

東海大學化學系

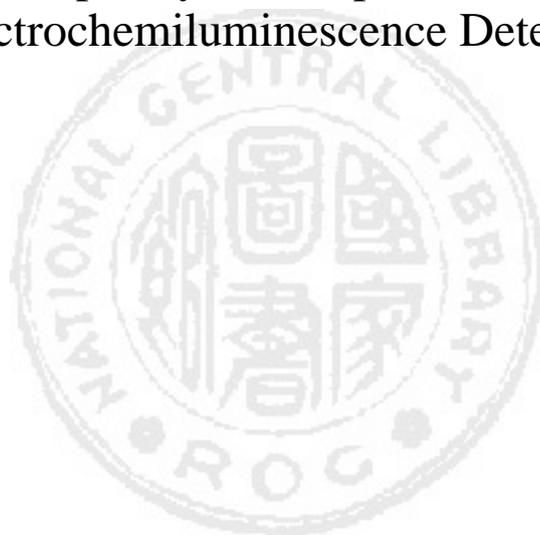
碩士論文

指導教授：黃承文博士

毛細管電泳/電激發化學放光偵測法

應用於 Methoxyphenamine 與 Ethambutol 的分析

Analysis of Methoxyphenamine and Ethambutol
by Capillary Electrophoresis with
Electrochemiluminescence Detection



研究生：謝依倩 撰

中華民國九十四年七月

摘要

本研究利用毛細管電泳配合 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 電激發化學放光偵測方式，發展治療肺結核藥物methoxyphenamine與ethambutol的分析方法。提供 ITO電極 1.4 V工作電位，在電泳高壓端緩衝溶液為 20 mM 磷酸鈉(pH 10)，低壓端緩衝溶液為 300 mM磷酸鈉(pH 8)其中含有 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 條件下，施加 9 kV電壓，可於 15 分鐘內完成分析物的分離與偵測。Ethambutol結構上缺乏吸光團，不具UV吸收性質，但利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 偵測可在無需衍生的條件下直接分析。Methoxyphenamine與ethambutol於水溶液中的檢量線線性範圍分別為 $3\mu\text{M}\sim 20\mu\text{M}$ 與 $6\mu\text{M}\sim 40\mu\text{M}$ ， $R^2 > 0.997$ ，偵測極限分別為 $2\mu\text{M}$ 與 $4\mu\text{M}$ 。配合場放大樣品濃縮技術，兩分析物在水溶液樣品中的偵測極限可降至 5 nM。

血漿樣品經除去蛋白質前處理後，配合場放大堆積濃縮，兩分析物於血漿中的檢量線線性範圍均為 $5\mu\text{M}\sim 20\mu\text{M}$ ， $R^2 > 0.997$ ，偵測極限為 $4\mu\text{M}$ 。添加 $20\mu\text{M}$ methoxyphenamine與ethambutol於血漿中的回收率大於 95 %，相對標準偏差小於 8 %。經實際測試，毛細管電泳配合 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 偵測可應用於血漿中 methoxyphenamine 與 ethambutol分析，但偵測極限與文獻報導兩藥物在人體血漿中藥物動力濃度範圍 $0.1\mu\text{M}\sim 1\mu\text{M}$ (methoxyphenamine)與 $2\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ (ethambutol)尚有一段距離。

目錄

摘要.....	I
目錄.....	II
表目.....	V
圖目.....	VI
內容	
壹、 緒論.....	1
一、 毛細管電泳.....	1
1. 簡介.....	1
2. 偵測方法.....	3
二、 化學放光與電激發化學放光.....	5
三、 CE / ECL 偵測的發展.....	10
四、 分析物簡介.....	24
1. Methoxyphenamine.....	24
2. Ethambutol.....	26
五、 研究動機.....	29
貳、 實驗.....	30
一、 儀器設備.....	30
二、 藥品.....	33

三、 實驗方法.....	35
1. ITO (indium / tin oxide) 電極之製作.....	35
2. ECL 偵測裝置.....	35
3. CE / ECL 偵測系統.....	35
4. 儲存溶液(stock solution)的配製.....	39
5. 緩衝溶液的配製.....	40
6. 血漿樣品前處理.....	40
7. 毛細管處理與進樣.....	41
參、 結果與討論.....	42
一、 分離條件最佳化.....	42
1. 分離管柱的選擇.....	42
2. 電泳電壓的影響.....	46
3. 電泳緩衝溶液濃度的影響.....	49
4. 電泳緩衝溶液 pH 值的影響.....	52
二、 偵測條件最佳化.....	57
1. ECL 偵測電位.....	57
2. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度的影響.....	57
3. 偵測端緩衝溶液濃度的影響.....	59
4. 偵測端緩衝溶液 pH 值的影響.....	63

5. 毛細管末端與 ITO 電極表面距離的影響.....	65
6. 分析物進樣時間.....	67
三、 最佳分析條件.....	69
四、 檢量線與分析再現性.....	71
1. 檢量線的製作.....	71
2. 分析再現性.....	71
五、 偵測靈敏度的提升.....	74
六、 血漿樣品分析.....	83
肆、 結論.....	101
伍、 參考文獻.....	102

表目

表 3-1	MOP 與 EMB 的檢量線及偵測極限.....	72
表 3-2	水溶液樣品中 MOP 與 EMB 的分析再現性.....	72
表 3-3	MOP 與 EMB 經場放大堆積後的檢量線及偵測極限.....	80
表 3-4	氰甲烷去除蛋白質處理血漿的回收率.....	92
表 3-5	超過濾前處理的血漿中 MOP 回收率.....	99

圖目

圖 1-1	毛細管電泳裝置圖.....	2
圖 1-2	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 結構圖.....	8
圖 1-3	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 與胺類分析物ECL反應機構.....	8
圖 1-4	Gilman等人所設計的CE / luminol- H_2O_2 ECL偵測系統.....	11
圖 1-5	Forbes等人所設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	11
圖 1-6	Tsukagoshi 等人所設計的 CE/ECL 偵測系統.....	13
圖 1-7	Dickson ¹ 等人設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	15
圖 1-8	Wang與Bobbitt設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	17
圖 1-9	Chiang與Whang 設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	17
圖 1-10	Cao等人所設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	19
圖 1-11	Cao 等人所設計的固態 ECL 偵測器.....	19
圖 1-12	Chiang等人設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器.....	21
圖 1-13	Liu 等人設計的晶片形式 ECL 偵測系統.....	21
圖 1-14	Chen 等人設計的 CE / ECL 偵測系統.....	23
圖 2-1	ITO 電極製作流程.....	36
圖 2-2	ECL 偵測裝置完成圖.....	37
圖 2-3	CE / ECL 系統裝置圖.....	38
圖 3-1	以 PEEK 管柱分離 EMB 與 TPA 的電泳圖.....	44

圖 3-2	PEEK 管柱與 fused silica 管柱分離 EMB 與 TPA 電泳圖..	47
圖 3-3	不同電壓下 TEA、MOP 與 EMB 電泳圖.....	48
圖 3-4	分析物遷移時間與電泳電壓的關係.....	50
圖 3-5	分析物訊號面積隨電泳緩衝溶液濃度變化關係.....	51
圖 3-6	遷移時間對電泳緩衝溶液濃度變化關係.....	53
圖 3-7	電泳緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物面積比值的影響..	54
圖 3-8	電泳緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物遷移時間比值的... 影響.....	56
圖 3-9	分析物 ECL 訊號強度與 ITO 電極電位的關係.....	58
圖 3-10	分析物訊號面積與 Ru(bpy) ₃ ²⁺ 濃度的關係.....	60
圖 3-11	ECL 訊號/雜訊比值與 Ru(bpy) ₃ ²⁺ 濃度的關係.....	61
圖 3-12	ECL 強度與偵測端緩衝溶液濃度的關係.....	62
圖 3-13	偵測端緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物面積的影響.	64
圖 3-14	毛細管末端與電極表面垂直距離對 ECL 強度的影響.....	66
圖 3-15	重力進樣時間對訊號高度及理論板數的影響.....	68
圖 3-16	最佳分析條件下 MOP 與 EMB 的電泳分離圖.....	70
圖 3-17	樣品溶液中緩衝溶液濃度對訊號面積的影響.....	77
圖 3-18	電動進樣時間對訊號高度及理論板數的影響.....	79
圖 3-19	純水樣品中低濃度 MOP 與 EMB 電泳圖.....	82

圖 3-20	經氘甲烷處理的血漿電泳圖.....	84
圖 3-21	血漿基質對 ITO 電極的干擾.....	85
圖 3-22	不同血漿樣品的電泳圖.....	88
圖 3-23	經去離子水稀釋 10 倍的血漿中 MOP 與 EMB 檢量線...	90
圖 3-24	血漿中低濃度 MOP 與 EMB 電泳圖.....	91
圖 3-25	超過濾與氘甲烷去除蛋白質處理的血漿分析比較.....	94
圖 3-26	超過濾處理的血漿電泳圖.....	95
圖 3-27	超過濾處理的血漿中 MOP 檢量線.....	97
圖 3-28	超過濾前處理的血漿中低濃度 MOP 電泳圖.....	98

壹、緒論

一、毛細管電泳

1. 簡介

毛細管電泳(capillary electrophoresis)是近年來發展極為快速的分離方法。其基本裝置如圖 1-1 所示，包括一個高壓電源供應器、內徑 10~100 μm 的毛細管、兩個緩衝溶液儲存槽、2 支白金電極及一套偵測系統。實驗時先將毛細管內充滿緩衝溶液，再將毛細管兩端分別插入緩衝溶液槽中。於毛細管高壓端注入分析樣品後，在兩緩衝溶液槽間施加高電壓。由於毛細管大多為熔矽(fused silica)材質，當管中電解質溶液的pH值大於 2 時，管壁上的矽醇基(Si-OH)會解離成 SiO^- ，使管壁帶負電荷；溶液中正離子由於靜電作用而聚集於管壁附近，形成電雙層(electric double layer)。在高電場下，擴散層中的大量水合正離子會帶動毛細管內的整體溶液往陰極方向移動，形成電滲流(electroosmotic flow，簡稱EOF)。各種分析物離子因淨移動速度(即離子本身的電泳速度與電滲流速度的總和)不同而達分離效果。

由於毛細管具高電阻，在高電場下(100~500 V/cm)只產生很低的電流，且毛細管的表面積對體積比大，散熱效果佳，避免焦耳熱的

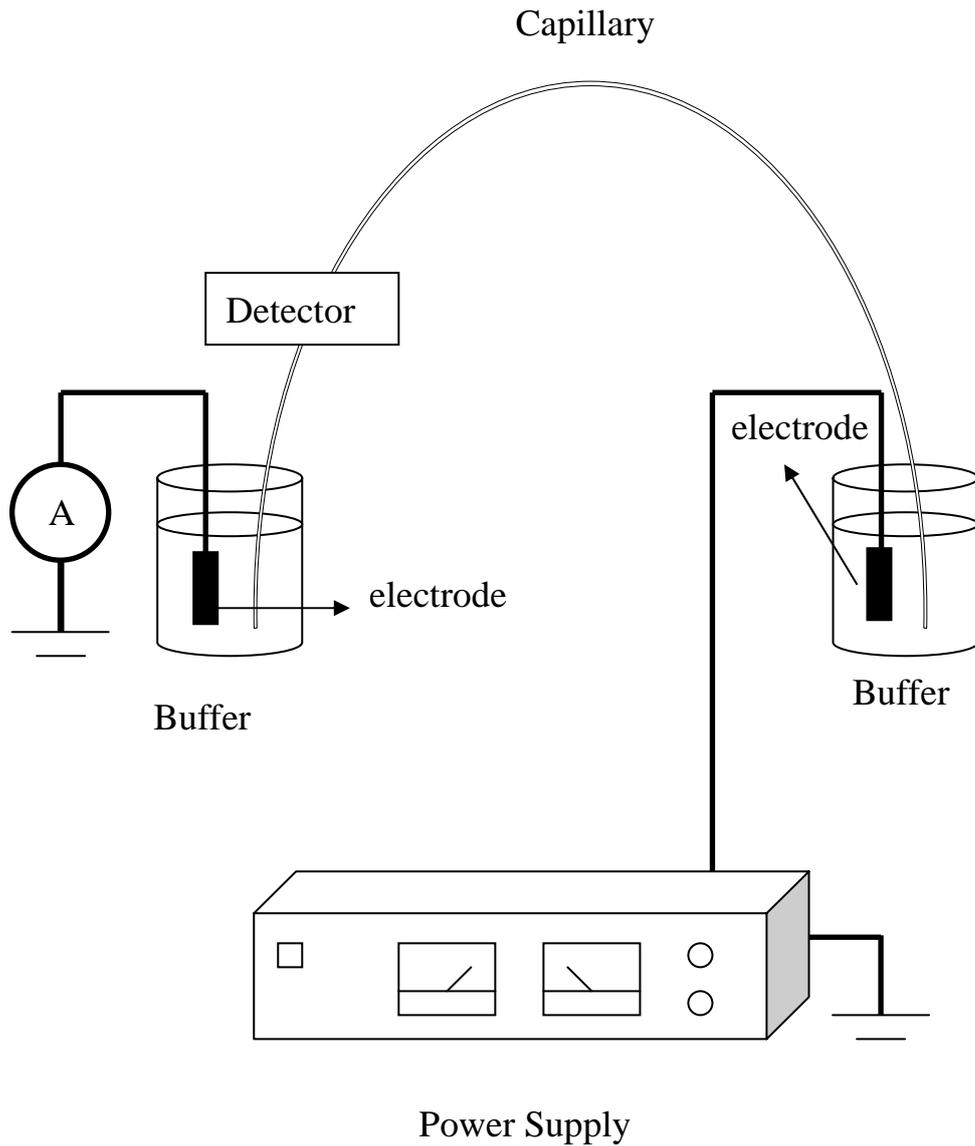


圖 1-1 毛細管電泳裝置圖

不利影響，可使用高電場增加分離速度。高電場不僅縮短分析時間，

且可提高分離效率。此外，毛細管電泳所需的樣品體積小(1 ~ 50 nL)、方法開發簡單及儀器易自動化等皆為其優點。毛細管電泳在各方面的應用愈趨廣泛，如：食品分析^[1-5]、生化醫學^[6-9]、製藥分析^[10-11]、環境檢測^[12-14]以及刑事化學上槍擊或爆炸殘餘物、藥物及DNA的分析鑑定^[15-17]，於目前分離技術中占有舉足輕重的地位。

2. 偵測方法

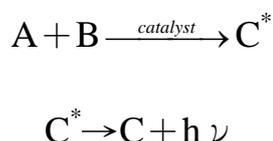
毛細管電泳樣品進樣量小(nL 範圍)，雖管柱本身具透光性，但光徑較短，僅在 10~100 μm 範圍，對於微量樣品常會遭遇偵測靈敏度不足的問題。選擇一個靈敏度高的偵測方法，是毛細管電泳分析一項重要的課題。

管柱上光學偵測(on-column optical detection)由於不需介面或連接裝置，可避免間隙體積(dead volume)所導致的解析度降低現象，為目前最普遍使用的偵測方式。管柱上光學偵測主要包括紫外—可見光(UV—VIS)吸收偵測^[18-20]與螢光放射偵測^[21-25]。紫外—可見光吸收偵測雖受限於毛細管內徑小、光徑短，導致偵測靈敏度較差(10^{-4} ~ 10^{-6} M)，但因適用的分析物範圍廣且儀器設計簡單，仍為最普遍的偵測方法。以雷射為激發光源的螢光放射偵測，靈敏度相較於紫外—可見光吸收偵測可提高 10^2 ~ 10^4 倍，為高靈敏度的線上(on-line)偵測方法。但自然界中具螢光性的物質不多，對於不具紫外—可見光吸收

或無螢光性質物質，可利用間接方式偵測^[26-29]或將其衍生，使其接上具有螢光性質的官能基，再進行螢光偵測。近年來另有其他偵測方式發展出來，如：化學放光偵測^[30-32]、電激發化學放光偵測^[33-40]、電化學偵測^[41-43]、質譜偵測^[44-45]等方法，這些偵測方法雖需特殊介面，儀器設計上較複雜，但因其靈敏度高，選擇性佳，目前仍在持續發展中。

二、化學放光與電激發化學放光

化學放光(chemiluminescence , 簡稱CL)是一種經由化學反應產生光放射的現象。分析物分子藉化學反應生成一個位處高能量狀態的中間分子，當此不穩定的中間分子回復低能量穩定狀態時，多餘的能量以光的形式釋放，此放光現象即稱為化學放光，可以下式表示 [46-49] :



其中A為分析物分子，B為反應試劑，C*代表產物分子C的高能量不穩定狀態。

並非所有反應皆能產生化學放光現象，通常需符合以下三項基本條件^[50]：

- (1) 足夠的能量：化學反應所產生的能量必須大於使物質從基態到激發態所需的能量，因此反應須為放熱反應，且能量至少需 180 kJ / mole 以上才可能產生可見光範圍的光放射。
- (2) 反應路徑：化學反應的反應路徑必須有利於激發態產物的形成。
- (3) 能量的釋放：化學反應所產生的激發態產物必須能以直接釋放光子或將能量移轉至其他螢光性分子的方式降低其本身能量至穩定狀態。

水溶液系統中，最常使用的化學放光試劑為 luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) 與 tri(2,2'-bipyridine) ruthenium(II)；在非水溶液系統下，最常用的化學放光試劑則為 peroxyoxalate。

自然界中具化學放光性質的物質不多，不具化學放光性質的分析物若欲以化學放光方式偵測，則需利用衍生反應，將具有化學放光性質的試劑鍵結於分析物上再進行偵測。

化學放光偵測不需光源，無光源所造成的散射光(stray light)干擾，背景雜訊低，因此靈敏度高。此外，化學放光偵測儀器設備簡單，僅需一個反應槽，以及收集化學放光訊號的光電倍增管(PMT)。化學放光偵測的應用廣泛，於靜態系統、微胞系統、氣相層析、液相層析及流動注入分析(FIA)皆可使用其作為偵測方式。

電激發化學放光(electrogenerated chemiluminescence 或 electrochemiluminescence，簡稱 ECL)係指以直接或間接的方式，利用電化學反應產生的化學放光，屬於光電化學(spectro-electrochemical)技術的一種。

與化學放光相比，電激發化學放光除了擁有化學放光靈敏度高與選擇性佳的優點外，尚有以下優點^[51]：

(1) ECL 反應所需的試劑直接在電極表面生成，因此可藉由調節電極

電位來控制反應的起始、速率及過程。

(2) 可藉由電位的調節來控制放光強度，放光區域集中於電極表面，偵測器定位容易，靈敏度可因此而提升。

(3) 一些分析物可藉電化學反應於電極表面再生，分析物的循環生成可提升放光量，使 ECL 偵測靈敏度增加。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 是水溶液系統中最常使用的 ECL 試劑之一，其結構如圖 1-2。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在室溫下具有極佳的化學穩定性與氧化還原性，即使於有氧氣存在的水溶液中，亦不影響其放光效率。此外，電化學反應產生的激發態 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 發光量子產率高且半生期長，使得 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 於 ECL 研究中受到高度重視。

針對 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 的分析研究，多著重於 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 與胺類化合物反應系統，反應機構顯示於圖 1-3^[51]。胺類分析物於電極表面氧化，形成帶正電荷的自由基離子，經去質子步驟成為自由基形式的中間產物，再與電極表面氧化生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行 ECL 反應。連接胺基的烷基鏈上 α -碳位置具有易移除的氫原子是此種 ECL 的必要條件^[52]。許多因素會影響 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / amine 系統的 ECL 反應放光效率。胺基的氮或 α -碳原子若連接具推電子性質的取代基（如：烷基鏈），可穩定去質子後的自由基，因此可增加 ECL 的放光強度；反之，若胺基的氮或 α -碳原子連接具拉電子性質的取代基（如：羥基），則

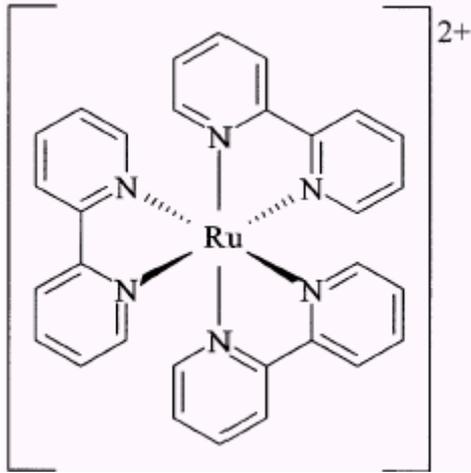


圖 1-2 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 結構圖

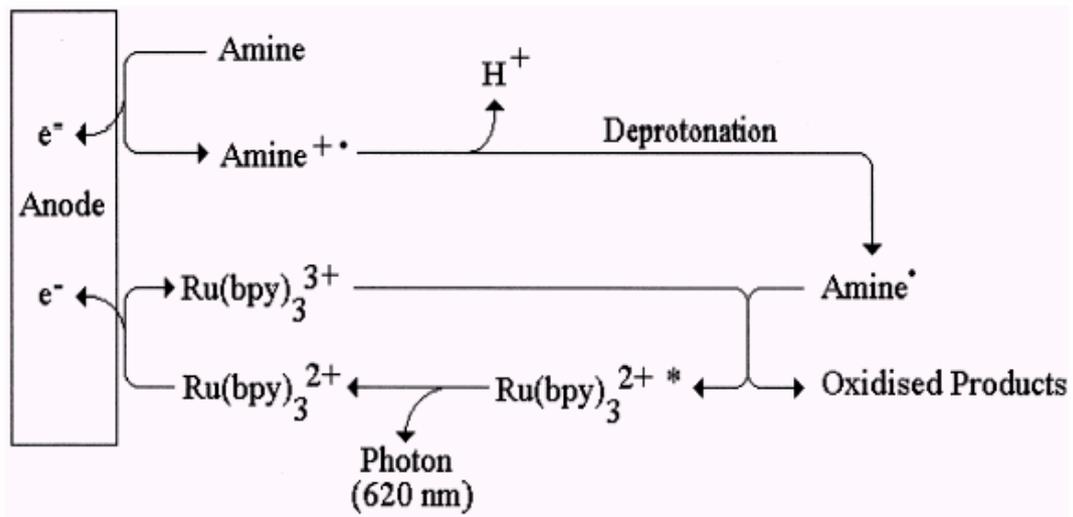


圖 1-3 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 與胺類分析物ECL反應機構^[51]

會使得去質子後的自由基不穩定，導致ECL的放光強度下降^[53]。增加連接在胺基上的烷基碳數目與鏈長亦可增強對於自由基的穩定能力，因此ECL強度以三級胺最大，其次是二級胺，一級胺為最弱^[54]。此外，形成的自由基離子結構若非平面，則會使得其與Ru(bpy)₃³⁺反應有空間上的立體阻礙，造成ECL的放光強度下降^[52]。若胺基的氮或 α -碳原子連接之取代基為苯環，則所形成的自由基會與苯環上的 π 鍵因共振使得自由基未定域化(delocalize)，造成與Ru(bpy)₃³⁺反應不易進行，產生的ECL強度很弱^[53]。根據報導，苯胺、二苯基胺及三苯基胺化合物與Ru(bpy)₃²⁺反應根本觀測不到ECL^[54]。

Ru(bpy)₃²⁺ ECL具低偵測極限，線性範圍廣與分析物多樣性之優點，可與多種分離技術結合，如：液相層析(HPLC)、流動注入分析(FIA)以及毛細管電泳(CE)。由於CE具有分析時間短、樣品需要量少、分離效率高等優點，近年來ECL結合CE的研究亦受到重視。

三、CE / ECL 偵測的發展

ECL 結合 FIA 與 HPLC 的例子相當多，結合 CE 的方法於近年來也陸續有文獻發表。不同於 HPLC，CE 分離需藉助高電場，高電場下產生的電泳電流會影響 ECL 偵測，因此偵測器的設計上較為複雜。

1994 年，Gilman^[55] 等人發展出 CE / luminol-H₂O₂ ECL 偵測系統，偵測器設計類似 end-column 電化學偵測，裝置如圖 1-4 所示。實驗以陰極緩衝溶液端作為 ECL 反應槽，藉由 10 μm 白金或碳纖維電極氧化 luminol 及過氧化氫，產生 ECL 反應，再由光纖收集光至 PMT。文章中提到，使用直徑較小的電極，可降低背景基線干擾，進而提升 ECL 效率。此外，內徑小的毛細管 (< 25 μm) 於高電場下產生的電泳電流較小，可降低電流對 ECL 偵測的影響。利用此偵測系統可成功分析經 luminol 或 N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) 衍生的胺類化合物。

1997 年，Forbes^[56] 等人使用 Ru(bpy)₃²⁺ 為 ECL 試劑，所設計的 ECL 偵測器裝置如圖 1-5 所示。取一內徑 25 μm，長度 10 cm Pt/Ir 纖維工作電極，將其插入內徑 75 μm 毛細管末端約 3 mm，施加 +1.25 V (v.s. Ag/AgCl) 電位。分析物經 CE 分離後，與電極上產生的 Ru(bpy)₃³⁺ 反應而放光，藉由拋物面反射鏡收集光聚焦至 PMT 上。由於工作電

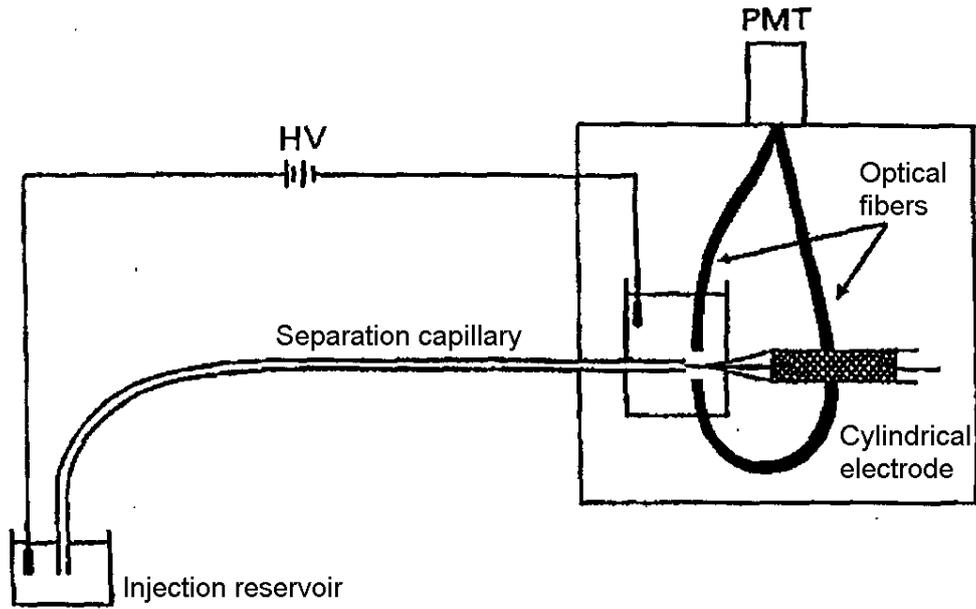


圖 1-4 Gilman^[55]等人所設計的CE / luminol-H₂O₂ ECL偵測系統

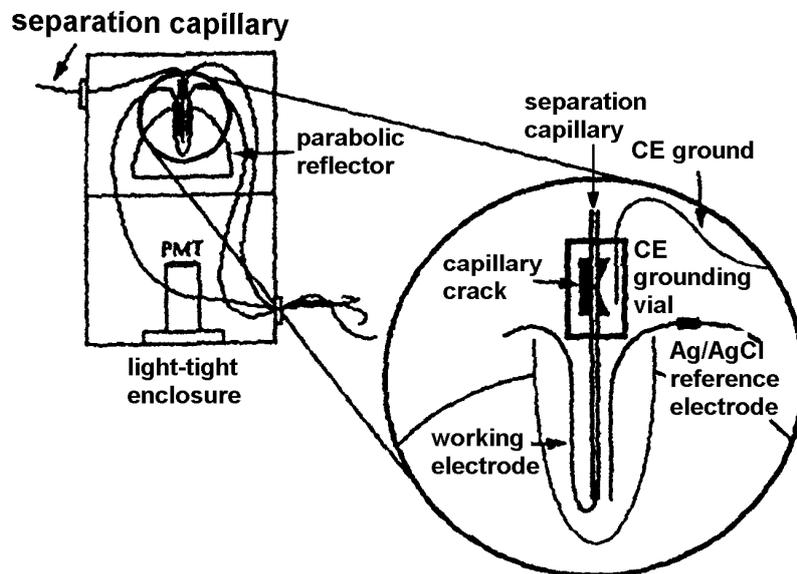


圖 1-5 Forbes^[56]等人所設計的Ru(bpy)₃²⁺/ECL偵測器

極位於毛細管內，CE高電場會使得水解反應在工作電極表面發生而產生氣泡，進而影響ECL偵測，隔離CE的高電場與ECL電極是必要的。作者設計的高電場隔絕裝置其做法為將毛細管末端 1.5 cm處切一道裂口，裂口處塗覆醋酸纖維(cellulose acetate)，並將裂口置於緩衝溶液槽中，置入一支電極，將高電壓產生的電泳電流藉由裂口導出。如此一來，電泳高電壓止於裂口處，毛細管末端工作電極不至於受到高電壓干擾。利用此一系統作者成功分離一系列 β -blockers。文獻中指出，添加Triton X-100 與 β -cyclodextrin可改善 β -blockers的分離情形，且不會降低ECL強度，對oxprenolol的偵測極限為 $0.6 \mu\text{g/ml}$ ($2 \mu\text{M}$)。此一系統中的ECL試劑 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 是直接添加於緩衝溶液內，進行電泳分離時， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 會與毛細管壁產生吸附作用，使得電滲流變化大，造成平衡時間過長。此外，當 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 移動速率與分析物不相等時，會使得帶寬增加。

