

一、毛細管電泳

毛細管電泳主要是利用外加高電壓下，分析物在緩衝溶液中解離成不同帶電性質的型式，藉由不同帶電性質在電場中受吸引或排斥的力量產生遷移速率的差異，而造成分離的現象。電泳技術的發展始於 1897 年 Kohlrausch 提出在溶液中荷電離子的遷移方程式，解釋荷電粒子在電場作用下的移動行為，至 1937 年 Tiselius 率先發展出電泳分離技術，成功地分離人體血清中的 α 、 β 、 γ 球蛋白及胺基酸，由此 Tiselius 也於 1948 年獲得了諾貝爾化學獎。由於電泳的分離效率與外加電場的大小成正比，電場越大，分離效率越高，但伴隨著電場作用，在高電壓下分離溶液所形成導體通路，會因電流的輸送產生大量的焦爾熱，焦爾熱與電流通量成正比，焦爾熱散熱所形成的熱對流會加速分析物分子質傳擴散 (diffusion)，且熱效應降低緩衝溶液黏度，樣品區帶變寬，不利分離，焦爾熱效應限制了傳統電泳分離時高電壓的使用。自由溶液所產生的熱擴散及對流問題會造成譜帶變寬和分離效果不佳，因此 Tiselius 藉由流動性較差的凝膠介質如：聚丙烯醯胺(acrylamide) 或瓊脂 (agarose) 來降低熱對流，經由 Tiselius 改良的平板凝膠電泳已被廣為應用在生化分析上，但其具有製備繁瑣與散熱差的缺點。

電泳技術發展之後，1974 年， Virtanen 使用內徑 200~500 μm 的玻璃毛細管來進行電泳分離； Mikkers 等人使用內徑 200 μm 的聚四氟乙烯毛細管，有效地利用小內徑毛細管管壁薄，相對於平板電泳比表面積增大許多來克服焦爾熱所引起的困擾，改善分離效果。 1981 年 Jorgenson 和 Lukacs 更進一步的證實毛細管電泳為一種具發展性的分離技術，他們利用 75 μm 內徑的毛細管玻璃管柱，使焦爾熱效應減少到最低，成功地分離胺基酸衍生物，並且利用螢光偵測器降低方法之偵測極限[1][2]。

Jorgenson 和 Lukacs 所利用的毛細管電泳技術後來又被稱毛細管區帶電泳(Capillary zone electrophoresis, CZE)，在此毛細管區帶電泳僅對帶電物質就進行分離，不帶電荷的中性物質並不適用，直到 1984 年，Terabe[2] 1018 提出了微胞電動力學毛細管層析法(Micellar Electrokinetic Capillary

Chromatography, MEKC) ，於緩衝溶液中加入界面活性劑，在臨界微胞濃度以上的界面活性劑產生微胞形成假靜相(pseudo-stationary phase) ，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(partition) 不同，使遷移速度不同，此方法不僅可用來分離中性物質，也改善了毛細管區帶電泳只能分離帶電分析物的限制，因而增大了毛細管電泳的應用範圍。

1.1 分離原理

在此我們藉由帶電粒子在毛細管內的電泳遷移行為與影響毛細管電泳遷移的主要因素電滲流來介紹毛細管電泳的分離原理。

1.1.1 帶電粒子的電泳遷移行為[1][5]

帶電粒子在自由溶液中，受外加電場作用下，其遷移行為遵守歐姆定律：

$$V = IR \quad (1-1)$$

其中 V 為外加電場電位差(V)， I 為電流(A)， R 為電阻(Ω)

此時我們微觀地看帶電粒子在自由溶液中的電泳遷移行為，當一個帶 z_i 電荷的粒子，在均勻電場 E 作用下所受到的靜電作用力 F_e 。

$$F_e = z_i e_0 E \quad (1-2)$$

其中 e_0 為電子所帶之電量。

在自由溶液中，液體本身具有黏度，帶電粒子在移動時會因液體的黏度而產生黏滯力，除電場作用力 F_e 之外，粒子還受到溶液中黏滯力 F_d 的作用。

$$F_d = k \eta v_i^0 \quad (1-3)$$

其中 η 為緩衝溶液的黏度， v_i^0 為帶電粒子 i 在緩衝溶液的遷移速率， k 為常數，根據 Stoke 定律，球型粒子的 k 值等於 $6\pi r_i$ ，則黏滯力 F_d 的大小與粒子的移動速度、粒子半徑 r_i 、緩衝溶液的黏度 η 有關，其關係式如下所示：

$$F_d = 6 \pi \eta r_i v_i^0 \quad (1-4)$$

當上述二項作用力達力平衡時， $F_e = F_d$

由式(1-3)(1-4)

$$z_i e_0 E = 6 \pi \eta r_i v_i^0 \quad (1-5)$$

式(1-5)移項整理可得帶電荷粒子 z_i 在電場 E 下的移動速率

$$v_i^0 = \frac{z_i e_0 E}{6 \pi \eta r_i} \quad (1-6)$$

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

$$v_i^0 = \mu_i E \quad (1-7)$$

比較式(1-5)(1-6)

$$\mu_i = \frac{z_i e_0}{6 \pi \eta r_i} \quad (1-8)$$

我們定義電泳遷移率為單位電場下粒子電泳速率。

1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)[4]

電滲流是除了分析物本身的電泳遷移外，另一個影響緩衝溶液在毛細電泳中遷移速率主要因素。電滲流是藉由外加電場對管壁溶液形成電雙層(double-layer charge distribution) 的作用，毛細管內壁表面電荷因靜電作用相斥或相吸所造成管內液體整體的流動。如 Figure 1-1 所示，在熔融矽(fused silica) 材質的毛細管中，管內壁的矽醇官能基(Si-OH) 在 pH 值大於 2 的緩衝溶液下，將會解離($\text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O}^-$)，因而吸引緩衝溶液中電解質陽離子，形成所謂的電雙層結構。

根據 Stern 的電雙層理論，溶液中的正離子在流經活化的毛細管後，會因前述原因所形成的靜電吸引力而吸附在管壁上，形成不可逆的吸附，如 Figure 1-1 所示，第一層吸附，稱為固定層(Rigid layer)。固定層之外稍遠離毛細管表面也會有過多的正電荷離子被靜電力吸引，此時吸附的程

度並無第一層來的強，其電荷密度隨遠離管壁的程度呈指數趨勢逐步下降，此層稱為擴散層(Diffuse layer)。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，形成所謂的電滲流。另外，電滲流形成主要是受外加的電場作用，因此促使毛細管內液體的移動型式為「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(laminar flow)」，故分析物經由毛細管電泳分離時，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。

由於溶液在毛細管內電荷分布的差異(愈靠近管壁電荷密度愈高),因此溶液與管壁間會有電位差的存在。電位差距稱為 Zeta 電位(ζ potential)。以公式表示如下：

$$\zeta = (4\pi \times \delta \times e) / \varepsilon \quad (1-9)$$

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

$$\mu_{\text{eof}} = (\varepsilon \times \zeta) / \eta \quad (1-10)$$

$$V_{\text{EOF}} = \mu_{\text{eof}} \times E \quad (1-11)$$

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

$$\mu_{\text{a}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eof}} \quad (1-12)$$

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

1.1.3 分離效率[1]

理論板數(theoretical plates, N) 是反應物質在固定相和流動相中動力學特性的層析參數，理論板數越高，表示分離效率越好，可用分析物的遷移時間 t_m 與波峰寬度 w 來表示：

$$N = 16(t_m/w)^2 \quad (1-13)$$

如果波峰寬度為半高寬 $w_{1/2}$ 又可表示為：

$$N = 5.54(t_m/w_{1/2})^2 \quad (1-14)$$

因此我們可以從公式 1-13 看出越窄的波峰寬度與越長的遷移時間，理論板數越高，分離效率越好，但在毛細管電泳中移動型式為平板流(plane flow) 不同於高效液相層析分析方法的拋物線流，因此根據 Giddings 的推論，理論板數(N) 表示為：

$$N = L^2/\sigma^2 \quad (1-15)$$

σ 為變度(variance)， L 為毛細管總管長。

$$\sigma^2 = 2Dt_m \quad (1-16)$$

D 為分析物之擴散係數(diffusion coefficient)，分析物的遷移時間 t_m 又可表示為：

$$t_m = lL/(\mu_{ep} + \mu_{eof})V \quad (1-17)$$

其中 l 為毛細管管長的有效長度， V 為外加電場電位差所產生的電壓。
由式(1-16)(1-17)

$$\sigma^2 = 2DlL/(\mu_{ep} + \mu_{eof})V \quad (1-18)$$

由式(1-15)(1-18)

$$N = (\mu_{ep} + \mu_{eof})V/2D \quad (1-19)$$

最後我們由公式 1-19 可以知道電壓越大理論板數就越大，不過電壓越大毛細管的溫度越高，焦爾熱效應就越大，因此其結果還會受限於焦爾熱的影響。

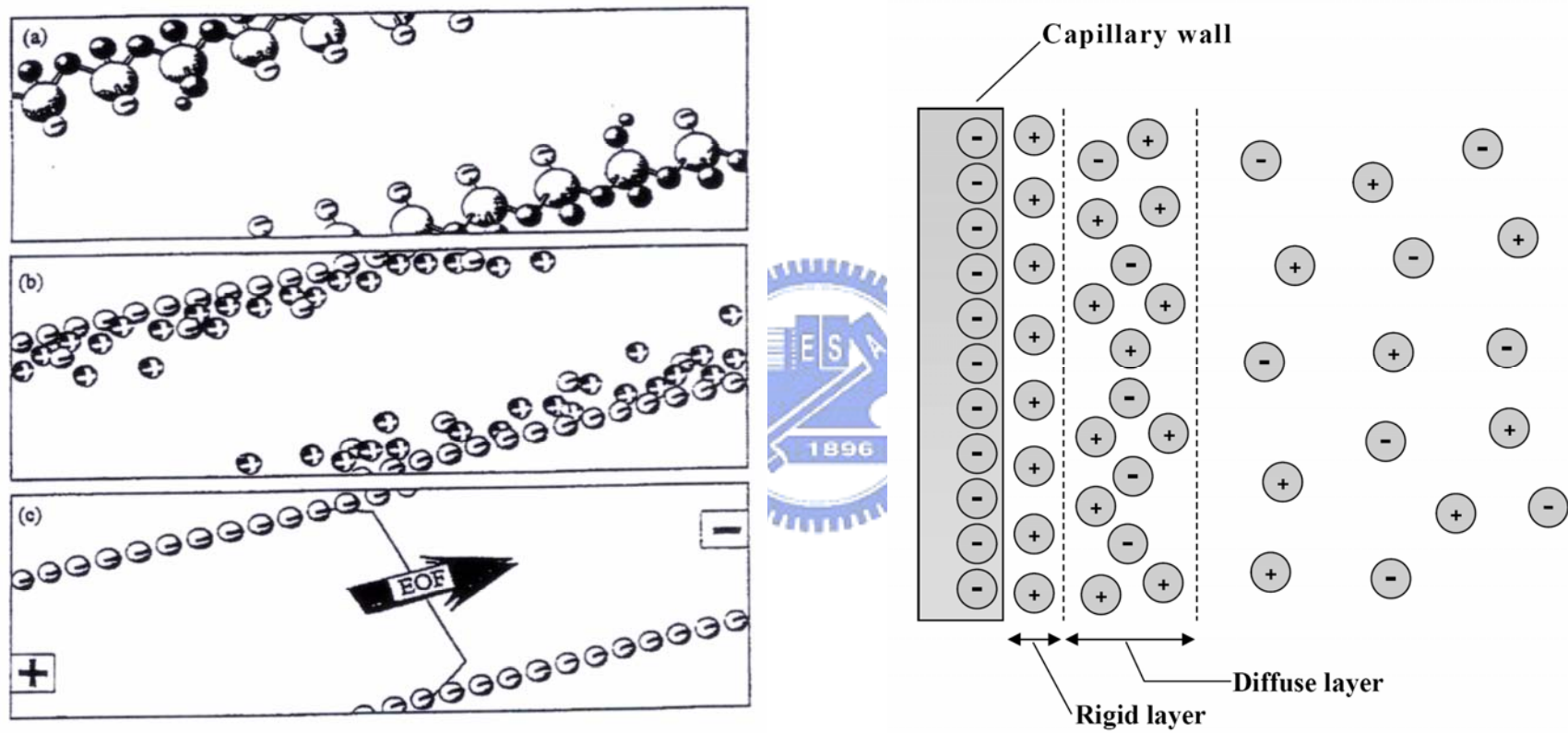


Figure 1-1 The profiles of EOF and double-layer charge distribution at a negatively charged capillary wall.

二、線上濃縮技術介紹

毛細管電泳利用外加電壓使分析物因本身不同的電泳移動速度，而達到分離的目的，其具有高解析度與縮短分離時間的優點，但毛細管電泳卻因光徑短和注入樣品體積小的限制，使得毛細管電泳應用於一般常用的UV吸收偵測器上的靈敏度較差，因此在改善毛細管電泳法之偵測極限上已有研究者利用延長毛細管光徑之設計(e.g. Z-shaped, multi-reflection, bubble cell)，或是使用靈敏度較高的偵測器，如電化學法、雷射誘發螢光法和電導度分析法來提供較好的靈敏度，但不論是改變毛細管光徑之設計，或選擇不同的偵測器都受到現行商業化毛細管電泳儀硬體設備的配合度與經濟上考量的困難點，因此在不改變毛細管電泳硬體設備配置下，近年來就有線上樣品濃縮技術的產生。

線上樣品濃縮技術最早是在 1979 年時，由 Mikkers[6] 在實驗中發現樣品堆積(sample stacking) 的現象，到了 1989 年，Chien 與 Burgi 等人[7-9] 進一步研究，利用樣品與緩衝溶液導電性的差異產生不連續的電場差距，使得帶電荷分析物在此兩種環境中遷移速度不同，而形成樣品堆積，即成為毛細管電泳中相當重要的技術。另外，中性不帶電荷的分析物電場大小的改變，並不影響分析物的遷移速度，因此並不適用樣品堆積技術。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濃縮技術，並降低偵測極限最高可達百萬倍。

2.1 線上濃縮技術之模式

現今發表的線上濃縮方法有許多不同的濃縮模式，研究者需依據分析物的特性選擇合適的方法，用不同線上濃縮的模式來分析。以下我們將針對線上樣品濃縮技術常用模式做簡單的介紹

2.1.1 線上堆積(sample stacking)

線上堆積技術是利用帶電荷分析物在樣品與緩衝溶液間導電性的不同以

致電場強度的差異，造成分析物在此兩種環境中遷移速度改變，而形成樣品堆積。

2.1.1.1 電場放大堆積(Field-amplified sample stacking, FASS)[10]

此為最簡單的線上濃縮技術，在這方法中，特別要注意的是分析物必需溶於低導電性的緩衝溶液中，背景緩衝溶液則配製為高導電性的緩衝溶液，而通常分析物可用稀釋 100-1000 倍的背景緩衝溶液或水來配製，導電性的差異可以用溶液的離子強度來控制，其機制如 Figure 2-1 所示(濃縮示意圖上方為電場強度示意圖)，在此分析物溶解於水溶液中，首先，在毛細管中注入高導電性(高離子強度)的緩衝溶液，之後將分析物溶液導入，再外加一正向電壓後，根據歐姆定律得知，由於樣品區帶低導電性(高電阻)的緩衝溶液所感應的電場強度較強，離子分析物於樣品區帶內將快速通過樣品區帶，當進入緩衝溶液區帶時，由於緩衝溶液區帶導電性增高(低電阻)，所感應電場強度降低，分析物電泳遷移速率相對的在此時也大幅減低，形成遷移速度改變(先快後慢)，於是離子分析物會在樣品區帶前方界面處濃縮堆疊，最後以毛細管區帶電泳的分離機制進行分離。

綜合以上的機制，電場放大堆積法原理主要是利用電場強度不同(如 Figure 2-1(B))，與離子分析物遷移速度不同，產生樣品堆積的效果(如 Figure 2-1(C))。其方法應用在濫用藥物鴉片類[11]和海洛因代謝[12]的藥物，靈敏度可提升 10-1000 倍。

2.1.1.2 大體積樣品堆積(Large-volume sample stacking, LVSS) [13]

大體積樣品堆積其背景緩衝溶液與樣品溶液的配置與電場放大堆積法相似，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二分之一。其機制如 Figure 2-2 所示，首先，在毛細管充滿低電場強度的背景緩衝溶液後，以壓力注入一長段的樣品，若分析物帶負電，則外加一負向電壓，利用分析物受電場移動的方向與電滲流的移動方向相反，電滲流會將樣品區帶的基質

(帶正電及中性物質)帶出毛細管外(如 Figure 2-2(B))，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，當壓縮至所偵測的電流值為最大電流值的 95%-99% 時，需將電極的極性反向，使濃縮的分析物向出口端移動(如 Figure 2-2(C))，最後以毛細管區帶電泳的分離機制進行分離(如 Figure 2-2(D))。此方法的應用很廣泛，包括食品添加劑[14]、金屬離子[15]、抗生素[16]上的分析等等，偵測極限可提高至 100 倍以上，但必需注意得是此方法只能單獨偵測陽離子或陰離子。

2.1.1.3 緩衝溶液酸鹼值調整修飾濃縮(pH-Mediate stacking) [10]

上述的兩項濃縮法，樣品都必須溶解於低導電性的緩衝溶液中，但生化性樣品大都含有高濃度的鹽類，因此造成其樣品基質屬於高導電性而不利於堆積的操作，緩衝溶液酸鹼值調整修飾濃縮是利用強酸或強鹼中和背景緩衝溶液之弱酸弱鹼鹽，使之背景緩衝溶液得以中性化，降低導電性形成高電場區域，讓此區域的分析物分子電泳遷移速度加速，其機制如 Figure 2-3 所示(濃縮示意圖上方為電場強度示意圖)，先將背景緩衝溶液充滿整個毛細管，再電動注入一大段高導電性樣品溶液。Figure 2-3 (B) 以壓力注入一段強酸(ex. HCl)。Figure 2-3 (C)(D)完成注入強酸動作後，毛細管兩端施予正向高電壓，此時強酸在移動的過程中會中和樣品溶液，使作用範圍被中性化而降低導電度，由 Figure 2-3 (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。Figure 2-3 (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。其方法已被廣泛應用在藥物[17]和 DNA 序列[18]的分析上。

2.1.2 掃掠式線上濃縮(Sweeping-MEKC)

掃掠式線上濃縮(sweeping-MEKC) 為中性不帶電荷分析物的堆積模式，利用分析物在含有界面活性劑微胞與不含界面活性劑微胞溶液遷移速度不同，而形成樣品堆積，它可以有效的改善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的缺點，因此近年來廣受注意，根據界面活性劑種類有不同的堆積機制，在此我們依據界面活性劑的性質來一一介紹。

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

[19]

陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮為最早被發展的掃掠式線上濃縮模式，不需考慮樣品與緩衝溶液之間的離子強度，可以實際應用於真實樣品的檢測。在此方法中，必須在調整低 pH 值(需小於3) 抑制電滲流，使在施加負向電壓下，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，與陰離子界面活性劑結合後會受電極吸引而往出口端移動，而追趕上前方分析物，造成樣品區帶濃縮。其機制如 Figure 2-4 所示，先在毛細管中充滿陰離子界面活性劑微胞的酸性背景緩衝溶液，抑制電滲流產生，再注入一段和背景緩衝溶液離子強度相近的樣品溶液，分析物恆不帶電性，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背景緩衝溶液中，施加一負向電壓，陰離子界面活性劑微胞在電場的吸引下往偵測器方向移動，此時分析物因為不帶電荷，電滲流趨近於零，在微胞接觸樣品區帶後，分析物在與陰離子界面活性劑微胞結合之後受電極吸引而向出口端移動，分析物開始聚集於樣品區帶的後端，再經由分析物與微胞親和力的不同，而產生分離。利用此種模式在農藥分析上，可以降低偵測極限170倍[20]；藥物分析上，可以降低偵測極限250倍[21]，而在毒品分析上，其濃縮效率有200倍[22]。

