

國立臺灣大學理學院化學所
博士論文

Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

類黃酮化合物在毛細管電泳法之分離與線上濃縮之研究
Studies of Separation and On-line Concentration of Flavonoids in
Capillary Electrophoresis



郭家銘
Chia-Ming Kuo

指導教授：林萬寅 博士，林敬二 博士

Advisor: Wann-Yin Lin, Ph.D.
Ching-Erh Lin, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月
July, 2012

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

論文中文題目：類黃酮化合物在毛細管電泳法之分離與線上濃縮之研究

論文英文題目：Studies of Separation and On-line Concentration of Flavonoids in
Capillary Electrophoresis

本論文係郭家銘君（學號 D96223109）在國立臺灣大學化學系完成之博士學位論文，於民國 101 年 7 月 16 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：

林敬二 林萬寧 (簽名)

(指導教授)

林金立

吳劍侯

林萬寧

桂椿樞

林敬二

謝誌

首先要感謝林敬二教授及林萬寅教授這幾年來對我的指導，老師們的學者風範總令我景仰不已，無論做研究或待人處事都使我長了許多視野，也知道我還有很多不足得好好再學習的地方。並感謝口試委員林金全老師、桂椿雄老師及吳劍侯老師蒞臨指導，並提醒我論文不足之處，還有很感謝預口試請的劉春櫻老師各方面的包容及配合。

一路求學過程非常感謝帶我長大的奶奶，她一直希望家裡小孩能唸個博士，感謝一直各方面支援我的叔公跟叔叔還有伯父伯母，一直督導我好好做個正派有用的人，外婆、大舅舅、舅媽跟表弟表妹也一直讓我回南部的時候感到家庭的溫暖，還有一直很疼我的媽媽，感謝妳讓我到這世上體驗人生。

謝謝研究所生活中認識的所有人，旭敦學長引導我來學習毛細管電泳，一開始教我如何報告的郁庭學姊，實驗上幫我解決非常多問題的宇智大學長、碩班時照顧過我的怡茹學姊、幫我解決任何word處理及懂很多有的沒有的艾傑學長、常常一起聊些五四三的育錚學姊、方旬、信凱、33、番仔、小白兔和阿毛、碩班時的夥伴思親及雯堯、總是有很多有趣新奇事物的巍儒、廷璋、育生、losie、常一起去看電影的夠用、紅白、很白癡的崇元，因為你們這些系上的朋友來實驗室才會一直有動力。

也非常感謝高中大學一路相挺同學們，讓我一開始來台北有黑戶可以住的卓勳跟建安，建安常常給我很多其他的幫助，讓我在學業之餘也可以追求音樂的夢想、在低潮時可互相吐苦水的小米、總提供很多有用的資訊以前常借我機車的紅燒魚、超好約的玩樂咖林白爛、常找我吃飯的君豪、鬍子、河馬、愛玉、林彥伯、哲維。

感謝詞曲創作社認識的朋友一直學業上及音樂上的互相鼓勵，幫我得到政大

金旋獎創作組第二名的壩子跟熱拿鐵，常關心我然後常找我打桌球保齡球的skippy，還有感謝樂園工作室跟工作室的大夥，冠宇、kelly、貞子、小茵，讓我周末有可以去放鬆心情的市內桃園，感謝小馬讓我在課業外玩音樂能玩到賣出第一首歌，完成了來台北後很希望能達到的夢想。

感謝所有教過的家教學生及他們的家長，有家教薪水讓我有更多機會去探索台北這個複雜的城市，也開了很多眼界並學習到許多事物。

最後感謝我的女朋友小武，一直陪在我身邊陪我，鼓勵我，而且總是能陪我嘗試各樣的事物或吃吃喝喝，讓我總是保持著開心幸福的感覺。

在台大這麼多年終於要畢業了，碩班畢業的時候忘了寫謝誌，所以這次多寫了一些，真的很感謝這段時間遇到的每個親朋好友對我的照顧，希望往後的人生還能有很多機會互相打擾指教，這段時間能遇到你們真是我運氣非常好。



中文摘要

本論文選擇以類黃酮化合物(flavonoids)以毛細管電泳法來探討偵測靈敏度的增強，注重小分子在毛細管電泳上之線上濃縮技巧。結果分為兩大部分：

第一部份先以毛細管區帶電泳法(CZE)及微胞電動力層析法(MEKC)做分離，接著測試幾種不同堆積模式，包括電極極性反向堆積模式(large volume sample stacking with reverse electrode polarity, LVSS)及大體積反向電壓微胞掃集模式(large volume sample stacking-sweeping, LVSS-sweeping)或正向添加 SDS 的掃集模式，其中 LVSS-Sweeping 及正向掃集的最佳化條件較難求得，而 LVSS 法於 0.4 分鐘時切換電壓方向可得良好的堆積，並測得 hesperetin、naringenin、quercetin 與 kaempferol 的偵測極限分別 14.87、14.71、19.76 與 16.66 ng/mL(S/N = 3)，並可用於真實樣品偵測。

第二部份強調於逆向掃集模式的改良，最佳條件為使用掃集模式(sweeping)，於分離緩衝中及樣品基質中添加適當電解質，有助改善長時間進樣的樣品濃縮。甚至可讓注入類黃酮化合物時間達 480 秒，最大樣品體積約佔毛細管總長的 96.5%。樣品基質使用 pH 2.0 的 20 mM 磷酸鹽緩衝液，分離緩衝液為 pH 2.0 的 20 mM 樣品注入時間為 120 秒時，磷酸緩衝液並分別添加 50 mM 的 SDS，ACN 則分別添加 10%。而 120 秒的樣品注入所得 hesperetin、naringenin、quercetin 及 kaempferol 之偵測極限分別為 43.53、38.25、57.38 及 48.55 ng/mL(S/N = 3)。而 480 秒的樣品注入所得 hesperetin、naringenin、quercetin 及 kaempferol 之偵測極限分別為 21.28、15.37、24.26 及 24.7 ng/mL(S/N = 3)。並能有效應用於真實樣品之檢測。

關鍵字：類黃酮化合物、毛細管電泳、線上濃縮、樣品掃集、大體積堆積。

Abstract

In this dissertation, four flavonoid analytes were selected to investigate the enhancement of detection sensitivity by capillary electrophoresis. Several on-line concentration modes studied were divided into two parts:

In the first part, CZE and MEKC modes were studied first, and then the large volume stacking with switching the electrode polarity (LVSS) mode and the LVSS-sweeping mode were used to concentrate the analytes. Among these modes, the LVSS with switching polarity at 0.4 min was the optimal condition. The limits of detections ($S/N = 3$) of hesperetin, naringenin, quercetin and kaempferol were determined to be 14.87, 14.71, 19.76 and 16.66 ng/mL, respectively.

In the second part, the sweeping technique was improved to concentrate the analytes. With 120 sec sample injection, the concentration of phosphate buffer at 20 mM was used as the sample matrix, while the separation buffer consisting of 20 mM phosphate electrolyte and 50 mM SDS and 10 % acetonitrile at pH 2.0 was optimized, and the limits of detections ($S/N = 3$) of hesperetin, naringenin, quercetin and kaempferol were determined to be 43.53, 38.25, 57.38 and 48.55 ng/mL, respectively. Sample injection up to 480 sec can also be achieved for baseline separation of four flavonoids in the sweeping mode, and the limits of detections ($S/N = 3$) of hesperetin, naringenin, quercetin and kaempferol were determined to be 21.28, 15.37, 24.26 and 24.7 ng/mL, respectively. The method was successfully applied to determine flavonoids in several real samples.

Key words: flavonoids, capillary electrophoresis, on-line concentration, sweeping, large volume sample stacking.

目錄

審定書.....	i
謝誌.....	ii
中文摘要.....	iv
Abstract.....	v
第 1 章 序論.....	1
1-1 引言	1
1-2 毛細管電泳發展史	1
1-3 毛細管電泳的分離原理	3
1-3-1 電泳遷移率(Electrophoretic mobility)	3
1-3-2 電滲流(Electroosmotic flow, EOF)與流型(Flow profile).....	5
1-3-3 分離效率(Separation efficiency)	6
1-4 毛細管電泳的分離模式	8
1-4-1 毛細管區帶電泳法(CZE).....	8
1-4-2 微胞電動力層析法(MEKC).....	9
1-4-3 毛細管凝膠電泳法(CGE)	9
1-4-4 毛細管等電聚焦電泳法(CIEF).....	10
1-4-5 毛細管等速電泳法(CITP).....	10
1-4-6 毛細管電層析法(CEC)	10
1-5 毛細管電泳的注入方式	11
1-5-1 水動力注入法(Hydrodynamic injection)	11
1-5-2 水靜力注入法(Hydrostatic injection).....	11
1-5-3 電動力注入法(Electrokinetic injection).....	12
1-6 毛細管電泳的儀器裝置	13

1-7 線上樣品濃縮的原理與相關計算	13
1-8 毛細管電泳之線上樣品濃縮技術	16
1-8-1 正向堆積模式(NSM).....	17
1-8-2 電極極性反向堆積模式(REPSM).....	18
1-8-3 反向遷移微胞濃縮(SRMM).....	18
1-8-4 增強電場樣品進樣(FESI).....	19
1-8-5 以反向遷移微胞增強電場樣品進樣(FESI-RMM).....	19
1-8-6 利用反向遷移微胞濃縮與水之堆積(SRW).....	19
1-8-7 掃集(Sweeping).....	20
1-8-8 陽離子選擇性注射法與掃集之結合模式(CSEI-Sweeping) ..	21
1-8-9 動力 pH 接合-掃集(dynamic pH junction-Sweeping).....	21
1-9 毛細管電泳之未來展望	22
第 2 章 文獻探討.....	40
2-1 類黃酮類化合物	40
2-1-1 基本介紹.....	40
2-1-2 結構及分類.....	40
2-1-3 我們選用之分析物.....	42
2-2 類黃酮化合物之毛細管電泳相關文獻	43
第 3 章 實驗設備與方法.....	51
3-1 實驗藥品	51
3-1-1 分析物.....	51
3-1-2 緩衝溶液.....	51
3-1-3 緩衝溶液添加劑.....	52
3-1-4 其他試劑與藥品.....	52
3-2 實驗設備及耗材	52

3-2-1 毛細管電泳儀.....	52
3-2-2 毛細管柱.....	53
3-2-3 實驗室型酸鹼度/氧化還原電位計(Laboratory pH Meter).....	54
3-2-4 實驗室型導電度計(Laboratory conductivity meter)	54
3-3 實驗方法	55
3-3-1 分析物之配製.....	55
3-3-2 緩衝溶液之配置.....	55
3-3-3 紅酒樣品之萃取.....	56
3-3-4 蜂蜜樣品之萃取.....	56
3-3-5 毛細管的處理.....	56
3-3-6 實驗操作.....	57
3-3-7 毛細管電泳之相關計算.....	57
第 4 章 結果與討論.....	61
4-1 線上濃縮模式之挑選.....	61
4-2 一般模式-毛細管區帶電泳法(CZE).....	62
4-3 大體積樣品堆積(LVSS).....	62
4-4 正向大體積堆積掃集 (LVSS-Sweeping).....	63
4-5 正向掃集模式 (sweeping with normal polarity).....	64
4-5-1 pH 值.....	64
4-5-2 注入時間.....	64
4-6 逆向掃集模式 (sweeping with reverse polarity)	64
4-6-1 不同秒數的樣品注入變化.....	64
4-6-2 120 秒樣品注入.....	65
4-6-3 480 秒注入.....	67
4-7 各方法比較.....	68

4-8 結論	69
參考文獻.....	111

圖目錄

圖 1-1 Stern model of the electric double layer is occurring at the interface between an electrolyte solution and the surrounding surface.	24
圖 1-2 Flow profiles of HPLC (A) and CE (B), respectively.	25
圖 1-3 Instrumental set-up of a capillary electrophoresis system.....	26
圖 1-4 Schematic explanation of band broadening; representation of the variation of the field strength, sample distribution, and the peak shape in the sample zone: (A) sample zones of ions with higher mobility than the background; (B) sample zones of ions with the same mobility as the background electrolyte; (C) sample zones of ions with lower mobility than the background electrolyte.....	27
圖 1-5 Evolution of migration of analytes and micelles in the sample solution (S) zone and separation solution (BGS) zone during NSM-MEKC: (A) After injection; (B) high-velocity micelles in S zone carry the analytes to the opposite concentration boundary B_2 in the order of decreasing retention factor: $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) analytes stack in B_2 into thin concentrated zones; (D) analytes zones separate by virtue of MEKC.	28
圖 1-6 Evolution of migration of analytes and micelles during REPSM-MEKC: (A) Starting situation; (B) micelles entering from cathodic end of the capillary carry with analytes, where $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) micelles and analytes stack at the concentration boundary B_1 and polarity is switched later to positive; (D) separation and later detection of zones.....	29
圖 1-7 Evolution of migration of analytes and micelles in S and BGS during and after stacking at acidic pH: (A) starting situation; (B) high-velocity micelles in the S zone emanating from the cathodic vial carry the analytes to the concentration boundary B_1 in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) analytes after stacking leave B_1 prior to the removal of the sample matrix due to electrophoresis in the BGS zone; (D) analyte zones migrate toward the detector and continue to separate.....	30
圖 1-8 Evolution of migration of analytes and micelles during FESI-MEKC: (A)	

initial situation; (B) anionic micelles enter the capillary and carry with them analytes emanating from the cathodic vial, $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) micelles and analytes stacked at the concentration boundary B_2 , voltage is cut and the sample vial is replaced by another BGS vial when the measured current is approximately 97-99 % of the predetermined current, voltage is then applied at positive polarity; (D) separation of zones occurs.....31

圖 1-9 Evolution of migration of analytes and micelles in the water plug and BGS zone during and after FESI-RMM: (A) hydrodynamic injection of water after conditioning the capillary with BGS; (B) injection using voltage of analytes prepared in a micellar matrix found in the cathodic vial (analytes solubilized in these micelles enter the water plug in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$); (C) voltage is shut, the sample vial is replaced by another BGS vial and voltage is applied at negative polarity again, and analytes stack at the concentration boundary B; (D) focused bands separate by virtue of MEKC.32

圖 1-10 Evolution of migration of analytes and micelles in the water zone, S and BGS zones during SRW-MEKC: (A) Hydrodynamic injection of water followed by S after conditioning the capillary with BGS; (B) application of voltage at negative polarity with the BGS in the inlet and outlet vials (analytes solubilized in the micelles enter the water zone and stack in the concentration boundary in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$); (C) separation of stacked zones prior to the total removal of the low conductivity zones; (D) focused bands separate by virtue of MEKC.33

圖 1-11 Evolution of migration of analyte zones in Sweeping-MEKC: (A) Starting situation, injection of sample solution S with length l_{inj} after conditioning the capillary with BGS (found at both electrode vials); (B) micelles from the cathodic vial enter the S zone or capillary (area enclosed by blue lines) and sweep the analytes into narrower bands depending on the retention factor (ka_1 , ka_2 , depicted by red and green lines, respectively); (C) First batch of micelles that entered the S zone reaches the interface I between S and BGS zones; (D) Separation of zones based on MEKC.34

圖 1-12 Evolution of migration of analyte zones in CSEI-Sweeping-MEKC: (A) starting situation; (B) electrokinetic injection at positive polarity of cationic analytes prepared in a low-conductivity matrix or water, nonmicellar background buffer found in the outlet end, cationic analytes focus or stack at the interface between the water zone and high-conductivity buffer

void of organic solvent zone; (C) application of voltage at negative polarity, micelles entering from the cathodic vial into the capillary and sweep the analytes to narrower bands; (D) separation of zones based on MEKC.35

圖 1-13 Schematic diagrams of the dynamic pH junction-sweeping model. (A) The anionic micellar (such as SDS) BGS and the sample solution (a nonmicellar buffer) are injected into the capillary, respectively; (B) when the injection is complete, a positive polarity is applied (if a negatively charged SDS surfactant is used) to power the CE separation; (C) the neutral analytes are converted to anions and are swept by the SDS micelles; (D) separation occurs by the MEKC mode.....	36
圖 2-1 類黃酮化合物基本架構.....	41
圖 2-2 類黃酮類化合物之結構及分類.....	46
圖 3-1 左一為智利紅酒梅若紅，左二為台灣紅麴紅酒，左三為美國加州紅酒，左四為西班牙克里斯提娜紅酒.....	51
圖 3-2 Beckman P/ACE MDQ 毛細管電泳儀.....	53
圖 3-3 毛細管.....	53
圖 3-4 酸鹼度計.....	54
圖 3-5 導電度計.....	55
圖 3-6 四個分析物之結構及 pKa 值.....	58
圖 3-7 Beckmann 軟體 120 sec 樣品注入的計算.....	59
圖 3-8 Beckmann 軟體 480 sec 樣品注入的計算.....	59
圖 4-1 Effect of pH of running buffer: (A) pH 9.0; (B) pH 9.5; (C) pH 10.0. Separation buffer: 50 mM borate buffer. Sample: 10 µg/mL flavonoids. Injection pressure: 1 psi, applied voltage: +25 kv. Injection time: 10 sec...70	70
圖 4-2 Effect of injection time of sample on the stacking efficiency: 1 µg/mL mix flavonoids dissolved in water, separation buffer, 50 mM borate buffer at pH 9.0; Injection pressure, 1 psi; applied voltage, +25 kv. Injection time: 5-60 sec.	71
圖 4-3 (A) LVSS with 480 sec analyte injection, (B) LVSS with 120 sec analyte injection, (C) CZE with 5 sec sample injection, analyte concentration : 1 µg/mL for (A) and (B), 10 µg/mL for (C). Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.	72
圖 4-4 The calibration curves of hesperetin and naringenin, LVSS with polarity switch at 0.4 min.	73
圖 4-5 The calibration curves of quercetin and kaempferol, LVSS with polarity switch at 0.4 min.	74
圖 4-6 Effect of glycol and SDS in the running buffer: (A) 10 % glycol and 20 mM	

- SDS, (B) 10 % glycol and 50 mM SDS, (C) 20 % glycol and 20 mM SDS and (D) 20 % glycol and 50 mM SDS, Separation buffer: 50 mM borate buffer at pH 9.0. Sample: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ flavonoids. Injection pressure: 1 psi, applied voltage: +25 kv. Injection time: 120 sec.75
- 圖 4-7 Effect of pH of running buffer electrolyte: sample solution, flavonoids (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolved in 20 mM phosphate buffer, separation buffer, 20 mM phosphate buffer containing 25 mM SDS at different pH: (A) pH 6.5 (B) pH 7.0 (C) pH 7.5. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.....76
- 圖 4-8 The variation of peak height of analytes as a function of pH in the range 6.5~7.5 in a phosphate (20 mM) buffer. Injection time : 120 sec. Analyte identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.77
- 圖 4-9 Effect of injection time of sample on the stacking efficiency: mix flavonoids 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (A), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (B)~(E) dissolved in 20 mM phosphate buffer at pH 6.5, separation buffer, 20 mM phosphate buffer containing 25 mM SDS at pH 6.5; Injection pressure, 1 psi; applied voltage, +20 kV. Injection time: (A) 5 sec, (B) 60 sec, (C) 120 sec, (D) 180 sec, (E) 240 sec.78
- 圖 4-10 Plots of peak height versus injection time with a mixture of four flavonoids at a sample concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 20 mM SDS at pH 2.0; applied potential, - 15 kV....79
- 圖 4-11 Plots of peak area versus injection time with a mixture of four flavonoids at a sample concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 20 mM SDS at pH 2.0; applied potential, - 15 kV....80
- 圖 4-12 Effect of applied voltage on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: Sample solution, mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec. Applied voltage: (A) -25 kV, (B) -22 kV, (C) -20 kV, (D) -18 kV, (E) -15 kV81
- 圖 4-13 The variation of peak area of analytes as a function of applied voltage (-15 kV, -18 kV, -20 kV, -22 kV, -25 kV) in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Analyte symbol, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.82

- 圖 4-14 The variation of peak height of analytes as a function of applied voltage(-15 kV, -18 kV, -20 kV, -22 kV, -25 kV) in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time: 120 sec. Analyte symbol, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.83
- 圖 4-15 Effect of acetonitrile concentration in the buffer on the separation efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 µg/mL for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. Acetonitrile concentration: (A) 0 %, (B) 4 %, (C) 6 %, (D) 10 %84
- 圖 4-16 Effect of methanol concentration in the buffer on the separation efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 µg/mL for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. Methanol concentration: (A) 0 %, (B) 4 %, (C) 8 %, (D) 10 %,.....85
- 圖 4-17 Effect of SDS concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 µg/mL for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. SDS concentration: (A) 25 mM, (B) 50 mM.86
- 圖 4-18 The variation of peak area of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.87
- 圖 4-19 The variation of peak height of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.88
- 圖 4-20 Effect of sample matrix on separation and peak height of flavonoids: Sample solution, flavonoids (1 µg/mL) dissolved in (A) 10 mM, (B) 20 mM, (C) 50 mM, (D) 75 mM, (E) 100 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 50 mM SDS at pH 2.0; applied potential, -15 kV. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.89
- 圖 4-21 The variation of peak height of analytes as a function of phosphate

	concentration in the range 10~100 mM in the sample matrix at pH 2.0. Injection time : 120 sec.	90
圖 4-22	The calibration curves of hesperetin and naringenin in the sweeping mode with 120 sec sample injection.	91
圖 4-23	The calibration curves of quercetin and kaempferol in the sweeping mode with 120 sec sample injection.	92
圖 4-24	Electropherogram of honey obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.....	93
圖 4-25	Electropherogram of red wine 1 obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.....	94
圖 4-26	Electropherogram of red wine 5 obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.....	95
圖 4-27	Effect of acetonitrile concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 µg/mL for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 480 sec; applied voltage, -15 kv. Acetonitrile concentration: (A) 10 %, (B) 15 %, (C) 20 %,	96
圖 4-28	Effect of SDS concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 µg/mL for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 480 sec; applied voltage, -15 kv. SDS concentration: (A) 25 mM, (B) 50 mM, (C) 75 mM, (D) 100 mM.....	97
圖 4-29	The variation of peak area of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 480 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.	98
圖 4-30	The variation of peak height of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 480 sec.	99
圖 4-31	The calibration curves of hesperetin and naringenin at the sweeping mode with reverse polarity. Sample injection time: 480 sec.	100
圖 4-32	The calibration curves of quercetin and kaempferol at the sweeping mode	

with reverse polarity. Sample injection time: 480 sec.	101
圖 4-33 Electropherogram of different stacking mode (A) in normal mode (B) LVSS (C) Sweeping (D) Sweeping. Sample concentration: (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B)~(D) 1 $\mu\text{g/mL}$. Injection: (A) 1 psi; 5 sec; (B) and (C) 1 psi; 120 sec; (D) 1 psi, 480 sec.	102

表目錄

表 1-1 Injection techniques in capillary electrophoresis.....	37
表 1-2 Comparisons of CE and HPLC.....	38
表 1-3 Conditions of on-line preconcentration techniques in MEKC using SDS micelles	39
表 2-1 The references about MEKC (part I).....	47
表 2-2 The references about MEKC (part II).....	48
表 2-3 The references about MEKC (part III)	49
表 2-4 The references about MEKC (part IV).....	50
表 3-1 MEKC 常用界面活性劑之臨界微胞濃度值(CMC)及單體聚集數(N)[137].	60
表 4-1 The conductivity of the phosphate buffer matrix	103
表 4-2 The conductivity of running buffer	104
表 4-3 LOD and reproducibility of flavonoids for 120 sec injection in the LVSS mode(n=3).....	105
表 4-4 LOD and reproducibility of flavonoids for 120 sec injection in the sweeping mode (n=6).....	106
表 4-5 Recovery of two kinds of wine.....	107
表 4-6 The flavonoid contents for different species of wines.....	108
表 4-7 LOD and reproducibility of flavonoids for 480 sec injection in the sweeping mode(n = 3).....	109
表 4-8 Comparison of the enhancement effect of different modes.....	110

第1章 序論

1-1 引言

近年來，毛細管電泳為一已成熟之分離技術，其利用加電壓於毛細管兩端，使得帶電荷之分析物擁有不同的電泳速度而分離，相較於傳統的 HPLC 分離技術，其特色為分析樣品量少，時間短，廣泛運用於分離各種藥物或環境污染物之鑑定上。但因毛細管管徑狹小，使得其靈敏度不佳，更使得偵測極限較高，故各式各樣的離線濃縮方法及線上濃縮方式陸續地被開發出來。

許多研究指出類黃酮化合物具有抗氧化性、抗心血管疾病、以及抗癌的功效，且廣泛地存在於各種水果、植物及食物中，例如蜂蜜及紅酒或一些天然藥材都含有類黃酮化合物，本篇論文研究類黃酮化合物在不同條件下之線上濃縮效果，並試著應用到真實樣品(蜂蜜或紅酒)之檢測。

1-2 毛細管電泳發展史

電泳(Electrophoresis)定義為溶液中之帶電荷分子，在電場作用下受到吸引力或排斥力，而朝向相反電荷之兩極方向遷移的現象。利用帶電荷粒子的帶電性、帶電量及粒子的大小差異形成不同的遷移速度而達到分離的效果，這種分離技術即稱為電泳分離法。早先電泳實驗大多在親水性凝膠或其他支撐介質上進行，通常用以分離較大的分子物質如蛋白質或其他生生物質，但是凝膠的製備不僅費時費力，實驗結果的再現性亦不佳。然而，電泳分離法在化學或生化的領域中被視為是一種非常重要的分析技術。

1897 年，Kohlraush[1]首先提出帶電荷粒子在電解質中的遷移方程式，利用物理定律來解釋離子在電解質中的遷移行為。直到 1937 年，瑞典科學家 Tiselius[2]以”移動邊界(moving boundary)”方法將人體血清中的 α 、 β 、 γ 球蛋白以及胺基酸分離出來，由於他在電泳技術發展與應用有卓越貢獻，使他在 1948 年榮獲諾貝

爾化學獎，從此電泳分離技術逐漸受到大家重視。

理論上電泳的分離效率與外加電場的大小成正比，但施加高電壓時會產生焦耳熱(Joule heating)而導致熱擴散與對流的現象，此熱效應會使介質產生黏度梯度及速度梯度而導致樣品區帶變寬，使得分離的效率受到熱擴散和對流的限制[3]。此種焦耳熱效應會隨著電場的強度增加而增加，早期為了克服這項限制，使用許多介質如濾紙、聚丙烯醯胺(polyacrylamide)、澱粉(starch)或瓊脂(agarose)凝膠來穩定電解質的擾動。另外以較小內徑的管柱來乘載電解質，也可以減少中心到兩側或管柱內徑向的黏度差異與速度差異。

1967年 Hjerten[4]使用內徑僅 1~3 mm 的石英管以減少熱效應，且以甲基纖維素(methylcellulose)修飾毛細管管壁，然後將毛細管繞著管柱中心軸緩慢的旋轉以防止電滲流的產生，成功地分離無機離子、核酸的水解物、蛋白質、核酸與濾過性病毒等。1974年 Virtanen 和 Mikkers[5, 6]使用 200~500 μm 內徑的玻璃毛細管和聚四氟乙烯管進行電泳分離的實驗，可有效地控制焦耳熱產生的對流問題。

目前大家所論及的毛細管電泳技術，又稱為高效能毛細管電泳法(High performance capillary electrophoresis, 簡稱 HPCE)，其為在內徑約 25~75 μm 的毛細管中進行電泳分離實驗，因口徑小的毛細管內壁表面積大，散熱率好，使得理論板數大為提高。然而毛細管與傳統電泳的主要差別為前者是在毛細管中進行的，後者為在平板上進行，毛細管電泳是由 Jorgenson 和 Lukacs[7-9]在 1981 年所提出的，他們以內徑 75 μm 的毛細管柱來分離衍生化的胺基酸，在充滿緩衝溶液的毛細管兩端施加 30 kV 的高電壓進行分離實驗，並且用螢光偵測器做線上偵測，成功地分離胺基酸的衍生物。他們詳細探討各種影響分離效率的因素，並且建立毛細管電泳的理論和實驗基礎。

毛細管區帶電泳法(Capillary zone electrophoresis)於一般情況下只能分離帶電荷離子，而無法應用於中性分析物，中性分析物通常隨電滲流一起遷移。但是

Terabe 在 1984 年[10]提出微胞電動力毛細管層析法(Micellar electrokinetic capillary chromatography)，使得毛細管電泳法能夠同時分離帶電荷粒子與中性分析物。此技術為在緩衝溶液中添加濃度大於臨界微胞濃度值(CMC)的界面活性劑而形成微胞，利用分析物在微胞相與水相有不同的分配係數來進行分離。1985 年 Hjerten[11]將傳統的等電聚焦技術應用到毛細管電泳中，進而提出毛細管等電聚焦法(Capillary isoelectric focusing)。1987 年 Cohen 和 Karger[12]亦將傳統的凝膠電泳法應用到毛細管中以分離胜肽與蛋白質，因而提出毛細管凝膠電泳(Capillary gel electrophoresis)的技術。同年，Tsuda[13]結合高效能液相層析管柱與電泳技術提出毛細管電層析法(CEC)。此外，還有其他的毛細管電泳技術被發展出來，如毛細管等速電泳法(Capillary isotachopheresis)。1988 年 Rose 和 Jorgenson[14]首先提出毛細管電泳作微量分析的可行性，且商業化的毛細管電泳儀亦於此年上市，加速毛細管電泳的應用與發展。

1-3 毛細管電泳的分離原理

1-3-1 電泳遷移率(Electrophoretic mobility)

電泳是溶液中的帶電荷粒子在電場的作用下，以不同的速度朝兩極移動的現象，其電泳速率 v_{ep} 可表示如下：

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1-1)$$

其中 μ_{ep} 為電泳遷移率， E 為外加電場。

一個帶 z_i 電荷的粒子，在固定電場 E 作用下所受到的靜電力為：

$$F_i = z_i e E \quad (1-2)$$

其中 e 為一個電子的電量。

這個力量會使此粒子進行加速運動直到與反向摩擦力 F_d 達成平衡：

$$F_i = F_d \quad (1-3)$$

此摩擦力與粒子的運動速度 v_i 及介質黏滯係數成正比[15]。假設粒子為球型離子，則摩擦力可表示為：

$$F_i = 6\pi\eta r_i v_i \quad (1-4)$$

其中 r_i 為球型分子的離子半徑。

因此在電泳過程中，當靜電力與摩擦力達到穩態平衡時，兩者大小相等而方向相反，可知帶電粒子 i 在電場 E 作用下的移動速率為 v_i ：

$$v_i = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_i} E \quad (1-5)$$

這種帶電粒子的遷移行為即為電泳，我們定義電泳遷移率為單位電場下的電泳速率為 μ_i 或 μ_{ep} ：

$$\mu_i = \mu_{ep} = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_i} \quad (1-6)$$

1.2.2 電雙層(Electric double layer)與 Zeta 電位

在毛細管電泳中，不論是帶電荷粒子或毛細管電泳的內壁均會有電雙層的形成，電雙層是浸於溶液中的物質表面都會發生的一種情形。一般毛細管的材料常採用熔融矽膠(fused silica)，在 $\text{pH} > 3$ 的情況下，毛細管表面受到鹼液活化後，毛細管表面的矽醇基(Si-OH)解離而形成帶負電荷的 Si-O^- ，使溶液中存在過多的正電荷；有些被不可逆地吸附在毛細管的內壁，稱為固定層(Stern layer)；還有一些分佈在距離毛細管較遠的區域，其電荷密度隨著距離管壁愈遠而成指數趨勢急劇下降，此層稱為擴散層(Diffusion layer)，此兩部分電荷所組成的離子層稱為電雙層(Electric double layer)，如圖 1-1[16]所示。由於毛細管溶液中電荷分佈不均勻，使溶液與管壁間有電位差的存在，若將溶液的中央部分(Bulk solution)的電位定為 ψ_1 ，管壁的電位定為 ψ_2 ，此時固定層的電位下降 ϕ ，而在擴散層中電位由 ψ_2 降至 ψ_1 ，毛細管內溶液各處與 $(\psi_2 - \phi)$ 的差距稱為 Zeta 電位(ζ potential)，其方程式可表示如下：

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon} \quad (1-7)$$

式中 δ 為電雙層的厚度， e 為每單位表面積的電荷， ϵ 為溶液的介電常數。

1-3-2 電滲流(Electroosmotic flow, EOF)與流型(Flow profile)

廣義地說，電滲流是緩衝液相對於毛細管內壁表面移動的電泳現象，在電場的作用之下，毛細管內壁形成電雙層，其中水合陽離子集體向負極移動所引起的電滲流與帶電粒子在溶液中的電泳遷移行為類似，可用下列方程式表示之：

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \quad (1-8)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta_{eo}}{\eta} \quad (1-9)$$

其中 v_{eo} 為電滲流速率， μ_{eo} 為電滲流遷移率， η 為緩衝液的黏度， ε 為介電常數， ζ 為電滲流的 Zeta 電位。

由此方程式可以看出電滲流與 Zeta 電位及介電常數成正比，與黏度成反比。一般而言，電滲流強度受 Zeta 電位、電雙層的厚度和緩衝液黏度的影響。Zeta 電位愈大、電雙層愈厚、黏度愈小，將使得電滲流值愈大。由於 Zeta 電位在擴散層中急劇下降，其寬度僅數十微米，故毛細管中接近內管壁的大部分溶液，其 Zeta 電位均為定值，因此毛細管在電場作用下，除了靠近毛細管管壁微米區域之外，其他區域皆以同一個速度前進，此時的電泳速率 v_{eo} 即造成穩定的電滲流。影響電滲流的大小與方向除了緩衝液組成與濃度、pH 值、有機添加劑、毛細管管壁修飾與否之外，毛細管樣品區帶的組成亦是影響的主要因素。

毛細管電泳中的電滲流是電解質相對於毛細管管壁移動的現象，此由距離管壁表面甚近的正電荷離子所引起的，當施加電場後，這些正電荷粒子因電場作用之下而集體向負極移動，同時也帶動附近水分子一起移動，當此種電滲流與電解質黏滯力達到平衡時，整個流體會像一個扁平板塞狀而向負極移動，與一般 HPLC 的拋物線流型是不相同的，如圖 1-2[17]所示。因為 HPLC 的驅動力是靠壓力系統，受黏滯力的影響，中央處的速度大約是平均速度的 2 倍。換言之，即

使樣品在管柱中不滯留，也會因為本身流型的影響造成區帶變寬的現象，然而毛細管電泳的流型是扁平型，因此樣品不會有區帶變寬的現象發生。

由於帶電荷粒子在毛細管內的緩衝溶液中有自己的電泳遷移率(μ_{ep})；而分離緩衝溶液本身亦有電滲流遷移率(μ_{eo})的存在，因此帶電荷粒子在沒有其它因素影響下的視遷移率(μ_{ap})為這兩者向量的加成：

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (1-10)$$

在毛細管電泳實驗中，可由中性物質(如氬甲烷)的遷移時間 t_0 ，以及帶電荷分析物的遷移時間 t_m ，來求得分析物的電泳遷移率(μ_{ep})：

$$\mu_{ep} = \mu_{ap} - \mu_{eo} = \frac{L_d \times L_t}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (1-11)$$

其中 L_d 為毛細管進樣端到偵測器的有效長度， L_t 為毛細管的總長度， V 為施加的總電壓。

在毛細管電泳分離的過程中，分離的機制就是藉著各種樣品分析物在緩衝溶液中之電泳遷移率差異性來達成分離。因此藉由改變緩衝條件如成分、濃度、pH 值、添加有機修飾劑等來達成分離的目的。

1-3-3 分離效率 (Separation efficiency)

毛細管電泳(CE)與高效能液相層析(HPLC)同為液相分離技術，因此 CE 在功能和結果上與 HPLC 十分相似，所以毛細管電泳的分離效率可以用理論板數(N)及解析度(R_s)當作指標：

$$N = \frac{L_d}{H} = \frac{L_d^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_a V L_d}{2 D L_t} \quad (1-10)$$

$$R_s = \frac{2Dt}{W_1 + W_2} = \frac{1}{4\sqrt{2}} \times \Delta\mu \times \sqrt{\frac{V}{\mu_a D}} \quad (1-11)$$

其中 H 為理論板高， σ^2 為分析物的變異係數， D 為分析物在介質中的擴散係數，

Δt 為二分析物的遷移時間差， W_i 為分析物 i 的吸收峰半高寬， $\Delta\mu$ 為二分析物的視電泳遷移率差。

由於毛細管電泳是藉著電泳的現象流動，其流動層面為扁平板面，而不像高效能液相層析是藉由壓力系統來達成，其流動層面為拋物面，所以在毛細管電泳中，理論板數常常可以高達每米數十萬以上，甚至數百萬之上，其分離效率相當可觀。

此外，在毛細管電泳中造成吸收峰波形變寬而影響分離效率的因素主要有下列幾種：

- (1) 焦耳熱造成管內溫度分佈不均，形成介質各處的黏度不一樣；
- (2) 溶質吸附於管壁而造成吸收峰拖尾；
- (3) 溶質與緩衝溶液的導電度相差太大而造成峰行畸變；
- (4) 溶質在介質中的擴散現象；
- (5) 樣品進樣太多。

