

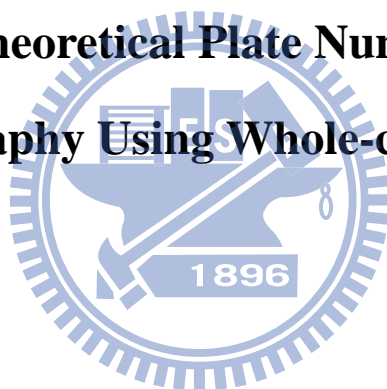
國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

使用全管柱偵測法探討層析理論板數之計算

**Investigation of Theoretical Plate Number Calculations
in Chromatography Using Whole-column Detection.**



研究生:許育國

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十九年六月

使用全管柱偵測法探討層析理論板數之計算

Investigation of Theoretical Plate Number Calculations
in Chromatography Using Whole-column Detection.

研究生：許育國
指導教授：余艇 博士

Student: Yu-Guo Hsu
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 2010
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十九年六月

使用全管柱偵測法探討層析理論板數之計算

學生：許育國

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學研究所

摘要

在液相層析中常使用理論板數(N)來表示其分離效率。然而，計算理論板數的方式常常被誤用。在非線性層析實驗條件下，相較於原始定義以空間為單位計算得到的理論板數，以時間為單位所計算得到的理論板數值常被高估。此外，由於層析波峰壓縮效應(peak compression effect)，樣品在管柱中的波寬會被壓縮變窄。而這種效應也將影響理論板數計算。

在此，我們使用全管柱偵測系統(WCD)觀測樣品在階梯式沖提和連續式沖提中的流動訊號。利用全管柱偵測系統可同時獲得空間和時間的信號，並用來計算理論板高與板數。本研究中有兩種修正方式。首先，由樣品遷移速度概念，將波峰寬度由時間單位轉換為空間單位，以滿足最初的定義。由空間計算的板數作為基準，此修正後的板數大幅降低了誤差，從 1000%降低至 40%。第二種修正涉及層析波峰壓縮效應。波寬壓縮發生在兩動相的交界處，當由沖提能力較弱的動相改變沖提能力較強的沖提動相時，因分佈在背部動相(靠近管

柱進口端)樣品的遷移速度比在前面動相(靠近管柱出口端)中的樣品快，導致波峰寬度變窄。此效應會造成理論板數增加，第二次修正板數則考量此效應進行修正。在進一步考量波壓縮效應所修正後的板數，其誤差值甚至可低於 10%，。在連續式梯度沖提所提修正板數方程式中，所有的參數皆可自一般層析實驗中，安裝在管柱出口端傳統的單通道探測器得到。



Investigation of Theoretical Plate Number Calculations in Chromatography Using Whole-column Detection.

Student: Yu-Guo Hsu

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

Separation efficiency is normally displayed using the theoretical plate number (N) in liquid chromatography. However, the way how to calculate this number has often been misused. Under non-linear chromatographic processes, the N values computed using chromatograms recorded on the time coordinate have almost always highly over-estimated compared with the values originally defined by the spatial peak profile. In addition, analyte bandwidth in the column would be reduced due to a peak compression effect. This effect will also influence the plate number calculations.

A whole-column detection (WCD) system was applied to investigate the flowing analyte signals in the column during the step-wise and linear

gradient elutions. Both the spatial and temporal signal data obtained using WCD were used to adjust the equations for calculating the plate number and plate height. Two correction measures were made. First, analyte migration speed was introduced in converting the peak bandwidth of the temporal scale into the spatial scale in order to satisfy the original definition. This adjustment reduced the calculation errors of the temporal data drastically from 1000% to 40%, verified by the spatial data. The second modification involved the peak compression effect. This effect resulted in peak bandwidth narrowing when the elution solvent of the greater solvation power replaced that of the lower solvation power. Solute molecules distributed in the back solvent migrated faster than those in the front solvent, therefore a bandwidth reduction occurred at the solvent boundary. The plate number increase due to this effect was considered in the second modification. This additional correction made the error lower than 10% for all the experiments performed in this study. All the parameters in the equation derived for the linear gradient elution could be obtained experimentally using the conventional single-channel detector installed at the column outlet.

誌謝

兩年的碩士生涯，終於在此畫下句點，首先感謝恩師余艇教授在研究與實驗上的指導，再來要感謝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。

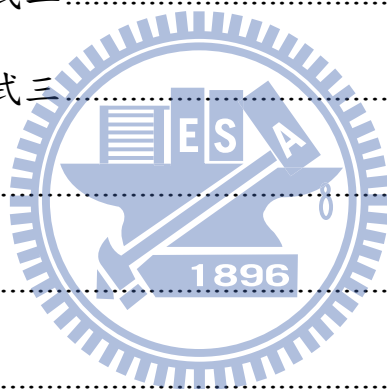
謝謝無敵的淑慧學姊一直以來的照顧，不厭其煩的指導，有報告障礙的學弟我，終於可以畢業了。也謝謝經緯、印從、婉茹學長姐，幫我解決實驗上的問題，為實驗室帶來歡樂的氣氛。祝學長學姊在未來都能一路順風。也謝謝和我一起奮鬥2年的同學，大美女伶宜和BG王典祐，讓我兩年的碩士生涯更加豐富，“我們3個”終於可以畢業囉！祝你們工作順利喔!!還有感謝小美女宜儒、勇者無懼士峯，冷面笑匠詩軒幫我打理口試的瑣事，明年就換你們囉，加油！也謝謝研究所同學小毛、阿財、白鯨、凱撒、阿灃、正旭、Q雄、陸董、豪大、MI，讓我提前了解到人性的黑暗面，為未來出社會作準備，真是太GJ了。

最後，感謝我的父母親和家人，由於你們的支持鼓勵，使我能無後顧之憂的完成學業，笨蛋阿國要畢業，告別學生身分，長大人囉，哇哈哈。

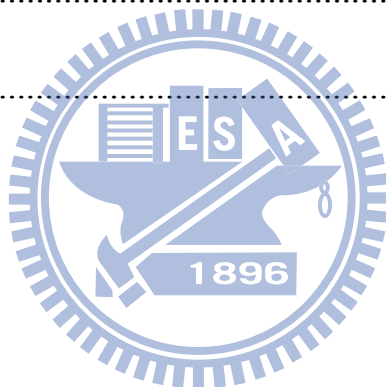
目錄

摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
第一章 緒論.....	1
第二章 研究背景與文獻回顧.....	4
第三章 實驗.....	10
3.1 實驗藥品.....	10
3.2 儀器裝置:.....	10
3.3 儀器組裝及各裝置介紹:.....	11
3.3.1 自製 HPLC 管柱:.....	11
3.3.2 WCD 系統:.....	12
3.3.3.WCD 操作介面設定.....	14
3.4 數據類型定義.....	16
3.5 實驗流程.....	19
3.6 實驗步驟.....	20

3.6.1 等位沖提.....	20
3.6.2 階梯式沖提.....	21
3.6.2.1 模式一.....	21
3.6.2.2 模式二.....	21
3.6.2.3 模式三.....	22
3.6.3 連續式沖提.....	24
3.6.3.1 模式一.....	24
3.6.3.2 模式二.....	24
3.6.3.3 模式三.....	24
第四章 結果與討論.....	26
4.1 等位沖提結果.....	26
4.2 階梯式沖提.....	30
4.2.1 模式一.....	30
4.2.2 模式二.....	34
4.2.3 模式三.....	39
4.3 連續式沖提.....	45
4.3.1 模式一.....	45
4.3.2 模式二.....	47
4.3.3 模式三.....	49



4.4 理論板數討論及修正公式:	52
4.4.1 考慮因移動速度變化所得修正板數 N_1	52
4.4.2 考慮層析波峰壓縮效應修正板數 N_2	55
4.4.2.1 階梯式沖提修正板數 N_2	55
4.4.2.2 連續式沖提修正板數 N_2'	57
4.4.3.1 階梯式沖提板數比較.....	61
4.4.3.2 連續式沖提板數比較.....	62
第五章 結論.....	66
參考文獻.....	67



圖目錄

圖 2-1 階梯式沖提示意圖	6
圖 2-2 連續式沖提示意圖	6
圖 2-3 層析波峰壓縮發生在動相界面處示意圖	8
圖 3-1 實驗裝置圖	11
圖 3-2 電腦操作介面圖	14
圖 3-4 遷移路徑圖與遷移曲線之定義	18
圖 3-5 樣品半高寬與管柱位置關係圖及波寬變化示意圖	19
圖 3-6 階梯式沖提所設計的三種實驗模式	23
圖 3-7 連續式沖提所設計的三種實驗模式	25
圖 4-1 樣品在不同動相組成中所得之遷移路徑圖	27
圖 4-2 樣品在不同動相組成之空圖波峰	29
圖 4-3 樣品在階梯式沖提模式一中之空間波形	31
圖 4-4 階梯式沖提模式一中之所得之樣品遷移路徑圖	32
圖 4-5 階梯式沖提模式一中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖	33
圖 4-7 階梯式沖提模式二中之所得之樣品遷移路徑圖	37
圖 4-8 階梯式沖提模式二中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖	38
圖 4-9 樣品在階梯式沖提模式三中之空間波形	40
圖 4-10 階梯式沖提模式三中之所得之樣品遷移路徑圖	41

圖 4-11 階梯式沖提模式三中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖	42
圖 4-12. 三種梯度模式中的 13 組數據移動速度差值 Δu 與波寬變化值 Δw 關係圖	44
圖 4-13 連續式沖提模式一中樣品空間波形	46
圖 4-14 連續式沖提模式二中樣品空間波形	48
圖 4-15 連續式沖提模式三中樣品空間波形	50
圖 4-16 公式修正之流程圖	52
圖 4-17 空間波峰標準偏差與波峰寬度關係圖	54
圖 4-18 樣品移動速度與甲醇比例關係圖	59
圖 4-19 樣品移速變化與動相組成變化關係圖	60



表目錄

表 3-1 曝光時間對照表	16
表 3-2 動相代號與動相組成表	20
表 4-1 等位沖提中，樣品在不同動相下的移動速度	28
表 4-2 階梯式沖提模式一中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動 速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw	34
表 4-3 階梯式沖提模式二中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動 速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw	39
表 4-4 階梯式沖提模式三中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動 速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw	43
表 4-5 三種階梯式沖提模式的 13 組數據移動速度差值 Δu 與波寬變化 值 Δw 表	44
表 4-6 三種階梯式沖提模式的 13 組數據空時圖理論板數與修正公式 N_1 、 N_2 計算結果	64
表 4-7 三種連續式沖提模式的 11 組數據空時圖理論板數與修正公式 N_1 、 N_2' 計算結果	65

第一章 緒論

前言與研究動機

層析法包含了一群多門且重要的方法，它使科學家從複雜的混合物中可以分離出十分相似的成分。在所有層析分離法中，樣品是由動相 (mobile phase) 來輸送，它可以是一種氣體、液體、或超臨界流體 (supercritical fluid)，此動相被輸送通過一個不互溶的靜相 (stationary phase)，靜相可以是固體或者是吸附在惰性擔體 (support) 表面的液體。這兩相的選取乃為了於樣品中的成分在動靜相間有不同程度的分佈。利用樣品成分在靜相及動相間作用力不同，而在動靜相有分佈的差異，造成各成分物被沖提的速率不同，而達到區帶分離的目的。

理論板高 H 與理論板數 N ，此兩數值為評估管柱效能常用的參數，而 H 與 N 值其原始定義如下

$$H = \frac{\sigma_s^2}{L} \quad (1-1)$$

$$N^* = \frac{L^2}{\sigma_s^2} \quad (1-2)$$

H : 理論板高

N^* : 空間單位計算所得的理論板數

L : 管柱長度

σ_s : 空間波峰標準偏差

H 值越小， N 值越大則管柱的分離效果越好，然而在常用的偵測器中，並無法觀察樣品在空間的分布情形，而常用偵測器所得到的層析圖譜訊號，為一個訊號峰以時間函數表示的圖譜，根據文獻[1]，可藉由速度的轉換將空間計算板數轉換為時間計算板數，轉換後以時間計算的理論板數如下式所示：

$$H = \frac{LW(t)^2}{16t_R^2} \quad (1-3)$$

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W(t)}\right)^2 \quad (1-4)$$

N : 以時間單位計算所得理論板數

$W(t)$: 層析時圖所得到波峰底部寬度

t_R : 樣品滯留時間

另一種求得 H 與 N 值的方法為使用 $W_{1/2(t)}$ 這個參數，這是波峰最大高度之半位置處的兩側波峰寬度總合。板高 H 與板數 N 可用式 1-5 及 1-6 求得。

$$H = \frac{L}{5.54} \left(\frac{W_{1/2(t)}}{t_R}\right)^2 \quad (1-5)$$

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

$W_{1/2(t)}$: 層析時圖上波峰最大高度之半位置處的兩側波峰寬度總合

在提升層析分離效能的方法除了改善管柱填充條件外，可對樣品

k (retention factor) 值做最適化調整，對液體動相而言，藉由改變溶劑組成來操控 k 值大小，操控過程可搭配等位 (isocratic elution) 或梯度沖提 (gradient elution)，來達到提升分離效率的目標。

但由文獻指出[2]，上述 1-3~1-6 式不適用在非線性層析系統 (梯度沖提) 下，在線性 (等位沖提) 與非線性層析層析系統中，要回歸 H 、 N 的原始定義計算理論板數與板高才是正確的使用

但樣品空間分佈標準偏差 σ_s 並無法由一般傳統偵測器得到，因此有學者發展出一系列修正公式，可由一般層析時間參數圖譜計算正確理論板數與板高公式，然而所提出公式參數複雜且需要大量的數值模擬工具，因此在本研究中，我們在此論文中提出簡單方便的修正公式，以期計算出非線性層析系統下正確的理论板數值，使一般單通道偵測器使用者也能準確的獲得非線性層析系統的理论板數。而在本研究中，我們使用全管柱偵測器來輔佐驗證修正公式的正確性。

第二章 研究背景與文獻回顧

隔板理論

層析領域中，許多解釋區帶擴張的理論被提出來表現和管柱變數相關的一些變數對板高的關係，其中包含 Martin 和 Synge 所提的板論(plate theory)[3]，他們將層析管柱視為類似蒸餾塔，由無數不連續但相鄰的薄層所組成，在每一平板上，假設平衡會發生於物種分佈於動相和靜相間，在管柱內分析物的下移即視為平衡的動相由一平板至另一平板作階梯式的轉移。並不斷形成新的平衡。而此薄層高度即為板高(plate height, H)，將管柱長度除上板高即為理論板數 N ，此兩數值為評估管柱效能常用的參數。一個層析管柱的塔板數越多，則其分離效果就越好。

H 與 N 常被使用來評估管柱效能， H 值越小 N 值越大，代表管柱效能越好。提升層析分離效能的方法可藉由改變溶劑組成來操控 k 值大小，對樣品 k 值做最適化調整。在逆相層析中，靜相是疏水的碳氫化合物，溶質與靜相之間的作用主要是非極性相互作用，或者說疏水相互作用，因此溶劑的強度隨著極性增加而降低。水是極性較強的溶劑，也是逆相層析中較弱的溶劑。在逆相層析中常常用和可以與水互溶的有機溶劑，以得到不同強度的流動相。逆相層析中最常用的有

機溶劑有甲醇和乙腈，因此，甲醇或乙腈佔動相組成比例越高，樣品能更快流出，動相的沖提能力也就越強。操控過程可搭配等位或梯度沖提，來達到提升分離效率的目標。文獻提及[4]，通常利用梯度沖提可大大提高分離效率，使用二種(或更多種)溶劑，其極性極為不同，但可互溶，在開始沖提後，二溶劑之比值以漸進方法改變為沖提能力較強的動相，有時是連續式的改變，有時是一系列步驟的改變溶劑比值。常見有二種沖提模式：

1. 階梯式沖提(stepwise elution)

此種沖提方法為先使用沖提能力較低的動相沖提一段時間，而在某一時間，瞬間將動相變化為沖提能力較強的動相，減少分析時間(如圖 2-1所示)，此種沖提方法常用在分離蛋白質上[5]，將要被純化的目標物之抗體鍵結在固態物質表面上，藉由改變移動相的特性而將它們層析分離之，在此沖提條件下，目標物及其類似物會被固定相吸附，其他雜質被沖出管柱，隨後改變沖提條件，將目標物及其類似物逐一沖出管柱，同時達到萃取、純化、分離及檢測目標物及其類似物的目的。

