

第二章 研究背景

2.1 醣類分子分離技術

2.1.1 前言

醣類分子在人體中扮演相當重要的角色，舉凡飲食、生理機能、疾病預防與偵測等，都有舉足輕重的影響，因此相關的研究與分析技術日益增多，有關醣類分子的研究領域包括酵素合成、醫藥、醫材、食品、化妝品、農藥、化工及醣類分子分離技術，本章節將就醣類分析技術作詳細的介紹。

醣類分子因本身結構的特性，如分子結構多樣化、缺乏發光團與可解離之官能機等，導致分離、分析與結構鑑定上有某種程度上的困難，有待進一步克服。因為上述的限制，傳統醣類分子的分析是選擇以下幾種技術：

1. 氣相層析(Gas chromatography, GC)
2. 高效液相層析法(High performance liquid chromatography, HPLC)
3. 超臨界流體層析(Supercritical fluid chromatography, SFC)
4. 毛細管電泳(capillary electrophoresis, CE)

上述技術又可依分析物的各種特性，做不同的調整，如：改變動靜相組成、添加界面活性劑、或利用不同緩衝溶液濃度達到濃縮效果等，讓分析醣類方法更為有效、迅速，而更擴大其分析範圍。醣類分子結構鑑定法大致分為二種：核磁共振儀(nuclear magnetic resonance, NMR)、質譜儀(mass spectrometry, MS)，可精確提供分子結構的資訊。以下針對上述幾點分析技術相關文獻作介紹。

2.1.2 氣相層析法

使用氣相層析法分析醣類分子，需要經衍生步驟使結構中親水性較高的醣分子變成具揮發性之化合物，此法具有不錯的分離效率，為分析此類化合物的一種選擇。

Traitler *et al.* [36]應用氣相層析法分離利用 silyl 衍生之低分子量寡醣。其實驗結果應用於分析聚合度 6 之寡醣分子，且有良好之解析度；但若要分離聚合度達 6 以上的醣類分子，需結合揮發性更高的衍生試劑，並將管柱溫度提高才能達到優良的分離效果。後來於 1988 年 Hansson *et al.* [38]等學者使用高溫氣相層析分離經衍生後的寡醣，其分析物聚合度可提高 10。

除了單純使用氣相層析技術分離醣類之外，Masahiro *et al.* [39]等人在 1999 年利用氣相層析結合質譜儀間接了解這些醣分子於醣類代謝過程中之變化，其研究內容是分析糖尿病婦女在懷孕期間尿液中的醣及醣醇分子，先將尿液樣品經過尿酶(urease)處理，再先後與 N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide 和 trimethylchlorosilane 進行衍生反應，可檢測葡萄糖、山梨糖醇(sorbitol)、果糖、1,5-anhydro-D-glucitol、myo-inositol 於尿液中之改變量。

Rudolf *et al.* [37]等學者亦利用氣相層析結合質譜儀，分析 30 種源於醣蛋白的寡醣分子。實驗應用內部塗佈不同極性和選擇性的靜相的玻璃毛細管(直徑 0.22 mm)，如：Silar 9CP、Dexsil 410、SE-30 及 OV 101，醣分子在經過甲醇化(methylation)衍生反應後，其中 22 種寡醣可以於塗佈 Silar 的管柱中得到解析度極佳的分離，另外八種醣類則較適合於 coating Dexsil 410 或 OVG 101 管柱中分析。

2.1.3 高效液相層析法

2.1.3.1 正相層析(normal-phase chromatography)

藉由 silica 表面之羥基或少許 alumina 與分析物之間交互作用的強弱達到分離的目的，此技術較適用在以非水相沖提液來分析低聚合度及經衍生後之寡醣分子。

White *et al.* [40]使用吸附層析法分析數種與 Phenyltrimethylsilyl 衍生之單、雙醣，高效液相層析後再接核磁共振光譜分析(nuclear magnetic resonance, NMR)或質譜儀(mass spectrophysics)鑑定分析物結構，此系統可定量至 sub- μg ，並同時以元素分析(Elemental analysis)、薄層分析(Thin-layer chromatography, TLC)、紫外光分析、紅外線光譜分析(Infrared, IR)等技術進一步鑑定這些醣類分子衍生物的結構。文中提到使用管柱前(pre-column)衍生醣類分子方法有諸多優點：可使用較長波長的紫外光偵測器、可用純度較低的溶劑、吸收強度大。

2.1.3.2 逆相層析(reversed-phase chromatography)

將固定相鍵結 silica matrix 表面，最常使用的就是 C18 (octadecylsilyl silica, ODS)的管柱，分析物會因彼此間極性的差異，在非極性固定相和極性動相間作一連串的分配作用以達到分離的效果 [41]。

Yu *et al.* [42]利用 octadecyl-zirconia 集合有機物和無機物組成靜相，分離經衍生的數種寡醣分子，為一靈敏且快速之分離技術。而疏水性交互層析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)則是在靜相中塗佈一層親水性較高之有機層，例如：短鏈的烷基或小分子的芳香族羥基，而動相則為疏水性的溶劑，使分析物在動靜相之間分配而達到分離。另有許多利用疏水性交互層析分離蛋白質的論文發表，其使用的靜相包括：polyvinyl alcohol、poly(alkylaspartamide)-silica、

oligoaminoalcohol ligands 和 amide functions[43-45]。同樣使用極性靜相和相對於靜相較低極性的動相，卻應用了逆相層析的 C 18-silica 靜相，為了有別於正相液相層析利用極性動相驅動液體的型式，便稱作親水性互動層析(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)。

IKemoto *et al.* [46]將醣類分子和 2-naphthylimidazole 進行衍生，結合雷射誘發螢光偵測法，此分析方法之偵測極限可低於 0.1 pmol，若改用紫外光亦可得到相當高的偵測靈敏度，但偵測極限較螢光偵測差近一個數量級。

2.1.3.3 高效能陰離子交換層析(High-performance anion-exchange chromatography, HPAEC)

搭配脈衝式電流偵測法偵測(pulsed amperometric detection, PAD)中性醣類，是一種兼具高選擇性與靈敏度的分析技術，分析物不需要進行衍生反應，減少實驗步驟與增加樣品污染機會的可能性。

Camp *et al.* [47]在 2000 年發表一個簡便且高效能的方法，利用陰離子交換層析管柱搭配脈衝式電流偵測，可在 43 分鐘內完成 13 種醣類分子的分析，偵測極限可低至 1-5 pmol。

2.1.3.4 配位體交換層析(ligand exchange chromatography)

將 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Pr^{3+} 等金屬離子利用靜電作用固定於堅固的陽離子交換層中，常用的材質是 polystyrene-divinylbenzene 樹脂，分離時以水當作動相沖提液。

Westerlund *et al.* [48]研究中將中性醣分子與金屬離子錯合，並通過陽離子交換樹脂，其實驗結果首次證明配位體交換層析可成功應用在分離醣分子。

2.1.3.5 鍵結相層析(bonded-phase chromatography)

於 silica 表面以較穩定化學鍵結的方式結合固定相，如 cyano-、aminopropyl-、amino-等官能基。分析物間藉由與固定相及動相間親和力不同而達成分離。

Akiyama *et al.* [49]使用 amine-bonded vinyl alcohol 共聚合物之管柱分析，並比較未經衍生或與 ethyl p-aminobenzoate 衍生之中性單醣或寡醣分子。研究中發現，使用此鍵結相層析方法分析經衍生過之 isomaltooligosaccharide，雖可分析聚合度約 13 的寡醣分子，但其解析度較直接以折射率偵測器分析聚合度約 9 的相同寡醣分子差。

2.1.3.6 親和性層析(affinity chromatography)

是唯一藉由特定分析物與具生化特異性(biospecific)且固定住的配位體(immobilized ligand)，進行交互作用來達到分離效果之分析技術。

1992 年 Kobata *et al.* [50]利用 con A-Sepharose 管柱，發展出一簡便且靈敏的方法，分析許多醣蛋白的寡醣分子。分析過程中發現，此分析管柱之管壁鍵結十分堅固，亦可應用在研究醣類分子結構上。

2.1.3.7 凝膠滲透層析(gel permeation chromatography)

