

壹、緒論

一. 前言

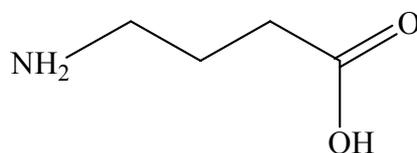
在生活周遭裡，癲癇患者常是社會中被忽視的一群，近幾年來，新型抗癲癇藥物的推行^[1]，對於少部份難控制型癲癇症(Refractory epilepsies)而言是一項重要的發展，克服了傳統型抗癲癇藥物的缺點，這些藥物化學性質和作用機制各有所不同，然而這些新型抗癲癇藥物其副作用仍然會有，但整體而言，優於傳統型抗癲癇藥物的益處，所以新型抗癲癇藥物的研究就更為重要。

至今目前對於新型抗癲癇藥物的研究，不管是在個別或同時分析上，已廣泛發展出許多之應用，本研究將結合具有高分離效率、分析時間短、樣品使用量少，高靈敏度的毛細管電泳雷射激發螢光 (capillary electrophoresis laser-induced florescence, CE-LIF)系統，成功地應用於抗癲癇藥物在尿液中的檢測。

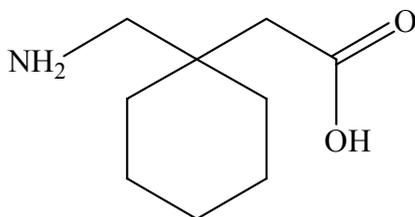
二. 分析物背景介紹

對癲癇患者發病之苦，找尋發作的原因，搭配有效的藥物治療才能根治患者的痛楚，近來藉由動物神經細胞的實驗，發現神經傳導物質可分為兩大類 — 興奮性與抑制性，而 γ -aminobutyric acid (GABA；【a】) 為抑制性的神經傳導物質，所以新型抗癲癇藥物的合成，Gabapentin (GBP；【b】) 和Vigabatrin (VGB；【c】) 的結構上類似GABA，因此可幫助穩定癲癇患者神經細胞之平衡，進而有效抑制癲癇患者的發作。然而新型抗癲癇藥物的作用與傳統型抗癲癇藥物最大的不同，主要為增加患者的醫療效果或減少身體副作用的發生。

【a】 γ -aminobutyric acid(GABA)

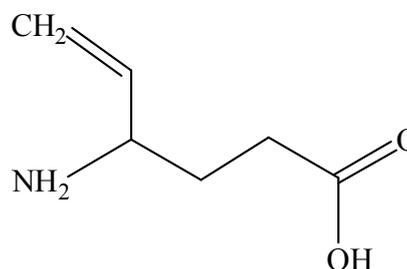


【b】 Gabapentin(GBP)



(pKa : 3.89、9.56)

【c】 Vigabatrin(VGB)



(pKa : 4.02、9.72)

圖(一)抗癲癇藥物與神經傳導物質GABA之結構圖

2-1. Gabapentin之簡介

GBP與GABA不同的地方在於化學式結構上有Cyclohexane，因此GBP可以穿過血腦障壁(blood-brain barrier)，進入中樞神經系統。在1993年美國食品暨藥物管理局(FDA)核准用於治療癲癇症，它的作用機轉目前並不清楚，起初最先用來當作GABA的增強劑，代謝後本身也不會變成GABA，所以近來有許多文獻針對 GBP 研究，成立一些機制的假設探討^[2]。GBP 的口服吸收迅速，對食物的干擾影響不大，每日必須將劑量分為3次服用，當口服過量，可能會產生一些副作用，主要為中樞神經的抑制作用，如走路平衡不佳、嗜睡、頭暈等症狀，嚴重的話甚至對於淋巴系統會有紫斑症的產生^[3]。臨床上的治療，單一療法對局部性發作(partial seizure)效果不錯^[4]，除此之外全身性的復發(secondary generalizure)和全般性發作(rolandic seizure)的治療也控制良好。有關藥物動力學的特性列於表(一)

表(一) 有關Gabapentin的藥物動力學特性^[5]

Pharmacokinetic properties of Gabapentin	
吸收作用	<p>生物體有效利用的口服劑量</p> <p>一天劑量所需範圍≤ 1800 mg，藥效吸收達 70%， 當藥量≥ 3600 mg，藥效吸收會降至 35%。</p> <p>口服吸收在 2~3 h 濃度達最大，半衰期 5~7 h</p>
蛋白質結合率	0%
代謝作用	<p>機轉過程至今仍不清楚</p> <p>對肝臟系統的酵素不影響</p> <p>不會自我誘發反應</p>
排泄反應	<p>經腎臟排泄，尿液以原形排出</p> <p>對傳統 AEDs 藥物濃度不受影響</p>
藥物之間的作用	<p>傳統 AEDs 對此藥之療效不受影響</p>

h : hour ; AEDs : antiepileptic drugs

2-2. Vigabatrin 之簡介

VGB是第一個以人工合成的有效新型抗癲癇藥物，在1990年時就被歐洲通過使用於治療難治型癲癇症(refractory epilepsy)。此藥物之機轉為抑制GABA transaminase (GABA-T)，GABA-T為分解GABA之主要酵素，為了使GABA不會被分解，所以提高大腦突觸部位GABA的濃度，有效防止癲癇患者神經細胞的不正常放電^[6]。每日口服劑量需分為2~3次服用，當口服過量，可能會產生一些副作用，主要為精神狀態上的影響，症狀如短暫性嗜睡、頭暈、疲勞等現象^[7]，身體上的影響，症狀如腸胃不佳、體重增加等現象產生。臨床上治療，可適用於小孩的局部性發作，而單一療法的效果，對嬰兒時期點頭痙攣症(infantile spasm)也有得到很好的控制，其他治療方面尚還有全身性的復發(secondary generalizure)。有關藥物動力學的特性列於表(二)

表(二)有關Vigabatrin的藥物動力學特性^[1]

Pharmacokinetic properties of Vigabatrin	
吸收作用	生物體有效利用的口服劑量 一天劑量範圍 1500~4000 mg，藥效吸收為 60~80% 口服吸收成人於 2 h 濃度達最大，半衰期 5~8 小時 孩童於 1.3~2.4 h 濃度達最大，半衰期 5.5 小時
蛋白質結合率	0%
代謝作用	抑制 GABA-T 的機轉 對肝臟系統的酵素不影響 不會自我誘發反應
排泄反應	經腎臟排泄，尿液以原形排出 對傳統 AEDs 之 DPH 藥物濃度略降
藥物之間的作用	傳統 AEDs 對此藥之療效不受影響

DPH：phenytoin

三. 過去研究之探討

過去文獻對 GBP 和 VGB 的相關報導，大部分以氣相層析(gas chromatography , GC)、高效液相層析(High- performance liquid chromatography , HPLC) 及毛細管電泳(capillary electrophoresis , CE) 為主^[11 ~20]，針對以下過去的文獻比較，進而開發新的分析方法。

3-1 Gabapentin 之分析方法

GC 的分析上，搭配的偵測方式有火焰離子化偵測 (flame ionization ,FI)^[8,9] 和質譜法(mass spectrometry , MS)^[10]，這些偵測方法需進行衍生化反應，因為 GBP 不具揮發性無法直接分析，因此要提高其揮發性且須避免管柱交互作用之干擾；然而衍生化反應的時間會影響整體實驗的效率，早期 Hooper 等人，研究人體血液和尿液中 GBP 的含量，此方法需兩步驟衍生化 GBP 結構上的羧基 (carboxy group)、胺基(amino group)，共需耗費 1 小時^[8]，後來 Kushnir 等人研究，只要單一步驟，即可同時衍生化羧基與胺基，進而只需 15 分鐘^[10]。

HPLC 的分析上，搭配的偵測方式，以 UV-Vis 吸收偵測^[11 ~15]和螢光偵測(Fluorescence detection , FD)^[16 ~20]為主。由於 GBP 本身無發色團(chromophores)或螢光團(fluorophores)的結構，所以不具 UV-Vis 吸收或螢光偵測的性質，因此需要透過衍生劑的幫助進行偵測；

在搭配 UV-Vis 吸收的分析上，Hengy 等人使用的衍生劑 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid (TNBS) 於管柱前衍生，此為穩定的衍生劑，缺點是 GBP 的分析時間需等待超過 10 分鐘^[11]，後來 Zhu 等人利用衍生劑 phenylisothiocyanate(PITC)於管柱前衍生，發展應用於臨床動力學的分析上，且可每天操作大量樣品(一天超過 100 個樣品)，改善過去分析樣品數量的限制，美中不足的是使用 SPE 作血液的前處理，在大量的操作分析時，則需花費昂貴的成本^[15]，近幾年來，Sagirli 等人利用衍生劑 1,2-naphtho-quinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) 進行反應，提高 GBP 在血液中的偵測極限^[14]；在搭配 FD 的分析上，有 Tang 等人研究使用衍生劑 *o*-phthalaldehyde (OPA)，發現 OPA 的衍生條件溫和且反應迅速，但是衍生產物的穩定性只有 25 分鐘，所以衍生完必須立即注射，以免影響實驗的結果^[18]。後來有文獻針對 OPA 的穩定性不佳，則發展利用穩定性佳的衍生劑 9-fluorenylmethyl Chloroformate (FMOC-Cl)^[19]與 GBP 進行衍生反應。

至於 CE 的分析上^[21~24]，Pedro Rada 等人利用 CE 搭配微透析 (microdialysis) 研究老鼠體內 GBP，此技術的優點，可直接將樣品注射分析、分析簡單且快速，但此實驗的衍生劑 fluorescein isothiocyanate (FITC) 之衍生反應耗時(需 14 小時)，然而 CE 和 GC、HPLC 相比較下，HPLC 和 CE 的偵測極限比 GC 還要低一個級數，加上 CE 有較

好的分離效率且樣品注射量少，甚至對於有機溶劑的使用也相對較少，所以近幾年的發展上，CE 搭配的偵測方式，以 UV 吸收偵測或雷射激發螢光（Laser-induced Fluorescence, LIF）偵測為主，並應用於市售藥物及血液樣品的分析。相關文獻列於表(三)

表(三) Gabapentin 之分析方法

Detection mode	Derivatization reagent	Reaction Temp/Time	Application	Limits of detection	Recovery (%)	Year/Ref.
GC	MHC+ trifluoroacetic anhydride	-	human plasma urine	0.10 µg/mL -	33 33	1990/[8]
GC	MTBSTFA+ 1% t-BDMCS	70°C/30min	human plasma	0.20 µg/mL	-	1996/[9]
GC-MS	MTBSTFA+ 1% t-BDMS	90°C/15min	human plasma drug	0.10 µg/mL	-	1999/[10]
HPLC-UV	TNBS	RT/30min	human plasma urine	0.01 µg/mL -	- -	1985/[11]
HPLC-UV 340nm	TNBS	50°C/10min	human plasma	0.05 µg/mL	94.20	1995/[12]
HPLC-UV 335nm	TNBS	90°C/10min	human plasma	1 µg/mL	94~101	2003/[13]
HPLC-UV	NQS	60°C/20min	human plasma urine	0.01 µg/mL 0.05 µg/mL	72.21 72.73	2006/[14]
HPLC-UV	PITC	RT/20min	human plasma	0.03 µg/mL	78~87	2002/[15]
HPLC-FD						

λ_{ex} 330nm λ_{em} 440nm	OPA	RT /5min	human plasma	0.5 $\mu\text{g/mL}$	≥ 90	1996/[16]
HPLC-FD λ_{ex} 320nm λ_{em} 450nm	OPA	RT /6min	human plasma	0.10 $\mu\text{g/mL}$	100	1999/[17]
HPLC-FD λ_{ex} 230nm λ_{em} 420nm	OPA	–	human plasma	0.05 $\mu\text{g/mL}$	–	1999/[18]
HPLC-FD λ_{ex} 260nm λ_{em} 315nm	FMOC-Cl	60°C /10min	human plasma	0.03 $\mu\text{g/mL}$	90	2006/[19]
HPLC-FD λ_{ex} 350nm λ_{em} 450nm	OPA	–	human plasma	0.30 $\mu\text{g/mL}$	90~98	2002/[20]
CE-LIF Ar+-laser	FITC	RT /14 h	rat(in brain)	0.17 ng/mL	–	1998/[21]
CE-LIF Ar+-laser	CFSE	RT /30min	human plasma	0.01 $\mu\text{g/mL}$	91.20~99.70	2004/[22]
CE-UV 215nm	–	–	drug	4.98 $\mu\text{g/mL}$	98.5~101.8	2004/[23]
CE-UV 200nm	fluorescamine	–	human serum	1 $\mu\text{g/mL}$	92.7	1995/[24]

【註】 RT = room temperature
MHC=Methanolic hydrogen chloride
MTBSTFA= *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide
t-BDMS = t-BDMCS =*tert*-butyldimethylsilyl
TNBS = 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid
PITC =phenylisothiocyanate
NQS= 1,2-naphtho-quinone-4-sulphonic acid sodium salt
OPA= *o*-phthalaldehyde
FITC= fluorescein isothiocyanate ;
FMOC-Cl= 9-fluoren-ylmethyl chloroformate
CFSE= 6-carboxyfluorescein,succinimidyl ester

3-2 Vigabatrin 之分析方法

關於 VGB 在 HPLC 的研究裡^[25~30]，因為 VGB 和 GBP 同樣也不具有發色團或螢光團的結構，所以可以利用 UV-直接偵測的方式，或藉由衍生劑 TNBS、NQS 使分析物帶有發色團，分別應用分析在癲癇患者血液中藥物的殘留量和健康人體服用後血液及尿液中的含量；然而 UV 的偵測靈敏度^[25~27]不及螢光偵測(FD)^[28]，而且 Erturk 等人^[28]使用衍生劑 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) 進行管柱前衍生，再搭配固相萃取技術(solid-phase extraction, SPE)，降低生成干擾物和背景訊號，成功地應用於臨床動力學上，分析人體血液、尿液中 VGB 含量，此方法雖可以提升偵測靈敏度，但缺點為衍生條件過於費時，以及固相萃取技術過程的繁雜。

有鑒於過去層析技術的缺點— 複雜的衍生步驟、短波長偵測上靈敏度的不足、衍生產物的低穩定性等，所以近來質譜的分析上，有研究關於液相層析串聯式質譜儀(LC -MS/MS)的偵測方式^[33]，針對層析方法上的缺點，研究出一個簡單快速的方法，定量人體血液中 VGB 的含量，但是缺點為儀器配備昂貴。

在 CE 搭配的偵測方式，以 UV 吸收偵測^[34]或雷射激發螢光偵測(LIF)^[35~37]為主，因為 LIF 的偵測極限比 UV-吸收偵測低，所以近年曾利用 CFSE 或 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester

(CTRSE)結合 VGB 進行管柱前衍生，應用於血液樣品的分析，另外在動物樣品的分析上，Benturquia 等人利用微透析的方式，偵測老鼠大腦中的 VGB 等氨基酸，並且結合微胞電動層析(micellar electrokinetic chromatogramphy, MEKC)達到分離的目的。相關 VGB 過去研究文獻列於表(四)。

除了上述相關 VGB 的研究，還有針對 VGB 鏡相異構物分離的偵測，因為其本身為水溶性消旋混合物，只有 S-(+)-enantiomer 具有藥理活性，而 R-(-)-enantiomer 不具藥理活性，且也不會進行 chiral inversion，干擾 S- (+)-enantiomer 的藥理活性。其實早在 1983 年時，就已經有利用 GC-MS 偵測 VGB 鏡像異構物於人體的血液、尿液和腦脊隨液，此方法需要兩步驟衍生 VGB 結構上的胺基與羧基，並且進行一連串冗長的操作，使分析物易揮發達到偵測的目的^[38]。

關於 HPLC-FD 偵測 VGB 鏡像異構物，VGB 需進行管柱前 diastereomer 衍生反應，此偵測目的為改善過去文獻中 GC 和 GLC 的缺點 — 花費昂貴的 chiral capillary columns、分析時間、樣品製備的繁雜，此方法的衍生反應，除了衍生劑 OPA 與 VGB 鏡相異構物的結合外，還需添加 *N*-acetyl-*L*-cysteine，使之達到偵測目的^[39]，這幾年來的研究發現，只需加入具有 chiral 結構性質的 naproxen acyl chloride (NAC)進行衍生反應^[40]，偵測到的衍生產物訊號穩定且再現性高。

至於 HPLC-UV 偵測上，Chen 等人則添加 Boc-L-Leu-Osu，幫助進行管柱前 diastereomer 衍生反應^[41]，後來 Perucca 等人，則利用 TNBS 結合 VGB 鏡像異構物進行衍生反應，再搭配具光學性質的管柱 (chiralcel-ODR columns) 進行分離^[42]。而在 CE-UV 的相關研究不多，近來有 Zhao 等人，利用具有 chiral 結構性質的 dehydroabietylisothiocyanate (DHAIC)^[42] 進行管柱前衍生反應，詳細相關文獻列於表

(五)

表(四) Vigabatrin 之分析方法

Detection mode	Derivatization reagent	Reaction Temp/Time	Applicatn	Limits of detection	Recovery (%)	Year/Ref.
HPLC-UV 210nm	—	—	pharmaceutical	—	99.80	1987/[25]
HPLC-UV 340nm	TNBS	50°C/10min	Epileptic patients	1 µg/mL	—	2000/[26]
HPLC-UV 448nm	NQS	60°C/20min	human plasma urine	1 µg/mL	81.07 83.05	2004/[27]
HPLC-FD	NBD-Cl	70°C/50min	human plasma urine	0.10 µg/mL 0.10 µg/mL	70~88 86~91	2001/[28]
HPLC-FD λ _{ex} 345nm λ _{em} 455nm	OPA	—	—	—	—	1985/[29]
HPLC-FD λ _{ex} 345nm λ _{em} 418nm	Dns chloride	50°C/15min	human plasma urine	0.50 µg/mL 10 µg/mL	— —	1985/[30]

SPM 460nm				0.50 µg/mL	106.10	
SFM λ_{ex} 460nm λ_{em} 520nm	NBD-Cl	70°C/50min	drug	0.01 µg/mL	105.35	2002/[31]
Fluorimeter λ_{ex} 340nm λ_{em} 440nm	OPA	–	human plasma urine	–	91~104 75~95	1984/[32]
LC-MS/MS	–	–	human plasma	0.05 µg/mL	99.59	2005/[33]
CE-UV 214nm	–	–	drug	1.50 µg/mL	99.4~100.4	2005/[34]
CE-LIF Ar+-laser	CFSE	RT/30min	human plasma	2 µg/mL	97~101.6	2007/[35]
CE-LIF 442nm	NDA	RT/1hr	rat (in brain)	0.10 ng/mL	–	2004/[36]
CE-LIF He-Ne laser	CTRSE	RT/30min	human plasma	0.02 µg/mL	95.2~100.3	2003/[37]

【註】 NBD-Cl =4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole

CTRSE =5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester

NDA=naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde

表(五) 分離 Vigabatrin enantiomers 之方法

Detection mode	Derivatization reagent	Reaction Temp/Time	Application	Limits of detection	Recovery (%)	Year/Ref.
GC-MS	–	–	plasma urine	–	–	1983/[38]
HPLC-FD	OPA/N-acetyl -L-cysteine	–	human plasma	0.20 µg/mL 0.14 µg/mL	(R)88.2 (S)92.4	1998/[39]

HPLC-FD λ_{ex} 230nm λ_{em} 350nm	NAC	30°C/5min	human plasma	0.32 ng/mL	-	2008/[40]
HPLC-UV 210nm	Boc-L-Leu-OSu	35°C/30min	human plasma	-	(R)98~102	1984/[41]
HPLC-UV 340nm	TNBS	50°C/10min	human plasma	0.50 μ g/mL	(R)89~103 (S)91~97	2007/[42]
CE-UV 202nm	DHAIC	65°C/45min	human plasma	0.15 μ g/mL	(R)96.7~108	2006/[43]

【註】 Boc-L-Leu-OSu = *tert*-butyloxy-L-leucine N-hydroxysuccinimide ester

NAC= naproxen acyl chloride

DHAIC=dehydroabietylisothiocyante

表(六) 同時分析 Gabapentin 和 Vigabatrin 之方法

Detection mode	Derivatization reagent	Reaction Temp/Time	Applicaion	Limits of detection	Recovery (%)	Year/Ref.
HPLC-FD λ_{ex} 230nm λ_{em} 455nm	OPA	- -	human plasma human urine	(G)0.08 μ g/mL (V)0.06 μ g/mL	(G)(V)≐ 100	1998/[44]
HPLC-FD λ_{ex} 340nm λ_{em} 445nm	OPA	-	human plasma	(G)0.17 μ g/mL (V)0.13 μ g/mL	94~106 102~104	1998/[45]
HPLC-FD λ_{ex} 235nm λ_{em} 435nm	OPA	-	human plasma	(G)0.10 μ g/mL (V)0.60 μ g/mL	-	2000/[46]
HPLC-FD λ_{ex} 390nm λ_{em} 472nm	fluorescamine	-	human plasma drug	(G)0.10 μ g/mL (V)0.03 μ g/mL	102.7	2005/[47]
HPLC-FD λ_{ex} 330nm λ_{em} 450nm	OPA	RT /1~2min	human plasma	(G)0.53 μ g/mL (V)0.06 μ g/mL	- -	2004/[48]

