

一、苯二氮平類鎮靜安眠藥

1.1 引言

面對高度工業化社會的來臨，一般人常會有失眠、焦慮、無望感等精神疾病發生，於是許多人試圖以酒精、藥物來尋求一時的解脫。以致藥物濫用已經成為現今社會嚴重問題之一，這個問題不但沒有因為社會的進步而得到解決，反而讓這些被濫用的藥物有更多管道得以在世界各地流竄。所以，加強藥物檢測技術的研發和訂立相關法規，可以立即且有效的嚇阻有心人士濫用藥物；至於引發濫用行為的心理因素和社會問題，則須結合各領域的學者專家，尋求最根本的解決之道。本篇論文主要目的是建立一種簡單、快速的電泳分析方法，用來檢測分析苯二氮平類藥物，苯二氮平類藥物主要用途為鎮靜 (sedation)、安眠 (hypnotic)、抗焦慮 (anxiolytic) 與抗癲癇 (anticonvulsant)，早期使用的巴比妥鹽類 (barbiturates) 藥物，產生較多副作用，且對呼吸抑制性較強，近年來已極少使用，目前在臨床上使用的鎮靜安眠藥大部份多屬於苯二氮平類藥物 [1,2,3]。近年來由於毛細管電泳法快速發展，在臨床醫學生化檢測與一般藥物檢測上，毛細管電泳儀已是不可或缺的利器，本研究將發展二種不同分離機制的毛細管電泳檢測技術，用於苯二氮平類藥物之檢驗。此二種方法分別為：(1)非水相毛細管泳法；(2)微胞電動層析結合掃掠式線上濃縮技術。

1.2 苯二氮平藥理學 [4,5]

一般說來苯二氮平的藥理功能可分五大類：1. 抗焦慮功能、2. 鎮靜（及催眠）功能、3. 肌肉鬆弛功能、4. 抗痙攣功能、5. 記憶力減退（amnesia）功能。其主要是由於增進中樞神經系統中以 gamma-aminobutyric acid (GABA γ -胺基丁酸) 為媒介的抑制作用，

GABA 由神經末梢釋放，與 GABA 之 A 型接受器 (type A receptor) 結合而活化，此活化作用會使氯離子通道打開，增加神經元中氯離子的傳導，所有的 Cl^- 離子通道受體促進劑 (agonists)，包括酒精、巴比妥胺酸鹽類，meprobamate 類及 A 型 γ -aminobutyric acid (GABA) 都可以促進這種通道的打開，而使 Cl^- 離子自由地由細胞外移入細胞內。GABA 與調整情緒無關，它可調整肌肉的緊張和鬆弛。在哺乳類動物的大腦裡，中樞神經系統中之 GABA 神經傳導物質-接受器系統是主要的抑制性生化途徑，特別是在杏仁體 (amygdala region) 和脊髓。GABA 的主要功能是與 Cl^- 離子通道受體結合，促進通道的開通，促使 Cl^- 離子移進細胞內。苯二氮平與巴比妥鹽類藥物會與 GABA 之 A 型接受器相結合，使氯離子管道之氯離子流增加，細胞外之氯離子大量湧入細胞內，而抑制其活動。苯二氮平與 A 型接受器結合，會使氯離子通路開放之頻率增加；而巴比妥酸鹽與 A 型接受器結合，則是會延長氯離子管道的開放時間。由各種現象顯示出大腦中多數的苯二氮平結合位置與鎮靜、肌肉鬆弛和抗癲癇的活性有關，也與 GABA 的 A 型接受器及氯離子管道有關，無論如何，定量上的差異必定會存在於不同的藥物-接受器複合物之間，可藉以界定不同苯二氮平類藥物的效力，故此類藥物中有些作為鎮靜安眠藥，有些是抗癲癇藥，又有些則具有高度的肌肉鬆弛作用。中樞神經細胞的氯離子通道 (chloride ion channel, 簡稱為 Cl^- 離子通道) 一旦打開，臨床上人體就會產生在本章上一小節所敘述過的五項藥理功能。反之， Cl^- 離子通道一旦關閉，人體就會產生和上述五項藥理功能完全相反的症狀，如焦慮、興奮、肌肉緊張、容易發生痙攣及「記憶不會減退」等。

1.3 藥物臨床表現 [5,6,7,8]

苯二氮平類藥物自 1960 年代問世以來，逐漸取代巴比妥鹽類藥物，主要的原因為：(1)作用濃度範圍寬廣，(2)即使過量中毒，其致

死率低於巴比妥鹽類，(3)較不易誘導肝臟酵素增加，(4)使用抗凝血劑 warfarin 者，併用安眠藥之首選藥物即為苯二氮平類藥物。根據一項針對美國藥品工業的統計指出，在 1999 年的醫師處方藥排名中，苯二氮平類藥物排名第十，苯二氮平類藥物會有如此龐大的使用量，不僅是因為在臨床上有較高的安全性，且同時具有鎮靜、安眠、抗焦慮與抗癲癇一藥多用的特性。