利用凝膠在空間中產生許多孔洞，分析物可依其分子大小不同，使其通過孔洞所需時間各異，因而達到分離的目的。常用的凝膠有聚丙烯醯胺(polyacrylamide)及葡萄糖聚醣(dextran)。

Shibata *et al.* [51]利用一名為 Aquasil 的商業化矽膠凝體，分析且前處理不同聚合度的多種醣類。其實驗結果顯示可於 10 分鐘內完成分析木醣(xylose)等多種醣類；此分子量相近的六種單醣亦可在 12 分鐘內完成分析。

2.1.4 超臨界流體層析法

1986 年超臨界流體層析技術首次被應用分析於醣類分子。CO₂ 為沖提之動相，藉由適當的控制溫度和壓力使得 CO₂ 性質介於液體和氣體之間，達超臨界狀態且具備氣體之高擴散性(diffusivity)、低黏度(viscosity)等特性。且分離過程中可視不同分析樣品的需要調整 CO₂ 如液體般之密度和溶合能力(solvation power)。除此，藉由加入修飾劑(modifier)可增加流體的極性。常見的修飾劑有甲醇、乙醇、介面活性劑等。其使用分離管柱和鍵結相的氣相層析管柱十分相似，但通常內徑較小，約 50-100 μm，且有一厚度極薄的靜相塗佈於管壁，其厚度約為 0.05-0.2 μm。超臨界流體層析和氣相層析有許多相似的地方，其優點是可用於分析較大分子量之醣類，且在相同沖提溫度之下，可分析揮發性較小之分析物，偵測器的選擇包括可類似氣相層析之偵測器，如火焰游離偵測器(flame ionization detector, FID)。[52]

Chester *et al.* [53]在 1986 年提出利用超臨界層析結合火焰游離偵測器，分析源自於 corn syrup 之麥芽寡醣，聚合度高達 18，因為動相為非極性之 CO₂，因此如欲分析極性的醣類分子須進行衍生反應，衍生試劑的選擇是 n-trimethylsilylimidazole (TMSI)。分析則是利用鍵結 methylpolysiloxane 管柱，圖譜中發現每一個醣類均可看到雙峰的訊號，這是因為每個醣類均有 α-及 β-anomer 型式的結構存在。

除了火燄游離偵測器之外，Herbreteau *et al.* [54]應用超臨界流體層析分析極性的醣類分子，搭配光散射偵測器(light-scattering detection)分析葡萄糖、木糖、果糖、山梨糖醇等 6 種醣分子。在管柱內塗佈極性材質，如：cyano-、diol-、nitro-鍵結，以 CO₂-methanol 作為動相，研究中並比較不同極性填充管柱對於醣分子選擇性之影響。

Michalski *et al.* [55]則是利用 SFC 搭配 FID 和化學游離質譜儀(chemical ionization MS)偵測器，採用經 DB-5 塗佈的毛細管柱，分析

經衍生後聚合度可至 13 的麥芽寡糖分子。

2.1.5 毛細管電泳法

利用帶電物質於外加電場下有不同的移動速度及方向而達到分離效果。1989 年商業化之自動毛細管電泳儀上市，由於使用精密的電腦控溫系統，因此可以控制電泳環境的溫度，使得分離效能更加提高。於是毛細管電泳分析技術挾帶自動化裝置的優勢，展現極佳的分離效率，受到各界廣泛的使用。以下介紹數篇利用毛細管電泳技術分析醣類分子的研究。

Soga *et al.* [56]利用毛細管電泳同時分析木糖(xylose)、核糖(ribose)、葡萄糖(glucose)、木糖醇(xylitol)等 12 種醣類分子。緩衝溶液由 20 mM 之 PDC (2,6-pyridicarboxylic acid)和 0.5 mM 之 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)組成，並利用 1 M NaOH 將緩衝溶液 pH 值調至 12.1，可得到最佳的分離解析度。其偵測方法使用間接紫外光偵測法，偵測極限在 23~71 μ M 間(注入量 6 nL)。文中更進一步探討胎球蛋白(fetuin)酸水解條件，使用 2 M HCl 溶液於 95°C 反應 5 小時，水解後之產物利用相同電泳和偵測系統分析，同樣可得到很好的分離效果。

Kelly *et al.* [57]則是將毛細管電泳分析法結合紫外光線上偵測，使用電灑游離化質譜儀(electrospray ionization mass spectrophoresis, ESI-MS)定出分析物脂肪醣(lipooligosaccharides)的結構。其電泳條件為毛細管長度 100 cm、內徑 50 μ m、緩衝溶液為 pH 8 之 50 mM ammonium formate，可在 20 分鐘內完成分離，並隨即以質譜儀定出分析物結構。

Novotny *et al.* [58]發表過許多關於醣類分子分析的論文，在 1994 年發表的論文中利用毛細管電泳結合雷射激發螢光偵測法分析葡聚醣(dextran)和糊精(dextrin)，並比較三種衍生試劑，結果發現帶有負電

的 ANTS (8-Aminonaphthalene-1.3.6-trisulfonate)所衍生之分析物電泳速度較 AP (2-aminopyridine) 快了三倍，而 ANA (5-aminonaphthalene-2-sulfate)則居中，所以選用既可讓分析物衍生後帶發光基團又帶電的 ANTS 當作衍生試劑，分離效率因衍生產物間荷質比差異增加而提高。實驗又進一步測試不同聚合度之醣分子對電場強度增加時於電泳速度之影響。結果發現，對聚合度較小的分子而言，當電場強度不大到足以影響緩衝溶液黏度時，分析物的電泳速度不會產生明顯的變化，當電場強度變大時電泳速度也只會有些微增加，但高聚合度的醣分子，則其變化量較為顯著。此外，文中也發現緩衝溶液(borate-tris buffer)的濃度越高，則分析物速度越慢，但不論離子濃度為何，若以分析物聚合度取對數作為 X 軸且電泳速度對數作為 y 軸作圖，都會呈一線性關係。

Camilleri *et al.* [59]採用 2-AA 作為衍生試劑，分析從不同醣蛋白所釋放出來的具支鏈(branched)寡醣分子，衍生條件為 90°C-30 分鐘。分析直鏈和線性之葡聚醣分子的 2-AA 衍生產物時，當分離緩衝溶液中加入界面活性劑 taurodeoxycholate 後，因 2-AA 分子本身與界面活性劑形成之微胞作用力相當強，故在毛細管電泳中，施予正相電壓、鹼性緩衝溶液下，可將過量衍生試劑分子之干擾去除，提高圖譜鑑定的簡易度。相同實驗室[60]將另一個和 2-AA 結構相似的衍生試劑 AA-AC(3-(acetylamino)-6-aminoacridine)對醣分子衍生的效果相互比較，分析的醣分子有葡聚醣、和由 bovine ribonuclease B、human IgG、 α -acid glycoprotein 釋放出的醣分子，並將電泳分析結果和正相、逆相-HPLC、CZE、MEKC 等技術比較分析結果。研究中探討 AA-AC 最佳之衍生條件，並發現使用 AA-AC 平均會得到高於 2-AA 近 2.24 倍的靈敏度。使用加了微胞的 MEKC 分析 AA-Ac 衍生之葡聚醣分子，會得到與 CZE 電泳順序逆轉(reversed migration order)的分析結果。

2.1.6 木聚醣(xylan)

本實驗所研究的分析物是採用木醣，木聚醣是組成植物細胞壁的主要成分，它是一種半纖維素(hemicellulose)，而半纖維素是指許多非纖維素的多醣類(noncellulose polysaccharides)，而木聚醣佔了很大的部分。以生物質量來計算，纖維素(cellulose)佔了自然界含量的40%，半纖維素30%，木質素(lignin)23%，可知半纖維素是僅次於纖維素，為自然界含量第二豐富的有機質。

這種多醣類大多存在於纖維素或木質素的表面，拿掉這些多醣類便成為纖維質(fiber)，在傳統上，漂白木材的方法是利用加入化學試劑，如：氯或次氯酸，將木質素和這些多醣類去除，但此種處理木材的方法不但造成環境污染，更是一種資源浪費，因為木聚醣分解後，可當成食物或燃料的來源，這種可以再利用的資源，不應該在木材處理時或產品製造過程中，被當成廢棄物而流失，因此，如上何將木聚醣利用低污染的技术分解成寡醣利用，是現今大量處理農產林木的時代所必需的。