因此在毛細管電泳分離過程中，必須特別注意以上這些現象，才能適當地克服這些缺點，進而增加分離效率。

1-4毛細管電泳的分離模式

毛細管電泳技術發展至今，已有數種不同分離模式，不同分離模式的分離機制各不相同。目前已發展出來的方法是依照分離原理來命名的：

- 毛細管區帶電泳法
(Capillary zone electrophoresis, CZE)
- 微胞電動力層析法
(Micellar electrokinetic chromatography, MEKC)
- 毛細管凝膠電泳法
(Capillary gel electrophoresis, CGE)
- 毛細管等電聚焦電泳法
(Capillary isoelectric focusing, CIEF)
- 毛細管等速電泳法
(Capillary isotachopheresis, CITP)
- 毛細管電層析法
(Capillary electrochromatography, CEC)

1-4-1 毛細管區帶電泳法(CZE)

毛細管區帶電泳法是電泳技術中最簡單的一種，其分離機制是藉由施加電壓的條件下，毛細管緩衝溶液中的各種樣品分析物因質量與有效電荷量的不同，使得電泳遷移率有差異性，而達到分離的效果，因此又可以稱為自由區帶電泳(free zone electrophoresis)。由於有電滲流的存在，所以可用來分離陰、陽離子，而中性溶質本身在電場中不移動，故隨電滲流一起流出毛細管。此方法可藉由改變緩衝液的成份、濃度、pH 值或添加有機修飾劑等方法來改善分離效率。因為這個方法操作簡單和多樣化，所以毛細管區帶電泳法的應用範圍很廣，包括胺基酸的分析、多肽分析、蛋白質的純度分析、陰陽離子分析等等[18-21]。

1-4-2 微胞電動力層析法(MEKC)

微胞電動力層析法是由 Terabe 等人[10]於 1984 年所提出的一種創新的毛細管電泳分析法，毛細管區帶電泳分離技術受限於化合物必須會解離成離子形式，然而微胞電動力層析法的特色就是能同時對中性物質與帶電物種進行分離。此方法為添加界面活性劑在緩衝溶液中，藉由分析物在水相和微胞相中有不同的分配作用，進而將樣品分析物分離的一種方法。添加大於臨界微胞濃度(Critical Micellar Concentration, CMC)的界面活性劑於緩衝溶液中，界面活性劑單體分子會聚集在一起而形成微胞(micelle)。微胞在水溶液中的結構為界面活性劑單體的疏水性端向內聚集形成微胞中心，親水性端朝外分佈於緩衝溶液中。微胞電動力層析法有兩相，一為緩衝液所組成的水相，另一為微胞所組成的微胞相，此兩相同時存在。微胞電動力層析法分離的原理即是利用樣品分析物在微胞相與水相之間的分配係數不同而達成分離。在微胞動力層析法中，分析物分離的機制不僅是光靠其本身所帶的電荷數與電性的差別，並且利用分析物疏水性及親水性的大小差異而達到分離，所以不帶電荷的分析物也可以在這個方法中被分離。因此微胞動力毛細管層析法的引入，對於毛細管電泳法提供了一種很有價值的分離技術，也使得應用的領域更加寬廣[10, 22-24]。

1-4-3 毛細管凝膠電泳法(CGE)

毛細管凝膠電泳法是目前所有的分析技術中，具有最高分離效率的一種，其理論板數可達每米數百萬的範圍。因為膠體本身具有分子篩的功能，可以用來當作電泳分離的介質，而且膠體亦為非傳導性的介質，它能降低溶質擴散所造成的區帶變寬現象，及減少溶質吸附在毛細管管壁上，通常將管壁覆蓋水溶性聚合物，以消除電滲流。其主要的分離機制為帶電的樣品分析物在一種網狀構造中，藉由施加一外電場作用，使樣品從毛細管的進樣端向偵測器端移動，由於樣品分析物的分子大小或構形不同，因而受到不同程度的網狀阻力，較大分子所受的阻力愈大，其遷移時間愈長，進而達到分離的效果[25-28]。

1-4-4 毛細管等電聚焦電泳法(CIEF)

毛細管等電聚焦法是於 1985 年由 Hjerten 和 Zhu[11]首先提出，是一種依樣品的等電點(pI)不同而達到分離。在這個分析技術中，將酸性溶液放置於毛細管的正極端，而於負極端放置鹼性溶液，當分析物與兩性介質溶液導入毛細管中時，會建立一個 pH 梯度。在外加電場的作用下，兩性的分析物在介質中會移動到其等電點的位置而停止，此時分析物的淨電荷為零。各分析物被聚焦於很窄的區帶裡，再藉由其他方式將分析物推出毛細管偵測分析[29-31]，進行 CIEF 實驗時必須設法抑制或消除電滲流，以免聚焦步驟結果之前，兩性電解質即被沖出毛細管。可將毛細管壁覆蓋或共價鍵合或加入高黏度的水溶性聚合物(如甲基纖維素)以提高緩衝液的黏度，均可達到抑制或完全消除電滲流的效果。

1-4-5 毛細管等速電泳法(CITP)

Isotachopheresis(ITP)是一種等速移動界面的電泳技術，iso-tacho 是等速的意思。等速電泳是在各領域使用相當廣泛的一種分析技術。它的主要特色是使用不連續的緩衝溶液系統，樣品成份聚集在前導電解質(leading electrolyte)和尾端電解質(terminating electrolyte)組成的緩衝溶液中以相等的速度移動，各個成份依據電泳速率的不同而形成連續的樣品區帶，所選用的緩衝溶液，其前導電解質的陰離子遷移率，必須大於樣品的遷移率，而尾端電解質的陰離子遷移率，則必須小於樣品的遷移率，所以毛細管等速電泳法的分離機制即是利用分析物電泳速度的不同來分離。而它的最大的優點在於分析物的濃縮效應，並且提供毛細管電泳法線上濃縮技術的發展，改善了傳統毛細管電泳法偵測靈敏度不佳的缺點[32-34]。

1-4-6 毛細管電層析法(CEC)

毛細管電層析法是使用類似液相層析法中的填充物於毛細管中[35-37]。將平均 2 μm ~ 10 μm 大小的特殊塗佈或鍵結化學官能基的顆粒填充到毛細管中，利用分析物在這種特殊填充物與溶質間的分佈平衡，而產生分離的一種機制。在外加電場的作用下，電滲流是由填充粒子的表面所產生的，但是因為受到填充粒子

的影響，流動的方向較為曲折，但是和壓力驅動的系統比較，實際上它的流動性仍較為一致，很接近平板式的流動圖型。因此使用相同的填充管柱，在毛細管電層析法中比液相層析法能夠得到較高的分離效率。

1-5 毛細管電泳的注入方式

樣品注入的再現性是毛細管電泳法的一個主要困難的問題，樣品區帶愈小愈好而不致於變成為區帶變寬的主要來源。為達到此目的，非常小的樣品體積(2~20 nL)須具有再現性的注射，過量的樣品體積導致峰形迅速扭曲及損失解析度。為達如此高的要求和小體積較好處理，樣品的自動化和微小化是必需的。大部份商業自動化儀器的進樣型態列於表 1-1。

由於毛細管電泳使用的毛細管內徑小於 100 μm ，一般 HPLC 的注射針器十分困難使用，從進樣角度而言，一般電泳技術的進樣量必須小於 100 nL，否則會造成過載(overloading)。毛細管電泳的進樣方法主要分為水動力注入法、水靜力注入法及電動力注入法等三種，以下就毛細管電泳技術的進樣方法加以說明：

1-5-1 水動力注入法(Hydrodynamic injection)

水動力注入法可細分成壓力差(pressure)和抽真空(vacuum)兩種。採用水動力注入法所注入的樣品量與樣品本身的電泳遷移率無關，比電動力注入法較不受樣品基質的影響，較適合作定量分析但其精確度可能較電動力注入法差。本論文所使用的水動力注入法為在毛細管入口端(inlet)施加一壓力差，以此壓力差將入口端的樣品推入毛細管中。進樣量可經由 Hagen-Poiseuille 方程式求出：

$$Q = \frac{\Delta P \times d^4 \times \pi \times C \times t}{8 \times \eta \times L} \quad (1-12)$$

其中 ΔP 為施加在毛細管兩端的壓力差(mbar)， d 為毛細管內徑(μm)， C 為分析物的濃度， t 為分析物的進樣時間， η 為緩衝液的黏度以及 L 為毛細管的總長。

1-5-2 水靜力注入法(Hydrostatic injection)

若是以虹吸進樣，方程式中的壓力差可以表示為：

$$\Delta P = \rho \times g \times \Delta h \quad (1-13)$$

其中 ρ 為緩衝溶液的密度， g 為重力常數， Δh 為毛細管兩端的高度差。由上述的公式可得知採用水動力注入法及水靜力注入法的進樣量不受樣品基質的影響，也與樣品本身的電泳遷移率無關，因此較適合作定量分析。

1-5-3 電動力注入法(Electrokinetic injection)

電動力(或電遷移)注入法是施加一電壓將分析物自樣品溶液瓶中注入毛細管中，電動力注入法所注入分析物的量與分析物的遷移率有關，遷移率愈小則進樣量就愈少，故不適合定量，且其再現性亦較差，因而在應用上受到某些限制。但是當毛細管中有黏性介質或凝膠時，無法採用水動力注入，則需使用電動力注入法。

進樣量 Q (g 或 moles) 由 Jorgenson 提出，可用下式計算之：

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times \pi \times r^2 \times C \times t}{L} \quad (1-14)$$

其中 μ_{ep} 為分析物的有效電泳遷移率， μ_{eo} 為電滲流的電泳遷移率， V 為電壓， r 為毛細管內徑， C 為分析物的濃度， t 為進樣時間及 L 為毛細管的總長。

由上式可知分析物的進樣量與本身有效電泳遷移率及電滲流有關，視遷移率 ($\mu_{ep} + \mu_{eo}$) 快的分析物進樣量會比遷移率慢的分析物進樣量多。但是使用電場放大法對微量樣品作分析時，電動力注入法則有其優勢所在[15, 21, 22]。

1-6 毛細管電泳的儀器裝置

一般毛細管電泳儀的儀器組件包括一根毛細管柱(含窗口)、兩個緩衝溶液瓶、穩定高壓電源、一組光源及偵測器(如 UV 或 PAD)和資料處理器(如積分器)，如圖 1-3 所示[16]。

1-7 線上樣品濃縮的原理與相關計算

毛細管區帶電泳法只能對離子型分析物進行分離，因此 CZE 模式的樣品堆積技術只能對離子物種進行濃縮；然而適當的選擇微胞相與控制相關的分析參數，使得微胞電動力毛細管層析法的樣品濃縮技術可應用於中性分析物，這是因為在分離與濃縮的過程中，分析物溶入微胞的程度不同，使得分析物的有效遷移率不同，進而達到濃縮與分離的效果。

在 MEKC 模式中，已知常用的四種線上樣品濃縮技術分別為樣品堆積 (sample stacking)[38-45]、掃集 (sweeping)[46-50]、瞬間等速電泳 (transient isotachopheresis, t-ITP)[51-55] 與動力 pH 接合 - 掃集 (dynamic pH junction-sweeping)[56-62]。樣品堆積發生在毛細管內高電場區帶(如低導電度之樣品溶液(S 區帶)或水區帶(water))與低電場區帶(如高導電度之分離緩衝液(BGS 區帶))的濃度邊界，分析物在此兩區帶的有效遷移率(或速度)相差甚大，利用分析物的有效遷移率驟降而濃縮在兩種溶液間的濃度邊界。然而掃集是樣品基質與分離緩衝溶液的導電度是維持相等的，因此毛細管內 S 區帶與 BGS 區帶的電場強度大約是相等，利用假靜相(如微胞)挑選(picking)與聚積(accumulating)分析物，且 S 區帶為不含微胞的區帶。瞬間的等速電泳是緩衝溶液內使用兩種具不同遷移率的電解質如前導與末端電解質，以聚焦低濃度且具中度遷移率的離子型分析物。一般而言，毛細管的線上濃縮技術應用與分析物的性質與樣品基質有關。動力 pH 接合是另一種基於分析物在多區段緩衝液的離子化程度(遷移率)不同的線上聚焦方法。動力 pH 接合初始用以描述弱酸性分析物聚焦在樣品區帶與緩衝液區帶接合處形成一段移動的 pH 邊界(moving pH boundary)。當使用 UV 偵測器

時，已有數篇文獻證實弱酸性與兩性分析物的動力 pH 接合的濃度靈敏度可增強毫微莫耳級數[56]，然而，動力 pH 接合無法應用在強酸性與中性分析物，因分析物的遷移率與緩衝液 pH 無關。

在以流體動力注入的樣品濃縮技術中，先將整支毛細管充滿一段含高導電度的 BGS 區帶，再進樣一段長時間且低導電度的 S 區帶。當在毛細管兩端施加一高電壓後，在 S 區帶與 BGS 區帶的濃度邊界，微胞速度降低以致濃縮成一段非常窄的區帶，此時的微胞速率 $v_{(mc)}$ 可表示如下[63]：

$$v_{(mc)} = v_{eo} + v_{ep(mc)} \quad (1-1)$$

其中 v_{eo} 與 $v_{ep(mc)}$ 分別為電滲流速度與微胞速度。

在一個連續性的均相系統中，微胞速度 v_{mc} 可表示如下：

$$v_{(mc)} = [\mu_{eo} + \mu_{ep(mc)}] \cdot E \quad (1-2)$$

其中 μ_{eo} 與 $\mu_{ep(mc)}$ 分別為電滲流遷移率與微胞遷移率。若 E_S 與 E_{BGS} 分別表示在 S 區帶與 BGS 區帶的電場強度， κ_s 與 κ_b 分別表示在 S 區帶與 BGS 區帶的導電度，並且其電阻分別為 R_S 與 R_{BGS} ，分析物的增強因子(enhancement factor, γ)可依下式表示之[95]：

$$\gamma = \frac{\kappa_b}{\kappa_s} = \frac{R_S}{R_{BGS}} = \frac{E_S}{E_{BGS}} \quad (1-3)$$

假設 S 區帶與 BGS 區帶的電場強度在電泳分離實驗過程中皆保持固定[96]，

Chien 和 Burgi [69]提出毛細管的平均電滲流速率 $v_{eo(ave)}$ 可表示如下：

$$v_{eo(ave)} = \frac{\gamma \cdot x \cdot v_{eof(S)} + (1-x) \cdot v_{eof(BGS)}}{\gamma \cdot x + (1-x)} \quad (1-4)$$

其中 $v_{eof(S)}$ 為毛細管只填充 S 的電滲流速率； $v_{eof(BGS)}$ 為毛細管只填充 BGS 的電滲流速率； x 為樣品長度佔毛細管總長的分率，其值介於 0 與 1 之間，所以可將方程式(2-1)重新表示為：

$$v_{(mc)} = v_{eo(ave)} + v_{ep(mc)} \quad (1-5)$$

因為 S 區帶與 BGS 區帶的電場強度不同，所以微胞在此兩區的遷移速度亦不同，

微胞在 S 區帶與 BGS 區帶的遷移速度分別可表示為 $v_{(mc)(S)}$ 與 $v_{(mc)(BGS)}$ ，若假設微胞在此兩段的有效遷移速率 $\mu_{ep(mc)}$ 相同， $v_{(mc)(S)}$ 與 $v_{(mc)(BGS)}$ 可表示如下：

$$v_{(mc)(S)} = v_{eo(ave)} + v_{ep(mc,S)} \quad (1-6a)$$

$$v_{(mc)(BGS)} = v_{eo(ave)} + v_{ep(mc,BGS)} \quad (1-6b)$$

$$v_{ep(mc,S)} = \mu_{ep(mc)} \cdot E_S \quad (1-7a)$$

$$v_{ep(mc,BGS)} = \mu_{ep(mc)} \cdot E_{BGS} \quad (1-7b)$$

其中 $v_{ep(mc,S)}$ 為微胞在 S 區帶的遷移速度， $v_{ep(mc,BGS)}$ 為微胞在 BGS 區帶的遷移速度。

$$E_S = \frac{\gamma \cdot E_o}{[\gamma \cdot x + (1-x)]} \quad (1-8a)$$

$$E_{BGS} = \frac{E_o}{[\gamma \cdot x + (1-x)]} \quad (1-8b)$$

$E_o (=V/L)$ 為施加在毛細管兩端的總平均電場強度， V 為施加在毛細管兩端的總電壓， L 為毛細管的總長。依方程式(1-8a)和(1-8b)可知當樣品區帶長度 x 減小時， E_S 、 E_{BGS} 增加， E_S 為 E_{BGS} 的 γ 倍，亦使 $v_{(mc)(BGS)}$ 與 $v_{ep(mc,BGS)}$ 增加。實際上， $v_{ep(mc,S)}$ 、 $v_{ep(mc,BGS)}$ 與 v_{eof} 隨 x 改變而改變，但 v_{eo} 與 $v_{ep(mc,BGS)}$ 的變化沒有 $v_{ep(mc,S)}$ 變化大。堆積效率(Stacking efficiency, SE)為表示分析物的樣品濃縮程度，10~1000 倍的濃縮效率相當於增加分析物 10~1000 倍的偵測靈敏度(detection sensitivity)，或是相當於降低一~三個級數的濃度偵測極限(如濃度偵測極限從 10^{-8} M 降低至 10^{-9} ~ 10^{-11} M)。常用 SE height 與 SE area 來表示吸收峰高度與吸收峰面積的堆積效率，分別表示如下：

$$SE_{height} = \frac{H_{stack}}{H_{standard}} \times \frac{C_{standard}}{C_{diluted}} \quad (1-9)$$

其中 H_{stack} 為長時間進樣堆積後的吸收峰高， $H_{standard}$ 為短時間進樣所得的吸收峰高， $C_{standard}$ 為短時間進樣的濃度， $C_{diluted}$ 為稀釋後的濃度。

$$SE_{area} = \frac{A_{corr,stack}}{A_{corr,standard}} \times \frac{C_{standard}}{C_{diluted}} \quad (1-10)$$

其中 $A_{\text{corr,stack}}$ 為長時間進樣後堆積的相對面積， $A_{\text{corr,standard}}$ 為短時間進樣的相對面積(1 或 2 sec)。

$$A_{\text{corr}} = \frac{A}{t_r} \quad (1-11)$$

其中 A 為樣品的面積， t_r 為樣品的遷移時間。

一般主要是以 SE_{height} 來表示分析物的堆積程度，是因為電滲流的再現性為影響分析物吸收峰面積的因素，而利用遷移時間修正分析物的吸收峰面積，是為了消除在 MEKC 模式的電滲流之再現性問題。

1-8 毛細管電泳之線上樣品濃縮技術

已有數十篇的文獻探討樣品線上濃縮的機制[24, 46, 64-70]，為了有一套完整性的說法，本論文以陰離子界面活性劑 SDS 為例子，將分析物在 MEKC 模式的線上樣品濃縮分成數種濃縮技術，其命名原則乃根據實驗中變異的因素來命名：

- 正向堆積模式 (Normal stacking mode, NSM)
- 電極極性反向堆積模式 (Reversed electrode polarity stacking mode, REPSM)
- 反向遷移微胞堆積 (Stacking with reverse migration micelles, SRMM)
- 增強電場樣品進樣 (Field enhanced sample injection, FESI)
- 以反向遷移微胞增強電場樣品進樣 (Field enhanced sample injection with reverse migrating micelles, FESI- RMM)
- 利用反向遷移微胞與水之堆積 (Stacking using reverse migrating micelles and a water, SRW)
- 掃集 (Sweeping)
- 陽離子選擇性注射法與掃集之結合模式 (Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping, CSEI-Sweeping)
- 動力 pH 接合-掃集 (dynamic pH junction-Sweeping)

1-8-1 正向堆積模式(NSM)

本章所論及的線上樣品濃縮模式皆以分離緩衝液中添加陰離子界面活性劑(如 SDS)為例子，而添加陽離子界面活性劑於分離緩衝液的線上樣品濃縮模式為類似的情況，一般只需將施加高電壓時的電極極性方向反轉。Quirino 和 Terabe[64] 詳述微胞與分析物在 NSM 的堆積過程，其遷移行為與堆積如圖 1-5 所示。NSM 為最簡單的樣品堆積技術，衍生自 MEKC 的一般技術。首先，利用水動力注入方式將整隻毛細管填充高導電度且含微胞之 BGS 區帶，再長時間進樣低導電度且含分析物的 S 區帶(圖 1-5(A))，另外分析物 a_x , a_y , a_z 的滯留因子(retention factor)大小為 $k_{(ax)} > k_{(ay)} > k_{(az)}$ ；最後施加一正向高電壓進行線上濃縮與分離(圖 1-5 (B) ~ (D))。以下所討論的數種濃縮模式，若無特別標示分析物的種類，則分析物可適用於中性分子或帶正電荷的離子。

將樣品溶液的導電度製備成比緩衝液之導電度更低，導致帶電荷物種(如微胞)在 S 區帶的電場強度較 BGS 帶區的電場強度增加，使得帶電荷物種在 S 區帶有相對較高的遷移速率。因此微胞從 BGS 區帶經濃度邊界 B_1 進入 S 區帶時，微胞的遷移率增加；微胞從 S 帶區經濃度邊界 B_2 進入另一段 BGS 區帶時，微胞的遷移率減少。同理可知分析物從濃度邊界 B_1 到濃度邊 B_2 的有效速度 $v_{ep}(S)$ 比在 BGS 帶區的有效速度 $v_{ep}(BGS)$ 更大。當分析物進入相對電場強度較低的 BGS 區帶之後，由於電場強度變小，使得遷移速率變小，因此樣品分析物在濃度邊界 B_2 不斷地受到擠壓而達到濃縮的效果。

1-8-2 電極極性反向堆積模式(REPSM)

微胞與分析物在 REPSM 過程的遷移行為如圖 1-6 所示[65]，製備一低導電度且不含微胞的樣品溶液，如此會使得微胞進入 S 區帶的電泳速率比進入 BGS 區帶來得快。首先將毛細管充滿含微胞的緩衝液，然後注入比 NSM 更長的樣品長度(圖 1-6 (A))，S 區帶為含分析物(a_x, a_y, a_z)的深色區帶，BGS 區帶是淺色區帶，並於毛細管兩端施加一所需的負電壓(圖 1-6 (B))，以使電動力注入的微胞將中性分析物從負極帶到偵測端的正極。高滯留因子的化合物比低滯留因子的化合物移動快，緩衝液中的陰離子亦進入 S 區帶。同時毛細管中的樣品基質(如水)被電滲流趕至負極瓶中，並由正極瓶中含微胞的緩衝液遞補。移除樣品基質可減少高低導電區帶間的電滲流的不匹配，使層流(laminar flow)的分散效應減小。當大部份的中性分析物已濃縮聚集在濃度邊界 B_1 時，此時電流為施加負電壓之電流的 97~99%，再將電極的極性改變成正電壓，直到完成整個分離過程(圖 1-6 (C), (D))。若注入的樣品體積大於一般操作模式 10 倍以上的時候又稱為大體積樣品堆積模式(large volume sample stacking, LVSS)。

1-8-3 反向遷移微胞濃縮(SRMM)

SRMM 是在毛細管充滿含微胞的緩衝液後，從負極之進樣端進樣一定長度的樣品溶液，如圖 1-7 (A)所示[66]，施加一負電壓以使微胞遷移至偵測端的正極，此時微胞的電泳速率大於電滲流速率[71]，此乃因毛細管內壁表面的矽醇基質子化而降低了電滲流。深灰色區帶為含中性分析物的 S 區帶，淺灰色區帶為含微胞的 BGS 區帶。經過一段時間之後，如圖 1-7 (B)所示，負極瓶中的微胞進入毛細管中且帶動樣品區帶中的中性分析物至偵測端的正極。在中性分析物濃縮至濃度邊界 B_1 後，分析物聚集區帶從 B_1 開始分離，且樣品基質不斷地被電滲流推出負極瓶中，而且由正極瓶中的緩衝液所遞補。在樣品基質完全移除之前，中性分析物已分離且進入含微胞的緩衝液區帶(圖 1-7 (C))，之後樣品基質從管柱中完全移除，然後繼續分離與被偵測器所偵測之，此模式不需改變電極極性(圖

1-7(D))。

1-8-4 增強電場樣品進樣(FESI)

FESI的機制如圖 1-8 所示[67]，首先將毛細管充滿含微胞的緩衝液，然後進樣一定長度的水區帶，再將負極瓶子換成含有微胞的樣品溶液之瓶子(圖 1-8 (A))。於毛細管兩端施加一負電壓(圖 1-8 (B))，因為有水區帶的增強電場，使得以電動力注入的樣品之電泳速率比電滲流、微胞及在毛細管中的中性分析物還來得快，中性分析物移動至濃度邊界 B_2 ， B_2 為水區帶中含微胞與不含微胞的邊界。當中性分析物被帶至濃度邊界 B_1 ，水區帶開始被電滲流推出毛細管外。在電流為施加負電壓之總電流的 97 ~ 99 % 時，再將進樣端瓶子換成裝含有微胞的緩衝液之瓶子，並施加一正電壓(圖 1-8 (C))，然後繼續分離與被偵測器所偵測之(圖 1-8 (D))。若以電動力注入，樣品進樣量會受到其本身之解離度的影響。中性分析物的遷移順序與滯留因子有關，可知遷移時間隨滯留因子增大而增長。若滯留因子大小為 $k_{(ax)} > k_{(ay)} > k_{(az)}$ ，則其遷移時間為 $t_{(az)} > t_{(ay)} > t_{(ax)}$ 。

1-8-5 以反向遷移微胞增強電場樣品進樣(FESI-RMM)

圖 1-9 為描述 FESI-RMM 的過程[68]，首先將毛細管充滿含微胞的緩衝液，然後進樣一定長度的水區帶(圖 1-9 (A))。再將負極瓶子換成含有微胞的樣品溶液之瓶子，於毛細管兩端施加一負電壓(圖 1-9 (B))，因為有水區帶的增強電場，使得以電動力注入的樣品之電泳速率比電滲流、微胞及在毛細管中的中性分析物還來得快，中性分析物堆積至濃度邊界 B ， B 為水區帶中含微胞與緩衝液的邊界，水區帶開始被電滲流推出毛細管外。在電流為施加負電壓之總電流的 70 ~ 90 % 時，再將進樣端瓶子換成含有微胞緩衝液之瓶子，再施加一負電壓(圖 1-9 (C))，然後繼續分離與被偵測器所偵測之(圖 1-9 (D))。

1-8-6 利用反向遷移微胞濃縮與水之堆積(SRW)

圖 1-10 為 SRW 模式之堆積過程[69]，為了提供一比水更高的電場，將一定量的水比樣品優先進樣於毛細管中，如此可消除由樣品區帶中的微胞所引起的擴

散效應[65](圖 1-10 (A))。其樣品置於一低導電度的微胞基質中，此使得在樣品區帶的分析物可以較快的速率進入水區帶。採用低 pH 值的樣品溶液是為了降低電滲流與減少樣品吸附於毛細管的表面，低的電滲流可防止樣品掉入進樣端瓶中而減少損失。若分析物在樣品區帶與水區帶的有效電泳速率比電滲流快，分析物終會到達偵測器的正極，故施加一負電壓以進行樣品濃縮與移除樣品基質與水區帶(圖 1-10 (B), (C))，樣品區帶與水區帶被電滲流推至入口端瓶中，然後由出口端瓶中含微胞的緩衝液所遞補。在樣品移除的過程中，電滲流一直在遞減，造成微胞遷移速率的方向改變，即低導電度的樣品區帶與水區帶的長度減小而增加緩衝液的電場。水區帶與緩衝液區帶之間的濃度邊界 B_1 的遷移速率等於電滲流的速率且向負極移動[72](圖 1-10 (B))，樣品區帶與水區帶之間的濃度邊界 B_2 的遷移速率假設等於電滲流的速率且向負極移動。分析物濃縮在濃度邊界 B_2 沒有比濃縮在濃度邊界 B_1 上來得重要，大部份的正極含微胞的緩衝液中的陽離子會濃縮在濃度邊界 B_2 ，且對全部過程沒有太大的影響。最後微胞繼續帶動中性分析物區帶遷移至偵測器與分離(圖 1-10 (D))。

1-8-7 掃集(Sweeping)

掃集為另一種不同於樣品堆積的線上濃縮技術，此技術為 Terabe 及其學生 Quirino 於 1998 年所發表[46]，掃集與樣品堆積的最大不同在於樣品基質與緩衝溶液的導電度是維持相等的，因此毛細管內的電場強度是一定的。其機制為先在毛細管內填充低 pH 值酸性緩衝溶液，可抑制電滲流且其值趨近於零。再利用水動力注射法注入一段和緩衝液導電度相近的樣品溶液，最後將管柱兩端置於含 SDS 微胞的酸性緩衝溶液中，並施加一負電壓(圖 1-11(A))。管柱進樣端的陰離子微胞在電場的作用下進入管柱中並朝偵測器方向移動，在微胞進入樣品區帶內後，SDS 微胞會慢慢地採集和積聚不同分佈係數的中性分析物。與微胞作用力大的中性分析物堆積而成的濃縮區帶會比與微胞作用小的分析物濃縮區帶較為狹

窄(圖 1-11 (B), (C))。由此可知，微胞的掃集動作會對樣品區帶中的分析物造成聚集效果，最後再經由偵測器偵測之(圖 1-11 (D))。

1-8-8 陽離子選擇性注射法與掃集之結合模式(CSEI-Sweeping)

陽離子選擇性注射法與掃集之結合模式為 Terabe 與 Quirino 在 2000 年提出的技術[70]。此技術的最大特色是結合增強電場進樣與掃集兩種濃縮方法，其偵測靈敏度可提升至約一百萬倍。CSEI-Sweeping 的機制為利用水動力注射法先將毛細管充滿低 pH 值或是無微胞的緩衝溶液，接著注入一段高導電度的緩衝溶液(HCB)，然後注入一小段的水(圖 1-12 (A))。第二個步驟為在進樣端利用電動力注入進樣一長段溶於低導電度的陽離子分析物於毛細管內(圖 1-12 (B))；因為電滲流的牽引及帶正電分析物自身的遷移速度(往偵測器端)，使得樣品能進入毛細管中。當樣品經過水區帶時，會產生快速的電泳速度，最後由於電場的差異，堆積在水與 HCB 間的交界面，並形成一段濃縮的樣品區帶(圖 1-12(C))。接著將毛細管的兩端置於含有陰離子微胞(SDS)的緩衝溶液中，並且施加一負電壓。此時，微胞會進入前述利用 FESI 注入的低導電度樣品基質中，然後經過水區帶，堆積在與 HCB 的交界面上。最後，堆積的微胞開始掃集之前濃縮過的樣品分析物，並將分析物帶往偵測器方向進行偵測(圖 1-12 (D))。因為樣品是經由兩階段的濃縮，所以其堆積效果會比單一濃縮方法要來的好。

1-8-9 動力 pH 接合-掃集(dynamic pH junction-Sweeping)

動力 pH 接合-掃集為類似動力 pH 接合技術，但需添加微胞(如 SDS)於不連續地電解質系統，其機制說明如圖 1-13[24]。圖 1-13 (A)為起始狀態，以水動力注入高 pH(如硼酸鹽)含微胞的 BGS 後，然後注入適量低 pH(如磷酸鹽)不含微胞的樣品區帶。圖 1-13 (B)為施加一正向高電壓後，OH⁻和陰離子微胞 SDS 進入毛細管，導致中性分析物帶負電荷和被 SDS 微胞掃集。然而電滲流的遷移率大於微胞的遷移率，可將分析物帶至偵測器端偵測(圖 1-13 (C))，然後分析物以 MEKC 模式分離(圖 1-13 (D))。此技術可有效克服一般掃集模式低濃縮效率和寬濃縮吸

收峰的問題，和克服 pH 接合只能對親水性和中性分析物分析的問題，但需花費比一般 pH 接合或掃集模式較長的分析時間。總而言之，此九種濃縮模式的比較列於表 1-3 中，電極極性需反向的有 REPSM、FESI、CSAI-Sweeping；電動力注入的有 FESI、FESI-RMM、CSAI-Sweeping，其餘為水動力注入。需於低 pH 值下進行的有 SRMM、SRW、Sweeping、FESI-RMM、CSAI-Sweeping，此五種模式因最後之微胞遷移速率大於電滲流遷移率，且其遷移方向與電滲流方向相反，所以是藉由陰離子界面活性劑帶動樣品分析物，較高疏水性的溶質先遷移至偵測器而被偵測之，此乃因與微胞結合力愈強，其視遷移速率愈大；另外四種模式是在電滲流遷移率比微胞遷移速率較大時進行的，藉由電滲流將其帶至偵測器偵測之，因此遷移順序為較低的滯留因數先遷移至偵測器而被偵測之。

1-9 毛細管電泳之未來展望

毛細管電泳法(CE)與高效能液相層析法(HPLC)相比，雖同為液相分離技術，但是我們從表 1-2 的比較結果就可知 CE 的優越性。CE 的毛細管與 HPLC 的管柱相比，CE 之毛細管成本較低，且改變操作模式和電解質的組成較易、較迅速。相較之下，HPLC 需準備較多且昂貴的管柱，而改變操作模式和沖提液組成要消耗大量溶劑和時間。

近年來，毛細管電泳法發展頗為快速，具有分離與分析技術的潛力。它具有極高的分離效率，高靈敏度，微小的樣品用量以及快速分離等優點，因此非常具有發展的潛力。毛細管電泳分離法發展至今已有很廣泛的應用，分析的樣品從無機離子、有機酸、藥物、胺基酸、界面活性劑、染料，到高分子的蛋白質、核酸以及病毒與單一細胞等等，所遍及的層面可以說非常廣泛。而毛細管電泳技術也被用來測定物質的某些物理特性，例如溶液的黏度、弱酸及弱鹼的解離常數、錯合物的結合常數以及微胞臨界濃度的測定等。

1990 年以後，Chien 和 Burgi[38, 39, 41, 42, 73-76]提出樣品濃縮技術以改善毛細管電泳之的偵測極限，樣品導入的方式可以電動力注入[38, 39, 73-76]或流體

動力注入[41, 42]。Thompson 和 Foret[52, 53]將樣品濃縮技術引入等速電泳法中，形成等速樣品濃縮(Isotachopheresis Sample Stacking, ITPSS)。

Quirino 和 Terabe[70]於微胞電動力層析法之模式下進行線上樣品濃縮，可增強中性分析物的偵測濃度約百萬倍。這些技術的應用使得毛細管電泳於使用 UV 偵測器時，能偵測到 ppb (或 ng / mL)甚至到 ppt (或 1pg / mL)的濃度範圍，進而提昇毛細管電泳應用於偵測微量真實樣品分析物的可行性，而不需費時的前濃縮處理，如固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE) 或昂貴的偵測器，如雷射誘導螢光(Laser Induce Fluorescence, LIF)偵測器。

由於 CE 結合雷射誘導螢光偵測器，發展出 CE-LIF 偵測技術，顯著地降低毛細管電泳的偵測極限[77, 78]。克服毛細管電泳儀和質譜儀串連時界面的問題，發展出 CE-MS 方法，對於毛細管電泳法的定性能力有很大的貢獻[79, 80]。然而線上樣品堆積(On-line sample stacking)的發展，使得一般學者不需要昂貴的儀器，也能對微量的環境分析物進行研究[46, 64-69]。自從第一部商業化的自動電泳層析儀推出後，愈來愈多原來從事層析研究的學者都投入了電泳的領域。若能再針對毛細管電泳法中再現性較差及低濃度偵測靈敏度的缺點加以改善，相信毛細管電泳法在未來勢必成為非常強而有力的分析工具。

近年線上樣品堆積技術開始蓬勃發展，然而在環境污染物與藥品上的應用及其堆積的原理仍有待深入探討，因此設計一系列的實驗來了解理想的濃縮條件與其堆積的機制，使毛細管電泳能有效偵測 ppb 級數以下的分析物，有效改善毛細管在定量上的弱勢。本論文著重小分子在毛細管電泳的線上濃縮技術，因此分別選用 naringenin、hesperetin、quercetin 及 kaempferol，更進一步的了解其濃縮的機制，並能有效偵測達 ppb 級數的分析物而不需費時的前濃縮處理。

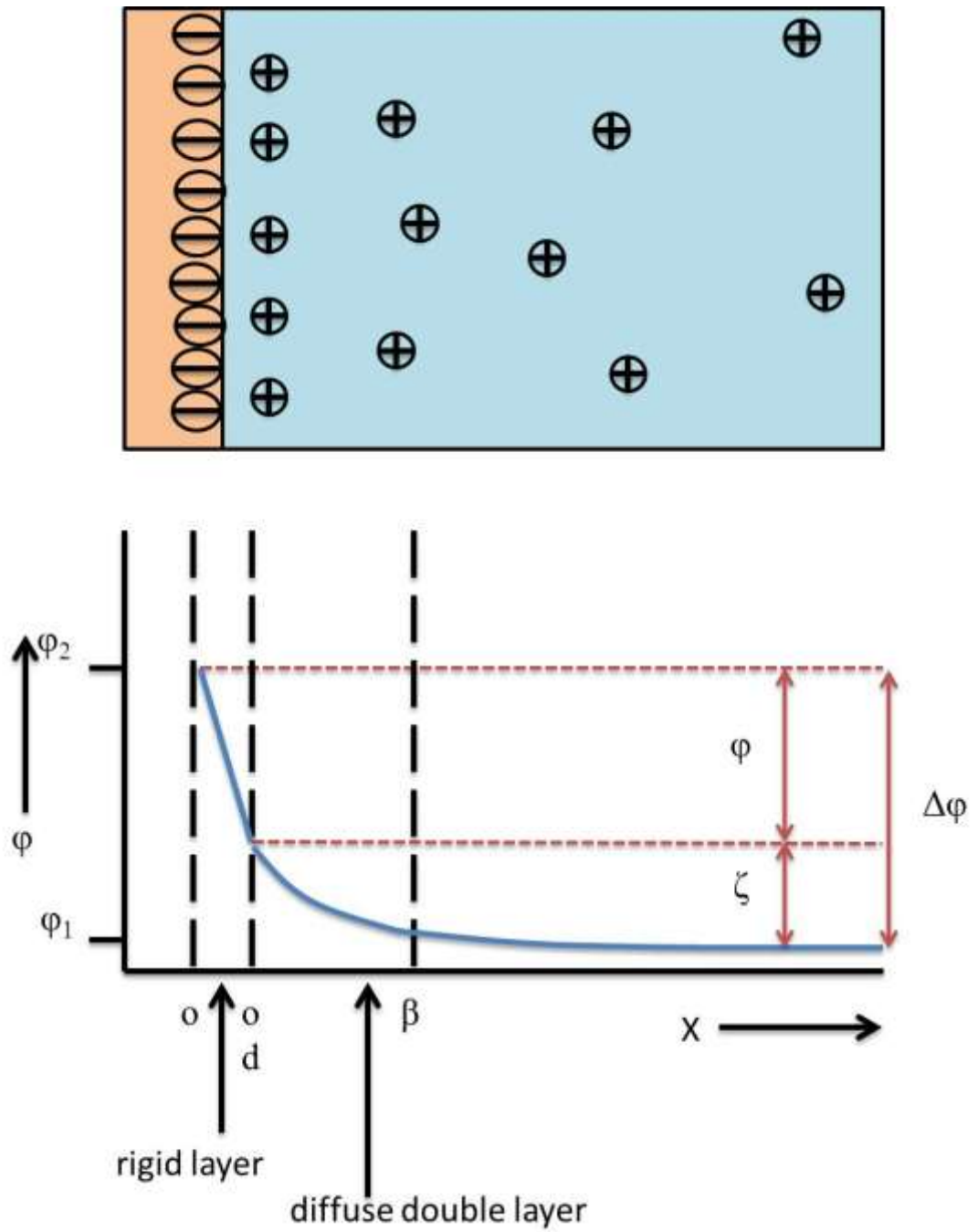


圖 1-1 Stern model of the electric double layer is occurring at the interface between an electrolyte solution and the surrounding surface.

