

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測茶葉中的胺類

化合物與人體血漿中之脯胺酸

Detection of amine compounds from tea extracts and
determination of proline from human plasma by capillary
electrophoresis with electrochemiluminescence

林郁萍

Yu-Ping Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 6 月

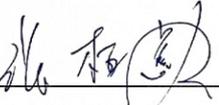
東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 林郁萍 君所提之論文

以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測茶葉
中的胺類化合物與人體血漿中之脯胺酸

Detection of amine compounds from tea extracts
and determination of proline from human plasma
by capillary electrophoresis with
electrochemiluminescence

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

105 年 6 月 2 日

東 海 大 學 碩 士 班 研 究 生
論 文 口 試 委 員 審 定 書

化學系 碩士班 林郁萍 君所提之論文

以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測茶葉
中的胺類化合物與人體血漿中之脯胺酸

Detection of amine compounds from tea extracts
and determination of proline from human plasma
by capillary electrophoresis with
electrochemiluminescence

論文口試委員會 召集人 莊曼傑 (簽章)

委 員 張柏英
林泱蔚

中 華 民 國 105 年 6 月 2 日

謝誌

首先，我要感謝我的指導教授張柏齡老師，謝謝老師給予我機會進入實驗室，除了感謝老師平時的照顧與鼓勵之外，也要謝謝老師在實驗上細心的指導與諄諄教誨，我才能得以完成碩士學業。在此我也要感謝我的家人在我的背後默默支持我，讓我無後顧之憂的完成學業，謝謝家人平時的照顧與鼓勵，讓我在碰到瓶頸時，能有動力繼續努力堅持下去。還要感謝兩位口試委員莊旻傑老師與林泱蔚教授，在百忙之中抽空幫學生口試，給予論文上的指導與建議，使學生的論文更加完善。

在實驗上，我要感謝彥竹學長及宜安學長，在我剛進入實驗室時，帶著我學習實驗及跑公文等事務，謝謝學長耐心的教導及帶領。也要感謝實驗室的學弟妹們，感謝他們平日的幫忙，讓我的實驗更順利，平時也會與我討論實驗，讓我能更加瞭解其他實驗領域。另外要感謝系上其他老師對我的關心還有課業上的指導，尤其系辦的藍姐，無論是公文上的處理或是課業上的相關事務都給予很多的幫忙及協助。最後也要感謝東海大學化學系，給予我無數的資源與幫助。在這幾年的碩士生涯中受到許多人的幫助，我很感謝所有幫助過我以及給予鼓勵的各位！最後我想將此成果與榮耀獻上最大的感謝，並與我的家人及大家共享這份成果。

論文摘要

茶類是全球最為流行的飲品之一，因此，對於了解其中成份也是相當重要的。本研究提出以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(CE-ECL)，並以緩衝溶液為分離基礎，以進行偵測其胺類化合物。電激發化學放光偵測法使用 tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 為放光試劑，並於自製的化學反應槽中進行化學偵測。本研究在具有電滲流(electroosmotic flow, EOF)之電泳環境下，使用緩衝溶液成功地分離出較多茶葉的胺類化合物訊號，於優化的分離條件下，最佳分離效果之緩衝溶液為 100 mM Boric acid (pH 9.0)。

然而，在人體體液中脯胺酸(proline)的含量，對於腎功能不全或慢性尿毒症患者是一個重要的生物參數。因此，本研究以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(CE-ECL)，並以緩衝溶液為分離基礎，偵測人體血漿中的脯胺酸，並進行定量。於優化的偵測條件下，使用電壓進樣並利用樣品堆積(sample stacking)的方式，使內標準品 TPA 的最低濃度可偵測至 1 μM ，於真實樣品血漿中加入 TPA，可偵測到的 TPA 濃度為 10 μM 。而標準品脯胺酸的最低濃度可偵測至 1 μM ，其偵測極限為 0.17 μM 。因此，本實驗相較於雷射誘發螢光、發光二極體誘發螢光，提供了實驗裝置簡單、實驗成本低、樣品消耗量少及高解析度等優點的分離方法。

Abstract

Tea is one of the most popular beverages in the world, therefore, to understand which ingredients are also very important. This study proposed an optimized buffer solution for the separation of amine compounds by capillary electrophoresis with electrogenerated chemiluminescence(ECL)detection. The tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) was utilized for ECL on the surface of indium tin oxide (ITO) electrode that embedded in a home-made PDMS detection cell. The electrophoretic separation of amines was performed by 100 mM boric acid (pH 9.0) in the presence of electroosmotic flow (EOF). The detection of ECL was improved by electrokinetic sample stacking under optimal condition. The limit of detection of standard tripropylamine (TPA) could be reached to 1 μM while the plasma sample that spiked with TPA was raised to 10 μM , and the minimum detectable concentration of proline to 1 μM , which detection limit of 0.17 $\mu\text{mol/l}$. In this study, we demonstrated the CE-ECL is useful for the determination of amine compounds from tea and human plasma. Moreover, our data also shown the CE-ECL have enough sensitivity for the determination of secondary amine from body fluid. Therefore, the CE-ECL may potentially be a powerful tool for the determination of proline in the clinical diagnosis of cancer ?

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	X
參與學術會議.....	102
第一章毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之簡介	1
1.1 毛細管電泳緒論.....	1
1.1.1 毛細管電泳原理.....	4
1.1.1.1 淌度 (mobility)	4
1.1.1.2 電滲流 (electroosmotic flow, EOF)	6
1.1.1.3 毛細管電泳的進樣方法.....	10
1.1.1.4 偵測系統.....	11
1.1.2 毛細管電泳分析胺基酸之應用	12
1.2 電激發化學放光偵測法(Electrogenerated Chemiluminescence) ..	13
1.2.1 緒論	13
1.2.2 電激發化學放光系統之原理與應用.....	24

1.3	胺基酸.....	31
1.3.1	緒論	31
1.3.2	食品中的胺基酸	32
1.3.3	生物體內的胺基酸	33
1.3.4	與癌症相關之胺基酸	34
1.3.5	胺基酸之檢測方法	36
1.4	參考文獻.....	37
	第二章 以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法分離茶葉中的胺類 化合物.....	50
2.1	緒論.....	50
2.2	實驗部分	51
2.2.1	實驗試藥	51
2.2.2	毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之裝置	51
2.2.3	ECL 反應槽之製作	53
2.2.4	毛細管前處理	55
2.2.5	緩衝溶液的配製	55
2.2.6	分析物前處理	56
2.2.7	實驗流程	56

2.3	結果與討論	57
2.3.1	分離條件最佳化	58
2.3.1.1	緩衝溶液之選擇	58
2.3.1.2	添加界面活性劑	61
2.3.1.3	添加篩分介質	65
2.3.2	茶葉樣品之檢測	68
2.4	結論	71
2.5	參考文獻	72
第三章..以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法偵測人體血漿中之		
脯胺酸及其重要性		
3.1	緒論	73
3.2	實驗部分	80
3.2.1	實驗試藥	80
3.2.2	分析物前處理	80
3.3	結果與討論	81
3.3.1	實驗條件最佳化	82
3.3.1.1	分析物濃度之選擇	82

3.3.2	血漿樣品之檢測.....	86
3.3.2.1	添加有機溶劑、篩分介質與界面活性劑.....	89
3.3.2.2	血漿樣品之定量與再現性.....	94
3.4	結論.....	98
3.5	參考文獻.....	99

圖目錄

圖 1-1	電雙層結構及 ζ 電位之示意圖	7
圖 1-2	(a)電滲流及(b)層流之比較圖	9
圖 1-3	Forbes 等人設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ 偵測器之示意圖	18
圖 1-4	Tsukagoshi 等人設計的 CE/ECL 偵測器之示意圖	20
圖 1-5	Dickson 等人設計的 CE/ECL 偵測器之示意圖	21
圖 1-6	Bobbitt 和 Wang 設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ 偵測器之示意圖 ...	23
圖 2-1	毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之裝置圖	52
圖 2-2	ECL 反應槽之製作示意圖	54
圖 2-3	使用不同的緩衝溶液分離二、三級胺之標準品，以尋找最佳的分離緩衝溶液	59
圖 2-4	使用不同的緩衝溶液分離茶葉樣品，並使用其中一種緩衝溶液之不同濃度來尋找最佳的分離緩衝溶液	60
圖 2-5	於進樣端及毛細管緩衝溶液中添加 Triton X-100 來分離茶葉樣品	62
圖 2-6	於末端緩衝溶液中添加不同濃度的 Triton X-100 來分離茶葉樣品	63

圖 2-7 分別於毛細管與末端緩衝溶液中加入不同濃度的 SDS 來分離茶葉樣品.....	64
圖 2-8 於進樣端及毛細管緩衝溶液中添加 5 mM 的 β -環糊精來分離茶葉樣品.....	66
圖 2-9 於進樣端及毛細管緩衝溶液中分別添加不同的環糊精與不同的濃度來分離茶葉樣品	67
圖 2-10 LC-MS-MS 檢測後之搜尋結果.....	69、70
圖 3-1 酶聯免疫吸附測試之示意圖.....	78
圖 3-2 酶聯免疫間接法之原理示意圖.....	79
圖 3-3 探討可偵測到標準品 proline 之最低濃度	83
圖 3-4 脯胺酸 proline 之濃度對訊號面積作檢量線圖	84
圖 3-5 增加脯胺酸 proline 之進樣時間，對電泳的影響	85
圖 3-6 將血漿樣品進行稀釋，以探討其最佳解析度.....	87
圖 3-7 真實樣品-血漿之定性標定	88
圖 3-8 於進樣端添加 5 % Isopropanol 分離血漿樣品	90
圖 3-9 於進樣端添加 5 mM α -CD、5 mM β -CD 分離血漿樣品	91
圖 3-10 於進樣端添加 5 mM α -CD，並於樣品中加入 100 mM 的 SDS 分離血漿樣品.....	92

圖 3-11 於毛細管緩衝溶液中添加 10 mM SDS 進行分離.....	93
圖 3-12 於真實樣品-血漿中添加標準品 TPA，探討是否可以與血漿樣 品完全分離.....	96
圖 3-13 於真實樣品-血漿中添加內標準品，探討可偵測到內標準品之 最低濃度.....	97

表目錄

表 3-1 血漿中的胺基酸含量(微莫耳/升).....	74
表 3-2 不同年齡的尿液樣品中的胺基酸含量(mmol/mol of creatinine)	74

第一章 毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之簡介

1.1 毛細管電泳緒論

於 1909 年，由 Michaelis 提出^[1]電泳 (electrophoresis) 一詞，藉由帶有電荷粒子之溶液，施加一個外加電場，帶電粒子因庫倫力受到電的牽引，在溶液中產生遷移而往前泳動，稱為電泳。利用此原理可將不同荷質比之帶電粒子，藉由產生不同的遷移速度而在溶液中進行分離，此方法稱為電泳分離。一位瑞典的化學家 Tiselius，在 1937 年利用電泳分離技術，成功地從血漿蛋白中，將 α 、 β 、 γ 三大類的球蛋白^[2]分離出來，因此項突破性實驗，使 Tiselius 於 1948 年獲得諾貝爾化學獎之肯定。

傳統的電泳大多使用平板(slab)式^[3-5]的電泳，利用凝膠當作介質，將樣品添加至凝膠板上，然後進行通電分離，利用分析物之不同大小，進而達到分離的效果，隨後可將樣品染色直接進行觀察。平板電泳雖然方便，但也有缺點，例如在進行分析時，需要利用通電進行分離，因此，會產生焦耳熱，進而影響解析度^[6]，所以通常無法使用高電壓進行分離，實驗過程也就會顯得相當費時，除此之外，平板電泳消耗樣品量大且過程製備繁瑣、重複性差等。因此，後來發展出毛細管電泳，1967 年，Hjertén 使用內徑為 3 mm 的石英玻璃管柱，在自由溶液中進行區帶電泳的實驗，並結合 UV 吸收偵測法進行分析，此方法

可以成功地分離出核酸、蛋白質、病毒、無機離子^[7]，由於使用的管柱內徑較小，因而降低了熱對流所造成的影響，因此也證明了管柱內徑與焦耳熱有相對的關係。1974 年，Virtanen 進一步地使用了內徑縮減至 0.2 ~ 0.5 mm 之玻璃毛細管來分離十六種陰離子^[8]，並於十分鐘內成功地被分離出來，不僅克服了焦耳熱所造成的熱對流之影響，同時也簡化了儀器裝置的設計，並提升了使用小孔徑的管柱電泳在分析上的實用性。發展至此的毛細管電泳，仍然存在著靈敏度較差、內徑大等問題，因此還無法達到快速分析、自動化等優點。

因此，直到 1981 年，Jorgenson 和 Lukacs 利用內徑為 75 μm 之毛細管柱，進行分離胺基酸之衍生物^[9,10]，因為管柱內徑縮小，散熱效果佳，所以可使用高電壓進行分離，縮短了分析時間，並結合螢光偵測法成功地偵測，且提高靈敏度，這為毛細管電泳之研究奠定了基礎。近年來，依照不同的原理與機制而產生的分離技術，可以分為六大類：毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)^[11]、毛細管電層析 (capillary electrochromatography, CEC)^[12]、微粒電動力層析法 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)^[13]、毛細管等電聚焦 (capillary isoelectric focusing, CIEF)^[14]、毛細管等速電泳法 (capillary isotachopheresis, CITP)^[15]、毛細管凝膠電泳法 (capillary gel electrophoresis, CGE)^[16]。

隨著技術的蓬勃發展，近年來科學家將其微小化並應用至微晶片上，甚至在微晶片上以蝕刻技術刻出微小的通道（channel）^[17,18]，使得電泳技術可以小型化，與傳統的電泳相比，比較不占空間、成本較低、多通道、分析時間短、樣品消耗量少及高通量等優點。後來甚至有實驗室晶片（Lab-on-a-chip）^[19]系統的產生，此技術是能將實驗的前處理、分離、偵測等步驟，微小化至單一晶片中可以完成的技術。

早期的電泳實驗大多於自由溶液中進行分離，但因考慮到焦耳熱所造成的熱對流會造成解析度不佳^[6]，後來嘗試改用流動性較差的凝膠進行篩分（sieving），以提高電泳解析度。篩分是藉由分子量之大小，來分離樣品，因此適用於分離生物樣品中大分子量的樣品。毛細管電泳發展至今，無論是分析帶電粒子還是有機、無機離子等，或是單、雙股 DNA 以及 PCR（Lab-on-a-chip）產物，皆顯得重要。在毛細管凝膠電泳初期，所用的凝膠為傳統平板凝膠電泳使用的交聯性聚丙烯醯胺（cross-linked polyacrylamide）^[20]，因為其黏度較高，所以比較難以壓力的方式填充毛細管，因此會利用毛細管內聚合的方式來填充毛細管，由於管柱內徑較小，不易製備，還會伴隨著凝膠體積之差異、容易產生氣泡、聚合之再現性差、使用壽命不長等缺點，所以必須尋找其他可替代之凝膠介質。然而，在 1989 年，Zhu 和 Colbum 使用非交聯性的線性聚合物作為凝膠介質，且利用毛細管電泳成功地

將 DNA 片段^[21]分離，此線性聚合物的黏度較低，因此可先於毛細管外聚合後，再以壓力的方式填入毛細管中，可藉由實驗結果發現，不但可以提高實驗再現性，還可以延長毛細管之使用壽命，所以至今的毛細管凝膠電泳皆以線性聚合物作為分離介質。目前文獻中最常見的線性聚合物有：聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone, PVP）^[22,23]、線性聚丙烯醯胺（linear polyacrylamide, LPA）^[24]、聚環氧乙烷（poly(ethylene oxide), PEO）^[25]、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol）^[26]、瓊脂膠（agarose）^[27]、各種纖維素（cellulose）^[28,29]衍生物等。

毛細管電泳經過長期不斷的改善，技術已趨近於成熟，現在發展為具有多重性之設計及自動化等優點^[30]，對於生物分析上是相當有幫助的，現今的毛細管電泳已成為分離生化樣品之重要工具，無論是胺基酸（amino acid）^[31,32]、蛋白質（protein）^[33]、醣類（carbohydrates）^[34]、DNA^[35]、RNA^[36]以及藥物^[37]等樣品，皆可利用毛細管電泳之技術，達到良好的分離效果。

1.1.1 毛細管電泳原理

1.1.1.1 淌度（mobility）

帶電粒子因受到外加電場影響，使得帶電粒子會以一個速度(v_{ep}) 在溶液中移動，而且與電場強度成正比（E），其關係式可表示為：

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1-1)$$

μ_{ep} 為電泳淌度 (mobility)，即在單位電場下，帶電粒子的遷移速度。

當對於帶電粒子施以外加電場時，帶電粒子會受到庫倫作用力 (F) 影響，而加速移動，並與有效電荷 (q) 及電場強度 (E) 成正比，關係式可表示為：

$$F = q E \quad (1-2)$$

帶電粒子在移動時，會與介質產生摩擦力 (f)，使得移動速度變慢，影響淌度的主要因素即為庫倫力及摩擦力，當帶電粒子加速達一定程度時，摩擦力與庫倫力會達到平衡，帶電粒子則會形成等速度移動。

於 Stokes 定律，假設帶電粒子為剛性球體時，受到之摩擦力 (f) 可表示為：

$$f = f v = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-3)$$

式子中 f 為剛性球體之動摩擦係數， η 為溶液介質之黏度， r 為粒子半徑。當帶電粒子因庫倫作用力與摩擦力達平衡時，帶電粒子會形成等速度移動，並結合方程式 (1-2) 與 (1-3)，可得下列關係式：

$$F = q E = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-4)$$

亦可表示為：

$$v_{ep} = qE / 6 \pi \eta r \quad (1-5)$$

若以淌度表示，可將式子再寫成：

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E = q / 6 \pi \eta r \quad (1-6)$$

由以上公式可得知，淌度與帶電粒子之電荷成正比，而與帶電粒子的半徑大小成反比，因此，帶電粒子的半徑大小及帶電量會影響電泳之淌度。

1.1.1.2 電滲流 (electroosmotic flow, EOF)

於電場作用下，使得毛細管溶液中的離子會往前移動，而形成電滲流(EOF)，為毛細管電泳中的第二種驅動力。毛細管的主要材質為融熔矽 (fused silica) 毛細管，當通入電解質溶液 pH 值大於 3 時，毛細管壁上的矽醇基 (-Si-OH) 解離，形成矽醇陰離子 (-Si-O⁻)，使管壁帶有負電荷，因此會吸引溶液中之陽離子，在毛細管壁上形成電雙層 (electrical double layer)。如圖 1-1 所示，被矽醇陰離子所吸引之陽離子為固定層 (stern layer)，固定層之外的為擴散層 (diffusion layer)，所被吸引之陽離子數目會隨著管壁的距離增加而減少。當毛細管通電時，擴散層之陽離子會受到庫倫作用力的影響，而帶動體相溶液 (bulk solution) 一起往負極移動，產生電滲流。毛細管內的擴散層與固定層之陰陽離子，會因為分佈不均，使得電雙層之間形成電位差，稱之為 ζ 電位 (zeta potential)。其方程式^[38]如下：

$$\zeta = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (1-7)$$

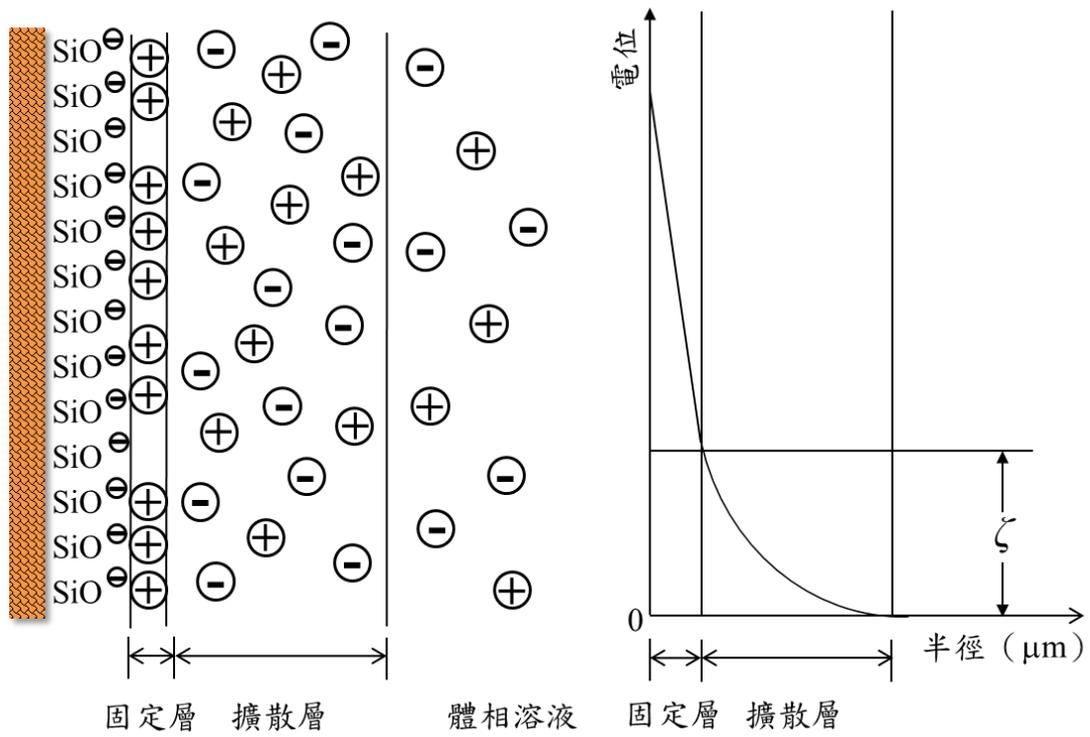


圖 1-1 電雙層結構及 ζ 電位之示意圖

δ 為電雙層之厚度， e 為單位面積之總電荷， ϵ 為緩衝溶液之介電常數。

電滲流與 zeta (ζ) 電位之關係式可表示為：

$$\mu_{eo} = \epsilon \zeta / \eta \quad (1-8)$$

淌度 μ_{eo} ，為電滲流之遷移速率大小，其正比於 zeta (ζ) 電位及緩衝溶液之介電常數(ϵ)，與緩衝溶液之黏度(η)成反比。zeta (ζ) 電位之強弱與毛細管壁的矽醇基之解離程度有關，當解離程度越高時，就能吸引到更多的陽離子，電雙層就會變厚，zeta (ζ) 電位也會增強，電滲流的遷移速率便會隨之變快。緩衝溶液之離子強度與電滲流之大小有關，離子強度越強，表示緩衝溶液中有較多的離子數目，代表可以吸引到較多的陽離子於毛細管壁上，使得電雙層厚度被縮減，zeta (ζ) 電位會隨之變小，因此，電滲流之遷移速率也會跟著變慢。

除此之外，緩衝溶液之 pH 值亦會影響電滲流的大小，當 pH 值大於 3.0 時，矽醇基會開始解離，而 pH 值大於 4.0 以上時，可以發現電滲流有明顯增加的趨勢，隨著 pH 值的上升，電滲流也跟著變大，直到 pH 值大於 8.0 以上時，電滲流會逐漸趨於一定值。溫度也會影響緩衝溶液之黏度，或是在毛細管壁進行表面修飾，皆會改變電滲流的大小^[39]。由於擴散層中的離子受到電場的影響而產生遷移，形成電滲流，因此並無外在壓力，亦即沒有壓力差，使得在毛細管壁中的各處流速呈現相同的平面流型，如圖 1-2 所示。

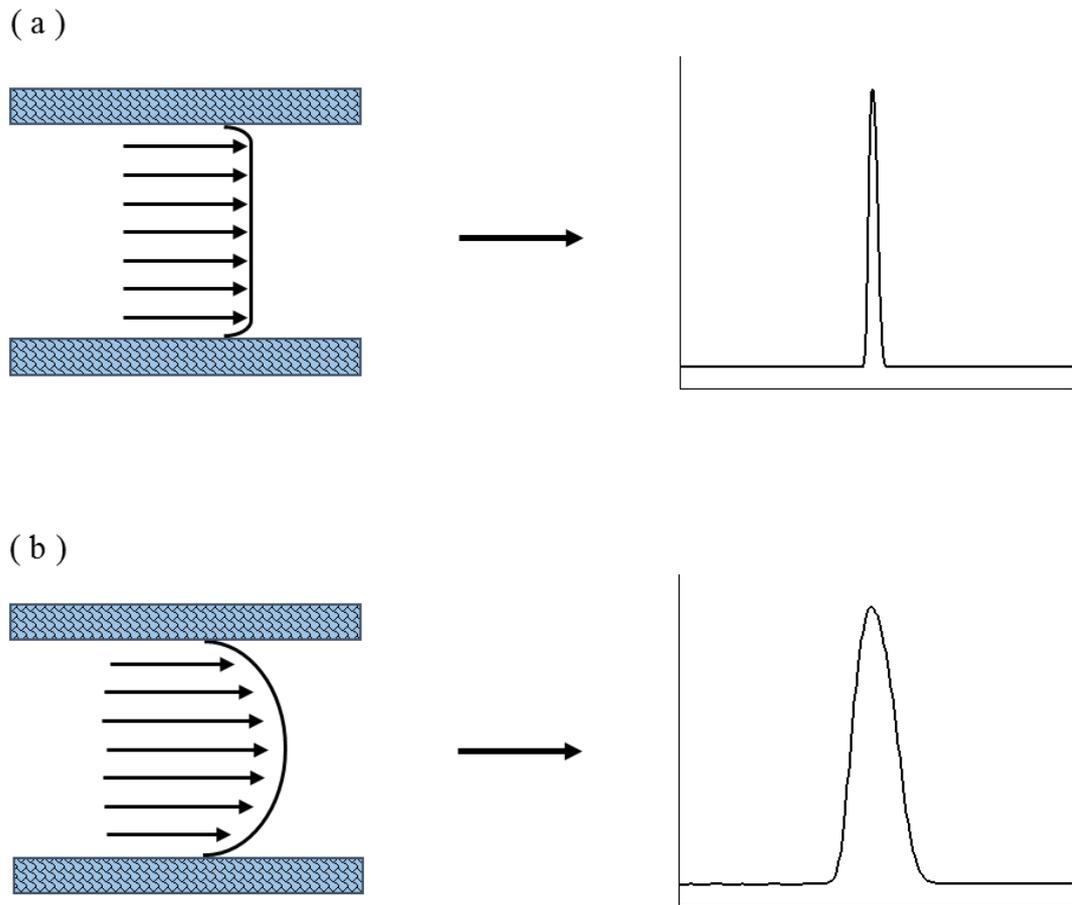


圖 1-2 (a)電滲流及(b)層流之比較圖

相較於使用幫浦作為驅動力之管柱層析，這會使得毛細管中的溶液與毛細管壁產生摩擦力、剪切力，而形成溶液呈現拋物線狀態之層流（laminar flow）。產生層流會使樣品區帶擴散、解析度降低，相較於使用電滲流作為驅動力之平面流型，不僅樣品區帶不會變寬、解析度佳、管柱效率大幅提升，且理論平板數也能提高至數百萬以上。

利用電滲流作為毛細管電泳之驅動力來偵測生物樣品(如:RNA、DNA、蛋白質)時，發現大多數生物樣品容易吸附於毛細管壁上，因此，可在進行分析生物樣品前，先將毛細管壁塗覆一層聚合物來防止吸附^[40,41]，但這會造成 zeta (ζ)電位與電滲流消失，所以通常在進行分析生物樣品時，是在無電滲流之環境下進行，而此時生物樣品之遷移則是因樣品本身受到電場的影響而往前移動。

1.1.1.3 毛細管電泳的進樣方法

在毛細管電泳中，有三種不同的進樣方法，分別為：虹吸進樣（siphoning）、電動進樣（electrokinetically）、壓力進樣（hydrostatically），這三種方法可依照實驗的不同需求來使用。虹吸進樣，是將樣品放至一定高度後，利用前端與末端之高度重力差，讓樣品引入毛細管前端，再通高壓電進行分離，此方法較為簡易、而且不會受到樣品離子的干擾，而影響進樣量，若是在毛細管內徑為 75 μm 下，維持 5 公分以上之高度差，進樣 10 秒，進樣量約為 6 nL。電動進樣，是利用電來作

