

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吸附型管柱中之樣品衝破
Examination of Sample Breakthrough in Adsorption
Column Using Whole-Column Detection

研究生：邱俐揚

指導教授：余 艇 博士

中華民國 一百零一 年 六 月

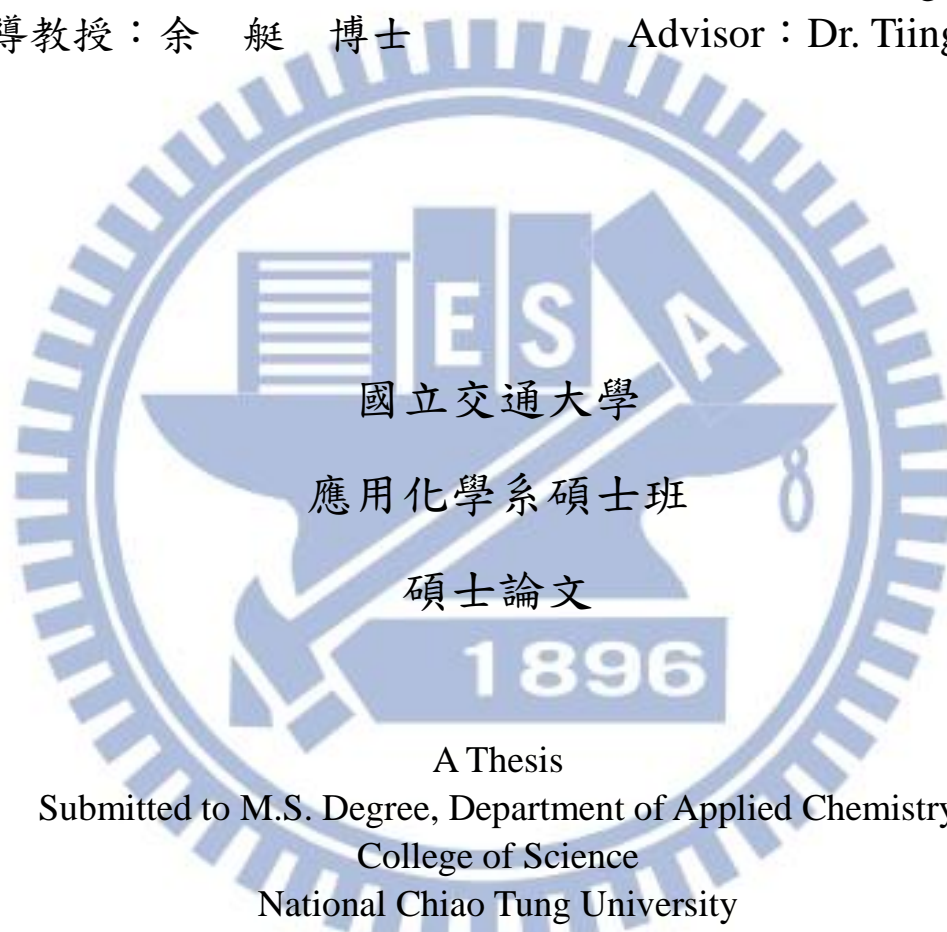
以全管柱偵測法探討吸附型管柱中之樣品衝破
Examination of Sample Breakthrough in Adsorption
Column Using Whole-Column Detection

研究生：邱俐揚

Student : Li-Yang Chiu

指導教授：余 艇 博士

Advisor : Dr. Tiing Yu



A Thesis
Submitted to M.S. Degree, 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 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吸附型管柱中之樣品衝破

學生：邱俐揚

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學系碩士班

摘要

吸附層析法(adsorption chromatography)，利用固定相與不同物質分子吸附能力的差異而達到混合物的分離效果，其過程為移動相分子與物質分子競爭固定相吸附中心，通常用於預濃縮樣品與製備型分離樣品。吸附型層析是科學史上第一種層析技術，直到今日，此技術仍被大量使用，但一般研究所注重的卻僅限於濃縮與分離的結果，至於管內樣品的吸附機制與濃度分布則無深入研究。本研究以全管柱偵測(whole-column detection, WCD) 系統，搭配可透光之玻璃管柱，來觀察樣品亞甲基藍與甲基橙之吸附，並和 Pai 所提出的郵包模型(parcel model)理論互相比較。

研究中發現，若把管柱全長分為 n 段，隨著低濃度樣品持續注入管柱，樣品雖是如肉眼所見的由第一段開始載入至第 n 段，但以 WCD 偵測時，樣品並不會先載滿第一段後才開始載入第二段，而是會受到樣品的動態吸附平衡常數、樣品濃度、流速、溶劑種類之影響。

研究也發現，理論圖形和實驗圖形之誤差和 n 值有關。當 n 值設定為 10 時，經由郵包模型所模擬出的理論圖形會與實驗圖形有約 23.01% 之誤差，當 n 值為 20 時，則理論圖形與實驗圖形將有 42.58% 之誤差，若 n 值提高到 100，理論圖形甚至完全背離實驗圖形。

除了流速提高會造成單位體積樣品的載入速度較快外，管內吸附圖形亦會隨著動態吸附平衡常數之不同而產生大幅改變；若樣品濃度越高，則因有效管柱容量增加及聚合體的形成，而使得單位莫耳數樣品載入速度較慢；且由於水相對於乙醇具有較低的溶劑強度，會造成樣品載入速度較慢，因此，當溶劑中的乙醇比例改變時，樣品於管內空間的訊號將產生劇烈變化。

Examination of Sample Breakthrough in Adsorption Column Using Whole-Column Detection

Student : Li-Yang Chiu

Advisor : Tiing Yu

Abstract

Adsorption chromatography enables separation of mixtures by utilizing difference of adsorption affinity on different compounds. Analytes compete with the mobile phase of the adsorptive active sites on the stationary phase. This technique has been mainly applied in sample enrichment or preparative separations. Being the first chromatographic technique in the history, it has still been heavily applied up-to-date. However, the researches concerning separation mechanism and the on-column analyte distribution profile have been largely ignored. In this study, we analyzed adsorption of methylene blue and methyl orange on the octadecylsilane packed in a glass column using whole-column detection (WCD). The results were compared with the parcel model proposed recently by Pai.

The column was artificially divided into n sections. While the sample of low concentration was injected into the column, it appeared that the sample would fully occupy the first section before move to the second section, observed by naked-eyes. However, sample molecules, monitored by WCD, were found to penetrate the second section even the

adsorption had not reached saturation in section one. The mechanism was dependent on the dynamic adsorption constant, sample concentration, and the solvent type. The deviation between the simulated data using the parcel model and the experimental data was n -dependent. A 23.01% deviation was found for $n = 10$, 42.58% for $n = 20$. Simulated with $n = 100$ it deviated completely from the empirical data.

Higher flow rates would affect the adsorption profiles when the sample concentration remained the same. The on-column adsorption profiles might change drastically with the changing dynamic adsorption constants of the samples. Larger effective column capacity and aggregate (such as dimers and trimers) formation of the sample with higher concentration slowed down the sample loading onto the stationary phase. The water, with a relatively lower solvent strength, would also decrease the sample loading rate. Thus, the on-column adsorption profile appeared significantly different from that of the sample prepared in water with ethanol .

謝誌

這本論文可以完成，要感謝的人實在太多了。首先要謝謝指導教授余艇博士，謝謝老師這一年半來的細心教導，除了在課業與研究上的指導外，在人生領悟方面也讓我受惠良多。再來就是實驗室的同學們了：感謝聰穎的沛沛時常為我解答學術問題並且一直聊天搞笑讓我不無聊；感謝勤奮的柏森幫大家倒垃圾，而且還讓大家了解健康與正常作息的重要；也感謝機警的泓哲，幫柏森倒垃圾以及為大家擋子彈，還曾經每天中午幫我買奶油廚房。也要感謝宜儒學姐、士峯學長及詩軒學長，在我剛進實驗室時，耐心的教導我實驗室的研究內容和情況；尤其是宜儒學姐，感謝她幫我架設新的一套 WCD 系統，並且教我如何操作。

除此之外，也要特別感謝台大海洋研究所的白書禎教授及張良維同學，謝謝他們對我的耐心指點。也感謝口試委員陳月枝教授，讓我順利通過論文口試；還有建宏層析的業務廖先生，在晚上九點多還不厭其煩的接我的電話告訴我怎麼修理泵浦。

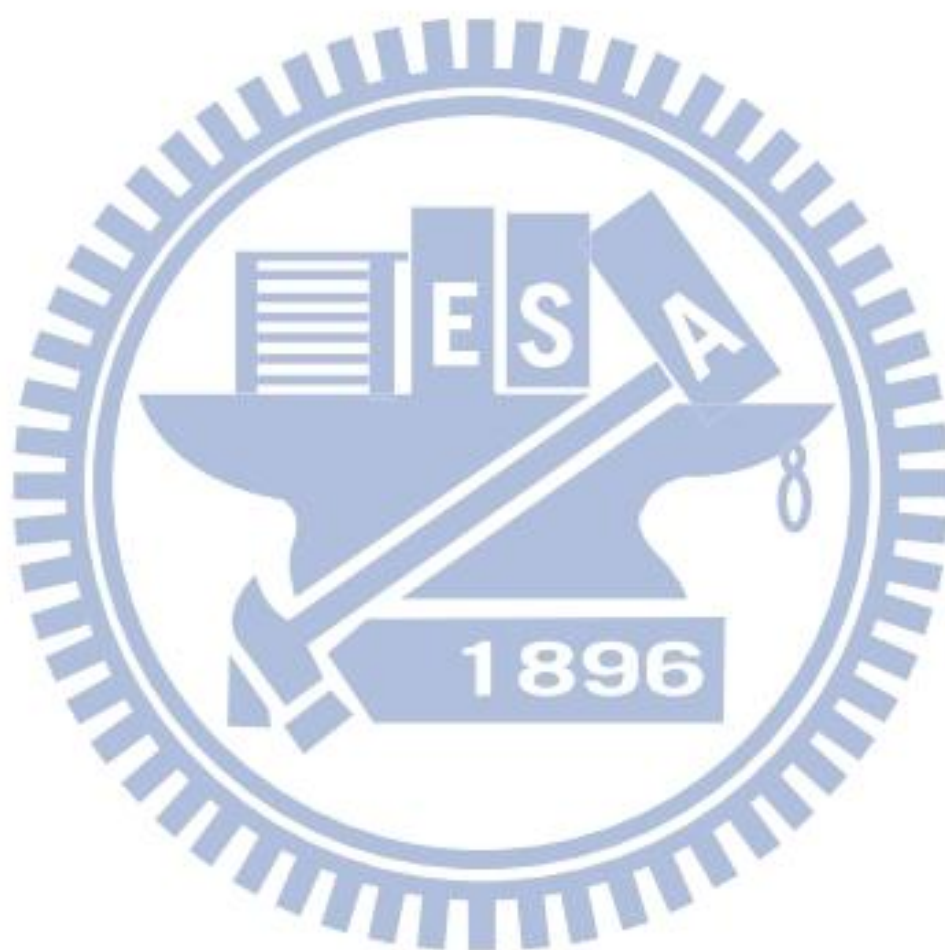
沒有大家的幫忙，我可能沒辦法如預期的一年半畢業，衷心的謝謝每個幫過我的人，不論是在研究或生活上。同時，也希望每個人都平安健康，整個世界和平喜樂。

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
誌謝.....	V
目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論	1
1.1 前言	1
1.2 研究動機.....	1
第二章 研究背景與文獻回顧.....	3
2.1 層析法簡介.....	3
2.2 吸附型層析.....	8
2.3 全管柱偵測系統之發展.....	11
2.4 衝破實驗簡介.....	15
2.5 郵包模型 (parcel model).....	18
第三章 實驗部分	22
3.1 實驗藥品	22
3.2 儀器裝置.....	23

3.3	儀器組裝及各裝置介紹.....	24
3.3.1.	玻璃管柱.....	24
3.3.2.	WCD 系統.....	26
3.3.3.	WCD 系統操作介面設定.....	28
3.4	數據類型定義.....	30
3.5	實驗流程.....	31
第四章	結果與討論.....	34
4.1	數據處理.....	34
4.2	亞甲基藍衝破實驗.....	35
4.2.1	亞甲基藍衝破實驗管外時圖.....	35
4.2.2	亞甲基藍衝破實驗管內空圖.....	37
4.2.3	以郵包模型模擬亞甲基藍衝破實驗之理論空圖.....	42
4.3	甲基橙衝破實驗.....	48
4.3.1	甲基橙衝破實驗管外時圖.....	48
4.3.2	甲基橙衝破實驗管內空圖.....	49
4.3.3	與亞甲基藍衝破實驗之管內空圖相比較.....	51
4.4	濃度變因衝破實驗.....	52
4.4.1	濃度變因衝破實驗管內空圖.....	52
4.4.2	濃度變因與 k 值變因之管內空圖差異比較.....	57

4.5	流速變因衝破實驗	59
4.6	溶劑變因衝破實驗	62
第五章	結論	65
參考文獻	68



圖目錄

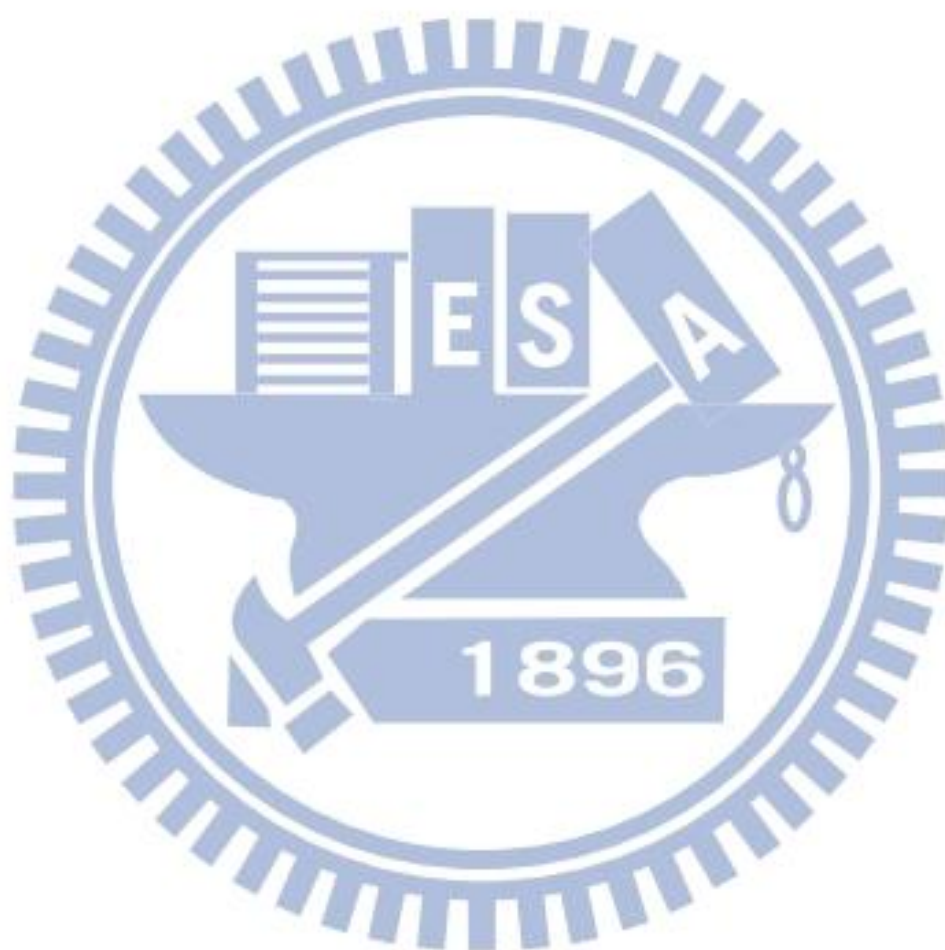
(圖 1) 標準衝破曲線 time v.s. abs.....	16
(圖 2) 標準衝破曲線 volume v.s. conc.....	16
(圖 3) parcel $P(n, \tau)$	19
(圖 4) 亞甲基藍分子結構與全波長吸收光譜圖.....	22
(圖 5) 甲基橙分子結構與全波長吸收光譜圖.....	22
(圖 6) BenchMark™ 玻璃管柱.....	25
(圖 7) BenchMark™ 玻璃管柱結構圖.....	25
(圖 8) sep-pak® cartridge 與其內的 C_{18} 粉末.....	25
(圖 9) 詳細光學盒示意圖.....	27
(圖 10) WCD 系統電腦操作界面圖.....	29
(圖 11) 管外時圖和管內空圖的定義.....	31
(圖 12) 實驗裝置圖.....	32
(圖 13) 實驗流程簡圖.....	33
(圖 14) 從 WCD 系統所偵測出的 result 檔.....	34
(圖 15) 亞甲基藍衝破實驗管外時圖之 k 值計算.....	36
(圖 16) 亞甲基藍衝破實驗管內空圖.....	39
(圖 17) 不同濃度、相同時間下的亞甲基藍衝破實驗管內空圖.....	40

(圖 18) 不同濃度、同莫耳數載入量的亞甲基藍管內空圖	41
(圖 19) excel parcel model.....	43
(圖 20) 實驗所得的管內空圖與經由 parcel model (n=10) 模擬出的理論空圖相比較	44
(圖 21) 實驗所得的管內空圖與經由各 n 值的 parcel model 所模擬出的理論空圖相比較	45
(圖 22) 甲基橙衝破實驗管外時圖之 k 值計算.....	49
(圖 23) 甲基橙衝破實驗管內空圖.....	50
(圖 24) 同流速、同時間點的亞甲基藍與甲基橙管內空圖	51
(圖 25) 甲基橙與亞甲基藍衝破實驗之管內空圖.....	52
(圖 26) 不同濃度、同莫耳數載入量的甲基橙管內空圖	54
(圖 27) 亞甲基藍二聚體之聚合反應.....	56
(圖 28) 亞甲基藍聚合體之光譜圖.....	56
(圖 29) 亞甲基藍與甲基橙的衝破實驗管內空圖.....	58
(圖 30) 亞甲基藍與甲基橙於同時間點的衝破實驗管內空圖	59
(圖 31) 亞甲基藍於相同流速、相同載入量下的管內空圖	59
(圖 32) 亞甲基藍於不同流速但相同體積載入量下的管內空圖	61
(圖 33) 亞甲基藍於不同溶劑下的的管內空圖.....	63

表目錄

(表 1) 計算誤差所取用的時間與空間點46

(表 2) 亞甲基藍於水溶液中可形成的聚合體列表55



第一章 緒論

1.1 前言

層析法(chromatography)自二十世紀初發展至今，已成為分離混合物最有效率的方法，可以提供定性鑑定與定量分析，比起其他的分離純化方法(蒸餾、再結晶、萃取、昇華)，層析法既快速、簡便又安全，且可進行微量分離，是一種高效率且可應用到各領域的分離方法。

目前常為人使用的吸附型層析法(adsorption chromatography)，常做為前處理步驟，其原理乃是利用身為固定相(stationary phase)的吸附劑(adsorbent)對不同物質分子有不同的吸附能力而達到混合物的分離效果。

為了瞭解吸附型層析的管內吸附情形，本研究以全管柱偵測系統觀察染料在填充有 C_{18} 吸附劑之玻璃管柱內的吸附機制與濃度分布，同時結合管外的單通道偵測器(紫外光可見光偵測器，UV-Vis detector)來觀察管外樣品流析訊號。

1.2 研究動機

吸附型層析法是科學史上第一種層析技術，其所接的偵測器多為單通道偵測器 (single-channel detector)。然而，根據 Pai 所發表之文獻[1, 2]指出：「由一般管柱外單通道偵測器所獲得之以時間單位為

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的瞬間空分佈有一定差異」，此差異稱為「空時差異」，即在忽略所謂時間效應(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[5-9]，因此 Pai 陸續發展出一系列模擬層析行為之理論公式，稱為郵包模型(parcel model)[1-2, 4]。

