

## 運用微胞電動力層析法線上掃集生物胺

王信智、胡焯淳、邱泰嘉

### 摘要

本研究開發一種簡單且有效的毛細管電泳(capillary electrophoresis, CE)搭配線上掃集的濃縮方法，利用含十二烷基硫酸鈉的背景電解質(background electrolyte, BGE)，進行七種生物胺——酪胺酸(tyrosine, Tyr)、多巴胺(dopamine, DA)、腎上腺素(epinephrine, Epi)、去甲腎上腺素(norepinephrine, NE)、色胺酸(tryptophan, Trp)、5-羥基色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HTP)、血清素(serotonin, 5-HT)的分析。本實驗分別探討背景電解質 pH 值、十二烷基硫酸鈉濃度、樣品中磷酸鹽緩衝溶液的濃度及 pH 值。

最佳分離條件為使用內徑 75  $\mu\text{m}$ ，外徑 365  $\mu\text{m}$ ，全長 50 cm，有效長度 40 cm 之毛細管；背景電解質為 10 mM 磷酸緩衝溶液(pH 2.3)，含 25 mM 十二烷基硫酸鈉，以上述溶液為分離溶液，外加電壓-15 kV，以紫外光/可見光偵測器(UV-Vis absorbance detection, UV)進行偵測，偵測波長設定在 200 nm 下進行毛細管電泳實驗。在此最佳分離條件下以訊號/雜訊比(S/N ratio) 等於 3 作為判定標準，偵測極限(limit of detection, LOD)介在 0.039 ~ 0.154  $\mu\text{M}$ ，與傳統樣品進樣方法比較濃縮 6~ 11 倍，線性範圍介在 0.2~5.0  $\mu\text{M}$ ，七支分析物相關係數(R)大於 0.99 且在 7 分鐘內完成分離。

**關鍵字：**微胞電動力層析法、生物胺、線上掃集、尿液

---

王信智，國立臺東大學應用科學系。

胡焯淳，國立臺東大學應用科學系。

邱泰嘉(通訊作者)，國立臺東大學應用科學系。E-mail: [tcchiu@nttu.edu.tw](mailto:tcchiu@nttu.edu.tw)

## Online sweeping biogenic amines using micellar electrokinetic chromatography

Xin-Zhi Wang, Cho-Chun Hu & Tai-Chia Chiu

### Abstract

In this study, an effective method for determining seven biogenic amines (tyrosine, dopamine, epinephrine, norepinephrine, tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin) using online sweeping-micellar electrokinetic chromatography was developed. The experimental conditions such as pH of background electrolytes, concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS), and pH and concentration of the phosphate solution in the matrix were investigated. The optimal conditions were performed that using a 50-cm capillary (40-cm in effective length), the background electrolyte containing 10 mM phosphate solution (pH 2.3) and 25 mM SDS. The applied voltage was set at -15 kV and the detection wavelength was set at 200 nm. Under the optimal conditions, the separation was completed within 7 min. The linear range of the analytes was ranging from 0.2 to 5.0  $\mu\text{M}$  ( $R^2 > 0.99$ ) with LODs ranging from 0.039 to 0.154  $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** micellar electrokinetic chromatography, biogenic amines, online sweeping, urine

---

Xin-Zhi Wang, Student, Department of Applied Science, National Taitung University.  
Cho-Chun Hu, Associate Professor, Department of Applied Science, National Taitung University.  
Tai-Chia Chiu (Corresponding Author), Professor, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: [tcchiu@nttu.edu.tw](mailto:tcchiu@nttu.edu.tw)

## 壹、前言

生物胺是一種含氮之低分子量的有機化合物總稱，具有生物活性，在合成蛋白質、調節核酸及生物膜穩定性方面有著重要的作用，單胺類的生物胺可調節血管及肌肉的舒張和收縮，對大腦皮層也有重要的調節作用；多胺類的生物胺則能促進 DNA、RNA 和蛋白質的合成，加速生物體的發育，微量生物胺在生物體內是屬於正常活性成分，當攝入過量或是同時多種時，會引起頭痛、噁心、心悸、血壓變化、呼吸紊亂等過敏反應，嚴重時還會使生命受到危害。

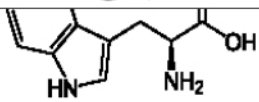
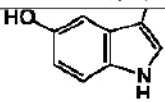
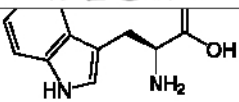
生物胺可分為兒茶酚胺類(多巴胺、去甲腎上腺素、腎上腺素)、吲哚胺類(血清素)和咪唑胺類，透過追蹤生物流體，如：尿液、血液等，確定其最終代謝物，可以早期診斷代謝疾病，生物胺也是重要的神經傳導物質。<sup>[1-3]</sup>表 1 列出本研究所分析的七種生物胺類分析物。

氣相層析法(gas chromatography, GC)，是一種高效及高準確性的分析方法，但是通常需要衍生化步驟，所以到目前為止開發了高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[4, 5]</sup>和毛細管電泳<sup>[6-10]</sup>，目前液相層析法是偵測生物胺的主流方法。毛細管電泳又比液相層析更快速、方便、有機溶劑低消耗量、分離效率高、基質干擾少，其搭配的偵測模式有螢光、紫外光/可見光、化學發光(chemiluminescence, CL)<sup>[9]</sup>、雷射誘導螢光(laser-induced fluorescence, LIF)<sup>[10]</sup>、質譜法(mass spectrometry, MS)<sup>[11]</sup>、電化學偵測器(electrochemical detector, ECD)<sup>[12, 13]</sup>、循環伏安法(cyclic voltammetry, CV)<sup>[14]</sup>等方式。為了提高靈敏度，開發了許多不同的樣品堆積技術<sup>[15]</sup>，根據濃縮方式又分為掃集法、場放大樣品堆積、注射(FASS、FASI)<sup>[2, 7]</sup>、pH 接合界面等。

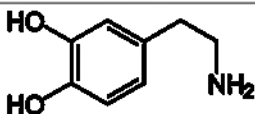
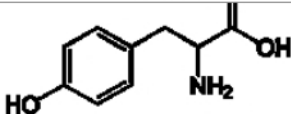
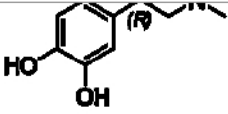
本研究目的在於開發微胞電動力毛細管電泳搭配線上濃縮分析技術，希望以高靈敏度、高解析度、分離時間短、樣品用量少等優點來取代傳統分析方法。人體尿液中的基質干擾嚴重，會導致分析結果出現失誤，通常在偵測前，尿液的處理通常很繁複，所以希望利用微胞搭配線上濃縮技術及簡單前處理方式，提高生物胺偵測的靈敏度及準確度，達到準確分析的目的。