為驅動力，將樣品引入毛細管中，因此，必須先將毛細管末端放入裝有緩衝溶液之容器中，並放入電極，再將另一電極放入裝有樣品之容器中，然後放入毛細管前端，並施加電壓，此時可讓樣品引入毛細管中，最後再將樣品容器中的毛細管與電極取出，放回裝有緩衝溶液之容器中，即可通電進行分離。此方法之進樣量，會相對於虹吸進樣與壓力進樣來的多，通常注入之樣品量約為 5 至 50 nL，因此，若想要偵測到更微量之樣品，會是一個比較好的方法。壓力進樣，是在毛細管的前端施加壓力，將樣品引入毛細管中，或是在毛細管的末端設置真空幫浦 (pump)，將樣品從前端吸入毛細管中，雖然此方法能將樣品引入毛細管內，而且也能引入具有高離子強度之樣品，但此方法因需要增加額外的儀器，所以不便於使用。

1.1.1.4 偵測系統

使用於毛細管電泳之偵測系統有：紫外光-可見光吸收 (ultraviolet-visible absorption) ^[42]、螢光測定 (fluorimetry) ^[43]、質譜儀 (mass spectroscopy, MS) ^[44]、電激發化學放光 (ECL) ^[45] 等。目前的螢光測定，以雷射誘發螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 最為靈敏，有文獻指出雷射誘發螢光之偵測極限已可達到 50 yoctomoles (10^{-24} M) ^[46]，而此系統也可應用於偵測單分子或是單細胞上 ^[47,48]。

近年來也有使用發光二極體作為激發光源^[49]，不僅可以降低實驗成本，還可以延長光源壽命等，接有螢光分子之樣品，只會受到特定波長的激發光源而被激發，放出螢光訊號。但大部分的分析物並不含有螢光之結構，因此，為了順利讓分析物能夠被偵測到，有時候會添加染料，對分析物進行衍生化反應，但若考量到反應時間之長短，就必須考慮到衍生化之反應速率，所以除了可以利用共價鍵結的衍生化方法之外，也可以利用高親和力(affinity)的染料來標記特定的分析物，或是在實驗進行前，先讓螢光染料嵌入樣品中，再進行偵測。然而，現在毛細管電泳結合螢光偵測法是最常被使用於研究基因突變^[50]或DNA定序^[51]上。

1.1.2 毛細管電泳分析胺基酸之應用

現今的毛細管電泳也普遍使用於人體體液的定量與分析上^[52-54]，如：腦脊髓液^[55]、唾液^[56]、尿液^[57,58]、血漿^[59,60]等。人體體液中含有大量的小分子，如：無機鹽類^[61,62]、胺基酸^[63,64]等，傳統的檢測方法為酶聯吸附免疫測試法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[65-67]，此方法主要為檢測含有抗原與抗體^[68,69]之體液。而近年來有許多的醫學文獻指出人體體液中的胺基酸濃度與許多疾病^[70,71]有關，如癌症^[72-74]。因此，藉由毛細管電泳等優點，除了可應用於DNA、RNA的檢測上，現在也被使用於人體體液中胺基酸^[75]濃度之檢測與定量。

1.2 電激發化學放光偵測法(Electrogenerated Chemiluminescence)

1.2.1 緒論

在自然界中具有放光性質的分析物不多，若想要以間接化學放光偵測法來分析不具有螢光性質或紫外光/可見光之分析物時，可能需要進行衍生化反應使分析物帶有可放光之官能基或是帶有特定之吸收光基團，再進行偵測。因此，在 1986 年，Cooper 提出^[76]了間接化學放光偵測法，此技術是利用間接化學放光偵測法結合流動式注射分析(flow injection analysis, FIA)，對於酸根與鹵素等陰離子進行分析。除此之外，間接化學放光偵測法也可以結合毛細管電泳作為使用。一般而言，利用衍生化反應進行化學放光偵測的方式較為普遍，可進行衍生化之分析物有：胜肽^[77,78]、胺基酸^[79,80]、蛋白質等。但進行衍生化反應需要考慮到：有無適合之衍生化試劑、反應時間、反應之完全性、衍生物之穩定性(單一分析物之衍生物有其他副產物)、及衍生化反應條件對放光強度之影響等因素。

化學放光偵測法之裝置很簡單，只需要一個可進行化學反應之反應槽，還有收集化學放光訊號之光電倍增管(PMT)，並不需要額外的激發光源，進行偵測時，也不會受到所產生的迷光(stray light)干擾，因此，背景雜訊較低，偵測極限可以達到 10^{-7} - 10^{-10} M。其應用範圍也相當廣泛，例如：流動式注射分析(FIA)、液相層析、氣相層析等，

都可以結合化學放光偵測法。而會影響化學放光反應的因素有很多，例如：氧化劑與催化劑之種類與濃度、放光試劑等。化學放光偵測法常用之放光試劑有：bis(2,4,6-trichlorophenyl)peroxyoxalate (TCPO)、acridiniumesters、(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) (luminol)、tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)，其中最常被使用於水溶液系統的是 luminol 與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。然而，會影響到化學放光強度之環境因素為：溶劑、離子強度、pH 值及溫度等。由於影響化學放光偵測法之影響因素與進行分離之最佳化條件與最理想條件無法一致，因此，導致在實驗條件上會有所限制。

電激發化學放光(Electrogenerated Chemiluminescence or Electrochemiluminescence, ECL)是近幾十年發展出來的另一種化學放光(Chemiluminescence, CL) 偵測法，其以間接或是直接的方式，並利用電化學反應所產生出來的化學放光，是屬於光電化學(spectro-electrochemical)的一種。於 1927 年，Dufford 等人，在溶於無水醚的格林鈉試劑溶液中，於陰極或陽極施加 500-1500 V 的電壓之電解過程中所觀察到的光放射現象。在 1929 年時，Harvey^[81]發現，當在鹼性溶液中之電極表面施加 2.8 V，進行電解可產生 luminol 的化學放光反應。而電激發化學放光是指以下幾種的放光反應^[82]：

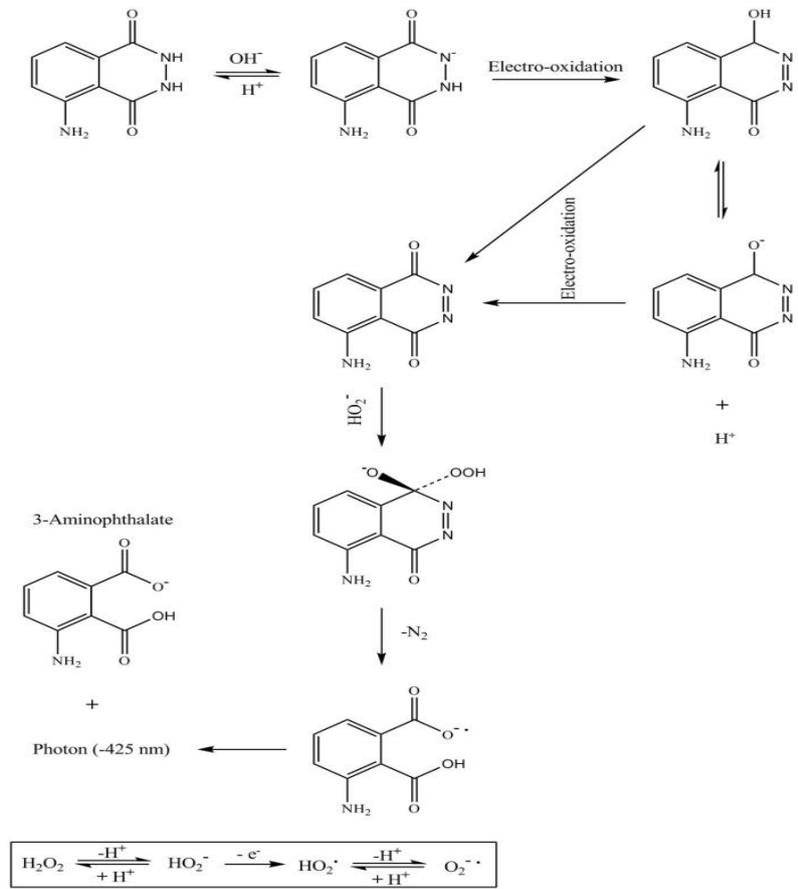
- I. 以電化學方法作為起始的化學放光反應，如：luminol 的電化學氧化反應。
- II. 在電極之間利用電化學方法所產生之自由基進行高能電子轉移反應，如：聚芳香烴類(Polyaromatic Hydrocarbons, PAHs)之間的自由基離子重組。
- III. 將電化學方法進行修飾，參與化學放光反應中的分析物。
- IV. 陰極極化(cathodic polarisation)，在金屬電極上塗覆氧化物(如：鋁、鎂、鎵、銻)，使高能電子轉移至電極表面，還原 O_2 、 H_2O_2 、 $S_2O_8^{2-}$ ，產生放光，稱之為陰極放光。
- V. 無機離子(如：某些過渡金屬錯合物)之間的高能電子轉移反應。
電激發化學放光之實驗裝置簡易、低偵測極限及化學放光之高靈敏度等。

雖然化學放光分析法已發展了很長的一段時間，但以選擇性與靈敏度來說，電激發化學放光相較於化學放光具有以下優點^[82]：

- I. 藉由電極電位之調整，可以控制反應之起始、反應過程、反應速率，在電極表面上可以直接原位(in-situ)生成 ECL 反應所需之活性試劑。
- II. 藉由電位之調整，可有效控制放光之訊號強度，ECL 反應之放光區域集中於電極表面，偵測器容易定位，因此可提升靈敏度。

III. 在 ECL 反應中，某些分析物可以在電極表面藉由電化學的方法再生，藉由分析物的循環生成，不僅可以提升放光量，也提高了偵測靈敏度。

傳統之化學放光反應可改由電化學方法開始，最多是以 luminol 作為研究，傳統的化學放光反應與 luminol 的 ECL 反應類似，經過電化學之氧化反應後，luminol 陰離子再氧化為 3-aminophthalate (3-APA) 之激發態，然後放光，如下圖。除此之外，可以利用 ECL 反應進行偵測的，像是具有催化效果之過渡金屬離子或是可以產生過氧化氫之生物酵素反應，及 luminol 和其衍生物等，其應用範圍相當之廣泛。



有關於 HPLC 與 FIA 結合 ECL 的文獻很多，而在近幾年也逐漸發展出結合 CE 的方法。HPLC 或 FIA 之進樣量約為 μL ，CE 之進樣量則約為 nL ，因此在偵測器之設計上有相當的難度。在 1994 年時，Gilman 等人^[80]將偵測器設計為類似 end-column 之電化學偵測裝置^[83]，發展出 CE/luminol- H_2O_2 之 ECL 偵測系統，其藉由 Pt 電極或是一支在內徑為 $25\ \mu\text{m}$ 毛細管內之碳纖維，對 luminol 及 H_2O_2 進行氧化反應，產生 ECL。實驗結果顯示 Pt 電極之靈敏度較高，但是碳纖維之穩定性較佳，這兩種電極對 luminol 之偵測極限分別為 $92\ \text{amol}$ 及 $260\ \text{amol}$ 。利用此系統可以成功地分析經由 N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) 或是 luminol 衍生後的胺類化合物，理論平板數可高達約 90000-140000。1997 年，Forbes 等人^[84]以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 作為 ECL 試劑，並將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 混合於 CE 之高壓端緩衝溶液中，並在毛細管低壓端插入約為深度 $3\ \text{mm}$ 之 Pt/Ir 纖維工作電極，並施加電位 $+1.25\ \text{V}$ (vs. Ag/AgCl)，使經由 CE 分離後之分析物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行反應，產生放光，並以反射鏡將光收集到 PMT 上。此系統可以成功地分析一系列 β -blockers，發現添加 β -CD 與 Triton X-100 並不會降低 ECL 之訊號強度，亦可改善 β -blockers 分離情形，對於 oxprenolol，理論平板數將近有 15000，偵測極限為 $2\ \mu\text{M}$ ($12\ \text{fmol}$)。由於此系統是將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 混合於 CE 之高壓端緩衝溶液中，

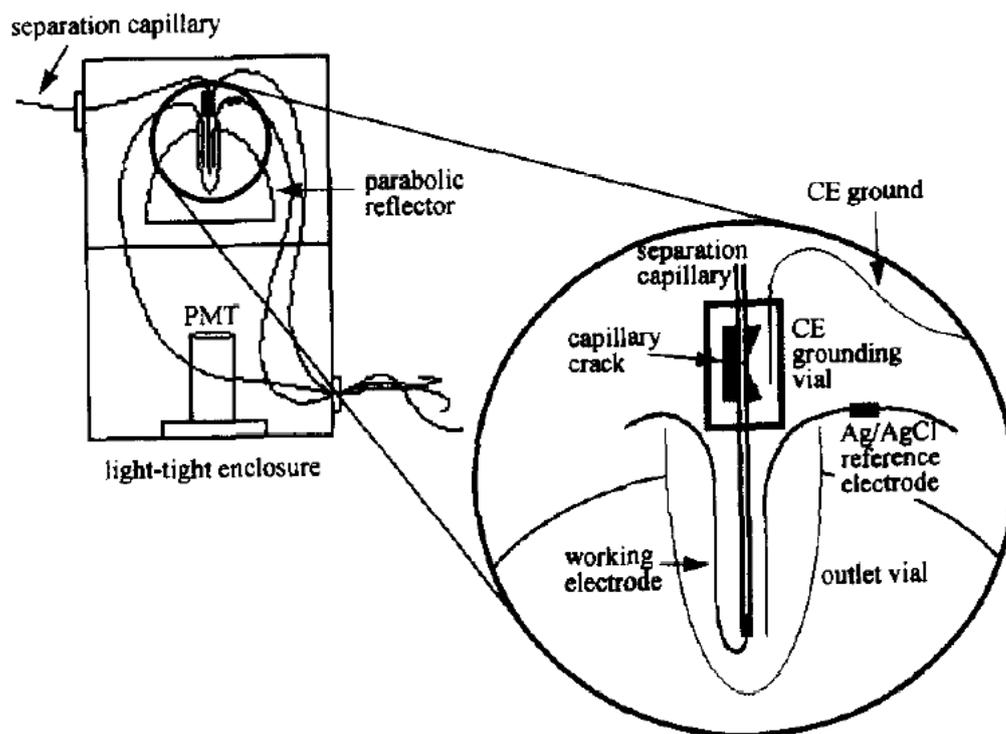


圖 1-3 Forbes 等人^[84]設計的 Ru(bpy)₃²⁺/ECL 偵測器之示意圖

所以進行電泳時， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 會吸附於毛細管壁上，產生電滲流變化大，導致平衡時間過長，而且當分析物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 之移動速度不同時，會使得波峰有變寬之現象。

Tsukagoshi 等人^[85]也設計出一個類似於 CL 偵測^[86]之 ECL 偵測系統，藉由一個連接器將氧化劑導入毛細管末端。首先，利用幫浦 (pump) 以 40 mL/min 的流速將溶於 H_2SO_4 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 導入一個獨立的電化學反應槽，碳電極會先將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 氧化成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 會隨著液體流至位於 PMT 前毛細管末端之 CL 反應槽中，並會與流出毛細管之分析物混合而產生 CL 反應進而放光。此裝置需要幫浦來輸送 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，因而增加複雜度，且因為 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的流速大，因此藥品消耗量大，這不僅會增加成本，同時也產生了許多的廢液。後來 Dickson 等人^[87]也同時發展出 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / ECL 偵測系統，其裝置類似於 Forbes^[84]的設計，不同的是在於此系統的工作電極是位於毛細管末端之出口處，未插入毛細管內。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液是置於管柱末端 (end-column) 之電化學反應槽中，並在反應槽中產生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行 ECL 反應。此系統是使用內徑為 100 μm 、外徑為 360 μm 的毛細管，並以 proline 與 tripropylamine 作為測試之分析物，偵測極限則分別為 1.3×10^{-5} M、 3.7×10^{-5} M。由於工作電極在管柱末端之外，因此間隙體積大，造成波峰變寬之現象產生，proline 理論平板數則僅為 4225。

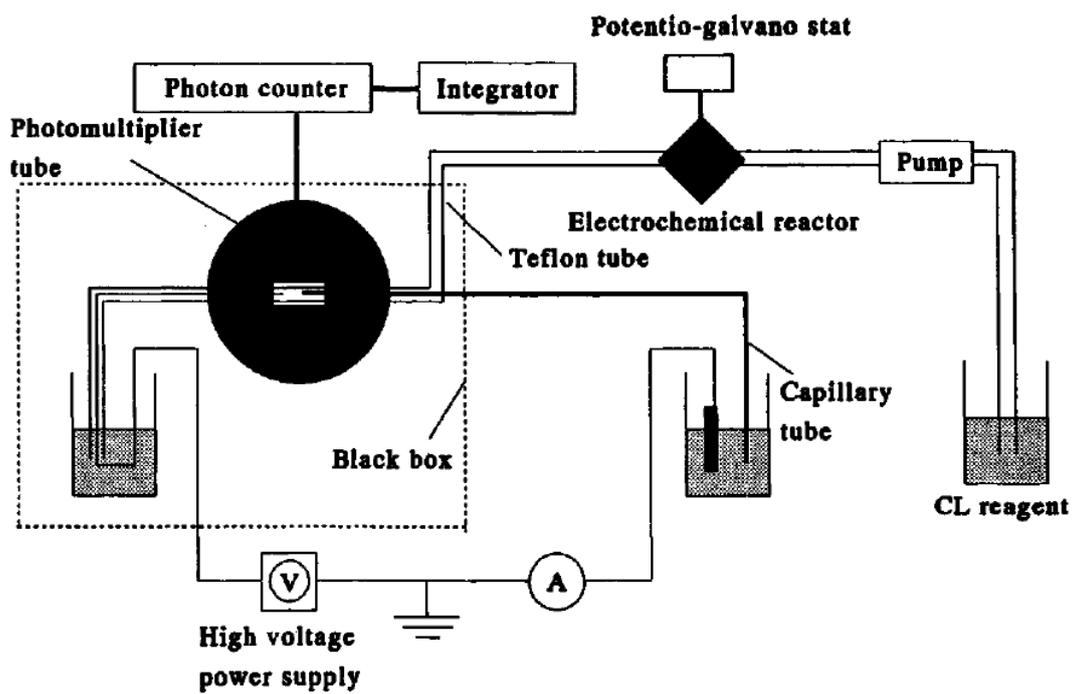


圖 1-4 Tsukagoshi 等人^[85]設計的 CE/ECL 偵測器之示意圖

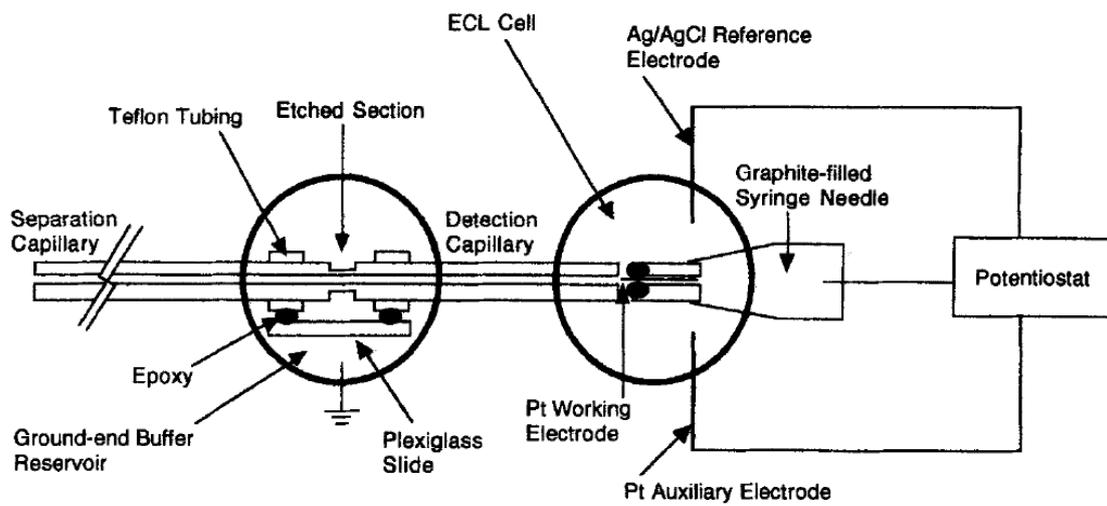


圖 1-5 Dickson 等人^[87]設計的 CE/ECL 偵測器之示意圖

在 1998 年時，Bobbitt 等人^[88]以類似於 Forbes^[84]隔離電泳之高電壓的方式，在距離毛細管末端 4 cm 處切一缺口，並塗覆具有陽離子交換性質的 Nafion 高分子膜，且其偵測器之設計與 Dickson 之設計^[87]皆是以管柱末端偵測的形式，以 35 μm 之碳纖維為工作電極，施加電位 1.15 V (vs. SCE) 氧化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，經由毛細管分離後的分析物會在電極表面上與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行 ECL 反應。並以 15 mM 硼酸鈉緩衝溶液 (pH 9.5)，分離電壓為 20 kV 之實驗條件下，可以成功地分離 proline、serine、triethylamine、valine，proline 的理論平板數約為 20000。

對於 proline 與 triethylamine 有較高之靈敏度，偵測極限分別為 68 nM、120 nM，而 serine 與 valine 之偵測極限則為 100 μM 、58 μM 。由於此偵測反應槽的容積為 100 μL ，而流出毛細管之背景電解液會使得反應槽中之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度改變，因此每隔四小時需更換新的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液，所以在操作上較不方便。

1999 年，Bobbitt 和 Wang^[89]將分離用之毛細管末端放置位於 T 型連接器內之反應毛細管中，並將分離用之毛細管末端燒除 2-3 mm 的 polyimide 作為偵測視窗，反應毛細管的另一端則放入 Pt 工作電極。利用幫浦 (pump) 以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速，再由 T 型連接器輸送 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 至反應毛細管，經由毛細管分離後的分析物會與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 同時在反應毛細管內的電極表面進行 ECL 反應。為了要避免電泳之高電場會

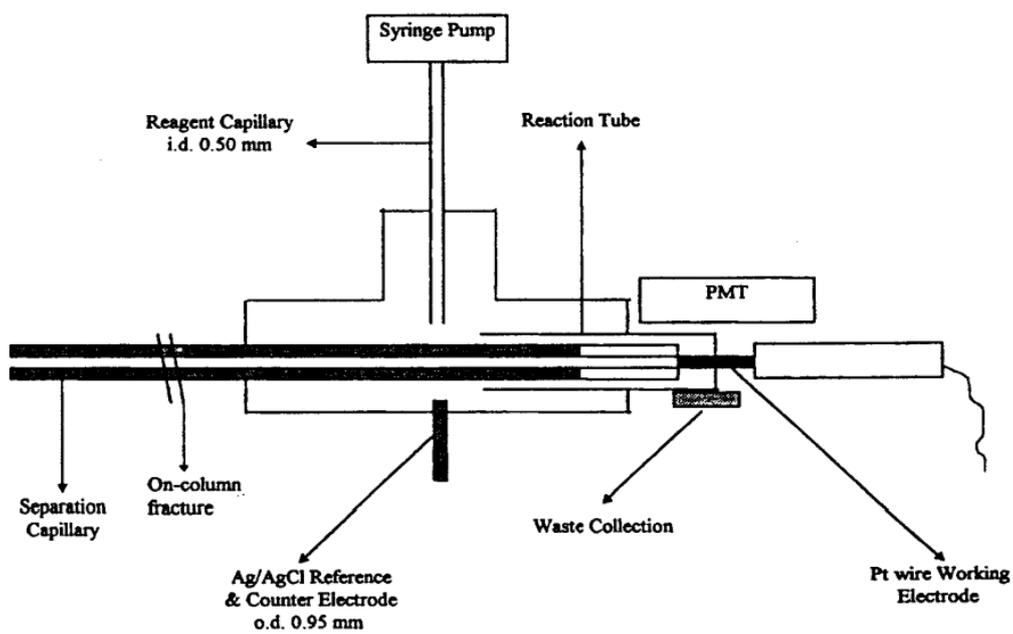
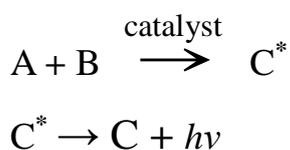


圖 1-6 Bobbitt 和 Wang^[89]設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL 偵測器之示意圖

對偵測系統產生干擾，於是亦製作了可以隔絕高電場的裝置。此系統具有良好的分離效果，以 15 mM 硼酸鈉(pH 9.0)混合 10 % (v/v) 氫甲烷作為背景電解質，在分離電壓為 20 kV 之實驗條件下，可分離 lysine、methionine、phenylalanine、proline、triethylamine、valine，理論平板數約為 74000-80000，對於 proline、phenylalanine、valine 之偵測極限，分別為 0.2 μM 、0.5 μM 、0.7 μM 。可以利用幫浦來固定輸送 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 至電極表面之流速，即可解決偵測槽內需要更換 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液的問題，除了會增加 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的消耗量之外，電泳之高電場與偵測器之間的隔絕裝置亦增加了實驗操作上的難度。

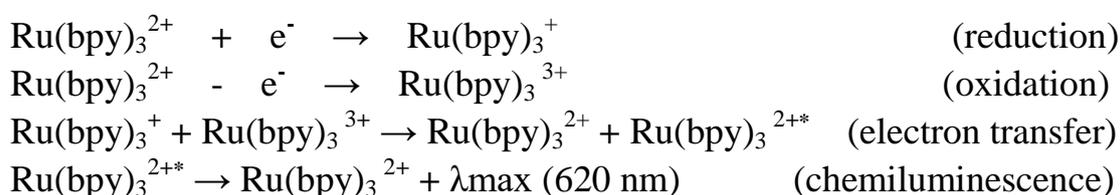
1.2.2 電激發化學放光系統之原理與應用

藉由化學反應而產生之光放射現象，稱為化學放光 (Chemiluminescence, CL)，其反應機制如下：

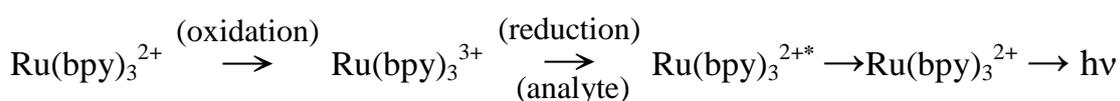


化學反應是由反應物 A、B，經由催化劑，產生激發態 C^* ，當激發態 C^* 回到基態 C 時，將能量以放光的形式釋放出來，此現象即稱為化學放光^[90-92]。在自然界中也有少數生物會有化學放光之現象，如：螢火蟲，稱之為生物放光 (bioluminescence, BL)。

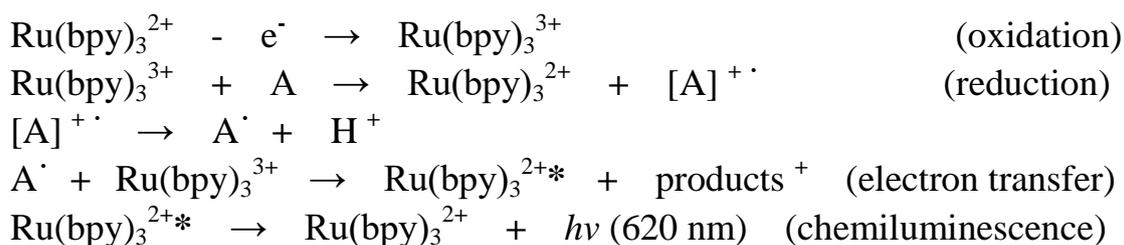
最常被研究於可與 ECL 產生反應之有機金屬錯合物或是無機分子的試劑是 tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)，是水溶液系統中最常使用之試劑之一。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 具有氧化還原之特性，在室溫下也有很好的化學穩定性，就算是在含氧之水溶液中，也不會影響到放光效率。在電極表面上 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 行氧化還原反應產生放光之機制^[82]，如下：



