

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

以全管柱偵測法探討液相層析之波峰壓縮效應

Peak Compression Effects in Liquid Chromatography
Examined Using Whole-Column Detection

研 究 生：周宜儒

指 導 教 授：余 艇 博 士

中華民國 一百 年 六 月

以全管柱偵測法探討液相層析之波峰壓縮效應

Peak Compression Effects in Liquid Chromatography Examined Using Whole-Column Detection

研究 生：周 宜 儒
指 導 教 授：余 艇 博 士

Student : Yi-Ru Chou
Advisor : Dr. Tiing Yu



Submitted to Department of Applied Chemistry
College of Science
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master
In
Applied Chemistry
June 2011
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國 一百 年 六 月

以全管柱偵測法探討液相層析之波峰壓縮效應

學生：周宜儒

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學研究所

摘要

樣品甫注入液相層析管柱時，會產生波峰壓縮效應，另一種波峰壓縮效應則發生於梯度沖提時，於兩溶劑強度不同之移動相交界處。

本研究以全管柱偵測(whole-column detection, WCD)系統觀察以上兩種波峰壓縮效應，全管柱偵測系統可直接觀察梯度沖提過程中的以空間與以時間為座標軸之波峰變化。

在管柱入口處樣品波峰寬度和滯留因子 k 有很高的相關性，在管柱入口約一公分處，樣品波峰在空間座標之標準差和 $1/(1+k)$ 成線性關係，在填充效率較好之管柱中，使用溶劑強度較小之移動相沖提，會產生較大的 k 值，當樣品分子位移至管柱末端時，其波峰寬度比使用溶劑強度較大之移動相沖提可能會較狹窄；然而，使用填充效率較差之管柱，以較大 k 值移動相沖提，當樣品波峰位移至管柱末端時，波峰寬度則可能會較寬。以連續式沖提，其理論板數之增加會超過使用階梯式沖提之理論板數增加。在本研究中，我們以樣品移動速率為基礎來計算梯度沖提之理論板數，和傳統方式計算理論板數相比，其

結果顯示有大幅的改善，在某些實驗中有高達四倍的改進。



Peak Compression Effects in Liquid Chromatography

Examined Using Whole-Column Detection

Student : Yi-Ru Chou

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

Peak compression occurred when a sample solution was injected into a liquid chromatographic column. Another compression phenomenon took place at the interface of the two mobile phases with different solvent strengths under a gradient elution. We examined both effects using a whole-column detection (WCD) system which enabled direct observations of both the spatial and temporal peak profiles during the elution.

The sample peak width at the column inlet was highly related to the retention factor k . The peak standard deviation on the spatial coordinate was linearly proportional to $1/(1+k)$ at the column position ~ 1 cm. The peak width might stay narrower at the column outlet for a chromatographic run of a large k compared with a run of a small k with the use of a column with good efficiency. However, the peak width of a large k might become wider at the column outlet with the use of a low-efficiency column. The plate number increase of the continuous gradient prevailed over that of the stage-wise gradient. Plate numbers for gradient elutions were calculated in this study based on analyte moving

rates. The results gave significant improvements, up to four folds in some experiments, compared with the use of conventional equations.



誌謝

二年的研究所生涯以及新竹生活將在此告一段落，回想起這期間的點滴，開心與難過時光，都將成為人生中美好的回憶。

首先感謝恩師余艇教授，在實驗與研究上的指導，使我可以順利完成碩士學位，接著感謝口試委員白書禎教授與謝有容教授，能抽空來參加我的口試，並對於我的研究與論文內容提出糾正和指點，使我的論文內容及研究成果更臻完美。

超級感謝淑慧學姊，總是不厭其煩的教導我，總能在我迷惘時為我解惑。也感謝育國學長、典祐學長以及伶宜學姊在實驗上的熱心幫助，也謝謝實驗室夥伴詩軒與士峯，平日的幫忙與協助，還有感謝沛穎、俐揚、泓哲以及柏森替我張羅口試相關的東西，也為實驗室增添歡樂的氣氛，祝你們明年都順利畢業。感謝鈴宛、佑勳、芝綺與姝怡在新竹的陪伴，有你們真好！再來感謝台中的知己們，家琪、涵菁、文慈、家慧、有炆、韻茜以及孟臻，總是讓我回到台中好快樂，也感謝大學的麻吉們琬祺、鈺堯、舒涵、漪彤、哲宇、佩琪與鼎瑋平日的支持與打氣，最後感謝我的同鄉們千惠、小凡、品卉以及宥儒在家鄉給我的溫暖。

當然最最重要的是感謝我的家人，因為有你們的支持與關心，我才能無後顧之憂的專心完成碩士學位。

宜儒畢業了！即將告別學生身分，返回台中，進入人生下一個階段。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	x
表目錄.....	xiii
第一章 緒論.....	1
1.1 前言	1
1.2 研究動機.....	2
第二章 研究背景與文獻回顧.....	4
2.1 層析法發展簡介.....	4
2.2 平板理論	7
2.3 全管柱偵測系統發展簡介	16
2.4 波峰壓縮效應.....	20
2.4.1 樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應	20
2.4.2 非線性層析之波峰壓縮效應	22
第三章 實驗.....	24
3.1 實驗藥品.....	24

3.2 儀器裝置.....	24
3.3 儀器組裝及各裝置介紹	25
3.3.1 管柱.....	25
3.3.1.1 自製 HPLC 管柱—管柱 1、2.....	25
3.3.1.2 玻璃管柱—管柱 3	30
3.3.2 WCD 系統	30
3.3.3 WCD 系統操作界面設定	34
3.4 數據類型定義.....	36
3.5 實驗流程.....	40
3.6 實驗步驟.....	41
3.6.1 等位沖提.....	41
3.6.2 梯度沖提.....	41
3.6.2.1 階梯式沖提.....	43
3.6.2.2 連續式沖提.....	44
第四章 結果與討論（一）一樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應	45
4.1 數據處理.....	45
4.2 波形參數指標.....	45
4.3 數據結果討論.....	47
4.3.1 管柱外 UV/Vis 偵測器數據討論	47

4.3.2 管內空時圖數據討論.....	47
4.3.2.1 空時差異.....	52
4.3.2.2 樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應	61
4.3.2.3 波峰寬度對應管柱位置.....	64
第五章 結果與討論（二）－非線性層析之波峰壓縮效應	73
5.1 梯度沖提結果.....	73
5.1.1 階梯式沖提.....	74
5.1.2 連續式沖提.....	77
5.2 理論板數討論.....	81
5.3 樣品移速計算.....	84
5.3.1 階梯式沖提樣品移速計算.....	85
5.3.2 連續式沖提樣品移速計算.....	86
5.4 理論板數計算.....	90
5.4.1 階梯式沖提理論板數計算.....	94
5.4.2 連續式沖提理論板數計算.....	94
5.5 理論板數比較.....	98
5.5.1 梯度沖提與等位沖提實驗，空間單位理論 板數 N 值比較.....	98
5.5.2 梯度沖提與等位沖提實驗，時間單位理論	

板數 N_t 值比較	104
5.5.3 梯度沖提實驗，空間單位理論板數 N 值比較.....	104
5.5.4 梯度沖提實驗，時間單位理論板數 N_t 值比較	108
5.5.5 梯度沖提實驗，管外時圖之時間單位理論 板數 N_t 與 N_t^* 值比較	110
第六章 結論.....	112
參考文獻.....	114
附錄.....	123

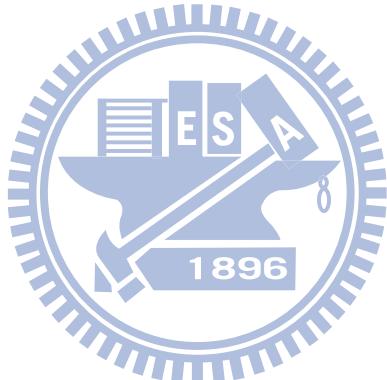


圖 目 錄

圖 2-1 (a)理論板高之定義 (b)以時間為橫軸之典型層析圖譜.....	8
圖 2-2 (a)階梯式沖提示意圖 (b)連續式沖提示意圖	14
圖 3-1 實驗裝置圖.....	26
圖 3-2 管柱 1、2 結構圖	29
圖 3-3 管柱 3 結構圖	31
圖 3-4 詳細實驗裝置圖	33
圖 3-5 電腦操作界面圖	35
圖 3-6 管外時圖和管內空圖的定義	37
圖 3-7 遷移路徑圖與遷移曲線之定義	39
圖 3-8 梯度沖提所設計之兩種實驗模式	44
圖 4-1 三管柱於等位沖提實驗中，管外時圖結果	48
圖 4-2 三管柱於等位沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖	50
圖 4-3 管柱 1 於等位沖提實驗中，管內空圖結果	53
圖 4-4 管柱 2 於等位沖提實驗中，管內空圖結果	54
圖 4-5 管柱 3 於等位沖提實驗中，管內空圖結果	55
圖 4-6 管柱 1 於等位沖提實驗中，管內時圖結果	56
圖 4-7 管柱 2 於等位沖提實驗中，管內時圖結果	57
圖 4-8 管柱 3 於等位沖提實驗中，管內時圖結果	58

圖 4-9 三管柱等位沖提實驗中，管外時圖與管柱內 17 公分處 管內空時圖波寬比例關係圖	59
圖 4-10 三管柱在等位沖提實驗中，不同 k 值的條件以 $1/(1+k)$ 對空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 作圖	63
圖 4-11 三管柱在等位沖提實驗中，以空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}^2$ ， 對於管柱位置作圖	65
圖 4-12 三管柱在等位沖提實驗中，以時間波峰寬度 $\sigma_{(t)}^2$ ， 對於管柱位置作圖	67
圖 4-13 樣品在填充效率較差之管柱流動情形示意圖	71
圖 4-14 樣品在填充效率較佳之管柱流動情形示意圖	72
圖 5-1 階梯式沖提實驗中，管內空圖結果	75
圖 5-2 階梯式沖提實驗中，管內時圖結果	76
圖 5-3 階梯式沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖	78
圖 5-4 連續式沖提實驗中，管內空圖結果	79
圖 5-5 連續式沖提實驗中，管內時圖結果	80
圖 5-6 連續式沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖	82
圖 5-7 等位沖提實驗中，所計算出之三種理論板數	91
圖 5-8 階梯式沖提 4 組實驗中，所計算出之理論板數	95
圖 5-9 連續式沖提 4 組實驗中，所計算出之理論板數	99

圖 5-10 階梯式與連續式沖提理論板數增加幅度解釋圖109



表目錄

表 3-1 本實驗所使用三種管柱之詳細規格	27
表 3-2 等位沖提實驗中，移動相組成比例與數據取點間距時間	42
表 3-3 兩種梯度沖提實驗中，數據取點間距時間	43
表 4-1 等位沖提實驗中，樣品於三管柱之管外時圖波形指標	49
表 4-2 等位沖提實驗中，三管柱遷移曲線斜率與管外時圖 所計算而得的樣品移速之數據比較	51
表 4-3 等位沖提實驗中，三管柱之樣品在不同 k 值條件下， 管外時圖與管柱內 17 公分處管內空時圖波比例數據	60
表 4-4 等位沖提實驗中，三管柱之空間波峰寬度	66
表 4-5 等位沖提實驗中，三管柱之時間波峰寬度	68
表 5-1 等位沖提實驗中，在不同移動相下的樣品移速	85
表 5-2 階梯式沖提實驗中，樣品在管柱不同位置之移動速度 與樣品在管柱中之平均移動速度，以及差異值計算	87
表 5-3 連續式沖提實驗中，樣品在管柱不同位置之移動速度 與樣品在管柱中之平均移動速度，以及差異值計算	89
表 5-4 等位沖提實驗 1 至 4 所算出之理論板數與差異值	92
表 5-5 等位沖提實驗 5 至 7 所算出之理論板數與差異值	93
表 5-6 階梯式沖提實驗 1 及 2 所計算出之理論板數與差異值	96

表 5-7 階梯式沖提實驗 3 及 4 所計算出之理論板數與差異值.....	97
表 5-8 連續式沖提實驗 1 及 2 所計算出之理論板數與差異值.....	100
表 5-9 連續式沖提實驗 3 及 4 所計算出之理論板數與差異值.....	101
表 5-10 階梯式沖提與等位沖提實驗，空圖理論板數 N 值比較	102
表 5-11 階梯式沖提與等位沖提實驗，時圖理論板數 N_t 值比較.....	103
表 5-12 連續式沖提與等位沖提實驗，空圖理論板數 N 值比較	105
表 5-13 連續式沖提與等位沖提實驗，時圖理論板數 N_t 值比較.....	106
表 5-14 梯度沖提實驗，管外時圖理論板數 N_t 與 N_t^* 值比較	111
附錄 A-1 等位沖提實驗，管內空圖之波峰位置所對應取點時間 ...	123
附錄 A-2 梯度沖提實驗，管內空圖之波峰位置所對應取點時間 ...	124
附錄 A-3 三管柱在等位沖提實驗中，以空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}^2$ ，對於管柱 位置作圖所得線性斜率與 R^2 值.....	125
附錄 A-4 三管柱在等位沖提實驗中，以時間波峰寬度 $\sigma_{(t)}^2$ ，對於管柱 位置作圖所得線性斜率與 R^2 值.....	126

第一章 緒論

1.1 前言

層析法(chromatography)是一種可應用到各科學部門的分離方法，由於有許多新型層析技術的發展，使得其應用在過去五十年間有巨幅成長。這些方法對科學界的巨大衝擊，可由1952年諾貝爾獎頒發給Martin和Synge以獎勵他們在此領域的貢獻而得到佐證，更令人印象深刻的是，在1937年到1972年間可列出12個諾貝爾獎，在他們的研究工作中層析法扮演重要的角色[1]，可以見得層析法對科學界的重要性。



在液相層析法(liquid chromatography, LC)中，為利用樣品在固定相(stationary phase)以及移動相(mobile phase)間作用力不同，而在移動相與固定相間分佈之差異，造成各成分物被沖提的速率不同，而達到區帶分離的目的。

液相層析法一般所用的偵測器，屬於單通道偵測器(single-channel detector)類型，即為一種將管柱流出物中之樣品成分含量與含量變化轉換成訊號輸出的裝置。根據Pai所發表之文獻[2-3]指出：「由一般單通道偵測器所獲得以時間單位為橫軸的圖譜，並非樣品在層析管柱中的真實空間分佈，進而使得測量結果與樣品在管柱內瞬間空間分佈有

一定差異。」此差異稱為「空時差異」，即在忽略時間效應(temporal effect)的情況下，會對一般偵測器所收集到的訊號產生錯誤的解釋，且Pai認為，此種空時差異的現象普遍地存在於採用一般單通道偵測器流動形系統內，不僅在流動注入分析系統(flow injection analysis, FIA)[4-7]，亦會發生於被廣泛使用的層析系統裡[8]。在Pai所發表之文獻中，亦暗示傳統層析理論需要做修正，並且陸續發展出一系列模擬層析行為之理論公式，要證實其公式之正確性，除了必須得到一般樣品流經管柱後之層析圖譜訊號，亦必須獲得在沖提過程中，於管柱內的樣品空間分佈訊號，故本研究室設計出一套全管柱型偵測(whole-column detection, WCD)系統，具大範圍觀測視窗(長達21公分)，可完整記錄層析管柱內樣品波形分佈，結合單通道偵測器，組成一套完整的多功能偵測系統，能同步觀察管柱內、外之樣品流析訊號，獲得管柱內空間及時間之實驗數據，並透過全管柱偵測系統，研究層析波峰壓縮效應(peak compression effect)之現象，對部分有疏失之層析理論進行修正[3,9-10]。

1.2 研究動機

在文獻中提及[11-13]，樣品在注入管柱入口端時，會產生波峰壓縮效應(peak compression effect)之現象，並指出樣品在管柱入口端之

空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 會與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比之關係，即在 k 值較大之條件下，其管柱入口端之空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 會呈現較窄之情況，然而文獻中則缺乏詳細實驗數據可佐證此一關係式，故啟發了本研究之實驗動機；我們以自行填充之玻璃管柱，搭配本實驗室所開發出之全管柱偵測系統，來觀察樣品在玻璃管柱中之完整流動訊號，並觀察樣品在管柱入口端之波峰壓縮效應。文獻指出[14-16]，在進行非線性層析系統下，當變換移動相組成使其溶劑強度改變時，亦會產生波峰壓縮效應之現象，在文獻[17-19]中提出非線性層析系統下之理論板數計算，但所提出之計算公式，需要考量許多參數，公式相當複雜且艱澀難懂，因此在本研究中利用全管柱偵測系統，觀察在非線性層析系統中波峰壓縮效應之現象，並提出較正確與簡單的方式，計算出非線性層析系統下之理論板數。

第二章 研究背景與文獻回顧

2.1 層析法發展簡介

層析法為從複雜之混合物中，利用其在移動相與固定相中分佈程度不同，進而將各別化合物予以分離、辨識之分析技術，一般移動相可為氣體、液體或是超臨界流體，固定相則可為液體或固體。層析法為在 1903 年[20]，由俄羅斯植物學家 Mikhail Tswett，首次發表了有關層析的演說，當時他利用一支填充有細顆粒的碳酸鈣管柱，分離出綠色葉子中的葉綠素與葉黃素等各種植物色素，其實驗操作方法，為將不同植物色素化合物之混合溶液通過細顆粒之碳酸鈣管柱，而被分離的物種在管柱中顯現出有顏色的層帶，這也是它命名此法為「層析法」的由來，由於在當時，尚未發展出線上偵測(on-line detection)技術，故當時的科學家僅能倚靠肉眼來觀察樣品在管柱中分離的情形。

若使用之移動相為液體，固定相為固體支持物，則稱為液相層析法(liquid chromatography, LC)，於早期的液相層析法，為以直徑 1 到 5 公分，填充固定相長度約 50 至 500 公分之玻璃管柱進行分析操作，而其固定相為塗佈有吸附性液體之固態顆粒，而使用此種固定相，為獲得合理之流速，固定相之粒徑則需採用 150 到 200 μm 之粒徑較大顆粒；而在層析法發展初期，科學家們早已了解減小固定相粒子的尺寸可以增加管柱效率，於 1960 年中，發展出利用粒徑 50 μm 固定相

材料所填充而成之管柱，在 1960 年末，製造及應用直徑小至 $3\text{-}10 \mu\text{m}$ 固定相的技術才被發展出來[21-23]。在過去 40 年裡，液相層析法所用之固定相材料已發展出許多改進方式使達更加之分離效果，例如從固定相合成與化學修飾法改進[24]、改變固定相間不同化學鍵結方式以增加選擇性[25]、增加固定相之化學穩定性[26]、使用直徑小於 $2 \mu\text{m}$ 之固定相材料[27-30]以及將所用固定相形狀改為規則球狀等方式[31-33]，利用以上所發展出之固定相，可大幅減短分析所需時間，並可提供更佳之分離效率。然而欲使用以上固定相製作出分離效率較佳之管柱，則需要可耐高壓條件下操作的儀器設備，因而，古典液相層析法所使用的簡單玻璃管柱便以不鏽鋼管等耐高壓管柱取代[34-36]，同時，線上偵測樣品流動訊號的偵測系統便也開始發展起來[37]。除改良固定相材料外，近年來有許多研究使用管柱內徑較小之管柱，目前常用的管柱內徑為 4.6 毫米，而為了減少沖提溶劑以及固定相材料之使用，增加質量靈敏度，以及與質譜儀相容性更高，則發展出使用窄內徑(narrow-bore)2.1 毫米或 1.0 毫米之之管柱[38-42]，雖然使用窄內徑管柱具上述之優點，然而有文獻指出[43]，在使用窄內徑時，其效率卻不如使用內徑 4.6 毫米管柱，因此目前分離常用管柱內徑仍以 4.6 毫米為主。然而在使用上述所提到使用直徑小於 $2 \mu\text{m}$ 之固定相材料，雖可使分離效率提高，以及可提供較快之分離速度，使得分離所

需時間大幅減短，但此種粒徑小之固定相，卻會造成分離時背壓(back pressure)增大之缺點，根據文獻[44-45]，當粒徑尺寸降低 2 倍時，其增加之背壓會上升至 4 倍，甚至在填充效率極佳之管柱，當粒徑尺寸降低 2 倍時，其增加之背壓則會高達 8 倍[46]；傳統之液相層析儀器設備可提供在約 414 bar(6000 psi)壓力條件下操作，在使用固定相直徑小於 2 μm 時，則須搭配可提供更高壓 1000 bar(14500 psi)條件下操作之儀器設備[47-50]。除背壓問題外，使用粒徑尺寸小之固定相，其高流速之優點卻伴隨著溫度升高之問題[29,51-52]，以及由儀器與管路等原因產生之管柱外效應(extra-column effect)[53-56]所造成之波峰變寬，因此，目前液相層析法發展之重點，除致力於提升管柱分離效率，並提供較短之分析時間外，解決管柱外效應問題，實驗條件之溫度與壓力控制，以及儀器設備之改良，皆為重要考量因素。

液相層析法一般所用的偵測器，屬於單通道偵測器，通常銜接於管柱出口，流經偵測器的樣品訊號通常以「時間對訊號強度值」的方式記錄。在以上所述的耐高壓之不鏽鋼管柱開始使用後，液相層析管柱就如同個黑盒子似的，將樣品、移動相以及固定相包覆於其內，分離的結果仰賴樣品流出管柱抵達管柱外偵測器時所接收到的訊號，然後再對所得訊號進行研究與探討，故樣品在管內的真實流動情形便無法直接觀察到了。在操作者無法直接觀察到液相層析管柱中的分離情

形之下，爾後所發展出來解釋樣品分離現象的說法，可能因此而產生錯誤。

2.2 平板理論(plate theory)

在層析的發展史中，有許多解釋區帶擴張的理論被提出來，其中最廣泛被應用的理論為在 1941 年由諾貝爾獎得主 Martin 和 Synge 所提出的平板理論(plate theory)[57]，他們將層析管柱視為類似蒸餾塔，由無數個獨立但呈現連續的薄層所組成，並將此薄層命名為理論平板 (theoretical plates)。在每一個平板中，假設分析物會在分佈在移動相與固定相之間且可達成平衡狀態，而分析物在管柱中往下移動，可視為分析物由一個已達成平衡之移動相，經由一個平板以階梯式轉移至下一個平板，並不斷地形成新的平衡。此平板之高度即為理論板高 (plate height, H or height equivalent to one theoretical plate, HEPT)，此參數與另一相關參數理論板數(theoretical plate, N)之關係式如下：

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

L ：管柱固定相之長度

理論板數 N 與理論板高 H ，兩數值常用於評估管柱效率之參數，而 N 與 H 值其原始定義如下式2-2與式2-3(見圖2-1)：

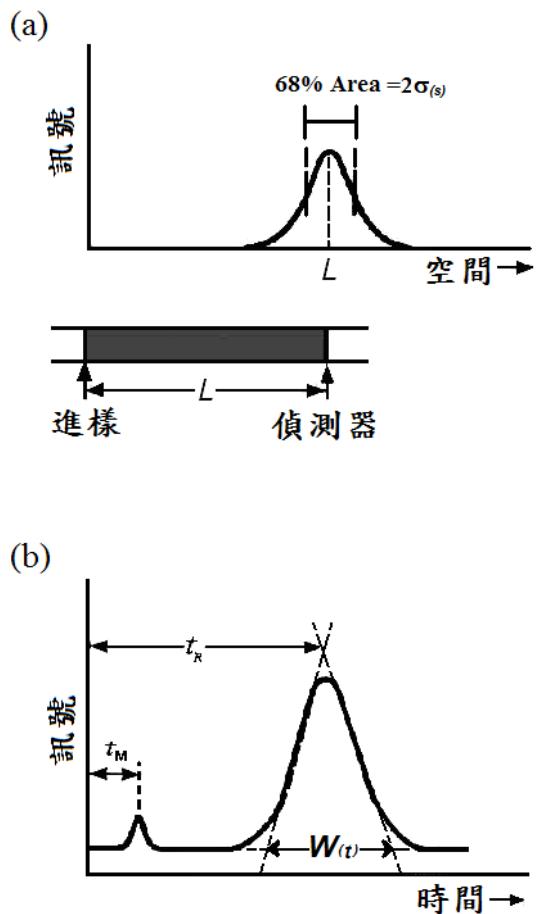


圖 2-1 (a)理論板高之定義 (b)以時間為橫軸之典型層析圖譜

圖(a)中， L 為管柱固定相之長度， $\sigma_{(s)}$ 為空圖波峰之標準偏差值。理論板高原始定義為： $H = \frac{\sigma_{(s)}^2}{L}$

圖(b)中， t_R ：分析物滯留時間，分析物從注入管柱後至抵達管柱外偵測器所需時間， t_M ：移動相或無滯留之物種抵達管柱外偵測器所需時間，在層析峰的兩側轉折點做切線延長，其與層析峰之基線交會長度即為 $W_{(t)}$ ，且 $W_{(t)}=4\sigma_{(t)}$ ， $\sigma_{(t)}$ 為時圖波峰標準偏差值。

一分析物A之 k 值計算方式為： $k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

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

$$H = \frac{\sigma_{(s)}^2}{L} \quad (2-3)$$

N ：理論板數

H ：理論板高

L ：管柱固定相之長度

$\sigma_{(s)}$ ：空間波峰標準偏差

層析管柱之分離效率隨著理論板數的增加以及理論板高的減小而增加，然而通常管柱效率有明顯的差異之原因為管柱形式、移動相與固定相選擇不同所導致[58]，然而一般常用之偵測器，所得之訊號是以時間為橫軸之典型層析圖譜，據文獻指出[58]，樣品在抵達層析管柱末端之空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與所層析圖譜獲得之時間波峰標準偏差 $\sigma_{(t)}$ 之關係如式2-4所示：

$$\sigma_{(t)} = \frac{\sigma_{(s)}}{L / t_R} \quad (2-4)$$

L/t_R ：分析物在管柱中之移動速度， $L/t_R = u_m$

然而在高斯波形下，時間波峰標準偏差 $\sigma_{(t)}$ 與波峰寬度 $W_{(t)}$ 有如式2-5之關係

$$W_{(t)} = 4\sigma_{(t)} \quad (2-5)$$

可將式2-5代入式2-4，可得式2-6

$$\sigma_{(s)} = \frac{LW_{(t)}}{4t_R} \quad (2-6)$$

將式2-6代入式2-2與式2-3即得到式2-7與式2-8

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_{(t)}} \right)^2 \quad (2-7)$$

$$H = \frac{LW_{(t)}^2}{16t_R^2} \quad (2-8)$$

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(見圖2-1)

t_R ：分析物滯留時間(retention time)，分析物從注入管柱後抵達管柱外

偵測器所需時間

藉由上述速度的轉換，可將空間計算理論板數方式轉換為時間計

算理論板數，即可透過式2-7及式2-8計算出理論板數以及理論板高。

另一種求得理論板數與理論板高的方法為使用 $W_{1/2(t)}$ 這個參數，此為

波峰最大高度之一半位置處的兩側波峰寬度總和。故理論板數與理論

板高可以式2-9及式2-10求得：

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2(t)}} \right)^2 \quad (2-9)$$

$$H = \frac{L}{5.54} \left(\frac{W_{1/2(t)}}{t_R^2} \right)^2 \quad (2-10)$$

$W_{1/2(t)}$ ：層析時圖上波峰最大高度之一半位置處的兩側波峰寬度總和

提升層析分離效能的方法除了改善管柱填充條件外，可對分析物之滯留因子(retention factor, k)做最佳化調整。

對於一分析物A，其 k 值之可定義如式2-11所示：

$$k = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (2-11)$$

V_S ：管柱中固定相之體積

V_M ：管柱中移動相之體積

K_A ：分析物A在移動相與固定相之分佈常數(distribution constant)， K_A

之定義如式2-12所示：



(2-12)

C_S ：分析物A在固定相的莫耳分析濃度值

C_M ：分析物A在移動相的莫耳分析濃度值

另外可利用將分析物在管柱中之移動速率表示成移動相速率之分率

形式[52]，如式2-13所示：

$$u_m = u_0 \times \frac{1}{1+k} = \frac{L}{t_0} \times \frac{1}{1+k} \quad (2-13)$$

u_m ：分析物在管柱中之移動速率

u_0 ：移動相在管柱中之移動速率, $u_0=L/t_0$

L ：管柱固定相之長度

t_R ：分析物滯留時間(retention time)，分析物從注入管柱後至抵達管柱

外偵測器所需時間

t_0 ：移動相或無滯留之物種抵達管柱外偵測器所需時間

可透過式2-13轉換，獲得另一 k 之計算方式，如式2-14所示：

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2-14)$$

t_R 與 t_0 值都可透過由管柱外偵測器所獲得之層析圖譜中觀測到，因此

可藉由層析圖譜中來計算一分析物之 k 值(見圖2-1)。

在液相層析中，要調整 k 值之大小，最簡單的方法為透過改變移動相之溶劑組成，不同的移動相具有不同的溶劑強度(solvent strength)，所謂的溶劑強度是指溶劑與溶質間的作用力程度，與溶質具強烈作用力之溶劑，通常稱為「強」溶劑，當移動相的溶劑強度大時，表示在沖提過程中，樣品受到移動相的作用力大，因此樣品較不容易受固定相滯留，因此可透過改變移動相組成使其溶劑強度改變，使分析物之滯留時間產生變化，藉此調控 k 值大小。在逆相層析法(reversed-phase chromatography)中，採用非極性之固定相，為矽氧烷類之官能基所組成，其中所用烷類取代基常為 C_{18} 鏈，此類型固定相名為Octadecylsilane(ODS)；分析物與固定相之作用力主要為非極性之分散

