

國立台東大學生命科學研究所
碩士論文

指導教授：胡焯淳 博士

毛細管電泳應用於藥品及農藥之分析



研究生：蔡郁嫻 撰

中華民國九十六年七月

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 蔡郁嫻 君

所提之論文 毛細管電泳應用於藥品及農藥之分析

業經本委員會通過合於 ☒ 碩士學位論文 條件
☐ 博士學位論文

論文學位考試委員會：

劉春櫻

(學位考試委員會主席)

張煥宗

胡輝淳

(指導教授)

論文學位考試日期：96 年 6 月 13 日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立台東大學 生命科學研究所
 組 96 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。
論文名稱： 毛細管電泳應用於藥品及農藥之分析

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予下列單位：

同意	不同意	單 位
☐	☒	國家圖書館
☒	☐	本人畢業學校圖書館

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為： ，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
☒	☐	☐	☐

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：胡煒淳 (親筆簽名)

研究生簽名：蔡郁嫻 (親筆正楷)

學 號：9400813 (務必填寫)

日 期：中華民國 96 年 7 月 24 日

1. 本授權書 (得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載) 請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2. 依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議: 研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本 2005/06/09

致謝辭

首先誠摯的感謝指導教授胡焯淳 博士及張煥宗 博士，兩位老師悉心的教導使我得以一窺化學分析領域的深奧，不時的討論並指點我正確的方向，使我在這兩年中獲益匪淺。感謝劉春櫻 教授審查並參與我的論文口試，老師對學問的嚴謹更是我輩學習的典範。

本論文的完成另外亦得感謝馬偕紀念醫院台東分院的白明忠 醫師及台東農改場的謝進來 博士大力協助，使得本研究的實驗條件可以應用於真實樣品上，驗證其可行性。生科所助理 惠嵐對我的問題都能細心的一一答覆。因為有你們的體諒及幫忙，使得本論文能夠更完整而嚴謹。

兩年裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，感謝各位學弟妹的共同砥礪，你們的陪伴讓兩年的研究生生活變得絢麗多彩。

感謝台大實驗室的學長姐、同學和學弟妹的照顧，柏齡學長指導我實驗技巧，關心我什麼時候畢業，常常麻煩秋玲學姊帶我去好吃的東西。感恩于鈞(學長/學弟)辛苦的管理實驗室的電腦，幫忙完成老師交辦的事情，且總能在我電腦有問題時為我解決，也感謝玟伶、青苓的鼓勵及幫忙，恭喜我們順利走過這兩年。一起討論人生大代誌的彩娥還有幫忙論文校稿及準備口試用品的文璋和姿羽當然也不能忘記，從你們的身上，我獲益良多。還有很多貴人，在生活上適時給我一個方向及幫助，多謝你們。

家人在背後的默默支持更是我前進的動力，沒有你們的體諒、包容，相信這兩年的生活將是很不一樣的光景。也感謝奶奶千里迢迢從高雄送資料到台東來，讓我能順利申請到獎學金，在生活上不虞匱乏。

最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親。

毛細管電泳應用於藥品及農藥之分析

蔡郁嫻

國立台東大學生命科學研究所

摘要

本實驗以毛細管電泳連接螢光偵測器為分析方法，對藥品及農藥進行分離及檢測。在藥品方面分離 ofloxacin 異構物，使用 50 mM 的磷酸緩衝溶液 (pH 2.30) 添加 60 mM 的 HP- β -CD 的條件下分離 ofloxacin，解析度大於 2，對 levofloxacin 最低之偵測極限為 10^{-8} M。對 levofloxacin 的標準品定量範圍可從 10^{-7} M $\sim$ 5×10^{-3} M, $R^2=0.9989$ 。對添加在尿液中的 levofloxacin 定量線性範圍從 5×10^{-6} M 至 5×10^{-3} M 之間， $R^2=0.9943$ 。應用在藥物的不純度判別上，一顆藥錠中約含有 93 毫克的 levofloxacin，R(+)-ofloxacin : levofloxacin 為 0.1 : 99.9。應用在服用藥物病人的尿液檢測藥物含量上，可發現尿液中 levofloxacin 含量約為 7.9×10^{-4} M，且 levofloxacin : R(+)-ofloxacin 99.35 : 0.65。此外，實驗中也提出在動相緩衝溶液中添加幾丁聚醣 (chitosan) 及金屬離子的檢測方式，發現添加濃度為 5×10^{-7} (W/V) 的幾丁聚醣及 5×10^{-8} M 的 Cu^{2+} 時，分離效果比單獨只有 HP- β -CD 時略佳，將來可朝向添加其他的金屬離子研究是否會有更佳的分離效果。

在農藥方面，開發以陽離子界面活性劑分離偵測五種農藥（加保利、貝芬替、奈乙醯胺、奈乙酸和腐絕）的分析方法，最佳的分離條件為 15 mM 磷酸緩衝溶液（pH 6.47）添加 15 mM CTAB 和 10 % 正丙醇，並以 10 mM 和 5 mM HP- β -CD 分別添加在緩衝溶液和樣品中作為螢光增強劑，使用 -25 kV 進行電泳時，可在 13 分鐘內完成所有的分離，偵測極限最低可達 0.06 ppm（加保利），最高為 0.191 ppm（貝芬替）。應用在六種自然界的水質樣品上，無特殊前處理步驟，可在無干擾的狀態下，偵測加保利、奈乙醯胺、腐絕及奈乙酸皆達到 10^{-6} M，貝芬替最低可偵測到 5×10^{-6} M，回收率從 93.5 % 至 118.4 %。應用在市面上的農藥（立倍利）偵測上，可成功的偵測及定量出加保利，以甲醇為溶劑時所測得的加保利含量符合農藥上所標示的含量。驗證此分析方法及條件可應用在水質及農藥成品上的偵測及定量。

關鍵詞： levofloxacin，毛細管電泳，螢光，農藥，陽離子界面活性劑

Analysis drug and pesticides with capillary electrophoresis

Tsai Yu-Hsien

Abstract

PART I In this study, we developed an analytical method for the enantioseparation of ofloxacin, using capillary electrophoresis with fluorescence detector. The optimum separation conditions were obtained with 60 mM hydroxylpropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) dissolved in 50 mM phosphate buffer at pH 2.30. Under these conditions, the (+) and (-) forms could be completely separated and the detection limit of levofloxacin in distilled water was 1×10^{-8} M. The linear ranges of levofloxacin were 1×10^{-7} to 5×10^{-3} M with $R^2=0.9989$ and 5×10^{-6} to 5×10^{-3} M with $R^2=0.9943$ in DI water and untreated urine, respectively. We also applied this method to investigate the purity of the commercial drug. The results revealed that the ratio between R(+)-ofloxacin and S(-)-ofloxacin (levofloxacin) was 0.1: 99.9, and there is about 93mg levofloxacin per tablet (100mg). The concentration of levofloxacin in patient's urine was founded to be 7.9×10^{-4} M, and the ratio between the two optical isomers was 99.3: 0.7.

PART II In this study, we developed an analytical method for five pesticides (CAR, NAD, TBZ, NAA and CAB) by using micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). The optimum separation conditions for MEKC were 15 mM phosphate buffer (pH 6.47),

15 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and excitation wavelength is 280 nm, emission wavelength is 336 nm by fluorescence detector. We also found that 10 mM HP- β -CD added in running buffer and 5 mM HP- α -CD added in sample solution could increase fluorescence signal from 8 to 38 %. Under this condition, these pesticides were separated for less than 13 min and the detection limits in distilled water were 3×10^{-7} M (NAD, CAR, NAA), 5×10^{-7} M (TBA) and 5×10^{-6} M (CAB) respectively. The linear ranges of five pesticides were 5×10^{-7} M to 1×10^{-4} M (NAD, CAR, NAA), 1×10^{-6} M to 1×10^{-4} M (TBZ) and 5×10^{-6} M to 7×10^{-5} M (CAB) with R^2 all larger than 0.995. This method was applied to not only the analysis of the residual pesticides in nature water without pretreatment but also the analysis of commercial insecticide (carbaryl). The results revealed that the recovery ranged from 93.5 to 118.4 % for different nature water samples and the carbaryl contains in commercial insect ides was about 85.8 %.

Keywords: levofloxacin, capillary electrophoresis, fluorescence, pesticides, cationic surfactant.

總目錄

中文摘要	i
英文摘要	iii
表目錄	viii
圖目錄	ix
縮寫全文對照	xiii

第一部分 以毛細管電泳分析尿液中的 ofloxacin

第一章 緒論	
一、前言	1
二、文獻回顧	2
三、毛細管電泳簡介	10
(一) 電淌度	10
(二) 電滲流	11
(三) 毛細管區帶電泳	13
(四) 對掌選擇劑	14
第二章 材料與方法	
一、儀器	16
二、藥品與溶液	17
三、樣品配製	17
四、毛細管電泳實驗流程	18
第三章 結果與討論	
一、pH 值對螢光的影響	19
二、HP- β -CD 濃度對螢光的影響	20
三、添加幾丁聚醣及金屬離子對分離異構物的影響	21
四、定量	23

五、應用	24
(一) 藥物不純度	24
(二) 病人尿液中藥品定量	25
第四章 結論	27
第五章 參考文獻	28

第二部分 以毛細管電泳分析疑似環境荷爾蒙之農藥

第一章 緒論	
一、前言	44
(一) 加保利	45
(二) 貝芬替	48
(三) 腐絕	48
(四) 奈乙醯胺	52
(五) 奈乙酸	52
二、文獻回顧	53
三、微胞電動層析	65
(一) 微胞電動層析簡介	65
(二) 陽離子界面活性劑	65
第二章 材料與方法	
一、儀器	68
二、藥品與溶液	69
三、實際樣品配製	70
四、毛細管電泳實驗流程	70
第三章 結果與討論	
一、pH 值對螢光的影響	72
二、界面活性劑種類及濃度對分離度的影響	73
三、緩衝溶液的濃度對分離度的影響	75

四、有機溶劑的種類與濃度對螢光強度及分離的影響	76
五、電壓對分離的影響	77
六、添加 HP- β -CD 對螢光增強的影響	77
七、定量	79
八、應用	80
(一) 自然界水質的檢測	80
(二) 商業農藥(立倍利)之偵測	81
第四章 結論	83
第五章 參考文獻	84



表目錄

第一部分 以毛細管電泳分析尿液中的 ofloxacin

Table 1. The analysis conditions collected from reference papers	6
Table 2. The pH value and the resolution of ofloxacin at different concentrations of chitosan	31
Table 3. Effect of various metal ions at different concentrations on resolution of racemic ofloxacin	32
Table 4. Analytical parameters of the proposed method	33

第二部分 以毛細管電泳分析疑似環境荷爾蒙之農藥

Table 5. The analysis conditions collected from reference papers	60
Table 6. Optimum conditions for capillary electrophoresis experiment	88
Table 7. The linear range, LOD, LOQ and linear range of the proposed method	89
Table 8. Recovery values of pesticides in different water sample	90

圖目錄

第一部分 以毛細管電泳分析尿液中的 ofloxacin

Fig. 1. Structure of ofloxacin.	1
Fig. 2. Cravit that we used in this study is the pastille type.	2
Fig. 3. Development of the electroosmotic flow.	12
Fig. 4. Separation mechanism of capillary zone electrophoresis.	14
Fig. 5. (a) two-dimensional (b) three-dimensional structure of HP- β -CD	15
Fig. 6. Structure of chitosan	21
Fig. 7. Fluorescence intensity of ofloxacin at various pH value of the phosphate buffer.	34
Fig. 8. Enantioseparation of ofloxacin in various concentration of HP- β -CD and phosphate buffer (50 mM) at pH 2.30.	35
Fig. 9. Effect of HP- β -CD at different concentrations on resolution of racemic ofloxacin.	36
Fig. 10. Fluorescence intensity of ofloxacin at different concentration of HP- β -CD.	37
Fig. 11. Fluorescence intensity of ofloxacin at different concentration of HP- β -CD.	38
Fig. 12. Electropherograms of racemic ofloxacin in 50 mM phosphate with different concentration of chitosan.	39
Fig. 13. Electropherograms of racemic ofloxacin 50 mM phosphate buffer with	40

5 mM HP- β -CD , 5×10^{-7} (w/v) chitosan and various metal ions.

Fig. 14. Electropherograms of the commercial drug.	41
Fig. 15. Electropherograms of (a) urine from a healthy person; (b) urine from a patient diluted 10 times; (c) urine from a patient diluted 10 times and spiked with 5×10^{-5} M ofloxacin .	42
Fig. 16. The Standard addition method used to determinate the concentration of levofloxacin in patient's urine.	43

第二部分 以毛細管電泳分析疑似環境荷爾蒙之農藥

Fig. 17. Structure of carbaryl.	45
Fig. 18. The metabolism pathway of carbaryl.	46
Fig. 19. Structure of carbendazim.	48
Fig. 20. Structure of thiabendazole.	49
Fig. 21. The metabolism pathway of thiabendazole.	50
Fig. 22. Structure of 1-naphthylacetamide	52
Fig. 23. Structure of 1-naphthylacetic acid	52
Fig. 24. The EOF of MEKC	66
Fig. 25. Structure of cationic surfactants	67
Fig. 26. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer with 15 mM TTAB and 10 % n-propanol at various pH value.	91
Fig. 27. The fluorescence intensity of pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) .	92
Fig. 28. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer	93

(pH 6.47) with different surfactant and 10 % n-propanol.	
Fig. 29. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with different concentrations of CTAB and 10 % n-propanol.	94
Fig. 30. Electropherograms of the four pesticides in (a)5 mM; (b)15 mM; (c)20 mM; (d)30 mM; (e)45 mM phosphate buffer (pH 6.47) containing 15 mM CTAB and 10 % n-propanol.	95
Fig. 31. Electropherograms of the four pesticides in 15mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % (a) methanol ; (b) ethanol ; (c) n-propanol ; (d) iso-propanol ; (e) ACN.	96
Fig. 32. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and (a) 0 %; (b) 2 % ; (c) 6 % ; (d) 10 % ; (e)12 % n-propanol.	97
Fig. 33. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % n-propanol.	98
Fig. 34. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB, 10 % n-propanol, and (a) no HP- β -CD in sample and buffer; (b) 5 mM HP- β -CD in sample and no HP- β -CD in buffer; (c) 10 mM HP- β -CD in buffer and no HP- β -CD in sample; (d) 5 mM HP- β -CD in sample and 10 mM HP- β -CD in buffer.	99
Fig. 35. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % n-propanol, addition (a) 0 mM; (b) 5 mM; (c) 10 mM; (d) 15 mM; (e) 20 mM HP- β -CD.	100
Fig. 36. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer	101

(pH 6.47) with 15 mM CTAB, 10 mM HP- β -CD and 10 % n-propanol,

(a) 0 mM; (b) 5 mM; (c) 10 mM; (d) 15 mM HP- β -CD in sample.

Fig. 37. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in tap water. 102

Fig. 38. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 1. 103

Fig. 39. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 2. 104

Fig. 40. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 3. 105

Fig. 41. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 4. 106

Fig. 42. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 5. 107

Fig. 43. The commercial sample of carbaryl. 108

Fig. 44. Electropherograms of the commercial sample dissolved in (a) distilled water (b) methanol. 109

縮寫全文對照

ACN	acetonitrile
BAL	bronchoalveolar lavage
CAB	carbendazim
CAR	carbaryl
CD	cyclodextrin
CE	capillary electrophoresis
CEKC	capillary electrokinetic chromatography
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
CZE	capillary zone electrophoresis
DAD	diode array detector
DNA	deoxyribonucleic acid
DTAB	dodecyltrimethylammonium bromide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assays
EOF	electroosmotic flow
ESI	electrospray ionization
FI	flow injection
FL	fluorescence
GC	gas chromatography
HP- β -CD	hydroxylpropyl- β -cyclodextrin
HPLC	high performance liquid chromatography
HPTLC	high performance thin layer chromatography
IT	ion trap

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD ₅₀	lethal dose, 50 percent kill
LLE	liquid-liquid extraction
LOD	limited of detection
LOQ	limited of quantification
MAE	microwave-assisted extraction
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
MS	mass spectroscopy
MS/MS	tandem MS
NAA	1-naphthylacetic acid
NAD	1-naphthylacetamide
PAD	photodiode array detector
Ref.	reference
SFE	supercritical fluid extraction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPE	solid phase extraction
TBAA	tetrabutylammonium acetate
TBZ	thiabendazole
TEA	triethylamine
TTAB	trimethyl(tetradecyl)ammonium bromide
UV	ultraviolet

第一部份

偵測藥物

-以毛細管電泳分析尿液中的
ofloxacin

第一章 緒論

一、前言

Ofloxacin 是 氟 化 奎 林 酮 類 (fluoroquinolones) 的 一 種 , IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) 命名為

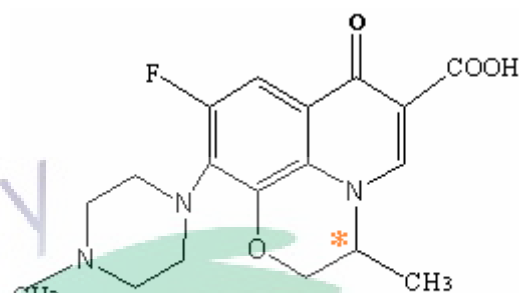


Fig. 1. Structure of ofloxacin.

9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7 H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid hemihydrate，結構如Fig. 1，有光學異構物存在，” * ”處為其對掌光學中心。氟化奎林酮類是人工合成的抗生素，主要抗菌機制是抑制細菌的DNA gyrase及type IV topoisomerase，使細菌無法進行DNA的轉錄及轉譯，抗菌範圍包括革蘭氏陽性菌及陰性菌。 ofloxacin常用於治療呼吸道、尿道、皮膚及全身性感染。研究顯示 ofloxacin 的左旋異構物 levofloxacin 具有較高的抗菌活性，是右旋的8-128倍^[1]，目前已有成藥”可樂必妥”在市面上販賣，見Fig. 2。



Fig. 2. Cravit that we used in this study is the pastille type. The diameter is about 0.81cm and each tablet contains 100 mg levofloxacin.

ofloxacin經由口服能快速的被人體吸收，人體中只能代謝很少量的ofloxacin，大約有87 %服入的藥物在48小時內會恢復為原來的形式從尿液中排泄，少於4 %的藥物會在72小時內從糞便中排出，只有少於5 %的藥物會代謝成desmethyl和 N-oxide代謝物從尿液中排出^[2]。

二、文獻回顧

文獻中偵測levofloxacin以高效能液相層析方法（high performance liquid chromatography, HPLC）居多。Wong 等人提出以單步驟液相萃取（liquid-liquid extraction, LLE）人類尿液及血漿中的levofloxacin，再以Inertsil C₁₈管柱採用逆相HPLC-UV偵測及定量levofloxacin，線性範圍（linear range）分別為0.08~5.18 µg/mL（血漿），23~1464 µg/mL（尿液）。並可使用ligand-exchange

操作模式將細胞液中 ofloxacin 的異構物分離^[3]。Wright 等人使用逆相 HPLC-UV 可在生長基質 (growth media) 中偵測到包含 ofloxacin 的三種奎林酮類抗生素，線性範圍為 0.0625~20 $\mu\text{g/mL}$ ^[4]。Böttcher 實驗團隊則是利用逆相 HPLC-FL 分析偵測軟組織、骨頭和血清中的 levofloxacin，線性範圍為 0.1~40 $\mu\text{g/mL}$ ，偵測極限 (limited of detection, LOD) 為 1 ng/mL (血清與膽汁)^[5]。Tsai 等人使用微透析和 HPLC 偵測老鼠血液和膽汁中的 levofloxacin，線性範圍為 0.1~5 $\mu\text{g/mL}$ ，偵測極限為 50 ng/mL^[6]。Stewart 實驗團隊提出使用固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 及 HPLC 的方法分離人類血漿中包含 levofloxacin 的氟化奎林酮類，levofloxacin 的線性範圍為 51.2~5069 ng/mL，偵測極限為 25 ng/mL，定量極限 (limited of quantification, LOQ) 為 51.2 ng/mL^[7]。Sowinski 等使用 HPLC 連接 UV 和螢光偵測器分離血漿中的包含 levofloxacin 的六種氟化奎林酮類，levofloxacin 在血漿中的線性範圍分別為 50~10000 ng/mL (UV)，20~5000 ng/mL (FL)^[8]。Mayer 實驗室提出以逆相 HPLC 連接螢光偵測器偵測血漿中的氟化奎林酮類，並與微透析萃取方法比較。levofloxacin 的線性範圍分別為 0.0156~5 $\mu\text{g/mL}$ (微透析)，0.02~12.5 $\mu\text{g/mL}$ (血漿)，偵測極限分別為 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (微透析) 和 0.0125 $\mu\text{g/mL}$ (血漿)^[9]。Breilh 等則提出偵測血漿、脊髓液和骨頭組織中的 levofloxacin 的 HPLC-UV 方法，線性範圍分別為 0.25~25 $\mu\text{g/mL}$ (血漿)、1~6

