

東海大學化學系

碩士論文

指導教授：黃承文 博士

毛細管電泳結合多孔洞中空纖維/液相微萃取

應用於三環抗憂鬱劑的分析

Analysis of Tricyclic Antidepressants by  
Capillary Electrophoresis Coupled with  
Hollow Fibre-Based Liquid-Phase Microextraction



研究生：林士崇 撰

中華民國九十四年七月

# 摘要

憂鬱症是一種全身性的疾病，包括生理、情緒及思想。世界衛生組織預測憂鬱症將是 21 世紀影響人類生活最重要的疾病之一。三環抗憂鬱劑(Tricyclic Antidepressants; TCAs)如 Amitriptyline、Doxepin、Imipramine 等，或稱傳統性抗憂鬱劑，為目前治療憂鬱症的第一線藥物，於血漿中的治療濃度範圍大約在 100 至 300  $\mu\text{g/L}$ 。但當濃度超過 500 $\mu\text{g/L}$  會有中毒的現象產生。這類藥物的分子量、結構與 pKa 值都很相似，因此不易分離。

本研究利用管壁塗覆 PDMA (polydimethylacrylamide) 的毛細管 (52  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  366  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  60 cm，有效長度 48 cm) 配合 50 mM 磷酸鈉 (pH 3.0) 緩衝溶液添加 0.5 mM  $\beta$ -環糊精，成功的以毛細管電泳分離九種結構相似的三環抗憂鬱劑，並且順利分離其中具有幾何異構物與鏡像異構物的分析物。結合多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取方法進行樣品前處理，配合 CE-UV 偵測，於水溶液中可得到 0.01  $\mu\text{M}$  ~ 0.5  $\mu\text{M}$  TCAs 的偵測極限，於血漿中可得到 0.25  $\mu\text{M}$  ~ 0.8  $\mu\text{M}$  TCAs 的偵測極限。血漿樣品中 TCAs 的回收率大於 93%，相對標準偏差小於 5.5%。實驗證明本研究所發展的方法可應用於人體血漿中微量 TCAs 的分析。

# 目錄

摘要 .....	I
目錄 .....	II
圖目錄 .....	V
表目錄 .....	VII
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.....	3
三、毛細管電泳的分離模式.....	6
1.毛細管區帶電泳 (CZE) .....	6
2.微胞電動毛細管層析 (MEKC) .....	8
3.毛細管凝膠電泳 (CGE) .....	8
4.毛細管等電聚焦法(CIEF).....	10
5.毛細管等速電泳 (CITP) .....	10
四、毛細管電泳的進樣方式.....	12
五、毛細管電泳的偵測方式.....	13
1.紫外-可見光 (UV-VIS) 吸收偵測.....	13
2.螢光放射偵測.....	14

六、三環抗憂鬱劑簡介.....	15
七、液相微萃取簡介.....	26
八、研究動機.....	39
貳、實驗.....	40
一、儀器設備.....	40
二、藥品.....	42
三、實驗方法.....	45
1.儲存溶液 (stock solution) 的配製.....	45
2.電泳緩衝溶液的配製 .....	45
3.血漿樣品前處理 .....	45
4.毛細管內壁鍵結相的製備 .....	46
(a) 毛細管的前處理 .....	46
(b) 塗覆步驟 .....	46
5.多孔洞中空纖維管為主的 LPME 萃取步驟 .....	47
(a) 水溶液品 .....	47
(b) 血漿樣品 .....	48
6.樣品注入方式與毛細管清洗 .....	48
參、結果與討論.....	49

一、毛細管的管壁塗覆	49
二、DMA 濃度對管壁塗覆的影響	53
三、毛細管塗覆再現性	55
四、緩衝溶液中添加 $\beta$ -環糊精對 TCAs 分離的影響	58
五、緩衝溶液濃度之影響	69
六、緩衝溶液 pH 值之影響	72
七、重力注射進樣時間之探討	73
八、最佳分離條件	76
九、液相微萃取濃縮配合毛細管電泳分析	84
十、血漿樣品分析	90
肆、結論	96
伍、參考文獻	98

## 圖目錄

圖(1)毛細管電泳基本裝置.....	4
圖(2)毛細管區帶電泳示意圖.....	7
圖(3)微胞電動毛細管層析示意圖.....	9
圖(4)毛細管凝膠電泳示意圖.....	9
圖(5)毛細管等電聚焦法示意圖 .....	11
圖(6)毛細管等速電泳示意圖 .....	11
圖(7)LPME 裝置圖 .....	27
圖(8)U 字形結構 LPME 裝置圖 .....	29
圖(9)Hollow fibre-based LPME 的基本原理.....	31
圖(10)主動傳輸方法的基本原理 .....	33
圖(11)動態模式的 LPME .....	34
圖(12)rod-like 結構 LPME 裝置圖 .....	36
圖(13)U-shaped 結構 LPME 裝置圖.....	37
圖(14)TCAs 在一般毛細管中之電泳圖 .....	50
圖(15)毛細管壁 PDMA 聚合反應的流程圖.....	52
圖(16)不同濃度 DMA 塗覆毛細管對 TCAs 分離的影響 .....	54
圖(17)9 種三環抗憂鬱劑的電泳分離結果 .....	59
圖(18)環糊精分子結構側視圖.....	60

圖 (19) 環糊精之化學結構圖.....	61
圖 (20) 環糊精輔助分離的主要機制.....	63
圖 (21) 9 種 TCAs 在緩衝溶液中添加 0.4 mM $\beta$ -CD 後的電泳圖.	65
圖 (22) 緩衝溶液中添加不同濃度 $\beta$ -CD 對 Thioridazine 之鏡像異構物解析度的影響 .....	67
圖 (23) 緩衝溶液中添加不同濃度 $\beta$ -CD 對 Doxepin 之幾何異物解析度的影響.....	67
圖 (24) 緩衝溶液添中加不同濃度 $\beta$ -CD 對 9 種 TCAs 分離影響.	68
圖 (25) 緩衝溶液添中加不同濃度 $\beta$ -CD 對 TCAs 遷移時間的影響 .....	70
圖 (26) 不同濃度磷酸鈉緩衝溶液對 9 種 TCAs 分離的影響.....	71
圖 (27) 緩衝溶液 pH 值對分析物遷移時間的影響.....	74
圖 (28) 進樣時間對理論板數與訊號高度的影響.....	75
圖 (29) 進樣時間 15 秒之三環抗憂鬱劑電泳分離圖 .....	77
圖 (30) 最佳條件下 9 種 TCAs 的電泳分離圖.....	78
圖 (31) Doxepin 之幾何異構物.....	80
圖 (32) 3 種 TCAs 經液相微萃取前後的比較.....	85

## 表目錄

表 (1) 九種 TCAs 之分子結構、分子量與 pKa 值	17
表 (2) CE 在 TCAs 分析上的應用	22
表 (3) Promazine 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析	56
表 (4) Trimipramine 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析	56
表 (5) Amitriptyline 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析	57
表 (6) Doxepin 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析	57
表 (7) 9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限	82
表 (8) 水溶液樣品中 9 種 TCAs 的 CE 分離再現性	83
表 (9) 液相微萃取後 9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限	86
表 (10) 經萃取處理前後 9 種 TCAs 偵測極限的比較	88
表 (11) 經萃取後水溶液樣品中 9 種 TCAs 的 CE 分離再現性	89
表 (12) 4 種 TCAs 在血漿中的分析檢量線與偵測極限	91
表 (13) 血漿中 4 種 TCAs 經多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取之回收率	93
表 (14) Desipramine 回收率之 ANOVA 分析	94
表 (15) Imipramine 回收率之 ANOVA 分析	94
表 (16) Nortriptyline 回收率之 ANOVA 分析	94
表 (17) Amitriptyline 回收率之 ANOVA 分析	94

# 壹、緒論

## 一、毛細管電泳的發展

電泳 (electrophoresis) 是指帶電物質在電場中因受到吸引或排斥而引起的遷移運動，利用這種速差移動作為分離的方式，稱作電泳技術。電泳技術的發展已有百年的歷史，但其受重視是從 1937 年瑞典科學家 Tiselius 成功地將人類血清蛋白質以電泳技術分為白蛋白、 $\alpha$  球蛋白、 $\beta$  球蛋白與  $\gamma$  球蛋白<sup>[1]</sup>，電泳技術從此受到重視。由於 Tiselius 的卓越貢獻，他在 1948 年獲頒諾貝爾獎。

傳統電泳通常是在以凝膠 (gel)、聚丙醯胺 (polyacrylamide) 或是纖維素 (cellulose) 為介質的平板或管柱中進行。傳統電泳最大的問題在於採用高電壓分離時所引起的焦耳熱，會造成平板從中心至兩側或管柱內徑中的黏度與速度產生梯度變化，導致分析物區帶變寬、降低分離效率，且其影響會隨電場強度的增加而加大，因此限制了高電壓的使用範圍，也難以提高分離的速度。

為了改善傳統平板電泳的缺點，科學家發展出使電泳於細孔管或毛細管中進行的方法。1967 年 Hjerten 採用毛細管繞其縱軸旋轉的方式來削弱熱對流所造成的影響，成功地以電泳來分離無機離子、蛋白質與核酸<sup>[2]</sup>。1974 年 Virtanen 用 200 ~ 500  $\mu\text{m}$  內徑的玻璃材質與聚四氟乙烯材質的毛細管進行了電泳實驗，證實了能利用小內徑的毛細管

以控制焦耳熱的產生<sup>[3]</sup>。1981年Jorgenson與Lukacs<sup>[4-5]</sup>以75 μm內徑的石英毛細管柱，施加高電壓來分離經衍生後的胺基酸，證明毛細管區帶電泳（capillary zone electrophoresis, CZE）的確是一種高效率且具實用價值的分離技術。

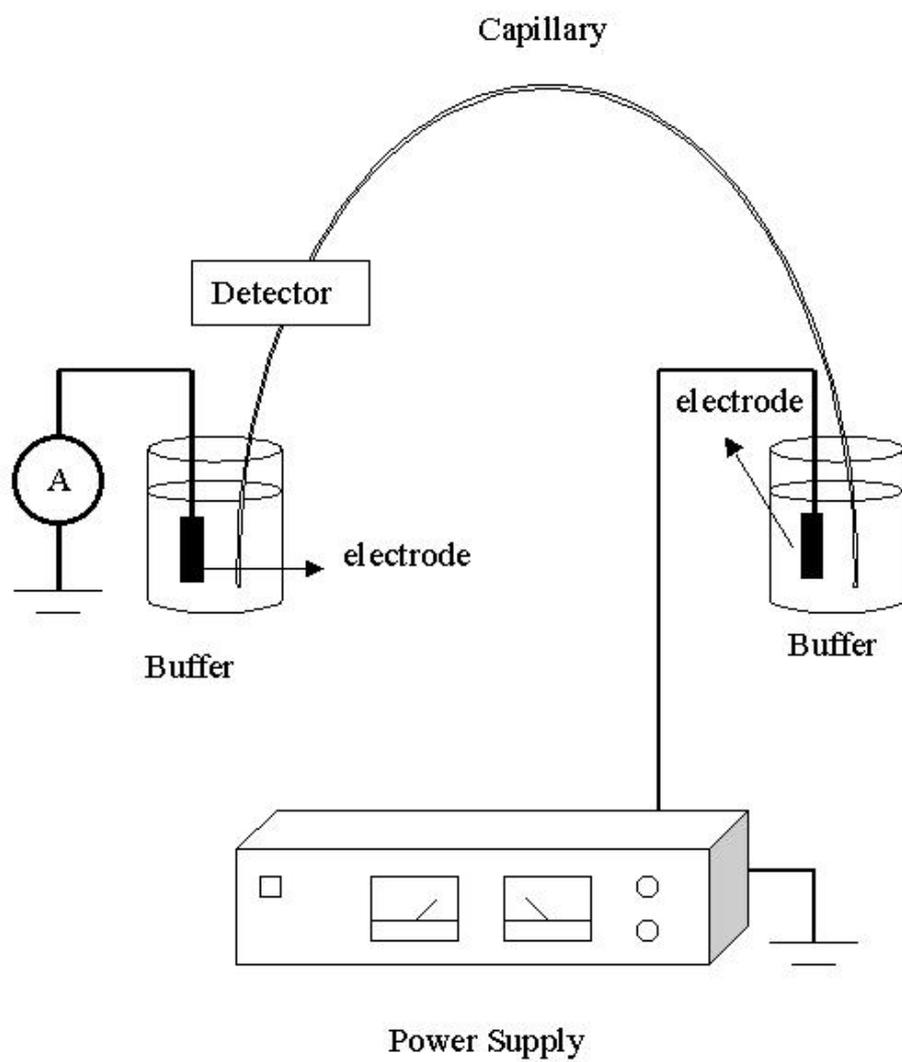
電泳是分離帶電物質的方法，不帶電的物質只會被電滲流帶動，彼此的遷移率並無差異，因此早期無法使用毛細管電泳來進行分析。1984年Terabe<sup>[6]</sup>突破此限制，於緩衝溶液中添加高濃度的界面活性劑，使其產生微胞，利用待測物分子在微胞和緩衝溶液之間的不同分配係數來達成分離，這就是所謂的微胞電動毛細管層析法（micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC或MEKC），此技術擴展了毛細管電泳的應用範圍。1985年Tsuda<sup>[7]</sup>結合毛細管電泳與液相層析的特色，在毛細管中填充表面含有固定相的顆粒，施加高電壓進行分離，這就是所謂的毛細管電層析（capillary electrochromatography, CEC）。同年Hjerten提出毛細管等電聚焦（capillary isoelectric focusing, CIEF），此技術成功地應用於蛋白質分析<sup>[8]</sup>。1987年，Cohen和Kager發表了毛細管凝膠電泳（capillary gel electrophoresis, CGE）<sup>[9]</sup>，主要應用於蛋白質等生化大分子的分離。1988年Rose和Jorgenson成功地利用毛細管電泳作為微量製備的工具<sup>[10]</sup>。近年來則有熱門的微晶片電泳法的出現，此技術將毛細管電泳的實用價值推上更高一層的里

程碑<sup>[11-13]</sup>。

毛細管電泳具有高分離效率、分析速度快、所需樣品量少等三大特性，1988年商品化的毛細管電泳儀上市後<sup>[14]</sup>，更提高了使用上的便利性，可廣泛的應用於藥物與DNA的鑑定分析<sup>[15-17]</sup>、環境檢測<sup>[18-20]</sup>、生化醫學分析<sup>[21-24]</sup>等各領域。而隨著毛細管電泳與質譜儀間介面的開發趨於成熟<sup>[25-26]</sup>，CE-MS結合更可提供分析物之分子量與化學結構的重要資訊。毛細管電泳已成為分析化學中舉足輕重的分析技術。

## 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 (1)。電泳是依據樣品離子在電場下質荷比差異產生不同的泳動速度而達成分離。毛細管材質通常為熔融矽，當管中緩衝溶液的 $\text{pH} \geq 2$ 時，毛細管內壁表面的矽醇基 (SiOH) 會解離成 $\text{SiO}^-$ 而帶負電，此時緩衝溶液中正離子會被管壁所吸引，形成電雙層 (electric double layer)。在外加電場的作用下，擴散層中的水合正離子會牽動整個溶液往陰極方向移動，形成電滲流 (electroosmotic flow, EOF)<sup>[29]</sup>。樣品離子向陰極移動的過程中，除了自身受電場作用而產生的泳動速度外，還受到管內溶液電滲流的影響，樣品離子在毛細管中的淨移動速度 ( $v$ )



圖（1）毛細管電泳基本裝置圖

是結合電滲流速度與本身泳動速度兩者向量和，以公式（1）表示：

$$v = v_e + v_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo}) \cdot E = (\mu_e + \mu_{eo}) \frac{V}{L_t} \quad (1)$$

式中各參數定義如下：

$v$ ：電泳淨速度（m/s）       $v_e$ ：樣品離子的泳動速度（m/s）

$v_{eo}$ ：電滲流流速（m/s）       $\mu_e$ ：電泳淌度（ $\text{m}^2/\text{V} \times \text{s}$ ）

$E$ ：電場強度（V/m）       $\mu_{eo}$ ：電滲流淌度（ $\text{m}^2/\text{V} \times \text{s}$ ）

$V$ ：外加電壓（V）       $L_t$ ：毛細管總長度（m）

一般情況下，毛細管表面帶負電，電滲流的方向是由正極到負極。由於電滲流可以比離子的電泳淌度大一個數量級，能夠將所有離子推向負極，故陰離子、中性物質與陽離子可往同一方向遷移而在一次分析中得到分離。其中陽離子因為遷移方向與電滲流相同，所以移動最快；中性物質因不帶電荷，其遷移速度便等於電滲流的速度；而陰離子則因為遷移方向與電滲流相反導致速度最慢。

毛細管電泳的分離效率可以理論板數（ $N$ ）描述，如公式（2），理論板數越高，表示分離效率越好。

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

式中各參數定義如下：

H：理論版高 (m)       $L_d$ ：注入端到偵測器的距離 (有效長度) (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)

由公式 (2) 可觀察到，理論板數與電場強度成正比，而與離子的擴散係數成反比。電場越大，分離效率越高。

### 三、毛細管電泳的分離模式

毛細管電泳技術至今已發展出多種模式，分離機制各不相同，其命名通常按照其分離原理而來。

#### 1. 毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)

在各種分離模式中，毛細管區帶電泳是最簡單也是應用最廣的一種，如圖 (2)。樣品離子依本身電荷與質量的差異，不同的離子區帶以不同的速率移動而被分離。CZE 應用範圍包含：胺基酸、蛋白質、鏡像異構物、離子態物種的分離。此分離模式需注意的地方有兩項：一、各分析物離子的電泳速度需不同；二、避免分析物離子或樣品基質吸附在管壁上。此外，為了提高分離的效果，有時也會在緩衝溶液中加入修飾劑，其中介面活性劑是使用最多的一種，在低於臨界微胞濃度 (critical micellar concentration, CMC) 下，離子性界面活性劑

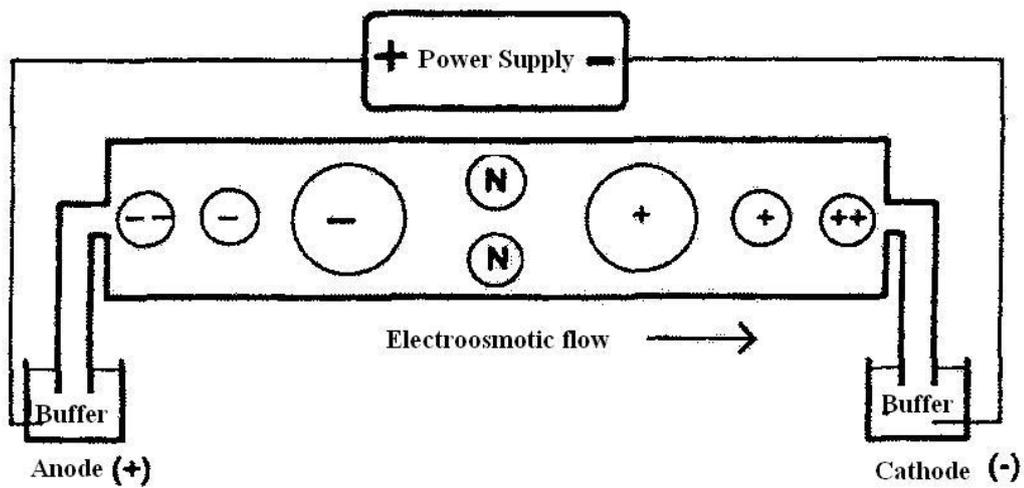


圖 (2) 毛細管區帶電泳示意圖

可使毛細管內壁改性，減少分析物在管壁的吸附。

## 2. 微胞電動毛細管層析 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)

微胞電動毛細管層析是唯一能分離中性溶質又可分離帶電離子的電泳技術，方式是在電泳緩衝溶液中添加高濃度的界面活性劑。當界面活性劑濃度超過其臨界微胞濃度，溶液中的界面活性劑分子聚集形成微胞 (micelle)，微胞的疏水端向內排列，電荷端朝向緩衝溶液，以微胞的疏水性中心作為偽固定相 (pseudo-stationary phase) 來進行層析，如圖 (3)，不同分析物依其與微胞有不同的疏水依附性而在毛細管內被分離，疏水性強的分析物與微胞的作用大，因此滯留在微胞中的時間較長。

## 3. 毛細管凝膠電泳 (capillary gel electrophoresis, CGE)

毛細管凝膠電泳主要用於分離生物大分子物質，如蛋白質、DNA、核酸與碳水化合物等。在此操作模式中，毛細管內添加特定孔徑大小的凝膠，其具有分子篩的功能，可作為電泳分離的介質。凝膠亦為非傳導性的介質，故可減少溶質擴散而導致區帶變寬的現象。如圖 (4) 所示，當樣品離子在一種類似網狀的環境中，於外加電場作用下由一極往另一極移動，因樣品離子的形狀大小不同，所受的阻力也不同，使移動速度產生差異因而達到分離的目的。CGE 的優點在於可施加

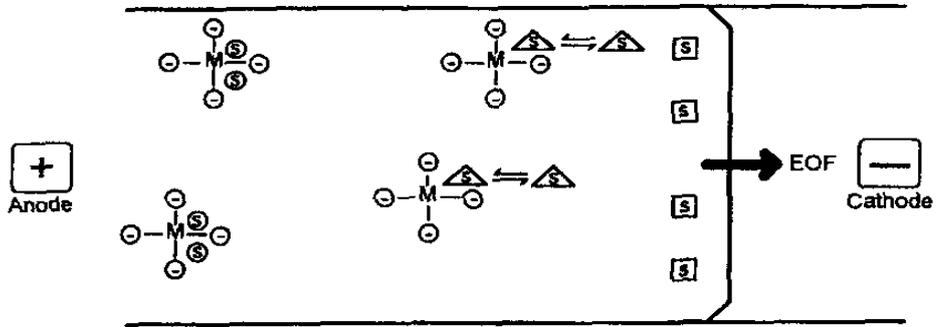


圖 (3) 微胞電動毛細管層析示意圖

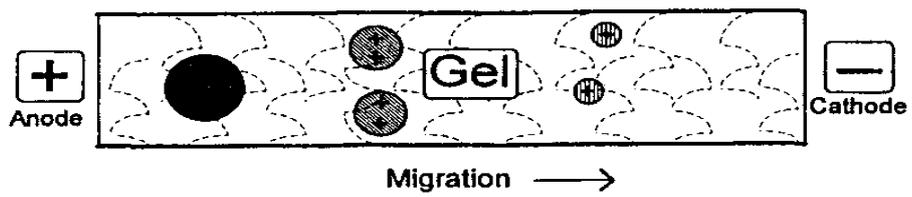


圖 (4) 毛細管凝膠電泳示意圖

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。

#### 4. 毛細管等電聚焦法 (capillary isoelectric focusing, CIEF)

毛細管等電聚焦法是在一支具有 pH 梯度的毛細管中依據等電點 (isoelectric points, pI) 不同而分離蛋白質或胺基酸等兩性物質的電泳技術。如圖 (5)，在某一 pH 值區段中，兩性分析物離子的正電荷與負電荷相等，淨電荷為零，在電場下分析物離子不向陽極或陰極移動，此時所處的 pH 值環境即是分析物的 pI，此過程稱為聚焦。聚焦效應的起因是樣品若處於不等於其 pI 的 pH 值區域時，會重新具有淨電荷，若帶正電會往陰極移動，反之則向陽極移動，在高電場作用下又遷移回到 pH 值等於自身 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電滲流，防止兩性電解質在樣品聚焦完成前就流出毛細管。

