

一、毛細管電泳簡介

1.1、毛細管電泳的簡介

電泳的分離是利用帶電分析物在緩衝溶液中，外加高電壓時，分析物會以不同的移動速率向電荷相反的方向遷移，造成分析物分離的現象。1937年，Tiselius[1]率先將電泳技術發展成一種分離技術，並成功地利用電泳技術分離人體血清中的球蛋白，由於此研究與貢獻，Tiselius於1948獲得了諾貝爾化學獎。1967年，Hjerten [2]提出以直徑3mm的開管毛細管管柱，在高電場之下進行毛細管區帶電泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)，造成無機離子、蛋白質與核酸的分離。1974年，Virtanen[3]採用了內徑200~500 μm 的玻璃毛細管柱進行電泳實驗，並針對電滲流與焦耳熱對散熱及分離效率的影響加以探討。1981年，Jorgenson與Lukacs[4-5]以75 μm 內徑的毛細管在高電場下進行一系列氨基酸的分離，而開啟了毛細管電泳的應用。1984年，Terabe[6]提出了微胞電動力學毛細管層析法(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC)，可用來分離中性物質，不再侷限於帶電分析物，因而提昇毛細管電泳的應用範圍。

毛細管電泳因內徑小，管壁內表面積對體積的比值高，使得散熱快，可降低高電場引起的焦耳熱效應，改善了傳統電泳在高電壓分離時，因焦耳熱效應，而無法獲得好的分離效果的缺點。相較於高效液相層析(HPLC)，毛細管電泳的分離效率較高，分析速度快，所需樣品量少及溶劑消耗量少的優點。分離不同性質的分析物，僅需改變操作模式、緩衝溶液的組成與操作條件，即可分離不同的樣品，因此毛細管電泳具有很大的選擇性。此外，毛細管電泳因結合了電泳的分離機制、色層分析儀器及自動化的分離技術，所以具有線上檢測、定量分析和儀器自動化的特點，使得毛細管電泳迅速成為極有潛力的分離

技術。現今商業型毛細管電泳儀主要可分為高電壓供給器、白金電極、分離之毛細管、緩衝溶液、偵測器及訊號處理器等部份，儀器裝置簡圖如圖 1 所示。樣品由毛細管一端注入，然後將毛細管兩端分別置於緩衝溶液中，再藉由白金電極將高電壓導入緩衝溶液形成外加電場，使分析物因遷移速率不同而分離，最後經由偵測器檢測。

1.2 毛細管電泳分離原理

毛細管電泳的分離原理是利用分析物在緩衝溶液中解離成不同電性、不同電荷數之離子，在施加電場作用下，依照分析物本身之遷移速度而形成分離。在緩衝溶液中，中性分析物不受外加電場影響，分析物遷移速度與電滲流相同，故無法造成分離效果，所以調節緩衝溶液使分析物帶不同電性，是重要的考量因素。毛細管管柱為 fused silica 材質，當毛細管管柱注入 pH 值大於 2 的緩衝溶液時，內部管壁表面的 silanol group 會開始解離而帶負電荷，此時緩衝溶液中的陽離子因受管壁上之負電荷吸引而在管壁表面形成電雙層，在外加電場作用下，電雙層中擴散層的水合陽離子會帶著管柱中的溶液往負電極流動，形成電滲流。電滲流因受外加電場作用而形成，其移動型式為「平板流(plane flow)」，而非如高效液相層析分析方法由壓力驅動所產生之「拋物線流」，故分析物利用毛細管電泳分離時，在毛細管中的樣品區間可更為集中，分離的理論板數因此提高。若毛細管內壁經過修飾而帶有正電荷時，則電滲流的方向為由負極往正極；若管壁不帶電荷或為電中性時，則無電滲流的產生。由 von Smoluchowski 所推演的公式(1)可清楚看出電滲流速度與電場強度成正比的關係，另和介電常數、則塔電位及溶液黏度也有密切的關連。

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta E}{\eta} \quad (1)$$

v_{eo} : 電滲流速度(velocity of electroosmotic flow)

μ_{eo} : 電滲流移動率(mobility of electroosmotic flow)

E : 電場強度(electric field strength)

ε : 介質的介電常數(dielectric constant of medium)

ε_0 : 真空中電穿透度(electrical permittivity of free space)

ζ : 則塔電位(zeta potential)

η : 介質的黏度(viscosity of medium)

一般而言，由於電滲流的速度大於分析物本身的遷移速度，故負離子仍將朝負極移動，因此在負極端的偵測器可分別偵測到帶正電荷與帶負電荷之分析物。在毛細管電泳中正、負離子及中性物質之移動速度的差異為：正離子由於電荷吸引與電滲流同方向，故向負極移動的速度最快，最先經過偵測器；中性物質移動速度與電滲流相同；負離子因電荷吸引與電滲流反方向，故向負極移動速度最慢，分析物移動速度關係圖如圖 2 所示。分析物在電場中移動的速度可以公式(2)來表示。

$$v = \frac{L_{\text{eff}}}{T} = (\mu_e + \mu_{eo})E = \mu_{\text{eff}}E = \mu_{\text{eff}} \frac{V}{L} \quad (2)$$

v : 分析物移動速度(velocity of an analyte)

L_{eff} : 毛細管有效管長(effective length of a capillary tube)

T : 分析物之移動時間(migration time of an analyte)

μ_e : 分析物電泳速率(electrophoretic mobility of an analyte)

μ_{eff} : 分析物的有效移動率(effective mobility of an analyte)

V : 施加之電壓(applied voltage)

L : 管柱全長(full length of tube)

E : 電場強度

毛細管電泳中影響分析區帶變寬的主要因素，包括縱向擴散、焦耳熱引起的溫度梯度、樣品進樣長度、分析物與管壁的電性相互作用。縱向擴散決定了分析物分離的理論板數，低擴散係數的分析物易形成窄的區帶。焦耳熱導致溫度梯度與層流，造成局部緩衝溶液的黏度產生變化及分析物的分子動能增加，而引起樣品區帶分散。分析物與管壁若電性相反，則兩者會互相吸引，而產生波峰拖尾，甚至管壁吸附分析物，造成靈敏度下降。故上述變因都應詳加考慮，以獲得最佳層析圖譜。

1.3 毛細管電泳的分離模式

毛細管電泳有許多分離模式，各種方式的分離模式均不相同，且各有其優缺點，目前發展出較成熟的模式有以下幾種，如：毛細管區間電泳(capillary zone electrophoresis, CZE)、毛細管凝膠電泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)、毛細管等速電泳(Capillary Isotachopheresis, CITP)、微胞電動層析法(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)。毛細管區間電泳為最簡單且最基本的分離模式，而微胞電動層析法是本實驗利用其進行線上濃縮的方法。

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

毛細管區間電泳(capillary zone electrophoresis, CZE)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，當遷移速度不同時即可達到分離的效果，稱為毛細管區間電泳。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，可藉由加入不同添加物來達到分離的效果。

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

此方法是 1984 年由 Terabe[6-7]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分離技術。由於緩衝溶液以水溶液為主，藉由添加界面活性劑在緩衝溶液中產生微胞，形成假靜相，而增加分離效率與應用範圍，界面活性劑所形成的微胞內部為疏水性，外部為親水性，利用分析物間的疏水性強弱差異，造成分析物於微胞中的分配比例不同，形成遷移速度不同，造成分離。藉由調整界面活性劑的濃度，亦可改變分析物與微胞之間分配親和力的強弱，進而影響分析物的遷移速度，此方法稱之為微胞電動層析法。為了產生微胞，必須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)，此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[53]。常用界面活性劑的臨界微胞濃度與聚結的單體數目如表 1 所示。

1.4 偵測方法

目前常用的偵測器有紫外光偵測器、螢光偵測器、雷射誘發螢光偵測器、電化學偵測器和質譜偵測器等。其中以紫外光偵測法最被廣泛使用，因為花費低廉、原理簡單、對大部分分析物均適用，且配合紫外光二極體列陣偵測器(UV-VIS diode array)，可獲得分析物的全光譜圖，有利於分析物的鑑定。紫外光偵測法能偵測 nL 或更小體積的樣品，將毛細管外層的聚乙醯胺移除約 3mm 作為偵測窗口，在毛細管末端管柱上完成偵測。由於毛細管的偵測光徑約為 50~100 μm ，吸取注入樣品量非常少，所以此方法偵測極限上受到很大的限制，因此增加光徑長度或線上濃縮技術的開發，是解決問題的重要方法。

二、線上濃縮簡介

2.1 線上濃縮簡介(On-line preconcentration)

毛細管電泳具有高解析度與分離時間快的優點，但毛細管電泳受到光徑短，且注入樣品體積小的限制，使得UV吸收偵測法有靈敏度上的缺點。以電化學法、雷射誘發螢光法和電導度分析法為偵測器雖可提供較好的靈敏度，但必須選擇特定的分析物，而質譜分析法雖然常見且具有良好的靈敏度，但儀器非常昂貴。此外，常見的離線(off-line)預濃縮方式，如：液相萃取法(liquid-liquid extraction)、固相萃取法(solid-phase extraction)及固相微萃取法(solid-phase microextraction)雖可達到偵測極限降低的目的，但有繁瑣的前處理步驟，而以線上濃縮技術降低偵測極限，解決低濃度分析物在毛細管電泳偵測上的問題，是一個重要的技術。

為改善毛細管電泳靈敏度的缺點，使用線上樣品濃縮的方式來降低偵測極限，提高靈敏度，是最簡單且最經濟的方法，而又不需增加任何儀器設備。注射樣品時，提高樣品的注射時間，此時樣品區帶會隨之增加，利用分析方法將樣品區帶聚集濃縮，以提高相對濃度，此方法稱之為樣品堆積(sample stacking)技術。樣品堆積技術在毛細管電泳中最早出現在 1979 年時，由 Mikkers[8]在實驗中所發現，到了 1989 年，才由 Lauer、Chien 與 Burgi 等人[9-11]進一步研究，成為毛細管電泳中重要技術。根據分析物不同，可分為帶電荷分析物與不帶電荷分析物兩種堆積方法。在帶電荷分析物的堆積方法中，最早是利用樣品與緩衝溶液導電度的差異，造成分析物在此兩種環境中遷移速度不同，而形成樣品堆積，稱之為電場放大堆積。在中性不帶電荷分析物的堆積模式下，因為分析物不帶電荷，所以電場作用的改變，並不影響分析物的遷移速度，因此樣品堆積技術並不適用。但經由 Terabe

教授的研究，發展出在 MEKC 模式下對中性分析物進行樣品堆積技術，並降低偵測極限最高可達百萬倍。

現今已發表過的濃縮方式大致有：電場放大堆積法、大體積樣品堆積、不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮與掃掠式線上濃縮，其各有不同適合的分析物，需針對分析物與濃縮效率(concentration efficiency)的要求選擇最適當的樣品堆積方法。