$\mu\text{g/mL}$ (脊髓液) 和 $0.5\sim 10\ \mu\text{g/g}$ (骨頭組織), 偵測極限分別為 $0.050\ \mu\text{g/mL}$ (血漿)、 $0.10\ \mu\text{g/mL}$ (脊髓液) 和 $0.20\ \mu\text{g/g}$ (骨頭組織) ^[10]。Greelet實驗團隊使用 column-switching HPLC-螢光偵測血清中三種氟化奎林酮類, levofloxacin 線性範圍為 $125\sim 4000\ \text{ng/mL}$, 偵測極限為 $60\ \text{ng/mL}$ ^[11]。Santoro實驗團隊則使用 HPLC-UV 定量藥錠中的四種氟化奎林酮類, levofloxacin 線性範圍為 $4.0\sim 24.0\ \mu\text{g/mL}$, 偵測極限為 $0.15\ \mu\text{g/mL}$, 定量極限為 $0.46\ \mu\text{g/mL}$ ^[12]。

Mochón提出另一種偵測藥錠、尿液及血清中 levofloxacin 的螢光發光法, 在 pH 4 的醋酸緩衝液時, 可偵測到 $20\sim 3000\ \text{ng/mL}$ 的 levofloxacin, 在 pH 5 的醋酸緩衝溶液中添加 $6\ \text{mM}$ SDS 可增強螢光, 偵測極限分別為 $5\ \mu\text{g/mL}$ (血清) 與 $420\ \mu\text{g/mL}$ (尿液) ^[13]。Du實驗室提出利用電子轉移形成錯合物而產生的螢光偵測 levofloxacin、ofloxacin 等四種奎林酮類, 線性範圍分別是 $0.02\sim 1.0\ \mu\text{g/mL}$ (ofloxacin)、 $0.04\sim 1.2\ \mu\text{g/mL}$ (levofloxacin), 偵測極限分別為 $0.006\ \mu\text{g/mL}$ (ofloxacin)、 $0.012\ \mu\text{g/mL}$ (levofloxacin), 可應用在藥錠、膠囊、尿液和血漿中 ^[14]。El-Sherif等提出使用玻璃碳電極以方波伏安法偵測 levofloxacin, 線性範圍為 $6\times 10^{-9}\ \text{M}\sim 5\times 10^{-7}\ \text{M}$, 偵測極限為 $10^{-9}\ \text{M}$, 可應用在稀釋後的病人尿液偵測上 ^[2]。Radi等人利用 DNA 與 levofloxacin 的反應, 以玻璃碳電極使用循環伏安法偵測, 線性範圍為 $5\times 10^{-7}\ \text{M}\sim 5\times 10^{-6}\ \text{M}$, 偵測極限為 $1\times 10^{-7}\ \text{M}$,

應用在尿液偵測中，偵測極限可達25 $\mu\text{g/mL}$ ^[15]。Sursh實驗團隊提出利用高效能薄層分析（high-performance thin layer chromatography, HPTLC），線性範圍為0.8~3.0 $\mu\text{g/mL}$ ，偵測極限為0.08 μg ，定量極限為0.3 μg ^[16]。

在毛細管電泳（capillary electrophoresis, CE）方面，有三篇關於分離ofloxacin異構物的文獻。Horimai^[17]的團隊提出使用 γ -CD-Zn(II)-D-phenyl -alanine 錯合物分離數種氟化奎林酮類藥物的異構物，利用Zn(II)和D-phenyl與氟化奎林酮類作用產生ligand-exchange， γ -CD與氟化奎林酮類產生host-guest interaction，使其異構物分離。Boer^[1]的實驗團隊則是採用毛細管電動層析（capillary electrokinetic chromatography, CEKC）系統連接UV偵測器在50 mM phosphate buffer（pH 2.5）中添加了0.35 mM sulfated β -cyclodextrin，可在五分鐘內分離ofloxacin異構物，在未經前處理的尿液中對R-(+)-ofloxacin最低偵測極限為2 $\mu\text{g/mL}$ （ 5.5×10^{-6} M）。Ouyang和Baeyens^[18]的團隊提出毛細管電泳連接UV偵測器使用70 mM phosphate buffer添加40 mM HP- β -CD使用不同的pH值分離lomefloxacin、gatifloxacin、pazufloxacin及ofloxacin，對所有的異構物線性範圍都為7~105 $\mu\text{g/mL}$ ，最低偵測極限皆為7 $\mu\text{g/mL}$ （約 1.94×10^{-5} M），以上文獻實驗條件及結果整理在Table 1。

Table 1. The analysis conditions collected from reference papers

1. High performance liquid chromatography (HPLC)							
Sample	Matrix	Preparation	Condition	Detector	Linear range	LOD	Ref.
ofloxacin	plasma, urine	Single- step LLE	Ligand-exchange mode Mobile phase: 5 mM copper (II) sulfate pentahydrate containing L-isoleucine (10 mM)/methanol (87.5:12.5,v/v) Flow rate: 1.0 mL/min	UV (330 nm)	plasma: 0.08~5.18 µg/mL urine: 6.36×10^{-5} M ~ 4×10^{-3} M	-	[3]
Ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin	Muelle- Hinton broth	-	Mobile phase: pH 3.0, phosphate buffer with SDS and TEA –ACN (65 %: 35 %) Flow rate: 1.75 mL/min	UV (280 nm)	0.0625~20 µg/mL	-	[4]
levofloxacin	serum, soft tissue, bone, bile	-	Mobile phase: pH 3.0, phosphate buffer/methanol/triethylamine (750:250:4, v/v/v) Flow rate: 1.5 mL/min	FL (295 nm/ 490 nm)	0.1~40 µg/mL	1 ng/mL (serum and bile)	[5]
levofloxacin	serum,	-	Mobile phase: ACN/1 mM	FL	0.1~5 µg/mL	50 ng/mL	[6]

	bile		1-octanesulfonic acid (40:60) Flow rate: 1 mL/min	(292 nm/ 494 nm)			
zidovudine, levofloxacin	plasma	SPE	Mobile phase: 25 mM phosphate buffer, 0.1% trifluoroacetic acid (pH 2.4)/ACN (86:14,v/v) Flow rate: 1.5 mL/min	UV (266 nm)	51.2~5069 ng/mL	25 ng/mL	[7]
levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin, cinoxacin	plasma	-	Mobile phase: 10 mM SDS, 10 mM TBAA, 25 mM citric acid and 43% ACN at pH 3.5. Flow rate: 1 mL/min	UV (293 nm) FL (280 nm/ 450 nm)	UV: 50~10000 ng/mL FL: 20~10000 ng/mL	-	[8]
levofloxacin, ciprofloxacin	plasma	-	Mobile phase: 0.11% orthophosphoric acid and 1.5% ACN (pH 3.0) Flow rate: 0.4 mL/min	FL (310 nm/ 467 nm)	microdialysates: 0.0156 ~5 µg/mL plasma: 0.02~12.5 µg/mL	microdialysates: 0.01 µg/mL plasma: 0.0125 µg/mL	[9]
levofloxacin	plasma, bronchoal- veolar lavage,	liquid- solid extraction	Mobile phase: 0.4 % triethylamine (pH 3.0) /ACN (83:17, v/v). Flow rate: 1.2 mL/min	UV (299 nm)	plasma: 0.25~25 µg/mL BAL: 1~6 µg/mL	plasma: 0.050 µg/mL BAL: 0.10 µg/mL	[10]

	bone tissues				bone tissues: 0.5~10 µg/g	bone tissues: 0.20 µg/g	
levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin	serum	column-switching	Mobile phase: 2 mM tetrabutylammonium bromide, 10 mM phosphate buffer (pH 2.5), 12 % ACN Flow rate: 1 mL/min	FL (296 nm/ 504 nm)	125~4000 ng/mL	60 ng/mL	[11]
gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, pefloxacin	tablets	-	Mobile phase: water/ ACN (80:20, v/v) with 0.3 % of triethylamine (pH 3.3) Flow rate: 1 mL/min	UV (279 to 295 nm)	4~24 µg/mL	LOD: 0.15 µg/mL LOQ: 0.46 µg/mL	[12]

2. Capillary electrophoresis (CE)

Sample	Matrix	Condition	Detector	Linear range	LOD	Ref.
quinolone drug	-	10 mM γ -CD, 10 mM ZnSO ₄ , 10 mM D-phenylalanine, 10 mM ammonium acetate (pH 6.5)	UV (295 nm, 300 nm)	-	-	[17]
ofloxacin	urine	50 mM phosphate buffer (pH 2.5), 0.35 mM sulfated β -cyclodextrin	UV (291 nm)	2~12 µg/mL	2 µg/mL	[1]
lomefloxacin, gatifloxacin,	urine	70 mM phosphate buffer (pH 2.16), 40	UV	7~105 µg/mL	7 µg/mL	[18]

pazufloxacin, ofloxacin		mM HP- β -cyclodextrin	(254 nm)		
3. Other methods					
Sample	Matrix	Condition	Linear range	LOD	Ref.
ofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, pipemidic acid	tablet, plasma, urine	charge transfer complexes formation 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane	ofloxacin: 0.02~1.0 $\mu\text{g/mL}$ levofloxacin: 0.04~1.2 $\mu\text{g/mL}$	ofloxacin: 0.006 $\mu\text{g/mL}$ Levofloxacin: 0.012 $\mu\text{g/mL}$	[14]
levofloxacin	patient's urine	cyclic and square-wave voltammetry at glassy carbon electrode	$6 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 5 \times 10^{-7} \text{ M}$	10^{-9} M	[2]
DNA and levofloxacin	urine	cyclic voltammetry at glassy carbon electrode	$5 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$ urine: 25 $\mu\text{g/mL}$	[15]
levofloxacin	-	high-performance thin layer chromatography Mobile phase: water/methanol/n-butanol/ammonia solution (25 %) (5:5:5:0.4, v/v)	0.8~3.0 $\mu\text{g/mL}$	0.08 μg LOQ: 0.3 μg	[16]

三、毛細管電泳簡介

電泳的定義是帶電離子受到電場作用而產生的不同速率運動，最早是用來分離蛋白質等大分子，主要的分離機制是分子質量的差異。使用高電壓進行電泳會產生熱擴散和對流的問題，所以需要在膠體（gel）這類的物質中進行實驗，解決對流的問題，也不能使用過高的電壓，避免焦耳熱過大，但因此導致分離時間長，效率低。直到 1980 年，使用內徑為 75 μm 的毛細管電泳實驗首次被提出，毛細管因為大表面積/體積比及細小的管柱內徑克服了熱擴散和對流的問題，也因此可以使用更高的電壓，使得分離速率變快、分離效率更高，且可在毛細管中使用水相進行電泳實驗，提供了多樣化的操作模式，可以分離更多種類的樣品，而不再只是侷限在大分子或帶電物質的分離上，開啟了毛細管電泳的時代。以下簡單介紹毛細管電泳分離的理論。

（一）電淌度

電泳是以帶電物質在電場中的不同速率作為分離基礎，帶電離子的遷移速率可以下式來表示：

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

v = 離子遷移速度， μ_e = 電泳淌度， E = 電場強度。 μ_e 為該離子的物理常數，從標準表中可以查到物質的電泳淌度，這是假設物質在帶最大電荷時所得之常數，但在不同 pH 值的緩衝溶液中，還是會有不同的淌度，稱為有效淌度。電泳淌度會與離子在毛細管

內受到的電場力 F 成正比和摩擦力 f 成反比，電場力又可寫成：

$$F = qE \quad (2)$$

q 為帶電量，摩擦力 f 也可以下式計算：

$$f = -6\pi\eta rv \quad (3)$$

η 為溶液黏度， r 為離子半徑， v 為速度。電泳的過程中是電場力與摩擦力兩個力互相平衡，此時兩力的方向相反。

$$qE = -6\pi\eta rv$$

$$v = \frac{qE}{-6\pi\eta rv} \quad (4)$$

將(4)帶入(1)，可得：

$$\mu_e = \frac{q}{-6\pi\eta rv}$$

由上式可知，帶電量大的離子，電泳淌度較大，帶電量小的離子，電泳淌度較小。

(二) 電滲流 (electroosmotic flow, EOF)

除了物質自己本身的電泳淌度之外，管柱內的溶液受到電場作用而形成的電滲流，也是另一個分離的重要因素。毛細管壁是由矽醇基所組成，使用毛細管進行實驗前會先以 NaOH 活化管壁，使管壁帶負電，如下 Fig. 3 (a)，注入緩衝溶液後，會吸引溶液中的正離子聚集在管壁，形成緻密層。電荷吸引力與距離的平方成反比，所以離管壁越遠吸引力越弱，會有一層較為稀疏的正離子組成的擴散層，此兩層稱為電雙層，如下 Fig. 3

(b)。因為電雙層與靠近的溶液之間的電荷差異形成一個電位差，稱為 zeta 電位，施加電壓後組成擴散層的離子會由正極往負極移動，帶動所有的體相溶液，形成電滲流，如 Fig. 3 (c)。

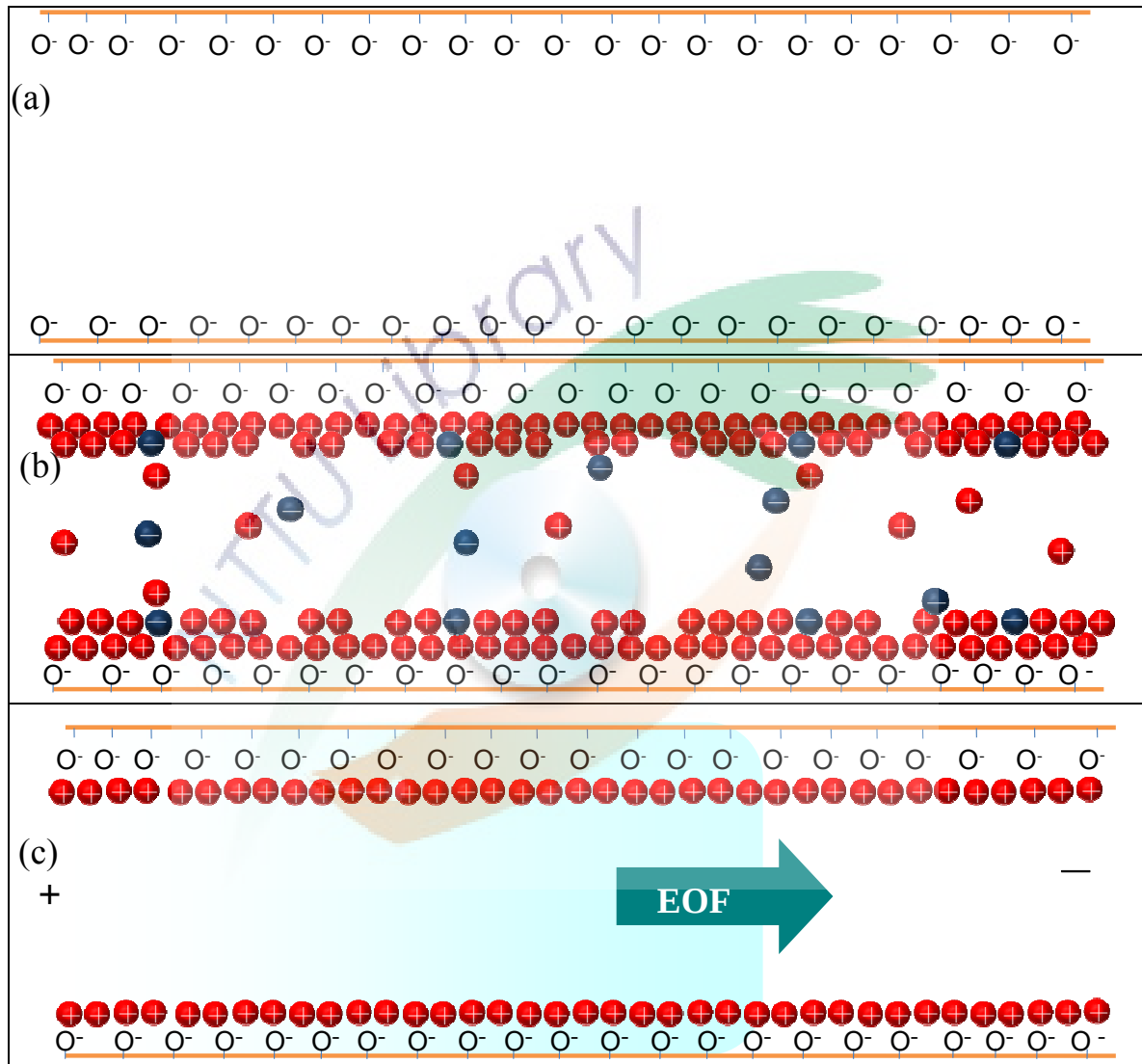


Fig. 3. Development of the electroosmotic flow:

- (a) negatively charged fused silica surface.
- (b) hydrated cations accumulating near surface.
- (c) bulk flow towards the cathode upon application of electric field.

電滲流可以用下面這個式子表示：

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E \quad \text{或} \quad \mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}$$

v_{EOF} 為速度， μ_{EOF} 為電滲淌度， ζ 為 zeta 電位， ϵ 為介電常數。

電滲流會因為溶液的 pH 值而影響其大小。

一般由壓力進行分離的分析技術，靠近管壁的液體會有較大的摩擦力，導致管柱內的流速產生差異，形成層流，這就會使得樣品的波峰變寬。而電滲流因為是由靠近管壁的液體帶動流動，就不會產生流速的差異導致樣品峰的擴散。

電滲流的另一個優點是可以使所有的離子往同一方向移動，不論其所帶的電荷為何。在帶負電荷的毛細管壁狀態下，電滲流是由正極往負極移動，帶正電荷的離子因與電滲流同方向，其電泳速度會是電泳淌度加上電滲流，所以會最快。不帶電的物質會隨著電滲流出來，帶負電的離子會因為與電滲流反向，所以最慢被流出。

(三) 毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)

本研究使用的操作模式為毛細管區帶電泳，只在管柱中注入緩衝溶液，讓樣品因為其帶電量及質量的不同而形成不同的區塊分離，而中性離子就隨著電滲流被分離出來。見 Fig. 4^[19]。

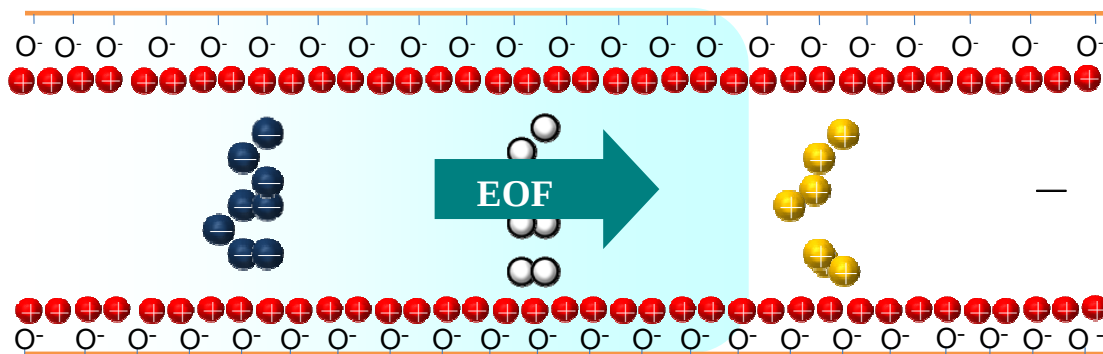


Fig. 4. Separation mechanism of capillary zone electrophoresis.