#### 5. 毛細管等速電泳 (capillary isotachopheresis, CITP)

CITP 是一種等速移動界面的電泳技術，主要是在非連續的電解質系統下進行，如圖 (6)。此非連續的電解質是由前導緩衝溶液 (leading electrolyte) 與殿後緩衝溶液 (terminating electrolyte) 所構成，前導緩衝溶液形成前端層帶，殿後緩衝溶液形成末端層帶。分離時各種樣品離子形成的區帶夾在前端層帶與末端層帶之間，一起以等速移動。以分析陰離子為例，前導緩衝溶液的陰離子電泳速度需大於所有樣品

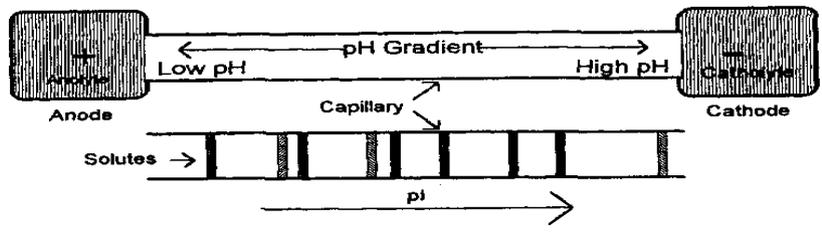


圖 (5) 毛細管等電聚焦法示意圖

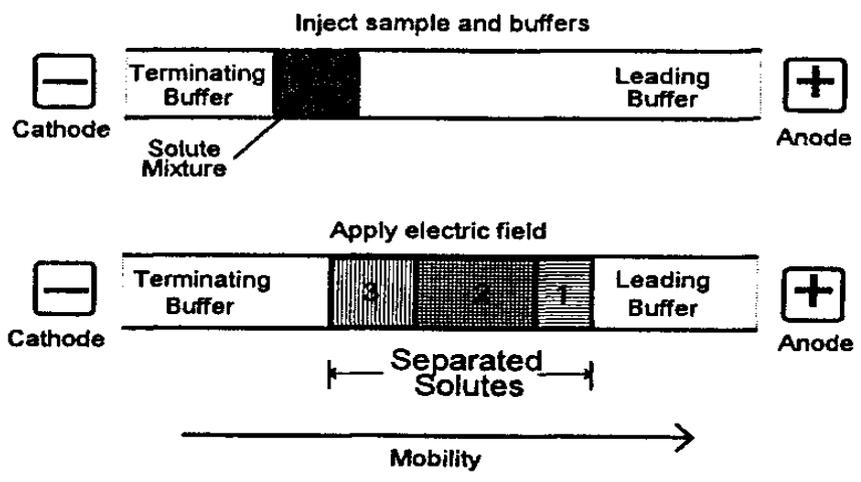


圖 (6) 毛細管等速電泳示意圖

離子的電泳速度，而殿後緩衝溶液的陰離子電泳速度需小於所有樣品離子的電泳速度。施加電場時，陰離子向陽極移動，由於前導緩衝溶液的陰離子移動速度最大，因此向陽極移動的速度最快，陸續接在後面的是移動速度次之的各種分析物陰離子，最慢的是殿後緩衝溶液的陰離子。CITP 實驗通常以固定電流的方式進行，由於每一區帶導電度不同，電場強度不一樣，在分離過程中各區帶分析物會保持一定的移動速度，達到分離之目的。

#### 四、毛細管電泳的進樣方式

毛細管電泳常用的進樣方式包括電動進樣 (electrokinetic injection) 與流動進樣 (hydrodynamic injection) <sup>[29]</sup> 兩種，而流動進樣又包含壓力、真空與重力注入三種模式。電動進樣時各分析物的進樣量會隨各種離子移動速率而不同，導致毛細管中樣品溶液組成與樣品瓶中不同，在定量分析時容易有誤差，較適合用於定性分析。壓力、真空與重力進樣方法原理相似，都是利用毛細管進樣端與流出端的壓力差，使得樣品溶液進入管內，這三種進樣方式又以重力進樣最為簡便。重力進樣 (或稱高度差進樣) 是利用虹吸現象，將進樣端的樣品瓶位置抬高超過出口端，使樣品溶液流入毛細管。除了以上兩種常用的進樣方式之外，還有分液進量系統 (split flowsyring injection system)

<sup>[30]</sup>、旋轉型注射器 (rotary-type injector)<sup>[31]</sup>、微注射器 (microinjector)<sup>[32]</sup> 等，但較少使用。

## 五、毛細管電泳的偵測方式

在早期毛細管電泳的發展中，縮小毛細管內徑成為提高分離效率的最佳方法，但卻也造成了毛細管承受樣品量太少與偵測光徑過短，產生靈敏度不足的問題，因而限制其在微量分析上的應用，因此選擇一高靈敏度的偵測方法是非常重要的。

管柱上光學偵測 (on-column optical detection) 不需介面或外接偵測槽，可避免因檢測器間隙體積 (dead volume) 所帶來的解析度下降現象，是目前廣泛使用的偵測模式。管柱上光學偵測法包含了紫外-可見光吸收偵測與螢光放射偵測。

### 1. 紫外-可見光 (UV-VIS) 吸收偵測

紫外-可見光 (UV-VIS) 吸收偵測為目前毛細管電泳應用最廣的偵測方法。即使因為毛細管的內徑窄、偵測光徑短而造成偵測靈敏度較差，但其所適用的分析物範圍廣，且儀器操作較簡單，所以它仍是使用最普遍的偵測方式。進行偵測前，需將一小段毛細管的 polyimide 保護外膜去除，直接作為偵測視窗，對於具有紫外-可見光吸收性質的樣品，如蛋白質、胺基酸、金屬錯合物離子皆可直接進行偵測。

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，常用的方法如氣泡型容槽 (Bubble cell)<sup>[33]</sup>、Z型容槽 (Z-shaped flow cell)<sup>[34-35]</sup>。另外，亦可使用雷射為光源，來進行雙光束 (double-beam) 校正背景雜訊的直接<sup>[33]</sup>或間接<sup>[36]</sup>紫外-可見光吸收偵測，由延長光徑與抑制背景雜訊，可有效地提升紫外-可見光吸收偵測法的靈敏度。

## 2. 螢光放射偵測

螢光為一種光放射現象，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到高能階狀態，且在極短時間 ( $10^{-8} \sim 10^{-4}$ 秒) 內回到低能階狀態，同時以放光的形式把多餘的能量釋出，此即為螢光。毛細管電泳的螢光放射偵測與HPLC的螢光放射偵測相同，皆具有高靈敏度與選擇性。依照所使用的激發光源可分為傳統光源激發螢光<sup>[4,37]</sup>與雷射激發螢光<sup>[38]</sup>，以雷射激發螢光靈敏度較高，因為雷射具有高強度、帶寬窄及同調性的特點，容易以透鏡聚焦在毛細管視窗上，其單位面積有強大的能量，可有效地提高靈敏度。

近年來除了管柱上光學偵測外，還有其他配合毛細管電泳的偵測法陸續開發出來，例如：導電度偵測法<sup>[39]</sup>、安培偵測法<sup>[40-42]</sup>、電化學偵測法<sup>[43-45]</sup>、化學放光偵測法<sup>[46]</sup>等，然而這些方法皆需要特殊介面的輔助，儀器設計較為複雜，因此應用性上較不普遍。

## 六、三環抗憂鬱劑簡介

憂鬱症是一種全身性的疾病，包括生理、情緒及思想。隨著社會的變遷，人口結構的改變，患憂鬱症的比例有增無減，世界衛生組織預測憂鬱症將是 21 世紀影響人類生活最重要的疾病之一。

目前治療憂鬱症的藥物可分為以下四大類<sup>[47-48]</sup>：

- 一、三環抗憂鬱劑 (Tricyclic antidepressants, TCAs)，如 Amitriptyline、Imipramine、Doxepin 等，或稱傳統性抗憂鬱劑。
- 二、選擇性血清素再吸收抑制劑 (Selective serotonic reuptake inhibitors, SSRIs)，如 Fluoxetine、Paroxetine 等，或稱第二代抗憂鬱劑。
- 三、單胺氧化酵素抑制抗憂鬱劑 (Monoamine oxidase inhibitors, MAOIs)，如 Phenelzine，moclobemide 等。
- 四、其他：Trazoone，一些 stimulants (ECT)，鋰鹽等，也有人用來治療憂鬱症。

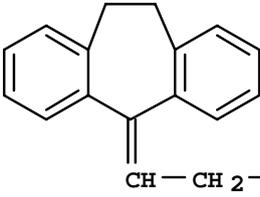
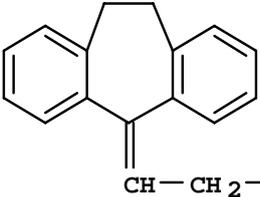
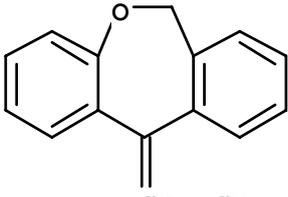
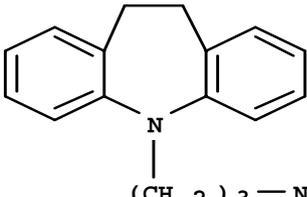
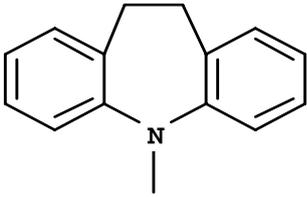
所有類型的抗憂鬱劑對治療憂鬱症與恐慌症皆有效果，大多數的醫師都使用 TCAs 為第一線藥物，因為它們的治療效果已建立，較具安全性和容易服用。

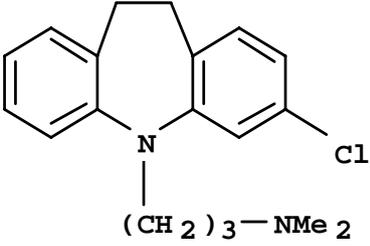
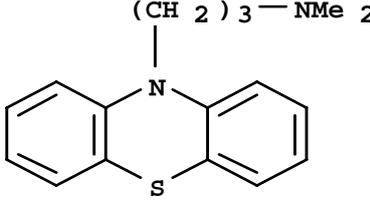
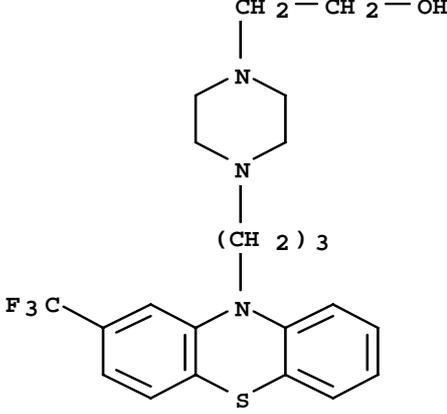
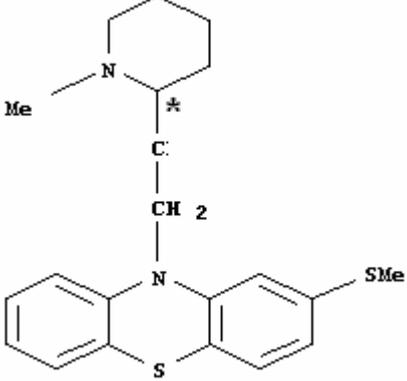
本文所探討的對象為第一類的三環抗憂鬱劑 (TCAs)，主要有 Amitriptyline、Imipramine、Doxepin、Clomipramine、Desipramine、

Fluphenazine、Nortriptyline、Promazine 與 Thioridazine 9 種，其化學結構、分子量、pKa 值列於表 (1)，其中 Desipramine 與 Nortriptyline 為二級胺結構，其餘為三級胺結構。Thioridazine 具有鏡像異構物，Doxepin 具有幾何異構物。這些化合物皆屬於鹼性藥物，其結構與分子量也非常相似。

Imipramine 為第一個被使用的三環抗憂鬱劑，1955 年瑞士的精神科醫師 Roland Kuhn 曾把 Imipramine 給數百個精神分裂的病人使用，但並未看到任何改善。Kuhn 同時也把 Imipramine 給憂鬱症的病人使用，卻意外發現它有抗憂鬱的效果。1958 年 Imipramine 開始被引進臨床處方，隨後其他的三環抗憂鬱劑也陸續被使用。這類藥物主要作用是在抑制腦內神經傳導物質如：norepinephrine、serotonin 與神經突觸的作用。Imipramine 主要作用是消除或減輕憂鬱病徵、幫助睡眠，另外亦有抗組織胺作用，藥效發生較慢，適合治療兒童的夜尿症。Imipramine 去甲基即為 Desipramine，在所有的 TCAs 中對中樞神經的作用最小。Amitriptyline 有較強的鎮靜作用，主要作用與 Imipramine 相似，對於內生性憂鬱症的治療最有效，因此適用於情緒激動和失眠的憂鬱症患者。Nortriptyline 是 Amitriptyline 的代謝產物，主要作用與 Amitriptyline 相似，但幫助睡眠作用不明顯，是最安全的抗憂鬱藥物。Clomipramine 主要作用與 Amitriptyline 相似，亦可用於強逼性障

表(1) 九種TCAs之分子結構、分子量與pKa值<sup>[100]</sup>

TCA	結構	分子量	pKa
Amitriptyline	 <p style="text-align: center;">CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub></p>	277.4	9.4
Nortriptyline	 <p style="text-align: center;">CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHMe</p>	263.37	9.7
Doxepin	 <p style="text-align: center;">CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub></p>	279.38	9.19
Desipramine	 <p style="text-align: center;">(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHMe</p>	266.38	10.2
Imipramine	 <p style="text-align: center;">(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NMe<sub>2</sub></p>	280.40	9.49

Clomipramine		314.85	9.49
Promazine		284.42	9.43
Fluphenazine		437.52	7.21
Thioridazine		370.58	9.66

礙與病徵。Doxepin 對於中樞神經抑制的效果最強，適合用在神經障礙所引起的憂鬱。Thioridazine 主要作用在促進睡眠、安定焦躁不安的情緒，可經由注射讓病者快速安定下來。Fluphenazine 主要作用與 Thioridazine 相同，但助睡眠作用不明顯，亦有長效注射劑，一般 2~5 週注射一次。2003 年，抗 SARS 藥物研發團隊發現七種三環抗憂鬱劑可有效地抑制 SARS 病毒複製，其中又以 Promazine 效果尤佳<sup>[49]</sup>。

抗憂鬱藥劑應從低劑量開始，並且緩慢的增加。以 Amitriptyline 為例，一般病患每日劑量約 75~300 mg，有效劑量為每日 150 mg，超過 300 mg 時，其治療效果並未明顯增加<sup>[47,50]</sup>。三環抗憂鬱劑作用於身體許多的神經突觸接受器，因此使用時需非常小心，以避免出現副作用，常見的副作用有顫抖、記憶力衰減、心律不整、視力模糊、性能力障礙等<sup>[51]</sup>，因此一般於睡前服用，如此副作用均發生在睡眠期間，較不影響白天生活。三環抗憂鬱劑在血中的治療濃度範圍大約為 100 至 300  $\mu\text{g/L}$ ，若在血漿中的濃度超過 500  $\mu\text{g/L}$ ，則會有中毒的現象產生<sup>[52]</sup>。

由於 TCAs 的廣泛使用，再加上服用這些藥物所產生的副作用與過量中毒的危險，有必要開發靈敏、簡便的血中測定 TCAs 含量方法，以達到藥物管制及血中濃度監測的目的。

目前已經有幾種技術被應用來偵測生化樣品中的 TCAs，如氣相

層析法 (gas chromatography, GC)、高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

在GC分析方法中，Araujo<sup>[53]</sup>等人以GC/氮磷偵測器分離血漿中 Imipramine與Desipramine兩種TCAs，偵測極限分別為 15 ng/ml與 20 ng/ml。Torre<sup>[54]</sup>等人以固相萃取 (solid-phase extraction, SPE) 前處理血漿樣品，配合GC/氮磷偵測器分離 6 種TCAs，偵測極限為 1.2 - 5.8 ng/ml。Sporkert<sup>[55]</sup>等人以頂空固相萃取 (headspace solid phase extraction, HS-SPME) 前處理技術配合GC/質譜儀 (MS)，分析頭髮中的 4 種TCAs，偵測極限為 0.5 - 1.0 ng/mg。Gasgupta<sup>[56]</sup>等人以衍生技術配合GC/MS，分析血漿中的Desipramine，偵測極限為 2.0 ng/ml。Lee<sup>[57]</sup>等人以頂空固相萃取處理血漿樣品，配合GC/火焰離子偵測器分析 4 種TCAs，偵測極限為 32 - 50 ng/ml。

血漿與尿液中的TCAs分析大多以HPLC為主。Theurillat<sup>[58]</sup>等人以液相萃取 (liquid - liquid extraction, LLE) 前處理技術，配合逆相HPLC/UV分離血漿中 6 種TCAs，偵測極限為 20 - 40 ng/ml。Yoshida<sup>[59]</sup>等人以HPLC/化學放光分析 5 種TCAs，在血漿中偵測極限為 12 - 33.1 pg/ml。Kagan<sup>[60]</sup>以氟化物溶劑 (ethoxynonafluorobutan) 取代正己烷作為動相，配合HPLC/UV，成功分離 6 種TCAs。Karpinska<sup>[61]</sup>等人以逆相HPLC/UV分離 2 種TCAs，偵測極限皆為 15 ng/ml。Kollroser<sup>[62]</sup>

等人以HPLC/大氣壓力化學游離串連質譜儀 ( APCI - MS-MS ) 在 12 分鐘內分離血漿中 7 種TCAs。Ruiz-Angel<sup>[63]</sup> 等人分別使用Eclipse XDB C8 與XTerra MS C18 兩種管柱，配合HPLC / UV，成功分離 7 種TCAs。Trocewicz<sup>[64]</sup> 以支撐式液膜 ( supported liquid membrane, SLM ) 前處理尿液樣品，配合HPLC/UV偵測，在尿液中TCAs的定量極限為 1 ng/ml。在HPLC的分析方法中大部分使用UV偵測器，由於UV偵測器的靈敏度不夠，不易偵測低濃度的TCAs。有人改用質譜儀當偵測器來對體液檢品作分析，雖然改善了感度不佳的缺點，但儀器價格昂貴。HPLC使用後所產生的大量有機廢液處理也是一大問題。

CE是一種高效率的分離技術，對於許多藥物或生化樣品可提供高解析力與快速的分析，再加上其所需樣品、試劑耗用量少等優點，使之成為近年來頗受重視的分析方法，因此有人開始利用CE來分析TCAs，相關文獻報導整理歸納於表 ( 2 )。Salomon<sup>[65]</sup> 等人首先調整 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid ( CAPSO ) 緩衝溶液的pH值和濃度，再添加甲醇於緩衝溶液中，可同時降低電滲流與電泳遷移率，以CZE-UV偵測，成功的分離 7 種TCAs，於水溶液樣品的偵測極限為 0.4 - 1.1  $\mu\text{g/ml}$ 。Spencer<sup>[66]</sup> 等人於citrate緩衝溶液中添加carboxymethyl - $\beta$ -cyclodextrin ( CM- $\beta$ -CD )，配合管壁塗覆

表 (2) CE 在 TCAs 分析上的應用

年代	TCAs	分析方法	條件	偵測極限	Reference
1991	Protriptyline Amitriptyline Nortriptyline Imipramine Doxepin Nordoxepin Desipramine	CZE-UV	Column: 1 m ×75 μm I.D. Buffer: 50 mM CAPSO-16.2 mM NaOH with 7.9% methanol (pH 9.55)	水溶液樣品： 0.4-1.1 μg/ml	K. Salomon, et al. [ 65 ]
1997	Carbamezepin Trimipramine Clomipramine Protriptyline Imipramine Desipramine Amitriptyline Nortriptyline Opipramol	CZE-UV MEKC-UV	Column: 70 cm ×50 μm I.D. coating MAPS Buffer: For CZE : 10 mM citrate, 10 mM CM-β-CD (pH 6-7) For MEKC : 10 mM citrate, 20 mM SDS, 10 mM CM-β-CD (pH 5-7)		B. J. Spencer , et al. [ 66 ]

1998	Amitriptyline Nortriptyline Imipramine Doxepin Nordoxepin Desipramine Protriptyline	CZE-UV	Column: 57 cm × 51 μm I.D. Buffer: 50 mM phosphate buffer, 0.06 % PUG, 20% methanol (pH 9.55)		C. W. Harrell , et al. [ 67 ]
1998	Desipramine Nortriptyline Imipramine Clomipramine Amitriptyline	NACE with thermo-optical absorbance detection	Column: 75 cm × 50 μm I.D. Buffer: 40 mM ammonium acetate, 75% methanol and 25% acetonitrile	水溶液様品： 0.1-0.5 μM	X. F. Li, et al. [ 68 ]
1998	Desipramine Nortriptyline Imipramine Clomipramine Amitriptyline	NACE-ESI- MS	Column: 80 cm × 50 μm I.D. Buffer: 50 mM ammonium acetate, 85% methanol and 15% acetonitrile Nebulizing gas: 0.41 L/min	水溶液様品： 0.5 -1.0 μM	X. F. Li, et al. [ 69 ]

2001	Desipramine Amitriptyline Nortriptyline Imipramine Maprotyline	SPE-NACE	Column: 106 cm × 180 μm I.D. Buffer: 1.0 M acetic acid, 25 mM ammonium acetate in acetonitrile	尿液样品： 40-80 ng/ml 血浆样品： 60-100 ng/ml	J.R. Veraer, [ 70 ]
2002	Desipramine Nortriptyline Imipramine Doxepin Amitriptyline	CZE-UV	Column: 57 cm × 50 μm I.D. Buffer: 100 mM TMBD phosphate (pH 9.5)		D. A. Caterina [ 71 ]
2004	Desipramine Nortriptyline Imipramine Amitriptyline	LLE-NACE	Column: 48 cm × 50 μm I.D. Buffer: 50 mM ammonium acetate, 1.0M acetic acid in acetonitrile	血浆样品： 30-50 ng/ml	D. C. Marcelo, et al. [ 72 ]

※ CM-β-CD : carboxymethyl -β-cyclodextrin

PUG : poly ( n-undecylenyl -α-D-glucopyranoside )

