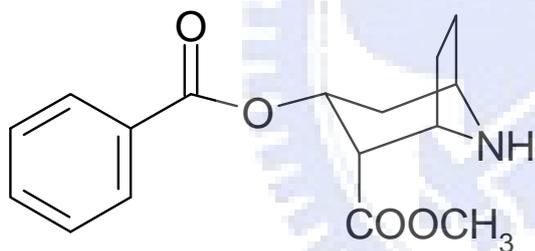
最佳條件為，背景緩衝溶液為 pH 1.8、100 mM 磷酸含有 10% 異丙醇和 10% 四氫呋喃，高電導度緩衝溶液為 pH 1.8, 150 mM 磷酸，分析物以去離子水稀釋，15kV 電壓注入 900 秒，分離用緩衝溶液 pH 1.8、100 mM 磷酸含有 75 mM SDS 和 10% 異丙醇和 10% 四氫呋喃，施加 -20 kV 分離電壓進行濃縮分離，偵測極限在 29.71 ~ 236.2 ppt 之間，古柯鹼的放大倍率也有 30,000 倍。在尿液樣品方面，藉由固相萃取的前處理步驟可以清楚地看到古柯鹼及其代謝物的訊號，回收率則介於 74.9~87.6% 之間。



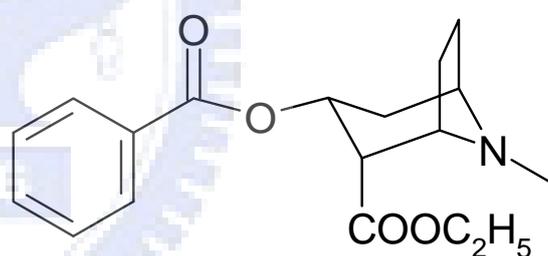
cocaine (CC)



benzoylecgonine (BE)



norcocaine (NC)



cocaethylene (CE)

Figure 4.1 The structures of cocaine and its metabolites.

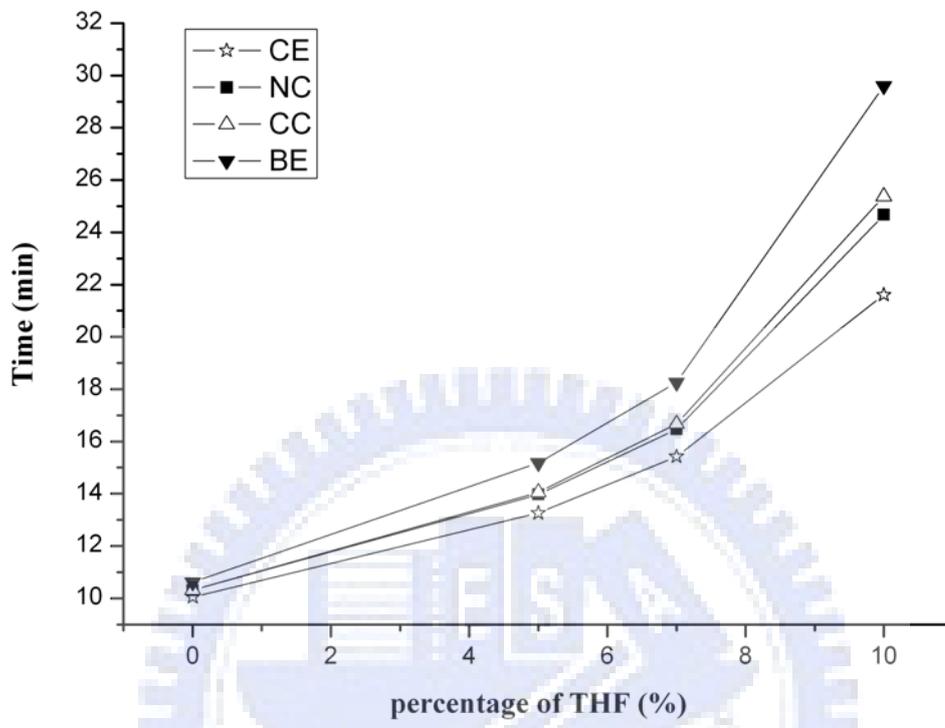


Figure 4.2 Effect of the percentage of THF on CSEI-sweeping-MEKC.

Condition, BGS: 100 mM phosphoric acid, pH 1.8; HCB: 150 mM phosphoric acid; SB: 100 mM phosphoric acid, 100 mM SDS; electrokinetic injection 15 kV, 900 sec; separation voltage: -20 kV. Analyte: CE 50 ppb; NC 50 ppb; CC 50 ppb; BE 50 ppb.

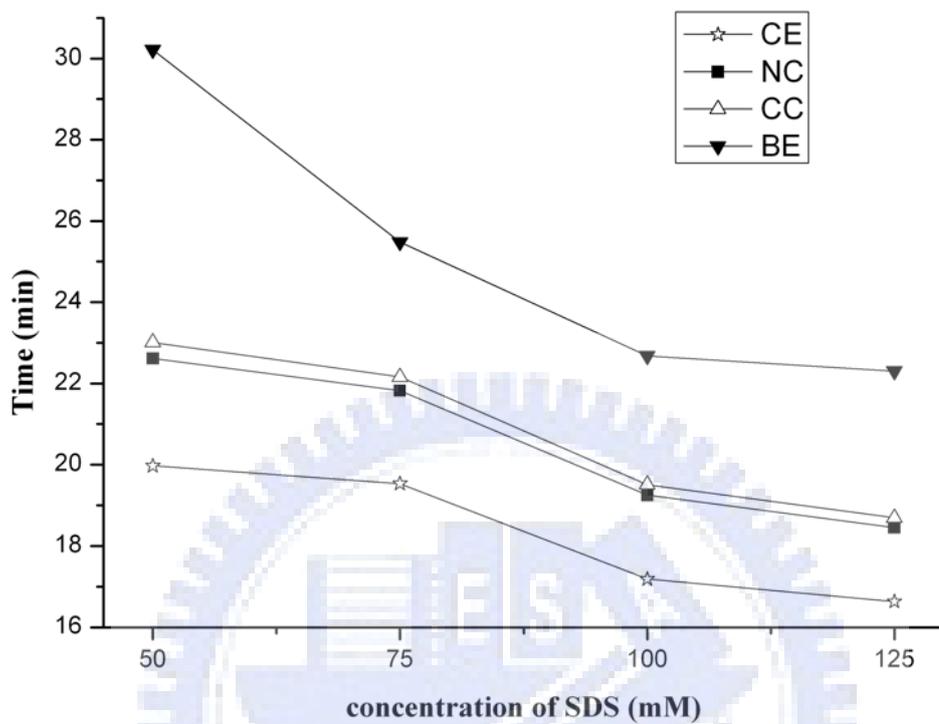


Figure 4.3 Effect of the concentration of SDS in separation buffer.

Condition, BGS: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, pH 1.8 ; HCB: 150 mM phosphoric acid; SB: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF; electrokinetic injection 15 kV, 900 sec; separation voltage: -20 kV. Analyte: CE 25 ppb; NC 25 ppb; CC 25 ppb; BE 50 ppb.

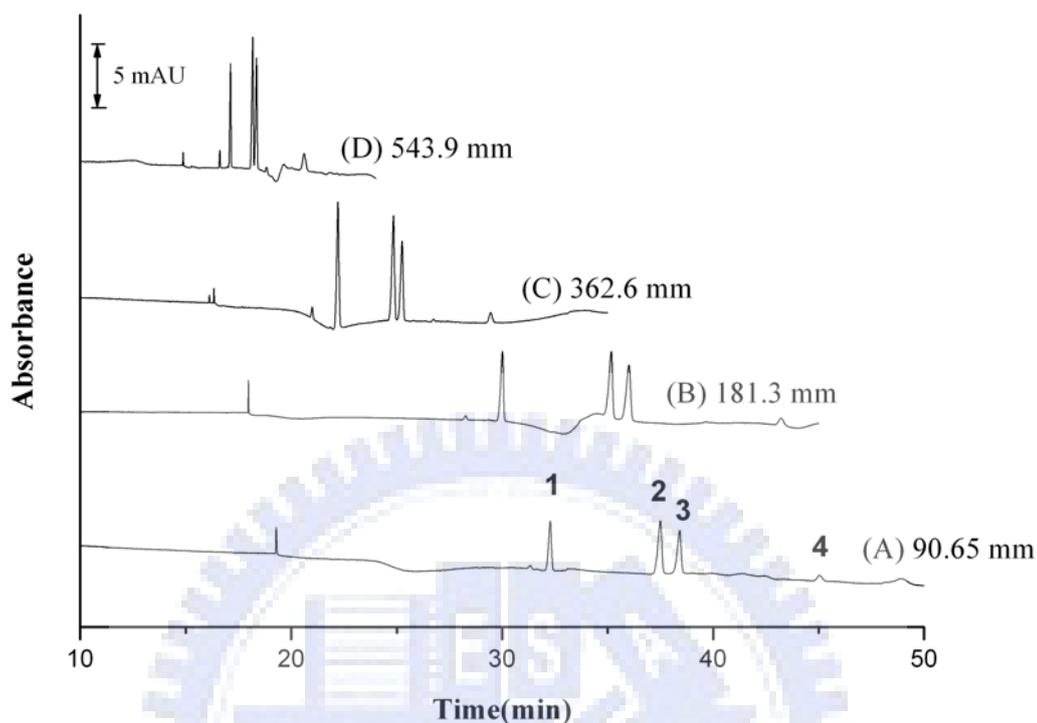


Figure 4.4 Effect of hydrodynamic injection length of high conductivity buffer.

(A) 90.65 mm; (B) 181.3 mm; (C) 362.6 mm; (D) 543.9 mm.

