

# 毛細管電泳在農藥主成份分析之應用

蕭懿民

## 前 言

自從 1960 年代及 1970 年代發展出高效液相層析 (High performance liquid chromatography, HPLC) 及凝膠電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 之後, 毛細管電泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 是新興的分離技術。1980 年代 Jorgenson 等人即證實可利用 CE 做微量且高效的分析 (Jorgenson and Lukas, 1981)。三種分析科技成就了今日的 CE, 首先是由氣相層析 (Gas chromatography, GC) 衍化而來的熔融石英毛細管, 其次是由 HPLC 發展而來的高感度吸收光偵測器, 以及傳統 PAGE 的廣泛分離模式。結合了這三種分離技術之優點, 使 CE 兼具高解析與靈敏度。更由於 CE 不會如 HPLC 產生具有毒性、燃性之廢液, 又不會如 PAGE 之染色偵測耗時, 目前 CE 已廣泛的被眾多實驗室所接受, 可補強或取代原有的層析與電泳分析技術。目前已成功地被應用在下列領域: 1. 生化分析: Amino acid、peptide、protein、oligonucleotide、DNA 及各種生物體代謝產物。2. 藥物分析: 各類水溶性、油溶性藥物、化學合成藥物、基因工程藥物及中藥。3. 光學異構物分析: 各類結構異構物及光學異構物 (D, L 或 R, S form)。4. 離子分析: 各種陰陽離子、有機酸根、金屬離子等。5. 石化產品分析: PTA 純度及各種 polymer 分子量分析。6. 環境分析: 多氯、多苯環等環境污染物分析。7. 食品化學分析: 各類食品添加物 (如色素、人工甘味、防腐劑等), 與營養成份 (如維生素、胺基酸、蛋白質、醣類等) 之分析。

CE 是一個結構簡單的儀器 (見圖 1.)。一根細內徑、具有彈性的石英毛細管, 兩端置於緩衝液瓶中, 瓶中與管內盛裝相同的溶液, 兩個緩衝液瓶中放置電極, 將欲分離的樣品引入到毛細管後, 施加電場, 分離便開始進行。光學檢測可在毛細管的另一端直接透過管壁進行。

將樣品引入毛細管的進樣模式以流體力學方式應用最廣

泛，將樣品於進樣端加氣壓入，或在毛細管的出口端抽真空引入，或是利用虹吸現象將樣品引入。此外亦可以樣品管置換緩衝液瓶，並施加電壓來進行電動進樣。

CE 操作的基礎是電滲流 (Electroendosmosis flow)。在  $\text{pH} > 3$  的情況下，石英毛細管表面會因  $-\text{SiOH}$  基的解離而帶負電，為了保持電荷平衡，緩衝液中的陽離子會在靠近毛細管表面處聚積，而形成了所謂的電雙層，向毛細管兩端施加一個電壓，組成擴散層的陽離子將被吸引到負極，形成電滲流。電滲流的強度隨著  $\text{pH}$  值上升而上升，在鹼性的情況下，其速度比任何樣品離子的遷移速度來得大。所以，電滲流可以使幾乎所有物種，不論其電荷性質如何，向同一方向移動，此特性可應用在膠束電動力學毛細管色譜層析 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC) 上，為一分離中性及帶電荷離子之技術。

CE 有多種操作方式，運用不同的分離機理，不同的操作模式可以提供互補的信息。CE 的基本操作方式可粗略分為：

## 毛細管區帶電泳

(Capillary zone electrophoresis, CZE)

CZE 是最簡單且應用最廣的一種分離型式。樣品組成分根據荷質比 (mass to charge ratio) 在毛細管內泳動形成不同的區帶。由於待分析物的泳動與其電荷有關，使用 CZE 必須尋找適當的緩衝液  $\text{pH}$  值，同時緩衝液的緩衝能力、離子導電性及不被紫外光吸收也是必須考慮的。另外可視情況加入一些添加劑去增加待分析物的溶解度，或抑制管壁吸附，或降低電滲流。

