

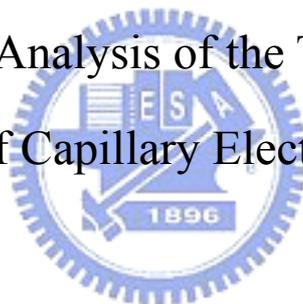
國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

毛細管電泳訊號之時間效應初探

The Preliminary Analysis of the Temporal Effect in
Signals of Capillary Electrophoresis



研究生:林俊宏

指導教授:余 艇 博士

中華民國九十四年十月

毛細管電泳訊號之時間效應初探

The Preliminary Analysis of the Temporal Effect in
Signals of Capillary Electrophoresis

研究生：林俊宏
指導教授：余艇博士

Student: Chun-Hung Lin
Advisor: Dr. Tiing Yu

國立交通大學
應用化學研究所
碩士論文



A Thesis
Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Science
in
Applied Chemistry
October 2005
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十四年十月

毛細管電泳訊號之時間效應初探

學生：林俊宏

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學研究所

摘要

對於流動型分析儀器的訊號，最近有文獻提出了所謂“時間效應”的假說。本研究之目的在於探討毛細管電泳訊號，是否有時間效應的存在。

所謂時間效應是指樣品在管路裡流動時，由於在管中產生的分散現象，會導致樣品在通過偵測器之時，樣品的分佈會因流動而改變，因此所測得樣品之訊號和實際樣品之分佈並不相同。

我們設計了一個多通道的偵測器，可以記錄樣品在毛細管中和時間相關的樣品分佈函數（時圖），和以空間相關的樣品分佈函數（空圖）。由於儀器之偵測靈敏度尚無法提供良好的訊號，我們以目前最好的訊號，來探討毛細管電泳訊號是否有時間效應的存在。結果發現，相同樣品之訊號，其波峰之空圖和時圖都同時會呈現拖尾(tailing)或是趨前(fronting)，因此毛細管電泳之訊號，並無明顯的時間效應存在。

The Preliminary Analysis of the Temporal Effect in Signals of Capillary Electrophoresis

Student : Chun-Hung Lin

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

Signals of flowing type analytical instruments are subjected to a so-called “temporal effect” that was proposed recently. This study tries to examine whether the temporal effect exists in capillary electrophoresis.

The temporal effect is said to occur while sample molecules are passing a fixed-position detector. Since the sample dispersion keeps changing during the monitoring, the signal (sample distribution) recorded should be different from that of the true sample distribution in the flow.

We designed a multi-channel detector that enables recording of sample profiles as a function of time (temporal profile) and as a function of longitudinal position (spatial profile). Since the current system was unable to provide decent signals, we used the best data at the present time to examine the temporal effect. As a result, both of the temporal and spatial profiles showed tailing and fronting for signals of the same samples. No significant temporal effect was observed in capillary electrophoresis.

謝誌

「終於畢業了！」，這是在口試過後最想喊的一句話。雖然在交大才兩年多的時間，可是卻讓我擁有很多美好的回憶。

首先感謝恩師余艇教授，在我想放棄的時刻拉我一把；在我實驗不順的時候，提供一些我沒想到的方法；在我寫論文的時候，建議我該如何寫。除了在學業和研究上的指導之外，也讓我體認一些人生的道理。也感謝口試委員白書禎教授在邏輯上的指導，以及謝有容教授提醒我該注意的地方。

再來是彥宏的陳彥昇先生，沒有你的協助，向量光學平台不會被改的這麼好的。還有虹光的楊得志先生，感謝你無私地提供光學掃瞄器和非常好用的數據處理系統，讓我的實驗能夠順利完成。

感謝被我一直煩的大學姐—淑慧，沒有妳的幫忙，我是不可能順利畢業的。還有學長姐們的教導—基育、志強、郁培，讓我的研一生活充滿樂趣。

謝謝俊竹、月杏、經緯在我研究和學業上的幫忙，未來一定要常常聯絡喔。還有上雯學姊、瓊葦、秀麗、瑜婷、彥愷、亞玄學長、逸婷、杏嵐提供有關毛細管電泳方面的協助。也祝福秀琴、凱傑、淑嫻、士宗、鈺評、霆琪在未來實驗上能夠順順利利完成，如期畢業。

也謝謝毓棟、吳大、王大、立民、大乘、冠宇、雅嫻、弓箭手、

冷翰、川哥、阿魯咪，讓我的生活多了一些樂趣。

另外感謝在台大念博士班的昆鴻，在學業上不厭其煩地教我有關毛細管電泳的技術。

當然還要感謝芳如，因為偶而的一起吃飯、看電影、逛街、運動等等，讓我能夠在短時間之內充滿幹勁，繼續在實驗上努力奮鬥。我相信妳一定可以考上台大資工所，要加油喔！

還有在清大生資所的方瑜、在成大臨床藥學所的桂禎，妳們在精神上都是永遠支持並鼓勵我，祝福妳們明年能夠順利畢業。

最後感謝我的家人，尤其是爸媽，你們辛苦了，每次打電話回去就是在聽我訴苦。還有我兩個妹妹：桂如和佳慧，也是常常都聽我在抱怨實驗等等，妳們也辛苦了。

最後送給大家一句話，那就是：即使遇到困境，也要繼續撐下去，永遠不要放棄，撐到最後，成功一定就是你的了。

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
謝誌.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
第一章 緒論.....	1
1.1 毛細管電泳概述.....	1
1.2 時間效應.....	1
1.3 空時差異.....	3
1.4 實驗起源.....	3
第二章 研究動機與目標.....	9
第三章 毛細管電泳簡介.....	10
3.1 電泳的發展史.....	10
3.2 電泳分離和遷移率.....	12
3.3 毛細管電泳的原理.....	14
3.3.1 電滲流.....	14
3.3.2 分離效率.....	17
3.4 常見的毛細管電泳分離模式.....	18

3.4.1 毛細管區間電泳.....	18
3.4.2 毛細管等速電泳.....	19
3.4.3 毛細管等電聚焦電泳.....	19
3.4.4 毛細管凝膠電泳.....	20
3.4.5 微胞電動層析法.....	20
第四章 實驗.....	26
4.1 藥品.....	26
4.2 儀器裝置.....	26
4.2.1 單通道偵測系統.....	26
4.2.1.1 電源供應器.....	26
4.2.1.2 紫外可見光偵測器.....	27
4.2.1.3 數據處理系統.....	27
4.2.2 多通道偵測系統.....	27
4.2.2.1 電源供應器.....	27
4.2.2.2 多通道偵測器.....	28
4.3 毛細管.....	28
4.4 向量光學平台組裝與測試.....	28
4.5 樣品的選擇.....	30
4.6 分離模式的選擇.....	30

4.7 標準溶液的配製.....	30
4.8 緩衝溶液的配製.....	30
4.9 毛細管的處理.....	30
4.10 實驗流程.....	31
第五章 結果與討論.....	47
5.1 吸收光譜.....	47
5.2 向量光學平台之改善.....	47
5.3 實驗條件的選擇.....	49
5.4 收集樣品訊號的方式.....	49
5.5 數據處理.....	50
5.6 背景訊號.....	50
5.7 樣品的空圖和時圖之比較.....	51
5.7.1 Tartrazine.....	51
5.7.2 Sunset Yellow FCF.....	52
5.8 未來改善實驗的建議.....	53
第六章 結論.....	70
參考文獻.....	72



圖目錄

圖 1	流動注入分析系統.....	5
圖 2	樣品受到層流和擴散的效應，在偵測器上所表現的濃度分佈圖形(上圖為樣品在管路中的濃度分佈，下圖是濃度對時間作圖，縱軸是濃度，橫軸是時間).....	6
圖 3	質量分佈圖(左)相對應在偵測器上所收集到的圖譜(右).....	7
圖 4	時圖和空圖的說明.....	8
圖 5	毛細管電泳儀器簡圖.....	22
圖 6	形成電滲流之原因.....	23
圖 7	電滲流和層流在管中所造成流動之剖面圖.....	24
圖 8	離子在有電滲流存在下的速度.....	25
圖 9	單通道偵測系統(左)和多通道偵測系統(右)之對比圖.....	32
圖 10	光學盒(上圖為正面圖，下圖為俯視圖).....	33
圖 11	光學盒內部的光學原理.....	34
圖 12	向量光學平台(上圖為側視圖，下圖為俯視圖).....	35
圖 13	實驗裝置簡圖.....	36
圖 14	連接多通道偵測系統和個人電腦的使用界面.....	37
圖 15	燈源的放射波長和濾片的穿透波長.....	38
圖 16	角度向量(箭頭是表示可以調整的方向).....	39

圖 17	角度向量(箭頭是表示可以調整的方向).....	40
圖 18	各零件在向量光學平台上的位置.....	41
圖 19	毛細管固定架.....	42
圖 20	毛細管卡匣(上圖是整體，下圖是放大右邊).....	43
圖 21	多通道偵測系統(上圖是正面圖，下圖是側視圖).....	44
圖 22	上圖為黃色四號的結構式；下圖為其 UV 光譜圖.....	45
圖 23	上圖為黃色五號的結構式；下圖為其 UV 光譜圖.....	46
圖 24	吸收光譜.....	55
圖 25	(a)改善前的(b)改善後的向量光學平台簡圖.....	56
圖 26	殘餘電流.....	57
圖 27	偵測範圍(此時狹縫寬度為 0.7 公厘).....	57
圖 28	狹縫的寬度(a)寬度比較大(b)寬度比較小.....	58
圖 29	因狹縫寬度的改變，造成強度的改變.....	58
圖 30a	測試用的毛細管.....	59
圖 30b	預期在偵測器上所得到的訊號圖.....	59
圖 31a	光線未通過測試用的毛細管之訊號圖.....	60
圖 31b	光線通過測試用的毛細管之訊號圖.....	60
圖 32a	光線未通過實驗用的毛細管之訊號圖.....	61
圖 32b	光線通過實驗用的毛細管之訊號圖.....	61

圖 33a	毛細管的入口端.....	62
圖 33b	多通道偵測系統.....	62
圖 34a	由單通道偵測系統所得到的背景訊號.....	63
圖 34b	由多通道偵測系統得到的背景訊號的時圖結果.....	63
圖 34c	由多通道偵測系統所得到的背景訊號的空圖結果.....	64
圖 35a	100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—單通道偵測系統所得到的 時圖結果.....	65
圖 35b	100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—多通道偵測系統所得到的 時圖結果.....	65
圖 35c	100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—多通道偵測系統所得到的 空圖結果.....	66
圖 36a	500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—單通道偵測系統 所得到的時圖結果.....	67
圖 36b	500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—多通道偵測系統 所得到的時圖結果.....	67
圖 36c	500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—多通道偵測系統 所得到的空圖結果.....	68
圖 37	增大光程示意圖.....	69

第一章 緒論

1.1 毛細管電泳概述

在毛細管電泳(Capillary Electrophoresis, CE)中，管內徑一般是在 25 到 100 μm 之間，管內通常充滿緩衝溶液，電泳則是在毛細管中進行。因為毛細管的高電阻能夠在使用很高的電場(100~500 V/cm)下，只有產生很少的熱量，因此不會造成樣品因熱分散而影響分離解析度，且使用高電場導致分析時間短和分離效率高。在電泳中還有一個獨特的現象，那就是電滲流(Electroosmotic Flow, EOF)。電滲流是一個平面流型(plug flow)，不會對樣品區帶變寬有所貢獻。另外還具有不同分離機制和選擇性的多種分離模式、很少的樣品需要量、線上偵測、定量分析和自動化的潛力。所有這些特點使得毛細管電泳變成一種迅速發展的分離技術。

1.2 時間效應

對於流動型分析儀器而言，以流動注入分析系統(Flow Injection Analysis System, FIA)(如圖 1 所示)為例，波峰常常都是以拖尾的形式出現，有許多文獻和教科書說明為什麼流動注入分析系統的波峰是呈拖尾的現象[1-7]。樣品溶液進入管路之後，會產生分散的情形，其

原因一般認為是取決於一種現象：層流(laminar flow)。圖 2 是表示樣品受不同分散的原因所造成的結果，圖 2a 是沒有產生分散的情形，然後被載送液推動的結果，圖 2b 和圖 2d 則是分別只受層流和擴散影響的結果，圖 2c 是同時考慮層流及擴散影響的結果[7]。樣品因層流而產生彈頭型的形狀，才是波峰變形的主要原因。

但是由白所發表的文獻中指出：在流動注入分析系統中，影響波峰變形的因素有兩個，一個是空間效應(spatial effect)，另一個則是時間效應(temporal effect)[8]。

圖 3 是說明空間效應和時間效應對於偵測器所收集到的之圖譜影響。圖 3a 表示樣品因層流而產生不對稱的分佈形狀，假設其分佈形狀不會隨著時間改變，在經過偵測器之後，會得到一個同樣有拖尾但方向相反的波峰形狀。此時我們即稱：使樣品產生拖尾現象的原因是空間效應。但是如圖 3b 所示，一個原本假設呈高斯分佈的形狀，在流動時是以對稱擴散流動，經過單一光徑偵測器之後，還是會產生一個有拖尾的波峰形狀。此時我們即稱：使樣品產生拖尾現象的原因是時間效應，因為在偵測過程中，濃度分佈隨時間持續在改變中。其實在真實的情況下(如圖 3c 所示)，波峰會產生拖尾是由於空間效應和時間效應所造成的[8]。

最後白指出：「由單一光徑偵測器所得到的圖形，並非樣品在管

柱內真實的分布情形」，意指單一光徑偵測器在忽略時間效應的情況下，會對收集到的訊號產生誤判的結果[8]。

1.3 空時差異

白指出，由單一光徑偵測器得到的波峰圖形，並非樣品在管柱內的真實分布[8]。這是因為單一光徑偵測器的測量是屬於「延時偵測」。收集訊號的同時，樣品的空間分佈狀態仍然一直在改變，這樣的結果與樣品在管柱內的瞬間空間分佈有一定的落差。這個落差我們稱為空時差異，因為時間(時相)與空間(空相)是完全不同的向量，兩個因子對波形的貢獻程度是不一樣的。

如圖 4 所示，時相是指固定一個偵測位置，隨著時間來收集樣品通過偵測位置的訊號，所得到的圖為時圖。而空相是以多通道偵測器來同時偵測大範圍的樣品分佈，所得到的圖為空圖。

1.4 實驗起源

而毛細管電泳系統和流動注入分析系統的差別只在於管路粗細不同和推動樣品的推動力不一樣，其餘的可說是大同小異。但是對於毛細管電泳而言，理論上電滲流對樣品的分散沒有任何貢獻，所以訊號應該是呈高斯的形狀，可是實際上是呈非高斯的形狀，這是否代表

有空時差異的存在。

為了了解樣品在管柱內真實的分佈情形，因此我們設計一套多通道偵測系統來記錄樣品在管柱內分佈的情形。除了可以得到大範圍的空圖之外，還可以固定不同的偵測位置，在不同的時間下得到樣品的訊號，則所得到的圖是為時圖。也就是在多通道偵測系統中，只要改變收集訊號的方式，就可以同時得到管柱內時圖和空圖的結果。



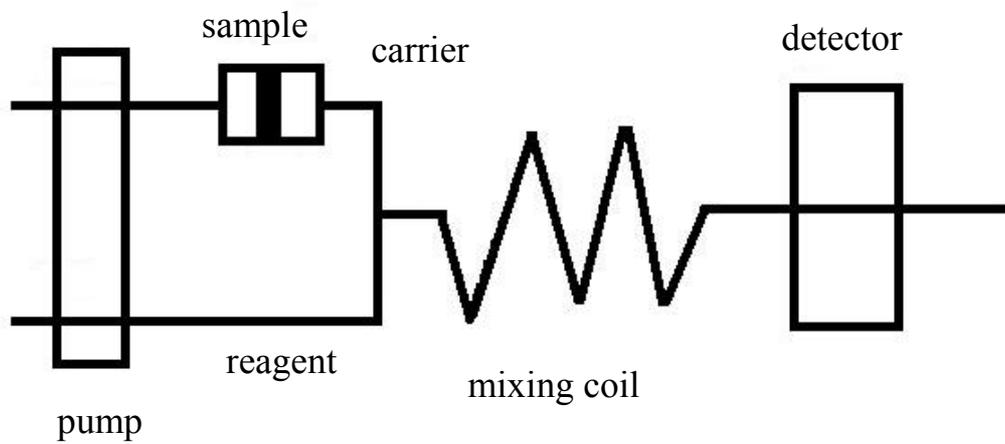


圖 1、流動注入分析系統(Flow Injection Analysis System, FIA)

基本的 FIA 系統包含幫浦、樣品注入閥、混合捲管和適合的偵測器所組成。原理是利用樣品注入閥將一定體積的樣品溶液注入一個流動的載送液裡，隨著載送液的向前推進，與反應試劑作適當混合反應之後，生成一個適合偵測器偵測的化合物，流到偵測器之後，即可得到一個偵測訊號

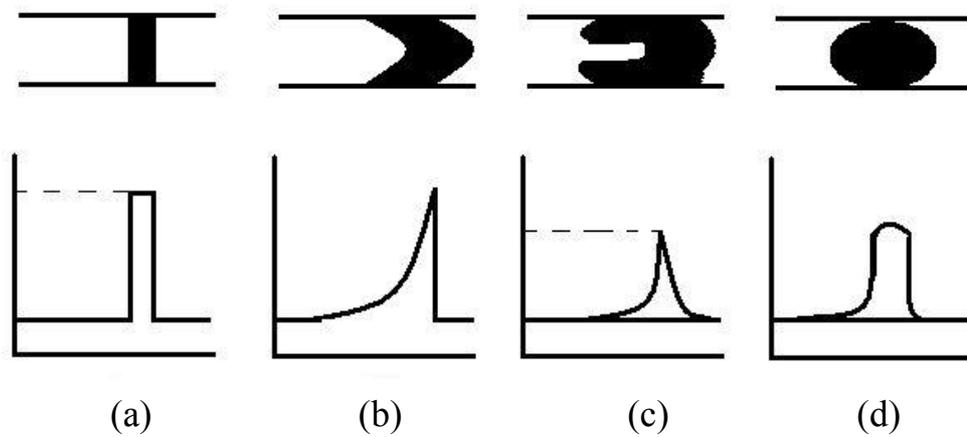


圖 2、樣品受到層流和擴散的效應，在偵測器上所表現的濃度分佈圖形(上圖為樣品在管路中的濃度分佈，下圖是濃度對時間作圖，縱軸是濃度，橫軸是時間)[7]