鎮靜與安眠其實是程度上的差別，催眠劑可以說是較強之鎮靜劑，不但使人鎮靜並且入睡，使用安眠藥的治療目的是促進睡眠，對於失眠只是症狀治療，所有的安眠藥物都會改變正常的睡眠週期，而抑制快速動眼睡眠 (rapid eye movement, REM)，因此對因環境改變而引起的偶發或短期失眠頗具療效，但長期服用安眠藥雖能幫助入睡，卻無法改善睡眠品質；在現今文明社會中，焦慮症之人口比例約佔 30%，焦慮症常會帶動交感神經系統之活動，進而出現交感神經興奮的精神肉體效應 (psychosomatic)，如心悸 (palpitation of heart)、手足顫抖 (tremor) 及腹瀉 (diarrhea) 等，酒精、鴉片、巴比妥酸鹽是最早被使用於治療焦慮症之藥物，目前則以苯二氮平類為第一線用藥。

苯二氮平類藥物口服之吸收良好，所以一般以口服方式給藥，雖然它們大部份會被肝臟所代謝，但是並不會如使用巴比妥鹽或酒精，發生誘導肝臟酵素系統的情形，一般的情形下苯二氮平並不容易造成死亡或嚴重的呼吸抑制，不過在使用時仍須注意其耐受性 (tolerance)、戒斷症候群 (withdrawal syndrome)、藥物相互作用 (drug interactions) 以及過量 (over dose) 的問題。

1.4 苯二氮平類藥物檢測技術回顧

苯二氮平類藥物的檢測技術，主要可以分成兩大類，分別為非層析技術 (nonchromatographic techniques) 和層析技術 (chromatographic

techniques)，這兩種技術彼此相輔相成，缺一不可，同時也是檢測其他濫用藥物最主要的方法。

檢測苯二氮平類藥物的非層析技術包括酵素免疫分析法 (enzyme immunoassays, EIA) [9]、偏極光免疫分析法 (fluorescence polarization immunoassay, FPIA) [10,11]以及同位素免疫分析法 (radio immunoassay, RIA) [12]等，由於這類檢測技術操作簡便，且有商業化的產品可供使用，一般人只需稍加訓練，很快就能擔任檢測的工作，適合進行現場 (on-site)大量樣品之篩檢。這類技術的缺點是在檢測結果的判讀上，有可能發生偽陽性與偽陰性的檢測結果，前者是由於檢體成份複雜，可能含有能與免疫分析技術中使用的藥物抗體發生交叉反應 (cross-reaction)之物質，而造成檢測結果呈陽性反應；後者則因為篩檢濫用藥物之作業，對於呈陰性反應的檢體通常不需再作確認工作，只有呈現陽性反應的檢體才需要進行再確認，所以藥物濫用者常會在自己的檢體中添加如食鹽、漂白劑、肥皂、水等能夠影響免疫分析法之物質，而使得免疫分析技術無法檢出，這時就需要有經驗的檢測人員，判斷檢體的酸鹼度、比重及氣味等是否正常。

當檢體呈現陽性反應時，必須以較精確的層析技術進行再確認的工作，層析技術主要包括薄層層析法 (thin-layer chromatography, TLC)、高效能液相層析法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)、氣相層析法 (gas chromatography, GC) 以及毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE)等。

Olaf H. Drummer [13]在 1998 年寫的一篇回顧性論文中，對這四種層析技術應用於分析苯二氮平類藥物有詳盡的介紹。其中有關毛細管電泳法部分，因從化學結構上看來苯二氮平分子屬於不易帶電的中性分子，故論文中介紹的大部分都是以微胞電動層析法為主。直至 1998 以後，隨著毛細管內填充分配性靜相物質之毛細管電動層析方法 (Capillary Electrochromatography, CEC) 興起，開始也有人利用填充式

毛細管進行苯二氮平類藥物的分離[14,15]。惟一般使用微胞電動層析法常需要在緩衝溶液內添加大量界面活性劑，界面活性劑不易揮發，與先進的質譜偵測器作串聯，會有系統相容性的問題。雖然使用填充式毛細管電動層析法(CEC)與質譜儀可能是一個不錯的選擇，但是填充式毛細管製作不易費時費力，且管柱使用壽命不長，在經濟成本考量上似乎不宜作此考慮。



二、毛細管電泳分離方法之介紹

2.1 簡介及發展歷程

毛細管電泳(capillary electrophoresis)的分離原理是在外加電場下，因背景緩衝溶液的作用使其分析物帶不同電荷而有不同的分離速度，並藉此達到分離的效果。其前身係從平板電泳技術發展而來，電泳技術的發展實際上已有上百年的歷史，在十九世紀末(1897) Kohlrausch 已提出再溶液中荷電離子的遷移方程式[16]，解釋荷電粒子在電場作用下的移動行為。雖然利用不同的遷移速度可將帶電的混合物予以分離，因此在固定電場作用下，荷電分子會因為荷電量與本身質量的不同而產生不同的遷移速度，由此可達到混合物分離的效果。但由於電泳的分離效率與外加電場的大小成正比，故電場越大，分離效率越高，由相關的理論得知：伴隨著電場作用，在高電壓下分離溶液所形成導體通路，會因電流的輸送產生大量的焦耳熱，焦耳熱與電流通量成正比，焦耳熱散熱所形成的熱對流加速分析物分子質傳擴散(diffusion)，且熱效應降低緩衝溶液黏度，樣品區帶變寬，不利分離，由此可見焦耳熱效應限制了傳統電泳分離時高電壓的使用。