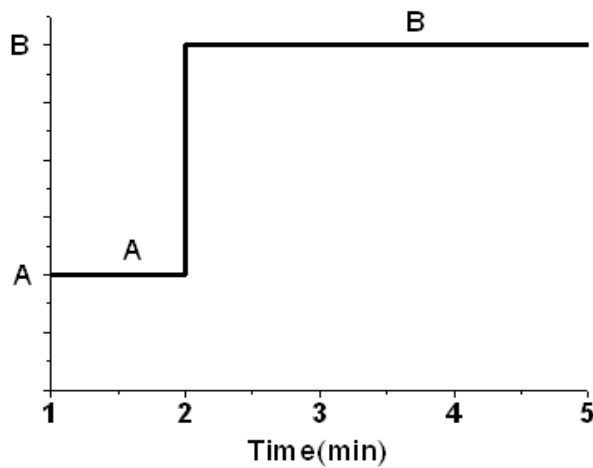


圖 2-1 階梯式沖提示意圖

動相從沖提能力較弱的動相 A 在 2 分鐘後瞬間變化為沖提能力較強的動相 B

2. 連續式沖提(Continuous elution)

此種沖提方法為先使用沖提能力較低的動相沖提一段時間，而在某一時間，將動相線性的變化為沖提能力較強的動相，減少分析時間(如圖 2.2 所示)，此種沖提方法常用在分離天然物分離上[6-7]

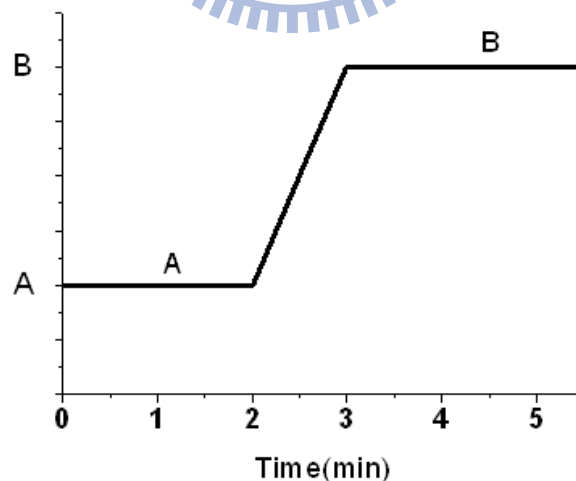


圖 2-2 連續式沖提示意圖

動相從沖提能力較弱的動相 A 在 2 分鐘後以線性方式變化為沖提能力較強的動相 B

使用梯度沖提目的在於縮短管內化合物的滯留時間(retention

time)，其優點如下：

1. 增強混合物的全面分離能力
2. 全部的分析時間可以顯著的減少
3. 改善層析圖譜上的波形
4. 增加靈敏度

然而文獻中提到[2]，在梯度沖提等非線性層析系統中，以時間單位為定義的 H 與 N 值並不適用，其主要原因來自於式 1-3~1-6 是一建構在樣品移動速度固定之下發展而成的公式，但在非線性層析系統中，由於動相組成隨時間改變，樣品會隨著不同時間下受到不同溶劑強度影響，而使樣品移動速度有所改變，導致式 1-3~1-6 無法使用。必須將此層析公式作修正才能獲得較正確的 H 或 N 值。

Snyder 等人發表一系列有關於梯度液相層析法的理論模擬系統 [8]，提到當在進行非線性層析系統時，動相的組成變化，會使空間中的波寬發生變化，當後端動相使用沖提能力較強的動相時，樣品會在兩動相交界面處，因前後端動相對樣品作用力不同，而使樣品在前後端動相中的移動速度不同，處於管柱出口端沖提能力較弱動相中的樣品分子，移動速度比起處於管柱入口端的的樣品分子慢，而造成界面後端樣品擠壓的現象，產生空間樣品在動相交界面處波寬變窄，等後端動相完全通過樣品後，空間樣品波寬再隨時間漸漸變寬的情形，

如圖 2-3 所示。

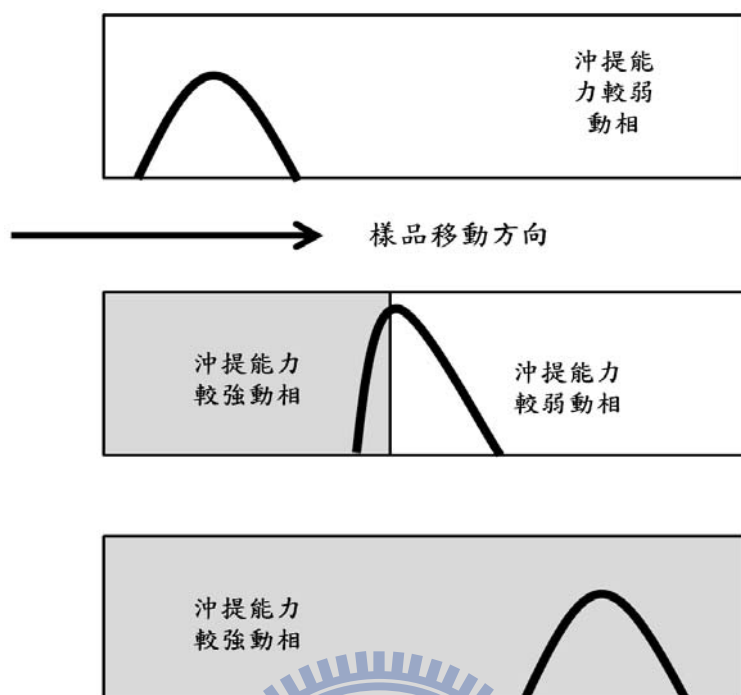


圖 2-3 層析波峰壓縮發生在動相交界面處示意圖

樣品在動相交界面，由於後面動相中的樣品產生擠壓的情形而使樣品波寬變窄，此種樣品在動相交界面處波寬先變窄而後再漸漸變寬的現象，稱之為層析波峰壓縮效應(peak compression effect)，在後來 Tamura 等人以 CCD 攝影鏡頭來記錄螢光樣品在玻璃層析管柱中分離過程，也發現有這個情形[9-10]，文獻[8]提及此效應對理論板數的計算也會有所影響，而後 Snyder 等人對層析波峰標準偏差以及理論板高進行修正[8,11-12]，且在文獻[13]特別對層析波峰壓縮效應進行板數探討與修正，並使用一些常見偵測器來佐證其模擬數據。Yamamoto 亦發表一系列不同沖提模式下的板高修正理論[14-17]。然而以上文獻發表

時，文獻中的公式包含大量的公式運用以及條件參數，相當複雜且艱澀難懂，在應用上須考量許多參數以及運用大量數值模擬軟體。而很多分析領域的學者專心致力於開發新的分析技術及應用，對於理論公式的發展及推導並不熟悉，所以導致傳統公式定義在這方面的疏失，仍有一些學者沒注意到[18-25]，依舊使用傳統板高及板數的定義的公式 1-3~1-6 計算非線性層析系統條件下的實驗結果，以表現管柱效率，在非線性條件使用式 1-3~1-6，理論板數與板高會被錯估，造成管柱效率大幅提高的假象。

如前所述，使用式 1-2 所計算的理論板數 N^* 才是正確的，在以上所提文獻[8,11-13]，在非線性層析板數探討中，並沒有直接觀測樣品在管柱空間分布情形，故無法計算正確的理論板數 N^* ，以至於無法驗證其公式的正確性，且所提出的公式須要考量許多參數，以及運用大量的數值模擬軟體。綜合以上所提，本研究藉著設計一系列非線性沖提模式，然後以全管柱偵測系統(WCD)觀察樣品空間與時間的層析行為，計算正確的理論板數 N^* ，並與推導出之修正公式作比較，驗證修正公式的正確性。所提出的修正公式參數簡單，不需複雜的數值模擬軟體，使一般單通道偵測器系統使用者，即使沒有樣品空間分佈數據，仍可藉由公式轉換，由一般層析時圖數據，正確估計出非線性層析系統下管柱的效率。

第三章 實驗

3.1 實驗藥品

(a) 實驗樣品:

Alizarin(茜素), $C_{14}H_8O_4$, 分子量 240.21, 購自於 Acros Organics (New Jersey, USA) 最大吸收波長 460 nm, 溶於甲醇中, 使成為樣品溶液, 濃度為 200 mgL^{-1} 。

(b) 動相組成:

甲醇:HPLC grade, 99.9%, (TEDIA, USA)

水 : 為經過 Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q 處理過後的
18.2 MΩ 的去離子水

3.2 儀器裝置:

(a) 往復式梯度沖提幫浦(Reciprocating Pump)

Series 4 (購自 Lab Alliance, Pa, USA), 輸出體積流速範圍
 $0.01 \text{ mL min}^{-1} \sim 9.99 \text{ mL min}^{-1}$

(b) 內體積為 $20 \mu\text{L}$ 的樣品迴圈(sample loop)

(c) 自製 HPLC 管柱

(d) WCD 系統

3.3 儀器組裝及各裝置介紹:

儀器組裝示意圖如圖 3-1 所示

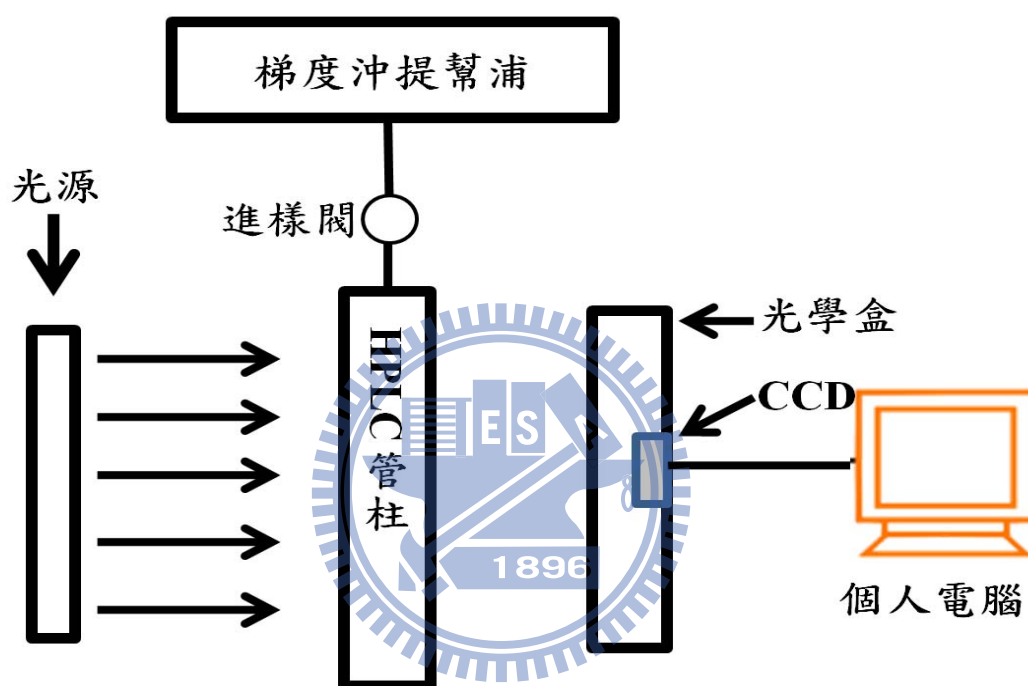


圖 3-1 實驗裝置圖

包含光源、光學盒、自製管柱等零件架於 XYZ 軸調整基座上

3.3.1 自製 HPLC 管柱:

將一長度 20 公分、外徑 2 公分、內徑 8 毫米的不鏽鋼管柱兩側切割出長 15 公分，寬 4 毫米的開口，然後將長 18 公分、外徑 8 毫米、內徑 3 毫米的玻璃管柱放入上述的不鏽鋼管柱中，而光線可由不鏽鋼管柱其中一側開口進入，穿過玻璃管柱後，再由另一側開口出來，抵

達偵測器。玻璃管與不鏽鋼管接合方是為在玻璃管兩端末端切面處放置 Viton 材質的 O 型環，然後在旁邊鎖上 Swagelok 的 male nuts，當 male nuts 擠壓 O 型環時，此不鏽鋼管會過 O 型環與玻璃管連結成一內徑 3 毫米、長度 25 公分的空心管柱，並在不鏽鋼管柱末端接上一 Swagelok nut，然後連接內含檔板(frit, 0.45 μm)的 external column connector 以避免靜相流失，如此便完成空心管柱本體。以上管柱本體委託彥宏開發科技有限公司設計製造(台北縣新莊市化成路 63 巷 71 號)。而後委託建宏層析企業股份有限公司(台北市內湖區港墘路 221 巷 19 號 5 樓)以高壓填充方式將 10 μm ODS 靜相注入管中，便完成了自製的 25 公分長，內徑 3 毫米，填充 10 μm ODS 作為靜相的 HPLC 管柱，詳細說明見參考文獻 1。

3.3.2 WCD 系統:

系統包含光學盒、燈源、XYZ 軸調整機座以及處理訊號用的個人電腦。光學盒從虹光精密工業股份有限公司(新竹科學工業園區研新一路 20 號)所提供的光學掃描器(型號 CanoScan 5000) 拆解下來，內部包含三組平面鏡和一片聚焦的透鏡，透過此光學盒所設計的光學路徑，21 公分寬的光線可被聚焦在一個 6 公分的 CCD(型號 Toshiba models T8E21)上，然後轉換成電訊號於個人電腦上，燈源為放射波長為 460 nm 的藍光 LED 燈源由曜宇科技股份有限公司(台北縣中和市中正路

872 號 6 樓之 1)提供，(型號 DL-15-300-B)。XYZ 軸調整機座分為兩個部分，第一個部分可架設光源、管柱，第二個部分架設光學盒，兩個部分總共可以有 5 種方向來調整彼此間的距離與高度，以及調整光源之光線穿透管柱後射入光學盒的角度，此機台委託彥宏開發科技股份有限公司設計製作。

光線必須通過有填充靜相的管柱後抵達位於光學盒內的 CCD 上，雖然填充的靜相並不透明，但光線可藉由擴散反射 (diffuse-reflection) 的方式穿越於靜相空隙間，雖然以此方式所收集的穿透光線並非一般常見的吸收光譜測量方法，但根據文獻[26-27]指出，仍有不少團隊以此種模式觀察管內樣品分離行為，此即表示以此種方法進行分析是可行的，亦可以精確的表現樣品在管柱中的移動行為。

樣品吸收訊號處理方法如下:樣品尚未注入管柱前，先收集光源通過含有初始條件動相之管柱後抵達 CCD 的訊號，令其為 P_0 ，樣品注入的同時，再次啟動 WCD 系統收集樣品在通過管柱過程中所有光線強度訊號，令其為 P ，吸收值 $A = \log(P_0/P)$ ，此為根據 CCD 所收集之電訊號來計算樣品通過管柱過程中之吸收訊號的方法。

3.3.3.WCD 操作介面設定

電腦操作界面圖如圖 3-2:

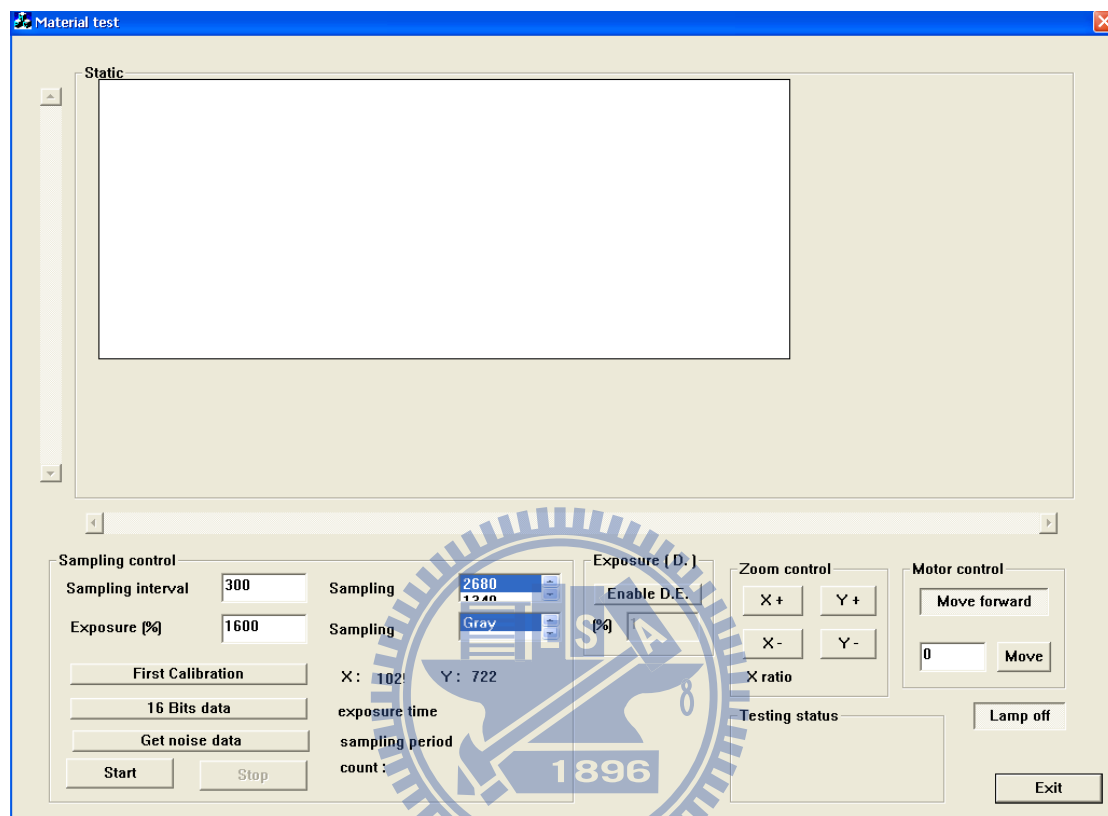


圖 3-2 電腦操作介面圖

(a) 樣品取樣時間 (sampling interval)