(四) 對掌選擇劑 (chiral selectors)

對於電泳遷移速率相近之對掌異構物 (enantiomers) 毛細管區帶電泳無法有效的將其分離，常須藉由添加對掌選擇劑於緩衝溶液中分離對掌異構物。在1997年就有毛細管電泳中應用環糊精 (cyclodextrin, CD) 分離異構物的文獻回顧，可知環糊精是最常使用且有效的對掌選擇劑。環糊精的結構為D form的葡萄糖分子用C-1, C-4 鍵結而成的環狀聚合物，可因鍵結的分子數目不同而分為 α 、 β 、 γ 三種，性質也有所差異，比較如下^[20]。

	α -CD	β -CD	γ -CD
Number of glucose unit	6	7	8
Molecular mass	972	1135	1297
Internal cavity diameter (nm)	0.47~0.52	0.60~0.64	0.75~0.83
External cavity diameter (nm)	1.46 $\pm$ 0.05	1.54 $\pm$ 0.04	1.75 $\pm$ 0.04
Cavity height (nm)	0.79~0.80	0.79~0.80	0.79~0.80
Solubility in water at 25 °C (g/100 mL)	14.5	1.85	23.20

因應不同的異構物可以使用不同類型的環糊精。此外，環糊精還可以經由衍生化形成許多陽性、陰性和中性的衍生物，不但解決了環糊精對水溶解度不佳的問題，並且可混合使用於電泳中分離異構物，這就是環糊精可以廣泛的應用在對掌異構藥物選擇上的原因^[21,22]。

本次研究中所採用的是 β -CD 的衍生物，hydroxylpropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)，比 β -CD 有較好的水溶性。分子結構式如 Fig. 5 (a)，立體結構如 Fig. 5 (b)，為內部疏水，外部親水的結構，可以幫助難溶於水的物質溶解。一級氫是位在小的開口，二級氫是位在大的開口。分離原理主要是以環糊精本身的空腔孔洞為主體 (host)，分析物為客體 (guest)，利用環糊精與異構物於空腔孔洞中形成主-客錯合物 (host-guest complexes) 或內包錯合物 (inclusion complexes) 的程度差異，進而影響內包錯合物的電泳遷移速率，達到分離對掌異構物的效果。

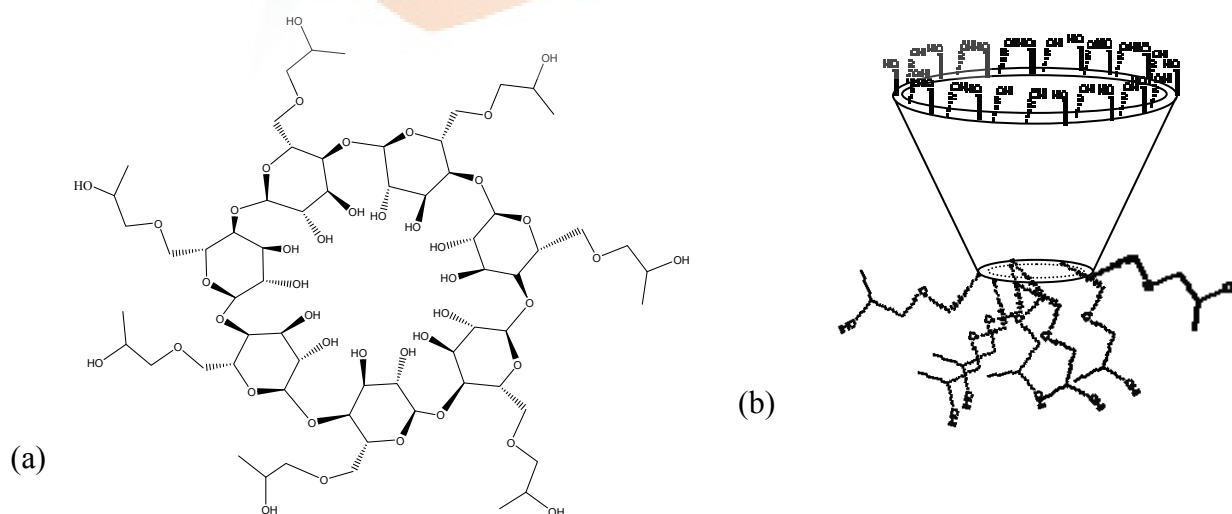


Fig. 5. (a) two-dimensional (b) three-dimensional structure of HP- β -CD

第二章 材料與方法

毛細管電泳因為具備了操作簡單、分離快速、低消耗量而在近幾年被廣泛使用。螢光偵測器具有高靈敏度、低干擾和非破壞性的優點。所以本實驗採用毛細管電泳連結螢光偵測器發展分離 ofloxacin 的分析方法。在緩衝溶液中添加 HP- β -CD 作為對掌選擇劑，測試不同 pH 值、濃度的緩衝溶液、不同濃度的 HP- β -CD 對分離的影響，並嘗試添加低黏度的幾丁聚醣（chitosan）和金屬離子於緩衝溶液中，測試其對分離效果的影響，最後使用最佳化的實驗條件對 levofloxacin 作定量的線性範圍及應用在測試藥物的不純度與服藥病人尿液中 levofloxacin 的含量。以期對監控病人的服藥量、藥物的代謝路徑提供一種便利、快速的分析方法。

一、儀器：

測試樣品激發與放射波長的螢光儀為 Hitachi F-4500，毛細管電泳儀器連接的螢光偵測器型號為 Jasco FP-1520，設定激發波長（excitation） 292 nm，放射波長（emission） 493 nm。電泳實驗是以商業化的儀器進行，型號為 Model prince 4-tray CE System 使用 WPrince 32 bits 軟體從電腦控制，SISC 32 2.0 中文版軟體系統擷取數據，計算面積及分離度。pH 計使用 Horiba

pH/ion meter D-23。所有的水溶液皆以 Barnstead 製造的純水配製，電阻值皆大於 18 MΩ/cm。所使用的空毛細管內徑為 75 μm，外徑 375 μm，總長度為 80 公分，有效長度為 54 公分。

二、藥品及溶液

動相緩衝溶液（running buffer）的配製是混合不同比例的磷酸、磷酸二氫鈉及磷酸氫二鈉，並測定其 pH 值。hydroxypropyl β-cyclodextrin (Aldrich) 母液（stock solution）的濃度為 200 mM，溶在純水中。levofloxacin (Fluka)、ofloxacin (Sigma)都溶在甲醇中，母液濃度分別為 10^{-2} M 及 10^{-3} M。存放在冰箱中，可保存約二個星期，實驗時以純水稀釋至需要的濃度。低黏度的幾丁聚醣（low-viscosity chitosan, Fluka）在酸性的條件下溶解度較好，以重量百分比為 0.01 % 溶解在 0.05 M HCl，CuCl₂ (Aldrich)、ZnCl₂ (Riedel-de Haën)及 CoCl₃ (J.T.Baker)的母液為 10^{-3} M 溶在水溶液中，以上所使用的溶劑皆為 LC 級。

三、樣品配製

目前販售的 levofloxacin 成藥分為藥錠及藥劑，本次實驗所使用的是藥錠，外觀看起來為白色、圓凸形，上面有紅色的記號 D 723，一粒藥錠重約 200 毫克，包裝上標明內含 100 毫克的

levofloxacin。藥錠樣品配製依以下步驟進行：將藥錠秤重紀錄，以研鉢磨碎後再次紀錄取用的重量，用 10 mL 的甲醇溶解，以超音波器震盪 15 分鐘，以 6000 rpm 離心後取上層澄清液，將不溶物去除，再以 0.22 μm 的尼龍過濾膜過濾後，稀釋到 25 mL，置於冰箱作為母液，實驗時依需要以純水稀釋成不同濃度使用。

依患者感染的部位不同，levofloxacin 的投藥量也不盡相同，服藥後 1 至 2 小時內會達到血中最高濃度，以原來的形式從尿液中排出，故可以在服藥的病人尿液中直接檢測到 levofloxacin。此次分析的尿液樣品來源是每天服藥量約 400 毫克，連續服藥四天的病人，收集第四天服藥後 3~4 小時的尿液，保存於冰箱中，實驗時依需要的濃度以純水稀釋偵測。

四、毛細管電泳實驗流程

新的空毛細管先以 0.5 N NaOH 充滿，隔夜後以純水沖洗 10 分鐘後，再以緩衝溶液沖洗 15 分鐘，就可開始使用。樣品以 100 psi 施壓 0.1 分鐘注入毛細管中，以 15 kV 進行電泳，電泳完後用緩衝溶液以 1000 psi 推出剩餘物質，接著以緩衝溶液沖洗三分鐘，便可開始下一次的實驗。實驗結束後，以 0.5 N NaOH 沖洗 15 分鐘，再以純水沖洗 10 分鐘即可關機。

第三章 結果與討論

一、pH 值對螢光的影響

在文獻^[1,18]中大都以酸性的條件作為最佳的分離酸鹼度，在本實驗中先混合不同比例的磷酸、磷酸二氫鈉及磷酸氫二鈉，測試不同的 pH 值對 ofloxacin 的螢光強度及分離的影響。如 Fig. 7，使用波長 292 nm 激發，在高 pH 值時，ofloxacin 的最大放射波長約位於 450 nm 左右，隨著 pH 值降低，放射波長產生了紅位移 (red shift)，最大放射波長移到了約 507 nm，但螢光強度變得較弱，因為 ofloxacin 的 pKa 為 6.0 和 8.0，Fig. 7 (c) 的 pH 為 6.47 恰好介於這兩個 pH 值之間，導致(c)的圖形為兩個最大吸收波長的波形重疊。本實驗是為了分離 ofloxacin 異構物，故希望能使 EOF 值較小，讓樣品有足夠的時間與 HP- β -CD 反應。pH 值越高，分離時間越快，停留在管柱的時間就越短，也使得 ofloxacin 與對掌選擇劑反應的時間不夠長，導致分離效果變差，所以為了降低 EOF，延長停留在管柱裡的時間，故選擇酸性的 pH 值，為了使緩衝溶液有較好的緩衝性，故本實驗採用以 1:1 的磷酸和磷酸二氫鈉混合而成的緩衝溶液，緩衝溶液最佳化的條件為 50 mM 的磷酸緩衝溶液 (pH 2.30)，此時的 EOF 值幾近於 0，螢光偵測

器的激發波長設定為 292 nm，放射波長設定為 493 nm 作為最佳實驗條件。

二、HP- β -CD 濃度對分離度的影響

對掌異構物的差異只在光學活性的不同，其分子量和帶電量都相同，使用單純的 CZE 無法分離，故需添加對掌選擇劑，本研究選擇 HP- β -CD 作為對掌選擇劑，在此討論 HP- β -CD 的濃度對分離度以及對 ofloxacin 螢光強度的影響，在 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 2.30)中添加不同濃度的 HP- β -CD 的實驗結果為 Fig. 8，由圖中可知添加的 HP- β -CD 濃度越高，分離效果越好，但遷移時間也會隨之增長，HP- β -CD 濃度為 40 mM 時，分離度就可以達到 2.0，濃度對分離度的結果呈現於 Fig. 9。且由 Fig. 8 發現添加不同濃度的 HP- β -CD 後，ofloxacin 的峰高及面積有變大的趨勢。

為了驗證 HP- β -CD 是否可以增強 ofloxacin 的螢光強度，本實驗固定 ofloxacin 的濃度添加不同濃度的 HP- β -CD 測試其螢光強度的變化及增強的百分率，結果呈現於 Fig. 10。發現 HP- β -CD 的濃度從 0 mM 增加到 40 mM 時，螢光強度可以增加約 20 %，但到了 40 mM 以後，螢光增強的幅度就漸趨緩慢，見 Fig. 11，HP- β -CD 濃度為 60 mM 和 80 mM 時，螢光分別增強 22 %和 27 %，證實了添加 HP- β -CD 在緩衝溶液中不但可以作為對掌選擇劑分離 ofloxacin，也可作為螢光增強劑，文獻^[23]中也有以 HP- β -CD

增強其他樣品的探討，但對使用毛細管電泳分離 ofloxacin 這方面尚未看到類似的文獻。推測可能是因為 ofloxacin 進入了 HP- β -CD 後，形成了一個較為剛性的結構，導致其螢光強度增加。但過了 40 mM 後，HP- β -CD 和 ofloxacin 的結合呈現飽和狀態，導致螢光強度增強的幅度變緩。雖然高濃度的 HP- β -CD 可以提供高分離度及較強的螢光強度，但在高濃度 HP- β -CD 下 S/N 會降低，而使偵測極限提高，可能是因為高濃度的 HP- β -CD 對螢光強度會有些微干擾，影響基線（baseline）的穩定度。但本次研究中的藥錠樣品需要在高濃度的左旋異構物中看到右旋異構物，需要高分離度才可以作出區別。考慮以上幾點因素，選擇 60 mM HP- β -CD 作為最適合的實驗條件，可以提供高分離度並增強 27 % 的螢光。使用 50 mM 磷酸緩衝溶液（pH 2.30）添加 60 mM HP- β -CD 的最佳條件對溶解在純水中的 levofloxacin 最低偵測極限可達 10^{-8} M。

三、添加幾丁聚醣及金屬離子對分離異構物的影響

幾丁聚醣與 HP- β -CD 都為葡萄糖分子聚合而成，但幾丁聚醣的 C-2 置換成一個胺基，結構

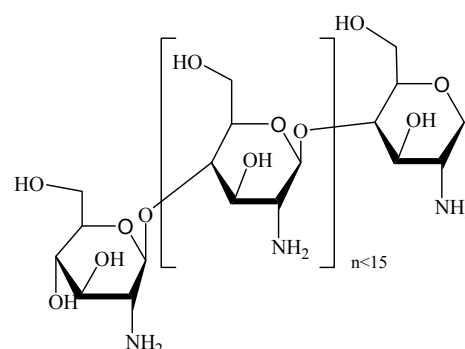


Fig. 6. Structure of chitosan.

式如 Fig. 6，本身也如 HP- β -CD 一樣是個多分子聚合物，但為直線型聚合。因為幾丁聚醣與 HP- β -CD 在單體結構上相似，故想測試直線型幾丁聚醣對於對掌異構物是否同樣具有分離的效果，以此開發新的對掌選擇劑。故嘗試將幾丁聚醣添加在緩衝溶液中，測試對分離 ofloxacin 是否有與 HP- β -CD 相同的結果。因為幾丁聚醣需在酸性的條件下才有較好的溶解度，添加大量的幾丁聚醣會使得 pH 值變化過大，所以在 50 mM 緩衝溶液（pH 2.30）中固定 5 mM HP- β -CD 濃度，添加少量的幾丁聚醣，測試對分離度的影響。電泳結果呈現於 Fig. 12。可以發現添加了幾丁聚醣後，遷移時間變長，但是沒有一個很好的規律性，這也可能是因為實驗誤差或因為幾丁聚醣添加在緩衝溶液後改變了 pH 值，由圖中可發現分離度皆無較佳的改變，反而添加的濃度越大，分離度越差。各分離度及 pH 變化整理在 Table 2。

可能是因為其為線形聚合物，無法與 ofloxacin 形成完整的錯合物，因此想利用加入金屬離子與幾丁聚醣結合使其變得較為剛性而有利於與 ofloxacin 結合。所以，固定 5 mM 的 HP- β -CD 及幾丁聚醣為 5×10^{-7} (w/v) 測試添加不同濃度與不同的金屬離子於緩衝溶液中，測試的結果見 Fig. 13，分離度整理在 Table 3。除了 Cu^{2+} 以外，添加 Zn^{2+} 及 Co^{3+} 對分離度沒有正面的幫助，反而使得分離度變差。添加微量的 Cu^{2+} 對分離有正面的幫助，但改變的幅度也不大。因為幾丁聚醣與金屬離子結合的最佳 pH 值為 6，

推測可能是因為 pH 值導致幾丁聚醣未與金屬離子發生錯合反應或是錯合反應未完全，因此無法作為有效的光學選擇劑。也可能是 ofloxacin 對幾丁聚醣與金屬離子形成的錯合物不會結合，導致對分離度沒有大幅度的改善。由此實驗結果可知，幾丁聚醣對分離如 ofloxacin 之類的異構物沒有良好的助益。

四、定量

由以上的實驗結果得知最佳的實驗條件為 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 2.30) 添加 60 mM HP- β -CD。以此實驗條件對 levofloxacin 定量。對溶在純水中的 levofloxacin 標準樣品，線性範圍可從 1×10^{-7} M ~ 5×10^{-3} M, $R^2=0.9989$ 。levofloxacin 添加在尿液中的定量範圍可從 5×10^{-6} M ~ 5×10^{-3} M, $R^2=0.9943$ 。最低偵測極限在 S/N 比大於 3 的狀態下分別達到 1×10^{-8} M 和 1×10^{-7} M，最低定量極限（在線性定量範圍的最低濃度）分別為 1×10^{-7} M 和 5×10^{-6} M。總整理見 Table 4。

相較於 Ouyang 和 Baeyens^[18]的團隊提出毛細管電泳連接 UV 偵測器的分析方法，使用 70 mM phosphate buffer (pH 2.16) 添加 40 mM HP- β -CD 為實驗條件分離 ofloxacin 及其他有對掌異構物的藥物，對 ofloxacin 的線性範圍為 7~105 $\mu\text{g/mL}$ (1.94×10^{-5} M ~ 2.91×10^{-4} M)，最低偵測極限為 7 $\mu\text{g/mL}$ (約 1.94×10^{-5} M)。因為本研究使用螢光偵測器，因此所測得的偵測極限值遠比此文

獻中的偵測極限值要低 2000 倍，同時線性範圍也較廣。文獻中只檢驗溶在純水中的標準品，而本實驗除了檢測在水中及尿液中的標準品外，還測試真實藥物及服用藥物病人的尿液，所以文獻中 HP- β -CD 的濃度只需添加 40 mM 就足夠，但本研究卻因此需要添加至 60 mM，才能在極大量的左旋異構物中分離出右旋異構物。

五、應用

(一) 藥物的不純度

levofloxacin 目前已是應用在醫療上的成藥-可樂必妥 (cravit) 的主成分，將應用本研究所得之分析條件檢測該藥物的純度，是否真的只含有 levofloxacin 及一顆藥錠中 levofloxacin 的真實含量為多少，實驗結果為 Fig. 14。Fig. 14 (a) 為將樣品加純水稀釋 10 倍直接進行實驗所得之結果，可以發現在高濃度的 levofloxacin 旁邊有一個小小的峰形。Fig. 14 (b) 為添加了 5×10^{-5} M ofloxacin 於樣品中，兩電泳圖比較後可以發現在高濃度的 levofloxacin 旁邊存在著微量的右旋異構物。經由面積的比例得到藥物中 R(+)-ofloxacin 對 S(-)-ofloxacin (levofloxacin) 的比率約為 0.1 : 99.9。藥物包裝上寫內含 100 mg/錠的 levofloxacin，經由實驗測得的 levofloxacin 含量約為 93 mg。

(二) 病人尿液中藥品定量

Fig. 15 (a) 的電泳圖是應用此分析方法的條件檢測添加 levofloxacin 於未服用藥物，25 歲健康女性的尿液，可從圖中發現此分析方法應用在尿液的偵測上，基線平穩不會產生基質干擾效應，因此尿液樣品不需經過複雜的前處理，可稀釋後直接應用此方法作檢測。

Fig. 15 (b) 為未經過前處理，只以純水稀釋 10 倍的病人尿液直接進行實驗得到的電泳圖，可知此條件應用在病人的尿液分析中不會因為病人服藥或生理狀況的不同而有其他的干擾發生。從圖中可以看到在 levofloxacin 旁邊依舊有一個小小的峰形存在，經由 Fig. 15 (c) 添加了 5×10^{-5} M ofloxacin 比較後，可以確認此峰為右旋異構物，因此在病人尿液中也存在著微量 R(+)-ofloxacin，且對 levofloxacin 的比率約為 99.35 : 0.65。左右旋藥物的比率和藥物的比率略有不同，推測可能是在經過人體的代謝後，有些左旋的藥物被轉換成了右旋或左右旋藥物的代謝速率不同，導致尿液中的比率有所差異。使用標準添加法，在稀釋 100 倍的病人尿液中分別加入不同體積的 levofloxacin 標準品，使得最後添加的濃度為 0、 1×10^{-5} M、 2×10^{-5} M 和 5×10^{-5} M 的 levofloxacin，以面積對添加的 levofloxacin 濃度作圖，見 Fig. 16，得到 $y=257226x+147579$ ， $R^2=0.9996$ ，測定出尿液中的

levofloxacin 含量約為 5.7×10^{-4} M，使用校正曲線得到的數據是 8.6×10^{-4} M。由校正曲線得到的數值略高於標準添加法所得之數值，可能是因為每個人的飲食及生活習慣的差異，尿液基質中還是有一些成份的差異存在，導致校正曲線法所得的數據略高於標準添加法之數據，因為在標準添加法中每個樣品都有一樣的基質干擾，因此所得的數據較具可信度。一般成人每日的排尿量約 1~1.5 L，依照其代謝的數據，假設此病人服用的藥物在一天內以尿液排出 80%，平均含量約為 4.40×10^{-4} M~ 2.96×10^{-4} M，實驗的樣品是在服藥後的 3~4 小時內收集，故此樣品的濃度略高於平均濃度應該是屬於可接受的，證明此方法對於測定病人尿液中的 levofloxacin 的含量是有效且合理的，對監控病人的服藥量及尋找藥物的代謝途徑提供一個簡便的方法。

第四章 結論

本實驗在 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 2.30) 中添加 60 mM HP- β -CD 可得到最佳的分離度及螢光強度增強效果，對 levofloxacin 最低偵測極限可達 1×10^{-8} M，溶在水中的標準品定量範圍從 1×10^{-7} M~ 5×10^{-3} M 之間有良好的線性，添加在尿液中的線性範圍從 5×10^{-6} M~ 5×10^{-3} M， R^2 可分別達到 0.9989 和 0.9943。應用在藥物的不純度判別時，可得知藥物中 R(+)-ofloxacin 對 S(-)-ofloxacin (levofloxacin) 的比率約為 0.1 : 99.9，一粒藥錠約含有 93 mg 的 levofloxacin。應用在服用藥物病人的尿液檢測藥物含量，可發現 R(+)-ofloxacin 對 S(-)-ofloxacin (levofloxacin) 的比率約為 0.65 : 99.35。使用標準添加法測得 levofloxacin 的含量約為 5.7×10^{-4} M。此外，實驗中也提出在 buffer 中添加幾丁聚醣及金屬離子的檢測方式，發現添加濃度為 5×10^{-7} (w/v) 的幾丁聚醣及 5×10^{-8} M 的 Cu^{2+} 時，分離效果比單獨只有 HP- β -CD 時略佳，將來可朝向添加不同的金屬離子或改變緩衝溶液的 pH 研究是否會有更佳的分離效果。

第五章 參考文獻

1. De Boer, T.; Mol, R.; De Zeeuw, R. A.; De Jong, G. J.; Ensing, K. *Electrophoresis* **2001**, 22, 1413.
2. Radi, A.; El-Sherif, Z. *Talanta* **2002**, 58, 319
3. .Wong, F. A.; Juzwin, S. J.; Flor, S. C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, 765.
4. Wright, D. H.; Herman, V. K.; Konstantinides, F. N.; Rotschafer, J. C. *J. Chromatogr. B* **1998**, 709, 97.
5. Böttcher, S.; Baum, H.v.; Hoppe-Tichy, T.; Benz, C.; Sonntag, H. *G. J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 25, 197.
6. Cheng, F. C.; Tsai, T. R.; Chen, Y. F.; Hung, L.C.; Tsai, T. H. *J. Chromatogr. A* **2002**, 961, 131.
7. Caufield, W. V.; Stewart, J. T. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2002**, 25, 1791.
8. Liang, H.; Kays, M. B.; Sowinski, K. M. *J. Chromatogr. B* **2002**, 772, 53.
9. Neckel, U.; Joukhadar, C.; Frossard, M.; Jäger, W.; Müller, M.; Mayer, B. X. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, 199.
10. Djabarouti, S.; Boselli, E.; Allaouchiche, B.; Ba, B.; Nguyen, A.