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的層析圖譜訊號，亦必須獲得樣品在管內移動過程中，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(可長達二十一公分)，可完整記錄層析管柱內樣品分佈，結合單通道偵測器，組成一套完整的多功能偵測系統，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。

透過全管柱偵測系統，可觀察吸附型管柱內的樣品吸附情形，並和 Pai 所提出的 Parcel model 理論互相比較。

第二章 研究背景與文獻回顧

2.1 層析法簡介

層析法(Chromatography)之原理乃是利用不同物質在不同相態的選擇性分配，以移動相(普遍為液體或氣體)對固定相(大多為多孔的固體或覆蓋在固體支持物上的液體)中的混合物進行沖提，使混合物中不同的物質產生不同的移動速度，而達到分離的效果與分析之目的。

層析法起源於 1903 年[10]，由俄羅斯植物學家 Mikhail Tswett，首次發表了有關層析的演說，其內容為利用一支填充有細顆粒碳酸鈣的管柱來分離綠色葉子中的葉綠素與葉黃素等各種植物色素，此實驗的操作方法是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，而被分離的物質在管柱中顯現出有顏色的層帶，這也是他命名此法為「層析法」的由來；由於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。

接著，層析學便以驚人的速度快速發展；1952 年時，A. J. P. Martin 和 R. L. M. Synge 更因為在層析領域的偉大貢獻而得到諾貝爾化學獎。在許多研究中，層析法總是扮演不可或缺的一角，令人驚嘆的是於 1937 至 1972 年間，共有十二個諾貝爾獎其內容與層析法密不

可分[3]，由此可見層析法對科學界的重要性。

層析法又可依照層析機制、移動相與固定相種類、操作形式來分類：

(1) 液相層析機制

- 吸附層析(adsorption chromatography)，乃是利用固定相與不同物質分子吸附能力的差異而達到混合物的分離效果，其機制為移動相分子與物質分子競爭固定相吸附中心的過程。
- 分配層析(partition chromatography)，是層析法中最常使用的機制，其原理乃是利用不同物質於固定相與移動相間之滯留程度不同而達分離效果，其機制為物質分子在動靜兩相間之分配係數不同而達到分離。
- 離子交換層析(ion exchange chromatography)，乃是利用不同物質與固定相之間發生離子交換的能力差異來達到分離目的。離子交換層析的固定相大多為離子交換樹脂，樹脂分子結構中存在許多可以電解的活性中心，待測樣品中的離子會與這些活性中心發生離子交換，達到離子交換平衡，從而在移動相與固定相之間形成分配。其機制為固定相的固有離子與不同物質中的離子間相互爭奪固定相中的離子交換中心。
- 膠體滲透層析(gel permeation chromatography)，又稱為分子篩

選層析(size exclusion chromatography)，其中的固定相支持物是人工合成的交聯聚合物，在水中膨脹後成為凝膠，不同的交聯度內部孔徑不同，交聯度小的孔徑大，交聯度大的孔徑小。只有小於孔徑的待測物質分子可通過孔徑，由於小分子所經過的孔徑最多，因此路徑最長，會最晚被沖提出來。

- 親和層析(affinity chromatography)，常用於生物化學實驗中，其原理乃是利用分子與其配體間特殊且可逆性的親和作用而達到分離目的。

(2) 移動相與固定相種類

依移動相不同可粗分為氣相層析與液相層析，其中更可以移動相與固定相兩相細分為氣固層析、氣液層析、液固層析和液液層析等等。

(3) 操作形式

- 管柱層析(column chromatography)，將固定相固定於管柱內，使樣品沿一個方向而達到分離。
- 紙層析(paper chromatography)，利用濾紙做為液體樣品的載體，再以移動相沖提，以達到分離目的。
- 薄層層析(thin layer chromatography)，將適當顆粒大小的吸附劑於鋁片上鋪層薄層，再以和紙層析相似的方法進行樣品的

分離和鑑定。

在經過了將近一世紀的研究後，層析法成為分析化學中應用很廣泛且發展很迅速的一個研究領域，同時，層析法的新技術與新方法依然層出不窮。

而目前最常為各實驗室所用的層析法為「分配型液相層析法」。早期的分配型液相層析法，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，且為獲得合理之流速，固定相之粒徑需採用 150 到 200 μm 之粒徑較大的顆粒。

在層析法發展初期，科學家們早已了解到減小固定相粒子的尺寸可以增加管柱效率，並於 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 3-10 μm 的固定相的技術才被發展出來[11-13]。在過去四十年裡，分配型液相層析法所用之固定相材料已發展出許多改進方式以達更佳的分離效果，例如從固定相合成與化學修飾法改進[14]、改變固定相間不同化學鍵結方式以增加選擇性[15] 增加固定相之化學穩定性[16]使用直徑小於 2 μm 之固定相材料[17-20]、以及將所用固定相形狀改為規則球狀等方式[21-23]，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，層析管柱便由古典液相層析法中所使用的簡單玻璃管柱轉變為不鏽鋼管等耐高壓管柱取代[24-25]。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[26]。

除改良固定相材料外，近年來許多研究偏好使用管柱內徑較小之管柱，以減少沖提溶劑以及固定相材料之使用，增加質量靈敏度，以及與質譜儀更高的相容性，此種窄內徑(narrow-bore)管柱之內徑約為 2.1 毫米或 1.0 毫米[27-31]。然而，儘管使用窄內徑管柱具有上述之優點，卻有文獻指出[32]，在使用窄內徑時，其效率卻不如使用一般常用的內徑 4.6 毫米之管柱，因此目前分離常用管柱內徑仍以 4.6 毫米為主。

需注意的是，在使用上述所提到的直徑小於 $2\mu\text{m}$ 之固定相材料時，雖可使分離效率提高並提供較快之分離速度，使得分離所需時間大幅減短，但此種粒徑較小之固定相，卻會造成分離時背壓(back pressure)增大，根據文獻[33-34]，當粒徑尺寸降低 2 倍，其增加之背壓會上升 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[35]；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，在使用直徑小於 $2\mu\text{m}$ 的固定相時，則需搭配可提供更高壓，約 1000 bar(14500 psi) 條件下操作之

儀器設備[36-39]。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[19, 40-41]，以及由儀器與管路等原因產生之管柱外效應(extra-column effect)[42-45]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 吸附型層析

事實上，第一位提出「層析法」技術的 Tswett，其在研究中所使用的層析技術即為吸附型層析[46]；而自從 Tswett 以吸附型層析法開啟層析學大門後，許多科學家開始對對吸附型層析法進行更深入的

研究，其中，美國化學家 Palmer 是第一位將吸附型層析技術引入生物化學領域的科學家[47]。除此之外，Kuhn 也因為利用吸附型層析法進行類胡蘿蔔素和維生素的研究而於 1938 年獲得諾貝爾獎[48]。

在吸附型層析法中，固定相稱為吸附劑(adsorbent)，而移動相則可為液相或氣相，其中以液固相吸附型管柱最常見，實驗室常使用的薄層層析法(TLC)即為液固型吸附型層析法的一種。

吸附型層析法的原理乃是依據不同物質對固定相的吸附力與被移動相脫附的傾向不同而達到分離目的，此法特別適用於許多中等分子量的樣品(分子量小於 1000 的低揮發性樣品)的分離，其分離效果取決於吸附劑(adsorbent)、沖提液(eluent)和樣品性質此三個因素。

好的吸附劑必須具有以下條件：

- 和移動相不互溶
- 樣品可吸附於其上，卻不會與之起反應
- 顆粒大小合適，可提供好的分離能力

最常見的吸附劑為矽膠(silica gel)，層析用的矽膠為一多孔性材料，為二氧化矽水合物，其分子中具有矽氧烷的交錯結構，而在顆粒表面則具有許多矽醇基，矽膠吸附力的強弱便和其上的矽醇基數量多少有關，由於矽醇基可利用氫鍵和水緊密吸附，故矽膠的吸附力會隨著吸附著的水分增加而降低，但可因此用做為分配(partition)層析法的

固定相。另外，矽膠為一酸性吸附劑，較適用於中性或酸性的層析，若遇到鹼性化合物，則由於矽膠表面上的矽醇基可釋放弱酸性的氫離子，故矽膠會成為一弱酸性的陽離子交換劑，而吸附鹼性化合物。

在吸附型層析中，沖提液的選擇也對分離效率影響重大。當待分離化合物為弱極性時，就須選用弱極性的溶劑為沖提液，反之亦然。

吸附型層析在使用目的上可粗分為兩大類：

- 濃縮：將大體積、低濃度的樣品填入管柱，使化合物被吸附劑緊緊吸附後，再以適當的沖提液沖出，而達樣品濃縮目的。
- 製備型分離：以吸附劑為固定相，沖提液為移動相，利用吸附劑對混合物不同成分的吸附力不同而達到分離目的，其中會發生一系列吸附、脫附、再吸附、再脫附的過程，吸附力越強的物質因移動距離較小，因此會較慢流出管柱，反之亦然。

在吸附型濃縮層析的部分，由 Pai 所做的一系列以 Chelex-100 鉗合樹脂濃縮海水中微量元素與金屬元素的研究中[49-54]，啟發他發展了一套以理論公式模擬吸附型層析管內外吸附情形的系統，稱之為「parcel model for column-type adsorption concentration」。然而，在此模擬系統中，一般實驗室大多僅能證明其模擬出的管外時圖結果是否正確，而管內的吸附機制與濃度分布則無法透過一般的單通道偵測器

獲得；因此，本研究將以全管柱偵測系統，來觀察吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布，並將實驗結果與 Pai 所發展的郵包模型模擬系統互相比較。

2.3 全管柱偵測系統之發展

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[54]，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，藉著觀察分析物在兩偵測點間的趨勢，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 et al.設計了一組解析度更高的多通道偵測系統[55]，將十四組紫外光感二極體(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[56]，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：

- 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。
- 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。
- 更精確的得到滯留因子。
- 可測量移動相與固定相間平衡的速度。
- 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[57]，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[58-63]。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[64, 65]。甚至有科學家使用 WCD 系統來獲得部分實驗參數後，透過五公分之觀察視窗，便可預測在 CIEF 實驗中，分離一百五十種樣品之混合物的分析結果[66]。

在 WCD 技術開始發展後，便有科學家以具透光性之玻璃材質的層析管柱來進行分離實驗，並使用錄影影像(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[67, 68]。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[69-71]，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。

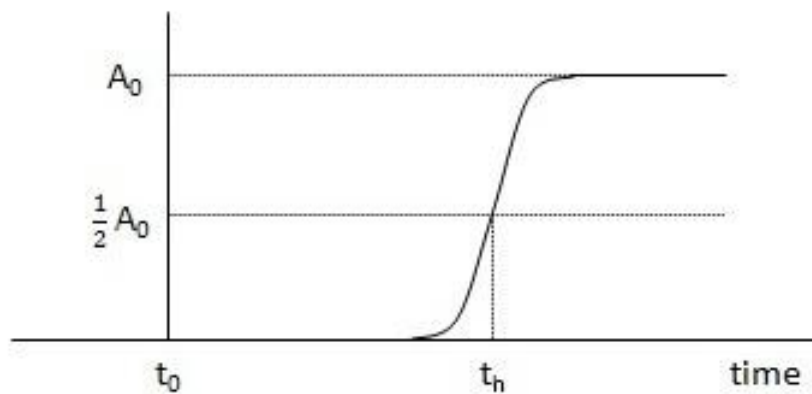
本實驗室組裝設計了一套可同時整合「直接獲取分析訊號」、「高解析度」、「大範圍觀測視窗」等裝置優勢之 WCD 系統，並設計一耐高壓玻璃管柱，可大範圍(21 cm)的觀察分析物在一般常用的 HPLC 實驗條件下之分離過程，藉由同時獲得管柱內、外之實驗數據，並可獲得管柱內空間及時間之實驗數據，對部分有疏失之層析理論進行修正[9, 73-75]。

而本篇論文將使用此具多項優點的 WCD 系統來觀測樣品於吸附型管柱之管內吸附機制與濃度分布，藉由同時獲得管柱內、外之實驗數據，和獲得管柱內空間及時間之實驗數據，來驗證 Pai 的郵包模型理論。

2.4 衝破實驗簡介

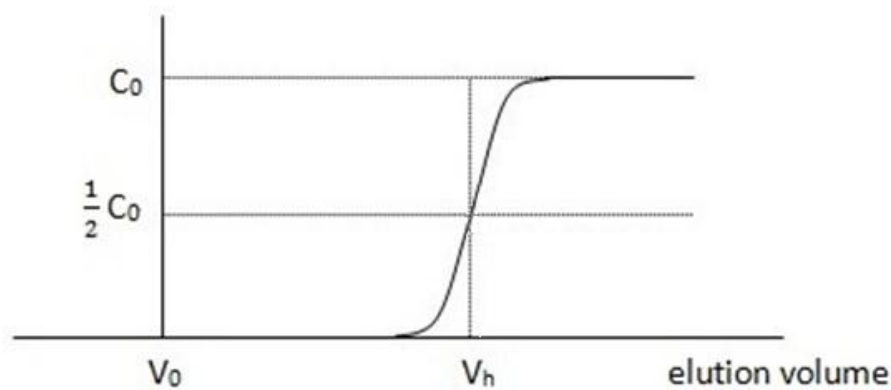
衝破實驗(breakthrough experiment)通常用來最佳化前處理的濃縮流程(pre-concentration)，在已知條件下(濃度、離子強度、溫度及流速等等)，衝破實驗可提供我們有關最大吸附量(maximum volume or capacity)、吸附效率(efficiency)、回收率(recovery)。由此，學者們可藉由調整管柱填充長度、流速等等條件來達到實驗最佳化。

標準的衝破曲線為有如酸鹼滴定實驗結果的 S 形曲線，如圖 1：



(圖 1) 標準衝破曲線 time v.s. abs.

圖 1 中，橫軸為時間(time)，縱軸為吸收度(Absorbance)，其中 A_0 表示尚未載入的樣品溶液之吸收度；為了方便公式的推導，可將時間與吸收度轉換為體積(Volume)對應濃度(Concentration)，以 C_0 表示尚未載入的樣品溶液之濃度，如圖 2：



(圖 2) 標準衝破曲線 volume v.s. conc.

衝破曲線的中點(t_h or V_h)稱之為半衝破點(half-breaking point)，在半衝破點左下側的三角形面積等於右上側的三角形面積，因此 $C_0 \times V_h$ 的長方形面積代表的就是管柱在某特定條件下，所能滿載的有

效容量(capacity)。

假設流速為 Q ，載入時間為 t ，樣品總體積為 V_s ，則 $V_s=Qt$ ，其所載入的分析物之量則為：

$$m_{loaded}(t) = C_0Qt = C_0V_s \quad (1)$$

當分析物開始流出管柱時，其在流出液(effluent)中的濃度 C_e 會緩慢持續的增加，而所流出的分析物可經由積分計算：

$$m_{leaked}(t) = Q\int_0^t C_e(t)dt = \int_0^V C_e(V)dV \quad (2)$$

管柱內在時間 t 所吸收的分析物則為：

$$m_{adsorbed}(t) = m_{loaded}(t) - m_{leaked}(t) \quad (3)$$

管柱效率(column efficiency) $E\%$ 則為：

$$E\%(t) = \left[1 - \frac{m_{leaked}(t)}{m_{loaded}(t)}\right] \times 100\% \quad (4)$$

而有效管柱容量(effective column capacity, ECC)，則需帶入 t_h 值或 V_h 值求得：

$$ECC \approx C_0Q(t_h - t_0) = C_0V_h \quad (5)$$

在單一樣品的吸附型濃縮實驗中，假設化合物 A 會吸附於樹脂吸附劑 R 上，此吸附反應可用下列平衡式表示： $A + R \rightleftharpoons AR$ 。

在固定流速下，其動態平衡常數(dynamic stability constant)為：

$$K_{stab} = \frac{[AR]_{resin}}{[A]_{liquid}[R]_{resin}} \quad (6)$$

$[AR]_{resin}$ 為吸附於樹脂上的分析物濃度(mole g^{-1})， $[A]_{liquid}$ 為化合物 A 的濃度(mole L^{-1})，而 $[R]_{resin}$ 則為尚保有可吸附樣品能力(free capacity)的樹脂量(mole g^{-1})。

若管柱內的溶劑體積及樹脂重量為定值，則上列公式可簡化

為：

$$k = \frac{(AR)_{resin}}{(A)_{liquid}(R)_{resin}} \quad (7)$$

此 k 值即為動態吸附平衡常數(dynamic adsorption stability constant)，

其中 $(AR)_{resin}$ 、 $(A)_{liquid}$ 、 $(R)_{resin}$ 皆為莫耳數。

而層析學中常用的分配比率(distribution ratio)和此動態平衡常數間的關係為：

$$D = k(R)_{resin} = \frac{(AR)_{resin}}{(A)_{liquid}} \quad (8)$$

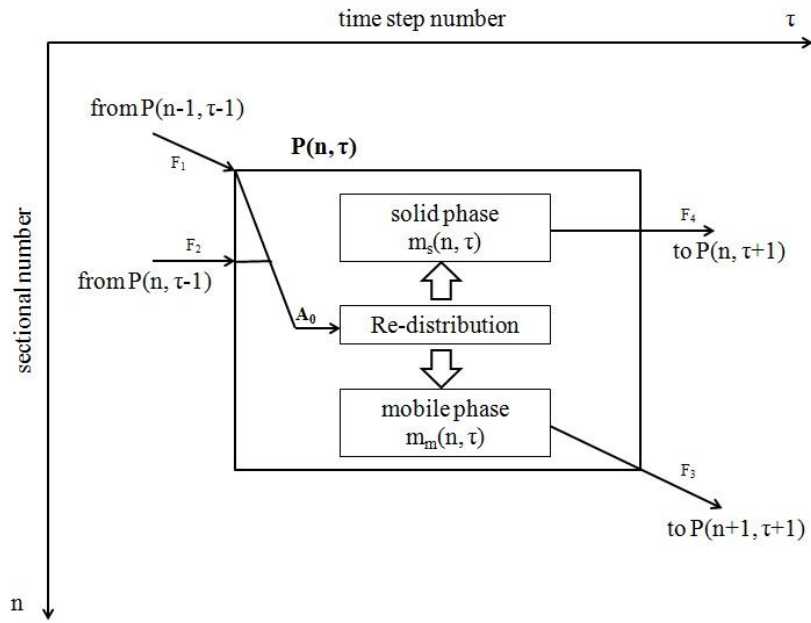
由於在實驗進行的同時， $(R)_{resin}$ 值會不斷減少，因此 D 值較不適合用來建立濃縮實驗的數學模型，相較之下，k 值不受濃度、載入體積與時間的影響，十分適合此數學模型的建立。

2.5 郵包模型 (parcel model)

在 Pai 所發表的文獻中[1,2]，提出了以「郵包」的觀念來模擬分配型層析(partition chromatography)的管內外流動情形；此後，Pai 又將此觀念代入吸附型層析中，經過些微的調整後，此郵包模型(parcel model)便可模擬出吸附型層析的管內外流動情形。

在此模型中，Pai 先將管柱長度 L 平分為 n 等分($L = n\Delta L$)，並將時間 t 也平分為 τ 等分($t = \tau\Delta t$)，而一個「郵包」所代表的即是一個長度單位 n 與一個時間單位 τ 所構成的一小空時區間，以 $P(n, \tau)$ 表

示，如圖 3：



(圖 3) parcel $P(n, \tau)$

圖 3 中，每單一時間 τ 所載入此單一空間 n 的分析物質量為 A_0 ，為 F_1 (來自 $P(n-1, \tau-1)$ 的存在於移動相的分析物質量) 與 F_2 (來自 $P(n, \tau-1)$ 的存在於固定相的分析物質量) 的總和；在此 parcel 經過重新分配 (re-distribution) 平衡後，其存在於固定相的的分析物質量將會經由 F_4 轉移至 $P(n, \tau+1)$ ，存在於移動相的分析物質量則會經由 F_3 轉移至 $P(n+1, \tau+1)$ 。