此方法不需要額外衍生化樣品即可偵測，未來可應用在尿液中做偵測，甚至是針對酒類做生物胺的檢測。

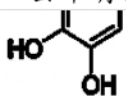
表 1 七種生物胺類分析物

分析物	色胺酸	血清素	5-羥基色胺酸
化學結構			
分子式	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$C_{10}H_{12}N_2O$	$C_{11}H_{12}N_2O_3$
pKa	9.39	9.8	9.6
分子量	204.23	176.215	220.23

分析物	多巴胺	酪胺酸	腎上腺素
化學結構			
分子式	$C_8H_{11}NO_2$	$C_9H_{11}NO_3$	$C_9H_{13}NO_3$
pKa	8.72	10.1	8.55
分子量	153.178	181.19	183.204

分析物	去甲腎上腺素
化學結構	
分子式	$C_8H_{11}NO_3$
pKa	8.4
分子量	169.18



## 貳、文獻回顧

2013 年，A. Bacaloni 的團隊通過毛細管電泳結合場放大樣品注射在人類尿液中對五種生物胺(血清素、腎上腺素、酪胺、色胺、多巴胺)的靈敏分析。<sup>[2]</sup>實驗最佳化條件為波長 210 nm，電壓+30 kV，毛細管總長 100 cm (有效長度 91.5 cm)；FASI：水 (50 mbar，5 s)、樣品 (12 kV，60 s)；緩衝溶液為 20 mM MES、30 mM pH 6.5 PBS、10 % (v/v) 甲醇和 0.05 % (v/v) HPC，樣品溶液為含 50%(v/v)乙腈。標準品的再現性之遷移時間 RSD (n=6) 介於 0.07~0.3 %，波面積 RSD (n=6) 介於 0.25~3.34%，同日間 RSD (n=6) 皆小於 10.8%，異日間 RSD (n=6) 皆小於 13.9%，線性範圍 0~0.4  $\mu\text{M}$  (5-HT、TA、DA、EP)及 0~1.0  $\mu\text{M}$  (T)，LOD 0.01~0.15  $\mu\text{M}$ ， $R^2$  皆大於 0.972，回收率在 89~108% 之間。成功在人體尿液中以場放大樣品注射及紫外線偵測出生物胺，此方法媲美雷射誘導螢光與結合固相萃取法的 CE。

2012 年，Ming-Mu Hsieh 團隊藉由毛細管電泳搭配 UV 偵測器，利用不同導電度區帶的 BGE，進行線上預濃縮及分離神經物質中的陽離子和陰離子。<sup>[6]</sup>實驗最佳條件為波長 220 nm，電壓+18kV，毛細管總長度為 60 cm (有效長度為 50 cm)；緩衝溶液前端為含 10% (v/v) 甘油的 500 mM TB (pH 9.0)，後端為含 0.5% (v/v) PEO 的 500 mM TB (pH 9.0)；樣品溶液含 1 mM 甲酸和 20% (v/v)乙腈，注射高度及體積為 25 cm 和 720 nL。同日間 RSD 2.0~6.6%，異日間 RSD 1.6-4.0%，回收率介於 93~109%， $R^2 > 0.995$ ，LOD 14.7~313.4 nM，靈敏度增強為 116~287 倍。此方法對於神經元的研究及診斷有很大的潛力，未來可望應用在臨床醫學及神經學上。

2012 年，Ting-Yu Chin 團隊利用雷射誘導螢光毛細管電泳結合微波輔助衍生法及場放大樣品堆積(FASS)，偵測老鼠大腦內的兒茶酚胺(多巴胺、腎上腺素、去甲腎上腺素)。<sup>[7]</sup>最佳實驗條件：LIF 偵測波長為 488/520 nm、電壓+20kV、毛細管為 40 cm  $\times$  50  $\mu\text{m}$  id、前端緩衝溶液為 pH 8.9 的 50 mM 硼酸溶液+ 40 mM 硼酸鹽溶液，後端緩衝溶液為 pH 8.5 的 160 mM 硼酸溶液+ 50 mM 硼酸鹽溶液、FASS：水塞(0.5 psi，35 s)，樣品(-5kV，25 s)。標準品遷移時間 RSD 為 7.5~8.0%，峰面積 RSD 為 3.14~5.64%，其 LOD 介於 0.14 pM~0.19 pM， $R^2$  在 0.9997-0.9999 之間，回收率為 102.7%。此研究證明兒茶酚胺 (DA，NE 以及 Epi) 以 CE-LIF 結合微波輔助衍生法的可行性。另外，真實樣品基質在衍生化的過程中並沒有產生問題，由此可見對生物樣品的衍生化潛

力。

2013 年, Wei-Lung Tseng 團隊藉由毛細管電泳搭配 UV 偵測器使用氧化鐵奈米粒子選擇性的濃縮兒茶酚胺(多巴胺、腎上腺素、去甲腎上腺素)。<sup>[8]</sup>實驗最佳條件為 1. 萃取條件: 10 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0)、12 mg/mL 氧化鐵 NPs (125 $\mu$ L)、0.1M 磷酸 (10 $\mu$ L), 2. CE 條件: 背景電解質為含 1.2% (v/v) PDDAC 的 5 mM 甲酸 (pH 4.0)、毛細管總長 60 cm (有效長度 40 cm)、電壓-15 kV、偵測波長 200 nm, 3. 進樣: 入口端高度 20 cm、10 s。標準品線性範圍 0.03–10  $\mu$ M, LOD 8–10 nM,  $R^2$  為 0.9903–0.9933, 峰面積及遷移時間 RSD 分別為 4%及 1%。成功驗證氧化鐵奈米粒子對兒茶酚胺的選擇性濃縮及萃取效果, 對於檢測尿液中是否含有兒茶酚胺類毒品及植物中的多酚類有著很大的潛力。

2012 年, Bin Cong 及 Weijun Kang 團隊藉由毛細管區帶電泳搭配化學發光偵測在人類尿液中檢測三大主要兒茶酚胺 (多巴胺、腎上腺素、去甲腎上腺素)。<sup>[9]</sup>最佳實驗條件: 1. 電泳條件: 毛細管為 54 cm  $\times$  50  $\mu$ m id、電壓 12kV、緩衝溶液為含 1mM 的 20mM 硼酸鈉(pH 9.5)、進樣 10 s, 2. CL: 毛細管 200  $\mu$ m id、含 0.2 mM Ag(III)的 20 mM 氯氧化鈉溶液, 3. 反應用毛細管 530  $\mu$ m i.d。標準品 RSD(peak height)為 4.7–5.4%, LOD 為 0.089–0.1  $\mu$ M, 回收率分別為 96.0–110.0%(Epi)、94.7–103.5%(NE)、92.4–99.4%(DA)。成功以毛細管電泳搭配化學發光偵測兒茶酚胺, 比 HPLC 有更短的分析時間、低樣品量及簡單的操作, 其 LOD 足夠偵測人體尿液中是否有異常生物胺, 可用於診斷早期的嗜鉻細胞瘤。