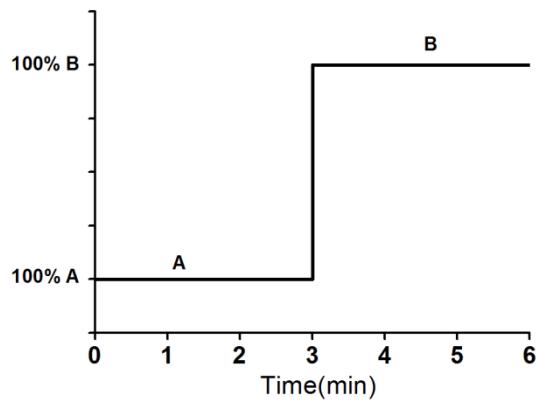
力，故所選用之移動相會隨著其極性增加而使得其溶劑強度降低。水為極性較強之溶劑，然而在逆相層析中則屬於溶劑強度較弱的；在逆相層析分離操作中，常使用水與其他極性有機溶劑混合，以得到不同溶劑強度的移動相，常用的有機溶劑有甲醇、乙腈(acetonitrile)以及四氫夫喃(tetrahydrofuran, THF)，其中水在移動相中組成比例越低，移動相之沖提能力則越強，可減少分析物之滯留時間。

在液相層析中，可搭配等位沖提(isocratic elution)或梯度沖提(gradient elution)，亦可達到提升分離效率的目標。在沖提過程中，採用固定移動相組成的沖提過程稱為等位沖提，而在沖提過程中，改變移動相之組成則為梯度沖提；文獻指出[59-61]，利用梯度沖提可大幅提高分離效率，常見之梯度沖提有階梯式沖提(stepwise elution)與連續式沖提(continuous elution)兩種模式，以下將簡單介紹兩梯度沖提模式。

1. 階梯式沖提(stepwise elution)

此種沖提方式為先使用溶劑強度較弱的移動相沖提，而在某一瞬間，轉變為溶劑強度較強之移動相，如圖2-2(a)所示，於1974年由Jandera與Churacek等人提出一系列研究[60,62-66]，將階梯式沖提應用在液相層析法上，然而此方法發展至今未被廣泛應用之原因為，由於

(a)



(b)

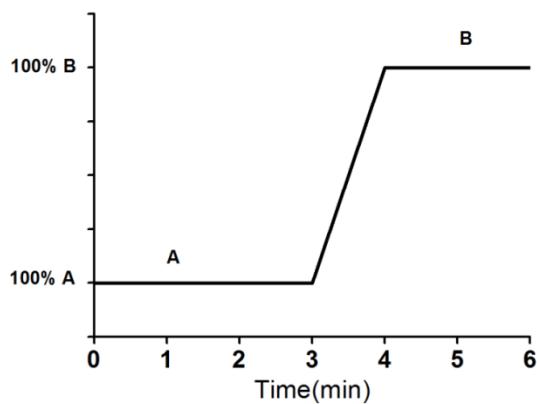


圖 2-2 (a)階梯式沖提示意圖 (b)連續式沖提示意圖

圖(a)階梯式沖提模式中，先以溶劑能力較弱之移動相A進行沖提，在沖提至3分鐘時，瞬間變化為溶劑能力較強之移動相B

圖(b)連續式沖提模式中，先以溶劑能力較弱之移動相A進行沖提，在沖提至3分鐘時，以線性方式將移動相成分隨時間變化，並在變化時間1分鐘後，變換為溶劑能力較強之移動相B

其無法提供較令人滿意之分離情況，故此方法常須與連續式沖提模式相結合應用[67-70]，此種沖提模式曾用於分離蛋白質之親和性層析應用上[71]，首先利用溶劑強度較弱的移動相將樣品帶入親和性管柱中，故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。

2. 連續式沖提(continuous elution)

此種沖提方式為先使用溶劑強度較弱的移動相沖提，而在某一時間，將移動相成分以線性或非線性隨時間變換成溶劑強度較強的之移動相，如圖2-2(b)所示，此種模式為梯度沖提較常使用之模式，可成功用於複雜之混合物分離，例如分離天然物之分離[59,72-74]。

根據上述文獻可總結使用梯度沖提之優點：

- (1) 可增強混合物的全面分離能力，提升解析度。
- (2) 透過縮短分析物之滯留時間，可大幅減少分析所需時間。
- (3) 改善層析圖譜上的波形。
- (4) 增加偵測之靈敏度。

2.3 全管柱偵測(whole-column detection, WCD)系統發展簡介

在進行各類的流體實驗如流動注入分析法，液相層析、氣相層析(gas chromatography, GC)和毛細管電泳(capillary electrophoresis, CE)時，一般使用銜接於管柱出口之單通道偵測器來對通過之樣品進行偵測。流經偵測器的樣品訊號通常以「時間對訊號強度值」的方式記錄，然後再對所得訊號進行研究與探討。然而，有些科學家認為以上所述的單通道偵測器並非唯一觀察流體行為之偵測系統，因此開始發展出多通道偵測(multi-channel detection, MCD)系統，亦即全管柱偵測系統，這種系統可以瞬間同時的偵測大範圍的樣品訊號，若要完整的研究層析分離行為的話，全管柱型的偵測器比單通道偵測器更為恰當。



於1988年由Evans和McGuffin，發表第一篇有關多通道偵測系統之研究[75]，其利用雙通道偵測器來觀察螢光樣品在毛細管中的流動行為，藉著觀察分析物在2偵測點間的趨勢，可排除分析管柱中所謂的管柱外效應對樣品產生的影響。之後，Rowlen等人設計了一組解析度更高的多通道偵測系統[11,76]，將14組紫外光感二極體(UV-sensitive photodiode)架設在玻璃材質的層析管柱外，用來即時觀察樣品在層析管柱中進行沖提時的遷移分佈情形，對這種偵測系統，作者命名其為全管柱偵測(whole-column detection, WCD)系統，但在這套偵測系統開發出來前，作者在1986年便以電腦模擬的方法來表現全管柱偵測器

觀察流體行為的結果[77]，並且提出使用全管柱偵測系統的優點及其潛力等論述；延續電腦模擬的研究之後，作者著手開發WCD系統，並且以實驗數據來證實使用WCD的確對高效能液相層析(high-performance liquid chromatography, HPLC)有相當地優勢與價值，其列舉出來可能的優勢如下：

- (1) WCD 系統可以真實的記錄樣品於管柱前端、尾端等不同位置的分佈與流析時間。
- (2) 藉由 WCD 系統所獲得的數據，可在尚未進行樣品沖提前幫助準確預測實驗結果。
- (3) 更精確的得到滯留因子。
- (4) 可測量移動相與固定相間平衡的速度。
- (5) 可透過實驗證明滯留因子在線性層析(linear chromatography)或非線性層析(non-linear chromatography)過程中的改變狀況。



當WCD系統的用法及優勢被提出後，相當多的分離科學者開始改良這套偵測系統，捨棄先前所使用的分離式光能轉換器(discrete photon transducer)，改以電荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)為訊號接受器，CCD為一種陣列式的光電耦合檢像器，上有許多排列整齊的電容能感應光線，並將影像轉變成數位訊號，在擷取影像時，有類似傳統底片的感光作用，常被應用於數位相機、光學掃描器與攝影

機等感光元件。CCD的使用大幅增進了WCD系統的效能，其陣列式的電路排列除了大幅提升偵測器空間解析度外，影像擷取的效果還可以讓使用者觀察到更生動真實的樣品流動過程，但是由於市售CCD尺寸上的限制，所以在這套技術發展初期，是用於觀察小範圍毛細管內的樣品流動情形，其中又以觀察毛細管導電聚焦(capillary isoelectric focusing, CIEF)實驗中樣品流體行為之研究最為常見。第一次以WCD系統來觀察毛細管等電聚焦系統的科學家是Wu等人[78]，作者以雷射光源激發管內樣品使其放光，然後以全管柱影像偵測(whole-column imaging-detection, WCID)技術獲得樣品在毛細管內的分佈影像，其觀察視窗為15 mm；隨後，作者以不同的偵測機制來觀察CIEF的實驗結果，以提升WCID的應用性，例如螢光偵測法及吸收光偵測法[79-84]。在WCD系統的發展史中，CCD的裝置與使用方法多有不同，有些學者是以CCD直接收集光訊號然後轉換成電訊號來進行研究分析，有些則是將CCD搭配光學設計的零件來獲得更寬廣之觀察範圍的訊號，例如使用數位攝影鏡頭來收集樣品移動影像，Nilsson等人就是以CCD攝影機來記錄毛細管電泳實驗中的DNA片段的螢光影像[85-86]。甚至有科學家使用WCD系統來獲得部分實驗參數後，透過5 cm之觀察視窗，便可預測在CIEF實驗中，分離150種樣品之混合物的分析結果[87]。

在液相層析的發展初期，為以具透光性之玻璃材質的層析管柱來進行分離實驗，因此在WCD技術開始發展後，便有科學家使用錄影影像(video-imaging)擷取的偵測方法來觀察填充固定相後的玻璃管柱內樣品位移的情形，Tamura等人以CCD攝影鏡頭來直接記錄發螢光樣品在逆相高效能層析(reversed-phase high performance liquid chromatography)玻璃管柱中的分離過程影像[88-89]。Guiochon等人也設計了一套WCD系統，用來收集層析系統中樣品沖提過程中的影像訊號[90-92]，並且指出一般HPLC管柱中常用來防止固定相流失的擋板(frit)也會對樣品在空間上的波形產生影響。以上所介紹的這些WCD系統，都是以影像收集的方法獲得在玻璃管柱內樣品位移過程中的空間濃度分佈，然後再進一步地將影像結果透過軟體轉換成數位訊號來進行分析處理，這樣的技術較先前所提的以光能轉換器為訊號收集器的偵測方法，大幅提升了其空間解析度，並且可以獲得物質遷移過程中的三維資訊：樣品遷移時間、樣品濃度強度(peak height)、樣品分佈範圍(peak width)，藉由獲得更多樣品在層析過程中的動態層析資訊(dynamic chromatography information)，將有助於分析管柱內所發生的層析流體行為，進而改善實驗條件來達到分離效率提升的目標。

本實驗室組裝設計了一套可同時整合「直接獲取分析訊號」、「高

解析度」、「大範圍觀測視窗」等裝置優勢之WCD系統，並設計一耐高壓玻璃管柱，可大範圍(21 cm)的觀察分析物在一般常用的HPLC實驗條件下之分離過程，藉由同時獲得管柱內、外之實驗數據，並可獲得管柱內空間及時間之實驗數據，對部分有疏失之層析理論進行修正[8,9]，並透過WCD系統，觀測於非線性層析實驗條件下，層析波峰壓縮效應(peak compression effect)之現象[10]。

2.4 波峰壓縮效應

液相層析法發展至今，目前普遍以耐高壓之不鏽鋼管柱作為層析分離管柱，且僅能由管柱外偵測器所接收之訊號來衡量管柱效能，在無法直接觀測到分析物在層析管柱中的流動情形下，因此一些隱藏在管柱中之層析現象常被忽視，在層析管柱中所發生的波峰壓縮效應(peak compression effect)現象即為其中之一，然而波峰壓縮效應又可以分為兩種：一為，樣品在初注入管柱時，由於樣品同時受移動相與固定相之作用因而產生波峰壓縮效應之現象，二為，使用梯度沖提之非線性層析系統中，由於移動相組成之變化而造成之波峰壓縮效應。以下將介紹兩種波峰壓縮效應現象。

2.4.1 樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應

文獻[93-95]指出，當一樣品注入至分離管柱入口端時，樣品受到

溶劑強度較小(為與溶解樣品之溶劑相比)之移動相沖提時，會發生濃縮(concentrated)或聚集(focused)之情形，稱此現象為「On-column focusing」，並指出此原因為樣品在初注入至管柱入口端時，受固定相之吸附因而產生較窄之波峰。文獻指出[96]，在液相層析法發展出窄內徑之管柱，未能普遍被使用，其中因素為，相對於一般內徑4.6毫米而言，其僅能注入少量樣品分析，若樣品量太多則為由於進樣體積過量(overloaded)而使分析效能變差，然而利用On-column focusing之壓縮現象，則可改善進樣體積過量之情況。於1991年Rowlen等人提出[11]，當樣品注入管柱時，會受到滯留能力不同而使得聚集(focusing)程度不同，並稱此現象為「Effect of solvent on focusing」，在其研究中為利用其設計之WCD系統獲得樣品在管柱內的波峰寬度，根據其研究指出，樣品在管柱入口端之空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 會與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比之關係，即在 k 值較大之條件下，其管柱入口端之空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 會呈現較窄之情況。在近年研究中，根據文獻[12]指出，樣品在層析管柱內位移過程中，其空間波峰寬度之變化至少受三種力量所影響：第一，樣品在注入管柱的起始狀態；第二，樣品受擴張效應之影響，第三樣品受滯留效應所影響，並指出樣品在注入管柱後的空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ ，其應與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比關係。於2010年，由Gritti等人提出[13]可

分別計算空間與時間為單位之波峰寬度公式，並指出樣品初注入管柱之空間波峰變異係數(peak variance) $\sigma_{(s)}^2$ 會與 $(\frac{1}{1+k})^2$ 成正比之關係，亦指出在 k 值較大之條件下，其樣品注入管柱會受到固定相強烈之濃縮作用，使得樣品在管柱入口端之波峰較窄，即以溶劑能力較弱(水含量較高)之移動相沖提樣品，其產生之波峰壓縮效應會較明顯，並說明此種波峰壓縮效應現象，類似於在使用梯度沖提時變換移動相組成所產生之壓縮現象。

2.4.2 非線性層析之波峰壓縮效應

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[14-17]，在其研究中提到當在進行非線性層析系統時，移動相的組成變化，會使空間中的波峰發生變化，當後端移動相使用溶劑強度較強的移動相時，樣品會在兩移動相交界面處，因前後端移動相對樣品作用力不同，而使樣品在前後端移動相中的移動速度不同，處於管柱出口端溶劑強度較弱移動相中的樣品分子，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，產生樣品分子在移動相交界面處波寬變窄，等後端移動相完全通過樣品後，樣品之空間波寬再隨時間漸漸變寬，樣品在移動相之交界面，由於後面移動相中的樣品產生擠壓的情形而使樣品波寬變窄，此種樣品在移動相交界面處波峰變窄之現象，稱之為波峰壓縮效應。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，也發現有此現象[88-89]，Yamamoto於1995年發表文獻指出，在離子交換層析系統中，以梯度沖提模式對蛋白質進行分離時，理論板高可藉由一系列實驗參數來進行修正[97]，之後提出更多在不同沖提模式下的理論板高修正理論[98-100]。文獻[14]提及波峰壓縮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[14-16]，且在文獻[17]特別對層析波峰壓縮效應進行理論板數探討與修正，並使用一些常見偵測器來佐證其模擬數據，Gritti等人提出一系列公式用於計算非線性條件下之理論板數計算[18-19]。本實驗室亦透過自行設計之WCD系統，觀測於非線性層析實驗條件下，層析波峰壓縮效應之現象[9,10]，並指出在梯度沖提之非線性層析系統中，以時間單位為定義的理論板高 H 值與理論板數 N 值並不適用。其主要原因由於式2-7~2-10是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，由於移動相之組成會隨時間改變，樣品在不同時間會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2-7~2-10無法使用，故須將此層析公式作修正才能獲得較正確的理論板高 H 值以及理論板數 N 值。

第三章 實驗

3.1 實驗藥品

(a) 實驗藥品：

Anthrarufin(1,5-Dihydroxyanthraquinone), C₁₄H₈O₄, 分子量 240.21，純度 90%，購自於 Alfa aesar (Ward, MA, USA)，最大吸收波長 425 nm，溶於丙酮中使成為樣品溶液，濃度為 215 mg L⁻¹，丙酮屬 HPLC 級溶劑(99.9%)，購自 Aldrich。

(b) 移動相組成：

移動相組成為甲醇與去離子水。甲醇 HPLC 級溶劑(99.9%)，購自 Aldrich。實驗用水為經過 Millipore(Beford, MA, USA) Milli-Q 處理的 18.2 MΩ 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 mL min⁻¹~9.99 mL min⁻¹。

(b) 進樣閥門(Sample injection valve)

進樣用的六向閥，購自 Valco(Houston, TX, USA)。

(c) 內體積 20 μL 的樣品迴圈(sample loop)

(d) 管柱(Column)

自製 HPLC 管柱以及玻璃管柱。

(e) UV/Vis 偵測器

Waters 486(購自 Milford, MA, USA)。

(f) 全管柱偵測(whole-column detection, WCD)系統

包含光學盒、光源、管柱、XYZ 軸調整機座以及用來處理訊號

之個人電腦。

3.3 儀器組裝及各裝置介紹

本實驗詳細儀器裝置示意圖如圖3-1所示。以下將詳細介紹實驗所使用之管柱以及WCD系統。

3.3.1 管柱

利用兩充填壓力不同之自製 HPLC 管柱(管柱 1、2)，以及自行填充之玻璃管柱(管柱 3)進行實驗，三管柱詳細規格於表 3-1。

3.3.1.1 自製 HPLC 管柱—管柱 1、2

本實驗室委託新北市彥宏開發科技有限公司設計製造此管柱本體，使其盡量吻合一般 HPLC 不鏽鋼管柱之使用條件，管柱結構如圖

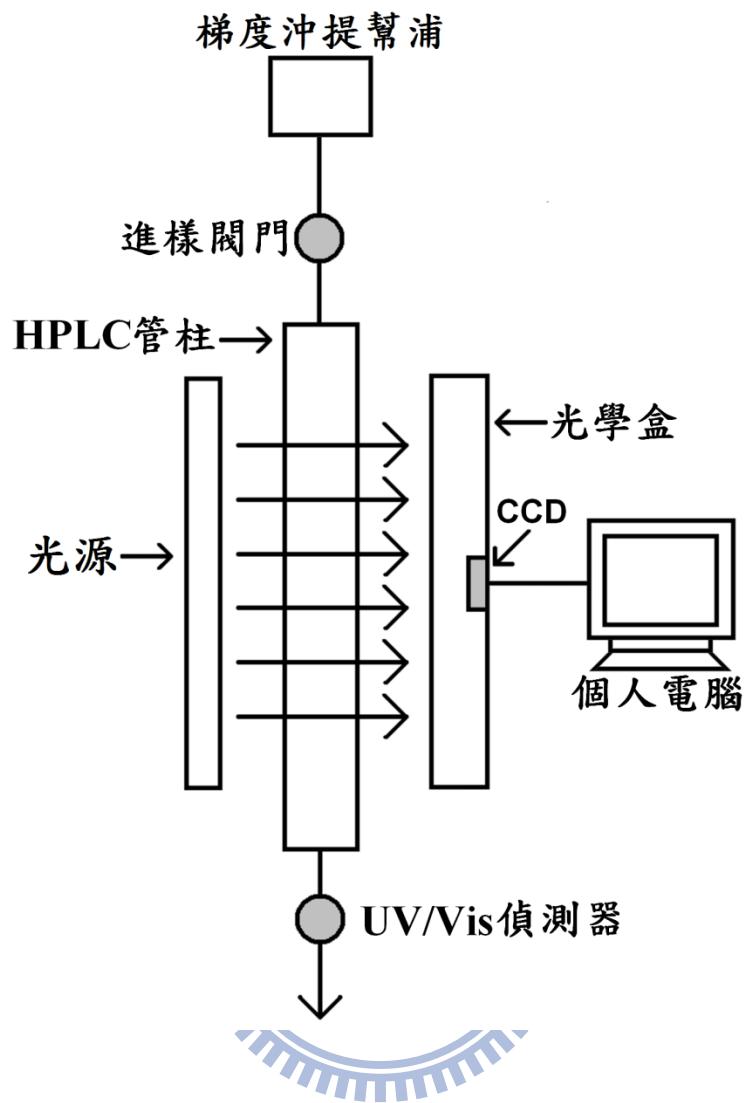


圖 3-1 實驗裝置圖

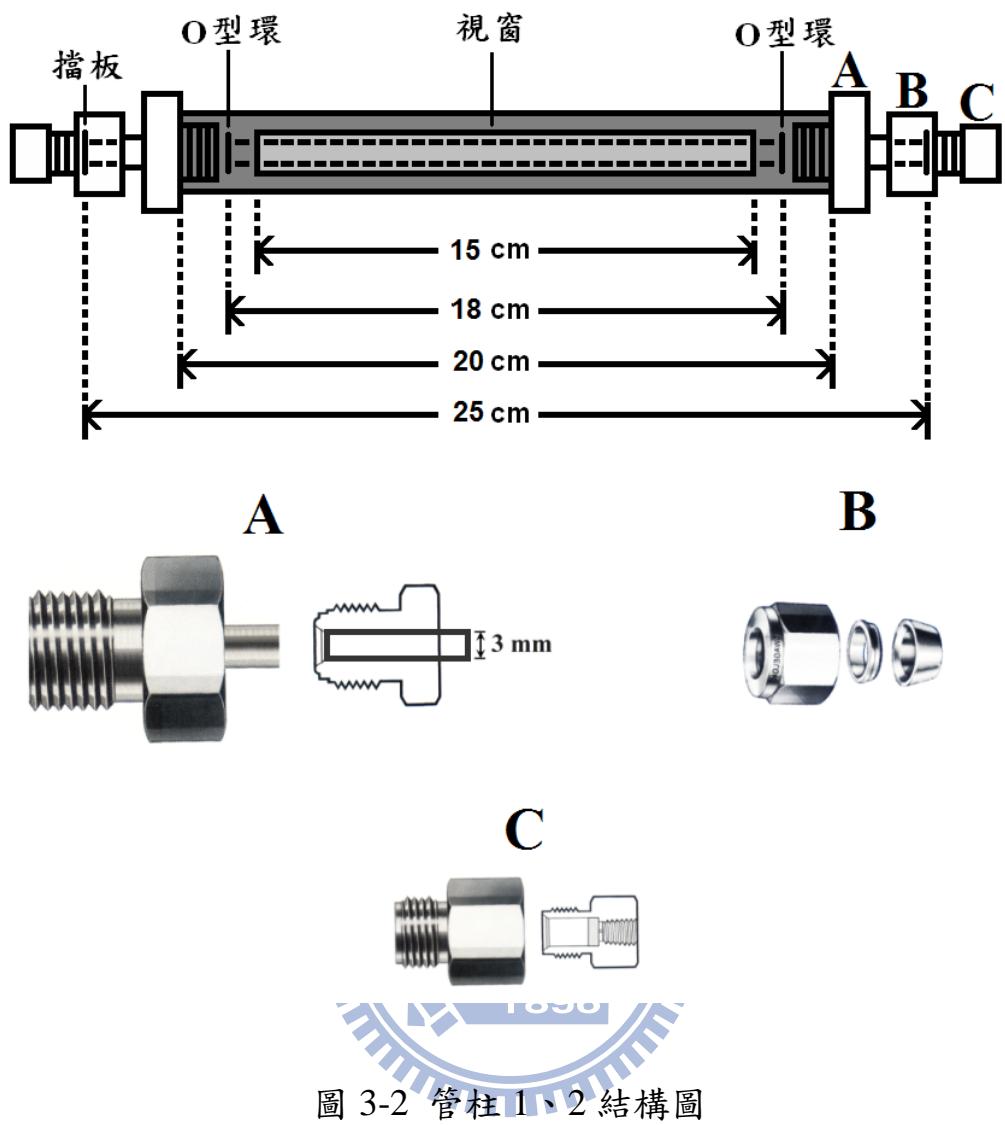
包含光源、光學盒、管柱等零件架設於 XYZ 軸調整機座上之 WCD 系統。此實驗裝置即可利用 WCD 系統及 UV/Vis 偵測器同時獲得之層析實驗條件訊號。

表 3-1 本實驗所使用三種管柱之詳細規格

	管柱 1	管柱 2	管柱 3
填充壓力	103 bar	41 bar	常壓下自行填充
管柱內徑	3.0 mm	3.0 mm	6.6 mm
固定相種類	Kromasil 100-10 C ₁₈	Kromasil 100-10 C ₁₈	Nucleosil 100-10 C ₁₈
粒徑大小	10 μm	10 μm	10 μm
粒徑形狀	spherical	spherical	spherical
孔徑大小	110 \AA	110 \AA	100 \AA
比表面積	$330 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$	$330 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$	$350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
Carbon loading	20 %	20 %	14 %
End capping	是	是	是

3-2 所示。首先將一長度 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之不鏽鋼管柱中，在此設計下，光線可以從不鏽鋼管其中一側的開口進入，穿透過玻璃管柱後，再從另外一側的開口出來，抵達偵測器。玻璃管與外接不鏽鋼管接合方式為在玻璃管兩端末端切面處放置 Viton 材質的 O 型環，然後兩旁鎖上 Swagelok 的 male nuts(內徑 6.35 毫米，如圖 3-2A)，此 male nuts 內嵌有一外徑 6.35 毫米、內徑 3 毫米的不鏽鋼管，當 male nuts 據壓 O 型環時，此不鏽鋼管會透過 O 型環與玻璃管柱連結成一內徑 3 毫米、長度 25 公分之空心管路，如此一來，便可將層析系統中所使用之固定相填充於其內；而為了使固定相不會流失，不鏽鋼管末端必需先接上一 Swagelok nut(圖 3-2B)，然後連接內含擋板(frit，2 μm)的 external column end connector(圖 3-2C)，此即完成自製 HPLC 管柱本體。

當管柱本體製作完成後，以往復式針式幫浦或針式幫浦測試其耐壓程度，測試結果為此種設計之玻璃管柱能承受至少 159 bar(2300 psi)之壓力不會產生洩漏，且不會造成玻璃管柱之損壞，於一般 HPLC 實驗條件中，壓力鮮少超過此限，故可確定此種設計之管柱可進行往後層析實驗條件。而後委託台北市建宏層析企業股份有限公司分別以高



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

壓 41 bar(600 psi)及 103 bar(1500 psi)之填充壓力，將 10 μm ODS 固定相注入管柱中，便完成了長 25 公分，內徑 3 毫米，填充 10 μm ODS 作為固定相的兩支管柱。

3.3.1.2 玻璃管柱—管柱 3

玻璃管柱購自於Omnifit(Danbury, CT, USA)，具有可調端之組件(圖3-3A)，即可自行調整固定相所需填充長度，利用自行填充之方式，填充10 μm ODS作為固定相。自行填充方式為採用乾式填充法，直接將乾粉狀之固定相逐次微量填充至玻璃管柱中，填充過程不時輕敲管壁以減少空隙並且讓固定相平整而緊密，因若固定相上端表面不平整、管柱中有空隙，會破壞分離區帶的平整，使分離效果變差。填充完成後，利用甲醇以適當流速沖洗管柱，而後再旋轉玻璃管柱之可調端組件，藉此使填充之固定相更為緊密，便完成了固定相填充長度16公分，內徑6.6毫米，填充10 μm ODS作為固定相之玻璃管柱，管柱結構如圖3-3所示。

3.3.2 WCD 系統

系統包含光學盒、光源、XYZ 軸調整機座以及處理訊號用的個人電腦。光學盒為新竹市虹光精密工業股份有限公司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

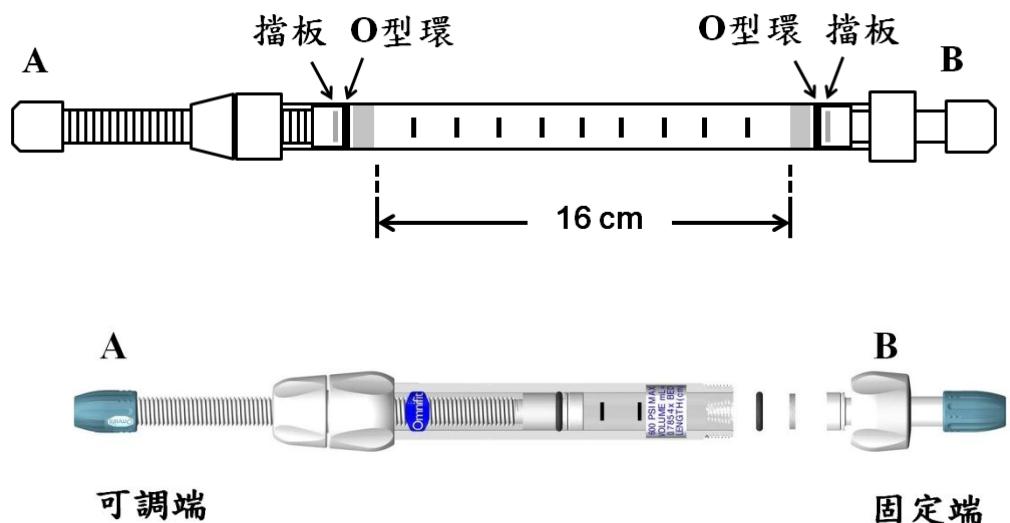


圖 3-3 管柱 3 結構圖

管柱規格：固定相長度 16 公分、內徑 6.6 毫米，內含擋板(frit, 10 μm)。

其中，A 部分為可調端，可透過旋轉可調端組件來改變固定相填充長度，B 部分則為固定端。



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(如圖 3-4 所示)。

光源為放射波長為 460 nm 的藍光 LED 光源(型號 DL-15-300-B)，由新北市曜宇科技股份有限公司提供。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，此機台委託新北市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固定相的管柱後抵達位於光學盒內的 CCD 上，雖然填充的固定相並不透明¹⁶，但光線可藉由擴散反射 (diffuse-reflection)的方式穿越於固定相空隙間，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[11,76]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位移行為。