SFM λ_{ex} 390nm λ_{em} 472nm	Fluorescamine	–	drug human urine	(G)0.06 μ g/mL (V)0.05 μ g/mL (V)0.08 μ g/mL	99.61 100.21 91~105	2002/[49]
SFM λ_{ex} 465nm λ_{em} 532nm	NBD-Cl	70°C/30min	drug human plasma	(G)0.97 μ g/mL (V)0.54 μ g/mL –	98.7~101.3 103~105 101.58	2001/[50]
CE-UV 300nm	OAC + dirthylamine	30°C/10min	–	(G)0.85 μ g/mL (V)0.60 μ g/mL	98.9 101.0	2004/[51]

【註】 SFM=spectrofluorimeter ; SPM=spectrophotometer

OAC=ofloxacin acyl chloride

3-3 研究動機

從過去的研究，得知選擇高靈敏度的毛細管電泳雷射激發螢光偵測(CE-LIF)可廣泛地應用於人體血液中藥物含量的分析和市售藥物的檢測，而且發現在分析 GBP 和 VGB 的文獻資料裡^[44~51]，應用在人體尿液的檢測研究不多，加上得知活性鹵素類衍生劑 NBD-Cl，進行管柱前衍生反應，其條件為高溫 70°C 下 30 分鐘，而同屬於活性鹵素類衍生劑 NBD-F 反應性優於 NBD-Cl，所以選擇 NBD-F 搭配 CE-LIF 應用於人體尿液中 GBP 和 VGB 的偵測，並且建立一個簡單、靈敏、迅速的分析方法。

四. 毛細管電泳介紹

近幾年來，毛細管電泳(CE)已經成為一個重要的分析技術，尤其對於生物分子的偵測或分離，被廣泛的應用於生物化學、生醫工程和製藥分析技術上；目前儀器的發展已趨於成熟，但毛細管電泳的分析優勢仍是未來發展應用的方向。

4-1 毛細管電泳的背景

在西元 1897 年，Kohlrausch 推導帶電荷離子在電解質溶液中的遷移方程式。此理論直到西元 1937 年，Tiselius 將其發展成為一種分離技術^[52,53]。電泳(electrophoresis)的定義為帶電荷粒子受到外加電場的作用下，正負電極吸引或排斥的現象，導致遷移速度的不同，達到分離的效果，由於 Tiselius 成功地將電泳技術的發展應用於人類血清蛋白的分離，分別為 α_1 、 α_2 、 β 、 γ 、球蛋白等成分，所以在西元 1948 年獲頒諾貝爾化學獎。後來電泳的技術受到重視，逐漸有各種理論研究產生，早期電泳分離是在自由溶液(free zone electrophoresis)中進行，在電場的作用下會使電解質離子產生過多的焦耳熱(Joule heating)，原因是受熱效應影響會產生熱擴散和熱對流的現象，造成分析訊號區帶過寬，分離效果不佳，導致無法在高壓電場下運作，欲改善此現象，可以使用高分子聚合物如聚丙烯胺醯(acrylamide)或瓊脂凝膠(agarose)，但是缺點就是凝膠製備處理複雜且分析時間較長。

到西元 1967 年時, Hjerten^[54,55] 研究發展出狹窄內徑的毛細管(1~3 mm), 欲降低溶液之熱對流作用, 管壁以甲基纖維素(Methyl Cellulose) 修飾, 將石英管壁繞著縱軸緩慢旋轉, 成功地在高電場下進行自由溶液(free solution)區帶電泳分析, 並應用於無機離子、蛋白質、核酸和病毒等。西元 1974 年 Virtane^[56] 利用玻璃毛細管有效的控制焦耳熱產生, 除此之外, 還提出電滲流(electroosmotic flow)可能是影響電泳分析的因素之一; 西元 1979 年 Mikkers^[57] 為了減少對流問題(convect-ion problem)使用內徑 200 μm 聚四氟乙烯管(Polytetrafluorethylene , PTFE)進行電泳分離實驗, 發現樣品注射量的多寡會影響毛細管電泳的解析度。

經過多年的研究, 直到西元 1981 年, Jorgenson 和 Lukacs^[58-60] 以 75 μm 二氧化矽材質的毛細管分離衍生化胺基酸, 在高電場作用下搭配螢光偵測器進行線上(on-line)偵測, 提供高效率電泳分離, 開啟了帶電荷粒子的應用並奠定了毛細管區帶電泳理論基礎的發展。西元 1984 年, Terabe^[61] 成功的分離出不帶電荷中性物質, 所謂的微胞電動力層析法(MEKC), 在緩衝溶液中加入界面活性劑^[62], 當界面活性劑高於臨界飽和濃度(critical concentration)時, 微胞會以親水端朝內, 疏水端朝外之排列, 使微胞在分離系統有如兩相的狀態存在, 一個是緩衝溶液組成的水相, 另一個是界面活性劑所組成的微胞相(所

謂的假靜相 pseudostationary phase)，透過分析物在微胞與緩衝溶液之間有不同的分佈係數(Partition coefficient)，可成功地分離不帶電荷的中性分子。

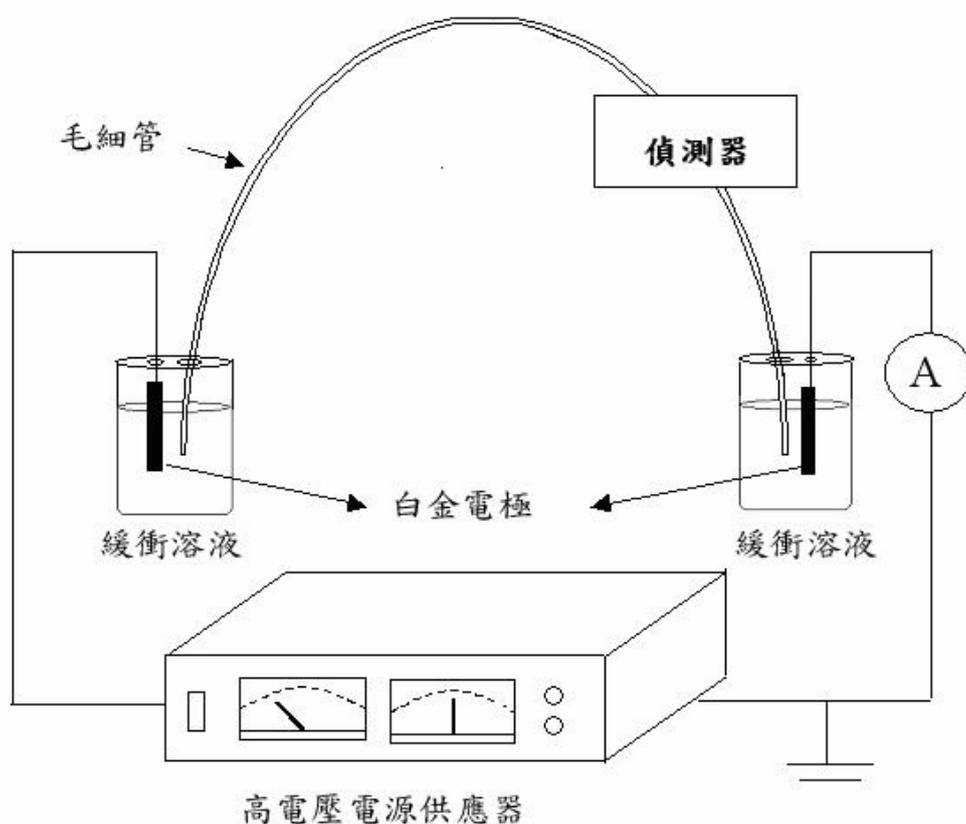
之後陸續有對生物分析技術突破性理論的發表，1985年 Hjerten^[63] 提出毛細管等電聚焦(Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)，此方法主要依據蛋白質類物質具有不同的等電點(pI)來進行分離，首先用兩性電解質溶液在毛細管中建立 pH 梯度，將陰極置於鹼性溶液，陽極置於酸性溶液，當施加一電場，此時蛋白質會在介質中開始遷移，直至達到不帶電區域而聚集，此時溶液的 pH 值等於蛋白質 pI 值，此過程稱為“聚焦”。在 1987 年時，有 Cohen 和 Karger^[64] 提出毛細管凝膠電泳 (Capillary gel electrophoresis, CGE)，其優點可改善傳統板式凝膠電泳無法在高電壓下使用及防止對流之特性，此方法主要是藉由將毛細管內壁塗佈凝膠物質 polyacrylamide，形成多孔性的凝膠，如同一個分子篩，再根據分子大小的差異達到分離目的。此後又有毛細管等速電泳(Capillary isotachopheresis, CITP)的理論建立^[65]，此為非連續的電解質系統，主要的作用是使離子態分析物的遷移率，位於前導電解質(leading electrolyte)與終止電解質(terminating electrolyte)之間，當施加一高電壓後，會因各區帶所感應的電場強度不同，在分離過程中依離子不同的電泳遷移率，而自行調整維持區帶的等速移動。

毛細管電層析法^[66,67] (Capillary electrochromatography, CEC)是結合細管區帶電泳(CZE)及液相層析的技術，主要是利用裝填的方式，使毛細管內存有固定相，當施加高電壓進行分析，會類似於液相層析管柱，當樣品進入毛細管中會藉由分析物的電泳遷移率之差異，加上分析物在靜相與動相之間分配平衡不同的作用力，使之達成分離目的，且展現更多的選擇性和分離效率。

毛細管電泳的優點，不僅是分離效率高、分析速度快，而且所需樣品量少，雖然近來有各種相關毛細管電泳發展出的商品化儀器，至今毛細管電泳的發展，仍廣泛應用於各生化領域階層中，所以毛細管電泳更為不可忽視的理論基礎。

4-2 毛細管電泳的分離原理

毛細管電泳裝置如圖(二)，首先取一適當長度的熔融矽毛細管，使毛細管內充滿緩衝溶液，再將其兩端置入緩衝溶液中並各放入一白金電極，而緩衝溶液的一端接高壓電極，另一端接地線，形成迴路；於毛細管高壓電極端注入分析物後，施加一高電壓於此迴路，分析物流經偵測視窗時，被偵測器偵測產生訊號並由電腦轉換成圖譜儲存分析。



圖(二) 毛細管電泳基本裝置圖

當分析物由毛細管入口端往偵測器方向移動，因為分析物本身所帶電荷對質量比的不同，造成不同的電泳移動度而達到分離的目的。藉電泳移動度(electrophoretic mobility)顯示其分析物遷移速率，由式(1)表示^[65]

$$\nu_e = \mu_e \cdot E = \mu_e \cdot \frac{V}{L} \quad \text{式(1)}$$

ν_e ：樣品離子的遷移速度 (cm/s)

μ_e ：電泳移動度 ($\text{cm}^2 / \text{s} \cdot \text{V}$)

E：電場強度(V/cm)

V：外加電場 (V)

L：毛細管總長度(cm)

除了電泳移動度之外，尚還有一作用力是影響電泳重要因素，此作用力會把所有分析物帶往偵測器的方向移動，稱之電滲流(EOF：electroosmotic flow)：

(1) 電滲流的形成：毛細管的外部塗覆高分子聚合物 polyimide 增加其彈性，內壁為矽醇基(-SiOH)所構成，內徑小(20~75 μm)，散熱佳，所以可以在高壓電場下作用；當緩衝溶液 $\text{pH} \geq 3$ 時，毛細管內壁的 SiOH 會解離成 SiO^- ，使其內壁帶負電荷，然而為了維持電荷

平衡，緩衝溶液中的帶正電荷離子會被帶負電荷的管壁所吸引，形成所謂的電雙層(electric double layer)。其主要包含靠近管壁的固定層(stern layer)和離管壁較遠處的擴散層(diffuse layer)，之所以為擴散層是因為仍有一些帶正電荷的離子受到吸引，其電荷數會隨著離管壁越遠數量趨於急速遞減而稱之，然而電荷密度隨著與毛細管壁距離增加而逐漸下降，因而產生一個電位差（ ξ ：zeta potential），外加電場的作用下，擴散層中的水合正離子會牽動整個溶液中的所有物質往陰極方向移動，形成所謂的電滲流。

zeta 電位和電滲流的關係式(2)、式(3)^[65]：

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

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

ν_{eo} ：電滲流流速 (cm/s)

μ_{eo} ：電滲流移動度 (cm² /s · V)

ε ：緩衝溶液之介電常數

ξ ：毛細管壁電雙層之 zeta 電位(V)

η ：緩衝溶液之黏度

(2) zeta 電位的影響：由式(3)可以觀察到電滲流與 zeta 電位成正比，且主要是由毛細管內壁表面所帶電荷決定，改變緩衝溶液的 pH 值會影響電雙層，換句話說，電荷量受 pH 值控制，所以電滲流的大小隨著緩衝溶液 pH 高低成正比。

zeta 電位與電雙層厚度關係式(4)

$$\xi = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad \text{式(4)}$$

$$\xi = (3 \times 10^7) \cdot (Z) \cdot (C^{1/2})$$

δ ：電雙層厚度

e ：每單位表面積之電荷

Z ：價電子數

(3)電滲流的特性與影響：電滲流是利用電驅動管內液體流動方式，其毛細管內各處的流速幾乎都一樣，流動層面具有平面流型的特性。毛細管內的樣品離子，在其本身的電泳移動度和電滲流的影響下，會產生一個淨移動速度。

電泳速度與電滲流的關係式(5)^[65]

$$\nu = \nu_e + \nu_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo}) \cdot \frac{V}{L} \quad \text{式(5)}$$

ν ：電泳淨速度(cm/s)

分析物的遷移時間快慢和毛細管長度成正比，與電泳淨速度成反比，電泳淨速度與毛細管電泳樣品離子在管內移動時間關係式(6)

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L^2}{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot V} \quad \text{式(6)}$$

t ：樣品離子在毛細管中之遷移時間(min)

L ：毛細管之有效長度(cm)

一般而言毛細管電泳中，電滲流之速度要比正、負電離子的電泳遷移速率還要快些，因此不論是正、負離子或是中性物質都是會隨著電滲流的遷移而流出毛細管，其中帶正電的陽離子物質最快從管柱流出，接著是中性物質，最慢的是帶負電的陰離子。

(4)電泳分離效率：根據 Giddings 所提的理論板數和 Einsteinz 所提的空間性變異(δ^2 ：spatial variance)的方程式結合整理出的關係式(7)及式(8)

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\delta^2} = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot V}{2D} \quad \text{式(7)}$$

$$N = 5.54 \cdot \left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^2 \quad \text{式(8)}$$

N ：理論板數

H：理論板高

δ^2 ：變異

D：樣品離子在溶液中之擴散係數

$W_{1/2}$ ：波峰半高寬

藉由式(7)可以觀察到理論板數(N)與擴散係數(D)成反比，即電場強度越強，分離效率越高，但若施加電壓過高，產生過多的焦耳熱，會使分析物區帶易擴散，造成分離效率下降的現象。

(5)毛細管分離的解析度，由式(9)表示^[62]

$$R = \frac{1}{5.4(\Delta\mu)} \left[\frac{V}{D(\mu + \mu_{eo})} \right]^{1/2} \quad \text{式(9)}$$

R：解析度

$\Delta\mu$ ：兩種離子電泳移動度之差

V：施加電壓大小

μ_{eo} ：電泳移動度

$\bar{\mu}$ ：兩種離子之平均電泳移動度

對陽離子而言，遷移方向和電滲流相同，造成解析度下降；相反的對陰離子而言，遷移方向和電滲流不同，即 μ 與 μ_{eo} 正負相反，所以分母較小，產生的解析度當然較好；當電滲流移動度和陰離子的平均電泳速度相同時，即($\mu \doteq \mu_{eo}$)，可得到最大解析

度，但需要較長的時間才會達成^[62,68]。

4-3 毛細管電泳的進樣方式

應用不同的技術將分析樣品導入毛細管分為兩種主要作用力，分別為電動進樣(electrokinetic injection)和流體力學進樣(hydrodynamic injection)^[69]。

(1) 電動進樣：將毛細管的進樣端和電極，從緩衝溶液瓶轉換至分析樣品溶液瓶中，然而在高壓電場的作用下，分析樣品離子會因各自移動度的不同和電滲流的推動下進入毛細管內。最常用於毛細管中有黏滯性的介質或凝膠，其缺點為樣品的進樣量會受分析物的電泳淌度影響，不同電泳淌度的分析物，進樣量因此不同。

其進樣量以式(10)表示^[70]：

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

μ_{ep} ：分析物電泳移動度

V ：注射電壓

t ：注射時間

r ：毛細管內之半徑

C_i ：分析樣品之濃度

L_t ：毛細管總長度

(2) 流體力學進樣：有壓力(pressure)、吸力(suction)和重力(gravity)三種形式，依序分別為利用外加壓力、真空吸引力和高度差將分析樣品注入毛細管內，流體力學進樣方式為應用最為廣泛，不受樣品基質的干擾。由於本實驗使用最方便、不需繁雜的方式，所以介紹重力注射為主^[71]；重力注射方式是將毛細管注入樣品瓶中一起抬高至 Δh 的位置，並且經過 t_i 時間後，分析樣品注入體積 V 會因為重力差而進入毛細管內，其注入體積以式(11)表示：

$$V = \frac{\rho g \Delta h \pi r^4 t_i}{8 \eta L} \quad \text{式(11)}$$

ρ ：樣品溶液的密度

g ：重力常數

r ：毛細管內之半徑

t_i ：注射時間

Δh ：注射高度和出口端高度差

4-4 毛細管電泳的偵測方式

毛細管電泳所需注入的量很少，大概介於 pL~nL 之間，由於注入的量很少且偵測光徑過短，所以具有高靈敏度的偵測器就為重要。

除了紫外-可見光吸收(UV-VIS)偵測和雷射激發螢光偵測(LIF)，尚有

電化學法^[72,73] (Electrochemical)、電導度^[74] (conductivity)和二極體陣列^[75] (diode array detection)等都是為了提升靈敏度而設計；在此以介紹常見的 UV-VIS 和 LIF 比較為主，偵測模式上，兩者皆屬線上光學偵測(on-column optical detection)，不需任何介面或外接偵測槽。

表(七)UV-VIS 和 LIF 偵測之比較

	UV-VIS	LIF
偵測模式	※ 直接或間接偵測 (固定或可變波長— 用濾光片或光柵來選 取所需檢測波長)	※ 雷射源射出連續光能，激發光束聚焦在毛 細管上，誘導通過偵測視窗的螢光衍生物， 產生的螢光以 PMT 偵測。
優點	※操作簡單 ※儀器價格低廉 ※適用分析物範圍廣	※雷射源產生的激發光具高能量、易聚焦於 光細管上 ※有不同波長的雷射源可選擇 ※可偵測微量生化分子，偵測極限低(可達 10^{-12} M) ^[76]
缺點	※偵測靈敏度不足 (約 10^{-4} ~ 10^{-6} M)	※需要螢光發光團結構，才能偵測到 ※高能量的雷射價格較貴(如氬氫雷射) ※激發波長受限，需找尋適合的衍生劑

依據比爾定律(Beer' law)公式得知，由於毛細管內徑狹窄導致光徑短，使 UV 吸收值會降低，所以偵測靈敏度被限制；為了提升偵測靈敏度，可以採用增加光徑的方法，如將偵測視窗變形的方式：Z-shaped flow cell^[77]、Bubble cell^[78,79]、rectangular capillary^[80]...等。

尚還有其他增加光徑方式，利用在偵測視窗塗反光物質，提高入射光在管壁內反射的效果或使用雷射作為光源，進行雙光束直接或間接 UV-VIS 吸收偵測，對抑制背景雜訊的效果也有很大的幫助。然而以 LIF 作偵測系統時，分析物必須本身具有螢光性質(native fluorescence)，當不具有螢光性質則需找具發光團之染料分子結合進行衍生化反應，衍生化反應有三種方式，分別為管柱前(pre-column)、管柱中(on-column)和管柱後(post-column)，彼此之間的比較列於表(八)。

表(八)衍生方式的比較^[81]

	優點	缺點
pre-column	<ul style="list-style-type: none"> * 有彈性的反應條件 * 不需更改電泳裝置 * 衍生劑的選擇性多 	<ul style="list-style-type: none"> * 反應時間通常較長 * 消耗較多的樣品 * 稀釋體積的問題

on-column	<ul style="list-style-type: none"> * 消耗少量的樣品 * 方法自動化 * 反應時間短 	<ul style="list-style-type: none"> * 過量的衍生劑會干擾分離 * 較適合短暫的衍生時間
post-column	<ul style="list-style-type: none"> * 消耗少量的樣品 * 方法自動化 	<ul style="list-style-type: none"> * 與衍生劑的反應不完全 * 需要特殊的裝置 (易使訊號產生 Band broadening 導致分離效率的降低) * 易造成背景訊號增加

