

# 謝誌

# 摘要

藍紫光二極體雷射是 1999 年由日本 Nichia 公司所開發出來新型的雷射光源，其具有波長短、壽命長、穩定性高、體積小與價格便宜等優點。本研究利用微胞電動毛細管層析配合藍紫光(410 nm)二極體雷射激發螢光偵測發展血樣中 baclofen 的分析方法。Baclofen 是一種臨床治療多發性硬化症或脊髓損傷後，抑制肌肉痙攣之鬆弛劑。但人體血液中 baclofen 含量若過高，會產生四肢無力、昏迷、呼吸抑制、抽搐、低血壓與心搏變緩等副作用，因此監測病人血液中 baclofen 濃度是很重要的。Baclofen 分子不具螢光性質，分析前需先以螢光試劑 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester 衍生才得以偵測。

微胞電動毛細管層析的分離條件為：毛細管內徑 50  $\mu\text{m}$ 、總長 65 cm、有效長度 45 cm，緩衝溶液 50 mM 硼酸鈉 (pH 9.5) 添加 10 mM sodium dodecyl sulfate (SDS)，電壓 18 kV。血漿樣品經由簡單的超過濾 (ultrafiltration) 前處理，可在 30 分鐘內完成 baclofen 的分離。血漿樣品中 baclofen 的檢量線線性範圍 0.3  $\mu\text{M}$ ~20  $\mu\text{M}$ ， $r^2 = 0.998$ ，血漿中的分析極限為 0.06  $\mu\text{M}$ 。添加 0.3  $\mu\text{M}$  baclofen 於血樣中的回收率大於 96%，相對標準誤差小於 7%。實驗證明微胞電動毛細管層析配合藍紫光二極體雷射激發螢光偵測可應用於人體血漿中微量的 baclofen 分析。

# 目錄

摘要.....	I
謝誌.....	I
目錄.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
壹、緒論.....	1
一、毛細管電泳的發展.....	1
二、毛細管電泳的分離原理.....	4
三、毛細管電泳的分離模式.....	8
1.毛細管區帶電泳 (CZE) .....	9
2.微胞電動毛細管層析 (MECC or MEKC) .....	9
3.毛細管凝膠電泳 (CGE) .....	10
4.毛細管等速電泳 (CITP) .....	13
5.毛細管等聚焦法 (CIEF) .....	14
6.毛細管電層析 (CEC) .....	14
四、毛細管電泳的進樣方式.....	15

五、毛細管電泳的偵測方式.....	17
1.紫外-可見光（UV-VIS）吸收偵測.....	17
2.螢光放射偵測.....	18
六、Baclofen簡介.....	21
1.藥理性質.....	22
2.分析方法.....	23
3.樣品前處理.....	25
4.研究動機.....	27
貳、實驗.....	28
一、儀器設備.....	28
二、藥品.....	31
三、實驗方法.....	33
1.樣品儲存溶液（stock solution）的配製.....	33
2.電泳緩衝溶液的配製.....	34
3.血漿樣品前處理.....	33
4.衍生反應.....	35
5.毛細管電泳/雷射激發螢光裝置.....	36
6.樣品注射方式與毛細管處理.....	39

參、結果與討論 .....	40
一、分析條件最佳化 .....	40
1. 衍生反應 .....	40
2. DCCS-baclofen 之MEKC 分離 .....	51
3. 最佳分析條件 .....	62
4. 檢量線製作 .....	66
5. 分析再現性 .....	66
二、血漿樣品的分析 .....	70
三、確效試驗 .....	87
肆、結論 .....	89
伍、參考文獻 .....	90

# 圖目錄

圖(一)毛細管電泳儀器裝置圖.....	5
圖(二)界面活性劑形成微胞的示意圖.....	11
圖(三)微胞電動層析的分離示意圖.....	12
圖(四) GABA與baclofen結構圖.....	23
圖(五)超過濾之原理.....	27
圖(六)毛細管電泳/雷射激發螢光偵測器裝置圖.....	37
圖(七)雷射激發螢光偵測器細部元件構造圖.....	38
圖(八) DCCS與baclofen的衍生反應圖.....	41
圖(九) DCCS的水解反應.....	43
圖(十)衍生時間pH值對DCCS-baclofen訊號面積的影響.....	44
圖(十一)衍生反應時間對 DCCS-baclofen 訊號面積的影響.....	45
圖(十二)衍生反應溫度對 DCCS-baclofen 訊號面積的影響.....	47
圖(十三) DCCS-baclofen 穩定性測試(4°C).....	48
圖(十四) DCCS-baclofen 穩定性測試(25°C).....	49
圖(十五) PPA之結構圖.....	50
圖(十六) Baclofen的DCCS衍生產物電泳圖 (CZE).....	52
圖(十七) 血漿樣品中 Baclofen的電泳圖 (CZE).....	53

圖(十八)電泳緩衝溶液之SDS濃度對DCCS-baclofen遷移時間的影響.....	55
圖(十九)電泳效率與電壓的關係圖 .....	56
圖(二十)不同電壓下對 DCCS- baclofen遷移時間的影響 .....	57
圖(二十一)電泳緩衝溶液濃度對DCCS- baclofen遷移時間的影響 .....	59
圖(二十二)電泳緩衝溶液濃度對DCCS- baclofen訊號面積的影響 .....	60
圖(二十三)電泳緩衝溶液pH值對DCCS- baclofen遷移時間的影響 .....	61
圖(二十四)進樣時間對理論版數及訊號高度的影響. ....	63
圖(二十五)Baclofen及PPA的DCCS衍生產物電泳圖 (MEKC) .....	65
圖(二十六)DCCS-baclofen 的檢量線.....	67
圖(二十七)血漿樣品中DCCS-baclofen的電泳圖 (MEKC) .....	72
圖(二十八)經氫甲烷前處理之血漿樣品中DCCS-baclofen的檢量線 .....	73
圖(二十九)血漿樣品中低濃度DCCS-baclofen的電泳圖 (MEKC) .....	74
圖(三十)兩種不同血漿樣品前處理方法的比較.....	78
圖(三十一)超過濾淨化後血漿樣品中DCCS-baclofen的衍生產物濃度檢量 線.....	80
圖(三十二)血漿樣品中低濃度DCCS-baclofen的電泳圖 .....	81
圖(三十三)血漿樣品A之DCCS-baclofen的電泳圖 .....	82
圖(三十四)血漿樣品B中之DCCS-baclofen的電泳圖 .....	83
圖(三十五)血漿樣品C中之DCCS-baclofen的電泳圖 .....	84

# 表目錄

表(一)水溶液樣品中DCCS-baclofen的分析訊號再現性 .....	69
表(二)以氰甲烷處理血漿樣品回收率 .....	76
表(三)以超過濾前處理血漿樣品的baclofen回收率 .....	85
表(四)分析血漿中baclofen的確效試驗 .....	88

# 壹、緒論

## 一、毛細管電泳的發展

電泳 ( electrophoresis ) 是在電場作用下，帶電荷粒子於電解質溶液中以不同的速度朝不同方向遷移，利用這種現象對某些化學或生化分子進行分離的技術稱為電泳技術。電泳的發展，實際上已有近百年的歷史，1937年瑞典科學家 Tiselius 首度利用電泳技術成功地分離人血清中之白蛋白、 $\alpha$ 球蛋白、 $\beta$ 球蛋白、 $\gamma$ 球蛋白<sup>[1]</sup>，電泳技術從此受到重視。由於 Tiselius 對發展電泳技術的卓越貢獻，於 1948 年獲頒諾貝爾化學獎。

傳統的電泳通常是在以凝膠 ( gel )、纖維素 ( cellulose ) 或聚丙醯胺 ( polyacrylamide ) 為介質的平板或管柱中進行，以降低熱擴散和熱對流的影響。雖然固相介質可以減緩溶液的對流作用，但是在高電場下，高電阻所產生的焦耳熱 ( joule heat ) 會造成平板中的溫度、黏度及離子運動速度產生梯度的變化，導致訊號帶變寬，而降低分離效率。這種效應會隨著電場強度的增加而急速惡化，因此限制了平板電泳中高電壓的使用範圍。儘管傳統平板電泳目前仍是應用非常廣泛的分離方法之一，但是其散熱效率差、分析時間長、分離效率低、再現性不佳、偵測及自動化困難等缺點，使得分析技術發展受到限制。

為了改善傳統平板電泳的缺點，1967年 Hjerten 利用直徑 3 mm 的石英管，並以甲基纖維素修飾管壁，再將石英管繞著縱軸緩慢的旋轉以減低溶液的熱對流，成功地分離無機離子，蛋白質、核酸及病毒<sup>[2]</sup>。1974年 Virtanen 使用內徑 200~500 μm 的玻璃毛細管進行電泳分離實驗，證實了較小內徑的毛細管可以有效地控制焦耳熱的產生<sup>[3]</sup>。現今大家所熟知的毛細管電泳則是由 Jorgenson 和 Lukacs 在 1981 年開發出的，他們利用內徑 75 μm 的玻璃毛細管柱分離經過衍生的胺基酸<sup>[4]</sup>，並以螢光偵測器進行線上 (on-line) 偵測，得到的理論板數達四十萬以上，證明毛細管電泳的確是一種高效率的分離技術。

電泳是分離帶電物質的方法，而中性物質因本身不帶電，並不會受到電場的影響，因此無法利用毛細管電泳來進行分離。1984 年日本科學家 Terabe<sup>[5]</sup> 發展出微胞電動毛細管層析 (Micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC or MEKC)，這是在毛細管中利用添加有高濃度界面活性劑的緩衝溶液，使其形成微胞相。由於微胞本身帶正電或負電，可以在毛細管內電泳，配合待測物分子相對於微胞相的疏水性或親水性不同的特性，可以分離不帶電的中性分子，如芳香族化合物等。1985 年 Tsuda<sup>[6]</sup> 在毛細管中填充表面含有固定相的顆粒，施加高電場進行分析，這就是所謂的毛細管電層析 (capillary electrochromatography, CEC)，同年，Hjertén

與 Zhu將傳統電泳等電聚焦方法應用在毛細管電泳上，發展出毛細管等電聚焦電泳<sup>[7]</sup> (capillary isoelectric focusing, CIEF)，可依據分析物（如蛋白質）的等電點（pI）不同而達分離。1987年Cohen和Karger將傳統的凝膠電泳技術應用在毛細管，他們利用polyacrylamide做為毛細管的填充物，提出了毛細管凝膠電泳(capillary gel electrophoresis, CGE)<sup>[8]</sup>，其主要應用於蛋白質等生化大分子的分離。近幾年來，Reyes 與 Auroux 等人將電泳技術應用到微晶片 (microchip)<sup>[9-10]</sup>，在微晶片上蝕刻小的通道，並在其中進行電泳分離，其優點為分析時間更短、成本低、樣品使用量更少、高通量 (high-throughput) 與多重性 (multiplex) 設計容易。未來晶片電泳的發展趨勢為將所有的實驗流程都結合在同一個晶片上，即所謂的晶片實驗室 (lab-on-a-chip)<sup>[11]</sup>。

毛細管電泳最主要的特色有三個：一、分離效率高；二、分析速度快；三、所需樣品微量。1988年商品化的毛細管電泳儀上市後，更增加其使用的便利性，而毛細管電泳儀發展至今結合了自動進樣的功能，對分析的再現性與效率而言提升了許多，因此毛細管電泳在在各方面的應用日漸普遍，如：環境檢測<sup>[12-15]</sup>，生化醫學分析<sup>[16-19]</sup>，製藥分析<sup>[20]</sup>、刑事化學上槍擊或爆炸殘餘物與DNA的鑑定分析<sup>[21-23]</sup>。毛細管電泳與質譜儀的結合<sup>[24-25]</sup>更可提供分析物之分子量和化學結構的判斷。毛細管電泳已成

為化學分離中一種重要的技術。

## 二、毛細管電泳的分離原理

毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE) 的基本裝置如圖 (一), 其主要是由高壓電源供應器、緩衝溶液瓶、毛細管、偵測器所構成。實驗時, 將電泳緩衝溶液充滿於毛細管中, 其兩端分別插入置有白金電極的緩衝溶液瓶內, 再將一端連接高電壓電源供應器, 一端接地, 形成迴路。當樣品離子注入充滿電泳緩衝溶液的毛細管後, 提供一直流電壓, 各種樣品離子在毛細管中受電場影響會產生不同的移動速度<sup>[ 26-27 ]</sup>, 而達到分離的目的。

電泳的分離是依據不同樣品離子在電場下會產生不同泳動速度。離子在電場中的泳動速度可以式 (1) 表示：

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

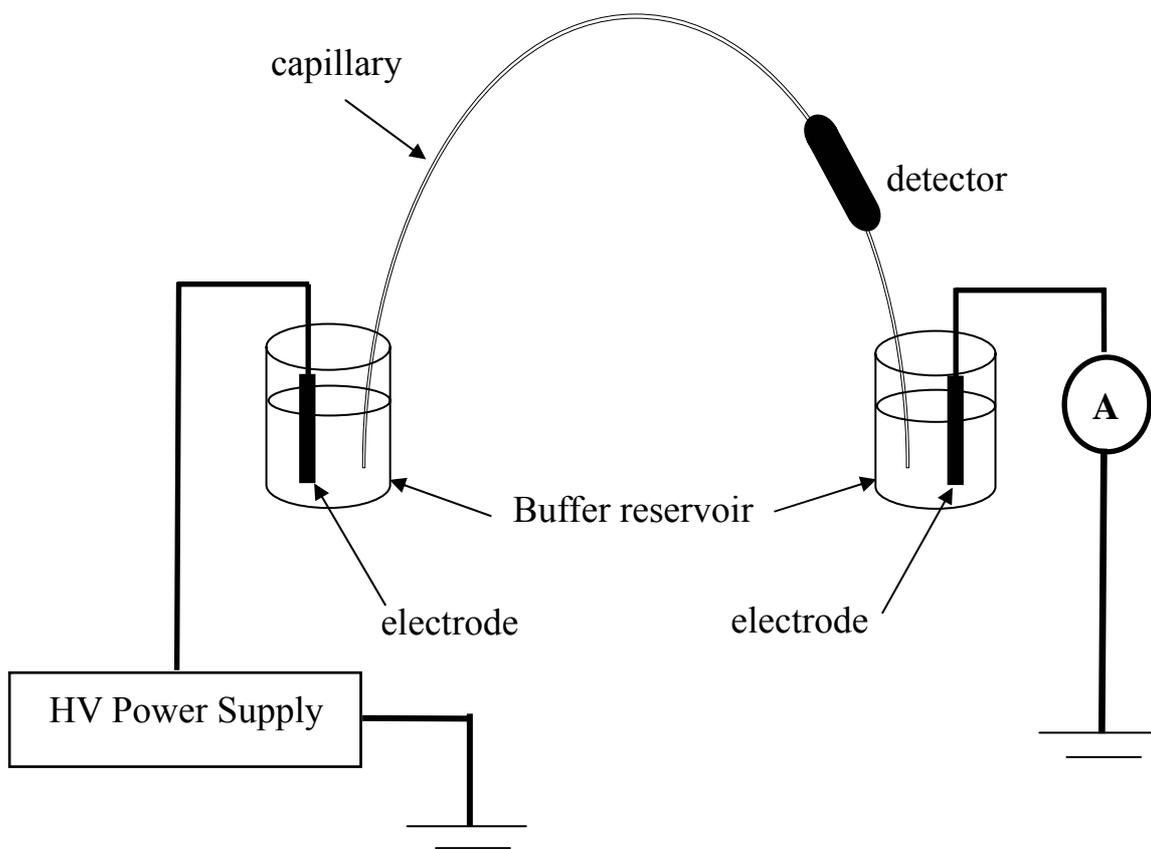
$v_e$ ：樣品離子的泳動速度 (m/s)

$\mu_e$ ：電泳淌度 ( $m^2/V \times s$ )

$E$ ：電場強度 (V/m)

$V$ ：外加電壓 (V)

$L_t$ ：毛細管總長度 (m)



圖(一)毛細管電泳儀器裝置圖

CE分離的另一個驅動力是電滲流 (electro-osmotic flow, EOF)。由於毛細管材質主要為熔融矽，當緩衝液的pH $\geq$ 2時，毛細管內壁表面的矽醇基 (SiOH) 會解離成SiO $^-$ 而帶負電，緩衝溶液中帶正電的離子會被管壁所吸引，形成電雙層 (electric double layer)。若在毛細管兩端施加高電壓，擴散層中的水合正離子會帶動整個溶液朝陰極方向移動，此現象稱為EOF<sup>[28]</sup>。EOF的速度一般比離子的電泳速度還要快很多 (一個級數以上)，因此在電泳過程中，不論是陰離子，陽離子或中性物質，都會隨EOF往負極移動，其中陽離子移動得最快，中性物質次之，陰離子移動得最慢。EOF的速度可以(2)式表示：

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

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

$v_{eo}$ ：電滲流流速 (m/s)

$\mu_{eo}$ ：電滲流淌度 (m<sup>2</sup>/V×s)

$\varepsilon$ ：電泳溶液的介電常數 (C<sup>2</sup>/J×m)

$\zeta$ ：管壁電雙層中的 Zeta 電位 (V)

$\eta$ ：電泳溶液的黏度 (N×s/m<sup>2</sup>)

毛細管內的樣品離子因其本身的電泳及 EOF 的雙重影響，會產生一淨移動速度  $v$ ，以 (4) 式表示：

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

$v$ ：電泳淨速度 (m/s)

樣品離子在毛細管內的移動時間，可以式 (5) 表示：

$$t = \frac{L_d}{v} = \frac{L_d}{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot E} = \frac{L_d \times L_t}{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot V} \quad (5)$$

$t$ ：樣品離子在毛細管中的遷移時間 (s)

$L_d$ ：毛細管樣品注入端到偵測器的長度(有效長度)(m)

CE的分離效率可以理論板數 ( $N$ ) 描述，如下式 (6)：

$$N = \frac{L_d}{H} = \frac{L_d^2}{\delta^2} = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \times L_d \times E}{2 \times D} \quad (6)$$

$H$ ：理論板高度 (m)

$D$ ：樣品離子在電泳溶液中的擴散係數 ( $m^2/s$ )

$\delta^2$ ：變異度 (variance)

當所紀錄的分析物訊號峰為對稱的高斯峰時，N 可利用下式計算：

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t}{W_{0.5}} \right)^2 \quad (7)$$

$W_{0.5}$ ：訊號峰的半高寬 (s)

CE分離的解析度R，可以式(8)表示

$$R = \frac{1}{5.7} (\mu_{e,1} + \mu_{e,2}) \times \left[ \frac{V}{D(\mu_{e'} + \mu_{eo})} \right]^{1/2} \quad (8)$$

R：解析度

$\mu_{e'}$ ：兩種離子的平均電泳淌度 ( $\text{m}^2/\text{V}\times\text{s}$ )

$\mu_{e,1}$ ：樣品離子 1 的電泳淌度 ( $\text{m}^2/\text{V}\times\text{s}$ )

$\mu_{e,2}$ ：樣品離子 2 電泳淌度 ( $\text{m}^2/\text{V}\times\text{s}$ )

由式(8)可知，當EOF與電泳淌度的方向相反時，兩者的正負號不同、分母變小，相對的解析度變大，可得到較好的解析度。

### 三、毛細管電泳的分離模式

CE技術至今已發展出多種操作模式，不同的分離模式其分離機制也不盡相同。目前較普遍的分離模式有下列幾種：毛細管區帶電泳 (Capillary

zone electrophoresis, CZE )<sup>[4]</sup>；微胞電動毛細管層析 ( Micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC or MEKC )<sup>[5]</sup>；毛細管凝膠電泳 ( Capillary gel electrophoresis, CGE )<sup>[8]</sup>；毛細管等速電泳 (Capillary Isotachopheresis, CITP )<sup>[29]</sup>；毛細管等電聚焦法 ( Capillary isoelectric focusing, CIEF )<sup>[7]</sup>；毛細管電層析 ( Capillary electrochromatography, CEC )<sup>[6]</sup>。以上各種毛細管電泳操作模式的命名通常是按照其分離原理而來。

## 1. 毛細管區帶電泳 ( CZE )

CZE 是目前 CE 中最簡單且應用最廣的一種分離型式。樣品離子根據本身電荷與質量的不同，在毛細管內泳動形成不同的區帶而達到分離，應用範圍包括：胺基酸、蛋白質、鏡相異構物、離子態物種的分離。CZE 的分離模式有兩項值得注意：一、各分析物離子的電泳速度必須不相同；二、分析物離子或樣品基質避免吸附在管壁上。另外，為了提高分離的效果有時也會在緩衝溶液中添加界面活性劑修飾管壁，使用的界面活性劑包括陽離子、陰離子、及非離子性界面活性劑。但是，界面活性劑的濃度不得超過其臨界微胞濃度 ( critical micelle concentration, CMC )。

## 2. 微胞電動毛細管層析 ( MECC or MEKC )

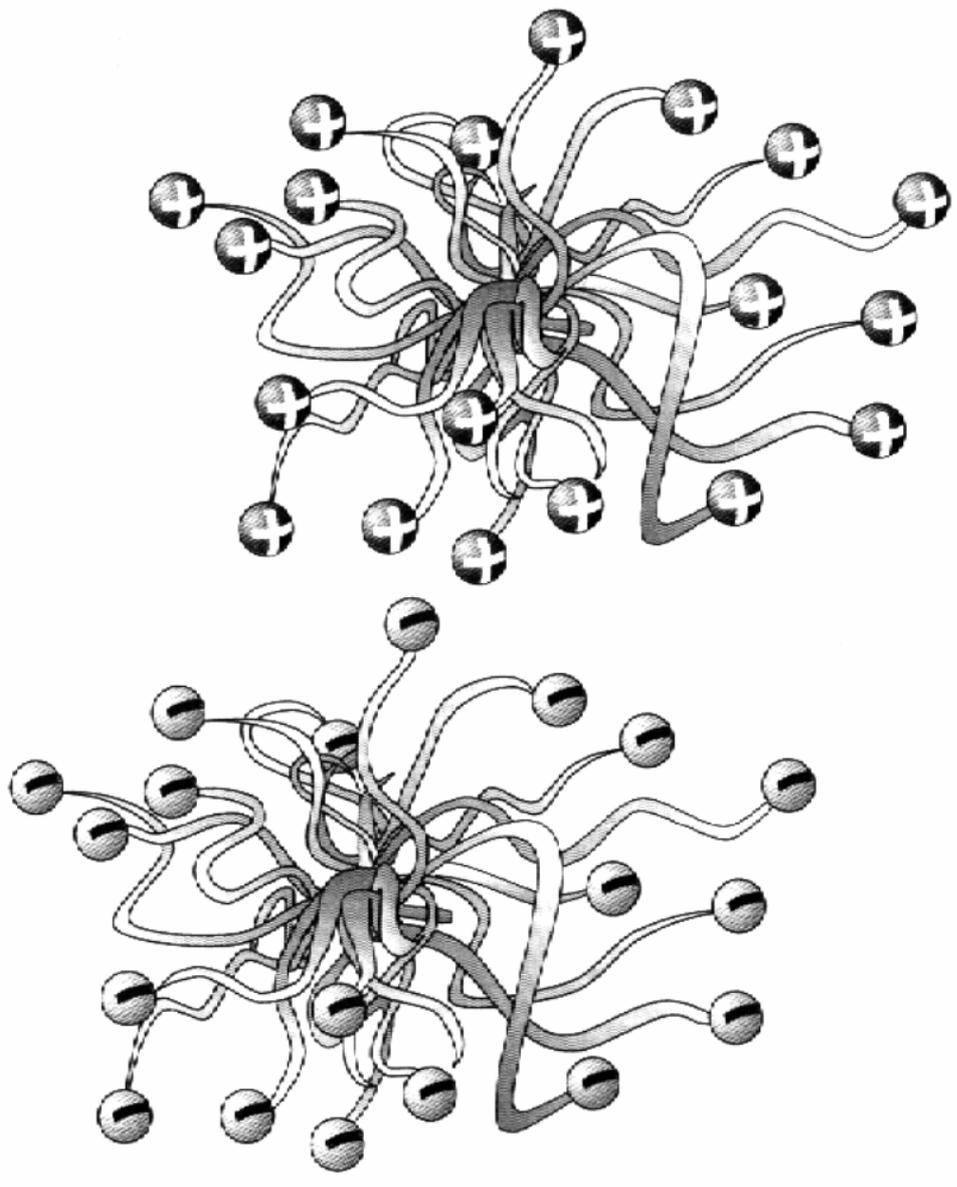
MEKC 為一種兼具電泳與層析的分離技術，它由日本姬路大學的寺部教授於 1984 年提出，是 CE 中應用最廣的方式之一，也是唯一既能分離中性溶質又能分離帶電離子的電泳技術。此技術是在電泳緩衝溶液中添加較高濃度的界面活性劑，當其濃度超過臨界微胞濃度時，界面活性劑分

子會聚集而形成微胞 (micelle)，圖(二)為界面活性劑形成的微胞示意圖，在團狀微胞結構中，界面活性劑分子疏水性的一端聚在一起向內排列而避開緩衝溶液，帶電荷的一端則朝向緩衝溶液。圖(二)上方與下方分別為陽離子及陰離子界面活性劑所形成的微胞。