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移動相之管柱後抵達 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

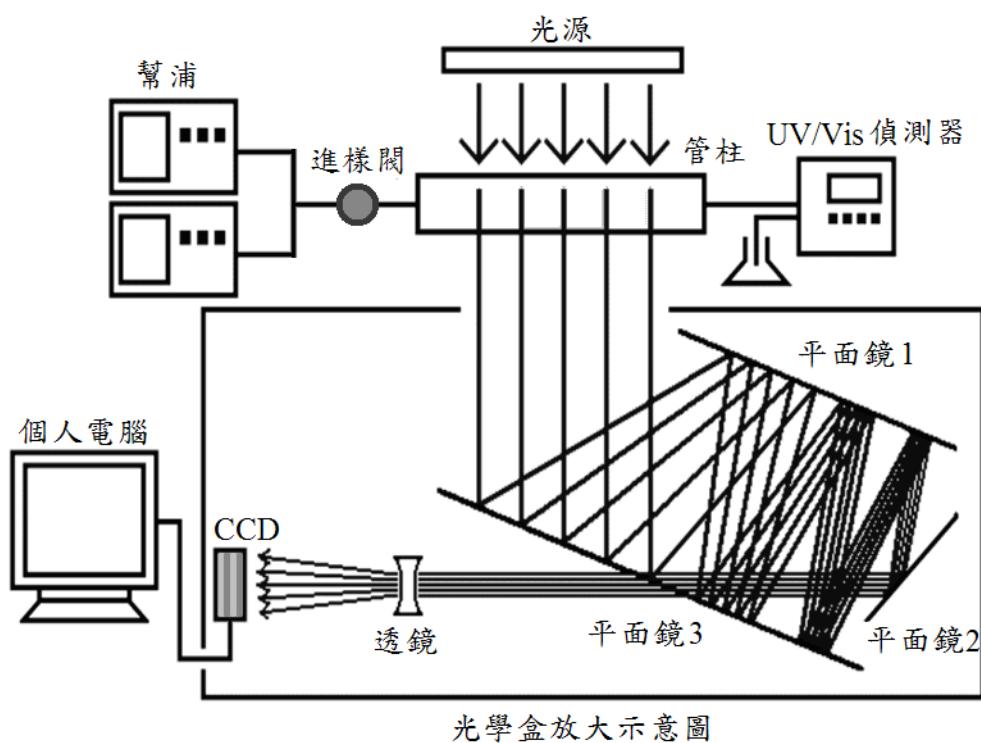


圖 3-4 詳細實驗裝置圖

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

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 系統操作界面設定

進行實驗前，必須先設定好連接WCD系統之個人電腦中的操作界面(圖3-5)，樣品取樣時間、取樣點數、取樣模式及曝光時間參數，使WCD系統獲得樣品吸收訊號，以下逐一介紹操作介面各項參數之設定原則。

(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)

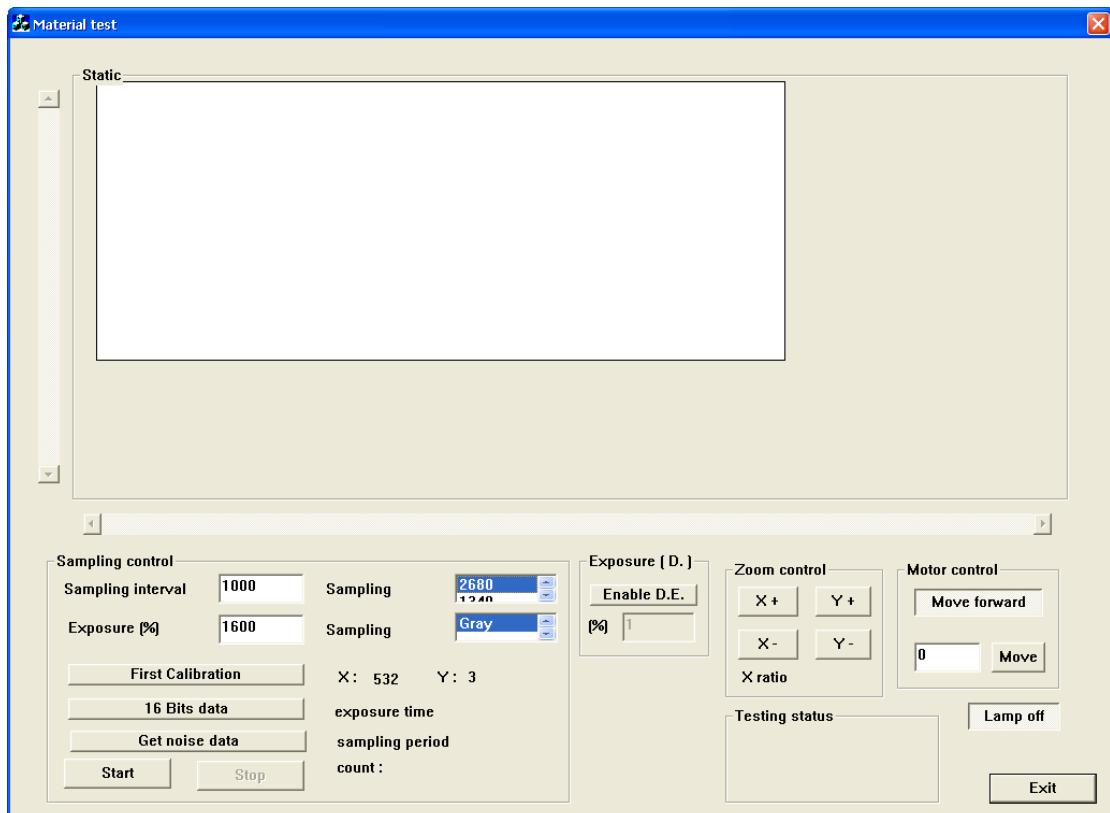


圖 3-5 電腦操作界面圖

操作界面上可設定之參數包含：1. 數據取點間距時間；2. 偵測器曝光時間；3. 取樣點數；4. 取樣模式。除了數據取點間距時間於每次實驗前須重新輸入以外，在本研究中，偵測器曝光時間固定為 1600% (57.6 ms)、取樣點數固定為 2680 個、取樣模式固定為 “Gray”。

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，本研究中WCD系統的最短曝光時間為3.6 ms，但由於管柱內填充固定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)。

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，此段落將對本研究中所獲得的各種類圖譜進行定義(圖3-6)。本研究當中使用2組偵測系統(WCD與UV/Vis偵測器)，以UV/Vis偵測器收集訊號時，為固定一個偵測管柱出口的位置，隨時間來擷取樣品通過偵測位置的訊號，故所得的圖形橫座標單位為時間，縱座標單位為訊號強度，此類型數據即稱之為時圖(temporal profile)，且由此組數據是

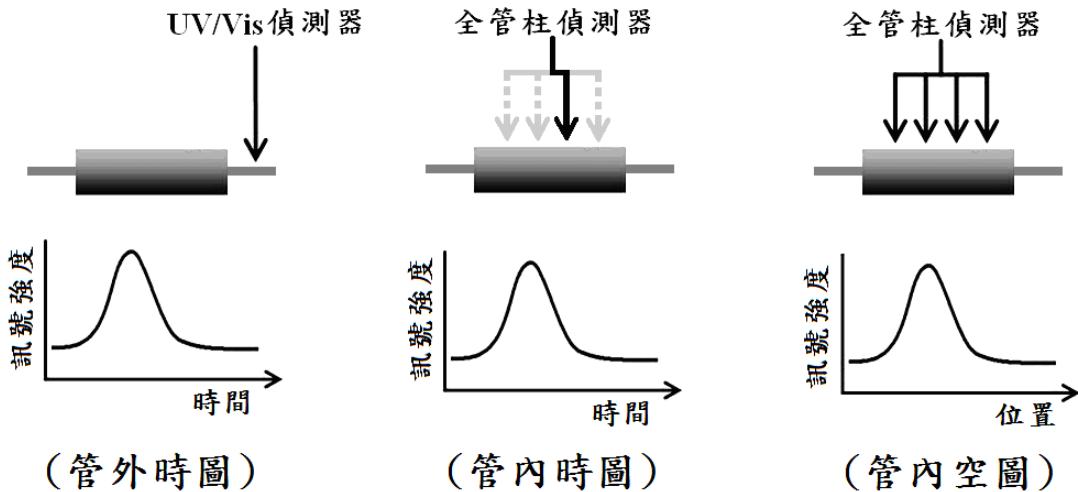


圖 3-6 管外時圖和管內空圖的定義

管外時圖是以單通道偵測器收集樣品流出管柱後的訊號結果，所得圖表橫軸座標單位為時間；管內時圖是以 WCD 系統持續收集大範圍之樣品空間分佈訊號，但選擇其中一固定管柱位置為偵測點，隨時間累積而得的訊號，可得此橫座標單位為時間的管內時圖；管內空圖是以 WCD 系統同時偵測大範圍的管柱內樣品空間分佈訊號，所得圖表橫軸座標單位是空間。

在管柱外之環境所收集而得，故又稱管外(post-column)時圖。使用WCD系統時，可以同時偵測大範圍的樣品分佈，如同瞬間拍照的技術，獲取樣品在一維管柱空間中的訊號強度值，獲得的圖譜橫座標為管柱位置、縱座標為訊號強度，此類型之數據稱為空圖(spatial profile)，且由於此數據是在管柱內之環境所獲得，故亦可稱之為管內(on-column)空圖。

WCD系統除可獲得管柱內樣品的空圖訊號，若將一固定管柱位置為偵測點，隨著時間累積所獲得的訊號，亦可獲得橫座標單位為時間的管內時圖數據(圖 3-6)。



根據WCD系統所獲得的管內空圖數據，可繪製出樣品在管內沖提移動過程中的遷移路徑圖(migration route)如圖3-7：WCD在 T_1 、 T_2 、 $T_3 \dots T_n$ 等流析時間時“拍攝”到樣品於管柱內的空圖波峰訊號 Peak_1 、 Peak_2 、 $\text{Peak}_3 \dots \text{Peak}_n$ ，找出以上空圖波峰之頂點分別位於管柱位置 N_1 、 N_2 、 $N_3 \dots N_n$ 處，再將 T_1 、 T_2 、 $T_3 \dots T_n$ 與 N_1 、 N_2 、 $N_3 \dots N_n$ 等數據同時表現於同一張關係圖上，此樣品流析時間與空圖波峰頂點位置關係圖即稱之為樣品遷移路徑圖，遷移路徑圖中所繪製出的數據趨勢線則稱為遷移曲線(migration curve)，遷移曲線之斜率則代表樣品在管柱中的移動速度。

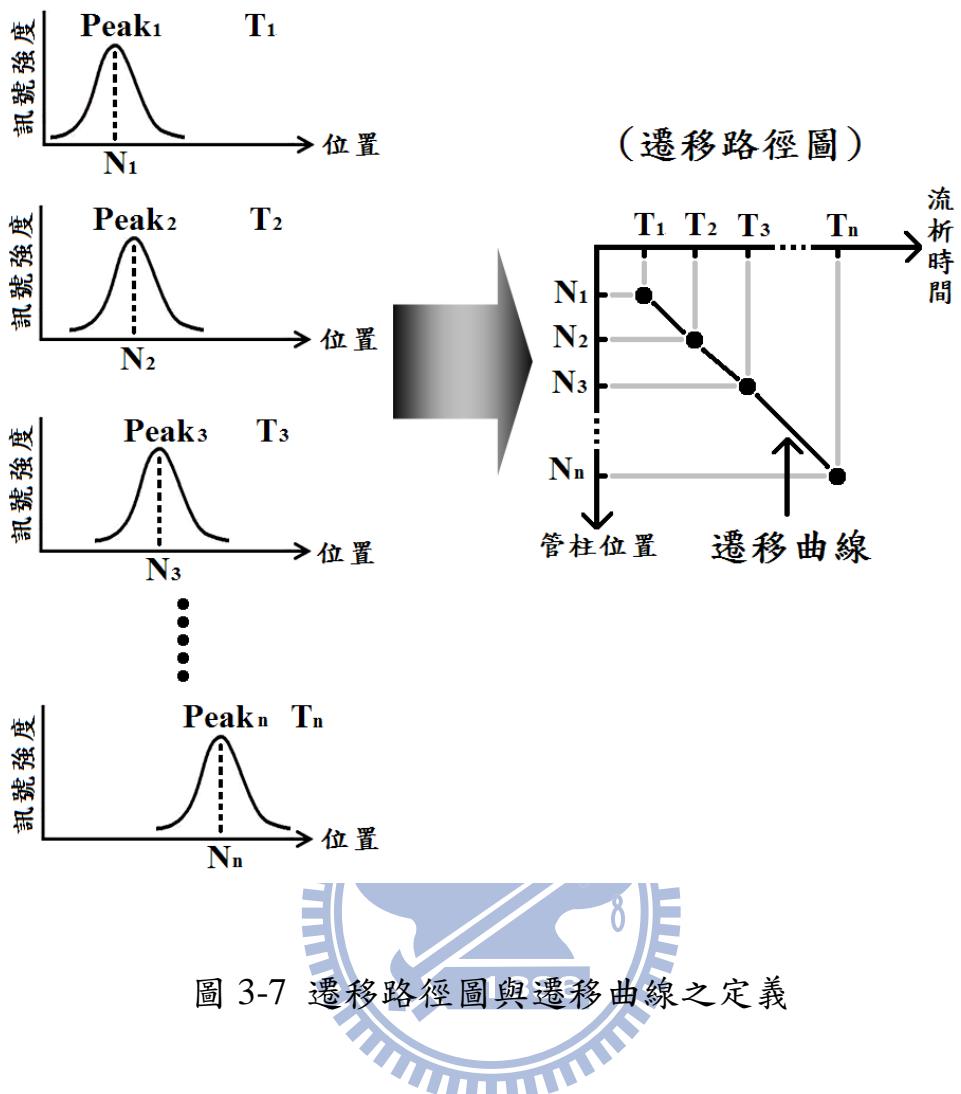


圖 3-7 遷移路徑圖與遷移曲線之定義

WCD 在 T_1 、 T_2 、 $T_3 \dots T_n$ 等流析時間時獲得樣品於管柱內的空圖波峰訊號 Peak_1 、 Peak_2 、 $\text{Peak}_3 \dots \text{Peak}_n$ ，找出以上空圖波峰之頂點分別位於管柱位置 N_1 、 N_2 、 $N_3 \dots N_n$ 處，再將 T_1 、 T_2 、 $T_3 \dots T_n$ 與 N_1 、 N_2 、 $N_3 \dots N_n$ 等數據同時表現於同一張關係圖上，此關係圖即為樣品遷移路徑圖，遷移路徑圖中的數據趨勢線則為遷移曲線。

3.5 實驗流程

實驗裝置架設完畢之後，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固定相之管柱並進入偵測器，然後根據電腦操作界面上呈現的光源訊號強度，進行機台之 XYZ 軸微調，以達最佳化狀態，所謂最佳化狀態是指光源強度穩定且左右兩端強度對稱，機台調整完畢後測量偵測點所對應的管柱位置。上述步驟執行完畢後，進行接下來的實驗步驟：

- 
- (1) 每次層析實驗操作前，以約 30 mL 之 HPLC 級甲醇清洗管柱。
 - (2) 依照實驗條件設定幫浦沖提程式。
 - (3) 設定電腦操作界面。
 - (4) 注入樣品，並將儀器蓋上黑布避免受其他光源干擾。
 - (5) 開啟幫浦進行實驗，並同時開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器 2 組系統收集樣品訊號。
 - (6) 從電腦操作界面上看到訊號恢復至原本狀態即表示樣品已流出管柱，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

三種不同管柱移動相以甲醇和去離子水做不同比例混合(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 系統與 UV/Vis 偵測器收集樣品流經管柱過程的波峰訊號(包含管內空圖和管內時圖)以及管外訊號(管外時圖)，在不同移動相沖提樣品的條件下，樣品停留於管柱內所需的總滯留時間長度不同，為了收集適量的數據來進行往後的分析處理，則 WCD 系統所需之數據取點間距時間亦不相同，移動相沖提實驗所分別搭配的數據取點間距時間列於表 3-2。

3.6.2 梯度沖提

梯度沖提實驗採用管柱 1 作為分析管柱，實驗為利用甲醇與水作為移動相，亦使用 0.7 mL min^{-1} 的流速對 $20 \mu\text{L}$ 的樣品進行沖提，在樣品一注入的同時，立即開啟 WCD 系統收集樣品流經管柱過程的樣品波峰訊號(包含管內空圖和管內時圖)。

本實驗設計階梯式沖提與連續式沖提兩種模式之梯提沖提條件，進而探討非線性層析之波峰壓縮效應與理論板數計算。兩種梯度沖提

表 3-2 等位沖提條件中，移動相組成比例與數據取點間距時間

編號	移動相比例(V/V)	數據取點間距時間
	甲醇(%)：去離子水(%)	(ms)
管柱 1		
1	99 : 01	100
2	95 : 05	200
3	90 : 10	300
4	85 : 15	400
5	80 : 20	500
6	75 : 25	700
7	70 : 30	1000
管柱 2		
1	99 : 01	100
2	95 : 05	200
3	90 : 10	300
4	85 : 15	400
5	80 : 20	500
6	75 : 25	700
7	70 : 30	1000
管柱 3		
1	99 : 01	100
2	95 : 05	200
3	92 : 08	300
4	90 : 10	400
5	87 : 13	500
6	85 : 15	700
7	83 : 17	1000
8	80 : 20	1200

之實驗條件與分別搭配之 WCD 系統的數據取點間距時間列於表 3-3。

表 3-3 兩種梯度沖提實驗中，數據取點間距時間

實驗編號	數據取點間距時間(ms)
階梯式沖提	
1	1500
2	1200
3	900
4	700
連續式沖提	
1	750
2	800
3	850
4	900



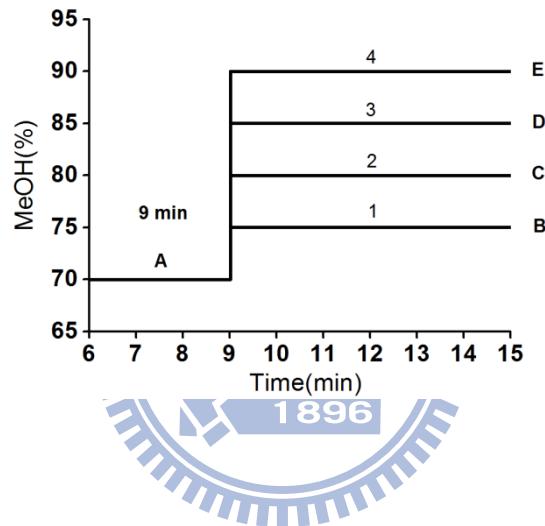
3.6.2.1 階梯式沖提

階梯式沖提模式啟動前，先以 100% 的移動相 A 以流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 9 分鐘時，瞬間將移動相變換為 100% 的移動相 B、C、D、E，如圖 3.8(a)所示。

3.6.2.2 連續式沖提

連續沖提模式啟動前，先以 100% 的移動相 A 以流速 0.7 mL min^{-1} 的條件進行管柱平衡，接著在樣品注入後的 9 分鐘時，將移動相在 0.5、1.0、2.0、3.0 分鐘變換為 100% 的移動相 D，如圖 3.8(b)所示。

(a)階梯式沖提模式



(b)連續式沖提模式

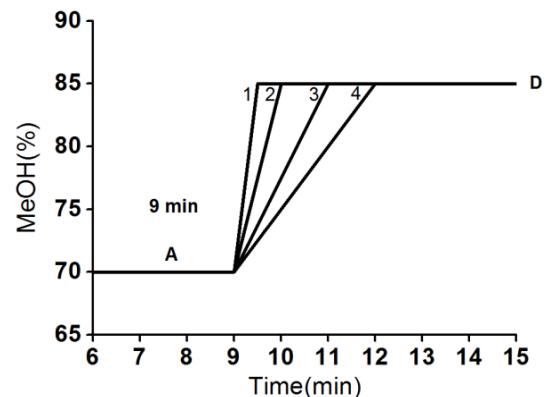


圖 3-8 梯度沖提所設計之兩種實驗模式

第四章 結果與討論（一）一樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應

4.1 數據處理

本實驗所使用的全管柱偵測系統，此偵測系統會在同一時間得到 2680 個訊號收集點，因此每一個空間訊號含 2680 個數據。

數據處理步驟如下：實驗過程中，每次取樣會記錄 2680 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。

在固定的偵測位置，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，而一般管柱外偵測器所得的紀錄波形即為管外時圖。

將「相同流析時間」但「不同偵測位置」的訊號點取出，依據偵測點對應的管柱位置作出「位置對應吸收值」的圖形，這種在同一時間獲得全部偵測點的訊號，並以管柱位置作圖得到的圖形稱為空圖。詳細數據類型定義已在 3.4 節提及。

4.2 波形參數指標

本實驗所獲得之空圖與時圖之波形指標參數為：

(a) 波峰位置：表為波形之最高點所對應至橫軸座標位置

空圖：波峰最高點所對應為管柱位置

時圖：波峰最高點所對應為樣品滯留時間(retention time, t_R)

(b) 波峰寬度：

於統計學中，常會以標準偏差值(standard deviation, σ)，來表示據據點分散情形之參考指標。當波形為一高斯波形時，其波形之半高寬約為2.35倍之標準偏差值，可透過波形最高點之1/2高度處，計算波峰左右兩側的寬度，求出波峰半高寬進而求得標準偏差值。然而若波形非高斯波形之情況下，則須根據統計學上計算標準偏差之公式來求得。由於本實驗所獲得之空圖及時圖之波形是由許多數據點所組成，因此可藉由計算構成波形之數據點之標準偏差值，來代表波峰寬度。所用計算公式如下：


$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum y_i \times (x_i - \bar{x})^2}{\sum y_i}} \quad (4-1)$$

y_i ： y_i 代表第*i*個訊號值， y_{i+1} 代表第*i+1*個訊號值。

x_i ： x_i 代表 y_i 所對應橫軸座標之位置， x_{i+1} 代表 y_{i+1} 所對應橫軸座標之位
置。

\bar{x} ：波形質量之中心(calculated mass center by shape profile)，為所有數
據點位置的平均值，可由以下公式計算出：

$$\bar{x} = \sqrt{\frac{\sum y_i \times x_i}{\sum y_i}} \quad (4-2)$$

4.3 數據結果討論

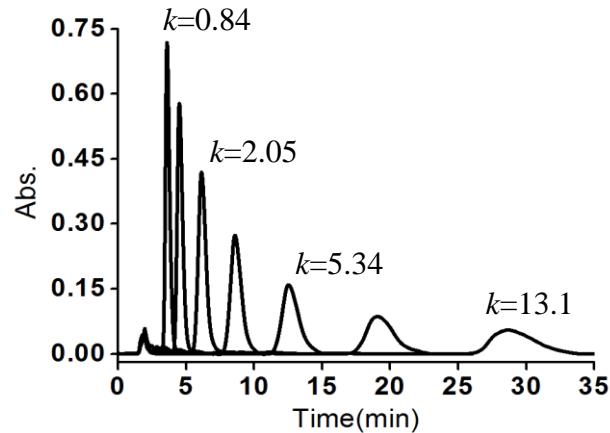
4.3.1 管柱外 UV/Vis 偵測器數據討論

利用三管柱以不同之移動相， 0.7 mL min^{-1} 之流速，對樣品進行等位沖提，由一般管柱外UV/Vis偵測器所收獲得之管外時圖如圖4-1所示。三管柱在不同移動相之等位沖提條件以式2-14計算出 k 值，並利用式2-13所計算而得之樣品移速，以及管外時圖之波形指標皆列於表4-1。根據以上結果顯示出，當 k 值越大，由於樣品在管柱內受到固定相滯留力較強，因此在管柱內之樣品移速較慢，且 k 值越大，其在管外時圖之波寬越寬、波高越矮；此原因在一般教科書上解釋其原因為當樣品在管柱內滯留時間長，即 k 值較大之樣品，其在空間上產生擴張情形顯著，故空間波峰較寬，反之滯留時間短，亦即 k 值較小之樣品，其在管柱內產生擴張情形較不明顯，故空間波峰較窄。然而造成此一現象正確解釋應為：樣品在流析出管柱之際，會受到樣品之移速不同而影響其在管外時圖之波峰寬度[9]。

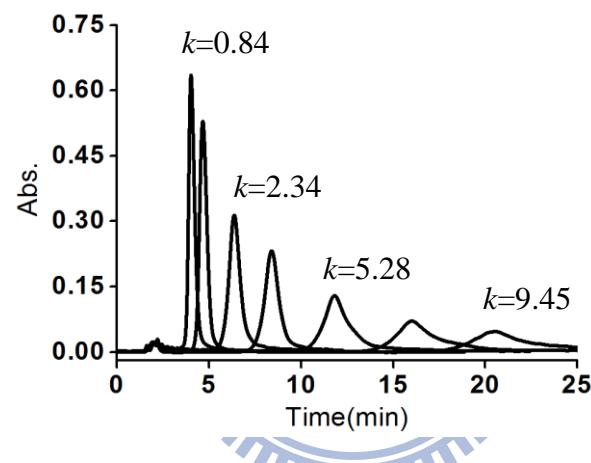
4.3.2 管內空時圖數據討論

透過WCD系統可獲得三管柱之個別遷移路徑圖(圖4-2)，計算遷移曲線之斜率，即可得到樣品在移動相中的個別移動速度，而遷移曲線斜率與由管外時圖利用式2-13所計算而得之樣品移速 u_m (見表4-2)

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

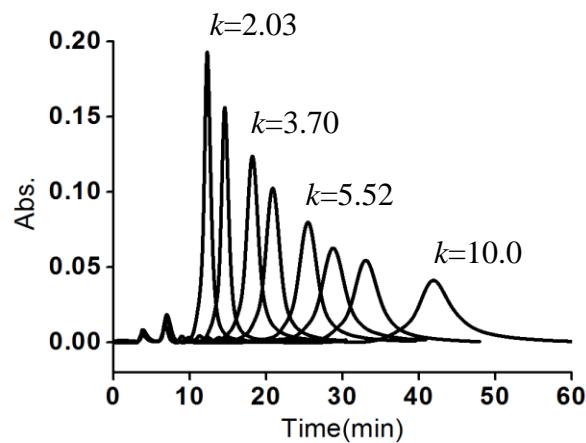


圖 4-1 三管柱於等位沖提實驗中，管外時圖結果

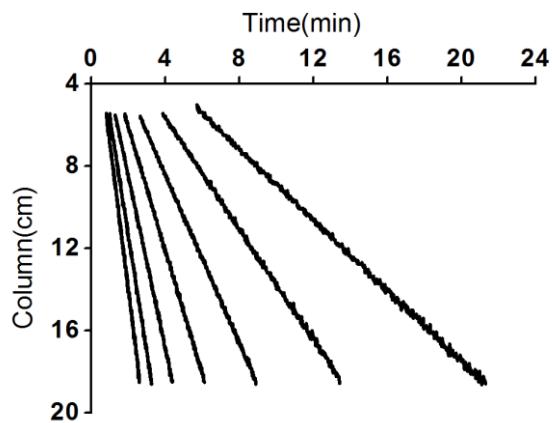
註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

表 4-1 等位沖提實驗中，樣品於三管柱之管外時圖波形指標

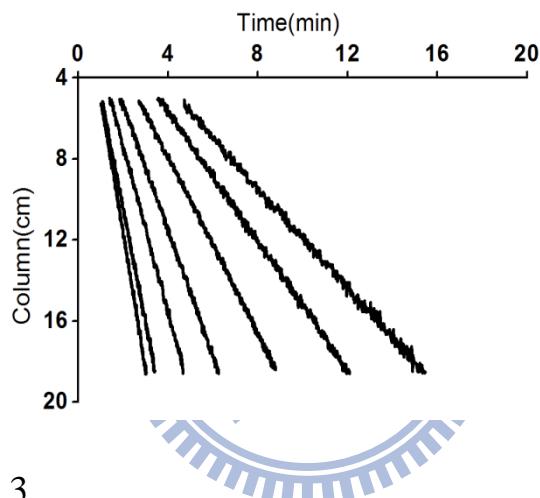
編號	k 值	樣品移速 u_m (cm min ⁻¹)	滯留時間 t_R (min)	波峰寬度 $\sigma_{(t)}$ (min)
管柱 1				
1	0.84	6.94	3.60	0.144
2	1.23	5.71	4.50	0.184
3	2.05	4.17	6.13	0.261
4	3.29	2.97	8.60	0.378
5	5.34	2.01	12.5	0.564
6	8.44	1.35	19.1	0.929
7	13.1	0.90	28.7	1.524
管柱 2				
1	0.84	6.29	4.03	0.148
2	1.16	5.36	4.66	0.189
3	2.34	3.92	6.37	0.279
4	3.42	2.97	8.41	0.347
5	5.28	2.12	11.8	0.585
6	7.19	1.56	16.0	0.884
7	9.45	1.21	20.6	1.283
管柱 3				
1	2.03	1.43	12.3	0.403
2	2.80	1.14	14.6	0.463
3	3.70	0.92	18.2	0.749
4	4.35	0.81	20.8	0.909
5	5.52	0.66	25.4	1.187
6	6.47	0.58	28.7	1.481
7	7.61	0.50	33.0	1.666
8	10.0	0.39	41.9	2.149

