


國立交通大學

應用化學系碩士班

碩士論文



以全管柱偵測法探討液相層析之波峰跳動現象
Peak Jump Phenomenon in Liquid Chromatography
Examined Using Whole-Column Detection

研究生:吳沛穎

指導教授:余 艇 博士

中華民國 一零一 年 六 月

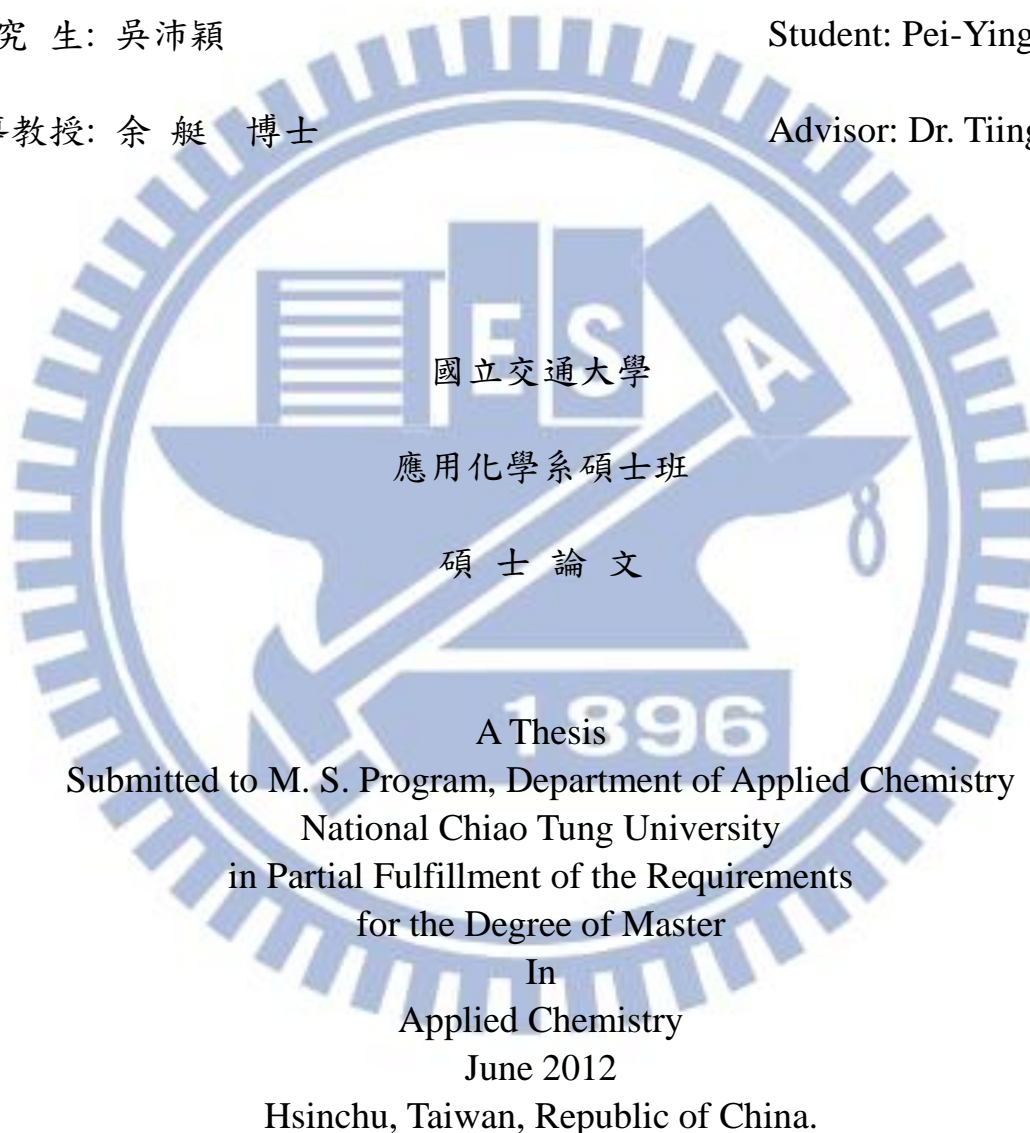
以全管柱偵測法探討液相層析之波峰跳動現象
Peak Jump Phenomenon in Liquid Chromatography
Examined Using Whole-Column Detection

研究生: 吳沛穎

Student: Pei-Ying Wu

指導教授: 余艇 博士

Advisor: Dr. Tiing Yu



國立交通大學

應用化學系碩士班

碩士論文

A Thesis

Submitted to M. S. Program, Department of Applied Chemistry

National Chiao Tung University

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

In

Applied Chemistry

June 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國 一百零一年 六月

以全管柱偵測法探討液相層析之波峰跳動現象

學生：吳沛穎

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學系碩士班

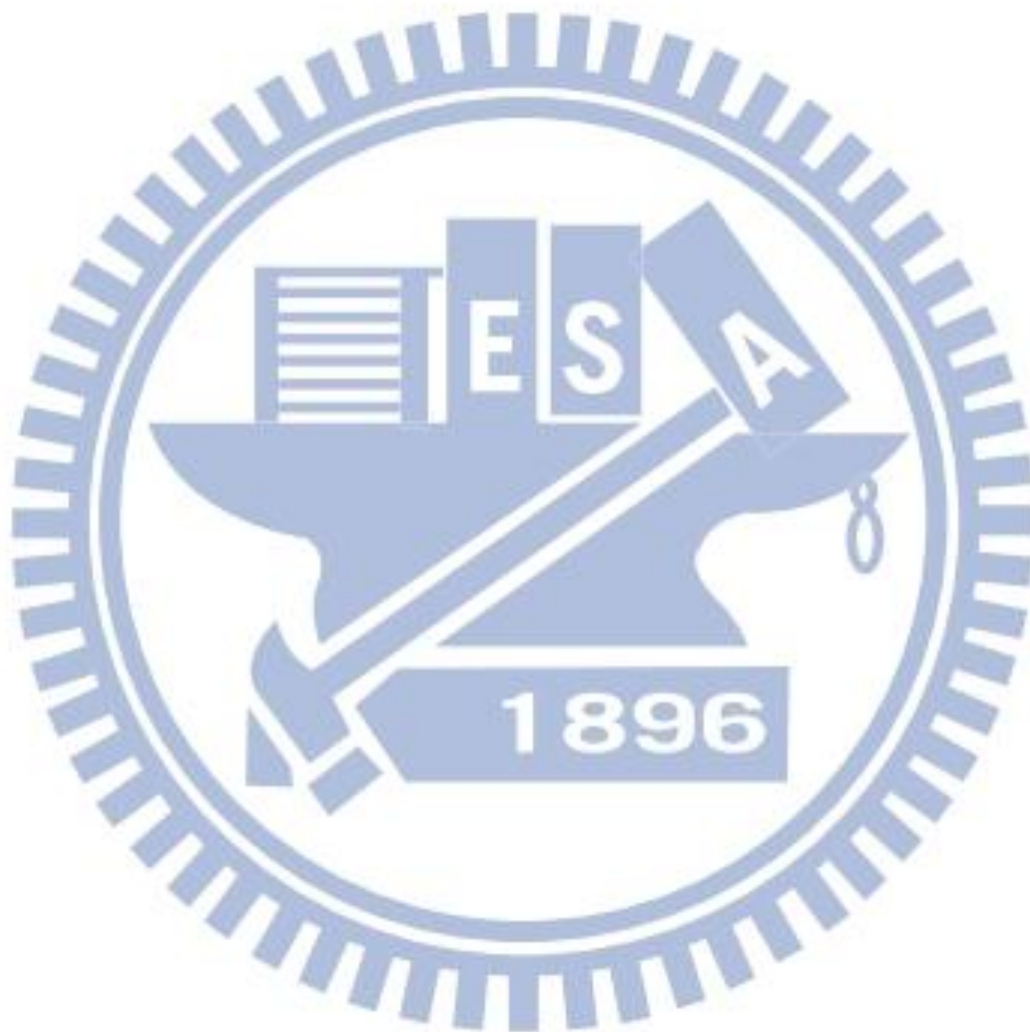
摘要

在層析的過程中，將沖堤能力較弱的移動相變換為沖堤能力較強的移動相，便會加快固定相將樣品釋放到移動相的速度。若樣品已經有一部分流出管柱時感受到移動相的沖堤能力增強，則管柱末端填充的固定相會加速釋出樣品，隨後被管柱外的 UV/Vis 偵測器偵測到，造成層析圖譜中波峰特殊的轉折甚至跳動。

本研究利用全管柱偵測法(Whole-column detection)配合管柱後端連接的 UV/Vis 偵測器，來觀察階梯式沖堤(stepwise elution)時不同時間改變移動相對管柱末端樣品的影響。全管柱偵測法可以得到管柱中樣品濃度的空間分布，以補足管外偵測器所無法觀察到的管內樣品實際的流動狀況。

實驗中發現，樣品在沖堤力強的移動相到達之前便先流出管柱的話，則層析圖譜的波峰高度會受到壓縮效應(compression effect)及擴散效應(diffusion effect)影響，移動相沖堤能力改變較不明顯者會受擴散效應影響較大，反之，若移動相沖堤能力改變較劇烈者會受到壓縮效應影響較強。

另外，樣品在部分流出管柱時遭遇移動相之改變，移動相沖堤能力改變較不明顯者，層析圖譜中波峰產生轉折，若移動相沖堤能力改變較劇烈者，則圖譜中波峰有跳動的現象。上述觀察結果正好印證了白書禎教授於尾論(Tailography)中的計算推導。



Peak Jump Phenomenon in Liquid Chromatography Examined Using Whole-Column Detection

Student: Pei-Ying Wu

Advisor: Tiing Yu

Abstract

In the chromatographic process, the release of sample from stationary phase will speed up when the mobile phase of weak strength changed to the mobile phase of strong strength. If the solvent strength of the mobile phase became stronger when a part of sample had already flowed out of the column, the sample would be released faster from the stationary phase packed in the end of the column. Then, that would cause a shoulder or jump on the chromatogram monitored using a post-column detector.

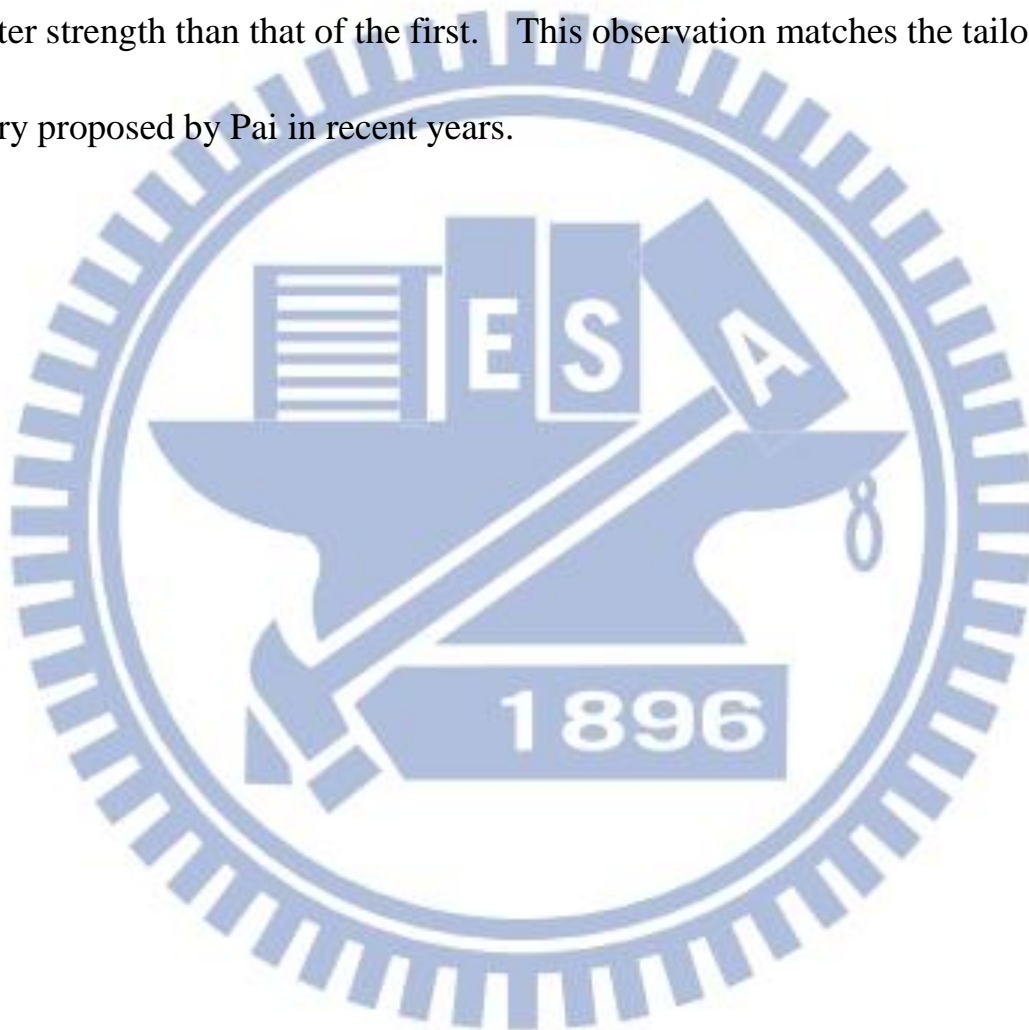
In this research, we used whole-column detection (WCD) and a UV/Vis detector to examine the influence of stepwise elutions at which the mobile phase was changed at different time when the sample appeared at the end of the column. The WCD was used to obtain the spatial distribution of sample which was not available in using the post-column detector.

It is suggested that both the compression effect and diffusion effect would affect the peak shape. Which effect dominated was decided by the difference of solvent strengths of the two mobile phases. When the difference of the solvent

strengths was large, the compression effect dominated, and vice versa.

In addition, there would appear a shoulder on the chromatogram if the strength of second solvent was not much greater than that of the first solvent.

However, there would be a signal jump if the second solvent possessed a much greater strength than that of the first. This observation matches the tailography theory proposed by Pai in recent years.



目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖目錄.....	vii
表目錄.....	ix
第一章 緒論	
1.1 前言.....	1
1.2 研究動機.....	3
第二章 研究背景與文獻回顧	
2.1 層析法發展簡介.....	5
2.2 平板理論(plate theory).....	6
2.3 郵包模型(parcel model).....	14
2.4 全管柱偵測(WCD)系統介紹.....	22
第三章 實驗	
3.1 實驗藥品.....	26
3.2 儀器裝置.....	26
3.3 儀器組裝及各裝置介紹.....	27
3.3.1 管柱.....	29

3.3.2 WCD 系統.....	30
3.3.3WCD 系統操作界面設定.....	31
3.4 數據類型定義.....	34
3.5 實驗流程.....	36
3.6 實驗步驟.....	38
3.6.1 移動相由 85/15 跳動至 100/0(甲醇/水)，流速為 1 mL/min.....	38
3.6.2 移動相由 70/30 跳動至 100/0(甲醇/水)，流速為 2mL/min.....	39
第四章 結果與討論	
4.1 數據處理.....	41
4.2 波形參數指標.....	42
4.3 數據結果討論.....	44
4.3.1 移動相由 85/15 跳動至 100/0(甲醇/水).....	44
4.3.2 移動相由 70/30 跳動至 100/0(甲醇/水).....	53
第五章 結論.....	70
參考文獻.....	72

圖目錄

圖 1-1	不同時間變換動相可能造成的波形特徵.....	3
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.....	7
圖 2-2	(a)階梯式沖堤示意圖(b)連續式沖堤示意圖.....	13
圖 2-3	樣品在單一郵包(parcel)內平衡示意圖.....	18
圖 2-4	簡化的樣品在郵包內平衡示意圖.....	20
圖 3-1	實驗裝置圖.....	28
圖 3-2	玻璃管柱結構.....	29
圖 3-3	詳細實驗裝置圖.....	31
圖 3-4	電腦操作介面圖.....	33
圖 3-5	管外時圖和管內空圖的定義.....	35
圖 3-6	遷移路徑圖與遷移曲線之定義.....	36
圖 4-1	滯留因子計算方式圖示.....	43
圖 4-2	移動相為體積比 85/15(甲醇/水)的管外時圖.....	44
圖 4-3	分別在不同層析時間變換移動相為甲醇.....	46
圖 4-4	移動相由 85/15(甲醇/水)跳至純甲醇基線飄移校正曲線.....	47
圖 4-5	基線校正過後的管外時圖.....	48
圖 4-6	各管外時圖所對應的管內空圖.....	50
圖 4-7	樣品在管柱末端遭遇沖堤能力較強移動相的計算波形.....	52

圖 4-8 移動相為體積比 70/30(甲醇/水)的管外時圖.....	53
圖 4-9 分別在不同層析時間變換移動相為甲醇.....	56
圖 4-10 基線飄移校正曲線.....	58
圖 4-11 基線校正過後的管外時圖.....	60
圖 4-12 波峰高度對應變換移動相時間圖.....	61
圖 4-13 各管外時圖所對應的管內空圖.....	66
圖 4-14 等位沖堤(圖 4-8)實驗中的管內空圖.....	66
圖 4-15 變換移動相時間為第 4、7、9、11、15、17 分鐘之管柱中段管內空 圖.....	67



表目錄

表 2-1 郵包模型(parcel model)電腦試算表格.....	21
表 3-1 實驗條件整理表.....	40
表 4-1 不同變換移動相時間之波峰高度.....	61
表 4-2 圖 4-15 中各圖譜之波峰最高位置、訊號強度整理表.....	68



第一章 緒論

1.1 前言

在二十世紀中期以前，混合物的分離大都是以傳統的方法如沉澱、蒸餾及萃取來實現。至今，則常以層析和電泳法來進行，尤其是多成分且複雜的樣品，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的成長。這些方法對科學界的巨大衝擊，可由 1952 年諾貝爾頒發給 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 年間可以列出 12 個諾貝爾獎，在他們的研究工作中層析法都扮演重要的角色[1]，可見層析法對科學界的重要。

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。

Pai 於 2002 年發表之尾論(Tailography)[2]，以及 2003 年發表於同一期刊之 Parcel model[3]皆指出：「由傳統單一通道偵測器(single-channel detector)所獲得之以時間單位為橫軸的圖譜結果，並非流析管路中樣品的真實空間分佈」，在忽略時間效應(temporal effect)的情況下，會對傳統偵測器所收集到的訊號產生錯誤的解釋，此類型之疏失不只發生在流動注入分析(flow injection analysis, FIA)系統中[4-7]，也會發生於被廣泛使用的層析系統裡。