NACE : nonaqueous capillary electrophoresis

TMBD : N,N,N',N'- tetramethyl-1,3-butanediamine

3 - (Trimethoxysilyl) propyl methacrylate以抑制電滲流，在CZE-UV偵測下，可分離 5 種TCAs；而在利用sodium dodecyl sulfate (SDS) 介面活性劑的微胞電動毛細管層析系統下，可分離 9 種TCAs。Harrell<sup>[67]</sup> 等人利用同時具有親水基與疏水基的非離子性介面活性劑poly (n-undecylenyl - $\alpha$ -D-glucopyranoside) (PUG)，與適當比例的甲醇混合添加於pH=9.5 的磷酸鈉緩衝溶液中，在 15 分鐘內可成功的分離 7 種TCAs。Li.<sup>[68-69]</sup> 等人利用非水相毛細管電泳 (NACE) 分別配合thermo-optical absorbance detection與ESI-MS，分離 5 種TCAs，這兩種偵測方法在水溶液樣品中的偵測極限皆為 0.1 - 0.5  $\mu$ M。Veraart<sup>[70]</sup> 利用固相微萃取為前處理技術，配合NACE-UV偵測，分析尿液與血漿樣品中 5 種TCAs，在尿液中的偵測極限為 40 - 80 ng/ml，血漿中的偵測極限為 60 - 100 ng/ml。Caterina<sup>[71]</sup> 於磷酸鈉緩衝溶液中添加 100 mM N,N,N',N'-tetramethyl-1,3-butanediamine (TEMED) 來降低電滲流，以CZE-UV偵測，可成功的分離 5 種TCAs。Marcelo<sup>[72]</sup> 等人利用液相-液相萃取為前處理技，配合NACE-UV偵測，分離血漿樣品中 4 種TCAs，偵測極限為 30 - 50 ng/ml。由於TCAs具有相似的結構與pKa值，加上毛細管中電滲流的影響，導致TCAs在電泳中的遷移速度相近而不易分離。上述文獻中大部分都是在電泳緩衝溶液中添加修飾劑來抑制電滲流與分析物的電泳遷移率以達成分離目的。

## 七、液相微萃取簡介

雖然 CE 擁有高解析力、操作方便、樣品與試劑消耗量少等優點，但由於一般 UV 偵測的光徑長度短、分析物注入量太少，其偵測極限不易降低，對於分析生物樣品或環境樣品更受複雜基質影響，因此需發展可提高分析物濃度並淨化樣品的萃取方法。

傳統的萃取法有液相萃取 (LLE) 和固相萃取 (SPE)。液相萃取是將適當有機溶劑加入水相樣品中，以分液漏斗將水相與有機相分離，分析物因分配原理自水相樣品萃取至有機溶劑，接著移出有機層，經濃縮後再導入儀器中分析。固相萃取是利用類似 HPLC 管柱填充固定相為吸附載體，先將樣品溶液流過針筒狀管柱或碟狀的 SPE 薄膜，使分析物吸附於載體，再利用溶劑將分析物洗出，接著導入儀器中分析。此兩種方法具有以下缺點：(1) 時間冗長，尤其是需要經過繁瑣的萃取步驟，易造成分析物流失而影響分析結果的準確性；(2) 需耗費大量的高純度有毒有機溶劑，廢棄有機溶劑更造成環境污染問題。

為了改善傳統萃取法的缺點，近年來樣品萃取技術多朝著快速與溶劑減量的方向發展。微小化的液相—液相萃取 (liquid - liquid extraction; LLE) 與液相微萃取 (liquid-phase microextraction ; LPME)

<sup>[73-76]</sup> 自 1996 年開始已有報導，其典型裝置如圖 (7)。LPME 方法是

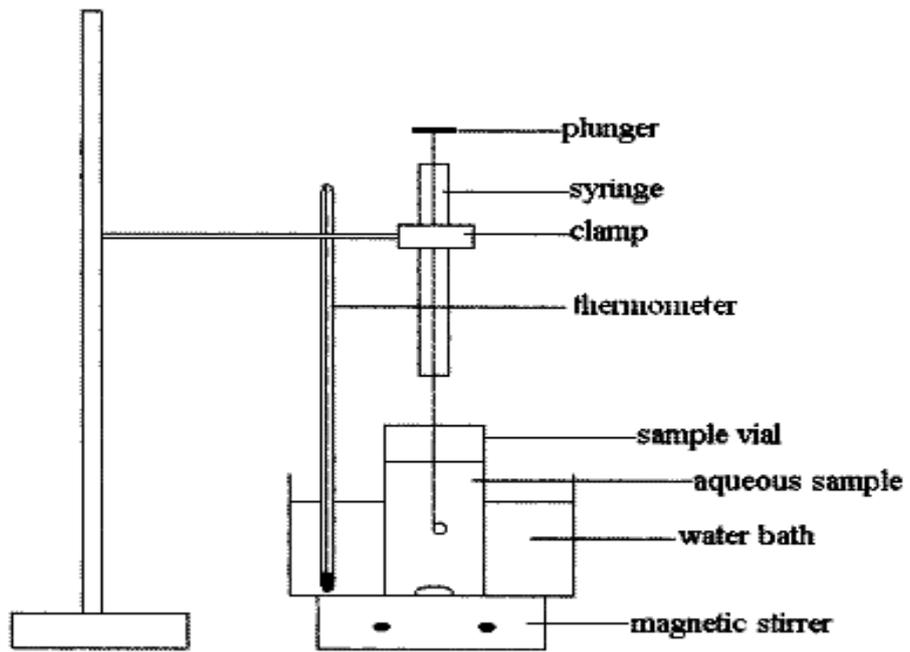


圖 (7) LPME裝置圖<sup>[76]</sup>

在 GC 或 LC 注射針的尖端懸掛一滴疏水性有機液滴，置於水溶液樣品中進行液相-液相萃取，當分析物被萃取進入有機液滴，再將有機液滴收回注射針內，之後將有機液滴直接注入 GC 或 LC 進行分析。由於分析物從體積較大（1-5 mL）的樣品溶液被萃取進入小體積（1-5  $\mu\text{L}$ ）的有機液滴，因此具有高濃縮倍率。但這種型式的液相微萃取有一個嚴重的缺點，懸掛在注射針尖端的有機液滴在磁石攪拌下穩定性不佳，經常會造成液滴損失。

為了改善上述的缺點，1999 年 Stig Pedersen-Bjergaard 與 Knut Einar Rasmussen 提出新型的 LPME<sup>[77-78]</sup>，設計如圖（8）。它主要是使用一段由聚丙烯製成的多孔洞中空纖維管支撐有機溶劑進行萃取，這種以中空纖維管為主的液相微萃取有以下兩項優點：一、有機相不易損失，由於萃取過程主要是在纖維管內進行，有機相會固定在纖維管的孔洞中，即使在萃取過程中震動或攪拌，都不會使有機相損失。二、價格便宜，且纖維管使用過一次即丟棄，可避免交叉污染的問題。

選用的中空纖維管其材質為聚丙烯，主要是因為聚丙烯製成的多孔洞中空纖維管適用於多種有機溶劑，而在萃取期間有機溶劑可以固定在纖維管的孔洞中。有機溶劑的選擇主要考慮以下三點：一、必須與水不互溶，以避免在萃取期間有機溶劑損失；二、分析物在有機萃取溶劑中的溶解度需高於其在水溶液樣品中；三、必須為低揮發性，

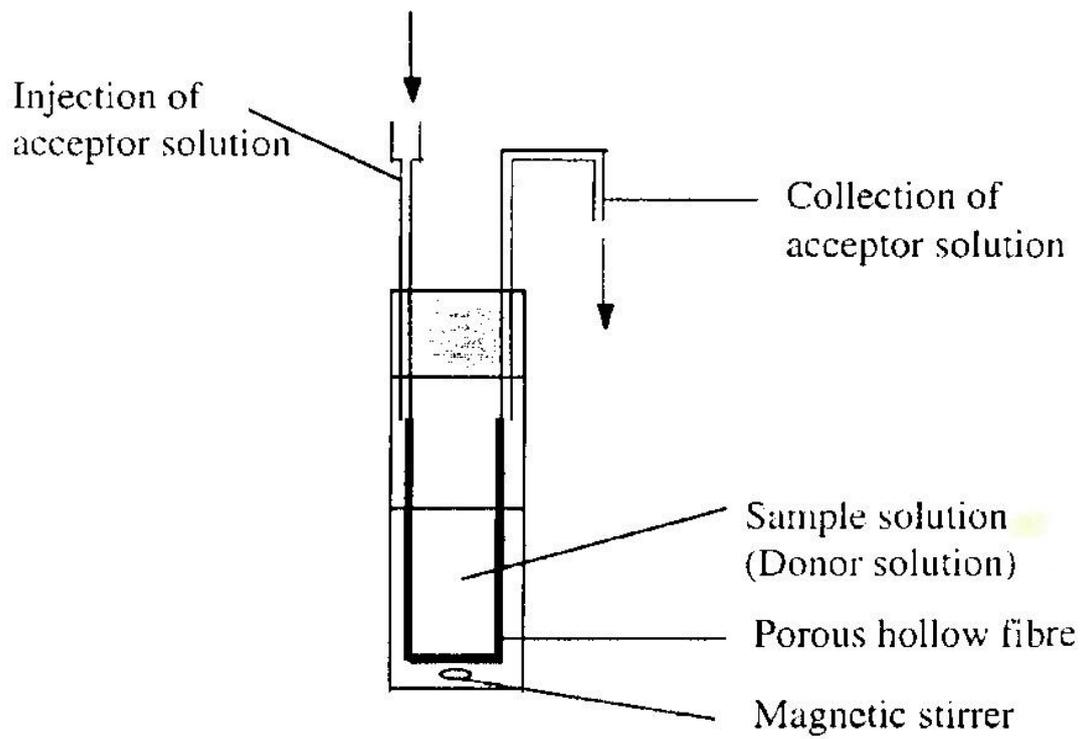


圖 (8) U字形結構LPME裝置圖<sup>[77]</sup>

才能防止萃取期間有機溶劑汽化，無法固定在纖維管的孔洞。一般最常用的有機溶劑為 1-octanol<sup>[77]</sup>，主要是因為與其他有機溶劑相比，如 2-octanone、hexyl ether 等，它在纖維管孔洞的穩定性最佳。

多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取其基本原理如圖(9)所示。進行萃取前先將纖維管短暫浸入有機萃取溶劑，使有機溶劑分子充滿於纖維管的孔洞中。接著再將處理過的纖維管置入樣品水溶液中，對於具酸鹼性質的分析物，需調整樣品水溶液的 pH 值。以鹼性分析物為例，為了使分析物呈中性不帶電荷狀態，降低其在樣品水溶液的溶解度，需調整水溶液的 pH 值，使其大於分析物的 pKa 值，利於萃取中性分析物到纖維管孔洞中的有機相。為了避免分析物在有機相達飽和而萃取停止，可以在中空纖維管中提供一個水溶液接收相，形成了一個三相系統。中空纖維管內的接收相其 pH 值需調低，使溶液成酸性，當中性分析物到達有機相與接收相的接觸面後會質子化，以正離子的型式進入接收相。大體積分子物質，如蛋白質，由於無法通過中空纖維管的微小孔洞而進不了有機相，仍留在樣品水溶液中；酸性物質在高 pH 的樣品水溶液中會解離而帶電荷，亦無法萃取到有機相。中性物質不受酸鹼影響，可由樣品水溶液萃取進入有機相，但最後會因為在有機相的濃度太高而擴散回到低濃度的樣品水溶液，因此多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取除了可提高濃縮倍率外，也具有

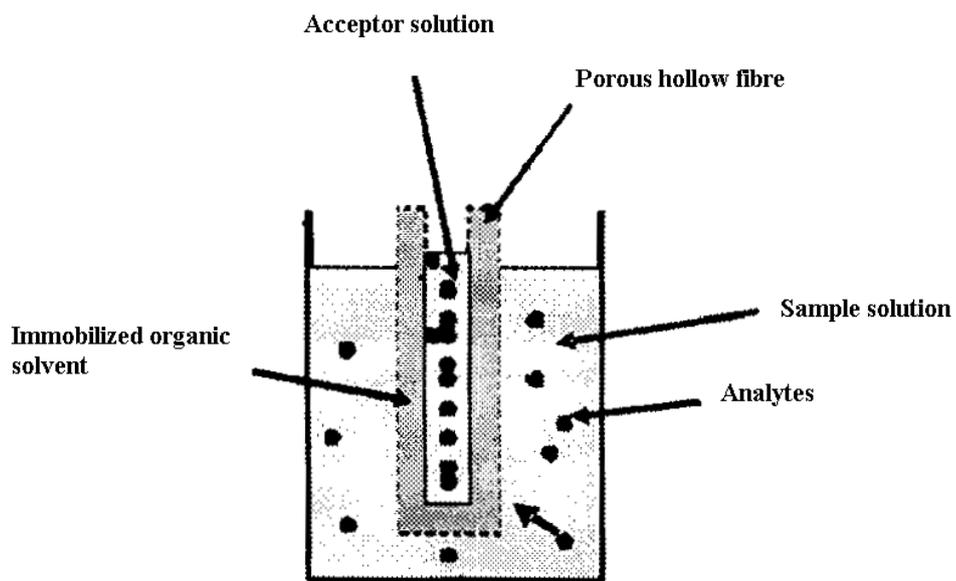


圖 (9) Hollow fibre-based LPME 的基本原理

淨化樣品的能力。以上是以鹼性的分析物為例，若為酸性的分析物，則樣品溶液與接收溶液的 pH 值需相反過來。

上面所提到的靜態三相萃取系統適用於分析物有高的分佈係數，可藉由擴散來進行萃取。若是對於一些分佈係數低的分析物，如具親水性結構的化合物，不易利用擴散作用進行萃取，必須使用主動傳輸的方法<sup>[79]</sup>，圖（10）為其基本原理。於pH = 7.0 樣品溶液中加入一種具疏水基的離子對試劑，試劑會與分析物離子形成疏水性的離子對中性混合物，此混合物可由樣品溶液萃取出纖維管孔洞中的有機相，當混合物到達有機相液膜與纖維管內部酸性接收水溶液的接觸面，混合物會釋出分析物離子，使其進入接收溶液，而此過程是不斷循環的。

上述所討論的皆是屬於靜態的液相微萃取，這種利用多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取也可在動態的模式下進行，如圖（11）所示<sup>[80]</sup>。在二相的系統中，注射針內裝填少量的有機萃取溶劑，實驗前將 1~2 cm 長的中空纖維管先浸置於有機溶劑中，使之填滿於纖維管內部及孔洞，再將纖維管連接於注射針尖端，置入攪拌的樣品水溶液中。萃取期間重複的抽推注射針，在抽回期間，含有分析物的有機相被收集至注射針筒內；在推出期間，注射針筒裡的新鮮有機溶劑進入纖維管內進行萃取。重複多次抽推後，注射針筒內可收集高濃度分析

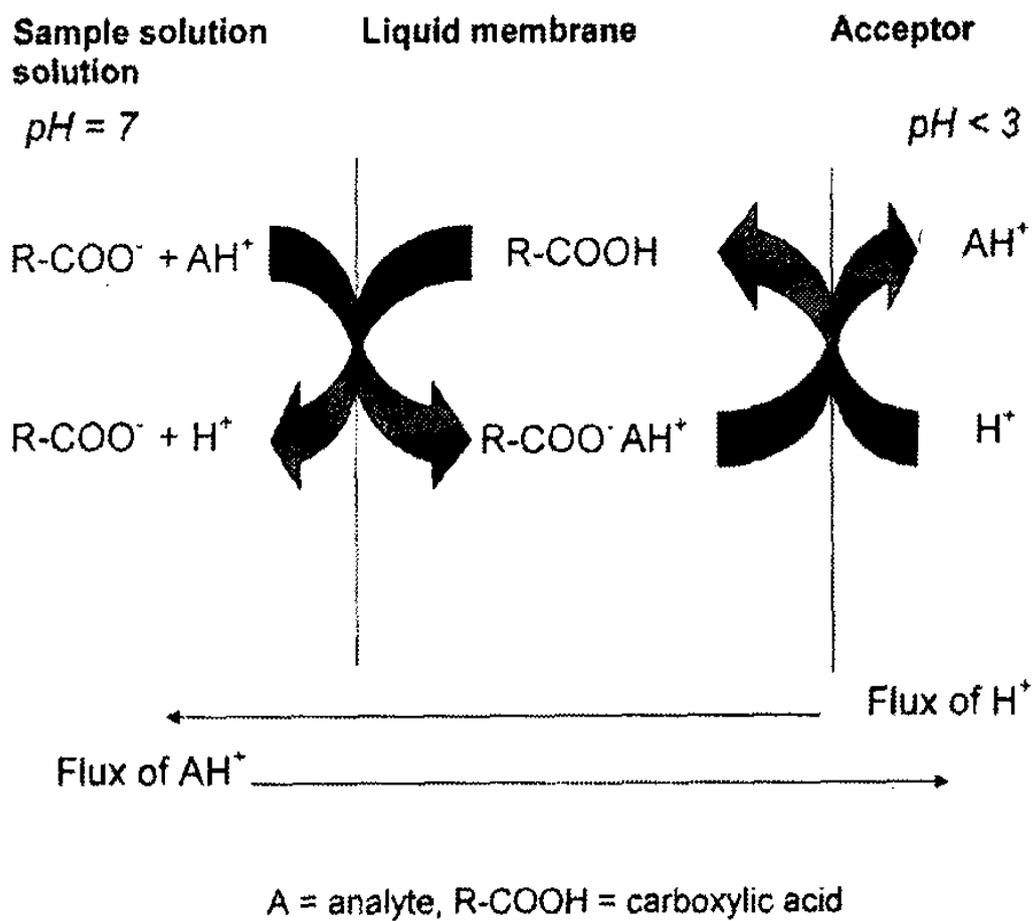


圖 (10) 主動傳輸方法的基本原理<sup>[79]</sup>

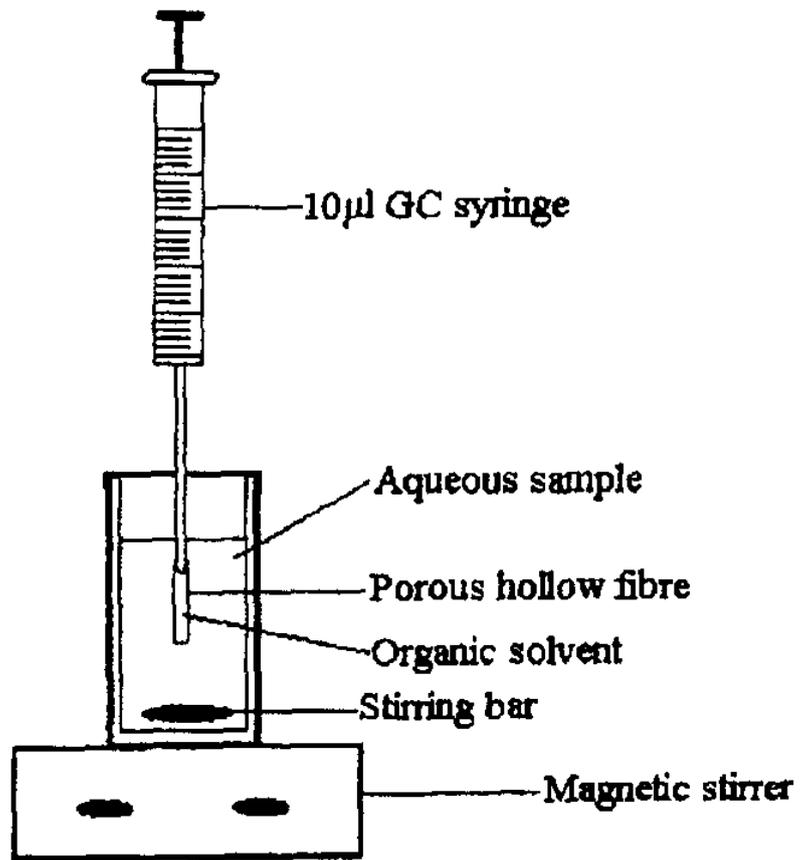


圖 (11) 動態模式的LPME<sup>[80]</sup>

物。三相系統與二相的操作模式相似，不同之處在於將注射針筒裡的有機溶劑換為水相接收溶液。動態模式與靜態模式相比，萃取速度較快，但裝置較為複雜且有較多的實驗參數需考慮。

多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取發展過程中，不同的裝置設計陸續發表，如Pedersen-Bjergaard與Rasmussen 所報導的U形結構<sup>[77]</sup>（見圖（8）），可提供良好的萃取效率，但在接收溶液的傳送上仍有問題，不易自動化為其最大的缺點。而由Rasmussen、Kramer、Pedersen-Bjergaard與Andress共同發展的rod-like結構<sup>[81]</sup>（見圖（12）），可改善不易自動化的缺點，圖中纖維管上方錐型引導管可使注射針輕易的將接收溶液注入纖維管中。由於注射針可通至纖維管的底部，方便接收溶液的注入與取出。另外還有Muller所提出的U-shaped構造（見圖（13））<sup>[82]</sup>，在纖維管一端連接一個漏斗狀的不銹鋼針，可作為注射針的引導管，在不銹鋼針上面有一個Dent，用來支撐另一端未封口的纖維管。此裝置也是利用注射針來傳送接收溶液，而未封口的纖維管端可避免在傳送接收溶液時有氣泡形成。

多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取具有價格低廉、濃縮倍率高、可淨化樣品、萃取速度快、避免交叉污染等優點，可適用的領域很廣，如藥物分析<sup>[83-84]</sup>、環境分析<sup>[85]</sup>、有機污染物分析<sup>[86-87]</sup>等。此技術的操作模式有靜態、動態與主動傳輸系統，因此不同種類的分析