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

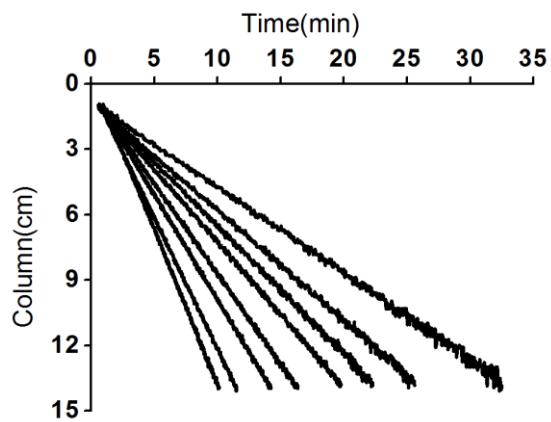


圖 4-2 三管柱於等位沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖

樣品遷移路徑圖中，各組實驗遷移曲線的斜率代表樣品在個別移動相組成的移動速度。註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

表 4-2 等位沖提實驗中，三管柱遷移曲線斜率與管外時圖所計算而得的樣品移速之數據比較

編號	遷移曲線斜率 (cm min^{-1})	樣品移速 u_m (cm min^{-1})
管柱 1		
1	7.14	6.94
2	5.71	5.71
3	4.19	4.17
4	3.00	2.97
5	2.05	2.01
6	1.35	1.35
7	0.86	0.90
管柱 2		
1	6.66	6.29
2	5.63	5.36
3	4.09	3.92
4	3.09	2.97
5	2.18	2.12
6	1.61	1.56
7	1.26	1.21
管柱 3		
1	1.47	1.43
2	1.21	1.14
3	0.96	0.92
4	0.83	0.81
5	0.67	0.66
6	0.59	0.58
7	0.50	0.50
8	0.39	0.39

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

結果符合，此結果即表示由一般管柱外偵測器所獲得之管外時圖，亦可代表樣品管柱中的移動速度。利用三管柱之等位沖提實驗中，以WCD系統觀察所得樣品之管內空圖結果如圖4-3、4-4、4-5所示，管內時圖結果如圖4-6、4-7、4-8所示。由於管柱1、2之耐壓設計，為在不鏽鋼管柱切割出15公分作為觀察視窗，因此僅可觀測管柱1、2由管柱7公分位移至17公分之流動情形，然而使用管柱3，可觀測到樣品從管柱1公分至管柱13公分之流動情形，即可觀察樣品在管柱內流動的完整情形。

4.3.2.1 空時差異

由三管柱之管內空圖結果(圖4-3、圖4-4及圖4-5)皆可看出，樣品在管柱中進行等位沖提時，樣品隨著移動相沖提往管柱後端位移，其空間波峰寬度逐漸變寬，且 k 值較大者，由於受到固定相滯留力量較大，故樣品在管柱內之波峰寬度變為較寬，相較於三管柱之管內時圖(圖4-6、圖4-7及圖4-8)之結果，樣品位移至管柱後端，其時圖波峰寬度亦逐漸變寬，且變寬程度相較於管內空圖結果明顯許多。為了彰顯空時圖數據之明顯差異，將三管柱之各組不同 k 值條件之空圖與時圖波寬分別除上 k 值最小條件之空圖與時間波寬，藉此觀察樣品從 k 值最小增加至 k 值大條件時，管內外時圖波寬增加程度與管內空圖波寬增加程度之差異，三管柱之比較結果於圖4-9及表4-3中，此結果可看出

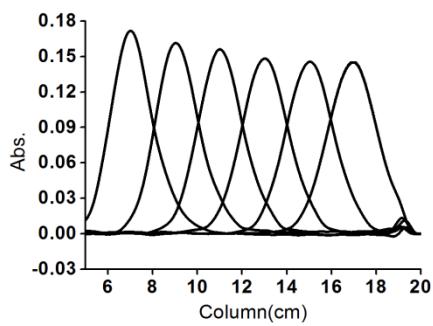
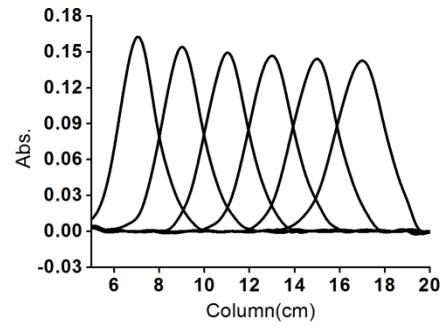
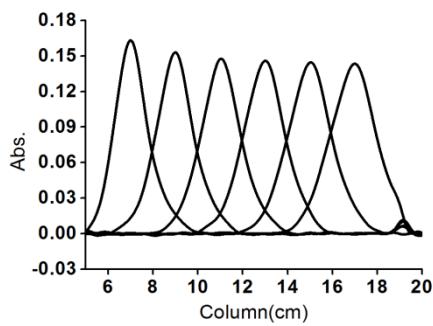
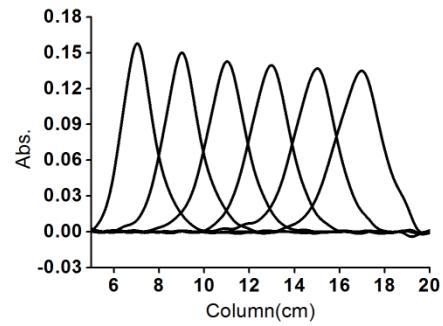
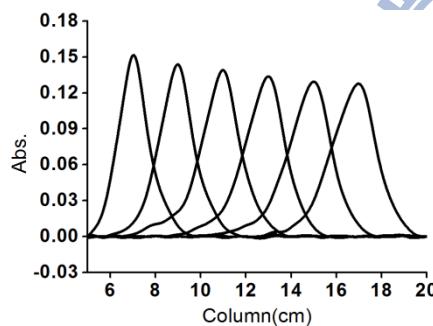
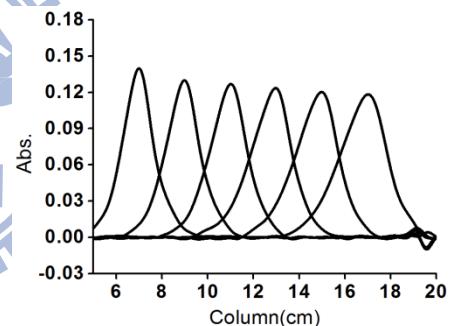
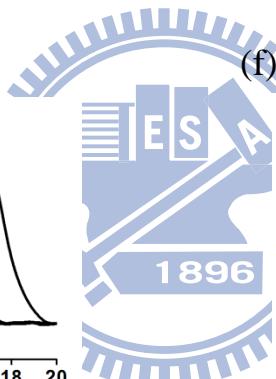
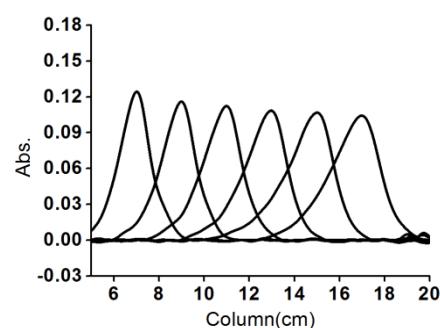
(a) $k=0.84$ (b) $k=1.23$ (c) $k=2.05$ (d) $k=3.29$ (e) $k=5.34$ (f) $k=8.44$ (g) $k=13.1$ 

圖 4-3 管柱 1 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、9、11、13、15、17 公分處之管內空圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

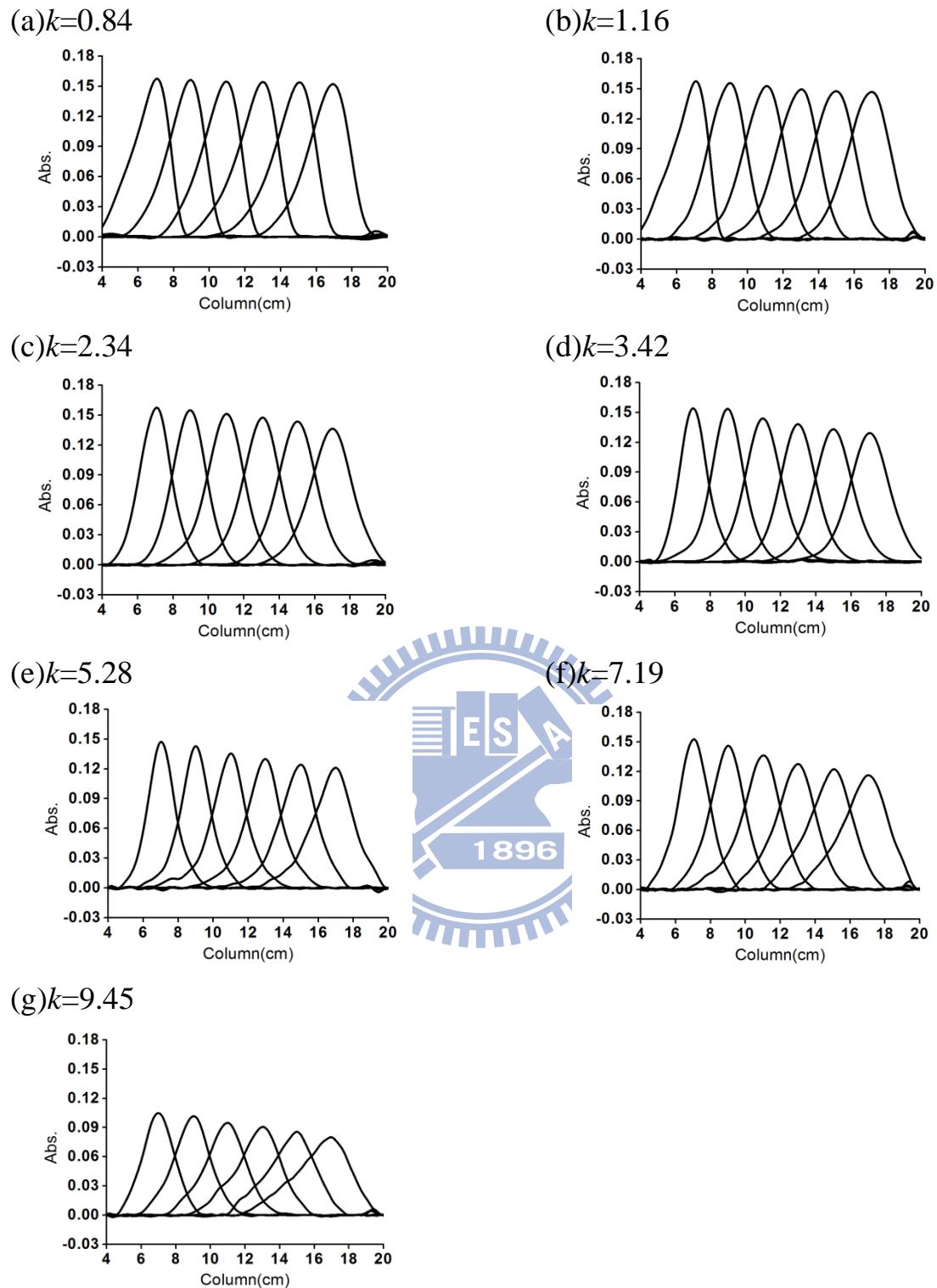


圖 4-4 管柱 2 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、9、11、13、15、17 公分處之管內空圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

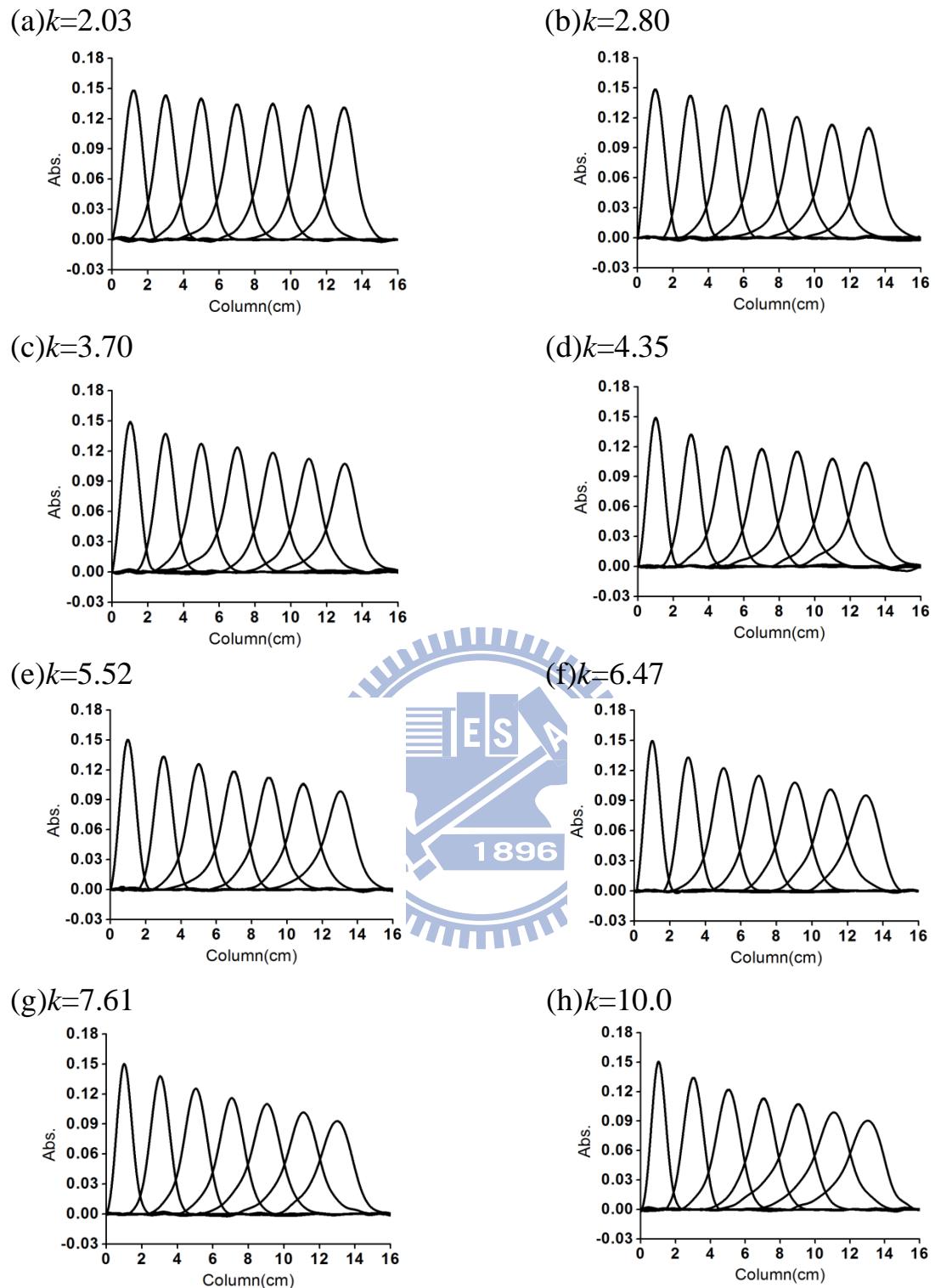


圖 4-5 管柱 3 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 1、3、5、7、9、
11、13 公分處之管內空圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

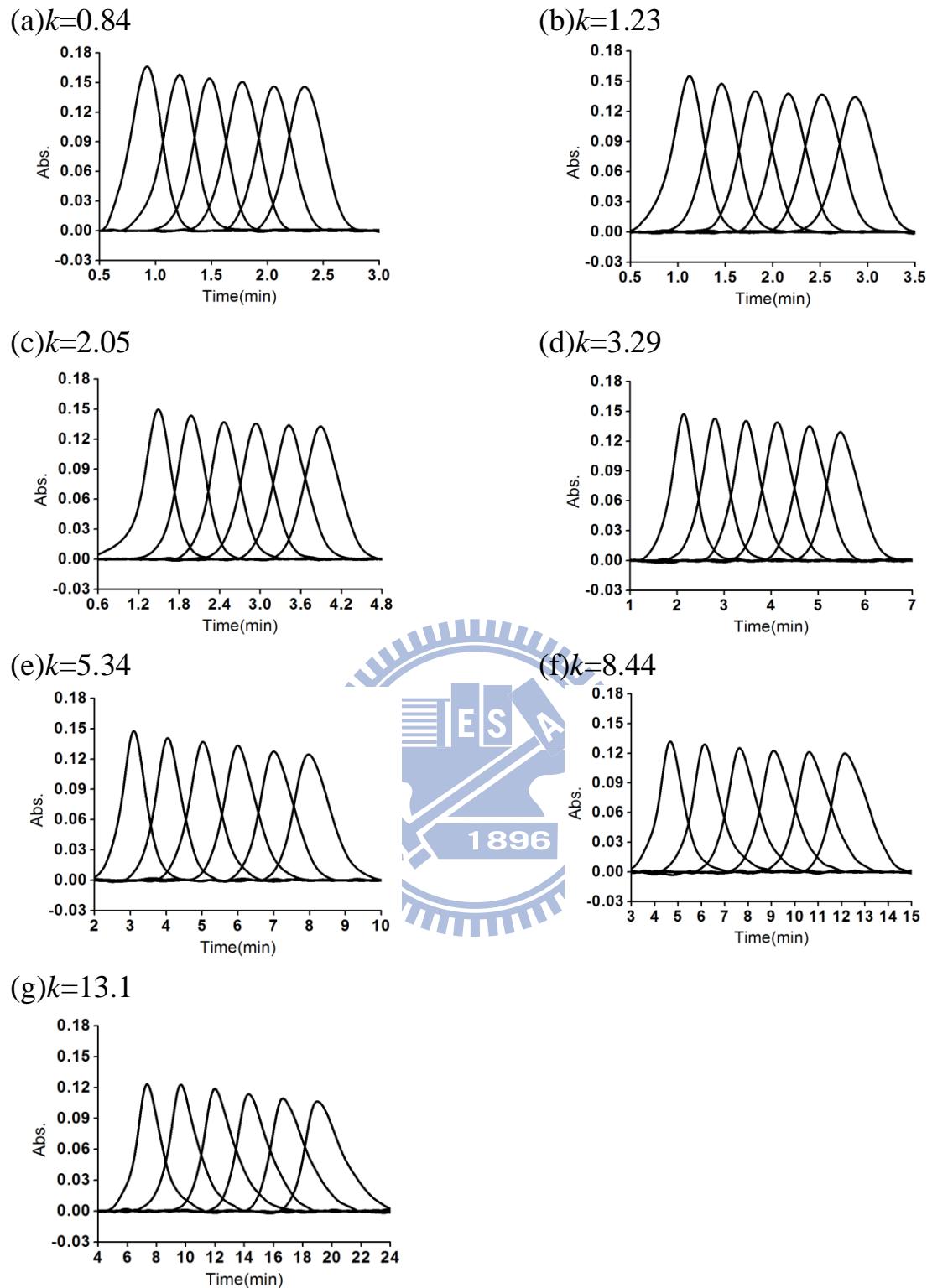


圖 4-6 管柱 1 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、9、11、13、15、17 公分處之管內時圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

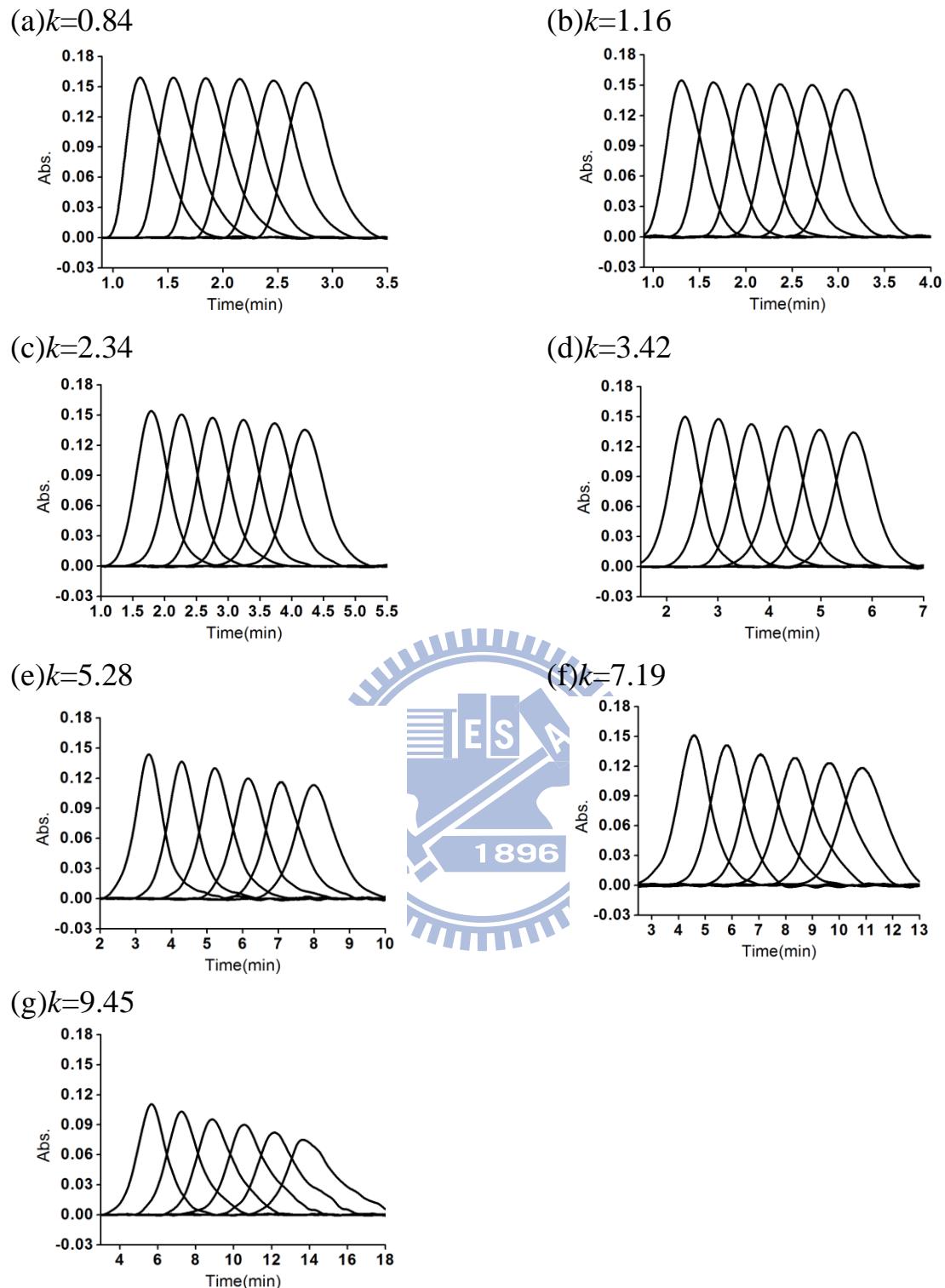


圖 4-7 管柱 2 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、9、11、13、15、17 公分處之管內時圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

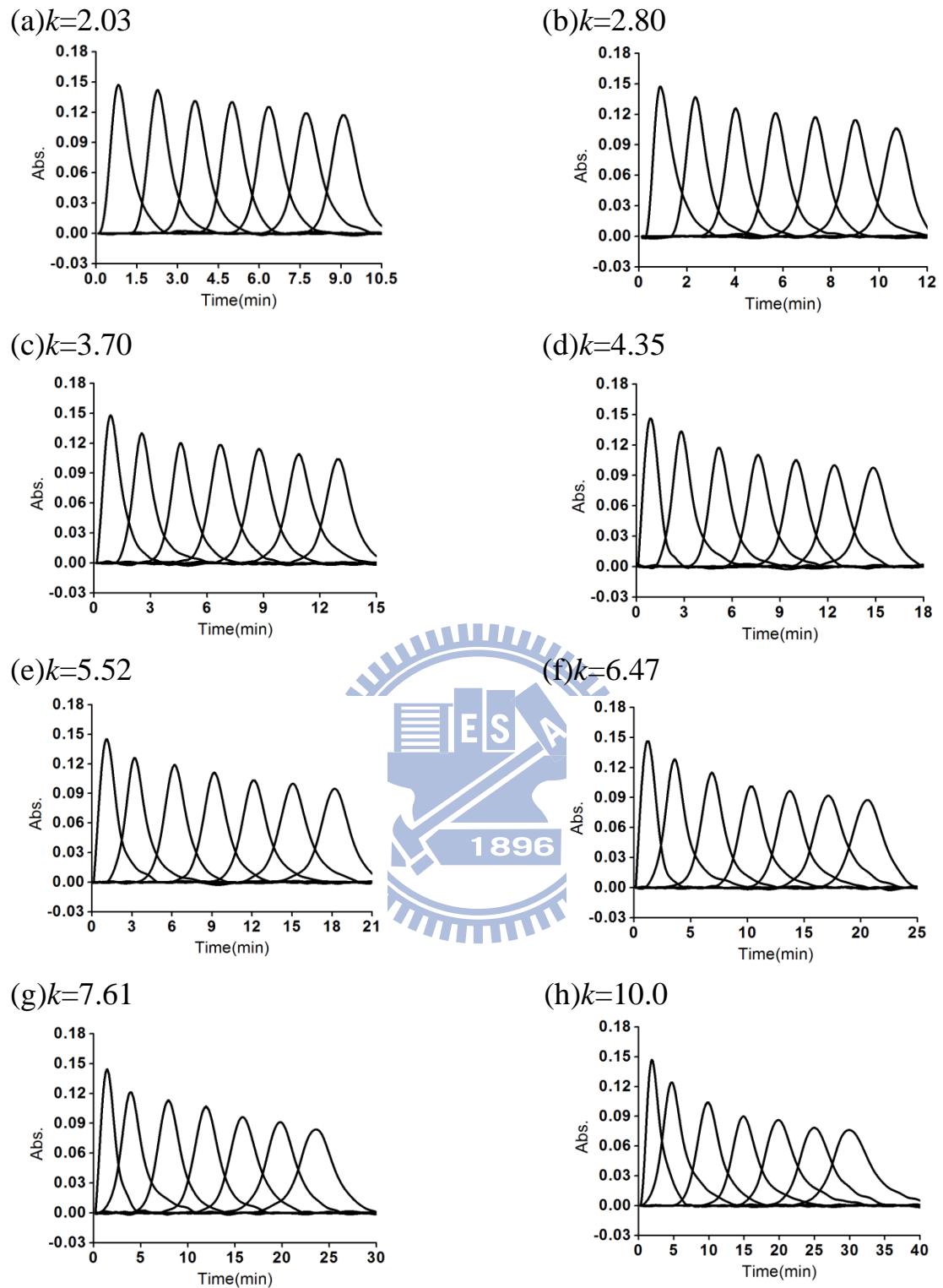
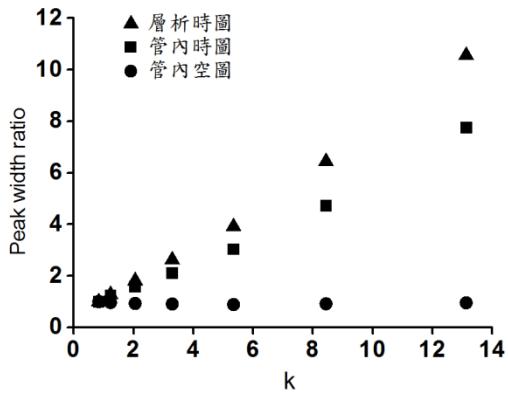


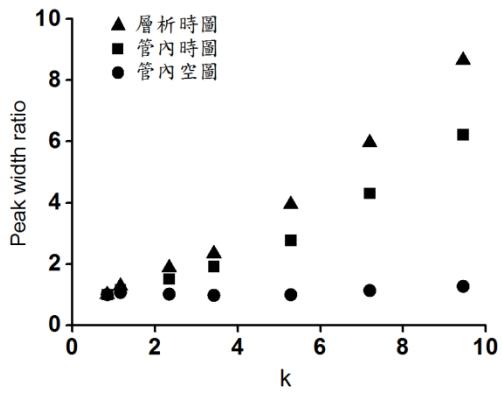
圖 4-8 管柱 3 於等位沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 1、3、5、7、9、11、13 公分處之管內時圖結果

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

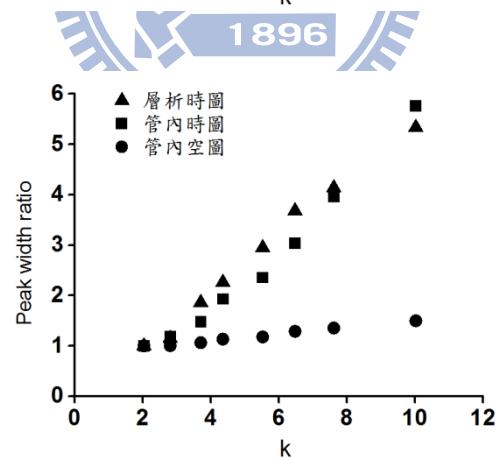


圖 4-9 三管柱等位沖提實驗中，管外時圖與管柱末端之管內空時圖波寬比例關係圖

註：波寬比例之計算公式為，peak width ratio = $\frac{\sigma_{(k)}}{\sigma_{(k_{min})}}$

詳細實驗條件列於表 3-2 中

表 4-3 等位沖提實驗中，三管柱之樣品在不同 k 值條件下，管外時圖與管柱內 17 公分處管內空時圖波寬比例數據

編號	k 值	管內空圖 波寬比例	管內時圖 波寬比例	管外時圖 波寬比例
管柱 1				
1	0.84	1.00	1.00	1.00
2	1.23	0.97	1.23	1.27
3	2.05	0.93	1.59	1.81
4	3.29	0.91	2.11	2.62
5	5.34	0.89	3.03	3.91
6	8.44	0.91	4.73	6.43
7	13.1	0.96	7.76	10.6
管柱 2				
1	0.84	1.00	1.00	1.00
2	1.16	1.07	1.15	1.28
3	2.34	1.02	1.51	1.88
4	3.42	0.98	1.92	2.34
5	5.28	1.00	2.77	3.94
6	7.19	1.13	4.31	5.96
7	9.45	1.27	6.23	8.65
管柱 3				
1	2.03	1.00	1.00	1.00
2	2.80	1.00	1.19	1.15
3	3.70	1.06	1.48	1.86
4	4.35	1.13	1.93	2.26
5	5.52	1.18	2.36	2.95
6	6.47	1.29	3.04	3.68
7	7.61	1.36	3.96	4.13
8	10.0	1.50	5.76	5.33