Tsukagoshi^[57]等人所設計的ECL偵測系統如圖 1-6 所示。藉由幫浦將溶於 H_2SO_4 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 以 40 mL/min 流速輸送至一電化學反應槽中，施以 100 mA 電流將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 氧化，產生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 隨即流至毛細管末端與分析物(emetine 與 emetine dithiocarbamate $\text{Cu}(\text{II})$ complex) 產生反應而放光。此一系統利用幫浦輸送 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 試劑，所設流速大，使得試劑消耗量多，不僅造成分析成本增加，同時廢液

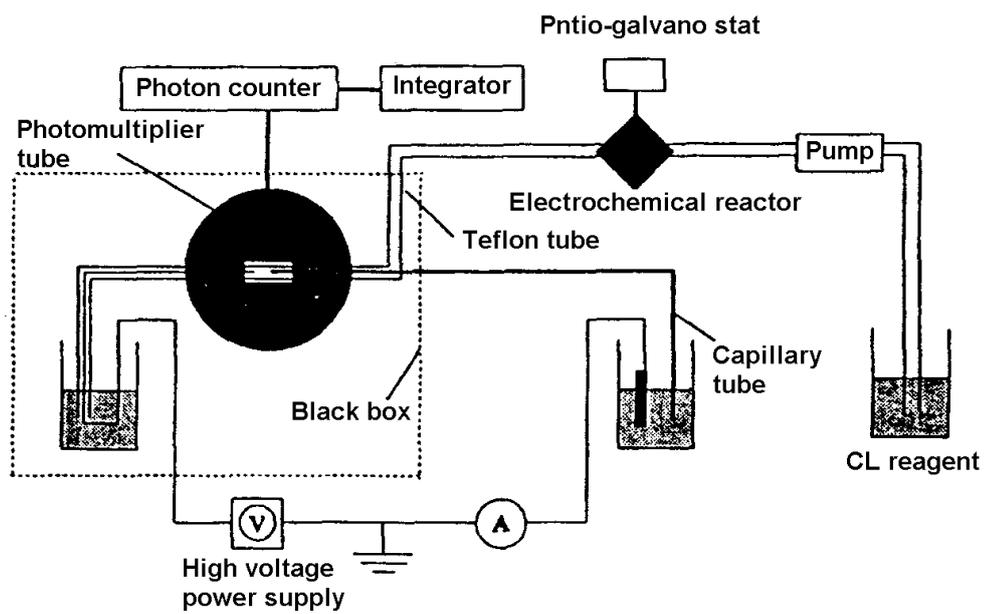


圖 1-6 Tsukagoshi^[57]等人所設計的CE/ECL偵測系統

的產生量也較多。

Dickson^[58]等人所設計的ECL偵測系統與Forbes^[80]等人所設計的系統類似，裝置顯示於圖 1-7。實驗使用內徑 100 μm 毛細管，為避免CE電流對Pt工作電極的干擾，作者亦於毛細管末端 5 cm處設計一隔絕高電壓裝置。此系統工作電極位於毛細管末端管柱外，間隙體積大，因此分析訊號帶寬較寬，對測試分析物proline而言，理論板數僅有 4225。

1998 年，Bobbitt^[59]等人以類似Forbes^[56]等人隔離CE高電壓方式，於毛細管末端 4 cm處切一道裂口，裂口處改以具陽離子交換性質的Nafion塗覆。以 35 μm 碳纖維為工作電極，施以 1.15 V (v.s. SCE) 電位，於 15 mM硼酸緩衝溶液(pH 9.5)，分離電壓 20 kV條件下，可同時分離triethylamine、proline、valine以及serine。對於triethylamine與proline有較高的靈敏度，偵測極限分別為 120 nM與 68 nM。此偵測槽的容積僅有 100 μL ，流出毛細管的緩衝溶液會改變反應槽中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的濃度，因此每隔四小時需更換新的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液，操作上較為不便。

1999 年，Wang和Bobbitt^[60]將分離毛細管末端燒去 2~3 mm外覆的polyimide作為偵測視窗，並將分離毛細管末端置入T型連接器

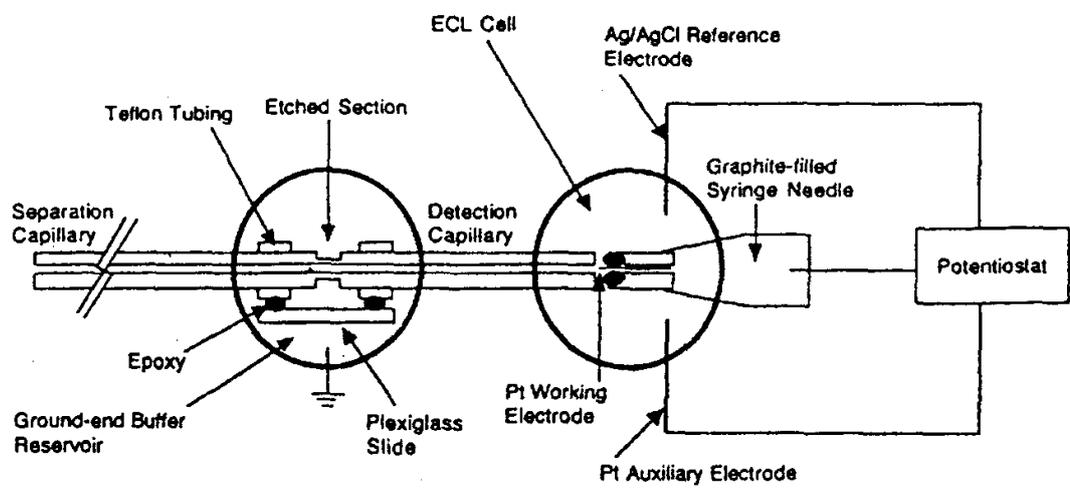


圖 1-7 Dickson^[58] 等人設計的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /ECL偵測器

內的反應毛細管中，反應毛細管另一端則置入Pt工作電極，裝置圖顯示於圖 1-8。Ru(bpy)₃²⁺ 溶液由幫浦以 10 μL/min 流速藉由 T 型連接器輸送至反應毛細管，分析物與 Ru(bpy)₃²⁺ 於反應毛細管內電極表面反應。為避免 CE 高電壓對偵測的干擾，在毛細管後段亦製作一高電壓隔絕裝置。此系統工作電極與分離毛細管皆位於反應毛細管內，間隙體積較小，理論板數可達 74000/m~80000/m。Ru(bpy)₃²⁺ 試劑以幫浦輸送雖可解決偵測槽內溶液更新問題，但 Ru(bpy)₃²⁺ 的消耗量增加是一缺點，高電壓隔絕裝置亦增加了實驗操作上的困難度。

2001 年，本實驗室發表以 indium/tin oxide (ITO) 玻璃為工作電極的 Ru(bpy)₃²⁺/ECL 偵測裝置設計^[61]，顯示於圖 1-9，ECL 放光藉由光纖收集至 PMT。以往文獻中絕大多數的 CE/ECL 偵測裝置均使用電位計 (potentiostat) 提供工作電極電位，為避免 CE 高電流進入電位計內造成電位計的損害，需另設法將 CE 高電場與偵測器部分隔絕。然而 ECL 是藉由分析物與 ECL 試劑反應而放光，實驗僅需記錄放光強度，並不需記錄工作電極上 ECL 反應電流，因此以簡單的乾電池提供工作電極電位亦可。圖 1-9 的設計利用乾電池提供 ITO 工作電極電位，完全不需隔離 CE 高電壓，裝置非常簡單。於 15 mM 硼酸緩衝溶液 (pH 9.5)，分離電壓 12 kV 實驗條件下，可同時分離 triethylamine、proline 與 hydroxyproline，proline 的偵測極限為 1 μM，

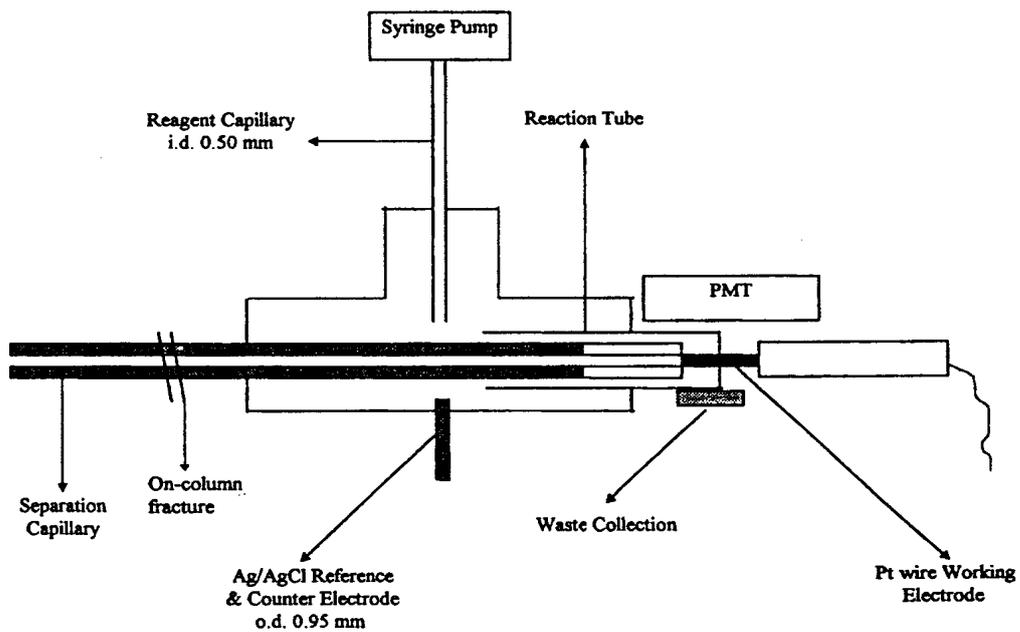


圖 1-8 Wang與Bobbitt^[60]設計的Ru(bpy)₃²⁺/ECL偵測器

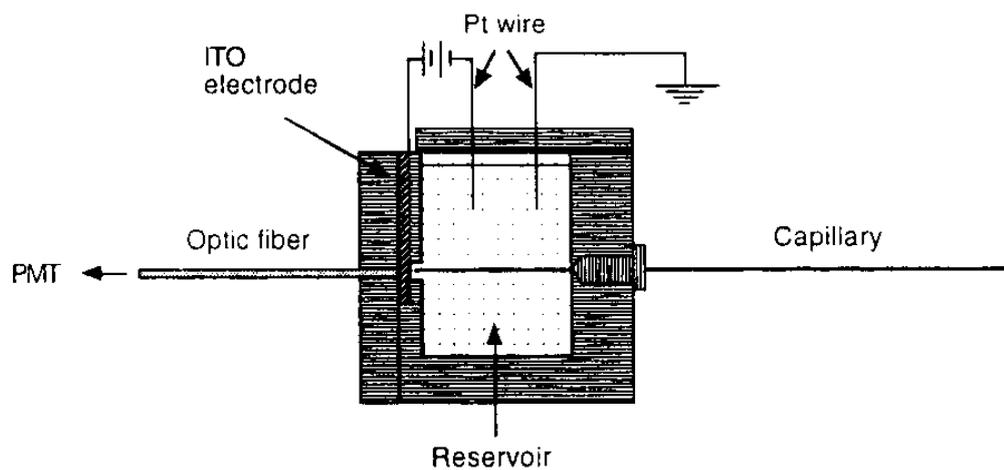


圖 1-9 Chiang與Whang^[61]設計的Ru(bpy)₃²⁺/ECL偵測器

理論板數約為 4000。

2002 年，Cao^[62] 等人設計一無 CE 高電壓隔絕裝置的 ECL 偵測器，裝置如圖 1-10 所示。CE 的接地電極以中空的不銹鋼管代替，分離毛細管透過不銹鋼管的中空部份進到 ECL 反應槽，反應槽體積約 300 μ L，以直徑 300 μ m Pt 電極為工作電極，藉由電位計提供工作電極電位。此偵測裝置雖不需與 CE 高電壓隔絕，但 CE 的高電場仍會干擾 ECL 反應所需的起始電位。當 CE 的電流逐漸增加時，分析物與 Ru(bpy)₃²⁺ 進行 ECL 反應所提供的電位也隨之增加。文章中提到，雖然提供的電位不同，但不影響 ECL 的放光強度。應用此一系統分析尿液中 lidocaine，偵測極限為 2.0 $\times 10^{-8}$ M。

Cao^[63] 等人延續上述的 Ru(bpy)₃²⁺ / ECL 反應槽設計，以修飾的 Pt 電極作為固態 ECL 偵測器，ECL 反應槽如圖 1-11 所示。固態 ECL 偵測器作法為取一直徑 500 μ m 的 Pt 電極，以靜電吸附的方式將 Ru(bpy)₃²⁺ 固定於電極表面的 poly-(p-styrene-sulfonate)-silica-(poly(vinyl alcohol)-grafting-4-vinylpyridine) (PSS-silica-(PVA-g-PVP)) 高分子膜上，此修飾電極長時間浸於磷酸緩衝溶液中，偵測穩定度可維持至少 24 小時。利用此一 ECL 固態偵測器，於 10 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 9.5)，分離電壓 15 kV 實驗條件下，對於 tripropylamine 與 proline 的偵測極限分別為 2 nM 與 2 μ M，理論板數為 70000 與 16000。

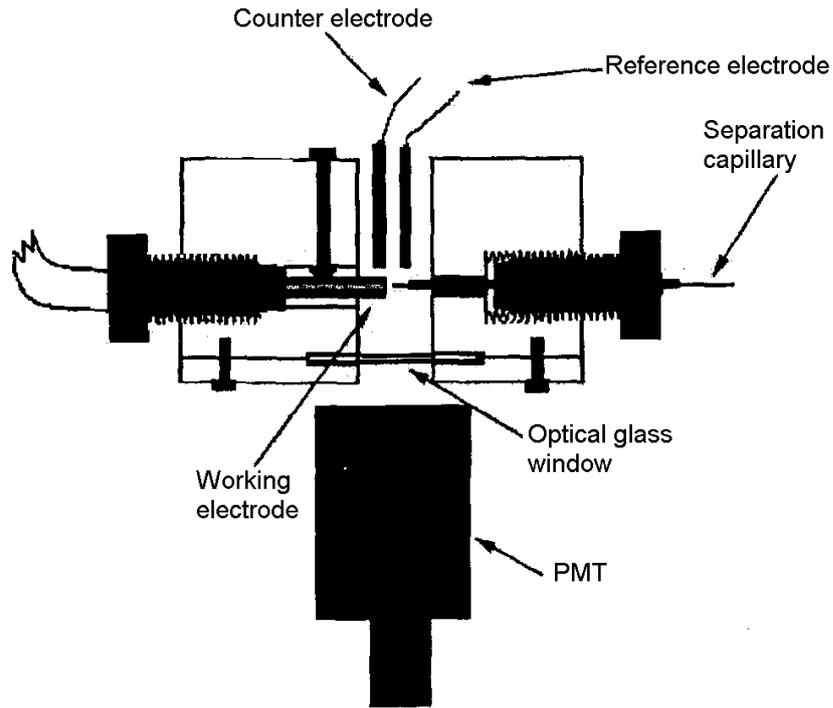


圖 1-10 Cao^[62]等人所設計的Ru(bpy)₃²⁺/ECL偵測器

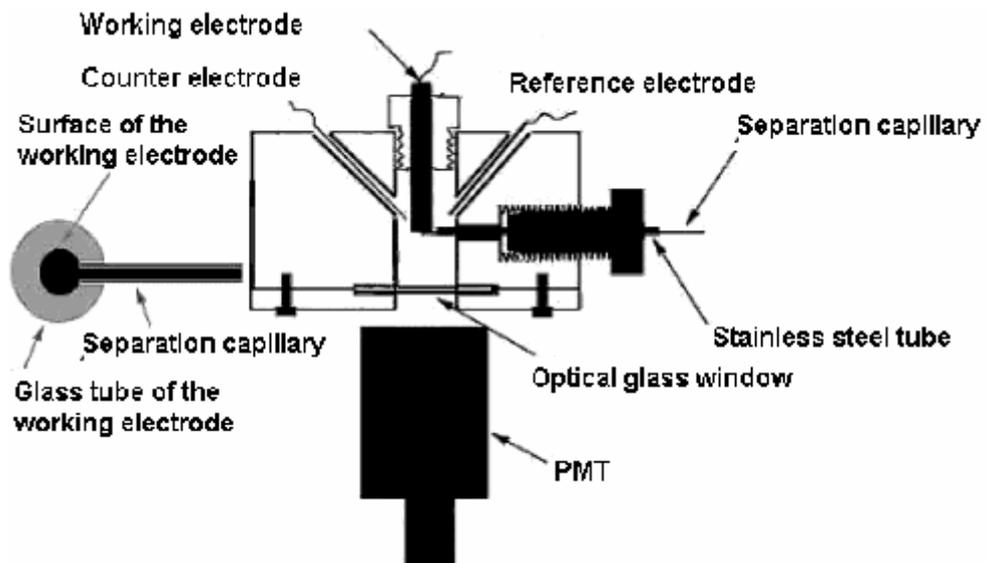


圖 1-11 Cao^[63]等人所設計的固態ECL偵測器

2003 年，本實驗室再度發表以ITO工作電極為主的Ru(bpy)₃²⁺ / ECL偵測器改良設計，ECL反應槽顯示於圖 1-12^[64]。利用 0.5 mL 塑膠瓶為ECL反應槽，移去光纖，直接以PMT收集ECL反應產生的光，提高了光的收集效率。此一系統具極佳的分離效果，以 15 mM 硼酸鈉緩衝溶液(pH 9.0)，分離電壓 6 kV實驗條件下，可同時分離四種三級胺類(trimethylamine、triethylamine、tripropylamine 及 tributylamine)與兩種氨基酸(proline以及hydroxyproline)，理論板數為 60000/m~240000/m。

同年，Liu^[65]等人發展出晶片形式(chip-type) CE / ECL偵測系統，如圖 1-13 所示。以兩片soda lime玻璃片(長 20 mm，寬 15 mm，高 1.7 mm)為偵測系統本體，利用HF / NH₄F溶液蝕刻玻璃片製作液體通道，並使用兩PVC塑膠瓶分別作為Ru(bpy)₃²⁺試劑與CE廢液儲存槽，將CE接地電極(外徑 0.7 mm，內徑 0.45 mm，長 2 cm 的中空不銹鋼管)、參考電極(0.2 mm銀絲)及工作電極(外徑 0.95 mm，內徑 0.85 mm，長 1 cm 的中空不銹鋼管)以環氧膠固定於蝕刻出的通道上。此設計將間隙體積大幅減小，具高分離效率，對於tripropylamine與 proline的理論板數分別為 52000/m與 105000/m。此外，Ru(bpy)₃²⁺試劑由儲存槽直接供應，無緩衝溶液流入造成的稀釋問題，因此偵測極限可降至 1.4 nM (tripropylamine)與 0.16 μM (proline)。

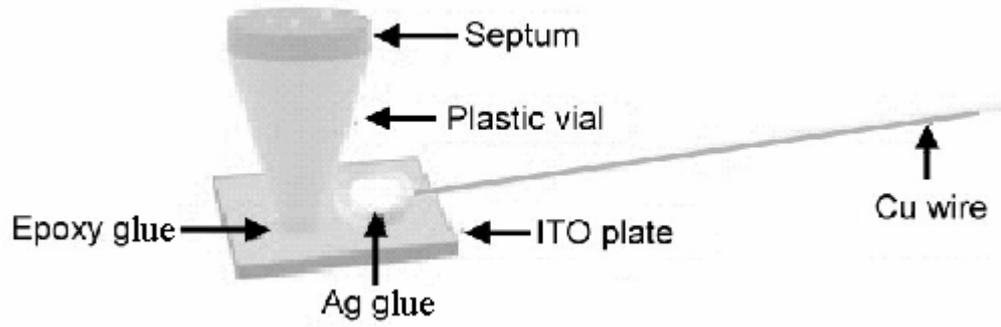


圖 1-12 Chiang 等人^[64] 設計的 Ru(bpy)₃²⁺/ECL 偵測器

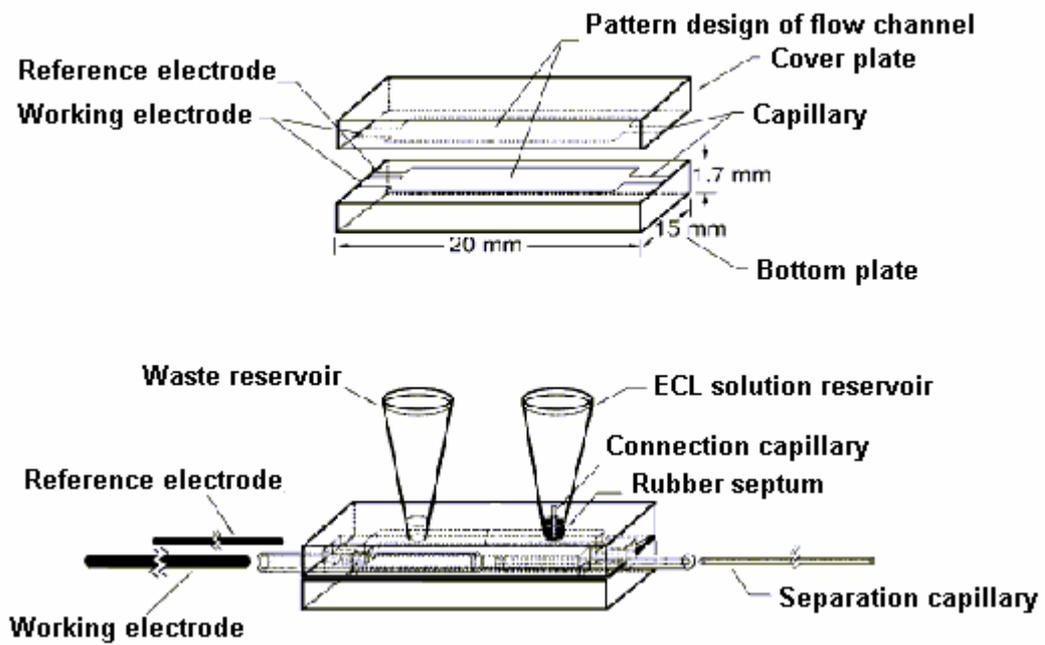


圖 1-13 Liu^[65] 等人設計的晶片形式 ECL 偵測系統

Chen^[66]等人將直徑 $100\ \mu\text{m}$ ，長 $10\ \text{cm}$ 白金絲繞在毛細管末端，將其表面磨平，製作成內徑 $360\ \mu\text{m}$ ，外徑 $560\ \mu\text{m}$ 的白金環電極，以此環電極為工作電極，完整的 CE / ECL 偵測系統顯示於圖 1-14。文章中提到，此偵測系統亦不須與 CE 高電場隔絕，僅當白金工作電極接觸到偵測視窗時，CE 的高電場才會造成顯著的偵測干擾。因此在不與偵測視窗接觸的前提下，工作電極或毛細管末端可盡量貼近偵測視窗以提高偵測靈敏度。利用此一系統於 $10\ \text{mM}$ 磷酸鈉緩衝溶液 (pH 12)，分離電壓 $20\ \text{kV}$ 下，可於 3 分鐘內完成 p-hydroxyphenylpyruvic 溶液中草酸的分離。

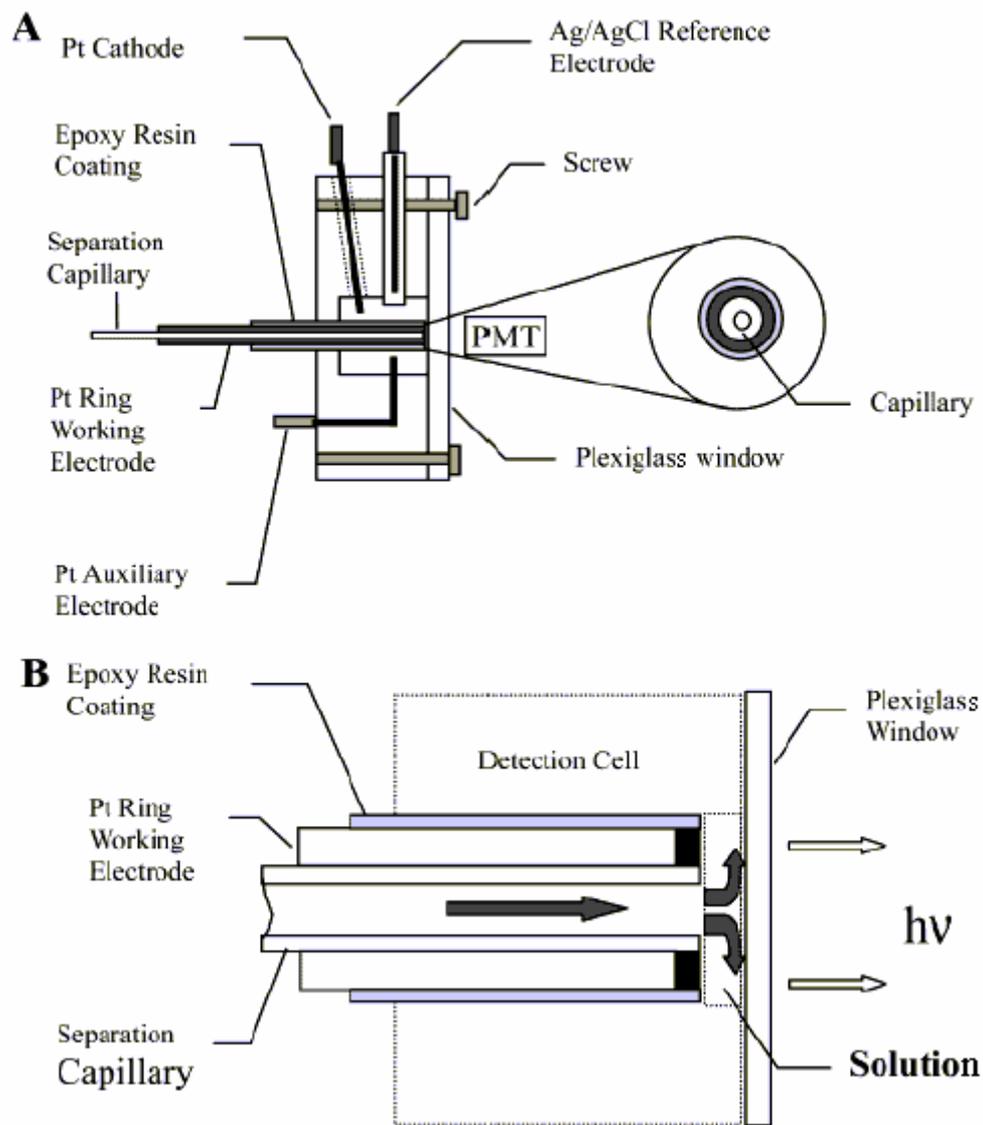


圖 1-14 Chen^[66]等人設計的CE / ECL偵測系統

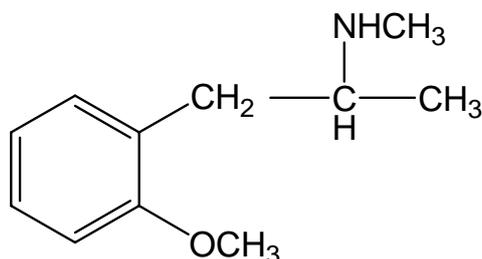
四、分析物簡介

1. Methoxyphenamine (MOP)

(1) 藥理性質

Methoxyphenamine ， 2-methoxy-N, α - dimethylbenzenethan-amine，一種呼吸系統用藥，臨床上用來治療伴隨感冒，支氣管氣喘，急性與慢性支氣管炎，肺結核以及上呼吸道炎之咳嗽^[67]。