在此 parcel 中，重新分配的現象可以下列公式表示：

$$k_{(n, \tau)} = \frac{m_{s(n, \tau)}}{m_{m(n, \tau)} \times r} \quad (9)$$

此 $k_{(n, \tau)}$ 代表分析物於 $P(n, \tau)$ 的實際吸附係數，而 r 代表 $P(n, \tau)$ 的吸附劑的有效容量。

若整支管柱的容量為 R ，則每單一 parcel 中，其 resin 的容量以 R_0 表示，也就是 $R = nR_0$ 。然而，往往實驗後所計算出來的管柱容量卻常常低於 nR_0 值，這是因為並非每一個 R_0 值皆為 100% 有效 (effective) 的，因此，在計算管柱容量時，應以有效管柱容量 (effective column capacity, ECC) 為計算標準：

$$ECC \approx m_0 (\tau_h - \tau_v) \quad (10)$$

上列公式中， τ_h 為半衝破時間， τ_v 為無效時間 (樣品流經 void position 的時間)。

當單一 parcel 達到平衡後，將不會有多餘的分析物再被樹脂吸附，而注入此單一 parcel 的分析物量與流出此單一 parcel 的分析物量會完全相等，因此，被吸附於樹脂上的分析物之量可由下列公式求得：

$$k = \frac{m_s}{(R_0 - m_s)m_0} \quad (11)$$

由 11 式可得 m_s 值：

$$m_s = \frac{m_0 k R_0}{m_0 k + 1} \quad (12)$$

此 m_s 值所代表的即是當 parcel 內部達到平衡時， R_0 所可吸附的分析物量。將此數值乘上 n ，即為有效管柱容量：

$$ECC = \frac{m_0 k}{m_0 k + 1} n R_0 \quad (13)$$

由於 (10) 式及 (12) 式十分相近，因此可將兩式結合，而計算出 τ_h 、 k 值、 R_0 值：

$$\tau_h = \frac{nkR_0}{m_0k+1} + \tau_v - 0.5 \quad (14)$$

(上式中，0.5 為人工常數(artificial constant)，可提供更佳精準度)

$$k = \frac{-\tau_h + \tau_v}{m_0\tau_h - m_0\tau_v - nR_0} \quad (15)$$

$$R_0 = \frac{(\tau_h - \tau_v)(m_0k+1)}{nk} \quad (16)$$

然而，在一般情況，我們無法得知某樣品的 k 值及管柱的 R_0 值。因此，若要求出某樣品的 k 值，則需至少已知兩個 m_0 值和兩個與其對應的 τ_h 值：

$$ECC_1 = m_1 (\tau_1 - \tau_v) = \frac{m_1 k}{m_1 k + 1} nR_0 \quad (17)$$

$$ECC_2 = m_2 (\tau_2 - \tau_v) = \frac{m_2 k}{m_2 k + 1} nR_0 \quad (18)$$

將兩式相除，得到：

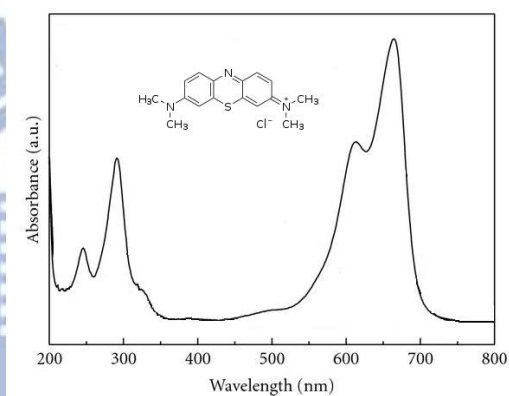
$$k = \frac{\tau_2 - \tau_1}{m_1(\tau_1 - \tau_v) - m_2(\tau_2 - \tau_v)} \quad (19)$$

藉由上式，將可從實驗結果求出分析物的 k 值，並利用此 k 值代回其餘公式，進而求出各項數據，包括 ECC 值與 R_0 值。

第三章 實驗部分

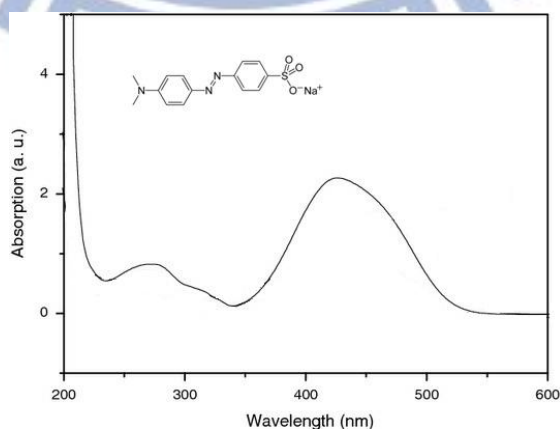
3.1 實驗藥品

- (1) 亞甲基藍(methylene blue)： $C_{16}H_{18}N_3S$ Cl，分子量 319.85 g/mole，購自 Acros Organics (Geel, Belgium)，分子結構與全波長吸收光譜圖如圖 4。



(圖 4) 亞甲基藍分子結構與全波長吸收光譜圖^[75]

- (2) 甲基橙(methyl orange)： $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ ，分子量 327.33 g/mole，購自 Fluka analytical (MO, USA)，分子結構與全波長吸收光譜圖如圖 5。



(圖 5) 甲基橙分子結構與全波長吸收光譜圖^[76]

- (3) 乙醇(ethanol)： C_2H_6O ，分子量 46.07 g/mole，濃度為 95%，購自 Tedia (USA)。
- (4) 鹽酸(hydrochloride acid)： HCl ，濃度為 1N，購自 Scharlau (Barcelona, Spain)。
- (5) sep-pak[®] C₁₈ 粉末：sep-pak[®] 為由美商 Waters(MA, USA)研究開發的固相萃取(solid-extraction)匣，其內部機制和吸附型層析之作用機制相同；sep-pak[®] C₁₈ 粉末的顆粒大小(particle size)在 55 μ m 至 105 μ m 之間，孔徑(pore size)為 125 \AA ，表面積(surface)為 325m²/g，碳載入量(carbon load)為 12%。

3.2 儀器裝置

- (1) 往復式幫浦：型號為 Series III，購自 Lab Alliance (PA, USA)，輸出流速範圍由 0.04 mL/min 至 40 mL/min。
- (2) 玻璃管柱：研究中使用的管柱為由美國 Omnifit (Danbury, CT, USA)所研究開發的 BenchMark[™] 玻璃管柱，型號為 006BCC-06-05-AF，長度 50mm，管柱直徑 6.6mm，含一固定末端與一可調式末端。
- (3) UV-Vis 偵測器：型號為 model 201，購自 Lab Alliance (PA, USA)。
- (4) 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

3.3.1. 玻璃管柱

BenchMark™ 玻璃管柱如圖 6，含一固定末端與一可調式末端。由於具備可調端之組件(圖 7)，故可自行調整固定相所需填充長度。

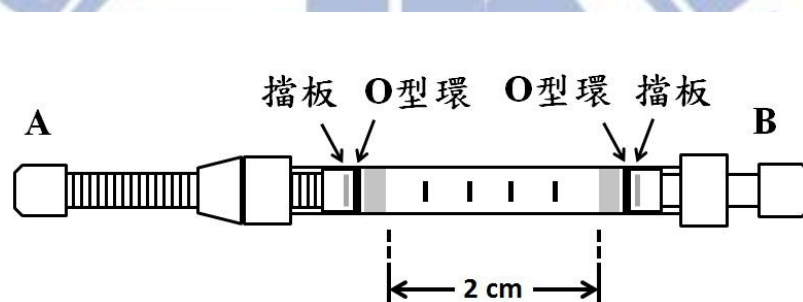
在填充管柱前，為避免玻璃管柱上之商標與管柱型號標籤遮擋 WCD 系統之光源，故須利用酸性溶液去除標籤。首先先將除去兩端組件的玻璃管柱浸泡於 16M 濃硝酸(16M HNO₃)中，浸泡約三小時後，標籤上的染料便會脫落且防水膜也隨之鬆弛；此時再使用濃氫氟酸 (concentrated HF)，將緊黏於玻璃管柱上之標籤去除；使用濃氫氟酸時須特別小心，並在具有充備安全防護的狀況下，以棉花棒沾取濃氫氟酸後，以極輕的力道於標籤上來回擦拭，由於氫氟酸除去標籤的機制乃是利用氫氟酸與二氧化矽間的反應： $\text{SiO}_2 + 6\text{HF} \rightarrow \text{H}_2[\text{SiF}_6] + 2\text{H}_2\text{O}$ ，若太用力則會使玻璃管柱之玻璃受損。

將玻璃管柱去除標籤後，便可利用自行填充之方式，填充 sep-pak® 中的 C₁₈ 粉末。自行填充採用乾式填充法，首先將 sep-pak® 剪開，取出其內的 C₁₈ 粉末(圖 8)，在測量其重量後，直接將乾粉狀之 C₁₈ 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 C₁₈ 固定相平整而緊密，若 C₁₈ 吸附劑並非緊密、平均的分布於管柱內，將會使得樣品於管柱內各段的吸附情形不穩定。填

充完成後，利用乙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 1.5cm，內徑 6.6mm，填充 sep-pak[®] C₁₈ 為固定相之玻璃管柱。



(圖 6) BenchMark™ 玻璃管柱



(圖 7) BenchMark™ 玻璃管柱結構圖。管柱規格：固定相長度填充 1.5cm、內徑 6.6mm，內含擋板(frit, 10 μ m)。其中，A 部分為可調端，透過旋轉組件來改變固定部分為可調端，透過旋轉組件來改變固定相填充長度，B 部分則為固定端。



(圖 8) sep-pak[®] cartridge 與其內的 C₁₈ 粉末

3.3.2. WCD 系統

WCD 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 9 所示。

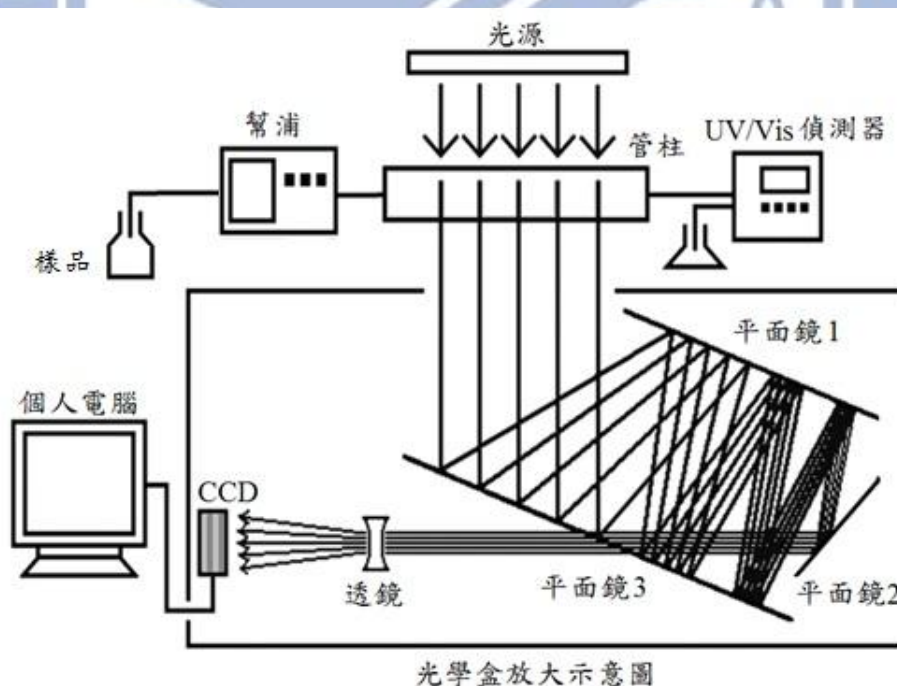
光源可視偵測的樣品種類而做更換，通常使用和樣品顏色相對應的光色做為實驗光源(若樣品為亞甲基藍則使用紅色光源，若樣品為甲基橙則使用藍色光源)，本研究中所使用的光源包括放射波長為 460 nm 的藍光 LED 光源(型號 DL-15-200-B-V)，及放射波長為 620nm 的紅光 LED 光源(型號 DL-15-200-R-V)，以上光源皆購自曜宇科技股份有限公司。

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

光線必須通過填充固定相的玻璃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，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[55]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 9) 詳細光學盒示意圖。光學盒內部包含三組平面鏡和一片聚焦，透過圖示之路徑，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。

3.3.3. WCD 系統操作介面設定

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 10)，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，以下逐一介紹操作面各項參數之設定原則。

(1) 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。

(2) 樣品取樣點數(data points)

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。

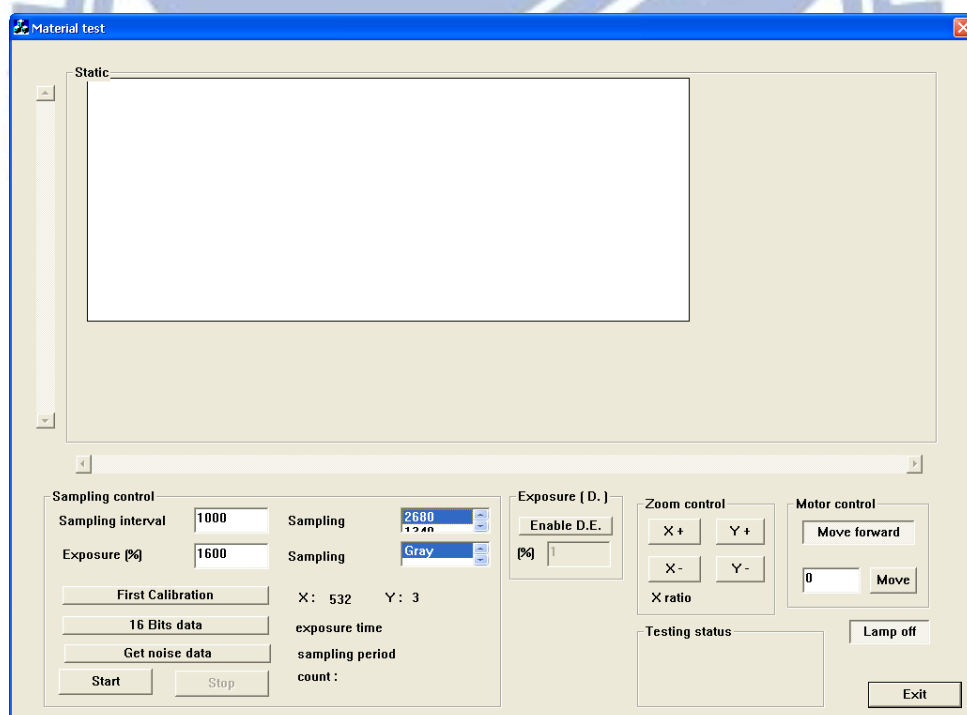
(3) 樣品取樣模式(sampling mode)

光學盒內部的 CCD 有塗佈材料，可以過濾掉不同波長的光源。因此，由取樣模式可以選擇光源通過 CCD 的波段，選擇模式有 5 種，分別

為 Red、Green、Blue、Color、Gray，在本實驗中，因所選擇的光源已是單波段光源，所以選擇「Gray」為取樣模式，即 CCD 不需濾掉任何波長的光，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。

(4) 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)。

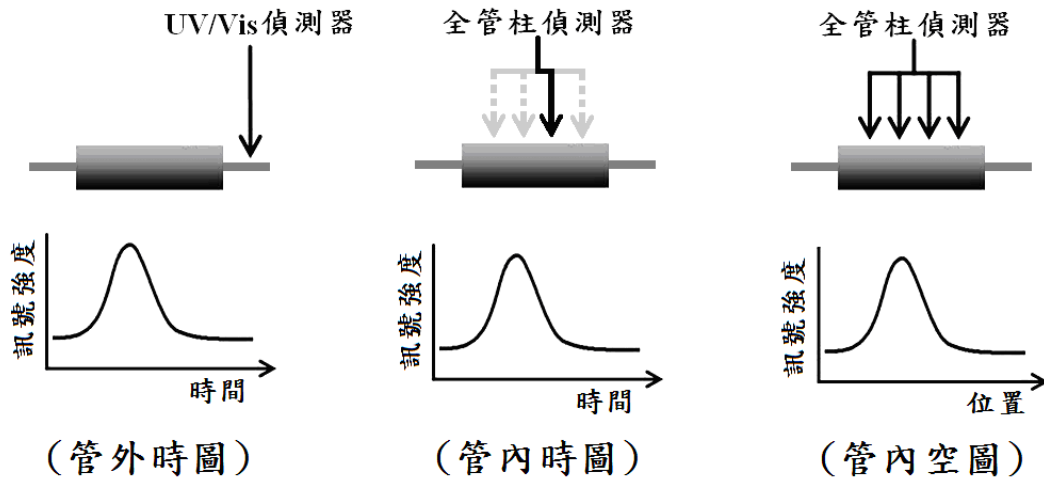


(圖 10) WCD 系統電腦操作界面圖。操作界面上可設定之參數包含：數據取點間距時、偵測器曝光時間、取樣點數、取樣模式。除了數據取點間距時間於每次實驗前須重新輸入以外，在本研究中偵測器曝光時間固定為 前須重新輸入以外，在本研究中偵測器曝光時間固定為 1600%(57.6ms)，取樣點數固定為 2680 個、取樣模式固定為「Gray」。

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，可得一吸收值空時矩陣(matrix)，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圖譜定義於圖 11。如圖 11，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器的訊號，故所得圖形橫座標單為時間，縱座標單位為訊號強度，此類型數據即稱之為時圖(temporal profile)，且由此組數據是在管柱外之環境所收集而得，故又稱為管外(post-column)時圖。使用 WCD 系統時，可以同時偵測大範圍的樣品分佈，如瞬間拍照，以獲取樣品在一維管柱空間中的訊號強度值，此獲得的圖譜橫座標為管柱位置、縱座標為訊號強度，此類型之數據稱之為空圖(spatial profile)，且由於此數據是在管柱內之環境所獲得，故亦可稱為(on-column)管內空圖。

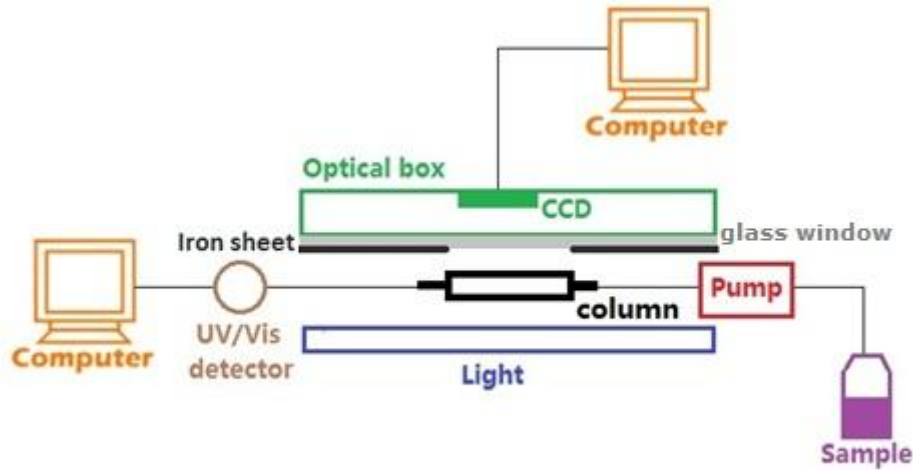
WCD 系統除可獲得管柱內樣品的空圖訊號，若將一固定管柱位置為偵測點，隨著時間累積所得的訊號，則亦可獲得以時間為橫座標，訊號強度為縱座標之管內時圖數據 (如圖 11)。