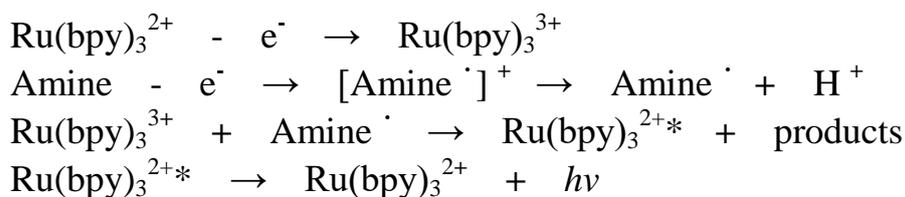
從電化學反應中所產生的激發態 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ ，其量子產率高、半生期長^[93]，因而使得 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在 ECL 研究中備受關注。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 之放光機制亦可簡化為：



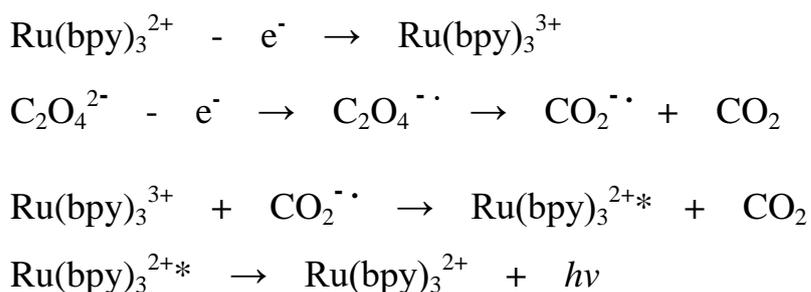
在有 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 參與的 ECL 反應中，分析物有時候可當還原劑，取代上述反應中之還原反應，其機制如下：



某些分析物不容易被進行衍生化，卻可以直接在電極表面上進行氧化反應，例如：烷基胺(alkylamines)，更可以利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 來達到放光進行偵測，其反應機構如下：



此外，非放光反應之草酸鹽(oxalate)，也可以藉由 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 產生自由基 $\text{CO}_2^{\cdot-}$ ，並進行反應，產生放光，其反應機構如下：



在電極表面上氧化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，產生高氧化之活性試劑 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 後，再與具有還原性之分析物在電極表面上進行高能之電子轉移，產生具有放光性質的激發態 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ ，當激發態 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 回到基態時，會伴隨著放射出 620 nm 的光，其放光強度要視 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 還原為 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 的機制^[82] 與效率而定，也可以利用放光強度之測定，用以推測出分析物之濃度。

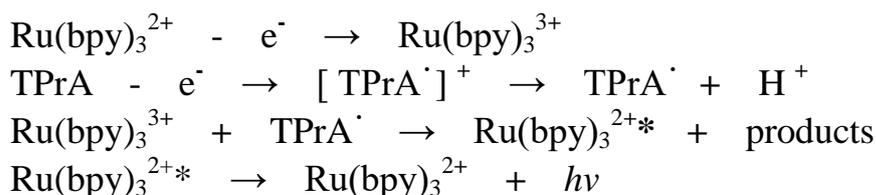
可以生成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 的方法有兩種：電化學氧化法 (electrochemical)、化學/光化學法 (chemical/photochemical)。若是利用化學/光化學法所產生之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，是屬於化學放光；利用電化學氧化法則是屬於電激發化學放光，即為 ECL。化學氧化法是利用氧化劑(如：二氧化鉛^[94]等)氧化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，形成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，此為一種較為簡便又快速的製備方法，但是此方法無法穩定地持續提供 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，因此在分析之應用上較為不普遍。Shinozaki 等人^[95,96]利用 UV 光去照射含有 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液來產生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，並結合 LC 來分析各種 amines^[95,96]與 amino alcohols^[97]。利用電化學氧化法生成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 的方式，以分析物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 的反應位置又可以分為兩種，即電化學氧化與原位電化學放光 (in situ electrochemiluminescence)。電化學氧化是在電化學反應槽中生成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，再以幫浦輸送 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 與分析物混合，產生 CL 反應進而放光。而原位電化學放光則是在電極表面上產生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，直接與分析物在電極表面進行反應，產生 ECL，是目前最常使用的方法。

近年來許多關於 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / ECL 分析方法之研究，大多都著重於 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / amine 的系統上，其他含有胺基或是胺類(amine)之分析物，如：蛋白質、脂肪胺、胺基酸、環胺，及其他許多藥物分子等，皆可利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / ECL^[98]來進行測定。此系統對於胺類之分析物

具有極高之靈敏度，ECL 的必要條件^[99]為連接胺基的烷基鏈上之 α -碳，具有容易移除的氫原子，而此原子經過去質子化後，形成自由基，與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 產生 ECL 反應進而放光。若是胺基上的氮或是 α -碳，接有推電子基，如烷基，即可穩定去質子化後之自由基，藉此可加強 ECL 之強度。因此，增加烷基的碳數目或鏈長，就可以增強對於自由基的穩定性，所以對於 ECL 強度來說，以三級胺最大，二級胺次之，最弱的則是一級胺。但若是推電子基穩定自由基的能力太強的話，反而會阻礙胺類分析物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 之間的反應，導致放光強度降低。由於芳香胺具有極佳的穩定自由基的能力，因此 ECL 強度相對較弱，根據文獻指出，對於三苯基胺、二苯基胺、苯胺，均無法觀察到 ECL^[100]。

雖然 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / amine 的 ECL 系統有優點，但相對的在使用上也有一些限制。在 ECL 的反應上 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 選擇性低，因此在進行分析前，必須先將分析物與其他干擾物質分離，以提高選擇性。此外，利用電化學方法所產生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 會與水分子進行反應，進而產生背景雜訊^[101,102]，因此在偵測上的影響很大，尤其是一、二級胺。

在胺類分析物中，其中以三丙基胺 (tripropylamine, TPrA) 與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 之反應，擁有最好的電激發化學放光強度，ECL 反應機制^[100,103,104]如下：



上述之反應機制，可以藉由高活性之自由基，還原 Ru(bpy)_3^{2+} ，產生激發態之 Ru(bpy)_3^{2+*} 。也可以藉由氧化 TPrA，再經過去質子化以形成自由基，並與 Ru(bpy)_3^{3+} 進一步氧化或是進行 ECL 反應。

在 Ru(bpy)_3^{2+} / ECL 系統中，TPrA 可以視為分析物，亦可以利用其過量之濃度來定量 Ru(bpy)_3^{2+} 。此外，也可以藉由 Ru(bpy)_3^{2+} 與其他分析物進行 ECL 反應來定量分析物。所以此系統常被廣泛使用於 DNA 檢測 (DNA-probe assay)^[105,106] 或免疫分析 (immunassay)^[107,108] 上。在 ECL 檢測上，以 Ru(bpy)_3^{2+} 或 TPrA 為分析物，皆有很高之靈敏度，有文獻指出，TPrA 之偵測極限最低可達 $2.8 \times 10^{-13} \text{ M}$ ^[100]，而 Ru(bpy)_3^{2+} 之偵測極限最低則為 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ ^[109]。

Ru(bpy)_3^{2+} / ECL 可以結合 CE 或 LC 作為一種偵測方法，具有分析物之多樣性、低偵測極限、線性範圍寬等優點。與其他偵測方法相比，例如：螢光偵測，分析物需要經由衍生化反應之後才能進行偵測，但 Ru(bpy)_3^{2+} / ECL 則不需要，對於混合之分析物，可以直接藉由 CE 或 LC 分離，來提高偵測之選擇性。由於 CE 具有樣品消耗量少、分離效率高、解析度佳、分析時間短等優點^[110]，因此，結合

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ ，儘管是極少之進樣量，亦可達到理想之偵測效果，
所以近年來對於 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ 結合 CE 之研究已被廣泛運用。

1.3 胺基酸

1.3.1 緒論

胺基酸，是構成蛋白質的基本單位，也是重要的生物指標之一，其為雙性分子(amphoteric molecules)，在分子結構中同時含有羧基(-COOH)與胺基(-NH₂)。在溶液狀態下的各種胺基酸，會隨著不同的 pH 值而改變，使羧基與胺基的帶電基團，形成不同的帶電型式，例如：在酸性溶液環境下，羧基不容易解離，而胺基會解離帶有正電，因此，整個胺基酸帶有正電荷；若是在鹼性溶液環境下，羧基會解離帶有負電，胺基則不容易解離，因此，整個胺基酸帶有負電荷。

胺基酸可分為三大類：基本胺基酸、次要編碼胺基酸、其他胺基酸；基本胺基酸又可分為兩類^[111]：必需胺基酸、非必需胺基酸。必需胺基酸，為動物體無法自行製造，或是體內生成的速度無法滿足身體機能的需求，因此，需要藉由食物來取得。而人體可從外界攝取到的胺基酸有 22 種，其中為 8 種必需胺基酸、12 種非必需胺基酸以及 2 種次要編碼胺基酸。

以分子量的大小來說，胜肽介於胺基酸與蛋白質之間。藉由兩個胺基酸形成醯胺鍵(peptide bond)連結在一起，而其中一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的胺基結合，並失去一個水分子，形成二胜類，以此類推，將數個胺基酸進行此反應，即為胜肽類，而胜肽在人體中，

有著抑制賀爾蒙^[112]及免疫調節^[113]等功效。若是把更多的胺基酸互相連結聚合形成更大的巨分子，即為蛋白質。而其主要結構是以線性排列而成，且會隨著胺基酸的序列不同，所生成的蛋白質構型、活性、功能會有所不同，最主要是傳輸水分、養分以及催化生理代謝反應的酵素等功能。當蛋白質失去功能時，會由蛋白酶水解成胜肽，再降解為胺基酸，並經由血液的運送再被利用，或是藉由酵素轉換成其他的代謝胺基酸，最後由尿液排至體外。因此，在許多的醫學文獻中，證實人體體液中的胺基酸與胜肽的含量與許多疾病有關，例如：癌症^[114]。

1.3.2 食品中的胺基酸

在人類所攝取的食品中，有許多豐富的胺基酸，並藉由這些胺基酸，來維持人體的正常機能運作。但是過量的攝取或是缺乏都不好，像是苯丙胺酸，其經由酵素轉換為酪胺酸，然後再轉換為多巴，也會被其他不同的酵素轉換為神經傳導物質，例如：腎上腺素、多巴胺等。當苯丙胺酸的含量過高時，會導致智力成長緩慢，因此，在飲食上需要控制，避免攝取過多含有苯丙胺酸的食物，否則會因為肝臟無法將人體中多餘的苯丙胺酸轉換為酪胺酸，造成體液中含有大量的苯丙胺酸，因而患有苯丙胺酸尿症。

在茶葉中，胺基酸與兒茶素及咖啡因等化合物，隨著發酵程度以及製茶技術的不同，而有各自獨具特色的口感與香氣，像是經過特殊烘焙的鐵觀音及凍頂烏龍茶，因為在加熱的情況下，胺基酸與醣類會發生梅納反應(Maillard reaction)^[115,116]，因此茶葉帶有焦糖香味。除此之外，茶葉中的胺基酸含量也會影響到神經遞質含量，如：血清素、去甲腎上腺素等，而對血壓及大腦有所影響；茶葉中的兒茶素約占茶多酚總量的 70%，是重要的生物活性物質，其具有抗氧化、清除自由基等功用；另外，對於哺乳動物的中樞神經系統，茶葉中的 γ - 氨基丁酸(GABA)為抑制神經遞質的重要角色，且若是長時間飲用茶品，發現可以降低血壓。目前已經發展出許多不同的方法來檢測茶葉中的胺基酸濃度，甚至是茶葉中的農藥殘留等，因此，確切知道茶葉中胺基酸的含量，對生物學上及臨床上的研究是有所幫助的。

1.3.3 生物體內的胺基酸

胺基酸在人體內除了用於合成胜肽與蛋白質外，與某些疾病和人體的修復機制亦有關，像是人體內的半胱胺酸為氧化還原反應的重要角色，若是缺乏半胱胺酸，可能會產生皮膚損害、肝功能損害等疾病；當人體受到放射線傷害，半胱胺酸也是修復的角色，同時更是芳香族與丙烯晴的解毒用藥。在人體的中樞神經系統內，穀胺酸則為興奮性

神經遞質，在醫學上可以改善智力發育與治療肝昏迷；在人體免疫方面，為免疫細胞分裂的前導物質，可以加速細胞分裂、提高免疫力等功用。穀胺醯胺在人體腎臟中，可以產生氨，來達到酸鹼平衡；在細胞內可以作為替代能量，阻止蛋白質分解。

在人體尿液中的胺基酸，如： γ -氨基丁酸(GABA)，其含量可以作為罹患癌症的指標^[117]；而無法將苯丙胺酸(Phenylalanine)轉換為酪胺酸(Tyrosine)之胺基酸代謝紊亂者，亦可稱為苯丙酮尿患者^[118]。在生物液體中，脯胺酸(Proline)是以游離、胜肽和蛋白質的形式呈現，它的含量變化與各種疾病，如腫瘤^[119]和慢性尿毒症^[120]有關。體液中游離的脯胺酸含量，對於腎功能不全或慢性尿毒症患者是一個重要的生物參數，通常患者體液中的脯胺酸含量是高於健康的人^[121]。因此，藉由分析尿液中的脯胺酸含量，可以判斷病人是否腎功能不全或是患有慢性尿毒症，所以，為了追蹤患者之康復狀況或是想要更了解自身的身體健康狀況，則必須確切知道尿液中胺基酸的正常值。

1.3.4 與癌症相關之胺基酸

除了上述之胺基酸與癌症有關之外，像是從肝癌患者之血漿中的支鏈胺基酸(Branched-chain amino acid, BCAA)與酪胺酸的比值^[122,123]，其與正常人的比值相較起來就有明顯的差異。而在胃的惡性腫瘤組織

[124] 中，牛磺酸、蘇胺酸、絲胺酸、脯胺酸、甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、酪胺酸、賴胺酸含量高($P < 0.05$)。進展期腫瘤與早期腫瘤相比，脯胺酸、纈胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、苯丙胺酸高($P < 0.05$)。癌症腫瘤與胺基酸代謝^[125]的關係，這些癌症腫瘤包括喉癌 Hep II 細胞，急性非淋巴細胞白血病和急性淋巴細胞白血病，結果顯示：(1)喉癌細胞株培養過程中亮胺酸、賴胺酸、絲胺酸、天門冬醯胺、異亮胺酸、甘胺酸以及蘇胺酸等水平明顯降低，而色胺酸水平明顯增加，說明喉癌細胞的生長繁殖必須依賴以上 7 種胺基酸，同時釋放色胺酸；(2)急性非淋巴細胞白血病(ANLL)患者血漿中的谷胺酸、甘胺酸、亮胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸等水平明顯升高，而蘇胺酸、組胺酸、丙胺酸等水平明顯降低，這些結果與國際報導一致；(3)經治療後，ANLL 患者血漿中的甘胺酸、色胺酸和苯丙胺酸等水平明顯降低，而丙胺酸、組胺酸等水平明顯升高，表明腫瘤細胞是處在無氧代謝。患者經治療後，色胺酸和苯丙胺酸水平降低和組胺酸水平的升高對患者預後是有益的；(4)急性淋巴細胞白血病患者血漿中的苯丙胺酸、賴胺酸、色胺酸和酪胺酸水平提高，這些胺基酸能促進腫瘤生長，而天門冬醯胺、谷胺醯胺以及天門冬胺酸水平降低，說明這 3 種胺基酸為腫瘤生長所必須。此外，還發現 ALL 患者外周淋巴細胞中精胺酸水平增加，精胺酸對癌症腫瘤細胞有直接殺傷作用。

1.3.5 胺基酸之檢測方法

目前在醫療上主要使用於檢測人體體液中胺基酸含量的方法有：氣相層析 (Gas chromatography, GC)、液相層析 (Liquid Chromatography, LC)、毛細管電泳 (Capillary Electrophoresis, CE)、液相層析串聯質譜 (LC / MS) 等。使用 LC 或 CE 進行分析時，需要先将分析物進行衍生化，其分離效果會受到衍生化與衍生化後之結構影響。以下為常見的衍生化試劑：2,3-萘二甲醛 (Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde, NDA)^[126]、2,4-二硝基氟苯 (2,4-dinitrofluoro-benzene, DNFB)^[127]、異硫氰酸苯酯 (Phenyl isothiocyanate, PITC)^[128]、異硫氰酸螢光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC)^[129]、丹醯氯 (5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride, Dns-Cl)^[130] 等。其中，常使用於蛋白質胺端的胺基酸定序檢測之衍生化試劑為：DNFB。雖然 LC / MS 具有快速、高靈敏度等優點，但進行分析時，由於胺基酸的分子量小，因而容易受到基質影響訊號，而且無法有效判斷同分異構物之訊號，進樣時，也容易在游離的過程中受到基質鹽類的影響，而導致游離效果不佳。

1.4 參考文獻

1. Michaelis L: **Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **17**:231.
2. Tiselius A: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J* 1937, **31**(9):1464-1477.
3. Hayashi K: **PCR-SSCP: a method for detection of mutations.** *Genetic analysis, techniques and applications* 1992, **9**(3):73-79.
4. Smooker PM, Cotton RG: **The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations.** *Mutation research* 1993, **288**(1):65-77.
5. Viridi AS, Loughlin JA, Irven CM, Goodship J, Sykes BC: **Mutation screening by a combination of biotin-SSCP and direct sequencing.** *Human genetics* 1994, **93**(3):287-290.
6. Knox JH: **Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation.** *Chromatographia* 1988, **26**:329-337.
7. Hjérten S: **Free zone electrophoresis.** *Chromatographic Reviews* 1967, **9**(2):122-219.
8. Virtanen R: *Acta Polytechnica Scand* 1974, **123**:1.
9. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries.** *Analytical Chemistry* 1981, **53**(8):1298-1302.
10. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**(4621):266-272.
11. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives.** *Journal of Chromatography* 1991, **542**(2):459-471.
12. Grant IH: **Capillary electrochromatography.** *Methods Mol Biol* 1996, **52**:197-209.
13. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromatogr* 1989, **465**(2):331-343.
14. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.

15. Smith RD, Fields SM, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR, Edmonds CG: **Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins.** *Electrophoresis* 1990, **11**(9):709-717.
16. Cohen AS, Karger BL: **High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1987, **397**:409-417.
17. Jacobson SC, Ramsey JM: **Microchip electrophoresis with sample stacking.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):481-486.
18. Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ: **Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):271-276.
19. Hutt LD, Glavin DP, Bada JL, Mathies RA: **Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration.** *Anal Chem* 1999, **71**(18):4000-4006.
20. Naito HK, Wada M, Ehrhart LA, Lewis LA: **Polyacrylamide-Gel Disk-Electrophoresis as a Screening Procedure for Serum Lipoprotein Abnormalities.** *Clin Chem* 1973, **19**(2):228-234.
21. Chin AM, Colburn JC: **Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis.** *American Biotechnology Laboratory* 1989, **7**(10A):16-16.
22. Schutzner W, Caponecchi G, Fanali S, Rizzi A, Kenndler E: **Improved separation of diastereomeric derivatives of enantiomers by a physical network of linear polyvinylpyrrolidone applied as pseudophase in capillary zone electrophoresis.** *Electrophoresis* 1994, **15**(6):769-773.
23. Chen H, Zeng Y, Liu BF, Pang DW, Cheng JK: **Influence of soluble polymer polyvinylpyrrolidone on separation of small peptides and amino acids by microchip-based capillary electrophoresis.** *Anal Bioanal Chem* 2002, **373**(4-5):314-317.
24. Carrilho E, Ruiz-Martinez MC, Berka J, Smirnov I, Goetzinger W, Miller AW, Brady D, Karger BL: **Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions.** *Anal Chem* 1996, **68**(19):3305-3313.
25. Chang HT, Yeung ES: **Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography B* 1995, **669**(1):113-123.

26. Kleemiss MH, Gilges M, Schomburg G: **Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(5-6):515-522.
27. Chrambach A, Aldroubi A: **Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1-2):18-22.
28. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
29. Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tsuchiko M: **High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions.** *J Chromatogr A* 1993, **653**(2):329-335.
30. Xu XH, Yeung ES: **Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution.** *Science* 1997, **275**(5303):1106-1109.
31. Dolnik V, Novotny MV: **Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 1993, **65**(5):563-567.
32. Chang PL, Lee KH, Hu CC, Chang HT: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electro-chemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
33. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Analytical biochemistry* 1989, **179**(2):404-412.
34. Honda S, Suzuki K, Kakehi K: **Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis.** *Analytical biochemistry* 1989, **177**(1):62-66.
35. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
36. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.

37. Wey AB, Zhang CX, Thormann W: **Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis. Preparation of extracts for determination of opioids in microliter amounts of body fluids.** *J Chromatogr A* 1999, **853**(1-2):95-106.
38. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice,** Springer-Verlag, New York. 1993.
39. Colyar CL, Tang T, CHien N, Harrison DJ: *Electrophoresis* 1997, **18**:1733.
40. Hjerten S: **High-Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption.** *Journal of Chromatography* 1985, **347**(2):191-198.
41. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *J Capillary Electrop* 1995, **2**(4):191-196.
42. Caslavaska J, Gassmann E, Thormann W: **Modification of a tunable UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds.** *J Chromatogr A* 1995, **709**(1):147-156.
43. Zhang T, Fang Q, Wang SL, Qin LF, Wang P, Wu ZY, Fang ZL: **Enhancement of signal-to-noise level by synchronized dual wavelength modulation for light emitting diode fluorimetry in a liquid-core-waveguide microfluidic capillary electrophoresis system.** *Talanta* 2005, **68**(1):19-24.
44. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **721**(1):109-125.
45. Richter, M. M: **Electrochemiluminescence (ECL).** *Chemical Reviews* 2004, **104** (6):3003-3036.
46. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 1994, **657**(2):265-269.

47. Fister JC, Jacobson SC, Davis LM, Ramsey JM: **Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices.** *Anal Chem* 1998, **70**(3):431- 437.
48. Kang SH, Yeung ES: **Dynamics of single-protein molecules at a liquid/solid interface: implications in capillary electrophoresis and chromatography.** *Anal Chem* 2002, **74**(24):6334-6339.
49. Yang TH, Chang PL: **Determination of RNA degradation by capillary electrophoresis with cyan light-emitted diode-induced fluorescence.** *Journal of chromatography A* 2012, **1239**:78-84.
50. Siles BA, O'Neil KA, Tung DL, Bazar L, Collier GB, Lovelace CI: **The use of dynamic size-sieving capillary electrophoresis and mismatch repair enzymes for mutant DNA analysis.** *J Capillary Electrop* 1998, **5**(1-2):51-58.
51. Chen DY, Swerdlow HP, Harke HR, Zhang JZ, Dovichi NJ: **Low-cost, high-sensitivity laser-induced fluorescence detection for DNA sequencing by capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):237-246.
52. Thormann W, Minger A, Molteni S, Caslavská J, Gebauer P: **Determination of substituted purines in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection.** *J Chromatogr* 1992, **593**(1-2):275-288.
53. Prochazkova A, Krivankova L, Bocek P: **Quantitative trace analysis of L-ascorbic acid in human body fluids by on-line combination of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis.** *Electrophoresis* 1998, **19**(2):300-304.
54. Tim RC, Kautz RA, Karger BL: **Ultratrace analysis of drugs in biological fluids using affinity probe capillary electrophoresis: analysis of dorzolamide with fluorescently labeled carbonic anhydrase.** *Electrophoresis* 2000, **21**(1):220-226.
55. Takahama K, Seo Y, Tomono S, Yukawa N: **Capillary tube isotachopheresis of proteins in early postmortem serum, cerebrospinal fluid and pericardial fluid.** *Nihon Hoigaku Zasshi* 1989, **43**(3):246-250.
56. Tseng HM, Li Y, Barrett DA: **Profiling of amine metabolites in human biofluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **388**(2):433-439.

57. Jumppanen J, Siren H, Riekkola ML: **Screening for diuretics in urine and blood serum by capillary zone electrophoresis.** *J Chromatogr A* 1993, **652**(2):441-450.
58. Sun H, Li L, Wu Y: **Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for simultaneous determination of proline and fleroxacin in human urine.** *Drug Test Anal* 2009, **1**(2):87-92.
59. Kitagishi K, Shintani H: **Analysis of compounds containing carboxyl groups in biological fluids by capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1998, **717**(1-2):327-339.
60. Michalke B, Schramel P: **Application of capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and capillary isoelectric focusing-inductively coupled plasma mass spectrometry for selenium speciation.** *J Chromatogr A* 1998, **807**(1):71-80.
61. Timerbaev AR: **Inorganic analysis of biological fluids using capillary electrophoresis.** *J Sep Sci* 2008, **31**(11):2012-2021.
62. Galli V, Garcia A, Saavedra L, Barbas C: **Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples.** *Electrophoresis* 2003, **24**(12-13):1951-1981.
63. Zunic GD, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z: **Capillary electrophoresis of free amino acids in physiological fluids without derivatization employing direct or indirect absorbance detection.** *Methods Mol Biol* 2012, **828**:243-254.
64. Strieglerova L, Kuban P, Bocek P: **Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection.** *J Chromatogr A* 2011, **1218**(37):6248-6255.
65. Singh AK, Makker SP: **A rapid tube ELISA for human IgG in body fluids using Staphylococcus aureus.** *Clin Chim Acta* 1983, **129**(3):271-277.
66. Homsy J, Thomson-Honnebier GA, Cheng-Mayer C, Levy JA: **Detection of human immunodeficiency virus (HIV) in serum and body fluids by sequential competition ELISA.** *J Virol Methods* 1988, **19**(1):43-56.

67. Lauwers S, Vander Heyden Y, Rombaut B: **Screening of an enterovirus specific RT-PCR ELISA method for the quantification of enterovirus genomes in human body fluids by means of a three-level experimental design.** *J Pharm Biomed Anal* 2001, **25**(1):131-142.
68. Terai I, Kobayashi K, Fujita T, Hagiwara K: **Human serum mannose binding protein (MBP): development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and determination of levels in serum from 1085 normal Japanese and in some body fluids.** *Biochem Med Metab Biol* 1993, **50**(1):111-119.
69. Albrechtsen M, Bock E: **Quantification of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human body fluids by means of ELISA employing a monoclonal antibody.** *J Neuroimmunol* 1985, **8**(4-6):301-309.
70. Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP, Sherlock S: **Plasma amino-acid patterns in liver disease.** *Gut* 1982, **23**(5):362-370.
71. Montanari A, Simoni I, Vallisa D, Trifiro A, Colla R, Abbiati R, Borghi L, Novarini A: **Free amino acids in plasma and skeletal muscle of patients with liver cirrhosis.** *Hepatology* 1988, **8**(5):1034-1039.
72. Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzigmann H, Thiery J, Fiedler GM: **Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer.** *Metabolomics* 2012, **8**(4):643-653.
73. Kao YY, Liu KT, Huang MF, Chiu TC, Chang HT: **Analysis of amino acids and biogenic amines in breast cancer cells by capillary electrophoresis using polymer solutions containing sodium dodecyl sulfate.** *J Chromatogr A* 2010, **1217**(4):582-587.
74. Cheng PN, Leung YC, Lo WH, Tsui SM, Lam KC: **Remission of hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma.** *Cancer Lett* 2005, **224**(1):67-80.

