

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

流動注入分析訊號空時差異之進階研究

Comprehensive Investigation of The Difference Between
The Spatial and Temporal Signals in Flow Injection
Analysis

研究生:吳印從

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十八年六月


流動注入分析訊號空時差異之進階研究

Comprehensive Investigation of The Difference Between
The Spatial and Temporal Signals in Flow Injection
Analysis

研究生：吳印從
指導教授：余艇 博士

Student：Yin-Tsung Wu
Advisor：Dr. Tiing Yu

國立交通大學
應用化學研究所
碩士論文



A Thesis
Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Science
In
Applied Chemistry
June 2009
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十八年六月

流動注入分析訊號空時差異之進階研究

學生：吳印從

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學研究所

摘要

一般小分子樣品在流動注入分析系統中，經由單通道偵測器所紀錄之隨流析時間得到的訊號圖形(訊號強度 v.s. 時間)常呈現拖尾的類高斯波形。根據本實驗室近年來之研究，若使用多通道偵測器觀察其空間的分布(訊號強度 v.s 樣品位置)，可以發現其空間分布的情形為一高斯對稱的波形。這兩種利用不同觀測方式(單通道 v.s 多通道)而得到的兩種波形之間的差異即為空時差異。

以奈米粒子當做流動注入分析系統的樣品時，其本身的單通道偵測器所記錄的訊號波形是非常特別的「雙峰」波形，因此本實驗想藉由多通道偵測器來觀測，是否空時差異的情形也會存在於奈米粒子的情況當中，並將奈米粒子與小分子樣品(tatrazine)兩者之空時差異情形進行比較。除此之外，本實驗也利用了相對標準偏差當作波形延散情形的指標，來對於波形的延散情形之空時差異進行探討。實驗的結果發現，兩種不同觀測方式得到的奈米粒子波形形狀的確存在著明顯差異的情形，但是此兩波形其相對標準偏差值卻是相似的。當時圖訊號的相對標準偏差為 19.57%時，其波形還是以「雙峰」並存波形的形式呈現，然而以多通道偵測器所觀測到的相對應訊號，其相對標準偏差為 22.25%時，卻已呈現相當高斯的波形。除此之外，本實驗還發現，時圖波形的相對延散(亦即相對標準偏差)情形與空時差異有很

大的關係，當其相對延散的情形越大，則此條件下之兩者波形形狀的空時差異程度會越大，反之則越小，因此證明了相對延散的情況是影響波形形狀空時差異的一項重要的指標。並且藉由實驗的結果找到相對延散情形與各實驗參數(如：樣品擴散係數、管長等)的關係式。



Comprehensive Investigation of The Difference Between The Spatial and Temporal Signals in Flow Injection Analysis

Student: Yin-Tsung Wu

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

The temporal signals of well diffusive solutes (typical small molecules) monitored using conventional single-channel detectors are usually Gaussian-like profiles with apparent tailing in flow injection analysis (FIA). According to the previous researches in our laboratory, the spatial signals monitored using the multi-channel detector were nearly Gaussian and symmetric under typical FIA conditions. The shape difference between the temporal and spatial profiles appeared due to the way how the measurements were conducted. The difference thus occurs is called spatial-temporal difference.

It has been reported that the temporal signals of nanoparticles in FIA emerged usually as double-humped shapes, including so-called convection and diffusion peaks. In this study, we examined how the difference between the temporal and spatial profiles of tartrazine and Ag nanoparticles could come out using the laboratory-made multi-channel

detector. The results showed a considerable difference between the temporal and spatial profiles for both solutes. However, their relative standard deviations, the parameter to describe the solute dispersion behaviors, turned out to be quite similar. The solute profile, acquired using the single-channel detection, was found to show somewhat double-hump character for Ag nanoparticles when the RSD was nearly 19.57%. However, the corresponding spatial signal of the same sample remained Gaussian with the RSD of 22.25%. In addition, the spatial-temporal difference became greater as the dispersion (RSD) of the temporal profile became larger. The dispersion was thus proved one of the major factors to affect the spatial-temporal difference. According to the results obtained using multi-channel detection, we also derived the relation between the signal RSD and other experimental factors including the molecular diffusion coefficient, and the tube length.

謝誌

耶~超開心的，終於畢業了!懸於心中的那塊大石總算得以卸下來了。這兩年來的一切點點滴滴，就在此時此刻劃下了句點，心中其實覺得滿不捨的。回想一路走來，受到了許多人的幫助，沒有你們的幫助，就沒有今天的這些成果。

首先最主要的當然是要感謝我的恩師余艇老師，帶領我進入了分析化學這個領域，並不時地給予我實驗及研究上的指導，讓我能順利將研究完成；再來要感謝口試委員白書禎教授和王念夏教授，能在百忙之中抽空來參加我的口試並對於我研究上及論文上的內容提出糾正和指點，使我的論文內容和研究成果更加完美。

謝謝一直以來都很照顧我的淑慧學姊，每當我實驗上或是心靈上遇到迷惘和疑惑時，總是能給即時地鼓勵我並提出建議，讓我能夠再次的鼓起勇氣繼續克服我所遇到的困難。也謝謝經緯學長，總是能夠幫助我解決實驗上或生活上所有遭遇到的難題，並常常找我們這些學弟妹們出去聚餐、打球，讓實驗室裡的氣氛可以更加融洽，希望學長也可以如期地順利畢業。也要感謝實驗室的同學婉茹以及學弟妹 Danny、伶宜和阿國，由於你們的開朗活潑，為平常的實驗室生活帶來了許多歡樂，祝婉茹日後工作和學弟妹的學業及研究可以順利。還有要感謝隔壁實驗室的云琦和雅柔，在修課的過程中受到了你們不少的幫忙和照顧，也謝謝其他大學同學任逸、家誌、傑哥、查斯特、邦邦、貓王、小白...等，彼此之間的互相幫忙和扶持。

最後要感謝我的父母親和家人及女朋友，由於你們的支持鼓勵和體諒，才讓我能夠專心於學業和研究。

目錄

中文摘要	ii
英文摘要	iv
謝誌	vi
圖目錄	ix
表目錄	xii
第一章 序論	1
1.1 流動注入分析法簡介	1
1.2 奈米粒子的流動訊號波形	2
1.3 空時差異	4
1.4 研究動機與目標	6
第二章 文獻回顧	8
2.1 奈米粒子在流動注入分析系統的波形成因	8
2.2 τ 值與波形的關係	10
2.3 理論板數(N)與波形的關係	11
第三章 實驗	15
3.1 藥品	15
3.2 實驗裝置	15
3.3 儀器組裝	16

3.4 樣品及載液的選擇與製備	19
3.5 實驗參數的測量	23
3.6 電腦操作介面設定	24
3.7 實驗流程	27
第四章 結果與討論	28
4.1 數據處理	28
4.2 波形參數指標	28
4.2.1 基本參數	29
4.2.2 進階參數	30
4.3 相對標準偏差與波形的關係	32
4.4 數據結果與討論	34
4.4.1 實驗條件	35
4.4.2 時圖波形變化趨勢	35
4.4.3 空圖波形變化趨勢	48
4.4.4 空時差異	59
第五章 結論	68
參考文獻	70
附錄 A 符號定義表	72

圖目錄

圖 1 典型流動注入分析系統	1
圖 2 流動注入分析法波形及其指標參數	2
圖 3 奈米粒子和一般樣品在流動注入分析系統中產生的波形	3
圖 4 不同粒徑的金奈米粒子的流動注入分析波形	4
圖 5 空圖和時圖的定義	6
圖 6 層流造成的流場	8
圖 7 τ 值對於波形的影響(電腦模擬之結果).....	11
圖 8 螺旋管柱系統中離心力(F)對於流場產生的影響.....	12
圖 9 驗裝置示意圖	17
圖 10 濾片的穿透波長與燈源的放射波長	18
圖 11 管路纏繞示意圖.....	19
圖 12 tatrazine 的結構與 UV 光譜圖	21
圖 13 銀奈米粒子的掃描式電子顯微鏡的圖和粒徑分布圖以及 UV 光譜圖.....	22
圖 14 電腦操作介面圖	25
圖 15 積分法求波形面積的示意圖	29
圖 16 h_1 和 h_2 的示意圖	31
圖 17 tatrazine 在不同體積流速，相同偵測位置的時圖波形。.....	37

圖 18 銀奈米粒子在不同體積流速，相同偵測位置的時圖波形。 ..	38
圖 19 tatrazine 在不同體積流速下的時圖	40
圖 20 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖	42
圖 21 tatrazine 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位置 的關係.....	44
圖 22 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位 置的關係.....	46
圖 23 tatrazine 在不同體積流速下，估算質量中心位置在附近的空圖 波形。	50
圖 24 銀奈米粒子在不同體積流速下，估算質量中心位置在附近的空 圖波形。	51
圖 25 tatrazine 在不同體積流速下的空圖	53
圖 26 銀奈米粒子在不同體積流速下的空圖	55
圖 27 tatrazine 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與質量中心 位置的關係.....	57
圖 28 tatrazine 在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖(右)	60
圖 29 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖 (右).....	62
圖 30 銀奈米粒子空時圖波形 h_1/h_2 對體積流速的關係	64

圖 31 空時圖波形的相對標準偏差對體積流速的關係66



表目錄

表 1 曝光時間對照表	26
表 2 tatrazine 在不同體積流速，相同偵測位置的時圖波形相關參數	37
表 3 銀奈米粒子在不同體積流速，相同偵測位置的時圖波形相關參 數	38
表 4 tatrazine 在不同體積流速下，估算質量中心位置在附近的空圖 波形相關參數	50
表 5 銀奈米粒子在不同體積流速下，估算質量中心位置在附近的空 圖波形相關參數	51



第一章 序論

1.1 流動注入分析法簡介

流動注入分析法(Flow Injection Analysis, FIA)是在 1975 年，由 Ruzicka 和 Hansen[1]提出的一種可以在有限時間內完成大量樣品數檢測的分析方法，該系統可以將傳統的手動操作步驟，例如加入樣品、試劑、混合反應、送入偵測器等過程，整合在一個預先設計好的管路中依序完成，達到自動化分析，既方便又省時。因此流動注入分析法已被廣泛的應用在各種領域的檢測上。

一個最簡單的單線流動注入分析系統(single-line FIA)如圖 1 所示，基本架構包含幫浦(pump)、樣品注入閥(sample injection valve)、管路迴圈(coil tube)，以及一個偵測器(detector)。

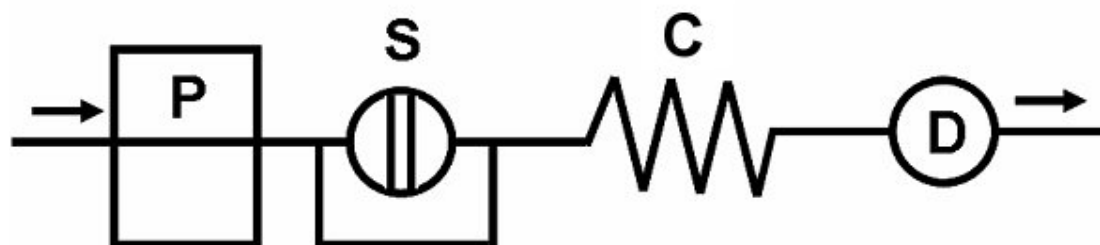


圖 1 典型流動注入分析系統

基本架構包含幫浦(P)；樣品注入閥(S)；管路迴圈(C)；偵測器(D)。

幫浦推動管路中的載液(carrier)與試劑(reagent)，在樣品注入後順著管路向前移動，經過管路迴圈後，送入偵測器測得訊號。流經偵測器的樣品被記錄器以「時間對訊號值」的方式記錄，可以得到一組時間對應訊號強度的波形。最常見的波形如圖 2，此波形通常為拖尾單峰形

式的類高斯波形，根據這個波形，可訂出四個指標參數：波高(h)、波寬(W_t)、面積(A_t)、波峰位置(t_p)。

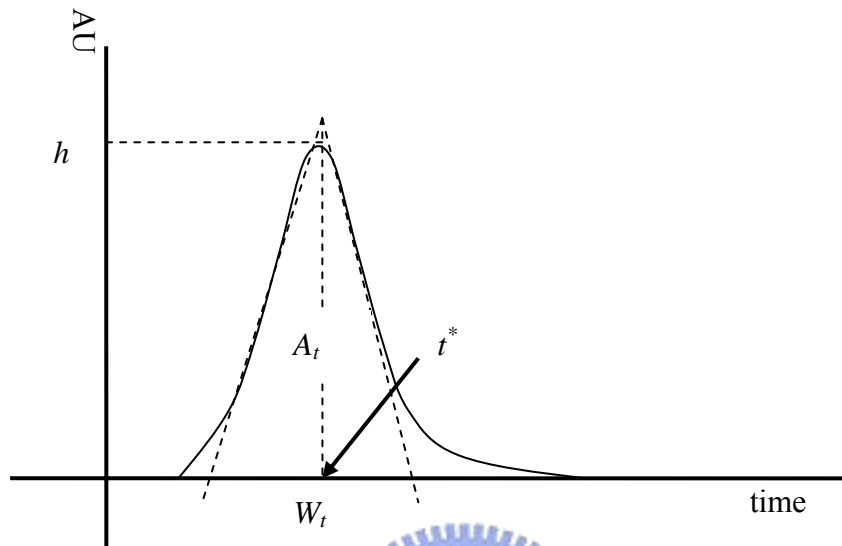


圖 2 流動注入分析法波形及其指標參數

此圖為波形示意圖，通常會觀察到波峰形狀呈現不對稱之拖尾的特徵。利用此波形可訂出四種波形指標參數：波高(h , AU)、波寬(W_t , s)、面積(A_t , AU-s)、波峰位置(t_p , s)。

1.2 奈米粒子的流動訊號波形

奈米粒子在流動注入分析系統中產生的訊號波形常會以「雙峰波形」的形式被觀察到，與一般常見到的單峰形式的類高斯波形的流動注入分析訊號相當不同(如圖 3)。這個現象最早由 Fischer 等人所研究 [2]，Fischer 將此波形的兩個波峰分別加以命名，出現時間較早的波峰為 convection peak，而較晚出現的波峰為 diffusion peak。Fischer 等人發現，當注入的奈米粒子樣品，粒徑越大則 convection peak 的訊號

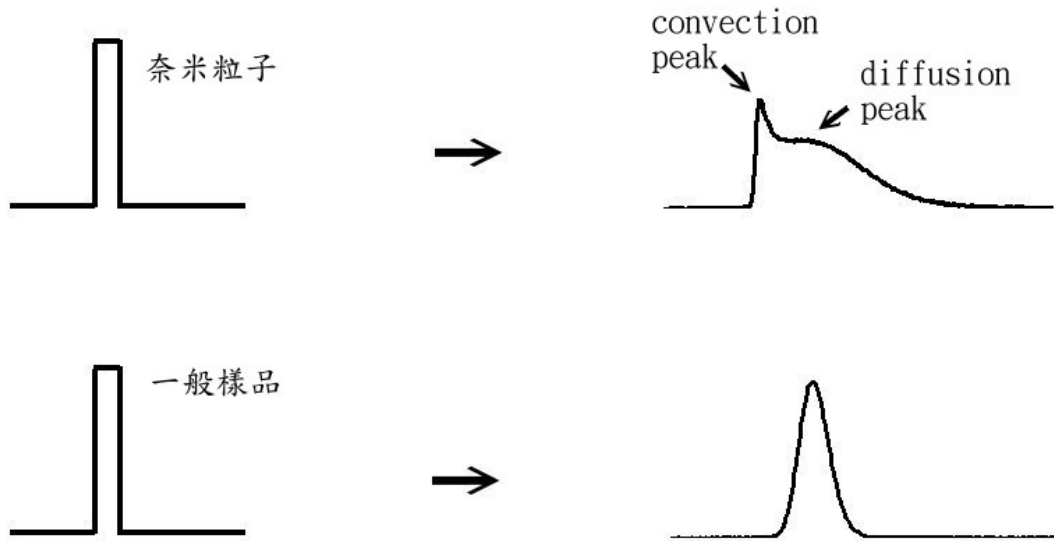


圖 3 奈米粒子和一般樣品在流動注入分析系統中產生的波形

奈米粒子的波形是獨特的「雙峰波波形」，與一般樣品所生的類高斯的單峰波形非常的不同。這兩個雙峰的名稱分別為：convection peak(出現位置和時間較早)以及 diffusion peak(出現位置和時間較晚)

強度會越強，diffusion peak 的訊號強度會越弱。反之，當樣品粒徑越小，convection peak 的訊號強度會減弱，而 diffusion peak 的訊號強度會增強。當粒徑小到一個程度之後，convection peak 的訊號強度會趨近於零，整個波形會變為只有 diffusion peak 存在，此波形即為一般常見到的單峰類高斯波形，整體波形的變化趨勢如圖 4。Fischer 等人將奈米粒子其流動注入分析系統的波形會隨奈米粒子粒徑改變的特性，應用到預測奈米粒子的粒徑分布上。

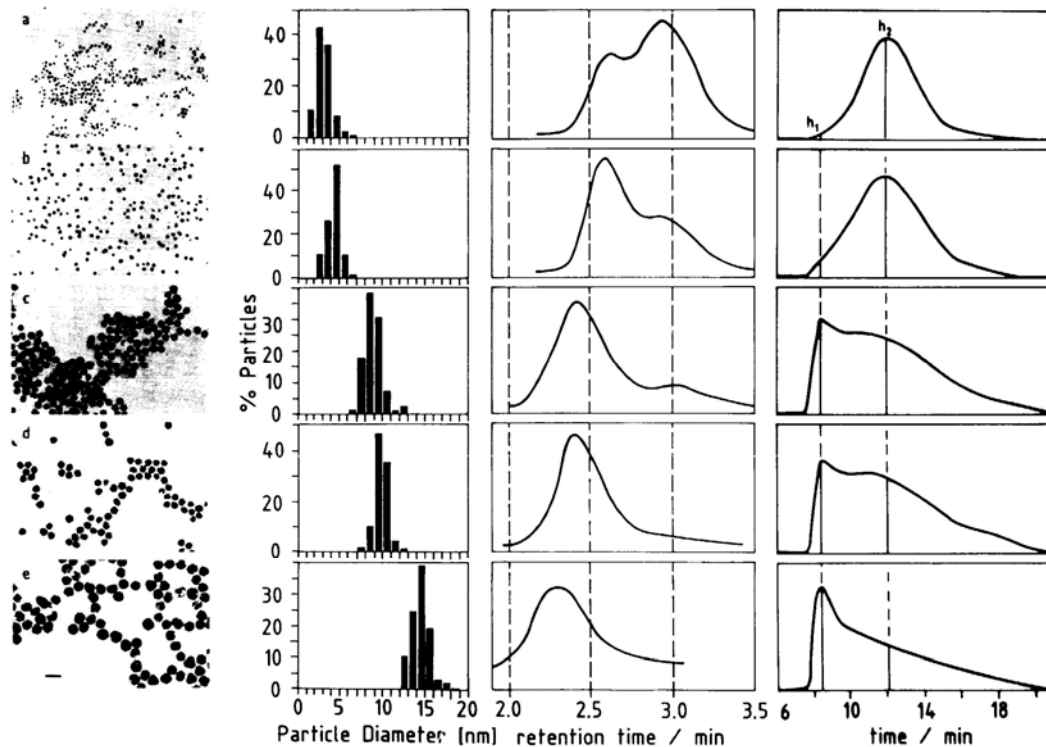


圖 4 不同粒徑的金奈米粒子的流動注入分析波形[2]

