

東海大學化學研究所

碩士論文

指導教授：張玉珍 博士

毛細管電泳/雷射激發螢光偵測法應用保米黴素

及嘉賜黴素之分析

Analysis of Blasticidin S and Kasugamycin by Capillary
Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence
Detection



研究生：張貴媚

中華民國九十八年七月

摘要

Blasticidin S與 Kasugamycin皆屬抗生素類之殺菌劑，可干擾病原菌絲合成蛋白質，有效控制稻熱病(rice blast)。農藥中殺菌劑是用來保護農作物，然而在不當使用或施藥次數太多情況下，會造成農作物上的殘留，雨水也會使含有農藥的水流入河川，污染環境並且危及人民的健康，必須建立一套有系統的分析方法來監控Blasticidin S和Kasugamycin。

本研究發展以毛細管電泳搭配氦-鎘雷射激發螢光偵測系統分析Blasticidin S及 Kasugamycin。利用naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) 將不具螢光性質的 Blasticidin S及Kasugamycin進行管柱前衍生，以毛細管電泳成功的分離NDA-fungicides衍生物。各分析物遷移時間的標準偏差(RSD)為1.0~1.1 %，訊號面積的RSD為4.0~6.4 % (n=7)。Blasticidin S和Kasugamycin的校正曲線範圍為75-5000 nM (n=5) 間都呈一線性關係，相關係數(r)為0.999以上，偵測極限為33nM。將分析方法應用於地下水中回收率可達94 %以上。

謝誌

在東海研究一千多個日子中，即將進入尾聲。研究期間承蒙指導老師張玉珍教授於課業、實驗的指導，和生活上的關心，在此給予您最誠摯的感謝。同時也感謝口試委員黃承文老師以及張柏齡老師對論文提供的指正，並惠賜諸多寶貴意見，使本論文更加妥適完善，在此由衷的感謝，並致上最高的敬意。

在實驗期間裡，感謝樓元棋助教給予實驗上的協助和照顧；同學晏祥；學妹汶陵、宛靜、怡涵；學長姐懿娟、韋勳、偲嘉、銘達、怡甄、佩芝；和 315 實驗室於實驗繁忙時的幫助、生活上的關心、鼓勵；及一直幫助我為我打氣加油的高中與大學好友，感謝你們讓我的研究生涯更加順利。

最後感謝我的家人，在我受到挫折的時候給予最大的支持與鼓勵，讓我得以順利完成碩士學業，因為有你們才造就今天的我，在此獻上最深的謝意。

目 錄

| | |
|--|----------|
| 摘要 | I |
| 謝誌 | II |
| 目錄 | III |
| 圖目錄 | V |
| 表目錄 | VI |
| | |
| 壹、緒論 | 1 |
| 一、毛細管電泳背景 | 1 |
| 二、毛細管電泳簡介 | 5 |
| 1. 毛細管電泳分離原理 | 5 |
| 2. 電滲流 | 7 |
| 3. 毛細管電泳進樣方式 | 11 |
| 4. 毛細管電泳的偵測方式 | 13 |
| 三、保米黴素(Blasticidin S)與嘉賜黴素(Kasugamycin)..... | 17 |
| 1. 簡介 | 17 |
| 2. 保米黴素(Blasticidin S) | 18 |
| 3. 嘉賜黴素(Kasugamycin) | 18 |
| 4. 生物毒性 | 20 |
| 5. 食品中農藥的殘留管制..... | 20 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 6. 分析方法 | 23 |
| 四、研究動機 | 24 |
| 貳、儀器設備及實驗方法 | 26 |
| 一、藥品 | 26 |
| 二、儀器設備 | 28 |
| 三、實驗方法 | 31 |
| 1. 毛細管前處理及使用方式 | 31 |
| 2. 藥品配製 | 31 |
| 3. 真實樣品的配製 | 32 |
| 4. 衍生反應 | 32 |
| 5. 進樣方式 | 33 |
| 6. 毛細管電泳(CE)裝置 | 33 |
| 7. 雷射激發螢光(LIF)偵測裝置 | 33 |
| 參、結果與討論 | 36 |
| 一、衍生反應條件之探討 | 36 |
| 1. 衍生反應 | 36 |
| 2. 衍生緩衝溶液 pH 之探討 | 38 |
| 3. 衍生劑對分析物比例之探討 | 40 |
| 4. 衍生時間之探討 | 42 |

| | |
|-------------------------|----|
| 二、分離條件之探討..... | 44 |
| 1. SDS 濃度的影響..... | 44 |
| 2. 電泳緩衝溶液 pH 的影響..... | 46 |
| 3. 電壓的影響..... | 48 |
| 三、最佳分析條件..... | 50 |
| 四、標準品中檢量線與偵測極限..... | 52 |
| 五、再現性..... | 55 |
| 六、真實樣品之檢測..... | 55 |
| 1. 地下水樣品中的檢量線與偵測極限..... | 58 |
| 2. 回收率試驗..... | 58 |
| 3. 分析方法確效試驗..... | 61 |
| 肆、結論與未來展望..... | 65 |
| 伍、參考文獻..... | 66 |

圖目錄

| | |
|-----------------------------------|----|
| 圖(一)毛細管電泳基本裝置..... | 6 |
| 圖(二)電滲流..... | 8 |
| 圖(三) 雷射激發螢光偵測器內部元件構造..... | 34 |
| 圖(四) NDA 與一級胺化合物的衍生機制..... | 37 |
| 圖(五) 衍生緩衝溶液 pH 值對訊號面積之關係圖..... | 39 |
| 圖(六) 衍生劑與分析物比例對訊號面積之關係圖..... | 41 |
| 圖(七) 衍生時間對訊號面積之關係圖..... | 43 |
| 圖(八) 緩衝溶液中不同 SDS 濃度與殺菌劑之電泳圖..... | 45 |
| 圖(九) 緩衝溶液 pH 值與殺菌劑之電泳圖..... | 47 |
| 圖(十) 電壓與殺菌劑之電泳圖..... | 49 |
| 圖(十一) 最佳分離條件之電泳圖..... | 51 |
| 圖(十二) NDA-fungicides 衍生產物電泳圖..... | 54 |
| 圖(十三) 地下水分析..... | 57 |

表目錄

| | |
|--|----|
| 表(一) Blasticidin S 與 Kasugamycin 之基本型態(free base)特性..... | 19 |
| 表(二) Blasticidin S 與 Kasugamycin 鹽酸鹽類形態之生物毒性..... | 21 |
| 表(三)各國殘留農藥安全容許量..... | 22 |
| 表(四)標準品中檢量線、偵測極限及再現性..... | 53 |
| 表(五)地下水檢量線..... | 59 |
| 表(六)地下水中殺菌劑之回收率..... | 60 |
| 表(七)地下水殺菌劑同日間與異日間之精密度..... | 62 |
| 表(八) 單因子變異數分析結果..... | 63 |

壹、緒論

一、毛細管電泳背景

電泳是指帶電荷物質在緩衝溶液中，受到電場作用下，依電荷與質量比值大小的不同會有不同的遷移速率，進而達到分離的目的^[1]。

早在 1808 年就發現電泳現象，但應用為分離方法卻是於 1937 年瑞典科學家 Tiselius^[2,3] 所設計出世界第一臺的自由電泳儀，建立了移界電泳法 (moving boundary electrophoresis)，成功的將人類血清蛋白分為白蛋白、 α_1 、 α_2 、 β 、 γ 球蛋白等 5 個主要成分，由於 Tiselius 對電泳技術的貢獻卓越，於 1948 年榮獲諾貝爾化學獎，此後電泳技術也逐漸受到重視。由於移界電泳法 (free zone electrophoresis) 的電泳技術是在自由溶液中進行，自由溶液受熱後發生密度變化，容易產生熱擴散及熱對流現象，且在高電場下會造成電解離子產生過高的焦耳熱 (joule heating)，使得分析區帶變寬，分析效率降低，因此無法承受高電壓，而使用聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 或瓊脂凝膠 (agarose) 等高分子聚合物，這些介質可減少熱對流，降低焦耳熱，但所需的分析時間較長及凝膠介質製備方法繁複。直至西元 1967 年 Hjertén^[4,5] 以毛細管壁 3 mm 石英管及甲基纖維素 (methyl cellulose) 修飾管壁，將石英管壁繞著縱軸緩慢旋轉，減低溶液之熱對流，成功進行自由溶液區帶電泳，進行無

機離子、蛋白質與核酸的分離，為毛細管電泳技術發展的開始。1974 年，Virtane^[6]使用內徑約 200~300 μm 玻璃材質進行區帶電泳，證實利用較小的毛細管能有效控制焦耳熱，並提出電滲流(electroosmotic flow)是影響電泳分析的決定因素。西元 1979 年，Mikkers^[7]利用內徑 200 μm 聚四氟乙烯管(polytetrafluorethylene; PTFE)進行電泳分離實驗，並發現毛細管內徑大小和樣品注入量會影響毛細管電泳的解析度。1981 年，Jorgenson和Lukacs^[8-10]提出以內徑 75 μm 的玻璃毛細管柱分離經過衍生的胺基酸，並以螢光偵測器作線上(on-line)偵測，分離效率之理論板數超過 40 萬以上，建立了毛細管區帶電泳法之理論基礎，同時也證明毛細管電泳是一種高分離效率之分離技術。而此方法只對於帶有電荷的分析物具有高的分離效率，但對於不具電荷的中性物質則無法進行分離。1984 年，日本姬路大學的Terabe^[11]教授提出微胞電動毛細管層析技術(Micellar Electrokinetic Chromatography or Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC or MECC)，原理是在緩衝溶液中添加界面活性劑來分離不帶電的中性物質，當界面活性劑於溶液中達到臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)以上時可形成微胞(micelles)，微胞的排列形式是以疏水性的一端共同聚集朝內，親水性的一端朝外，由於微胞的形成在分離系統中有如兩相的存在；一是由緩衝溶液組成的水相，另一是由界面活性劑所組成的微胞相^[12]，故微胞內部所

形成的疏水區域為假靜相(pseudostationary phase)，使分析物在微胞與緩衝溶液間有不同的分佈係數而達到分離中性分子，並可藉由改變界面活性劑的種類^[13]及濃度來調整分離的情形，而sodium dodecyl sulfate (SDS) 是最常添加來形成微胞之陰離子型界面活性劑，另外亦有陽離子型（如cetyltrimethylammomium bromide，CTAB）、兩性離子型（如3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate，CHAPS）等界面活性劑。

1987年，Hjertén將傳統電泳等電聚焦法應用在毛細管電泳中，發展出毛細管電泳等電聚焦法 (capillary isoelectric focusing, CIEF)^[14]，此技術是依據蛋白質類等電點(pI)不同進行分離。首先要用兩性電解質在毛細管內建立pH梯度，將陰極置於鹼性溶液中，陽極放到酸性溶液中，施加電場後，此時帶電的兩性離子和蛋白質在介質中開始遷移，直到到達一個不帶電的區域，即溶液的pH值和分析物的pI值相同時，這個過程稱為“聚焦”。樣品在CIEF的分離中能保持在一個很窄的區帶內，因為環境中的pH值小於分析物的pI時，分析物分子會和環境中的氫離子結合，會以帶正電荷的形式存在，並且往陰極方向遷移；相反的，環境中的pH值大於樣品的pI時，樣品分子會解離出氫離子，以帶負電荷的形式存在，而往陽極方向移動，在電場的作用下又會遷移回pH等於pI處，另外為了防止電滲流(electroosmotic

flow, EOF)造成兩性電解質在樣品未完全聚焦就流出毛細管，可以塗覆或共價鍵結的方式修飾毛細管壁以抑制電滲流^[13,15]。1987年，Cohen及Kager^[16]提出了毛細管凝膠電泳法(capillary gel electrophoresis, CGE)，首先在毛細管中填充凝膠，如聚丙烯醯胺(polyacrylamide)、瓊脂膠(agarose)和聚乙二醇(polyethylene glycol)等高分子聚合物，藉由他們所形成的孔徑大小如同一個分子篩，依據分子大小差異來分離，其優點在於可以改善傳統板式凝膠電泳無法使用高電壓及防止對流之特性，此方法目前廣泛的應用於DNA 序列研究^[17]。Cohen及Kager並且提出毛細管等速電泳法(capillary isotachopheresis, CITP)^[18]，CITP是一種“移動界面”的電泳技術，在非連續的電解質系統中進行，是由前導電解質(Leading electrolyte, LE)與末端電解質(Terminating electrolyte, TE)兩種不同的緩衝溶液所構成，LE形成前端層帶而TE形成末端層帶，此兩種緩衝溶液之遷移率為分析樣本之極大值與極小值，因此當進行分離時，所有被分離樣品所形成的層帶，都夾在LE與TE所形成的層帶之間，最大遷移率之樣本將貼近於前端層帶，因此其離子強度約與LE相同；最小遷移率之樣本則接近末端層帶但不會超出此範圍。故當處於一高電場時所有離子將同時以等速度方式移動，由毛細管之注入端向偵測端前進，同時進行分離。