- T. Gordien, J. B.; Bernadou J. M.; Saux M. C.; Breilh D. J. *Chromatogr. B* **2004**, 799, 165.
11. Nguyen, H. A.; Grellet, J.; Ba, B. B.; Quentin, C.; Saux, M. C. J. *Chromatogr. B* **2004**, 810, 77.
12. Santoro, M. I. R. M.; Kassab, N. M.; Singh, A. K.; Kedor-Hackmam, E. R.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, 179.
13. Ocaña González, J. A.; Callejón Mochón, M.; Barragán de la Rosa, F.J. *Talanta* **2000**, 52, 1149.
14. Du, L. M.; Yang, Y. Q.; Wang, Q. M. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 516, 237.
15. Radi, A.; El Ries, M.A.; Kandil, S. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 495, 61.
16. Meyyanathan, S.N.; Ramasarma, G. V. S.; Suresh, B. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 1698
17. Horimai, T.; Ohara, M.; Ichinose, M. *J. Chromatogr. A* **1997**, 760, 235.
18. Zhou, S.; Ouyang, J.; Baeyens, W. R. G.; Zhao, H.; Yang, Y. J. *chromatogr. A* **2006**, 1130, 296.
19. D. N. Heiger, *High performance capillary electrophoresis-An introduction*, Hewleett-Packard Company, 1992.

20. Luong, J. H. T.; Nguyen, A. L. *J. Chromatogr. A* **1997**, 792, 431.
21. Verleysen, K.; Sandra, P. *Electrophoresis* **1998**, 19, 2798.
22. de Boer, T.; de Zeeuw, R. A.; de Jong, G. J.; Ensing, K. *Electrophoresis* **2000**, 21, 3220.
23. Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. *Anal. Chem. Acta* **2003**, 488, 193.



Table 2. The pH value and the resolution of ofloxacin at different concentrations of chitosan. The concentration of ofloxacin is 5×10^{-6} M.

chitosan (w/v)	0	5×10^{-7}	2.5×10^{-6}	5×10^{-6}	5×10^{-5}
pH	2.26	2.25	2.22	2.08	1.65
Resolution	0.63	0.64	0.62	0.62	0.46



Table 3. Effect of various metal ions at different concentrations on resolution of racemic ofloxacin. The concentration of chitosan is 5×10^{-7} (w/v)

metal ion(M)	5×10^{-8}	2.5×10^{-7}	5×10^{-7}	5×10^{-6}
Cu^{2+}	0.65	N	0.58	0.56
Zn^{2+}	0.60	0.61	0.55	0.57
Co^{3+}	0.63	0.55	N	N

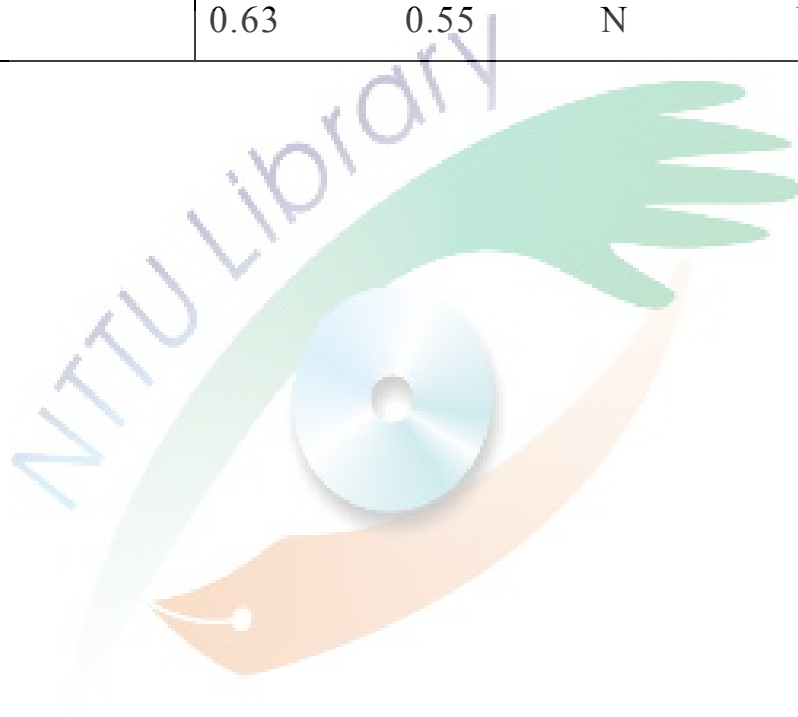


Table 4. Analytical parameters of the proposed method

	Levofloxacin in distilled water	Levofloxacin in urine
Linear range	1×10^{-7} M- 5×10^{-3} M	5×10^{-6} M~ 5×10^{-3} M
LOD ^a	1×10^{-8} M	1×10^{-7} M
LOQ ^b	1×10^{-7} M	5×10^{-6} M
R ²	0.9989	0.9943

a: LOD, limit of detection

b: LOQ, limit of quantification

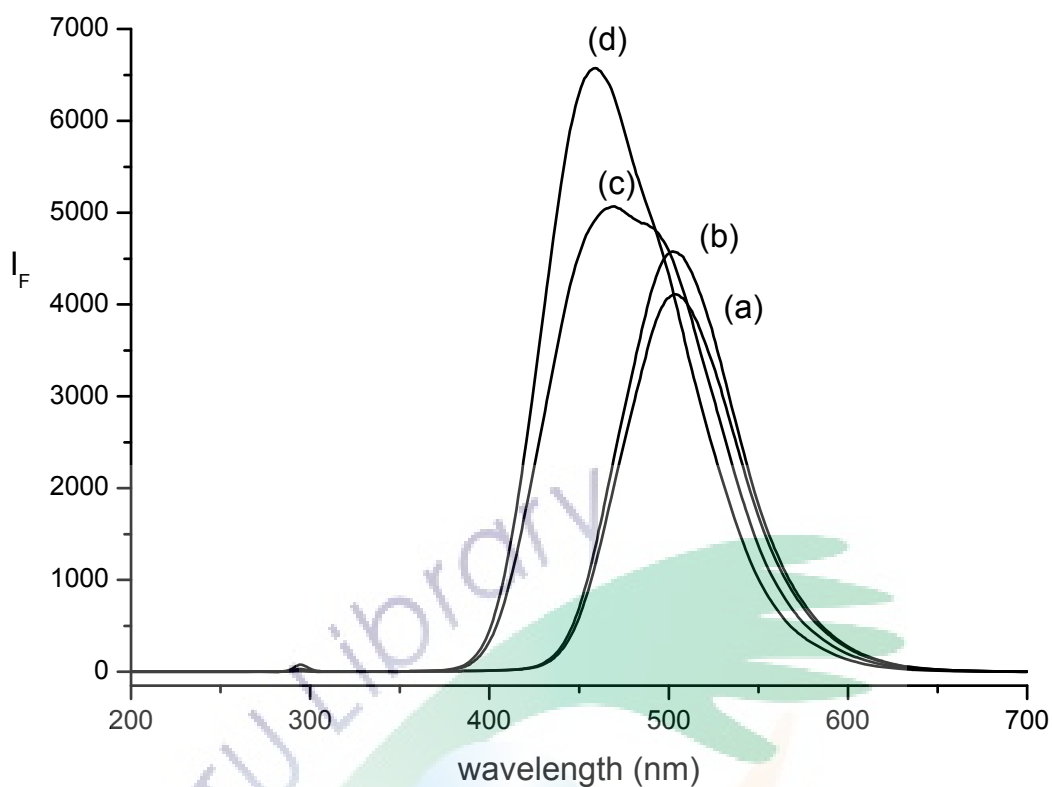


Fig. 7. Fluorescence intensity of ofloxacin at various pH value of the phosphate buffer. (a) pH 2.30; (b) pH 3.00; (c) pH 6.47; (d) pH 7.00. The concentration of ofloxacin was 10^{-4} M and the excitation wavelength was 292 nm.

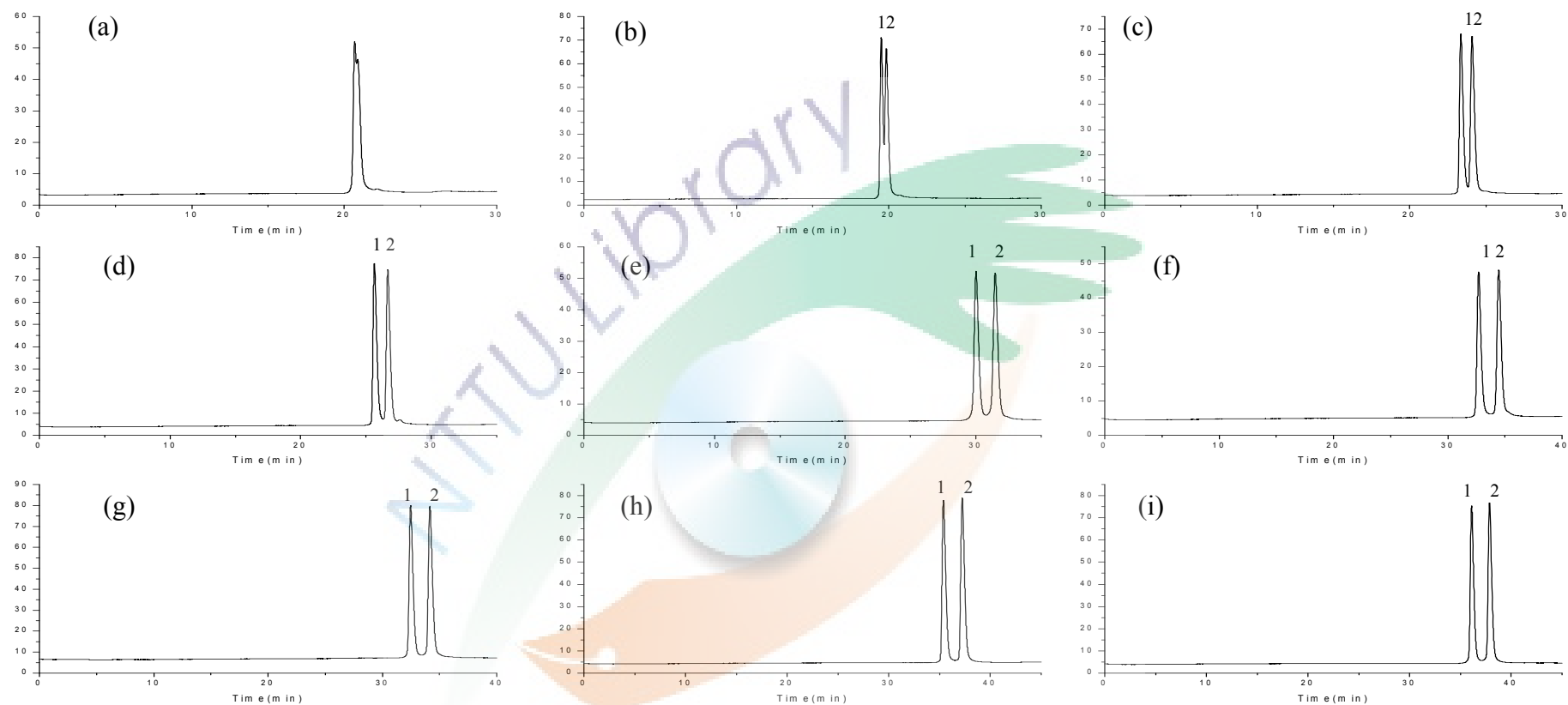


Fig. 8. Enantioseparation of ofloxacin in various concentration of HP- β -CD and phosphate buffer (50 mM) at pH 2.30. (a) 5 mM; (b) 10 mM; (c) 20 mM; (d) 30 mM; (e) 40 mM; (f) 50 mM; (g) 60 mM; (h) 70 mM; (i) 80 mM. Peak 1: S(-)-ofloxacin (levofloxacin) ; peak 2: R(+)-ofloxacin. Sample injection : 0.1 min at 100 psi; separation at 15 kV; fluorescence detection at λ_{ex} =292 nm and λ_{em} =493nm.

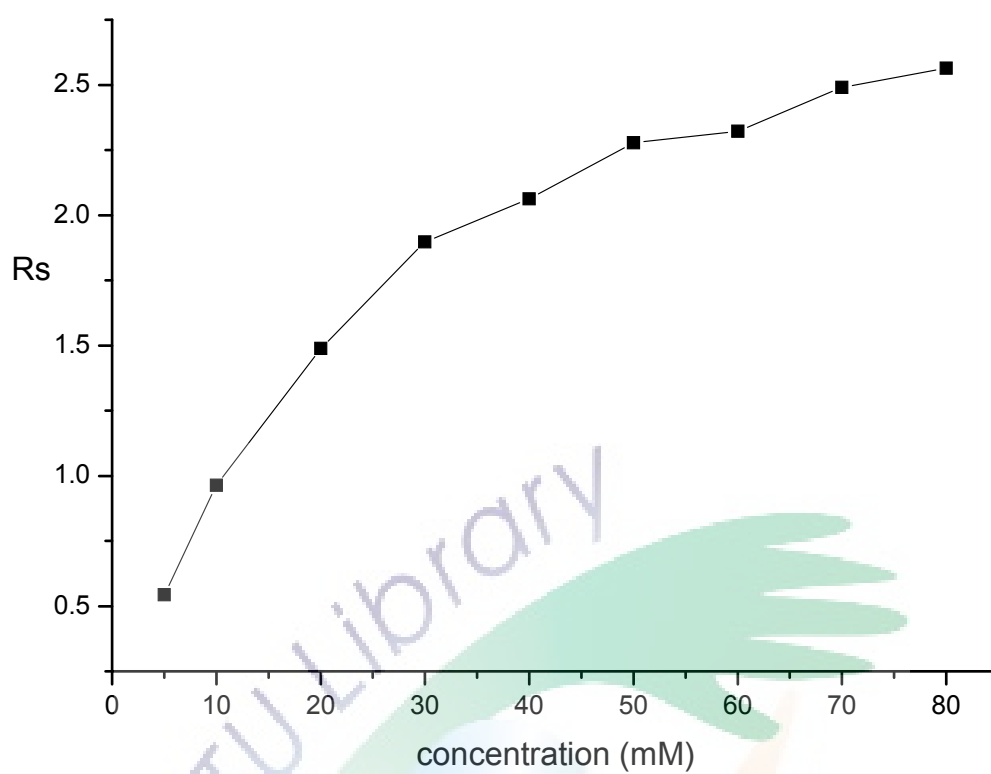


Fig. 9. Effect of HP-β-CD at different concentrations on resolution of racemic ofloxacin.

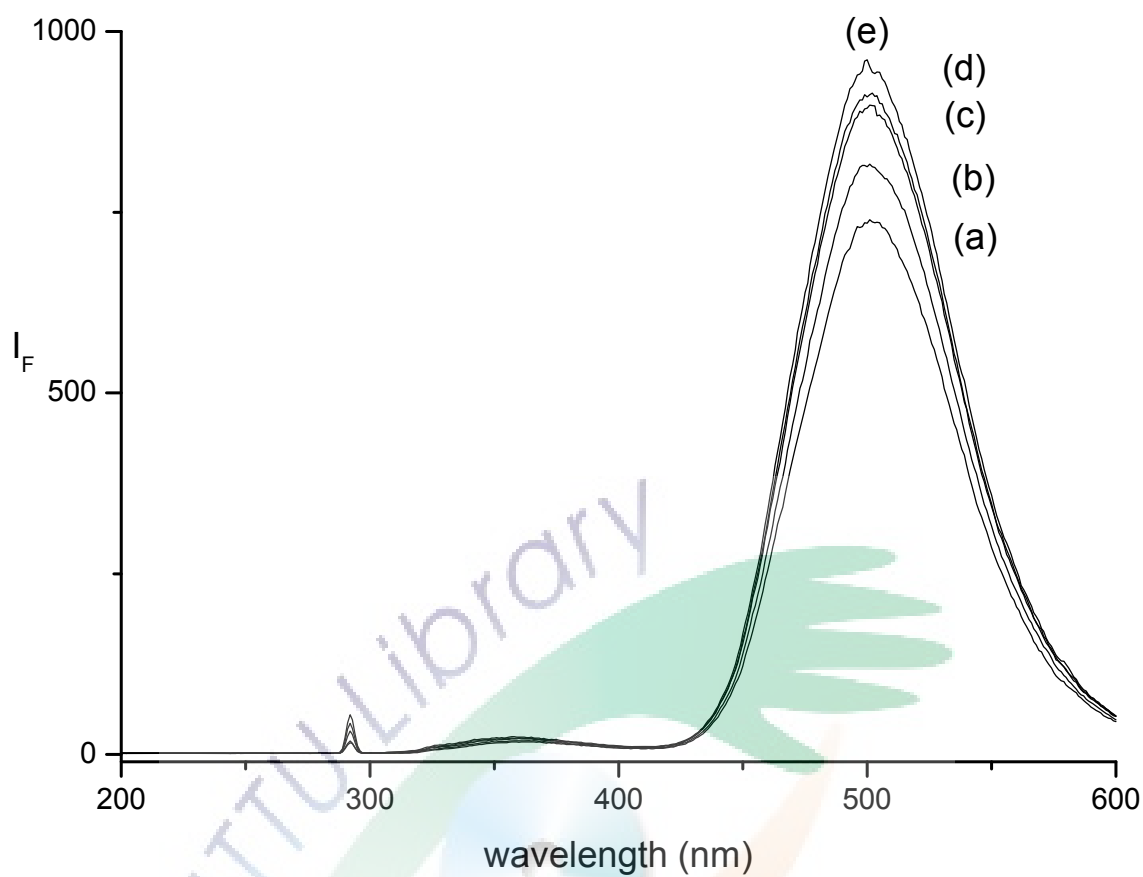


Fig. 10. Fluorescence intensity of ofloxacin at different concentration of HP-β-CD. (a) 0 mM; (b) 20 mM; (c) 40 mM; (d) 60 mM; (e) 80 mM. The concentration of ofloxacin was 5×10^{-5} M in phosphate buffer (50 mM, pH 2.3) and the excitation wavelength was 292 nm

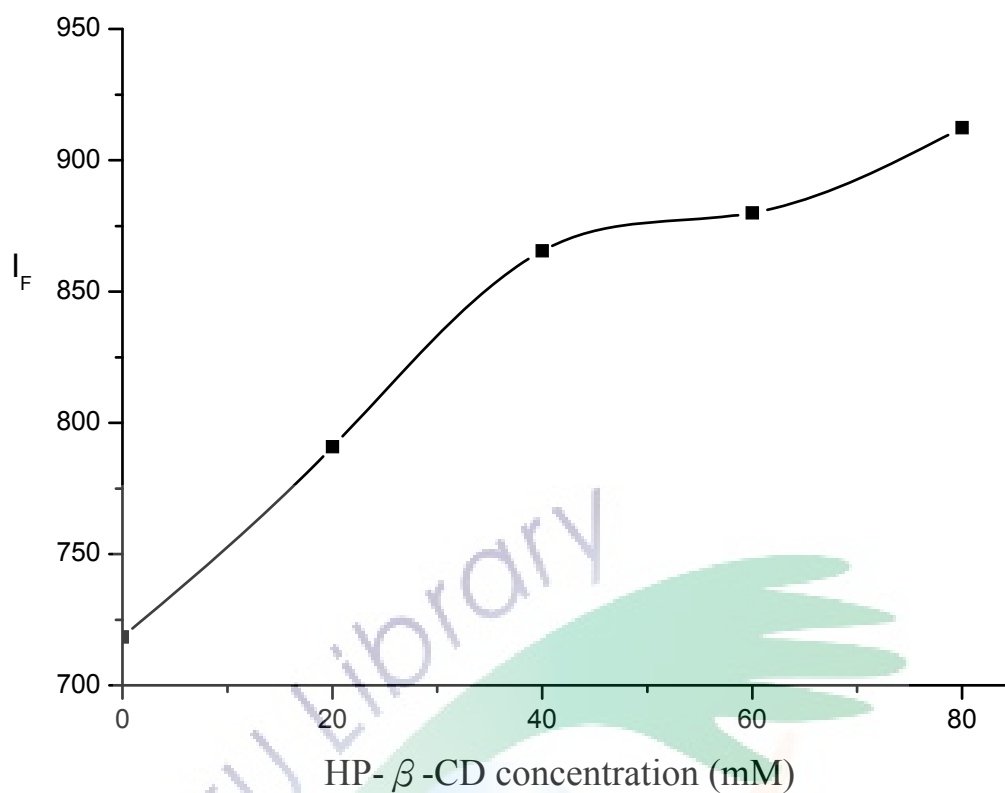


Fig. 11. Fluorescence intensity of ofloxacin at different concentration of HP- β -CD. The concentration of ofloxacin was 5×10^{-5} M in phosphate buffer (50 mM, pH 2.3), the excitation wavelength was 292 nm and emission wavelength was 509 nm.