Condition, BGS: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, pH 1.8; HCB: 150 mM phosphoric acid; SB: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, 75 mM SDS; electrokinetic injection 15 kV, 900 sec; separation voltage: -20 kV; Analyte: peak 1, CE 10 ppb; peak 2, NC 10 ppb; peak 3, CC 10 ppb; peak 4, BE 50 ppb.

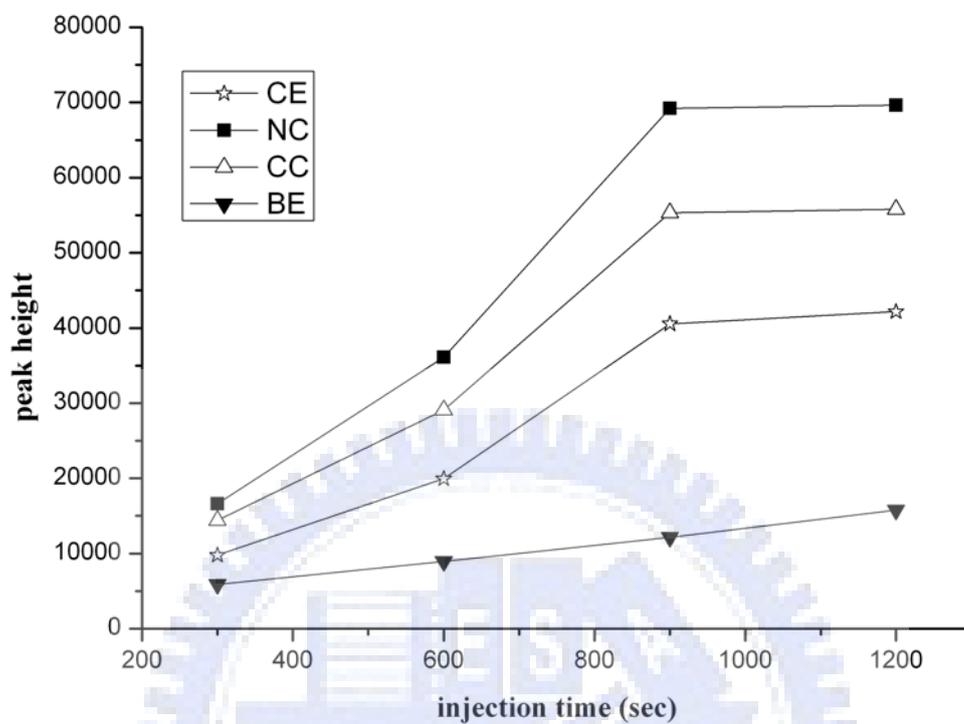


Figure 4.5 Effect of electrokinetic injection time.

Condition, BGS: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, pH 1.8; HCB: 150 mM phosphoric acid; SB: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, 75 mM SDS; electrokinetic injection 15 kV; separation voltage: -20 kV. Analyte: CE 10 ppb; NC 10 ppb; CC 10 ppb; BE 50 ppb.

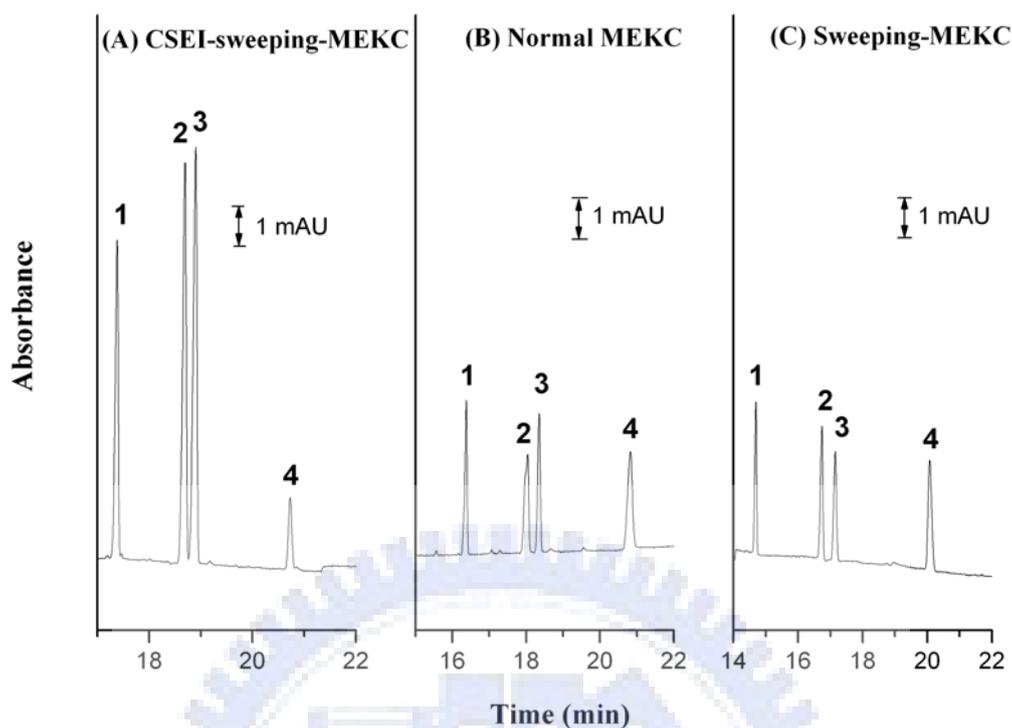


Figure 4.6 A comparison between CSEI-sweeping-MEKC, sweeping-MEKC and normal MEKC. (A) CSEI-sweeping-MEKC. Condition, BGS: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, pH 1.8; HCB: 150 mM phosphoric acid; SB: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, 75 mM SDS; electrokinetic injection 15 kV, 900 sec; separation voltage: -20 kV. Analyte: peak 1, CE 10 ppb; peak 2, NC 10 ppb; peak 3, CC 10 ppb; peak 4, BE 50 ppb. (B) Normal MEKC. Sample concentration: 100 ppm; hydrodynamic inject: 0.5 psi, 3s. Separation condition: 100 mM phosphoric acid, 10% IPA&10% THF, 75 mM SDS; separation voltage : -20 kV. (C) Sweeping-MEKC. Sample concentration: 5 ppm; hydrodynamic inject: 0.5 psi, 120s. The separation condition was the same as normal MEKC.

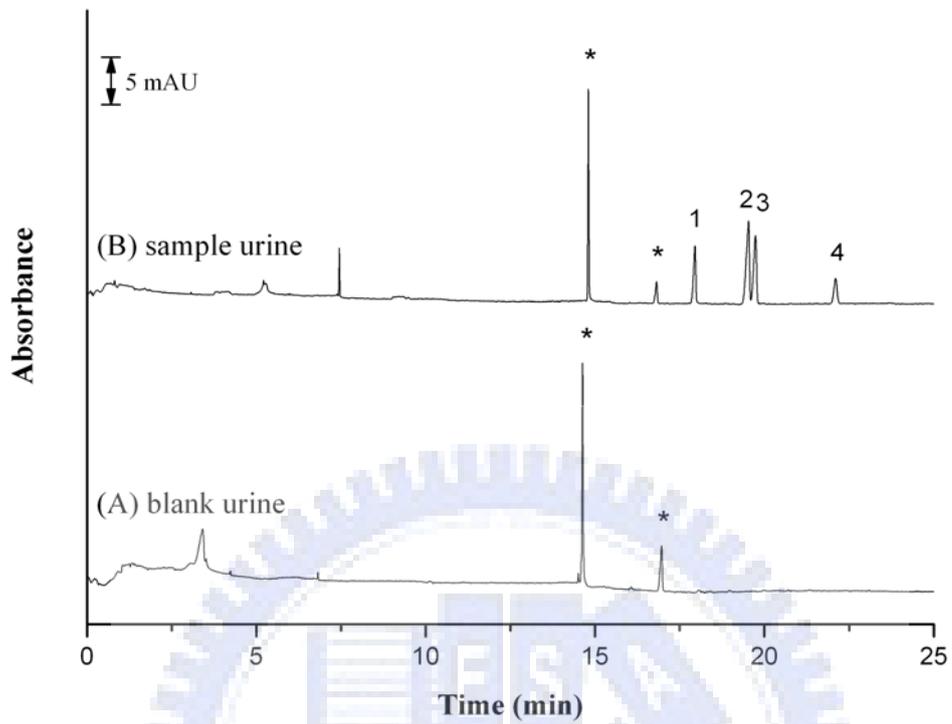


Figure 4.7 CSEI-sweeping-MEKC electropherogram of extraction urine. (A) blank urine, (B) sample urine. Analyte: peak 1, CE 10 ppb; peak 2, NC 10 ppb; peak 3, CC 10 ppb; peak 4, BE 50 ppb; *, unknown.