木醣的結構，除了主鏈是木聚醣單醣(xylose, 木醣)以 β -1,4鏈連接外，木聚醣都會有異質多醣體(heteropolysaccharides)的存在，而異質多醣體的分類方式由鏈結及取代基的不同而有差別。單元糖上羥基的氫以許多不同的取代基所修飾，如：乙醯基(acetyl group)、阿拉伯夫喃醣(arabinofuranose)、葡萄糖酸(glucuronic acid)及甲基葡萄糖酸(methylglucuronic acid)等等，形成支鏈。其分子結構如圖(2-1)。

2.1.7 幾丁聚醣

分子之結構為一種葡萄糖胺[poly(1,4- β -D-glycopyrano-samine)]，如圖(2-1)所示，所以也稱作幾丁胺醣，幾丁聚醣是幾丁質去乙醯化(deacetylation)之產物，幾丁質在自然界中分布極為廣泛，舉凡真菌類植物、酵母菌及海藻的細胞壁，海洋無脊椎動物之內骨骼、水產甲殼

類動物之外殼、昆蟲等節肢動物之外殼及內骨骼，甚至酒類發酵過程中所產生的殘渣，均可發現幾丁質的存在，其中以蝦蟹殼的含量最高，將其經過去礦物質及去蛋白質之處理，即可得到適用於其他用途的幾丁質。

2.2 醣類分子偵測法

2.2.1 前言

由於大多數的醣類分子其分子結構缺乏發光團，毛細管電泳偵測未衍生醣類分子方法有直接紫外光可見光偵測法、間接紫外光可見光、螢光偵測法、電化學偵測、折射率偵測等。

倘若藉由選擇一合適之含有發色團分子與醣類分析物分子進行衍生反應後，可對於衍生後醣類分子作光學偵測。衍生反應除了幫助分析物戴上發光團外，亦可藉由衍生試劑上所帶有的電荷來改變多數醣類原本中性的電性，增加醣類分子電性的差異，有助於分離時達到更理想的結果。衍生試劑的選擇將視分離目的而有所不同，一個成功的衍生反應要符合以下幾點：

- 1.反應產率高。
- 2.反應選擇性高，反應後只產生單一產物。
- 3.樣品需求量少，特別針對取之不易的生化樣品而言。
- 4.衍生試劑於固定波長下之莫耳吸收係數（molar absorptivity）值要高，如此以降低背景緩衝溶液中其它物質的干擾，而達到更靈敏的偵測。
- 5.衍生反應後的產物不需在經淨化步驟處理，步驟簡單亦可避免污染。

毛細管電泳偵測衍生醣類分子方法有紫外光可見光偵測法、雷射誘發螢光偵測法。對於這兩種醣類分子之偵測法詳述如下：

2.2.2 未經衍生之醣類分子偵測法

2.2.2.1 直接紫外光可見光偵測法 (Ultraviolet-visible, UV-Vis)

直接紫外光可見光偵測器在毛細管電泳分析法中為最普遍使用的偵測儀器，但應用於醣類分子時，會因為大部分的醣類分子缺乏 π 鍵等吸光結構，因此吸光效率低，並不適合直接以紫外光可見光偵測方法偵測。雖然某些有機分子的吸光範圍界於 160-180 nm，但此波長區域範圍內的光很容易受到空氣或儀器中光學組件的干擾，進而影響偵測的靈敏度。

少數醣類分子具有帶電荷的官能基，能在電場作用下產生遷移的現象。這些醣包括：醣醛酸(uronic acid)、唾液酸(Sialic Acid)及胺基糖(amino sugars)，如葡萄糖胺(glucosamine)、半乳糖胺(lactosamine)等。而可直接偵測的醣類分子有：glycosaminoglycans 經酵素切割後所產生帶有不飽和醣醛酸(uronic acid)之酸性雙醣分子，如軟骨素(chondroitin)、肝素(heparin)、琉璃醣碳基酸(hyaluronic acid)，均有 232 nm 的紫外光，可以進行直接紫外光可見光偵測。

R. J. Linhardt *et al.* [61,62] 於 1991 年，利用 pH 8.8 的硼酸鹽緩衝溶液加入 sodium dodecyl sulfate (SDS)，可將上述醣分子利用直接紫外光偵測器偵測，可得到微莫耳濃度(10^{-6} M)的偵測極限。另外像是 N-acetylglucosamine、N-acetylgalactosamine 和 sialic acid 等寡醣，也可以利用偵測波長 200 nm 或是 185 nm 偵測。

Hoffstetter-Kuhn *et al.* [63] 在 1991 年的論文中發現某些單、雙醣分子在硼酸鹽組成的鹼性緩衝溶液中，藉由與 $B(OH)_4^-$ 離子(tetrahydroxyborate ion)形成帶負電荷之錯合物，便可在波長 195 nm 下進行直接偵測，且其莫耳吸收係數可增加 2-15 倍。其論文中亦從錯合物形成的反應機制推論：錯合物形成的原因和緩衝溶液的 pH 值、離子濃度及醣分子上相鄰羥基之相對空間位置有關，也受醣類分

子結構為環狀或是開環的鏈狀而影響。實驗中亦發現，提高電泳分離未衍生的醣類錯合物分子時之溫度至 60°C，可降低緩衝溶液的黏度，縮短分析時間，大幅提高分離解析度。應用毛細管電泳技術藉由與 $B(OH)_4^-$ 離子錯合來直接偵測醣分子的方法，所得到的濃度偵測靈敏度為 10^{-3} M。

Newburg *et al.* [64]於 2000 年發表利用 UV 吸收在波長 205 nm 進行毛細管電泳，來分離人乳中的寡醣，偵測極限達到 femtomole，藉由靈敏、高再現性的分析分是顯示不同來源的人乳寡醣其結構異構物存有很大的變異。Linhardt *et al.* [65]於 2003 年發表以直接 UV 偵測法於波長 232 nm 偵測 heparin oligosaccharides，在 Ammonium hydrogencarbonate 30 mM pH 8.5 狀態下分離聚合度 4~14 的寡醣，並且添加三乙基胺(triethylamine)10 mM 來幫助分離，並顯示良好的偵測極限(1.2 μ g/mL)與再現性(RSD<3%)。

2.2.2.2 間接(indirect)紫外光可見光/螢光偵測

此方法即於電泳背景緩衝溶液中加入具有高度穩定的發光團或螢光劑，此離子稱之為共競離子 (co-ion)，這些離子的有效電泳移動速率與分析物相同或相近，且不與管壁發生作用。當不具發光團的醣分子於緩衝溶液中，經過偵測窗口時，會因為取代 (displacement) 共競離子而使偵測器的訊號值降低，形成負吸收峰，完成間接地以紫外光/可見光或螢光偵測的目的。共競離子的選擇有下列幾點考量：

1. 在偵測波長和激發波長範圍內有穩定且高的莫耳吸收率。
2. 間接螢光偵測時，共競離子需具有高量子效率，且單一性佳。
3. 需與緩衝溶液能完全溶解，但不可與緩衝溶液反應。
4. 不會和毛細管壁作用。
5. 必須帶有電性且最好與分析物具有相同電性。
6. 有效電泳移動率須與分析物相同或近似。

若上述條件皆符合，即可得到不錯的分析結果。常見的共競離子如 sorbic acid 在 256 nm、tryptophany 在 280 nm 具有高度莫耳吸收。

Bergholdt *et al.* [66]將高效能毛細管電泳結合間接紫外光偵測兩種醣酸 aldobionic acid，在 pH 5 緩衝溶液中含有 6 mM 的 sorbic acid，可以得到最佳的分析解析度，偵測極限達到 18 femtomole。

Bonn *et al.* [67,68]在 pH 12.1 的緩衝溶液下加共競離子—6 mM sorbic acid，間接偵測幾種醣分子。實驗發現於強鹼的環境下的共競離子與分析物醣類皆帶有一價負電荷，有相近的電泳速度，藉由共競離子的高莫耳吸收度 ($\epsilon = 27800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，葡萄糖的偵測極限因而可降至 2 picomole。

