

**Table 4-1**

[43]  $pK_a^*$  values of basic analytes (as cation acids,  $BH^+$ ) in MeOH at 25°C

Analyte	$pK_a^*$ (MeOH)	$pK_a$ (water)	$\Delta pK_a$
Aniline	6.2	4.87	1.3
2-Methylaniline	6.1	4.45	1.7
3-Methylaniline	6.4	4.71	1.7
4-Methylaniline	5.5	5.08	0.4
2,6-Dimethylaniline	5.5	3.89	1.6
<i>N</i> -Methylaniline	5.6	4.85	0.8
<i>N,N</i> -Dimethylaniline	5.3	5.07	0.2
<i>N</i> -Isopropylaniline	6.5	5.77	0.7
Pyridine	5.6	5.23	0.4
2-Methylpyridine	6.3	6.00	0.3
3-Methylpyridine	6.0	5.70	0.3
4-Methylpyridine	6.4	5.99	0.4
4-Methoxypyridine	7.1	6.58	0.5
Quinoline	5.3	4.90 <sup>a)</sup>	0.4
Isoquinoline	5.9	5.40 <sup>a)</sup>	0.5
Alprenolol	11.1	9.5	1.6
Amphetamine	11.2	9.9	1.3
Cocaine	9.9	8.4	1.5
Codeine	9.3	8.2	1.1
Dihydrocodeine	9.8	8.8	1.0
Dipipanone	11.1	8.5	2.6
Ephedrine	11.2	9.6	1.6
Ethylmorphine	9.3	8.08 <sup>b)</sup>	1.2
Levorphanol	10.7	8.2	2.5
Methadone	11.0	8.3	2.7
Methamphetamine	11.2	10.1	1.1
Noscapine	7.1	6.52	0.6
Papaverine	7.6	6.4	1.2
Propranolol	11.1	9.5	1.6
Thebaine	9.6	8.15 <sup>b)</sup>	1.5

a) At 20°C; b) at 15°C; (–) value not reported

Literature values in water are included for comparison.

$\Delta pK_a = pK_a^* (\text{MeOH}) - pK_a (\text{water})$

**Table 4-2**  $pK_a^*$  values of anionic analytes (as neutral acids, HA) in MeOH at 25°C  
[43]

Analyte	$pK_a^*$ (MeOH)	$pK_a$ (water)	$\Delta pK_a$
2,4-Dichlorobenzoic acid	7.89	2.76	5.1
2,6-Dichlorobenzoic acid	7.04	1.82	5.2
2-Hydroxybenzoic acid	7.90	2.98	4.9
2,3-Dihydroxybenzoic acid	7.95	2.94	5.0
2,4-Dihydroxybenzoic acid	8.48	3.29	5.2
2,5-Dihydroxybenzoic acid	8.04	2.97	5.1
2,4,6-Trihydroxybenzoic acid	5.98	1.68	4.3

Literature values in water are included for comparison.

$$\Delta pK_a = pK_a^* (\text{MeOH}) - pK_a (\text{water})$$

**Acetic acid**  $K_a = 1.75\text{E-}5$

**Formic acid**  $K_a = 1.80\text{E-}4$

**Oxalic acid**  $K_{a1} = 5.60\text{E-}2$

Table 4-3 Comparison of theoretical plates of Benzodiazepines separations

Benzodiazepines	Aqueous system	Nonaqueous system
Chlordiazepoxide	33,807	33,477
Clorazepate	22,126	43,392
Diazepam	12,339	26,899
Bromazepam	32,736	36,922
Nitrazepam	32,736	52,289
Alprazeolam	18,745	71,491
Triazolam	18,745	57,376
Estazolam	18,745	61,693

Unit : N/m

Table 4-4 Migration time、reproducibilities of Benzodiazepines for Non-Aqueous CE.

Benzodiazepines	migration time (min)	RSD(%) for migration time <sup>a</sup>	RSD(%) for peak area <sup>a</sup>
Chlordiazepoxide	4.07	1.15	4.38
Clorazepate	4.20	1.12	2.53
Diazepam	4.53	0.97	2.36
Bromazepam	4.81	0.98	1.41
Nitrazepam	5.75	0.82	4.53
Alprazeolam	6.05	0.73	2.66
Triazolam	9.12	1.25	0.32
Estazolam	9.55	1.25	0.96



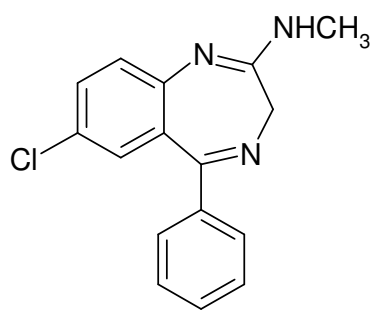
a. run to run : n = 5

Table 4-5 Regression equation,  $R^2$  and detection limits of Benzodiazepines for Non-Aqueous CE.

Benzodiazepines	Regression equation	$R^2$	LOD <sup>a</sup> (ppm)
Chlordiazepoxide	$y = 281.8x - 913.7$	0.9922	2.43
Clorazepate	$y = 260.5x - 831.5$	0.9910	2.66
Diazepam	$y = 446.8x - 1053.1$	0.9981	1.70
Bromazepam	$y = 559.5x - 1961.4$	0.9946	2.89
Nitrazepam	$y = 249.7x - 715.8$	0.9939	3.62
Alprazeolam	$y = 362.2x - 1176.5$	0.9934	2.69
Triazolam	$y = 800.5x - 2691.8$	0.9963	3.17
Estazolam	$y = 592.0x - 2032.6$	0.9977	3.37

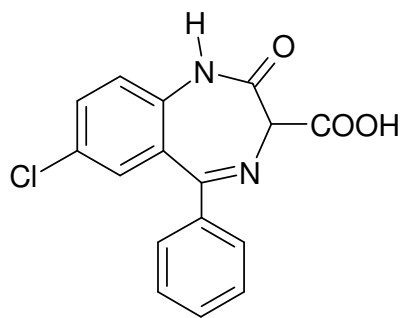
a. LOD: S/N=3

Fig.4-1 Structure of the Benzodiazepines [13,50]



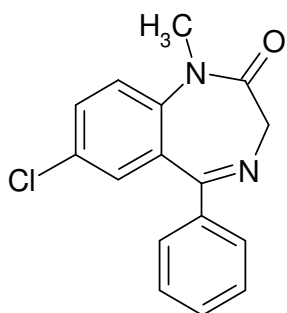
chlordiazepoxide

$pK_a = 4.6$



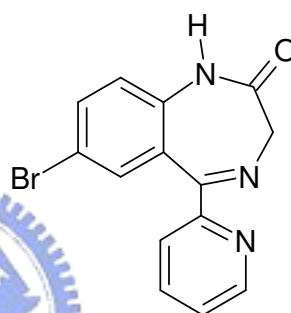
clorazepate

$pK_a = 3.5$



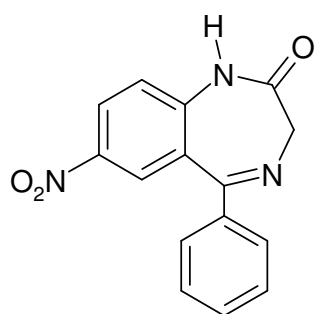
diazepam

$pK_a = 3.3$



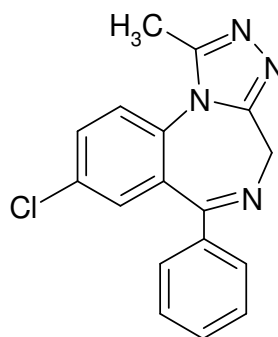
bromazepam

$pK_a = 2.9$



nitrazepam

$pK_a = 3.2$



alprazolam

$pK_a = 2.4$

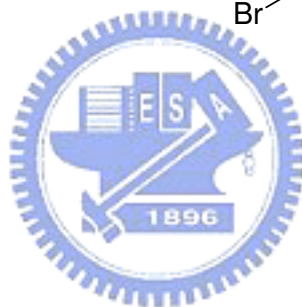
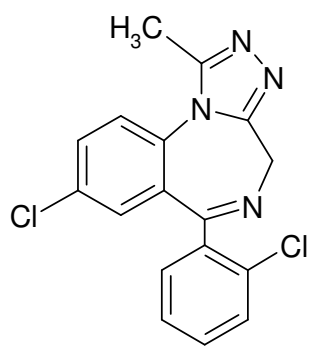
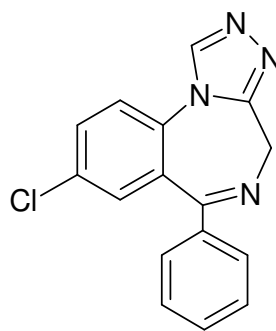


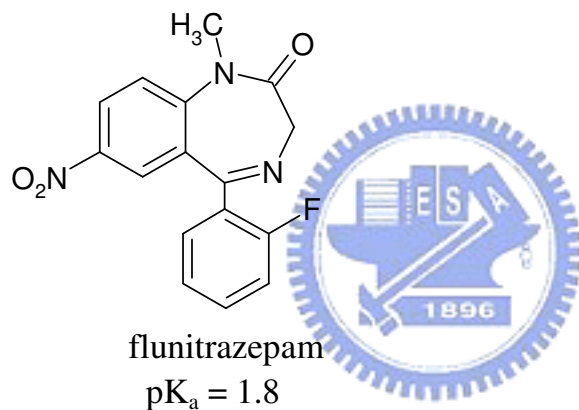
Fig.4-1 Structure of the Benzodiazepines [13,50]



triazolam



estazolam



flunitrazepam  
 $pK_a = 1.8$



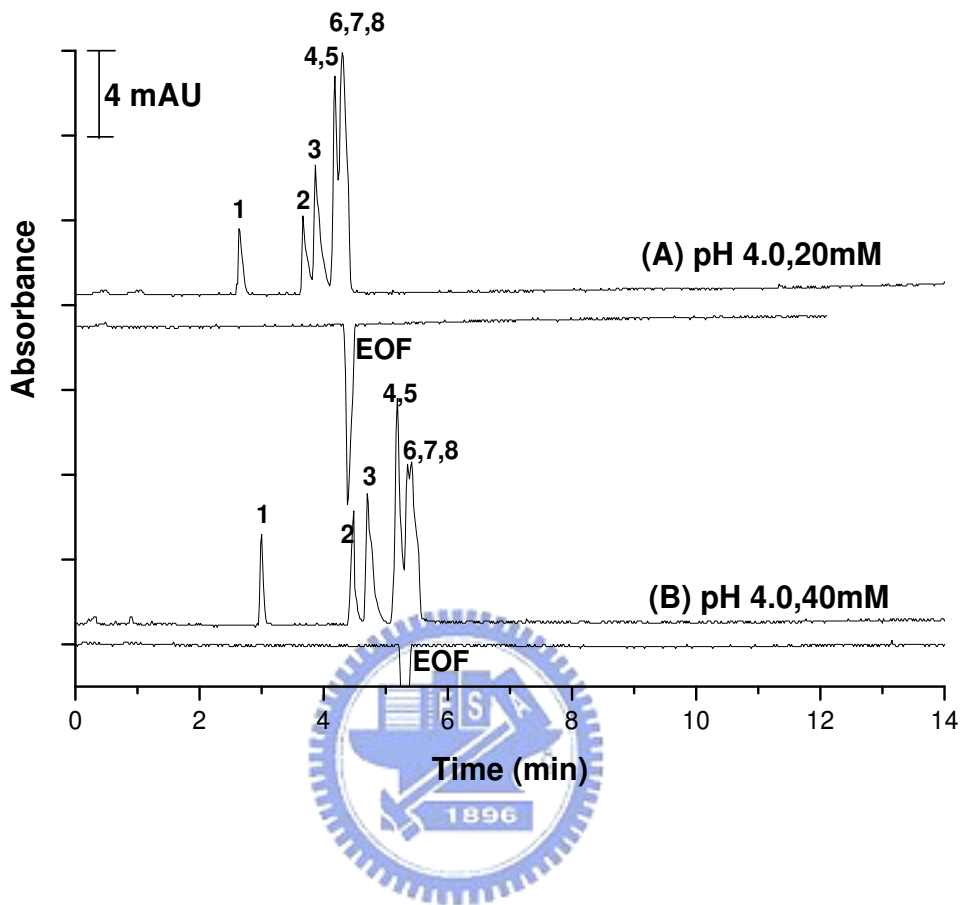


Fig.4-2 Electropherogram of benzodiazepines with aqueous capillary electrophoresis . Buffer : (A) pH 4.0, 20 mM Acetic acid/ sodium acetate. (B) pH 4.0, 40 mM Acetic acid/ sodium acetate. ; separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm; total length :37 cm; ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(100ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam



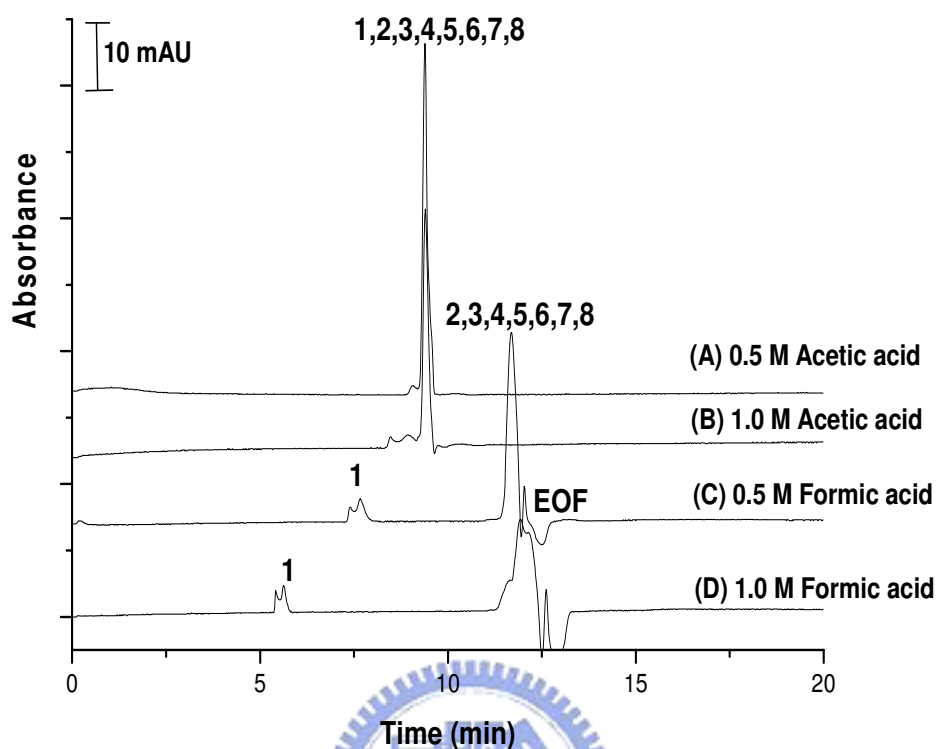


Fig.4-3 Electropherogram of benzodiazepines with non-aqueous capillary electrophoresis . Buffer : (A) 0.5 M Acetic acid/ 10 mM sodium acetate. (B) 1.0 M Acetic acid/ 10 mM sodium acetate. (C) 0.5 M Formic acid /10 mM sodium formate (D) 1.0 M Formic acid /10 mM sodium formate ; Solvent:methanol-acetonitrile (95:5,v/v); separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm; total length :37 cm; ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(100ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam

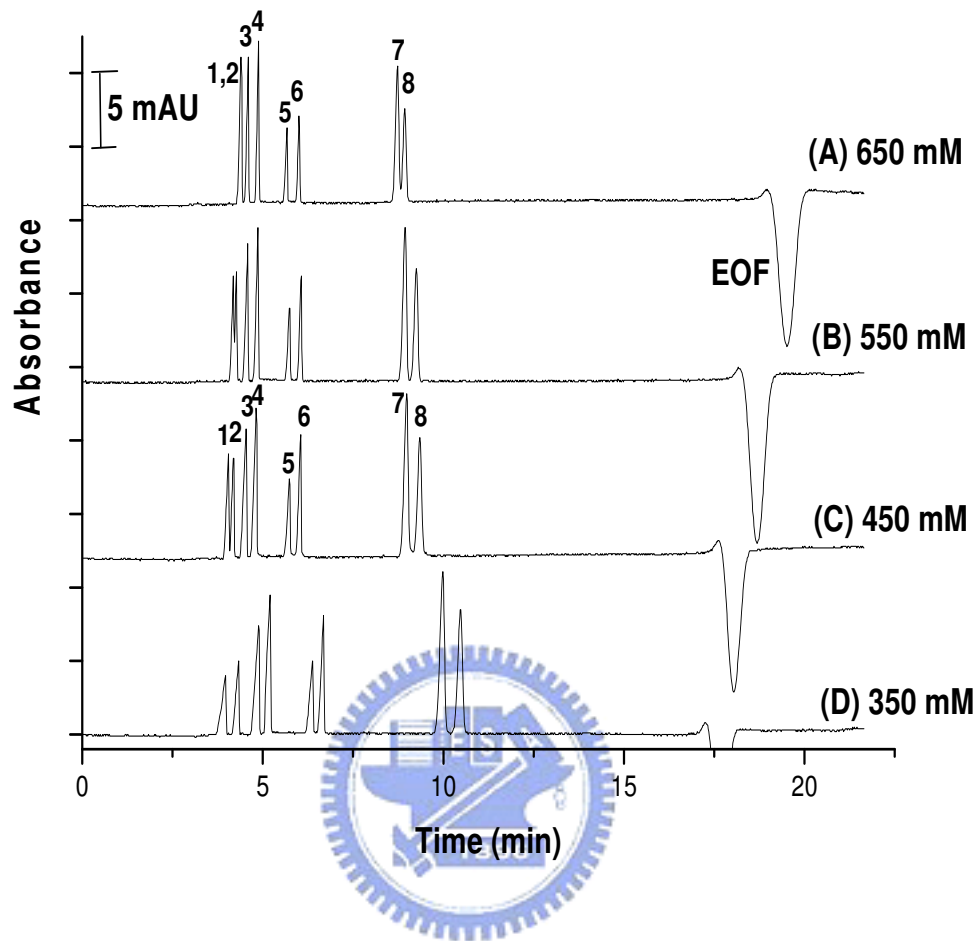


Fig.4-4 Effect of concentration of Oxalic acid on separation of benzodiazepines . Buffer : Oxalic acid/2.5 mM TEA. Solvent:methanol-acetonitrile (95:5,v/v) ; separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm; total length :37 cm; ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(100ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam

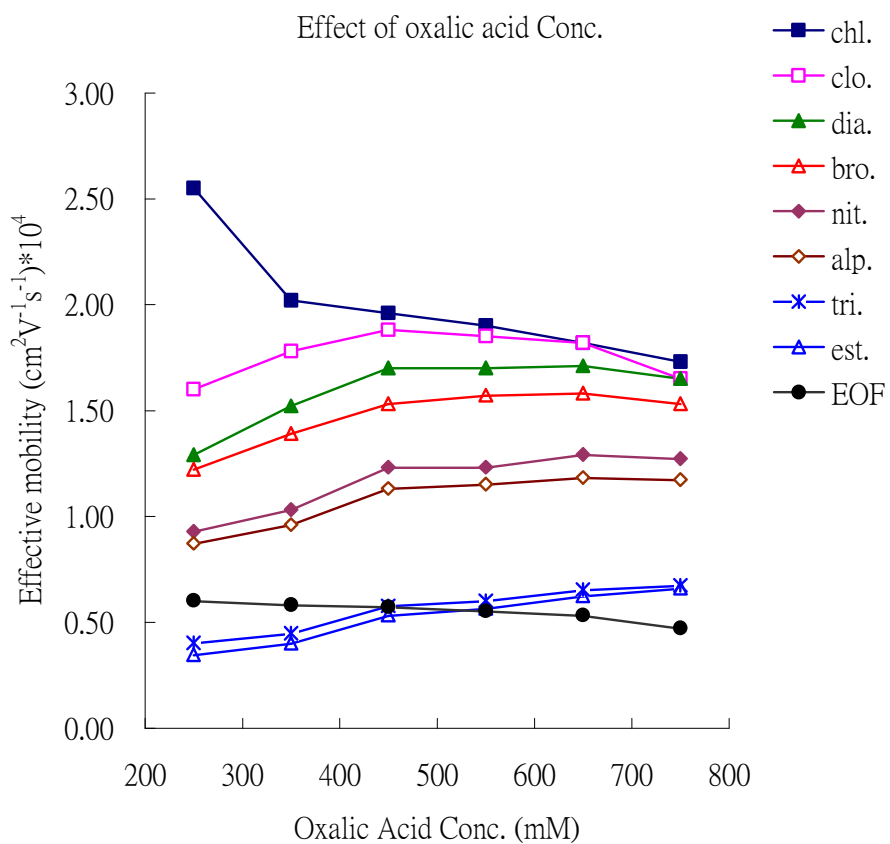


Fig.4-5 Variation of the effective mobilities of benzodiazepines as a function of Oxalic Acid concentration. Other conditions as described in Fig. 4-4.

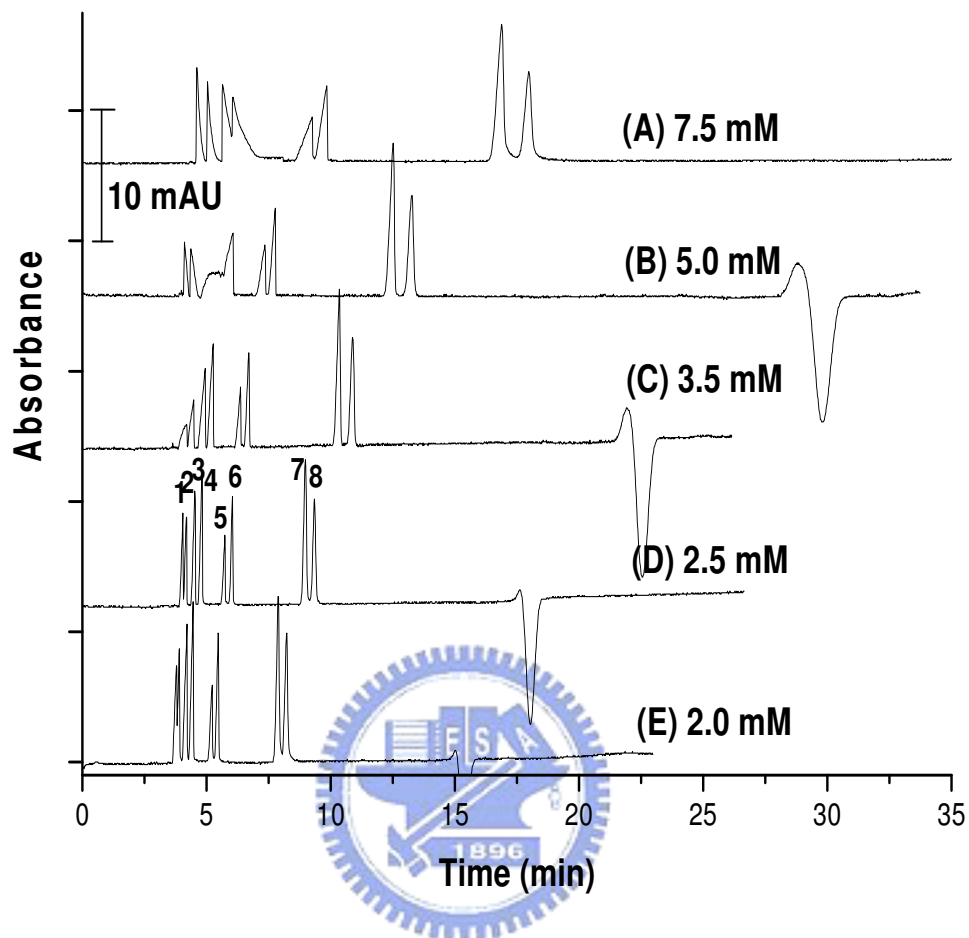


Fig.4-6 Effect of concentration of Triethylamine on separation of benzodiazepines. Buffer : 450mM Oxalic acid/ TEA. Solvent:methanol-acetonitrile (95:5,v/v) ; separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm; total length :37 cm; ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(100ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam

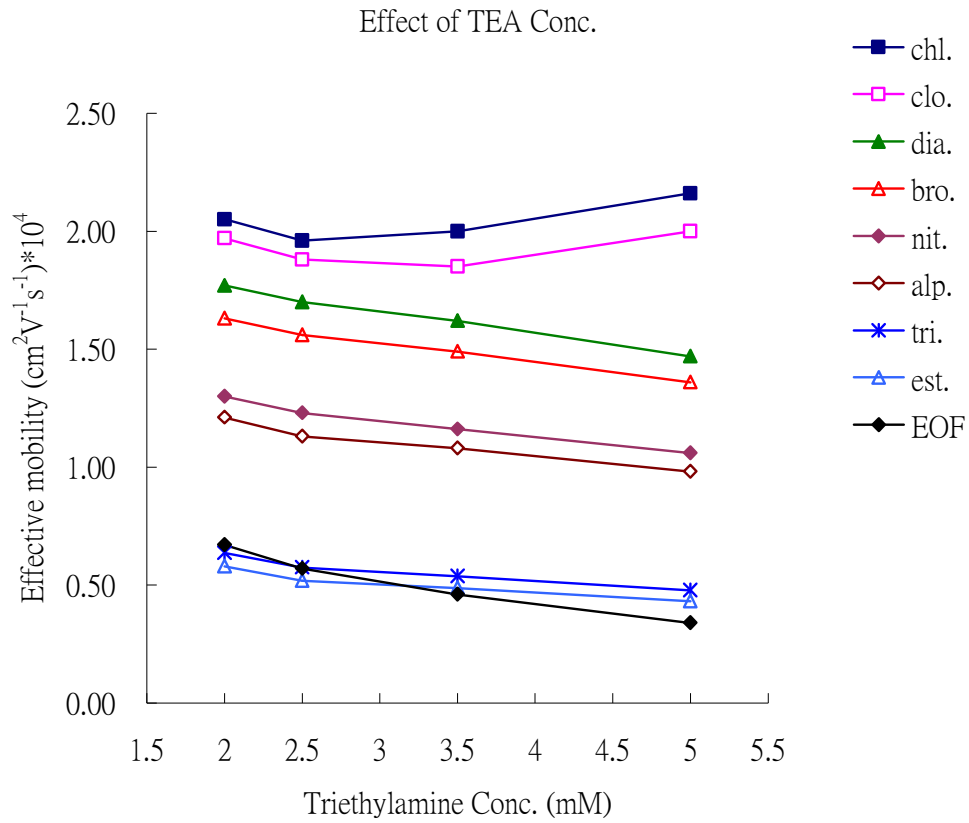


Fig.4-7 Variation of the effective mobilities of benzodiazepines as a function of Triethylamine concentration. Other conditions as described in Fig. 4-6.