Methoxyphenamine於人體中能刺激活化 β -receptor，具支氣管擴張作用，另外，亦具有抗組織胺(antihistamine)作用。Methoxyphenamine (MOP)化學結構如下：



其pKa值為 10.17。成人口服 60.3 mg MOP後，於 2-3 小時內達血液中最高濃度約 $1 \mu\text{M}$ ，24 小時後，經人體的代謝，MOP於血液中濃度僅剩 $0.1 \mu\text{M}$ 左右^[67]。服用本藥有許多副作用，如：心悸亢進、不眠、血壓變動、發汗、頭痛、神經過敏、噁心、嘔吐、便秘等。因服用此藥後有心悸亢進的副作用，屬興奮劑的一種，國際奧林匹亞協會 (International Olympic Committee, IOC) 將其列為運動禁藥之一^[68]。

(2) 分析方法

早期分析 MOP 主要亦藉由氣相層析。Roy^[67] 等人以 pentafluorobenzoyl chloride 為衍生劑，利用氣相層析配合電子捕捉偵測器分析 MOP 經人體代謝後血漿中代謝物與 MOP 殘餘濃度，對 MOP 的偵測極限為 3.8 ng/mL。Srinivas^[69] 等人以 N-heptafluorobutyryl-L-prolyl chloride 為衍生劑，利用 GC / 電子捕捉偵測器分析尿液中的 MOP 及其代謝物，MOP 於尿液中的偵測極限為 0.25 μ g/mL。Soriano^[70] 等人以 tert-butyl ether 萃取尿液中的 MOP，利用 GC / 氮-磷-火焰離子偵測器 (NP-FID) 分析 MOP 有機萃取液，於尿液中的偵測極限為 0.3 μ g/mL。Myung^[71] 等人以液相微萃取 (LPME) 前處理尿液樣品，利用 GC/氮-磷偵測器分析尿液中 MOP，LPME 具樣品濃縮效果，因此偵測極限可降至 0.05 μ g/mL。

於液相層析方面，Gil-Agusti^[72] 等人利用液相層析配合 UV 偵測，移動相使用 sodium dodecylsulfate (SDS) 溶液，以 1-propanol 為有機修飾劑分離一系列與 MOP 同類型的治療咳嗽藥物，methoxyphenamine 的偵測極限為 3 ng/mL。市售治療咳嗽藥物多為苯基胺類混合物，Yin^[84] 等人利用 HPLC 配合 UV 偵測同時分離並定量三種市售治療咳嗽膠囊中混合物成分 (含 MOP)，MOP 的檢量線濃度範圍為 62.5~375 μ g/mL，與標示含量相比，相對標準偏差小於 0.6 %。

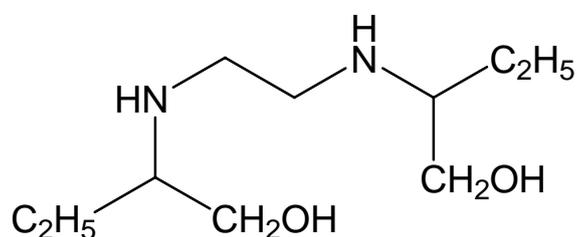
以毛細管電泳分析 MOP 多著重於鏡像異構物的分離。Stalcup^[73]

等人於 10 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 3.8) 中添加 2 % sulfated cyclodextrin, 分離 MOP 等 40 種以上具鏡像異構物的化合物。Zhu^[74] 等人利用非水相毛細管電泳配合 UV 偵測, 以 octakis(2,3-diacetyl-6-sulfato)- γ -cyclodextrin 為鏡像分離添加劑, 亦可分離 MOP 等數種含鏡像異構物的化合物。其他以 CE 分離 MOP 鏡像異構物的添加劑如: heptakis(2-O-methyl-3,6-di-O-sulfo)- β -cyclodextrin^[75]、octakis(2,3-O-dimethyl-6-O-sulfo)- γ -cyclodextrin^[76]、以及 hexakis(2,3-diacetyl-6-O-sulfo)- α -cyclodextrin^[77] 亦有報導。

2. Ethambutol (EMB)

(1) 藥理性質

Ethambutol, d-(R,R)-N,N'-ethylene-bis-(2-aminobutan-1-ol) dihydrochloride, 是一種抗結核劑, 臨床上用為治療肺結核的藥物^[78]。Ethambutol (EMB) 的化學結構如下:



其 pKa 值為 6.3 與 9.6^[79]。EMB 在人體中主要作用為抑制蛋白質的合成和損傷細胞的代謝, 因而阻斷結核菌細胞的增殖。成人病患口服

15 mg / kg EMB後，於 1-2 小時內達血液中最高濃度約 $10 \mu\text{M}$ ($2 \mu\text{g/mL}$)，24 小時後，經由人體的代謝，在血液中濃度約 $2 \mu\text{M}$ ($0.5 \mu\text{g/mL}$) 左右^[80]。服用本藥有些許副作用，如：胃口降低、嘔吐、精神恍惚、頭痛等，此外，此藥亦會對視力產生影響，因此患有視神經炎患者不得使用。

(2) 分析方法

根據文獻報導，早期 EMB 的分析主要藉助氣相層析法。Lee^[81] 等人利用 CHCl_3 將 EMB 自血漿或尿液中萃取出，再與 trifluoroacetic anhydride (TFAA) 衍生，使用 GC/電子捕捉 (electron capture) 偵測，血漿中的檢量線性範圍為 $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ，可應用於真實血漿樣品中 EMB 的分析。Blair^[82] 等人以 TFAA 為衍生劑，利用 GC/質譜 (MS) 分析人體血漿中的 EMB，偵測極限為 10 ng/mL 。Lee 與 Benet^[83] 以 TFAA 為衍生劑，利用 GC 搭配電子捕捉偵測器分析血漿中 EMB 的濃度，偵測極限為 100 ng/mL 。Lee 與 Wang^[84] 亦以 TFAA 為衍生劑，配合 GC/電子捕捉偵測器分析 EMB。兩文獻報導不同之處為過量衍生劑的處理方式。Lee 與 Benet 是以 HCl 分解過量的 TFAA，而 Lee 與 Wang 則是將過量 TFAA 加熱氣化，此種處理方式可避免 TFAA 與 EMB 的衍生物因 HCl 的加入而水解，偵測極限可降至 10 ng/mL 。

近年來分析 EMB 則以液相層析法為主。由於 EMB 分子結構中不

含吸光團，在一般溶劑中不具明顯的紫外可見光吸收^[79]，在分析EMB時，常需先將其衍生，方能進行偵測。Lacroix^[85]等人應用EMB與Cu(II)錯合物具UV吸收的特性，以LC配合UV偵測，方法的偵測極限為6 μ g/mL。EMB的pKa值為6.3與9.6^[79]，在水溶液中帶正電荷，與一般LC的silica材質固定相常會產生吸附作用。Ma^[86]等人改以cyanopropyl-bonded phase為固定相的管柱配合間接導電度偵測，改善EMB吸附於固定相上的問題。利用此方法分析EMB藥片中的含量，與標示含量相比，相對標準誤差小於2%。Breda^[87]等人將EMB與NBD-F(4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)在80°C下衍生反應30分鐘，得到螢光衍生產物，再以LC搭配螢光偵測，於血漿中的偵測極限為10 ng/mL，尿液中的偵測極限為10 μ g/mL。Chenevier^[88]等人使用phenylethylisocyanate為衍生劑，將EMB衍生物以氮氣乾燥後再以LC移動相配製成樣品溶液，利用LC結合UV偵測分析，於血漿中的偵測極限為0.2 μ g/mL。

利用CE分析EMB的文獻報導很少。Ragonese^[89]等人曾選取EMB藥片為分析物，從統計的觀點，以Box-Behnken design進行CE分離實驗最佳化探討。針對緩衝溶液濃度、pH值以及電場強度三個參數設計15次實驗，歸納出最佳分離條件為58.0 mM硼酸鈉緩衝溶液(pH 9.5)，電場強度為412 V/cm。

五、 研究動機

本研究主要利用學姐於 2003 年開發的 CE / Ru(bpy)₃²⁺ ECL 偵測器^[64]，測試其在真實血漿樣品中藥物分析的實用性。ITO 電極為主的 CE/ECL 偵測器成本低(反應槽僅為一個塑膠瓶)，且利用乾電池提供工作電極電位，毛細管上不需 CE 高電壓隔絕裝置，整體實驗裝置相當簡單，提供一個製作容易且成本低廉的 ECL 偵測方法。

選擇測試的分析物為 methoxyphenamine (MOP) 與 ethambutol (EMB)。此兩種藥物均屬二級胺結構，其中 EMB 因不具紫外可見光吸收，需先將其衍生始能進行光學偵測，但二級胺的衍生並不容易；不經衍生步驟的偵測方式目前也僅有以間接導電度偵測^[86]。衍生步驟費時且複雜，衍生反應的完全程度亦影響實驗結果。由於 Ru(bpy)₃²⁺ ECL 偵測適用於分析二級胺類化合物，本研究探討以 ECL 偵測搭配 CE 分離，在不經衍生的情況下同時分析 MOP 與 EMB 兩種藥物，並嘗試將此分析方法應用於血漿樣品的分析。

貳、實驗

一、儀器設備

1. 毛細管電泳裝置：

實驗室中自行組裝，包括一台高壓電源供應器，Glassman High Voltage 公司(Whitehouse Station, NJ, USA)產品，Model PS / MJ 30P0400-11，可供應直流電壓 0 至 +30 kV。高電壓啟動線路與樣品注射計時裝置為實驗室中自行設計組裝。

2. 熔矽毛細管：

實驗使用熔矽毛細管，內徑 $52\ \mu\text{m}$ ，外徑 $366\ \mu\text{m}$ ，外覆聚乙烯胺(polyimide)，為 Polymicro Technologies 公司(Phoenix, AZ, USA)產品，Model TSP050375。

3. PEEK 管柱：

PEEK 管柱為 polyether ether ketone 材質，內徑 $50\ \mu\text{m}$ ，外徑 $360\ \mu\text{m}$ ，Upchurch Scientific 公司(Oak Harbor, WA, USA)產品。

4. 銦 / 氧化錫薄膜電極(ITO electrode)：

$50\ \text{mm} \times 75\ \text{mm} \times 0.7\ \text{mm}$ 玻璃片，僅一面塗覆 ITO 導電薄膜， $R_s \leq 20\ \Omega / \text{square}$ ，Delta Technologies 公司(Stillwater, MN, USA)產品。

5. 偵測器：

偵測電激發化學放光訊號的光倍增管(PMT)為 Hamamatsu 公司 (Hamamatsu City, Japan)產品，Model R928。

6. 電流放大器：

使用 Keithley Instrument 公司(Cleveland, Ohio, USA) Model 485 picoammeter 放大 PMT 的電流訊號，並轉換成電壓輸出。

7. 雜訊抑制器(time constant)：

實驗室中自行組裝，內含 1 秒的 RC low-pass filter，具有過濾雜訊的功用。

8. X-Y-Z 微調平台：

Newport 公司(San Diego, CA, USA)產品，Model M-460A series，調整毛細管末端與工作電極的垂直距離。

9. 酸鹼度計：

酸鹼度計為 Suntex 公司(台北，台灣)產品，Model SP-701。

10. 超音波震盪器：

a. Branson Ultrasonic 公司(Banbury, CA, USA) 產品，Model 1200。

b. L&R Ultrasonic 公司(Kearny, NJ, USA)產品，Model Quantrex AG 90。

11. 過濾薄膜：

TITAN 公司(San Diego, CA, USA)產品，nylon 材質，孔徑大小為 $0.45 \mu\text{m}$ 。

12. 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。

13. 微量離心機：

DENVILLE 公司(Metuchen, NJ, USA)產品，Model Micro 240A。

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。

16. 數據處理：

個人電腦配合訊華公司(台北，台灣)積分軟體(Data Station)作為數據處理系統。

二、藥品

1. Methoxyphenamine ($C_{11}H_{17}NO \cdot HCl$; 2-methoxy-N, α - dimethylbenzenethanamine hydrochloride) : Sigma公司(St. Louis, MO, USA)產品，分析試藥級。
2. Ethambutol ($C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$; d-(R,R)-N,N'-ethylene-bis (2-aminobutan-1-ol) dihydrochloride) : Sigma公司(St. Louis, MO, USA)產品，分析試藥級。
3. 三乙基胺($C_6H_{15}N$; triethylamine ; TEA) : E. Merck公司(Darmstadt, Deutschland, Germany)產品，純度 99.5 % 。
4. 三丙基胺($C_9H_{21}N$; tripropylamine ; TPA) : Aldrich公司(Gillinoham, Dorset, UK)產品，純度 99+ % 。
5. Tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate ($Ru(bpy)_3Cl_2 \cdot 6H_2O$) : Aldrich公司(Gillinoham, Dorset, UK)產品，純度 99.95 % 。
6. 磷酸二氫鈉($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; sodium dihydrogen phosphate monohydrate) : E. Merck公司(Darmstadt, Deutschland, Germany) 產品，純度 99 % 。
7. 氫氧化鈉($NaOH$; sodium hydroxide) : E. Merck 公司(Darmstadt, Deutschland, Germany)產品，純度 99 % 。

8. 鹽酸(HCl ; hydrochloric acid) : E. Merck 公司(Darmstadt, Deutschland, Germany)產品。
9. 異丙醇($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$; isopropyl alcohol) : Tedia公司(Fairfield, OH, USA)產品，純度 99.97 %。
10. 氰甲烷(CH_3CN ; acetonitrile) : E. Merck 公司(Darmstadt, Deutschland, Germany)產品，HPLC級試藥。
11. 甲醇(CH_3OH ; methanol) : E. Merck公司(Darmstadt, Deutschland, Germany)產品，HPLC級試藥。
13. 實驗所用之純水是將自來水先經軟化與蒸餾後，再經由 Barnstead 公司(Dubuque, IA, USA) NANO pure II deionization system 純化處理。

三、 實驗方法

1. ITO (indium / tin oxide) 電極之製作^[90] :

利用玻璃切割刀將ITO電極片切割成所需之大小(約 1 cm × 1.5 cm),切割完成之電極片以清潔劑及異丙醇經超音波各震盪 15 分鐘,接著以去離子水震盪清洗 15 分鐘,重新更換去離子水再清洗一次,最後以氮氣乾燥後待用^[91]。另外截取適當長度單股電話線(約 5~6 cm),剝除外部的絕緣膠皮,抽出內部銅絲,一端沾取適量銀膠(EPO-TEK H20E, Billerica, MA, USA),黏於ITO電極片上,置入 80 °C烘箱中 3 小時使銀膠固化,再以環氧膠(epoxy glue)覆於銀膠上,使銅線不易脫落。製作流程與成品見圖 2-1。製作完成之電極,以去離子水超音波震盪 15 分鐘,經氮氣乾燥後即可進行實驗。

2. ECL偵測裝置^[90] :

取一小塑膠瓶(0.5 ml)將其底部切成中央 1.0~2.0 mm 直徑的平面,再將此塑膠瓶利用環氧膠垂直固定於 ITO 電極上,做為 ECL 的反應槽。塑膠瓶蓋鑽三個小洞,以便固定毛細管與兩支白金電極。製作完成之成品見圖 2-2。

3. CE / ECL 偵測系統

完整的 CE/ECL 偵測裝置見圖 2-3。取一內徑 52 μ m, 外徑 360

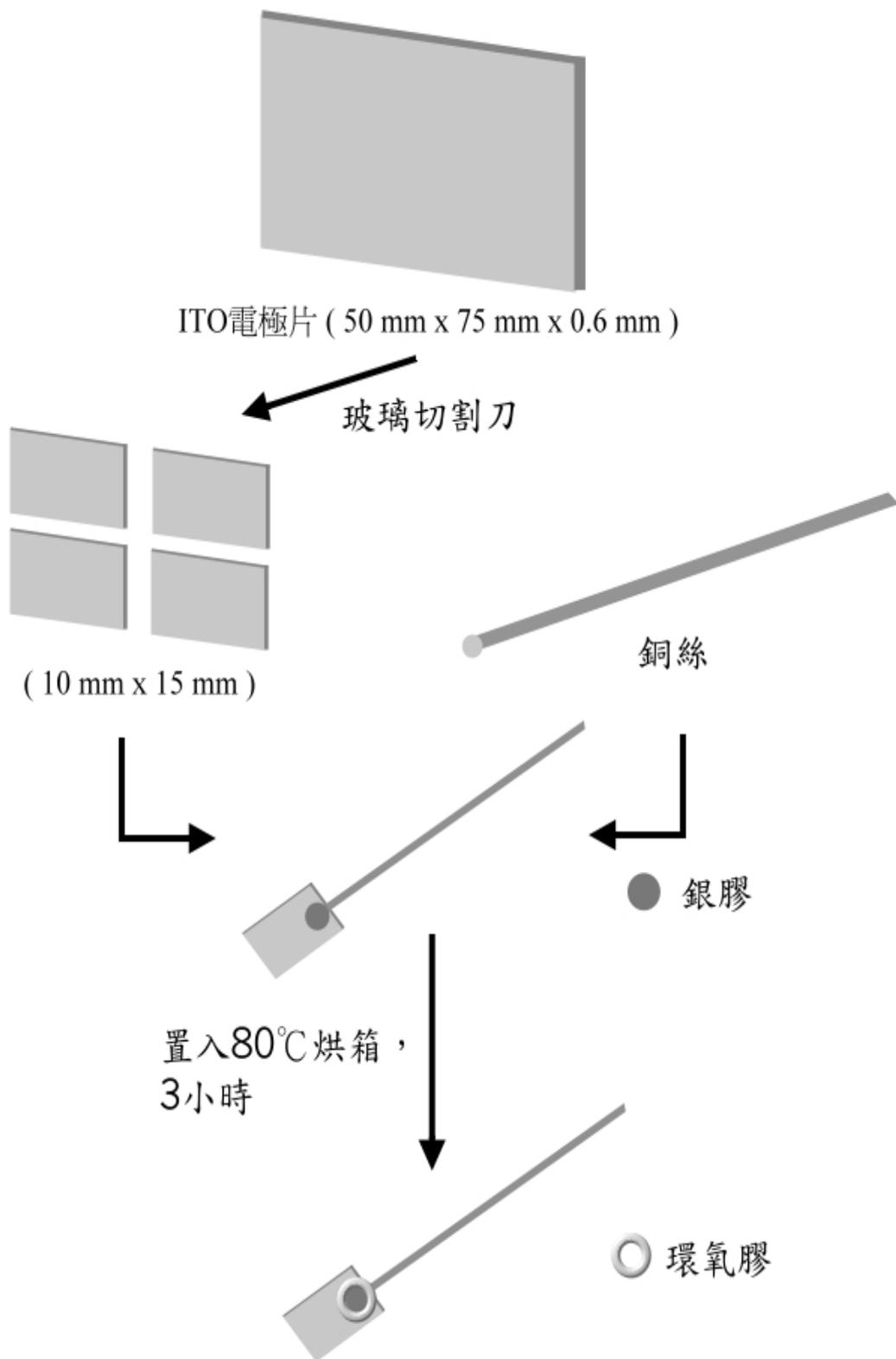


圖 2-1 ITO 電極製作流程

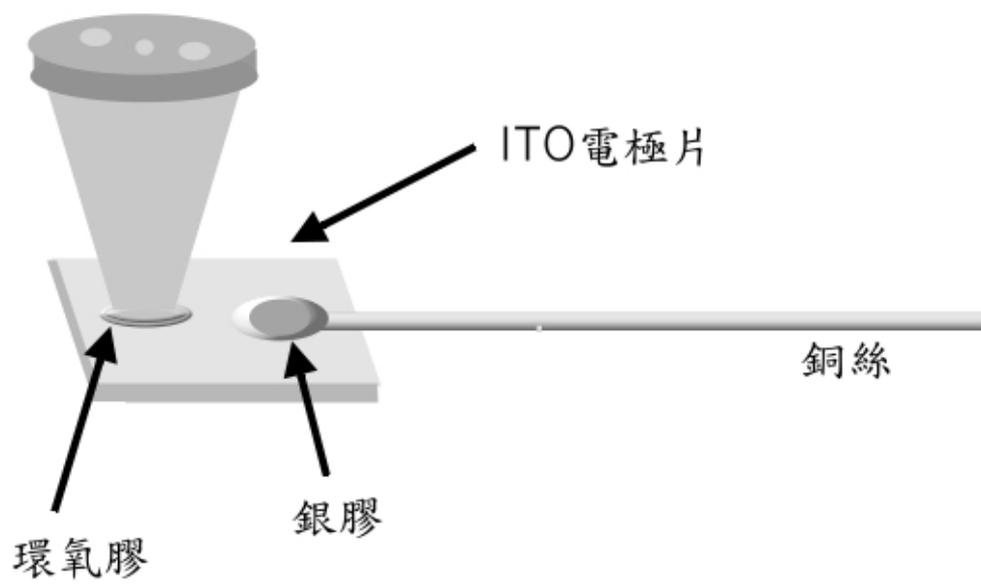


圖 2-2 ECL 偵測裝置完成圖

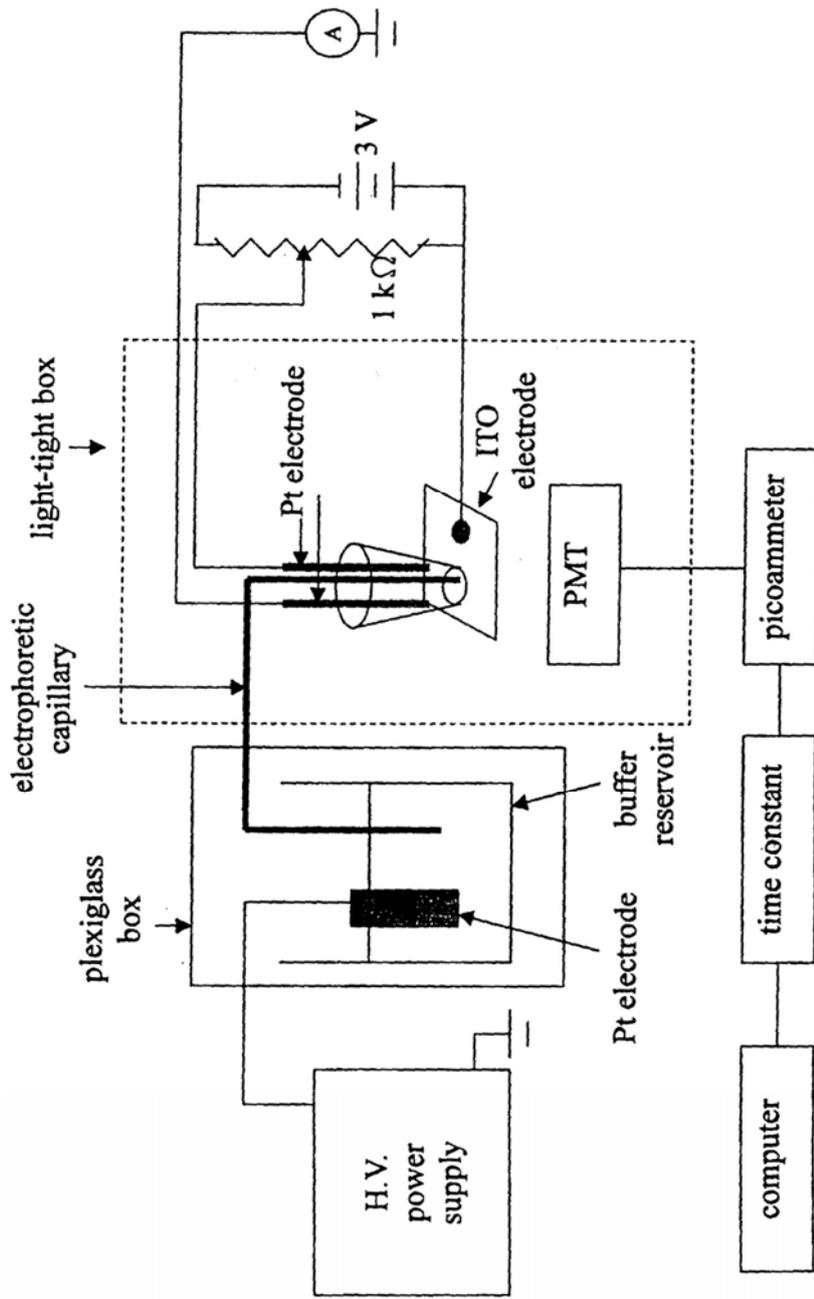


圖 2-3 CE/ECL 系統裝置圖

μm ，長度 50~55 cm 之毛細管，以注射器將緩衝溶液注入並充滿毛細管中。將毛細管前端置於高電壓端的緩衝溶液儲存槽中，並插入一連接高電壓電源供應器的白金電極。毛細管的末端則垂直插入含有以緩衝溶液配製之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液的 ECL 反應槽內，使末端稍微接觸 ITO 電極表面，並藉由蓋體的小孔固定毛細管位置。毛細管末端與 ITO 電極表面的垂直距離是利用一台 x-y-z 微調平台控制。將 ECL 反應槽內接地的白金電極先串聯一個三用電表以監視電泳電流，再連接至地線，與高壓端形成一迴路。ITO 電極所需的電壓是串聯 2 個市售 1.5 V 乾電池，經分壓電阻調整輸出提供。ITO 電極連接至電池組的正極，反應槽內另一支白金電極連接至電池負極。

以 PMT 偵測電激發化學放光訊號時，將 PMT 直接安置於 ITO 電極正下方，並盡可能縮短 ITO 電極與 PMT 間的距離，以提高 PMT 收集光的效率。PMT 所產生的微弱光電流藉 picoammeter 放大並轉換成電壓信號輸出，經濾波線路過濾雜訊後，以電腦收集並記錄處理。為了實驗者安全，電泳高電壓端置於透明壓克力盒中；為隔絕外界光線干擾，ECL 偵測裝置以黑色壓克力箱覆蓋，並於壓克力箱外再罩上一層黑布。

4. 儲存溶液(stock solution)的配製

(1) Triethylamine：以去離子水配製成 10 mM 儲存溶液，置於 4°C 冰

箱保存，期限為一個月。使用時以磷酸鈉緩衝溶液稀釋至所需濃度。實驗時當做內標準品(internal standard, I.S.)。

(2) Methoxyphenamine 與 ethambutol：以去離子水配製成 10 mM 儲存溶液，置於 4°C 冰箱保存，期限為一個月。使用時以磷酸鈉緩衝溶液稀釋至所需濃度。

(3) Ru(bpy)₃Cl₂：以磷酸鈉緩衝溶液配製 10 mM Ru(bpy)₃Cl₂ 儲存溶液。由於藥品對光照敏感，需以鋁箔紙包裹容器，並置於 4°C 冰箱保存，期限 2 週。使用時以磷酸鈉緩衝溶液稀釋至所需濃度。