在 Pai 所發表之文獻中暗示傳統層析理論需要做修正，並且，在後來的研究中，其陸續發展出一系列模擬層析行為之理論公式，要證實這些公式的正確性，除了必須得到傳統之樣品流經管柱後的層析圖譜訊號，還必須獲得在沖提過程中，於管柱內的樣品空間分佈訊號，有鑑於此，本研究室設計了有別於傳統的偵測系統，組裝成全管柱型偵測系統(whole-column detection, WCD)，以便得到大範圍觀測視窗(長達 21 公分)，完整記錄層析管柱內樣品波型分佈，結合傳統單一光徑吸收光譜偵測器，組成一套完整的多功能偵測系統，能同步觀察管柱內、外之樣品流析訊號，期望以此系統所獲得實驗數據來驗證 Pai 所提出之相關層析學說。

1.2 研究動機

在文獻中[3]Pai 曾經利用電腦計算推導出，樣品在管柱末端感受到移動相沖堤能力變大時，原本滯留於固定相的樣品便會加速被釋出到移動相中，此時，裝置在管外的 UV/Vis 偵測器可偵測到樣品吸收強度的增強；若移動相沖堤能力改變劇烈，即移動相改變時間很快或移動相極性變化幅度很大，則樣品被固定相釋出的強度會更高，所以管外偵測器就更容易出現不規則的波動(圖 1-1)。

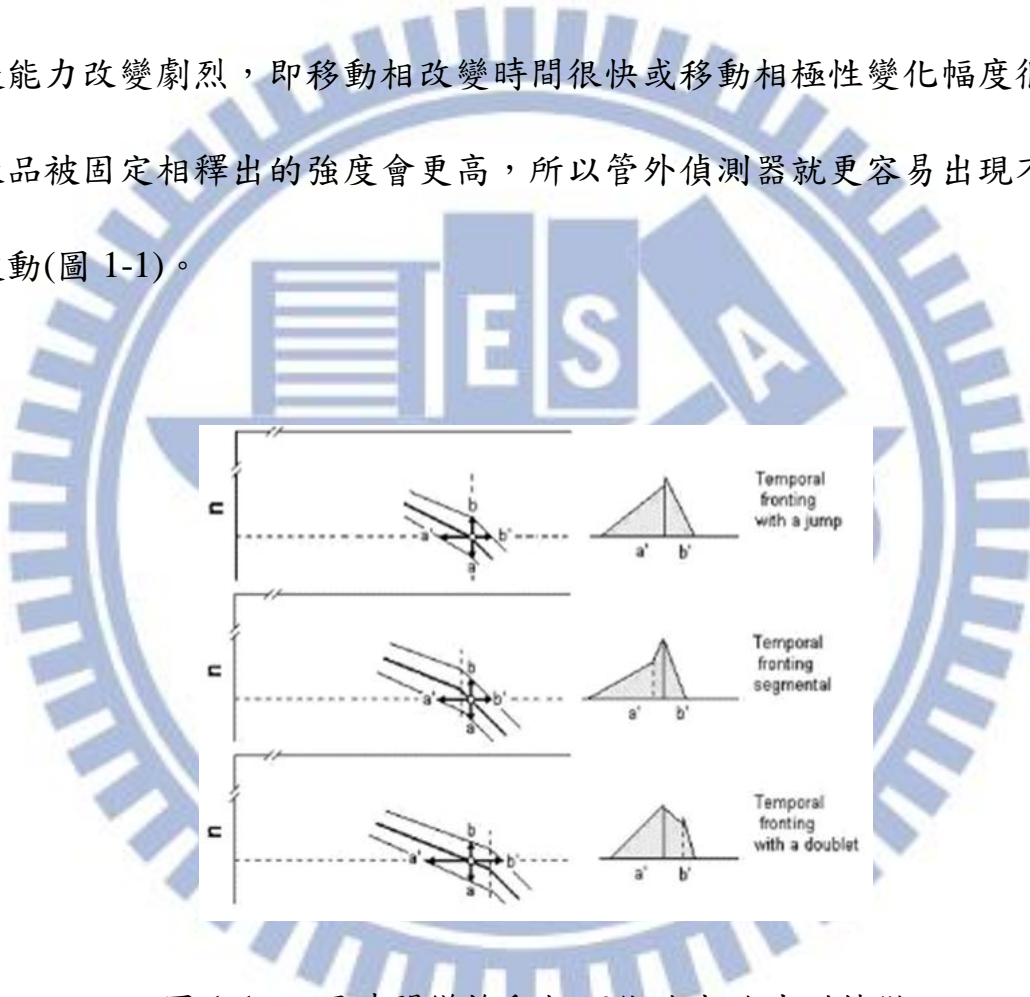


圖 1-1 不同時間變換動相可能造成的波形特徵
左圖為不同時間變換移動相之空時矩陣作圖(見 2.3 郵包模型)，右圖為計算出的相對應層析圖譜，由 Pai 的計算推導可得到一些不對稱的波形改變。

根據文獻的說法[3]，階梯式(stepwise)的沖堤過程相當符合移動相變化劇烈的條件，文獻中[8, 9-13]也有利用階梯式沖堤的例子，此種沖堤方式也常常被應用於蛋白質的分離中，而這些文獻裡[14, 15]，圖譜中確實出現其作者並未解釋的波峰不對稱跳動。

雖然此種特殊波形對於實際分離上並無太大的影響，但卻沒有文獻清楚的解釋其成因，便讓我們更加好奇是不是如同文獻[3]所解釋的，因為移動相沖堤能力變化劇烈所造成，因此啟發了探討此問題的想法。



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，利用其在一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。若使用之移動相為液體，固定相為固體的支持物，則稱為液相層析法(liquid chromatography, LC)。

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之達到更佳的分離效果，例如從固定相合成與化學修飾法改進[16]、改變固定相不同化學鍵結方式以增加選擇性[17]、增加固定相之化學穩定性[18]、使用直徑小於 2 μm 之固定相材料[19-22]以及將所用固定相形狀改為規則球狀等方式[23-25]，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，欲使用以上之固定相製做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[26-28]，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[29]。

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」的方式記錄。在以上所述的耐高壓不鏽鋼管柱開始使用後，液相層析管柱就如同黑盒子一般，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的偵測器時所接收到的訊號，然後再對所得之訊號進行研究與探討，故樣品在管柱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是於 1941 年由 Martin 和 Synge 所提出的平板理論(plate theory)[30]，他們將層析管柱視為類似蒸餾塔，由有限個獨立但連續的薄層所組成，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前移動，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，並不斷的 forming 新的平衡。此平板之高度即為理論版高(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(plate number, N)之關係式如下:

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

L :管柱內有填充固定相之長度

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

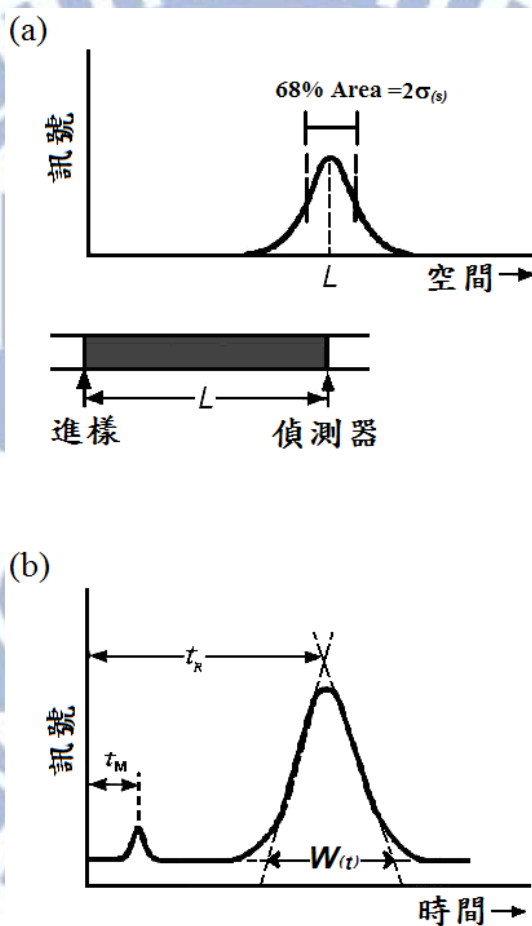


圖 2-1(a)理論板高之定義(b)以時間為橫軸之典型層析圖譜

圖(a)中， L 為管柱固定相之長度， $\sigma_{(s)}$ 為以管柱長度為橫軸時波形的標準偏差值。理論板高原始定義為式(2-2)

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

$W_{(t)}$:在層析峰的兩側轉折點做切線延長，其與層析峰基線交會之長度

一分析物 A 之 k 值的定義為： $k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

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

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

N :理論板數

H :理論板高

L :管柱固定相之長度

$\sigma_{(s)}$:以管柱長度為橫軸(空圖)時的波峰標準偏差

層析管柱的分離效率隨著理論板數的增加以及理論板高的減少而增加，然而通常管柱的分離效率有明顯差異之原因為管柱形式、移動相與固定相選擇不同所導致[31]，然而以一般常用之偵測器，所得之訊號是以時間為橫軸的典型層析圖譜，樣品在抵達層析管柱末端之空間波峰標準偏差 $\sigma_{(s)}$ 與常見層析圖譜所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， $L/t_R = u_m$

在高斯波形下，時間波峰標準偏差 $\sigma_{(t)}$ 與時間波峰寬度 $W_{(t)}$ 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 即可得到式 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

藉由上述單位的轉換，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 和式 2-8 計算出理論板數以及理論板高。

得理論板數及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半位置處的兩側波峰寬度總和。故理論板數與理論板高可由式 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的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 在移動相及固定相之分佈常數(distribution constant)， K_A 之定義如式 2-12 所示：

$$K_A = \frac{c_S}{c_M} \quad (2-12)$$

c_S :分析物 A 在固定相的莫耳濃度

c_M :分析物 A 在移動相的莫耳濃度

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

[32]，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和，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)以及四氫呋喃(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，採用固定相移動相組成的沖提過程稱為等位沖提，而在沖提過程中，改變移動相之組成的沖提過程則稱為梯度沖提;文獻指出[33, 34]，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，以下將簡單介紹兩種梯度沖提模式:

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[8, 9-13]，將階梯式沖提應用在液相層析法上，此種沖提模式曾用於分離蛋白質之親和性層析應用上[35]，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，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之移動相，如圖 2-2(b)所示，此種模式可用於天然物之分離[33, 36-38]。

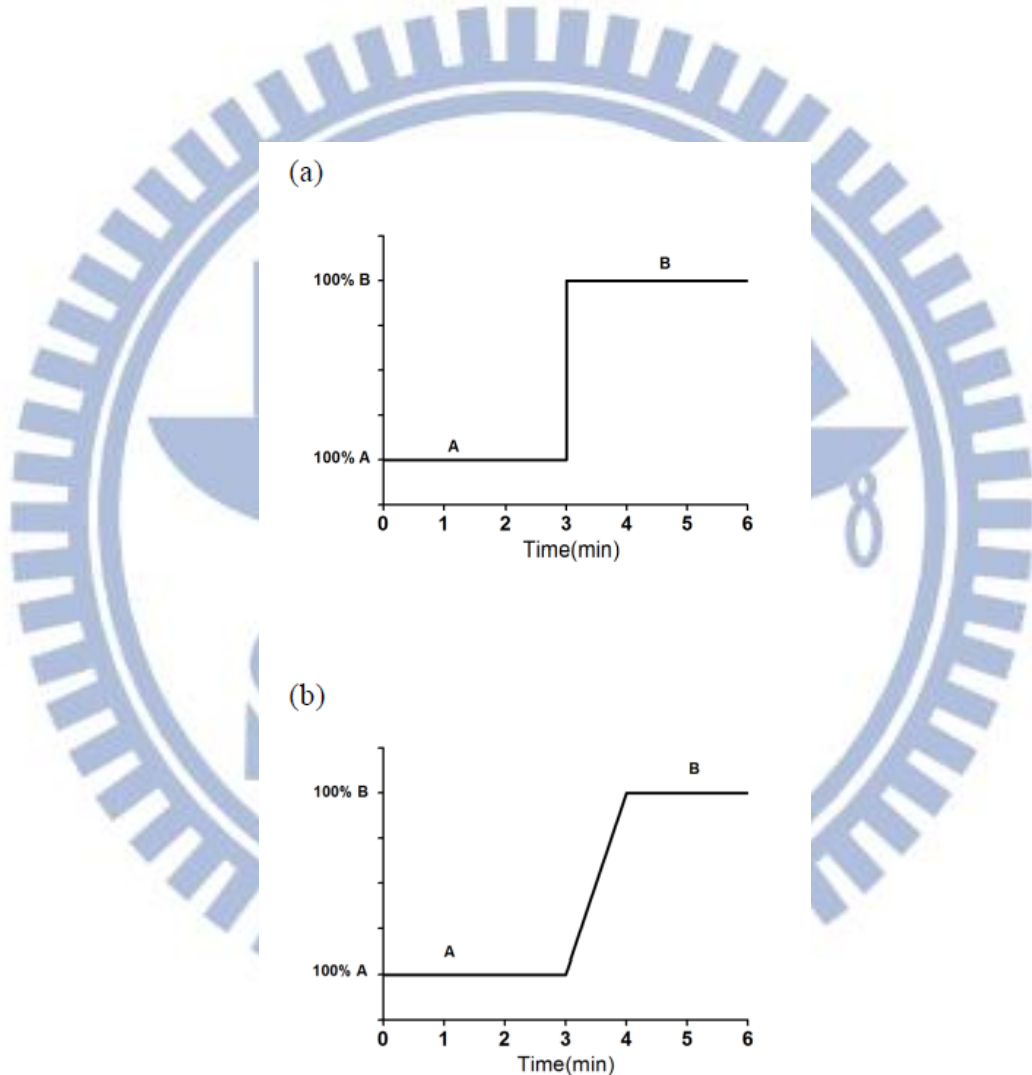


圖 2-2(a)階梯式沖提示意圖(b)連續式沖提示意圖

根據上述文獻可總結使用梯度沖提之優點:

- (1) 可增加混合物的全面分離能力
- (2) 透過縮短分析物滯留時間，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 郵包模型(parcel model)

在本論文前言的部分有提到郵包模型(parcel model)的起源，即 Pai 於 2003 年發表於 Journal of Chromatography A.的論文 Parcel model for peak shapes in chromatography[3]，並希望透過此模型解釋 HPLC 實驗中各種波型的變化。

Pai 將傳統的平板理論(plate theory)加以延伸成為矩陣模型，用電腦運算此矩陣以模擬樣品在管柱中發生的各種層析行為。此種運算模式下，可推演計算出許多種的波形，包括近高斯、拖尾或趨前的波形，

這些波形不對稱的情形，大體上可歸咎於兩種原因:空間(spatial)因素和時間(temporal)因素。空間(spatial)因素主要是緣於樣品在管柱中自然發生的擴散現象;而時間(temporal)因素則是由於”固定相位置的偵測器”及”隨著時間而逐漸變寬的樣品空間波峰”交互作用之下產生的”扭曲波形”(temporal distortion)，即固定相位置的偵測器將不同時間通過的樣品吸收訊號重新組

合成最後輸出的管外時圖。

根據郵包模型，在等位沖堤的情形下，管外時圖波形(chromatographic peak)通常呈現”拖尾 (prolonged tail)”的形狀，即波的最高點偏左的不對稱形態;在非線性沖堤，也就是梯度沖堤(gradient elution)的情形下，其管外時圖波形(chromatographic peak)會有”拖尾(prolonged tail)”也會有”趨前(fronting tail)”的形狀。

Pai 認為「在大多數波形不對稱的例子中，時間因素造成的波形扭曲相當重要，且為不可忽略的因素，並不是所有管外時圖波形的不對稱都起因於樣品空間波峰的形狀」，特別的地方在於此論點與許多前人的研究不太相同，甚至，也和現行教科書內容有所差異。

以下將對 parcel concept 做更進一步的介紹:

1. 樣品在一平板(plate)中的平衡

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (2-15)$$

K :樣品的分配係數(distribution constant)

c_S :樣品在固定相中的濃度

c_M :樣品在移動相中的濃度

在體積為定值的情況下:

$$k = \frac{m_S}{m_M} \quad (2-16)$$

k : 質量分配係數(mass partition ratio)

c_s : 樣品在固定相中的質量

c_M : 樣品在移動相中的質量

在層析過程中，樣品在動固定相間只能達成”動力學平衡”，無法達成式 2-16 所表示的”熱力學平衡”，故再加入一參數 d_u 來表示到達熱力學平衡的程度，如式 2-17，當 $d_u=1$ 時，就表示樣品有足夠時間來達到熱力學平衡：

$$k' = d_u \times k \quad (2-17)$$

k' : 動力學分配係數(dynamic partition ratio)，會受到溫度、移動相成分影響

2. 郵包概念(parcel concept)

在傳統平板理論(plate theory)中，板高表示管柱中的單位長度(unit section)，而郵包概念(parcel concept)就是要探討時間對於波形的一些影響，故又多了一項”時間”參數，由時間和空間這種二維的方式表達整個層析過程。

某特定時間和某特定空間形成一個”郵包(parcel)”，將管柱長度以 n 等分、將流析時間以 τ 等分，則整個層析過程中將有 $(n \times \tau)$ 個郵包(parcel)，郵包(parcel)為此矩陣(matrix)中最小的單位，如式 2-18、2-19、2-20 所表達：

$$L = n \times \Delta L \quad (2-18)$$

$$t = \tau \times \Delta t \quad (2-19)$$

$$P(n, \tau) \quad (2-20)$$

L :層析管柱的全長

ΔL :管柱 n 等分後，每一等分的長度

t :樣品流析所需總時間

Δt :樣品流析所需總時間 τ 等分後，每一等分的時間

P :某特定管柱長度在某特定時間的狀態，即某特定郵包 (parcel)

3.某特定郵包中樣品質量(mass flux)的進出情形

對某特定郵包而言，樣品質量的進出主要可區分為三種類型:

1.在移動相中隨之流動的樣品，隨著流析時間在管柱內往偵測

器方向移動。

2.被固定相滯留的樣品，隨著流析時間，其在管柱內的位置並

不會有所改變。

3.樣品也會自然而然的向四面八方擴散，也就是說，對某特

定郵包而言，在上一個時間單位，樣品會由管柱前一個郵包和後一個郵包流入此郵包;到了下一個時間單位，此郵包內的樣品也同樣會藉著擴散(diffusion)原理注入管柱前一個郵包和後一個郵包。

上述三種樣品質量(mass flux)的移動可用圖 2-3 來表示，圖 2-3 中，橫軸表示流析時間，縱軸則代表管柱中的位置:

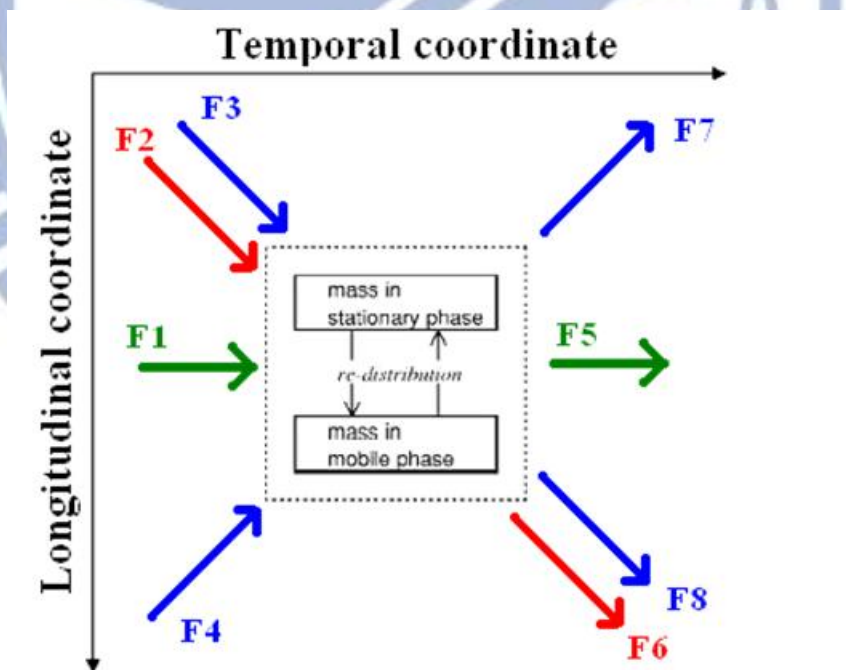


圖 2-3 樣品在單一郵包(parcel)內平衡示意圖

F2、F6: 在移動相中隨之流動的樣品，隨著流析時間在管柱內

往偵測器方向移動。

F1、F5: 被固定相滯留的樣品，隨著流析時間，其在管柱內的

位置並不會有所改變。

F3、F4: 在上一個時間單位，樣品由管柱前一個郵包和後一

個郵包流入此郵包。

F7、F8: 下一個時間單位，此郵包內的樣品藉著擴散

(diffusion)原理注入管柱前一個郵包和後一個郵

包。

由於Pai提出郵包模型(parcel model)的目的主要是為了探討層析管外時圖波形的不對稱因素，圖 2-3 中，樣品在管柱中的擴散行為並無方向性，而是四面八方的擴散，及對稱的形式往外擴散，故對於管外時圖的不對稱並無貢獻。有鑑於此，Pai 將圖 2-3 簡化成圖 2-4，省略了擴散的樣品流向，並將此坐標系擴展到數個郵包並存的型態，更用此圖表現出樣品於郵包內動固定相間的平衡:

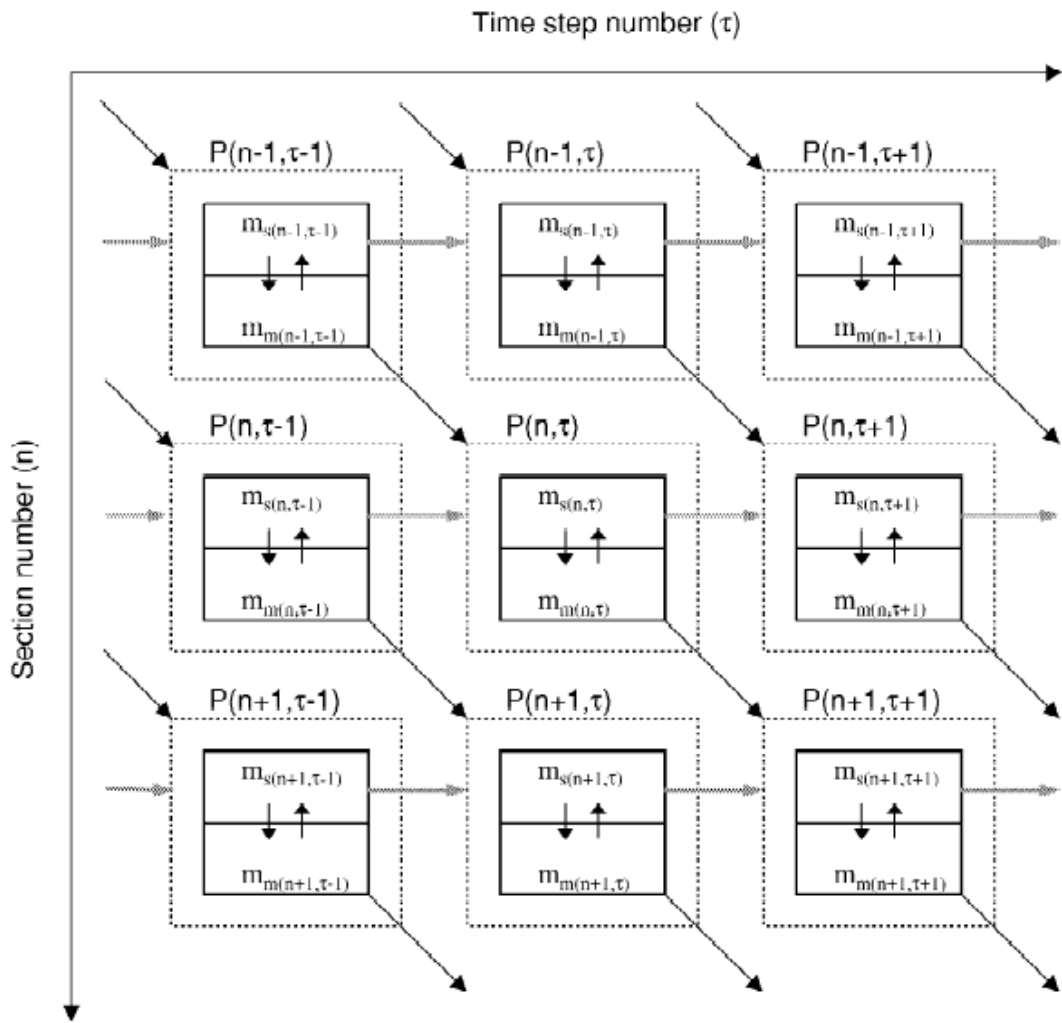


圖 2-4 簡化的樣品在郵包內平衡示意圖

m_s : 某特定郵包中的固定相(stationary phase)

m_m : 某特定郵包中的移動相(mobile phase)

4. 利用電腦來運算郵包模型(parcel model)

利用電腦來運算上述郵包模型便可增加郵包數量，以模擬真正的層析過程。

大致計算方式如表 2-1 所示：

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		$\tau =$	0	1	2	3	4	5	6
2		$\lambda =$	0	0	0	0	0	0	0
3		$k^*(\tau) =$	1	1	1	1	1	1	1
4		$n =$							
5	0		0	0	0	0	0	0	0
6			1	0	0	0	0	0	0
7	1		0	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031	0.016
8			0	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031	0.016
9	2		0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.078
10			0	0.000	0.250	0.125	0.063	0.031	0.016
11	3		0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.188	0.156
12			0	0.000	0.000	0.125	0.188	0.188	0.156
13	4		0	0.000	0.000	0.000	0.063	0.125	0.156
14			0	0.000	0.000	0.000	0.063	0.125	0.156
15	5		0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.078
16			0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.078
17	6		0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
18			0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016

表 2-1 郵包模型(parcel model)電腦試算表格

橫軸為時間單位，縱軸為長度單位， τ 表示第幾個時間單位，而 n 則代表的幾個長度單位，即式 2-18、2-19、2-20 中的 n 和 τ ，可用 (n, τ) 的方式來表示某特定郵包。此表格中，樣品在動固定相之間的分配係數(partition constant)為一，故每格郵包中樣品在移動相和在固定相的質量是一樣的。

承表 2-1，若固定相某格時間單位，用樣品訊號強度對管柱位置做圖，則可得到某時間點的管內空圖；反之，若固定相某格長度單位，用樣品訊號對流析時間作圖，則可得到某位置設置管外偵測器所得到的管外時圖。由空圖和時圖的對應，便可一窺如同黑盒子一般的管柱內部，了解到底在層析過程中樣品發生了怎樣的流體行為。

2.4 全管柱偵測(WCD)系統介紹

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

第一篇有關多通道偵測系統的文獻於 1988 年發表[39]，Evans 和 McGuffin 使用雙通道偵測器來觀察螢光樣品在毛細管中的流動行為，藉著觀察分析物在兩偵測點間的趨勢，可排除分析管柱中所謂的管外效應(extracolumn effect)對樣品產生的影響。之後，Rowlen 等人設計了一組解析度更高的多通道偵測系統[40, 41]，將 14 組紫外光感二極體(UV-sensitive photodiode)架設在玻璃材質的層析管柱外，用來即時觀察樣品在層析管柱中進行沖堤時的遷移分佈情形，對這種偵測系統，作者命名其為全管柱偵測(WCD)系統，但在這套偵測系統開發出來前，作者在 1986 年便以電腦模擬

的方法來表現全管柱偵測器觀察流體行為的結果[42]，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) 有相當的優勢與價值，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布與流析時間。
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(retention factor)。
4. 可測量動固定相間平衡的速度。
5. 可以實驗證明滯留因子在線性層析(linear chromatography)或者非線性層析(non-linear chromatography)過程中的改變狀況。

當 WCD 系統的用法及優勢被提出來後，相當多的分離科學家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)為訊號接收器，這是一種陣列式的光電耦合檢像器，上有許多排列整齊的電容能感應光線，並將影像轉變成數位訊號，在擷取影像時，有類似傳統影片的感光作用，

常被應用於數位相機、光學掃描器與攝影機等感光元件。CCD 的使用大幅增進了 WCD 系統的效能，其陣列式的電路排列除了大幅提升偵測器空間解析度以外，影像擷取的效果還可以讓使用者觀察到更生動真實的樣品分析過程。

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[43, 44]。

除了以具透光性的熔融二氧化矽運用於毛細管電泳外，在液相層析的發展初期，其實也是以具透光性的玻璃材質的層析管柱來進行分離實驗的，所以在 WCD 技術開始發展後，便有科學家使用錄影影像擷取的偵測方法來觀察填充固定相後的玻璃管柱內樣品移動的情形。Tamura 等人以 CCD 攝影鏡頭來直接紀錄發螢光樣品在逆相光效能層析(reversed-phase high performance liquid chromaography)玻璃管柱中的分離過程影像[45, 46]。

Guiochon 等人也設計了一套 WCD 系統，用來收集層析系統中樣品沖堤過程中的影像訊號[47-49]，並且點出一般 HPLC 管柱中常用來防止固定相流失的擋板也會對樣品在空間上的波形產生影響。以上所介紹的這些 WCD 系統，都是以影像收集的方法獲得在玻璃管柱內樣品移動過程中的空間濃度

分佈，然後在近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、樣品分佈範圍，藉由獲得更多樣品在層析過程中的動態層析資訊(dynamic chromatography information)，將有助於分析管柱內所發生的層析流體行為，進而改善實驗條件來達到分離效率提升的目標。

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

第三章 實驗

3.1 實驗藥品

Anthrarufin (1,5-Dihydroxyanthraquinone), $C_{14}H_8O_4$, 分子量 240.21, 純度 90%, 購自於 Alfa aesar (Ward, MA, USA), 最大吸收波長 425nm, 溶於丙酮中使成為樣品溶液, 濃度 218.4 mg/L, 丙酮屬 HPLC 級溶劑(99.9%), 購自 Aldrich(Louis, MO, USA)。

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 18.2MΩ 去離子水。

3.2 儀器裝置

(a) 往復式梯度沖提幫浦(Reciprocating Pump)

Series4(購自 Lab Alliance, PA, USA), 輸出體積

流速範圍 0.001mL/min~9.99mL/min。

(b) 進樣閥門(Sample injection valve)

進樣用的六向閥, 購自 Valco (Houston, TX, USA)。

(c) 內體積 20μL 的樣品迴圈(sample loop)

(d) 管柱(column)

以玻璃管柱自行填充固定相, 耐壓 900psi。

(e) UV/Vis 偵測器

Waters486(購自 Milford, MA, USA)。

(f) 全管柱偵測器(whole-column detector, 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。



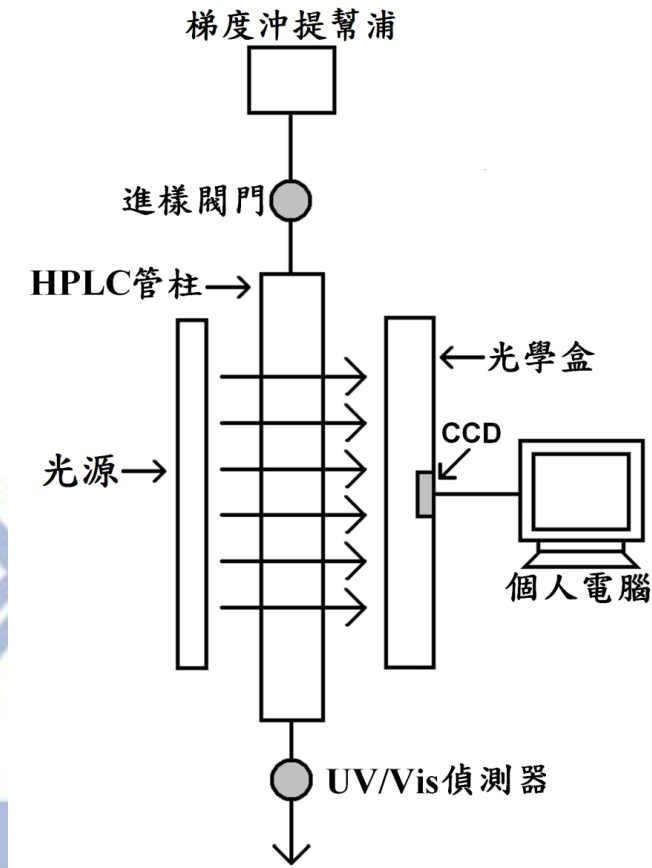


圖 3-1 實驗裝置圖

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。

3.3.1 管柱

玻璃管柱購自於 Omnifit (Danbury, CT, USA)，具有可調端之組件(圖 3-2A)，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 $10\mu\text{m}$ 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 20 公分，內徑 6.6 毫米，填充 $10\mu\text{m}$ ODS 作為固定相之玻璃管柱，管柱結構如圖 3-2 所示。

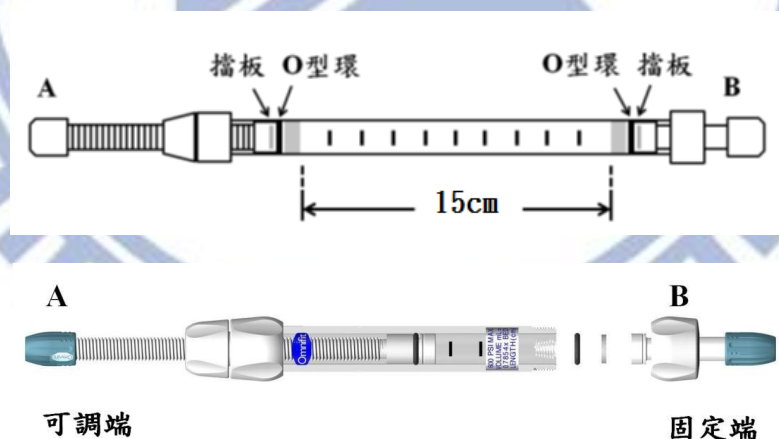


圖 3-2 玻璃管柱結構圖

管柱規格:固定相長度 20 公分，內徑 6.6 毫米，內含擋板(frit, $10\mu\text{m}$)。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 部分則為固定相端。

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焦的透鏡，透過此光學盒所設計的光學路徑，21 公分寬的影像可被聚集在一個 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 3-3 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 軸調整機座分別為兩個部分，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，但光線可藉由擴散反射(diffuse-reflection)的方式穿越於固定相空隙間。以上述方式所收集的穿透光線並非一般常見的吸收光譜測量法，但根據文獻[40, 41]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訊號後抵達 CCD 的訊號，令其為 P_0 ，樣品注入的同時，再次啟動 WCD 系統收集樣品在通過管柱過程中所有光線強度訊號，令其為 P ，吸收值 $A = \log(P_0/P)$ ，此為根據 CCD 所收集之電訊號來計算樣品通過管柱過程中之吸收訊號的方法。

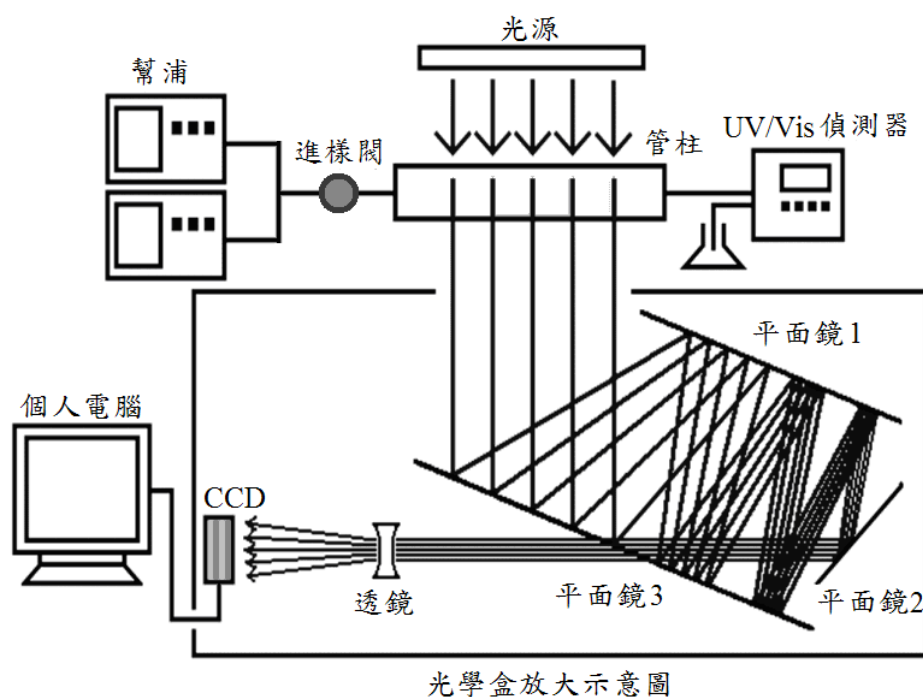


圖 3-3 詳細實驗裝置圖

光學盒內部包含三組平面鏡和一片聚焦透鏡，透過圖示內之光學路徑，21 光分寬的光線可被收集在一組寬度 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。