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

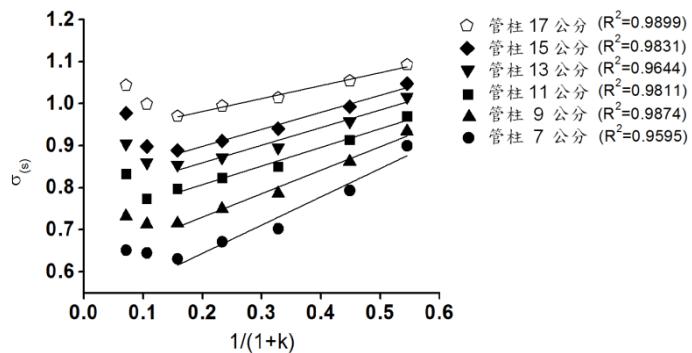
，三管柱在最大 k 值條件相對於 k 值最小條件下，其管內外時圖之波寬比例最大差異甚至可達10倍以上，然而管內空圖波寬比例差異卻在1.5倍以內，甚至在填充效率最佳的管柱1中管內空圖波寬比例皆小於1；根據以上結果便可看出，樣品在管柱中，不管滯留時間差異有多顯著，其管內空圖之波峰的變化並沒有如管內時圖以及管外時圖所得之明顯趨勢： k 值越大，波形越趨於矮寬。即表示由一般管柱外偵測器所獲得之管外時圖所表現之波峰寬度趨勢，並不能直接反應樣品在管柱中真正的空間波峰寬度。此一現象在前已提及，在Pai文獻[2-3]中指出：以一般單通道偵測器所得的紀錄波形，並非樣品在層析管柱中的真實空間分佈，進而使得測量結果與樣品在管柱內瞬間空間分佈有一定差異，此差異稱為空時差異，且會發生於層析系統中[8]。

4.3.2.2 樣品注入管柱入口端之波峰壓縮效應

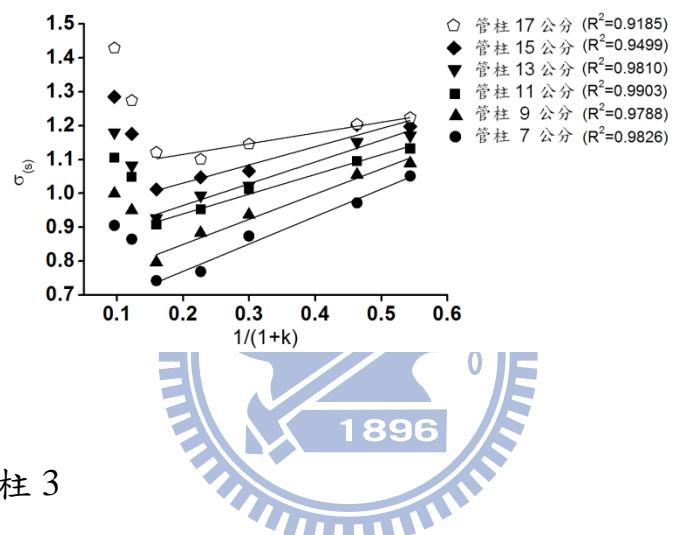
利用管柱3對樣品進行等位沖提，可探討樣品注入至管柱入口端之空間波峰寬度，從其管內空圖(圖4-5)可看出，在管柱1公分處， k 值越大，樣品之空間波峰寬度越窄，反之， k 值越小，樣品之空間波峰寬度越寬之情形。此一現象原因為：樣品在注入填充固定相的管柱時，受到固定相滯留的程度不同；當 k 值越大，樣品受固定相滯留作用力較強，故其瞬間之空間分佈較窄，可想像成樣品初注入至填有固定相的管柱時，其受固定相「壓縮」的程度較大，使得其空間波峰寬

度較窄；根據文獻指出[11-13]，樣品在注入填充固定相的層析管柱後，其瞬間在空間上的分佈範圍會根據樣品受固定相之滯留程度而有所不同，在管柱入口端，不同 k 值的樣品其空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 會與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比。本研究中，使用管柱3進行等位沖提實驗中，在管柱1公分處，實驗數據顯示出，不同 k 值的樣品其空間波峰寬度與 $\frac{1}{1+k}$ 大體成正比之線性關係($R^2=0.9684$)，見圖4-10(c)，然而位於管柱3公分處，在 k 值較大之條件則有偏離線性之情形，甚至在管柱末端13公分處，空間波峰寬度與 $\frac{1}{1+k}$ 已趨向成反比之趨勢；此種波峰變寬現象可透過Van Deemter equation所提出之波峰變寬成因解釋，一般而言， k 值越大，在沖提過程中產生之波峰變寬現象越明顯，故在本實驗中，使用管柱3進行等位沖提條件下，樣品注入填充固定相的管柱中，其空間波峰寬度受起始端波峰壓縮效應之影響，而隨著樣品在管柱內持續位移，導致 k 值較大的樣品，受滯留效應等因素使其空間波峰寬度變得較寬之情形。亦可由文獻[12]所提出之空間波峰變寬成因解釋；樣品在層析管柱中位移過程中，其空間波峰寬度之變化至少受三種力量所影響：第一，樣品在注入管柱的起始狀態；第二，樣品受擴張效應之影響，第三樣品受滯留效應所影響。故在本實驗中，使用玻璃管柱之等位沖提條件下，樣品注入至填充有固定相的管柱中，其空間波峰寬度受最初起始狀態之影響，而隨著樣品在管柱內持續位移，受另

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

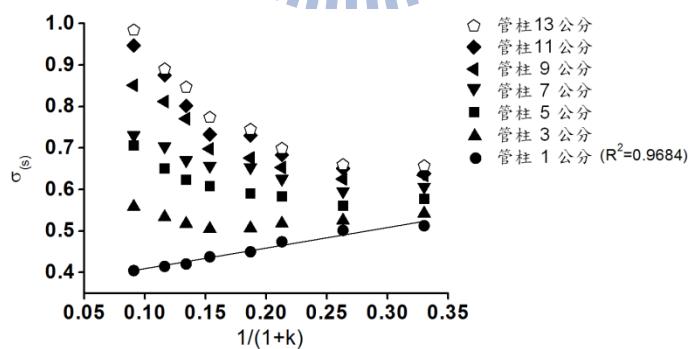


圖 4-10 三管柱在等位沖提實驗中，不同 k 值的條件以 $1/(1+k)$ 對空間
波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 作圖

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

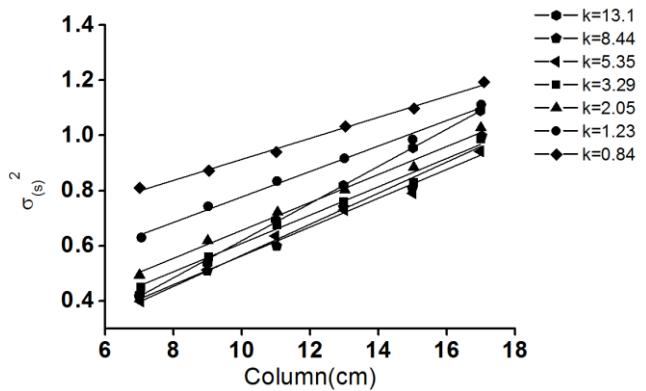
外兩種力量影響漸趨增加，導致 k 值較大的樣品，其在管柱內停留時間較長，其空間波峰寬度變得較寬之情形。

而使用管柱1、2，雖然無法觀測到樣品在注入管柱入口端之空間波峰，但可從樣品位移至管柱7公分處，看出兩管柱在 k 值較小之條件中，其空間波峰寬度與 $\frac{1}{1+k}$ 亦有大體成正比之線性關係(圖4-10(a)、(b))，而當 k 值較大之條件下，由於樣品在管柱中空間波峰寬度變寬程度較為明顯，故樣品位移至管柱7公分處，已無法觀測出入口端之壓縮效應；然而管柱1、2從管柱7公分位移至管柱17公分，其變化趨勢幾乎相同，此變化趨勢與管柱3不同之原因為，管柱1、2為採用高壓填充方式，其填充效率相較於以自行填充的管柱3較佳，故在填充效率較佳的管柱1、2中，樣品之波峰變寬程度較小，且由於樣品在管柱1、2中平均停留時間亦較管柱3短，故其表現出之空間波峰寬度之變化情形則不同於管柱3。

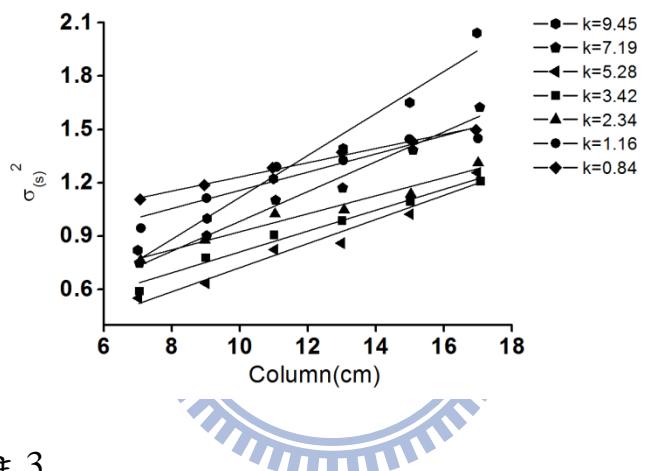
4.3.2.3 波峰寬度對應管柱位置

利用三管柱測量樣品在不同移動相下進行等位沖提，以空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}^2$ ，對於管柱位置作圖，所得結果如圖 4-11 與表 4-4 所示，所獲得之圖形，在使用不同移動相，即在不同 k 值條件中，其所得曲線有交錯情形產生。而利用三管柱測量樣品在不同移動相下進行等位沖提，以時間波峰寬度 $\sigma_{(t)}^2$ ，對於管柱位置作圖，所得結果如圖 4-12 與

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

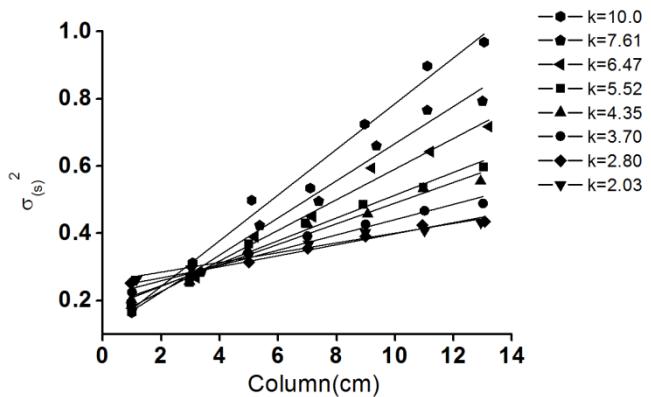


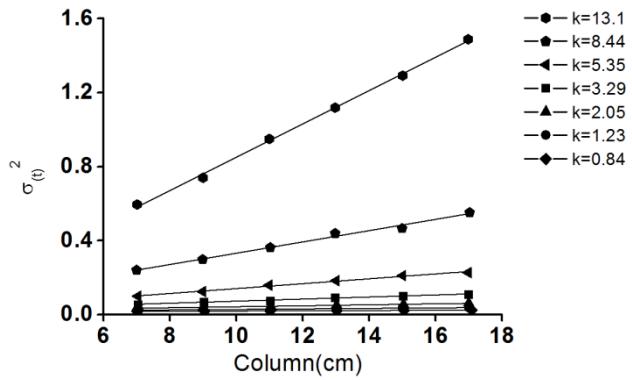
圖 4-11 三管柱在等位沖提實驗中，以空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}^2$ ，對於管柱位置作圖
註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

表 4-4 等位沖提實驗中，三管柱在不同管柱位置之空間波峰寬度

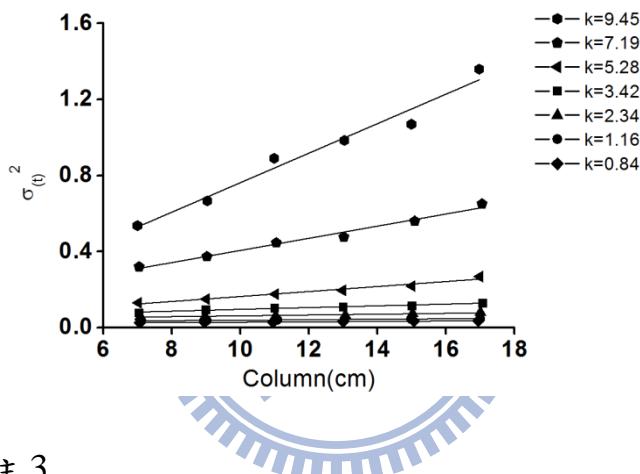
		管柱 1		$\sigma_{(s)}^2(\text{cm}^2)$			
管柱位置		k 值					
(cm)	0.84	1.23	2.05	3.29	5.34	8.44	13.1
7	0.810	0.630	0.494	0.451	0.398	0.416	0.425
9	0.873	0.743	0.619	0.562	0.512	0.509	0.536
11	0.940	0.835	0.722	0.677	0.636	0.599	0.694
13	1.032	0.917	0.802	0.761	0.729	0.740	0.819
15	1.097	0.985	0.885	0.830	0.790	0.807	0.955
17	1.194	1.112	1.028	0.989	0.942	0.999	1.090
		管柱 2		$\sigma_{(s)}^2(\text{cm}^2)$			
管柱位置		k 值					
(cm)	0.84	1.16	2.34	3.42	5.28	7.19	9.45
7	1.106	0.945	0.764	0.592	0.552	0.748	0.820
9	1.186	1.114	0.878	0.780	0.635	0.902	0.999
11	1.283	1.290	1.025	0.909	0.824	1.102	1.222
13	1.371	1.326	1.047	0.988	0.860	1.171	1.393
15	1.434	1.446	1.137	1.097	1.024	1.383	1.651
17	1.498	1.450	1.312	1.211	1.257	1.624	2.042
		管柱 3		$\sigma_{(s)}^2(\text{cm}^2)$			
管柱位置		k 值					
(cm)	2.03	2.80	3.70	4.35	5.52	6.47	7.61
1	0.263	0.251	0.225	0.203	0.192	0.177	0.172
3	0.294	0.276	0.269	0.257	0.255	0.268	0.285
5	0.334	0.314	0.340	0.349	0.370	0.389	0.423
7	0.368	0.355	0.391	0.427	0.431	0.449	0.495
9	0.402	0.391	0.427	0.457	0.487	0.594	0.660
11	0.407	0.424	0.467	0.533	0.537	0.643	0.766
13	0.432	0.435	0.489	0.555	0.599	0.717	0.793

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

(a)管柱 1



(b)管柱 2



(c)管柱 3

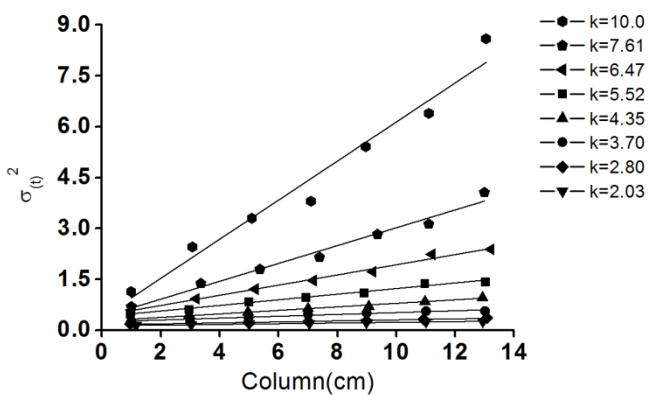


圖 4-12 三管柱在等位沖提實驗中，以時間波峰寬度 $\sigma_{(t)}^2$ ，對於管柱位置作圖
註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

表 4-5 等位沖提實驗中，三管柱在不同管柱位置之時間波峰寬度

		$\sigma_{(t)}^2(\text{min}^2)$						
管柱位置		k 值						
(cm)	0.84	1.23	2.05	3.29	5.34	8.44	13.1	
7	0.0182	0.0245	0.0361	0.0559	0.0995	0.240	0.595	
9	0.0187	0.0267	0.0402	0.0692	0.124	0.298	0.740	
11	0.0195	0.0287	0.0429	0.0759	0.159	0.363	0.950	
13	0.0216	0.0324	0.0510	0.0920	0.183	0.439	1.119	
15	0.0223	0.0361	0.0555	0.101	0.211	0.466	1.292	
17	0.0247	0.0373	0.0623	0.110	0.227	0.552	1.488	

		$\sigma_{(t)}^2(\text{min}^2)$						
管柱位置		k 值						
(cm)	0.84	1.16	2.34	3.42	5.28	7.19	9.45	
7	0.0253	0.0344	0.0585	0.0790	0.131	0.320	0.536	
9	0.0277	0.0377	0.0596	0.0943	0.150	0.374	0.666	
11	0.0283	0.0411	0.0619	0.103	0.176	0.446	0.890	
13	0.0314	0.0437	0.0643	0.111	0.196	0.476	0.984	
15	0.0350	0.0455	0.0736	0.116	0.218	0.560	1.069	
17	0.0350	0.0466	0.0801	0.130	0.268	0.651	1.359	

		$\sigma_{(t)}^2(\text{min}^2)$						
管柱位置		k 值						
(cm)	2.03	2.80	3.70	4.35	5.52	6.47	7.61	10.0
1	0.137	0.187	0.258	0.310	0.478	0.597	0.695	1.139
3	0.165	0.205	0.330	0.461	0.625	0.927	1.380	2.456
5	0.188	0.217	0.374	0.538	0.842	1.211	1.798	3.299
7	0.197	0.255	0.467	0.643	0.976	1.465	2.152	3.802
9	0.227	0.273	0.509	0.701	1.099	1.723	2.825	5.410
11	0.247	0.324	0.565	0.846	1.383	2.238	3.125	6.392
13	0.259	0.366	0.567	0.964	1.436	2.384	4.061	8.589

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中

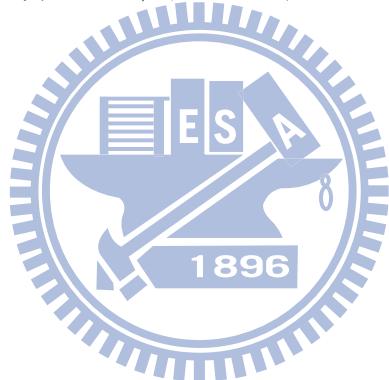
表 4-5 所示，可看出所獲得圖形之曲線皆無交錯情形發生。

在圖4-11中所獲得圖形之曲線會有交錯情形產生，此一原因為，樣品初注入填充有固定相的管柱中，其空間波峰寬度受起始端波峰壓縮效應之影響，而隨著樣品在管柱內持續位移，導致 k 值較大的樣品，受滯留效應等因素使其空間波峰寬度變得較寬之情形。以三管柱中填充效率最佳的管柱1之結果(圖4-11(a))為例，在 $k=0.84$ 條件下，由於樣品注入管柱時，受固定相壓縮情形較小，故在管柱7公分處之 $\sigma_{(s)}^2$ 值較其他實驗條件大，且由於 k 值較小之條件下，其在沖提過程中受滯留效應等因素影響較小，使得其空間波峰寬度變寬程度較小，因此其在管柱中之 $\sigma_{(s)}^2$ 變化幅度較小，故在圖中曲線斜率較小，而在 $k=13.1$ 之條件下，由於其在初注入管柱時，受固定相壓縮力量較大，故在管柱7公分處之 $\sigma_{(s)}^2$ 值較小，且由於 k 值較大之條件下其空間波峰變寬程度較大，因此其 $\sigma_{(s)}^2$ 變化幅度較大，故與其他 k 值條件之曲線產生交錯之情形。而在填充效率較差的管柱2，樣品在管柱中波峰變寬之程度會較管柱1明顯，主導樣品在管柱中 $\sigma_{(s)}^2$ 之變寬因素較多，因此可從圖4-11(b)、(c)看出各條件 k 值之圖形曲線交錯點較多，在填充效率最差的管柱3中，在沖提過程中，樣品在管柱1公分處，受固定相壓縮力量影響，故在 k 值越大之條件其 $\sigma_{(s)}^2$ 值較小，而隨著樣品在管柱內持續位移， k 值較大之條件下其空間波峰變寬程度較大，導致 $\sigma_{(s)}^2$ 值隨 k 值增

加，故其變化幅度有增加之情形。

然而在圖4-12中所獲得圖形之曲線則無交錯情形產生，此原因為時間波峰寬度主要肇因於樣品分子流經某一固定偵測點之速率而得，故無法反映出樣品在注入管柱入口端時受波峰壓縮效應之影響，因此所獲得圖形之曲線皆無交錯情形產生。

綜合以上討論，可藉由簡單示意圖描述樣品在層析管柱中之流動情況，由圖4-13可描述樣品在填充效率較差的管柱3之流動情形，而可由圖4-14預測樣品在填充效率較佳的管柱之流動情形。



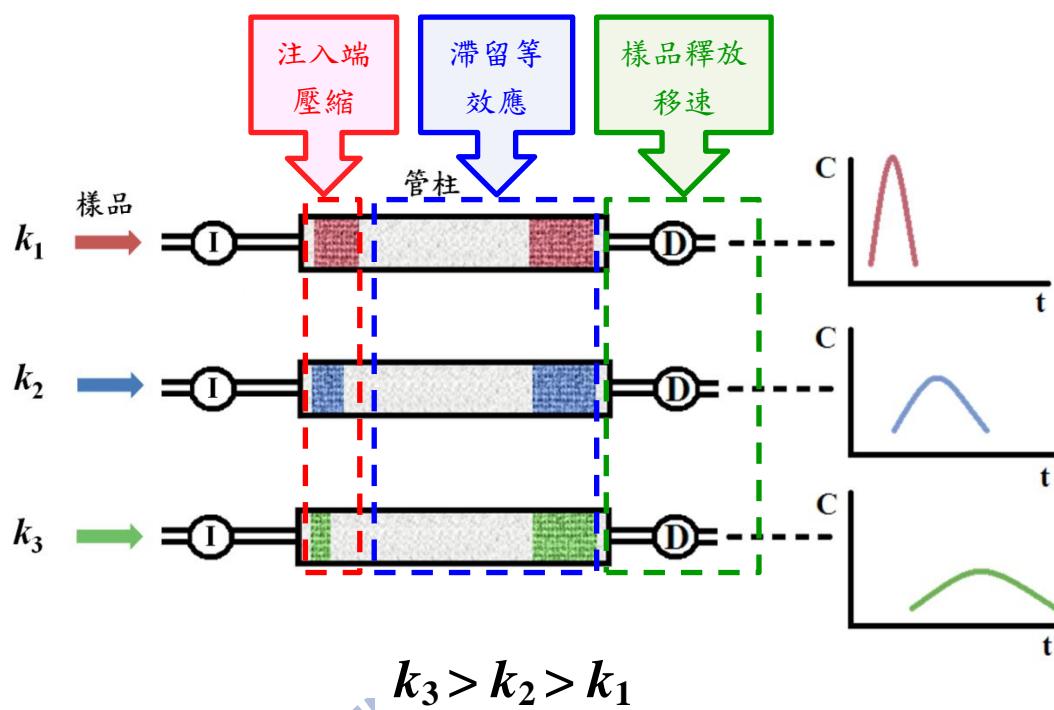


圖 4-13 樣品在填充效率較差之管柱流動情形示意圖

I 表進樣閥門，D 表管外偵測器，右方圖譜則為管外偵測器所收集到的樣品管外時圖。以填充效率比較差的管柱所獲得的結果，可透過三個不同 k 值的條件為例；首先樣品初注入管柱時，受到注入端的壓縮效應，使得 k 值較大的條件下，受到固定相壓縮力量較大，故波峰寬度較窄，然而，隨著樣品受移動相沖提往管柱後端位移，受到滯留等效應影響使得波峰寬度變寬，最後，樣品流析出管柱之際，受到樣品本身移速不同，影響樣品釋放出管柱外抵達偵測器的速度，進而影響其在管外時圖的表現。在 k 值大的條件下，樣品在管內之移速較慢，故在管外時圖表現的波峰較為矮胖。

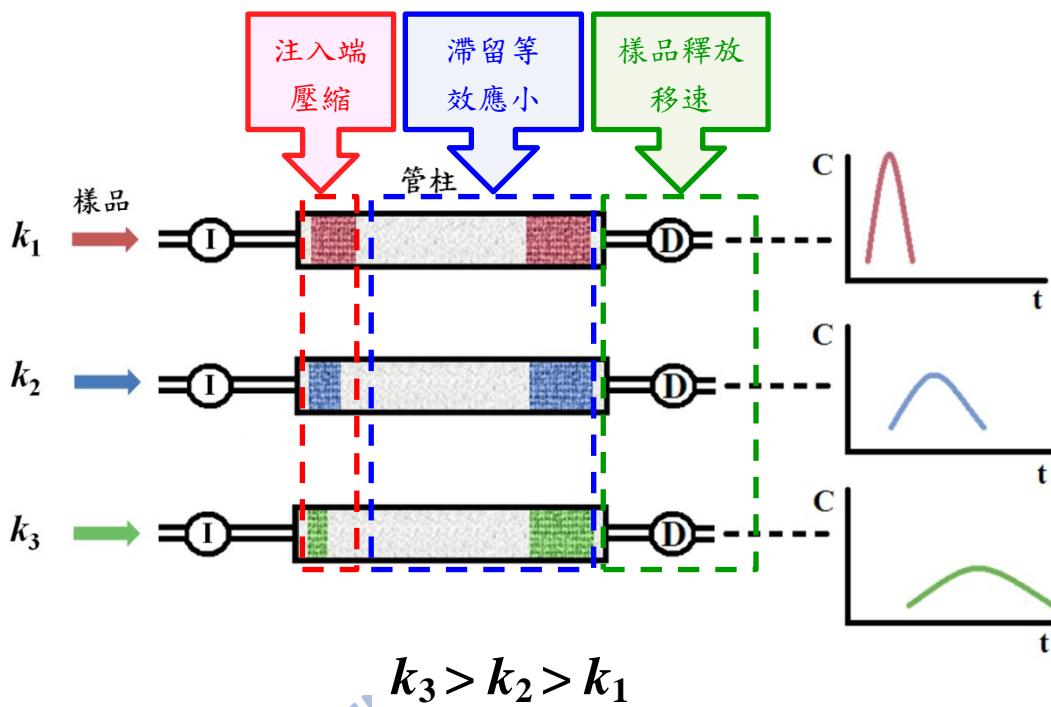


圖 4-14 樣品在填充效率較佳之管柱流動情形示意圖

I 表進樣閥門，D 表管外偵測器，右方圖譜則為管外偵測器所收集到的樣品管外時圖。以填充效率比較佳的管柱所獲得的結果，可透過三個不同 k 值的條件為例；首先樣品初注入管柱時，受到注入端的壓縮效應，使得 k 值較大的條件下，受到固定相壓縮力量較大，故波峰寬度較窄，然而在填充效率較佳的管柱中，樣品在管柱中受滯留等效應影響較小，因此波峰寬度變寬程度不大，導致樣品位移到管柱末端時，在 k 值較大的條件下，樣品波峰寬度還是呈現較窄的情況，與管柱外偵測器所得到的結果，為相反的趨勢，因此可以得知，從樣品在管柱外得到的層析時圖來回推樣品在管柱中的流動情形，可能會有所錯誤產生。

第五章 結果與討論（二）－非線性層析之波峰壓縮效應

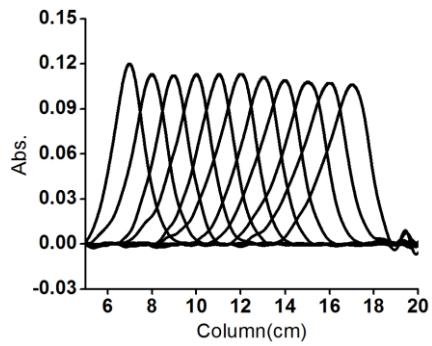
5.1 梯度沖提結果

首先在等位沖提實驗中，樣品分子之移動速度可透過 WCD 系統所獲得之遷移路徑圖與管外時圖計算而得，並在本研究 4.3 節指出，由一般管柱外偵測器所獲得之管外時圖，即可代表樣品在管柱中的移動速度。在梯度沖提模式下[18,61,101]，由於移動相之組成並非固定，在先使用溶劑強度較弱之移動相再變換為強度較強之移動相時，其 k 值亦會隨著沖提時間改變，且有波峰壓縮效應現象產生，因此樣品在此種模式下，其在管柱中之滯留因子 k 值，則應視為一平均值 \bar{k} ，而非樣品在個別移動相在等位沖提情況下所得之 k 值，由於波峰壓縮效應[61]，在梯度沖提時，變換為溶劑強度較強之移動相時，其所表現之 k 值，相較於在等位沖提模式下，使用同樣溶劑強度之移動相所獲得之 k 值較大，然而欲正確計算梯度沖提模式下所表現之平均 k 值，需要考量許多參數，以及應用到許多繁瑣之公式，且在此類型研究上仍有許多爭議點，在文獻中[10]，利用兩移動相在等位沖提下之個別 k 值所計算出之樣品移速則會有所誤差，因此在本實驗中，將使用 WCD 系統獲得樣品在管柱內變換移動相所得之平均移動速率，並計算出其差異值。以下將探討兩梯度沖提實驗之結果，並說明計算理論板數以及樣品移速方式。