Table 4.1 Stacking efficiency in term of peak height

Compound	SE_{height}^a	SE_{height}^b
cocaethylene	20,600	1,030
norcocaine	39,600	1,390
cocaine	30,000	1,740
benzoylecgonine	1,750	81

^a peak height(CSEI-sweeping-MEKC)/ peak height(normal MEKC) \times dilution factor

^b peak height(CSEI-sweeping-MEKC)/ peak height(sweeping-MEKC) \times dilution factor



Table 4.2 Regression equation, Coefficient of variation (r^2), limits of quantization (LOQ), limits of detection (LOD), and values of RSD for cocaine, benzoylecgonine, norcocaine, and cocaethylene during separation using sweeping-MEKC and CSEI-sweeping-MEKC technique, respectively.

	cocaethylene	norcocaine	cocaine	benzoylecgonine
sweeping-MEKC				
Regression equation	^a $y = 568.56x + 58.08$	^a $y = 829.65x + 79.33$	^a $y = 709.39x + 46.29$	^a $y = 1113x + 111.77$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9989$	$r^2 = 0.9992$	$r^2 = 0.9994$	$r^2 = 0.9992$
LOD(S/N = 3, ppb; n = 5)	52.78	39.74	50.33	33.45
LOQ(S/N = 10, ppb; n = 5)	175.9	132.5	167.8	111.5
RSD(%; n = 5)				
(a) Migration time (min)	1.76	2.09	2.14	2.43
(b) Peak area	6.85	6.42	8.57	4.66
(c) Peak height	7.47	6.52	6.55	2.18
CSEI-sweeping-MEKC				
Regression equation	^b $y = 2891.99x - 417.7$	^b $y = 4323.52x - 590.05$	^b $y = 3164.89x - 444.18$	^c $y = 164.01x + 48.46$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9989$	$r^2 = 0.9994$	$r^2 = 0.9980$	$r^2 = 0.9958$
LOD(S/N = 3, ppt; n = 3)	42.21	29.71	36.71	236.2
LOQ(S/N = 10, ppt; n = 3)	140.7	99.04	122.4	787.2
RSD(%; n = 3)				
(a) Migration time (min)	3.37	3.96	4.06	4.71
(b) Peak area	10.7	8.38	11.1	4.06
(c) Peak height	15.9	11.9	15.9	9.98

^a Calibration line (0.2 – 5 ppm): peak area (arbitrary units) = slope × concentration (ppm) + y-intercept

^b Calibration line (0.2 – 10 ppb): peak area (arbitrary units) = slope × concentration (ppb) + y-intercept

^c Calibration line (1 – 50 ppb): peak area (arbitrary units) = slope × concentration (ppb) + y-intercept

五、大麻類藥物

5.1 大麻之性狀與藥理作用

大麻植物自古以來就是用來製繩及紡織的纖維原料，中國古代名醫華佗曾使用大麻樹脂調製而成的「麻沸散」作全身麻醉之用，而印度及阿拉伯亦有以大麻作醫療用途之記錄。大麻為雌雄異株灌木，二者均含有會影響中樞神經系統的 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) 成分。吸食大麻會有陶醉感，Marijuana 是由葡萄牙文的 Mariguango 語彙演變而來的，有令人陶醉的意思，在美國稱「Marijuana」者是泛指大麻植物的任何部位或抽提物，均會使人感覺興奮及放鬆、改變對時間的認知、缺乏專注力、學習能力與記憶受損，嚴重時會產生妄想與幻覺[75]。在大麻植物中最富藏的三種成分有大麻酚 (Cannabinol)、大麻二酚 (Cannabidiol) 及四氫大麻酚 (Tetrahydrocannabinol) 的異構物。其中，四氫大麻酚的異構物中具有大麻大部份之精神性作用的化學成分為 Δ^9 -THC，主要作用於中樞神經系統及心臟血管系統，現今在我國大麻為第二級管制藥品（毒品），每年吸食案例依舊不斷地在增加中。

5.2 大麻在體內的吸收與代謝

大麻植物通常經乾燥、剝碎並混入香菸中，其濫用的方式以抽吸為主，大麻燃燒後，其所含 THC 約有 60% 轉為焦油。抽吸大麻煙後，原型 Δ^9 -THC 的可用率由 2~50% 不等，含 2% Δ^9 -THC 的大麻煙一克，約有 0.4~10 毫克進入循環。通常在開始抽吸後幾分鐘內即發生作用，於 7~10 分鐘達到血中濃度高峰，於 20~30 分鐘內會產生明顯生理上的反應，一根大麻煙的主要作用很難維持超過 3 小時。

Δ^9 -THC 在體內很快會轉變為仍具活性的代謝物 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH)，其作用與 Δ^9 -THC 相似，最後會代謝

成為極化、無活性的代謝物 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-glucuronide (THC-COOH glucuronide) 以共軛型態出現，所以在檢驗尿液樣品時，需作去共軛的處理步驟還原成 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) [76]，完整代謝途徑如 Figure 5.1。大麻在尿液中的濃度隨著時間增加而相對下降，並快速分布於末梢脂肪組織而進行緩慢代謝，半衰期約為 30 小時。 Δ^9 -THC 及代謝物在人體血液中維持數天甚至一周後，仍可從尿液中偵測到。

5.3 大麻之相關檢測技術

有很多方法可檢測人體體液中大麻及其代謝物的含量[77]。以層析法為例，有薄層色析法 (Thin-layer Chromatography, TLC) [78]、氣相層析質譜儀 (gas chromatography/ mass spectrometry, GC/MS) [79-84]和液相層析質譜儀 (high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) [85-88]；以非層析法為例，主要是免疫分析技術 (immunoassays) [89-91]。在以上的方法中，GC/MS 是最常被使用於毒品分析的檢測技術，其缺點是分析前需要衍生較為耗時，所以不適用於大量樣品的分析。而毛細管電泳的優點為分離效率高與分析時間短，但受限於毛細管的光徑短，利用紫外光吸收光譜法作偵測時，無法有效降低偵測極限，為了克服此缺點，便發展出線上樣品濃縮技術，不必改變儀器設備，在毛細管電泳中搭配簡單的紫外光偵測器就能降低偵測極限和增加靈敏度。

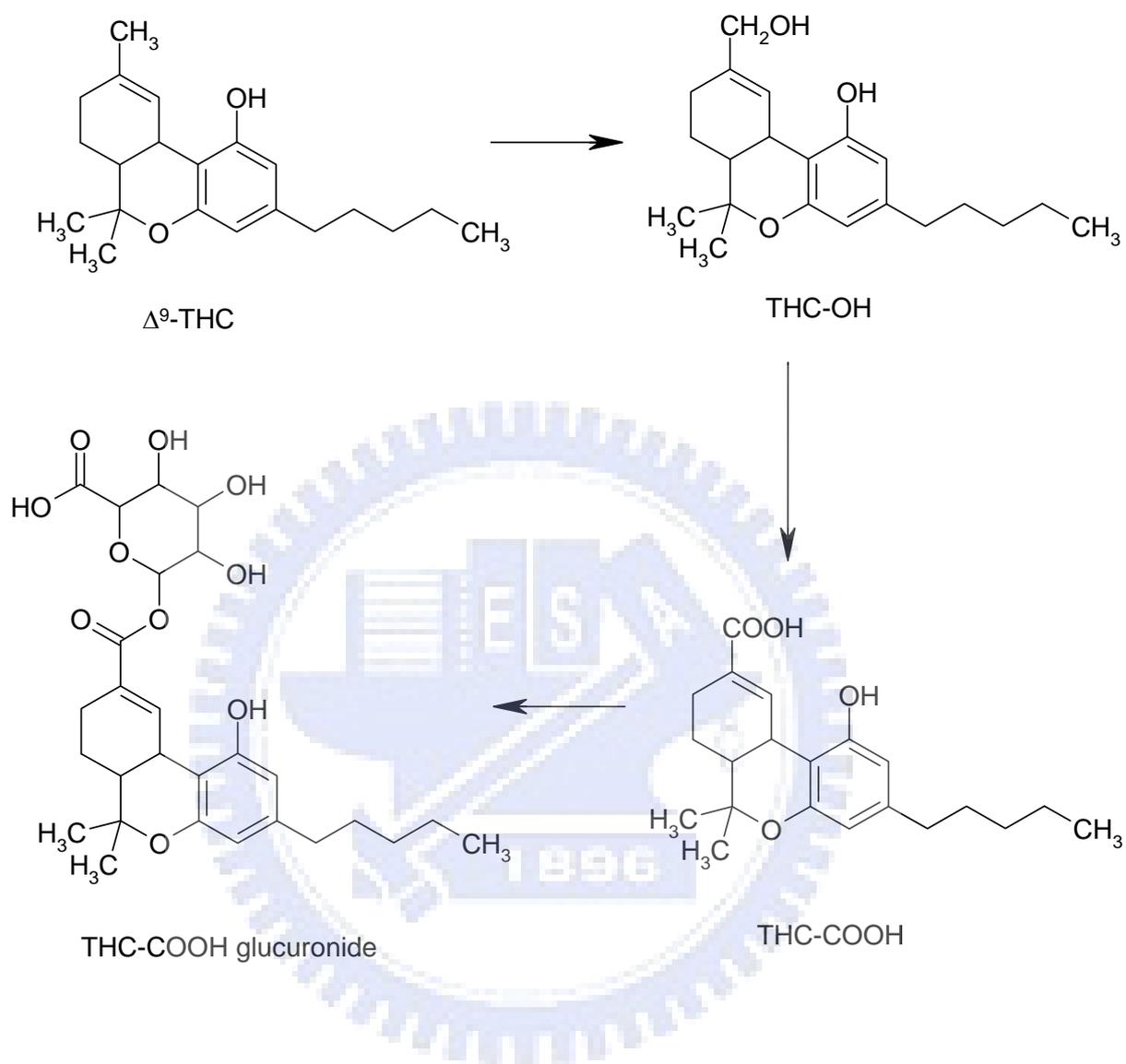


Figure 5.1 The general metabolic pathways of THC.