(a)沒有分散(b)受到層流所產生的分散(c)受到層流和擴散所產生的分散(d)受到擴散所產生的分散

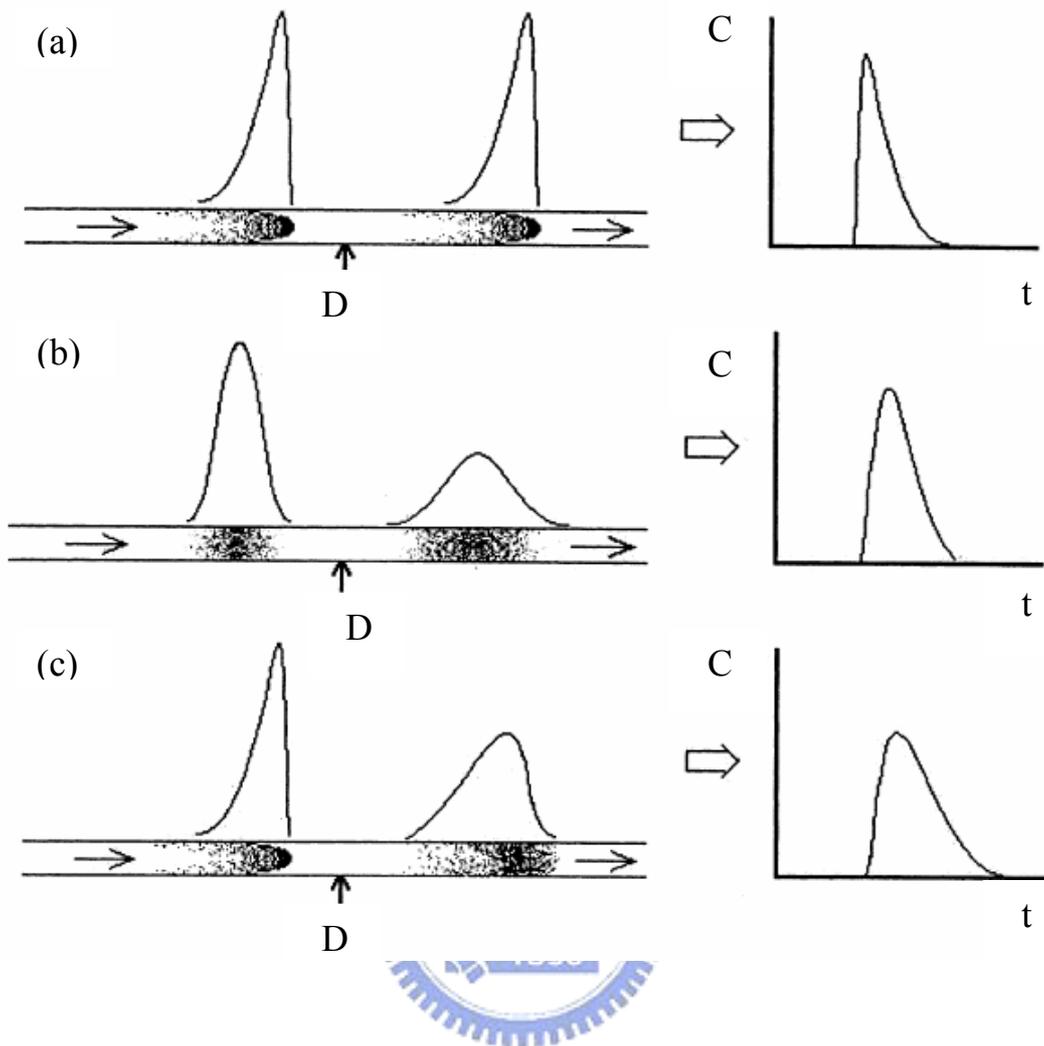
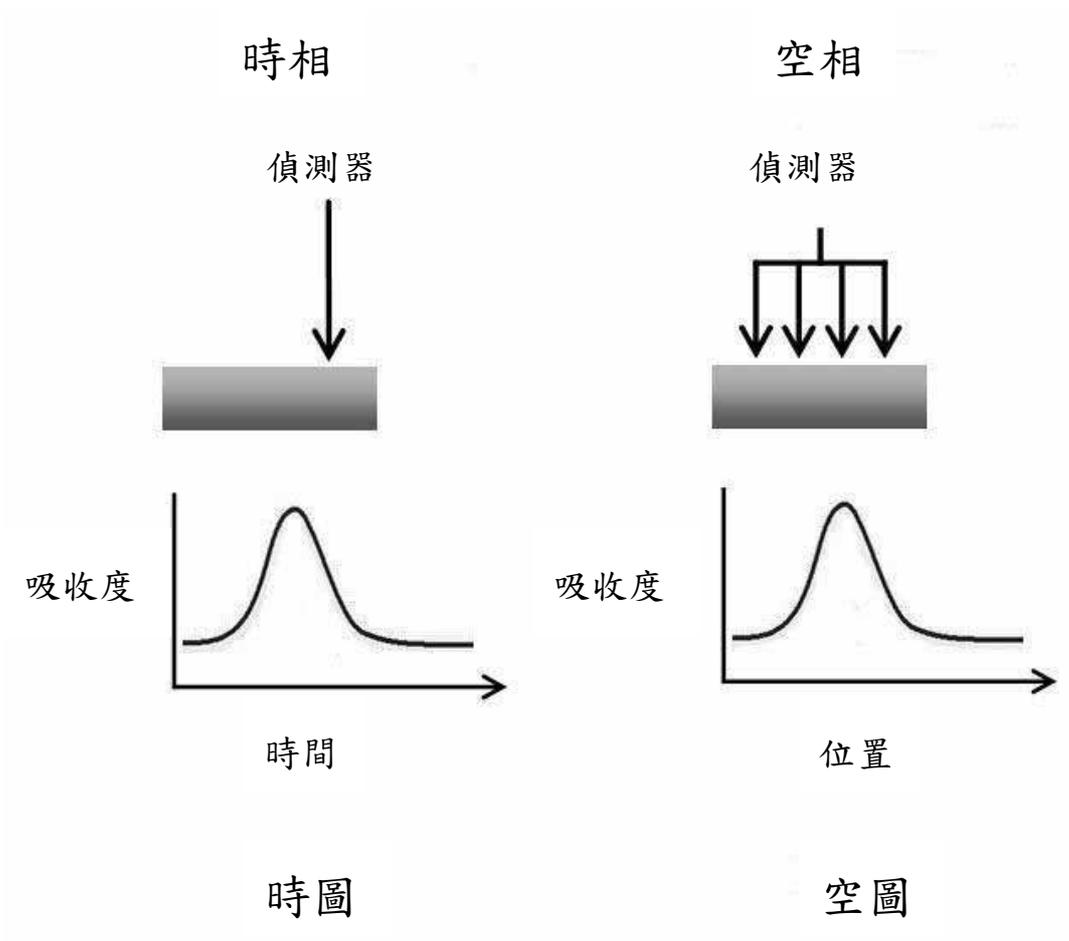


圖 3、質量分佈圖(左)相對應在偵測器上所收集到的圖譜(右)(D：偵測器，C：樣品濃度，t：時間)[8]

(a)空間效應(b)時間效應(c)真實情況



1896

圖 4、時圖和空圖的說明

第二章 研究動機與目標

於白所提出的文獻中指出：「由單一光徑的偵測器所得到的圖形，並非樣品在管柱內真實的分佈情形」[8]，提出單一光徑偵測器在忽略時間效應的情況下，會對所收集到的訊號產生誤判，也提出層析理論中需要被修正的地方，並且提出有關層析區帶變化的原因來修正現有的層析理論[9-11]。

因此為了證實其層析理論[9-11]，本實驗室設計新的偵測系統——多通道偵測系統，可同步偵測管柱內樣品流動情形，並結合單一光徑的偵測系統，完整紀錄樣品在管柱內外的圖譜訊號。

而在電泳理論中，因為電滲流是平面流型，流動的推動力是沿著毛細管管壁均勻地分布，不會在毛細管內產生壓力差，所以毛細管各處之流速相同。理論上電泳所得之樣品訊號，波峰的形狀應該是呈現高斯的形狀，但是實際上仍是有非高斯的形狀發生，因此使用這個新的偵測系統，從另一個角度來觀察樣品在毛細管內的流動情形，以檢驗毛細管電泳之訊號，是否有所謂時間效應的存在。

第三章 毛細管電泳簡介

電泳是在緩衝溶液間通以一個直流電壓，基於帶電荷物質的不同遷移速率，使樣品得以分離的一種分析方法。物質的遷移速率和其帶的電荷有關，也和物質本身大小有關。分離是基於各種分析物有不同的荷質比。荷質比愈大，在電場中的遷移速率愈快。

3.1 電泳的發展史

1937 年，Tiselius, A. 開始將電泳做為一種分析工具，利用電泳分析技術進行血清中白蛋白、 α 球蛋白、 β 球蛋白和 γ 球蛋白分離的研究。由於此研究的貢獻，在 1948 年獲得諾貝爾化學獎[12]。

1967 年，Hjerten, S 首先提出利用窄口徑分離管柱(直徑 3 mm 的石英管)做電泳分析，在高電場情況下進行自由溶液的區帶電泳，進行無機離子、蛋白質與核酸的分離[13]。

1970 年，Neuhoff, V. 在玻璃管中(內徑 450 μm ，長 3 cm)中填滿聚丙烯醯胺凝膠狀物質，分析微量的蛋白質並將其染色，以放射線技術照相技術進行偵測[14,15]。

1974 年，Virtanen, R 使用更小內徑的 pyrex 管柱(200~500 μm)，

提供自由區帶電泳，應用電位偵測法定量分析鹼金屬離子，和對電泳圖做理論分析，考慮到毛細管區帶中的縱向擴散、分散性因素和不均勻的電位梯度，並對各種現象做探討，也討論電滲流對分析物電泳行為的影響[15-17]。

1979 年，Mikkers, F.E.P.為了減少對流擴散的問題，利用內徑為 200 μm 的鐵氟龍管柱，進行自由區帶電泳的分析並應用於 UV 吸收和導電度分析做偵測，在短時間內可以同時解析有機和無機的陰離子 [15,17,18]。



1981 年，Jorgenson, J 和 Lukacs, K.D 首先採用內徑小於 100 μm ，並以熔融態成型的二氧化矽材質的毛細管作為分離管柱，所應用的電壓高達 30 kV，並以螢光做偵測，可提供高效率的電泳分離。此外也對毛細管電泳的理論概念做簡略描述，指出電滲流在離子物質遷移的情形扮演重要的角色，電滲流亦影響解析度和分析時間，開啟了毛細管電泳的發展史[15,19,20]。

1984 年，Terabe, S.提出微胞電動力學毛細管層析法，可以用來分離中性物質，不再局限於帶電荷的分析物，因而提升毛細管電泳的應用範圍[21]。

1987年，Cohen, A.和 Karger, B.L.利用類似傳統的凝膠電泳，將十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺在毛細管內形成凝膠，直接應用在蛋白質的分離與分子量的決定，發展成毛細管凝膠電泳[22]。

之後還有毛細管等速電泳法[23,24]和毛細管電動層析法[25]被發展出來，隨著以上這些技術的發展，使得毛細管電泳分離技術的應用日益廣泛。

3.2 電泳分離和遷移率

電泳的分離是以電場中物質的速度差異為基礎。離子的遷移速度可以用下式表示


$$v_{ep} = \mu_{ep} E$$

v_{ep} = 離子遷移速度

μ_{ep} = 電泳遷移率

E = 電場強度(電場強度是外加電場和毛細管長度的簡單函數，單位為 V/cm。)

對於一個球形離子而言，其在固定電場作用下所受到的靜電作用力是

$$F_E = qE$$

而摩擦力是

$$F_F = -6\pi\eta\gamma v_{ep}$$

q = 離子電量

η = 溶液黏度

γ = 離子半徑

在電泳的過程中，可以達到由上述兩個作用力的平衡所決定的穩態，即速度不再改變。


$$qE = 6\pi\eta\gamma v_{ep}$$

整理之後可以得到離子在電場下的移動速率

$$v_{ep} = \frac{qE}{6\pi\eta\gamma}$$

和 $v_{ep} = \mu_{ep}E$ 比較，得到

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta\gamma}$$

我們定義 μ_{ep} 為電泳遷移率，就是在單位電場下離子的電泳速率。

由上式可以得知，較小的離子且帶的電荷越多，電泳遷移率越大，在電泳的過程中，跑的越快，在電泳圖譜中也最早出現。同理反之亦然。

3.3 毛細管電泳的原理

毛細管電泳是利用高電場(10~30 kV)作用下，在微小內徑的毛細管中，使分析物進行電驅動的分離，造成分析物分離的現象。儀器裝置的簡圖如圖 5 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，分析樣品中帶電的離子在電場影響下產生移動，因為分析物本身不同的電荷量和體積大小，使分析物因遷移速率不同而分離，最後經過偵測器檢測。

3.3.1 電滲流

電滲流是由於熔融態成型的二氧化矽毛細管內部表面有電荷存在所形成的。當毛細管中的緩衝溶液 pH 值高於 2 時，管柱內壁的矽醇基會有去質子作用產生，造成矽醇基解離，誘導出陰離子，在這個情況下，形成了固定的聚陰離子層(polyanionic layer)，又因為緩衝溶液中的電解質作為離子對的角色，而進行陽離子的聚集而產生了聚陽

離子層(polycationic layer)，如圖 6 所示。

負電荷離子(即聚陰離子層)吸引緩衝溶液中的正電荷離子(即聚陽離子層)形成的現象，導致電雙層的產生。根據 Stern 的電雙層理論，溶液中的正電荷離子在流經活化的毛細管之後，會因前述原因的靜電吸引力而被吸附在管壁上，形成第一層的吸附，稱為固定層。固定層之外稍微遠離毛細管表面，也會有過多的正電荷離子被負電荷離子吸引，但是吸附的程度沒有固定層來的強，其電荷密度是隨著遠離管壁的程度呈指數趨勢下降，是為移動層，如圖 6 所示。

由於溶液在毛細管內電荷分布的差異，因此毛細管管壁與溶液間會有電位差的存在。如果以毛細管中央部份的電位為零電位，則管壁的電位為 Ψ_0 ，此時固定層的電位由 Ψ_0 降到 Ψ_δ ，而在移動層的電位由 Ψ_δ 降到零。而 Ψ_δ 和毛細管中央部份的電位差為Zeta電位，可以用下式表示。

$$\zeta = \frac{4\pi \times \delta \times e}{\varepsilon}$$

ζ = Zeta 電位

δ = 電雙層的厚度

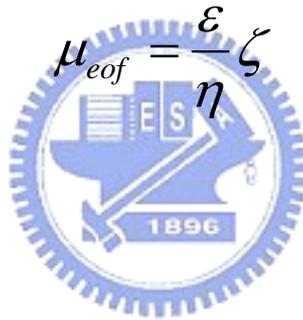
e = 單位表面積的電荷

ε = 緩衝溶液的介電常數

由於 Zeta 電位的存在，所以當毛細管外加電壓後，電雙層中的移動層的水合陽離子會帶著管柱中的溶液往負電極流動，使毛細管中的溶液會有移動的現象，即形成電滲流。

電滲流的特點是其流動的剖面圖是平板狀，不像傳統的壓力驅動所造成的層流而呈現拋物線型，如圖 7 所示，因此電滲流不會對區帶變寬有所貢獻。

電滲流的線性遷移率(electroosmotic mobility, μ_{eof})為

$$\mu_{eof} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}$$


η = 緩衝溶液黏度

考慮電滲流的移動速率(electroosmotic flow velocity, v_{eof})，在 1903 年 Smoluchowski[26] 提出其下列關係式

$$v_{eof} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E$$

$$v_{eof} = \mu_{eof} E$$

由於離子藉著本身的電泳遷移率，和緩衝溶液本身因 pH 值、離子強度、有機修飾劑等因素所造成的電滲流遷移率，因此離子整體的

遷移率則為這兩者向量的加成

$$\mu_{total} = \mu_{ep} + \mu_{eof}$$

因此離子速度則是

$$v_{total} = (\mu_{ep} + \mu_{eof})E$$

因為有電滲流的結果，典型的毛細管電泳分離順序是：最快的陽離子先出來，接著是較慢的陽離子，然後是所有的中性分子，再來是較慢的陰離子，最後是最慢的陰離子，如圖 8 所示。

在毛細管電泳分離過程中，基本的區帶電泳分離機制就是靠著分析物在緩衝溶液中電泳遷移率的差異來達成的。



3.3.2 分離效率

毛細管電泳的分離效率可以用理論板數來表示，理論板數是反映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，可以由下式表示

$$N = \mu_{total} \frac{V}{2D}$$

N=理論板數

D=分析物的擴散係數

V=外加電壓

另外也可以用時間來換算出理論板數，其表示法是

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

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

t=分析物的遷移時間

w=分析物的波峰寬度

w_{1/2}=分析物的波峰半高寬



3.4 常見的毛細管電泳分離模式

毛細管電泳有許多的分離模式，各種方式的分離模式均不相同，目前發展出較成熟的模式有：毛細管區間電泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)、毛細管等速電泳(Capillary Isotachopheresis, CITP)、毛細管等電聚焦電泳(Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)、毛細管凝膠電泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)、微胞電動層析法(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)。

3.4.1 毛細管區間電泳

毛細管區間電泳是利用分析物在緩衝溶液中解離為正或負離子之後，受電場作用而移動，當分析物質量與所帶的有效電荷有差異時，會導致電泳移動速率不同而達到分離的效果。一般無表面修飾的毛細管，通常陽離子的運動方向和電滲流一致，會最先通過偵測器，中性分析物本身電泳速度為零，將隨著電滲流一起動，而陰離子因為運動方向和電滲流相反，則是最後通過偵測器。但是對於不帶電荷的分析物，因為與電滲流有相同的移動速度，無法達到分離的目的。

3.4.2 毛細管等速電泳



毛細管等速電泳是一種移動界面的電泳技術，是使用兩種緩衝溶液系統造成所有被分離的區帶等速遷移的狀態，被分離的區帶像三明治一樣，被夾在前面電解質和後面的電解質之間。在 CITP 中會發生等速遷移是因為各個區帶的電場強度不一樣。在分離過程中場強會自行調整以維持區帶的等速移動(遷移速度=遷移率×場強)。遷移率大的離子所在的區帶場強較低，這種現象使各個區帶間保持著明顯的界面。如果一個離子擴散到一個相鄰的區帶，它的遷移速度會發生改變，而很快的回到原來所在的區帶。

3.4.3 毛細管等電聚焦電泳

毛細管等電聚焦電泳是利用分析物本身等電點(pI)的差異，來達到分離的目的。實驗前必須於管壁內壁進行表面處理，來充分抑制電滲流。此種進行分離的分析物必須是兩性物質。在這個方法中首先要建立一個具有 pH 梯度的環境，當梯度環境建立完成之後，兩性分析物具有負電荷時，它的移動方向會朝向正極，所經之處由於環境 pH 值持續下降，所以會逐步發生質子化反應，減少其所帶的負電荷，最後會到達一個淨電荷等於零的 pH 值，也就是 pI 值。此過程會導致每一種兩性分析物被分離並濃縮到等電位點的狹窄區帶中。

3.4.4 毛細管凝膠電泳



凝膠電泳是用於生物學上分離大分子物質，所添加的聚合物在分離的過程中扮演分子篩的角色。由於凝膠的高分子鏈具有糾纏性，當帶電分析物因為電場力的推動下於聚合物網狀結構內遷移時，其運動受到一定程度的阻礙，大分子所受到的阻礙比小分子大，因此大分子的遷移速度會比較慢，藉著分子篩的作用就能夠達到大小分子分離的結果。

3.4.5 微胞電動層析法

利用添加界面活性劑在緩衝溶液中產生帶電荷的微胞及單體，形

成假靜相，使分析物在受電場作用而移動的過程中，與溶液中的假靜相產生分配作用，藉此造成分析物間遷移速度不同，而產生分離的效果。除對不解離的中性分析物之外，對於解離而荷質比相近的分析物，可以根據疏水性及親水性的強弱差異進行分離。一般緩衝溶液以水為主，所形成的微胞內部是呈疏水性，當分析物間的疏水性及親水性有強弱差異時，藉由調整界面活性劑的濃度大小可以改變疏水性分析物與微胞之間分配作用力的強弱，進而影響分析物的遷移速度。微胞電動層析最大的優點是改善毛細管電泳對中性分析物的分析能力，但是對於非中性的分析物而言，因為分析物疏水的情況不同，也可以影響分離結果。



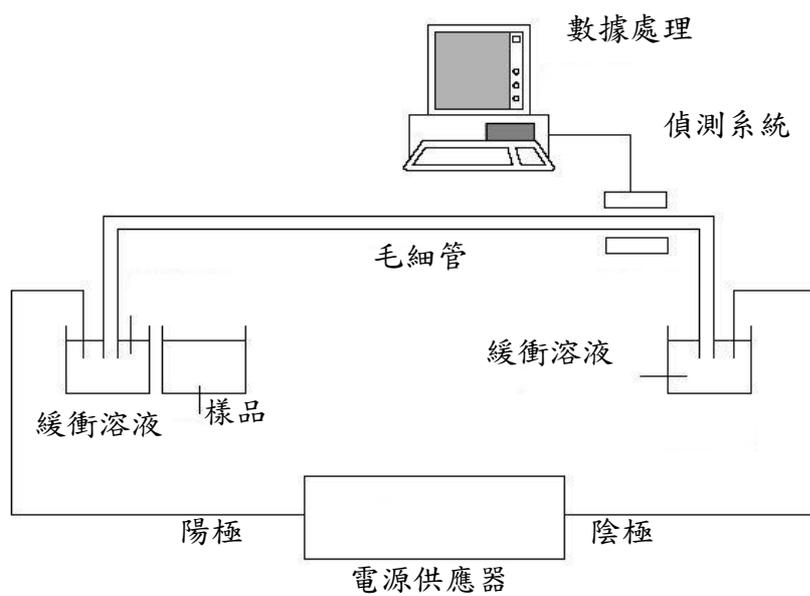


圖 5、毛細管電泳儀器簡圖



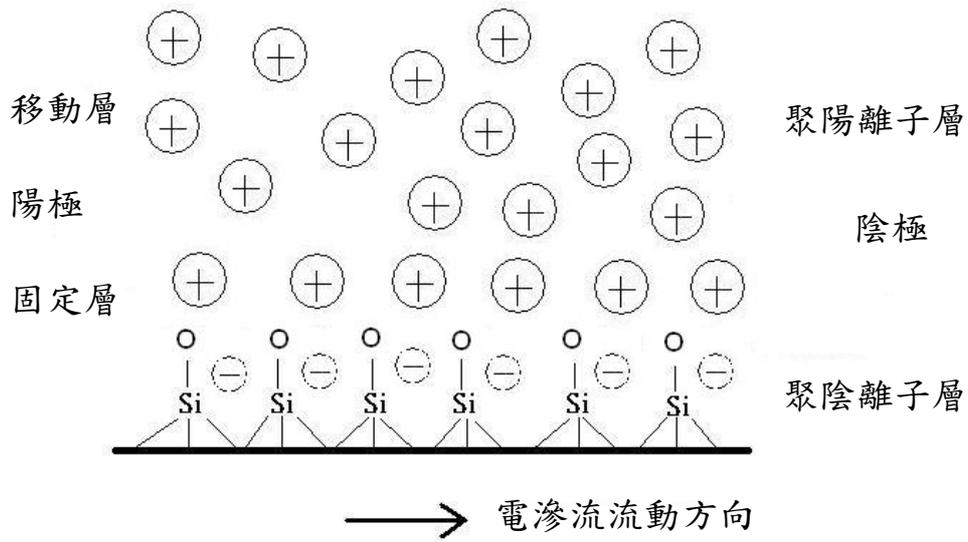
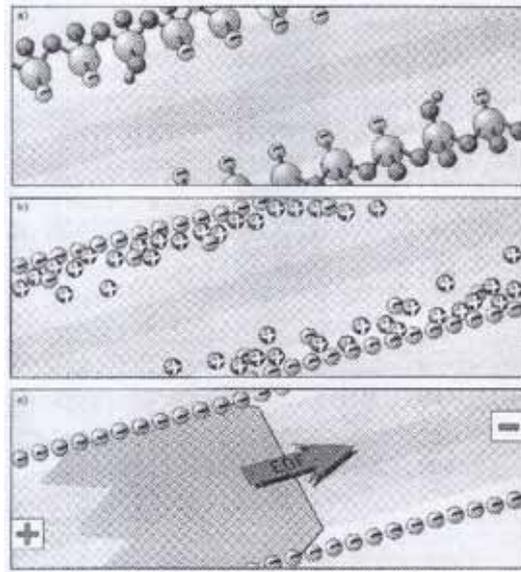