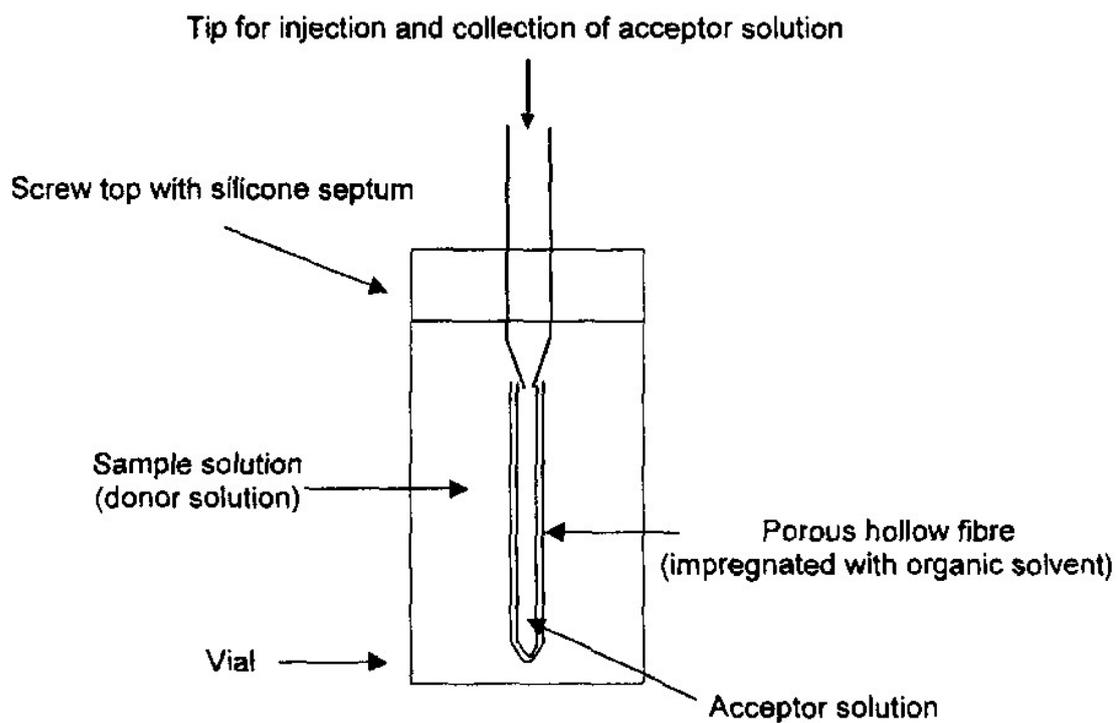


圖 (12) rod-like結構LPME裝置圖<sup>[81]</sup>

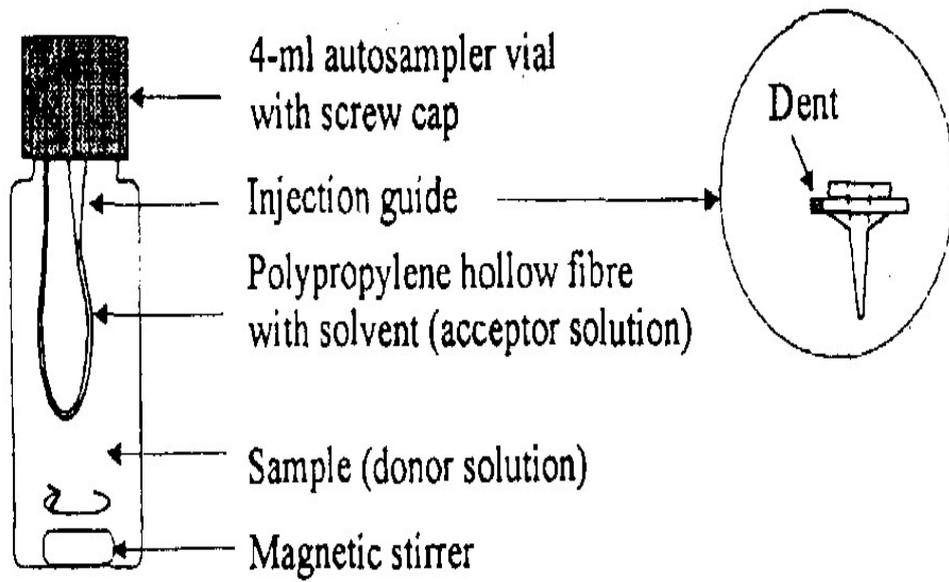


圖 (13) U-shaped結構LPME裝置圖<sup>[82]</sup>

物可選擇其合適的操作模式來進行萃取。多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取與毛細管電泳結合，可在短時間內分析多種樣品，且具有較低的偵測極限。目前最常使用的微萃取技術為固相微萃取（SPME），但 SPME 主要適合搭配 GC 應用，較不適用於液相分離方法，如 HPLC 與 CE。多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取則可適用於 HPLC 與 GC。

## 八、研究動機

由於三環抗憂鬱劑 (TCAs) 的廣泛使用，再加上服用這些藥物所產生的副作用與過量中毒的危險，開發靈敏、簡便的血中 TCAs 分析方法是必要的。在毛細管電泳方面，由於 TCAs 具有相似的化學結構、分子量與 pKa 值，加上毛細管中電滲流的影響，導致 TCAs 在電泳中的遷移速度相近而不易分離。於電泳緩衝溶液中添加修飾劑雖然可以抑制電滲流而分離部份 TCAs，但對於具有鏡像異構物或幾何異構物的 TCAs 還是無法分離。本研究嘗試利用管壁塗覆高分子聚合物的毛細管配合 CE-UV 偵測，發展血漿中 TCAs 的分析方法。並以多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取進行血漿樣品前處理，期望獲得更佳的分離效果與較低的偵測極限。

## 貳、實驗

### 一、儀器設備

- 1.高電壓電源供應器：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.紫外光偵測器：Dynamax 公司 ( Reno, NV, USA ) 產品，Model UV – C，配合毛細管電泳，組裝為 CE-UV 偵測裝置。
- 3.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。
- 4.數位/類比轉換器：IOtech 公司 ( Cleveland, OH, USA ) 產品，Model Personal Daq/55。
- 5.雜訊抑制器：實驗室自行組裝，內含 1 秒的 RC low-pass filter，具有過濾雜訊之功能。
- 6.過濾薄膜：TITAN 公司 ( San Diego, CA, USA ) 產品，直徑 25 mm，0.45  $\mu\text{m}$  孔徑。
- 7.酸鹼度計：Suntex 公司 ( 臺北，台灣 ) 產品，Model SP – 701。
- 8.毛細管：Polymicro Technologies 公司 ( Phoenix, AZ, USA ) 產品，Model TSP-050375t，熔融矽材質 ( fused silica )，內徑 52  $\mu\text{m}$ ，外徑

- 366  $\mu\text{m}$ ，外覆聚乙烯胺 (polyimide)。
9. 中空纖維：Membrana 公司 (Wuppertal, Germany) 產品，Model PP 150/330，Polypropylene 材質，內徑 330  $\mu\text{m}$ ，膜厚 150  $\mu\text{m}$ 。
10. 微量離心機：DENVILLE 公司 (Metuchen, NJ, USA) 產品，Model Micro 240A。
11. 超音波震盪器：Branson 公司 (Danbury, CT, USA) 產品，Model 1200。
12. 電子加熱攪拌器：IKA 公司產品 (Wilmington, USA)，Model Ceramag midi。
13. 烘箱：Kwang Shen 公司 (臺北，台灣) 產品，Model KS-21。
14. 天平：日本電子科學株式會社 (Kyoto, Japan) 產品，Model AJ-100。

## 二. 藥品

1. *N,N*-Dimethylacrylamide : ( $C_5H_9NO$  ; DMA ) , Aldrich公司  
( Gillinoham, Dorset, UK ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 99 % 。
2. 3 - ( Trimethoxysilyl ) propyl methacrylate : ( $C_{10}H_{20}O_5Si$  ; MPT ) ,  
Fluka公司 ( Buchs, Switzerland ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 99 % 。
3. *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine : ( $C_6H_{16}N_2$  ; TEMED ) , Fluka  
公司 ( Buchs, Switzerland ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 99 % 。
4. Ammonium persulfate : ( $(NH_4)_2 S_2O_8$  ; APS ) , Sigma公司 ( St. Louis,  
MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % 。
5. Amitriptyline hydrochloride : ( $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$  ) , Sigma公司 ( St. Louis,  
MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % 。
6. Clomipramine hydrochloride : ( $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$  ) , Sigma公司 ( St.  
Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % 。
7. Desipramine hydrochloride : ( $C_{18}H_{22}N_2 \cdot HCl$  ) , Sigma公司 ( St. Louis,  
MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % 。
8. Doxepin hydrochloride : ( $C_{19}H_{21} NO \cdot HCl$  ) , Sigma公司 ( St. Louis,  
MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % , ( Z : 15% , E : 85% ) 。
9. Fluphenazine dihydrochloride : ( $C_{22}H_{26}F_3N_3OS \cdot 2HCl$  ) , Sigma公司  
( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 。

10. Imipramine hydrochloride : ( $C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$ ) , Sigma公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 。
11. Nortriptyline hydrochloride : ( $C_{19}H_{21}N \cdot HCl$ ) , Sigma公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 98 % 。
12. Promazine hydrochloride : ( $C_{17}H_{20}N_2S \cdot HCl$ ) , Sigma公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 。
13. Thioridazine hydrochloride : ( $C_{21}H_{26}N_2S_2 \cdot HCl$ ) , Sigma公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 99 % 。
14. Trimipramine : ( $C_{20}H_{26}N_2 \cdot C_4H_4O_4$ ) , Sigma公司 ( St. Louis, MO, USA ) 產品 , 分析級試藥 , 純度 99 % 。
15. 磷酸二氫鈉 : ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  ; sodium dihydrogen phosphate monohydrate ) , E. Merck公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品 , 純度 99 % 。
16. 磷酸氫鈉 : ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  ; di-Sodium hydrogen phosphate dihydrat ) , E. Merck公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品 , 純度 99 % 。
17. 辛醇 : ( $C_8H_{18}O$  ; 1-octanol ) , Riedel-deHaën公司 ( GmbH & Co. KG, Germany ) 產品 。
18.  $\beta$ 環糊精 (  $C_{42}H_{70}O_{35}$  ;  $\beta$ -Cyclodextrin ) , E. Merck公司 ( Darmstadt, Germany ) 產品 , HPLC級試藥 。

19. 甲醇： $(\text{CH}_3\text{OH}; \text{methanol})$ ，E. Merck公司 (Darmstadt, Germany)  
產品，HPLC級試藥。
20. 氰甲烷： $(\text{CH}_3\text{CN}; \text{acetonitrile})$ ，E. Merck公司 (Darmstadt, Germany)  
產品，HPLC級試藥。
21. 氫氧化鈉： $(\text{NaOH}; \text{sodium hydroxide})$ ，E. Merck 公司 (Darmstadt,  
Germany) 產品，HPLC 級試藥，純度 99 %。
22. 醋酸： $(\text{CH}_3\text{COOH}; \text{acetic acid})$ ，E. Merck公司 (Darmstadt, Germany)  
產品，HPLC級試藥，純度 99.8 %。
23. 鹽酸： $(\text{HCl}; \text{hydrochloric acid})$ ，E. Merck 公司 (Darmstadt,  
Germany) 產品，濃度 37 %。
24. 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. 儲存溶液 (stock solution) 的配製

以去離子水配製 9 種 1.0 mM 三環抗憂鬱劑樣品儲存溶液，置於 4°C 冰箱，保存期約一個月。使用時以緩衝溶液稀釋至所需的濃度。

#### 2. 電泳緩衝溶液的配製

以去離子水配製 50 mM 磷酸鈉電泳緩衝溶液，於其中添加 0.5 mM  $\beta$ -環糊精，並以 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  調整至 pH = 3.0。此溶液於 4°C 冰箱中保存期約一個月。

#### 3. 血漿樣品前處理

以針筒抽取人血後放置於含有 EDTA 的乾燥試管裡，隨即以 700 g 離心 5 分鐘取得血漿，保存於 -20°C 冰箱中。血漿樣品分析前需先去除其中的蛋白質大分子，本實驗以添加氯甲烷方式使蛋白質沈澱去除。將 200  $\mu\text{l}$  氯甲烷加入 200  $\mu\text{l}$  含分析物的血漿樣品使蛋白質沈澱，經離心 15 分鐘後，取出上層澄清液 200  $\mu\text{l}$ ，加入 800  $\mu\text{l}$  50 mM 磷酸鈉溶液 (pH = 10)，成為 1.0 ml 的實驗樣品。

#### 4.毛細管內壁鍵結相的製備

##### (a) 毛細管的前處理<sup>[81]</sup>

取一長 60 cm、內徑 52  $\mu\text{m}$ ，外徑 366  $\mu\text{m}$  之毛細管，先以丙酮流洗 10 分鐘，再以 1 M NaOH 流洗 30 分鐘，再用 0.1 M HCl 流洗 30 分鐘，接著再以去離子水流洗 10 分鐘，最後注入 10 % MPT (100  $\mu\text{l}$  MPT + 450  $\mu\text{l}$  acetic acid + 450  $\mu\text{l}$  acetone) 10 分鐘。然後將毛細管兩端以高分子材質墊片封口，置於室溫下，放至隔天即可進行管壁塗覆。

##### (b) 塗覆步驟<sup>[81]</sup>

以去離子水配製 1 % DMA 1 ml，接著將 50  $\mu\text{l}$  10 % (v/v) TEMED 與 50  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) APS 加到 900  $\mu\text{l}$  1 % DMA，使總體積成為 1.0 ml 的混合溶液。將以上配製的混合溶液注入處理完成的毛細管，再將毛細管兩端以高分子材質墊片封口，置入 50  $^{\circ}\text{C}$  烘箱，開始進行聚合反應，持續兩小時。兩小時後將毛細管取出，放置室溫下冷卻，再以去離子水清洗 10 分鐘，將未反應的 DMA 去除，塗覆手續即完成。新製備好的毛細管在使用前先以去離子水清洗 10 分鐘。

## 5. 多孔洞中空纖維管為主的 LPME 萃取步驟

### (a) 水溶液樣品

LPME 萃取裝置如圖 (8) <sup>[80]</sup>。首先將 10  $\mu\text{l}$  的 1-octanol 以 10  $\mu\text{l}$  GC 注射針注入 8 cm 長的 polypropylene 材質中空纖維管，靜置纖維管 5 秒，使 1-octanol 滲入纖維管的孔洞，再將多餘的 1-octanol 以空針推出纖維管。纖維管的兩端各接 1 段毛細管 (內徑 180  $\mu\text{m}$ ，外徑 335  $\mu\text{m}$ )，分別為 4 公分與 8 公分長。8 公分毛細管端接一個 500  $\mu\text{l}$  塑膠瓶，用來接收萃取完成的溶液，而 4 公分毛細管的一端用來引入接收溶液 (50 mM 磷酸鈉溶液含 0.5 mM  $\beta$ -CD, pH = 3.0)。將 10 ml 樣品溶液 (pH = 10.0) 裝入置有小磁石的 10 ml 棕色瓶，接著把處理好的纖維管浸入樣品溶液中，以注射針將 10  $\mu\text{l}$  的接收溶液注入纖維管，在 400 rpm 攪拌速率下進行萃取 15 分鐘。以空針將纖維管中萃取液推出並收集至 500  $\mu\text{l}$  塑膠瓶，接著再重新注入 10  $\mu\text{l}$  新鮮接收溶液萃取 15 分鐘，共重複三次，總共收集 30  $\mu\text{l}$  的萃取溶液，接著以 CE-UV 進行分析。

## (b) 血漿樣品

LPME 萃取裝置與步驟同上節。不同之處為中空纖維管縮短為 3 公分長，樣品溶液減少為 500  $\mu\text{l}$  ( $\text{pH} = 10.0$ )，裝入置有小磁石的 1 ml 塑膠瓶。實驗時以注射針將 3  $\mu\text{l}$  的接收溶液注入管壁已浸泡 1-octanol 的纖維管內，在 400 rpm 攪拌速率下進行萃取 15 分鐘。以空針將萃取液推出並收集至 500  $\mu\text{l}$  塑膠瓶，接著再注入 3  $\mu\text{l}$  的新鮮接收溶液萃取 15 分鐘，重複萃取三次，總共收集 9  $\mu\text{l}$  的萃取溶液。

## 6. 樣品注入方式與毛細管清洗

本實驗採用的樣品注入方式為重力注射，進樣時將高壓端的毛細管提高 20 cm，浸入樣品溶液槽 5 秒，分析物會因虹吸作用而導入毛細管中，此時再將進樣端毛細管放回電泳緩衝溶液槽裡。實驗前，先以去離子水沖洗毛細管 15 - 20 分鐘，再用電泳緩衝溶液沖洗 20 分鐘。實驗結束後，以去離子水沖洗毛細管 20 分鐘，將管中殘餘的電泳緩衝溶液趕出，使毛細管保存於去離子水中。

## 參、結果與討論

### 一、毛細管的管壁塗覆

一般毛細管材質主要為熔融矽，當管中緩衝溶液的 $\text{pH} \geq 2$ 時，毛細管內壁表面的矽醇基（ $\text{SiOH}$ ）會解離成 $\text{SiO}^-$ 而帶負電，帶正電荷分析物會與管壁表面的負電荷作用，產生吸附現象而導致訊號峰拖尾。另外，毛細管高表面積與體積比對散熱是相當有利的，但是也增加了產生吸附的可能，特別是對一些具多電荷的蛋白質分析物吸附特別嚴重。

本研究所探討的三環抗憂鬱劑（TCAs）屬於鹼性藥物，因此也可能有吸附於管壁的問題。圖（14）顯示三種TCAs均會與管壁作用，導致其訊號峰嚴重的拖尾。文獻中有多種降低分析物與管壁吸附作用的方法，例如，增加緩衝溶液濃度，可降低管壁的表面電荷來減少分析物與管壁的作用，但此方法常受限於電泳電流增加產生之焦耳熱會破壞分離解析度。調整緩衝溶液 $\text{pH}$ 值使分析物帶電性和毛細管壁相似亦可減低吸附，但此方法常受限於電泳緩衝溶液 $\text{pH}$ 值的選擇範圍。另一種方法是修飾毛細管壁，修飾毛細管壁最常用的方法是先進行管壁矽烷化，再鍵結上適合的官能基（R），形成 $\text{Si-O-Si-R}$ 的型式<sup>[88]</sup>。雖然有很多可利用的R基可選擇，如polyacryamide、sulfonic acid、maltose等，但矽氧鍵（ $\text{Si-O-Si}$ ）只有在 $\text{pH}=4 \sim 7$ 的範圍內才

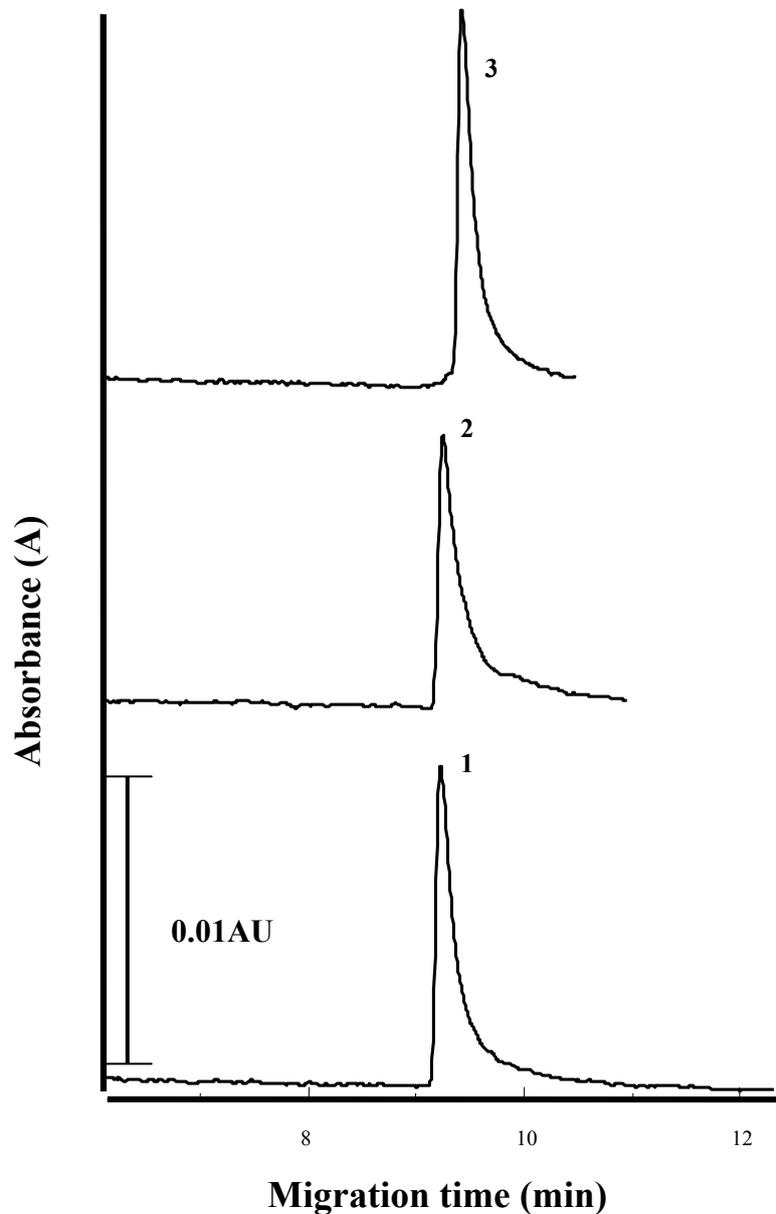


圖 (14) TCAs 在一般毛細管中之電泳圖

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0

毛細管：52  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  366  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)

分離電壓：21 kV

UV 偵測器：波長：210 nm

分析物：1. Trimipramine、2. Amitriptyline、3. Doxepin，  
皆為 50  $\mu\text{M}$

進樣方式：重力注射；20 公分高；15 秒

較穩定，超過此範圍容易發生水解，限制了毛細管的穩定性。此外也可直接以Si-C連接<sup>[89]</sup>，此種方法不需進行管壁矽烷化，而且在pH = 2 – 8 的範圍非常穩定，但製作過程較為困難。另外還有管壁吸附聚合物的方法，如polyethylene glycol (PEG)<sup>[90]</sup>，但此方法穩定性差，且只適用於低pH範圍(2 – 4)。本實驗採用Hong等人所開發的方法<sup>[91]</sup>，先將*N,N*-Dimethylacrylamide (DMA) 以Si-O-C鍵結於毛細管壁，再加入過硫酸胺 (APS) 進行聚合反應，形成中性的polydimethylacrylamide (PDMA)，聚合過程如圖(15)。與前面敘述的其他方法相比，這種塗覆可提供簡單、快速和再現性高等優點。根據報導<sup>[91]</sup>，經塗覆PDMA的毛細管在pH = 8 的緩衝溶液中電滲流可降至  $6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，且管壁聚合形成的PDMA覆蓋了表面大部分負電荷，減少管壁與分析物的吸附作用，提高分離效率。作者利用此方法成功地分離鹼性與酸性蛋白質，對於cytochrome c的分離效率高達  $12 \times 10^5 \text{ plates / m}$ 。此外，PDMA塗覆的毛細管在pH = 10 緩衝溶液中也很穩定，至少可進行150次的蛋白質分離實驗，毛細管不會有衰退的現象。另外此種表面鍵結PDMA的毛細管，可使用有機溶劑(如丙酮、甲醇等)沖洗，因此也適用於非水相的毛細管電泳。