此圖可以分為四個部份來看，首先最左邊由上而下的圖形是這些不同粒徑的粒子其相對應的掃描式電子顯微鏡(electronic screen microscope, SEM)的圖像；第二行的圖形為這些不同粒徑的粒子的粒徑分布圖；第三行為這些不同粒徑的粒子的 size exclusion chromatography(SEC)的層析圖，越下面的奈米粒子粒徑越大，因此 SEC 的流析時間會比較短，層析圖的波峰會比較早出現；最右邊的圖為不同粒徑的粒子其各自相對應的流動注入分析波形，可以發現粒徑較大的奈米粒子其 convection peak 的訊號會比較強，反之，若粒徑較小的奈米粒子，其 diffusion peak 的訊號會比較強，當粒仔的粒徑小到某個程度之後，波形 convection peak 的訊號會完全消失，只剩下 diffusion peak 的訊號存在，此時的波形即為一般常見到的單峰類高斯波形。

1.3 空時差異

Pai 在 2002 年和 2007 年所發表的兩篇文獻[3,4]中點出流動注入分析訊號所產生的空時差異的概念，由一般單通道偵測器所得的波峰圖形與樣品在管路內的空間分布情形並不相同，這是由於一般偵測器

在收集訊號的同時，樣品在管內的空間分布狀態隨時間一直在改變，使得測量結果與樣品在管路內瞬間的空間分布有一定差異，稱之為空時差異。空時差異，是探討波形理論和其成因的一個很重要的觀念，然而這個現象長久以來常被大家所忽略。Pai 認為，這種差異普遍地存在於採用一般單通道偵測器的流動型系統內，不僅是流動注入分析系統，在層析系統中也應該存在這種現象[3]，並在 2003 年提出相關的研究[4-6]。空時差異最常見的例子是，在流動注入分析系統中利用一般的偵測器來偵測小分子樣品時，會偵測到一個拖尾的類高斯波形，然而此小分子樣品其空間分布情形卻是一個相當對稱的高斯波形[7]。因此推斷以往的波形理論在忽略空時差異的情況下，如果從實驗結果來推測樣品在管路內的變化將會產生誤差。



在這裡我們先定義：固定一個單通道偵測器的位置，隨時間來擷取樣品通過偵測位置的訊號，所得的圖形稱為時圖，一般的偵測器都屬於單通道偵測器。如果使用多通道偵測器，可以同時偵測大範圍的樣品空間分布，所得的圖形稱為空圖 (圖 5)。

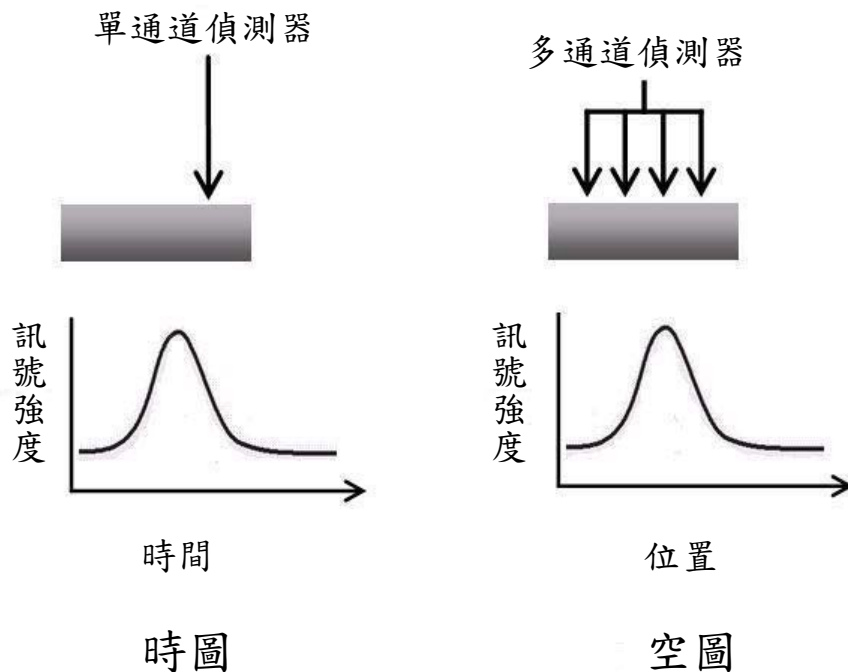


圖 5 空圖和時圖的定義

時圖的橫座標單位是流析時間 (time)，空圖的橫座標單位則是管路位置 (length)。

1.4 研究動機與目標

根據 Pai 的文獻[3,4]指出，由一般單通道偵測器所得到的波形訊號(時圖波形)與其空間上的波形分布(空圖波形)有空時差異的存在。部份文獻[9-12]也已證實，小分子樣品在 FIA 系統中確實存在空時差異，而根據 Fischer 等人的研究[2]可得知，以奈米粒子當做注入的樣品時，在流動注入分析系統中得到的時圖偵測波形是相當特別的，因此本研究希望觀察奈米粒子在流動注入分析系統中的空時差異，並將此空時差異與小分子樣品所產生的空時差異情形做比較。為了想同時獲得空圖和時圖的實驗結果，使用本實驗室所設計的多通道偵測系

統，可同時得到大範圍的觀測視窗(21 公分)以取得樣品在管路中的空間分布，也可以隨時間來收集樣品通過偵測位置的訊號，而得到時間函數之訊號波形。

實驗的目標:於流動注入分析系統中，利用多通道偵測器得到奈米粒子的空圖和時圖波形，並進一步測量相關波形參數，比較空圖波形與時圖波形的差異情形。



第二章 文獻回顧

2.1 奈米粒子在流動注入分析系統的波形成因

在上述 1.2 節中有提到，奈米粒子形成的波形會含有兩個波峰，一個波峰是 convection peak，其出現的時間較早，而另一個波峰是 diffusion peak，其出現的時間較晚。當流析條件保持不變，隨著注入的樣品粒徑變大，convection peak 的訊號強度會增加，而 diffusion peak 的訊號強度會下降，反之若注入的樣品粒徑變小，則變化的情形相反。Fisher 等人對於此現象提出解釋[2]，Fisher 指出，這個現象的產生同時受到兩種效應的影響，第一個是來自於經由幫浦把載液帶入空管中時產生了層流(laminar flow)的效應，第二個是樣品本身擴散係數(diffusion coefficient, D)較低所導致。層流是由於樣品在管路內移動時，流體受到管壁的摩擦作用，在管路中心的樣品摩擦力較小，速度因而較快，而越接近管壁的樣品，摩擦力越大，速度越慢，導致管內流速呈現拋物線(parabolic)或彈頭型的分布，如圖 6 所示。

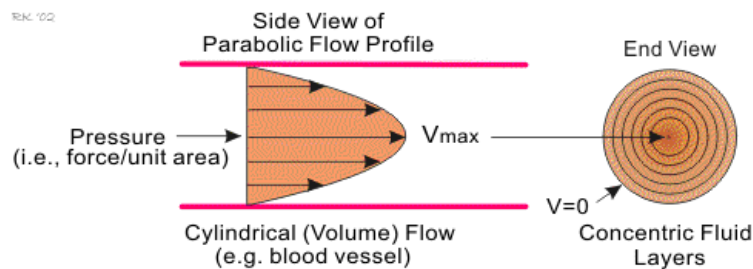


圖 6 層流造成的流場 <http://www.cvphysiology.com/Hemodynamics/H006.htm>
由於層流的影響，在管柱中心的樣品會以最大的速度向前移動，而在管壁附近的樣品，向前移動的速度會趨近於零。

至於擴散的影響，樣品的擴散方向可分為平行於流動方向(axial)的擴散以及垂直於流動方向(radial)的擴散，由於樣品受到幫浦推動向前移動時，其水平方向分子的擴散造成的位移比起流速造成的位移而言小了許多，因此流動的過程中，我們只需考慮其垂直接流動方向的擴散造成的影響，所以樣品的擴散能力也就代表著其垂直接流動方向的位移能力。若樣品分子或粒子的擴散能力較差，初始位置處於管路中心的樣品分子，在整個流動的過程直至抵達偵測器前，會有很大的機率，一直待在管路的中心以流速較快的方式向前移動，造成一個很快就出現的波峰訊號，此波峰訊號即為 convection peak。值得一提的是，只要波形有 convection peak 訊號的出現，則此波形也勢必會有非常嚴重的拖尾，convection peak 的訊號強度越強，拖尾程度越嚴重。這是由於那些在流動初始位置接近管壁的樣品所造成的，由於擴散能力較差，在流動過程直至抵達偵測器之前，此樣品會有很大的機率都是在管壁附近以一個流速很慢的方式向前移動，造成抵達偵測器的時間會比較晚，故整個波形結束的時間也會拖的比較長。當樣品的擴散能力變好時，此樣品的樣品分子或粒子會有比較大的機率，從管路中心往管壁附近移動或從管壁附近往管路中心移動，也就是說樣品分子或粒子待在管路中心以流速較快方式向前移動的的機率，和待在管壁附近以流速較慢的方式向前移動的機率都相同，因此，此樣品分子或粒子會以一個趨近於平均速度的速度前進，而得到一個比 convection peak 晚出現的波峰訊號，此訊號為 diffusion peak。因此，當注入流動分析系統中的奈米粒子，粒徑越大，則擴散能力越差，形成的 convection peak 的訊號會越強，波形拖尾的情況也會跟著越嚴重。而當注入的奈米粒子粒徑越小，擴散能力越好，diffusion peak 的訊號則會越強，波形拖

尾的現象就較不顯著。

2.2 τ 值與波形的關係

在 2.1 節所討論到影響波形的因素，主要的變因是樣品的擴散能力。但是在 2005 年的時候，Harada 等人提出了除了擴散能力外尚其他的實驗參數，會影響到奈米粒子在空管中產生的這個雙峰波形，並將這些參數都結合起來，並以 τ 值來表示[8]。 τ 值的公式如下：

$$\tau = \frac{DL}{r^2 u_{av}} \quad (2.1)$$

其中 D 是擴散係數，即樣品的擴散能力；L 是管長，即樣品抵達偵測器所需要移動的距離；r 是管徑； u_{av} 是線性流速，也是整體樣品的平均線性移動速度。值得注意的是，此公式是根據直線的空管中的流體行為所推導出來的，還不能完全適用於流動注入分析系統的螺旋管柱。

τ 值可視為波形的量化參數，藉由實驗參數的代入，我們就可以預期我們所觀察到的波形應該要以什麼形式和形狀呈現。以 τ 等於 1 為界線，當 τ 大於 1 時，得到的波形應該是一個趨近於高斯的單峰波形，而當 τ 值小於 1 時，得到的波形就是同時有 convection peak 和 diffusion peak 共存的雙峰波形。 τ 值越小，convection peak 的訊號越高，diffusion peak 的訊號會越低， τ 值越大 convection peak 的訊號就會越低，而 diffusion peak 的訊號會越高，如圖 7。

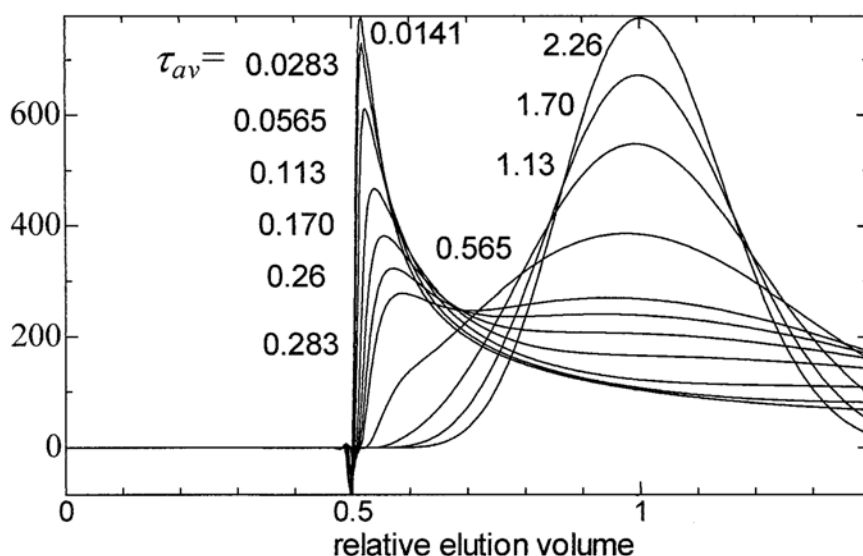


圖 7 τ 值對於波形的影響(電腦模擬之結果)[8]

以 τ 值等於 1 為界線，當 τ 值大於 1 時，波形是單峰的高斯波形，只有 diffusion peak 的訊號而沒有 convection peak 的訊號，一但當 τ 值開始小於 1 時，convection peak 的訊號開始產生， τ 值越小，convection peak 的訊號會越大。

Harada 等人提出，樣品在抵達偵測器前，是否有足夠的時間能夠在整個管路的截面進行完全地擴散，是影響整個波形的關鍵。當樣品擴散能力比較差(D 值小)、管長太短(L 值小)、管路截面積太大(r 值大)或流速太快(u_{av} 值大)，都會使得樣品在抵達偵測器之前無法完全地擴散至整個管路截面，而計算出來的 τ 值就會小於 1。 τ 值等於 1 時，樣品在抵達偵測器時恰好會完全地擴散於整個管路截面，波形會開始以單峰的類高斯形式呈現。

2.3 理論板數(N)與波形的關係

過去有文獻提到，可以將流動注入分析法應用在測量蛋白質分子量[9-11]。他們首先根據 Taylor[12,13]、Aris[14]和 Golay[15]的公式，推導出在空管中流動的樣品，產生訊號波形的理論板高(H)應該要和

一些特定的實驗參數相關，理論板高的公式如下。

$$H = \frac{Q}{24\pi D} \quad (2.2)$$

其中 Q 為體積流速、D 為擴散係數。因為理論板數為管長除以理論板高，因此我們可以將理論板數(N)的公式寫成：

$$N = 24\pi \times \frac{DL}{Q} \quad (2.3)$$

公式 2.3 和公式 2.1 一樣，都只適用於直線形的空管，並不適用於流動注入分析法的螺旋管柱系統，因此須將此公式以一個 κ 值的參數對其進行修正[16]。 κ 值與螺旋管柱纏繞的圈數、纏繞的半徑以及體積流速相關，這個參數的造成，是由於樣品在螺旋管柱中移動時會產生離心力所造成的。在直線管柱的情況下，管路中心的流速較快，形成一個拋物線型的流場。當管路變成螺旋形時，樣品在向前移動的過程中都會受到一個垂直於流動方向且方向向外的離心作用力。在低流速的條件下，離心力的影響不顯著，因此流場還會維持拋物線型的形式，如圖 8(a)。但是當流速變高時，離心力的作用增強，會使得流場從原本的拋物線型，變成斜線型，如圖 8(b)。

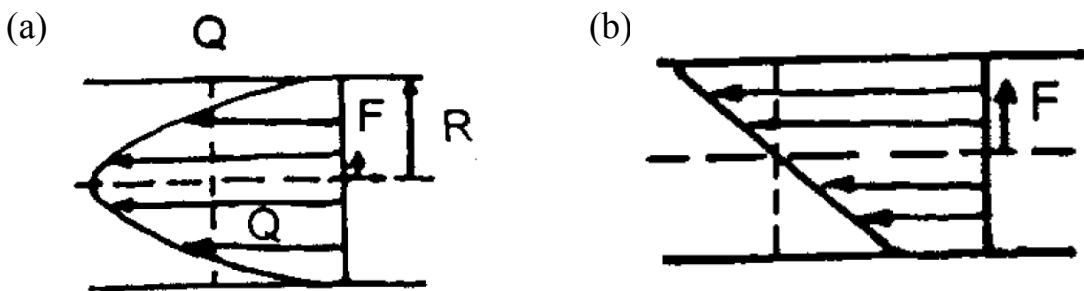


圖 8 螺旋管柱系統中離心力(F)對於流場產生的影響

(a)低流速的條件下，離心力的影響還不顯著，因此流場還會維持一個拋物線型的形式。(b)流速變高時，強離心力的作用，會使的流場會從原本的拋物線型，變成斜線型。

因此，需將公式加入 κ 值進行修正：

$$N = 24\pi \times \frac{DL}{\kappa Q} \quad (2.4)$$

又當實驗的波形為一高斯波形時，理論板數可以下列公式計算：

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_p}{W_{1/2,t}} \right)^2 \quad (2.5)$$

將公式 2.5 代回公式 2.4，我們可以得到另一個表示式：

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_p}{W_{1/2,t}} \right)^2 = 24\pi \times \frac{DL}{\kappa Q} \quad (2.6)$$

其中 t_p 為波峰位置， $W_{1/2,t}$ 為此波形半高寬的寬度。公式 2.6 中，波峰位置和半高寬可以從實驗的結果求得，管長和流量是實驗設定的條件，因此將實驗結果和這些已知的參數代入，就可以推得此實驗的樣品應有的擴散係數，再以擴散係數推算樣品的分子量，達到測量樣品分子量的目的。除了利用公式 2.6 可以求得樣品分子量之外，這個公式還顯示出其他的資訊：一般的流動注入分析系統中，管長是固定的，因此公式中的 L 參數是固定的，由於管長是固定的，不論使用的樣品為何，此樣品的訊號波形(單峰的高斯波形)的波峰位置應該都要相同，因此公式中的 t_p 參數也是固定的。根據這樣的推論，我們可以得到，當分子的擴散能力越差(D 值越小)，或實驗設定的體積流速越大(Q 值越大)，會造成訊號波形的半高寬越寬($W_{1/2,t}$ 越大)，半高寬越寬，意味著樣品訊號波形整體的分布也會跟著越大。因此藉由公式 2.6，可以估算出樣品的訊號分布情形。

如果將公式 2.3 中的流量，以管路的截面積($a=\pi r^2$)乘上線性流速(u_{av})代換，可以將公式轉換成：

$$N = 24 \times \frac{DL}{r^2 u_{av}} \quad (2.7)$$

最後再將公式 2.1 代入公式 2.7 中，可以得到：

$$N = 24 \times \tau \quad (2.8)$$

藉由公式 2.8，我們可以清楚地了解，只要將理論板數經過係數的轉換就可以得到 τ 值。由於 τ 值與樣品的波形有很高的相關性，當 τ 值大於 1 時，波形才漸漸成為一個單峰的高斯波形，而 τ 值小於 1 時，波形會是有雙峰訊號並存的形式出現。因此我們可以預期，理論板數值也會和波形呈現的形狀有關係。無獨有偶地，Golay 提出當波形的理論板數大於 30 時，才可將此波形視為是一個趨近於高斯的波形 [15]，根據公式 2.8，當理論板數大於 30 時， τ 值應該為 1.25，也的確是大於 1，符合了 Harada 等人所提出的當 τ 值大於 1 之後波形的形狀才會變成類高斯波形的說法。因此我們可將 τ 值和理論板數視為相同的波形參數。



第三章 實驗

3.1 藥品

(a) 色素樣品

Tartrazine, $C_{16}H_9N_4O_9S_2Na_3$, M.W. 534.4, dye content approx. 90 %
(Sigma, St. Louis, MO, USA)

(b) 銀奈米粒子(silver nanoparticle)合成試劑

Silver nitrate, $AgNO_3$, M.W.169.87, 99.8%, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

11-mercaptoundecanoic acid (MUA), $C_{11}H_{22}O_2S$, M.W. 218.36, 95.0%,
GR grade (Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sodium borohydride, $NaBH_4$, M.W. 37.83, 98.0%, GR grade (Alfa aesar, Ward Hill, MA, USA)