圖 6、形成電滲流之原因

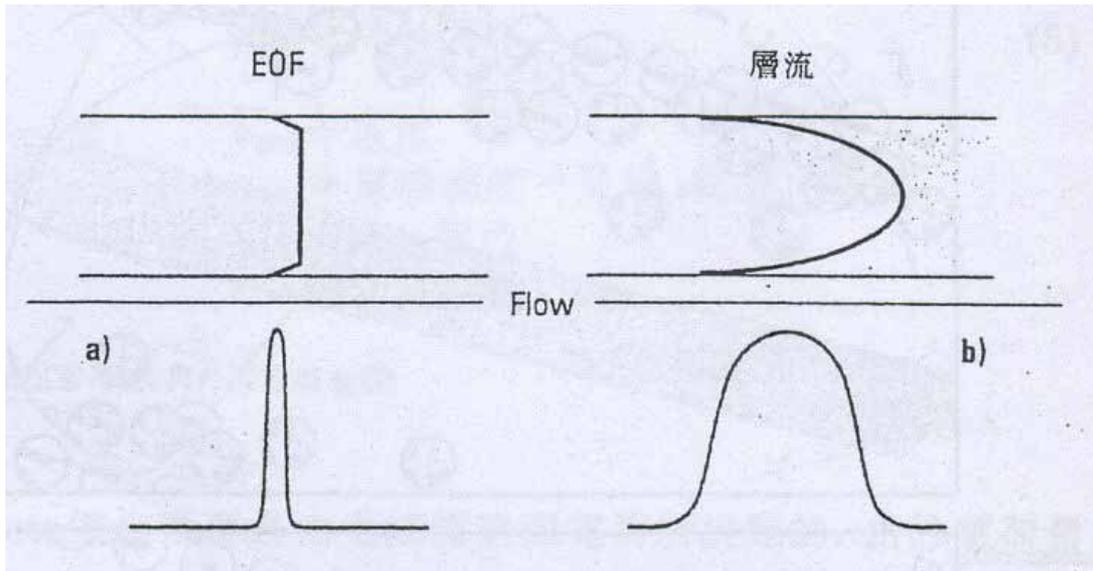


圖 7、電滲流和層流在管中所造成流動之剖面圖

引起流動的推動力，沿著毛細管管壁均勻地分佈，不會在毛細管內形成壓力差，所以流速到處相同，是為平面流型(圖 a)；由外部驅動的力，因管壁處存在摩擦力而產生的拋物線流型(圖 b)

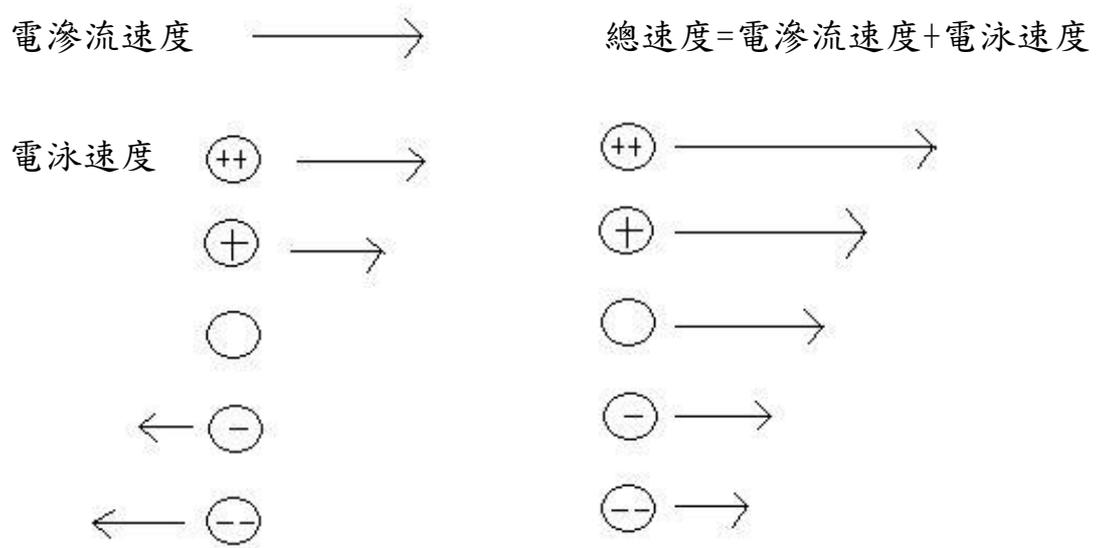


圖 8、離子在有電滲流存在下的速度

負極在右邊，正極在左邊，箭頭的長度表示速度的大小，箭頭的方向表示移動的方向

第四章 實驗

4.1 藥品

Tartrazine(黃色四號合成色素)，dye content approx. 90 %，購自於 SIGMA(Sigma Chemical Co.，St. Louis，USA)。

Sunset Yellow FCF (黃色五號合成色素)，dye content approx. 90 %，購自於 TCI(Tokyo Kasei Kogyo Co.，LTD. 東京化成工業株式會社，東京都北區豐島 6-15-9)。

Disodium tetraborate，購自於 SIGMA。

Sodium hydroxide，購自於 SHOWA(Showa Chemical Co.，LTD. 昭和化學株式會社，東京都中央區日本橋本町 4-3-8)。

實驗用水為經過 Millipore(Beford，MA，USA) Milli-Q 處理的 18.2MΩ 去離子水。

4.2 儀器裝置

4.2.1 單通道偵測系統

4.2.1.1 電源供應器

Spellman CZE1000R，購自於 Spellman(Spellman High Voltage

Electronics Corporation, Hauppauge, New York , USA) 。

4.2.1.2 紫外可見光偵測器

Model 340,購自於 Varian(Varian, Inc., 3120 Hansen Way, Palo Alto, CA 94304-1030, USA) 。

4.2.1.3 數據處理系統

SIC Chromatocorder12,購自於 SIC(System Instruments Co., Ltd) 。

4.2.2 多通道偵測系統



圖 9 是單通道和多通道偵測系統之對比圖，因為本實驗是觀察樣品的流動情形，但是又要符合偵測方法為吸收光譜的儀器構造，也就是偵測範圍要從一個點到一個長度。我們發現一般的光學掃瞄器的一些組件可用於本實驗，掃描器上的燈管可作為燈源，光學盒可提供一線性物件之成影。另外本實驗不做掃描波長的動作及為了減少和分析物吸收不相干之波長的干擾，於是在光學盒前面加了一個濾片。

4.2.2.1 電源供應器

YSTC high voltage power supply, 購自於友聲電子股份有限公司

(桃園縣龜山鄉文化一路 259 號)。

4.2.2.2 多通道偵測器

光學盒(如圖 10 所示)是由虹光精密儀器工業股份有限公司(新竹科學工業園區研新一路 20 號)所提供。其內部光學原理如圖 11 所示，光線進入光學盒之後，經過平面鏡的多次反射，使光線集中到一個凹面鏡，接著透過凹面鏡的放大作用，使成像於 CCD 上，最後由個人電腦收集訊號。光線在進入光學盒之前，有使用濾片濾掉多餘的波長。濾片是 435 nm 的窄帶過濾波片(穿透波長中心是 435 nm，波峰寬度是 50 nm，穿透率約等於 90%)，由裕群光電科技股份有限公司(桃園縣龍潭鄉中豐路 618 號)製作。最後將光學盒、濾片和毛細管放在一個向量光學平台(如圖 12 所示)上。向量光學平台由彥宏開發科技有限公司(台北縣新莊市化成路 63 巷 71 號)所設計製造。

4.3 毛細管

內徑是 100 μm ，外徑是 365 μm ，材質是二氧化矽(fused-silica)，在表面外層塗附上聚醯亞胺(polyimide)，購自於 Polymicro(Polymicro Technologies Incorporated, Phoenix, AZ, USA)。

4.4 向量光學平台組裝與測試

1. 實驗裝置如圖 13 所示。
2. 拆解由虹光公司所提供的光學掃描器，以燈管和內部光學盒作為本實驗的光源和多通道偵測器。另外由虹光公司的 楊得志 先生設計連接多通道偵測系統和個人電腦間的使用界面(如圖 14 所示)。
3. 光源的放射波長和濾片的穿透波長如圖 15 所示。本實驗選擇吸收光譜為偵測方式，光源強度約在 430 nm 附近最大，因此樣品選擇以在 430 nm 附近範圍的吸收度最大為優先。
4. 向量光學平台內含 6 組角度向量(如圖 16 和圖 17 所示)的組件，可於組件上架設光學盒、燈源、狹縫、濾片(貼在光學盒的視窗上)以及放置毛細管(如圖 18 所示)。所有裝置安裝完畢之後，將向量光學平台置於穩定乾燥的環境下進行實驗。
5. 將已燒除聚醯亞胺的毛細管，利用毛細管固定架(如圖 19 所示)，裝入於毛細管卡匣(如圖 20 所示)裡。
6. 調整毛細管位置，使得光線通過毛細管的光量是一樣的。
7. 架設好裝置之後(如圖 21 所示)，即可以進行實驗，最後以個人電腦取訊號。

4.5 樣品的選擇

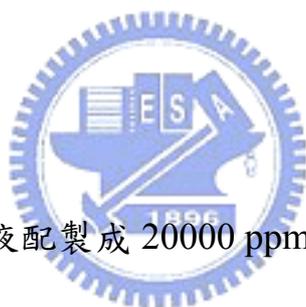
根據光源和濾片的可用波長範圍，選擇黃色四號和黃色五號做為本實驗的樣品，其分別之結構和吸收光譜如圖 22 和圖 23 所示。

4.6 分離模式的選擇

毛細管區間電泳是最簡單且最基本的分離模式，因此本實驗是以毛細管區間電泳模式來看波峰的變化。

4.7 標準溶液的配製

樣品以去離子水溶液配製成 20000 ppm、5000 ppm、1000 ppm、500 ppm、100 ppm，並置於室溫下保存。



4.8 緩衝溶液的配製

緩衝溶液是由 3 ml 的 0.1 M 硼酸鹽和 4 ml 的 0.1 M 氫氧化鈉混合，然後稀釋到 20 ml，最後的濃度為 15 mM，pH=10。使用前再稀釋成為 5 mM。

4.9 毛細管的處理

本實驗所使用的毛細管內徑為 100 μm ，外徑為 365 μm ，管柱總長度是 90 公分，有效長度是 35 公分，毛細管外層塗附的聚醯亞胺以火焰燒除約 5 公分(原因於 5.2 會說明)，再以甲醇擦拭乾淨使作為偵測窗口。

新的毛細管在使用之前依序以 1 M 的鹽酸、去離子水、1 M 的氫氧化鈉和去離子水各清洗 10 分鐘。

每天實驗進行前，毛細管依序用 0.1 M 氫氧化鈉和去離子水各清洗 10 分鐘，最後是緩衝溶液清洗 10 分鐘。

每次實驗進行前，依序以去離子水和緩衝溶液各清洗 10 分鐘。

每天實驗結束後，以去離子水清洗 10 分鐘，最後將毛細管的兩端浸在去離子水裡。



4.10 實驗流程

用多通道偵測系統做偵測時，進樣方式採高度差(15 公分)進樣，進樣時間：100 ppm 為 15 秒；500 ppm 為 5 秒，分離電壓 20 kV，偵測波長 430 nm，實驗溫度為室溫，偵測時間 20 分鐘。

用單通道偵測系統做偵測時，為了使平均電場一樣(20 kV/ 90 公分)，所以毛細管總長度改為 45 公分，但是有效長度不變，一樣是 35 公分，偵測視窗是 0.15 公分，分離電壓則改為 10 kV，其餘條件不變。

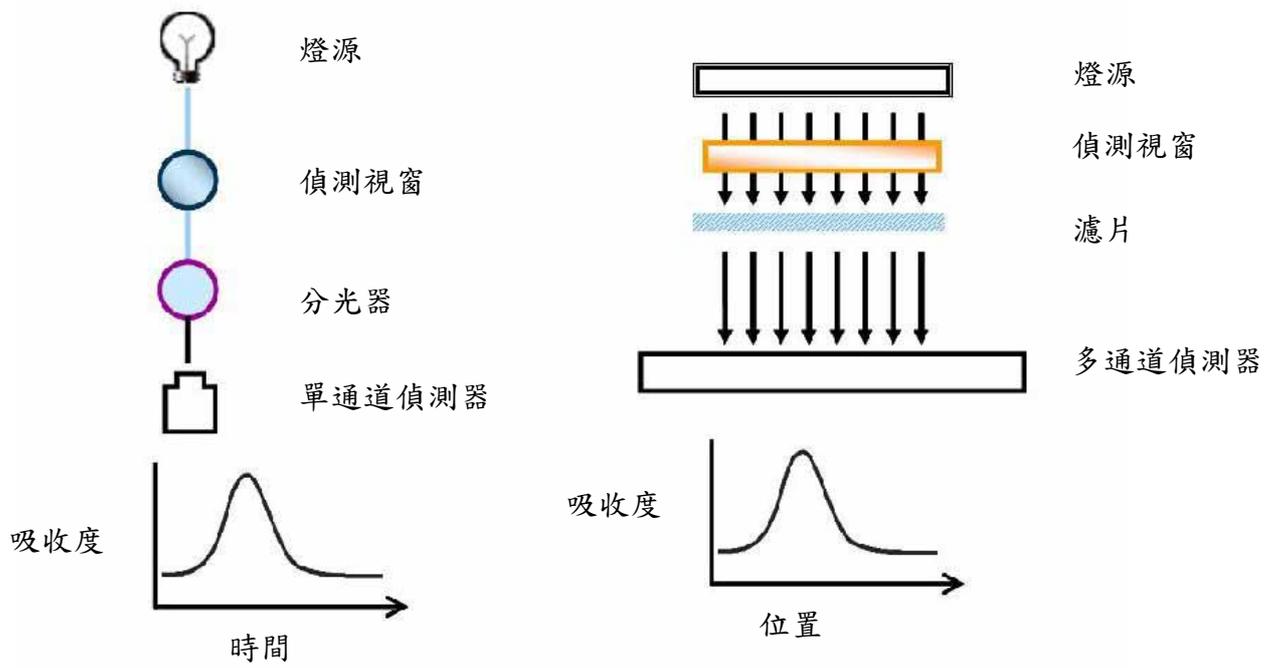


圖 9、單通道偵測系統(左)和多通道偵測系統(右)之對比圖



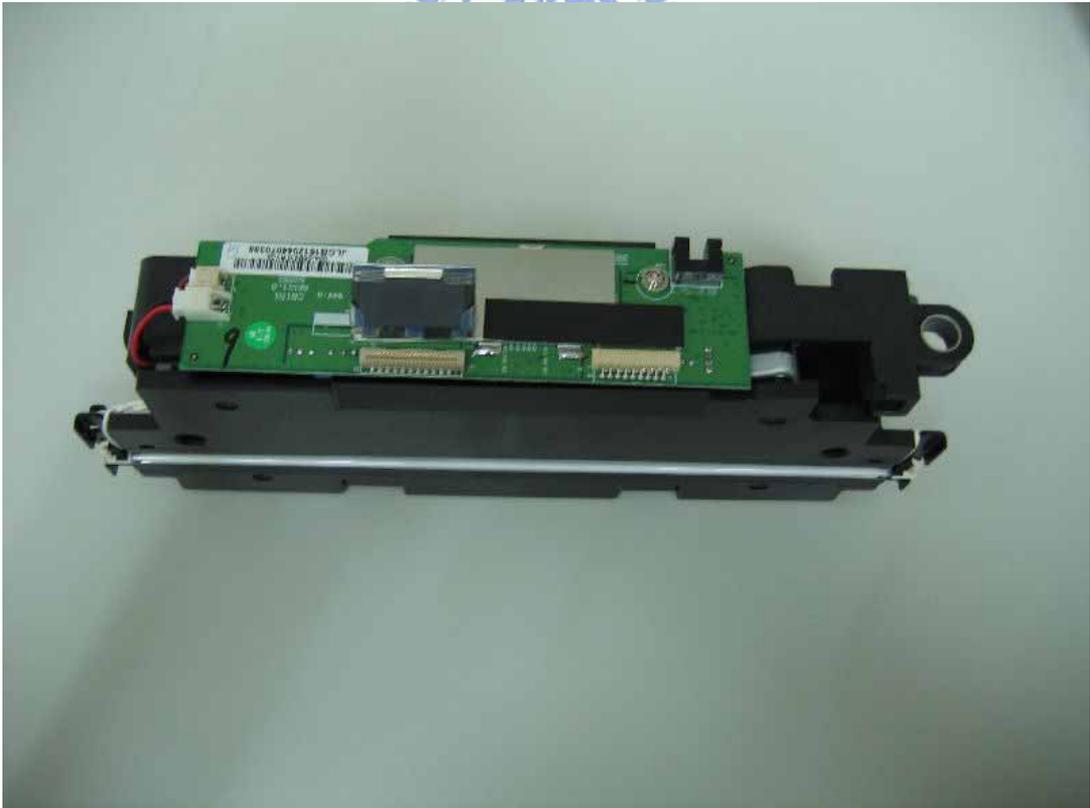


圖 10、光學盒(上圖為正面圖，下圖為俯視圖)