2.2 線上濃縮法之原理

線上濃縮法的主要概念就是讓分析物產生遷移速度改變，使較晚時間進入毛細管的分析物可以追趕上前方的分析物，使得樣品區帶產生濃縮的效應。使分析物產生速度改變的方式有兩種，一為樣品濃縮於樣品區帶的前端(較靠近 outlet 的一端)，例如：電場放大堆積法。另一種為樣品濃縮於樣品區帶的後端(較靠近 inlet 的一端)，例如：利用陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮法與中性界面活性劑掃掠式線上濃縮法。使分析物產生速度改變的原理有以下幾點概述。

2.2.1 電場強度的影響

由電場與淌度的關係及歐姆定律，可以得知分析物的遷移速度與分析物所處的電位成正比。由於整段毛細管內的電流為一定值，根據歐姆定律可知毛細管內的任何一點的電位與該點的電阻成正比，所以電阻越大之處，電位也越大，則分析物在該點的遷移速度也越快。

歐姆定律為： $V=IR$ (3)

V：電壓(voltage)

I：電流(current)

R：電阻(resistance)

若在毛細管前端注入高離子強度的緩衝溶液，而分析物配製在低離子強度的樣品溶液中，則分析物一開始時，因位處於低離子強度的溶液中，電阻大而電場也大，所以分析物會快速通過此區域，當分析物位處於高離子強度的緩衝溶液，因為電阻小而電場也小，分析物遷移速度變慢而使後方的分析物追趕上前方分析物，形成樣品聚集於樣品區帶的前端。

2.2.2 pH 值的影響

分析物因為處在不同的 pH 值緩衝溶液中，其所帶的電荷數不同，而造成分析物的遷移速度改變，例如：在酚類分析物中，其在 pH 10.5 時，分析物帶有負電荷，而 pH 6.0 時，分析物為中性物質，此時若施加正向電壓，而毛細管中前端為 pH 10.5 的緩衝溶液，後端為 pH 6.0 的緩衝溶液，當前方分析物進入 pH 10.5 的緩衝溶液時，分析物因帶有負電荷而與電極相斥，使得遷移速度變慢，則後方分析物則會追趕上前方分析物，形成樣品聚集於樣品區帶的前端。

2.2.3 界面活性劑微胞的影響

此因素在掃掠式線上濃縮技術中最常被使用，當分析物接觸界面活性劑微胞時，會造成分析物遷移速度變快或變慢，而產生樣品堆積。例如：酚類分析物在 pH 10.5 時，分析物會帶有負電荷，若施加正向電壓，則分析物會與電極相斥，使得分析物遷移速度小於電滲流，若在緩衝溶液中添加中性界面活性劑時，分析物會與微胞溶合而使得負電荷的數目減少，則後方的分析物因在微胞中，本身遷移速度加快而趕上前方分析物，形成樣品聚集於樣品區帶的後端。

2.2.4 電極與分析物的影響

利用分析物所帶的電荷與電極產生相斥，導致分析物的遷移速度小於電滲流，而產生樣品濃縮現象。當分析物帶有負電荷時，在施加反向電壓下，則樣品基質會隨著電滲流而流出毛細管，帶有負電荷的分析物因遷移速度較慢，而堆積於毛細管末端，此時再施加正向電壓，使分析物往偵測端移動。

以上幾點為分析物產生速度改變的基本原理，線上濃縮技術大都利用上述原理中的一至二種濃縮原理進行實驗設計，因為每種原理適合的分析物不同，所以選擇時必須詳加考慮。

2.3 線上濃縮的模式

現今發表的線上濃縮方法有許多的濃縮模式，各種濃縮原理均不相同，且各有其優缺點，目前發展出較成熟的模式有以下幾種，如：電場放大堆積(Field-amplified sample stacking, FASS)、大體積樣品堆積(Large-volume sample stacking, LVSS)、不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(pH Junction)、掃掠式線上濃縮(sweeping-MEKC)。而 FASS、LVSS、pH Junction 必須應用於帶有電荷的分析物，但 sweeping-MEKC 可以應用於中性分析物，圖 3 為選擇線上濃縮技術的建議流程圖。

2.3.1 電場放大堆積(Field-amplified sample stacking, FASS)

在毛細管電泳分析技術中，最常見的樣品堆積法為電場放大堆積法(利用原理 2.2.1)，其原理主要是利用電場強度不同，分析物遷移速度不同，而產生樣品堆積效果。其機制為：在毛細管中注入高離子強度、低電場強度的緩衝溶液(如圖 4(a)所示)，將分析物溶於離子強度

低於緩衝溶液的樣品溶液中(如圖 4(b)所示)，分析物會快速通過離子強度較低的樣品區帶，堆積於緩衝溶液與樣品區帶介面(如圖 4(c)所示)。由電場與淌度的關係及歐姆定律，可以得知分析物的遷移速度與分析物所處的電位成正比。由於整段毛細管內的電流為一定值，根據歐姆定律可知毛細管內的任何一點的電位與該點的電阻成正比，所以電阻越大之處，電位也越大，則分析物在該點的移動速度也越快，因此只要在毛細管中形成不同離子強度的區段即可達到電場差異的效果，而造成樣品堆積的效果。電場放大堆積的應用包括界面活性劑碳鍊長度的分析，其濃縮效率為 300 倍[12]；中藥的分析上可以降低偵測極限 1000 倍以上[13]；而在濫用藥物的檢測上，其靈敏度可提升 1000 倍[14]，但其限制為樣品的離子強度需低於緩衝溶液的離子強度，使得在真實樣品偵測上有嚴重的限制。

2.3.2 大體積樣品堆積(Large-volume sample stacking, LVSS)

大體積樣品堆積此方法的最大特色是樣品的注入量最高可達毛細管體積的 50%，利用分析物所帶的電荷與電極相斥而停留於毛細管中(利用原理 2.2.4)，其機制如下：先在毛細管中注入大量的樣品(如圖 5(a)所示)，利用分析物受電場移動的方向與電滲流的移動方向不同，電滲流會將樣品區帶的基質帶出毛細管外，分析物因受外加電場的影響，會排斥向入口端移動，而壓縮樣品區段(如圖 5(b)所示)，當壓縮至所偵測的電流值為最大電流值的 95%時(如圖 5(c)所示)，需將電極的極性反向，使濃縮的分析物向出口端移動(如圖 5(d)所示)。此方法最須注意的是壓縮樣品的時間，當偵測的電流達到最大值的 95%時，必須將電極反向，否則分析物可能因此而流失。大體積樣品堆積可應用於食品添加劑的分析，可以增加靈敏度 120 倍[15]；抗生素分析上，其濃縮效率為 400 倍[16]；在金屬離子分析上可降低偵測極限

200 倍[17]，此方法只能單獨偵測陽離子或陰離子，且過程中須注意電流值的變化，才能得到具有再現性的結果。

2.3.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(pH Junction)

不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮是利用分析物在不同 pH 值緩衝溶液中，分析物所帶的電荷數不同，而造成濃縮的現象(利用原理 2.2.2)，其主要機制如下：如圖 6(a)所示，一般而言，若毛細管柱中充滿相同 pH 值的緩衝溶液，則分析物的遷移速度並無變化，亦不會產生堆積，但如圖 6(b)所示，先在毛細管中注入一段 pH 10.0 的緩衝溶液，再注入一段 pH 6.0 的緩衝溶液，並施加正電壓，因為分析物在 pH 6.0 的緩衝溶液中不帶電性，而在 pH 10.0 的緩衝溶液會帶負電荷，所以分析物一開始為中性，其會隨者電滲流快速往出口端移動，而當分析物進入 pH 10.0 的緩衝溶液中，分析物會轉而帶負電，使得遷移速度變慢，而堆積樣品與兩種緩衝溶液的界面。不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮原理和樣品溶液離子強度無關，所以主要應用於生物樣品分析，如：抗生素及其代謝物的分析，可以將其偵測極限降低 1000 倍[18]；蛋白質的分析上，其濃縮效率為 300 倍[19]；而在吡黃素的分析上，可以將其偵測極限降低 1200 倍[20]。

2.3.4 掃掠式線上濃縮(sweeping-MEKC)

掃掠式線上濃縮是利用界面活性劑與分析物在毛細管內遷移速度的不同，而造成樣品區帶的濃縮，其最大特點是可以適用於中性分析物，無論利用電場放大堆積或大體積樣品堆積，分析物均受限於離子分析物，因此掃掠式線上濃縮在近年來廣受注意，其依照分析物的帶電性與界面活性劑的性質，可以分為許多種的掃集模式：

- 1.中性界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with nonionic micelles)
- 2.陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with cationic micelles)
- 3.陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with anionic micelles)
- 4.陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(Anion-Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography)
- 5.陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(Cation-Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography)
- 6.大體積注入結合掃掠式線上濃縮(Large-volume sample stacking -Sweeping- Micellar Electrokinetic Chromatography)

由 Terabe 教授[23]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，而無需考慮分析物所帶的電性與電量。

如圖 7 所示，若被微胞掃集過的長度為 l_{sweep} ，則

$$I_{\text{sweep}} = d(a_c) - d(mc_c) \quad (4)$$

a_c 與 a_a 分別代表位在正極端與負極端的分析物樣品溶液與緩衝溶液界面的分析物， mc_c 與 mc_a 則分別代表位於正極端與負極端緩衝溶液中帶有的界面活性劑。當 a_a 接觸到 mc_c 時， mc_c 所移動的距離 $\{ d(mc_c) \}$ 與 a_c 所移動的距離 $\{ d(a_c) \}$ 可分別表示為

$$d(mc_c) = V_{mc} t_{\text{sweep}} \quad (5)$$

$$V_{mc} = V_{ep}(mc) + V_{EOF} \quad (6)$$

$$d(a_c) = V_a(\text{MEKC}) t_{\text{sweep}} \quad (7)$$

$$V_a(\text{MEKC}) = V_{ep}^*(a) + V_{eof} \quad (8)$$

V_{mc} ：微胞的電泳移動速度

$V_a(\text{MEKC})$ ： 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 的有效電泳移動速度

t_{sweep} : 當 a_a 接觸到 mc_c 的時間

$$V_{ep}(mc) = \mu_{ep}(mc)E \quad (9)$$

$$V_{ep}^*(a) = \left[\frac{k}{1+k} \right] \mu_{ep}(mc)E \quad (10)$$

$$t_{sweep} = l_{inj} / (V_{eof} - V_{mc}) \quad (11)$$

$$V_{EOF} = \mu_{EOF}E \quad (12)$$

$\mu_{ep}(mc)$: 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相與溶液相中的比例

$$\left(\frac{a_{mc}}{a_{free}} \right)$$

μ_{EOF} : 電滲流的電泳遷移率

我們將上面各式加以整合可得到

$$I_{sweep} = I_{inj} [1 / (1+k)] \quad (13)$$

由上式可得知，當 I_{inj} 固定時，分析物的容量係數越大，則 I_{sweep} 會變得越短，所得到的濃縮效果越好；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。