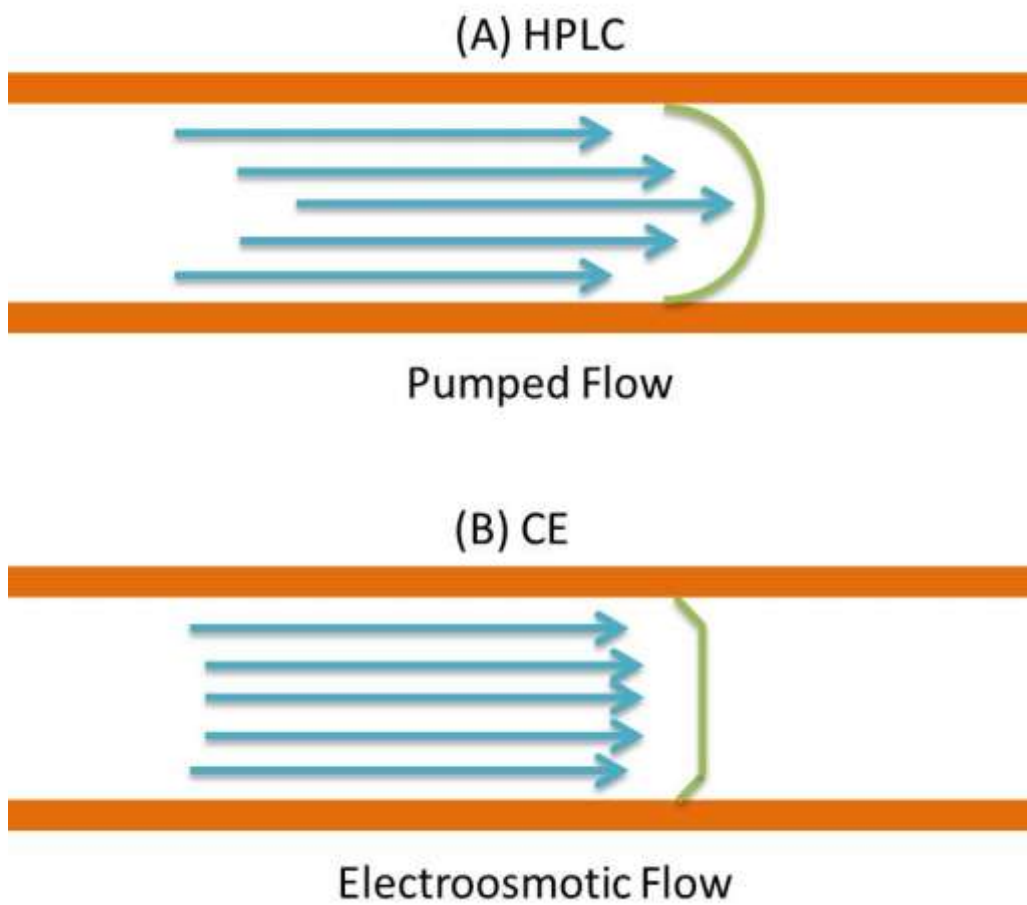
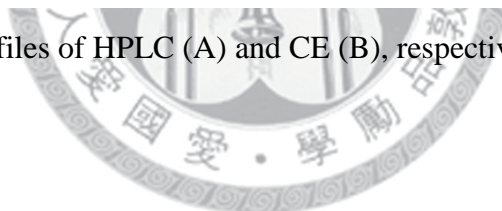


圖 1-2 Flow profiles of HPLC (A) and CE (B), respectively.



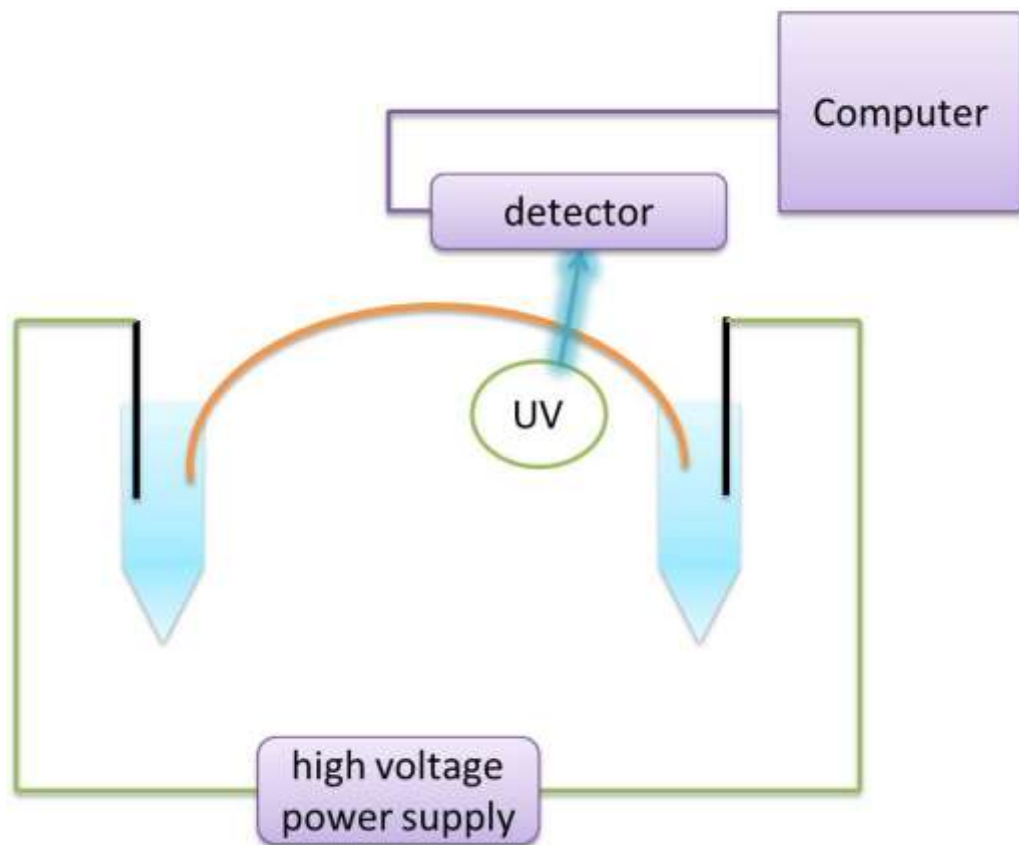
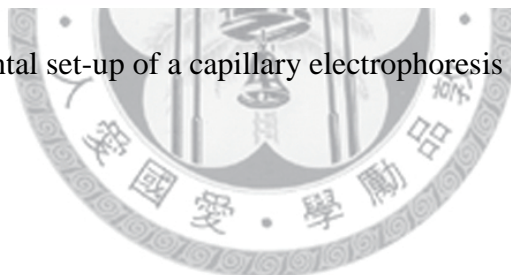


圖 1-3 Instrumental set-up of a capillary electrophoresis system



Variation of the field strength along the separation path

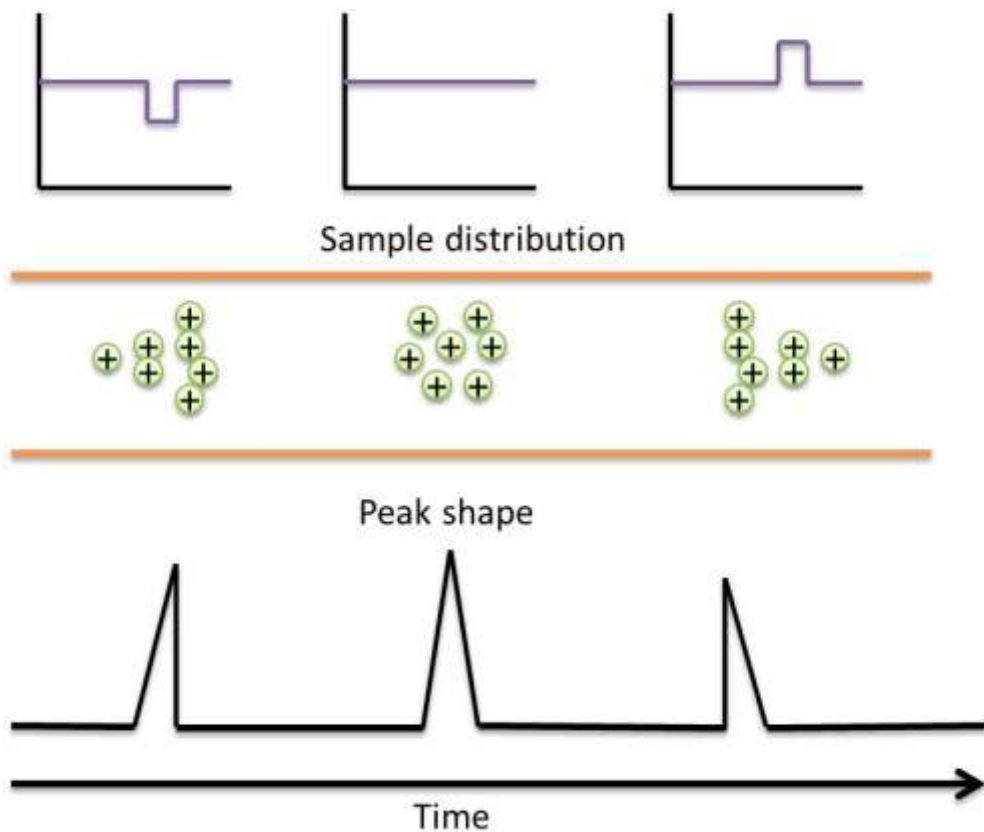


圖 1-4 Schematic explanation of band broadening; representation of the variation of the field strength, sample distribution, and the peak shape in the sample zone: (A) sample zones of ions with higher mobility than the background; (B) sample zones of ions with the same mobility as the background electrolyte; (C) sample zones of ions with lower mobility than the background electrolyte.

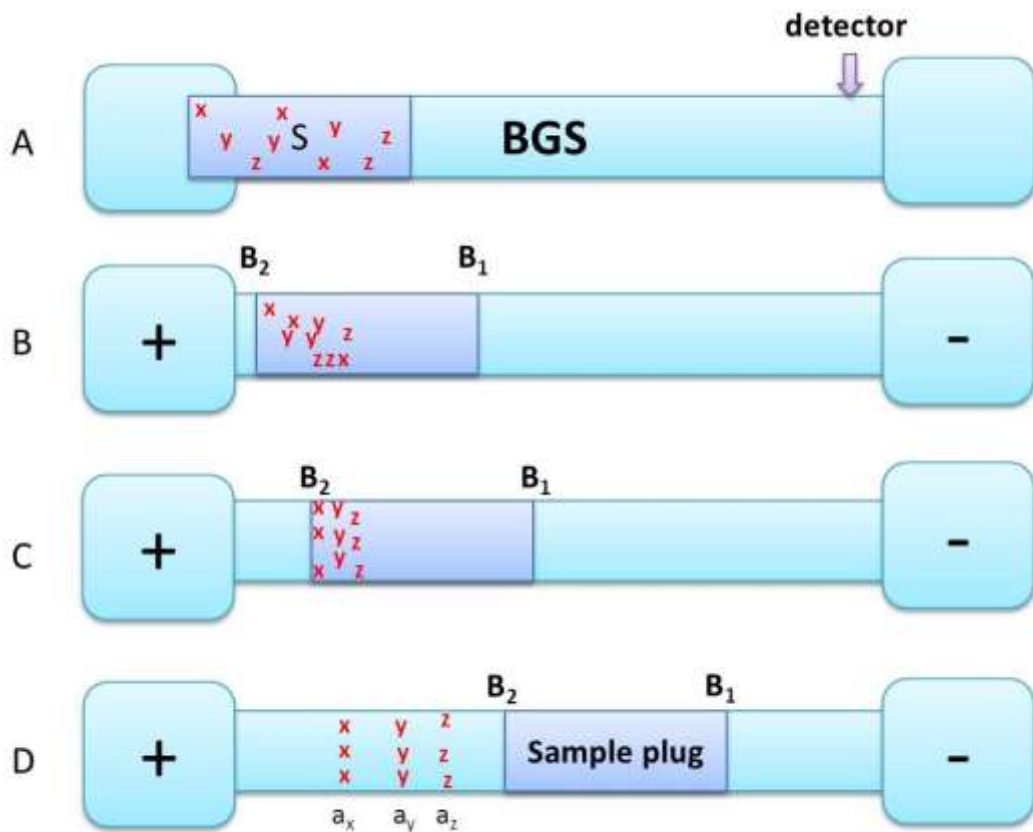


圖 1-5 Evolution of migration of analytes and micelles in the sample solution (S) zone and separation solution (BGS) zone during NSM-MEKC: (A) After injection; (B) high-velocity micelles in S zone carry the analytes to the opposite concentration boundary B₂ in the order of decreasing retention factor: $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) analytes stack in B₂ into thin concentrated zones; (D) analytes zones separate by virtue of MEKC.

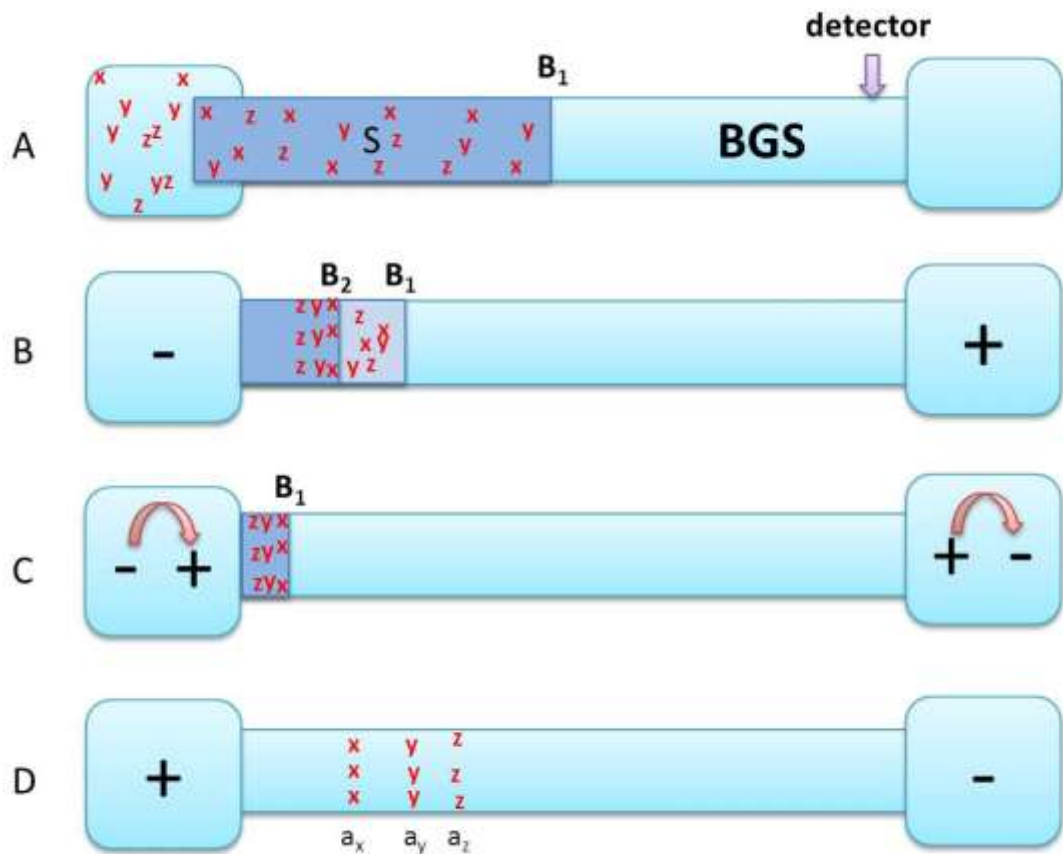


圖 1-6 Evolution of migration of analytes and micelles during REPSM-MEKC: (A) Starting situation; (B) micelles entering from cathodic end of the capillary carry with analytes, where $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) micelles and analytes stack at the concentration boundary B_1 and polarity is switched later to positive; (D) separation and later detection of zones.

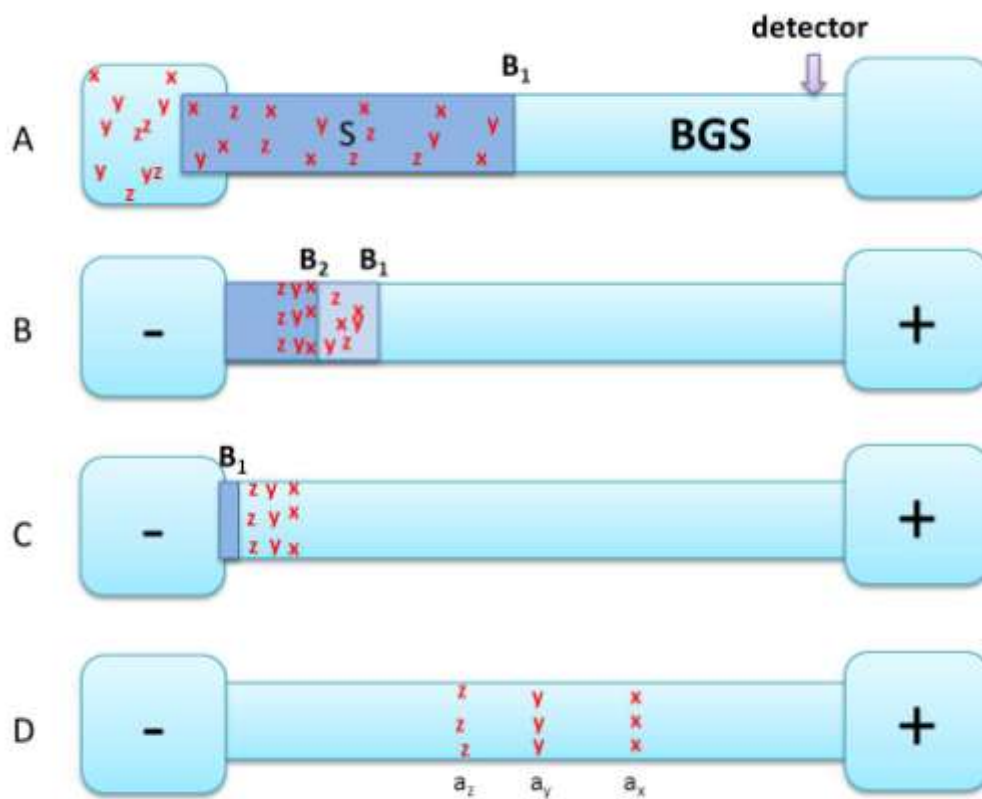


圖 1-7 Evolution of migration of analytes and micelles in S and BGS during and after stacking at acidic pH: (A) starting situation; (B) high-velocity micelles in the S zone emanating from the cathodic vial carry the analytes to the concentration boundary B_1 in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) analytes after stacking leave B_1 prior to the removal of the sample matrix due to electrophoresis in the BGS zone; (D) analyte zones migrate toward the detector and continue to separate.

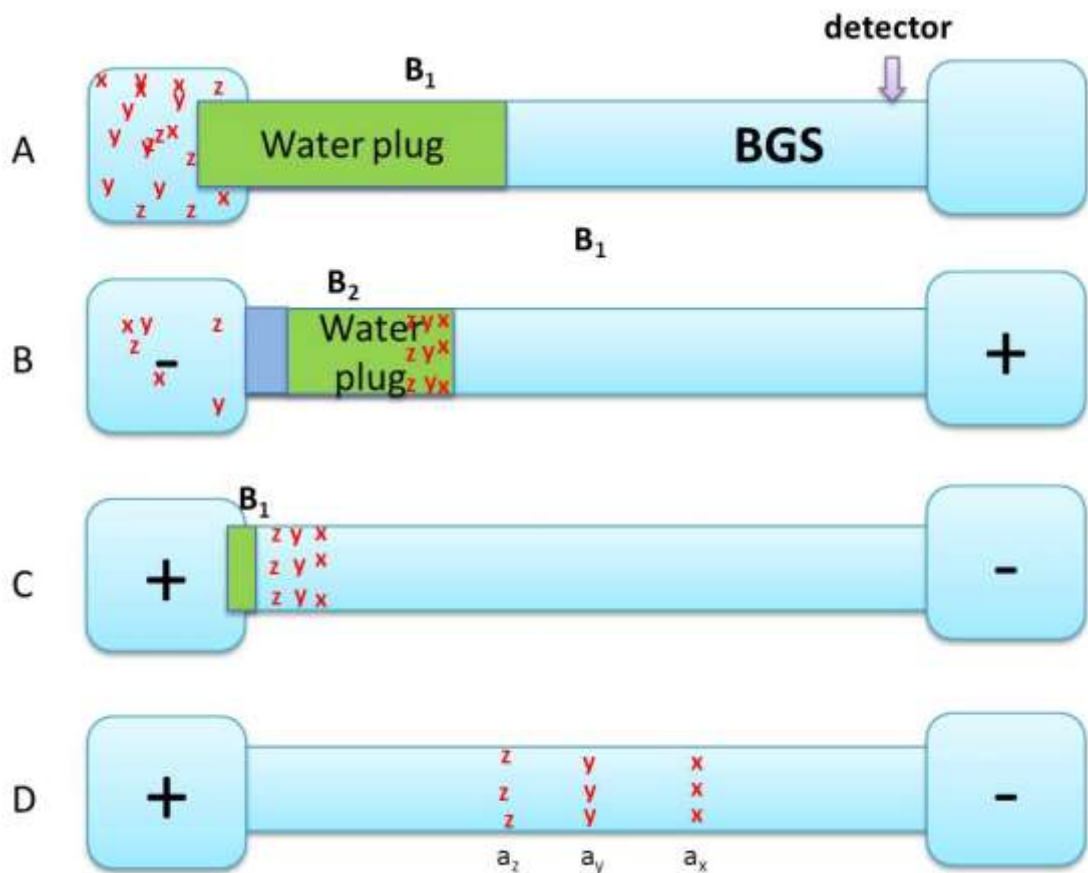


圖 1-8 Evolution of migration of analytes and micelles during FESI-MEKC: (A) initial situation; (B) anionic micelles enter the capillary and carry with them analytes emanating from the cathodic vial, $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$; (C) micelles and analytes stacked at the concentration boundary B_2 , voltage is cut and the sample vial is replaced by another BGS vial when the measured current is approximately 97-99 % of the predetermined current, voltage is then applied at positive polarity; (D) separation of zones occurs.

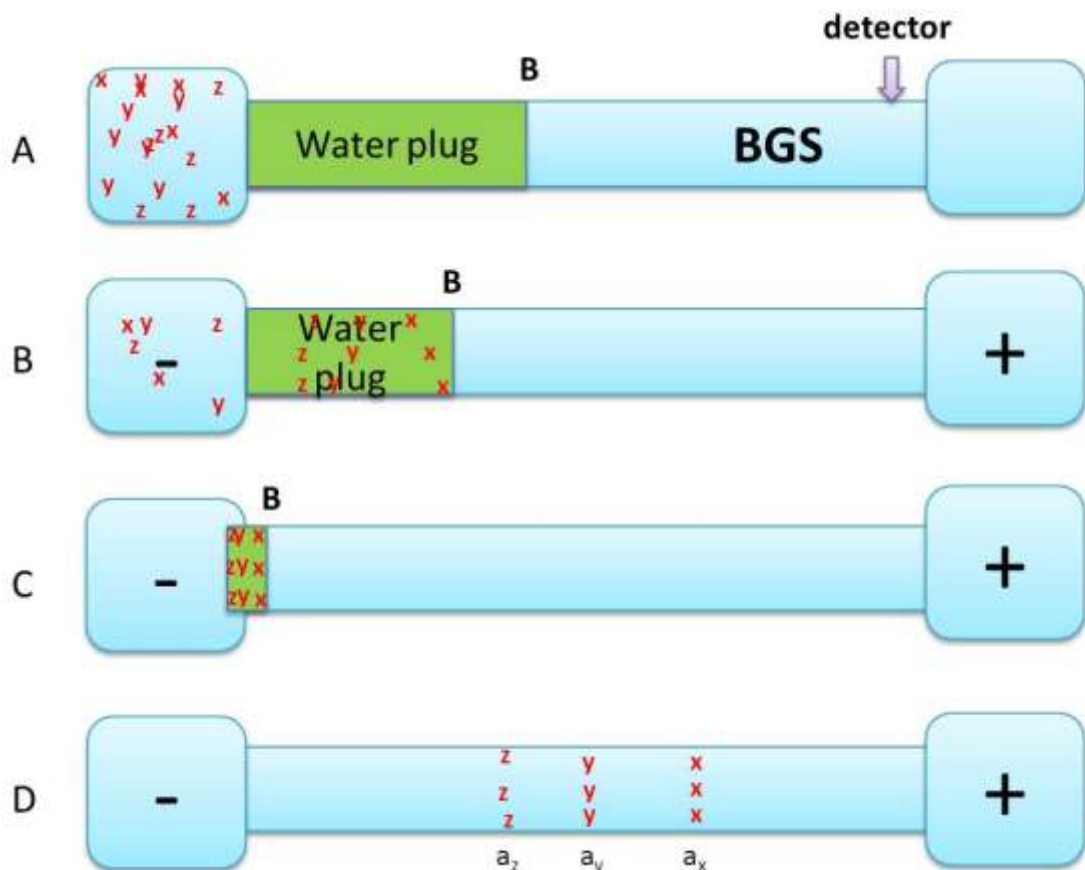


圖 1-9 Evolution of migration of analytes and micelles in the water plug and BGS zone during and after FESI-RMM: (A) hydrodynamic injection of water after conditioning the capillary with BGS; (B) injection using voltage of analytes prepared in a micellar matrix found in the cathodic vial (analytes solubilized in these micelles enter the water plug in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$); (C) voltage is shut, the sample vial is replaced by another BGS vial and voltage is applied at negative polarity again, and analytes stack at the concentration boundary B; (D) focused bands separate by virtue of MEKC.

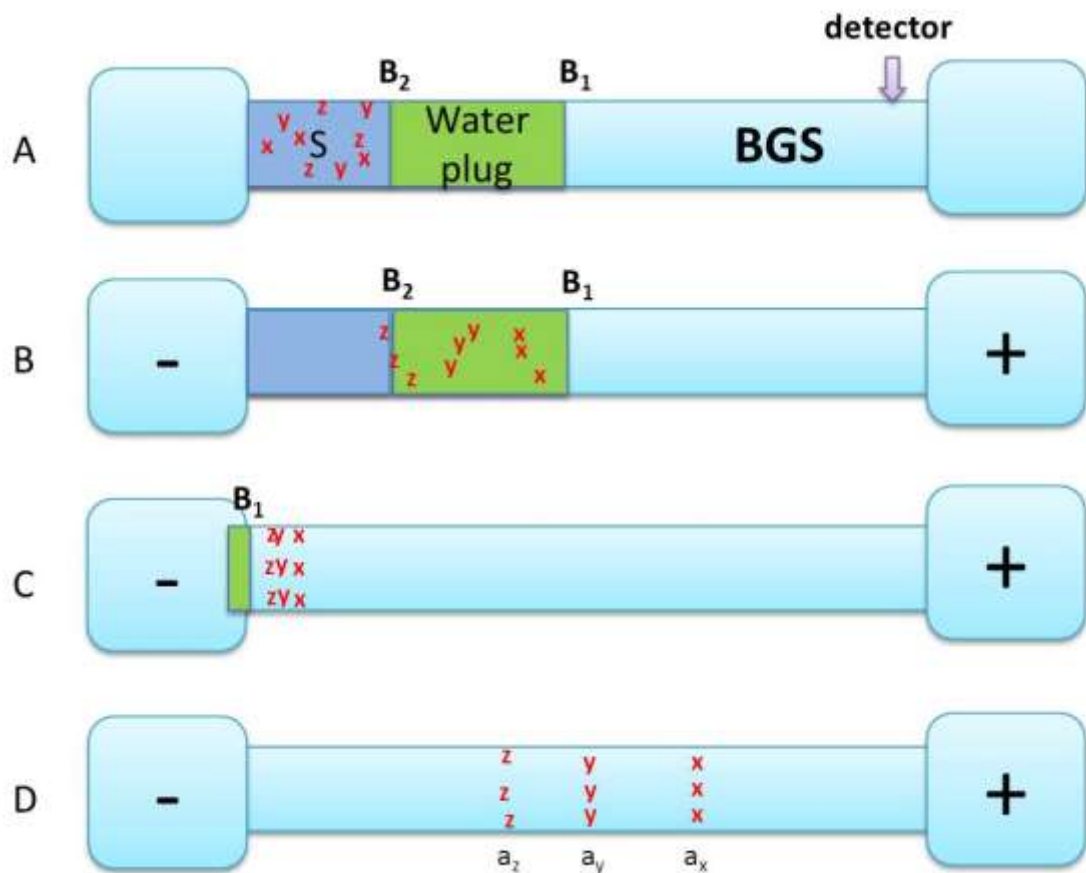


圖 1-10 Evolution of migration of analytes and micelles in the water zone, S and BGS zones during SRW-MEKC: (A) Hydrodynamic injection of water followed by S after conditioning the capillary with BGS; (B) application of voltage at negative polarity with the BGS in the inlet and outlet vials (analytes solubilized in the micelles enter the water zone and stack in the concentration boundary in the order of decreasing retention factor $k(a_x) > k(a_y) > k(a_z)$); (C) separation of stacked zones prior to the total removal of the low conductivity zones; (D) focused bands separate by virtue of MEKC.

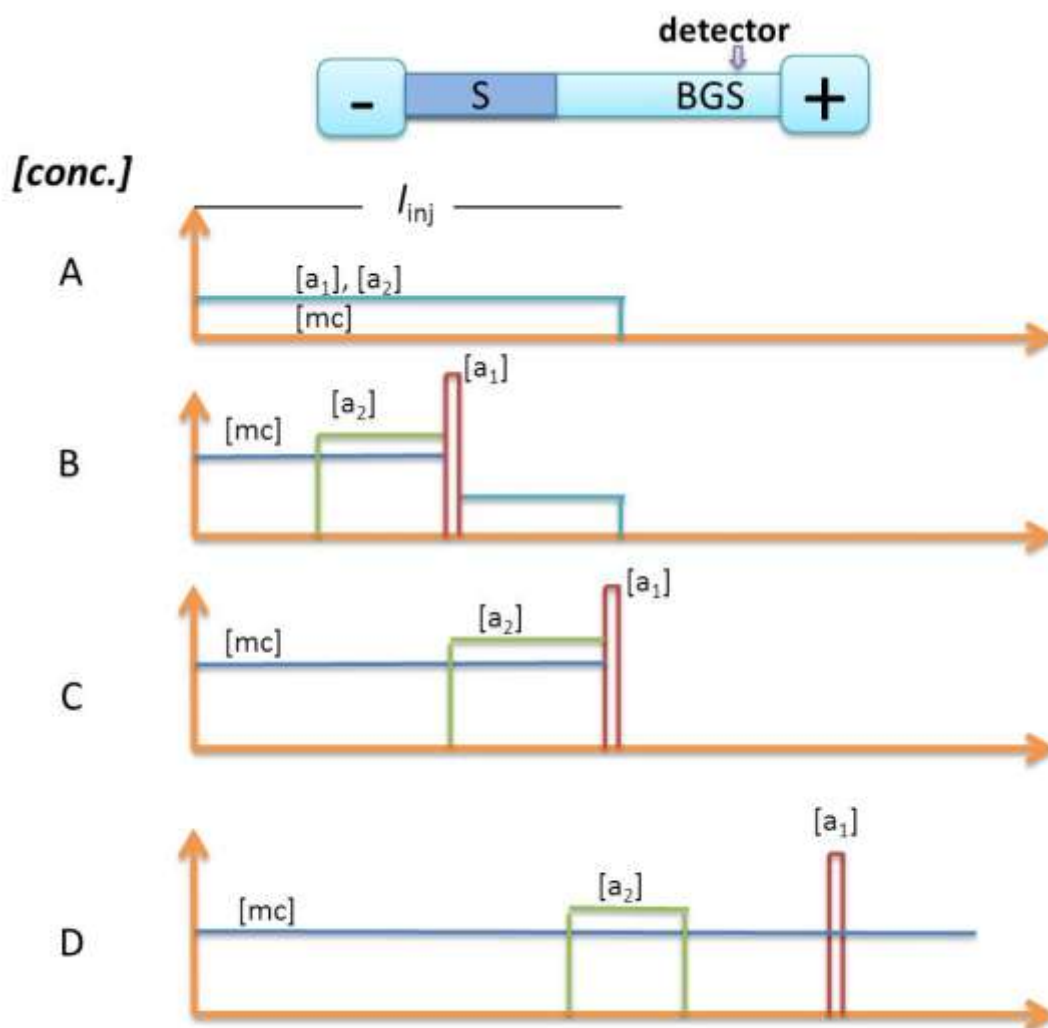


圖 1-11 Evolution of migration of analyte zones in Sweeping-MEKC: (A) Starting situation, injection of sample solution S with length l_{inj} after conditioning the capillary with BGS (found at both electrode vials); (B) micelles from the cathodic vial enter the S zone or capillary (area enclosed by blue lines) and sweep the analytes into narrower bands depending on the retention factor (k_{a1} , k_{a2} , depicted by red and green lines, respectively); (C) First batch of micelles that entered the S zone reaches the interface I between S and BGS zones; (D) Separation of zones based on MEKC.

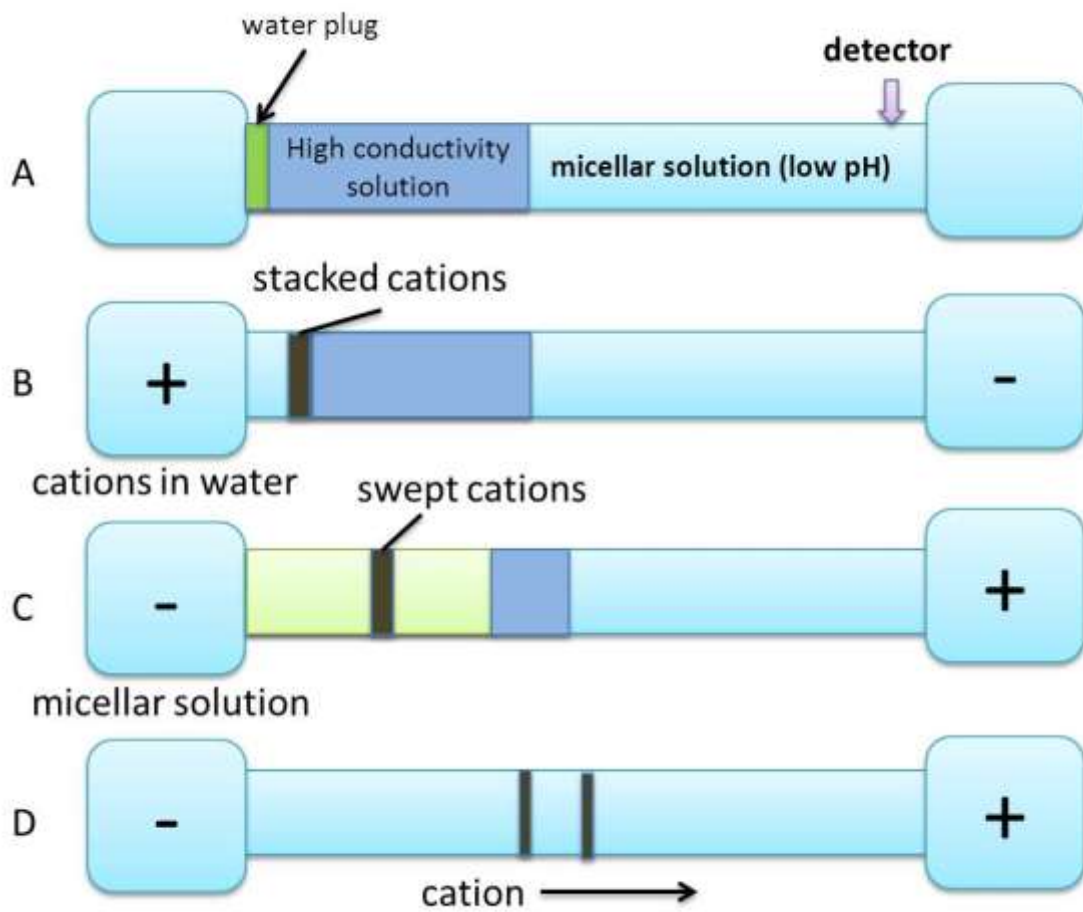


圖 1-12 Evolution of migration of analyte zones in CSEI-Sweeping-MEKC: (A) starting situation; (B) electrokinetic injection at positive polarity of cationic analytes prepared in a low-conductivity matrix or water, nonmicellar background buffer found in the outlet end, cationic analytes focus or stack at the interface between the water zone and high-conductivity buffer void of organic solvent zone; (C) application of voltage at negative polarity, micelles entering from the cathodic vial into the capillary and sweep the analytes to narrower bands; (D) separation of zones based on MEKC.