## 參、材料與方法

### 一、藥品與溶劑

實驗中所使用的標準品色胺酸 (tryptophan, 1)、5-羥基色胺酸 (5-hydroxytryptophan, 3)、多巴胺鹽酸鹽 (dopamine, 4)、酪胺鹽 (tyrosine, 5)、腎上腺素 (epinephrine, 6)、去甲腎上腺素 (norepinephrine, 7)、磷酸 (phosphoric acid)、磷酸二氫鈉 (sodium phosphate monobasic dihydrate)、磷酸氫二鈉 (sodium phosphate dibasic)、鹽酸 (hydrochloric acid)、十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 皆購自 SIGMA。血清素 (serotonin, 2) 購自 Alfa Aesar。乙醇 (ethanol) 購自島久試藥,

超純水是由美國 Barnstead 公司出產之超純水系統 (Barnstead Nanopure Ultrafiltration unit) 所製造，電阻值皆大於 18 MΩ/cm。十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 結構如圖 1 所示。

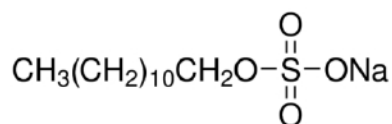


圖 1 SDS 化學結構圖

## 二、儀器介紹

- (1) 紫外/可見光吸收儀型號為 SAPPHIRE 600 購自美國 ECOM。
- (2) 數據搜集與整理用 Clarity/Clarity Lite 層析數據處理系統。
- (3) 高電壓電源供應器型號為 ES20P-DAM 購自 GAMMA
- (4) pH meter 型號為 pH/ion meter D-23，購自日本 HORIBA。
- (5) 超純水使用 NANO pure Infinity UV/Ufe，購自美國 Barnstead Thermolyn。
- (6) 毛細管柱購自美國 Polymicro Technologies Inc.，內徑為 75 μm，外徑為 375 μm，
- (7) 總長為 50 cm，有效長度為 40 cm。
- (8) 超音波震盪器型號為 BRANSON 1510，購自美國。

## 三、標準品與背景電解質配置

背景電解質是使用磷酸與磷酸二氫鈉調配而成的緩衝溶液，首先將磷酸與磷酸二氫鈉各配製 10 mM，混合並調整至所需 pH 值，再將十二烷基硫酸鈉粉末溶於緩衝溶液中。樣品緩衝溶液是以磷酸二氫鈉與磷酸氫二鈉配製而成，首先配置 100 mM 的磷酸二氫鈉與磷酸氫二鈉，將兩者混合並調整到所需 pH 值。色胺酸、酪胺鹽、腎上腺素、去甲腎上腺素、皆溶於 1M 鹽酸與超純水中，母液的濃度皆為 10 mM；5-羥基色胺酸、多巴胺鹽酸鹽、血清素皆溶於超純水中，母液的濃度皆為 10 mM，並配製於褐色離心管中，保存於溫度為 4°C 的冰箱內。實驗時以超純水稀釋至 10 μM，即可上機偵測。

## 四、真實樣品前處理與配置

尿液中的基質干擾會使分析物不容易被偵測到，為了減少基質的干擾，參考 Guo<sup>[10]</sup> 所使用的方法並稍加改良，方法如下：

收集人體新鮮尿液，取 400  $\mu\text{L}$  的尿液與 800  $\mu\text{L}$  的乙腈混合，12000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液 1100  $\mu\text{L}$  進行過膜(0.22  $\mu\text{m}$ )去除雜質，再將過膜後的樣品放置在吹氮氣濃縮加熱裝置進行濃縮，實驗時以樣品緩衝溶液 400  $\mu\text{L}$  回溶並稀釋即可上機偵測。

## 五、毛細管電泳實驗流程

新毛細管進行實驗之前，先以 0.5 M NaOH 注射 10 秒，再以 1 kV 電流進行 2 小時活化，即可進行實驗。實驗前注射緩衝溶液 10 秒，以虹吸的方式進樣後上機偵測，進樣高度差為 20 公分，再快速的放入緩衝溶液中，以 -15 kV 電壓進行分離。最後注射緩衝溶液 10 秒後，即可進行下次的實驗。每日最後一次偵測結束後，注射 10 秒超純水，最後並將毛細管兩端浸泡在超純水中。

## 六、線上濃縮機制

本篇分離機制是在低 pH 值下進行，如圖 2，我們先注射含有 SDS 的背景電解質(圖 2A)，再以流體進樣的方式進樣 60 秒 (圖 2B)。進樣完畢之後，將注射端迅速放入含有 SDS 的背景電解質中，開啟高電壓(-15 kV)，因為電滲流是反向的，會使分析物滯留時間加長，而達到濃縮，此時背景電解質中 SDS 微胞帶負電會受到正極吸引(圖 2C)，之後會根據分析物的分配係數決定遷移順序，且 SDS 微胞受正極吸引效果大於電滲流，所以最後分析物還是會被帶往偵測端進行偵測(圖 2D)。

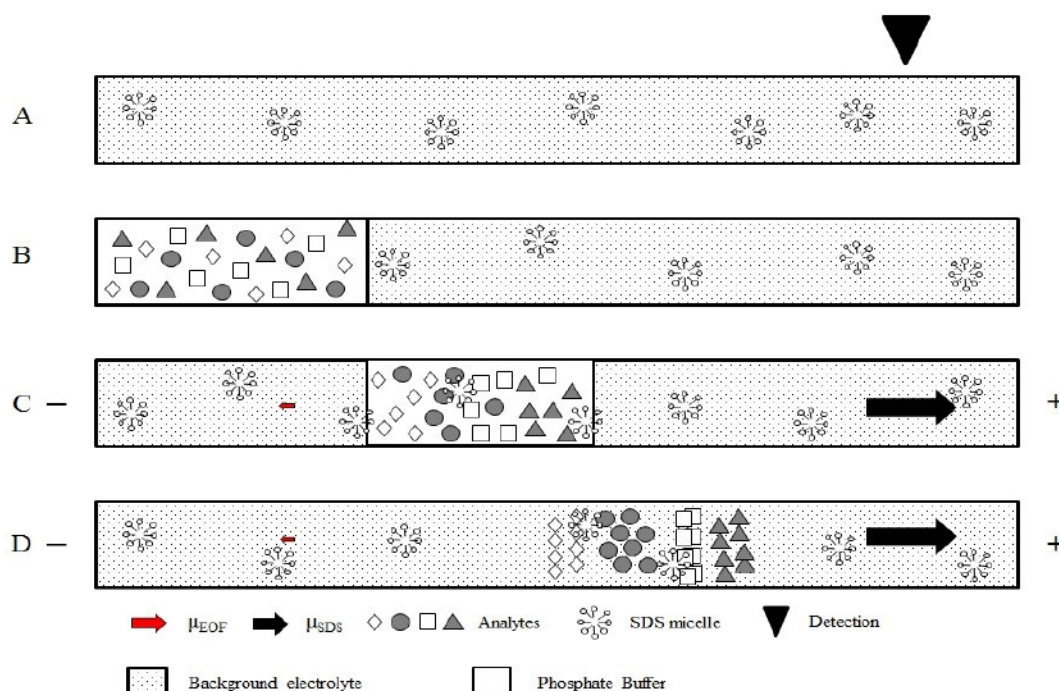


圖 2 在 MEKC 模式下對生物胺進行分離及偵測

註：(A)毛細管填充含 SDS 的背景電解質。(B)從負極端以虹吸原理將樣品溶液引入毛細管。(C)開啟負高電壓供應器。(D)分析物與 SDS 微胞結合並朝正極移動，開始分離並偵測。