2.3.4.1 中性界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with nonionic micelles)

此機制最大的優點在於增加界面活性劑的濃度並不影響電流值，因此不會增加焦耳熱，亦不會造成波峰變寬的現象，而不影響系統的穩定性。此方法在施加正電壓下，利用分析物所帶的負電荷而與

電極相斥，而中性界面活性劑遷移速度與電滲流相同，使得後方分析物因接觸微胞，而與微胞溶合使本身遷移速度變快，追趕上前方分析物而形成樣品區帶濃縮(利用原理 2.2.3)。其機制為：在毛細管中充滿中性界面活性劑微胞的鹼性緩衝溶液，再注入一段和緩衝溶液導電度相近的樣品溶液(如圖 8(a)所示)，分析物必須在鹼性緩衝溶液環境下為陰離子，最後將毛細管柱兩端置於含有中性界面活性劑微胞的鹼性緩衝溶液，並施加一個正電壓(如圖 8(b)所示)，因為分析物受外加電場的影響，所以中性界面活性劑微胞的遷移速度大於陰離子分析物的遷移速度，而開始聚集分析物，形成濃縮的樣品區帶，分析物會與微胞一起往偵測器方向移動並造成分離(如圖 8(c)所示)。中性界面活性劑掃掠式線上濃縮主要應用於帶電性分析物，如：在酚類化合物上的分析，可以降低偵測極限 150 倍[21]；而農藥分析上，其濃縮效率為 100 倍[22]。



2.3.4.2 陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with cationic micelles)

此機制最大的特點是分析物會聚集於樣品區帶的前端，有別於中性界面活性劑與陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮聚集樣品於樣品區帶的後端。此方法在施加負向電壓及電滲流反向環境下，分析物與電滲流的速度與移動方向相同，毛細管前段的陽離子界面活性劑因與電極相斥而遷移速度小於電滲流，當前方分析物接觸微胞時，分析物因與微胞溶合使本身遷移速度會變慢，而後方的分析物會追趕上前方分析物(利用原理 2.2.3)。其機制為：在毛細管中充滿含有陽離子界面活性劑微胞的緩衝溶液，使電滲流反向，由負極流向正極，再注入一段樣品溶液，分析物必須維持中性，最後將毛細管柱兩端置於含有陽離子界面活性劑微胞的緩衝溶液中，並施加一個負電壓(如圖 9(a)所

示), 使得中性分析物的遷移速度大於陽離子界面活性劑的微胞, 而在緩衝溶液與樣品界面的前端開始聚集分析物, 形成濃縮的樣品區帶(如圖 9(b)所示), 分析物會與陽離子界面活性劑微胞一起往偵測器方向移動並造成分離(如圖 9(c)所示)。陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮主要應用於藥物分析上, 其可以增加靈敏度 250 倍[24]; 在除草劑的分析上, 可以降低偵測極限 130 倍以上[25]; 在環境荷爾蒙的偵測上, 其濃縮效率有 67 倍 [26]。

2.3.4.3 陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮(Sweeping with anionic micelles)

陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮可以針對中性分析物進行濃縮分離, 為最常見的濃縮分離機制, 且不需考慮樣品與緩衝溶液之間的離子強度, 可以實際利用於真實樣品的檢測。此方法在施加負向電壓及低電滲流下, 中性分析物幾乎停滯不動, 當分析物接觸陰離子界面活性劑的微胞時, 會受電極吸引而往出口端移動, 因而追趕上前方分析物, 造成樣品區帶濃縮(利用原理 2.2.3)。其機制為: 先在毛細管中充滿陰離子界面活性劑微胞的酸性緩衝溶液, 且酸性緩衝溶液的 pH 值需小於 3, 抑制毛細管產生電滲流, 將電滲流值趨近於零。再注入一段和緩衝溶液導電度相近的樣品溶液, 分析物在此酸性緩衝溶液中為中性分子, 不需帶有電荷(如圖 10(a)所示), 最後將毛細管柱兩端置於含有陰離子界面活性劑微胞的酸性緩衝溶液, 並施加一個負電壓, 管柱入口端的陰離子界面活性劑微胞在電場的吸引下, 進入管柱並往偵測器方向移動, 在此環境下, 分析物因為不帶電荷, 且電滲流趨近於零, 所以分析物的移動是藉由滯留於陰離子界面活性劑微胞中, 利用微胞受電極吸引而向出口端移動(如圖 10(b)所示), 在微胞接觸樣品區帶後, 微胞會開始聚集分析物, 形成濃縮的樣品區帶, 並依

照分析物與微胞親和力的不同，而產生分離(如圖 10(c)所示)。陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮主要應用於：在農藥分析上，可以降低偵測極限 170 倍[27]；藥物分析上，可以降低偵測極限 250 倍[28]，而在毒品分析上，其濃縮效率有 200 倍[29]。

2.3.4.4 陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(Anion-Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography , ASEI-sweeping-MEKC)

陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮此機制為掃掠式線上濃縮技術的更進一步研究，可將濃縮效率從 100 倍提升到 10000 倍以上。此方法同時利用電場放大堆積及掃掠式線上濃縮的原理，將分析物配製在低導電度的樣品基質中，利用電壓注入法注入毛細管中，則帶有負電荷的分析物會快速通過高電場區的水，而停留在低 pH 值的緩衝溶液中，形成中性分析物，再利用陰離子界面活性劑微胞進行濃縮，使樣品區間再次濃縮(利用原理 2.2.1 和原理 2.2.3)。其機制為：先在毛細管中充滿酸性緩衝溶液，將電滲流值趨近於零，接著注入一段水以達到施加電壓時，樣品電場放大的目的(如圖 11(a)所示)。接著施加負電壓，利用電動注入法將樣品注入於管柱中，並由電滲流將水往管柱入口端排出(如圖 11(b)所示)，則分析物會快速通過低導電度的水，而停留在低 pH 值的緩衝溶液中，形成中性分析物(如圖 11(c)所示)，將水完全排出毛細管柱後，即完成樣品注入(如圖 11(d)所示)，最後將管柱兩端置入含有陰離子界面活性劑微胞的酸性緩衝溶液中，並施加負電壓，由於緩衝溶液 pH 值的影響，使得微胞的遷移速度大於電滲流，而朝偵測器端移動(如圖 11(e)所示)，在微胞接觸樣品區帶後，微胞會開始聚集分析物，形成濃縮的樣品區帶，並依照分析物與微胞親和力的不同，而產生分離(如圖 11(f)所示)。陰離子選擇性

全注入結合掃掠式線上濃縮主要應用於氨基酸的分析，可以降低偵測極限 1000 倍[30]，而水中農藥檢測上，其濃縮效率為 100000 倍 [31]，但此方法偵測真實樣品時，分析物的注入量會受樣品基質的離子強度影響，為其主要限制。

2.3.4.5 陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(Cation-Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography , CSEI-sweeping-MEKC)

陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮此原理與陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮大致相同，亦可以濃縮 10000 倍以上，主要是針對陽離子分析物。其將分析物配製在低導電度的樣品基質中，利用電壓注入法注入毛細管中，則帶有正電荷的分析物會快速通過高電場區的水，而停留在低電場區的緩衝溶液中，再利用陰離子界面活性劑微胞進行濃縮，使樣品區間再次濃縮(利用原理 2.2.1 和原理 2.2.3)。其機制為：先在毛細管中注入一段較低導電度的酸性緩衝溶液，再導入一段高導電度的酸性緩衝溶液，接著注入一小段水以達到施加電壓時，樣品電場放大的目的(如圖 12(a)所示)。接著施加正電壓，利用電動注入法將樣品注入於管柱中，樣品因為電場放大堆積，會聚集樣品區帶於高導電度酸性緩衝溶液中(如圖 12(b)所示)，當分析物充滿高導電度酸性緩衝溶液前，停止注射樣品(如圖 12(c)所示)，再將管柱兩端置入含有陰離子界面活性劑的酸性緩衝溶液中，並施加負電壓(如圖 12(d)所示)，由於緩衝溶液 pH 值的影響，使得微胞的遷移速度大於電滲流，而朝偵測器端移動，另一方面，因為電滲流的關係，樣品基值將從入口端被移出(如圖 12(e)所示)。陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮主要應用於金屬離子分析上，其偵測極限可以降低 200000[32]；而農藥分析上，其濃縮效率為 100000 倍[33]，但亦有陰

離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮的缺點。

2.3.4.6 大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮(Large-volume sample stacking-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography , LVSS-sweeping-MEKC)

大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮是為了解決真實樣品偵測上的問題，因為電壓注入法容易受樣品基質干擾，造成分析物進入毛細管中的濃度不一，而大體積樣品堆積的注入方式是氣壓注入法，故較不受樣品基質干擾，其濃縮效率也可達到 1000 倍以上。此方法先注入大量的樣品體積，利用分析物帶有負電荷而與電極相斥，使樣品基質因受電滲流影響而排出，分析物卻滯留於毛細管末端(Inlet 端)，此時再利用陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮法進行樣品堆積(利用原理 2.2.3 和原理 2.2.4)。其機制為：首先在毛細管中充滿低 pH 值的緩衝溶液，再注入一大段的樣品，並開始施加負電壓，此時緩衝溶液中並無界面活性劑(如圖 13(a)所示)，樣品基質因受電滲流影響，會快速往出口端移動，分析物因為帶有負電荷而緩慢向出口端聚集(如圖 13(b)所示)，當電流值為最大電流值的 90%時(實驗值)，再將毛細管兩端置入含有陰離子界面活性劑微胞的緩衝溶液中，再施加負電壓(如圖 13(c)所示)，此時，分析物會停留在低 pH 值的緩衝溶液中，形成中性分析物(如圖 13(d)所示)，因為緩衝溶液的低 pH 值，抑制電滲流，使得陰離子界面活性劑微胞的遷移速度大於電滲流，則分析物會藉由微胞往出口端移動(如圖 13(e)所示)。

三、應用陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮分析防腐劑

3.1 防腐劑的種類與使用

因為食品加工業的不斷發展，為了在銷售期間保持食品的新鮮度和穩定性，防腐劑的使用是無可避免的。防腐劑主要用來抑制細菌、霉菌的生長，防止食物變壞的食品添加劑，亦可稱為抗微生物劑或抗菌劑。理想的防腐劑應具有強大的防腐力和對人體毒性小，但現實情況中，兩者是不可兼得，防腐劑大都帶有毒性，所以當添加量超過安全標準時，對人體依然會有傷害產生，因此分析防腐劑的工作是重要且須進一步發展。