若能設法使電泳過程在散熱效率極高的毛細管內進行，即可克服焦耳熱，因為毛細管管壁薄，相對於平板電泳比表面積增大許多，商用儀器中常配合冷煤進行冷卻，大幅抑制焦耳熱，全面改善分離效果。1970年代末期及1980年代初期 Mikkers 等人及1981年 Jorgenson 和 Lukacs 證實 CE 為一種具發展性的分離技術，同時也證實了可利用 75 μm 內徑的毛細管玻璃管柱，在充滿緩衝溶液的情況下，可成功的分離胺基酸衍生物，並且利用螢光偵測器降低方法之偵測極限 [17,18]。

在此之前，文中所提到的毛細管電泳層析法，由分離機制看來均屬於毛細管區帶電泳法，(Capillary Zone Electrophoresis,CZE)，在發

展初期僅能對帶電荷分子具有優異的分離能力，而對於中性分子而言則無法進行分離，直至 1984 年，日本 Terabe 發現可在緩衝溶液中添加具電荷的界面活性劑，利用微胞液相層析原理發展出微胞電動力毛細管層析法(Micellar Electrokinetic Chromatography,MEKC)，其主要分離機制係利用界面活性劑本身具電荷的特性，在高電場環境下其遷移速度與中性分析物明顯不同，界面活性劑在形成微胞後生成所謂的假靜相(Pseudo-Stationary Phase)，而中性的分析物在假靜相的分配(partition)作用下，中性分析物遷移速率亦會產生差異進而達到分離的效果[19]。同時使用電聚焦(isoelectric focusion)亦可適用於毛細管型式[20]，利用胺基酸等兩性分子具有不同等電點(pI)的特性，於是使用不同 pH 梯度的緩衝溶液，就能使兩性分子在毛細管中的不同位置聚焦，聚焦完成後以壓力驅動方式通過偵測器。

在 1987 年，Cohen 與 Karger 利用類似傳統的凝膠電泳，將十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺在毛細管內形成凝膠，直接應用在蛋白質的分離與分子量的決定，發展成毛細管凝膠電泳 (Capillary Gel Electrophoresis, CGE)[21];之後還有利用不連續緩衝溶液系統，造成電場差異，使分析物依據不同電場下電泳速率不同而形成樣品區帶的毛細管等速電泳法(Capillary isotachopheresis,CITP)被發展出來 [22,23];此外，使用類似於液相層析法中的填充物於毛細管中，利用分析物在特殊填充物與溶液間的分佈平衡，產生的分離機制稱為毛細管電動層析法(Capillary Electrochromatography,CEC)[24,25]。隨著以上這些技術的發展使得毛細管電泳分離技術的應用日益廣泛，同時由於商業化的毛細管分析儀器不斷問市，基於自動化與操作簡便種種的優點，毛細管電泳技術漸漸被應用在藥物、環境污染和生化分析上，成為簡便、有效率的分析方法。

2.2 基本分離原理

2.2.1 電泳分離與遷移率

電泳的分離機制是以帶電粒子在電場中遷移的速度差異為基準，當一個帶 Z_i 電荷粒子，在固定電場 E 作用下所受到的靜電作用力 F_i [26]

$$F_i = Z_i e E \quad (1)$$

其中, e 為電子所帶之電量。

由於自由溶液中液體本身具有黏度的關係，荷電粒子在移動時會因液體的黏度而產生黏滯力，除電場作用力 F_i 之外，粒子還受到溶液中黏滯力 F_d 的作用，假設粒子為球型粒子，則黏滯力 F_d 的大小與粒子的移動速度、粒子半徑 r_i 、緩衝溶液的黏度 η 有關，其關係式如下所示：

$$F_d = 6 \pi \eta r_i v_i \quad (2)$$

當上述二項作用力達力平衡時，此時帶電粒子的移動速度為終端速度，即速度不再改變； $F_i = F_d$

由(1)(2)

$$Z_i e E = 6 \pi \eta r_i v_i \quad (3)$$

(3)移項整理可得帶電荷粒子 i 在電場 E 下的移動速率

$$v_i = \frac{Z_i e E}{6 \pi \eta r_i} \quad (4)$$

而這種帶電粒子 i 遷移的行為即為電泳(electrophoresis)。在此我們定義電泳遷移率(μ_i 或 μ_{ep})為單位電場下的電泳速度，其數學式可表示為