75. Deng YH, Wang H, Zhang HS: **Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *J Sep Sci* 2008, **31**(16-17):3088-3097.
76. Cooper MM, Spurlin SR: **Chemiluminescent Method for Flow Injection Analysis of Anions.** *Analytical Letters* 1986, **19**(23-24): 2221-2230.
77. Ruberto MA, Grayeski ML: **Investigation of acridinium labelling for chemiluminescence detection of peptides separated by capillary electrophoresis.** *Journal of Microcolumn Separations* 1994, **6**(6): 545-550.
78. Gilman SD, Silverman CE, Ewing AG: **Electrogenerated chemiluminescence detection for capillary electrophoresis.** *Journal of Microcolumn Separations* 1994, **6**(2):97-106.
79. Zhao J-Y, Labbe J, Dovichi NJ: **Use of a sheath flow cuvette for chemiluminescence detection of isoluminol thiocarbamyl-amino acids separated by capillary electrophoresis.** *Journal of Microcolumn Separations* 1993, **5**(4):331-339.
80. Dadoo R, Seto AG, Colon LA, Zare RN: **End-column chemiluminescence detector for capillary electrophoresis.** *Analytical Chemistry* 1994, **66**(2):303-306.
81. Harvey N: **Luminescence during Electrolysis.** *The Journal of Physical Chemistry* 1928, **33**(10):1456-1459.
82. Knight AW: **A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1999, **18**(1):47-62.
83. Huang X, Zare RN, Sloss S, Ewing AG: **End-column detection for capillary zone electrophoresis.** *Analytical Chemistry* 1991, **63** (2):189-192.
84. Forbes GA, Nieman TA, Sweedler JV: **On-line electrogenerated Ru(bpy)₃³⁺ chemiluminescent detection of β -blockers separated with capillary electrophoresis.** *Analytica Chimica Acta* 1997, **347** (3):289-293.

85. Tsukagoshi K, Miyamoto K, Saiko E, NAKAJIMA R, HARA T, FUJINAGA K: **High-Sensitivity Determination of Emetine Dithiocarbamate Copper (II) Complex Using the Electrogenerated Chemiluminescence Detection of Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II).** *Analytical sciences* 1997, **13**(4):639-642.
86. Staller TD, Sepaniak MJ: **Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2291-2296.
87. Dickson JA, Ferris MM, Milofsky RE: **Tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium (III) as a chemiluminescent reagent for detection in capillary electrophoresis.** *Journal of High Resolution Chromatography* 1997, **20**(12):643-646.
88. Bobbitt D, Jackson W, Hendrickson H: **Chemiluminescent detection of amines and amino acids using in situ generated Ru(bpy)₃³⁺ following separation by capillary electrophoresis.** *Talanta* 1998, **46**(4):565-572.
89. Wang X, Bobbitt DR: **In situ cell for electrochemically generated Ru(bpy)₃³⁺-based chemiluminescence detection in capillary electrophoresis.** *Analytica Chimica Acta* 1999, **383**(3):213-220.
90. Grayeski ML: **Chemiluminescence analysis.** *Analytical Chemistry* 1987, **59**(21):1243A-1256A.
91. Townshend A: **Solution chemiluminescence-some recent analytical developments.** Plenary lecture. *Analyst* 1990, **115**(5): 495-500.
92. Birks JW: **Chemiluminescence and photochemical reaction detection in chromatography.** *VCH Publishers*:1989.
93. Juris A, Balzani V, Barigelletti F, Campagna S, Belser Pl, Von Zelewsky A: **Ru (II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, eletrochemistry, and chemiluminescence.** *Coordination Chemistry Reviews* 1988, **84**:85-277.
94. Gerardi RD, Barnett NW, Lewis SW: **Analytical applications of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (III) as a chemiluminescent reagent.** *Analytica Chimica Acta* 1999, **378**(1):1-41.
95. Hercules DM, Lytle FE: **Chemiluminescence from reduction reactions.** *Journal of the American Chemical Society* 1966, **88**(20): 4745-4746.

96. Shinozaki O, Kunezaki N, Yamazaki S, Tanimura T: **Chemiluminescent method for aliphatic tertiary amines using Ru (bipy)₃²⁺-S₂O₈ reagent.** *Chromatographia* 1992, 3:275-276.
97. Yamazaki S, Chiba R, Uchikura K, Tanimura T: **Simultaneous determination of primary, secondary and tertiary amines by postcolumn reaction.** *Chromatographia* 1995, 16:322-323.
98. Baeyens W R, Ling B L, Imai K, Calokerinos A C, Schulman S G: **Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis.** *Journal of Microcolumn Separations* 1994, 6 (3):195-206.
99. Yamazaki S, Ozaki K, Saito K, Tanimura T: **Enantiomeric separation of β-amino alcohols with a primary or tertiary amine moiety by reversed phase liquid chromatography with a chiral mobile phase containing copper (II) and (R)-mandelic acid.** *Journal of High Resolution Chromatography* 1995, 18(1):68-70.
100. Knight AW, Greenway GM: **Relationship between structural attributes and observed electrogenerated chemiluminescence (ECL) activity of tertiary amines as potential analytes for the tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) ECL reaction. A review.** *Analyst* 1996, 121(11):101R-106R.
101. Noffsinger JB, Danielson ND: **Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2, 2'-bipyridine) ruthenium (III).** *Analytical Chemistry* 1987, 59(6):865-868.
102. Rubinstein I, Bard AJ: **Electrogenerated chemiluminescence. 37. Aqueous ecl systems based on tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (2+) and oxalate or organic acids.** *Journal of the American Chemical Society* 1981, 103(3):512-516.
103. Rubinstein I, Martin CR, Bard AJ: **Electrogenerated chemiluminescent determination of oxalate.** *Analytical Chemistry* 1983, 55(9):1580-1582.
104. Zu Y, Bard AJ: **Electrogenerated chemiluminescence. The role of direct coreactant oxidation in the ruthenium tris(2,2') bipyridyl/tripropylamine system and the effect of halide ions on the emission intensity.** *Analytical Chemistry* 2000, 72(14):3223-3232.

105. Xu X-H, Yang HC, Mallouk TE, Bard AJ: **Immobilization of DNA on an aluminum (III) alkanebisphosphonate thin film with electrogenerated chemiluminescent detection.** Journal of the American Chemical Society 1994, **116**(18):8386-8387.
106. Xu X-H, Bard AJ: **Immobilization and hybridization of DNA on an aluminum (III) alkanebisphosphonate thin film with electrogenerated chemiluminescent detection.** Journal of the American Chemical Society 1995, **117**(9):2627-2631.
107. O'Connell CD, Juhasz A, Kuo C, Reeder DJ, Hoon DS: **Detection of tyrosinase mRNA in melanoma by reverse transcription-PCR and electrochemiluminescence.** Clinical chemistry 1998, **44**(6):1161-1169.
108. Clifton-Hadley FA: **Detection and diagnosis of Escherichia coli O157 and other verocytotoxigenic E. coli in animal faeces.** Reviews in Medical Microbiology 2000, **11**(1):47-60.
109. De Mello A: **Sub-microliter electrochemiluminescence detector-a model for small volume analysis systems.** Analytical Communications 1997, **34**(12):393-395.
110. Huang X-J, Fang Z-L: **Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis.** Analytica Chimica Acta 2000, **414**(1):1-14.
111. **Protein and amino acid requirements in human nutrition.** *World Health Organ Tech Rep Ser* 2007(935):1-265, back cover.
112. Kitada S, Fujita S, Okada Y, Kim S, Chiba K: **Hydrophobic tag-assisted liquid-phase synthesis of a growth hormone-inhibiting peptide somatostatin.** *Bioorg Med Chem Lett* 2011, **21**(15):4476-4479.
113. Guimond DM, Cam NR, Hirve N, Duan W, Lambris JD, Croft M, Tsoukas CD: **Regulation of immune responsiveness in vivo by disrupting an early T-cell signaling event using a cell-permeable peptide.** *PloS one* 2013, **8**(5):e63645.
114. Cercek L, Cercek B: **Cancer-associated SCM-recognition, immunodefense suppression, and serine protease protection peptide. Part I. Isolation, amino acid sequence, homology, and origin.** *Cancer Detect Prev* 1992, **16**(5-6):305-319.
115. Ellis GP: **The Maillard reaction.** *Adv Carbohydr Chem* 1959, **14**, 63-134.

116. Kaanane A, Labuza TP: **The Maillard reaction in foods.** *Prog Clin Biol Res* 1989, 304, 301-27.
117. Hsieh C-Y, Tsai E-M, Wu H-L: **Simple and sensitive liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the analysis of γ -amino-n-butyric acid in human urine.** *Analytica chimica acta* 2006, **577** (2):201-206.
118. Kitagawa T: **Gas-Liquid Chromatography of Phenylalanine Metabolites in Urine and Sera of Hyperphenylalaninemic and Phenylketonuric Patients.** *Clinical chemistry* 1974, **20**(12): 1543-1547.
119. Palka J A, Phang J M: **Prolidase in human breast cancer MCF-7 cells.** *Cancer letters* 1998, **127** (1):63-70.
120. Sun H, Su M, Li L: **Simultaneous Determination of Tetracaine, Proline, and Enoxacin in Human Urine by CE with ECL Detection.** *Journal of chromatographic science* 2010, **48** (1): 49-54.
121. Sun H, Li L, Wu Y: **Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for simultaneous determination of proline and fleroxacin in human urine.** *Drug Testing and Analysis* 2009, **1** (2):87-92.
122. Nakamura Y, Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Harada K, Ota S, Hirata K: **Cluster analysis of indicators of liver functional and preoperative low branched-chain amino acid tyrosine ration indicate a high risk of early recurrence in analysis of 165 hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy.** *Surgery* 2011, **150** (2):250-62.
123. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Harada K, Kukita K, Hirata K: **Prognostic impact of preoperative the branched-chain amino acid to the tyrosine ratio in hepatocellular carcinoma patients after initial hepatectomy.** *J Gastrointest Surg* 2011, **15** (8):1433-9.
124. 梁晓宇; 王鹏志; 朱理玮; 章志翔; 周德俊; 邱宇杰; 王倩:
胃癌组织中游离氨基酸变化与肿瘤进展程度的关系. *肠外与肠内营养* 2001, **8** (1):1-3.

125. 蒋滢; 黄美英; 戴英; 徐颖: 癌肿与氨基酸代谢的研究. *氨基酸和生物资源* 2001, **23** (2):51-54.
126. Teruhisa Ueda RM, Fumito Kitamura, Timothy Metcalf: **Separation of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by high-performance capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *J Chromatogr A* 1992, **593**(1-2):265-274.
127. She Z, Sun Z, Wu L, Wu K, Sun S, Huang Z: **Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2002, **979** (1-2):227-32.
128. Kim NJ, Kim JH, Lee KJ: **Application of capillary electrophoresis to amino acid sequencing of peptide.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):510-515.
129. S. P. D. Lalljie PS: **MEKC analysis of FITC and DTAF amino acid derivatives with LIF detection.** *Chromatographia* 1995, **40**:513-518.
130. Matsubara N, Terabe S: **Separation of 24 dansylamino acids by capillary electrophoresis with a non-ionic surfactant.** *J Chromatogr A* 1994, **680**(1):311-31

第二章 以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法

分離茶葉中的胺類化合物

2.1 緒論

台灣的民眾大多數皆有喝茶的習慣，喝茶不僅對身體有益處，還有穩定情緒、集中注意力等優點。而在茶類中特有的主要胺基酸為：茶氨酸(theanine)^[1]，是茶葉中的游離胺基酸，也是茶湯甘甜的主要來源，愈是甘甜的茶葉含量也就愈高。而有研究指出茶氨酸可以促進腦中樞多巴胺釋放，提高腦內多巴胺之生理活性，不僅具有減少焦慮、舒緩疲勞等功效，甚至可降低出現憂鬱症的風險。而其他含量較高的成分包括茶多酚、咖啡因及茶鹼等。茶多酚除了可幫助清除人體內的自由基、有抗氧化的功效之外，還可以防齲齒、去口臭等。咖啡因則有助於幫助消化。茶葉中還含有生物鹼，其大多為胺基酸之衍生物，是一種含氮的鹼性化合物，雖然大部分的生物鹼對人體有毒，但它不僅有顯著的生物活性，也是中草藥重要的有效成分之一。偵測胺類與生物鹼的方法有：高效能液相層析串聯質譜(HPLC-MSⁿ)、毛細管電泳與發光二極體誘發螢光和電激發化學放光(CE-LEDIF-ECL)^[2]、毛細管電泳與發光二極體誘發螢光(CE-LEDIF)等。以上方法裝置較為複雜，因此，本實驗利用簡易的毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(CE-ECL)，在具有電滲流(EOF)之電泳環境下進行偵測並分離茶葉

中的胺類化合物。

2.2 實驗部分

2.2.1 實驗試藥

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (tris(2,2' -bipyridyl)ruthenium(II))、四硼酸鈉 (Sodium tetraborate)、SDS (Sodium dodecyl sulfate) 購自 ACROS。磷酸二氫鈉 (NaH_2PO_4)、 β -CD (β -Cyclodextrin) 購自 Merk。磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 購自日本和光純藥工業株式會社。Triton X-100 購自 Alfa Aesar。 α -CD (α -Cyclodextrin) 購自美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

2.2.2 毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之裝置

實驗所使用的高電壓電源供應器，電壓範圍為0 - 20 kV，是購自 Gamma High Voltage Research公司 (Ormond, FL, USA)。實驗中的毛細管是使用內徑為75 μm 、外徑為365 μm ，總長為40 cm的熔融矽毛細管，是購自美國的Polymicro Technologies公司。將自製的ECL反應槽固定於光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 之上方，所偵測到的化學放光訊號，經由光電倍增管將訊號放大，並利用10 k Ω 電阻將電流轉換為電壓訊號，再以10 Hz的頻率，由24-bit數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development) 擷取訊號並轉

換為數位資訊，將資料儲存於電腦，最後由Clarity層析軟體(DataApex, Prague, Czech Republic) 將儲存於電腦中的訊號轉換為電泳圖。

本實驗是利用電化學放光的方式進行，為了避免外在光源會影響實驗結果，所以實驗過程中是在密閉的黑箱內進行，其裝置如圖2-1所示。

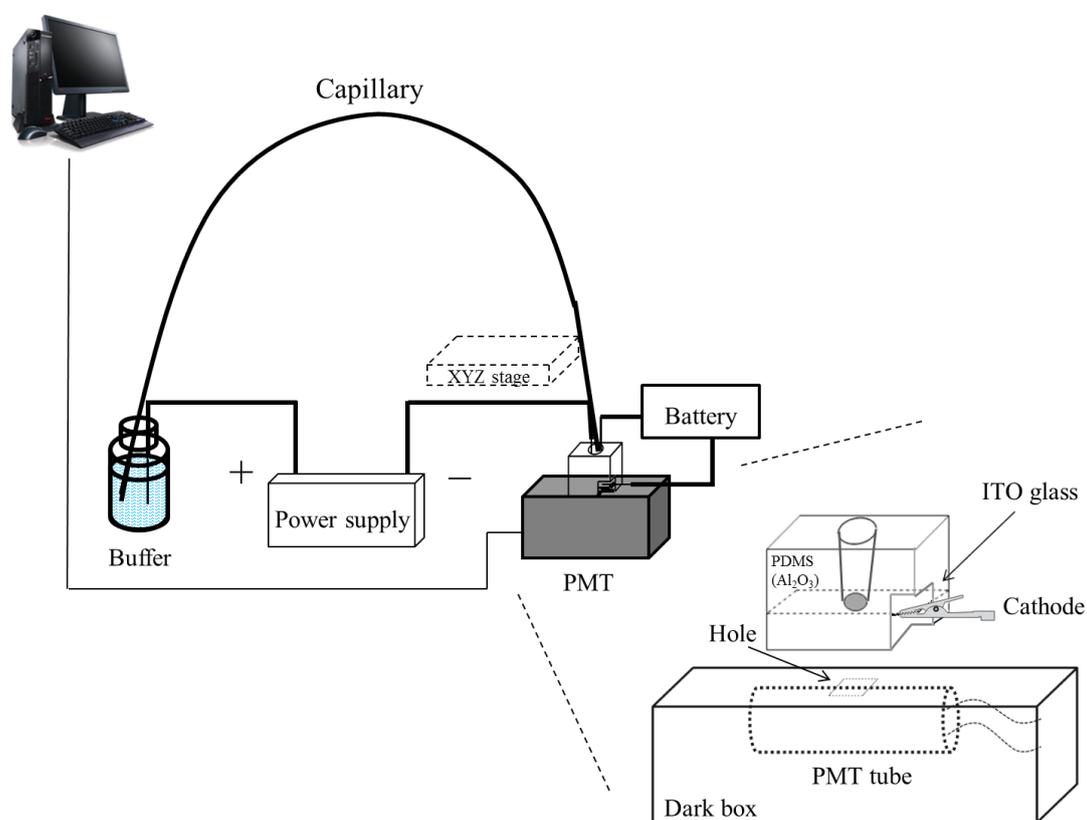


圖2-1 毛細管電泳與電激發化學放光偵測法之裝置圖

2.2.3 ECL 反應槽之製作

取一片 50 mm x 75 mm x 0.7 mm 的 ITO(indium/tin oxide)玻璃電極片(僅一面塗覆 ITO 導電薄膜, $R_s \leq 20 \Omega / \text{squire}$, Delta Technologies 公司(Stillwater, MN, USA)的產品), 並利用鑽石刀切割成約為 10 mm x 15 mm x 0.7 mm 的大小, 將切割好的電極片以稀釋後的清潔劑, 並使用超音波震盪 30 分鐘, 先將殘留於電極片上的清潔劑略微沖洗後, 再使用去離子水震盪清洗 30 分鐘, 最後再以酒精震盪 10 分鐘兩次。並將清洗好的電極片置於拭鏡紙上, 放置烘箱乾燥後, 最後保存於乾燥箱。

先將切割好的塑膠片(約 2 cm x 3 cm)架設好並黏貼固定於模型塑膠盒內, 再依序放入約為 0.5 cm 的矽膠彈性體墊片、ITO 電極片、一側有開口之塑膠片(約 4 cm x 4 cm)、錐尖型的筆頭, 調整好位置後, 再使用 C 型鐵夾固定。以 Sylgard 184 矽膠彈性體、固化劑、 Al_2O_3 (10 : 1 : 0.25 w/w)之膠體混合物, 於混合後放置真空槽中, 進行除氣, 以減少固化期間形成氣泡。將此膠體混合物灌入模型中, 並放置 65 °C 之烘箱內 1 小時, 使其固化。最後再從模型中取出, 使用前再將墊片去除即可。ECL 反應槽之製作示意圖^[3], 如圖 2-2。

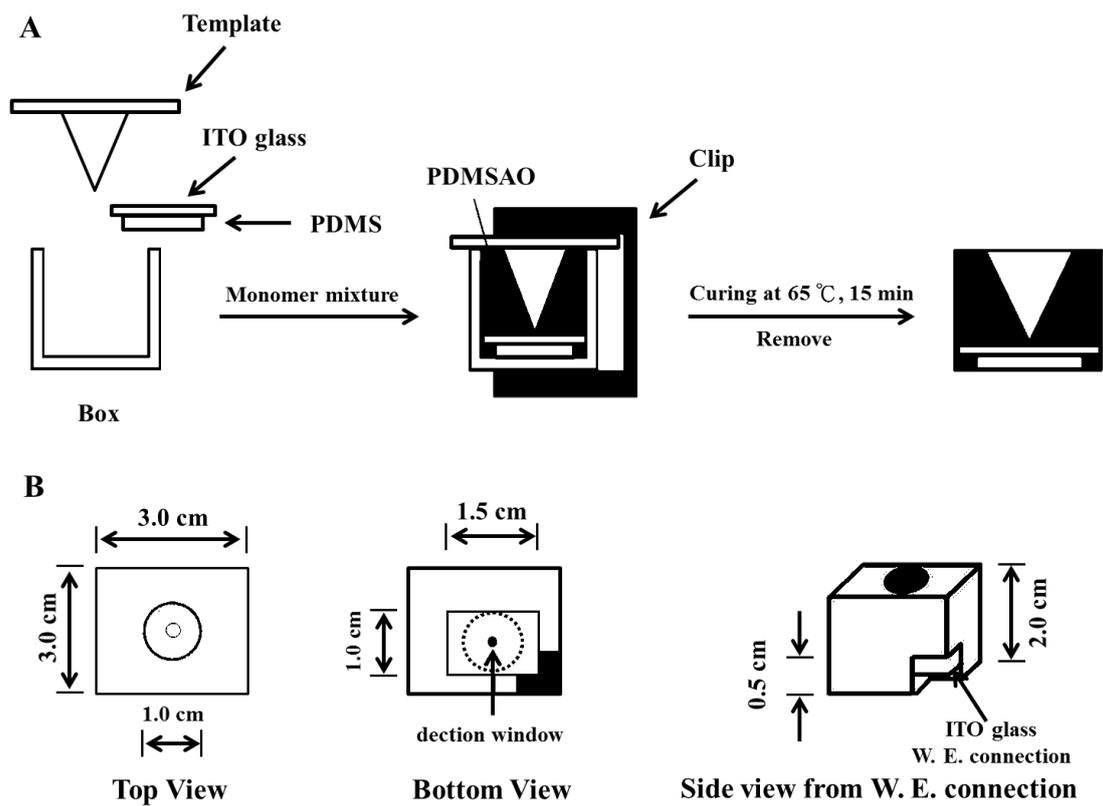


圖2-2 ECL反應槽之製作示意圖

2.2.4 毛細管前處理

在進行實驗前，先利用石英片切一段 40 公分長的毛細管備用。之後，先以去離子水注入毛細管中，活化毛細管內壁官能基，再將事先配製好的 0.5 M NaOH 注入毛細管並靜置十二小時以上，讓毛細管壁上的矽醇基解離。隔天再以實驗選用的緩衝溶液注入毛細管，洗掉內部的 NaOH，並保存於緩衝溶液中。在每次實驗間，皆會使用當天取出的緩衝溶液先將保存液推出，再注入緩衝溶液，提高實驗再現性與靈敏度。

2.2.5 緩衝溶液的配製

在配製緩衝溶液之前，需要先將所需容器用清潔劑刷洗，以去離子水沖洗乾淨，並使用超音波震盪器震盪 5 分鐘。本實驗所使用的緩衝溶液是 10 mM tetraborate, pH 9.0。配製緩衝溶液時，將秤取好的 sodium tetraborate 粉末以去離子水溶解，並測 pH 值，最後將 pH 9.0 的緩衝溶液加入去離子水至體積量瓶之刻度線，即配製完成，並將緩衝溶液保存於 4 °C 冰箱中。而在使用之前需要先從冰箱拿出來，讓溫度降回室溫，才能使用。其餘的緩衝溶液亦是相同之配製方法與保存方法，由於本實驗之系統容易受電流之影響，因此，在調配 pH 值時，皆是使用其相對應的弱酸或是弱鹼來調配。

2.2.6 分析物前處理

本實驗所分析之茶類樣品為一般市售的含有人蔘粉茶葉，首先，秤取 2 克的茶葉，並倒入樣品瓶中，再加入 100 °C 的熱開水，浸泡 15 分鐘之後，以濾紙過濾，去除茶葉與大顆粒的雜質，並讓濾液溫度降至室溫，最後分裝至 1.5 c.c 的 PCR tube，保存於 -20 °C 冰箱中。

2.2.7 實驗流程

進行實驗之前，需要先將自製的 ECL 反應槽之偵測視窗對準於 PMT 正上方的洞口，並將其固定。把市售的兩顆 1.5 V 乾電池串聯成一個電池組，利用三用電表來監視，再藉由可變電阻調整輸出值，以提供 ITO 電極之所需電位，電池組的正極要連接至 ITO 電極上，電池組的負極則是要接上一支白金電極，並放入 ECL 反應槽內。之後將以緩衝溶液配製的 5 mM Ru(bpy)₃²⁺ 填入 ECL 反應槽內，並把前處理過的毛細管，以當天取出的緩衝溶液先推出 3-5 滴後，再注入緩衝溶液至推出 1-2 滴，而將毛細管之末端平貼於 ITO 電極表面上，且利用 XYZ 微調整平台來調整毛細管末端與 ITO 電極的垂直距離與位置。取 10 μL 之茶葉樣品於 200 μL 的 PCR tube，並放入毛細管之前端，再將樣品放至 5 公分以上的高度後，利用前端與末端之高度差，進樣 10 秒，並快速將毛細管之前端放入裝有緩衝溶液且連接高壓電的白金電極之容器內，再施加 +10 kV、+15 kV 的高壓電進行電泳分離。

2.3 結果與討論

本實驗利用毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(CE-ECL)，在具有電滲流(EOF)之電泳環境下進行偵測，並分離茶葉中的胺類化合物。實驗中除了利用不同的緩衝溶液來進行分離之外，也分別在進樣端、末端及毛細管等緩衝溶液中添加不同的界面活性劑與篩分介質來增加分離效率。由於本實驗是使用 ITO 電極自製成化學反應槽，因此，在末端緩衝溶液內添加中性界面活性劑 Triton X-100 來保護 ITO 電極，降低分析物之吸附情形，並在此探討於末端緩衝溶液中添加不同濃度的 Triton X-100 是否為影響訊號高度之因素，但發現隨著增加 Triton X-100 的濃度，其訊號高度並沒有太大的差異，因此證明添加不同濃度的 Triton X-100，並不會影響訊號高度；除此之外，也有探討毛細管末端是否碰觸到 ITO 會因而增加訊號高度，發現當毛細管碰觸到 ITO 時，訊號高度有明顯的增加。最後使用不同濃度的 Boric acid 緩衝溶液來探討分離效果，結果發現 100 mM Boric acid (pH 9.0) 緩衝溶液之分離效果優於 10 mM Tetraborate (pH 9.0) 緩衝溶液。因此偵測茶葉中的胺類化合物之最佳分離效果的緩衝溶液為 100 mM Boric acid (pH 9.0)。

2.3.1 分離條件最佳化

2.3.1.1 緩衝溶液之選擇

在 ECL 偵測法中，由於間接偵測相對於直接偵測的靈敏度來的差，且為了盡量減少水合氫離子或氫氧根離子的干擾，所以緩衝溶液之 pH 值限制於 3.0 - 10.0 的範圍內。一開始之實驗中，是使用 10 mM 檸檬酸(Citric acid)與 10 mM 四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)兩種緩衝溶液進行比較，如圖 2-3，但由於使用 10 mM 檸檬酸(Citric acid)緩衝溶液之實驗結果皆不是很穩定，因此，後續實驗是選用 10 mM 四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)緩衝溶液來進行分離條件最佳化。利用固定的 pH 值 9.0，可以使茶葉中的胺類化合物解離並帶有電荷，使帶有電荷的化合物進行分離。實驗最後選用硼酸(Boric acid)緩衝溶液與 10 mM 四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)緩衝溶液進行比較，如圖 2-4，結果顯示，使用硼酸(Boric acid)緩衝溶液的分離效果優於四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)緩衝溶液，而且 100 mM 硼酸(Boric acid)緩衝溶液的分離效果又優於 50 mM 硼酸(Boric acid)緩衝溶液。