(圖 11) 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；管內空圖是以 WCD 系統持續收集大範圍之樣品空間分佈訊號，所得圖表橫軸座標單位是空間；但若選擇其中一固定管柱位置為偵測點，則此點隨著時間累積訊號，可得以時間為橫座標單位的管內時圖。

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，進行機台的 XYZ 軸微調，以達最佳化狀態；並把直接進入偵測器之光線(本研究使用之管柱較短，故管柱無法完全遮掩光源)以鐵片遮蔽(如圖 12)，避免在高強度且長時間的照射下損壞偵測器。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。



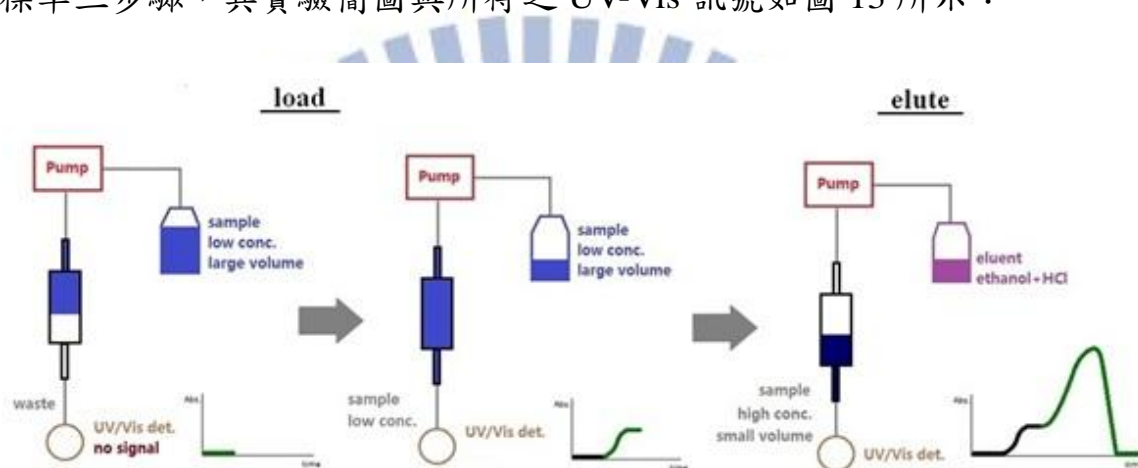
(圖 12) 實驗裝置圖

上述步驟 執行完畢後，進行接下來的實驗步驟：

- (1) activate：以 95% 酒精，流速 10mL/min 沖提管柱三分鐘。
- (2) wash：以流速 10mL/min 的 D.I. water 沖提管柱三分鐘，以除去管內的乙醇，使管內的溶劑成分與待打入的樣品溶劑相同。
- (3) 設定電腦操作介面。
- (4) 將 WCD 系統機台上的黑布蓋下，量測無樣品時之背景值。
- (5) load：開始打入樣品，並同時開啟 WCD 系統與 UV-Vis 偵測器以同時偵測管內與管外的實驗數據。
- (6) 當 UV-Vis 偵測器觀察到衝破實驗圖形中的 S 曲線完成，且訊號維持一定達約五分鐘時，即可停止收集 WCD 系統與 UV-Vis 偵測器之訊號。
- (7) elute：以 95% 乙醇:0.1N 鹽酸(8:1, v/v)溶液，沖提管柱，將吸附於固定相的樣品沖提出來。

(8) 觀察 UV-Vis 偵測器訊號，當訊號值回到 $0 \pm 10\text{mv}$ 時，代表管柱內之樣品已完全沖提出，可繼續由步驟(1)開始，重複進行下一次實驗。

實驗步驟中的 active、load 與 elute 是使用 sep-pak[®] cartridge 的標準三步驟，其實驗簡圖與所得之 UV-Vis 訊號如圖 13 所示：



(圖 13) 實驗流程簡圖

除此之外，在進行衝破實驗前，還需細心挑選合適的樣品。適合進行衝破實驗的樣品需具備下列條件：

- (1) 必須有足夠強的吸光係數
- (2) 需對 sep-pak[®] C₁₈ 有足夠的吸附性
- (3) 為單一分子量之化合物
- (4) 易被 ethanol : HCl (8:1, v/v) 溶液沖提出來

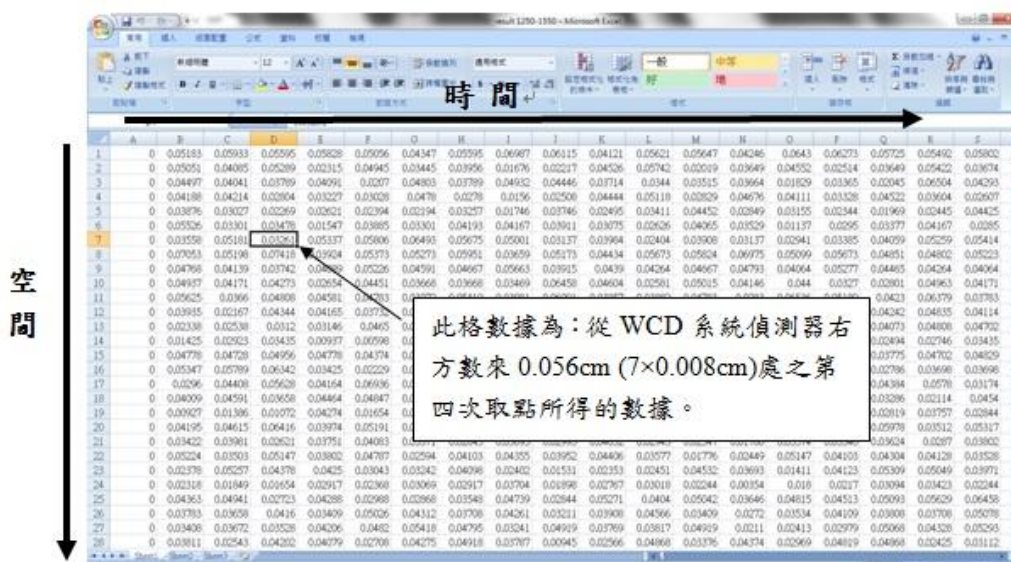
在許多染料中，亞甲基藍和甲基橙皆具有以上條件，因此本研究中使用此兩種染料來進行實驗。

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，可在同一時間得到 2680 個訊號收集點，因此每一個空間訊號含 2680 個數據。由於 WCD 偵測器的可偵測長度約為 21cm，因此每個數據點間的距離約等於 0.008cm。

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，result.txt 檔以 excel 打開後如圖 14 所示，列中所示為空間(pixel)訊號，欄中所示為時間(count)訊號：



(圖 14) 從 WCD 系統所偵測出的 result 檔

本實驗由於 CCD 前後端皆有鐵片遮蔽，遮蔽處之訊號值皆為 0，故在 2680 個訊號收集點中，只取其中 1250 至 1550 處的訊號，共 300

個訊號收集點。

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，也就是一般管柱外偵測器所測得的紀錄波形，稱為管外時圖。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，稱之為管內空圖。詳細數據類型定義已在 3.4 節提及。

4.2 亞甲基藍衝破實驗

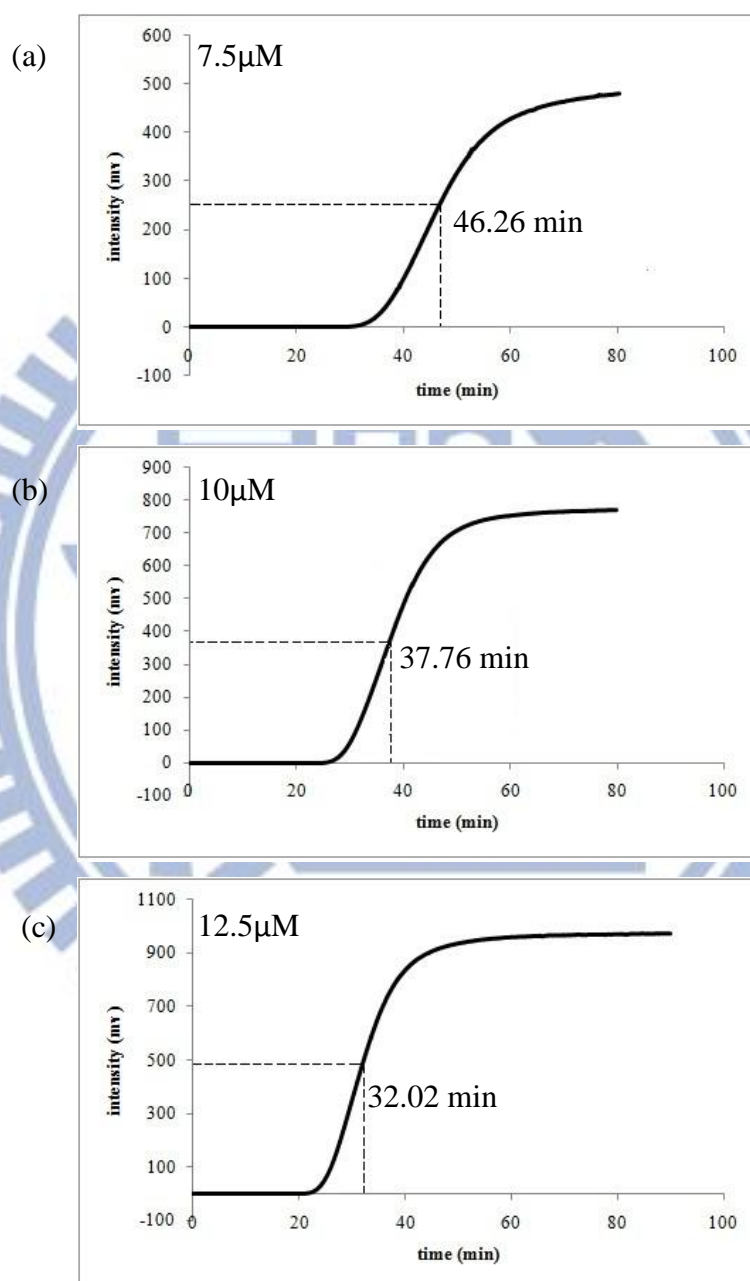
4.2.1 亞甲基藍衝破實驗管外時圖

在 2.5 節曾提及，若要得到一分析物於吸附型管柱內之 k 值，則需至少做兩個相同樣品、不同濃度之實驗，再將所得數據代入公式 (19)，方可得到此分析物之 k 值。因此，本實驗分別配製了 $7.5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 和 $12.5 \mu\text{M}$ 之亞甲基藍水溶液，以 10 mL/min 之流速將亞甲基藍水溶液持續載入填有 sep-pak[®] C₁₈ 的玻璃管柱中。

衝破實驗所得之管外時圖皆如圖 15，其圖形為一 S 形曲線，此 S 形曲線稱為衝破曲線(breakthrough curve)，此 S 形之中點即為半衝破點(half-breakthrough point)，其所對應的時間為半衝破時間(half-breakthrough time)，通常以 t_h 表示。

經由計算後得知： $7.5 \mu\text{M}$ 亞甲基藍水溶液之半衝破時間為 46.26 min ， $10 \mu\text{M}$ 亞甲基藍水溶液之半衝破時間為 37.76 min ， $12.5 \mu\text{M}$ 亞

甲基藍水溶液之半衝破時間為 32.02min；將這些數據兩兩代入公式 (19)中，即可求得亞甲基藍的 k 值，所得之 k 值分別為 0.0277、0.0253 與 0.0267，平均為 0.0266，誤差範圍為 ± 0.0013 。



(圖 15) 亞甲基藍衝破實驗管外時圖之 k 值計算。(a)濃度 7.5 μ M，半衝破時間 46.26min。(b)濃度 10 μ M，半衝破時間 37.76min。(c)濃度 12.5 μ M，半衝破時間 32.02min。(a)(b)兩圖計算所得之 k 值為 0.0277；(b)(c) 兩圖計算所得之 k 值為 0.0253；(a)(c) 兩圖計算所得之 k 值為 0.0267；平均 k 值為 0.0266 \pm 0.0013，誤差為 4.89%。

4.2.2 亞甲基藍衝破實驗管內空圖

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，此圖便稱之為管內空圖。本研究中，所有管內空圖圖形皆如圖 16 所示，橫軸為管柱位置，縱軸為吸收值，而不同顏色的波段代表的是不同的流析時間，隨著流析時間增長，波段將由左往右擴展(各波段所代表的時間先後為：紅、綠、紫、天藍、橘直至淡藍色)。因此，最左方的紅色波段所代表的即為樣品溶液剛注入管柱時，管內樣品分布的狀況；而最右方的淡藍色波段所代表的即是樣品已載滿整支管柱時，管內樣品分布的狀況。

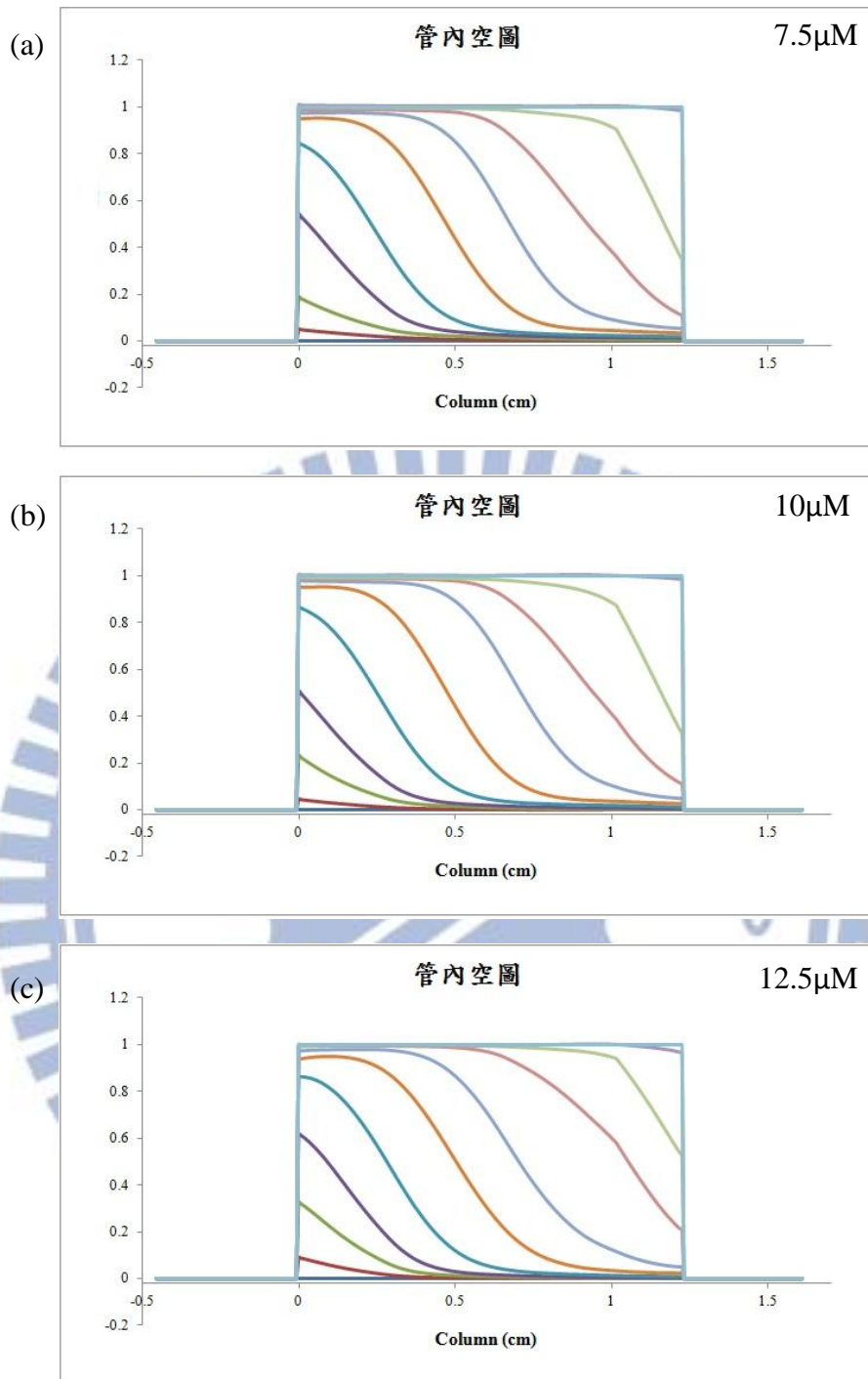
為了方便各實驗圖形間的相互比較，因此每張圖形皆需正則化(normalized)，正則化的方法為將各空間上，每一時間所得的數據除以各空間上，最後一次取點所得的數據(也就是將淡藍色波段上的各點數據為分母，其餘波段上的各點數據為分子，如此計算後所得的數據即為 normalized 後的圖形)。

由於正則化之影響，管內空圖中，靠近管柱末端之波段將呈現較不平滑之曲線，雖然曲線稍微不平滑，但並不會影響我們觀察樣品於吸附型管柱內的載入情形。

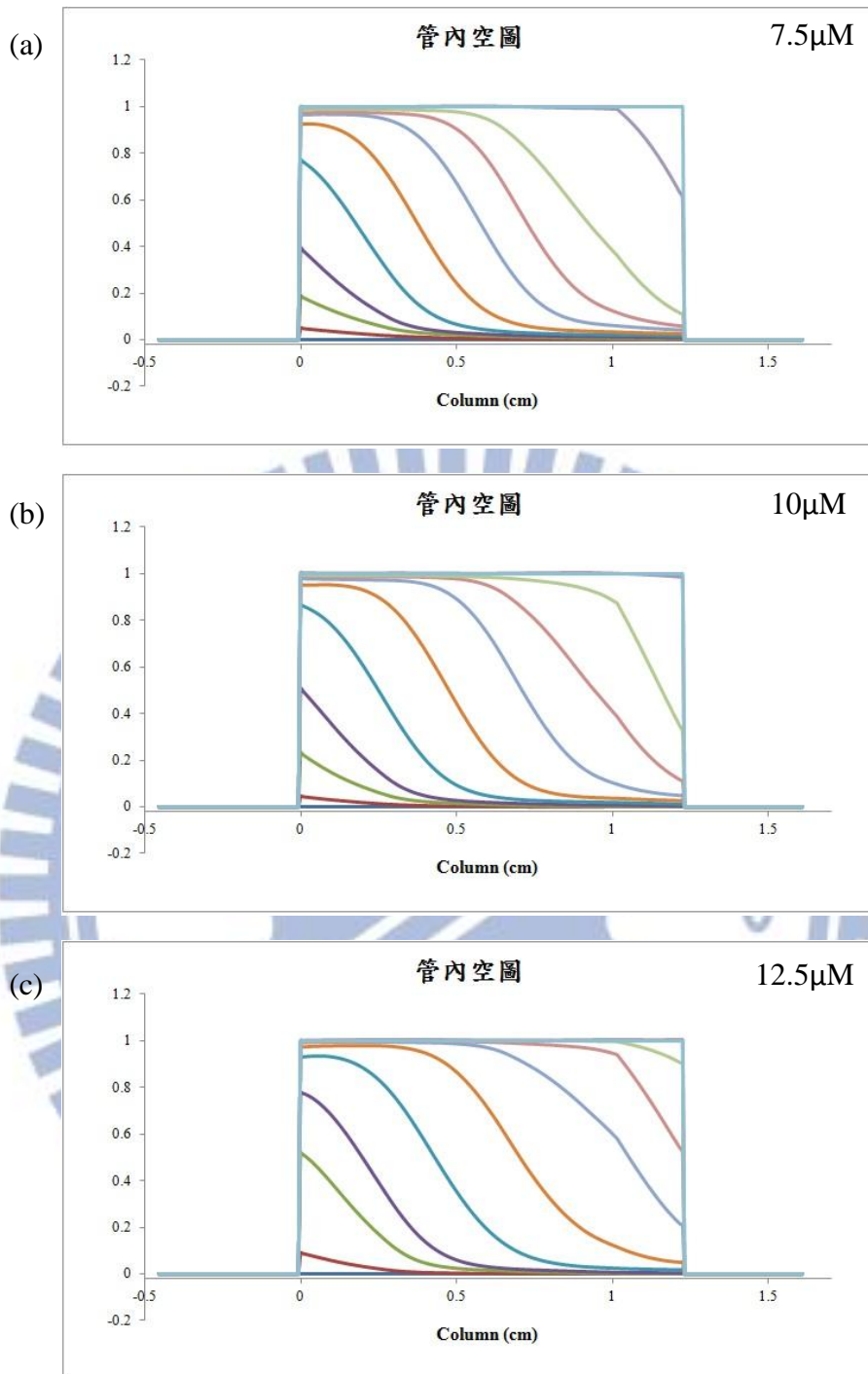
在亞甲基藍衝破實驗的管內空圖部分，我們可以清楚觀察到亞甲基藍水溶液於吸附型管柱內之載入模式；實驗發現，不論是 $7.5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 亦或 $12.5\mu\text{M}$ 的亞甲基藍水溶液，其管內載入情形都是相同的：若將玻璃管柱分為 n 段，則亞甲基藍雖是從第一段開始載入，但並不會如肉眼所見的「先載滿第一段後才開始載入第二段」；而是在第一段載滿前，亞甲基藍便開始載入後幾段。為了方便觀察各濃度的載入情形，因此在圖 16 中，不同濃度的管內空圖之取點時間皆不相同，如此方可了解亞甲基藍水溶液於吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布。