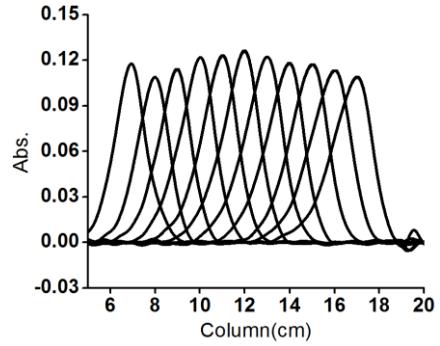
5.1.1 階梯式沖提

於階梯式沖提模式之4組實驗中，以WCD系統觀察樣品位移至管柱位置7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17公分處的管內空圖(圖5-1)，可看出樣品波高在9公分處開始逐漸變高，而波峰變寬程度亦有下降之趨勢，即可看出波峰壓縮效應之現象，在實驗1中，因前後移動相極性差異最小，故其波峰壓縮程度較不明顯。從管內時圖(圖5-2)結果顯示，將移動相變換為溶劑強度較強之移動相後，樣品在管柱內之移速增加，故在管內時圖可明顯看出樣品之波峰寬度變小，且所變換之第二移動相的溶劑強度，由實驗1至4逐漸變強，故在實驗4中，因移動相極性差異最大，即前後兩移動相對樣品的移動速度差值越大，其波峰壓縮程度最為明顯，因此從圖5-2(d)可觀察到變換成溶劑強度最強之第二移動相，在管柱位置7公分處之時圖波峰，產生不規則之波形，在圖5-2(c)於管柱位置9公分處之時圖波峰，亦可觀察到此種不規則波形產生，此不規則波形產生發生原因為在樣品受到後端溶劑強度較強之移動相沖提時所造成之波峰變化，即變換移動相使得樣品移速增加所導致。於文獻[3,102-103]有提及此類相關研究，其中在文獻[3]，利用所發展之郵包理論(Parcel model)探討層析中由於時間扭曲效應(temporal distortion effect)造成各類型不對稱波形產生；文獻[102-103]指出，在等位沖提情況下，當選用之移動相與溶解樣

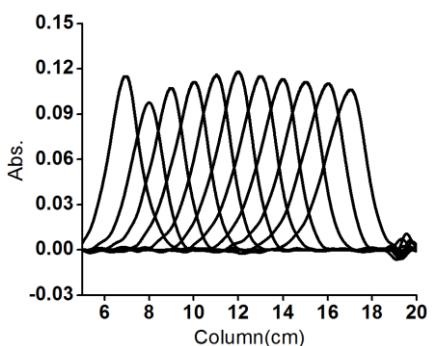
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

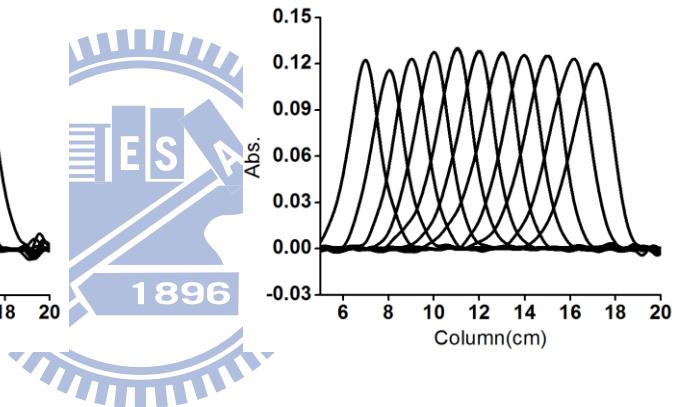
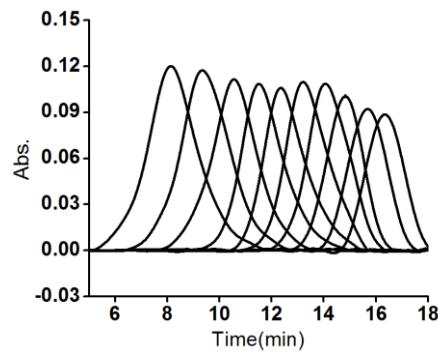


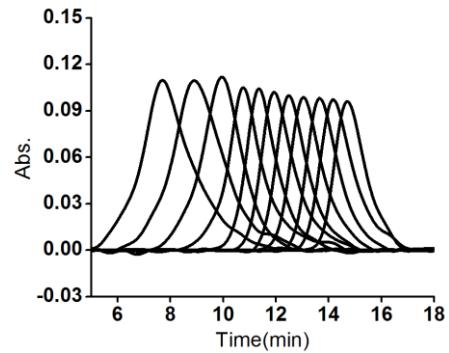
圖 5-1 階梯式沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、8、9、10、11、12、
13、14、15、16、17 公分處之管內空圖結果

註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

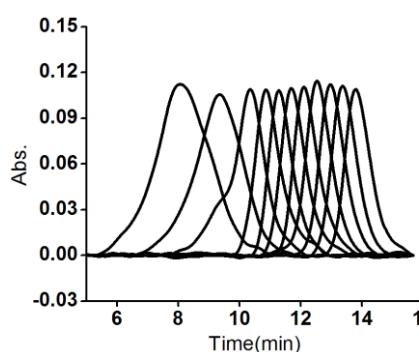
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

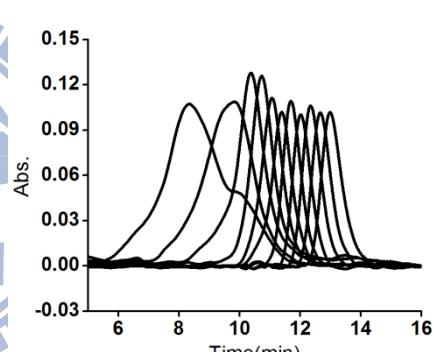


圖 5-2 階梯式沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 公分處之管內時圖結果

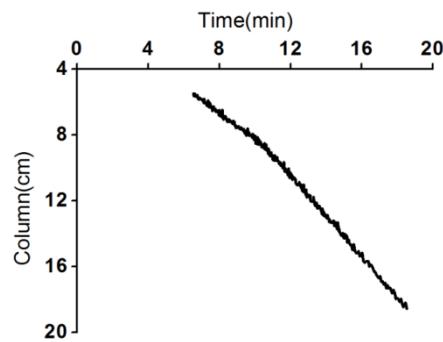
註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

文獻[102-103]指出，在等位沖提情況下，當選用之移動相與溶解樣品之溶劑，兩溶劑之黏度差異過大，會造成不對稱波形產生，原因為當移動相之黏度與溶解樣品之溶劑差異極大時，在沖提過程中，兩不同黏度之流體接觸時其交界處會產生不穩定之情況，進而使得其波形產生變化。而變換移動相產生之黏度差異，亦可反映在樣品移速之改變，即變換為極性較小，黏度較低之第二移動相，樣品在管柱中之移速會提升。樣品移速之改變，透過4組實驗之遷移路徑圖(圖5-3)可看出；在遷移曲線斜率變化處，也就是樣品開始受變換的第二移動相所影響，其移速開始變化的 положение, 約在管柱9公分位置處，且變換後之移動相與原移動相移速差異越大，其在遷移路徑圖中所變化程度即越明顯，而其中實驗1(圖5-3(a))中因為移動相移速差異較小，因此在管內空圖與遷移路徑圖中變化程度較不明顯。

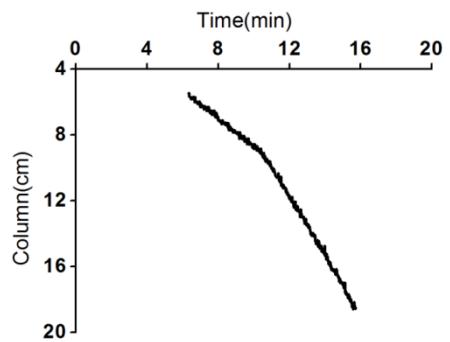
5.1.2 連續式沖提

於連續式沖提模式之4組實驗中，以WCD系統觀察樣品位移至管柱位置7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17公分處的管內空圖(圖5-4)所示，可看出樣品波高在9公分處開始逐漸變高，而波峰變寬程度亦有稍微下降之趨勢，然而此處改變之幅度較無階梯式沖提模式明顯。從管內時圖(圖5-5)結果顯示，將移動相變換為溶劑強度較強之移動相後，樣品在管柱內之移速增加，故在管內時圖可明顯看出樣

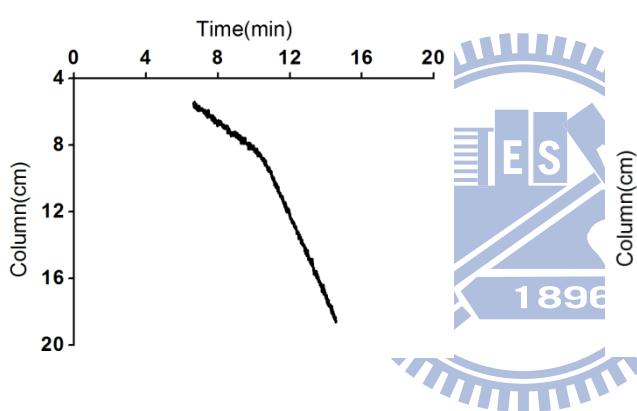
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

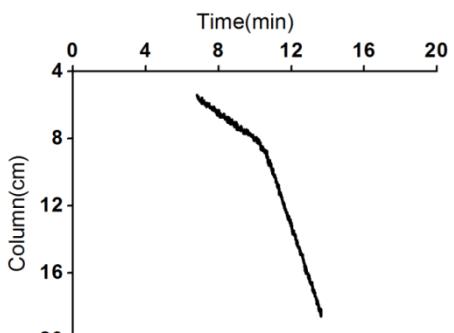
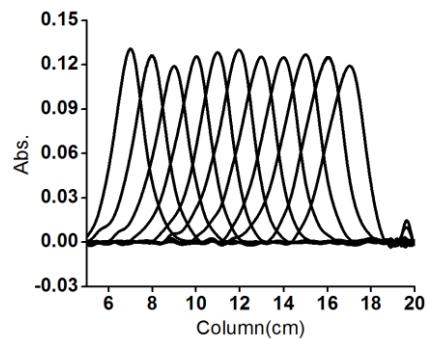


圖 5-3 階梯式沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖

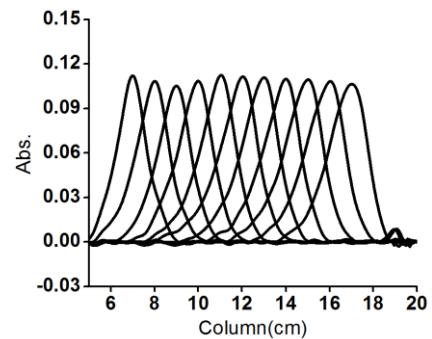
樣品開始受第二移動相影響，移速開始變化的位罝，約在 9 cm 處

註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

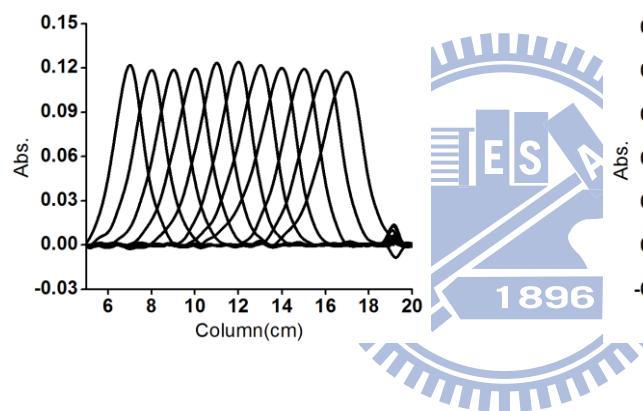
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

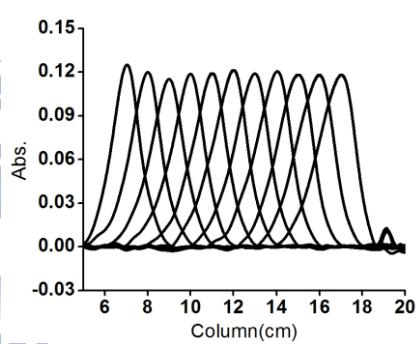
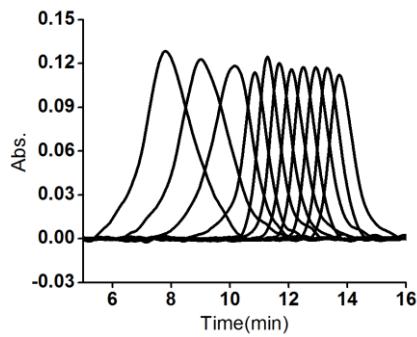
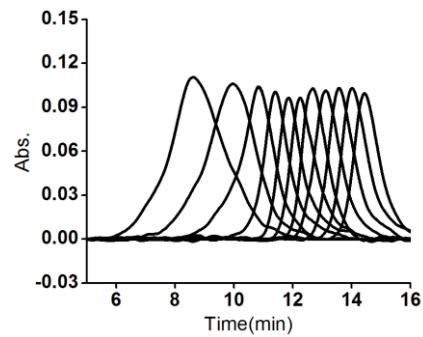


圖 5-4 連續式沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、8、9、10、11、12、
13、14、15、16、17 公分處之管內空圖結果
註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

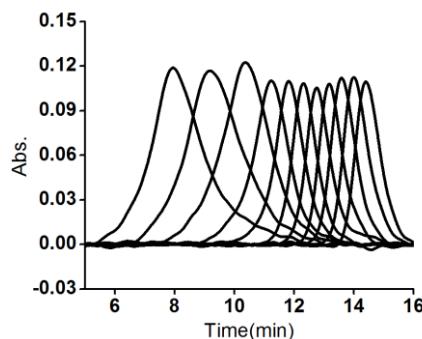
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

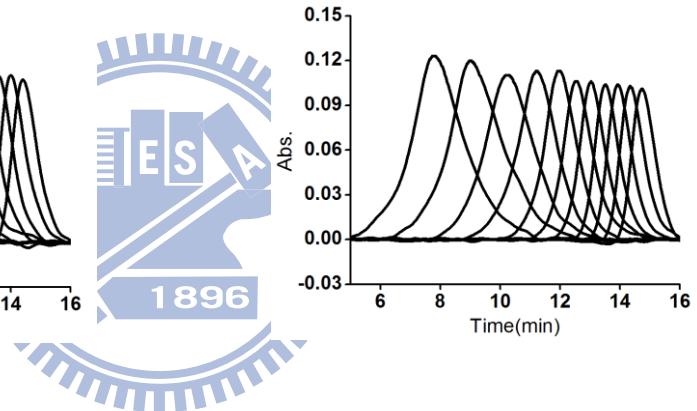


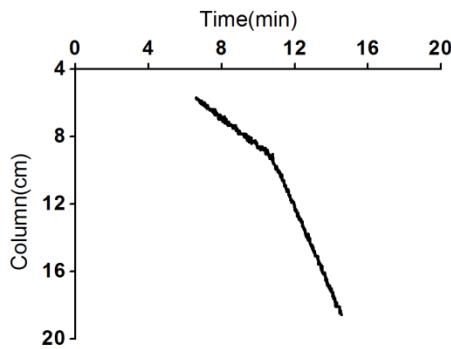
圖 5-5 連續式沖提實驗中，當樣品抵達管柱約 7、8、9、10、11、12、
13、14、15、16、17 公分處之管內時圖結果
註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

品之波峰寬度變小，然而由於移動相之組成為隨時間作線性改變，移動相在管柱中之移速變化亦較小，故管內時圖並無如階梯式沖提模式中產生不規則波形。樣品移速之改變，透過 4 組實驗之遷移路徑圖(圖 5-6)可看出；在遷移曲線斜率變化處，也就是樣品開始受變換之第二移動相所影響，其移速開始變化的位置，約在管柱 9 公分位置處，於連續式沖提模式中，為隨時間將移動相成分以線性變換成第二移動相，而不像階梯式沖提模式中瞬間變換成第二移動相，故其在遷移路徑圖中，移速改變點較不明顯，且在實驗 4 中(圖 5-6(d))，由於變換至第二移動相所需時間較長，故可看出其遷移曲線轉折點較不明顯，且稍呈圓弧狀改變，非像階梯式沖提中呈現折線改變情形。

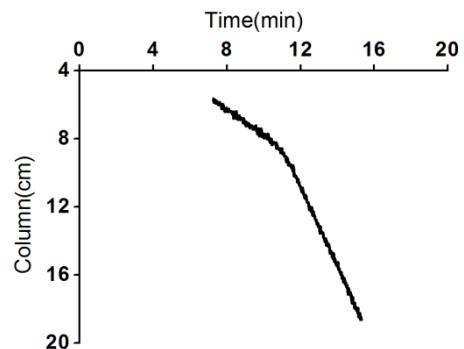
5.2 理論板數討論

使用式2-7與式2-9做理論板數之運算，是建構在「樣品移動速度固定」之原則下發展而成的，但在非線性層析系統中由於移動相組成隨時時間改變，故樣品會隨著不同時間下受到不同溶劑強度影響，而使樣品在管柱中之移動速度有所改變，導致使用式2-7與式2-9計算理論板數時會有極大誤差。故在本實驗室先前研究中[9-10]，提出較正確用於計算非線性層析之理論板數公式，所提出的公式 N_t^* 及各項參數如下：

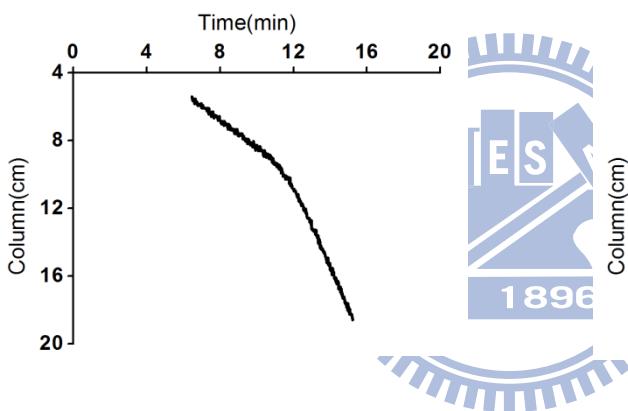
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

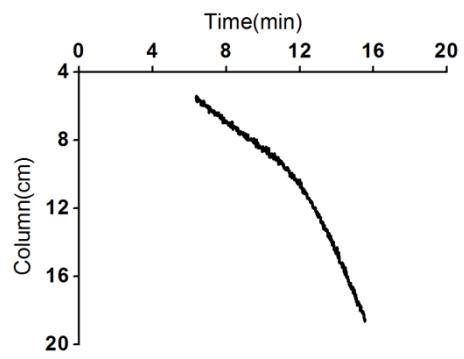


圖 5-6 連續式沖提實驗中，樣品之遷移路徑圖

樣品開始受第二移動相影響，移速開始變化的位罝，約在 9 cm 處

註：詳細實驗條件可參考圖 3-8

$$N_t^* = N_t \times \left(\frac{L}{t_R \times u_m} \right)^2 \quad (5-1)$$

N_t^* ：修正後理論板數

N ：以時間單位計算所得之理論板數， $N_t = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2(t)}} \right)^2$

L ：管柱開始有固定相到偵測位置長度

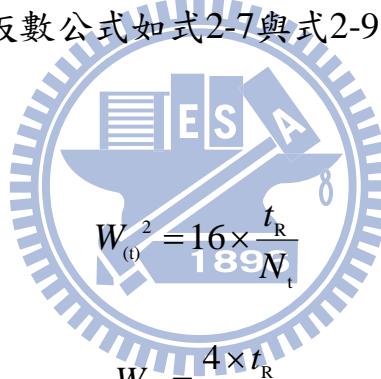
t_R ：樣品滯留時間

u_m ：樣品抵達偵測位置時之流速

推導過程如下：

以時間單位計算理論板數公式如式2-7與式2-9，將式2-7作轉換得式

5-2與式5-3



$$W_{(t)}^2 = \frac{16 \times t_R}{189 N_t} \quad (5-2)$$

$$W_{(t)} = \frac{4 \times t_R}{\sqrt{N_t}} \quad (5-3)$$

由於使用式2-2所計算出空間單位的理論板數值 N 才是正確的，因此需將時圖波峰寬度轉換為空圖波峰寬度，使用式5-4與式5-5，可將時圖波寬轉換成空圖波寬，

$$\sigma_{(t)} = \frac{\sigma_{(s)}}{u_m} \quad (5-4)$$

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

將式5-5代入式5-3，可得式5-6

$$W_{(s)} = \frac{4 \times t_R}{\sqrt{N_t}} \times u_m \quad (5-6)$$

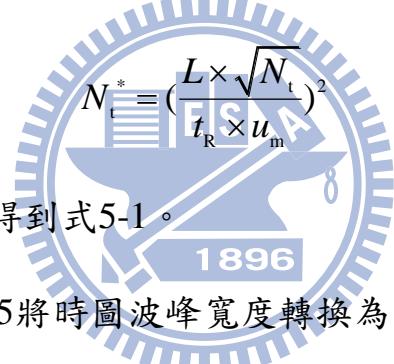
然而在高斯波形下，空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與波峰寬度 $W_{(s)}$ 有如式 5-7 之關係

$$W_{(s)} = 4\sigma_{(s)} \quad (5-7)$$

將式 5-7 代入式 5-6，可得式 5-8

$$\sigma_{(s)} = \frac{t_R \times u_m}{\sqrt{N_t}} \quad (5-8)$$

如此得到空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ ，將其代入式 2-2，可得式 5-9



$$N_t^* = \left(\frac{L \times \sqrt{N_t}}{t_R \times u_m} \right)^2 \quad (5-9)$$

將上式做整理，即可得到式 5-1。

使用式 5-4 與式 5-5 將時圖波峰寬度轉換為空圖波峰寬度之方式，雖非正確之轉換方式，然而在本實驗中，樣品僅在 25 公分長之管柱(管柱 1)位移，且樣品在管柱停留時間較短，波峰變寬程度較不明顯，故此一轉換方式產生之誤差較小，然而若使用長度較長之管柱，即樣品位移範圍較大，或使用填充效率差之管柱，樣品在管柱中之波峰變寬程度較明顯時，則不能用此方式作轉換。

5.3 樣品移速計算

當在進行梯度沖提時，由於移動相組成之改變，使得樣品在管柱

中之移動速率亦隨不同溶劑強度之移動相沖提而改變，而不像在等位沖提中為一固定值；在梯度沖提中，在使用溶劑強度較強之移動相之前，通常會使用一溶劑強度較弱的移動相沖提一段時間，樣品在此段時間中移動速率不變，然而，在變換移動相開始之際，極性不同之移動相接觸時會發生波峰壓縮效應，故在此變動不穩定區域樣品之移動速度則難以計算，然而本實驗可透過 WCD 系統獲得樣品之遷移路徑圖，並可從中計算出樣品在管柱中變換移動相所得平均移動速度，將與在第 4 章所完成之等位沖提實驗中，個別移動相在管外時圖中所獲得之移動速度(表 5-1)比較，並計算其產生之差異值。

表 5-1 等位沖提實驗中，在不同移動相下的樣品移速

編號	移動相比例(V/V) 甲醇(%)：去離子水(%)	1896	樣品移速 $u_m(\text{cm min}^{-1})$
1	99 : 01		6.94
2	95 : 05		5.71
3	90 : 10		4.17
4	85 : 15		2.97
5	80 : 20		2.01
6	75 : 25		1.35
7	70 : 30		0.90

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中，所使用管柱為管柱 1。

5.3.1 階梯式沖提樣品移速計算

階梯式沖提，為瞬間將移動相變換成為溶劑強度較強之移動相，可從 WCD 系統所獲得之遷移路徑圖與管內空時圖數據，得知樣品位

移至管柱 9 公分處發生波峰壓縮效應。因此可以管柱 9 公分為界線，將樣品位移至 9 公分前之樣品移速，視為起始移動相在等位沖提時之移速，然而樣品位移至 9 公分後的樣品移速，則以變換後的第二移動相在等位沖提之移速表示，利用此方式計算 4 組階梯式沖提實驗下，樣品在管柱不同位置之移速，並與從 WCD 系統獲得樣品由管柱 9 公分位移至 17 公分所得平均移動速度比較，計算兩者之差異值，數據列於表 5-2 中。於表中可看出，在實驗 4 中，其所觀察到之差異最大，此原因為前述所提及，當變換後移動相之溶劑強度與起始移動相差異最大時，其移速差異最大，波峰壓縮效應亦最強，因此使得樣品在管柱中之移速會與在等位沖提中之相同移動相差異最大。根據表 5-2 亦可發現，4 組實驗中，樣品在管柱中表現之平均移動速率 \bar{u}_m ，皆小於第二移動相在等位沖提下計算所得之移速 u_m ，根據式 2-13，可知樣品移速與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比，即樣品移速與 k 值有反比之關係，因此當 $\bar{u}_m < u_m$ ，即表示樣品在管柱中所表現之 $\bar{k} > k$ ，符合在文獻中提到[58]，由於波峰壓縮效應，因此在梯度沖提模式下變換為溶劑強度較強之移動相時，其所表現之平均 k 值，大於在等位沖提模式使用同樣溶劑強度之移動相所獲得之 k 值。

5.3.2 連續式沖提樣品移速計算

連續式沖提，為將移動相隨時間作線性變換成溶劑強度較強之移

表 5-2 階梯式沖提實驗中，樣品在管柱不同位置之移動速度與樣品在管柱中之平均移動速度，以及差異值計算

管柱位置(cm)	實驗 1	實驗 2	實驗 3	實驗 4
7	0.90	0.90	0.90	0.90
8	0.90	0.90	0.90	0.90
9	1.35	2.01	2.97	4.17
10	1.35	2.01	2.97	4.17
11	1.35	2.01	2.97	4.17
12	1.35	2.01	2.97	4.17
13	1.35	2.01	2.97	4.17
14	1.35	2.01	2.97	4.17
15	1.35	2.01	2.97	4.17
16	1.35	2.01	2.97	4.17
17	1.35	2.01	2.97	4.17
樣品平均移速 \bar{u}_m (cm min ⁻¹)	1.23	1.81	2.40	3.18
差異值(%)	9%	10%	19%	24%

註：差異值為 4 組階梯式沖提模式第二移動相在等位沖提之樣品移速

樣品移速 u_m 與由 WCD 系統所獲得之樣品平均移速 \bar{u}_m 之差異值，計

$$\text{算方式如右式所示：} \text{差異值} = \frac{|\bar{u}_m - u_m|}{\bar{u}_m} \times 100\%$$

動相，可從 WCD 系統所獲得之遷移路徑圖中與管內空時圖數據，得知在管柱 9 公分處發生波峰壓縮效應。因此可以管柱 9 公分為界線，將樣品位移至 9 公分前之樣品移速，視為起始移動相在等位沖提時之移速，然而樣品位移至 9 公分後的樣品移速，則隨時間以線性變換成第二移動相，且 4 組實驗條換至第二移動相所需時間亦不相同，由於壓縮現象發生在管柱 9 公分處，且可透過 WCD 系統獲得樣品在抵達管柱位置所需時間，因此將樣品抵達管柱 9 公分之時間 t_9 視為一基準值，樣品抵達管柱 10 公分所需時間值則為 t_{10} ，以實驗 4 為例，在 3.0 分鐘後變換成第二移動相，因此若時間 $(t_{10}-t_9)=\Delta t$ ，當 $\Delta t < 3.0$ ，表示尚未變換至第二移動相，可根據梯形公式比例換算得此時之樣品移速。若 $\Delta t > 3.0$ ，表已變換至第二移動相，其樣品移速則以第二移動相在等位沖提條件中所計算之移速代表。利用此方式計算 4 組連續式沖提條件下，樣品在管柱不同位置之移速，並與從 WCD 系統獲得樣品由管柱 12 公分位移至 17 公分所得平均移動速度比較，計算兩者差異值，數據列於表 5-3 中。此處由 12 公分處開始計算原因為，因為在連續式沖提模式下，移動相隨時間作線性變化，雖可得知壓縮現象發生於 9 公分處，然而此種緩慢變換移動相之方式，使得樣品在管柱 9~11 公分處中之遷移曲線斜率變化非線性關係，即樣品在 9~11 公分處其移速為隨時間變化，非一固定值，故從管柱 12 公分處開始計算移速。