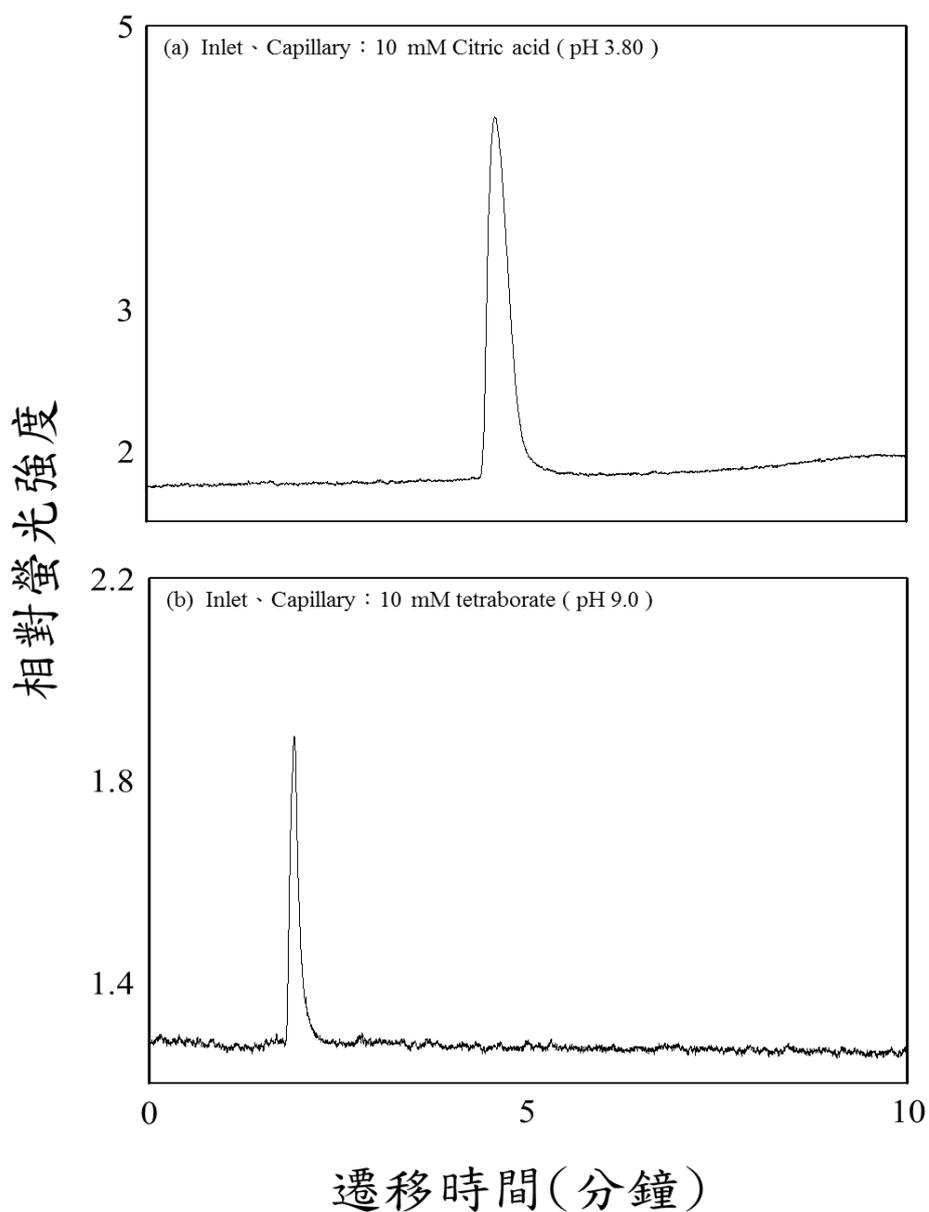


圖 2-3 使用不同的緩衝溶液分離二、三級胺之標準品，以尋找最佳的分離緩衝溶液。

(a)三級胺之標準品：1 mM TPA。

(b)二級胺之標準品：1 mM Proline。

Outlet 皆為：10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM Ru(bpy)₃²⁺。

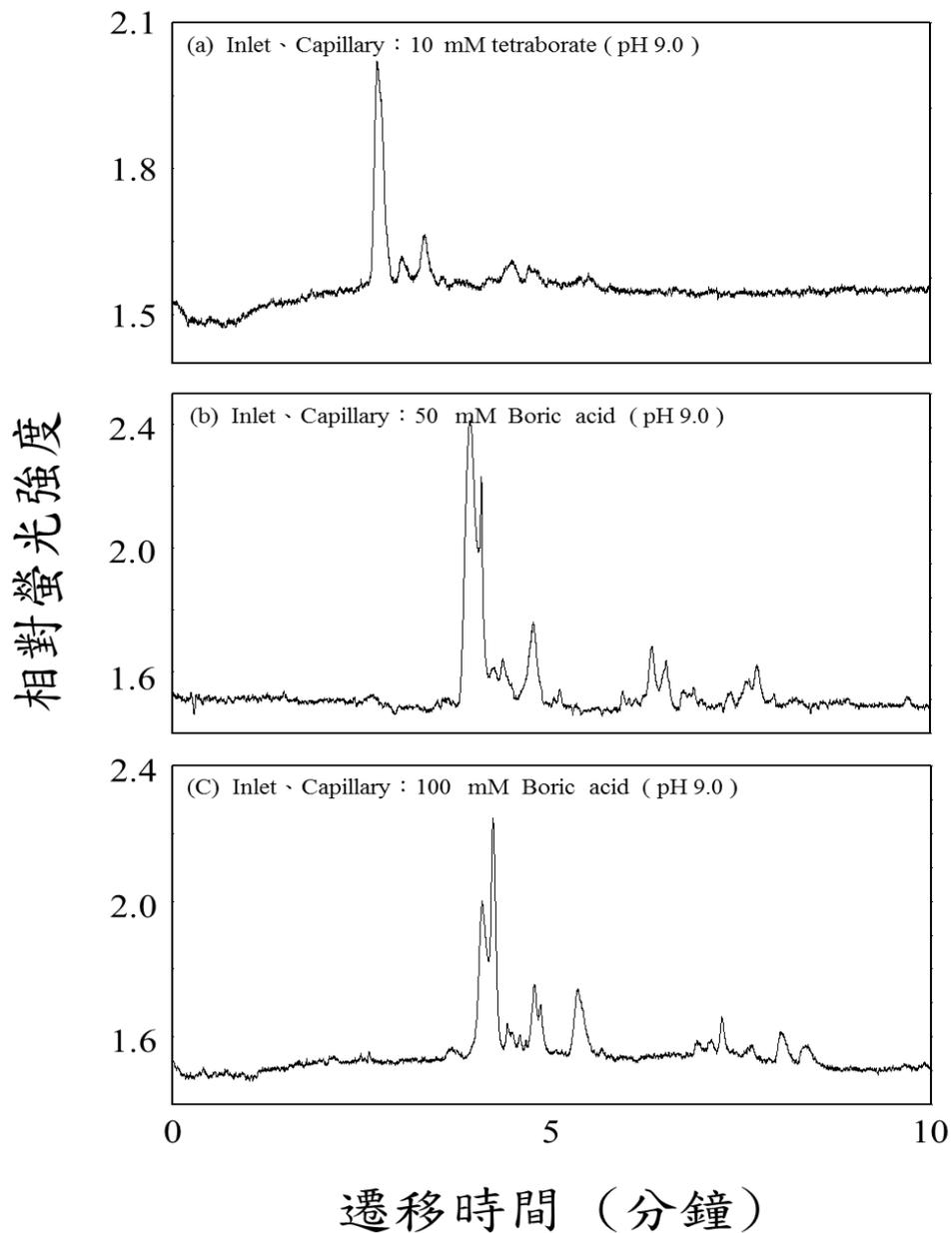


圖 2-4 使用不同的緩衝溶液分離含有人蔘粉之茶葉樣品，並使用其中

一種緩衝溶液之不同濃度來尋找最佳的分離緩衝溶液。

(a)、(b)、(c)：分析物為市售標榜含有人蔘粉之茶葉。

Outlet 皆為：10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM Ru(bpy)₃²⁺。

2.3.1.2 添加界面活性劑

實驗中，於末端之緩衝溶液內添加中性界面活性劑 Triton X-100 是為了降低分析物吸附於 ITO 電極之情形。在尋找分離條件最佳化時，亦分別於進樣端及毛細管之緩衝溶液中添加界面活性劑 Triton X-100 來分離含有人蔘粉之茶葉樣品，如圖 2-5，原本預期想利用與分析物之間的疏水性差異來達到分離，但結果顯示分離效果不明顯。學生亦探討於末端緩衝溶液中添加不同濃度的 Triton X-100 是否為影響訊號高度之因素，但發現隨著增加 Triton X-100 的濃度，訊號高度並沒有太大的差異，如圖 2-6，因此證明添加不同濃度的 Triton X-100，並不會影響其訊號高度。除此之外，也選用了不同的界面活性劑來進行分離，分別於毛細管與末端緩衝溶液中加入不同濃度的界面活性劑 SDS 來分離含有人蔘粉之茶葉樣品，如圖 2-7，實驗過程中發現，當含有 SDS 之緩衝溶液與末端溶液混合時，SDS 會與放光試劑 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 結合，因而產生沉澱，導致後續實驗難以進行，且實驗結果顯示分離效果不佳，因此，後續實驗選擇在進樣端與毛細管中不添加任何界面活性劑。

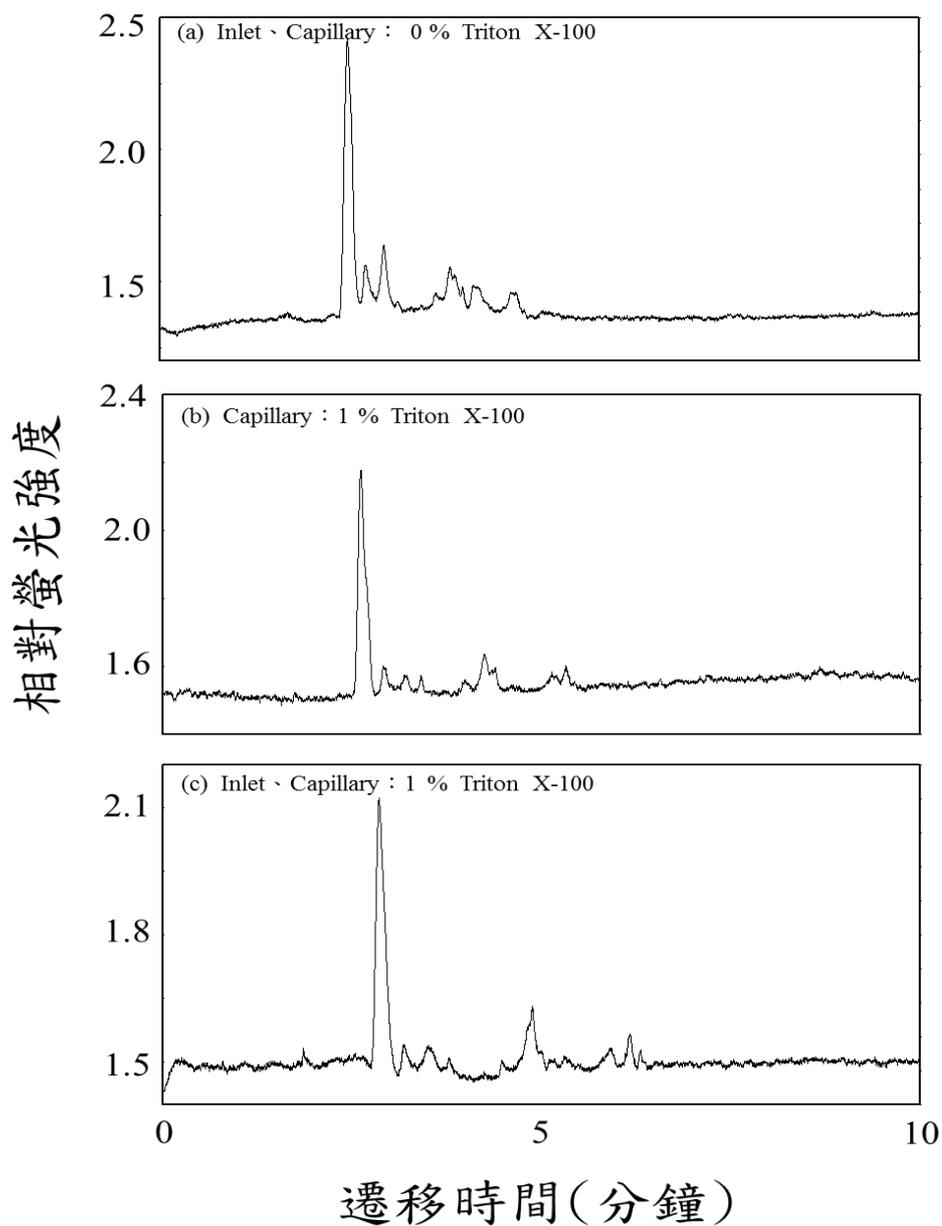


圖 2-5 於進樣端及毛細管緩衝溶液中添加界面活性劑 Triton X-100 來分離含有人蔘粉之茶葉樣品。(a)皆未添加 Triton X-100。(b)於毛細管緩衝溶液中添加 1 % Triton X-100。(c)於進樣端緩衝溶液中添加 1 % Triton X-100。 Runnig buffer : 10 mM Tetraborate (pH 9.0) 。 Outlet 皆為 : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM Ru(bpy)₃²⁺ 。

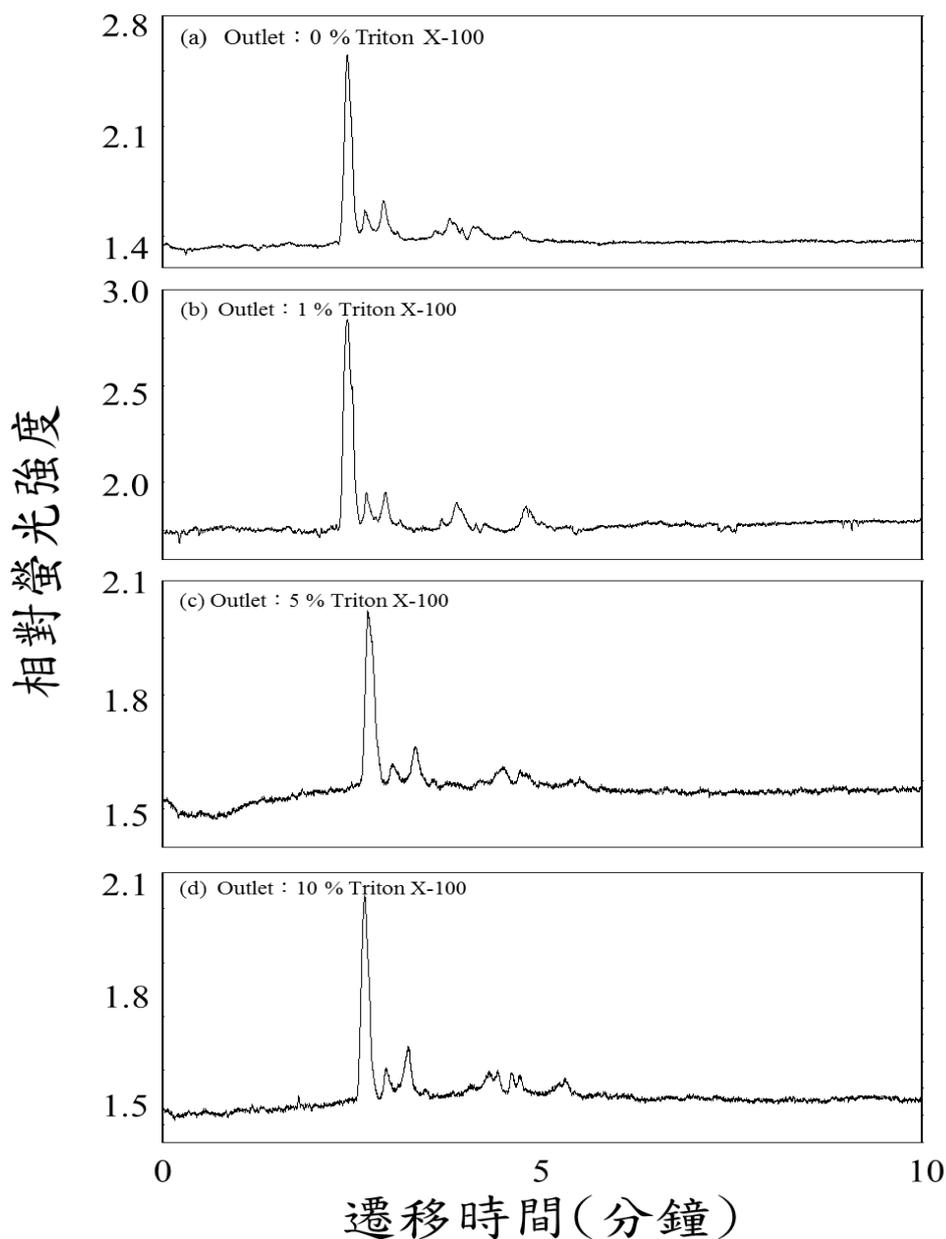


圖 2-6 於末端緩衝溶液中添加不同濃度之界面活性劑 Triton X-100，探討是否會影響訊號高度。分析物為市售標榜含有人蔘粉之茶葉。

(a)未添加 Triton X-100。(b)添加 1 % Triton X-100。

(c)添加 5 % Triton X-100。(d)添加 10 % Triton X-100。

Runnig buffer : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)。

Outlet 皆為 : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。

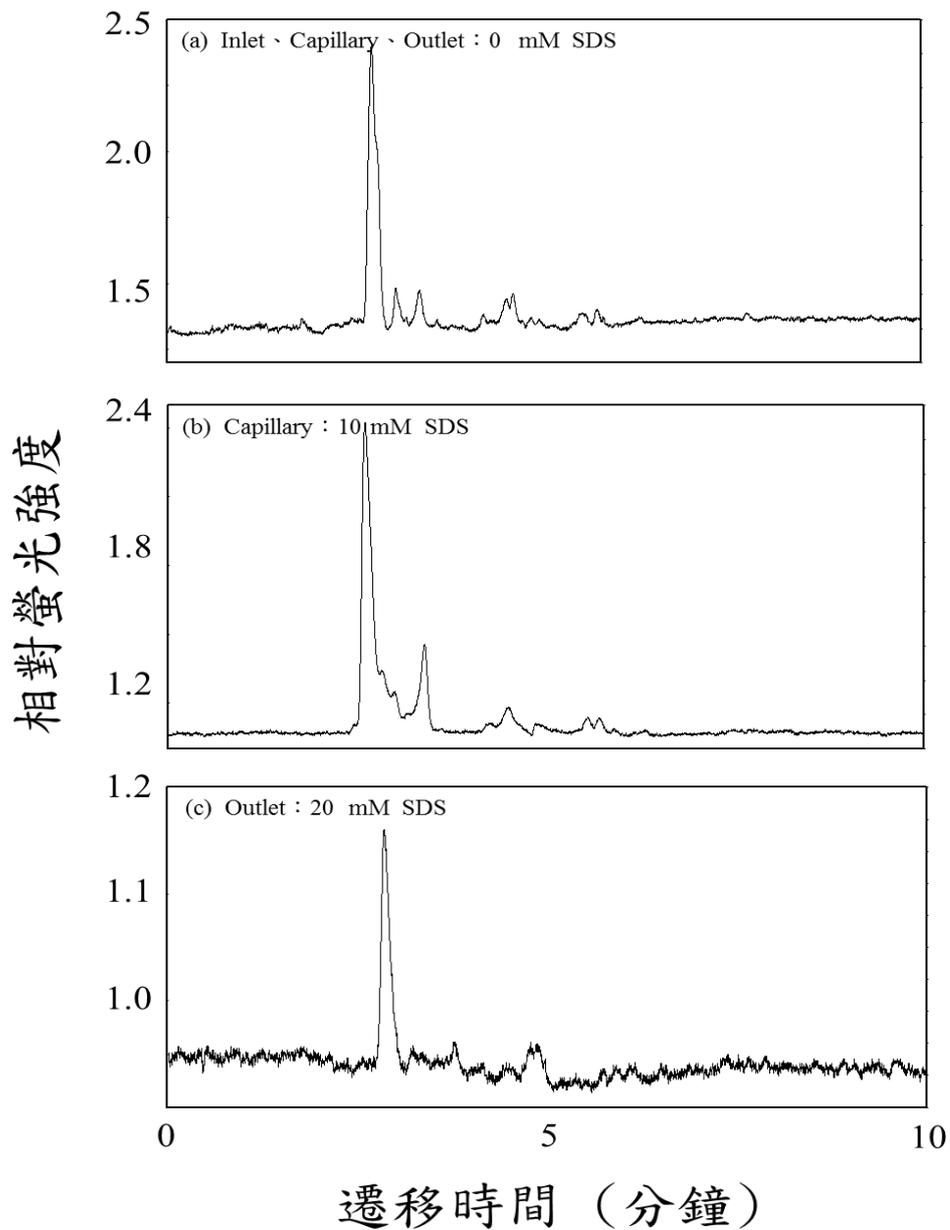


圖 2-7 分別於毛細管與末端緩衝溶液中加入不同濃度的界面活性劑 SDS 來分離含有人蔘粉之茶葉樣品。(a)皆未添加 SDS。(b)於毛細管緩衝溶液中加入 10 mM SDS。(c)於末端緩衝溶液中加入 20 mM SDS。

Runnig buffer : 10 mM Tetraborate (pH 9.0) 。

Outlet 皆為 : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM Ru(bpy)₃²⁺ 。

2.3.1.3 添加篩分介質

由於實驗中使用緩衝溶液與添加不同的界面活性劑來進行分離並沒有得到良好的分離效果，因此，試著在進樣端及毛細管緩衝溶液中添加環糊精，利用其不同的葡萄糖分子個數，且其內部為疏水性之空穴，想藉此是否能使分析物得到較為明顯的分離效果，但結果顯示與前面之實驗結果相比並沒有較大的差異。在此並探討毛細管是否會因為碰觸 ITO 電極而增加訊號高度，發現當毛細管碰觸到 ITO 電極時，訊號高度有明顯地增加，如圖 2-8，因此證明毛細管碰觸 ITO 電極進行實驗會增加訊號高度。接著，在進樣端及毛細管緩衝溶液中分別添加不同之環糊精與不同的濃度來分離含有人蔘粉之茶葉樣品，如圖 2-9，實驗結果顯示，雖然添加濃度 5 mM 的環糊精有較佳的分離效果，且 α -環糊精的分離效果又優於 β -環糊精，但與最後選用硼酸 (Boric acid) 緩衝溶液來進行分離的效果相比之下，還是比較差，因此，最後實驗選擇在進樣端及毛細管之緩衝溶液中皆不添加篩分介質。

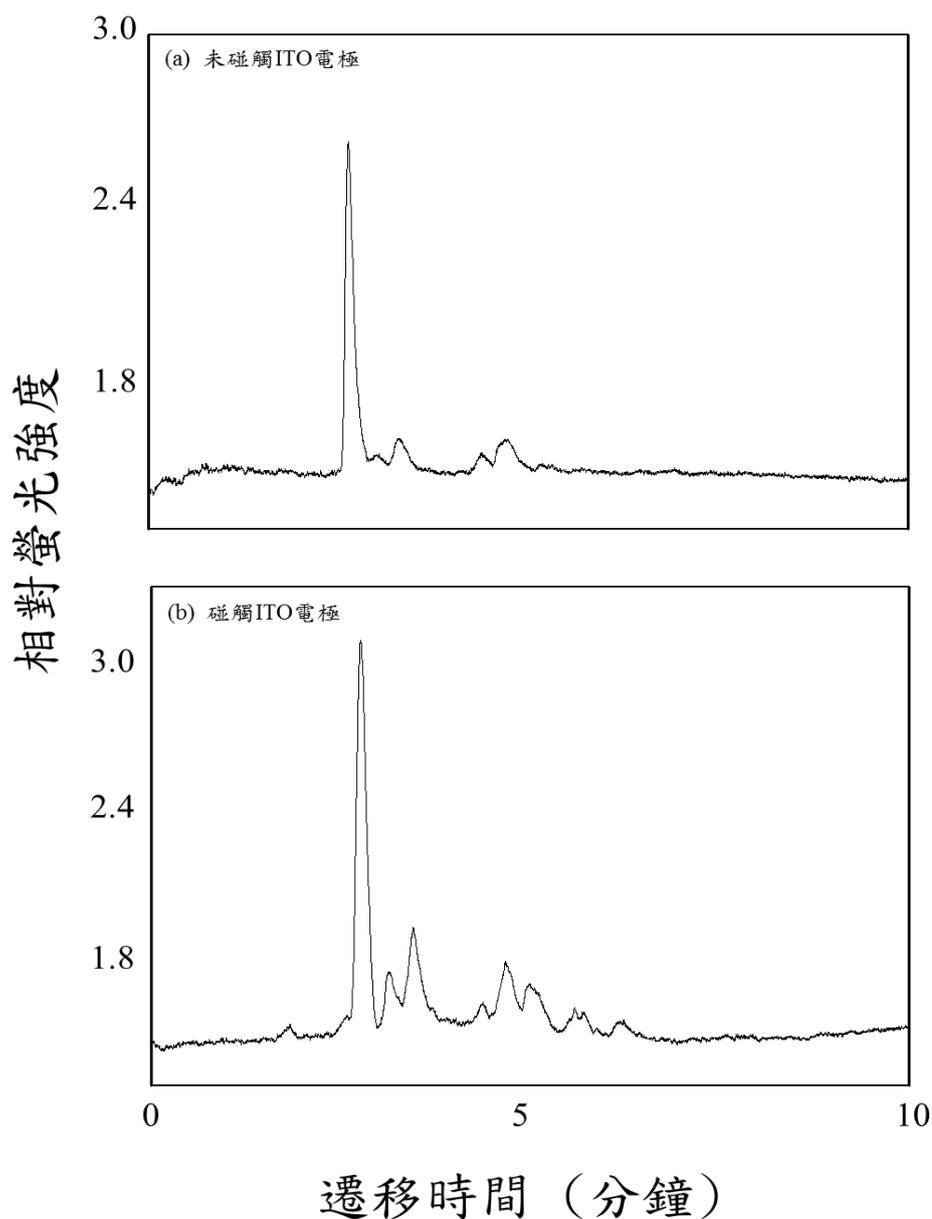


圖 2-8 於進樣端及毛細管緩衝溶液中添加 5 mM β -環糊精來分離含有
人蔘粉之茶葉樣品，並探討毛細管是否會因為碰觸 ITO 電極而增加訊
號高度。Runnig buffer：10 mM Tetraborate (pH 9.0)。