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介面 (圖 3-4)，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) 樣品取樣間隔時間(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(data points)

此欄可以選擇訊號收集點的數量，總共有五個選項:670、1340、2680、5360、10720，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)，若以相鄰兩點做平均積分處理，會得到 5360 個訊號收集點;若相鄰四點、八點、十六點、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，對本實驗而言其解析度已足夠。

(c) 取樣模式(sampling mode)

光學盒內部的 CCD 有塗佈材料，可以過濾掉不同波長的光源，因此，由取樣模式可以選擇光源通過 CCD 的波段，選擇模式有五種，分別為 Red、Green、Blue、Color、Grey，在本實驗中，因所選擇的光源是單波段光源，所以選擇 Grey 為取樣模式，即 CCD 不須過濾掉任何波長的光，盡可能讓所有可用的光線都能到達偵測器，提高偵測訊號的靈敏度。

(d) 曝光時間(exposure)

曝光時間是以百分比(%)的方式表示，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相為最大值 1600%(57.6 ms)。

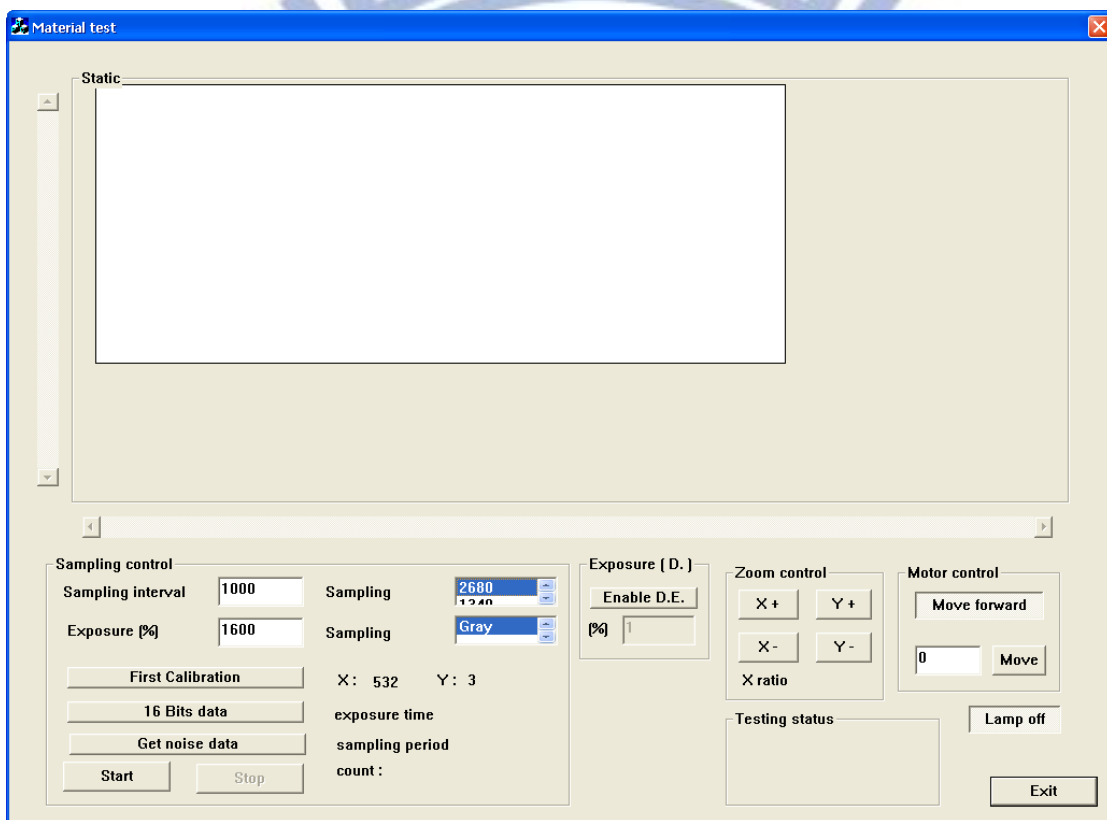


圖 3-4 電腦操作介面圖

操作介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時間前須重新輸入以外，在本研究中，偵測器曝光時間固定相為 1600%(57.6 ms)、取樣點數固定相為 2680 個、取樣模式固定相為 Grey。

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，本研究中所獲得的各種類型圖譜定義於(圖 3-5)。以 UV/Vis 偵測器收集訊號時，為固定相一個偵測管柱出口的位置，隨時間來擷取樣品通過偵測器位置的訊號，故所得的圖形橫軸座標單位為時間，縱軸座標單位為訊號強度，此類型數據即稱之為時圖(temporal profile)，且由於此組數據是在管柱外之環境所收集而得，故又稱管外(post-column)時圖。使用 WCD 系統時，可以同時偵測大範圍的樣品分布，如同瞬間拍照的方式，獲取樣品在一維管柱空間中的訊號強度值，獲得的圖譜橫坐標為管柱位置、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，若將一固定相管柱位置為偵測點，隨著時間累積所獲得的訊號，亦可獲得橫坐標單位為時間的管內時圖數據(圖 3-5)。

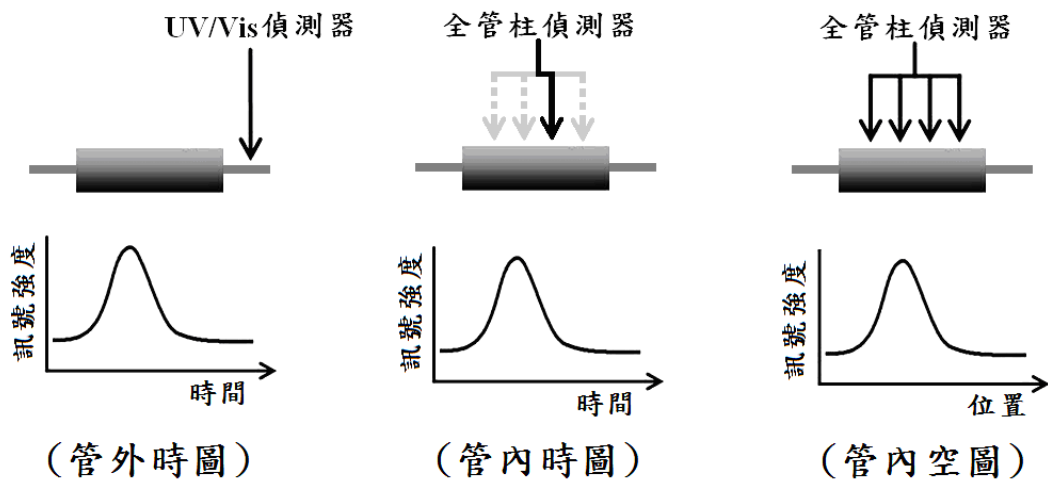


圖 3-5 管外時圖和管內空圖的定義

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，但選擇其中一固定相管柱位置為偵測點，隨時間累積而得到的訊號，可得此橫軸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。

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堤移動過程中的遷移路徑圖(migration route)如圖 3-6，WCD 在 T_1 、 T_2 、 T_3 …… T_n 等流析時間時”拍攝”到樣品於管柱內的空圖波峰訊號 $Peak_1$ 、 $Peak_2$ 、 $Peak_3$ …… $Peak_n$ ，找出以上空圖波峰之頂點分別位於軌柱位置 N_1 、 N_2 、 N_3 …… N_n 處，再將 T_1 、 T_2 、 T_3 …… T_n 與 N_1 、 N_2 、 N_3 …… N_n 等數據同時表現於同一張關係圖上，此樣品流析時間與空圖波峰頂點位置關係圖即稱之為樣品遷移路徑圖，遷移路徑圖中所繪製出的數據趨勢線則稱為遷移曲線(migration curve)，遷移曲線之斜率則代表樣品在管柱中的移動速度。

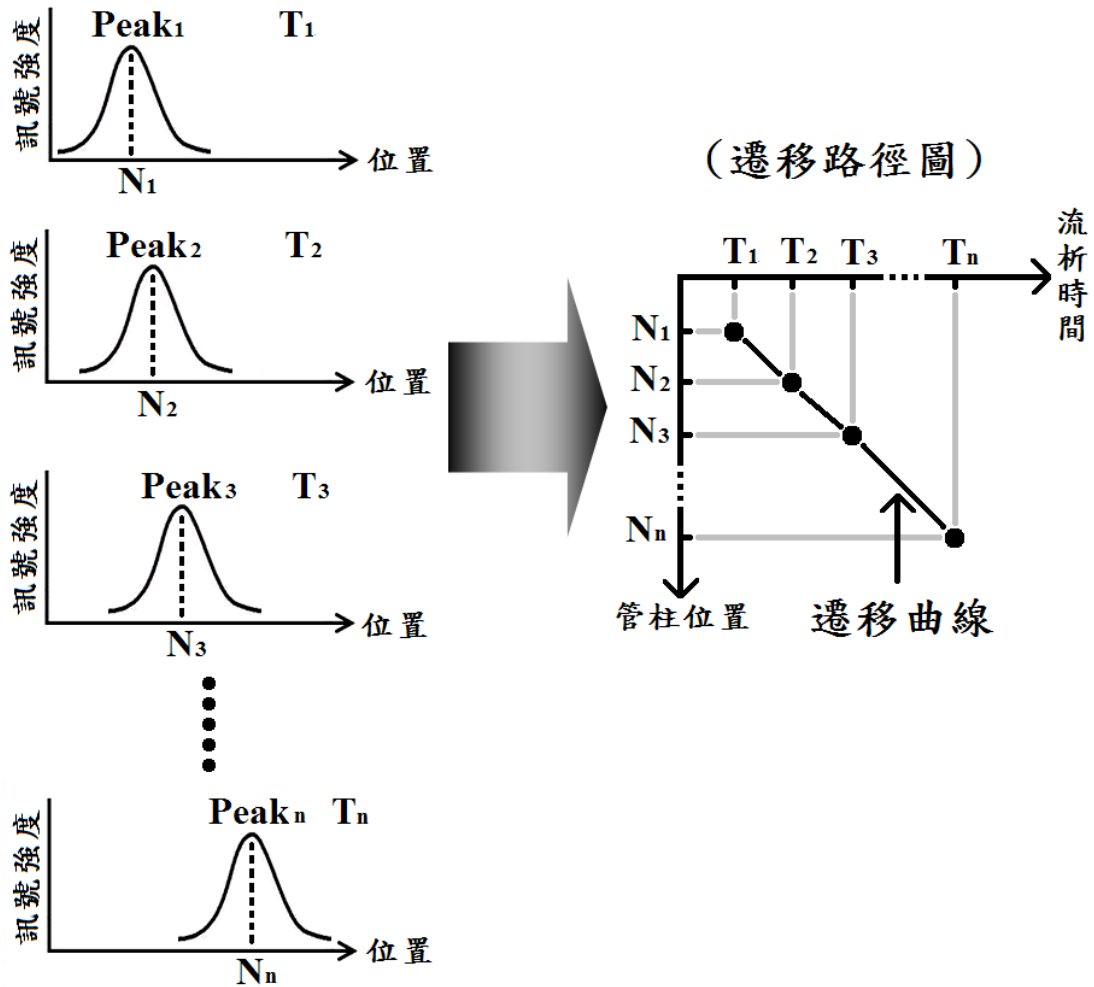


圖 3-6 遷移路徑圖與遷移曲線之定義

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，然後根據電腦操作介面上呈現的即時光源訊號強度，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) 設定電腦操作介面。
- (4) 注入樣品，並將儀器蓋上黑布避免受其他光源干擾。
- (5) 開啟幫浦進行實驗，並同時開啟 WCD 系統與 UV/Vis 偵測器兩組系統收集樣品訊號。
- (6) 從電腦操作介面上看到訊號恢復至原本狀態即表示樣品已流出管柱，此時停止收集訊號。



3.6 實驗步驟

3.6.1 移動相由 85/15 跳動(jump)至 100/0(甲醇/水)，流速為 1 mL/min

配製兩種極性不同的移動相，甲醇與水以體積比 85:15 混合均勻，此溶液為移動相 A;純甲醇溶液做為移動相 B。先以移動相 A、流速 1 mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，並注入樣品進行等位沖堤(isocratic elution)的實驗，以便決定階梯式沖堤時改變移動相的時間。

階梯式沖堤模式啟動前，先以移動相 A、流速 1 mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，接著分別在樣品注入 3、4、6、9、10、12、15 分鐘時，將移動相瞬間跳動(jump)至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6 秒內完成，即幫浦 gradient elution 程式的最短時間單位。在樣品注入的同時，開啟 WCD 系統及 UV/Vis(425 nm)偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號以及管外訊號，五種切換移動相時間的實驗搭配的 WCD 系統數據取點間距時間皆為 1800 ms。

接下來在沒有注入樣品的狀況下，執行只有移動相跳動的實驗，得到的圖用來校正上述的實驗。階梯式沖堤模式啟動前，先以移動相 A、流速 1 mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，接著分別在 UV/Vis 偵測器開始取點之後的第 3、6、9、10、12、15 分鐘時，將移動相瞬間跳動(jump)至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6

秒內完成，即幫浦 gradient elution 程式的最短時間單位。此實驗得到的圖稱為”基線校正曲線”。

3.6.2 移動相由 70/30 跳動至 100/0(甲醇/水)，流速為 2 mL/min

配製兩種極性不同的移動相，甲醇與水以體積比 70:30 混合均勻，此溶液為移動相 A;純甲醇溶液做為移動相 B。先以移動相 A、流速提高為 2 mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，並注入樣品進行等位沖堤(isocratic elution)的實驗，以便決定階梯式沖堤時改變移動相的時間。

階梯式沖堤模式啟動前，先以移動相 A、流速 2 mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，接著分別在樣品注入 4、7、9、11、15、17、20、22、23.6 分鐘時，將移動相瞬間跳動(jump)至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6 秒內完成，即幫浦 gradient elution 程式的最短時間單位。在樣品注入的同時，開啟 WCD 系統及 UV/Vis(425 nm)偵測器收集樣品流經管柱過程的樣品空間波峰訊號以及管外訊號，九種切換移動相時間的實驗搭配的 WCD 系統數據取點間距時間依序為 900、900、900、1200、1200、1200、2400、2400、2400ms。

接下來在沒有注入樣品的狀況下，執行只有移動相跳動的實驗，得到的圖用來校正上述的實驗。階梯式沖堤模式啟動前，先以移動相 A、流速 2

mL/min 的條件進行管柱平衡，之後將吸收訊號強度歸零，接著分別在 UV/Vis 偵測器開始取點之後的第 4、7、9、11、15、17、20、22、23.6 分鐘時，將移動相瞬間跳動(jump)至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6 秒內完成，即幫浦 gradient elution 程式的最短時間單位。此實驗得到的圖稱為”基線校正曲線”。

章節	起始移動相	跳至移動相	流速	變換移動相
	甲醇:水 (v/v)	甲醇:水 (v/v)		時間 (min)
3.6.1	85/15	100/0	1 mL/min	3、6、9、10、 12、15
3.6.2	70/30	100/0	2 mL/min	4、7、9、11、 15、17、20、 22、23.6

表 3-1 實驗條件整理表

第四章 結果與討論

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。

在固定相的偵測位置，以固定相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記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做出”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。

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:波峰最高點所對應之管柱位置

時圖:波峰最高點所對應樣品滯留時間(retention time)

(b)滯留因子(retention factor)

通常用來描述樣品在管柱中的移動速率(migration rate)，數值高表示移動速率慢，沖堤的時間相對較久，數值低則相反。一般而言要控制在 2~10 之間是最理想的狀態，因為沖堤太快則分離度不佳，無法定量及定性;太慢則費時且會有定量上的問題。

詳細計算方式如式 4-1、4-2 所示:

$$A_{\text{mobile}} = A_{\text{stationary}}$$
$$K = \frac{c_S}{c_M} = \frac{n_S/V_S}{n_M/V_M} \quad (4-1)$$

K :分散係數(partition coefficient)

c_S :樣品在固定相中的莫耳分率

c_M :樣品在移動相中的莫耳分率

$$k = \frac{KV_S}{V_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4-2)$$

k :滯留因子(retention factor)

t_R : 樣品的滯留時間，如圖 4-1 所示

t_0 : 移動相的滯留時間，如圖 4-1 所示

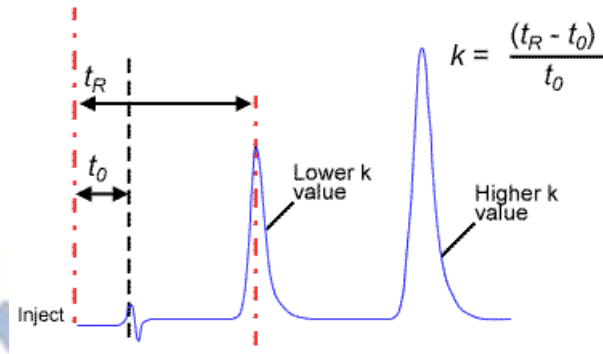


圖 4-1 滯留因子計算方法圖示



4.3 數據結果討論

4.3.1 移動相由 85/15 跳動至 100/0(甲醇/水)

圖 4-2 為等位沖堤的管外時圖，移動相為甲醇、水以體積比 85 比 15 的比例混合，流速為 1 mL/min，根據圖 4-1 的滯留因子計算方法，可計算出圖 4-2 中，層析波峰的 k 值，如式 4-4 所示：

$$k = \frac{14.5667 - 4.17}{4.17} = 2.49 \quad (4-4)$$

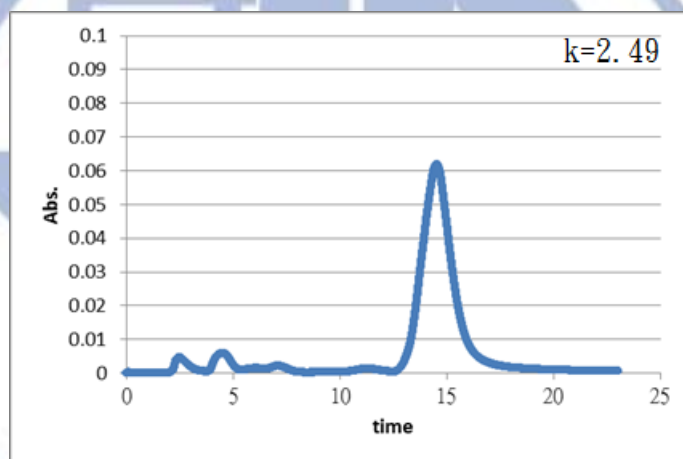


圖 4-2 移動相為體積比 85/15(甲醇/水)的管外時圖
等位沖堤的管外時圖，移動相為甲醇、水以體積比 85 比 15 的比例混合，流速為 1 mL/min，根據圖 4-1 的滯留因子計算方法，可計算出圖 4-2 中，層析波峰的 k 值為 2.49。