$$v_i = \mu_i E \quad (5)$$

比較(4)(5)

$$\mu_i = \frac{Z_i e}{6 \pi \eta r_i} \quad (6)$$

我們定義電泳遷移率為單位電場下粒子電泳速率。

2.2.2 電滲流

電滲流(electroosmotic flow, EOF)主要是指毛細管內壁表面電荷因電極相斥及吸引所引起的管內液體整體流動,形成的原因為外加電場對管壁溶液電雙層的作用。如 Fig.2-1 所示,在溶融矽(fused silica)材質的毛細管中,管內壁的矽醇官能基(Si-OH)在不同的緩衝溶液接觸下,將有不同程度的解離(Si-OH \rightarrow Si-O⁻),進而吸引緩衝溶液中電解質陽離子,形成所謂的電雙層結構。

依據 Stern 的電雙層理論,溶液中的正離子在流經活化的毛細管後,會因前述原因所形成的靜電吸引力而吸附在管壁上,形成不可逆吸附的第一層吸附,稱為固定層(stern layer)。固定層之外稍遠離毛細管表面,也會有過多的正電荷離子被靜電力吸引,此時吸附的程度則沒有第一層來的強,其電荷密度隨遠離管壁的程度呈指數趨勢逐步下降,此層稱為擴散層(diffusion layer)[27]。

由於溶液在毛細管內電荷分布的差異(愈靠近管壁電荷密度愈高),因此溶液與管壁間會有電位差的存在。若溶液管中央部分(bulk solution)定為零電位,則管壁的電位為 ϕ_0 ,此時在固定層中的電位由 ϕ_0 降至 ϕ_δ ,而在擴散層中的電位則由 ϕ_δ 降至零。此時 ϕ_δ 與 bulk solution 電位差距稱為 zeta 電位(ζ potential)。以公式表示如下:

$$\zeta = (4\pi \times \delta \times e) / \epsilon \quad (7)$$

其中 δ 為電雙層的厚度, e 為每單位表面積的電荷, ϵ 為溶液的介電常數。由於 zeta 電位的存在,在高電場的作用下,毛細管壁擴散層的水合陽離子會朝陰極方向遷移,且因水分子與陽離子溶合的關係,整個緩衝溶液亦會被拉往陰極,使得毛細管中的液體會有泳動的現象,即為電滲流,如 Fig.2-1 所示,將電滲流遷移率定義為單位電場下的電滲流速率,可表示為:

$$\mu_{\text{eof}} = (\varepsilon \times \zeta) / \eta \quad (8)$$

$$V_{\text{EOF}} = \mu_{\text{eof}} \times E$$

由於帶電粒子在緩衝溶液中，藉著靜電力和本身質量的影響電泳遷移率(μ_{ep})，而溶液本身因 pH 值、緩衝溶液離子強度、有機修飾劑等因素存在下可控制電滲流遷移率的大小，因此帶電粒子整體遷移率則為這兩者向量的加成：

$$\mu_{\text{a}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eof}} \quad (9)$$

在毛細管電泳分離的過程中，基本的區帶電泳分離機制就是靠著分析物間在電解質溶液中電泳遷移率之差異來達成的。

2.2.3 分離效率

毛細管電泳的分離效率可以用理論板數來表示，理論板數(N)是反應物質在固定相和流動相中動力學特性的層析參數，理論板數越高，表示分離效率越好，可用(10)或(11)式計算得出：

$$N = \mu_e \frac{V}{2D} \quad (10)$$

D：分析物之擴散係數(diffusion coefficient)

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{V}{2D} \quad (11)$$

N：理論板數(theoretical plates)

σ ：變度(variance)

另外，亦可用時間來換算出理論板數，其表示法為(12)及(13)式：

$$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2 \quad (12)$$

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (13)$$

t：分析物的移動速度

w：分析物的時間寬度

$w_{1/2}$ ：分析物的時間半高寬

而對於時間相近的兩分析物，其解析度(resolution)可用(14)式表示其分離的效率，定義如圖(5)所示：

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} \quad (14)$$

- t_1 ：分析物 1 的遷移時間
- t_2 ：分析物 2 的遷移時間
- w_1 ：分析物 1 的時間寬度
- w_2 ：分析物 2 的時間寬度

2.3 常見的毛細管電泳分離模式

2.3.1 毛細管區間電泳(capillary zone electrophoresis, CZE)

毛細管區間電泳是毛細管電泳中最基本的一種分離模式，利用分析物在緩衝溶液中解離為正或負離子後，受電場作用而移動，當分析物質量與所攜帶有效電荷有差異時，會導致電泳移動率不同而達到分離的效果，一般無表面修飾的熔融矽毛細管情況下，通常陽離子的運動方向與電滲流一致，會最先通過偵檢器；中性分析物粒子本身電泳速度為零，將隨電滲流而行，而陰離子因為運動方向和電滲流相反，則最後通過偵檢器。但是對於不帶電荷的分析物因為與電滲流有相同的移動速度，因而無法達到分離的目的。針對此類中性物質，可藉由加入不同修飾劑(additive)來達到分離的效果。