本實驗所分析的對氫氧基苯甲酸酯類廣泛用於各種化粧品製劑，在所有防腐劑中，使用頻率佔第一位。常用的有對氫氧基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯和丁酯，具有抗真菌和細菌的特性，此酯類分析物抗微生物的活性隨著酯基上碳鏈長度增加而增加，但碳鏈越長，分析物在水中的溶解度越低，所以太高碳數的酯類並不適用[34-35]。

防腐劑的定性與定量分析方法，當使用氣相層析法(GC)進行防腐劑的分析時，往往須經過複雜的衍生前處理。高效能液相層析法(HPLC)是目前主要應用於化妝品中防腐劑的分析方法，因為不須衍生反應步驟，但其偵測極限只有 ppm 等級[34-38]。對於毛細管電泳分離技術而言，已有對於苯甲酸與己二烯酸在飲料或食品中的分析，但並沒有包含所有的防腐劑分析，且偵測極限也只有 ppm 等級[39-41]。本研究將針對六種常見的對氫氧基苯甲酸酯類防腐劑，包括對氫氧基苯甲酸甲酯、對氫氧基苯甲酸乙酯、對氫氧基苯甲酸丙酯、對氫氧基苯甲酸丁酯、對氫氧基苯甲酸異丙酯、對氫氧基苯甲酸異丁酯等六種分析物，並配合毛細管線上濃縮降低分析物的偵測極限至 ppb 等級，可降低樣品偵測極限 100 倍以上。

3.2 線上濃縮方法

毛細管電泳是近年來相當受到重視的分析技術，但往往受限於毛細管的光徑，在 UV 的偵測上，無法有效降低靈敏度，而樣品線上濃縮技術是解決方法之一，其可以增加偵測極限至 ppb 等級，甚至 ppt 等級，而不必更改或變換任何儀器設備，是一種既簡便又經濟的方式。其原理是增加毛細管中樣品的進樣量，透過不同的方式，將樣品區間聚集濃縮，以提高樣品的濃度。

本實驗利用陰離子界面活性劑(SDS)掃掠式線上濃縮分析防腐劑，其原理為：在毛細管中充滿 SDS 的酸性緩衝溶液，使其抑制毛細管產生電滲流，再注入一大段樣品溶液，並施加一個負向電壓，最後使管柱入口端的微胞在電場的吸引下，進入管柱並往偵測器方向移動，此分析方法必須分析物在酸性環境中不帶電荷，所以分析物的移動是藉由停留於微胞內部的疏水端，利用微胞受電極吸引而使分析物與微胞一起向前移動。本實驗兩個最主要的變因是電滲流與 SDS 的濃度，當電滲流越小時，分析物與微胞接觸時間越長，則濃縮效果越佳，而影響電滲流的主要變因是緩衝溶液的 pH 值與離子強度。當 SDS 的濃度增加時，分析物的容量係數亦隨之增加，而增加濃縮效率，故需討論 SDS 的濃度與樣品的離子強度。

3.3 實驗

3.3.1 試藥

所有藥品均為分析級。磷酸氫二鈉 (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide, NaOH)購自於 Fluka(Buchs, Switzerland)公司。十二烷基磺酸鈉(Sodium dodecyl

sulfate , SDS)、對氫氧基苯甲酸甲酯(Methyl *p*-hydroxybenzoate)、對氫氧基苯甲酸乙酯(Ethyl *p*-hydroxybenzoate)、對氫氧基苯甲酸丙酯(Propyl *p*-hydroxybenzoate)、對氫氧基苯甲酸丁酯(Butyl *p*-hydroxybenzoate)自 Sigma(St. Louis , MO , USA)購入。對氫氧基苯甲酸異丙酯(Isopropyl *p*-hydroxybenzoate)、對氫氧基苯甲酸異丁酯(Isobutyl *p*-hydroxybenzoate)購自 Tokyo Chemical Industry(Tokyo , Japan)。檸檬酸(Citric acid) 、 甲醇(Methanol)購自 Merck (Darmstadt , Germany)。分析物的結構式如圖 14 所示。實驗用水係經 Milli-Q 水系統(Millipore , Bedford , MA , USA)純化後，經 0.22 μm 濾紙過濾，電阻值達 18.2 $\text{m}\Omega$ 。

3.3.2 儀器裝置

使用貝克曼公司(Beckman Instrument , Fullerton , CA , USA)所製造之毛細管電泳儀，P/ACE MDQ 系列進行實驗。紫外光-可見光光二極體陣列(UV-VIS diode array)作為偵測器。儀器與分析數據由 P/ACE MDQ 視窗版軟體控制與處理。毛細管內徑為 50 μm ，外徑為 360 μm ，管柱長 60 cm，有效長度為 50 cm，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 0.5 cm，再以乙醇擦拭作為偵測窗口。毛細管溫度由儀器控制於 20 -50 下。分離電壓為-25 kV。樣品注入為壓力注射(0.5 p.s.i.)方式進入毛細管。偵測器吸收波長設於 210 nm。

3.3.3 標準溶液與緩衝溶液之配製

六種標準樣品以水/甲醇溶液(75:25, v/v)配製成濃度 1 mg/ml 的儲備標準溶液中，並置於 4 的冰箱中保存，分析時，將此儲備溶液以檸檬酸/磷酸氫二鈉混合稀釋，配成不同濃度組成的溶液，作為分析

的標準溶液。緩衝溶液是由檸檬酸和磷酸氫二鈉以去離子水和甲醇所配製而成，並添加十二烷基磺酸鈉 (SDS) 當作緩衝溶液。

3.3.4 分析實驗操作

本實驗所使用的毛細管內徑為 50 μm ，外徑為 360 μm ，管柱長 60 cm，有效長度為 50 cm，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 0.5 cm，再以乙醇擦拭作為偵測窗口，裝置於 MDQ 卡夾中。新的毛細管柱在使用前依序以 1N HCl、去離子水、1N NaOH 和去離子水分別清洗 30 分鐘。

每次分析實驗進行前，以緩衝溶液清洗 5 分鐘，再注入分析樣品。分離電壓為 -25 kV，偵測波長為 210 nm，分離管柱的溫度控制在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，每次實驗過後以甲醇、1N NaOH 和去離子水分別清洗 5 分鐘。

每天實驗前都先以 1N NaOH 與去離子水各清洗 15 分鐘，實驗結束後則以甲醇、1N NaOH 和去離子水各清洗 20 分鐘。

3.4 結果與討論

3.4.1 緩衝溶液中有機溶劑的影響

在微胞電動層析毛細管電泳實驗中，常會加入有機修飾劑來改變緩衝溶液的性質，減少分析物在微胞相的分配比例，增加高疏水性分析物於緩衝溶液中溶液相的分配比例。由於本實驗的分析物有對氫氧基苯甲酸丙酯、對氫氧基苯甲酸丁酯、對氫氧基苯甲酸異丙酯、對氫氧基苯甲酸異丁酯等兩組同分異構物，且均為高疏水性分析物，其大部分時間滯留於微胞內層的疏水端，以致無法有效分離，因此需要在緩衝溶液中添加有機修飾劑，來增加高疏水性分析物在緩衝溶液中溶

液相的時間，減少分析物與微胞的親和力，改變溶質的容量係數 (capacity factor, k)。

分析物向出口端移動是藉著陰離子界面活性劑 (SDS) 受電極吸引所移動，所以分析物的 k 值越大，其遷移速度越快。由圖 15 得知，當緩衝溶液中的甲醇濃度越高時，溶液相與微胞相的疏水性越相似，則分析物越容易停留在溶液相中，會增加波峰解析度，但分析物與 SDS 的親和力下降，亦會增加移動時間，並降低濃縮效率。當緩衝溶液中無添加甲醇時，對氫氧基苯甲酸丙酯與對氫氧基苯甲酸異丙酯、對氫氧基苯甲酸丁酯及對氫氧基苯甲酸異丁酯會因為對微胞親和力接近，無法有效分離，當加入 10% 的甲醇時，對氫氧基苯甲酸丙酯與對氫氧基苯甲酸異丙酯可以有效的分離，當加入 30% 的甲醇時，六種分析物可以完全被分離，但緩衝溶液甲醇的濃度過高時，會產生濃縮效率降低與移動時間增加的缺點，所以選擇在緩衝溶液中添加 30% 的甲醇為最佳條件。



3.4.2 緩衝溶液中 SDS 濃度的影響

在微胞電動層析毛細管電泳實驗中，當外加一電場時，會產生一個電滲流由正電極端往負電極端方向移動，而陰離子界面活性劑 (SDS) 是一外面帶負電荷的微胞，在外加電場作用下，表面帶負電荷的微胞會往正電極方向移動，故微胞和電滲流遷移方向相反。系統施加反向電壓下，在低 pH 值的緩衝溶液中，會抑制毛細管產生電滲流，電滲流值會趨近於零，故微胞的遷移速度比電滲流的速度快，所以微胞會與分析物一起向出口端移動。由於分析物需藉 SDS 向前移動，所以分析物疏水性越強，分析物的容量係數(k)越大，移動時間就越短。且由(14)式得知，當增加 SDS 的濃度時，則分析物的 k 值亦隨之增加，其移動時間越短，且濃縮效果越佳。

$$k = K (V_S/V_M) \quad (14)$$

k：容量係數(capacity factor)

K：分配係數(熱力學的平衡常數，partition coefficient)

V_S ：微胞相(假靜相)的體積

V_M ：溶液相的體積

在圖 16 中,含有 30% 甲醇的緩衝溶液,添加 SDS 濃度由 80 mM、100 mM、120 mM 至 150 mM,隨著 SDS 濃度增加,分析物的容量係數越大,具有較佳的濃縮效率,故以 SDS 濃度為 150 mM 時有最佳效果。電泳波峰的出現順序為:對氫氧基苯甲酸丁酯、對氫氧基苯甲酸異丁酯、對氫氧基苯甲酸丙酯、對氫氧基苯甲酸異丙酯、對氫氧基苯甲酸乙酯及氫氧基苯甲酸甲酯,此順序符合分析物的疏水性比較。增加 SDS 濃度時,雖然分析物的濃縮效率會增加,但在低 pH 值緩衝溶液中,SDS 較不易解離,當 SDS 濃度大於 150 mM 時,SDS 容易吸附在毛細管管壁,而造成毛細管損害,故最佳條件選擇 SDS 濃度為 150 mM。