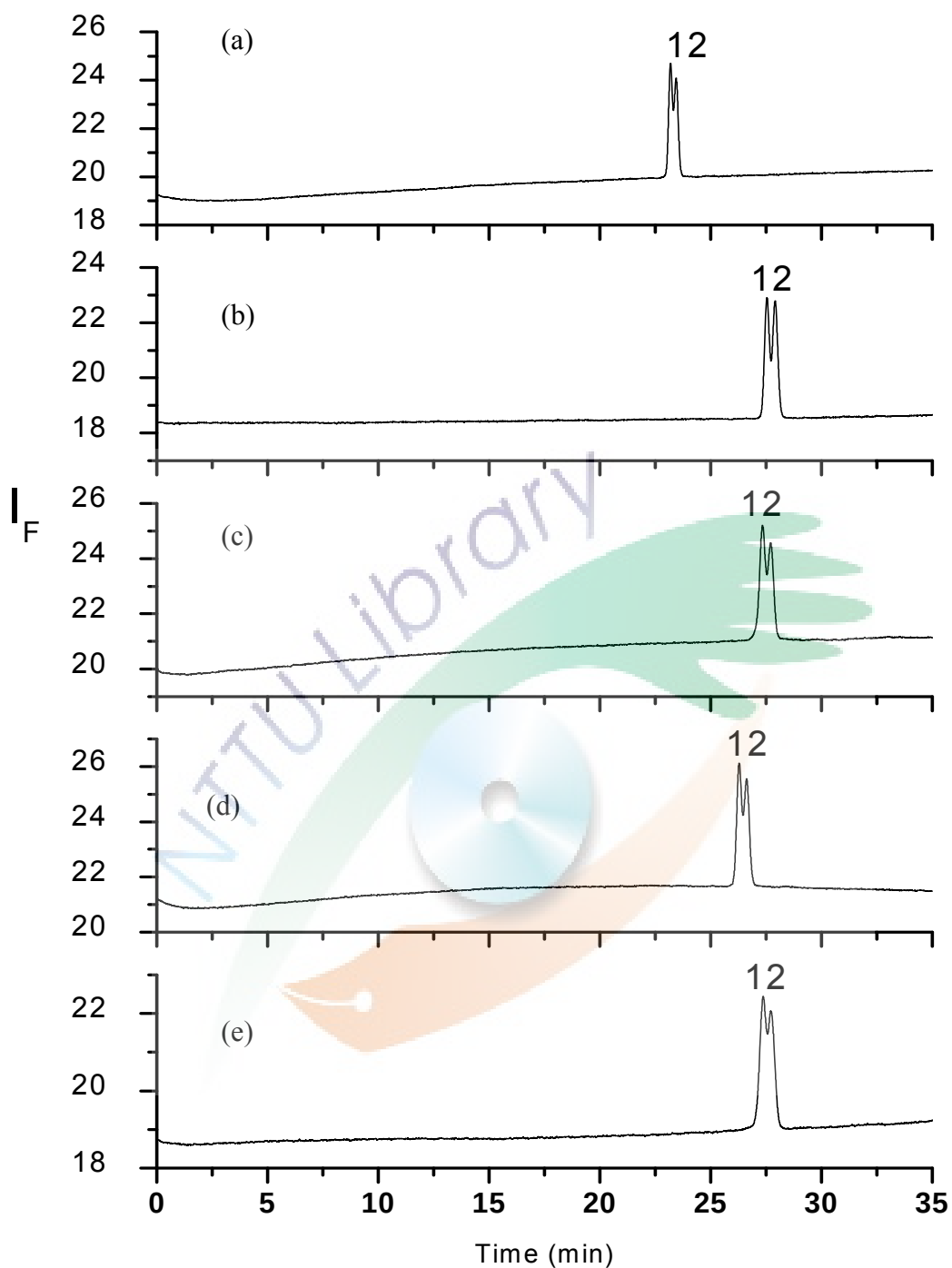


Fig. 12. Electropherograms of racemic ofloxacin in 50 mM phosphate with different concentration of chitosan. (a) 0 ; (b) 5×10^{-7} ; (c) 2.5×10^{-6} ; (d) 5×10^{-6} and (e) 5×10^{-5} (w/v). The HP- β -CD concentration was 5 mM. Other condition as described in Fig. 11.

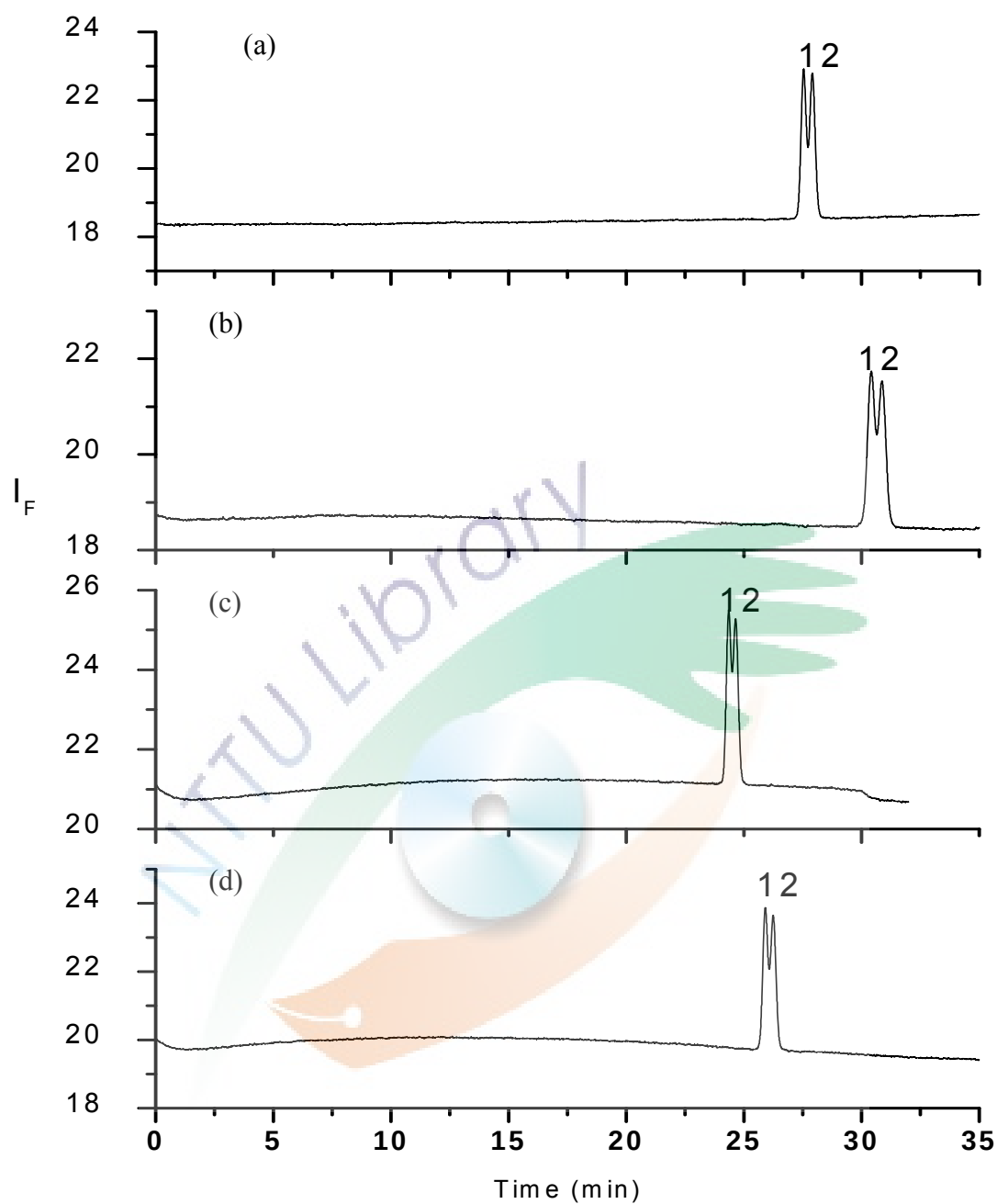


Fig. 13. Electropherograms of racemic ofloxacin 50 mM phosphate buffer with 5 mM HP- β -CD , 5×10^{-7} (w/v) chitosan and various metal ions. (a) blank ; (b) 5×10^{-8} M Co^{3+} ; (c) 5×10^{-8} M Zn^{2+} ; (d) 5×10^{-8} M Cu^{2+} ion in running buffer. Other condition as described in Fig. 11.

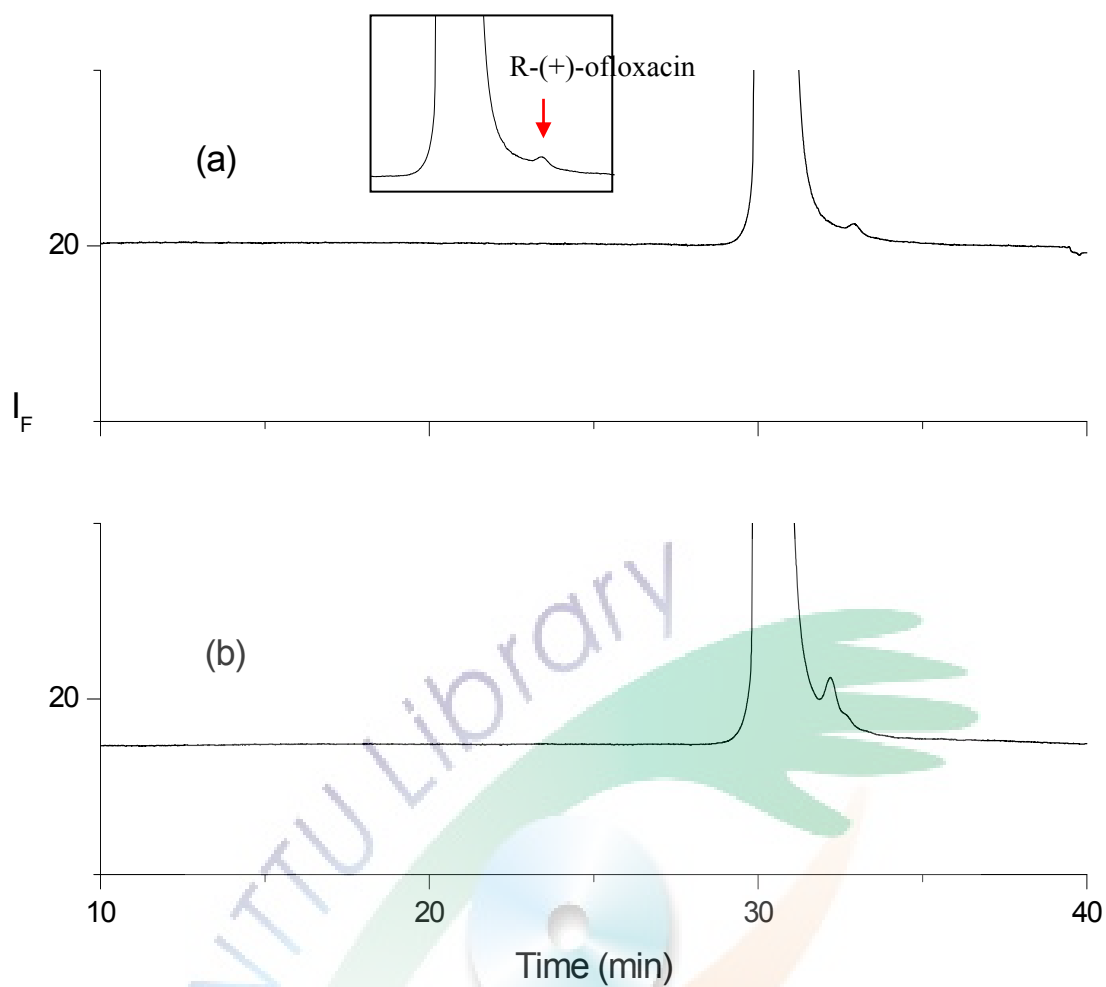


Fig. 14. Electropherograms of the commercial drug. (a) The stock solution diluted with distilled water ten times; (b) Drugs diluted with distilled water and spiked with 5×10^{-5} M ofloxacin. running buffer: phosphate buffer (pH 2.30) with 60 mM HP- β -CD. Other condition as described in Fig. 11.

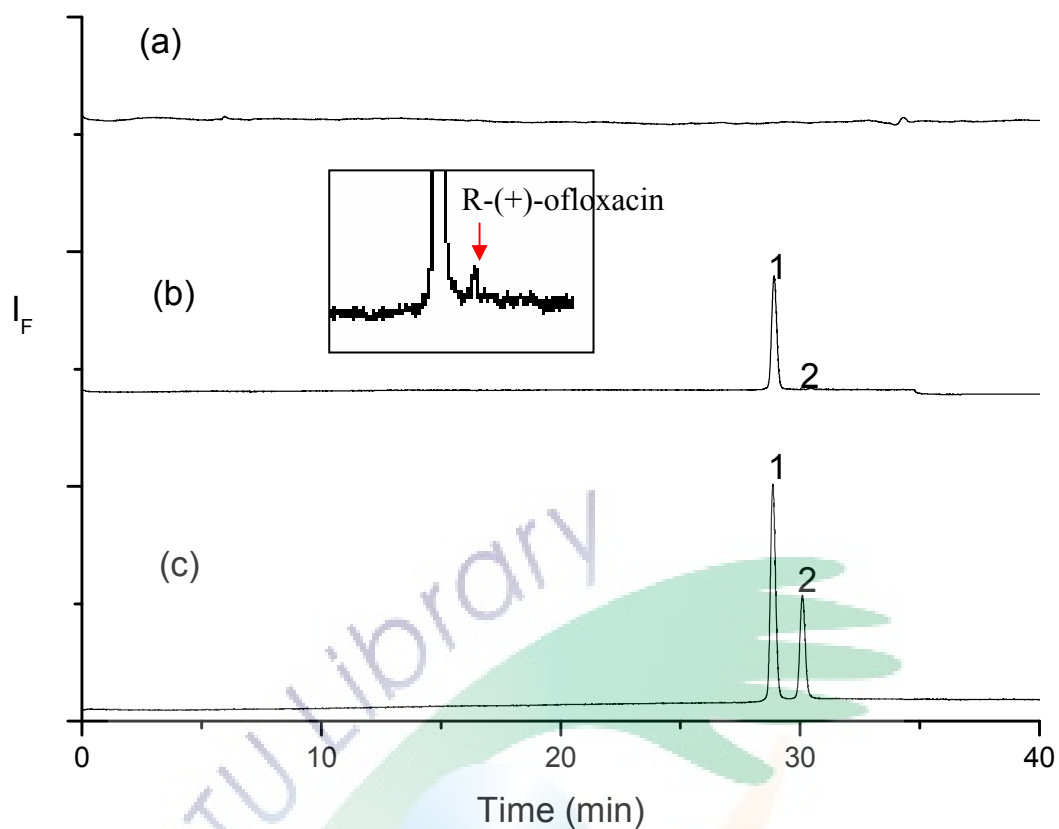


Fig. 15. Electrograms of (a) urine from a healthy person; (b) urine from a patient diluted 10 times; (c) urine from a patient diluted 10 times and spiked with 5×10^{-5} M ofloxacin . Other condition as described in Fig. 14.

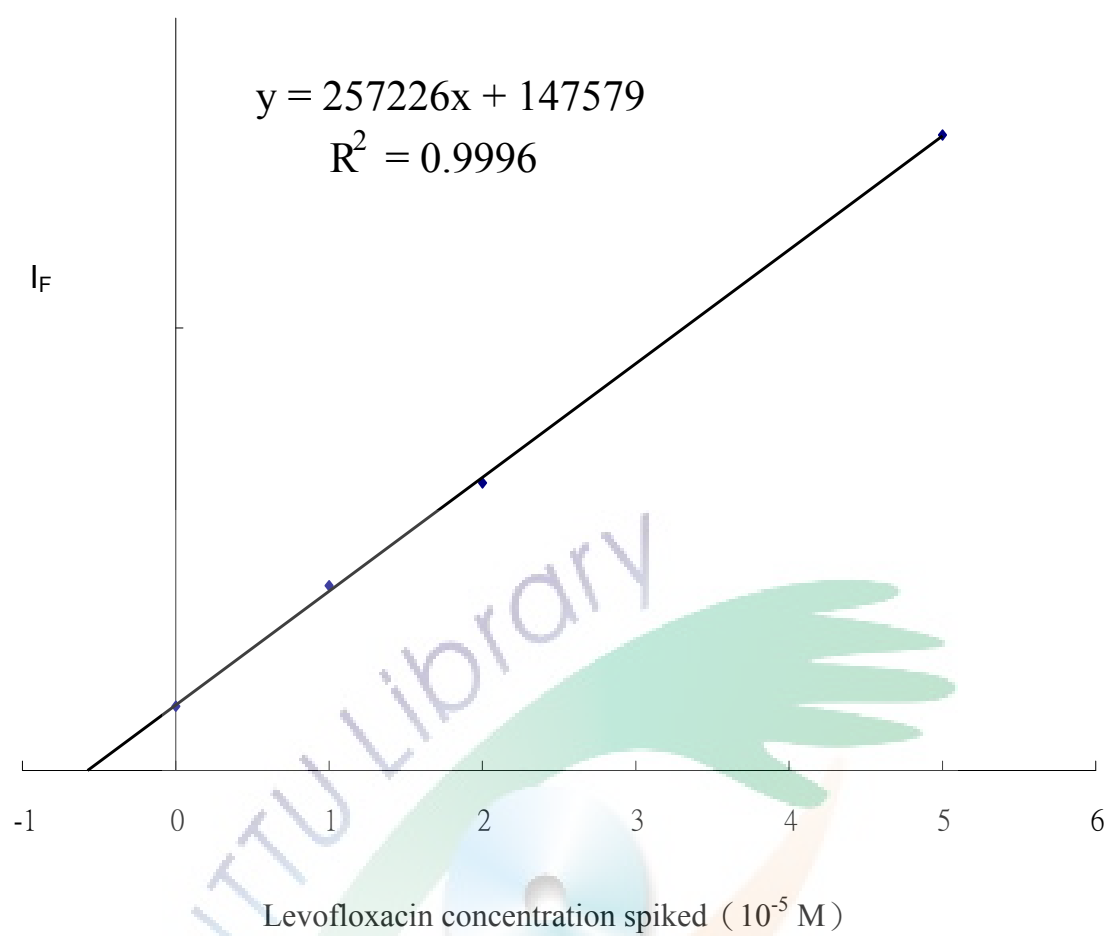


Fig. 16. The Standard addition method used to determinate the concentration of levofloxacin in patient's urine.