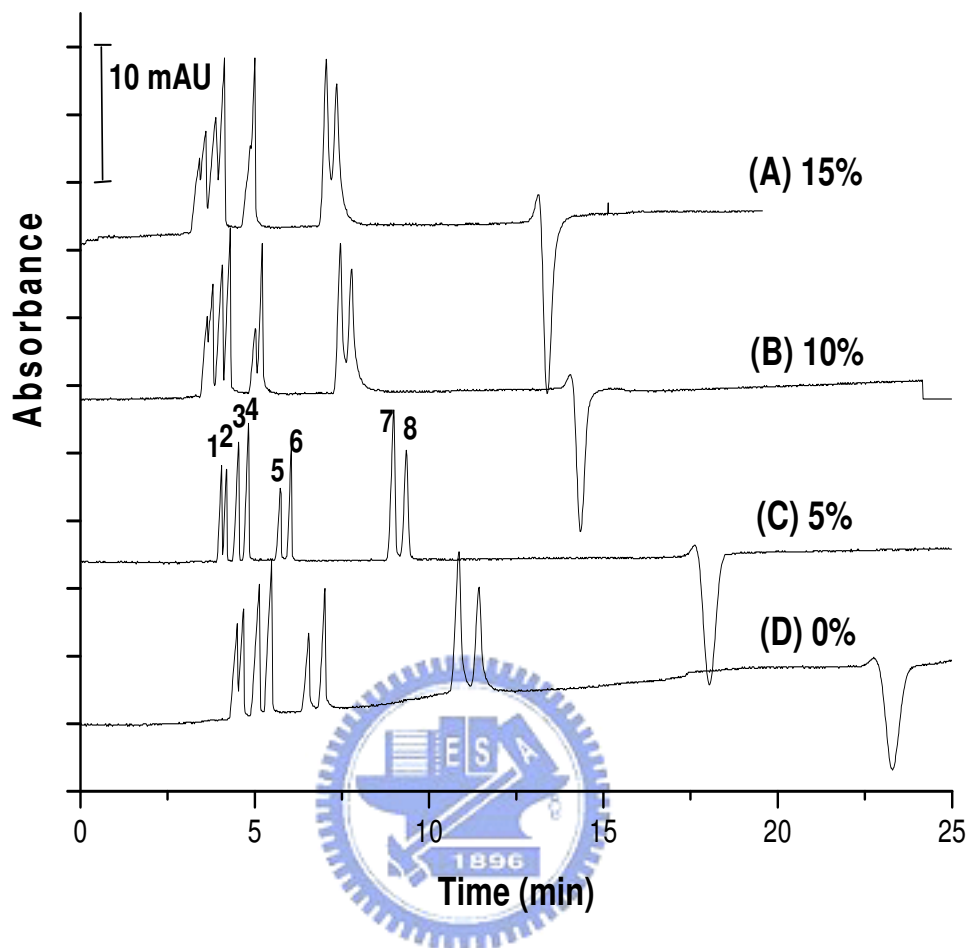


Fig.4-8 Effect of percentage of acetonitrile in buffer solvent (v/v) on separation of benzodiazepines . Buffer : 450 mM Oxalic acid/2.5 mM TEA. Solvent:methanol-acetonitrile ; separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm; total length :37 cm; ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(100ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam

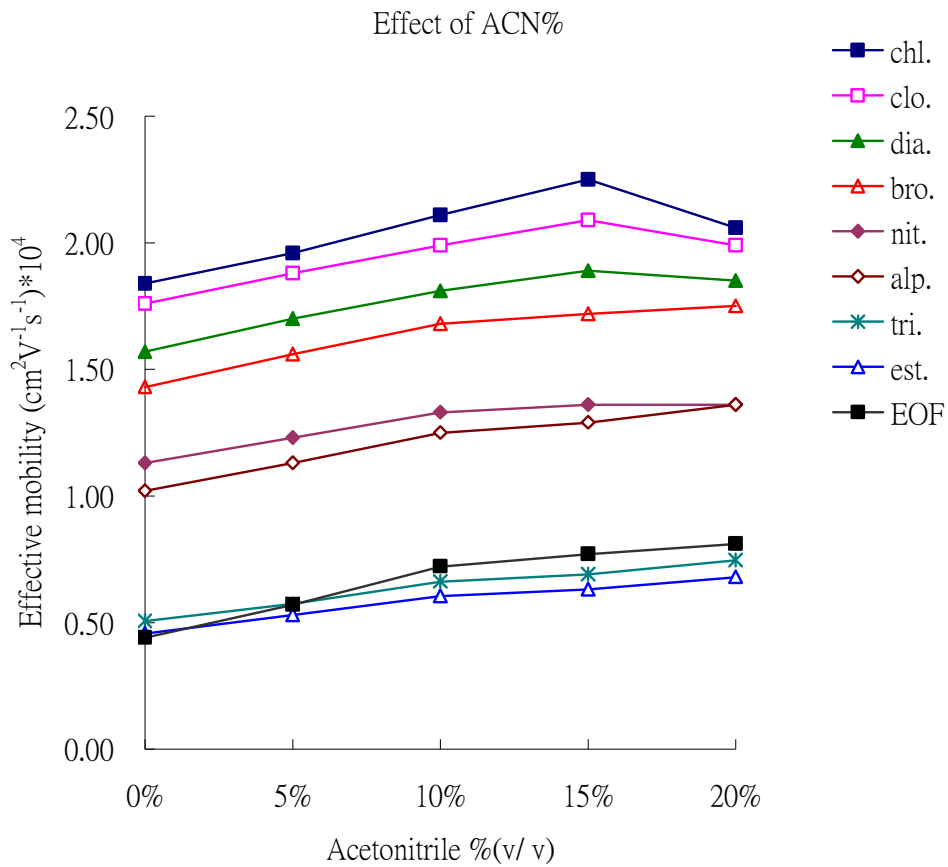


Fig.4-9 Variation of the effective mobilities of benzodiazepines as a function of percentage of acetonitrile in buffer solvent. Other conditions as described in Fig. 4-8.

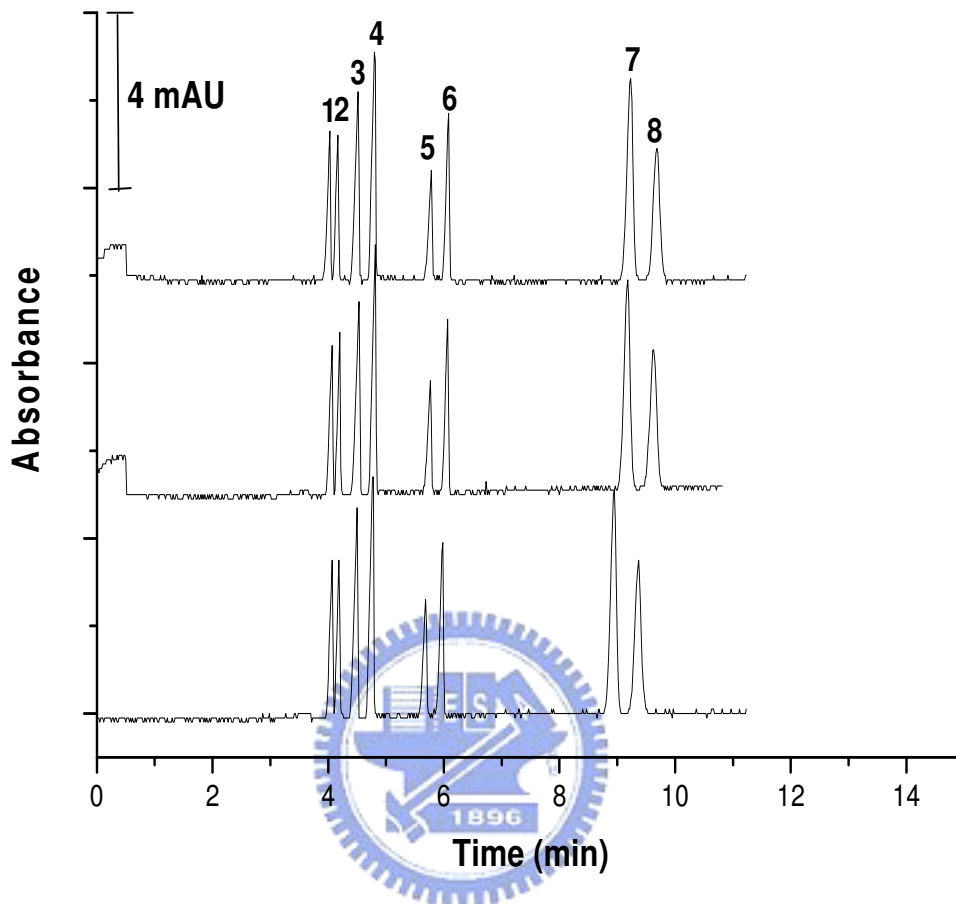


Fig.4-10 Electropherogram of a standard mixture of eight benzodiazepines . Buffer : 450 mM Oxalic acid/2.5 mM TEA. Solvent:methanol-acetonitrile (95:5,v/v) ; separative voltage : 18 KV ; injection time : 2s ; effect length : 30 cm.ID = 50 $\mu$ m ; On-line UV detection obtained at 230 nm. Analytes(50ppm) : 1.Chlordiazepoxide , 2.Clorazepate 3.Diazepam, 4.Bromazepam , 5.Nitrazepam , 6.Alprazolam, 7.Triazolam , 8.Estazolam



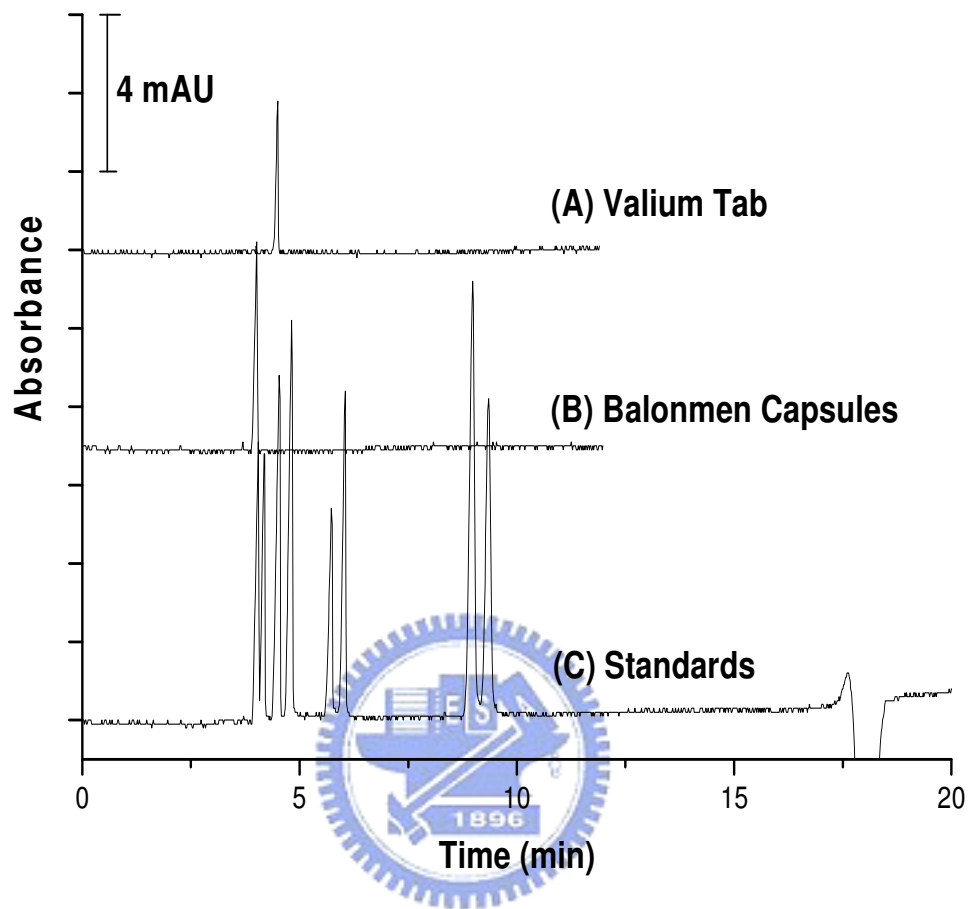


Fig.4-11 Typical electropherogram of Benzodiazepines for medicinal tablet. (A) Valium Tab (ROCHE Pharmaceutical Co.,LTD), (B) Balonmen Capsules (JEN SHENG Pharmaceutical Co.,LTD). Other conditions as described in Fig. 4-9.

## 五、毛細管電泳法線上濃縮技術介紹

### 5.1 緒論

毛細管電泳法(capillary electrophoresis, CE)主要分離機制是利用一外加電壓，使分析物在背景緩衝溶液中因其本身性質形成帶不同電荷、電量，而有不同的電泳移動速度，藉此達到分離的目的。由於毛細管電泳分析方法具有分離效率高、分析時間短、所需樣品及緩衝溶液少、操作方式簡便等優點。但因毛細管分離管柱光徑較短，致使選用線上光學偵測器進行偵測時，所能提供的偵測靈敏度較差，為了改善毛細管電泳法之偵測極限，常見的方法有改變毛細管 window 之設計(延長光徑:e.g. Z-shaped, multi-reflection, bubble cell)，及使用靈敏度較高的偵測器(e.g. electrochemical detector, laser induced fluorescence, amperometric detector)等。改變毛細管 window 設計與現行商用毛細管電泳儀硬體設備配合上困難點較高，在相關硬體設備上必須配合毛細管管徑變化而改變；而使用靈敏度較高的偵測器似乎要再投入較高的設備及試劑成本，在經濟考量上應用性低。於是乎在不改變毛細管電泳硬體設備配置下之線上樣品濃縮技術也就應運而生，簡言之，毛細管線上濃縮技術是利用緩衝溶液間電解質及相關組成之差異，進而影響分析物在毛細管之電泳遷移速度，致使樣品在不同溶液區帶間造成速度改變而進行堆疊濃縮(stackings)的一種技術。

毛細管電泳法中目前較常用之線上濃縮方法 [51,52]計有:1.電場放大樣品堆積法(Field-amplified sample stacking) 2.大體積樣品線上濃縮法(Large volume sample stacking) 3.緩衝溶液酸鹼值調整修飾濃縮(pH-Mediate stacking) 4.不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(pH junction) 5.掃掠式線上濃縮技術(Sweeping stacking techniques in MEKC)及 6.複合型掃掠式線上濃縮技術等多種。而本篇論文，在考量分析物(苯二氮平)與方法之相容性後，採掃掠式線上濃縮技術(Sweeping stacking techniques in MEKC)做為研究的重點，希望能藉此降低苯二氮平毛細

管電泳分析之偵測極限，以下依不同濃縮原理，簡單介紹各種常用於毛細管電泳之線上濃縮分析技術。

### 5.2 電場放大樣品堆積法(Field-amplified sample stacking,FASS)[53,54]

利用注入樣品區帶(sample zone)與緩衝溶液區帶(BSG zone)之間導電度之差異，形成分析物電泳遷移速度改變，以進行濃縮堆疊(stack)，如 Fig.5-1(A)所示:以分析物帶正電,先將緩衝溶液以壓力注入方式充滿整個毛細管，再注入一長段低導電度的樣品溶液，此時毛細管兩端加高電壓，根據歐姆定律得知，由於樣品區帶低導電度(高電阻)所感應的電場強度較強，正電分析物離子於樣品區帶內將快速朝負極移動，當進入緩衝溶液區帶，由於緩衝溶液區帶導電度增高(低電阻)，感應電場強度大幅減弱，分析物遷移速度在此時大幅減低，形成遷移速度改變(先快後慢)，於是正電分析物離子會在樣品區帶前方界面處(SB)濃縮堆疊。

相對於帶電分析物，不帶電之中性分析物也能夠在帶電微粒修飾下進行場放大濃縮，如 Fig.5-1(B)所示:中性分析物被帶負電微粒所影響，本身電泳方向朝出口端之負極移動，因樣品區帶低導電度(高電阻)所感應的電場強度較強，故分析物整體朝出口端遷移速率變小，在電滲流整體速率仍不變的情況下，含分析物的負電微粒，會在樣品區帶後方界面處(SB)濃縮堆疊。

### 5.3 大體積樣品線上濃縮法(Large volume sample stacking)[55]

大體積樣品線上濃縮法主要之原理，是利用分析物本身電泳遷移方向與電滲流遷移方向不同，彼此交互作用下讓分析物堆疊。在進一步描述大體積樣品線上濃縮之原理前，首先略述一下電滲流在整個濃縮過程中之變化情形：根據電滲流計算公式((8)式)所表示的意義，電滲流大小與期間整體區域之電場強度成正比。而大體積線上濃縮法在