首位在毛細管電泳中利用間接螢光偵測醣類分子的 Garner *et al.* [69]在 1990 年發表的論文中指出，於 pH 11.5 的緩衝溶液中加入 1 mM Coumarin 343 作為共競離子，利用 He-Cd 雷射發出波長為 442 nm 的光波偵測，分析蔗糖(sucrose)等三種醣類，偵測極限可至 640 femtomole。文中並指出此種共競離子的優點，如：好的溶解度、高量子效率、高莫耳吸收度($\epsilon=20000$)。但作者發現 Coumarin 343 在酸鹼值高於 pH 11.5 的緩衝溶液下便會分解，因此不適合用於 pH 值更高的分離溶液。

Yeung *et al.* [70]則是利用 fluorescein 當共競離子，分離 dextran(分子量 2,000,000)、comb-dextran、hydroxyethylamylose 及 amylose 等四種高分子量的醣類分子，緩衝溶液酸鹼值為 pH 11.5，激發光源是波長 488 nm 的氬離子雷射。

2.2.2.3 電化學偵測法(Electrochemical detection)

電化學偵測法是針對不具發光團之分析物，可不經繁複的衍生步驟，直接偵測電流或是電位的一種偵測法。相對於光學偵測系統與間接偵測法，電化學偵測同樣不需衍生靈敏度卻較高。而電化學偵測的

原理是工作電極(working electrode)表面施加一固定電位，利用定電位器偵測經毛細管分離的分析物依序流經電極表面所發生的氧化還原反應所放出的反應訊號，所以即使微小的電極表面也不會影響偵測靈敏度。近年來，常被使用的兩種電化學偵測技術為 PAD (pulsed amperometric detection)和 ADCP (amperometric detection at constant potential)。

鉑(Pt)和金(Au)為惰性金屬，一直是電極材質的最佳選擇，LaCourse *et al.* [71]利用 PAD 偵測數個醣類分子，結果發現，只要很低的電位，醣類分子就會吸附在電極表面進行電化學反應，但也發現陰極還原反應的產物，亦會吸附到電極表面，使得電極受到污染，故須定期將電極上之污染物利用去吸附過程清潔，避免因電極表面成分改變，而影響偵測之再現性或訊號出現正負偏差。

O'Shea *et al.* [72]利用毛細管電泳分析 inositol、sorbitol、arabinose 等 9 種醣類分子，搭配 PAD 作為偵測器，所選用的電極材質為金，其形狀為簡單的線性，偵測極限可達 22.5 femtomole。若將金電極改成直徑 10 μm 的圓盤狀，面對 10 μm 內徑的毛細管出口接收分析物訊號，可將偵測極限下降約 1-2 個數量級。

為了降低偵測極限，Weber *et al.* [73]等學者利用 PAD 偵測碳水化物的錯合物，如: glycopeptides，偵測極限可至 2 μM (S/N=3)。Ye *et al.* [74]等人亦設計一簡單的偵測裝置，稱之為 wall-jet electrochemical detector，其使用之銅工作電極直徑大於 100 μm ，呈圓盤狀對準毛細管開口，且將參考電極、相對電極及電泳之陰極皆置於電化學槽中，其偵測極限可改善約 50 倍(至 1 fmol)，再現性亦提高約 5-6 倍。Zare *et al.* [75]利用一直徑 25 μm 銅線作為工作電極偵測 15 種不經任何處理的醣類分子，在固定電壓為 0.6 V 且為 pH 13 的高鹼性 NaOH 溶液中，可於 45 分鐘內完成分離，偵測極限皆低於 50 fmole，定量的線性範圍可含括 3 個數量級。探討其實驗再現性差的原因為歸咎於電極

和毛細管出口的空間排列位置之差異。

電化學偵測法的缺陷在於：

1. 分析訊號會受到其他物質的干擾，如對於氨基酸(amino acids)、胜肽(peptides)、有機酸以及脂肪胺等都有訊號產生，因此對於真正的分析物會造成測量上的誤差。
2. 電極表面性質易變，即使同一類分析物的訊號再現性質接受到影響，因此每一種分析條件要定量前，都須先做校正曲線。
3. 緩衝溶液可以選擇的酸鹼值範圍窄，pH 值要保持在 12 以上，使得尋找最佳電泳分離條件時受到限制。
4. 電極與毛細管開口間空間位置排列會影響偵測結果之準確度。

2.2.2.4 折射率偵測法(Refractive index detection)

利用折射率來偵測也是一種不需經過樣品衍生的偵測法。其原理是利用雷射光源(常用氬-氬雷射)側照射(side-illumination)一充滿液體的毛細管，會因毛細管中成分不同而產生不同的折射率(refraction)變化。

Dovich *et al.* [76,77]是第一批將此偵測法搭配高效液相層析或是毛細管電泳的研究團隊，後來漸受大家推廣利用。其結果發現，雖然此法沒有極高的偵測靈敏度，但其偵測極限較以低波長紫外光直接偵測低，所以常用於分析缺乏發光團之醣類分子。

Bruno *et al.* [78]在毛細管的周圍包一層 refraction index match fluid (RIMF)，或使用 position sensitive photodiode (PSD)，可降低因溫度變化所造成的干擾雜訊，順利的在 50 μm 內徑的毛細管後結合此偵測法，分析 lactose 等五種雙醣分子，其中蔗糖(saccharose)的偵測極限可至 10 μM ，除了焦耳熱的問題外，此種偵測法尚未有商業化產品出現，也是無法普及的原因。

2.2.3. 衍生之醣類分子偵測法

2.2.3.1 紫外光可見光偵測方法(Ultraviolet-visible, UV-Vis)

醣類分子等碳氫化合物本身不具有紫外光可見光發色團，經由衍生反應和衍生試劑結合而具有光學偵測的特性，即可利用紫外光可見光偵測法偵測。一般常見的紫外光可見光範圍之衍生試劑有：2-aminopyridine (2-AP, λ_{\max} : 240 nm, λ_{em} : 375 nm)、p-aminobenzonitrile (λ_{\max} : 285 nm)、p-aminobenzoic acid (λ_{\max} : 285 nm)、ethyl p-aminobenzoate (λ_{\max} : 305 nm)、S-(-)-1-Phenethylamine (λ_{\max} : 200 nm)、6-aminoquinoline (6-AQ, λ_{\max} : 270 nm)、2-aminoacridone (2-AA, λ_{\max} : 264 nm)等等，大致上可分為苯胺類(aminobenzene)及胺萘磺酸類(aminonaphthalene sulfonic acids)等分子。圖(2-4, 2-5)為常見衍生試劑之分子結構。

Rassi *et al.* [79]利用 2-AP 與麥芽醣寡醣(maltooligosaccharides)分子衍生，在波長 240 nm 的紫外光下偵測，緩衝溶液為磷酸鹽溶液(phosphate buffer)，並試著在其中添加 50 mM tetrabutylammonium bromide，產生兩種相反的影響：其一是 tetrabutylammonium bromide 分子會與管壁作用，使得管壁表面正離子吸附變薄，電滲流速度因而提高；其二是添加 tetrabutylammonium bromide 後，緩衝溶液中離子濃度提高，電滲流速度變慢。最終結果發現：在最佳分離條件下有助於使波峰訊號強度增大，且分離解析度較高。論文中還探討分離電壓、電解質濃度、緩衝溶液 pH 值對分離所造成的影響。同樣的研究團隊在 1995 年發表的另一篇論文中[80]，將 gangliosides 與紫外光衍生試劑 sulfanilic acid (SA)和 7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDA)反應，偵測波長為 240 nm 之紫外光。論文中也對電泳條件詳加探討：在 phosphate 緩衝溶液中加入 15 mM α -CD 以及 50%的乙腈(acetonitrile)，可以得到很好的解析度和分離效率，另外，硼酸鹽緩衝

溶液系統也有很好的分離效果，pH 10.0、150 mM 溶液中加入 15 mM α -CD，可成功分離聚合度 1-3 的 gangliosides 寡糖。利用衍生試劑分離中性的糖類分子，最要注意的衍生試劑特性除了光學活性要高，最好還可以帶有電性，使得衍生後的分析物間的荷質比差異大，如此一來才能有助於提高中性糖類分子在電泳中的分離效率。