六、利用掃掠式線上濃縮法分析大麻及其代謝物

6.1 線上濃縮方法

毛細管電泳是近年來相當受到重視的分析技術，但受限於毛細管光徑太短，搭配使用 UV 吸收光譜儀時，往往會有靈敏度差，無法降低偵測極限的問題，而樣品線上濃縮技術是解決方法之一，不必額外增設或變換任何儀器，是一種既簡單、方便又經濟的方式。其原理是增加樣品的進樣量，透過不同的方式將樣品聚集濃縮，以提高樣品在毛細管中的濃度並縮短樣品區帶長度，達到高靈敏度和低偵測極限的目的。

本實驗利用陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮分析大麻及其代謝物，其機制為：將毛細管內充滿含有 SDS 的酸性緩衝溶液，酸鹼度值必須小於 3 用以抑制電滲流，再以壓力注入一大段和緩衝溶液離子強度相近但不含 SDS 的樣品溶液，爾後將毛細管兩端置換成含有 SDS 的酸性緩衝溶液，並施加負向電壓，最後管柱入口端的微胞會在電場的吸引下，進入管柱並往偵測器方向移動，在此方法中，分析物的移動是藉由停留於微胞內部的疏水端，利用微胞受電極吸引，而使分析物與微胞一起向前移動。實驗兩個主要的變因是電滲流與 SDS 的濃度，當電滲流越小時，分析物與微胞的接觸時間越長，而影響電滲流的主要變因是緩衝溶液的 pH 值。當 SDS 濃度增加時，分析物的滯留因子亦隨之增加，而增加濃縮效率。

6.2 儀器裝置

以貝克曼公司 (Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA) 所製造的毛細管電泳儀，P/ACE MDQ 進行實驗，紫外光-可見光二極體陣列 (UV-VIS diode array) 作為偵測器，儀器與分析數據由 Beckman Coulter MDQ 32 Karat software 控制與處理；使用之二氧化矽毛細管(fused-silica

capillary, Polymicro Technologies Inc., Phoenix, AZ, USA) 為內徑 50 μm , 外徑 360 μm , 總長 60 公分 (有效長度 50 公分)。毛細管外層塗佈之聚醯亞胺 (polyimide) 以火焰燒灼 0.2 公分, 再以乙醇輕微擦拭燒灼處, 去除聚醯亞胺作為偵測窗口。管柱溫度控制在 25 $^{\circ}\text{C}$ 。偵測波長設於分析物最大吸收波長 210 nm。

6.3 藥品與試劑

甲醇 (Methanol, 99.9%) 購自 Echo 公司 (Miaoli, Taiwan)。鹽酸 (Hydrochloric Acid)、氫氧化鈉 (Sodium Hydroxide) 皆購自 Riedel-deHaën 公司 (Seelze, Germany)。十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)、磷酸 (Phosphoric Acid, 85.5%)、冰醋酸 (Glacial acetic acid) 皆購自 J. T. Baker 公司 (Phillipsburgh, Nj)。單水檸檬酸 (Citric acid monohydrate) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)。磷酸氫二鈉 (Disodium hydrogen phosphate anhydrous) 由 Fluka (Buchs, Switzerland) 所購買。氫氧化鉀 (Potassium hydroxide) 購自 Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。正己烷 (Hexane) 購自 BDH 公司 (Poole, Dorset, England)。乙酸乙酯 (Ethyl acetate) 從 Grand Chemical Co. (Bangkok, Thailand) 購入。Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC, 1000 ppm in methanol)、11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH, 100 ppm in methanol)、11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-OH, 1000 ppm in methanol) 皆購自 Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA)。所有試藥均為分析級。實驗中所用之去離子水是由 Milli-Q 水系統 (Millipore, Milford, MA, USA) 所提供。

6.4 實驗方法

6.4.1 實驗前、後毛細管的處理

新的毛細管在使用前先以甲醇沖洗 10 分鐘，接著用 1.0 M 鹽酸水溶液沖洗 10 分鐘，再的去離子水沖 5 分鐘去除管壁油污；為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化並達到穩定，再以 1.0 M 之氫氧化鈉水溶液活化管壁 10 分鐘，最後以去離子水沖洗 5 分鐘。

每次的實驗進行之前都先以含有界面活性劑的緩衝溶液潤洗管柱 5 分鐘，壓力注入不含界面活性劑的樣品溶液，之後將毛細管兩端置換成含有界面活性劑的緩衝溶液，施加負向電壓，等到完成電泳分離，使用去離子水沖洗管柱 3 分鐘，避免界面活性劑吸附管壁的現象發生。另外，每日實驗結束前必須依序以甲醇洗 20 分鐘後再用去離子水洗 20 分鐘，徹底清洗毛細管內壁，以延長使用壽命。

6.4.2 標準溶液之配製

THC、THC-COOH 和 THC-OH 母液標準品配製在甲醇中，濃度分別為 1000 ppm、100 ppm 和 1000 ppm 保存於 -4°C 的冰箱中，結構圖如 Figure 6.1。三種標準樣品以 25 mM 緩衝溶液/甲醇 (80:20, v/v) 配製成濃度 10 ppm 的儲備標準溶液，並置於 4°C 冰箱保存，分析時，將此儲備溶液以 25 mM 之緩衝溶液稀釋至分析實驗所需的濃度。緩衝溶液是由檸檬酸和磷酸氫二鈉以去離子水配製而成的。

6.4.3 不同濃縮分離條件的測試

6.4.3.1 緩衝溶液中甲醇含量之影響

加入有機溶劑會改變緩衝溶液的性質，改變分析物在溶液相與微胞相之間的分配情況。實驗探討緩衝溶液中甲醇含量 30 %、40 % 和 50 % 對分析物的移動時間和分離效率的影響。其餘分離條件為 25mM 單水

檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液 (pH 2.6) 含有 75 mM SDS，標準品濃度為 5 ppm 以 0.5 psi 壓力注入 120 秒，外加分離電壓為 -20 kV。

6.4.3.2 緩衝溶液 SDS 濃度之影響

藉由增加緩衝溶液中陰離子界面活性劑 SDS 含量以了解負電微粒數目對濃縮效果及分離效率之影響。因此固定緩衝溶液為 25mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉 (pH 2.6) 含有 40 % 甲醇，改變其中的 SDS 濃度，由 50 mM 到 100 mM，標準品濃度為 5 ppm 以 0.5 psi 壓力注入 120 秒，外加分離電壓為 -20 kV。

6.4.3.3 緩衝溶液 pH 值之影響

改變緩衝溶液 pH 值會影響電滲流的速度，也會影響分析物的帶電性，為了使分析物之性質更易與負電微粒結合，因此探討 25mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液的 pH 值從 2.6、3.6 到 4.6 對分析物的移動時間與濃縮效率之影響。固定緩衝溶液為 25mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉含有 75 mM SDS 和 40 % 甲醇，標準品濃度為 5 ppm 以 0.5 psi 壓力注入 120 秒，外加分離電壓為 -20 kV。

6.4.3.4 樣品注入時間之影響

固定以 0.5 psi 壓力注入樣品，延長注入時間可直接增加樣品進入毛细管的量，標準品濃度為 1 ppm，改變注入時間由 180 秒、300 秒到 420 秒，探討注入量對解析度與濃縮效率之影響。固定緩衝溶液為 25mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉含有 75 mM SDS 和 40 % 甲醇，外加分離電壓為 -20 kV。

6.4.3.5 樣品濃縮效果與再現性分析

取三種標準樣品以 25 mM 緩衝溶液/甲醇 (80:20, v/v) 配製成濃度 10 ppm 的儲備溶液，將儲備溶液以 25 mM 之緩衝溶液稀釋成 0.1 ppm、1 ppm、3 ppm、4 ppm 和 5 ppm 等五種濃度，樣品以 0.5 psi 壓力注入 300 秒，以前述所獲得之最佳濃縮分離條件進行掃掠式線上濃縮法分析五次，將大麻及其代謝物之波峰面積對濃度作圖，製備標準校正曲線。另外再針對分析物遷移時間、波峰積分面積和高度進行再現性分析，並計算個別之相對標準偏差值 (RSD%)，以及大麻與其代謝物之偵測極限。

以相同的最佳分離條件進行毛細管電泳 MEKC 模式分析五次，樣品濃度為 80 ppm，以 0.5 psi 壓力注入 3 秒，作為與掃略式線上濃縮法比較濃縮效率之用。

6.4.3.6 尿液樣品之固相萃取步驟

本實驗所使用的固相萃取管為 Bond Elut Certify (10 cc/300 mg) 購自 Varian 公司，並搭配 Supelco 公司 (Bellefonte, PA, USA) 所生產之 12 port Vacuum Manifold 固相萃取裝置，以 Eyela (Tokyo, Japan) 公司所生產的 A-3S 型水噴射幫浦進行萃取。

固相萃取之尿液樣品製備方法為取 3 mL 空白尿液添加 100 ppm 的 THC、THC-COOH 和 THC-OH 各 20 μ L，再加入 300 μ L 10 M 氫氧化鉀，於 60 $^{\circ}$ C 之下進行水解反應 15 分鐘，將尿液中的 THC-COOH glucuronide 還原成 THC-COOH 之後，溶液自然冷卻至室溫，加入 400 μ L 冰醋酸和 3 mL 50 mM 磷酸，調整其酸鹼度為 4 到 5 之間，即完成樣品製備。固相萃取管先用 2 mL 甲醇和 2 mL 50 mM 磷酸沖洗活化，接續加入配製好的尿液樣品，再用 9 mL 50 mM 磷酸及 5 mL 50 mM 磷酸/

methanol (70:30, v/v) 依序加入沖洗萃取管，等溶液完全通過之後，以 15 英寸汞柱抽乾 10 分鐘，最後以 3 mL 正己烷/乙酸乙酯(80:20, v/v) 的混合溶液沖提，沖提液於 40 °C 下以氮氣吹乾，乾燥後的物質再以 400 μ L 的 25 mM 緩衝溶液/甲醇 (80:20, v/v) 回溶，方能使用掃掠式線上濃縮法進行分析。

取 3 mL 空白尿液以上述之固相萃取步驟操作，沖提液以氮氣吹乾後，加入 100 ppm 的 THC、THC-COOH 和 THC-OH 各 20 μ L，再以 25 mM 緩衝溶液/甲醇 (80:20, v/v) 回溶至 400 μ L，做為空白尿液 (blank urine)，與在萃取前加入樣品的尿液 (sample urine) 比較，計算波峰面積後帶入公式 (4-1) 計算回收率。