(c) 酸液及緩衝溶液配置

Hydrochloric acid, HCl , M.W. 36.45, 35.0~37.0%, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Potassium hydroxide, KOH , M.W. 56.11, 85%, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

Dipotassium hydrogenphosphate, K_2HPO_4 , M.W. 174.18, 99%, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

3.2 實驗裝置

(a) 往復式幫浦 (Reciprocating Pump)

Series II Digital HPLC Pump(Pharma-Tech Research Company (Baltimore, Maryland, USA)，輸出體積流速範圍 0.01 mL/min ~ 9.99mL/min。

(b) 進樣閥門 (Sample injection Valve)

進樣用的六向閥，購自 Valco(Houston, TX, USA)。

(c) 管路 (Tubing)

內徑為 0.04 英吋 (1000 μ m)，外徑為 1/16 英吋 (約為 1.6 公釐)，透明的 Perfluoroalkoxy 材質管路(Teflon PFA tubing)，購自於 Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA)。

(d) 固定管路的玻璃管

透明的玻璃管，內徑 1.25 公分、外徑 1.5 公分、長為 28 公分，於國立清華大學科學儀器中心訂做。

(e) 多通道偵測系統

光學盒由虹光精密工業股份有限公司(新竹市科學工業園區)提供；435 奈米窄帶濾波片，穿透波長中心 435 nm，波峰寬度約 50 nm，穿透度約等於 90%，由裕群光電科技股份有限公司(桃園縣龍潭鄉)製作；向量調整機台委託彥宏開發科技有限公司(台北縣新莊市)設計製造。

(f) UV-Vis 光譜儀

型號為 Agilent8453，購自 Agilent Technologies (Waldronn, Germany)，此儀器用來測量樣品吸收波長，和定性及定量實驗。

3.3 儀器組裝

本實驗為了得到流動注入分析系統中的空圖及時圖，採用了自行設計和組裝的實驗機台，搭配多通道偵測器來收集樣品訊號，實驗裝置系統如圖 9。

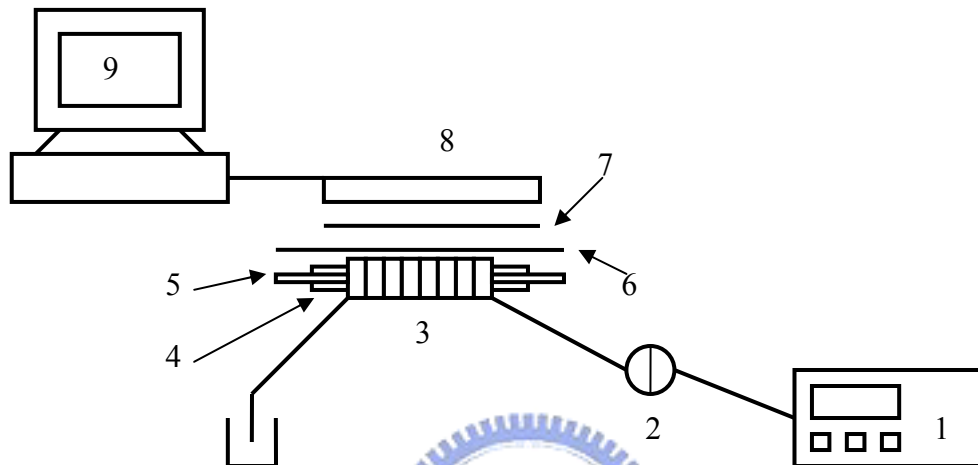


圖 9 驗裝置示意圖

1：往復式幫浦；2：樣品注入用六向閥；3：管路迴圈纏繞；4：玻璃管；5：燈管；6：狹縫；7：濾波片；8：多通道偵測器；9：個人電腦

(a) 多通道偵測系統

多通道偵測系統包含多通道偵測器、濾波片與向量調整機台[17]。多通道偵測器從虹光公司提供的光學掃描器拆解下來，以掃描器的燈管與內部光學盒作為本實驗所需之光源與多通道偵測器，光學盒視窗寬度為 21 公分。光源之放射光譜與濾波片之穿透波長範圍如圖 10 所示，光源強度在 435 nm 左右最強，故需選擇在 435 nm 有吸收的樣品。並將濾波片固定在光學盒的視窗上以過濾光源的其他放射波長。向量調整機台分為兩個部份，第一個部份上可架設燈源、管路迴圈與狹縫，第二個部份上架設光學盒(含濾波片)，兩個部份可分別調整彼

此間的距離與高度，並調整狹縫寬度與光源射入光學盒的角度。

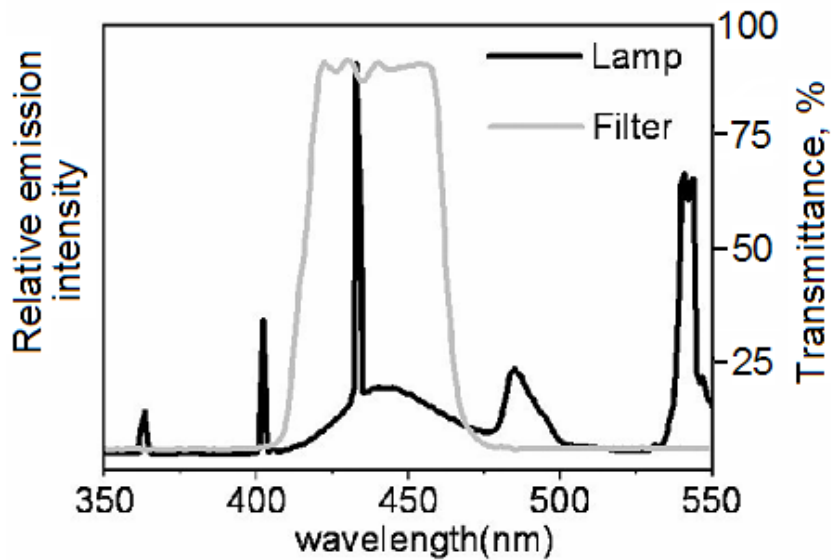


圖 10 濾片的穿透波長與燈源的放射波長

(b) 管路迴圈

由於樣品在空管中延散(dispersion)非常大，對於本實驗的多通道偵測器的最大偵測範圍 21 公分而言，如果把管路與偵測器平行放置，將無法完全觀測到樣品在管路中的分布。有文獻提出將反應管路做成迴圈型(coiled)、編織型(knitted)或彎曲型(serpentine)，甚至在管路中填入珠子[18,19]，可以降低軸分散的效應。於本實驗中，在玻璃管外圈的一側貼上雙面膠帶，將透明的 Teflon PFA tubing 纏繞在此玻璃管後，用透明膠帶固定住，作成管路迴圈(如圖 11)，藉此以達到降低軸分散的效應，而使我們可以觀察完整的波峰訊號。最後再將光源置於玻璃管中，並在玻璃管另一側放置多通道偵測器。

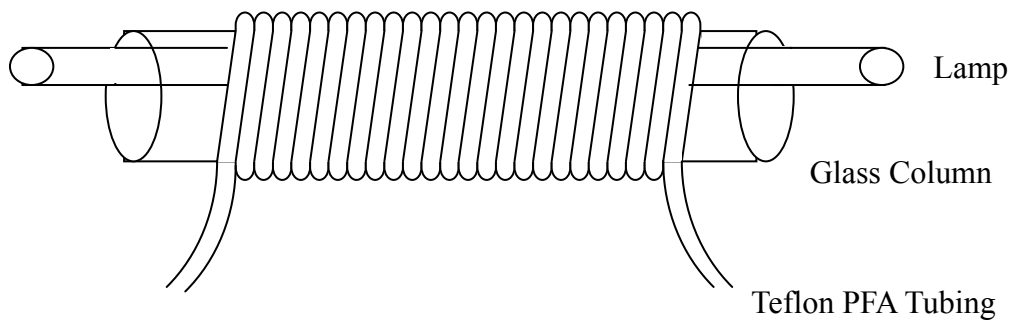


圖 11 管路纏繞示意圖

(c) 樣品注入

本實驗採用轉閥注入法 (valve injection) 進樣，剪裁一段與管路相同的 Teflon PFA tubing 作為樣品迴圈 (sample loop)，先將六向閥轉至進樣 (Loading) 位置，待樣品充滿迴圈後，再將六向閥轉到注入 (injection) 位置，樣品注入總體積為「樣品迴圈內體積」加上「注入閥內的體積」，總體積測量方法，會於下節(3.5(a))中介紹。

(d) 載液的推動

使用往復式幫浦來輸送實驗用載液。

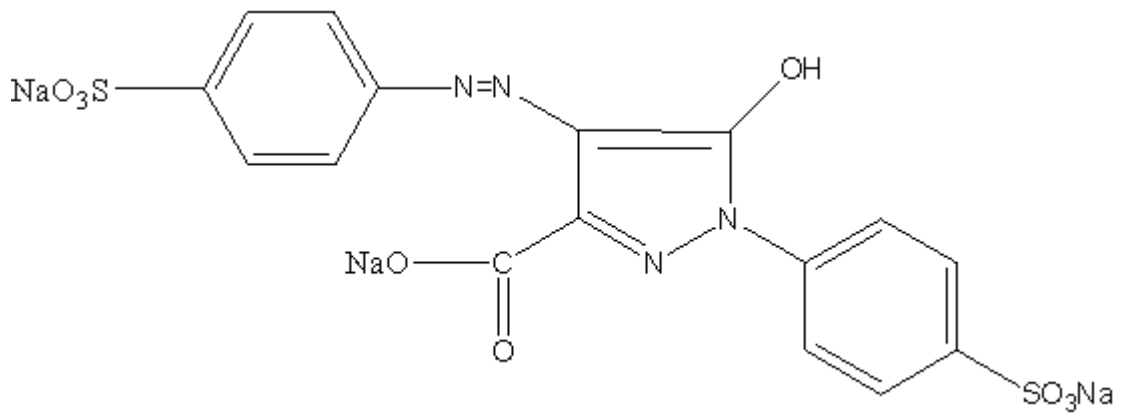
3.4 樣品及載液的選擇與製備

由於光源的放射波長與濾波片的可用波長範圍約 435 nm 附近，因此需選擇最大吸收波長也在此放射波長附近的樣品來進行實驗。本實驗選擇 tatrazone(最大吸收波長：429 nm)和平均粒徑為約 15 nm 的銀奈米粒子(最大吸收波長：411 nm)來當做實驗的樣品，此兩種樣品的光譜和其相對應的結構及 SEM 圖分別如圖 12 和圖 13。本實驗中所使用的銀奈米粒子其表面修飾著 MUA 分子，而 MUA 分子的 pK_a 約為

5.7[20]，即大部分的 MUA 分子在環境 pH 值大於 5.7 後就會以解離的狀態存在於溶液中，因此對表面修飾著 MUA 分子的銀奈米粒子而言，在鹼性溶液中，銀奈米粒子在溶液內的分散的能力較佳，較不易產生聚集(aggregation)的情況，故選擇高 pH 值的緩衝溶液來當做實驗的溶劑和載液。值得注意的是，除了 pH 值的調控需要注意之外，奈米粒子存在環境的鹽類濃度如果太高，也會使得銀奈米粒子產生聚集(salt-induce aggregate)[21]，因此使用的緩衝溶液其濃度不可以太高。



(a)



(b)

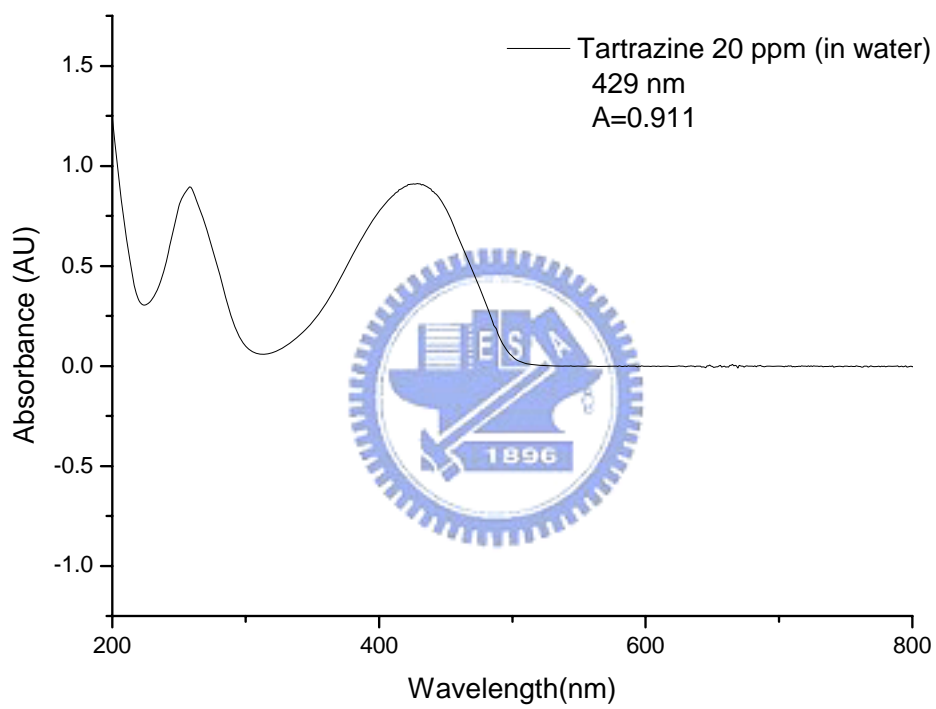
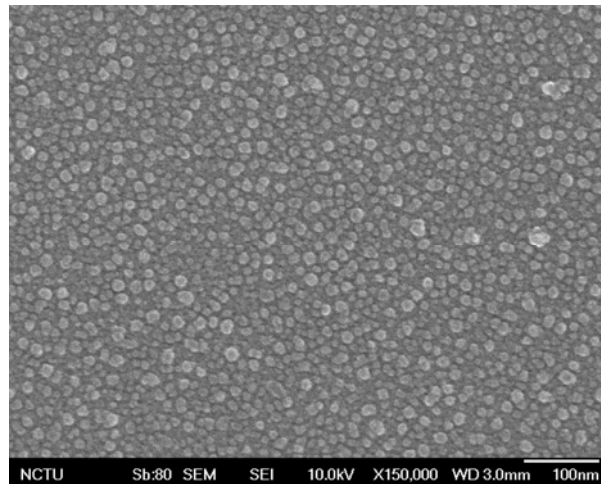


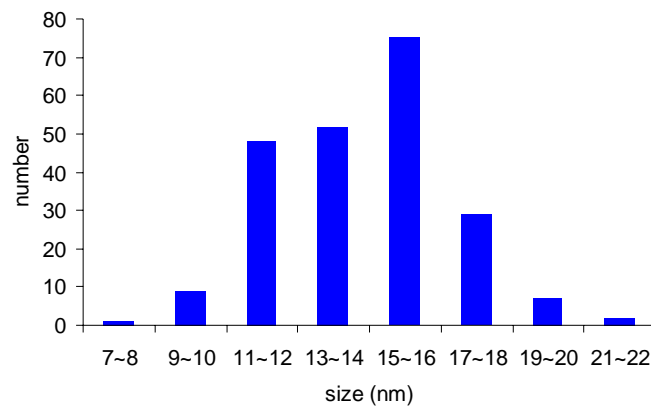
圖 12 tartrazine 的結構與 UV 光譜圖[22]

(a)為 tartrazine 的結構式；(b)為其 UV 光譜圖。

(a)



(b)



(c)

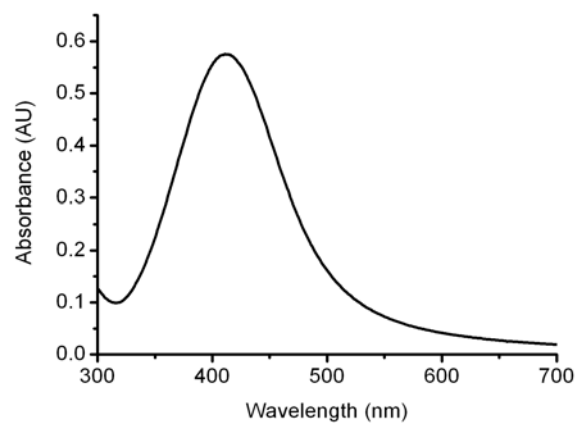


圖 13 銀奈米粒子的掃描式電子顯微鏡的圖和粒徑分布圖以及 UV 光譜圖
(a)銀奈米的掃描式電子顯微鏡的圖(b)粒徑分布圖，粒徑為 15 ± 2 nm (c)銀奈米粒子的 UV 光譜圖，最大吸收波成為 411nm。

(a) 20mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH11)之配製

將 1.7418 g 之磷酸氫二鉀以 50 ml 的去離子水溶解，之後再加入 20 ml 之 0.1 M 氫氧化鉀水溶液，最後將整體溶液之體積稀釋至 500 ml 即完成緩衝溶液之配製。

(a) tatrazine 溶液之配製

將 tatrazine 以緩衝溶液配製成濃度為 500 mg/l 的樣品水溶液。

(b) 銀奈米粒子之合成[23]

將 1.7 mg 的 MUA 加入 25 ml 的 sodium borohydride 水溶液(20 mM) 中，攪拌五分鐘。之後在劇烈攪拌的情況下，以緩慢滴入的方式加入 25 ml 的 Silver nitrate 水溶液(5 mM)。剛開始滴入時，只有少量的奈米粒子形成，因此溶液的顏色會成淡黃色，待 Silver nitrate 水溶液完全滴入後，由於形成大量的奈米粒子，溶液會呈現棕黑色。將溶液攪拌 24 小時之後，以 0.1 M 的鹽酸調整溶液之 pH 值成為 2，然後將此溶液以 6000 rpm 的轉速進行離心 2 分鐘。離心完後將沉澱下來的銀奈米粒子(約 15 mg)再溶於 25 ml 的緩衝溶液裡保存，準備進行日後的實驗。

3.5 實驗參數的測量

(a) 樣品體積 (V_s , ml)

本文實驗使用「染料注入法」來預估樣品體積[24]。首先，將一已知濃度的染料注入後，六向閥轉到輸出位置，然後注入去離子水並收集於定量瓶中，加水至定量瓶上刻度，測量其吸光值。接著，取幾組特定體積的染料稀釋至相同體積，測量吸光值，做出一條染料體積對吸

光值的檢量線。最後將待測樣品體積吸光值代入此檢量線，便可反推樣品的注入體積。

(b) 多通道偵測器訊號的校正

在偵測系統中，多通道偵測器測量到的訊號可能會受到下列幾項因素的影響：(1)光源(燈管發出的光強度不均以及強度隨時間變化)；(2)玻璃管(玻璃管壁厚度不均勻)；(3)管路(透明的 PFA 管路纏繞擠壓後，其內徑不均勻)；(4)偵測器(偵測器上每一個偵測點對光線的靈敏度)，造成訊號會有誤差存在，因此需要做吸收訊號之校正。將一已知濃度的染料注入整個管路，以多通道偵測器測量吸收訊號，將每一圈管路其光吸收值最高的偵測點挑出來，代表此圈管路的光吸收值，即相當於光線通過此圈管路的最大光徑。每一圈管路都會有一個光吸收值最高的偵測點，假設各偵測點的吸收值相同，之後才能分析樣品訊號之變化，故將這些偵測點的吸收值平均，再除上每一點原本的吸收值，即可得到每一個偵測點的吸收校正因子，此因子可用於樣品吸收度之校正。