## 肆、結果與討論

### 一、BGE 不同 pH 值的影響

在本實驗中，固定磷酸緩衝溶液的濃度為 10 mM，並調配出 pH 2.0 至 pH 3.5 的磷酸緩衝溶液或磷酸溶液，內含 20 mM 的十二烷基硫酸鈉( SDS )，電壓設定為 -15 kV、波長 200 nm，進行實驗。隨著 pH 值的提高，遷移時間隨之增加。主要原因可能是因為隨著 pH 值上升，使得毛細管壁有更多的矽醇基解離，可以吸附更多的陽離子，使得電雙層更厚，溶液之間所產生的 Zeta 電位差大，故電滲流變大，以增加整個分析時間。本實驗主要探討背景電解質的 pH 值對於分析物遷移時間、分離效率及解析度的影響，分別探討 pH 2.0 – 3.5，由於背景電解質中 10 mM 磷酸溶液 pH 值為 2.3，故以 1 M HCl 加入磷酸溶液中，調整磷酸溶液至 pH 2.0，內含 20 mM SDS 作為背景電解質，開始電泳。從圖 3 中可以發現 pH 值越高遷移時間越慢，分離效率越好，但是大於 pH 2.5 以上分離效率不好(表 2)，pH 2.0 的分離時間較長且第六支分析物峰值明顯降低，所以最後選擇 pH 值 2.3 的磷酸溶液進行後續的探討。

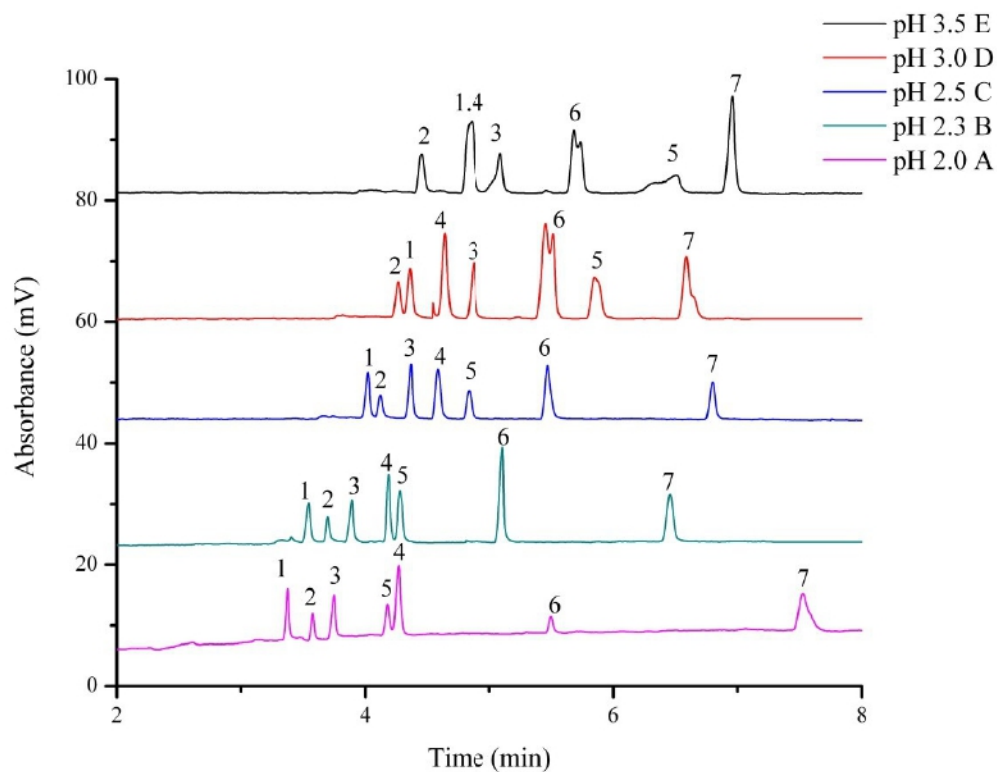


圖 3 BGE 不同 pH 值對分離七種生物胺訊號的影響。

註：背景電解質 pH 值分別為：(A) pH 2.0；(B) pH 2.3；(C) pH 2.5；(D) pH 3.0；(E) pH 3.5 的訊號。分析物訊號：1：色胺酸；2：血清素；3：5-羥基色胺酸；4：多巴胺；5：酪胺酸；6：腎上腺素；7：去甲腎上腺素。實驗條件：10 mM 背景電解質 20 mM SDS，4 mM 磷酸鹽緩衝溶液(pH 7.5)，分離電壓-15kV。

表 2 不同 pH 值之分離效率與峰高

pH	Efficiency ( $\times 10^4$ )				
	2.0	2.3	2.5	3.0	3.5
Trp	8.03	3.59	5.60	4.56	—
5-HT	5.47	5.83	4.07	4.36	3.50
5-HTP	6.00	5.23	10.30	6.79	5.30
DA	5.20	7.48	4.30	5.18	—
Tyr	6.04	4.40	5.61	2.45	0.38
Epi	8.67	9.03	5.29	1.31	1.79
NE	4.05	4.64	9.47	5.87	7.45

pH	Peak height (mV)				
	2.0	2.3	2.5	3.0	3.5
Trp	8.253	6.391	7.443	7.916	—
5-HT	4.437	4.081	3.714	5.719	6.197
5-HTP	6.990	6.885	8.804	9.128	6.453
DA	11.408	10.922	8.104	13.882	—
Tyr	5.043	8.289	4.628	6.787	2.882
Epi	2.681	15.608	8.735	15.580	10.367
NE	6.022	7.695	6.023	10.274	15.905

## 二、 BGE 中不同濃度的十二烷基硫酸鈉的影響

分析物會與十二烷基硫酸鈉(SDS)產生的微胞作用，十二烷基硫酸鈉為陰離子界面活性劑，通以負電壓進行電泳分析，因為負電的關係，電滲流的流動方向相反而產生堆積。實驗分別探討 10 mM、15 mM、20 mM、25 mM 和 30 mM 的 SDS 濃度，如圖 4，當濃度在 15 mM 以下時，分析物分離不好，可能是微胞剛形成與分析物的作用力不大，大於 15 mM 之後，可從表 3 得知分析物的分離效率大大提升，濃度在 25 mM 之後的分離及高度都接近、分離時間不再加快，比較分析表 3 中的相關數據後，最後選擇 25 mM SDS 進行後續的實驗探討。