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

[23]

此模式不同於陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮，整個分離過程不需調整 pH 值來抑制電滲流，且分析物會聚集於樣品區帶的前端，在利用陽離子界面活性劑使電滲流反向的環境下，必須施加負向電壓，使分析物與電滲流的移動方向相同。其機制如 Figure 2-5 所示，首先，毛細管中充滿含有陽離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液，促使分離時電滲流反向，注入一段不含陽離子界面活性劑的樣品溶液，此時分析物還是維持中性，最後將毛細管柱兩端置於含有陽離子界面活性劑微胞的背景緩衝溶液中，並施加一個負向電壓，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，分析物因與微胞結合使本身遷移速度會變慢，而形成堆積(如Figure 2-5(B))，之後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，以微胞電動力學毛細管層析法(MEKC)的分離機制進行分離。

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

此模式應用於帶電(負電荷)的分析物，在毛細管中充滿中性界面活性劑微胞的鹼性緩衝溶液後，注入一段樣品溶液，施加正向電壓後，利用分析物所帶的負電荷與電極相斥往出口端的遷移速度變慢，中性界面活性劑遷移速度卻與電滲流相同，樣品區帶後方的分析物接觸微胞後，與微胞溶合使遷移速度變快，追趕上前方分析物而形成樣品區帶濃縮，最後分析物會與微胞一起往偵測器方向移動並造成分離。中性界面活性劑微胞因不帶電荷故其濃度並不影響電流值，因此在高界面活性劑濃度時不會有焦爾熱的影響，減低了在高界面活性劑濃度時波峰變寬的現象。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：在嘌呤鹼基上的分析，可以降低偵測極限 100 倍 [24]；而酚類化合物分析上，其濃縮效率為 150 倍[25]。

2.1.2.4 掃掠式線上濃縮模式之濃縮公式[26]

在此列出在電滲流存在下，以陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮中性分

析物所推論的公式，由公式也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。

如 Figure 2-6 所示，若被微胞掃集過的長度為 l_{sweep} ，則

$$l_{\text{sweep}} = d(a_c) - d(mc_c) \quad (2-1)$$

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

$$d(mc_c) = V_{mc} t_{\text{sweep}} \quad (2-2)$$

$$V_{mc} = V_{ep}(mc) + V_{EOF} \quad (2-3)$$

$$d(a_c) = V_a(\text{MEKC}) t_{\text{sweep}} \quad (2-4)$$

$$V_a(\text{MEKC}) = V_{ep}^*(a) + V_{eof} \quad (2-5)$$

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

$$V_{ep}(mc) = \mu_{ep}(mc)E \quad (2-6)$$

$$V_{ep}^*(a) = [k/(1+k)] \mu_{ep}(mc)E \quad (2-7)$$

$$t_{\text{sweep}} = l_{\text{inj}} / (V_{eof} - V_{mc}) \quad (2-8)$$

$$V_{EOF} = \mu_{EOF}E \quad (2-9)$$

$\mu_{ep}(mc)$ ：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

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

$$l_{\text{sweep}} = l_{\text{inj}} [1/(1+k)] \quad (2-10)$$

式(2-10) 可得知，當 l_{inj} 固定時，分析物的容量係數 k (capacity factor) 越大，則 l_{sweep} 會變得越短，所得到的濃縮效果越好；當 l_{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。

2.1.2.5 陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法(Cation selective exhaustive injection-sweeping-micellar, CSEI-sweeping-MEKC) [27]

陽離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法最早是由 Terabe 於 2000 年所提出，此方法比掃掠式線上濃縮更為靈敏，可降低陽離子分析物偵測極限達十萬倍，其機制如 Figure 2-7 所示，先將不含微胞的酸性緩衝溶液充滿毛細管管柱，接著注入一大段較高離子強度的酸性緩衝溶液，後再導入一小段純水，之後如 Figure 2-7 (B) 所示，以電動注入(正向電壓)配製在低導電度基質之陽離子分析物，此時陽離子分析物在低導電度基質下受電場力之驅使，快速通過高電場區之純水區域，並停留在高離子強度之酸性緩衝溶液區帶中，因此陽離子分析物會聚集或堆積在純水區域與高離子強度之緩衝溶液的交界處，形成初步的濃縮 (如 Figure 2-7 (C))。後續再以負電微胞進行陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮的程序(如 Figure 2-7 (D) 此時必須轉換電極方向)，達到再次濃縮目的，為了避免負電微胞導入毛細管時遭遇到電滲流的阻抗，先前將非微胞酸性緩衝溶液充滿毛細管的動作，已對電滲流作抑制的作用。完成濃縮程序後分析物再依 MEKC 分離機制進行分離(如 Figure 2-7 (E))。

2.1.2.6 陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法(Anion selective exhaustive injection-sweeping-micellar, ASEI-sweeping-MEKC)[28]

陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法，其觀念與前述方法相似，

使用的界面活性劑則調整為陽離子界面活性劑，並且在程序上加以修飾調整以適用於陰離子分析物，其機制如 Figure 2-8 所示，Figure 2-8 (A) 與上述方法相同，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。以負向電壓方式注入陰離子分析物，而負電荷之分析物將快速通過高電場區的水，而停留在非微胞酸性緩衝溶液，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，因此達到低速滯留之目的，故此法不如前一個方法，中間不用加注一段高離子強度電解質(如 Figure 2-8(B)(C))。Figure 2-8 (D)(E)(F) 完成第一次的濃縮後，後續過程即與上述方法相同，導入界面活性劑，讓微胞以掃掠濃縮方式使陰離子分析物進行第二次濃縮的程序。

以上兩種方法不同於前述的掃掠式線上濃縮技術，它主要是以掃掠式線上濃縮技術為基礎，結合電動注入進行場放大濃縮，以獲得更高濃縮倍率。

2.1.3 不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(Dynamic pH junction) [29]

不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮的原理主要是指樣品區帶和背景緩衝溶液 pH 值的改變，造成兩性或弱酸鹼性的分析物在不同 pH 值的環境下，有遷移速率的變化。其機制如 Figure 2-9 所示，Figure 2-9 (A)分析物為含有胺基的藥物分子，它所存在之樣品基質(sample matrix)環境為 pH 2.0，此環境中胺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 Figure 2-9 (B)所示，將毛細管兩端加負向電壓，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;而樣品區帶之左側界面因接觸 pH 4.0 背景緩衝溶液，導致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。Figure 2-9 (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 MEKC 方式達到分離的目的。

此種濃縮方法主要是與分析物本身電性轉變有關。通常帶電分析物其電

荷的強弱與性質極易受到外在環境 pH 值影響而改變，一但電性改變或被中和，在電場中粒子的遷移速率會大幅受到影響，而產生樣品堆積，不同於線上堆積，與樣品溶液離子強度無關，應用此方法用於分析帶負電的分析物時，無須加入陽離子界面活性劑修釋毛細管管壁使其電滲流反轉。

2.1.4 不同酸鹼值緩衝溶液接合結合掃掠式線上濃縮 (Dynamic pH junction-sweeping)

此方法與不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(Dynamic pH junction)相似，但其加入了界面活性劑，造成不連續的電解質系統，加乘了兩種線上濃縮技術，改善傳統掃掠式線上濃縮峰形不佳的缺點，其操作程序如 Figure 2-10 所示，首先，毛細管在充滿高 pH 值含有界面活性劑的背景緩衝溶液中，接續注入一長段配製於不含界面活性劑及低 pH 值的樣品溶液，施加一正向電壓(假設負離子型界面活性劑，如 SDS 時)，分析物在進入背景緩衝溶液後，因其電性的改變加上界面活性劑作用，使之滯留於樣品區帶與背景緩衝溶液的交界處因而達到濃縮的效果。藉由緩衝溶液 pH 值與界面活性劑的作用，在吡黃素的分析[30]上，與傳統掃掠式線上濃縮(sweeping)和不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(dynamic pH junction)比較，可以改善 4 倍的峰形寬度，並降低偵測極限達 1200 倍。

2.1.5 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) [31]

大體積樣品堆積結合掃掠式線上濃縮是為避免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濃度不一的情況，以氣壓注入法固定樣品注入量，故較不受樣品基質干擾，且結合兩種線上濃縮的模式提高濃縮效率。此方法先利用大體積樣品堆積的原理以氣壓注入大量的樣品體積，利用分析物帶有負電荷而與入口端電極相斥，而樣品基質因受電滲流推動而往出口端排出，分析物卻滯留於毛細管入口端，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。其機制如 Figure 2-11 所示，先在毛細管內充滿低 pH 值的緩衝溶液降低電滲流的速度，再注入一大段的樣品，並開始施加負向電壓，此時緩衝溶液中不含界面活性劑，樣品基質因受微小的電滲流影響，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，當電流值為最大電流值的 95%-99% 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，施加一負向電壓，以陰離子界面活性劑掃掠式線上濃縮的方式進行二次濃度的動作。

綜合以上各種線上濃縮的技術，我們可以知道在各模式的開發裡，其主要被應用的原理有電場強的差異、pH 值的變化、界面活性劑微胞與電極對帶電分析物的影響。電場強的差異乃是在毛細管電泳中分析物的遷移速度與外加電場成正比，在遵守歐姆定律的情況下，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，因此在不同導電度(電阻不同)的緩衝溶液下，分析物會有不同的遷移速度，因此藉由調整各區帶中導電度的差異，可以導致峰形的改變，最早描述此現象為所謂的電分散作用(electrophoretic dispersion)。當樣品區帶導電度大於背景緩衝溶液樣品區帶進入背景緩衝溶液時，前端的分析物會因遇到了較大電壓的背景緩衝溶液，使得分析物加速離開樣品區帶造成區帶前伸(peak fronting)，而在樣品區帶後端的分析物，分析物由樣品區帶擴散至背景緩衝溶液時，同樣的遇到了較大電壓的背景緩衝溶液，此時促使分析物加速返回樣品區帶，因此造成鋒形後方較為尖銳；反之，樣品區帶導電度小於背景緩衝溶液，則會因電分散作用的造成鋒形前方較為尖銳，後方拖尾(peak tailing) 的現象。樣品區帶導電度等於背景緩衝溶液時，則不會有鋒形的改變。但由電場差異所造成鋒形改變的現象，只會在帶有電荷的分析物上有作用，中性分析物則無此作用；弱酸弱鹼的分析物會因為處在不同的 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，因此 pH 值在毛細管電泳中扮演了改變分析物性質的重要角色，此種特性在 MEKC 的系統下也可以藉由調整緩衝溶液的 pH 值使分析物與界面活性劑的作用力更強，而不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(Dynamic pH junction) 就是巧妙的利用緩衝溶液 pH 值不同來改善峰形的寬度及高度，達到濃縮的效

果；界面活性劑微胞的種類眾多，當其分析物結合之後，會影響改變分析物在毛細管電泳中的遷移速度，此因素主要是應用在掃掠式線上濃縮技術，藉由微胞的作用使線上濃縮的技術能擴展到中性不帶電的分析物；電極對帶電分析物的影響，主要是利用分析物所帶的電荷與電極產生相斥的現象，藉以調整分析物的遷移速度小於電滲流，當分析物帶有負電荷時，在施加負向電壓下，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，此應用就如陰離子選擇性全注入結合掃掠式線上濃縮法(ASEI-sweeping-MEKC) 利用電極對帶電分析物的影響來改善濃縮的效率。由以上各因素的應用，我們可以輕易的推斷不同的分析物適用於不同的線上濃縮模式，如 Figure 2-12 所整理的，依據不同分析物選擇適合的線上濃縮模式，在進行線上濃縮技術時可為重要的參考。



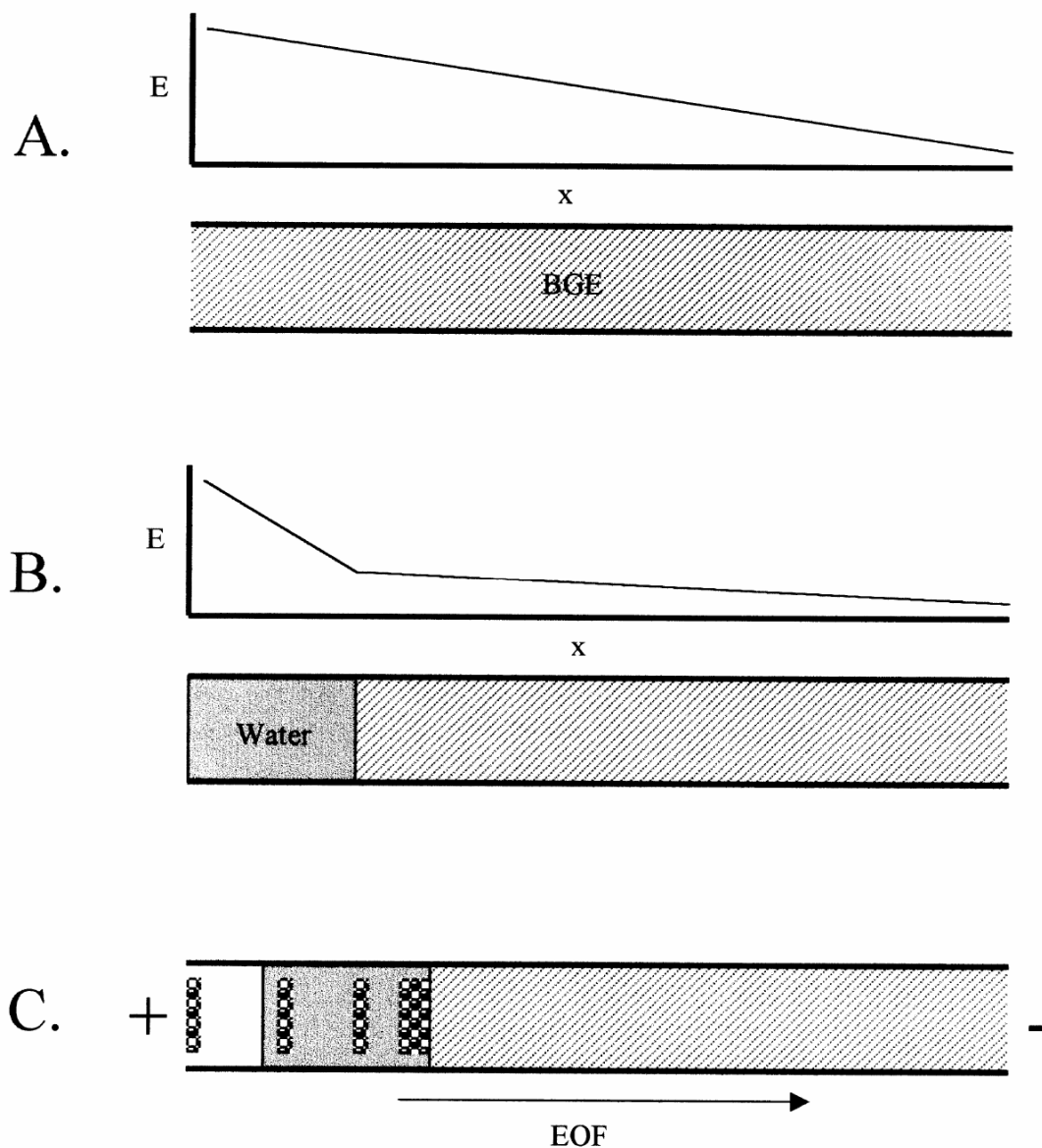


Figure 2-1 Schematic diagrams of the FASS model. [10]

(A) The capillary is conditioned with a BGE (a high conductivity buffer), the sample, prepared in a low-conductivity matrix, is then injected to a certain length, and a high positive voltage is applied; (B) focusing of the analytes occurs near the boundaries between the sample zone and the BGS because of its mobility changes; (C) stacked analytes migrate and are separated by the CZE mode.

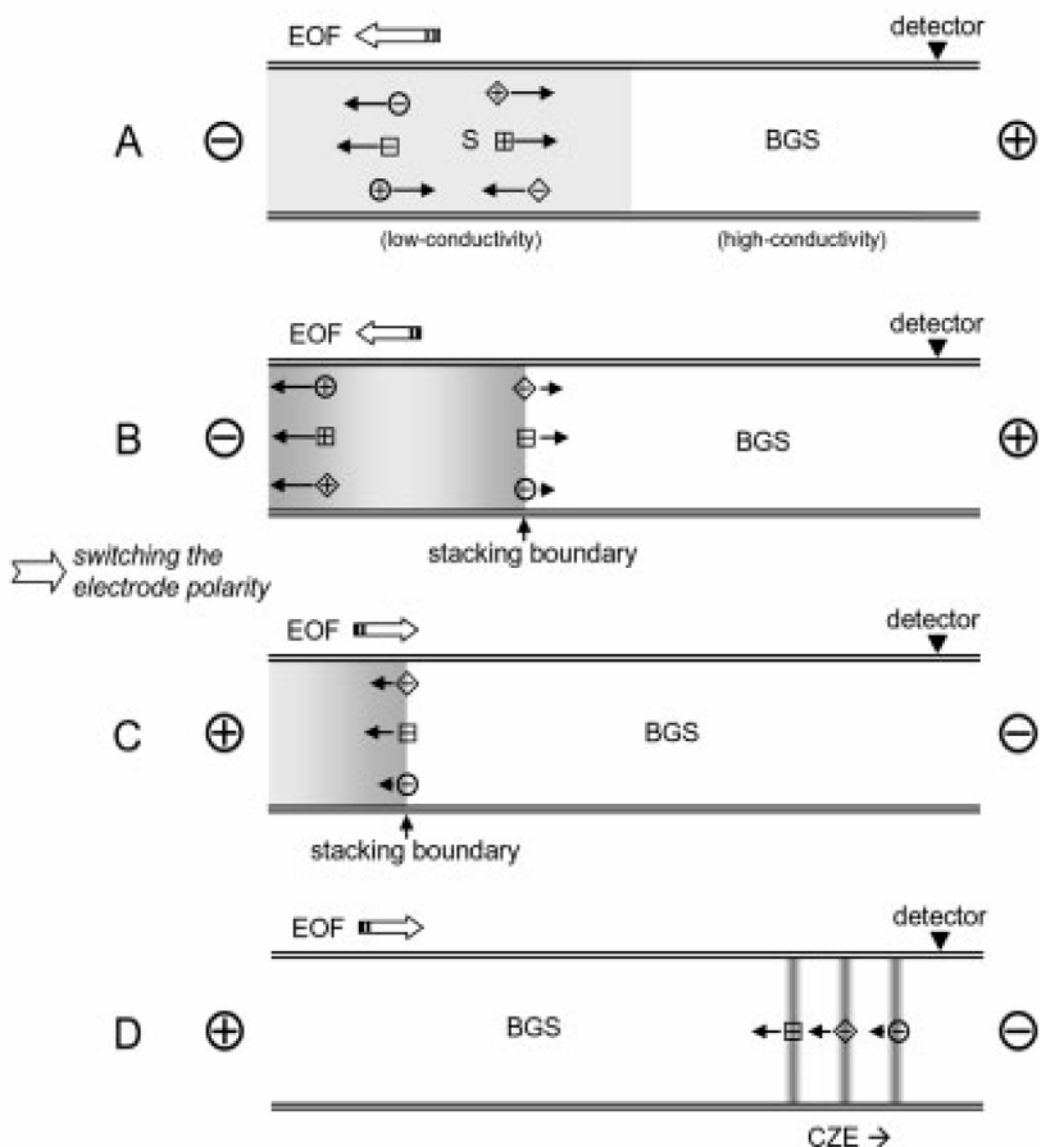


Figure 2-2 Schematic diagrams of the LVSS model. [13]

(A) The capillary is conditioned with a BGS (a high-conductivity buffer), the sample prepared in a low-conductivity matrix, is then injected to a certain length, and then a high negative voltage is applied (EOF is toward the inlet); (B) the anionic analytes move toward the detection end (outlet) and stack at one side of the boundary, whereas the cations and neutral species move and exit the capillary at the injection end (inlet); (C) the electrophoretic current is carefully monitored until it reaches approximately 95–99% of its original value, and the polarity is then quickly returned to positive (EOF is reversed); (D) the following separation occurs by CZE mode.