而由於毛細管電泳在各個分析領域上使用的廣泛性，及技術上的便利

性，再加上 1988 年商品化儀器的上市，使得此分析方法漸受矚目，更促使毛細管電泳成為近年來發展最為快速的一種超微量分析技術。

二、 毛細管電泳簡介

1. 毛細管電泳分離原理

毛細管電泳的基本裝置如(圖一)所示。首先，取一適當長度的毛細管，內部充滿緩衝溶液，將其兩端置入緩衝溶液瓶中，於瓶中各放入一白金電極，使其一端接高壓電極，另一端接地線，以形成迴路，並於毛細管高壓端注入分析樣品後，在兩緩衝溶液槽間施加一高壓電，樣品流經偵測視窗，被偵測器偵測產生訊號並由電腦轉換成圖譜儲存分析。因分析物本身所帶電荷對質量比不同，而擁有不同電泳移動度進而達到分離的目的，其樣品電泳遷移速度(electrophoretic mobility)由式(1)表示^[15]：

$$v_e = \mu_e \cdot E = \mu_e \cdot \frac{V}{L} \quad (1)$$

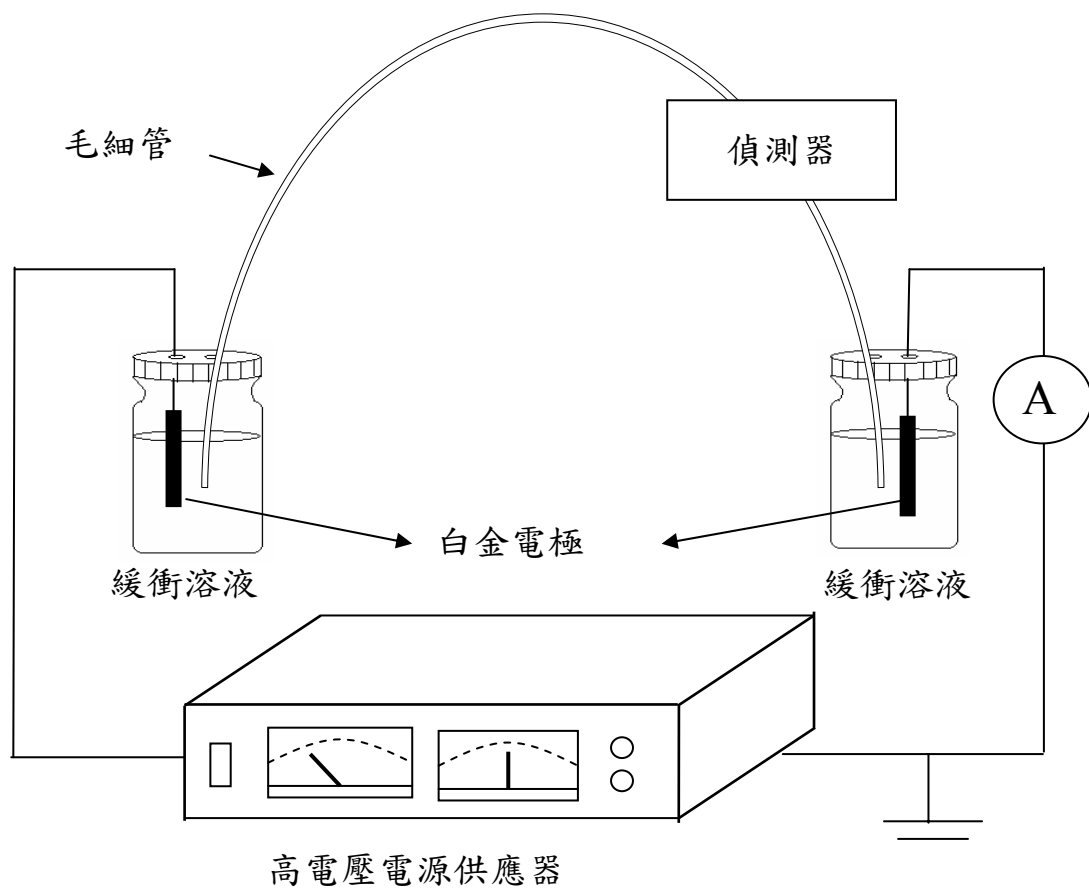
v_e ：樣品離子的遷移速度

μ_e ：電泳遷移率

E：電場強度

V：外加電壓

L：毛細管總長度



(圖一) 毛細管電泳基本裝置

2. 電滲流(electroosmotic flow)^[19]

毛細管電泳的分離進行中有一個重要的驅動力為電滲流。常用之熔融矽毛細管的內壁是由矽醇基(-SiOH)所構成，當毛細管內電泳緩衝溶液 pH \geq 3 時，管壁內的-SiOH會解離而形成SiO⁻帶負電，為了保持電荷平衡，此時緩衝溶液中的帶正電離子會受到此負電荷表面的吸引，而堆積在毛細管內壁表面形成電雙層(electric double layer)。此靠近管壁的電雙層為固定層(stern layer)，而離管壁較遠處仍有一些帶正電的離子受到吸引，此層為擴散層(diffuse layer)，此區電荷密度隨著與毛細管壁距離增加而下降，因此產生了一個電位差(zeta potential)，在外加直流電場之作用下，擴散層中的正電荷離子受負極吸引，往負極移動，進而帶動毛細管內的液體整體朝向負極流動，此一吸引作用而產生的流動現象稱之為電滲流(圖二)，可用式(2)式(3)表示^[15]：

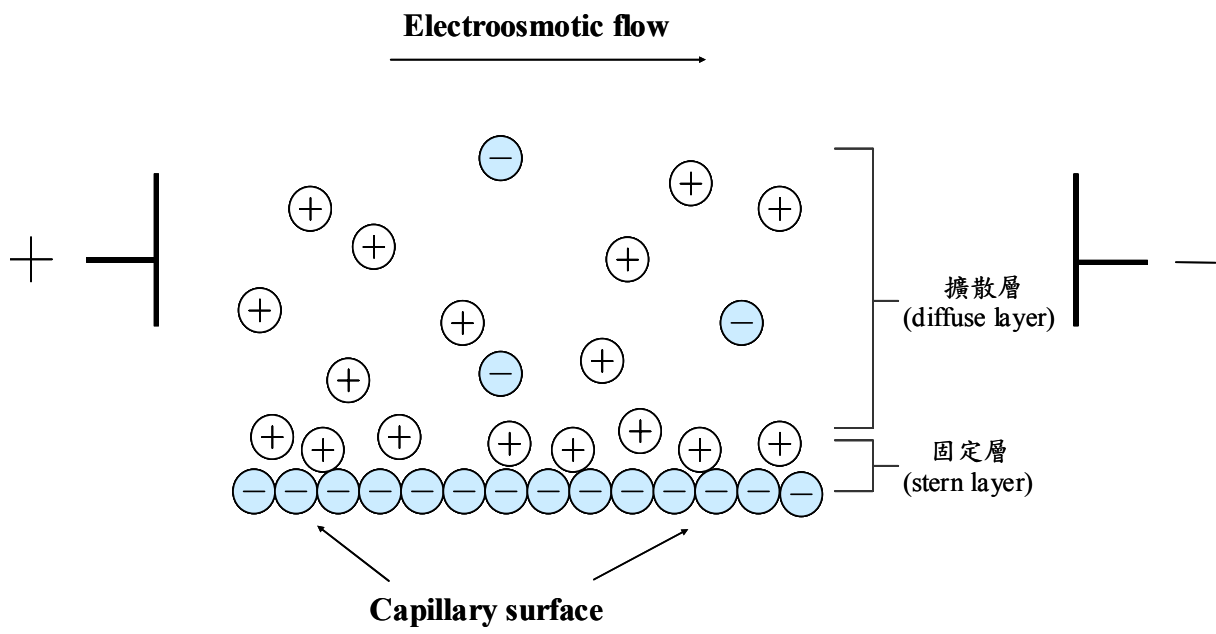
$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \mu_{eo} \cdot \frac{V}{L} \quad (2)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \quad (3)$$

v_{eo} ：電滲流遷移速度

μ_{eo} ：電滲流淌度(electroosmotic mobility)

ε ：緩衝溶液的介電常數



(圖二) 電滲流^[19]

ζ : 管壁電雙層中的 Zeta 電位

η : 緩衝溶液的黏度

Zeta 電位主要是由毛細管表面電荷所決定的。由於電荷量受 pH 控制，電滲流的大小也隨 pH 變化。在高 pH 下，毛細管內壁-SiOH 大量解離，電滲流隨之增加。

電滲流是利用電驅動管內液體流動方式，其毛細管各處的流速幾乎都一樣，流動層面具有平面流型的特性。然而，其他管柱層析法以壓力帶移動相，會因管壁的摩擦力及剪切力而產生層流(laminar flow)，造成區帶變寬、解析度降低。由於電滲流對區帶變寬的影響極微，所以毛細管電泳之管柱效率相當的好。一般而言，毛細管電泳中電滲流的速度要比正、負電離子的電泳遷移速率還要快的多，因此在電泳過程中不論是正、負電離子或是中性物質都會隨著電滲流的遷移而流出毛細管。其中，帶正電的離子物質最快流出管柱，中性物質次之，而後帶負電離子物質最慢。

毛細管內的樣品離子，會因為本身的電泳淌度及電滲流的雙重影響下，產生一個淨移動速率 v ，以式(4)表示^[15]：

$$v = v_e + v_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo}) \cdot \frac{V}{L} \quad (4)$$

v : 電泳淨速度

毛細管電泳樣品離子在管中所移動的時間(t)，以(5)式表示^[13]：

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L^2}{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot V} \quad (5)$$

t：樣品離子在毛細管中之遷移時間

L：毛細管之有效長度

毛細管電泳之分離效率可由式(6)及式(7)表示理論板數(N)：

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\delta^2} = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot V}{2D} \quad (6)$$

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t}{W_{1/2}}\right)^2 \quad (7)$$

N：理論板數(分離效率)

H：理論板高

δ^2 ：變異(variance)

D：樣品離子在溶液中的擴散係數

$W_{1/2}$ ：波峰半高寬

而毛細管分離的解析度，則可以式(8)表示^[13]：

$$R = 0.177 \cdot (\Delta\mu) \cdot \left[\frac{V}{D(\mu + \mu_{eo})} \right]^{1/2} \quad (8)$$

R：解析度

$\Delta\mu$ ：兩種離子之電泳移動度差

V ：施加電壓

μ_{eo} ：電滲流移動度

$\bar{\mu}$ ：兩種離子之平均電泳移動度

由式(8)可知，對陰離子而言，遷移方向與電滲流相反， $\bar{\mu}$ 與 μ_{eo} 正負相反時分母較小，此時解析較大，而最大解析度發生在電滲流約等於陰離子的平均移動速率，即 $|\bar{\mu}| \approx |\mu_{eo}|$ ，可得到最大的解析度，但需要較長的時間才會達成^[2,13]。對陽離子而言，因移動方向與電滲流相同，解析度下降，可以藉由提高分離電壓、增減毛細管長度，或將毛細管管壁改性來改善解析度^[13]。

3. 毛細管電泳進樣方式

在毛細管電泳中最常使用的進樣方式為以下兩種：

流體力學進樣(hydrodynamic injection)可分為三種形式；壓力(pressure)、吸力(suction)及重力(gravity)。其導入形式分別利用外加壓力、真空引力及高度差將樣品送入毛細管內，這類進樣方式不受樣品基質的影響。注射的進樣量可由式(9)表示^[15]：

$$V = \frac{\rho g \Delta h \pi r^4 t_i}{8 \eta L} \quad (9)$$

ρ ：樣品溶液的密度

g ：重力加速度常數

Δh ：注射高度與出口端高度差

t_i ：注射時間

η ：樣品溶液的黏滯係數

L ：毛細管總長度

電動進樣^[20](electrokinetic injection)是將毛細管的入口端和電極由緩衝溶液中置換置樣品瓶內，並施加電壓一段時間，使樣品以離子遷移與電滲流的推動下而進入毛細管內，其進樣量以式(10)表示^[21]：

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{EOF})\pi r^2 V t C_i}{L_t} \quad (10)$$

r ：毛細管內半徑

V ：注射電壓

t ：注射時間

C_i ：樣品濃度

L_t ：毛細管內總長度

電動進樣較常用於毛細管中有黏滯性的介質或凝膠，最大缺點為樣品的進樣量會因為分析物電泳遷移度的不同而不同，造成樣品注入量的差異，因此遷移速度快離子的進樣量比遷移速度慢離子的進樣量多一些。此外，還有幾種模式，為分液注射器^[22] (split-flow injector)、旋轉型注射器^[23] (rotary-type injector)、微注射器^[24] (microinjector)等。

4. 毛細管電泳的偵測方式

由於毛細管內徑約為 10-100 μm ，長度約為 40-100 cm，所承受的樣品量極少(<10 nL)，在微量分析上常常會遇到靈敏度不足的問題，所以在選擇一個高靈敏度的偵測方法是值得重視的一個方向。一般線上光學偵測(on-column optical detection)不需任何介面或外接偵測槽，所以可以避免因偵測器間隙體積(dead volume)而帶來的解析度降低現象，成為目前被廣泛使用的偵測模式，而線上光學偵測又以紫外/可見光吸收偵測法和螢光放射偵測法最為常見。另外，還有質譜偵測法(mass spectrometry ; MS)^[25-27]、電導度偵測 (conductivity)^[28,29]、化學放光(chemiluminescence)^[30,31]、二極體陣列(diode array detection ; DAD)^[32]等偵測模式。

4.1 紫外-可見光吸收(UV/VIS absorbance)偵測

紫外-可見光吸收偵測屬於線上(on-column)的光學偵測法，由於毛細管內徑窄而導致偵測光徑短，根據比爾定律(Beer's law)，其UV吸收值也會降低，因此偵測靈敏度也就被限制，偵測極限約為 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ M。為了提升偵測靈敏度，可以藉由增長光徑來改善，像是將偵測視窗變形的的方式，如Z形容槽(Z-shaped flow cell)^[33,34]、氣泡狀容槽(Bubble cell)^[35,36]、多重反射式容槽(multiple reflection cell)^[37]或矩形毛細管(rectangular capillary)^[38]等。另外，在偵測視窗外塗上一層反光物質，利用入射光在管壁內反射的效果來增加光徑^[39]。此外使用雷射作為光源，進行雙光束(double-beam)校正背景雜訊的直接^[40]或間接^[41]紫外-可見光吸收偵測，可有效提升此系統的靈敏度和應用範圍。紫外-可見光吸收偵測其儀器價格便宜並且操作簡單，適用分析物範圍廣泛，所以它仍是目前最普遍的偵測方法。

4.2 螢光偵測

螢光偵測法為目前線上光學偵測中最靈敏的偵測方法。螢光是一種能量釋放的現象，當一個適當波長的光照射具有螢光性質的分子，分子會吸收光的能量而被激發到高能量狀態，在極短時間($10^{-8} \sim 10^{-4}$)秒內，分子回復低能量狀態，同時以光的形式釋放能量，此即為螢光。依照激發光源可分為傳統光源激發螢光及雷射激發螢光兩大類。

4.2.1 傳統光源激發螢光(Conventional Lamp Induced Fluorescence)

傳統光源激發螢光應用於毛細管電泳中，最早於 1981 年由 Jorgenson 和 Lukacs^[42] 提出，以汞弧燈為光源，常用的傳統光源有汞、氙、氬、鎢等電弧燈，這些光源發射出連續光能，以濾光片分離出所需波長，再聚焦於毛細管內，來激發分子，使其產生螢光，然而光線不易聚焦，且須經由濾片來選擇波長，往往造成入射光強度大幅減弱，同時影響到靈敏度，其偵測極限約在 $10^{-5} - 10^{-8}$ M 左右。