貳、實驗

一、藥品

1. Gabapentin ($C_9H_{17}NO_2$; 1-[Aminomethyl] cyclohexaneacetic acid) :
TOCRIS 公司 (Ellisville, MO, USA) 產品 【MW : 171.24】
2. Vigabatrin ($C_6H_{11}NO_2$; 4-Aminohexenoic acid) : TOCRIS 公司
(Ellisville, MO, USA) 產品 【MW : 129.16】
3. NBD-F ($C_6H_2FN_3O_3$. ; 4-fluoro-7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole) :
Molecular Probe 公司 (Eugene, OR) 產品。
4. MeOH (CH_3OH ; Methanol) : E. Merck 公司 (Darmstadt, German
產品，HPLC 級試藥，純度 99.9%。
5. ACN (C_2H_3N ; Acetonitrile) : E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品，HPLC 級試藥。
6. HCl (Hydrochloric acid) : E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品，HPLC 級試藥。
7. NaOH (Sodium hydroxide) : Tedia 公司 (Fairfield, Ohio, USA) 產
品，分析級試藥，純度 98.5%。
8. SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$; sodium dodecyl sulfate) : Aldrich 公司
(Milwaukee, WI, USA) 產品，純度 98%。

9. Sodium Borate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; sodium tetraborate decahydrate) :

E.Merck 公司產品 (Darmstadt, Germany) 。

10. Copper(II) acetate, monohydrate ($[\text{CH}_3\text{COO}]_2\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$) : J.T.Baker

公司(France) , 分析級試藥 【MW : 199.65】

二、儀器設備

1. 氬離子雷射裝置：Upiphase 公司(San Jose,CA USA)產品，包含小型氣冷式氬離子雷射，Model 2219-010SLS，雷射功率範圍 10 mW；電源供應器，Model 2119-010SLS。
2. 高壓電源供應器：Glassman High Voltage公司 (High Bridge, NJ, USA)產品，Model PS/EL30P01.5，提供電壓0~30 kV，電流1.5 mA。
3. CE-LIF 偵測裝置：實驗室自行組裝，所有元件
 - 520 nm干涉濾片：Edmund Scientific公司 (Barrington, NJ, USA) 產品，Model D30738，有效帶寬為10 nm。
 - Notch filter：Beckman Coulter公司，Model 144941，488 nm。
 - 聚焦鏡：Edmund Scientific公司 (Barrington, NJ, USA) 產品，Model D45079，焦距為1.4 cm。
 - 10倍顯微接物鏡：Edmund Scientific公司 (Barrington, NJ, USA) 產品，Model D43903。
 - 反射鏡：Edmund Scientific公司 (Barrington, NJ, USA) 產品，Model D33502。
 - 光電倍增管(PMT)：Hamamatsu公司 (Bridge Water, NJ, USA) 產品，Model R-928，電源供應器，Model HC123-01。

4. 數據處理：IBM相容586個人電腦，配合訊華公司（台北，台灣）中文版2.1積分軟體。
5. 數據介面：SISC 訊華公司（台北，台灣）產品， Model 9724-2。
6. 穩壓器(AVR)：聯達公司（台中，台灣）產品，Model：AVR 1000w-R(Electromagnetic Interference Filter [EMI])，電子式交流穩壓器輸入電壓 AC 90V~125V 50/60 Hz，輸出電壓 AC 110V 50/60 Hz。
7. 酸鹼度計：為公司(台北，台灣)產品，Model：
8. 超音波震盪器：Branson 公司(Danbury, CT , USA)產品，Model：2510-DTH。
9. 反應加熱器：PIERCE 公司(Rockford , IL ,USA)，Reacti-Therm™ Heating/Stirring Module，Model No. 18970。
- 10.天平：日本電子科學株式會社(Kyoto, Japan)產品，Model AJ-100。
- 11.超純水機：Deionization ultrapure system 是 Millipore 公司(Billerica, MA,USA) 產品 Model ZRQS6005Y 。
- 12.毛細管：Polymicro Technologies 公司（Phoenix, AZ, USA）產品，Model TSP-050375t，熔融矽材質，內徑 50 μ m，外徑 364 μ m，外覆聚乙炔胺(polyimide)。
- 13.磁石：SUPELCO 公司(Bellefonte,PA,USA)產品，用於 Micro reaction Vessel 0.1~2mL

14.加熱專用玻璃瓶：SUPELCO 公司(Bellefonte,PA,USA)產品，為

Micro reaction Vessel 1.0 mL。

15.不斷電系統：飛瑞公司(台北,台灣)產品，Model C-3000。

三、實驗方法

3.1 毛細管的處理與使用

取一毛細管全長 50 cm，有效偵測長度為 30 cm 並在此處作記號，用火焰將毛細管外層塗佈的 polyimide 燒至約 0.5 cm，再用試鏡紙沾取分析級甲醇溶液擦拭出一透明視窗。每次實驗前毛細管以去離子水、緩衝溶液沖洗，再以適當電壓平衡，等待系統穩定即可進行實驗，為了確保每次實驗的再現性，所以每天實驗完，將毛細管以適量分析級 ACN 沖洗，接著再以去離子沖洗 30 分鐘左右，並且將毛細管用盛有去離子水的瓶中存放。

3.2 藥品的配製

➤ 標準品 Gabapentin 和 Vigabatrin

分別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，可保存一個月，實驗時依需要用去離子水稀釋至所需的濃度。

➤ 螢光劑 NBD-F

以 ACN 當溶劑，配製成所需濃度，作分析物的衍生劑，衍生劑需避光，所以用鋁箔紙包覆並放置於冰箱零下-20°C，每次實驗前重新配製，確保衍生劑的螢光性為最佳狀態。

- 衍生緩衝溶液 150 mM 硼酸鈉 pH= 8.5~11

以去離子水溶解配製於定量瓶中，再用超音波震盪器使之充分溶解，再用 NaOH 或 HCl 溶液，調至所需的 pH 值。

3.3 電泳緩衝溶液的配製

20~70 mM 硼酸鈉 + 0.1~2.5 mM SDS

以去離子水溶解配製於定量瓶中，再用超音波震盪器使之充分溶解，以 NaOH 或 HCl 調配至所需 pH 值。

3.4 尿液樣品的配製

- 0.4M 醋酸銅溶液的配製

以去離子水溶解配製於定量瓶中，再用超音波震盪器使之充分溶解，於每次實驗前重新配製

- 尿液樣品

來源為本實驗室學弟妹的尿液，採集時間為早上第一次尿液排放後，到中午之前所排放的尿液，儲存於冰箱零下-20°C 內，實驗前於室溫下退冰備用。

- 尿液樣品的前處理

取 500 μ L 的尿液樣品與 50 μ L 的醋酸銅溶液充分混合於 vial 中，並在 60°C 下隔水加熱 15 分鐘，取上層清液，丟棄下層沉澱物，依實驗條件添加分析物或純水，而成為尿液樣品或尿液

空白樣品。

3.5 衍生反應

取 80 μL 的標準溶液或處理後的尿液樣品於微量玻璃瓶中，加入 10 μL 衍生緩衝溶液(150 mM 硼酸鈉)，及 10 μL 衍生劑，以鋁箔紙包覆加熱器專用的微量玻璃瓶，防止光照並加入磁石攪拌幫助反應，於高溫 70°C 下，進行 50 秒的快速反應。

3.6 進樣方式

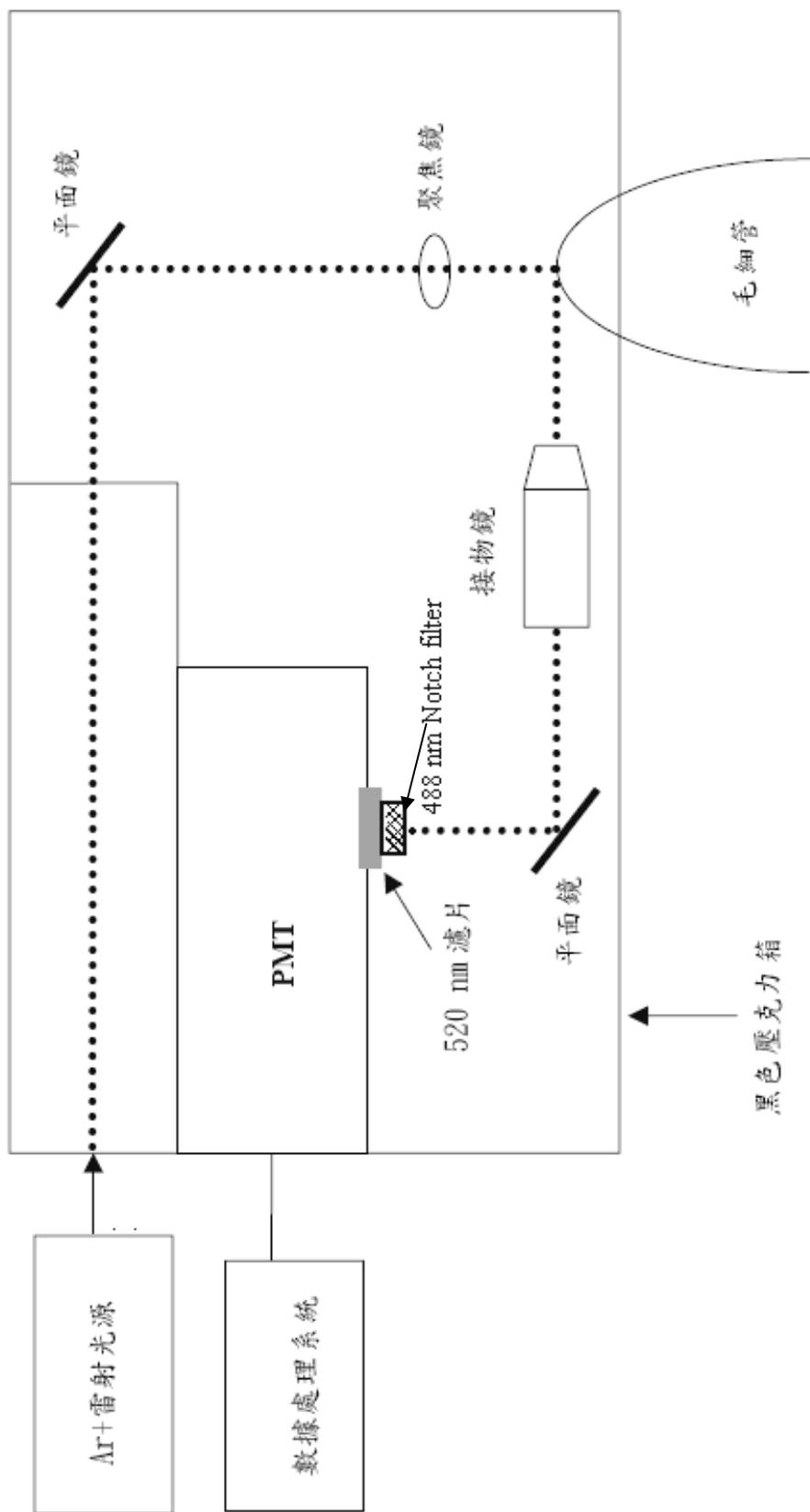
將置於正極緩衝電解液瓶中之毛細管一端，以高度注射方式將毛細管抬高 18 cm，置入標準樣品瓶中 10 秒，標準品分析物會因虹吸現象進入毛細管前端，此時再將毛細管插回正極緩衝電解液瓶中。

3.7 毛細管電泳裝置

毛細管置於偵測系統裝置中，將偵測窗口對準雷射光徑，然而將毛細管兩端由偵測系統裝置中的小孔洞拉出，使用注射器將電泳緩衝溶液注入毛細管中，使其毛細管管柱內充滿電泳緩衝溶液，再將毛細管兩端分別浸入充滿電泳緩衝溶液瓶中，使之液面等高，於緩衝溶液瓶中各置入一白金電極，將高壓電源供應器連接至毛細管前端緩衝溶液瓶中之電極，末端電極的部份則連接至地線，與高壓端形成一電源迴路。

3.8 雷射激發螢光偵測裝置

雷射激發螢光偵測系統內部元件於圖(三)所示，雷射光束先經過一平面鏡反射 90 度後射入偵測系統裝置中，經由一個焦距 1.4 cm 的凸透鏡聚焦於毛細管的偵測視窗上，接著在雷射光束垂直的方向架設一顯微接物鏡收集樣品螢光，再用一平面鏡反射 90 度後，通過 488 nm notch filter 和 520 nm 干涉濾片用以去除散射光，最後聚焦於光電倍增管(PMT)偵測器上，轉為電壓信號輸出後，藉由數據處理介面及電腦收集、紀錄並可作數據處理。然而為了隔絕干擾，所有元件均放置於黑色壓克力箱內，本儀器有利用螢光素鈉溶液與雷射所產生的激發螢光進行校正，測試系統的靈敏度。



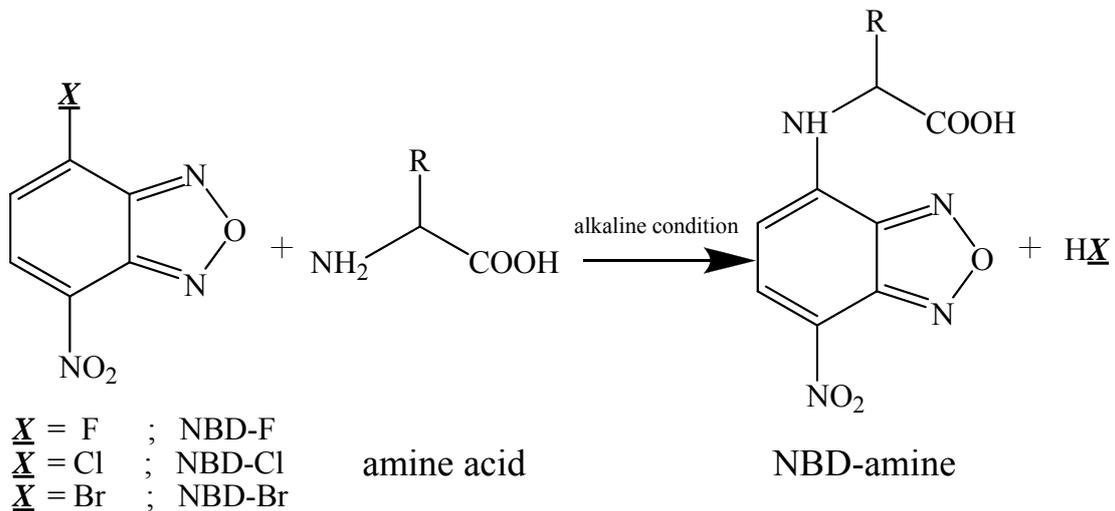
(圖三)雷射激發螢光偵測系統內部元件俯視圖

參、結果與討論

一、衍生條件之探討

1. 衍生劑的介紹

Benzoxadiazole reagents (NBD)此類型衍生試劑，它們含有活性鹵素原子，均可以和一級、二級胺基酸反應，其反應快慢順序，分別依序為 NBD-F、NBD-Cl、NBD-Br，所以 NBD-F 與胺基酸反應最快^[82]，其反應過程顯示於圖(四)。此反應是一種親核性反應(Nucleophilic reaction)基於活性鹵素原子與胺基的氮縮合釋放出鹵化氫而形成的衍生物。



圖(四) Benzoxadiazole reagents 衍生反應的機制

在西元 1970 年時, 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F) 由科學家 Di Nunno *et al* 首先發明的一種化合物^[83], 此化合物後來在西元 1981 年時, 經由科學家 Watanabe 和 Imai 研究, 利用 NBD-F 與帶有胺基的分析物衍生, 成功地發展成為一種可以分析胺基酸的方法^[82], 因此奠定了此化合物的應用性, 廣泛的偵測分析於一胺基酸類 (amino acids)^[84-90]、蛋白質和胜肽類 (proteins and peptides)^[91] 及含有胺基的重要生物分子 (biologically important amines)^[92]。

NBD-F 具有螢光性, 與不具螢光性質的胺基化合物結合形成具有螢光的衍生物, 然而衍生物的最大激發波長在 470 nm, 放射波長在 530 nm, 與波長 488 nm 的氬離子雷射激發光源相近, 再搭配雷射激發螢光偵測, 可提高偵測靈敏度。和其他的螢光試劑 (OPA^[93-95]、NDA^[96,97]、Fluorescamine^[98]、Fluorescein isothiocyanate^[99,100]) 相比較下, NBD-F 有以下幾項優點: (a) 幾乎與一級和二級的胺基酸都容易產生作用^[101] (b) 反應時間迅速, 高溫下與胺基酸作用 1 分鐘即可完成反應^[102] (c) 反應性佳, 可在室溫^[103] 或高溫下^[104] 反應 (d) 分析圖譜背景信號較少, 反應後產生的信號主要為偵測物和螢光背景信號, 顯示此螢光試劑與分析物的結合不會帶來過多的背景干擾信號。

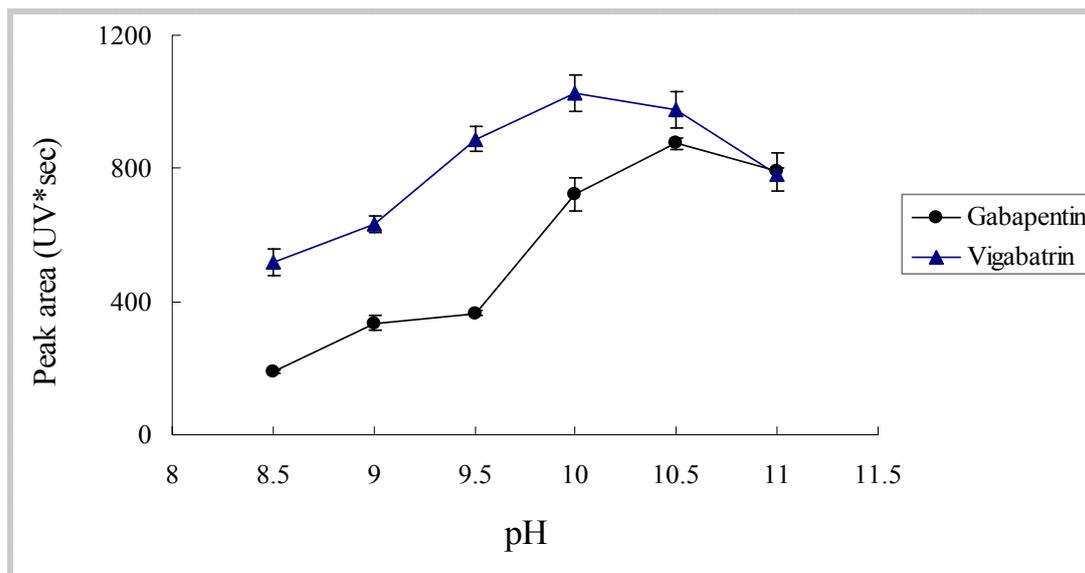
GBP 和 VGB 皆為含一級胺之化合物, 無法直接偵測於毛細管電泳激發螢光偵測系統, 所以使用衍生劑 NBD-F, 基於結構上氬離子

的電子密度高，易與 GBP 及 VGB 結構上胺基的氫結合離去，使之產生具有螢光性質的衍生物。然而衍生反應的結合狀態，還須考慮衍生緩衝溶液種類的選擇，由於此結合方式是一種親核性反應 (Nucleophilic reaction)，在鹼性狀態(alkaline condition)反應下尤佳，從 Almajed 的研究結果^[105]，發現在相同 pH 值之螢光強度比較，硼酸鈉緩衝溶液(borate buffer)的作用下，產生的螢光強度高於碳酸緩衝溶液(carbonate buffer)與磷酸緩衝溶液(phosphate buffer)，是因為 NBD-F 的水解產物 4-hydroxy-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-OH)生成速度較慢，不影響其主要偵測物的螢光強度(此結論由 Miyano 提出)，所以本實驗選擇硼酸鈉水溶液作為衍生反應所需的緩衝溶液。