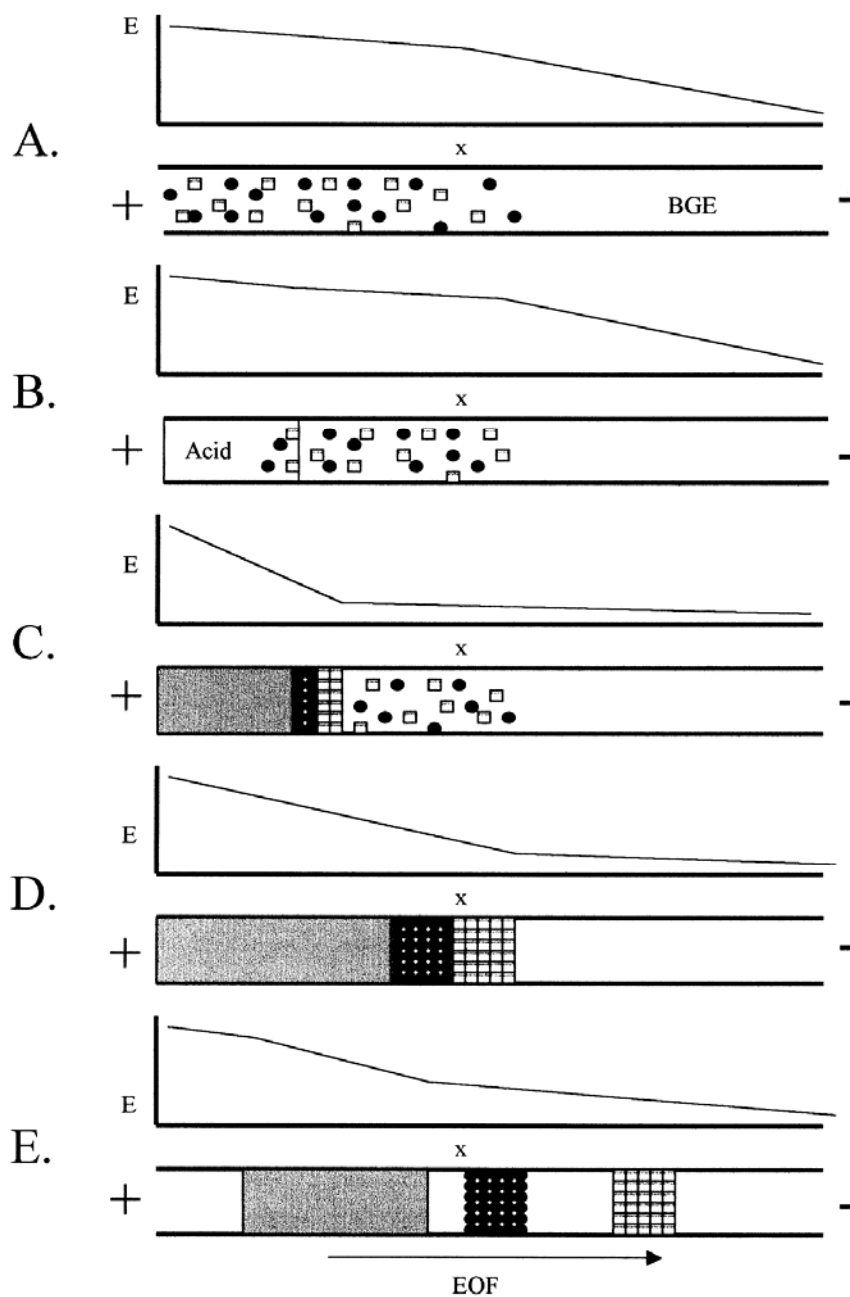


Figure 2-3 Schematic diagrams of the pH-Mediate stacking model. [10]

(A) The analytes dissolved in a high ion strength buffer are electrokinetic injected into the capillary, and then a plug of strong acid is also electrokinetic injected; (B) a positive separation voltage is applied; (C) causing the ions to migrate faster and become stacked; (D) the following separation occurs by CZE mode.

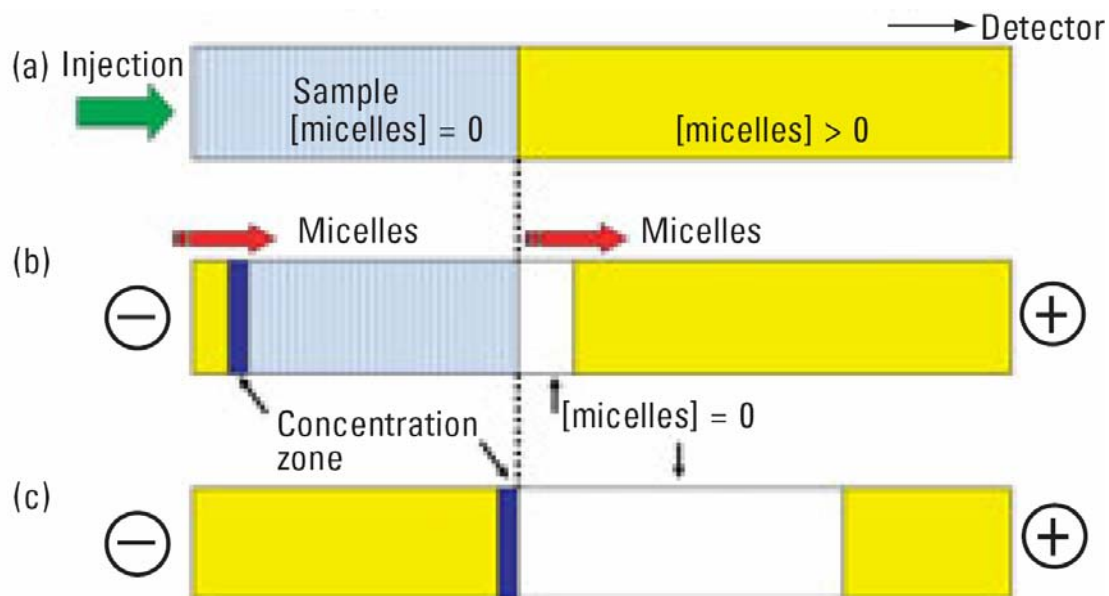
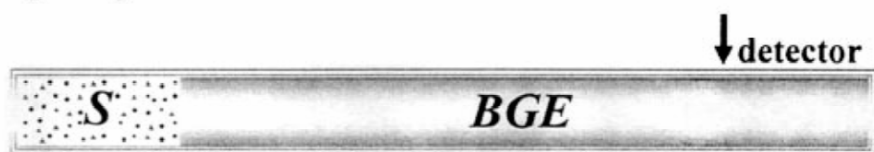


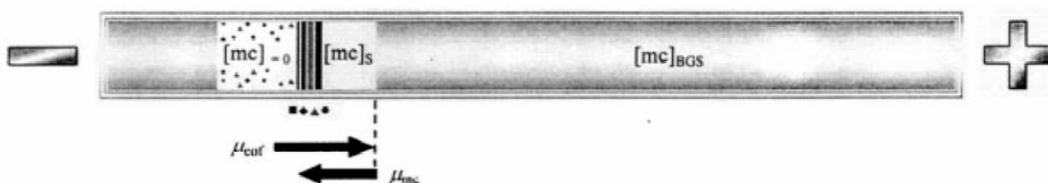
Figure 2-4 Schematic diagram of a stacking mechanism by sweeping with anionic micelles model [19]

(a) A sample solution prepared in a matrix with conductivity similar to that of BGS but devoid of micelle is injected hydrodynamically as a long plug. (b) Electrophoresis is started by applying voltage at negative polarity with the BGS in the inlet vial. The analytes are swept by the micelle penetrating the sample zone. (c) When the micelle from the inlet vial reaches the boundary between the sample and the BGS zones, sweeping is finished and MEKC begins in the reversed migrating micelle mode.

A. Sample injection



B. Stacking of analytes



C. Separation after sweeping



Figure 2-5 Schematic diagram of a stacking mechanism by sweeping with cationic micelles model [23]

(A) the capillary column is initially filled with a micellar background electrolyte (BGE); (B) A sample zone containing nonmicellar sample matrix or simply water is injected hydrodynamically with pressure for a period much longer than usual. By application of voltage at negative polarity the electroosmotic flow is directed toward the anode (as cationic micelles is adsorbed on the capillary wall) and the micelles migrate toward the cathode; (C) The separation is then achieved via MEKC

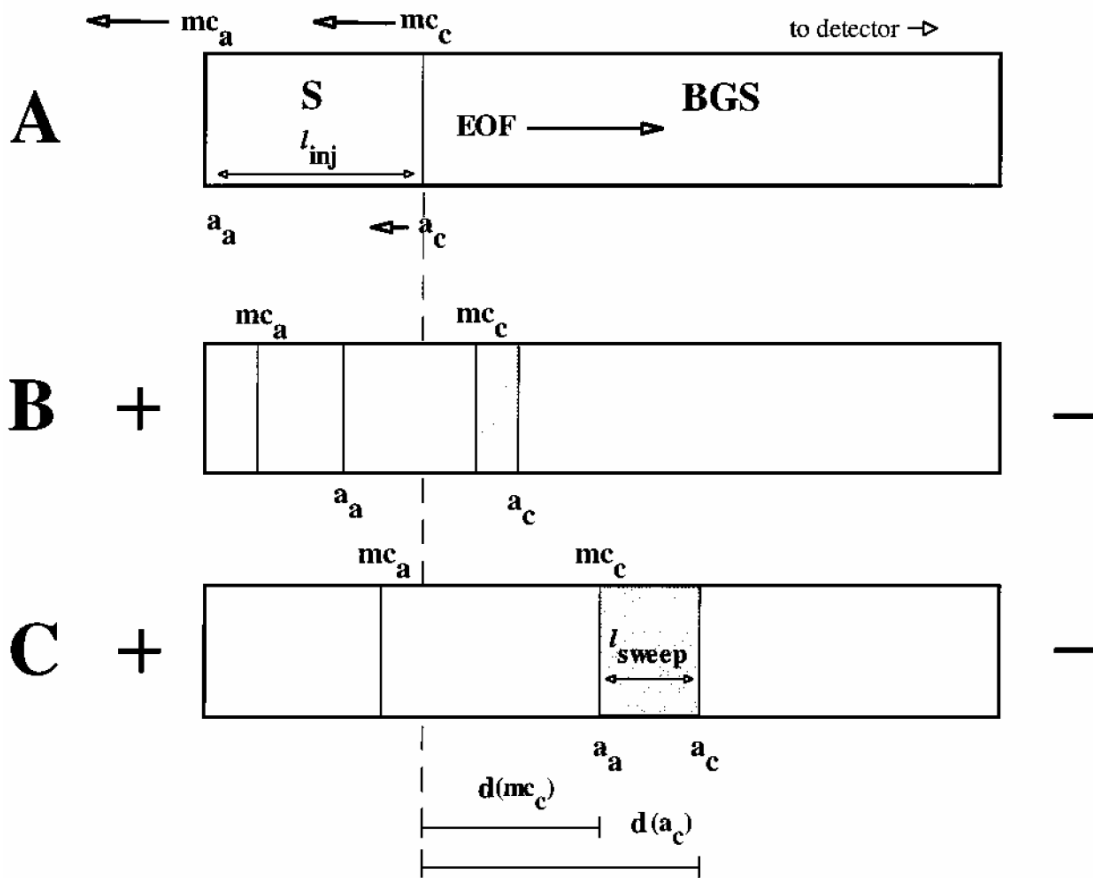


Figure 2-6 Evolution of micelles and neutral analyte molecules during sweeping [26]

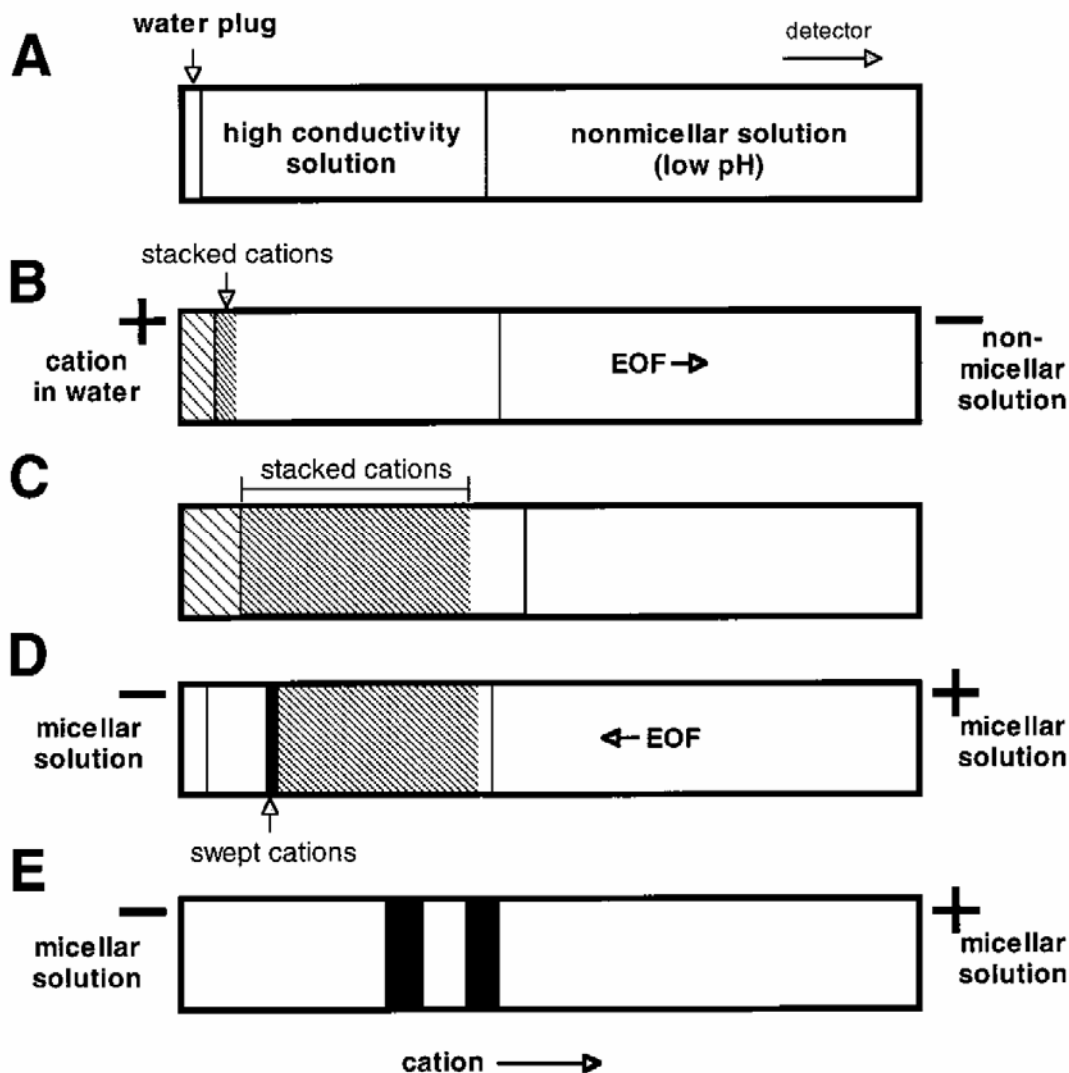


Figure 2-7 Schematic diagram of the CSEI-sweep-MEKC model [27]

(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.

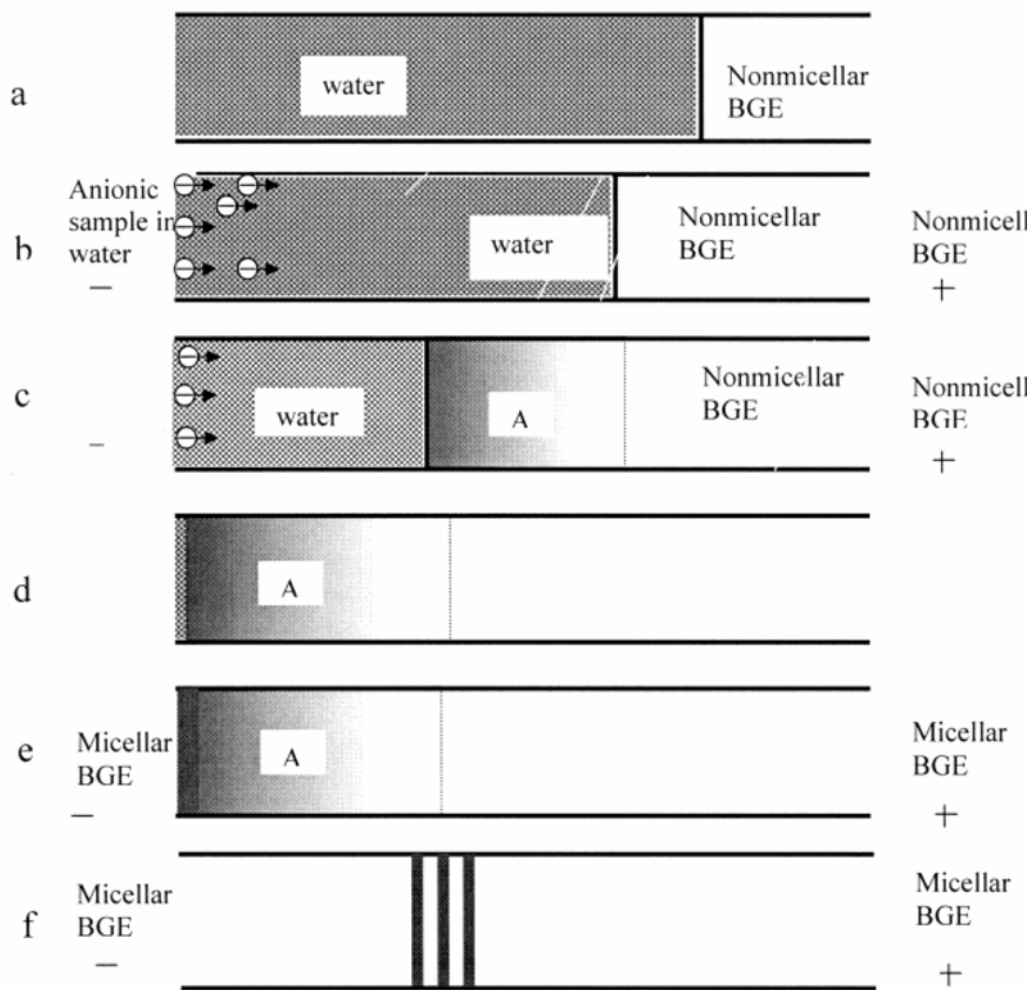


Figure 2-8 Schematic diagram of the ASEI-sweep-MEKC model [28]

(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 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.