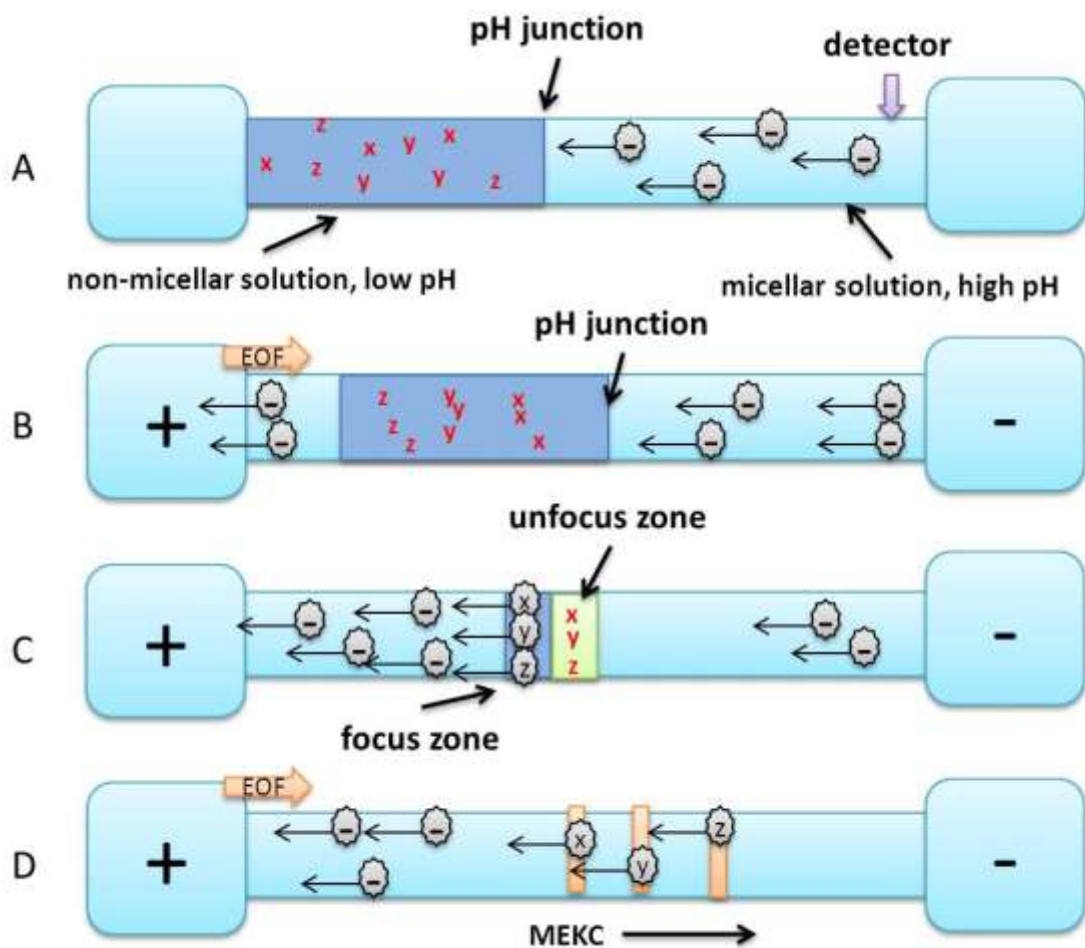


圖 1-13 Schematic diagrams of the dynamic pH junction-sweeping model. (A) The anionic micellar (such as SDS) BGS and the sample solution (a nonmicellar buffer) are injected into the capillary, respectively; (B) when the injection is complete, a positive polarity is applied (if a negatively charged SDS surfactant is used) to power the CE separation; (C) the neutral analytes are converted to anions and are swept by the SDS micelles; (D) separation occurs by the MEKC mode.

表 1-1 Injection techniques in capillary electrophoresis

	Electrokinetic Injection	Hydrostatic Injection	Hydrodynamic Injection
Injection by :	Electric filed	Siphon effect	Pressure Or vacuum
Automation	Yes	Yes	Yes
Minimum	< 2.0 L	< 2.0 L	< 2.0 L
Sample amount	Repeated Injection	Repeated Injection	Repeated Injection
Discrimination Effects during Sample injection	Yes	No	No
RSD values	~ 3 %	< 3 %	2~3 %

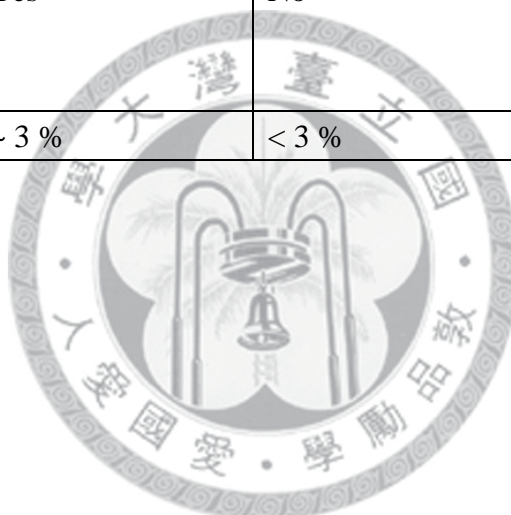


表 1-2 Comparisons of CE and HPLC

	CE	HPLC
Separation mechanism	Charge / mass partition size-exclusion	Partition adsorption ion-exchange size-exclusion
Column	30 ~ 70 cm 25 ~ 100 μm I.D. open tube surface coated gel-filled	10 ~ 30 cm 2 ~ 8 mm I.D. open tube packed material (3 ~ 10 μm)
Injection method	Hydrodynamic hydrostatic electrokinetic	syringe sampling valve
Sample amount	1 ~ 10 nL	1 ~ μL
Flow mode	Electrophoresis	Pumping
Detection	On-line	Flow cell
Peak width	< 5 sec	~ 15 sec
Flow rate (/min)	μL	μL ~ mL
Analysis time	1 ~ 20 min	5 ~ 60 min
Solvent volume	< 100 mL	~ 1000 mL
Sensitivity	ng ~ pg	μg
Separation efficiency (N/m)	$> 10^5$	$10^3 \sim 10^4$
Reproducibility of the peak height	~ 1 %	~ 0.2 %
Reproducibility of the peak area	~ 3 %	~ 0.5 %

表 1-3 Conditions of on-line preconcentration techniques in MEKC using SDS micelles

Techniques	Sample matrix	Water plug ^a	Buffer electrolyte	pH (BGS)	EOF ^b	Polarity
Hydrodynamic injection						
NSM	High field (non-micellar)	X	Low field	Neutral or Basic	Strong	+
REPSM	High field (non-micellar)	X	Low field	Neutral or Basic	Strong	- → + ^c
SRMM	High field (non-micellar)	X	Low field	Acidic	Weak	-
SRW	High field (micellar)	O	Low field	Acidic	Weak	-
Sweeping	Equal field (non-micellar)	X	Equal field	Acidic	Weak	-
Dynamic pH	Equal field (non-micellar)	X	Equal field	Neutral or Basic	Strong	+
Electrokinetic injection						
FESI	High field (micellar)	O	Low field	Neutral or basic	Strong	- → + ^d
FESI-RMM	High field (micellar)	O	Low field	Acidic	Weak	-
CSAI-Sweeping	Equal field (non-micellar)	O	Equal field	Acidic	weak	+ → - ^e

^aA water plug is introduced into the capillary at the inlet end after conditioning the capillary with BGS.

^bEOF is suppressed under the acidic condition.

^cPolarity is to be switched when the current close to 97 % of the original value.

^dElectrokinetic injection with negative polarity, then separation voltage is applied at positive polarity.

^eElectrokinetic injection with positive polarity, then separation voltage is applied at negative polarity.

第2章 文獻探討

2-1 類黃酮類化合物

2-1-1 基本介紹

類黃酮 (flavonoids) 為水溶性物質，常存在於植物之中，它們賦予蔬菜、水果顏色，例如：葡萄、蕃茄、櫻桃、柑橘類水果、豆科植物、洋蔥。目前發現的類黃酮化合物及其衍生物已經超過四千種以上，類黃酮經常被當為維生素 P，它能使維生素 C 與腎上腺素不被銅氧化，也幫助產生抗自由基的酵素。能抗病毒、抗發炎反應、抗痙攣。在健康狀態下，類黃酮能協助維生素 C 儲存膠原，兩者合併使用能發揮相助作用，強化彼此的功能，能提高血管的效能與調節滲透能力，是維持生命所需的元素。芸香甘(Rutin)以及槲皮素(Quercetin)是生物中最常見之類黃酮，芸香甘(Rutin)被用來治療牙齦出血，槲皮素(Quercetin)可抑制致癌物發生作用，黃豆中也富含黃酮物質。

天然的類黃酮化合物被公認為非常好的抗氧化劑，抗氧化能力是維生素 E 的 50 倍，維生素 C 的 20 倍，且分子結構小，水溶性，易被人體吸收，無蓄積性作用，因此廣泛地被當作藥物使用，一般認為此類化合物有療效是因為它的結構可以吸收自由基。

2-1-2 結構及分類

類黃酮素的主要結構為一色烷(chromane)架構，在位於 C₂ or C₃ 的位子接上一苯基(phenyl) [81]可見下圖所示：

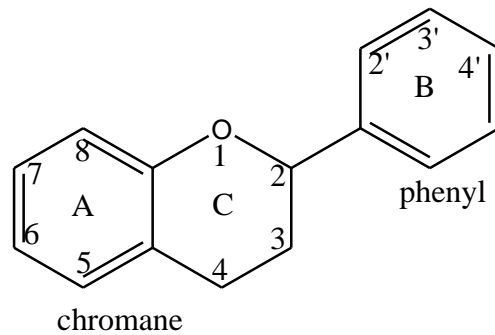


圖 2-1 類黃酮化合物基本架構

由 15 個碳組成，骨架為 C₆-C₃-C₆，並且大部分與醣類結合成配醣基 (glycosides) 的形式存在於植物中，此醣類經由酸水解後，可以產生不含醣的配醣基 (aglycone) 和醣。其包含了五種分類[82]：

1. 黃酮醇類(flavonol)-結構為 C₂、C₃ 之間有雙鍵，C₄ 位置上具有羰基，C₃ 位置上帶有羥基，如槲皮素(queretin)、kaempferol、myricetin、rhamnazin 及 fisetin 等。
2. 黃烷酮類(flavanone)-結構為 C₂、C₃ 之間為單鍵，因此 C₂ 位置會造成掌性異構物的存在，C₄ 位置上具有羰基，此類大多存於柑橘及橙汁之中，如柚皮素(naringenin)、橙皮素(hesperetin)、花旗松素(taxifolin)及柚皮元(narirutin)等。
3. 黃酮類(flavone)-結構為 C₂、C₃ 之間為雙鍵，C₄ 位置上有羰基，C₃ 位置上無羥基取代，如芸香素(rutin)類黃鹼素(luteolin)白陽素(chrysin)及異黃酮(isoflavones)等。異黃酮的 B 環苯基若是接於 3 號位置上，則為異黃酮(isoflavone)類，大豆中含有大量的異黃酮化合物，有些研究指出此類化合物可以降低癌症發生率[83, 84]。
4. 黃烷醇類(flavanol, catechin)-結構為 C₂、C₃ 之間為單鍵，C₄ 位置上無羰基，C₃ 位置上帶有羥基，如兒茶素(catechin)表沒食子兒茶素(epigallocatechin)。大都存在茶葉及紅酒之中，容易形成穩定的酚自由基，

故兒茶素等酚類會具有較維生素 C 及維生素 E 更高的抗氧化力[85]。

5. 花青素類(anthocyanidin)-O₁ 的位置帶有正電荷，O₁、C₂ 和 C₃、C₄ 之間為雙鍵，C₃ 位置上大都為羥基取代，為水溶性色素，經常存在於櫻桃紅豆、蔬果及紅酒之中，如矢車菊素(cyaniding)、飛燕草素(delphindin)及氯化錦葵色素(malvidin)等。有許多文獻指出花青素是強力的抗氧化劑之一[86, 87]。

2-1-3 我們選用之分析物

我們使用的幾種分析物分別介紹如下：

1. Hesperetin：橙皮素，大多存在於柑橘類中，是目前最常被研究的天然物質之一。
2. Naringenin：柚皮素，來自葡萄柚、柑橘及番茄中。其難以被人體吸收，大約只有 15% 攝入之柚皮素會被人體吸收。
3. Quercetin：槲黃素，又稱槲皮素或洋蔥素，是一種存在於蘋果、紅洋蔥與黃洋蔥、辣椒、紅葡萄、葡萄汁、柑橘類、綠葉蔬菜、青花椰菜、覆盆子及櫻桃等中的植源性黃酮類化合物，廣泛存在於自然界中，包括：茶葉(茶樹; 2000-2500 mg/kg)，蘋果(44 mg/kg)，紅洋蔥(1910 mg/kg)，紅葡萄，柑橘、西紅柿、西蘭花及其他綠葉蔬菜。此外還有許多漿果的含量也較高，包括覆盆子、歐洲越橘(158 mg/kg，鮮重)，越橘(種植 74 mg/kg，野生 146 mg/kg)，蔓越莓(種植 83 mg/kg，野生 121 mg/kg)，還有紅茶、綠茶與紅酒也常出現，部分品種的蜂蜜中也存在槲黃素，包括源於桉樹及澳洲茶樹的蜂蜜[88]。
4. Kaempferol：山柰酚，是一種天然黃酮類化合物，常存在於茶葉[89]、西蘭花、翠雀草、金縷梅、葡萄柚、孢子甘藍、蘋果等植物中植源性物質。山柰酚為黃色結晶體，熔點為 276-278 °C，微溶於水，溶於乙醇和乙醚的熱混合物中。

之後以號碼稱呼各分析物時，亦以上述之號碼為主。

紅酒中常見之類黃酮化合物含有 quercetin 及 kaempferol，而蜂蜜製品常含有以上四者分析物。

2-2 類黃酮化合物之毛細管電泳相關文獻

於 Web of Science 的資料庫中，搜尋關鍵字”flavonoid”及”capillary electrophoresis”不限年份會得到 580 篇文獻資料，2003 年以前為 130 篇，2003-2007 占了 227 篇而 2008-2012 年佔了 223 篇，若加上”wine”的關鍵字則文獻篇數縮至 44 篇，若以”flavonoid”及”HPLC”查詢會得到 12585 篇文獻，大致上可以觀察出雖然 HPLC 還是有很多優勢存在，但也越來越多研究投入毛細管電泳應用在此類化合物的分析之上，

大多類黃酮化合物的分離鑑定目前還是依賴高效能液相層析來達成，但其中我們關心的是，如何以更節省有機溶劑以及時間的方式來達成分析的目的。

目前類黃酮化合物的分析技術有下列文獻報導過：薄層層析[90, 91]，氣相層析[92, 93]，高效能液相層析[94-97]，毛細管電泳[98-102]。

大部分利用毛細管電泳來分析類黃酮類化合物[81, 103]，是的使用在研究天然物，如植物[104-106]、蔬菜水果[107]、草藥[108]及其他植物或蔬果汁之衍生產品[109-111]上。主要分離方法會使用毛細管區帶電泳法(CZE)或微胞電動力層析法(MEKC)，緩衝溶液主要為磷酸或是硼酸緩衝液，毛細管的內徑會選擇 50-100 μm ，電壓範圍為 10-30 kV，注入樣品的體積範圍為 10-50 nL，主要以 UV 偵測，但有時也會使用螢光偵測、電化學偵測或質譜儀偵測。

緩衝溶液經常選擇硼酸溶液是因為硼酸分子易與 1, 2-diol 位置形成五環錯合物，或與 1, 3-diol 位置形成六環錯合物而有利分析的進行[112]。

1994 年, Ferreres 等人[100] 以 MEKC 的方法分離了蜂蜜中 13 種類黃酮類化合物, 分離條件為: pH 8.0 的 200 mM 硼酸緩衝液添加 50 mM SDS 及 10 % 甲醇, 75 cm × 75 μm I.D. 毛細管柱, 外加電壓+20 kv, 溫度為 30 °C。

2004 年, Wang 等人[113]以 HPLC 及 CZE 的方法分析紅酒中之類黃酮化合物, quercetin 的偵測期限為 60 ng/mL, naringenin 偵測期限為 100 ng/mL, hesperetin 偵測極限為 150 ng/mL。

2007 年, Zhu 等人[114]以將樣品溶於水之中, 以反向遷移微胞濃縮法(SRMM)及增強樣品進樣法(ASIW-Sweep-RMM)的方法分離草藥中之類黃酮化合物, SRMM 法得到了 27~37 倍的增強效果, 而 ASIW-Sweep-RMM 法得到了 45~194 倍的增強效果。分離條件: pH 2.0 之 20 mM 磷酸緩衝液加上 100 mM SDS 及 20 % ACN, 52.5 cm × 75 μm I.D. 毛細管柱, 外加電壓為-15 kV, hesperetin 之偵測極限為 11.5 ng/mL。SRMM 法依然是依據 stacking 的概念。

2007 年, Herrero-Martinez 等人[115]以混合界面活性劑之 MEKC 方法在 20 分鐘內分離了蜂膠中的類黃酮化合物。分離條件: pH 7, 50 mM 磷酸緩衝液含 25 mM SC 及 25 mM SDS, 外加電壓為+20 kV, 偵測極限為 1.2 ~ 4 μg / mL。

2008 年, Jiang 等人[116]以 MEKC 的方法分離了蜂膠中 10 種類黃酮化合物, 分離條件為: pH 9.7 之 20 mM 硼酸及 10 mM 磷酸混和緩衝液添加 100 mM SDS 及 16 mM β-CD, 30 cm × 75 μm I.D. 的毛細管柱, 外加+19 kV 電壓, 溫度為 25 °C, 偵測極限為 0.15~1.36 μg/mL。

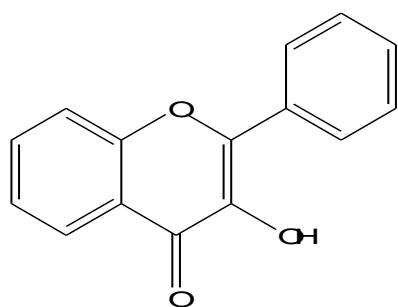
2010 年, Pospisilova 等人[117]使用大體積樣品注入堆積(large volume sample stacking with polarity switching, LVSS)的技術分離植物萃取液中多酚類成分, 分離條件為 pH 9.0 的 50 mM 硼酸緩衝液, 施加-25 kV 1.6 分鐘後轉為+ 25 kV, 偵測極限為 9~16 ng/mL。

2010 年, Cesla 等人[118]在 15 分鐘內以 MEKC 方法分離了 25 種黃烷酮類化合物, 分離條件為: pH 9.05 之 25 mM 硼酸緩衝液添加 10 g/L SDS 及 1.85 g/L

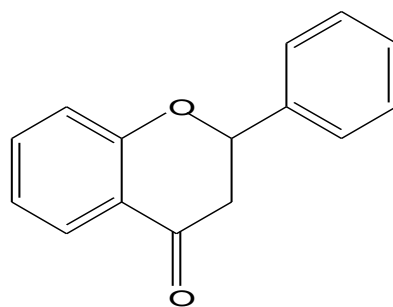
S- β -CD，外加電壓為+20 kV。

2011年，Cao 等人[119] 使用 MEEKC 的方法，得到 185~508 倍增強的訊號，分離條件為：10 mM 硼酸緩衝液或 25 mM 磷酸緩衝液中添加 0.5 % 乙酸乙酯，2 % SDS，9 mM DTAC 和 4 % 正丁醇，47.5 cm \times 50 μ m I.D.的毛細管柱，外加 25 kV 電壓，溫度為 25 $^{\circ}$ C，偵測極限為 8~22 nL/mL。

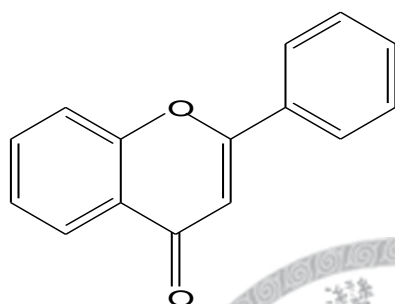




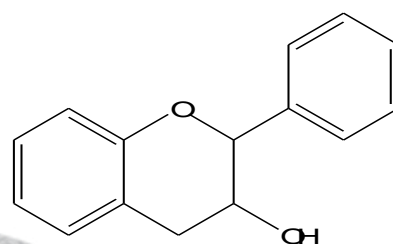
1. Flavonols (黃酮醇)



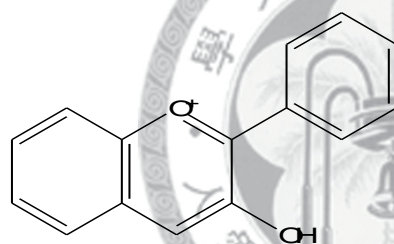
2. Flavonols (黃烷酮)



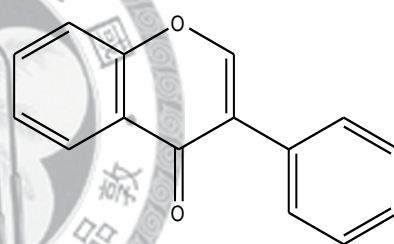
3. Flavones (黃酮)



4. Flavanols (黃烷醇)



5. Anthocyanidin (花青素)



Isoflavanols (異黃酮)

圖 2-2 類黃酮類化合物之結構及分類

表 2-1 The references about MEKC (part I).

Sample	Flavonoids	Buffer	Ref. Year
Honey	Pinobanksin, naringenin, hesperetin, 8-methoxykaempferol, myricetin, quercetin, luteolin, eriodictyol, pinocembrin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin	MEKC: 50 mM SDS, 10 % methanol, 200 mM sodium borate at pH 8.0	[100] 1994
Azadirachta indica	Astragalin, nicotiflorin quercetin, isoquercetin, rutin	50 mM SDS, 20 mM phosphate buffer (pH 2.5), 15% ACN and 5% THF	[120] 2005
Tea leaves, tea beverages, Grapes, apples, red wines	Green tea catechin, Syringic acid, p-cumaric acid, vanillic acid, caffeic acid, gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid,	MEEKC: 2.89 % w/v SDS, 1.36 % w/v heptane, 7.66 % w/v cyclohexanol, 2 % w/v ACN, phosphate buffer at pH 2.0	[121] 2005
Green tea dietary supplements	Green tea catechins	50 mM SDS, 5 mM borate–60 mM phosphate at pH 7.0	[122] 2006
Theobroma cacao beans, chocolate	(–)-Epicatechin, caffeine, theobromine and procyanidin B1 and B2	90 mM SDS, 50mM Britton-Robinson buffer (pH 2.5) + 12 mM HP-β-CD	[123] 2006
Scutellaria baicalensis Georgi	Baicalin, baicalein, wogonin	15 mM SDS, 15 mM borate-40 mM phosphate; 15% ACN, 7.5% 2-propanol	[124] 2007

表 2-2 The references about MEKC (part II).

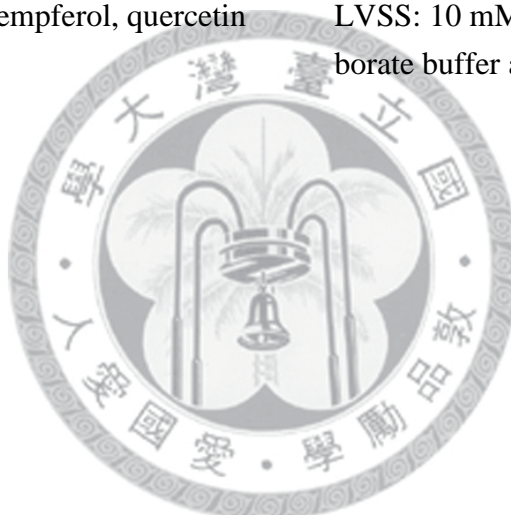
Sample	Flavonoids	Buffer	Ref. Year
Alpinia katsumadai Hayata	Cardamonin, alpinetin	RMEKC: SDS (20.9 %, w/v), water (13.0 %, v/v), 1-butanol(18 %, v/v), heptane (1.5 %), ACN (8.0 %)	[125] 2007
Propolis, Ginkgo biloba	Catechine, epicatechin, naringenin, morin, fisetin, quercetin, kaempferol, galangin, apigenin, chrysin	MEKC: 25 mM SDS, 25 mM SC, 10 % methanol, 50 mM phosphate at pH 7. 0	[115] 2007
Ixeridium gracile	Luteolin-7-o-glucoside, 2', 4'-dihydroxy-dihydrochalcone, 7-hydroxy-flavanone, quercetin-3-o-galactoside	MEKC: 15 mM borate, 30 mM SDS, 10 % methanol at pH 10.5	[126] 2007
Fructus aurantii Immaturus	Tangenetin, nobiletin, hesperetin, naringenin, hesperidin, naringin	SRMM or ASIW-Sweep-RMM: 100 mM SDS, 20 % ACN, 20 mM H ₃ PO ₄ at pH 2.0	[114] 2007
silymarin capsule, Saururus chinensis	Puerarin, catechin, epicatechin, liquiritin, rutin, baicalein, hyperoside, quercitrin, naringin, naringenin, luteolin, silymarin, alpinetin, wogonin	MEEKC: 0.9 % w/v SDS, 0.9 % sodium cholate, 0.9 % w/v butan-1-ol, 0.6 % w/v ethylacetate, 98.2 % v/v of 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ -20 mM H ₃ BO ₃ buffer (pH 7.5)	[127] 2008
Jasmine tea, Green tea	Epicatechin, catechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate	LVSS-sweeping: 40 %, v/v ethylene glycol, 10 mM borate-90 mM sodium cholate	[128] 2008

表 2-3 The references about MEKC (part III)

Sample	Flavonoids	Buffer	Ref. Year
Propolis, Ginkgo biloba	Rutin, apigenin, luteolin, eriodictyol, kaempferol, chrysin, acacetin, flavanone, flavone, fisetin	MEKC: 100 mM SDS, 16 mM β -CD, 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -10 mM NaH_2PO_4 at pH 9.7	[116] 2008
Green tea samples	Green tea catechins	90 mM SDS, 25 mM borate-phosphate pH 2.5, 25mM HP- β -CD	[129] 2009
Green tea beverages	Green tea catechins	50 mM SDS, 50 mM phosphate pH 2.0, 75 mM NaCl.	[130] 2009
Green tea samples	Green tea catechins, flavones such as naringin, biochanin A, hesperetin	10 g/L SDS, 25 mM borate (pH 9.05) + 1.85 g/L heptakis(6-O-sulfo)- β -cyclodextrin	[118] 2010
Radix Astragali, Radix et Rhizoma Salvia Miltiorrhizae	Calycosin-7-O- β -D-glucoside, calycosin, formononetin, rosmarinic acid, caffeic acid, salvianolic acid B, protocatechuic acid	MEEKC: 0.6 % w/v heptane, 3.0 % w/v SDS, 6.0 % w/v 1-butanol, 5 mM sodium tetraborate buffer (pH 9.0) + variable amounts of SC-SWNTs	[131] 2010

表 2-4 The references about MEKC (part IV).

Sample	Flavonoids	Buffer	Ref. Year
Radix Astragali	Quercetin, rutin, calycosin, ononin, calycosin-7-o- β -D-glucoside	MEEKC: 0.5 % ethyl acetate, 2 % SDS, 9 mM DTAC, 4 % 1-butanol, 10 mM sodium borate or 25 mM phosphoric acid at pH 2.0	[119] 2011
Vegetable, fruit, beverage	Quercetin, epicatechin, catechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate	MEKC: 70 mM SDS, 15 mM borate-5 mM phosphate at pH 8.0	[132] 2011
Brassica oleracea	Kaempferol, quercetin	LVSS: 10 mM sodium borate buffer at pH 8.4	[133] 2012



第3章實驗設備與方法

3-1 實驗藥品

3-1-1 分析物

Hesperetin, Naringenin 購買於 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)公司，Kaempferol 購買於 TCI (Tokyo, Japan)公司，Quercetin and Sudan III 購買於 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)公司，Sodium tetraborate 與 Dodecyl sulfate sodium (SDS) 購買於 Acros (New Jersey, USA)公司，Boric acid、disodium hydrogen phosphate 和 sodium dihydrogen phosphate dihydrate 購買於 Showa Chemicals (Kyoto, Japan)公司，蜂蜜購買於 Gee bees farm (Nantou, Taiwan)，紅酒皆買於學校附近超商，其中梅若紅葡萄酒製造於智利，紅麴紅酒製造於台灣，everyday 紅酒製造於美國加州，cristina 紅酒產於西班牙。



圖 3-1 左一為智利紅酒梅若紅，左二為台灣紅麴紅酒，左三為美國加州紅酒，左四為西班牙克里斯提娜紅酒

3-1-2 緩衝溶液

硼酸(H_2BO_3)與四硼酸二鈉($Na_2B_4O_7$)分別為日本 SHOWA 及德國 Merck 公司

之產品。

3-1-3 緩衝溶液添加劑

本實驗所使用的陰離子界面活性劑為正十二烷基硫酸鈉(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)為德國 Merck 公司之產品，其分子量為 288.38 g/mole 及分子式為 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_2\text{ONa}$ ，如表 3-1 其 25 °C 下於純水中之臨界微胞濃度值(critical micelle concentration, CMC)為 8.2 mM[134]，在 pH 較低(pH < 4)時 CMC 值會降至 6 mM[135]，在 8.2 mM 濃度下微胞約為 62 個單體組成[136]。

3-1-4 其他試劑與藥品

氰甲烷(acetonitrile, ACN)購買於美國 Fisher 公司的 HPLC 級試藥。氫氧化鈉(NaOH)與鹽酸(HCl)購買於日本 Kanto Chemical 公司的分析級試藥。二次去離子水以美國 Millipore 的 Milli-Q 系統(Millipore, Bedford, MA, USA)純化之。在本實驗中， μ_{eof} 的中性標示劑為氰甲烷， μ_{mc} 的標示劑為 Sudan III。所有的溶液在使用之前，皆以 0.22 μm 的薄膜過濾。

3-2 實驗設備及耗材

3-2-1 毛細管電泳儀

如圖 3-2 使用的電泳儀為 Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA) 全自動化毛細管電泳儀，連接 PDA (photo-diode array)偵測器，能偵測的波長範圍為 190 ~ 600 nm (256 Element Diode Array)。電泳儀的操作電壓範圍為-30.0 ~ +30.0 kV；恆溫控制範圍：15 ~ 40 °C；進樣時間範圍：1.0 ~ 600.0 秒；水動力注入壓力範圍：0.1 ~ 25.0 psi；真空進樣壓力範圍：0.10 ~ 5.00 psi；電力進樣電壓範圍：-1.0 ~ -10.0 及+1.0 ~ 10.0 kV (1.0 ~ 99.9 秒)；洗滌(rinse)壓力範圍：0.1 ~ 100.0 psi。儀器的控制與資料的處理經由個人電腦(586-IBM AT-compatible PC)及控制軟體(P/ACE MDQ system version 2.3 for window)連線控制，並使用 IEEE-488 界面板將電腦與儀器連線。



圖 3-2 Beckman P/ACE MDQ 毛細管電泳儀

3-2-2 毛細管柱

如圖 3-3 本實驗所採用的熔溶矽膠 (fused silica) 毛細管為 PolymicroTechnologies 公司(Phoenix, AZ, USA)之產品,其內壁沒有衍生化修飾,表面覆蓋一保護層-聚乙烯胺(polyimide),外徑(O. D.)為 363 μm ,內徑(I. D.)為 50 μm ,總長(L_t)為 60.2 cm,至偵測器的有效長度(L_d)為 50 cm。並且在近偵測器端燒出一個約 3 mm 之窗口,作為 UV-Vis 光源穿透毛細管及偵測毛細管柱內的分析物。

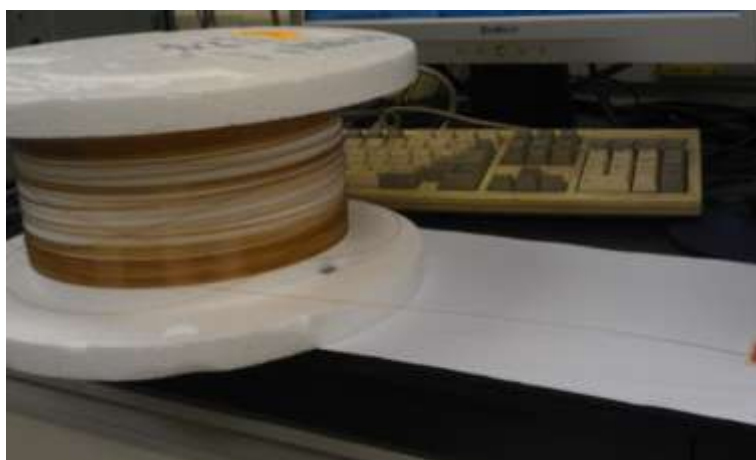


圖 3-3 毛細管

3-2-3 實驗室型酸鹼度/氧化還原電位計(Laboratory pH Meter)

如圖 3-4 酸鹼度計為台北上泰(Suntex)公司之產品，型號為 SP-2300，內附有溫度校正的功能，其電極(InLab 410)為瑞士 Mettler-Toledo 公司之產品，其 pH 值的測定範圍為 pH -2.00~+16.00，準確度為 ± 0.01 個單位，具有 0~100 °C 自動或手動溫度補償。



圖 3-4 酸鹼度計

3-2-4 實驗室型導電度計(Laboratory conductivity meter)

如圖 3-5 導電度計為台北上泰(Suntex)公司之產品，型號為 SC-170，內附有溫度校正的功能，其電極(980-K19/120)為瑞士 Mettler-Toledo 公司之產品，其導電度的測定範圍為 0.00 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ~2000 ms/cm ，具有六段測量範圍，可自動或手動切換。在 50 ms/cm 內導電度之精確度為 $\pm 1\%$ (當使用 1.0 Cell)；其溫度測定範圍為 0 ~ 100 °C，溫度精確度 ± 0.4 °C，具有自動溫度補償及 Hold 等功能。



圖 3-5 導電度計

3-3 實驗方法

3-3-1 分析物之配製

樣品分析物之母液濃度為 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，皆溶於含 100 % 甲醇中，平時冷藏於 4°C 的冰箱。先將四種分析物母液混合並再以甲醇稀釋 10 倍成為二次母液 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及含 100 % 氫甲烷) 後，再依據實驗條件稀釋至所需的偵測濃度。

3-3-2 緩衝溶液之配置

H_2BO_3 與 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 之母液濃度皆為 200 mM 溶解於水溶液，平時冷藏於 4°C 的冰箱中，實驗進行時將相同濃度的 H_2BO_3 與 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 以適當的體積比例互相混合調配至所需 pH 值的硼酸鹽緩衝溶液，再稀釋至偵測所需的濃度，必要時以 1 M 的鹽酸或氫氧化鈉來微調 pH 值。

實驗用之 SDS 母液濃度為 200 mM 之水溶液，平時冷藏於 4 °C 的冰箱中，實驗進行時再稀釋至偵測所需的濃度。

3-3-3 紅酒樣品之萃取

取 10 mL 紅酒及 10 mL 乙醚以超音波萃取，萃取後取上層乙醚層置入減壓濃縮儀濃縮，濃縮完成之剩餘物以 10 % 甲醇溶液調配成 5 mL 的樣品溶液，接著以 0.22 μm 的薄膜過濾。

3-3-4 蜂蜜樣品之萃取

根據文獻，取 50 克之蜂蜜溶於 100 mL 的 pH 2 鹽酸溶液中，以脫脂棉過濾後，加入 20 克 XAD-2 樹脂(吸附類黃酮類化合物)，之後通入 20 mL 玻璃管柱中，以 40 mL 的 pH 2 鹽酸溶液及 60 mL 的水清洗，隨後以 40 mL 甲醇將樣品流出並放入減壓濃縮儀，最後的濃縮物再加入甲醇，接著以 0.22 μm 的薄膜過濾。