(a)毛細管末端未碰觸 ITO 電極。(b)毛細管末端碰觸 ITO 電極。

Outlet 皆為：10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。

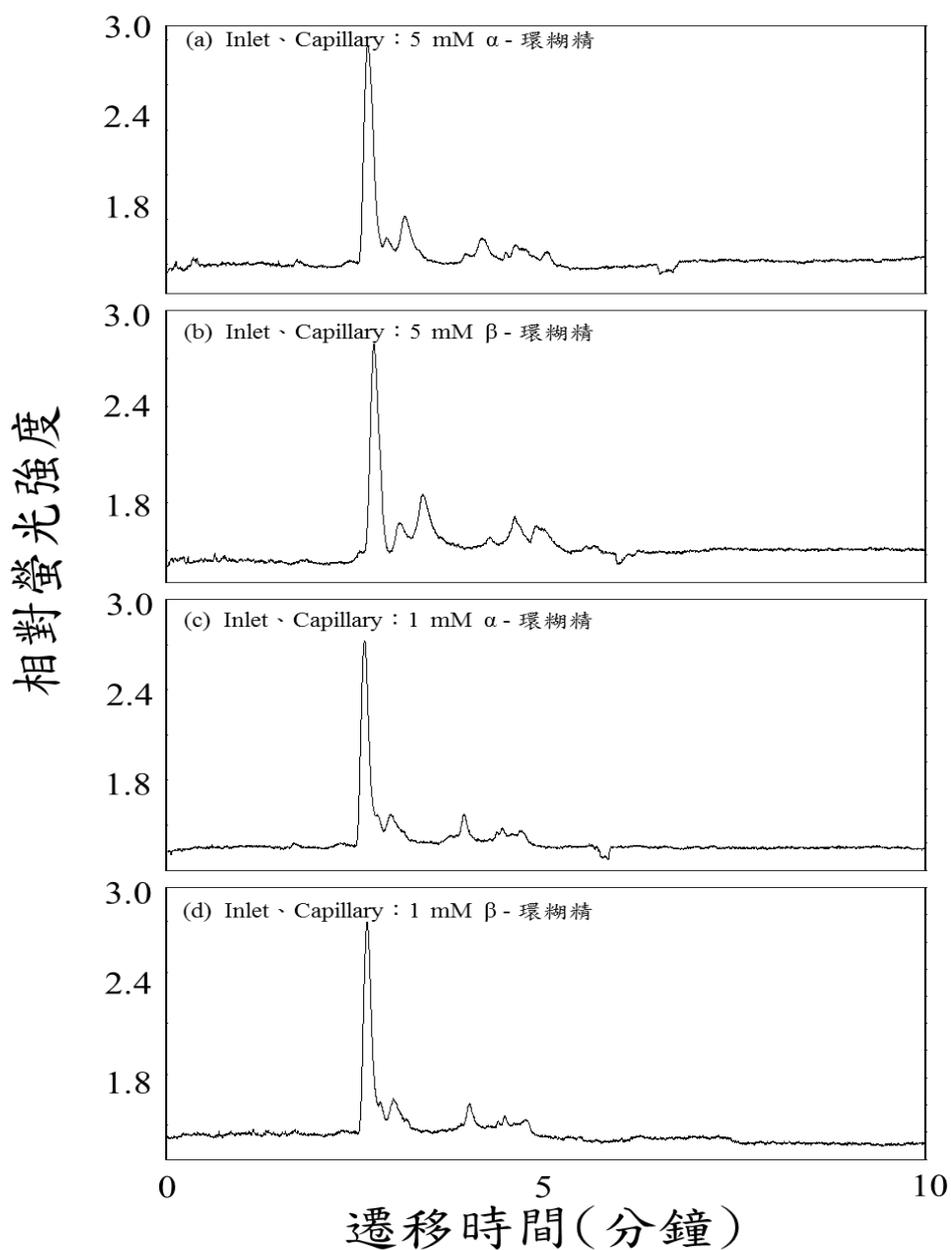


圖 2-9 毛細管末端碰觸 ITO 電極，於進樣端及毛細管緩衝溶液中分別添加不同的環糊精與不同的濃度來分離含有人蔘粉之茶葉樣品。

Runnig buffer : 10 mM Tetraborate (pH 9.0) 。

(a)、(b)為 5 mM 的 α 、 β -環糊精。(c)、(d)為 1 mM 的 α 、 β -環糊精。

Outlet 皆為 : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。

2.3.2 茶葉樣品之檢測

在台灣，茶類已經有兩百多年的歷史，不但是台灣民眾傳統的飲品之一，在日常生活中也是很常見的。在茶葉中含有許多對人體有益的成分，例如：胺基酸、多酚、生物鹼化合物等，不僅具有抗氧化能力、可清除生物體內的自由基，亦有一定的抑菌等功用。在種植茶葉時，有時會噴灑農藥，因此，在泡茶時，農藥可能也會隨著釋放出來，若是這樣被飲用，長期下來會對人體造成危害。而農藥中部分具有二、三級胺結構的分子，也可利用本實驗來進行偵測。實驗中，取 2 克的市售茶葉，再加入 100 °C 的熱開水，浸泡 15 分鐘後，以濾紙過濾，去除茶葉與大顆粒雜質，並讓濾液溫度降至室溫，直接取 5 µl 的茶水進樣。如以上的電泳圖所示，發現電泳圖上雖然有明顯強度較高的訊號，但卻一直無法更進一步地進行定性^[4-6]，因此，我們也送至本校的貴儀檢測中心，使用 LC-MS 進行檢測，但初步也只能判定茶葉中含有咖啡因、可可鹼、茶鹼、茶氨酸等以上之胺基酸，如圖 2-10。

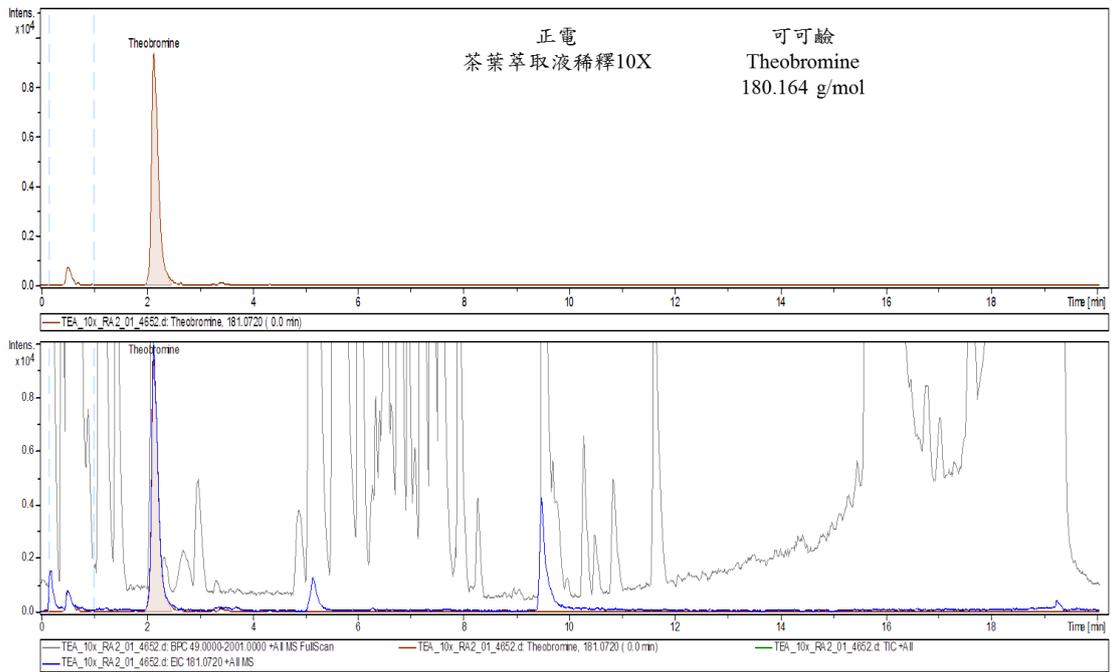
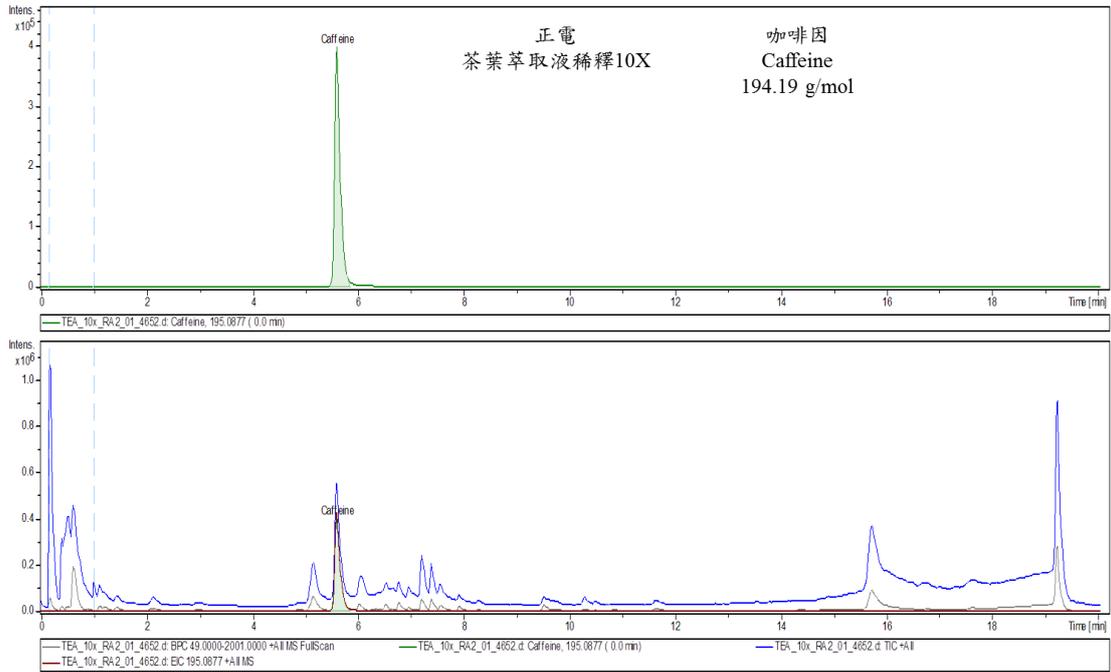
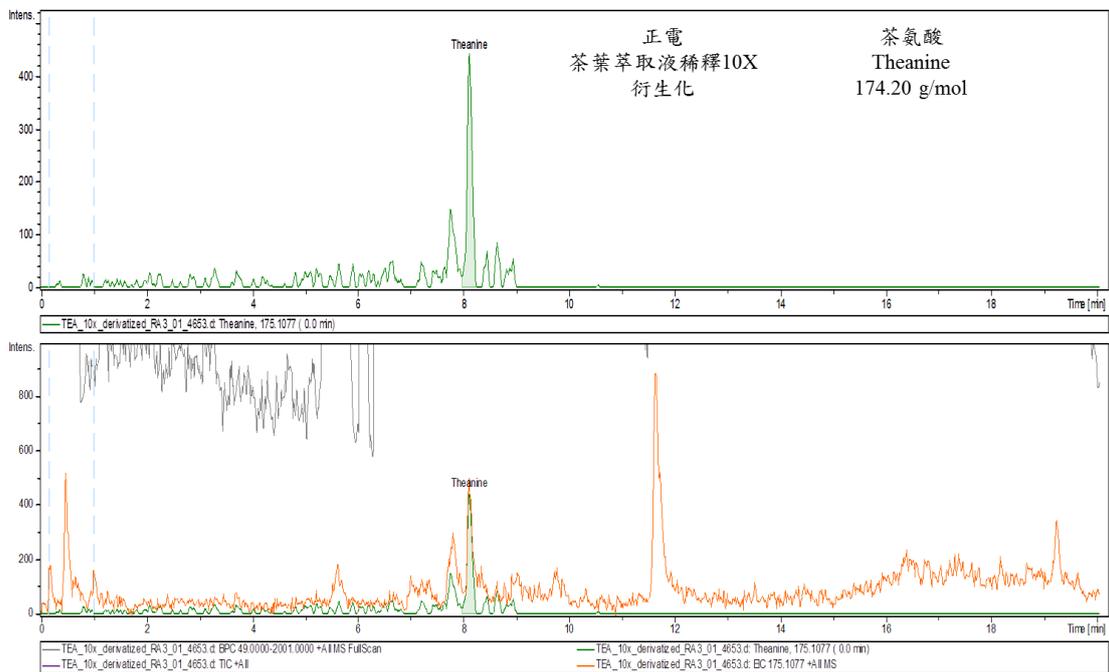
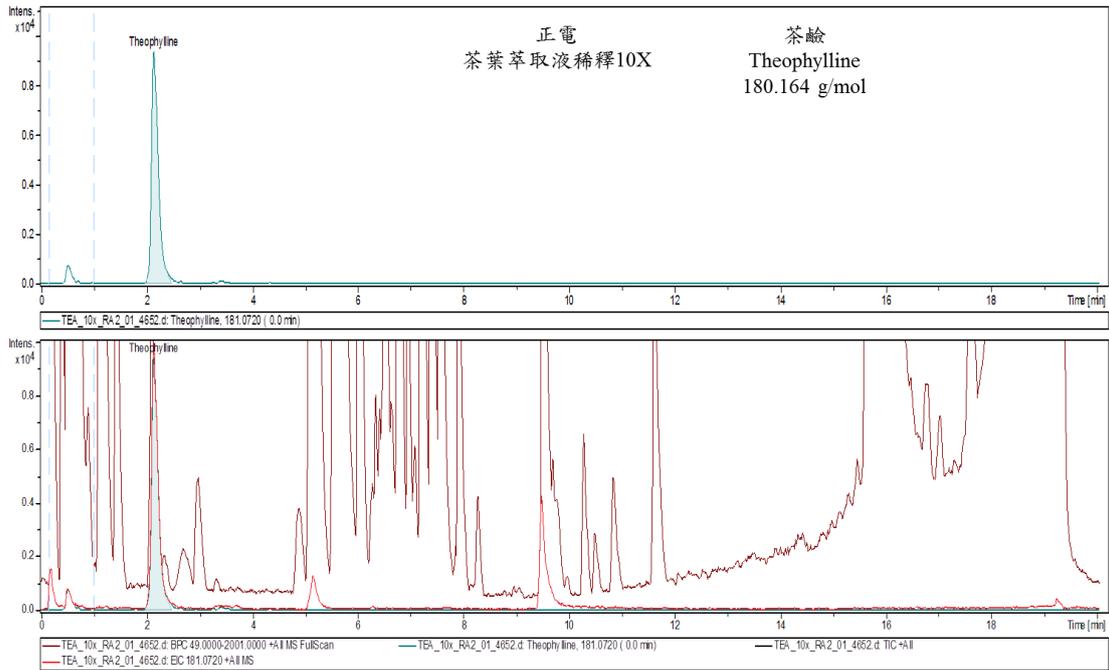


圖 2-10 LC-MS-MS 檢測後之搜尋結果



LC-MS-MS 檢測後之搜尋結果

2.4 結論

本實驗以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / ECL作為偵測系統，並在具有電滲流之電泳環境下進行毛細管電泳，透過毛細管電泳分離方法中的毛細管驅動電泳，使用100 mM硼酸(Boric acid)緩衝溶液來進行毛細管電泳，成功地在10分鐘內分離出較多茶葉中的胺類化合物的訊號。雖然目前只能依據LC-MS檢測結果，初步判定茶葉中含有咖啡因、可可鹼、茶鹼、茶氨酸等胺基酸，但此實驗提供了簡單的實驗裝置、低成本(自製ITO電極的化學反應槽作為偵測器)、樣品需求量低、分析時間短等分離方法。此偵測系統常被使用於免疫分析與DNA檢測上，而目前已經發展出不同的方法來檢測不同種類茶葉中的胺基酸濃度，因此，確切的知道茶葉中的胺基酸含量是有助於臨床檢驗及生物學上的研究。若是此分離方法在未來能尋找到更佳的實驗條件或是結合其他的儀器，期望能進行更準確的定性及定量，並檢測是否含有農藥殘留及其種類等，如此一來則可應用於一般的食品檢測及環境分析上。

2.5 參考文獻

1. NING J-m, SHI C-y, CHEN Q, LIANG J, WAN X-c, ZHANG Z-z: **Research progresses on detection method of theanine.** *Journal of Anhui Agricultural University* 2012, **6**, 020.
2. Chang P L, Lee K H, Hu C C, Chang H T: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electro-chemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
3. Sreedhar M, Lin Y W, Tseng W L, Chang H T: **Determination of tertiary amines based on pH junctions and field amplification in capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection.** *Electrophoresis* 2005, **26** (15):2984-2990.
4. Chen C-N, Liang C-M, Lai J-R, Tsai Y-J, Tsay J-S, Lin J-K: **Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2003, **51** (25):7495-7503.
5. Cabrera C, Giménez R, López M C: **Determination of tea components with antioxidant activity.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2003, **51** (15):4427-4435.
6. Horie H, Kohata K: **Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography A* 2000, **881** (1):425-438.

第三章 以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法

偵測人體血漿中之脯胺酸及其重要性

3.1 緒論

隨著科技的進步，現代文明病也日益增加，雖然現在有許多疾病已經有很好的預防及治療方式，如果可以利用容易取得的檢體又快速的檢測方式，就可以在黃金治療時期提高治癒率。胺基酸在人體或是飲食當中皆扮演重要的角色，在生物體中，某些特定胺基酸對於某些疾病是一個重要的生物參數，例如：胺基酸代謝異常之患者，其尿液中會有高含量的苯丙胺酸(phenylalanine)^[7,8]及脯胺酸(proline)^[9-11]，可藉由分析尿液中胺基酸含量的多寡，來判斷患者是否患有腎功能不全或是慢性尿毒症^[12]等疾病。因此，確切了解尿液中胺基酸之正常值，有助於了解身體健康狀況，甚至是追蹤患者的治療狀況。而從人體體液中最容易取得的為尿液與血液，表2-1、2-2為血漿、尿液中所含苯丙胺酸(phenylalanine)及脯胺酸(proline)之含量^[13]。在目前的研究中，使用於偵測脯胺酸(proline)的方法有：分光光度法^[14]、液相層析(LC)^[15]和化學發光(CL)^[16]等。以上的方法解析度較低、偵測極限較差、儀器昂貴等。因此，本實驗以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(Capillary Electrophoresis-Electrochemiluminescence, CE-ECL)，並在具有電滲流(Electroosmotic Flow, EOF)之電泳環境下進行實驗。

表3-1 血漿中的胺基酸含量(微莫耳/升)^[13]。數值範圍為平均值±兩倍標準偏差。

Amino acid	Children (n=52)	Adolescents (n=80)	Women (n=15)	Men (n=50)	Infants < 3 mo (n=17)
Proline	40-332	58-324	112-220	97-297	97-254
Phenylalanine	26-98	34-86	42-62	46-74	25-74

表3-2 不同年齡的尿液樣品中的胺基酸含量(mmol/mol of creatinine)^[13]。數值範圍為平均值±兩倍標準偏差。

Amino acid	0-1 month	1-6 month	6-12 month	1-2 years	2-4 years	4-7 years	7-13 years	> 13 years
Proline	21-213	0-130	0-14	0-13	0-9	0-9	0-9	0-9
Phenylalanine	4-32	7-28	11-28	10-31	7-21	6-26	5-20	2-19

酶聯免疫吸附測試(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

是使用於傳統的血液醫療檢驗的方法，大多使用於檢驗血液中的紅血球^[17,18]、白血球^[19,20]、蛋白質^[21,22]、病毒^[23]等表面具有抗體抗原的檢體，其可以區分為三種：間接法酶聯免疫吸附測試、競爭法酶聯免疫吸附測試、三明治法酶聯免疫吸附測試。第一種間接法酶聯免疫吸附測試^[24]，是先將已知的抗原固定(coating)於多孔塑膠盤中，並洗去多餘的抗原，再將待測的檢體加入多孔塑膠盤中，若是待測的檢體是含有一次抗體，其會與多孔塑膠盤中的抗原鏈結。洗去多餘的待測物後，再加入含有酵素的二次抗體與其鏈結，再洗去多餘的二次抗體，並加入受質酵素，使其呈色。然後使用儀器量測多孔塑膠盤中待測物的吸光值，以定量待測物與待測物上抗體的含量。此方法是用於檢測體內所含的抗體及含量。

第二種競爭法酶聯免疫吸附測試^[25,26]，亦是先將抗體固定於多孔塑膠盤上，並洗去多餘的抗體，再加入待測的檢體，等待測檢體中的抗原與多孔塑膠盤上的抗體鏈結後，洗去多餘的待測檢體，並加入含有酵素的抗原與多孔塑膠盤上的抗體鏈結，洗去多餘的抗原，再加入受質酵素，使其呈色。此時，若是檢體的含量高或是檢體上的抗原含量高，呈色會比較弱。此方法適用於檢測待測物上抗原的含量。

第三種三明治法酶聯免疫吸附測試^[27,28]，是在多孔塑膠盤上先固定一層具有專一性的抗體，固定抗體後，再洗去多餘的抗體。在固定抗體的多孔塑膠盤中加入待測檢體，如果檢體中含有待測的抗原，其會與多孔塑膠盤中的抗體進行專一性的鏈結。之後，洗去多餘的待測檢體，並加入另一種對抗原具有專一性的一次抗體，使其鏈結後，再洗去多餘的一次抗體，並加入含有酵素的二次抗體，洗去多餘的二次抗體後，加入受質酵素，使其呈色，並讀取其呈色數據。此方法是用於檢測大分子抗原的待測物，具有極高的專一性，但因為需要使用到多種抗體及待測物需要有足夠的表面積，且抗原又需要為多價之抗原，所以，此方法並不適用於半抗原、小分子抗原等分子量小的待測物。

現今除了以ELISA來篩檢血液中抗體抗原的血液檢測方法外，也使用液相層析、液相層析串聯質譜、毛細管電泳等來分離血液中的胺基酸、蛋白質、無機鹽類等分析物，並探討其訊號及定量。雖然ELISA的呈色快速且具有專一性，但不適用於不含抗體抗原的待測分析物上，如：血漿中的胺基酸、無機鹽類等。在血液分析上，液相層析^[29]具有便利、快速等優點，但分析物不具有光學之特性，因此，需將樣品進行衍生化反應，分離效益也會隨著衍生化反應後所生成的不同結構而有所差異。由於胺基酸及無機鹽類等分析物的分子量較低，因此，在血液分析上，液相層析串聯質譜^[30]的訊號容易受到基質影響，而造成

解析度降低，且質譜無法分離樣品中的同分異構物。質譜分析，使用樣品直接進樣，在樣品游離時，容易受到基質中高鹽類的影響，而造成游離效益降低。而毛細管電泳可以結合雷射誘發螢光、發光二極體誘發螢光等偵測系統^[31-33]來分析血液樣品，此分析系統提供了快速、樣品需求量少、高解析度、高靈敏度等優點。

而本實驗是使用毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法偵測人體血漿中之胺基酸-脯胺酸。化學放光偵測法相較於雷射誘發螢光、發光二極體誘發螢光，具有裝置較為簡單、只需一個可進行化學反應之反應槽、光電倍增管(PMT)，不需要額外的激發光源、不受迷光干擾等優點。利用緩衝溶液之 pH 值，可以使分析物解離，並帶有電荷，以進行分離。在分離條件中，可藉由矽醇陰離子(SiO^-)並調整施加的高壓電的大小，即可縮短分析物之遷移時間，獲得分析訊號。

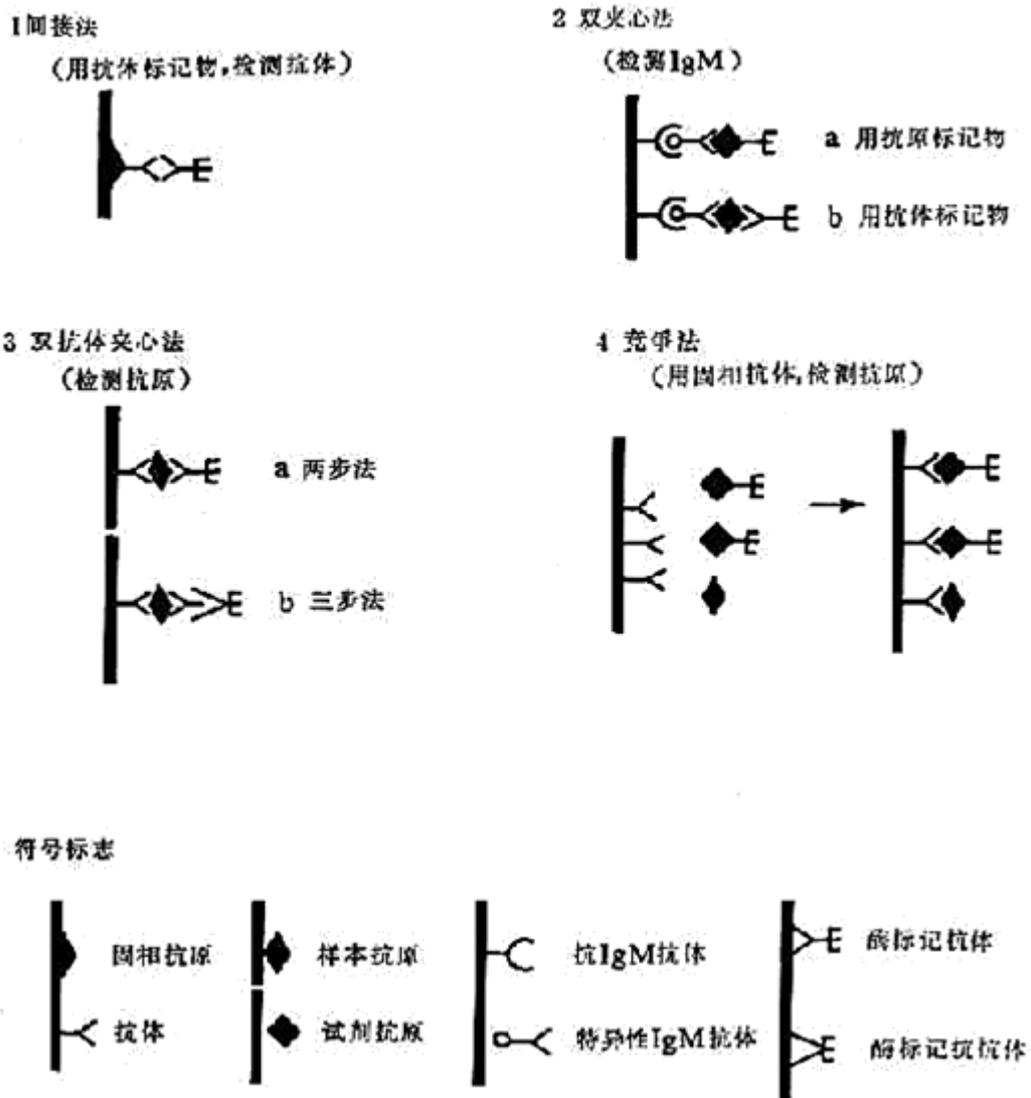


圖3-1 酶聯免疫吸附測試之示意圖

取自網路上之搜尋圖片

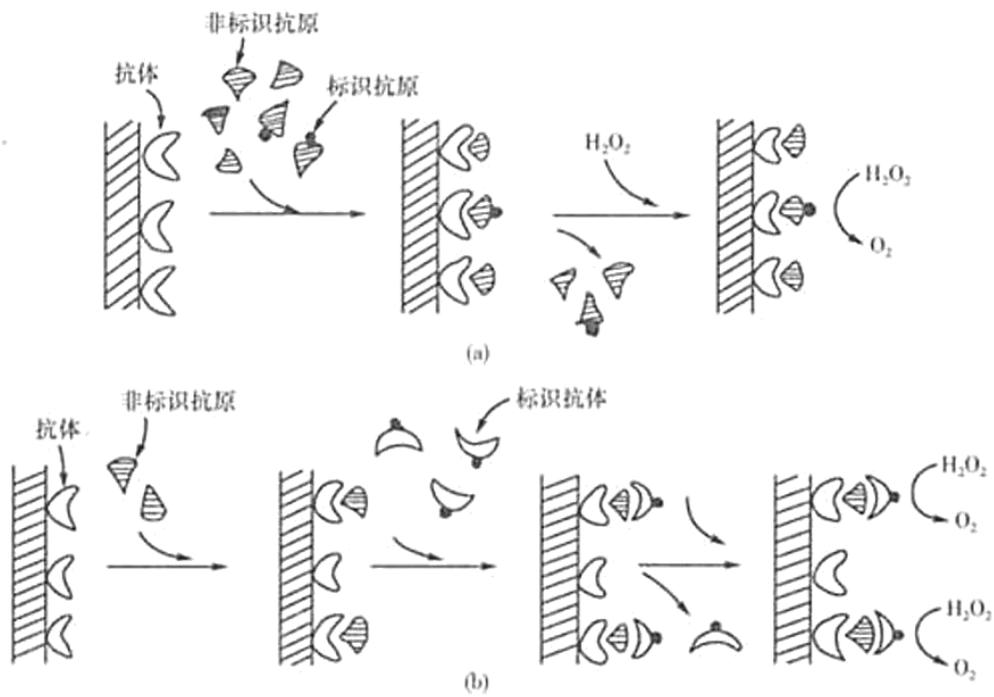


圖3-2 酶聯免疫間接法之原理：(a)競爭法(b)夾心(三明治)法

取自【<http://www.rensheng2.com/600000/593601.shtml>】

3.2 實驗部分

3.2.1 實驗試藥

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (tris(2,2' -bipyridyl)ruthenium(II))、四硼酸鈉 (Sodium tetraborate) 購自 ACROS。磷酸二氫鈉 (NaH_2PO_4) 購自 Merk。磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 購自日本和光純藥工業株式會社。Triton X-100 購自 Alfa Aesar。脯胺酸 (proline)、檸檬酸鈉 (Sodium Citrate tribasic)、異丙醇 (Isopropanol) 購自美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。檸檬酸 (Citric acid) 購自 COTA Chemical。三丙基胺 (tripropylamine, TPrA)。

3.2.2 分析物前處理

本實驗使用的分析物有 1 種標準胺基酸 (Proline) 與 1 種標準品 (TPA)。血漿會先加熱至 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 、10 分鐘 (以去除蛋白質)，冷卻至室溫後，並以 10000 xg ，離心 10 分鐘，取上清液，保存於 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