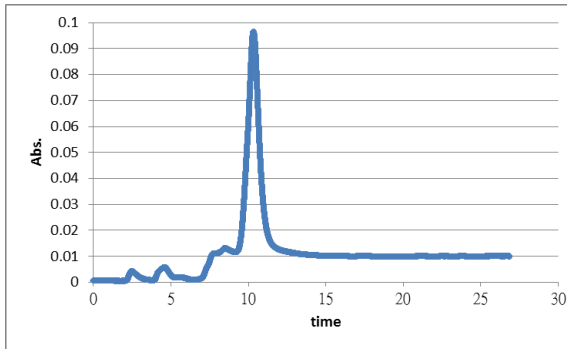
之後，以圖 4-2 等位沖堤中的移動相為基礎，即初始動相，分別在不同的層析時間變換移動相，變換成純甲醇為移動相，其管外時圖為圖 4-3，分別在 3、6、9、10、12、15 分鐘時變換移動相為純甲醇。圖 4-3 中各層析圖譜皆有基線飄移的問題，因為 UV/Vis 訊號強度在初始移動相沖堤的狀態下

歸零，而變換移動相為甲醇時，新移動相便會造成一背景吸收值，為了排除移動相吸收背景值的影響，所以需要做基線校正曲線來解決基線飄移的問題。

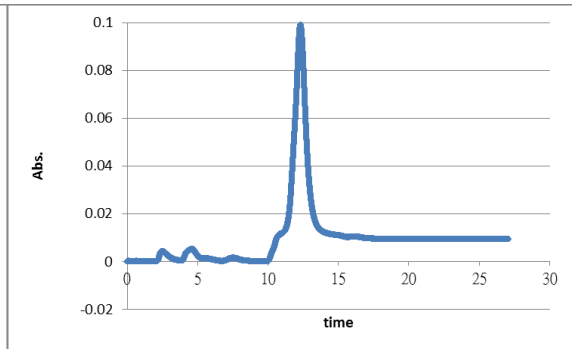
基線校正曲線的實驗方式已在本論文章節 3.6.2 中提及，除了不注入樣品之外，其餘條件參數都和圖 4-3 的實驗相同。此法，可獲得只含移動相吸收訊號強度的管外時圖，圖 4-4。發現校正曲線有跳動，之後才回到甲醇的吸收訊號強度，而非呈現平穩的階梯型態，這種來自移動相改變的訊號跳動現象曾經在文獻中被提及[50-53]，由於後來進入管柱的移動相黏度較初始移動相小，即甲醇的比例越高則黏度就越低，在兩種不同移動相的界面會有作用力產生，後來注入的移動相便會推擠前方的初始移動相，導致後方移動相在界面處產生壓縮效應(compression effect)，此被壓縮的區域流出管柱時對 UV/Vis 產生較高的吸收度，於是產生圖 4-4 中的特殊跳動波形。

將圖 4-3 中各圖譜扣除其圖 4-4 中對應的基線校正曲線，可得完全無移動相吸收強度背景值干擾的管外時圖(圖 4-5)。

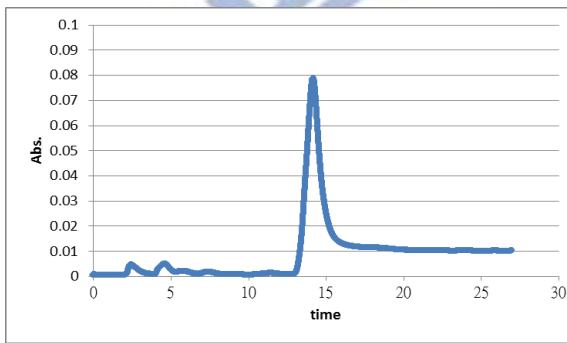
3min



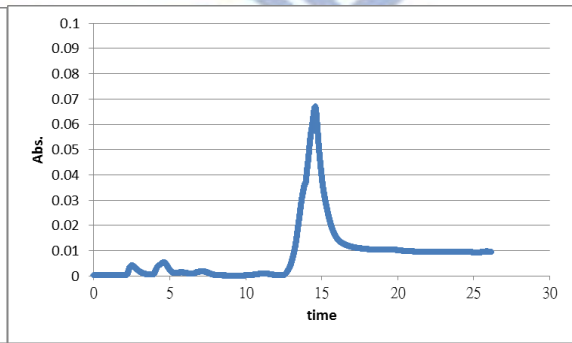
6min



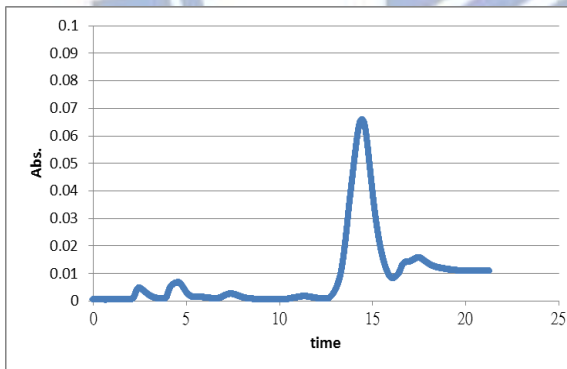
9min



10min



12min



15min

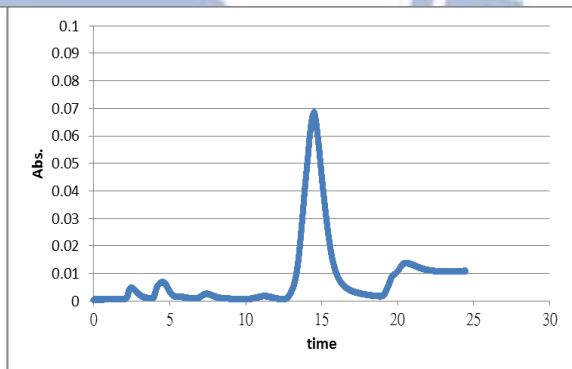
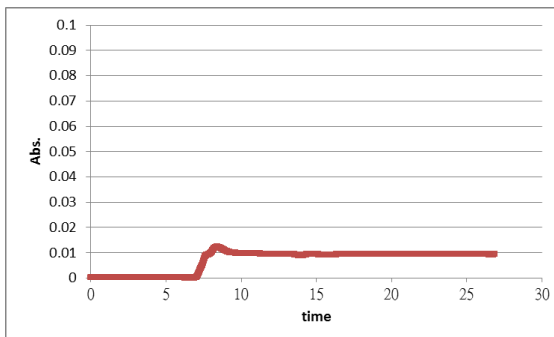
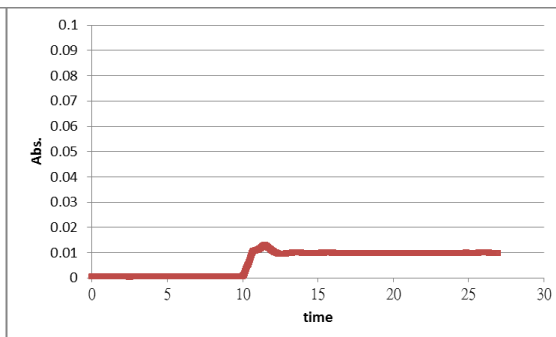


圖 4-3 分別在不同層析時間變換移動相為甲醇
以甲醇、水體積比 85:15 為初始移動相，流速 1 mL/min，分別在不同的層析時間變換移動相，在 3、6、9、10、12、15 分鐘時變換移動相為純甲醇。

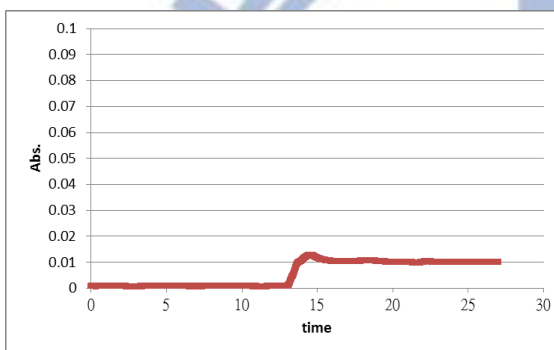
3min



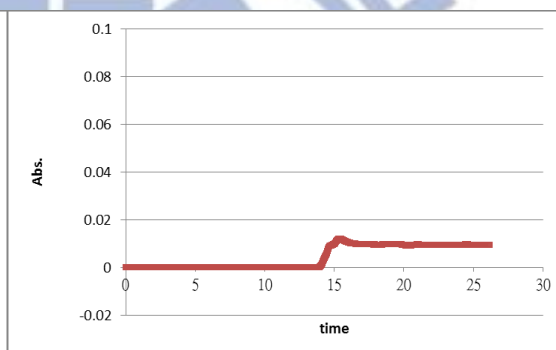
6min



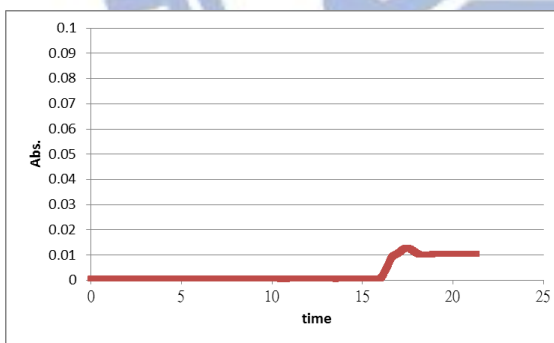
9min



10min



12min



15min

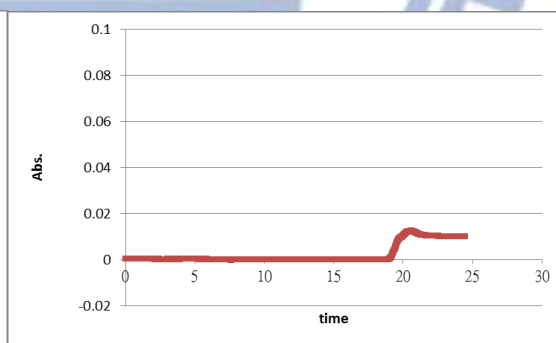
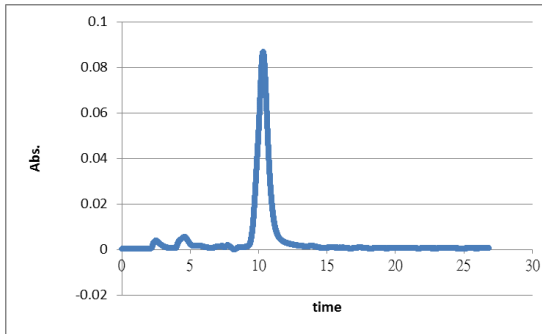
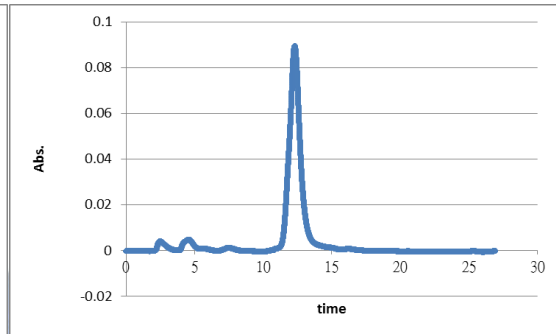


圖 4-4 移動相由 85/15(甲醇/水)跳至純甲醇基線飄移校正曲線
因為 UV/Vis 訊號強度在初始移動相沖堤的狀態下歸零，而變換移動相為甲醇時，新移動相便會造成一背景吸收值，為了排除移動相吸收背景值的影響，所以需要做基線校正曲線來解決基線飄移的問題。除了不注入樣品之外，其餘條件參數都和圖 4-3 的實驗相同。此法，可獲的只含移動相吸收訊號強度的管外時圖。

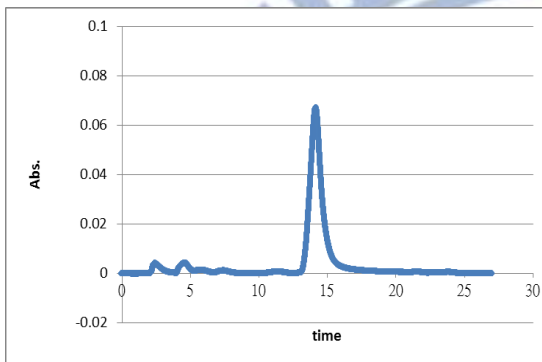
3min



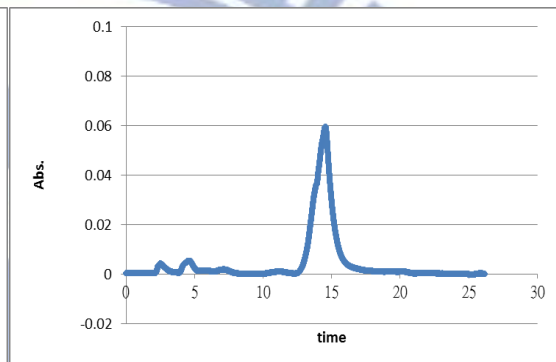
6min



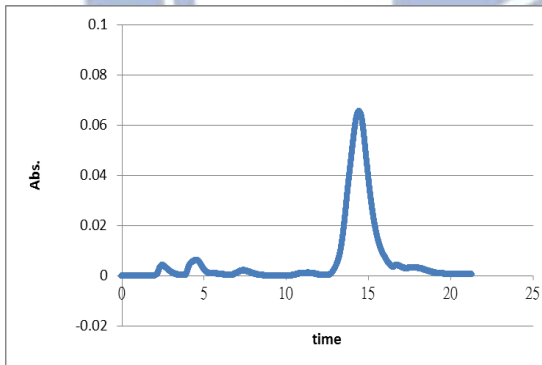
9min



10min



12min



15min

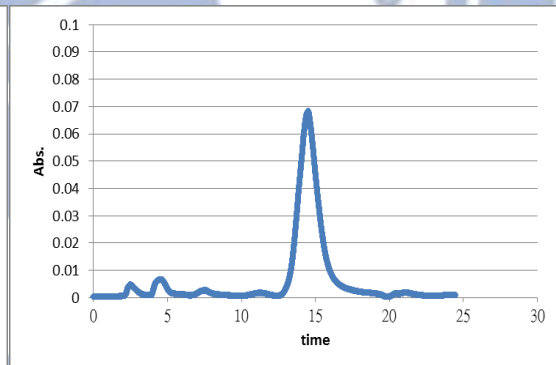


圖 4-5 基線校正過後的管外時圖

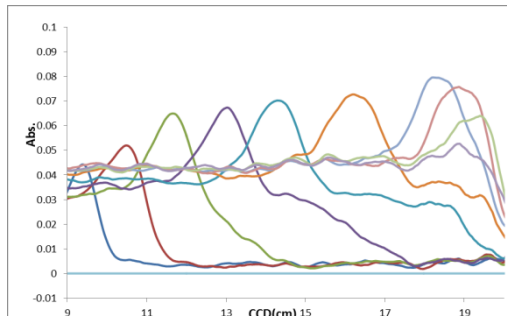
圖 4-3 中，各種不同時間變換移動相之階梯式沖堤(stepwise elution)皆出現因變換移動相而造成的背景吸收值，即基線飄移的現象，故將圖 4-3 中的各圖分別扣除圖 4-4 中相對應的基線校正曲線，便可得到此無背景值干擾的管外時圖。

由圖 4-5 可看出波峰高度隨著流析時間越長而有漸漸下降的趨勢，此為層析過程中常見的現象，因為樣品在管柱中的時間越長，就有越長的時間可以向四周擴散，樣品越不集中其波峰寬度就越寬，相對的，其波峰高度也就會越矮，所以圖 4-5 中的波形才會由又高又窄慢慢變為又矮又寬。

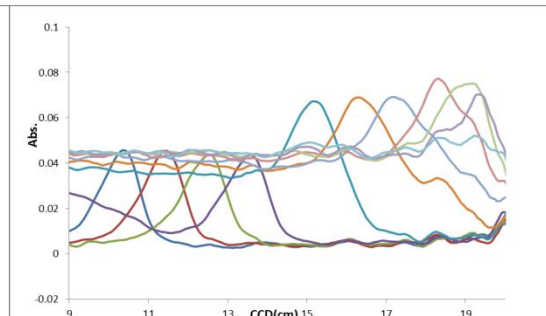
比較特別的部分是，圖 4-5 中第 10 分鐘變換移動相的層析圖譜，他的波峰高度比較矮，而且波峰形狀也比較特殊，有「shoulder」出現，而其他時間變換移動相的層析圖譜中並無此現象，故須透過管內空圖(圖 4-6)來確認其原因。



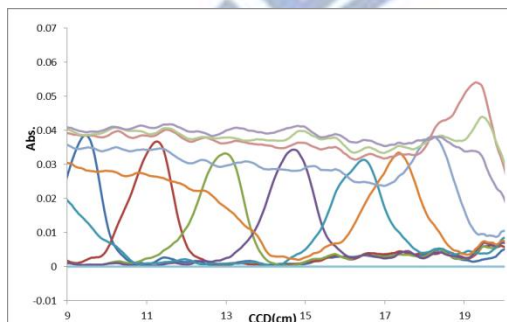
3min



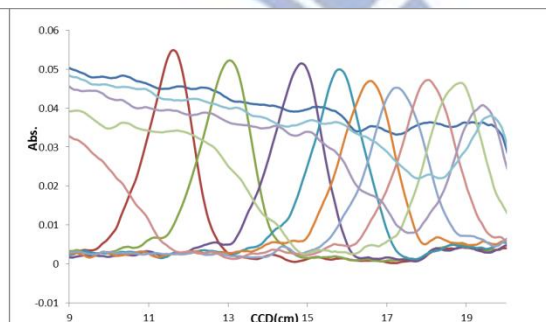
6min



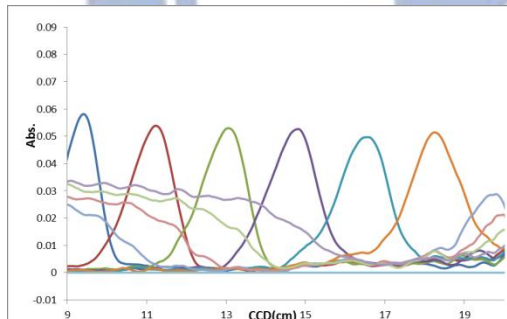
9min



10min



12min



15min

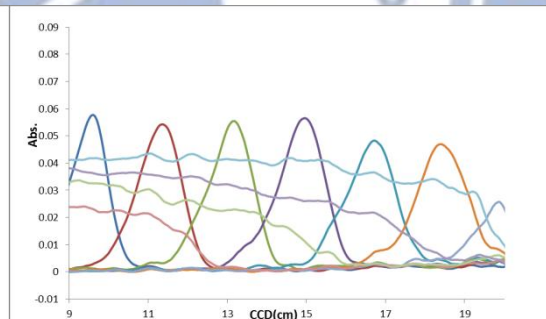


圖 4-6 各管外時圖所對應的管內空圖

分別在 UV/Vis 偵測器開始取點之後的第 3、6、9、10、12、15 分鐘時，將移動相瞬間跳動至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6 秒內完成，由上述不同改變動相時間所對應的管內空圖可以看到樣品在管柱中的沖堤過程。