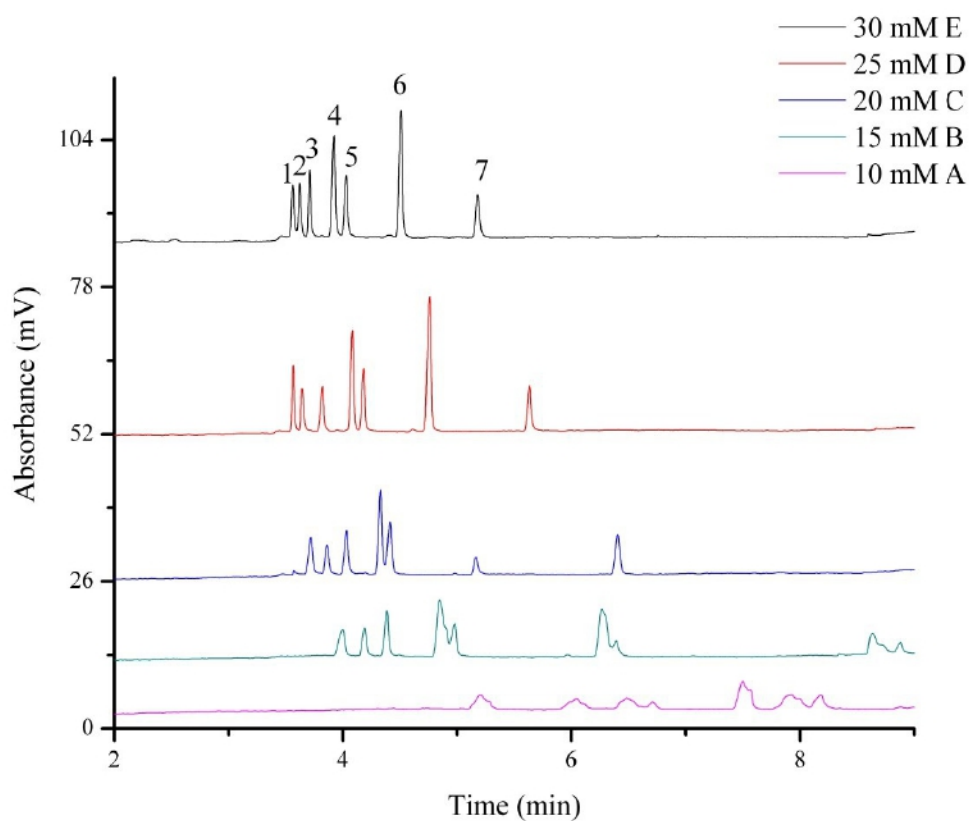


圖 4 BGE 中不同濃度的十二烷基硫酸鈉之影響。

註：添加的十二烷基硫酸鈉之濃度分別為：(A) 10 mM；(B) 15 mM；(C) 20 mM；(D) 25 mM；(E) 30 mM。其他實驗條件請參考圖 3B。



表 3 不同 SDS 濃度之分離效率與解析度

SDS (mM)	Efficiency ( $\times 10^4$ )				
	10	15	20	25	30
Trp	0.77	2.16	3.96	12.24	6.64
5-HT	0.92	4.22	5.16	9.36	6.87
5-HTP	1.12	6.65	5.63	6.24	9.47
DA	2.02	1.68	8.00	9.02	8.10
Tyr	1.07	3.81	5.57	7.48	6.77
Epi	4.79	2.80	9.23	7.85	6.91
NE	14.51	6.45	8.40	13.56	7.62
SDS (mM)	Resolution				
	10	15	20	25	30
Trp/5-HT	3.442	2.065	1.967	1.634	1.106
5-HT/5-HTP	1.778	2.575	2.534	3.319	3.319
5-HTP/DA	4.456	4.277	4.596	4.581	4.091
DA/Tyr	1.661	1.052	1.239	1.735	1.944
Tyr/Epi	1.127	10.237	10.564	8.943	7.577
Epi/NE	7.244	16.632	15.904	13.539	9.721

### 三、 樣品中磷酸緩衝溶液不同 pH 值的影響

這部分探討樣品中磷酸緩衝溶液 pH 值對分析物之遷移時間的影響，pH 值的變化範圍為 6.5 – 8.5，由圖 5 可知樣品緩衝溶液 pH 值並不會影響遷移時間，可能是因為標準品是鹽酸鹽，標準品溶液 pH 值過低，因此我們加入調整的緩衝溶液是無法影響其 pH 值，故依舊採用 pH 7.5 的磷酸緩衝溶液進行後續實驗。