5. 緩衝溶液的配製

以去離子水配製所需濃度的磷酸二氫鈉為緩衝溶液，並以 NaOH 調整 pH 值至實驗所需之酸鹼值，使用 0.45 μm 濾膜過濾後置於 4°C 冰箱中保存，期限為一個月。

6. 血漿樣品前處理

人血以針筒抽出後置於含 EDTA 的乾燥試管中，立即以 2800 g 離心 10 分鐘取得血漿，保存於 -20°C 冰箱。血漿樣品分析前需先去除蛋白質等大分子，實驗以添加氯甲烷和超過濾兩種方式進行去蛋白質處理，並比較兩種方式所得結果差異。

(1) 氯甲烷沈澱蛋白質：

於 185 μ L 血漿樣品中先添加 15 μ L 去離子純水或含有 triethylamine、methoxyphenamine 與 ethambutol 標準品水溶液，再添加 200 μ L 氰甲烷使蛋白質沈澱，經 8000 g 離心 15 分鐘後，取上層澄清液，做為空白血漿或實驗樣品溶液。

(2) 超過濾去除蛋白質

取一孔徑為 5000 NMWL 的 Ultrafree-MC 超過濾薄膜匣，將 200 μ L 血漿樣品(包含 185 μ L 血漿和 15 μ L 去離子純水或含有 triethylamine、methoxyphenamine 與 ethambutol 標準品水溶液)置入其中，經 8000 g 離心 20 分鐘後，收集濾液，做為實驗樣品或空白背景。

7. 毛細管處理與進樣：

實驗前，以去離子水沖洗毛細管 15 分鐘，再以電泳緩衝溶液沖洗 15 分鐘，於高電場下平衡一段時間，待背景訊號穩定後即可進行實驗。進樣時，採用電動進樣或重力進樣方式將分析物注入毛細管內。實驗後，以去離子水清洗殘餘的電泳緩衝溶液，再以分析級甲醇溶液清洗毛細管 20 分鐘，最後再以去離子水沖洗 15 分鐘，將毛細管保存於去離子水中。

參、結果與討論

本研究主要沿用江美足學姐設計之ECL反應槽^[64]，測試其於分析血漿樣品中微量藥物的實用性。許多因素會影響CE/ECL偵測，如：緩衝溶液濃度、分離電壓、提供工作電極的電位以及Ru(bpy)₃²⁺的濃度等。實驗選定methoxyphenamine (MOP)與ethambutol (EMB)為分析物，triethylamine (TEA)為內標準物，分別探討分離與偵測條件中各項參數的影響。

一、 分離條件最佳化

1. 分離管柱的選擇

一般CE使用的毛細管材質為fused silica，當管中電解質溶液的pH值大於2時，管壁上Si-OH基解離成SiO⁻，在高電場作用下有電滲流的產生。分析物的分離主要藉助於電滲流的驅動力與本身的電泳遷移率的差異，但因毛細管內壁帶電荷，常會與分析物產生吸引力，而使得分離效率降低。本研究選取的兩種鹼性藥物MOP與EMB其pKa值分別為10.17 (MOP)與6.3及9.6 (EMB)，在一般中性與酸性緩衝溶液中，會以正電荷形式存在而產生電泳，但也可能與負電性的fused silica毛細管內壁產生吸附作用。為避免分析物與毛細管內壁的吸附問題，

實驗先嘗試以polyether ether ketone (PEEK)材質毛細管為分離管柱。

有機聚合物毛細管柱其內壁表面電荷較少，在電場作用下雖然亦有電滲流的產生，但其微弱的電滲流主要為吸附在管壁的陰離子所造成，因此速度較fused silica材質毛細管產生的電滲流慢^[92]，分析物主要藉本身的電泳遷移率差異而分離。近年來polymethylmethacrylate (PMMA)^[93-95]、PEEK^[95-97]和其他高分子材質^[93-94]的毛細管柱曾陸續被探討，這些毛細管的電滲流速度雖較慢，但礙於其管壁本身不透光，因此無法搭配UV或螢光偵測器，應用並不普遍。本研究使用的ECL偵測屬於管柱末端偵測，即使管柱本身無透光性，亦可與此種偵測方式結合。

實驗首先探討以PEEK管柱分離三丙基胺(TPA)與EMB，並配合ECL偵測。以 20 mM磷酸鈉(pH 7) 為陽極緩衝溶液及 20 mM磷酸鈉(pH 7)含 3.5 mM Ru(bpy)₃²⁺為陰極緩衝溶液進行實驗，電泳圖顯示於圖 3-1A。由圖可知，TPA與EMB可於 10 分鐘內完全分離。由於EMB的pKa值為 6.3 及 9.6，在pH 7 的緩衝溶液中帶正電荷，外加正高壓作用下，會往負端遷移，TPA與EMB可因本身電泳遷移率的差異而達基線分離。雖然TPA與EMB可完全分離，但訊號峰甚寬且有拖尾現象，研判可能因缺少電滲流的驅動力，加上分析物本身

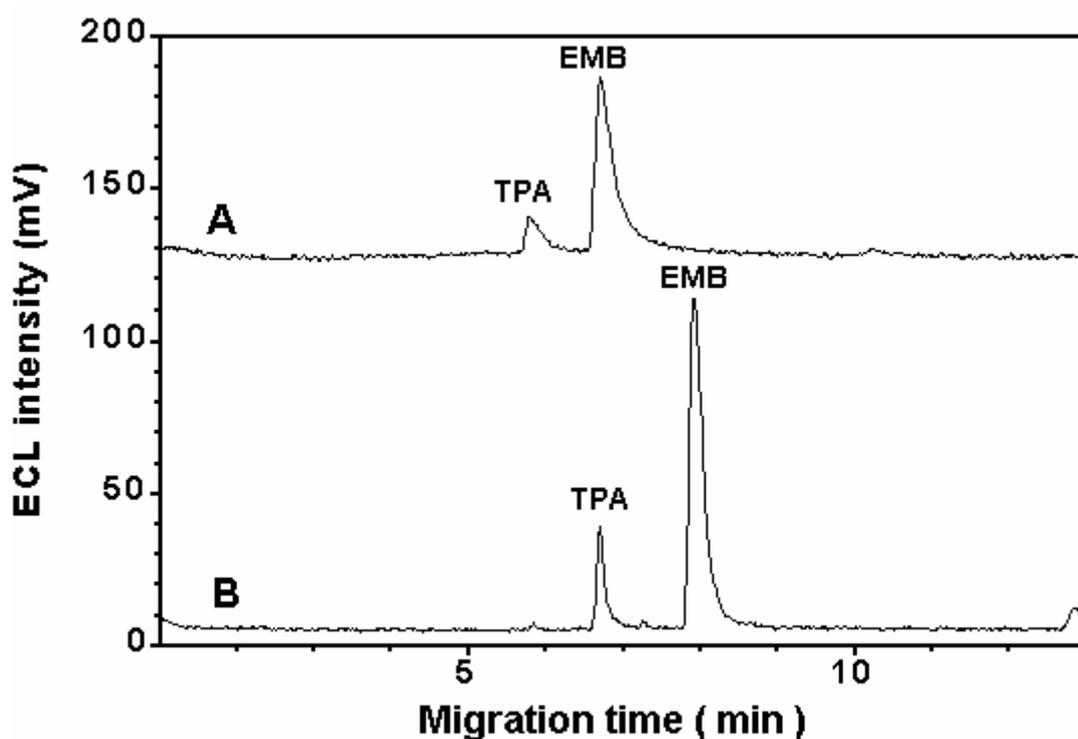


圖 3-1 以 PEEK 管柱分離 EMB 與 TPA 的電泳圖

A：陽極緩衝溶液－20 mM 磷酸鈉(pH 7)

陰極緩衝溶液－20 mM 磷酸鈉(pH 7) + 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

B：陽極緩衝溶液－20 mM 磷酸鈉(pH 10)

陰極緩衝溶液－80 mM 磷酸鈉(pH 7) + 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

實驗條件：樣品：TPA $10 \mu\text{M}$ ；EMB $100 \mu\text{M}$

PEEK 管柱： $50 \mu\text{m}$ I.D. \times $360 \mu\text{m}$ O.D. \times 51 cm

電泳電壓：12 kV

進樣方式：重力進樣，15 cm，15 sec

ITO 電極電位：1.2 V

PMT 電位：900 V

帶正電，與吸附於管壁的陰離子間有作用而導致。

為改善上述峰寬問題，改變陽極緩衝溶液pH值為 10。文獻曾報導，胺類的最佳ECL放光條件為pH偏中性^[98]，因此陰極緩衝溶液pH值仍維持在 7；此外，為緩和兩端緩衝溶液的pH值差異，提高陰極緩衝溶液濃度至 80 mM。在此條件下的分離電泳圖見圖 3-1B。比較圖 A與圖B，可發現分析物訊號拖尾情形明顯改善。提高陽極緩衝溶液的pH值雖使得吸附於PEEK內壁的負離子增加，但pH 10 大於分析物 EMB的兩個pKa值，使EMB分子偏中性，可降低原本帶正電荷時與吸附於管壁的負離子間產生的吸引力，因此可改善訊號拖尾的問題。此外，遷移時間與訊號高度亦隨條件的改變而增加。一般分離管柱為 fused silica毛細管時，電滲流隨pH值增加而增大，移動速率變快而分析時間縮短。在PEEK管柱內，分析物移動主要靠本身的電泳遷移率。電泳緩衝溶液pH 10 時，分析物偏中性，僅受電滲流往負電壓端推動力影響，淨移動速率稍減，導致遷移時間增加。訊號高度的增加可能是因為兩端緩衝溶液濃度不同所造成。分析物在濃度較低的毛細管內移動速率較快，在濃度較高的偵測端移動速度較慢，因此在毛細管末端濃度逐漸改變的緩衝溶液交界區域，分析物離子因移動速度的漸減而產生擠壓堆積，因而訊號高度增加，原理類似場放大樣品堆積機制。

在高壓端緩衝溶液為 20 mM磷酸鈉(pH 10)，偵測端緩衝溶液為

為 80 mM 磷酸鈉(pH 7) 條件下，分別以 fused silica 及 PEEK 毛細管為分離管柱，比較兩種管柱的分離效果，結果顯示於圖 3-2。就 TPA 與 EMB 分離而言，PEEK 管柱可提供較高的解析度，但訊號峰寬度較寬。除了分析物於 PEEK 管柱中因移動速率較慢導致訊號寬度增加外，PEEK 管柱的熱導度(thermal conductivity) 差亦可能是導致訊號變寬的原因之一。PEEK 管柱的熱導度相對於 fused silica 管柱而言低許多 (2500 vs. 6000 W/m · K)^[95]，因此在高電場下產生的焦耳熱不易散去，推測此為 PEEK 管柱訊號峰較寬的主因。此外，分析物於 fused silica 中移動速率快，分析物較集中，使得訊號高度較高。原先預測分析物於中性或酸性緩衝溶液中與 fused silica 管壁的吸附作用，因調整緩衝溶液 pH 值至 10，使分析物偏中性，電泳圖中未發現因吸附作用而產生的明顯拖尾現象。基於訊號峰寬與偵測感度的考量，後續實驗仍選擇 fused silica 材質的毛細管為分離管柱。

2. 電泳電壓的影響

為了解電泳電壓對分析物遷移時間的影響，調整電壓為 6、9、12、15 kV，平衡一段時間後注射含三種分析物(TEA、MOP 及 EMB) 的樣品進行分離，不同電壓下的電泳圖見圖 3-3。圖中可發現，隨著電壓的增加，分析物移動的速率加快，使得訊號峰寬度隨電泳電壓

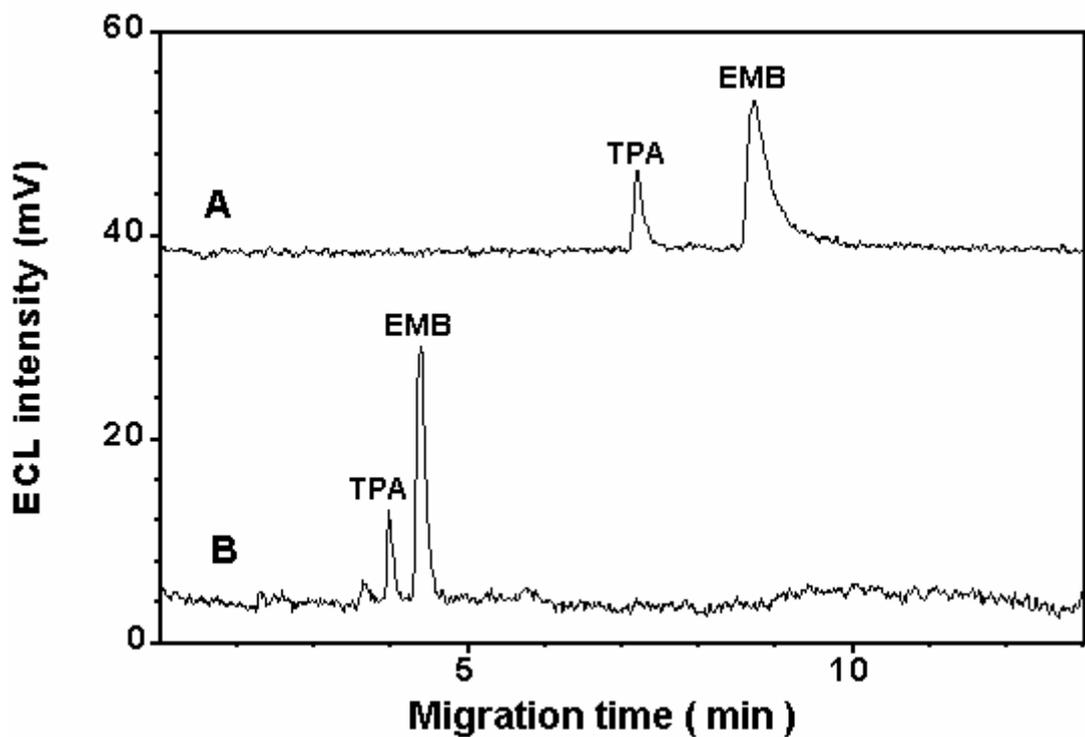


圖 3-2 PEEK 管柱與 fused silica 管柱分離 EMB 與 TPA 電泳圖

A : PEEK 管柱， $50\ \mu\text{m}$ I.D. \times $360\ \mu\text{m}$ O.D. \times 51 cm

B : fused silica 管柱， $50\ \mu\text{m}$ I.D. \times $360\ \mu\text{m}$ O.D. \times 51 cm

實驗條件：樣品：TPA ($5\ \mu\text{M}$) ; EMB ($50\ \mu\text{M}$)

陽極緩衝溶液—20 mM 磷酸鈉 (pH 10)

陰極緩衝溶液—80 mM 磷酸鈉 (pH 7) + 3.5 mM
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

電泳電壓：12 kV

進樣方式：重力進樣，15 cm，15 sec

ITO 電極電位：1.2 V

PMT 電位：900 V

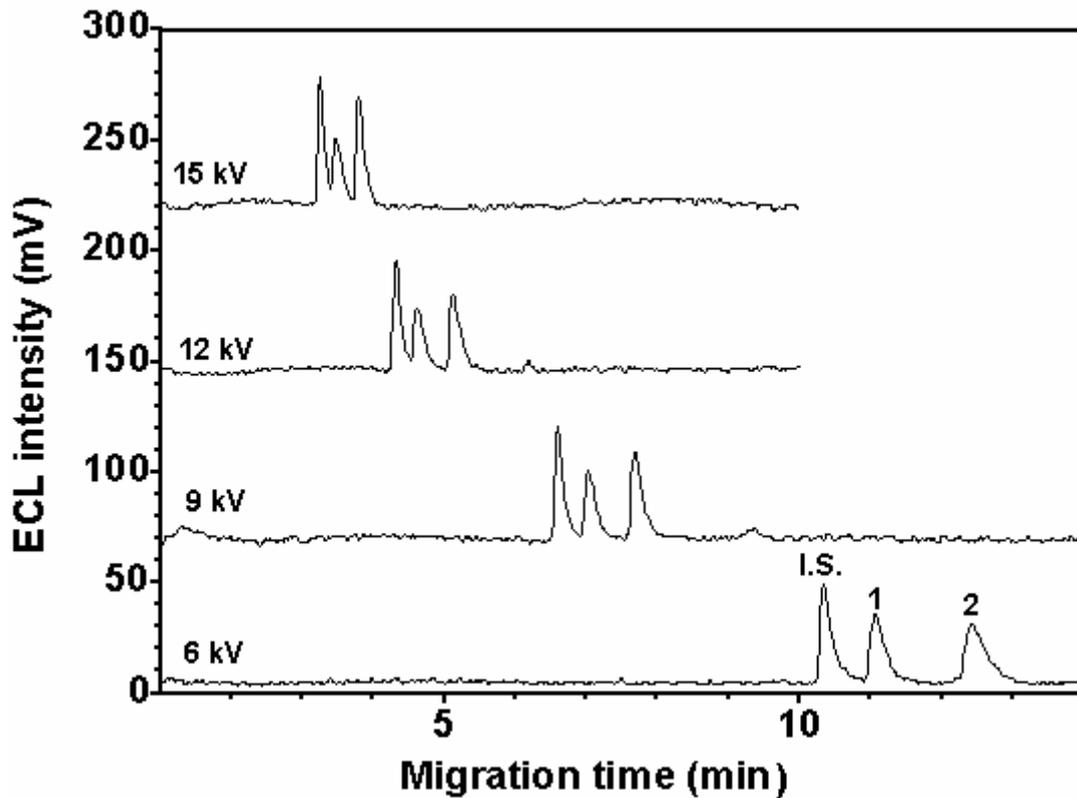


圖 3-3 不同電壓下 TEA、MOP 與 EMB 電泳圖

訊號峰標示：I.S.=TEA ($5 \mu\text{M}$)；1=MOP ($50 \mu\text{M}$)；2=EMB ($50 \mu\text{M}$)

實驗條件：fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55cm
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉 (pH 10)
 陰極緩衝溶液：200 mM 磷酸鈉 (pH 7) + 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 進樣方式：重力進樣，15 cm，15 sec
 ITO 電極電位：1.4 V
 PMT 電位：960 V

的增加而減小。此外，背景基線平穩，顯示本實驗的 ECL 偵測系統並未受電泳高電壓的干擾。當電泳電壓大於 12 kV 時，TEA 與 MOP 的訊號開始重疊，無法完全分離。

分析物遷移時間與電泳電壓的關係顯示於圖 3-4。由圖可發現，分析物遷移時間隨電泳電壓增加而遞減。提高電泳電壓，分析物離子本身的移動速率與電滲流速率會增加，使得分析物淨移動速率加快，因此遷移時間會隨電泳電壓增加而縮短。基於訊號分離及分析時間的考量，選擇以 9 kV 作為電泳電壓進行後續實驗。

3. 電泳緩衝溶液濃度的影響

電泳緩衝溶液濃度會對 CE 分離產生影響，針對此因素，改變高壓端磷酸鈉緩衝溶液濃度 10~40 mM (pH 10)，觀察分析物與內標準物訊號面積的變化，結果顯示於圖 3-5。由圖可知，20 mM 磷酸鈉緩衝溶液提供的偵測效果較佳。當緩衝溶液濃度低時，因電滲流速率較快，分析物快速被送至 ITO 電極表面，可能造成分析物於電極表面來不及氧化而未與電極表面生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 充分反應，使得訊號面積降低。另外，當電滲流速率較大時，單位時間內到達電極表面的溶液增加，使得電極表面生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 濃度被稀釋，放光反應的效率變差^[99-100]，訊號面積降低。當緩衝溶液濃度繼續增加，發現訊號面積有下降的趨勢。由於實驗中高壓端與低壓端緩衝溶液濃度不同，

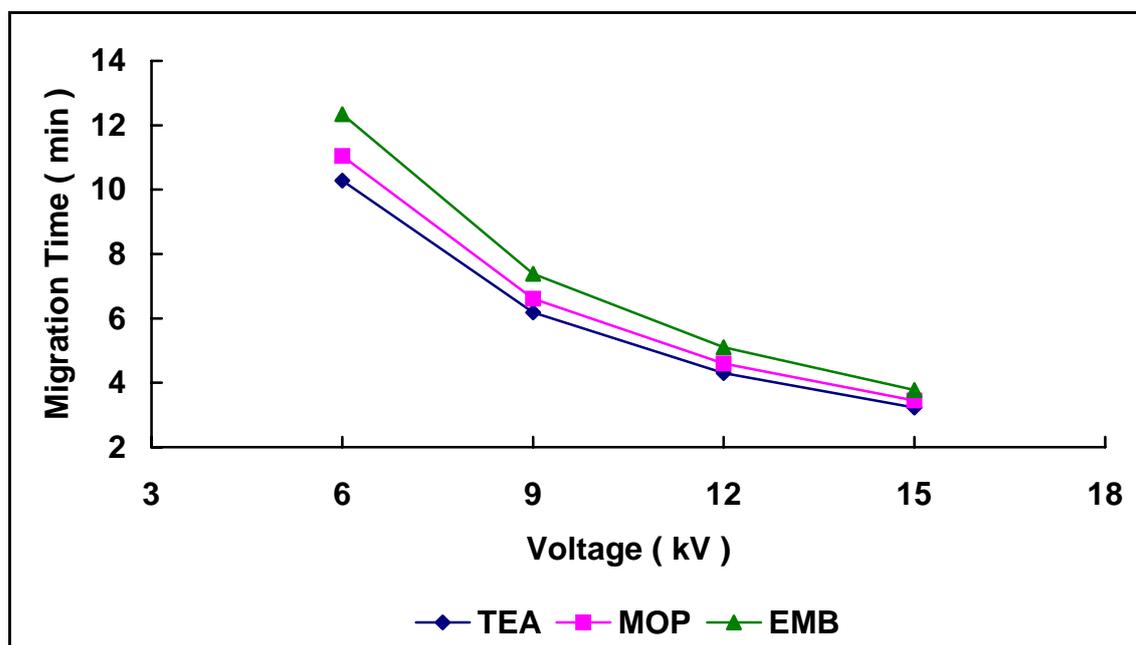


圖 3-4 分析物遷移時間與電泳電壓的關係

實驗條件同圖 3-3

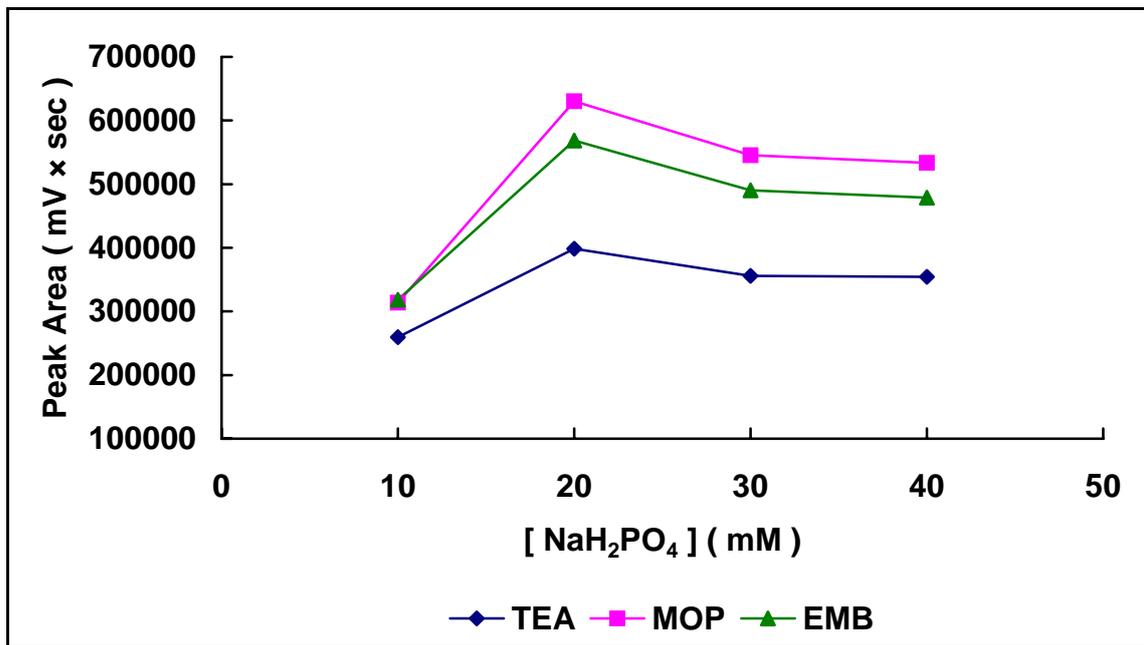


圖 3-5 分析物訊號面積隨電泳緩衝溶液濃度變化關係

其他實驗條件同圖 3-3

當兩端緩衝溶液濃度差異越大時，樣品堆積的作用較顯著。隨著高壓端緩衝溶液濃度的增加，兩端緩衝溶液濃度差異縮小，使得樣品堆積效果減低，推測此為導致訊號面積降低的原因。

分析物遷移時間與電泳緩衝溶液濃度的關係圖顯示於圖 3-6。緩衝溶液濃度越高，溶液中離子強度越大，使得電滲流速變小，分析物淨移動速率變慢，因此遷移時間隨電泳緩衝溶液濃度的增加而遞增。基於偵測感度的考量，選擇 20 mM 磷酸鈉為高壓端緩衝溶液最佳濃度。

4. 電泳緩衝溶液 pH 值的影響

高壓端緩衝溶液的 pH 值會影響分析物的電泳分離。為了解 pH 值的影響，配製 pH 6~11，20 mM 磷酸鈉緩衝溶液進行實驗，分析物與內標準物相對面積比值隨高壓端緩衝溶液 pH 值的變化顯示於圖 3-7。由圖中發現，當 pH 值低於 8 時，EMB 與內標準物訊號面積比值隨 pH 增加而增加，可能是在 pH 6~8 範圍因 EMB 本身 pKa 值分別為 6.3 與 9.6，大部分 EMB 以帶超過一個正電荷的形式存在，影響其在電極表面的氧化後的去質子步驟，使得 ECL 反應的放光效率變差，導致訊號面積降低。在測試的 pH 範圍內，內標準物 TEA 與分析物 MOP 皆以帶一個正電荷的形式存在，可能產生 ECL 反應的放光效率差異不大，因此訊號面積的比值變化不顯著。當 pH 值高於 8 時，