圖 4-6 為圖 4-5 中不同時間變換移動相所對應的管內空圖，每張管內空圖皆為不同流析時間的空間波峰疊圖，是樣品在管柱內流動的軌跡。因為管內空圖取點時是用移動相 A 來做歸零的，所以當移動相 B 進入管柱時會得到一背景吸收訊號，故可以看到在沖提過程中移動相 B 在管柱前端追逐管柱末端的樣品，又因為移動相 B 進入管柱的時間不同，所以和樣品之間的相對位置也有所差異，也就是造成管外時圖各有不同的原因所在。

圖 4-6 中，第 3、6、9 分鐘變換移動相的管內空圖，可以看到樣品在尚未到達管柱末端時就已經被移動相 B 趕上，流出管柱時已經有移動相 B 的背景吸收訊號存在；而第 12、15 分鐘變換移動相的管內空圖，可以看到移動相 B 在追逐管柱末端的樣品，最後樣品直接流出管柱，並未被移動相 B 趕上；圖 4-5 中波形特殊的第 10 分鐘變換動相圖譜，在圖 4-6 的對應空圖中可以看到特別的狀況，即樣品有一部分已流出管柱時正好被移動相 B 追趕上，最後，管柱內剩餘的樣品便和移動相 B 一起流出管柱，所以才會在管外時圖中看到一個有特殊轉折的波形，即 Pai 在尾論中所提出的狀況(圖 4-7)。

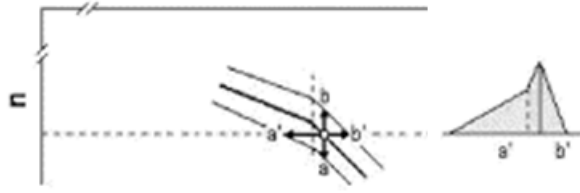


圖 4-7 樣品在管柱末端遭遇沖堤能力較強移動相的計算波形
 樣品一部分流出管柱時，管柱內剩餘的樣品遭遇沖堤能力較強的移動相，
 管柱末端固定相加速將樣品釋出到移動相中，造成管外時圖波形有一轉折
 產生。

以下將討論移動相沖堤能力變化更劇烈的例子，即由移動相 70/30(甲醇
 /水)跳至純甲醇，但因滯留時間太長的問題，所以將流速提高為 2 mL/min。



4.3.2 移動相由 70/30 跳動至 100/0(甲醇/水)

圖 4-8 為等位沖堤的管外時圖，移動相為甲醇、水以體積比 70 比 30 的比例混合，流速為 2 mL/min，根據圖 4-1 的滯留因子計算方法，可計算出圖 4-8 中，層析波峰的 k 值，如式 4-5 所示：

$$k = \frac{23.6133 - 2.3167}{2.3167} = 9.19 \quad (4-5)$$

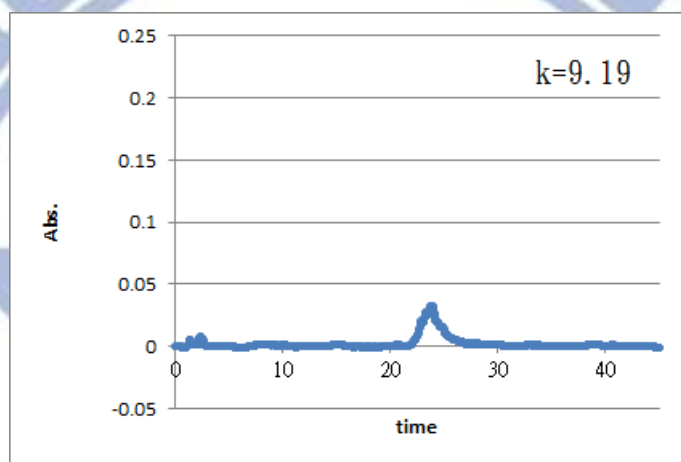


圖 4-8 移動相為體積比 70/30(甲醇/水)的管外時圖等位沖堤的管外時圖，移動相為甲醇、水以體積比 70 比 30 的比例混合，流速為 2 mL/min，根據圖 4-1 的滯留因子計算方法，可計算出圖 4-8 中，層析波峰的 k 值為 9.19。

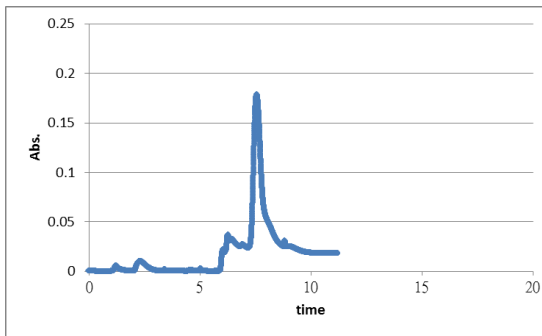
之後，以圖 4-8 等位沖堤中的移動相為基礎，即初始動相，分別在不同的層析時間變換移動相，變換成純甲醇為移動相，其管外時圖為圖 4-9，分別在 4、7、9、11、15、17、20、22、23.6 分鐘時變換移動相為純甲醇。圖 4-15 中各層析圖譜皆有基線飄移的問題，因為 UV/Vis 訊號強度在初始移動相沖堤的狀態下歸零，而變換移動相為甲醇時，新移動相便會造成一背景吸收值，為了排除移動相吸收背景值的影響，所以需要做基線校正曲線來

解決基線飄移的問題。

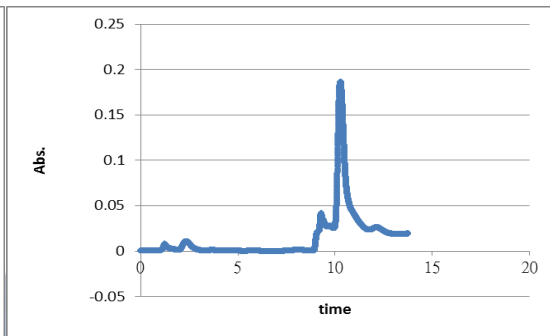
基線校正曲線的實驗方式已在本論文章節 3.6.2 中提及，除了不注入樣品之外，其餘條件參數都和圖 4-9 的實驗相同。此法，可獲得只含移動相吸收訊號強度的管外時圖，圖 4-10。發現校正曲線有跳動，之後才回到甲醇的吸收訊號強度，而非呈現平穩的階梯型態，這種來自移動相改變的訊號跳動現象曾經在文獻中被提及[50-53]，由於後來進入管柱的移動相黏度較初始移動相小，即甲醇的比例越高則黏度就越低，在兩種不同移動相的界面會有作用力產生，後來注入的移動相便會推擠前方的初始移動相，導致後方移動相在界面處產生壓縮效應(compression effect)，此被壓縮的區域流出管柱時對 UV/Vis 產生較高的吸收度，於是產生圖 4-10 中的特殊跳動波形。

將圖 4-9 中各圖譜扣除其圖 4-10 中對應的基線校正曲線，可得完全無移動相吸收強度背景值干擾的管外時圖，圖 4-11。圖 4-11 中，各層析圖譜中樣品波峰除了滯留時間各異之外，波峰高度、波形也有很大的不同，為了能更清楚的表示波峰高度隨著變換移動相時間不同而改變，將圖 4-11 中，各圖譜的波峰高度取出，另外製作波峰高度對變換移動相時間的圖 4-12 和表 4-1。由圖 4-12 中發現，波高隨變換移動相時間延後而有先升後降，最後降至和初移動相等位沖堤(圖 4-8)相同波高，而在最後的波峰下降階段波形也產生跳動的現象(peak jump phenomenon)，此現象相當特殊。

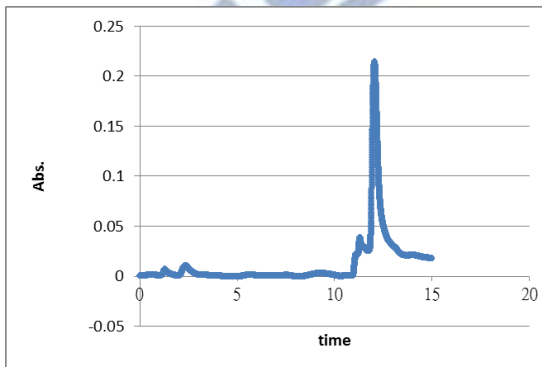
4min



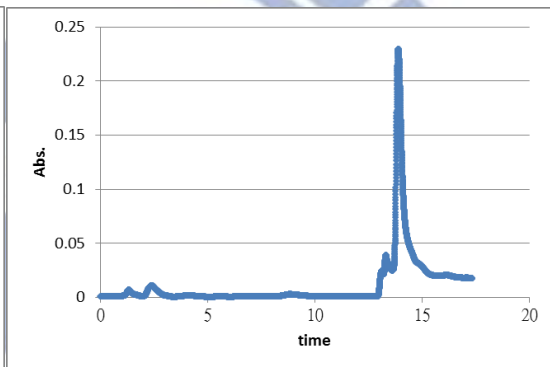
7min



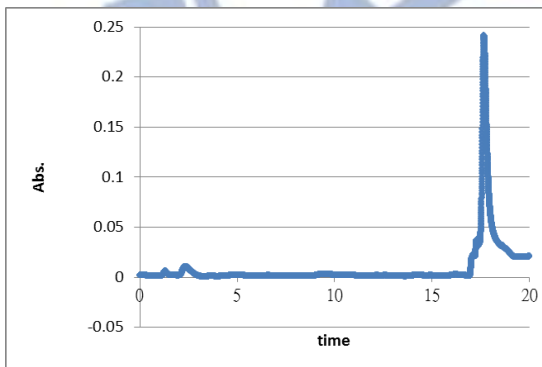
9min



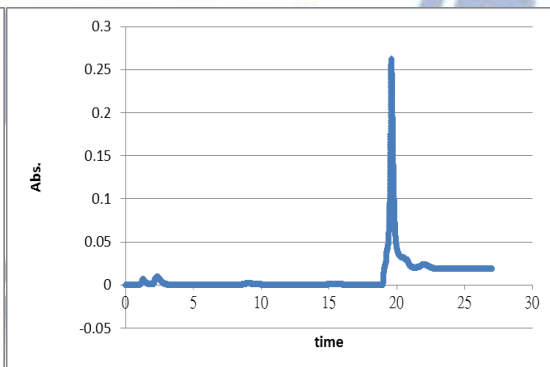
11min



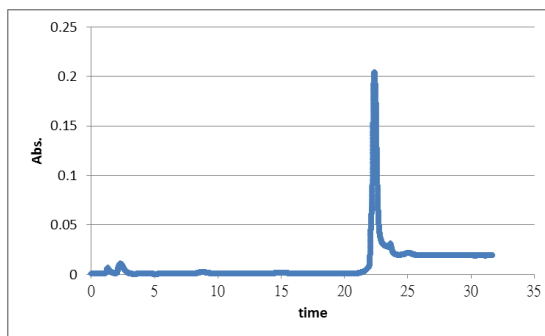
15min



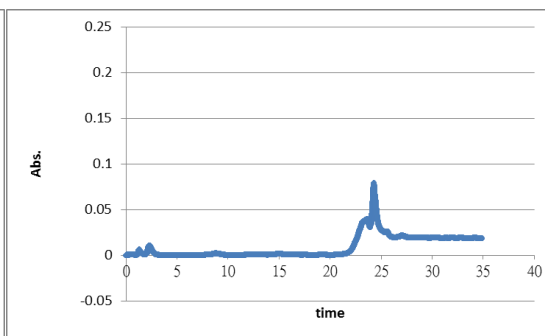
17min



20min



22min



23.6min

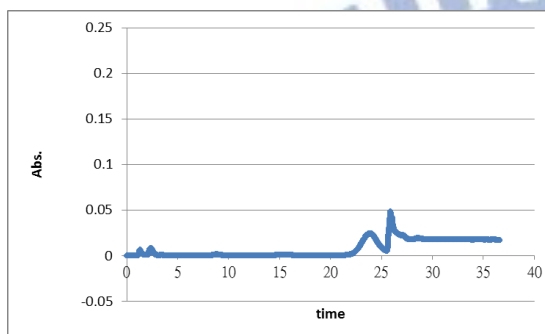
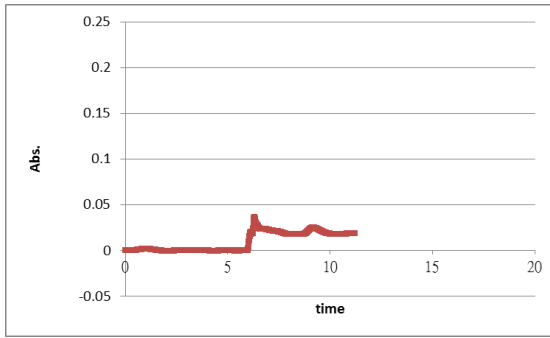
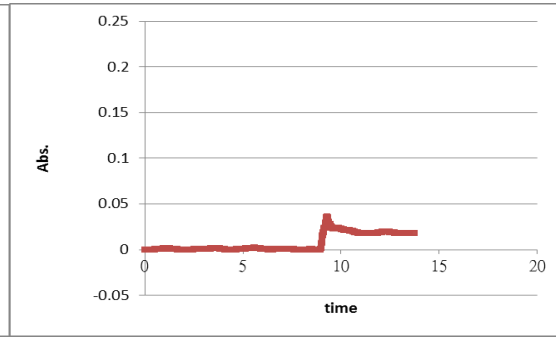


圖 4-9 分別在不同層析時間變換移動相為甲醇以甲醇、水體積比 70:30 為初始移動相，流速 2 mL/min，分別在不同的層析時間變換移動相，在 4、7、9、11、15、17、20、22、23.6 分鐘時變換移動相為純甲醇。

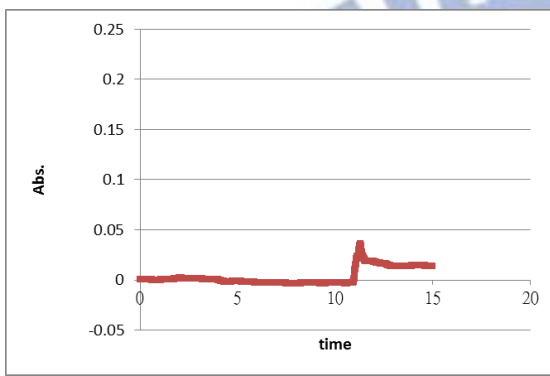
4min



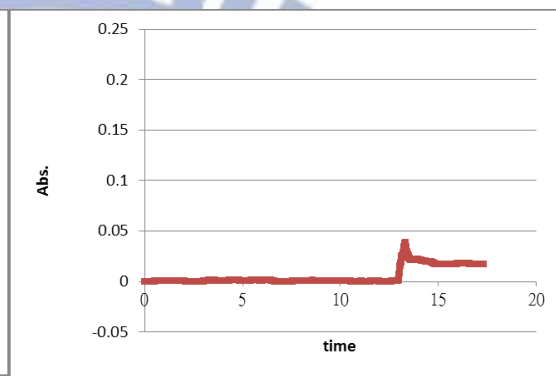
7min



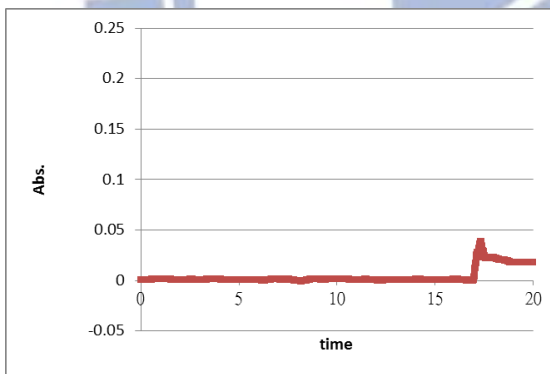
9min



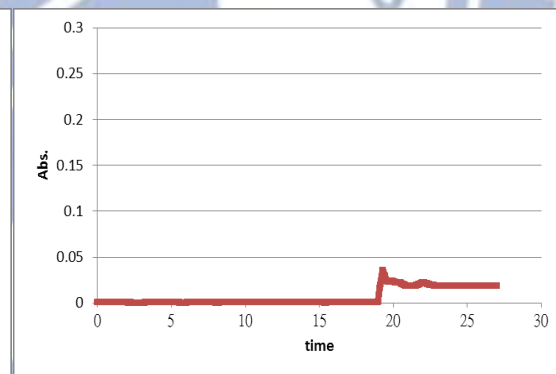
11min



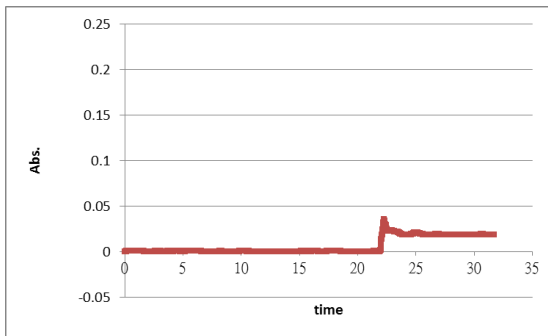
15min



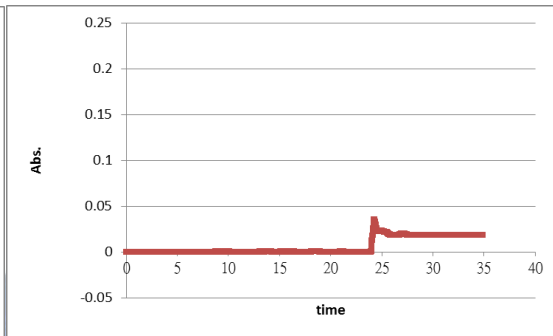
17min



20min



22min



23.6min

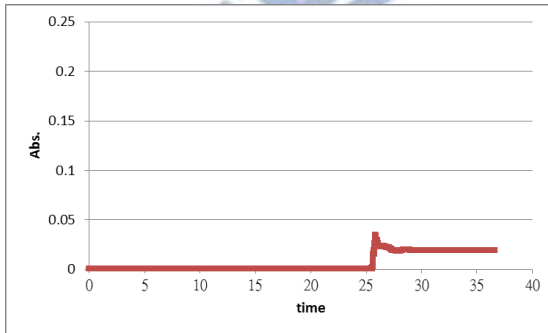
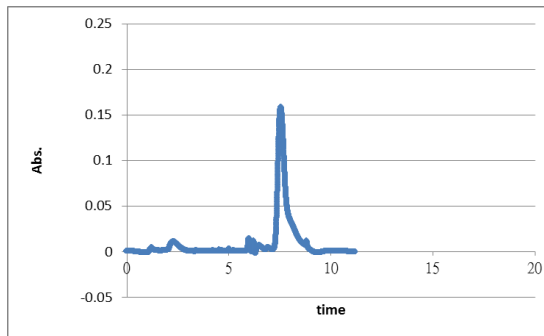
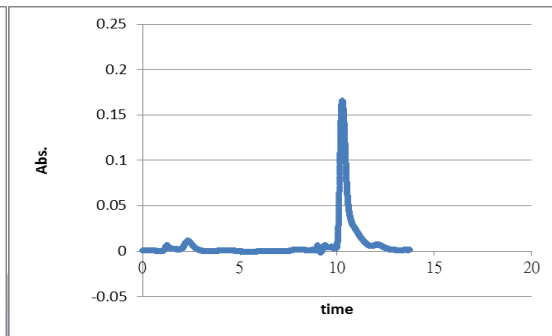