若取的是相同時間、不同濃度的管內空圖(圖 17)，則可觀察到，當亞甲基藍水溶液濃度增加時，其載入速度也會較快。

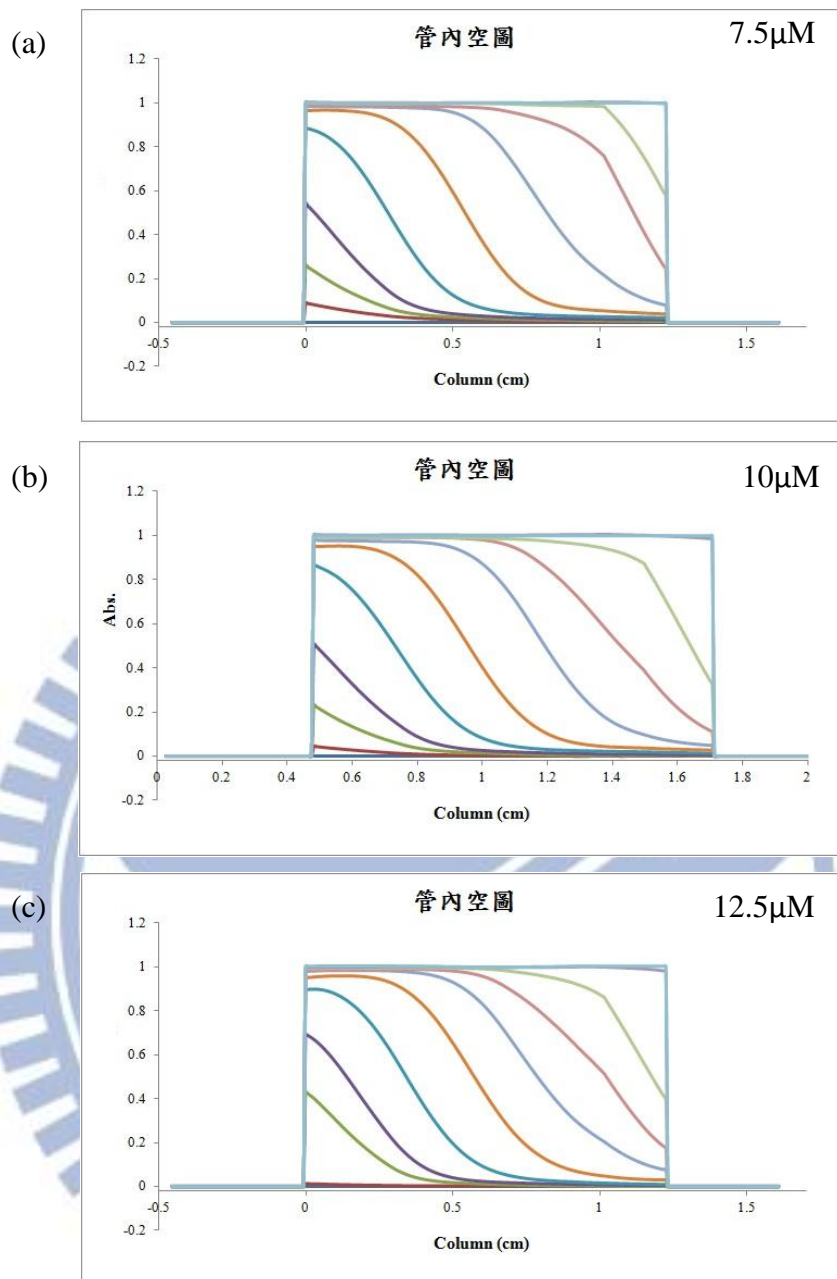
至於不同濃度的亞甲基藍水溶液，在達到相同載入莫耳數時的管內空圖之比較(圖 18)中，可發現較高濃度的亞甲基藍水溶液其載入速度較低濃度的亞甲基藍水溶液慢。由於此節實驗中所選用的濃度為 $7.5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 與 $12.5\mu\text{M}$ ，濃度的差異並不大，因此所看到的管內空圖差異並不明顯；更詳細的「樣品濃度對吸附情形的影響」的實驗將會在 4.4 節中有更清楚的實驗結果與描述。



(圖 16) 亞甲基藍衝破實驗管內空圖。(a)濃度 7.5 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 80, 200, 350, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 1999。(b)濃度 10 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 80, 150, 300, 500, 700, 850, 1000, 1350, 1999。(c)濃度 12.5 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 50, 100, 200, 350, 500, 700, 850, 1050, 1999。



(圖 17) 不同濃度、相同時間下的亞甲基藍衝破實驗管內空圖；由左至右之波段的取點時間(sec.)皆為：1, 30, 80, 150, 300, 500, 700, 850, 1000, 1350, 1999。 (a)濃度 7.5 μ M。 (b)濃度 10 μ M。 (c)濃度 12.5 μ M。可觀察到隨著濃度提高，載滿的速度也較快；濃度較低，則載滿的速度較慢。



(圖 18) 不同濃度、相同莫耳數載入量的亞甲基藍衝破實驗管內空圖；由左至右各波段所代表的亞甲基藍莫耳數載入量(nmole)皆為：2, 50, 133, 250, 500, 833, 1167, 1417, 1667, 2250, 3332。(a)濃度 $7.5\mu\text{M}$ ，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 40, 107, 200, 400, 667, 933, 1133, 1333, 1800, 2665。(b)濃度 $10\mu\text{M}$ ，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 80, 150, 300, 500, 700, 850, 1000, 1350, 1999。(c)濃度 $12.5\mu\text{M}$ ，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 24, 64, 120, 240, 400, 560, 680, 800, 1080, 1600。從圖中可看出，在相同莫耳數載入量下，濃度越高者，其單位莫耳數載入速度較慢；濃度較低者，單位莫耳數載入速度較快。更詳細的實驗結果將在 4.4 節中有更清楚的描述。

4.2.3 以郵包模型模擬亞甲基藍衝破實驗之理論空圖

在 2.5 節曾提到，樣品於單一特定時間空間單位 $P(n, \tau)$ 中的 k 值如公式(9)：

$$k_{(n, \tau)} = \frac{m_{s(n, \tau)}}{m_{m(n, \tau)} \cdot r} \quad (9)$$

此 $k_{(n, \tau)}$ 代表分析物於 $P(n, \tau)$ 的實際吸附係數，而 r 代表 $P(n, \tau)$ 的吸附劑的有效容量；若整支管柱的容量為 R ，則每單一 parcel 中，其 resin 的容量以 R_0 表示，也就是 $R = nR_0$ 。

若要將這些數據代入 excel 來模擬，則必須將吸附於吸附劑上的分析物質量，也就是 $m_s(n, \tau)$ ，設為 x ；而殘留於溶劑中的分析物質量，也就是 $m_m(n, \tau)$ ，則設為 a ；並將進入 $P(n, \tau)$ 的所有質量設為 A_0 。這樣一來，公式(9)即可以下式表示：

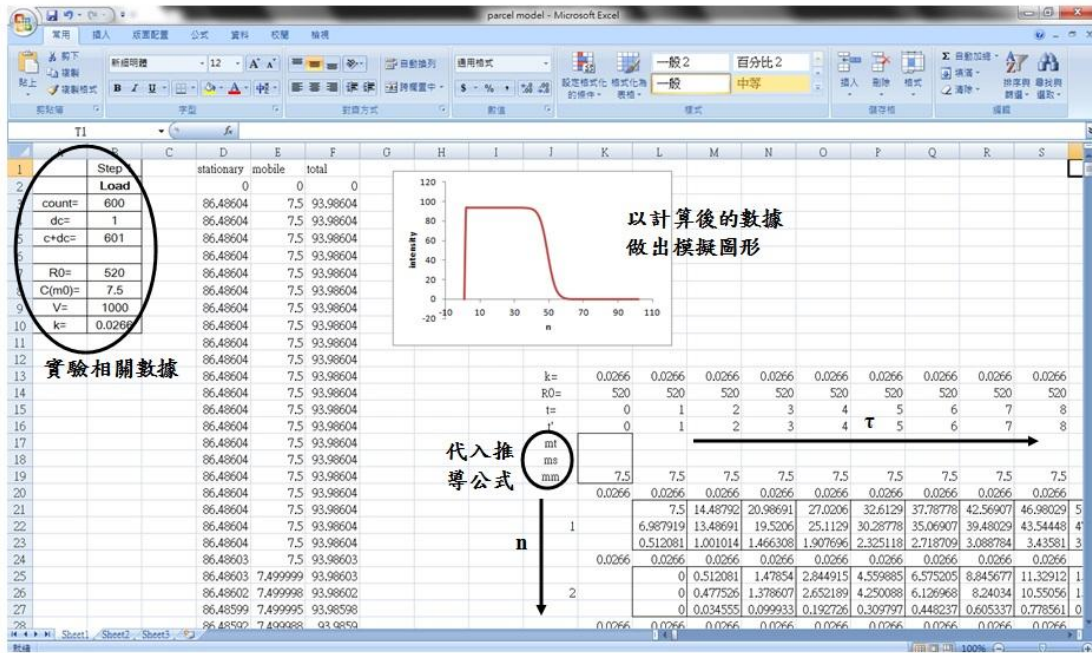
$$k_{(n, \tau)} = \frac{x}{(A_0 - x)(R_0 - x)} \quad (20)$$

由上列公式，可得：

$$x = \frac{A_0 + R_0 + \frac{1}{k} - \sqrt{\left(A_0 + R_0 + \frac{1}{k}\right)^2 - 4A_0R_0}}{2} \quad (21)$$

$$a = A_0 - x \quad (22)$$

接著可將這些公式置入 excel 中，來模擬分析物在特定條件下，於動靜兩相間的分佈(圖 19)。



(圖 19) excel parcel model

在將實驗所得的數據(k 值及 R_0 值)代入此 excel parcel model 前，必須先設定好 n 值，也就是「將管柱分成 n 段」，n 值所代表的意義和古典層析理論中的理論板數(theoretical plate number)概念相近；n 值越大，即板數(plate number, N)越大，板高(plate height, H)越低，管柱效能越好；n 值越小，則板數越小，板高越高，管柱效能較差。

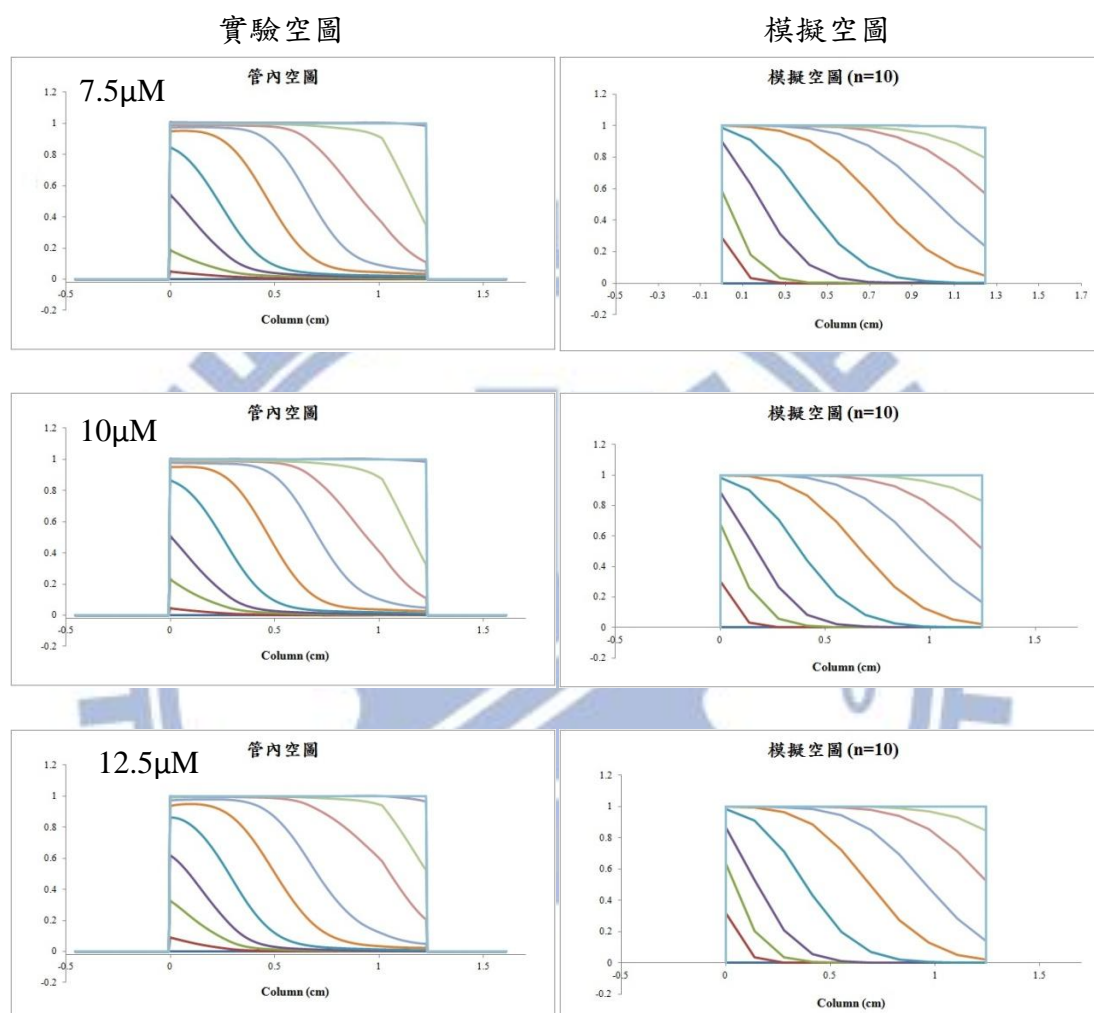
首先將 n 值設為 10，並將 4.2.1 節所計算出的 k 值(0.0266)，代入由 2.5 節所導出的公式(16)：

$$R_0 = \frac{(\tau_h - \tau_v)(m_0 k + 1)}{nk} \quad (16)$$

可得到 R_0 值為 520.34。將此 k 值及 R_0 值代入郵包模型中，即可得到各濃度的亞甲基藍水溶液於某時間點的管內的理論空圖(圖 20)。

在與實驗圖比較(圖 20)後，可發現雖然細節(高度與相對位置)

略有不同，但整體趨勢是相同的，可見郵包模型的確能用以模擬吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布。

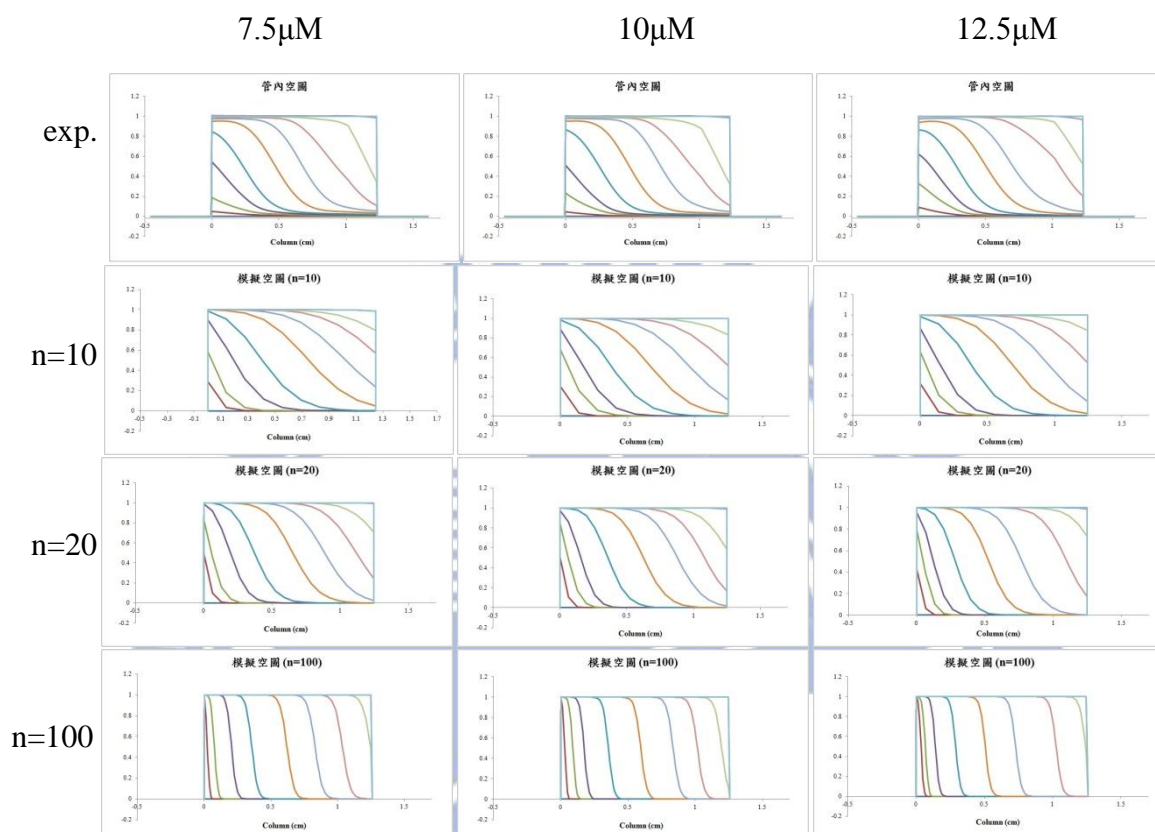


(圖 20) 實驗所得的管內空圖與經由 parcel model ($n=10$) 模擬出的理論空圖相比較。可發現雖然細節(高度與相對位置)略有不同，但整體趨勢是相同的。

為了瞭解 n 值設定對管內空圖模擬是否會造成影響，因此於圖 23 中，將 $n=10$ 、 $n=20$ 及 $n=100$ 所模擬出的空圖與實驗空圖互相比較。

當 $n=20$ 時， R_0 值縮減為 260.17；當 $n=100$ 時， R_0 值縮減為

52.03。將這些 R_0 值與 k 值(0.0266)代入郵包模型中，即可得到模擬空圖(圖 21)。



(圖 21) 實驗所得的管內空圖與經由各 n 值的 parcel model 所模擬出的理論空圖相比較。可清楚發現在模擬空圖中，隨著 n 值越大， R_0 值越小，和實驗空圖的誤差越大。此實驗空圖與模擬空圖的巨大差異來主要來自於手動填充的玻璃管柱內部十分不緊密，使得實驗所用的管柱為底板數(lower plate number)的管柱，因此和 n 值較大的模擬空圖差異極大。