3.4.3 緩衝溶液 pH 值的影響

緩衝溶液中 pH 值的改變會影響電滲流的大小,亦會影響分析物的帶電荷數,但對氫氧基苯甲酸酯類分析物只會在鹼性溶液中解離,在酸性溶液中為中性分析物,所以在本實驗中,改變 pH 值只會影響電滲流的改變,不會影響分析物的帶電荷數。在圖 17 中所示,因為電滲流(往入口端)與微胞(往出口端)前進的方向為相反方向,pH 值越小,電滲流越小,而分析物移動時間也越短,且電滲流越小,亦會造成分析物與微胞接觸時間越長,濃縮效率越高,所以 pH 2.6 的分析物移動時間短於其他探討條件,且有較平穩的基線與較高的濃縮效

率，故最佳條件選擇 pH 2.6 的緩衝溶液。

3.4.4 緩衝溶液離子強度的影響

在毛細管電泳分離過程中，由於外加一高電壓，所以在陽極會電解產生微量的 O_2 與 H^+ ，陰極會產生微量的 H_2 與 OH^- ，而產生 pH 值的變化，造成 pH 值梯度的情形發生，影響分離結果的再現性，因此添加緩衝溶液幫助 pH 值的穩定，使分離結果的再現性提高。

緩衝溶液濃度效應，亦為離子強度效應，當緩衝溶液濃度提高時，離子強度增加會造成毛細管壁電雙層被壓縮，使毛細管中的 Zeta 電位降低，因而減低電滲流的速度。由於電滲流與微胞前進方向相反，電滲流往入口端移動，微胞往出口端移動，所以電滲流越小，理論上，微胞和分析物所接觸的時間越長，樣品堆積效果越好。

由圖 18 中所示，固定 pH 2.6、150 mM 的 SDS 與 30% 甲醇緩衝溶液中，分別增加緩衝溶液離子強度由 15 mM、25 mM、50 mM 至 75 mM，由於緩衝溶液離子強度增加，電滲流變小，分析物與微胞所接觸的時間變長，分析物的濃縮效率增加，故在 75 mM 的緩衝溶液中有最佳的濃縮效率，但可能為焦耳熱效應所影響，此緩衝溶液的電泳圖譜基線不如 25 mM 的緩衝溶液平穩，以 25 mM 緩衝溶液的波峰高度為基準，75 mM 的緩衝溶液波峰高度為其 1.1 倍以下，所以考慮濃縮效率增加有限，及電泳圖譜的再現性情況下，選擇 25 mM 離子強度的緩衝溶液為最佳條件。

3.4.5 樣品離子強度的影響

樣品的離子強度與緩衝溶液中的離子強度對分析物的濃縮與分離有顯著的影響。當樣品離子强度高於緩衝溶液離子強度時，因為樣

品溶液為低電場區，而緩衝溶液為高電場區，所以陰離子界面活性劑 (SDS) 會快速通過高電場區的緩衝溶液，堆積於靠近負電極端的樣品與緩衝溶液界面上，造成局部 SDS 的濃度提高，也增加分析物濃縮效果，但相反的是，當掃集完成後，微胞中內含的分析物由樣品基質進入緩衝溶液時，會因為由低電場區進入高電場區，而造成擴散。當樣品離子強度低於緩衝溶液離子強度時，反而在一開始時造成局部 SDS 濃度降低，濃縮效果變差，但最後微胞中內含的分析物由樣品基質進入緩衝溶液時，反而因為電場強度差異的關係，而造成分析物濃縮現象，故必須針對個別分析物進行討論，在 Terabe 教授[42]的掃掠式線上濃縮法論文中，對此情形亦有所探討。

由圖 19 中所示，固定 pH 2.6、150 mM 的 SDS、30% 甲醇、25 mM 緩衝溶液中，分別增加樣品離子強度由 15 mM、25 mM、50 mM、75 mM 至 100 mM 進行討論，可以發現樣品基質濃度小於 75 mM 時，分析物的濃縮效率隨著樣品離子強度的增加而增加，這顯示因為電場強度的關係，造成 SDS 聚集而掃集效果變好的影響比分析物因電場強度關係而擴散的效果明顯，但當樣品離子強度到達 100 mM 後，因為樣品擴散效果比 SDS 聚集的影響明顯，且樣品離子強度變高，導致焦耳熱效應產生波峰變寬，造成分析物濃縮效率降低，甚至發生波峰些許重疊的現象，所以選擇 75 mM 的樣品離子強度為最佳條件。

3.4.6 樣品注射時間的影響

一般毛細管電泳實驗之樣品注射時間在 10 秒之內，若注射時間過長，會造成樣品區帶變寬，使得分析物波峰解析度及分離效率變差，然而本實驗是注入長秒數的樣品溶液，藉由微胞的遷移對分析物造成堆積，而降低偵測極限。但當注射時間太大時，亦會造成分離的區段太小，分析物波峰變寬，波峰高度不再增加，甚至造成波峰重疊

的現象，所以分析物波峰高度有一定限制，必須選擇濃縮效率最大又可完全分離的注射秒數。

由圖 20 中所示，增加注射秒數由 90 秒、180 秒、240 秒至 300 秒中進行討論，可以發現波峰高度隨者注射時間增加而增加。因為對氫氧基苯甲酸丙酯、對氫氧基苯甲酸丁酯、對氫氧基苯甲酸異丙酯及對氫氧基苯甲酸異丁酯等四種分析物對 SDS 的親和力較好，堆積效果較好，所以波峰高度隨著秒數增加而增加的效果較為明顯；但對氫氧基苯甲酸甲酯、對氫氧基苯甲酸乙酯對 SDS 的親和力較差，所以波峰高度隨著秒數增加而增加的效果不明顯，反而造成波峰變寬的效應，故選擇注射時間 240 秒為最佳條件，當注射時間大於 300 秒後，對氫氧基苯甲酸異丁酯與對氫氧基苯甲酸丁酯兩波峰會開始因為分離區域不足，而造成重疊現象。

3.4.7 再現性與濃縮效率



堆積效率(stacking efficiency, SE)[31]可以看出分析物在此方法的濃縮效率，以靈敏度的觀點而言，堆積效率每增加十倍，相當於增加一個級數的偵測極限，因此可藉由堆積效率獲知此方法的濃縮效率，在分析圖譜中，堆積效率可從分析物波峰高度計算出(SE_{height})：

$$SE_{\text{height}} = \frac{H_{\text{stack}}}{H} \times \frac{C}{C_{\text{stack}}} \quad (15)$$

H_{stack} ：為使用線上濃縮技術後所得的分析物波峰高度

H ：為一般層析法所得的分析物波峰高度

C_{stack} ：為使用線上濃縮技術時，所使用的分析物濃度

C ：為一般層析法所使用的分析物濃度

圖 21 為最佳條件下，防腐劑的掃掠式線上濃縮法層析圖與短秒數注入的一般層析圖，兩方法所使用的分析物濃度相差 50 倍，而波峰高度相差 2.4 倍以上，故堆積效率為 120 倍至 270 倍。

為確定陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮技術是否具再現性，在最佳條件下，連續進行五次實驗，以觀察分析物的移動時間、再現性、偵測極限及濃縮效率。如表 2 中所示，六種分析物的移動時間相對標準偏差都小於 1.05%，以最佳條件進行掃掠式線上濃縮法，可以將對氫氧基苯甲酸丙酯、對氫氧基苯甲酸丁酯、對氫氧基苯甲酸異丙酯、對氫氧基苯甲酸異丁酯四種分析物的偵測極限降至 17.6 ppb 以下，濃縮效率為 230 倍以上，對氫氧基苯甲酸甲酯與對氫氧基苯甲酸乙酯的偵測極限分別為 28.4 ppb 與 20.6 ppb，濃縮效率為 120 倍及 180 倍，亦證明分析物與微胞間的親和力越大，移動時間越短，樣品濃縮效率越高，偵測極限越低。



3.5 結論

本實驗使用陰離子界面活性劑 (SDS)，在 MEKC 模式下，對中性分析物防腐劑進行線上濃縮研究。此方法最大特色是使用 pH 2.6 的酸性緩衝溶液，使電滲流的遷移速率降低，利用微胞的遷移速度大於電滲流，將中性分析物堆積在樣品與緩衝溶液交界處，形成樣品區帶濃縮並進行分離，此方法不需改變電極亦能進行線上濃縮，避免被儀器條件所限制。

本研究在樣品中添加檸檬酸/磷酸氫二鈉的緩衝溶液，分離緩衝溶液中添加 SDS，並以有機修飾劑改變緩衝溶液性質，進行研究與討論。我們發現在掃掠式線上濃縮方法中，因為同分異構物與 SDS 的親和力非常接近，且分析物與微胞親和力良好，所以難以藉著分析物與 SDS 親和力不同，而造成分離，需在緩衝溶液中加入甲醇，以改

變溶質的容量係數，當甲醇濃度越大時，會增加解析度，但亦會增加移動時間，降低濃縮效率。緩衝溶液的離子強度越大，則電滲流越小(往 inlet 移動)，分析物與微胞的接觸時間就越長，會有較佳的濃縮效果，且電滲流越小，分析物移動時間越小，但是當離子強度太大時，因有焦耳熱效應，會產生基線不平穩的現象；而樣品基質的離子強度與緩衝溶液離子強度息息相關，必須針對分析物個別討論。除此之外，SDS 微胞濃度對樣品堆積有重大影響，SDS 濃度越大，濃縮效率越高，但 SDS 濃度太高可能導致毛細管壁吸附的現象；當分析物與 SDS 的親和力大時，則堆積效果較為良好。

本方法的最佳條件：緩衝溶液為 pH 2.6、25 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉，含有 30% 甲醇的有機修飾劑與 150 mM SDS 於緩衝溶液中，此時外加電壓為 -25 kV，樣品以 0.5 psi 注入 240 秒，分析物配製於 pH 2.6、75 mM 檸檬酸/磷酸氫二鈉的緩衝溶液中(不含甲醇與 SDS)，防腐劑的偵測極限可達 28.4 ppb 以下。



四、應用大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮分析酚酸

4.1 酚酸的種類

在文獻中指出，新鮮水果含有豐富的酚酸 (phenolic acids) 及黃酮醇(flavonoids)，這些來自植物的化學物質能產生抗氧化活動，壓抑癌細胞分裂，具有預防癌症的效果[43-44]。酚酸很廣泛地以自由態或結合態存在於自然界，大部分的植物均含有酚類化合物，而酚酸是最常出現的酚類化合物。酚酸是天然的抗氧化劑，許多水果及蔬菜皆含有此類化合物，如：茶葉、大豆、蕃茄、柑橘類水果及胡蘿蔔均具有相當多的多酚類化合物(酚酸 phenolic acids 及縮酚酸 depsides)。在動物實驗中，一些植物的化學成分，如：酚酸中的咖啡酸(caffeic acid)、阿魏酸 (ferulic acid)、綠原酸(chlorogenic acid)等皆可預防癌症。綜合言之，對植物和食物來說，酚酸具有非常重要的成分。

