

第二章、分析方法與原理

2.1 毛細管電泳分析法之發展歷程

利用外加電場使荷電粒子在電解質中，以不同的速率向荷電相反的電極遷移，在某固定電場的作用下，荷電分子因荷電量與質量的不同，產生不同的遷移速率，藉此可達成混合物的分離的目的，即為電泳分離法。事實上，Kohlrausch 早在 1897 年首先提出荷電離子在電解質溶液中的遷移方程式，解釋荷電離子在電場的作用下，荷電粒子將往荷電相反的電極移動，將此行為稱為電泳 (electrophoresis)。

理論上，電泳的分離效率與外加電場的大小成正比，故電場越大，分離效率越高。但是在高電場的作用下，因焦耳熱產生熱對流，反而造成區帶變寬，影響分離的效率。1967 年 Hjerten 首次在自由溶液中(即不用凝膠介質)成功地進行電泳實驗。他以 1~3 mm 的石英管，繞著縱軸緩慢的旋轉，消緩層帶擴散的影響，並以甲基纖維素

(methylcellulose)修飾石英管內部表面，防止電滲流(electroosmosis)的產生，進行區帶電泳的實驗。由於毛細管有極大的表面積/體積比，能將所產生的焦耳熱有效地散去，且毛細管愈細所產生的焦耳熱愈少，所以能提供較為一致的溫度截面，有利於分離。1970 年代末期及 1980 初期，Mikkers 等人及 1981 年 Jorgenson 和 Lukacs 證實 CE 為一種具發展性的分離技術，並以 75 μ m 內徑的毛細管柱，施以 30kV

的高電壓，成功分離胺基酸衍生物，並利用螢光偵測器有效提高靈敏度。現代毛細管材質為 fused-silica (Si-OH)，其內徑通常為 20 至 100 μm ，因為毛細管內徑極小，散熱較迅速，使得毛細管可以承受較高伏特的高電壓，使的分離效率以及理論板數大大提昇。再者，由於毛細管電泳會產生 EOF (電滲流) 流動界面，使得分析物的分佈區帶比用幫浦推動的流體產生的區帶更窄，而使得層析的理論板數及分離效率大大的提高。

毛細管電泳分析法發展初期，主要為毛細管區帶電泳層析法 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)。但此方法主要用來分離荷電分子，無法對中性分子加以分離。1984 年 Terabe 在緩衝溶液中添加界面活性劑形成微胞，提出利用界面活性劑與中性分子間分配係數的不同，可達到中性分子的分離。事實上界面活性劑的使用開創了毛細管電泳的另一個領域，使毛細管電泳不僅能對帶電物質進行分離，也可對中性物質進行電泳分離，使電泳的發展更為廣泛。隨後 Hjerten 在 1985 年提出毛細管等電聚焦電泳(CIEF)(Hjerten and Zhu, 1985); Cohen 與 Karger 在 1987 年發表毛細管凝膠電泳 (CGE) (Cohen and Karger, 1987)，此方法類似傳統的凝膠電泳，將十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯氨在毛細管內形成凝膠，直接應用在蛋白質的分離與分子量的決定，各種毛細管電泳技術的發展使其應用日益廣泛。在 1988 年，

第一部商業化毛細管電泳儀器上市，毛細管分析儀器的自動化，使得操作更為簡單，而毛細管電泳分析技術逐漸成熟，廣泛的應用在藥物、環境污染，生化的分析上成為簡單而有效率的分析方法。

表 2-1：毛細管電泳層析法之發展歷程 [1-31]

研究者	發展過程
1886 Lodge	使用含有膠質的電解液，在兩端加以電壓，發現顏色會產生變化
1892 Picton	使用含離子色素的電解液
1899 Hardy	使用含有膠質粒子的 U 型管，球蛋白可在電流存在下於管內移動，而發現“電泳”現象
1905 Hardy	繼續研究球蛋白於不同填充材質之 U 型管內的移動
1907 Field and Teague	利用洋菜管進行毒素/抗毒素之分離
1923 Kendell and Crittenden	利用洋菜填充之 U 型管進行同位素之分離
1930 Tiselius	研究有關溶液中蛋白質之移動界面 (moving boundary)
1937 Tiselius	對移動界面分離方法的分析儀器進行改良，並將之應用於離子性物質的分離與精製。
1939 Coolidge	利用玻璃絲填充之管柱進行血清中蛋白質的電泳分離。
1946 Consden 等人	利用矽膠平板分離胺基酸，並引入“吸附”的觀念。
1950 Haglund and Tiselius	利用玻璃粉末填充之管柱進行電泳分離。
1956 Porath	利用纖維素填充之管柱進行電泳分離。
1965 Konstantinov	首度使用毛細管進行電泳分離。
1965 Hjerten 等人	利用丙醯胺管柱對核糖體進行粒子篩 (particle sieving)。
1967 Hjerten	以內徑為 3 mm 之管柱進行電泳分離。
1974 Virtanen	進一步確定小內徑管柱的優點。
1979 Mikkers 等人	利用聚合物填充之毛細管進行分離。
1981 Jorgenson and Lukacs	使用內徑為 75 μm 的石英毛細管，以螢光偵測的方式進行研究，確立了毛細管區帶電泳法 (CZE) 的理論基礎。
1984 Terabe 等	發展出膠束電動層析法 (MEKC) 的分離模式。
1984 Walbroehl 和 Jorgenson	應用完全以氰甲烷 (acetonitrile) 作為 CE 分離的緩衝液開啟非水相毛細管電泳的大門
1987 Hjerten	將傳統的等電聚焦法應用到毛細管電泳法，發展出毛細管等電聚焦法。
1987 Cohen	提出毛細管凝膠電泳法。
1996 W. Lu, G. K. Poon, 等	非水相 CE/MS ⁷⁵
1996 Gerald. J. Small 等	毛細管電泳/低溫 (4.2 K) 螢光光譜分析法 (CE/FLNS) 42
2001 C. -H. Lin, Y. -L. Chung, Y-H. Chen	非水相毛細管電泳/低溫 (77 K) 螢光光譜分析法 ⁷⁶⁻⁷⁷

2.2 毛細管電泳分析法之基本原理

2.2-1 電泳分離與電泳遷移率

電泳的分離是以電場中溶質的速度差異為基礎，一般而言，離子的遷移速度可以用下列式子表示：[32]

$$V = \mu_e E$$

其中： v = 離子遷移速度

μ_e = 電泳淌度

E = 電場強度

電場強度 (E) 是外加電壓與毛細管長度的比值 (單位為 V/cm)。

對於淌度而言，其意義就是給定一離子與介質的相互作用產生的一特徵常數，且此數值也和電場成正比：

$$\mu_e \propto \frac{\text{電場力}(F_E)}{\text{摩擦力}(F_F)}$$

電場力可寫成：

$$F_E = NeE$$

而摩擦力 (對球型離子) 為：

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

其中： N = 離子電荷價數

e = 電子電量

η = 溶液黏度

$r =$ 離子半徑

$v =$ 離子速度

在電泳過程中，上述提到的兩作用力會達到平衡，此時這兩種力大小相等而方向相反：

$$NeE = 6\pi\eta\gamma v$$

對速度 v 求解可得：

$$v = \frac{NeE}{6\pi\eta\gamma}$$

將此解代入 $v = \mu_e E$ 中可得：

$$\mu_e = \frac{Ne}{6\pi\eta\gamma}$$

由上式可以說明，遷移率與粒子半徑、表面電荷及介質的黏度有關。通常在同一介質中，粒子越小而表面電荷越大時，其電泳速度越大；反之則越小。

2.2-2 電滲透流與電荷粒子的遷移行為

電滲透流是毛細管內壁表面電荷所引起的管內液體的整體流動，是毛細管電泳的基本現象。由於毛細管是以熔融矽（fused silica）為材質，管柱內壁表面的矽醇官能基 Si-OH 在不同 pH 值下會有不同的解離度，其解離現象如圖 2-1 所示。