(c) 管路位置

樣品在管路中的空間分布波形的橫軸是以長度為單位，所以，必須知道偵測點對應的管路位置 (L)。先使用氮氣先將管路迴圈吹乾，接著，用幫浦推動染料進入空管路中，記錄染料前端(染料與空氣的接觸面)通過每個偵測點花費的時間 (t)，將時間乘上體積流速(Q)再除以管路截面積($a=\pi r^2$)，就得到偵測點對應的管路位置($L=t\times Q/a$)。

3.6 電腦操作介面設定

進行實驗前，必須先設定好電腦操作介面，例如：樣品取樣時間、曝光時間...等，使多通道偵測器獲得樣品吸收訊號，以下會逐一介紹操作介面(圖 14)。

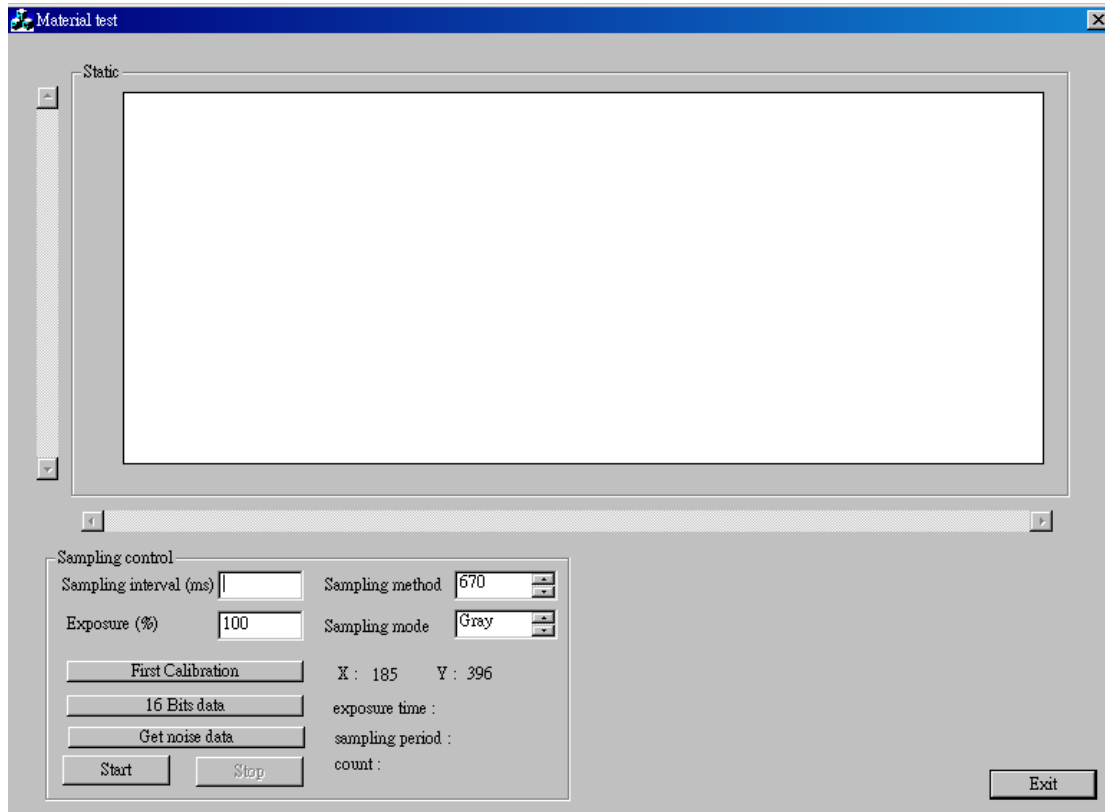


圖 14 電腦操作介面圖

(a) Sampling interval (樣品取樣時間)

樣品取樣時間是以毫秒(ms)為單位，根據樣品種類與幫浦流速等實驗條件，輸入適當的取樣時間，使多通道偵測器在每個不同流速實驗條件下獲取的空圖組數一樣多。

(b) Sampling method (取樣方法)

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，在偵側範圍 21 公分的多通道偵測器裡，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，其解析度已足夠，並且，以相鄰 16 點做平均積分，可以達到加強訊號雜訊比(S/N)的效果。

(c) Sampling mode (取樣模式)

光學盒內的 CCD 有塗佈材料，可以過濾掉不同波長的光源，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，因光學盒已加上自行設計的濾波片，使符合樣品吸收波長之波段的光源通過，所以，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。

(d) Exposure (曝光時間)

曝光時間是以百分比(%)為單位，輸入不同的數值會對應到不同的曝光時間(表 1)，若偵測器接收到足夠的光源強度，儘量選擇較短的曝光時間，因為曝光時間過長，對於空間分布瞬間變化很劇烈的樣品而言，其實驗結果的解析度不好，樣品在管內的行為無法被偵測，所以，曝光時間若過長會影響偵訊器所收集到的記錄波形。

表 1 曝光時間對照表

Exposure (%)	time (sec)
100	0.003590
200	0.007190
300	0.01079
400	0.01439
500	0.01799
600	0.02159
700	0.02519
800	0.02879
900	0.03239

3.7 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，以及調整適當的狹縫寬度，使光源能夠通過管路迴圈並進入偵測器，並且依照電腦操作介面上呈現的訊號強度，進行微調，調整完畢後測量偵測點所對應的管路位置，上述步驟完畢後進入接下來的實驗部份。

(1)將緩衝液以超音波洗淨器充分震盪後，使其充滿管路迴圈，並檢查管路內是否有氣泡，若有氣泡則再重覆此實驗步驟，直到管路迴圈內沒有氣泡；(2)依照實驗條件設定幫浦流量；(3)設定電腦操作介面 (Sampling mode : Gray ; Sampling method : 670 ; Exposure : 100%)；(4)注入樣品，並將儀器蓋上黑布避免受其他光源干擾；(5)開動幫浦推動載液進行實驗並同時收集偵測訊號；(6)從電腦操作介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)進行吸光值校正。

第四章 結果與討論

4.1 數據處理

本實驗所使用的多通道偵測系統，其偵測器會在同一時間得到 670 個訊號收集點。每次取樣的曝光時間 (exposure time) 為 3.6 ms，對本研究所使用的最高流速實驗條件 1.06 ml/min (2.26 cm/s) 來說，每次取樣期間，樣品只會在管路內前進 81 μm ，對於一個完整波形寬度而言，此值甚小，故可忽略曝光時間對空間波形的影響。

數據處理步驟如下：實驗過程中，每次取樣會記錄 670 個訊號收集點的偵測訊號，由「timeInfo.txt」檔案可以得到每次取樣時間的數據；「result.txt」檔案內含整個系統偵測過程中樣品的吸收訊號，在 670 個訊號收集點內，挑出光線通過最大光徑的訊號偵測位置，將這些偵測位置所測得的吸收訊號分別乘上 3.5(b) 節提及的吸收校正因子，以校正樣品之正確吸收值。

在固定的偵測位置(L)，以固定的取樣間隔時間收集偵測訊號，可得到「時間對應吸收值」的圖形，這種隨流析時間收取訊號作圖的圖形稱為時圖(一般偵測器所得的記錄波形即為時圖)，本實驗中，為要比較不同體積流速下的時圖波形，因此將原本時圖橫座標的時間單位(s 或 min)經由乘上體積流速來轉換成流量(ml)單位。

將同一時間(瞬間)中「不同偵測位置」的偵測訊號取出，依據偵測點對應的管路位置作出「位置對吸收值」的圖形，這種在同一時間獲得全部偵測點的訊號，並以管路位置作圖得到的圖形稱為空圖。

4.2 波形參數指標

4.2.1 基本參數

空圖與時圖波形基本的指標參數為：

- (a) 波高：訊號波形的最大訊號值。
- (b) 波峰位置：即波形最高點所對應的橫座標位置，由於空圖與時圖的作圖方式不同，其單位可為長度(空圖)或流量(時圖)。
- (c) 波面積：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 15)，計算公式為：

$$A = \frac{\sum (y_i + y_{i+1}) \times (x_{i+1} - x_i)}{2} \quad (4.1)$$

其中 y_i 代表第 i 個訊號值， x_i 為 y_i 對應的位置； y_{i+1} 代表第 $i+1$ 個訊號值， x_{i+1} 為 y_{i+1} 對應的位置，若 x_i 與 x_{i+1} 間隔差距越小，則累加結果會越接近真實面積。

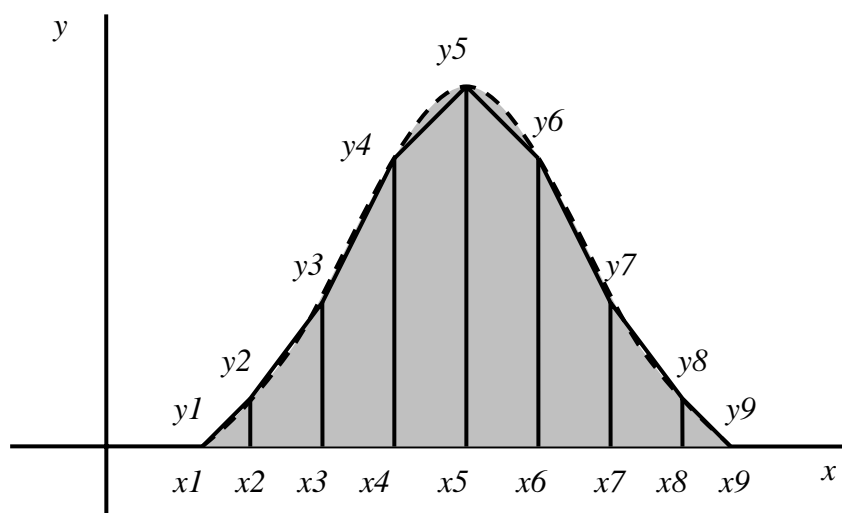


圖 15 積分法求波形面積的示意圖

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。

(d)波形質量中心(calculated mass center by the shape profile): 意義為波形面積的一半，也是所有數據點位置的平均值，可由以下公式計算得知：

$$\bar{x} = \frac{\sum y_i \times x_i}{\sum y_i} \quad (4.2)$$

和波峰位置一樣，波形的質量中心由於空圖波形與時圖波形的作圖方式不同，其單位可為長度(空圖)或流量(時圖)。

(e)由流速估算之空圖波形的質量中心(estimated mass center by the flow rate): 樣品在空間中移動時，其質量中心位置可以藉由線性流速乘上樣品流析時間推算，公式如下：

$$\bar{x}_L' = u_{av} \times t \quad (4.3)$$

(f)半高寬：波形高度一半的波寬，其單位可為長度或流量。



4.2.2 進階參數

本實驗目的是要了解奈米粒子在流動注入分析系統中空時差異的情形，因此會對於空時圖的波形訊號結果進行比較，比較的方式有兩種，第一是波形形狀的比較，第二為波形延散程度的比較。

(a)波形形狀：

由於大部分奈米粒子在流動注入分析系統中產生的波形同時會含有 convection peak 和 diffusion peak 這兩個波峰訊號的關係，因此可以將 convection peak 和 diffusion peak 的高度比當作波形形狀的參考指標。此參數最早由 Fischer 等人所提出[2]，他們定義 convection peak 的高度為 h1，diffusion peak 的高度為 h2，如圖 16，藉由 h1 和 h2 的比例

可以推算出奈米尺寸(nano scale)粒子的擴散係數的關係以及其相對應的尺寸大小分布。利用這個參數可以將不同波形彼此間形狀上的差異量化成數字的結果。

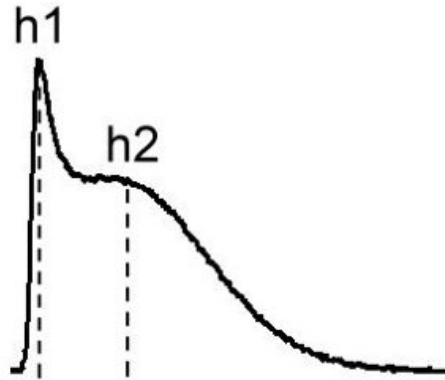


圖 16 h1 和 h2 的示意圖

h1 為 convection peak 的訊號高度，h2 為 diffusion peak 的訊號高度。

(b)波形延散程度：

在統計學上，常常會以標準偏差值(σ)來當作數據點分散情形的參考指標。空圖和時圖的波形，也是由許多的數據點所構成，因此也可以藉由算出構成這些波形的數據點的標準偏差值，來代表這個波形的延散程度。當波形是一個高斯波形，則此高斯波形的半高寬恰好會是 2.35 倍的標準偏差值，因此可以很簡單的被我們求得，但是當波形為非高斯波形的情況下，就必須根據統計學上計算標準偏差的原始公式來求得，公式如下：

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum y_i \times (x_i - \bar{x})^2}{\sum y_i}} \quad (4.4)$$

標準偏差，是一個有單位的數值，就像波峰位置、平均值和半高寬一樣，會由於時圖和空圖做圖的方式不同，而使得時圖和空圖的標準偏差有不同的單位，也因為如此，單位不同的兩種數據便無法直接拿來

進行比較。

相對標準偏差(RSD)，是將標準偏差在除上所有數據點的平均值，並以百分比的方式呈現，公式如下：

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.5)$$

相對標準偏差和標準偏差一樣都可以用來表示數據分散的情形，差別只是相對標準偏差的分散情況是與平均值來做比較，是屬於相對分散情形，而標準偏差是沒有考慮到平均值的絕對分散情形。除此之外，相對標準偏差是一個沒有單位的數值，因此可以用在空時圖數據點分散情形的比較。

實驗波形所得的各指標參數與理論公式中所使用的參數，其符號的定義整理於附錄 A。



4.3 相對標準偏差與波形的關係

(a) 時圖的相對標準偏差

在 2.2 和 2.3 節中，我們分別探討了 τ 值和理論板數與波形結果的關係，同時也討論了 τ 值和理論板數相關性。在此我們要將訊號波形的相對擴張的情形，也就是相對標準偏差值，去與訊號波形以及實驗相關條件進行關聯。理論板數其最原始的表示式為：

$$N = \left(\frac{\bar{x}}{\sigma} \right)^2 \quad (4.6)$$

若波形是高斯波形，由於波形左右對稱的關係，則此樣品的波峰位置

可以視為是構成此訊號波形的所有數據點其位置的平均值，且其半高寬恰好會是 2.35 倍的標準偏差，因此才可將公式 4.6 理論板數的表示式改寫成公式 2.5 的形式。標準偏差除以平均值的結果會是相對標準偏差，因此又可以將公式 4.6 改寫成：

$$N = \left(\frac{1}{RSD} \right)^2 \quad (4.7)$$

利用公式 4.7，我們可以藉由構成波形的所有數據點的相對標準偏差值計算出任何波形的理論板數，而不再只是侷限於計算高斯波形的理論板數。將公式 2.8 的關係式代入公式 4.7 可得到：

$$N = 24 \times \tau = \left(\frac{1}{RSD} \right)^2 \quad (4.8)$$

根據公式 4.8，由於相對標準偏差與和波形的形狀相關的 τ 值有等式的關係(公式 2.8)，因此我們可以斷定構成此波形的相對標準偏差，也會與波形的形狀有很大的關係。根據 Golay[15]等人的說法，當理論板數大於 30 之後，才可將波形視為是一個高斯波形，經由公式 4.7 的轉換，我們可以得到，若理論板數要大於 30，則樣品的訊號波形的所有數據點的相對標準偏差值應該要小於 18.26%。因此當理論板數大於 30，或構成此波形的所有數據點的相對標準偏差值計算出來小於 18.26%時，我們可以預期此波形的形狀是一個趨近於高斯形狀的波形。

再來，我們可以將公式 4.7 中的理論板數值以公式 2.4 的理論板數與各實驗參數的關係式代入，並將關係式中的流量，以截面積($a=\pi r^2$) 乘上線性流速(u_{av})進行代換，可以得到的到波形的相對分散情形或構成此波形所有數據點的相對標準偏差與各實驗參數間的關係式：

$$N = \left(\frac{1}{RSD} \right)^2 = 24\pi \times \frac{DL}{\kappa r^2 u_{av}} \quad (4.9)$$

根據公式 4.9，我們可以預期，當樣品擴散能力越好(D 值大)、管長越長(L 值大)、管徑越細(r 值較小)以及流速越慢(u_{av} 值較小)，樣品所形成的波形相對延散程度或平均標準偏差會越小，一旦波形的相對延散程度或相對標準偏差小於 18.26%時，此波形即可視為一個單峰的高斯波形。

(b)空圖的相對標準差

當樣品沿著管路擴張時，其延散程度 σ_L 應與樣品的移動距離的平方根成正比，而樣品的移動距離即為其所在的質量中心位置，即：

$$\sigma_L = \mu_L \sqrt{\bar{x}} \quad (4.10)$$

其中， μ_L 是樣品的延散係數(dispersion coefficient)。將公式 4.10 的等號左右兩邊都除上質量中心，即可得到：

$$\frac{\sigma_L}{\bar{x}} = \frac{\mu_L}{\sqrt{\bar{x}}} \quad (4.11)$$

將標準偏差除以平均值的結果即為相對標準偏差，且為了與時圖的相對標準偏差值的關係式(公式 4.9)進行比較，可將公式 4.11 改寫成：

$$\left(\frac{1}{RSD} \right)^2 = \frac{\bar{x}}{\mu_L^2} \quad (4.12)$$

根據公式 4.12，我們可以得知，在相同延散係數的實驗條件下，樣品的質量中心位置越向管路後端移動，樣品的相對延散程度越小。

4.4 數據結果與討論

4.4.1 實驗條件

本實驗使用兩種不同擴散係數的樣品，分別是 tatzazine 和銀奈米粒子。將濃度 500 mg/L 的 tatzazine 水溶液和 600 mg/L 的銀奈米粒子水溶液分別注入管徑 1000 μ m 的流動注入分析系統中，再以 5 種不同的體積流速(0.21 ml/min、0.43 ml/min、0.64 ml/min、0.85 ml/min、1.06 ml/min)將載液(緩衝溶液)打入並收集訊號。在數據處理時，分別將偵測點設定在 5 個不同的管路位置(274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm)，收集隨流析時間而改變的樣品吸收訊號，將所得結果做圖，因此每種流速有 5 組時圖，並找出空圖樣品估算質量中心位置(由公式 4.3 估算而得)移動到此 5 個管路位置時的空圖，所以每種流速的 5 組時圖會有相對應的 5 組空圖。



4.4.2 時圖波形變化趨勢

(a) 不同體積流速，相同偵測位置的時圖波形趨勢比較

圖 17 和圖 18 分別為偵測位置在管路位置 471.6 cm 處，tatzazine 和銀奈米粒子在 5 種不同體積流速(0.21 ml/min、0.43 ml/min、0.64 ml/min、0.85 ml/min、1.06 ml/min)下所得到的時圖偵測結果，其各波形參數列於表 2 和表 3。在 tatzazine 的實驗結果方面，不論流速如何改變，我們所得到的波形都還是屬於類高斯的波形，波峰位置都會在流析流量約為 3.7 ml 的時候出現，只是當流速提高時，樣品的波高會下降，而波寬會增加。但是，在銀奈米粒子的實驗結果方面，可以明顯的看的到，流速改變時，我們所得到的波形結果會非常的不同。以

銀奈米粒子當樣品時，其流動注入分析訊號的波形會以雙峰的形式出現(convection peak 和 diffusion peak)。以本實驗而言，convection peak 的訊號會出現在流析流量 2.5 ml 處，而 diffusion peak 訊號出現在流析流量 3.7 ml 處。低流速時 diffusion peak 訊號較強，波峰位置即為 diffusion peak 出現的位置，而隨著流速提升，convection peak 的訊號也會慢慢變強，甚至到了後來，波峰位置也會往前移動到 convection peak 出現的位置。