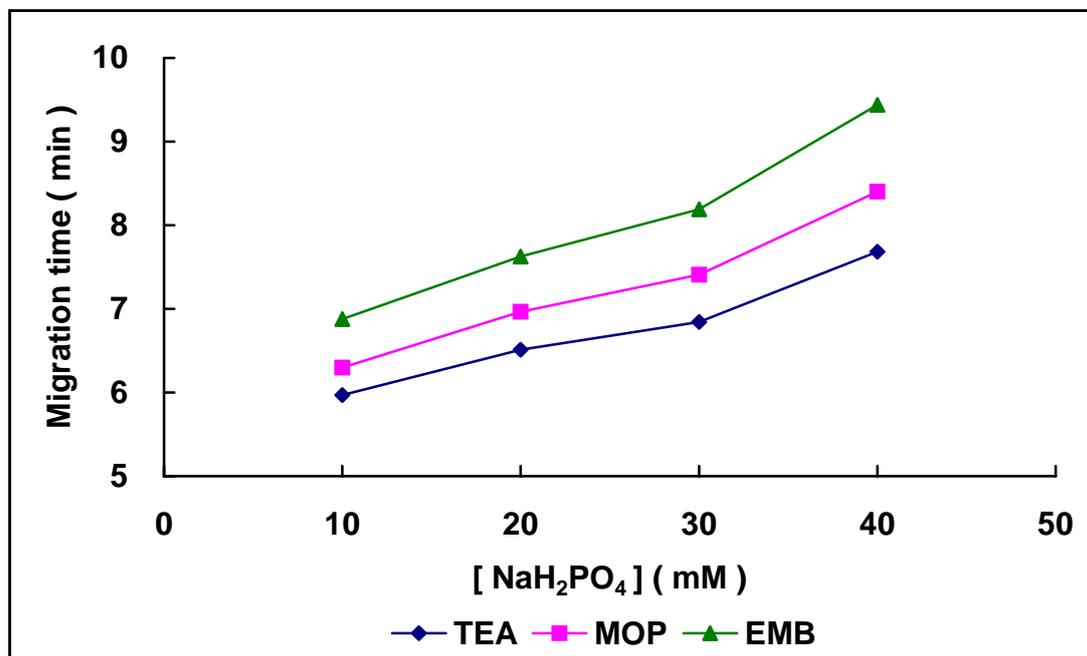


圖 3-6 遷移時間對電泳緩衝溶液濃度變化關係

其他實驗條件同圖 3-3

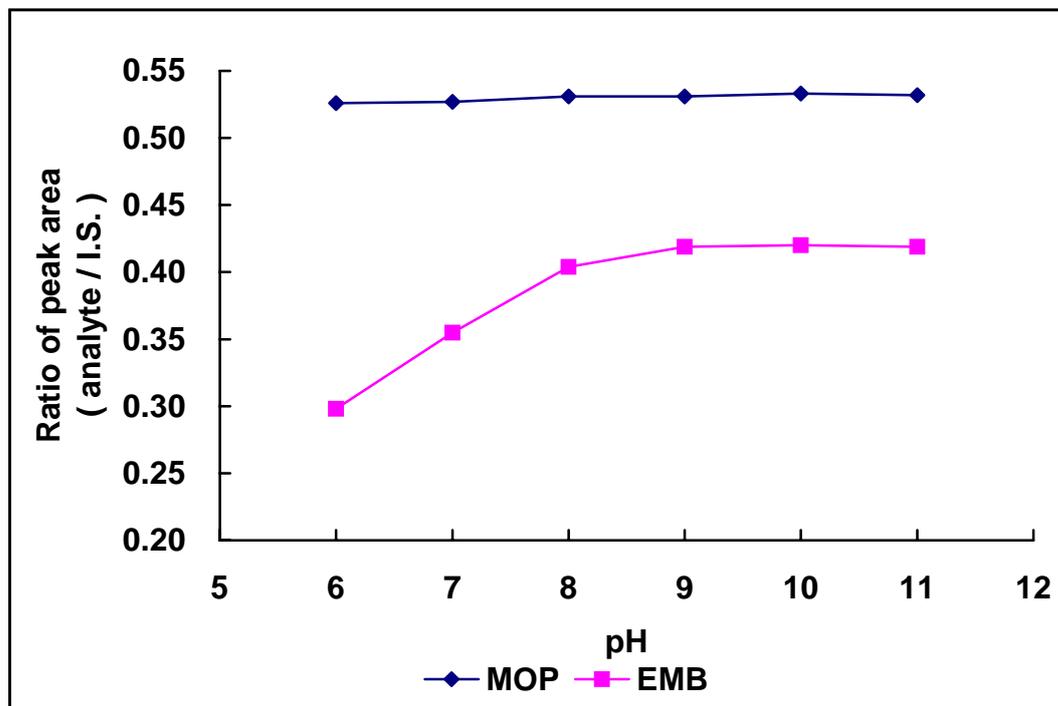


圖 3-7 電泳緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物面積比值的影響

實驗條件：樣品：MOP (100 μ M) ; EMB (50 μ M)
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉(pH 6~11)
 電泳電壓：9 kV
 其他實驗條件同圖 3-3



EMB 大部分為帶一個正電荷的形式，推測其於電極表面產生 ECL 反應的放光效率與同為帶一個正電荷形式存在的內標準物 TEA 與分析物 MOP 大小差不多，因此訊號面積的變化趨於平緩。

分析物與內標準物相對移動時間比值隨高壓端緩衝溶液 pH 值的變化顯示於圖 3-8。因 pH 升高導致電滲流速率增加，使得 EMB 移動速率變快，與內標準物 TEA 移動時間的比值隨 pH 的增加而減少。由於測試的 pH 範圍內 MOP 與 TEA 的帶電量改變不大，相對移動時間隨 pH 的變化不顯著。當 pH 值大於 9 時，EMB 變化趨於平緩，因此選定 pH 10.0 為電泳緩衝溶液最佳條件。

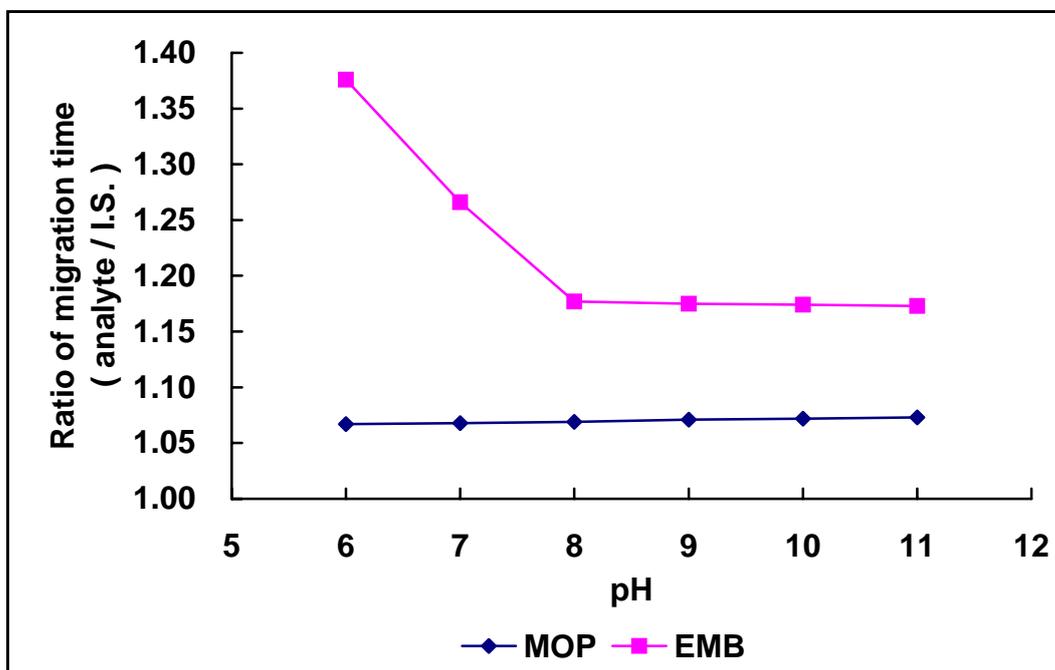


圖 3—8 電泳緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物遷移時間比值的影響

實驗條件：樣品： MOP (100 μ M) ; EMB (50 μ M)
陽極緩衝溶液： 20 mM 磷酸鈉 (pH 6~11)
電泳電壓： 9 kV
其他實驗條件同圖 3—3

二、偵測條件最佳化

1. ECL 偵測電位

ECL的放射強度與化學反應速率有關，而光放射的化學反應速率則與電極的電位有關^[101]，因此，工作電極的電位是影響ECL反應放光強度的一個重要參數。為求得最佳偵測靈敏度，改變ITO電極電位由 1.0 V至 1.8 V，觀察分析物ECL訊號強度對電位的關係，顯示於圖 3-9。

胺類分析物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 反應產生的ECL放射是由於胺類分析物於電極表面氧化，經去質子步驟成為自由基形式的中間產物，再與電極表面氧化生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行ECL反應所產生(反應機構如圖 1-3 所示)，放光強度與激發態 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 的量成正比，即放光強度與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 氧化程度及分析物濃度有關。由圖 3-9 可知，內標準物TEA和分析物MOP以及EMB的ECL強度對電位有類似的變化趨勢。當提供的ITO電極電位達 1.4 V時，三種分析物ECL放光強度均趨於平緩，因此選擇 1.4 V為最佳偵測電位。

2. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度的影響

由於溶液中只有部分 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 會在電極表面氧化產生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，電化學方式生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 為ECL反應中的限量試劑^[102]，其產量影響ECL放光強度的大小。提高溶液中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的濃

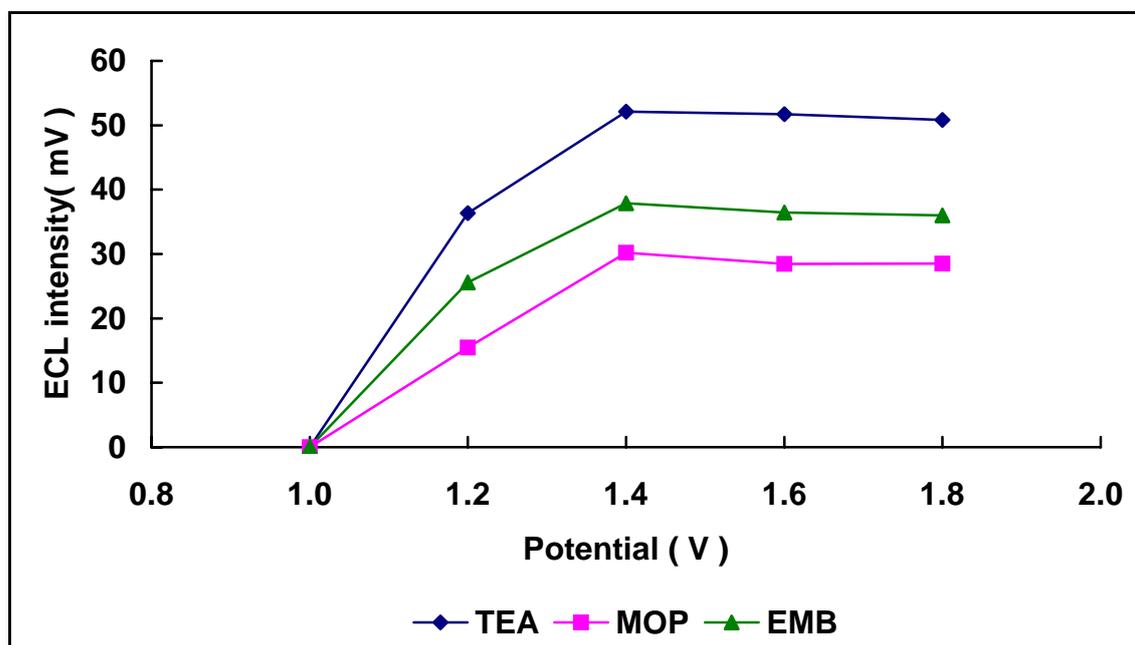


圖 3-9 分析物 ECL 訊號強度與 ITO 電極電位的關係

實驗條件：樣品：TEA ($5 \mu\text{M}$)；MOP ($50 \mu\text{M}$)；EMB ($50 \mu\text{M}$)
 fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55cm
 陽極緩衝溶液： 20mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 10$)
 陰極緩衝溶液： 200mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 7$) + 3.5mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 電泳電壓： 9kV
 進樣方式：重力進樣， 15cm ， 15sec
 PMT 電位： 960V

度可提高電極表面 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 的產量，進而提高ECL的放光強度。實驗中改變 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的濃度，觀察分析物訊號面積與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度的變化，結果顯示於圖 3-10。由圖可發現，分析物訊號面積隨 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的濃度增加而增大，但當 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度達 3.5 mM時，訊號面積的增加漸趨平緩。再提高 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的濃度至 5.0 mM雖然可提高偵測靈敏度，但相對的也會增加背景雜訊的強度，導致S / N比值(訊號/雜訊比值)下降，如圖 3-11 所示。基於此項考量，選擇 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 為最佳濃度。

3. 偵測端緩衝溶液濃度的影響

Sun等人^[103]發現，提高ECL偵測端的緩衝溶液濃度使其高於電泳緩衝溶液的濃度時，可提高偵測的靈敏度。先前測試PEEK管柱分離實驗中，我們亦觀察到相同的現象。為探討偵測端緩衝溶液濃度對ECL強度的影響，將 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 配製於 100~400 mM的磷酸鈉 (pH 7.0)緩衝溶液中進行實驗，結果顯示於圖 3-12。

當偵測端緩衝溶液濃度由 100 mM 提高至 300 mM 時，各分析物訊號高度也隨之增加，造成此現象原因可能是當偵測端緩衝溶液濃度提高時，與電泳緩衝溶液的濃度相差越大，毛細管末端兩濃度不同緩衝溶液交界區域造成的樣品堆積作用越明顯，使得訊號高度逐漸增加。此外，由於實驗使用的電泳緩衝溶液 pH 值為 10，而偵測端緩衝

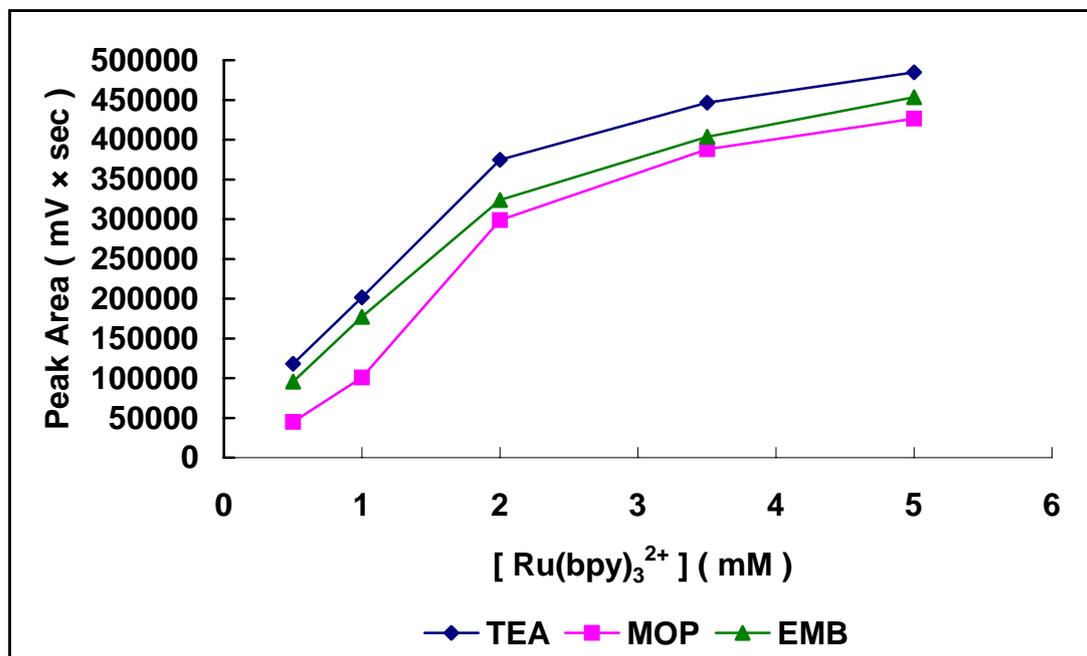


圖 3-10 分析物訊號面積與Ru(bpy)₃²⁺濃度的關係

實驗條件：樣品：TEA (5 μ M)；MOP (50 μ M)；EMB (50 μ M)
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉(pH 10)
 陰極緩衝溶液：200 mM 磷酸鈉(pH 7) + 0.5~5 mM
 Ru(bpy)₃²⁺
 ITO 電極電位：1.4 V
 其他條件同圖 3-9

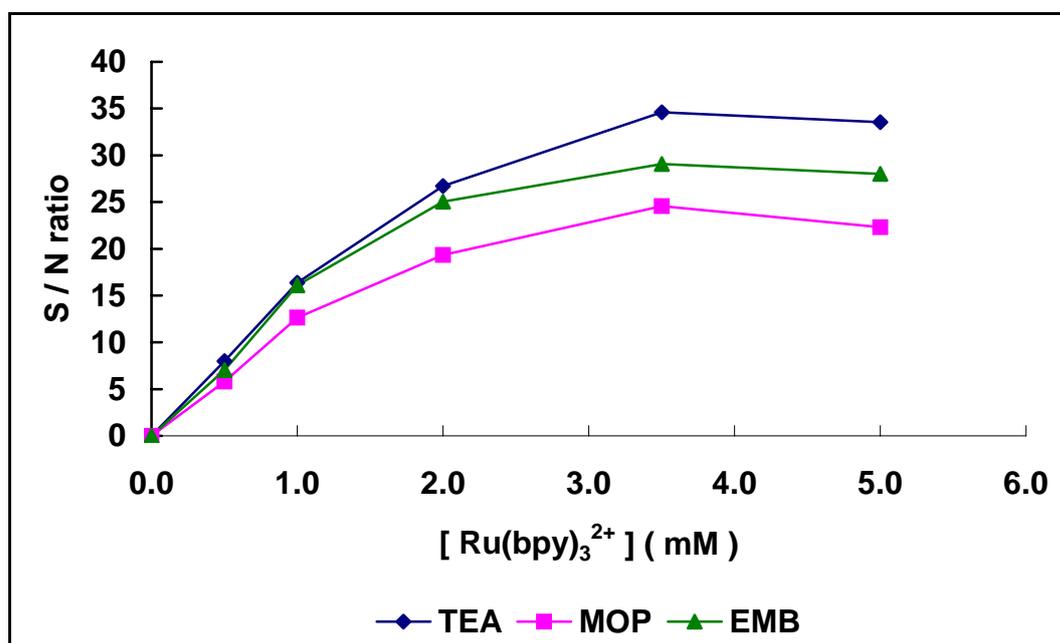


圖 3-11 ECL 訊號/雜訊比值與 Ru(bpy)₃²⁺ 濃度的關係

實驗條件：樣品：TEA (5 μ M)；MOP (50 μ M)；EMB (50 μ M)
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉 (pH 10)
 陰極緩衝溶液：200 mM 磷酸鈉 (pH 7) + 0.5~5 mM
 Ru(bpy)₃²⁺
 ITO 電極電位：1.4 V
 其他條件同圖 3-9

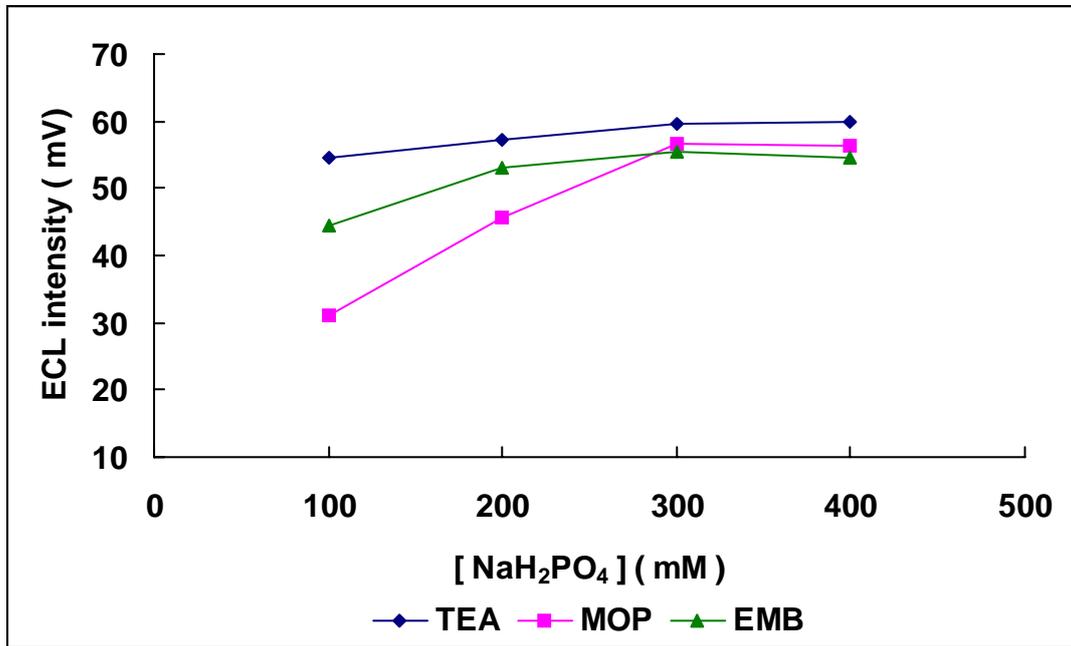


圖 3-12 ECL 強度與偵測端緩衝溶液濃度的關係

實驗條件：樣品：TEA (5 μ M)；MOP (50 μ M)；EMB (50 μ M)
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉 (pH 10)
 陰極緩衝溶液：100~400 mM 磷酸鈉 (pH 7) + 3.5 mM
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 ITO 電極電位：1.4 V
 其他條件同圖 3-9

溶液 pH 值為 7，偵測端使用濃度較高的緩衝溶液可穩定偵測端 pH 值以符合最理想 ECL 放射所需的中性條件。當濃度再提高至 400 mM 時，變化趨於平緩，因此選擇偵測端磷酸鈉緩衝溶液濃度 300 mM 為最佳條件。

4. 偵測端緩衝溶液 pH 值的影響

偵測端緩衝溶液 pH 值是影響 ECL 強度的一個重要因素。ECL 反應的效率和溶液的 pH 值與分析物本身的分子結構有關，對三級胺分子而言，最佳放光 pH 範圍為 8~9^[52,98]。胺類分析物與 Ru(bpy)₃²⁺ 的反應機構如圖 1-3 所示，胺類分子先於電極表面氧化，形成帶正電荷的自由基離子，再經去質子步驟成為自由基形式的中間產物，最後與電極表面氧化產生的 Ru(bpy)₃³⁺ 進行 ECL 反應。溶液的 pH 值會影響分析物自由基離子的去質子步驟，進而影響 ECL 放光的強度。先前圖 3-7 顯示，調整高電壓端電泳緩衝溶液的 pH 值對偵測訊號面積的影響不大。但實驗發現，調整偵測端的緩衝溶液 pH 值對於 ECL 訊號強度的影響很大，如圖 3-13 所示。當 pH 值由 6 提高至 8 時，分析物與內標準物面積也隨之上升。在較低 pH 值時，分析物去質子步驟可能較不易進行，造成訊號強度偏低。當 pH 值大於 8 時，溶液中 OH⁻ 濃度漸增高，可能與電極表面產生的 Ru(bpy)₃³⁺ 進行以下反應^[104]：

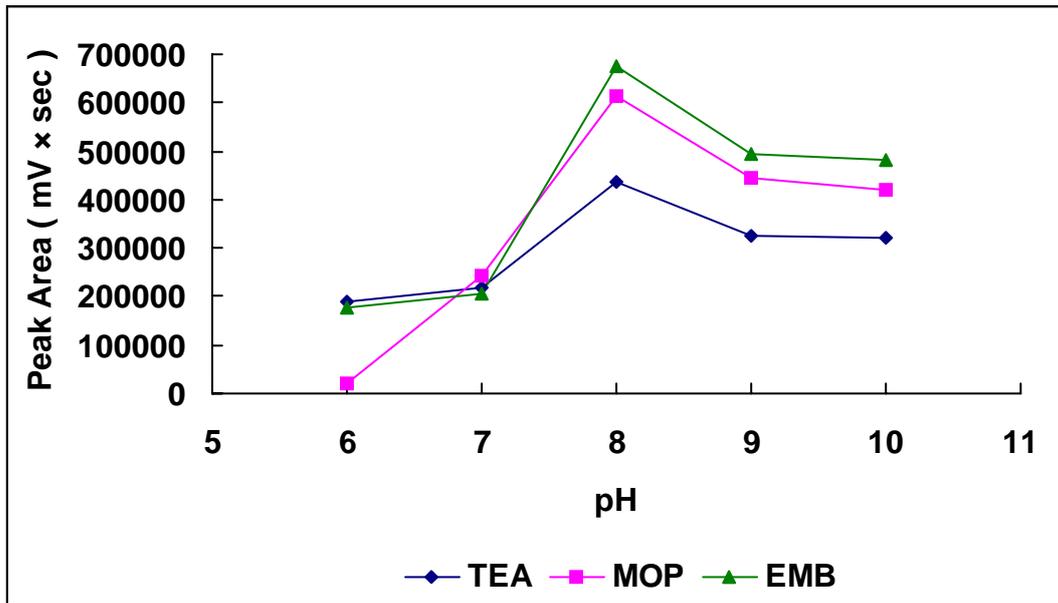
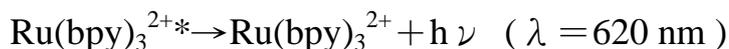
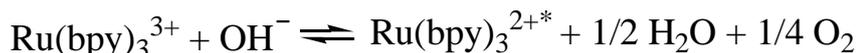


圖 3-13 偵測端緩衝溶液 pH 值對分析物與內標準物面積的影響

實驗條件：樣品：TEA ($5 \mu\text{M}$)；MOP ($50 \mu\text{M}$)；EMB ($50 \mu\text{M}$)
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉 (pH 10)
 陰極緩衝溶液：300 mM 磷酸鈉 (pH 6~10) + 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 ITO 電極電位：1.4 V
 其他條件同圖 3-9



電極表面產生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 部分與溶液中的 OH^- 反應，ECL背景隨pH增加而升高，能與分析物反應的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 百分比減少，使得內標準物與分析物的訊號面積隨pH的升高而降低。PH 8 顯然為最佳偵測端緩衝溶液pH值。

5. 毛細管末端與 ITO 電極表面距離的影響

本研究使用的ECL偵測槽電極配置為wall-jet形式，電泳溶液及分析物以噴射狀由毛細管末端垂直接觸ITO電極表面(見圖 2-3)。當所有條件固定，毛細管末端與ITO電極表面的垂直距離會影響分析物本身的氧化，及與電極表面氧化產生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 反應程度，進而導致ECL訊號強度的改變。

實驗中以x-y-z微調平台控制毛細管末端與ITO電極的垂直距離，觀察其對ECL放光強度的影響，結果顯示於圖 3-14。圖中橫軸 0 mm代表毛細管末端稍微接觸電極表面。由圖 3-14 發現，當兩者間距離大於 0.25 mm時訊號強度急遽下降，這是因為分析物流出毛細管後擴散於溶液中，未能立即在電極表面氧化並與電極表面產生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行ECL反應，因此訊號強度下降。基於偵測感度的考量，以毛細管末端稍微接觸ITO電極表面，即兩者間的垂直距離 0 mm為

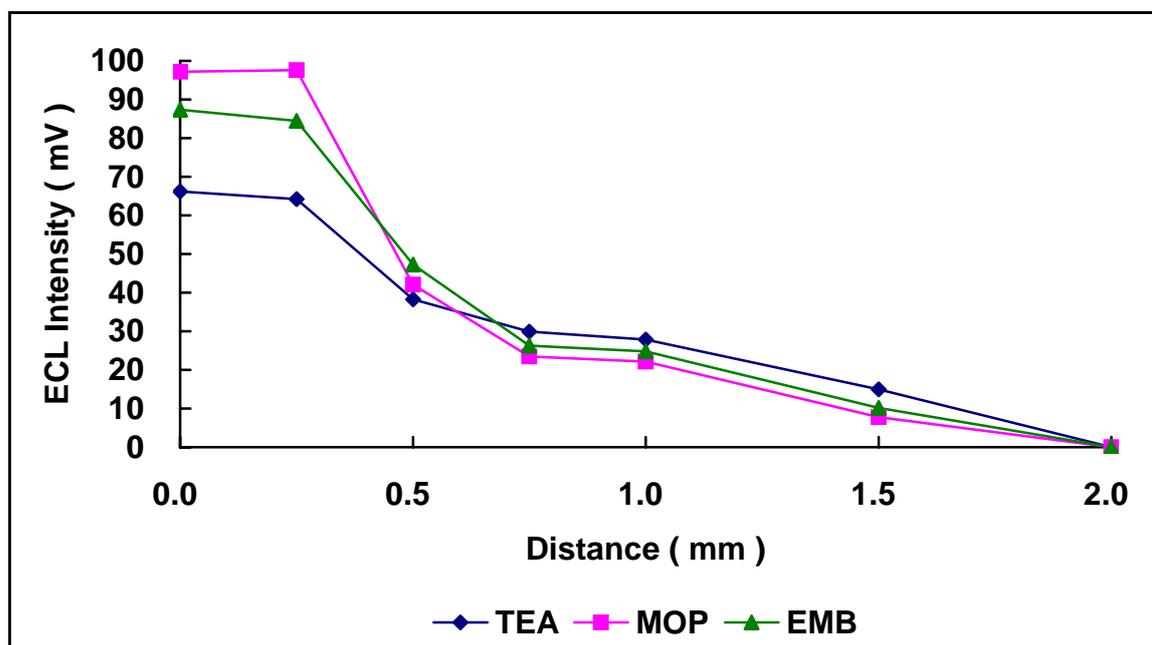


圖 3-14 毛細管末端與電極表面垂直距離對 ECL 強度的影響

實驗條件：樣品：TEA ($5 \mu\text{M}$)；MOP ($50 \mu\text{M}$)；EMB ($50 \mu\text{M}$)
 fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55cm
 陽極緩衝溶液： 20mM 磷酸鈉 (pH 10)
 陰極緩衝溶液： 300mM 磷酸鈉 (pH 8) + 3.5mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 電泳電壓： 9kV
 進樣方式：重力進樣， 15cm ， 15sec
 ITO 電位： 1.4V
 PMT 電位： 960V