4.2.2 雷射激發螢光(Laser Induced Fluorescence, LIF)

雷射具有高強度、同調性(coherent)且易聚焦的特點，所以容易用透鏡將光聚焦於毛細管上，毛細管電泳搭配雷射激發螢光法(CE-LIF)於 1985 年由 Zare 提出^[43]，以 325nm He-Cd 雷射利用透鏡直接聚焦於毛細管上，激發 dansylated amino acids 的螢光，其偵測極限可達 10^{-15} mole。

初期因雷射波長選擇受限制，但隨著雷射介質(laser medium)種類的增加，已有多種不同波長的雷射光可供選擇，使得雷射應用更為廣泛。而在常用的雷射光源為氫離子雷射、氬鎘雷射、氬氬雷射和半導體雷射等。

在自然界中存在的天然螢光性質的物質不多，以雷射激發螢光作為偵測時，分析物須具有螢光性質，若分析物不具螢光性質則需與發光團之染料分子結合進行衍生反應，使其形成具螢光性的衍生產物，以利進行螢光

偵測。衍生化反應分為管柱前衍生化反應(pre-column derivatization)、管柱內(on-column derivatization)和管柱後(post-column derivatization)衍生化反應三種方式^[44]。管柱前衍生為最常見的一種衍生方式，其優點為，不需改變毛細管電泳儀器裝置、有較彈性的反應時間及條件、操作容易，但選用衍生試劑仍須考慮衍生物的安定性、泳動速度的穩定性及衍生反應的完全性，在本實驗室中已有學長姐成功的以管柱前衍生化反應，應用於分析藥物^[45]、農藥^[46]、除草劑^[47]...等。管柱中和管柱後衍生皆以進行電泳的毛細管為反應槽，管柱中衍生化反應是將分析物於毛細管中同時進行衍生及分離，此方法適用於衍生反應時間很短暫或是衍生劑與分析物結合力很弱，為避免分離時結構被破壞時使用，其缺點為過量的衍生劑可能會干擾到分離，因此管柱中衍生化模式是較少使用的衍生方法。而管柱後衍生是先將分析物分離後再進行衍生，適用於衍生反應時間短且易分解的衍生產物，必須加入一個能允許螢光劑流入界面裝置，經過更改毛細管末端設計後，可能會產生較大的間隙體積及渦流而降低分離效率，而此衍生方法所使用的儀器也較為複雜且花費較高。

三、 保米黴素(Blasticidin S)與嘉賜黴素(Kasugamycin)

1. 簡介

台灣地處熱帶及亞熱帶區，屬海島型氣候，常年高溫多濕，成為病蟲孳生的溫床，使得農作物身受病蟲危害。早期農民多施用化學農藥，以降低病蟲害來確保收成與減少損失，長期使用下，造成病蟲害產生抗藥性、傷害非標的生物且破壞生態平衡，在安全與環境考量下，生物農藥(Biopesticide)^[48-50]是另一種選擇。生物農藥主要是利用昆蟲的蟲生病菌及植物病菌的拮抗菌等微生物，大量培養、量產後配製成類似農藥的劑型，相較化學農藥下，具有少量有效、分解快速、專一性高、環境汙染低等優點。

生物農藥包括蟲生病原性線蟲、細菌和病毒等微生物，植物衍生物和昆蟲費洛蒙等。其中鏈黴菌(*Streptomyces* spp.)^[51]可以產生各種物質的分解酵素及抗生物質的代謝物，此代謝物質可作為植物保護劑，由鏈黴菌產生的抗生素有鏈黴素、保米黴素、嘉賜黴素、放線黴素等。農藥使用最大量的地方，為水稻病蟲害防治，如稻熱病(rice blast; *Pyricularia oryzae* Cav.)^[52]。稻熱病為真菌類病原菌*Magnaporthe grisea*寄生所引起，發病率受氣候(溫度25~28°C，相對濕度90%以上)影響很大，病菌侵入組織後，以菌絲體在組織中生長蔓延，產生病斑並不斷形成分生孢子飛散於空氣中傳播病害，最後甚至全株枯死，全無收穫，影響稻米產量。

本研究將介紹保米黴素(Blasticidin S)與嘉賜黴素(Kasugamycin)，兩者皆屬於抗生素類之殺菌劑(antibiotic fungicide)，由下列表(一)列出保米黴素與嘉賜黴素基本型態(free base)性質^[53-60]。

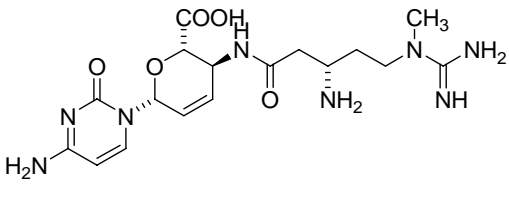
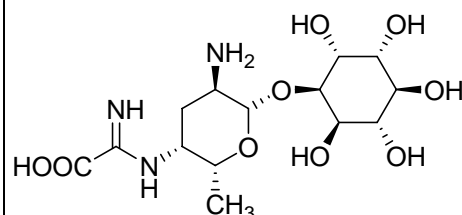
2. 保米黴素(Blasticidin S)

保米黴素是屬於核酸類抗生素，含有核酸類似物的衍生物，結構如表(一)所示，首次發現於1955年，由日本人Fukunaga^[61]從 *Streptomyces griseochromogenes* 的培養液中的抗生素物質，殺菌作用主要是影響病原菌絲蛋白質的合成^[56,57]，能抑制孢子萌發、菌絲的發育和孢子的形成，用於防治稻熱病^[62-64]，代謝產物為cytomycin及deaminohydroxy blasticidin-S^[54]。此外還具有抗病毒作用，對番茄、茄子、豆、煙草等有效。

3. 嘉賜黴素(Kasugamycin)

嘉賜黴素是屬於胺基糖苷類抗生素，由糖或胺基酸與其他分子結合而成，在1965年日本人Umezawa^[61]從放射菌 *Streptomyces kasugaensis* 的培養液中發現的抗生素物質，在植物體內具有遷移性，干擾細菌aminoacyl-tRNA與mRNA-30S、mRNA-70S核糖體結合，抑制病原細胞蛋白質的合成^[56,57]，於微酸條件下(pH=5)進行反應，中性條件下幾乎不反應，而稻米的葉子處微酸的環境，嘉賜黴素較保米黴素選擇性高^[56]，能有效抵抗稻熱病^[65,66]。

表(一) Blasticidin S 與 Kasugamycin 之基本型態(free base)特性^[53-60]

| 理 | 化學結構 | Blasticidin S | Kasugamycin |
|--------------------|-------------------|--|--|
| | |  |  |
| 化 性 | 分子量 | 422.4 | 379.4 |
| | 外觀 | 無色針狀結晶固體 | 無色針狀結晶 |
| | 溶點 | 235-236°C (分解) | 202-204°C (分解) |
| | 溶解度 | > 30g/L(水, 20°C) 不溶於有機溶劑 | 125g/L(水, 25°C) 微溶於甲醇 |
| | pKa | pKa ₁ 2.4 pKa ₂ 4.6 pKa ₃ 8.0 pKa ₄ >12.5 | pKa ₁ 3.23 pKa ₂ 7.73 pKa ₃ 11.0 |
| 作用 | 殺菌劑 | 殺菌劑 | |
| 劑型 | 乳劑 溶液 可濕性粉劑 | 溶液 可濕性粉劑 | |

4. 生物毒性

農藥的毒性可藉由動物試驗引起死亡劑量多寡，由半致死劑量(medium lethal dose)或半致死濃度(medium lethal concentration)推估對人體及非目標生物可能之危害。農藥對哺乳動物經口服、皮膚、呼吸毒性試驗之半數(50%)致死劑量毫克數用LD₅₀ mg/kg 表示，亦需考量眼刺激性試驗及皮膚刺激性試驗；在空氣中呈氣體狀或粉塵狀、或經由河流或湖水途徑暴露所造成半數(50%)受試動物致死濃度，則以LC₅₀ mg/l表示。表(二)為Blasticidin S 與Kasugamycin 鹽酸鹽類形態之生物毒性^[53-60]。

5. 食品中農藥的殘留管制

農藥直接散佈在蔬菜、茶、果實上，可依行政院農業委員會公佈之植物保護手冊^[67]所規定施用劑量，若使用不當，可能殘留於食品中，影響人體健康，因此針對農產品上的農藥殘留訂有殘留農藥安全容許量。表(三)各國殘留農藥安全容許量。台灣由衛生署食品衛生處公告殘留農藥安全容許量^[68]，Kasugamycin 在米類為0.04 ppm、核果類(芒果、龍眼、荔枝、枇杷等) 為0.5 ppm，Blasticidin S因安全性高，得免訂容許量，毋需檢驗其殘留量；美國環境保護局(EPA) ^[69]對Kasugamycin蔬果類(Group 8)殘留量為0.04 ppm；中國植保植檢網^[70]對Kasugamycin和Blasticidin S糙米殘留量為

表(二) Blasticidin S 與 Kasugamycin 鹽酸鹽類形態之生物毒性^[53-60]

| 殺菌劑 | | | Blasticidin S | Kasugamycin |
|------------------|----------------|-------------|--|--|
| 生物毒性 | | | | |
| 哺 乳 動 物 | 鼠 (雌/雄) | 口服 | rats LC ₅₀ : (56.8/55.9 mg/kg) mice LC ₅₀ : (51.9/60.1 mg/kg) | rats、mice LC ₅₀ >5000 mg/kg |
| | | 皮膚/眼睛 刺激 | rats LC ₅₀ >500 mg/kg 對眼睛有嚴重刺激性 | — |
| | 兔子 | 皮膚/眼睛 刺激 | — | LC ₅₀ >2000 mg/kg 對眼睛沒有刺激性 |
| 鳥類 | | | — | LD ₅₀ > 4000mg/kg |
| 魚類 | | | LC ₅₀ >40 mg/L (48 h) | LC ₅₀ >40 mg/L (48 h) |
| 蜜蜂 | | | — | LD ₅₀ >40 µg/bee |
| 水中生物 | | | LC ₅₀ >40 mg/L (3 h) | LC ₅₀ >40 mg/L (6 h) |

表(三) 各國殘留農藥安全容許量

| 國家 | 作物類別 容許量(ppm) | | Ref. |
|----|---------------|---------------------|---------|
| | Blasticidin S | Kasugamycin | |
| 台灣 | 免定容許量 | 米類 0.04 蔬果類 0.5 | [68] |
| 美國 | — | 蔬果類 0.04 | [69] |
| 中國 | 米類 0.05 | 米類 蔬果類 0.04 | [70] |
| 日本 | — | 米類 蔬果類 0.04 茶 | [71,72] |

0.04與0.05 ppm、Kasugamycin蔬果類殘留量為0.04 ppm；日本厚生勞動省^[71,72]對Kasugamycin米類、蔬果類、茶的殘留量為0.04 ppm，在水質上並沒有對兩者規定其殘留量。

6. 分析方法

早期以生物鑑定(bioassay)為主要分析，Blasticidin S 及 Kasugamycin 的產物分析分別為 *Bacillus cereus* 生物鑑定法^[53,57] 及 *Pseudomonas fluorescens* 鑑定法^[53,57]，而Blasticidin S 及 Kasugamycin 的殘留分析分別為 *Fulvia fulva* 生物鑑定法^[53,57] 及 *Pyricularia oryzae* 鑑定法^[53,57]，但生物鑑定法因微生物本身對藥劑的選擇性有限，無法有效鑑定藥物的真偽、成份及含量，且步驟繁瑣、耗時、再現性不佳。

在層析方法中，氣相層析 (gas chromatography, GC) 不適用於 Blasticidin S 與 Kasugamycin 分析，因兩者熔點太高而難以氣化，常用分析方法為高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC) 和毛細管電泳(Capillary Electrophoresis, CE)。目前行政院農業委員會公告 Blasticidin S^[74] 及 Kasugamycin^[75] 的標準檢驗方法是以高效液相層析儀配合UV偵測器監控有效成分。過去文獻報導中，以高效液相層析搭配 photodiode array 偵測器^[76] 鑑定市售農藥中 Blasticidin S 的含量，偵測極限

為0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；毛細管電泳結合UV偵測器測定 Blastacidin S^[77,78]及 Kasugamycin^[78,79]含量，偵測極限分別為0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與0.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而往後利用高效液相層析與毛細管電泳搭配UV偵測器^[80]來測定 Kasugamycin，並且說明兩種方法結果一致、方法可靠，但兩種各有優點，在分離方面，毛細管電泳的理論板數遠超過高效液相層析，定量上高效液相層析則較毛細管電泳優越。

Blasticidin S 與 Kasugamycin 具有特殊的抗菌活性，為農、醫兩用抗生素，文獻中利用生物鑑定法檢測^[81]Blasticidin S 於穀物、土壤，偵測極限為0.05 ppm，也曾以高效液相層析搭配光度計^[82]分析Blasticidin S於人體血液、尿液，偵測極限為2 pmol，兩者皆由於真實樣品基質複雜會干擾分析，需要繁瑣的前處理步驟去除干擾物。Blasticidin S 與 Kasugamycin在農業、生物醫藥^[83-90]上持續發展，對於提高萃取兩分析物產量從有機合成或培養液也有相關文獻^[91,92]。

四、研究動機

農藥是保護農林作物的藥劑。在普遍使用下，有小部分留在作物上，大部分進入環境中。而環境中的農藥，會經由大雨流入河川，污染水源破壞生態平衡。過去使用生物鑑定法只能藉著細胞成長量來判定，無法確定分析物的含量，且變因不易控制、步驟繁瑣，而毛細管電泳相較於高效液相層析具

有分離效率高、樣品量少、操作簡單等優點，本實驗室也曾利用毛細管電泳
搭配氬離子雷射激發螢光偵測法分析 Kasugamycin 及 Blasticidin S，以
6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)^[46]進行管柱前衍生，需2個衍生
小時。本研究建立一套簡單快速的分析方法，利用毛細管電泳搭配氬-鎘雷
射激發螢光偵測技術於抗生素類之殺菌劑 Blasticidin S 及 Kasugamycin
以 naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) 衍生，應用於地下水中的分析。