樣品取樣時間是以毫秒為單位，根據實驗條件做調整，輸入適當的取樣時間。

(b) 取樣點數 (sampling method)

此欄可以選擇訊號收集點的數量，總共有 5 個選項: 670、1340、2680、5360、10720，在偵測範圍 21 公分的全管柱偵測器裡，其光學盒內線性 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；若以相鄰 4 點、8 點、16 點做平均積分處理，分別會有 2680、1340、670 個訊號收集點，本實驗每一組訊號波形皆由 2680 個點所組成，空間解析度相當於 0.078 mm，對本研究而言其解析度已足夠。

(c) 取樣模式 (sampling mode)

光學盒內部的 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，因所選擇的光源已是單波段光源，所以選擇“Gray”為取樣模式，即 CCD 不需過濾掉任何波長的光，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) 曝光時間 (Exposure)

曝光時間是以百分比(%)，輸入不同的數值會對應到不同的曝光時間(表 3-1)，本研究中，WCD 系統的最短曝光時間為 3.6 ms，但由於管柱內填充靜相會導致光源訊號大幅減弱，進而影響訊號解析度，故本研究所選擇的曝光時間長度固定為最大值 1600 % (57.6 ms)。

表 3-1 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

3.4 數據類型定義

以 WCD 系統收集樣品於管柱中之吸收訊號值，可得一吸光值空時矩陣，將此矩陣進行詳細的分析，便可獲得數種不同的實驗數據類型，在此對本實驗所獲得的各種圖譜進行定義。

在此我們先定義以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，所得圖形為一橫座標軸單位為時間、縱座標軸單位為訊號強度的圖譜，如圖 3-3(a)，此類型數據即稱之為時圖 (temporal profile)，使用 WCD 系統時，可以同時偵測大範圍的樣品分佈，如同瞬間拍照的技術，獲取樣品在一維管柱空間的訊號強度值，獲得的圖譜為橫座標軸為管柱位置、縱座標軸為訊號強度，如圖 3-3(b)，此類型之數據稱為空圖 (spatial profile)。

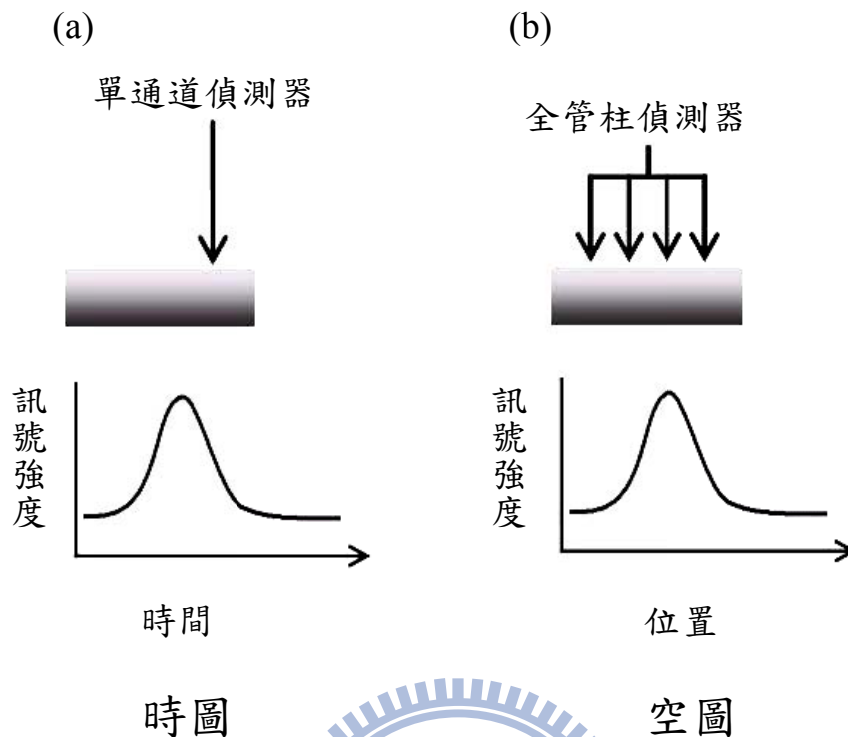


圖 3-3 時圖和空圖的定義(取自流動注入分析訊號空時差異之進階研究[28]，吳印從，圖 5) 時圖的橫座標單位是流析時間 (time)，空圖的橫座標單位則是管路位置 (length)。

根據 WCD 系統所獲得的管內空圖數據，又可繪製出樣品在管內沖提移動過程中的遷移路徑圖 (migration route) :WCD 在 T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 等流析時間時拍攝到樣品在管柱內空圖波峰訊號 $Peak_1$ 、 $Peak_2$ 、 $Peak_3$... $Peak_n$ ，找出以上空圖的波峰頂點分別位於 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 處，再將 T_1 、 T_2 、 T_3 ... T_n 與 N_1 、 N_2 、 N_3 ... N_n 等數據同時表現於同一張關係圖上，如圖 3-4，此樣品流析時間與空圖波峰頂點位置關係圖即稱之為樣品遷移路徑圖。遷移路徑圖中所繪製出的數據趨勢線則

稱為遷移曲線(migration curve)，曲線的斜率則代表樣品在管柱中的移動速度。

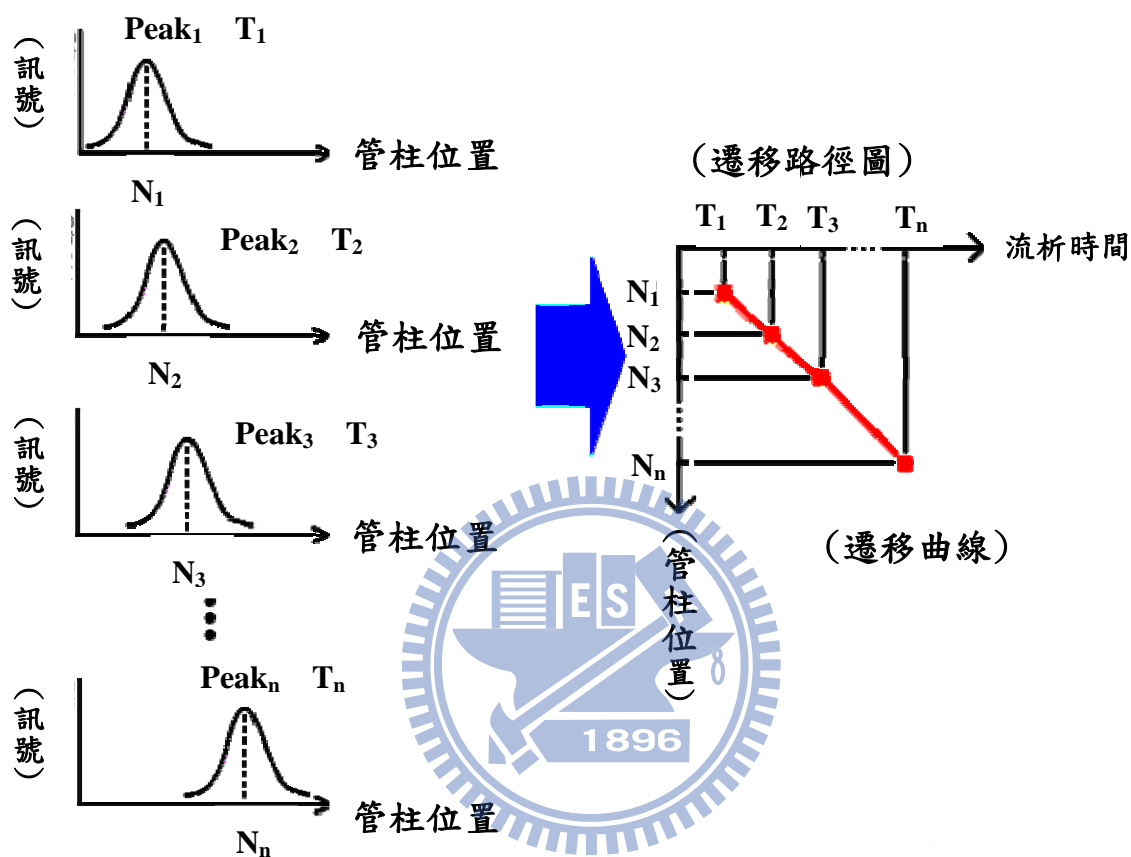


圖 3-4 遷移路徑圖與遷移曲線之定義

利用 WCD 偵測樣品波峰移動到管柱各個位置時，樣品空間半高寬 $w_{1/2}$ 與管柱位置作圖，會得到一個波峰半高寬與管柱位置圖(3-5)，在之後的數據呈現，因為有層析波峰壓縮效應，樣品波寬在特定位置會變窄然後再漸漸變寬，在此我們先定義波寬變化從寬變窄之間的差值為波寬變化值 Δw ，如圖 3-5 所示

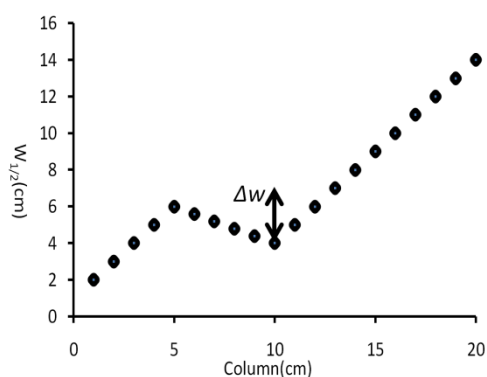


圖 3-5 樣品半高寬與管柱位置關係圖及波寬變化示意圖

樣品因層析波峰壓縮效應，樣品半高寬從寬變窄的差值(管柱 5 公分處波寬與 10 公分處波寬差值)定義為波寬變化值 Δw

3.5 實驗流程

實驗裝置架設完畢後，先調整機台與全管柱偵測器的相關位置與角度，使光源之光線能夠通過填充管柱並抵達偵測器，然後根據電腦操作介面上呈現的光訊號強度，進行機台之 XYZ 軸之微調，以達到最佳化狀態，所謂最佳化狀態是指光源強度穩定且左右兩邊強度對稱；機台調整完畢後測量偵測點所對應的管柱位置；上述步驟執行完畢後，進行接下來的實驗步驟：

- (1) 每次層析操作前，以約 30 mL 之 HPLC 級甲醇清洗管柱。
- (2) 依照實驗條件設定幫浦沖提模式。
- (3) 設定電腦操作介面。
- (4) 注入樣品，並將儀器蓋上黑布避免受其他光源干擾。

- (5) 開動幫浦進行實驗並以 WCD 系統收集樣品訊號。
- (6) 從電腦操作介面上看到訊號以恢復原本狀態即表示樣品已經流出管柱，此時停止收集訊號。
- (7) 進行數據處理。

3.6 實驗步驟

3.6.1 等位沖提

由於層析波峰壓縮效應是因樣品在前後動相界面速度差異造成，故先進行等位沖提實驗，計算樣品在個別動相組成中的移動速度。動相以甲醇和水作 7 種不同比例的混合，如表 3-2，然後再以 0.7 mL min^{-1} 的流速對 $20 \mu\text{L}$ 的樣品進行等位沖提，在樣品注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統收及樣品流經管柱過程的波峰訊號。

表 3-2 動相代號與動相組成表

動相	動相組成(甲醇:水)
A	55:45
B	60:40
C	65:35
D	70:30
E	75:25
F	80:20
G	85:15

3.6.2 階梯式沖提

本實驗使用上述 7 種不同比例的甲醇與水做為動相，以相同流速下進行沖提，並設計一系列的階梯式沖提條件，藉以探討層析波峰壓縮程度與移動速度差的關係。

3.6.2.1 模式一

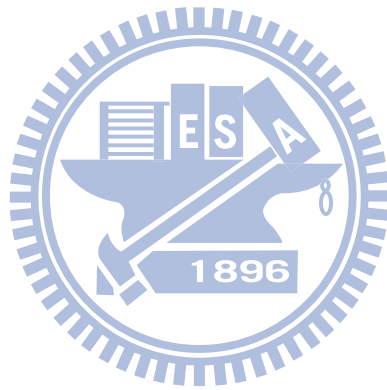
階梯式沖提模式啟動前，先以 100% 的動相 A 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 5.5 分鐘時，瞬間將動相變為 100% 的動相 B、C、D、E、F、G，如圖 3-6(a) 所示，在這樣的切換動相模式實驗中，我們稱動相 A 為第一動相，動相 B、C、D、E、F、G 為第二動相，在往後的模式二、三也以此類推。樣品一注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號。在此先定義為階梯式沖提實驗條件 1、2、3、4、5、6。

3.6.2.2 模式二

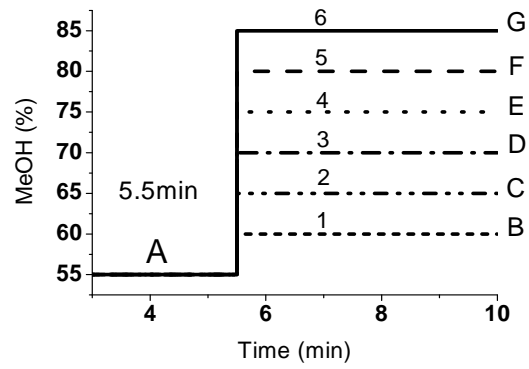
階梯式沖提模式啟動前，先以 100% 的動相 B 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 2.8 分鐘時，瞬間將動相變為 100% 的動相 D、E、F，如圖 3-6(b) 所示。樣品一注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號。在此先定義為階梯式沖提實驗條件 7、8、9。

3.6.2.3 模式三

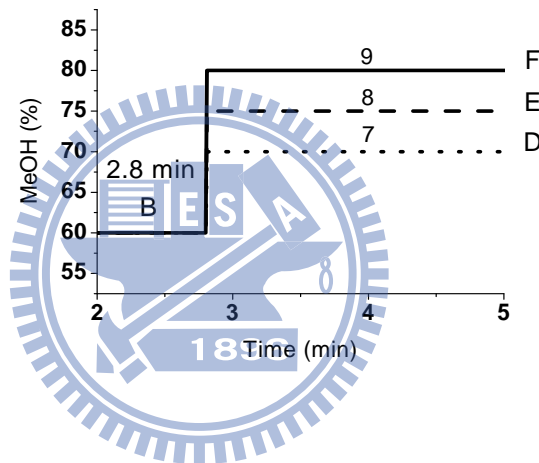
階梯式沖提模式啟動前，先以 100%的動相 C 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 2 分鐘時，瞬間將動相變為 100%的動相 D、E、F、G，如圖 3-6(c)所示。樣品一注入管柱的同時，立即開啟 WCD 系統收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號。在此先定義為階梯式沖提實驗條件 10、11、12、13。



(a) 模式一



(b) 模式二



(c) 模式三

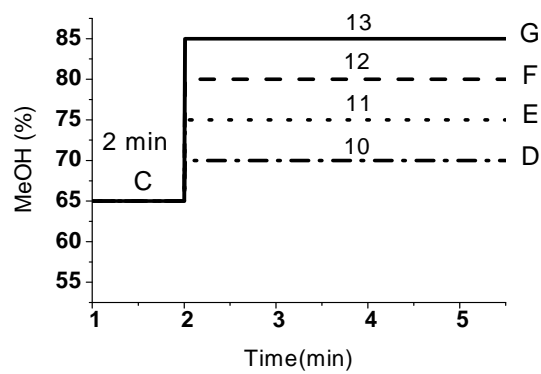


圖 3-6 階梯式沖提所設計的三種實驗模式

3.6.3 連續式沖提

3.6.3.1 模式一

連續式沖提模式啟動前，先以 100% 的動相 C 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 2 分鐘時，將動相在 0.5、1、1.5、2 分鐘內變為 100% 的動相 G，如圖 3-7(a) 所示。在此先定義為連續式沖提實驗條件 1、2、3、4。

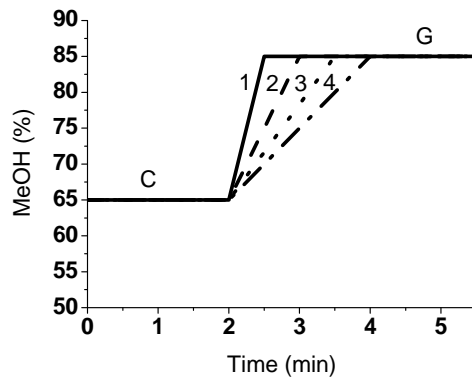
3.6.3.2 模式二

連續式沖提模式啟動前，先以 100% 的動相 C 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 2 分鐘時，將動相在 1.5 分鐘內變為 100% 的動相 E、F、G，如圖 3-7(b) 所示。在此先定義為連續式沖提實驗條件 5、6、7。