2. 衍生緩衝溶液 pH 值

此條件的探討為針對衍生緩衝溶液於不同的 pH 值下，對分析物訊號面積之影響，實驗結果顯示於圖(五)。首先觀察 GBP 訊號面積對衍生 pH 值的趨勢來看，可以發現在 pH 值為 8.5~10.5 時，訊號面積明顯逐漸上升，pH 值到 10.5 之後，訊號面積趨於緩和下降；而 VGB 的部分，發現 pH 值從 8.5~10 時，訊號面積明顯逐漸上升，pH 值到達 10 之後，VGB 的訊號面積趨於緩和下降，造成這兩個分析物趨勢的原因，可能是因為^[106,107]— 當衍生緩衝溶液 pH 值小於 GBP 和 VGB 結構上胺基的 pKa(兩者胺基團的 pKa 分別為 9.56、9.72)時，因為胺基被質子化，所以氫離子的解離程度低，衍生反應不完全，隨著 pH 值的逐漸增加，胺基上的氫離子解離程度增加，進而提升衍生產物的產率，然而當 pH 值大於 10.5 時，GBP 和 VGB 與衍生劑的反應完全，產生的螢光強度可達最大，但 GBP 和 VGB 於 pH 值為 10.5~11 時，訊號面積呈現明顯下降的趨勢，可能是因為衍生反應中，NBD-OH 之螢光背景信號的生成速度比衍生產物的速度還要快所導致。綜合以上，GBP 和 VGB 最佳衍生緩衝溶液的 pH 值，分別依序為 10.5 和 10 (與 Atmaca 文獻結果相同^[31])，但是考量本實驗操作上是同時進行分析，而且可能是因 GBP 結構上帶有環狀結構，在相同 pH 值時，會造成訊號靈敏度較 VGB 弱^[106]，雖然 VGB 其本身在 pH 值

為 10~10.5 時，訊號面積略下降(但只佔 pH 值為 10 時，訊號總面積的 4.8%)，所以最後選擇衍生緩衝溶液 pH 值 10.5 為 GBP 和 VGB 最佳條件。



圖(五)分析物訊號面積對衍生緩衝溶液 pH 值之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 1 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=8.5~11

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 2 mM，pH=9

衍生時間：30 min

衍生溫度：24±1°C

分析物濃度：1 μM

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μm，外徑 364 μm；長度 50 cm，有效長度 30 cm

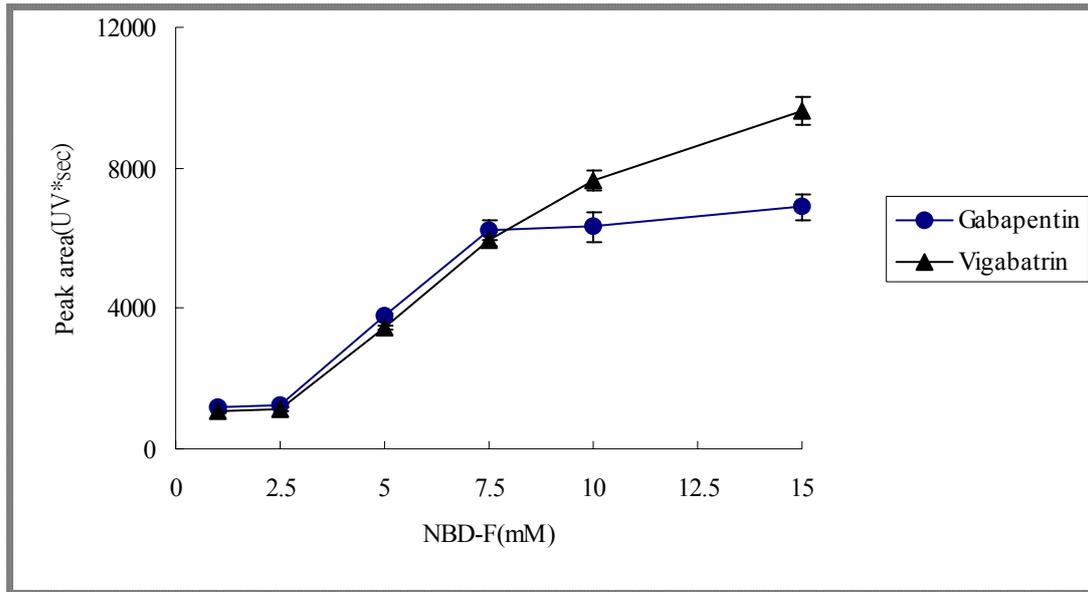
每個點實驗次數為 3 次 (n=3)

3. 衍生劑與分析物之比例關係

為了探討使用 NBD-F 為衍生劑時，衍生產物是否可達到最高產率，以及反應是否完全，故藉由分析物對衍生劑濃度的不同，分別進行以下條件的測試：衍生劑的濃度分別為— 1、2.5、5、7.5、10、15 mM，其實驗結果顯示於圖(六)。

首先觀察 GBP 的部份，衍生劑濃度為 2.5~7.5 mM 時，隨著衍生劑濃度的增加，螢光強度越大，分析物的訊號面積急速上升，當超過 7.5 之後，GBP 的訊號面積已趨於平緩，推測可能是衍生劑的濃度到達 7.5 mM 時，與 GBP 的結合已完全反應，趨於飽和的狀態；相對地 VGB 的部份，隨著衍生劑濃度的增加，當超過 15 mM 之後，仍呈現急速上升的趨勢，顯示此反應尚未達到飽和狀態，甚至要達最大產率，衍生劑濃度需要超過 10 mM 以上，雖然衍生劑濃度越高，分析物的訊號面積靈敏度越好，但是衍生劑濃度過高會導致毛細管堵塞，因此分析物的再現性變差。

綜合以上兩者的最佳條件，對 GBP 而言，衍生劑濃度為 7.5 mM，然而 VGB 的部份，雖然過了 7.5 mM 仍持續反應，但此條件為曲線範圍的中間點，且考量毛細管的再現性，所以最後選擇 7.5 mM 為衍生劑 NBD-F 之最佳濃度。



圖(六)分析物訊號面積對衍生劑濃度之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F (1~15 mM)

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 2 mM ， pH=9

衍生時間：30 min

衍生溫度：24±1°C

分析物濃度：1 μM

分離電壓：15 KV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μm，外徑 364 μm；長度 50 cm，有效長度 30 cm

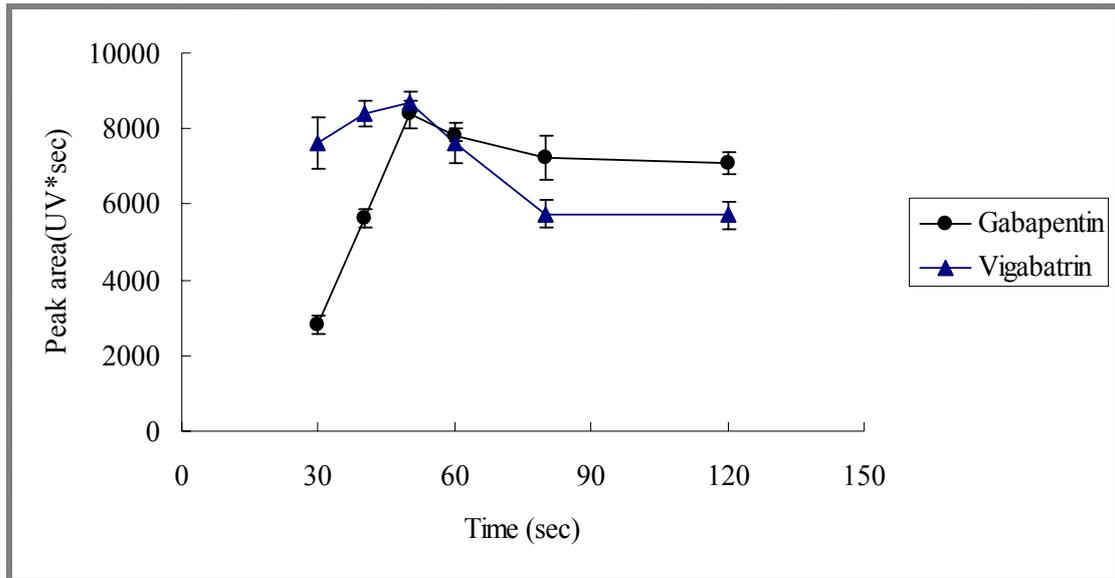
每個點實驗次數為 3 次 (n=3)

4. 衍生時間之影響

針對 NBD-F 的特性，增加衍生反應之溫度，可使分析物的碰撞機率變大，縮短反應時間，從文獻得知—與胺基酸的衍生反應，大約在 70~80°C 下^[31,106]，訊號靈敏度可達到最大值。除了參考文獻資料外，還經過多次的實驗，最後決定選擇 70°C 為最佳的衍生溫度。

因為從文獻得知藉由提高溫度到 70°C，反應時間越長會導致衍生產物的訊號強度降低^[108]，所以衍生時間基於 70°C 下的因素，探討的加熱時間條件為— 30、40、50、60、80、120 (單位：秒)，其衍生秒數對分析物訊號面積的影響，實驗結果顯示於圖(七)。首先在 30~50 秒時，隨著衍生時間的增加，衍生產物的訊號面積隨之迅速增加，當反應時間超過 50 秒之後，GBP 和 VGB 會隨著衍生秒數的增加，兩者的訊號降低，且下降的速度為 VGB > GBP，然而到 80 秒時，兩者的訊號面積才趨於平緩狀態；根據過去文獻^[106]—結構上立體障礙較小的胺基化合物，會因為一開始的升溫，使之反應快速，但隨著時間的增加，產物分子之間的碰撞劇烈，導致焦耳熱增加，衍生物不穩定，產生的螢光強度降低，訊號面積下降的趨勢大；相對地結構上立體障礙較大的胺基化合物，在同樣的條件下，訊號面積下降的趨勢則較小。由於 VGB 的安定性較 GBP 差，當衍生時間超過 50 秒後，VGB 的訊號面積下降速度較 GBP 大。綜合以上，在 70°C 下選擇最佳衍生

時間 50 秒為最佳條件。



圖(七)分析物訊號面積對衍生時間之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 2 mM，pH=9

衍生時間：30 ~120 sec

衍生溫度：70°C

分析物濃度：1 μ M

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次 (n=3)

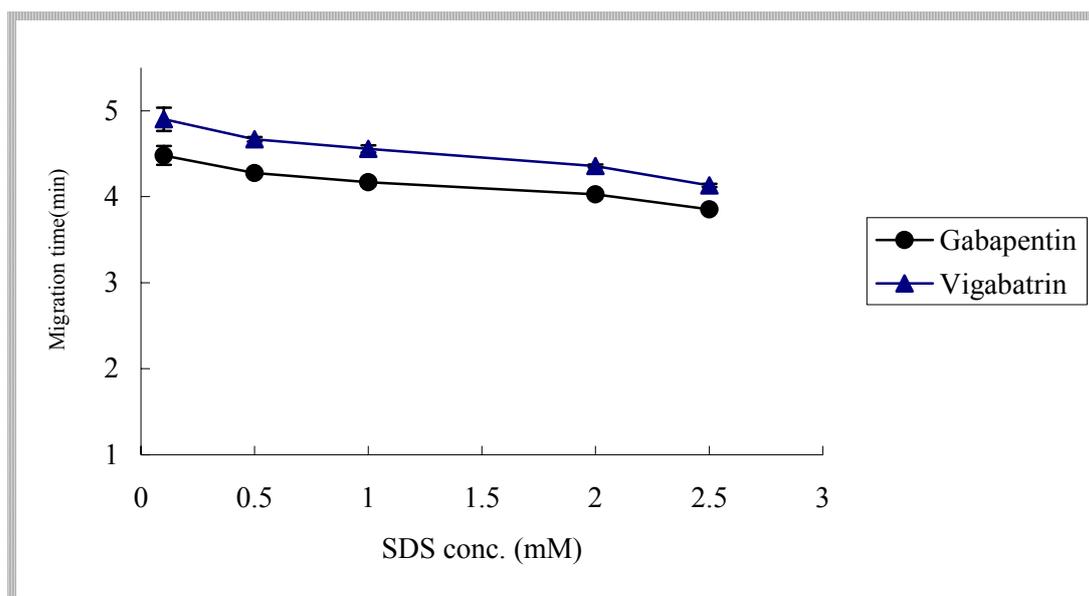
二、分離條件之探討

1. SDS 濃度的影響

在電泳緩衝溶液中，加入 SDS 使之濃度介於臨界飽和濃度 Critical micellar concentration(CMC：8.3 mM)之上，通常是為了使分析物在 MEKC 的狀態下，達到分離的目的；然而本實驗所探討的 SDS 濃度範圍(0.1~2.5 mM)，並未達到所謂的臨界飽和濃度，仍屬 CZE 的狀態。

添加 SDS 最主要目的，是為了提升實驗的再現性，當加入 0.1 mM SDS 時，遷移時間的 RSD% 為 2.67% ，隨著 SDS 濃度逐漸的增加，遷移時間的 RSD% 都在介於 0.91% 以下。可能是因為實驗反覆的操作下，衍生物殘留在毛細管壁發生吸附的現象，導致 EOF 降低，影響分析物的再現性，所以添加陰離子界面活性劑 SDS，減少衍生物吸附於毛細管壁的現象，幫助穩定分析物的再現性。由於 GBP 和 VGB 的信號位置，不影響彼此的分離狀態，所以 SDS 添加的濃度範圍為 0.1~2.5 mM，實驗結果顯示於圖(八)，隨著 SDS 濃度逐漸的增加，分析物遷移時間的縮短，可能的原因為^[109]—當 SDS 濃度增加，電泳緩衝溶液中的 SDS 分子可能吸附於管壁表面，導致管壁電荷量的增加，EOF 速度增加，所以遷移時間隨之縮短，另一方面，當 SDS 的濃度超過 2 mM 之後，分析物信號下降，結果顯示於圖(九)，推測造成的

原因為^[110]—訊號面積的減少，可能是因毛細管壁吸附嚴重，加入過多的 SDS，以致 EOF 速度增快，分析物在偵測視窗停留的時間太短，以導致分析物信號降低，所以綜合以上因素，選擇 SDS 的濃度為 2 mM 為最佳分離條件。



圖(八) 分析物遷移時間對 SDS 濃度之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

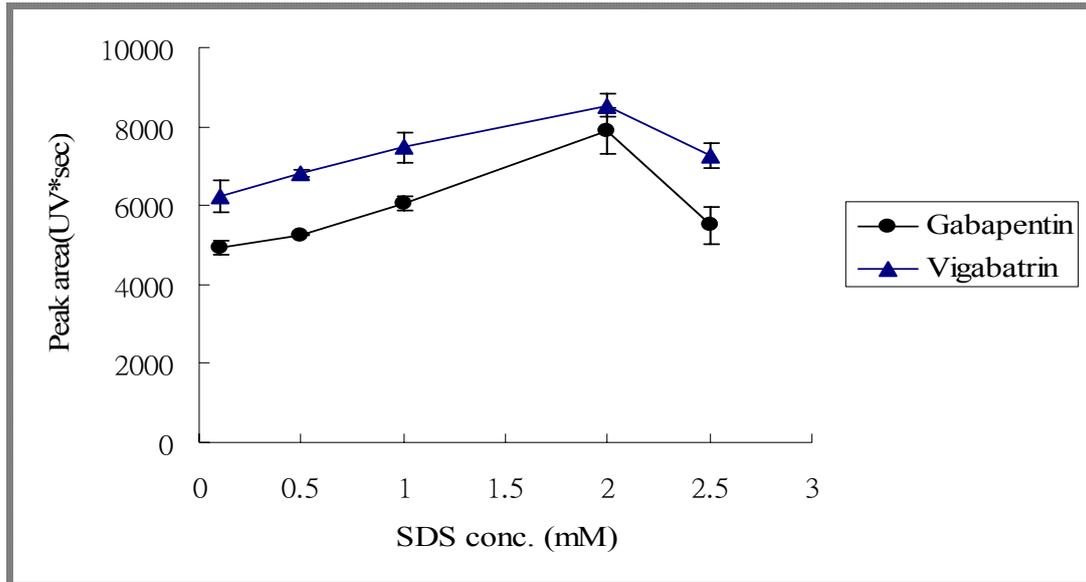
分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 0.1~2.5 mM；pH=9

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次(n=3)



圖(九)分析物訊號面積對 SDS 濃度之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

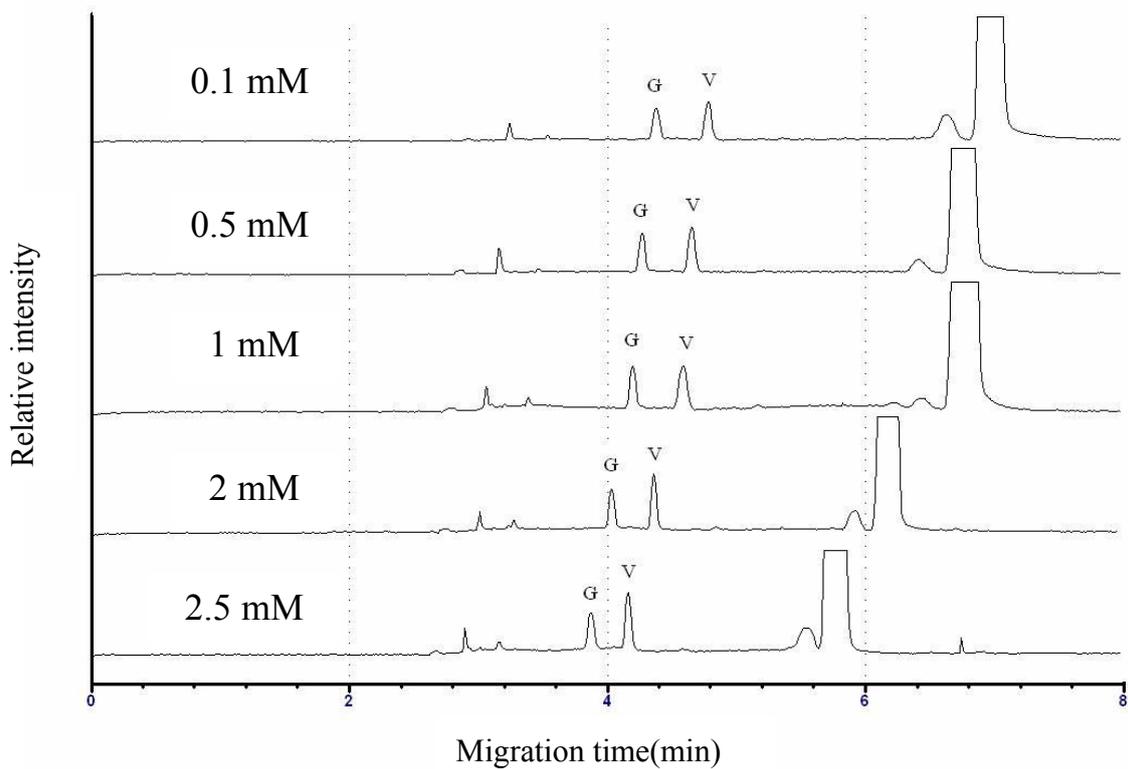
分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 0.1~2.5 mM；pH=9

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次 (n=3)



圖(十) 不同 SDS 濃度之電泳圖

G : Gabapentin V : Vigabatrin

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

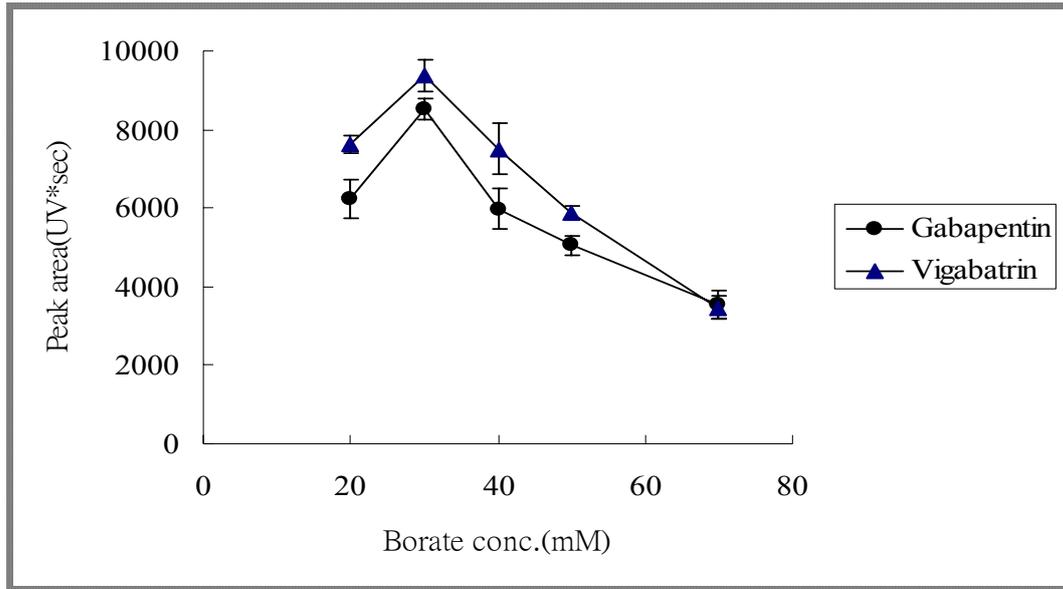
分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