根據 4.3(b) 節中相對標準偏差對於波形的探討，當時圖的實驗波形其相對標準偏差值小於 18.26% 時，實驗所得的波形應該是一個趨近於高斯的單峰波形。依照本實驗的實驗結果，也的確發現這樣的現象存在。表 2 中，tetrastazine 不管在何種流速的條件下，其波形的相對標準偏差值都小於 18.26%，因此在每個流速條件下其波形都會趨近於高斯波形。然而，在表 3 中，不論何種流速條件下，奈米粒子的相對標準偏差都大於 18.26%，當流速最小時(0.21 ml/min)其相對標準偏差值為 19.57%，是最接近上述 18.26% 之值，因此相較於其他流速(0.43~1.06 ml/min)下所產生的波形而言，的確也是最接近高斯波形的一個實驗波形。

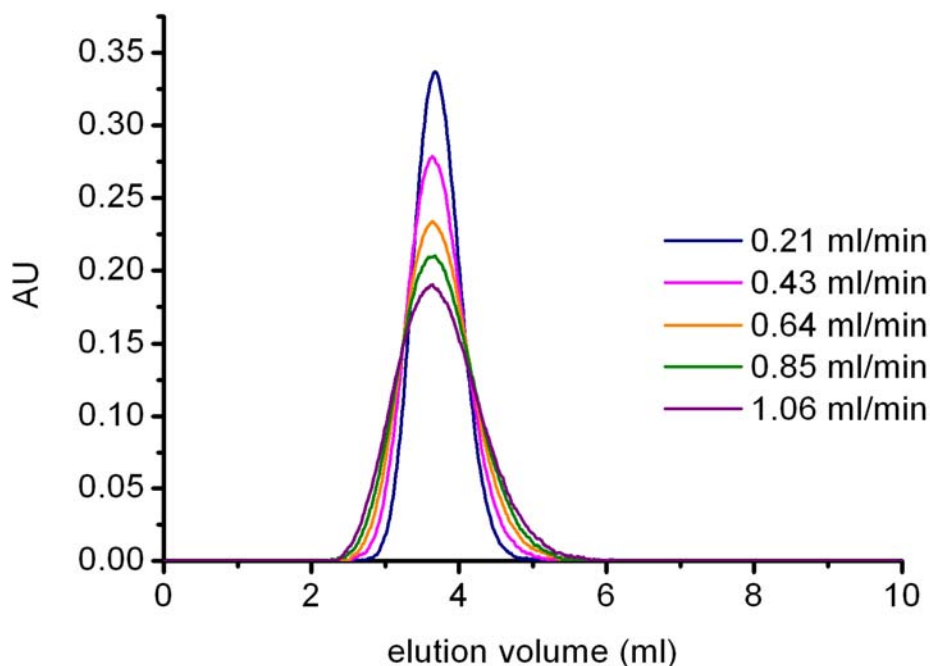


圖 17 tatrazine 在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)，相同偵測位置(471.6cm)的時圖波形。



表 2 tatrazine 在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)，相同偵測位置(471.6cm)的時圖波形相關參數

體積流速(ml/min)	0.21	0.43	0.64	0.85	1.06
波高 h (AU)	0.337	0.278	0.233	0.210	0.189
波峰位置 t_p (ml)	3.68	3.63	3.64	3.68	3.64
面積 A_t (AUml)	0.262	0.265	0.263	0.265	0.262
質心流量 \bar{x}_t (ml)	3.72	3.71	3.73	3.73	3.74
半高寬 $W_{1/2,t}$ (ml)	0.733	0.895	1.07	1.19	1.31
標準偏差 σ_t (ml)	0.314	0.396	0.463	0.504	0.561
相對標準偏差 RSD (%)	8.5	10.7	12.4	13.5	15.0

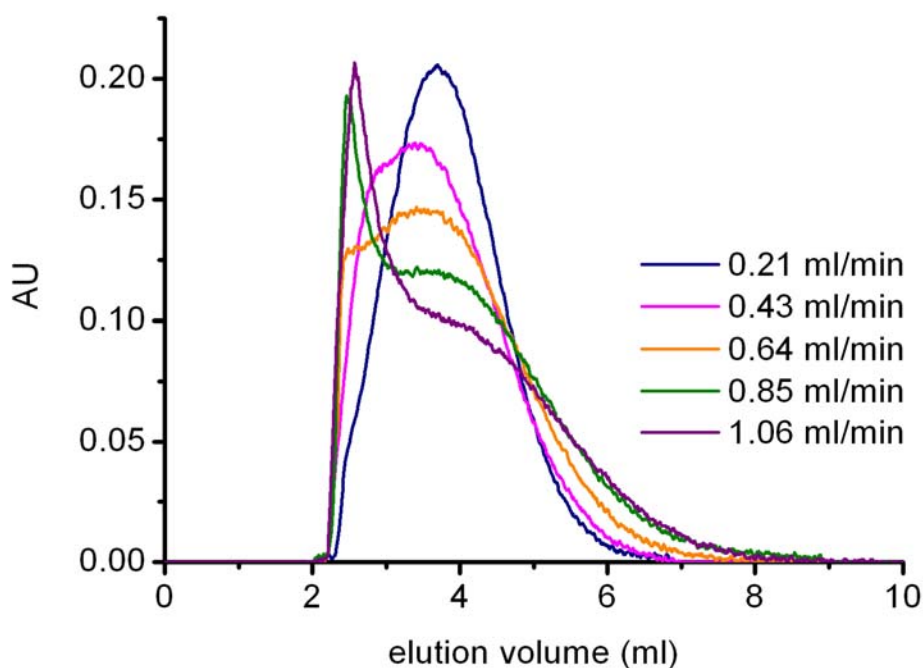


圖 18 銀奈米粒子在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)，相同偵測位置(471.6cm)的時圖波形。

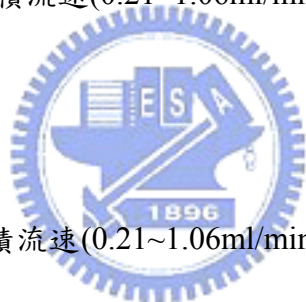


表 3 銀奈米粒子在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)，相同偵測位置(471.6cm)的時圖波形相關參數

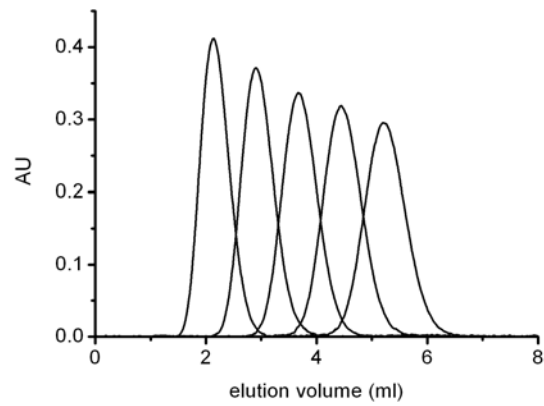
體積流速(ml/min)	0.21	0.43	0.64	0.85	1.06
波高 h (AU)	0.204	0.173	0.146	0.191	0.208
波峰位置 t_p (ml)	3.70	3.39	3.41	2.43	2.57
面積 A_t (AU-ml)	0.378	0.387	0.390	0.383	0.396
質心流量 \bar{x}_t (ml)	3.85	3.73	3.87	3.93	3.93
半高寬 $W_{1/2,t}$ (ml)	-	-	-	-	-
標準偏差 σ_t (ml)	0.753	0.854	1.01	1.23	1.25
相對標準偏差 RSD (%)	19.6	22.9	26.2	31.2	31.6
$h1/h2$	0.29	0.71	0.90	1.47	1.99

(b)相同體積流速，不同偵測位置的時圖波形趨勢比較

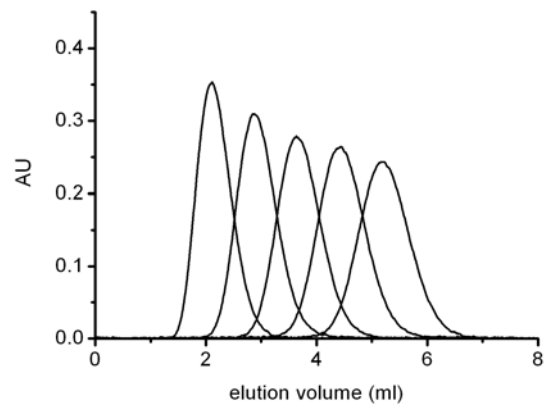
除了探討不同流速對時圖波形變化的影響之外，我們也對於不同偵測位置所偵測到的時圖波形進行探討。圖 19(a)~(e)和圖 20(a)~(e) 為 tatrazine 和銀奈米粒子這兩種不同的樣品在 5 種不同流速所得到的時圖波形，每一組時圖分別代表著 5 個不同偵測位置(274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm)，模擬單通道偵測器隨流析時間紀錄樣品訊號而得到的波形。以 tatrazine 的同組時圖波形而言，當管路越長，樣品抵達偵測器所花的時間越久，導致波峰越慢出現，波形也會變的越矮和越寬的趨勢。對於銀奈米粒子的實驗結果而言，除了管路越長，波峰會越慢出現和波形會越矮越寬的趨勢之外，偵測位置的改變也會影響到 convection peak 和 diffusion peak 消長的情況。偵測位置較前面所得到的時圖波形，convection peak 的訊號會較為明顯，隨著管路位置越來越後面，則 diffusion peak 的訊號則會越來越明顯。

公式 4.8 顯示出，同種樣品在固定流速和管路截面積的情況下，偵測到的時圖波形平均標準偏差值之倒數平方(RSD^{-2})，應該要和偵測位置(L)有正比的關係。圖 21(a)~(e)和圖 22(a)~(e)分別為 tatrazine 和銀奈米粒子，在各流速下不同偵測位置，所得到的時圖波形平均標準偏差的倒數平方和偵測位置的做圖結果。結果顯示，不論是 tatrazine 或是銀奈米粒子的時圖，亦即波形不論是類高斯的波形還是非常遠離高斯且不對稱的波形，都會遵守著平均標準偏差的倒數平方和偵測位置為線性的關係。

(a)



(b)



(c)

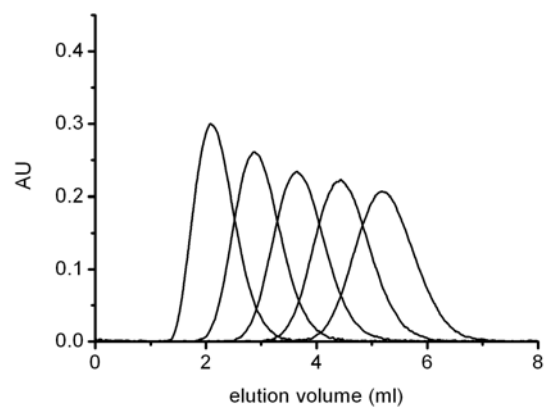
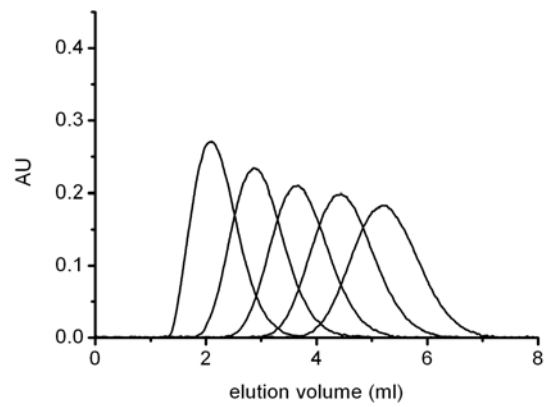


圖 19 tatrazine 在不同體積流速下的時圖

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

每一組時圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器在不同偵測位置隨時間取得的紀錄波形，偵測位置由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(d)



(e)

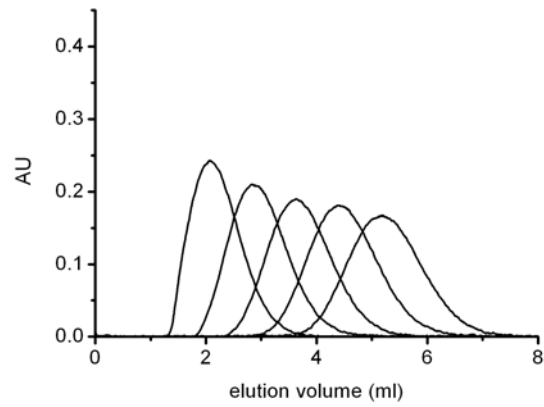
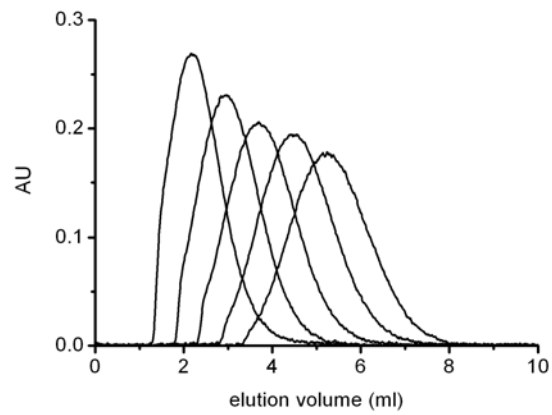


圖 19 tatrazine 在不同體積流速下的時圖(續)

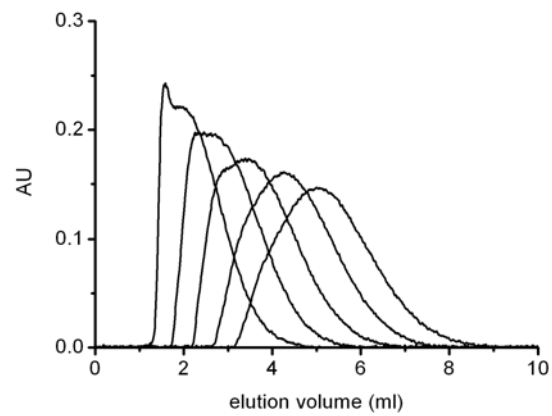
(c) 0.85 ml/min (d) 1.06 ml/min

每一組時圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器在不同偵測位置隨時間取得的紀錄波形，偵測位置由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(a)



(b)



(c)

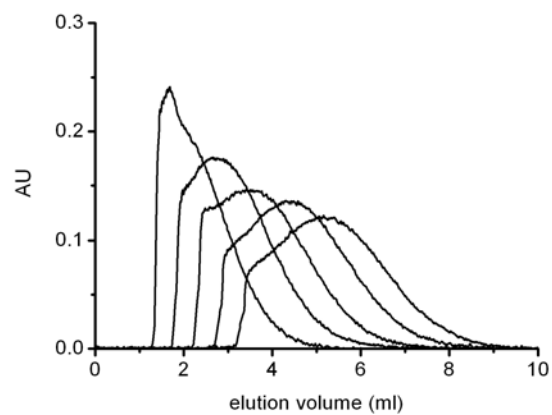
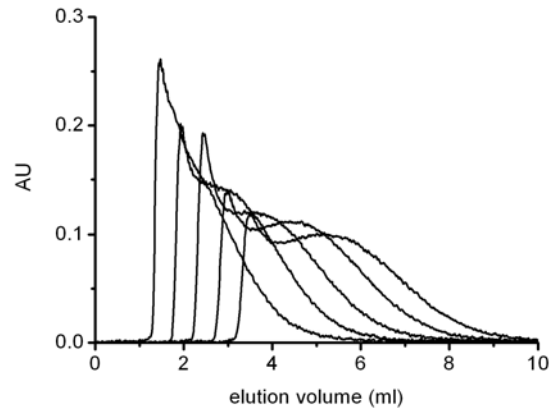


圖 20 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

每一組時圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器在不同偵測位置隨時間取得的紀錄波形，偵測位置由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(d)



(e)

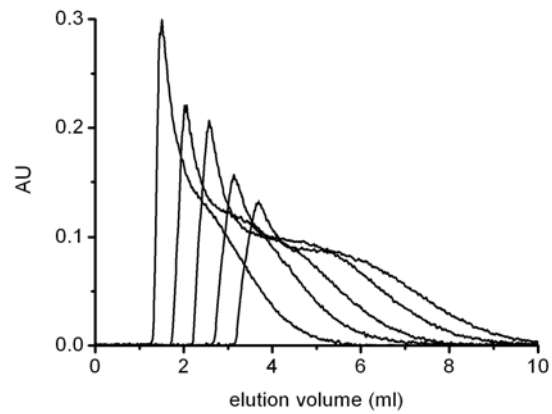
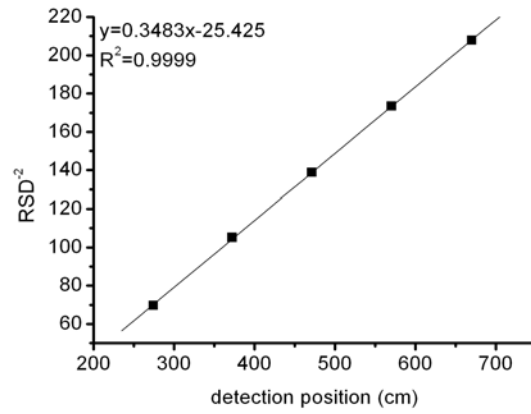


圖 20 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖(續)

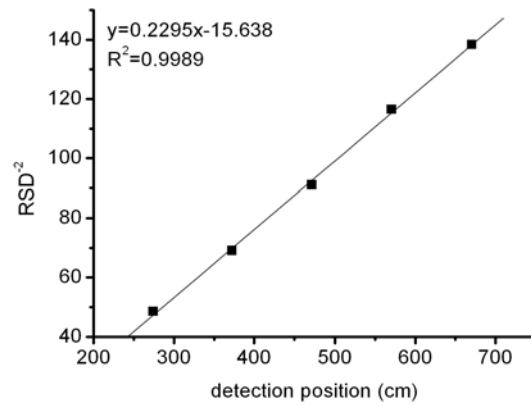
(c) 0.85 ml/min (d) 1.06 ml/min

每一組時圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器在不同偵測位置隨時間取得的紀錄波形，偵測位置由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(a)



(b)



(c)

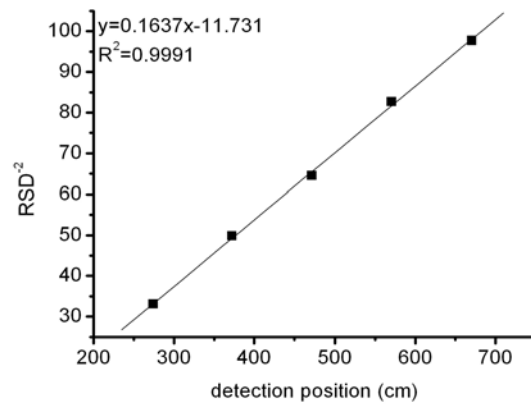
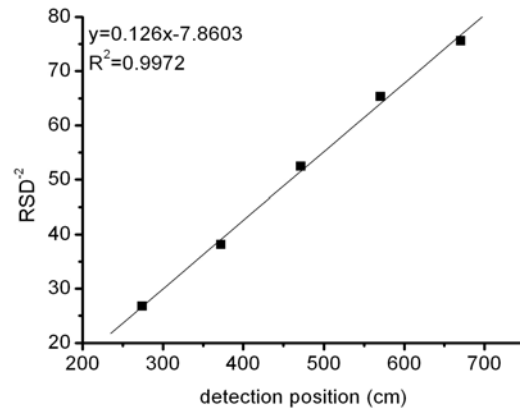