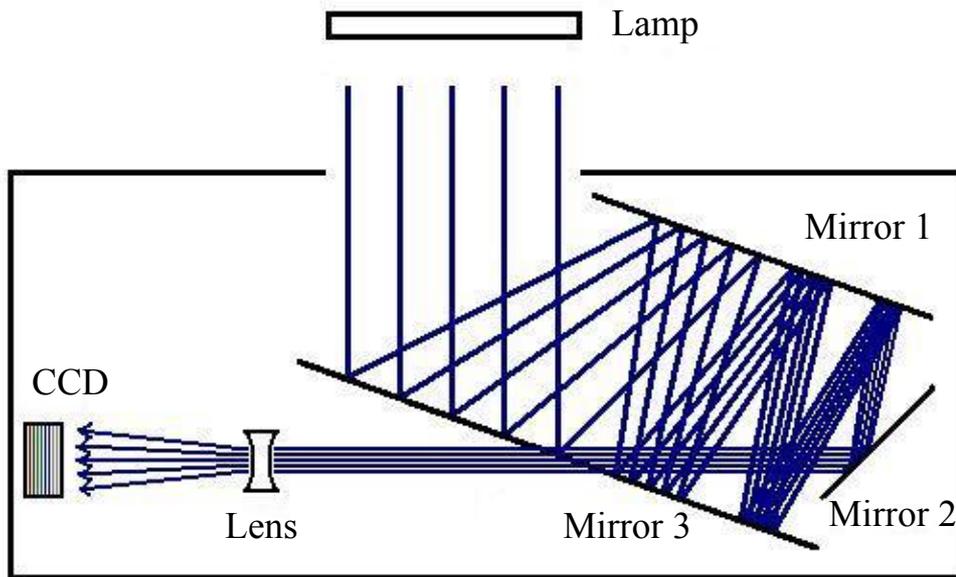


圖 11、光學盒內部的光學原理



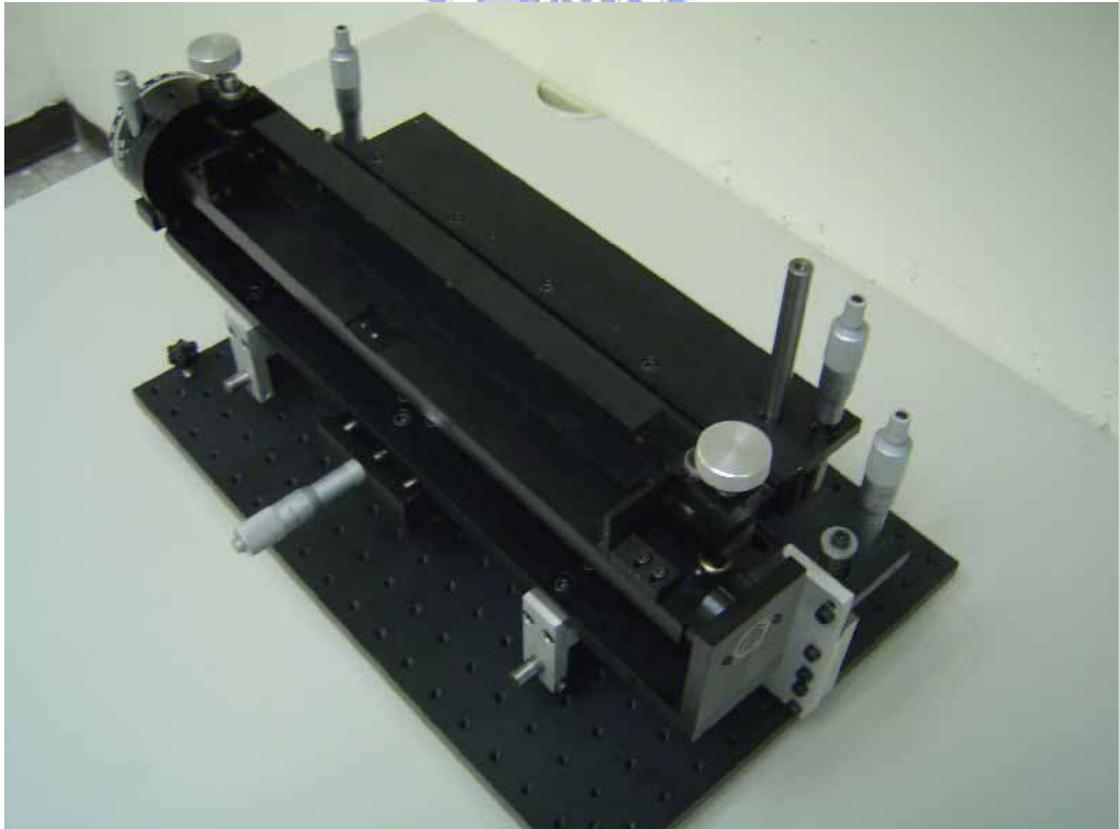
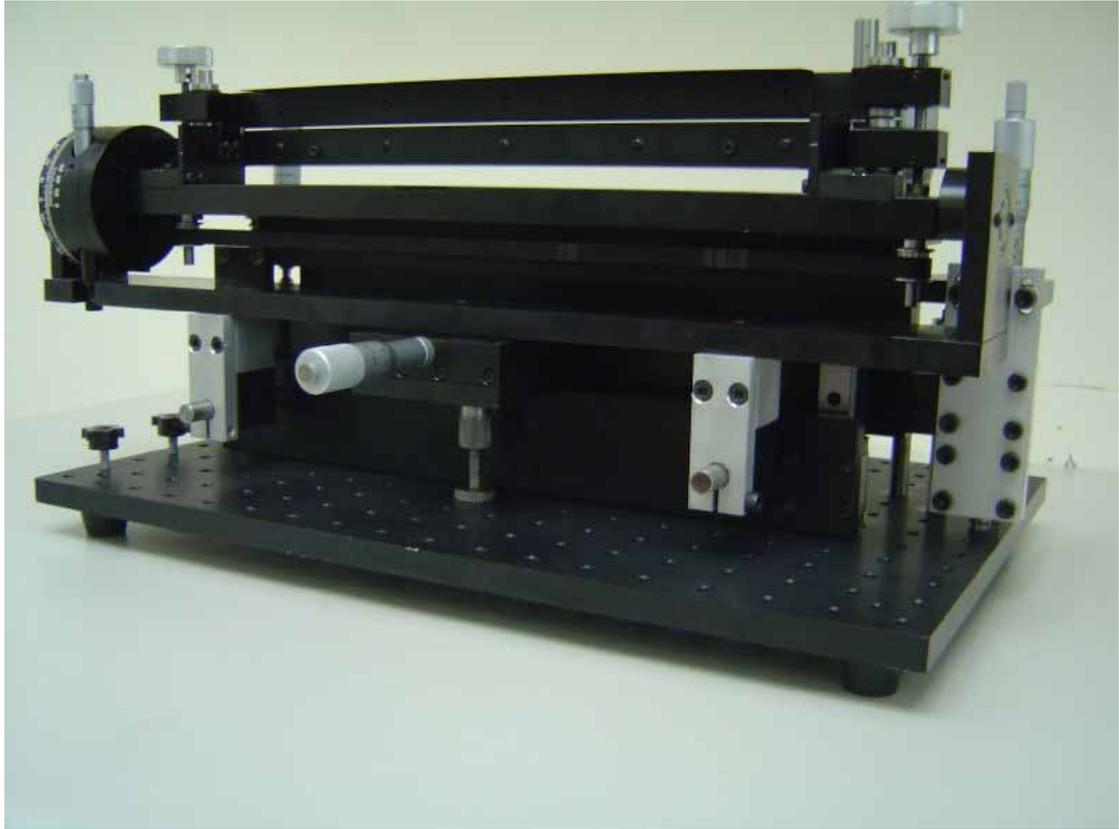


圖 12、向量光學平台(上圖為側視圖，下圖為俯視圖)

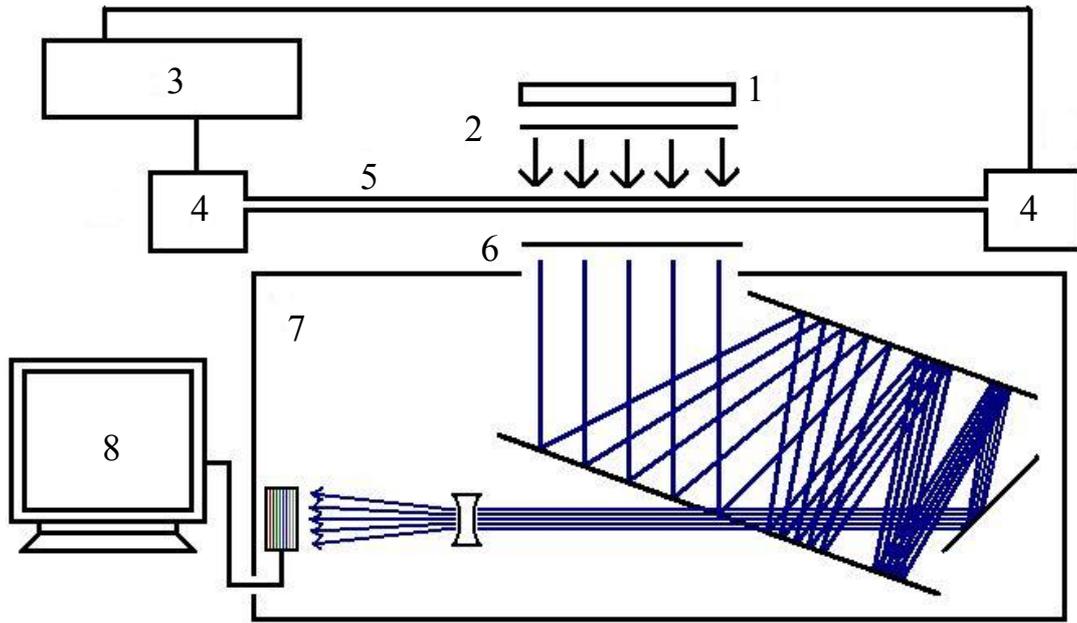


圖 13、實驗裝置簡圖

1：燈源，2：狹縫，3：高壓電源供應器，4：緩衝溶液槽，5：
毛細管，6：濾片，7：多通道偵測器(光學盒)，8：個人電腦

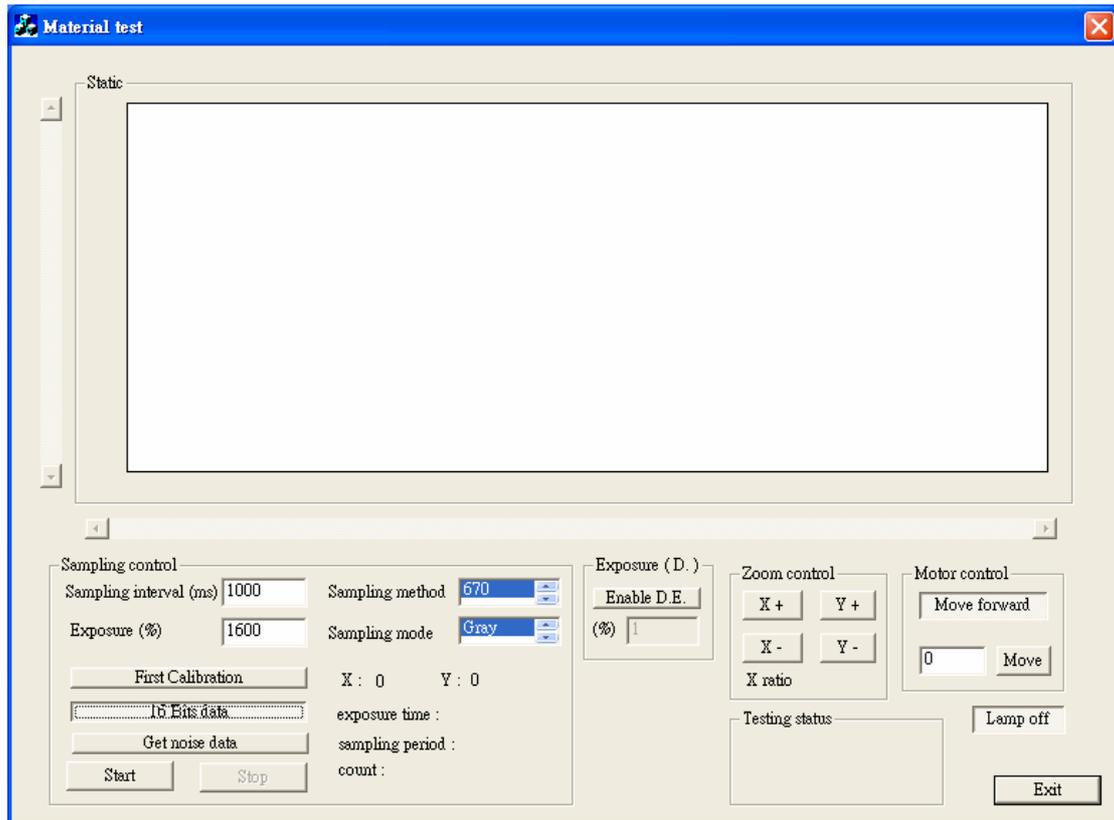


圖 14、連接多通道偵測系統和個人電腦的使用界面

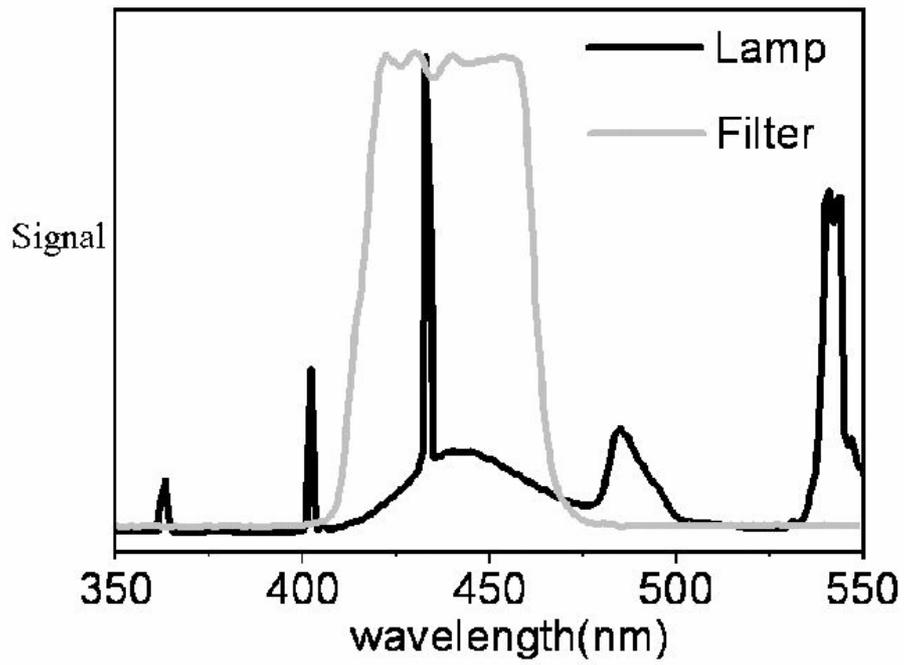


圖 15、燈源的放射波長和濾片的穿透波長



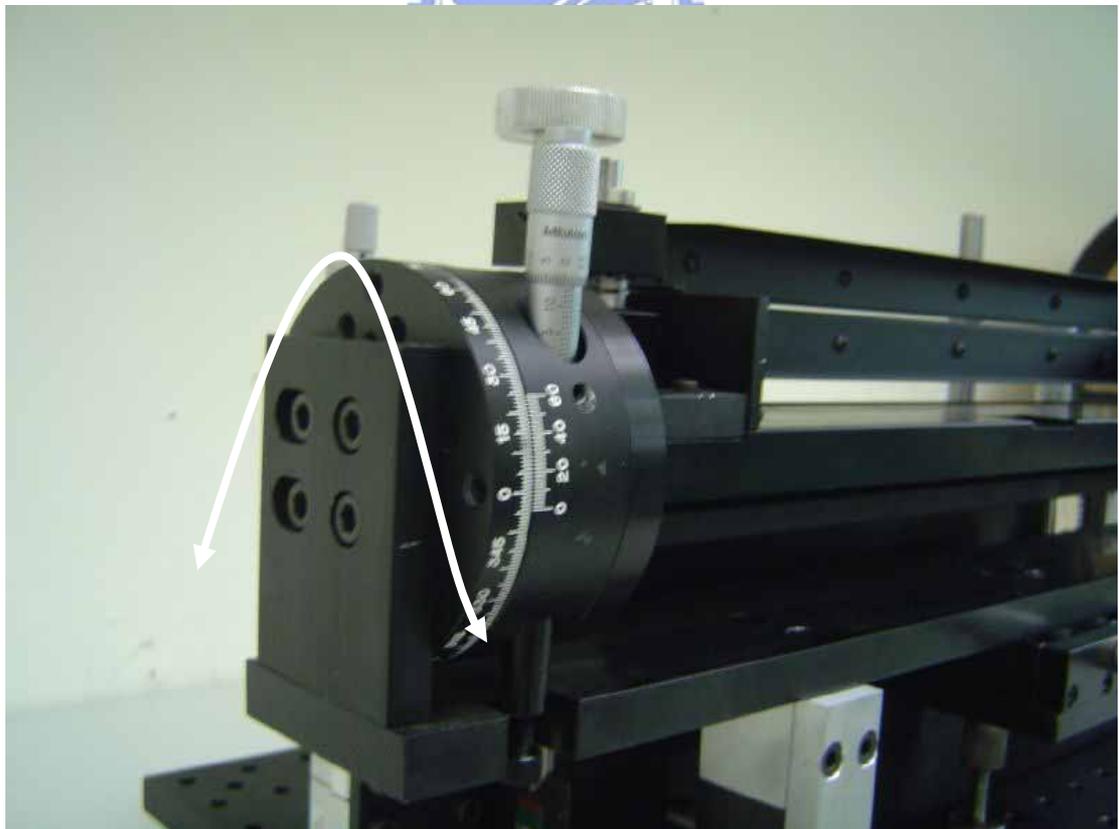
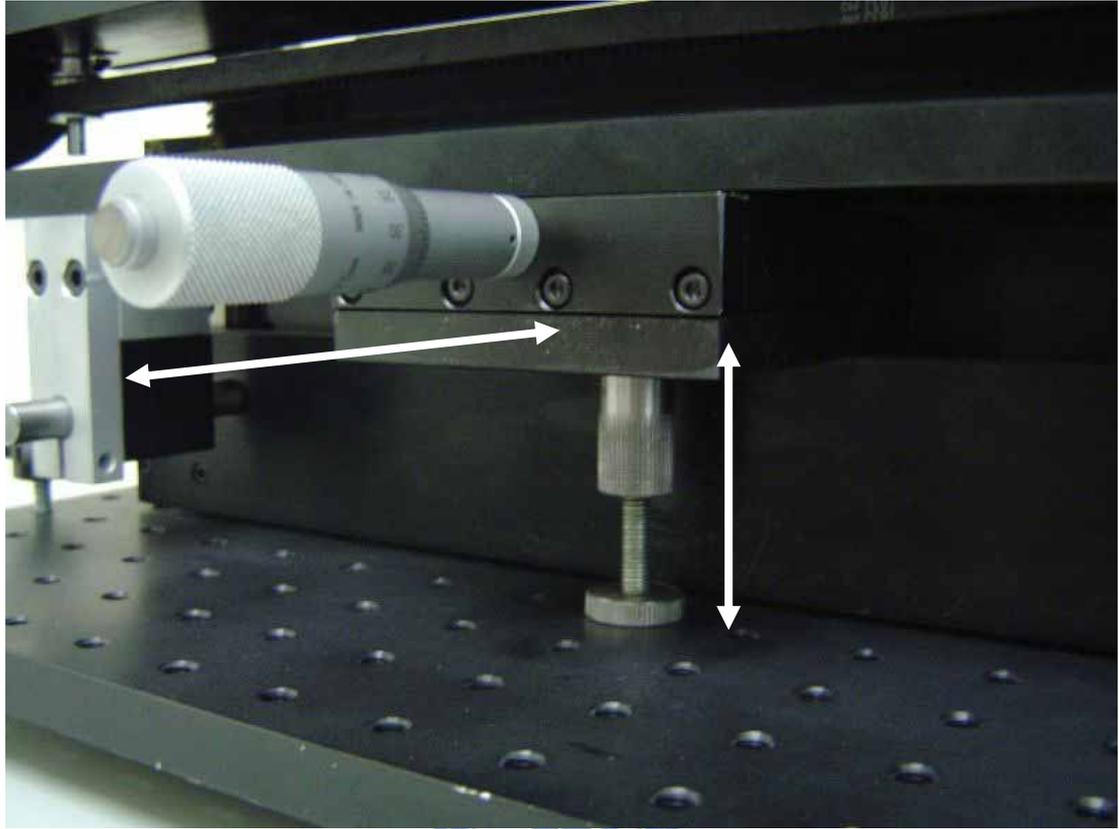


圖 16、角度向量(箭頭是表示可以調整的方向)