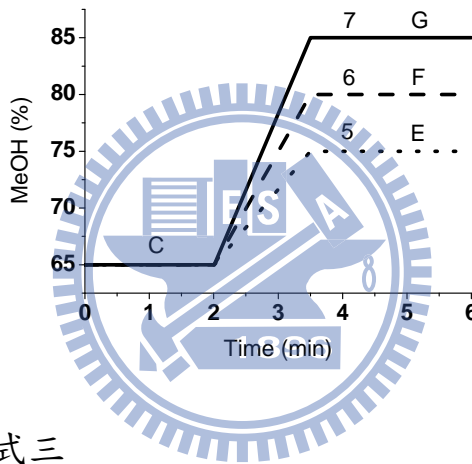
3.6.3.3 模式三

連續式沖提模式啟動前，先以 100% 的動相 A、B、C、D 流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後 5.5、2.8、2、1.5 分鐘時，將動相在 1.5 分鐘內變為 100% 的動相 G，如圖 3-7(c) 所示。在此先定義為連續式沖提實驗條件 8、9、10、11。

(a) 模式一



(b) 模式二



(c) 模式三

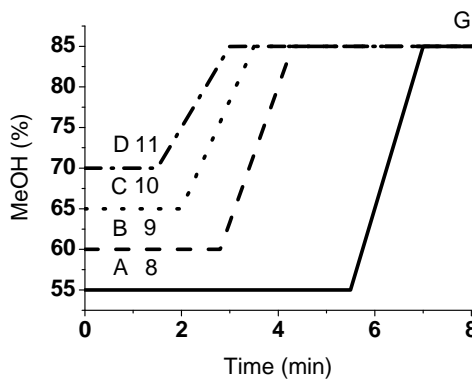


圖 3-7 連續式沖提所設計的三種實驗模式

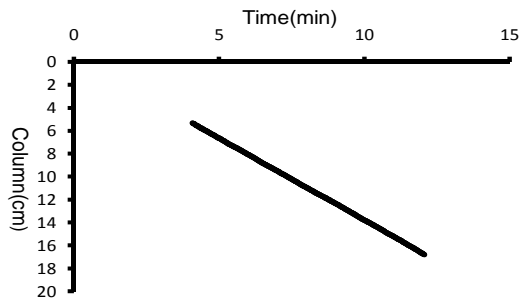
第四章 結果與討論

4.1 等位沖提結果

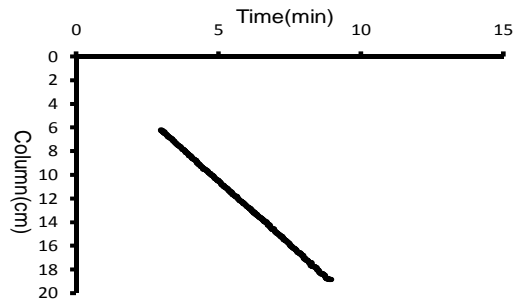
由 7 組沖提實驗遷移路徑路徑圖(圖 4-1)，計算其斜率，可得到樣品在 7 組動相中的個別移動速度(表 4-1)。7 組沖提實驗中，以 WCD 系統觀察所得之樣品移動至離管柱入口端約 7.2、9.0、10.8、12.6、14.4、16.2 公分處的空圖波峰如圖 4-2 所示。由 7 組實驗空圖可看出，樣品在管柱中進行等位沖提時，其空間波高會隨著沖提波峰位置前進逐漸降低，而波寬會逐漸變寬。



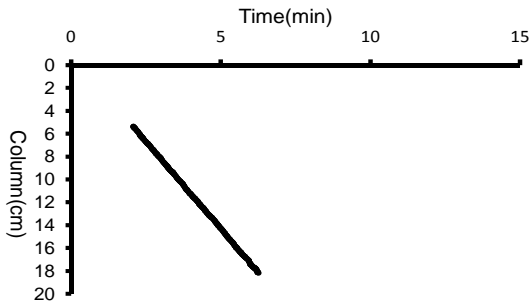
(a)動相 A



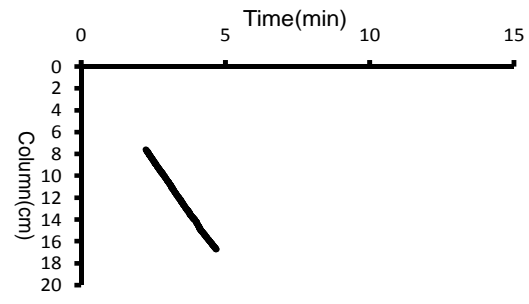
(b)動相 B



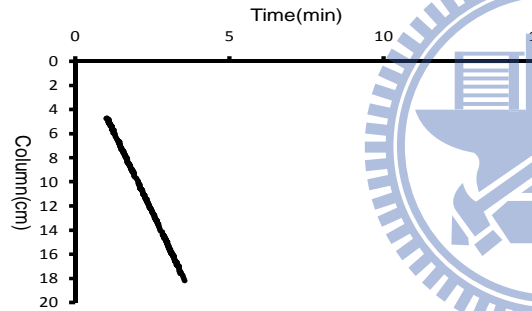
(c)動相 C



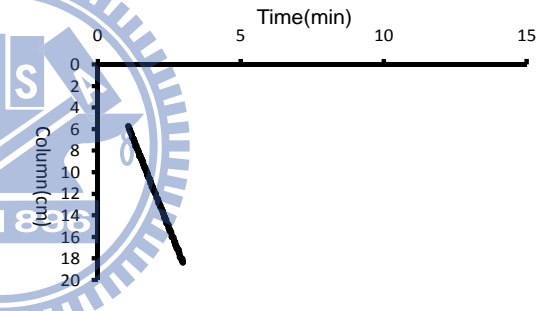
(d)動相 D



(e)動相 E



(f)動相 F



(g)動相 G

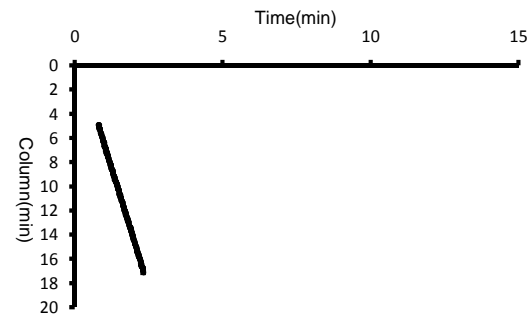


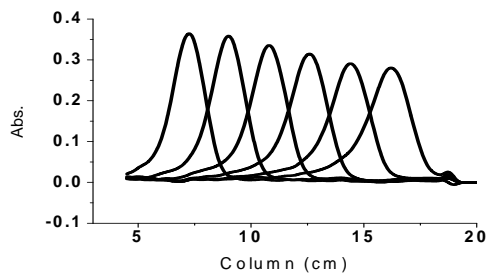
圖 4-1 樣品在不同動相組成中所得之遷移路徑圖
各組實驗遷移曲線的斜率代表樣品在個別動相組成的移動速度

表 4-1 等位沖提中，樣品在不同動相下的移動速度

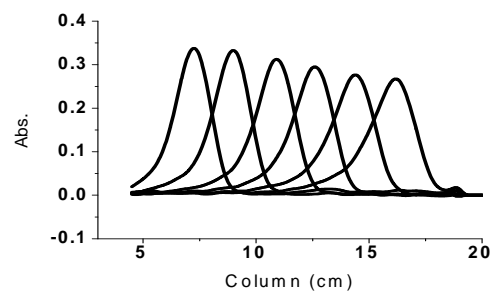
動相組成(甲醇:水)	樣品移動速度(cm min^{-1})
55:45(A)	1.31
60:40(B)	2.15
65:35(C)	3.03
70:30(D)	4.19
75:25(E)	5.31
80:20(F)	6.61
85:15(G)	7.92



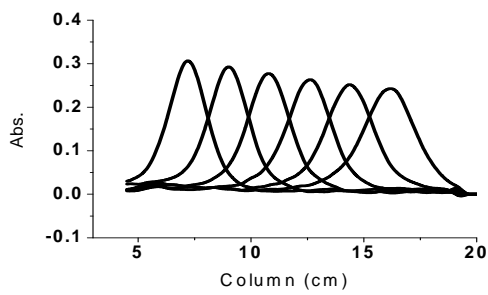
(a)動相 A



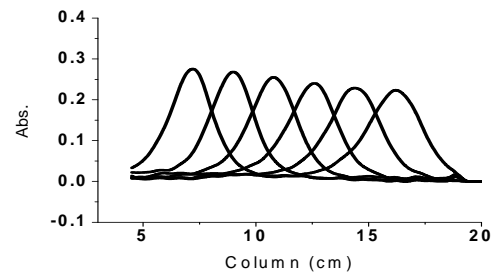
(b)動相 B



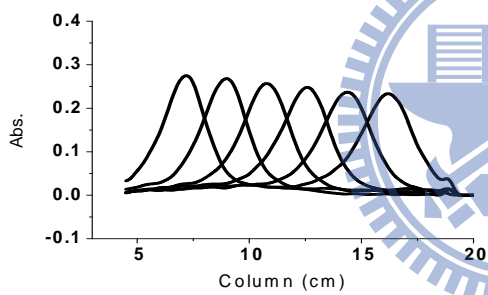
(c)動相 C



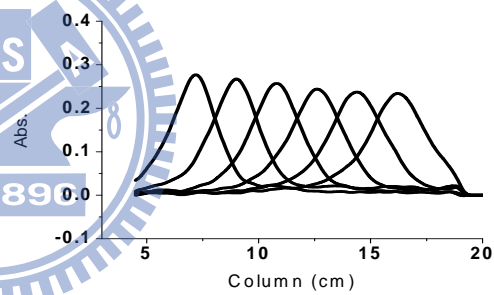
(d)動相 D



(e)動相 E



(f)動相 F



(g)動相 G

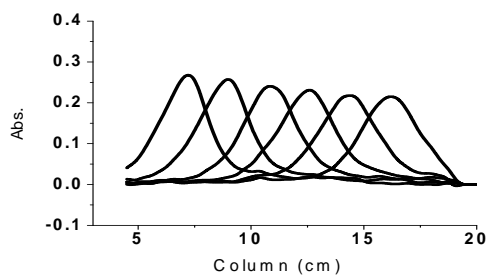


圖 4-2 樣品在不同動相組成之空圖波峰
 樣品抵達 7.2、9.0、10.8、12.6、14.4、16.2 公分處的管內空間波形

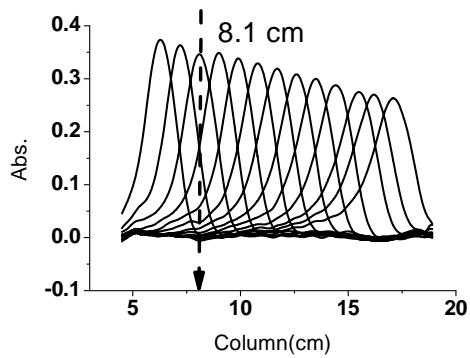
4.2 階梯式沖提

4.2.1 模式一

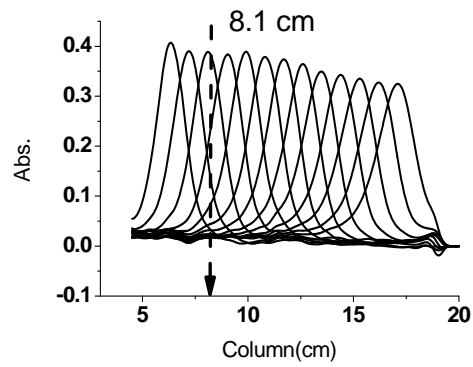
在模式一的階梯式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-3)，並作出樣品於管柱內的遷移路徑圖(圖 4-4)。並將模式一各組實驗中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 列於表 4-2。

由模式一的空圖結果可看出，樣品波高在 8.1 公分處開始逐漸變高，而波寬逐漸變窄，而與模式一的遷移路徑圖對照，可發現在遷移曲線斜率變化處，也就是樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約 8.1 公分，正好就是樣品波高逐漸變高，波寬逐漸變窄的空間位置，而且前後兩動相對樣品的移動速度差值越大，其波高與波寬變化程度就越明顯。將模式一條件之樣品空間波峰半高寬度 $w_{1/2}$ 與管柱位置作圖(圖 4-5)，圖中可看到樣品波峰 8.1 公分處變窄然後再逐漸變寬的情形，此現象即為前述的層析波峰壓縮現象，且 6 組實驗條件中，實驗條件 6 因動相極性差異最大，其波寬壓縮程度最為明顯，將模式一中各組實驗波寬變化值 Δw 列於表 4-2。

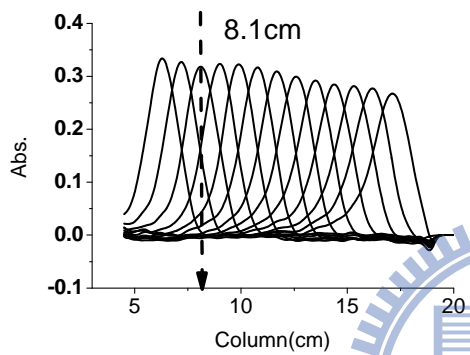
(a) 實驗條件 1



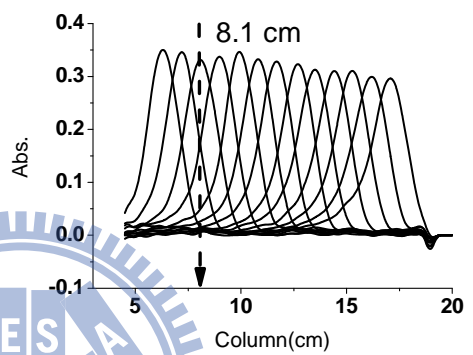
(b) 實驗條件 2



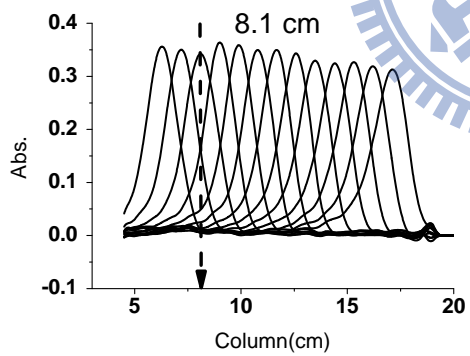
(c) 實驗條件 3



(d) 實驗條件 4



(e) 實驗條件 5



(f) 實驗條件 6

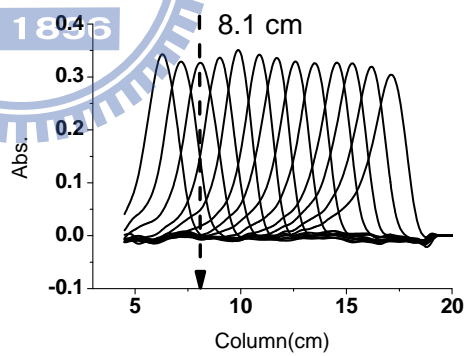
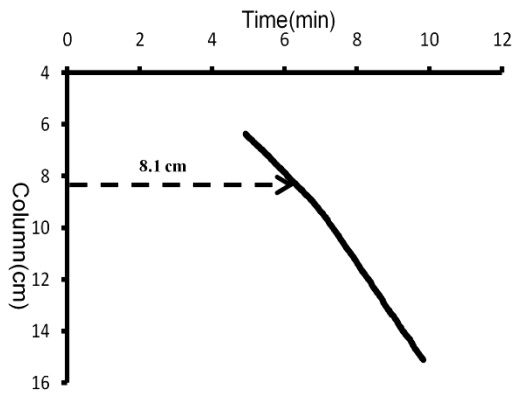
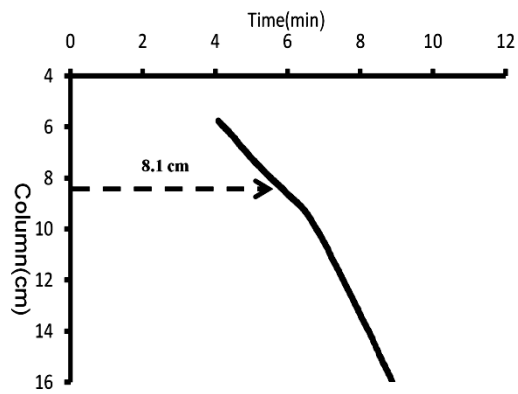


圖 4-3 樣品在階梯式沖提模式一中之空間波形
樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、
15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形。樣品波寬在 8.1 cm 處出現
波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是層析波峰壓縮現象