最佳條件。

6. 分析物進樣時間的影響

在 CE 的分析中，進樣時間會影響分析物進樣絕對量。進樣時間越長，分析物進入毛細管的量也越多，可提高偵測訊號強度。但進樣過多時，則會造成理論板數與解析度的下降。利用重力注射，於高度 15 cm 處，針對分析物進樣的時間對 ECL 訊號強度與理論板數的影響進行探討，結果顯示於圖 3-15。當進樣時間越長，分析物的訊號高度會增加，但相對的，理論板數也隨進樣的時間增加而下降。圖 3-15 顯示，在訊號高度與理論板數變化曲線之交點處約 20 秒進樣時間應有最佳效果，但實際上，進樣 20 秒會使 MOP 與內標準物 TEA 的訊號部份重疊，造成定量上的困難，因此選擇進樣 15 秒為重力進樣的最佳時間。

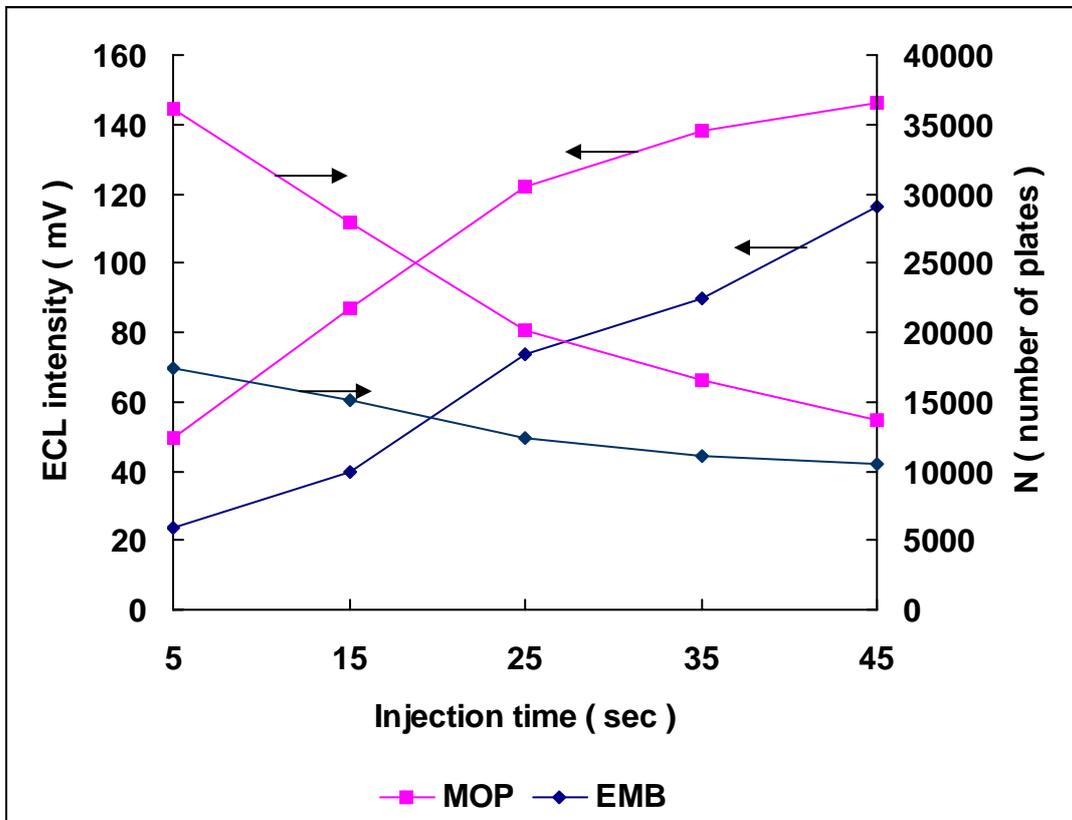


圖 3-15 重力進樣時間對訊號高度及理論板數的影響

實驗條件：樣品：TEA ($5 \mu\text{M}$)；MOP ($50 \mu\text{M}$)；EMB ($50 \mu\text{M}$)
 進樣方式：重力進樣，15 cm，5~45 sec
 其他實驗條件同圖 3-14

三、最佳分析條件

綜合以上實驗結果，歸納出最佳CE分離條件為：毛細管內徑 52 μm 、外徑 366 μm 、管長 55 cm，分離電壓 9 kV，進樣端電泳緩衝溶液為 20 mM磷酸鈉(pH 10)；最佳ECL偵測條件為：ITO電極電位 1.4 V，偵測端緩衝溶液為 300 mM磷酸鈉(pH 8)其中含 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，毛細管末端稍微接觸ITO電極(即兩者間垂直距離為 0 mm)；進樣高度 15 cm，時間 15 秒，PMT電位 960 V。

最佳條件下 MOP 與 EMB 的電泳圖顯示於圖 3-16。圖中可清楚看到內標準物與分析物的訊號完全分離，未受到電泳高電壓干擾。利用 ECL 偵測方式，TEA 與 EMB 不需衍生即可分析，大幅縮短實驗的時間，加上偵測裝置簡單，為二級與三級胺類藥物分析提供了一種快速且方便的偵測方法。

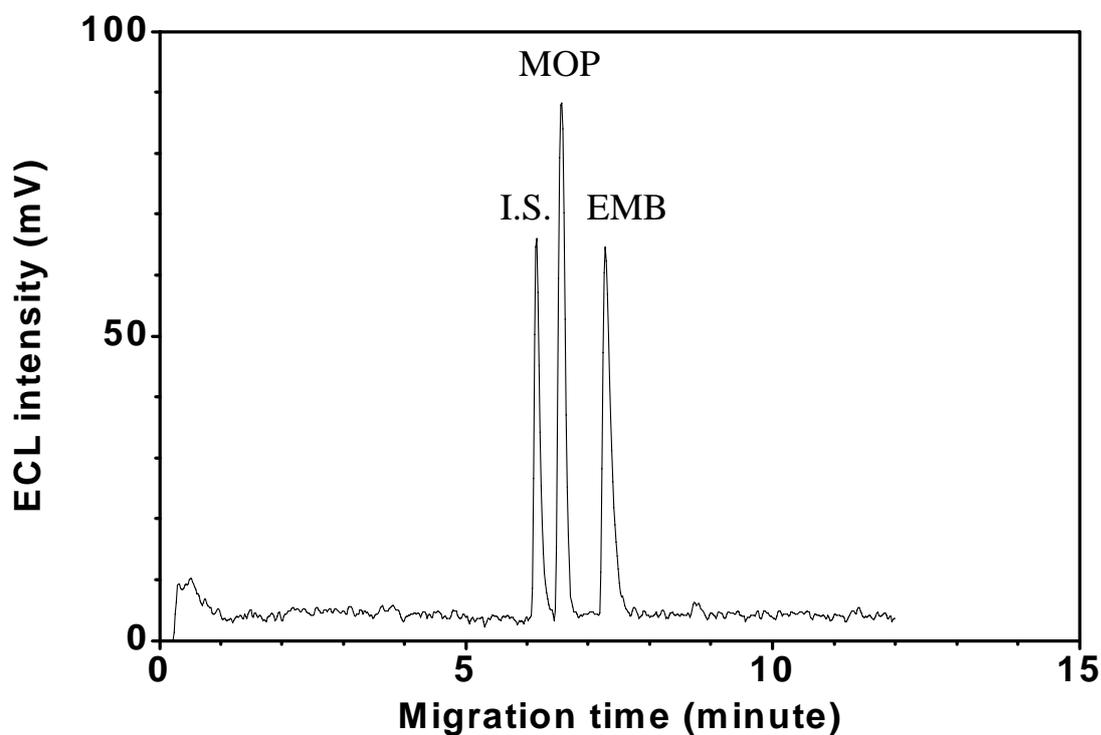


圖 3-16 最佳分析條件下 MOP 與 EMB 的電泳分離圖

實驗條件：樣品：I.S.=TEA ($5 \mu\text{M}$)；MOP ($50 \mu\text{M}$)；EMB ($50 \mu\text{M}$)

fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55cm

陽極緩衝溶液： 20mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 10$)

陰極緩衝溶液： 300mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 8$) + 3.5mM
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

電泳電壓： 9kV

進樣方式：重力進樣， 15cm ， 15sec

ITO 電位： 1.4V

PMT 電位： 960V

四、檢量線與分析再現性

1. 檢量線的製作

於最佳條件下進行檢量線製作，分別取添加 5 種不同濃度分析物及內標準物 $5 \mu\text{M}$ TEA 的樣品溶液，以重力進樣(15 cm 高度，15 秒)方式將樣品溶液注入毛細管中，表 3-1 列出分析物在 $\text{CE} / \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 最佳條件下所得的檢量線及相關係數。MOP 與 EMB 檢量線濃度範圍分別為 $3 \sim 20 \mu\text{M}$ 與 $6 \sim 40 \mu\text{M}$ ，線性相關係數(R^2)都在 0.997 以上。以訊號/雜訊(S/N)比值為 3 時作為偵測極限的判定標準，兩分析物偵測極限亦列於表 3-1。MOP 的偵測極限為 $2 \mu\text{M}$ ，EMB 的偵測極限為 $4 \mu\text{M}$ 。

2. 分析再現性

為探討分析方法的再現性，在最佳實驗條件下，配製 $7 \mu\text{M}$ MOP、 $10 \mu\text{M}$ EMB 與內標準物 TEA $5 \mu\text{M}$ 於 20mM 磷酸鈉(pH 10.0)緩衝溶液中，以 15 cm 高度及進樣時間 15 秒將樣品溶液注入毛細管中，重複 CE / ECL 偵測分析七次，計算分析方法的再現性，列於表 3-2。MOP 與 EMB 遷移時間相對標準偏差分別為 1.83 % 與 2.25 %，經內標準物校正後相對標準偏差可降至 0.24 % 與 0.70 %。MOP 與 EMB 訊號面積相對標準偏差分別為 7.78 % 與 14.06 %，以內標準物

表 3-1 MOP與EMB的檢量線及偵測極限^a

分析物	濃度範圍 (μM)	檢量線($n=5$) ^b	相關係數 (R^2)	偵測極限 (μM)
MOP	3~20	$y=0.0267x+0.0238$	0.997	2
EMB	6~40	$y=0.0291x-0.0633$	0.998	4

a：實驗在CE / Ru(bpy)₃²⁺ ECL系統最佳條件下進行

b：以分析物與內標準物(TEA)訊號面積比值對分析物濃度作圖

表 3-2 水溶液樣品中MOP與EMB的分析再現性^a

分析物	遷移時間	以內標準物校	訊號面積	以內標準物校
	相對標準偏差 (%) ^b	正後相對標準 偏差(%)	相對標準偏差 (%) ^b	正後相對標準 偏差(%)
MOP	1.83	0.24	7.78	5.44
EMB	2.25	0.70	14.06	8.15

a：MOP $7\mu\text{M}$ ，EMB $10\mu\text{M}$

b：七次實驗之相對標準偏差

校正後可將標準偏差值降為 5.44 % 與 8.15 %。分析物經內標準物校正後的遷移時間與訊號面積相對標準偏差皆小於未經內標準物校正的值，顯示以內標準物校正可提高分析結果的再現性。

五、偵測靈敏度的提升

由於上述MOP與EMB的偵測極限僅為 $2\ \mu\text{M}$ 與 $4\ \mu\text{M}$ ，與文獻報導兩藥物在人體血漿中藥物動力濃度範圍 $0.1\ \mu\text{M}\sim 1\ \mu\text{M}$ (MOP)^[68] 與 $2\ \mu\text{M}\sim 10\ \mu\text{M}$ (EMB)^[79] 尚有一段差距，顯示本方法的實用性不高。

為提升靈敏度，降低偵測極限，研究嘗試以線上堆積方法提高毛細管內分析物濃度。一般CE中常用的樣品堆積方式包括清掃堆積 (sweeping)^[105-107]、氬甲烷堆積^[108-111] 與高場堆積^[112-122]。

清掃堆積 (sweeping) 是膠束電動層析 (MEKC) 中使用的堆積模式。緩衝溶液中添加高濃度界面活性劑，將分析物溶於導電度與緩衝溶液相同的溶液(但不含界面活性劑)，利用重力進樣方式使大體積樣品溶液進入毛細管內。在外加電壓下，分析物會堆積在樣品溶液與緩衝溶液交界區域而達濃縮目的。清掃堆積需使用含高濃度界面活性劑的電泳緩衝溶液，但根據文獻報導，界面活性劑(如：cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 與 sodium dodecyl sulfate (SDS)) 的存在會鈍化工作電極，降低ECL的放光效率^[56]，此種堆積方式不適用於ECL偵測。

氬甲烷堆積是一種操作簡單的堆積方法，僅需將樣品溶液與氬甲烷事先以適當比例混合，利用重力進樣方式將大體積樣品溶液注入毛

細管內(甚至佔毛細管體積 50 % 量)，在外加電壓下可產生濃縮效果 [109]，但此種堆積機制至今無較明確的解釋。使用氬甲烷堆積需進樣大體積樣品溶液至毛細管內，大量的樣品基質進入毛細管內，到達偵測端時可能污染ITO電極，導致偵測感度的降低，特別是血漿樣品的污染情況會更嚴重，此種堆積方式亦不適用於ECL偵測。

高場堆積是將分析物以水或稀釋的緩衝溶液配製成樣品，分析時可得到較尖銳的訊號峰。以水或稀釋的緩衝溶液配製的樣品溶液離子強度較低，在外加電壓下電場強度較高，分析物離子於此區域移動速率較快，當離子到達濃度較高的緩衝溶液區時，速度減慢，因此堆積在高濃度與低濃度緩衝溶液的交界區域。依進樣方式不同區分，高場堆積可分為大體積堆積(重力進樣)與場放大堆積(電動進樣)。

大體積堆積是以重力進樣使毛細管充滿樣品溶液，再利用偵測端緩衝溶液將樣品區段大部分溶劑推出毛細管外，分析物堆積在緩衝溶液與樣品溶液的交界區域。因需利用偵測端緩衝溶液將樣品區段溶劑推出毛細管外，此方法會造成ECL放光試劑的損失，加上此種堆積模式操作不便，需改變施加電壓的極性，或於低pH值緩衝溶液中添加陽離子界面活性劑(如：CTAB)^[123]抑制電滲流的速度，因此亦不適合ECL偵測。

場放大堆積方法操作簡單，將樣品配製於水或稀釋的緩衝溶液

中，以電動進樣使分析物進到毛細管內，分析物因於濃度較高的電泳緩衝溶液中移動速度較慢而堆積於毛細管進樣端，藉由電場極性的改變可同時堆積陽離子與陰離子分析物。電流通過管柱所產生的焦耳熱、樣品溶液與電泳緩衝溶液濃度不同造成的電滲流線性流速改變與樣品溶液中其他離子的存在，皆會使堆積效果受到影響^[114]。生化樣品中通常含有高濃度的鹽類，鹽類的存在亦會使得堆積效果降低^[121]。由於此種堆積模式操作簡便，且無其他堆積方式適用於ECL偵測，本研究嘗試採用此種堆積模式提高ECL偵測靈敏度。

初步實驗將 MOP 與 EMB 分別配製於去離子水及 1~20 mM 磷酸鈉緩衝溶液(pH 10)中，以電動進樣方式將樣品注入毛細管，比較樣品溶液中緩衝溶液濃度不同造成分析物訊號面積的差異，結果顯示於圖 3-17。電動進樣時，低濃度緩衝溶液的離子強度較低，外加高電壓作用下，可產生一個電場強度較強的區域，分析物在此區域的移動速率較大。在固定進樣電壓與進樣時間下，進樣量會因分析物的移動速率增加而增多。當樣品溶液與電泳緩衝溶液濃度差異越大時，分析物進樣量的增加越明顯，因此將分析物直接配製於去離子水中的堆積效果最為顯著。圖 3-17 中因分析物直接配製於去離子水([磷酸鈉]=0 mM)所得的訊號面積過大，而未列入圖中。

由實驗結果可知，分析物配製於濃度愈稀的緩衝溶液中，產生的

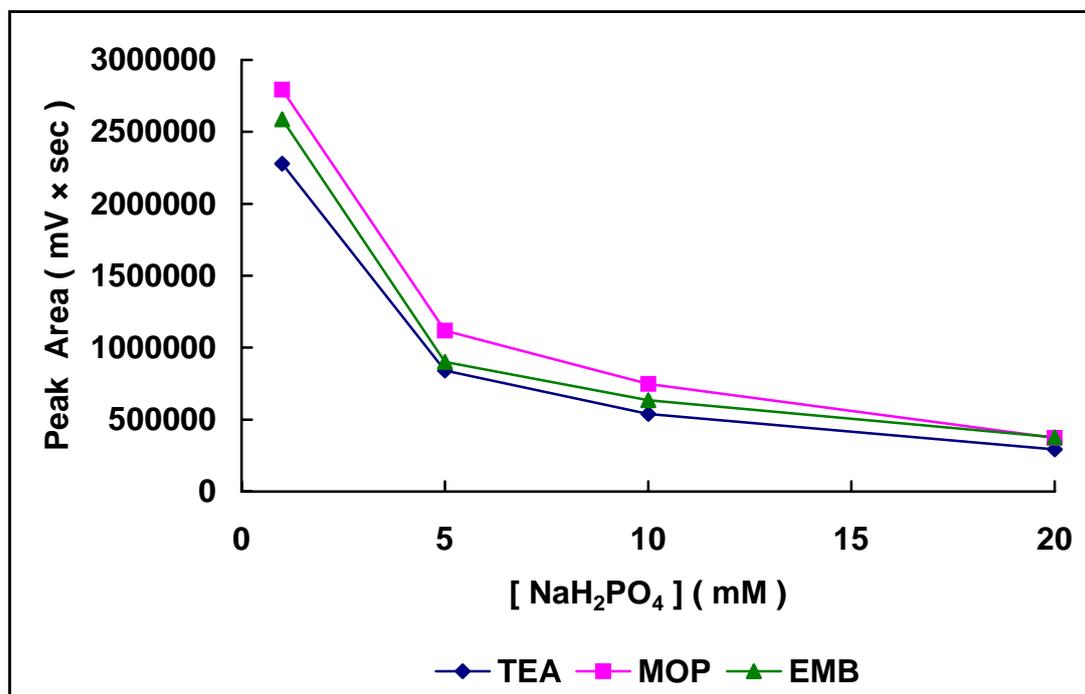


圖 3-17 樣品溶液中緩衝溶液濃度對訊號面積的影響

實驗條件：樣品：TEA (5 μ M)；MOP (50 μ M)；EMB (50 μ M)
 fused silica 毛細管：52 μ m I.D. \times 366 μ m O.D. \times 55 cm
 陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉(pH 10)
 陰極緩衝溶液：300 mM 磷酸鈉(pH 8) + 3.5 mM
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$
 電泳電壓：9 kV
 進樣方式：電動進樣，9 kV，3.3 sec
 ITO 電位：1.4 V
 PMT 電位：960 V

場放大效果愈顯著。在固定進樣電壓與進樣時間下，以分析物配製於與高壓端電泳緩衝溶液（[磷酸鈉]=20 mM）相同濃度的緩衝溶液所得訊號面積為基準，分析物配製於 1 mM 磷酸鈉緩衝溶液中的濃縮倍率為 6~8 倍，而配製於去離子水中（[磷酸鈉]=0 mM）所得的濃縮倍率為 35~80 倍。除了配製分析物的緩衝溶液濃度會影響堆積效果外，電壓進樣時間多寡亦會影響堆積效果。為求最佳堆積效果，固定進樣電壓為 9 kV，將分析物配製於去離子水中，針對分析物進樣時間對 ECL 訊號強度與理論板數的影響探討，結果顯示於圖 3-18。圖中可發現，分析物的訊號高度隨進樣時間增加而增加，但相對的，理論板數隨進樣的時間增加而下降。圖 3-18 顯示，在訊號高度與理論板數變化曲線的交點處約 17 秒進樣時間應有最佳效果，但實際進樣 17 秒時，發現 MOP 與內標準物 TEA 的訊號部份重疊，使得定量上有困難，因此選擇 15 秒為最佳的進樣時間。

分別取添加 5 種不同濃度分析物及內標準物 0.02 μ M TEA 樣品溶液（配製於去離子水中），以電動進樣（電壓 9 kV，時間 15 秒）方式將樣品溶液注入毛細管中，表 3-3 列出分析物在 CE / Ru(bpy)₃²⁺ ECL 最佳條件下所得的檢量線及相關係數。在 7.5 nM~100 nM 濃度範圍間兩分析物的線性相關係數都在 0.993 以上。分析物配製於去離子水（pH≐6~7）時，兩種分析物皆因質子化而帶正電荷，EMB 的 pKa

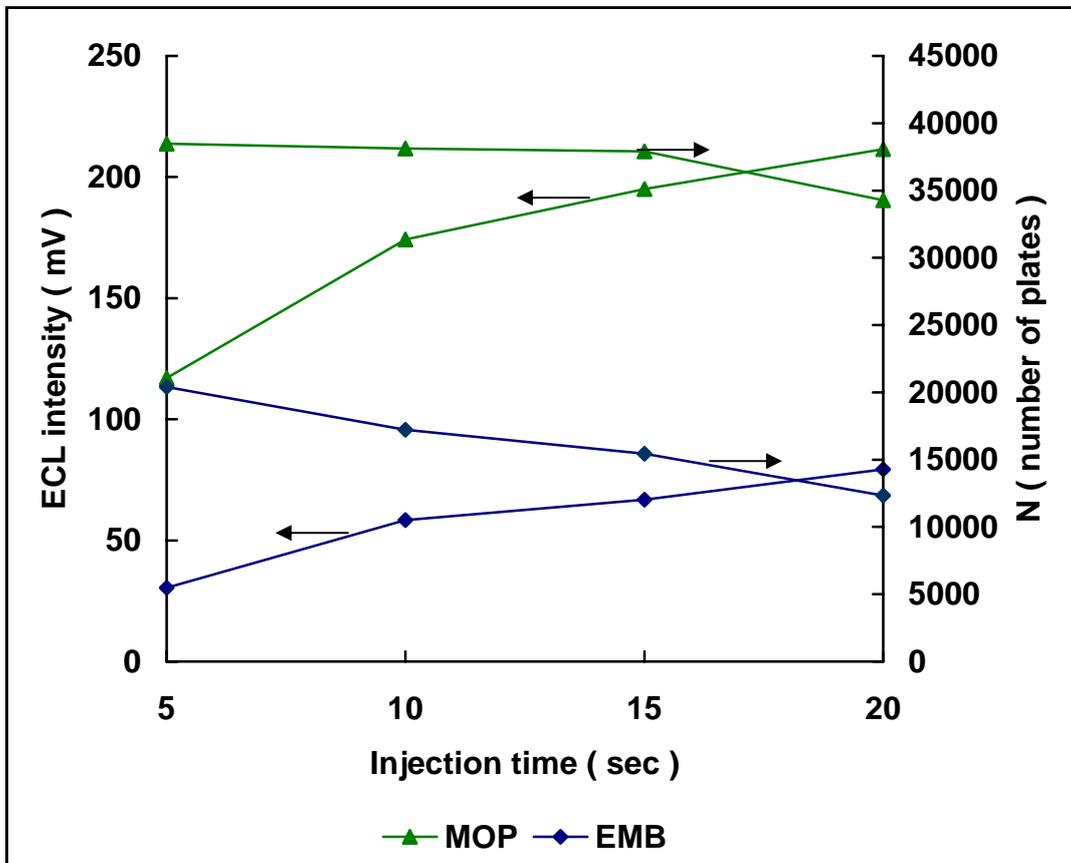


圖 3-18 電動進樣時間對訊號高度及理論板數的影響

實驗條件：樣品：TEA ($0.02 \mu\text{M}$)；MOP ($0.5 \mu\text{M}$)；EMB ($0.5 \mu\text{M}$)

進樣方式：電動進樣，9 kV，5~20 sec

其他實驗條件同圖 3-17

表 3-3 MOP與EMB經場放大堆積後的檢量線及偵測極限^a

分析物	濃度範圍 (nM)	檢量線 (n=5) ^b	相關係數 (R ²)	偵測極限 (nM)
MOP	7.5~100	$y=3.04x + 3.11 \times 10^{-3}$	0.993	5
EMB	7.5~100	$y=5.46x + 2.12 \times 10^{-3}$	0.994	5

a：分析物配製於去離子水中([磷酸鈉]=0 mM)；電動進樣，9 kV，15 sec；其他實驗條件如圖 3-17 所示

b：以分析物與內標準物(TEA)訊號面積比值對分析物濃度作圖

值為 6.3 及 9.6，大部分以帶一個正電荷以上的形式存在，MOP 的 pKa 值為 10.17，大部分以帶一個正電荷的形式存在。外加正電壓，相同注射時間下，移動速率較快的離子進樣量較多，而移動速率與離子的帶電量成正比，因此帶一個正電荷以上的 EMB 進到毛細管內的量比僅帶一個正電荷的 MOP 多，其檢量線斜率(或靈敏度)也較高。以訊號/雜訊(S/N)比值為 3 作為偵測極限的判定標準，兩分析物在純水中的偵測極限亦列於表 3-3 中。純水中 MOP 與 EMB 的偵測極限皆為 5 nM，電泳圖顯示於圖 3-19。由實驗結果可知，利用場放大堆積方式，對於靈敏度的提升有顯著的效果，分析物 MOP 與 EMB 在水溶液樣品中的偵測極限可由原本 2 μ M 與 4 μ M 降至 5 nM。

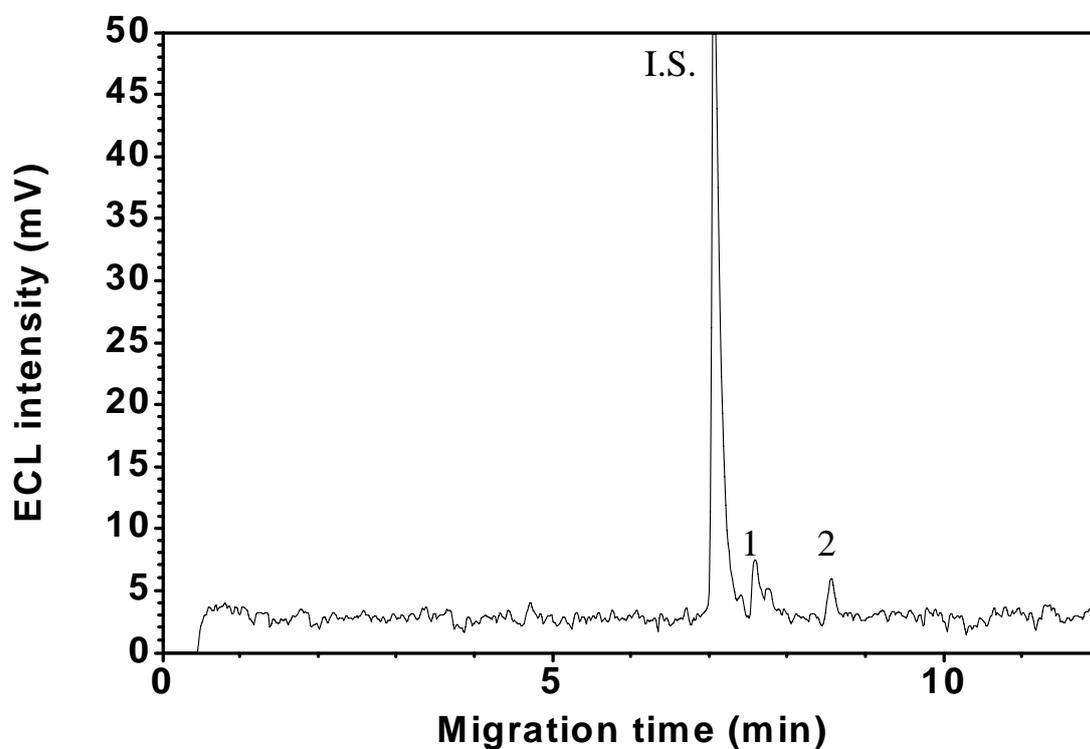


圖 3-19 純水樣品中低濃度 MOP 與 EMB 電泳圖

訊號峰標示：I.S.=TEA ($0.02 \mu\text{M}$)；1=MOP (5 nM)；2=EMB (5 nM)