2. 硼酸鈉濃度的影響

為了探討硼酸鈉濃度的不同對電泳緩衝溶液的影響，實驗結果顯示於圖(十一)：當濃度為 30 mM 時，其訊號面積達最大值，然而濃度超過 30 mM 之後，訊號面積便呈現逐漸遞減的趨勢，可能的原因為一依據文獻研究說明^[108]，當硼酸鈉濃度的變大，離子強度的增加，產生的焦耳熱劇增，訊號易發生 Band broadening，所以導致分析物的訊號強度降低；至於遷移時間則是隨著硼酸鈉濃度的增加而增加，顯示於圖(十二)，推測可能造成的原因^[111]—隨著電泳緩衝溶液中硼酸鈉濃度的增加，分析物的遷移時間隨之增加，主要是由於 EOF 的抑制所引起，換句話說就是，隨著緩衝溶液離子強度的增加，導致電雙層壓縮，毛細管內壁的 zeta 電位降低，使 EOF 變小，因此選擇低濃度的電泳緩衝溶液，可以確保產生的電流較低，除此之外，還可避免有過多的焦耳熱產生。所以選擇硼酸鈉濃度 30 mM 為最佳的分離條件。



圖(十一)分析物訊號面積對硼酸鈉濃度之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

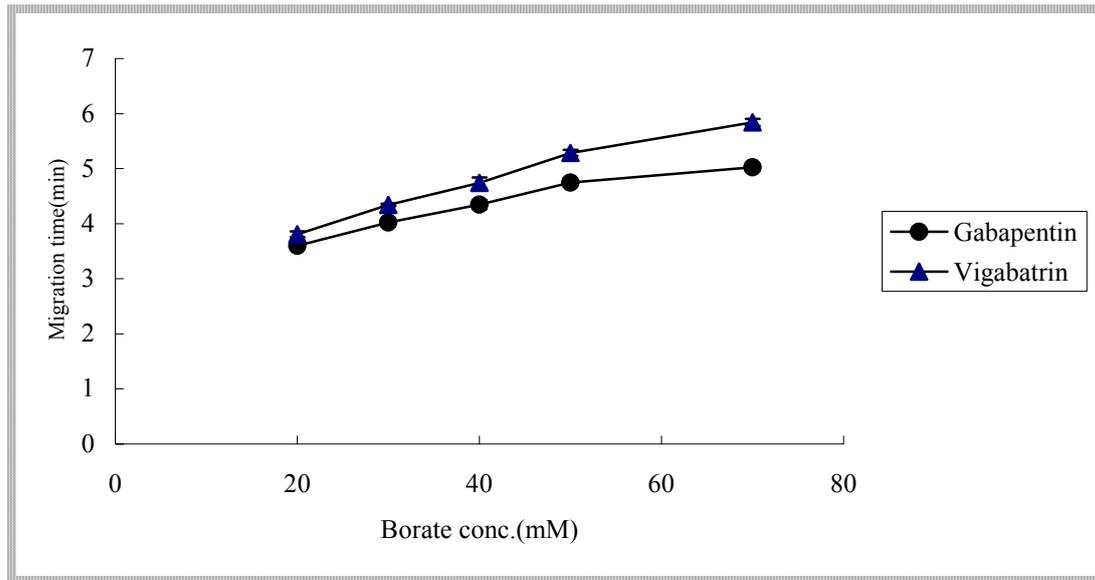
分離緩衝溶液：硼酸鈉 20~70 mM + SDS 2 mM；pH=9

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次 (n=3)



圖(十二)分析物遷移時間對硼酸鈉濃度之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

分離緩衝溶液：硼酸鈉 20~70 mM+SDS 2 mM；pH=9

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

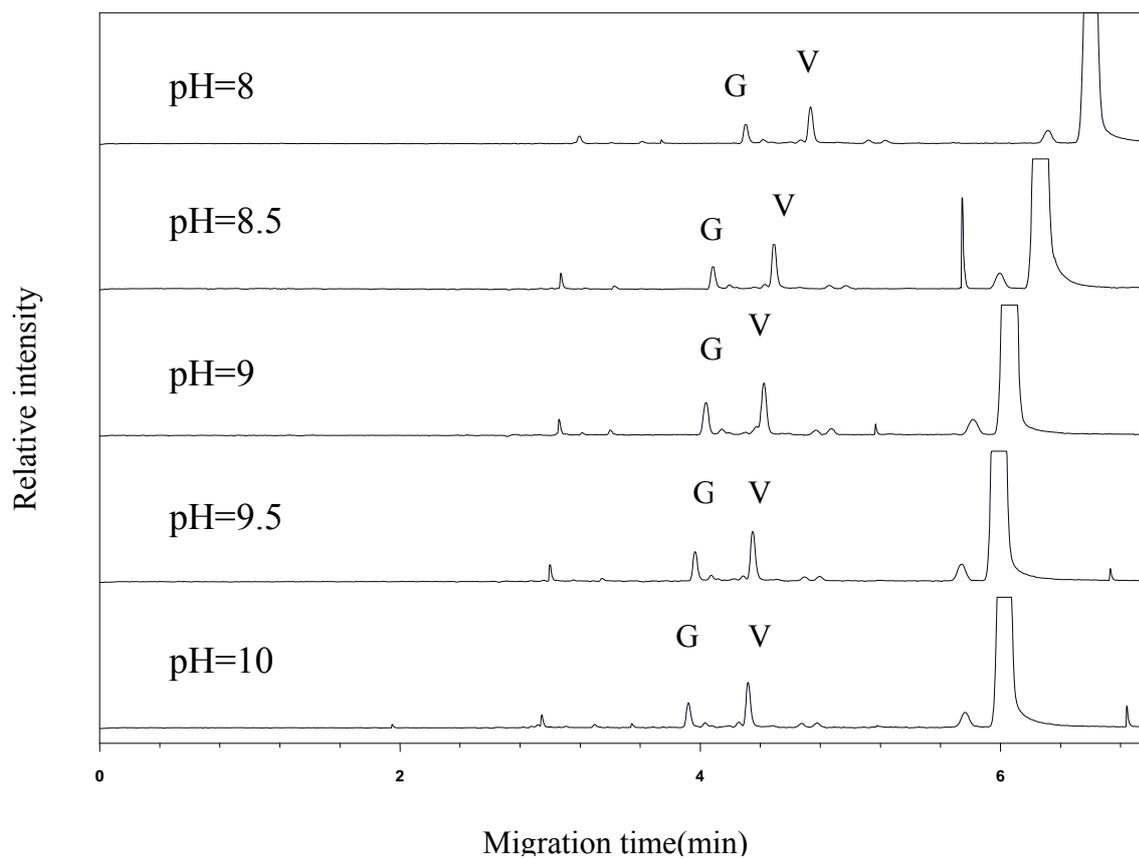
毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次(n=3)

3. 電泳緩衝溶液 pH 值

在毛細管電泳實驗裡，分析帶有電荷時，可藉由改變電泳緩衝溶液pH值，影響分析物的移動度，有兩個主要的因素會影響分析物移動，其中一作用力為改變電滲流的速度，另一個則為分析物所帶電荷數的關係。本實驗電泳緩衝溶液的組成(30 mM硼酸鈉+2 mM SDS)，分別配製成pH 8~10做探討，在此pH範圍，GBP和VGB之衍生產物所帶電荷數為-1價，然而GBP及VGB所帶電荷數相同時，則依據彼此分子量的大小，決定分析物移動度的快慢。一分子量較大者較早出現，反之則較慢。

毛細管壁的解離程度，隨pH值(大於3)的增加，解離程度越大，EOF越大，遷移時間隨之減少，然而探討的pH值範圍8~10，從pH值電泳圖(十三)發現，當pH值大於8之後，推測毛細管壁已完全地解離，因此pH值為9~10時，分析物的遷移時間的改變已不大。然而從圖(十四)分析物訊號面積對電泳緩衝溶液pH值的關係來看，在pH值為9時，訊號靈敏度最大，超過pH=9之後，可能因產生過多的焦耳熱，使分析物的區帶擴散，導致分析物信號強度下降，所以綜合以上結果，選擇電泳緩衝溶液 pH=9為最佳分離的條件。



圖(十三)不同電泳緩衝溶液 pH 值之電泳圖

G : Gabapentin V : Vigabatrin

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

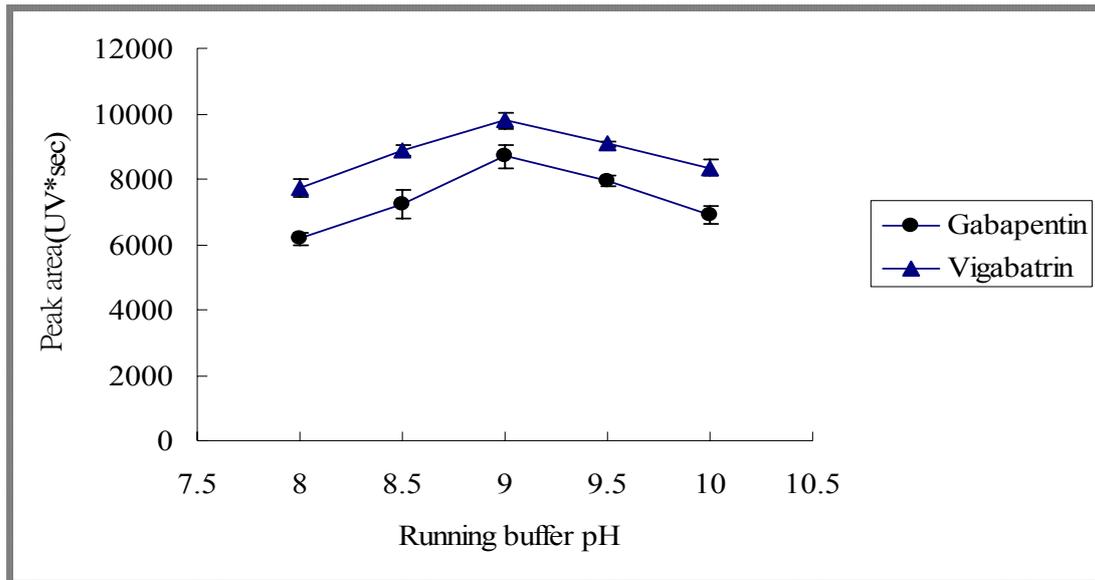
衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm



圖(十四) 分析物訊號面積對電泳緩衝溶液 pH 值之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生時間：50 sec

衍生溫度：70°C

分析物濃度：1 μ M

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM + SDS 2mM，pH=8~10

分離電壓：15 kV

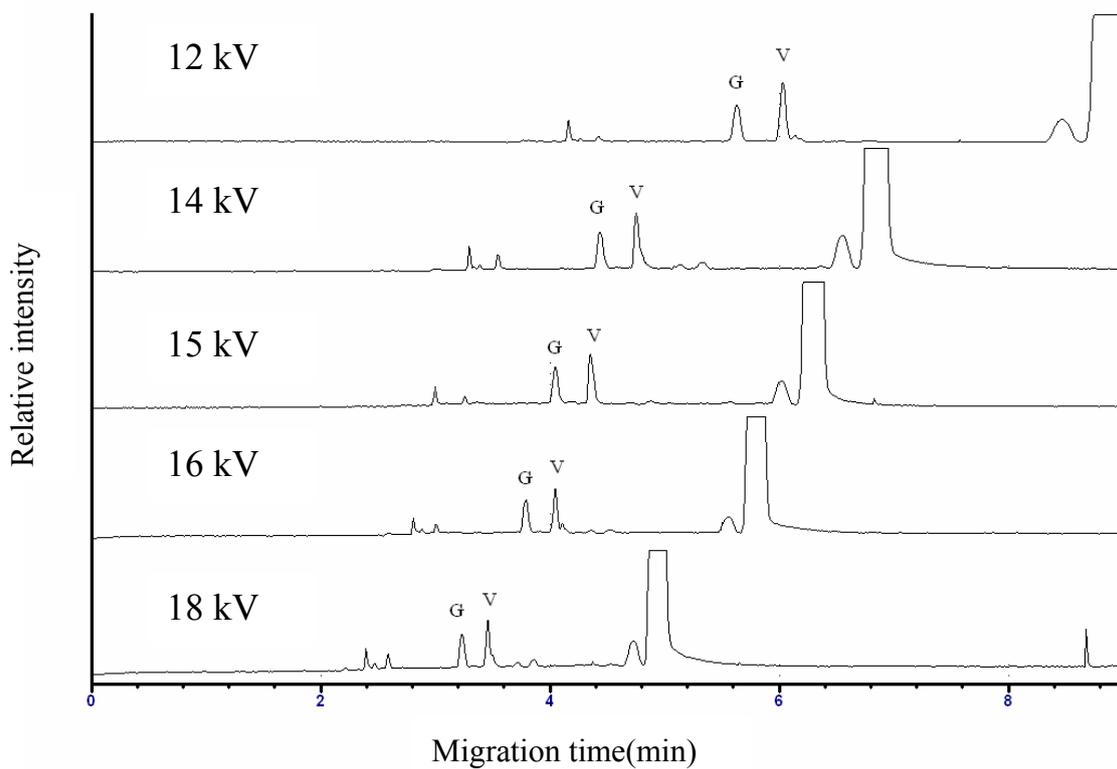
樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次 (n=3)

4. 電壓的影響

電壓的大小對電泳的分離是個重要的因素，本實驗研究的電壓範圍為 12~18 kV，結果顯示於圖(十五)、圖(十六)和圖(十七)，得知隨著電壓的增加，遷移時間則隨之縮短，而訊號面積隨之遞減；雖然電壓的大小對此兩分析物位置彼此不會互相干擾，但是對於圖譜分析時間和衍生物螢光產率會受到影響，可能發生的原因為一隨著電壓的增加，EOF 速度變快，導致遷移時間隨之縮短，使衍生產物通過偵測視窗的時間變短，接受雷射光刺激的時間減少，因此產生的螢光強度下降。當選擇的電壓越大時，產生的電流越大，引起焦耳熱，使基線不穩，綜合以上結論，以適當的整體分析時間和訊號面積靈敏度，兩者一起考慮，所以選擇電壓 15 kV 為最佳分離條件。



圖(十五) 不同電壓之電泳圖

G : Gabapentin V : Vigabatrin

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

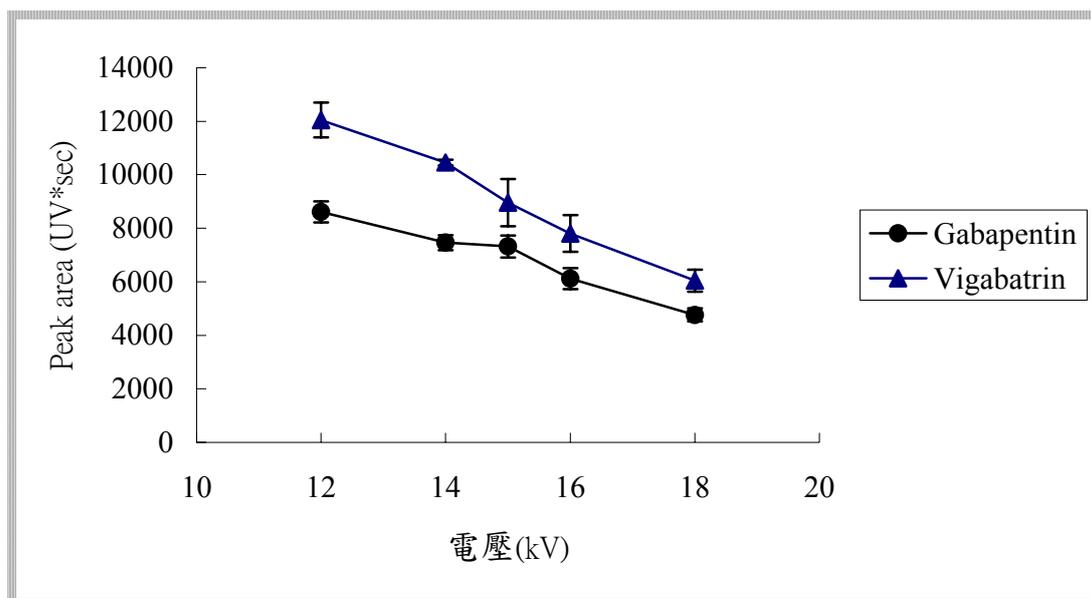
衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

分離電壓：12~18 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm



圖(十六)分析物訊號面積對電壓大小之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

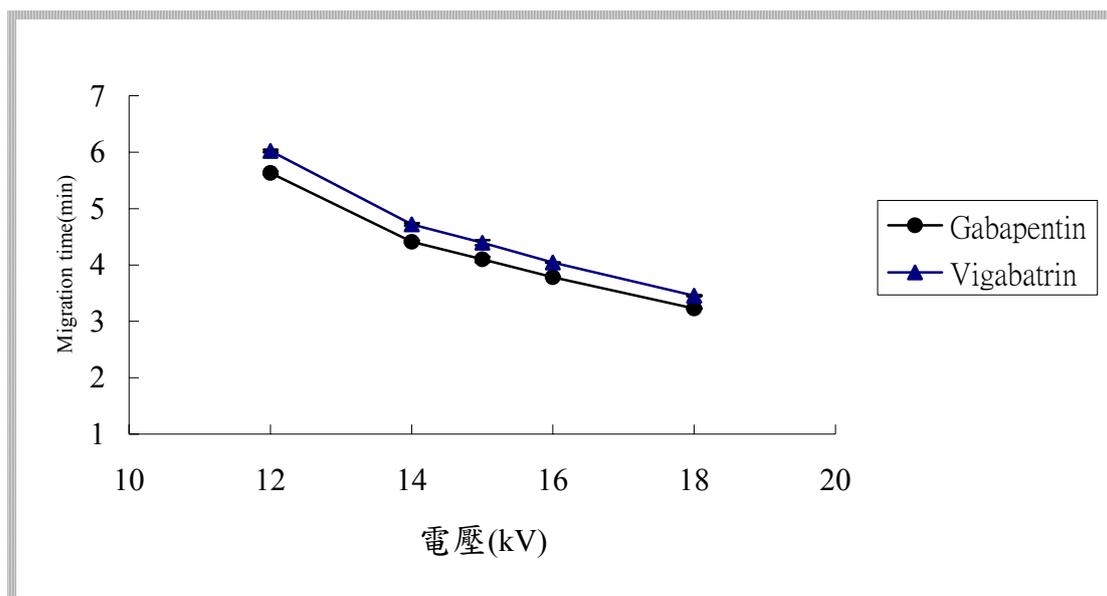
分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM+SDS 2 mM pH=9

分離電壓：12~18 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50cm，有效長度 30cm

每個點實驗次數為 3 次 (n=3)



圖(十七)分析物遷移時間對電壓之關係圖

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分析物濃度：1 μ M

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM+SDS 2 mM pH=9

分離電壓：12~18 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 50 μ m，外徑 364 μ m；長度 50 cm，有效長度 30 cm

每個點實驗次數為 3 次(n=3)

三、最佳分離之條件

歸納上述各參數之討論，使用毛細管電泳搭配氫離子雷射激發螢光偵測系統，藉由衍生劑 NBD-F 和分析物 GBP、VGB 進行管柱前快速衍生反應，反應的溫度與時間分別為 70°C、50 秒，樣品則以 18 cm 高度重力注射的進樣模式，注射時間為 10 秒；電泳的部分一緩衝溶液(pH=9)為 30 mM 硼酸鈉與 2 mM SDS 共同組成，分離電壓為 15kV。最佳分離條件下得到的電泳圖表示於圖(十八)，分析物 GBP 和 VGB 的遷移時間分別為 4.10 及 4.39 分鐘出現，可於 5 分鐘內完成分離。