從圖中可以清楚觀察到，當 n 值越大，所模擬出的理論空圖越是偏離實驗空圖(圖 21)。最主要的原因在於實驗中所用的玻璃管柱乃是手動以乾式填充法填充(如 3.3.1 節所提及的)，因此玻璃管柱內部並沒有填充得十分緊密與均勻；理論上， n 值越大， R_0 值越小，代表分析物可在很短的時間內把前幾個 parcel 填滿，但實驗上由於管柱填

充並非很緊密，因此分析物在填滿前幾個 parcel 前就已經流至較後段的 parcel 並吸附於其上，造成實驗空圖與模擬空圖間的差異。

為了更清楚了解不同 n 值所模擬出的模擬空圖與實驗空圖間的誤差，我們必須計算模擬空圖與實驗空圖間的差異值。此處，利用 10 μ M 的實驗空圖與模擬空圖來進行誤差值計算，計算方法為取模擬空圖與實驗空圖中，取相同時間、相同位置的數據點，計算此兩數據點間的誤差值；再將數個誤差值平均後以得總誤差值。數據點的取法如表 1，取點時只取訊號完整的部分，不取訊號趨近於零的點，共取 64 點。

時間 空間 (cm)	時間 (sec.)	30	80	150	300	500	700	850	1000	1350
0.002		v	v	v	v	v	v	v	v	v
0.138		v	v	v	v	v	v	v	v	v
0.277			v	v	v	v	v	v	v	v
0.415				v	v	v	v	v	v	v
0.554				v	v	v	v	v	v	v
0.692					v	v	v	v	v	v
0.831					v	v	v	v	v	v
0.969						v	v	v	v	v
1.107						v	v	v	v	v
1.246									v	v

(表 1) 計算誤差所取用的時間與空間點

計算後， n 設定為 10 的模擬空圖與實驗空圖之誤差為 23.01%；當 n 設定為 20 時，模擬空圖和實驗空圖之誤差提高為 42.58%；當 n 提高為 100，則模擬空圖完全不符合實驗空圖；由此可見，若郵包模型中的 n 值設定越大，則模擬出的理論圖形會越偏離實驗結果。

總結來說，實驗空圖和較低 n 值所模擬出來的理論空圖較為相近，因為實驗中所使用的管柱為手動填充，內部並不緊密，可視為效能較差、板數較低之玻璃管柱；而郵包模型中之 n 值概念和理論板數概念相近，故 n 值越小，越符合理論板數較低的實驗管柱。反之，若使用較大的 n 值來模擬管內空圖，則因為此 n 值和實際使用的管柱之理論板數不相當，而造成實驗空圖和模擬空圖上的巨大差異。

除了管柱填充不緊密造成板數降低，因而使實驗空圖與模擬空圖有所差異外，或許高流速也是使兩者間差異極大的原因之一。試想，在高流速的情況下，溶液中的樣品在打入管柱時，會具有一「衝力」，當流速越快，衝力越強，可能使得樣品隨著此衝力而更快移動至較後端的 parcel 而吸附於其上，造成實驗空圖和模擬空圖的差異。此「流速對實驗空圖的影響」將於 4.5 節有更詳細的實驗結果與討論。

4.3 甲基橙衝破實驗

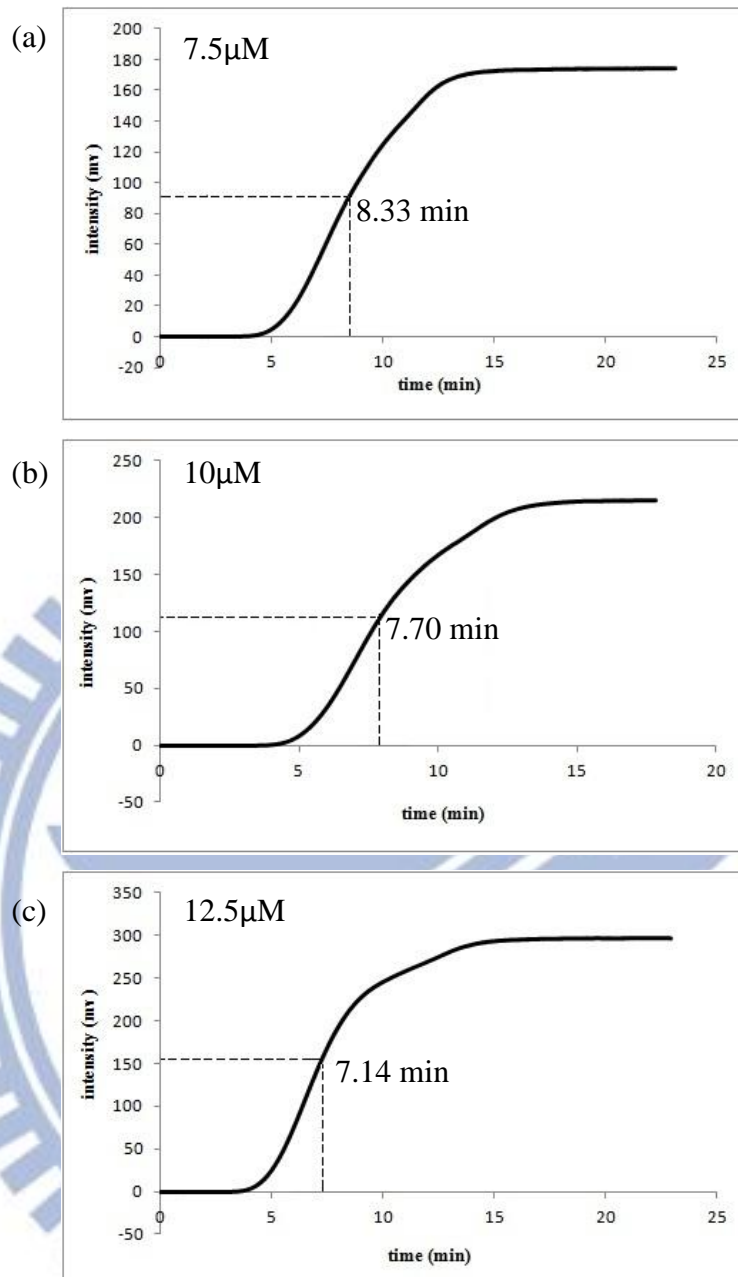
為了瞭解不同 k 值在吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布的差異，本實驗選用甲基橙進行衝破實驗，並將結果與 4.2 節中的亞甲基藍衝破實驗數據做比較。

4.3.1 甲基橙衝破實驗管外時圖

如同 4.2.1 節所述，在此節中也分別配置了 7.5 μ M、10 μ M 和 12.5 μ M 之甲基橙水溶液，並以 10mL/min 之流速不斷將甲基橙水溶液載入填有 sep-pak[®] C₁₈ 的玻璃管柱中。

實驗所得之管外時圖如圖 22。計算後得知：7.5 μ M 甲基橙水溶液之半衝破時間為 8.33min，10 μ M 甲基橙水溶液之半衝破時間為 7.70min，12.5 μ M 甲基橙水溶液之半衝破時間為 7.14min；將這些數據兩兩代入公式(19)中，即可求得甲基橙的 k 值，所得之 k 值分別為 4.34×10^{-3} 、 4.44×10^{-3} 與 4.57×10^{-3} ，平均為 $4.45 \times 10^{-3} \pm 1.20 \times 10^{-4}$ 。

根據 4.2.1 節的計算結果，亞甲基藍之 k 值為 0.0266，因此由本節所計算出的甲基橙 k 值(4.45×10^{-3})與亞甲基藍之 k 值差距約為 5.98 倍。k 值同時代表了吸附能力的強弱，由數據可明顯得知甲基橙對吸附劑的吸附能力較亞甲基藍對吸附劑的吸附能力差。

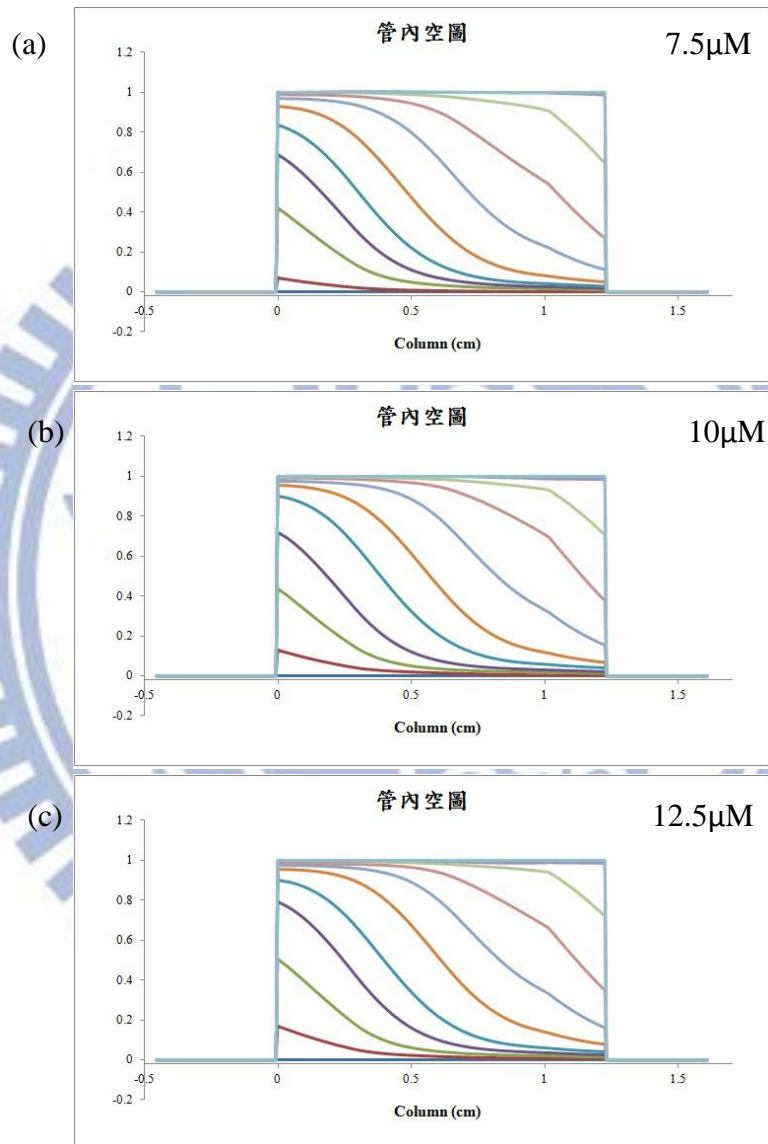


(圖 22) 甲基橙衝破實驗管外時圖之 k 值計算。(a)濃度 $7.5\mu\text{M}$ ，半衝破時間 8.33min 。(b)濃度 $10\mu\text{M}$ ，半衝破時間 7.70min 。(c)濃度 $12.5\mu\text{M}$ ，半衝破時間 7.14min 。(a)(b)兩圖計算所得之 k 值為 4.34×10^{-3} ；(b)(c) 兩圖計算所得之 k 值為 4.57×10^{-3} ；(a)(c) 兩圖計算所得之 k 值為 4.44×10^{-3} ；平均 k 值為 $4.45 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-4}$ ，誤差為 2.70%。

4.3.2 甲基橙衝破實驗管內空圖

在管內空圖的部分(圖 23)，我們可以清楚觀察到甲基橙水溶液於吸附型管柱內之載入模式；實驗發現，不論是 $7.5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 亦或

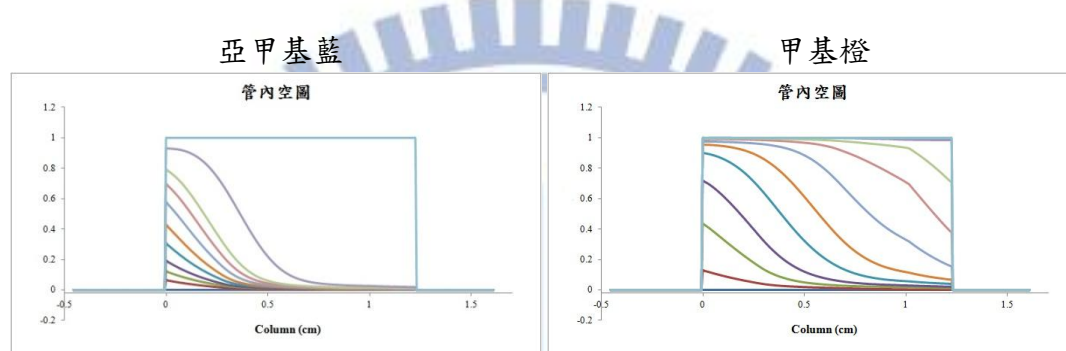
12.5 μ M 的亞甲基橙水溶液，其管內載入趨勢皆和 4.2.2 節中，亞甲基藍水溶液的管內載入趨勢相同：在甲基橙載滿第一段前，甲基橙已開始載入後幾段。



(圖 23) 甲基橙衝破實驗管內空圖。(a)濃度 7.5 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 50, 70, 90, 120, 160, 200, 250, 380, 1204。(b)濃度 10 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 35, 50, 70, 100, 130, 170, 210, 250, 400, 1037。(c)濃度 12.5 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 35, 50, 70, 90, 120, 150, 180, 220, 320, 1188。

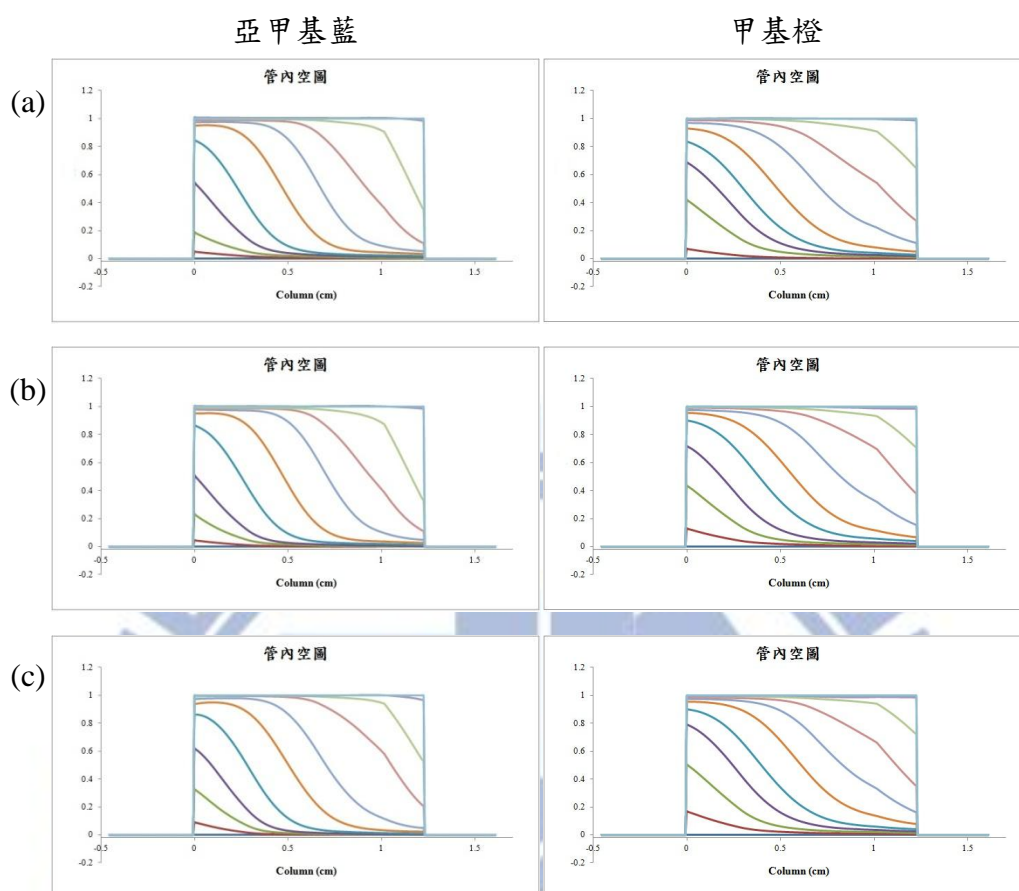
4.3.3 與亞甲基藍衝破實驗之管內空圖相比較

若將相同時間點，亞甲基藍衝破實驗與甲基橙衝破實驗所測得之管內空圖互相比較(圖 24)，則可發現當亞甲基藍已載滿整支管柱時，甲基橙卻只載滿約六分之一至五分之一的管柱，大略符合 k 值的 6 倍之差。



(圖 24) 相同流速、相同時間點下的 10 μ M 亞甲基藍與 10 μ M 甲基橙衝破實驗管內空圖，由左至右之波段取點時間(sec.)為：1, 35, 50, 70, 100, 130, 170, 210, 250, 400, 1037。圖中，當甲基橙已載滿整支管柱時，亞甲基藍卻只載滿約六分之一至五分之一的管柱。

為了清楚觀察甲基橙衝破實驗之管內空圖與亞甲基藍衝破實驗之管內空圖的差異，因此在圖 25 中，所取的時間點並不相同。從圖 25 中，可發現到甲基橙的波形，其波形較為平緩。這是因為甲基橙的 k 值(4.45×10^{-3})較亞甲基藍的 k 值(0.0266)小，代表甲基橙對 sep-pak[®] C₁₈ 的吸附能力較弱，而使得部分甲基橙分子可被溶劑(D.I. water)帶到相對遠的 parcel 並吸附於其上；反之，k 值較大，對 sep-pak[®] C₁₈ 的吸附能力較強的亞甲基藍分子，則因為較容易被 C₁₈ 所吸附，因此無法被溶劑帶到較遠的 parcel，只能吸附於較近範圍內的 C₁₈ 上。



(圖 25) 甲基橙與亞甲基藍衝破實驗之管內空圖，流速皆為 10mL/min。
 a) 濃度 7.5 μ M，亞甲基藍管內空圖由左至右之波段的取點時間(sec.) 為：1, 30, 80, 200, 350, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 1999。甲基橙管內空圖由左至右之波段取點時間(sec.) 為：1, 30, 50, 70, 90, 120, 160, 200, 250, 380, 1204。
 b) 濃度 10 μ M，亞甲基藍管內空圖由左至右之波段的取點時間(sec.) 為：1, 30, 80, 150, 300, 500, 700, 850, 1000, 1350, 1999。甲基橙管內空圖由左至右之波段取點時間(sec.) 為：1, 35, 50, 70, 100, 130, 170, 210, 250, 400, 1037。
 c) 濃度 12.5 μ M，亞甲基藍管內空圖由左至右之波段的取點時間(sec.) 為：1, 30, 50, 100, 200, 350, 500, 700, 850, 1050, 1999。甲基橙管內空圖由左至右之波段取點時間(sec.) 為：1, 35, 50, 70, 90, 120, 150, 180, 220, 320, 1188。