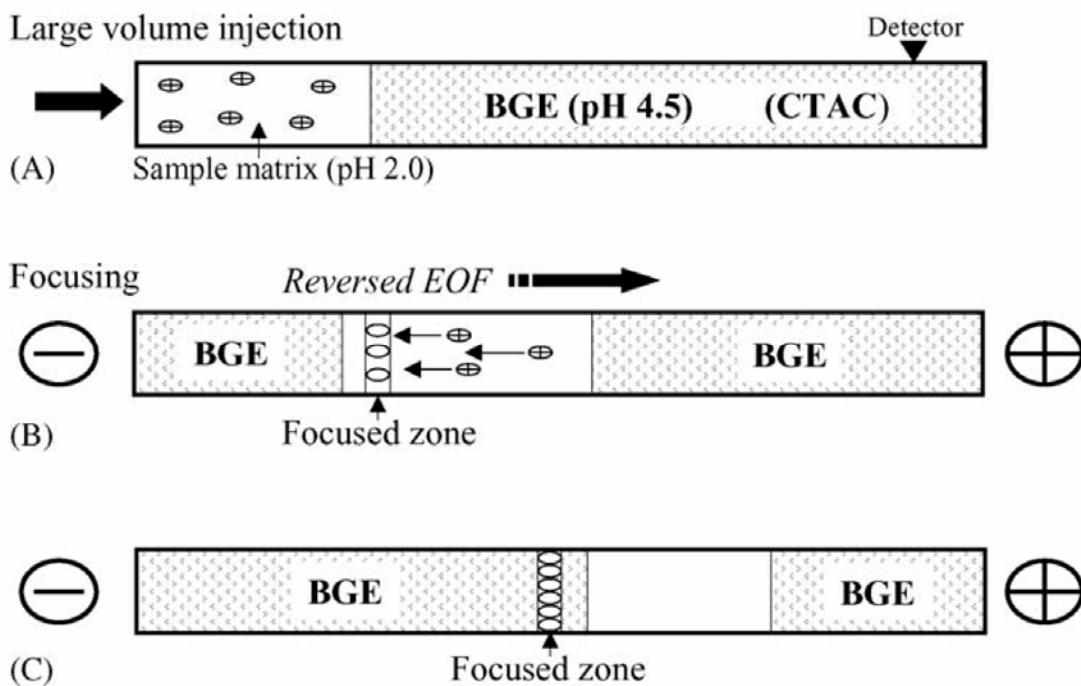


Figure 2-9 Schematic diagram of the dynamic pH junction model [29]

(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.

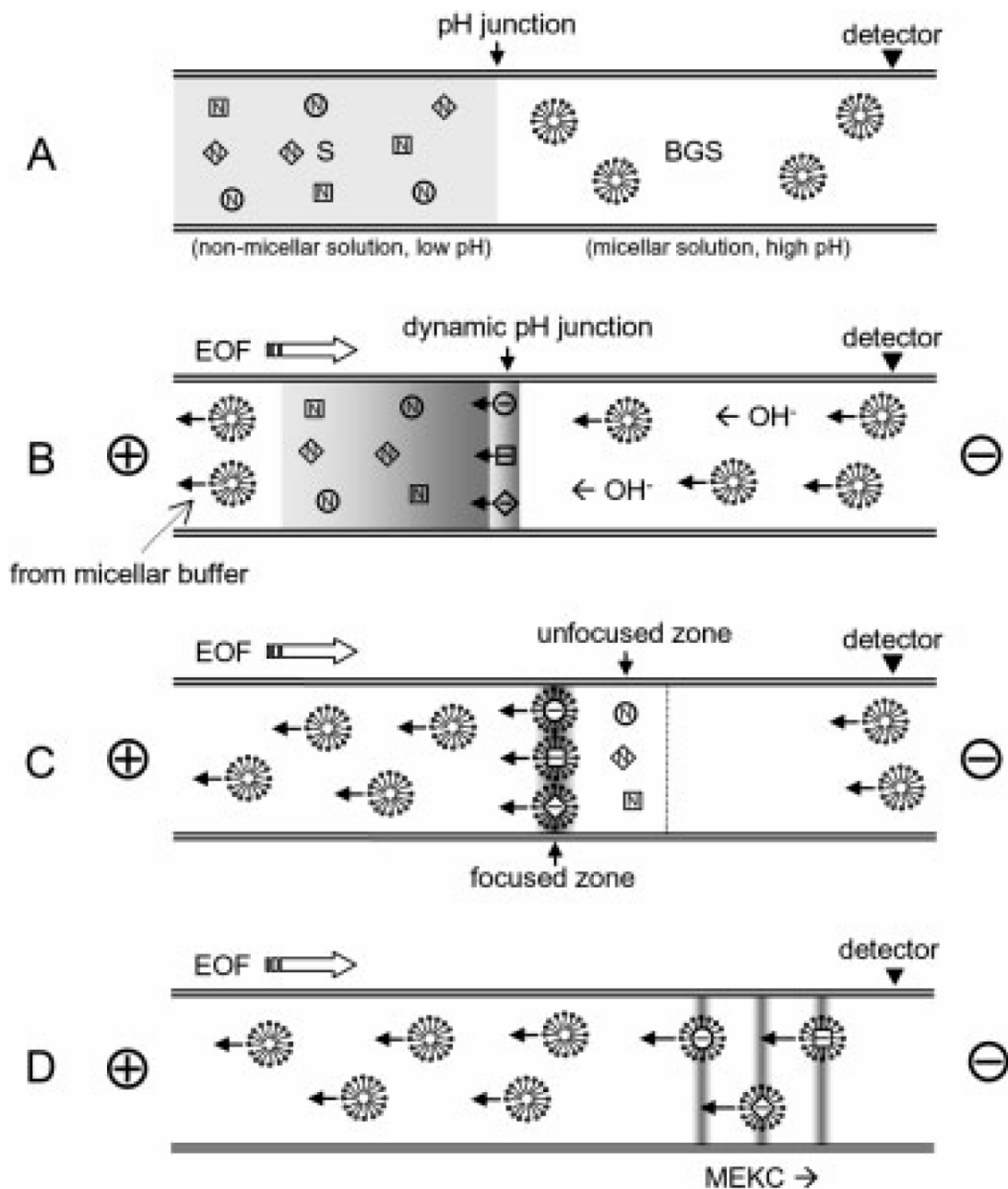


Figure 2-10 Schematic diagrams of the dynamic pH junction-sweeping model.[13]
 (A) The micellar (such as SDS) BGS and the sample solution (a nonmicellar buffer) are injected into the capillary, respectively; (B) when the injection is complete, a positive polarity is applied (if a negatively charged SDS surfactant is used) to power the CE separation; (C) the neutral analytes are converted to anions and are swept by the SDS micelles; (D) separation occurs by the MEKC mode.

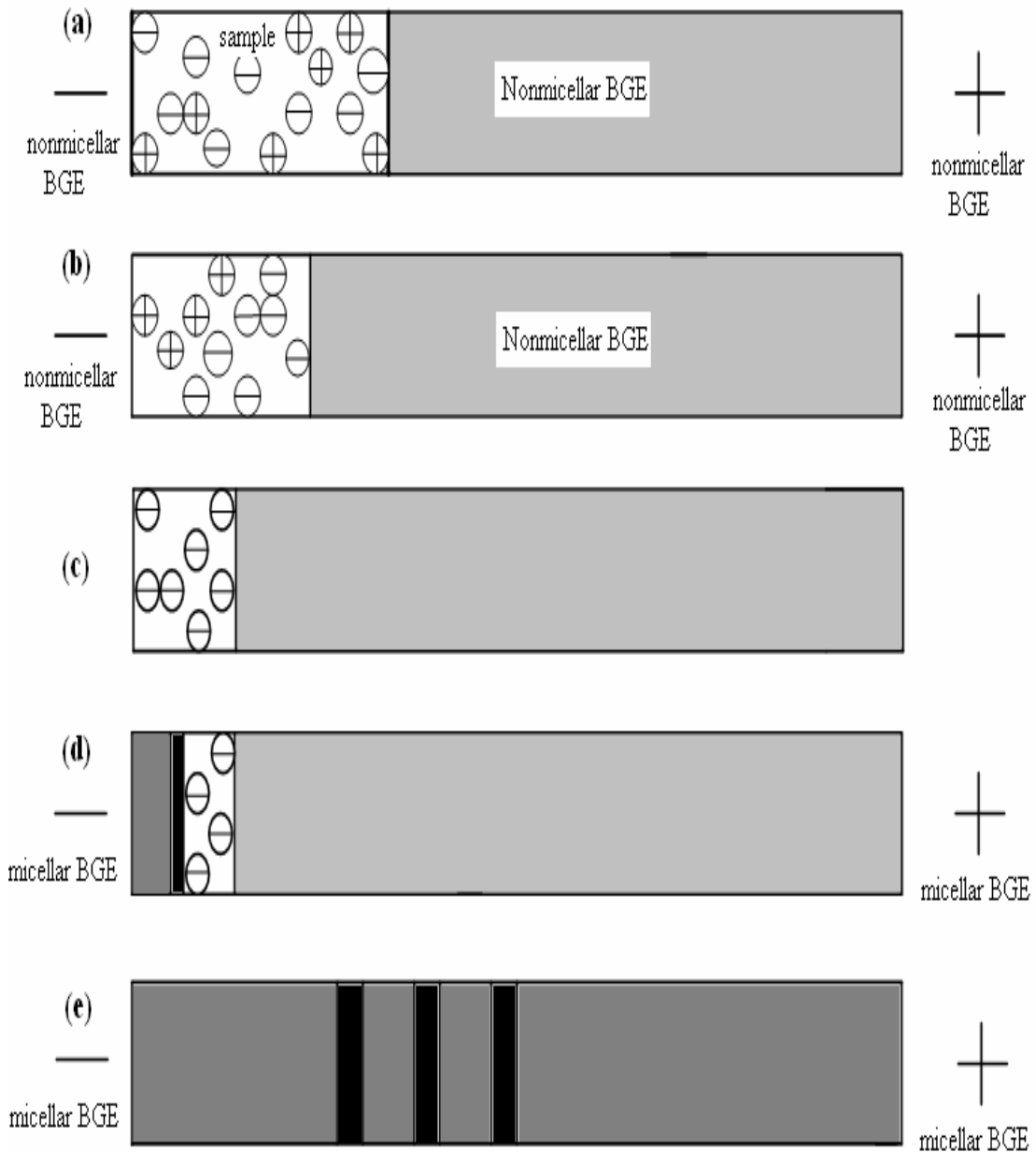


Figure 2-11 Evolution of analyte zones in LVSS-sweeping-MEKC [31]

(a) A large-volume sample (prepared in water) was injected hydrodynamically (b) the voltage was applied with reversed polarity (reversed EOF direction), the sample-matrix was pushed back into the inlet vial by the EOF; (c) anionic analytes were focused on passing through the concentration boundary and both vials at inlet and outlet are changed to low-pH micellar BGE; (d) optimal stacking was achieved, negative potential is applied to permit the micelles to enter the capillary and sweep the focused sample zone as a narrow band. (e) subsequent separation is achieved under MEKC mode.

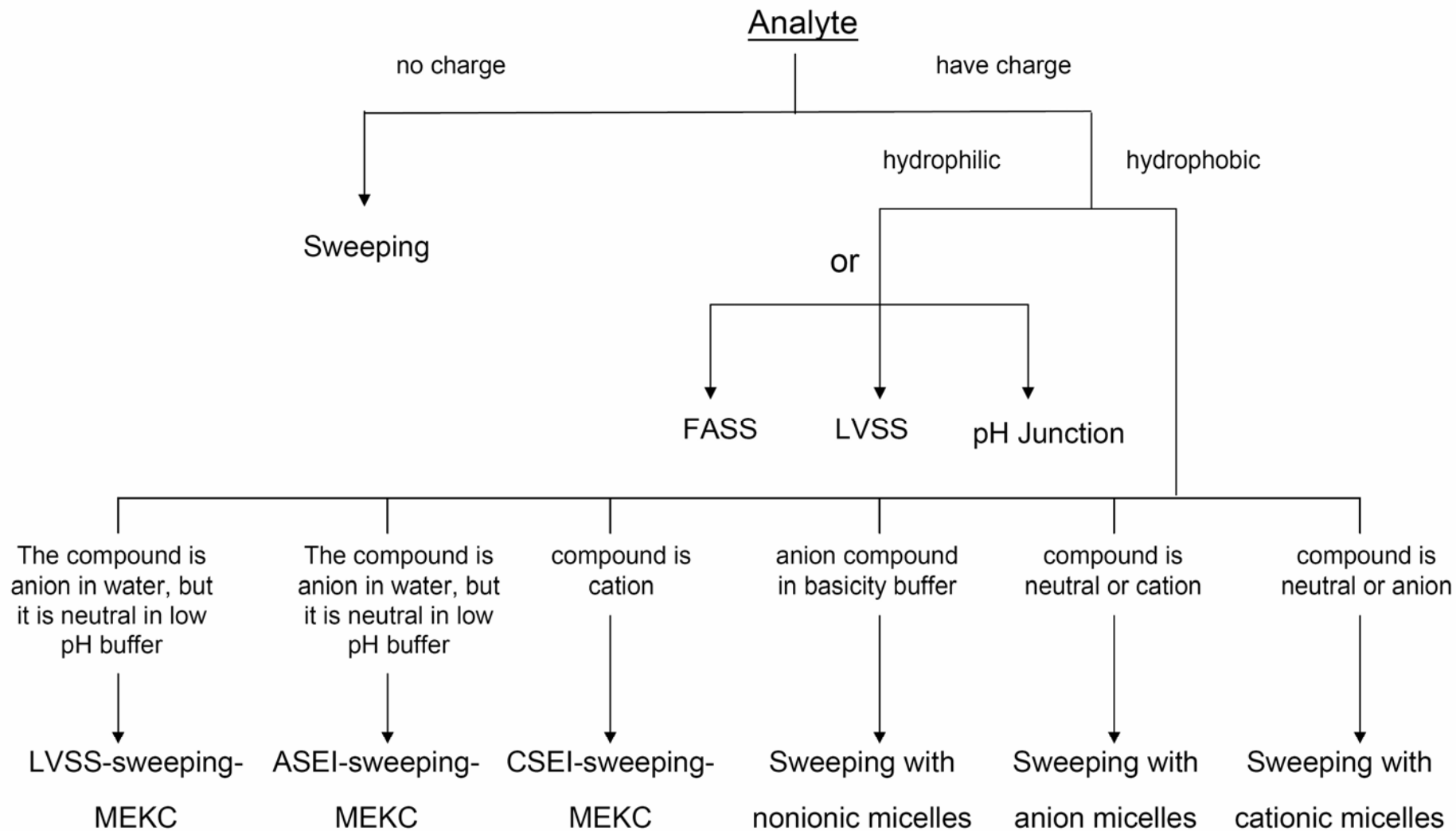


Figure 2-12 The choice of on-line concentration techniques.[31]

三、利用掃略式線上濃縮毛細管電泳法 分析氟硝西洋及其代謝物

3.1 氟硝西洋

氟硝西洋 (flunitrazepam) 硝基苯二氮洋類藥物，化學全名為 5-(2-fluoro-phenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one。其結構如 Figure 3-1 所示，特徵在於 1,4-benzodiazepines 上帶一個硝基，又稱 Rohypnol，自 1975 年由瑞士羅氏藥廠所發明上市後，目前行銷全世界八十多個國家，每天有超過一百萬人服用，1976 年開始在台上市，由於療效卓著，副作用極少，因此為世界各國廣泛使用。

苯二氮洋類藥物為臨床上治療失眠焦慮症狀所使用的藥物之一，已取代早期使用的巴比妥鹽。雖然各種苯二氮洋藥物在中樞神經系統作用機制相類似，但其吸收代謝及安眠作用的亦有所差異，氟硝西洋是屬於長效型 ($t_{1/2}$ 大於 12 個小時) 的苯二氮洋藥物，在體內主要的作用機制是透過與 γ -丁胺酸受體 (Gamma-aminobutyric acid, GABA) receptor 結合，主要作用在 omega-1 與 omega-2 receptor，引起氯通道打開，增加膜外氯離子流入膜內，造成細胞膜過極化 (hyerpolarization) 現象產生，而使神經細胞膜去極化困難，降低神經的興奮，因此產生中樞神經系統抑制或鎮靜的藥理作用。omega-1 receptor，主在存在於小腦中，與鎮靜、睡眠及抗焦慮作用有關；omega-2 receptor，存在於海馬 (Hippocampus) 及基底核 (Basal ganglia) 中，與記憶、運動、感覺及認知功能有關 [32]。

氟硝西洋經口服由十二指腸吸收，經過肝臟代謝後，由腎臟排出，在體內的代謝如 Figure 3-1 示，代謝路徑有去甲基化 (N-desmethylation)、羥基化 (3-hydroxylation) 最後與尿酞酸 (Glucuronidation) 結合及還原硝基產生 7-aminoflunitrazepam，其中以還原硝基為最主要的途徑，故 7-aminoflunitrazepam 為氟硝西洋在體內最主要的代謝物，約超過 10% 給予劑量，原型氟硝西洋經由腎臟排出到尿液約只剩下 0.2% [33]。

氟硝西洋相當普遍地使用於治療失眠症狀，其治療效果非常顯著，相

較於早期同樣使用於鎮定安眠的巴比妥酸鹽，其安全性比巴比妥酸鹽來得高，使用上危險性較少，長期服用較不具毒性，因此為精神科醫生所廣為應用。此藥物在治療劑量下，副作用包括記憶障礙，影響動作與精神狀態，降低注意力，延長反應時間，且會對呼吸中樞有抑制的作用，所以應避免快速的靜脈注射，對於中樞神經系統、呼吸系統、心臟血管系統已有病變的人及新生兒做注射時更應格外的小心，大量服用對心臟、肝臟及腎臟會產生危害性。

氟硝西洋在治療失眠時是減少快速動眼期眼球轉動次數得以入眠，長期使用後若突然停藥，服用者往往出現眼球快速轉動次數增加甚多，主觀上覺得常常作惡夢，不易得到舒適的睡眠，使得病人不得不恢復服用藥物。另外一種副作用是在當催眠劑使用時，常發生引起宿醉的後遺症，這種症狀通常可自癒，也可用中樞神經興奮劑如咖啡鹼(Caffeine) 等，減輕其症狀[34]。

氟硝西洋的毒性，在大鼠依不同攝取途徑條件下其 LD_{50} 值如下，經口給予其 LD_{50} 值為 415 mg/kg，腹腔注射為 1060 mg/kg，皮下注射為大於 4000 mg/kg，肌肉注射為大於 2000 mg/kg。分析其腦、肝臟、腎臟、以及血液中氟硝西洋的含量，結果發現，在組織中普遍比在血液中高，而在口服用後第 5 小時左右氟硝西洋濃度達到最高量[35]。

氟硝西洋在單獨使用時其致死率並不高，但若合併如酒精、安眠鎮定藥、嗎啡、海洛因、酒精、強力膠等其他中樞神經抑制劑，則會加重神經毒性，使其危險性大為提高，許多濫用致死者主要因精神恍惚造成意外或因吸入嘔吐物而導致呼吸停止。