2.3.2 微胞電動層析法(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)

此分離技術是 1984 年時由 Terabe 與其他研究者為分離中性分析物所發展的一種毛細管電泳衍生技術[19]。利用添加界面活性劑在緩衝溶液中產生帶電荷的微胞及單體，形成假靜相 (pseudo-stationary phase)，使分析物在受電場作用而移動的過程中，與溶液中假靜相產生分配(partition)作用，藉此造成分析物移動率的差異而產生分離的效果，此種技術即稱為微胞電動層析。除對不解離之中性分析物外，對於可解離而電荷/質量比值相近之物質，亦可依據分子疏水性及親水

性之強弱差異進行分離。一般緩衝溶液以水溶液為主，所形成的微胞其內部呈厭水性(hydrophobicity)，當分析物間的疏水性及親水性有強弱差異時，藉由調整界面活性劑的濃度大小可改變厭水性分析物與微胞之間分配作用力的強弱，進而影響分析物的有效移動率。微胞電動層析分離技術主要可應用於藥物分析、中藥成份分析、氨基酸及胜肽或其他小分子物質之分析。

若添加之界面活性劑屬陰離子型界面活性劑，在毛細管中受電場作用會往正極方向移動，微胞內部可滯留疏水性強之分析物，因此延長該分析物之遷移時間(migration time)，使其與電滲流分離或與具相同電荷/質量比而疏水性強弱不同之分析物分離。界面活性劑可分為離子性與非離子性(如 Brij 35)兩大類，端視其溶於水相後解離與否。其中離子性界面活性劑又可依其解離後所產生之離子種類區分為陽離子性 (Dodecyltrimethyl-ammonium chloride, DTAC)、陰離子性 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)與兩性界面活性劑等三類。當緩衝溶液中界面活性劑的濃度超過臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)時，界面活性劑的分子便會由單體聚集形成微胞，進而對分析物之分離情況產生影響。微胞電動層析最大的優點是改善毛細管電泳對中性物質的分析能力，但對非中性的分析物而言，因分析物親疏水的情況不同,亦可影響其分離結果。

2.3.3 毛細管凝膠電泳(CGE)

凝膠電泳主要用於生物學上分離大分子物質，所添加的聚合物凝膠在分離的過程中扮演著分子篩的角色，以 DNA 為例，DNA 鏈每增加一個核苷酸就增加一個相同的質量和電荷單位，對它在自由溶液中的電泳遷移率是不會造成影響的，因此在一般 CZE 與 MEKC 環境中是無法將不同鏈長的 DNA 分子予以分離的。在毛細管中添加凝膠，由於凝膠的高分子鏈具有糾纏性，當帶電分析物在電場力的推動

下於凝膠聚合物網狀結構內遷移時，其運動受到一定程度的阻礙，大分子受到的阻礙比小分子大，因此大分子的遷移速度比較慢，藉著分子篩的作用就能達到大小分子分離的效果。

2.3.4 毛細管等電聚焦電泳(CIEF)

毛細管等電聚焦電泳是利用分析物本身等電點(pI)的差異，來達到分離的目的。使用於等電聚焦電泳之毛細管，實驗前必須於管內壁進行表面處理，以充分抑制電滲流。此種進行分離的分析物必須是具有不同電性的兩性物質，如氨基酸、蛋白質等。在這個方法中首先要毛細管中建立一個具有 pH 梯度的環境，將毛細管充滿混合 ampholyte(兩性離子混合物)之電解液，電極兩端通電後 ampholyte 會形成 pH 梯度。當毛細管內 pH 梯度環境建立完成，若此時兩性分析物具有負靜電荷時，它的移動方向就會朝向正極，此方向所經之處由於溶液環境 pH 值持續下降，所以該分析物會逐步發生質子化反應，並減少其所帶的負電荷，最後會到達一個淨電荷等於零的 pH 值(pI)。此過程會導致每一種兩性分析物被分離並濃縮至位於其等電位點 pH 值處之狹窄層帶中。

2.3.5 毛細管等速電泳(CITP)

毛細管等速電泳是一種移動界面的電泳技術，一般是使用兩種緩衝溶液體系造成所有被分離的區帶等速遷移的狀態，被分離的區帶向夾心麵包一樣，被夾在前導(leading)電解質和尾隨(terminating)電解質之間。以分離正離子為例，前導緩衝溶液的正離子其電泳遷移率必需大於所有正離子分析物的電泳遷移率，而尾隨緩衝溶液之正離子電泳遷移率則必需小於所有分析物，在此情況下毛細管兩端施加電場，正離子開始向負極移動，前導電解質之正離子遷移率最大，跑得最快，其次才是分析物正離子。在 ITP 中之所以會發生等速遷移，是因為各