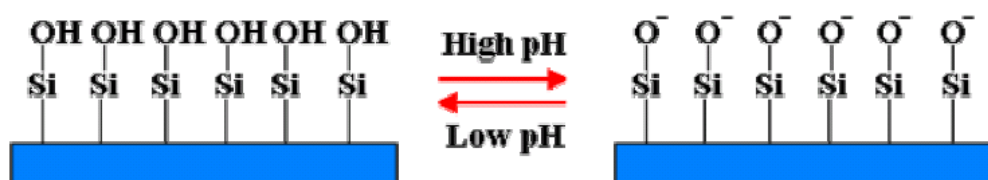


圖 2-1 毛細管柱內壁表面矽醇基 Si-OH 解離示意圖

根據 Stern 的電雙層理論（如圖 2-2）[33]，溶液的正離子在離子化後的毛細管壁上，將因靜電吸引力而吸附在管壁表面上，吸附的程度隨遠離管壁程度呈指數趨勢急遽下降 [34]。毛細管內溶液各處與 ψ_0 的差距即為 zeta 電位（ ζ potential），用公式則表示為：

$$\zeta = \frac{4\pi \cdot \delta \cdot e}{\epsilon}$$

其中， δ 為電雙層的厚度， e 為每單位面積的電荷， ϵ 為溶液的介電常數。由於 zeta 電位的存在，在高壓電場的作用下，毛細管壁過剩的水合陽離子會朝陰極方向遷移，同時整個緩衝溶液拉往陰極，使得毛

細管中的液體會有泳動的現象，即為電滲流 (electroosmotic flow, EOF)，如圖 2-3 [34]。將電滲流遷移率定義為單位電場下的電滲流速率，可表示為：