氟硝西洋濫用主要分為兩個部分，一被稱為俱樂部藥物(club drug)，另外則是約會強暴的頭號幫兇，為著名的「約會強姦藥」(date-rape drug)。氟硝西洋被稱為俱樂部藥物主要是因為其常出現在青少年聚集的場所，如舞廳、Pub 及 KTV 的聚會中，其功能有輔助酒精或其他種濫用藥物(如海洛因、古柯鹼及愷它命等)更快速地達到藥物作用。氟硝西洋有別其他苯二氮平的特色在於其具有失憶的效果，在服用後這段期間會失去記憶，

因此近幾年來，常常有人利用氟硝西洋良好安眠鎮靜及失憶的效果，作為不當的犯罪用途，且藥錠溶於溶液中，呈現無色無味，甚至加在含酒精的飲料，更使其加強效果，服用者通常在服用後十五至三十分鐘陷入昏迷，時程約八至十個小時，受害人往往在不知不覺中飲用而受害，因此為坊間著名的約會強姦藥之一。最近，藥廠為了防止此類犯罪行為，決定讓全球的氟硝西洋都改裝，變成墨綠色膜衣、藍色藥心的小藥丸，劑量也減半，溶於飲料會變色，使有心人士再也買不到以往舊型無色無味、橢圓小丸子的氟硝西洋。在台灣，氟硝西洋也一直是苯二氮平類的藥物中濫用最多的一種，在國內則一般俗稱 FM2，主要是取其學名首尾兩個英文字母及其一錠常用劑量 2mg 而得，但通常需要劑量只有 0.5 mg 至 2 mg，即每次四分之一錠至一錠即可發揮藥效。政府也為了管制類似 FM2 這類可能造成上癮或危害社會的藥物，衛生署依照管制藥品管理條例，列為第三級管制藥品，規定使用的醫師必須領取使用執照，製造或販售也必須申請登記證。未來販售氟硝西洋會依照毒品危害防制條例，被判處五年以上的有期徒刑。雖然政府和藥廠紛紛採取措施，杜絕犯罪，然而一些有心人士還是可以由國外走私進口或地下工廠自行合成獲得，由此可見，氟硝西洋對社會的危害。

氟硝西洋在低劑量時(0.5~2mg) 就可以達到很好效果，經由身體的代謝，在體內所剩的濃度很低。再者氟硝西洋在體內代謝非常迅速且複雜，減低了同一代謝物在體內的含量，因此對刑事案件的實際檢測來說，受害者往往可能只服用一次，收集到檢體的時間可能在事發後好幾天，經過體內的代謝，體內原型藥物和代謝物可能只剩一點點而已，因此在氟硝西洋檢驗的發展上需要一種高靈敏度的分析方法，目前已研究分析氟硝西洋的方法有免疫化學技術(immunoassay) [36-39] 來做篩選測試氟硝西洋，其他如用薄層層析法分析(Thin-layer chromatography, TLC) ，但這些方法不能區分藥物和其代謝物，只適用於初步的篩選，不能定量，其原因在於敏感性不佳且易與其他相似的藥物產生偽陽性。在氣相層析分析方面，接上電子捕捉偵測器(Electron-capture detector, ECD)[40]，或是結合質譜儀[41-45]，在結合質譜儀方面可以有效的降低偵測極限，但氟硝西洋的代謝

物在分析前常常需要衍生或水解的步驟。依照目前分析尿液中氟硝西洋及其主要代謝物的方法，使用氣相層析質譜儀在不同的游離模式下分析，各具有其優缺點，但仍有改善的空間。在液相層析分析方面，同樣地結合電噴灑游離法(electrospray ionization, ESI)[46] 或大氣壓力化學游離法(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)[47] 也可以成功地在低濃度下偵測到氟硝西洋及其代謝物。在毛細管電泳分析方面，氟硝西洋為不易帶電物質，因此在毛細管電泳中必須藉由微胞電動力學毛細管層析法(MEKC) 的系統使氟硝西洋與其代謝物分離，但在結合 UV 偵測器上偵測極限卻往往達不到要求，因此為了有效降低偵測極限，相關研究者便使用毛細管表面修飾 C18 的毛細管結合 ESI-MS[48] 來做分析。

毛細管電泳近年來被廣泛應用於生化及藥物分析上，其優點包括利用外加電場與微小內徑的管徑有效地增加分離效率、快速的分離時間與所需要的樣品體積相較於 HPLC 減少了許多。在氟硝西洋(flunitrazepam) 的分析上，受限於其在身體的代謝速率非常的快速，經由人體代謝後在尿液或血液中，氟硝西洋的含量非常的稀少，在尿液中會大部分存在的是其還原後之代謝物 7-氨基氟硝西洋(7-aminoflunitrazepam) ，有鑑於此在氟硝西洋結合固相萃取在尿液的分析中我們選擇了氟硝西洋、7-氨基氟硝西洋與氟硝西洋去甲基後的代謝物去甲基氟硝西洋(*N*-desmethyl flunitrazepam) ，作為偵測的指標。雖然 GC/MS 在氟硝西洋與其代謝物的分析上，已有很好的研究成果，但在代謝物的分析上卻需要很長的分析時間與前置的衍生步驟，因此我們利用毛細管電泳分析技術，不需前置的衍生步驟及其快速的分離時間之優點，來改善氟硝西洋及其代謝物的分析結果，但受限於毛細管管徑短小應用在 UV 偵測器上靈敏度受到限制，在相關研究上已有研究者選擇 CEC/MS 來補足靈敏度的缺點，但在技術的純熟度與經濟的考量上，我們應用「線上濃縮技術」來改善 UV 偵測器靈敏度的限制。

3.2 線上濃縮方法(On-line concentration method)


在 Figure 2-12 的整理中，我們可以清楚看出不同性質的分析物適用不同的線上濃縮方法，帶電荷的分析物可應用於電場放大堆積(FASS)、大體積樣品堆積(LVSS) 及不同酸鹼值緩衝溶液接合濃縮(Dynamic pH junction) 等模式；與界面活性劑作用力強的帶電荷的分析物，也可應用於掃掠式線上濃縮(sweeping) 及複合兩種線上濃縮的模式(CSEI-sweeping-MEKC, ASEI-sweeping-MEKC, LVSS-sweeping-MEKC)；中性分析物因其電泳遷移速率不受電場的影響，故在線上濃縮方法中只適用於掃掠式線上濃縮(sweeping)。氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋均為不易帶電物質，因此在線上濃縮方法的開發，我們選擇掃掠式線上濃縮模式，經實驗比較分析物與界面活性劑的作用力後，選用陽離子界面活性劑 CTAB(hexadecyltrimethylammoniumbromide) 在鹼性環境進行掃掠式線上濃縮。

氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋在鹼性四硼酸鈉/氫氧化鈉緩衝溶液下，利用 CTAB 可做較高倍率的濃縮，且三種分析物的分離能力也不錯，其濃縮機制模式如 Figure 3-2，首先讓活化(condition) 後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，致使電滲流反轉，然後再注入一長段高秒數的樣品區帶(如 Fig. 3-2(A))，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，以尋求較佳之掃集效率，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電壓(由負極到正極)，此時樣品區帶內的中性物質便隨著電滲流的驅動，快速朝向出口端的正極移動，在緩衝溶液內的 CTAB 微胞因電性相斥的關係速度變慢，並由區帶邊界逐漸進入樣品區帶中，當分析物接觸到 CTAB 微胞時，即因與微胞結合使其本身電泳速度大幅減慢(如 Fig. 3-2(B))，由此造成遷移速度改變，而讓分析物堆疊集中在樣品區帶與背景緩衝溶液(BGE) 的交界處(如 Fig. 3-2(C))，而達到濃縮放大之目的。

3.3 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-可見光二極體陣列(UV-VIS diode array) 作為偵測器。儀器與分析數據由 Beckman Cotlter MDQ 32 Karat software 控制與處理；以內徑 50 μm ，外徑 360 μm ，總長 60 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，去除塗附之聚醯亞胺以形成偵測窗口。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。偵測器吸收波長設於 240 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。

3.4 試藥



所有試藥均為分析級。四硼酸鈉(sodium tetraborate) 購自 Sigma Chem. Co.(St.Louis,MO,U.S.A.)。CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide)購自 Merck-Schuchardt 公司(Schuchardt, 8011 Hohenbrunn bei München)。磷酸二氫鈉(sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4)、氫氧化鈉(sodium hydroxide)、鹽酸(HCl) 皆購自 Fluka 公司。甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)、二氯甲烷(dichloromethane)、異丙醇(isopropanol)皆購自 Merck 公司，氨水(Ammonium hydroxide) 購自 Riedel-deHaën 公司。氟硝西洋(flunitrazepam, catalog no. F-907; 1 mg/mL methanol; F)、7-氨基氟硝西洋(7-aminoflunitrazepam catalog no. A-911; 1 mg/mL acetonitrile; 7-AF)與去甲基氟硝西洋(*N*-desmethylflunitrazepam, catalog no. D-918; 1 mg/mL methanol; N-DF) 皆購自 Radian International 公司，其結構詳見 Figure 3-1。

3.5 固相萃取

使用 Supelco 公司(Bellefonte, PA, U.S.A) 所生產之 12 port Vacuum Manifold 固相萃取裝置，搭配 EYELA (Tokyo, Japan) 公司所生產之 A-3S 型水噴射幫浦。固相萃取管為 Oasis[®] MCX solid phase extraction cartridges (3 cc/60 mg) 購自 Waters 公司(Waters, Milford, MA, USA)。

3.6 實驗方法

3.6.1 新毛細管的調態(Condition)

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先以甲醇沖洗 10 分鐘，接著以去離子水沖洗 2 分鐘，去除管壁油污。為了讓毛細管內壁之矽醇基游離活化並穩定，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 20 分鐘，然後以純淨的去離子水沖洗 10 分鐘後備用。



3.6.2 實驗前、後毛細管的處理

毛細管先以 0.1 N NaOH 沖洗 3 分鐘，再以甲醇沖洗 3 分鐘，最後去離子水沖洗 3 分鐘去除殘留的甲醇，然後再以實驗所使用緩衝溶液沖洗 3 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前述之步驟以 0.1 N NaOH、甲醇、去離子水沖洗毛細管；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。

3.6.3 氟硝西洋標準溶液之配製

氟硝西洋(flunitrazepam)、去甲基氟硝西洋(*N*-desmethyl flunitrazepam) 與 7-氨基氟硝西洋(7-aminoflunitrazepam) 標準品為各自配置於甲醇與乙腈的溶液，各為 1000 ppm 的標準母液存放在冰箱中 -10°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，前述母液需再以去離子水為溶劑混合稀釋至 10 ppm，分析時再依所需要以緩衝溶液稀釋至適當的濃度。

3.6.4 不同濃縮分離條件之測試

3.6.4.1 緩衝溶液不同 pH 值之影響

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 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)、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易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 9.0 至 10.5 以測試對氟硝西洋與其代謝物線上濃縮之影響，分離緩衝溶液其餘條件：CTAB 90 mM、甲醇含量 30% (v/v)、樣品注入條件，0.5 psi; 180 sec、分析物濃度均為 2.0 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。

3.6.4.2 緩衝溶液不同離子濃度之影響

緩衝溶液離子濃度的高低，影響了電滲流的遷移速度，緩衝溶液在高離子濃度下所產生的電流，也會增加焦爾熱對分離的影響，固定緩衝溶液 pH 值為 9.5，並調整變化四硼酸鈉(的濃度由 10 mM 至 50 mM)以測試對氟硝西洋與其代謝物線上濃縮結果之影響，分離緩衝溶液其餘條件：CTAB 90 mM、甲醇含量 30% (v/v)、樣品注入條件，0.5 psi; 180 sec、分析物濃度均為 2.0 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。

3.6.4.3 緩衝溶液含量不同濃度 CTAB 之影響

在掃集的模式中，藉由含微胞溶液與不含微胞溶液與分析物作用後，產生的速度差造成聚集，因此改變所添加 CTAB 的含量，由 10 mM 增加至 90 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：pH 9.5, 40 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; 300 sec、分析物濃度均為 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。

3.6.4.4 緩衝溶液含有機修飾劑之影響

藉由有機溶劑的添加可以改變分析物在微胞相與溶液相的分配情況，因此改變緩衝溶液中甲醇之含量，由 10% (v/v) 增加至 40% (v/v) 藉此尋求氟硝西洋與其代謝物之最佳分離結果。分離緩衝溶液其餘條件：pH 9.5, 40 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 50 mM、樣品注入條件，0.5 psi; 300 sec、分析物濃度均為 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。

3.6.4.5 樣品區帶不同離子濃度緩衝溶液之影響

由前述電場放大原理，知道帶電離子在外加高電壓下，因處於不同離子濃度的緩衝溶液，造成所感應的電場強度有所差異而影響其電泳遷移速率，本實驗掃集模式中使用的 CTAB 微胞為帶正電粒子，故稀釋樣品所使用之緩衝溶液，其所含的離子濃度高低，也就會對掃集過程造成一定程度的影響，因此固定分離緩衝溶液之離子濃度，變更樣品區帶之離子濃度由 10 mM 增加至 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：pH 9.5, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 50 mM、

甲醇含量 30% (v/v)、樣品注入條件， 0.5 psi; 300 sec、分析物濃度均為 1.0 ppm。

3.6.4.6 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，因此我們固定分離緩衝溶液條件：pH 9.5, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 50 mM、甲醇含量 30% (v/v) 與樣品區帶之離子濃度 40mM，樣品注入 0.5 psi; 由 180 sec 增加至 420 sec，以尋找最適當的樣品注入時間。

3.6.4.7 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 以甲醇溶劑稀釋之標準液，樣品注入 0.5 psi; 3.0 sec，經外加高電壓分離完成後，量測所有分析物之波峰絕對高度訊號值與前述最佳掃集結果訊號值相比較，以波峰高度訊號之堆積效率(stacking efficiency in term of peak hieght, SE_{height})[28] 表示並計算放大倍率。

$$SE_{\text{height}} = \frac{h_{\text{stack}}}{h} \times \frac{C}{C_{\text{stack}}} \quad (3-2)$$

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

3.6.4.8 再現性分析及定量校正曲線


取氟硝西洋與其代謝物混合標準原液 10 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、400 ppb、800 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, 300 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五次。以氟硝西洋及其代謝物之波峰面積對濃度作圖，得到標準校正曲線。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, %)。

3.6.5 藥錠之偵測

三種不同嫌疑藥錠由憲兵司令部刑事鑑識中心所提供。將取得的藥錠磨成粉末狀，各取 2 mg 加入 1 mL MeOH 進行超音震盪 30分鐘後，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取其上層溶液用 40 mM 四硼酸鈉緩衝溶液稀釋 100 倍之後進入毛細管電泳分析。

3.6.6 尿液樣品之固相萃取步驟



取空白尿液樣品 3 mL 加入 30 μ L 10 ppm 混合的標準品及 60 μ L 1 M 的磷酸二氫鈉(調整pH值約至5)，首先利用 2 mL 甲醇和 2 mL 去離子水來沖洗平衡全新的固相萃取管，做完上述步驟後，接續著加入配置好的 3 mL 尿液以小於 1 mL/min 的流速通過萃取管，之後再以 2 mL 0.1 N 鹽酸和 2 mL 甲醇流速大於 2 mL/min 沖洗萃取管，等萃取管內溶液完全被吹乾後，以 3 mL 二氯甲烷/異丙醇/氨水(78 /20 /2) 沖提，最後沖提液在 35°C 下以氮氣吹乾，乾燥後的物質再以 300 μ L 樣品緩衝溶液回溶，進入毛細管電泳分離。

3.6.6.1 固相萃取之回收率(Recovery, RE)

固相萃取的回收率為了減低尿液樣品的基質干擾利用 3 mL 空白尿液樣品中只加入 60 μ L 1 M 的磷酸二氫鈉同前述之固相萃取步驟，沖提液在氮氣吹乾後加入 30 μ L 10 ppm 混合的標準品以樣品緩衝溶液回溶至 300

μL (Post-extracted spiked sample) ，進入毛細管電泳分離，與空白尿液樣品在萃取前加入 30 μL 10 ppm 混合的標準品(Extracted sample) 之分析結果比較，計算其波峰面積百分比，運算公式如以下所示。最後以重複五次分析結果之平均值和 1.96 倍的標準偏差值(SD)，做為 95% 的可信賴區間。

$$\% \text{ RE} = \frac{\text{Peak Area}_{\text{Extracted sample}}}{\text{Peak Area}_{\text{Post-extracted spike sample}}} \times 100 \quad (3-3)$$

3.7 結果與討論

3.7.1 緩衝溶液不同 pH 值之影響

在電泳分析中，緩衝溶液 pH 值的高低一直是重要的調控因數，pH 值主要可能改變分析物帶電能力，或是進一步地影響電滲流遷移速度的大小，而氟硝西洋及其兩種主要代謝物在鹼性環境下為中性物質，因此在本系統中之 pH 值，主要是影響電滲流的遷移速度，從 Figure 3-3 可以發現由 pH 9 至 pH 10.5 的範圍內，pH 值越小整體的分析時間越快，此乃是因緩衝溶液中添加了陽離子界面活性劑 CTAB 造成毛細管表面因吸附 CTAB 而電性改變，電滲流反轉由負極朝向正極方向前進，降低 pH 值有利於 CTAB 解離，因此由 Figure 3-4 可以看出，在緩衝溶液濃度固定下，pH 值越小毛細管管壁表面解離的正電荷越多，電滲流的遷移速度越快。電滲流的速率增大，造成分析物移動的時間越快與微胞作用的時間越短，濃縮的效果因而減低，反之，增加 pH 值使分離時電流值增高，擴散效應的影響變得明顯，因此在比較濃縮效率後，選擇 pH 9.5 的緩衝溶液為最佳的分離條件。

3.7.2 緩衝溶液不同離子濃度之影響

在分析中加入緩衝溶液主要是減小溶液在外加高電壓後，在陽極會電解產生 O_2 與 H^+ 及陰極產生 H_2 與 OH^- 而造成溶液 pH 值的變化，緩衝溶液可以穩定溶液的 pH 值，增加分析的再現性。

由 Figure 3-5 可以看出，在固定 pH 值、界面活性劑及有機修飾劑的量時，離子濃度越高，整體的遷移速率越慢。在毛細管電泳分離原理中，驅動電滲流與分離，主要是由於毛細管管壁電雙層的形成，緩衝溶液的離子濃度越高，管壁電雙層中的擴散層厚度被壓縮，使得毛細管中的 Zeta 電位降低，因而減低電滲流的速度。對於濃縮效率，在 10 mM 時遷移速率太快使得分析物與微胞作用的時間太短，濃縮動作未完成因此波峰有變寬的現象，而在 30 mM 以後，雖然波峰高度因作用的時間變長而有所成長，但在遷移時間越長的分析物去甲基氟硝西洋卻開始有拖尾的現象，因此選擇緩衝溶液濃度 25 mM 為最佳的分離條件。

3.7.3 緩衝溶液含量不同濃度 CTAB 之影響

由 Terabe 所推演的公式(式(2-10)) 顯示，在掃掠式線上濃縮(sweeping)中分析物的容量係數 k (capacity factor) 越大，則掃集的長度越短，所得到的濃縮效果越好。

以下為容量係數 k (capacity factor) 的定義：

$$k = K (V_S / V_M) \quad (3-1)$$

K : 分配係數(partition coefficient)