## 膠束電動力學毛細管色譜層析

(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC)

MECC 兼具電泳與色譜層析技術，它由 Terabe 於 1984 年提出 (Terabe *et al.*, 1984)，是 CE 中應用最廣的方式之一。MECC 是唯一既能分離中性溶質又能分離帶電組成分的電泳技術，這是其主要優勢所在。此技術是使用較大濃度的界面活性劑，在臨界膠束濃度 (如 SDS 為 8-9 mM) 以上，單個的界面活性劑分子之間聚集而形成膠束 (micelle)，這個團狀結構中，界面活性劑疏水性的一端聚在一起向內排列從而避開緩衝溶液，帶電

荷的一端則朝向緩衝溶液，分離機理是以膠束之疏水性中心作為固定相，電滲流為移動相來進行層析，也就是利用電滲流當成幫浦去推動緩衝液及膠束到偵測區；不同的待分析組成分將會利用對膠束不同的疏水依附性而在毛細管內被分離。在 MECC 中，可以經由使用不同的界面活性劑以形成具有不同物理性質的膠束來控制其選擇性，就像在 LC 中改變固定相一樣。亦可加入有機溶劑來控制溶質與膠束間的相互作用。

## 毛細管凝膠電泳

(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)

CGE 是依據分子尺寸之分離技術，讓相同荷質比溶質（例如核酸及 SDS-蛋白質）在具“分子篩”作用的聚合物內進行電泳而分離。其分離機理與傳統凝膠電泳是一樣的，而其優點在於可施加比平板式電泳高 10-100 倍的電壓而不會引起對分離不利的焦耳熱效應，又可具備毛細管柱上檢測之簡易性和儀器的自動化操作。然而製備型分離與多道分離為 CGE 難以實現的部份。

## 毛細管等電聚焦

(Capillary isoelectric focusing, CIEF)

CIEF 是一項依據  $pI$  進行多月太或蛋白質分離的“高分辨”電泳技術。類似於傳統凝膠 IEF，ampholyte 溶液受到電場的影響形成 pH 梯度，此時蛋白質會在等電點的位置上被濃縮（聚焦）而與其它的蛋白分開。其較大的問題在於有些蛋白在其等電點時將會沈澱而影響遷移的再現性及定量的準確性，因此限制了 CIEF 的樣品載量。此外，最好使用有塗層的毛細管，以降低或消除電滲流，以防 ampholyte 在溶質聚焦完成之前就流出毛細管或是溶質尚未濃縮聚焦完成就已流經偵測區。

綜上所述，不難了解 CE 這種分析技術可被廣泛運用在各種應用領域，有關農藥分析方面之應用，對成分分析的技術提昇大有助益。譬如過去進行抗生素類藥劑品質的分析與管制常須以生物檢驗法進行。但生物檢驗法因微生物本身對藥劑的選擇性有限，因此無法有效鑑定藥品的真偽、有效成份組成及結構類似的分解產物的含量。除此之外，生物檢驗法又有步驟繁瑣、耗時久、再現性差等缺點。CE 提了快速分析、高解析度、樣品用量小、以及全自動的操作等優點，且有不同的操作模式可選

擇適用各種性質之抗生素，因此可逐步取代傳統的生物檢驗法，大大改進抗生類藥劑的分析能力。已由本系成功的應用於抗生素類殺菌劑的分析，至目前為止，包括運用 CZE 分析保米黴素 (Blasticidin S) (Lo *et al.*, 1995)、嘉賜黴素 (Kasugamycin)(Lo and Hsiao, 1996)、保粒黴素(丁)(Polyoxin D)，運用 MECC 分析維利黴素 (Validamycin A) (層析圖譜如圖 2.，方法見表 1.，其滯留時間、偵測極限與理論平板數之比較見表 2.)。