操作上，必須利用電滲流推力，將樣品區帶異電性物質排出注入端之管外，通常樣品區帶的導電度會被設計成低導電區(高電場)，由於樣品區帶於濃縮過程中不斷被壓縮，而其中不斷排出樣品區帶，將使得整個毛細管高場區作用區域不斷地減少，如此電滲流推力在濃縮過程中將不斷地減小[55]。

由 Fig.5-2(A)所示:在充滿背景緩衝溶液(BGE)之毛細管管柱內，以壓力注入方式注入一大段樣品溶液(分析物恆帶負電)。通常為了避免帶負電分析物分子被推出管外，樣品區帶的導電度會低於背景緩衝溶液(高電場)。Fig.5-2(B)毛細管兩端加負向高電壓，濃縮操作時電滲流流向由出口端朝向入口側推移，分析物分子由於體積小具強負電荷，因此可以抵抗電滲流之推力而朝向毛細管出口側正極方向遷移，但當移動到接觸背景緩衝溶液(BGE)時，由於 BGE 屬於高導電低場區，負電分析物遷移速率立刻受到影響而減速並在樣品區帶與背景緩衝溶液之界面處形成堆積。Fig.5-2(C)在中性樣品基質不斷被排出的同時，由於低場區的作用範圍逐漸縮短，因此  $V_{eof(avg)}$  亦逐漸變小。Fig.5-2(D) 當中性樣品基質 (水分) 逐漸被排盡，在此情況下  $V_{eof(avg)}$ (EOF) 會是最小值，無法充分抑制住帶負電之分析物，此時已推積之負電分析物將受正電極之吸引而朝向出口端 (偵測器方向) 移動並進行分離，所有程序均無需更換電極方向。以上模式是適用於本身具強負電荷密度的分析物，整個濃縮分離過程電極正負向無須轉換，電滲流方向永遠與負電分析物電泳方向反方向之模式。

若分析物帶電傾向不是那麼明顯，即本身電泳遷移速率與電滲流遷移速率差異稍大，那麼僅需稍微修改一下操作程序，仍能適用於大體積線上濃縮技術。主要的不同是最後一個步驟必須將電極正負極顛倒讓電滲流(EOF)反向，改由入口端推向偵測器出口端。因為上述的情況回推至最後，雖然電滲流已降至最小，但仍大於負電分析物本身的電泳速度，電滲流如不反向恐將分析物完全排出管外，那將失去此

項濃縮操作的意義。故將電滲流反向將有助於已濃縮的分析物區帶導向出口偵測器端。

#### 5.4 不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(Dynamic pH junction)[56]

不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮的原理十分簡單，主要是與分析物本身電性轉變有關。通常帶電分析物並不會在任何情況下都保有電荷，電荷的強弱與性質極易受到外在環境 pH 值影響而改變(如:蛋白質、氨基酸、DNA 等)。電性一但改變或被中和，在電場中粒子的遷移速率一定會產生大幅影響;而不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮方式就是利用這個原理，讓分析物在兩個不同 pH 環境(緩衝溶液區帶)中遷移，藉此產生速度變化，以進行分析物之濃縮。

由 Fig.5-3 所示，可以看出整個方法之流程:由 Fig.5-3(A)我們假定分析物是含有氨基的藥物分子，它所存在之樣品基質(sample matrix)環境為 pH 2.0，此環境中氨基藥物分子將接受質子呈現帶正電荷之趨勢，背景緩衝溶液 (BGE) 為 pH 4.0 且添加陽離子界面活性劑 (CTAB)，修釋毛細管管壁後將使得電滲流方向逆轉。由 Fig.5-3(B)所示，將毛細管兩端加負向高電壓，此時正電分析物將受入口負極之吸引，抵抗電滲流方向之推力，致使朝出口偵測器方向的速度減緩;另樣品區帶之左側界面因接觸 pH 4.0 背景緩衝溶液，受其影響分析物失去正電荷呈現中性化，中性化後的分析物分子移動速度將與電滲流相同。茲因 pH 4.0 背景緩衝溶液移動速度大於樣品區帶，致使其影響逐漸擴及整個樣品區帶，分析物中性化後亦逐漸追上前方的正電分子產生濃縮堆疊效應。Fig.5-3(C)完成濃縮後之分析物分子將與 CTAB 微胞進行分配(partition)作用，以電動微胞層析(MEKC)方式達到分離的目的。

#### 5.5 緩衝溶液酸鹼值調整修飾濃縮(pH-Mediate stacking)[57]

緩衝溶液酸鹼值調整修飾濃縮 (pH-Mediate stacking) 是一種適用於高鹽類樣品基質的線上濃縮技術。在前述的幾項濃縮法(除 Dynamic pH junction 外)與後續幾項方法中都需要樣品基質屬低導電性的條件加以配合，以呈現最大的濃縮效率。樣品溶液中含有過高的高解離度之電解質是不利濃縮操作的，不幸的是通常生化性樣品大都含有高導電性之電解質，以致進行真實樣品檢測前，都需要前處理程序，以去除電解質之干擾。而 pH 調整修飾濃縮方法一般可在鹽類存在下進行線上濃縮操作。pH 調整修飾濃縮其原理簡言之：就是將強酸或強鹼以電泳移動的方式逐漸中和背景緩衝溶液(BGE)之弱酸弱鹼鹽，使之背景緩衝溶液得以中性化，降低導電度形成高電場區域，讓此區域的分析物分子電泳遷移速度加速，方法進行之程序如 Fig.5-4 所示。

Fig.5-4(A)所示，先將背景緩衝溶液注入充滿整個毛細管然後注上一大段樣品溶液(濃縮示意圖上方係電場強度示意圖)，由於分析物本身帶正電，故背景緩衝溶液屬弱酸性，類似醋酸及其共軛鹽所形成之緩衝溶液。Fig.5-4(B)以壓力注入方式注入一段強酸(HCl)。Fig.5-4(C)(D)完成注入強酸動作後，毛細管兩端加正向高電壓，此時強酸中的  $H^+$  離子體積小電荷強，受電場吸引後快速朝出口端移動， $H^+$  離子在移動的過程中會中和及抑制背景緩衝溶液中醋酸之解離，使被作用範圍之醋酸分子中性化而降低導電度，由 Fig.5-4(C)上方的電場強度示意圖，亦可看出被作用的部分已逐漸形成高電場，在高電場的作用下分析物遷移速度加快，追上前方的分析物分子達到濃縮的目的。Fig.5-4(E)完成濃縮後之分析物區帶，再依毛細管區帶電泳的分離機制進行分離。

## 5.6 掃掠式線上濃縮技術(Sweeping stacking techniques in MEKC)

一般而言適用掃掠式線上濃縮技術之時機是分析物具疏水性特性，我們即可讓各式各樣界面活性劑微胞之疏水端與其作用，使作用後的分析物分子產生遷移速度差，進而達成濃縮的效果。由於適用的

背景緩衝溶液環境不同，所選擇的界面活性劑電性各異，因此有許多堆疊濃縮模式被發展出來，令人目不暇給，以下謹介紹三種基礎掃掠式線上濃縮模式，作為此段濃縮原理之展現。

#### 5.6.1 使用帶電微胞執行後樣品區帶濃縮模式[58]

針對不帶電的中性分析物，我們選用負電微胞與其作用形成遷移速度改變。在此模式下控制緩衝溶液 (BGS) 為低 pH 值以充分抑制 EOF，並讓微胞受負向電場之吸引而掃掠過中性樣品區帶進行濃縮，如 Fig.5-5 所示。如 Fig.5-5(A) 先將酸性緩衝溶液(含負電微胞)充滿管柱，然後注入一段與 BGS 相同導電度之樣品區帶。如 Fig.5-5(B) 完成樣品注入後毛細管兩端外加負向高電壓，入口端為負極，出口端為正極，於是緩衝溶液中帶負電的 SDS 微胞分子將通過樣品區帶往出口端(正極)移動，其速度快於中性分子，中性分析物在樣品區帶後段(靠近入口端)被 SDS 微胞溶合後堆疊。Fig.5-5(C) 完成掃集後再依 MEKC 之分離機制進行分離。

#### 5.6.2 使用帶電微胞執行前樣品區帶濃縮模式[58]

與前項實驗相同我們在此亦使用負電微胞，所適用的分析物亦是不帶電之中性分析物，惟在此模式下我們要充分利用電滲流(EOF)作為我們分析物前進的動力，因此背景緩衝溶液(BGS)必須調整成鹼性或微鹼性以維繫一定程度的電滲流，而背景緩衝溶液 (BGS) 仍含有 SDS 負電微胞，主要目的則是扮演對抗電滲流並在樣品區帶前方(靠近出口端)捕集樣品流之角色，詳如 Fig.5-6 所示。

由 Fig.5-6(A) 將鹼性緩衝溶液(含負電微胞)充滿管柱，然後注入一段與 BGS 相同導電度之樣品區帶。如 Fig.5-6(B) 完成樣品注入後，毛細管兩端外加正向高電壓，入口端為正極，出口端為負極，中性分析物在樣品區帶中以等同於電滲流的速度向偵測器方向移動 (速度較

快)，當遭遇背景緩衝溶液帶負電之 SDS 微胞且微胞溶合後移動速度大幅減慢。Fig.5-6(C)完成掃集後再依 MEKC 之分離機制進行分離。

### 5.6.3 使用中性微胞執行後樣品區帶濃縮模式[59]

此法是使用於帶負電分析物，為了進一步造成遷移速度改變，在此選用中性微胞在鹼性之緩衝溶液下進行濃縮，相關的操作程序與前所示之”帶電微胞執行後樣品區帶濃縮模式”相近，僅電極方向相異，毛細管入口端為正極，出口端為負極，且在鹼性的狀況下，EOF 電滲流的方向由正極朝向負極，中性微胞移動方向及速度與電滲流相同，而負電分析物因電極同性斥力的關係朝負極移動速度減慢，當帶負電分析物受中性微胞溶合影響呈現中性化趨勢時，移動速度加快，而樣品區帶前方未受中性微胞作用部分，分析物仍帶負電移動速度較慢，整個樣品區帶因中性微胞溶合造成移動速度加快追上前方的負電分析物，以致於界面處濃縮堆疊，詳如 Fig.5-7 所示。完成掃集後再依 MEKC 之分離機制進行分離。

## 5.7 複合型掃掠式線上濃縮技術

有關複合型掃掠式線上濃縮技術係以：前述之掃掠式線上濃縮技術為核心，再結合其他線上濃縮技術，以獲得更高濃縮倍率之線上濃縮方法。有關此一概念最早係由 Shigeru Terabe 於2000年所提出陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法 (Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping)[60]肇始，隨後於2002年 Hian Kee Lee 以類似的想法加以修飾調整提出陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法(Anion-Selective Exhaustive Injection-Sweeping)[61]，有了二人觀念想法上之創新，促使掃掠式線上濃縮技術能更上層樓，整體放大倍率高達十萬倍，偵測極限直逼ppt之譜。以傳統的紫外光-可見光偵測器進行偵測，無添加螢光衍生試劑及其他輔助設備情況下，能達此一境



界誠屬不易，筆者認為此觀念之創舉堪稱毛細管電泳線上濃縮法之楷模。以下僅介紹此二法之濃縮原理。

#### 5.7.1 陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法[60]

以掃掠式線上濃縮為骨架，於使用界面活性劑溶合分析物之前，先行設計安排一個能適合陽離子執行場放大濃縮（電動注入）之環境，針對陽離子分析物作初期濃縮，然後再以陰離子微胞溶合分析物方式作掃掠式濃縮，以收放大相乘之效，此為複合型掃掠式線上濃縮技術之精髓。以下依濃縮示意圖相關程序逐步解析：

如 Fig.5-8(A)所示，先將非微胞酸性緩衝溶液充滿毛細管管柱，再注入一大段較高離子強度酸性緩衝溶液，高離子強度酸性緩衝溶液在此之目的，是為了營造管柱前端低電場環境，以備未來攔截滯留大量電動注入陽離子之用；而最後注入一小段純水，其目的則與前述原因相反，反而是希望能利用最前端的高電場作用，能於未來電動注入時大量引入陽離子分析物。如 Fig.5-8(B)有了前述精心而積密之安排，接下來將配製於低導電度基質之陽離子分析物，加正向電壓，以電動注入方式注入毛細管，此時位於低導電度基質之正電荷分析物將受電場力之驅使，而快速通過高電場區之純水區域，並停留在低電場區之酸性緩衝溶液區帶中，完成初期濃縮之目的(詳如 Fig.5-8(C))。如 Fig.5-8(D)後續程序就是負電微胞登場之時刻，為了避免負電微胞導入毛細管時遭遇較大的阻抗，我們先前的非微胞酸性緩衝溶液對於電滲流起了一定程度之抑制作用。於是在做法上我們更換緩衝溶液瓶(更換電極正負向)，以施加負電壓之方式導入 SDS 負電微胞，讓微胞以掃掠濃縮方式通過陽離子分析物堆積層。如 Fig.5-8(E)完成濃縮程序後分析物再依 MEKC 分離機制進行分離。走筆至此不禁對最早發現 MEKC 分離機制之 Terabe 教授心生敬仰之意，方法中每一程序均寓含深意，邏輯推演之精妙無與倫比，實為修習毛細管電泳之後進樹

立最佳典範。

### 5.7.2 陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法[61]

有關 Hian Kee Lee 所提之陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法，其觀念是以前述方法為藍本，在程序上加以修飾調整以適用於陰離子分析物，以下謹依所附之濃縮示意圖 Fig.2-9 進行濃縮方法之介紹：如 Fig.5-9(A)與前法第一步驟相同，均先注入非微胞酸性緩衝溶液以充滿毛細管，然後再注入一大段純水，以建立未來加電壓時毛細管中高電場之區域。如 Fig.5-9(B)(C)以施加負電壓之方式導入陰離子分析物，而負電荷之分析物將快速通過高電場區的水，而停留在低 pH 值之非微胞緩衝溶液，由於陰離子分析物易受酸性溶液抑制解離而形成中性分子進而達到低速滯留之目的，故此法不似前法，中間還要加注一段高離子強度電解質，以作為滯留離子性分析物之用。Fig.5-9(D)(E)(F)完成初期濃縮後，後續所有程序即與前法相同，均是以施加負電壓之方式導入 SDS 負電微胞，讓微胞以掃掠濃縮方式通過陽離子分析物堆積層，以收放大相乘之效。

### 5.8 掃掠式線上濃縮法之前樣品區帶濃縮模式數學公式

由 Terabe 教授[58]所推演的公式可清楚看出掃掠式線上濃縮法適用於與微胞有良好親和性的分析物。數學模式亦有前樣品區帶濃縮模式與後樣品區帶濃縮模式二種，由於本論文係以陽離子微胞執行苯二氮平藥物掃掠式線上濃縮法之研究，其推積模式上與前樣品區帶濃縮模式相同，故謹列舉相關數學公式以供參考之用。