V_S : 微胞相(假靜相)的體積

V_M : 溶液相(動相) 的體積

由以上公式可知，分析物在微胞相的體積增加容量係數 k 變大，濃縮效果就越好，因此藉由增加緩衝溶液中 CTAB 的濃度來增加微胞的數量，以達到最佳的濃縮效果。

由 Figure 3-7 所示，除了 7-AF 最高的波峰出現在 CTAB 30 mM，其餘的分析物在 CTAB 50 mM 濃縮效果最好，會有此現象的產生，主要是

三種分析物與 CTAB 親合性的不同所造成的，7-AF 為氯硝西洋還原後氨基的代謝物，因此其與微胞作用力沒有其他兩種分析來得好，對擴散效應忍受程度較小，在 CTAB 50 mM 以後就會因擴散現象使波峰變寬而降低其濃縮效果。

CTAB 為陽離子型的界面活性劑，因此濃度越大所產生的電流越大，導致在毛細管中溫度梯度和層流的變化，產生的焦爾熱效應就越明顯，而造成波峰寬度變寬的現象，在濃度超過 70 mM 時，由 Figure 4-6(A)(B) 可知分析物 F (peak 2) 及 NF (peak 3) 已開始有波峰變寬的現象，而雖然在 CTAB 30 mM 7-AF(peak 1) 堆積效果最好，但因為其出現的位置與背景峰很接近，考慮往後定量的準確性，選擇了 CTAB 50 mM 為最佳的條件。

3.7.4 緩衝溶液含不同甲醇量之影響

在傳統的微胞電動層析(MEKC)中，添加有機溶劑可以修飾分析物在微胞相與溶液相的分配情況，以改善分離的效率，除此之外，有機溶劑藉由介電常數(ϵ)、Zeta 電位(ζ potential) 和粘度(η) 的不同，在毛細管中影響電滲流遷移率的大小也會促使分析物遷移速度的改變，在此選擇甲醇為有機修飾劑。

由 Figure 3-8 所示，隨著甲醇的量增加，整體背景緩衝溶液電滲流的遷移速度越慢，因此間接增加分析物的濃縮時間。添加 10% 含量的甲醇，已可完全分離，但第一個分析物(7-AF) 卻未被濃縮完全，逐漸增加甲醇的含量均可增加分離與濃縮的效率，當添加至 40% 時，濃縮的效率有下降的驅勢，此乃是因當緩衝溶液中甲醇大量的增加，相對地降低溶液相的極性，使得臨界微胞濃度(CMC) 上升，緩衝溶液固定界面活性劑的濃度，在高甲醇含量下形成微胞的數目變少，因此濃縮的效率變差，考慮濃縮的效果選擇了 30% 含量的甲醇為最佳的條件。

3.7.5 樣品區帶不同離子濃度緩衝溶液之影響

由電泳遷移速度的公式可知，電泳遷移速度隨著電場強度增加而變快，因此藉由背景緩衝溶液與樣品區帶中溶液之電場強度差異可能造成分散作用，也可以利用來形成堆積效果，在此電場強度是利用溶液離子濃度來調控，離子濃度越高，電場強度越小，電泳遷移速越慢。

雖然在本系統中分析物為中性物質，其電泳速度不受外加電場強度所影響，但因界面活性劑所形成微胞為陽離子微胞，在分析物與微胞結合之後也會促使分析物對電場強度變化而有速度上的改變。在樣品區帶離子濃度小於背景緩衝溶液時樣品區帶的電場強度較高，陽離子微胞在接觸到高場強樣品區帶後，其本身的電泳運動快速的往負極端(入口端)前進，造成了擴散的效應，反之則有助於濃縮，但離子濃度的增加會伴隨著焦爾熱的產生，而降低濃縮的效率，因此必須綜合各項因素選擇最佳的濃縮效果。

在本系統中，藉由固定背景緩衝溶液濃度在 25 mM, pH 9.5, CTAB 50 mM, 30% CH₃OH 下，探討樣品區帶在四種不同的離子濃度(10, 30, 40, 50 mM) 的變化。當背景緩衝溶液之離子濃度大於樣品區帶之離子濃度(10 mM) 時，我們可以由 Figure 3-9(D) 清楚地看到擴散的結果使得波峰變寬，越後面出現的分析物越明顯；反之，當樣品區帶之離子濃度(30, 40, 50 mM) 大於背景緩衝溶液之離子濃度時，利用電場增加濃縮效果的現象開始出現，造成分析物往出口端聚集，比較濃縮效果之後，選擇了 40 mM 為最佳的條件。

3.7.6 樣品注射時間

藉由延長樣品的注射時間，可以增加樣品進入毛細管的量，但因分析物與微胞的作用有限，在濃縮效率方面，並不是一謂地增加樣品的注射量就能增加濃縮效率，當濃縮效率到達極限增加樣品的注射量反而會此波峰變寬或未堆積(unstacking) 的現象產生，因此由 Figure 3-10 不同的注射時間發現，樣品的注射時間由 180 至 300 秒波峰高度有增加的趨勢，但從 360 秒開始波峰就有未堆積及拖尾的現象產生，尤其最後的分析物(NF) 最為明顯，因此選擇 300 秒為最佳條件。

3.7.7 樣品掃集濃縮效果及放大倍率

由 Figure 3-11 所示，在所探討的最佳分離條件(pH 9.5, 25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液、CTAB 50 mM、甲醇含量 30% (v/v)；樣品區帶：40 mM 四硼酸鈉緩衝溶液，不添加陽離子界面活性劑 CTAB 及甲醇)下，比較注入高濃度短秒數(Figure 3-11(A) 100 ppm, 3.0 sec.)與低濃度長秒數(Figure 3-11(B) 1.0 ppm, 300 sec)，由圖譜可以明顯的看出長秒數的 sweep-MEKC 模式有效地濃縮低濃度的分析物，使其訊號與短秒數的 MEKC 模式 100 ppm 分析物相當，由波峰高度訊號值比較放大倍率 SE_{height} (如式 3-2)，經計算後分析物與 CTAB 結合的放大效果 7-AF (peak 1)、F (peak 2)、NF (peak 3) 分別是 110 倍、140 倍、200 倍。

3.7.8 再現性分析及定量校正曲線

為確定本實驗經由陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮技術濃縮低濃度分析物是否有再現性，在最佳分離條件下，重複五次實驗，針對分析物的遷移時間與積分面積作觀察，如 Table 3-1 所示，三種分析物的遷動時間相對標準偏差均小於 0.51%；積分面積相對標準偏差均小於 4.10%，由此可知本實驗不論在遷移時間或積分面積再現性均良好。

將氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋三種分析物以適當緩衝溶液稀釋配置成不同濃度後，以最佳分離條件來製作定量校正曲線，結果三種分析物之定量校正曲線線性方程式如 Table 3-1 所示，線性相關係數(r^2) 均介於 0.9964~0.9992 之間，所顯示的線性關係良好。與傳統的 MEKC 比較，三種分析物在兩種方法下遷動時間均有良好的再現性，去甲基氟硝西洋(*N*-desmethylflunitrazepam)的積分面積則比傳統的 MEKC 再現性差，推測乃是因為長秒數的注射時間與較長的分離時間增加其濃縮的不穩定性所至，使用上述實驗的最佳分離濃縮條件方法偵測極限 ($S/N=3$) 為 5.6 ppb~13.4 ppb 之間，比傳統的 MEKC 之偵測極限約降低

兩個級數。

3.7.9 藥錠之偵測

由 Figure 3-12 所示，三種不同嫌疑藥錠之偵測及混合三種藥錠及添加入氟硝西洋標準品之分析圖譜，分離條件為上述所探討之最佳條件。初步由遷移時間作為比較依據，可以清楚的看出三種嫌疑藥錠中，嫌疑藥錠 III (如 Figure 3-12(C)) 可能為氟硝西洋之成分，再進一步地添加入氟硝西洋標準品發現嫌疑藥錠 III 與氟硝西洋標準品為同一個波峰 (如 Figure 3-12(D))，因此我們可以判定嫌疑藥錠 III 為含氟硝西洋成分之藥錠，經計算 Figure 3-12(C) 嫌疑藥錠 III 氟硝西洋所含濃度除以嫌疑藥錠 III 之取樣濃度，得知在此藥錠內氟硝西洋的含量為 0.8%。

3.7.10 尿液樣品之偵測與回收率

尿液樣品方面，使用空白的尿液添加入氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋三種分析物來進行偵測，偵測條件為上述所探討之最佳條件。由 Figure 3-13 可以看出在未經由固相萃取純化之尿液樣品其基質干擾也經由長秒數的注入量被放大，覆蓋住分析物的訊號，因此本實驗必須經由固相萃取之前處理去除基質干擾，才能順利地看到分析物的訊號，如 Figure 3-13 所示，重複五次相同的萃取步驟 (見 4.5.5 節)，氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋回收率分別介於 $75.9 \pm 7.04\%$ 、 $72.3 \pm 3.17\%$ 與 $79.6 \pm 5.55\%$ 之間。

3.8 結論

本實驗選擇在陽離子界面活性劑掃掠式線上濃縮模式下，對氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋進行線上濃縮研究。此方法利用陽離子界面活性劑吸附在毛細管管壁改變管壁性質使電滲流反轉，在

不需抑制電滲流的情況下，利用陽離子微胞會被負極吸引，使其本身的電泳遷移往入口端方向，綜合電滲流的影響，陽離子微胞在毛細管的遷移速度小於電滲流，當不含陽離子微胞的樣品溶液接觸到具有陽離子微胞的緩衝溶液時會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，過程中不須改變電極。

本研究將分析物置於四硼酸鈉緩衝溶液鹼性的環境中，背景緩衝溶液中添加陽離子界面活性劑 CTAB，並以有機修飾劑改變背景緩衝溶液性質，進行研究與討論。在掃掠式線上濃縮方法中，藉由在背景緩衝溶液加入有機修飾劑甲醇改變溶質的容量係數來幫助分離，但因為添加甲醇會增加整體的遷移時間，降低濃縮效率。緩衝溶液的離子強度越大，則電滲流越小，分析物與微胞的接觸時間就越長，會有較佳的濃縮效果，但是高離子強度會導致電流變大，焦爾熱效應的影響趨於明顯反而降低了濃縮的效率；而樣品基質的離子強度與緩衝溶液離子強度在此也因陽離子微胞有互相平衡的作用。除此之外，在掃掠式線上濃縮方法中微胞濃度對樣品堆積有重大影響，微胞濃度越大，濃縮效率越高，但在離子型微胞的濃縮方法中，微胞濃度太高使焦爾熱效應變得明顯導致波峰變寬，隨著分析物與微胞的親合性不同對擴散效應的忍耐力也不同，因此必須針對分析物尋找其最佳微胞濃度。

在藥錠與尿液樣品方面，本實驗成功地經由萃取的前處理方式去除樣品的基質干擾，在最佳條件：緩衝溶液為 pH 9.5、25 mM 四硼酸鈉緩衝溶液，含 30% 甲醇的有機修飾劑與 50 mM CTAB 於緩衝溶液中，此時外加電壓為 -25 KV，樣品以 0.5 psi 注入 300 秒，分析物配製於 pH 9.5、40 mM 四硼酸鈉緩衝溶液(不含甲醇與 CTAB) 中，在藥錠樣品方面，可以經由添加標準品的方式，辨別含有氟硝西洋成分的藥錠，在尿液樣品中也可以清楚地看到氟硝西洋及其代謝物 7-氨基氟硝西洋與去甲基氟硝西洋的訊號。

Table 3-1 Regression equations, coefficients of variation (r^2), limits of quantitation (LOQ), limits of detection (LOD), migration times, and values of RSD for flunitrazepam, 7-amino-flunitrazepam, and *N*-desmethylflunitrazepam during separation using the normal MEKC and sweeping-MEKC techniques, respectively.

	flunitrazepam	7-amino-flunitrazepam	N-desmethyl-flunitrazepam
<u>Normal MEKC</u>			
Regression equation	$y = 100.61 x + 224.45$	$y = 129.94 x - 121.41$	$y = 71.544 x - 227.85$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9968$	$r^2 = 0.9985$	$r^2 = 0.9971$
LOQ ($S/N = 10$, ppm)	6.23	1.74	5.82
LOD ($S/N = 3$, ppm)	1.87	0.52	1.74
Migration time (min)	10.54	7.17	13.10
RSD (%; $n = 5$)			
I . Migration time	0.55	0.25	0.62
II . Peak area	2.85	2.04	1.48
<u>sweeping-MEKC</u>			
Regression equation	$y = 11.494 x - 681.53$	$y = 28.198 x - 852.94$	$y = 24.66 x - 3097.3$
Coefficient of variation	$r^2 = 0.9964$	$r^2 = 0.9992$	$r^2 = 0.9982$
LOQ ($S/N = 10$, ppb)	44.7	18.2	40.0
LOD ($S/N = 3$, ppb)	13.4	5.6	12.0
Migration time (min)	8.48	6.21	10.24
RSD (%; $n = 5$)			
I . Migration time	0.39	0.28	0.51
II . Peak area	1.14	2.01	4.10

Table 3-2 Recoveries for 7-aminoflunitrazepam (7-AF), flunitrazepam (F) and *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

		Recovery				AVE	$\pm 1.96 \times SD$
7-AF	76.1%	80.7%	72.4%	72.4%	78.1%	75.9	$\pm 7.04\%$
F	72.8%	68.7%	69.7%	73.8%	76.6%	72.3	$\pm 3.17\%$
NF	82.9%	77.0%	82.2%	77.0%	78.6%	79.6	$\pm 5.55\%$

$\pm 1.96 \times SD$ (95% confident level)



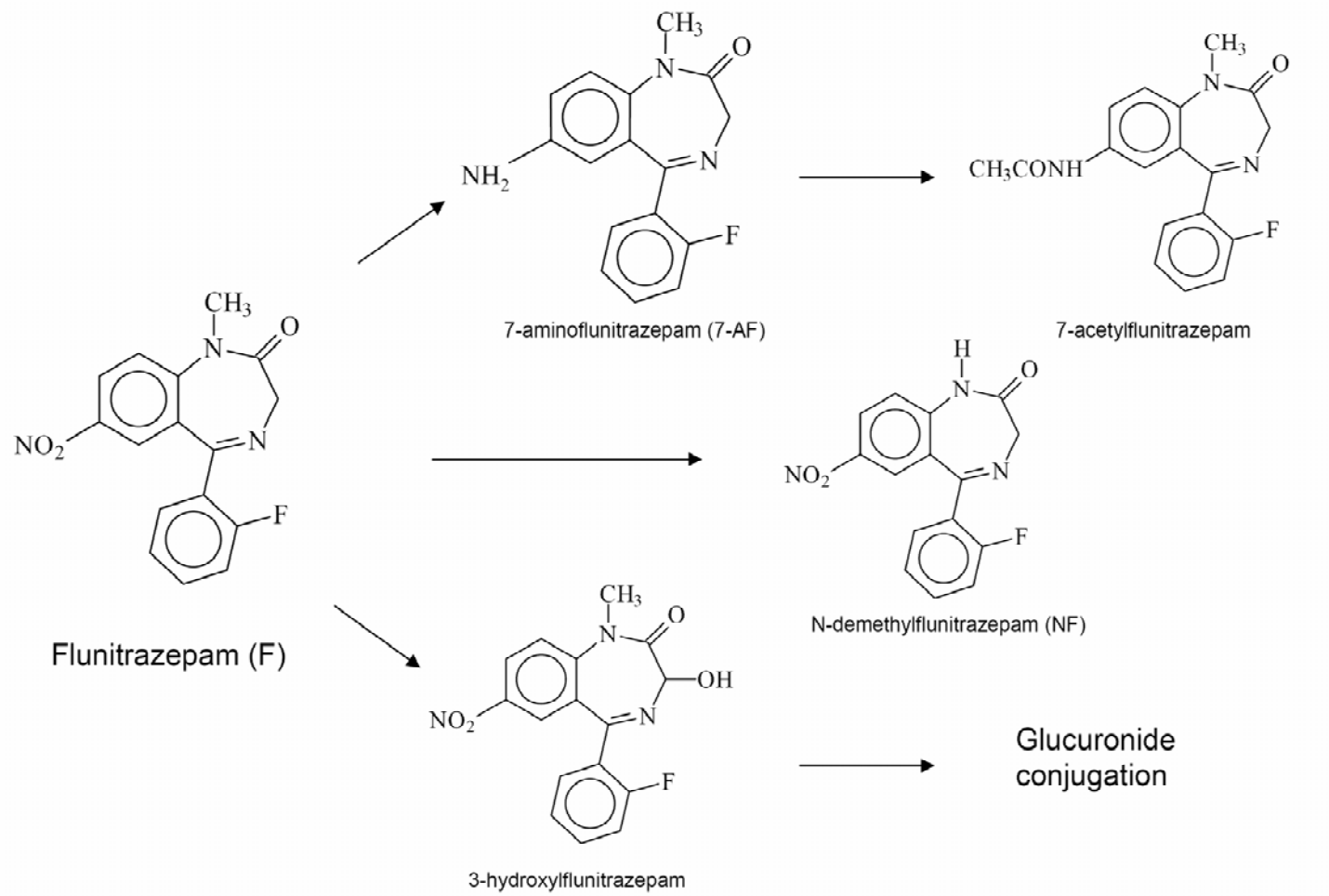


Figure 3-1 The major mechanisms of flunitrazepam metabolism in humans.

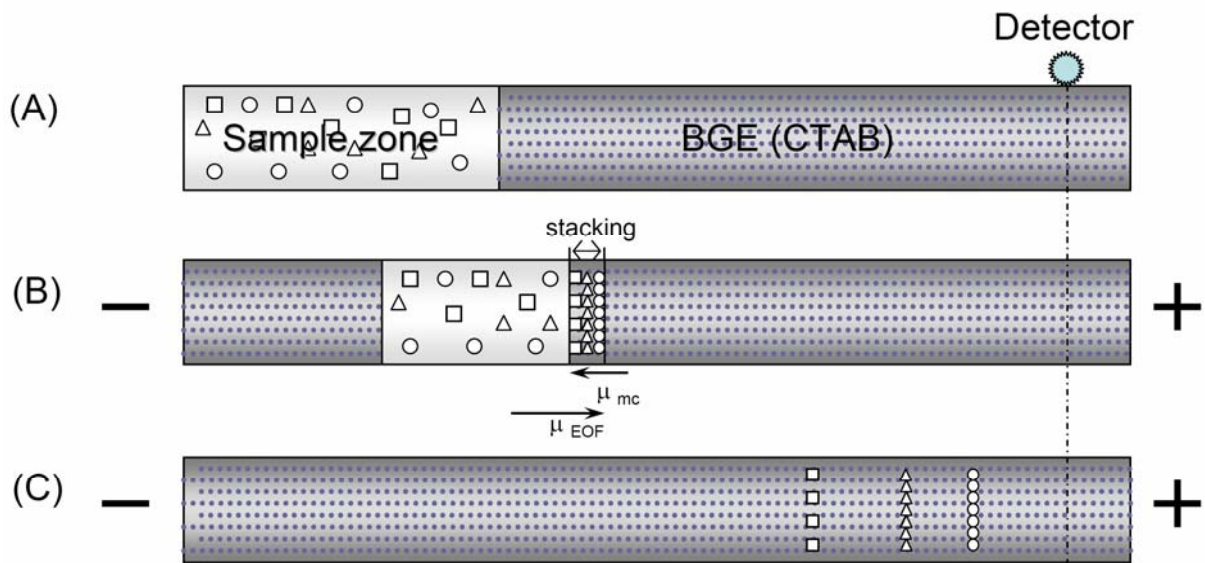


Figure 3-2 Schematic diagram of sweeping using a CTAB micellar phase.