個區帶感應的電場強度不一樣所致，在通電分離的過程中，正離子的遷移速度不一樣將導致導電通路正離子不連續，會有斷電流的現象發生，因此事實上是不可能的，為了維繫導電通路的完整，所有的正離子必需有一致的遷移速度，所以各個區帶感應的場強才會不一樣，在前導電解質部分，因為原本離子遷移率較大，為了維繫相同的速度，因此感應為低場區(遷移速度=遷移率×場強)，尾隨緩衝溶液部分為高場區，所以各個區帶感應的場強與遷移率成反比，對此剛好有一個濃度聚焦的放大效果，即當分析物溶質擴散時，前端部擴散會進入低場區而使速度趨緩，尾端擴散會進入高場區而使速度加快，所以等速電泳技術具有聚焦抑制區帶擴散的效果。



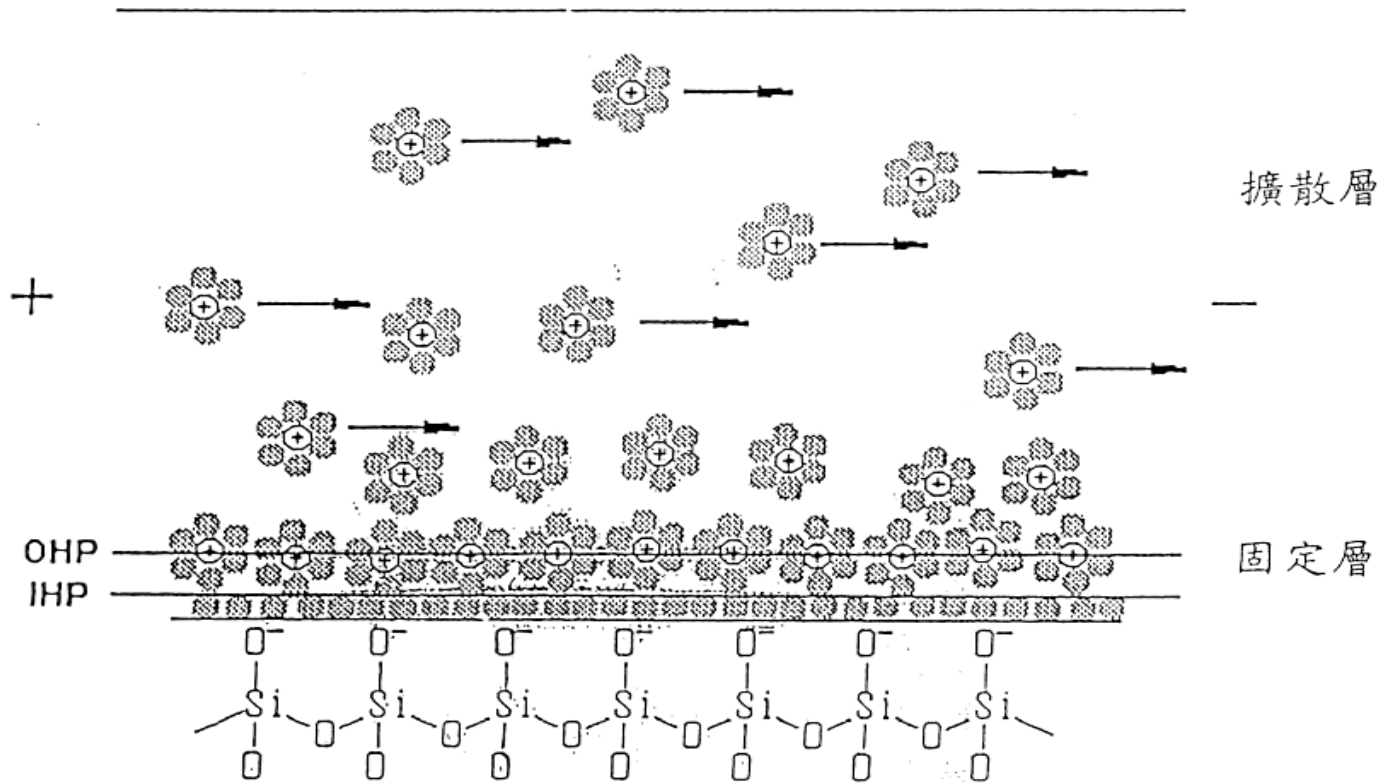


Fig.2-1 Chart of Electroosmotic Flow

三、非水相毛細管電泳簡介

3.1 非水相毛細管電泳之特性

雖然水相毛細管電泳是一個高效率、快速的分離技術，但它仍有部分缺點。第一，由於使用太細的毛細管內徑，使得毛細管電泳具有較高的偵測極限，靈敏度較差，偵測能力受到限制，所以並不是很適用在例行的微量分析上。而若要增進偵測極限，可使用雷射誘發螢光偵測電泳(LIF-CE)或是使用較大內徑的毛細管，但使用大內徑的毛細管卻因水相溶液會產生較高的焦耳熱 (Joule heating)造成波峰變寬 (broadening)而被限制使用[28]，因此可改用非水相毛細管電泳(低焦耳熱)改善此現象(有機溶劑通電時，電流值較低，因此分離時可以忍受較高的電場強度)。第二，對於一些較疏水性的藥物，水相毛細管電泳礙於溶解度不佳，分離效果並不好[29]；還有結構較相似的分析物，也由於它們在水相的電泳移動速度太相近而無法分離[30]。