實驗條件：fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55 cm

陽極緩衝溶液： 20 mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 10$)

陰極緩衝溶液： 300 mM 磷酸鈉 ($\text{pH } 8$) + 3.5 mM
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

電泳電壓： 9 kV

進樣方式：電動進樣， 9 kV ， 15 sec

ITO 電位： 1.4 V

PMT 電位： 960 V

六、血漿樣品分析

為評估 $\text{CE} / \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 偵測方法的實用性，嘗試進行血漿樣品分析，實驗用血漿由本人與實驗室成員貢獻。血漿樣品前處理已於實驗部分詳述。

人體的血液成分約有 55 % 的血漿，45 % 的血球蛋白，而血漿則是由 90 % 的水與 10 % 化學物質組成。所謂的化學物質其組成複雜，包含蛋白質、鹽類、脂肪、醣類、維生素、酵素、激素及代謝物等^[124]。因血漿樣品基質複雜，分析血漿時需經前處理將複雜的基質除去以降低干擾。

本實驗先利用氫甲烷沈澱血漿中的蛋白質大分子，再藉離心取得血漿澄清液。經氫甲烷去除蛋白質後的血漿樣品電泳圖顯示於圖 3-20。圖(A)為空白血漿電泳圖，圖(B)為添加 $10 \mu\text{M}$ MOP、 $10 \mu\text{M}$ EMB 及 $5 \mu\text{M}$ 內標準物 TEA 的血漿電泳圖。比較兩圖可發現，分析物的訊號未與血漿的基質訊號重疊，血漿複雜基質的 ECL 訊號集中在 20 分鐘左右。

為探討血漿基質對 ITO 電極可能的損害，固定實驗條件，每 30 分鐘進樣血漿一次，於第二次進樣時即發現分析物的偵測受到嚴重干擾，無法分辨分析物訊號出現位置，如圖 3-21 所示。造成 ITO 電極偵測受干擾的原因可能是血漿基質殘留於電極表面所致。由於血漿複

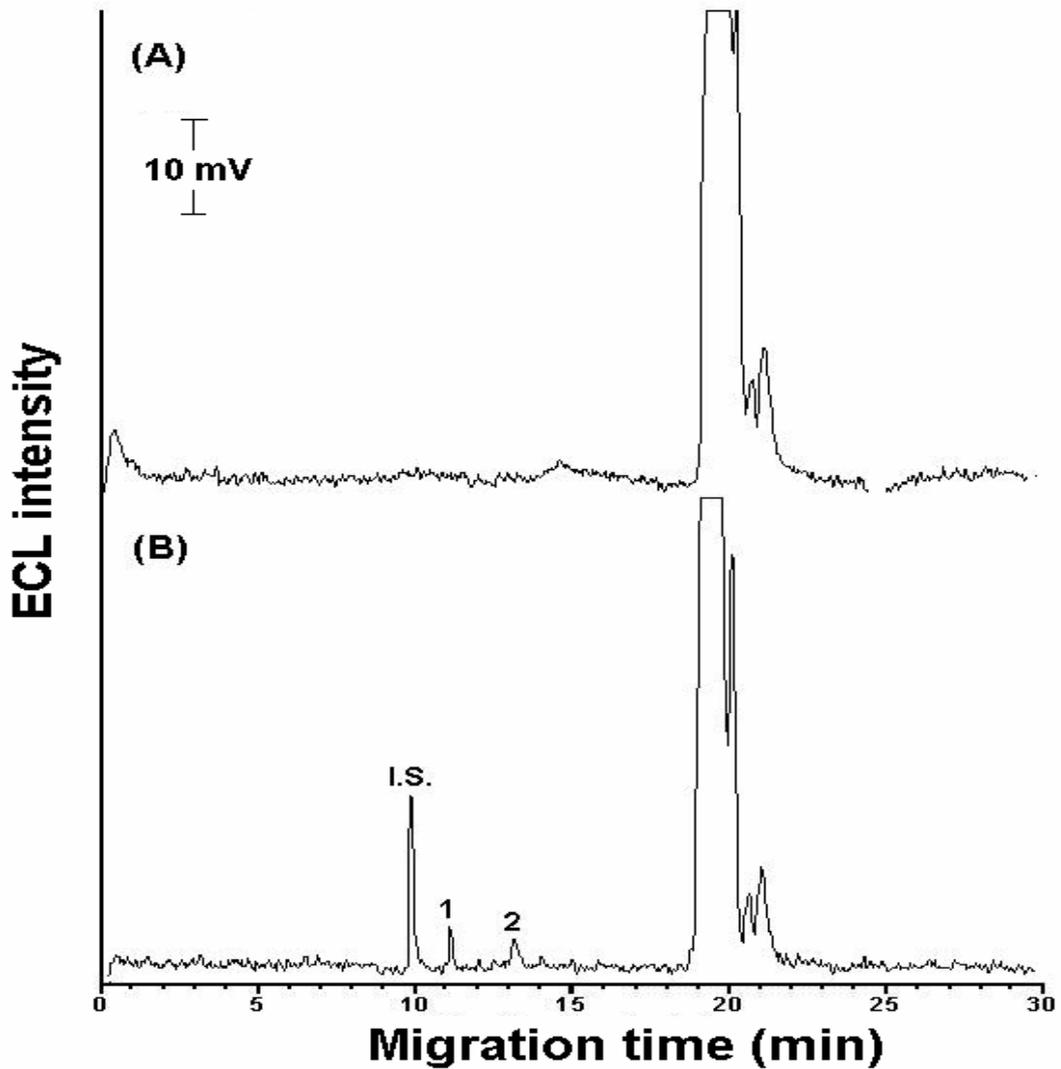


圖 3-20 經氬甲烷處理的血漿電泳圖

(A) Blank

(B) I.S. = TEA ($5 \mu\text{M}$) ; 1 = MOP ($10 \mu\text{M}$) ; 2 = EMB ($10 \mu\text{M}$)

實驗條件：fused silica 毛細管： $52 \mu\text{m}$ I.D. \times $366 \mu\text{m}$ O.D. \times 55cm

陽極緩衝溶液： 20mM 磷酸鈉 (pH 10)

陰極緩衝溶液： 300mM 磷酸鈉 (pH 8) + 3.5mM

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

電泳電壓： 9kV

進樣方式：重力進樣， 15cm ， 15sec

ITO 電位： 1.4V

PMT 電位： 960V

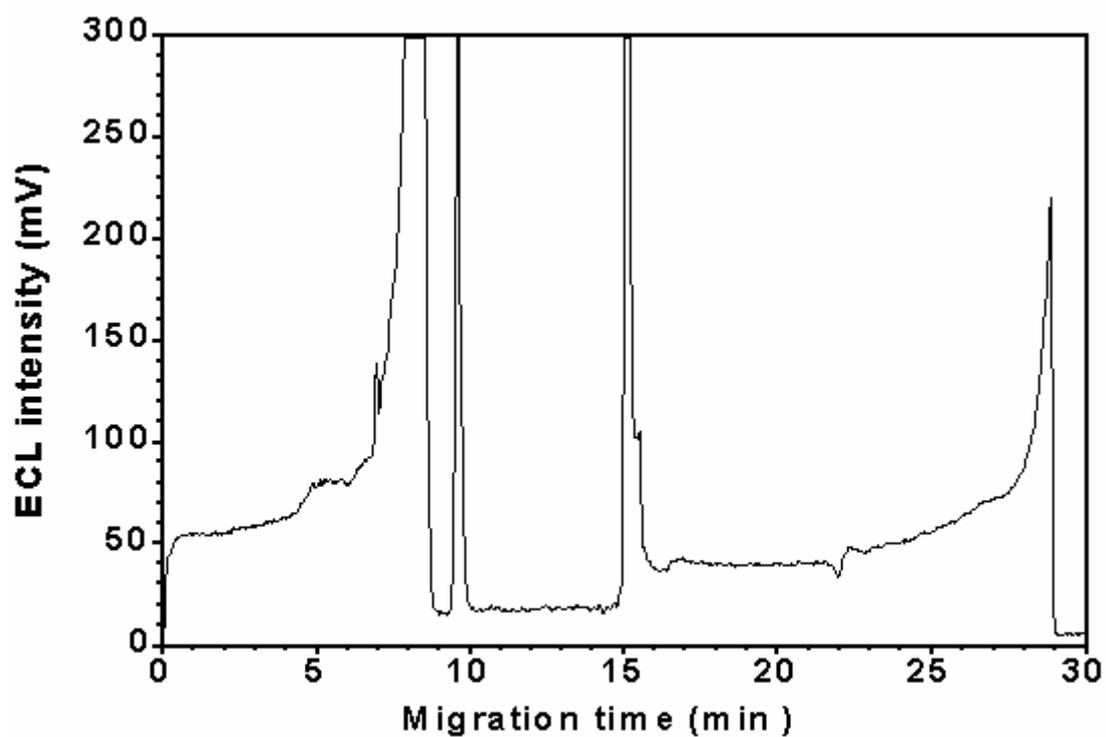


圖 3-21 血漿基質對 ITO 電極的干擾

實驗條件：樣品：I.S.=TEA ($5 \mu\text{M}$) ; MOP ($10 \mu\text{M}$) ; EMB ($10 \mu\text{M}$)

其他實驗條件同圖 3-20

雜基質的 ECL 訊號集中在 20 分鐘左右，本研究嘗試於電泳進行 15 分鐘(EMB 訊號出現後，血漿基質訊號出現前)即停止高電壓供應，藉由 x-y-z 微調平台將毛細管末端提高至距離 ITO 電極約 2 mm 處，以高壓端緩衝溶液將剩餘的血漿基質推出毛細管後再調整毛細管末端回距離 ITO 電極 0 mm 處，此時恢復高電壓供應，待光背景穩定後才再度進樣。改用此操作方式後血漿樣品電泳圖與圖 3-20 (B)相似，由於血漿基質不直接接觸 ITO 電極表面，因此干擾情況可獲得改善。此操作需調整毛細管末端與 ITO 電極間的距離，當毛細管末端重新接觸 ITO 電極時，接觸位置可能偏移，會造成偵測的再現性與感度有差異。此外，x-y-z 微調平台與 PMT 同位於黑色壓克力箱內，欲調整毛細管末端位置，則需先將 PMT 關閉，待恢復高電壓供應後再將 PMT 開啟，重複的開關動作可能會對 PMT 造成損傷，因此研究嘗試其他方式改善干擾情形。實驗發現，將進樣間隔調整為每 60 分鐘進樣一次，則可得到與圖 3-20 (B)相似的電泳圖，干擾情況亦可獲得改善，分析物訊號可清楚分辨。推測改善的原因是由於緩衝溶液在兩次注射間連續不斷沖洗 ITO 電極表面，可將部分覆蓋在電極表面的血漿基質移除，恢復電極原先的靈敏度。後續實驗採用進樣相隔 60 分鐘以減少血漿基質對 ITO 電極偵測的干擾。

為了解血液的來源不同是否有不同干擾，抽取實驗室內四位同學

的血液，經相同樣品前處理與分析步驟，結果分別顯示於於圖 3-22 (A)、(B)、(C)及(D)。比較四個電泳圖，所有血漿樣品的基質似乎無明顯的差異。

分析血漿樣品時，原本採用重力進樣方式，但當MOP濃度低於 $5\ \mu\text{M}$ 與EMB濃度低於 $10\ \mu\text{M}$ 即無偵測訊號。根據文獻報導，若在血漿樣品中添加氬甲烷，加上血漿本身含有約 $150\ \text{mM}$ 的NaCl^[111]，可使分析物堆積而濃縮，提升靈敏度。雖然我們注射的血漿樣品因去除蛋白質前處理已含有約 50% 的氬甲烷，但實驗結果顯示堆積作用不顯著，原因可能是添加氬甲烷堆積樣品通常需進樣 50% 以上毛細管體積的量方有最佳堆積效果^[109]，而我們注射的樣品量只佔毛細管體積的 1.8% 左右。若進樣大量的血漿基質到達偵測端會污染ITO電極使其鈍化，嚴重干擾偵測感度，因此氬甲烷堆積法不適用於ECL偵測。前述分析水溶液樣品中MOP與EMB藉重力進樣的偵測極限只有 $2\ \mu\text{M}$ 與 $4\ \mu\text{M}$ ，本研究於氬甲烷處理血漿樣品前添加分析物，其濃度會因氬甲烷的添加而稀釋，導致偵測血漿中低濃度分析物有困難。

血漿中存在高濃度鹽類，在外加高電場下，離子於鹽類濃度較高的溶液中移動速率較慢，進入毛細管內的量較低濃度鹽類溶液中少，限制了分析物以電動方式的進樣量。但在前述提升靈敏度實驗中發

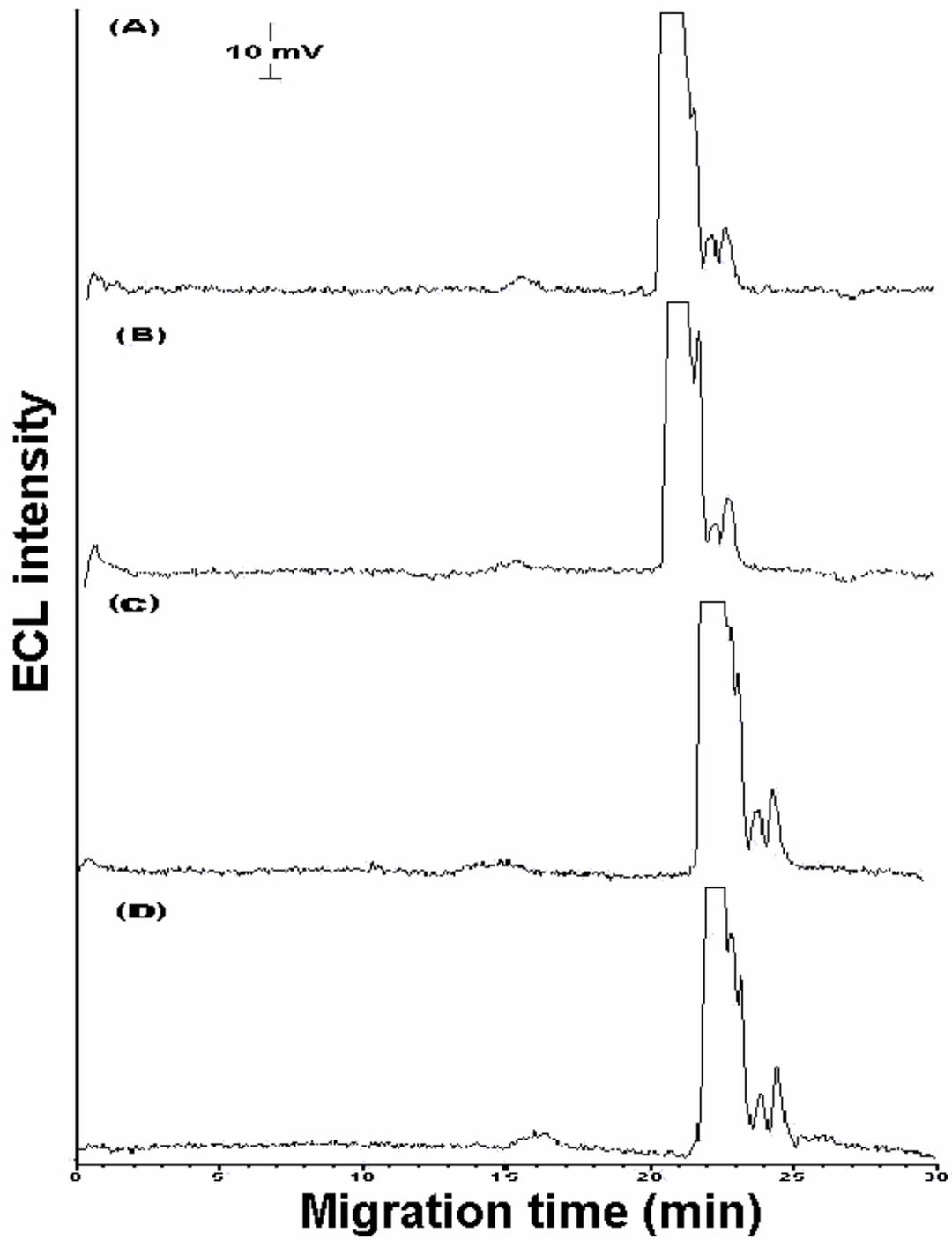


圖 3-22 不同血漿樣品的電泳圖

(A) 血漿樣品 A ; (B) 血漿樣品 B ; (C) 血漿樣品 C ; (D) 血漿樣品 D

其他實驗條件同圖 3-20

現，利用場放大樣品堆積，即將分析物直接配製於純水中，採電動進樣可大幅降低偵測極限，因此嘗試將血漿樣品經氫甲烷去除蛋白質處理後，以去離子水稀釋 10 倍再進行分析。血漿基質經去離子水稀釋 10 倍後對 ITO 電極的干擾降低，進樣間隔可縮短至 30 分鐘，重複注射所得電泳圖無太大的差異。但為防止血漿基質逐漸累積於 ECL 偵測槽內影響偵測，每進樣六次(間隔 3 小時左右)即更換 ECL 反應槽內緩衝溶液。去離子水稀釋 10 倍的血漿中 MOP 與 EMB 檢量線顯示於圖 3-23，MOP 與 EMB 檢量線濃度範圍均為 $5\ \mu\text{M}\sim 20\ \mu\text{M}$ (血漿中分析物原始濃度)，相關係數在 0.997 以上。此外，從圖 3-23 可發現，EMB 的截距值較大，推測可能是氫甲烷處理血漿並未能將干擾偵測的基質完全去除，因而使得 EMB 的檢量線截距較大。以訊號 / 雜訊 (S/N) 比值 3 所對應的分析物濃度定義為偵測極限，接近濃度偵測極限之電泳圖顯示於圖 3-24。去離子水稀釋 10 倍後血漿中 MOP 與 EMB 的濃度偵測極限均為 $4\ \mu\text{M}$ (血漿中分析物原始濃度)。

為探討前處理血漿樣品的回收率，取含有 $5\ \mu\text{M}$ TEA、 $20\ \mu\text{M}$ MOP 與 EMB 血漿樣品，經氫甲烷去除蛋白質後，以去離子水稀釋 10 倍後利用標準添加法定量血漿中分析物的濃度，重複上述實驗三次，結果列於表 3-4。由於分析物經氫甲烷去除蛋白質，濃度稀釋一倍，因此添加濃度以 $10\ \mu\text{M}$ 計算。MOP 與 EMB 的回收率分別為

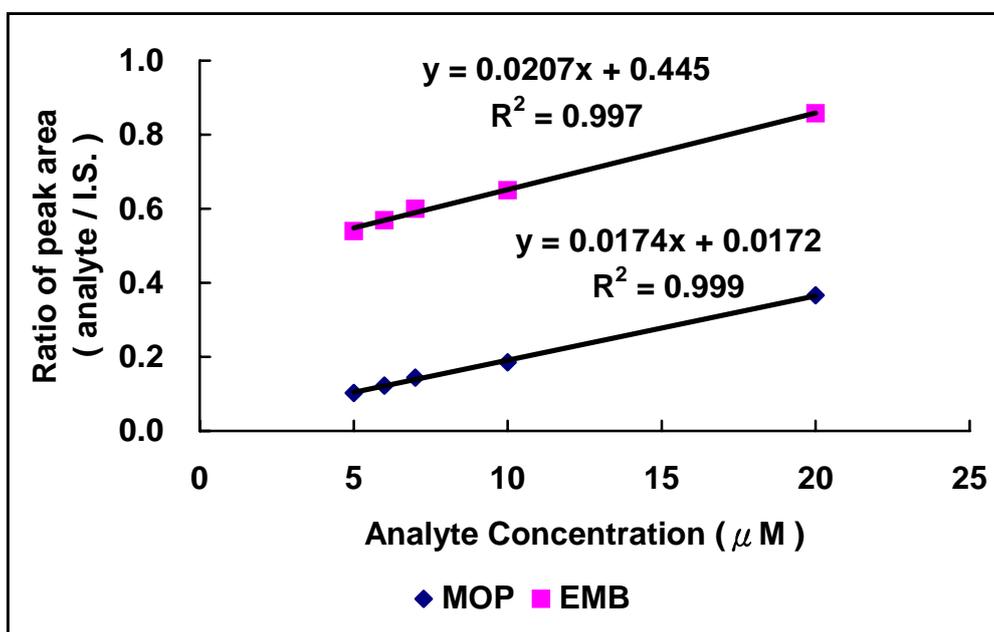


圖 3-23 經去離子水稀釋 10 倍的血漿中 MOP 與 EMB 檢量線

實驗條件：fused silica 毛細管：52 μm I.D. × 366 μm O.D. × 55 cm

陽極緩衝溶液：20 mM 磷酸鈉 (pH 10)

陰極緩衝溶液：300 mM 磷酸鈉 (pH 8) + 3.5 mM

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

電泳電壓：9 kV

進樣方式：電動進樣，9 kV，15 sec

ITO 電位：1.4 V

PMT 電位：960 V

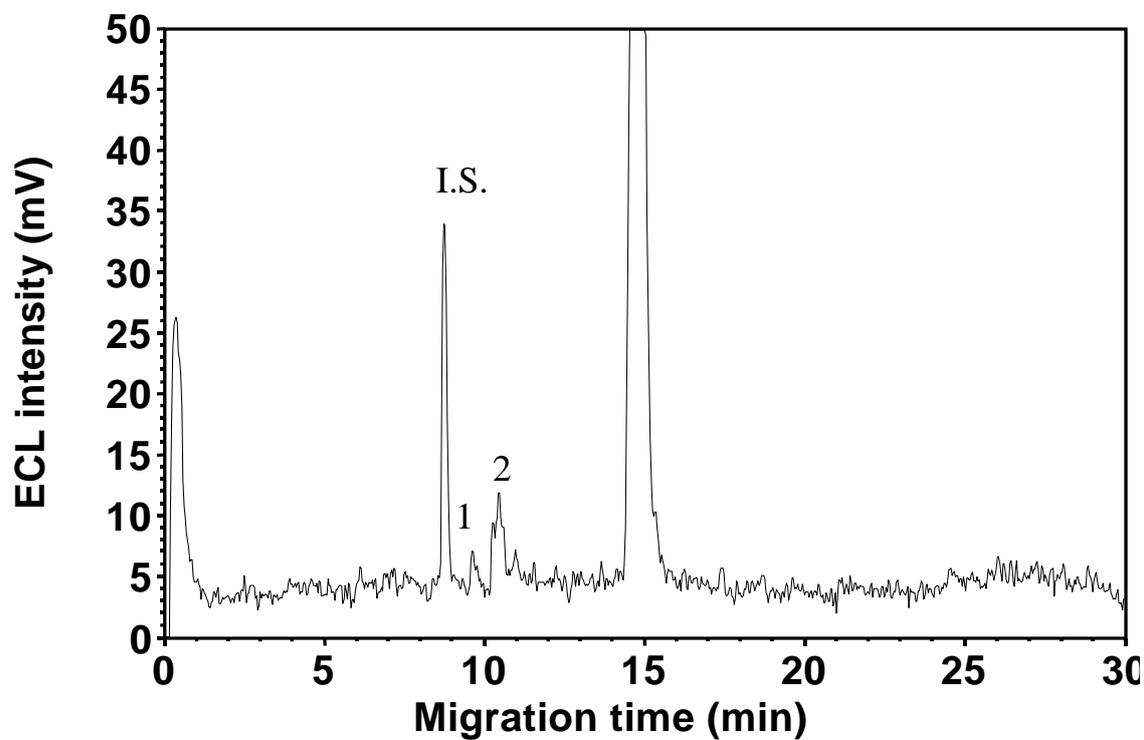


圖 3-24 血漿中低濃度 MOP 與 EMB 電泳圖

訊號峰標示：I.S. = TEA ($5 \mu\text{M}$)；1 = MOP ($4 \mu\text{M}$)；2 = EMB ($4 \mu\text{M}$)

其他實驗條件同圖 3-23

表 3-4 氰甲烷去除蛋白質處理血漿的回收率

Analyte	Added (μM)	Found (μM)	Recovery (%)	RSD (%)	n
MOP	10	9.56 \pm 0.75	95.6	7.8	3
EMB	10	9.75 \pm 0.59	97.5	6.0	3

其他實驗條件同圖 3-23

95.6 % 與 97.5 %，相對標準偏差(RSD)分別為 7.8 % 與 6.0 %。兩分析物回收率皆大於 95 %，顯示添加的兩種藥物絕大部分可自血漿基質中分離出來。

文獻報導以超過濾(ultrafiltration)方式亦可去除血漿中的蛋白質等大分子^[125]，本研究亦嘗試此種方式來淨化血漿樣品。超過濾為利用多孔性薄膜配合高速離心，將分子量低的分析物與蛋白質等大分子分離的一種樣品前處理技術，操作簡單且迅速，不需添加其他試劑，適合血漿樣品的前處理。實驗所用濾膜為 5000 NMWL的Ultrafree-MC超過濾薄膜匣。將 200 μ l血漿樣品(包含 185 μ l血漿和 15 μ l含有 TEA、MOP與EMB標準品水溶液)置入其中，經 8000 g離心 20 分鐘後，收集濾液進行實驗。

圖 3-25 顯示血漿經兩種不同樣品前處理方式後再經去離子水稀釋 10 倍所得空白電泳圖。比較兩圖，發現仍以氬甲烷前處理過的血漿電泳圖基質訊號較少。超過濾前處理後經去離子水稀釋 10 倍的血漿電泳圖顯示於圖 3-26，其中圖(A)為空白血漿電泳圖，圖(B)為添加 20 μ M MOP、20 μ M EMB 及 5 μ M 內標準物 TEA 的血漿電泳圖。比較兩圖可發現，經超過濾前處理，EMB 的訊號仍受到血漿基質的干擾，訊號峰重疊，定量會有困難。