第二部分

偵測農藥

-以毛細管電泳分析疑似環境

荷爾蒙之農藥

第一章 緒論

一、前言

農藥一詞是泛指大量不同的生化、無機和有機化合物，包含位置、幾何和光學異構物，用來控制、保護和除去對植物的危害。這些有機化合物大部分都有明顯的生理活性，且具有毒性及持續性。應用在植物的同時會影響到土壤和地下水，進而影響飲用水，對食用有殘留農藥的動、植物的人體也會產生重大傷害。台灣現每年的農藥用量約為 25000 公噸。根據統計，台灣農藥使用量由 1988 年每千元的農產產值使用 0.049 公斤農藥，至 2002 年每千元的農業產值使用 0.062 公斤農藥，呈現緩慢上升的趨勢；到 2005 年的農藥使用量佔農業產值的比率達 0.089，相較於農產產值逐漸下降，顯示農藥使用量偏高^[1]。而部分農藥成分進入生物體內後會影響其內分泌系統，產生類似荷爾蒙的影響或是破壞、干擾原有內分泌系統的平衡及功能，進而對生物的成長、發育、生殖等產生不良影響，而這類化學成分稱之為環境荷爾蒙。目前日本公布疑似環境荷爾蒙的成分有戴奧辛、草脫淨、拉草、草滅淨、加保利等，其中的戴奧辛等成分已經被我國政府禁用，但部份成份如加保利仍在使用中。

日前，在菊花茶中檢驗出加保利的殘留，顯示對於蔬果及茶類製品的農藥檢測是必要且須持續進行，才能保障國人在食用上的安全，以下就本實驗測試的農藥一一說明其性質。

(一) 加保利(carbaryl, CAR)

加保利的分子式 $C_{12}H_{11}NO_2$ ，
IUPAC 命名為 1-naphthyl
methylcarbamate，結構如 Fig. 17。

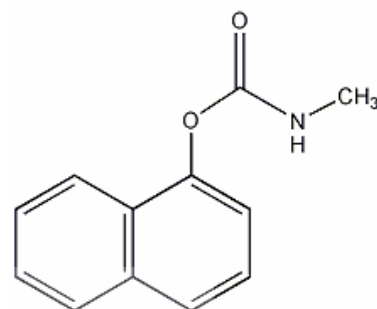


Fig. 17. Structure of carbaryl.

農藥分類屬於胺基甲酸鹽類

(N-methylcarbamates)，加保利的主要用途包含：

- 1.當做玉米、蔬菜、大豆、棉花、脫落性的果實、堅果、煙草及其他農作物或是森林、家畜、家禽、及其他非農業性用途（如環境衛生用，花園、草圃等），均可使用加保利來當作殺蟲劑。
- 2.殺恙蟲藥。
- 3.殺軟體動物劑^[2]。

加保利的半衰期會因所處的環境（泥土、沙地、水）、pH 值不同而有所差異，因為本實驗的實驗基質為水相，僅列水中之 pH 值對半衰期($T_{1/2}$ ，50% 主成份分解所需時間)的影響如下^[3]：

pH 值	6	7	8	9
半衰期	10 至 150 天	24 至 30 天	3 至 3 天	少於 1 天

可以看出加保利在鹼性條件下較易被分解，半衰期較

短，超過 pH 9 之後，在一天之內就會水解。在酸性條件下可以保存較久。

直到最近，加保利在植物中的代謝路徑和主要代謝物才被發現，如 Fig. 18^[4]。

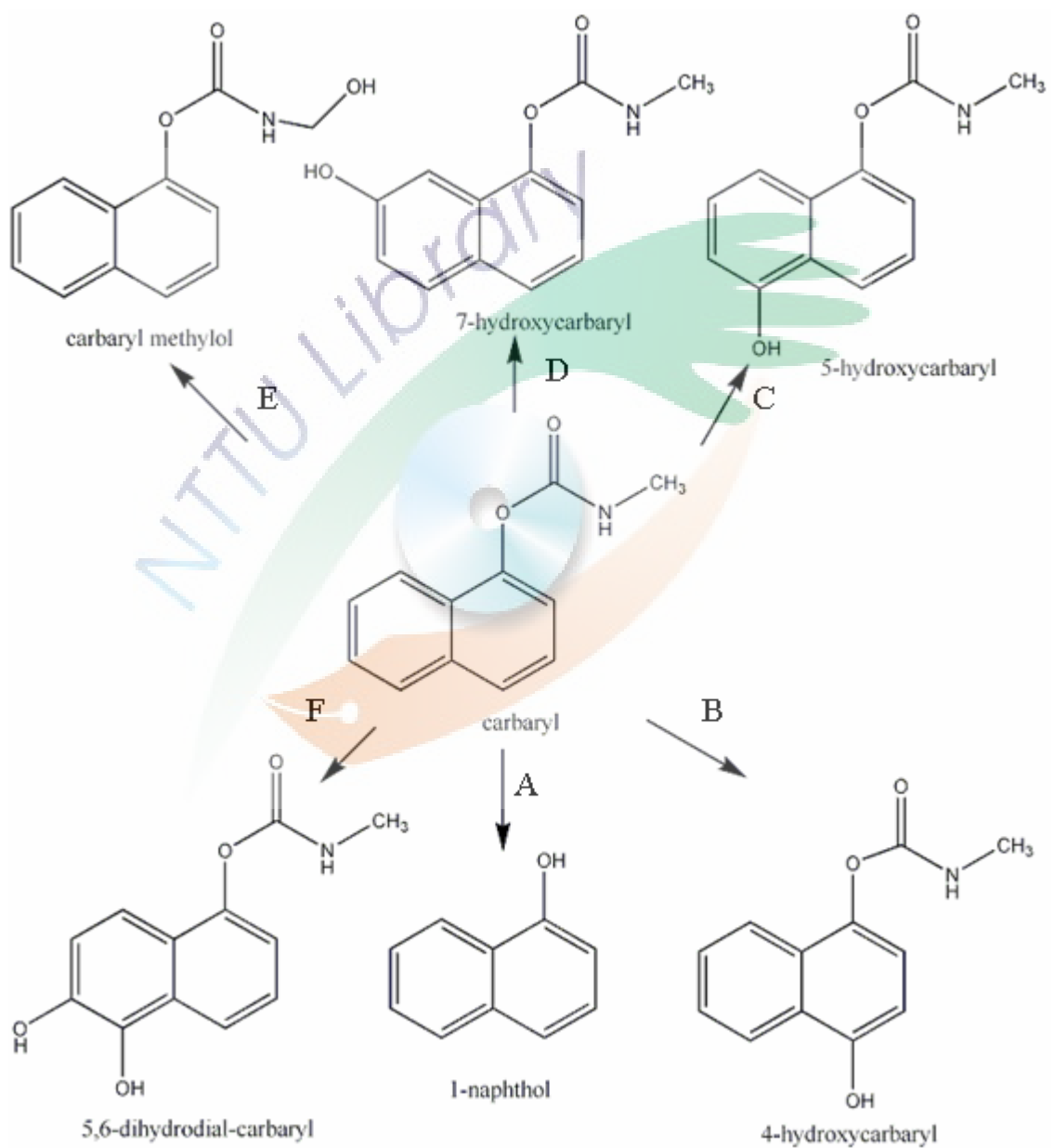


Fig. 18. The metabolism pathway of carbaryl.

加保利在哺乳動物的代謝路徑包含了數種細胞色素 P450 異構酵素執行環的羥基化及在鹼性條件下的水解，研究指出，加保利在老鼠和人體中主要代謝路徑是胺基甲酸鹽連接處的水解。因此，主要代謝路徑為 A，產物為 1-奈酚（1-naphthanol），其餘的路徑及產物如 4- 或 5-hydroxylcarbaryl 等在組織樣品中佔不到 1 %，再由 1-naphthanol 繼續降解，最後代謝成 CO_2 及 H_2O 。

加保利可以經由皮膚快速的吸收到血液中，會散佈到腎臟和肝臟中，屬於急毒性，其毒性主要作用在神經系統。在正常的情況下，當神經系統受到刺激時，神經元會釋放神經傳導物質如乙醯膽鹼（acetylcholine）至突觸（synapse）中，使刺激訊息傳送至下一個神經元，當訊息傳遞後，乙醯膽鹼會立即被乙醯膽鹼酵素（acetylcholinesterase, AChE）水解成乙酸（acetic acid）和膽鹼（choline）。當暴露在加保利時，因胺基甲酸鹽類殺蟲劑的結構與乙醯膽鹼相似，所以加保利與乙醯膽鹼共同競爭乙醯膽鹼酵素，因而阻礙生物體內乙醯膽鹼酵素之正常催化作用，以致體內乙醯膽鹼無法分解而累積，當累積在中樞神經系統時，過多的乙醯膽鹼刺激神經，造成中樞及自主神經系統過度反應而無法執行原有功能，而引起神經失調、發抖、腹瀉、尿失禁、支氣管收縮和瞳孔縮小等反應；當累積在神經肌肉時，則引起肌肉異常收

縮、虛弱、反射系統喪失和麻痺等現象。當胺基甲酸鹽類被代謝後，其對乙醯膽鹼酵素之作用即消失，則神經傳導系統便恢復正常，不過其引起的毒性作用卻頗為迅速，因此導致微量毒性效應的劑量和致死量差異很大^[5]。成人每日可接受攝取量（acceptable daily intake, ADI）為 8 mg/kg，對生命或健康有立即危險極限(immediately dangerous to life or health limit, IDHL)空氣樣品中為 100 mg/m³。LD₅₀（Lethal Dose, 50 percent kill）為 32 mg/kg（小鼠口服）。

(二) 貝芬替(Carbendazim, CAB)

分子式 C₉H₉N₃O₂，IUPAC 命名為 methyl benzimidazol-2-ylcarbamate，結構式如 Fig. 19。

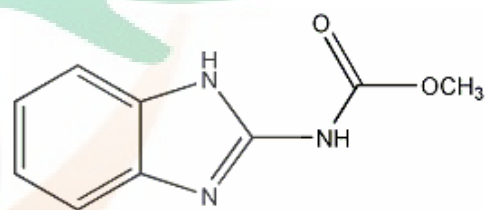


Fig. 19. Structure of carbendazim.

在農藥分類上屬於苯并咪唑類 (benzimidazole)，主要用途為殺菌劑，屬廣效性殺菌劑，主要為抑制微管蛋白的合成，作用機制為抑制真菌的有絲分裂，具治療作物功效。有研究發現貝芬替的毒性也可能會影響大鼠生殖與發育，對其生殖系統產生危害，可能有致畸胎毒性。成人每日可接受攝取量為 0.3 mg/kg。LD₅₀ 為 6400 mg/kg（白鼠口服）。

(三) 腐絕(Thiabendazole, TBZ)

腐絕分子式為：C₁₀H₇N₃S，IUPAC 命名

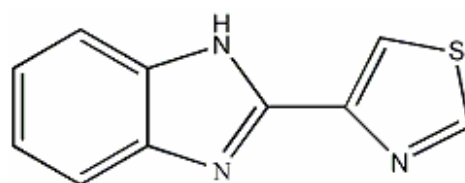


Fig. 20. Structure of thibendazole.

2-(thiazol-4-yl)benzimidazole，在農藥分類上屬於苯并咪唑類 (benzimidazole)，結構如 Fig. 20。

其主要用途為：

- 1.防止蔬菜水果發霉、腐爛等的農藥。
- 2.添加在蔬菜水果的打臘液中，保持其鮮度。
- 3.腐絕的次磷酸鹽可應用在非食物的方面上，如裝飾電燈泡。也可當作防腐劑，添加在油漆、地毯等。
- 4.是一個用途廣泛的驅蟲劑，可適用於動物和人類。
- 5.在醫學方面為有效的金屬螯合劑。

腐絕可以在環境中持續一段很長的時間，在土壤中經由光解及水解半衰期約為 933 天，在水中且暴露在非天然的光線下會加速光解，半衰期約為 29 小時。腐絕作為殺菌劑時，主要機制為抑制真菌微管的功能，導致細胞核分裂時染色體無法分離。作為驅蟲劑，作用機制為干擾寄生蟲的丁烯二酸鹽還原酵素系統 (fumarate reductase system)，妨礙能量的來源。丁烯二酸鹽是克氏循環的一部分，而克氏循環是有機體的共同能量來源，因此此腐絕的活性模式可能可以當

作是評估人類大量暴露在腐絕下所會產生的風險。腐絕可能也會阻止寄生蟲的微管集合，會抑制寄生蟲乙醯膽鹼酵素的分泌使得其妊娠終止。腐絕的代謝路徑及代謝物如下：

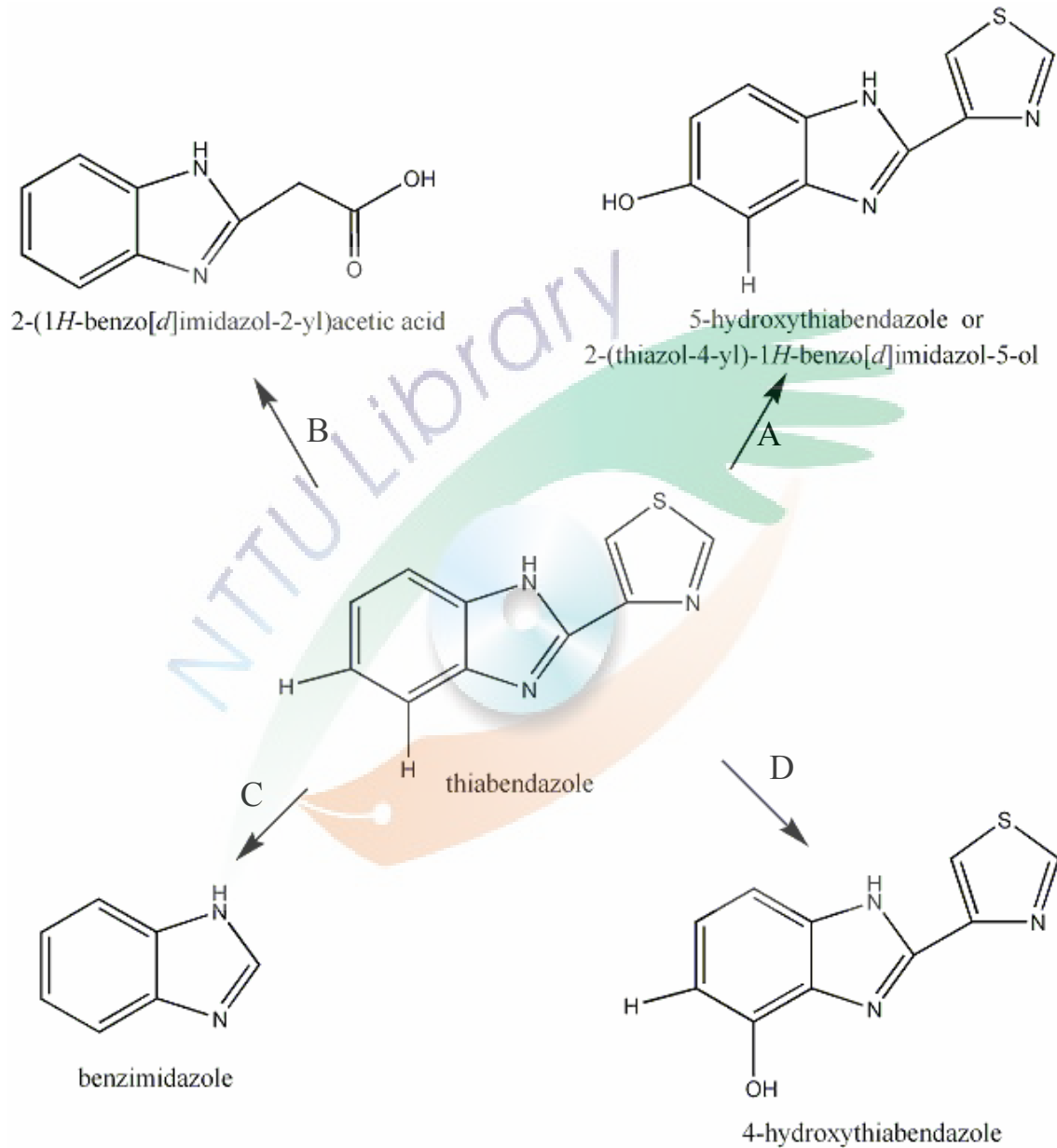


Fig. 21. The metabolism pathway of thiabendazole.

主要代謝物是經由 CYP1A2 催化苯環羥化產生 5-hydroxythiabendazole (5-OHTBZ)，如途徑 A 所示，5-OHTBZ 會再轉變成尿酞酸化物 (glucuronide) 或硫酸鹽結合體 (sulfate conjugate) 從尿液或膽汁排泄。然而文獻也指出腐絕會經由 CYP1A2 促成的機制結合組織的蛋白質，為一個不可逆的反應。腐絕會被完全代謝成無活性的化合物，一般視為安全的物質，但在高濃度代謝物的狀況下還是會產生毒性，暴露在高濃度的腐絕中，將導致頭暈、厭食，噁心和嘔吐。接觸到皮膚可能會產生 Stevens—Johnson 徵候群，(嚴重多型性紅斑，並侵犯口腔及會陰部之粘膜，全身倦怠，發燒，頭痛，關節痛，以及結合膜炎)。其他症狀包括搔癢、皮疹、頭疼、疲勞，白血球減少症、耳鳴、心跳緩慢和低血壓症等。在老鼠跟狗的實驗中，腐絕主要是作用在甲狀腺和肝臟，過高的腐絕濃度會干擾甲狀腺激素的平衡，因而形成致癌物質，且服用高劑量的藥量會抑制老鼠骨髓的成長並導致減退，其他慢性作用包括中毒性腎損害和致畸性，會導致老鼠肢體發展和胚胎損傷。對人類而言會引起中毒性腎損害，成人每日可接受攝取量為 0.056 mg/kg^[6]，LD₅₀ 為 3,800 mg/kg (大鼠口服)。

(四) 奈乙醯胺(1-naphthylacetamide, NAD)

分子式 $C_{10}H_7CH_2CONH_2$, IUPAC

命名為 2-Naphthalen-1-ylacetamide,

結構如 Fig. 22。

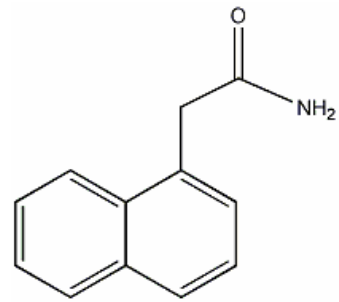


Fig. 22. Structure of 1-naphthylacetamide.

主要用途：植物生長調節劑，可作為發根劑。中毒症狀：呼吸困難、

刺激食道、噁心或嘔吐。LD₅₀為1690 mg/kg (大鼠口服)。

(五) 奈乙酸(1-naphthylacetic acid, NAA)

分子式 $H_{10}O_2C_{12}$, 結構

式如 Fig. 23。

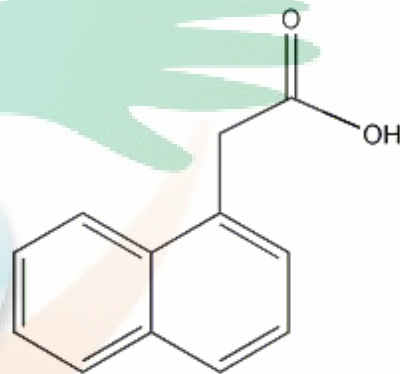


Fig. 23. Structure of 1-naphthylacetic acid.