以上這些問題都可藉由添加修飾劑在分離緩衝溶液中來改善，譬如添加界面活性劑(surfactants)或是環糊精(cyclodextrin)等修飾劑[31]可以增加分離選擇性。不過使用修飾劑也有一些問題，例如有些修飾劑價錢昂貴，及使用修飾劑的系統因礙於修飾劑的揮發不好而無法與質譜儀結合，為了讓毛細管電泳儀與質譜儀做一個完美的串聯，考慮有機溶劑溶液揮發，使用非水相電泳似乎是一個不錯的選擇。另外一個改善分離選擇性的方向則是添加少許的有機溶劑(<30%)，發現適量的有機溶劑能增加分析物的溶解度及分離效率[32]。因此在 1984 年，由 Walbroehl 和 Jorgenson 發表第一篇完全使用 100%有機溶劑的文章[33]，他們使用乙腈溶劑分析一系列的 quinoline 的分析物，並且有很好的分離結果。由於非水相溶劑產生的焦耳熱小，分離效率高，對極性小的分析物具有較好的溶解力，許多分析家開始使用非水相溶劑從

事一連串毛細管電泳的相關研究，例如一系列藥物及其代謝產物的分析[34,35,36,37]，或是在分離對掌異構物[38]及鏡像異構物[39]，都有很好的表現。非水相毛細管電泳的另一項優點，就是與 MS 連接時，具有很高的相容性[40]。

3.2 非水相溶劑的選擇

所謂好的分離溶劑就是具有可與陽離子結合的配位鍵，又有可與陰離子結合的氫鍵。其中水是最好的選擇，它可以當成質子的接受者，亦可以當質子的供給者，但是對於溶解度不佳或是無法分離的分析物，使用有機溶劑也不失為一個好選擇。而如何選擇一個適當的溶劑，除了要考慮溶劑的揮發度(volatility)，分析物對其溶劑的溶解度(solubility)，溶劑的毒性、黏度和介電常數，溶劑對 UV 光的穿透力也是很重，像是丙酮(acetone)則是因為本身 UV 吸收太高，不適合當非水相溶劑。還有就是這個溶劑對非水相系統是否能產生電滲流，如正己烷(*n*-hexane)為鈍性溶劑(inert solvent)，無法供給或是接受質子，因此毛細管壁無法解離而不能產生電滲流，當然不適合做為非水相毛細管電泳的有機溶劑[41]。最重要的一點，也就是這個溶劑對整個系統的選擇性好不好，因為使用不同的溶劑對分析物具有不同的分離效率[42]。

從分離效率的觀點去考慮溶劑的選擇，原理如水相毛細管電泳前述所敘，分析物的電泳移動速度為移動速率與電場強度的乘積，而遷移率的公式又可以(15)式表示：

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (15)$$

q：電荷數(charge)

r : 分析物的半徑(the Stokes radius of the analyte)

另外考慮則塔電位及電雙層的厚度及介電常數，電荷數的值由(16)式表示：

$$q = 4\pi r \zeta (1 + r \kappa) \quad (16)$$

ϵ_0 : 真空中的電容率(the permittivity in vacuum)

κ : 電雙層的厚度(the electrical double layer thickness)

其中 κ 又可以(17)式表示：

$$\kappa = ((2e^2 I N_A) / (\epsilon \epsilon_0 k T))^{1/2} \quad (17)$$

e : 一個電子的電荷數(the charge of an electron)

I : 離子強度(the ionic strength)

I : 離子強度(the ionic strength)

N_A : Avogadro's number

k : 波茲曼常數(Boltzmann's constant)

T : 絕對溫度(absolute temperature)

對於半徑較小的分析物，其 r 與 κ 的乘積遠小於 1，可忽略不管，從(15)式到(17)式可導出電泳移動率的公式(13)

$$\mu_e = 2/3 (\epsilon \epsilon_0 \zeta / \eta) \quad (18)$$

另外，分析物到達偵測器的時間可由(19)式表示：

$$t = L_d / ((\mu_e + \mu_{EOF}) * E) \quad (19)$$

L_d ：毛細管入口端到偵測器的長度

而分析物的擴散係數可由(20)式表示：

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta} \quad (20)$$

結合公式(8)、(11)、(18)~(20)，可導出分析物的理論板數與分析時間的公式(21)：

$$\frac{N}{t} \propto \frac{r}{kT\eta} (2\zeta_{ion} - \zeta_{wall})^2 (\epsilon \epsilon_0 E)^2 \quad (21)$$

ζ_{ion} ：分析物的則塔電位

ζ_{wall} ：毛細管壁的則塔電位

從式(16)發現，若要具有較高的分離效率，選擇溶劑時需要考慮具有低黏度、高介電常數、能使用高電場、及與分析物有較大則塔電位差異的溶劑[35]。另外，因焦耳熱造成的溫度上升也影響到分離效率的好壞，溫度高會使得分離效率下降。