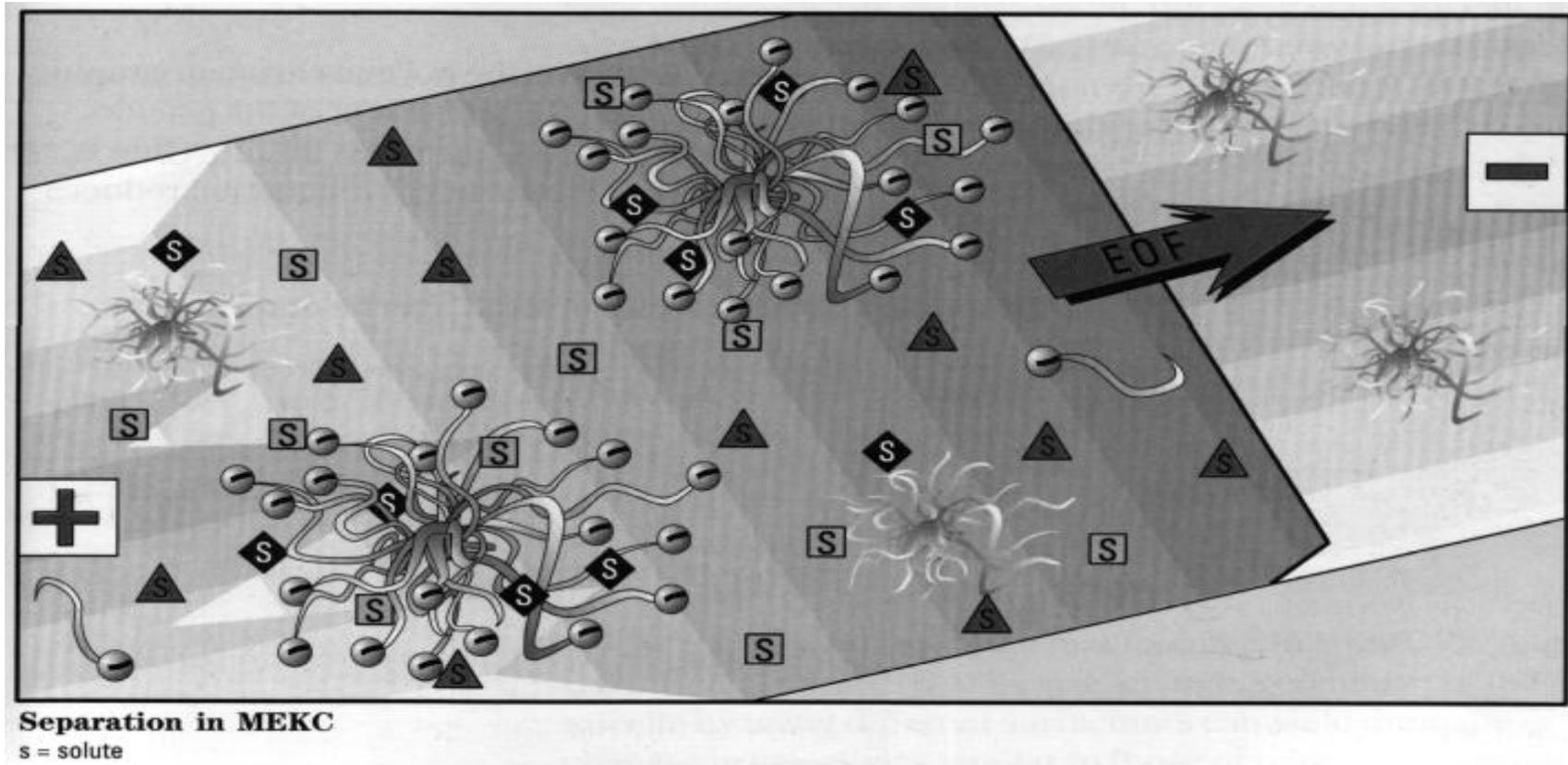
MEKC 分離的機制是以微胞之疏水性中心當作偽固定相 (pseudo stationary phase)，不同極性的樣品分子與微胞有不同程度的親和性，因而在微胞相與水相間產生不同的分配係數 (partition coefficient)，使樣品分子達到分離的效果。圖(三)為微胞電動層析的分離示意圖。對陰離子界面活性劑所形成的微胞而言，由於其外圍帶許多負電荷，使微胞的電泳朝向陽極遷移。一般在中性和鹼性 pH 下，EOF 的遷移速率遠大於微胞的電泳速率，且兩者移動方向相反，迫使微胞最終以較低的遷移速度朝向陰極移動。在 MEKC 中，可以使用不同的界面活性劑以形成具有不同聚合數、電性和形狀的微胞來控制其選擇性，就像在液相層析中改變固定相一樣，因此 MEKC 將毛細管電泳的適用範圍擴及中性物質的分離。

### 3. 毛細管凝膠電泳 (CGE)

CGE 具有極高的分離效率，其理論板數可達每米數百萬的程度。在此操作模式中，毛細管中添加了具特定孔徑大小的凝膠，其具有分子篩的功能，而且可做為電泳分離的介質。凝膠亦為非傳導性的介質，因此能減少溶質擴散而導致區帶變寬的現象，也可以抑制 EOF 及溶質或樣品基質吸附於毛細管管壁的情形。CGE 主要的分離機制是依據分子大小而分離，



圖(二)界面活性劑形成微胞的示意圖<sup>[30]</sup>



圖(三)微胞電動層析的分離示意圖<sup>[30]</sup>

相同荷質比但大小差異的溶質（例如核酸及蛋白質）在具分子篩作用的凝膠聚合物內移動速度不同，因而分離。雖然其分離機制與傳統凝膠電泳是一樣的，但是 CGE 的優點在於可施加較平板式凝膠電泳高 10-100 倍的電壓而不會產生焦耳熱效應，又具備了毛細管柱上檢測之簡易性和儀器的自動化。CGE 主要應用於分離生物大分子物質，例如 DNA、蛋白質、核酸、與碳水化合物。

#### 4. 毛細管等速電泳 (CITP)

CITP 是一種等速移動界面的電泳技術。其主要是在非連續的電解質系統中進行，此非連續的電解質是由前導電解質（leading electrolyte）與尾端電解質（terminating electrolyte）兩種不同的緩衝溶液所構成。前導電解質形成前端層帶，而尾端電解質形成末端區帶。在進行分離時，各種樣品離子形成的區帶夾在前端層帶和末端區帶之間，一起以等速移動。以分析陰離子為例，所選用的緩衝溶液，其使用前導電解質的陰離子電泳速度要大於所有樣品離子的電泳速度，而末端電解質的陰離子電泳速度則要小於所有樣品離子的電泳速度。當施加電場時，陰離子會往陽極移動，而前導電解質的陰離子移動的比樣品離子還快，末端電解質的陰離子移動的比樣品離子還慢。CITP 實驗通常以固定電流的方式進行，每一區帶的電場強度不一樣，在分離的過程中電場強度會自行調整以維持區帶的等速移動，遷移速度由前導電解質決定。另外，CITP 實驗的另一特色是各區帶內的離子濃度對遷移率的比值必須保持恆定，這取決於前導電解質的濃度。若溶質區帶的離子濃度低於（高於）前導電解質的濃度則溶質區帶發生壓縮（擴

張)，這種濃縮樣品的特性，也常被應用到 CZE、MEKC 和 CGE 的樣品前濃縮。

## 5. 毛細管等電聚焦法 (CIEF)

CIEF 是一項依據等電點 (isoelectric points, pI) 不同而分離蛋白質的電泳技術，它與傳統的凝膠等電點分離法類似。CIEF 的分離模式中，首先必須利用兩性電解質在毛細管內建立 pH 梯度，兩性電解質指同時具有酸性官能基和鹼性官能基的分子 (如胺基酸)。當毛細管中充滿待分離樣品 (蛋白質) 和兩性電解質後，pH 梯度會迅速建立起來。鹼性溶液在陰極，酸性溶液在陽極，施加電場後，帶電的兩性離子與蛋白質開始遷移，直到使樣品的靜電荷為零而停止，該 pH 值即是樣品自身的 pI，此一過程稱為“聚焦”。CIEF 之所以有此聚焦效應，是因蛋白質若處於不等於其 pI 的 pH 值區域時，將會帶電荷，如在低 pH 值時，蛋白質帶正電荷，會向陰極移動；在高 pH 值時，蛋白質帶負電荷，會向陽極移動，在電場的作用下，又遷移回到 pH 值等於其自身 pI 的區域。在 CIEF 中常利用塗覆或共價鍵結的方式修飾毛細管壁，以抑制 EOF，防止兩性電解溶液在蛋白質聚焦完成之前就流出毛細管或是蛋白質尚未濃縮聚焦完成就已流經偵測區。

## 6. 毛細管電層析 (CEC)

CEC 是一項融合了液相層析與毛細管電泳的新技術。在 CEC 操作模式中，毛細管內裝填有類似液相層析中常用的固定相物質，例如表面鍵結 C<sub>18</sub> 或 C<sub>8</sub> 的矽膠顆粒，或分離對掌異構物的 chiral selector 粒子，樣品除了利用原

有電泳的淌度差異外，更加入了疏水性與掌性的分離機制，使具有疏水性與掌性的分析物達成分離的目的。本操作模式對於中性分子的分離特別有效，而且可以很明顯減少分離時間。

#### 四、毛細管電泳的進樣方式

CE常用的進樣方式有以下兩種：電動進樣（electrokinetic injection）及流動進樣（hydrodynamic injection）<sup>[31]</sup>。流動進樣又包含壓力、真空與重力注入三種方法。當進行複雜樣品分析時常採用流動進樣的方式。

電動進樣是將高壓端的毛細管連同電極置入樣品槽中，施加一定時間的高電壓，使得樣品離子隨 EOF 進入毛細管。進樣量  $Q$  可以(9) 式表示：

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \times \pi r^2 \times V_i \times t_i \times C}{L_t} \quad (9)$$

$r$ ：毛細管內半徑 (m)

$V_i$ ：進樣時施加的電壓 (V)

$t_i$ ：注射時間 (sec)

$C$ ：樣品濃度 (mol/l)

由上式可知樣品中不同的分析物離子因電泳移動速率不同，進入毛細管中的量也會不同，注入的樣品組成無法代表原始樣品，在定量分析時

會有誤差，所以電動進樣一般用於定性分析。另外，樣品溶液與電解質溶液導電度若不相同，式(9)則不適用，即此式僅適用估算以電泳緩衝溶液配製的樣品溶液注入量。

壓力進樣、真空及重力進樣方法原理雷同，他們都是利用毛細管的進樣端與流出端的壓力差，使得樣品溶液進入管內，而三種進樣方式之中以重力進樣的方式最為簡便。重力進樣(或稱高度差進樣)是利用毛細管兩端的高度差產生的虹吸(siphoning)現象將樣品導入毛細管中，進樣量Q可以(10)式表示：

$$Q = \frac{\Delta P \times \pi r^4 \times t \times C}{8\eta L_t} = \frac{\rho \times g \times \Delta h \times \pi r^4 \times t \times C}{8\eta L_t} \quad (10)$$

$\Delta P$ ：毛細管兩端的壓力差 (Pa)

$\rho$ ：樣品溶液的密度 ( $\text{kg/m}^3$ )

$g$ ：重力加速度常數 ( $\text{m/s}^2$ )

$\Delta h$ ：毛細管兩端的高度差 (m)

$t$ ：進樣時間 (sec)

$\eta$ ：樣品溶液的黏滯係數 ( $\text{N}\times\text{s}/\text{m}^2$ )

由式(10)得知，流動進樣不需考慮各離子的泳動速率，不會有離子進

樣量的差異問題，適合用於定量分析。但是，當進樣時間較短時，再現性較差，若要克服此問題可藉由增加進樣時間來改進。

除了上述兩種樣品進樣模式外，尚有分液進量系統 (split flow syringe injection system)<sup>[32]</sup>、旋轉型注射器 (rotary-type injector)<sup>[33]</sup>、微注射器 (microinjector)<sup>[34]</sup>等其他進樣的方法，但一般較少使用。

## 五、毛細管電泳的偵測方式

近年來，CE 已經成為普遍的分析工具，因為其具有高分離效率，高解析度，分析時間短與樣品使用量少等優點。然而，由於毛細管只能承受很少量的樣品體積 (10 nL)，並且其光徑較短 (10-100 $\mu$ m)，在分析微量樣品時常常遭遇偵測靈敏度不足的問題，選擇一高靈敏度的偵測方法是一項重要的課題。管柱上光學偵測 (on-column optical detection) 由於不需介面或連接裝置，可避免因檢測器間隙體積 (dead volume) 所導致的解析度降低現象，為目前廣泛使用的檢測模式。管柱上光學偵測法主要包括紫外-可見光吸收偵測及螢光放射偵測兩種。

### 1. 紫外-可見光 (UV-VIS) 吸收偵測

紫外-可見光 (UV-VIS) 吸收偵測是目前CE應用最廣泛的偵測方法。

雖然由於毛細管的內徑窄，偵測光徑短，導致偵測靈敏度較差，一般所能測得的分析物濃度約為  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  M，但因所適用的分析物範圍廣，且儀器設計簡單，仍是目前最普遍使用的偵測方式。

紫外-可見光吸收偵測法靈敏度不高，但可藉由增長光徑來改善靈敏度，常用的幾種方式包括使用氣泡型容槽 ( Bubble cell )<sup>[35]</sup>、Z形容槽 ( Z-shaped flow cell )<sup>[36]</sup>與多重反射式容槽 ( multiple reflection cell )<sup>[37]</sup>。在不影響分離解析度之下，氣泡型容槽可以提升大約 3~8 倍的偵測靈敏度；Z形容槽約可提升 10 倍的偵測靈敏度；而多重反射式容槽提升的倍率最高，靈敏度可提升 40 倍。

## 2. 螢光放射偵測

螢光是一種光放射現象，當一個適當波長的光照射具有螢光性質的分子，分子會吸收光而被激發至高能量狀態，並在極短時間 ( $10^{-8} \sim 10^{-4}$  秒) 內，回復至低能量狀態，同時將多餘能量以放光的形式釋出，此即為螢光。毛細管電泳的螢光放射偵測如同HPLC的螢光放射偵測一樣，具有高的靈敏度與選擇性。但是以傳統光源進行毛細管電泳的螢光放射偵測時，其靈敏度僅優於UV-VIS吸收偵測 1~2 個級數，其主要問題在於傳統光源不易聚焦在微小的毛細管內，毛細管壁產生的迷光，常限制了螢光偵測的靈敏度。

CE的螢光放射偵測系統中，傳統光源包括汞、氬、氫、鎢等電弧燈。由於這些光源發射連續波長的輻射，使用時需先以濾片或單光器將特定波長的光分離出，如此可降低光源的干擾，但同時也因激發光強度的大幅減少，降低了螢光偵測的靈敏度，一般偵測極限在  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  M左右。

雷射具有高強度、易聚焦及同調性 (coherent) 的特點，所以特別容易以透鏡聚焦在毛細管上。CE搭配雷射激發螢光偵測在 1985 年由Zare<sup>[38]</sup> 首先提出，他以 325 nm 氬／鎢雷射為激發光源，利用透鏡聚焦於毛細管內，激發經分離後的dansylated amino acids螢光，偵測極限約  $10^{-18}$  mol。目前文獻上報導配合CE的雷射激發螢光 (LIF) 最低偵測極限可達  $10^{-21}$  mol<sup>[39]</sup>。商品化的LIF偵測器由於價格昂貴且波長受到限制，使用並不普遍，大多數的裝置都是在實驗室依照需要自行組裝，也因此雷射的種類，聚焦方式，螢光的收集及偵測方法上會有不同<sup>[40]</sup>。雖然雷射光源一般受到波長選擇性的限制，但是隨著雷射介質 (laser medium) 種類的增加，已有許多不同波長的雷射，尤其是半導體或二極體雷射可供選擇，增加了雷射應用的廣泛性。

二極體雷射是近年來受到相當重視的雷射光源之一，它具有價格低，壽命長 (約 50000 小時)，體積小，穩定度高，不需保養<sup>[41]</sup>等優點，適合做為毛細管電泳的LIF偵測光源。雖有文獻報導應用近紅外光二極體雷射

( 785/780 nm ) 與紅光二極體雷射( 635/670 nm )<sup>[41-43]</sup>於CE-LIF的偵測，但是，適用上述波長範圍中的衍生試劑非常少，因此發展較短波長的二極體雷射，可使其應用更廣泛。藍紫光( 405 nm )二極體雷射是 1999 年由日本 Nichia公司所開發出來的新型雷射，由於此雷射的波長短，使用在DVD錄放影機可儲存 27.4 Gbyte高容量的數據，與現今DVD的雷射儲存 8.54 Gbyte容量相比，新型的雷射數據儲存容量較傳統的高出 3 倍之多<sup>[44]</sup>，因此，藍紫光雷射未來將取代目前廣泛使用的紅光二極體雷射用於雷射印表機與DVD錄放影機之讀寫頭。2000 年Melanson 與Lucy<sup>[44]</sup>首先將藍紫光二極體雷射( 405 nm )成功的應用於CE-LIF偵測分析 15 種胺基酸。由於配合此雷射波長之衍生劑種類較多，二極體雷射未來將可成為CE-LIF偵測中重要的光源。

為了廣泛利用高靈敏度的LIF偵測，不具螢光性質的物質需先進行衍生。進行衍生反應的目的，除了可改變分析物的特性，以增進分離效率與穩定性，更重要的是使不具螢光性質的分析物分子接上具有螢光性質的官能團，而能進行直接螢光偵測。衍生反應可分為管柱前 ( pre-column )、管柱中 ( on-column ) 及管柱後 ( post-column ) 三種衍生進行方式<sup>[45]</sup>。管柱前衍生是目前最主要的應用模式，其優點包括：一、不需更改CE的儀器設備，操作容易；二、可依衍生反應的需要選擇與CE系統不互溶的溶劑；三、屬於off-line的模式，不受衍生反應進行的速度影響，因此對於需花費較長

時間的衍生反應也可適用。管柱中衍生是讓分析物在毛細管中進行衍生、分離，一般而言所使用的衍生劑必需要限制在衍生反應後才具有螢光性質，並且要衡量分析物在毛細管中所停留的時間。此操作模式最大的問題在於毛細管中過量的衍生劑可能干擾分離，因此管柱中衍生是目前最少應用的模式。管柱後衍生是分析物分離後再進行衍生，因此衍生劑並不會影響前段的分離，但此操作模式需額外加入一個導入衍生劑的裝置，如此設計可能會產生間隙體積而降低分離效率。過量的衍生劑也可能造成高偵測背景，因此衍生劑注入的量與時機都必須精確控制。

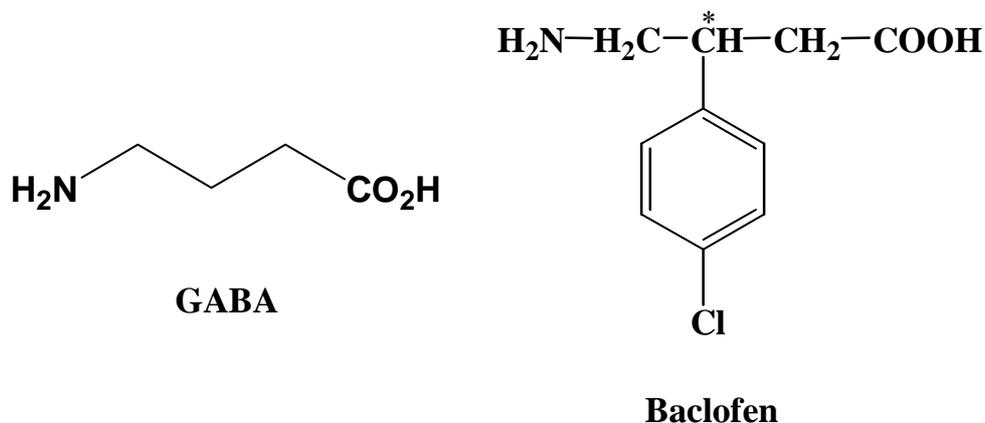
近年來另有其他配合CE的偵測方式發展出來，例如：化學放光偵測<sup>[46]</sup>、電激發化學放光偵測<sup>[47-48]</sup>、安培偵測法<sup>[49-51]</sup>、電化學偵測<sup>[52-54]</sup>與質譜偵測<sup>[55-56]</sup>等，這些偵測方法通常需要特殊的界面，儀器的設計較複雜，因此應用尚不普遍。

## 六、Baclofen 的簡介

## 1. 藥理性質

Baclofen ( 4-amino-3-p-chlorophenylbutyric acid ) 是一種肌肉鬆弛劑，臨床上常被用來做為治療肌肉痙攣的藥物<sup>[57]</sup>。Baclofen之化學結構如圖(四)，其結構類似可抑制神經傳導的物質GABA (  $\gamma$ -aminobutyric acid )，baclofen不同於GABA的是它含有*p*-chlorophenyl結構與一個不對稱中心。Baclofen為具有鏡像異構物之藥物，就其藥物動力學與毒物學而言，R(-)-enantiomer 較S(+)-enantiomer具有活性，相對的也較具毒性<sup>[58-59]</sup>，此外，S(+)-enantiomer 會抑制 R(-)-enantiomer 的反應性，因此單含 R(-)-enantiomer的baclofen會比消旋 ( racemic ) 的baclofen更具藥效。

正常人服用 20 mg Baclofen後經由腸胃道快速吸收，在 2-4 小時內達到血液中最高濃度約 1.5  $\mu$ M，也就是此藥的最大作用期。經過 22-24 小時，由於人體的代謝，血液中baclofen濃度只剩 0.1  $\mu$ M左右<sup>[60]</sup>。Baclofen吸收之後作用於大腦和脊髓，抑制脊髓內神經元發出的痙攣反射指令，阻斷神經衝動傳導，使緊張硬化的肌肉可以獲得鬆弛。此種藥品常見的副作用為：疲倦、噁心、虛弱、頻尿、頭痛與頭暈等等，但是這些副作用通常在服用藥物一陣子後，便會漸漸消失。另外，此藥還有一些較嚴重的副作用：手腳顫抖、心跳突然加快、耳鳴、肌肉痛、胸口疼痛、精神沮喪與精神恍惚等，但發生的機率較低<sup>[57-59]</sup>。



圖(四) GABA 與 baclofen 結構圖

## 2. 分析方法

根據文獻報導，早期分析生物體液（血漿、尿液與腦脊髓液）中的 baclofen 含量，主要以氣相層析（gas chromatography, GC）與高效能液相層析（liquid chromatography, LC）為主，近年來，具有高分離效率與高靈敏的 CE-LIF 偵測的技術，亦發展成為分析 baclofen 的工具。

由於 baclofen 不具有揮發性，以氣相層析分析的相關文獻並不多，Degen 與 Riess<sup>[57]</sup> 以萃取和衍生的技術配合 GC/電子捕捉偵測器首次分離 baclofen，血液與尿液中 baclofen 的偵測極限分別為 3  $\mu\text{g/ml}$  與 50  $\mu\text{g/ml}$ 。Swahn<sup>[61]</sup> 等人以 GC 結合質譜儀（MS），分析腦脊髓液與血漿中的 baclofen，偵測極限為 5  $\text{ng/ml}$ 。在 baclofen 異構物的分離方面，Sioufi<sup>[62]</sup> 等人利用具有對掌性質的 GC 管柱，成功分離 baclofen 的對掌異構物，血液與尿液中的定量

極限分別為 25 nmol/l與 2 μmol/l。

血漿、尿液與腦脊髓液中的 baclofen 分析大多以液相層析為主。Harrison<sup>[63]</sup> 等人利用 HPLC 配合 UV/VIS 偵測分析血漿中的 baclofen。另外 Wuis<sup>[64]</sup> 等人也以逆相 HPLC 配合 UV/VIS 偵測尿液中的 baclofen，偵測極限為 50 ng。在文獻中亦有報導以 o-phthalaldehyde (OPA)<sup>[65]</sup> 和 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)<sup>[60]</sup> 為螢光衍生劑，利用管柱前衍生的方法，配合 HPLC 螢光偵測器分析血漿與尿液中的 baclofen，以 OPA 為螢光衍生劑的方法中，血液與尿液中 baclofen 的偵測極限分別為 1.5 ng 與 5ng；以 NBD-Cl 為螢光衍生劑的方法中，血液與尿液中 baclofen 的偵測極限分別為 20 ng/ml 與 100 ng/ml。OPA 與 baclofen 的衍生產物易分解，其穩定狀態僅可維持 25 分鐘，因此必須注意實驗時間的控制。Mignot<sup>[66]</sup> 等人利用固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE) 前處理血漿樣品，以 OPA-tert.-butanethiol 進行衍生，再藉 HPLC/電化學偵測分析血樣中的 baclofen，定量極限為 10 ng/ml。Zhu 與 Neirinck 利用 HPLC 鏡像管柱，於移動相中添加 CuSO<sub>4</sub> 分離血樣中之 baclofen 對掌異構物<sup>[67]</sup>，配合 UV 偵測，偵測極限為 20 ng/ml。Flärdh<sup>[68]</sup> 等人以串聯質譜儀 (tandem MS) 為偵測器，配合 HPLC 分析血液中的 baclofen 並提供詳細的結構資訊，定量極限為 10 nmol/l。Goda 等人<sup>[69]</sup> 以高靈敏度之液相層析-串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 配合