貳、儀器設備與實驗方法

一、藥品

1. 保米黴素： $(C_{17}H_{26}N_8O_5 \cdot HCl)$, Blasticidin S hydrochloride), MW = 458.9
生工有限公司 (台北; 台灣), 純度 $\geq 98\%$ 。
2. 嘉賜黴素： $(C_{14}H_{25}N_3O_9 \cdot HCl)$, Kasugamycin hydrochloride), MW = 415.9
, Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA) 產品。
3. NDA： $(C_{12}H_8O_2)$; Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde) Molecular Probe 公
司 (Eugene, OR, USA) 產品, 純度 97%。
4. 硼酸鈉： $(Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O)$; di-sodium tetraborate decahydrate) E. Merck
公司 (Darmstadt, Germany) 產品, 純度 99.0%。
5. 十二烷基硫酸鈉： (SDS) ; sodium dodecyl sulfate; $C_{12}H_{25}NaO_4S$): Aldrich
公司 (Milwaukee, WI, USA) 產品, 純度 98%。
6. 氰甲烷： (ACN) ; acetonitrile, C_2H_3N , E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品, HPLC 級試藥。
7. 甲醇： (CH_3OH) ; Methanol), E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany) 產品,
HPLC 級試藥, 純度 99.9%。
8. 氰化鉀： (KCN) ; Potassium cyanide), E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品, 分析級試藥, 純度 97.0%。

9. 氫氧化鈉：(NaOH ; sodium hydroxide) , TEDIA 公司(Fairfield, Ohio, USA)產品，分析級試藥，純度 98.5 %。
10. 鹽酸：(HCl ; Hydrochloric acid) , E. Merck 公司(Darmstadt, Germany) 產品，分析級試藥。

二、儀器設備

1. 氦鎘雷射裝置：Melles Griot Laser Group 公司(Carlsbad, CA, USA)產品，Model 4056-S-A01，功率 17mW。
2. 高壓電源供應器：Gamma 公司 (Ormond Beach, FL, USA) 產品，Model RR30-1P，提供電壓 0~30 kV，電流 5 mA。
3. CE/LIF 偵測室裝置：實驗室自行組裝，所用元件
 - 3.1 三稜鏡：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，Model E43498。
 - 3.2 聚焦鏡：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，Model D45079，聚焦為 1.4 cm。
 - 3.3 10 倍顯微接物鏡：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，Model D43903。
 - 3.4 455 nm cut-off filter：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，Model 144941。
 - 3.5 500 nm 干涉濾片：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，有效帶寬 10 nm。
 - 3.6 反射鏡：Edmund Scientific 公司，(Barrington, NJ, USA)產品，Model D33502。

- 3.7 光電倍增管(PMT)：Hamamatsu 公司(Bridge Water, NJ, USA)產品，
Model R-928，電源供應器，Model HC 123-01。
4. 數據處理系統：Window 98 作業系統，相容 586 個人電腦，配合宏濬儀器有限公司(台北，台灣) peak-ABC 積分軟體。
5. 數據介面：peak-ABC，宏濬儀器有限公司(台北，台灣)產品。
6. 穩壓器(AVR)：聯達公司(台中，台灣)產品，Model AVR 1000W-R
Electromagnetic Interference (EMI)，電子式交流穩壓器，其輸入電壓 90
~125V 50/60Hz，輸出電壓 110V 50/60Hz。
7. 不斷電系統(UPS)：Phoenixtec 公司(台北，台灣)產品，Model C-1000。
8. 注射器濾膜：Millipore 公司(Billerica, MA, USA)產品，Nylon 材質，
孔徑大小 0.25 μ m。
9. 超純水機(deionization ultrapure system)：系 Millipore 公司(Billerica, MA,
USA)產品，Model：ZRQS6005Y。
10. 超音波震盪器：Branson 公司(Danbury, CT, USA)產品，Model 2510-
DTH。
11. 震盪器：Thermolyne 公司(USA)產品 Model M37615。
12. 酸鹼度計：Suntex 公司(台北，台灣)產品，Model SP-701。
13. 天平：日本 A&D 株式會社(Tokyo, Japan)產品，Model GR-202。

14. 毛細管：Polymicro Technologies 公司(Phoenix, AZ, USA)產品，Model TSP-050375t，熔融矽材質，內徑 50 μm ，外徑 360 μm ，外覆 polyimide。

三、實驗方法

1. 毛細管處理及使用方式

取一段 50 cm，內徑 50 μm 、外徑 360 μm 之毛細管，於進樣端 30 cm 處使用火焰將毛細管外塗佈的 polyimide (聚亞醞胺) 燒製約 0.5 cm，用試鏡紙沾取 HPLC 級甲醇溶液擦拭出一透明視窗，此為雷射激發螢光的偵測窗。毛細管在每次實驗前先去離子水、電泳緩衝溶液沖洗，並於適當電場下平衡等待實驗進行，為確保毛細管柱於每次實驗進樣時的再現性，在每次實驗後以去離子水將殘留於毛細管中的電泳緩衝溶液徹底洗淨，再用適量分析極 ACN 溶液清洗，並將毛細管兩端存放於裝有去離子水的瓶中。

2. 藥品配製

a. 電泳緩衝溶液配製

秤取適量 SDS、硼酸鈉粉末，以去離子水配製成 40 mM 硼酸鈉 + 12 mM SDS 溶液，並以 1 M HCl 調整至 pH 為 9，每次實驗電泳緩衝溶液皆須重新配製。

b. 衍生緩衝液配製

秤取適量硼酸鈉粉末，以去離子水配製成 150 mM 硼酸鈉溶液並調整 pH 至 8 備用。

c. Blasticidin S 及 Kasugamycin 配製

秤取適量粉末，以去離子水溶解配製成 1 mM 的儲存溶液，放置於冰箱 4 °C 冷藏，保存三個星期，實驗時依需要用去離子水稀釋至所需的濃度。

d. 衍生劑 NDA

秤取適量的 NDA 粉末，以 ACN 為溶劑配製成 2 mM 溶液，藥品對光敏感，需以鋁箔紙包住樣品瓶保存於 4 °C 冰箱中備用。

e. KCN 溶液配製

秤取適量 KCN 粉末，以 150 mM 硼酸鈉(pH=8)緩衝溶液溶解配製成 4 mM，保存於冰箱 4 °C 內，此為 CN⁻ 衍生反應中離子的來源。

3. 真實樣品的配製

地下水來自東海大學 CH-404 實驗室，取 480 µl 地下水置於 1000 µl 微量離心管，加入 20 µl Blasticidin S 及 Kasugamycin 標準溶液(25 µM)，均勻混合後，經過孔徑 0.25 µm 濾膜過濾，製備成含有 1 µM Blasticidin S 及 Kasugamycin 的地下水樣品。

4. 衍生反應

取 80 µl 的標準溶液或地下水樣品於微量離心管中，加 10 µl 4 mM

KCN 溶液及 10 μ l 衍生劑 NDA，以鋁箔紙包住微量離心管並均勻混合後，在室溫下($25 \pm 1^\circ\text{C}$)於震盪器下反應 30 分鐘。

5. 進樣方式

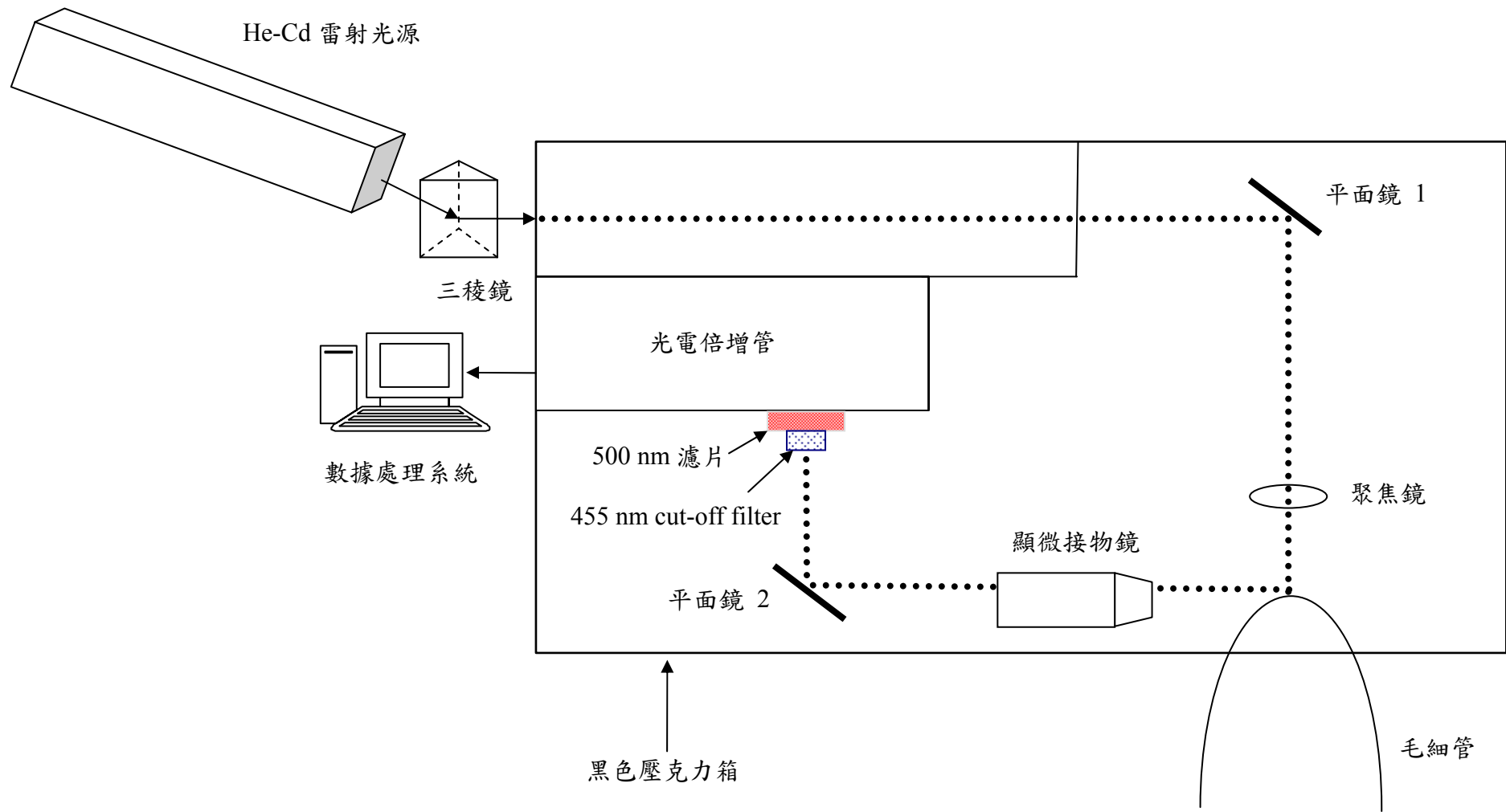
將置於正電極緩衝溶液瓶中之毛細管一端，以高度注射方式將毛細管抬高 18 公分，置入樣品瓶 10 秒，樣品會因虹吸現象進入毛細管前端，再將毛細管插回正電極緩衝液瓶中，提供高壓電場進行分離。

6. 毛細管電泳(Capillary Electrophoresis, CE)裝置

毛細管置於偵測系統裝置中，將偵測視窗對準雷射光徑，再將毛細管兩端由偵測系統裝置中拉出，使用注射器將電泳緩衝溶液注入毛細管中，使毛細管管柱內充滿電泳緩衝溶液，此時將毛細管兩端分別放入充滿電泳緩衝液溶瓶中，使其液面等高，分別於緩衝液瓶中各置入一白金電極，將高壓電源供應器連接到毛細管前端緩衝溶液瓶中之電極，而末端電極則連接至接地線，與高壓端形成一電流迴路。

7. 雷射激發螢光(Laser-Induced Fluorescence, LIF)偵測裝置

雷射激發螢光偵測系統細部的裝置如(圖三)，雷射光束先經過三稜鏡後射入一平面鏡反射 90 度，再經由一個焦距為 1.4 cm 的凸透鏡將光束聚焦於毛細管的偵測視窗上，於與雷射光束垂直位置架設一顯微接物



圖(三)雷射激發螢光偵測器內部元件構造^[93]

鏡接收樣品被激發所放射出的螢光，再經第二面平面鏡反射 90 度後，通過 455 nm cut-off 濾片及 500 nm 干涉濾片，以去除不需要的激發光與散射光，最後聚焦於 PMT 偵測器上，轉為電壓信號輸出後，透過電腦數據處理介面收集、紀錄，並做數據處理。而為了隔絕外界光線的干擾，LIF 裝置中所有光學元件均置於黑色壓克力箱中。

參、結果與討論

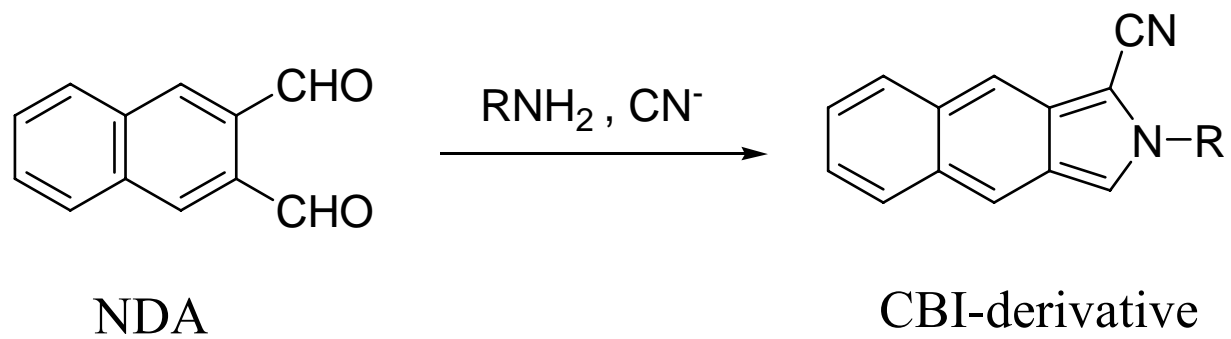
一、衍生反應條件之探討

1. 衍生反應

本研究利用毛細管電泳/氬-鎘雷射偵測系統時，分析物需具有螢光性質，Blasticidin S 及 Kasugamycin 皆為含有一級胺之化合物，不具螢光性質，因此選用 naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)作為衍生試劑與分析物進行衍生反應，由於 NDA 衍生後共振結構改變，衍生產物的最大吸收會往長波長方向移動，與氬-鎘雷射激發波長(442nm)相近。