6.5 結果與討論

6.5.1 緩衝溶液中甲醇含量之影響

在微胞電動層析法中，常會加入有機修飾劑來改變緩衝溶液的性質，減少分析物在微胞相的分配比例，增加疏水性分析物於溶液相中的分配比例，進而改善分離效率。由 Figure 6.2 看出，當緩衝溶液中加入 30% 甲醇時，尚無法有效地分離三種分析物，而當緩衝溶液中甲醇量到 40% 時，三種分析物可以完全被分離，主要是因為隨著緩衝溶液中的甲醇濃度提高時，溶液相與微胞相的疏水性越相似，分析物越容易停留於溶液相中，會增加分離效率，改善解析度。若再繼續提高緩衝溶液中的甲醇濃度至 50%，則會產生濃縮效率降低與移動時間增加的缺點，因為分析物往出口端移動的動力是藉由與陰離子界面活性劑 (SDS) 結合後，SDS 受出口端電極吸引作用所影響而移動的，所以當甲醇量過高，分析物於溶液相中的分配比例增加，會降低與 SDS 的作用力，導致分析物的 k 值 (滯留因子, retention factor) 下降，移動速度變慢，增加移動時間，並降低濃縮效率。所以選擇在緩衝溶液中添加 40% 甲醇為最佳條件。

6.5.2 緩衝溶液 SDS 濃度之影響

微胞電動層析法的實驗中，在 pH 3 以上的環境裡，當外加電場時，會產生一電滲流由正極端往負極端移動；SDS 為陰離子型界面活性劑，是負電性的微胞，在外加電場的作用下，表面的負電荷受正極端吸引，而由負極端往正極端方向移動，故負電性微胞與電滲流遷移方向相反。在本實驗中，控制緩衝溶液在低於 pH 3 的環境裡，可以抑制電滲流的產生，使電滲流值趨近於零，此時，微胞的遷移速度會大於電滲流的速度，並且施加反向電壓，所以分析物與微胞結合之後會一起往出口端的

正電極方向移動。在 Figure 6.3 中，SDS 濃度由 50 mM、75 mM 至 100 mM，隨著 SDS 濃度的增加，分析物的訊號高度也跟著增加，由式(2-8)得知，分析物的疏水性越強或界面活性劑 SDS 的濃度越高，滯留因子 (k) 越大， I_{sweep} 就會變得越短，表示濃縮的效果越好。雖然在高濃度界面活性劑的條件下，分析物的濃縮效率會增加，但是卻破壞了訊號解析度，而且在低 pH 值的緩衝溶液中，SDS 較不易解離，於高濃度時容易吸附在毛細管管壁上，降低了訊號再現性。所以最佳條件選擇 SDS 濃度為 75 mM。

6.5.3 緩衝溶液 pH 值之影響

如 4.6.1 節所提到，緩衝溶液的 pH 值會影響電滲流大小，也會影響分析物的帶電性，因為電滲流（往入口端）與微胞（往出口端）前進的方向相反，所以 pH 值越小，電滲流越小，而與微胞結合的分析物的移動時間就會越短，如 Figure 6.4 所示，在緩衝溶液為 pH 2.6 的環境中，分析物移動時間最短且具有較平穩的基線，所以選擇 pH 2.6 的緩衝溶液為最佳條件。

6.5.4 樣品注入時間之影響

一般毛細管電泳實驗之樣品注射時間在 10 秒之內，若注射時間過長，會造成樣品區帶變寬，使得分析物之波峰解析度與分離效率變差。而掃掠式線上濃縮法是注入長秒數的樣品溶液，藉由微胞的遷移對分析物造成堆積濃縮，進而達到降低偵測極限的目的。由 Figure 6.5 所示，增加注射秒數由 180 秒、300 秒至 420 秒並進行討論。在 180 秒到 300 秒之間，波峰高度隨著注射秒數增加而增加，但當注射時間大於 300 秒時，THC 和 THC-COOH 波峰高度的增加效果並不明顯，而且 THC-OH 高度不再增加，波峰也開始變寬，因為進樣量已經到達了掃掠式線上濃

縮法的濃縮極限，而且當樣品注射時間太長時，會造成毛細管後端有效分離長度太短、分析物波峰變寬、波峰高度不再增加，甚至波峰重疊現象，所以樣品注射秒數有限制，必須選擇濃縮效率最大又可以完全分離的注射秒數，故選擇注射時間 300 秒為最佳條件。

6.5.5 樣品濃縮效果與再現性分析

就如 Figure 6.6 所示，在最佳條件（pH 2.6、25 mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液、75 mM SDS、甲醇含量 40 %）下，比較注入高濃度短秒數（Figure 6.6 (A) 80 ppm, 3 s）與低濃度長秒數（Figure 6.6 (B) 1 ppm, 300 s）的訊號高度，由圖可以看出 sweeping-MEKC 模式能有效地濃縮低濃度的分析物，其堆積效率（stacking efficiency, SE_{height} ）經由式（4-2）計算後，THC、THC-COOH 和 THC-OH 的放大倍率分別為 77 倍、139 倍、199 倍。

為確定陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮技術是否具再現性，在最佳分離條件下重複進行五次實驗，以觀察分析物的移動時間、波峰面積與波峰高度，並針對分析物的積分面積與濃度作定量校正曲線。在 Table 6.1 中，三種分析物的移動時間相對標準偏差都小於 0.39 %，表示本實驗移動時間的再現性良好。定量校正曲線線性方程式如 Table 6.1 所示，線性相關係數（ r^2 ）介於 0.9977 至 0.9989 之間，顯示線性關係良好。以掃掠式線上濃縮法分析大麻及其代謝物的偵測極限（S/N=3）為 3.87~15.2 ppb 之間。

6.5.6 尿液樣品之固相萃取與回收率之計算

Figure 6.7 是比較空白尿液萃取後不添加大麻及其代謝物的層析圖與樣品尿液萃取後的層析圖，圖中標記星號的訊號為萃取後依舊存在的尿液基質，但是透過固相萃取前處理的步驟已經可以除去尿液中絕大部

分的基質干擾，配合掃掠式線上濃縮法，便能在尿液中看見大麻及其代謝物的訊號。以相同的萃取步驟重複五次（參照 6.4.3.6 節），做五組空白尿液 (blank urine) 與樣品尿液 (sample urine) 的比較，帶入公式 (4-1) 計算回收率，THC、THC-COOH 和 THC-OH 的回收率分別為 53.7 %、63.6 % 和 83.9 %。

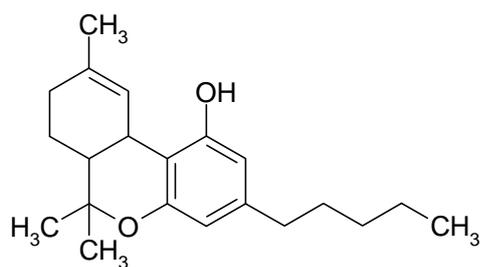


6.6 結論

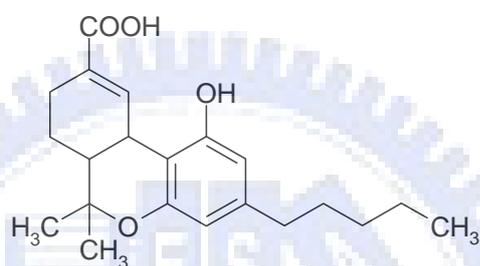
本實驗成功地應用陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮法，對大麻及其兩種主要代謝物進行線上濃縮的研究。此方法的最大特色是使用低 pH 值緩衝溶液使電滲流速度降低，利用微胞移動速度大於電滲流，將分析物堆積在樣品區帶與緩衝溶液交界處，形成樣品濃縮並進行分離。

在本實驗中，是將分析物配製於相同離子強度的檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液中，分離用緩衝溶液裡添加 SDS，並以有機修飾劑改變緩衝溶液的性質，進行研究與討論。在此方法中，因為分析物結構相似，與 SDS 的作用力大小也非常接近，所以難以分離，需於緩衝溶液中添加甲醇，改變溶質的滯留因子 (k)，當甲醇濃度越大時，會增加解析度，但亦會增加移動時間，降低濃縮效率。微胞濃度對濃縮也有影響，SDS 濃度越大，濃縮效率越好，但 SDS 濃度太高時可能會破壞解析度或吸附在毛細管管壁上，使得再現性變差。除此之外，緩衝溶液的 pH 值和樣品注入時間的長短也是影響濃縮效率的變因。

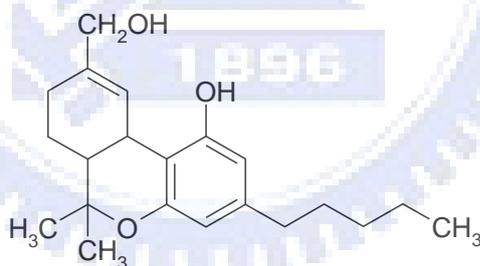
最佳條件為 pH 2.6 的 25 mM 單水檸檬酸/磷酸氫二鈉緩衝溶液，含有 75 mM SDS 和 40 % 的甲醇，外加分離電壓為 -20 kV，樣品以 0.5 psi 注入 300 秒。使用掃掠式線上濃縮法分析大麻及其代謝物的偵測極限在 3.87~15.2 ppb 之間。在尿液樣品方面，使用固相萃取法 (SPE) 作樣品前處理，可以成功地在尿液基質中看見大麻及其代謝物的訊號。



THC



THC-COOH



THC-OH

Figure 6.1 The structures of THC and its metabolites.