由於酚酸預防癌症的重要性，因此有許多分析方法被發展應用於酚酸的分析，而目前最常見的方法為液相層析法[44-48]，其主要用於分析果汁、水果、麥胚芽中的酚酸。然而同時分析超過五種以上的酚酸時，分離的時間會大於 30 分鐘[44,46]，甚至一個小時之久[47-48]，且分析的偵測極限只有 ppm 等級。在毛細管電泳技術方面，也有應用於酚酸的分析，但只有分析六種酚酸，且分析的偵測極限也只有 ppm 等級[49]。

本研究將發展在短時間內，可快速分析多種酚酸的分析方法，且降低偵測極限至 ppb 等級。故針對八種酚酸做為分析目標物，包括咖啡酸(caffeic acid)、阿魏酸 (ferulic acid)、綠原酸(chlorogenic acid)、香豆酸 (p-coumaric acid)、對氫氧基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid)、香草酸 (vanillic acid)、芥子酸(sinapic acid) 及丁香酸(syringic acid) 等八種分析物，發展毛細管電泳的分析方法，並配合毛細管線上濃縮

降低分析物的偵測極限至 ppb 等級，且提出一種新的線上濃縮技術，以解決陰離子全注入結合掃掠式線上濃縮在真實樣品偵測上的缺點。

4.2 線上濃縮方法

ASEI-sweeping-MEKC 其機制為：先在毛細管中充滿酸性非微胞緩衝溶液，接著注入一段水以達到施加電壓時，樣品電場放大堆積的目的。接著施加負電壓，利用電動注入法將樣品注入於管柱中，利用電滲流將水往管柱入口端排出，則分析物會快速通過低導電度的水，而停留在低 pH 值的緩衝溶液中，形成中性分析物，最後將管柱兩端置入含有陰離子界面活性劑的酸性緩衝溶液中，並施加負電壓，使微胞開始聚集分析物，形成濃縮的樣品區帶，並依照分析物與微胞親和力的不同，而產生分離。此方法雖有良好的靈敏度，但因利用電壓注入法，分析物注入毛細管中的濃度，易受樣品基質的干擾，故本實驗提出大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法來解決此問題，希望達到高靈敏度而又較不受樣品基質的干擾。

本實驗利用大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法 (LVSS-sweeping-MEKC) 分析酚酸，其原理為：將毛細管中充滿低 pH 值的緩衝溶液，再注入一大段的樣品，並開始施加負電壓，樣品基質因受電滲流影響，會快速往入口端排出，分析物因為帶有負電荷而緩慢向入口端聚集，當電流值為最大電流值的 90% 時，再將毛細管兩端置入含有陰離子界面活性劑微胞的緩衝溶液中，藉由微胞受外加電場吸引，將分析物帶往出口端移動，此方法的分析物偵測極限可以降低 1000 倍以上。本實驗並對大體積樣品堆積結合掃略式線上濃縮 (LVSS-sweeping-MEKC) 與陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮 (ASEI-sweeping-MEKC) 進行比較，包括樣品基質的干擾、再現性與濃縮效率。

4.3 實驗

4.3.1 試藥

所有藥品均為分析級。綠原酸(chlorogenic acid)、磷酸氫二鈉(disodium hydrogen phosphate , Na_2HPO_4)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide , NaOH)購自於 Fluka(Buchs , Switzerland)公司。十二烷基磺酸鈉(Sodium dodecyl sulfate , SDS)、咖啡酸(caffeic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、香豆酸(p-coumaric acid)、對氫氧基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid)、香草酸(vanillic acid)、芥子酸(sinapic acid)及丁香酸(syringic acid)等自 Sigma(St. Louis , MO , USA)購入。檸檬酸(citric acid) 、 甲醇(Methanol)購自 Merck (Darmstadt , Germany)。分析物的結構式如圖 22 所示。實驗用水係經 Milli-Q 水系統(Millipore , Bedford , MA , USA)純化後經 0.22 μm 濾紙過濾，電阻值達 18.2 $\text{m}\Omega$ 。



4.3.2 儀器裝置

使用貝克曼公司(Beckman Instrument , Fullerton , CA , USA)所製造之毛細管電泳儀，P/ACE MDQ 系列進行實驗。紫外光-可見光光二極體陣列(UV-VIS diode array)作為偵測器。儀器與分析數據由 P/ACE MDQ 視窗版軟體控制與處理。毛細管內徑為 50 μm ，外徑為 360 μm ，管柱長 60 cm，有效長度為 50 cm，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 0.5 cm，再以乙醇擦拭作為偵測窗口。毛細管溫度由儀器控制於 20 -50 下。分離電壓為-30 kV。樣品注入為壓力注射(5 p.s.i.)方式進入毛細管，並用-20 kV 的反向電壓進行樣品區間壓縮。偵測吸收波長設於 210 nm。

4.3.3 標準溶液與緩衝溶液之配製

八種標準樣品以水/甲醇溶液(75:25, v/v)配製成濃度 1 mg/ml 的儲備標準溶液中，並置於 4 °C 的冰箱中保存，分析時，將此儲備溶液以去離子水混合稀釋，配成不同濃度組成的溶液，作為分析的標準溶液。緩衝溶液是由檸檬酸和磷酸氫二鈉以去離子水所配製而成，並添加十二烷基磺酸鈉(SDS)當作緩衝溶液。

4.3.4 分析實驗操作

本實驗所使用的毛細管內徑為 50 μm ，外徑為 360 μm ，管柱長 60 cm，有效長度為 50 cm，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 0.5 cm，再以乙醇擦拭作為偵測窗口，裝置於 MDQ 卡夾中。新的毛細管柱在使用前依序以 1N HCl、去離子水、1N NaOH 和去離子水分別清洗 30 分鐘。

在每次分析實驗進行前，以無界面活性劑的緩衝溶液清洗 3 分鐘，再注入分析樣品，並用 -20 kV 的電壓進行樣品區間壓縮，當電流值達到最大電流值的 90% 時，再施加分離電壓 -30 kV，並將毛細管兩端置於含有陰離子界面活性的緩衝溶液中，偵測波長為 210 nm，分離管柱的溫度控制在 25 °C，每次實驗過後以甲醇、1N NaOH 和去離子水分別清洗 10 分鐘。

每天實驗前都先以 1N NaOH 與去離子水各清洗 15 分鐘，實驗結束後則以甲醇、1N NaOH 和去離子水各清洗 15 分鐘。

4.4 結果與討論

4.4.1 回推時間的影響

本實驗利用大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮分析酚酸，而樣品區帶的堆積一部分是靠反向電壓時間加以控制，若施加電壓時間過短，樣品區帶尚未完成堆積，造成分析物無法有效被分離；若施加電壓時間過長，容易造成分析物流失，此時分析物雖能夠被有效分離，但因樣品流失而降低分析的靈敏度。在本實驗中，透過電流的變化對施加電壓時間操作加以控制。圖 23 是樣品堆積與分離時的電流圖，以-20 kV 電壓進行樣品堆積時，電流最大值約為-7 μA ，當偵測的電流值達到最大值(-7.82 μA)的 90%時，此時反向電壓回推時間為 5.1 min，停止樣品堆積，將毛細管兩端所置入的緩衝溶液從無微胞緩衝溶液變成微胞緩衝溶液，再施加-30 kV 的電壓，以進行掃掠式線上濃縮。在圖 24 中所示，當反向電壓回推時間只有 4 min 時，樣品區間尚未完成堆積，造成樣品區間過大，而形成樣品基線的不平穩；當反向電壓回推時間為 6 min 時，會造成分析物流失，而降低靈敏度。故選擇施加 5.1 min 的反向電壓時間作為最佳條件。

4.4.2 緩衝溶液 SDS 濃度的影響

如 3.4.2 節所提到，陰離子界面活性劑(SDS)為帶負電荷的微胞，在施加反向電壓作用下，SDS 會往出口端(正電極)方向移動，而電滲流會往入口端(負電極)移動。本實驗的微胞遷移速度比電滲流的速度快，所以 SDS 與分析物會一起向出口端移動。由於分析物需藉著 SDS 向前移動，所以分析物疏水性越強，分析物的容量係數(k)越大，分析物移動時間就越短。在圖 25 中所示，固定反向電壓回推時間，增

加 SDS 濃度由 120 mM、150 mM 及 180 mM，由(14)式得知，隨著 SDS 濃度增加，分析物的 k 值亦隨之增加，而有較短的移動時間與較佳的濃縮效率。所以電泳波峰的出現順序為：sinapic acid、ferulic acid、p-coumaric acid、chlorogenic acid、caffeic acid、syringic acid、vanillic acid 及 p-hydroxybenzoic acid，此順序符合分析物的疏水性比較。增加 SDS 濃度時，分析物的濃縮效率會增加，但在低 pH 值緩衝溶液中，SDS 較不易解離，當 SDS 濃度大於 180 mM 時，SDS 容易吸附在毛細管管壁，而造成毛細管損害，故最佳條件選擇 SDS 濃度為 180 mM。

4.4.3 緩衝溶液 pH 值的影響

如 3.4.3 節所提到，緩衝溶液中 pH 值的改變會影響電滲流的大小，亦會影響分析物的帶電荷數，而酚酸類化合物在低 pH 的酸性緩衝溶液中為中性分析物，但隨著緩衝溶液 pH 的增加，而逐漸帶有負電荷，在本實驗中，改變 pH 值不只會影響電滲流的改變，亦有可能造成分析物的電荷數改變。在圖 26 中所示，因為電滲流(往入口端)與微胞(往出口端)前進的方向為相反方向，pH 值越大，電滲流越大，而分析物移動時間越長，所以 pH 2.6 的分析物移動時間短於 pH 3.0，且具有較平穩的基線，故最佳條件選擇 pH 2.6 的緩衝溶液。因為酚酸類化合物具有羧酸官能基，其在低 pH 值的緩衝溶液中，會抑制分析物解離，當緩衝溶液 pH 值逐漸增加時，其分析物會慢慢解離為陰離子，不利於分析物與 SDS 的結合，而降低濃縮效率，故當緩衝溶液 pH 值大於 3.0 時，酚酸難以利用此方法進行線上濃縮。

4.4.4 微胞緩衝溶液離子強度的影響

理論上而言，緩衝溶液離子強度提高時，會造成毛細管壁電雙層被壓縮，使毛細管中的 Zeta 電位降低，因而減低電滲流的速度。由於電滲流(往入口端)與微胞(往出口端)前進方向相反，所以電滲流越小，分析物與微胞所接觸的時間越多，且電滲流越小，分析物的移動時間就越短。但在本實驗中，尚有另一個需注意的變因，為微胞緩衝溶液與非微胞緩衝溶液的離子強度差異，當微胞緩衝溶液比非微胞緩衝溶液的離子強度低時，因為電場強度關係，SDS 會聚集於兩溶液界面，形成較高濃度的 SDS 區帶，則分析物的容量係數增加，會使得分析物往出口端移動速度較快，故本討論變因必須兩者皆考慮。