圖 4-10 移動相由 70/30(甲醇/水)跳至純甲醇基線飄移校正曲線
因為 UV/Vis 訊號強度在初始移動相沖堤的狀態下歸零，而變換移動相為甲醇時，新移動相便會造成一背景吸收值，為了排除移動相吸收背景值的影響，所以需要做基線校正曲線來解決基線飄移的問題。除了不注入樣品之外，其餘條件參數都和圖 4-15 的實驗相同。此法，可獲的只含移動相吸收訊號強度的管外時圖。

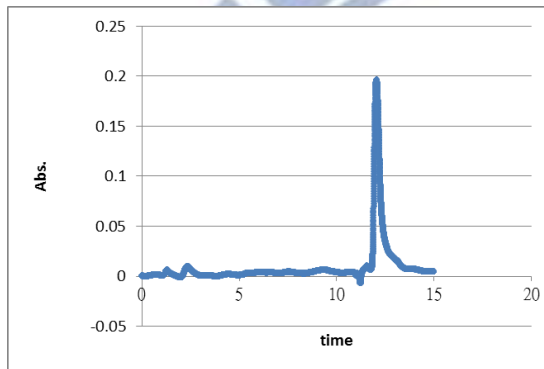
4min



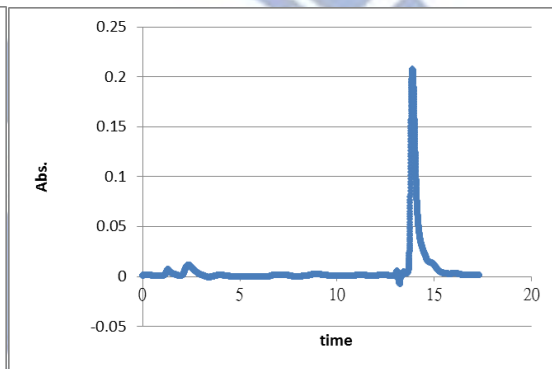
7min



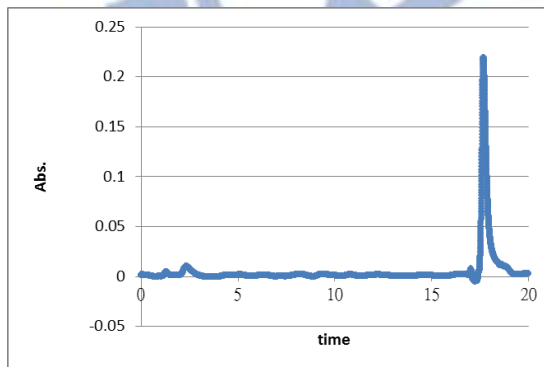
9min



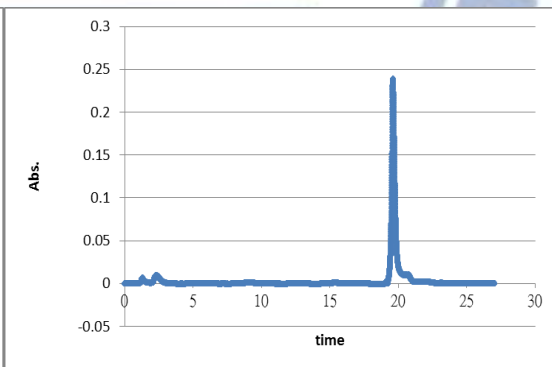
11min



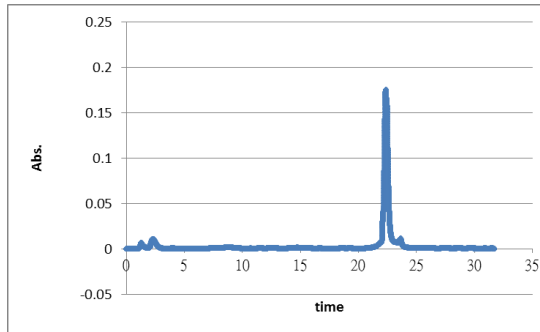
15min



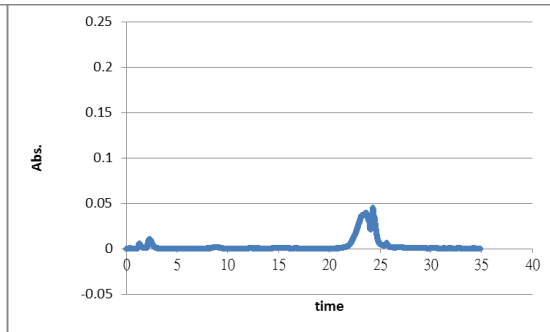
17min



20min



22min



23.6min

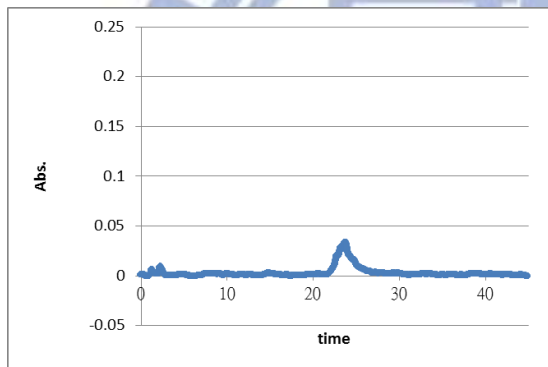


圖 4-11 基線校正過後的管外時圖

圖 4-9 中，各種不同時間變換移動相之階梯式沖提(stepwise elution)皆出現因變換移動相而造成的背景吸收值，即基線飄移的現象，故將圖 4-9 中的各圖分別扣除圖 4-10 中相對應的基線校正曲線，便可得到此無背景值干擾的管外時圖。

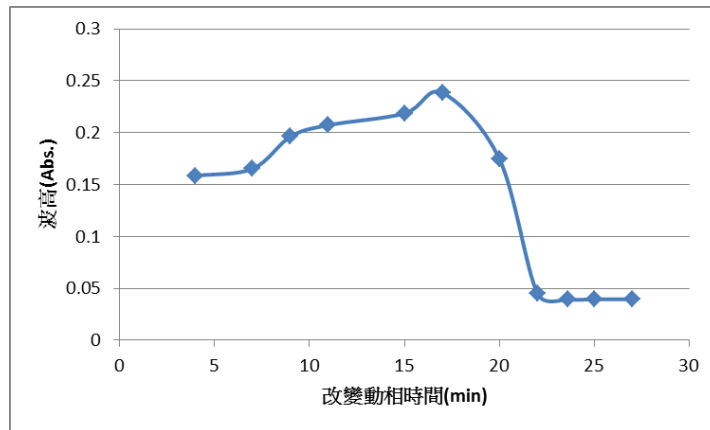


圖 4-12 波峰高度對應變換移動相時間圖

圖 4-11 中，各層析圖譜中樣品波峰除了滯留時間各異之外，波峰高度也有很大的不同，為了能更清楚的表示波峰高度隨著變換移動相時間不同而改變，將圖 4-11 中，各圖譜的波峰高度取出，另外製作此波峰高度對變換移動相時間圖。

變換動相時間(min)	樣品波峰高度(Abs.)
4	0.158
7	0.165
9	0.196
11	0.207
15	0.219
17	0.238
20	0.175
22	0.045
23.6	0.039
25	0.039
27	0.039

表 4-1 不同變換移動相時間之波峰高度

圖 4-11 中，各層析圖譜中樣品波峰除了滯留時間各異之外，波峰高度、波形也有很大的不同，為了能更清楚的表示波峰高度隨著變換移動相時間不同而改變，將圖 4-11 中，各圖譜的波峰高度取出，另外製作此波峰高度對變換移動相時間表。

一般認為滯留時間(retention time)越長，波峰應該越寬越矮，因為樣品在流析的過程中會受擴散效應(diffusion effect)影響，使波形持續變寬，但在圖 4-12 中卻顯示有一段區間波峰高度隨著滯留時間變長而上升後又下降，此部分須結合 WCD(whole-column detection)收集的管內空圖來觀察，圖 4-13 為圖 4-11 中各管外時圖所對應的管內空圖。

由圖 4-13 可知，改變移動相時間為第 4、7、9、11、15、17 分鐘的管內空圖中，管柱末端處，即管柱第 13 至 20 公分處，確實可以看到空圖波形漸高的現象，波高隨流析時間漸高有三種可能：

1. 改變後的移動相沖堤能力較強，讓原本滯留於固定相的樣品被加速釋放到移動相中，最後被管外偵測器收集。
2. 管柱末端連接管外線路處，因管徑由大變小，造成背壓改變，進而使樣品空間波形改變。
3. 改變移動相後，受到壓縮效應(compression effect)的影響，造成空間波寬變窄、高度變高。

可能原因 1. 中，樣品在移動和固定相間的分布(partition)是無法在管內空圖中看到的，無論樣品在移動相或固定相都會被光源穿透，也都會造成吸收訊號，也就是說管內空圖中看到的樣品吸收訊號其實是移動相、固定相中樣品的總和。但圖 4-13 中，改變移動相時間為第 4、7、9、11、15、17 分鐘的管內空圖確實可以看到空圖波形波高漸高的現象，表示樣品確實

有被集中，而非垂直的在移動相和固定相之間移動，故此可能原因確定可排除。

可能原因 2.所假設的情形，只用圖 4-13 是無法判斷的，但若收集等位沖堤(圖 4-8)實驗中的管內空圖(圖 4-14)，就能清楚的看到，此實驗管柱末端設計和圖 4-13 中各實驗皆相同，但管柱末端空圖完全沒有波峰增高的現象，故管路背壓造成空間波峰增高的可能也可完全排除。

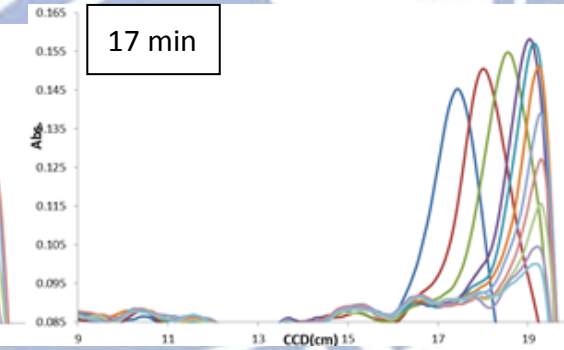
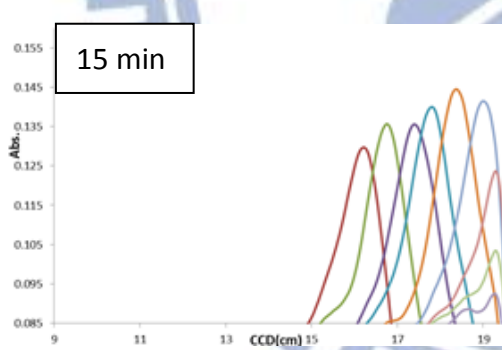
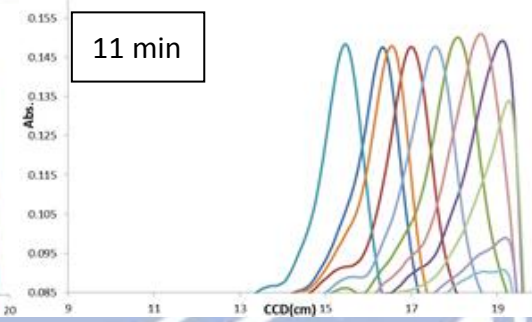
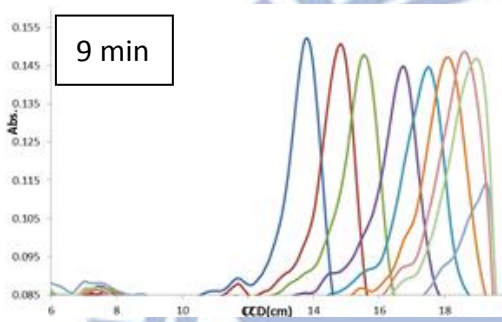
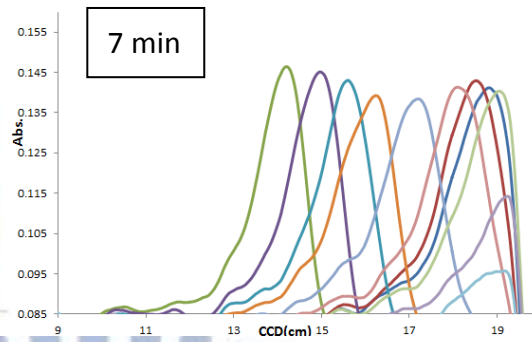
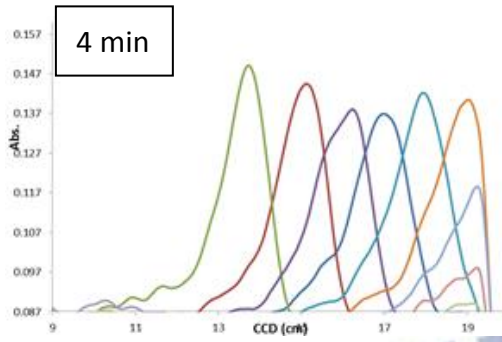
至於最後一個可能原因，波峰壓縮效應(compression effect)，則需管柱中段空圖(圖 4-15)做輔助才能更加釐清，即找出波峰壓縮於管柱中的起始位置。為了使解釋更為詳盡，將圖 4-15 中各圖譜之波峰最高位置、訊號強度整理於表 4-2 中，由表 4-2 可知，在此六組實驗中，越晚變換移動相者，其空間波峰壓縮位置越接近管柱出口，因較晚變換移動相者，樣品在越接近管柱出口處遭遇後方的變換移動相;但波峰壓縮最高波峰有略微下降的趨勢，因在遭遇變換移動相之前，隨著流析時間管內的空間波形受擴散作用影響而越來越寬、越矮，故在管柱後段遭遇移動相者，其波峰較在管柱前段就被壓縮者來的矮。

若單看表 4-2，可能會有所誤解，晚變換移動相者，其波峰壓縮處的最高波峰較矮，何以流出管柱後可以得到訊號強度較高的管外時圖呢?參照圖 4-15 便可以得到解答，因為越先遭遇變換移動相者，雖然波峰較高，但須經過較長距離才得以進入管外偵測器，而此遷移過程中，原先因壓縮效應

增加的波高則會被擴散效應抵消，使此管柱中的壓縮現象無法為管外時圖所觀察。反之，在管柱後端才遭遇變換移動相者，其波峰雖無前段遭壓縮者高，但隨即流出管柱，還來不及被擴散效應所掩蓋。表 4-2 中,較晚換移動相的三組數據(11、15、17 分鐘)其壓縮波峰最高值相去不遠，也應證了上述理由。

而 4.3.1 中討論的移動相由 85/15(甲醇/水)變換為純甲醇的實驗中，並沒有發生波峰壓縮的現象，是因為移動相的沖提能力變化不夠大，所以仍然以樣品在管柱中的擴散作用為主。





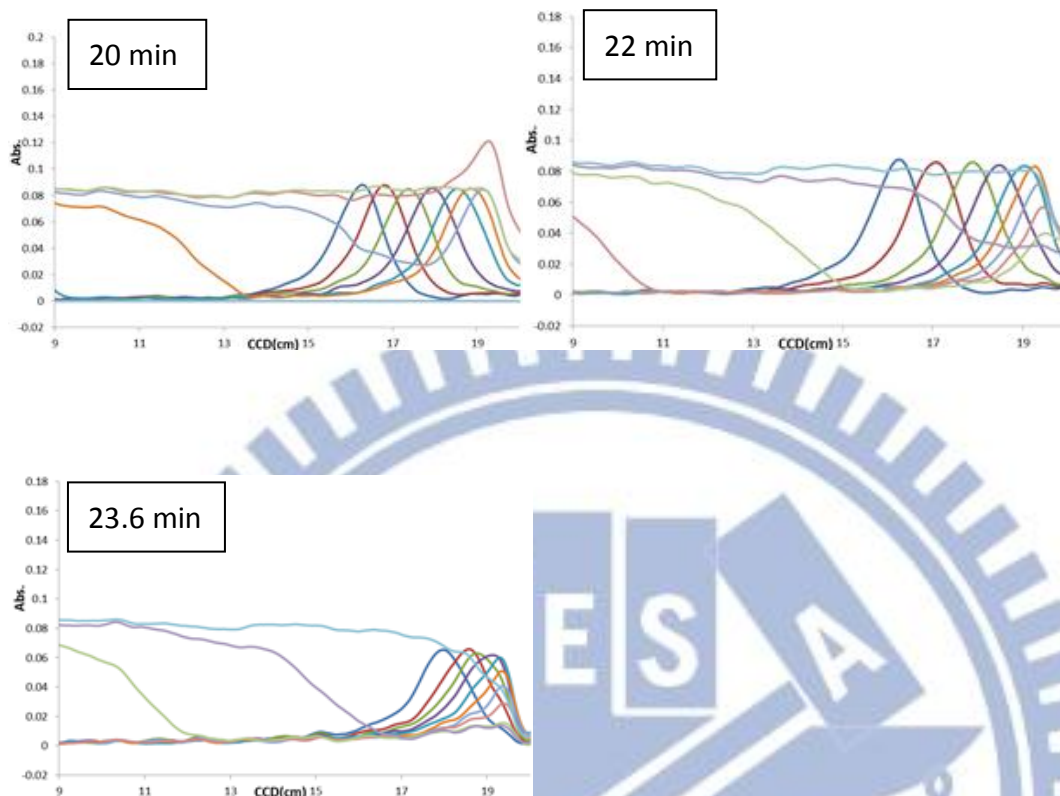


圖 4-13 各管外時圖所對應的管內空圖
 分別在 UV/Vis 偵測器開始取點之後的第 4、7、9、11、15、17、20、22、23.6 分鐘時，將移動相瞬間跳動至移動相 B，由 A 移動相跳至 B 移動相之過程設定在 0.6 秒內完成，由上述不同改變動相時間所對應的管內空圖可以看到樣品在管柱中的沖堤過程。