主要用途為植物生長調節劑，可作為發芽抑制劑，也可用來改變落果的時

間。可以經由吸入、食入或皮膚吸收，進入人體後會對粘膜、上呼吸道、眼、皮膚等組織有極強的損壞作用。吸入後可能會有喉嚨、支氣管發炎、水腫、痙攣，化學性肺炎或肺水腫而致死。中毒症狀有燒灼感、咳嗽、喘息、喉炎、氣短、頭痛、噁心和嘔吐，屬低毒類。LD₅₀：1000 mg/kg (大鼠口服)

二、文獻探討

行政院農委會農業藥物毒物試驗所目前公布的農藥檢驗方法如下^[7]：

	Carbaryl	Carbendazim	Thiabendazole	1- Naphthyl-acetic acid
檢測方式	HPLC連接UV偵測器，檢測波長280 nm	HPLC連接UV偵測器，檢測波長280 nm	GC 連接 FID 偵測器	HPLC 連接 UV 偵測器，檢測波長225 nm
層析管	C ₁₈ ，粒徑 5 μm，內徑4.0 mm，長度25 cm	C ₁₈ ，粒徑 10 μm，內徑 3.9 mm，長度30 cm	0.32 mm × 12 m (ID×L)，CP-sil 5CB，WCOT，融矽管柱	逆相層析管柱，4.6 mm × 150 mm (ID × L)，Inertsil 5 μm ODS-2
儀器操縱條件	動相：純水：氘甲烷 50:50(v/v)。流速：1.0 mL/min。	動相：5%醋酸水溶液：氘甲烷 (20：80，v/v)。流速：1.5 mL/min	溫度：注入器：270 °C。層析管柱：190 °C，持續10分鐘。檢出器：270 °C。 氣體流速：攜帶氣體(氮氣) 2 mL/min。分流比：1 / 50。 補充氣體(氮氣)：28 mL/min。 氬氣：30 mL/min。 空氣：300 mL/min。	動相：氘甲烷+ 0.04 % (v/v) 磷酸水溶液(330 + 670，v/v)。流速：1.0 mL/min。

以上的方法是針對農藥有效成分、不純物及其他成分含量分析，另外還有食品中殘留農藥檢驗方法，可檢驗多種農藥，其檢驗方法分為氣相層析儀(gas chromatography, GC)及高效能液相層

析 (high performance liquid chromatography, HPLC)，偵測器分別為火焰光度偵測器 (flame photometric detector, FPD) 和電子捕獲偵測器 (electron capture detector, ECD) 及螢光偵測器 (fluorescence detector)，對加保利最低檢測量為0.1 ppm。衛生署針對不同的作物別規定不同的殘留農藥容許量，加保利在0.1~2.0 ppm之間，貝芬替在0.1~4.0 ppm，腐絕在0.1~10.0 ppm，奈乙酸得免定容許量，奈乙醯胺未定^[8]，然而從行政院農業委員會農糧署可以查得關於奈乙酸和奈乙醯胺的外國殘留量限制 (<http://www.afa.gov.tw/index.asp>)，對梨子中奈乙酸最高殘留量為1.0 ppm，奈乙醯胺為0.1 ppm。

文獻中關於農藥偵測也有許多方法，在高效能液相層析方面，Pawlowski 等在1998年提出使用50大氣壓高壓熱水萃取食物中的貝芬替和腐絕後使用液相—液相濃縮，以ion-pairing HPLC方法使用紫外光偵測器及螢光偵測器偵測，測試了香蕉、檸檬、蘋果及洋菇等食物都有不錯的回收率^[9]。Abad等以單一酵素抗體的enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) 和使用NaOH和OPA將樣品衍生化後用HPLC—螢光偵測器兩種方法偵測水果和蔬菜中的加保利等農藥，ELISA可應用在未純化的樣品萃取可得到100 %的回收率^[10]。Horne實驗團隊在2003提出應用HPLC及酵素的方法偵測肉類及內臟中腐絕的含量，指出動物食用腐絕後，會殘留在內臟及肉中，故需監控肉品中的腐絕含量，以免對

人體造成傷害^[11]。Singh等提出以microwave-assisted extraction (MAE) 萃取蔬果中的貝芬替等農藥，再以HPLC—紫外光偵測器偵測定量，在標準品中的最低偵測量 (limit of detection, LOD) 為0.018 $\mu\text{g/mL}$ ，真實樣品(紅辣椒)中最低可達到0.032 $\mu\text{g/mL}$ ^[12]。Wang等在2005提出以HPLC/ESI-MS/MS偵測嬰兒食品中的加保利、腐絕及貝芬替等13種農藥，線性範圍1~50 mg/kg，最低偵測極限加保利：0.09 $\mu\text{g/kg}$ ，腐絕：0.1 $\mu\text{g/kg}$ ，貝芬替：0.08 $\mu\text{g/kg}$ ^[13]。Haib實驗團隊提出應用高壓液相萃取法，經過自動化的固相萃取淨化，可將農藥分成三部分：有機磷類、有機氯和胺基甲酸鹽類，分別以GC/MS/MS（有機磷類，有機氯類）和HPLC—螢光儀（胺基甲酸鹽類）進行分離偵測，應用在菸草上可分析多種農藥，加保利的最低偵測極限為0.01 ppm，最低定量極限 (limit of quantification, LOQ) 為0.35 ppm^[14]。

在質譜儀方面，以GC-IT-MS/MS偵測尿液中加保利和其代謝物並定量，線性範圍1~200 ng/mL，最低偵測極限0.1 ng/mL^[4]。Orea等提出使用超臨界流體萃取 (supercritical fluid extraction, SFE) 再使用 LD (laser desorption) 和 REMPI-TOF-MS (resonance-enhanced multi-photon ionization, time-of-flight mass spectrometry) 偵測胡椒中的貝芬替，線性範圍為0.3~6 ppm，最低偵測極限是0.3 ng^[15]。Ito實驗團隊也提出利用 flow-injection ESI MS/MS (electrospray ionization) 偵測柑橘類

水果中的腐絕等農藥，線性範圍為0.4~10 $\mu\text{g/mL}$ ，最低偵測極限是1 mg/kg，回收率有100.5~103.2 %^[16]。

在電化學方面，使用鑽石電極以方波法進行偵測，在純水中加保利的線性範圍為2.5~30 μM ，偵測極限為 $8.2 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ ^[17]。Soto-Chinchilla等提出過氧化化學發光法偵測水中及胡蘿蔔中的加保利，線性範圍為0.026~0.65 $\mu\text{g/mL}$ ，偵測極限為0.009 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限是0.102 $\mu\text{g/mL}$ ^[18]。Veglia實驗團隊提出添加 $\beta\text{-CD}$ 和 $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ 可以增強加保利的螢光強度，以螢光儀偵測並測定其連結常數，發現添加 $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ 後螢光增強的效果比 $\beta\text{-CD}$ 好，靈敏度變佳，並測試了不同的有機溶劑對螢光增強的影響，此方法應用在水果及自來水的偵測時，加保利線性範圍為0.8~13.0 ng/cm^3 ，LOD可達到1.94 ng/cm^3 ^[19]，此文獻提供了我們一個靈感，可以試著將 $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ 添加在緩衝溶液中，測試其在電泳的過程中是否也可以增強樣品的螢光強度，如此可以達到促進分離效率與增加靈敏度的雙重效果。

毛細管電泳因具有進樣量少、靈敏度高，操作簡便等優點，也有大量的文獻問世。Hinsmann等利用自動線上固態萃取及毛細管微胞電泳連接二極體陣列偵測器同時偵測包含加保利等7種農藥殘留，自動線上濃縮萃取是採用continuous flow system技術，使樣品注入 C_{18} 管柱10分鐘後再用30 %ACN洗出，MEKC分離條件為pH 9.5 磷酸緩衝溶液中添加60 mM陰離子界面活性劑SDS，加

入8 %ACN為有機修飾劑。在未經C₁₈管柱濃縮萃取時，使用MEKC對各農藥定量時，可得加保利的線性範圍為1~5 µg/mL，LOD為0.24 µg/mL，LOQ為0.79 µg/mL；使用C₁₈管柱濃縮萃取後對各農藥定量，加保利的線性範圍為0.05~0.025 µg/mL，LOD為0.02 µg/mL，LOQ為0.05 µg/mL，可發現此線上濃縮法可降低偵測極限達12倍。且此方法可應用在偵測河水中農藥的含量，回收率約在90~114 %之間^[20]。Mañes等人提出可在葡萄等四種水果中偵測貝芬替及腐絕等7種農藥的MEKC方法，並比較使用SPE前後的再現性，使用的緩衝溶液為4 mM borate buffer (pH 9.2) 添加75 mM SDS。線性範圍為1~100 µg/mL，LOD在1~2 mg/mL之間，未經過固相萃取前，在葡萄與番茄中添加1 mg/kg貝芬替及腐絕的回收率為53~58 %之間，經過固相萃取後，回收率50~69 %之間，在四種水果基質中LOD分別在0.1~1 mg/kg^[21]。Molina的實驗團隊提出使用MEKC-ESI-MS的方法偵測包含加保利等8種農藥，為了克服界面活性劑在ESI-MS所造成的電噴灑穩定性差、質譜偵測器的污染及靈敏度的下降，採用了三種方式去克服：在酸性條件(pH 5) 下的PF-MEKC (partial filling-MEKC) 和在酸性條件(pH 5) 下使用空白管柱的RMMs-MEKC (Reverse migrating micelles-MEKC) 及在鹼性條件 (pH 9) 下使用 poly(sodium 2-actylamide-2-methylpropane-sulfonate) 修飾過的毛細管進行RMMs-MEKC。緩衝溶液為醋酸銨添加SDS作為分離條件，加保

利的LOD在此三種條件下分別為0.08、0.04及0.1 $\mu\text{g/mL}$ ^[22]。Travares團隊則是針對微量的樣品提出了MEKC濃縮偵測包含加保利的九種農藥的三種方法：sweeping (SW)、stacking with reverse migration of micelles (SRMM) 及在樣品注入前先注入一段水。MEKC條件：pH 2.5, 0.02 M磷酸緩衝溶液添加0.025 MSDS及10 % MeOH，偵測器：DAD (diode array detector) 220 nm。對加保利的偵測極限分別為5.6、5.3及2.7 $\mu\text{g/L}$ ，最後將這些方法應用在真實樣品（自來水及胡蘿蔔萃取液），都可以得到不錯的結果^[23]。Carretero等人也提出使用MEKC-DAD偵測包含NAD、CAR、TBZ、CAB等五種樣品，電泳條件為30 mM $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (pH 9) 添加15 mM SDS。線性範圍分別為2.4~10、0.7~10、2.7~10、0.7~10 $\mu\text{g/mL}$ ，LOD分別是0.7、0.2、0.8、0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，LOQ分別為2.4、0.7、2.7、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 。應用在真實樣品上可以不經任何前處理直接偵測添加在黃瓜中的農藥^[24]。

Picó的團隊在2003發表毛細管電泳應用在農藥分析上的文獻回顧，針對了不同的前處理過程增加的濃縮倍數、堆疊技術及分析條件作了一個總整理，最後，比較了GC、LC、CE各自的優缺點，並提出解決辦法^[25]。Rodríguez-Delgado的團隊也在2004年發表毛細管電泳在農藥偵測上的文獻回顧，針對近年來的文獻分別對樣品的萃取、偵測模式及偵測器作一個整理^[26]。對以上文獻中的偵測樣品、偵測方式及偵測結果等作一個整理，如Table 5。

綜合以上的文獻探討，可知為了能夠偵測到低濃度的農藥，大都需要經過費時且複雜的前處理，而毛細管電泳具有線上濃縮操作簡單、易自動化的優點適合農藥分析。但因為農藥為了其長效的藥性而大都不帶電且為疏水性，造成分離及溶解度上的困擾，而帶電荷的界面活性劑除了可形成微胞幫助溶解之外，還可以達到使樣品分離的效果。因此以微胞電動層析分離不同的農藥是一可行性極高的方法，故本研究採用毛細管電泳作為分析的方法，為了提高毛細管電泳的靈敏度，連接螢光偵測器偵測農藥樣品。



Table 5. The analysis conditions collected from reference papers

1. High performance liquid chromatography (HPLC)							
Sample	Matrix	Preparation	Condition	Detector	Linear range	LOD	Ref.
thiabendazole, carbendazim	banana, lemons, orange, mush- rooms, rice	water 50 atm extraction LLE : ethyl acetate	Mobile phase : buffer :1 g 1-decanesulfonate,sodium salt, 10 mL triethylamine and 7 mL H ₃ PO ₄ diluted to1 L . buffer/methanol (55 : 45, v/v) . Flow rate: 1.5 mL/min	DAD (280nm) FL CAB: (280 nm/310 nm) TBZ: (305 nm/380 nm)	-	-	[9]
carbaryl, carbofuran, methiocarb	cucumbers, straw- berries	SPE	ELISA Antibody carbaryl:LIB-CNH45 Tracer carbaryl:HRP-CPNU HPLC Mobile phase: water-methanol-ACN Flow rate: 1.5 mL/min NaOH and OPA as derivatization agents	FL (339 nm/445 nm)	-	-	[10]
thiabendazole	livers, hepatocyte	ethyl acetate	Mobile phase: CH ₃ CN/0.05 M NH ₄ CO ₃ (1 : 4, v/v)	PAD	-	-	[11]

		extraction	Flow rate: 1 mL/min				
thiamethoxam, imidacloprid, carbendazim	cabbage tomato, chilies, peppers, potatoes	MAE: 60 Hz, 1100 W	Mobile phase: ACN/water (containing 0.01% orthophosphoric acid) (1:1, v/v) Flow rate: 1.0 mL/min.	UV (270 nm)	0.1~2.0 µg/mL	cabbage:0.048 tomato:0.045 chilies:0.032 peppers: 0.041 potatoes:0.043 (µg/mL):	[12]
aldicarb sulfoxide, aldicarb sulfone, oxamyl, methomyl, formetanate, 3-hydroxy- carbofuran, carbendazim, thiabendazole, aldicarb, propoxur, carbofuran, carbaryl, methiocarb	apple-base d infant foods	SPE	Mobile phases: solvent A: ACN, solvent B: 0.1 M ammonium acetate with 20 % ACN in water solvent C: water gradient Flow rates: 0-13 min, 0.2 mL/min; 13-19 min, 0.3 mL/min; and 19-20 min, 0.2 mL/min.	ESI-MS/MS	CAB : 1.1~54.0 TBZ: 1.1~549 carbaryl: 1.1~55.2 (µg/kg)	carbendazim: 0.08 thiabendazole: 0.1 carbaryl : 0.09 (µg/kg)	[13]
organochlorin	tobacco	Pressurized	Mobile phase: water/methanol gradient	FL(330 nm/ 465		carbaryl	[14]

e compounds, organo- phosphorus, N-methyl- carbamates		liquid extraction (PLE) , SPE	Post-column derivatization	nm)		0.01 ppm LOQ:0.035 ppm	
2. Mass spectrometric method (MS)							
Sample	Matrix	Preparation	Condition	Linear range	LOD	Ref.	
carbaryl, carbofurm	urine	enzymic hydrolysis, SPE using Oasis HLB sorbent cartridges. trifluoroacetic acid anhydride (TFAA) as derivatization agent	GC-MS/MS capillary column (30m×0.25mm I.D., 0.25 μm film thickness). The capillary column was connected with a universal connector to a 1 m-deactivated silica pre-column (0.25 mm). Helium (purity 99,999 %) was used as a carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min.	1~2000 ng/mL	0.1 ng/mL	[4]	
carbendazim	pepper	SFE 300 atm, 50 °C , 15 mL CO ₂	LD-REMPI-TOF-MS Nd-YAG laser:532 nm(desorption), 281.1 nm (ionization)	0.3~6 ppm		[15]	
thiabendazole, Imazalil, o-Phenylphenol	citrus fruit	LLE	FI/ESI-MS/MS carrier liquid : methanol-water (90:10, v/v) Flow rate : 200 μL/min.	0.4~10 μg/kg	1 mg/kg	[16]	
3. Other methods							
Sample	Matrix	Preparation	Condition	Linear range	LOD	Ref.	

carbaryl	-	-	boron doped diamond electrode square-wave voltammetry in 0.1 mol /L Na ₂ SO ₄ , pH 6.0 °	2.5~30.0 × 10 ⁻⁶ mol /L	8.2 mg /L	[17]
carbaryl	cucumber	LLE ethyl acetate	photodecomposition and peroxyoxalate chemiluminescent detection MA and OPA as derivatization agents	0.026~0.65 µg/mL	0.009 µg/mL LOQ 0.026 µg/mL	[18]
carbaryl, carbofuran	fruit, tap water		The best result is added HP-β-CD in sample and used n-propanol as organic modifier.	0.8~13 µM	14.5 ng/cm ³	[19]

4. Capillary electrophoresis (CE)

Sample	Matrix	Preparation	Condition	Detector	Linear range	LOD	Ref.
fenuron, carbaryl, atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, ametryn	river water	SPE	MEKC 60 mM SDS, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 8 % ACN, pH 9.5	DAD (226 nm)	0.05~0.025 µg/L	0.01~0.03 µg/L	[20]
carbendazim, imazalil, methyl- thiophanate, O-phenylphenol, prochloraz, procimidone, thiabendazole triadimefon	grape, lettuce, orange, tomato	LLE SPE	MEKC 4 mM borate with, 75 mM sodium cholate (pH 9.2)	DAD (210 nm)	1~100 µg/mL	0.2~1.0 mg/kg	[21]
oxamyl, methomyl,	-	-	MEKC	IT-ESI-	0.04~2.0 mg/L	-	[22]

aldicarb, propoxur, carbofuran, aminocarb, carbaryl, pirimicarb			PF: 20 mM NH ₄ Ac (pH 9.0), micellar solution: 10 mM NH ₄ Ac, 20 mM SDS (pH 9.0) RMMs: 10 mM NH ₄ Ac, 10 mM SDS (pH 5 and 8.5) sheath liquid : 150 µL/h, water/methanol (1:1 v/v)	MS			
carbendazim, simazine, atrazine, propazine, ametryn, diuron, linuron, carbaryl, propoxur	carrot extracts, drinking water	sweeping and stacking (SRMM) SPE	MEKC 20 mM phosphate (pH 2.5), 25 mM SDS, 10 % methanol	DAD (220 nm)	2~46 µg/L	2.5 µg/L (carrots), 0.1 µg/L (drinking water, SPE)	[23]
naphthalene-acetamide, carbaryl, 1-naphthanol, thiabendazole, carbendazime	cucum-ber	liquid-liquid extraction	MEKC 30 mM NH ₄ Cl /NH ₃ buffer(pH 9.0), 15 mM SDS, 10 % methanol.	DAD (228nm)	CAB:2.4~10 TBZ:0.7~10 CAR:0.7~10 NAD:2.7~10 (µg/mL)	CAR:0.2 CAB:0.7 TBZ:0.2 NAD:0.8 (µg/mL)	[24]

三、微胞電動層析 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)

(一) 微胞電動層析簡介

微胞電動層析是毛細管電泳中使用最廣的方式之

一。優點是除了帶電的離子之外，還可以將不同的中性物質分離出來。MEKC 的特點是要在緩衝溶液中加入界面活性劑，界面活性劑一端是親水性，另一端通常為長碳鏈為疏水性，添加的界面活性劑濃度超過其臨界微胞濃度

(critical micellar concentration, cmc) 之後，界面活性劑會以疏水端互相聚集形成微胞，利用分析物質與微胞之間的作用力不同，達到分離中性物質的目的。

(二) 界面活性劑

界面活性劑有很多種類，在電泳時通常會選擇帶有電荷的界面活性劑。SDS為帶負電的界面活性劑，使用在分離時會以和電滲流相反的方向移動，但因為電滲流的速度比界面活性劑的速度快，還是會往同方向進行分離，但因為速度較慢，所以會較慢出來，因此與SDS的作用力越強的分析物就會越慢出來。

至今尚未有文獻探討農藥在陽離子界面活性劑下之

分離條件，因此本研究擬探討農藥在陽離子界面活性劑之毛細管電泳分離情形。使用陽離子界面活性劑如CTAB，可以修飾管壁使電滲流逆向，因為管壁為矽醇基構成，活化後會帶負電吸引一層CTAB，CTAB的另一端長鏈為疏水性，會因為疏水作用而疏水端相吸引再連接上另一層CTAB，親水端朝外形成一帶正電的偽固定相，吸引帶負電的離子形成電雙層，進行電泳時就會由負極往正極移動，故在電泳時需使用負電壓進行偵測，見Fig. 24^[27]。

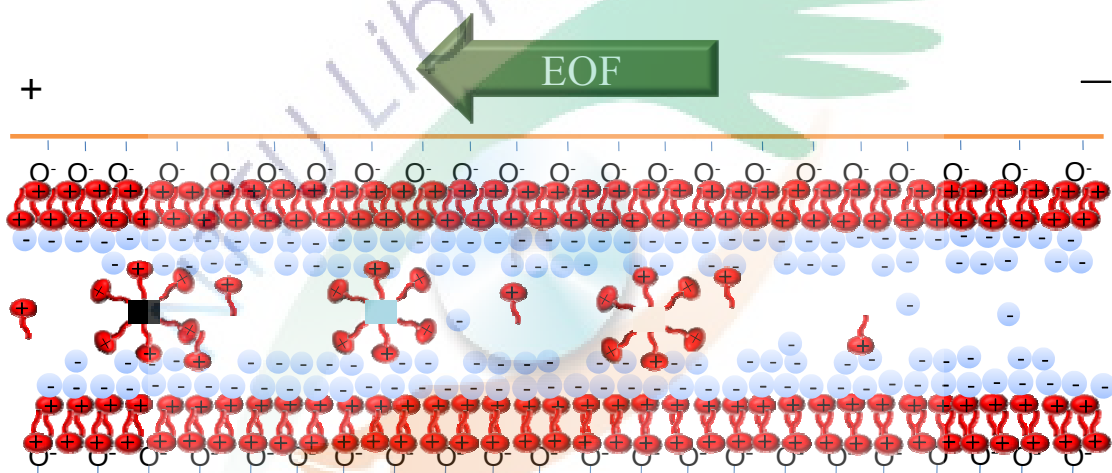


Fig. 24. The EOF of MEKC.