此外，異構物的分析在藥物和食品工業日益重要，目前其分離主要是利用 HPLC 和 GC 進行，複雜而難以令人滿意，而且手性固定相 (chiral stationary phase) 通常很昂貴，利用 CZE 進行手性分析非常簡單，只須在操作緩衝溶液中加入手性選擇劑，如 cyclodextrins。與使用大量手性相來選擇性改變手性色譜之分離相比，CE 分離的高效率使其只須要少量的手性添加劑。選擇性的調整可以通過調節 chiral selector 的類型和濃度來實現。

有機硫磺殺菌劑中可能產生之有害不純物 ETU (ethylenedithiourea) 的分析亦可應用 MECC 技術加以分析。HPLC 為目前用來分析 ETU 的自動化儀器，然而大量樣品抽查下來，HPLC 的分析勢必產生大量有毒有機廢液，不僅造成了廢液處理的困擾，亦對分析人員的健康造成威脅，於經費消耗更不在話下。若能改以 CE 來完成例行的 ETU 分析工作，將可省下大量有機溶劑的消耗，節省時間、人力、金錢。ETU 之 HPLC 與 CE 分析比較可參考 (Lo and Hsiao, 1997)。

由此可見，CE 優異的解析能力與快速的分析時間之特點，勢將成為未來生化與分析化學界，取代 GC、HPLC 等傳統色譜層析之利器。若能結合質譜 (mass)，以及新近問世的鐳射螢光檢測 (laser-induced fluorescence detection) 等，更將大幅提高其靈敏度，可處理更複雜的試樣，在分析上將更為樂觀。

表 1. 以 CE 分析保米黴素 (Blasticidin S)、嘉賜黴素 (Kasugamycin)、保粒黴素 (丁) (Polyoxin D)、維利黴素 (Validamycin A)、ETU 之方法

成分名稱	毛細管柱	自動注射轉盤內之溫度	注射時之壓力	操作電壓	緩衝液	極性	偵測波長
保米黴素	24 cm×25 μm (ID), coated, 20°C	20°C	20 psi ×sec	8 kV	0.1M Phosphate buffer, pH 2.4	正到負	265 nm
嘉賜黴素	24 cm×25 μm (ID), coated, 20°C	20°C	20 psi ×sec	15 kV	0.1M Phosphate buffer, pH 2.5	正到負	210 nm
保粒黴素 (丁)	24 cm×25 μm (ID), coated, 20°C	20°C	20 psi ×sec	15 kV	0.1M Phosphate buffer, pH 2.5	正到負	270 nm
維利黴素	50 cm×50 μm (ID), uncoated, 20°C	20°C	5 psi ×sec	18 kV	100 mM SDS, 50 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	正到負	195 nm
ETU	50 cm×50 μm (ID), uncoated, 20°C	20°C	3 psi ×sec	15 kV	100 mM SDS, 10 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 10 mM NaH <sub>2</sub> P <sub>0</sub> 4	正到負	225 nm

表 2. 以 CE 分析保米黴素 (Blasticidin S)、嘉賜黴素 (Kasugamycin)、保粒黴素 (丁) (Polyoxin D)、維利黴素 (Validamycin A)、ETU 其滯留時間、偵測極限與理論平板數之比較

成分名稱	滯留時間	儀器偵測極限	方法偵測極限	理論平板數
	min	$\mu\text{g} / \text{ml}$	$\mu\text{g} / \text{ml}$	
保米黴素	3.79	0.05	0.20	8078
嘉賜黴素	4.83	0.44	0.51	16589
保粒黴素 (丁)	9.43	0.10	0.15	9840
維利黴素	7.78	1.00	1.81	8378
ETU	4.75	0.25	0.30	12491