四、標準品之檢量線及偵測極限

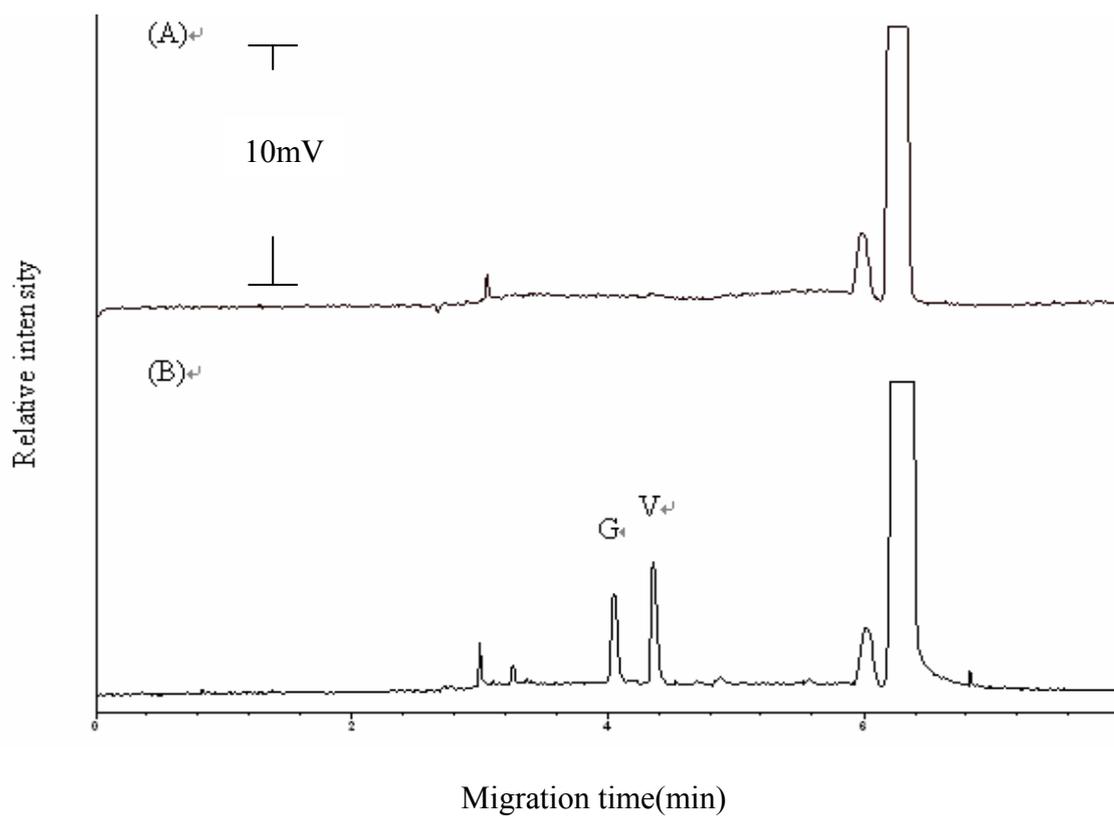
將 GBP 和 VGB 配製好的溶液，混合後以去離子水稀釋至所需濃度，濃度為 10^{-7} ~ 10^{-5} M 五種濃度製作標準檢量線，每個濃度重複 3 次分析，求平均值後，以訊號面積對分析物濃度作圖，得到的結果顯示於表(九)，相關係數(Correlation Coefficient：r)分別為 0.9912 及 0.9931，偵測極限則分別為 3.46×10^{-8} M 和 2.37×10^{-8} M。

和本實驗室過去的方法比較：(1) GBP 與 CFSE 的衍生反應，在標準品溶液的偵測極限可達 3.70 nM，然而衍生條件的部分，CFSE 需在室溫下反應 30 分鐘。(2) VGB 與 CTRSE 的衍生反應，在標準品溶液的偵測極限可達 24 nM，然而衍生條件的部分，CTRSE 也是需

要在室溫下反應 30 分鐘。綜合以上偵測方法，對 GBP 的部分，NBD-F 的偵測極限不如 CFSE，但可縮短以往的衍生時間，只需要高溫 70°C 下反應 50 秒即可，且衍生劑的背景信號少；而 VGB 的部分，與 NBD-F 的反應下，偵測極限和衍生方法都比 CTRSE 還要好。

五、再現性

探討此分析方法的再現性，以最佳分離條件連續分析七次，實驗結果顯示於表(九)，分析物 GBP 與 VGB 對遷移時間的相對標準偏差 (RSD%)分別為 0.58 和 0.65；訊號面積的相對標準偏差(RSD%)分別為 4.30 和 1.78。



圖(十八) 最佳分離條件之電泳圖

(A)Blank

(B)分析物 $1 \mu\text{M}$

實驗條件：

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM+SDS 2 mM pH=9

分離電壓：15 kV

樣品注射方式：重力注射 10 sec，高度 18 cm

毛細管：內徑 $50 \mu\text{m}$ ，外徑 $364 \mu\text{m}$ ；長度 50 cm，有效長度 30 cm

表(九) 標準品之檢量線、偵測極限及再現性

	Gabapentin	Vigabatrin
Linear range (M)	$10^{-7} \sim 10^{-5}$	$10^{-7} \sim 10^{-5}$
Slope ^[a]	5.65×10^9	7.14×10^9
Intercept ^[a]	1.01×10^3	1.34×10^3
Correlation coefficient (r)	0.9912	0.9931
LOD ^[b] (M)	3.46×10^{-8}	2.37×10^{-8}
Migration time ^[c] ~RSD(%)	0.58	0.65
Peak area ^[c] ~ RSD(%)	4.30	1.78

[a] : y 為訊號面積； x 為分析物濃度(M)

Slope : (mV*sec/M)

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

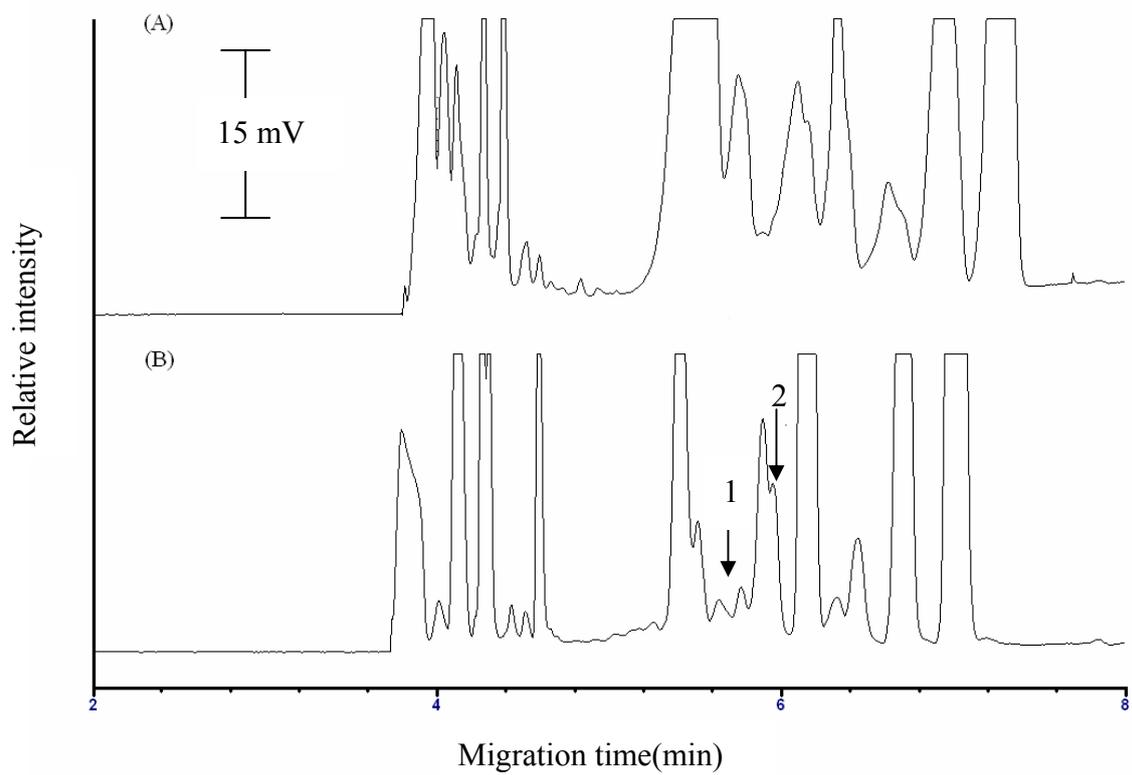
[c] : 0.5 μ M Gabapentin or Vigabatrin (n=7)

六、真實樣品之應用

將本實驗開發的分析方法，應用於檢測人體尿液中抗癲癇藥物的含量^[28,112]，同時可以評估此方法未來於臨床上的應用性。由於尿液的成分，主要是水約佔 97% ，而固體成分約佔 3% ，除此之外，尚含有一些無機鹽、尿素、尿酸等小分子代謝廢物。尿液所含的成分與人的飲食習慣、體內代謝環境及腎臟處理功能息息相關，所以當分析尿液中藥物的含量時，可能會有些內生性干擾的胺基酸，導致分析物出現的位置受到阻礙。

1. 尿液樣品的前處理

為了解決去除尿液中大部分干擾物，曾經嘗試使用 — ACN 去除尿液中的蛋白質，測試是否可以減少干擾物的訊號，但是發現效果不佳，表示尿液中所含的蛋白質成分不多，其處理前後空白電泳圖顯示於圖(十九)，在 GBP 和 VGB 出現的位置上，背景干擾物仍存在，推測尿液中的干擾物可能是小分子胺基酸，所以後來參考 Smithers 等人的處理方法^[30]，使用帶有二價銅離子的醋酸銅溶液，能有效幫助去除胺基酸，所以將反應後沉澱產生的銅鹽錯合物去除，達到有效降低背景干擾，另一方面，為了呈現較佳的分離圖譜，在最佳條件上會有些許的調整改變。



圖(十九) ACN 處理前後之空白尿液電泳圖

(A)未處理之尿液 Blank

(B) ACN 處理後之 Blank

1：GBP 會出現的位置

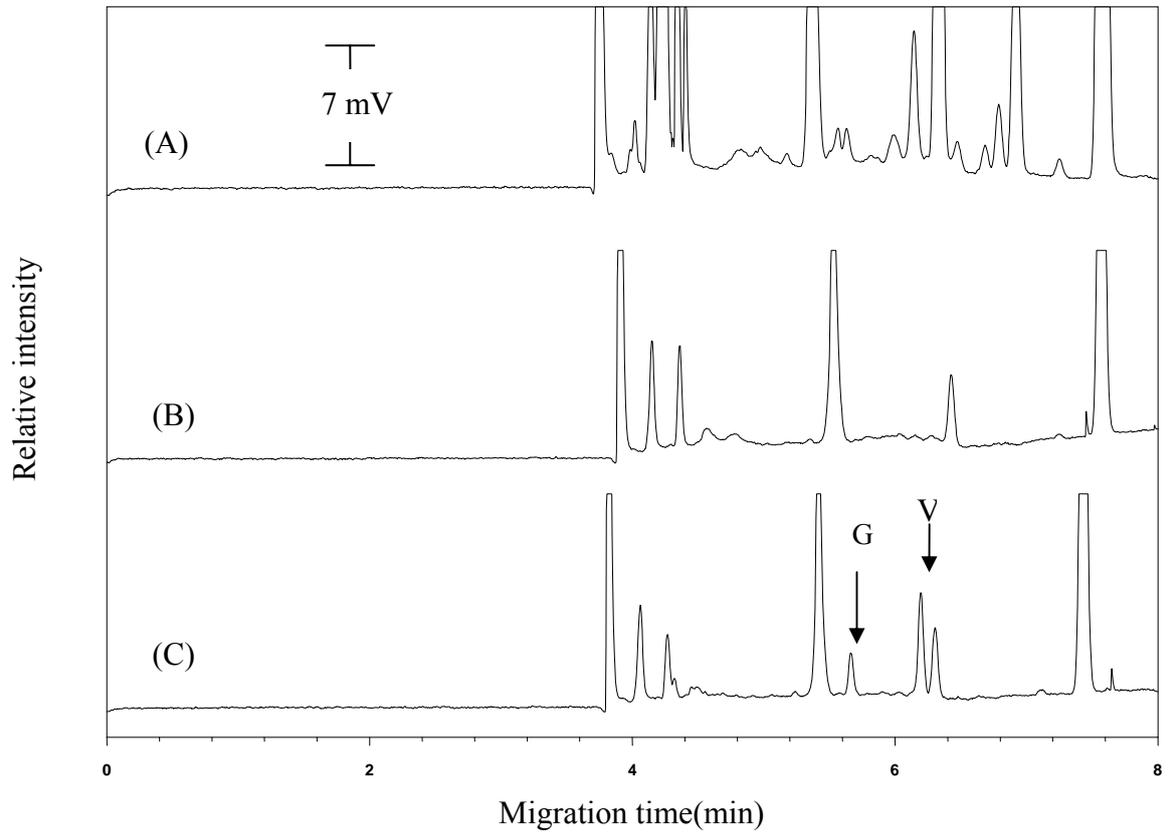
2：VGB 會出現的位置

實驗條件： 注射時間 10 sec、高度 18 cm，電壓 12 kV

其他條件和圖(十八)相同

2. 分離條件的調整

將處理後的尿液樣品，取 90 μL 的尿液樣品添加 10 μL 的去離子水或分析物，作為處理後之空白樣品或尿液樣品，然後將之取出 80 μL 再與衍生劑和緩衝溶液，在最佳條件下衍生的尿液圖譜，發現分析物 VGB 與其他基質訊號未完全地分離，所以首先，試著先以改變電壓大小，看是否可以讓分析物 VGB 達到較好的分離狀態，然而此結果仍尚未讓彼此位置有較好的分離，為了達到有效的分離，則試著改變重力注射的條件，發現增加高度，減少注射時間^[113]，可以讓分析物 VGB 與其他基質能達到較好的分離狀態；最後測試結果以注射時間 3 秒、高度 23 公分，為尿液真實樣品的最佳重力注射條件，至於電壓部分以 12 kV 為較佳分離狀態，最佳的尿液測試結果顯示於圖(二十)。



圖(二十) 用醋酸銅溶液處理之尿液電泳圖

(A) 未處理之 Blank

(B) 處理後之 Blank

(C) 處理後所添加的濃度—GBP : $0.5 \mu\text{M}$

VGB : $5 \mu\text{M}$

(G : GBP V : VGB)

實驗條件： 注射時間 3 sec、高度 23 cm，電壓 12 kV

其他條件和圖(十八)相同

3. 尿液樣品之檢量線與偵測極限

經過多次測試後，以上述偵測尿液的最佳條件，製作尿液樣品中 GBP 和 VGB 的檢量線，結果顯示於表(十)，GBP 與 VGB 的線性範圍在尿液中濃度分別為 $4.00 \times 10^{-7} \sim 1.50 \times 10^{-4}$ M 和 $4.00 \times 10^{-6} \sim 2.50 \times 10^{-4}$ M，相關係數(Correlation Coefficient : r)分別為 0.9925 及 0.9912，然而最低偵測極限(LOD)分別為 1.34×10^{-7} M ($0.02 \mu\text{g/mL}$)和 4.50×10^{-7} M ($0.58 \mu\text{g/mL}$)，此範圍分別足以適用於服用 400 mg GBP^[113]，以及 500 mg VGB^[28]後，尿液中抗癲癇藥物的濃度起伏變化。

和過去檢測尿液的文獻比較：(1)利用 HPLC-UV 偵測 GBP，使用的衍生劑為 NQS，偵測極限可達 $0.05 \mu\text{g/mL}$ (2) 利用 HPLC-FD 偵測 VGB，使用的衍生劑為 Dns chloride，偵測極限可達 $10 \mu\text{g/mL}$ ，綜合以上過去方法，對 GBP 和 VGB 而言，搭配醋酸銅溶液的前處理，以 NBD-F 作衍生劑，利用 CE-LIF 偵測尿液中抗癲癇藥物的含量，足以比上述過去方法的偵測靈敏度還要低。

表(十)尿液樣品中抗癲癇藥物之檢量線及偵測極限

	Gabapentin	Vigabatrin
Linear range (M) (n=5)	$4.00 \times 10^{-7} \sim 1.50 \times 10^{-4}$	$4.00 \times 10^{-6} \sim 2.50 \times 10^{-4}$
Slope ^[a]	1.10×10^9	4.85×10^8
Intercept ^[a]	2.68×10^2	6.76×10^2
Correlation coefficient(r)	0.9925	0.9912
LOD ^[b] (M)	1.34×10^{-7}	4.50×10^{-7}

[a] : y 為訊號面積； x 為分析物濃度(M)

Slope : (mV*sec/M)

[b] : The concentration LOD is evaluated by calculating the

concentration at S/N=3

4.回收率

為了探討尿液樣品前處理之步驟，對分析物的損耗情形，進行 GBP 和 VGB 在尿液中的回收率試驗，然而 GBP 和 VGB 所得到的回收率結果分別為 76.83~91.24% 與 76.60~86.54% ，其結果顯示於表(十一)，造成無法完全回收的原因，可能因醋酸銅溶液的作用可去除尿液中胺基酸，本實驗分析物的結構也屬帶胺基的化合物，因此影響分析物的回收，但和過去文獻中 SPE 處理尿液樣品的結果(平均回收率 72.73%) 相比較，醋酸銅溶液的處理有較好的回收率結果。

5.分析方法之確效試驗

針對 GBP 與 VGB 在尿液中的濃度範圍分別為 $4.00 \times 10^{-7} \sim 1.50 \times 10^{-4} \text{M}$ 和 $4.00 \times 10^{-6} \sim 2.50 \times 10^{-4} \text{M}$ ，取高中低三個濃度進行 within-day (n=5) 與 day to day (5days, n=25) 的重現性測試，為了避免儀器於不同天的操作下有所差異，故使用標準添加法作定量，並以相對標準偏差(R.S.D.)與相對平均誤差(R.M.E.)評估方法之精密度(Precision)及準確性(Accuracy)。在 GBP 的部分，同日間與異日間之 R.S.D.% 分別為 2.46~5.38 和 3.88~6.65，然而 R.M.E.% 則為 1.88~2.87 和 1.50~1.75；相對地 VGB 的部分，同日間與異日間之 R.S.D.% 分別為 6.47~9.82 和 5.36~8.58，而 R.M.E.% 分別在 3.47~-6.25 與 1.60~-5.75 之間。根據生物分析方法確效(Bioanalytical Method Validation)

的規定，within-day 與 day to day 之 R.S.D.及 R.M.E.誤差範圍必須於 15% 以內，此結果顯示於表(十二)，指出有良好的精密度與準確性。另一方面，為了確認不同天的實驗結果是否有所差異，同時也希望可以檢測每天實驗的配製操作上是否有所差異而影響實驗結果，所以使用統計上的雙因子變異數分析(ANOVA)進行驗證，在 95% 信心程度下，GBP 的 F 值介於 0.44~1.06，而 VGB 的 F 值介於 0.26~2.36，兩者的 F 值皆小於其臨界值(critical value) 3.01，因此證明不同天之間無顯著的差異性；除此之外，還可同時檢測 5 天 25 個樣品處理有無顯著的差異性，其結果分別為 GBP 的 F 值介於 1.71~2.33，而 VGB 的 F 值介於 0.75~1.70，也都皆小於其臨界值，表示同一樣品內重複分析的差異不顯著。

6.選擇性之試驗

此分析方法為了測試是否適用於一般人之尿液樣品，所以選擇至少六個不同來源的尿液樣品測試，然而尿液樣品的採樣方式，將前段排泄的尿液捨棄目的是避免檢查時尿中的污染而影響結果，除此之外，尿液的採樣時間對於檢驗疾病的類別而有所不同，因為本實驗是根據服用抗癲癇藥物後，尿液中濃度變化檢測，為了與達到與癲癇病患的真實採樣尿液相仿，對於尿液檢體採集是早上第一次尿液排放後到中午以前所排放的尿液，所以在此尿液的選擇性試驗，由 6 位以上

的實驗室同學及學弟妹配合來作試驗(編號 A~F)，分析結果於圖(二十一~二十六)所示，尿液樣品處理後之空白背景與添加分析物後所得之電泳圖，證明了 GBP 和 VGB 不會因為尿液樣品來源的不同而受到影響，使分析方法受到限制，實驗確認此方法對於大部分人的尿液樣品適用。

表(十一)尿液樣品中抗癲癇藥物之回收率(n=3)^[d]

Sample	concentration(μ M)		Recovery(%)	R.S.D. ^[c] (%)
	Added ^[a]	Found(mean \pm S.D. ^[b])		
Gabapentin				
	72.00	65.69 \pm 2.58	91.24	3.93
	6.00	5.11 \pm 0.24	85.23	4.73
	0.72	0.55 \pm 0.04	76.83	7.05
Vigabatrin				
	108.80	94.16 \pm 2.84	86.54	3.02
	36.00	29.75 \pm 1.46	82.65	4.90
	7.20	5.52 \pm 0.36	76.60	6.61

[a]為尿液中原始濃度

[b] S.D. (standard deviation)

[c] R.S.D.(relative standard deviation)