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

因此粒子整體的遷移率則為粒子本身的遷移率及電滲流的加成：

$$\mu_{total} = \mu_{e^+} + \mu_{eof}$$

電滲流 (EOF)，可藉由改變電解質的條件，如組成、濃度、pH 值、有機修飾劑、電解質修飾劑、管柱修飾劑等，來改變 EOF 達成不同的分離效果[35]。

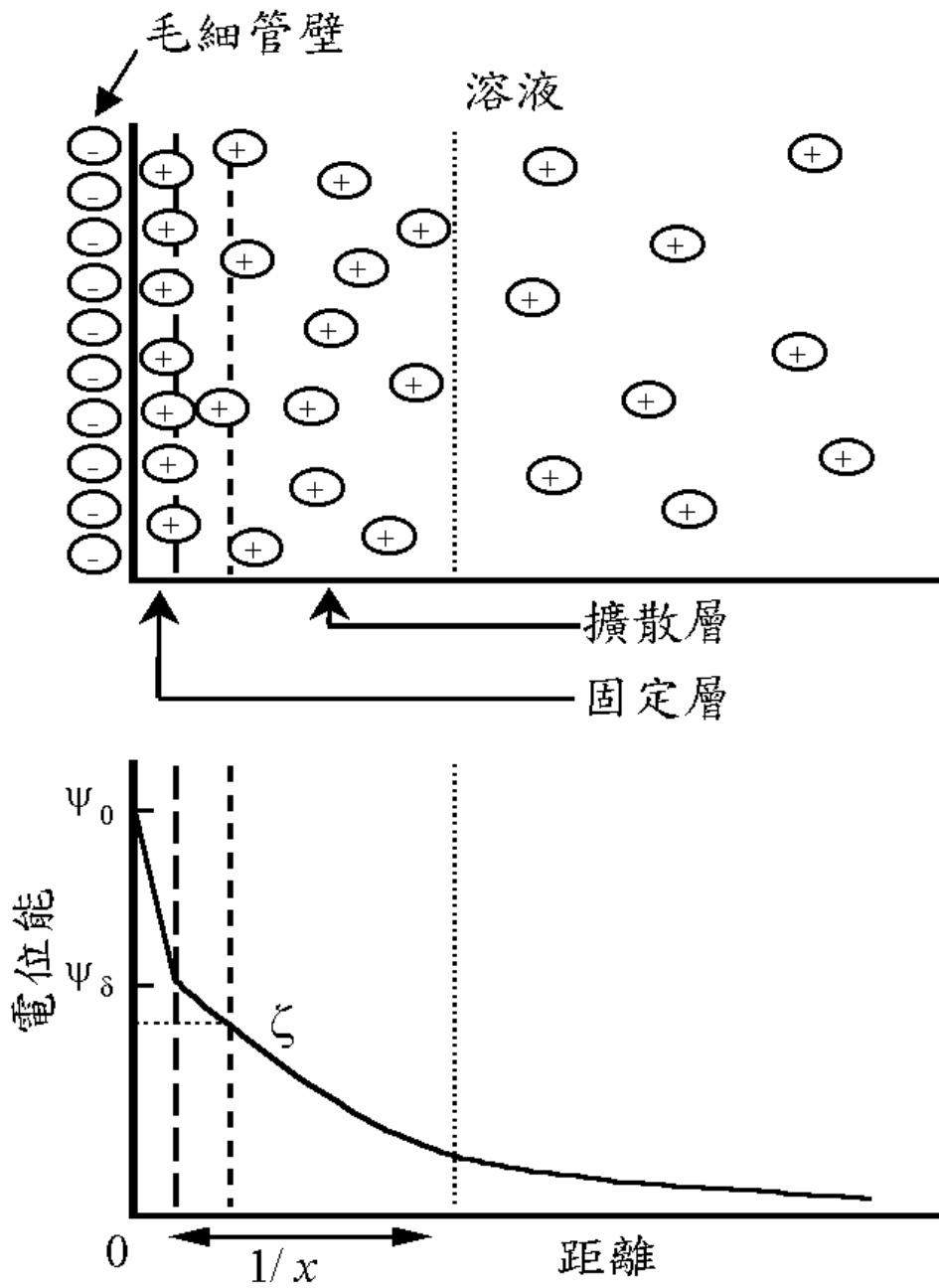


圖 2-2 毛細管內壁之 Stern 電雙層模型

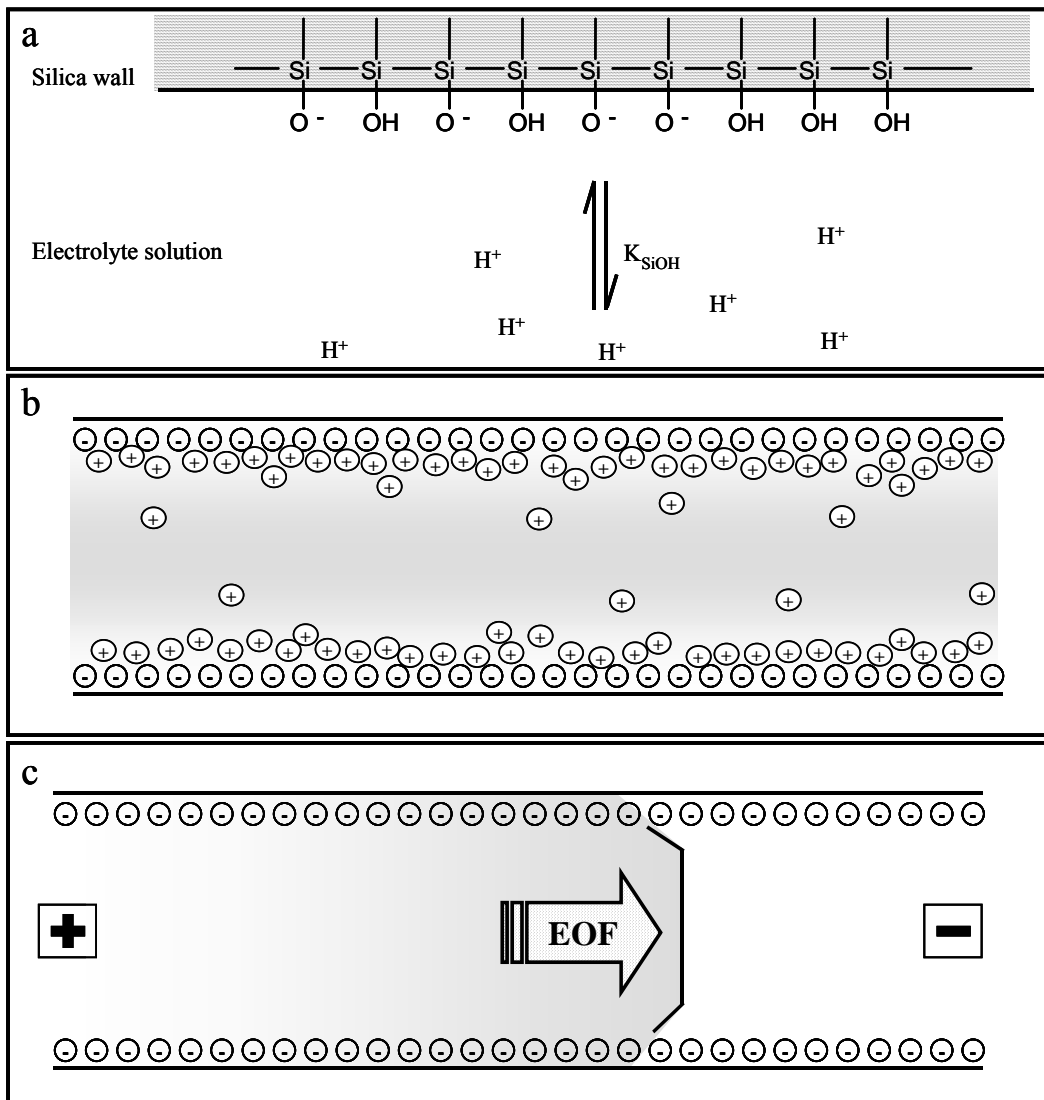


圖 2-3 EOF的形成及流動示意圖
 (a)毛細管壁的解離
 (b)電雙層的形成
 (c)通電後，電滲流的形成

2.2-3 分離效率與解析度

(一) 理論板數 (theoretical plate number)

理論板數 (N) 是反應物質在固定相和流動相中動力學特性的重要數值，代表管柱分離效能的指標，毛細管電泳分離效率與一般層析方法一樣，可用以下理論板數公式表示：

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2$$

其中 t ：分析物遷移時間； $W_{1/2}$ ：分析物吸收峰半波寬。

一般而言，毛細管電泳的理論板數比 HPLC 高，實際上會因為各種因素導致譜帶加寬和分離效率降低，造成因素如：焦耳熱所造成的溫度梯度、樣品吸附於管壁、進樣長度、緩衝液與樣品溶液間導電度的不同等等。

(二) 解析度 (resolution)

解析度用來描述兩譜峰的分離情況，可用以下公式表示：

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

t_1 及 t_2 為溶質 1 及 2 的遷移時間， W_1 及 W_2 則為各別的吸收峰波底寬 (如圖 2-4)。通常 R_s 大於 1.5 時，表示兩譜峰分離的情況已達到可以定性定量的標準其中，

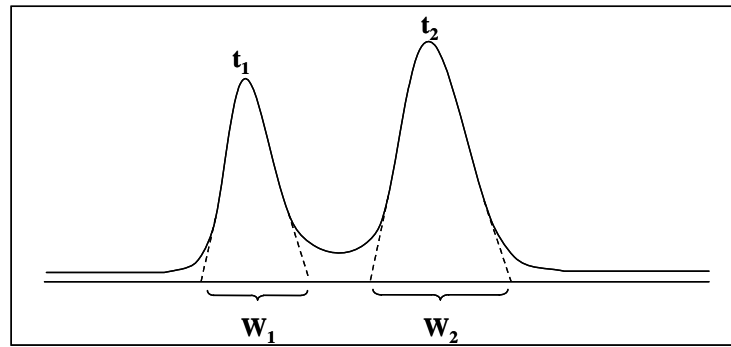


圖 2-4 層析圖譜之譜峰底寬及遷移時間之示意圖

2.3 毛細管電泳層析法的分離模式

毛細管電泳具有各種不同的操作模式，每種模式具有獨特的分離機制。在多數情況下，各模式可經由改變緩衝溶液的組成加以執行。

各模式及其分離機制如表 2-2[36]。

表 2-2 毛細管電泳常見分離模式與機制

分 離 模 式	分 離 機 制
毛細管區帶電泳 Capillary zone electrophoresis (CZE)	自由溶液的電泳遷移率
微胞電動層析 Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	分析物與微胞間相互作用力不同
毛細管凝膠電泳 Capillary gel electrophoresis (CGE)	分析物大小及電荷不同
毛細管等電聚焦 Capillary isoelectric focusing (CIEF)	等電點不同 (pKI)
毛細管等速電泳 Capillary isotachopheresis (CITP)	界面移動導致分析物分離
毛細管電色析層法 Capillary electrochromatography (CEC)	分析物與靜相間作用力

2.3-1 毛細管區帶電泳 (CZE)

毛細管區帶電泳法是毛細管電泳中最基本，也是應用最廣的一種操作模式。這是利用各種分析物在緩衝溶液中，因質量與有效電荷的比值不同，造成電泳遷移率的差異而達到分離的效果。陽離子運動方向和電滲流一致，會最先通過檢測器。中性粒子泳流速度為零，將隨電滲流而行。而陰離子因其運動方向和電滲流相反，則是最後通過檢測器（圖 2-5）。

CZE 法中需要控制的操作變因主要包括電壓、溫度、緩衝溶液、pH 值、濃度以及適當的修飾劑。當管柱長度固定時，隨操作電壓的增加，電泳流與電滲流速度的絕對值都會增加，這會使粒子的總遷移速度加快，移動時間縮短。溫度升高、黏度減小也會縮短移動時間。緩衝溶液的種類和濃度對分離及選擇性有相當程度的影響。不同的 pH 值下，粒子荷質比直接影響其遷移速度，也是分析效果良窳的關鍵之一。有時針對不同的需要，可在緩衝溶液中加入修飾劑，例如：有機修飾劑、界面活性劑及對掌性選擇劑（chiral selectors）等，透過不同的作用機制，以達到不同的分離效果。CZE 的方法簡單，所以應用的範圍很廣，亦是最常被利用的方法[37-40]。