圖 21 tatrazine 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位置的關係

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

(d)



(e)

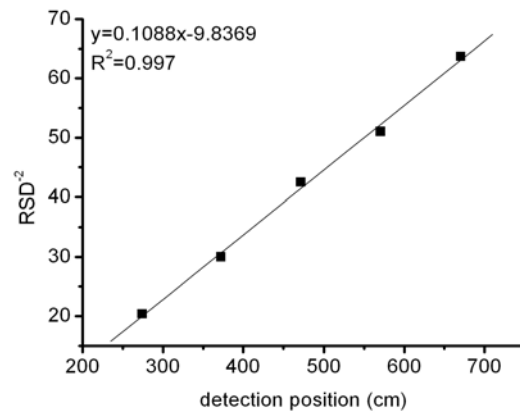
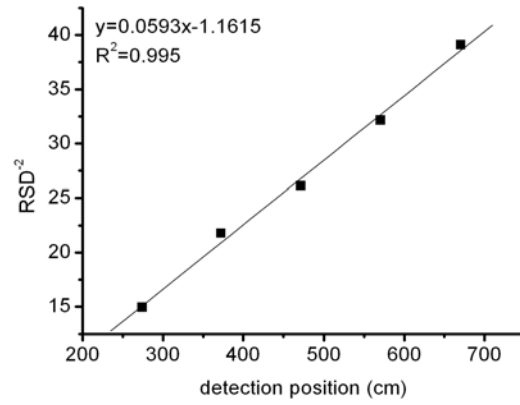


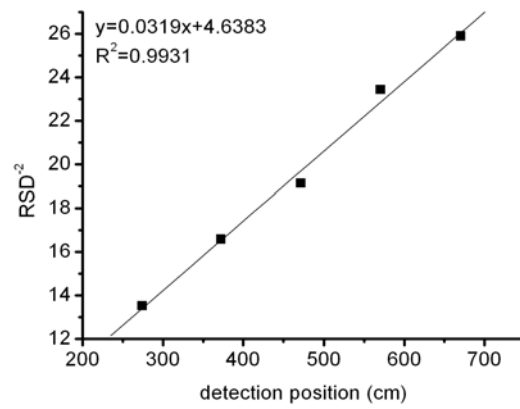
圖 21 tatrazone 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位置的關係 (續)

(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

(a)



(b)



(c)

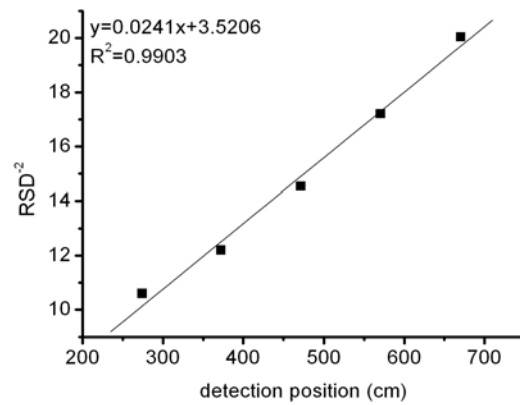
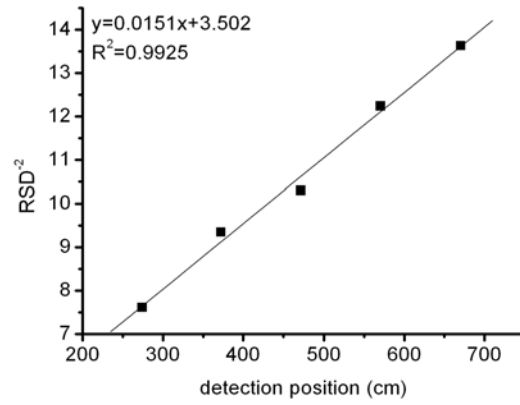


圖 22 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位置的關係

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

(d)



(e)

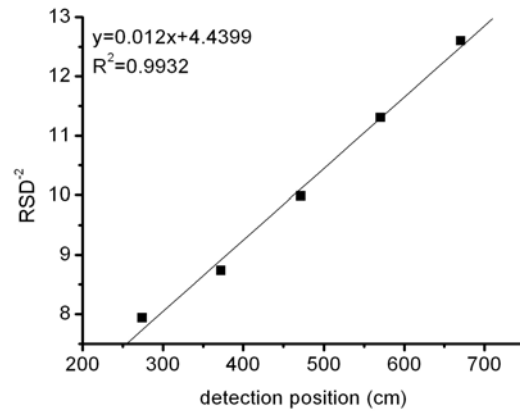


圖 22 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與偵測位置的關係 (續)

(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

4.4.3 空圖波形變化趨勢

(a)不同體積流速，相同估算質量中心位置的空圖波形趨勢比較

圖 23 和圖 24 為 tatrazine 和銀奈米粒子這兩種樣品在 5 種不同體積流速下(0.21 ml/min、0.43 ml/min、0.64 ml/min、0.85 ml/min、1.06 ml/min)樣品估算質量中心移動到接近 471.6 cm 管路位置時進行訊號偵測所得到的空圖波形，其各波形的參數如表 4 和表 5。tatrazine 的空圖波形，不論流速為何，波形都是類高斯的波形，波峰位置都會出現在管路位置 476.98 cm 處。隨著流速變快，波高會降低而波寬會增加。銀奈米的空圖波形，也同時存在著 convection peak 和 diffusion peak 這兩種形式的波峰。Convection peak 訊號出現在管路位置 675.29 cm 處，而 diffusion peak 訊號出現在管路位置 443.96 cm 處。流速越快 convection peak 的高度越高，反之，若流速越慢則 diffusion peak 的高度會越高。

tatrazine 空圖的估算質量中心位置與實際波形的質量中心位置誤差值很小，而銀奈米粒子空圖的結果卻存在著些許的誤差，推測的原因有兩個：第一，由於多通道偵測系統所使用的光源最大放射波長位於 435nm 處，此放射波長使得 tatrazine 的樣品(最大吸收波長:429nm)的偵測靈敏度比銀奈米粒子樣品(最大吸收波長：411nm)的偵測靈敏度來得好，因此 tatrazine 在多通道偵測系統內的訊號雜訊比(S/N)較佳而銀奈米粒子的訊號雜訊比較差。在利用公式 4.2 計算實際質量中心位置時，若訊號雜訊比較差時就很容易會產生誤差，因此銀奈米粒子的誤差值才會比 tatrazine 的誤差值大。第二，奈米粒子樣品在管路中

的延散(dispersion)效應很強，樣品在管內的空間分散情況會非常的廣，因此造成有一小部分的樣品超出多通道偵測器的偵測視窗範圍(21 cm)而無法被偵測到，因此在計算實際質量中心位置時，會產生誤差。



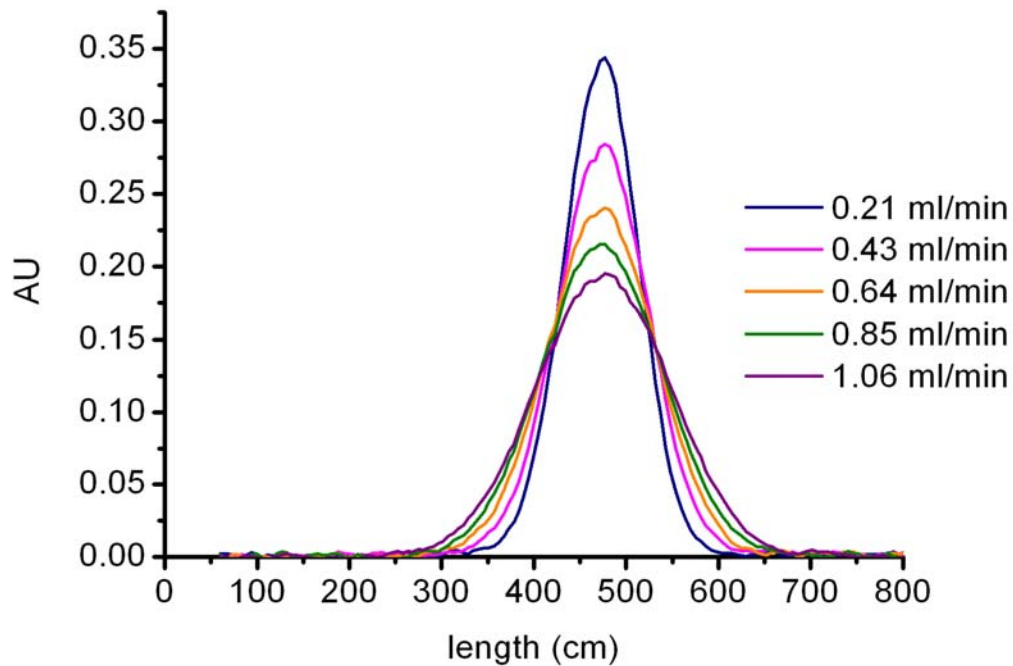


圖 23 tatrazine 在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)下，估算質量中心位置在 471.6cm 附近的空圖波形。

表 4 tatrazine 在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)下，估算質量中心位置在 471.6cm 附近的空圖波形相關參數

體積流速(ml/min)	0.21	0.43	0.64	0.85	1.06
估算質心位置 \bar{x}_L (cm)	472.24	470.98	471.03	471.39	471.58
波高 h (AU)	0.341	0.280	0.237	0.212	0.192
波峰位置 L_p (cm)	476.98	476.98	476.98	471.63	476.98
面積 A_L (AU-cm)	34.2	33.9	33.5	33.6	34.0
質心位置 \bar{x}_L	473.09	473.32	473.11	473.58	475.46
質心誤差(%)	0.180	0.497	0.442	0.464	0.824
半高寬 $W_{1/2,L}$	94.420	114.67	135.49	152.28	170.16
標準偏差 σ_L	40.179	48.794	57.655	64.799	72.408
相對標準偏差 RSD (%)	8.4	10.2	12.1	13.7	15.2

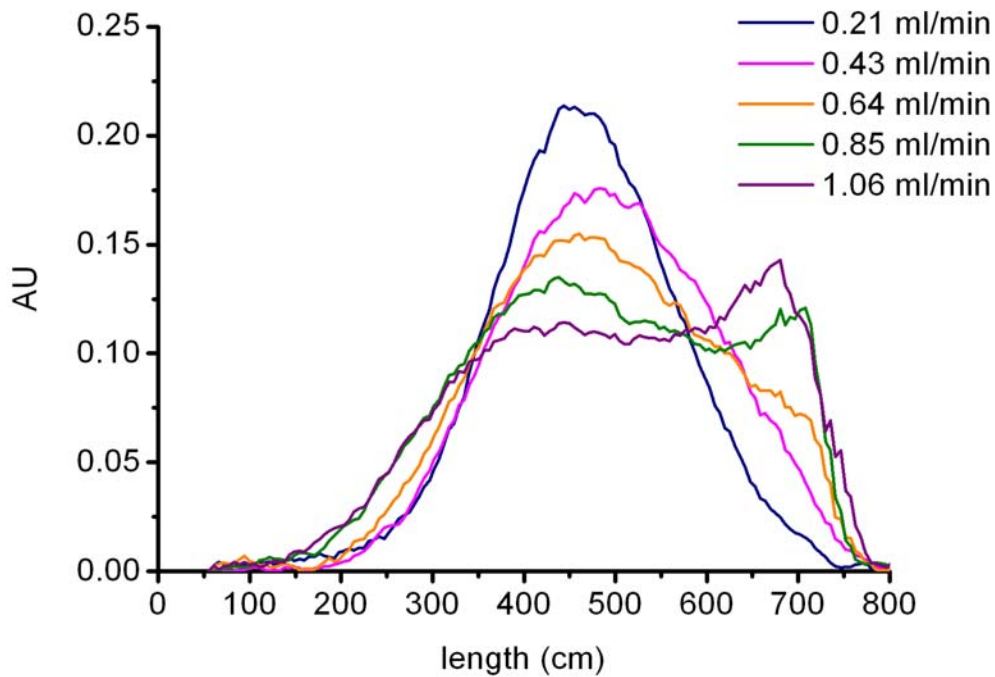


圖 24 銀奈米粒子在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)下，估算質量中心位置在 471.6cm 附近的空圖波形。

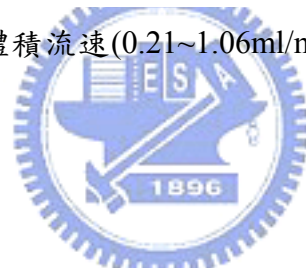


表 5 銀奈米粒子在不同體積流速(0.21~1.06ml/min)下，估算質量中心位置在 471.6cm 附近的空圖波形相關參數

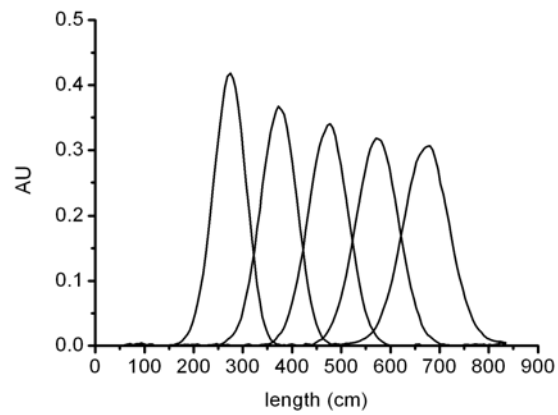
體積流速(ml/min)	0.21	0.43	0.64	0.85	1.06
估算質心位置 \bar{x}_L' (cm)	471.83	471.81	471.91	471.39	471.58
波高 h (AU)	0.211	0.173	0.152	0.133	0.141
波峰位置 L_p (cm)	443.96	482.67	460.71	438.74	680.57
面積 A_L (AU-cm)	50.6	51.6	51.2	53.0	53.3
質心位置 \bar{x}_L	465.37	492.72	490.03	491.67	501.79
誤差值 (%)	-1.37	4.43	3.84	4.30	6.41
半高寬 $W_{1/2,L}$	-	-	-	-	-
標準偏差 σ_L	103.57	114.28	128.30	143.95	150.25
相對標準偏差 RSD (%)	22.3	23.2	26.7	29.3	29.9
h_1/h_2	0.12	0.39	0.54	0.90	1.25

(b)相同體積流速，不同估算質量中心位置的空圖波形趨勢比較

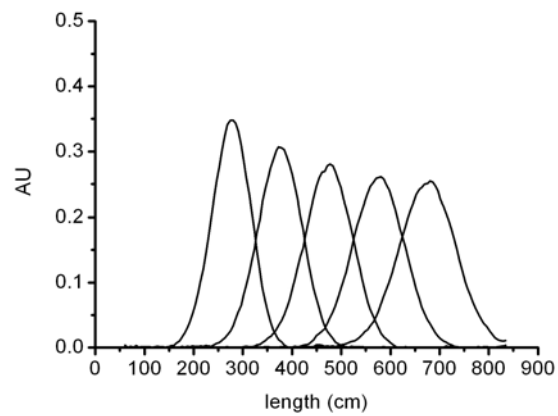
除了探討不同流速對空圖波形變化的影響之外，我們也對於不同樣品其估算質量中心移動到不同管路位置時的空圖波形進行探討。圖 25(a)~(e)和圖 26(a)~(e)分別為 tatzazine 和銀奈米粒子這兩種不同的樣品在 5 種不同流速的空圖波形，每一組空圖的 5 個波形，是分別由樣品估算質量中心來到 274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm 這 5 個管路位置時的樣品空間分布波形。以 tatzazine 的同組空圖波形而言，當樣品估算質量中心位置移動到較後面的管路位置時，波形會變的越矮越寬。對於銀奈米粒子的實驗結果而言，樣品估算質量中心移動到較後面的管路位置時的波形除了也會有越矮越寬的趨勢之外，同時也可以看的到 convection peak 和 diffusion peak 消長的情況。估算質量中心位置較前面所得到的時圖波形，convection peak 的訊號會較為明顯，隨著估算質量中心往後面的管路位置移動，diffusion peak 的訊號則會越來越明顯。

公式 4.11 顯示出，樣品在空間中移動的過程，其平均標準偏差倒數之平方，應該要和該樣品質量中心移動的距離有著線性的關係。圖 27(a)~(e)為 tatzazine，在各不同流速下條件下，所得到的空圖波形平均標準偏差的倒數平方和質量中心移動到的管路位置的做圖結果，結果顯示，平均標準偏差值經過倒數平方後和樣品質量中心移動的距離的確存在著線性的關係。由於多通道偵測器的偵測範圍僅有 21 cm 的關係，加上奈米粒子在空管中的延散(dispersion)效應很強，空間上分布的波形會很廣，因此奈米粒子樣品質量中心在比較前面和後面的管路位置的空圖波形，會是一個不完整的空圖波形，因此無法將其每個空圖波形平均標準偏差都計算出來，故在此不加以討論。

(a)



(b)



(c)

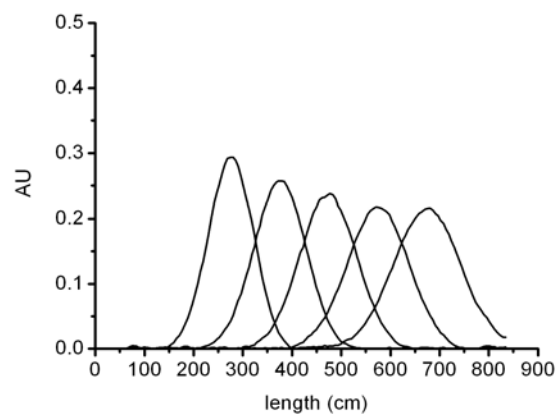
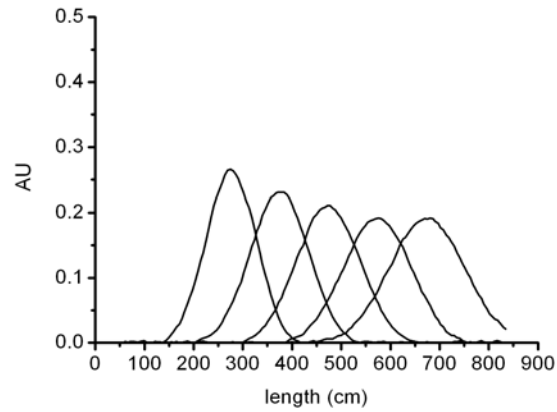


圖 25 tatrazine 在不同體積流速下的空圖

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

每一組空圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器偵測不同估算質量中心位置的空圖，空圖的估算質量中心由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(d)



(e)

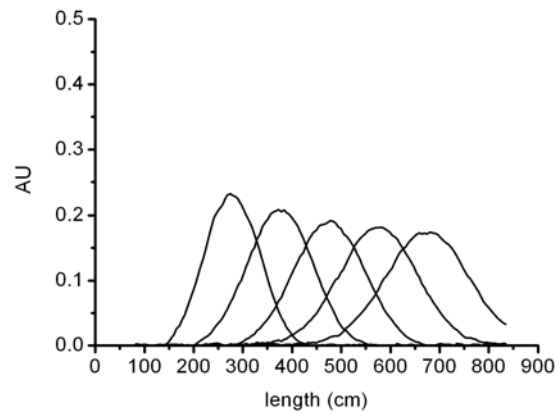
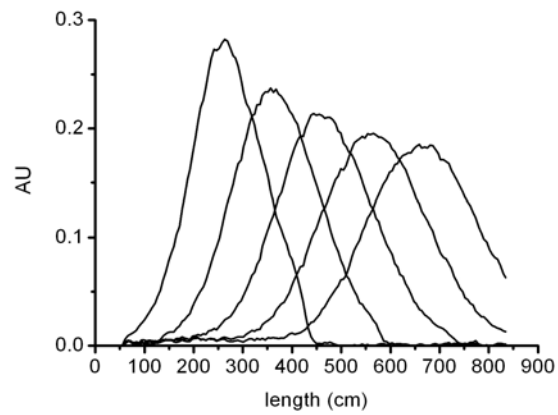