因此目前在非水相毛細管電泳中最常使用的有機溶劑有甲醇 (methanol)、乙醇 (ethanol)、乙腈 (acetonitrile)、formamide、*N*-dimethylformamide、*N,N*-dimethylformamide、dimethyl sulfoxide 等溶劑，Table 3-1 為這些有機溶劑性質表[31,41]。從 Table 3-1 所示，其中大多數的有機溶劑其介電常數都小於水，也因此會有較低的電流及焦耳熱，可減少因焦耳熱造成波峰變寬的問題，對熱不穩定的分析物也較好。因為有機溶劑有較低的電流所以可以使用較大的電場，得到較好的分離效率。而使用有機溶劑亦可使用較大內徑的毛細管，降

低偵測極限。儘管會因此延長分析時間，不過這可以藉由選擇低黏度的有機溶劑來補償。由式(2)所示，毛細管電泳的電滲流由介電常數、黏度決定，在非水相毛細管電泳， ϵ/η 值較大，可以得到較大的電滲流，亦縮短整體的分析時間。以純水來說，其 ϵ/η 值為 $78.5 \text{ mPa}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，而換成其他的有機溶液如乙腈為 $110 \text{ mPa}^{-1}\text{s}^{-1}$ [34]。若 ϵ/η 值相近純水或小於純水，亦可考慮使用具有較高 zeta 電位的有機溶液。水的 zeta 電位是 97.8 mV ，而甲醇是 84 mV ，乙腈更是高達到 195.2 mV 。

3.3 非水相電泳溶劑的影響

在非水相毛細管電泳中，溶劑影響分析物的電泳速度主要有三種方式：(1)可藉由改變溶劑分子的大小改變移動速度；(2)介電常數可能影響解離反應的平衡，較大的介電常數較不影響酸或鹼的解離；(3)分析物藉由 pK_a 值所表達的酸鹼性質，可經由不同的有機溶劑或是混合有機溶劑改變。其中第(3)項，在不同的有機溶劑中，改變分析物的 pK_a 值，這是影響分析物移動速度與順序的主要原因[42,44]。

3.4 非水相毛細管電泳的優點

從上述結果可知，使用非水相毛細管電泳系統具有幾項優點：

(1)具有較高的分離效率：

由於有機溶劑可改變分析物本身的 pK_a 值，改變解離情況，使得原本在水相遷移度太近而無法分離的分析物，在非水相中可以分離，而加入不同比例的有機溶劑亦可以達到不同的分離效率[42,44]。

(2)可使用較高的分離電壓和離子強度：

由於非水相溶液產生較少的電流，相對焦耳熱也比較少，因此可

應用較高的電壓和離子強度，縮短分析時間。另外也因較小的電流值，所以可使用大內徑管柱，降低偵測極限，亦可用於製備分析的用途。不過使用非水相毛細管及大內徑毛細管時，需注意會因入口端與出口端溶液瓶內液面高度差所產生的虹吸現象(siphoning)，將會影響電滲流速度與分離效率[28]。

(3)可減少分析物與管柱的吸附作用：

在使用水相毛細管電泳分析疏水性較大的分析物時，常會因分析物的疏水性造成與管壁產生吸附作用，而降低分離效率，在非水相毛細管中則可因具較好的溶解度減小吸附作用，達到較好的分離效率[45]。

(4)能添加更高量的修飾劑：

例如環糊精是很好的對掌異構物選擇劑，但礙於水溶性差不能有很好的分離效果，以 β -cyclodextrin 來說在水中的溶解量只有 18mM，無法分離 dansyl-amino acids，使用非水相系統 *N*-methylformamide 則可加入高達 700mM 的環糊精，提高分離能力，因此具有較高的對掌異構物選擇性[46]。

(5)有機溶劑選擇性大：

水相系統唯一可選擇的溶劑為水，而在非水相系統中可選擇的有機溶劑種類非常多，且有機溶劑彼此間的物理與化學性質差異大，因此可藉由選擇不同的有機溶劑達到更好的分離效率，具有更高的溶劑選擇性。

(6) 串聯電灑式質譜儀其相容性高:

非水相電泳系統與質譜相容性高，主要的原因是有機溶劑相較於水有更低的表面張力與汽化熱，非常容易分散揮發，因此輔助乾燥氣體流量小，分析物離子訊號可增強[47]。



Table 3-1 Properties of some organic solvents used in CE [31,41]

	η (cp)	ϵ	ζ (mV)
water	0.89	80.0	97.8
Formamide	3.30	111.0	45.6
N-methylformamide	1.65	182.2	52.0
N,N-dimethylformamide	0.80	36.7	144.7
Dimethyl sulphoxide	2.00	46.7	155.3
Acetonitrile	0.34	37.5	195.2
Methanol	0.54	32.7	84.0