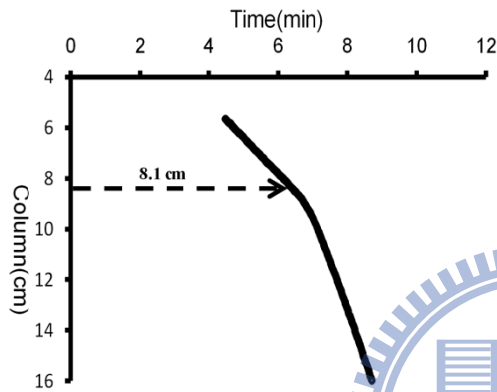
(a) 實驗條件 1



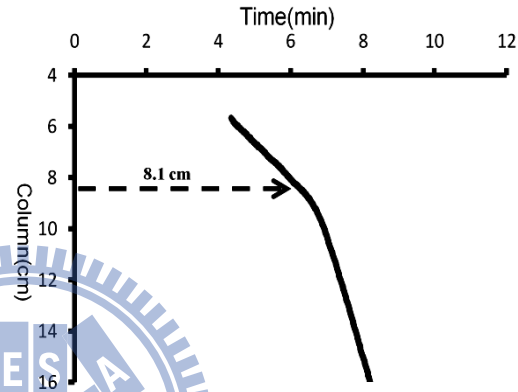
(b) 實驗條件 2



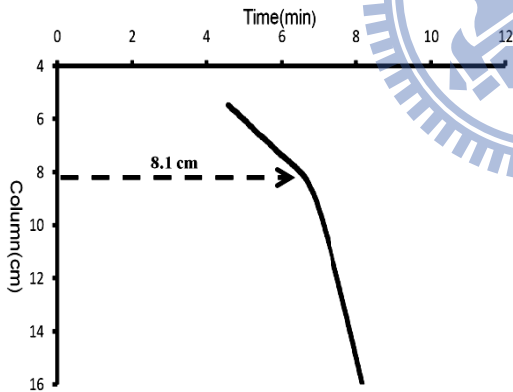
(c) 實驗條件 3



(d) 實驗條件 4



(e) 實驗條件 5



(f) 實驗條件 6

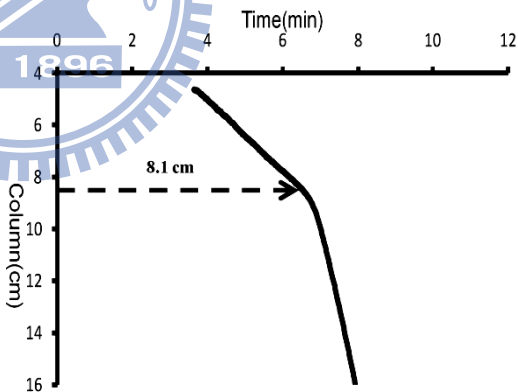
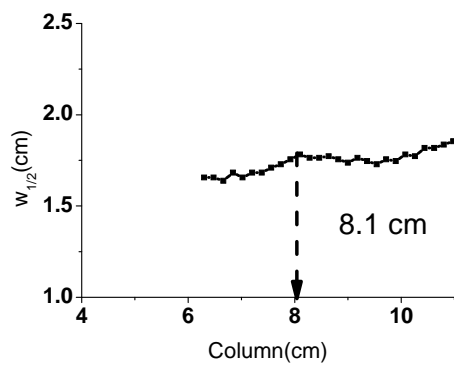
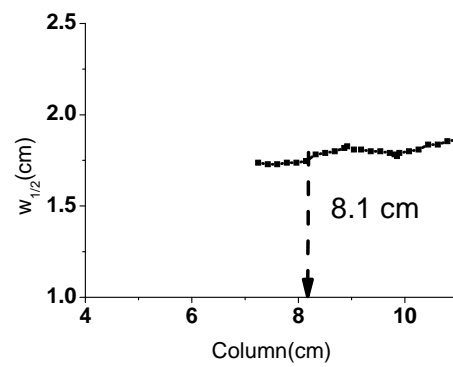


圖 4-4 階梯式沖提模式一中所獲得之樣品遷移路徑圖
樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約在 8.1 cm 處

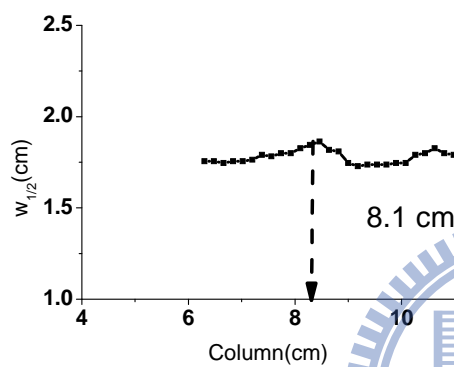
(a) 實驗條件 1



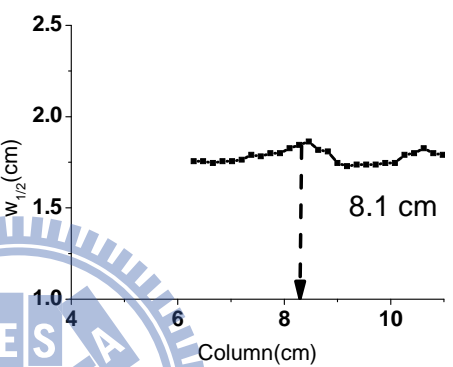
(b) 實驗條件 2



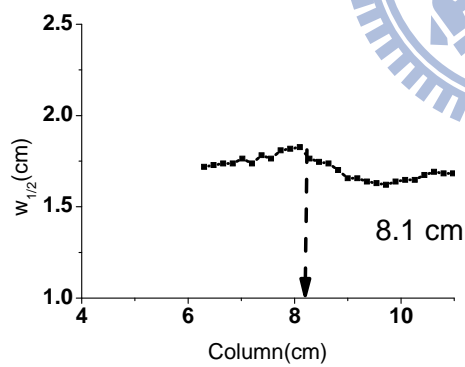
(c) 實驗條件 3



(d) 實驗條件 4



(e) 實驗條件 1



(f) 實驗條件 2

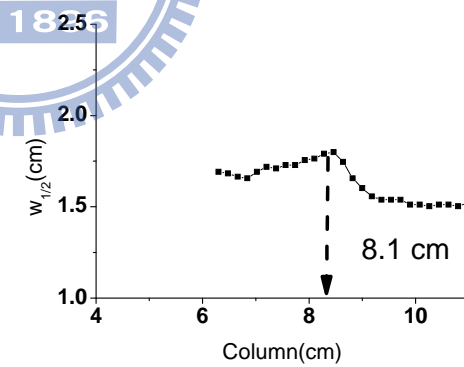


圖 4-5 階梯式沖提模式一中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖
樣品波寬在 8.1 cm 處出現波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是層析波峰壓縮現象

表 4-2 階梯式沖提模式一中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw

實驗條件	樣品移動速度差 $\Delta u(\text{cm min}^{-1})$	波寬變化 $\Delta w(\text{cm})$
1	0.84	0.045
2	1.72	0.063
3	2.88	0.135
4	4.00	0.171
5	5.30	0.225
6	6.61	0.297

4.2.2 模式二

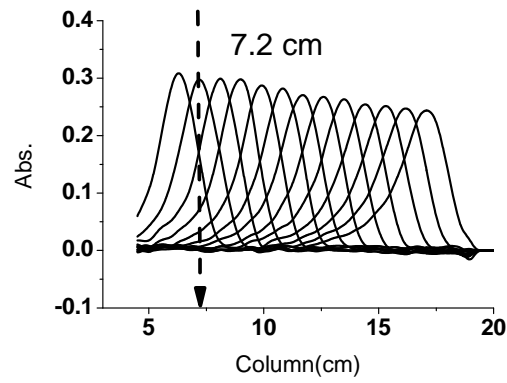
在模式二的階梯式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-6)，並作出樣品於管柱內的遷移路徑圖(圖 4-7)。並將模式二各組實驗中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 列於表 4-3。

由模式二的空圖結果可看出，樣品波高在 7.2 公分處開始逐漸變高，而波寬逐漸變窄，而與模式二的遷移路徑圖對照，可發現在遷移曲線斜率變化處，也就是樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約在 7.2 公分處，正好就是樣品波高逐漸變高，波寬逐漸變窄

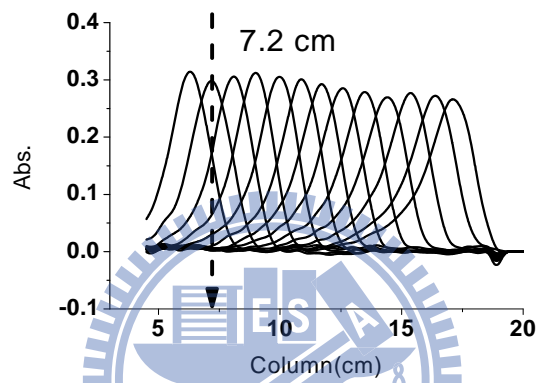
的空間位置，而且前後兩動相對樣品的移動速度差值越大，其波高與波寬變化程度就越明顯。將模式二條件之樣品空間波峰半高寬度 $w_{1/2}$ 與管柱位置作圖(圖 4-8)，圖中可看到樣品約 7.2 公分處波峰變窄然後再逐漸變寬的情形，此現象即為前述的層析波峰壓縮現象，且 3 組實驗條件中，實驗條件 7 因動相極性差異最小，其波寬壓縮程度最為不明顯，將模式二中各組實驗波寬變化值 Δw 列於表 4-3。



(a) 實驗條件 7



(b) 實驗條件 8



(c) 實驗條件 9

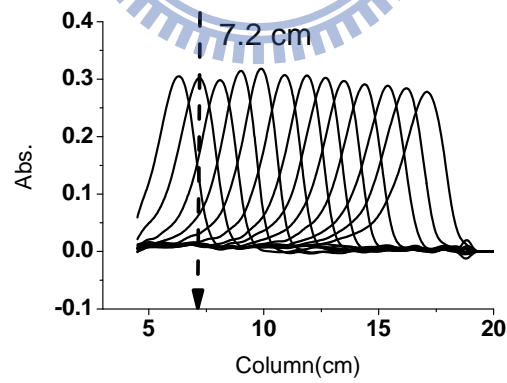


圖 4-6 樣品在階梯式沖提模式二中之空間波形
樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、
15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形。樣品波寬在 7.2 cm 處出現
波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是層析波峰壓縮現象

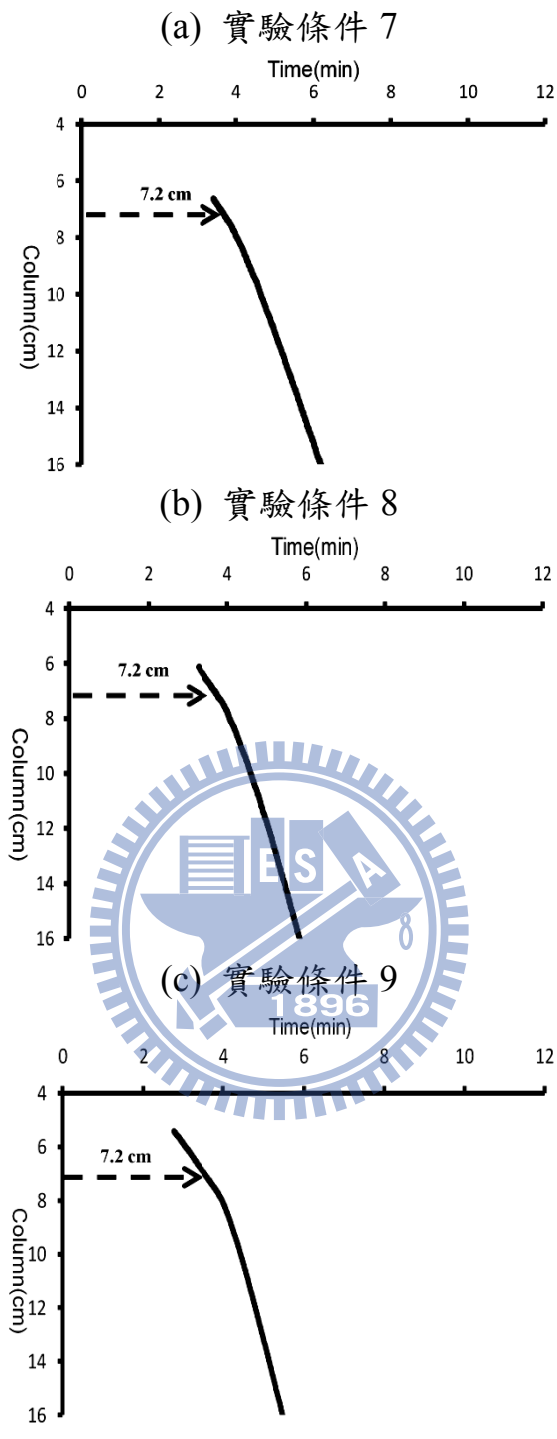
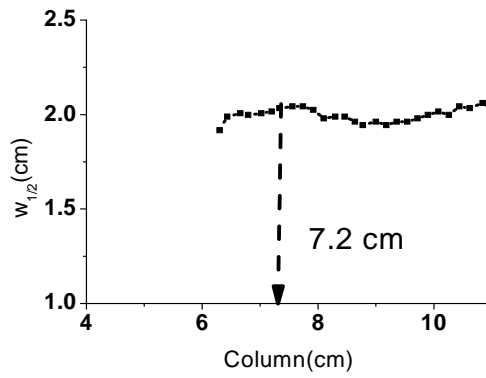
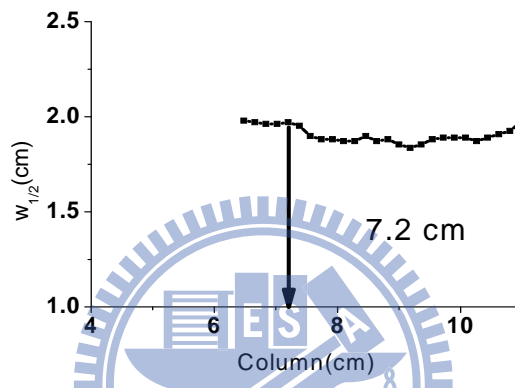


圖 4-7 階梯式沖提模式二中所獲得之樣品遷移路徑圖
 樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約在 7.2 cm 處

(a) 實驗條件 7



(b) 實驗條件 8



(c) 實驗條件 9

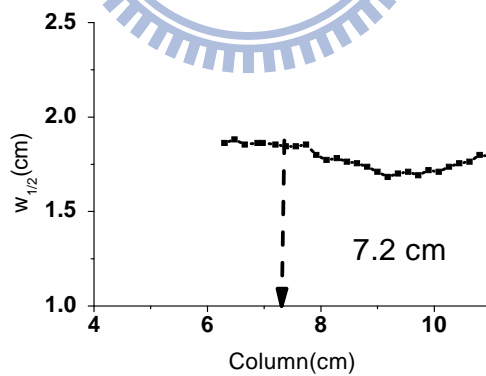


圖 4-8 階梯式沖提模式二中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖
樣品波寬在 7.2 cm 處出現波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是
層析波峰壓縮現象

表 4-3 階梯式沖提模式二中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw

實驗條件	樣品移動速度差 $\Delta u(\text{cm min}^{-1})$	波寬變化 $\Delta w(\text{cm})$
7	2.04	0.099
8	3.16	0.135
9	4.46	0.189

4.2.3 模式三

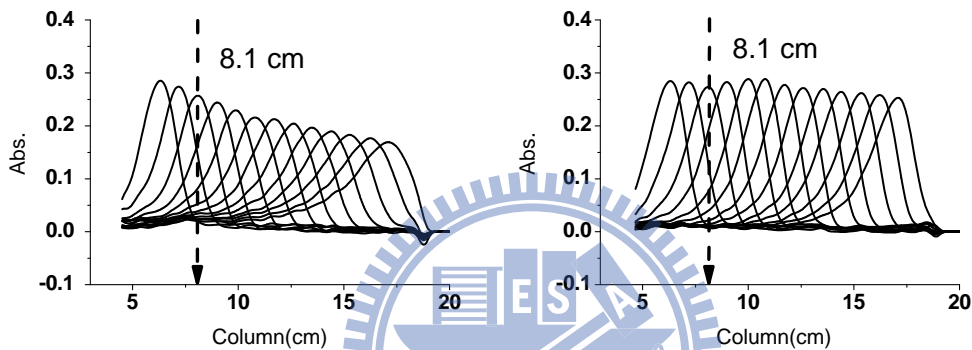
在模式三的階梯式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-9)，並作出樣品於管柱內的遷移路徑圖(圖 4-10)。並將模式三各組實驗中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 列於表 4-4。

由模式三的空圖結果可看出，樣品波高在 8.1 公分處開始逐漸變高，而波寬逐漸變窄，而與模式三的遷移路徑圖相對照，可發現在遷移曲線斜率變化處，也就是樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約 8.1 公分，正好就是樣品波高逐漸變高，波寬逐漸變窄的空間位置，而且前後兩動相對樣品的移動速度差值越大，其波高與波寬變化程度就越明顯。將模式三條件之樣品空間波峰半高寬度 $w_{1/2}$ 與

管柱位置作圖(圖 4-11)，圖中可看到樣品波峰在約 8.1 公分處變窄然後再逐漸變寬的情形，此現象即為前述的層析波峰壓縮現象，且 4 組實驗條件中，實驗條件 13 因動相極性差異最大，其波寬壓縮程度最為明顯，將模式三中各組實驗波寬變化值 Δw 列於表 4-4。