CROWNPAK CR(+)<sup>®</sup>鏡像管柱，分離血漿中baclofen 之鏡像異構物，定量極限為 0.15 ng/ml。

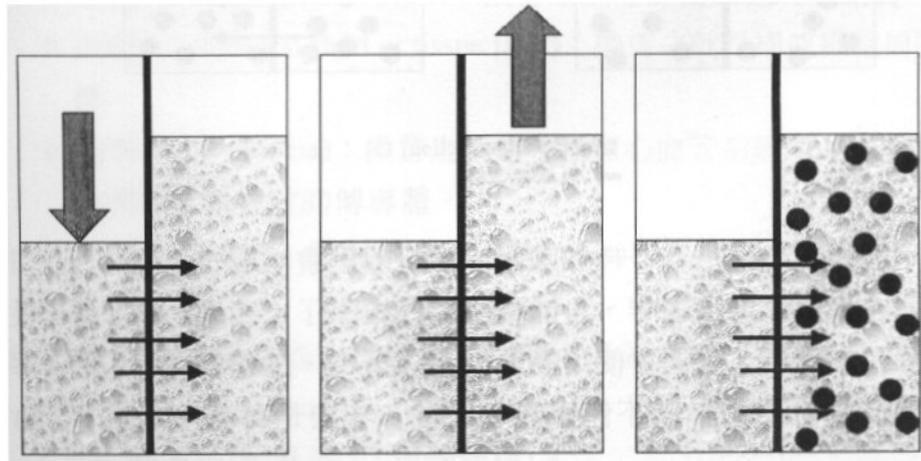
以CE-LIF偵測分析baclofen在文獻上亦有報導。本實驗室的學姊曾分別利用氦鎘 (He/Cd) 雷射 (442 nm) 配合Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) [70]與氬離子 (Ar<sup>+</sup>) 雷射 (488 nm) 配合 6-carboxyfluorescein succinimidy ester (CFSE) [71]衍生分析baclofen，偵測極限分別為 10 ng/ml 與 21 ng/ml。此外，Chang 與 Yang [72] 以anthracene-2,3-dicarboxaldehyde (ADA)衍生劑，配合毛細管電泳/氬氖 (He/Ne) 雷射 (543 nm) 激發螢光偵測分析血樣中的baclofen，偵測極限 0.3 μM，提供了低價位雷射光源之選擇。Whang 等人 [73]與Ali等人 [74]分別於電泳緩衝溶液中添加α-cyclodextrin (α-CD)及β-cyclodextrin (β-CD)，以毛細管電泳分離 baclofen 之鏡像異構物。

### 3. 樣品前處理

從事真實樣品的分析時，無論選擇那一種分析方法，分析人員必會遇到同一個問題——樣品前處理。當進行血樣中的baclofen分析時，血樣裡複雜的基質會常造成分離及偵測上的困難，因此必須針對血樣發展一套前處理的方法。在前一章節所敘述利用HPLC 分析baclofen的方法中，前處理方式大多採用固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)。雖然SPE可以成功的去

除大量的樣品基質，也可濃縮分析物，但其最大的缺點在於baclofen的回收率不佳，本研究分別採用以氫甲烷沉澱蛋白質及超過濾(ultrafiltration)兩種方式淨化樣品。氫甲烷不但可從血漿或血清樣品中沉澱蛋白質分子，氫甲烷在毛細管電泳中亦可誘發樣品濃縮的效應(樣品堆積效應)，因此以氫甲烷淨化血漿樣品適合用於CE分析。氫甲烷沉澱蛋白質的樣品前處理方法以往曾應用於baclofen的分析<sup>[70-72]</sup>。

超過濾是藉由幫浦或活塞產生正壓或負壓，來達過濾樣品的目的。超過濾的原理如圖(五)所示，圖A表示利用正壓力將水分子由左側經由半透膜推向右側；圖B表示利用負壓力，將水分子由左側經由半透膜吸向右側；圖C則是滲透作用所產生的滲透壓，將水分子由左側經由半透膜滲透到右側。血液透析(Hemodialysis)便是利用正負壓產生膜上壓(透析膜上的壓力 Transmembrane pressure, TMP)來淨化血液。超過濾亦可用於淨化血漿樣品<sup>[75]</sup>，此方法利用一固定孔洞大小的薄膜配合高速離心將低分子量分析物與高分子量蛋白質基質分離，達到樣品淨化的目的。Goda等人<sup>[69]</sup>利用超過濾去除蛋白質基質，配合LC/MS/MS偵測，成功地分析血漿中baclofen之鏡像異構物。



A.正壓

B.負壓

C.滲透壓

—— 代表半透膜；●代表大分子

圖(五) 超過濾之原理<sup>[76]</sup>

## 七、研究動機

目前文獻報導以 CE-LIF 偵測，大多仍利用傳統的氣體雷射，如：氫

離子雷射，氬氬雷射或氬鎘雷射為光源。傳統的氣體雷射通常價格昂貴、壽命短、體積大、雜訊高，本研究嘗試利用新的藍紫光(410 nm)二極體雷射為光源，配合 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester (DCCS) 衍生試劑，發展血樣中 baclofen 的 CE-LIF 分析方法。實驗中亦比較不同血漿樣品前處理方式以期降低偵測極限。

## 貳、實驗

### 一、儀器設備

1. 高壓電源供應器：Glassman High Voltage 公司( Whitehouse Station, NJ, USA ) 產品，Model PS/MJ 30P0400-11，提供直流電壓 0~30 kV。高電壓起動線路與樣品注射計時裝置為實驗室中自行設計組裝。
2. 藍紫色二極體雷射 ( Violet diode laser )：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model BWB-405-4E，雷射功率 4 mW。
3. CE/LIF 偵測裝置：實驗室自行組裝，所用元件為
  - a. 三稜鏡：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model E43498。
  - b. 470 nm 干涉濾片：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model E43062，有效帶寬 10 nm。
  - c. 聚焦鏡：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model D45079，焦距 1.4 cm。
  - d. 10 倍顯微接物鏡：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model D43903。
  - e. 反射鏡：Edmund Scientific 公司 ( Barrington, NJ, USA ) 產品，Model D33502。
  - f. 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：個人電腦，配合分析基礎開發中心 ( 台中，台灣 ) “層析

總管”4.7 版。

5. 數位/類比轉換器：IOtech公司（Cleveland, OH, USA）產品，Model Personal Daq/55。
6. 背景抑制器：實驗室中自行組裝，內含 1 秒的 RC low-pass filter，具有過濾雜訊之功能。
7. 不斷電系統(UPS)：New Seed(台中, 台灣)產品，Model NS-A102L，其輸入電壓 110 V/60 Hz，輸出電壓 110 V/60 Hz，最大可提供 9 A 電流。
8. 過濾薄膜：TITAN 公司（San Diego, CA, USA）產品，孔徑大小 0.45  $\mu\text{m}$ ，直徑 25 mm。
9. Ultrafree-MC 超過濾薄膜：Millipore 公司（Bedford, MA, USA）產品，孔徑大小 5000 NMWL（nominal molecular weight limit），型號：UFC3LCC25。
10. 酸鹼度計：Suntex 公司（台北，台灣）產品，Model SP-701。
11. 毛細管：Polymicro Technologies 公司（Phoenix, AZ, USA）產品，Model TSP-050375t，熔融矽材質（fused silica），內徑 50  $\mu\text{m}$ ，外徑 360  $\mu\text{m}$ ，外覆聚乙烯胺（polyimide）。
12. 微量離心機：DENVILLE 公司（Metuchen, NJ, USA）產品，Model Micro 240A。

13. 超音波震盪器：Branson 公司 (Danbury, CT, USA) 產品，Model 1200。
14. 烘箱：Kwang Shen 公司 (台北，台灣) 產品，Model KS-21。
15. 天平：日本電子科學株式會社 (Kyoto, Japan) 產品，Model AJ-100。

## 二、藥品

1. Baclofen : ( $C_{10}H_{12}ClNO_2$ ; 4-amino-3-p-chlorophenylbutyric acid), Sigma

- 公司 (Ellisville, MO, USA) 產品，分析級試藥。
2. DCCS : ( $C_{18}H_{18}N_2O_6$  ; 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester ) , Molecular Probe 公司 ( Eugene, OR, USA ) 產品，型號：D-1412，分析級試藥。
  3. PPA : (  $C_9H_{13}NO \cdot HCl$  ; phenylpropanolamine hydrochloride ) , Sigma 公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品，分析級試藥。
  4. 硼酸鈉 : (  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  ; sodium tetraborate decahydrate ) , E. Merck 公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品，分析級試藥，純度 99 % 。
  5. 氫氧化鈉 : ( NaOH ; sodium hydroxide ) , E. Merck 公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品，分析級試藥，純度 99 % 。
  6. 二甲基甲醯胺 : (  $CH_7NO$  ; Dimethylformamide, DMF ) , Malinckrodt 公司 ( Kentucky, USA ) 產品，HPLC級試藥。
  7. 甲醇 : (  $CH_3OH$  ; methanol ) , E. Merck 公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品，HPLC級試藥。
  8. 氰甲烷 : (  $CH_3CN$  ; acetonitrile, ACN ) , E. Merck 公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品，HPLC級試藥。
  9. Morin : (  $C_{15}H_{10}O_7$  ; 2,3,4,5,7-Pentahydroxyflavone ) , Fluka 公司 ( Buchs, Switzerland ) 產品，分析級試藥。
  10. 鋁標準溶液 : (  $Al(NO_3)_3$  in  $HNO_3$  ) , E. Merck 公司 ( Darmstadt,

Germany) 產品，1000 mg/L。

11. 十二烷基磺酸鈉： $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na})$ ；Sodium dodecyl sulfate, SDS)，Aldrich公司 (Milwaukee, WI, USA) 產品，純度 98%。

12. 實驗所用之純水是將自來水先經過軟化與蒸餾後，再經由 Barnstead 公司 (Dubuque, IA USA) NANO pure II deionization system 純化處理。

### 三、實驗方法

#### 1. 樣品儲存溶液 (stock solution) 的配製

- a. Baclofen：以去離子水配製成  $10^{-2}$  M 儲存溶液，置於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱，保存期一個月。使用時以 50 mM 硼酸鈉 (pH=8) 溶液稀釋至所需濃度。
- b. PPA：以去離子水配製成  $10^{-2}$  M 儲存溶液，置於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱，保存期約一個月。使用時以 50 mM 硼酸鈉 (pH=8) 溶液稀釋至所需濃度。實驗時做當內標準品溶液 (internal standard, I.S.)。
- c. DCCS 以 DMF 為溶劑，配製成  $10^{-2}$  M 溶液，由於藥品對光照敏感，需以鋁箔紙包裹容器，並置於  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱備用。

## 2. 電泳緩衝溶液的配製

以去離子水配製 50 mM 硼酸鈉與 10 mM SDS 的混合溶液為電泳緩衝溶液，並以 1N NaOH 溶液調整至 pH=9.5，此溶液於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中約可保存二個月。

## 3. 血漿樣品前處理

人血以針筒抽出後置於含有 EDTA 的乾燥試管中，立即以 700 g 離心 5 分鐘取得血漿，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。血漿樣品分析前須先去除其中的蛋白質大分子，本實驗以添加氰甲烷沉澱蛋白質和超過濾兩種方式去除蛋白質，並比較兩種方式所得到的實驗結果。

### a. 氰甲烷沉澱蛋白質

200  $\mu\text{l}$  血漿樣品中加入 200  $\mu\text{l}$  氰甲烷使蛋白質沉澱，經 8500 g 離心

15 分鐘，取出上層澄清液以 40  $\mu\text{l}$  體積分裝小瓶。分別取 10  $\mu\text{l}$  含有 PPA 及 baclofen 水溶液或 50 mM 硼酸鈉 (pH=8) 溶液添加入 40  $\mu\text{l}$  上層澄清液中，成為 50  $\mu\text{l}$  實驗樣品或空白背景。依實驗需要可添加不同濃度 baclofen 於澄清液中。進行回收率測試時，在去除蛋白質前添加 10  $\mu\text{l}$   $6 \times 10^{-5}$  M 與  $1 \times 10^{-6}$  M 的 baclofen 溶液於 190  $\mu\text{l}$  原始血漿中。

#### b. 超過濾

取一孔徑為 5000 NMWL 的 Ultrafree-MC 超過濾薄膜匣，將 90  $\mu\text{l}$  血漿樣品放置其中，再分別取 10  $\mu\text{l}$  含有 PPA 及 baclofen 水溶液或 50 mM 硼酸鈉 (pH=8) 溶液添加入上述血漿樣品內，經 6000 g 離心 30 分鐘，此時可收集到約 40  $\mu\text{l}$  的濾液，成為 40  $\mu\text{l}$  實驗樣品或空白背景。依實驗需要可添加不同濃度 baclofen 於血漿樣品中。進行回收率測試時，在超過濾前添加 10  $\mu\text{l}$   $3 \times 10^{-5}$  M 與  $3 \times 10^{-6}$  M 的 baclofen 溶液於 90  $\mu\text{l}$  血漿中，離心後收集濾液。

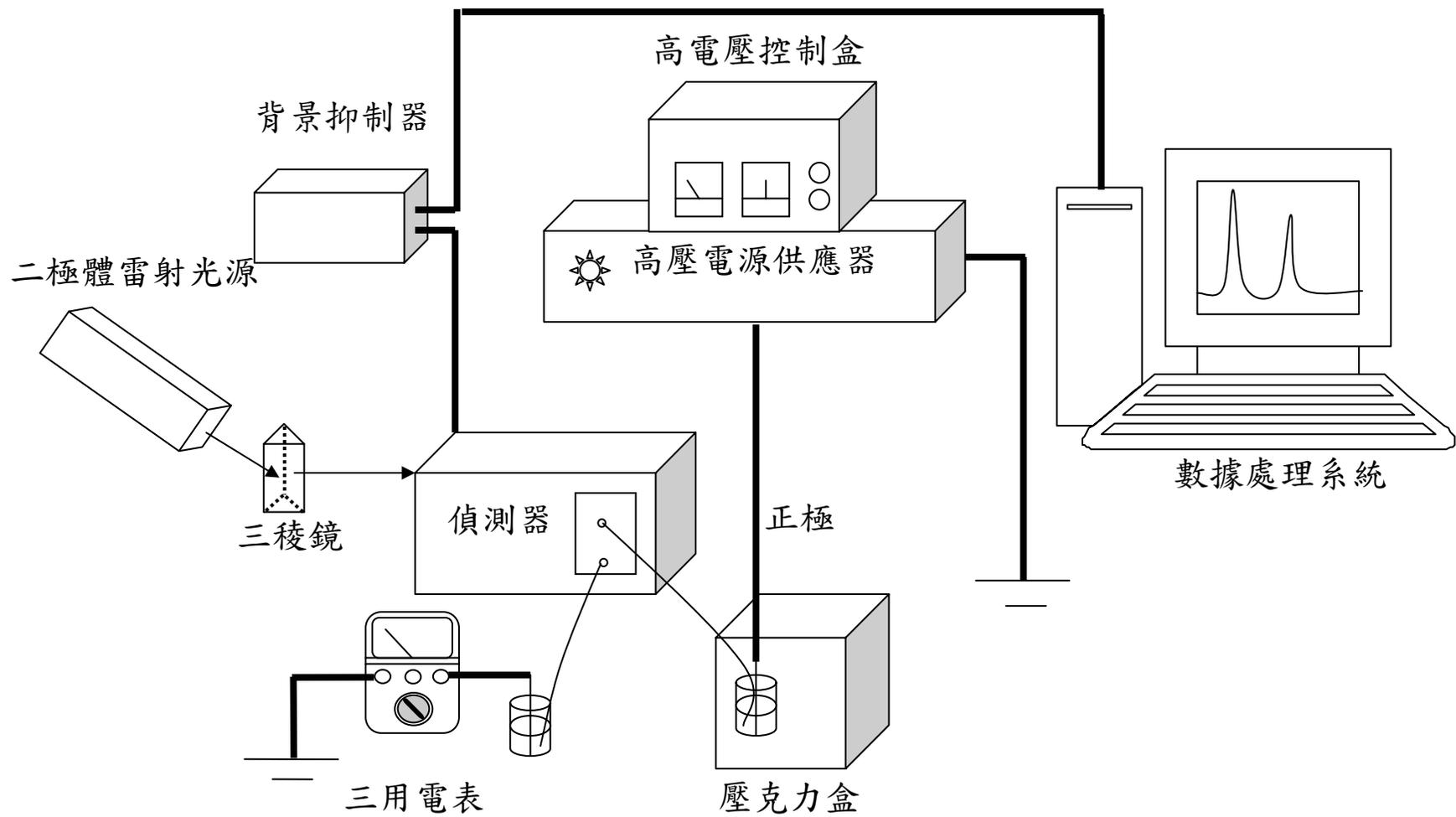
#### 4. 衍生反應

取 40  $\mu\text{l}$  標準樣品或去除蛋白質的血漿樣品於 500  $\mu\text{l}$  微量離心管中，先加入 40  $\mu\text{l}$  硼酸鈉溶液 (pH=8)，再添加 10  $\mu\text{l}$  10 mM 衍生劑 DCCS，以鋁箔紙包裹後充分搖晃混合，在室溫下於超音波震盪器中震盪 5 分鐘。

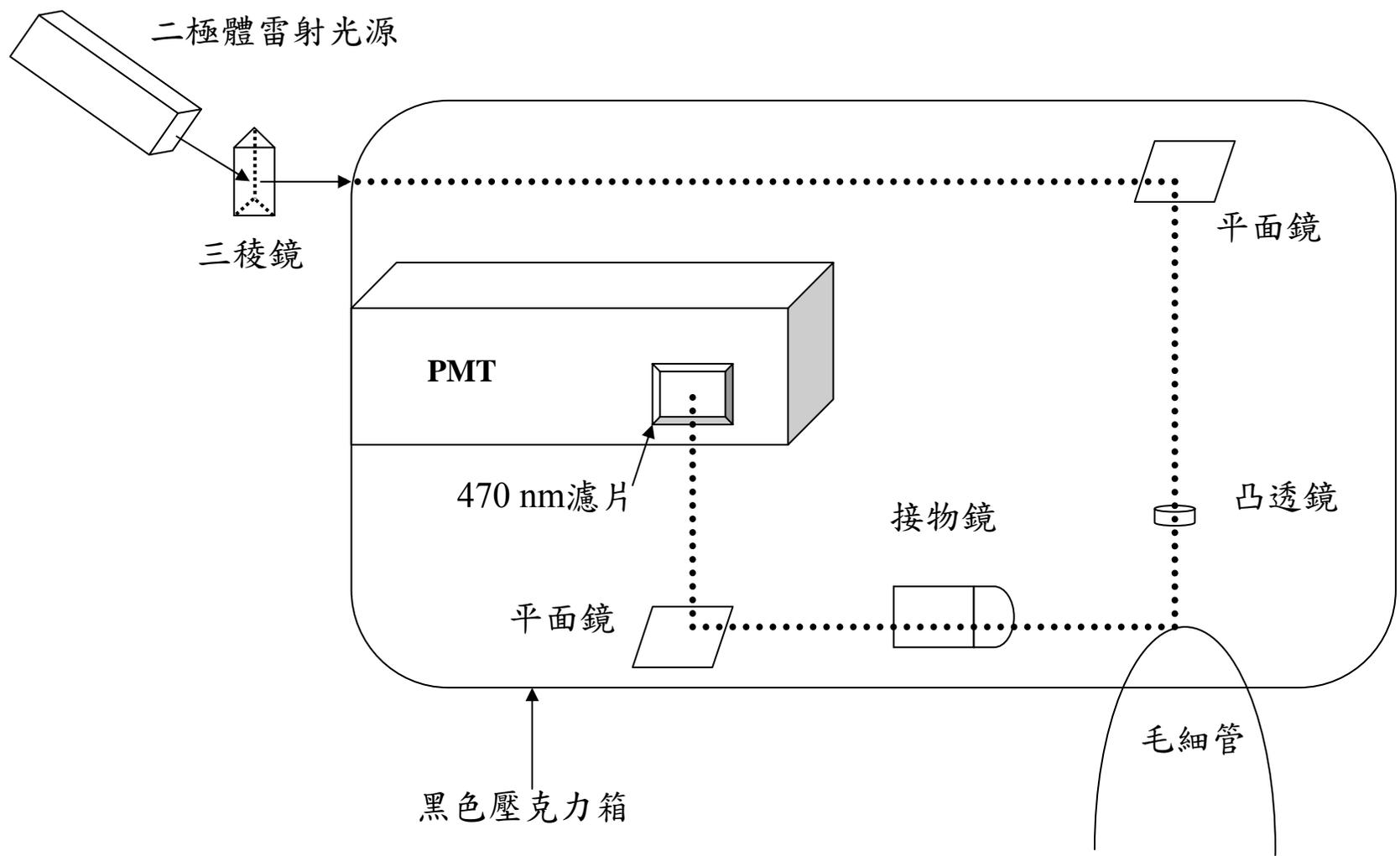
## 5. 毛細管電泳/雷射激發螢光偵測

CE-LIF 偵測裝置顯示於圖(六)。取一長 65 cm、內徑 50  $\mu\text{m}$ 、外徑 360  $\mu\text{m}$  之毛細管，在距離進樣端 45 cm 處以火焰燒去約 1 cm 的聚乙烯胺 (polyimide) 保護膜當作偵測視窗，並以甲醇擦拭乾淨。毛細管置於偵測裝置中，使偵測視窗對準雷射光徑，再將毛細管兩端由偵測裝置中拉出，以注射器將電泳緩衝液注入毛細管中，使其管柱內充滿電泳緩衝液。將毛細管兩端分別浸入充滿電泳緩衝液的瓶中，並使其液面等高。分別於緩衝液瓶中置入白金電極，將高壓電源供應器正極連接至毛細管進樣端緩衝液瓶中之電極，而偵測端電極則連接至地線，與高壓端形成一電流迴路。為了安全，毛細管的進樣端應置於透明壓克力盒中。

螢光偵測裝置細部如圖(七)，雷射光束先經過三稜鏡分離出實驗所需的藍紫色光束 (410 nm)，以平面鏡反射 90 度後進入偵測器中，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。在與雷射光束垂直的方向架設一顯微接物鏡收集由毛細管偵測視窗處分析物被激發的螢光，再經由另一平面反射鏡反射 90 度後，通過 470 nm 干涉濾片除去激發光與散射光，最後聚焦於光電倍增管 (PMT) 偵測器上，PMT 所產生的微弱電流



圖(六)毛細管電泳/雷射激發螢光偵測器裝置圖



圖(七)雷射激發螢光偵測器細部元件構造圖

藉由 picoammeter 放大並轉換為電壓信號輸出，再經背景抑制線路降低背景強度並過濾雜訊後，利用 A/D 轉換器及電腦收集並記錄處理。為隔絕外界光線干擾，所有光學元件均置放於黑色壓克力暗箱中。雷射光束路徑及各光學元件的最佳位置，均利用鋁與 Morin 形成的螢光錯合物校正。

## 6. 樣品注射方式與毛細管處理

本實驗所採用的樣品注入方式為重力注射，進樣時將正電壓端的毛細管提高 20 cm，放入樣品溶液瓶中 5~55 秒，分析物會因虹吸作用進入毛細管之前端，此時再將毛細管置回緩衝電解液瓶中。實驗前，先以去離子水沖洗毛細管 15 分鐘，再以電泳緩衝液沖洗 20 分鐘。實驗後，先以去離子水將毛細管中殘餘的電泳緩衝液徹底洗淨，再以分析級甲醇溶液清洗 20 分鐘，接著以去離子水沖洗 15 分鐘後，將毛細管保存於去離子水中。