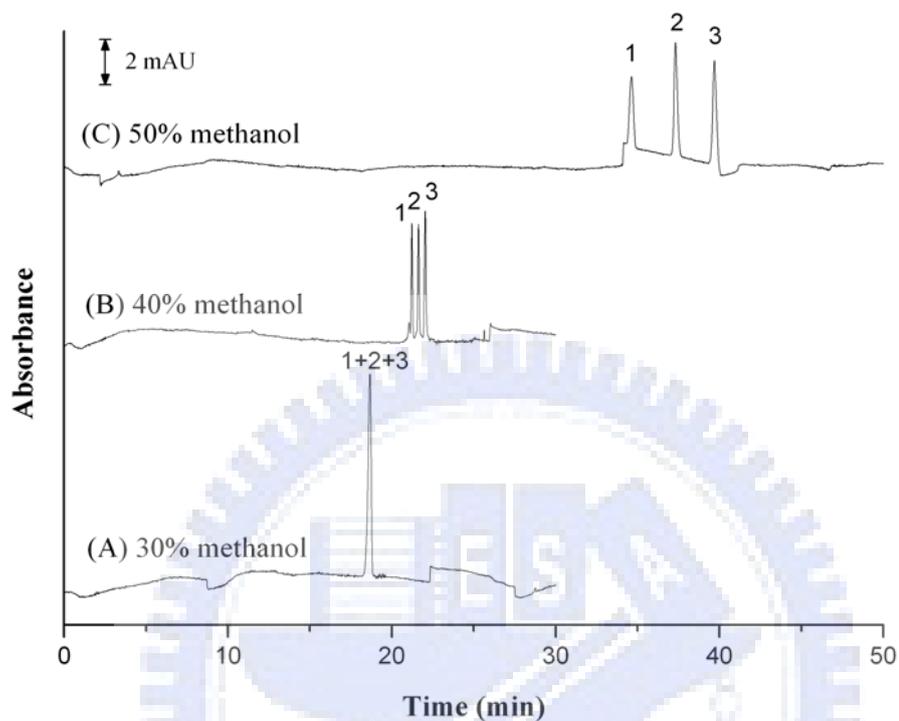


Figure 6.2 Effect of proportion of methanol in running buffer.

(A) 30 % methanol; (B) 40 % methanol; (C) 50 % methanol.

Separation buffer, 75mM SDS in 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer at pH 2.6; injection pressure, 0.5 psi; injection time, 120 sec; separation voltage: -20 kV; Analyte 5 ppm: peak 1, THC; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH.

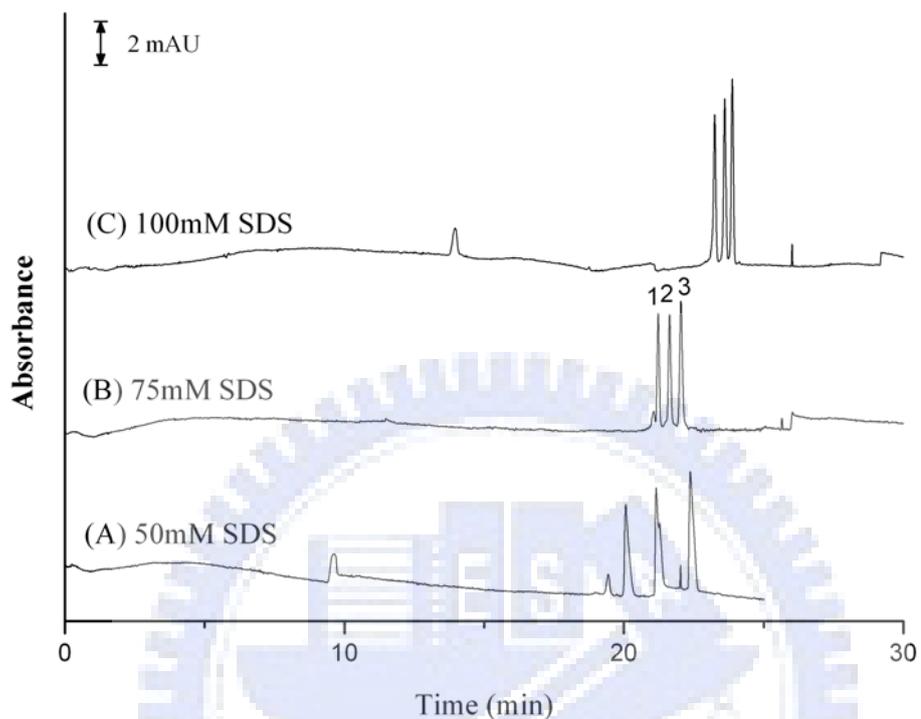


Figure 6.3 Effect of the concentration of SDS in running buffer.

(A) 50 mM SDS; (B) 75 mM SDS; (C) 100 mM SDS.

Separation buffer, 40 % methanol in 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer at pH 2.6; injection pressure, 0.5 psi; injection time, 120 sec; separation voltage: -20 kV; Analyte 5 ppm: peak 1, THC; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH.

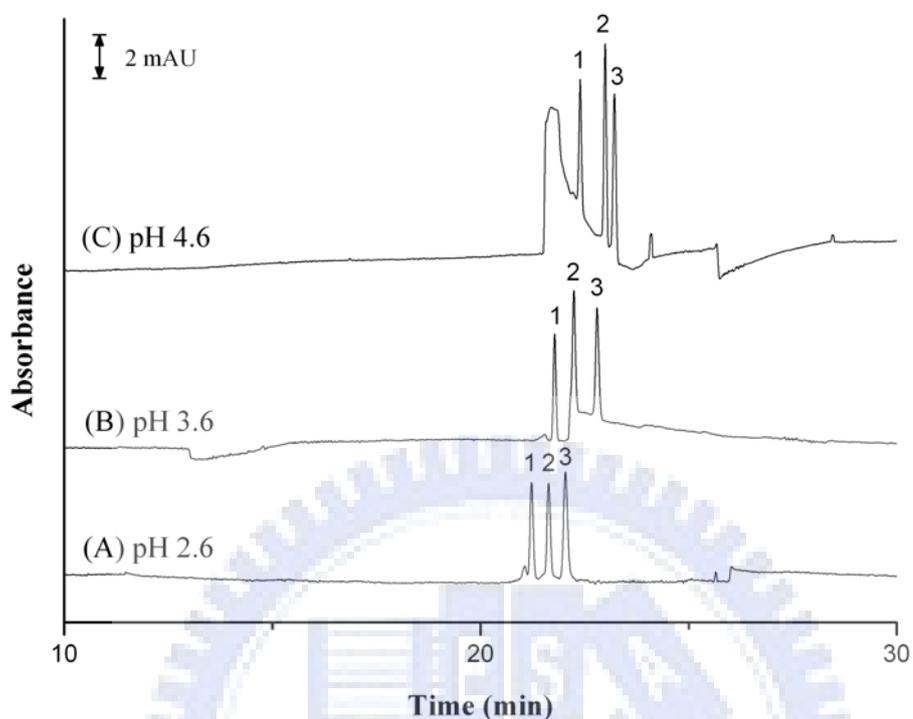


Figure 6.4 Effect of the pH of running buffer.

(A) pH 2.6; (B) pH 3.6; (C) pH 4.6.

Separation buffer, 75mM SDS, 40% methanol in 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer; injection pressure, 0.5 psi; injection time, 120 sec; separation voltage: -20 kV; Analyte 5 ppm: peak 1, THC; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH.

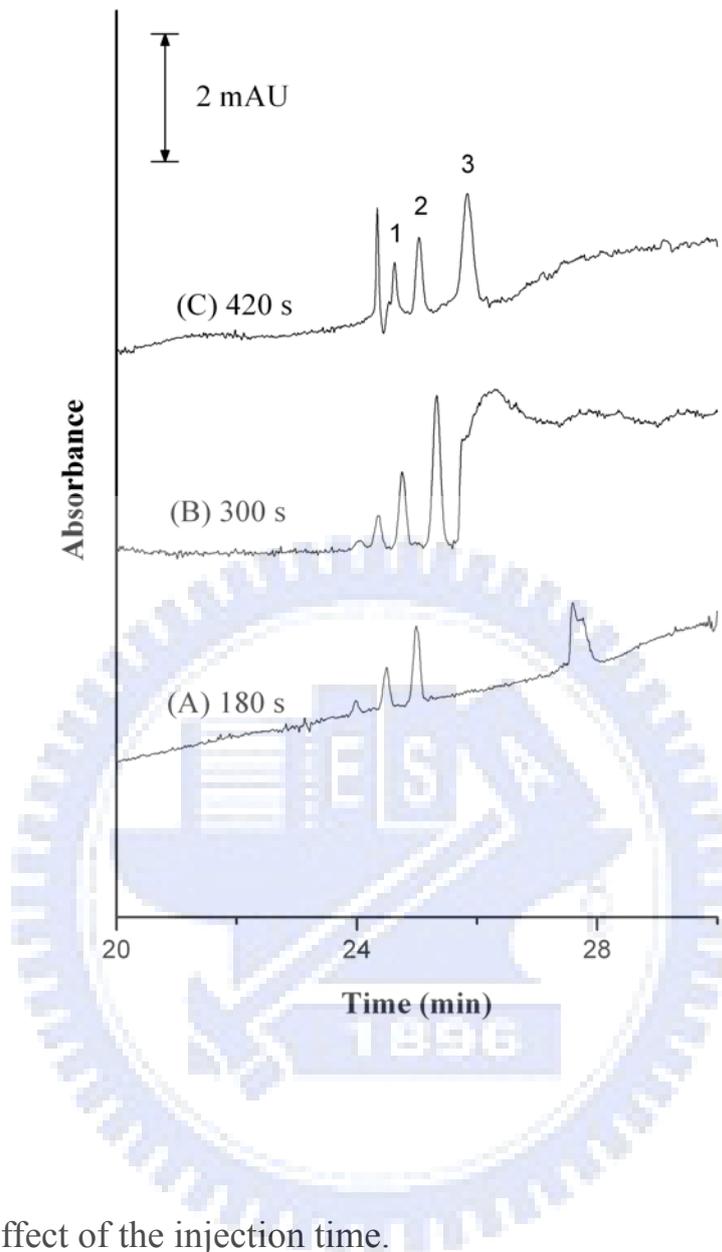


Figure 6.5 Effect of the injection time.