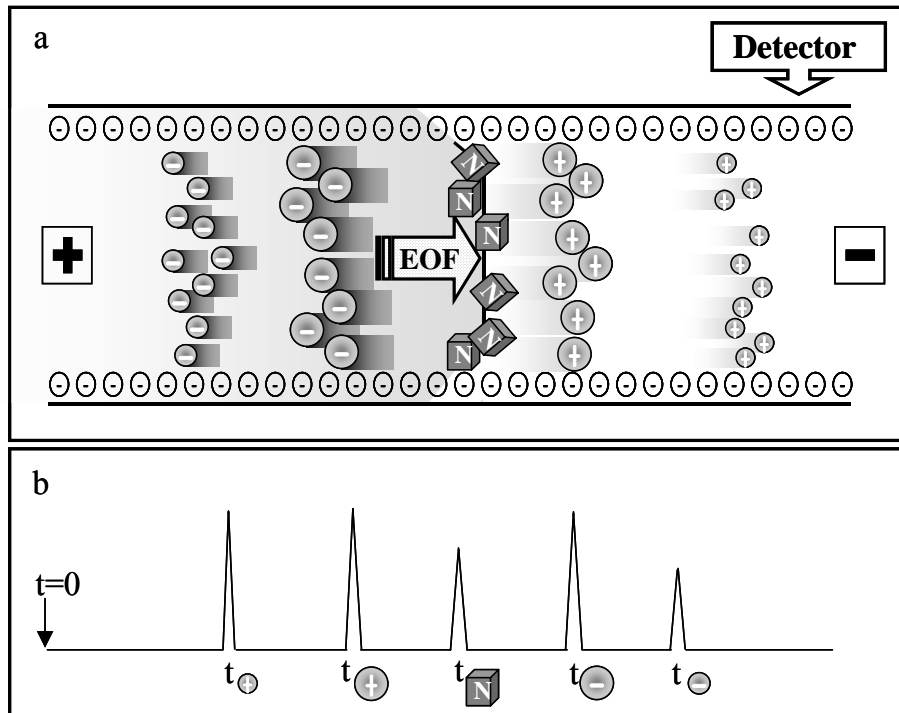


圖 2-5 在CZE的分離模式下，不同粒子的遷移圖
 (a) 分離示意圖
 (b) 層析圖譜示意圖

2.3-2 微胞電動層析法 (MEKC)

微胞電動層析 (MEKC) 技術於 1984 年由 Terabe 等人首先提出 [41]，此技術最大特點是同時可以分離離子與中性物質。

在 MEKC 中，通常在緩衝液中加入界面活性劑，使其濃度大於臨界微胞濃度 (critical micelles concentration, CMC)，表 2-3 為常用界面活性劑及其臨界微胞濃度值 [42]。界面活性劑大於臨界濃度時，界面活性劑單體會結合在一起，形成一個球體稱之為微胞 (micelle)，這類似 HPLC 層析中填充的靜相，但是這些微胞在電泳時會移動的，因此在 MEKC 的模式中包含了流動的緩衝溶液相以及類似固定作用的微胞相，如圖 2-6 [43] 所示，在電泳過程中溶質在兩相之間作用，而有不同的親合力 (affinity)，而有不同的滯留行為。MEKC 和毛細管區帶電泳一樣，由於緩衝溶液在靠近管壁處形成的正電荷，導致強大的電滲流形成並向陰極移動，對於陰離子微膠粒，如十二烷基磺酸鈉 (SDS) 的微膠粒，因其外表帶很大的負電荷 (SO_4^-)，使其往高電壓的陽極遷移。在一般的情況下，電滲流速度大於微膠粒的遷移速度，微膠粒最終乃以較低的速度向陰極移動，而達到分析物被分離的目的。

在 MEKC 中，界面活性劑的應用範圍受到其種類和臨界微膠粒子濃度的影響，濃度太低就相當於 HPLC 中填充的靜相不夠緊密，會

造成分離效果變差，而濃度太高會使緩衝溶液的導電度上升，產生有害的焦耳熱，而且濃度太高會使得界面活性劑過飽和而有析出的可能性。界面活性劑的種類對 MEKC 的選擇性影響很大，因為不同的界面活性劑會對系統產生不同的交互作用力，而有不同的溶解度以及聚合度（aggregation number）和形狀，這些因素在使用 MEKC 作為分離模式時都會影響到電泳的層析的結果。近年來，由於毛細管電泳被廣泛應用，因此對於大部分的分析物都已經找到合適的界面活性劑，但仍有新的界面活性劑被開發出來，因此這項技術仍有進步空間。

表 2-3 常見界面活性劑之種類與其 CMC 值及叢聚數

電 性	種 類	CMC (mM)	叢 聚 數
Anionic	SDS	8.2	62
	DOSS	—	—
Cationic	DTAB	14	50
	CTAB	1.3	78
	Octylglucoside	—	—
Non ionic	n-Dodecyl- β -D-maltoside	0.16	—
	Triton X-100	0.24	140
Zwitterionic	CHAPS	8	10
	CHAPSO	8	11
	Cholic acid	14	2-4
Bile Salt	Deoxycholic acid	5	4-10
	Taurocholic acid	10-15	4

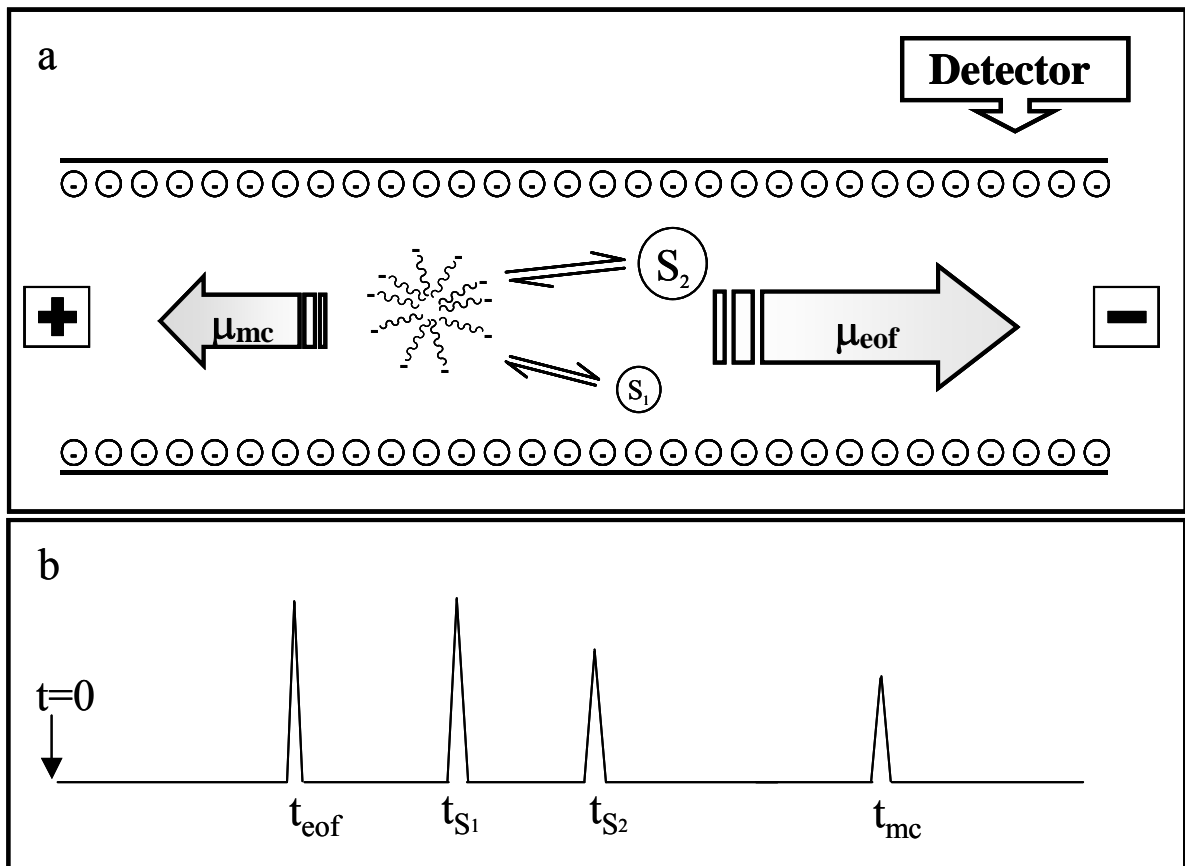


圖 2-6 MEKC 的分離模式

v_{mc} 及 v_{eof} 分別表 SDS 微胞的遷移速度與電滲流的速度，兩者方向相反但 v_{eof} 遠比 v_{mc} 來的大，所以最後可以在出口端偵測到待測物質。 S_1 及 S_2 分別代表不同的分析粒子，因與微胞產生作用力的不同，而有不同的遷移速率。