(a) 實驗條件 10

(b) 實驗條件 11



(c) 實驗條件 12

(d) 實驗條件 13

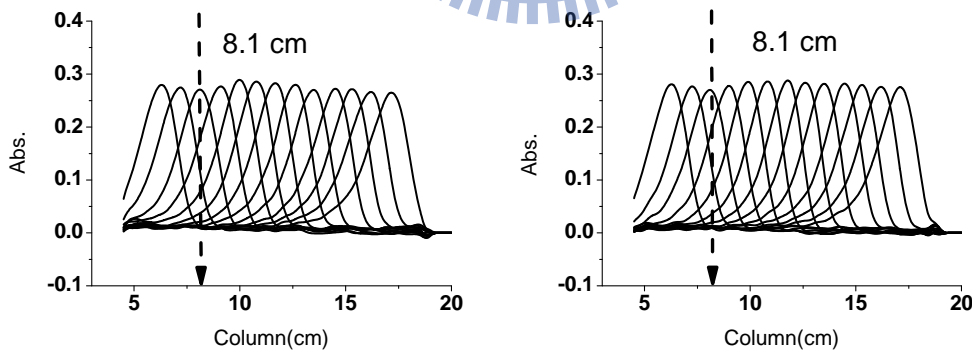
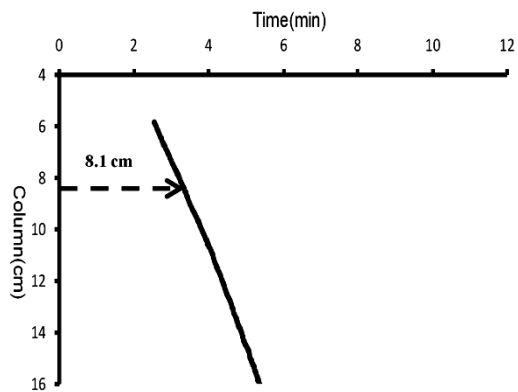
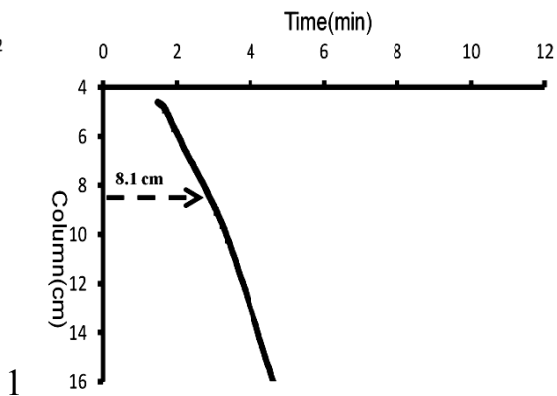


圖 4-9 樣品在階梯式沖提模式三中之空間波形
 樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形。樣品波寬在 8.1 cm 處出現波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是層析波峰壓縮現象

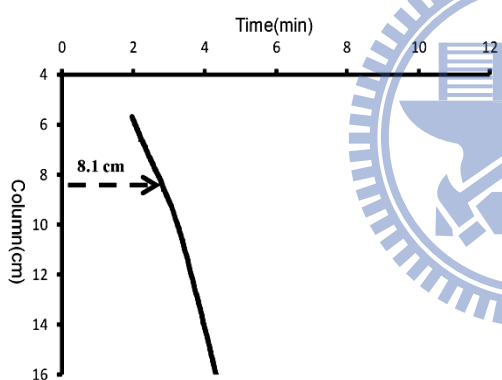
(a) 實驗條件 10



(b) 實驗條件 1



(c) 實驗條件 12



(d) 實驗條件 13

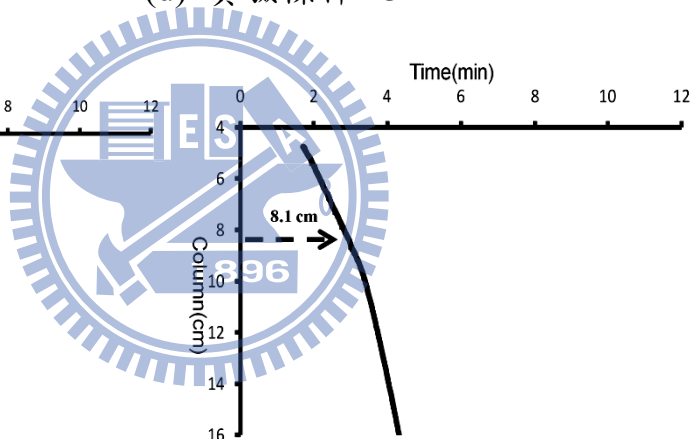
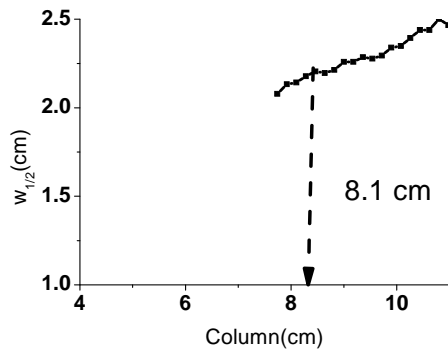
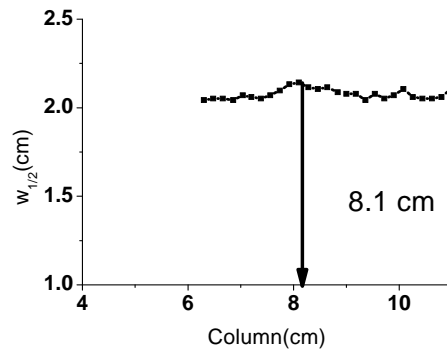


圖 4-10 階梯式沖提模式三中所得之樣品遷移路徑圖
樣品開始受後端動相影響，速度開始變化的位置，約在 8.1 cm 處

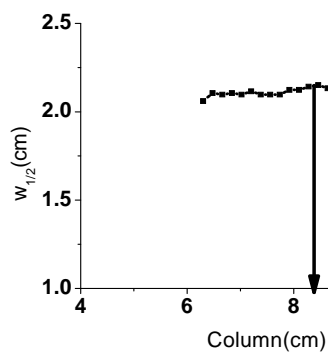
(a) 實驗條件 10



(b) 實驗條件 11



(c) 實驗條件 12



(d) 實驗條件 13

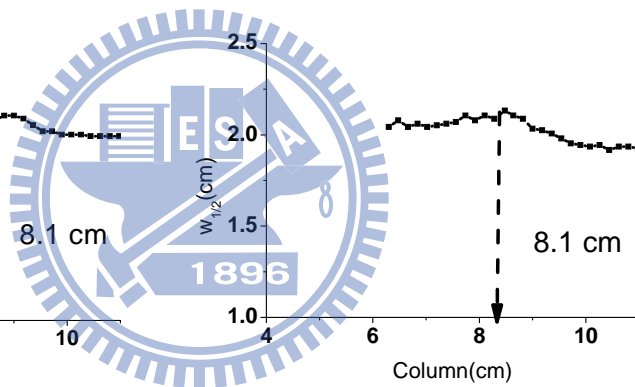


圖 4-11 階梯式沖提模式三中樣品空間半高寬與管柱位置之關係圖
樣品波寬在 8.1 cm 處出現波寬變窄而後再慢慢變寬的情形，也就是
層析波峰壓縮現象

表 4-4 階梯式沖提模式三中，各組實驗條件中，樣品在前後動相移動速度差值 Δu 與樣品波寬變化值 Δw

實驗條件	樣品移動速度差 $\Delta u(\text{cm min}^{-1})$	波寬變化 $\Delta w(\text{cm})$
10	1.16	0.054
11	2.28	0.099
12	3.58	0.153
13	4.89	0.216

由以上 3 種模式實驗結果都證明，樣品在動相組成改變時，的確會發生層析波峰壓縮效應，且發生位置正好就在動相交界面處，也就是遷移路徑圖中，遷移曲線斜率變化處。13 組階梯式沖提實驗中以 A→G 層析波峰壓縮程度最大，以 A→B 層析壓縮波峰程度最小，此即表示動相極性變化差異越大，造成沖提能力大幅改變，使樣品在前後端移動速度劇烈改變，則樣品波寬壓縮程度也會越大。將三種模式的 13 組數據移動速度差值 Δu 與波寬變化值 Δw 列於表 4-8，並作關係圖，結果如圖 4-12，結果顯示，波寬變化值 Δw 與移動速度差值 Δu 恰好成線性正比關係。

表 4-5 三種階梯式沖提模式的 13 組數據移動速度差值 Δu 與波寬變化值 Δw 表

樣品移動速度差 $\Delta u(\text{cm min}^{-1})$	波寬變化 $\Delta w(\text{cm})$
6.61	0.297
5.30	0.225
4.89	0.216
4.46	0.189
4.00	0.171
3.58	0.153
3.16	0.135
2.88	0.135
2.28	0.099
2.04	0.099
1.72	0.063
1.16	0.054
0.84	0.045

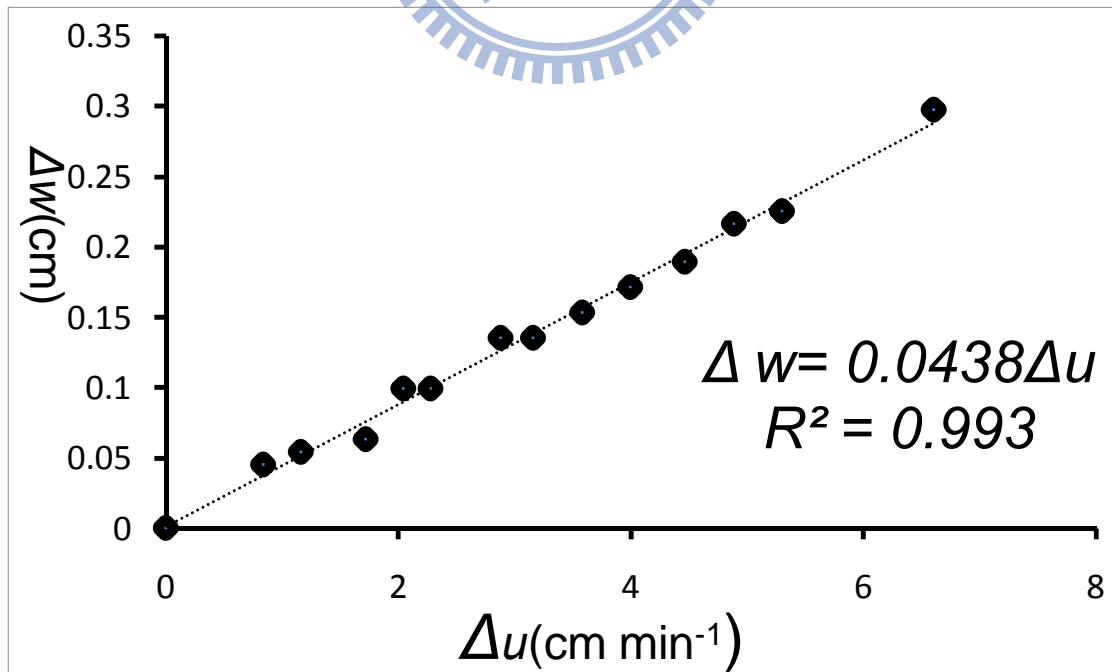


圖 4-12. 三種梯度模式中的 13 組數據移動速度差值 Δu 與波寬變化值 Δw 關係圖

4.3 連續式沖提

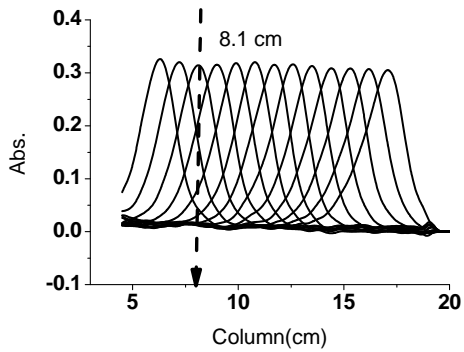
4.3.1 模式一

在模式一的連續式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-13)。

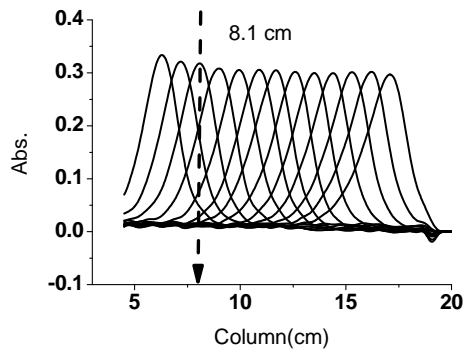
在連續式沖提模式一中，由於起始動相與動相變化時間皆與階梯式沖提模式三相同，故層析波峰壓縮效應應該在管柱約 8.1 公分處發生。但由連續式沖提模式一空圖結果可看出，相較於階梯式沖提模式三，樣品在空間 8.1 公分處波高先上升後下降的情形並不明顯，且沖提變化時間越長，其波高先上升後下降現象越不明顯，如前所述，層析波峰壓縮效應發生的原因來自樣品在兩動相交界面處，因前後端動相對樣品作用力不同，而使樣品在前後端動相中的移度速度不同，處於管柱出口端沖提能力較弱動相中的樣品分子，移動速度比起處於管柱入口端的樣品分子慢，而造成交界面後端樣品擠壓的現象，產生空間樣品在動相交界面處波寬變窄，而前後端動相極性差異越大，現象越明顯，然而在連續式沖提下，因動相組成隨時間做線性變化，前後動相組成變化並沒有階梯式沖提來的劇烈，所以層析波峰壓縮現象並不明顯，而線性變化時間越長，動相組成變化越不劇烈，所以 4 組

實驗中以實驗條件 4 峰壓縮現象最不明顯。

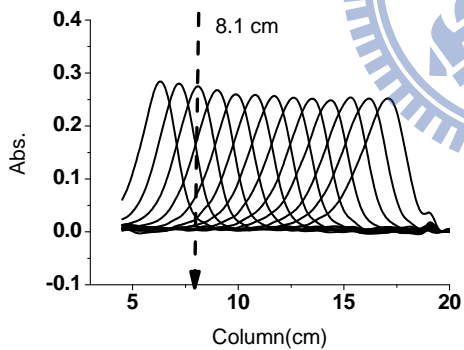
(a) 實驗條件 1



(b) 實驗條件 2



(c) 實驗條件 3



(d) 實驗條件 4

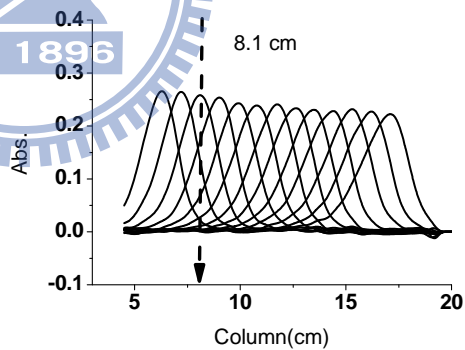


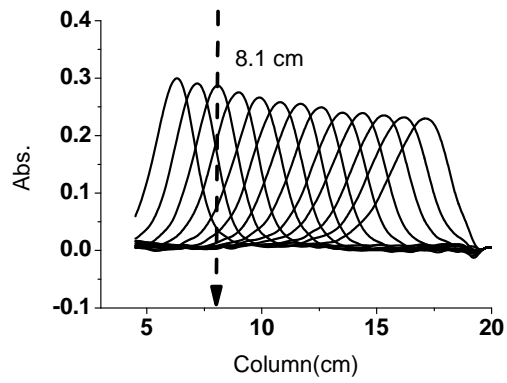
圖 4-13 連續式沖提模式一中樣品空間波形
樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、
15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形

4.3.2 模式二

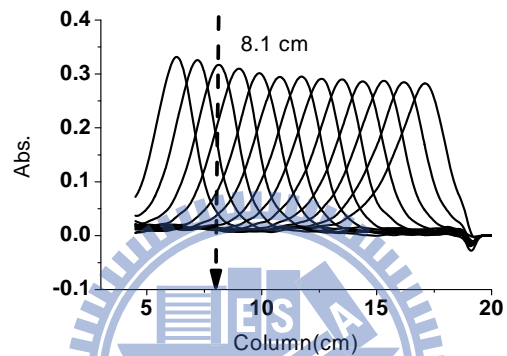
在模式二的連續式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-14)。

在連續式沖提模式二中，由於起始動相與動相變化時間皆與階梯式沖梯模式三相同，故層析波峰壓縮效應應該在管柱約 8.1 公分處發生。但由模式二空圖結果可看出，相較於階梯式沖提模式三，樣品在空間 8.1 公分處波高先上升後下降的情形並不明顯，如前所述，層析波峰壓縮效應發生的原因來自樣品在兩動相交界面處，而前後端動相極性差異越大，現象越明顯。故連續式沖提條件層析波峰壓縮現象較階梯式不明顯。而在 3 組條件中，以實驗條件 7 此組實驗條件，前後動相組成差異最大，因此其層析波峰壓縮現象較明顯。