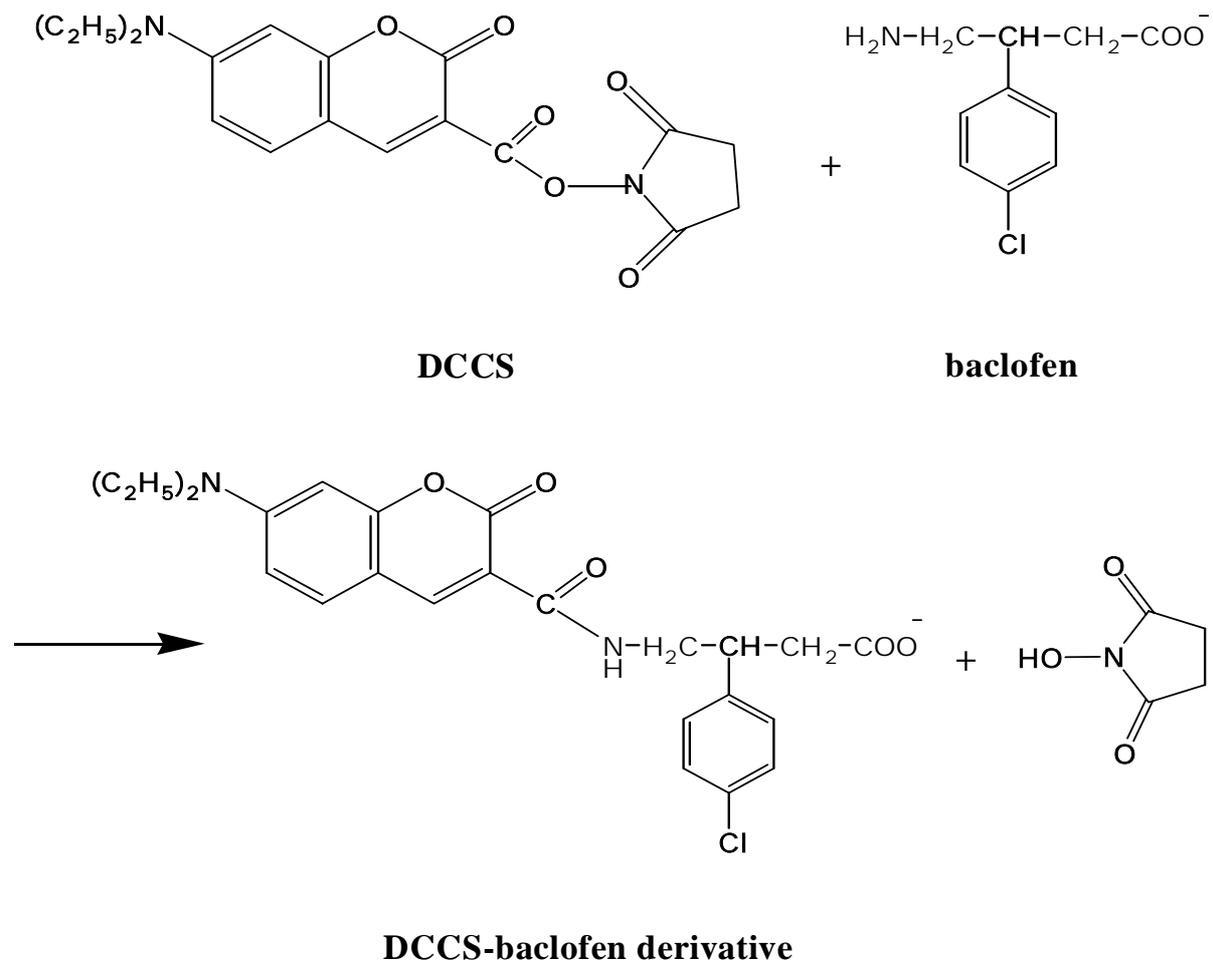
# 參、結果與討論

## 一、分析條件最佳化

### 1. 衍生反應

文獻中以藍紫色(405nm)二極體雷射為光源的 CE/LIF 偵測系統分析一級胺類化合物的報導只有一篇<sup>[44]</sup>，文中以naphthalene-2,3-dicarboxy aldehyde (NDA) 為衍生劑，與 15 種胺基酸進行衍生反應，再以CE分離。雖然實驗結果顯示靈敏度很高(偵測極限 10 nM)，穩定度亦佳，但是NDA衍生反應過程中必須添加親核基  $\text{CN}^-$ ，由於 $\text{CN}^-$ 在酸性條件下會轉變為毒性極高的HCN，在實驗中需非常小心。KCN或NaCN亦屬高危險性管制藥品。

本實驗採用 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester (DCCS) 做為衍生baclofen的螢光衍生劑。DCCS的最大吸收波長在 433 nm ( $\epsilon = 59\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $\text{pH} > 6$ )<sup>[77]</sup>，非常接近藍紫色二極體雷射之 410 nm放射線。根據文獻報導，Imasaka等人<sup>[78]</sup>曾以DCCS為衍生試劑，配合毛细管電泳/半導體雷射 (415 nm) 激發螢光偵測，在 6 分鐘內成功的分離 5 種胺基酸，其偵測極限可達 100 amol。DCCS與baclofen衍生反應的機制如圖(八)。利用baclofen結構上的一級胺基攻擊DCCS的succinimidyl ester，形成穩定的醯胺鍵結(amide bond)。衍生過程中多餘的衍生劑亦會進

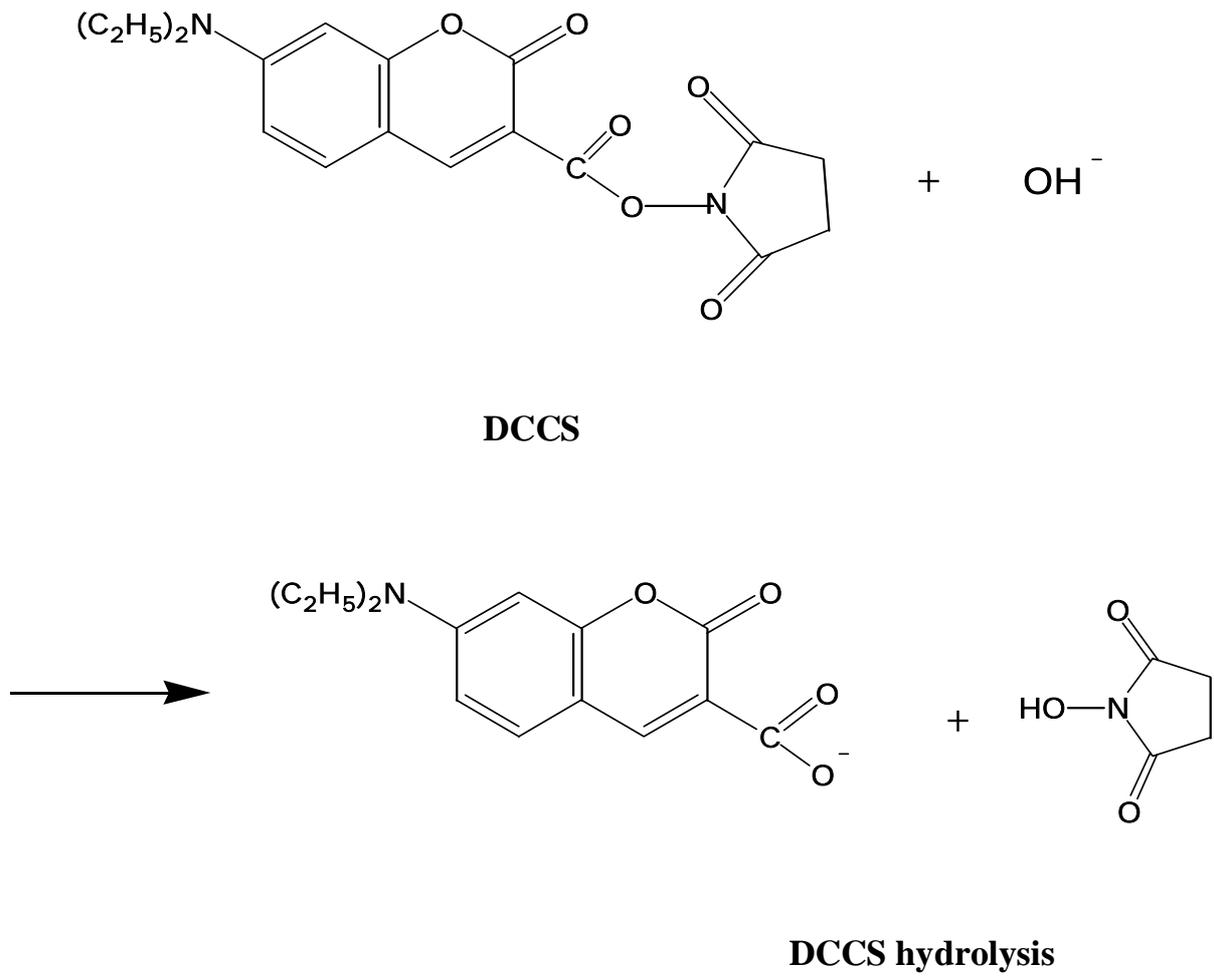


圖(八) DCCS 與 baclofen 的衍生反應

行水解反應，如圖(九)。

DCCS 與 baclofen 衍生反應之關鍵在於 baclofen 結構中的一級胺基能否維持非質子化的狀態，因此選擇一個適當的 pH 值對此衍生反應是很重要的。本研究首先探討衍生反應的 pH 值影響，實驗中以 50 mM 硼酸鈉控制衍生反應的 pH 在 7 ~ 10 之間，並以 CE/LIF 追蹤反應產物的訊號，結果顯示於圖 (十)。在 pH=8 時所得到的 DCCS-baclofen 訊號面積最大，換言之在 pH=8 時 baclofen 的衍生效果最佳。在 pH 值 7 ~ 8 之間 DCCS-baclofen 訊號面積隨 pH 增加而增大，原因可能是在較鹼性的條件下 baclofen 結構中的一級胺基較能維持在非質子化的狀態，有利於衍生反應的進行。當 pH 值繼續增大時訊號緩慢下降，並且 pH 值超過 9 時訊號下降特別快速，其原因可能是當 pH 升高時，溶液中之  $\text{OH}^-$  促使 DCCS 產生水解，尤其當  $\text{pH} > 9$  時，DCCS 水解情形更嚴重，限制了 DCCS 與 baclofen 衍生反應的進行。實驗結果符合文獻所述 succinimidyl ester 類衍生劑與一級胺類化合物的衍生反應適合在中性至微鹼性的 pH 下進行<sup>[79]</sup>。

其次探討衍生效率、衍生溫度以及衍生產物的穩定性。在衍生效率方面，實驗中以不同時間的超音波振盪輔助衍生進行，結果顯示於圖 (十一)。5 分鐘震盪時間 DCCS 與 baclofen 的衍生似乎即可達完全，且其衍生速度相對比 NDA 衍生劑來的快 (30 min)<sup>[44]</sup>。另外由圖中看出，當衍生時間增長，



圖(九) DCCS 的水解反應

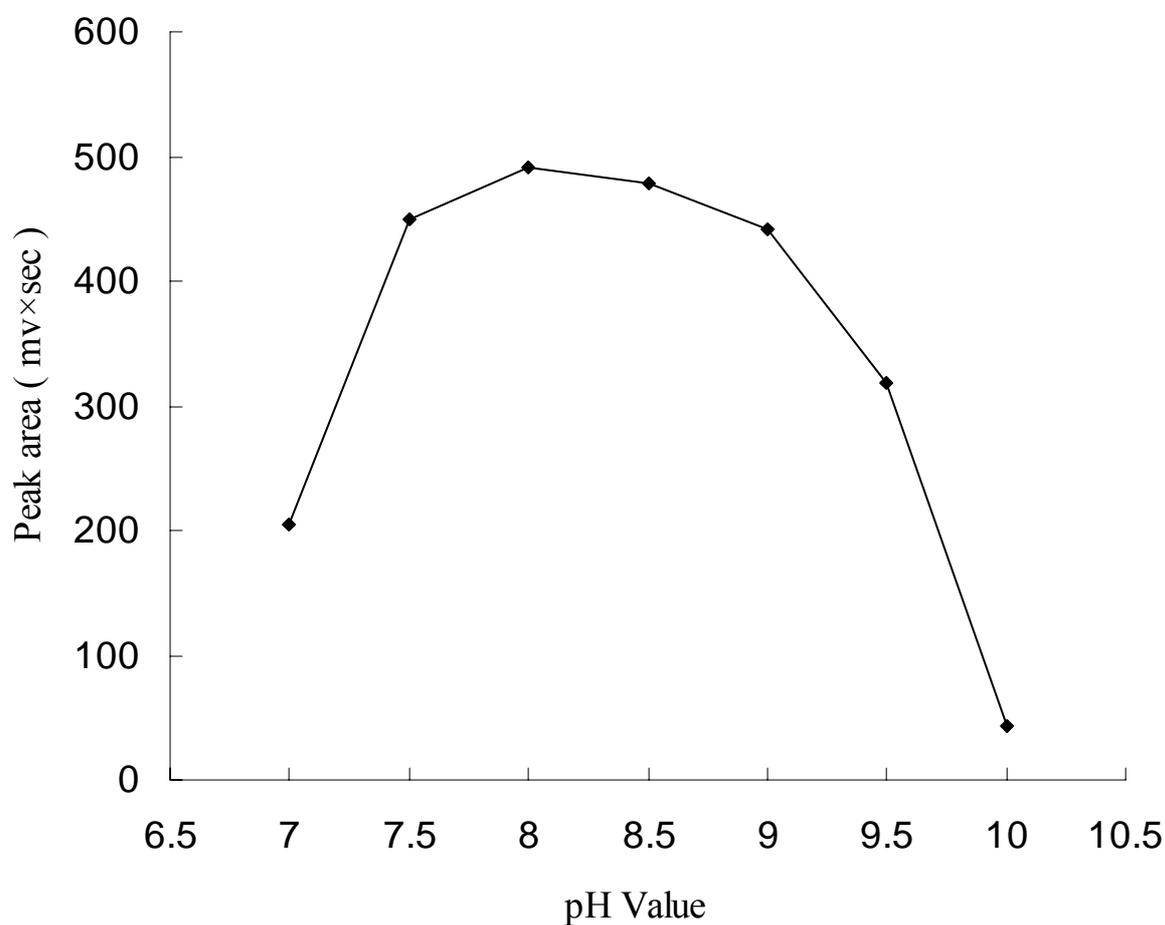


圖 (十) 衍生反應 pH 對 DCCS-baclofen 訊號面積的影響

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉，pH=9.5

分離電壓：18 kV

PMT 電位：1000 V

分析物： $1 \times 10^{-4}$  M baclofen

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

(有效長度 45 cm)

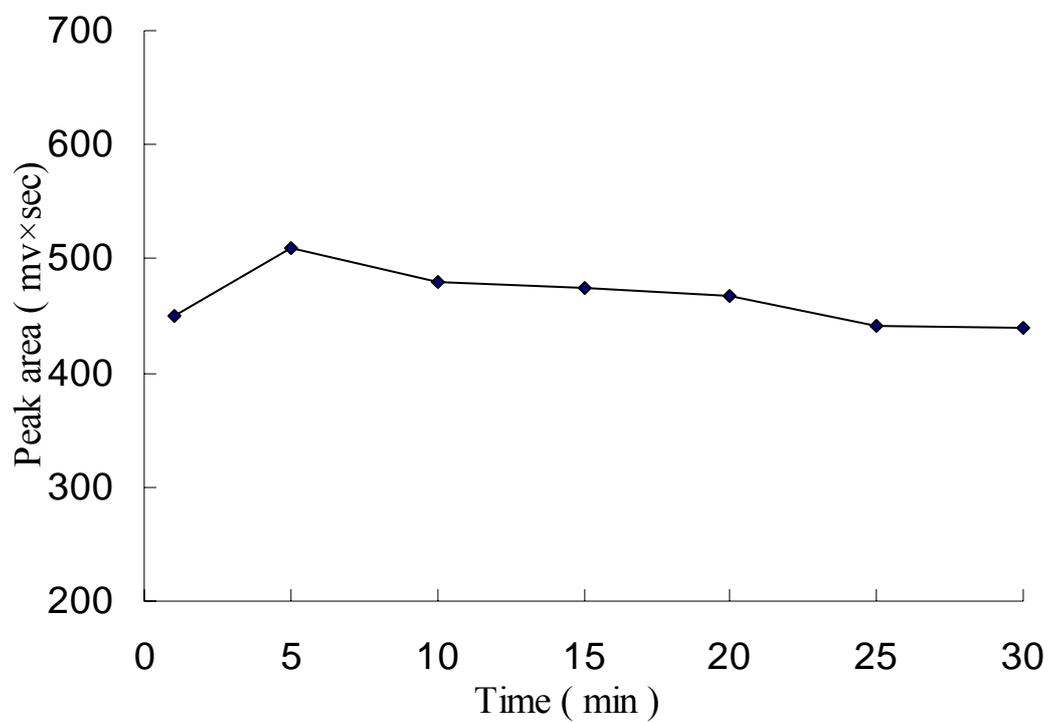


圖 (十一) 衍生反應時間對 DCCS-baclofen 訊號面積的影響  
其他實驗條件同圖 (十)

DCCS-baclofen 訊號面積稍有下降的趨勢，可能是因為隨著衍生時間的增

加，超音波振盪器中的水溫亦會提昇，使得 DCCS-baclofen 有分解的情形。而降低了 DCCS-baclofen 的衍生產率。為了解衍生反應溫度對 DCCS-baclofen 產率的影響，於超音波震盪器中控制水溫 10~30°C，並將 DCCS 與 baclofen 混合樣品振盪衍生 5 分鐘，結果如圖(十二)。衍生反應溫度由 10°C 上升至 20°C 時，由於溫度的上升使得衍生反應速度加快，DCCS-baclofen 產率亦增加，但是當衍生反應溫度超過 20°C 時，DCCS-baclofen 產率有下降的情形，其原因可能是由於 DCCS-baclofen 隨反應溫度上升而有分解的情形，因此我們選定 20°C 為最佳衍生反應溫度條件。實驗進一步探討衍生產物的穩定性，是將 DCCS 與 baclofen 混合樣品振盪衍生 5 分鐘，取出樣品注入毛細管中分析，然後將剩餘樣品分別保存在 4 °C 與室溫 (25°C) 下，每間隔 30 ~ 60 分鐘再取樣品進樣一次，連續 5 小時紀錄每次訊號大小並對時間做圖，結果如圖(十三)與圖(十四)。由圖(十三)中訊號大小變化趨勢可看出，DCCS-baclofen 衍生完成後保存在 4 °C 下非常穩定，即使經過 5 小時訊號面積也不會有明顯變化。另外由圖(十四)可看出，DCCS-baclofen 衍生物衍生完成後保存在 25°C 下，DCCS-baclofen 會隨時間增加而訊號緩慢下降，由此可知溫度會影響 DCCS-baclofen 的穩定性。

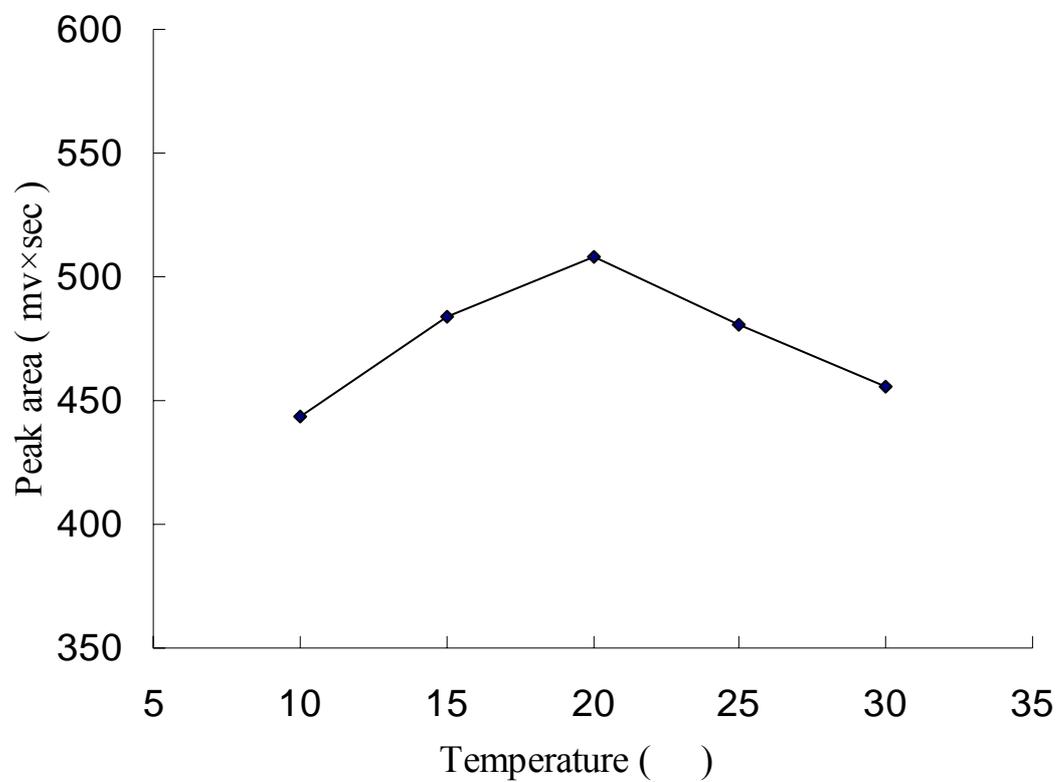


圖 (十二) 衍生反應溫度對 DCCS-baclofen 訊號面積的影響  
其他實驗條件同圖 (十)

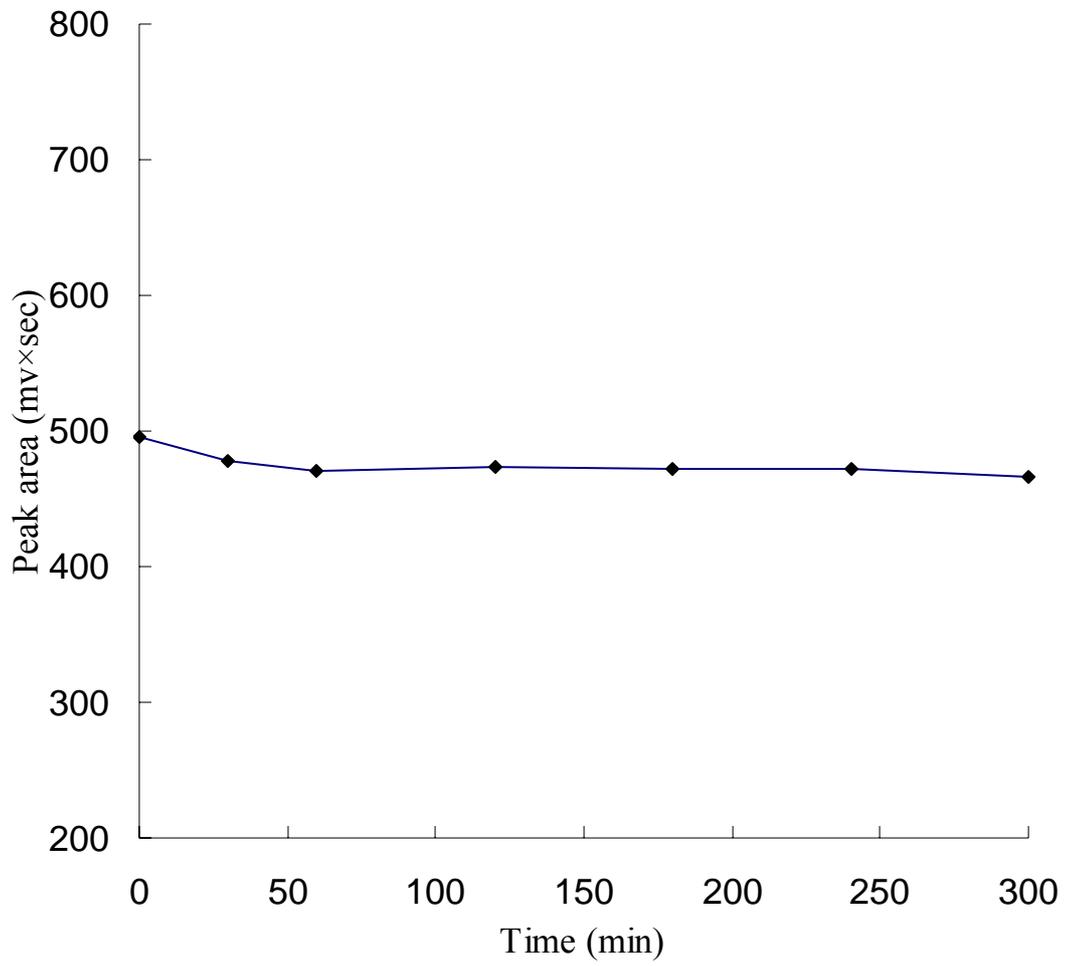


圖 (十三) DCCS-baclofen 穩定性測試(4°C)

其他實驗條件同圖 (十)