NDA是於 1986 年首次由美國學者 Carlson^[94, 95]等人經由“Ried 和 Bodem”方法^[96]從 2,3-dimethylnaphthalene 合成而得的，NDA 與一級胺類的反應與其他螢光試劑非常類似，如 *o*-phthalaldehyde (OPA)、3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ)^[97]及 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinoline- carboxaldehyde (CBQCA)，在定量上也常用這些試劑，然而 OPA 的衍生產物在室溫下不穩定^[98]，FQ、CBQCA 試劑又相當昂貴，因此 NDA 常用來當做衍生試劑。

NDA 與一級胺反應，需在 CN^- 離子存在下，可形成 1-cyanobenz[*f*]isoindole (CBI) 衍生物。NDA 與一級胺化合物的衍生機制

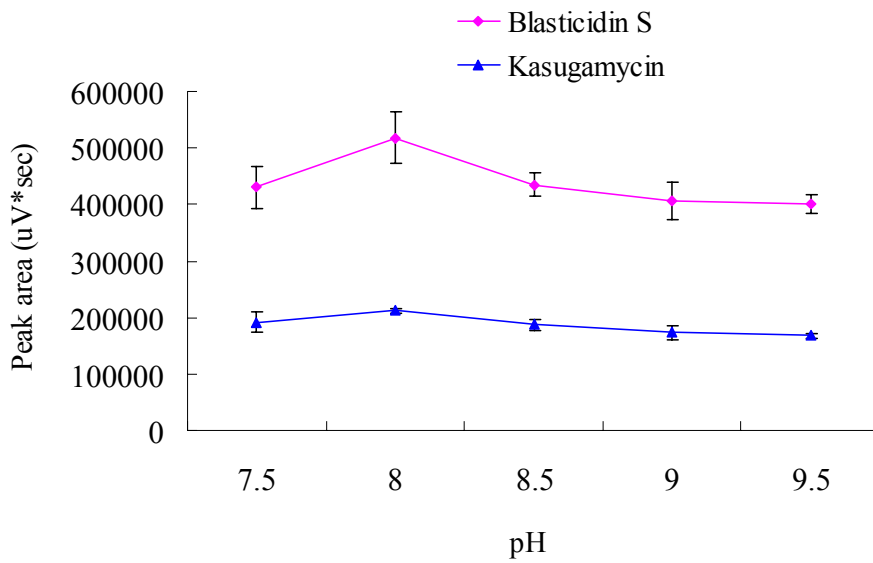


圖(四) NDA與一級胺化合物的衍生機制^[99]

見圖(四)^[99]。衍生過程需在鹼性環境下進行，使分析物結構上的胺基具有親核性，利用未鍵結電子對反應，而且KCN在鹼性的環境中不會轉變成毒性極高的HCN。

2. 衍生緩衝溶液 pH 之探討

本研究中首先探討衍生環境 pH 對於分析 fungicides 的影響，分別配製 pH 在 7.5~9.5 之間的緩衝溶液進行 NDA 與 Kasugamycin、Blasticidin S 衍生反應，NDA-fungicides 訊號面積隨衍生 pH 值變化，如圖(五)所示，趨勢上的每一點是經由注入樣品三次分析後(n=3)求平均而得，NDA 會與未質子化的胺基反應，而 Kasugamycin 和 Blasticidin S 結構上胺基的 pKa 分別為 7.7、8.0，當 pH 為 8.0 時，衍生分析物皆具有較好的訊號面積和強度，於是本研究選擇以 pH=8.0 作為衍生反應的 pH 值。



圖(五)衍生緩衝溶液 pH 值對訊號面積之關係圖

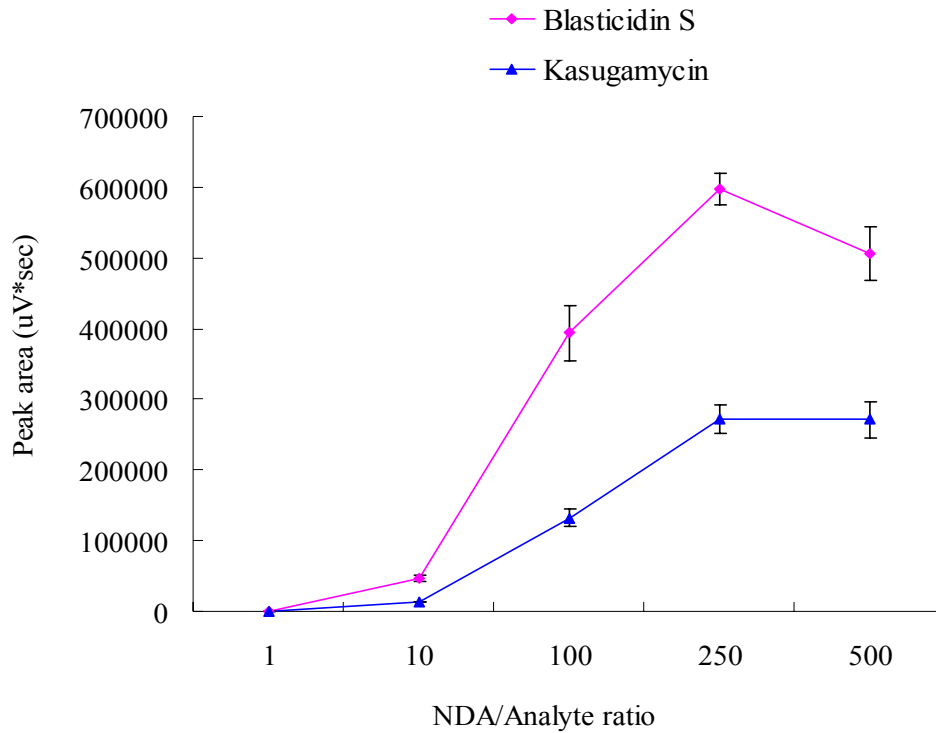
實驗條件：

- 衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 7.5 ~9.5
- 分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+10 mM SDS，pH 9.5
- 衍生時間：30 min
- 分離電壓：18 kV
- 衍生溫度：25 ± 1°C
- 分析物濃度：1 μM
- 進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec
- 毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)
- 每個點為重覆 3 次平均值(n=3)

3. 衍生試劑對分析物比例之探討

為了探討使用 NDA 為衍生試劑時，衍生產物 NDA-fungicides 是否達到最高的衍生率及反應是否完全，故針對衍生試劑對分析物樣品在不同比例下，分別進行衍生反應試驗。衍生試劑 NDA 與分析物的比為 1:1、10:1、100:1、250:1 及 500:1，衍生產物訊號面積與衍生比例之曲線顯示如圖(六)。

由實驗結果得知，NDA-Kasugamycin 衍生產物在衍生劑比例 1:1 ~ 250:1 時，螢光訊號隨著衍生劑比例增加而增強，衍生產物的產率也會隨之增加，當超過 250:1 之後，訊號面積已趨於平緩，推測可能是比例為 250:1，NDA 與 Kasugamycin 已完全反應，趨於飽和的狀態。而 NDA-Blasticidin S 衍生產物產率隨衍生試劑比例增加而增加，當衍生比例超過 250 時，螢光強度有下降的趨勢，推測的原因為當衍生劑過量時，衍生產物面積下降，文獻^[100]中指出 γ -aminobutyric acid (GABA) 也是以 NDA 衍生，GABA 訊號強度會隨衍生劑濃度增加而下降，這個原因不清楚，但可能是過量的衍生劑在衍生過程中形成其他產物或是偵測不到的產物所導致。由於 NDA 和 *o*-phthalaldehyde (OPA) 結構相似^[101]，當 OPA 過量時也會有類似的情況產生^[102]。在以下的實驗中，本研究將選擇衍生試劑與分析物比例為 250:1 (NDA 濃度為 2 mM) 為最佳的條件。



圖(六)衍生劑與分析物比例對訊號面積之關係圖

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+10 mM SDS，pH 9.5

衍生時間：30 min

分離電壓：18 kV

衍生溫度：25 ± 1°C

分析物濃度：1 μM

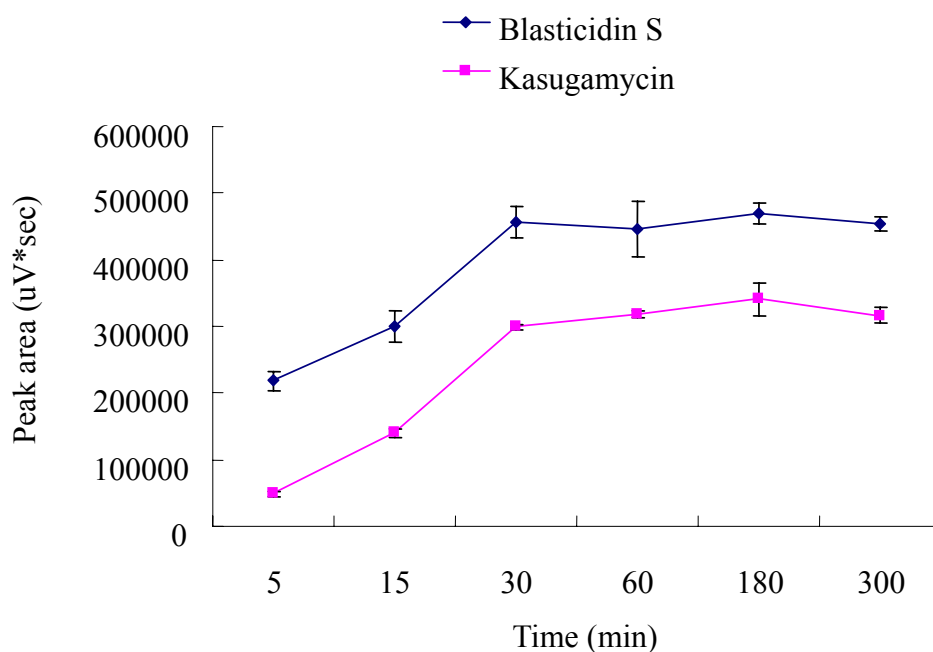
進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec

毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

每個點為重覆 3 次平均值(n=3)

4. 衍生時間之探討

探討衍生時間對於衍生效率的影響，本研究中以同一樣品進行持續 5~300 min 衍生，以 3 組(n=3)樣品在不同時間所得的訊號平均後，得到的關係圖如圖(七)所示，在衍生時間 5~30 分鐘時，衍生產物的訊號面積隨之增加，衍生時間在 30 分鐘時，已呈現最大的訊號面積，顯示出 Kasugamycin 和 Blasticidin S 皆可達到最佳的衍生效果，本研究以 30 分鐘為最佳的衍生時間。由實驗結果觀察出，衍生反應時間在 30~300 分鐘的曲線呈現一持平現象，表示經由 NDA 衍生後的分析物還可在室溫下室溫下穩定至少 4 個半小時，代表這兩種衍生產物在室溫下具有不錯的穩定性。



圖(七)衍生時間對訊號面積之關係圖

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+10 mM SDS，pH 9.5

衍生時間：5~300 min

分離電壓：18 kV

衍生溫度：25 ± 1°C

分析物濃度：1 μM

進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec

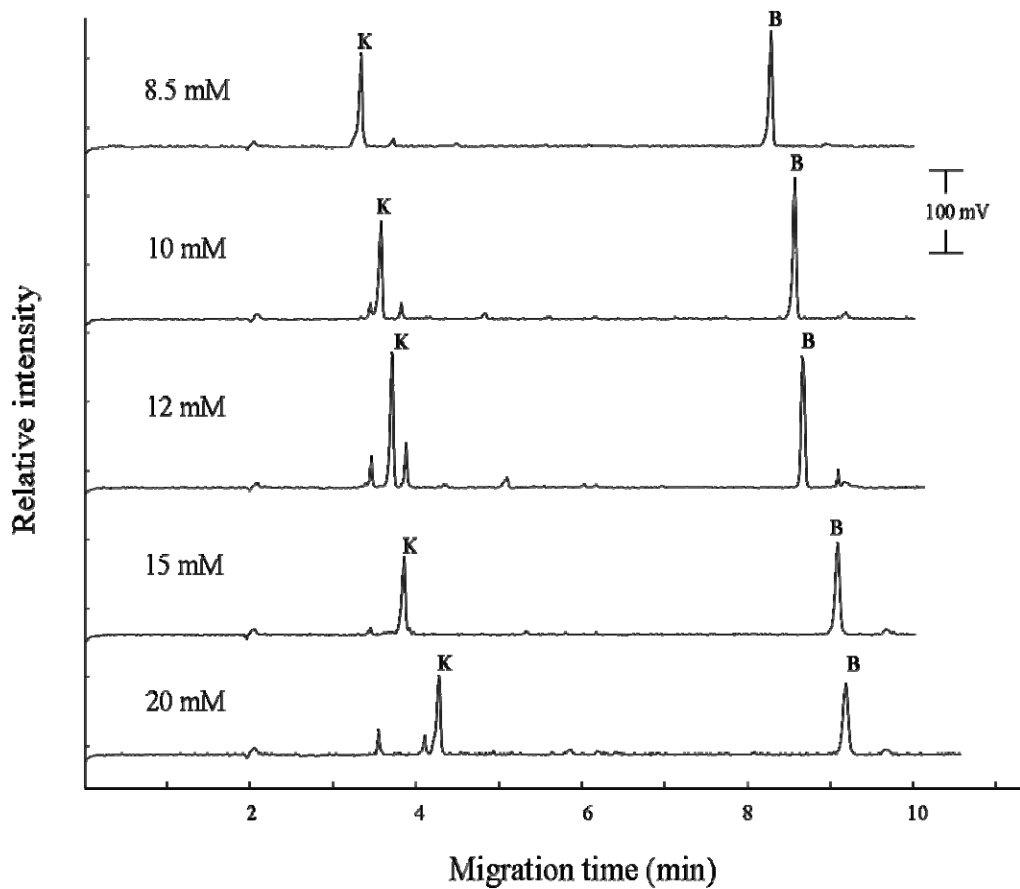
毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

每個點為重覆 3 次平均值(n=3)