如 Fig.5-6 或 Fig.6-1 所示，若被微胞掃集後樣品區帶之長度定為  $l_{\text{sweep}}$ ，則

$$I_{\text{sweep}}=d(a_c)-d(mc_c) \quad (22)$$

$a_c$  與  $a_a$  分別代表位在正極端與負極端的分析物樣品區帶邊界， $mc_c$  與

$mc_a$  則分別代表位於正極端與負極端緩衝溶液中界面活性劑區帶之邊界。當完成掃集  $a_a$  接觸到  $mc_c$  時， $mc_c$  所移動之總距離為  $[d(mc_c)]$  而  $a_c$  所移動之總距離為  $[d(a_c)]$  並以相關變數進一步展開

$$d(mc_c) = V_{mc} t_{sweep} \quad (23)$$

$$V_{mc} = V_{ep}(mc) + V_{EOF} \quad (24)$$

$$d(a_c) = V_a(MEKC) t_{sweep} \quad (25)$$

$$V_a(MEKC) = V_{ep}^*(a) + V_{eof} \quad (26)$$

$V_{mc}$ ：微胞的電泳移動速度

$V_a(MEKC)$ ： $a_c$  與微胞結合後複合物的電泳移動速度

$V_{ep}(mc)$ ：微胞本身的移動速度

$V_{ep}^*(a)$ ： $a$  受微胞影響後有效電泳移動速度

$t_{sweep}$ ：掃集過程時間

$$V_{ep}(mc) = \mu_{ep}(mc) E \quad (27)$$

$$V_{ep}^*(a) = [k/(1+k)] \mu_{ep}(mc) E \quad (28)$$

$$t_{sweep} = l_{inj} / (V_{eof} - V_{mc}) \quad (29)$$

$$V_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad (30)$$

$\mu_{ep}(mc)$ ：微胞的電泳遷移率

$E$ ：電場強度

$k$ ：容量係數(capacity factor)為分析物分布於微胞與動相中的莫耳比例

$\mu_{EOF}$ ：電滲流的電泳遷移率

我們將上面各式加以整合可得到

$$I_{sweep} = I_{inj} [1/(1+k)] \quad (31)$$

由上式可得知，當  $I_{inj}$  固定時，分析物的容量係數( $k$ )(capacity factor) 越大，則  $I_{sweep}$  會變得越短，所得之濃縮效果越好；當  $I_{inj}$  增加時，被

掃集的樣品區間就越長，所能進入毛細管內分析的樣品量就越大，其偵測極限就越低。

另有關掃掠式線上濃縮法之放大倍率計算，參考相關文獻後 [58,59,60,61]作以下之定義：

$$SFE_{\text{height}} = (h_{\text{sweeping-CZE}} / h_{\text{conventional-CZE}}) \times \text{dilution factor} \quad (32)$$

$SFE_{\text{height}}$  : peak height 訊號值放大倍率

$h_{\text{sweeping-CZE}}$  : 經掃掠式線上濃縮操作之分析物 peak height 訊號值

$h_{\text{conventional-CZE}}$  : 未經線上操作之分析物 peak height 訊號值



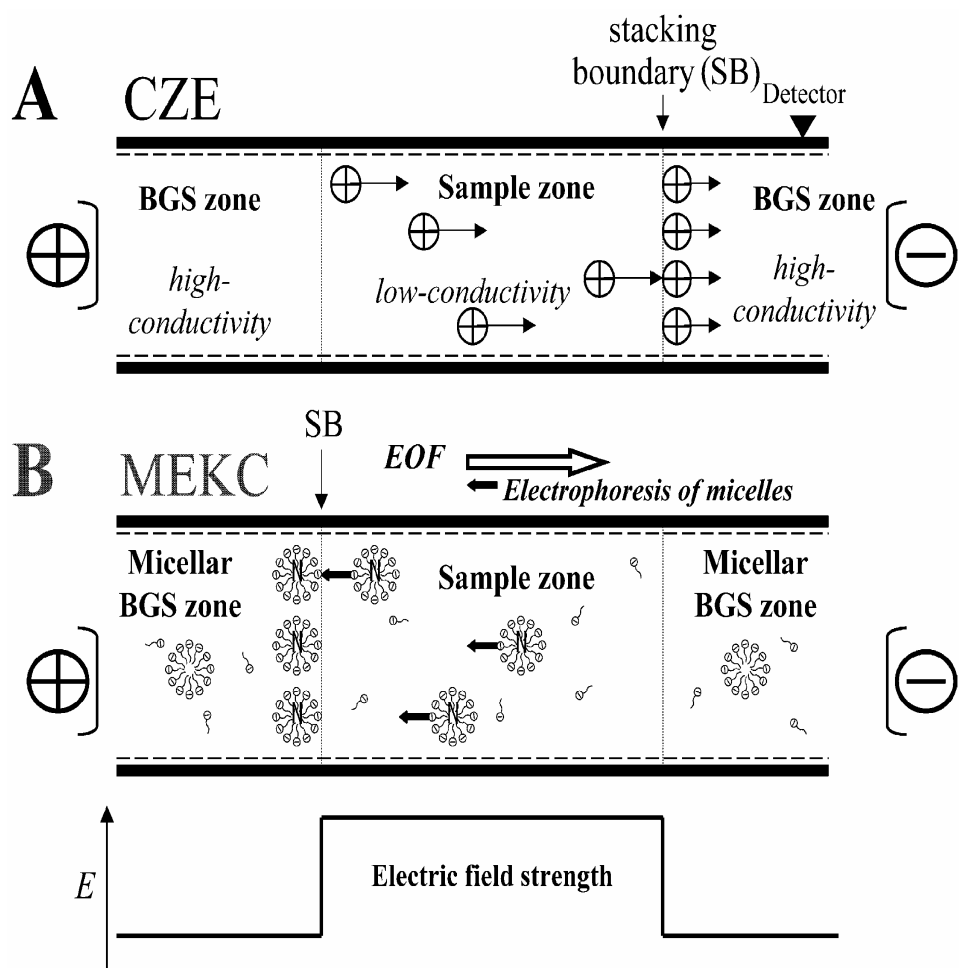
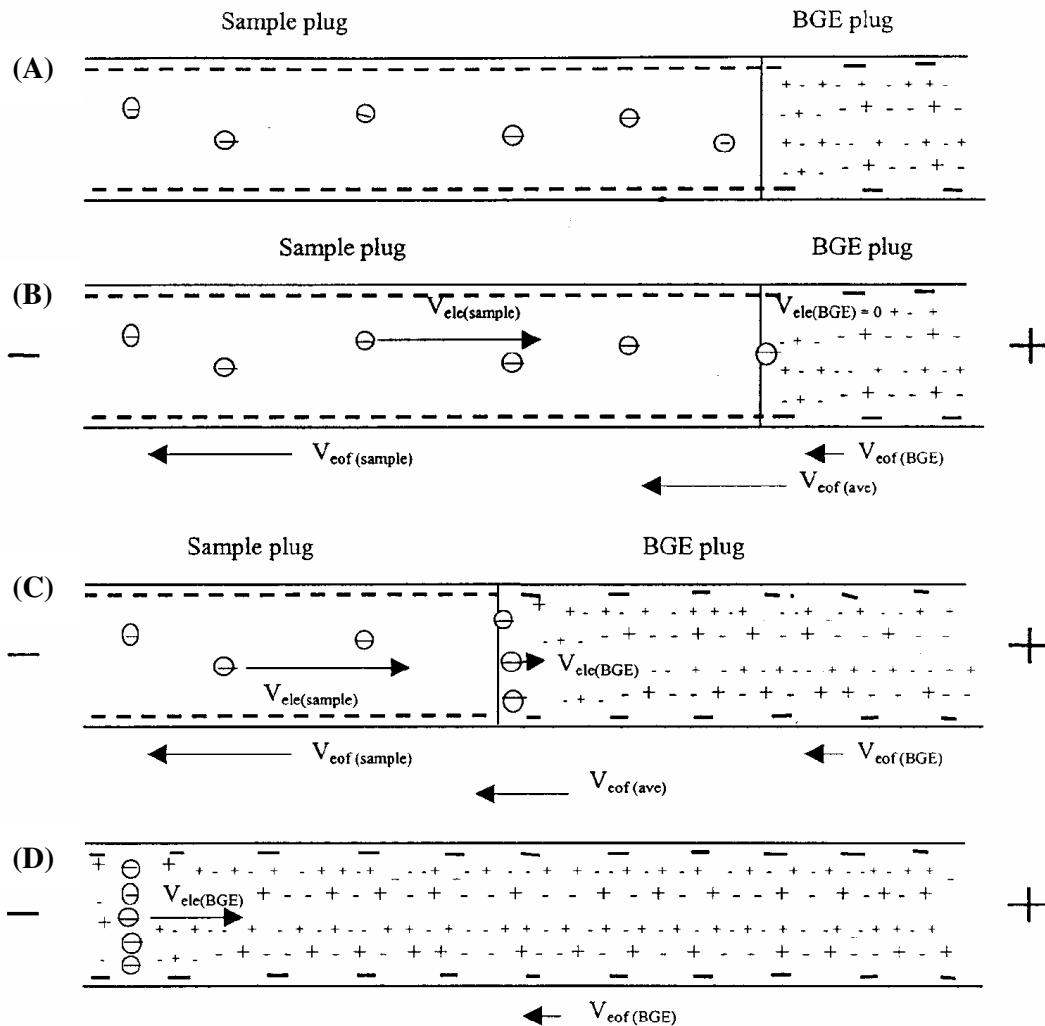


Fig.5-1 Schematic diagram of the principle of sample stacking (FASS) in CZE (A) and MEKC (B). [54]



Note:  $V_{ele(sample)}$  Electrophoretic mobility of anion in the sample plug  
 $V_{ele(BGE)}$  Electrophoretic mobility of anion in the BGE plug  
 $V_{eof(sample)}$  EOF in the sample plug  
 $V_{eof(BGE)}$  EOF in the BGE plug  
 $V_{eof(ave)}$  Average EOF in the capillary

Fig.5-2 Schematic illustration of the matrix removal and stacking of small anions in acidic buffer: (A) injection of extremely large volume of sample containing small anions by pressure; (B) start of anions stacking and removal of aqueous sample plug under negative voltage; (C) process of anion stacking and removal of aqueous sample plug; (D) complete removal of aqueous sample plug and start of separation under negative voltage. [55]

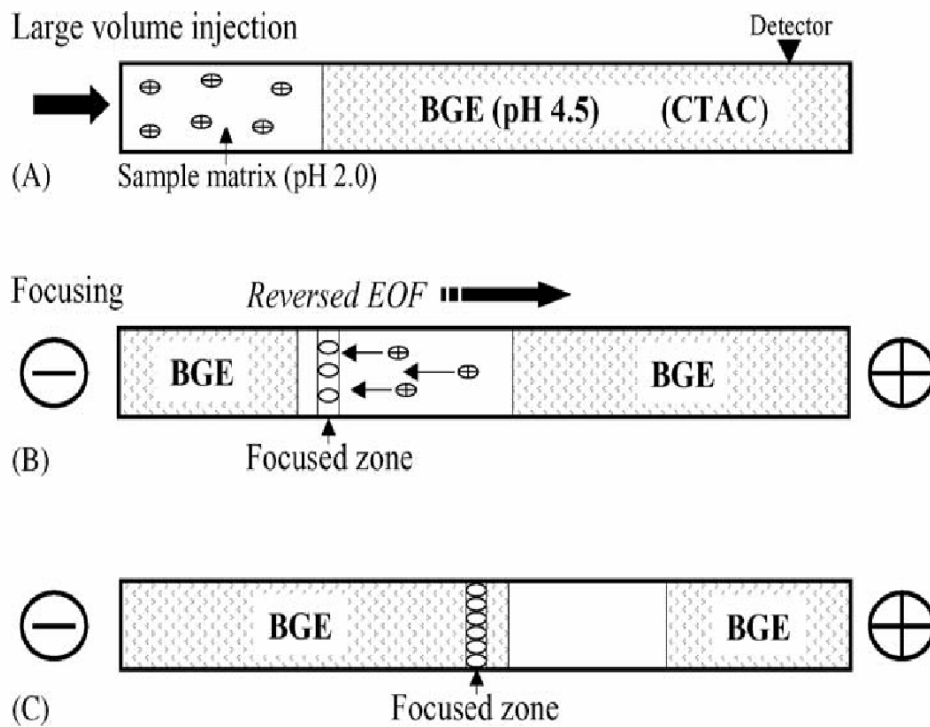


Fig.5-3 Schematic diagrams of a dynamic pH junction model: (A) capillary is conditioned with a BGE (pH 4.5), then the analyte prepared in sample matrix (pH 2.0) is injected by pressure for a much longer time compare to normal injection; (B) focusing of the analyte occurs because of its mobility changes in the two zones (BGE and sample zones); (C) focusing analyte zone migrates independently of the sample matrix. [56]