圖 25 tatrazine 在不同體積流速下的空圖(續)

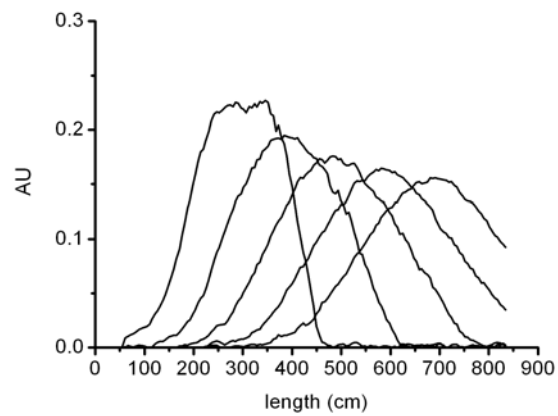
(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

每一組空圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器偵測不同估算質量中心位置的空圖，空圖的估算質量中心由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(a)



(b)



(c)

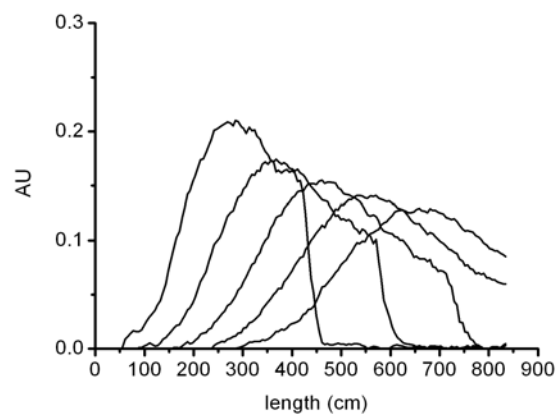
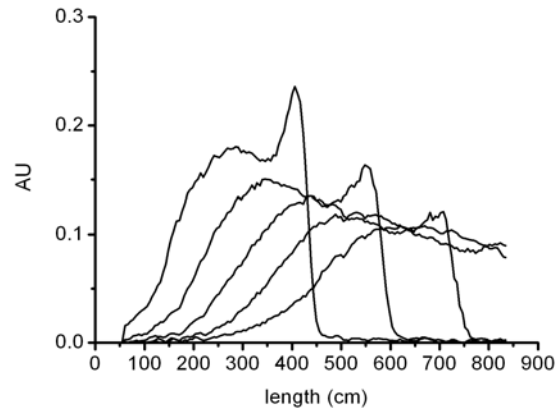


圖 26 銀奈米粒子在不同體積流速下的空圖

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

每一組空圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器偵測不同估算質量中心位置的空圖，空圖的估算質量中心由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(d)



(e)

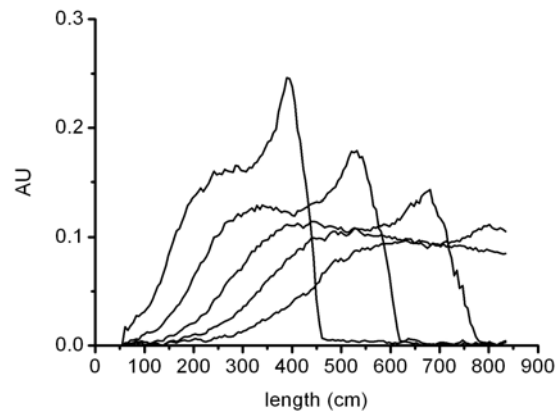
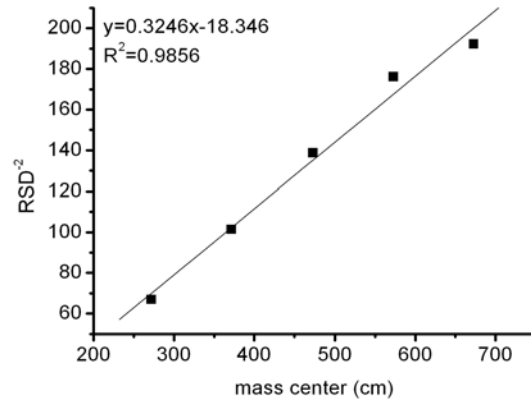


圖 26 銀奈米粒子在不同體積流速下的空圖(續)

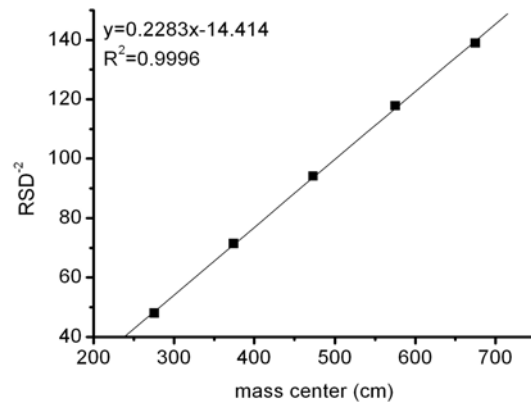
(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

每一組空圖由左至右有 5 個波形，分別代表該流速下，以多通道偵測器偵測不同估算質量中心位置的空圖，空圖的估算質量中心由左至右分別為：274.5 cm、372.5 cm、471.6 cm、570.6 cm、670.5 cm。

(a)



(b)



(c)

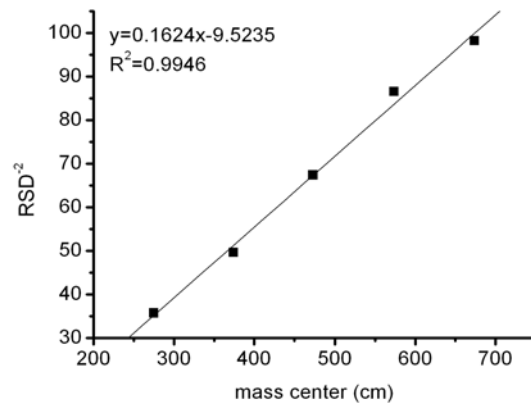
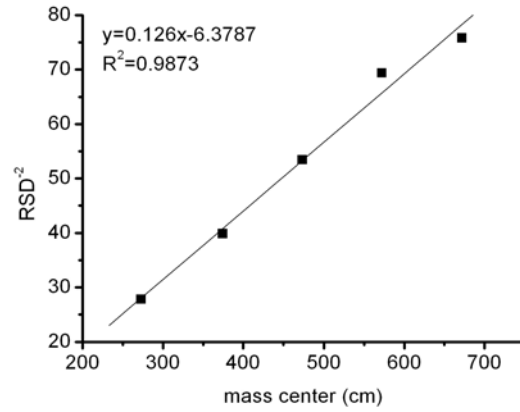


圖 27 tatrazone 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與質量中心位置的關係

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

(d)



(e)

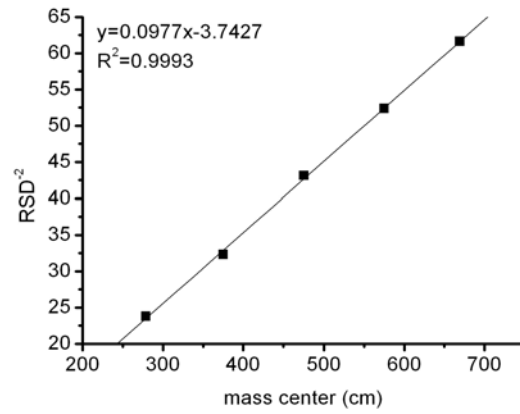


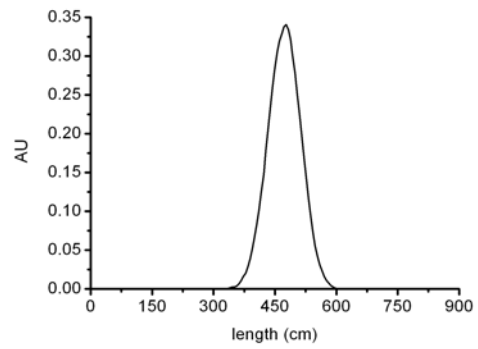
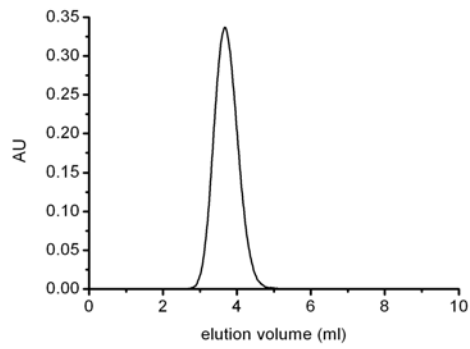
圖 27 tatrazone 在不同體積流速下的時圖相對標準偏差與質量中心位置的關係 (續)

(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

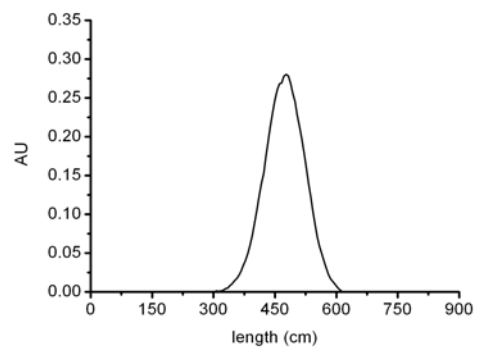
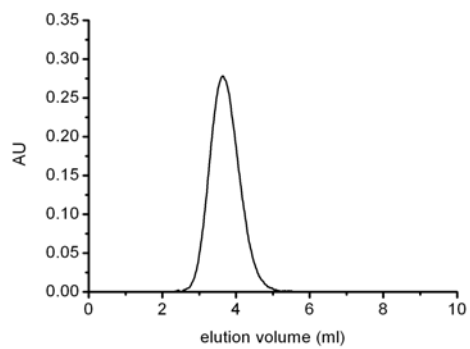
4.4.4 空時差異

根據文獻[24,25]，空圖與時圖這兩種因為觀測方式不同而得到的兩種波形，它們有著某種程度的差異性，也就是所謂的空時差異。由於以特定位置為固定偵測點所獲得的的時圖之所有數據點，是由實驗過程中的每一張空圖在此偵測位置的訊號強度所貢獻的，因此，時圖上每一個數據點都會對應到一張空圖。所以，必須要去選擇一張具有代表性的空圖來與時圖進行比較。本實驗選定當樣品估算質量中心位置移動到目標時圖的偵測位置的空圖，來與目標時圖進行比較，比較的方式有兩種，第一是比較兩者之波形之形狀，第二是比較兩種波形之相對標準偏差。圖 28(a)~(e)和圖 29(a)~(e)分別為 tatrazine 和銀奈米粒子在五個不同體積流速條件下，以管長 471.6 cm 為固定偵測位置所得到的時圖以及其相對應的空圖(估算質量中心位置在接近 471.6 cm 處)。值得一提的是，空時圖波形兩者的方向左右相反像是鏡像的關係。這是由於樣品是不斷的向右移動時，其空圖的右邊是波形的前端，而當樣品碰觸到偵測器時，時圖的訊號產生是由左至右，因此時圖的左邊反而是波形的前端，故使得空時圖呈現波形的方向變成左右相反。

(a)



(b)



(c)

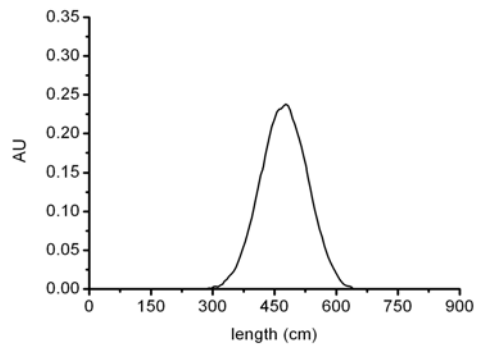
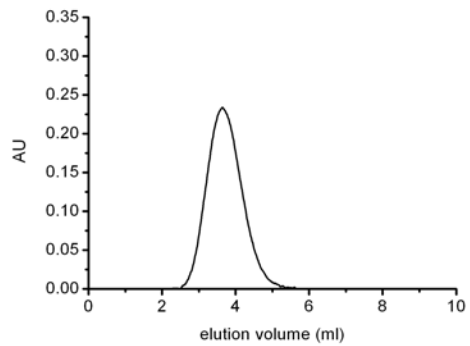
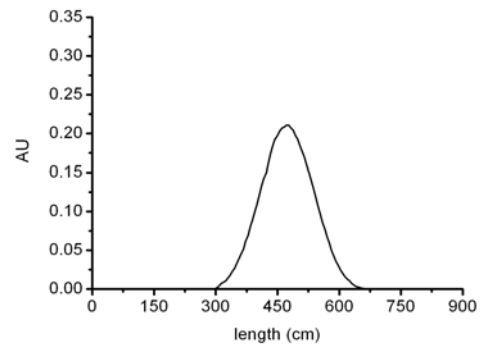
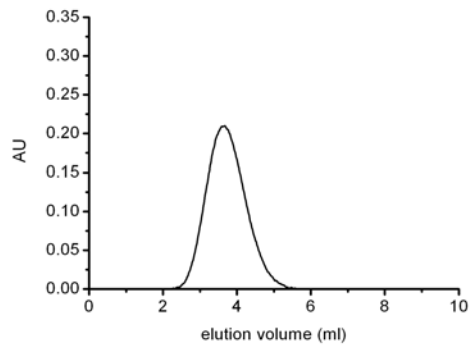


圖 28 tatzazine 在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖(右)

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

(d)



(e)

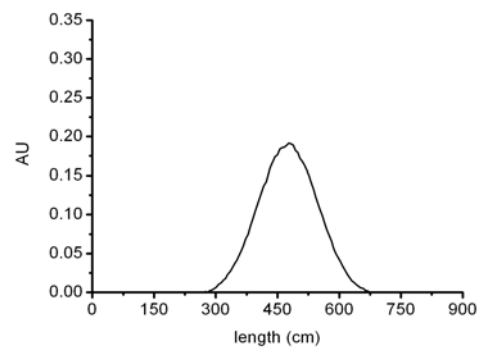
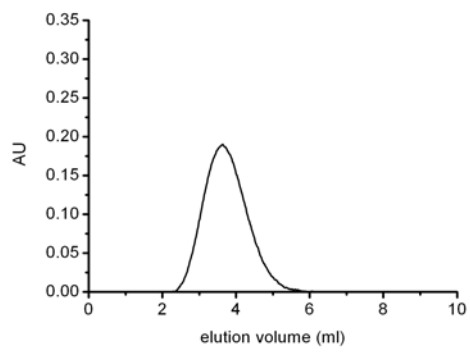
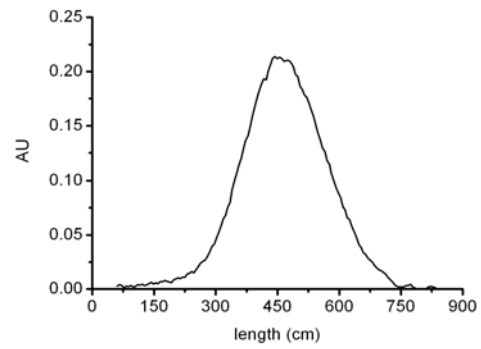
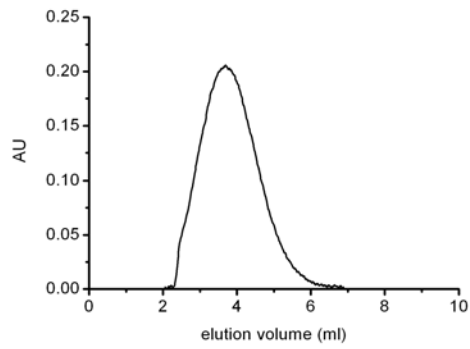
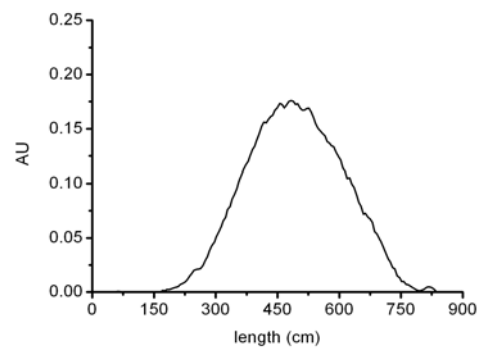
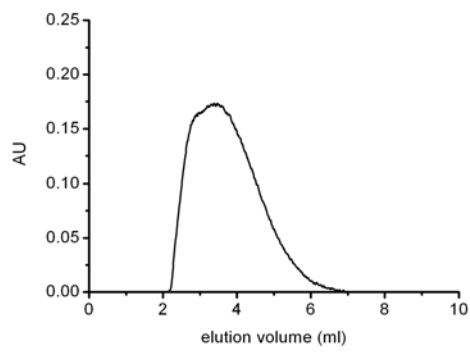


圖 28 tatrazine 在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖(右)(續)
(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

(a)



(b)



(c)

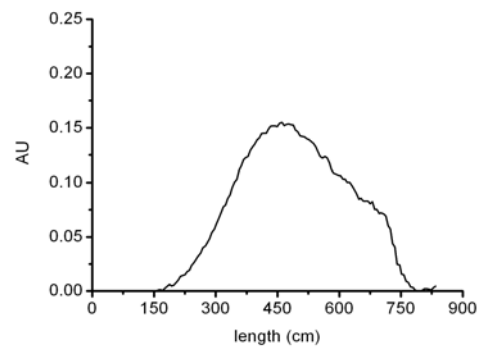
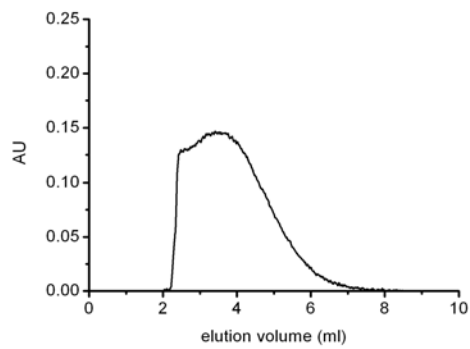
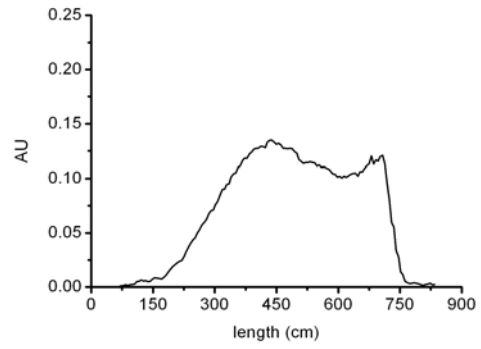
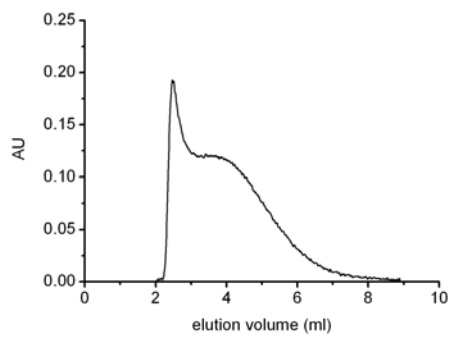