由圖 27 中所示，固定反向電壓回推時間與 pH 2.6、25 mM 無微胞緩衝溶液，微胞緩衝溶液離子強度由 15 mM、25 mM、50 mM 及 75 mM 進行討論，可以觀察出在 15 mM 的微胞緩衝溶液中，分析物移動時間最短，而 75 mM 的微胞緩衝溶液分析物移動時間最長，顯示出 SDS 聚集於兩溶液的界面，而使分析物往出口端移動速度變快的因素較為明顯。因為 SDS 聚集效應比離子強度效應明顯，其推測可能原因為：在低 pH 值的緩衝溶液中，緩衝溶液會抑制電滲流的速度，所以增加離子強度而造成電滲流速度降低的效應很小；且微胞緩衝溶液並非一開始就處於毛細管內，而是在分離分析物時，藉由電滲流將微胞緩衝溶液推入，將非微胞緩衝溶液推出，故其影響時間很短。以上原因造成 SDS 濃度聚集，使分析物移動速度變快的因素較為明顯，所以選擇 15 mM 離子強度的微胞緩衝溶液作為最佳條件，因為其分析物移動時間最短。

4.4.5 非微胞緩衝溶液離子強度的影響

改變非微胞緩衝溶液離子強度時，會影響電滲流的速度與 SDS 微胞的聚集，而造成二項變因，一為反向電壓回推時間的改變，其次為分析物移動時間的改變。施加反向電壓下，樣品區帶堆積是藉由電滲流(往入口端移動)將樣品基質推出毛細管，分析物因帶負電荷而受電極相斥的影響，抵抗電滲流，造成分析物遷移速度變慢，停留在毛細管末端中。故當電滲流變小時，樣品基質流出毛細管的速度變慢，造成反向電壓回推時間增加，但反向電滲流變小，分析物的移動時間會變短，且電滲流越小，分析物與微胞的接觸時間越長，濃縮效率越佳，故此討論變因需兼顧反向電壓回推時間與分析物移動時間，並觀察波峰高度的變化。

由圖 28 中所示，固定 pH 2.6、180 mM SDS、15 mM 的微胞緩衝溶液，改變無微胞緩衝溶液離子強度 15 mM、25 mM 及 50 mM，當無微胞緩衝溶液離子強度增加時，電滲流變慢，所以反向電壓回推時間分別為 3.8 min、5.1 min 及 9.8 min，而分析物移動時間也隨著電滲流(往入口端)變慢而減短，但波峰高度除 15 mM 無微胞緩衝溶液有明顯變小外，25 mM 及 50 mM 非微胞緩衝溶液波峰高度並無太大變化，以 25 mM 緩衝溶液的波峰高度為基準，50 mM 的緩衝溶液波峰高度為其 1.05 倍以下，所以選擇反向電壓回推時間較短，而波峰高度亦佳的 25 mM 無微胞緩衝溶液離子強度當作最佳條件。

4.4.6 樣品基質干擾的影響

本實驗比較大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮(LVSS-sweeping-MEKC)與陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(ASEI-sweeping-MEKC)兩種線上濃縮法進行比較，此兩種方法的最

大差別是分析物的注入方法, LVSS-sweeping-MEKC 是利用氣壓注入法注入一大段樣品, 而 ASEI-sweeping-MEKC 是利用電壓注入法, 利用電場強度差別與正負電極關係注入分析物, 所以 LVSS-sweeping-MEKC 的優點是分析物的注入濃度不受樣品基質的干擾, 在真實樣品偵測上有良好的應用。

本討論變因分為兩部分進行討論, 一為樣品基質中有機溶劑的影響, 二為樣品基質中離子強度的影響, 因為在真實樣品的取樣上, 可能含有機溶劑於樣品基質中, 或利用有機溶劑進行樣品前處理, 亦有可能具有雜質基質干擾, 而影響樣品的離子強度, 造成分析物注入量的不確定, 故選擇此兩種變因進行討論。

由圖 29 中所示, 在樣品基質中分別含有 0%、15% 及 30% 的甲醇, 以模擬在樣品中含有有機溶劑, 分別進行 LVSS-sweeping-MEKC 與 ASEI-sweeping-MEKC 兩種線上濃縮法的比較, 以樣品基質中含有 0% 的甲醇所得的波峰面積作為 100%, 並與其他條件所得之波峰面積作比較, 可以發現在 ASEI-sweeping-MEKC 方法中, 因為分析物在含有甲醇的溶液中, 解離能力降低, 分析物所帶的負電荷數目變少, 而降低分析物進入毛細管中的濃度, 當甲醇在樣品基質中的濃度提高時, 分析物進入毛細管中的濃度就越低, 會降低靈敏度, 且無法進行含有有機溶劑的真實樣品檢測。在 LVSS-sweeping-MEKC 中因為利用氣壓注入法, 所以分析物攜帶電荷的能力, 不會造成注入毛細管中分析物濃度的偏差, 但會造成電滲流的改變, 而影響反向電壓回推時間, 所以當樣品基質中甲醇濃度提升時, 不會影響分析物的濃度, 亦能完成檢量線, 故可以進行真實樣品的檢測。

由圖 30 中所示, 在樣品基質中分別含有 0 ppm、1 ppm 及 2 ppm 的氯化鈉, 以模擬在樣品基質中含有其他導電化合物, 分別進行 LVSS-sweeping-MEKC 與 ASEI-sweeping-MEKC 兩種線上濃縮法的比較, 以樣品基質中含有 0 ppm 的氯化鈉所得的波峰面積作為 100%,

並與其他條件所得之波峰面積作比較，可以發現 ASEI-sweeping-MEKC 因為樣品基質中含有氯化鈉，而導致樣品瓶中的離子強度增加，樣品與緩衝溶液的電場強度差異變小，分析物進入毛細管中的濃度就越低，電壓注入法的濃縮效率主要正比於分離緩衝溶液與樣品基質電導度的比值，所以當樣品基質中導電度提升時，分析物進入毛細管中的濃度變低，故無法進行真實樣品的檢測。在 LVSS-sweeping-MEKC 中因為利用氣壓注入法，增加氯化鈉濃度會使電滲流降低，改變反向電壓回推時間，但注入毛細管中分析物濃度的偏差只在 10% 以內，尚屬可接受的範圍內，所以當樣品基質中導電度提升時，較不會影響分析物的濃度，由此可證明 LVSS-sweeping-MEKC 較不容易受樣品中離子強度的變化，而影響偵測結果，此方法較能容忍樣品基質中導電度的改變，故較適合進行真實樣品的檢測。



4.4.7 再現性與濃縮效率

圖 31 為最佳條件下，利用 LVSS-sweeping-MEKC 分析酚酸的層析圖譜、掃略式線上濃縮與短秒數注入的層析圖譜，LVSS-sweeping-MEKC 與一般電泳方法所使用的分析物濃度相差 1000 倍，而波峰高度至少相差 5 倍，堆積效率則為 5000 倍~8000 倍，故此方法可以降低偵測極限至 3.7 ppb 以上。由圖 31 亦可觀察出，LVSS-sweeping-MEKC 比 Sweeping 的堆積效率較佳，可以再降低偵測極限 40~80 倍。圖 32 為最佳條件下，LVSS-sweeping-MEKC 與 ASEI-sweeping-MEKC 濃縮效率的比較，由於 ASEI-sweeping-MEKC 的分析物濃度與 LVSS-sweeping-MEKC 相差五倍，波峰高度相差 2~3 倍，所以 ASEI-sweeping-MEKC 的偵測極限可以降低 30000 倍以上，優於 LVSS-sweeping-MEKC 的濃縮效率。

為確定 LVSS-sweeping-MEKC 是否具再現性，並與 ASEI-sweeping-MEKC 進行比較，在最佳條件下，連續進行五次實驗，以觀察分析物的移動時間、再現性、濃縮效率與偵測極限。如表 3 和表 4 中所示，LVSS-sweeping-MEKC 的八種分析物移動時間相對標準偏差都小於 1.95%，而 ASEI-sweeping-MEKC 的八種分析物移動時間相對標準偏差都小於 2.89%。因為 ASEI-sweeping-MEKC 的分析物進樣為電動注入法，較易受樣品離子強度的干擾，所以在分析物濃度不同時，會有樣品離子強度差異的情況產生，而造成分析物進樣濃度不一，而 LVSS-sweeping-MEKC 是利用氣壓注入法，其樣品進樣不受離子強度干擾，故具有較佳的濃度線性關係。以最佳條件進行 LVSS-sweeping-MEKC 分析酚酸，可以將分析物的偵測極限降至 3.7 ppb 以下，濃縮效率也在 5000 倍~8000 倍，而 ASEI-sweeping-MEKC 在純水中分析酚酸時，雖然可以將分析物的偵測極限降至 0.91 ppb 以下，濃縮效率也在 30000 倍以上，但 ASEI-sweeping-MEKC 易受樣品離子強度的改變，而有不同的注入量與濃縮效率，並且其濃度線性關係較差，故在真實樣品的偵測上有其限制，而 LVSS-sweeping-MEKC 較不受樣品基質的干擾，且具有良好的濃度現性關係。

4.5 結論

本實驗使用陰離子界面活性劑(SDS)，結合大體積樣品堆積與掃掠式濃縮法(LVSS-sweeping-MEKC)，對中性分析物酚酸進行線上濃縮研究。此方法最大特色是結合兩種濃縮技術，使偵測極限降低 5000~8000 倍，大體積樣品堆積法使用反向電壓堆積樣品區帶，在 pH 2.6 的酸性緩衝溶液，利用微胞的遷移速度大於電滲流，將中性分析物堆積在樣品與緩衝溶液交界處，形成樣品區帶再次堆積並進行分離，而且此方法不需改變電極亦能進行線上濃縮，避免被儀器條件所

限制。

本研究以反向電壓堆積樣品區帶，若施加電壓時間過短，樣品區帶尚未完成堆積，造成分析物無法有效被分離；若時間過長，容易造成分析物流失，所以固定當壓縮電流值達到最大值的 90% 時，再將電極放置於微胞緩衝溶液中，進行掃掠式濃縮法。當 SDS 濃度越大，分析物的容量係數也越大，其濃縮效率越高，分析物移動時間越短，但 SDS 濃度太高可能導致毛細管壁吸附的現象。而微胞緩衝溶液的離子強度受因於 SDS 會聚集於微胞與非微胞緩衝溶液的界面，形成高濃度的 SDS，反而造成緩衝溶液離子強度越低時，分析物移動時間越短的現象；而非微胞緩衝溶液因考量電壓回推時間與濃縮效率，故選擇 25 mM 的離子強度作為最佳條件。本實驗並比較大體積樣品堆積結合掃掠式濃縮法(LVSS -sweeping-MEKC)與陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮(ASEI-sweeping-MEKC)兩種線上濃縮技術，可以發現 ASEI-sweeping-MEKC 其濃縮效率在 30000 倍以上，比 LVSS-sweeping-MEKC 偵測極限低，甚至可達 ppt 等級，但 LVSS-sweeping-MEKC 較不受樣品基質的干擾，且濃縮效率亦可達到 5000~8000 倍，為一種既靈敏又可運用於真實樣品中的偵測方法。