二、分離條件之探討

1. SDS 濃度的影響

MEKC是在電泳緩衝溶液中加入界面活性劑，當界面活性劑高於臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)時，可形成微胞(micelles)，藉由微胞相與不同極性溶質分子作用力大小不同而達到分離。本實驗所選用MEKC常用的界面活性劑sodium dodecyl sulfate (SDS)，其臨界微胞濃度為 8.2 mM^[19]，本研究所探討的SDS濃度範圍為 8.5~20 mM，屬於MEKC模式的分離。隨著SDS濃度的增加，微胞聚集數目也會增加，而NDA-Kasugamycin與NDA-Blasticidin S結構中疏水性部分和微胞間的作用也會增強，因此NDA-Kasugamycin與NDA-Blasticidin S的遷移時間會隨著SDS濃度的增加而延長。實驗結果顯示於圖(八)，因為在SDS濃度為 8.5、10、15 及 20 mM時，發現NDA-Kasugamycin與衍生劑的背景信號分不開或太靠近，所以選擇 12 mM做為添加於緩衝液中界面活性劑之濃度。



圖(八)緩衝溶液中不同 SDS 濃度與殺菌劑之電泳圖

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+8.5~20 mM SDS，pH 9.5

衍生時間：30 min

分離電壓：18 kV

衍生溫度：25 ± 1°C

分析物濃度：1 μM

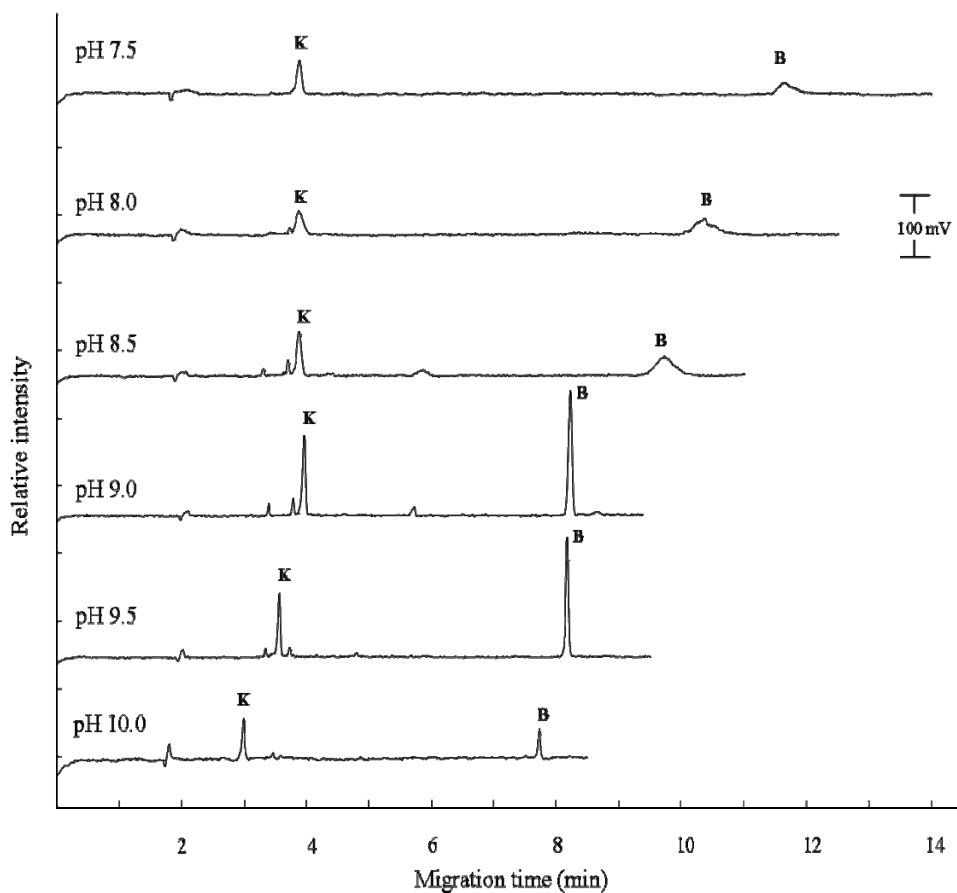
進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec

毛细管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

2. 電泳緩衝溶液 pH 值的影響

在毛細管電泳實驗中，電泳緩衝液pH會影響分析物的電荷量、電滲流的大小，為了達到理想的分離條件，選擇一適當的pH是必要的。本研究的電泳緩衝溶液為40 mM硼酸鈉及12 mM SDS所組成，分別配製成pH=7.5~10.0做探討。Blasticidin S (pKa:2.4、4.6、8.0及 > 12.5)與 Kasugamycin (pKa:3.2、7.7及11.0)在pH =7.5~10.0之間，兩分析物電荷總數趨近中性，在MEKC中，由溶質的極性大小來決定，由表(一)得知Blasticidin S 與 Kasugamycin結構，從結構中可看出Kasugamycin相較於Blasticidin S親水，因此Kasugamycin會比Blasticidin S上微胞的機率小，故Blasticidin S 與微胞的作用較強，所以Kasugamycin會比Blasticidin S較早被分離出來。

在低pH值下，Blasticidin S其中的一胺基pKa > 12.5，解離程度比在高pH值下少，整體結構上電荷總數趨近中性較為疏水，進微胞相機率高，使滯留時間增加，隨著pH值增加，解離程度增加，整體結構上電荷增加較為親水，進微胞的機率低，滯留時間減少。圖(九)為電泳緩衝溶液不同pH與殺菌劑的電泳圖，本實驗選用pH=9.0為最佳的電泳緩衝溶液pH值，由於在其他pH下，衍生劑訊號會與NDA-Kasugamycin重疊或太接近而影響分離。



圖(九)緩衝溶液 pH 值與殺菌劑之電泳圖

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+12 mM SDS，pH 7.5~10.0

衍生時間：30 min

分離電壓：18 kV

衍生溫度：25 ± 1°C

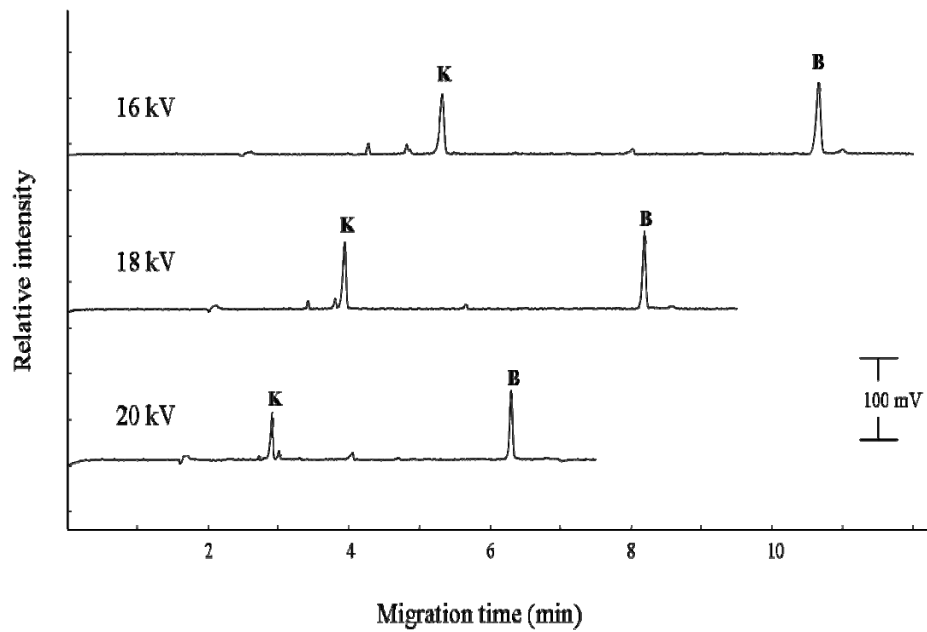
分析物濃度：1 μM

進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec

毛细管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

3. 電壓的影響

於電泳分離中，分離電壓的大小也是影響分離的重要因素，本研究將以分離電壓 16、18、20 kV 作評估，圖(十)為不同電壓下之殺菌劑的電泳圖，隨著電壓的增加，EOF 速度變快，導致分析物遷移時間隨之縮短，當電壓在 18 及 20 kV 時，可看出背景信號與 NDA-Kasugamycin 信號很靠近，本實驗因欲同時分析 Kasugamycin 和 Blasticidin S，因此選擇 16 kV 做為分離的電壓。



圖(十)電壓與殺菌劑之電泳圖

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+12 mM SDS，pH 9.0

衍生時間：30 min

分離電壓：16~20 kV

衍生溫度：25 ± 1°C

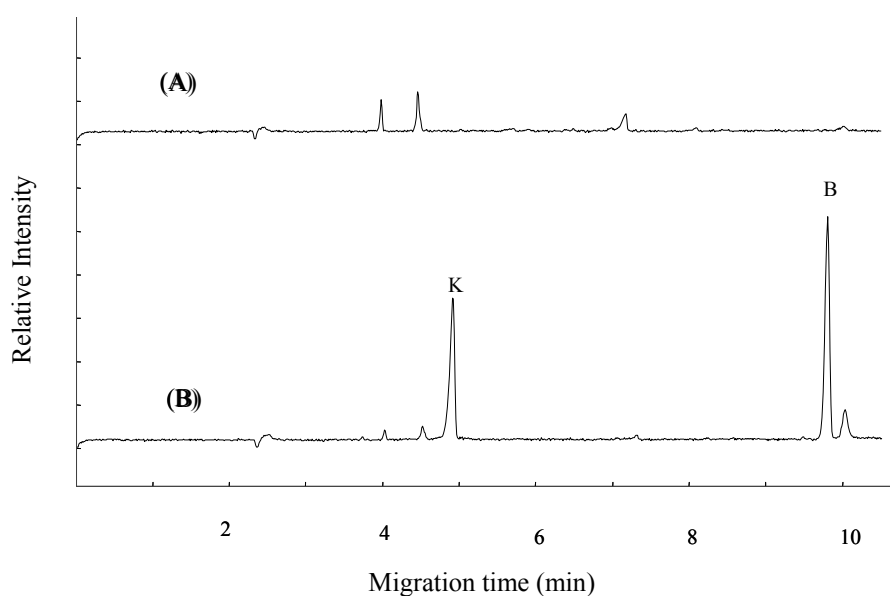
分析物濃度：1 μM

進樣方式：重力注射 18 cm，注射時間 10 sec

毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

三、最佳分析條件

綜合以上各分析參數的探討，歸納出以毛細管電泳搭配藍紫色氬-鐳雷射激發螢光偵測系統，藉由衍生試劑 NDA 濃度為 2 mM 與分析物 Blasticidin S、Kasugamycin 進行管柱前衍生反應，於室溫(25°C)下衍生 30 分鐘後，樣品以重力注射方式於高度 23 cm 下進樣 10 秒，注入毛細管中進行分析。使用的最佳分離條件為：緩衝溶液(pH=9)為 40 mM 硼酸鈉與 12 mM SDS 共同組成，分離電壓為 16 kV，毛細管規格為內徑 50 μm ，外徑 360 μm ，全長 50 cm，有效長度 30 cm，使用藍紫色氬-鐳雷射光源 (λ_{ex} : 442 nm; λ_{em} : 500 nm) 進行偵測。在最佳分析條件下得到所得到的電泳圖如圖(十一)。Blasticidin S 及 Kasugamycin 的遷移時間分別為 4.9 min 及 9.8 min，理論板數(N)為 130,331 及 30,287。



圖(十一)最佳分離條件之電泳圖(A)blank (B) 1×10^{-6} M標準溶液

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+12 mM SDS，pH 9.0

衍生時間：30 min

分離電壓：16 kV

衍生溫度： $25 \pm 1^\circ\text{C}$

進樣方式：重力注射 23 cm，注射時間 10 sec

毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

四、標準品中檢量線與偵測極限

將 Blasticidin S 和 Kasugamycin 配製好的溶液，混合後以去離子水稀釋至所需濃度，濃度為 75-5000 nM 進行檢量線製作，各樣品以重力進樣高度 23 cm 10 sec 方式注入毛細管中，每個濃度重複分析 3 次求平均，以訊號面積對濃度作圖。表(四)列出 NDA-fungicides 衍生產物的檢量線及相關數據。Blasticidin S 的線性範圍為 75-5000 nM (n=5)，相關係數(Correlation Coefficient, r)為 0.9998；Kasugamycin 的線性範圍為 75-5000 nM (n=5)，相關係數 0.9999。

偵測極限(LOD) 的定義以訊號/雜訊比(S/N)為 3 時所對應之濃度，水溶液中 Blasticidin S 和 Kasugamycin 的偵測極限分別為 33 nM 及 34 nM。圖(十二)說明殺菌劑在低濃度時與空白試驗(blank)的電泳圖不會有互相干擾的現象。

與過去曾以毛細管電泳結合UV偵測器測定 Blasticidin S^[77,78]及 Kasugamycin^[78,79]，偵測極限分別為 0.20 µg/mL (0.44 µM)與 0.51 µg/mL (1.18 µM)，與本研究方法比較，偵測極限較低且具有好的靈敏度。本實驗室也曾毛細管電泳結合氬離子雷射激發螢光偵測，利用 6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)來衍生Blasticidin S及Kasugamycin^[46]，偵測極限

表(四)標準品中檢量線、偵測極限及再現性

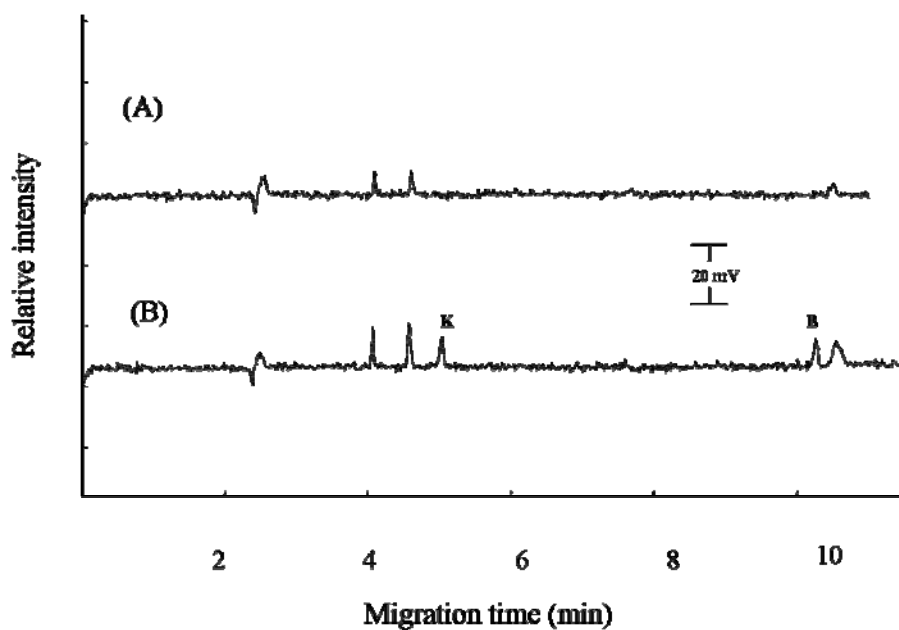
| Fungicides | Linear range (nM) (n=5) | Slope ^[a] | Intercept ^[a] | Correlation coefficient (r) | LOD ^[b] (nM) | RSD(%) | |
|---------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|-----------------------------------|
| | | | | | | Migration Time (n=7) ^[c] | Peak area (n=7) ^[c] |
| Blasticidin S | 75-5000 | 618 | 4257 | 0.9999 | 33 | 1.1 | 6.4 |
| Kasugamycin | 75-5000 | 565 | 5731 | 0.9999 | 34 | 1.0 | 4.0 |

[a] y 為訊號面積； x 為分析物濃度(nM)

Slope : ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}/\text{nM}$) ; Intercept : ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)

[b] The concentration LOD is evaluated by calculating the concentration at S/N=3.