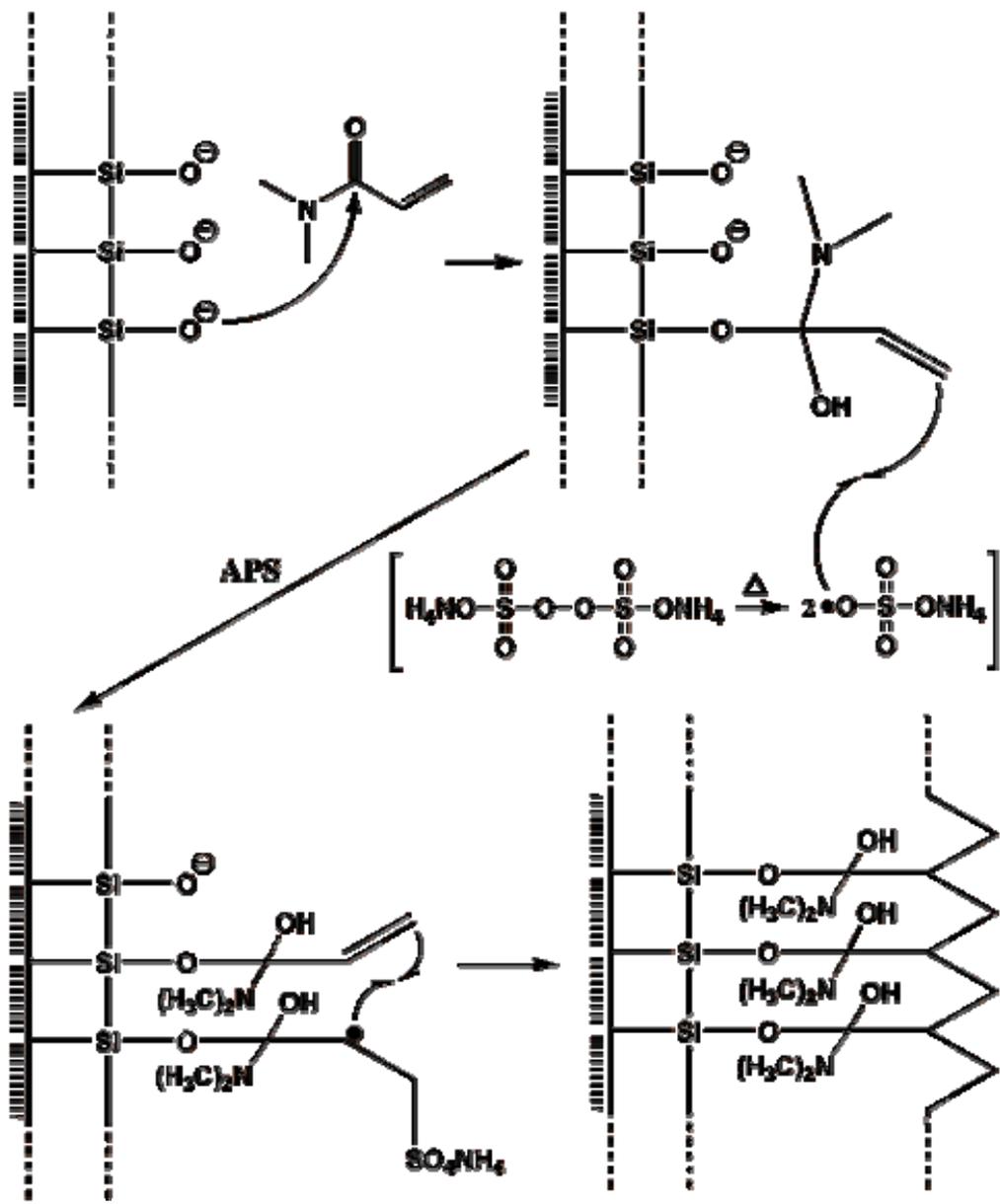


圖 (15) 毛細管壁PDMA聚合反應的流程圖<sup>[91]</sup>

## 二、DMA 濃度對管壁塗覆的影響

不同濃度的DMA進行管壁塗覆對分離有不同的效率。為了探討使用不同濃度DMA進行管壁塗覆對TCAs分離所造成的影響，以去離子水配製 0.5、1.0 與 3.0 % (v/v) 的DMA來進行毛細管壁塗覆，並選擇Amitriptyline、Doxepin、Promazine、Trimipramine四種分析物來測試管柱的分離能力，得到圖(16)。圖中顯示隨著DMA濃度的提高，四種TCAs的分離效果越好。TCAs的電泳遷移率與其帶電荷多寡有關，由於Promazine與Trimipramine結構上有 2 個可質子化的N原子，在pH=3 時帶正電量較大，往負極移動速度較快；Amitriptyline與Doxepin只有一個可質子化的N原子，移動速度較慢。當毛細管壁未經塗覆處理，由於Trimipramine與Amitriptyline的pka值非常相近（分別為 9.37 與 9.40），移動速度相似，加上受管壁負電荷吸附與電滲流（ $6.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ）的影響，導致訊號重疊，無法分開。使用 0.5 % (v/v) DMA塗覆的毛細管，Trimipramine與Amitriptyline受電滲流（ $1.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ）與管壁負電荷吸附的影響變小，分離效果得到改善。當DMA的濃度增加至 1.0 % (v/v) 時，電滲流降至  $2.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，而Trimipramine與Amitriptyline分離更加明顯。DMA的濃度再提高至 3.0 % (v/v) 時，電滲流降至  $5.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，但分離效果似乎並未進一步提升，改變的只有遷移時間。

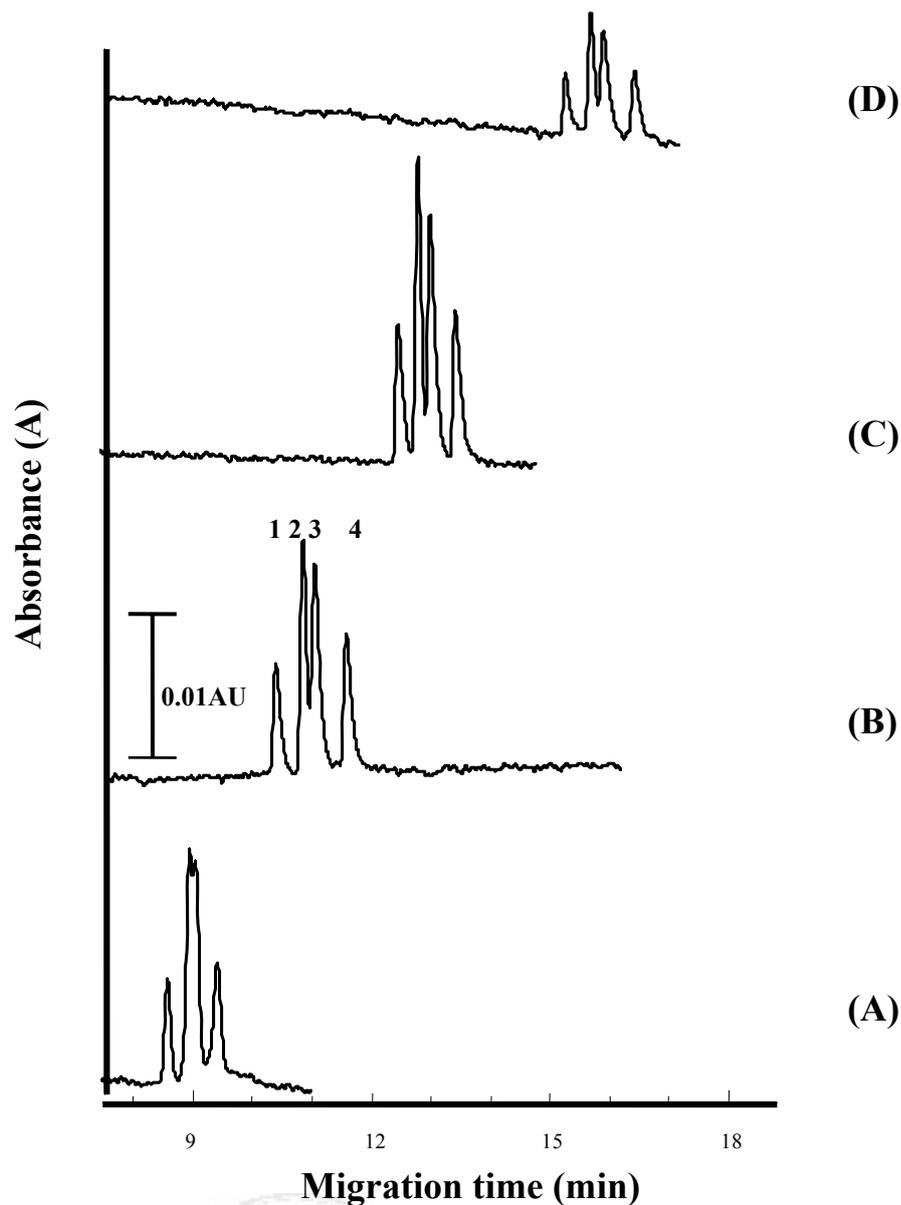


圖 (16) 不同濃度 DMA 塗覆毛細管對 TCAs 分離的影響

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0

毛細管：52  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  366  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)

分離電壓：21 kV

UV 偵測器：波長：210 nm

分析物：1. Promazine、2. Trimipramine、3. Amitriptyline

4. Doxepin，皆為 50  $\mu\text{M}$

進樣方式：重力注射；20 公分高；10 秒

(A) 未塗覆管壁

(B) 塗覆 0.5 % (v/v) DMA

(C) 塗覆 1.0 % (v/v) DMA

(D) 塗覆 3.0 % (v/v) DMA

當 DMA 的濃度越高，管壁的 PDMA 層越厚，遮蔽管壁表面負電荷的效果越明顯，而分析物的遷移時間也越長，主要是因為電滲流逐漸消失，分析物幾乎只能靠本身的泳動速度移動。為了顧及分離效果與實驗時間，選擇濃度為 1.0 % (v/v) 的 DMA 進行後續實驗的毛細管壁塗覆。

### 三、毛細管塗覆再現性

為了探討毛細管塗覆 PDMA 方法的再現性，配製濃度 1.0 % (v/v) 的 DMA 進行管壁塗覆，製備 5 支相同的毛細管，分別利用重力進樣重複分析 50  $\mu$ M Amitriptyline、Doxepin、Promazine、Trimipramine 四種 TCAs 共 3 次，以變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 計算分析結果的再現性，列於表 (3) 至表 (6)。從結果可知，在  $\alpha = 0.05$  和組間與組內自由度為 (4,10) 下，四種 TCAs 的遷移時間與訊號面積經 ANOVA 所求得的 F 值皆小於臨界值，表示不僅單一管柱的重複分析具有不錯的再現性，即使是使用不同的管柱對四種 TCAs 的分析也有相近的結果，顯示管柱與管柱間也有不錯的再現性。

表（3）Promazine 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析

（一）遷移時間

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.036173	4	0.009043	0.867327	3.47805
組內	0.104267	10	0.010427		
總和	0.14044	14			

（二）訊號面積

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.14604	4	0.03651	1.548346	3.47805
組內	0.2358	10	0.02358		
總和	0.38184	14			

表（4）Trimipramine 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析

（一）遷移時間

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.025507	4	0.006377	1.004727	3.47805
組內	0.063467	10	0.006347		
總和	0.088973	14			

（二）訊號面積

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.12196	4	0.03049	3.345647	3.47805
組內	0.091133	10	0.009113		
總和	0.213093	14			

\* 表（3）與表（4） $\alpha = 0.05$ ，d.f. = 4,10

表 (5) Amitriptyline 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析

(一) 遷移時間

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.026333	4	0.006583	3.428819	3.47805
組內	0.0192	10	0.00192		
總和	0.045533	14			

(二) 訊號面積

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.333333	4	0.008333	1.748252	3.47805
組內	0.047667	10	0.004767		
總和	0.081	14			

表 (6) Doxepin 的遷移時間與訊號面積之 ANOVA 分析

(一) 遷移時間

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.014893	4	0.003723	2.820707	3.47805
組內	0.0132	10	0.00132		
總和	0.028093	14			

(二) 訊號面積

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.141107	4	0.035277	1.304289	3.47805
組內	0.270467	10	0.027047		
總和	0.411573	14			

\*表 (5) 與表 (6)  $\alpha = 0.05$  , d.f. = 4,10

#### 四、緩衝溶液中添加 $\beta$ -環糊精對 TCAs 分離的影響

初步實驗顯示使用管壁塗覆處理的毛細管可以改善 4 種 TCAs 的分離效果，降低電滲流與管壁吸附的影響，於是嘗試將 9 種 TCAs 一起注入管壁塗覆 PDMA 的毛細管進行分析，結果顯示於圖 (17)。除了 Fluoxetine、Promazine、Amitriptyline 與 Thioridazine 可分離外，其餘五種 TCAs 仍無法分離。單純利用管壁塗覆 PDMA 高分子層的毛細管還是無法將 9 種 TCAs 完全分離。因此決定嘗試在緩衝溶液中添加  $\beta$ -環糊精，以提高分離之選擇性。

環糊精 (cyclodextrins) 是由 bacillus macerans 澱粉酵素 (amylase) 與澱粉及其相關化合物作用後產生的一系列寡糖 (oligosaccharids) 產物，1891 年被 Villers 發現<sup>[92]</sup>。環糊精結構如兩端開口的圓桶 (見圖 (18))，二級羥基 (在每個葡萄糖單位的第二、三個碳上) 位在較寬口的一邊，所有的一級羥基 (在每個葡萄糖單位的第六個碳上) 位在較窄口的一邊。無論一級或二級羥基均在圓桶外側，故為親水性；而圓桶內側為疏水性。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -cyclodextrin 分別由 6 個、7 個、8 個葡萄糖單體聚合而成，如圖 (19)，而內部空間大小以  $\gamma$ -cyclodextrin 最大， $\beta$ -cyclodextrin 次之， $\alpha$ -cyclodextrin 最小。

環糊精最早曾用在 TLC 中當作移動相添加物以分離鏡像異構物，隨後亦被鍵結到 LC 固定相上成為對掌性固定相，在商業上可購買到

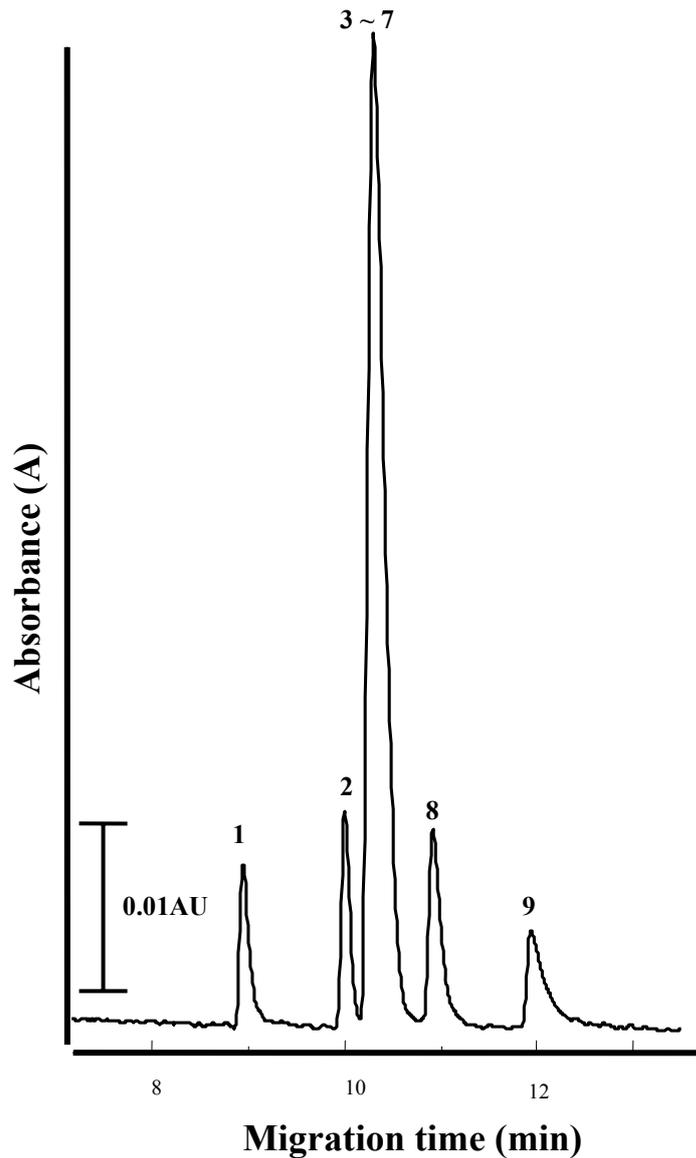


圖 (17) 9 種三環抗憂鬱劑的電泳分離結果

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0

毛細管：52  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  366  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)

管壁塗覆 PDMA

分離電壓：18 kV

UV 偵測器：波長：210 nm

分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine

4. Imipramine 5. Doxepin 6. Clomipramine

7. Nortriptyline 8. Amitriptyline 9. Thioridazine

皆為 100  $\mu\text{M}$

進樣方式：重力注射；20 公分高；5 秒

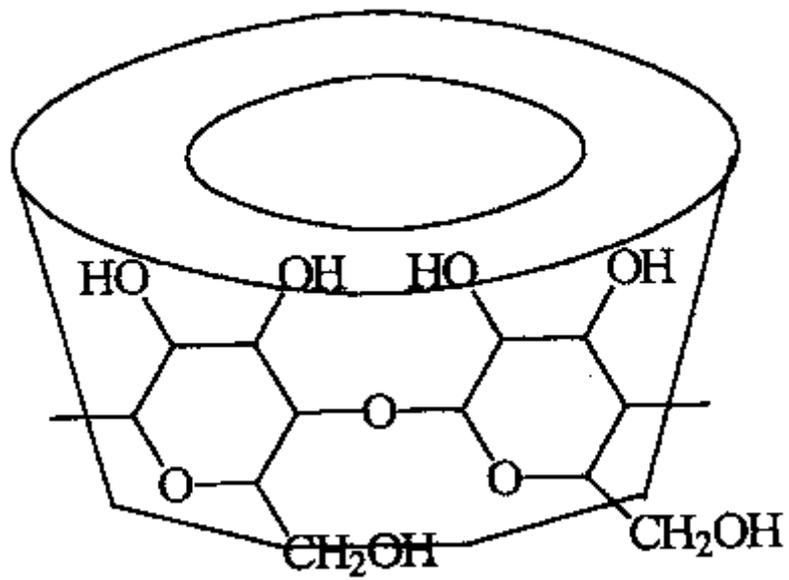


圖 (18) 環糊精分子結構側視圖

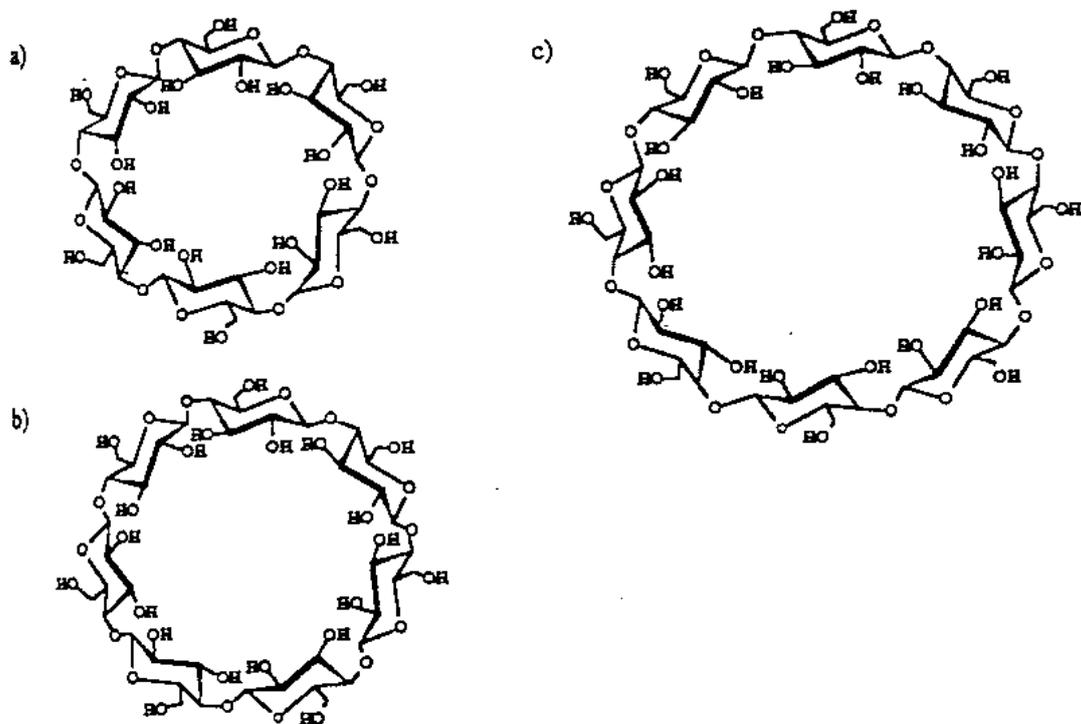


圖 (19) 環糊精之化學結構圖 <sup>[92]</sup>

(a)  $\alpha$ -cyclodextrin

(b)  $\beta$ -cyclodextrin

(c)  $\gamma$ -cyclodextrin

此類型的管柱，其中以  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) 使用最廣泛。環糊精最重要的特色之一是能與許多化合物形成主客錯合物 (host-guest complexes)，利用其內部空間來容納外來的化合物分子。此現象應用於許多方面，如藉著環糊精和藥物錯合製成藥錠，用來保護易被分解、穩定性差的藥物，或改變藥物的溶解度增加其利用性<sup>[93]</sup>；在食品應用方面，可降低食物風味的消失，並使其受氧化與光解的速度減緩<sup>[94]</sup>。

腔包現象是指一個腔主 (host) 可允許其他客體 (guest) 進入其腔中，而沒有任何共價鍵形成的現象<sup>[95]</sup>。鏡像異構物和環糊精所形成主客錯合物其穩定性不同，如圖 (20)，停留於環糊精內部的時間有差異，這是造成分離的主要機制。在毛細管電泳的應用中，環糊精本身不帶電，於電場中與電滲流速度相同，帶負電的分析物與環糊精所形成的錯合物，因電荷密度降低，使分析物往負極移動的速度加快，反之，帶正電的分析物與環糊精所形成的錯合物，會使分析物往負極移動的速度變慢，中性分析物則不受環糊精影響。另外環糊精在紫外光範圍不會吸收，所以含環糊精的水溶液並不會提高偵測背景。這種添加環糊精於電泳緩衝溶液來改進分離效果的應用，稱為環糊精修飾毛細管電泳 (cyclodextrin modified capillary electrophoresis)。Jelinek<sup>[96]</sup> 等人利用添加  $\alpha$ -環糊精來輔助分離相關的 penicillins，並且和緩

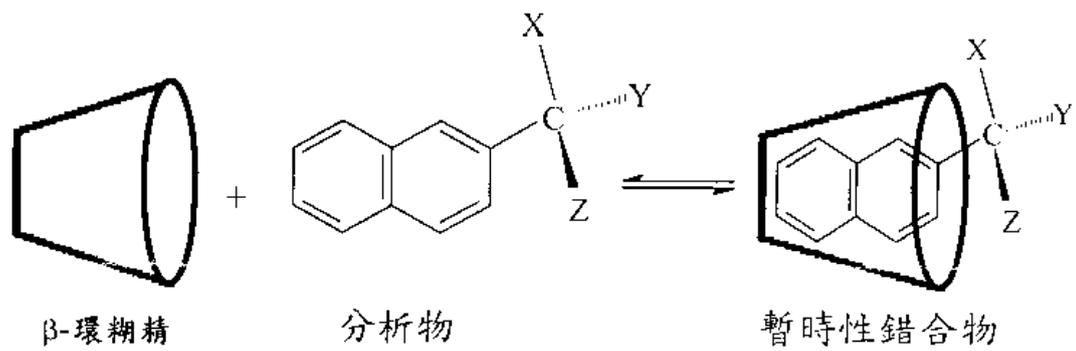


圖 (20) 環糊精輔助分離的主要機制

衝溶液分別加入D-葡萄糖、澱粉的分離結果比較，確立了環糊精其環狀結構是影響分離的主要關鍵。1987年Snopek<sup>[97]</sup>等人利用 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -環糊精的添加來探討含鹵素（F、Cl、Br、I）取代基的苯甲酸，其臨、間、對位的位置異構物分離的影響。Liu<sup>[98]</sup>等人利用添加 $\alpha$ 、 $\beta$ -環糊精於緩衝溶液中分離peptides。