Novotny *et al.* [81]在 1997 年發表的論文中提到，2-AP 和 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)都因沒有強的帶電官能基，所以在分離效率上無法突破。於是此篇論文使用帶多價電荷的 N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamic acid (ABG)當衍生試劑，2-3 小時在 90°C 水浴下進行衍生反應，利用 pH 10/0.2 M 的硼酸鹽緩衝溶液可將水解後的葡萄聚糖分離至聚合度 20 左右。再進一步將分離管柱塗佈 HPC，緩衝溶液換成 100 mM Tris-borate buffer、pH 8.8，甚至可將分離的樣品聚合度提高至 40 左右。

Honda *et al.* [82]利用酵素 chondroitinase ABC 將 glycosaminoglycans 水解，與 PMP 在 0.5 M NaOH 溶液下加熱至 70°C 衍生，衍生結束後另加 0.3 M (30 μ L) HCl 以中和衍生之混合物，最佳的電泳條件為：pH 9.0/100 mM 之硼酸鹽緩衝溶液，內含 0.1%的 polybrene，紫外光波長為 245 nm，分離電壓 25 kV。實驗結果顯示，糖類分子會和硼酸鹽離子錯合而使得分離解析度提高，但也發現會有其他非糖類分子干擾的缺點，總括來說，此分析系統仍可有效率的分離出來自 glycosaminoglycans 的多種寡糖分子。

Matti *et al.* [83]則是分析木頭中糖類分子經水解後所得之中性單糖分子，例如：arabinose、galactose、glucose、mannose、rhamnose、xylose.....等。衍生試劑為 4-aminobenzonitrile (4-ABN)，反應過程有兩種：其一，在醋酸溶液中，將衍生試劑和還原劑混合，再加入寡糖樣品，保持 116°C/30 mins；其二，和方法一不同的是在混合溶液多加了 10%乙醇，加熱條件改成 100°C/1 hr，且注入毛細管前先用孔徑

大小為 0.45 μm 的過濾器處理。衍生後之產物可吸收 286 nm 紫外光。實驗結果顯示:選用電泳溶液 pH 9.5/500 mM borate solution 當緩衝溶液, 並施加 16.0 kV 分離電壓, 可得到較佳的分離解析度, 偵測極限甚至可以小於 10 fmol。文中並將電泳結果和氣液相層析(gas-liquid chromatography, GLC)相比較, 結果證實毛細管帶電泳的確是個分析醣分子的利器, 分離的解析度、再現性以及偵測極限都相當令人滿意。

Lebrilla *et al.* [84]於 2003 年發表用 UV 衍生試劑 N-quaternized benzylamine (BA)對醣類進行衍生, 能藉由毛細管電泳在醋酸胺緩衝溶液的環境下分離中性醣類異構物並以質譜儀作結構分析, 此方法成功提供醣蛋白(glycoprotein RNase B.)結構資訊。Novotny *et al.* [85]運用 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde (CBQCA)進行氨基酸聚合物衍生, 進入毛細管固相凝膠電泳, 當於緩衝溶液加入 Hydrolink 20%可以有效幫助分離, 效果達到 50 之波峰以上。

2.2.3.2 雷射誘發螢光(Laser-Induced Fluorescence, LIF)偵測法

和紫外光可見光的原理相同, 將不發光的醣類分子與量子效率(quantum efficiency)值高之衍生試劑反應, 於某一特定雷射波長激發下, 此衍生產物會放射螢光, 達成偵測不具發光團醣類分子的目的。並有文獻[86]統稱此類利用螢光輔助醣類分子分析的方法為: fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE。

不同的衍生試劑要搭配合適波長的激發光源, 如: 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonic acids (APTS, λ_{exe} : 455 nm, λ_{em} : 512nm) 和 2-aminoacridone (2-AA, λ_{exe} : 425 nm, λ_{em} : 520 nm)須以氬離子雷射 (Ar^+ ion laser)作為光源; 而 quinolinecarboxaldehyde (CBQCA, λ_{exe} : 442 nm, λ_{em} : 552 nm)、8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS, λ_{exe} : 325 nm, λ_{em} : 520 nm)和 7-Aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDSA, λ_{exe} : 315 nm, λ_{em} : 420 nm)則可利用氬-鎘雷

射作為光源。至於氦-氖雷射 (He-Ne laser) 則須選用 5-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (TRSE, λ_{exc} : 543 nm, λ_{em} : 580 nm) 作為衍生試劑，圖(2-4, 2-5)為常見之螢光衍生試劑。

Starr *et al.* [87] 在 1994 年發表一篇利用毛細管電泳結合雷射誘發螢光偵測法分離葡萄聚糖的寡糖分子，文中利用激發波長為 360 nm 衍生試劑 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS)，雷射光源為 He-Cd 雷射。探討電場強度在 100-1000 V/cm 範圍內對寡糖分子移動速度的影響、溫度倒數和分析物移動速度取對數的關係以及分子量對移動速度的影響等。實驗結果發現都呈現很好的線性關係，並找出最佳電泳分離條件為：pH 4.25/25 mM 醋酸鹽緩衝溶液，分離時溫度定在 20°C，電場強度 526 V/cm，可在 15 分鐘內完成分離，且理論板數高達百萬。

同年，Novotny *et al.* [88] 利用毛細管內壁塗佈丙醯烯胺，使用 pH 8.5 緩衝溶液於反相電壓下，比較三種衍生試劑與葡聚糖衍生所產物的分析結果。結果顯示，衍生試劑分子上帶有電荷數目越多，分析結果越好。以 ANTS 分子上帶有 3 個磺酸基效果最佳，除了分離效率高、分離時間短，還可以解析較長鏈的葡聚糖分子(聚合度大於 90)。另一個常見的螢光衍生試劑為 3-(p-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxyaldehyde (CBQCA)。

Dovich *et al.* [89] 將其與 1-Mannosamine、2-glucosamine、1-glucosamine、1-fucosamine 及 1-galactosamine 等五種單糖衍生，在 50 mM phenylboronate 緩衝溶液下分離，分離電壓採取 400 V/cm，可在 13 分鐘內完成分離，且得到很好的解析度。文末並對離子濃度之所以影響分離解析度提出探討，關鍵在於分析物會和緩衝溶液中的 $B(Ph)(OH)_3$ 及硼酸鹽離子錯和。兩種錯合反應相互競爭，若分析物與 $B(Ph)(OH)_3$ 錯和，會增加分子量，但不會影響帶電價數；反之，與硼酸鹽離子錯合會帶上負電荷，因此對改善分離效果有幫助，另外，

B(Ph)(OH)₃ 上龐大的 phenyl group 會讓錯合反應因位阻效應而降低反應常數，故當離子濃度上升時，硼酸鹽緩衝溶液的錯和反應較 B(Ph)(OH)₃ 為多，因此，當緩衝溶液離子濃度從 30 mM 提高至 50 mM，大大改善了分離解析度。

Karamanos *et al.* [90] 利用衍生試劑 2-aminoacridone (2-AMAC) 衍生取自鯨魚軟骨的雙醣分子-Chondroitin sulfate(CS)，使其可以利用雷射激發螢光偵測。激發波長 425 nm、偵測波長 520 nm，衍生條件為 45°C/2 小時，電泳分離使用的緩衝溶液為 pH 3.0 / 15 mM orthophosphate buffer，分離電壓為 20 kV，偵測極限可達 0.51 pM。

Rassi *et al.* [91] 同樣分析軟骨素中的二醣。衍生反應是利用衍生試劑 7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDSA) 上的胺基和醣分子上的羧基(-COOH) 進行縮合反應，此反應之效率高達 97%，所以利用管柱前衍生-雷射激發螢光偵測法的偵測極限可達 nanomolar，遠比直接紫外光(波長 325 nm) 偵測極限低 3 個數量級。電泳條件則是使用 pH 4.0/100 mM sodium acetate buffer，反相電壓 20 kV，在 13 分鐘內成功分離 8 個醣類分子。