(A) 180 s; (B) 300 s; (C) 420 s.

Separation buffer, 75mM SDS, 40% methanol in 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer at pH 2.6; injection pressure, 0.5 psi; separation voltage: -20 kV; Analyte 1 ppm: peak 1, THC; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH.

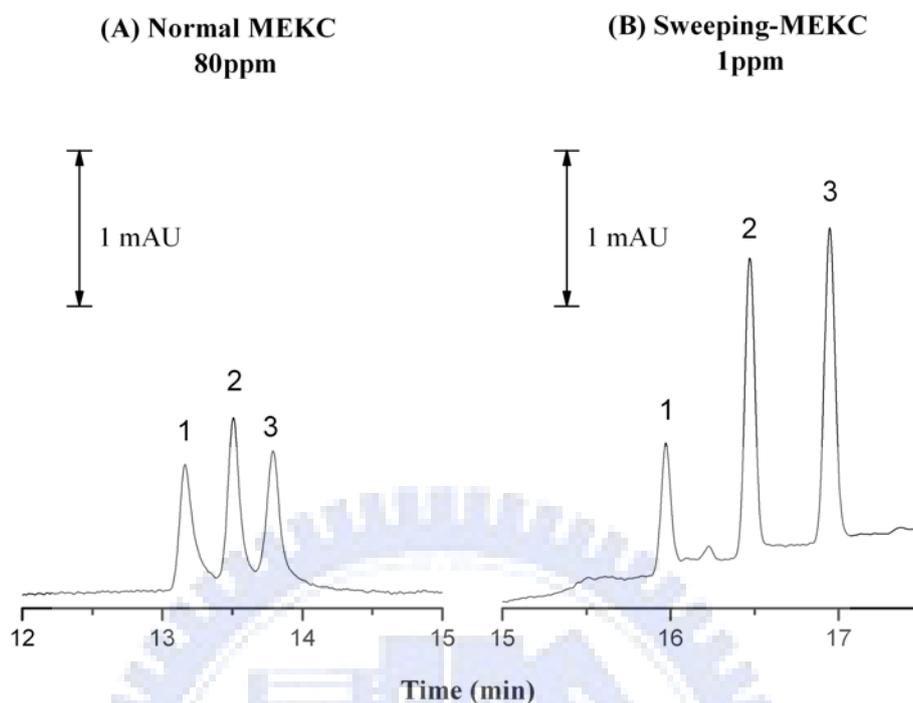


Figure 6.6 A comparison between sweeping-MEKC and normal MEKC.

(A) Normal MEKC. Sample concentration: 80 ppm; hydrodynamic inject: 0.5 psi, 3s. Separation condition: 75mM SDS, 40% methanol in 25 mM citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer at pH 2.6; separation voltage: -20 kV;
 (B) Sweeping-MEKC. Sample concentration: 1 ppm; hydrodynamic inject: 0.5 psi, 300s. The separation condition was the same as normal MEKC. Analyte: peak 1, THC; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH.

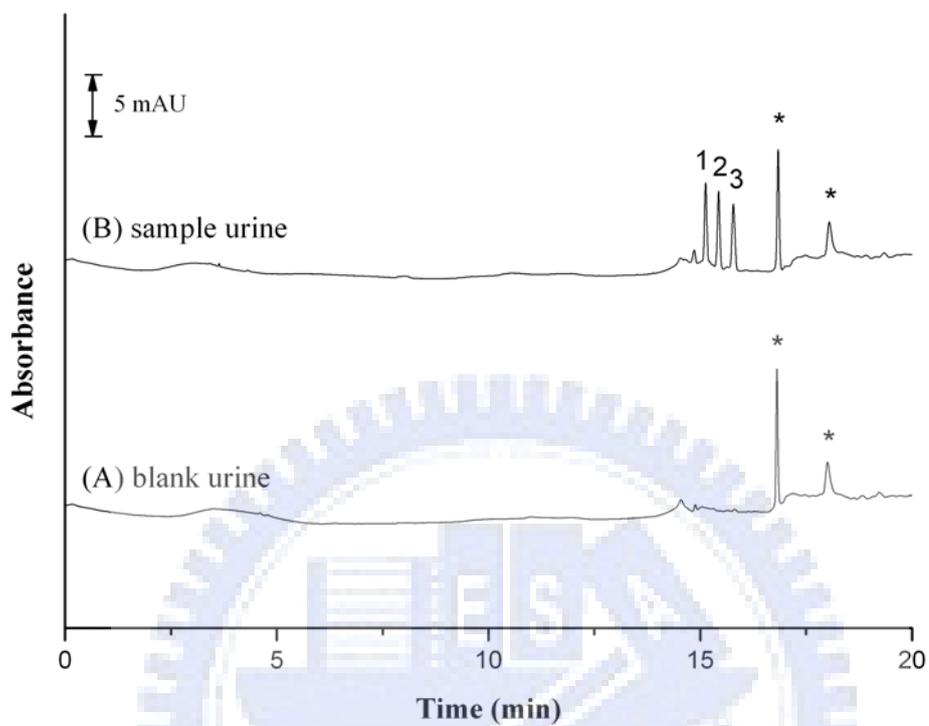


Figure 6.7 Sweeping-MEKC electropherogram of extraction urine. (A) blank urine, (B) sample urine. Analyte 5 ppm: peak 1, THC ; peak 2, THC-COOH; peak 3, THC-OH; *, unknown.

Table 6.1 Regression equation, Coefficient of variation (r^2), limits of quantization (LOQ), limits of detection (LOD), the values of RSD for THC, THC-COOH, and THC-OH, and sensitivity enhancement during separation using sweeping-MEKC.

	THC	THC-COOH	THC-OH
<u>sweeping-MEKC</u>			
Regression equation	^a $y = 37369x - 6736.5$	^a $y = 48914x + 1618.9$	^a $y = 56058x + 4003.2$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9977$	$r^2 = 0.9979$	$r^2 = 0.9989$
LOD(S/N = 3, ppb; n=5)	15.2	5.64	3.87
LOQ(S/N = 10, ppb; n=5)	50.6	18.8	12.9
RSD(%; n = 5)			
(a) Migration time	0.26	0.34	0.39
(b) Peak area	8.07	3.96	4.57
(c) Peak height	10.4	4.01	4.01
^b sensitivity enhancement	77	139	199

^a Calibration line (0.1 – 5 ppm): peak area (arbitrary units) = slope × concentration (ppm) + y-intercept

^b peak height(sweeping-MEKC)/ peak height(normal MEKC)×dilution factor

七、結論

本實驗已成功地利用陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法分析古柯鹼及其代謝物，放大倍率在 1,750 倍到 39,600 倍之間；另外，藉由掃掠式線上濃縮法分析大麻及其代謝物亦有不錯的效果。配合固相萃取法去除基質干擾後，便可成功應用於尿液樣品上。我們可從實驗中得到以下結論：

(一) pH 值的影響

緩衝溶液的 pH 值會影響電滲流大小，亦會影響分析物帶電性。在濃縮技術的設計上，有些方法會受限於電滲流或是分析物電性而無法進行，或導致濃縮效果變差。例如：利用陰離子界面活性劑進行掃掠式線上濃縮時，因為電滲流與微胞移動方向相反，pH 值越大，電滲流越大，分析物與微胞接觸時間變少，濃縮效果就不佳；而陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法則適用於帶正電的分析物，pH 值提高使得分析物不利於帶正電荷，就不利於此濃縮技術的樣品電動注入法，導致分析物進入毛細管的量減少，同樣的降低了濃縮效率。

(二) 有機修飾劑的影響

進行線上濃縮時，如果分析物性質相似，而無法有良好的分離效率時，可以在緩衝溶液中添加有機修飾劑來改變溶液的極性。在緩衝溶液中添加一定比例有機修飾劑會改變分析物在溶液相與微胞相的分配情況，增加分析物停留在溶液相的時間，改善分離效果，但有機溶液濃度越高時，分析物的移動時間也越長，濃縮效率也越差，所以需要在分離效率與濃縮效率之間取得一個最佳點。

(三) 緩衝溶液的 SDS 濃度

增加 SDS 濃度可以增加與分析物之間的作用，提高分析物的滯留因子 (k)，使得濃縮效率增加，但是當 SDS 濃度過高時，產生的焦耳熱會破壞毛細管中的層流，破壞了解析度，或因為在酸性緩衝溶液中溶解度不佳而吸附管壁上，造成毛細管損害。

(四) 樣品注射時間

分析物注射時間越長，所得的濃縮效率會越高，若注射長度過長，會超過濃縮極限，使得分析物波峰變寬，波峰高度不再增加的現象，造成解析度及分離效率變差。所以樣品的注射時間有一定的限制，必須選擇濃縮效率最大又可完全分離的注射秒數。

使用線上濃縮技術來降低偵測極限，提高靈敏度，是最簡單也最經濟的方法，不需要增設或改變任何儀器設備。本篇論文中介紹了許多種線上濃縮法，但每一種線上濃縮法所要求的條件、所能降低的偵測極限與所能提高的濃縮效率都不盡相同，必須根據分析物的性質挑選最適合的濃縮技術，並適度的變化調整實驗參數，以求得最佳分析圖譜。