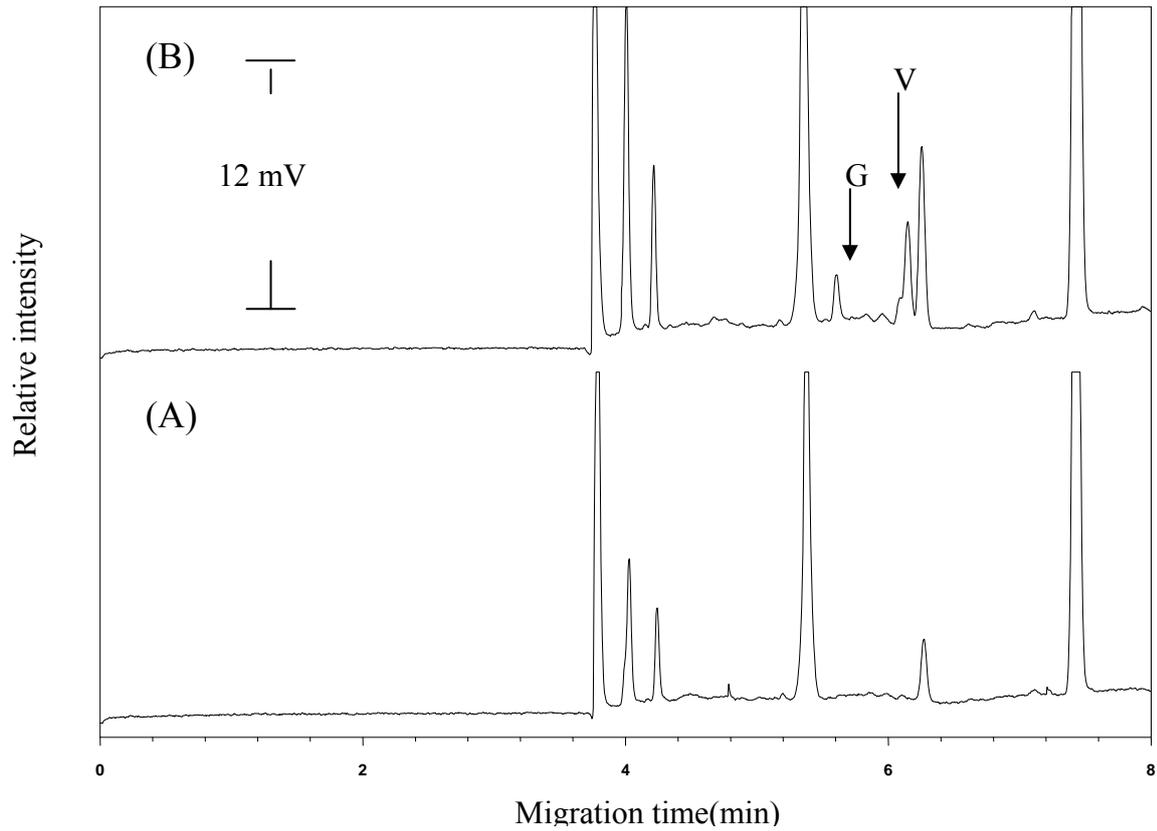
[d]每個濃度重複做三次

表(十二)抗癲癇藥於同日間與異日間之精密度與準確度

concentration(μ M)		R.S.D. (%)	R.M.E. ^[a] (%)	n
Sample	Found(mean \pm S.D.)			
within-day				
Gabapentin				
40.00	41.15 \pm 1.32	3.21	2.87	
4.00	4.08 \pm 0.10	2.46	1.88	5
0.40	0.41 \pm 0.02	5.38	1.93	
Vigabatrin				
80.00	82.77 \pm 5.36	6.47	3.47	
40.00	38.14 \pm 2.80	7.35	- 4.66	5
4.00	3.75 \pm 0.31	9.82	- 6.25	

concentration(μ M)		R.S.D. (%)	R.M.E.(%)	n
Sample	Found(mean \pm S.D.)			
day to day				
Gabapentin				
40.00	40.63 \pm 2.70	6.65	1.58	
4.00	4.07 \pm 0.22	5.49	1.75	25
0.40	0.41 \pm 0.02	3.88	1.50	
Vigabatrin				
80.00	81.29 \pm 6.97	8.58	1.60	
40.00	38.83 \pm 2.08	5.36	- 2.93	25
4.00	3.77 \pm 0.26	6.93	- 5.75	

[a] R.M.E.(relative mean error)



圖(二十一) 尿液樣品 A 之電泳圖

(A) 處理後之 Blank

(B) G : $1 \mu M$; V : $10 \mu M$

衍生劑濃度：NBD-F 7.5 mM

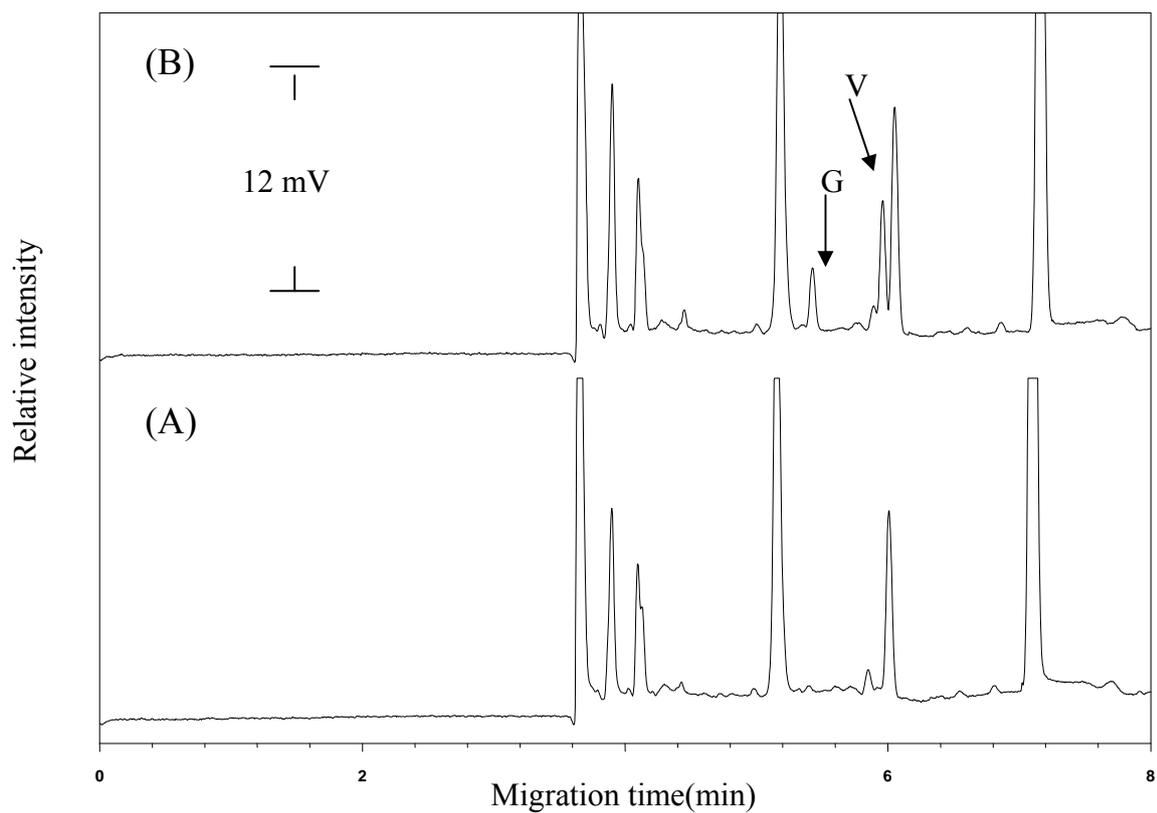
衍生緩衝溶液：硼酸鈉 150 mM，pH=10.5

衍生(溫度/時間)：70°C/50 sec

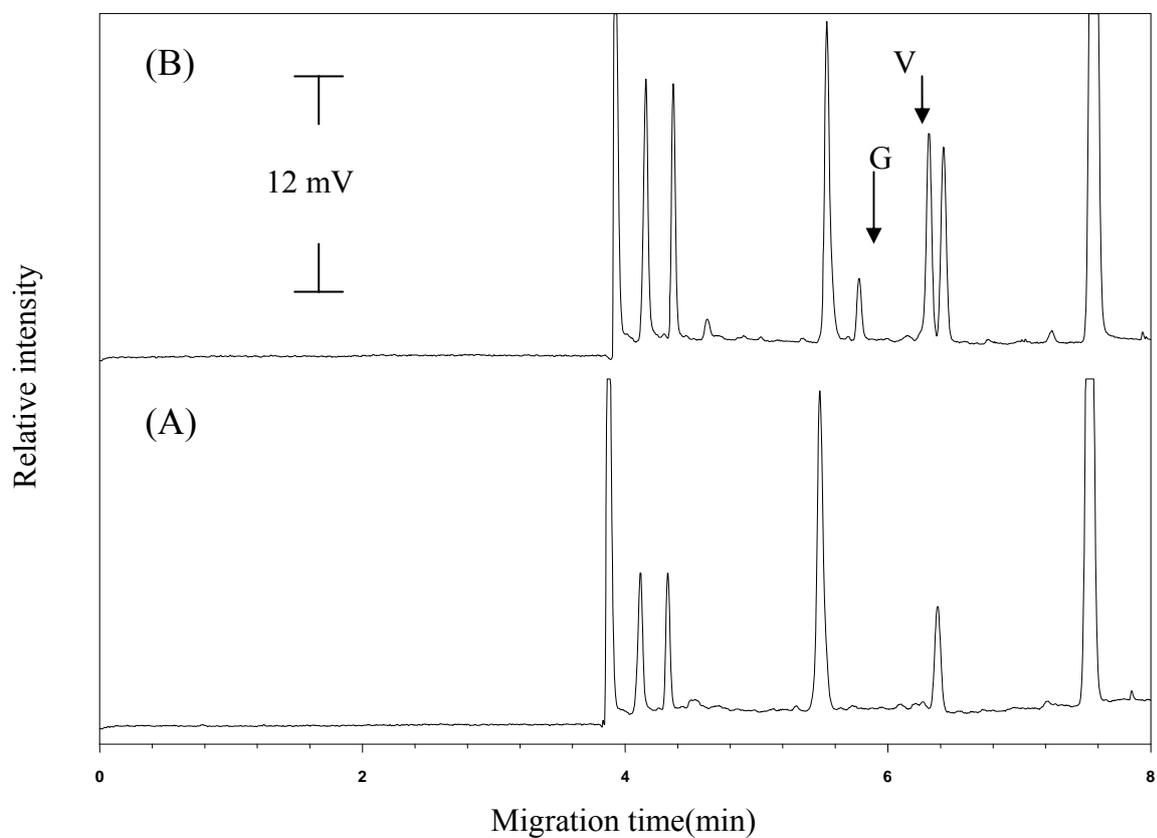
分離緩衝溶液：硼酸鈉 30 mM+SDS 2 mM；pH=9

分離電壓：12 kV

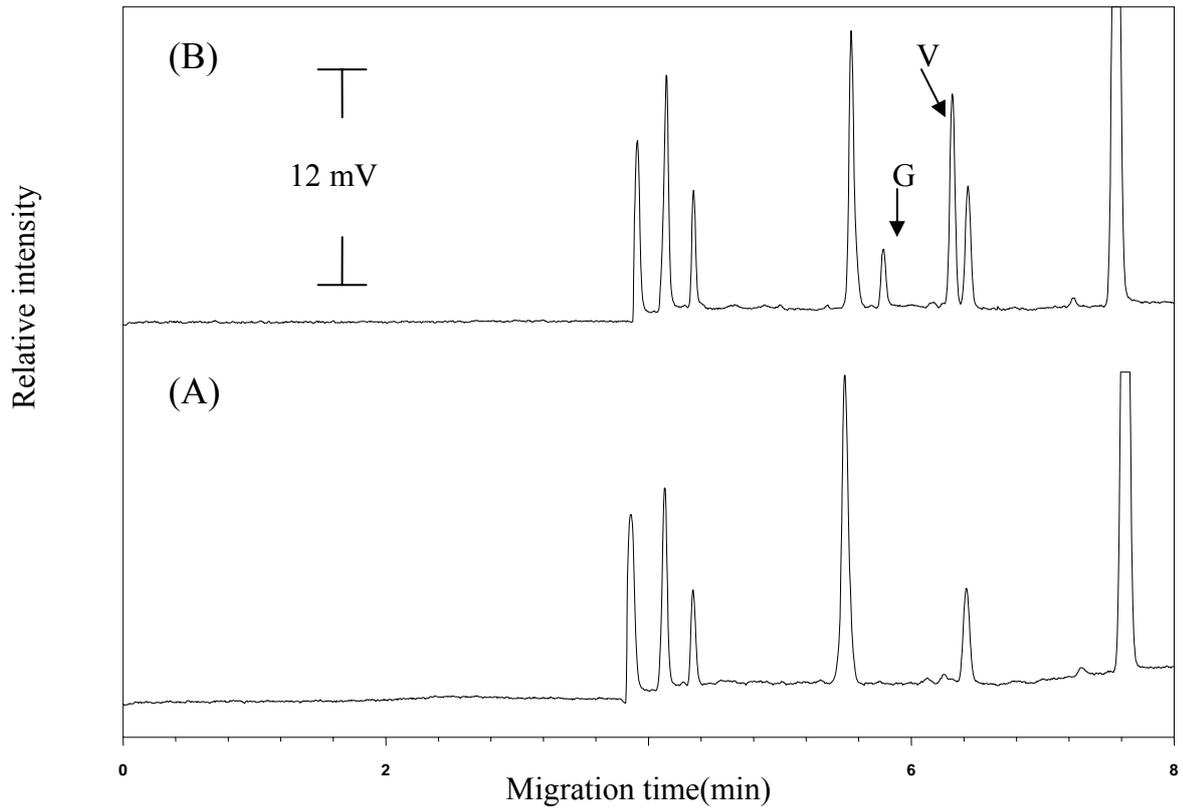
樣品注射方式：重力注射 3 sec，高度 23 cm



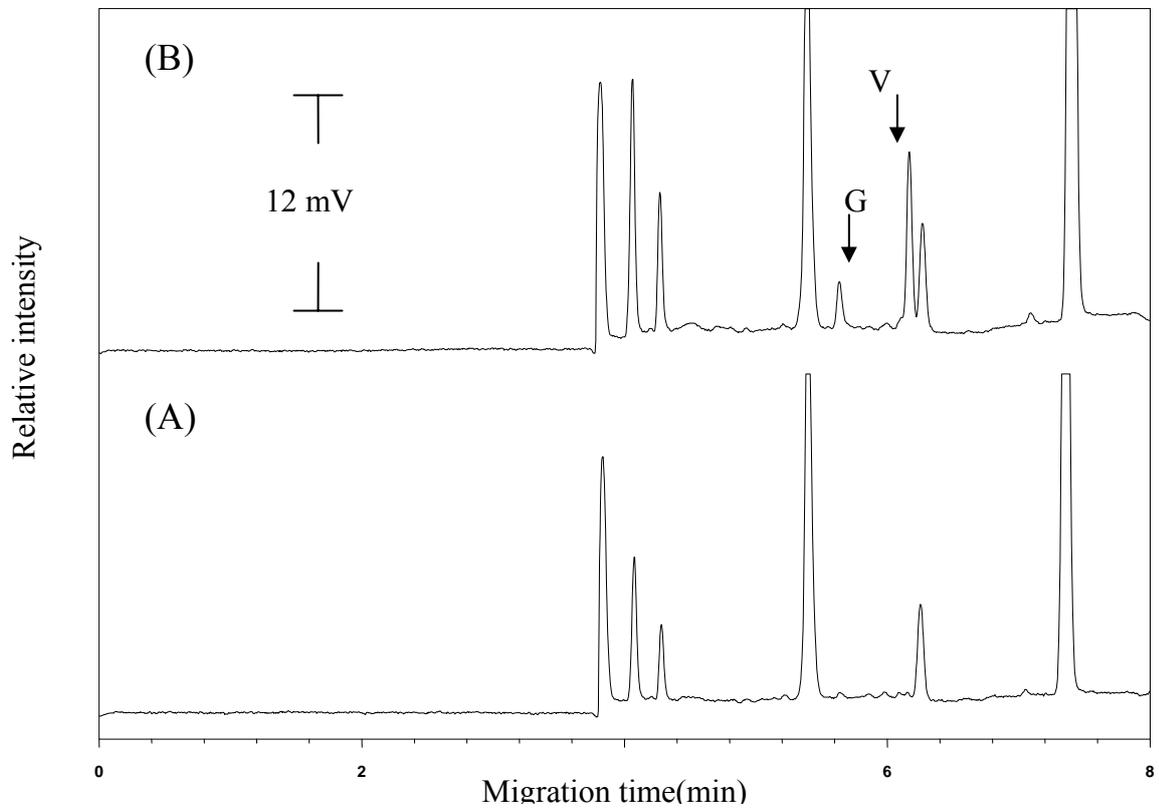
圖(二十二) 尿液樣品 B 之電泳圖



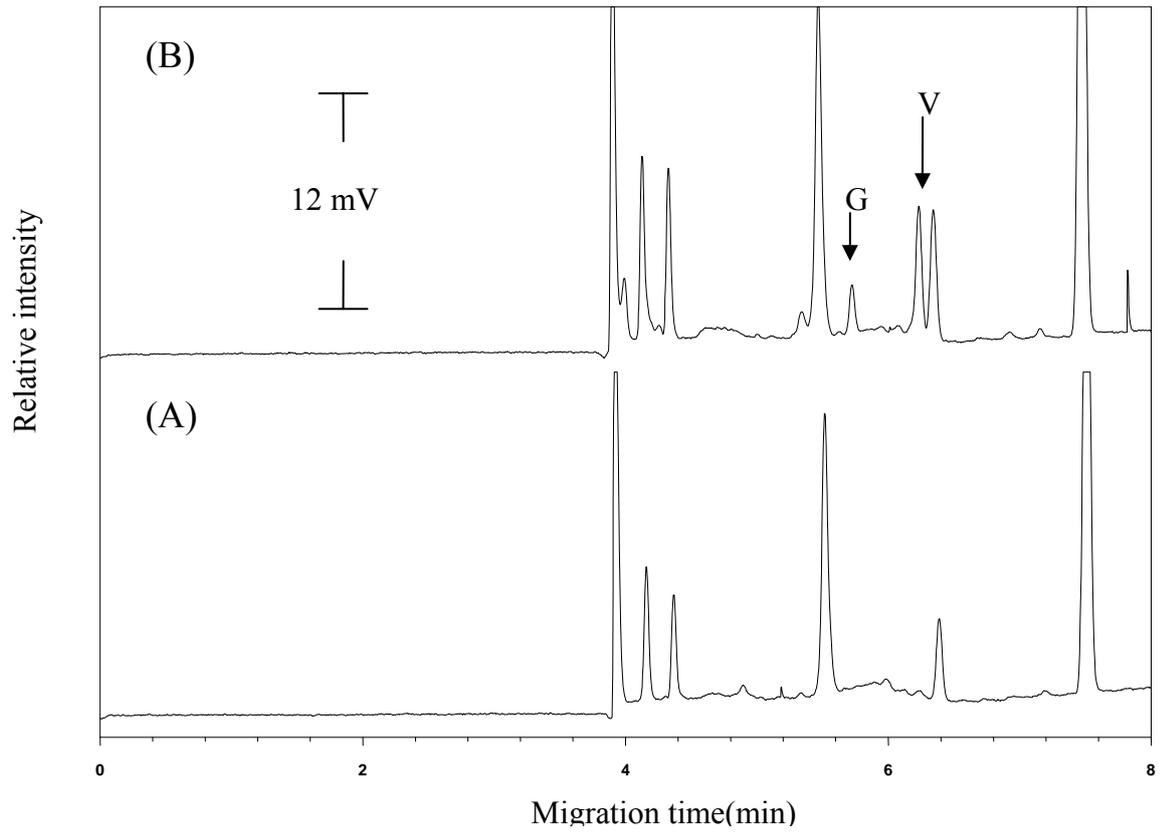
圖(二十三) 尿液樣品 C 之電泳圖



圖(二十四)尿液樣品 D 之電泳圖



圖(二十五)尿液樣品 E 之電泳圖



圖(二十六)尿液樣品 F 之電泳圖

肆、結論與未來展望

分析 GBP 和 VGB 的研究裡，本實驗針對衍生劑與分析物的反應時間作改善，且將尿液樣品用醋酸銅溶液處理，結合氣冷式氫離子雷射激發螢光搭配毛細管電泳(CE-LIF)偵測人體尿液中抗癲癇藥物的含量。使用的衍生劑 NBD-F，與分析物的衍生條件為 70°C 下 50 秒快速反應，此方法同時也證明了 NBD-F 能有效改善 NBD-Cl 衍生反應時間的冗長，且與本實驗室過去的方法比較下，能有效縮短衍生時間；而在人體尿液的檢測上，加入醋酸銅溶液隔水加熱，可有效去除尿液中胺基酸的干擾，與過去分析尿液的研究比較下，本實驗的分析方法和偵測極限都比 HPLC 搭配 UV 或 FD 的方式還要方便、省時。

未來可針對加強改善回收率的部分，或將此方法適用於臨床醫學上的測試，檢測癲癇患者的尿液中含量，或開發利用此衍生方式於其他藥物含量的檢測，有效防止患者用藥過量，而產生其他不良的副作用。

參考文獻

1. J. W. Wheless, R. E. Ramsay, S. D. Collins, “Vigabatrin”, *Neurotherapeutics*, Vol. 4, pp. 163-172 (2007).
2. C. P. Taylor, N. S. Gee, T. Z. Su, “A summary of mechanistic hypothesis of gabapentin pharmacology”, *Epilepsy*, Vol. 29, pp. 233-249 (1998).
3. M. I. Rao, P. Clarenbach, M. Vahlensieck, S. Kraitschmar, “Gabapentin augments whole blood serotonin healthy young men”, *Neurotransm*, Vol. 73, pp. 129-134 (1998).
4. N. Watemberg, J. M. Pellock, “Efficacy and tolerability of high dose gabapentin add-on therapy in children and adults” *Epilepsy*, Vol. 36 (suppl. 4), pp. 57 (1995).
5. M. J. McLean, “Gabapentin in the Management of Convulsive Disorders”, *Epilepsy*, Vol. 40 (suppl. 6), pp. s39-s50 (1999).
6. H. Stefan, “Novel anticonvulsant drugs”, *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 113, pp. 165-183 (2007).
7. J. Gibbs, R. E. Appleton, L. Rosenbloom “Vigabatrin in intractable childhood epilepsy a retrospective study”, *Pediatric Neurology*, Vol. 8, pp. 338-340 (1992).
8. M. M. Kushnir, J. Crossett, P. I. Brown, F. M. Urry, “Analysis of Gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry for therapeutic drug monitoring”, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 23, pp. 1-6 (1999).
9. W. D. Hooper, M.C. Kavanagh, R. G. Dickinson, “Determination of gabapentin in plasma and urine by capillary column chromatography”, *Journal of chromatography*, Vol. 529, pp. 167-174 (1990).
10. C. E. Wolf, J. J. Saady, A. Poklis, “Determination of gabapentin in

- plasma using solid-phase extraction and gas chromatography ”,
Journal of Analytical Toxicology, Vol. 20, pp. 498-501 (1996).
- 11.H. Hengy, E. Holle, “Determination of gabapentin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and pre-column labelling for ultraviolet detection”, *Journal of chromatography*, Vol. 341, pp. 473-478 (1985).
- 12.G. L. Lensmewer, T. Kempf, B. E.Gidal, D. A.Wiebe, “Optimized method for determination of gabapentin in serum by high-performance liquid chromatography”, *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 17, pp. 251-258 (1995).
- 13.J. M. Juenke, P. I. Brown, G. A. Mcmillin, F. M. Urry, “Procedure for the monitoring of gabapentin with 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic acid derivatization followed by HPLC with Ultraviolet detection”, *Clinical Chemistry*, Vol. 49, pp. 1198-1200 (2003).
- 14.O. Sagirli, S. M. Cetin, A. Onal, “Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection”, *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, Vol. 42, pp. 618-624 (2006).
- 15.Z. Zhu, L. Neirinck, “High-performance liquid chromatography for the determination of gabapentin in human plasma”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 779, pp. 307-312 (2002).
- 16.G. Forrest, G. J. Sills, J. P. Leach, M. J. Brodie, “Determination of gabapentin in plasma by high -performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 681, pp. 421-425 (1996).
- 17.Q. Jiang, S. Li, “Rapid high - performance liquid chromatography determination of serum gabapentin”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 727, pp. 119-123 (1999).