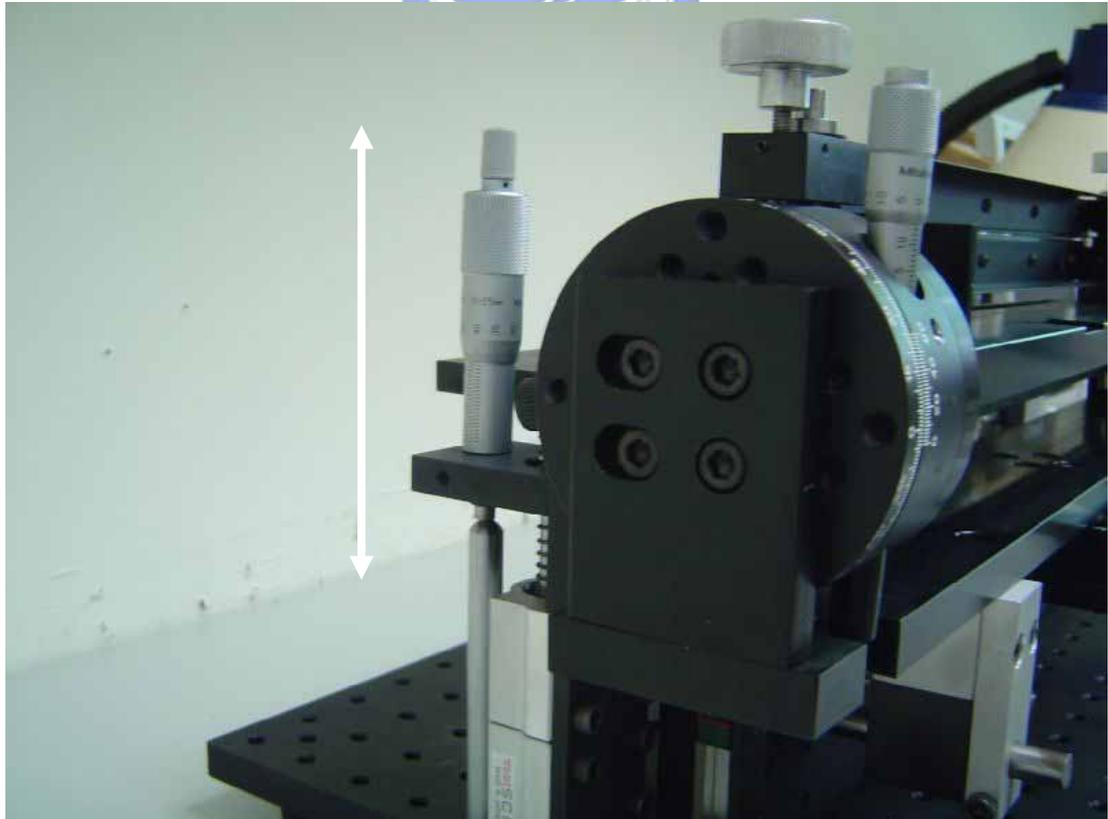
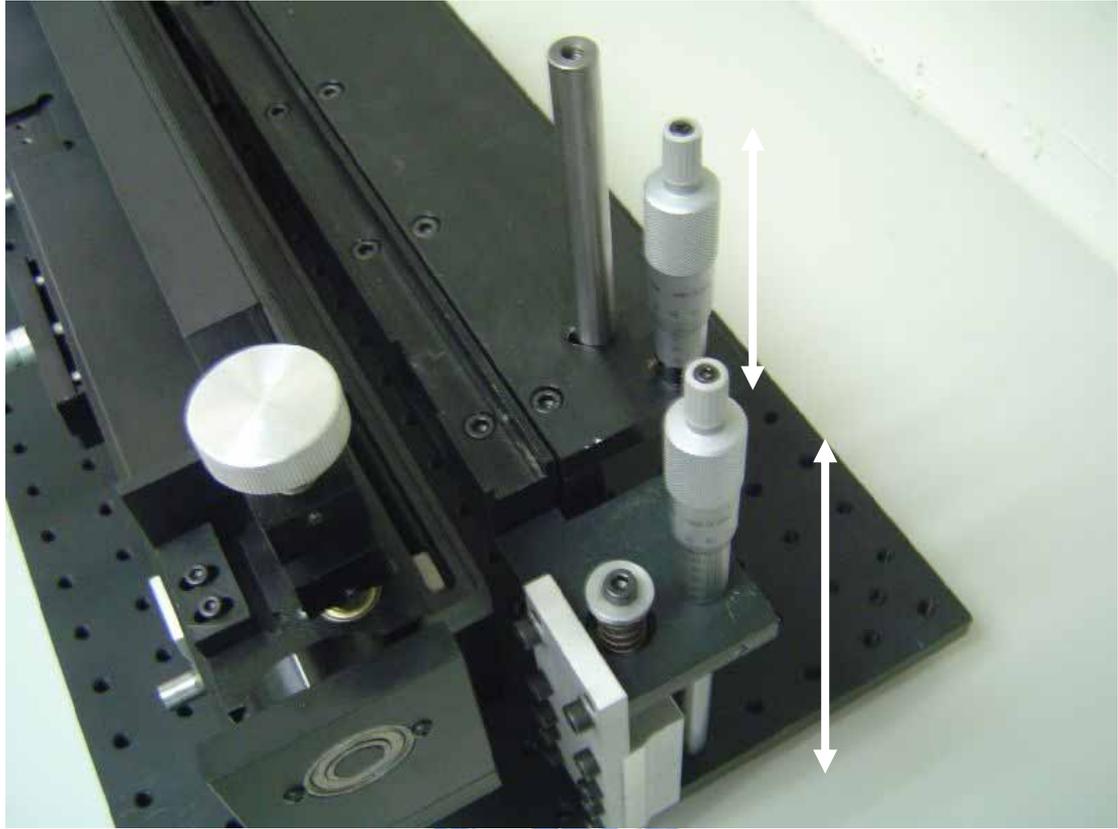


圖 17、角度向量(箭頭是表示可以調整的方向)

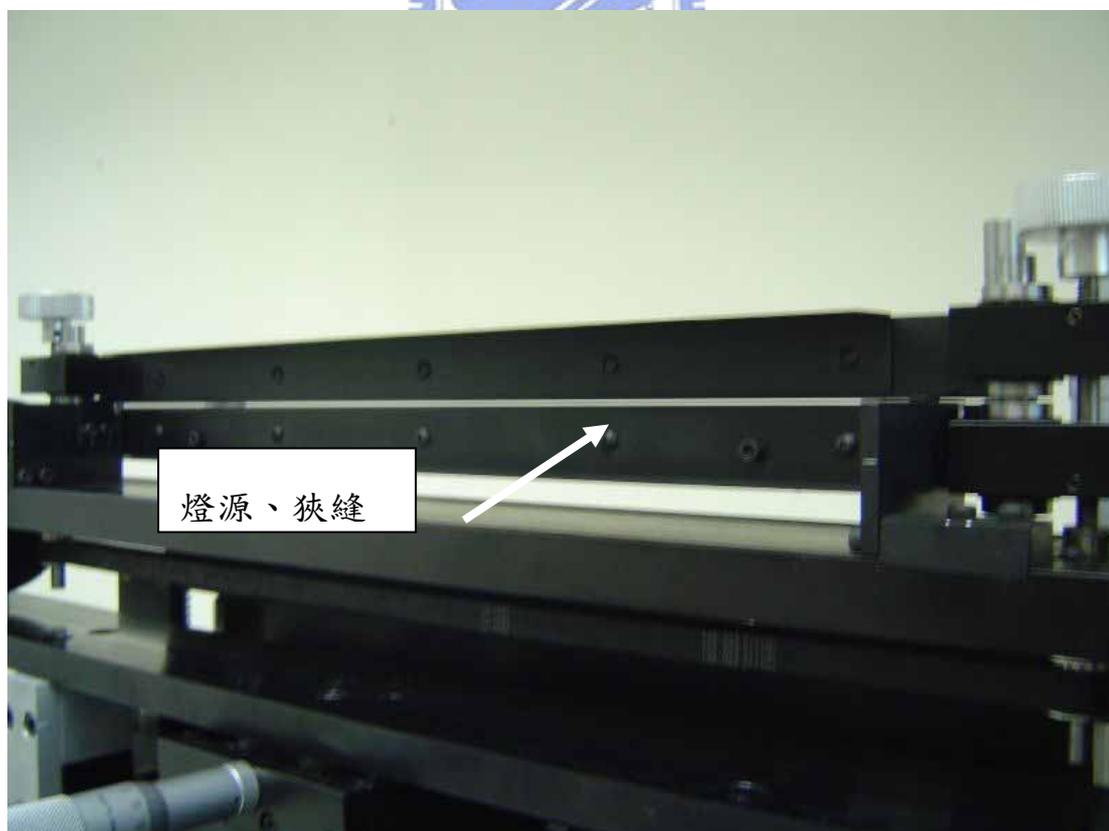
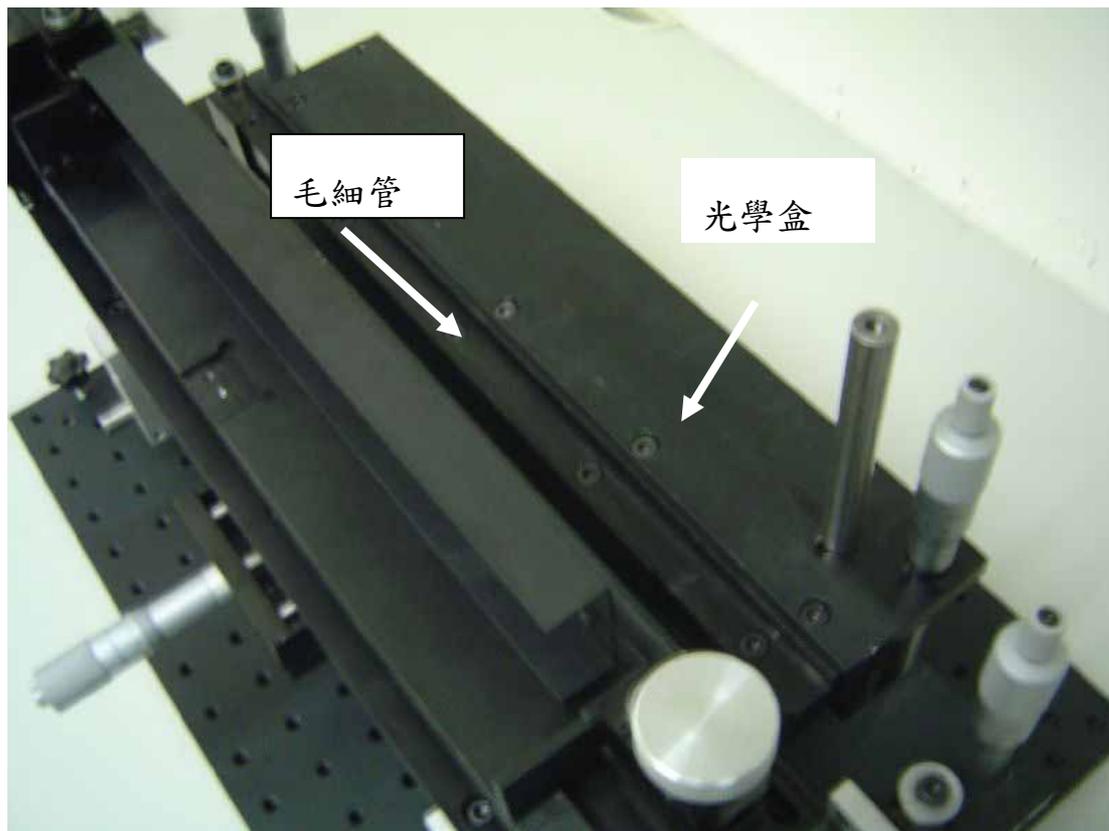


圖 18、各零件在向量光學平台上的位置



圖 19、毛細管固定架

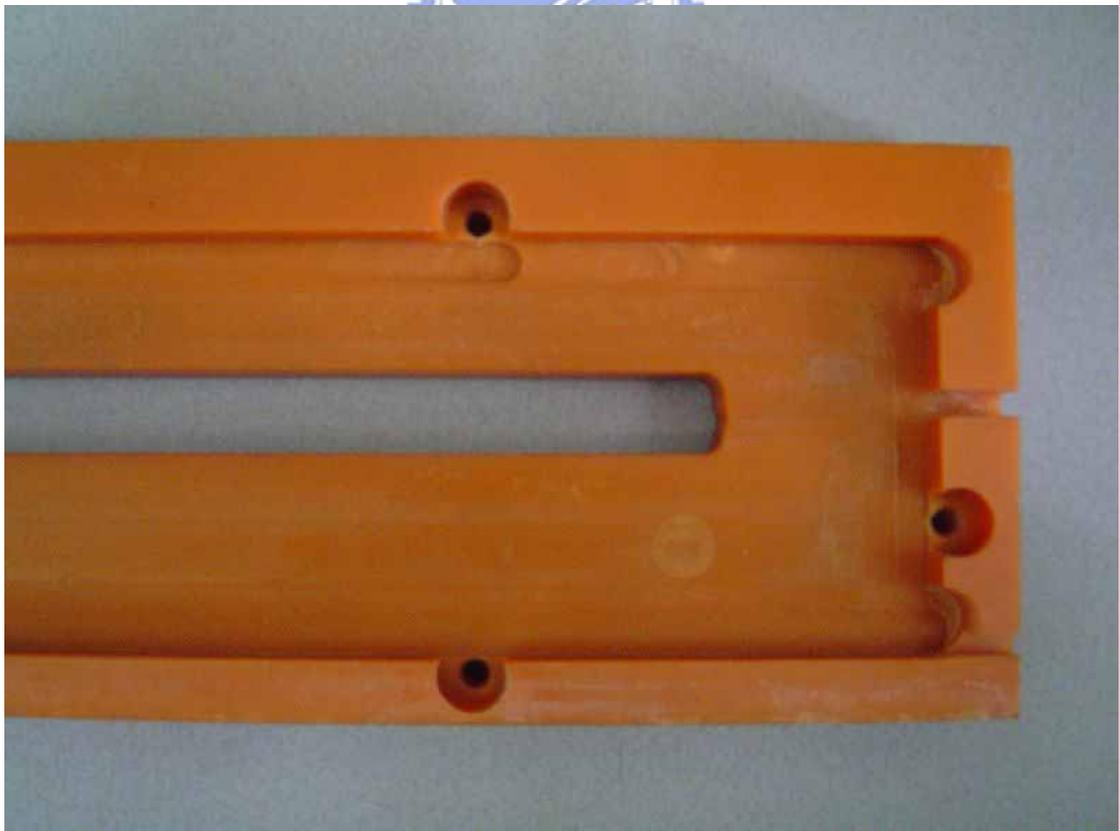


圖 20、毛細管卡匣(上圖是整體，下圖是放大上圖的右邊)

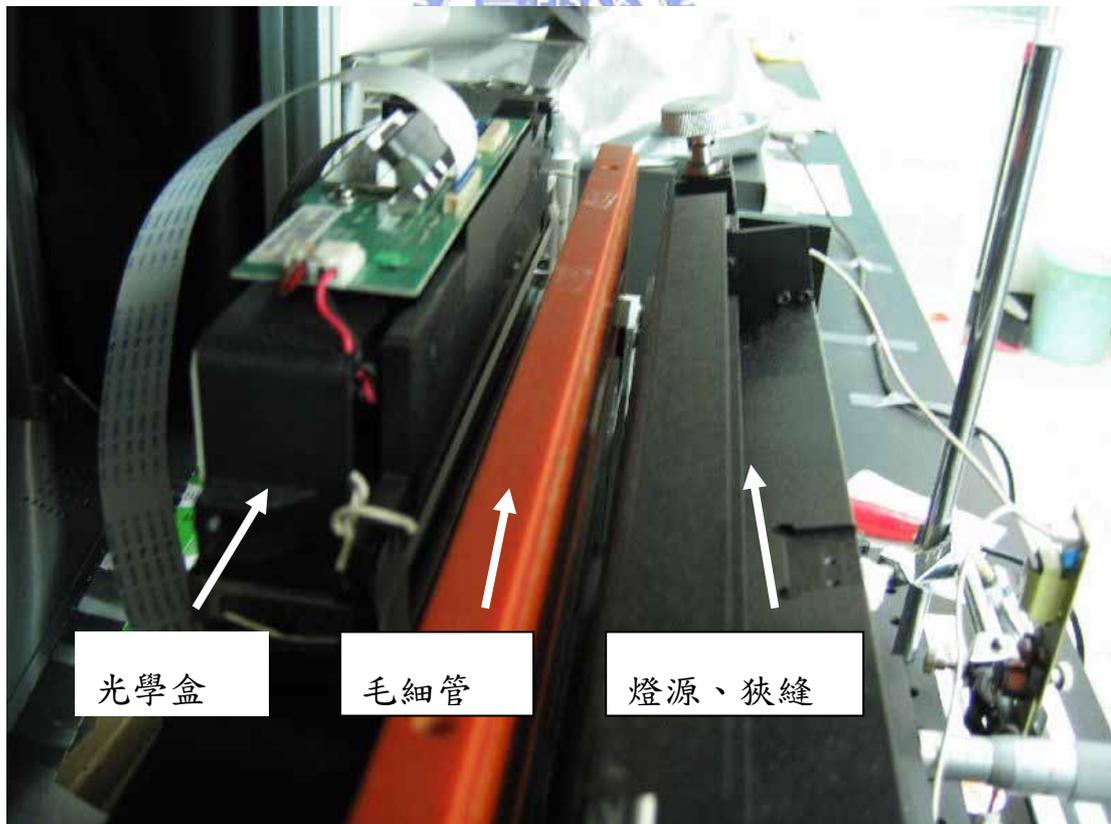
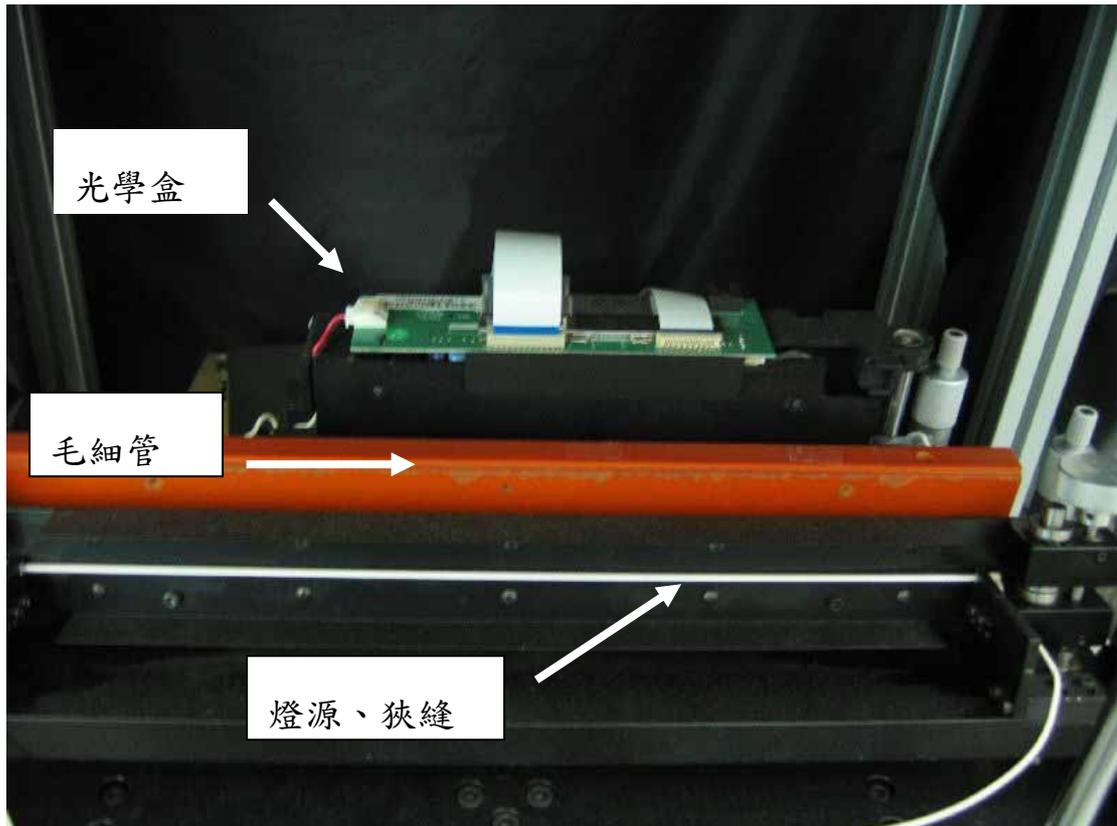


圖 21、多通道偵測系統(上圖是正面圖，下圖是側視圖)

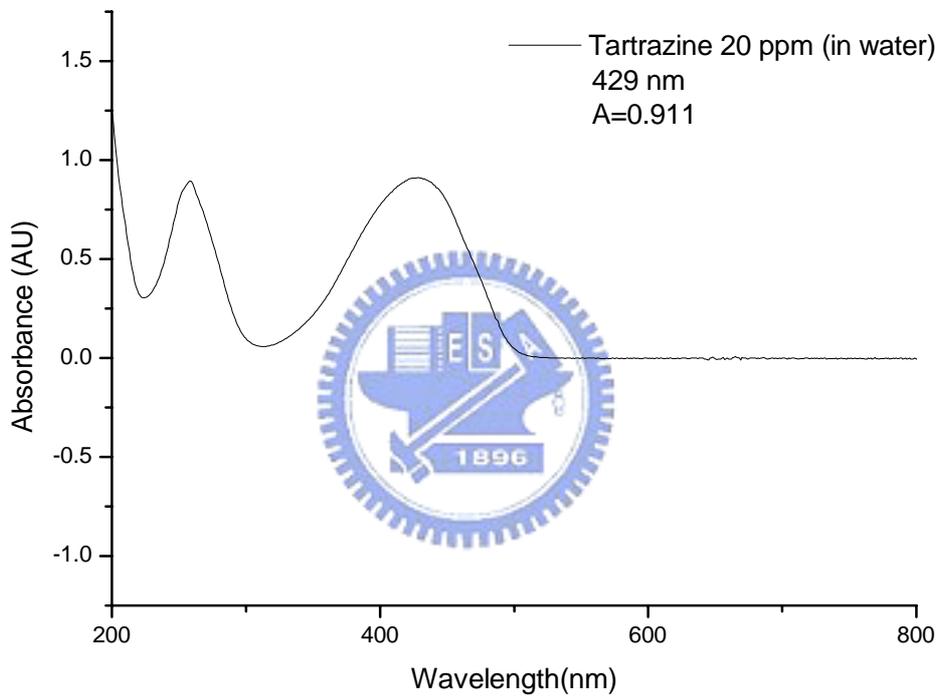
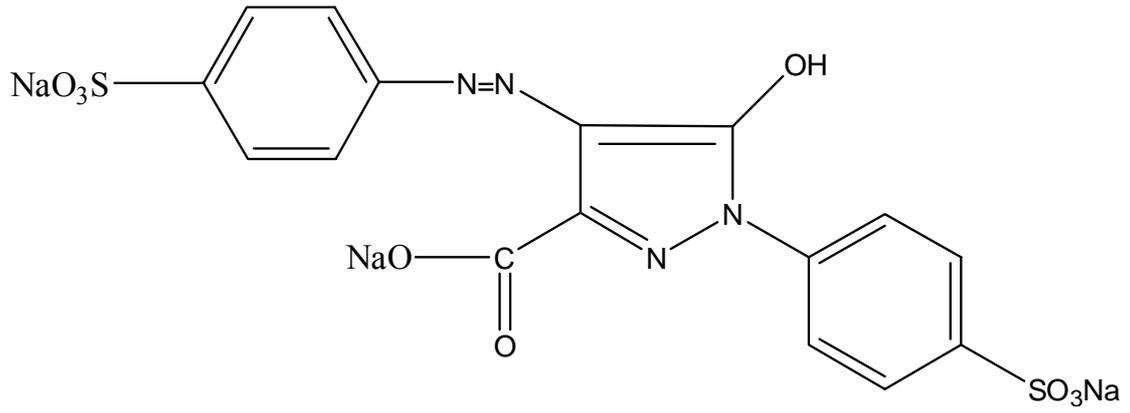