3-3-5 毛細管的處理

為了保持毛細管的暢通及活化，將清洗分為四個部份：新管柱之清洗、每日實驗前之清洗、每組實驗間之清洗及每次實驗間之清洗。一支新的毛細管柱，在未使用之前，先以二次去離子水清洗五分鐘，接著以 1M 的 NaOH 清洗二十分鐘，再以 0.1M NaOH 清洗二十分鐘，最後以二次去離子水清洗二十分鐘，所有步驟之溫度皆在 25 °C 下進行，以確保管壁之矽醇基的活化。在每日進行實驗之前，先以二次去離子水清洗五分鐘，接著以 1M 的 NaOH 清洗十分鐘，再以 0.1M NaOH 清洗十分鐘，最後以二次去離子水清洗四十分鐘，以確保毛細管的暢通，隨後及可進行每日實驗。在每組進行實驗之前，先以二次去離子水清洗二分鐘，接著以 1M 的 NaOH 清洗十分鐘，再以 0.1N NaOH 清洗十分鐘，最後以二次去離子水清洗十分鐘，以確保毛細管的流通舒暢，隨後及可進行每組實驗。在每次實驗進行之間，皆以二次去離子水清洗一分鐘，接著以 1.0 N 的 NaOH 清洗二分

鐘，再以 100 % ACN 清洗二分鐘，最後以二次去離子水清洗五分鐘，使管內的 pH 值與緩衝液達成平衡，所有步驟之溫度皆於 25 °C 下進行，隨後即可進行下一個實驗。

3-3-6 實驗操作

實驗的偵測波長定為 200 nm，區帶電泳的操作電壓為+25 kV，LVSS 模式的操作電壓為+25 kV 切換為-25 kV，反向掃及模式的操作電壓為-15 kV，電流控制在 0 ~ 100 μ A 之間，樣品進樣方式為水動力注入，注入時間在一般區帶電泳(CZE)為 5 秒，濃縮時注入時間為 120 秒或 480 秒，壓力差設為 1.0 psi (68.9 mbar)，管柱溫度控制在 25 °C，其他實驗條件於結果與討論部份再詳加敘述之。

3-3-7 毛細管電泳之相關計算

(1) 電滲流 μ_{eo} 與溶質有效電泳遷移率 μ_{ep}

$$\mu_{eo} = \frac{L_t \times L_d}{V} \times \frac{1}{t_{eo}} \quad (3-12)$$

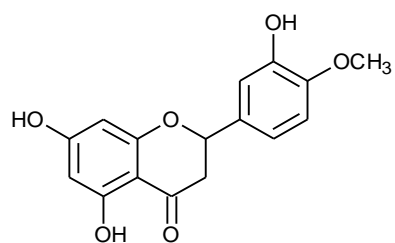
$$\mu_{ep} = \mu_{ap} - \mu_{eo} = \frac{L_t \times L_d}{V} \times \left(\frac{1}{t_r} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (3-13)$$

其中 t_{eo} 為電滲流的遷移時間(sec)， L_t 為毛細管總長(cm)， L_d 為毛細管進樣端到偵測器的有效分離長度(cm)， V 為外加電壓(voltage)， μ_{ap} 為分析物的視遷移率， t_r 為分析物的遷移時間(sec)。

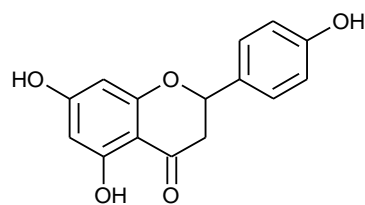
(2) 相對半高峰寬(Relative $\Delta W_{1/2}$)

$$\Delta W_{1/2} = \frac{W_{1/2}^1}{W_{1/2}^2} \quad (3-14)$$

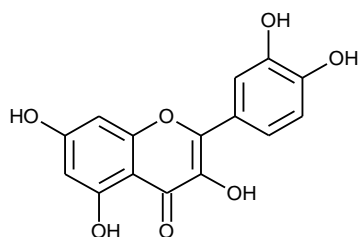
其中 $W_{1/2}^1$ ， $W_{1/2}^2$ 分別為分析物 1 與 2 的半高峰寬。



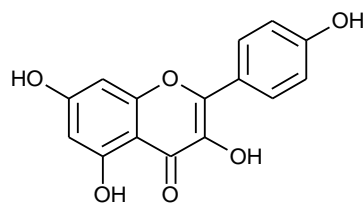
hesperetin



naringenin



quercetin



kaempferol

No.	Compound	pKa ^a
1.	Hesperetin	7.49 ± 0.40
2.	Naringenin	7.55 ± 0.40
3.	Quercetin	6.31 ± 0.40
4.	Kaempferol	6.34 ± 0.40

a. The data were from Scifinder Scholar Database, Ver. 2011. 12, by 2011 American Chemical Society

圖 3-6 四個分析物之結構及 pKa 值

System Type	Capillary Dimensions	Conditions
<input checked="" type="radio"/> PA 800 & P/ACE MDQ Series Systems <input type="radio"/> Generic CE	60.0 Total Length (cm) 50 Length to Window 50 Inside Diameter	25 Temperature (°C) ⓘ 1 Pressure (psi) 120 Time (sec)
<input type="button" value="Calculate"/> <input type="button" value="Reset"/>		
This program provides results based on theoretical principles. The answers presented here should be taken as approximations, not absolutes.		
Injection Plug Length (mm) 120.66 Plug % Length to Window 24.13 Capillary Volumes Replaced 0.20163	Hydrodynamic Injection (nl) 237.52 Capillary Volume (nl) 1178.0 Capillary Volume to Window (nl) 982.0	Seconds to replace 1 volume 595.0 Injection Pressure-seconds 120.0 Relative Viscosity (cp) 0.891

圖 3-7 Beckmann 軟體 120 sec 樣品注入的計算

System Type	Capillary Dimensions	Conditions
<input checked="" type="radio"/> PA 800 & P/ACE MDQ Series Systems <input type="radio"/> Generic CE	60.0 Total Length (cm) 50 Length to Window 50 Inside Diameter	25 Temperature (°C) ⓘ 1 Pressure (psi) 480 Time (sec)
<input type="button" value="Calculate"/> <input type="button" value="Reset"/>		
This program provides results based on theoretical principles. The answers presented here should be taken as approximations, not absolutes.		
Injection Plug Length (mm) 482.64 Plug % Length to Window 96.53 Capillary Volumes Replaced 0.80652	Hydrodynamic Injection (nl) 950.09 Capillary Volume (nl) 1178.0 Capillary Volume to Window (nl) 982.0	Seconds to replace 1 volume 595.0 Injection Pressure-seconds 480.0 Relative Viscosity (cp) 0.891

圖 3-8 Beckmann 軟體 480 sec 樣品注入的計算。

Detergent	CMC (mM)	N
Anionic		
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	8.2	62
Cholic acid	14	2~5
Glycocholic acid	13	2
Taurocholic acid	10~15	4~5
Cationic		
Cetyltrimethylammonium bromide (CATB)	1	78
Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)	15	50
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.026	168
Zwitterionic		
CHAPS		
CHAPSO		
Nonionic		
Polyoxyethylene dodecanol	0.1	
Triton X-100	0.24	140

表 3-1 MEKC 常用界面活性劑之臨界微胞濃度值(CMC)及單體聚集數(N)[137].

第4章 結果與討論

4-1 線上濃縮模式之挑選

本章選擇以四個類黃酮類化合物作為分析物，並探討樣品基質與緩衝液電解質兩者的組成和濃度，以及陰離子微胞濃度對中性分析物的偵測靈敏度與濃縮效率的影響，並研究在長時間進樣後的濃度訊號增強與偵測極限，最後以吸收峰高與濃縮效率來描述濃度偵測靈敏度的提昇。

我們挑選一些線上濃縮模式會在後面討論之：大體積堆積、大體積堆積掃集、正向掃集模式及逆向掃集模式。

其中伴隨切換電壓的大體積樣品堆積(Large Volume Sample Stacking with Polarity Switching, LVSS)為分析帶電分析物效果很好的方式，大體積(large volume)的定義為注入樣品之體積達到一般條件之注入體積十倍以上。而其有個著名的缺點是切換電極的時間再現性不易控制，且樣品基質或樣品注入體積有顯著改變時，原本切換電極方向之時間得重新測量，較為費時費力。

接著我們也嘗試使用近來文獻[128, 138]中提到的大體積堆積掃集(LVSS-Sweeping)之方式應用在類黃酮化合物的線上濃縮上，此法是利用存在電滲透流之正向毛細管電泳搭配界面活性劑做逆向的掃集，且樣品是配置於純水之中，所以在樣品區帶時會因場強較強而加速，並於場強較弱之背景電解質之界面減速產生堆積(stack)之效果，接著界面活性劑會再進行掃集的過程，且他們欲達到有效的使分析物在與背景分析物的界面(boundary)減速，添加了一些乙二醇增加背景電解質緩衝液之黏性，而此方法避免了原本 LVSS 需要切換電極之缺點，可以減少時間的使用故我們也測試之。

由於希望儘量減少方法之複雜性，所以我們也挑選了較為單純的掃集模式來做線上濃縮，並且正向電壓及逆向電壓之模式都做了嘗試，正向為高 pH 環境下以 SDS 或其他陽離子型界面活性劑做掃集，逆向掃集為低 pH 環境下施加逆向電

壓以 SDS 微胞做掃集堆積。

4-2 一般模式-毛細管區帶電泳法(CZE)

根據文獻[120-130]，若無使用線上濃縮或其他增加偵測靈敏度的方法，則 CZE 或 MEKC 的偵測極限最佳也只在 100 ng/mL(ppb)以上，若是以線上濃縮的方式才有機會達到 100 ng/mL(ppb)以下之偵測極限。

圖 4-1 為 50 mM 之硼酸鹽分離緩衝液在不同 pH 值下之電泳圖，pH 值分別為 (A) pH 9.0、(B) pH 9.5 及(C) pH 10.0，樣品濃度為 10 $\mu\text{g/mL}$ 注入條件為 1 psi 下 10 秒鐘注入，外加電壓為+ 25 kV。

其遷移順序應與分析物解離程度較有關，雖然 pH 增加應該會使電滲流稍微加快，但圖 4-1 中升高 pH 值卻讓 quercetin 及 kaempferol 出現的時間超過 20 分鐘，且所有的分析物遷移速度都會減慢，該是高 pH 值的條件使得分析物皆帶有更多的負電荷，測試的結果我們選擇 pH 9.0 為一般 CZE 模式使用之酸鹼值。

圖 4-2 為毛細管區帶電泳的模式下，改變分析物的注入時間之電泳圖，其中分離緩衝液中未添加其他添加劑，分析物濃度為 1 $\mu\text{g/mL}$ ，其中若樣品注入時間達 20 秒以上則訊號會產生嚴重的重疊，無添加其他添加劑則無法改善解析度，故無法單純以增加進樣量而達成有效之線上濃縮。

4-3 大體積樣品堆積(LVSS)

4-3-1 120 秒及 480 秒注入之堆積效率與偵測極限

圖 4-3(A)~(C)的分離緩衝液組成皆為 50 mM 硼酸鹽 pH 9.0，圖 4-3(A)為進樣 5 秒(樣品濃度， 10 $\mu\text{g/mL}$)，外加電壓+25 kV 之區帶電泳圖，圖 4-3(B)為施加進樣 120 秒(樣品濃度， 1 $\mu\text{g/mL}$)，外加 0.4 分鐘負電壓 25 kV 後轉為正電壓 25 kV，圖 4-3(C)為施加進樣 480 秒(樣品濃度， 1 $\mu\text{g/mL}$)，外加 1.31 分鐘負電壓 25 kV 後轉為正電壓 25 kV。堆積效率(stacking efficiency, SE)代表分析物線上濃縮堆積的程度，當堆積效率為 10~100 時，相當於增強 10~100 倍的偵測靈敏度。所以以

公式(1-9)比較大體積樣品堆積(LVSS)模式區帶電泳(CZE)模式可計算出 LVSS 模式的堆積效率。以圖 4-3(B)與圖 4-3(C)可算得各分析物樣品注入 120 秒(根據圖 3-8 軟體計算,約佔了毛細管總體積 24.13 %)在 LVSS 模式堆積後訊號增強效率: hesperetin(1)增強 44.98 倍、naringenin(2)增強 46.74 倍、quercetin(3)增強 40.35 倍,而 kaempferol(4)增強 50.82 倍。而比較圖 4-3(A)與圖 4-3(C)可算得各分析物在 LVSS 模式樣品注入 480 秒堆積後訊號增強效率: hesperetin(1)增強 260.77 倍、naringenin(2)增強 266.62 倍。可知以大體積堆積注入樣品 480 秒(根據圖 3-8 軟體計算,約佔了毛細管總體積 96.53 %)堆積效果非常好。hesperetin (1)、naringenin (2)、quercetin (3)與 kaempferol (4)之偵測極限分別為 14.87、14.71、19.76 及 16.66 ng/mL(如表 4-3 所示)。圖 4-4 及圖 4-5 為 LVSS 以 120 秒注入樣品之檢量線圖。

4-4 正向大體積堆積掃集 (LVSS-Sweeping)

我們測試的 LVSS-Sweeping 方法,目前只能有效的線上濃縮 hesperetin 及 naringenin,而 quercetin 及 kaempferol 在電泳圖中未找到訊號,圖 4-6 為分離緩衝液(pH 9.0 硼酸鹽)添加不同添加劑(上方兩圖添加 10 %的乙二醇,下方兩圖添加 20 %乙二醇, A 與 C 添加 20 mM 的 SDS, B 與 D 添加 50 mM SDS),分析物為 1 μ g/mL 的 flavonoid 水溶液,樣品注入壓力為 1 psi,注入時間為 120 秒。

其中由上兩圖及下兩圖比較可知添加乙二醇的量提升會使整體的訊號出現位置產生延遲,而由(A)與(B)圖比較或是(C)與(D)比較亦可知提高 SDS 之添加濃度也會使訊號延後出現,並使訊號解析度增加。而觀察不到 quercetin 及 kaempferol 的訊號(即使拉長電泳時間至 40 分鐘),猜測或許是相較於其他兩分析物, quercetin 跟 kaempferol 具有 diol 之結構,而添加 glycol 可能是使 quercetin 跟 kaempferol 太容易存在於動相中而較不願意分配於微胞相之中,故添加 glycol 會使 quercetin 及 kaempferol 的 peak 完全消失,而我們目前的結果可得在此堆積模式之下 hesperetin 及 naringenin 的增強效率分別為 24.29 及 19.23 倍。

4-5 正向掃集模式 (sweeping with normal polarity)

4-5-1 pH 值

圖 4-7 (A)~(C)為樣品分析物(10 $\mu\text{g/mL}$)溶在 20 mM 磷酸鹽緩衝液，樣品注入為 5 秒，而變化分離緩衝液之 pH(分別為 6.5、7.0、7.5)之電泳圖。圖 4-8 為圖 4-7 之吸收峰峰高變化圖，可知 naringenin、hesperetin 及 quercetin 在 pH 6.5 的時候吸收峰都較高，在 pH 6.5 時有較好的堆積效率，可能原因為 pH 提高時，分析物會帶部分負電，而減少與 SDS 的作用力使堆積效率下降，故我們選擇 pH 6.5 為分離緩衝液之最佳 pH 值。

4-5-2 注入時間

圖 4-9 (B)~(E)為樣品分析物(1 $\mu\text{g/mL}$)溶在 20 mM 磷酸鹽緩衝液，且分離緩衝液為添加 25 mM SDS 之 20 mM 磷酸緩衝液，進樣不同秒數之電泳圖，由圖 4-9 (E)可知樣品注入 240 秒的時候，hesperetin (1)、quercetin (3)和 kaempferol(4)的吸收峰會重疊，且 naringenin (2)的吸收峰會變寬，故在未添加其他有機修飾劑的情況下進樣時間只能在 180 秒以內。

以區帶電泳 5 秒注入及正向 MEKC 的 120 秒注入比較，可算得 hesperetin (1)增強效率為 25.56 倍，naringenin (2)增強效率為 22.79 倍，quercetin (3)增強效率為 16.06 倍，kaempferol (4)增強效率為 20.36 倍。

4-6 逆向掃集模式 (sweeping with reverse polarity)

4-6-1 不同秒數的樣品注入變化

如圖 4-10 及圖 4-11 可知注入不同秒數之樣品，可知加上負電壓之情況下，訊號高度及面積皆會隨著注入時間增加而增加。一般長時間進樣會使分離效率變差，所以需要調整 pH 值或添加其他有機試劑增加分離效率，其中我們挑了 120 秒樣品注入以及 480 秒樣品注入來做比較，當樣品注入 120 秒的時候，樣品注入體積佔毛細管柱 24.13 % 的體積，當樣品注入 480 秒的時候，樣品注入體積佔毛細管柱 96.53 % 的體積。

4-6-2 120 秒樣品注入

4-6-2-1 施加電壓對樣品堆積之影響

圖 4-12 (A)~(E)分為不同電壓下(-25 kV、-22 kV、-20 kV、-18 kV、-15 kV)之電泳圖，此時分離緩衝液組成為添加 50 mM SDS 於 pH 2.0 的 20 mM 磷酸鹽緩衝液。圖 4-12 (A)~(C)顯示當施加電壓為-25 ~-20kV 時，中間兩個分析物之吸收峰有顯著重疊，而到電壓減為-15 kV 如圖 4-12 (E)所示可使四個分析物達基線分離。當施加電壓較大時，SDS 微胞將分析物帶至偵測端的速度太快，而減少了分離效率。圖 4-13 和圖 4-14 分別顯示不同電壓下四個分析物吸收峰面積和高度之變化，可知在施加電壓為-15 kV 時，吸收峰面積及高度都比較高(n=3)，顯示此時堆積效果最佳，故我們選擇-15 kV 當作逆向堆積時之操作電壓。

4-6-2-2 添加有機修飾劑

添加有機溶劑於分離緩衝液中，可以改變移動相之極性和黏滯性，進而降低介電常數與 zeta 電位，所以對整個分離系統中的分離選擇性、電滲流、解析度會有所影響。由圖 4-15 可知氬甲烷可增加分離效果，加至 10 % 可使達基線分離，而由圖 4-16 之添加甲醇亦可增加分離效果，加至 10 % 可達基線分離。加入氬甲烷及甲醇會有作用應該是在 MEKC 模式下，由於界面活性劑的微胞藉由非極性的作用力而聚集，所以添加有機修飾劑可增加移動相的非極性，而使樣品更容易溶於溶液相而不分配於微胞中，等同於溶液相中有個拉扯的力量稍微牽制原本分析物的行動，而改變其分離效果。之後逆向掃集模式皆選擇添加氬甲烷。

4-6-2-3 SDS 濃度對樣品濃縮的影響

圖 4-17 為 pH 2.0 的 20 mM 分離緩衝液添加不同濃度 SDS 對樣品濃縮之電泳圖。由圖 4-17 可知樣品分析物在濃縮過程受到 SDS 濃度的影響之變化，SDS 濃度增高，與樣品分析物之間作用的比例增加，使得樣品分析物的有效遷移率變大，而遷移時間也因此縮短。由圖 4-17 (A)知添加 25 mM SDS 時，分離時間拉長至 35 min，而圖 4-17 (B)添加 50 mM SDS 時，可有效縮短分析時間，圖 4-18

顯示吸收峰面積是添加 25 mM SDS 時最高，而圖 4-19 中 hesperetin、quercetin 及 naringenin 在添加 50 mM SDS 時吸收峰最高，可知當添加 25 mM SDS 時還不能有效堆積四個樣品所以呈現吸收峰是寬胖的形狀，而在 SDS 添加 50 mM 以上的濃度堆積情況明顯改善，以分離效率及堆積效果考量，我們在樣品注入 120 秒的條件時選用添加 50 mM SDS 之條件為最佳化。

4-6-2-4 探討樣品基質對樣品濃縮的影響

圖 4-20 為樣品分析物進樣 120 秒，且分離緩衝液組成為 20 mM 磷酸鹽中添加 50 mM SDS 和 10 % 氘甲烷時，樣品溶液中添加磷酸鹽緩衝液對樣品濃縮的電泳圖。由圖 4-20 (A)~(E)可知，當添加 20 mM 磷酸鹽於樣品基質中，分離時間較短且堆積效果較佳。由圖 4-21 可知樣品基質的範圍落於 25 mM~75 mM 之中會有較好的堆積效果，由算式(1-3)的增強因子 γ 值定義及表 4-1 及表 4-2，在分離緩衝液為 50 mM 磷酸的情況下，可算得樣品基質為 25、45、50、75 和 100 mM 的緩衝溶液 γ 值分別為 0.619、1、1.11、1.45 及 1.74，而由圖 4-21 也可知若樣品直接溶於水中會造成樣品基質與分離緩衝液之導電度不匹配會使得掃集效果變差，此結果也顯示選擇 Sweeping 的模式會比文獻中選用 SRMM(分析物溶在水中，以 SDS 包覆分析物前進，其線上濃縮的概念較偏於堆積而非掃集)的模式[114]得到更好的堆積效果。

4-6-2-5 偵測極限及真實樣品檢測

圖 4-22 及圖 4-23 為進樣 120 秒時所得的樣品分析物之檢量線圖。表 4-4 為在最理想的實驗條件下，進樣 120 秒所得的樣品分析物偵測極限，hespererin (1)、naringenin (2)、quercetin (3)與 kaempferol (4)之偵測極限分別為 43.53、38.25、57.38、48.55 ng/mL。圖 4-24 為 10 倍稀釋的蜂蜜樣品進樣 120 秒，且分離緩衝液組成為 20 mM 磷酸鹽中添加 50 mM SDS 和 10 % 氘甲烷的電泳圖。可檢測出含有 quercetin 1.13 $\mu\text{g/mL}$ 。圖 4-25 為 10 倍稀釋的 1 號紅酒樣品進樣 120 秒，且分離緩衝液組成為 20 mM 磷酸鹽中添加 50 mM SDS 和 10 % 氘甲烷的電泳圖。可檢

測出含有 quercetin 7.76 $\mu\text{g/mL}$ 及 kaempferol 0.99 $\mu\text{g/mL}$ 。圖 4-26 為 10 倍稀釋的 5 號紅酒樣品進樣 120 秒，且分離緩衝液組成為 20 mM 磷酸鹽中添加 50 mM SDS 和 10 % 氘甲烷的電泳圖。可檢測出含有 quercetin 4.66 $\mu\text{g/mL}$ 及 kaempferol 1.47 $\mu\text{g/mL}$ 。表 4-5 為這兩種紅酒進行六次實驗之回收率及標準差。表 4-6 為我們買來的六種不同紅酒以 120 秒樣品注入並以逆向掃集模式偵測出之類黃酮含量。

4-6-3 480 秒注入

4-6-3-1 添加有機修飾劑

圖 4-27(A)~(C)分別為注入 480 秒樣品時，分離緩衝液中之添加 10、15、及 20 % 氘甲烷之電泳圖，由圖 4-27 (C)可知氘甲烷濃度添加至 20 % 才能有效將四根吸收峰作基線分離。

4-6-3-2 SDS 濃度對樣品濃縮的影響

圖 4-28 為 pH 2.0 的 20 mM 分離緩衝液添加不同濃度 SDS 對樣品濃縮之電泳圖。圖 4-28 (A)~(D)中隨著 SDS 濃度增高，與樣品分析物之間作用的比例增加，使得樣品分析物的有效遷移率增加，而遷移時間也因此縮短，但圖 4-28 (A)反而遷移時間較短，推測圖 4-28 (B)~(D)因為 480 秒的樣品注入使毛細管中離子濃度較高，而 SDS 濃度增加更增加導電度而導致焦耳熱，使分離時間部分延長。由圖 4-28 (B)~(D)知添加 50 mM SDS 以上時，quercetin、hesperetin 及 naringenin 分離時間拉長至 25 分鐘後才出來，而圖 4-28 (D)添加 100 mM SDS 時，quercetin 及 hesperetin 的吸收峰則會部分重疊，圖 4-29 顯示吸收峰面積於添加 25 mM SDS 時 quercetin 和 naringenin 有最大面積，而 kaempferol 及 hesperetin 吸收峰面積最大分別是在添加 75 mM 和 50 mM SDS 時。

而圖 4-30 中 quercetin 及 naringenin 在添加 25 mM SDS 時吸收峰最高，而 kaempferol 及 hesperetin 則是在添加 50 mM SDS 時吸收峰最高，以分離時間、效率及堆積效果考量，我們在分析物注入 480 秒的條件時選用添加 25 mM SDS 之

條件為最佳化。

與其他文獻相比，掃集模式可以有效增加樣品注入量而得到相對的訊號，原因可能是，掃集模式成功決定因素在擬靜相(微胞)與分析物之作用力要有足夠的強度，才能有效的掃集。雖然文獻[114]欲用掃集加堆積的加乘效應，但比起單純的掃集模式不見得是較有利的方法。

4-6-3-3 偵測極限

圖 4-31 與圖 4-32 為 480 秒樣品注入下，四個分析物的校正曲線，表 4-7 為在最理想的實驗條件下，進樣 480 秒時所得的樣品分析物偵測極限。hesperetin (1)、naringenin (2)、quercetin (3)與 kaempferol (4)之偵測極限分別為 21.28、15.37、24.26、24.7 ng/mL。

4-7 各方法比較

由圖 4-33(B)與(C)可知逆向掃集模式的堆積能力不會比大體積堆積差，而由(D)可知反向掃集模式樣品注入 480 秒可得非常優越之靈敏度，但由於 480 秒注入就是得使用 6 分鐘的時間做樣品注入，且訊號出現的時間也較晚要到 25 分鐘才能使電泳圖完整呈現，故若非需要更高的靈敏度，我們會選擇 120 秒注入的逆向掃集模式來做分析。

圖 4-33 還顯示了一些額外的資訊，(A)與(B)比較時知道做 LVSS 模式時 hesperetin 與 naringenin 的遷移順序會對調，quercetin 與 kaempferol 的遷移順序也會對調，應該是 LVSS 模式在切換電壓之前樣品在樣品基質中移動速度非常快，naringenin 會比 hesperetin 快抵達進樣端，quercetin 也會比 kaempferol 快抵達進樣端，而在切換電壓之後在分離緩衝液中速度差異較沒那麼快，在抵達偵測器之前原本被超前的位置並無法返回。而(C)中因在低 pH 值環境下，四個分析物皆為中性不帶電荷，所展現出之快慢順序應取決於與 SDS 之間之作用力大小，故其作用力大應該是 kaempferol > quercetin > hesperetin > naringenin。

4-8 結論

伴隨切換電壓方向之大體積樣品堆積(LVSS)可以提供很好的堆積效果，但切換電壓的時間再現性不易控制，故我們較希望能找到更方便的方法。

我們也試著在中性 pH 範圍(選擇 pH 6.5)，應用正向掃集模式對類黃酮化合物作線上濃縮，但正向模式若想更增加訊號靈敏度，可能還得進一步找到條件改良。接著再以高 pH 環境，嘗試做大體積堆積結合掃集的模式來做線上濃縮，但我們目前測試的結果只能對 hesperetin 及 naringenin 做有效濃縮，但 quercetin 及 kaempferol 的訊號會消失。

而我們主要的研究是選擇在低 pH 環境下以 SDS 來掃集的堆積模式，經我們測試，以水動力大量進樣中性分析物時，添加適當的電解質濃度於樣品基質(20 mM pH 2.0 的磷酸鹽)與分離緩衝液中，有助改善長時間進樣的樣品濃縮而不失去解析度。此逆向堆積模式於分離緩衝液中添加適量氬甲烷，可讓注入類黃酮化合物時間長達 120 秒，甚至 480 秒而分離不損失解析度，其中 480 秒的樣品注入體積約佔毛細管總長的 96.5%，可有效增強訊號且可有效應用於真實樣品的檢測。故目前之研究中的最佳選擇應為逆向掃集模式。

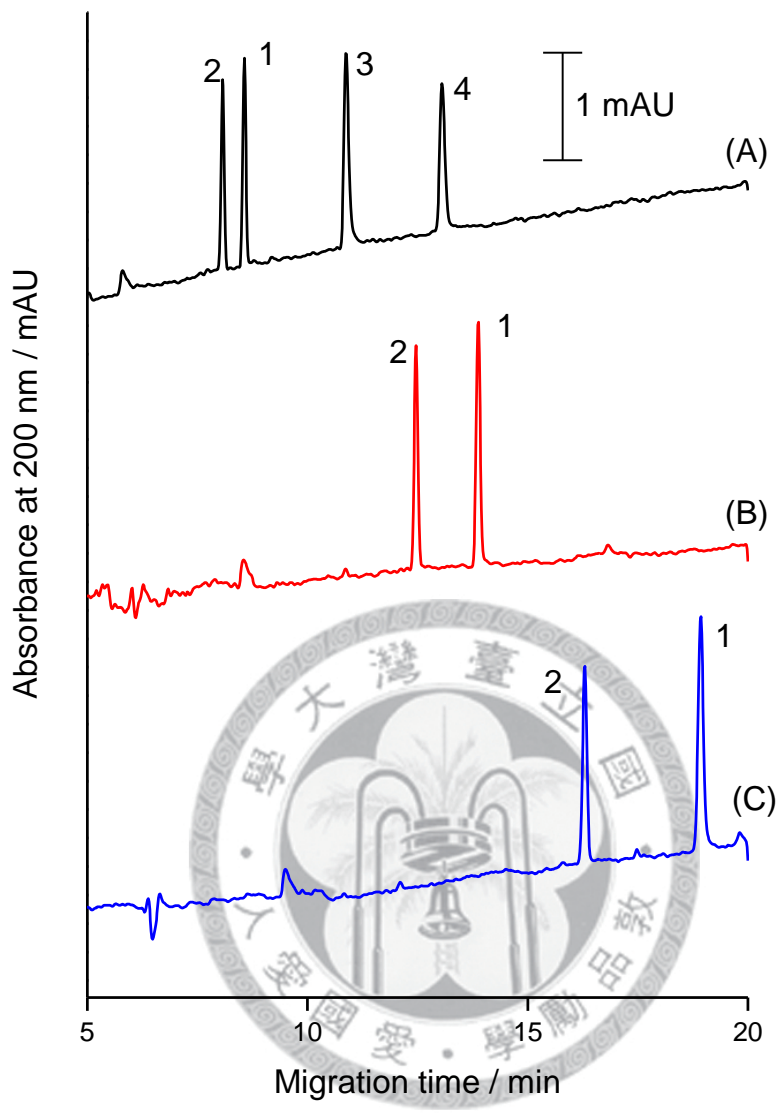


圖 4-1 Effect of pH of running buffer: (A) pH 9.0; (B) pH 9.5; (C) pH 10.0. Separation buffer: 50 mM borate buffer. Sample: 10 $\mu\text{g/mL}$ flavonoids. Injection pressure: 1 psi, applied voltage: +25 kv. Injection time: 10 sec.

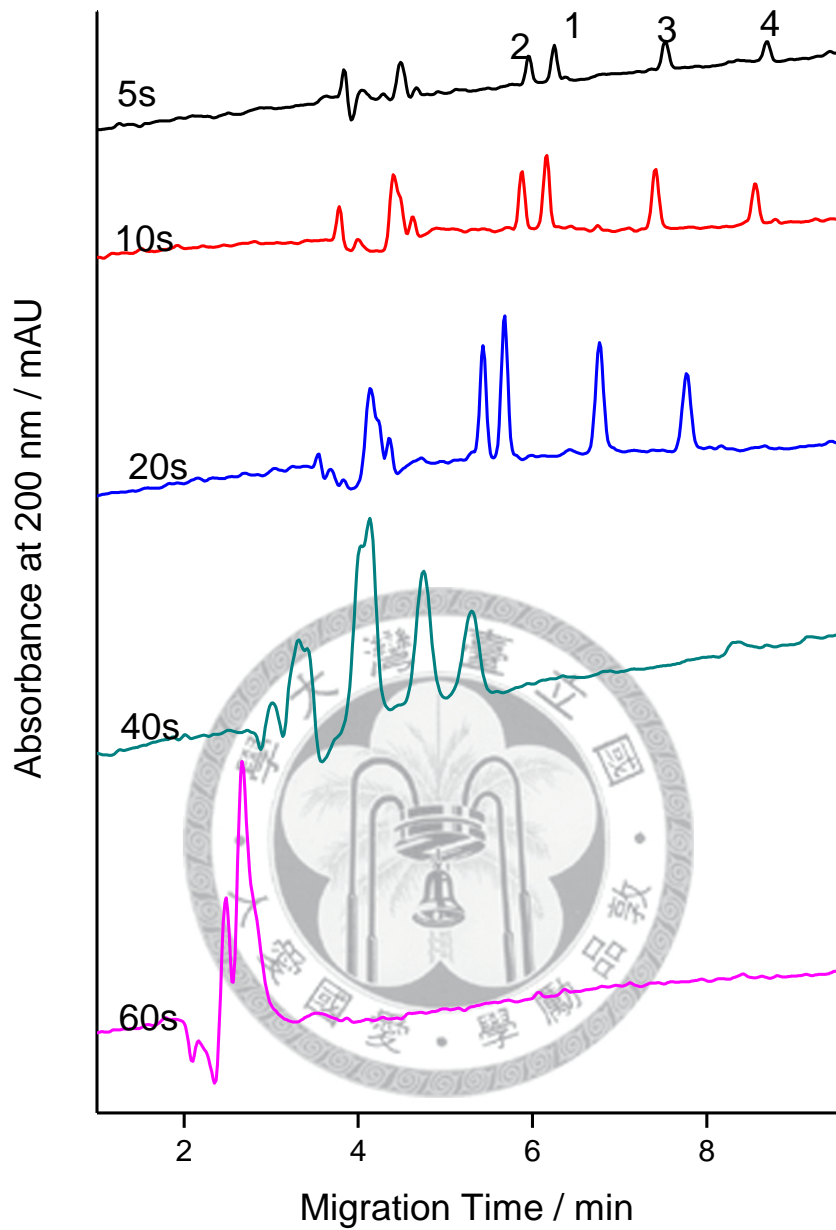


圖 4-2 Effect of injection time of sample on the stacking efficiency: 1 $\mu\text{g/mL}$ mix flavonoids dissolved in water, separation buffer, 50 mM borate buffer at pH 9.0; Injection pressure, 1 psi; applied voltage, +25 kv. Injection time: 5-60 sec.