圖 29 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖(右)

(a) 0.21 ml/min (b) 0.43 ml/min (c) 0.64 ml/min

(d)



(e)

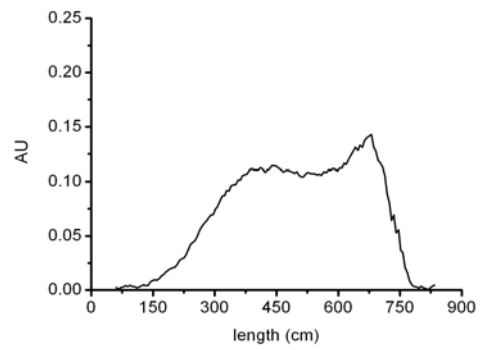
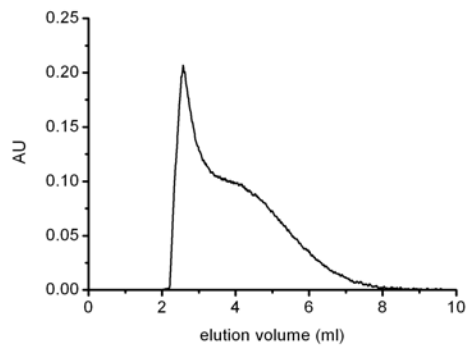


圖 29 銀奈米粒子在不同體積流速下的時圖(左)與其相對應的空圖(右)(續)

(d) 0.85 ml/min (e) 1.06 ml/min

(a)以波形形狀來探討空時差異

根據圖 27 所示，tatrazine 不論是時圖或空圖的波形形狀都是類高斯的波形，波形形狀相似，因此可先粗略的判定此兩者幾乎沒有形狀上的空時差異，唯一的小差別在於，tatrazine 的時圖波形有拖尾的情況產生而空圖的沒有，此結果與文獻[7,22,26,27]所提之現象相吻合。然而，根據圖 28 所示，銀奈米粒子的空時圖的波形形狀，相較於 tatrazine 而言，有比較大的差異性，亦即表示，如奈米粒子這類擴散能力較差的物質本，其身波形形狀的空時差異性會比較大。奈米粒子的波形形狀空時差異的程度可以從空時圖他們各自的 h_1/h_2 的值得知。圖 30 為銀奈米粒子的空時圖波形其各自的 h_1/h_2 值去對 5 個不同體積流速作圖，做圖的結果可以發現，銀奈米粒子空時圖波形的 h_1/h_2 值的差異，會隨著體積流速提高而變大，此即證明，體積流速提高時，波形形狀的空時差異確實跟著增加。

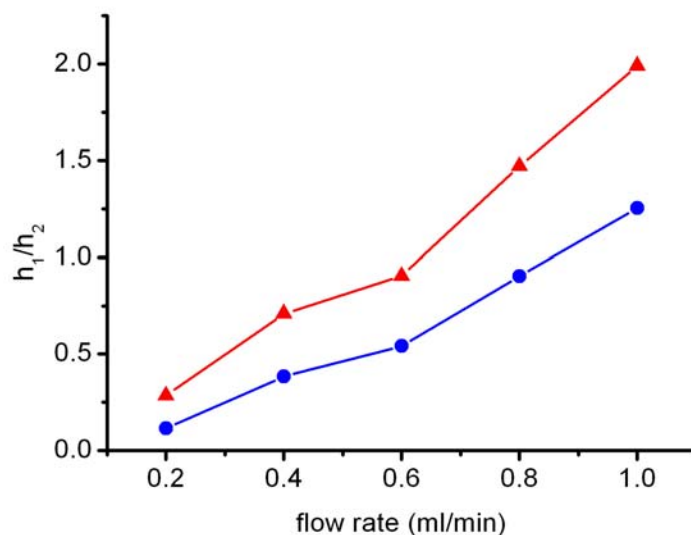


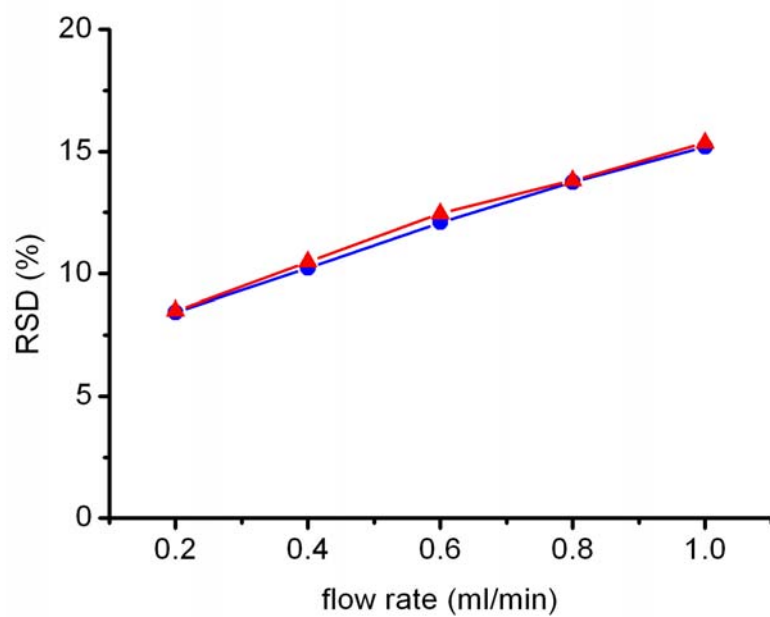
圖 30 銀奈米粒子空時圖波形 h_1/h_2 對體積流速的關係

▲：時圖，●：空圖

(b)以相對標準偏差(延散程度)來探討空時差異

圖 31(a)和圖 31(b)分別為 tatzazine 與銀奈米粒子其各自空時圖的相對標準偏差對於體積流速作圖的結果。從圖形結果可以得知，tatzazine 與銀奈米粒子，其空時圖的相對標準偏差值不論在何種體積流速條件底下都會非常地相近。這意味著，即使奈米粒子之空時圖的波形存在著空時差異，且會隨著體積流速提高而使得這個差異性提高(從 $h1/h2$ 可以得知)，但是空時圖的相對標準偏差，即空時圖的相對延散程度，仍是非常的相近。此外，以體積流速最低(0.21 ml/min)的實驗條件而言，銀奈米粒子之時圖的相對標準偏差值是 19.57%，此時的時圖的波形還有很明顯的 convection peak 訊號，使得這個時圖波形與高斯波形還有相當程度的差異存在(圖 29(a))。然而，以其相對應的空圖的相對標準偏差值雖然說是 22.25%，比時圖的相對標準偏差值稍微大了一點，但是此時的空圖波形已經和單峰的高斯波形非常相似(圖 29(b))。這樣的實驗結果顯示空時圖波形，要從雙峰並存的波形轉變成單峰的類高斯波形的過程中，相對標準差臨界值是不同的。根據在 4.3(a)節的推導，時圖波形要從雙峰訊號並存的波形轉變成單峰高斯波形，其相對標準偏差值的臨界值是 18.26%(理論板數須大於 30)；但是，根據本研究結果來看，這個波形轉變的臨界值對於空圖的波形而言應該是大於 18.26%的，甚至可能大於 22%以上，所以當空圖的相對標準偏差是 22.25%時，整個波形卻還是仍以類高斯波形的形式呈現。因此，雖然空時圖的相對標準偏差值會很相近，但空時圖從雙峰波形轉變單峰高斯波形的相對標準偏差臨界值是不同的。

(a)



(b)

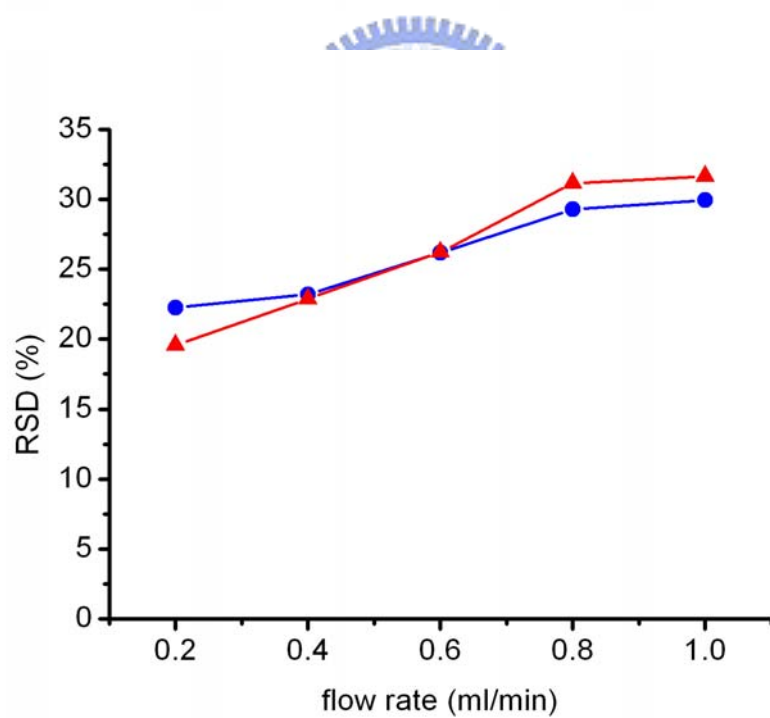


圖 31 空時圖波形的相對標準偏差對體積流速的關係

▲：時圖，●：空圖

(a)tatrazine

(b)銀奈米粒子

(c)相對標準偏差與波形形狀空時差異的關係

本實驗之設計是藉由使用不同擴散能力的樣品(tatrazine vs 銀奈米粒子)和改變體積流速這兩個實驗參數來觀察空時差異的情形。過去的文獻[9-12]，在探討小分子的波形形狀空時差異情形時，改變的參數是管長、管徑和流速這三個實驗參數。根據公式 4.8，不論是本實驗所探討的這些參數變因或過去文獻所探討的參數變因，都會與時圖的相對標準偏差有關係，所以在此將波形形狀的空時差異情形與時圖的相對標準偏差進行比較。

比較結果可以發現，當時圖波形之相對標準偏差值越大，則空時圖波形的差異性就越大。首先，奈米粒子(擴散較差的物質)其時圖波形的相對標準偏(>18.6%)差均大於 tatrazine (擴散較好的物質)的相對標準偏差(<18.6%)，而銀奈米粒子的空時波形形狀的空時差異也都會比 tatrazine 的結果來得大。再者，單獨以銀奈米粒子的樣品來進行不同流速的實驗時，也發現在高流速之下，銀奈米的時圖波形相對標準偏差會比較大，此時空時差異也會較大。最後，以過去文獻的結果來看，發現以會使相對標準偏差變大的實驗條件，如管長較短、管徑較粗，流速較快，來進行實驗的話，所得到的空時圖波形的空時差異都會變大。因此藉由時圖的相對標準偏差，可以預測空時波形形狀的空時差異情形如何。

第五章 結論

空時差異的概念，雖然長久以來常被人們忽略，但是根據本研究的實驗結果顯示，不論是奈米粒子或小分子樣品，針對波形來探討的話，兩者都會有著空時差異的情形產生，尤其以奈米粒子這種擴散能力極差的物質來說，空時波形的空時差異情形非常顯著，因此在探討波形成因和利用時圖回推空間上的波形時，空時差異這項因子是絕對不能被忽視的。除了以上結果以外，本研究還獲得了兩個相當重要的結論：第一，在本實驗中，不論是何種樣品或是在何種流速條件下進行實驗，波形的空時差異可以明顯的被觀察到；但是，兩者之相對標準偏差卻十分接近。以奈米粒子當做樣品，體積流速 0.21 ml/min 的實驗條件所獲得的實驗結果來看，時圖的相對標準偏差為 19.57% 時，波形還會有些許「雙峰」訊號的特徵，但其相對應之空圖雖然相對標準偏差為 22.25%，但此空圖卻已經是相當高斯的波形。第二，總體來說，實驗條件造成空間延散比較大的時候(相對標準偏差較大時)，也會有更大的波形形狀之時空差異，亦即空時差異之產生其實是空間延散所造成的。

除了空時差異的探討，本實驗還提出了利用相對標準偏差來對於波形的形狀、擴張的程度，波形的空時差異程度以及各個實驗的參數進行關聯。過去的文獻所利用的 τ 值或理論板數都會有其使用上不方便的地方。 τ 值無法直接從實驗波形的結果來獲得，只能與從模擬出來的波形結果進行比對來推算其實驗波形應有的 τ 值。而理論板數雖然可以從實驗的波形其波峰位置和半高寬來計算此實驗波形應有的理論板數，但只能適用於波形的形狀是相當趨近高斯時(理論板數計

算出來的結果須大於 30)才可以使用。相較於 τ 值和理論板數的不方便性，在取得波形的相對標準偏差上是比較方便的，只要能夠獲得構成這個實驗波形的所有數據點，就可以計算出此實驗波形應該有的相對標準偏差。計算出來的波形的相對標準偏差，經本實驗證實，不論波形是否為單峰的類高斯波形或雙峰並存的波形其時圖的相對標準偏差，都會與實驗的偵測位置的管長條件(L)有良好的線性關係。而空圖的相對標準偏差，以單峰的類高斯波形的實驗結果來看，也都會與空圖的質量中心位置()有良好的線性關係。即使雙峰並存的波形其空圖相對標準偏差由於偵測視窗觀測範圍太小的關係而無法直接證實，但是由於當空圖質量中心位置與時圖的偵測位置相同或相近時，此時的空時圖相對標準偏差會相似，而時圖的相對標準偏差不論是何種波形都會與偵測位置有良好的線性關係，因此可以間接的證明空圖的相對標準偏差即使是空圖波行為雙峰並存的波形結果也應該要和質量中心要有良好的線性關係。因此更加的确信在往後有關於波形的研究方面，可以使用波形的相對標準偏差值來當作代表此波形的參數，並更進一步來進行其他相關的研究。

參考文獻

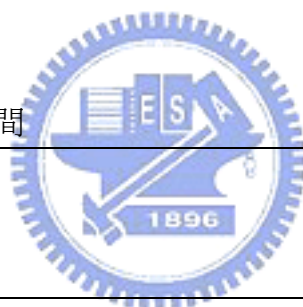
- [1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, "Flow injection analyses : part I. A new concept of fast continuous flow analysis", *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- [2] C.H. Fischer, M. Giersig, "Analysis of Colloids .7. Wide-Bore Hydrodynamic Chromatography, a Simple Method for the Determination of Particle-Size in the Nanometer-Size Regime", *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 97.
- [3] S.H. Lin, T. Yu, S.C. Pai, "Interpretation on Band-broadening in Chromatography with Spatial Peak Profiles Obtained Using Whole-column Detection", *J. Chin. Chem. Soc.* in press (2009).
- [4] S.C. Pai, C.S. Chern, L.Y. Chiao, "Further clarifications on the parcel model", *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 125.
- [5] S.C. Pai, "Parcel model for peak shapes in chromatography - Numerical verification of the temporal distortion effect to peak asymmetry", *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 233.
- [6] S.C. Pai, "Temporally convoluted Gaussian equations for chromatographic peaks", *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 89.
- [7] 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* 1216 (2009) 4618.
- [8] M. Harada, T. Kido, T. Masudo, T. Okada, "Solute distribution coupled with laminar flow in wide-bore capillaries: What can be separated without chemical or physical fields?", *Anal. Sci.* 21 (2005) 491.
- [9] G. Gerhardt, R.N. Adams, "Determination of Diffusion-Coefficients by Flow-Injection Analysis", *Anal. Chem.* 54 (1982) 2618.
- [10] M.S. Bello, R. Rezzonico, P.G. Righetti, "Use of Taylor-Aris Dispersion for Measurement of a Solute Diffusion-Coefficient in Thin Capillaries", *Science* 266 (1994) 773.
- [11] M. Ibrahim, G.W. Zou, J.J. Zhu, "Determination of diffusion coefficients of proteins by flow injection analysis and its application to estimation of molecular masses of proteins", *Instrum. Sci. Technol.* 26 (1998) 333.
- [12] G. Taylor, "Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube", *Proc. R. Soc. Lond. A* 219 (1953) 186.
- [13] G. Taylor, "The Dispersion of Matter in Turbulent Flow through a Pipe", *Proc. R. Soc. Lond. A* 223 (1954) 446.
- [14] R. Aris, "On the Dispersion of a Solute by Diffusion, Convection and Exchange between Phases", *Proc. R. Soc. Lond. A* 252 (1959) 538.

- [15] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, "Dispersion of Peaks by Short Straight Open Tubes in Liquid-Chromatography Systems", *J. Chromatogr.* 218 (1981) 97.
- [16] J.H.M. Vandenberg, R.S. Deelder, H.G.M. Egberink, "Dispersion Phenomena in Reactors for Flow-Analysis", *Anal. Chim. Acta* 114 (1980) 91.
- [17] 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.
- [18] J.M. Reijn, W.E. Vanderlinden, H. Poppe, "Transport Phenomena in Flow-Injection Analysis without Chemical-Reaction", *Anal. Chim. Acta* 126 (1981) 1.
- [19] J.M. Reijn, W.E. Vanderlinden, H. Poppe, "Dispersion in Open Tubes and Tubes Packed with Large Glass-Beads - the Single Bead String Reactor", *Anal. Chim. Acta* 123 (1981) 229.
- [20] J.F. Smalley, K. Chalfant, S.W. Feldberg, T.M. Nahir, E.F. Bowden, "An indirect laser-induced temperature jump determination of the surface pK(a) of 11-mercaptoundecanoic acid monolayers self-assembled on gold", *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 1676.
- [21] K. Das, A. Uppal, P.K. Gupta, "Hyper-Rayleigh scattering and continuum generation of salt induced aggregates of Silver nanoparticles: The effect of cation size (Li⁺, N⁺ and K⁺)", *Chem. Phys. Lett.* 426 (2006) 155.
- [22] 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 97 年).
- [23] C.W. Shen, T. Yu, "Size-fraction of silver nanoparticle using ion-pair extraction in a counter-current chromatography", *J. Chromatogr. A* in press (2009).
- [24] S.C. Pai, Y.H. Lai, L.Y. Chiao, T. Yu, "Dispersion-convolution model for simulating peaks in a flow injection system", *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 109.
- [25] S.C. Pai, "Evaluation of the temporal effect to the peak tailing in flow injection analysis", *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 271.
- [26] 張凱傑, "以多通道偵測器觀察流動注入分析訊號之空時差異", 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文 (民國 95 年).
- [27] 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 96 年).

附錄 A 符號定義表

A.1 實驗參數符號表

符號	定義	單位
D	分子擴散係數(diffusion coefficient)	cm ² /s
L	管路位置或管長	cm
r	管內半徑	cm
u _{av}	線性流速	cm/s
Q	體積流速	ml/s
a	管路截面積	cm ²
V _s	樣品體積	ml
t	樣品流析時間	s



A.2 波形參數符號表

符號	定義	單位
h	波高，即波形訊號之最大值	AU
W _{1/2,t}	時圖半高寬	ml
W _{1/2,L}	空圖半高寬	cm
A _t	時圖面積	AU-ml
A _L	空圖面積	AU-cm
t _p	時圖波峰位置	ml
L _p	空圖波峰位置	cm
\bar{x}_t	時圖質心流量	ml
\bar{x}_L	空圖質心位置	cm

\bar{x}_t'	空圖估算質心位置	cm
σt	時圖標準偏差	ml
σL	空圖標準偏差	cm
RSD	相對標準偏差	
h1	convection peak 的訊號強度	AU
h2	diffusion peak 的訊號強度	AU