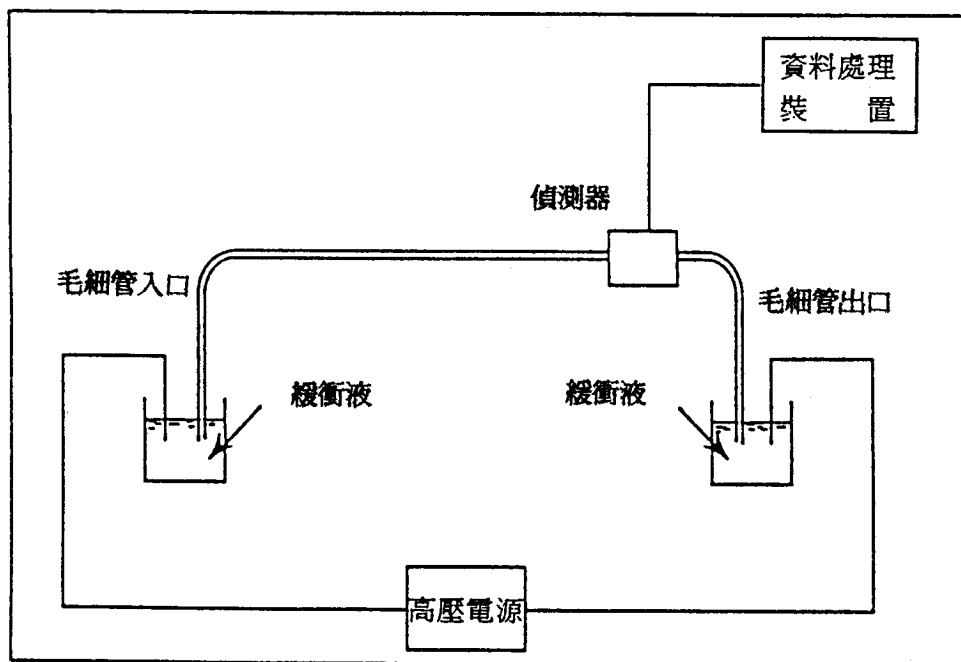


圖 1. CE儀器示意圖。

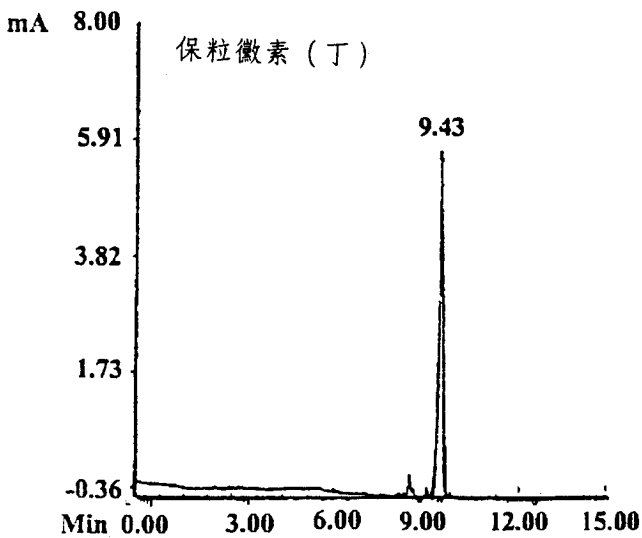
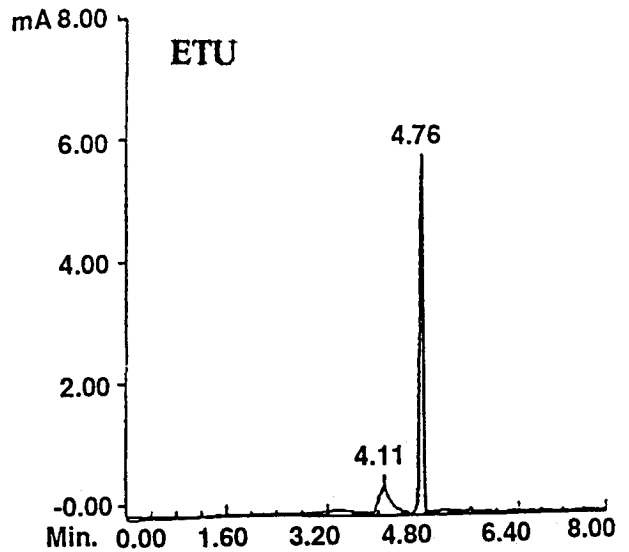
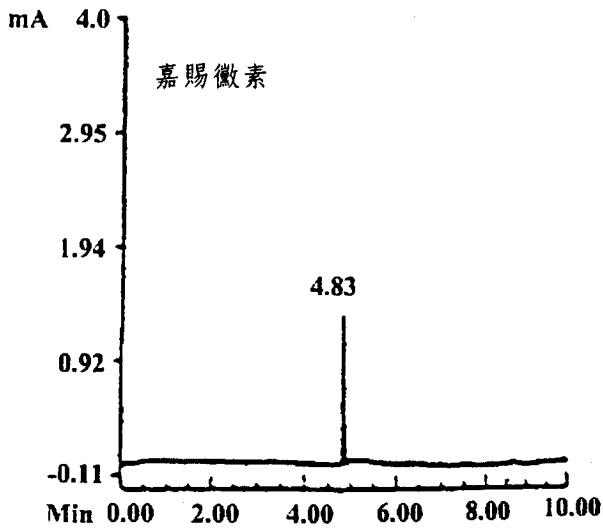