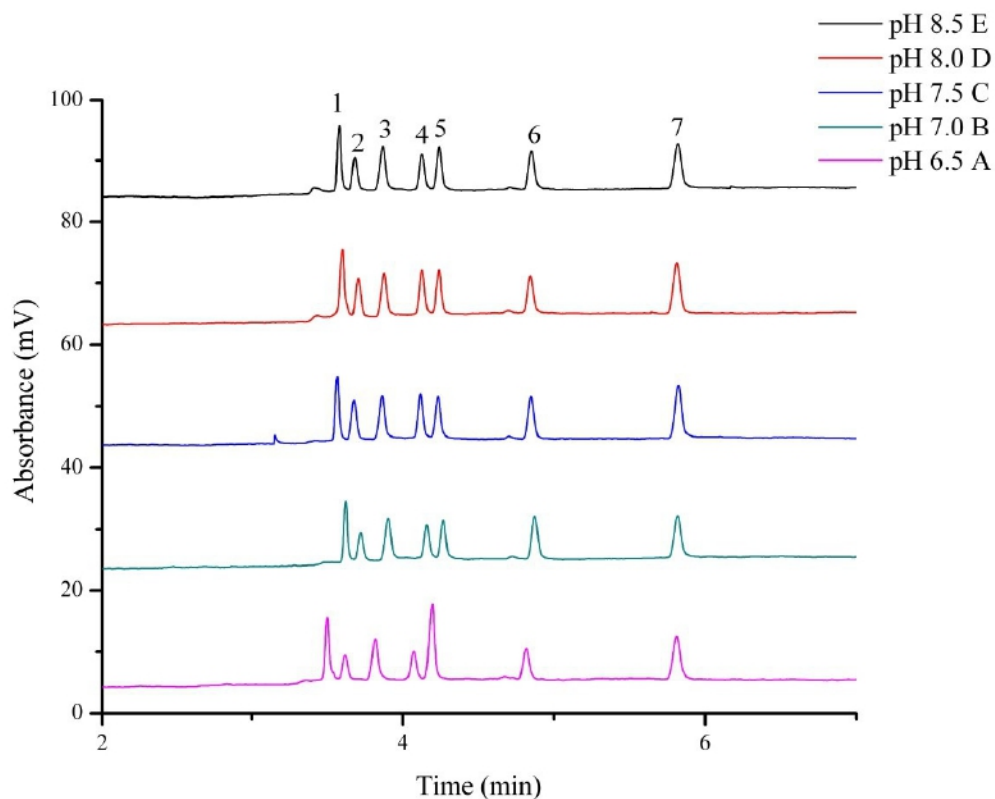


圖 5 樣品中磷酸鹽緩衝溶液不同 pH 值的影響。

註：磷酸鹽緩衝溶液 pH 值分別為：(A) 6.5；(B) 7.0；(C) 7.5；(D) 8.0；(E) 8.5。其他實驗條件請參考圖 4D。

#### 四、 樣品中磷酸緩衝溶液不同濃度的影響

本實驗探討磷酸緩衝溶液濃度的變化範圍為 2 mM 到 10 mM，實驗結果如圖 6 和表 4 所示。隨著磷酸緩衝溶液的濃度增加，離子強度隨著增強，因為離子強度差，而產生電導度不同的區域，由圖 6 可以看出在 6 mM 以上的濃度的堆積效果不好，而產生拖尾(peak tailing)現象。6 mM 以下的濃度，隨著濃度增加，分離時間減少，我們可以從表 4 得知磷酸緩衝溶液濃度為 6 mM 有較佳的分離效率，因此探討的最佳化的條件為 6 mM 磷酸緩衝溶液。

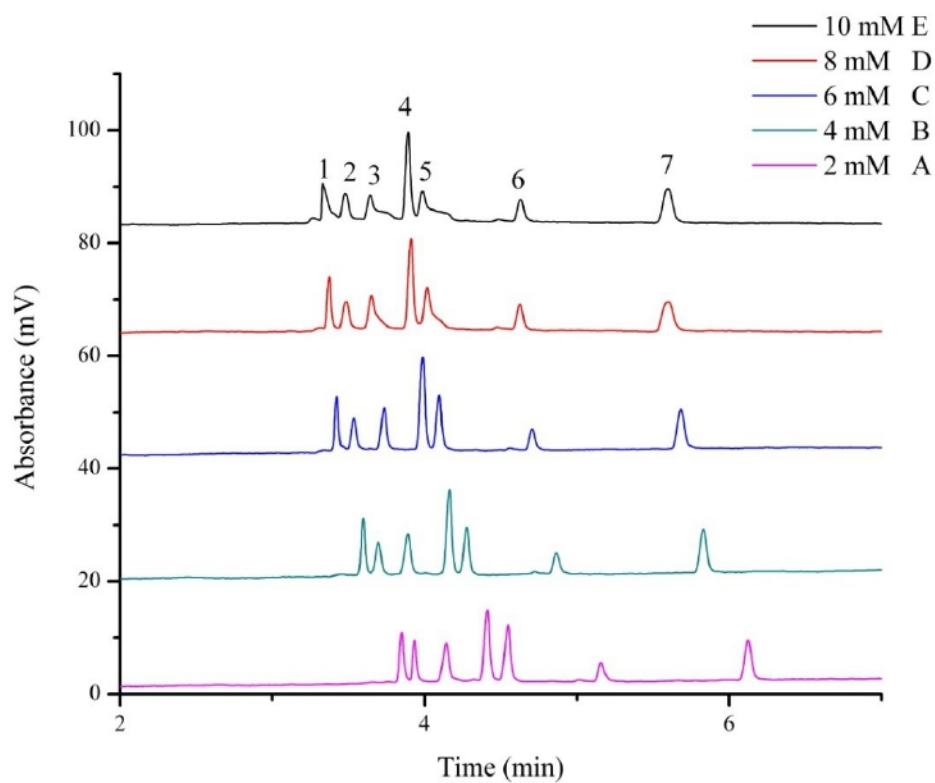


圖 6 樣品中磷酸鹽緩衝溶液不同濃度的影響。

註：磷酸鹽緩衝溶液濃度分別為：(A) 2 mM；(B) 4 mM；(C) 6 mM；(D) 8 mM；(E) 10 mM。其他實驗條件請參考圖 5C。

表 4 不同磷酸鹽緩衝溶液濃度的分離效率與解析度

PBS (mM)	Efficiency ( $\times 10^4$ )				
	2	4	6	8	10
Trp	6.90	7.17	6.34	4.86	3.17
5-HT	9.07	4.01	3.58	2.49	2.48
5-HTP	4.38	3.73	3.99	3.20	2.71
DA	5.88	6.11	5.51	4.38	5.24
Tyr	7.50	6.44	5.81	3.30	2.80
Epi	7.91	5.04	5.32	5.14	5.15
NE	6.86	5.50	5.70	2.46	3.35

PBS (mM)	Resolution				
	2	4	6	8	10
Trp/5HT	1.32	1.62	1.74	1.50	1.82
5-HT/5-HTP	2.54	2.46	2.63	1.94	1.86
5-HTP/DA	3.39	3.54	3.60	3.39	3.23
DA/Tyr	1.74	1.65	1.59	1.28	1.13
Tyr/Epi	8.49	8.31	8.15	7.17	7.31
Epi/NE	11.47	10.75	11.07	8.73	9.52

## 五、進樣時間探討

進樣時間影響了分析物的解析度和靈敏度。我們以含有 7 支生物胺的混合溶液做測試 (10  $\mu$ M)，在一個 20 公分的高度差以流體力學注入毛細管，探討注射 30 秒到 150 秒的效果。結果發現 30 秒到 120 秒進樣體積的增加，可以增加濃縮的倍率，且由於注射時間的增加，需要更多的時間疊加分析物，150 秒雖然峰高有略為增加，但是峰寬開始變大，沒有明顯的濃縮效果。注射 120 秒有效率的提高靈敏度，並對分離效率沒有太大的影響，如圖 7。