(a) 分離示意圖

(b) 層析圖譜示意圖

2.4 非水相毛細管電泳法

毛細管電泳法中以水溶液來配製緩衝溶液時，在分離的過程中，往往水溶液中的離子會解離，使得整體的導電度太高，使分離過程中形成了過多的焦耳熱。對於某些非離子性分析物而言，往往不易溶於水，因此不能有很好的分離效果。以螢光測量為偵測的方法時，經常因為會有水溶液導致螢光 quench 的作用，使偵測靈敏度變差。若是以質譜為偵測的方法時，又因為有太多的水分存在，容易造成技術上的困難。這些都使得 CE 的發展受到了些許的限制。因此在電泳的模式中，使用有機溶劑作媒介的研究，已逐漸受到重視[44-46]。

早期使用非水相的電泳，主要作為有機修飾劑[47-50]。加入非水相介質對酸鹼的解離常數、毛細管壁的 ζ 電位、溶質的溶解度、緩衝液的導電度、黏度、甚致於 EOF 等的都有不同程度的影響及效果。

一直到 1984 年，Walbroehl 和 Jorgenson 首先應用完全以氰甲烷

(acetonitrile) 作為 CE 分離的緩衝液，成功的分離奎林類 (quinoline-like compounds) 的化合物，才開啟非水相毛細管電泳的大門[51]。

在 CE 分離上，遷移率主要和介電常數與黏度的比值有很大的關聯性，因為

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

對於非水相毛細管電泳而言，此比值更是決定性因素。改變溶劑可以使得這項 ϵ/η 的比值，有了許多種不同的組合，因此也產生了不同的分離效果

由於非水相的介質不同於水的酸鹼性質，因此不同的分析物也會受到這不同的酸鹼性質而影響。換言之，非水相提供了更大的分離空間給離子物質，可藉由改變組成達到不同的酸鹼性質[52]。此外，非水相也供了非離子性分析物及界面活性劑更大的攜帶能力及增加溶解度[53]。由於非水相溶液本身具低離子強度，較低的導電性，因此可使用較高的電壓而不會有過大的焦耳熱造成的擴散效應而降低分離效果[54]。在非水相的緩衝溶液之下，鏡像物有更好的溶解度及穩定性。使用混合的溶劑，非水相毛細管電泳法對於光學活性分析物有更好的分離效果及較廣的應用範圍[55-57]。再者，使用非水相的技術不但可減少螢光的 quench，還可增加效率及改善偵測極限[58]。當使用非水相毛細管電泳法串接質譜偵測器時，亦可提高質譜的偵測的靈敏度[59]。

2.5 線上濃縮技術：毛細管電泳掃集法 (sweeping)

毛細管電泳發展初期，所用的偵測方式為傳統的紫外光吸收法 (UV absorbance)，但因為毛細管內徑極小，在樣品的偵測效果上不如傳統層析法靈敏，因此許多新式的偵測方法被開發應用在毛細管電泳偵測上，如雷射誘導螢光法 (Laser Induced Fluorescence, LIF) [60-68]、電化學偵測法與質譜分析法等等，或是在毛細管偵測窗部分以 Z 型槽[69]裝置取代，以及使用偵測窗為 bubble cell 的毛細管增加其偵測的光學路徑[70]等，這些方法均成功的提高偵測樣品的靈敏度達數個數量級，但缺點就是需要較高的成本、較複雜的偵測技術以及較高的維修費等等缺點；基於各種理由，勢必開發出一種可以增加 CE 靈敏度的方法，於是樣品線上濃縮技術 (on-line sample concentration) [71-72]就此被研究發展。

樣品線上濃縮技術大致可以歸納為兩大系統：(1) 移動相界面堆積 (moving boundary stacking)，與 (2) 靜相界面堆積 (stationary boundary stacking)[73]。前者的最佳例子為等速電泳 (isotachopheresis, ITP)，即所有樣品區帶以相同之速度移動；後者則為 1991 年由 Chien 與 Burgi 在 CZE 模式中對帶電粒子所導入電場放大樣品堆積 (field amplified sample stacking) 技術，其中樣品區帶導電度較低，緩衝溶液導電度較高，兩者之間所形成之界面在電泳分析期間是保持不動

的，當施加高電壓，樣品區帶中的帶電粒子受到電場效應而遷移速度增加，而移動到樣品區帶與緩衝區帶的交接處，因為緩衝區帶的導電度大而場強較小，帶電粒子至此處速度降下來而堆積在此界面，而堆積效應大致上與樣品溶液與緩衝溶液的離子強度差異成正比。

利用 MEKC 進行樣品堆積技術最早是在 1994 年，Liu 等人在樣品中加入濃度高於臨界微胞濃度的 SDS，分別以正電壓與負電壓進行樣品堆積[74]。Nielson 和 Foley 在樣品基質中加入混有陽離子的界面活性劑，並利用電動注射注入分析進行濃縮分析[75]。1997 年，Quirino 與 Terabe 使用低導電度之非微胞溶液來配製樣品[76]，上述情況都是高 EOF 存在下進行。1998 年又提出一種重要的中性分子堆積技術，稱為毛細管電泳掃集法[77]。Sweeping 的濃縮效應可看成是對分析物的挑選與聚集，將分析物掃集至一個較為狹窄的區帶，而達到濃縮的目的。隨後在 1999 年，Quirino 與 Terabe 詳細探討掃集法的理論及適用性之後，一系列結合線上濃縮技術的研究陸續出現[78-80]，直到 2000 年，Quirino 與 Terabe 結合堆積 (stacking) 與掃集 (sweeping) 兩大線上濃縮技術，不僅簡化了繁瑣的前處理步驟外，也使得 CE 的偵測極限靈敏度大大提昇，此項新式的結合技術是利用場放大電動注射來分析陽離子物質，注射期間具有選擇及完全注射掃集，且以 MEKC 模式進行分離，稱之為陽離子選擇性完全注射法 (Cation

Selective Exhaustive Injection, CSEI)[81]。由於本實驗只用到 sweeping 技術，所以只就 sweeping 於下節詳細介紹。

1998 年，Quirino 與 Terabe 提出一種稱為掃集法的 MEKC 線上樣品濃縮技術，此濃縮技術的特點在於樣品基質與緩衝溶液有相同的導電度，其機制如圖 2-4[82]，首先先以 pH~2 含有微胞的酸性緩衝液充滿管柱，使電滲流降低幾近於零，再注入一段含有分析物的樣品基質 (S)，緩衝區帶的微胞在電場作用下進入 (S) 區，將分析物掃至一狹窄區帶，當樣品區帶被掃集過後，分析物就被濃縮在黑色區帶上，進行一般的 MEKC 電泳，結合 sweeping 的 MEKC 濃縮技術就被廣泛的運用在毛細管電泳的分析上[83-90]。