MOP 在血漿樣品中經超過濾處理後配合場放大堆積(即以去離子

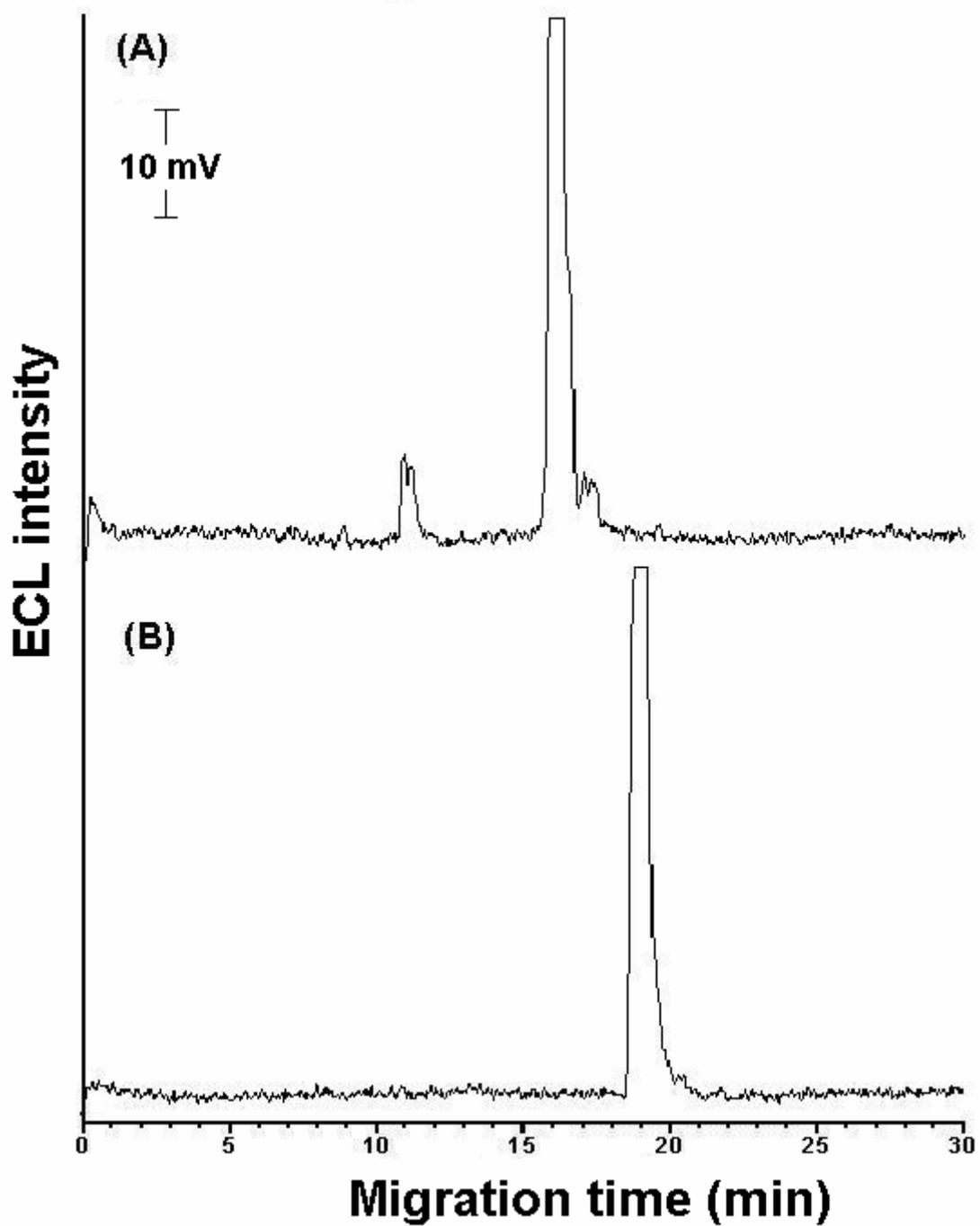


圖 3-25 超過濾與氘甲烷去除蛋白質處理的血漿分析比較

(A) 超過濾處理；(B) 氘甲烷處理

其他實驗條件同圖 3-23

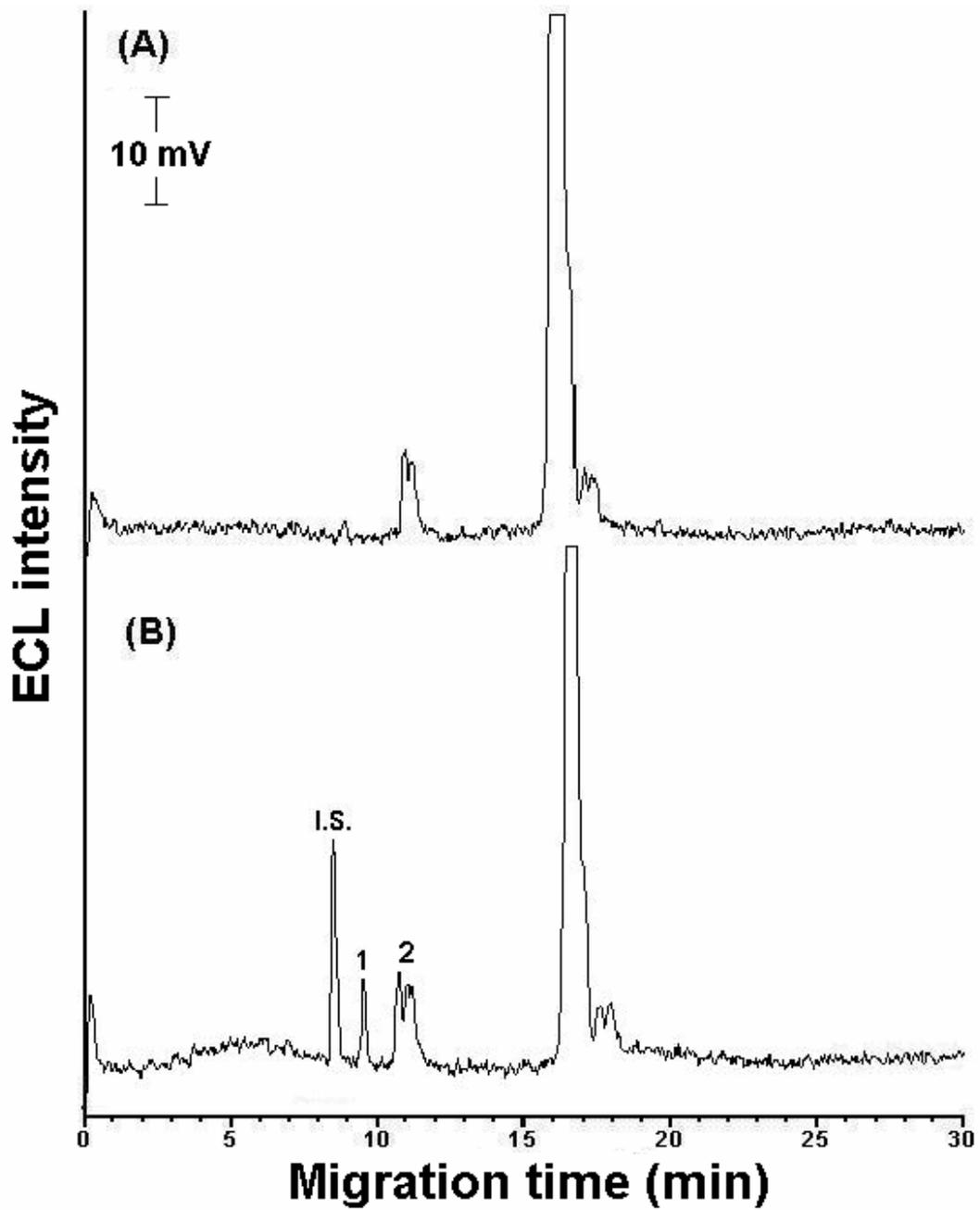


圖 3-26 超過濾處理的血漿電泳圖

(A) Blank

(B) I.S. = TEA ($5 \mu\text{M}$) ; 1 = MOP ($20 \mu\text{M}$) ; 2 = EMB ($20 \mu\text{M}$)

其他實驗條件同圖 3-23

水稀釋 10 倍)所得檢量線顯示於圖 3-27。MOP 的檢量線濃度範圍為 $6\ \mu\text{M}\sim 20\ \mu\text{M}$ (血漿中 MOP 原始濃度)，相關係數為 0.998。比較經氘甲烷與超過濾兩種去蛋白質處理後 MOP 檢量線圖(圖 3-23 與圖 3-27)，發現以氘甲烷前處理所得檢量線斜率較大，可能由於超過濾方式去除蛋白質效果較差，血漿中仍有其他基質存在而干擾偵測，使得經超過濾處理後所得檢量線斜率較小。以訊號 / 雜訊(S/N)比值為 3 時所對應的分析物濃度定義為偵測極限，血漿中 MOP 濃度偵測極限為 $5\ \mu\text{M}$ ，電泳圖顯示於圖 3-28。

由於 EMB 的訊號受到血漿基質訊號的重疊干擾，實驗僅針對 MOP 探討超過濾前處理方式回收率。取含有 $5\ \mu\text{M}$ TEA 與 $20\ \mu\text{M}$ MOP 血漿樣品，經超過濾去除蛋白質後，以去離子水稀釋 10 倍後利用標準添加法定量血漿中 MOP 的濃度，重複上述實驗三次，結果列於表 3-5。MOP 的回收率為 87.1%，相對標準偏差為 12.3%，顯示大部分 MOP 皆可自血漿基質中分離出來。

綜合上述兩種前處理方式搭配場放大堆積的結果，發現偵測極限仍無法降低至文獻報導血漿中兩分析物於藥物動力濃度範圍。通常血漿含有約 150 mM 的 NaCl ^[111]，經氘甲烷去除蛋白質與去離子水稀釋後， NaCl 濃度約為 7.5 mM 左右，與電泳緩衝溶液 20 mM 磷酸鈉的濃度差異不大。經超過濾處理後血漿中鹽類濃度並無太大改變，以去

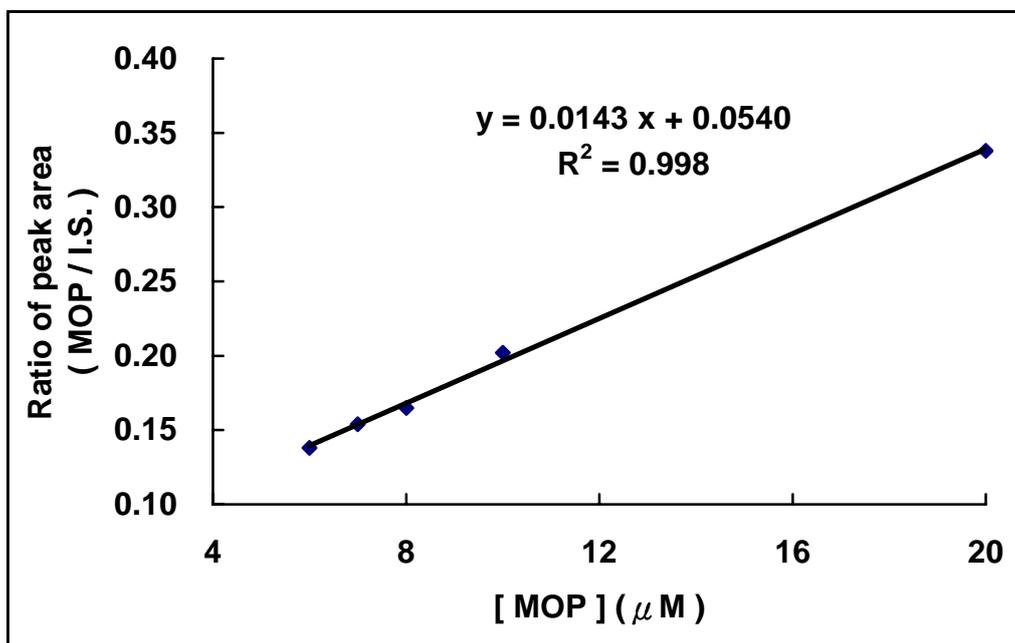


圖 3-27 超過濾處理的血漿中 MOP 檢量線

其他實驗條件同圖 3-23

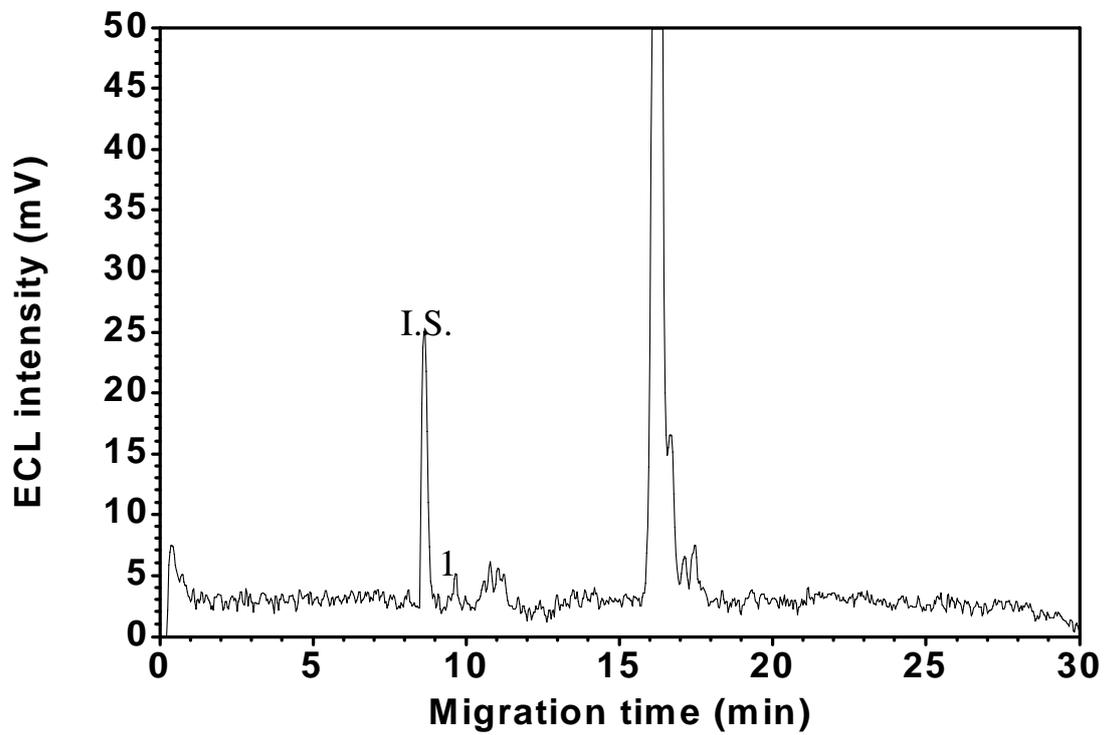


圖 3-28 超過濾前處理的血漿中低濃度 MOP 電泳圖

訊號峰標示：I.S.=TEA ($5 \mu\text{M}$)；1=MOP ($5 \mu\text{M}$)

其他實驗條件同圖 3-23

表 3-5 超過濾前處理的血漿中 MOP 回收率

Analyte	Added (μM)	Found (μM)	Recovery (%)	RSD (%)	n
MOP	20	17.43 \pm 2.14	87.1	12.3	3

其他實驗條件同圖 3-23

離子水稀釋後鹽類濃度約為 15 mM左右，與電泳緩衝溶液濃度(20 mM磷酸鈉)的差異更小。場放大堆積欲得較高的濃縮倍率，樣品溶液與電泳緩衝溶液的濃度差距至少要 10 倍以上，血漿樣品稀釋 10 倍後鹽類濃度與電泳緩衝溶液濃度差距不大，推測此為造成場放大堆積效果不顯著的主因。若能將血樣以去離子水稀釋更多倍，鹽類的影響可降低，但相對的分析物被稀釋的倍率也會越高。若不稀釋血樣，則電泳緩衝溶液的濃度必須越高越好^[126]，但血漿基質不稀釋會造成ITO電極的損害，且濃度高的電泳緩衝溶液會增加分析的時間，且在高電場下會產生較多的焦耳熱而導致訊號變寬，降低解析度。若要進一步降低偵測極限，則將分析物先自含高濃度鹽類的血漿基質中分離出是必要的，也許可藉由萃取(如：液相萃取或液相微萃取)來達成此目的。此外，緒論部分曾提過 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL反應機制為胺類分析物於電極表面氧化後形成帶正電荷的自由基離子，經去質子步驟成為自由基形式的中間產物，再與電極表面氧化生成的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 進行ECL反應(反應機構如圖 1-3)。連接在胺基上的烷基碳數目多寡會影響自由基的穩定能力，進而影響ECL的放光強度。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL強度一般以三級胺最大，二級胺不如三級胺，本研究所挑選的測試分析物皆屬二級胺，推測此亦為分析物偵測極限未能降低的因素之一。

肆、結論

本研究以毛細管電泳配合 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 電激發化學放光偵測方式嘗試分析兩種治療結核病的藥物，ethambutol (EMB) 與 methoxyphenamine (MOP)。在高壓端緩衝溶液為 20 mM 磷酸鈉(pH 10)，低壓端緩衝溶液為 300 mM 磷酸鈉(pH 8.0)其中含有 3.5 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 條件下，施加 9 kV 電壓，可於 15 分鐘內完成分離，不經衍生即可偵測 MOP 與不具紫外-可見光吸光或螢光性質的 EMB。

MOP 與 EMB 於水溶液樣品中偵測極限分別為 $2\ \mu\text{M}$ 與 $4\ \mu\text{M}$ ，配合場放大樣品濃縮技術，兩分析物偵測極限皆可降低至 5 nM。MOP 與 EMB 於血漿中經除去蛋白質前處理後，配合場放大堆積濃縮，偵測極限為 $4\ \mu\text{M}$ ，與文獻報導中的藥物動力濃度範圍 $0.1\ \mu\text{M}\sim 1\ \mu\text{M}$ (MOP)^[89] 與 $2\ \mu\text{M}\sim 10\ \mu\text{M}$ (EMB)^[100] 仍有距離。在水溶液樣品中配合場放大樣品濃縮技術，分析物偵測極限雖可降低至 nM 範圍，但由於分析物為二級胺，在 ECL 偵測上靈敏度原本即非最高，以及血漿中高濃度鹽類對於進樣上的限制，使得分析物於血漿中偵測極限未能降低至文獻報導中的藥物動力濃度範圍。未來應發展其他更有效的樣品淨化與濃縮的技術，以降低定量偵測極限。

伍、參考文獻

1. B. F. Kenney, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 423-430.
2. S. P. D. Lalljie, J. vindevogel, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 652 (1993) 563-569.
3. J. Karovicova, J. Polonsky, M. Drdak, P. Simko, V. Vollek, *J. Chromatogr.*, 638 (1993) 241-246.
4. D. Lagoutte, G. Lombard, S. Nisseron, M. P. Papet, T. Saint-Jalm, *J. Chromatogr. A*, 684 (1994) 251-257.
5. C. O. Thompson, V. C. Trenerry, B. Kemmery, *J. Chromatogr. A*, 704 (1995) 203-210.
6. D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 179-184.
7. B. L. Hogan, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2841-2845.
8. V. Dolnlk, J. Dolnlkova, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 269-277.
9. J. Schneede, P. M. Ueland, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 812-819.
10. J. Schiewe, Y. Mrestani, R. Nrubert, *J. Chromatogr. A*, 717 (1995) 255-259.
11. C. E. Lin, C. C. Chang, W. C. Lin, E.C. Lin, *J. Chromatogr. A*, 753 (1996) 133-138.
12. K. Bachmann, J. Boden, I. Haumann, *J. Chromatogr.*, 626 (1992) 259-265.
13. Y. C. Chao, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 229-237.
14. E. D. Zlotorzynska, J. F. Dlouhy, *J. Chromatogr. A*, 685 (1994) 145-153.
15. I. S. Lurie, R. F. Klein, T. A. 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. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchia, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111-113.
 19. K. L. Ackley, J. A. Day, J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 293-298.
 20. W. Li, D. Fries, A. Alli, A. Malik, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 218-227.
 21. H. T. Chang, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2947-2951.
 22. M. T. Chiang, S. Y. Chang, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 877 (2000) 233-237.
 23. M. T. Chiang, S. Y. Chang, C.W. Whang, *Electrophoresis*, 22 (2001) 123-127.
 24. U. B. Soetebeer, M. -O. Schierenberg, H. Schulz, G. Hempel, P. Andresen, G. Blaschke, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2178-2182.
 25. Y. S. Gu, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 972 (2002) 289-293.
 26. L. N. Amankwa, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1733-1737.
 27. Y. C. Chao, C. W. Whang, *J. Chromatogr.* 663 (1994) 229-237.
 28. K. S. Whang, C. W. Whang, *Electrophoresis*, 18 (1997) 241-246.
 29. Y. M. Huang, C. W. Whang, *Electrophoresis*, 19 (1998) 2140-2144.
 30. S. Y. Liao, Y. C. Chano, C. W. Whang, *J. High Resolu. Chromatogr.*, 18 (1995) 667-669.
 31. S. Y. Liao, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 247-254.
 32. H. C. Tsai, C. W. Whang, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2533-2538.
 33. W. Cao, J. Liu, X. Yang, E. Wang, *Electrophoresis*, 23 (2002)

- 3683-3691.
34. X. Sun, J. Liu, W. Cao, X. Yang, E. Wang, Y. S. Fung, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 137-145.
 35. W. Cao, J. Liu, H. Qiu, X. Yang, E. Wang, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1571-1576.
 36. X. Sun, J. Liu, W. Cao, X. Yang, E. Wang, Y. S. Fung, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 137-145.
 37. J. Liu, X. Yang, E. Wang, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3131-3138.
 38. W. Cao, X. Yang, E. Wang, *Electroanalysis*, 16 (2004) 169-174.
 39. J. Yan, J. Liu, W. Cao, X. Sun, X. Yang, E. Wang, *Microchem. Journal*, 76 (2004) 11-16.
 40. L. Fang, X. Yin, X. Sun, E. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 537 (2005) 25-30.
 41. X. Huang, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 189-192.
 42. I. C. Chen, C. W. Whang, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2461-2464.
 43. A. G. Ewing, J. M. Mesaros, P. F. Gavin, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 527A-537A.
 44. Y. Lin, V. L. Avila, J. J. Zhu, D. R. Wiederin , W. F. Beckert, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2020-2025.
 45. J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 667-692.
 46. M. L. Grayeski, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1248A.
 47. A. Townshend, *Analyst*, 115 (1990) 495-500.
 48. J. W. Birks, *Chemiluminescence and Photochemical Reactions Detection in Chromatography*, VCH Publishers Inc., New York, 1989.
 49. W. R. G. Baeyens, B. L. Ling, K. Imai, A. C. Calokerinos, S. G.

- Schulman, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 195-206.
50. W. R. Seitz, M. P. Neary, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 188A-202A.
51. A. W. Knight, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 47-62.
52. A. W. Knight, G. M. Greenway, *Analyst*, 121 (1996) 101R-106R.
53. S. N. Brune, D. R. Bobbitt, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 166-170.
54. J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 865-868.
55. S. D. Gilman, C. E. Silverman, A. G. Ewing, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 97-106.
56. G. A. Forbes, T. A. Nieman, J. V. Sweedler, *Anal. Chim. Acta*, 347 (1997) 289-293.
57. K. Tsukagoshi, K. Miyamoto, E. Saiko, R. Nakajima, T. Hara, K. Fujinaga, *Anal. Sci.*, 13 (1997) 639-642.
58. J. A. Dickson, M. M. Ferris, R. E. Milofsky, *J. High Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 643-646.
59. D. R. Bobbitt, W. A. Jackson, H. P. Hendrickson, *Talanta*, 46 (1998) 565-572.
60. X. Wang, D. R. Bobbitt, *Anal. Chim. Acta*, 383 (1999) 213-220.
61. M. T. Chiang, C. W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 934 (2001) 59-66.
62. W. Cao, J. Liu, X. Yang, E. Wang, *Electrophoresis*, 23 (2002) 3683-3691.
63. W. Cao, J. Jia, X. Yang, S. Dong, E. Wang, *Electrophoresis*, 23 (2002) 3692-3698.
64. M. T. Chiang, M. C. Lu, C. W. Whang, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3033-3039.
65. J. Liu, J. Yan, X. Yang, E. Wang, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 3637-3642.

66. G. Chen, Y. Chi, X. Wu, J. Duan, N. Li, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6602-6607.
67. S. D. Roy, G. McKay, E. M. Hawes, K. K. Midha, *J. Chromatogr.*, 310 (1984) 307-317.
68. S. W. Myung, S. H. Yoon, M. Kim, *Analyst*, 128 (2003) 1443-1446.
69. N. R. Srinivas, J. W. Hubbard, E. M. Hawes, G. McKay, K. K. Midha, *J. Chromatogr.* 487 (1989) 61-72.
70. C. Soriano, J. Munoz-Guerra, D. Carreras, C. Rodriguez, A. F. Rodriguez, R. Cortes, *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 183-187.
71. M. Gil-Agustí, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A*, 866 (2000) 35-49.
72. C. Yin, C. Tang, X. Wu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33 (2003) 39-43.
73. A. M. Stalcup, K. H. Gahm, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1360-1368.
74. W. Zhu, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 499-507.
75. D. K. Maynard, G. Vigh, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3152-3162.
76. M. B. Busby, O. Maldonado, G. Vigh, *Electrophoresis*, 23 (2002) 456-461.
77. S. Li, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 1051 (2004) 95-101.
78. J. H. Loenhout-Rooyackers, J. Veen, *Netherlands J. Medicine*, 53 (1998) 7-14.
79. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd edition, the Pharmaceutical Press, 1986, p. 592.
80. M. R. Holdiness, Z. H. Israili, J. B. Justice, *J. Chromatogr.* 224 (1981) 415-422.
81. C. S. Lee, L. Z. Benet, *J. Chromatogr.*, 128 (1976) 188-192.
82. A. D. Blair, A. W. Forrey, T. G. Christopher, B. Maxwell, R. E. Culter,

- Methodological Developments in Biochemistry*, 5 (1976) 231-234.
83. C. S. Lee, L. Z. Benet, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 470-473.
84. C. S. Lee, L. H. Wang, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 362-363.
85. C. Lacroix, F. Cerutti, J. Nouveau, S. Menager, O. Lafont, *J. Chromatogr.*, 415 (1987) 85-94.
86. C. K. Ma, C. S. Mok, P. K. Hon, *Anal. Chim. Acta*, 314 (1995) 77-85.
87. M. Breda, P. Marrari, E. Pianezzola, M. S. Benedetti, *J. Chromatogr. A*, 729 (1996) 301-307.
88. P. Chenevier, L. Massias, D. Gueylard, R. Farinotti, *J. Chromatogr. B*, 708 (1998) 310-315.
89. R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, *J. Pharm. And Biochem. Anal.*, 27 (2002) 995-1007.
90. 江美足，毛細管電泳/電激發化學放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)。
91. P. M. Armistead, H. H Thorp, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3764-377.
92. K. D. Lukacs, J. W. Jorgenson, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 8 (1985) 407-411.
93. S. Chen, M. L. Lee, *J. Microcol. Sep.*, 9 (1997) 57-62.
94. H. Bayer, H. Engelhardt, *J. Microcol. Sep.*, 8 (1996) 479-484.
95. P. J. Schneider, H. Engelhardt, *J. Chromatogr. A*, 802 (1998) 17-22.
96. C. Fujimoto, M. Sakurai, Y. Muranaka, *J. Microcol. Sep.*, 11 (1999) 693-700.
97. J. Tanyanyiwa, S. Leuthardt, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 978 (2002) 205-211.

98. S. N. Brune, D. R. Bobbitt, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 166-170.
99. P. R. Haddad, *Anal. Lett.*, 32 (1999) 2909-2924.
100. S. D. Gilman, C. E. Silverman, A. G. Ewing, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 97-106.
101. K. E. Haapakka, J. J. Kankare, *Anal. Chim. Acta*, 138 (1982) 263-268.
102. W. Y. Lee, T. A. Nieman, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1789-1796.
103. X. Sun, J. Liu, W. Cao, X. Yang, E. Wang, Y. S. Fung, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 137-145.
104. M. Zorzi, P. Pastore, F. Magno, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4934-4939.
105. J. P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J. B. Vincent, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 838 (1999) 3-10.
106. J. P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 282 (1998) 465-468.
107. J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1638-1644.
108. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 744 (1996) 231-240
109. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 807 (1998) 27-36.
110. G. Hempel, *Electrophoresis*, 21 (2000) 691-698.
111. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 107-117.
112. S. Hjerten, S. Jerstedt, A. Tiselius, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 219-223.
113. R. L. Chien, J. C. Helmer, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1354-1361.
114. D. S. Burgi, R. L. Chien, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2042-2047.
115. R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1046-1050.
116. L. Gross, E. S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 169-178.
117. R. L. Chien, D. S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 559 (1991) 141-152.
118. C. X. Zhang, Y. Aebi, W. Thormann, *Clin. Chem.*, 42 (1996)

1805-1811.

119. C. X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 540-548.
120. C. X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2523-2532.
121. R. Taylor, S. Toasakoro, R. G. Reid, *Electrophoresis*, 19 (1998)
2791-2797.
122. R. L. Chien, D. S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 559 (1991) 153-161.
123. J. P. Quirino, S. Terabe, *Electrophoresis*, 21 (2000) 355-359.
124. 何敏夫，*血液學*，和記圖書出版社，台北 (1993)
125. R. Goda, N. Murayama, Y. Fujimaki, K. Sudo, *J. Chromatogr. B*, 801
(2004) 257-264.
126. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 3-9.