八、參考資料

1. Tiselius, A. *Trans. Faraday. Soc.* **1937**, 33, 524-531
2. Hjertén, S. *Chromatogr. Rev.* **1967**, 6, 122
3. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298-1302
4. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111-113
5. D. N. Heiger 著，高效毛細管電泳導論，劉虎威、朱濤、卜一工和祁世澤譯，惠普公司出版，民國九十一年
6. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, P. E. M. *J Chromatogr.* **1979**, 169, 11
7. Chien, R.-L.; Helmer, J. C. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1354-1361
8. Burgi, D. S.; Chien, R.-L. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2042-2047
9. Burgi, D. S.; Chien, R.-L. *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 306
10. Locke, S.; Figeys, D. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2684-2689
11. Chen, Y.-L.; Jong, Y.-J.; Wu, S.-M. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1119, 176-182
12. Chien, R.-L.; Burgi, D. S. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1046-1050
13. He, S.; Zhao, Y.; Zhu, Z.; Liu, H.; Li, M.; Shao, Y.; Zhuang, Q. *Talanta* **2006**, 69, 166-171
14. Hadwiger, M. E.; Torchia, S. R.; Park, S.; Biggin, M. E.; Lunte, C. E. *J. Chromatogr. B* **1996**, 681, 241-249
15. Hoque, M. E.; Arnett, S. D.; Lunte, C. E. *J. Chromatogr. B* **2005**, 827, 51-57
16. Zhao, Y.; Lunte, C. E. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3985-3991
17. Shihabi, Z. K. *J. Chromatogr. A* **2000**, 902, 107-117
18. Beckers, J. L.; Boček, P. *Electrophoresis* **2000**, 21, 2747-2767
19. Osbourn, D. M.; Weiss, D. J.; Lunte, C. E. *Electrophoresis* **2000**, 21, 2768-2779
20. Quirino, J. P.; Terabe, S. *Scisece* **1998**, 282, 465-468
21. Quirino, J. P.; Terabe, S. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1638-1644

22. Quirino, J. P.; Kim, J.-B.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2002**, 965, 357-373
23. Quirino, J. P.; Terabe, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1023-1030
24. Isoo, K.; Terabe, S. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6789-6798
25. Kim, J.-B.; Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2001**, 932, 129-137
26. Zhu, L.; Tu, C.; Lee, H. K. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5820-5825
27. Kim, J.-B.; Okamoto, Y.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1018, 251-256
28. Lin, C.-H.; Kaneta, T. *Electrophoresis* **2004**, 25, 4058-4073
29. Wey, A. B.; Thormann, W. *J. Chromatogr. A* **2001**, 924, 507-518
30. Liu, S.; Li, Q.; Chen, X.; Hu, Z. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3392-3397
31. Lichtenberg, J.; Verpoorte, E.; de Rooij, N. F. *Electrophoresis* **2001**, 22, 258-271
32. Li, J.; Wang, C.; Kelly, J. F.; Harrison, D. J.; Thibault, P. *Electrophoresis* **2000**, 21, 198-210
33. Shiddiky, M. J. A.; Park, H.; Shim, Y.-B. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 6809-6817
34. Huang, H.-Y.; Chiu, C.-W.; Sue, S.-L.; Cheng, C.-F. *J. Chromatogr. A* **2003**, 995, 29-36
35. Chen, H.-C.; Ding, W.-H. *J. Chromatogr. A* **2003**, 996, 205-212
36. Chen, Z.; Naidu, R. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1023, 151-157
37. Siri, N.; Riolet, P.; Bayle, C.; Couderc, F. *J. Chromatogr. B* **2003**, 793, 151-157
38. Neusüß, C.; Pelzing, M.; Macht, M. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3149-3159
39. Ward, E. M.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R.; Lunte, C. E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32, 813-822
40. Sun, S.-W.; Tseng, H.-M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 39-45
41. Hsieh, M.-C.; Lin, C.-H. *Electrophoresis* **2004**, 25, 677-682
42. Chen, M.-C.; Chou, S.-H.; Lin, C.-H. *J. Chromatogr. B* **2003**, 801, 347-353
43. Lin, C.-E.; Liu, Y.-C.; Yang, T.-Y.; Wang, T.-Z.; Yang, C.-C. *J. Chromatogr. A* **2001**, 916, 239-245
44. Kim, J.-B.; Quirino, J. P.; Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2001**, 916,

123-130

45. Quirino, J. P.; Terabe, S.; Cap, J. *Electrophoresis* **1997**, 4, 233
46. Kim, J.-B.; Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2001**, 912, 343-352
47. Monton, M. R. N.; Quirino, J. P.; Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2001**, 939, 99-108
48. Kim, J.-B.; Britz-McKibbin, P.; Hirokawa, T.; Terabe, S. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3986-3993
49. Britz-McKibbin, P.; Bebault, G. M. ; Chen, D. D. Y. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1729-1735
50. Lin, Y.-H.; Li, J.-H.; Ko, W.-K.; Wu, S.-M. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1130, 281-286
51. Lin, Y.-H.; Lee, M.-R.; Lee, R.-J.; Ko, W.-K.; Wu, S.-M. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1145, 234-240
52. Britz-McKibbin, P.; Markuszewski, M. J.; Iyanagi, T.; Matsuda, K.; Nishioka, T.; Terabe, S. *Anal. Biochem.* **2003**, 313, 89-96
53. Britz-McKibbin, P.; Ichihashi, T.; Tsubota, K.; Chen, D. D. Y.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1013, 65-76
54. Britz-McKibbin, P.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 917-934
55. 黃萌棋，「利用毛細管電泳線上濃縮法分析防腐劑與酚酸」，國立交通大學，應用化學研究所碩士論文，民國九十三年
56. Srinivasan, K.; Wang, P.; Eley, T.; White, C. A.; Bartlett, M. G. *J. Chromatogr. B* **2000**, 745, 287-303
57. Hodges, C. C.; Rapoport, H. *J. Nat. Prod.* **1982**, 45, 481-485
58. Caslavská, J.; Allemann, D.; Thormann, W. *J. Chromatogr. A* **1999**, 838, 197-211
59. Sachs, H.; Kintz, P. *J. Chromatogr. B* **1998**, 713, 146-161
60. Tagliaro, F.; Battisti, Z. De; Lubli, G.; Neri, C.; Manetto G.; Marigo, M. *Forensic Sci. Int.* **1997**, 84, 129-135

61. Moeller, M. R.; Steinmeyer, S.; Kraemer, T. *J. Chromatogr. B* **1998**, 713, 91-109
62. Tomaszewski, C.; Runge, J.; Gibbs, M.; Colucciello, S.; Price, M. *J. Emerg. Med.* **2005**, 28, 389-394
63. de Jager, L. S.; Andrews, A. R. *J. Chromatogr. A* **2001**, 911, 97-105
64. Farina, M.; Yonamine, M.; Silva, O. A. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 127, 204-207
65. Hanajir-Kikura, R.; Kaniwa, N.; Ishibashi, M.; Makino Y.; Kojima, S. *J. Chromatogr. B* **2003**, 789, 139-150
66. Chasin, A. A. M.; Mídio, A. F. *Forensic Sci. Int.* **2000**, 109, 1-13
67. Montagna, M.; Poletini, A.; Stramesi, C.; Groppi, A.; Vignali, C. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 128, 79-83
68. Lewis, R. J.; Johnson, R. D.; Angier, M. K.; Ritter, R. M. *J. Chromatogr. B* **2004**, 806, 141-150
69. Staerk, U.; Külpmann, W. R. *J. Chromatogr. B* **2000**, 745, 399-411
70. Meadway, C.; George, S.; Braithwaite, R. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 127, 136-141
71. Alnajjar, A.; Butcher, J. A.; McCord, B. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1592-1600
72. Weu, A. B.; Thormann, W. *Chromatographia* **1999**, 49, S12-S20
73. Chien, R.-L. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2866-2869
74. Zhang, C.-X.; Thormann, W. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2523-2532
75. Helena, T.; Alain, V.; Paula, P.; Francisco, C.-R.; Paula, M.; Duarte, N. V. *Forensic Sci. Int.* **2007**, 170, 148-155
76. Huq, S.; Dixon, A.; Kelly, K.; Kallury, K. M.R. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1073, 355-361
77. Raharjo, T.J.; Verpoorte, R. *Phytochem. Anal.* **2004**, 15, 79-94
78. Alemany, G.; Gamundi, A.; Nicolau, M.C.; Saro, D. *Biomed. Chromatogr.* **1993**, 7, 273-274

79. Huang, W.; Moody, D. E.; Andrenyak, D. M.; Smith, E. K.; Foltz, R. L.; Huestis, M. A.; Newton, J. F. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25, 531-537
80. Manno, J. E.; Manno, B. R.; Kemp, P. M.; Alfod, D. D.; Abukhalaf, I. K.; McWilliams, M. E.; Hagaman, F. N.; Fitzgerald, M. J. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25, 538-549
81. Stout, P. R.; Horn, C. K.; Klette, K. L. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25, 550-554
82. Abraham, T. T.; Lowe, R. H.; Pirnay, S. O.; Darwin, W. D.; Huestis, M. A. *J. Anal. Toxicol.* **2007**, 31, 477-485
83. Kim, J. Y.; In, M. K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 1339-1342
84. Thomas, N.; Fritz, P. *J. Chromatogr. B* **2007**, 846, 78-85
85. Weinmann, W.; Vogt, S.; Goerke, R.; Müller, C.; Bromberger, A. *Forensic Sci. Int.* **2000**, 113, 381-387
86. Weinmann, W.; Goerner, M.; Vogt, S.; Goerke, R.; Pollak, S. *Forensic Sci. Int.* **2001**, 121, 103-107
87. Teixeira, H. ; Verstraete, A. ; Proença, P. ; Corte-Real, F. ; Monsanto, P. ; Vieira, D. N. *Forensic Sci. Int.* **2007**, 170, 148-155
88. Jung, J. ; Kempf, J. ; Mahler, H. ; Weinmann, W. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 354-360
89. Goodall, C. R. ; Basteyns, B. J. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19, 419-426
90. Niedbala, R. S. ; Karos, K. W. ; Fritch, D. F. ; Kardos, S. ; Fries, T. ; Waga, J. ; Robb, J. ; Cone, E. J. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25, 289-303
91. Broner, W. ; Nyman, P. ; Minden, D. V. *J. Anal. Toxicol.* **1990**, 14, 368-371