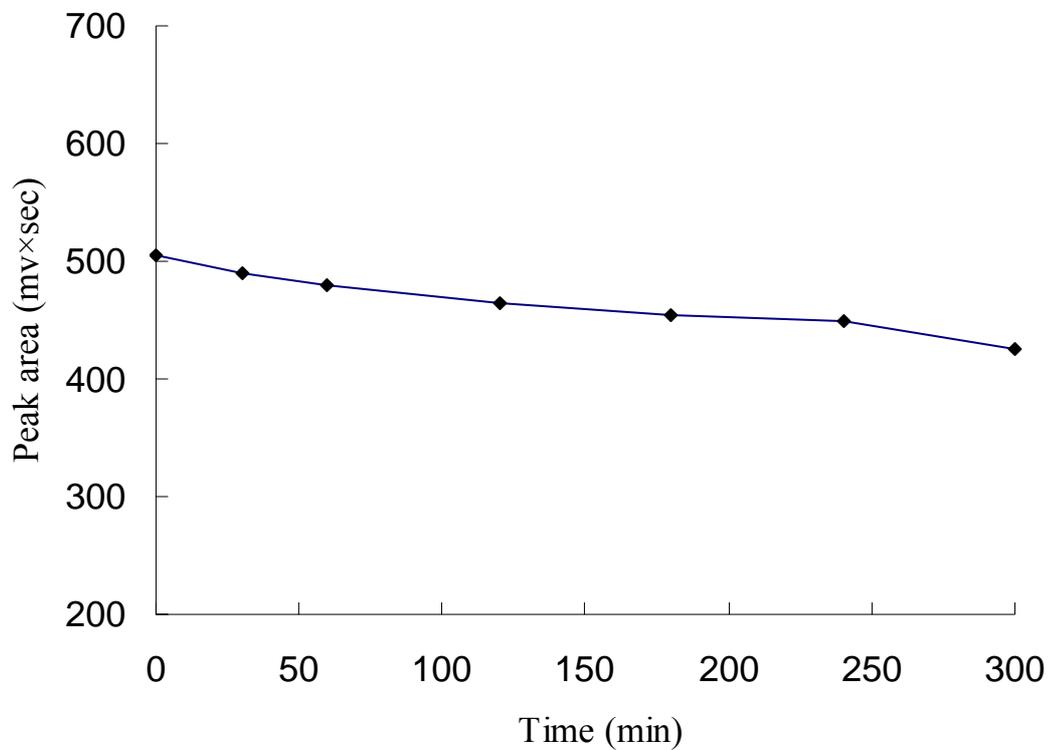
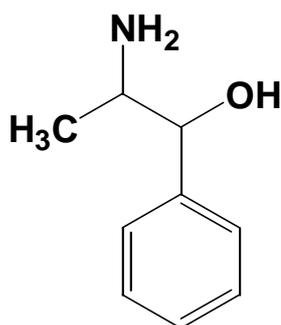


圖 (十四) DCCS-baclofen 穩定性測試(25°C)

其他實驗條件同圖 (十)

定量分析基質複雜的樣品時，常需在樣品溶液內添加一定量內標準物 (internal standard)。選擇內標準物時，首先要考慮內標準物的化學性質與結

構需與待測物類似但分析訊號不重疊，其次內標準物必須是在欲分析樣品中不存在的物質。由於待測物相對於添加內標準的比率是定值，即使在進樣時體積有誤差、前處理過程中樣品損失或是偵測器的感度發生變動，仍不致影響定量的準確度。本實驗所選用的內標準為 phenylpropanolamine hydrochloride ( PPA )，其結構如圖 ( 十五 )，亦屬一級胺類化合物。為了確保血漿樣品中 baclofen 與添加的 PPA 均能夠與衍生劑完全衍生，需將 DCCS 與 baclofen 的濃度比維持在 100 : 1 以上。實驗比較含有 10  $\mu$ M baclofen 的樣品溶液與 1 mM 及 10 mM DCCS 衍生劑反應結果，10 mM DCCS 衍生反應的產物訊號面積較 1 mM DCCS 約增加 1.3 倍。雖然 10 mM 衍生劑產生的水解產物訊號比 1 mM 衍生劑多，但不至於影響 baclofen 的定量，所以本實驗選用 10 mM 的衍生劑濃度作為往後實驗的條件。



**PPA**

圖 ( 十五 ) PPA 之結構圖

綜合以上實驗結果，我們歸納出最佳的 baclofen 衍生條件為：衍生溶液 pH=8，衍生時間 5 分鐘，衍生溫度 20 $^{\circ}$ C，10 mM DCCS 衍生劑濃度。在

上述最佳衍生條件下進行 baclofen 衍生物的毛細管電泳 (CZE) 分離/雷射激發螢光偵測分析，結果顯示於圖 (十六)，Baclofen 衍生物的移動時間為 5.87 分鐘。圖十六 (A) 為空白溶液電泳圖；圖十六 (B) 為 0.1 mM baclofen 與 10 mM DCCS 衍生所產生之 DCCS-baclofen 電泳圖，圖中除了背景訊號外，可清楚看到 DCCS-baclofen 的訊號。我們嘗試添加 baclofen 於經氫甲烷去除蛋白質分子後的血漿樣品中進行 CZE 分離，實驗結果如圖 (十七)，圖十七 (A) 為空白血漿樣品電泳圖；圖十七 (B) 為添加 0.1 mM baclofen 的血漿樣品電泳圖。比較圖十七 (A) 與圖十七 (B) 得知，利用 CZE 無法分離血漿樣品中的複雜基質與 baclofen 信號，因此決定改採 MEKC 分離模式，希望藉著微胞與分析物間的作用力將 DCCS-baclofen 的遷移時間延長，以避免血漿樣品中大量的基質訊號與 baclofen 訊號重疊。

## 2. DCCS-baclofen 之 MEKC 分離

MEKC 分離的原理是在電泳緩衝溶液中添加界面活性劑，當界面活性劑濃度高於其臨界微胞濃度 (CMC) 時，界面活性劑分子會開始聚集形成微胞，藉由不同極性溶質分子與微胞相作用力大小不同，可改變溶質分子遷移的速度而達到分離。本實驗選用 MEKC 最常用的陰離子型界面活性

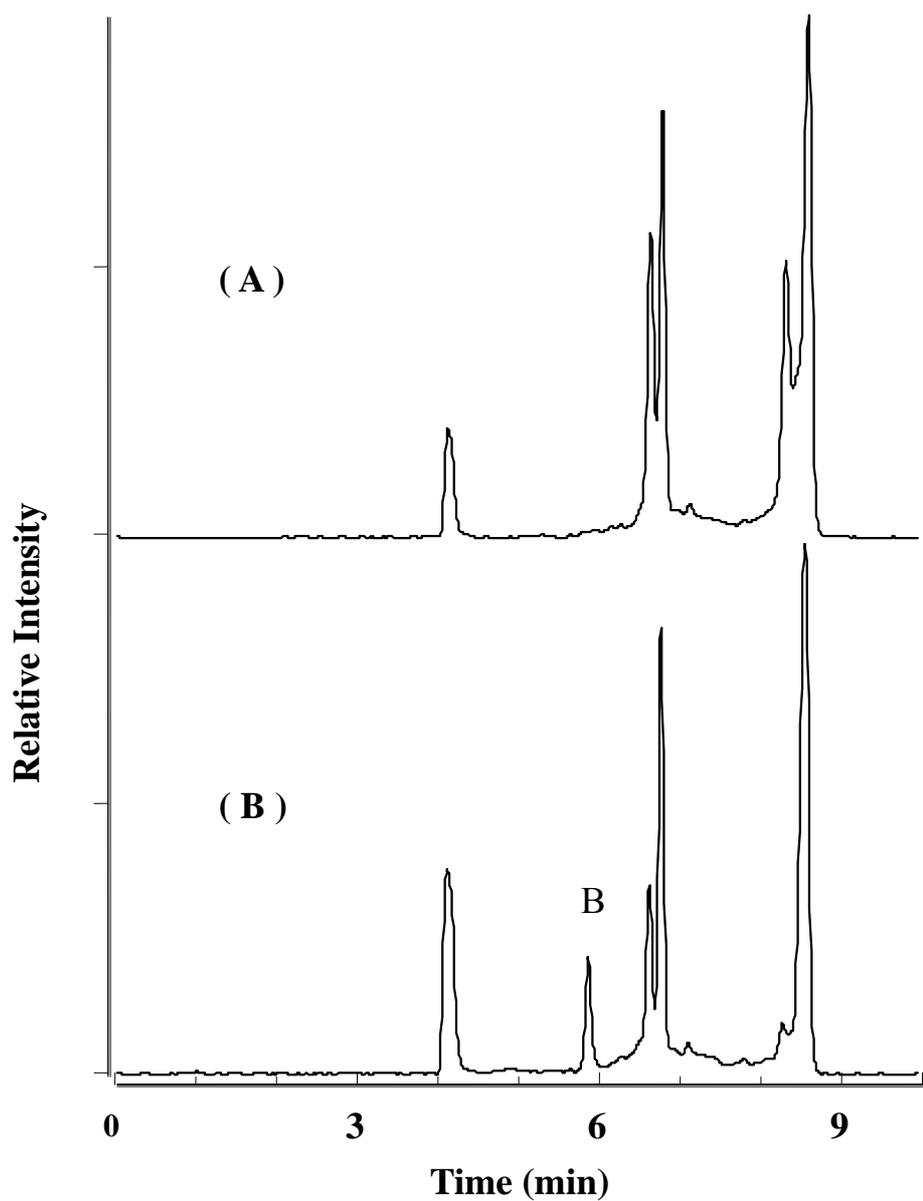


圖 (十六) Baclofen 的 DCCS 衍生產物電泳圖 (CZE)

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉，pH=9.5

分離電壓：18 kV ；PMT 電位：1000 V

進樣方式：高度注射；20 cm，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.× 50 $\mu$ m I.D. × 65 cm

(有效長度 45 cm)

(A) Blank ；(B) B = baclofen (0.1 mM)

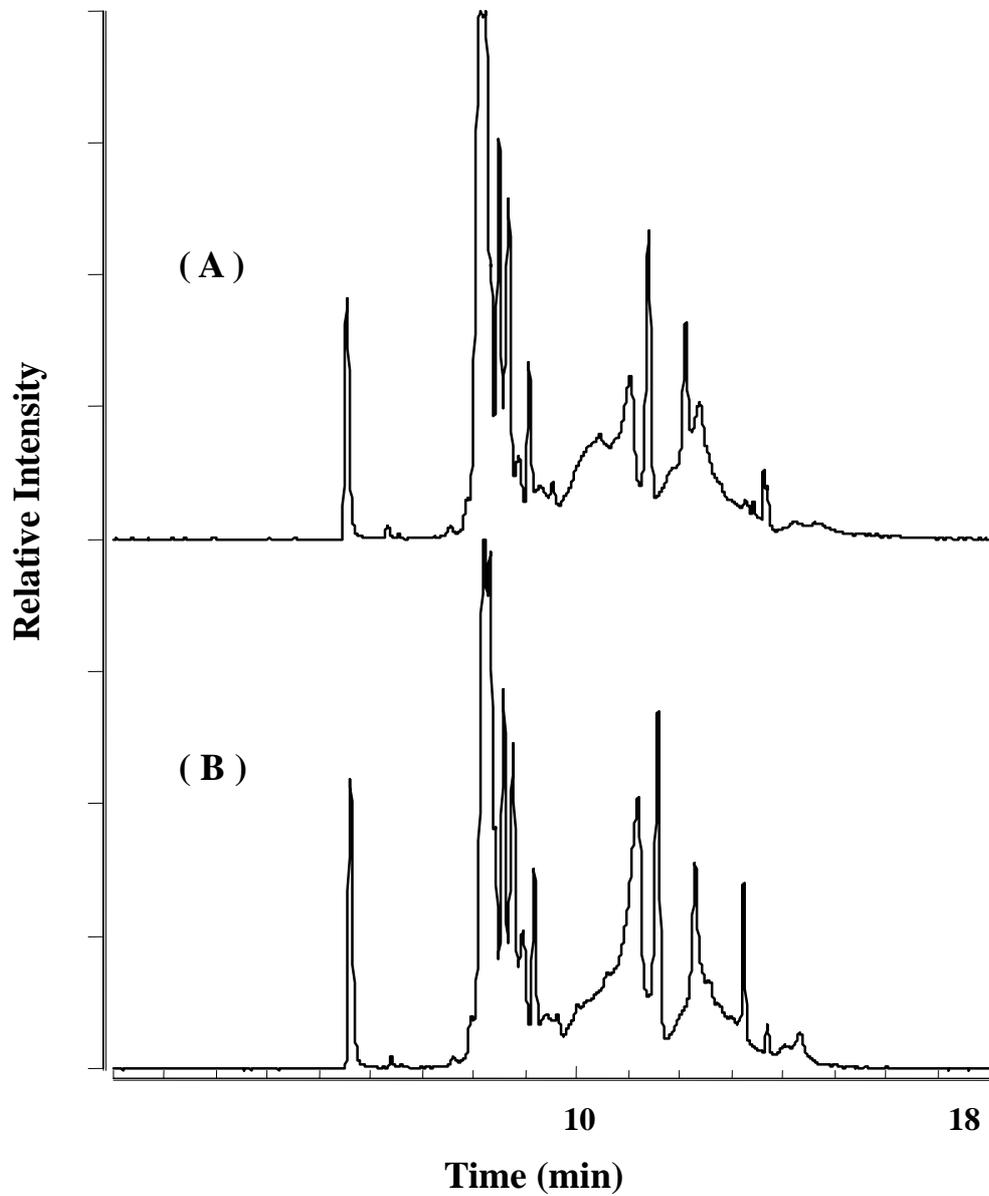


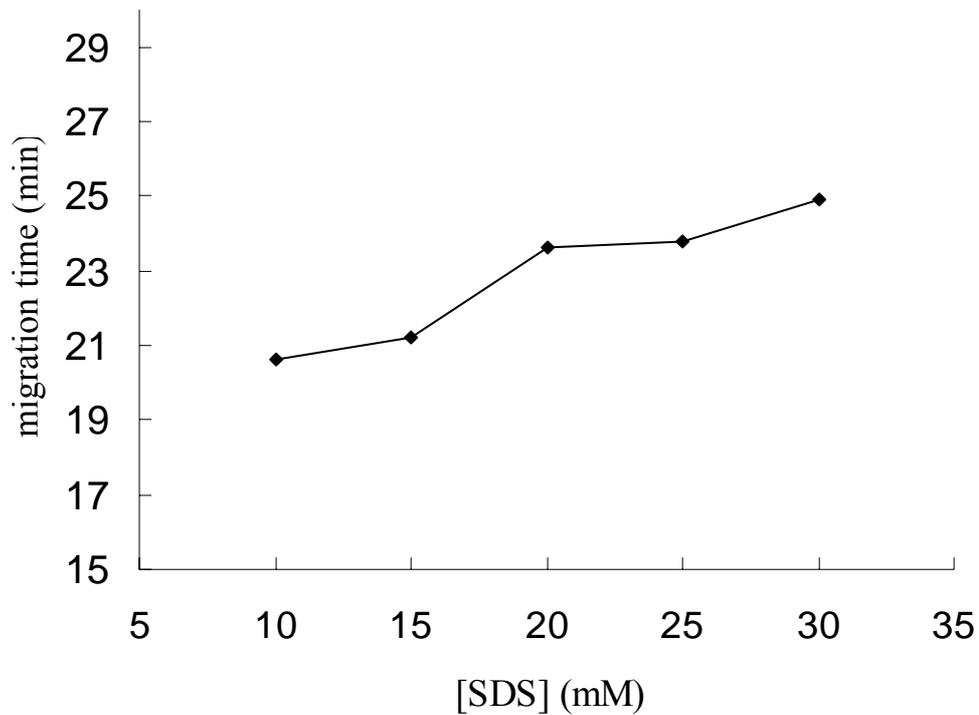
圖 (十七) 血漿樣品中 Baclofen 的電泳圖 (CZE)

其他實驗條件同圖 (十六)

劑sodium dodecyl sulfate (SDS) 來產生微胞相。SDS在純水中的CMC為 8.2

mM<sup>[80]</sup>。為探討電泳緩衝溶液中 SDS 濃度對 DCCS- baclofen 遷移時間的影響，於 50 mM 硼酸鈉緩衝溶液 (pH=9.5) 中分別添加 10~30 mM 的 SDS，結果顯示於圖 (十八)。隨著 SDS 濃度的增加，微胞聚集的數目也會增加，而 DCCS-baclofen 結構中疏水性部分和微胞作用也會增強，因此 DCCS-baclofen 的移動時間會隨 SDS 濃度的增加而延長。為了節省實驗的時間，選擇 10 mM SDS 做為界面活性劑添加的濃度。

進行 CE 分離時，所使用的電壓與分離效率息息相關，由緒論中的式 (6) 可知，電泳效率與電壓成正比。理論上要獲得較佳的分離效率，使用的電壓越高越好。溶質在毛細管內停留的時間短，擴散的時間較少，可得到較佳的電泳效率。電泳效率與電泳電壓的關係顯示於圖 (十九)。圖中可發現電泳電壓越大，其效率越高。另外，我們發現當電壓由 12 kV 增加為 21 kV 時，DCCS-baclofen 的訊號面積減少 84%，可能是因為毛細管內溶液在高電壓下產生了焦耳熱 (Joule heat)，使 DCCS-baclofen 分解而造成訊號面積的減少。DCCS-baclofen 移動時間與電泳電壓的關係顯示於圖 (二十)。DCCS-baclofen 的移動時間隨電壓增加呈現遞減現象，這是因為電泳電壓增加，使得 EOF 的速度與電泳遷移速度均增加，DCCS-baclofen 移動時間也就越短。考量毛細管電泳的效率與分析時間，雖然電壓為 21 kV 時具有較



圖(十八) 電泳緩衝溶液之 SDS 濃度對 DCCS-baclofen

遷移時間的影響

分離電壓：18 kV

分析物：3  $\mu$ M baclofen

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

( 有效長度 45 cm )

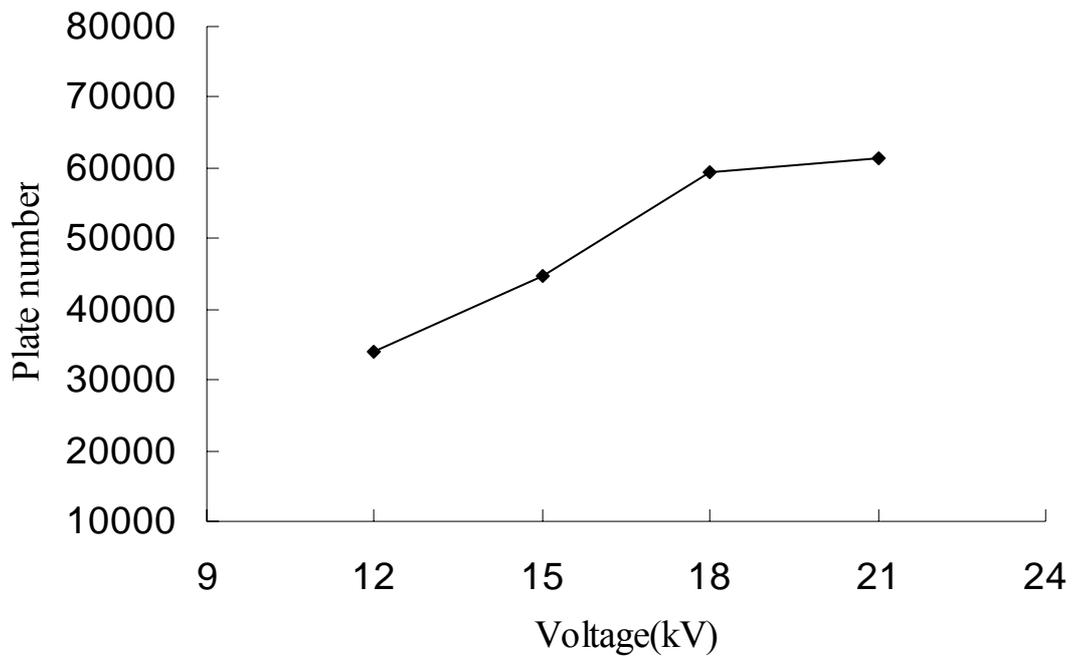


圖 (十九) 電泳效率與電壓的關係圖

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉 + 10 mM SDS，pH=9.5

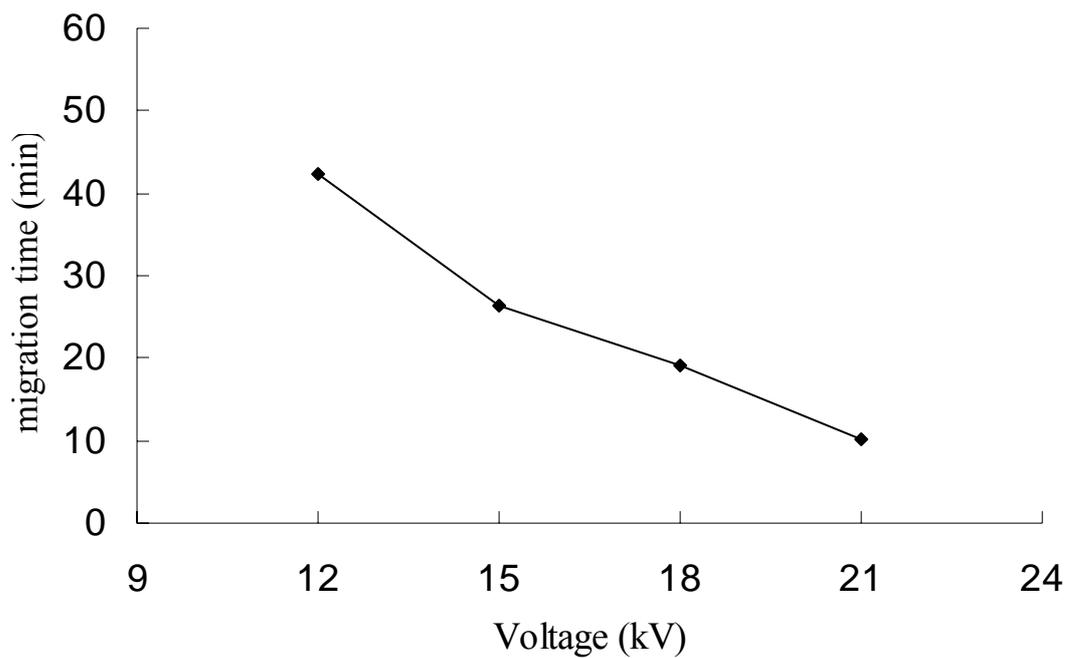
分析物：3  $\mu$ M baclofen

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

( 有效長度 45 cm )



圖（二十）不同電壓下 DCCS-baclofen 遷移時間的變化  
其他實驗條件同圖（十九）

高的電泳效率與較短的分析時間，但是其產生的焦耳熱限制了此高電壓的

使用，故選擇以 18 kV 做為電泳電壓進行實驗。

為探討電泳緩衝溶液濃度對 DCCS-baclofen 移動時間的影響，於 30~60 mM 硼酸鈉緩衝溶液 (pH=9.5) 中分別添加 10 mM 的 SDS，DCCS-baclofen 移動時間與電泳溶液中硼酸鈉濃度的關係顯示於圖 (二十一)。硼酸鈉濃度越高，溶液中的離子強度越大，導致電滲流變小，DCCS-baclofen 移動速率變慢，所以移動時間隨硼酸鈉濃度增加呈現遞減的趨勢。為了節省實驗的時間，30 mM 硼酸鈉添中加 10 mM SDS 之緩衝溶液似乎有較佳的效果，但我們嘗試添加 baclofen 於經前處理後的血漿樣品中進行 MEKC 分離，實驗結果顯示 30 mM 硼酸鈉添加 10 mM SDS 之緩衝溶液，無法將 baclofen 與血樣中複雜基質完全分離，因此犧牲實驗時間，選擇 50 mM 硼酸鈉添加 10 mM SDS 做為 MEKC 之緩衝溶液。電泳緩衝溶液之濃度對 DCCS- baclofen 訊號面積的影響顯示於圖(二十二)。改變硼酸鈉濃度由 30 mM 至 50 mM，DCCS-baclofen 訊號面積變化不大，但是當硼酸鈉濃度為 60 mM 時，DCCS- baclofen 訊號面積減少許多。此現象可能是因為電泳緩衝溶液濃度增加，其離子強度也增加，伴隨高電壓產生高電流與焦耳熱，使 DCCS- baclofen 衍生產物分解，造成 DCCS- baclofen 訊號面積減少。DCCS-baclofen 移動時間與電泳緩衝溶液 pH 值的關係顯示於圖(二十三)。由結果發現在 pH 8~10 範圍內，

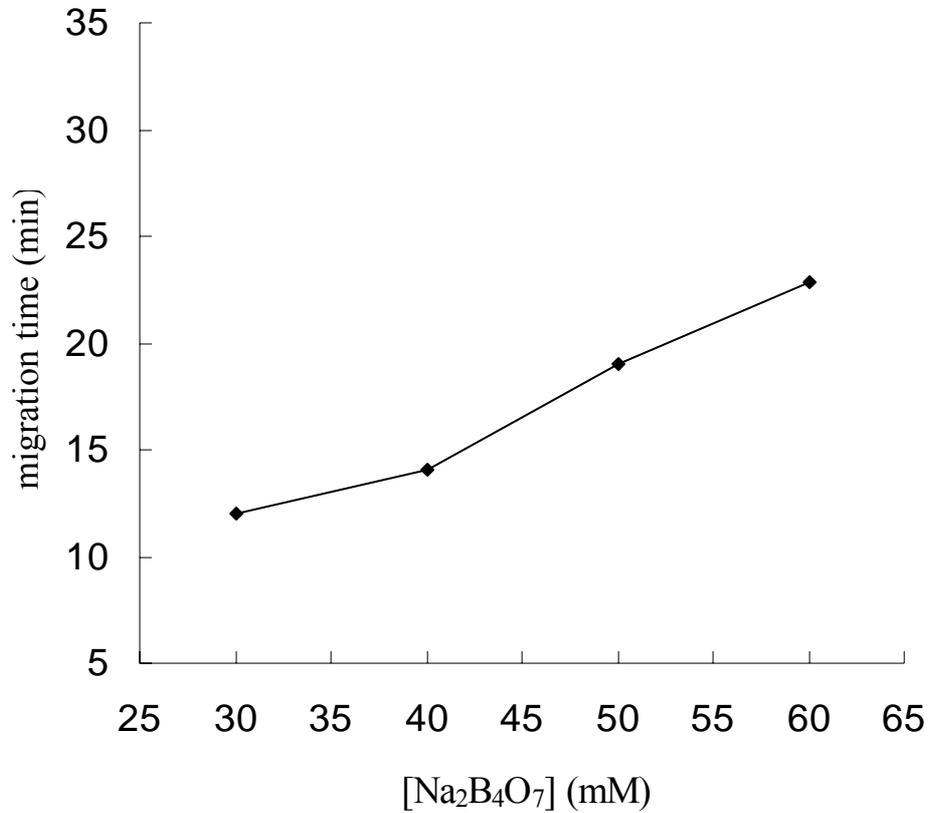


圖 (二十一) 電泳緩衝溶液濃度對 DCCS-baclofen

遷移時間的影響

分離電壓：18 kV

分析物：3  $\mu$ M baclofen

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

(有效長度 45 cm)