為了探討添加環糊精對9種TCAs分離的影響，於緩衝溶液中添加0.4 mM  $\beta$ -CD，結果如圖(21)。原本圖(17)中只有Fluoxetine、Promazine、Amitriptyline與Thioridazine四種TCAs可完全分離，在添加 $\beta$ -CD後，9種TCAs的分離明顯獲得改善，甚至Doxepin的幾何異構物（peak 5a、5b）與Thioridazine的鏡像異構物（peak 9a、9b）也可分離出來。兩個Thioridazine異構物訊號因無光學標準品確定其先後順序，故以Thioridazine<sub>1</sub>、Thioridazine<sub>2</sub>分別表示兩種鏡像異構物。

本實驗進一步利用CE-UV探討Thioridazine的鏡像異構物和Doxepin的幾何異構物分離情形。對於遷移時間相近的兩分析物，解析度（R）可用公式（3）表示：

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (3)$$

$t_1$ ：分析物1的遷移時間

$t_2$ ：分析物2的遷移時間

$w_1$ ：分析物1的時間寬度

$w_2$ ：分析物2的時間寬度

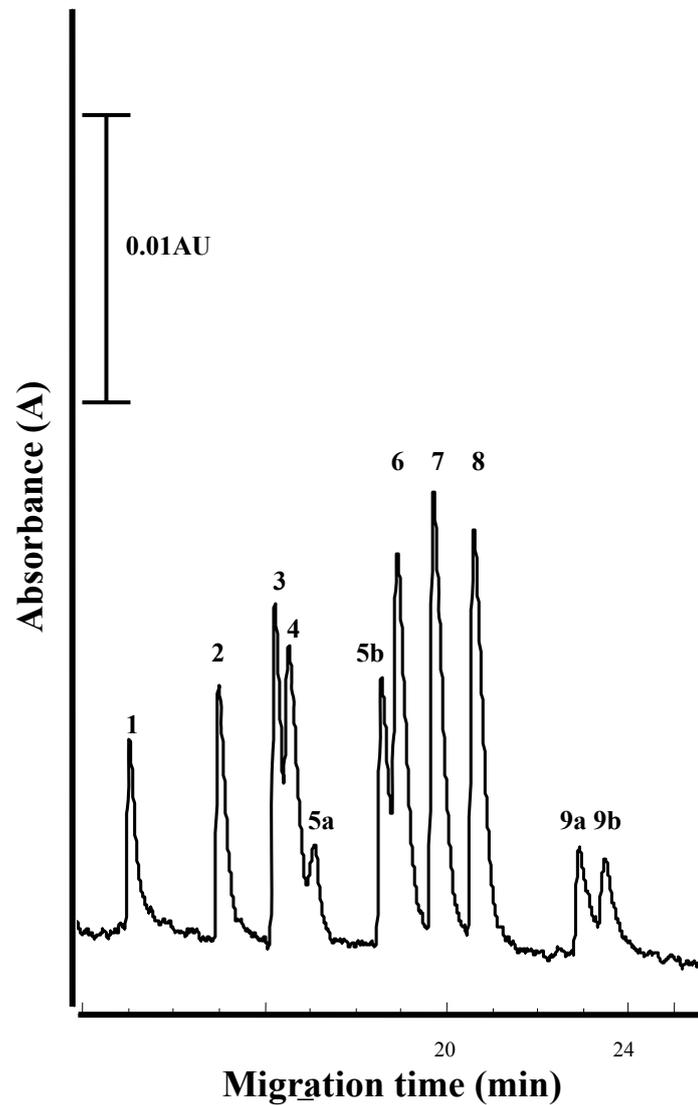


圖 (21) 9 種 TCAs 在緩衝溶液中添加 0.4 mM  $\beta$ -CD 後的電泳圖

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0，添加 0.4 mM  $\beta$ -CD  
 毛細管：52  $\mu$ m I.D.  $\times$  366  $\mu$ m O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)  
 管壁塗覆 PDMA

分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine  
 4. Imipramine 5a. Z-Doxepin 5b. E-Doxepin  
 6. Clomipramine 7. Nortriptyline 8. Amitriptyline  
 9a. Thioridazine<sub>1</sub> 9b. Thioridazine<sub>2</sub>，皆為 100  $\mu$ M

其他條件如圖 (17)

使用未塗覆 PDMA 的毛細管進行實驗，在緩衝溶液中逐漸增加  $\beta$ -CD 的濃度，可發現當  $\beta$ -CD 添加濃度為 0.45 mM 時，Thioridazine 的兩鏡像異構物有最佳的解析度 (2.53)，當  $\beta$ -CD 添加濃度為 0.8 mM 時 Doxepin 的幾何異構物有最佳的解析度 (7.76)，如圖 (22) 與圖 (23) 所示。

為尋求緩衝溶液中  $\beta$ -CD 之最佳添加濃度來改善分離效果，本實驗觀察緩衝溶液含 0.05 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM 及 0.8 mM  $\beta$ -CD，以 PDMA 塗覆毛細管對 9 種 TCAs 進行電泳分離的影響，結果顯示於圖 (24)。電泳緩衝溶液中未添加  $\beta$ -CD 時只有四種 TCAs 可完完全全分離 (peak 1、2、8、9)。當  $\beta$ -CD 的添加濃度為 0.05 mM 時，原本分不開的分析物漸漸開始分離，Thioridazine 的鏡像異構物 (peak 9a、9b) 也逐漸分開。當  $\beta$ -CD 的濃度太低，與分析物形成腔包錯合物的機會較小，因此分離效果的改善不明顯。隨著所加入  $\beta$ -CD 濃度增加，分離效果越佳。當加入  $\beta$ -CD 的濃度達 0.5 mM 時，幾乎可完全分離所有的 TCAs，而 Thioridazine 的鏡像異構物與 Doxepin 的幾何異構物 (peak 5a、5b) 也可以完全分開，但對於 Desipramine 與 Imipramine 這兩個分析物 (peak 3、4)，由於結構上只相差一個甲基，即使加入更多  $\beta$ -CD，也無法達成基線分離。繼續增加  $\beta$ -CD 濃度仍無法改善 Desipramine 與 Imipramine 的分離，

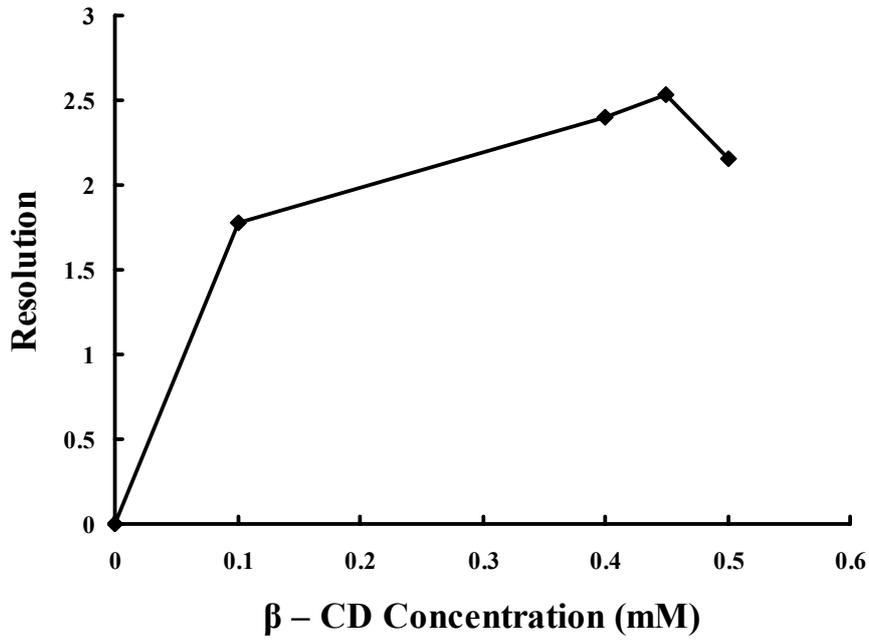


圖 (22) 緩衝溶液中添加不同濃度  $\beta$ -CD 對 Thioridazine 之鏡像異構物解析度的影響

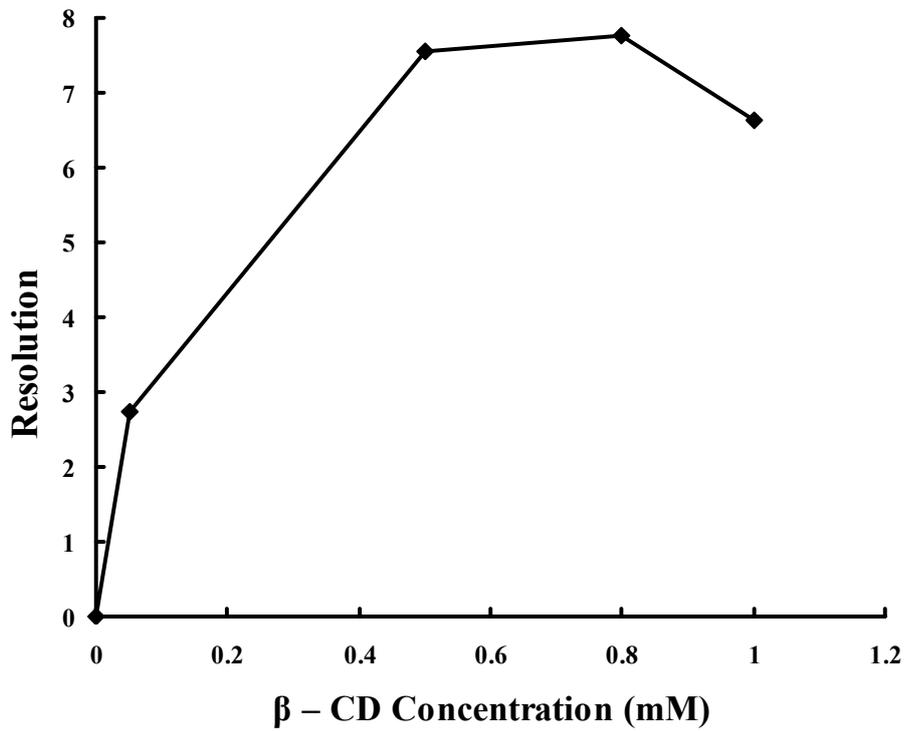
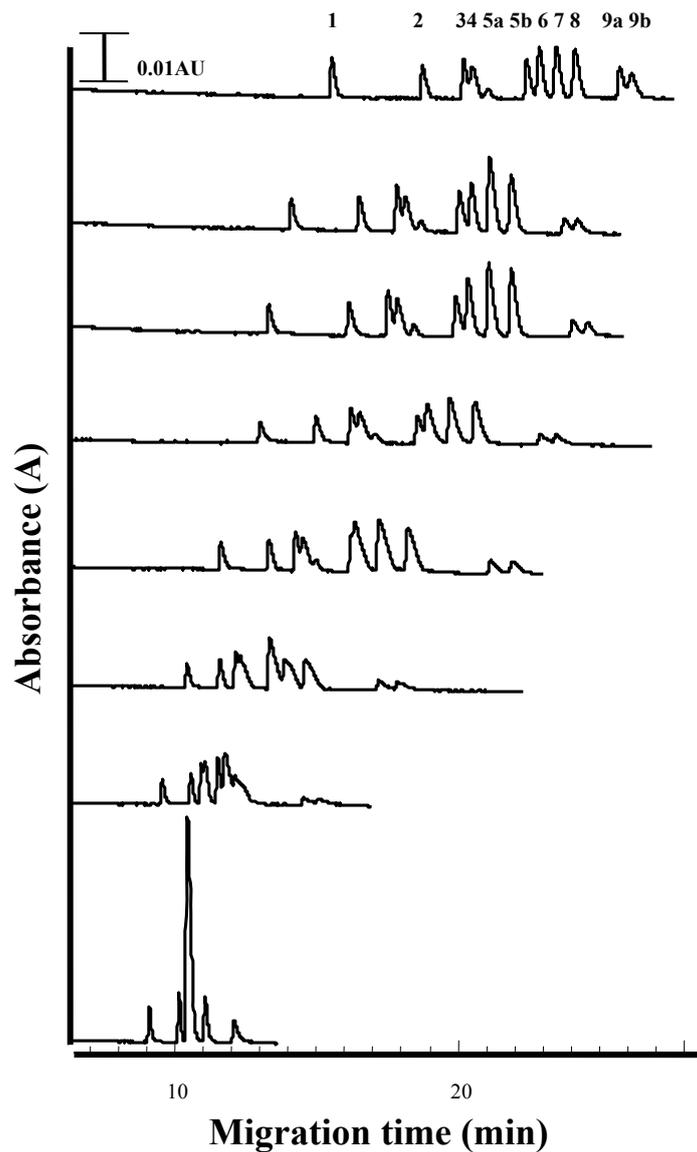


圖 (23) 緩衝溶液中添加不同濃度  $\beta$ -CD 對 Doxepin 之幾何異物解析度的影響



圖(24) 緩衝溶液添中加不同濃度  $\beta$ -CD 對 9 種 TCAs 分離影響

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0，添加不同濃度  $\beta$ -CD  
 毛細管：52  $\mu$ m I.D.  $\times$  366  $\mu$ m O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)  
 管壁塗覆 PDMA

分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine  
 4. Imipramine 5a. Z-Doxepin 5b. E-Doxepin  
 6. Clomipramine 7. Nortriptyline 8. Amitriptyline  
 9a. Thioridazine<sub>1</sub> 9b. Thioridazine<sub>2</sub>，皆為 100  $\mu$ M

其他條件如圖(17)

改變的只有分析物的遷移時間。當緩衝溶液中有較高濃度的  $\beta$  - CD 時，分析物分佈在  $\beta$  - CD 內部的量相對較高，對移動時間的影響較大，如圖(25)。綜合以上的結果，選擇緩衝溶液中添加 0.5 mM  $\beta$  - CD 以輔助 9 種 TCAs 的分離。

## 五、緩衝溶液濃度之影響

緩衝溶液濃度大小會影響毛細管壁電雙層與溶液黏稠度，進而影響到分析物的移動速度與分離情形。為了解緩衝溶液濃度對 TCAs 分離結果的影響，本實驗配製五種磷酸鈉緩衝溶液 (pH = 3)，濃度分別為 20 mM、30 mM、50 mM、60 mM 與 70 mM，其中各含有 0.5 mM  $\beta$  - CD，由不同濃度緩衝溶液對 9 種 TCAs 電泳分離的情形來選擇最適當的磷酸鈉濃度。

9 種 TCAs 的移動時間與磷酸鈉緩衝溶液濃度的變化顯示於圖(26)。當緩衝溶液的濃度為 20 mM 時，Thioridazine 的鏡像異構物無法分開 (peak 9)，而 E - Doxepin (peak 5b) 與 Clomipramine (peak 6) 分不開，Desipramine 和 Imipramine (peak 3、4) 的分離效果也不好。逐漸提高緩衝溶液的濃度，分離效果明顯改善；當緩衝溶液的濃度到達 50 mM 時，每個分析物幾乎可以完全分離，Thioridazine 的鏡像異構物與 Doxepin 的幾何異構物也可以分開。雖然 Desipramine 和

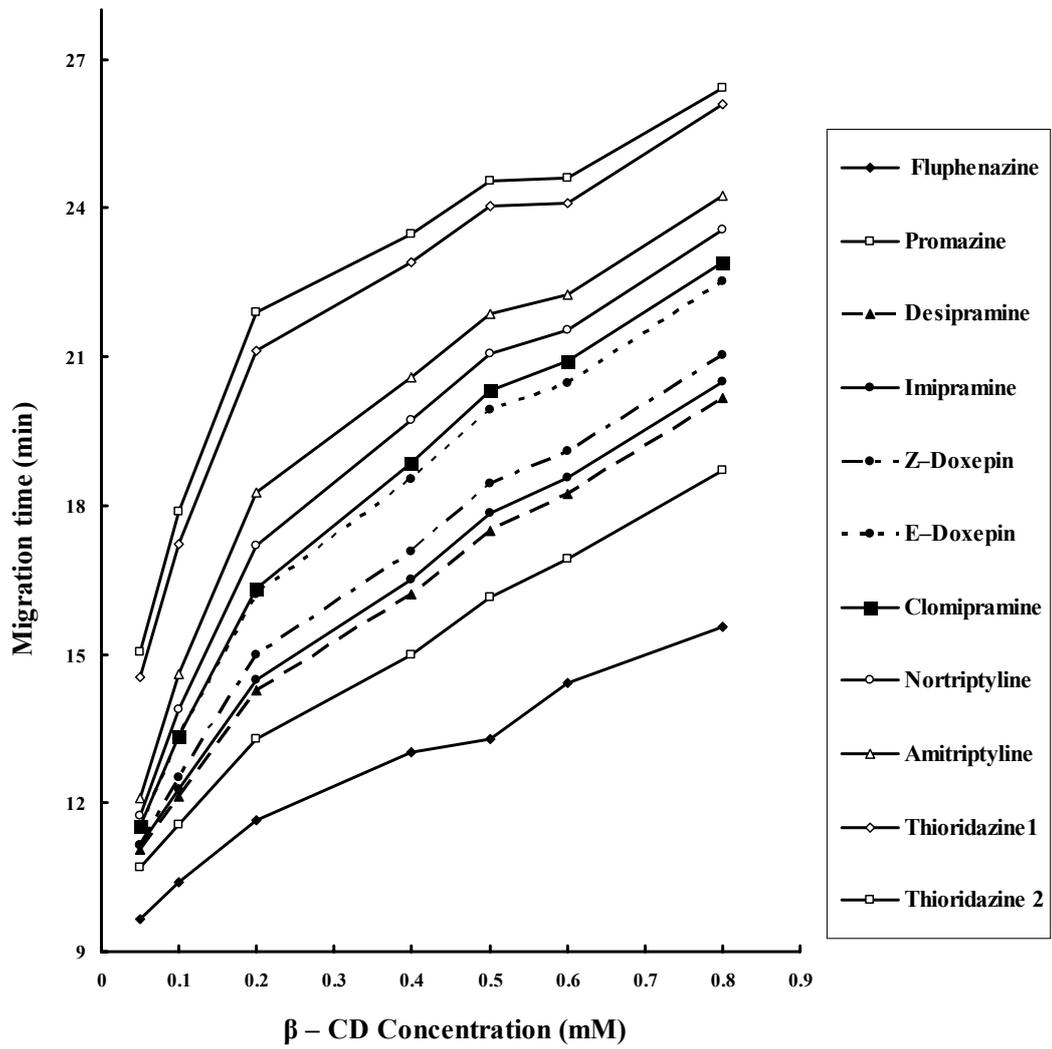


圖 (25) 緩衝溶液添中加不同濃度  $\beta$ -CD 對 TCAs 遷移時間的影響

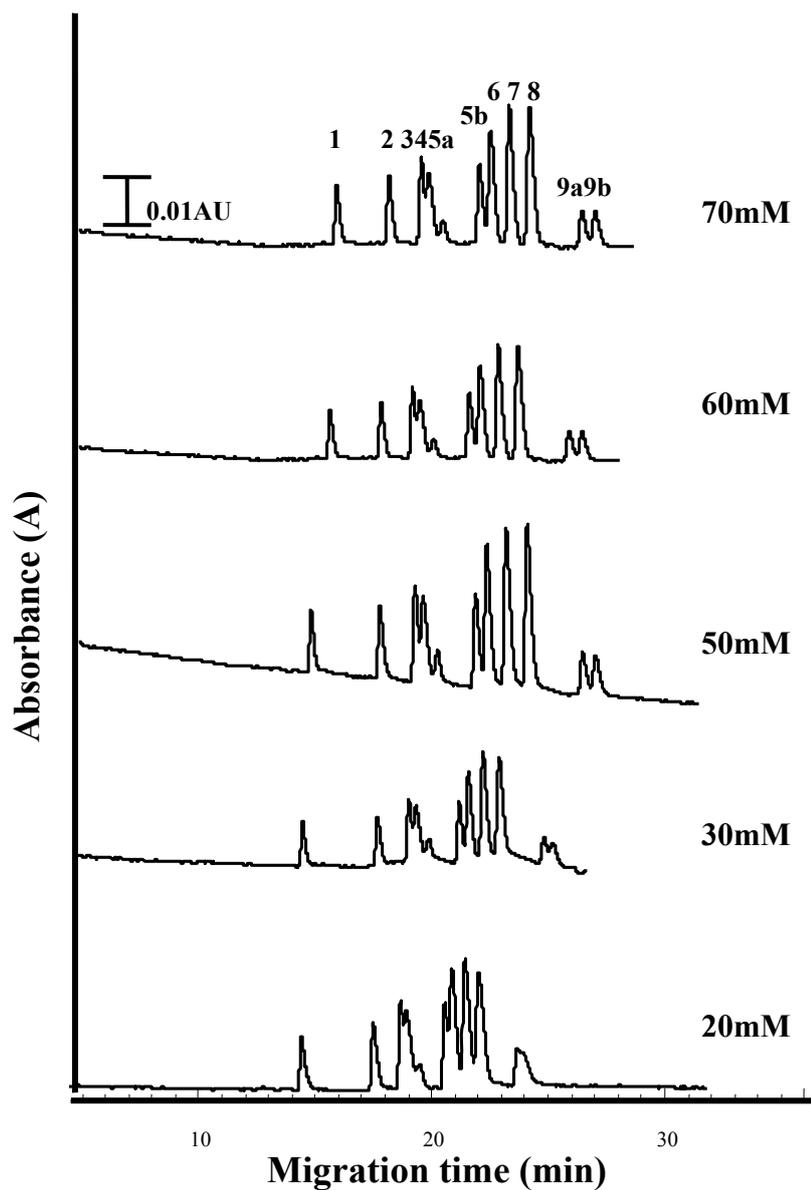


圖 (26) 不同濃度磷酸鈉緩衝溶液對 9 種 TCAs 分離的影響

緩衝溶液：磷酸鈉溶液，pH = 3.0，添加 0.5 mM  $\beta$ -CD

毛細管：52  $\mu$ m I.D.  $\times$  366  $\mu$ m O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)

管壁塗覆 PDMA

分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine

4. Imipramine 5a. Z-Doxepin 5b. E-Doxepin

6. Clomipramine 7. Nortriptyline 8. Amitriptyline

9a. Thioridazine<sub>1</sub> 9b. Thioridazine<sub>2</sub>，皆為 100  $\mu$ M

其他條件如圖 (17)

Imipramine 無法達到基線分離，但 50 mM 磷酸鈉的分離效果較低濃度下已有明顯改善。在一般的毛細管中，提高緩衝溶液濃度會造成分析物的移動時間增長，原因是緩衝溶液濃度越高，溶液中離子強度越大，使管壁電雙層壓縮，Zeta 電位降低，溶液黏稠度也增加，導致電滲流變小。但本實驗所使用的是管壁塗覆高分子物質的毛細管，電滲流幾乎不存在，故分析物移動時間的變化不明顯。另外，緩衝溶液濃度越高，電泳電流亦會提高，產生更多的焦耳熱，造成分析帶變寬。當緩衝溶液濃度為 60 mM、70 mM 時可發現，Desipramine 和 Imipramine 因分析帶的變寬，分離效果又變差。因此選擇濃度為 50 mM 的磷酸鈉緩衝溶液為最佳分析條件。