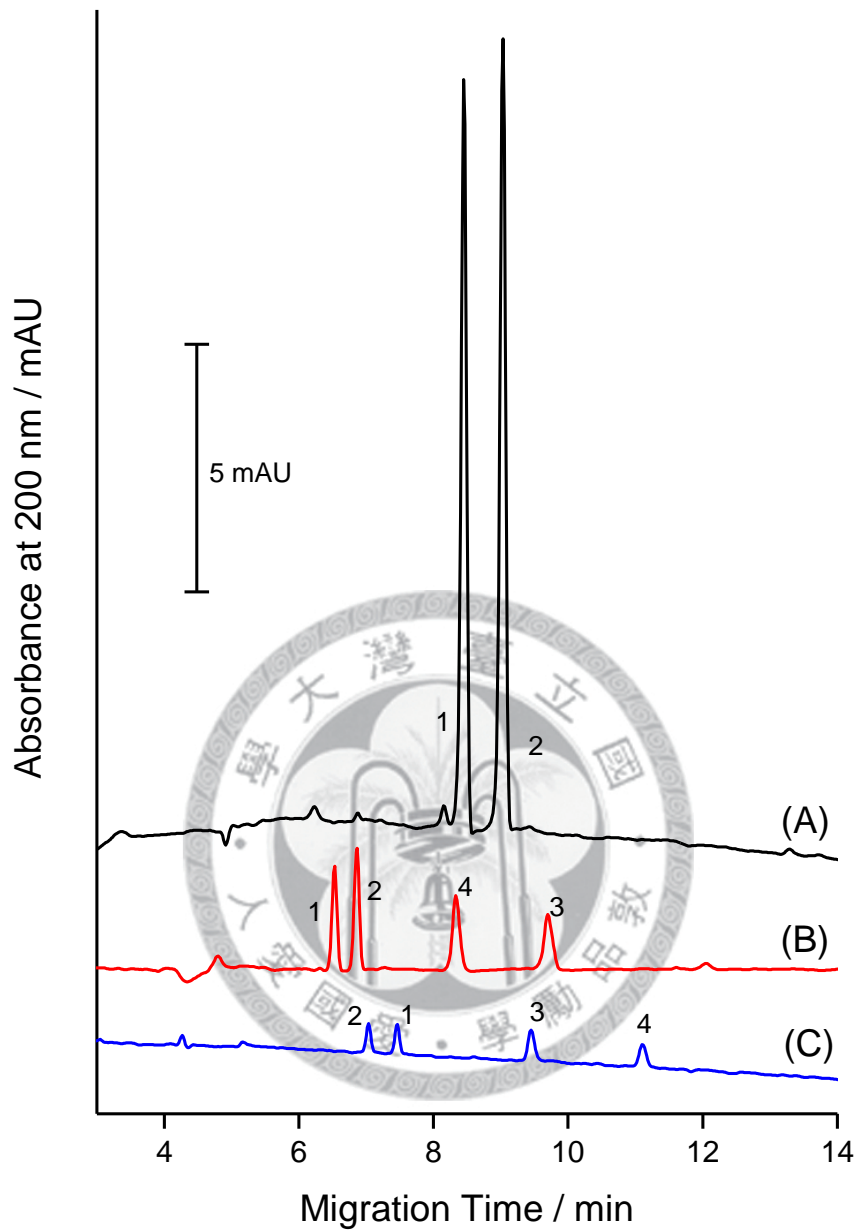


圖 4-3 (A) LVSS with 480 sec analyte injection, (B) LVSS with 120 sec analyte injection, (C) CZE with 5 sec sample injection, analyte concentration : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (A) and (B), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (C). Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

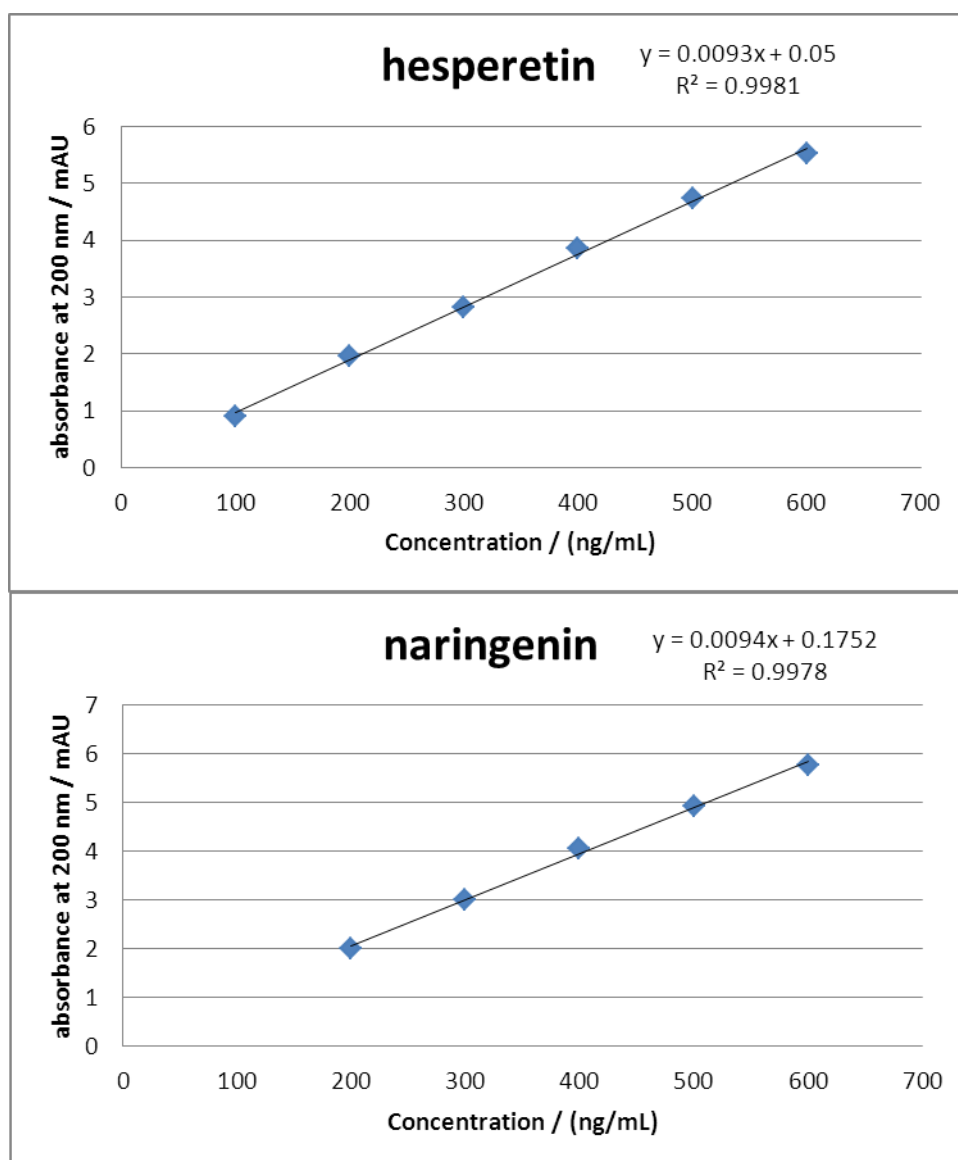


圖 4-4 The calibration curves of hesperetin and naringenin, LVSS with polarity switch at 0.4 min.

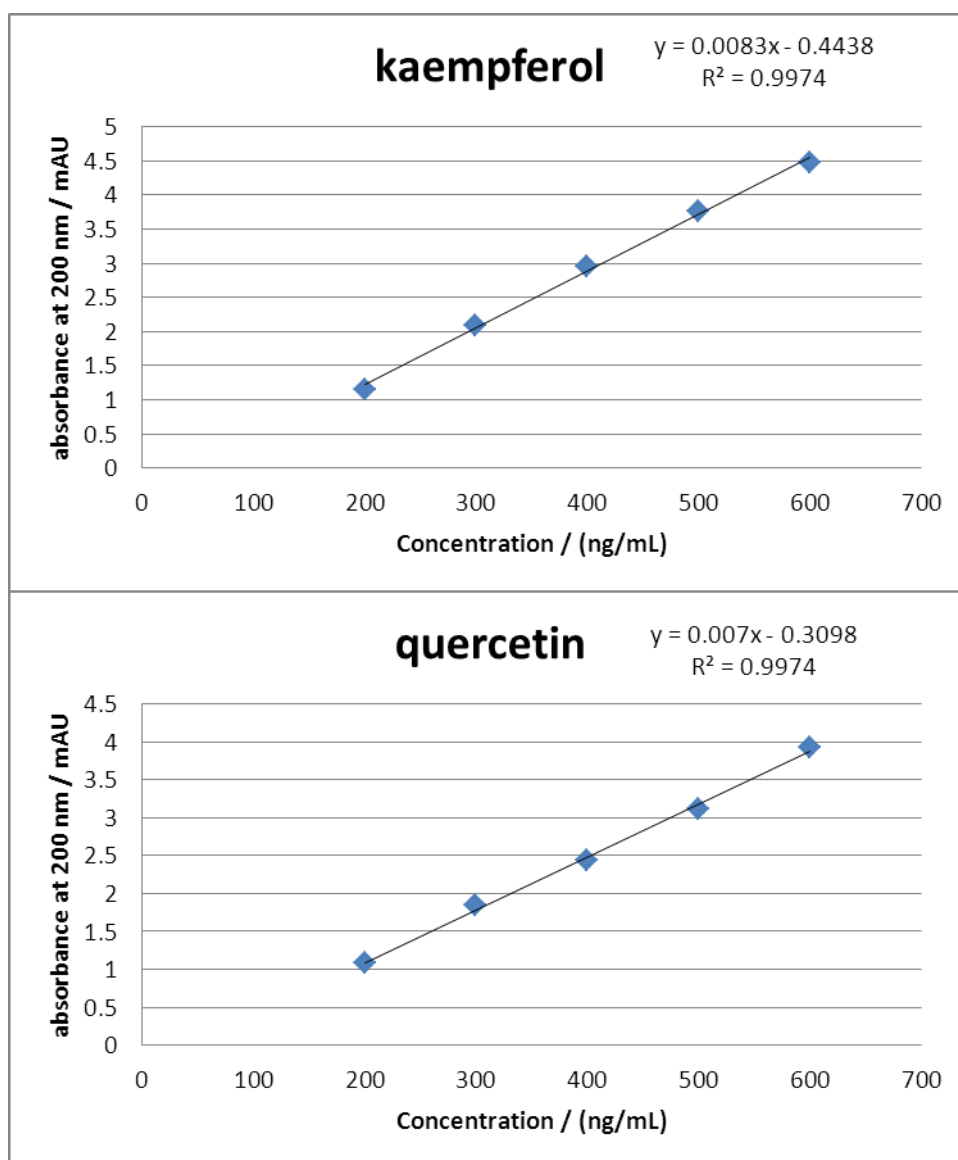


圖 4-5 The calibration curves of quercetin and kaempferol, LVSS with polarity switch at 0.4 min.

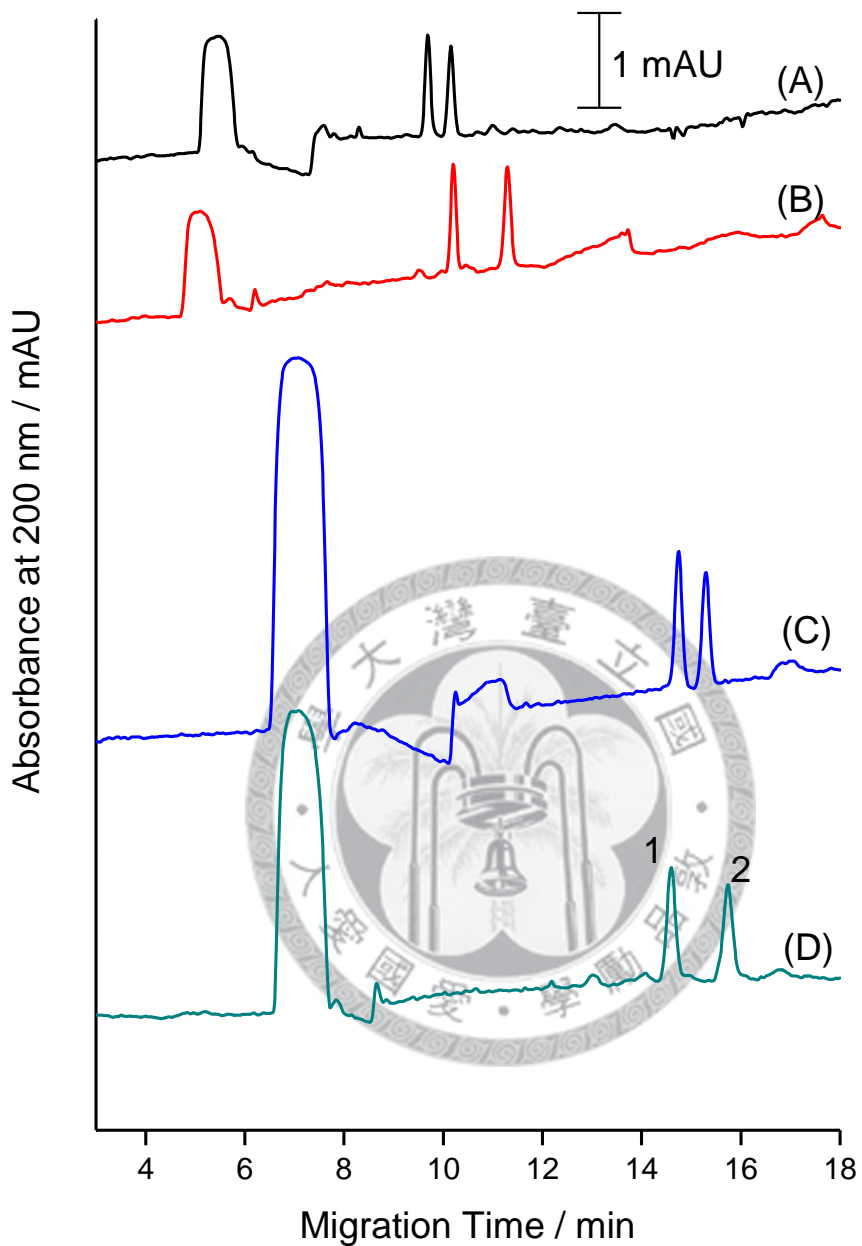


圖 4-6 Effect of glycol and SDS in the running buffer: (A) 10 % glycol and 20 mM SDS, (B) 10 % glycol and 50 mM SDS, (C) 20 % glycol and 20 mM SDS and (D) 20 % glycol and 50 mM SDS, Separation buffer: 50 mM borate buffer at pH 9.0. Sample: 1 μ g/mL flavonoids. Injection pressure: 1 psi, applied voltage: +25 kv. Injection time: 120 sec.

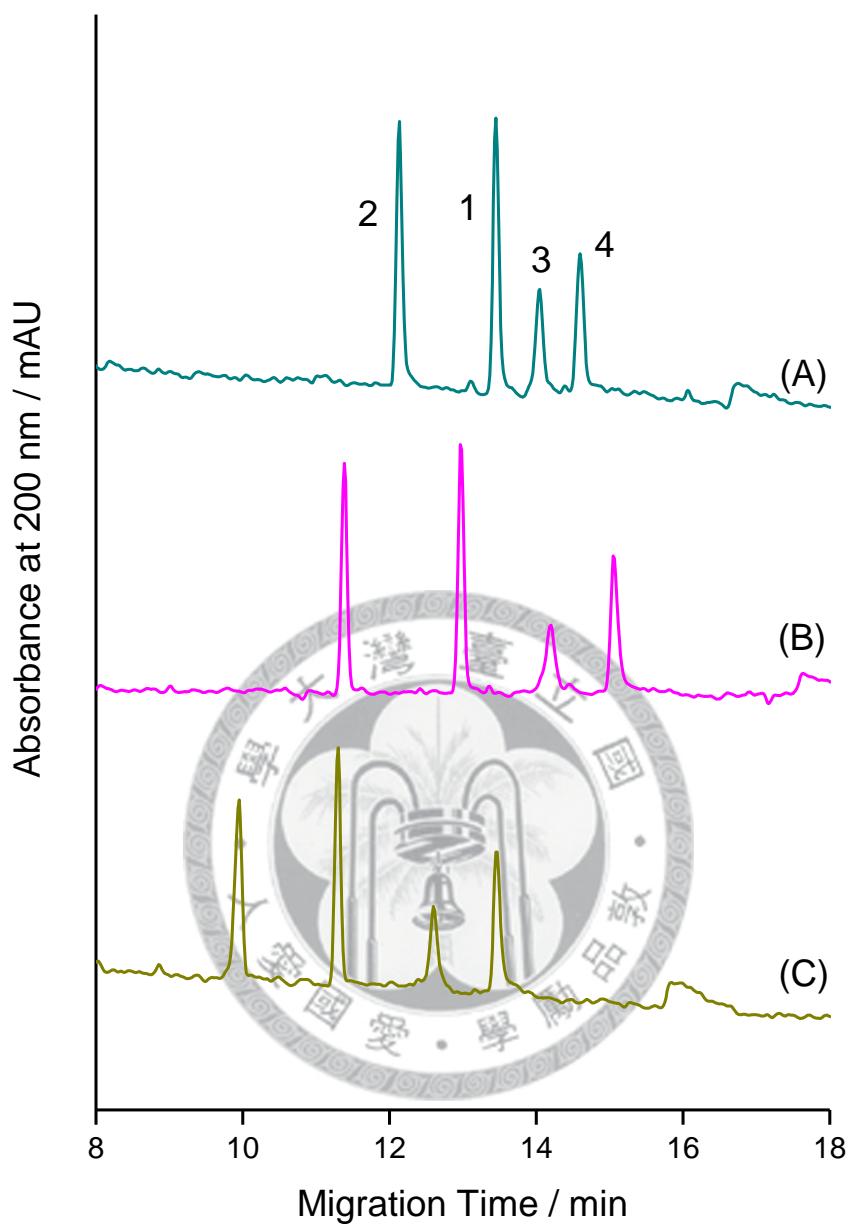


圖 4-7 Effect of pH of running buffer electrolyte: sample solution, flavonoids (10 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in 20 mM phosphate buffer, separation buffer, 20 mM phosphate buffer containing 25 mM SDS at different pH: (A) pH 6.5 (B) pH 7.0 (C) pH 7.5. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

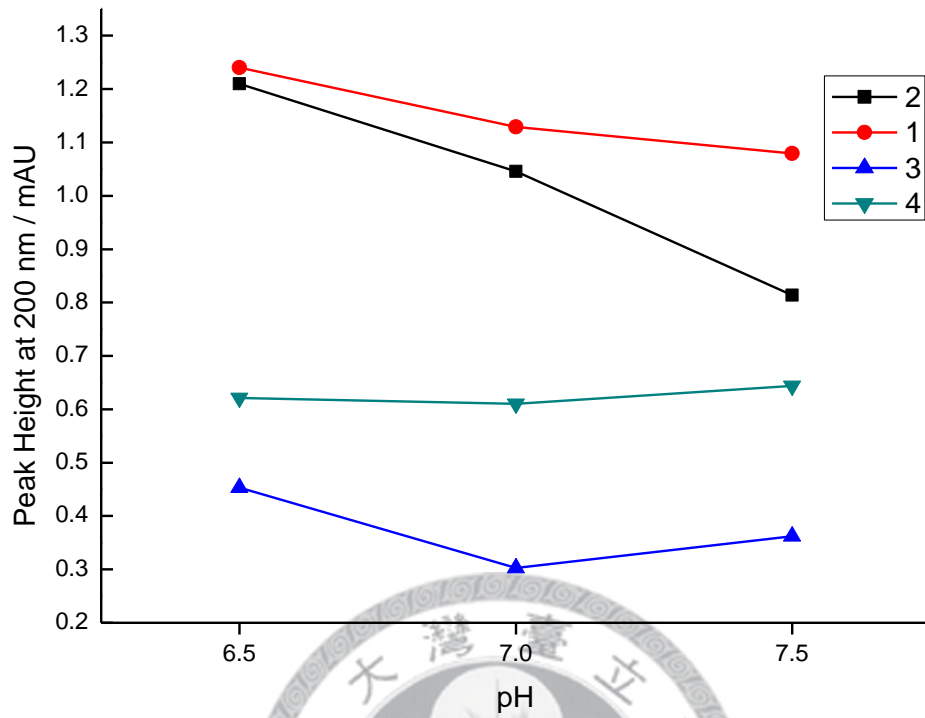


圖 4-8 The variation of peak height of analytes as a function of pH in the range 6.5~7.5 in a phosphate (20 mM) buffer. Injection time : 120 sec. Analyte identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

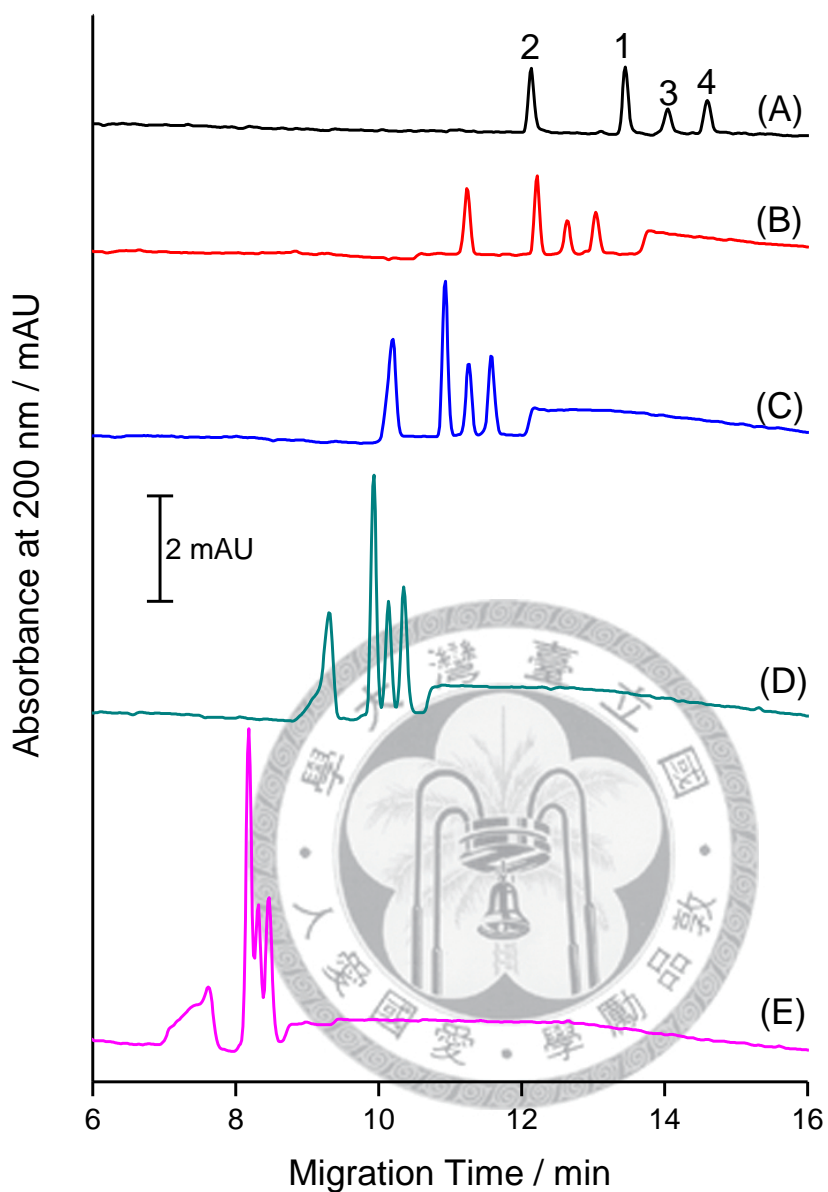


圖 4-9 Effect of injection time of sample on the stacking efficiency: mix flavonoids 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (A), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for (B)~(E) dissolved in 20 mM phosphate buffer at pH 6.5, separation buffer, 20 mM phosphate buffer containing 25 mM SDS at pH 6.5; Injection pressure, 1 psi; applied voltage, +20 kV. Injection time: (A) 5 sec, (B) 60 sec, (C) 120 sec, (D) 180 sec, (E) 240 sec.

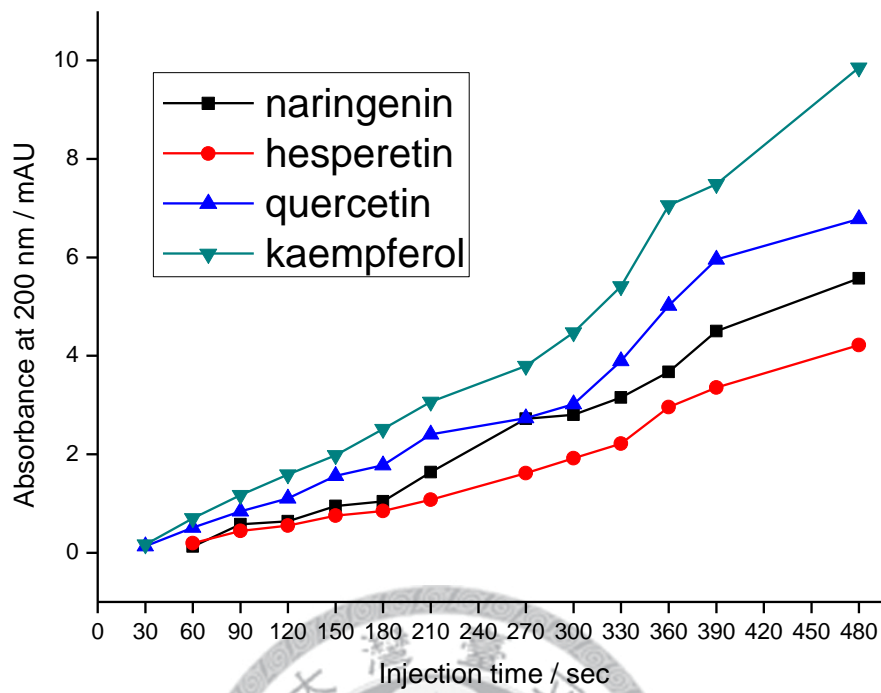


圖 4-10 Plots of peak height versus injection time with a mixture of four flavonoids at a sample concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 20 mM SDS at pH 2.0; applied potential, - 15 kV.

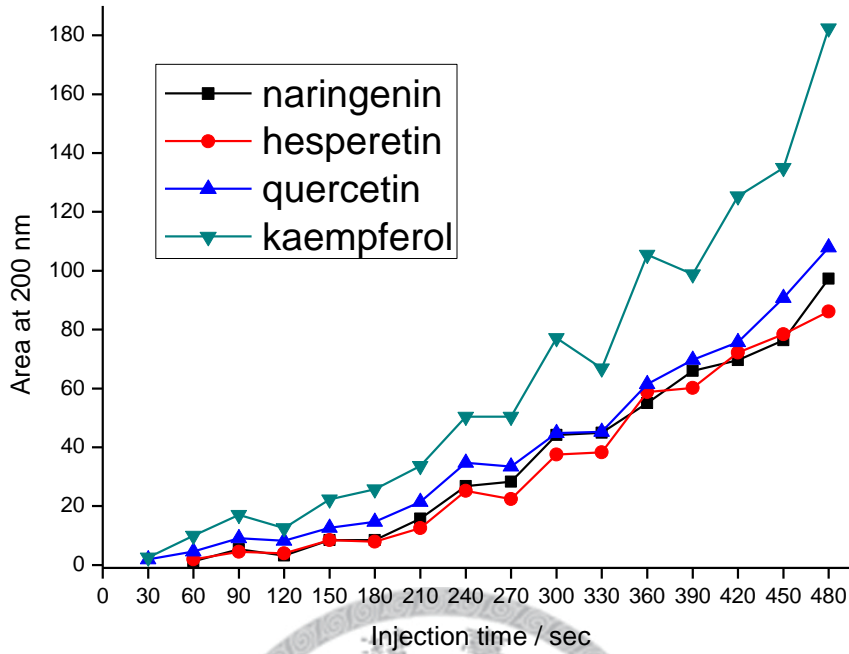


圖 4-11 Plots of peak area versus injection time with a mixture of four flavonoids at a sample concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 20 mM SDS at pH 2.0; applied potential, - 15 kV.

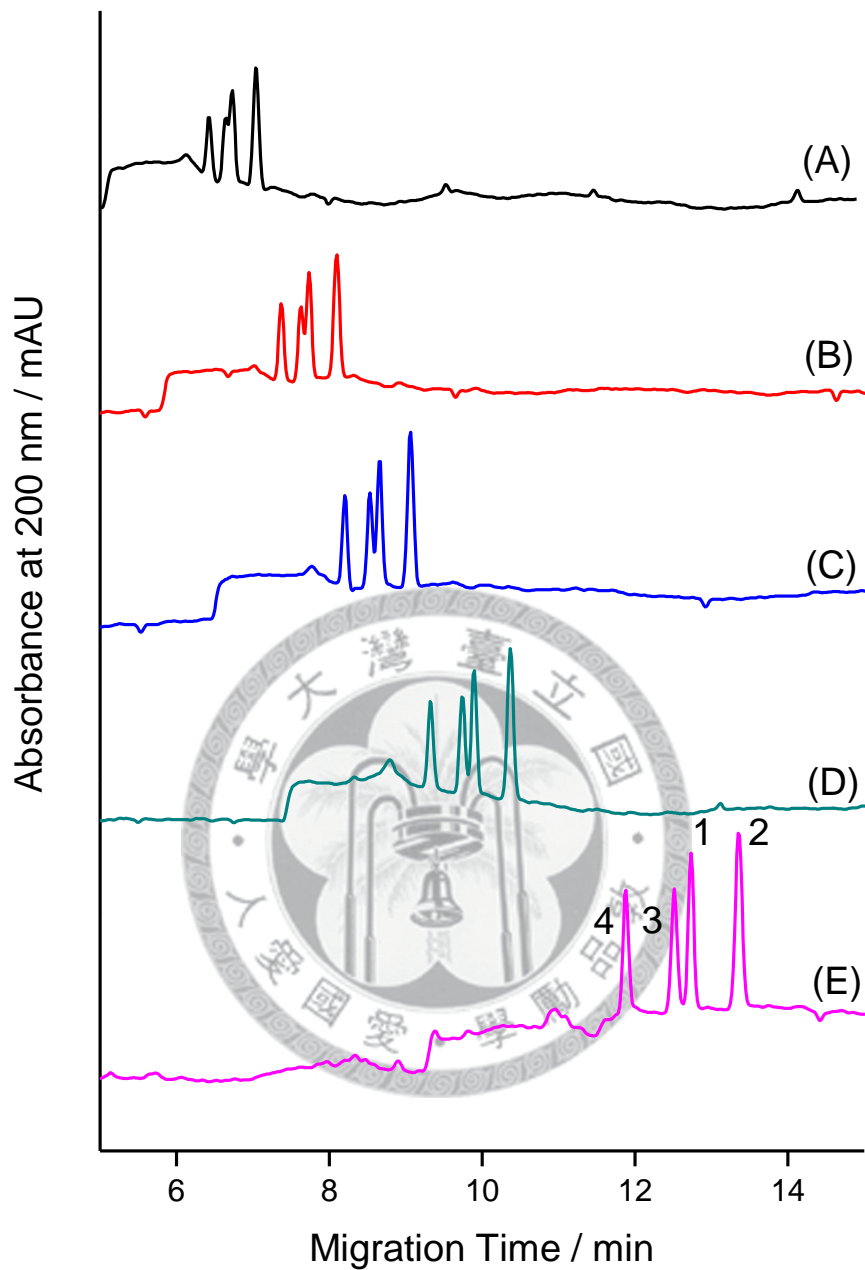


圖 4-12 Effect of applied voltage on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: Sample solution, mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec. Applied voltage: (A) -25 kV, (B) -22 kV, (C) -20 kV, (D) -18 kV, (E) -15 kV

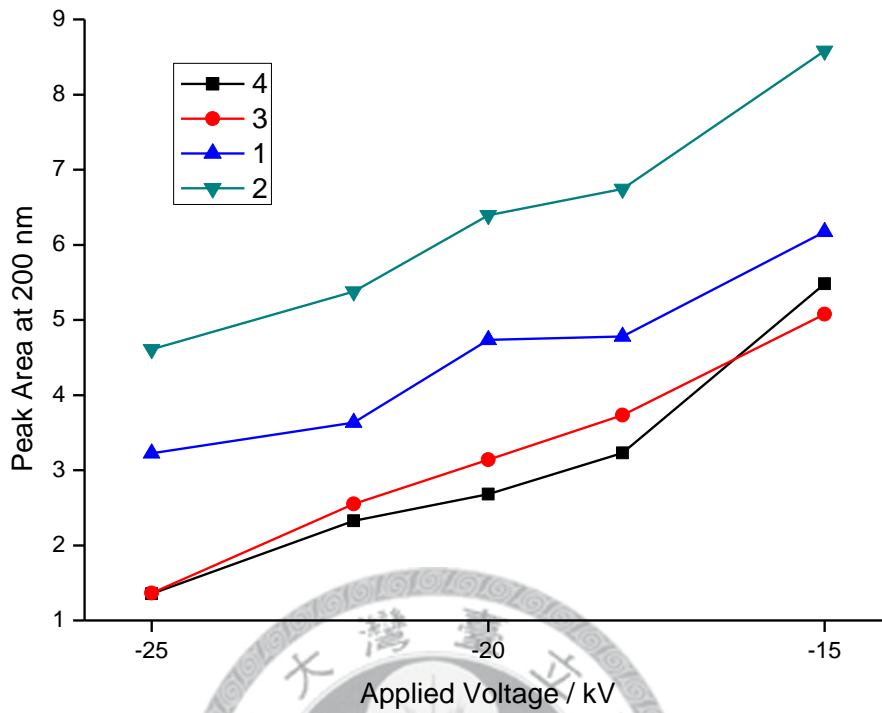


圖 4-13 The variation of peak area of analytes as a function of applied voltage (-15 kV, -18 kV, -20 kV, -22 kV, -25 kV) in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Analyte symbol, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

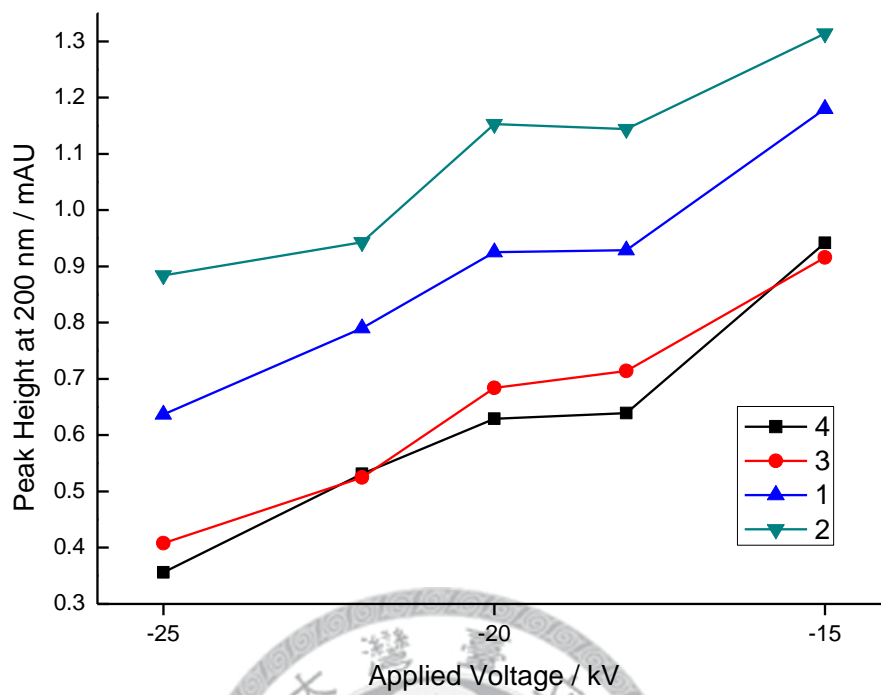


圖 4-14 The variation of peak height of analytes as a function of applied voltage(-15 kV, -18 kV, -20 kV, -22 kV, -25 kV) in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time: 120 sec. Analyte symbol, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

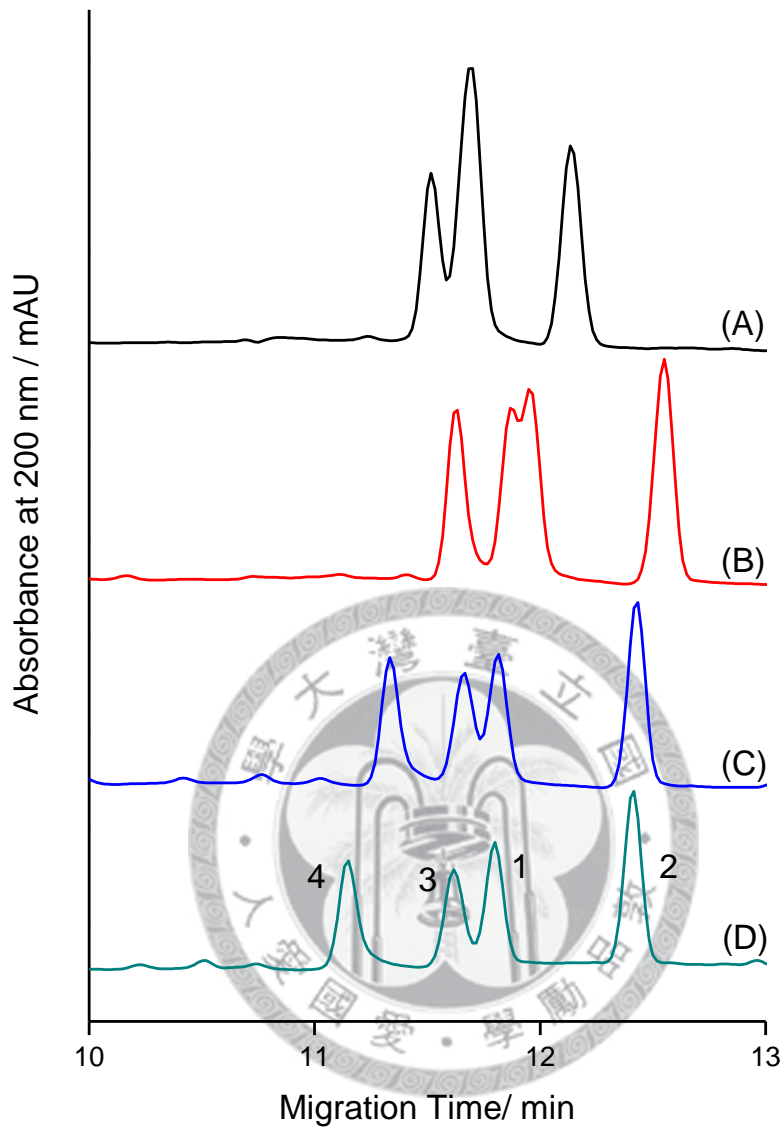


圖 4-15 Effect of acetonitrile concentration in the buffer on the separation efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g/mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. Acetonitrile concentration: (A) 0 %, (B) 4 %, (C) 6 %, (D) 10 %

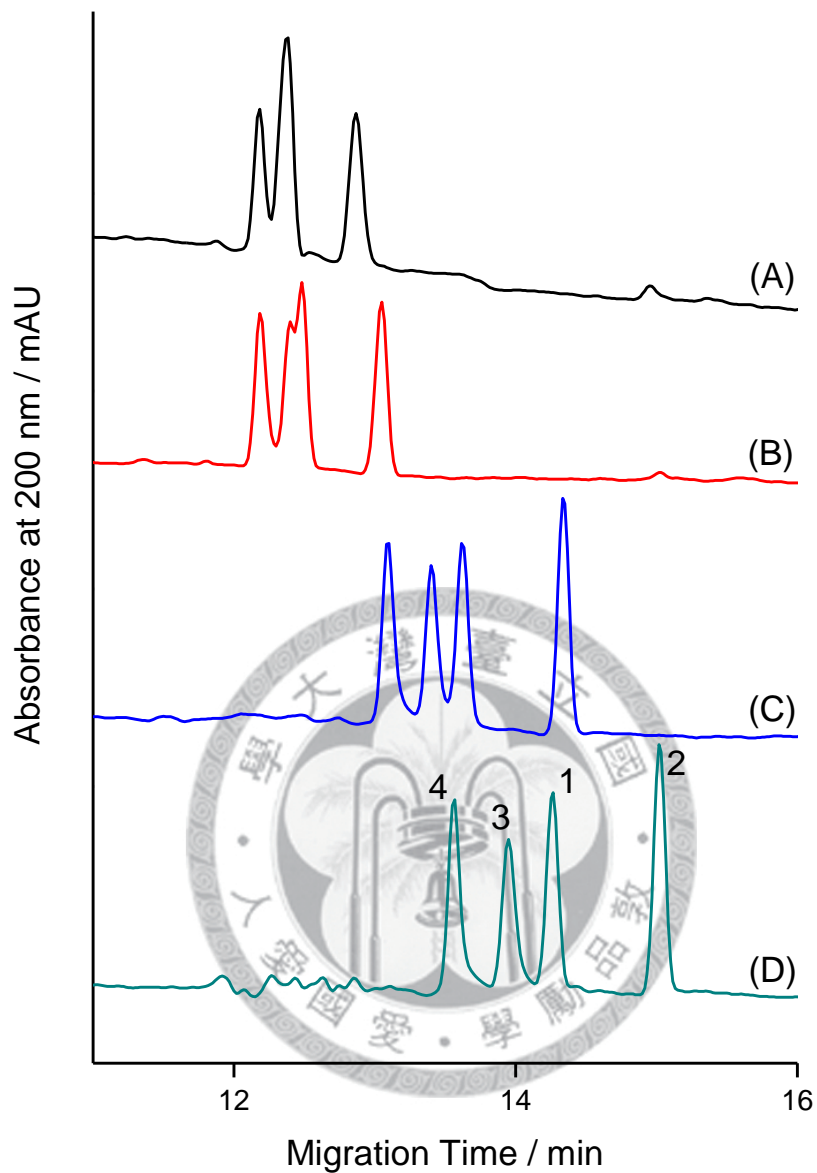


圖 4-16 Effect of methanol concentration in the buffer on the separation efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g/mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. Methanol concentration: (A) 0 %, (B) 4 %, (C) 8 %, (D) 10 %,

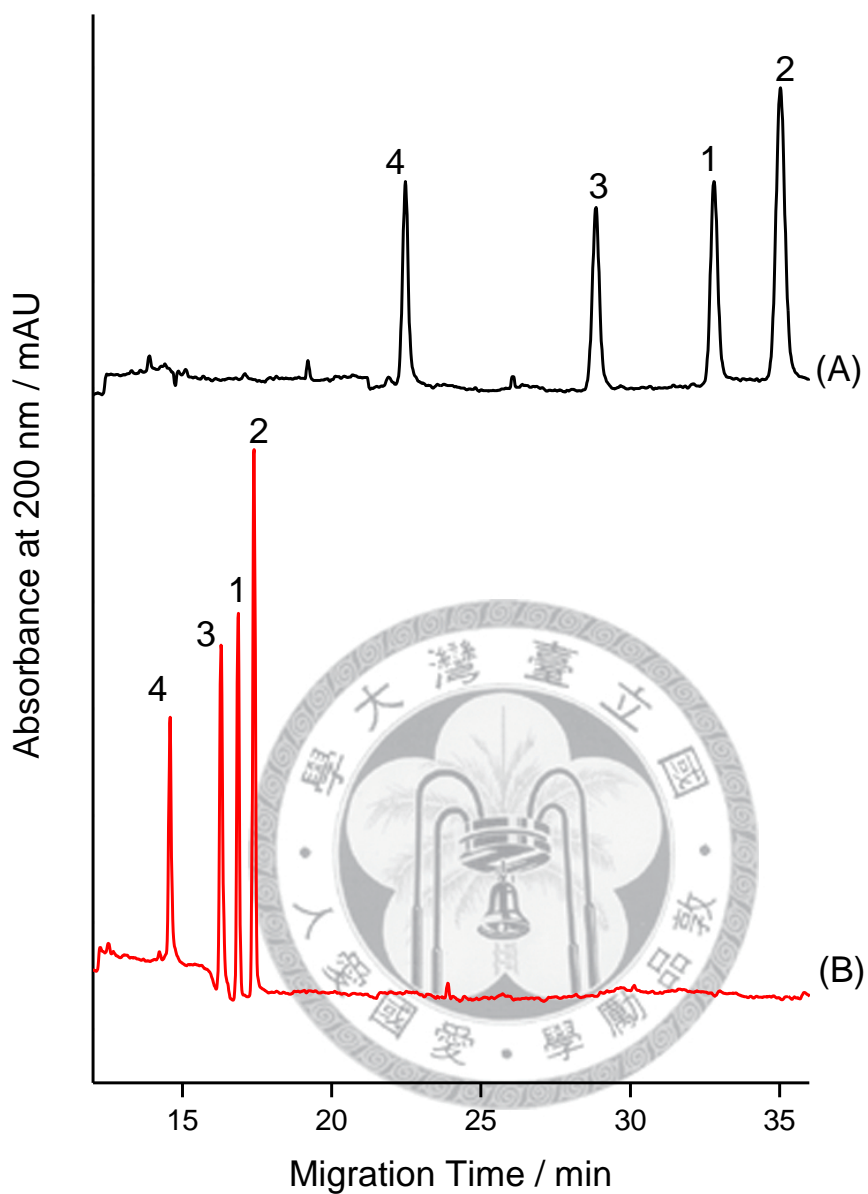


圖 4-17 Effect of SDS concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kv. SDS concentration: (A) 25 mM, (B) 50 mM.