Dovich *et al.* [92] 選擇 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (TRSE) 為衍生試劑，分離 glucose 等 6 種單醣分子。最佳電泳條件為：pH 9.3/18 mM 之 phenyl boronic acid buffer，另加入 10 mM 之 SDS 以增加分離效率，整個分析可在 22 分鐘內結束。但此衍生試劑有些缺陷：1. 此衍生試劑不穩定容易水解，因此，電泳圖譜中有三根波峰都是衍生試劑。2. 衍生後的樣品需處理，使得實驗步驟繁複，亦增加污染機會。3. 此衍生反應需要較高濃度的醣，以克服衍生試劑不斷的水解反應，提高衍生產量。

Cooke *et al.* [93] 利用 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid (APTS) 為衍生試劑，利用 reductive amination 鍵結於葡萄糖寡醣上，討論衍生的時間、溫度、衍生試劑的濃度，最佳條件分別是高溫狀態：55

度下 2 小時；低溫狀態：37 度下 16 小時，並且透過毛細管凝膠電泳的高解析度來分離醣蛋白。Du *et al.*[94]使用 2-aminobenzoic acid (2-AA)衍生試劑鍵結於醣蛋白上的醣類分子，藉由高效能的毛細管凝膠電泳分離單醣成分與寡醣（如：sialic acid 及 fucose）的圖譜。

Novotny *et al.* [85]運用 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde (CBQCA)進行寡醣衍生，在毛細管固相凝膠下進行分離，藉由大小篩分的能力改善了質荷比(m/z)所造成的高聚合度醣類分離不理想的部分。

Linhardt *et al.* [95]利用酵素水解後的 Hyaluronic acid 成為四醣與六醣，搭配 7-Aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDA)進行衍生，採用 pH 2.5 的磷酸緩衝溶液的條件下進行分離，並且在酵素水解完成度 16.9%時即利用高溫破壞酵素活性後，進行衍生反應，可以分離聚合度 4 到 50 醣的玻璃尿酸。

Rassi *et al.*[96]亦是利用 7-Aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDA)衍生多種單醣及 sialooligosaccharides derived，文中討論到運用 PVA 塗布的管柱來消除電滲透流的影響，並藉由調整離子強度以改變分析物的淌度(mobility)來提升分析效率、解析度與選擇性。

Novotny *et al.* [97]利用 APTS 衍生酵素水解之後的玻璃尿酸，所使用的分析管柱經過修飾，並且在緩衝溶液中加入高濃度線性凝膠，其優異的解析度能將玻璃尿酸分離至聚合度 380 醣，甚至連分子內排列有差異的構型相近之產物也能達到分離的效果，並藉此分析方法監測酵素水解的程度。同一研究團隊也探討經 APTS 衍生 amylopectin 寡醣與特定藥物間的作用，並經由毛細管電泳予以分析。研究中發現，當緩衝溶液添加特定藥物後，某些長度的寡醣分子其遷移時間與峰形狀 (peak sharp)會有明顯改變。寡醣-藥物複合物(complex)之形成會受到緩衝溶液 pH 值、離子強度及添加甲醇濃度的影響。

雷射誘發螢光偵測為靈敏度極高的偵測法，搭配毛細管電泳分析

醣類分子的研究很多，成果豐碩，整理出其優點如下：

- 1.此分析法具有極高的特異性，主要是因為只有低於 10%的吸光物質，在吸光後會在回到基態的同時放出螢光，所以圖譜的干擾極少。
- 2.縱使同樣都會吸收雷射激發光且放出螢光的物質同時存在，除非二者的結構非常相似，否則吸收同一波長的光也不會放出相同波長的螢光，而吸收相同螢光的兩個物質，則很可能放出不同波長的光，因此特異性很高。
- 3.螢光偵測法的檢量線有很長的線性範圍，長達 6 個數量級，而其他的光譜圖，通常只擁有 3 個數量級的線性範圍。然而雷射誘發螢光偵測最主要的缺點就是儀器設備及衍生試劑較為昂貴，因而限制了此技術的普及性和發展。

2.3 醣類分子衍生反應的類型

醣類分子衍生反應的位置可在醣類分子的羥基(-OH)、還原醣的羰基(-C=O)、胺醣的胺基(-NH₂)及酸性醣的羧基(-COOH)以下整理 5 種類型之衍生試劑和醣類分子的反應機制：

2.3.1 Reductive amination

此類衍生反應為最常見的衍生機制，反應方式如圖(2-2)中第一類型所示。還原糖(reducing sugar)在水溶液中會以三種形式存在：開環形式、具醛基的開環形式(open-chain aldehyde form)、以及環狀形式(annular form)。此反應先由衍生試劑的胺基(-NH₂, amino group)與還原醣上的醛基在弱酸催化下反應，形成一個較不穩定的中間產物—，此步驟為速率決定步驟(rate-limiting step)。接著加入適量的還原試劑 NaBH₃CN 將不穩定的中間產物 schiff base 還原為穩定的二級胺衍生產物此類型衍生通常在弱酸(醋酸)狀態下進行，與反應溫度、反應時

間、弱酸濃度、衍生試劑濃度等因子相關。表 2-1 所列出常見的衍生試劑與碳水化合物衍生之條件，其皆是利用 reductive amination 進行反應，以供之後實驗條件的參考。

2.3.2 具羧酸基(-COOH, carboxyl group)醣類分子與含胺基衍生試劑間，在 carbodiimide 存在下進行縮合(condensation)反應

羧酸基醣類分子先與 carbodiimide 形成一中間產物，再與含胺基的衍生試劑縮和生成最終產物與另依附屬產物 Isourea。反應方式如圖(2-2)中類型(2)所示。

2.3.3 還原醣之羰基(carbonyl group)與 PMP 或 PMPMP 進行縮和反應

在鹼性催化下，還原醣之羰基與 PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)或 PMPMP (1-(p-methoxy)phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)分子上的活性氫進行縮和反應，衍生試劑與醣類分子之間的反應莫耳數比例為 2:1，此類型產物只是用於紫外光偵測。如圖(2-2)之第(3)類型所示。

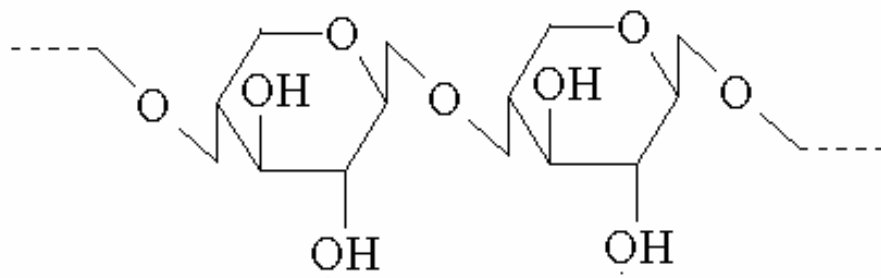
2.3.4 還原醣與 CBQCA 在氰化鉀(KCN)存在下之 reductive amination 反應

CBQCA(3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxyaldehyde)與醣分子結構中的胺基在 CN⁻存在下反應生成最終衍生產物。若還原醣分子結構中不含胺基，則可先將還原醣與還原劑 NaBH₃CN 和 NH₄⁺反應，形成帶胺基的醣分子後，同樣可利用 CBQCA 經由此反應而衍生成為帶發光團之化合物，衍生後的產物可適用於氫離子雷射(λ_{exc} : 457 nm or 488 nm, λ_{em} : 552 nm)或氬-氬雷射(λ_{exc} : 442 nm)。此類反應方程式如圖(2-2)中類型(4)所示。