4.4 濃度變因衝破實驗

4.4.1 濃度變因衝破實驗管內空圖

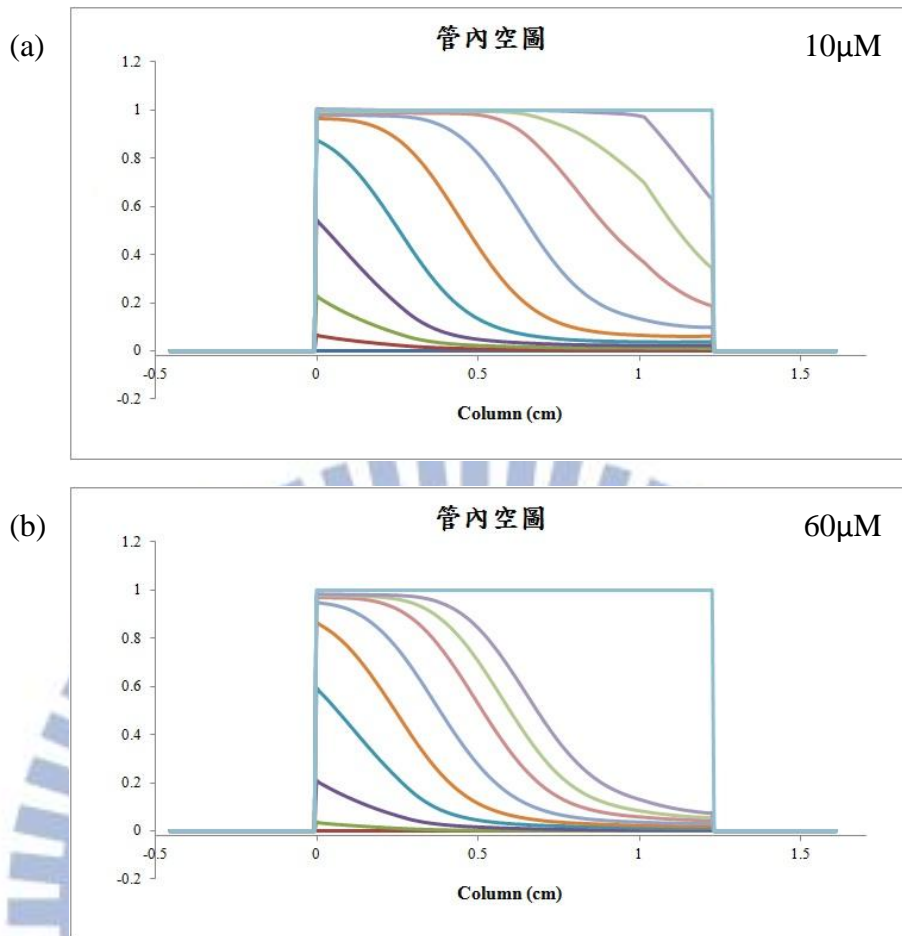
在 4.2.2 節中曾經提到，不同濃度的亞甲基藍水溶液，在達到相

同莫耳數載入量時，較高濃度的亞甲基藍水溶液其載入速度較低濃度的亞甲基藍水溶液慢(圖 18)。

由於圖 18 中，亞甲基藍水溶液的濃度分別為 $7.5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 與 $12.5\mu\text{M}$ ，濃度差異太過接近，使得管內空圖雖略有差異，但變化不大，不易觀察。而在 4.3 節的 k 值變因衝破實驗(甲基橙衝破實驗)中，由於甲基橙之 k 值與亞甲基藍之 k 值差距達到近 6 倍，使得兩者的管內空圖差異十分顯著。

因此，此處選擇 $10\mu\text{M}$ 與 $60\mu\text{M}$ 的亞甲基藍水溶液進行濃度變因實驗，希望在濃度差距高達 6 倍的情況下，能使不同濃度但相同載入量的管內空圖出現應有的顯著差異。並將不同濃度造成的管內空圖差異與不同 k 值造成的管內空圖差異互相比較，以得知 k 值和濃度對管內空圖各會造成何種影響。

從圖 26 可明顯觀察到在不同濃度、相同載入量的管內空圖中，高濃度($60\mu\text{M}$)的亞甲基藍水溶液其載入速度較低濃度($10\mu\text{M}$)的亞甲基藍水溶液慢：在相同的 3000nmole 載入量時(圖 26 中的紫色線)， $10\mu\text{M}$ 的亞甲基藍已經幾乎要載滿整支玻璃管柱，然而此時 $60\mu\text{M}$ 的亞甲基藍卻只載滿約二分之一的玻璃管柱。



(圖 26) 不同濃度、相同莫耳數載入量的亞甲基藍衝破實驗管內空圖；由左至右各波段所代表的亞甲基藍載入莫耳數(nmole)皆為：2, 67, 167, 417, 833, 1333, 1833, 2333, 2667, 3000。(a)濃度 10 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 40, 100, 250, 500, 800, 1100, 1400, 1600, 1800。(b)濃度 60 μ M，由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 7, 17, 42, 83, 133, 183, 233, 267, 300。從圖中可看出，在相同莫耳數載入量下，濃度越高者，其載入速度較慢；濃度較低者，載入速度較快。

在 2.4 節及 2.5 節中曾提及有效管柱容量(effective column capacity, ECC)之定義及推導過程，此值可藉由公式(13)計算：

$$ECC = \frac{m_0 k}{m_0 k + 1} nR_0 \quad (13)$$

式中，經由 4.2.1 節與 4.2.3 節之計算，已知 k 值為 0.0266， nR_0 值為 5203.4。因此，從公式(13)可計算出在亞甲基藍水溶液濃度為 10 μ M

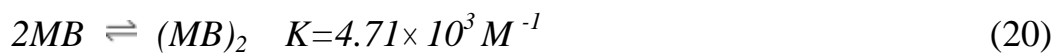
時，有效管柱容量為 1093.29；當亞甲基藍水溶液濃度為 60 μ M 時，有效管柱容量則提高為 3199.01，與 10 μ M 時有將近三倍的差距。此有效管柱容量之差距就是造成相同莫耳數下，高濃度樣品載入較慢的主因。

除此之外，此現象也可能是因為本實驗所選用的亞甲基藍，在較高濃度時會形成二聚體(dimer)，甚至在濃度更高的情況下會形成更複雜的聚合體(high-order aggregate) [77][78]，其可能形成的聚合體如表 2 所示：

聚合體種類	吸收峰(cm^{-1})	消光係數 ($\text{dm}^3/\text{mole}\cdot\text{cm}$)
MB^+	15060	95000
MBH_2^+	13495	76000
$(\text{MB}^+)_2$	16529	132000
$(\text{MB}^+)_3$	17241	110000

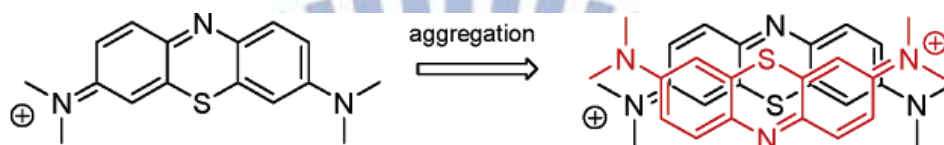
(表 2) 亞甲基藍於水溶液中可形成的聚合體列表

亞甲基藍二聚體之平衡反應如圖 27 所示，亞甲基藍間藉由 π - π stacking 而形成類似三明治的型態(sandwich form)，其平衡反應方程式如公式(20)，聚合常數(dimerization constant)為 $4.71 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 。

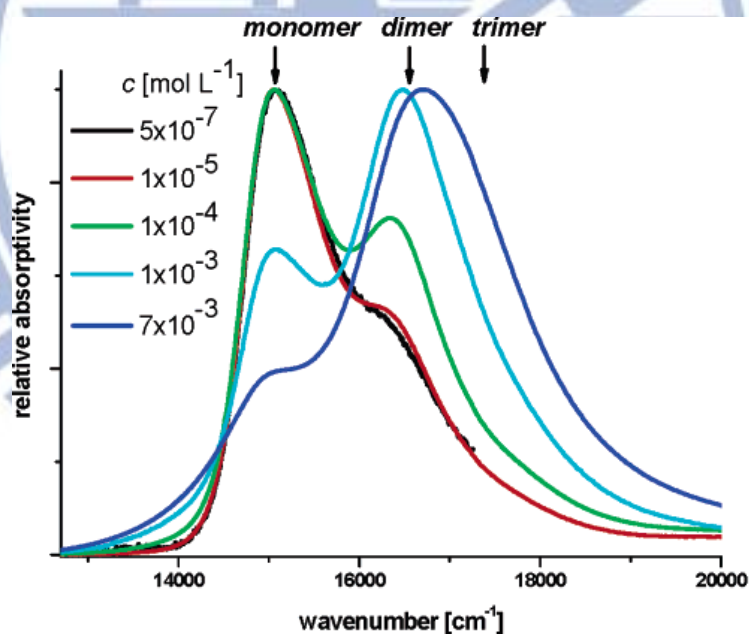


經由 K 值計算得知，當亞甲基藍濃度為 10 μ M 時，則其中亞甲基藍單體之比例為 99.58%；若亞甲基藍濃度為 60 μ M，則亞甲基藍單

體之比例為 97.57%。從圖 28 中也可觀察到，當濃度為 10 μ M(紅色線)時，於代表二聚體吸收峰的 16529 cm^{-1} 處之訊號已有些微上升，當濃度提高到 100 μ M(綠色線)時，16529 cm^{-1} 處之訊號將有顯著提升；由此可見本實驗中使用的 60 μ M 亞甲基藍所含之二聚體之量可能已足夠影響實驗結果。



(圖 27) 亞甲基藍二聚體之聚合反應



(圖 28) 亞甲基藍聚合體之光譜圖^[77]

二聚體及聚合體的形成將使原本可分別吸附於不同 C_{18} 吸附劑上的亞甲基藍分子，因為亞甲基藍互相聚合而同時吸附於同一個 C_{18} 的 active site 上，造成載入速度變慢。

因亞甲基藍聚合體在溶液中至多只占約 2% 之比例，故影響此單位莫耳數載入量下，高濃度載入速度較慢的原因，主要還是因為有效管柱容量增加所致。

然而，從實驗結果得知，在同莫耳數下，雖然高濃度會因有效管柱容量增加及聚合體的形成而造成載入速度較慢，但在相同時間下，高濃度的樣品還是會比低濃度的樣品更快衝破。

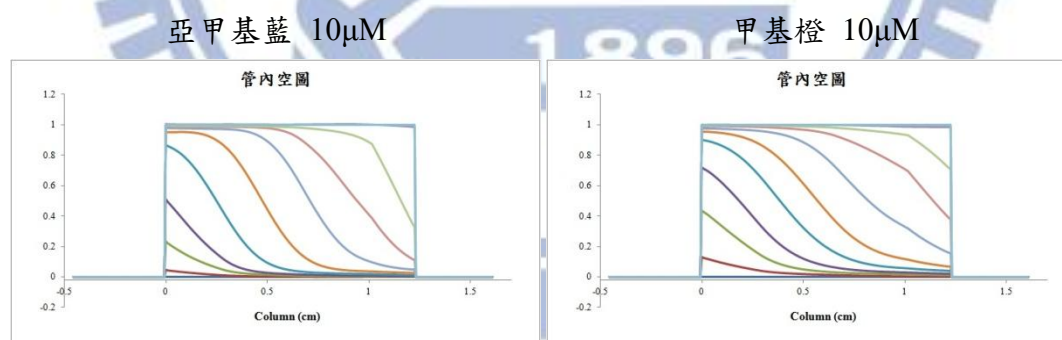
4.4.2 濃度變因與 k 值變因之管內空圖差異比較

若將濃度變因所造成的管內空圖差異與因 k 值不同而造成的管內空圖差異互相比較(圖 29、圖 30 與圖 31)，可發現濃度所造成的管內空圖改變僅限於「載入速度」，而不會影響其吸附強度，即濃度增高並不會造成波形的改變。反之，k 值改變則因為不同樣品對吸附劑的吸附能力不同，因此吸附強度的差異會表現在波形的平緩程度上。

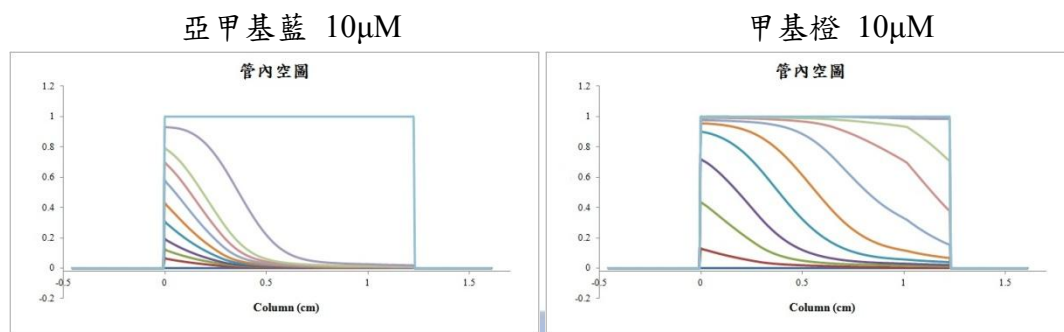
如圖 29，由於亞甲基藍之 k 值較甲基橙之 k 值大，代表亞甲基藍對 C_{18} 之吸附能力較強，因此亞甲基藍分子較不容易被溶劑帶至較後段的 parcel，使得波形較陡；反之，甲基橙由於 k 值較小，對 C_{18} 的吸附能力較弱，因此甲基橙分子容易被溶劑帶往較後段的 parcel 並吸附於其上，造成管內空圖之波形較為平緩。也由於亞甲基藍與甲基橙對 C_{18} 的吸附能力不同，因此也會造成「載入速度」的不同(圖 30)。

上述由 k 值改變所造成的管內空圖差異，主要來自於不同分析物對 C₁₈ 的「吸附能力」的不同；而因為濃度改變所造成的管內空圖差異則只僅限於「載入速度」。從圖 31 中可發現，雖然濃度提高造成有效管柱容量的增加，而導致載入速度變慢，但此因素並不會影響管內空圖之波形。這是因為濃度提高並不會影響亞甲基藍之吸附能力，故不會影響管內空圖之波形。

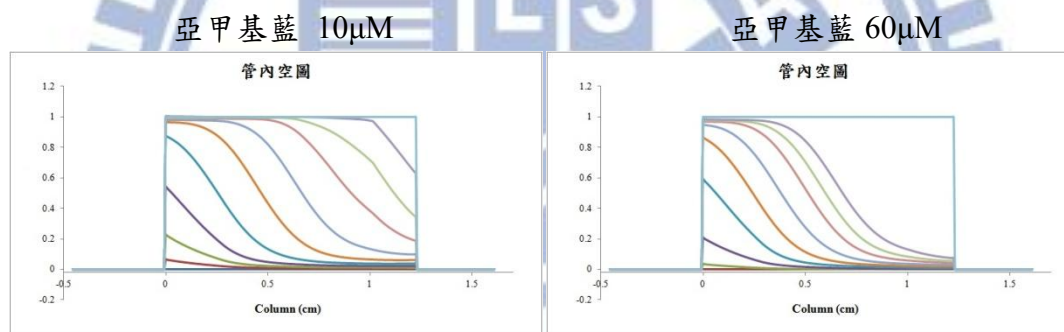
總結來說，由 k 值差異所造成的管內空圖差異包含了「載入速度改變」與「波形改變」，此兩種空圖的改變皆是源於不同分析物對 C₁₈ 的吸附能力不同；而由濃度差異所造成的管內空圖差異則僅限於「載入速度改變」，也就是濃度差異並不會造成波形的改變。



(圖 29) 亞甲基藍與甲基橙的衝破實驗管內空圖，流速皆為 10mL/min。亞甲基藍管內空圖由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 80, 150, 300, 500, 700, 850, 1000, 1350, 1999。甲基橙管內空圖由左至右之波段取點時間(sec.)為：1, 35, 50, 70, 100, 130, 170, 210, 250, 400。可發現甲基橙之空圖其波形較為平緩，此差異主要來自於不同分析物對 C₁₈ 吸附劑的吸附能力不同



(圖 30) 亞甲基藍與甲基橙於相同時間點下的之衝破實驗管內空圖。由左至右之波段取點時間(sec.)皆為：1, 35, 50, 70, 100, 130, 170, 210, 250, 400, 1037。圖中，當甲基橙已載滿整支管柱時，亞甲基藍卻只載滿約六分之一至五分之一的管柱。



(圖 31) 亞甲基藍於相同流速(10mL/min)、相同載入量下的管內空圖。波段由左至右其載入量(nmole)皆為 2, 67, 167, 417, 833, 1333, 1833, 2333, 2667, 3000。可看出，在相同莫耳數載入量下，濃度越高者，其載入速度較慢；濃度較低者，載入速度較快。此差異主要來自於高濃度時，有效管柱容量的增加。

4.5 流速變因衝破實驗

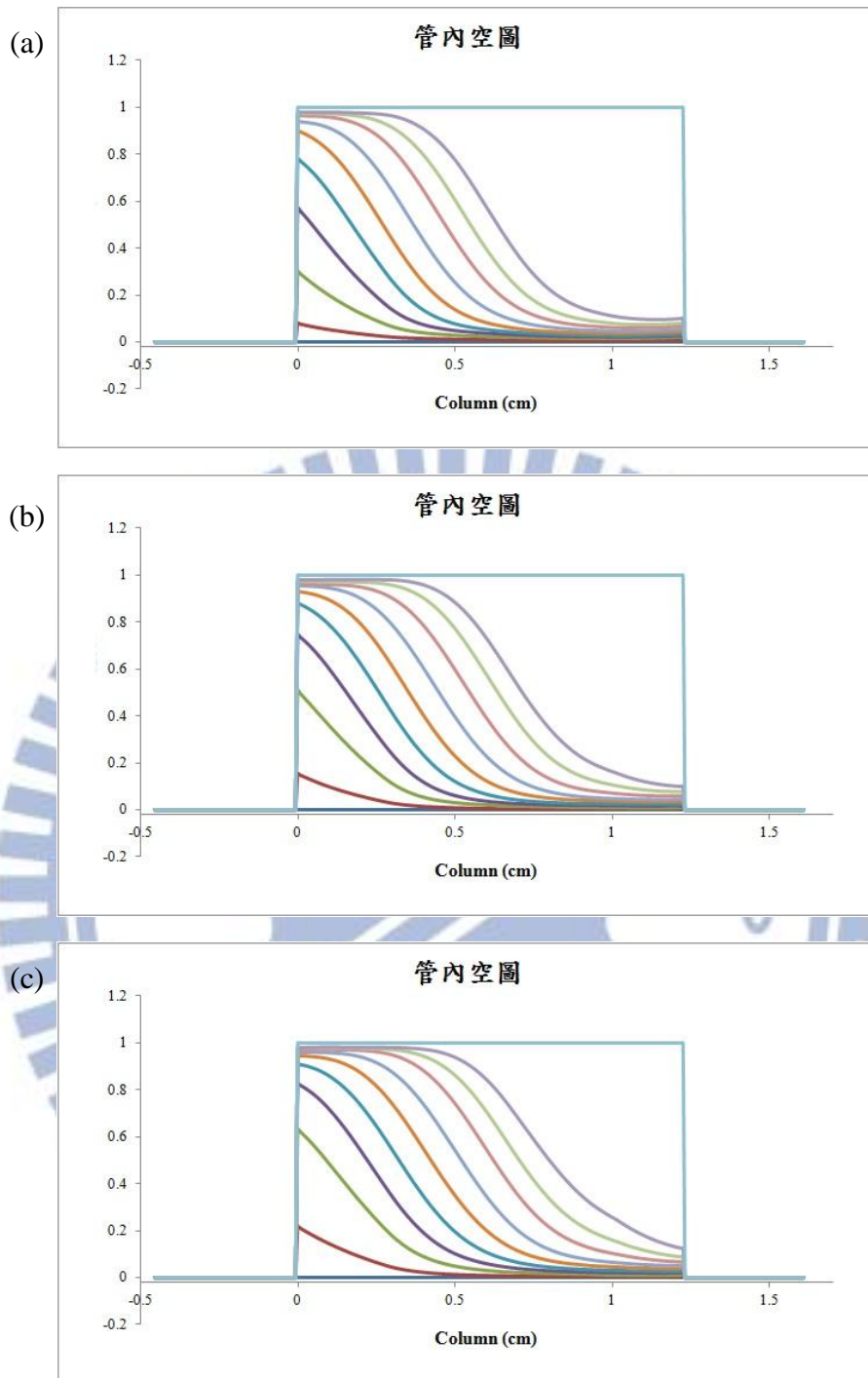
在 4.2.3 節曾提及，實驗空圖與模擬空圖間的差異來源，除了管柱填充不緊密造成吸附型管柱的板數下降外，或許高流速也是使實驗空圖和模擬空圖差異極大的原因之一。