## 六、緩衝溶液 pH 值之影響

由於TCAs的pKa值介於 7.21 至 10.5 之間，為了使TCAs在電泳過程中質子化帶正電荷，故設定緩衝溶液pH<4。另外由於本實驗所用的毛細管已經過管壁塗覆處理，大部分的SiO<sup>-</sup>已被聚合物遮蔽住，分析物正電荷與毛細管壁表面負電荷作用會減低。為了解緩衝溶液pH值變化對 9 種TCAs分離的影響，本實驗使用 50 mM的磷酸鈉緩衝溶液，以 85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>調整pH值，分別配製成pH 2.0、pH 2.5、pH 3.0、pH 3.25 與pH 3.5，再加入 0.5 mM β-CD，對 9 種TCAs的移動時間影

響顯示於圖 (27)。由結果發現，在pH 2.0 時，分析物所帶的正電荷較多，往負極的移動速度較快，但分離效果不盡理想，Z - Doxepin 會和Imipramine訊號重疊，而且Thioridazine的鏡像異構物亦無法完全分離。當pH 3.0 時，雖然分離所花的時間較長，但上述的問題皆有改善。繼續調高pH值，發現Fluphenazine的速度明顯減慢，原因是其 pKa 為 7.21，而其他 TCAs 的 pKa 值皆大於 9，因此當 pH 值提高時，Fluphenazine 所帶的正電荷減少的情形最顯著，移動速度減緩特別明顯，並且會與 Promazine 的訊號過於接近，分離不理想。由圖 (27) 的結果可看出，電泳緩衝溶液 pH 3.0 時為最佳分離條件。

## 七、重力注射進樣時間之探討

在毛細管電泳的實驗中，進樣時間所影響的為分析物注入毛細管中的量，進樣時間越長則分析物進樣的量越多，因此可以提高分析靈敏度。但若是進樣量太多，會降低毛細管的理論板數，反而使訊號的解析度變差，因此本實驗針對進樣時間影響理論板數與訊號高度的程度作探討。以 Desipramine 為測試分析物，採用重力注射方式，於進樣端相對偵測端 20 cm 高度分別進樣 5 ~ 25 秒，結果如圖 (28)。進樣時間越長，訊號高度越大，但理論板數亦會隨著進樣秒數增加而下降。為了兼顧訊號解析度與分析物的偵測靈敏度，選擇兩線交點約

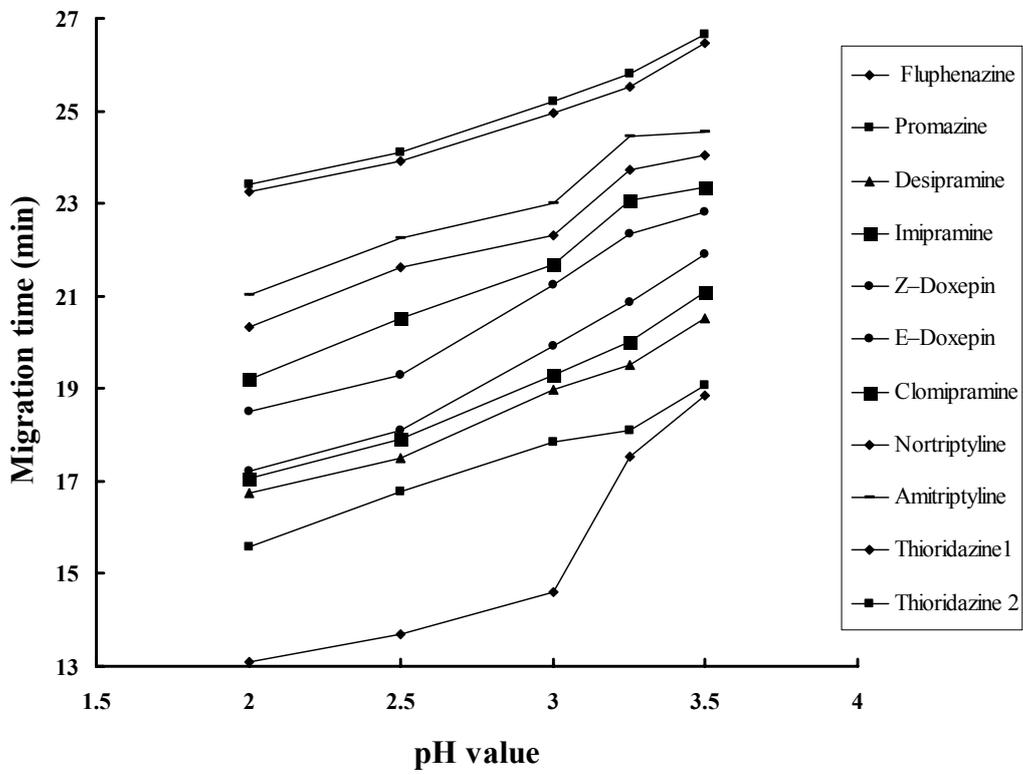


圖 (27) 緩衝溶液 pH 值對分析物遷移時間的影響

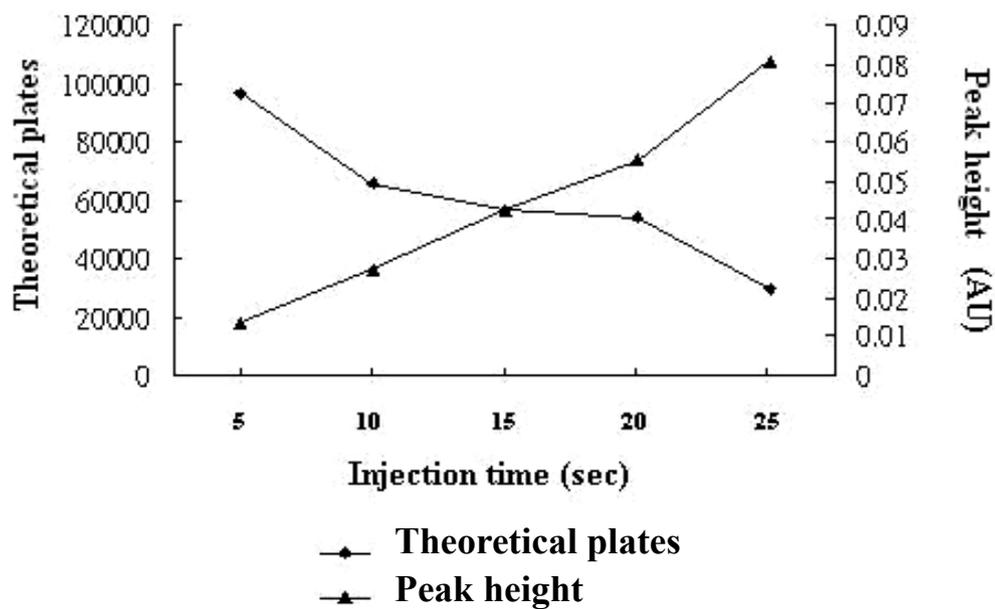


圖 (28) 進樣時間對理論板數與訊號高度的影響

分析物： 100  $\mu$ M Desipramine

進樣方式：重力注射；20 公分高

其他條件如圖 (17)

15 秒，應該會有最佳分析的效果。但實際應用在 9 種 TCAs 分析時，15 秒的進樣時間造成相臨的分析物訊號峰重疊而無法達成完全離，如圖 (29)。為達到完全分離的目的，選用分離效果最佳的 5 秒進樣時間進行 9 種 TCAs 的同時電泳分析，若分析少數的 TCAs，仍可用較長時間注射。

## 八、最佳分離條件

綜合以上實驗的結果，可歸納出最佳的分離條件如下：電泳緩衝溶液組成為 50 mM 磷酸鈉 (pH 3.0) 添加 0.5 mM  $\beta$ -環糊精，所使用的毛細管預先經 1% (v/v) DMA 進行管壁塗覆聚合，樣品以 20 公分高度利用重力進樣，時間 5 秒。在最佳條件下可成功的分離九種 TCAs，結果顯示於圖 (30)，Doxepin 之幾何異構物與 Thioridazine 之鏡像異構物也可完全分離。

Fluphenazine (peak 1) 在 pH 3.0 時帶正電荷較多，且結構上具一個羥基，極性最高，不易與  $\beta$ -CD 作用形成暫時性錯合物，受  $\beta$ -CD 影響最小，因此移動最快。與其他的分析物相比 Thioridazine (peak 9) 的兩端皆有強的疏水性結構，因此較容易進入  $\beta$ -CD 的疏水性內部，形成暫時性錯合物，所以移動最為緩慢。對於 Amitriptyline (peak 8)、Nortriptyline (peak 7)、Doxepin (peak 5) 這三個結構非常相似

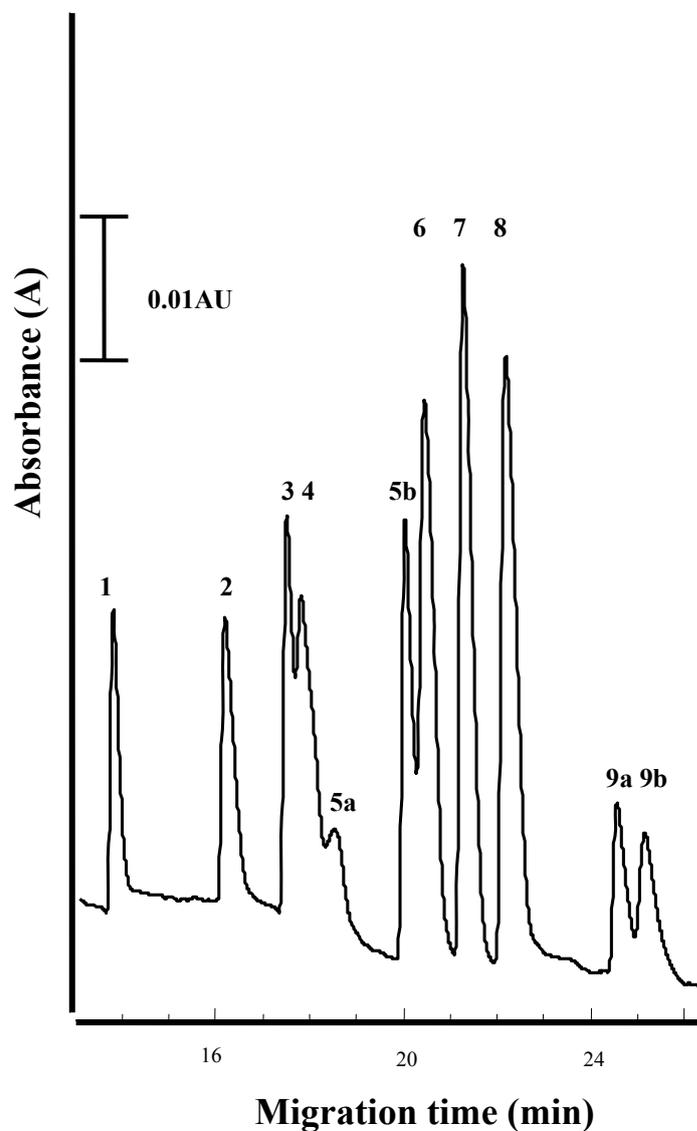


圖 (29) 進樣時間 15 秒之三環抗憂鬱劑電泳分離圖

分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine  
 4. Imipramine 5a. Z - Doxepin 5b. E - Doxepin  
 6. Clomipramine 7. Nortriptyline 8. Amitriptyline  
 9a. Thioridazine<sub>1</sub> 9b. Thioridazine<sub>2</sub>，皆為 100 μM

進樣方式：重力注射；20 公分高，15 秒  
 其他條件如圖 (17)

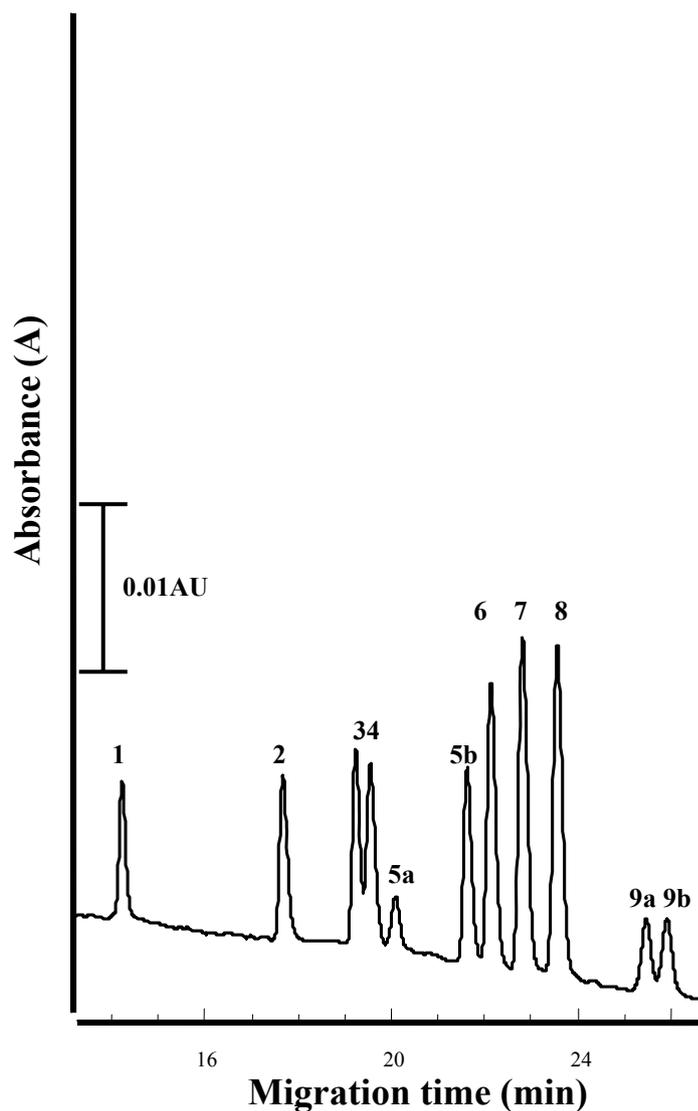


圖 (30) 最佳條件下 9 種 TCAs 的電泳分離圖

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0，添加 0.5 mM  $\beta$ -CD  
 毛細管：52  $\mu$ m I.D.  $\times$  366  $\mu$ m O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm)  
 管壁塗覆 PDMA

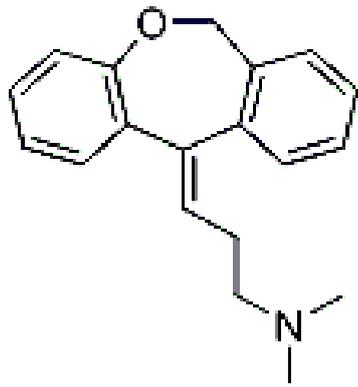
分離電壓：18 kV

UV 偵測器：波長：210 nm

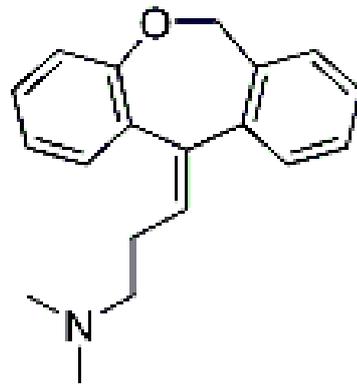
分析物：1. Fluphenazine 2. Promazine 3. Desipramine  
 4. Imipramine 5a. Z-Doxepin 5b. E-Doxepin  
 6. Clomipramine 7. Nortriptyline 8. Amitriptyline  
 9a. Thioridazine<sub>1</sub> 9b. Thioridazine<sub>2</sub>，皆為 100  $\mu$ M

進樣方式：重力注射；20 公分高；5 秒

的分析物，結果顯示 Doxepin 的移動速度最快，原因可能是 Doxepin 的三環上有一個氧，極性較強，與  $\beta$ -CD 結合形成的暫時性錯合物較不穩定，所以移動速度較快。Doxepin 具有 2 個幾何異構物，如圖 (31)，Doxepin 上的氧會受  $\beta$ -CD 上的二級醇羥基吸引而進入  $\beta$ -CD 形成腔包錯合物，由於 Z-Doxepin (peak 5a) 支鏈所造成空間立體障礙較大，不易與  $\beta$ -CD 結合，移動速度較快。反之，E-Doxepin (peak 5b) 的空間立體障礙較小，與  $\beta$ -CD 的結合較為穩定，移動速度較慢。另外，Amitriptyline 在結構上比 Nortriptyline 多一個甲基，疏水性較強，與  $\beta$ -CD 的結合較為穩定，故移動較為緩慢。另一組具有相似結構的分析物為 Desipramine (peak 3)、Imipramine (peak 4) 與 Clomipramine (peak 6)。Desipramine 為 Imipramine 去甲基而得，因此 Imipramine 的疏水性較強，與  $\beta$ -CD 的結合較為穩定，移動較 Desipramine (peak 3) 緩慢。由實驗結果可發現，這三個分析物中以 Clomipramine 的移動速度最緩慢，推測是因為 Clomipramine 上的 Cl 基與  $\beta$ -CD 上的二級醇羥基上產生氫鍵，因此形成的錯合物較為穩定，故移動速度較慢。另外，Promazine (peak 2) 移動速度較 Desipramine 快的原因可能是 Promazine 具疏水性的三環上有一個硫，所佔的立體空較大，與  $\beta$ -CD 相互作用較小，以致移動較快速。



**E form**



**Z form**

圖 (31) Doxepin 之幾何異構物

檢量線的製作是在最佳分離條件下進行。分別取添加有五種不同濃度 TCAs 的水溶液樣品，將各樣品以重力進樣（20 cm，5 sec）方式注入毛細管中。以 TCAs 的訊號面積對 TCAs 的濃度作圖，9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限列於表（7）。以訊號/雜訊比（S/N）為 3 所對應的濃度定義為偵測極限，在水溶液樣品中 9 種 TCAs 的濃度偵測極限範圍為 0.4  $\mu\text{M}$  ~ 5.0  $\mu\text{M}$ 。

為觀察 CE 分離的再現性，以相同步驟將 10  $\mu\text{M}$  各種分析物藉重力進樣（20 cm，5 sec），重複 CE-UV 偵測分析 7 次，計算結果的再現性，列於表（8）。遷移時間的相對標準偏差小於 0.8%，訊號面積的相對標準偏差小於 5.0%，訊號高度的相對標準偏差小於 4.1%，顯示再現性佳。

表 (7) 9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限

分析物	檢量線範圍 ( $\mu\text{M}$ )	線性方程式	線性相關係數 (r) (n=5)	偵測極限 ( $\mu\text{M}$ )
Fluphenazine	2.5~50	$y = 1.68x + 2.02$	0.997	1.8
Promazine	2.5~50	$y = 1.37x + 1.38$	0.996	2.0
Desipramine	2.5~50	$y = 1.67x + 1.76$	0.996	1.8
Imipramine	2.5~50	$y = 1.62x + 3.26$	0.997	1.8
Z-Doxepin	0.75~7.5	$y = 1.57x + 0.74$	0.995	0.6
E-Doxepin	4.3~42.5	$y = 1.52x + 0.62$	0.994	3.6
Clomipramine	0.5~50	$y = 3.36x + 1.42$	0.998	0.4
Nortriptyline	0.5~50	$y = 4.21x + 2.09$	0.996	0.4
Amitriptyline	0.5~50	$y = 4.13x + 5.26$	0.995	0.4
Thioridazine <sub>1</sub>	7.5~50	$y = 1.10x + 0.06$	0.999	5.0
Thioridazine <sub>2</sub>	7.5~50	$y = 1.18x + 0.03$	0.997	5.0

※實驗條件：緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0，添加 0.5 mM  $\beta$ -CD  
 毛細管：52  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  366  $\mu\text{m}$  O.D.  $\times$  60 cm (有效長度 48 cm) 管壁塗覆 PDMA  
 分離電壓：18 kV  
 UV 偵測器：波長：210 nm  
 進樣方式：重力注射；20 公分高；5 秒

表 (8) 水溶液樣品中 9 種 TCAs 的 CE 分離再現性

分析物	遷移時間的 相對標準偏差 (%)	訊號面積的 相對標準偏差 (%)	訊號高度的 相對標準偏差 (%)
Fluphenazine	0.63	3.34	3.22
Promazine	0.66	3.35	3.45
Desipramine	0.54	3.87	3.65
Imipramine	0.71	4.56	4.07
Z-Doxepin	0.53	4.67	3.34
E-Doxepin	0.50	4.73	3.40
Clomipramine	0.64	3.92	3.12
Nortriptyline	0.76	4.07	3.76
Amitriptyline	0.67	4.96	3.35
Thioridazine <sub>1</sub>	0.56	4.17	3.56
Thioridazine <sub>2</sub>	0.58	4.20	3.63

※ 實驗條件：同表 (7)，n = 7

## 九、液相微萃取濃縮配合毛細管電泳分析

由於生物樣品的基質通常很複雜，當分析生物樣品時常會遭遇很多問題，這是分析水溶液標準樣品所沒有的，因此分析真實樣品一般需經過前處理，以減低基質的干擾。本實驗探討以中空纖維管為主的液相微萃取作為分析 TCAs 的樣品前處理方法。由於中空纖維管管壁具有孔洞，可避免基質中一些大分子物質的干擾，同時中空纖維管的價格便宜，使用一次後丟棄，可避免樣品交叉污染。萃取前先將纖維管浸入 1-octanol，使 1-octanol 滲入纖維管的孔洞中，接著再將纖維管置放於以 50 mM 磷酸鈉 (pH = 10) 配製成的 10 ml 水溶液樣品，以注射針將 10  $\mu$ l 的接收溶液 (50 mM 磷酸鈉溶液含 0.5 mM  $\beta$ -CD，pH = 3.0) 注入纖維管內，在 400 rpm 攪拌速率下進行萃取 15 分鐘，以空針將萃取液推出至 500  $\mu$ l 塑膠瓶收集，再將 10  $\mu$ l 新鮮接收溶液再注入纖維管，萃取 15 分鐘，重複萃取三次，總共收集 30  $\mu$ l 的萃取溶液，接著以 CE-UV 進行分析。圖 (32) 為 3 種濃度皆為 0.5  $\mu$ M 的 TCAs 水溶液樣品，經萃取前後的電泳圖差別。在相同 TCAs 濃度下，萃取後分析物訊號明顯變大，因此利用此萃取方法可偵測到更低的分析物濃度。經多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取前處理後，9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限列於表 (9)，偵測極限範圍為 0.01  $\mu$ M ~ 0.5  $\mu$ M。比較表 (7) 與表 (9) 的檢量線斜率，發現經液相微萃取