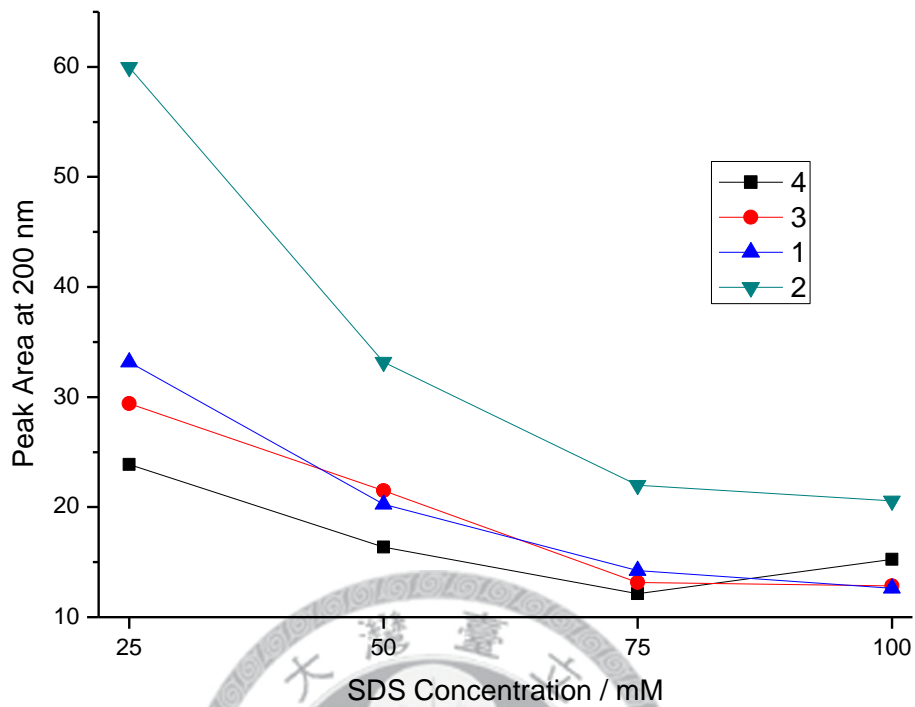


圖 4-18 The variation of peak area of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

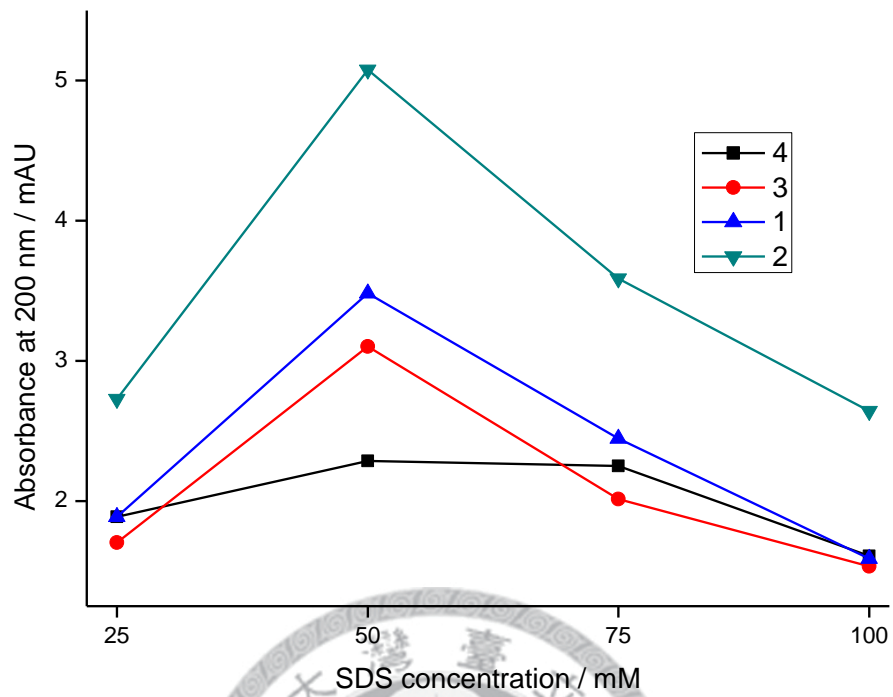


圖 4-19 The variation of peak height of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 120 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

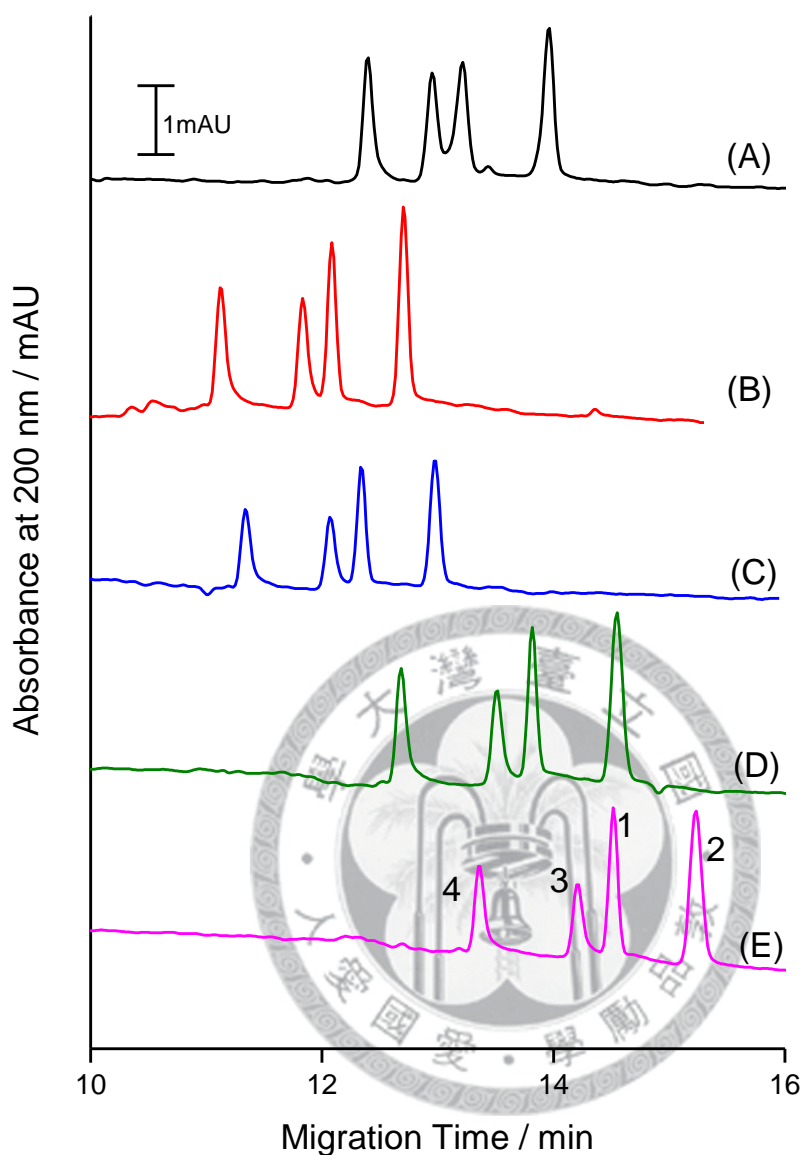


圖 4-20 Effect of sample matrix on separation and peak height of flavonoids: Sample solution, flavonoids (1 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in (A) 10 mM, (B) 20 mM, (C) 50 mM, (D) 75 mM, (E) 100 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; separation buffer, 20 mM phosphate containing 50 mM SDS at pH 2.0; applied potential, -15 kV. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

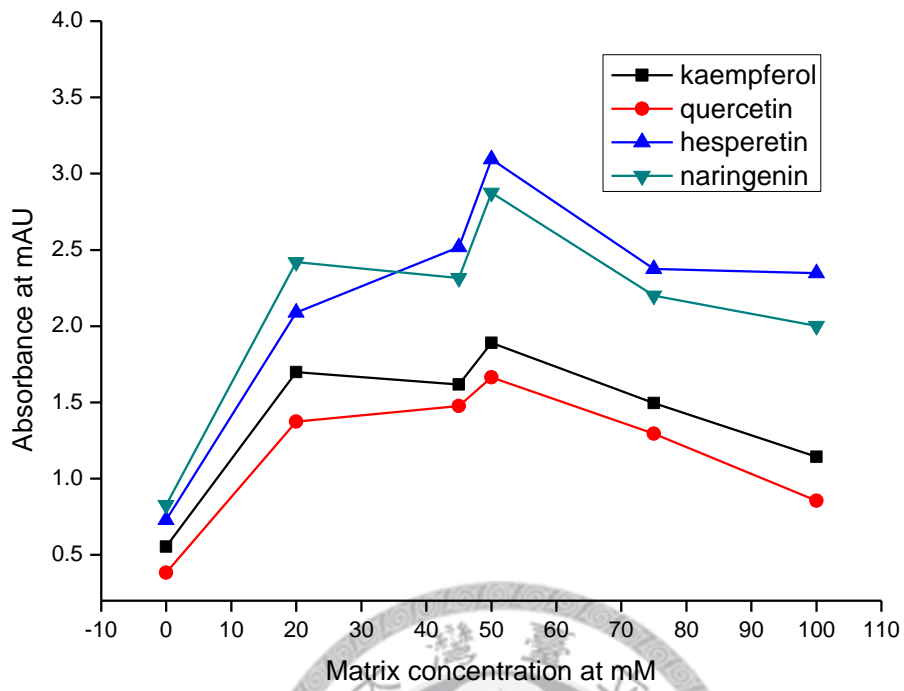


圖 4-21 The variation of peak height of analytes as a function of phosphate concentration in the range 10~100 mM in the sample matrix at pH 2.0. Injection time : 120 sec.

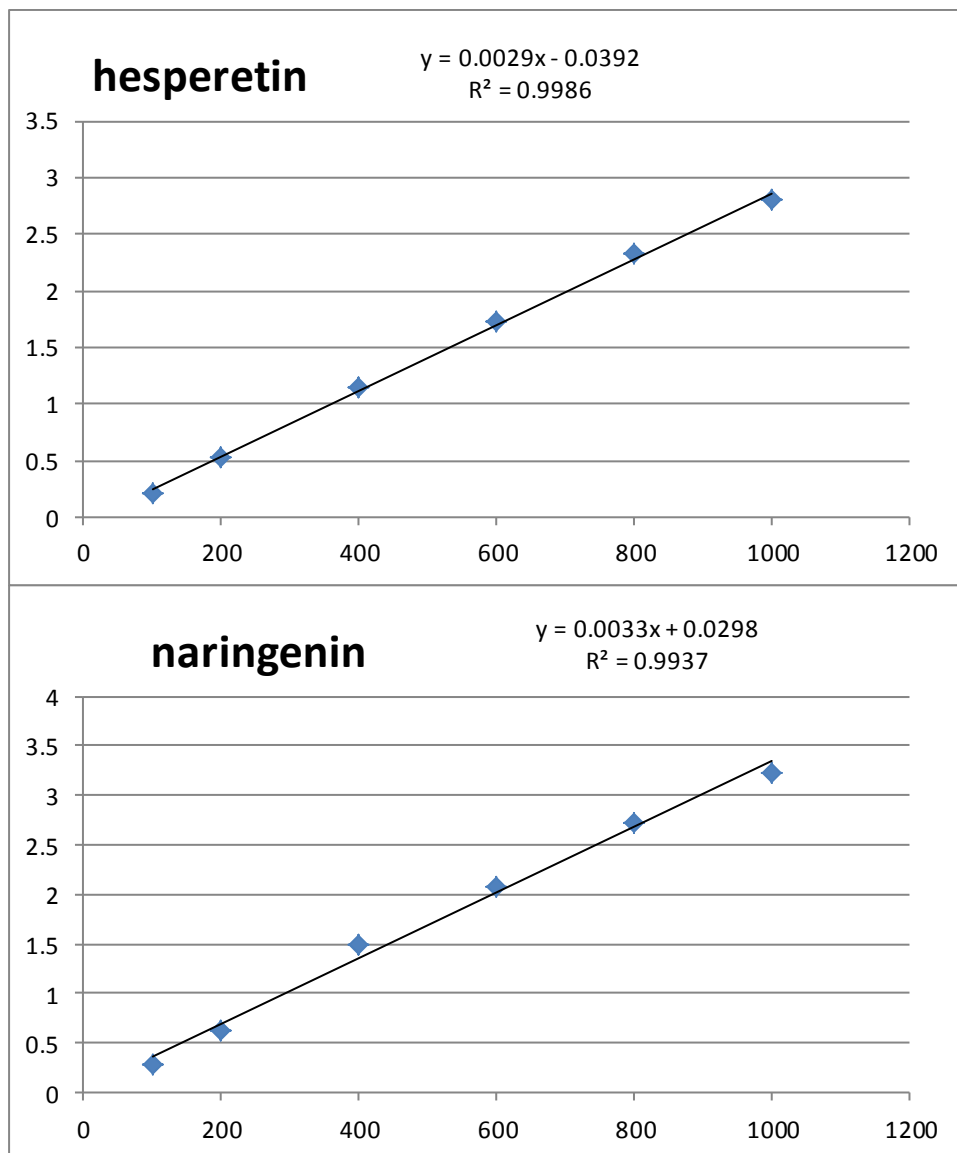


圖 4-22 The calibration curves of hesperetin and naringenin in the sweeping mode with 120 sec sample injection.

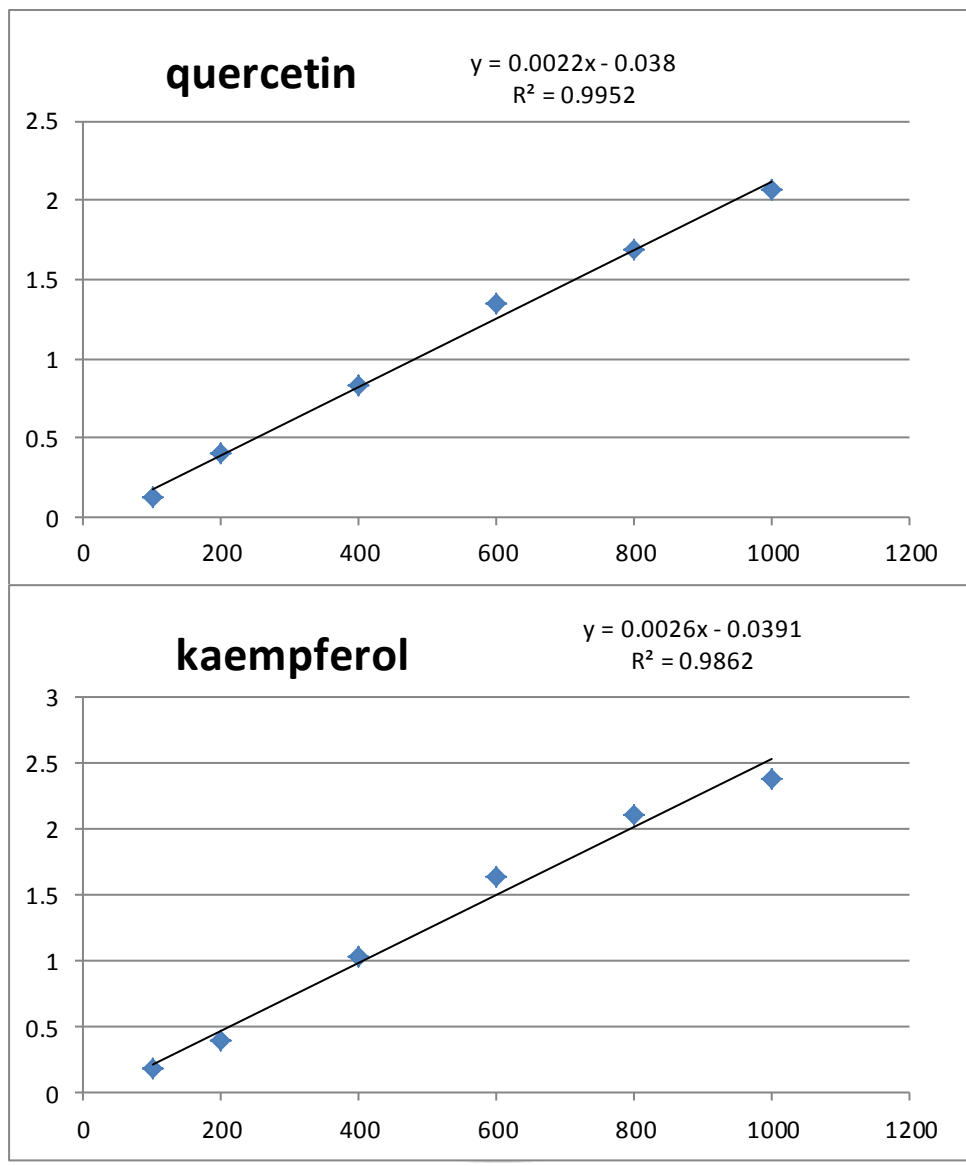


圖 4-23 The calibration curves of quercetin and kaempferol in the sweeping mode with 120 sec sample injection.

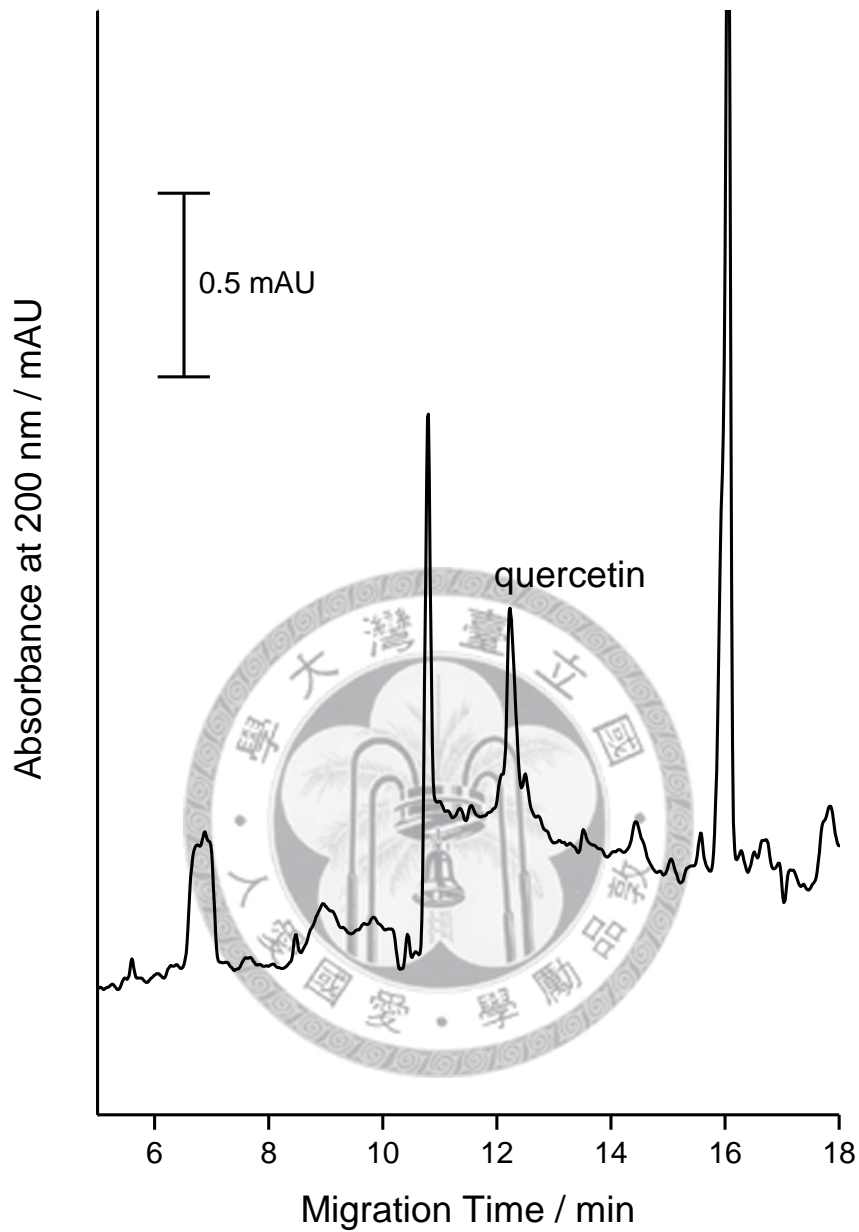


圖 4-24 Electropherogram of honey obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.

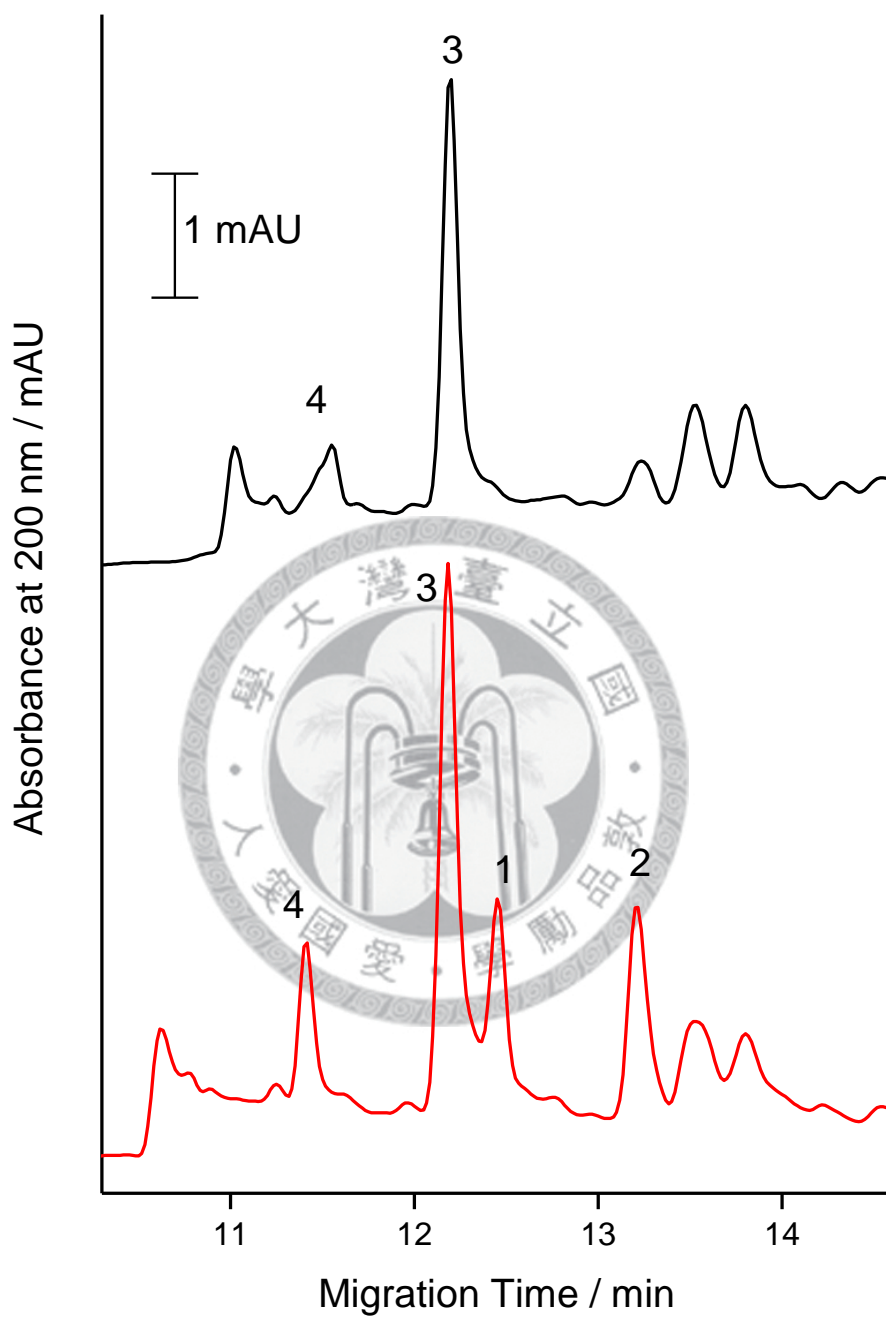


圖 4-25 Electropherogram of red wine 1 obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.

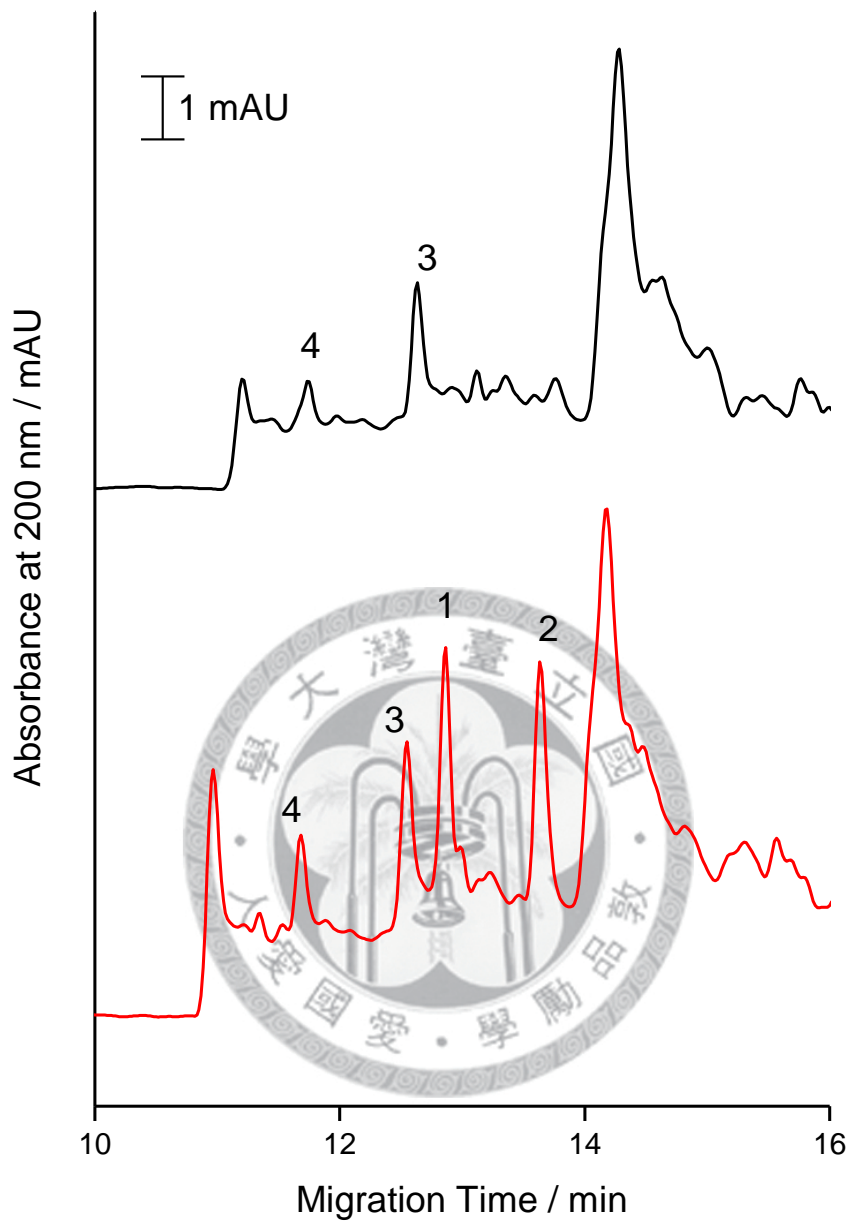


圖 4-26 Electropherogram of red wine 5 obtained with addition of SDS at 50 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 2.0. Injection pressure, 1 psi; injection time, 120 sec; applied voltage, -15 kV.

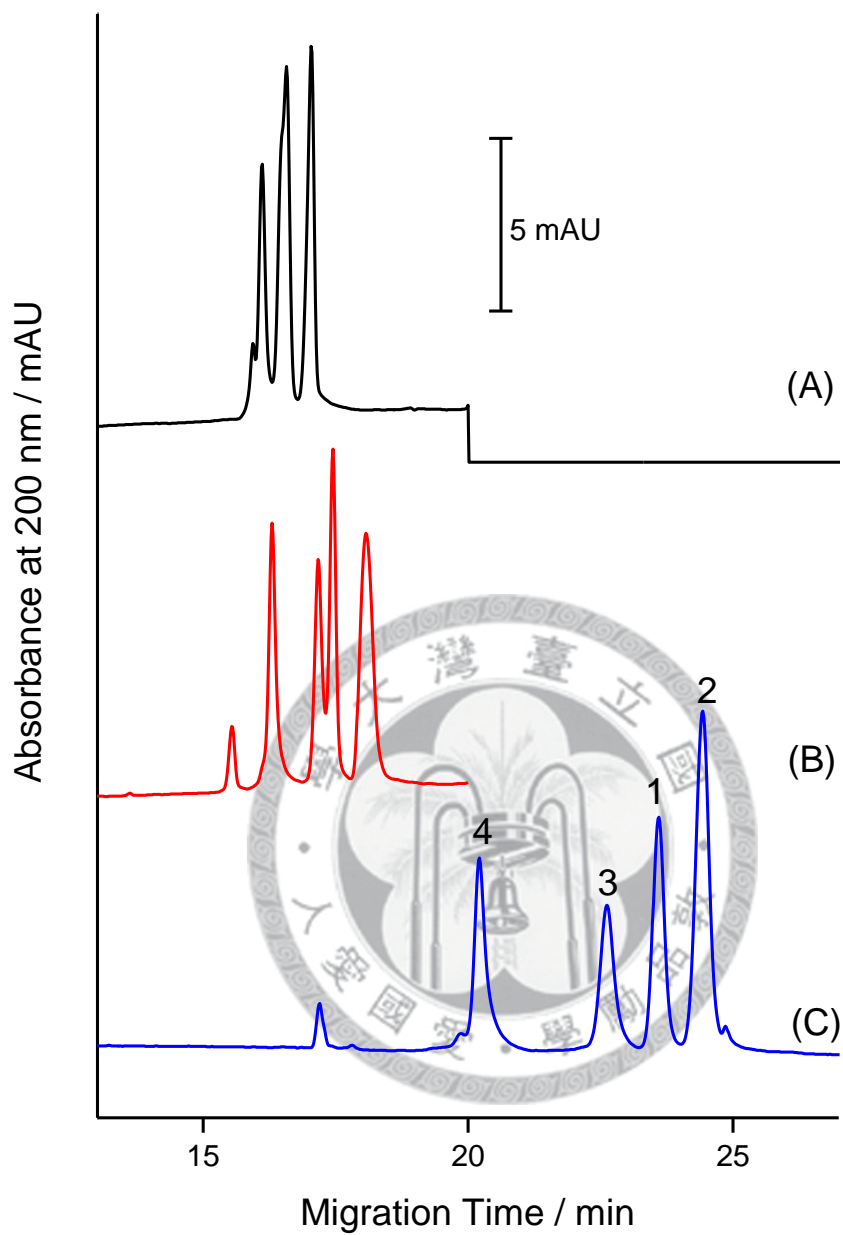


圖 4-27 Effect of acetonitrile concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: mix naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 480 sec; applied voltage, -15 kv. Acetonitrile concentration: (A) 10 %, (B) 15 %, (C) 20 %,

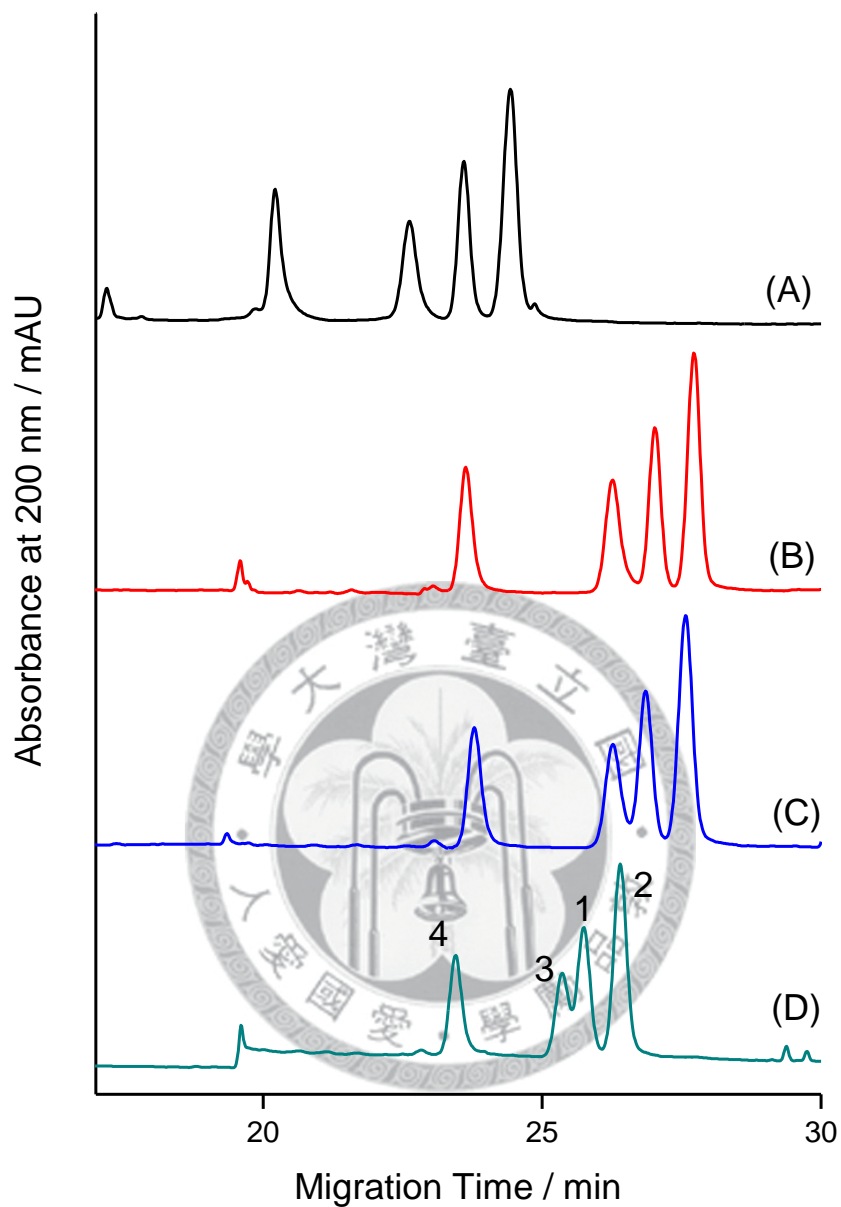


圖 4-28 Effect of SDS concentration in the buffer on the stacking efficiency and separation of the mix flavonoids: naringenin, hesperetin, quercetin and kaempferol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each) dissolved in 20 mM phosphate buffer containing methanol (1 %, v/v) at pH 2.0; Injection pressure, 1 psi; injection time, 480 sec; applied voltage, -15 kv. SDS concentration: (A) 25 mM, (B) 50 mM, (C) 75 mM, (D) 100 mM.