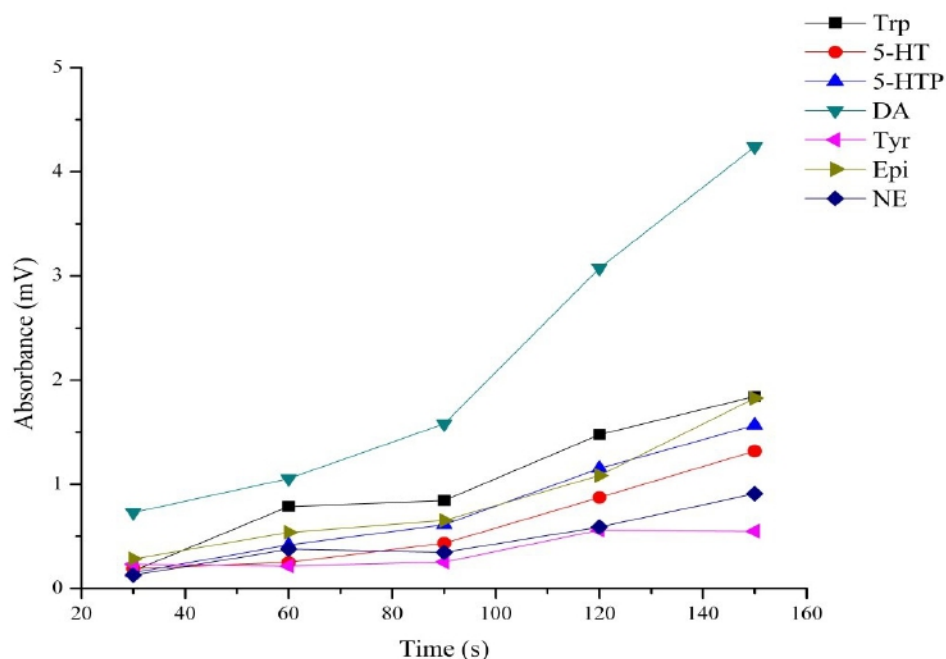


圖 7 進樣時間探討。

註：探討之進樣時間分別為：30、60、90、120、150 秒。其他實驗條件請參考圖 6 C。

## 六、最佳化條件

從以上的條件探討，可以找到實驗的最佳化條件，如表 5 所示。

表 5 實驗最佳化條件

偵測波長	200 nm
磷酸 pH 值	2.3
SDS 濃度	25 mM
磷酸濃度	10 mM
磷酸鹽緩衝溶液濃度	6 mM
磷酸鹽緩衝溶液 pH 值	7.5
電壓	-15 kV
進樣時間	120 s
毛細管長度	總長 50 cm (有效長度 40 cm)
毛細管規格	內徑 75 $\mu\text{m}$ ，外徑 375 $\mu\text{m}$

## 七、線性、偵測極限與其他方法比較

將上述實驗所得到的最佳分離條件列於表 5。應用此條件可在 7 分鐘內完全分離七種生物胺。使用此最佳化條件，找出七種標準品的線性範圍，結果如圖 8 和表 6 並與其他方法比較列於 7。七種生物胺之 60 秒的線性範圍在 0.2 – 5.0  $\mu\text{M}$  (色胺酸、血清素、5-羥基色胺酸、多巴胺)，0.3 – 5.0  $\mu\text{M}$  (酪胺酸、腎上腺素、去甲腎上腺素)，其 LOD 介於 0.039 (多巴胺) – 0.154  $\mu\text{M}$  (酪胺酸)，以訊號/雜訊比為 3 所對應的濃度定義為偵測極限。

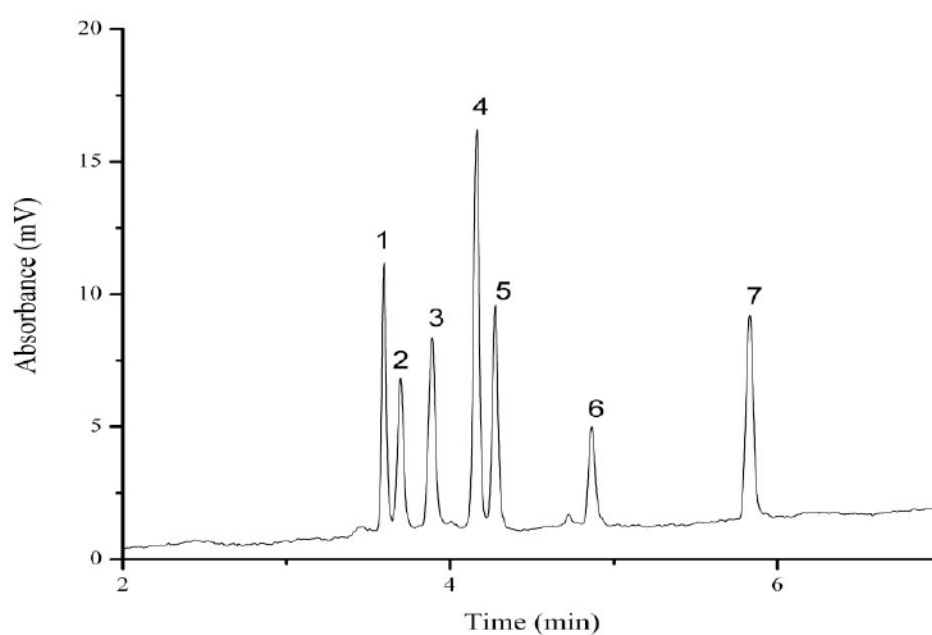


圖 8 最佳化條件之電泳圖。

註：分析物之分離訊號分別為：1：色胺酸；2：血清素；3：5-羥基色胺酸；4：多巴胺；5：酪胺酸；6：腎上腺素；7：去甲腎上腺素。實驗條件請參考表 5。

表 6 本方法之線性範圍、相關係數、偵測極限及濃縮倍率

分析物	線性範圍 ( $\mu\text{M}$ )	$R^a$	LOD ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	Enhancement factor <sup>c</sup>
Trp	0.2-5.0	0.998	0.092	6
5-HT	0.2-5.0	0.998	0.082	11
5-HTP	0.2-5.0	0.999	0.059	9
DA	0.2-5.0	0.998	0.039	6
Tyr	0.3-5.0	0.987	0.154	5
Epi	0.3-5.0	0.993	0.067	9
NE	0.3-5.0	0.999	0.091	10

註：<sup>a</sup> 相關係數；<sup>b</sup> 偵測極限：S/N = 3；<sup>c</sup> 濃縮倍率

表 7 本方法與其他方法之比較

方法	分析物	Time (min)	LOD ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	參考文獻
FASI-CZE-UV	5-HT, DA, Tyr, Epi, T, TA	< 24	0.01-0.15	[2]
MLC <sup>a</sup>	DA, Epi, NE	< 25	0.11 – 0.13	[3]
MEPS-HPLC-ED	5-HT, DA, NE	< 23	0.01-0.1	[5]
CZE-UV	Trp, 5-HT, DA, TA, 3-MT, HMBA, NMN, DL-dopa, Catechol, 5-HIAA, VMA, 3-IXS	< 20	0.014-0.313	[6]
CZE-CL	DA, Epi, NE	< 8	0.089-0.1	[9]
NAMCE-LIF	DA, Epi, NE	< 1	1.36-3.26	[10]
MEKC-UV	Trp, 5-HT, 5-HTP, DA, Tyr, Epi, NE	< 7	0.039-0.154	This work

註：<sup>a</sup> 微胞液相層析法；<sup>b</sup> 偵測極限

## 八、真實樣品

收集人體新鮮尿液，取 400  $\mu\text{L}$  的尿液與 800  $\mu\text{L}$  的乙腈混合，12000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液 1100  $\mu\text{L}$  進行過膜(0.22  $\mu\text{m}$ )去除雜質，再將過膜後的樣品放置在吹氮氣濃縮加熱裝置進行濃縮，實驗時以樣品緩衝溶液 400  $\mu\text{L}$  回溶並稀釋即可上機偵測。但是由於真實樣品注射超過 60 秒會使基線蓋過分析物訊號，故真實樣品以 60 秒為注射時間，結果如圖 9。