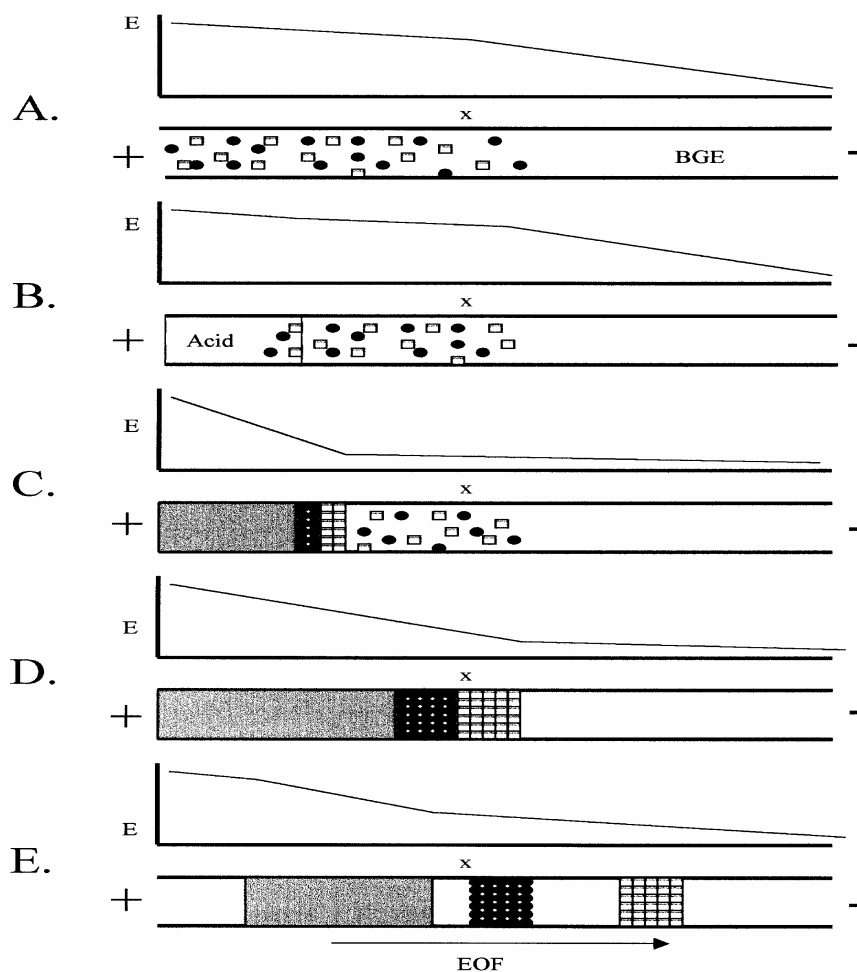


Fig.5-4 Schematic diagrams of pH-mediated stacking model. : (A) A sample in a high ionic strength sample matrix is injected electrokinetically. (B) Next a plug of strong acid is electrokinetically injected behind the sample plug. (C) As the separation voltage is applied the strong acid titrates the sample zone to neutral, creating a high resistance zone, the field strength will get bigger. (D) The acid titrates the entire sample zone and the analytes are stacked into narrow bands at the boundary of the titrated zone and the BGE. (E) The electrophoretic separation proceeds through the remainder of the capillary. [57]



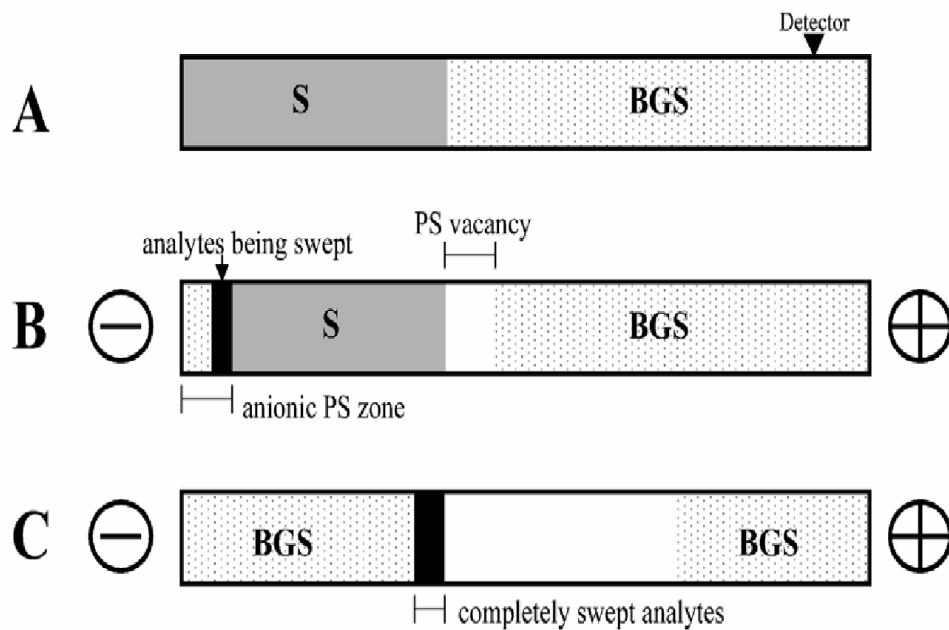


Fig.5-5 Schematic diagram of the principle of sweeping under acidic condition. [58]



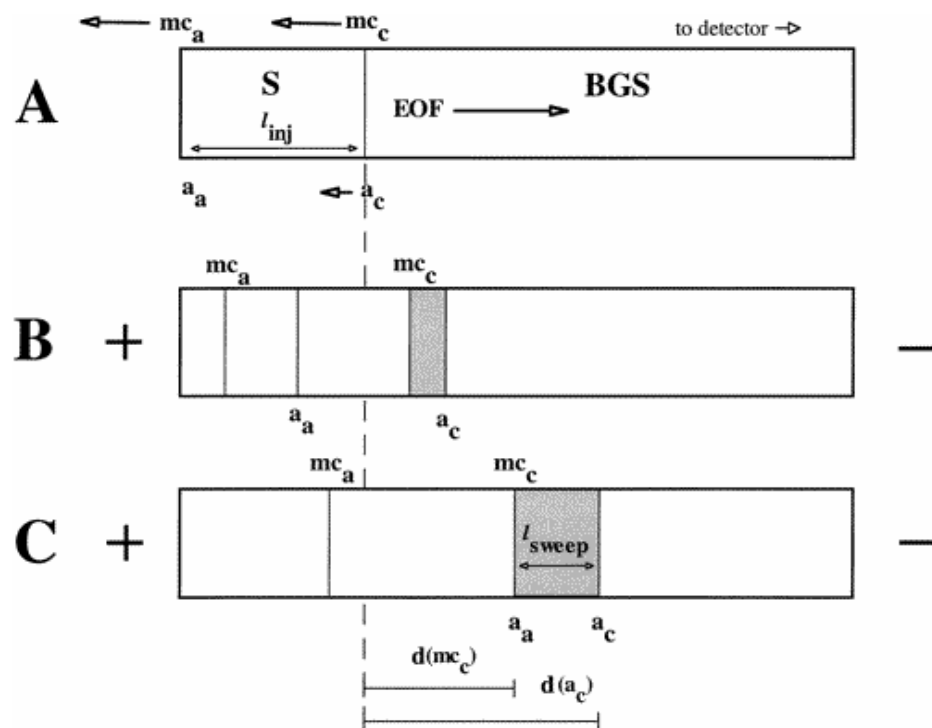


Fig.5-6 Schematic diagram of the principle of sweeping under basicity condition.(A) Starting situation, injection of S prepared in a matrix having a conductivity similar to that of the BGS; (B) application of voltage at positive polarity, micelles emanating from the cathodic side sweeping analyte molecules; (C) the injected analyte zone is assumed completely swept. [58]

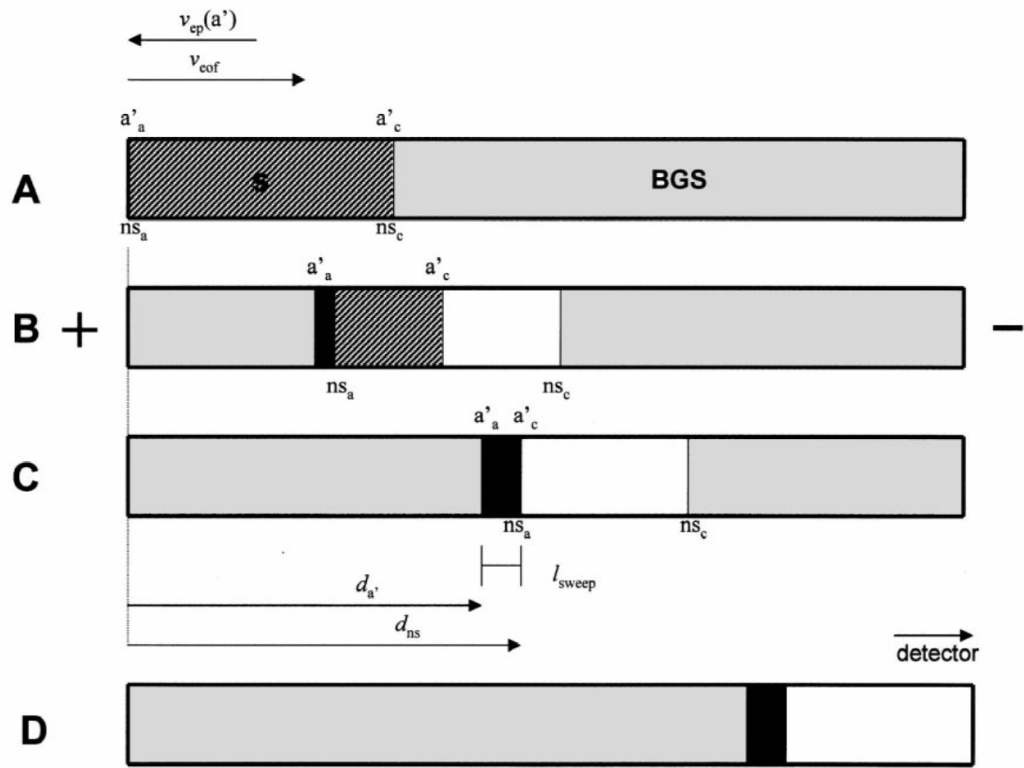


Fig.5-7 Sweeping of a charged analyte in electrokinetic chromatography with a neutral pseudostationary phase. [59]

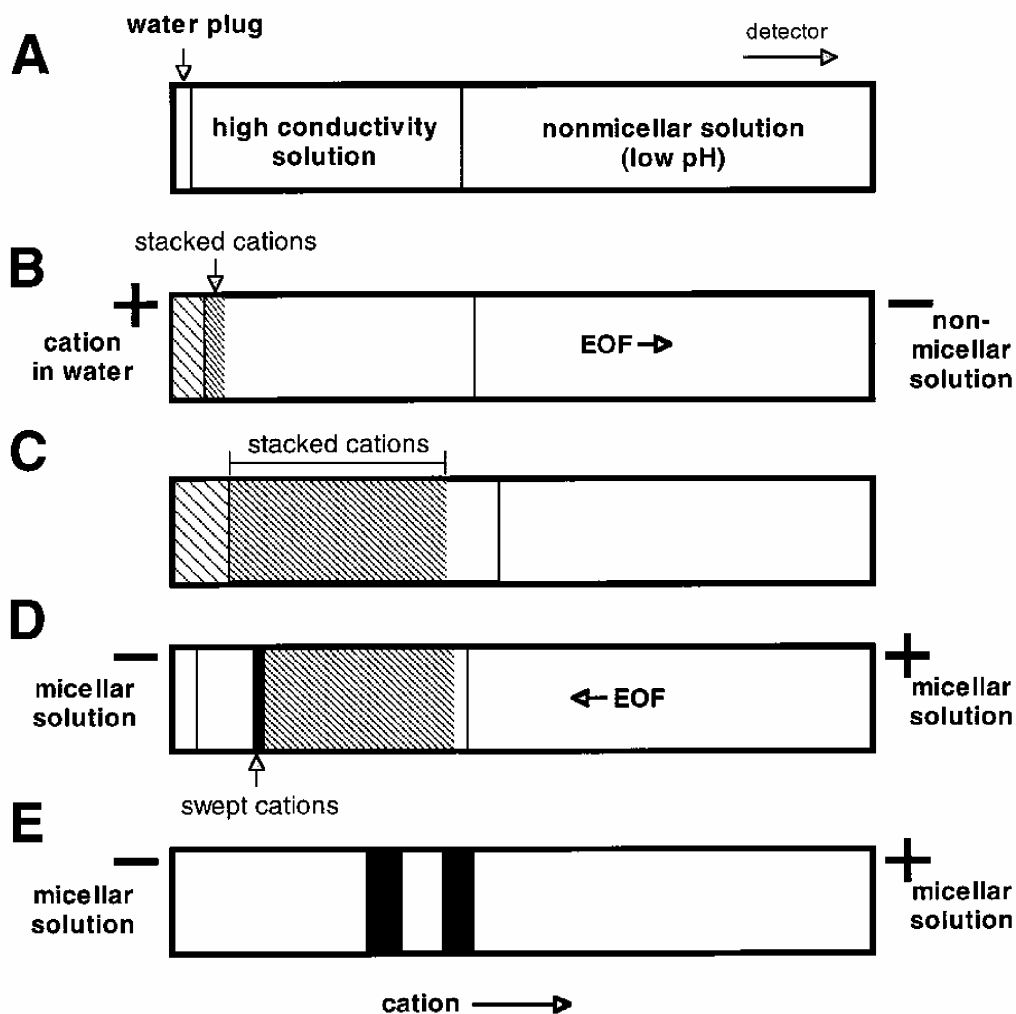


Fig.5-8 Schematic diagrams of the CSEI-sweep-MEKC model: (A)starting situation, conditioning of the capillary with a nonmicellar background buffer, injection of a high-conductivity buffer void of organic solvent, and injection of a short water plug; (B) electrokinetic injection at positive polarity (FESI) of cationic analytes prepared in a low-conductivity matrix or water, nonmicellar background buffer found in the outlet end, cationic analytes focus or stack at the interface between the water zone and high-conductivity buffer void of organic solvent zone; (C) injection is stopped and the micellar background solutions are placed at both ends of the capillary, shows the profile of the analytes after FESI; (D) application of voltage at negative polarity that will permit entry of micelles from the cathodic vial into the capillary and sweep the stacked and introduced analytes to narrower bands; (E) separation of zones based on MEKC. [60]