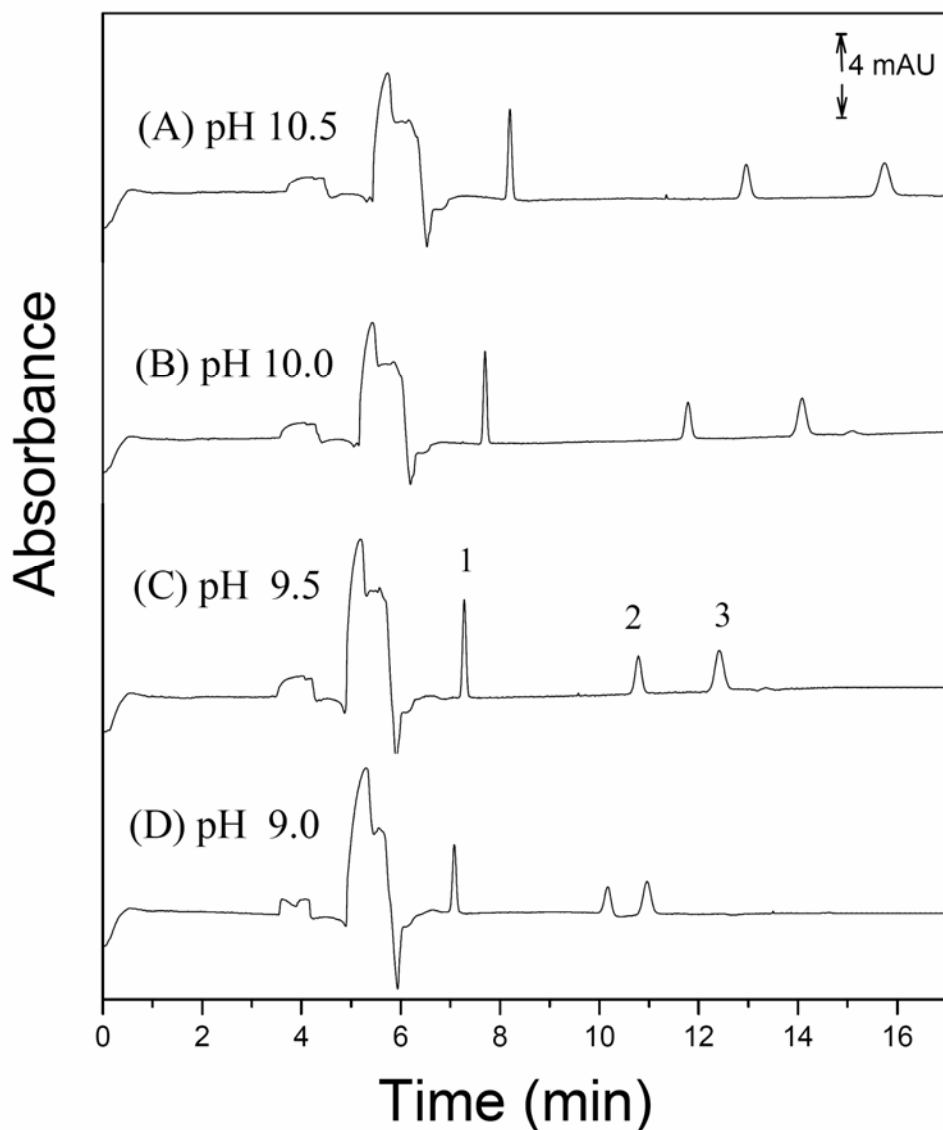


Figure 3-3 Effect that the pH of the buffer solution has on CE separation. (a) pH 10.5; (b) pH 10.0; (c) pH 9.5; (d) pH 9.0. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 μ m I.D.; buffer solution: 25 mM borate buffer, 90 mM CTAB, 30% CH_3OH (v/v); sample matrix solution: 25 mM borate buffer; pH is the same as that of the buffer; separation voltage: -25 kV; injection time: 180 s; UV detection at 240 nm. Analytes (2 ppm): peak 1, 7-aminoflunitrazepam (7-AF); peak 2, flunitrazepam (F); peak 3, *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

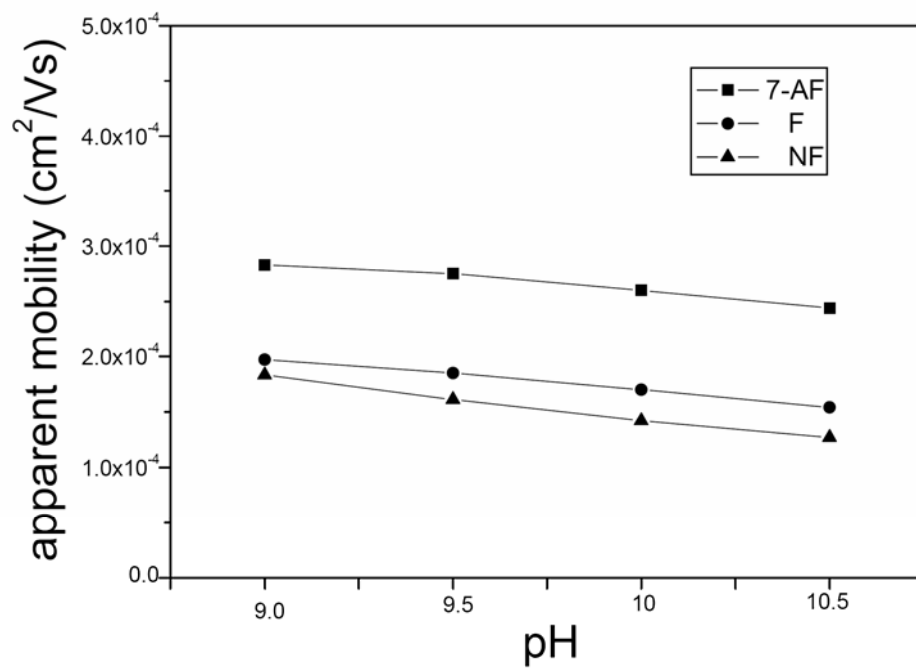


Figure 3-4 Variation of the apparent mobility of flunitrazepam and its major metabolite as a function of the buffer electrolyte pH. Other condition as described in Figure 3-3.



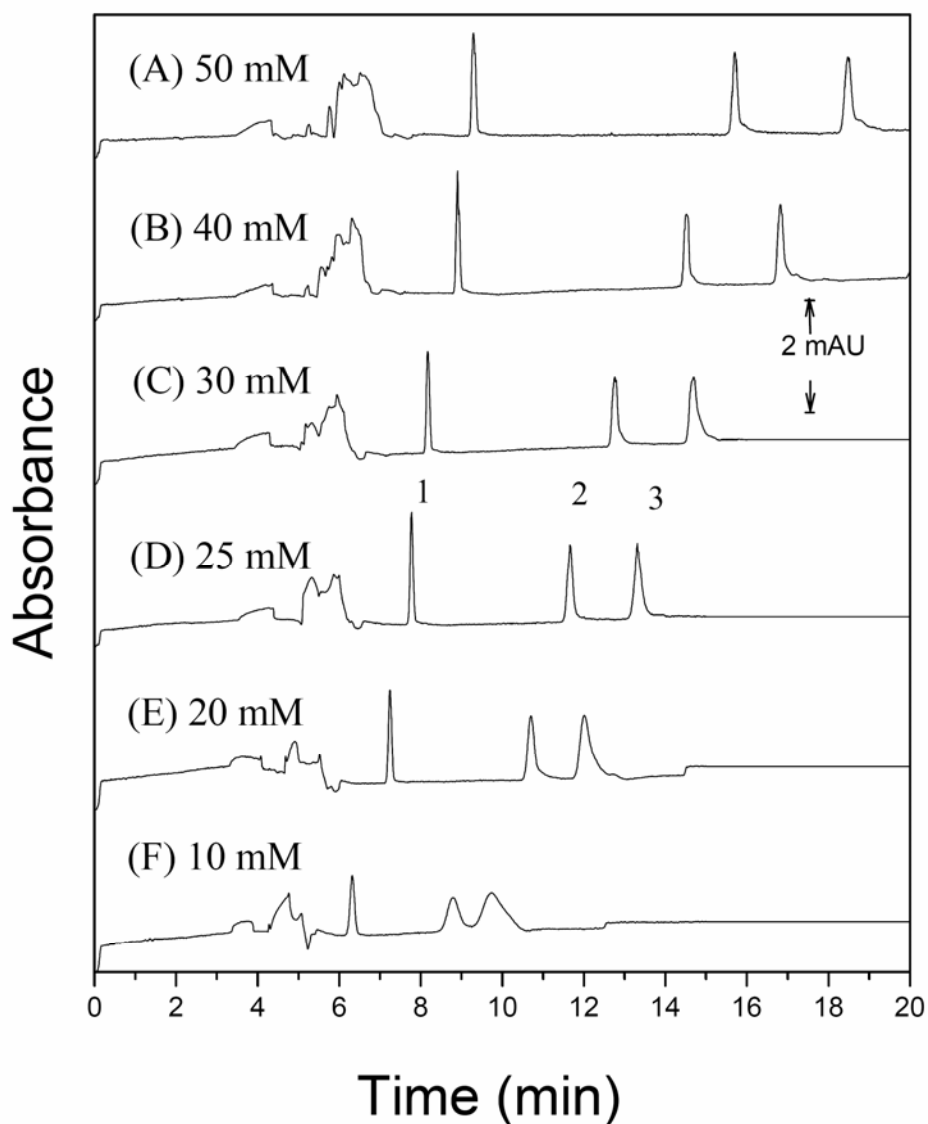


Figure 3-5 Effect that ion strength of buffer solution has on CE separation. (a) 50 mM; (b) 40 mM; (c) 30 mM; (d) 25 mM; (e) 20 mM; (f) 10 mM. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 μ m I.D.; buffer solution: borate buffer, pH 9.5, 90 mM CTAB, 30% CH_3OH (v/v); sample matrix: pH 9.5; borate buffer concentration is the same as that of the buffer; separation voltage: -25 kV; injection time: 180 s; UV detection at 240 nm. Analytes (2 ppm): peak 1, 7-aminoflunitrazepam (7-AF); peak 2, flunitrazepam (F); peak 3, *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

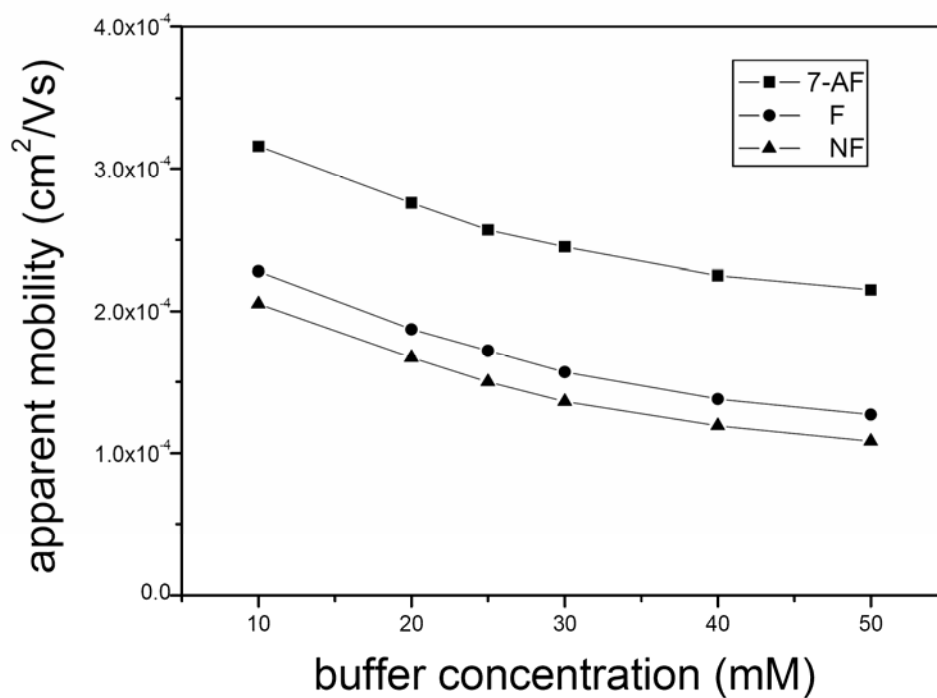
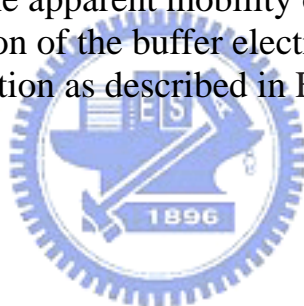


Figure 3-6 Variation of the apparent mobility of flunitrazepam and its major metabolite as a function of the buffer electrolyte concentration. Other condition as described in Figure 3-5.



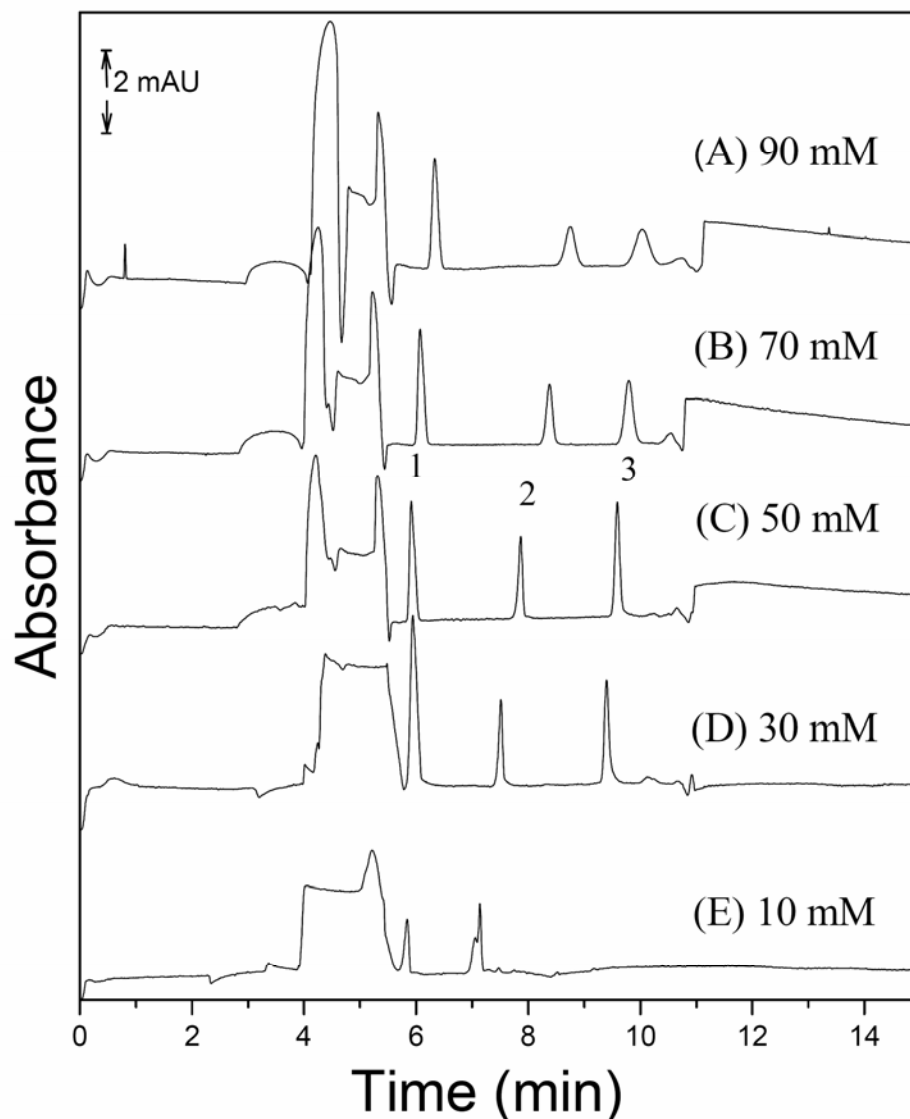


Figure 3-7 Effect that CTAB concentration in buffer solution has on CE separation. (a) 90 mM; (b) 70 mM; (c) 50 mM; (d) 30 mM; (e) 10 mM. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 mm I.D.; buffer solution: 25mM borate buffer, pH 9.5, 30% CH₃OH (v/v); sample matrix: pH 9.5; 40 mM borate buffer; separation voltage: -25 kV; injection time: 300 s; UV detection at 240 nm. Analytes (1ppm): peak 1, 7-aminoflunitrazepam (7-AF); peak 2, flunitrazepam (F); peak 3, *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

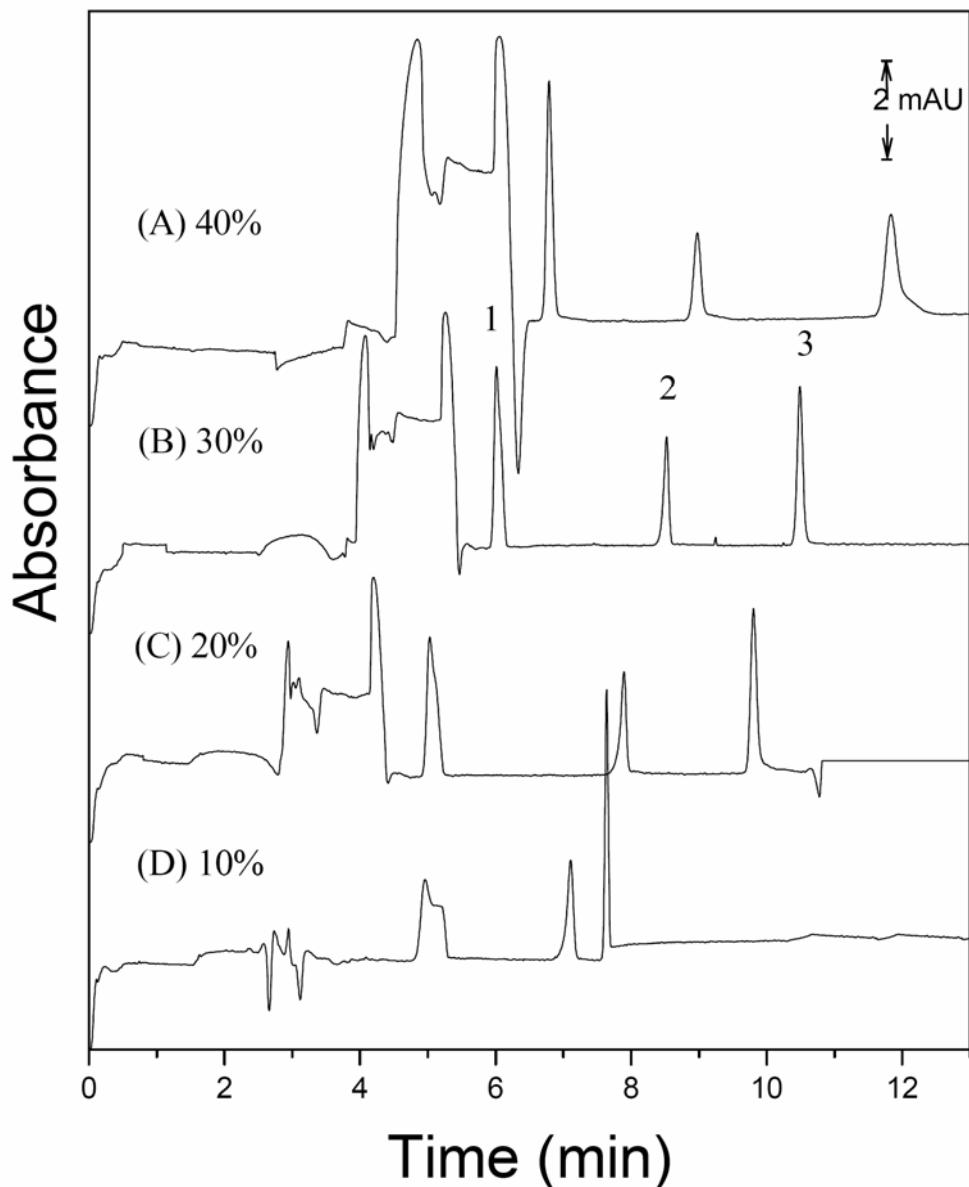


Figure 3-8 Effect that the percentage of methanol (v/v) in the buffer solution has on CE separation. (a) 40%; (b) 30%; (c) 20%; (d) 10%. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 μ m I.D.; buffer solution: 25mM borate buffer, pH 9.5, 50 mM CTAB; sample matrix: pH 9.5; 40 mM borate buffer; separation voltage: -25 kV; injection time: 300 s; UV detection at 240 nm. Analytes (1ppm): peak 1, 7-aminoflunitrazepam (7-AF); peak 2, flunitrazepam (F); peak 3, *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