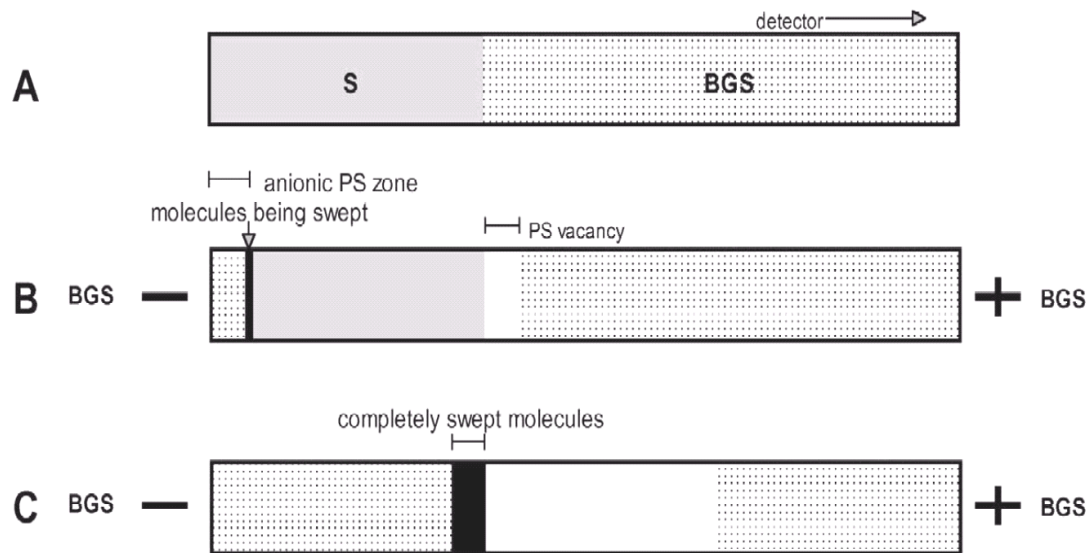


圖 2-7 掃集 (sweeping) 濃縮機制示意圖

A：緩衝溶液 (BGS) 首先注入整個毛細管，之後注射一段樣品 (S)。

B：通負電後微胞進入 S 區將分析物掃集至一狹窄區帶，而圖中所標 PS vacancy 則是指前導 BGS 中的微胞往前移動，導致的一段不含微胞的緩衝溶液。

C：隨著電泳時間增加，所有樣品區帶都被掃集過後，分析物完全被濃縮在此一黑色的區帶上，此後隨著微胞的繼續移動，濃縮過的分析物區帶 (黑色部分) 就進行普通 MEKC 電泳。

2.6 螢光光譜分析法

螢光與磷光都是屬於發光光譜。分子在基態(ground state)時，藉由光子的吸收使電子被激發(excitation)而躍遷至較高能階的激發態(excited state)。這些電子狀態(electronic states)都包含數個振動能階(vibrational levels)。藉由光子的吸收而使電子由最低的基態電子振動能階，躍遷至激發態的任何一個振動能階，當它們由激發態返回基態時，若自旋多重態(spin multiplicity)不變，則由此方式所放出的光稱為螢光(fluorescence)，亦即電子躍遷發生在激發單重態(excited singlet state)返回基態單重態(ground singlet state)時，放射出螢光(fluorescence)，生命期(lifetime)很短($\sim 10^{-8}$ s)；如果電子躍遷涉及電子自旋(electron spin)改變，例如由激發三重態(excited triplet state)返回基態單態(ground singlet state)時，放射出磷光(phosphorescence)，生命期(lifetime)較長($\sim 10^{-4}$ s)。一般分子在室溫下處於基態，當分子吸收輻射能後被激發，電子躍遷到較高能階，電子能階狀態的躍遷情況有兩種：單重態(singlet state)及三重態(triplet state)。若電子在躍遷過程中不發生自旋方向的改變，則分子處於激發單重態；若電子在躍遷過程中發生自旋方向的改變，則分子處於激發三重態。激發三重態的能階較相當的激發單重態能量低一些，而且平均壽命長。圖 2-8 表示光照射發光分子的部分能階圖，長的水平線代表電子能階，短的水平線

代表振動能階。 S_0 代表基態， S_1 代表第一電子激發單重態， S_2 代表第二電子激發單重態， T_1 代表最低的電子激發三重態。當分子在吸收適當的輻射能後，它由一個基態(S_0)的最低振動能階躍遷到某一激發電子能階 S_1 (或 S_2)的某一振動能階，這一過程稱為激發(excitation)，歷時約 $10^{-14} \sim 10^{-15}$ 秒。當此激發分子回到基態時，產生自發輻射，即螢光現象。螢光最常見於最低能階的躍遷，類型為鍵結 π 或未鍵結 n 電子到 π^* 反鍵結軌域，而這些所需之躍遷能量最小，波長範圍為 200~700 nm 是一般紫外光及可見光的範圍。分子被激發到第一激發單重態(S_1)的任一振動能階後，可能先經由振動鬆弛(vibrational relaxation)回到振動量子數為 0 的第一激發單重態(S_1)，再以輻射方式放出螢光；如果單重態(S_1)的振動能階與三重態(T_1)的振動能階重疊，則某些激發單重態分子會藉由系統間跨越(intersystem crossing)而轉移到激發三重態(excited triplet state T_1)，再從這裡返回基態(S_0)，便構成磷光發射。

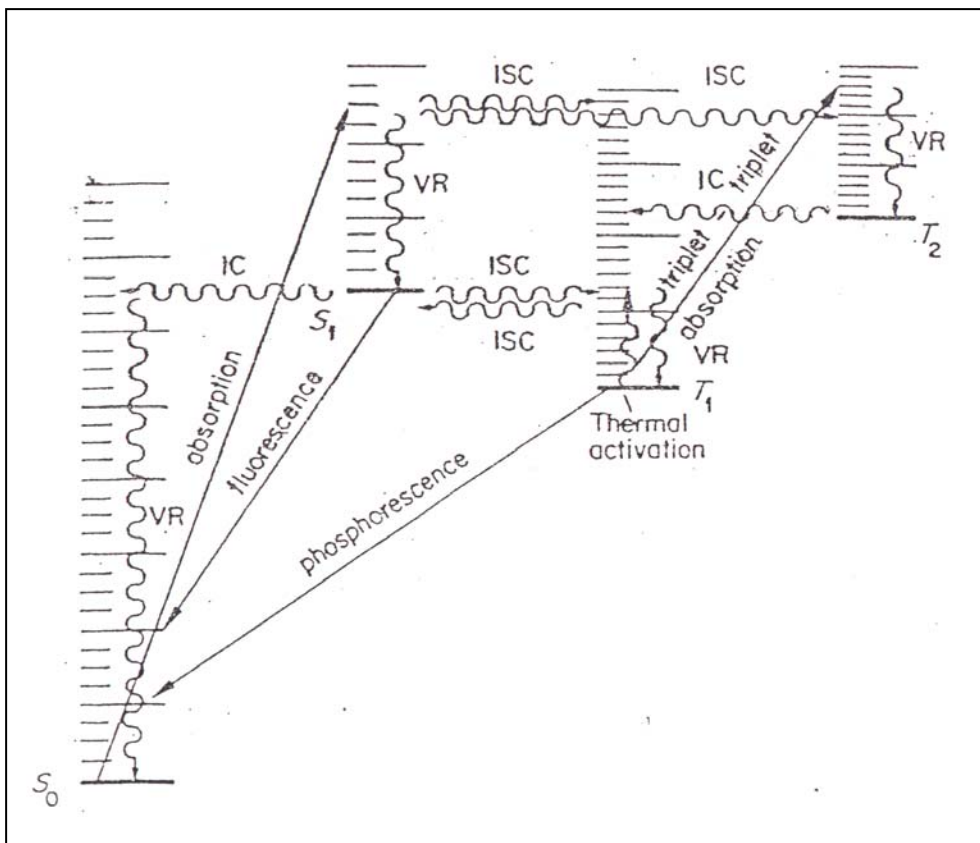


圖 2-8 電子躍遷能階圖

1. 螢光物質有兩種特徵光譜

(一)激發光譜(excitation spectrum)：螢光物質的激發光譜是指不同激發波長的輻射引起物質發射某一波長螢光的相對效率。固定發射波長，改變激發波長，所得的螢光強度與激發波長的關係曲線，即為激發光譜。