3.3 結果與討論

本實驗是以毛細管電泳結合電激發化學放光偵測法(CE-ECL)，在具有電滲流(EOF)之電泳環境下，偵測人體血漿中的脯胺酸(Proline)。實驗一開始先探討可偵測到標準品脯胺酸之最低濃度，並想利用大體積樣品堆積(Large-volume sample stacking, LVSS)的方式以測得更低濃度，原本預期可以壓縮樣品區段來達到堆積效果，但實驗結果發現並沒有預期來的好。於真實樣品-血漿中，發現其偵測之最佳解析度為血漿稀釋 10 倍後，接著進行定性，加入脯胺酸標準品，以確認其在電泳圖上出現的位置與時間。實驗中除了利用緩衝溶液來進行分離之外，也在進樣端及毛細管等緩衝溶液中分別添加有機溶劑 Isopropanol、界面活性劑 SDS 與篩分介質(環糊精)等來增加分離效率。除了在進樣端緩衝溶液中添加界面活性劑之外，也同時在血漿樣品中加入界面活性劑來進行分離，但分離效果也是不如預期。因此，於真實樣品血漿中添加內標準品(Internal Standard, I.S.)以進行定量，在挑選內標準品時，必須為血漿中沒有且也不會干擾到其他的訊號，所以最後選擇三級胺的 TPA 作為內標準品。

3.3.1 實驗條件最佳化

3.3.1.1 分析物濃度之選擇

進行實驗時，即選擇最初實驗較為穩定之四硼酸鈉(Sodium Tetraborate)緩衝溶液來進行分離。由於 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / ECL 的偵測靈敏度與胺類結構有關，等級次序反應為：三級 > 二級 > 一級胺，除此之外，電生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 可與水反應，產生 ECL 背景，這會造成胺類偵測能力的限制，特別是一級胺和二級胺。因此，一開始必須先探討可偵測標準品 proline 之最低濃度，如圖 3-3 所示，最低濃度為 $10 \mu\text{M}$ ，並以 proline 之濃度對訊號面積作檢量線圖，如圖 3-4。

接著，我們想利用大體積樣品堆積的方式，原本預期可以利用分析物、水與緩衝溶液之間電場的強弱不同而壓縮樣品區間，以期許可以達到樣品堆積，由圖 3-5 可發現，隨著樣品的進樣時間增加，當進樣時間增加至 30 秒時，雖然訊號高度有增加，但當增加至 1 分鐘時，發現波峰前面已有變寬的現象產生，直到增加至 5 分鐘時，整個波峰幾乎已經變寬。由於結果不如我們預期的，因此，後續實驗選擇不使用樣品堆積的方式。

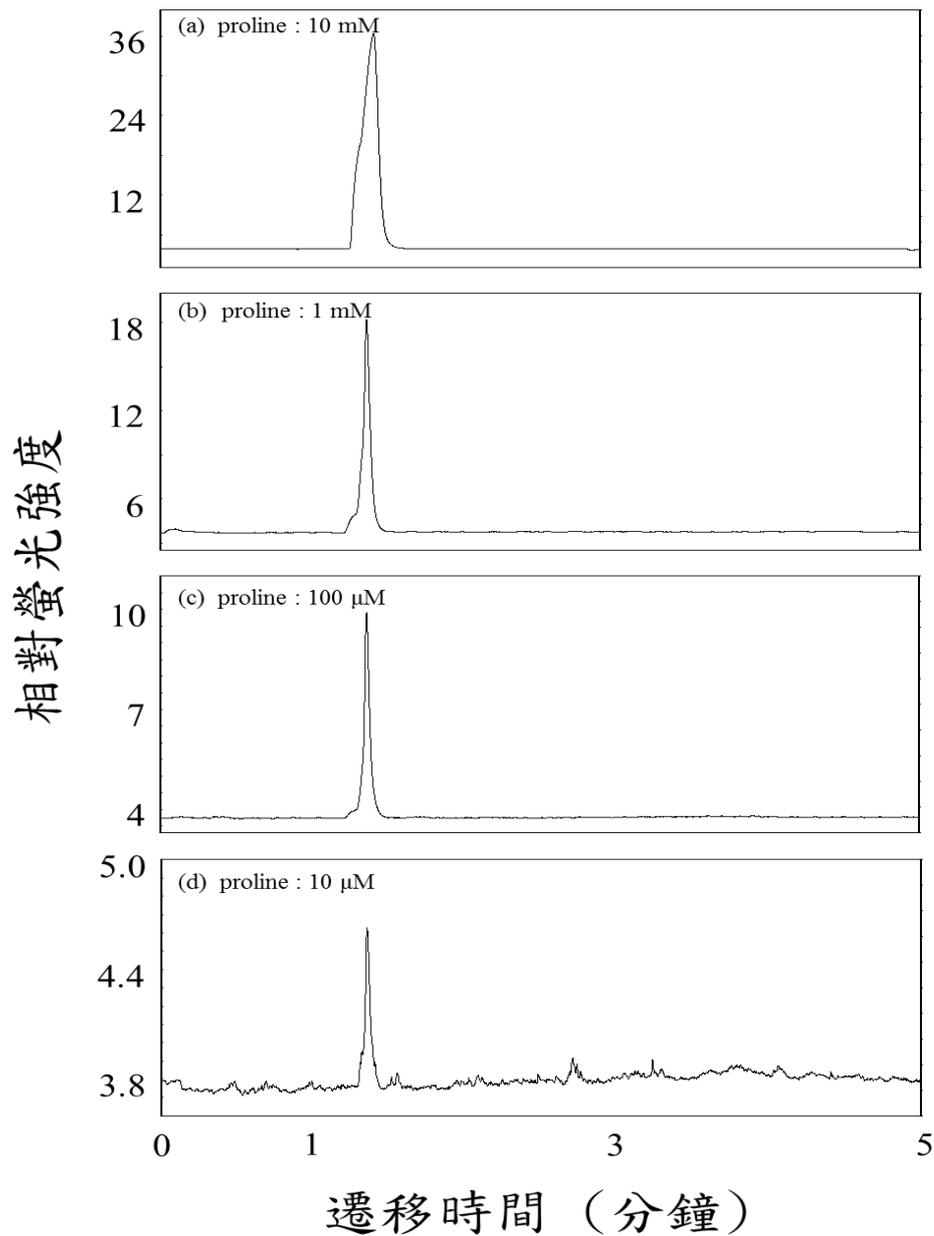


圖 3-3 探討可偵測到標準品 proline 之最低濃度。實驗條件為：

High voltage : + 15 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Inlet、Capillary : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

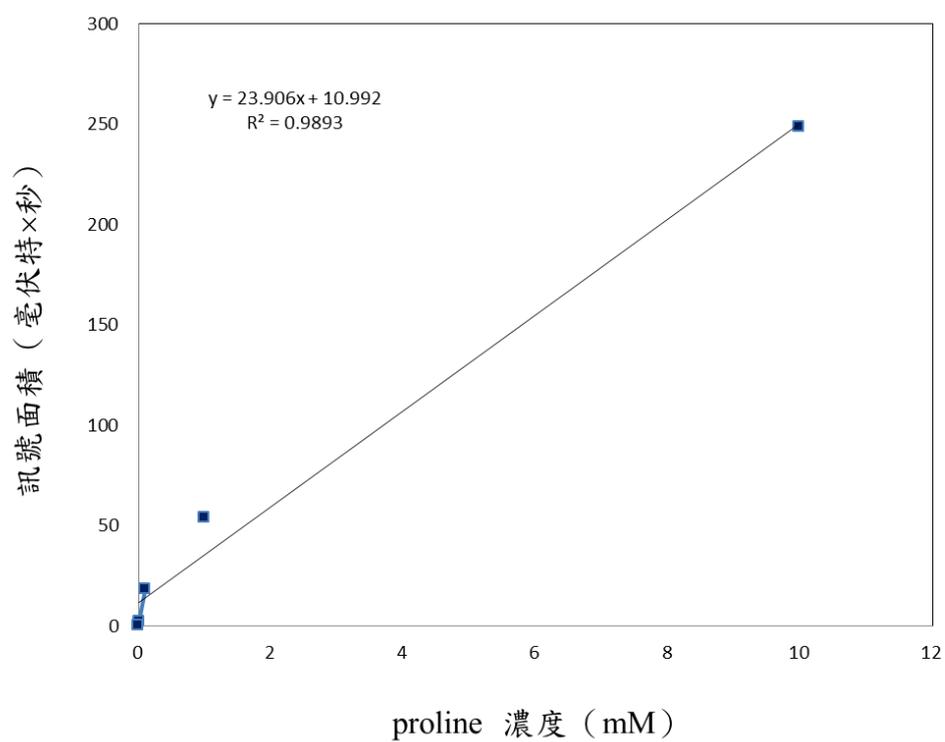
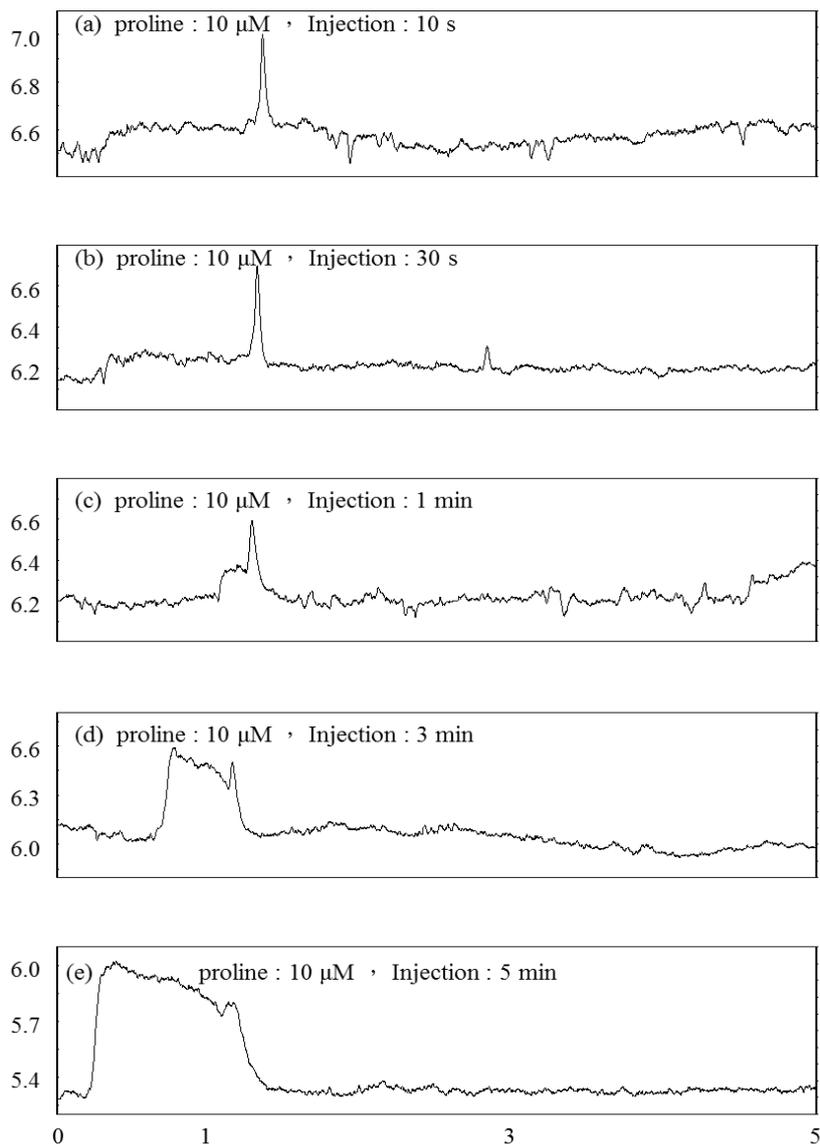


圖 3-4 脯氨酸 proline 之濃度對訊號面積作檢量線圖。

相對螢光強度



遷移時間 (分鐘)

圖 3-5 增加脯氨酸 proline 之進樣時間，對電泳的影響。實驗條件為：

High voltage : + 15 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Inlet、Capillary : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

3.3.2 血漿樣品之檢測

根據許多文獻報導，人體血漿中所含的脯胺酸對於某些疾病是一個重要的生物指標，例如：腫瘤^[34]、慢性尿毒症等。若是為胺基酸代謝異常之患者，其體液中的苯丙胺酸(phenylalanine)與脯胺酸(proline)含量是高於健康的人^[35]。因此，本實驗進行人體血漿樣品之分離，並探討其最佳的分離條件。由於原倍未處理過的血漿除了胺基酸之外，還包含了胜肽與蛋白質等會與胺基酸競爭，所以本實驗對血漿進行去除蛋白質之處理，將血漿以梯度循環溫控器設定 95 °C 加熱 10 分鐘，冷卻至室溫後，以 10,000 xg 離心 10 分鐘，並取出上清液，此上清液即視為原倍之去蛋白的血漿樣品。稀釋時，會取去除蛋白質後的原倍血漿，直接以去離子水進行稀釋。由圖 3-6 的(a)可知，原倍去蛋白之血漿樣品濃度太高，而導致解析度變差，因此，以 10 倍比例進行稀釋作為比較，最後使用稀釋 10 倍之血漿樣品來進行分離。在尋找到血漿樣品之最佳解析度後，進行定性的標定，如圖 3-7 所示，遷移時間約為 1.5 分鐘位置的確定為脯胺酸(proline)。

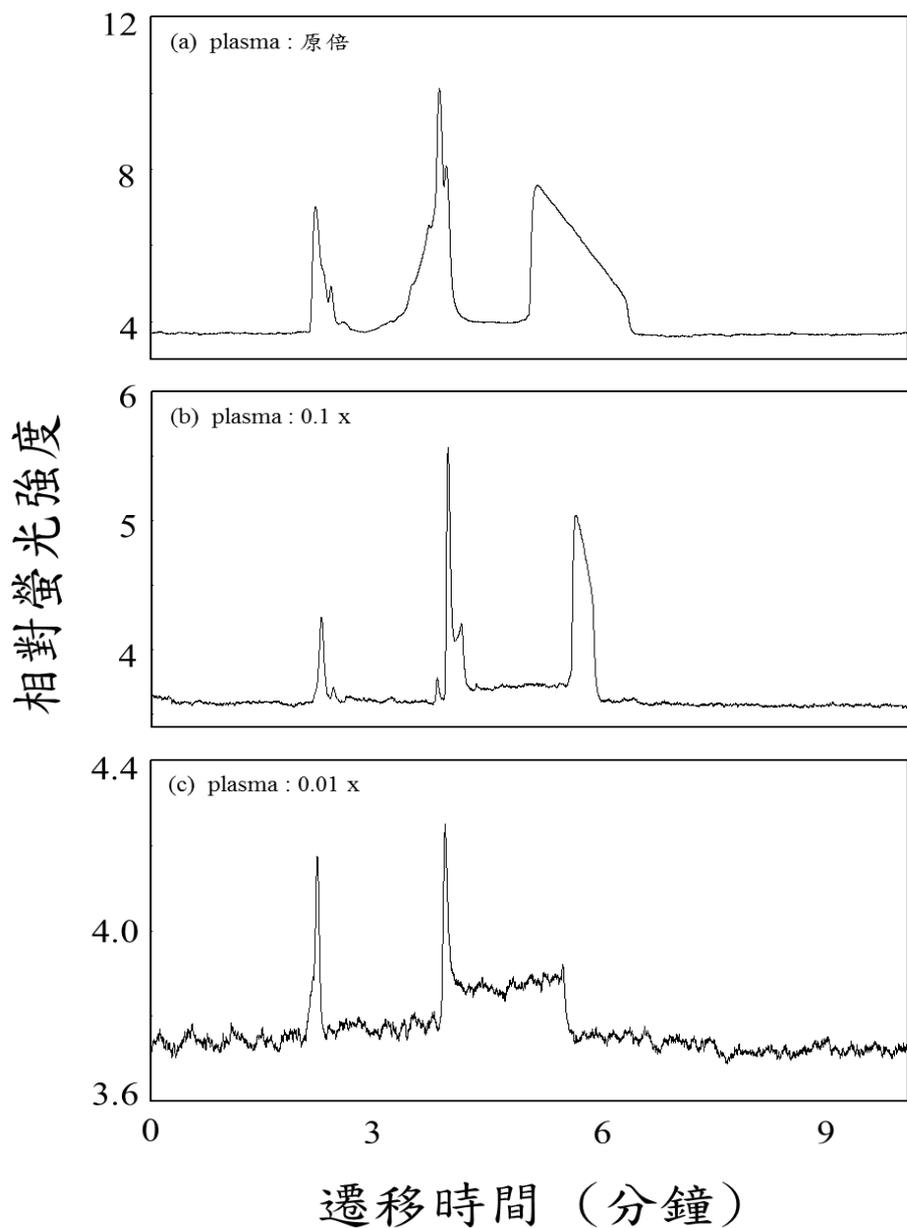


圖 3-6 將血漿樣品進行稀釋，以探討其最佳解析度。實驗條件為：

High voltage : + 10 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Inlet、Capillary : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

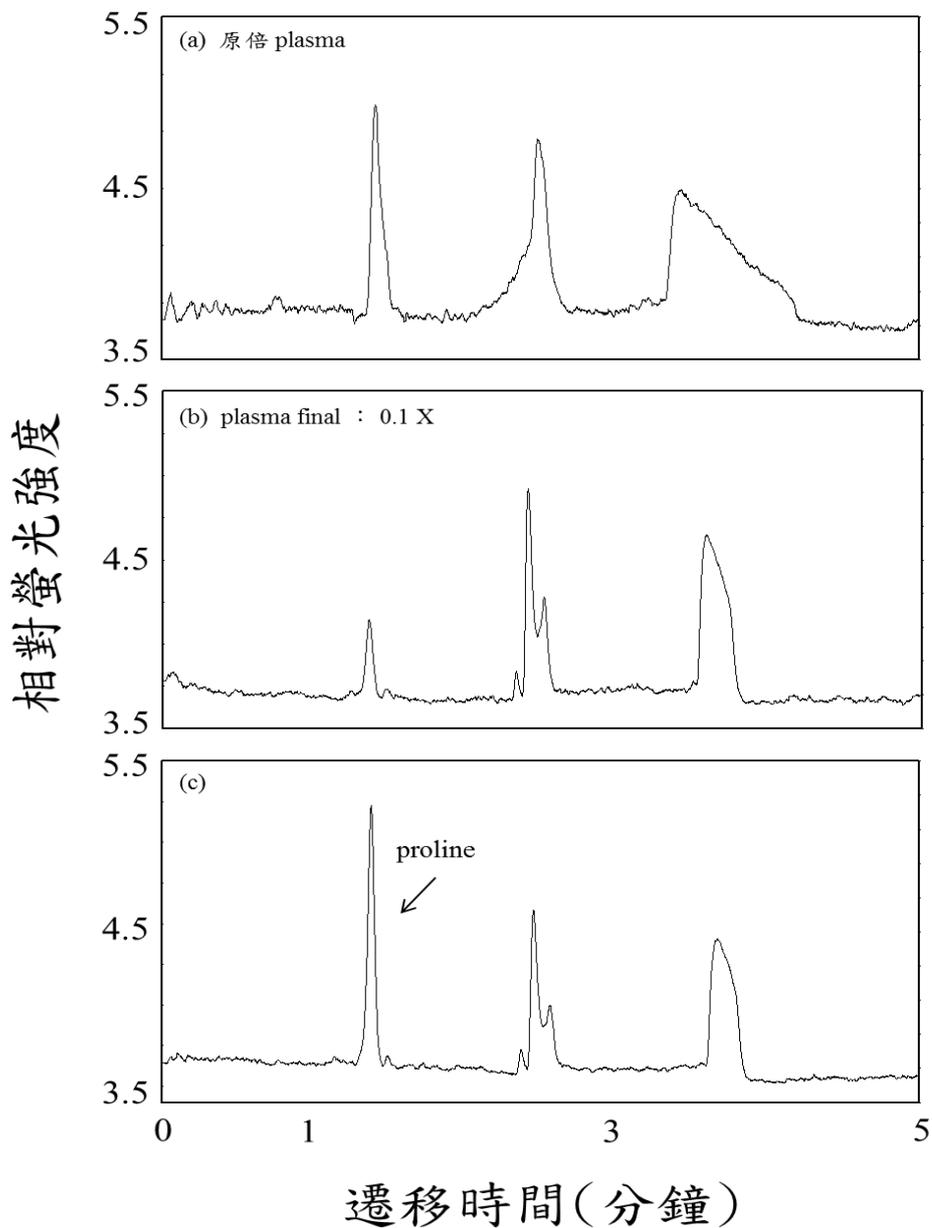


圖 3-7 真實樣品-血漿之定性，標定脯氨酸 proline 出現之位置。

實驗條件為：High voltage : + 15 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Inlet、Capillary : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

3.3.2.1 添加有機溶劑、篩分介質與界面活性劑

進行定性後，接著探討最佳化之分離條件。本實驗於緩衝溶液中嘗試添加有機溶劑來改變移動相之組成環境，因此，在進樣端之緩衝溶液中添加 5 % 異丙醇 Isopropanol，如圖 3-8，發現其解析度雖有變佳，但其分離效果卻比不添加時還差，因此，最後選擇不添加異丙醇。接著，嘗試在進樣端添加相同濃度但不相同之篩分介質-環糊精，以增加分離選擇性，如圖 3-9，以(a)與(c)相比較， α -CD 的分離效果看似比 β -CD 好，因此，在進樣端添加 5 mM α -CD 時，並同時於樣品中加入 100 mM SDS 來進行分離，由圖 3-10 可發現，當樣品中添加的 SDS 越多時，雖然似乎可以分離出幾個小波峰，但波峰之間卻無法分離的較開。而圖 3-11 為毛細管之緩衝溶液中添加 10 mM SDS 進行分離，由於本實驗之高電壓是使用正電壓，原本預期是想藉由帶負電的 SDS 在毛細管中可以往回放電端移動，與分析物形成掃掠，以增加其分離效果，但由實驗結果可發現，當只有進樣 10 秒時，解析度有增加，但當進樣時間增加至 1 分鐘時，波峰卻變寬了，解析度也變得較差，因此，後續實驗選擇皆不添加有機溶劑、環糊精與 SDS。

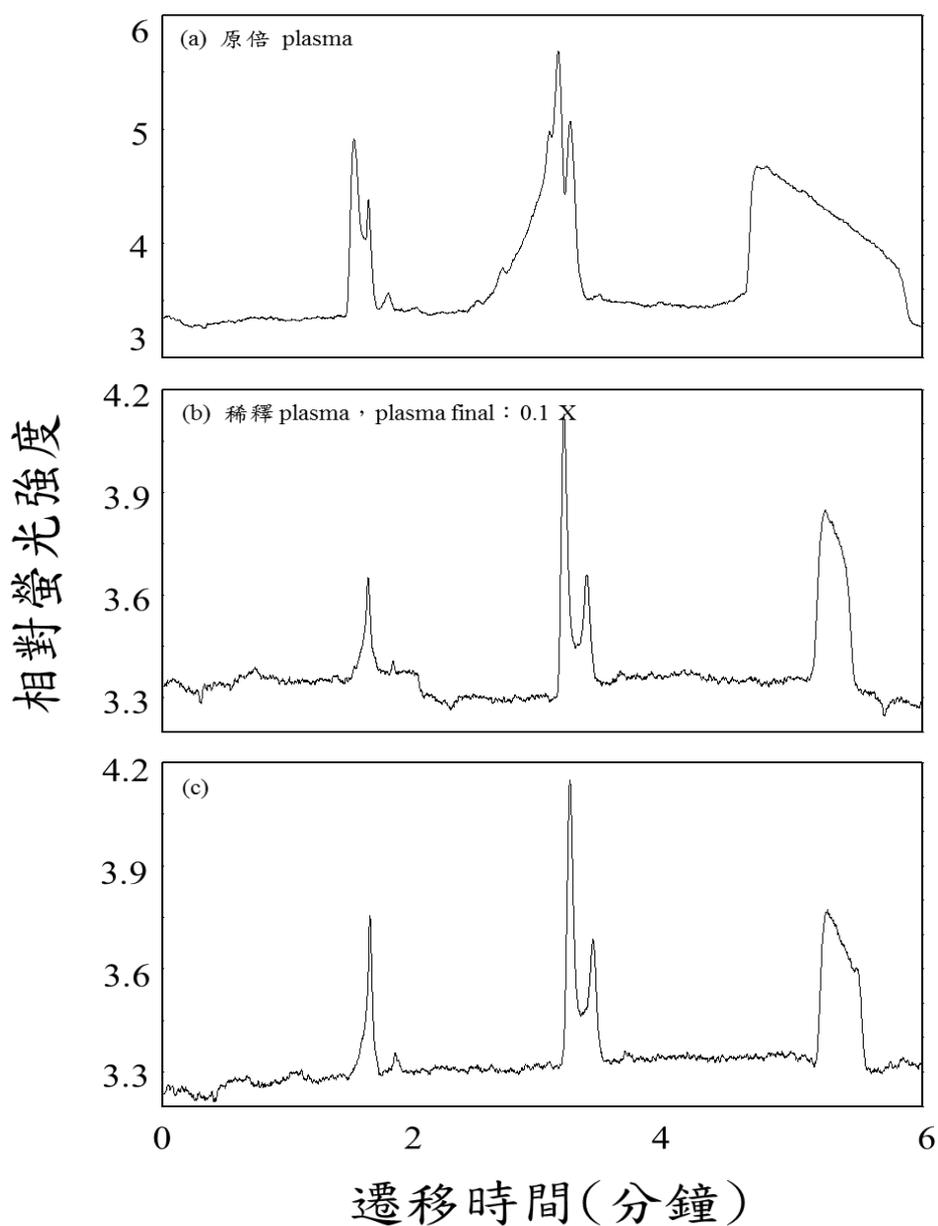


圖 3-8 於進樣端添加 5 % Isopropanol，進行分離。實驗條件為：

High voltage : + 15 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Inlet : 10 mM Tetraborate (pH 9.0) + 5 % Isopropanol