(a) 實驗條件 5



(b) 實驗條件 6



(c) 實驗條件 7

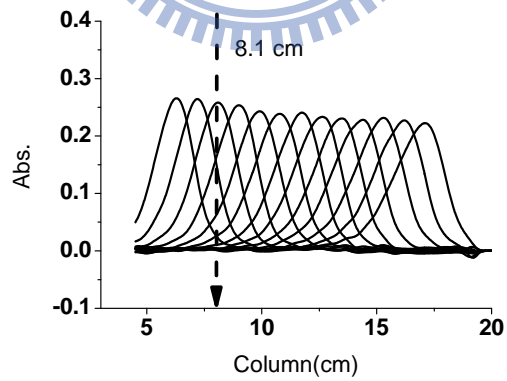


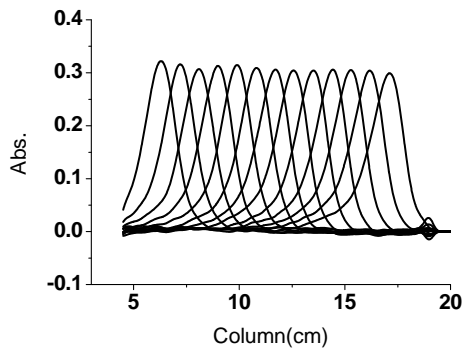
圖 4-14 連續式沖提模式二中樣品空間波形
樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、
15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形

4.3.3 模式三

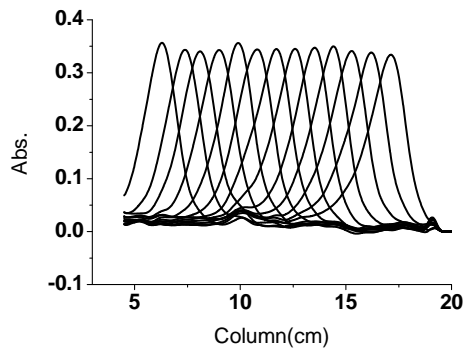
在模式三的連續式沖提條件中，選擇樣品移動至離管柱入口端約 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的空圖波峰觀察比較(圖 4-15)。

由模式三空圖結果可看出，樣品在空間波高先上升後下降的情形並不明顯，且前後動相極性差異越小，其波高先上升後下降現象越不明顯，如前所述，層析波峰壓縮效應發生的原因來自樣品在兩動相交界面處，而前後端動相極性差異越大，現象越明顯，在模式三中，最後流出管柱的動相組成皆為動相 G，且變化時間總長度相同，所以與動相 G 極性差異越大，層析波峰壓縮現象越明顯，故 4 組實驗條件中，以實驗條件 8 這組前後端動相組成差異最大，因此其層析波峰壓縮現象最明顯。

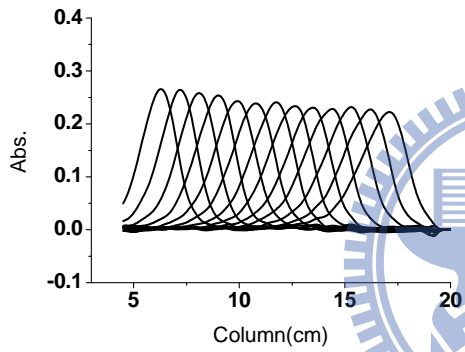
(a) 實驗條件 8



(b) 實驗條件 9



(c) 實驗條件 10



(b) 實驗條件 11

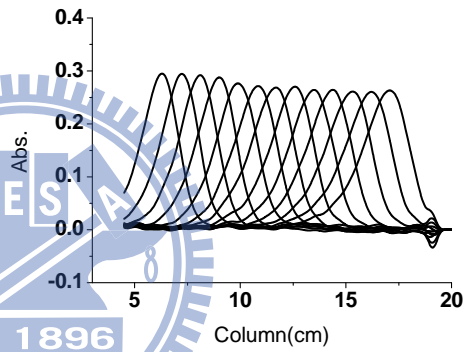


圖 4-15 連續式沖提模式三中樣品空間波形

樣品抵達 6.3、7.2、8.1、9.0、9.9、10.8、11.7、12.6、13.5、14.4、15.3、16.2、17.1 公分處的管內空間波形

由以上三種連續式沖提模式結果發現，其層析波峰壓縮現象皆不明顯，在連續式沖提模式一與二中，可發現在 8.1 cm 處後並無明顯的層析波峰壓縮現象，而是波寬與波高一直維持相近的高度與寬度。與階梯式沖提模式三相較，階梯式沖提雖然在 8.1 cm 處後有明顯的層析波峰壓縮現象，但隨著後端動相完全通過樣品後，樣品的波高便逐漸下降，波寬逐漸變寬。在後來的實驗數據顯示，雖然連續式沖提層析波峰先變窄而後逐漸變寬的現象較不明顯。然而在理論板數的計算上，連續式沖提所計算得到的 N_1 誤差卻會較階梯式沖提計算來的大，其原因在後續會討論。



4.4 理論板數討論及修正公式:

如前所述，傳統以時間單位所計算的理論板數值 N 並不適用在非線性層析系統條件下，因此必須將原有公式做修正，修正流程圖如 4-16 所示：

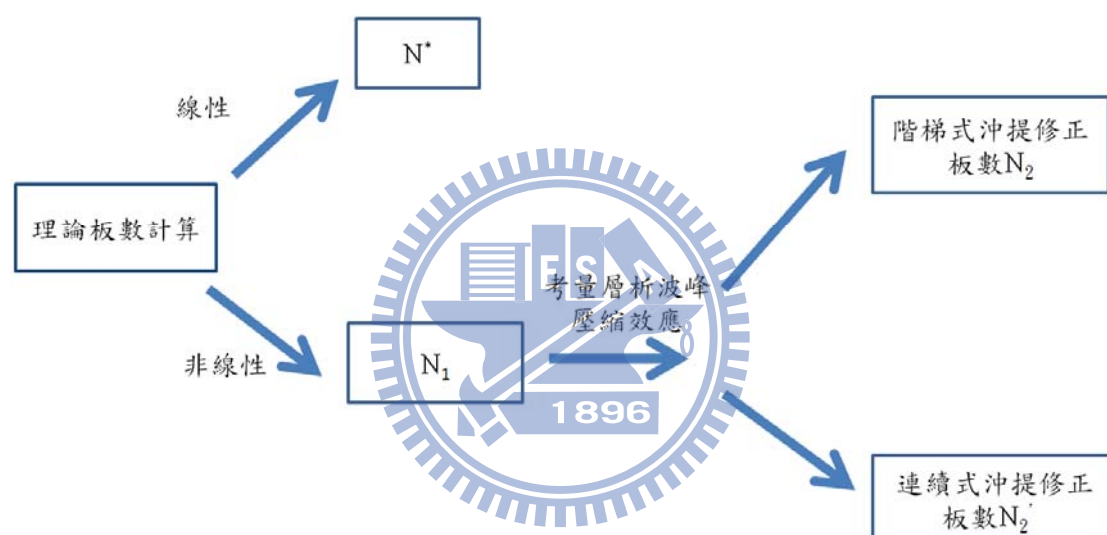


圖 4-16 公式修正之流程圖

4.4.1 考慮因移動速度變化所得修正板數 N_1

由文獻提及[1]，傳統以時間單位計算理論板數誤差主要原因是因為公式是建構在樣品移動速度固定原則下發展而成的，但在非線性層析系統中由於動相組成隨時間改變，樣品會隨著不同時間下受到不同溶劑強度影響，而使樣品移動速度有所改變，導致公式無法使用。

故在此，針對理論板數原始定義作修正。

所提出的公式 N_1 及各項參數如下：

$$N_1 = N \times \left(\frac{L}{t_R \times u_m}\right)^2 \quad (4-1)$$

N_1 : 第一次修正後板數

N : 傳統以時間單位計算所得之板數 [$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}(t)}\right)^2$]

L : 管柱開始有填充物到偵測位置長度

t_R : 樣品滯留時間

u_m : 樣品抵達偵測位置時之流速

推導過程如下：

傳統計算理論板數公式如式 1-4 及 1-6

將式 1-4 作轉換得

$$W_{(t)}^2 = 16 \times \frac{t_R^2}{N} \quad (4-2)$$

$$W_{(t)} = \frac{4 \times t_R}{\sqrt{N}} \quad (4-3)$$

由於使用空間計算的理論板數值 N^* 才是正確的，因此將時圖波峰寬度轉換為空圖波峰寬度，使用下式，可將時圖波寬轉換成空圖波寬

$$\sigma_t = \frac{\sigma_s}{u_m} \quad (4-4)$$

$$W_{(s)} = W_{(t)} \times u_m \quad (4-5)$$

將式 4-5 代入式 4-3

$$W_{(s)} = \frac{4 \times t_R}{\sqrt{N}} \times u_m \quad (4-6)$$

由下圖

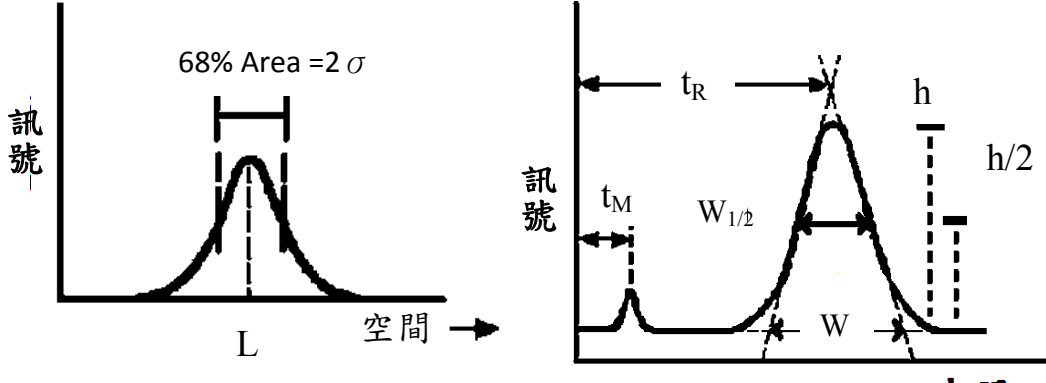


圖 4-17 空間波峰標準偏差與波峰寬度關係圖(取自儀器分析 skoog 林敬二譯，圖 24-5,24-6)，在高斯波形下，在最大值 2 個標準偏差之內($\pm 2\sigma$)有 96%的面積，其中 $W=4\sigma$

得到

$$W_{(s)} = 4\sigma_s \quad (4-7)$$

將式 4-7 代入式 4-6

$$\sigma_s = \frac{t_R \times u_m}{\sqrt{N}} \quad (4-8)$$

如此得到空間波峰標準偏差 σ_s ，將其代入式 1-2 得

$$N_1 = \left(\frac{L\sqrt{N}}{t_R \times u_m} \right)^2 \quad (4-9)$$

將上式做整理，即可得到式 4-1

修正公式 N_1 將傳統以時間為單位計算的理論板數，針對其原始定義進行修正轉換。然而在文獻[7-10]中提到，當在進行非線性層析系統時，動相的組成變化，會使空間中的波寬發生變化，也就是層析

波峰壓縮效應，而此效應對理論板數的計算也會有所影響， N_1 的修正並未考量到波寬變化的情況，因此在理論背景及校正成果中，仍有所不足。

4.4.2 考慮層析波峰壓縮效應修正板數 N_2

在前述板數探討中， N_1 與空圖板數 N^* 差異來自於未考慮到層析波峰壓縮效應，在此利用前面所得到的實驗結果，設計一考量層析波峰壓縮效應的修正公式 N_2 ，並與空圖板數值 N^* 來做比較。

4.4.2.1 階梯式沖提修正板數 N_2

階梯式沖提板數修正，所提出的公式及各項參數下，

$$N_2 = N_1 + \left(\frac{0.0438 \times \Delta u}{W_{1/2(t)} \times u_m} \right) \times N_1 \quad (4-10)$$

$$\Delta u = u_m - u_0$$

u_m : 樣品抵達偵測位置時之移動速度

u_0 : 樣品在注入管柱時移動速度

$W_{1/2(t)}$: 在管內固定一點作為偵測位置，在此偵測位置所得的時圖波寬

N_1 : 第一次修正後板數

N_2 : 考慮波壓縮後階梯式沖提修正板數

推導如下：

由於層析波峰壓縮效應主要是發生在兩動相交界面處，在動相交界面處，前端沖提能力較弱動相中樣品無法立即反應後端沖提能力較

強動相中樣品的移動速度，使得後端動相中的樣品產生擠壓的情形，造成樣品波寬變窄，在後端動相通過樣品時，波寬又會恢復逐漸變寬的情形。因在交界面波寬變窄，由式 1-2 可知，因 σ_s 變小，在交界面處空圖板數 N^* 會大幅上升，所以未考慮到層析波峰壓縮效應的修正公式 N_1 所修正出來的結果皆會小於空圖所得到的板數 N^* 。

因此修正想法即為加上一個因層析波峰壓縮效應產生的板數，即可修正 N_1 ，使其更符合空圖所得到的板數 N^* 。

在所設計實驗條件，樣品流經觀察位置時（管柱 17.1 公分處），所沖提的動相組成皆為最後動相組成，且維持此動相組成到流出沖提管柱，而在相同的動相組成下，樣品的移動速度就不會再改變了，因此在此流經管柱觀察位置時，是等速移動，可使用下式：

$$u_m W_{1/2(t)} = W'_{1/2(s)} \quad (4-11)$$

將偵測位置時圖寬度模擬成當時空圖寬度（此波寬並非空圖上樣品真實波寬，只是近似值），波寬 $W'_{1/2(s)}$ 提供空圖板數 N^* ，利用分率的概念，相對於偵測位置空圖波寬，壓縮波寬所增加之板數可用下式描述

$$\frac{\Delta w}{W'_{1/2(s)}} \times N^* \quad (4-12)$$

上式即為因層析壓縮波峰壓縮效應產生的板數，而波寬壓縮量大小可由實驗數據而得（見圖 4-12），利用下式可得到層析波峰壓縮量大小

$$\Delta w = 0.0438 \times \Delta u \quad (4-13)$$

然而空圖板數 N^* 並無法由單通道偵測器得到，為了使一般偵測

器皆能使用此修正公式，在此利用未修正前，最接近空圖板數的 N^* 的 N_1 去替代，由於 N_1 中的參數皆是傳統偵測器所能獲得，故一般單通道偵測器使用者也能使用此公式。故將式 4-12 的 N^* 用 N_1 替代得

$$\frac{\Delta w}{W'_{1/2(s)}} \times N_1 \quad (4-14)$$

將式 4-13 代入式 4-14，所模擬因層析波峰壓縮效應增加的板數即為

$$\left(\frac{0.0438 \times \Delta u}{W_{1/2(t)} \times u_m} \right) \times N_1 \quad (4-15)$$

將上式再加上未考慮層析波峰壓縮效應的修正板數 N_1 ，即可得到在階梯式沖提中，考慮層析波峰壓縮效應的修正板數 N_2

$$N_2 = N_1 + \left(\frac{0.0438 \times \Delta u}{W_{1/2(t)} \times u_m} \right) \times N_1 \quad (4-10)$$

0.0438 為本實驗中所得的波寬變化與移動速度斜率，若使用不同管柱或溶劑系統時，其值也會不同。

4.4.2.2 連續式沖提修正板數 N_2'

連續式沖提板數修正，所提出的公式及各項參數下：

$$N_2' = N_1 + \left[\frac{u_0 t + \frac{1}{2}(u_m - u_0) \times t}{L} \right] \times N_1 \quad (4-16)$$

N_2' : 考慮波壓縮後連續式沖提修正板數

N_1 : 第一次修正板數(未考慮層析波峰壓縮效應)

u_0 : 樣品在注入管柱時之移動速度

u_m : 樣品抵達偵測位置時之移動速度

t : 所設定的連續式沖提變化時間總長度

L : 管柱偵測位置(或是管長)

推導如下：

如前所述，未考慮到層析波峰壓縮效應的修正公式 N_1 所修正出來的結果皆會小於空圖所得到的板數 N^* ，因此修正想法即為加上一個因層析波峰壓縮效應增加的板數，即可修正 N_1 ，使其更符合空圖所得到的真實板數。

在此用層析波峰壓縮影響範圍 ΔL 的空圖板數，模擬增加的板數，計算影響範圍的空圖板數，則利用分率概念，將影響範圍長度除上全部管長，再乘上全部管柱的空圖板數 N^* ，即可獲得影響範圍板數，如下式

$$\left(\frac{\Delta L}{L}\right) \times N^* \quad (4-17)$$

然而空圖板數 N^* 並無法由單通道偵測器得到，為了使一般偵測器皆能使用此修正公式，在此利用未修正前，最接近空圖板數的 N^* 的 N_1 去替代，由於 N_1 中的參數皆是傳統偵測器所能獲得，故一般單通道偵測器使用者也能使用此公式。故將式 4-17 的 N^* 用 N_1 替代得

$$\left(\frac{\Delta L}{L}\right) \times N_1 \quad (4-18)$$

此即為要模擬因層析波峰壓縮影響增加的板數

在所設計的實驗條件中，樣品的移動速度與動相組成為一線性關

係，如圖 4-18，故連續式沖提中，樣品因動相組成隨時間作線性改變，在動相組成變化期間，樣品移動速度隨時間作一線性的變化的沖提條件，速度改變下的梯形面積即為動相交界面處範圍 ΔL ，如圖 4-19。在本實驗的條件下，樣品的移動速度與動相組成為線性關係，但在其他樣品或動相組成下不一定如此，在文獻記載[29-30]，在一些條件下，樣品移動速度會與動相組成有線性關係，因此所提的修正公式可以計算一些特定條件下的理論板數。