圖 22、上圖為黃色四號的結構式；下圖為其 UV 光譜圖

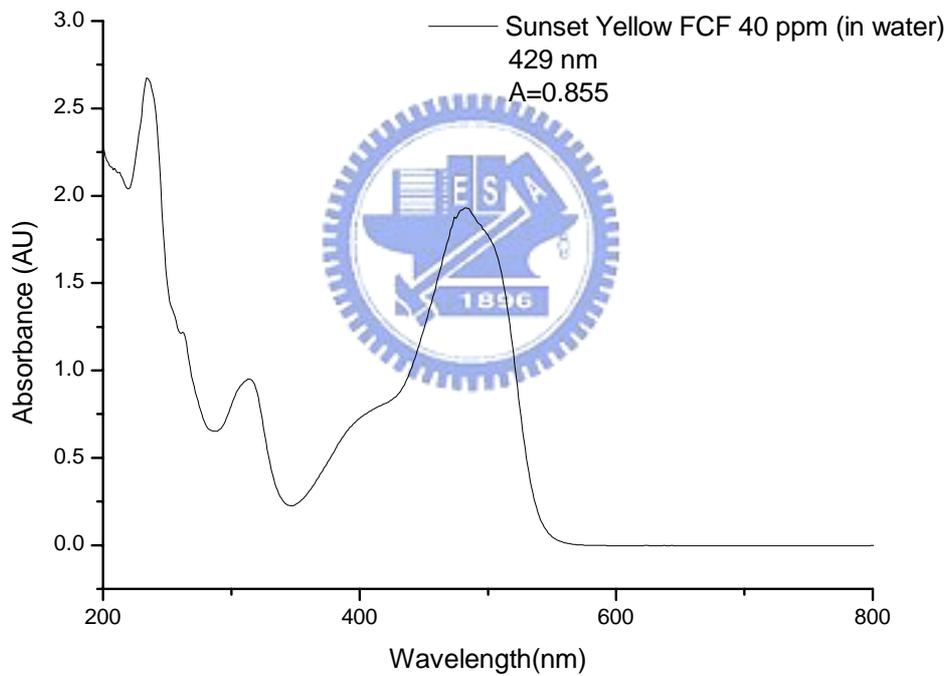
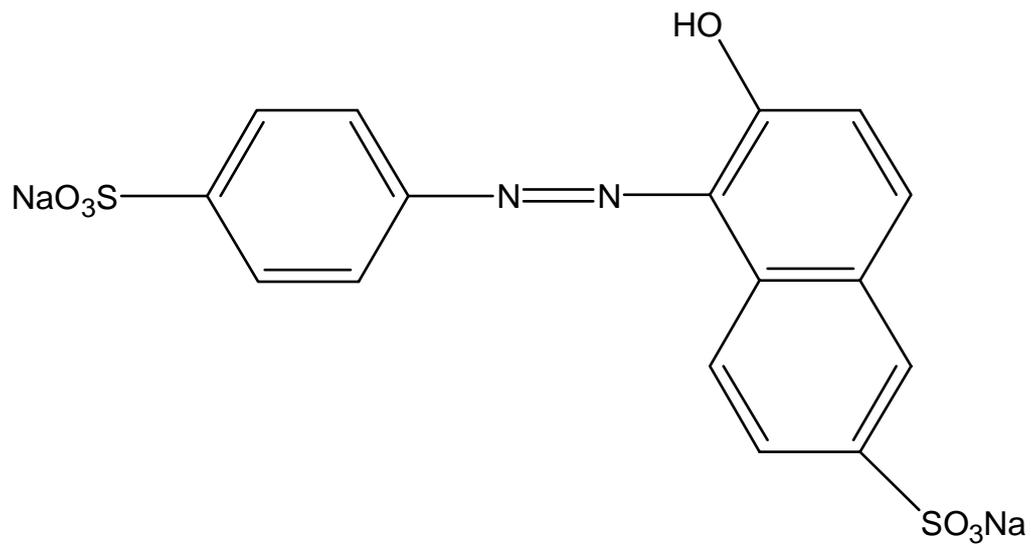


圖 23、上圖為黃色五號的結構式；下圖為其 UV 光譜圖

第五章 結果與討論

5.1 吸收光譜

在毛細管電泳系統裡，可以使用吸收、螢光、雷射誘導螢光、間接吸收、質譜等等，來作為偵測方式。在本實驗裡是選擇吸收光譜作為偵測方式，原因如圖 24 所示，由於吸收度是測量兩次穿透強度(背景和樣品)之比例，若實驗中一些參數有變化，例如本實驗所使用的燈源是取自光學掃描器的燈管，若是每個空間位置所放出來光的強度不等，可以藉著 $A = \log(P_0/P)$ (A 是吸收度， P_0 是背景強度，P 是樣品強度) 來降低因強度不等所造成的誤差。



5.2 向量光學平台之改善

原本之設計，燈源和管柱是架設於同一組可移動的組件上，進行校正時是需要兩者一起調整角度。但是本實驗使用 100 μm 的毛細管進行實驗，為了能夠更明確地掌握光線是有通過毛細管，故將燈源和管柱分開，使能夠分別對燈源和毛細管進行方向或角度調整。

圖 25a 是改善前的平台組件簡圖，圖 25b 是改善後的平台組件簡圖。將燈源、狹縫和光學盒固定不動，只調整毛細管的角度和方向，讓光通過毛細管每一位置的光量是幾乎相同的。

首先為了確定本光學盒“殘餘電流”的大小，因此做了一個測試，將燈源關閉、以黑布蓋上整個儀器，發現光學盒還是會得到一個值(如圖 26 所示)，大概是約 3350，此訊號為殘餘電流，此值將提供往後之實驗數據運算處理。

另外為了減少未通過毛細管而進入光學盒的光線所產生的干擾，狹縫的寬度最好要跟毛細管的內徑一樣，可是當狹縫的寬度是 0.7 公厘時，從圖 27 指出，可使用的毛細管長度僅約 5 公分，推測原因是當狹縫變窄時，光線在每個位置進入毛細管的通量要幾乎一樣是非常困難的，狹縫的寬度變小，光線進入偵測器的量會變少，但是會讓大部分的光線進入毛細管(如圖 28 所示)。可是當狹縫的寬度約 0.6 公厘時，會因為光線強度接近於殘餘電流，使得可偵測的範圍會變的很小(如圖 29 所示)。所以接下來的實驗，狹縫的寬度固定是 0.7 公厘，光可通過的毛細管範圍約 5 公分。

為了測試改善後的儀器是可以進行實驗的，我們在一段毛細管上面燒出約 5 公分的透明範圍，在此透明範圍上的兩個地方塗黑(如圖 30a 所示)，我們預期光線通過毛細管後，偵測器所得之樣品訊號會如圖 30b 所示。實驗結果為圖 31(將狹縫放大到 1 公厘以利觀察)，當光線沒有通過毛細管而直接進入偵測器時，收集到的光線強度是最高的，而當光線通過毛細管透明部份後，收集到的光線強度會降低，可

是在塗黑的部份，光線強度會更大幅地降低。以上述光線的強度改變，可以判斷光線有無通過毛細管。最後將測試用的毛細管改成實驗用的毛細管之後，狹縫改為 0.7 公厘，實驗結果如圖 32 所示。

此外由於多通道偵測系統不是固定在光學桌上，為避免毛細管受外界震動而改變其在毛細管卡匣內位置，因此在透明範圍附近貼有 3M 膠帶，來更確定地將毛細管固定在卡匣上。

5.3 實驗條件的選擇

根據文獻[27-30]，本實驗決定使用之緩衝溶液是硼酸鹽溶液 (pH=10, 5 mM)，分離電壓 20 kV，毛細管的入口端及出口端到毛細管卡匣約 20 公分(如圖 33a 所示)和多通道偵測系統的整體寬度約 50 公分(如圖 33b 所示)，故毛細管總長度為 90 公分，毛細管的入口端到偵測視窗是 35 公分，偵測視窗是 5 公分(即毛細管上的透明範圍)，進樣方式是高度差進樣(15 公分)。

5.4 收集樣品訊號的方式

在單通道偵測系統裡，是離毛細管入口端 35 公分的位置做偵測。在多通道偵測系統裡，時圖是離毛細管入口端 36.7 公分的位置做偵測；空圖是離毛細管入口端 35 公分到 40 公分的範圍，偵測範圍

是 5 公分。

5.5 數據處理

數據處理方式為背景強度的值(P_0)和樣品強度的值(P)都要減去殘餘電流的值(R)，再根據 $A = \log[(P_0 - R)/(P - R)]$ 的運算，即可得管內物質之吸收度大小等數據。

除上述運算之外，對於收集實驗訊號的時間也必須特別注意。用單通道偵測系統時，電泳實驗一旦開始，即可直接收集實驗訊號。但是用多通道偵測系統時，為了讓電流更穩定，而且考慮到樣品是在 6 分鐘之後才抵達偵測視窗，故以第 5 分鐘的光線強度為背景訊號，也就是電泳開始 5 分鐘之後開始偵測樣品，也就是偵測電泳實驗 5~20 分鐘之內的管內物質吸收度。

5.6 背景訊號

背景訊號是當毛細管內只有緩衝溶液時所測得的吸收度，圖 34a 是由單通道偵測系統所得到的結果；圖 34b 是由多通道偵測系統所得到的時圖結果；圖 34c 是由多通道偵測系統所得到的空圖結果。

圖 34a 是可以預期的，因為只有跑緩衝溶液，所以吸收度都幾乎為 0，而且基線是非常平穩的。圖 34b 和圖 34c 的基線雖然有受到光

線通過毛細管路徑不同的影響，不像圖 34a 那麼平穩，但是起伏不是很大，還是可以視為平的。

5.7 兩種樣品的空圖和時圖之比較

由於儀器之偵測靈敏度無法提供良好的訊號，故我們以目前最好的實驗數據，來探討毛細管電泳訊號是否有時間效應的存在。

5.7.1 Tartrazine

圖 35a 是由單通道偵測系統所得到的時圖結果；圖 35b 是由多通道偵測系統所得到的時圖結果；圖 35c 是由多通道偵測系統所得到的空圖結果。



從圖 35c 中發現，隨著電泳時間增加，樣品前進時的波峰形狀是保持固定且呈現拖尾，經過 5 公分的偵測視窗只需要 1 分鐘。另外在不同時間點出現的波峰，其半高寬和吸收度是一樣的，而且波峰形狀和圖 35a 一樣，是以拖尾形式出現。

此外從圖 35a、圖 35b 和圖 35c 中發現，波峰形狀是左右相反的，原因是當樣品分佈形狀固定且樣品訊號是前高後低時，經過偵測位置時，一開始訊號很高，可是隨著時間增加，樣品全部經過偵測位置之後，樣品訊號持續遞減到 0 為止。在時間上來看，偵測器會先偵測到最高的訊號，隨著時間增加，樣品訊號會遞減到 0 為止，造成波峰的

形狀是左右相反的。

比較圖 35a、圖 35b 和圖 35c，空圖和時圖中的波峰形狀是一樣的，都有拖尾的現象。因為在空間上的質量分佈和在時間上的訊號分佈是一樣的，所以沒有明顯的時間效應存在。

5.7.2 Sunset Yellow FCF

用多通道偵測系統觀察 Sunset Yellow FCF 的原因是，因為在單通道偵測系統的實驗結果中顯示，其樣品波峰形狀是呈現趨前的現象。時圖是趨前，那空圖會是怎樣的形狀？

Sunset Yellow FCF 最大的吸收波長是在 480 nm 附近，因為多通道偵測系統的波長限制在 430 nm 左右，為了能夠明顯地觀察樣品波峰的變化，故將 Sunset Yellow FCF 的濃度增加到 500 ppm。

圖 36a 是由單通道偵測系統所得到的時圖結果；圖 36b 是由多通道偵測系統所得到的時圖結果；圖 36c 是由多通道偵測系統所得到的空圖結果。

從圖 36c 中發現，隨著電泳時間增加，樣品前進時的波峰形狀是保持固定且呈現趨前，經過 5 公分的偵測視窗是少於 1 分鐘。另外在不同時間點出現的波峰，其半高寬和吸收度是一樣的，而且波峰形狀和圖 36a 一樣，是以趨前形式出現。

此外從圖 36a、圖 36b 和圖 36c 中發現，波峰形狀是左右相反的，

原因與 5.6.1 敘述 Tartrazine 波峰形狀相反的方式一樣。

比較圖 36a、圖 36b 和圖 36c，空圖和時圖中的波峰形狀是一樣，都有趨前的現象。因為在空間上的質量分佈和在時間上的訊號分佈是一樣的，所以沒有明顯的時間效應存在。

5.8 未來改善實驗的建議

建議多通道偵測系統放在光學桌上，減少因震動而可能產生的實驗誤差。

如果未來還是以吸收光譜做為偵測方式，且多通道偵測系統更加精密，則要提高樣品訊號和雜訊的比，可以試著減小狹縫的寬度，降低因光線未通過毛細管就進入偵測器，而對樣品訊號產生的干擾。

此外可以嘗試增加管柱光徑。用特殊的設計來增加光徑，但是卻不會增加整個毛細管的截面積，這樣的一個設計就是“泡狀池”(如圖 37 所示)。因為根據比爾吸收定律(Beer's law)($A = \epsilon bc$)(A : 吸收度, ϵ : 吸收係數, b : 光徑, c : 樣品濃度), ϵ 是固定不變的, 將 c 固定, 只要增加 b , 則吸收度會增加。泡狀池是直接 在毛細管中形成一個泡狀的擴張區, 增加光徑以提高吸收度。因為泡狀池只是位於檢測區域, 所以不會增加電流。在這區域裡, 泡狀池內的電阻減小, 所以場強也減小。由於泡狀池的體積大而相對的液體流動的速度也下降了, 當樣

品區帶的前沿進入泡狀池時，速度減慢，於是就類似“濃縮”或是“堆積”。樣品區帶因為體積增大而產生的擴張是徑向的，而不是沿著毛細管的軸向，所以樣品的濃度沒有變，但是光徑卻增加了，故吸收度就會增加。

不過由於本實驗的偵測視窗長達 5 公分，故為了提升儀器整體的靈敏度，毛細管的泡狀結構就必須要增加長度，成為“長條型的泡狀池”，才得以符合本實驗之要求。

此外也可以改用螢光做為偵測方式，因為螢光光譜的靈敏度會比吸收光譜高。

在目前多通道偵測系統裡，我們是用一般的 A4 光學掃瞄器內的光學盒做為多通道偵測器、燈管做為吸收光譜的燈源，未來我們可以試著用有感光耦合元件的相機來做為偵測器，因為有許多文獻[31-39]指出，有感光耦合元件的相機可做為觀察全管柱的偵測器，而且還可以有多重波長的選擇。



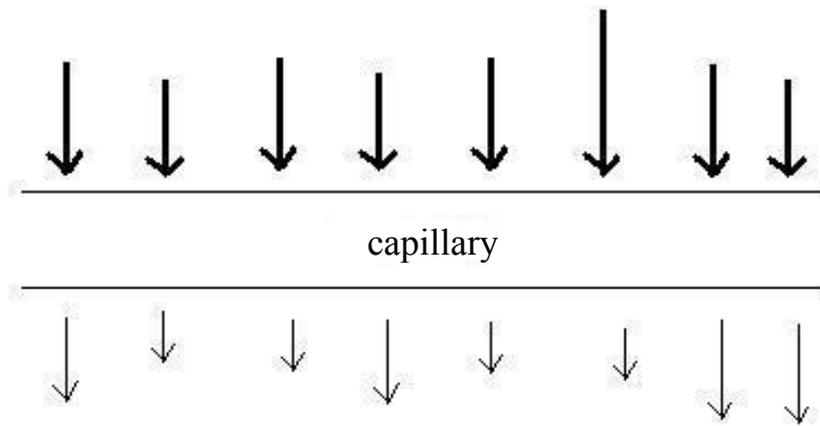
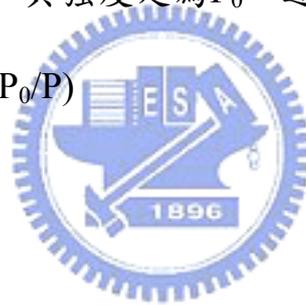
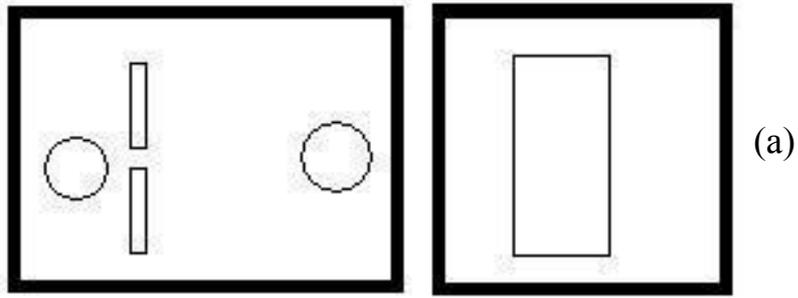


圖 24 、吸收光譜

光未通過毛細管前，其強度定為 P_0 ，通過後定為 P ，則毛細管內
物質之吸收度為 $A = \log(P_0/P)$





燈源 狹縫

毛細管

光學盒

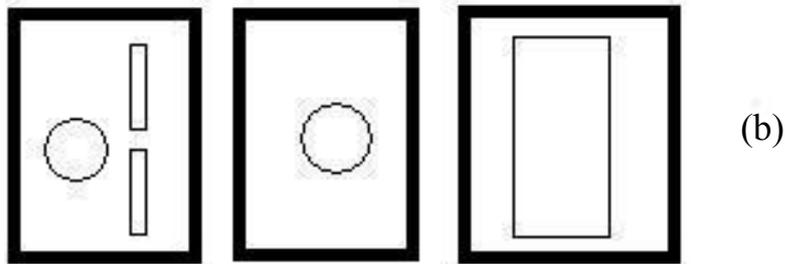


圖 25、(a)改善前的(b)改善後的向量光學平台簡圖

(黑色粗框裡的零件是一起調整的)

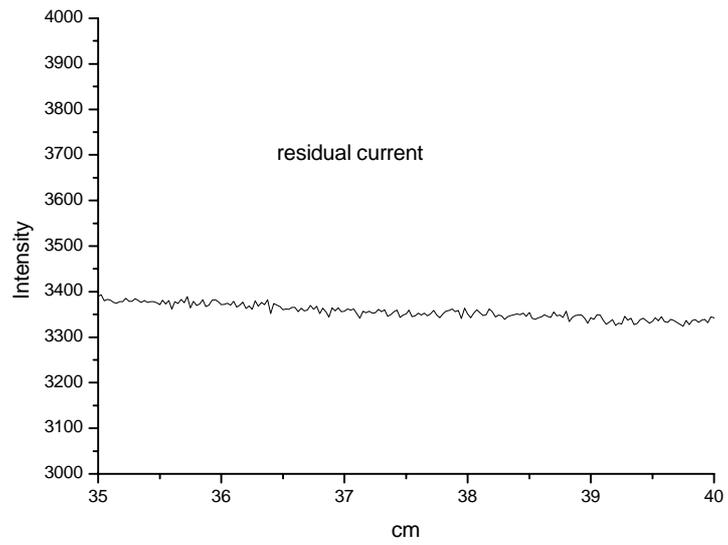


圖 26、殘餘電流

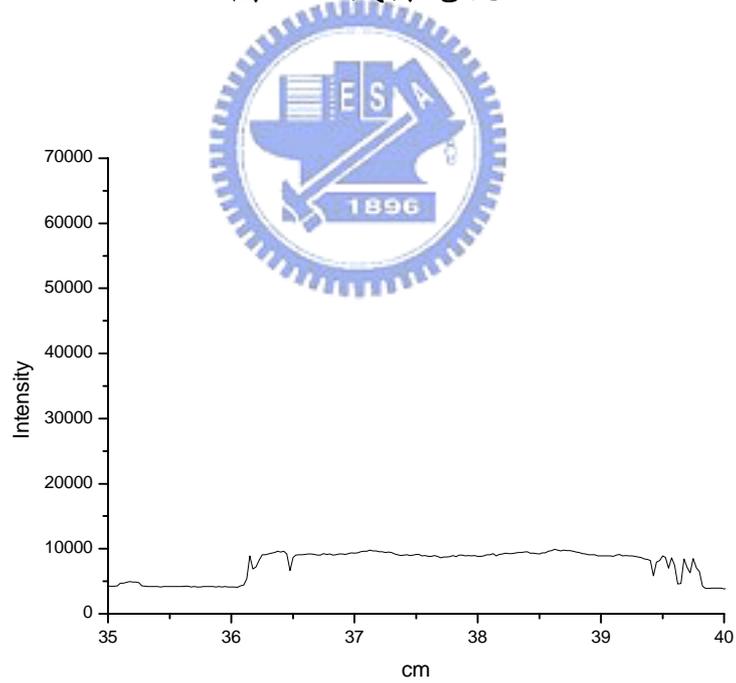


圖 27、偵測範圍(此時狹縫寬度為 0.7 公厘)