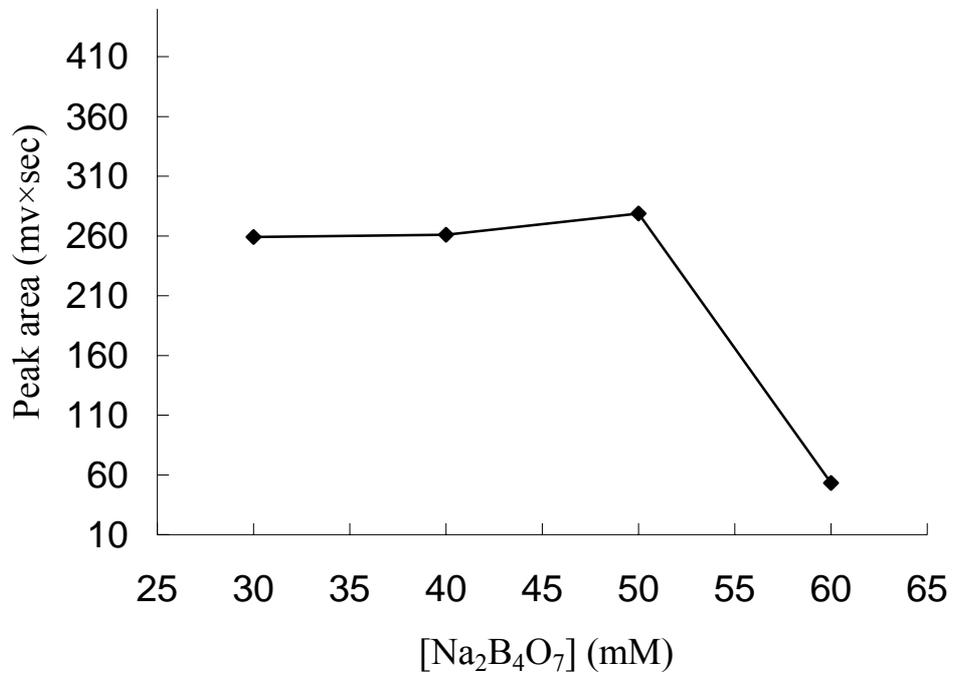


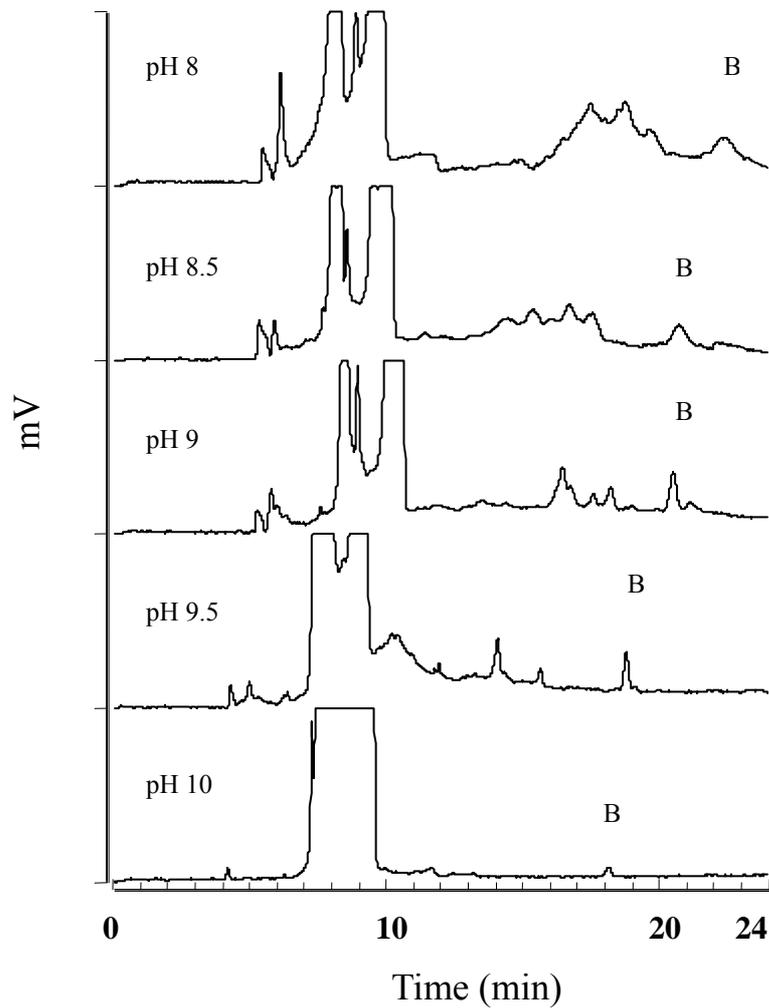
圖 (二十二) 電泳緩衝溶液濃度對 DCCS-baclofen

訊號面積的影響

30 mM 硼酸鈉 電流：25 $\mu$ A；40 mM 硼酸鈉 電流：34 $\mu$ A

50 mM 硼酸鈉 電流：39 $\mu$ A；60 mM 硼酸鈉 電流：52 $\mu$ A

其他實驗條件同圖 (二十一)



圖(二十三) 電泳緩衝溶液 pH 值對 DCCS- baclofen

遷移時間的影響

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉 + 10 mM SDS

分離電壓：18 kV

分析物：3  $\mu$ M baclofen

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

( 有效長度 45 cm )

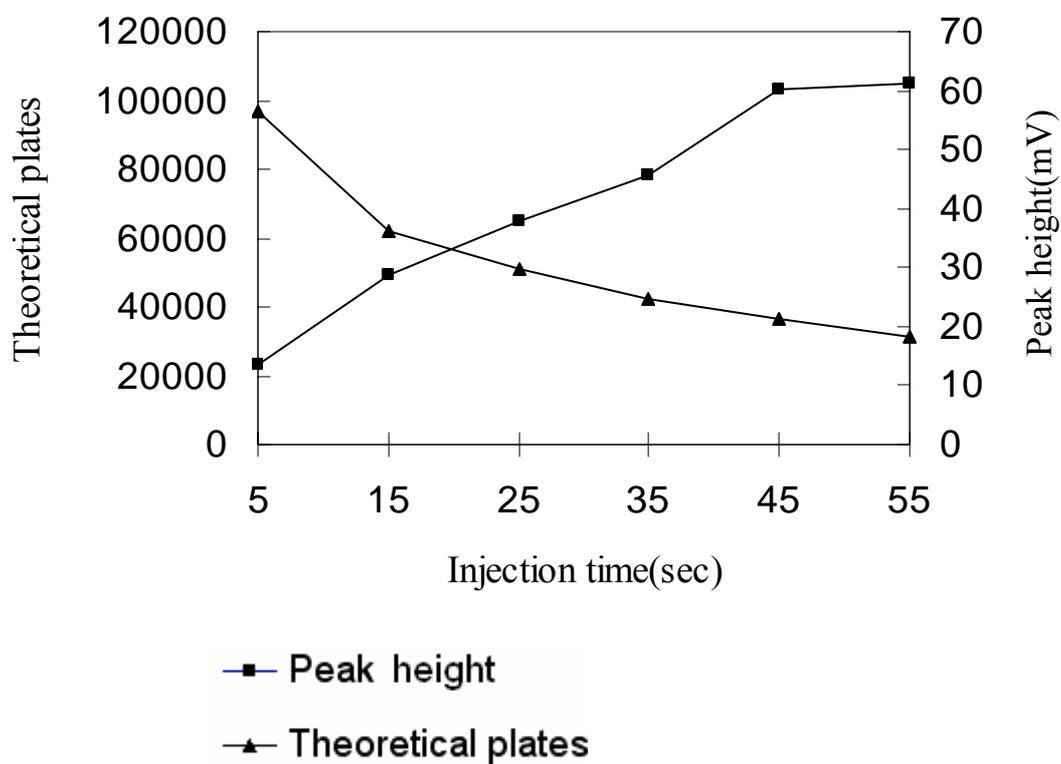
因電泳緩衝溶液 pH 值升高導致 EOF 增加，DCCS-baclofen 移動速率變快，

所以分析時間逐漸縮短。但是當 pH 值為 10 時，DCCS-baclofen 之訊號面積明顯減小，原因可能是因為 DCCS-baclofen 衍生物在 pH=10 電泳緩衝溶液中不穩定，產生水解反應，使得 DCCS-baclofen 訊號下降，所以選擇電泳緩衝溶液 pH=9.5 為最佳條件。

在 CE 分析中，進樣時間所影響的是分析物進入毛細管的量，時間越長則分析物進樣的量越多，如此便能提高分析靈敏度。但是若進樣量過多，則會降低毛細管的理論板數，反而使訊號的解析度變差，因此我們針對進樣時間影響理論板數與訊號高度的程度做探討。實驗採用重力進樣方式，於毛細管進樣端相對偵測端 20 cm 高度分別進樣 5~55 秒，結果見圖（二十四）。當進樣的秒數越長，baclofen 衍生物的訊號越大，然而理論板數亦隨著進樣的秒數增加而下降。為了兼顧訊號解析度與 baclofen 的偵測靈敏度，選擇兩線之交點進樣時間約 20 秒，應該有最佳的效果。但實際應用於血漿分析時，20 秒的進樣時間會使 DCCS-baclofen 衍生物訊號與血樣基質訊號重疊。進樣時間為 15 秒則可避免此困擾，因此進行血漿分析時選用進樣時間 15 秒。

### 3. 最佳分析條件

綜合以上實驗結果，我們歸納出最佳的 DCCS 與 baclofen 及 PPA 衍生



圖(二十四) 進樣時間對理論板數及訊號高度的影響

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉 + 10 mM SDS (pH=9.5)

分離電壓：18 kV

分析物：3  $\mu$ M baclofen

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高

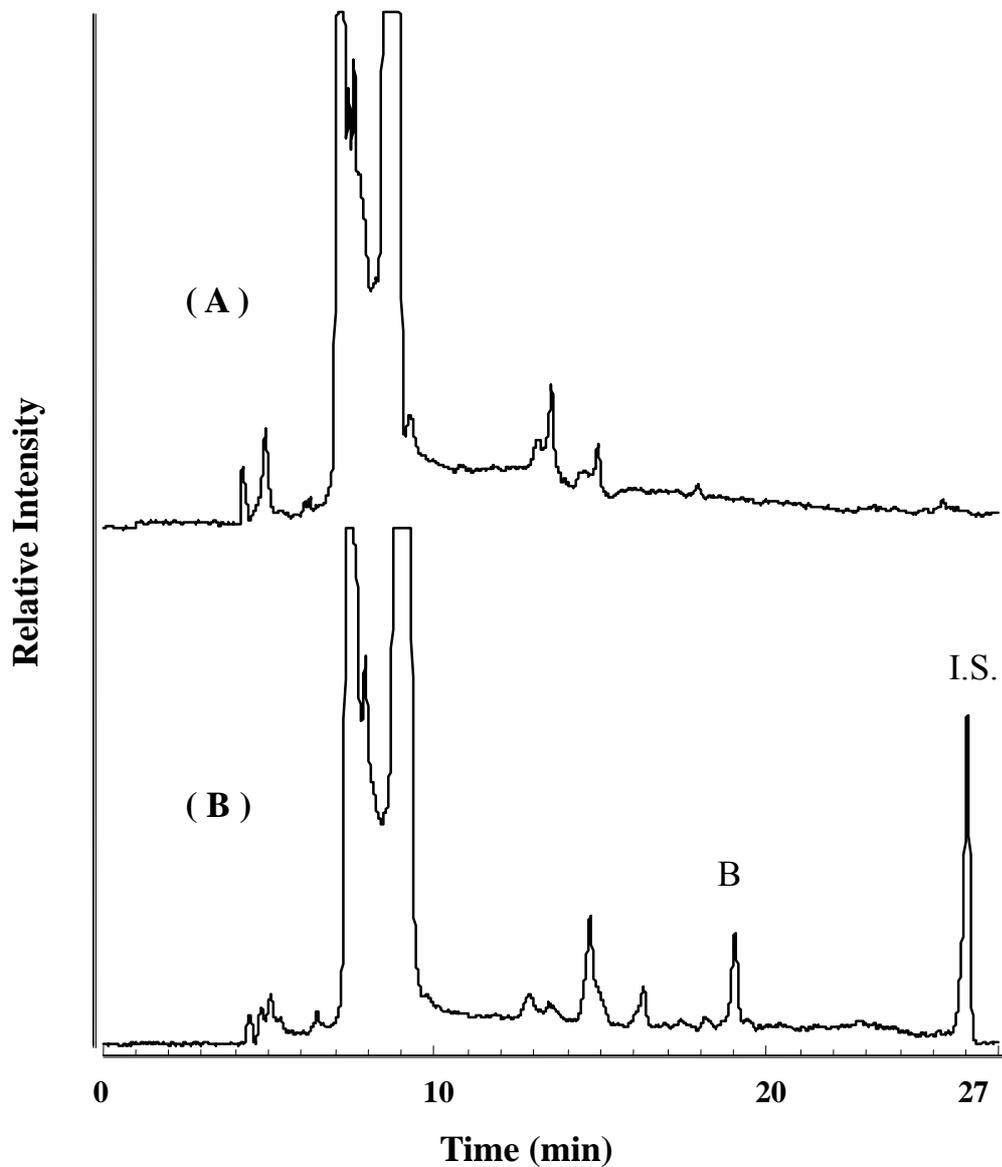
毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

( 有效長度 45 cm )

條件為：衍生溶液 pH=8，衍生時間 5 分鐘，衍生溫度 20 °C，10 mM DCCS 衍生劑濃度；最佳 MEKC 分離條件為：電泳緩衝溶液組成為 50 mM 硼酸鈉 10 mM SDS 混合溶液 (pH=9.5)，毛細管內徑 50 $\mu$ m、外徑 360 $\mu$ m、管長 65 cm，有效長度 45 cm，進樣時間 15 秒，分離電壓 18 kV，PMT 電位 1000 V。

在最佳條件下進行 baclofen 衍生物的 MEKC 分離 / LIF 偵測分析，結果顯示於圖(二十五)。Baclofen 衍生物與內標 PPA 衍生物的移動時間分別為 19.04 和 26.03 分鐘。圖二十五(A)空白溶液電泳圖中的背景訊號來源主要為過量的衍生劑及其水解產物；圖二十五(B)中除了背景訊號外，可清楚看到 DCCS-baclofen 與 DCCS-PPA 的訊號，而且未受到背景訊號干擾。

對一級胺類化合物進行螢光衍生反應最普遍使用的衍生試劑是 OPA 與 NDA，這兩種衍生試劑與 DCCS 相比，最大的優點在於衍生反應過程中較無副產物的形成，過量的衍生劑對於分析物的訊號亦較無干擾。但 OPA 衍生試劑最大的問題在於衍生產物不穩定，容易分解，因此進行管柱前衍生時會有困難；若以 NDA 為衍生試劑，在衍生的過程須添加具有毒性的  $\text{CN}^-$  做為衍生反應的親核基，實驗中需非常小心使用。另外 OPA 衍生試劑與 NDA 衍生試劑必須分別配合 UV 雷射與 He/Cd 雷射使用，而這兩種雷射的缺點為價格昂貴、保養不易與壽命短等。DCCS 能與一級胺類形成穩



圖(二十五) Baclofen 及 PPA 的 DCCS 衍生產物電泳圖 (MEKC)

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉 + 10 mM SDS，pH=9.5

分離電壓：18 kV；PMT 電位：1000 V

進樣方式：高度注射；20 cm，15 sec

毛細管：360  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  50  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  65 cm

(有效長度 45 cm)

(A) Blank；(B) B = baclofen (3  $\mu\text{M}$ )；I.S. = PPA (40  $\mu\text{M}$ )

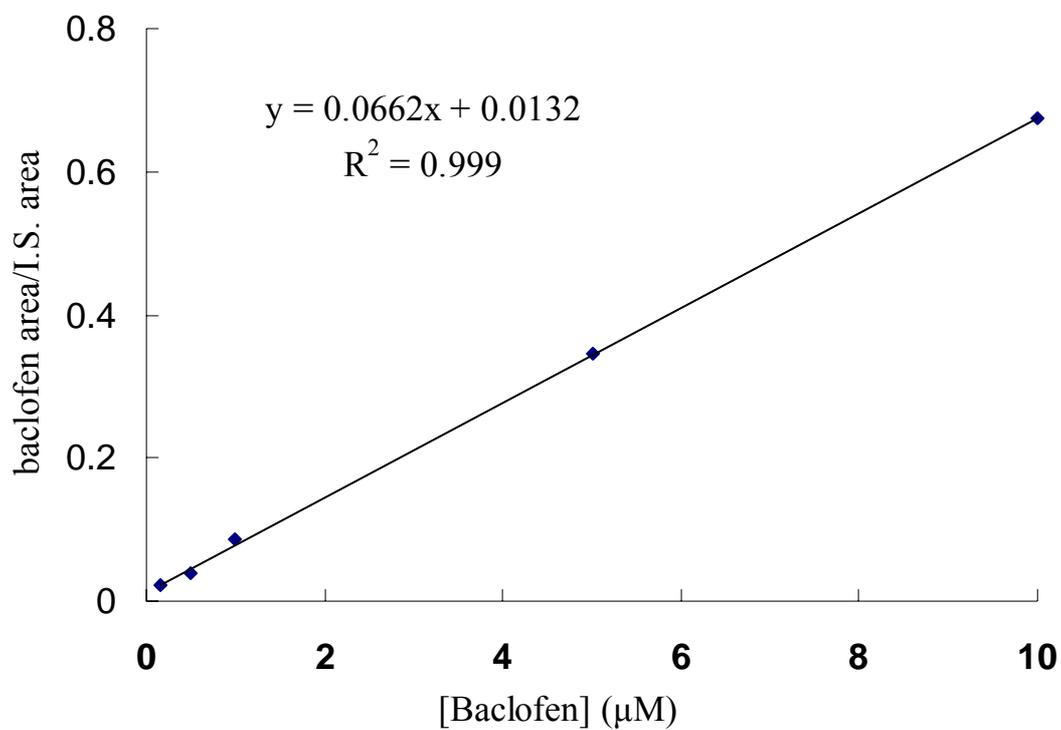
定的醯胺鍵結。雖然 DCCS 於衍生過程中會產生許多水解副產物，對於分析物訊號可能造成干擾，若能調整適當的電泳緩衝溶液的組成，仍可改善水解副產物與分析物訊號重疊的問題。而 DCCS 衍生劑所配合的二極體雷射具有價格低、壽命長，體積小、穩定度高與不需保養等優點，比氣體雷射更適合做為 CE/LIF 之光源。

#### 4. 檢量線製作

檢量線的製作是在最佳實驗條件下進行，分別取添加有 5 種不同濃度 0.15 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、5 $\mu$ M 與 10 $\mu$ M baclofen 及 40  $\mu$ M PPA 的水溶液樣品，加入 10 mM DCCS 進行衍生，再將各樣品以重力進樣(20 cm, 15sec) 方式注入毛細管中。以 baclofen / PPA 的訊號面積比對 baclofen 的濃度作圖，結果如圖(二十六)。在 0.15~10 $\mu$ M 範圍間的線性相關係數(r)為 0.999 (n=5)。以訊號/雜訊比(S/N)為 3 所對應的濃度定義為 baclofen 的偵測極限，在水溶液樣品中 baclofen 的濃度偵測極限為 0.1  $\mu$ M，此極限亦為 baclofen 在水中的衍生濃度下限。

#### 5. 分析再現性

為了探討本方法的再現性，將含 3 $\mu$ M baclofen 與 40 $\mu$ M PPA 的水溶液樣品進行衍生，利用重力進樣，重複 CE/LIF 偵測分析 7 次，計算此方法的再現性，結果列於表(一)。從表中可知，未利用內標準校正的 baclofen 遷



圖(二十六) DCCS-baclofen 的檢量線

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉 + 10 mM SDS，pH=9.5

分離電壓：18 kV

PMT 電位：1000 V

進樣方式：重力注射；20 cm 高，15 sec

毛細管：360 μm O.D. × 50 μm I.D. × 65 cm

(有效長度 45 cm)

移時間與信號面積的相對標準偏差分別為 2.9 % 與 5 % ；使用內標準校正的 baclofen 遷移時間與信號面積的相對標準偏差分別為 0.5 % 與 4 % ，顯示利用內標準校正可提高分析再現性。

表(一)水溶液樣品中 DCCS-baclofen 的分析再現性

Sample	baclofen Migration time (min)	baclofen / I.S. Migration time	baclofen Peak areas (mv×sec)	baclofen / I.S. Peak areas
baclofen	20.11	0.75	316.76	0.25
	19.00	0.74	290.02	0.24
	18.49	0.74	276.74	0.23
	18.86	0.74	298.89	0.26
	19.85	0.74	327.02	0.24
	19.04	0.74	308.26	0.25
	18.78	0.74	292.08	0.25
$\bar{X}$	19.16	0.741	301.38	0.24
S	0.55	0.004	15.90	0.01
RSD (%)	2.9	0.5	5	4

其他實驗條件同圖(二十五)

## 二、血漿樣品的分析

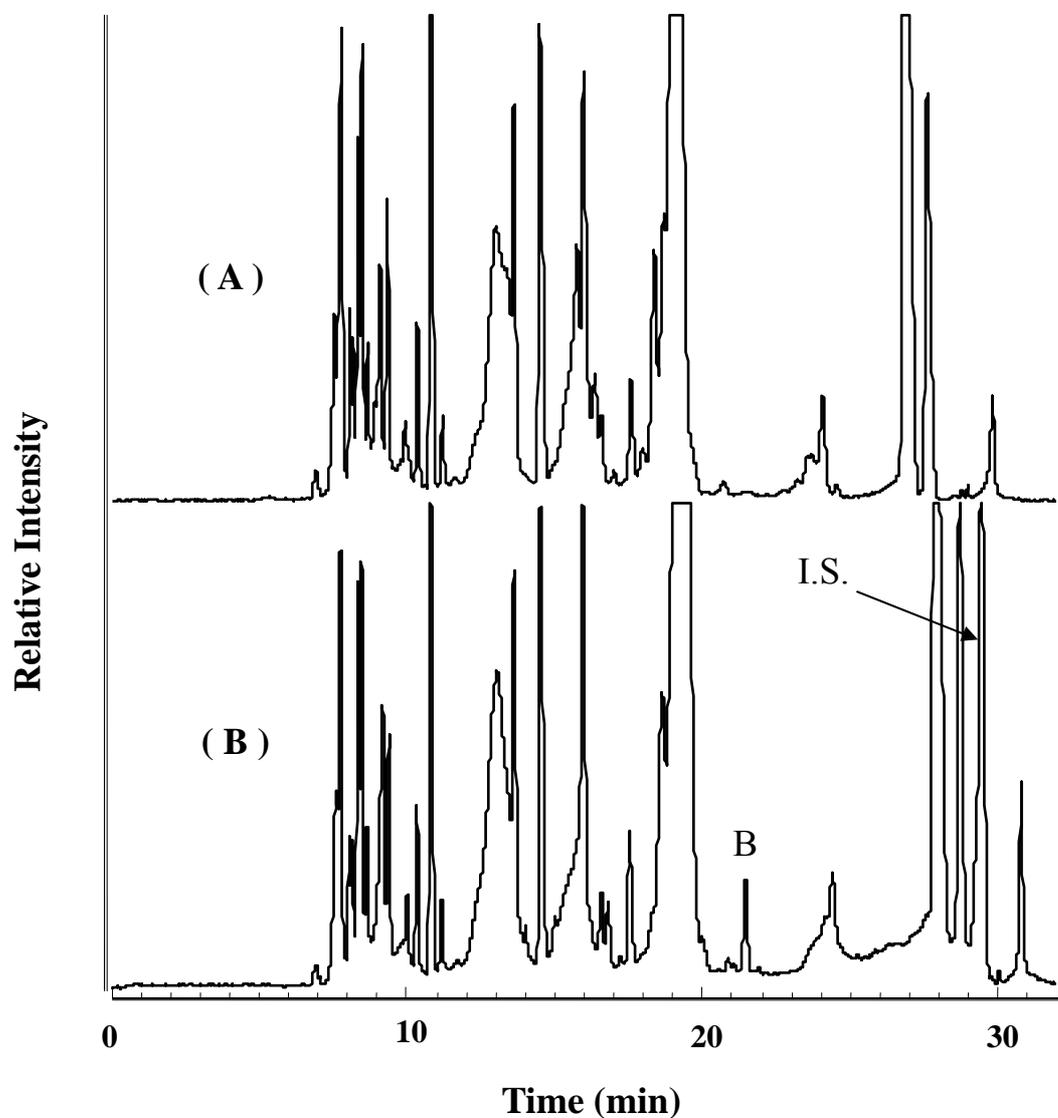
為評估本方法對實際血樣的適用性，接著進行血漿樣品的分析，實驗所使用的血漿樣品來源為本人與實驗室成員捐獻。首先將置於乾燥 EDTA 試管中的新鮮血液以 700 g 離心 5 分鐘，待血球與血漿分離後，取出上層血漿，將其分裝於 1.5 ml 的微量離心試管中，並將分裝好的血漿置於 -20°C 冰箱備用。實驗時添加 baclofen 標準溶液於血漿中再進行前處理。