[c] 500 nM Blasticidin S or Kasugamycin.



圖(十二)NDA-fungicides衍生產物電泳圖(A)blank (B) 7.5×10^{-8} M標準
溶液

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+12 mM SDS，pH 9.0

衍生時間：30 min

分離電壓：16 kV

衍生溫度： $25 \pm 1^\circ\text{C}$

進樣方式：重力注射 23 cm，注射時間 10 sec

毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

分別為 1.6 和 2.5 nM，與本研究方法比雖具有較好的靈敏度，但衍生時間需要 2 個小時。

五、再現性

為了探討此分析方法之再現性，將含有 500 nM 的 Blasticidin S 及 Kasugamycin 與 NDA 進行衍生後，於最佳分析條件下，以 23 cm 重力注射 10 sec 的方式連續分析七次，來測試此分析方法之重現性，所得數據結果如表(四)所示，Blasticidin S 和 Kasugamycin 遷移時間標準偏差(RSD)分別為 1.1 %和 1.0 %，訊號面積標準偏差分別為 6.4 %和 4.0 %。

六、真實樣品之檢測

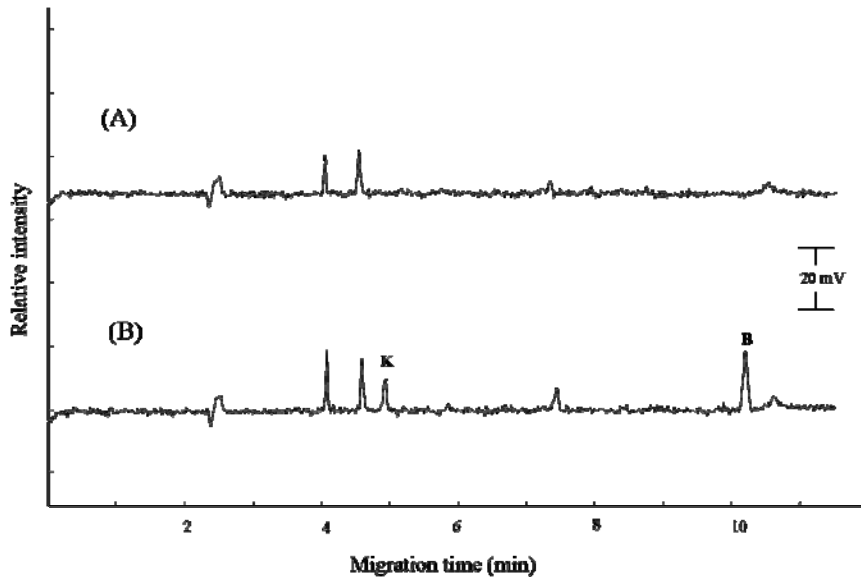
為了確立本方法的實用性，將以上述最佳分析條件應用於偵測地下水中 Blasticidin S 和 Kasugamycin 的含量。水樣來源為東海大學化學系所使用的地下水作為真實樣品。

取 480 μ l 未處理過的地下水置於 1000 μ l 微量離心管，再添加 20 μ l Blasticidin S 及 Kasugamycin 標準溶液，均勻混合後，經過孔徑 0.25 μ m 濾膜過濾，製備成含有 Blasticidin 及 Kasugamycin 的地下水樣品。

取 80 μ l 處理過的地下水置於 500 μ l 微量離心管，以鋁箔紙包住

微量離心管後添加 10 μ l 4 mM KCN 溶液及 10 μ l 衍生劑 NDA 並均勻混合，在室溫下($25 \pm 1^\circ\text{C}$)於震盪器下反應 30 分鐘。經衍生後的樣品以重力注射 10 sec 方式將樣品注入毛細管中，提供 16 kV 的電壓進行電泳分離。

地下水電泳圖顯示於圖(十三)，由圖譜顯示未添加分析物標準品的空白試驗電泳圖裡無干擾訊號，因此分析方法可應用於地下水中的 Blasticidin S 和 Kasugamycin 分離。



圖(十三)地下水分析(A)地下水 blank

(B)添加 8×10^{-8} M 標準液之地下水樣品

實驗條件：

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH 8.0

分離緩衝溶液：硼酸鈉 40 mM+12 mM SDS，pH 9.0

衍生時間：30 min

分離電壓：16 kV

衍生溫度： $25 \pm 1^\circ\text{C}$

進樣方式：重力注射 23 cm，注射時間 10 sec

毛細管規格：全長 50 cm (有效長度 30 cm)

1. 地下水樣品中的檢量線與偵測極限

依真實樣品之地下水配置(p.33)製作出地下水之檢量線，結果顯示於表(五)，Blasticidin 及 Kasugamycin 線性範圍為 80-5000 nM 之間，相關係數(Correlation Coefficient : r)分別為 0.9992 及 0.9980，以訊號/雜訊比(S/N)為 3 所對應的濃度定義為偵測極限，所得偵測極限為 23 nM 與 38 nM。

2. 回收率試驗

為了探討地下水樣品經前處理步驟後，分析物損耗的情形，對 Blasticidin S 及 Kasugamycin 進行回收率試驗，所得到的回收率為 94.47~103.60%，依據 Validation and Qualification in Analytical Laboratories 中 AOAC(分析化學家協會)^[103] 的規定，在本試驗所用的濃度回收率須在 80-110%之間，實驗結果皆在此範圍內。地下水分析之回收率結果列於表(六)。

表(五)地下水檢量線

| Fungicides | Linear range (nM) | Slope^[a] | Intercept^[a] | Correlation Coefficient (r) | LOD^[b] (nM) |
|-------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|
| Blasticidin S | (n=5) 80-5000 | 829 | 1046 | 0.9992 | 23 |
| Kasugamycin | (n=6) 80-5000 | 422 | 1050 | 0.9980 | 38 |

[a] : y 為訊號面積； x 為分析物濃度(nM)

Slope : ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}/\text{nM}$) ; Intercept : ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)

[b] : The concentration LOD is evaluated by calculating the concentration at S/N=3.

表(六)地下水中殺菌劑之回收率

| Fungicides | Concentration (μM)^[a] | Found (mean±SD^[b]) | Recovery(%) | RSD(%)^[c] | n^[d] |
|-------------------|---|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| Blasticidin S | 0.50 | 0.47±0.02 | 94.47 | 3.17 | 3 |
| Kasugamycin | 0.50 | 0.52±0.02 | 103.60 | 3.39 | 3 |

[a]濃度為地下水原始濃度

[b] SD (standard deviation)

[c] RSD (relative standard deviation)

[d]每個濃度測三次

3. 分析方法確效試驗

分別以 0.25 μM 與 2.50 μM 濃度，進行 Within-Day (n=3) 與 Day-Day (5days, n=15) 的重現性試驗，表(七)所顯示之相對標準偏差 (RSD) 是利用單因子變異數分析 (ANOVA) 計算而得，結果如表(八)所示。檢液濃度由檢量線算出後，再以單因子變異數分析 (ANOVA) 計算 Within-Day 與 Day-Day 是否有差異。在 95% 信心程度下，Blasticidin S 的 F 值介於 0.55~2.94，而 Kasugamycin 的 F 值介於 0.62~1.19，兩者在低、高濃度下皆比臨界值 3.48 小，因此證明不同天進行分析無顯著的差異性。而 Blasticidin S 的 Within-Day 與 Day-Day 的相對標準偏差範圍分別為 4.20%~6.26% 與 3.12% ~10.73%，Kasugamycin 的 Within-Day 與 Day-Day 的相對標準偏差範圍分別為 5.85% ~7.09% 與 5.62% ~6.38%，由 Validation and Qualification in Analytical Laboratories^[104] 中建議，環境或食物樣品的 RSD 需在 20% 內，實驗結果皆落在此範圍。

表(七)地下水中殺菌劑同日間與異日間之精密度

| Fungicides | Concentration (μM) | Precision (RSD%) | |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | Within-Day ^[a] | Day-Day ^[b] |
| Blasticidin S | 0.25 | 6.26 | 10.73 |
| | 2.50 | 4.20 | 3.12 |
| Kasugamycin | 0.25 | 7.09 | 5.62 |
| | 2.50 | 5.85 | 6.38 |

[a] n=3

[b] n=3*5(5 days, n=15)

表(八)單因子變異數分析結果

地下水中 Blasticidin S 原始濃度 0.25 μM

| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
|----|----------|-----|----------|------|-----------|------|
| 組間 | 2.61E-03 | 4 | 6.52E-04 | 2.94 | 7.57 E-02 | 3.48 |
| 組內 | 2.22E-03 | 10 | 2.22E-04 | | | |
| 總和 | 4.83E-03 | 14 | | | | |

地下水中 Blasticidin S 原始濃度 2.50 μM

| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
|----|----------|-----|----------|-------|-------|------|
| 組間 | 2.50E-02 | 4 | 6.25E-03 | 0.554 | 0.701 | 3.48 |
| 組內 | 0.113 | 10 | 1.13E-02 | | | |
| 總和 | 0.138 | 14 | | | | |

地下水中 Kasugamycin 原始濃度 0.25 μM

| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
|----|----------|-----|----------|-------|-------|------|
| 組間 | 5.94E-04 | 4 | 1.49E-04 | 0.625 | 0.655 | 3.48 |
| 組內 | 2.38E-03 | 10 | 2.37E-04 | | | |
| 總和 | 2.97E-03 | 14 | | | | |

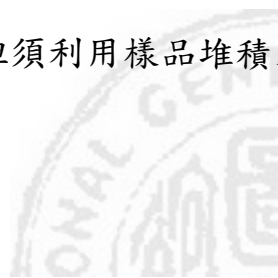
地下水中 Kasugamycin 原始濃度 2.50 μM

| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
|----|----------|-----|----------|------|-------|------|
| 組間 | 8.64E-02 | 4 | 2.16E-02 | 1.19 | 0.373 | 3.48 |
| 組內 | 0.182 | 10 | 1.82E-02 | | | |
| 總和 | 0.268 | 14 | | | | |

肆、結論與未來展望

本研究以毛細管電泳結合氬-鎘雷射激發螢光偵測系統成功地分離經 NDA 衍生非螢光性質的抗生素類之殺菌劑 Blasticidin S 和 Kasugamycin，於毛細管為內徑 50 μm 、外徑 360 μm 、全長 50 cm、有效長度 30 cm，配合 40 mM 硼酸鈉(pH=9.0)緩衝溶液含有 12 mM SDS，施加 16 kV 電壓分離。各分析物遷移時間的標準偏差(RSD)為 1.0~1.1 %，訊號面積的 RSD 為 4.0~6.4 % (n=7)。Blasticidin S 和 Kasugamycin 的校正曲線範圍為 75-5000 nM (n=5)，線性相關係數(r)為 0.999 以上，且有良好之線性關係，偵測極限為 33 nM 及 34 nM，應用於地下水回收率達 94.4~103.6%。

將此具選擇性且樣品前處理簡單，僅需要過濾步驟的分析方法應用於地下水的分析，在未來可實際應用於檢測米類及蔬果殘留以及環境污染的分析，但須利用樣品堆積來降低偵測極限進而提升靈敏度。



伍、參考文獻

1. Strickland, R .D., “Electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 38, pp. 99R-103R (1966).
2. S. F. Y. Li , “Capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 52 , *Elsevier*, New York, pp. 2 (1992).
3. A. Tiselius, “A new apparatus for electrophoresis analysis of colloidal mixtures”, *Transactions of the Faraday Society*, Vol. 33, pp. 524-531 (1937).
4. S. Hjerten, “Free zone electrophoresis”, *Chromatographic Review*, Vol. 9, pp. 122-239 (1967).
5. R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, “Capillary electrophoresis : Principle and Practice”, *Springer-Verlag*, New York, pp. 2 (1993).
6. A. G. Ewing, R. A. Wallingford, and T. M. Olefirowicz , “Capillary electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 61, pp. 292A-303A (1989).
7. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, and Th. P. E. M. Verheggen , “High-performance zone electrophoresis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 169, pp. 11-20 (1979).
8. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, “High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 218, pp. 209-216 (1981).
9. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, “Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries”, *Analytical Chemistry*, Vol.53, pp. 1298-1302 (1981).

10. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, “Capillary zone electrophoresis”, *Science*, Vol. 222, pp. 266-272 (1983).
11. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando, “Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries”, *Analytical Chemistry*, Vol. 56, pp. 111-113 (1984).
12. 魏國佐，林文政，「中性分子在微胞電動層析的樣品堆積」，*化學*，第 59 卷，第 363-372 頁(2001)。
13. D. R. Baker, *Capillary electrophoresis*, Wiley-Interscience, New York (1995).
14. S. Hjerten and M. D. Zhu, “Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing”, *Journal of Chromatography*, Vol. 346, pp. 265-270 (1985).
15. D. N. Heiger, *High-performance Capillary electrophoresis-An introduction*, Hewlett-Packard Company, France (1992).
16. T. Tsuds, “Electrochromatography using high applied voltage”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 521-523 (1987).
17. A. S. Cohen and B. L. Karger, “High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins”, *Journal of Chromatography*, Vol. 397, pp. 409-417 (1987).
18. T. Tsuda, “Electrochromatography Using High Applied Voltage”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 521-523 (1997).
19. D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, A Harcourt Higher Learning Company, Fifth Edition.
20. X. Huang, M. J. Gordon, and R. N. Zare, “Bisa in quantitative

- capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection”, *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 375-377 (1988).
21. D. J. Rose, Jr. and J. W. Jorgenson, “Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 642-648 (1988).
 22. M. Deml, F. Foret, and P. Boček, “Electric sample splitter for capillary zone electrophoresis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 320, pp. 159-165 (1985).
 23. T. Tsuda, T. Mizuno, and J. Akiyama, “Aids for analytical chemists”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp.799-800 (1987).
 24. R. A. Wallingfrd and A. G. Ewing, “Characterization of a microinjector for capillary zone electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 678-681 (1987).
 25. J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, and R. D. Smith, “On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 1230-1232 (1987).
 26. R. D. Smith, J. A. Olivares, N. T. Nguyen, and H. R. Udseth, “Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface”, *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 436-441 (1988).
 27. T. J. Thompson, F. Foret, P. Vouros, and B. L. Karger, “Capillary electrophoresis/Electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachophoretic sample preconcentration”, *Analytical Chemistry*, Vol. 65, pp. 900-906 (1993).

28. A. J. Zemann, "Conductivity detection in capillary electrophoresis", *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 20, pp. 346-354 (2001).
29. X. Huang and R. N. Zare, "Improved end-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 63, pp. 2193-2196 (1991).
30. M. W. F. Nielen, "Indirect time-resolved luminescence detection in capillary zone electrophoresis", *Journal of Chromatography*, Vol. 608, pp. 85-93 (1992).
31. R. Dadoo, A. G. Seto, L. A. Colón, and R. N. Zare, "End-column chemiluminescence detector for capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 66, pp. 303-306 (1994).
32. M. Nieddu, G. Boatto, Antonio Carta et. al., "Simultaneous determination of ten amphetamine designer drugs in human whole blood by capillary electrophoresis with diode array detection", *Biomedical Chromatography*, Vol. 19, pp.737-742 (2005).
33. J. P. Chervet, R. E. J. van Soest, and M. Ursem, " Z-shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography*, Vol. 543, pp. 439-449 (1991).
34. S. E. Moring, R. T. Reel, and R. E. J. van Soest, "Optical improvements of a z-shaped cell high-sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 65, pp. 3454-3459 (1993).
35. G. Hempel, D. Lehmkuhl, S. Krümpelmann, G. Blaschke, and J. Boos, "Determination of paclitaxel in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 745, pp. 173-179 (1996).

36. J. Olgemöller, G. Hempel, J. Boos, and G. Blaschke, "Determination of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in plasma and urine by capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography B*, Vol. 726, pp. 261-268 (1999).
37. J. A. Taylor and E. S. Yeung, "Axial-beam absorbance detection for capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography*, Vol. 550, pp. 831-837 (1991).
38. T. Tsuda, J. V. Sweedler, and R. N. Zare, "Rectangular capillaries for capillary zone electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 62, pp. 2149-2152 (1990).
39. T. Wang, J. H. Aiken, R. A. Huie, and R. A. Hartwick, "Nanoliter-scale multireflection cell for absorption detection in capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 63, pp. 1372-1376 (1991).
40. Y. Xue and E. S. Yeung, "On-Column double-beam laser absorption detection for capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 65, pp. 1988-1993 (1993).
41. Y. Xue and E. S. Yeung, "Double-beam laser Indirect absorption detection in capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, Vol. 65, pp. 2923-2972 (1993).
42. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, "Capillary Zone Electrophoresis", *Science*, Vol. 222, pp. 266-272 (1983).
43. E. Gassmann, J. E. Kuo, and R. N. Zare, "Electrokinetic separation of chiral compounds", *Science*, Vol. 230, pp. 813-814 (1985).
44. H. A. Baradelmeijer, J. C. M. Waterval, H. Lingeman, R. V. Hof, A. Bult, and W. J. M. Underberg, "Pre-, on- and post-column

- derivatization in capillary eletrophoresis”, *Electrophoresis*, Vol. 18, pp. 2214-2227 (1997).
45. 王鳳玉，「以毛細管電泳/雷射激發螢光偵測應用於微量藥物分析」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中 (2003)。
 46. 吳懿娟，「毛細管電泳/雷射激發螢光偵測法分析環境水樣中保米黴素及嘉賜黴素之含量」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中 (2006)。
 47. 魏妙宜，「毛細管電泳在除草劑與藥物上的應用」，碩士論文，朝陽科技大學應用化學系，台中 (2004)。
 48. United States Environmental Protection Agency, About biopesticides, <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/whatarebiopesticides.htm>
 49. 陳保良、李木川、黃德昌、葉瑩，「生物性農藥管理及未來發展」，農業生技產業季刊，第四期，第 54~59 頁 (2005)。
 50. 高穗生，「生物農藥之產業現況及應用」，農業生技產業季刊，第四期，第 34~39 頁 (2005)。
 51. 石信德，黃振文，「保護植物的重要菌源-鏈黴素」，科學發展，第 391 期，第 22-27 頁 (2005)。
 52. 簡錦忠，「稻熱病」，花蓮區農業推廣簡訊刊，第三期，第 7-9 頁 (1989)。
 53. H. Kidd and R. James, *The Agrochemicals Hand book*, Royal Society

- of chemistry information Services, Third Edition (1991).
54. *Pesticides Index*, Taiwan Provincial Department of Agriculture and Forestry (PDAF), July (1968)
 55. 徐聖煦，農藥化學，台北市正中書局印行（1971）。
 56. G. Matolcsy, M. Nádasy, V. Andriská, *Pesticide Chemistry*, Elsevier (1988).
 57. Tomlin, Clive, *The pesticide manual: a world compendium*, Farnham, Surrey, UK: British Crop Protection Council (1997).
 58. United States Environmental Protection Agency, Pesticide Fact Sheet, Kasugamycin, <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/kasugamycin.pdf>
 59. E. J. Vandamme, *Biotechnology of industrial antibiotics*, New York : M. Dekker (1984).
 60. H. Seto and H. Yonehara, “Studies on biosynthesis of blasticidin S. VI”, *The Journal of Antibiotics*, Vol. 30, pp. 1019-1021 (1977).
 61. L. G. Copping and J. J. Menn, “Review, Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy”, *Pest Management Science*, Vol. 56, pp.651-676 (2000).
 62. B. K. Hwang and H. S. Chung, “Acquired Tolerance to Blasticidin-S in *Pyricularia oryzae*”, *Phytopathology*, Vol. 67, pp. 421-424 (1976).
 63. T. O. Fukuda, N. T. Ando, S. Ohsato et al., “A fluorescent antibiotic resistance marker for rapid production of transgenic rice plants”, *Journal of Biotechnology*, Vol.122, pp. 521-527 (2006).
 64. I. Yamaguchi, K. Takagi and T. Misato, “The Sites for degradation of Blasticidin S”, *Agricultural & Biological Chemistry*, Vol. 36, pp.

- 1719-1727(1972).
65. 石山哲爾，「Kasugamycin 在農藥上的應用」，中國化學會誌，第 3 期，第 A23-A31 頁 (1966)。
 66. M. Taga, J. Nakagawa, M. Tsuda and A. Ueyama, “Identification of three different loci controlling kasugamycin resistance in *Puricularia oryzae*”, *Phytopathology*, Vol. 69, pp. 463-466 (1979).
 67. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所，植物保護手冊。
 68. 衛生署食品衛生署公告之蔬果殘留安全容許量，
<http://dohlaw.doh.gov.tw/Chi/NewsContent.asp?msgid=2275>。
 69. Federal Register Rules and Regulations, Vol. 70, pp. 55748-55752 (2005).
 70. 中華人民共和國農業部種植業管理司，植保植檢網，農藥合理使用準則，http://www.ppq.gov.cn/Article_Show.asp?ArticleID=284
 71. 行政院農業委員會農糧署，台灣農產品主要外銷國(地區)殘留農藥容許量標準，
<http://www.afa.gov.tw/Public/peasant/20063993357055.doc>。
 72. The Japan Food Chemical Research Foundation，
http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=15600。
 73. T. Endo, K. Furuta, A. Kaneko et al., “Inactivation of Blasticidin S by *Bacillus cereus*”, *The Journal of Antibiotics*, Vol. 40, pp. 1791-1795 (1987).

74. 保米黴素(Blasticidin-S)有效成分檢驗方法，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局防檢三字第 0941484442 號公告。
75. 嘉賜黴素(Kasugamycin)有效成分檢驗方法，行政院農業委員會 87 農糧字第 87144286 號公告。
76. C. C. Lo, Y. J. Lee, C. J. Chang, “High-performance liquid chromatographic method for the determination of Blasticidin S in formulated products with photodiode array detection”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44, pp. 153-158 (1996).
77. C. C. Lo, Y. J. Lee, C. J. Chang, “High-performance capillary electrophoresis method for the determination of Blasticidin S in formulated products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 43, pp. 2892-2895 (1995).
78. 蕭懿民，「毛細管在農藥主成份分析之應用」，台灣省農業藥物毒物試驗所技術專刊第 80 號。
79. C. C. Lo, Y. J. Lee, C. J. Chang, “High-performance capillary electrophoresis method for the determination of antibiotic fungicide Kasugamycin in formulated products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44, pp. 2231-2234 (1996).
80. 牛長群，祝仕清，張惠敏，「反相離子對高效液相色譜法和高效毛細管電泳法測定春雷黴素」，中國抗生素雜誌，第 26 卷，第五期，第 348-350 頁 (2001)。
81. M. Junshi, K. Philip, “Residue analysis of polyoxins B, D and blasticidin S in crops and soils”, *Pesticide Chemistry 5th*, pp.

- 309-316 (1983).
82. O. Haruki, O. Kousaburo, "Sensitive determination of blasticidin S in human blood and urine by high-performance liquid chromatography after conversion to cytomycin", *Journal of Forensic Toxicology*, Vol. 17, pp. 163-170 (1999).
 83. H. Danbara and M. Yoshikawa, "Plasmid-Determined Epistatic Susceptibility to Kasugamycin", *Antimicrobial Agents and Chemistry*, Vol. 8, pp. 243-250 (1975).
 84. E. R. Dabbs, "Kasugamycin-dependent mutants of *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, Vol. 136, pp. 994-1001 (1978).
 85. M. Kimura and I. Yamaguchi, "Recent development in the use of Blasticidin S, a microbial fungicide, as a useful reagent in molecular biology", *Pesticides Biochemistry and Physiology*, Vol. 56, pp. 243-248 (1996).
 86. S. Goyard, S. M. Beverley, "Blasticidin resistance: a new independent marker for stable transfection of *Leishmania*", *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol. 108, pp. 249-252 (2000).
 87. K. Suzukake and M. Hori, "Biochemical study of minosaminomycin in relation to the Kasugamycin group antibiotics", *The Journal of Antibiotics*, Vol. 30, pp. 132-140 (1977).
 88. T. Kitagawa, T. Kawasaki, H. Munechika, "Enzyme immunoassay of Blasticidin S with high sensitivity: A new and convenient method for preparation of immunogenic (hapten-protein) conjugates", *Journal of Biochemistry*, Vol. 92, pp. 585-590 (1982).
 89. I. Yamaguchi and T. Misato, "Active center and mode of reaction of

- Blasticidin S Deaminase”, *Agricultural & Biological Chemistry*, Vol. 49, pp. 3355-3361 (1985).
90. M. Kuwano, K. Matsui, K. Takenaka et al., “A mouse leukemia cell mutant resistant to Blasticidin S”, *International Journal of Cancer*, Vol. 20, pp. 296-302 (1977).
91. C. J. Kim, Y. Keun, and G. T. Chun, “Enhancement of kasugamycin production by pH shock in batch cultures of streptomyces kasugaensis”, *Biotechnology Progress*, Vol. 16, pp. 548-522 (2000).
92. N. Otake, S. Takeuchi, T. Endō and H. Yonehara, “Chemical studies on Blasticidin S part III. The structure of Blasticidin S”, *Agricultural & Biological Chemistry*, Vol. 30, pp. 132-141 (1966).
93. 簡麗娟，「毛細管電泳/雷射激發螢光偵測法應用於有機硒化合物的分析」，碩士論文，東海大學化學系碩士班，台中 (2006)。
94. R. G. Carlson, K. Srinivasachar, R. C. Givens, B. K. Matuszewski, “New derivatizing of N-substituted 1-cyanobenz [f]isoindole and their spectroscopic properties,” *Journal of Organic Chemistry*, Vol. 51, pp. 3987-3983 (1986).
95. R. Georges , L. Marlène, and C. G. Jean et al., “The use of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde for the analysis primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis,” *Biomedical Chromatography*, Vol. 21, pp. 1223-1239 (2007).
96. W. Ried, H. Bodem, “A simple and productive synthesis for naphthalene-(2,3)-dicarboxaldehyde,” *Chemische Berichte*, Vol. 89, pp. 708-712 (1956).

97. X. Liu, L. X. Yang, and Y. T Lu, "Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl) quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, Vol. 998, pp. 213-219 (2003).
98. W. A. Jacobs, M. W. Leburg and E. J. Madaj, "Stability of *o*-phthalaldehyde-derived isoindoles," *Analytical Biochemistry*, Vol. 156, pp. 334-34 (1956).
99. P. de Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens et al., "Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion : a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines," *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 1096-1101 (1987).
100. M. Shou, A. D. Smith, J. G. Shackman, J. Peris et al., "In vivo monitoring of amino acids by microdialysis sampling with on-line derivatization by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and rapid micellar electrokinetic capillary chromatography," *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 138, pp. 189-197 (2004).
101. D. P. Manica, J. A. Lapos, A. D. Jones and A. G. Ewing, "Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry," *Analytical Biochemistry*, Vol. 322, pp. 68-78 (2003).
102. J. F. Stobaugh, A. J. Repta, L. A. Sternson and K. W. Garren, "Factors affecting the stability of fluorescent isoindoles derived from reaction of *o*-phthalaldehyde and hydroxyalkylthiols with primary amines," *Analytical Biochemistry*, Vol. 135, pp. 485-504 (1983).

103. AOAC *Peer-Verified Methods Program*, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (November 1993).
104. Ludwig Huber, *Validation Qualification in Analytical Laboratories*, Iterpharm/ CRC, USA, pp. 127 (1999).