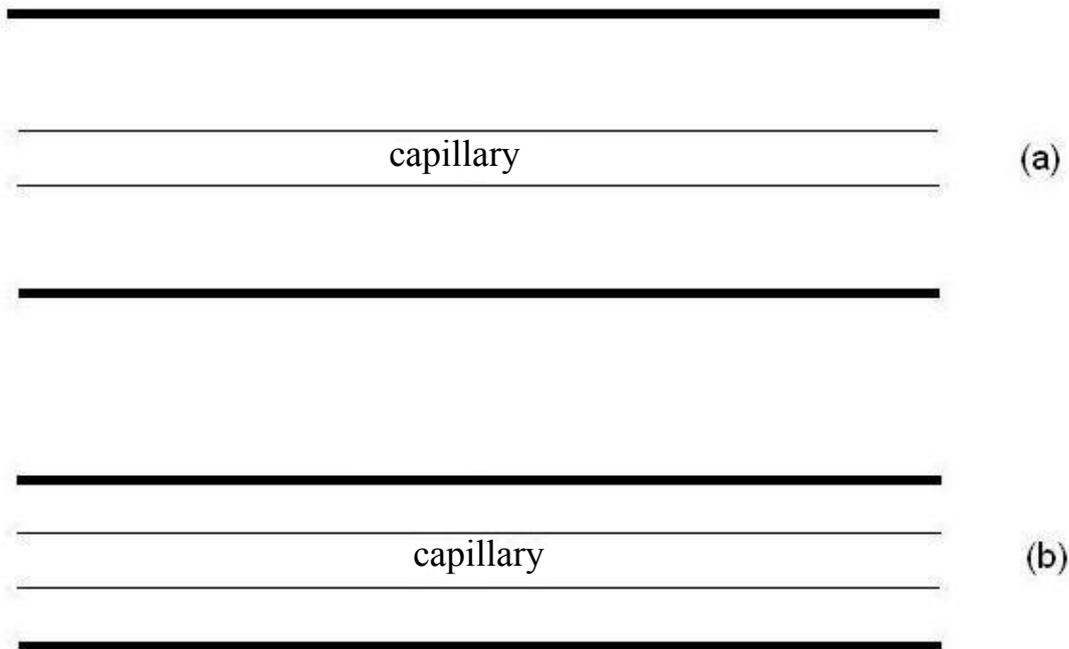


圖 28、狹縫的寬度(a)寬度比較大(b)寬度比較小(粗線表示狹縫的範圍，細線表示毛細管的範圍)

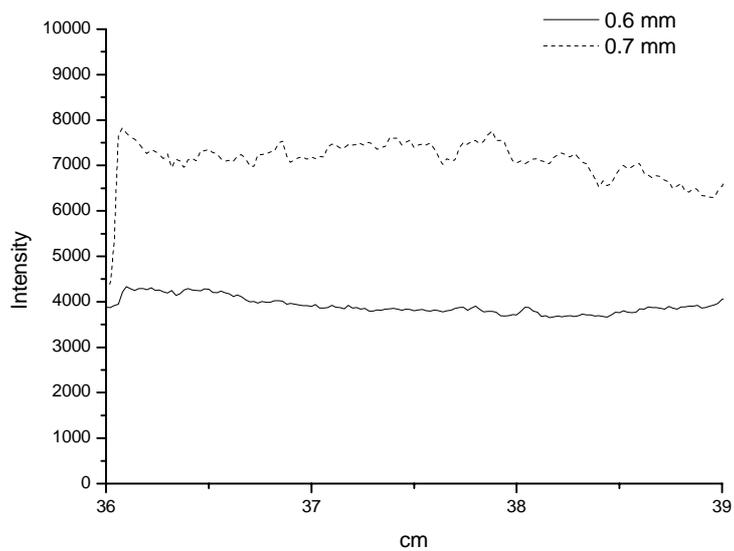


圖 29、因狹縫寬度的改變，造成強度的改變

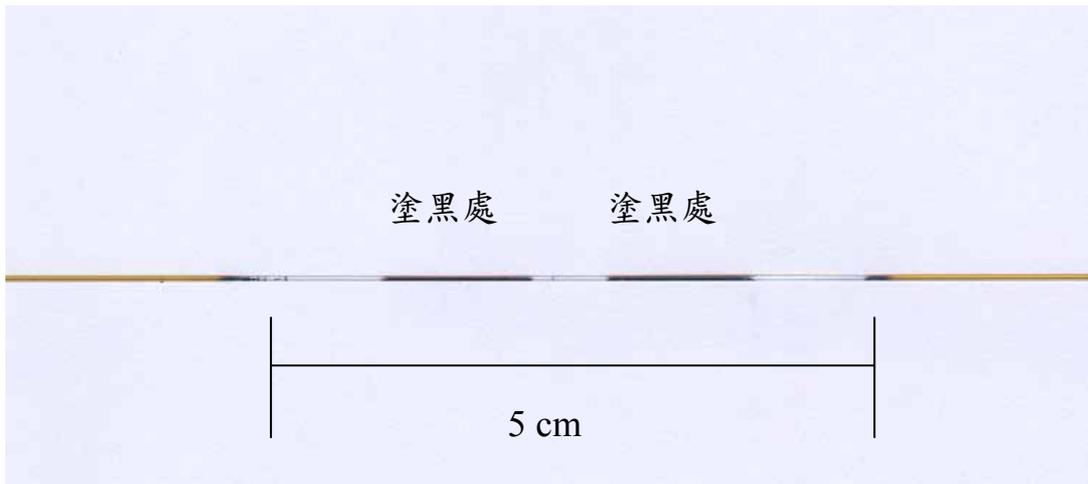


圖 30a、測試用的毛細管

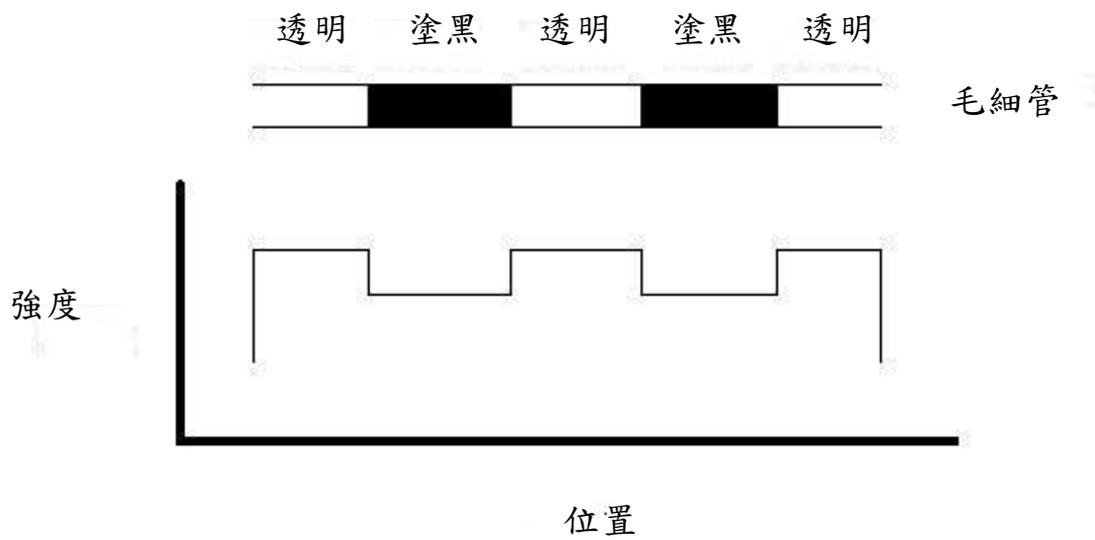


圖 30b、預期在偵測器上所得到的訊號圖

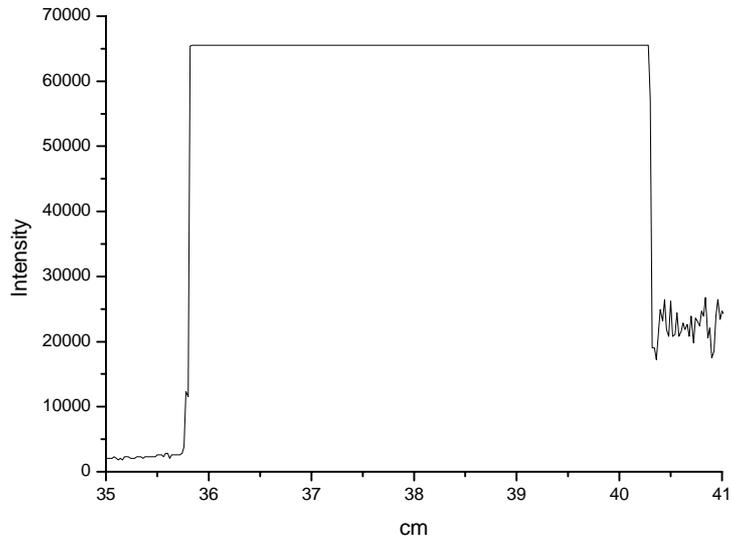


圖 31a、光線未通過測試用的毛細管之訊號圖

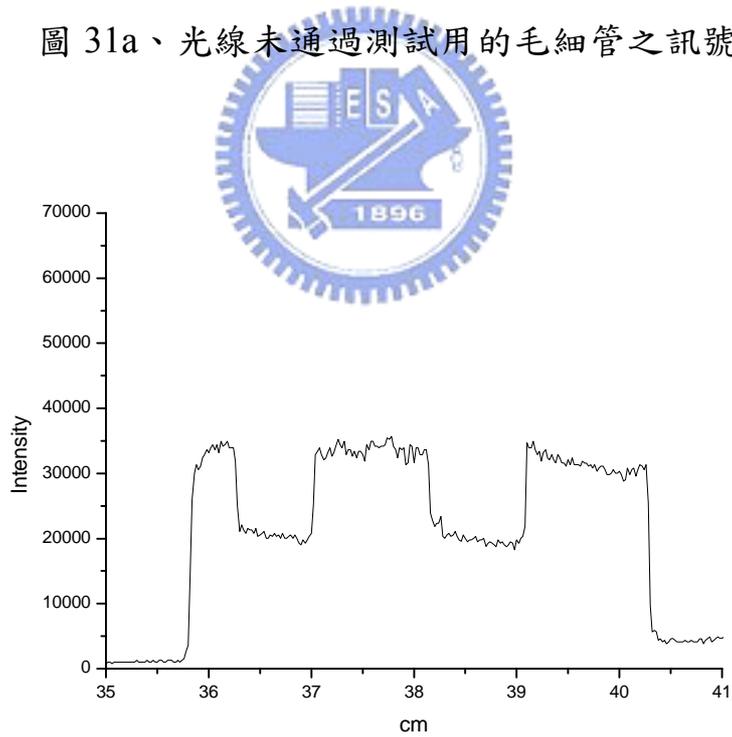


圖 31b、光線通過測試用的毛細管之訊號圖(此時狹縫寬度為 1 公厘)

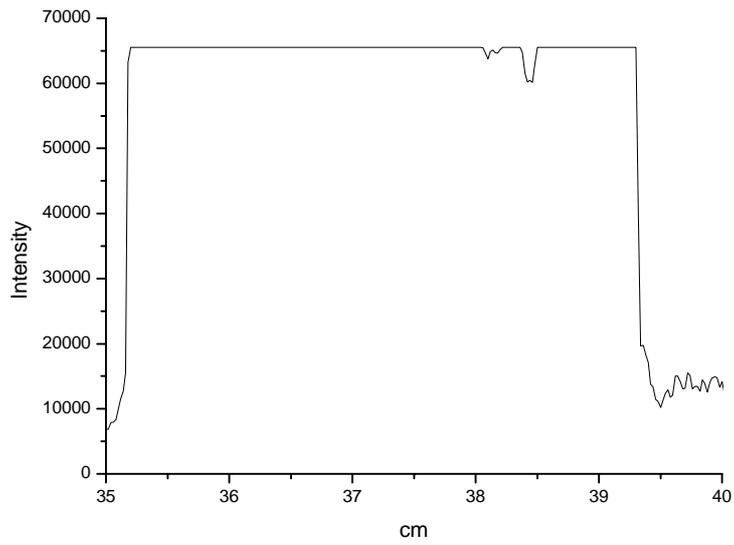


圖 32a、光線未通過實驗用的毛細管之訊號圖

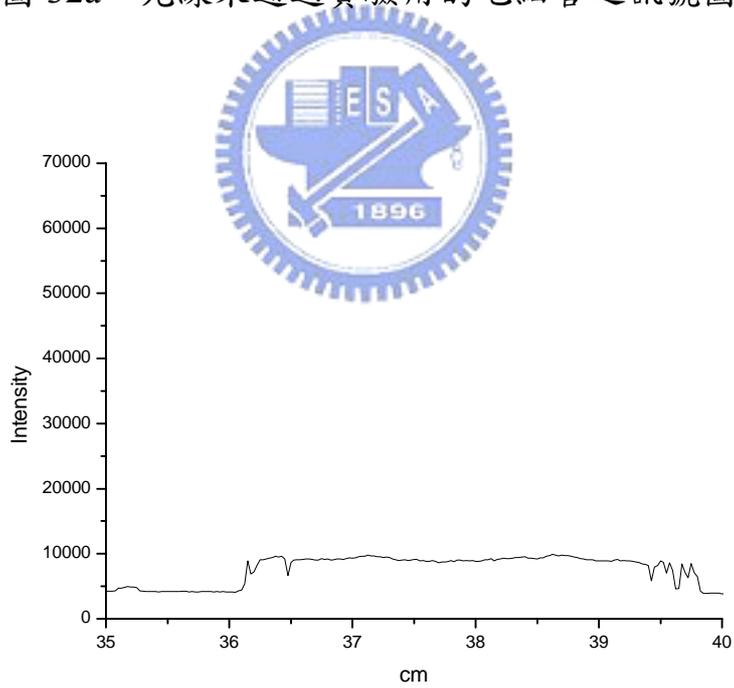


圖 32b、光線通過實驗用的毛細管之訊號圖(此時狹縫寬度為 0.7 公厘)