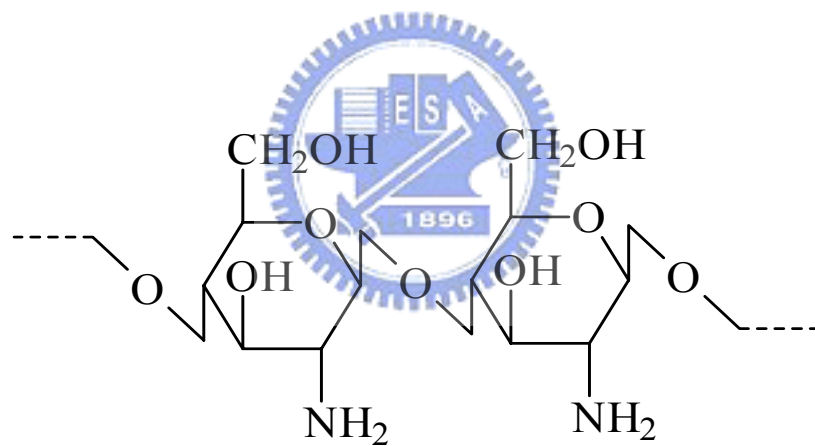
2.3.5 具胺基的還原醣與 TRSE 之 reductive amination 反應

TRSE(5-carboxy-tetramethylrhodamine succinimidyl ester)分子上的酯基碳與醣分子上之胺基進行反應，產物除了主要的醣衍生產物外，還有副產物 Hydroxysuccinimide，是由 TRSE 分子斷裂的小分子。如圖(2-2)中類型(5)所示。其衍生產物可是用於氬-氬雷射(λ_{exc} : 543 nm, λ_{em} : 580 nm)。





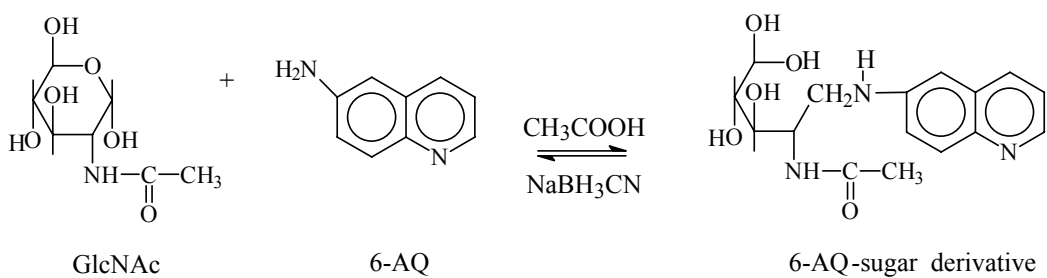
Poly[β -D-xylopyranose(1 \rightarrow 4)]
木聚糖(xylan)



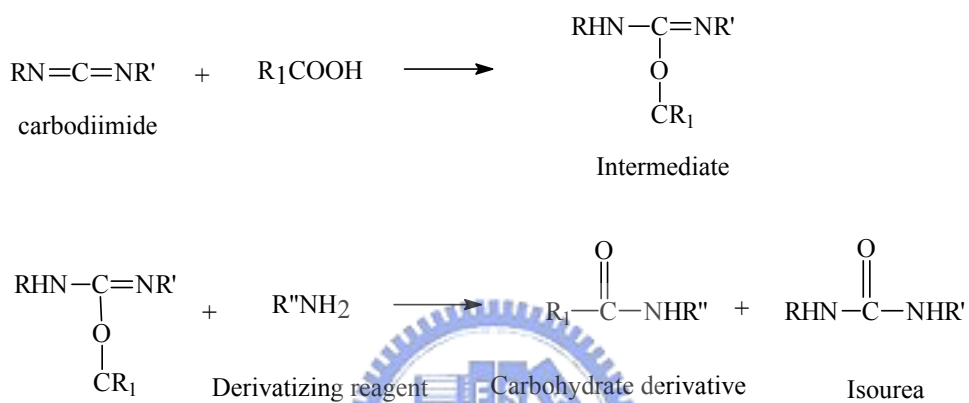
(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy- β -1,4-poly-D-glucosamine
幾丁聚糖(chitosan)

Figure 2-1 The structures of xylan and chitosan.

(1)



(2)



(3)

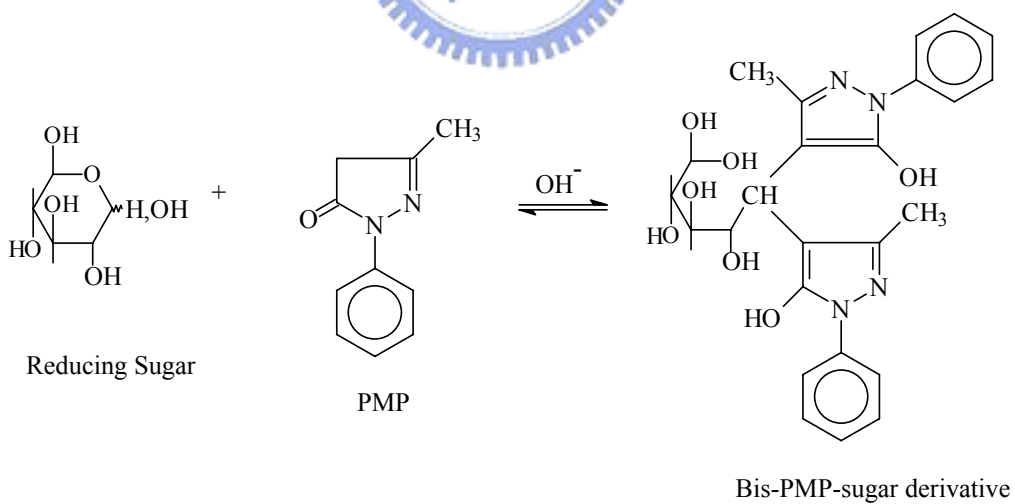
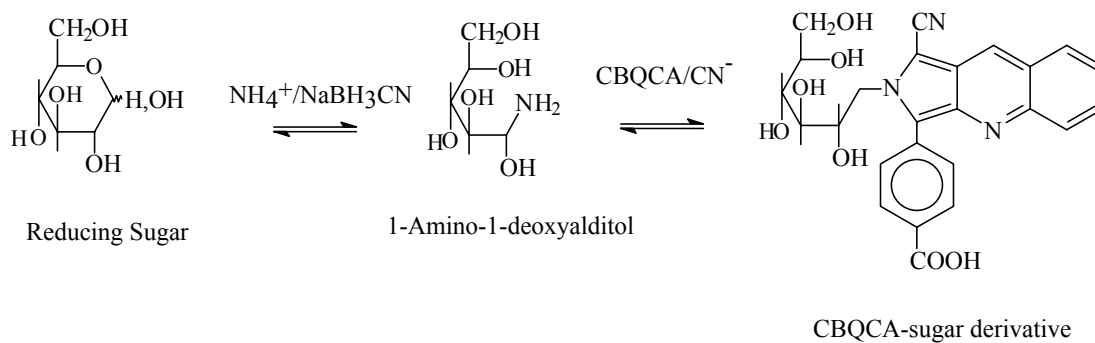


Figure 2-2 The derivative reactions(I - III).

(4)



(5)