(二)放射光譜(emission spectrum)：螢光放射光譜是指某一激發波長引起物質放射不同波長螢光的相對強度。固定激發光的波長與強度，測定所發射的不同波長的螢光強度，可得到螢光放射光譜。

觀察螢光放射光譜，發現其螢光放射波長總是大於激發光的波長(stoke shift)，主要是由於激發分子的內轉換等原因造成部分能量損失而造成。這兩種光譜與分子之特性及其環境有關；而強度則和螢光分子之濃度及環境〔酸鹼度、剛硬性、極性、溫度、黏滯性〕、造成消光之物質的量有關。

2. 影響螢光的因素：

(a) 分子結構：能夠發出較強螢光的分子幾乎都是通過 $p \rightarrow p^*$ 躍遷過程而產生的，因此含有多個共軛雙鍵，且具有高度共振穩定性的分子有利於發射螢光。 p 電子的共軛度越大，螢光量子產率越高。因此具有芳香族化合物及雜環化合物是產生螢光之基本條件，苯環愈多愈增

加螢光量子產率。多數具有剛硬性平面結構的有機分子具有強烈的螢光，這是因為剛硬性結構的分子結構不易產生形變堅固不易振動，能夠保持較大 p 電子的共軛度，而且剛硬性結構使得分子不易振動，進而減少了系統間的跨越及碰撞去活化的可能性，所以螢光效果好，在分子中缺乏剛硬性的結構較容易翻轉，而造成內轉換速率的增加，且因此增加非輻射去活化的可能性，而減少螢光產率。分子結構宜為平面，若為立體分子之各原子會擠在一起，而干擾到平面之發色團因此破壞螢光。

(b) 溶氧效應：溶解氧的存在通常會影響溶液中螢光強度變弱，是由於氧分子的順磁性，因而增進了系統間跨越及轉換激發態分子到三重激發態的結果。其他順磁性物質也會有同樣的結果。

(c) 濃度對螢光強度的效應：在溶液濃度較低時，螢光強度與物質的濃度成正比；但當濃度 $2.303\epsilon bc > 0.05$ 時，會造成線性負偏離的產生，有兩個因素一為自消光 (self-quenching)，另一則為自吸收 (self-absorption)。前者是激發分子間碰撞的結果。當濃度增加時，分子與分子之間的碰撞就會隨著增加，而逐漸的失去能量則產生自消光。造成自吸收的原因是分析濃度太高使得溶液尚未穿出，就被其他

基態的分子吸收。因為螢光必須穿出溶液，才能在偵檢器上偵測到，而這兩者因素都會造成螢光強度減弱。

(d) 溫度及溶劑效應：隨著溫度的降低，螢光的量子產率和螢光強度會增大，這是因為分子與分子之間的碰撞減少，而減低外轉換的關係。溶劑的黏滯性增高也會減低外轉換的可能性，因而產生相同的結果。一分子的螢光會因溶劑中含有重原子，而形成具有重原子效應，則會減少螢光而增強磷光。如果要增強磷光時，可在溶劑裏加入含有重原子的化合物，即可增強磷光。

(e) pH 值對螢光的效應：有些螢光物質本身為弱酸或弱鹼時，對 pH 值或離子的強度非常敏感。在不同的 pH 值下，分子存在的形式不同。例如鹼性增加而使其失去氫離子；相對的酸性增加則使其獲得氫離子，這些都會影響到螢光的強度，所以當我們在測量螢光時，調配酸鹼值是非常重要的，在不同 pH 值溶液均有顯著的變化，它不僅會影響發射波長範圍的改變，同時也會影響到螢光強度的強弱，這都會造成在實驗上的誤差。

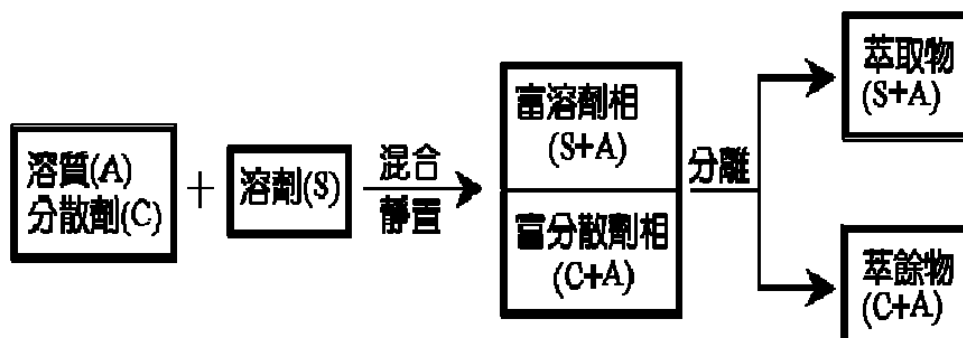
2.7 液液萃取法[91]

液液萃取，亦稱抽提(通用於石油煉製工業)，一種用液態的萃取劑處理與之不互溶的雙組分或多組分溶液，實現組分分離的傳質分離過程，是一種廣泛應用的單元操作。

沿革 1842 年 E.-M.佩利若研究了用乙醚從硝酸溶液中萃取硝酸鈾鹽。1903 年 L.埃迪蘭努用液態二氧化硫從煤油中萃取芳烴，這是萃取的第一次工業應用。20 世紀 40 年代後期，生產核燃料的需要促進了萃取的研究開發。現今萃取已應用於石油餾分的分離和精製，鈾、鈦、銻的提取和純化，有色金屬、稀有金屬、貴重金屬的提取和分離，抗菌素、有機酸、生物鹼的提取，以及廢水處理等。

原理為向待分離溶液中加入與之不相互溶解或部分溶解的萃取劑，形成共存的兩個液相。利用原溶劑與萃取劑對各組分的溶解度的差別，使它們不等地分配在兩液相中，然後通過兩液相的分離，實現組分間的分離。如碘的水溶液用四氯化碳萃取，幾乎所有的碘都移到四氯化碳中，碘得以與大量的水分開。

萃取原理如下圖：



液液萃取的過程主要包括兩個階段

- (1) 使不互溶的兩液體（溶劑與被萃取物）作暫時的混合與接觸
- (2) 接觸後的液體再度分離成兩相

萃取後溶質在兩相溶液中濃度的關係，可由分配係數求得，

分配係數定義：

$$K = C_V / C_L$$

C_V 與 C_L 分別指溶質在萃取相及萃餘相的平衡濃度（單位為 C_M ）

若某溶液 L 升，含溶質 m_0 克，以 V 升的溶劑一次萃取後，殘留在萃餘相中溶質重 m_1 克，則可由分配係數導出下式：

$$K = \frac{(M_0 - M_1) / V}{M_1 / L}$$

$$\therefore M_1 = M_0 \left(\frac{L}{KV + L} \right)$$

若以 V 升溶劑分成 n 次萃取 L 升之溶液，即每次加入 V/n 升溶劑，與萃餘物接觸 n 次後，最後萃餘物含溶質重 (m_n)，則公式成為：

$$M_n = M_o \left(\frac{L}{K \frac{V}{n} + L} \right)^n$$

由上式可知，將溶劑分成多次萃取的效果比一次萃取更好。

液液萃取與其他分離溶液組分的方法相比，優點在於常溫操作，節省能源，不涉及固體、氣體，操作方便。

液液萃取的功能與蒸餾相似，都是使液體混合物分離的操作，但下列三種情況較適合萃取：

- (1) 混合物具低揮發性（高沸點）
- (2) 共沸現象
- (3) 具溫度敏感性

2.8 環糊精

對掌選擇劑的原理與應用

對於電泳遷移率相近之位置異構物 (positional isomers) 與對掌異構物 (enantiomers)，一般傳統的毛細管電泳法無法有效的將其分離，常須藉由添加對掌選擇劑 (chiral selectors) 於緩衝溶液中，分離位置異構物與對掌異構物。常用於毛細管電泳中的對掌選擇劑有：環糊精 (cyclodextrin)、具有光學活性的微胞 (chiral micelles)、對掌金屬錯合物 (chiral metal complexes)、對掌冠狀醚 (chiral crown

ethers) 等。上述的對掌選擇劑中，在毛細管電泳法是以環糊精最常被使用，其分離原理主要是以環糊精本身的空腔孔洞為主體 (host)，分析物為客體 (guest)，環糊精會以不同程度強弱錯合不同分析物於空腔孔洞中，而形成非共價鍵結構的主-客錯合物 (host-guest complexes) 或內包錯合物 (inclusion complexes)，進而影響內包錯合物之電泳遷移率，達到分離位置異構物及對掌異構物的效果。