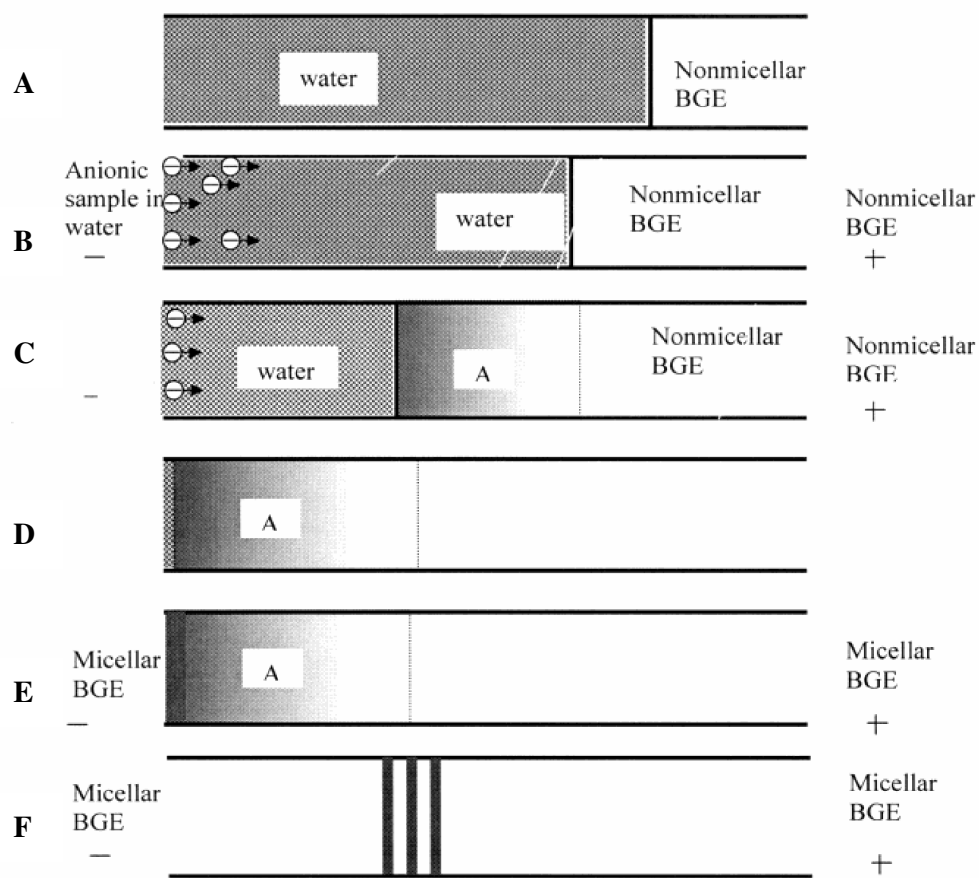


Fig.5-9 Schematic diagrams of the ASEI-sweeping-MEKC model.:  $\ominus$  represents anion; (A) after filling the capillary with low-pH nonmicellar electrolyte, a water plug is injected into the capillary to provide the high electric field at the injection point; (B) negative voltage (-20 kV) is applied with positive electrode at the capillary outlet, and the sample is electrokinetically injected into the capillary. Due to the high electric field, the anions move rapidly toward the outlet. At the same time, the water plug is moving out of the inlet of the capillary; (C) when the sample anions enter the boundary of water and low-pH BGE, they are neutralized and cease moving. A focused sample zone is formed (shaded area A); (D) injection is halted and both vials at inlet and outlet are changed to low-pH micellar BGE; (E) negative potential -20 kV is applied to permit the micelles to enter the capillary and sweep the focused sample zone as a narrow band. The water plug continues to move out of the inlet; (F) subsequent separation is achieved under MEKC mode. The dark bands represent three components being separated. [61]

## 六、利用掃略式線上濃縮毛細管電泳法分析苯二氮平類藥物

### 6.1 濃縮分離原理

先前苯二氮平類藥物利用非水相毛細管電泳進行分析時，雖然以有機溶劑取代水可增進分析物溶解度，並克服帶正電分析物吸附管壁的問題，使分離板數大幅降低增進分離效率。但仍有一般傳統毛細管偵測極限過高的問題，為了進一步降低毛細管電泳方法之偵測極限，由有關的文獻報導中發現尚有許多選擇[61]，在不擴充及變更硬體設備的情況下，利用毛細管內不同電解質區帶間組成差異所發展成的相關線上濃縮方法似乎是不錯的選擇。其中對中性分析物而言，掃略式線上濃縮技術就是兼具分析物濃縮集中與分離解析能力的好方法。方法中主要的靈魂人物是添加在緩衝溶液中各式各樣界面活性劑，由於部分界面活性劑本身帶有電荷在電泳中與電滲流遷移的速度不同，於是分析物在流經不同的電解質區帶時產生遷移速度差異，而遷移速度改變正是毛細管內部產生分析物集中的主要原因。例如：在正向電泳中我們使用陰離子界面活性劑，由於陰離子與毛細管出口端電極電性相同而相斥，故向出口端移動的速度要比中性分析物慢得多，因此中性分析物在樣品區帶時遷移速度與電滲流相近，但是開始與負電性微胞接觸後，藉由微胞融合作用速度變慢，分析物行進速度由快變慢，故在樣品區帶邊緣與負電微胞接觸處將隨電泳行進方向逐漸堆積濃縮。

在本次實驗中所採行的方案亦是與上述情形相似，由於苯二氮平分子具一定程度的疏水性，且於微鹼性或強鹼性環境中不帶電，故不易配合實施常見的場強放大 (FASS) 與大體積線上濃縮 (LVSS) 等技術，因此選用疏水性微胞作為分離時的假靜相 (Pseudo-Stationary Phase) 並配合高濃度微胞含量進行掃略式線上濃縮較為適當，本實驗經過一連串的界面活性劑符合性測試後發現，以陽離子界面活性劑

CTAB(hexadecyltrimethyl-ammoniumbromide)與苯二氮平親合性最好，在鹼性四硼酸鈉/氫氧化鈉緩衝溶液下利用 CTAB 可對苯二氮平可做較高倍率的濃縮，且九種分析物的分離能力也不錯，相關的濃縮機制模式圖見 Fig.6-1，首先讓乾淨的毛細管內充滿含有高濃度 CTAB 界面活性劑之鹼性緩衝溶液，然後再注入一長段(高注射秒數)樣品區帶，其中樣品區帶與緩衝溶液之離子濃度彼此間必須相互配合，以尋求較佳之掃集時間，因為陽離子吸附於負電管壁，使得電滲流移動方向反向(由負極朝向正極)，因此當我們施加負向高電壓(由負極到正極)，此時樣品區帶內的中性苯二氮平分子便隨著電滲流的驅動快速朝向出口端的正極泳動，而處於緩衝溶液內的 CTAB 微胞因電性相斥的關係速度變慢並由區帶邊界逐漸侵入樣品區帶中；當中性苯二氮平分子接觸到 CTAB 微胞時，即因與微胞溶合使其本身泳動速度大幅減慢，由此造成遷移速度改變，而讓分析物堆疊集中，因電滲流作用的關係，在樣品濃縮的過程中整個樣品區帶還是不斷地往出口端遷移，所有掃集過程由界面活性劑之  $m_c$  界面通過樣品區帶(S)至與樣品  $a_a$  界面重合即告結束，其歷經的時間稱為掃集時間( $t_{\text{sweeping}}$ )。而我們在緩衝溶液中添加有機溶劑(甲醇)主要是調整溶液相與微胞相之極性差異增進對分析物的分離解析能力。

## 6.2 儀器裝置

毛細管電泳儀是使用貝克曼公司 (Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA)所製造之 P/ACE 2000 系列進行實驗，資料分析則利用視窗版訊華軟體(訊華股份有限公司, Taipei, Taiwan)予以處理，內徑 50  $\mu\text{m}$ ，外徑 360  $\mu\text{m}$ ，總長 57 cm(至偵測窗口為 50 cm)之二氧化矽毛細管 (fused-silica capillary, polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ, USA)作為分離管柱，毛細管外層塗附之聚醯亞胺 polyimide(PI)以火焰灼燒 0.5 cm，再以乙醇溶劑輕微擦拭灼燒處，去

除加熱碳污以形成偵測窗口。管柱溫度控制在 25°C 下。分離電壓為-25 kV。樣品注射以壓力注射(0.5 psi)方式導入毛細管中。所使用之偵測器為 P/ACE 2000 內建之紫外光-可見光(UV-Visible)偵測器，偵測波長 230 nm。實驗室所用的去離子水係由 Milli-Q 水系統 (Millipore, Bedford, MA, USA) 所提供。

### 6.3 試藥

所有試藥均為分析級。苯二氮平類標準品九種包括氯二氮平 (chlordiazepoxide)、氯氮平酸鹽 (clorazepate)、安定 (diazepam)、溴西洋 (bromazepam)、硝西洋 (nitrazepam)、阿普唑他 (alprazolam)、三唑他 (triazolam)、舒樂安定 (estazolam)、氟硝西洋 (flunitrazepam)、四硼酸鈉 (sodium tetraborate) 皆購自 Sigma Chem.Co.(St.Louis, MO, U.S.A.)。CTAB(hexadecyltrimethyl-ammoniumbromide) 購自 Merck-Schuchardt 公司 (Schuchardt, 8011 Hohenbrunn bei München)。氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、鹽酸 (HCl) 皆購自 Fluka 公司。甲醇 (methanol)、乙醇 (ethanol) 皆購自 Merck 公司。苯二氮平分析物結構詳見 Fig.4-1。

### 6.4 實驗方法

#### 6.4.1 新的毛細管調態

將一支量好適當的長度，並用石英切片 (cutter) 裁剪毛細管，在一端開口 7.0 公分處做一標記，利用打火機將標記處外圍之聚醯亞胺 (PI) 灼燒，以拭鏡紙沾取乙醇擦拭一透明窗口，做為偵測 UV-Visible 吸收的窗口，將燒好窗口的毛細管裝入 P/ACE 2000 卡匣 (Cartridge) 中使用。為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化並穩定，先以 1.0 N 之鹽酸水溶液沖洗 30 分鐘，以去除管壁油污，然後以純淨的去離子水沖洗 10 分鐘，去除殘留的鹽酸，之後再以 1.0 N 之氫氧化鈉水溶液活化



沖洗毛細管內壁之矽醇基 30 分鐘，最後再以去離子水沖洗管內壁 30 分鐘後備用。

#### 6.4.2 實驗前、後毛細管的處理

先以 0.1 N HCl 沖洗 3 分鐘，再以太離子水沖洗 3 分鐘去除殘留的 HCl，然後再以實驗所使用緩衝溶液沖洗 4 分鐘，使管柱內壁矽醇基充分與緩衝溶液作用達到平衡，即可注入樣品溶液進行樣品分析實驗。完成電泳分離後，由於緩衝溶液含有高濃度的界面活性劑，處理不慎容易發生阻塞毛細管的情況。因此每次完成電泳分離後應立即以甲醇溶劑沖洗 5 分鐘；另每日實驗結束保存管柱前必須再沖洗甲醇溶劑 20 分鐘及去離子水 20 分鐘，以徹底清除緩衝溶液中之界面活性劑，延長分離管柱使用壽命。

#### 6.4.3 苯二氮平標準溶液之配製

苯二氮平標準品是以甲醇為溶劑，各配置成 1000 ppm 的標準母液存放在冰箱中 4°C 保存，由於實驗為線上濃縮實驗，因此不需要高濃度的標準母液，前述母液需再以甲醇-乙醇(50:50,v/v)混合溶劑混合稀釋至 20 ppm，分析時再依所需要測試的情況以適當濃度的緩衝溶液稀釋至 500 ppb。

#### 6.4.4 不同濃縮分離條件之測試

##### 6.4.4.1 不同 pH 值緩衝溶液之影響

本實驗之掃略式線上濃縮方法所使用之緩衝溶液包含四硼酸鈉鹽( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )、鹽酸或氫氧化鈉、CTAB(十六烷基三甲基溴化銨)、甲醇等，為了使分析物分子中性化便於讓界面活性劑微胞親合集中，我們固定四硼酸鈉的濃度 25 mM 並調整變化緩衝溶液 pH 值由 8.1 至 10.5 以測試對苯二氮平分析物線上濃縮之影響，分離緩衝溶液

其餘條件為 CTAB 70 mM、甲醇含量 25%(v/v)、樣品注入條件: 0.5 psi; 210 sec、分析物濃度 1.0 ppm; 稀釋樣品溶液用之緩衝溶液與分離時之緩衝溶液條件相同，但不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇。

#### 6.4.4.2 不同離子濃度緩衝溶液之影響

緩衝溶液所含電解質離子濃度高低，不僅影響電滲流的遷移速度，還進一步影響焦耳熱的大小，因此對分析物濃縮之效果影響頗鉅。為此我們固定緩衝溶液 pH 值為 9.6，並調整變化四硼酸鈉(的濃度由 10 mM 至 50 mM 以測試對苯二氮平分析物線上濃縮結果之影響，分離緩衝溶液其餘條件為 CTAB 60 mM、甲醇含量 25%(v/v)、樣品注入條件:0.5 psi; 210 sec、分析物濃度 500 ppb; 稀釋樣品溶液用之緩衝溶液與分離時之緩衝溶液條件相同，但不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇。

#### 6.4.4.3 不同 CTAB 含量緩衝溶液之影響

掃略式線上濃縮機制主要是讓分析物在不同的電解質區帶遷移時形成速度差而聚集，而造成速度差的主要因素係陽離子界面活性劑 CTAB 假靜相的作用力，因此我們改變所添加 CTAB 的含量，由 20 mM 變化至 100 mM 以了解添加 CTAB 形成之微胞數量多寡對分析物線上濃縮效果之影響。分離緩衝溶液其餘條件為 pH 9.6, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、甲醇含量 30%(v/v)、樣品注入條件:0.5 psi; 210 sec、分析物濃度 500 ppb; 稀釋樣品溶液用之緩衝溶液與分離時之緩衝溶液條件相同，但不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇。

#### 6.4.4.4 不同甲醇含量緩衝溶液之影響

通常微胞電動層析法中添加少量的有機溶劑主要目的是為了修飾微胞相與連續溶液相極性的差異，以調整分析物在兩相間的分配係

數達到良好的分離結果，掃略式線上濃縮之分離機制基本上與微胞電動層析法相同，因此我們改變緩衝溶液中甲醇之含量，由 10%(v/v) 增加至 40%(v/v) 藉此尋求九種苯二氮平分析物之最佳分離結果。分離緩衝溶液其餘條件為 pH 9.6, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 含量 60 mM、樣品注入條件:0.5 psi; 210 sec、分析物濃度 500 ppb; 稀釋樣品溶液用之緩衝溶液與分離時之緩衝溶液條件相同，但不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇。

#### 6.4.4.5 樣品區帶不同離子濃度緩衝溶液之影響

當我們明瞭前述場強放大原理，就知道溶液中如含有不同離子電解質，外加高電壓後所感應的電場強度亦有所差異，電場強度不同影響所及即是帶電離子之遷移速率，然而我們掃集過程中所使用的 CTAB 微胞就是一種帶正電粒子，故稀釋樣品所使用之緩衝溶液，其所含之電解質離子濃度高低，也就會對整個樣品區帶的掃集速率造成一定程度的影響。為此我們固定分離緩衝溶液之離子濃度;而變更樣品區帶之離子濃度由 10 mM 變化至 50 mM 用以測試掃集速率對整體線上濃縮結果之影響。分離緩衝溶液其餘條件為 pH 9.6, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 含量 50 mM、甲醇含量 30%(v/v)、樣品注入條件:0.5 psi; 210 sec、分析物濃度 500 ppb。

#### 6.4.4.6 樣品注射時間

為尋求最大的放大倍率，通常延長樣品注入時間是最直接的方法，但樣品注入量愈多則樣品區帶愈寬，如導致掃集時間過長，流經偵檢器時並未完全分離，將破壞層析譜圖之解析度。因此在最佳條件下測試可容忍之最大量樣品注入時間將極為重要，可進一步降低方法之偵測極限。