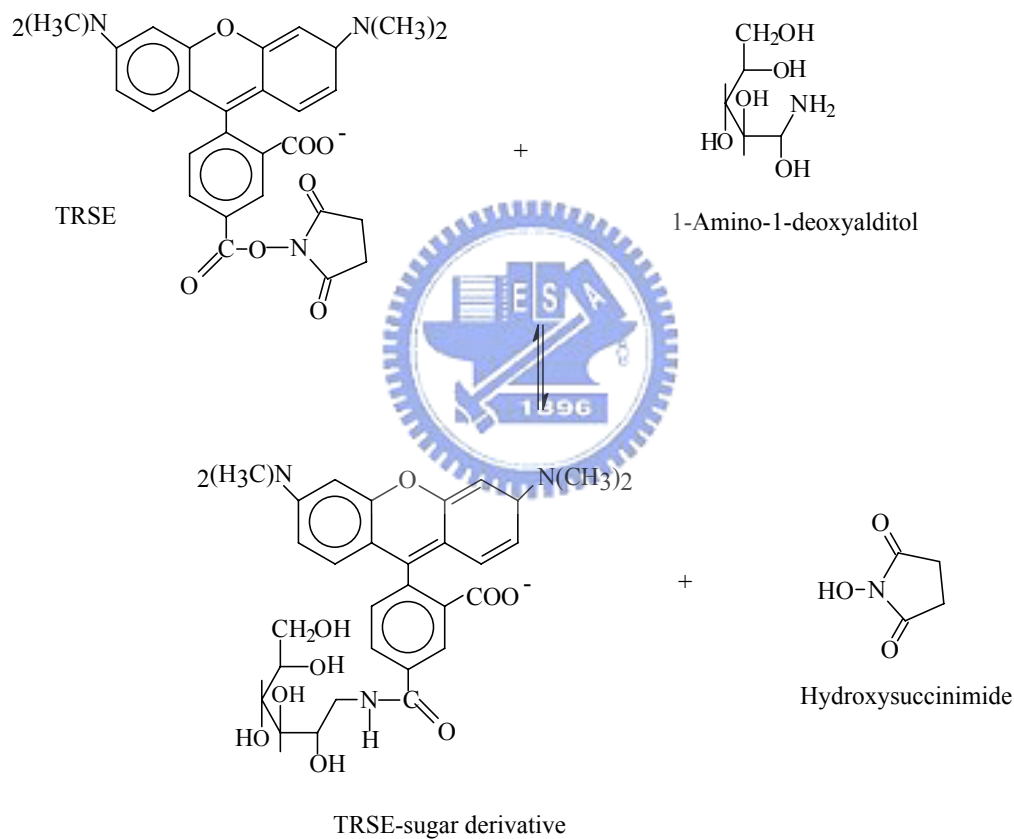


Figure 2-2 The derivative reactions(IV- V).

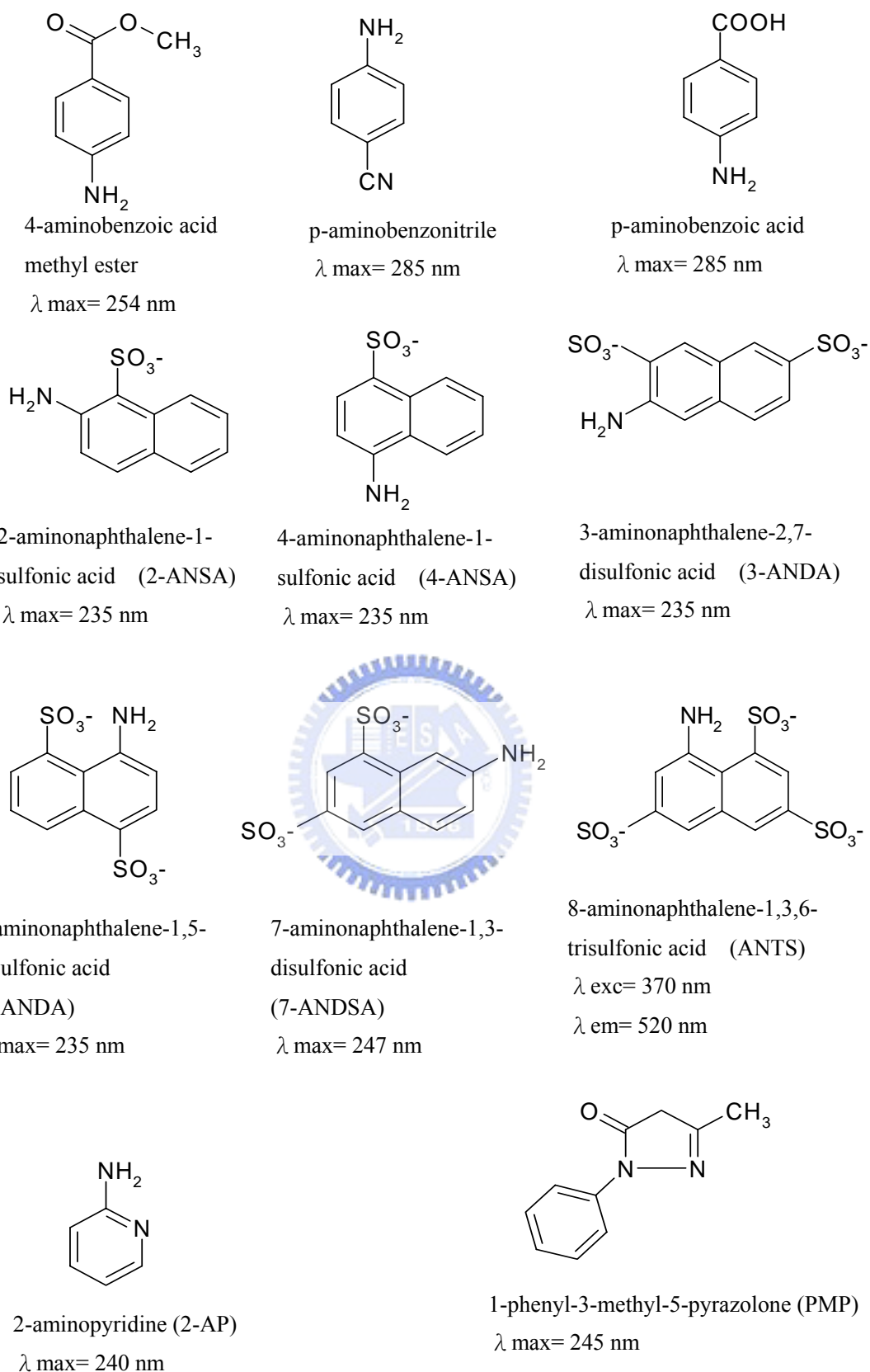
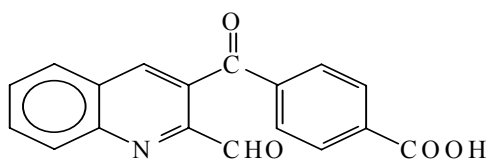


Figure 2-3 The structures of derivative reagents I .

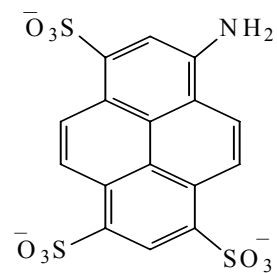


3-(4-Carboxybenzoyl)-2-quinoline
carboxaldehyde
(CBQCA)

$\lambda_{em} = 552 \text{ nm}$

Argon ion laser 457nm or 488 nm

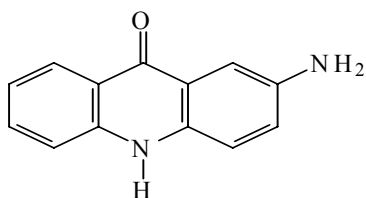
He-Cd laser 442 nm



9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonic acid
(APTS)

$\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$

Argon ion laser 488 nm

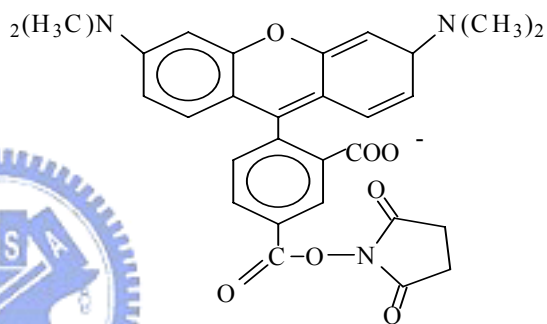


2-aminoacridone
(2-AA)

$\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$

$\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$

Argon ion laser 488 nm



5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester
(TRSE)

$\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$

He-Ne laser 543 nm



Figure 2-4 The structures of derivative reagents II .

Table 2-1

The optimized derivative condition.

Derivative reagent	Time (hr)	Temp. (°C)	Conc. of acetice acid (%)	Conc. of derivative reagent (M)	analyte	Conc.of analyte
3-aminonaphthalene-2,7-disulfonic acid ^[99]	2	90	30	0.2	Xylan	100 mg/ml
7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid ^[96]	6	45	15	0.15	Hyaluronate lyase	1.25 µg/µl
N-(4-amino-benzoyl)-L-glutamic acid ^[82]	2	90	50	0.18	Isomalto oligosaccharides	2 mg/ml
5-aminonaphthalene-2-sulfonic acid ^[89]	1	90	3	0.05	Dextrin	2.5 mg/ml
2-aminopyridine ^[89]	1	90	3	0.05	Dextrin	2.5 mg/ml
8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid ^[103]	3	80	15	0.15	Complex of oligosaccharides	25 µg/µl
1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate ^[94]	2	55	15	0.2	Isomalto oligosaccharides	50 nmol