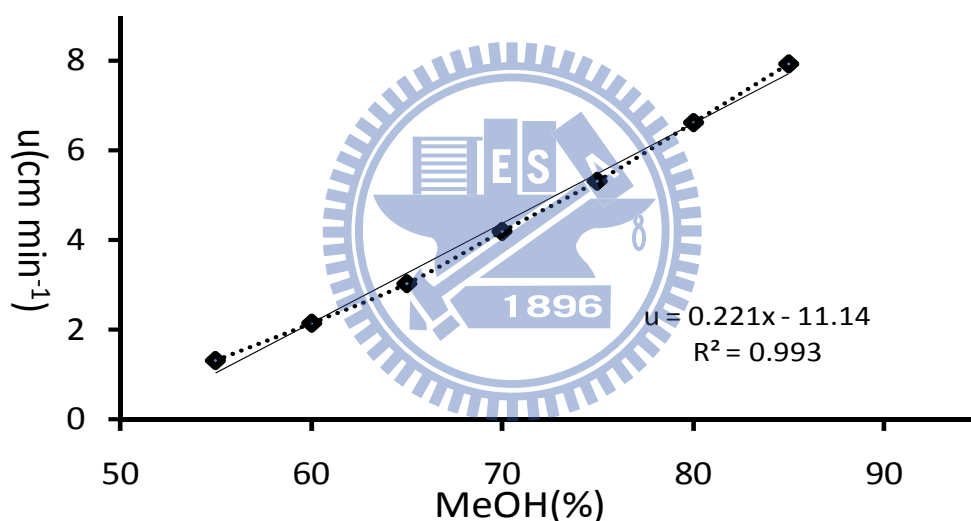


圖 4-18 樣品移動速度與甲醇比例關係圖 移動速度與甲醇比呈線性關係

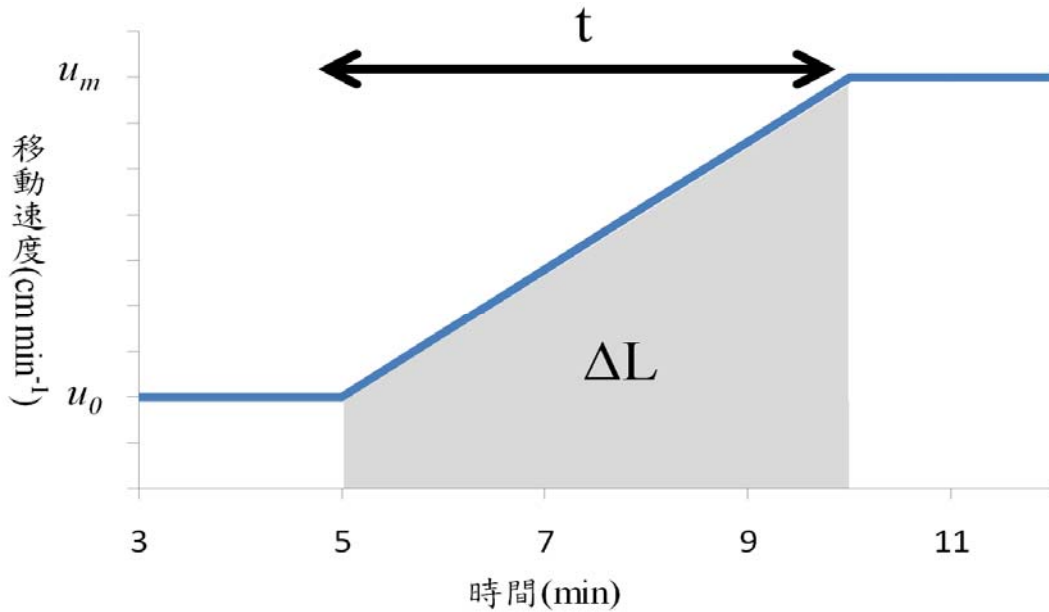


圖 4-19 樣品移速變化與動相組成變化關係圖
 動相組成隨著時間作線性改變，樣品的移速也作線性改變

使用下式計算梯形面積 ΔL

$$\Delta L = u_0 t + \frac{\frac{1}{2}(u_m - u_0)}{t} \times t^2 \quad (4-19)$$

經過化簡得

$$\Delta L = u_0 t + \frac{1}{2}(u_m - u_0) \times t \quad (4-20)$$

將其代入式 4-18，即為影響範圍的板數：

$$\left[\frac{u_0 t + \frac{1}{2}(u_m - u_0) \times t}{L} \right] \times N_1 \quad (4-21)$$

將影響範圍的板數加上未考慮層析波峰壓縮效應的板數 N_1 ，即為在

連續式沖提條件中，考慮層析波峰壓縮效應的修正板數 N_2'

$$N_2' = N_1 + \left[\frac{u_0 t + \frac{1}{2}(u_m - u_0) \times t}{L} \right] \times N_1 \quad (4-16)$$

以上所提的修正板數 N_1 、 N_2 、 N_2' ，其應用上有一些限制，即是在通過偵測點時，其樣品的移動速度不可改變，在未來，希望能更深

入的討論，即使通過偵測位置點時，速度仍在變化，也可藉由修正，得到正確的板數值。

4.4.3 修正後板數比較

4.4.3.1 階梯式沖提板數比較

在此使用樣品移動到管內 17.1 公分處的參數來計算理論板數，文獻提到[31]，管內時圖波寬，與管外時圖波寬一致的，因此一般管外偵測器也可用公式來計算非線性理論板數。根據式 1-6 來計算三種階梯式梯度沖提模式，所有實驗求得之時圖理論板數 N ，式 1-2 計算空圖理論板數 N^* ，式 4-1 計算第一次修正後理論板數 N_1 ，式 4-10 計算第二次修正後理論板數 N_2 ，結果列於表 4-6，將其與空圖板數值 N^* 作比較並計算 N 、 N_1 、 N_2 之間的誤差值，結果列於表 4-6。由結果顯示，在非線性層析系統中，若使用式 1-6 來計算理論板數 N ，會有相當大的誤差，以階梯式沖提實驗條件 A→G 甚至達 10 倍以上差異， N 值結果經過 N_1 修正後，可大幅降低其板數誤差，使其得到較正確的板數，由表 4-6 中 N_1 與 N^* 比較，發現當樣品在前後端動相移動速度差異越大， N_1 與 N^* 的板數差也會越多的趨勢，此代表了當層析波峰壓縮程度越大，對板數的影響也會越大，而使用加上考慮層析波峰壓縮效應的 N_2 再次修正，可更進一步的降低誤差，其誤差值約在 7% 以下。在此修正公式 N_1 以及 N_2 所使用的參數，都可由層析時

圖中所獲得，因此在沒有全管柱偵測器的情況下，也可利用修正公式，得到非線性系統下，正確的理论板數值 N^* 。

4.4.3.2 連續式沖提板數比較

根據 1-6 式來計算三種連續式梯度沖提模式所有實驗求得之時圖理论板數 N ，式 1-2 計算空圖理论板數 N^* ，式 4-1 計算第一次修正後理论板數 N_1 ，式 4-16 計算第二次修正後理论板數 N_2 ，結果列於表 4-7，將其與空圖板數值 N^* 作比較計算 N 、 N_1 、 N_2 之間的誤差值，結果列於表 4-7。由結果顯示，在非線性層析系統中，若使用式 4-2 來計算理论板數，就如同階梯式沖提實驗一樣，會有相當大的誤差，以連續式沖提條件 A→G 1.5 min 變化時間，甚至達 10 倍以上差異， N 值結果經過 N_1 修正後，可大幅降低其板數誤差，使其得到較正確的板數，由表 4-76 中 N_1 與 N^* 比較，在前後端選擇動相固定時，也就是沖提模式一，有當動相變化時間越長，其板數差值也會越大的傾向，因波壓縮效應影響的時間更長，而使得差異較大。而在變化時間相同時，也就是沖提模式二、三，有樣品在前後動相移動速度差異越大，其板數誤差值也會越大趨勢，因樣品在前後端動相移動速度差異越大，層析波峰壓縮程度越大，而使得板數差值越大。而使用加上考慮層析波峰壓縮效應的 N_2 再次修正，可更進一步的降低誤差，約可降低 20%，誤差值約在 10% 以下。如前所述，與階梯式沖提模式相比，連續式沖

提的層析波峰壓縮現象，從層析圖譜空圖上看較不明顯，但由表 4-6 與 4-7 相比，可發現 N_1 在連續式沖提的板數誤差都來的比階梯式的大，原因在於雖然連續式沖提層析波峰壓縮現象較不明顯，但其效應卻一直持續的發生，以致於波高與波寬維持一定，而階梯式沖提時，樣品波高與波寬雖會在動相變化交界面處上升與變窄，但隨後又會逐漸下降與變寬，其影響範圍與時間皆較連續式來的短暫。在連續式沖提下，由於層析波峰壓縮效應隨時間持續的影響，故層析波峰壓縮效應對板數的影響會較階梯式沖提來的大。在連續式沖提中，若不考慮層析波峰壓縮效應修正的板數 N_1 ，其誤差值甚至可達 37.6%，因此在修正理論板數值，層析波峰壓縮效應是更須要考慮的。在此修正公式 N_1 以及 N_2 所使用的參數，都可由層析時圖中所獲得，即便在沒有全管柱偵測器的情況下，也可利用修正公式，得到非線性系統下，正確的理論板數值 N^* 。

表 4-6 三種階梯式沖提模式的 13 組數據空時圖理論板數與修正公式

N_1 、 N_2 計算結果

實驗條件	N^*	N	N_1	N_2
1	359	646(80%)	349(2.8%)	355(1.1%)
2	372	931(150%)	345(7.3%)	357(4.0%)
3	414	1940(369%)	401(3.1%)	426(2.9%)
4	455	2827(521%)	412(9.5%)	449(1.3%)
5	484	4905(913%)	410(15.3%)	458(5.4%)
6	530	6667(1158%)	478(9.8%)	553(4.3%)
7	306	741(142%)	297(2.9%)	308(0.7%)
8	351	1138(224%)	327(6.8%)	348(0.9%)
9	391	1692(333%)	352(10.0%)	384(1.8%)
10	151	260(72%)	139(7.96%)	142(6.0%)
11	308	667(117%)	295(4.2%)	307(0.3%)
12	342	908(165%)	300(12.3%)	321(6.1%)

註:括弧內數值為時圖板數值 N ，修正後板數值 N_1 、 N_2 與空圖板數 N^*

的誤差值，計算方式如下式所示

$$\text{誤差值} = \left| \frac{[N^* - N \text{ or } N_1 \text{ or } (N_2)]}{N^*} \right| \times 100\%$$

表 4-7 三種連續式沖提模式的 11 組數據空時圖理論板數與修正公式

N_1 、 N_2' 計算結果

實驗條件	N^*	N	N_1	N_2'
1	333	1413(324%)	283(15.0%)	328(1.5%)
2	321	1324(312%)	235(27.8%)	310(3.4%)
3	285	1210(325%)	210(26.3%)	312(9.5%)
4	255	1003(293%)	159(37.6%)	261(2.4%)
5	195	448(130%)	136(30.3%)	203(4.1%)
6	276	861(212%)	208(24.6%)	296(7.3%)
7	285	1210(325%)	210(26.3%)	312(9.5%)
8	504	6519(1193%)	380(24.6%)	535(6.2%)
9	403	2261(461%)	291(27.8%)	419(4.0%)
10	285	1210(325%)	210(26.3%)	312(9.5%)
11	259	645(149%)	166(35.9%)	254(1.9%)

註:括弧內數值為時圖板數值 N ，修正後板數值 N_1 、 N_2 與空圖板數 N^* 的誤差值，計算方式如下式所示

$$\text{誤差值} = \left| \frac{[N^* - N \text{ or } N_1 \text{ or } (N_2)]}{N^*} \right| \times 100\%$$

第五章 結論

在非線性層析系統中，使用單一通道偵測器時圖波峰參數所計算而得的傳統理論板數 N 會與正確以空圖波峰參數所計算而得的理論板數 N^* 有相當大的誤差。本研究針對理論板數計算的原始定義作探討，並加以修正所得的公式 N_1 值，能將在非線性層析系統中誤用的 N 作修正，即使在傳統單通道偵測器，只能得到時圖波峰參數，也能經由公式，計算較正確的理論板數值。除了原始定義外，本研究也對層析波峰壓縮效應與空間樣品波寬作討論，結果顯示樣品波寬的壓縮程度，與前後動相對樣品作用力不同造成的移動速度差成正比關係。研究中也對因層析波峰壓縮所造成板數計算誤差作探討與修正，結果顯示，在非線性層析系統中，不考慮層析波峰壓縮效應計算的理論板數值 N_1 ，仍與正確由空間定義計算所得的理論板數值 N^* 有所誤差，在連續式沖提條件下，誤差值甚至可到 20~30%。修正公式所得之 N_2 、 N_2' 能將未考慮層析波峰壓縮效應修正公式 N_1 ，作更進一步的修正，誤差值都可降低至約 10% 以下。與過去文獻所提出的修正公式相比，本研究所提出的公式條件參數簡單，不需用到龐大的數值模擬軟體，而且誤差很小。

參考文獻

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, 5th Ed, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College, Philadelphia, 1998.
- [2] 林淑慧, 以全管柱偵測法探討液相層析之分離, 應用化學研究所博士論文, 民國九十八年.
- [3] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, "A new form of chromatogram employing two liquid phases", *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.
- [4] 石宇嘉, 石宇華, 儀器分析化學, 四版, 2004 年.
- [5] 周聰瑩, 陳緯傑, 李芳錦, 免疫親和性層析的進展與應用, *Chemistry (The Chinese Chem. Soc., Taipei)* .64(2006) 387-394.
- [6] T. Katsube, Y. Tsurunaga, M. Sugiyama, T. Furuno, Y. Yamasaki, "Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves". *Food Chemistry* 113 (2009) 964–969.
- [7] J. C. Delaunay, C. Castagnino, C. Che`ze, J. Vercauteren, "Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 123–128.
- [8] J.W. Dolan, J.R. Gant, L.R. Snyder, "Gradient elution in high-performance liquid chromatography. II. Practical application to reversed-phase systems", *J. Chromatogr.* 165 (1979) 31.
- [9] A. Tamura, K. Tamura, S. Razee, T. Masujima, "Direct Imaging of the Stepwise Elution Process in High-Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 68 (1996) 4000.
- [10] A. Tamura, M. Khademizadeh, K. Ozawa, T. Masujima, "Direct observation of sample trapping process onto internal-surface reversed-phase pre-column", *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 115.
- [11] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, "Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversedphase systems", *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
- [12] L.R. Snyder, J.W. Dolan, "The linear-solvent-strength model of gradient elution", *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
- [13] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder, "Peak compression in reversed-phase gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 32.
- [14] S. Yamamoto, "Plate height determination for gradient elution chromatography of proteins", *Biotechnol. Bioeng.* 48 (1995) 444.

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

- acyclovir and its major impurity guanine using a monolithic column and a flow gradient approach", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1526.
- [25] G.F. Barbero, A. Liazid, M. Palma, C.G. Barroso, "Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column", *Food Chem.* 107 (2008) 1276.
- [26] K.L. Rowlen, K.A. Duell, J.P. Avery, J.W. Birks, "Whole column detection: application to high-performance liquid chromatography", *Anal. Chem.* 61 (1989) 2624.
- [27] K.L. Rowlen, K.A. Duell, J.P. Avery, J.W. Birks, "Measurement of column efficiency in whole column detection chromatography", *Anal. Chem.* 63 (1991) 575.
- [28] 吳印從，流動注入分析訊號空時差異之進階研究，國立交通大學，應用化學系碩士論文，民國 98 年
- [29] K. Outinen, H. Haario, P. Vuorela, M. Nyman, E. Ukkonen, H. Vuorela, "Optimization of selectivity in high-performance liquid chromatography using desirability functions and mixture designs according to PRISMA", *EUR J PHARM SCI*, 6 (1998) 197–205
- [30] Ford, John C.; Jaeju, Ko, "Comparison of methods for extracting linear solvent strength gradient parameters from gradient chromatographic data", *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 1-1.
- [31] Lin S H, Yu T, Pai S C, "Interpretation on Band-broadening in Chromatography with Spatial Peak Profiles Obtained Using Whole-column Detection", *J. Chin. Chem. Soc.* 56, 480-484