表 5-3 連續式沖提實驗中，樣品在管柱不同位置之移動速度與樣品在管柱中之平均移動速度，以及差異值計算

管柱位置(cm)	實驗 1	實驗 2	實驗 3	實驗 4
		樣品移速 $u_m(\text{cm min}^{-1})$		
7	0.90	0.90	0.90	0.90
8	0.90	0.90	0.90	0.90
9	2.97	2.73	2.18	1.75
10	2.97	2.97	2.97	2.49
11	2.97	2.97	2.97	2.97
12	2.97	2.97	2.97	2.97
13	2.97	2.97	2.97	2.97
14	2.97	2.97	2.97	2.97
15	2.97	2.97	2.97	2.97
16	2.97	2.97	2.97	2.97
17	2.97	2.97	2.97	2.97
樣品平均移速 $\bar{u}_m(\text{cm min}^{-1})$	2.44	2.43	2.46	2.47
差異值(%)	22%	22%	21%	20%

註：差異值為 4 組連續式沖提模式第二移動相在等位沖提之樣品移速

樣品移速 u_m 與由 WCD 系統所獲得之樣品平均移速 \bar{u}_m 之差異值，計

$$\text{算方式如右式所示：差異值} = \frac{|\bar{u}_m - u_m|}{\bar{u}_m} \times 100\%$$

較為正確。於表 5-3 中可看出，在實驗 4 中，其所觀察到之差異值最小，此原因由於其變換至第二移動相所需時間較長，因此相較於其他條件下，移動相成分為隨時間緩慢變化，移速變化程度較為緩慢，因此差異值最小，然而連續式沖提計算移速差異值較階梯式較大之原因為，透過 WCD 系統獲得樣品在抵達管柱位置所需時間，WCD 系統數據取樣之時序，與利用幫浦設定梯度沖提模式之時間有些許差異所導致。

5.4 理論板數計算



利用 5.3 節所計算出之樣品移速套用至式 5-9，可以計算出樣品在梯度沖提模式之理論板數 N_t^* ；將等位沖提條件下，樣品在不同移動相下的移動速度 u_m 代入式 5-9，觀察在固定樣品移速中以式 5-9 計算出理論板數 N_t^* ，與由式 2-2 所計算出正確空間單位理論板數 N 值，亦即依照原始定義和實驗數據所得之值，以及由式 2-9 所計算出以時間為單位理論板數 N_t 值，比較三種理論板數之差異值，計算結果於圖 5-7、表 5-4 及表 5-5 中，結果表示，所計算出 N_t^* 值相較於利用時間單位計算出之理論板數 N_t 值，較接近於正確 N 值結果，並可計算出 N_t^* 值與正確 N 值之差異值約在 22% 以下。以下將個別討論階梯式與連續式沖提模式之理論板數計算結果。

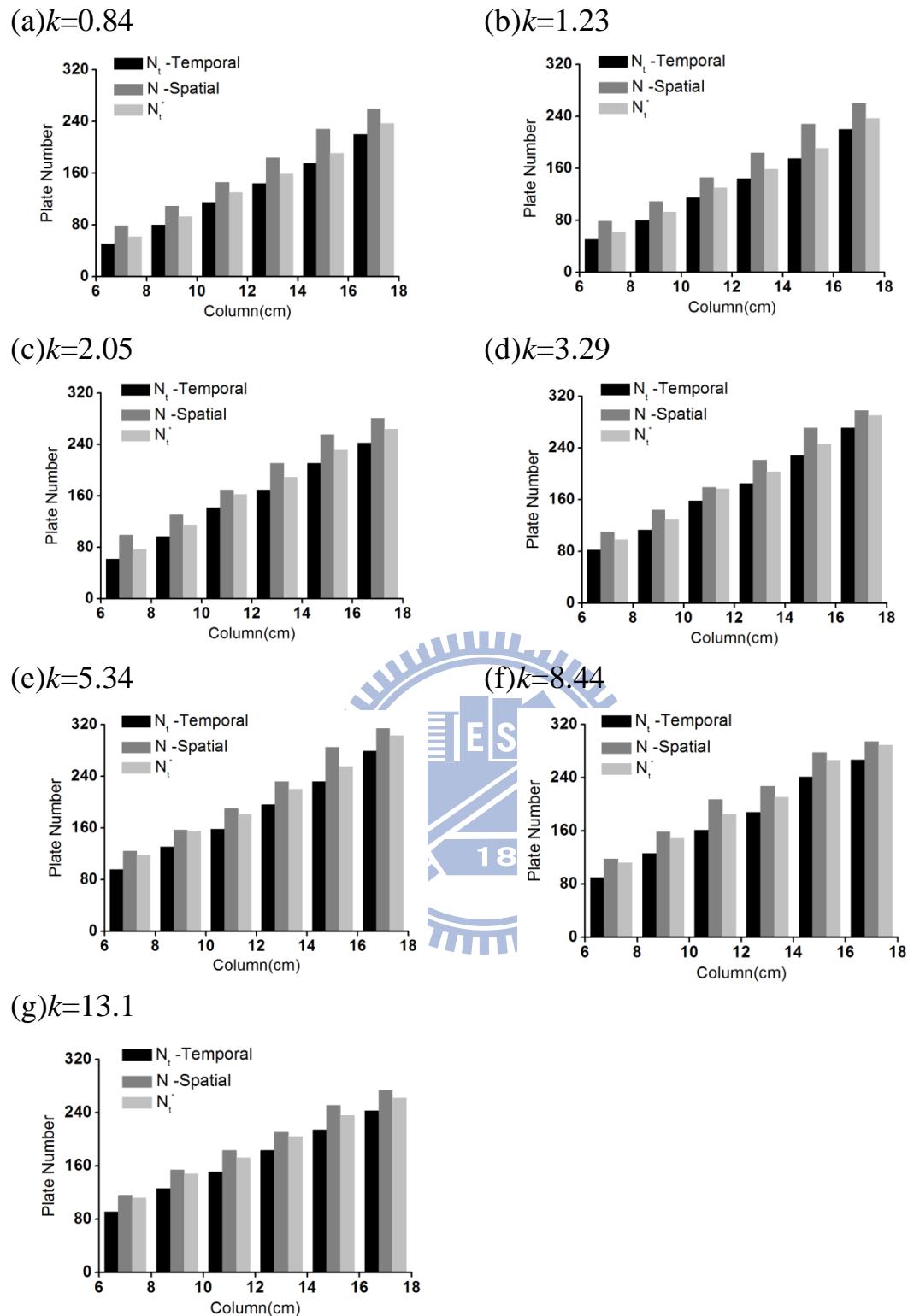


圖 5-7 等位沖提實驗中，所計算出之三種理論板數

註： N_t ：時圖理論板數， N ：理論板數， N_t^* ：修正後理論板數

表 5-4 等位沖提實驗 1 至 4，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	<i>N</i>	<i>N_t</i>	<i>N_t[*]</i>
<i>k</i> =0.84			
7	61	47 (23%)	53 (13%)
9	94	79 (16%)	86 (8%)
11	129	112 (13%)	122 (6%)
13	164	146 (11%)	154 (6%)
15	206	189 (8%)	198 (4%)
17	249	220 (12%)	231 (7%)
<i>k</i> =1.23			
7	79	51 (35%)	62 (21%)
9	109	80 (27%)	93 (15%)
11	146	115 (21%)	130 (11%)
13	184	144 (22%)	159 (13%)
15	228	175 (23%)	191 (16%)
17	260	220 (5%)	237 (9%)
<i>k</i> =2.05			
7	99	62 (38%)	77 (22%)
9	131	97 (26%)	115 (12%)
11	169	142 (16%)	162 (4%)
13	211	169 (20%)	189 (11%)
15	255	211 (17%)	231 (9%)
17	281	242 (14%)	264 (6%)
<i>k</i> =3.29			
7	110	82 (26%)	98 (10%)
9	144	113 (22%)	130 (10%)
11	179	158 (12%)	177 (1%)
13	221	185 (16%)	203 (8%)
15	271	228 (16%)	246 (9%)
17	298	271 (9%)	290 (3%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 *N_t*，修正後理論板數 *N_t^{*}* 與理論

板數 *N* 之差異值，計算方式如右式所示：差異值 = $\frac{|N - N_{t\text{ or }}N_{t^*}|}{N} \times 100\%$

表 5-5 等位沖提實驗 5 至 7，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	N	N_t	N_t^*
$k=5.34$			
7	124	96 (23%)	118 (4%)
9	157	131 (17%)	155 (2%)
11	190	158 (17%)	181 (4%)
13	232	196 (15%)	220 (5%)
15	285	232 (18%)	255 (10%)
17	314	279 (11%)	303 (4%)
$k=8.44$			
7	118	90 (23%)	112 (5%)
9	159	126 (20%)	149 (6%)
11	207	161 (22%)	185 (11%)
13	227	188 (17%)	211 (7%)
15	278	241 (13%)	266 (4%)
17	294	267 (9%)	289 (2%)
$k=13.1$			
7	116	91 (22%)	112 (4%)
9	154	126 (18%)	148 (4%)
11	183	151 (18%)	172 (6%)
13	211	183 (13%)	204 (3%)
15	251	214 (15%)	236 (6%)
17	274	243 (11%)	262 (4%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 N_t ，修正後理論板數 N_t^* 與理論

板數 N 之差異值，計算方式如下式所示：

$$\text{差異值} = \frac{|N - N_t \text{ or } N_t^*|}{N} \times 100\%$$

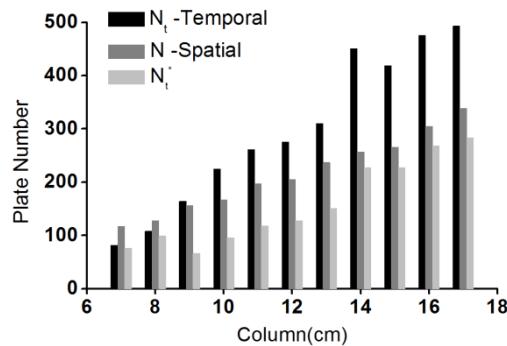
5.4.1 階梯式沖提理論板數計算

由 5.3.1 節所計算出，在階梯式沖提模式下，樣品在管柱不同位置時之樣品移速(表 5-2)，代入式 5-9 可獲得樣品在階梯式沖提模式下，位移至管柱不同位置時之理論板數值 N_t^* ，並由式 2-2 所計算出正確空間單位之理論板數 N 值，以及由式 2-9 所計算出以時間為單位之理論板數 N_t 值，比較三種理論板數值之差異值，計算結果於圖 5-8、表 5-6 及表 5-7 中，結果表示，使用時間單位計算出之理論板數 N_t 值，相較於正確 N 值結果差異值可能高達 500%，然而所計算出 N_t^* 值與正確 N 值之差異值最大為 81%，相較於利用時間單位計算出之理論板數 N_t 值， N_t^* 值較接近於正確 N 值結果，然而 N_t^* 之差異值來源主要為計算樣品移速時所造成之差異，且可從表 5-6 及表 5-7 看出 4 組實驗在管柱 9 公分位置，也就是波峰壓縮效應開始之位置，所產生之差異值皆最大，此原因即為在移動相交界處所產生之波動以及波峰壓縮效應最明顯，使得以 N_t^* 計算時會有較大差異。

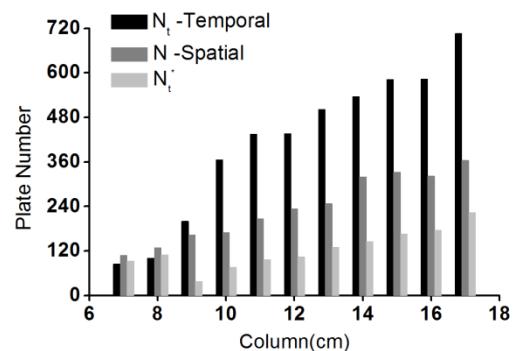
5.4.2 連續式沖提理論板數計算

由 5.3.2 節所計算出，在連續式沖提模式下，樣品在管柱不同位置時之樣品移速(表 5-3)，代入式 5-9 可獲得樣品在連續式沖提模式下，位移至管柱不同位置時之理論板數值 N_t^* ，並由式 2-2 所計算出正確空間單位之理論板數 N 值，以及由式 2-9 所計算出以時間為單位之理

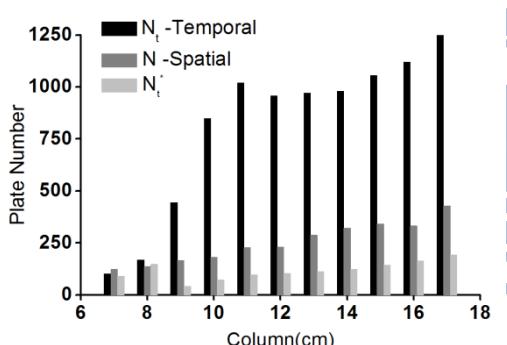
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

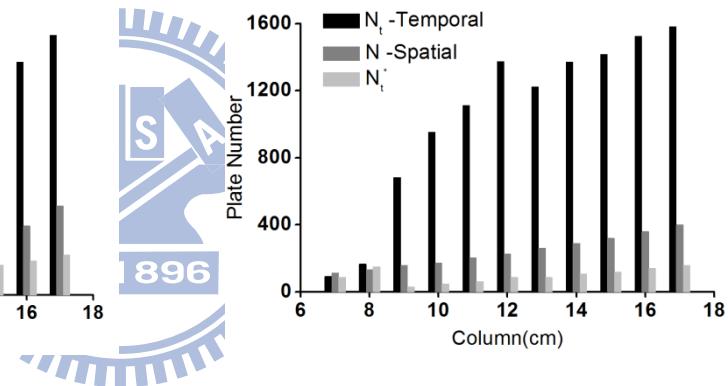


圖 5-8 階梯式沖提 4 組實驗中，所計算出之三種理論板數值

註： N_t ：時圖理論板數， N ：理論板數， N_t^* ：修正後理論板數

表 5-6 階梯式沖提實驗 1 及 2，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	N	N_t	N_t^*
實驗 1			
7	117	82 (30%)	76 (35%)
8	128	108 (16%)	99 (22%)
9	156	164 (5%)	66 (58%)
10	167	225 (34%)	96 (43%)
11	197	261 (33%)	118 (40%)
12	205	275 (34%)	128 (37%)
13	237	310 (31%)	151 (36%)
14	257	451 (75%)	227 (12%)
15	266	419 (58%)	227 (15%)
16	305	476 (56%)	268 (12%)
17	339	493 (45%)	283 (16%)
實驗 2			
7	109	85 (22%)	93 (14%)
8	129	101 (22%)	110 (15%)
9	164	200 (12%)	38 (77%)
10	170	366 (115%)	76 (56%)
11	207	435 (111%)	97 (53%)
12	234	436 (86%)	104 (56%)
13	248	502 (102%)	130 (48%)
14	320	536 (68%)	146 (54%)
15	333	582 (75%)	166 (50%)
16	322	584 (81%)	176 (45%)
17	364	706 (94%)	224 (38%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 N_t ，修正後理論板數 N_t^* 與理論

板數 N 之差異值，計算方式如下式所示：

$$\text{差異值} = \frac{|N - N_t \text{ or } N_t^*|}{N} \times 100\%$$

表 5-7 階梯式沖提實驗 3 及 4，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	<i>N</i>	<i>N_t</i>	<i>N_t[*]</i>
實驗 3			
7	111	87 (22%)	86 (23%)
8	133	165 (25%)	163 (23%)
9	171	530 (211%)	44 (74%)
10	176	797 (354%)	74 (58%)
11	215	939 (337%)	99 (54%)
12	242	921 (281%)	106 (56%)
13	274	1025 (274%)	130 (53%)
14	298	1005 (238%)	138 (54%)
15	340	1098 (223%)	162 (52%)
16	339	1146 (238%)	181 (47%)
17	376	1202 (220%)	202 (46%)
實驗 4			
7	114	85 (26%)	88 (23%)
8	132	166 (26%)	151 (15%)
9	157	683 (334%)	29 (81%)
10	173	952 (449%)	47 (73%)
11	204	1111 (443%)	63 (69%)
12	228	1373 (502%)	87 (62%)
13	261	1223 (369%)	86 (67%)
14	290	1372 (373%)	106 (64%)
15	320	1417 (342%)	119 (63%)
16	359	1525 (354%)	142 (61%)
17	400	1582 (296%)	157 (61%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 *N_t*，修正後理論板數 *N_t^{*}* 與理論

板數 *N* 之差異值，計算方式如下式所示：

$$\text{差異值} = \frac{|N - N_t \text{ or } N_t^*|}{N} \times 100\%$$

論板數 N_t 值，比較三種理論板數之差異值，計算結果於圖 5-9、表 5-8 及表 5-9 中，結果表示，使用時間單位計算出之理論板數 N_t 值，相較於正確 N 值結果差異值可能高達 366%，然而所計算出 N_t^* 值與正確 N 值之差異值最大為 87%，相較於利用時間單位計算出之理論板數 N_t 值， N_t^* 值較接近於正確 N 值結果，然而 N_t^* 之差異值來源為計算樣品移速時所造成之誤差，且可從表 5-8 及表 5-9 看出 4 組實驗在管柱 9 公分位置，也就是波峰壓縮效應開始之位置，所產生之差異皆最大，此原因亦為在移動相交界處所產生之波動以及波峰壓縮效應最明顯，使得以 N_t^* 計算時會有較大差異。

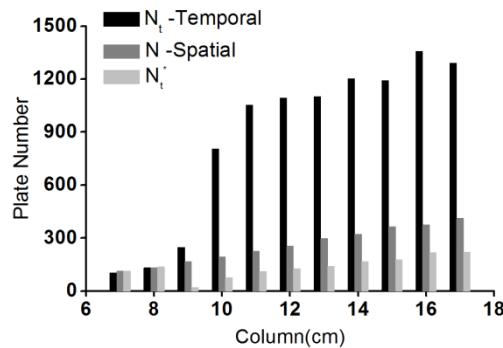
5.5 理論板數比較

在梯度沖提與等位沖提實驗下，可透過式 2-2 所計算出兩沖提模式之空間單位理論板數 N ，以及由式 2-9 所計算出時間單位理論板數 N_t 。以下將討論在兩沖提模式下，空間與時間單位理論板數之差異，並探討在階梯式與連續式兩種梯度沖提模式下，空間與時間單位理論板數之差異，並比較梯度沖提模式下，管外時圖之時間單位理論板數 N_t 與修正之理論板數 N_t^* 。計算結果列於表 5-10~5-14，表格中移動相編號 A~E 所代表之成分，可參考圖 3-8。

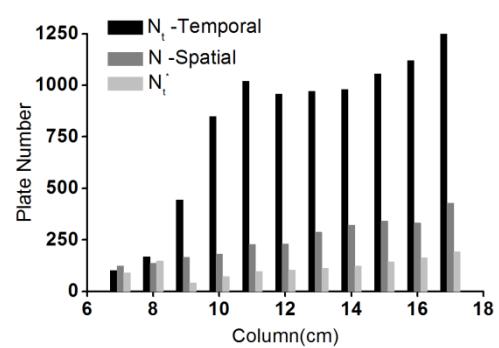
5.5.1 梯度沖提與等位沖提實驗，空間單位理論板數 N 值比較

在梯度沖提與等位沖提中，兩模式所計算出空間單位理論板數 N

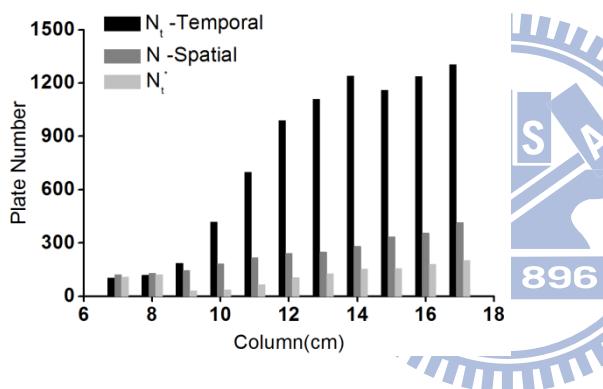
(a) 實驗 1



(b) 實驗 2



(c) 實驗 3



(d) 實驗 4

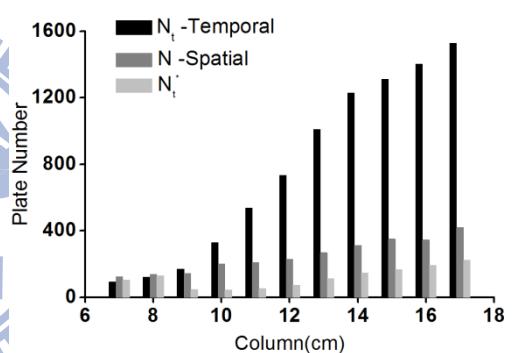


圖 5-9 連續式沖提 4 組實驗中，所計算出之三種理論板數

註： N_t ：時圖理論板數， N ：理論板數， N_t^* ：修正後理論板數

表 5-8 連續式沖提實驗 1 及 2，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	N	N_t	N_t^*
實驗 1			
7	115	104 (10%)	113 (1%)
8	133	131 (2%)	137 (3%)
9	166	247 (49%)	21 (87%)
10	194	806 (315%)	76 (61%)
11	227	1054 (364%)	111 (51%)
12	254	1094 (331%)	127 (50%)
13	299	1100 (268%)	140 (53%)
14	322	1202 (273%)	167 (48%)
15	366	1193 (226%)	179 (51%)
16	375	1358 (262%)	217 (42%)
17	412	1290 (213%)	220 (47%)
實驗 2			
7	123	102 (17%)	103 (26%)
8	137	168 (23%)	147 (7%)
9	165	445 (170%)	42 (74%)
10	182	848 (366%)	72 (60%)
11	228	1020 (348%)	98 (57%)
12	231	958 (315%)	103 (56%)
13	288	971 (237%)	113 (61%)
14	322	980 (204%)	124 (62%)
15	342	1056 (209%)	143 (58%)
16	332	1119 (237%)	163 (51%)
17	429	1249 (192%)	192 (55%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 N_t ，修正後理論板數 N_t^* 與理論

板數 N 之差異值，計算方式如下式所示：

$$\text{差異值} = \frac{|N - N_t \text{ or } N_t^*|}{N} \times 100\%$$

表 5-9 連續式沖提實驗 3 及 4，所計算出之理論板數與差異值

管柱位置 (cm)	N	N_t	N_t^*
實驗 3			
7	122	103 (15%)	109 (10%)
8	130	118 (10%)	122 (6%)
9	146	187 (28%)	31 (79%)
10	184	418 (127%)	37 (80%)
11	219	698 (219%)	67 (69%)
12	242	990 (309%)	105 (57%)
13	249	1109 (346%)	128 (48%)
14	281	1239 (341%)	155 (45%)
15	336	1161 (245%)	157 (53%)
16	356	1236 (247%)	180 (49%)
17	415	1305 (214%)	201 (52%)
實驗 4			
7	123	94 (24%)	105 (15%)
8	139	122 (12%)	131 (5%)
9	145	170 (17%)	46 (68%)
10	200	329 (65%)	44 (78%)
11	209	538 (158%)	52 (75%)
12	230	733 (218%)	74 (68%)
13	268	1011 (227%)	112 (58%)
14	312	1229 (294%)	148 (53%)
15	351	1310 (273%)	167 (52%)
16	345	1401 (306%)	192 (44%)
17	420	1528 (264%)	225 (46%)

註：括弧內數值分別為時圖理論板數 N_t ，修正後理論板數 N_t^* 與理論

板數 N 之差異值，計算方式如下式所示：

$$\text{差異值} = \frac{|N - N_t \text{ or } N_t^*|}{N} \times 100\%$$

表 5-10 階梯式沖提與等位沖提實驗，理論板數 N 值比較

管柱位置 (cm)	N (等位沖提)	N (等位沖提)	N (階梯式沖提)
	移動相 A	移動相 B	移動相 A→B
7	116	118	117
9	154	159	156
11	183	207	197
13	211	227	237
15	251	278	266
17	274	294	339
	移動相 A	移動相 C	移動相 A→C
7	116	124	109
9	154	157	164
11	183	190	207
13	211	232	248
15	251	285	333
17	274	314	364
	移動相 A	移動相 D	移動相 A→D
7	116	110	111
9	154	144	171
11	183	179	215
13	211	221	274
15	251	271	340
17	274	298	376
	移動相 A	移動相 E	移動相 A→E
7	116	99	114
9	154	131	157
11	183	169	204
13	211	211	261
15	251	255	320
17	274	281	400

表 5-11 連續式沖提與等位沖提實驗，理論板數 N 值比較

管柱位置 (cm)	N (等位沖提)			
	移動相 A		移動相 D	
7	116		110	
9	154		144	
11	183		179	
13	211		221	
15	251		271	
17	274		298	

管柱位 (cm)	N (連續式沖提)			
	移動相 A → DS 變換移動相所需時間			
	0.5min	1.0 min	2.0 min	3.0 min
7	115	123 896	122	123
9	166	165	146	145
11	227	228	219	209
13	299	288	249	268
15	366	342	336	351
17	412	429	415	420
$N_{17} - N_9$	246	264	269	275

註： $N_{17} - N_9$ ：管柱 17 公分位置處 N 值減去管柱 9 公分位置處 N 值；

表樣品由管柱 9 公分，位移至管柱 17 公分處，其 N 值增加幅度。

值列於表 5-10 與表 5-11 中，由表中結果可發現，在等位沖提模式下，使用溶劑強度較弱的移動相 A，相較於溶劑強度較強之移動相 B、C、D 及 E，其樣品位移至管柱 17 公分處的 N 值，數值皆較小，此因為，使用溶劑強度較弱的移動相，樣品在管柱內波峰變寬程度較大，故所計算出之 N 值較小。在表 5-10 與表 5-11 中，梯度沖提模式下，其樣品位移至管柱 17 公分處的 N 值，皆較等位沖提模式所計算之 N 值大，此原因為在梯度沖提模式下，變換移動相組成，使空間中的波寬發生變化，即波峰壓縮效應，使得空間單位的理論板數 N 值增加。

5.5.2 梯度沖提與等位沖提實驗，時間單位理論板數 N_t 值比較

在梯度沖提與等位沖提中，兩模式所計算出時間單位理論板數 N_t 值列於表 5-12 與表 5-13 中，由表中結果可發現，在等位沖提模式下，使用溶劑強度較弱的移動相 A，相較於溶劑強度較強之移動相 B、C、D 及 E，其樣品位移至管柱 17 公分處的 N_t 值，數值皆較小，此原因為，使用溶劑強度較弱的移動相，樣品在管柱中之移速較小，故所計算出之 N_t 值較小。在表 5-12 與表 5-13 中，梯度沖提模式下，其樣品位移至管柱 17 公分處的時間單位理論板數 N_t 值，皆較等位沖提模式所計算之 N_t 值大，此原因為在梯度沖提模式下，變換移動相組成，使樣品移速增加，故時間單位的理論板數 N_t 值增加。

5.5.3 梯度沖提實驗，理論板數 N 值比較

表 5-12 階梯式沖提與等位沖提實驗，時圖理論板數 N_t 值比較

管柱位置 (cm)	N_t (等位沖提)	N_t (等位沖提)	N_t (階梯式沖提)
	移動相 A	移動相 B	移動相 A→B
7	91	90	82
9	126	126	164
11	151	161	261
13	183	188	310
15	214	241	419
17	243	267	493
	移動相 A	移動相 C	移動相 A→C
7	91	96	85
9	126	131	200
11	151	158	435
13	183	196	502
15	214	232	582
17	243	279	706
	移動相 A	移動相 D	移動相 A→D
7	91	82	87
9	126	113	530
11	151	158	939
13	183	185	1025
15	214	228	1098
17	243	271	1202
	移動相 A	移動相 E	移動相 A→E
7	91	62	85
9	126	97	683
11	151	142	1111
13	183	169	1223
15	214	211	1417
17	243	245	1582

表 5-13 連續式沖提與等位沖提實驗，時圖理論板數 N_t 值比較

管柱位置 (cm)	N_t (等位沖提)			
	移動相 A		移動相 D	
7	91		82	
9	126		113	
11	151		158	
13	183		185	
15	214		228	
17	243		271	

管柱位置 (cm)	N_t (連續式沖提)			
	移動相 A → DS 變換移動相所需時間			
	0.5min	1.0 min	2.0 min	3.0 min
7	104	102 896	103	94
9	247	445	187	170
11	1054	1020	698	538
13	1100	971	1109	1011
15	1193	1056	1161	1310
17	1290	1249	1305	1528
$N_{t17} - N_{t9}$	1043	804	1118	1359

註： $N_{t17} - N_{t9}$ ：管柱 17 公分位置處 N_t 值減去管柱 9 公分位置處 N_t 值；

表樣品由管柱 9 公分，位移至管柱 17 公分處，其 N_t 值增加幅度。

在階梯式沖提模式下，由溶劑強度較弱之移動相變換成不同溶劑強度之移動相組成，其空間單位理論板數 N 值之差異，由表 5-10 結果可看出，其中，變換成溶劑強度最強之移動相 E，樣品位移至管柱 17 公分處的 N 值，相較於其他階梯式沖提條件 N 值大，此原因為變換為溶劑強度最強之移動相沖提時，所產生之波峰壓縮效應最為明顯，故使得所計算出之空間單位理論板數 N 值較大。