最佳條件為非微胞緩衝溶液為 pH 2.6、25 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，樣品以 5 psi 注入 7 min，此時外加回推電壓為-20 kV，反向回推電壓時間為 5.1 min，微胞緩衝溶液為 pH 2.6、15 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，含有 150 mM SDS 於緩衝溶液中，再施加分離電壓-30 kV，進行濃縮分離，酚酸的偵測極限可達到 3.7 ppb ASEI-sweeping-MEKC 的分離條件：微胞緩衝溶液為 pH 2.6、25 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，含有 150 mM SDS 於緩衝溶液中，非微胞緩衝溶液為 pH 2.6、25 mM 的檸檬酸/磷酸氫二鈉，此時外加分離電壓為-30 kV，樣品注射以-20 kV 的電壓注入 18 min，此方法對酚酸的偵測極限可達 0.91 ppb

五、結 論

本研究已成功地利用掃掠式線上濃縮法分析食品的防腐劑與酚酸，可以降低偵測極限 100 倍以上，並進一步利用大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法分析酚酸可以降低偵測極限 5000 倍以上，且較不受樣品基質的影響。我們可以從實驗中推得以下結論：

(一)分析物的性質

因為掃掠式線上濃縮法的濃縮效率正比於界面活性劑與分析物的親和力，由掃掠式線上濃縮法分析防腐劑的結果中，可以得知當分析物與微胞親和力越大時，移動時間越短，濃縮效率越高，波峰高度也越高。利用大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮法分析酚酸的結果中，樣品堆積的因素有兩個，一為利用反向電壓的樣品堆積，二為利用掃掠式線上濃縮法濃縮樣品區帶，所以必須選擇分析物在水中能夠帶負電荷，以便進行 LVSS 的樣品堆積，但分析物在低 pH 值的緩衝溶液中，又必須變回中性分析物，才能有較佳的濃縮效率。

(二)有機修飾劑的影響

進行掃掠式線上濃縮時，如果分析物因性質相似，而無良好的解析度時，可以在緩衝溶液中，添加有機修飾劑改變溶液相極性，進而使分析物與電滲流的性質發生變化。在緩衝溶液中，添加一定比例的有機修飾劑，可以改變溶質的容量係數，增加分析物停留在溶液相的時間，改善分離效果，但有機溶劑濃度越高時，分析物移動時間越長，濃縮效率也越差。

(三)緩衝溶液的 SDS 濃度

增加 SDS 的濃度可以增加分析物的容量係數，使分析物的移動

時間減短，濃縮效率增加，尤其針對於與 SDS 親和力低的分析物，藉由增加微胞的濃度，其波峰高度增加最為明顯，由掃掠式線上濃縮法分析防腐劑的結果中，增加 SDS 的濃度，氫氧基苯甲酸甲酯與對氫氧基苯甲酸乙酯波峰高度增加最明顯，但 SDS 濃度太高時，會因為在酸性緩衝溶液中溶解度不佳而吸附於管壁上，造成毛細管損害。

(四)樣品基質離子強度

樣品的離子強度與緩衝溶液中的離子強度關係必須針對不同分析物進行討論，當樣品離子強度高於緩衝溶液離子強度時，陰離子界面活性劑(SDS)會在負電極端的樣品與緩衝溶液界面上產生堆積，造成局部 SDS 的濃度提高，也增加濃縮的效果，但相反的是，當掃集完成後，微胞中內含的分析物由樣品基質進入緩衝溶液的界面時，會因為離子強度變小而產生擴散。當樣品離子強度低於緩衝溶液離子強度時，反而在一開始時造成局部 SDS 濃度降低，濃縮效果變差，但最後由樣品基質進入緩衝溶液的界面時，反而因為電場強度關係，而造成分析物濃縮現象。

(五)緩衝溶液離子強度

增加緩衝溶液的離子強度，會降低電滲流的速度。由於電滲流與微胞前進方向相反，所以電滲流越小，掃集所接觸的時間越多，分析物的移動時間越短，樣品堆積效果越好，但離子強度的增加，亦會導致焦耳熱效應增加，造成溫度梯度與層流，局部緩衝溶液的黏度也會因此產生變化及分析物的分子動能增加，而引起樣品區間的分散與層析圖譜基線不平穩的現象。

(六)注射時間

分析物的注射時間越長，所得到的濃縮效率越高，若注射時間過

長時，亦會造成分離的區段太小，分析物波峰變寬，波峰高度不再增加的現象，使得分析物解析度及分離效率變差，所以分析物波峰高度有一定限制，必須選擇濃縮效率最大又可完全分離的注射秒數。若分析物與 SDS 的親和力較高，堆積效果較好，所以波峰高度隨著注入秒數增加而增加的效果較為明顯；若分析物對 SDS 的親和力較差，注射時間的增加，反而容易造成波峰變寬的效應。

(七)電滲流的影響

在線上濃縮技術的設計上，有些方法會受限於電滲流而無法實行，或因而濃縮效果變差，例如：利用陰離子界面活性劑進行掃掠式線上濃縮法時，因為電滲流速度與微胞進行方向相反，則電滲流越大，分析物與微胞接觸時間越少，而濃縮效果也越不佳。又如陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法時，當使用無電滲流的毛細管時，此方法的緩衝溶液即可選擇高 pH 值的緩衝溶液，而適用於陽離子分析物上，增加此技術的適用範圍。所以如何製造出無電滲流的毛細管並發展新的線上濃縮技術，是一個可以深入研究的方向。

使用線上樣品濃縮技術來降低偵測極限，提高靈敏度，是最簡單且最經濟的方法，而又不需增加任何儀器設備。本篇論文介紹許多種線上濃縮技術以降低偵測極限，但每一種線上濃縮技術所要求的條件與所降低的濃縮效率都不盡相同，必須視分析物性質與要求的倍率做適度的變化，以求得最佳的分析圖譜。

六、參考文獻

1. A. Tiselius, *Trans. Faraday. Soc.* 33 (1937) 524.
2. S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122.
3. R. Virtanen, *Acta polytech. Scand.* 1 (1974) 123.
4. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
5. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 209.
6. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, K. Ichikawa and A. Tsuchiya, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111.
7. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.* 57 (1985) 834.
8. F. E. P. Moring, J. C. Colburn, P. D. Grossman, H. H. Lauer, *LC-GC Intl.* 3 (1990) 46.
9. R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A.
10. R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2042.
11. R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 306.
12. S. Liu, Q. Li, X. Chen, Z. Hu, *Electrophoresis* 23 (2002) 3392.
13. S. Morales, R. Cela, *Electrophoresis* 23 (2002) 408.
14. G. Manetto, F. Tagliaro, F. Crivellente, V. L. Pascali, M. Marigo, *Electrophoresis* 21 (2000) 2891.
15. H. Y. Huang, C. W. Chiu, S. L. Sue, C. F. Cheng, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 29.
16. Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
17. Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 23 (2002) 2880.
18. P. B. McKibbin, S. Terabe, *The Chemical Record* 6(2002)397.
19. J. B. Kim, Y. Okamoto, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 251.
20. B. M. Philip, K. Otsuka, and S. Terabe, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3736.
21. M. J. Markuszewski, P. B. McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T.

- Nishioka, *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 293.
22. M. N. Monton, J. P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 99.
23. J. P. Quirino, J. B. Kim, S. Terabe *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 357.
24. J. B. Kim, J. P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 123.
25. J. B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 239.
26. J. B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 131.
27. R. B. Taylor, R. G. Reid, A. S. Low, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 201.
28. A. Gavenda, J. Sevcik, J. Psotova, Petr. Bednar, *Electrophoresis* 22 (2001) 2782.
29. C. Fang, J. T. Liu, C. H. Lin, *Electrophoresis* 24 (2003) 1025.
30. J. B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 127.
31. L. Zhu, C. Tu, H. K. Lee *Anal. Chem.* 74 (2002) 5820.
32. K. Isoo, S. Terabe *Anal. Chem.* 75 (2003) 6789.
33. J. P. Quirino, S. Terabe *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023.
34. G. Burini, P. Damiani, *J. Chromatogr.* 543 (1991) 69.
35. A. Montano, A. H. Sanchez, L. Rejano, *Analyst* 120 (1995) 2483.
36. G. Burini, *J. Chromatogr. A* 664 (1994) 213.
37. H. Terada, Y. Sakabe, *J. Chromatogr.* 346 (1985) 333.
38. B. H. Chen, S. C. Fu, *Chromatographia* 41 (1995) 43.
39. D. Kaniansky, M. Masar, V. Madajova, J. Marak, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 179.
40. C. O. Thompson, V. C. Trenerry, B. Kemmery, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 507.
41. C. O. Thompson, V. C. Trenerry, B. Kemmery, *J. Chromatogr. A* 704

- (1995) 203.
42. J. P. Quirino, J. B. Kim, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 357.
43. M. T. Huang, T. Ferraro, C. T. Ho, *American Chemical Society, Washington, DC, 1994*, p3.
44. S. Shahrzad, I. Bitsch, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 223.
45. B. S. Dhingra, A. Davis, *J. Chromatogr.* 447 (1988) 284.
46. S. N. Onyeneho, N. S. Hettiarachchy, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1496.
47. G. P. Cartoni, F. Coccioli, L. Pontelli, *J. Chromatogr.* 537 (1991) 93.
48. F. Buiarelli, G. Cartoni, F. Coccioli, Z. Levetsovitiu, *J. Chromatogr. A* 685 (1995) 229.
49. G. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska, *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 209.
50. J. Vindevogel, P. Sandra, Introduction of Micellar Electrokinetic Chromatography (1997).
51. D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21(2000) 2768.
52. W. H. Ding, C. H. Liu, *J. Chromatogr. A* 929(2001) 143.
53. J. P. Quirino, J. B. Kim, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 965(2002) 357.
54. M. G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 780(1997)3.
55. J. P. Quirino, S. Terabe, *Science* 282(1998)465.
- 56.黃馨儀,「電動層析法結合掃掠式線上濃縮之研究」,國立交通大學,應用化學研究所碩士論文,民國九十年
- 57.郭光垠,「毛細管電泳應用於藥物及食品分析之研究」,國立交通大學,應用化學研究所博士論文,民國八十六年