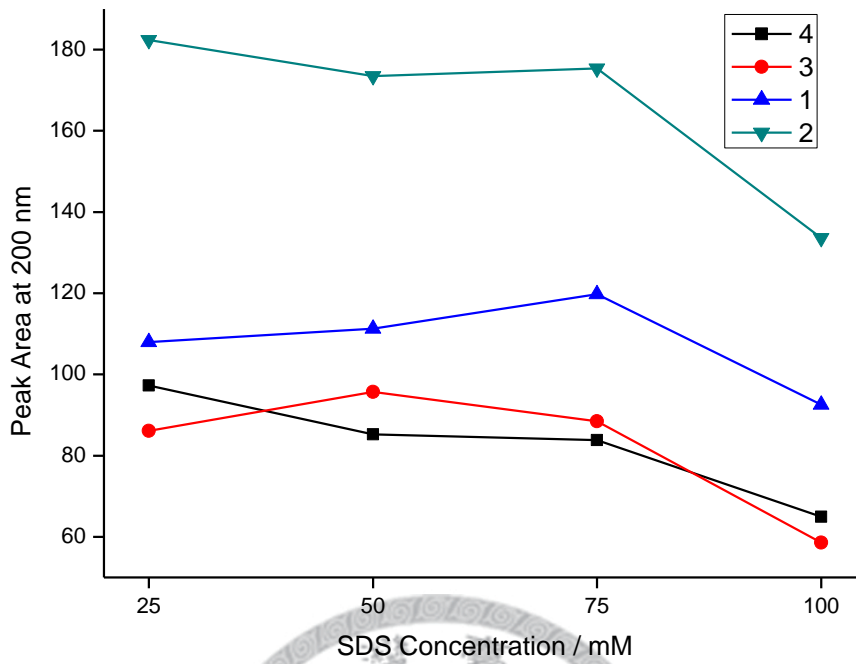


圖 4-29 The variation of peak area of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 480 sec. Peak identification, 1 = hesperetin, 2 = naringenin, 3 = quercetin, 4 = kaempferol.

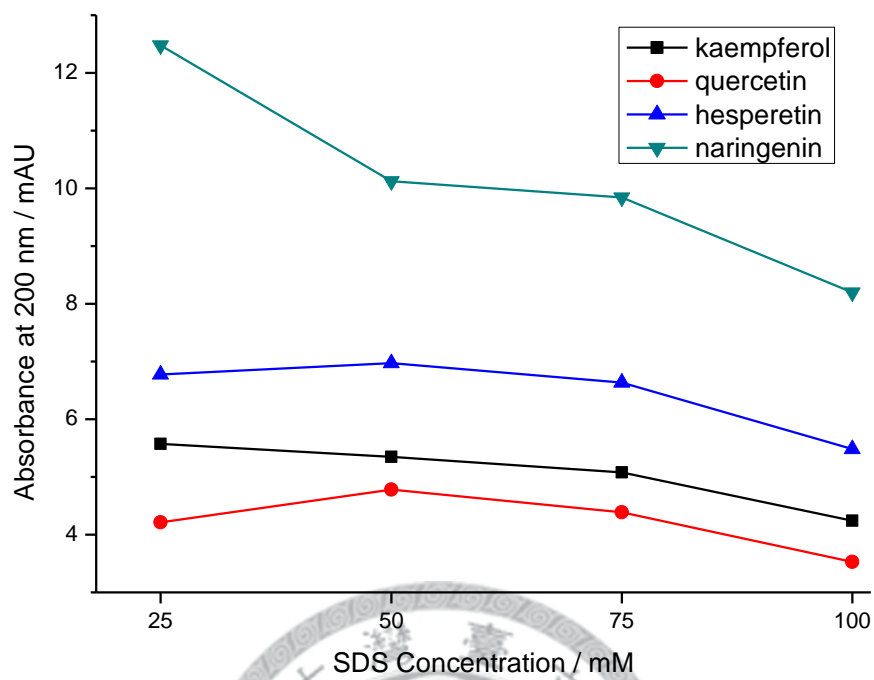


圖 4-30 The variation of peak height of analytes as a function of SDS concentration in the range 25~100 mM in a phosphate (20 mM) buffer at pH 2.0. Injection time : 480 sec.

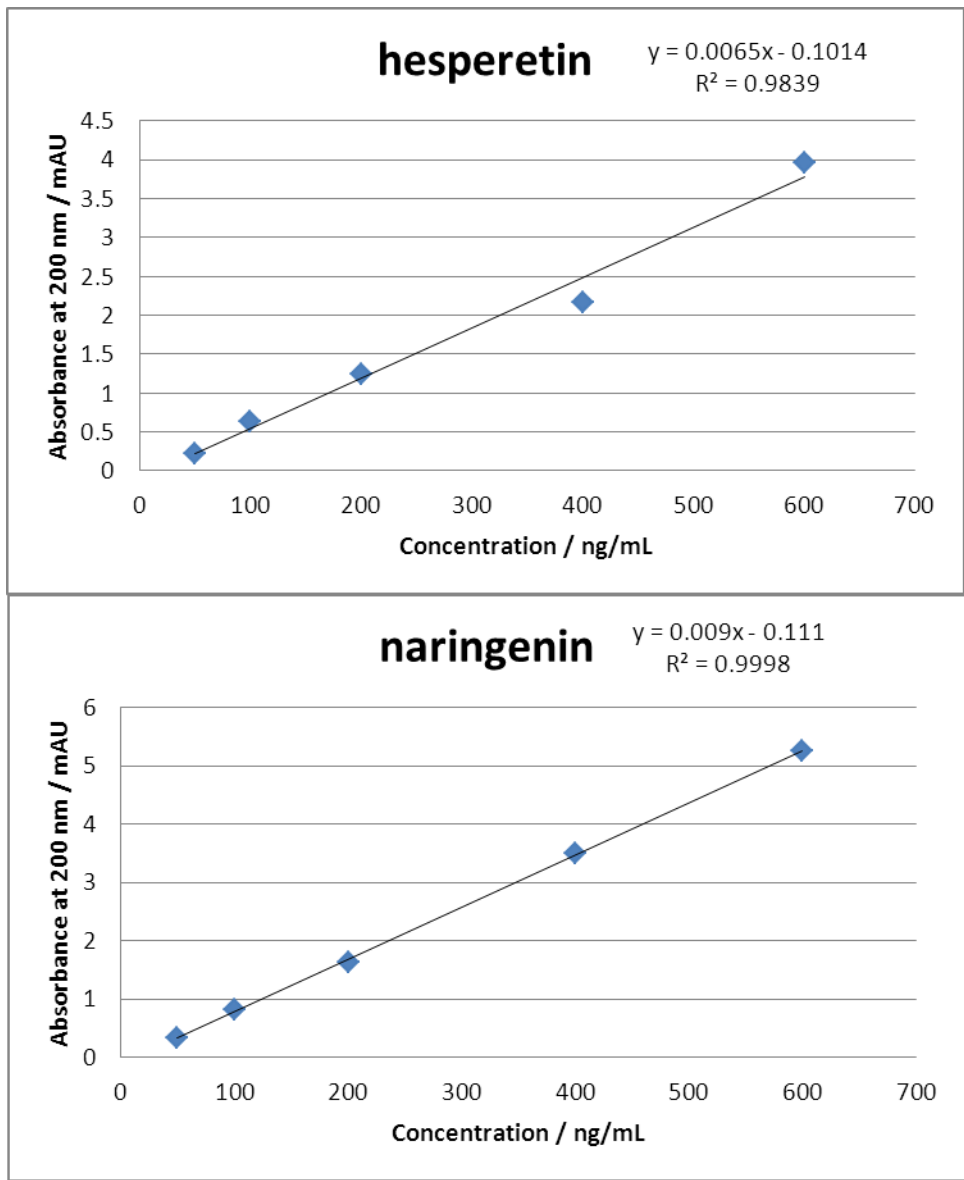


圖 4-31 The calibration curves of hesperetin and naringenin at the sweeping mode with reverse polarity. Sample injection time: 480 sec.

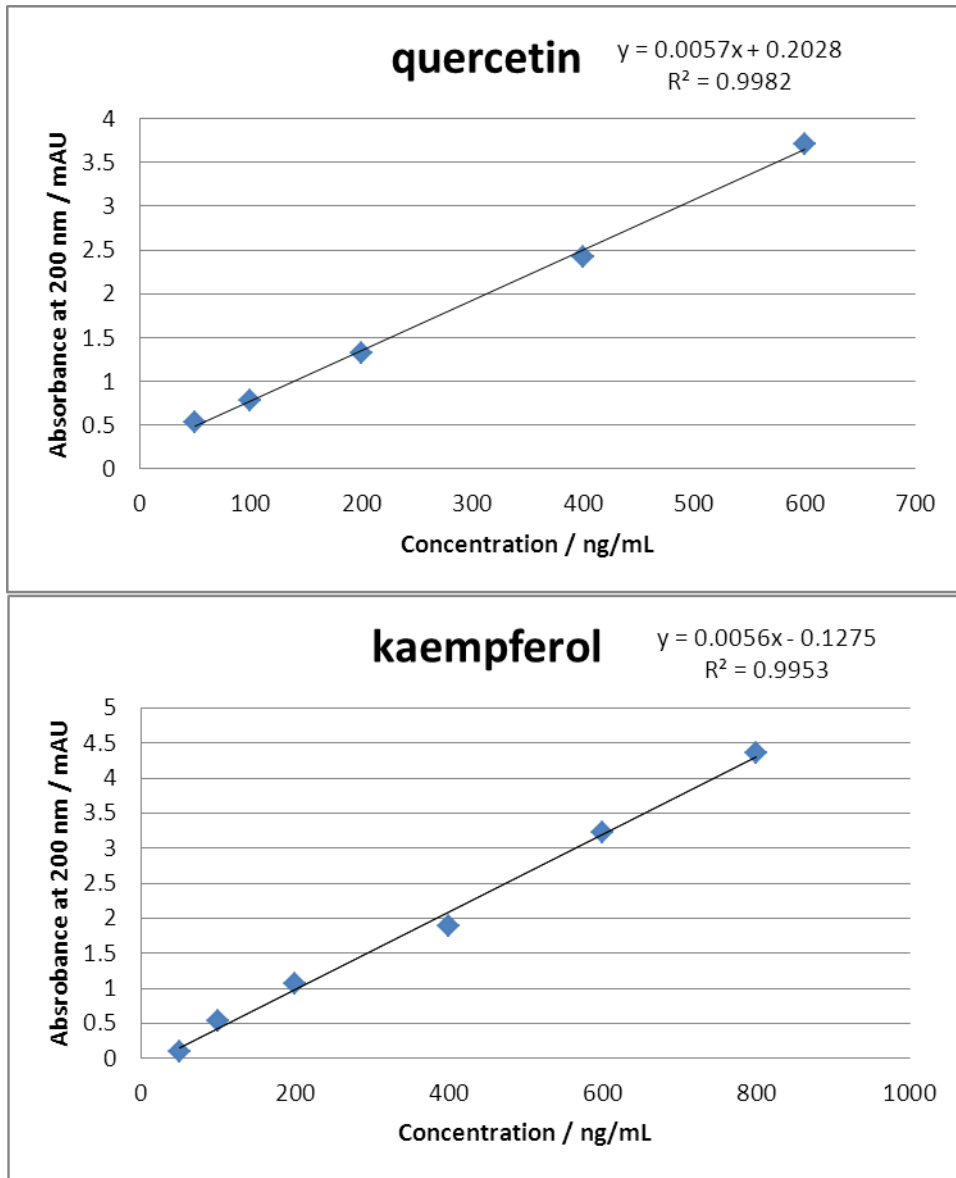


圖 4-32 The calibration curves of quercetin and kaempferol at the sweeping mode with reverse polarity. Sample injection time: 480 sec.

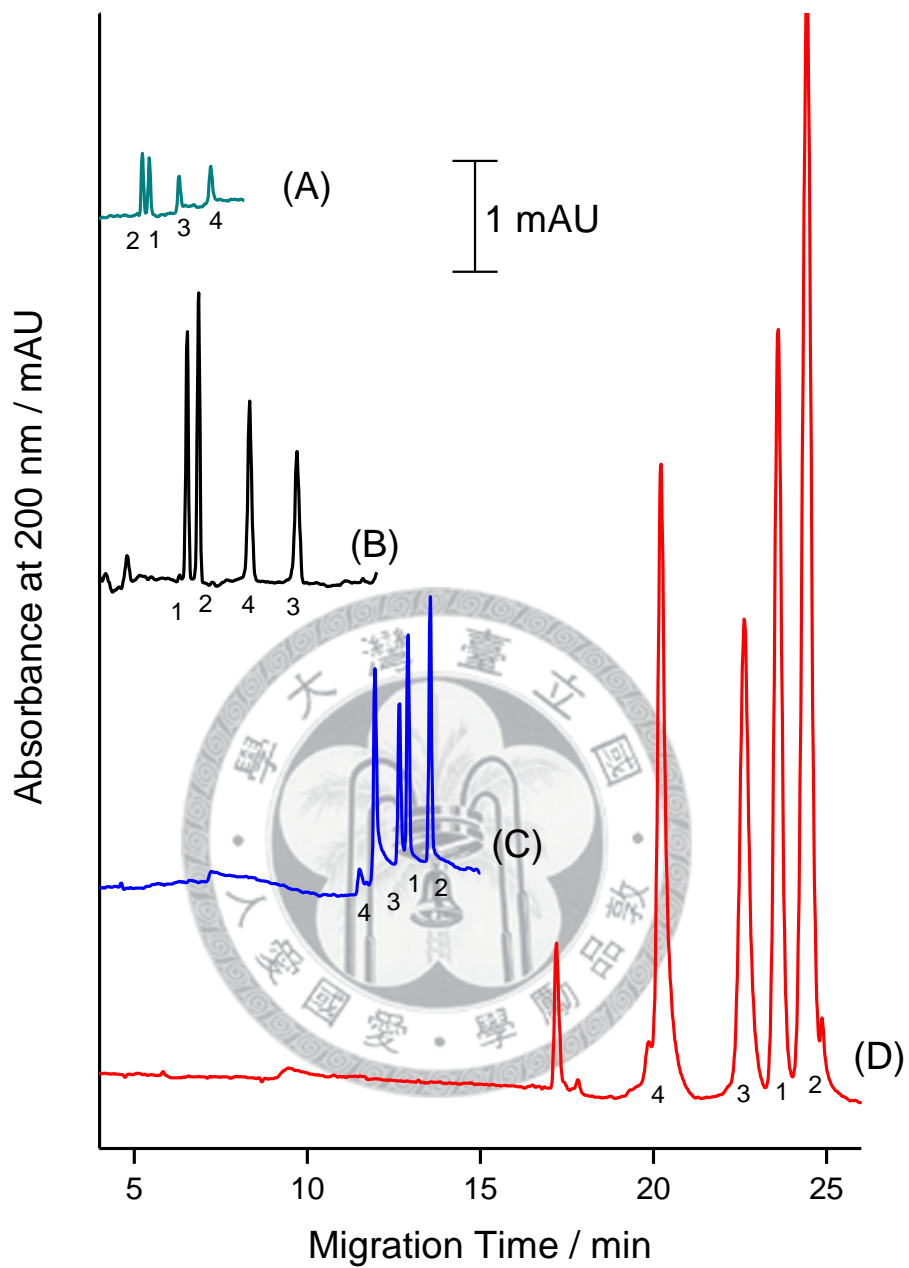


圖 4-33 Electropherogram of different stacking mode (A) in normal mode (B) LVSS (C) Sweeping (D) Sweeping. Sample concentration: (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B)~(D) 1 $\mu\text{g/mL}$. Injection: (A) 1 psi; 5 sec; (B) and (C) 1 psi; 120 sec; (D) 1 psi, 480 sec.

phosphate buffer	mS/cm
10 mM	1.37
20 mM	2.26
40 mM	3.45
45 mM	3.65
50 mM	4.06
75 mM	5.28
100 mM	6.35

表 4-1 The conductivity of the phosphate buffer matrix

20 mM phosphate, 10 %ACN	mS/cm
25 mM SDS	2.65
50 mM SDS	3.65
75 mM SDS	5.55

表 4-2 The conductivity of running buffer



表 4-3 LOD and reproducibility of flavonoids for 120 sec injection in the LVSS mode(n=3)

Analyte	Regression equation	R ²	LOD (ng/mL)	SE _{height}	RSD (time) (%)
Hesperetin	$y = 0.0093x + 0.05$	0.9981	14.87	44.98	0.508
Naringenin	$y = 0.0094x + 0.1752$	0.9978	14.71	46.74	0.549
Quercetin	$y = 0.007x - 0.3098$	0.9974	19.76	40.35	0.772
Kaempferol	$y = 0.0083x - 0.4438$	0.9974	16.66	50.82	0.955

表 4-4 LOD and reproducibility of flavonoids for 120 sec injection in the sweeping mode (n=6)

Analyte	Regression equation	R ²	LOD (ng/mL)	SE _{height}	RSD (time) (%)
Hesperetin	$y = 0.0029x - 0.0392$	0.999	43.53	40.78	0.548
Naringenin	$y = 0.0033x + 0.0298$	0.994	38.25	43.67	0.597
Quercetin	$y = 0.0022x - 0.038$	0.995	57.38	48.79	0.519
Kaempferol	$y = 0.0026x - 0.0391$	0.986	48.55	59.51	0.324



表 4-5 Recovery of two kinds of wine

Sample	Analyte	Content ($\mu\text{g/mL}$)	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Found ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%) (n = 6)	Recovery (%)
Wine1	Kaempferol	197.99	500	706.65	3.02	104.4
	Quercetin	1552.88	500	2091.06	2.01	107.6
Wine 5	Kaempferol	293.88	400	680.81	2.89	96.7
	Quercetin	930.9	400	1316	2.53	96.3



表 4-6 The flavonoid contents for different species of wines

		ng/mL			
紅酒	產地	hesperetin	naringenin	quercetin	kaempferol
Hinders choice	智利	no	no	7764	990
紅麴	台灣	302	197	no	no
everyday	加州	354	1240	465	941
cristina	西班牙	326	493	327	691
Canon Fronsac	法國	no	no	4655	1470

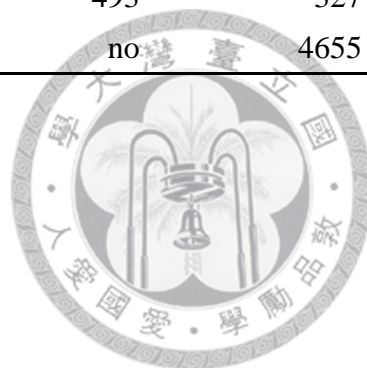
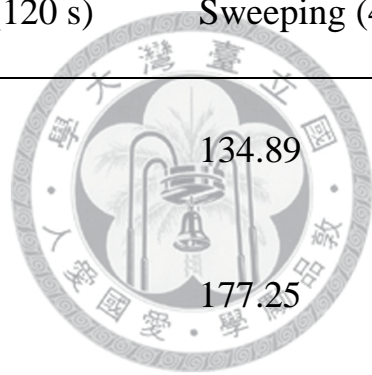


表 4-7 LOD and reproducibility of flavonoids for 480 sec injection in the sweeping mode(n = 3)

Analyte	Regression equation	R ²	LOD (ng/mL)	SE _{height}	RSD (time) (%)
Hesperetin	$y = 0.0065x - 0.1014$	0.9839	21.28	134.89	0.775
Naringenin	$y = 0.009x - 0.111$	0.9998	15.37	177.25	0.969
Quercetin	$y = 0.0057x + 0.2028$	0.9982	24.26	144.75	1.027
Kaempferol	$y = 0.0056x - 0.1275$	0.9953	24.7	170.95	1.165

表 4-8 Comparison of the enhancement effect of different modes

Analyte	SE _{height}		
	LVSS(120 s)	Sweeping (120 s)	Sweeping (480 s)
Hesperetin	44.98	40.78	134.89
Naringenin	46.74	43.67	177.25
Quercetin	40.35	48.79	144.75
Kaempferol	50.82	59.51	170.95



參考文獻

- [1] Kohlarush, F., *Wiedemanns Ann.* 1897, 62, 209.
- [2] Tiselus, A., *Trans. Faraday. Soc.* 1937, 33, 524.
- [3] Knox, J., *Chromatographia* 1988, 26, 329.
- [4] Hjerten, S., *Chromatographic reviews* 1967, 9, 122-219.
- [5] Virtanen, R., *Acta Polytech. Sand.* 1981, 1298.
- [6] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., *J Chromatogr* 1979, 169, 11-20.
- [7] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal Chem* 1981, 53, 1298-1302.
- [8] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *J Chromatogr* 1981, 218, 209-216.
- [9] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Science* 1983, 222, 266-272.
- [10] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal Chem* 1984, 56, 111-113.
- [11] Hjerten, S., Zhu, M. D., *J Chromatogr* 1985, 346, 265-270.
- [12] Cohen, A. S., Karger, B. L., *J Chromatogr* 1987, 397, 409-417.
- [13] Tsuda, T., *Anal Chem* 1987, 59, 521-523.
- [14] Rose, D. J., Jorgenson, J. W., *Anal Chem* 1988, 60, 642-648.
- [15] Landau, L. D., Lifshitz, E. M., *Fluid Mechanics*, Addison-Wesley, Reading, Ma. 1960.
- [16] Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., *Capillary electrophoresis : principles and practice*, Springer-Verlag, Berlin ; New York 1993.
- [17] Jandik, P., Bonn, G. n., *Capillary electrophoresis of small molecules and ions*, VCH, New York ; Cambridge 1993.
- [18] Krattiger, B., Bruin, G. J. M., Bruno, A. E., *Anal Chem* 1994, 66, 1-8.
- [19] Stefansson, M., Novotny, M., *Anal Chem* 1994, 66, 1134-1140.
- [20] Kim, Y. S., Morris, M. D., *Anal Chem* 1994, 66, 1168-1174.
- [21] Zhao, Z. X., Malik, A., Lee, M. L., *Anal Chem* 1993, 65, 2747-2752.
- [22] Harrold, M. P., Wojtusik, M. J., Riviello, J., Henson, P., *J Chromatogr* 1993, 640, 463-471.
- [23] Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Anal Chem* 1985, 57, 834-841.
- [24] Otsuka, K., Terabe, S., Ando, T., *J Chromatogr* 1985, 348, 39-47.
- [25] Bruno, A. E., Krattiger, B., Maystre, F., Widmer, H. M., *Anal Chem* 1991, 63, 2689-2697.
- [26] Lee, K. J., Heo, G. S., Kim, N. J., Moon, D. C., *J Chromatogr* 1992, 608, 243-250.
- [27] Schultz, N. M., Kennedy, R. T., *Anal Chem* 1993, 65, 3161-3165.

- [28] Xue, Q. F., Yeung, E. S., *Anal Chem* 1994, 66, 1175-1178.
- [29] Northrop, D. M., Martire, D. E., Maccrehan, W. A., *Anal Chem* 1991, 63, 1038-1042.
- [30] Weinberger, R., Lurie, I. S., *Anal Chem* 1991, 63, 823-827.
- [31] Wernly, P., Thormann, W., *J Chromatogr* 1992, 608, 251-256.
- [32] Huang, X. H., Zare, R. N., *Anal Chem* 1991, 63, 2193-2196.
- [33] Huang, X. H., Gordon, M. J., Zare, R. N., *Anal Chem* 1988, 60, 375-377.
- [34] Holland, R. D., Sepaniak, M. J., *Anal Chem* 1993, 65, 1140-1146.
- [35] Kennedy, R. T., Jorgenson, J. W., *Anal Chem* 1989, 61, 1128-1135.
- [36] Yan, C., Dadoo, R., Zare, R. N., Rakestraw, D. J., Anex, D. S., *Anal Chem* 1996, 68, 2726-2730.
- [37] Dittmann, M. M., Rozing, G. P., *J Chromatogr A* 1996, 744, 63-74.
- [38] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal Chem* 1992, 64, A489-A496.
- [39] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal Chem* 1992, 64, 1046-1050.
- [40] He, Y., Lee, H. K., *Anal Chem* 1999, 71, 995-1001.
- [41] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J Chromatogr* 1991, 559, 141-152.
- [42] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J Chromatogr* 1991, 559, 153-161.
- [43] Zhang, C. X., Thormann, W., *Anal Chem* 1998, 70, 540-548.
- [44] Liu, Z. Y., Sam, P., Sirimanne, S. R., McClure, P. C., Grainger, J., Patterson, D. G., *J Chromatogr A* 1994, 673, 125-132.
- [45] Quirino, J. P., Terabe, S., *J Capillary Electrop* 1997, 4, 233-245.
- [46] Quirino, J. P., Terabe, S., *Science* 1998, 282, 465-468.
- [47] Palmer, J., Munro, N. J., Landers, J. P., *Anal Chem* 1999, 71, 1679-1687.
- [48] Takagai, Y., Igarashi, S., *Analyst* 2001, 126, 551-552.
- [49] Quirino, J. P., Kim, J. B., Terabe, S., *J Chromatogr A* 2002, 965, 357-373.
- [50] Kim, J. B., Terabe, S., *J Pharmaceut Biomed* 2003, 30, 1625-1643.
- [51] Foret, F., Szoko, E., Karger, B. L., *J Chromatogr* 1992, 608, 3-12.
- [52] Thompson, T. J., Foret, F., Vouros, P., Karger, B. L., *Anal Chem* 1993, 65, 900-906.
- [53] Reinhoud, N. J., Tjaden, U. R., Vandergreef, J., *J Chromatogr* 1993, 641, 155-162.
- [54] Krivankova, L., Bocek, P., *Journal of Chromatography B* 1997, 689, 13-34.
- [55] Hirokawa, T., Okamoto, H., Ikuta, N., *Electrophoresis* 2001, 22, 3483-3489.
- [56] Britz-McKibbin, P., Chen, D. D. Y., *Anal Chem* 2000, 72, 1242-1252.
- [57] Britz-McKibbin, P., Bebault, G. M., Chen, D. D. Y., *Anal Chem* 2000, 72, 1729-1735.
- [58] Britz-McKibbin, P., Otsuka, K., Terabe, S., *Anal Chem* 2002, 74, 3736-3743.

- [59] Britz-McKibbin, P., Chen, D. D. Y., *Chromatographia* 2003, 57, 87-93.
- [60] Wang, S. J., Tseng, W. L., Lin, Y. W., Chang, H. T., *J Chromatogr A* 2002, 979, 261-270.
- [61] Britz-McKibbin, P., Terabe, S., *Chem Rec* 2002, 2, 397-404.
- [62] Britz-McKibbin, P., Nishioka, T., Terabe, S., *Anal Sci* 2003, 19, 99-104.
- [63] Vindevogel, J., Sandra, P., *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Huthig, Heidelberg 1992.
- [64] Quirino, J. P., Terabe, S., *J Chromatogr A* 1997, 781, 119-128.
- [65] Quirino, J. P., Terabe, S., *J Chromatogr A* 1997, 791, 255-267.
- [66] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal Chem* 1998, 70, 149-157.
- [67] Quirino, J. P., Terabe, S., *J Chromatogr A* 1998, 798, 251-257.
- [68] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal Chem* 1998, 70, 1893-1901.
- [69] Quirino, J. P., Otsuka, K., Terabe, S., *Journal of Chromatography B* 1998, 714, 29-38.
- [70] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal Chem* 2000, 72, 1023-1030.
- [71] Emmer, A., Jansson, M., Roeraade, J., *Hrc-J High Res Chrom* 1991, 14, 738-740.
- [72] Kienhuis, P. G. M., *J Chromatogr* 1993, 647, 39-50.
- [73] Krivankova, L., Gebauer, P., Thormann, W., Mosher, R. A., Bocek, P., *J Chromatogr* 1993, 638, 119-135.
- [74] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal Chem* 1991, 63, 2042-2047.
- [75] Burgi, D. S., Chien, R. L., *J Microcolumn Sep* 1991, 3, 199-202.
- [76] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal Biochem* 1992, 202, 306-309.
- [77] Kuhr, W. G., Yeung, E. S., *Anal Chem* 1988, 60, 2642-2646.
- [78] Liu, J. P., Shiota, O., Novotny, M. V., *Anal Chem* 1992, 64, 973-975.
- [79] Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., *Anal Chem* 1988, 60, 436-441.
- [80] Smith, R. D., Barinaga, C. J., Udseth, H. R., *Anal Chem* 1988, 60, 1948-1952.
- [81] de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., *J Chromatogr A* 2006, 1112, 31-63.
- [82] Merken, H. M., Beecher, G. R., *J Chromatogr A* 2000, 897, 177-184.
- [83] Zava, D. T., Duwe, G., *Nutr Cancer* 1997, 27, 31-40.
- [84] Su, S. J., Chow, N. H., Kung, M. L., Hung, T. C., Chang, K. L., *Nutr Cancer* 2003, 45, 113-123.
- [85] Sroka, Z., Cisowski, W., *Food Chem Toxicol* 2003, 41, 753-758.
- [86] SatueGracia, M. T., Heinonen, M., Frankel, E. N., *J Agr Food Chem* 1997, 45, 3362-3367.

- [87] Wang, J., Mazza, G., *J Agr Food Chem* 2002, 50, 850-857.
- [88] Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., Torronen, A. R., *J Agr Food Chem* 1999, 47, 2274-2279.
- [89] Park, J. S., Rho, H. S., Kim, D. H., Chang, I. S., *J Agr Food Chem* 2006, 54, 2951-2956.
- [90] Hiermann, A., Kartnig, T., *J Chromatogr* 1977, 140, 322-326.
- [91] Hiermann, A., *J Chromatogr* 1979, 174, 478-482.
- [92] Creaser, C. S., Koupaiabyazani, M. R., Stephenson, G. R., *J Chromatogr* 1989, 478, 415-421.
- [93] Christov, R., Bankova, V., *J Chromatogr* 1992, 623, 182-185.
- [94] Wulf, L. W., Nagel, C. W., *J Chromatogr* 1976, 116, 271-279.
- [95] Garcaviguera, C., Bridle, P., *Food Chem* 1995, 54, 349-352.
- [96] Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S., Black, C., *J Agr Food Chem* 1997, 45, 590-595.
- [97] Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T., *J Chromatogr A* 1998, 799, 101-110.
- [98] Seitz, U., Oefner, P. J., Nathakarnkitkool, S., Popp, M., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 1992, 13, 35-38.
- [99] Delgado, C., Tomasbarberan, F. A., Talou, T., Gaset, A., *Chromatographia* 1994, 38, 71-78.
- [100] Ferreres, F., Blazquez, M. A., Gil, M. I., Tomasbarberan, F. A., *J Chromatogr A* 1994, 669, 268-274.
- [101] Chi, H., Hsieh, A. K., Ng, C. L., Lee, H. K., Li, S. F. Y., *J Chromatogr A* 1994, 680, 593-597.
- [102] Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M. I., TomasBarberan, F. A., *Food Chem* 1997, 60, 79-84.
- [103] Gotti, R., *J Pharmaceut Biomed* 2011, 55, 775-801.
- [104] Baumann, D., Adler, S., Hamburger, M., *J Nat Prod* 2001, 64, 353-355.
- [105] Baggett, B. R., Cooper, J. D., Hogan, E. T., Carper, J., Paiva, N. L., Smith, J. T., *Electrophoresis* 2002, 23, 1642-1651.
- [106] Mellenthin, O., Galensa, R., *J Agr Food Chem* 1999, 47, 594-602.
- [107] Dadakova, E., Prochazkova, E., Krizek, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 1573-1578.
- [108] Chen, G., Zhang, H. W., Ye, J. N., *Anal Chim Acta* 2000, 423, 69-76.
- [109] Wang, C. Y., Huang, H. Y., Kuo, K. L., Hsieh, Y. Z., *J Chromatogr A* 1998, 802, 225-231.
- [110] Jiang, T. F., Li, Y., Shi, Y. P., *Planta medica* 2004, 70, 284-287.
- [111] Huck, C. W., Stecher, G., Ahrer, W., Stoggl, W. M., Buchberger, W., Bonn, G.

- K., *J Sep Sci* 2002, 25, 904-908.
- [112] Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Garrison, A. W., Freitag, D., Kettrup, A., *Anal Chem* 1998, 70, 3798-3808.
- [113] Wang, S. P., Huang, K. J., *J Chromatogr A* 2004, 1032, 273-279.
- [114] Zhu, J. H., Yu, K., Chen, X. G., Hu, Z. D., *J Chromatogr A* 2007, 1166, 191-200.
- [115] Herrero-Martinez, J. M., Oumada, F. Z., Roses, M., Bosch, E., Rafols, C., *J Sep Sci* 2007, 30, 2493-2500.
- [116] Jiang, L. Q., Fang, G. Z., Zhang, Y., Cao, G. J., Wang, S., *J Agr Food Chem* 2008, 56, 11571-11577.
- [117] Honegr, J., Safra, J., Polasek, M., Pospisilova, M., *Chromatographia* 2010, 72, 885-891.
- [118] Cesla, P., Fischer, J., Jandera, P., *Electrophoresis* 2010, 31, 2200-2210.
- [119] Cao, J., Dun, W. L., *Talanta* 2011, 84, 155-159.
- [120] Tonin, F. G., Jager, A. V., Micke, G. A., Farah, J. R. S., Tavares, M. F. M., *Electrophoresis* 2005, 26, 3387-3396.
- [121] Huang, H. Y., Lien, W. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 3134-3140.
- [122] Hompesch, R. W., Garcia, C. D., Weiss, D. J., Vivanco, J. M., Henry, C. S., *Analyst* 2005, 130, 694-700.
- [123] Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Cavrini, V., *J Chromatogr A* 2006, 1112, 345-352.
- [124] Yu, K., Gong, Y. F., Lin, Z. Y., Cheng, Y. Y., *J Pharmaceut Biomed* 2007, 43, 540-548.
- [125] Wang, S. M., Zhou, L., He, W. Y., Hu, Z. D., *J Pharmaceut Biomed* 2007, 43, 1557-1561.
- [126] Zhang, Y., Chen, J., Ma, X. M., Shi, Y. P., *J Pharmaceut Biomed* 2007, 45, 742-746.
- [127] Yu, L. S., Xu, X. Q., Huang, L., Ling, J. M., Chen, G. N., *Electrophoresis* 2008, 29, 726-733.
- [128] Zhang, H., Zhou, L., Chen, X. G., *Electrophoresis* 2008, 29, 1556-1564.
- [129] Gotti, R., Furlanetto, S., Lanteri, S., Olmo, S., Ragaini, A., Cavrini, V., *Electrophoresis* 2009, 30, 2922-2930.
- [130] Liu, J., Zhu, F. F., Liu, Z., *Talanta* 2009, 80, 544-550.
- [131] Cao, J., Qu, H. B., Cheng, Y. Y., *Electrophoresis* 2010, 31, 1689-1696.
- [132] Lopez, M. D. C., Vilarino, J. M. L., Rodriguez, M. V. G., Losada, L. F. B., *Microchem J* 2011, 99, 461-469.
- [133] Lee, I. S. L., Boyce, M. C., Breadmore, M. C., *Food Chem* 2012, 133, 205-211.

- [134] Mukerjee, P., Mysels, K. J., *Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems*, National Bureau of Standards, Washington (D.C.) 1971.
- [135] Rahman, A., Brown, C. W., *J Appl Polym Sci* 1983, 28, 1331-1334.
- [136] Turro, N. J., Yekta, A., *J Am Chem Soc* 1978, 100, 5951-5952.
- [137] Baker, D. R., *Capillary electrophoresis*, Wiley, New York ; Chichester 1995.
- [138] Zhu, Z. F., Yan, N., Zhou, X. M., Zhou, L., Chen, X. G., *J Sep Sci* 2009, 32, 3481-3488.