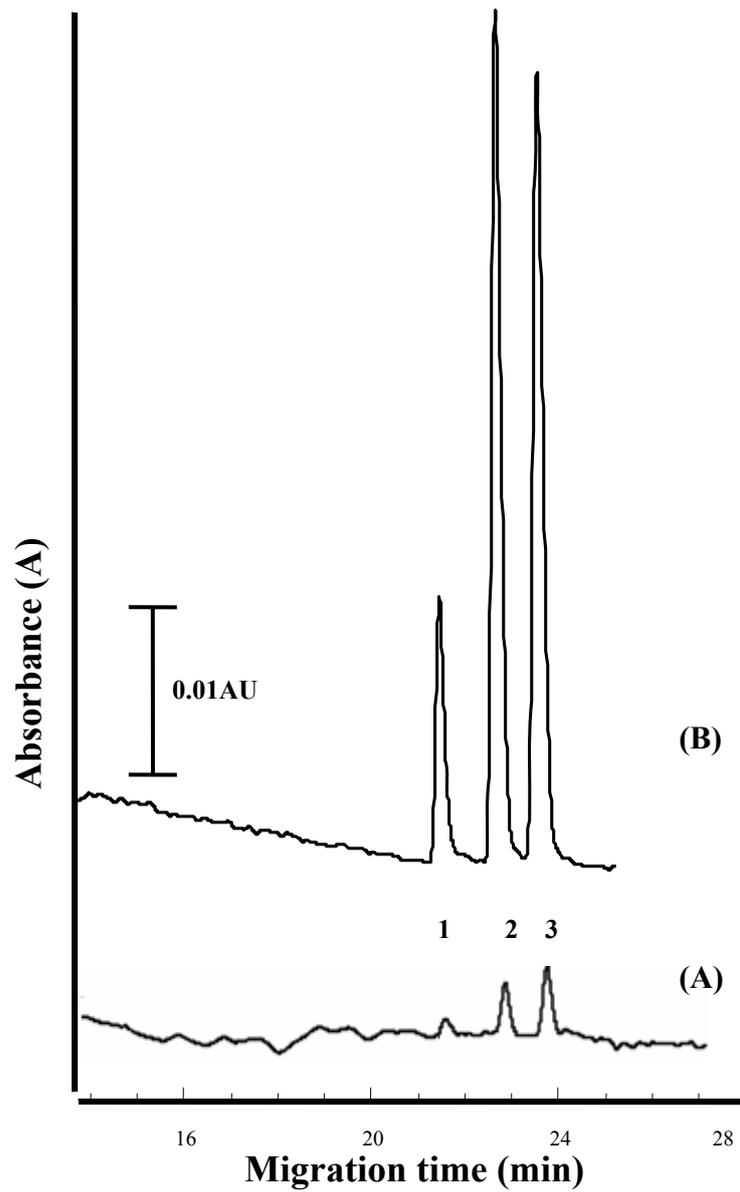


圖 (32) 3 種 TCAs 經液相微萃取前後的比較

分析物：1. Clomipramine、2. Nortriptyline、3. Amitriptyline，  
 濃度皆為  $0.5 \mu\text{M}$

其他實驗條件同圖 (30)

(A) 萃取前

(B) 萃取後

表(9) 液相微萃取後 9 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限

分析物	檢量線範圍 ( $\mu\text{M}$ )	線性方程式	線性相關 係數 (r) (n=5)	偵測極限 ( $\mu\text{M}$ )
Fluphenazine	0.1~50	$y = 30.3x + 4.23$	0.994	0.075
Promazine	0.1~50	$y = 51.7x + 7.75$	0.991	0.05
Desipramine	0.1~50	$y = 81.8x + 11.5$	0.996	0.05
Imipramine	0.1~50	$y = 76.4x + 12.6$	0.997	0.05
Z-Doxepin	0.06~7.5	$y = 70.4x + 4.02$	0.994	0.05
E-Doxepin	0.34~42.5	$y = 68.3x + 3.26$	0.997	0.25
Clomipramine	0.05~50	$y = 131x - 2.13$	0.998	0.03
Nortriptyline	0.02~50	$y = 157x - 2.33$	0.996	0.01
Amitriptyline	0.02~50	$Y = 153x - 1.51$	0.995	0.01
Thioridazine <sub>1</sub>	0.75~50	$y = 33.7x + 3.39$	0.999	0.50
Thioridazine <sub>2</sub>	0.75~50	$y = 34.7x + 2.99$	0.997	0.50

\* 實驗條件：

A：萃取部分

樣品溶液：50 mM 磷酸鈉含分析物，pH = 10.0，10 ml

接收溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3.0 含 0.5 mM  $\beta$ -CD，(10  $\mu\text{l}$   $\times$  3)

有機溶劑：1-octanol

Fibre：8 cm

萃取時間：15 分鐘  $\times$  3

B：毛細管電泳部分與未經萃取的實驗條件相同

處理後斜率增大很多，主要是此萃取方法具有樣品濃縮的功能，因此萃取後靈敏度提升。表(10)為經萃取處理前後其偵測極限的比較，採用多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取作為樣品前處理方法，可以成功的降低各 TCAs 的偵測極限。

為觀察 CE 分離的再現性，以相同步驟將 10  $\mu\text{M}$  各種分析物經萃取處理後，以重力進樣 (20 cm, 5 sec) 重複 CE-UV 偵測分析 7 次，計算分析結果的再現性，列於表 (11)。遷移時間的相對標準偏差小於 0.8%，訊號面積的相對標準偏差小於 5.1%，訊號高度的相對標準偏差小於 4.0%。與表 (8) 未經萃取前處理的再現性相比，並未有太大的差異。

表 (10) 經萃取處理前後 9 種 TCAs 偵測極限的比較

Sample	未經萃取處理的偵測極限 (μM)	經萃取處理的偵測極限 (μM)	濃縮倍率
Fluphenazine	1.8	0.08	23
Promazine	2.0	0.05	40
Desipramine	1.8	0.05	36
Imipramine	1.8	0.05	36
Z-Doxepin	0.6	0.05	12
E-Doxepin	3.6	0.25	15
Clomipramine	0.4	0.03	14
Nortriptyline	0.4	0.01	40
Amitriptyline	0.4	0.01	40
Thioridazine <sub>1</sub>	5.0	0.5	10
Thioridazine <sub>2</sub>	5.0	0.5	10

表 (11) 經萃取後水溶液樣品中 9 種 TCAs 的 CE 分離再現性

分析物	遷移時間的 相對標準偏差 (%)	訊號面積的 相對標準偏差 (%)	訊號高度的 相對標準偏差 (%)
Fluphenazine	0.68	3.68	3.17
Promazine	0.72	3.44	3.56
Desipramine	0.55	3.94	3.79
Imipramine	0.63	4.36	3.97
Z-Doxepin	0.58	4.78	3.55
E-Doxepin	0.56	4.66	3.15
Clomipramine	0.69	4.03	3.45
Nortriptyline	0.68	4.18	3.65
Amitriptyline	0.75	5.04	3.43
Thioridazine <sub>1</sub>	0.62	4.33	3.66
Thioridazine <sub>2</sub>	0.64	4.26	3.70

※實驗條件：同表 (9)，n = 7

## 十、血漿樣品分析

人體血液中血漿成分約佔 55%，其餘 45% 為血球蛋白。血漿的化學成分非常複雜，包含蛋白質、醣類、鹽類與其他代謝廢物，若不經前處理，容易影響儀器的偵測。為評估本方法分析血漿樣品的適用性，取真實血漿樣品進行實驗。實驗使用的血漿來源為實驗室成員捐獻，主要測試 Amitriptyline、Nortriptyline、Desipramine 與 Imipramine 四種 TCAs。首先將適量分析物添加於 200  $\mu\text{l}$  血漿，再將血漿樣品以 1:1 的體積比例與氫甲烷混合，經由離心去除蛋白質沈澱，取澄清液 200  $\mu\text{l}$ ，再加入 50 mM 磷酸鈉溶液 (pH = 10) 300  $\mu\text{l}$ ，使之成為體積 500  $\mu\text{l}$  的樣品溶液，接著將浸泡過 1-octanol 的 3 cm 纖維管置放其中，以注射針將 3  $\mu\text{l}$  的接收溶液 (50 mM 磷酸鈉溶液含 0.5 mM  $\beta$ -CD, pH = 3.0) 注入纖維管，在 400 rpm 攪拌速率下進行萃取 15 分鐘，以空針將萃取液推出至 500  $\mu\text{l}$  塑膠瓶收集，重複萃取步驟三次，總共收集 9  $\mu\text{l}$  的萃取溶液，接著以 CE-UV 進行分析。

經多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取處理後，血漿中 4 種 TCAs 的分析檢量線與偵測極限列於表 (12)。在血漿中 Desipramine 與 Imipramine 的濃度偵測極限為 0.8  $\mu\text{M}$ ，Amitriptyline 與 Nortriptyline 的濃度偵測極限為 0.25  $\mu\text{M}$ 。比較不經液相微萃取的水溶液樣品 (表 (7)) 與萃取後的血漿樣品 (表 (12)) 中 TCAs 檢量線斜率，可發

表 (12) 4 種 TCAs 在血漿中的分析檢量線與偵測極限

分析物	檢量線範圍 ( $\mu\text{M}$ )	線性方程式	線性相關 係數 (r) (n=5)	偵測極限 ( $\mu\text{M}$ )
Desipramine	1~50	$y = 9.20x + 0.57$	0.998	0.8
Imipramine	1~50	$y = 8.72x + 1.81$	0.996	0.8
Nortriptyline	0.3~50	$y = 14.3x + 0.132$	0.990	0.25
Amitriptyline	0.3~50	$y = 13.6x + 0.713$	0.998	0.25

※ 實驗條件：

A：萃取部分

樣品溶液：50 mM 磷酸鈉含分析物，pH = 10，500  $\mu\text{l}$

接收溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3 含 0.5 mM  $\beta$ -CD，(3  $\mu\text{l}$ ×3)

有機溶劑：1-octanol

Fibre：3 cm

萃取時間：15 分鐘 × 3

B：毛細管電泳部分

緩衝溶液：50 mM 磷酸鈉，pH = 3，添加 0.5 mM  $\beta$ -CD

毛細管：52  $\mu\text{m}$  I.D. × 366  $\mu\text{m}$  O.D. × 60 cm (有效長度 48 cm) 管  
壁塗覆 PDMA

分離電壓：21 kV

UV 偵測器：波長：210 nm

進樣方式：重力注射；20 公分高；20 秒

現萃取後血漿樣品中 TCAs 檢量線斜率較水溶液樣品大，主要原因是此萃取方法有濃縮功能。若比較萃取後的血漿樣品（表（12））與經液相微萃取的水溶液樣品（表（9））中 TCAs 檢量線斜率，則發現萃取後血漿樣品中 TCAs 檢量線斜率較經過液相微萃取後水溶液樣品小了許多，原因可能是血漿中的殘餘基質堵塞了中空纖維管孔洞，降低了萃取效率，可見即使使用多孔洞中空纖維管仍無法完全避免血漿中複雜基質干擾。

在探討回收率的實驗中，分別於血漿中添加 5  $\mu\text{M}$  的 Desipramine 與 Imipramine，1.5  $\mu\text{M}$  的 Amitriptyline 與 Nortriptyline，以氫甲烷去蛋白後再進行萃取，收取 9  $\mu\text{l}$  的萃取溶液，以重力注射的方式注入毛细管電泳進行分析。實驗結果如表（13），4 種 TCAs 回收率皆在 93.5 % 以上，相對標準偏差（RSD）小於 5.5 %，代表添加的分析物絕大部分都可由血漿基質中萃取出來。利用多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取不但可去除血漿中的大部分基質，避免分析受干擾，而且具濃縮功能，操作簡單且快速。每種分析物分別進行 5 次萃取，每次萃取進樣分析 3 次，以 ANOVA 方法計算 4 種 TCAs 於不同次萃取結果之回收率再現性，列於表（14）至（17）。在  $\alpha = 0.05$  和組間與組內自由度為（4,10）下，4 種 TCAs 利用 ANOVA 所求得的 F 值皆小於臨界值，表示不僅同一次萃取有不錯的分析再現性，即使是不同次萃

表 (13) 血漿中 4 種 TCAs 經多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取  
之回收率

sample	Added ( $\mu\text{M}$ )	Found (mean $\pm$ SD)	Recovery (%)	RSD (%) (n = 5)
Desipramine	5	4.69 $\pm$ 0.24	93.8	5.1
Imipramine	5	4.68 $\pm$ 0.23	93.6	4.9
Nortriptyline	1.5	1.41 $\pm$ 0.06	94.0	4.3
Amitriptyline	1.5	1.42 $\pm$ 0.07	94.7	5.0

\* 實驗條件：同表 (12)

表 (14) Desipramine 回收率之 ANOVA 分析

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.0354	4	0.00885	0.800181	3.47805
組內	0.1106	10	0.01106		
總和	0.146	14			

表 (15) Imipramine 回收率之 ANOVA 分析

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.0478	4	0.01195	1.796092	3.47805
組內	0.066533	10	0.006653		
總和	0.114333	14			

表 (16) Nortriptyline 回收率之 ANOVA 分析

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.016667	4	0.004167	2.248201	3.47805
組內	0.018533	10	0.001853		
總和	0.0352	14			

表 (17) Amitriptyline 回收率之 ANOVA 分析

ANOVA					
變源	SS	自由度	MS	F	臨界值
組間	0.016533	4	0.004133	1.29979	3.47805
組內	0.0318	10	0.00318		
總和	0.048333	14			

\*表 (14) 至表 (17)  $\alpha=0.05$  , d.f.= 4,10

取，對四種 TCAs 的回收率也有相近的結果，顯示每次萃取之間也有不錯的再現性。

依據文獻報導<sup>[47]</sup>，以 Amitriptyline 為例，一般患者每日劑量約 75 ~ 300 mg，有效劑量為每日 150 mg，在血樣本中濃度範圍大約為 100 至 300  $\mu\text{g/L}$  (0.36  $\mu\text{M}$  ~ 1.08  $\mu\text{M}$ )，若在血漿中的濃度超過 500  $\mu\text{g/L}$  (1.80  $\mu\text{M}$ )，則會有中毒的現象產生。本方法對血漿中 Amitriptyline 的偵測極限為 0.25  $\mu\text{M}$ ，因此本方法應適合直接應用於藥物動力學上的探討，進行血漿中低濃度 Amitriptyline 的監測。

## 肆、結論

本研究利用管壁塗覆 PDMA 的毛細管和在緩衝溶液中添加  $\beta$ -環糊精成功的分離九種結構相似的三環抗憂鬱劑，而且順利分離其中具有幾何異構物與鏡像異構物的分析物。結合多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取方法進行樣品前處理，在水溶液樣品中可得到  $0.01 \mu\text{M} \sim 0.5 \mu\text{M}$  TCAs 的偵測極限，在血漿中可得到  $0.25 \mu\text{M} \sim 0.8 \mu\text{M}$  的偵測極限。TCAs 在血漿中的回收率大於 93%，相對標準偏差小於 5.5%。

文獻中分離 TCAs 大部分都是利用非水相毛細管電泳，本研究發展的以多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取配合毛細管電泳分析方法，最大優點是不需在緩衝溶液中添加有機溶劑即可分離九種三環抗憂鬱劑，液相微萃取時一次所需的有機溶劑也低於  $10 \mu\text{L}$ ，不僅節省成本也減少廢液產生。在偵測方面，本實驗所提出的 CE-UV 偵測配合液相微萃取處理，靈敏度足以直接應用於藥物動力學上分析 TCAs。近年來多孔洞中空纖維管為主的液相微萃取的技術越趨成熟<sup>[99]</sup>，不同的模式逐漸被開發，依分析物種類可選擇適合的萃取裝置或萃取模式進行實驗，配合 CE-UV 偵測器應該可以得到最佳的偵測靈敏度。

行政院衛生署統計資料顯示，每十萬人口因憂鬱症自殺的死亡率從民國八十七年的 7.561 增加到民國九十一年年的 9.99，憂鬱症對人類

的影響越趨嚴重，希望此分析方法能對抗憂鬱劑藥物的分析檢測有所助益。

## 伍、參考文獻

1. A. Tiselius, *Trans Faraday Soc.*, 23 (1937) 524-531
2. S. Hjerten, *Chromatoger. Rev.*, 9 (1967) 122-239
3. R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.*, 123 (1974) 1-67
4. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs., *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298-1302
5. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs., *Science.*, 222 (1983) 266-272
6. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111-113
7. T. Tsuda, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 521-523
8. S. Hjerten, M. D. Zhu, *J. Chromatogr.*, 346 (1985) 265-270
9. A. S. Cohen, B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 409-417
10. D. J. Rose, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 642-648
11. D. Figeys, D. Pinto, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 330A-335A
12. D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2623-2636
13. P.-A. Auroux, D. Iossifidis, A. Manz, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2637-2652
14. J. C. Touchstone, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 1647-1665
15. I. S. Lurie, R. F. X. Klein, T. A. D. Cason, M. J. LeBelle, R. Brenneisen, R. E. Weinberger, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4019-4026
16. C. A. Kuffner, E. Marchi, J. M. Morgado, C. R. Rubio, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 241A-246A

17. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 349-354
18. K. Bächmann, J. Boden, I. Haumann, *J. Chromatogr. A*, 626 (1992) 259-265
19. Y. C. Chao, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 229-237
20. E. D. Zlotorzynska, J. F. Dlouhy, *J. Chromatogr. A*, 685 (1994) 145-153
21. J. Schneede, P. M. Ueland, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 812-819
22. D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 179-184
23. B. L. Hogan, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2841-2845
24. V. Doliník, J. Dolníková, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 269-277
25. J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 667-692
26. S. Y. Chang, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2251-2257
27. G. Ewing, R. A. Wallingford, T. M. Clefirowicz, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 292A-303A
28. A. Cohen, B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 409-417
29. X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 375-377
30. M. Deml, F. Foret, P. Boček, *J. Chromatogr.*, 320 (1985) 159-165
31. T. Tsuda, T. Mizuno, J. Akiyama, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 799-800
32. R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 678-681
33. Y. Xue, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1988-1993
34. J. P. Chervet, R. E. J. Van Soest, M. Ursem, *J. Chromatogr.*, 543

- ( 1991 ) 439-449
35. S. E. Moring, R. T. Reel, R. E. J. Van Soest, *Anal. Chem.*, 65 ( 1993 )  
3454-3459
  36. Y. Xue, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65 ( 1993 ) 2923-2927
  37. M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp, S. Moring, *Anal. Chem.*, 63 ( 1991 )  
417-422
  38. E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare, *Science.*, 230 ( 1985 ) 813-814
  39. X. Huang, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 63 ( 1991 ) 2193-2196
  40. L. A. Colón, R. Dadoo, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 65 ( 1993 ) 476-481
  41. T. M. Olefirowicz, A. G. Ewing, *J. Chromatogr.*, 499 ( 1990 ) 713-719
  42. W. Jin, J. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 868 ( 2000 ) 101-107
  43. X. Huang, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 63 ( 1991 ) 189-192
  44. C. W. Whang, I. C. Chen, *Anal. Chem.*, 64 ( 1992 ) 2461-2464
  45. A. G. Ewing, J. M. Mesaros, P. F. Gavin, *Anal. Chem.*, 66 ( 1994 )  
527A-537A
  46. W. F. Nielen, *J. Chromatogr.*, 608 ( 1992 ) 85-92
  47. 臺北市立中興醫院，中興藥訊第八期, 93 年 12 月
  48. 東元綜合醫院藥劑部，電子藥訊第 4 期, 93 年 8 月
  49. 國家衛生研究院電子報第 16 期, 92 年 10 月
  50. 謝宜倫，生達藥刊第 71 期, 94 年 5 月
  51. 朱麗玲，奇美醫訊第 66 期, 93 年 6 月

52. S. H. Preskorn, R. C. Dorey, G. S. Jerkovich, *Clin. Chem.*, 34 (1988) 822-826
53. A. Araujo, R. C. Pedroso, *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*, 37 (2001) 321-328
54. R. Torre, J. Ortuno, J. Pascual, S. Gonzana, J. Ballesta, *Therapeutic Drug Monitoring*, 20 (1998) 340-346
55. F. Sporkert, F. Pragst, *Forensic Science International*, 107 (2000) 129-148
56. A. Gasgupta, A.P. Hart, *J. Chromatogr. B*, 693 (1997) 101-107
57. X. P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, S. Osamu, *J. Chromatogr. Sci.*, 35 (1997) 302-308
58. R. Theurillat, W. Thormann, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 751-760
59. H. Yoshida, K. Hidaka, J. Ishida, H. Yoshikuni, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta*, 413 (2000) 137-145
60. M. Z. Kagan, *J. Chromatogr. A*, 918 (2001) 293-302
61. J. Karpinska, B. Starczewska, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 519-525
62. M. Kollroser, C. Schober, *Therapeutic Drug Monitoring*, 24 (2002) 537-544
63. M. J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, E. F. Simo-Alfonso, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32 (2003) 71-84
64. J. Trocewicz, *J. Chromatogr. B*, 801 (2004) 213-220
65. K. Salomon, Dean S. Burgi, John C. Helmer, *J. Chromatogr. A*, 549 (1991) 375-385

66. B. J. Spencer, Z. Wenbin, C. P. William, *Electrophoresis*, 18 (1997) 736-744
67. C. W. Harrell, A. Shahab, D. Joykrishna, P. Joe, M. W. Isiah, *Electrophoresis*, 19 (1998) 712-718
68. X. F. Li, C. S. Liu, R. Pieter, Jr. Eugene, C. E. Cerniglia, N. J. Dovichi, *Electrophoresis*, 19 (1998) 3178-3182
69. X. F. Li, C. S. Liu, R. Pieter, Jr. Eugene, C. E. Cerniglia, N. J. Dovichi, *Electrophoresis*, 19 (1998) 3183-3189
70. J. R. Veraaer, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 339-346
71. D. A. Caterina, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 341-350
72. D. C. Marcelo, S. Hillebrand, F. M. Lancas, E. Carrilho, *J. Chromatogr. B*, 799 (2004) 127-132
73. M. A. Jeannot, F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2236-2240
74. M. A. Jeannot, F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 235-239
75. V. He, H. E. Lee, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4634-4640
76. L. Zhao, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 919 (2001) 381-388
77. S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650-2656
78. S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, *Electrophoresis*, 21 (2000) 579-585
79. T. S. Ho, T. G. Havorsen, S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A*, 998 (2003) 61-72
80. L. Zhao, L. Zhu, H. K. Lee, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2486-2492

81. S. Andersen, T. G. Havorsen, S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, L. Tanum, H. Refsum, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33 (2003) 263-270
82. S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, *J. Chromatogr. A*, 985 (2003) 99-106
83. T. G. Havorsen, S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A*, 909 (2001) 87-93
84. T. G. Havorsen, S. Pedersen-Bjergarrd, K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B*, 760 (2001) 219-224
85. L. Zhao, L. Zhu, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 407-414
86. C. Basheer, H. K. Lee, J. P. Obbard, *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 191-199
87. L. Hou, G. Shen, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 985 (2003) 107-116
88. S. Hjerten, *J. Chromatogr.*, 347 (1985) 191-198
89. K. A. Cobb, V. Dolnik, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2478-2483
90. G. Bruin, J. Chang, R. Kuhlman, K. Zegers, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 471 (1989) 429-436
91. W. Hong, M. Öhman, L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 59-70
92. Villiers, A. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 112 (1891) 536-543
93. J. Szejtli, *Starch*, 33 (1981) 387-393
94. J. Szejtli, *Cyclodextrin and their inclusion complexes*, Akademiai kiado, Budapest, 1982.

95. 郭景鴻. 環聚糊精衍生物腔包現象螢光性質的研究, 東海大學碩士論文, 台中, 1991.
96. I. Jelinek, J. Snopek, *J. Chromatogr.*, 405 (1987) 379-384
97. J. Snopek, I. Jelinek, *J. Chromatogr.*, 411 (1987) 153-159
98. I. Lui, K. A. Cobb, *J. Chromatogr.*, 519 (1990) 189-197
99. K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergarrd, *Trend in Anal. Chem.*, 23 (2004) 1-10
100. C. J. Dratton (Ed.) , *Comprehensive Medicine Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1990.