Capillary : 10 mM Tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

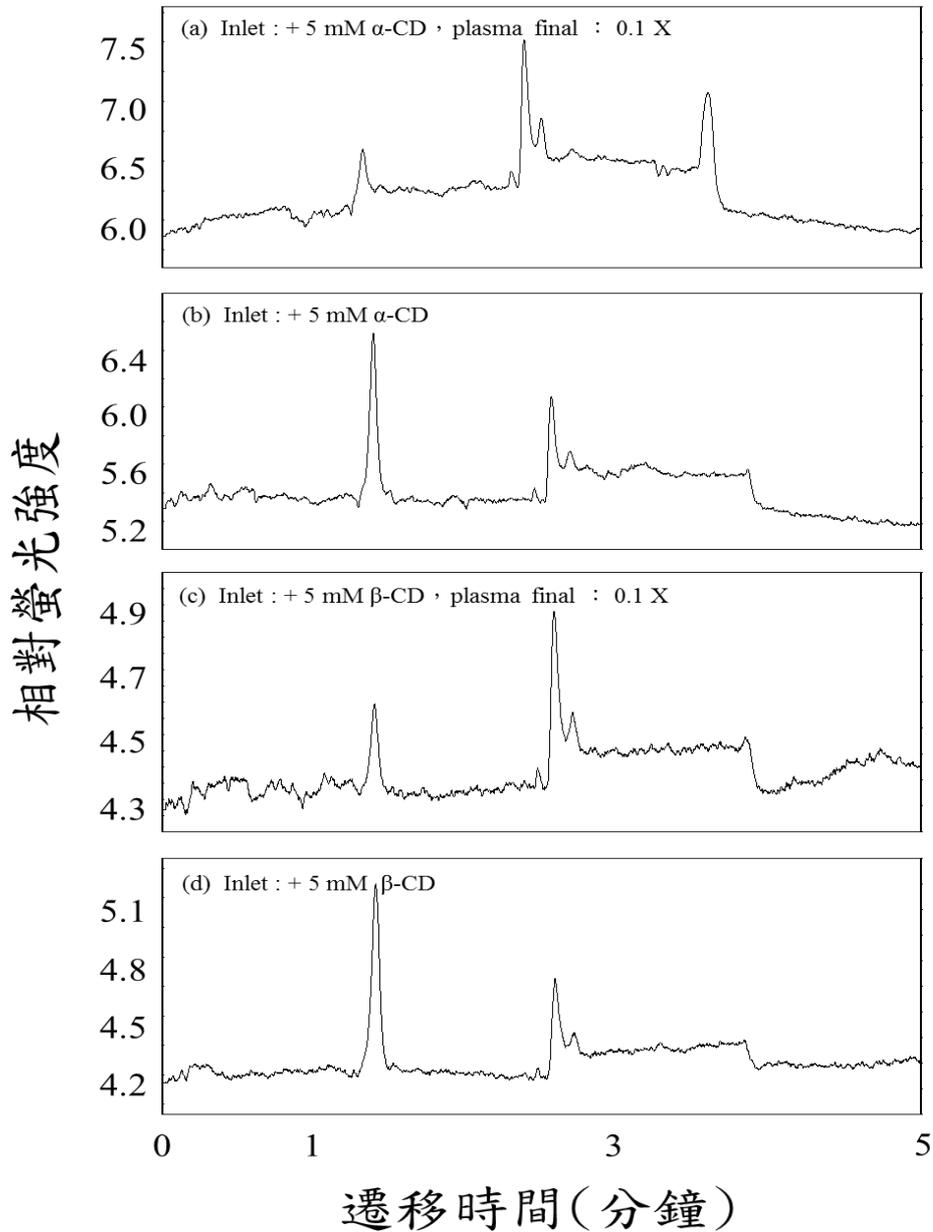


圖 3-9 於進樣端添加 5 mM α -CD、5 mM β -CD，進行分離。

實驗條件與圖 2-15 相同。Capillary: 10 mM Tetraborate (pH 9.0)。

(a)、(b) Inlet: 10 mM tetraborate (pH 9.0) + 5 mM α -CD。

(c)、(d) Inlet: 10 mM tetraborate (pH 9.0) + 5 mM β -CD。

Outlet: 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

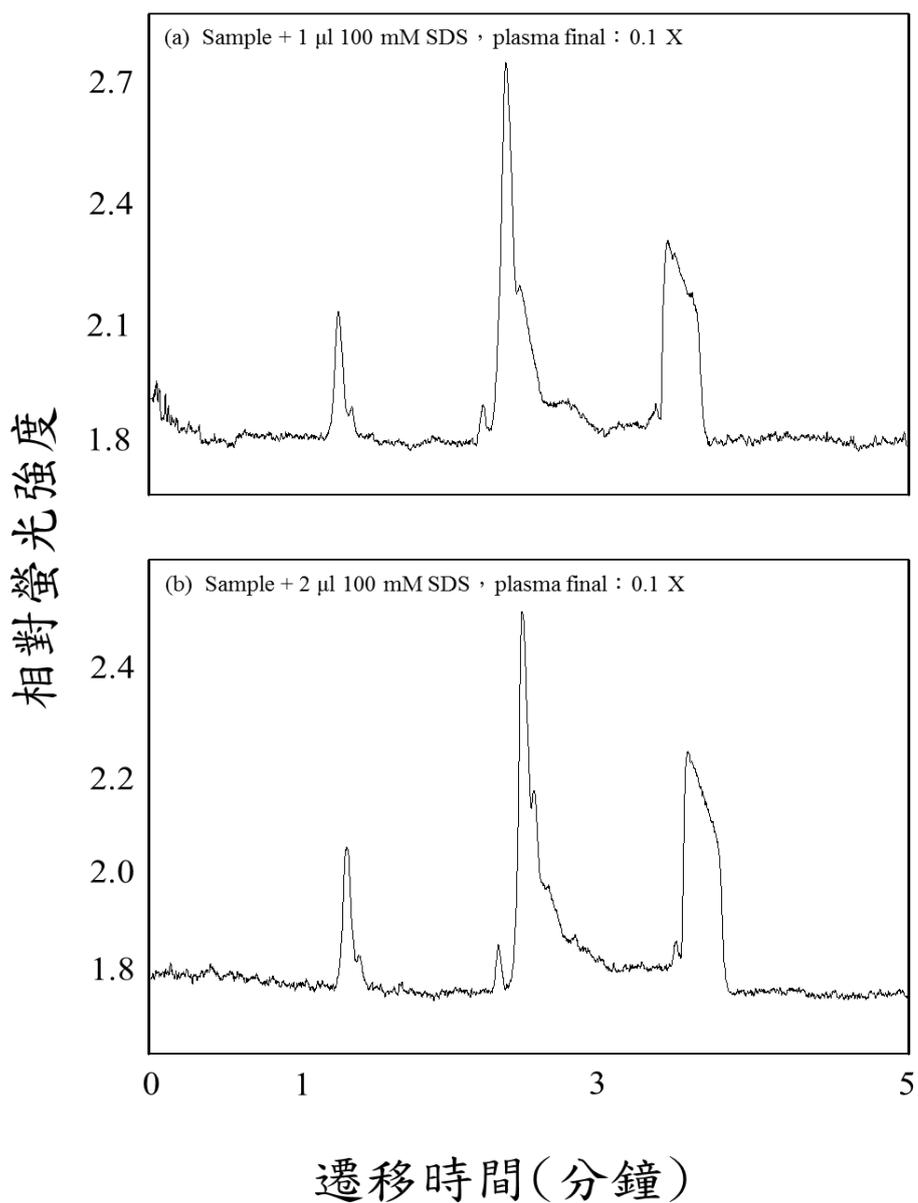


圖 3-10 於進樣端添加 5 mM α -CD，並於樣品中加入 100 mM SDS

進行分離。實驗條件為：High voltage : + 15 kV Capillary : 40 cm

Working voltage : 1.70 V Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Intlet : 10 mM tetraborate (pH 9.0) + 5 mM α - CD

Capillary : 10 mM tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

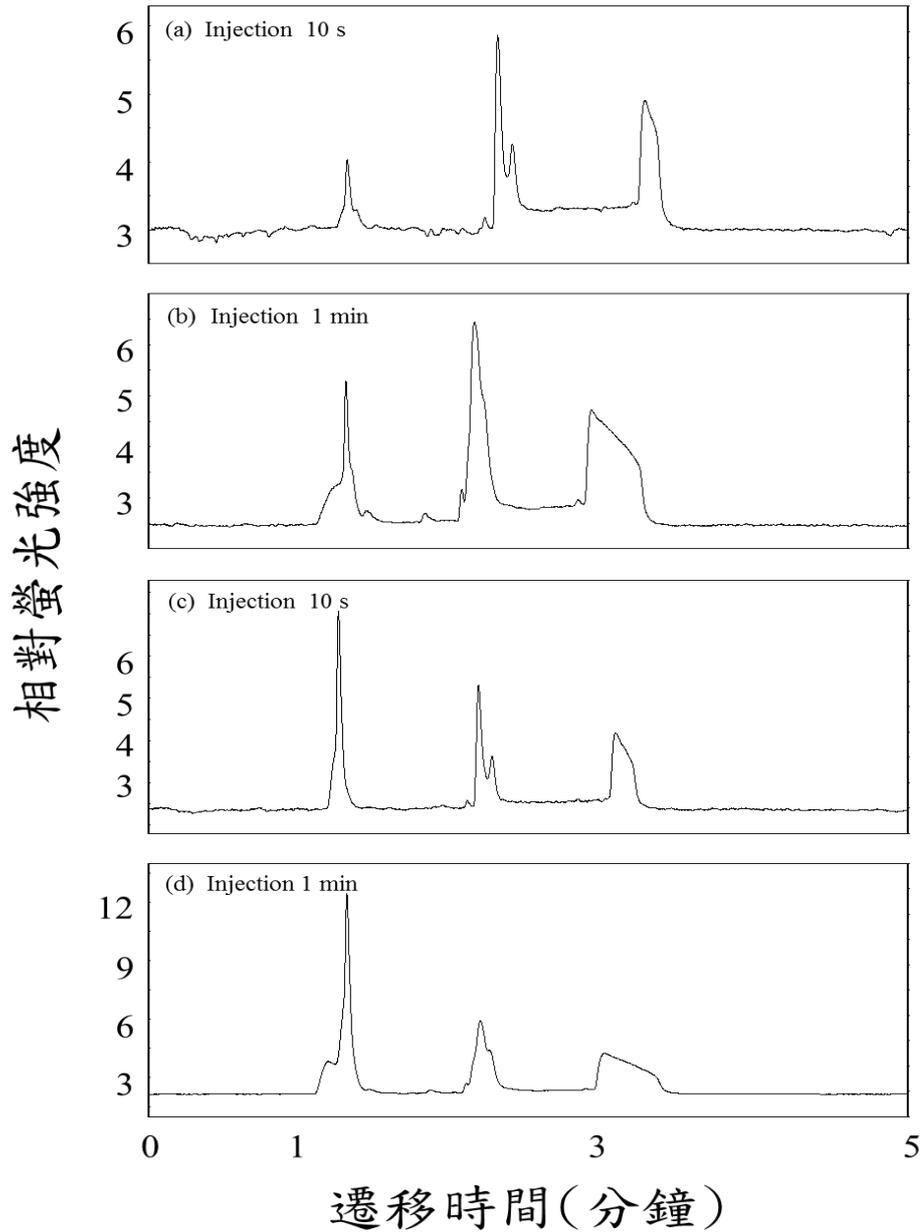


圖 3-11 於毛細管緩衝溶液中添加 10 mM SDS 進行分離。

實驗條件為：High voltage : + 15 kV

Working voltage : 1.70 V

Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

Capillary : 40 cm

Intlet : 10 mM tetraborate (pH 9.0)

Capillary : 10 mM tetraborate (pH 9.0) + 10 mM SDS

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

3.3.2.2 血漿樣品之定量與再現性

此實驗直接以四硼酸鈉(Sodium tetraborate)緩衝溶液進行電泳分離，成功的在 5 分鐘內於基質複雜之血漿樣品中分離出胺類之胺基酸訊號，並將其定性，確定訊號代表的胺基酸訊號。而在臨床檢驗中，有文獻指出，血漿中之脯胺酸與慢性尿毒症及腫瘤有關，因此，在實驗最後於血漿樣品中添加內標準進行定量分析^[36]。由於此實驗是在具有電滲流之電泳環境下進行分離之胺基酸樣品，因而分離時間較短，且 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ 的偵測靈敏度對於二級胺的偵測能力有限，因此在挑選內標準品時，必須找到可以用於定量脯胺酸之樣品訊號。

圖 3-12 為於血漿樣品中添加內標準品(Internal Standard, I.S.)之電泳圖，而由圖(b)可以觀察到三丙基胺(triethylamine, TEPA)與脯胺酸(Pro)之間不含分析物之訊號，而且是血漿中沒有而且也不會干擾到其他的訊號，因此選擇三級胺的 TEPA 作為內標準品。而實驗最後使用電壓進樣並利用樣品堆積(sample stacking)的方式，使內標準品 TEPA 的最低濃度可偵測至 1 μM ，添加內標準品於真實樣品血漿中，可偵測到的 TEPA 濃度為 10 μM ，如圖 3-13。

實驗中，學生針對與慢性尿毒症及腫瘤有關之脯胺酸進行定量，藉由胺基酸標準品的訊號面積與已知濃度使用公式 2-1 來計算其胺基酸之相關係數(Response factor, F)。

$$A_x / [X] = F(A_s / [S]) \quad (2-1)$$

A_x 為分析物訊號之面積， $[X]$ 為分析物之濃度， F 為相關係數， A_s 為標準品之訊號面積， $[S]$ 為標準品之濃度。

經由上述公式所計算出的相關係數 F 為 0.5621，代入胺基酸標準品之訊號面積與已知濃度及血漿樣品之訊號面積後，即可獲得血漿中胺基酸之濃度。而本實驗所測出的脯胺酸濃度相較於文獻中的平均濃度來的低，為 3.16 ($\mu\text{mol/l}$)。

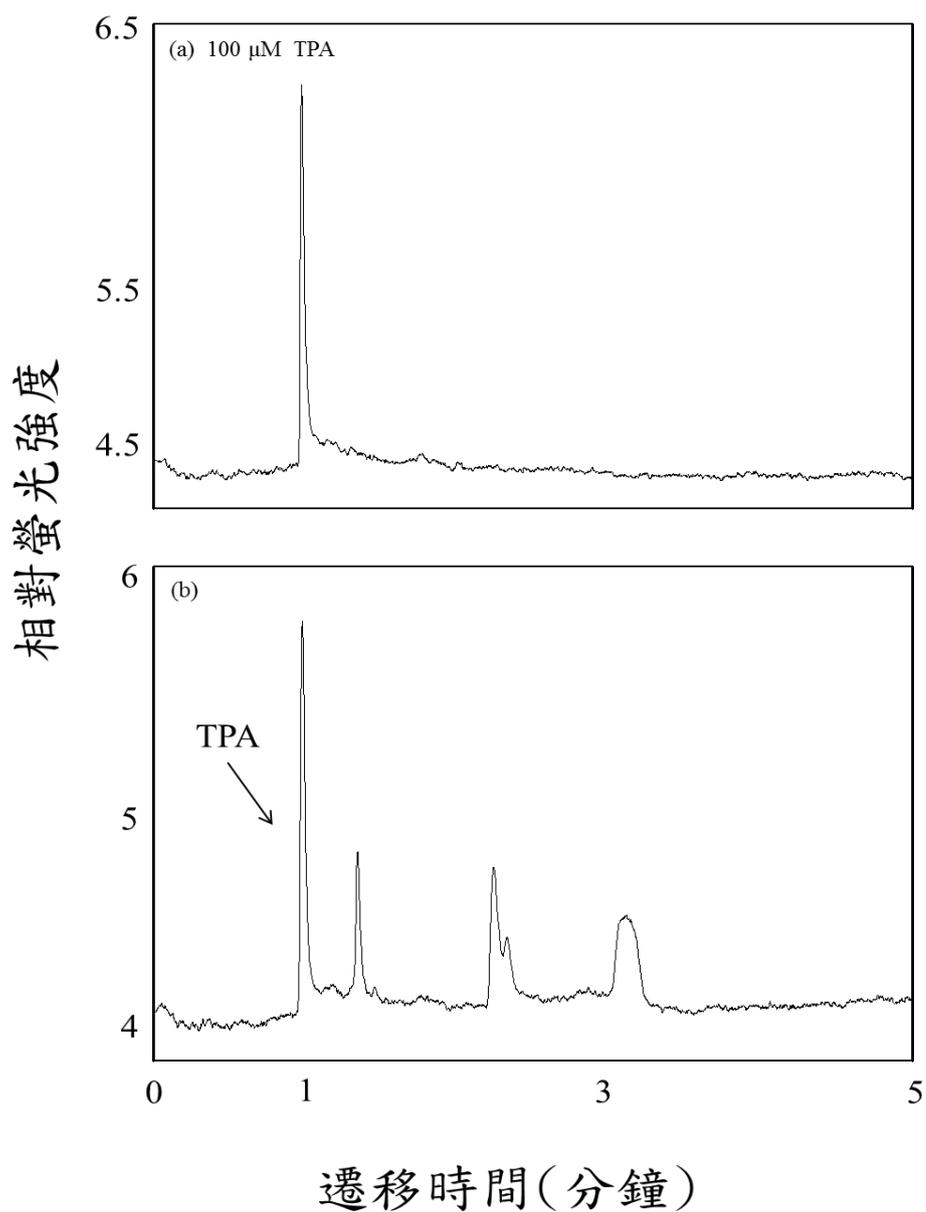


圖3-12 於真實樣品-血漿中添加標準品TPA，探討是否可與血漿樣品

分離，可作為內標準品。實驗條件為：Capillary : 40 cm

Working voltage : 1.70 V Injection : 虹吸進樣 (siphoning) 10 sec

High voltage : + 15 kV Inlet、Capillary : 10 mM tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
+ 5 % Triton X-100

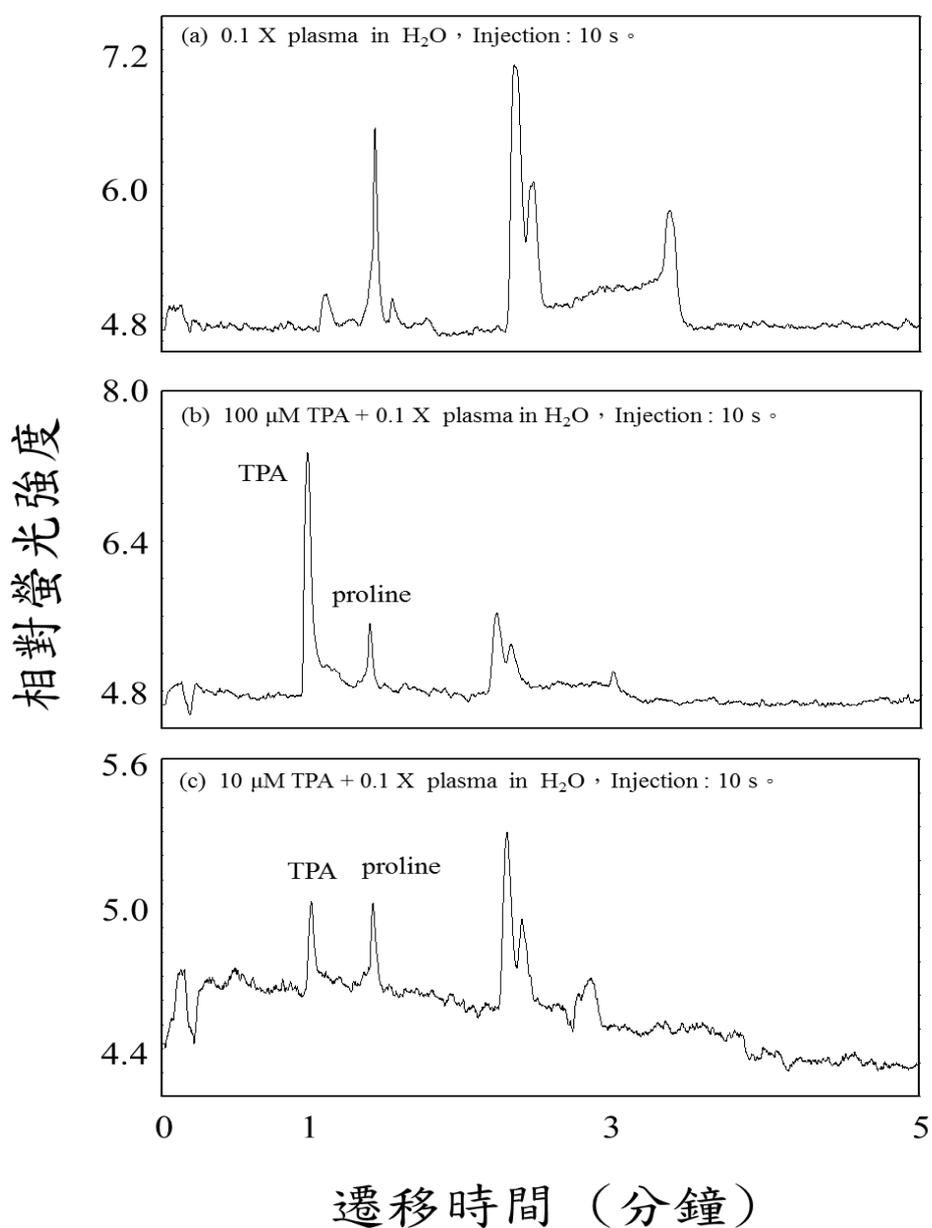


圖 3-13 於真實樣品-血漿中添加內標準品，探討可偵測到內標準品

之最低濃度。實驗條件為：High voltage : + 15 kV Capillary : 40 cm

Injection : 電動進樣 (electrokinetically) + 10 kV

Working voltage : 1.70 V ; Inlet、Capillary : 10 mM tetraborate (pH 9.0)

Outlet : 10 mM PB buffer (pH 7.5) + 5 mM Ru(bpy)₃²⁺
+ 5 % Triton X-100

3.4 結論

本實驗以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{ECL}$ 作為偵測系統，且在具有電滲流之電泳環境下進行毛細管電泳，並透過毛細管電泳分離方法中的毛細管驅動電泳，使用 10 mM Sodium tetraborate (pH 9.0) 緩衝溶液來進行毛細管電泳，成功地於 5 分鐘內將血漿樣品中之脯胺酸與其他胺類化合物分離出來。除了成功的將脯胺酸分離出來並進行定量之外，實驗最後使用電壓進樣並利用樣品堆積(sample stacking)的方式，使內標準品 TPA 的最低濃度可偵測至 1 μM ，並於真實樣品血漿中加入 TPA，可偵測到的 TPA 濃度為 10 μM 。而脯胺酸的最低濃度亦可偵測至 1 μM ，其偵測極限為 0.17 $\mu\text{mol/l}$ 。本實驗相較於雷射誘發螢光、發光二極體誘發螢光，提供了簡單(裝置簡易，容易配製之緩衝溶液)、成本低(自製 ITO 電極的化學反應槽作為偵測器)、樣品需求量低及高解析度、分析時間短等優點的分離方法。此偵測系統常被使用於免疫分析與 DNA 檢測上，而體液中游離的脯胺酸含量，對於腎功能不全或慢性尿毒症患者是一個重要的生物參數，因此，確切的知道體液中的脯胺酸含量，有助於我們了解身體健康狀況。若是此分離方法在未來能尋找到適合的修飾電極方法，以提高偵測靈敏度及穩定性、增加 ECL 強度或是可以結合其他的儀器，提高選擇性及增加其廣泛性，即可應用於體液與癌症上，對於偵測微量的生化樣品亦有所幫助。

3.5 參考文獻

1. N. Blau MD, M. E. Blaskovics, K. M. Gibson: **Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. 2nd ed, Part B, Amino Acid Analysis.** *Springer* 2003, **Part B:11-26.**
2. Singh R H, Quirk M E: **Using change in plasma phenylalanine concentrations and ability to liberalize diet to classify responsiveness to tetrahydrobiopterin therapy in patients with phenylketonuria.** *Molecular genetics and metabolism* 2011, **104** (4):485-491.
3. Hoeksma M, Reijngoud D-J, Pruijm J, de Valk H W, Paans A M, van Spronsen F J, Phenylketonuria: **high plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis.** *Molecular genetics and metabolism* 2009, **96** (4):177-182.
4. Liang H, Xue J, Li T, Wu Y: **A rapid capillary electrophoresis with electrochemiluminescence method for the assay of human urinary proline and hydroxyproline.** *Luminescence* 2005, **20** (4-5):287-291.
5. Sun H, Li L, Su M: **Simultaneous determination of proline and pipemidic acid in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection.** *Journal of clinical laboratory analysis* 2010, **24** (5):327-333.
6. Sun H, Su M, Li L: **Simultaneous Determination of Tetracaine, Proline, and Enoxacin in Human Urine by CE with ECL Detection.** *Journal of chromatographic science* 2010, **48** (1):49-54.
7. Mitch W E: **Amino acid release from the hindquarter and urea appearance in acute uremia.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1981, **241** (6):E415-E419.
8. Li S: **Study on charge transfer reaction of proline with tetrachlorobenquinone by spectrophotometry.** *Chin J Spectr Lab* 2005, **22**:831-833.
9. Inoue H, Kohashi K, Tsuruta Y: **Simultaneous determination of serum and urinary hydroxyproline and proline by liquid chromatography using two fluorescent labeling reagents.** *Analytica Chimica Acta* 1998, **365** (1-3):219-226.

10. Costin J W, Barnett N W, Lewis S W: **Determination of proline in wine using flow injection analysis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection.** *Talanta* 2004, **64** (4):894-898.
11. Wang JM, Wilson PB, Kumar S, Pye D, Hunter RD: **Quantitation of endothelial cell specific protein E-9 employing a single monoclonal antibody in an indirect sandwich ELISA.** *J Immunol Methods* 1994, **171**(1):55-64.
12. Seidel C, Gulyas M, David G, Dobra K, Theocharis AD, Hjerpe A: **A sandwich ELISA for the estimation of human syndecan-2 and syndecan- 4 in biological samples.** *J Pharm Biomed Anal* 2004, **34**(4):797-801.
13. Vilim V, Voburka Z, Vytasek R, Senolt L, Tchetverikov I, Kraus VB, Pavelka K: **Monoclonal antibodies to human cartilage oligomeric matrix protein: epitope mapping and characterization of sandwich ELISA.** *Clin Chim Acta* 2003, **328**(1-2):59-69.
14. Salazar EL, Fonseca E, Zarate A: **[Determination of estradiol-17 beta concentration in the saliva of fertile women during the menstrual cycle by an ELISA-type immunoenzymatic, competitive method].** *Ginecol Obstet Mex* 1992, **60**:8-13.
15. Makarananda K, Neal GE: **Competitive ELISA.** *Methods Mol Biol* 1992, **80**:267-272.
16. Jonusys AM, Steele EJ: **IgM anti-erythrocyte autoantibodies specific for buried and neo-antigens using cellular-ELISA assays.** *Mol Immunol* 1988, **25**(6):535-543.
17. Iwaki-Egawa S, Matsuno H, Yudoh K, Nakazawa F, Miyazaki K, Ochiai A, Hirohata S, Shimizu M, Watanabe Y: **High diagnostic value of anticalpastatin autoantibodies in rheumatoid arthritis detected by ELISA using human erythrocyte calpastatin as antigen.** *J Rheumatol* 2004, **31**(1):17-22.
18. Lollike K, Sorensen O, Bundgaard JR, Segal AW, Boyhan A, Borregaard N: **An ELISA for grancalcin, a novel cytosolic calcium-binding protein present in leukocytes.** *J Immunol Methods* 1995, **185**(1):1-8.
19. Zhang M, Niehus J, Schnellbacher T, Muller S, Graf K, Schultz KD, Baumgarten CR, Lucas C, Kunkel G: **ELISA for the neuropeptide degrading endopeptidase 3.4.24.11 in human serum and leukocytes.** *Peptides* 1994, **15**(5):843-848.

20. De Groot CJ, Hommes FA: **Plasma phenylalanine and tyrosine levels during the day in normal female controls and female obligate phenylketonuria heterozygotes.** *Enzyme* 1982, **28**(4):404-407.
21. Petzold A, Keir G, Green AJ, Giovannoni G, Thompson EJ: **An ELISA for glial fibrillary acidic protein.** *J Immunol Methods* 2004, **287**(1-2):169-177.
22. Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling PB, Peters CJ: **ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses.** *J Infect Dis* 1999, **179** Suppl 1:S192-198.
23. Palego L, Giannaccini G, Lucacchini A: **RP-LC of phenylthiocarbamyl amino acid adducts in plasma acetonitrile extracts: use of multiple internal standards and variable wavelength UV detection.** *Methods Mol Biol* 2012, **828**:201-217.
24. Oladipo O O, Weindel A L, Saunders A N, Dietzen D J: **Impact of premature birth and critical illness on neonatal range of plasma amino acid concentrations determined by LC-MS/MS.** *Molecular genetics and metabolism* 2011, **104** (4):476-479.
25. Chen S-J, Chen M-J, Chang H-T: **Light-emitting diode-based indirect fluorescence detection for simultaneous determination of anions and cations in capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography A* 2003, **1017** (1):215-224.
26. Gerhardt I, Mai L, Lamas-Linares A, Kurtsiefer C: **Detection of single molecules illuminated by a light-emitting diode.** *Sensors* 2011, **11** (1):905-916.
27. Huo F, Guijt R, Xiao D, Breadmore M C: **Dual wavelength excitation fluorescence detector for capillary electrophoresis using a pulsed bi-colour light emitting diode.** *Analyst* 2011, **136** (11):2234-2241.
28. Palka J A, Phang J M: **Prolidase in human breast cancer MCF-7 cells.** *Cancer letters* 1998, **127** (1):63-70.
29. Sun H, Li L, Wu Y: **Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for simultaneous determination of proline and fleroxacin in human urine.** *Drug Testing and Analysis* 2009, **1** (2):87-92.
30. Giese R W, Riordan J F: **Nitrotyrosine internal standard for amino acid analysis.** *Analytical Biochemistry* 1975, **64** (2):588-592.

參與學術會議

1. 2013 年中國化學年會
2. 2014 年中國化學年會
3. 第二十屆分析化學技術交流研討會