#### 6.4.4.7 樣品掃集濃縮效果及放大倍率

在最佳分離條件下，注入高濃度低秒數之樣品溶液，樣品濃度 100 ppm 以甲醇-乙醇(50:50,v/v)混合溶劑稀釋之標準液，注入時間 2.0 sec.，經外加高電壓分離完成後，量測所有分析物之 peak 絕對高度訊號值與前述最佳掃集結果訊號值相比較，依公式定義計算放大倍率。

#### 6.4.4.8 再現性分析及定量校正曲線

取九種苯二氮平混合標準原液以甲醇 -乙醇(50:50,v/v)之混合溶劑加以稀釋至 20 ppm，再以適當濃度不含界面活性劑之緩衝溶液稀釋成 50 ppb、100 ppb、300 ppb、600 ppb、1000 ppb 等五種濃度進行電泳分離實驗，樣品注入條件為 0.5 psi, 270 秒，以前述測試所獲得之最佳濃縮分離條件進行毛細管電泳分析三次。以九種苯二氮平之波峰面積對濃度作圖，製備標準校正曲線。另針對分析物之遷移時間及波峰積分面積進行再現性比較分析，個別計算相對標準偏差值(RSD)。

### 6.5 結果與討論

#### 6.5.1 不同 pH 值緩衝溶液之影響

由實驗結果 Fig.6-2 顯示：緩衝溶液 pH 值高低，除了影響分析物本身帶電能力，還進一步影響電滲流之遷移速度。在弱鹼性的情況下分離程度不佳，分離解析度在高 pH 值條件中表現較優。一般電泳分離中緩衝溶液 pH 值調控一直是相當重要的變因，本系統亦不例外，緩衝溶液中因添加了陽離子界面活性劑 CTAB，致使毛細管表面電性改變，電滲流方向反向(由負到正)；且表面已吸附 CTAB(十六烷基三甲基溴化銨)，微鹼性環境有利於 CTAB 解離，管壁表面正電荷總量變多，故在相同的電解質濃度下 pH 值愈低電滲流遷移速度會稍快。另在高 pH 值情況下分析物性質更趨向中性化及疏水性，故能與

CTAB 微胞作一良好的結合，濃縮放大倍率較高，遷移時間變長。由 Fig.6-2、Fig.6-3 之實驗結果，考量分析物濃縮與分離情況下以 pH 值 9.6 表現較優，故將 pH 9.6 定為本項變因探討之最佳條件。

#### 6.5.2 不同離子濃度緩衝溶液之影響

從實驗結果 Fig.6-4 顯示：緩衝溶液離子濃度愈高，完成分離的時間愈久，peak 寬度增加，peak 高度減小，但過低的離子濃度似乎也是不利分離的(Fig.6-4(E))。解釋這樣的現象先由電雙層理論談起：首先高離子濃度，會壓迫電雙層中擴散層的厚度，造成 Zeta 電位降低電滲流變慢的結果；除此之外高離子濃度亦會伴隨著高焦爾熱的發生，不利分析物濃縮集中。但是以微胞掃集原理推論，在一定程度上減慢電滲流遷移速度卻是有利於掃集濃縮，因為減慢電滲流會使得陽離子微胞通過樣品區間時速度減緩，延長分析物與微胞的接觸時間，使之充分接近熱力平衡狀態。如在離子濃度 10 mM 情況下，電滲流速度太快，微胞尚未與分析物有足夠長的接觸時間，整個程序即完成掃集濃縮，因此圖譜呈現濃縮未完全之現象(解析度亦不佳)。於是當逐步增加離子濃度，明顯可以發現濃縮結果逐步改善，但是我們亦不建議使用太高的離子濃度，以免分離時間過長，比較實驗圖譜我們建議方法中緩衝溶液之離子濃度應定為 25 mM 較為適宜。

#### 6.5.3 不同 CTAB 含量緩衝溶液之影響

觀察實驗結果 Fig.6-6、Fig.6-7 我們可以發現，當 CTAB 濃度愈高分析物遷移時間愈長。由掃集濃縮原理圖我們可以了解一個概念，當緩衝溶液中含有陽離子界面活性劑時，由於陽離子界面活性劑會吸附於負電性毛細管表面並進一步讓毛細管表面改變電性，造成整體電滲流反向由負極流向正極。而苯二氮平分析物在鹼性之樣品基質中電性為中性，其遷移速度與電滲流相同，當接觸到陽離子微胞後因受微

胞作用力影響而變慢，由此導致樣品堆積。由此我們可以做一個合理的推論：分析物與微胞作用力愈大者遷移時間愈慢（假靜相容量係數愈大者）；同理我們增加陽離子微胞 CTAB 的濃度亦表示增加在一定管長內微胞相的體積（微胞數目），相對的假靜相滯留係數亦同步增加；所以而分析物在假靜相中滯留係數愈大者似乎有利於濃縮，由樣品注射區帶長度與掃集完成之樣品區帶長度關係式可了解此一關係

( $l_{\text{sweep}}=l_{\text{inj}}*(1/(1+k))$ )(31 式)，實驗結果證實前述公式並不能完全解釋所有的線上濃縮行為（整個導證過程未包含擴散效應(diffusion effect)），由實驗結果 Fig.6-6 看來，當 CTAB 濃度由 20 mM 逐步增加至 50 mM 時確實符合關係式所述，有隨著 CTAB 濃度增加而掃集效果變好的現象，但是當 CTAB 濃度超越 70 mM 後則效果變差 peak width 變寬，深究其原因，係電泳焦爾熱影響加鉅所致，因為高 CTAB 微胞濃度作用下，分析物在毛細管管中待的時間將更長，而且 CTAB 亦屬離子性化合物，濃度愈高毛細管電流量愈大，以上二者均會加深焦爾熱效應導致分析物區帶擴散。考量圖譜中所有分離濃縮情況，研判最佳的界面活性劑濃度為 50 mM。

#### 6.5.4 不同甲醇含量緩衝溶液之影響

一般在微胞電動層析法中添加少量的有機溶劑 可用來修飾溶液相與微胞相之極性差異，調整其分配係數使之獲得較好的分離結果。由實驗結果 Fig.6-8 可看出，當逐步增加緩衝溶液中甲醇有機溶劑的比例時我們可以獲得解析度較佳的譜圖，但不幸地隨著解析程度的增加整體的分離時間也變慢了，而且 peak 濃縮集中的效果亦大幅受到影響。這是何故呢？分離時間增加之主因係電滲流變慢（甲醇電滲流速度低於水；由非水相電泳之 Table 3-1 得知）；當緩衝溶液中甲醇比例大幅增加時將會降低連續溶液相的極性，在此情況下微胞結構會被破壞，CMC（臨界微胞濃度）大幅提升，因此掃集效果變差，經所有條件

測試結果添加體積比 30% 甲醇之緩衝溶液，是在兼顧掃集效果能使九種苯二氮平充分分離之條件。

#### 6.5.5 樣品區帶不同離子濃度緩衝溶液之影響

前項 6.5.2 已經詳述過了緩衝溶液離子濃度對掃集濃縮結果之影響，在這裡我們調整樣品區帶的離子濃度也會出現類似的效應 (Fig.6-10)，當樣品區帶離子濃度較低(10 mM)，相對於周圍緩衝溶液區會形成一個高場區的環境，故樣品區帶一接觸到微胞而微胞帶正電，在高場區裏感應到往負極(入口端)的遷移速度較大，總體而言，微胞朝出口端移動速度減慢，由相對速度觀念來看相當於微胞一接觸到樣品區帶後將以較快速度通過樣品區帶。

由實驗結果整理 peak height 統計圖(Fig.6-11)將可看出此效應影響之大，樣品區帶由 10 mM 逐漸調高至 40 mM 時，大部分分析物濃縮效果大幅成長，peak height 訊號值同步升高，此一結果顯示樣品區帶形成高場區環境使得微胞通過速度太快(掃集作用時間短)不利於分析物分子集中，逐步增高樣品區間導電度(加大離子濃度)抑制高場區的形成將有助於延長掃集作用時間增大分析物濃縮集中之效果。但是一味地加大離子濃度並不是有效的萬靈丹，離子濃度增強將伴隨著焦耳熱(擴散效應)，由 peak height 統計圖 Fig.6-11 可看出趨勢當離子濃度上升到 40 mM 或 50 mM 時 peak height 訊號值由強轉弱。

有關九種苯二氮平分析物 peak height 訊號值轉折點(相對極大值)不同處以下提出二點解釋:(1)針對 bromazepam、estazolam、alprazolam 及 flunitrazepam 四種分析物而言因為遷移時間較短，分析物與 CTAB 微胞作用力較小( $k'$ 小)，對擴散效應忍受力較小，peak height 訊號值轉折點提前，最大值出現在 30 mM 處。(2)其餘的苯二氮平分析物由於遷移時間較長，分析物與 CTAB 微胞作用力較大( $k$ 大)，對擴散效應忍受力較大，peak height 訊號值轉折點略顯延後，最大值出現在 40

mM 處。詳細考量九種苯二氮平分析物訊號值消長的情況，將最佳濃縮條件定為 30 mM。

#### 6.5.6 樣品注射時間之探討

一般來說延長樣品注射時間有助於分析物 peak height 訊號值的增大，但是過長的樣品區帶(sample zone)將使掃集時間延長，在這裡必須注意到整個濃縮過程毛細管內的 EOF 是存在的(由負極到正極)，所以整個樣品區帶在電滲流的推動下正不斷地朝出口端移動，當注入區帶過大，或掃集完成後分離剩餘毛細管長度過短，都是不利於分離的(Fig.6-12)。我們在前述最佳條件下測試樣品區帶可分離的最大忍受力，測試注射秒數:150 sec.、210 sec.、270 sec.、330 sec.、390 sec.發現在可以 peak 完全分離情況下最長注入時間為 270 sec.。

#### 6.5.7 樣品掃集濃縮效果及放大倍率

為了了解本實驗濃縮放大的實際情況，使用最佳分離條件 buffer 溶液下(pH 9.6, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 含量 50 mM、甲醇含量 30%(v/v); 樣品區帶緩衝溶液: pH 9.6, 30 mM 四硼酸鈉，不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇)，注入低濃度(600 ppb) 長秒數(270 sec.)，與注入高濃度(100 ppm)短秒數(2.0 sec.)的分析物二種情況，進行比較性測試，此處高濃度樣品不含緩衝溶液，僅以甲醇-乙醇(50:50,v/v)混合溶劑配製，其結果如 Fig.6-13 所示，經比較換算 peak height 訊號值，其放大倍率如下所示: bromazepam 175 倍、estazolam 124 倍、alprazolam 150 倍、triazolam 199 倍、flunitrazelam 180 倍、chlordiazepoxide 248 倍、diazepam 235 倍、clorazepate 308 倍、nitrazepam 310 倍。由這些結果我們可以發現一項趨勢:即遷移時間愈慢表示與 CTAB 微胞作用力愈好放大倍率愈高，其中有少數分析物略微違反此趨勢，研判這樣的現象與個別分析物之擴散係數差異有關。



#### 6.5.8 再現性分析及定量校正曲線

為確定本線上濃縮法實驗各影響因子之穩定性，以九種苯二氮平分析物進行分離實驗，Table 6-1 係測定遷移時間及 peak 積分面積之再現性(reproducibility)分析結果，在遷移時間方面相對標準偏差值均小於 0.40%( Fig.6-14)，peak 積分面積方面均小於 4%，顯示方法再現性良好。

將九種苯二氮平混合標準溶液以適當的緩衝溶液稀釋配製完成後，依上述實驗方法來製作定量檢量線，結果九種苯二氮平定量檢量線線性方程式如 Table 6-2 所示，線性相關係數( $R^2$ )介於 0.9966~0.9999 之間，顯示線性關係良好。而使用最適化的線上濃縮條件其方法偵測極限為 17.2 ~ 36.5 ppb (詳見 Table 6-2)。

#### 6.6 結論

由以上的實驗結果我們知道要獲得最佳之掃集線上濃縮結果必須考量以下幾點條件:(1)研判分析物之性質包括帶電能力與親疏水性之情況，用以選擇適合該分析物之掃集濃縮模式及所需配合的界面活性劑，界面活性劑必須選擇與分析物作用熱力分配係數大者，避免一味地提高界面活性劑濃度而帶來增大焦耳熱之效應。(2)有關掃略式線上濃縮之機制有兩大效應在左右濃縮倍率之結果。一是微胞與分析物之親合作用力(k value);另一是焦耳熱所引發的擴散效應(溫度愈高擴散係數愈大)。在變因調控時必需注意二者之平衡。(3)適量添加有機溶劑於緩衝溶液中以修飾溶液相與微胞相極性的差異，增進分析物彼此之分離解析度。

本次實驗中我們成功地在 12 分鐘內完成分離濃縮九種苯二氮平類藥物，放大倍率介於 124~310 倍之間，在實驗最低濃度值 50 ppb 仍能看到清楚的偵測訊號，方法偵測極限為 17.2 ~ 36.5 ppb (S/N=3)，

顯示不變更傳統毛細管電泳儀的硬體設備下，利用掃略式線上濃縮技術仍能降低其偵測極限達到令人滿意的程度。



Table 6-1 Migration time 、reproducibilities of Benzodiazepines for Sweeping-MEKC.

Benzodiazepines	migration time (min)	RSD(%) for migration time <sup>a</sup>	RSD(%) for peak area <sup>a</sup>
Bromazepam	7.86	0.22	1.72
Estazolam	8.09	0.22	3.49
Alprazeolam	8.25	0.15	2.10
Triazolam	8.59	0.26	1.60
Flunitrazelam	8.82	0.22	1.75
Chlordiazepoxide	9.43	0.18	1.32
Diazepam	10.01	0.17	2.78
Clorazepate	10.90	0.22	2.55
Nitrazepam	11.62	0.39	0.35

b. run to run : n = 5



Table 6-2 Regression equation · R<sup>2</sup> and detection limits of Benzodiazepines for Sweeping-MEKC.

Benzodiazepines	Regression equation	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup> (ppb)
Bromazepam	$y = 30.6x + 241.6$	0.9988	17.2
Estazolam	$y = 17.6x + 159.3$	0.9968	31.8
Alprazolam	$y = 19.4x + 23.3$	0.9966	36.5
Triazolam	$y = 22.9x + 322.6$	0.9986	28.9
Flunitrazepam	$y = 14.8x - 25.4$	0.9990	23.7
Chlordiazepoxide	$y = 19.7x - 16.1$	0.9992	34.3
Diazepam	$y = 36.1x - 432.2$	0.9999	18.8
Clorazepate	$y = 24.2x - 196.7$	0.9996	24.5
Nitrazepam	$y = 24.2 - 313.3$	0.9995	33.7

a. LOD : S/N=3