分離對掌性異構物可將對掌性靜相塗覆修飾於層析管壁中而將其分離。由於對掌性固定相管柱相當昂貴，價格約在新台幣五萬元至九萬元，所以早期利用對掌性物質添加於移動相中作為對掌性選擇物質，達到分離與分析對掌異構物的效能。最早應用於高效液相層析法。然而添加對掌性選擇物質於動相中，其添加量大，因而分析成本高，而且層析分離過程複雜，分離效率亦差，因此探討以其他方法來取代傳統的高效液相層析法成為必然的趨勢。

近年來毛細管電泳新技術已有不少相關理論及論文被提出並廣泛地應用於對掌異構物的分離與分析，其分離模式大致可分為以下幾種：

1. 將對掌性選擇體溶於緩衝溶液中，並與分析物一同注入未經修飾或填充的毛細管中進行分析。
2. 將對掌性選擇體溶於緩衝溶液中，並與分析物一同注入經塗覆修

飾或填充不具對掌性選擇性靜相的毛細管中進行分析。

3. 毛細管內填充或塗覆修飾對掌性靜相，將分析物注入後，以適合的緩衝溶液進行分析。

本實驗利用 1. 之模式：應用環糊精於區帶毛細管電泳(Capillary zone electrophoresis; CZE)層析與微胞電動毛細管層析 (MEKC) 中進行分離。

環糊精是澱粉經酵素 glycosyltransferase 降解後的產物，其結構為葡萄糖的環狀寡聚物。而具有 6 個、7 個及 8 個葡萄糖單體所形成的環狀寡聚物分別被命名為 α -、 β -、 γ -環糊精，如圖 2-9，這三種為對掌性分析中最常見的環糊類對掌性選擇體。

在水溶液或部分有機溶劑與水混合的溶液中，環糊精亦與許多分子、離子或溶劑形成暫時性的主體-客體錯合物 (host-guest complexes)，其對對掌異構物分離的機制為溶質 (非極性分子或具有部分非極性特質的分子) 的疏水部分進入到疏水性空腔內形成暫時性的錯合物，而親水部分則與對掌性的二級醇羥基 (C-OH) 形成氫鍵，因 R 與 S 異構物對環糊精的鍵結常數不同而達成對掌異構物的選擇性，如圖 2-10。各種環糊精呈現不同的選擇性則是因為它們不同的空腔大小以及空腔周圍具有不同數目的羥基。然而，倘若溶液中有一些非極性溶劑存在，則可能影響錯合物的形成，而無分離效果。

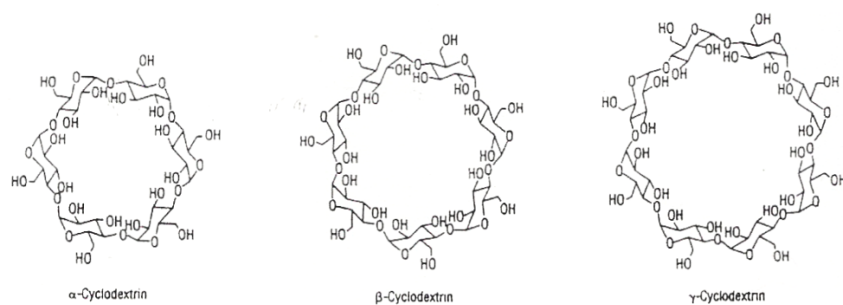


圖 2-9 α -, β -, 及 γ - 環糊精的結構圖

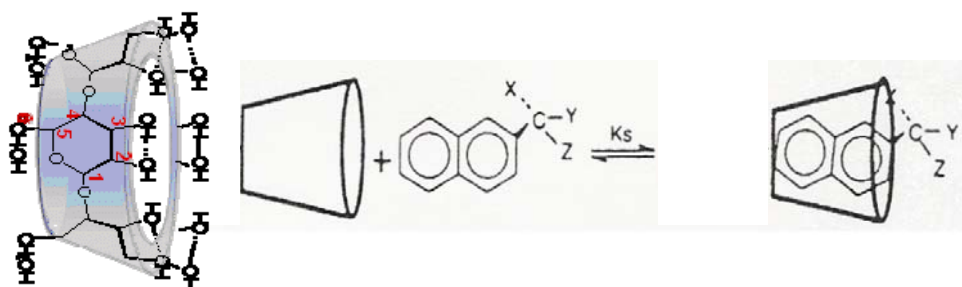


圖 2-10 環糊精與分析物質於水相中的作用模式

分析物的非極性部分多傾向於進入環糊精的
 疏水性內部，而形成暫時性的錯合物

對於位置異構物而言，由於此類異構物具有相同分子式、分子量及帶電荷量，只有在取代基之取代位置不同，因此在毛細管區帶電泳中具有相近的電泳遷移率，使位置異構物無法達到分離。如在緩衝溶液中添加環糊精，利用環糊精與位置異構物形成內包錯合物或主-客錯合物（host-guest complexes）之結合程度的差異，使得原本具有相近電泳遷移速率之分析物在經由環糊精錯合形成不同程度的內包錯合物後，造成電泳遷移速率改變而達到分離的效果。非離子型的中性環糊精抑或是帶有電荷的環糊精除了可應用於非對掌性分析物，如蛋白質、胜肽、胺基酸、小分子及各種位置異構物的分離（Terabe et al., 1990；Luong and Nguyen, 1997），亦可應用於對掌異構物的分析（Fanali, 2000；Zerbinati et al., 2000）。

由於 β -CD 在水中的溶解度很低，較不實用，所以價格上比其他環糊精便宜許多，而我們藉由加入其他簡單的化學藥品就可以幫助 β -CD 溶解，因此在經濟成本的考量下，決定使用 β -CD 當作分離光學異構物的重要組成份。

表 2-4 環糊精的性質 (Luong et al, 1997)

	α -環糊精	β -環糊精	γ -環糊精
葡萄糖單體數	6	7	8
分子量 (g/mole)	972	1135	1297
熔點 (K)	551	572	540
密度 (g/cm ³)	1.42~1.45	1.42~1.45	1.42~1.45
醇羥基數	18	21	24
一級醇羥基數	6	7	8
二級醇羥基數	12	14	16
空腔內徑 (nm)	0.47~0.52	0.60~0.64	0.75~0.83
空腔外徑 (nm)	1.46±0.05	1.54±0.04	1.75±0.04
空腔高度 (nm)	0.79~0.80	0.79~0.80	0.79~0.80
空腔體積 (nm ³)	0.176	0.346	0.510
空腔內水分子數	5	11	17
對水溶解度, 25°C (g/100mL)	14.5	1.85	23.20
醇羥基 pK _a 範圍	12.1~12.6	12.1~12.6	12.1~12.6
比旋光度 [α] ²⁵ _D	150.5±0.5	162.5±0.5	177.4±0.5