血液成份中約 55 % 為血漿，45 % 為血球蛋白。血漿是由 90 % 的水與 10 % 的化學成分組成。化學成分包含蛋白質、鹽類、醣類、脂肪、維生素、凝固因子、激素、酵素及代謝廢物<sup>[81-82]</sup>。由於人體血漿中含有蛋白質及複雜基質，而胺基酸又是構成蛋白質的基本物質，這對分析結構與胺基酸類似的baclofen而言是一大困擾。因此，在分析血漿中的baclofen時，必須經過樣品前處理以降低基質的干擾。文獻中大多採用固相萃取( solid-phase extraction, SPE )的方式來淨化血漿或尿液樣品<sup>[66]</sup>，雖然SPE常可有效地去除血漿中的干擾物質，但是步驟繁複費時，回收率也不理想。

本實驗採用的第一種淨化血漿前處理方式是在進行衍生反應前先利用氫甲烷沉澱血漿中的蛋白質，再經由離心去除蛋白質沉澱。希望藉由 CE 的高分離效率，即使基質去除的不完全，亦能達到可接受的分離效果。氫甲烷去除蛋白質的步驟在前面的實驗章節中已描述。取事先添加有 3  $\mu$ M

baclofen 與 40  $\mu\text{M}$  PPA 的淨化後血漿樣品 50  $\mu\text{l}$ ，於其中加入 40  $\mu\text{l}$  硼酸鈉溶液 (pH=8)，與 10  $\mu\text{l}$  10 mM DCCS 衍生劑，在超音波震盪下反應 5 分鐘，經 0.45  $\mu\text{m}$  之濾膜過濾後，注入毛細管進行 MEKC 分離，所得到的電泳圖顯示於圖(二十七)。圖二十七(A)為未添加 baclofen 與 PPA 的空白血漿樣品電泳圖而圖二十七(B)為添加 3  $\mu\text{M}$  baclofen 與 40  $\mu\text{M}$  PPA 於血漿樣品中的電泳圖。比較兩圖，baclofen 與 PPA 衍生物的遷移時間分別為 21.45 及 29.42 分鐘。另外，我們也可由圖中看出，血漿樣品電泳圖背景相當複雜，即使經過氫甲烷沉澱蛋白質分子，仍有許多基質存在血漿中。然而在本實驗的電泳緩衝溶液組成 50 mM 硼酸鈉添加 10 mM SDS (pH=9.5) 下，baclofen 與 PPA 衍生物的訊號與血液中的基質訊號仍可完全分離，顯示本方法應可用於血漿中 baclofen 的定量分析。

血漿樣品中 baclofen 衍生物的檢量線顯示於圖(二十八)，線性範圍在 0.3-20  $\mu\text{M}$  之間 (均指血漿於去除蛋白質前所添加之 baclofen 原始濃度)，相關係數為 0.998 (n=5)。以訊號/雜訊比(S/N)為 3 所對應的濃度定義為 baclofen 的偵測極限，最接近 baclofen 濃度偵測極限之電泳圖顯示於圖(二十九)，血樣中 baclofen 的濃度偵測極限為 0.1  $\mu\text{M}$ 。比較水溶液與血漿樣品中 DCCS-baclofen 之檢量線斜率 (0.0662 與 0.0312)，可知 DCCS-baclofen 於血漿樣品之檢量線斜率小了許多，主要原因應是血樣中大量的基質干擾



(二十七) 血漿樣品中 DCCS-baclofen 的電泳圖 (MEKC)

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉+ 10 mM SDS，pH=9.5

分離電壓：18 kV

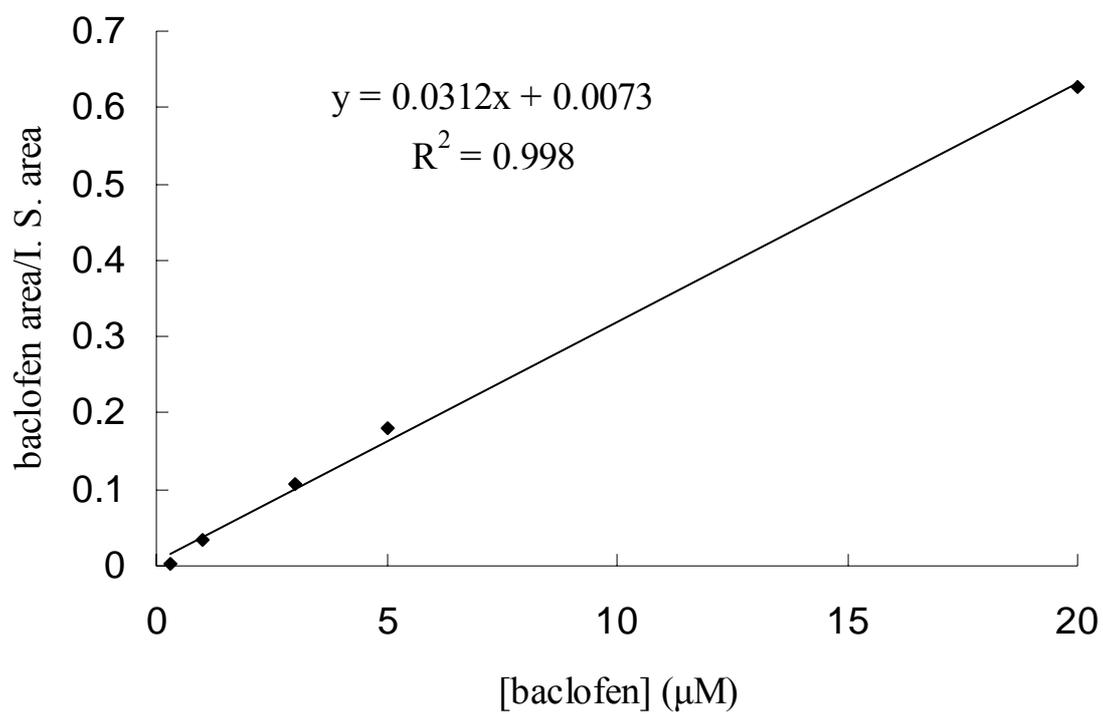
PMT 電位：1000 V

進樣方式：高度注射；20 cm，15 sec

毛細管：360  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  50  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  65 cm

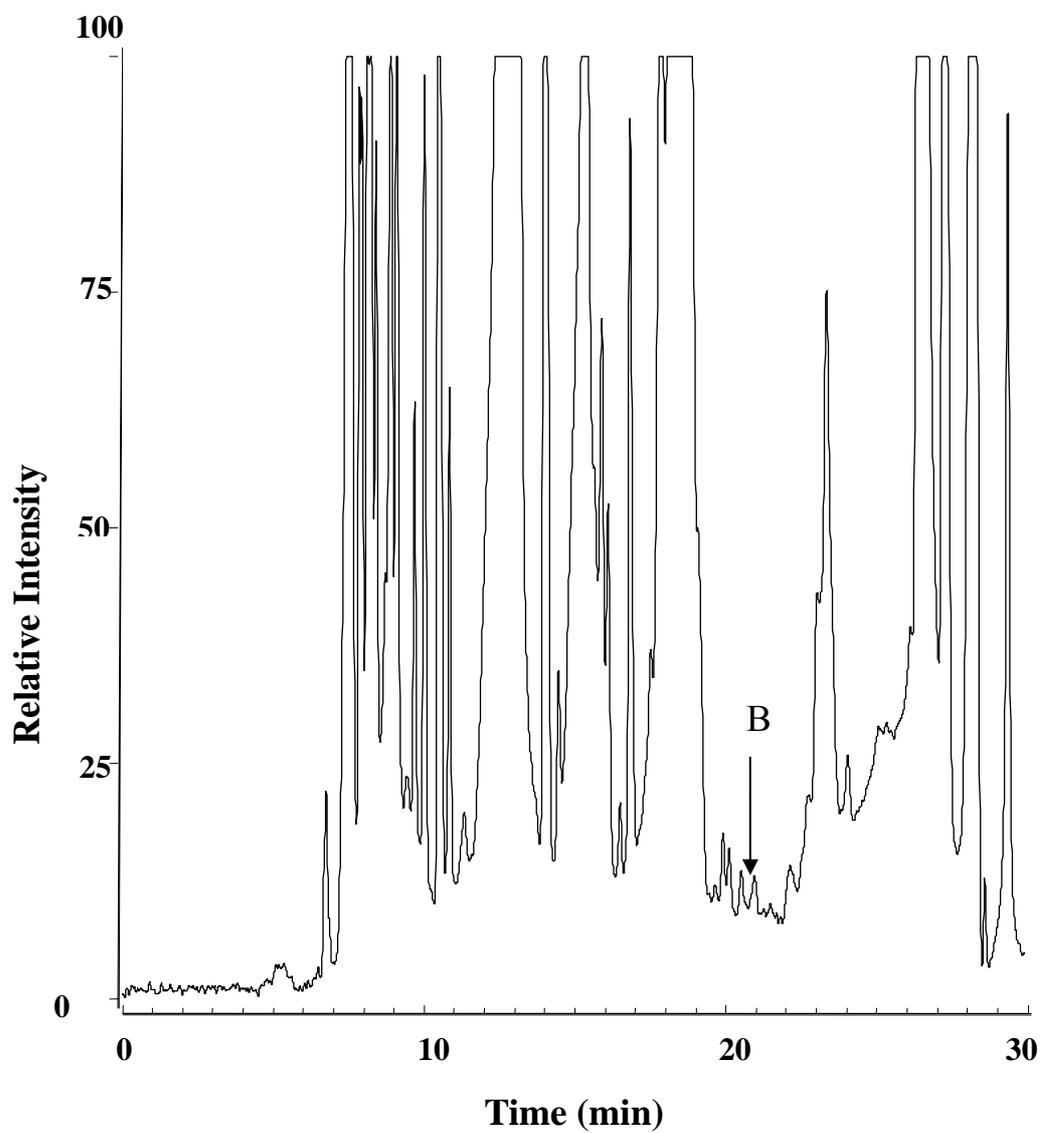
(有效長度 45 cm)

(A) Blank；(B) B = baclofen (3  $\mu\text{M}$ )；I.S. = PPA (40  $\mu\text{M}$ )



圖(二十八)經氫甲烷前處理之血漿樣品中 DCCS-baclofen 的檢量線

其他條件如圖(二十七)



(二十九) 血漿樣品中低濃度 DCCS-baclofen 的電泳圖 (MEKC)

分析物：0.2  $\mu\text{M}$  baclofen

其他條件如圖(二十七)

影響而導致靈敏度下降。根據文獻報導，在血漿樣品中添加氫甲烷，加上血漿中本來就含有約 150 mM的NaCl<sup>[83]</sup>，會導致分析物堆積而濃縮，使靈敏度提升。但是由實驗結果看來樣品堆積作用並不明顯，原因可能是要產生較佳的堆積效果，電泳緩衝溶液中氫甲烷的含量需達 66%左右<sup>[84]</sup>。但是在MEKC操作模式下，過多的有機溶劑會使界面活性劑無法形成微胞，因此分析物堆積濃縮方法不適用於MEKC之操作模式<sup>[85]</sup>。

根據文獻報導，以NDA為衍生試劑<sup>[70]</sup>，配合He-Cd 雷射進行CE/LIF 螢光偵測，血樣中baclofen的偵測極限為 0.05  $\mu$ M；以CFSE為衍生試劑<sup>[71]</sup>，配合Ar<sup>+</sup> 雷射進行CE/LIF 螢光偵測，baclofen的偵測極限為 0.1  $\mu$ M；以ADA為衍生試劑<sup>[72]</sup>，配合He-Ne雷射進行CE/LIF 螢光偵測，baclofen的偵測極限為 0.3  $\mu$ M。比較本研究與上述文獻報導baclofen分析方法之偵測極限，結果差異不大，影響偵測極限的最主要因素仍在於如何降低血漿中複雜基質的干擾。

為探討經由氫甲烷沉澱蛋白質前處理方法的回收率，分別添加 3  $\mu$ M 與 0.5  $\mu$ M 兩種不同濃度的 baclofen 於原始空白血漿樣品中進行分析，結果列於表(二)。3  $\mu$ M 與 0.5  $\mu$ M 兩種添加濃度下的回收率分別為 97.3 % 與 96.0 %，相對標準偏差 (RSD) 分別為 6.5 % 與 8.3 %。由於以氫甲烷處理血漿樣品回收率皆大於 96 %，代表添加的 baclofen 絕大部分都能從血漿樣品中

表(二)以氘甲烷前處理血漿樣品的 baclofen 回收率

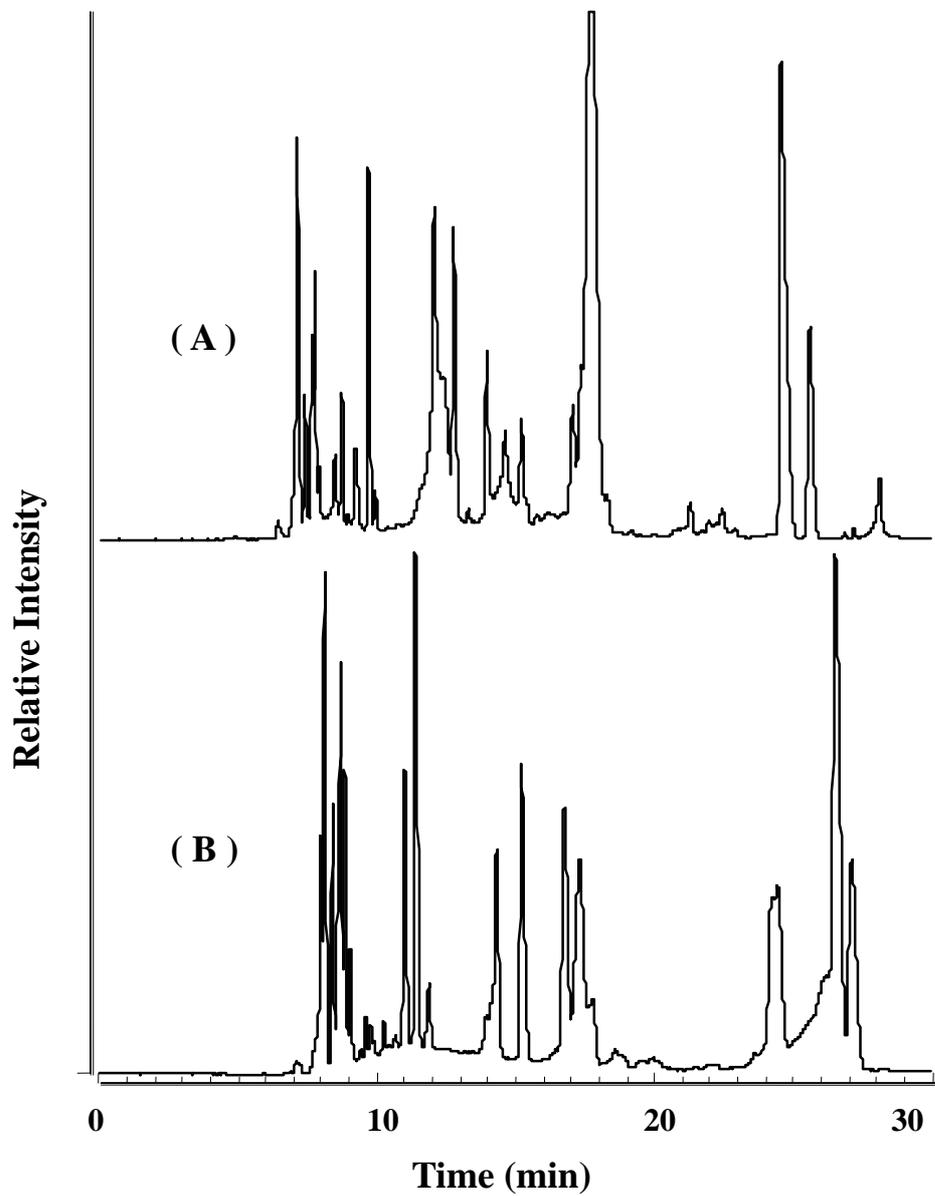
Added ( $\mu\text{M}$ )	Found (mean $\pm$ SD)	Recovery (%)	RSD(%)	n
3	2.92 $\pm$ 0.19	97.3	6.5	3
0.5	0.48 $\pm$ 0.04	96.0	8.3	3

其他實驗條件同圖(二十七)

分離出來，這顯示 baclofen 與血漿中的蛋白質結合率極低。實驗結果得知，以氫甲烷處理血漿樣品 baclofen 的回收率不差，但在偵測極限上仍不理想，顯示血漿樣品中基質干擾仍然嚴重，因此嘗試採用其他淨化樣品的前處理方式，以期降低偵測極限。

文獻上亦有報導使用超過濾( ultrafiltration )去除蛋白質分子的前處理方式，配合LC/MS/MS偵測分析血漿中baclofen 之鏡像異構物<sup>[ 69 ]</sup>。本實驗嘗試採用此方法來淨化血漿樣品基質。超過濾為一種以多孔性薄膜為基礎的分離技術，此方法是利用一固定平均孔洞大小的薄膜配合高速離心，使得低分子量分析物與高分子量蛋白質分離，而達到樣品淨化的目的。實驗時，取一 5000 NMWL 的Ultrafree-MC 薄膜，將 100  $\mu$ l原始血漿樣品放置其上，經過 30 分鐘 6000g的高速離心後，收集通過超過濾膜的血漿液體，而將殘留在薄膜上的平均分子量 >5000 的雜質丟棄。原本 100  $\mu$ l的血漿樣品經超過濾後，通過濾膜的血漿液體只剩 40  $\mu$ l，顯示此方法亦具濃縮樣品的作用。超過濾前處理可去除樣品中的大分子基質，具濃縮功能，過程中也不需添加任何化學試劑，操作簡單且快速，相當適合做為分析血漿的前處理方法。

圖(三十)顯示經兩種不同去除蛋白質的前處理方式所得的空白血漿電



圖(三十)兩種不同血漿樣品前處理方法的比較

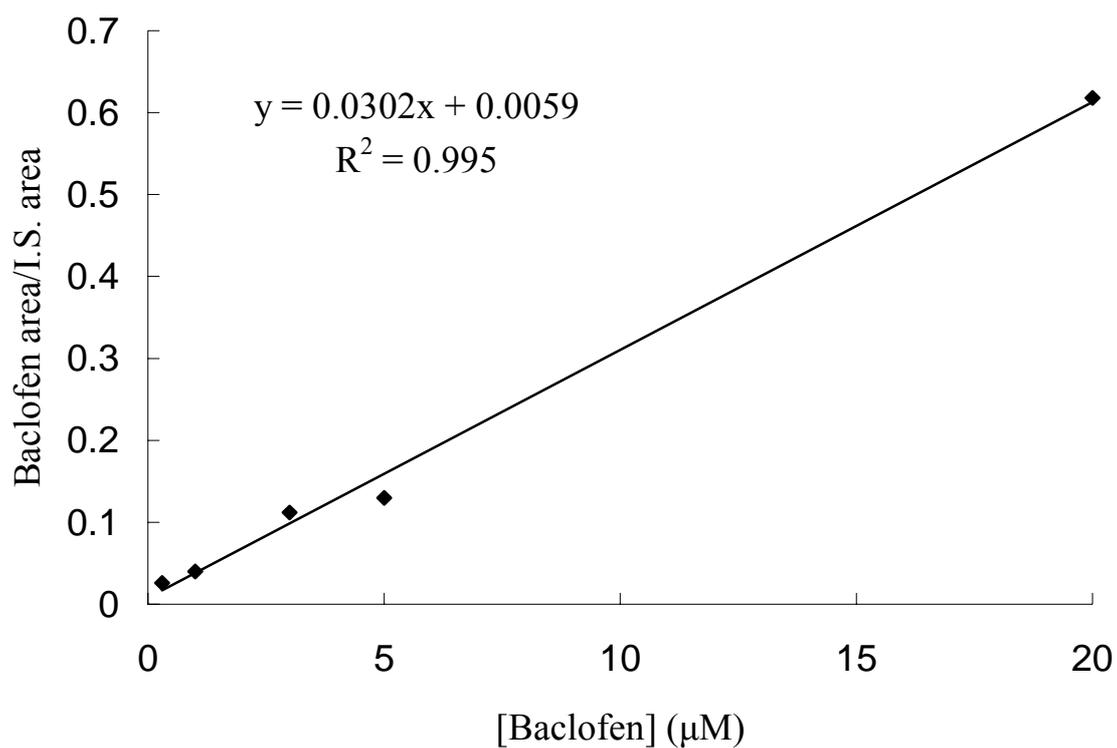
(A)以氰甲烷去除蛋白質分子；

(B)以超過濾去除蛋白質分子

其他條件同圖(二十七)

泳圖，其中圖三十(A)是以添加氫甲烷沉澱血漿中蛋白質；圖三十(B)是以超過濾方式去除血漿蛋白質。比較兩圖結果可看出圖三十(B)中血漿樣品的基質訊號比圖三十(A)的血漿樣品基質訊號略少。利用超過濾去除蛋白質的前處理配合進行血樣中 baclofen 的檢量線製作，結果如圖(三十一)。在 0.3-20  $\mu\text{M}$  線性範圍之間（均為前處理前添加之原始濃度），相關係數為 0.995 (n=5)，以訊號/雜訊比(S/N)為 3 所對應的濃度定義為 baclofen 的偵測極限，最接近 baclofen 濃度偵測極限之電泳圖顯示於圖(三十二)，血樣中 baclofen 的濃度偵測極限為 0.06  $\mu\text{M}$ 。比較兩種前處理方法檢量線的斜率 (0.0312 與 0.0302) 差異不大，顯示兩種前處理方法下分析血樣中 baclofen，所得到的靈敏度差不多，兩種前處理方法對於消除血樣中基質干擾的淨化能力亦無太大差別。為了證明超過濾前處理方法可適用於不同人的血漿分析，抽取實驗室三位同學的血液樣品進行分析，結果顯示於圖(三十三~三十五)。比較三圖得知，不同人的血漿所得的電泳圖皆雷同，表示此分析方法不會因個人體質的差異而受影響，因此可應用在不同人血液中之 baclofen 分析。