在連續式沖提模式下，由溶劑強度較弱之移動相，在不同時間點作線性變換成溶劑強度較強之移動相，其空間單位理論板數 N 值之差異，而由表 5-11 結果可看出，變換移動相所需時間最長之條件，樣品由管柱 9 公分即波峰壓縮效應開始之處，位移至管柱 17 公分處，其 N 值增加幅度相較於其他條件大，並可與表 5-10 階梯式沖提模式中，移動相之組成(移動相 A→D)相同條件比較，可看出此階梯式沖提條件下，樣品由管柱 9 公分，位移至管柱 17 公分處，其 N 值增加幅度(移動相 A→D， $N_{17} - N_9 = 205$)相較於連續式沖提模式皆較小，此原因為，雖然在連續式沖提模式下，將移動相隨時間作線性變化，其波峰壓縮效應現象較不明顯(見圖 5-1 與圖 5-4)，但壓縮效應卻持續發生，即在連續式沖提下，波峰壓縮效應影響之範圍與時間較階梯式沖提來的大，故使用連續式沖提，其波峰壓縮效應對理論板數影響會較階梯式沖提大，亦即增加之理論板數超過階梯式的梯度沖提(見圖

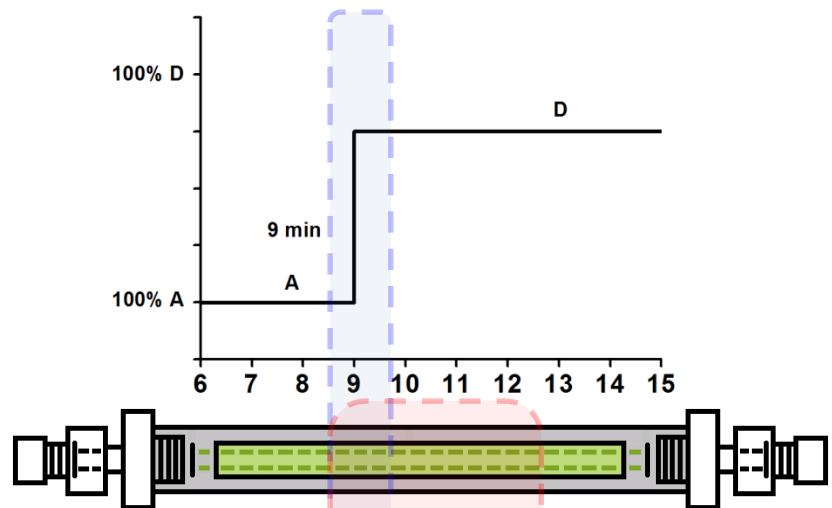
5-10)。

5.5.4 梯度沖提實驗，時間單位理論板數 N_t 值比較

在階梯式沖提模式下，由溶劑強度較弱之移動相變換成不同溶劑強度之移動相組成，其時間單位理論板數 N_t 值之差異，由表 5-12 結果可看出，其中，變換成溶劑強度最強之移動相 E，樣品位移至管柱 17 公分處的 N_t 值，相較於其他階梯式沖提條件 N_t 值大，此原因為變換為溶劑強度最強之移動相沖提時，其前後樣品移速差異最大，故使得所計算出之時間單位理論板數 N_t 值較大。

在連續式沖提模式下，由溶劑強度較弱之移動相，在不同時間點作線性變換成溶劑強度較強之移動相，其時間單位理論板數 N_t 值之差異，而由表 5-13 結果可看出，變換移動相所需時間最長之條件，樣品由管柱 9 公分處即波峰壓縮效應開始之處，位移至管柱 17 公分處，其 N_t 值增加幅度相較於其他條件大，並可與表 5-12 階梯式沖提模式中，移動相之組成(移動相 A→D)相同條件比較，可看出此階梯式沖提條件下，樣品由管柱 9 公分，位移至管柱 17 公分處，其 N_t 值增加幅度(移動相 A→D, $N_{t17} - N_{t9} = 672$)相較於連續式沖提模式皆較小，此原因為，在連續式沖提下，變換移動相所造成樣品移速改變影響之範圍與時間較階梯式沖提來的大，故使用連續式沖提，其理論板數增加幅度會較階梯式沖提大(見圖 5-10)。

(a)階梯式沖提模式



(b)連續式沖提模式

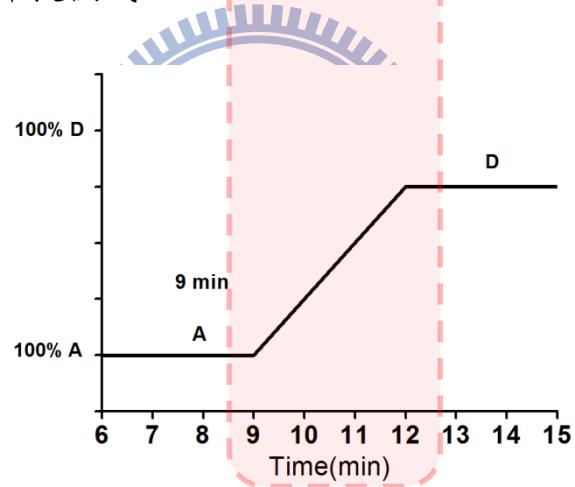


圖 5-10 階梯式與連續式沖提理論板數增加幅度解釋圖

在使用階梯式沖提時，為瞬間變換成第二移動相，故受影響的範圍與變換移動所需時間較少，然而在連續式沖提時，為以線性隨時間變換成第二移動相，因此受波峰壓縮效應影響之範圍與時間較階梯式沖提大，使得其理論板數增加的幅度較階梯地沖提大。

5.5.5 梯度沖提實驗，管外時圖之時間單位理論板數 N_t 與 N_t^* 值比較

非線性層析條件下，使用理論板數 N_t^* 之公式(式 5-1)計算，較接近正確之理論板數，因此，將梯度沖提實驗中，管外時圖所獲得之時間單位理論板數 N_t 與使用式 5-1 所計算出之理論板數 N_t^* 比較，結果列於表 5-14，雖然無法正確計算管柱外之理論板數 N ，然而可與 WCD 系統所獲得管內數據之結果比較(表 5-6 與表 5-7)，藉此評估使用 N_t^* 計算管外時圖之正確性，可發現在階梯式沖提模式下，管內與管外之時圖理論板數 N_t 皆遠大於理論板數 N_t^* ，且變換成不同溶劑強度之移動相，由實驗 1 至 4，其溶劑強度漸增，所計算出之理論板數 N_t 亦大幅提升，而 N_t^* 增加幅度較小，此趨勢與管內時圖數據相同，透過管內時圖所計算之 N_t^* ，較接近於管內數據所計算出之理論板數 N 。在連續式沖提模式下，管內與管外之時圖理論板數 N_t 亦大於理論板數 N_t^* ，且變換移動相所需時間，由實驗 1 至 4，其時間漸增，所計算出之理論板數 N_t 亦漸增，而 N_t^* 增加幅度較小，此趨勢與管內時圖數據相同，透過管內時圖所計算之修正後理論板數 N_t^* ，較接近於管內數據所計算出之理論板數 N ，因此，可推估以理論板數 N_t^* ，用於計算非線性層析條件下之理論板數較為正確。

根據以上結果可發現，在相同實驗條件下，所算出之空間單位理論板數 N 與時間單位理論板數 N_t ，數值差異極大，此原因即在於，由公

表 5-14 梯度沖提實驗，管外時圖理論板數 N_t 與 N_t^* 值比較

實驗編號	移動相	N_t	N_t^*
階梯式沖提			
1	A→B	518	326
2	A→C	782	336
3	A→D	1332	348
4	A→E	2457	370
A→D			
移動相變換時間(min)		連續式沖提	
1	0.5	1372	345
2	1.0	1548	365
3	2.0	1718	394
4	3.0	1891	419

註：詳細實驗條件列於表 3-2 中，所使用管柱為管柱 1。

式 2-9 計算時間單位理論板數的方法，是來自於使用空間單位理論板數公式(式 2-2)之衍生，為加入「樣品移動速度」參數(如式 2-4 表 5-14 所述)所轉換而得，即表示式 2-9 為建構在「樣品移動速度固定」之原則下，所延續發展而得的結果，然而在非線性層析條件中，由於移動相組成隨時間改變，因此樣品在管柱中受到不同溶劑強度之移動相影響，而使得樣品之移動速度有所改變，因此在非線性層析下，式 2-9 所計算出之時間單位理論板數 N_t 則無法成立，透過 5.4 章節所提出修正後之理論板數 N_t^* 之公式，用於計算非線性層析條件下之理論板數較為正確。

第六章 結論

本研究利用全管柱偵測系統觀察液相層析之波峰壓縮效應，在第四章中，觀察樣品在等位沖提條件中之流動訊號，結果得知，樣品在 k 值越大之條件下，其空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 較窄，並且在不同 k 值條件下，樣品在注入至管柱入口端時，其空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}$ 與 $\frac{1}{1+k}$ 成正比之關係，然而當樣品受移動相沖提往管柱後端位移時，受滯留效應等因素在 k 值越大之條件下其空間波峰寬度越寬，而當樣品在流析出管柱之際，會受到樣品之移速不同而影響其在管柱外偵測器之波峰寬度。在第五章中，觀察樣品在非線性層析下之波峰壓縮效應現象，並提出在梯度沖提模式下，較正確以及簡便之方法計算理論板數與樣品移速，相較於一般以時間單位計算出之理論板數 N_t ，所提出理論板數 N_t^* 計算結果，更接近於正確空間單位理論板數 N 之結果。和傳統方式計算理論板數相比，其結果顯示有大幅的改善，在某些實驗中有高達四倍的改進。

影響層析波峰寬度變化的原因是相當廣泛的，舉凡所有發生在移動相與固定相兩相間的物理作用力、化學作用力等都會對樣品之層析行為產生變化，諸如此類的研究發展至今，已相當完備，雖然本研究中探討的方法與以往不同，然而，以全管柱偵測系統之方法，可全面性地觀測樣品在管柱中之流動訊號，可以彌補一般層析系統之偵測器

所不足，有助於釐清層析空間和時間訊號之差異，對於層析分離現象可以提供更入微的觀察。

未來研究將利用全管柱偵測系統進一步觀察樣品在梯度沖提模式中，使用溶劑強度不同之移動相時，其交界處會產生波峰壓縮效應，以及溶劑交界處會產生不穩定之情形，進而使得其時圖產生不規則波形，由於液相層析常以梯度沖提模式來提高分離效率以及減少所需分辦時間，然而甚少研究針對在時圖中產生不規則波形之成因作解釋，因此，未來將以全管柱偵測系統搭配管柱外偵測器來觀察此現象，並且更進一步解釋此一現象成因。



參考文獻

- [1] L.S. Ettre,"High-Performance Liquid Chromatography", New York:Academic Press 1 (1980).
- [2] S.C. Pai,"Evaluation of the temporal effect to the peak tailing in flow injection analysis", J. Chromatogr. A 950 (2002) 271.
- [3] S.C. Pai,"Parcel model for peak shapes in chromatography Numerical verification of the temporal distortion effect to peak", J. Chromatogr. A 988 (2003) 233.
- [4] 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.
- [5] 張凱傑, 以多通道偵測器觀察流動注入訊號之空時差異, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十五年.
- [6] 趙士宗, 以多通道偵測器觀察流動訊號在毛細管柱之時間效應, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十五年.
- [7] 陳鈺君, 流動訊號在微管路中時間效應之探討, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十六年.
- [8] 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. 56 (2009) 480.
- [9] 林淑慧, 以全管柱偵測法探討液相層析之分離, 國立交通大學, 應用化學研究所博士論文, 民國九十八年.
- [10] 許育國, 使用全管柱偵測法探討層析理論板數之計算, 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國九十九年.
- [11] 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.
- [12] 賴俊傑, 以因次化郵包模型模擬層析管分離作用之研究, 國立台灣大學, 海洋研究所碩士論文, 民國九十三年.
- [13] F. Gritti, C. A. Sanchez, T. Farkas, G. Guiochon,"Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments", J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3000.

- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] L.R. Snyder, J.W. Dolan,"The linear-solvent-strength model of gradient elution", *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
- [17] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder,"Peak compression in reversed-phase gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 32.
- [18] F. Gritti, G. Guiochon,"Exact peak compression factor in linear gradient elution: I. Theory", *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 35.
- [19] F. Gritti, G. Guiochon,"The bandwidth in gradient elution chromatography with a retained organic modifier", *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 67.
- [20] M. Tswett,"One a New Category of Adsorption Phenomena and their Application to Biochemical Analysis", *Warsaw Soc. Nat. Sci, Biol. Sec.* 14 (1903) 6.
- [21] C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky,"Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers", *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422.
- [22] J.F.K. Huber, J.A.R.J. Hulsman,"A study of liquid chromatography in columns. The time of separation", *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 305.
- [23] J.J. Kirkland,"High-speed liquid chromatography with controlled surface porosity supports", *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 7.
- [24] U.D. Neue, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2000, p. 11450.
- [25] J.E. O'Gara, B.A. Alden, T.H. Walter, J.S. Petersen, C.L. Niederlander, U.D. Neue, "Simple preparation of a C₈ HPLC stationary phase with an internal polar functional group" *Anal. Chem.* 67 (1995) 3809.
- [26] U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [27] U.D. Neue, N. Brady, S. Serpa, P.C. Iraneta, B.A. Alden, T.H.

Walter, K. Wyndham, 32nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Baltimore, MD, May 10-16, 2008.

- [28] U.D. Neue, D. Diehl, P. Iraneta, Pittcon Conference & Expo 2009, Chicago, IL, March 8-13, 2009.
- [29] F. Gritti, G. Guiochon, "Optimization of the thermal environment of columns packed with very fine particles", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1353.
- [30] F. Gritti, G. Guiochon, "Performance of new prototype packed columns for very high pressure liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1485.
- [31] J.J. Kirkland, "Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography", *Anal. Chem.* 41 (1969) 218.
- [32] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, "Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2- μm particles", *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 254.
- [33] F. Gritti, I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker, G. Guiochon, "Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C₁₈", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1589.
- [34] J.F.K. Huber, "private communication", (December 1971).
- [35] B.L. Karger, H. Barth, "Influence of Column Material on Efficiency in High Speed Liquid Chromatography ", *Anal. Letters* 4 (1971) 595.
- [36] J.J. Kirkland, "Techniques for high-performance liquid-liquid and ion exchange chromatography with controlled surface porosity column packings", *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 361.
- [37] R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, *J. Chromatogr. Library Series*, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- [38] H.E. Schwartz, B.L. Karger, P. Kucera, "Gradient elution chromatography with microbore columns", *Anal. Chem.* 55 (1983) 1752.
- [39] S.R. Bakalyar, C. Phipps, B. Spruce, K. Olsen, "Choosing sample volume to achieve maximum detection sensitivity and resolution with high-performance liquid-chromatography columns of 1.0, 2.1 and 4.6 mm i.d", *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 167.

- [40] F. Houdiere, P. W. J. Fowler, N.M. Djordjevic, "Combination of Column Temperature Gradient and Mobile Phase Flow Gradient in Microcolumn and Capillary Column High-Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 69 (1997) 2589.
- [41] K. Krause, M. Girod, B. Chankvetadze, G. Blaschke, "Enantioseparations in normal- and reversed-phase nano-high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography using polyacrylamide and polysaccharide derivatives as chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 51.
- [42] D.B. Gomis, J.J. Mangas, A. Castaño, M.D. Gutiérrez, "Determination of Acaricides in Honey by Liquid Chromatography with Ordinary, Narrow-Bore, and Microbore Columns", *Anal. Chem.* 68 (1996) 3867.
- [43] F. Gritti, G. Guiochon, "Kinetic investigation of the relationship between the efficiency of columns and their diameter", *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1592.
- [44] P.C. Carman, "Fluid Flow through Granular Beds", *Trans. Inst. Chem. Eng.* 15 (1937) 150.
- [45] J. Kozeny, "Über kapillare Leitung des Wassers im Boden: Sitzungsber", Akad. Wiss. Wien 136 (1927) 271.
- [46] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, "Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns", *Anal. Chem.* 69 (1997) 983.
- [47] R.S. Plumb, J.R. Mazzeo, E.S. Grumbach, P. Rainville, M. Jones, T. Wheat, U.D. Neue, B. Smith, K.A. Johnson, "The application of small porous particles, high temperatures, and high pressures to generate very high resolution LC and LC/MS separations" *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1158.
- [48] M. Frank, A. Gratzfeld-Huesgen, S. Schuette, *Am. Lab.* 38 (2006) 17.
- [49] J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R.S. Plumb, "Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure", *Anal. Chem.* 77 (2005) 460A.
- [50] M. Swartz, "Ultra performance liquid chromatography: Tomorrow's HPLC technology today", *LabPlus Int.* 18 (2004) 6.
- [51] F. Gritti, G. Guiochon, "Complete Temperature Profiles in

Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Columns", Anal. Chem. 80 (2008) 5009.

- [52] F. Gritti, G. Guiochon,"Heat Exchanges in Fast, High-Performance Liquid Chromatography. A Complete Thermodynamic Study", Anal. Chem. 80 (2008) 6488.
- [53] F. Gritti, A. Felinger, G. Guiochon,"A chromatographic estimate of the degree of surface heterogeneity of reversed-phase liquid chromatography packing materials: II-Endcapped monomeric C₁₈-bonded stationary phase", J. Chromatogr. A 1136 (2006) 57.
- [54] D. Cabooter, A. de Villiers, D. Clicq, R. Szucs, P. Sandra, G. Desmet,"Method to predict and compare the influence of the particle size on the isocratic peak capacity of high-performance liquid chromatography columns", J. Chromatogr. A 1147 (2007) 13.
- [55] K.M. Usher, C.R. Simmons, J.G. Dorsey,"Modeling chromatographic dispersion: A comparison of popular equations", J. Chromatogr. A 1200 (2008) 122.
- [56] K.J. Fountain, U. D. Neue, E. S. Grumbach, D. M. Diehl,"Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2-microm porous particles", J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5979.
- [57] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge,"A new form of chromatogram employing two liquid phases", Biochem. J. 35 (1941) 1358.
- [58] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, 5th Ed, Principles of Instrumental Analysis, Saunders College, Philadelphia, 1998.
- [59] L. Snyder, High Performance Liquid Chromatography-Advances and Perspectives, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [60] P. Jandera, J. Churacek, Gradient Elution in Column Liquid Chromatography-Theory and Practice, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [61] F. Gritti, G. Guiochon,"The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography", J. Chromatogr. A 1178 (2008) 79
- [62] P. Jandera, J. Churacek,"Gradient elution in liquid chromatography : II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography-theoretical considerations", J. Chromatogr. 91

(1974) 223.

- [63] P. Jandera, J. Churacek, "Gradient elution in liquid chromatography. IX. Selection of optimal conditions in stepwise-elution liquid chromatograph", *J. Chromatogr.* 170 (1979) 1.
- [64] W. Gotkiewicz, M. Jaroniec, *J. High Resolut. Chromatogr./ Chromatogr. Commun.* 1 (1978) 245.
- [65] W. Gotkiewicz, "Optimization of stepwise gradient elution in reversed-phase chromatography", *Chromatographia* 21 (1986) 259.
- [66] S.T. Balke, R.D. Patel, "Gradient Elution Analysis and Prediction in HPLC", *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 741.
- [67] M. Hutta, R. Gora, "Novel stepwise gradient reversed-phase liquid chromatography separations of humic substances, air particulate humic-like substances and lignins", *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 67.
- [68] D. Huang, Y. Zhang, X. Chen, "Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 101.
- [69] C. Rielly, D. Crouch, G. Yost, A. Fatah, "Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 259.
- [70] H. Cui, C. He, G. Zhao, "Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection", *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 171.
- [71] 周璁瑩, 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.
- [72] P. Jandera, "Gradient elution in liquid column chromatography-prediction of retention and optimization of separation", *Adv. Chromatogr.* 43 (2005) 1.
- [73] 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.
- [74] 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.

- [75] C.E. Evans, V.L. McGuffin,"Dual on-column fluorescence detection scheme for characterization of chromatographic peaks", *Anal. Chem.* 60 (1988) 573.
- [76] 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.
- [77] D.G. Gelderloos, K.L. Rowlen, J.W. Birks, J.P. Avery, C.G. Enke,"Whole column detection chromatography: computer simulations", *Anal. Chem.* 58 (1986) 900.
- [78] J. Wu, J. Pawliszyn,"Universal detection for capillary isoelectric focusing without mobilization using concentration gradient imaging system", *Anal. Chem.* 64 (1992) 224.
- [79] J. Wu, J. Pawliszyn,"Capillary isoelectric focusing with a universal concentration gradient imaging system using a charge-coupled photodiode array", *Anal. Chem.* 64 (1992) 2934.
- [80] J. Wu, J. Pawliszyn,"Dual Detection for Capillary Isoelectric Focusing with Refractive Index Gradient and Absorption Imaging Detectors", *Anal. Chem.* 66 (1994) 867.
- [81] J. Wu, J. Pawliszyn,"Diode laser-based concentration gradient imaging detector for capillary isoelectric focusing", *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 337.
- [82] J. Wu, J. Pawliszyn,"Absorption Spectra, Multicapillary Imaging Detection for Capillary Isoelectric Focusing Using a CCD Camera", *Analyst* (Cambridge, UK) 120 (1995) 1567.
- [83] X.Z. Wu, J. Wu, J. Pawliszyn,"Fluorescence imaging detection for capillary isoelectric focusing", *Electrophoresis* 16 (1995) 1474.
- [84] J. Wu, C. Tragas, A. Watson, J. Pawliszyn,"Capillary isoelectric focusing with whole column detection, a membrane sample preparation system", *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 67.
- [85] S. Nilsson, J. Johansson, M. Mecklenburg, S. Birnbaum, S. Svanberg, K.G. Wahlund, K. Moasbach, A. Miyabashi, P.O. Larsson,"Real-time fluorescence imaging of capillary electrophoresis: Separation of nucleic acids", *J. Capillary Electrophor* 2 (1995) 46.

- [86] J. Johansson, D.T. Witte, M. Larsson, S. Nilsson,"Real-Time Fluorescence Imaging of Isotachophoretic Preconcentration for Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 68 (1996) 2766.
- [87] Q. Mao, J. Pawliszyn, W. Thormann,"Dynamics of Capillary Isoelectric Focusing in the Absence of Fluid Flow: High-Resolution Computer Simulation and Experimental Validation with Whole Column Optical Imaging", *Anal. Chem.* 72 (2000) 5493.
- [88] 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.
- [89] 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.
- [90] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon,"Visualization of solute migration in liquid chromatography columns ", *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 1.
- [91] B.S. Broyles, R.A. Shalliker, G. Guiochon,"Visualization of sample introduction in liquid chromatography columns. The effect of the frit diameter", *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 367.
- [92] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon,"On-Column Visualization of Sample Migration in Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 72 (2000) 323.
- [93] R.P.W. Scott, E Kucera,"Some aspects of preparative-scale liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 119 (1976) 467.
- [94] K. Slais, D. Kourilova, M. Krejci,"Trace analysis by peak compression sampling of a large sample volume on microbore columns in liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 282(1983)363
- [95] H.A. Claessens, M.A.J. Kuyken,"A comparative study of large volume injection techniques for microbore columns in HPLC", *Chromatographia* 23(1987) 331.
- [96] M. J. Mills, J. Malta, W. J. Lough,"Assessment of injection volume limits when using on-column focusing with microbore liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 759(1997) 1.
- [97] S. Yamamoto,"Plate height determination for gradient elution chromatography of proteins", *Biotechnol. Bioeng.* 48 (1995) 444.

- [98] T. Ishihara, T. Kadoya, N. Endo, S. Yamamoto,"Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data Reducing residual protein A by cation-exchange chromatography in monoclonal antibody purification", *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 97.
- [99] S. Yamamoto, A. Kita,"Rational design calculation method for stepwise elution chromatography of proteins", *Food Bioprod. Process* 84 (2006) 72.
- [100] 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.
- [101] U. D. Neue,"Theory of peak capacity in gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 153.
- [102] C. B. Castells, R. C. Castells,"Peak distortion in reversed-phase liquid chromatography as a consequence of viscosity differences between sample solvent and mobile phase", *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 55.
- [103] R.A. Shalliker, G. Guiochon,"Understanding the importance of the viscosity contrast between the sample solvent plug and the mobile phase and its potential consequence in two-dimensional high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 787.

附錄

附錄 A-1 等位沖提實驗，管內空圖之波峰位置所對應取點時間

管柱 1 波峰位置所對應取點時間(min)

管柱位置 (cm)	k 值						
	0.84	1.23	2.05	3.29	5.34	8.44	13.1
7	1.057	1.299	1.709	2.402	3.464	5.205	8.675
9	1.347	1.641	2.192	3.071	4.428	6.700	10.48
11	1.621	1.993	2.680	3.734	5.393	8.197	12.79
13	1.905	2.339	3.151	4.396	6.394	9.645	15.13
15	2.192	2.688	3.636	5.075	7.381	11.17	17.53
17	2.463	3.044	4.102	5.723	8.337	12.73	19.84

管柱 2 波峰位置所對應取點時間(min)

管柱位置 (cm)	k 值						
	0.84	1.16	2.34	3.42	5.28	7.19	9.45
7	1.347	1.428	1.986	2.629	3.715	4.996	6.218
9	1.646	1.784	2.465	3.272	4.640	6.251	7.834
11	1.942	2.154	2.962	3.916	5.559	7.513	9.470
13	2.245	2.497	3.455	4.569	6.475	8.782	11.16
15	2.552	2.859	3.938	5.214	7.398	10.08	12.70
17	2.827	3.209	4.422	5.871	8.307	11.38	14.42

管柱 3 波峰位置所對應取點時間(min)

管柱位置 (cm)	k 值						
	2.03	2.80	3.70	4.35	5.52	6.47	7.61
1	1.216	1.074	1.174	1.249	1.330	1.310	1.898
3	2.721	2.633	3.164	3.500	4.091	4.608	5.176
5	4.102	4.315	5.226	5.911	7.075	7.910	9.211
7	5.449	5.989	7.320	8.335	10.08	11.38	13.20
9	6.805	7.630	9.409	10.74	13.05	14.88	17.14
11	8.180	9.311	11.49	13.18	15.97	18.30	21.20
13	9.535	11.01	13.59	15.39	19.11	21.68	24.85
							31.74

附錄 A-2 梯度沖提實驗，管內空圖之波峰位置所對應取點時間

階梯式沖提 波峰位置所對應取點時間(min)

管柱位置 (cm)	實驗 1	實驗 2	實驗 3	實驗 4
7	8.794	8.601	8.767	8.951
8	10.09	9.561	10.12	10.20
9	11.03	10.56	10.75	10.72
10	11.87	11.21	11.21	11.07
11	12.71	11.81	11.63	11.41
12	13.53	12.34	12.04	11.71
13	14.39	12.93	12.47	12.03
14	15.14	13.45	12.86	12.34
15	16.03	14.07	13.31	12.65
16	16.77	14.57	13.71	13.01
17	17.65	15.12	14.11	13.33

連續式沖提 波峰位置所對應取點時間(min)

管柱位置 (cm)	實驗 1	實驗 2	實驗 3	實驗 4
7	8.493	8.652	8.641	8.562
8	9.720	9.857	9.874	9.752
9	10.73	10.63	11.00	10.94
10	11.24	11.32	11.71	11.78
11	11.65	11.79	12.25	12.45
12	12.05	12.24	12.70	12.98
13	12.46	12.66	13.14	13.46
14	12.86	13.08	13.53	13.90
15	13.28	13.50	13.97	14.32
16	13.67	13.95	14.37	14.69
17	14.07	14.37	14.75	15.10

附錄 A-3 三管柱在等位沖提實驗中，以空間波峰寬度 $\sigma_{(s)}^2$ ，對於管柱位置作圖所得線性斜率與 R^2 值

管柱 1

	k 值						
	0.84	1.23	2.05	3.29	5.34	8.44	13.1
斜率	0.0381	0.0462	0.0507	0.0514	0.0522	0.0564	0.0674
R^2	0.9956	0.9932	0.9916	0.9888	0.9894	0.9826	0.9989

管柱 2

	k 值						
	0.84	1.16	2.34	3.42	5.28	7.19	9.45
斜率	0.0399	0.0512	0.0506	0.0587	0.0678	0.0839	0.118
R^2	0.9935	0.9200	0.9655	0.9812	0.9647	0.9829	0.9761

管柱 3

	k 值						
	2.03	2.80	3.70	4.35	5.52	6.47	7.61
斜率	0.0145	0.0164	0.0227	0.0307	0.0339	0.0455	0.0552
R^2	0.9697	0.9850	0.9774	0.9792	0.9824	0.9892	0.9865

註：詳細線性圖形見圖 4-13。詳細實驗條件列於表 3-2 中

附錄 A-4 三管柱在等位沖提實驗中，以時間波峰寬度 $\sigma_{(t)}^2$ ，對於管柱位置作圖所得線性斜率與 R^2 值

管柱 1

	k 值						
	0.84	1.23	2.05	3.29	5.34	8.44	13.1
斜率	0.0006	0.0014	0.0026	0.0055	0.0132	0.0305	0.0901
R^2	0.9537	0.9827	0.9797	0.9910	0.9925	0.9902	0.9985

管柱 2

	k 值						
	0.84	1.16	2.34	3.42	5.28	7.19	9.45
斜率	0.0011	0.0013	0.0022	0.0046	0.0131	0.0319	0.0776
R^2	0.9573	0.9677	0.8888	0.9758	0.9696	0.0867	0.9701

管柱 3

	k 值						
	2.03	2.80	3.70	4.35	5.52	6.47	7.61
斜率	0.0103	0.0148	0.0273	0.0517	0.0829	0.150	0.263
R^2	0.9859	0.9592	0.9657	0.9881	0.9869	0.9896	0.9812

註：詳細線性圖形見圖 4-14。詳細實驗條件列於表 3-2 中