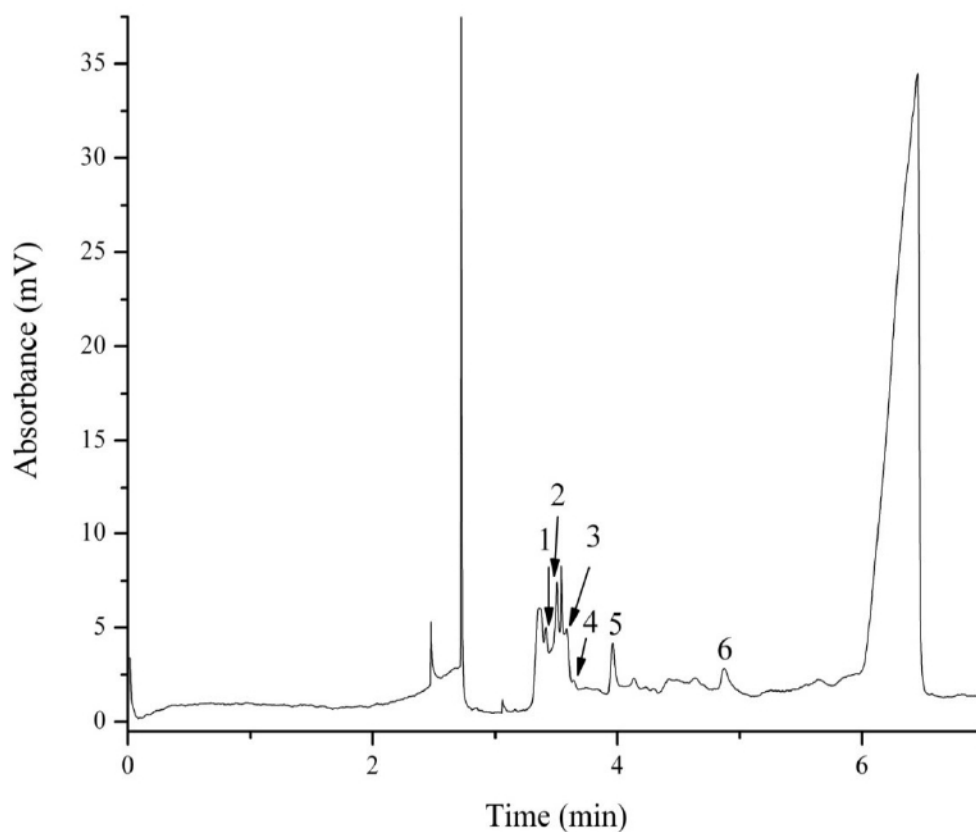


圖 9 真實樣品—尿液之電泳圖。

註：分析物之分離訊號分別為：1：色胺酸；2：血清素；3：5-羥基色胺酸；4：多巴胺；5：酪胺酸；6：腎上腺素。實驗條件請參考表 5。



## 伍、結論

本研究利用運用微胞電動力層析法線上掃集生物胺，可在 7 分鐘內分離並偵測七種生物胺（色胺酸, Trp、血清素, 5-HT、5-羥基色氨酸, 5-HTP、多巴胺, DA、酪胺酸, Tyr、腎上腺素, Epi、去甲腎上腺素, NE）。

最佳分離條件為 10 mM 磷酸溶液 (pH 2.3)，添加 25 mM 十二烷基硫酸鈉當作背景電解質，6 mM 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 7.5)，內徑 75  $\mu\text{m}$ 、總長為 50 cm (有效長度 40 cm) 的毛細管，進樣 60 秒，偵測波長為 200 nm，以 -15 kV 進行電泳在 7 分鐘內完成偵測七種分析物。其線性範圍在 0.2~5.0  $\mu\text{M}$  (Trp)、0.2~5.0  $\mu\text{M}$  (5-HT、5-HTP、DA) 及 0.3~5.0  $\mu\text{M}$  (Tyr、Epi、NE)、偵測極限介於 0.039 ~ 0.154  $\mu\text{M}$ ，且 R 值皆在 0.99 以上。

本實驗建立一種簡單且快速的方法，沒有複雜的樣品前處理及取樣容易，只需 7 分鐘即可偵測完畢，可以應用在偵測尿液中生物胺的含量，未來也可望用於偵測酒類中的生物胺。

## 參考資料

- Diao, P., Yuan, H., Huo, F., Chen, L., Xiao, D., Paau, M. C., & Choi, M. M. (2011). *Talanta*, 85(3), 1279-1284.
- Bacaloni, A., Insogna, S., Sancini, A., Ciarrocca, M., & Sinibaldi, F. (2013). *Biomedical Chromatography*, 27(8), 987-993.
- Ferrer, D. G., García, A. G., Peris-Vicente, J., Gimeno-Adelantado, J. V., & Esteve-Romero, J. (2015). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(30), 9009-9018.
- Ferry, B., Giftu, E. P., Sandu, I., Denoroy, L., & Parrot, S. (2014). *Journal of Chromatography B*, 951, 52-57.
- D. Oppolzer, I. Moreno, B. da Fonseca, L. Passarinha, M. Barroso, S. Costa, J.A. Queiroza, & E. Gallardo. (2013). *Biomedical Chromatography*, 27(5), 608-614.
- Hsieh, M. M., Lin, E. P., & Huang, S. W. (2012). *Talanta*, 88, 638-645.
- Liu, W. L., Hsu, Y. F., Liu, Y. W., Singco, B., Chen, S. W., Huang, H. Y., & Chin, T. Y. (2012). *Electrophoresis*, 33(19-20), 3008-3011.
- Lin, T. H., Lu, C. Y., & Tseng, W. L. (2013). *Electrophoresis*, 34(2), 297-303.
- Xu, X., Zhang, H., Shi, H., Ma, C., Cong, B., & Kang, W. (2012). *Analytical Biochemistry*, 427(1), 10-17.
- Hu, H., Li, Z., Zhang, X., Xu, C., Guo, Y. (2013). *Journal of Separation Science*, 36(20), 3419-3425.
- Lv C, Li Q, Liu X, He B, Sui Z, Xu H, Yin Y, Liu R, & Bi K (2015). *Journal of Mass Spectrometry*, 50, 354-363.
- Mateva, L. V., Sv. Petrov, S., St. Lozanov, V., Elenkova, A. P., Zacharieva, S., & Iv. Mitev, V. (2008). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(14), 2128-2140.
- Kanamori, T., Isokawa, M., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2015). *Journal of Chromatography B*, 985, 142-148.
- Fang, H., Pajski, M. L., Ross, A. E., & Venton, B. J. (2013). *Analytical Methods*, 5(11), 2704-2711.
- Zdena, M., Gebauer, P., & Boček, P. (2011). *Electrophoresis*, 32(1), 116-126.