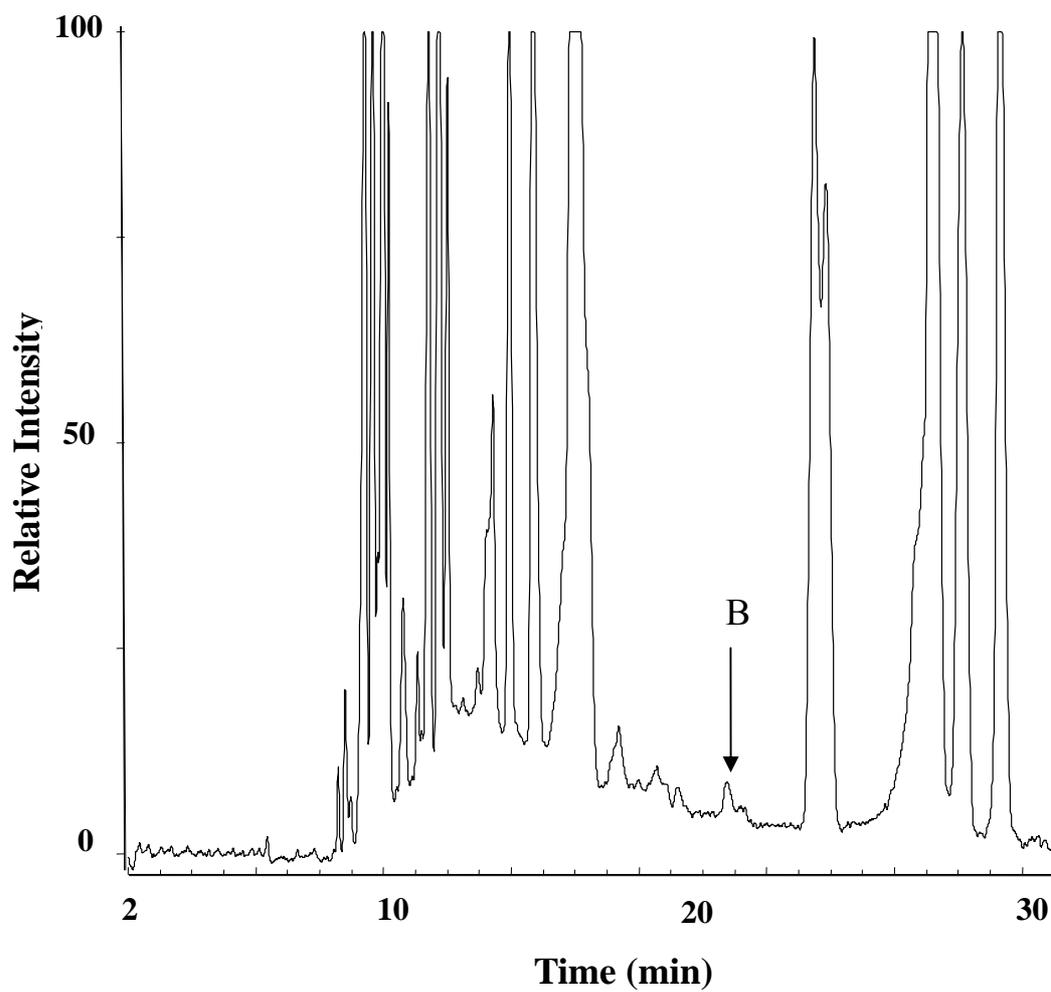
為探討超過濾方式前處理對 baclofen 的回收率，分別以添加 3  $\mu\text{M}$  及 0.3  $\mu\text{M}$  兩種不同濃度 baclofen 的血漿樣品進行試驗，結果列於表(三)。3  $\mu\text{M}$  及 0.3  $\mu\text{M}$  的添加回收率分別為 97.3 % 與 96.6 %，相對標準偏差(RSD)



圖(三十一)經超過濾前處理之血漿樣品中 DCCS-baclofen

的檢量線

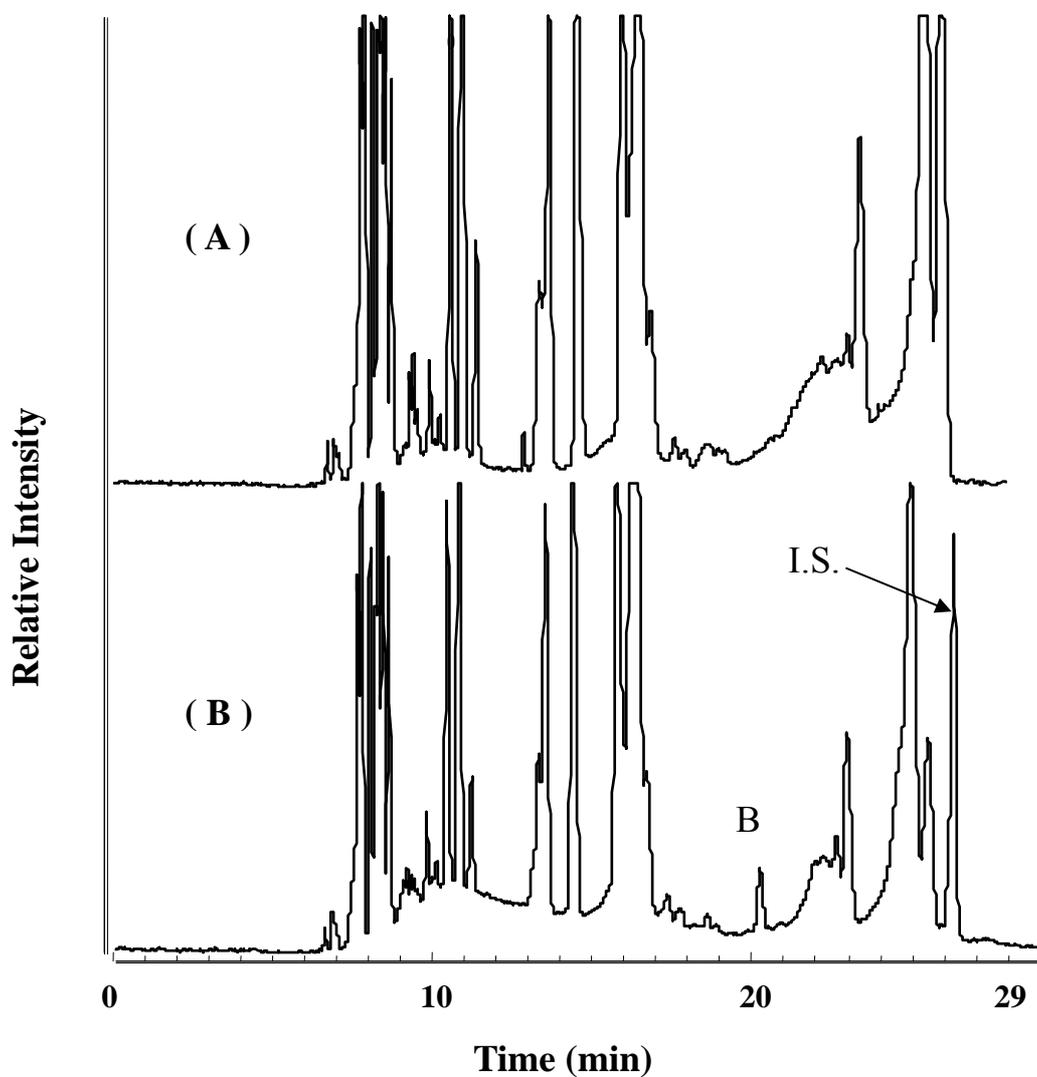
其他條件如圖(二十七)



圖(三十二) 血漿樣品中低濃度 DCCS-baclofen 的電泳圖

分析物：0.1  $\mu\text{M}$  baclofen

其他條件如圖(二十七)



圖(三十三)血漿樣品 A 中 DCCS-baclofen 的電泳圖

緩衝溶液：50 mM 硼酸鈉+ 10 mM SDS，pH=9.5

分離電壓：18 kV

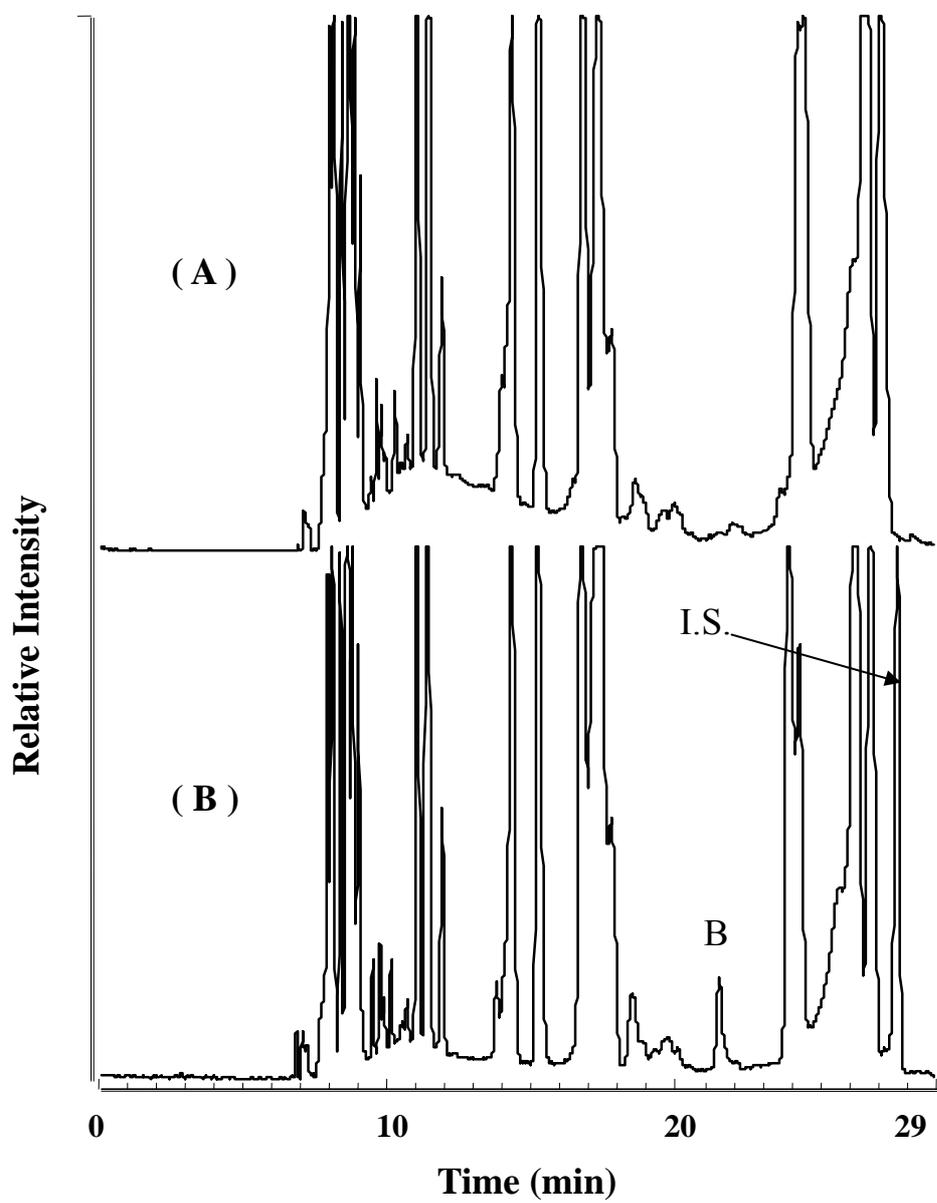
PMT 電位：1000 V

進樣方式：高度注射；20 cm，15 sec

毛細管：360 $\mu$ m O.D.  $\times$  50 $\mu$ m I.D.  $\times$  65 cm

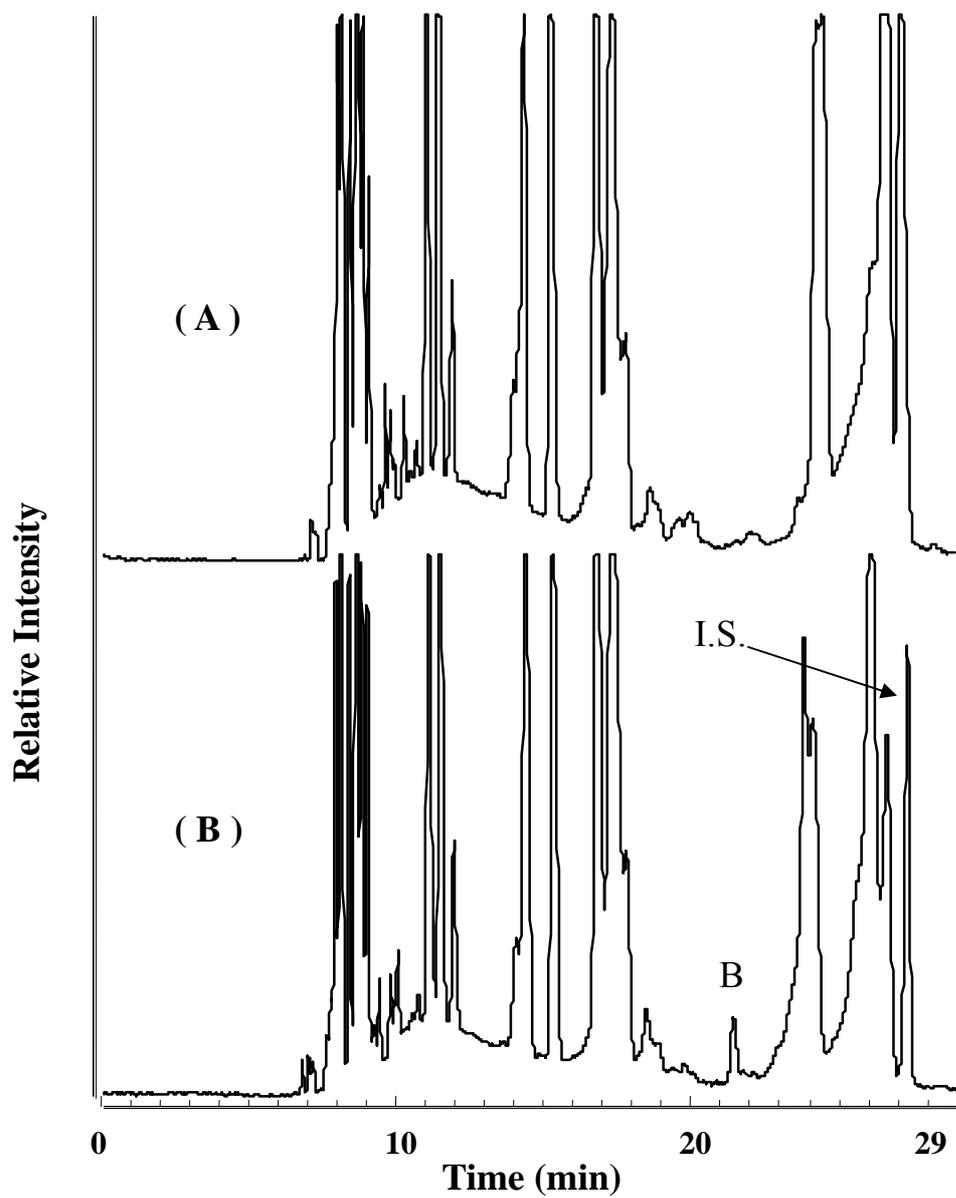
(有效長度 45 cm)

(A) Blank；(B) B = baclofen (3  $\mu$ M)；I.S.= PPA (40  $\mu$ M)



圖(三十四)血漿樣品 B 中 DCCS-baclofen 的電泳圖

其他實驗條件同圖(三十三)



圖(三十五)血漿樣品 C 中 DCCS-baclofen 的電泳圖

其他實驗條件同圖(三十三)

表(三)以超過濾前處理血漿樣品的 baclofen 回收率

Added ( $\mu\text{M}$ )	Found (mean $\pm$ SD)	Recovery (%)	RSD(%)	n
3	2.92 $\pm$ 0.15	97.3	5.1	3
0.3	0.29 $\pm$ 0.02	96.6	6.9	3

其他實驗條件同圖(三十三)

分別為 5.1 % 與 6.9 %。比較超過濾去除蛋白質與氫甲烷沉澱蛋白質兩種前處理，由於超過濾方式對於血漿樣品的淨化能力較添加氫甲烷方式稍佳，在後續的 MEKC/LIF 分析血漿樣品時前者之基質干擾較後者小。無論在濃度偵測極限，低濃度回收率與 RSD 上，超過濾去除蛋白質方式都有稍佳的結果。

### 三、確效試驗

為了評估本分析方法在同一天與不同天重複分析相同樣本可能產生的差異，接著進行分析確效( assay validation )的試驗。由於Ultrafree-MC超過濾薄膜價格昂貴，我們仍採用氫甲烷去除蛋白質之前處理方式進行此試驗。實驗中利用正常人血漿分別添加  $3\mu\text{M}$  及  $0.3\mu\text{M}$  兩種不同濃度 baclofen，進行 Within-Day (  $n=5$  ) 與 Day to Day ( 5 days,  $n=10$  ) 的再現性測試。結果列於表(四)。表中分別以相對標準偏差( RSD )及相對平均誤差( RME )來顯示系統的精密度( Precision )與準確度( Accuracy )，其中 Within-Day 與 Day to Day 的 RSD 分別小於 7.1% 與 10.7 %，而 RME 皆小於 -6.7% ，RME 均為負值代表可能是血漿中基質干擾或是樣品前處理過程中造成的樣品損失，使實驗所得的 baclofen 濃度小於添加的濃度。依據“Bioanalytical Method Validation”<sup>[86]</sup> 的標準，在各種濃度範圍中，其 RSD 及 RME 需在 15% 以內。本方法的 RSD 及 RME 皆符合要求，顯示本方法具有不錯的再現性及準確度。

表(四)分析血漿中 baclofen 的確效試驗

Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Found (mean $\pm$ SD)	RSD (%)	RME (%)	n
Within-Day				
3.00	2.99 $\pm$ 0.16	6.7	-1.0	5
0.30	0.28 $\pm$ 0.02	7.1	-6.7	5
Day to Day (5 days)				
3.00	2.95 $\pm$ 0.22	7.5	-1.7	10
0.30	0.28 $\pm$ 0.03	10.7	-6.7	10

本試驗以氘甲烷處理血漿樣品

## 肆、結論

本研究利用微胞電動毛細管層析( MEKC )配合藍紫光( 410 nm )二極體雷射激發螢光偵測，成功地應用於血樣中微量baclofen 的分析。結果顯示利用新型的二極體雷射，也能得到與傳統氣體雷射相同的分析靈敏度。與傳統氣體雷射比較，二極體雷射具有波長短、壽命長、穩定性高、體積小與價格便宜等優點。利用 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester ( DCCS )將不具螢光性質的baclofen進行管柱前衍生，配合添加氰甲烷沉澱蛋白質或超過濾的前處理方法淨化血漿樣品，可在 30 分鐘內完成 baclofen 的分離。血漿樣品中 baclofen 的檢量線線性範圍 0.3 ~20  $\mu\text{M}$ ， $r^2 = 0.995$ ，血漿中baclofen的濃度偵測極限為 0.06  $\mu\text{M}$ 。添加 0.3  $\mu\text{M}$  baclofen於血樣中的回收率大於 96 %，相對標準偏差小於 7 %。根據報導，baclofen 在人體血漿中藥物動力學濃度範圍一般為 0.1~1.5  $\mu\text{M}$ ，本方法對於血漿中低濃度的baclofen定量能力尚有不足，問題出在血漿樣品的基質非常複雜，常會干擾分析。未來應發展其他更有效的樣品淨化與分析物濃縮技術，以降低定量偵測極限。

## 伍、參考文獻

1. A. Tiselius, *Trans Faraday Soc.*, 23 (1937) 524-531
2. S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967) 122-239
3. R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.*, 123 (1974) 1-67
4. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs., *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298-1302
5. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111-113
6. T. Tsuda, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 521-523
7. S. Hjertén and M. D. Zhu, *J. Chromatogr.*, 346 (1985) 265-270
8. A. S. Cohen and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 409-417
9. D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux and A. Manz, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2623-2636
10. P.-A. Auroux, D. Iossifidis and Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2637-2652
11. D. Figeys and D. Pinto, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 330A-335A
12. K. Bächmann, J. Boden and I. Haumann, *J. Chromatogr.*, 626 (1992) 259-265
13. Y. C. Chao and C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 229-237
14. 江憲宗，以毛細管電泳/雷射激發螢光間接偵測法分析硒及銻類化合物，朝陽科技大學應用化學研究所，碩士論文，台中（2002）。
15. E. D. Zlotorzynska and J. F. Dlouhy, *J. Chromatogr. A*, 685 (1994) 145-153
16. B. L. Hogan and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2841-2845
17. V. Dolník and J. Dolníková, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 269-277
18. D. F. Swaile and M. J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, Vol. 63 (1991) 179-184
19. J. Schneede and P. M. Ueland, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 812-819
20. C. E. Lin, C. C. Chang, W. C. Lin and E. C. Lin, *J. Chromatogr. A*, 753 (1996)

133-138

21. I. S. Lurie, R. F. X. Klein, T. A. D. Cason, M. J. LeBelle, R. Brenneisen and R. E. Weinberger, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4019-4026
22. C. A. Kuffner, E. Marchi, J. M. Morgado and C. R. Rubio, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 241A-246A
23. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 349-354
24. J. Cai and J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 667-692
25. S. Y. Chang and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2251-2257
26. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298-1302
27. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 209-216
28. G. Ewing, R. A. Wallingford and T. M. Clefirowicz, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 292A-303A.
29. A. Cohen and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 409-417
30. D. N. Heiger, "High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction", Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, (1992) 58-59
31. X. Huang, M. J. Gordon and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 375-377
32. M. Deml, F. Foret and P. Boček, *J. Chromatogr.*, 320 (1985) 159-165
33. T. Tsuda, T. Mizuno and J. Akiyama, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 799-800
34. R. A. Wallingford and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 678-681
35. Y. Xue and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1988-1993
36. J. P. Chervet, R. E. J. Van Soest and M. Ursem, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 439-449
37. J. A. Taylor and E. S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 550 (1991) 831-837
38. E. Gassmann, J. E. Kuo and R. N. Zare, *Science*, 230 (1985) 813-814
39. D. Y. Chen, K. Adelhelm, X. L. Cheng and N. J. Dovichi, *Analyst*, 119 (1994) 349-352
40. R. J. V. D. Nesse, N. H. Velthorst, U. A. T. Brinkman and C. Gooijer, *J.*

- Chromatogr. A*, 704 (1995) 1-25
41. A. J.G. Mank and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. A*, 708 (1995) 309-321
42. S. V. Rahavendran and H. T. Karnes, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3022-3027
43. D. L. Gallaher, Jr. and M. E. Johnson, *Analyst*, 124 (1999) 1541-1546
44. J. E. Melanson and C. A. Lucy, *Analyst*, 125 (2000) 1049-1052
45. H.A. Bardelmeijer, H. Lingeman, C. de Rooter and W.J.M. Underberg, *J. Chromatogr. A*, 807 (1998) 3-26
46. W. F. Nielen, *J. Chromatogr.*, 608 (1992) 85-92
47. A. Arora, J. C. T. Eijkel, W. E. Morf and A. Manz, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3282-3288
48. 江美足，毛細管電泳/電激發化學發光偵測法的開發研究，東海大學化學研究所，碩士論文，台中（2002）
49. L. A. Colón, R. Dadoo and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 476-481
50. T. M. Olefirowicz and A. G. Ewing, *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 713-719
51. W. Jin and J. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 868 (2000) 101-107
52. X. Huang and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 189-192
53. C. W. Whang and I. C. Chen, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2461-2464
54. A. G. Ewing, J. M. Mesaros and P. F. Gavin, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 527A-537 A
55. J. Cai, and J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 667-692
56. Y. Lin, V. L. Avila, J. J. Zhu, D. R. Wiederin and W. F. Beckert, *Anal. Chem.*, 67(1995) 2020-2025
57. P. H. Degen and W. Riess, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 399-405
58. C. F. Terrence, M. Sax, G. H. Fromm, C. H. Chang and C. S. Yoo, *Pharmacology*, 27 (1983) 85-94
59. G. H. Fromm and C. F. Terrence, *Neurology*, 37(1987) 1725-1732
60. S. Tosunoglu, L. Ersoy, *Analyst*, 120 (1995) 373-375

- 61.C. G. Swahn, H. Beving, G. Sedvall, *J. Chromatogr.*, 162 (1979) 433-438
- 62.A. Sioufi, G. Kaiser, F. Leroux, J.P. Dubois, *J. Chromatogr.*, 405 (1988)  
221-232
- 63.P.M. Harrison, A.M. Tonkin, A.J. McLean, *J. Chromatogr.*, 339 (1985)  
424-428
- 64.E.W. Wuis, L.E.C. van Beijsterveldt, R.J.M. Dirks, T.B. Vree, E. van der  
Kleyn, *J. Chromatogr.*, 420 (1987) 212-216
- 65.E.W. Wuis, R.J.M. Dirks, T.B. Vree, E. van der Kleyn, *J. Chromatogr.*, 337  
(1985) 341-350
- 66.L. Millerioux, M. Brault, V. Gualano, A. Mignot, *J. Chromatogr. A*, 729  
(1996) 309-314
- 67.Z. Zhu, L. Neirinck, *J. Chromatogr. B*, 785 (2003) 277-283
- 68.M. Flärdh, B.-M. Jacobson, *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 169-173
- 69.R. Goda, N. Murayama, Y. Fujimaki, K Sudo, *J. Chromatogr. B*, 801 (2004)  
257-264
- 70.M.-T Chiang, S. Y. Chang, C.-W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 877 (2000)  
233-237
71. Y.-S. Gu, C.-W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 972 (2002) 289-293
- 72.S. Y. Chang, H. Yang, *Chromatographia*, 57 (2003) 852-829
- 73.M.-T Chiang, S. Y. Chang, C.-W. Whang, *Electrophoresis*, 877 (2000)  
123-127
- 74.I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2064-2069
- 75.P. S. Bonato, *Electrophoresis*, 24 (2003) 4078-4094
- 76.曾明吉, 血液淨化裝置作業技術規範, 醫療器材技術規範 13, 台北(2000)
- 77.R.P. Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,  
6th ed., Molecular Probes, Eugene, OR, 1996
- 78.T. Higashijima, T. Fuchigami, T. Imasaka and N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, 64

(1992) 711-714

- 79.M. Brinkley, *Bioconjugate Chem*, 3 (1992)2-13
- 80.T. Tsuda, J. V. Sweedler and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2149-2152
- 81.何敏夫，血液學，合記圖書出版社，台北（1993）
- 82.何敏夫，洪銘洲，血庫學，合記圖書出版社，台北（1999）
- 83.Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 902(2000) 107-117
- 84.Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 744(1996) 231-240
- 85.Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 807(1998) 27-36
- 86.US Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001.  
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (1992)