- 18.P. H. Tang, M. V. Miles, T. A. Glauser, T. DeGrauw, “Automated microanalysis of gabapentin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 727, pp. 125-129 (1999).
- 19.G. Bahrami , A. Kiani, “Sensitive high -performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 835, pp. 123-126 (2006).
- 20.D.Gauthier, R. Gupta, “Determination of gabapentin in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction with a C₁₈ column”, *Clinical Chemistry*, Vol. 48, pp. 2259-2261 (2002).
- 21.P. Rada , S. Tucci , J. Perez , L. Teneud , S.Chuecos, L. Hernandez , “in vivo monitoring of gabapentin in rat: A microdialysis study coupled to capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection” , *Electrophoresis*, Vol. 19, pp. 2976-2980 (1998).
- 22.S. Y. Chang , F. Y. Wang, “Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 799, pp. 265-270 (2004).
- 23.R. Sekar , S. Azhaguvel, “Indirect photometric assay determination of gabapentin in bulk drug and capsules by capillary electrophoresis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 36, pp. 663-667 (2004).

24. L. L. Garcia, Z. K. Shihabi, K. Oles, "Determination of gabapentin in serum by capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography B*, Vol. 669, pp. 157-162 (1995).
25. T. M. Chen, J. J. Contario, R. R. Fike, "high-performance liquid chromatography assay for vigabatrin and its primary degradation product in a pharmaceutical tablet formulation" *Journal of Chromatography*, Vol. 389, pp. 351-354 (1987).
26. S. George, L. Gill, R. A. Braithwaite, "Simple high-performance liquid chromatographic method to monitor vigabatrin and preliminary review of concentrations determined in epileptic patients", *Annals of Clinical Biochemistry*, Vol. 37, pp. 338-342 (2000).
27. S. M. Cetin, S. Atmaca, "Determination of vigabatrin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1031, pp. 237-242 (2004).
28. S. Erturk, E. S. Aktas, S. Atmaca, "Determination of vigabatrin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography B*, Vol. 760, pp. 207-212 (2001).
29. N. Seiler, B. Knodgen, "Determination of amino acids by separation of their ion pairs with dodecyl sulphate", *Journal of Chromatography*, Vol. 341, pp. 11-21 (1985).
30. J. A. Smithere, J. F. Lang, R. A. Okerholm, "Quantitative analysis of vigabatrin in plasma and urine by reversed-phase high - performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography*, Vol. 341,

pp. 232-238 (1985).

31. N. Olgun, S. Erturk, S. Atmaca, "Spectrofluorimetric and spectrophotometric method for the determination of vigabatrin in tablets", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.29, pp. 1-5 (2002).
32. J. Grove, R. G. Alken, P. J. Schechter, "Assay of γ -vinyl- γ -aminobutyric acid in plasma and urine by automatic amino acid analysis (Application to human pharmacokinetics)", *Journal of Chromatography*, Vol. 306, pp. 383-387 (1984).
33. K. M. Matar, M. E. Abdelhamid, "Quantification of Vigabatrin in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 28, pp. 395-406 (2005).
34. A. Shafaati, C. Lucy, "Application of capillary zone electrophoresis with indirect UV detection to the determination of a model drug, vigabatrin, in dosage forms", *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 8, pp. 190-198 (2005).
35. A. Musenga, R. Mandrioli, I. Comin, E. Kenndler, M. A. Raggi, "Determination of vigabatrin in human plasma by means of CE with LIF detection", *Electrophoresis*, Vol. 28, pp. 3535-3541 (2007).
36. N. Benturquia, S. Parrot, V. Sauvinet, B. Renaud, L. Denoroy, "Simultaneous determination of vigabatrin and amino acid neurotransmitters in brain microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection" *Journal of Chromatography B*, Vol. 806, pp. 237-244 (2004).

- 37.S. Y. Chang, W. C. Lin, “Determination of vigabatrin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 794 , pp.17-22 (2003).
- 38.K. D. Haegele, J. Schoun, R. G. Alken, N. D. Huebert, “Determination of the R(-) – and S(+)- enantiomers of γ -vinyl- γ -aminobutyric acid in human body fluids by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, Vol. 274, pp. 103-110 (1983).
- 39.T. A. C. Vermeij, P. M. Edelbroek, “High -performance liquid chromatographic analysis of vigabatrin enantiomers in human serum by precolumn derivatization with o- phthaldialdehyde—*N*-acetyl-L-cysteine and fluorescence detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol.716, pp. 233-238 (1998) .
- 40.C. Y. Hsieh, S. Y. Wang, A. L. Kwan, H. L. Wu, “ Fluorescent high performance liquid chromatographic analysis of vigabatrin enantiomers after derivatizing with naproxen acyl chloride” *Journal of Chromatography A*, Vol. 1178, pp. 166-170 (2008).
- 41.T. M. Chen, J. J. Contari, “High - performance liquid chromatographic resolution enantiomers of γ -vinyl- γ -aminobutyric acid”, *Journal of Chromatography* , Vol. 314, pp. 495-498 (1984).
- 42.V. Franco, I. Mazzucchelli, C. Fattore, R. Marchiselli, G. Gatti, E. Perucca, “Stereoselective determination of vigabatrin enantiomers in human plasms by high - performance liquid chromatography using UV detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 854, pp. 63-67 (2007).
- 43.S. Zhao, R. Zhang, H. Wang, L. Tang, Y. Pan, “Capillary electrophoresis enantioselective separation of vigabatrin enantiomers

- by precolumn derivatization with dehydroabietylisothiocyanate and UV-vis detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 833, pp. 186-190 (2006).
- 44.N. Wad, G. Kramer, “Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in serum and urine”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 705, pp. 154-158 (1998).
- 45.N. Ratnaraj, P. N. Patsalos, “A high-performance liquid chromatography micromethod for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in serum”, *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 20, pp. 430-434 (1998).
- 46.D. F. Chollet, L. Goumaz, C. Juliano, G. Anderegg, “Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 746, pp. 311-314 (2000).
- 47.A. A. Almajed, “A derivatization reagent for vigabatrin and gabapentin in HPLC with fluorescence detection”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 28, pp. 3119-3129 (2005).
- 48.T. A. C. Vermeij, P. M. Edelbroek, “Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde and fluorescence detection”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 810, pp. 297-303 (2004).
- 49.F. Belal, H. Abdine, A. Almajed, N. Y. Khalil, “Spectrofluorimetric

- determination of gabapentin and vigabatrin in urine and dosage forms through derivatization with fluorescamine”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 27, pp. 253-260 (2002).
- 50.E. M. Hassan, F. Belat, N.Y. Khalil, “Spectrofluorimetric determination of gabapentin and vigabatrin in dosage forms and spiked plasma samples through derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole”, *Journal of AOAC International*, Vol. 84, pp.1017-1024 (2002).
- 51.F. M. Lin, H. S. Kou, S. M. Wu, S. H. Chen, H. L. Wu, “Capillary electrophoresis analysis of gabapentin and vigabatrin pharmaceutical preparations as ofloxacin derivatives”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 523, pp. 9-14 (2004).
- 52.S. F. Y. Li , “Capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 52 , Elsevier, New York, pp.2 (1992).
- 53.A. Tiselius, “A new apparatus for electrophoresis analysis of colloidal mixtures”*Transactions of the Faraday Society*, Vol. 33, pp. 524-531 (1937).
- 54.S. Hjerten, “Free zone electrophoresis” *Chromatographic Review*, Vol. 9, pp. 122-239 (1967).
- 55.R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, “Capillary electrophoresis : Principle and Practice”, *springer-verlag*, New York, pp.2 (1993).
- 56.A. G. Ewing, R. A. Wallingford, T. M. Olefirowicz , “Capillary electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 61, pp. 292A-303A (1989).
- 57.F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen , “High

- performance zone electrophoresis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 169, pp. 11-20 (1979).
- 58.J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, “High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 218, pp. 209-216 (1981).
- 59.J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, “Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries”, *Analytical Chemistry*, Vol.53, pp. 1298-1302 (1981).
- 60.J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, “Capillary zone electrophoresis”, *Science*, Vol. 222, pp. 266-272 (1983).
61. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, “Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries ”, *Analytical Chemistry*, Vol. 56, pp. 111-113 (1984).
- 62.D. R. Baker, “Capillary electrophoresis”, *Wiley-Interscience*, New York (1995).
- 63.S. Hjerten, M. D. Zhu, “Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing” *Journal of Chromatography*, Vol. 346, pp. 265-270 (1985).
- 64.A. S. Cohen, 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).
- 65.D. N. Heiger, “High-performance Capillary electrophoresis – An introduction”, *Hewlett-Packard Company*, France (1992) .
- 66.T. Tsuds, “Electrochromatography using high applied voltage ” *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 521-523 (1987).
- 67.C. Yan, R. N. Zare, D. J. Rakestraw, D. S. Anex, “Gradient elution in

- capillary electrochromatography” *Analytical Chemistry*, Vol. 68, pp. 2726-2730 (1996).
68. S. F. Y. Li, “Capillary electrophoresis” *Journal of Chromatography Library*, Vol. 52, Elsevier, New York, pp. 33 (1992).
69. X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare, “Bias in quantitative capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection”, *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 375-377 (1988).
70. D. J. Rose, J. W. Jorgenson, “Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 642-648 (1988).
71. B. X. Mayer, “How to increase precision in capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 907, pp. 21-37 (2001).
72. A. Wang, Y. Fang, “Applications of capillary electrophoresis with electrochemical detection in pharmaceutical and biomedical analyses”, *Electrophoresis*, Vol. 21, pp. 1281-1290 (2000).
73. R. A. Wallingford, A. G. Ewing, “capillary zone electrophoresis with electrochemical detection”, *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 1762-1766 (1987)
74. A. J. Zemann, “Conductivity detection in capillary electrophoresis”, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 20, pp. 346-354 (2001).
75. M. Nieddu, G. Boatto, A. Carta, “Simultaneous determination of tenamphetamine designer drugs in human whole blood by capillary electrophoresis with diode array detection”, *Biomedical Chromatography*, Vol. 19, pp. 737-742 (2005).
76. C. Gooijer, S. J. Kok, F. Ariese, “Capillary electrophoresis with laser

- induced fluorescence detection for natively fluorescent analytes”, *Analysis*, Vol. 28, pp. 679-685 (2000).
- 77.J. P. Chervet, R. E. J. vansoest, M. Ursem, “ Z-shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography*, Vol. 543, pp. 439-449 (1991).
- 78.G. Hempel, D. Lehmkuhl, S. Krumpelmann, G. Blaschke, J. Boos, “ Determination of paclitaxel in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 745, pp. 173-179 (1996).
- 79.J. Olgemoller, G. Hempel, J. Boos, G. Blaschke, “Determination of (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine in human and urine by capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography B*, Vol. 726, pp.261-268 (1999).
- 80.T. Tsuda, J. V. Sweedler, R. N. Zare, “Rectangular capillary for capillary zone electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, Vol. 62, pp. 2149-2152 (1990).
- 81.M. T. Veledo, M. D. Frutos, J. C. Diezmasa, “Amino acids determination using capillary electrophoresis with on- capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1079, pp. 335-343 (2005).
- 82.K. Imai, Y. Watanabe, “Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 130, pp. 377-383 (1981).
- 83.K. J. James, I. R. Sherlock, “Determination of the cyanobacterial neurotoxin, anatoxin-a, by derivatisation using 7-fluoro-4-nitro

- 2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F) and HPLC analysis with Fluorimetric detection ”, *Biomedical Chromatography*, Vol. 10, pp. 46-47 (1996).
- 84.K. Imai, T. Fukushima, “Derivatisation with fluorimetric benzofurazan reagents of amino acids enantiomers and their separation on a Pirkle type column”, *Biomedical Chromatography*, Vol. 7, pp. 275-276 (1993).
- 85.K. Imai, T. Fukushima, S. Uzu, “Sensitive determination of enantiomers of amino acids derivatized with the fluorimetric reagents, 7- fluoro-4 -nitro- 2,1,3-benz-oxadiazole, separated on a Pirkle type column”, *Biomedical Chromatography* , Vol. 7, pp. 177-178 (1993).
- 86.H. Miyano, T. Toyo`oka, K. Imai, T. Nakajima, “Influences of metal ions on the reaction of amino and imino acids with fluorimetric reagents”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 150, pp. 125-130 (1985).
87. T. Toyo`oka, H. Miyano, K. Imai, “Amino acids composition analysis of minute amounts of cysteine-containing proteins using 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole and 4-fluoro-7-nitro -2,1,3-benzoxadiazole in combination with HPLC”, *Biomedical Chromatography*, Vol. 1, pp. 15-20 (1986).
- 88.Y. Wantanabe, K. Imai, “high - performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7–fluoro-4 -nitrobenzo -2-oxa-1,3-diazole”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 116, pp. 471-472 (1981).
- 89.Y. Wantanabe, K. Imai, “Pre-column labelling for high-performance liquid chromatography of amino acids with 7 - fluoro- 4 -nitrobenzo -2 -oxa-1,3-diazole and its application to protein hydrolysates”, *Journal*

- of Chromatography*, Vol. 239, pp. 723-732 (1982).
- 90.Y. Wantanabe, K. Imai, "Sensitive detection of amino acids in human serum and dried blood disc of 3 mm diameter for diagnosis of inborn errors of metabolism", *Journal of Chromatography*, Vol. 309, pp. 279-286 (1984).
- 91.T. Toyo 'oka, H. Miyano, K. Imai, "Protein Research Foundation" *Peptide Chemistry*, Vol 23, pp. 403-408 (1986).
- 92.T. Toyo 'oka, H. Miyano, K. Imai, "Reaction of amines of biological importance with 4- fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole ", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 149, pp. 305-312 (1983).
- 93.T. Teerlink, P. A. M. van Leeuwen, A. Houdijk, "Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes", *Clinical chemistry*, Vol. 40, pp. 245-249 (1994).
- 94.J. R. Benson, P. E. Hare, "o-Phthalaldehyde : Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin", *Proceedings of National Academy Sciences*, Vol. 72, pp. 619-622 (1975).
- 95.B. N. Jones, S. Paabo, S. Stein, "Amino acid analysis and enzymic sequence determination of peptide by an improvedo-phthalaldehyde precolumn labeling procedure" *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 4, pp. 565-586 (1981).
- 96.M. Ummadi, B. C.Weimer, "Use of capillary electrophoresis and laser -induced fluorescence for attomole detection of amino acids", *Journal of Chromatography A*, Vol. 964, pp. 243-253 (2002).

- 97.P. D. Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, K. Srinivasachar, L. A. Sternson, T. Higuchi, "Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde Cyanide ion : A rationally designed fluorogenic reagent for primary amines", *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 1096-1101 (1987).
- 98.S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle, "Fluorescamine : A Reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range", *Science*, Vol. 178, pp. 871-872 (1972).
- 99.K. Arlt, S. Brandt, J. Kehr, "Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection ", *Journal of Chromatography A*, Vol. 964, pp. 243-253 (2001).
- 100.K. Muramoto, H. Kamiya, H. Kawauchi, "The application of fluorescein isothiocyanate and high-performance liquid chromatography for the microsequencing of proteins and peptides", *Analytical Biochemistry*, Vol. 141, pp. 446-450 (1984).
- 101.S. Zhao, H. Yuan, D. Xiao, "Detection of D-Serine in rat brain by capillary electrophoresis laser induced fluorescence detection", *Journal of Chromatography B*, Vol. 822, pp. 334-338 (2005).
- 102.S. Hu, P. C. H. Li, "Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and fluorescent detection of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole", *Journal of Chromatography A*, Vol. 239, pp. 723-732 (1982).
- 103.C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunoda, T. Fukushima, C. Kitada, k. Imai, "A fully automated amino acids analyzer using NBD-F as a fluorescent

- derivatization reagent”, *Biomedical Chromatography*, Vol. 18, pp. 630-636 (2004).
- 104.I. Beijersten, D. Westerlund, “Derivatization of dipeptides with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole for laser-induced fluorescence and separation by micellar electrokinetic chromatography”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 716, pp. 389-399 (1995).
- 105.A. A. Almajed, “Specific spectrofluorometric quantification of D-penicillamine in bulk and dogage forms after derivatization with 4- fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole”, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 408, pp. 169-175 (2000).
- 106.C. C. Klinker, M. T. Bowser, “4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis—capillary electrophoresis ”, *Analytical Chemistry*, Vol. 79, pp. 8747-8754 (2007).
- 107.X. Zhu, P. N. Shaw, D. A. Barrett, “Catecholamines derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole : characterization of chemical structure and fluorescence properties” *Analytica Chimica Acta*, Vol. 478, pp. 259-269(2003).
- 108.Y. H. Hui, K. C. Marsh, “Sensitive detection of selected cholinergic channel activators derivatized 7- fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole ” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.14, pp. 131-142 (1995).
- 109.M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Toyo ' oka, “Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophorwsis using plastic microchip and fluorecence detection” *Journal of Chromatography A*, Vol.1013, pp. 183-189 (2003).

- 110.S. R. Wallenborg, I. S. Lurie, D. W. Arnold, C. G. Bailey, “On-chip chiral and achiral separation of amphetamine and related compounds labeled with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane” *Electrophoresis*, Vol. 21, pp. 3257-3263 (2000).
- 111.Q. Liu, Y. Li, F. Tang, L. Ding, S. Yao, “ Cationic gemini surfactant as dynamic coating in CE for the control of EOF and wall adsorption” *Electrophoresis*, Vol. 28, pp. 2275-2282 (2007).
112. R. A. Boyd, D. Turck, R. B. Abel, A. J. Sedman, H. N. Bockbrader, “Effect of age and gender on single-dose pharmacokinetics of gabapentin”, *Epilepsia* , Vol. 40(4), pp. 474-479 (1999).
- 113.A. Smirnova, K. Shimura, A. Hibara, M. A. Proskurnin, T. Kitamori, “Pesticide analysis by MEKC on a microchip with hydrodynamic injection from organic extract”, *Journal of Separation Science*, Vol. 31, pp. 904-908 (2008).