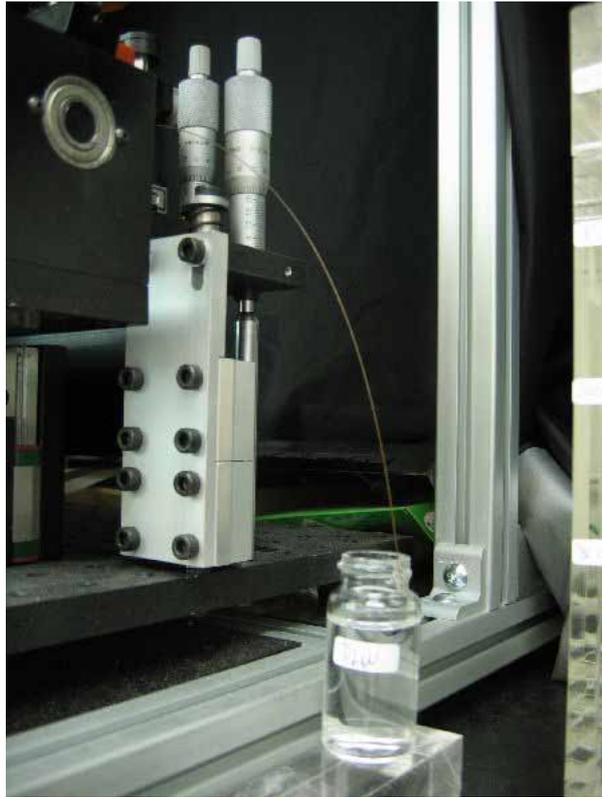


圖 33a、毛細管的入口端

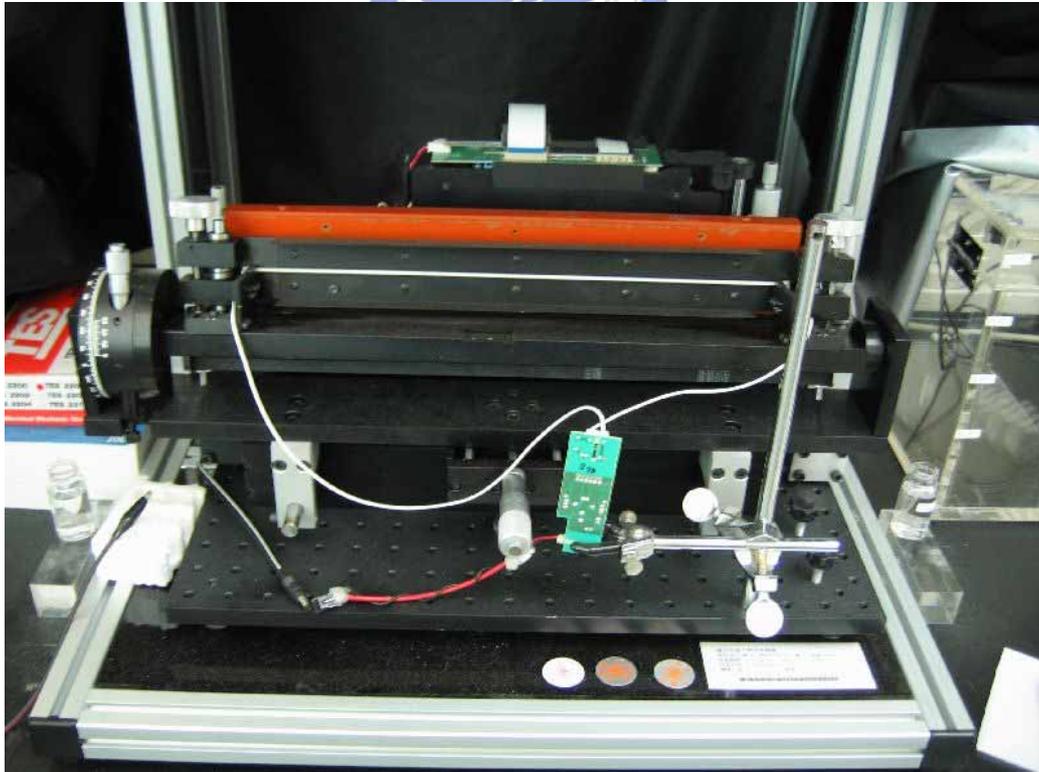


圖 33b、多通道偵測系統

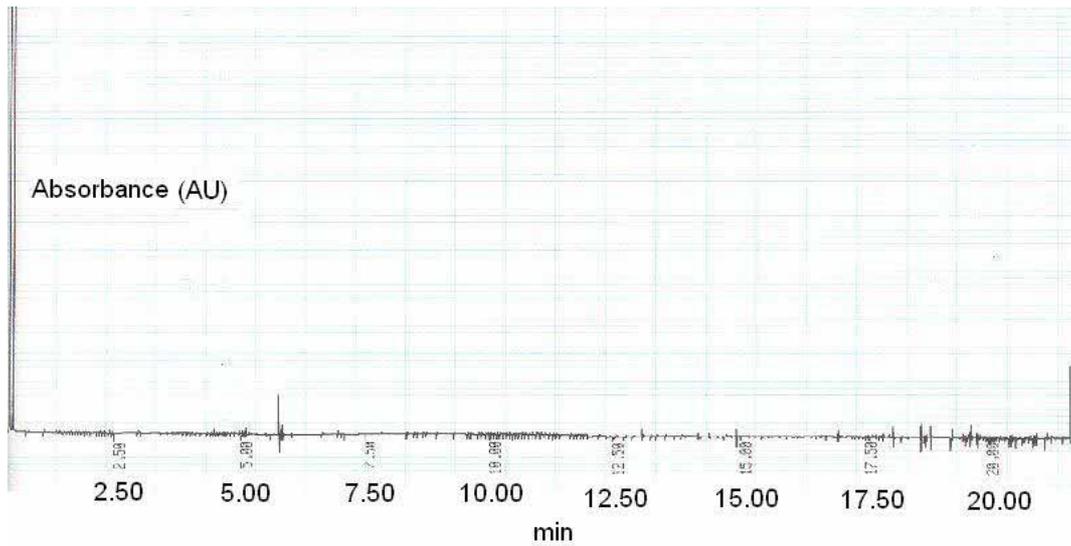


圖 34a、由單通道偵測系統所得到的背景訊號

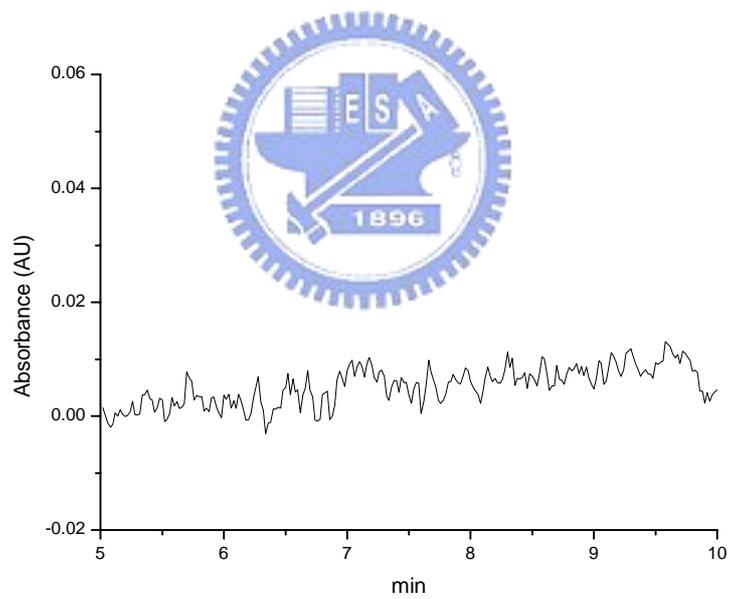


圖 34b、由多通道偵測系統所得到的背景訊號的時圖結果

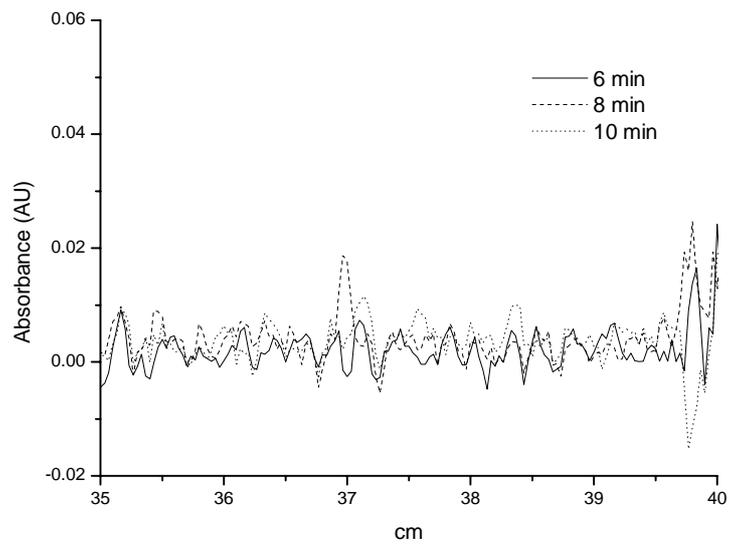


圖 34c、由多通道偵測系統所得到的背景訊號的空圖結果



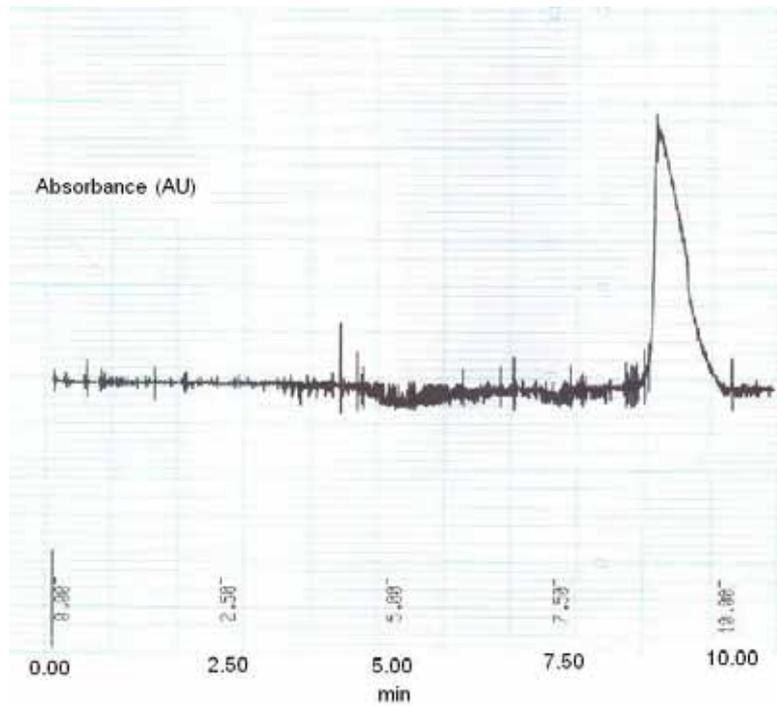


圖 35a、100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—單通道偵測系統所得到的時圖結果

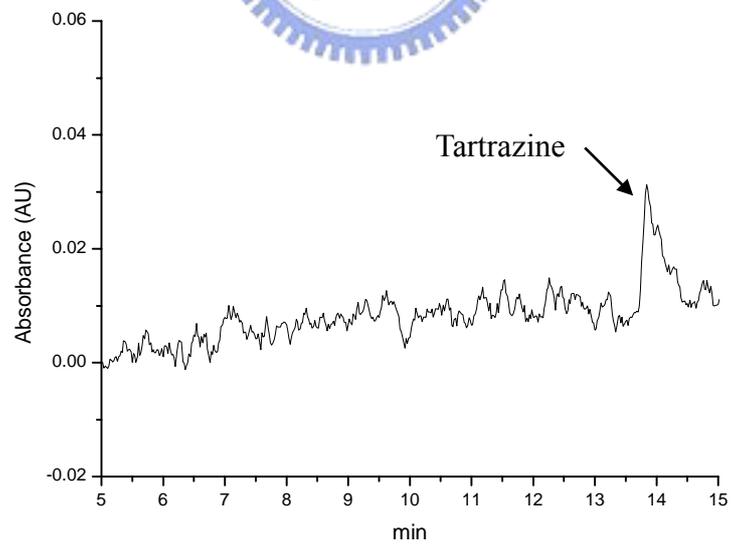


圖 35b、100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—多通道偵測系統所得到的時圖結果

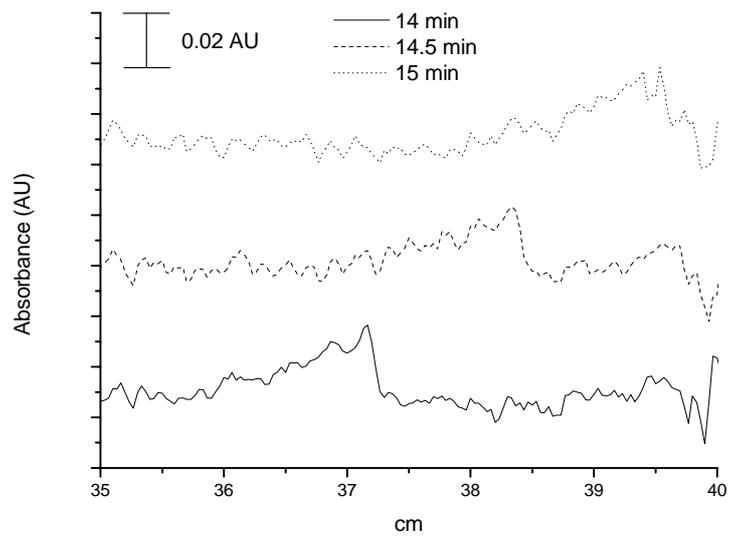


圖 35c、100 ppm 的 Tartrazine 之電泳實驗—多通道偵測系統所得

到的空圖結果



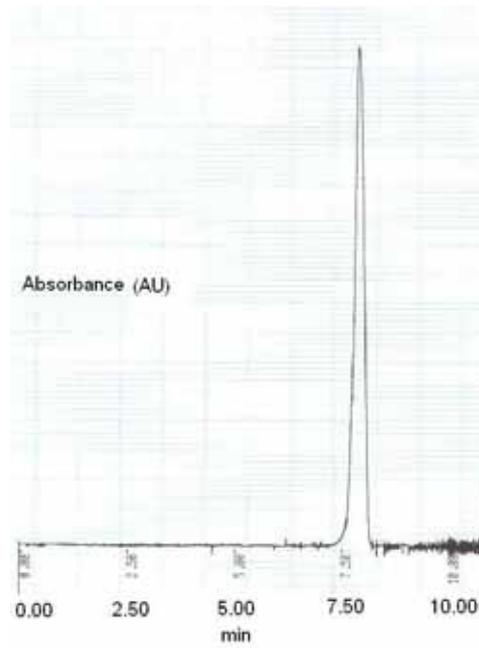


圖 36a、500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—單通道偵測

系統所得到的時圖結果

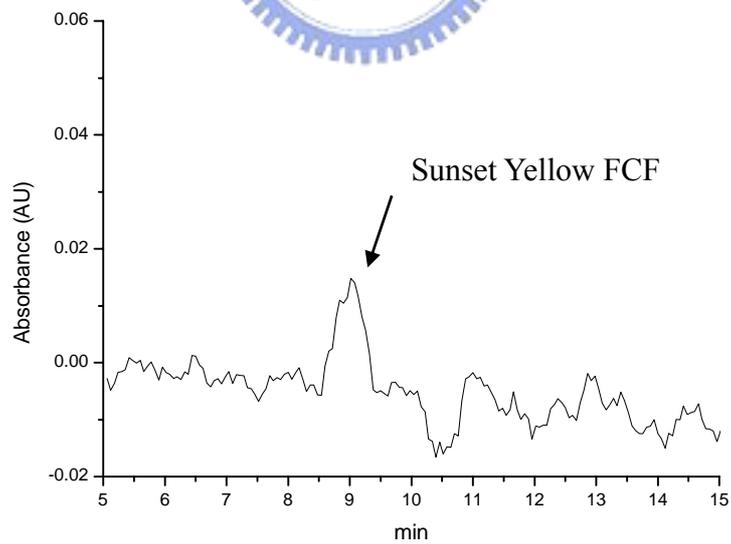


圖 36b、500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—多通道偵測

系統所得到的時圖結果

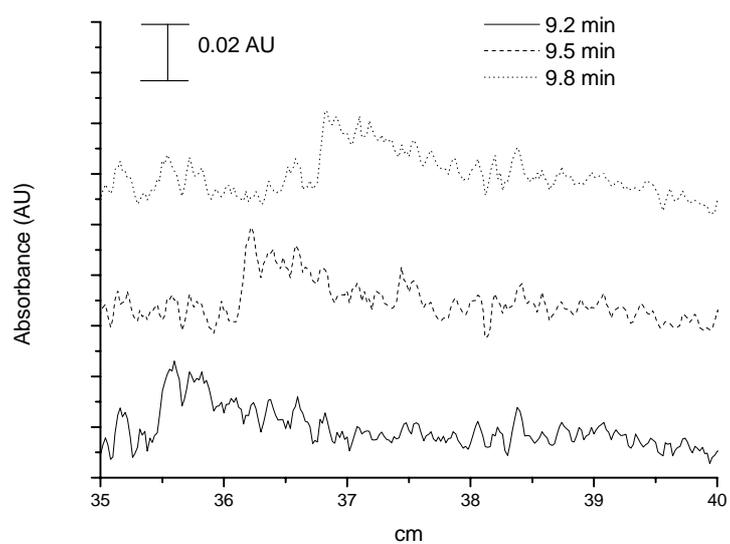


圖 36c、500 ppm 的 Sunset Yellow FCF 之電泳實驗—多通道偵測

系統所得到的空圖結果



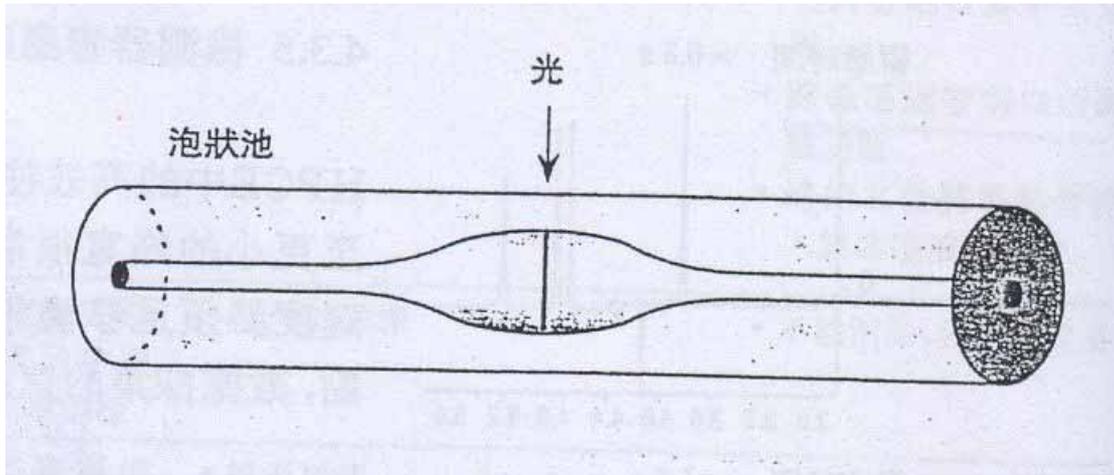


圖 37、增大光程示意圖



第六章 結論

對於流動型分析儀器的訊號，都有文獻說明波峰為什麼是呈現非高斯的形狀。但是由白所提出的假說[8-11]，讓我們對於波峰呈現非高斯的原因，有了新的看法。

這個假說已經先後證實波峰是非高斯的原因，有一定程度的影響[40-41]，不過對流動注入分析系統的證明還是處在理論的部份[40]，對於實驗上的證明，有待未來的研究；另外對於液相層析系統則證明有時間效應的存在[41]。

因此本實驗就朝向觀察樣品在毛細管內的流動情形，以檢驗毛細管電泳的訊號是否有所謂時間效應的存在。

但是本實驗最大的困難度在於樣品訊號和雜訊的比太低了，所以目前只有觀察到 100 ppm Tartrazine 和 500 ppm Sunset Yellow FCF 的樣品訊號。目前實驗結果指出樣品在毛細管內的流動，是沒有明顯的時間效應。也就是波峰形狀在空圖和時圖中是一樣的。在空圖中的質量分佈，直接對應到時圖中的訊號分佈。

不過根據白的假說[8]，毛細管電泳訊號應該有時間效應的存在，可是本實驗卻沒有觀察到，猜測因偵測位置是在離毛細管入口端 36.7 公分處，時間效應說不定在未抵達偵測視窗之前就出現，只是沒看到而已。因此未來要將偵測位置放在毛細管的入口端附近，以觀察

樣品的流動情形。或是將毛細管的總長度納入可以偵測的範圍裡，更
可以看到樣品在整個毛細管內的流動情形。



參考文獻

- [1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, in: *Flow Injection Analysis*, 2nd ed, Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1988.
- [2] G. I. Taylor, “Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube”, *Proc. R. London, Ser. A* 219 (1953) 186-203.
- [3] R. Tijssen, “Axial dispersion and flow phenomena in helically coiled tubular reactors for flow analysis and chromatography”, *Anal. Chim. Acta* 114 (1980) 71-89.
- [4] J. M. Reijn, W.E. van der Linden, H. Poppe, “Some theoretical aspects of flow injection analysis”, *Anal. Chim. Acta* 114 (1980) 105-118.
- [5] J.T. Vanderslice, K.K. Stewart, A.G. Rosenfeld, D.J. Higgs, “Laminar dispersion in flow injection analysis”, *Talanta* 28 (1981) 11-18.
- [6] S.H. Isaac, H. Soeber, L.H. Cristensen, J. Villadsen, “A computational technique for simulating the dynamic response of a flow injection analysis system”, *Chem. Eng. Sci.* 47 (1992) 1591-1600.
- [7] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, in: *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed, Saunders College Pub./ Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia/ Orlando, 1998.
- [8] S.C. Pai, “Evaluation of the temporal effect to the peak tailing in flow injection analysis”, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 271-279.
- [9] S.C. Pai, “Parcel model for peak shapes in chromatography -Numerical verification of the temporal distortion effect to peak asymmetry”, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 233-260.
- [10] S.C. Pai, C.S. Chern, L.Y. Chiao, “Further clarifications on the parcel model”, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 125-127.
- [11] S.C. Pai, “Temporally convoluted Gaussian equations for

chromatographic peaks”, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 89-103.

[12] A. Tiselius, “A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixture”, *Trans. Faraday. Soc.* 33 (1937) 524-530.

[13] S. Hjerten, “Free zone electrophoresis”, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122-219.

[14] V. Neuhoff, W.B. Schill, H. Sternbach, “Micro-analysis of pure deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase from *Escherichia Coli*”, *Biochem. J.* 117 (1970) 623-631.

[15] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Boca Raton, 1998.

[16] R. Virtanen, “Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection. Theoretical and experimental study”, *Acta polytech. Scand.* 123 (1974) 1-67.

[17] A.G. Ewing, R.A. Wallingford, T.M. Olefirowicz, “Capillary electrophoresis”, *Anal. Chem.* 61 (1989) 292A-303A.

[18] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.H. P.E.M. Verheggen, “High-performance zone electrophoresis”, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11-20.

[19] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, “Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries”, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302.

[20] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, “Capillary zone electrophoresis”, *Science.* 222 (1983) 266.

[21] S. Terbe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, “Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries”, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.

[22] A. S. Cohen, B.L. Karger, “High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and

proteins”, *J. Chromatogr.* 397 (1987) 409-417.

[23] X. Huang, R.N. Zare, “Improved end-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis”, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2193.

[24] X. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare, “Bias in quantitative capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection”, *Anal. Chem.* 60 (1988) 375-377.

[25] R.T. Kennedy, J.W. Jorgenson, “Preparation and evaluation of packed capillary liquid chromatography columns with inner diameters from 20 to 50 micrometers”, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1128-1135.

[26] R. Weinberger, in : Practical Capillary Electrophoresis, 2nd ed, San diego, California, 2000.

[27] 石瑩潔，「毛細管電層析之研究與牛奶中色素之分析」，私立中原大學，化學研究所碩士論文，民國九十一年。

[28] H. Y. Huang, Y. C. Shin, Y. C. Chen, “Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis”, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 317-325.

[29] H. Y. Huang, C. W. Chiu, S. L. Sue, C. F. Cheng, “Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking”, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 29-36.

[30] H. Y. Huang, C. L. Chuang, C. W. Chiu, M. C. Chung, “Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography”, *Electrophoresis* 26 (2005) 867-877.

[31] Z. Liu, J. Pawliszyn, “Capillary isoelectric focusing of proteins with liquid core waveguide laser-induced fluorescence whole column imaging detection”, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4887-4894.

[32] M. Girod, D. W. Armstrong, “Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charge-coupled device imaging system”, *Electrophoresis* 23 (2002) 2048-2056.

[33] X. Z. Wu, J. Pawliszyn, “Whole-column imaging capillary electrophoresis of proteins with a short capillary”, *Electrophoresis* 23 (2002) 542-549.

[34] B. Behnke, J. Johansson, E. Bayer, S. Nilsson, “Fluorescence imaging of frit effects in capillary separations”, *Electrophoresis* 21 (2000) 3102-3108.

[35] X. Z. Wu, N. S. K. Sze, J. Pawliszyn, “Miniaturization of capillary isoelectric focusing”, *Electrophoresis* 22 (2001) 3968-3971.

[36] Q. Mao, J. Pawliszyn, “Demonstration of isoelectric focusing on an etched quartz chip with UV absorption imaging detection”, *Analyst* 124 (1999) 637-641.

[37] J. Wu, J. Pawliszyn, “Absorption spectra and multicapillary imaging detection for capillary isoelectric focusing using a charge coupled device camera”, *Analyst* 120 (1995) 1567-1571.

[38] X. Z. Wu, J. Wu, J. Pawliszyn, “Fluorescence imaging detection for capillary isoelectric focusing”, *Electrophoresis* 16 (1995) 1474-1478.

[39] A. Palm, C. Lindh, S. Hjerten, J. Pawliszyn, “Capillary zone electrophoresis in agarose gels using absorption imaging detection”, *Electrophoresis* 17 (1996) 766-770.

[40] 賴宜鴻，「以空時扭變高斯方程式模擬流動注入分析法之波形研究」，國立台灣大學，海洋研究所碩士論文，民國九十四年。

[41] 林淑慧、余艇、白書禎，2004 「使用多通道偵檢器分析樣品波

峰扭變之現象」，發表於中國化學會年會，國立中興大學化學系主辦

(11.20)，台中。