試想在高流速的情況下，溶液中的樣品在打入管柱時，會具有一「衝力」，當流速越快，衝力便越強，可能使得樣品隨著此衝力而更快移動至較後端的 parcel 而吸附於其上，造成實驗空圖和模擬空圖的差異。

因此，本節將進行流速變因實驗，以觀察樣品溶液在不同流速下，管內空圖是否如預期般改變。

礙於玻璃管柱耐壓問題(玻璃管柱最高耐壓為 900psi)，本實驗選用 5mL/min、10mL/min 與 15mL/min 進行實驗(流速 15mL/min 時，管內壓力已約 820psi，故無法進行更高流速的實驗)，實驗結果如圖 32 所示。

圖 32 為不同流速，但相同體積載入量的管內空圖；從圖中可觀察到不同流速下對管內空圖所造成的變化：當流速越快時，單位體積的載入速度也更快，這可能是因為當流速提高時，溶液中的樣品可能具有較高的「衝力」，而使樣品有能力抵達並吸附於較遠的吸附劑上；反之，若流速較慢，則因樣品流動緩慢而有更充足的時間與吸附劑作用，因此樣品只要被帶到尚有自由容量吸附劑(free-capacity adsorbent)的位置，樣品就會吸附於其上。



(圖 32) 亞甲基藍於不同流速但相同體積載入量下的管內空圖。波段由左至右其載入量(mL)皆為 10, 40, 70, 100, 130, 160, 190, 210, 240, 270。(a)流速 5mL/min。(b)流速 10mL/min。(c)流速 15mL/min。由實驗結果可證明流速改變並不會造成管內空圖的差異。

本流速變因實驗所選用的流速差異為 5mL/min，此差距對管內空圖已造成可見的變化，因此，若流速差異更大，此現象將更明顯而

更顯著的影響樣品於吸附型管柱內的吸附情形。

而由此實驗，也可證明在 4.2.3 節所提及的實驗空圖與模擬空圖間的差異來源，除了因為管柱填充不緊密而造成吸附型管柱的板數較小，流速較高造成樣品無充裕時間與吸附劑作用也是原因之一。

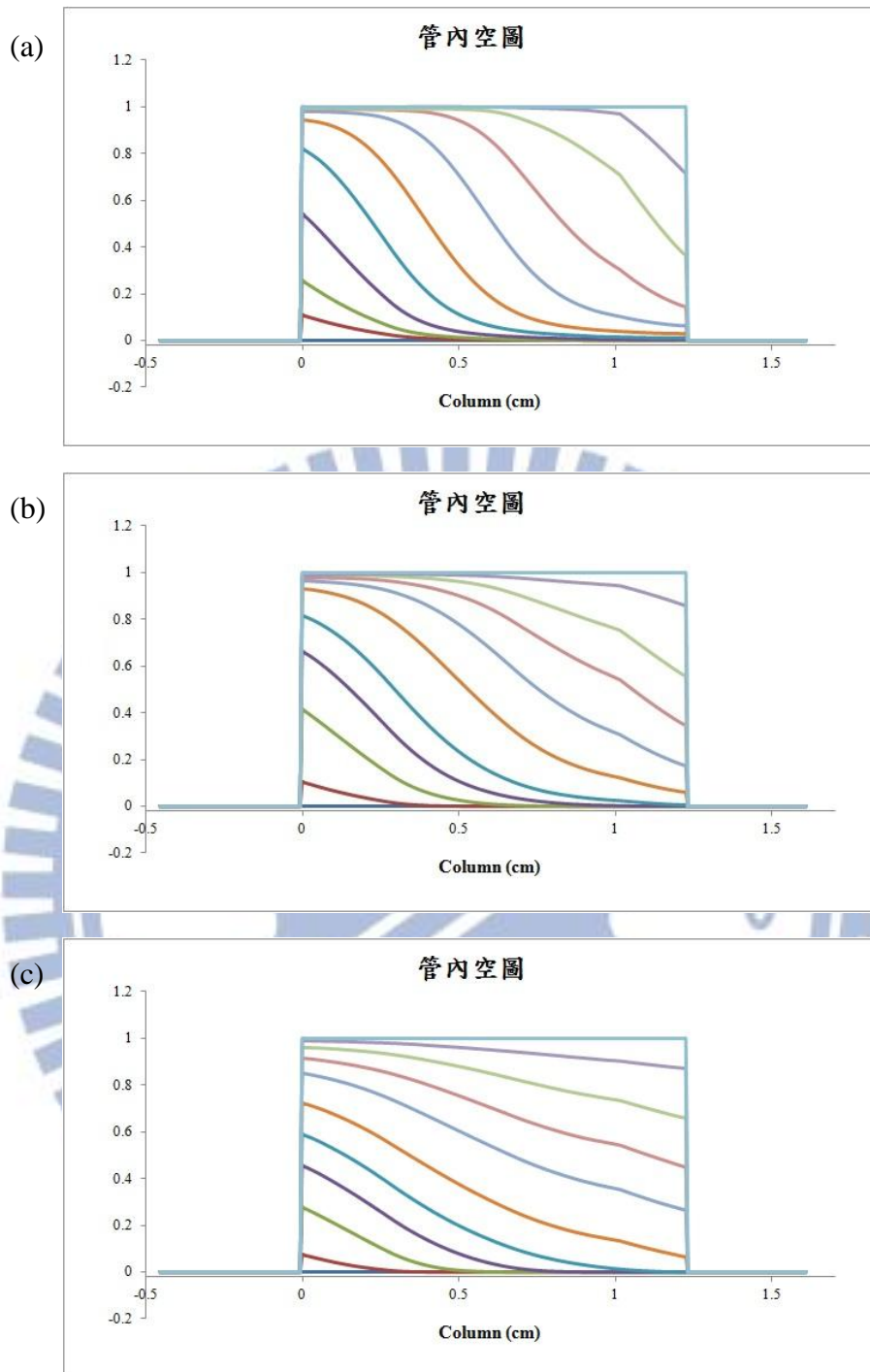
4.6 溶劑變因衝破實驗

從 4.5 節得知流速並不會影響管內空圖，那麼負責攜帶樣品的溶劑成分又是否會改變管內空圖呢？為了瞭解溶劑對樣品於吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布的影響，故本節進行溶劑變因實驗，逐次改變乙醇於樣品溶劑中的比例，以觀察溶劑對樣品於管內空圖分布的影響。

圖 33 中，可發現隨著溶劑中的乙醇比例增加，每波段的波形越平緩；也就是說，當溶劑中的乙醇比例增加，溶液裡的亞甲基藍分子將會更容易被帶到較遠的 parcel 並吸附於其上。

這是因為低極性的亞甲基藍較易溶於極性低的乙醇中，當溶劑為 100% 的去離子水時，亞甲基藍偏向吸附於非極性的 C_{18} 上，因此亞甲基藍每一次移動到有自由容量的 C_{18} 吸附劑時，便會花費較長的時間吸附於其上，造成移動速度緩慢。

相對於水，乙醇則因極性較小而使得亞甲基藍較易溶於其中，使得亞甲基藍吸附於 C_{18} 上的時間較短，造成移動速度較快。



(圖 33) 亞甲基藍於不同溶劑下的的管內空圖。(a)溶劑含 10% 乙醇，空圖中由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 30, 80, 200, 350, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 1999。(b)溶劑含 30% 乙醇，空圖中由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 34, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 110, 300。(c)溶劑含 50% 乙醇，空圖中由左至右之波段的取點時間(sec.)為：1, 33, 35, 37, 39, 42, 47, 55, 65, 77, 98。可看出隨著乙醇比例增加，亞甲基藍之移動速度變快，且波形明顯趨緩。

總結來說，當溶劑中的乙醇比例增加時，由於亞甲基藍較溶於乙醇，因此相較於亞甲基藍 100% 水溶液，含有乙醇的亞甲基藍水溶液其樣品吸附於 C_{18} 的時間縮短，造成如圖 33 的差異，即不但亞甲基藍移動較快，且波形較為平緩。



第五章 結論

吸附層析法通常用於預濃縮樣品與製備型分離樣品，然而，一般研究所注重的卻僅限於管外濃縮與分離的結果，至於管內樣品的吸附機制與濃度分布則無深入研究。因此本研究以全管柱偵測系統配合衝破實驗來觀察吸附型管柱內的樣品吸附機制與濃度分佈，並和 Pai 所提出的郵包模型理論互相比較。

在亞甲基藍水溶液之衝破實驗研究中發現，亞甲基藍如同肉眼所見的由管柱前端緩慢地往管柱後端載入；但若把管柱全長分為 n 段，隨著低濃度亞甲基藍水溶液持續注入管柱，樣品雖是如肉眼所見的由第一段開始載入至第 n 段，但在載入時並不會先載滿第一段後才開始載入第二段。

若將此衝破實驗所得的 k 值與 R_0 值代入郵包模型中，則由郵包模型中所計算出的理論圖形會和實驗圖形之誤差和 n 值有關。研究發現，實驗空圖和較低 n 值所模擬出來的理論空圖較為相近，因為實驗中所使用的管柱為手動填充，內部並不緊密，可視為效能較差、板數較低之玻璃管柱；而郵包模型中之 n 值概念和理論板數概念相近，故 n 值越小，越符合理論板數較低的實驗管柱。當所 n 值設定為 10 時，經由郵包模型所模擬出的理論圖形會與實驗圖形有約 23.01% 誤差，當 n 值為 20 時，則理論圖形與實驗圖形將有 42.58% 之誤差，若 n 值提高

到 100，理論圖形與實驗圖形甚至完全不相符；由此可見，若郵包模型中的 n 值越大，則模擬出的理論圖形會越偏離實驗結果。

本研究也釐清了各項實驗條件對樣品於吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布的影響。首先，研究發現，當樣品的動態吸附平衡常數較小時，吸附能力較差，造成管內空圖的波形較為平緩，這是因為樣品吸附於 C_{18} 吸附劑的相對時間較短，因此其在管內的移動速度便會較快。

若改變樣品的濃度，則樣品濃度越高，會因有效管柱容量增加及聚合體的形成使得單位樣品的載入速度較慢，但卻不會影響管內空圖的波形，因為此兩因素皆不影響樣品本身吸附能力的強度。

而流速快慢也會影響樣品於吸附型管柱內的吸附情形，較快的流速將使樣品較快抵達後方的吸附劑並吸附於其上，使得單位體積樣品載入速度較快；因此，流速太快也是造成理論空圖和實驗空圖之誤差的來源。

改變樣品溶劑比例成分則會明顯地影響樣品於吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布。這是因為低極性的亞甲基藍較易溶於極性低的乙醇中，當溶劑為 100% 的去離子水時，亞甲基藍偏向吸附於非極性的 C_{18} 上，並花費較長的時間吸附於其上，造成移動速度緩慢。相對於水，乙醇則因極性較小而使得亞甲基藍較易溶於其中，使得亞甲基

藍吸附於 C_{18} 上的時間較短，造成移動速度較快。因此，改變溶劑成分比例將影響樣品的吸附能力，進而改變波形的平緩程度。

本研究利用全管柱偵測系統，全面性地觀察樣品於吸附型管柱內的吸附機制與濃度分布，彌補一般層析系統所使用的單通道偵測器之缺點，從而得知許多以往不為人知的吸附現象。

藉由全管柱偵測系統，未來將可繼續進行「混合物樣品於吸附型管柱內的吸附與分離情形」，從而了解混合物樣品於吸附型管柱內的競爭情形與分離機制，對吸附層析法有更深入的認識。



參考文獻

- [1] S.C. Pai, "Evaluation of the temporal effect to the peak tailing in flow injection analysis", J. Chromatogr. A 950 (2002) 271.
- [2] 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.
- [3] L.S. Ettre, "High-Performance Liquid Chromatography", New York: Academic Press 1 (1980).
- [4] Pai, S.C., Chern, C.S., Chiao, L.Y., "Further clarifications on the parcel model", J. Chromatogr. A, (2003) 1018, 125-127.
- [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95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95年.
- [7] S.H. Lin, K.C. Chang, Y.C. Chen, T. Yu, S.C. Pai, "Examination of the temporal effect in a flow injection analysis system using multi-channel absorbance detection", J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4618.
- [8] 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96年.
- [9] 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.

- [10] M. Tswett, "On a New Category of Adsorption Phenomena and their Application to Biochemical Analysis", *Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec.* 14 (1903) 6.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] J.J. Kirkland, "High-speed liquid chromatography with controlled surface porosity supports", *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 7.
- [14] U.D. Neue, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2000, p. 11450.
- [15] 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.
- [16] U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [17] 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.

- [18] U.D. Neue, D. Diehl, P. Iraneta, Pittcon Conference & Expo 2009, Chicago, IL, March 8-13, 2009.
- [19] F. Gritti, G. Guiochon, "Optimization of the thermal environment of columns packed with very fine particles", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1353.
- [20] F. Gritti, G. Guiochon, "Performance of new prototype packed columns for very high pressure liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1485.
- [21] J.J. Kirkland, "Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography", *Anal. Chem.* 41 (1969) 218.
- [22] 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.
- [23] F. Gritti, I. Leonardi, 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.
- [24] B.L. Karger, H. Barth, "Influence of Column Material on Efficiency in High Speed Liquid Chromatography", *Anal. Letters* 4 (1971) 595.

- [25] 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.
- [26] R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, J. Chromatogr. Library Series, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- [27] H.E. Schwartz, B.L. Karger, P. Kucera, "Gradient elution chromatography with microbore columns", *Anal. Chem.* 55 (1983)1752.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] K. Krause, M. Girod, B. Chankvetadze, G. Blaschke, "Enantio separations 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.
- [31] 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.

- [32] F. Gritti, G. Guiochon, "Kinetic investigation of the relationship between the efficiency of columns and their diameter", *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1592.
- [33] P.C. Carman, "Fluid Flow through Granular Beds", *Trans. Inst. Chem. Eng.* 15 (1937) 150.
- [34] J. Kozeny, "Über kapillare Leitung des Wassers im Boden: Sitzungsber", *Akad. Wiss. Wien* 136 (1927) 271.
- [35] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, "Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns", *Anal. Chem.* 69 (1997)983.
- [36] 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.
- [37] M. Frank, A. Gratzfeld-Huesgen, S. Schuette, *Am. Lab.* 38 (2006) 17.
- [38] 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.
- [39] M. Swartz, "Ultra performance liquid chromatography: Tomorrow's HPLC technology today", *LabPlus Int.* 18 (2004) 6.

- [40] F. Gritti, G. Guiochon, "Complete Temperature Profiles in Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Columns", *Anal. Chem.* 80 (2008) 5009.
- [41] F. Gritti, G. Guiochon, "Heat Exchanges in Fast, High-Performance Liquid Chromatography. A Complete Thermodynamic Study", *Anal. Chem.* 80 (2008) 6488.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] K.M. Usher, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, "Modeling chromatographic dispersion: A comparison of popular equations", *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 122.
- [45] 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.
- [46] V.G. Berezkin (Compiler), *Chromatographic Adsorption Analysis*L

Selected Eorks of Tswett, Ellis Horwood, New York, (1990); a:pp. 9-19; b:99.21-26; c:pp.27-34;d:pp.35-79

- [47] L. S. Ettre, R. L. Wixom, " Leory Sheldon Palmer (1887–1944) and the beginnings of chromatography in the United States of America", CHROMATOGRAPHIA, Volume 37, Numbers 11-12 (1993), 659.
- [48] Shampo MA, Kyle RA., " Richard Kuhn--Nobel Prize for work on carotenoids and vitamins", Mayo Clin Proc. (2000) 75, 990.
- [49] Pai, S.C., Whung, P.Y. Lai, R.L. "Pre-concentration efficiency of Chelex-100 resin for heavy metals in seawater, Part 1, Effects of pH and salts on the distribution ratios of heavy metals", Anal. Chim. Acta,(1988) 221, 257.
- [50] Pai, S.C. "Pre-concentration efficiency of Chelex-100 resin for heavy metals in seawater, Part 2. Distribution of heavy metals on a Chelex-100 column and optimization of the column efficiency by a plate simulation method", Anal. Chim. Acta,(1988) 221, 271.
- [51] Pai S. C., Fang, T.H., Chen, A.C.T., Jeng, K.L. "A low contamination Chelex-100 technique for shipboard pre-concentration of heavy metals in seawater", Mar. Chem., (1990) 29, 295.
- [52] Pai, S.C., Chung, S.W., Ho, T.Y., Tsau, Y.J. "Determination of Nano-molar levels of nitrite in natural water by spectrophotometry after pre-concentration using SEP-PAK C18 cartridge", Int. J. Environ. Anal. Chem., (1996) 62, 175.

- [53] 鍾仕偉, "濃縮管柱板塊模式之建立及對測定海水中微量物質之應用", 國立台灣大學海洋科學所博士論文, 民國94年.
- [54] C.E. Evans, V.L. McGuffin, "Dual on-column fluorescence detection scheme for characterization of chromatographic peaks", *Anal. Chem.* 60 (1988) 573.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] J. Wu, J. Pawliszyn, "Universal detection for capillary isoelectric focusing without mobilization using concentration gradient imaging system", *Anal. Chem.* 64 (1992) 224.
- [58] 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.
- [59] J. Wu, J. Pawliszyn, "Dual Detection for Capillary Isoelectric Focusing with Refractive Index Gradient and Absorption Imaging Detectors", *Anal. Chem.* 66 (1994) 867.
- [60] J. Wu, J. Pawliszyn, "Diode laser-based concentration gradient imaging detector for capillary isoelectric focusing", *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 337.

- [61] J. Wu, J. Pawliszyn, "Absorption Spectra, Multicapillary Imaging Detection for Capillary Isoelectric Focusing Using a CCD Camera", *Analyst* (Cambridge, UK) 120 (1995) 1567.
- [62] X.Z. Wu, J. Wu, J. Pawliszyn, "Fluorescence imaging detection for capillary isoelectric focusing", *Electrophoresis* 16 (1995) 1474.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] J. Johansson, D.T. Witte, M. Larsson, S. Nilsson, "Real-Time Fluorescence Imaging of Isotachophoretic Preconcentration for Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 68 (1996) 2766.
- [66] 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.
- [67] 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.

- [68] 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.
- [69] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, "Visualization of solute migration in liquid chromatography columns ", *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 1.
- [70] 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.
- [71] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, "On-Column Visualization of Sample Migration in Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 72 (2000) 323.
- [72] 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98年.
- [73] 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99年.
- [74] 周宜儒, "以全管柱偵測法探討液相層析之波峰壓縮效應" 國立交通大學, 應用化學研究所碩士論文, 民國100年.
- [75] X. Wu, Z. Huang, Y. Liu, M. Fang, "Investigation on the Photoelectrocatalytic Activity of Well-Aligned TiO₂ Nanotube Arrays" *International Journal of Photoenergy* 2012 (2012) 832516.
- [76] Z. Ye, Z. Feng, Z. Junxi, X. Lingli, "Converting Layered Zinc

Acetate Nanobelts to One-dimensional Structured ZnO
Nanoparticle Aggregates and their Photocatalytic Activity”
Nanoscale Research Letters, 3(2008) 6.

[77] D. Heger, J. Jirkovsky, P. Klán, “Aggregation of Methylene Blue
in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy”
J. Phys. Chem. (2005) 109, 6702.

[78] S. Jockusch, N. J. Turro, D. A. Tomalia, “Aggregation of
Methylene Blue Adsorbed on Starburst Dendrimers”
Macromolecules (1995) 28, 7416.