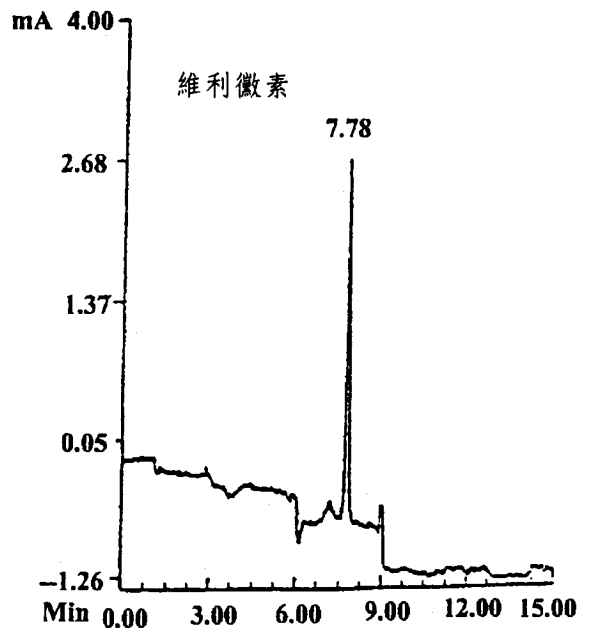
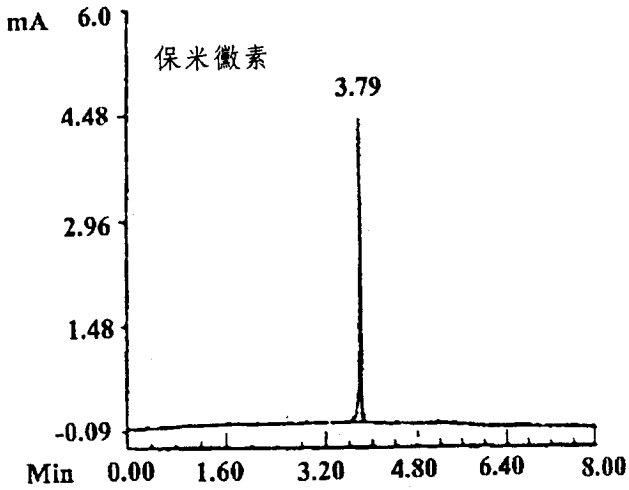


圖 2. 以 CE 分析保米黴素 (Blasticidin S)、嘉賜黴素 (Kasugamycin)、保粒黴素 (丁) (Polyxin D)、維利黴素 (Validamycin A)、ETU 之圖譜。