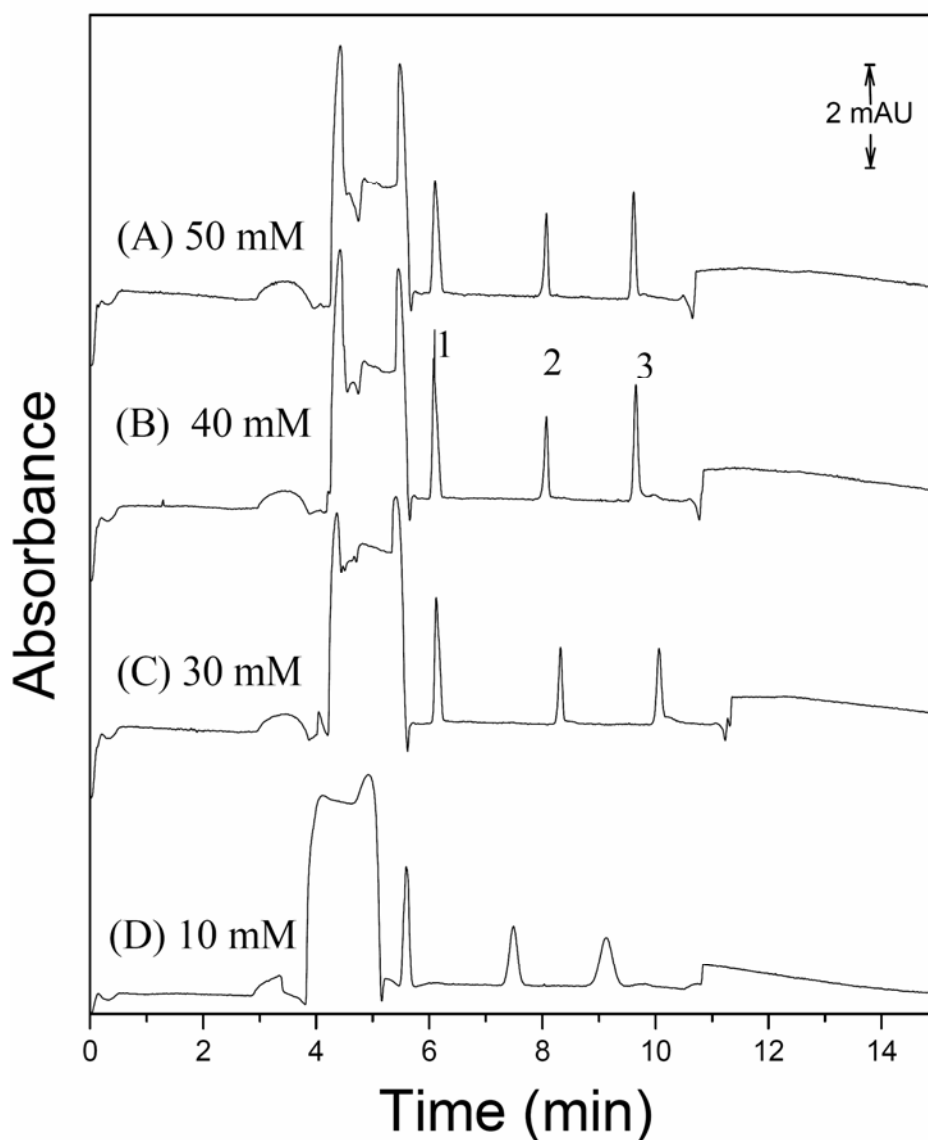


Figure 3-9 Effect that the sample matrix (borate buffer) concentration has on CE separation. (a) 50 mM; (b) 40 mM; (c) 30 mM; (d) 10 mM. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 μ m I.D.; buffer solution: 25 mM borate buffer, pH 9.5, 50 mM CTAB, 30% CH_3OH (v/v); sample matrix: pH 9.5; separation voltage: -25 kV; injection time: 300 s; UV detection at 240 nm. Analytes (1ppm): peak 1, 7-aminoflunitrazepam (7-AF); peak 2, flunitrazepam (F); peak 3, *N*-desmethylflunitrazepam (NF).

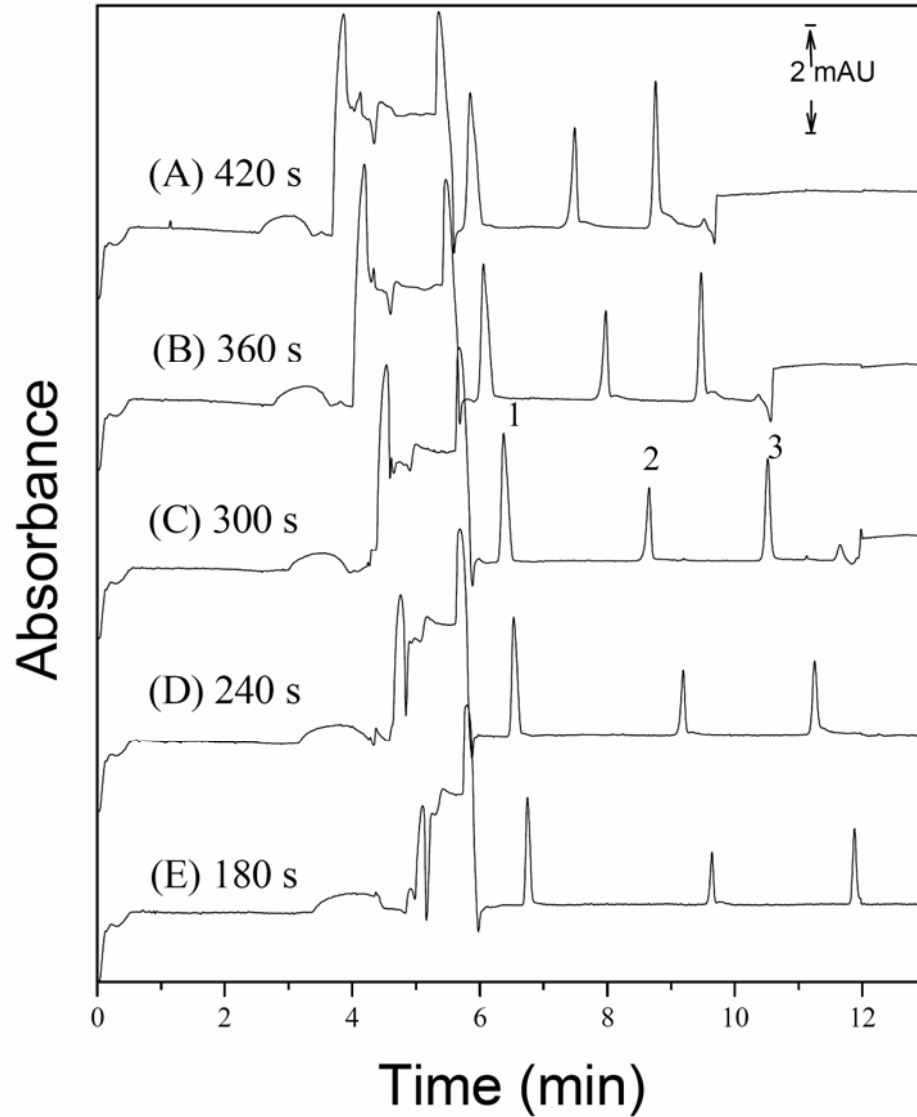


Figure 3-10 Effect that the injection time has on CE separation. (a) 360 s; (b) 300 s; (c) 240 s; (d) 180 s. Conditions: capillary, 60 cm (50 cm to detector), 50 mm I.D.; buffer solution: 25 mM borate buffer, pH 9.5, 50 mM CTAB, 30% CH₃OH (v/v); sample matrix: 40 mM borate buffer, pH 9.5; separation voltage: -25 kV; injection time: 300 s; UV detection at 240 nm. Analytes (1ppm): peak 1, 7-AF; peak 2, F; peak 3, NF.

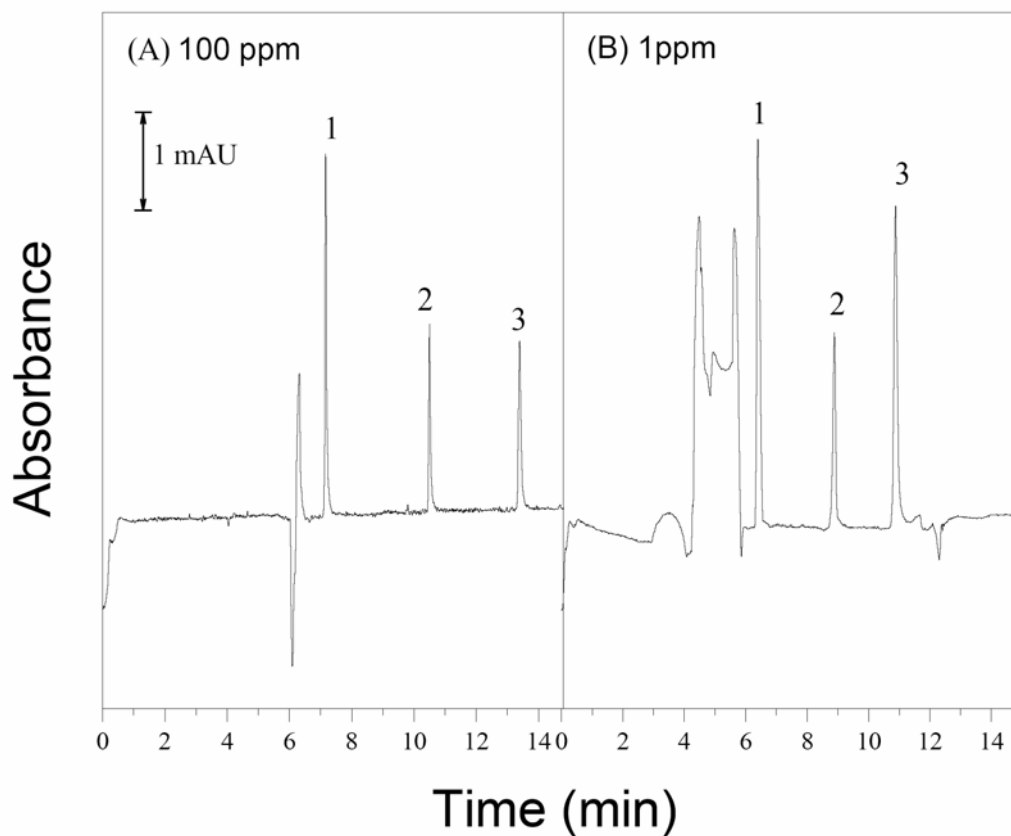


Figure 3-11 A comparison between the sweeping-MEKC method and that of normal hydrodynamic sample injection. (A) Normal hydrodynamic injection. Sample concentration: 100 ppm; hydrodynamic injection: 3.0 s. (B) Sweeping-MEKC procedure. Sample concentration: 1 ppm; sample injection: 300 s. Analytes : peak 1, 7-AF; peak 2, F; peak 3, NF.

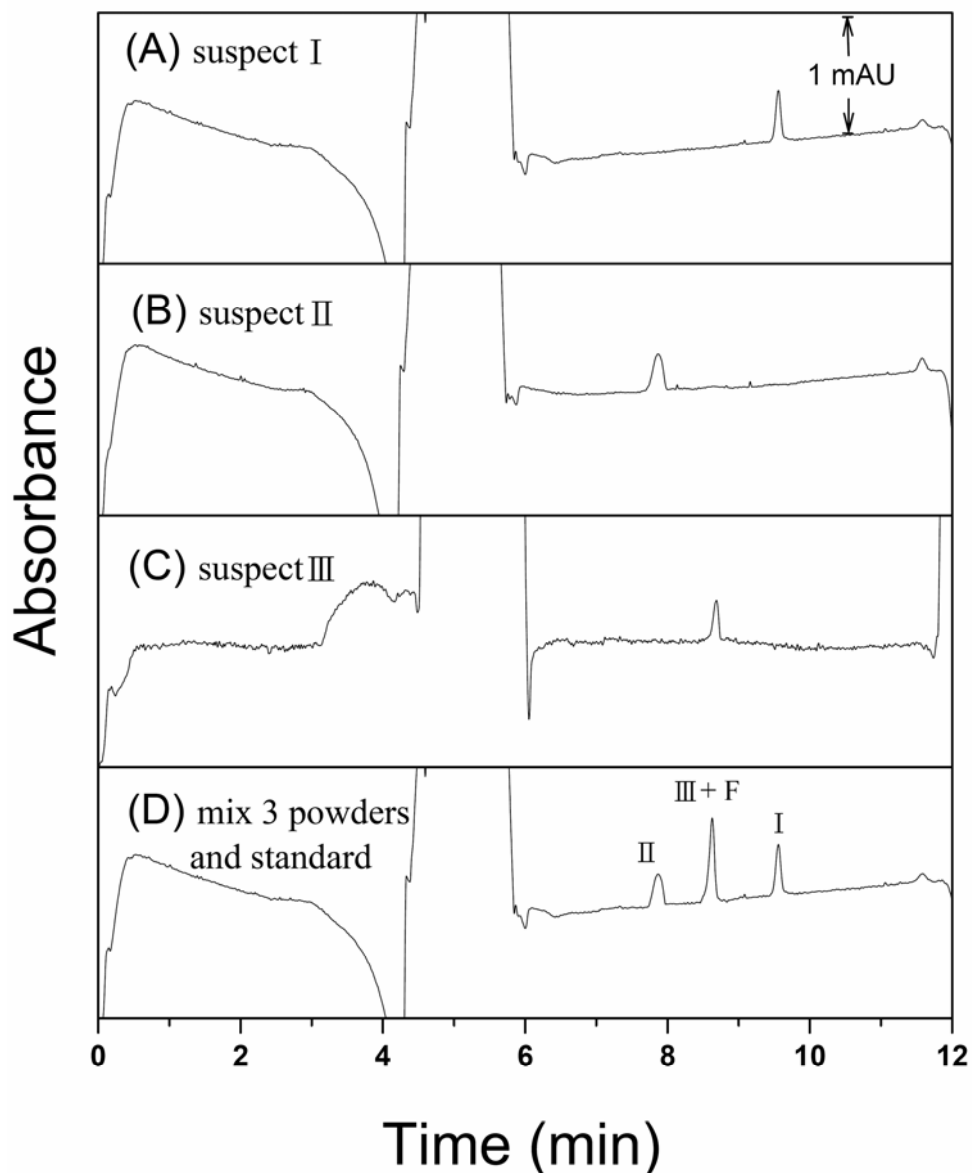


Figure 3-12 Sweep-MEKC electropherogram of (A) suspect I , (B) suspect II , (C) suspect III, (D) mix (A)(B)(C) powders and spike standard flunitrazepam (F).

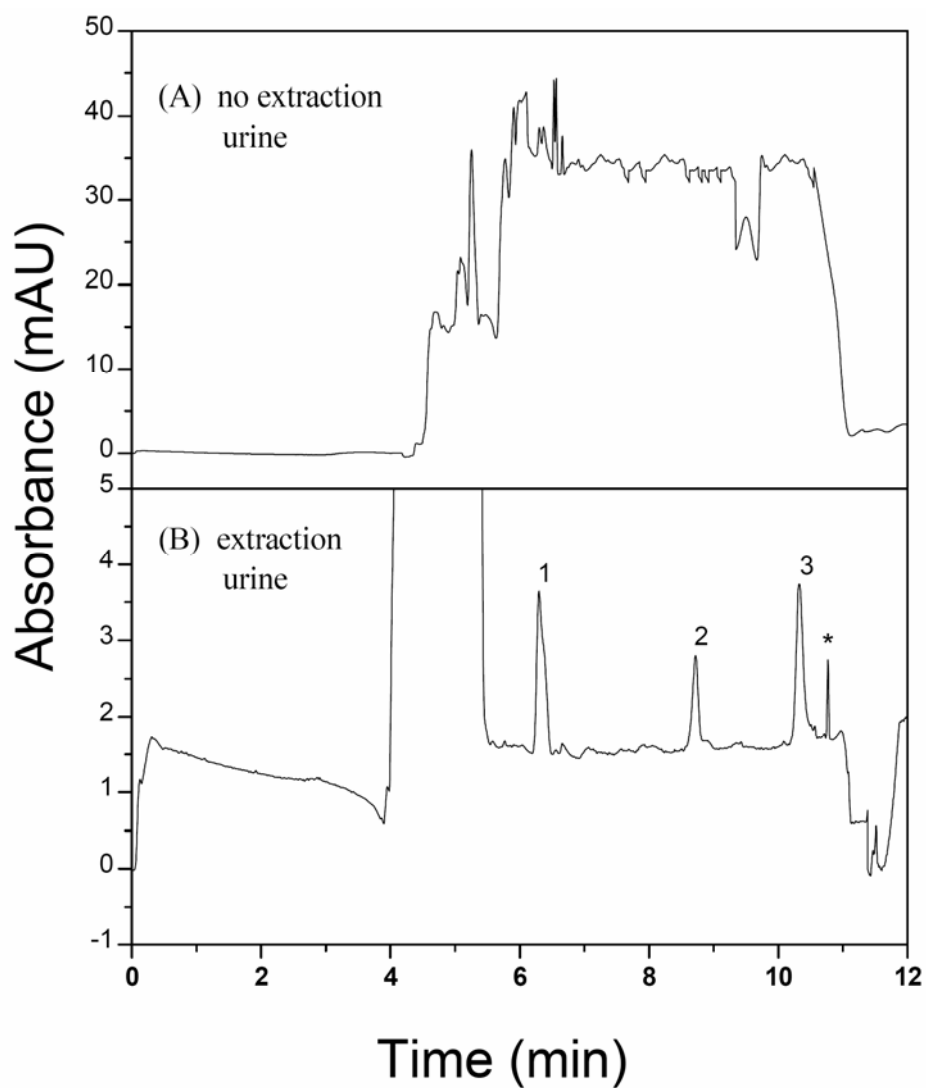


Figure 3-13 Sweep-MEKC electropherogram of (A) no extraction urine, (B) solid-phase extraction urine (spike standard 7-aminoflunitrazepam (peak 1), flunitrazepam (peak 2) and *N*-desmethylflunitrazepam (peak 3)), * is impurity.