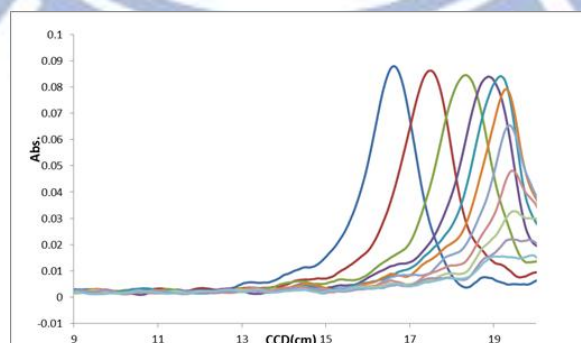


圖 4-14 等位沖堤(圖 4-8)實驗中的管內空圖

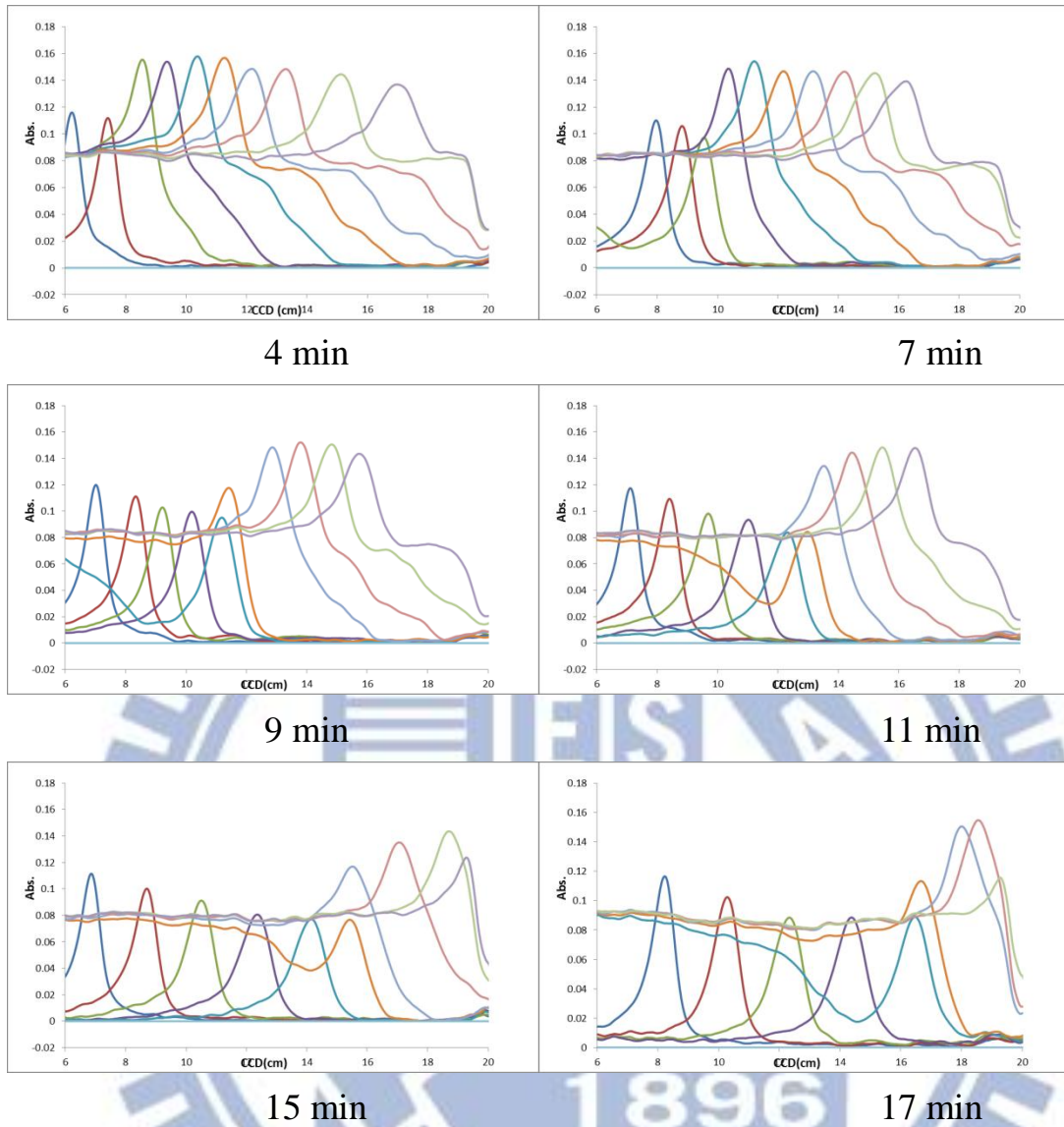


圖 4-15 變換移動相時間為第 4、7、9、11、15、17 分鐘之管柱中段管內空

圖

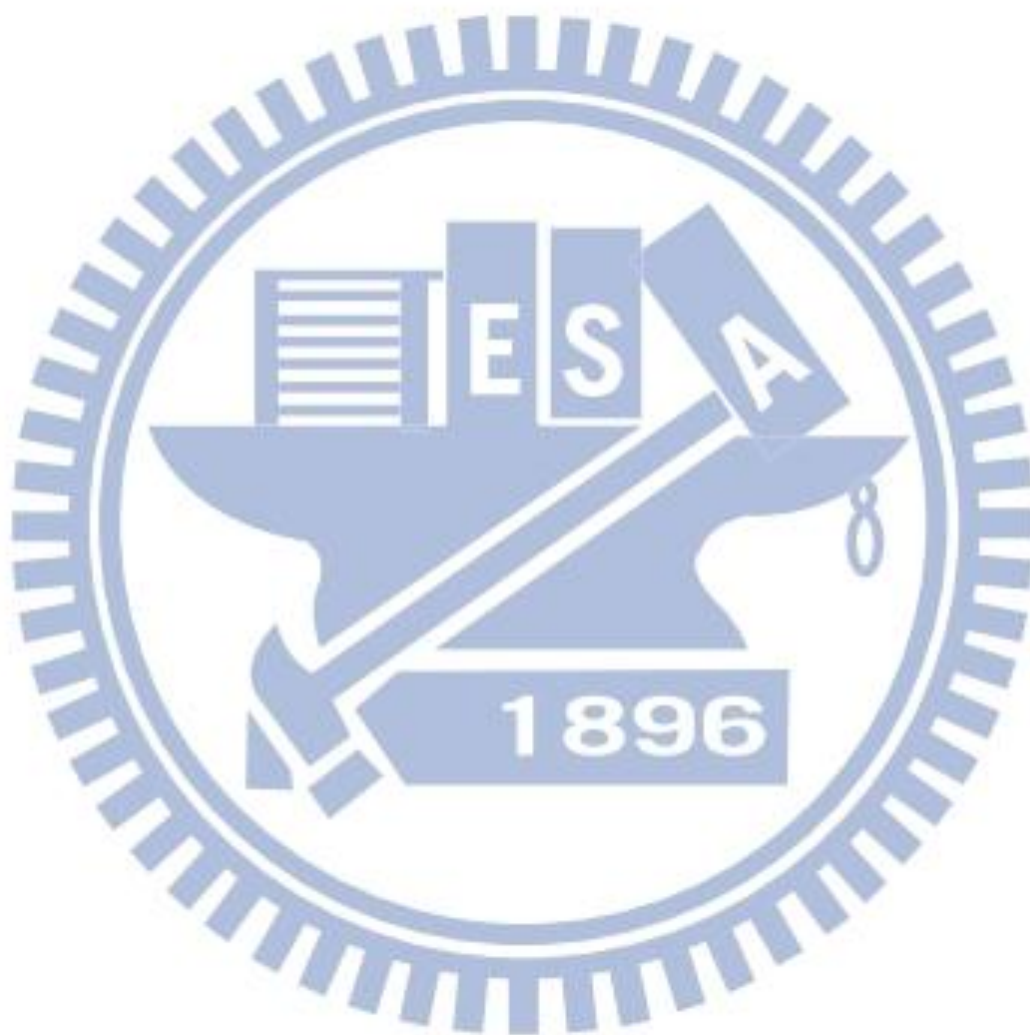
變換移動相時間 (min)	管柱位置 (cm)	訊號強度 (abs.)
4	10.377	0.157
7	11.214	0.155
9	13.797	0.153
11	15.462	0.148
15	18.567	0.147
17	18.918	0.149

表 4-2 圖 4-15 中各圖譜之波峰最高位置、訊號強度整理表

至於，圖 4-11 中，第 22 分鐘變換移動相圖譜之所以產生跳動，可以用圖 4-13 中相對應的管柱末端空圖解釋，樣品空間波峰已有一半在管柱外被管外偵測器偵測到，而剩餘在管柱內的樣品又正好遭遇變換移動相。空圖中明顯看到即將流出管柱的空間波峰並“沒有”增高的趨勢，但卻可在管外偵測器看到吸收訊號的突然變強，意味著樣品因變換的移動相沖堤能力較強而由固定相被加速釋出到移動相，又因為管內空圖所看到的訊號強度為動固定相中樣品之和，故沒有增高的波形出現。也就是 Pai 在論文[3]中所提到的特殊現象(圖 4-7)。但是在 4.3.1 中，此特殊現象用 shoulder 的方式呈現而非突然變強的跳動，歸因於移動相沖堤能力差異不夠大，固定相釋出樣品的速度加快的不夠劇烈，所以管外吸收訊號不夠強。

最後，在第 23.6 分鐘變換移動相的管外時圖，圖 4-11，之所以和圖 4-14

等位沖堤圖形相似，由圖 4-13 對應的空圖可以明白，太晚變換移動相的關係，變換的移動相無法追趕上即將流出管柱的樣品，故樣品空間波峰不受變換移動相影響，和等位沖堤無異。



第五章 結論

本研究利用全管柱偵測系統觀察液相層析變換動相時產生的波峰跳動現象，當初始移動相(移動相 A)和最終移動相(移動相 B)的沖堤能力差異不夠大時，在管柱中因為兩種移動相黏度不同而在界面上產生應力的波峰壓縮現象並不明顯，樣品在管柱中因為擴散作用的關係，管外時圖中的波峰高度隨著流析時間越長而越矮；而初始移動相(移動相 A)和最終移動相(移動相 B)的沖堤能力差異較明顯時，在管柱中因為兩種移動相沖堤能力不同而在界面上產生的應力較大，造成波峰壓縮現象較明顯，越先遭遇變換移動相者，雖然波峰較高，但須經過較長距離才得以進入管外偵測器，而此遷移過程中，原先因壓縮效應增加的波高則會被擴散效應抵消，使此管柱中的壓縮現象無法為管外時圖所觀察。反之，在管柱後端才遭遇變換移動相者，其波峰雖無前段遭壓縮者高，但隨即流出管柱，還來不及被擴散效應所掩蓋，所以此過程中管外時圖的波峰高度隨著流析時間越長反而越高。

當樣品在管柱末端，有一部分已經流出管柱時，在管柱中剩餘的樣品遭遇沖堤能力較強的移動相，使得管柱末端的固定相釋出樣品的速度加快，所以可以在管外時圖中看到波形的特殊轉折。

當初始移動相(移動相 A)和最終移動相(移動相 B)的沖堤能力差異不夠

大時，固定相釋出樣品的速度加快的不夠劇烈，所以管外吸收訊號不夠強，此時，波形轉折的特殊現象用 shoulder 的方式呈現；而初始移動相(移動相 A)和最終移動相(移動相 B)的沖堤能力差異較明顯時，固定相釋出樣品的速度變化較大，即加快很多，所以可以在管外時圖看到 UV/Vis 吸收訊號變強較多，呈現波峰跳動的狀況。

雖然此種特殊波形對於實際分離上並無太大的影響，但卻沒有文獻清楚的解釋其成因，但是希望透過全管柱偵測系統，可以讓黑盒子不鏽鋼管柱透明化，更了解這些波峰跳動現象的成因，讓液相層析的理論可以更圓滿、更完整。



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. A950(2002)271.
- [3] S.C. Pai, "Parcel model for peak shapes in chromatography numerical verification of the temporal distortion effect to peak", J.Chromatogr. A988(2003)233.
- [4] S.H. Lin, K.C. Chen, T. Yu, S.C. Pai, "Examination of the temporal effect in a flow injection analysis system using multi-channel absorbance detection", J. Chromatogr. A(2008) In Press.
- [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] P.Jandera, J. Churacek, Gradient Elution in Column Liquid Chromatography-Theory and Practice, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [9] 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.
- [10] P. Jandera, J. Churacek, "Gradient elution in liquid chromatography. IX. Selection of optimal conditions in stepwise-elution liquid chromatography", J. Chromatogr. 170(1979)1.
- [11] W. Gotkiewicz, M. Jaroniec, J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 1(1978)245.
- [12] W. Gotkiewicz, "Optimization of stepwise gradient elution in reversed-phase chromatography" Chromatographia 21(1986)259.
- [13] S.T. Balke, R.D. Patel, "Gradient Elution Analysis and Prediction in HPLC",

- J. Liq. Chromatogr. 3(1980)741.
- [14] Carol K. Holtzapple, Larry H. Stanker, "Affinity Selection of Compounds in a Fluoroquinolone Chemical Library by On-Line Immunoaffinity Deletion Coupled to Column HPLC", *Anal. Chem.* 1998,70,4817-4821.
- [15] Fuyou Du, Yu Bai, Yu Bai, Huwei Liu, "Quantitative Detection of Trace Systemins in Solanaceous Plants by Immunoaffinity Purification Combined with Liquid Chromatography/Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 2010,82,9374-9383.
- [16] U.D. Neue. in: R.A. Meyers (Ed). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2000, p.11450.
- [17] 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.
- [18] U.D. Neue. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. Wiley-VCH, New York, 1997.
- [19] 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.
- [20] U.D. Neue, D. Diehl, P. Iraneta, Pittcon Conference & Expo 2009, Chicago, IL, March 8-13, 2009.
- [21] F. Gritti, G. Guiochon, "Optimization of the thermal environment of columns packed with very fine particles", *J. Chromatogr. A* 1216(2009)1353.
- [22] F. Gritti, G. Guiochon, "Performance of new prototype packed columns for very high pressure liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 1217(2010)1485.
- [23] J.J. Kirkland, "Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography", *Anal. Chem.* 41(1969)218.
- [24] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, "Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: Some performance comparisons with sub-2 μ m particles", *J. Chromatogr. Sci.* 46(2008)254.
- [25] 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.
- [26] J.F.K. Huber, "private communication", (December 1971).
- [27] B.L. Karger, H. Barth, "Influence of Column Material on Efficiency in High Speed Liquid Chromatography", *Anal. Letters* 4(1971)595.

- [28]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.
- [29]R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, J. Chromatogr. Library Series, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- [30]A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, "A new form of chromatogram employing two liquid phases", *Biochem. J.* 35(1941)1358.
- [31]D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, 5th Ed, *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College, Philadelphia, 1998.
- [32]F. Gritti, G. Guiochon, "Heat Exchanges in Fast, High-Performance Liquid Chromatography. A Complete Thermodynamic Study", *Anal. Chem.* 80(2008)6488.
- [33]L. Snyder, *High Performance Liquid Chromatography-Advances and Perspectives*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [34]F. Gritti, G. Guiochon, "The ultimate band compression factor in gradient elution chromatography", *J. Chromatogr. A* 1178(2008)79.
- [35]周璉瑩，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.
- [36]P. Jandera, "Gradient elution in liquid column chromatography-prediction of retention and optimization of separation", *Adv. Chromatogr.* 43(2005)1.
- [37]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.
- [38]J.C. Delaunay, C. Castagnino, C. Ch'ze, J. Vercauteren, "Preparation isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography", *J. Chromatogr. A*964(2002)123
- [39]C.E. Evans, V.L. McGuffin, "Dual on-column fluorescence detection scheme for characterization of chromatographic peaks". *Anal. Chem.* 60(1988)573.
- [40]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.
- [41] 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.
- [42]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.
- [43] S. Nilsson, J. Johansson, M. Mecklenburg, S. Birbaum, S. Svanberg, K.G. Wahlund, K. Moasbach, A. Miyabashi, P.O. Larsson, “Real-time fluorescence imaging of capillary electrophoresis: Separation of nucleic acid”, *J. Capillary Electrophor* 2(1995)46.
- [44] J. Johansson, D.T. Witte, M. Larsson, S. Nilsson, ”Real-time Fluorescence Imaging of Isotachophoretic Preconcentration for Capillary Electrophoresis”, *Anal. Chem.* 68(1996)2766.
- [45] 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.
- [46] A. Tamura, M. Khademizadeh, K. Ozawa, T. Mazujima, ”Direct observation of sample trapping process onto internal-surface reversed-phase pre-column”, *Anal. Chem. Acta.* 365(1998)115.
- [47] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, ”Visualization of solute migration in liquid chromatography columns”, *J. Chromatogr.* A826(1998)1.
- [48] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, ”Visualization of sample introduction in liquid chromatography columns. The effect of the frit diameter”, *J. Chromatogr.* A855(1999)367.
- [49] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, ”On-Column Visualization of Sample Migration in Liquid Chromatography”, *Anal. Chem.* 72(2000)323.
- [50] 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.
- [51] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, ”Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversed-phase system”, *J. Chromatogr.* 165(1979)3.
- [52] L.R. Snyder, J.W. Dolan, ”The linear-solvent-strength model of gradient elution”, *Adv. Chromatogr.* 38(1998)115.
- [53] U.D. Neue, D.H. Marchand, L.R. Snyder, ”Peak compression in reversed-phase gradient elution”, *J. Chromatogr.* A1111(2006)32.