本研究中使用三種陽離子界面活性劑，探討其對分離的影響。分別為 hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)，trimethyl(tetradecyl)ammonium bromide (TTAB)，dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)，

並與陰離子界面活性劑sodium dodecyl sulfate (SDS)比較。試將其性質列下表比較：

	DTAB	TTAB	CTAB	SDS
碳鏈長	12	14	16	14
cmc(mM)	16.2	3.9	0.95	8.2

陽離子界面活性劑結構式見Fig. 25。

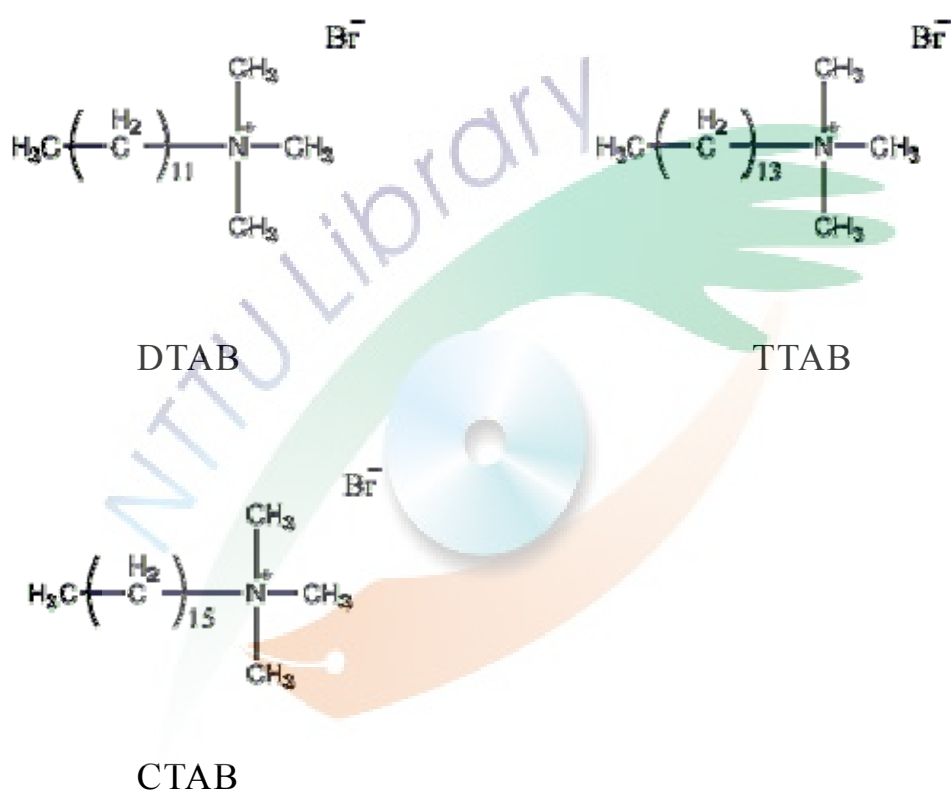


Fig. 25. Structure of cationic surfactants.

第二章 材料與方法

由以上的文獻回顧可知，在分離農藥方面，毛細管電泳具備了分離效率高、使用低消耗量的毒性溶劑及操作簡單且易自動化等優點，故在近幾年被廣泛使用。缺點是偵測極限較高及缺乏有選擇性的偵測器，螢光偵測器具有高靈敏度、低干擾的優點，故可以克服毛細管電泳的缺點，所以本實驗採用毛細管電泳連結螢光偵測器發展分離農藥的分析方法。採用微胞電動層析 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 的模式分離五種農藥，採用陽離子界面活性劑作為分離試劑，並添加 HP- β -CD 作為螢光增強劑。

一、儀器：

偵測激發與放射波長的螢光儀為 Hitachi F-4500，毛細管電泳儀器連接的螢光偵測器使用 Jasco FP-1520，設定激發波長 (excitation) 280nm，放射波長 (emission) 336 nm，但因貝芬替在此波長不靈敏，故在定量時，調整貝芬替的放射波長為 309 nm。使用商業化的儀器進行電泳實驗，型號為 Model prince 4-tray CE System，使用 WPrince 32 bits 軟體從電腦控制實驗流程。SISC 32 2.0 中文版軟體系統擷取數據，並計算分離度及面積。pH 計使

用 Horiba pH/ion meter D-23。因為實驗過程中，商業化的儀器發生短期內難以修復的錯誤，所以，另行採用高壓電自組裝實驗儀器，高壓電為 Glassman 公司生產的 high voltage power supply，型號為 series EH。所有的溶液皆以 Barnstead 製造的純水配製，電阻值皆大於 18 MΩ/cm。空毛細管內徑為 75 μm，外徑為 375 μm，長度為 82 公分，有效長度為 54 公分。

二、藥品及溶液

動相緩衝溶液 (running buffer) 是混合不同比例的磷酸二氫鈉及磷酸氫鈉，並測定其 pH 值。hydroxypropyl β-cyclodextrin (Aldrich) 母液 (stock solution) 的濃度為 200mM，溶在純水中。1-naphthaleneacetic acid (97 %, Sigma), carbaryl (99.5 %, Chem Service)、carbendazim (97 %, Aldrich)、thiabendazole (Sigma)、1-naphthaleneacetamide (98 %, Aldrich) 都溶在 methanol 中，母液濃度分別為 10^{-2} M、 10^{-3} M 及 2×10^{-3} M，存放在冰箱中，可保存約二個星期，實驗時以純水稀釋。hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB, minimum 99 %, Sigma)，trimethyl(tetradecyl)ammonium bromide (TTAB, 99 %, Sigma)，dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB, 99 %, Sigma), sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)，皆溶在純水中，母液濃度為 100 mM。甲醇、無水乙醇、正丙醇、異丙醇及氘甲烷 (Riedel-de Haën)

皆為 LC 級。

三、實際樣品配製

(一) 水質樣品

以取水器取離岸邊約 10 公分的上層水質，取回後編號，以 0.22 μm 的過濾膜過濾，儲存在冰箱中，約 3 個小時後開始進行電泳實驗。

空白樣品只添加 5 mM HP- β -CD，其他樣品添加農藥標準品及 5 mM HP- β -CD 於水樣中。

(二) 商業農藥(立倍利)

取市面上販售的農藥立倍利約 0.01 g，分別以 25 mL 的水及甲醇作為溶劑溶解，以超音波器震盪 15 分鐘後，用 0.22 μm 尼龍膜過濾，稀釋至 50 mL，冰在冰箱中作為母液。實驗時取適量母液添加 HP- β -CD 後加純水稀釋，稀釋倍率約為 2250 倍，進行實驗檢測。

四、毛細管電泳實驗流程

新的毛細管先以 0.5 N NaOH 充滿，隔夜後以純水沖洗 10 分鐘，再以緩衝溶液沖洗 15 分鐘，可以開始進行實驗。樣品以 100 psi，0.1 分鐘注入毛細管中，依需要的電壓進行電泳，每次

電泳實驗完後用緩衝溶液以 1000 psi 洗 3 分鐘，就可開始下一次的實驗。一天實驗結束後，以 0.5N NaOH 沖洗 15 分鐘，再以純水沖洗 10 分鐘後即可關機。

因為在實驗後期時改用自組裝的高壓電設備作實驗，此時樣品注入法為虹吸注入法，高度為 22 公分，注入 20 秒。



第三章 結果與討論

一、pH 值對螢光的影響

本實驗欲分離的農藥樣品皆具有不同的化學性質，為了使樣品能完全分離，需要較低的電滲流(electroosmotic flow, EOF)，而加保利在鹼性的條件下（pH 9.0 以上）會加速水解，所以不能選用鹼性的條件，且自然環境中的水質大約都為 pH 7 左右，為了讓此分析方法的條件可以應用在自然界的水質樣品中，而不需複雜的前處理過程，故挑選接近 pH 7 的酸鹼度進行實驗，測試其分離效果如何。Fig. 26 展現了三個不同的 pH 值對分離的影響，由圖中可知 pH 值越大，分離時間有略微增加，但圖(c)的分離時間和圖(b)差不多。可以發現從圖(b)開始在貝芬替 (peak 1)和奈乙醯胺 (peak 2)之間的基線 (baseline) 變得較為不穩，使得貝芬替 (peak 1)的峰形變寬、變矮，使得原本就不易偵測的貝芬替更難偵測。且在微量樣品偵測上，會因為基線的不穩產生干擾，導致偵測及定量不易。與圖 (a) 比較，(b) 和 (c) 樣品峰形也較寬，加保利(peak 4)的螢光高度較低，故最後選用了 pH 6.47 的磷酸緩衝溶液作為最佳分離的條件。

以此 pH 值在激發波長為 280 nm 時找各樣品的最大放射波

長，結果於 Fig. 27。螢光強度與 pH 值、溶劑成分及化合物的結構有關，一般而言，有高度共軛雙鍵結構的化合物因為其結構較為剛性，螢光強度會較強，但也會因為取代基不同而影響螢光的強度。可以發現加保利、奈乙醯胺及奈乙酸的放射波長最大值都位於 336 nm 附近，這是因為其結構都有萘的構造，且螢光強度也較大。腐絕的最大放射波長大約在 360 nm 左右，因為其結構只有一個苯環，螢光強度相較之下較弱，但在 336 nm 時的螢光強度尚可接受。貝芬替的螢光強度最弱，最大值位於 309 nm 左右，在 336 nm 時的螢光微弱，在電泳圖中 peak 不明顯，但為了能同時偵測到此五種樣品，因此，在測試各項分離條件時，全部以 280 nm 波長激發，以 336 nm 為放射波長，且貝芬替的標準樣品使用較高濃度以方便偵測、判讀。但在進行定量與偵測極限濃度時，貝芬替以 309 nm 進行定量，以便獲得較佳的靈敏度。

二、界面活性劑的種類及濃度對分離度的影響

因為樣品之間的分子量相近，故使用毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE) 無法完全分離樣品，必須在緩衝溶液中添加界面活性劑才能將樣品完全分離。Fig. 28 測試同濃度不同種類的界面活性劑對樣品分離度的影響，因為 SDS

為陰離子界面活性劑，所以採用正電壓進行電泳實驗。由 Fig. 28 可知，除了 DTAB 之外，其餘的界面活性劑在 15 mM 的濃度都可以將樣品完全分離，這可能是因為 DTAB 的臨界微胞濃度較高，在此濃度還未達到其臨界微胞濃度。以陽離子界面活性劑來看，CTAB 的臨界微胞濃度最低，在此濃度條件下其分離度為最佳。在 SDS 條件下，遷移時間最長，峰高較高。但樣品峰有點拖尾，導致峰形較寬，且腐絕和奈乙醯胺(peak 2 和 peak 3)的峰高差異較其他條件來的大。在 CTAB 的條件下，樣品峰比較尖銳，遷移時間較快，且基線也較為平穩，但峰高略小於 SDS 的條件。可見選擇陽離子界面活性劑可以使得分離時間較快、基線平穩，有利於偵測極限的降低。在 TTAB 的條件下，遷移時間與 CTAB 差不多，但峰高及面積都低於 CTAB，且峰形有點寬，導致分離度不如 CTAB。考慮以上的幾點條件，選擇了 CTAB 作為最佳的界面活性劑添加於緩衝溶液中。

Fig. 29 為測試不同濃度的 CTAB 對分離度的影響，CTAB 的濃度越高，樣品和 CTAB 之間的作用就越強，所以遷移速率越慢。在圖(b) 10 mM CTAB 時，分離度大於 2，隨著濃度的增加，分離度增加，但奈乙醯胺 (peak 3) 和加保利 (peak 4) 的螢光強度也隨之降低，且基線也出現些微不穩。為了顧及分離度及螢光強度，選擇添加 15 mM CTAB 在緩衝溶液中作為最佳化條件。

MEKC 的樣品分離受到溶液中 pH 值，離子強度，有機溶劑，

界面活性劑的種類及濃度等因素影響，主要影響的因素是與界面活性劑的結合力大小，不管陽離子與陰離子界面活性劑其電泳速率皆與 EOF 反向，故與界面活性劑結合力越大，會越慢被偵測到。所以在陽離子界面活性劑及 SDS 中所得到的分離順序皆是 CAB、TBZ、NAD、CAR 和 NAA，可知在本實驗的條件下與 CTAB 結合能力強弱的順序為 $NAA > CAR > NAD > TBZ > CAB$ 。

三、緩衝溶液的濃度對分離度的影響

磷酸緩衝溶液的濃度越高，電流越大，因為焦耳熱變大的影響，使得遷移時間變短，見 Fig. 30。從圖中可以看出，緩衝溶液濃度對加保利的遷移時間有很大的影響，相較於其他樣品縮短的時間而言，緩衝溶液濃度相差 40 mM，加保利的時間縮短了 2 分鐘，使得樣品之間變得較為集中，分析時間也相對可以縮短，但將樣品的濃度再加大時，使用高濃度的磷酸緩衝溶液會導致腐絕（peak 2）與奈乙醯胺（peak 3）無法完全分離。樣品的峰高也隨濃度的不同而有些微的改變，樣品的峰高在圖（b）15 mM 的條件下達到最高，接著濃度越高，峰高就跟著些微的降低，且峰形也隨著緩衝溶液的濃度增加而變的較窄。所以，考慮到遷移時間、螢光強度及分離度等因素，認為 15 mM 磷酸緩衝溶液（pH 6.47）為最佳分離條件。

四、有機溶劑的種類與濃度對螢光強度及分離的影響

因為文獻^[18]中提到甲醇及正丙醇可以增強加保利的螢光強度，故在此測試有機溶劑的種類與濃度對螢光強度的影響，本研究中測試了五種不同的有機溶劑：甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇及氘甲烷，結果見 Fig. 31，比較圖 (a)到圖 (d)，隨著醇類的碳鏈越長，遷移時間些微的增加，異丙醇的遷移時間與乙醇差不多。樣品高度增高最多的是在正丙醇的條件下，奈乙醯胺 (peak 3) 和加保利 (peak 4) 的增強最為顯著。遷移時間最快的是在氘甲烷的條件下，分離度皆大於 2，螢光也有些微增加。然而氘甲烷為毒性較強的溶劑，所以在時間差異不大，並考慮到螢光強度的增強，選擇添加正丙醇為最佳的有機修飾劑。

Fig. 32 為測試正丙醇的含量對分離度及螢光強度的影響，圖 (a)為未添加正丙醇的電泳圖，樣品峰形較寬導致腐絕和奈乙醯胺 (peak 2 和 peak 3) 分離度變差，隨著正丙醇的含量增加，樣品峰形變的較為尖銳，螢光強度也隨之增加，分離度也較佳，但因為電流變小，遷移時間也增加，且在正丙醇含量為 12 % 時，基線變得較為不穩，會影響貝芬替 (peak 1) 的偵測，故本研究以添加 10 % 正丙醇於緩衝溶液中作為最佳化的有機修飾劑條件。

五、電壓對分離的影響

以上的實驗結果已得到最佳的分離條件為 15 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 6.47)，添加 15 mM CTAB 為分離試劑，各樣品的分離度皆大於 2，有機修飾劑為 10 % 的正丙醇，可增強螢光強度。電壓也為影響分離的一個重要因素，測試不同的電壓對分離度及遷移時間的影響，結果見 Fig. 33。電壓越小，遷移時間越長，在 -20 kV 時要到 18 分鐘左右才會完全分離，而 -28 kV 可以在 10 分鐘內完全分離，但分離度較小，考慮到高濃度的腐絕和奈乙醯胺 (peak 2 和 peak 3) 在以此電壓進行實驗時會無法完全分離，故選擇了 -25 kV 為進行電泳實驗時的最佳電壓，可在 11 分鐘內完全分離四種農藥。

六、添加 HP- β -CD 對螢光增強的影響

文獻^[18]中除了提及有機修飾劑可以增加螢光強度之外，添加 HP- β -CD 也可以增強加保利的螢光，因此嘗試將 HP- β -CD 加入這個最佳化的條件，測試其影響。先測試 HP- β -CD 添加在緩衝溶液中、添加在樣品中及同時添加在樣品與緩衝溶液中對螢光強度的影響，結果見 Fig. 34。比較圖(a)、(b)，可以發現在樣品中有無添加 HP- β -CD 的電泳圖有明顯的峰高差異，腐絕和奈乙醯胺 (peak 2 和 peak 3) 的峰高都下降，但加保利和奈乙酸 (peak 4

和 peak 5) 卻都有顯著的增加，遷移時間及樣品之間的相對位置沒有明顯的改變。但對已添加 HP- β -CD 在緩衝溶液中，樣品中有無添加 HP- β -CD 的比較，就沒有這麼明顯的改變，見(c)和(d)，只有奈乙酸 (peak 5) 的峰高有顯著增加。比較 HP- β -CD 添加在緩衝溶液中的影響，見圖(a)和(c)，可以發現每個樣品的螢光強度都有些微的增加，遷移時間雖無明顯的改變，但樣品之間的相對位置有集中的現象發生。最後比較(a)和(d)，可以發現加保利 (peak 4) 和奈乙醯胺 (peak 3) 兩樣品較為集中，奈乙酸 (peak 5) 的螢光強度有明顯的增強。這可能是因為 HP- β -CD 添加在緩衝溶液時會與 CTAB 產生競爭，導致樣品與 CTAB 的結合變少，遷移速率產生改變，使得樣品變得較為集中。添加 HP- β -CD 在樣品中，使其先與樣品形成較穩定的內包錯合物，故可使螢光增強較多。由以上討論可以得知，HP- β -CD 添加於本實驗的分析條件中，有增強螢光及集中樣品的效果，故選擇添加 HP- β -CD 在緩衝溶液及樣品中作為螢光增強劑。

先探討添加不同濃度的 HP- β -CD 在緩衝溶液中的影響，結果如 Fig. 35。對奈乙酸 (peak 5) 之外的樣品而言，添加的濃度越高，螢光增加的強度越強，但對奈乙酸 (peak 5) 而言，當添加的濃度超過 10 mM 後，波峰就變寬。而且濃度越高，樣品都有漸漸往 8.5 分鐘集中的情形，有可能是因為 HP- β -CD 添加在緩衝溶液時會與 CTAB 產生競爭，導致樣品與 CTAB 的結合變少，

遷移速率產生改變，可以縮短分析的時間，但也因此導致腐絕 (peak 2) 和奈乙醯胺 (peak 3) 的分離度就變差了。考慮到分離度及奈乙酸的螢光強度等因素，所以，選擇在緩衝溶液中添加 10 mM HP- β -CD 作為最佳的螢光增強劑濃度。

Fig. 36 為測試不同濃度的 HP- β -CD 添加在樣品中時對螢光強度的增強效果，由圖可知，各樣品峰在添加 5 mM HP- β -CD 時，峰高最高，接著隨著 HP- β -CD 濃度越高，螢光反而下降，且各樣品有越集中的現象發生，而奈乙酸 (peak 5) 在添加超過 10 mM HP- β -CD 後，峰形變寬，且遷移時間變長。因此，選擇添加 5 mM HP- β -CD 於樣品中為最佳條件。

因此，本實驗利用 HP- β -CD 作為螢光增強試劑，並探討其濃度對分離及螢光強度的影響。最後得到最佳的螢光增強條件是在緩衝溶液中添加 10 mM HP- β -CD 及在樣品中添加 5 mM HP- β -CD，增強的比率分別為 130 % (貝芬替)、108 % (腐絕)、120 % (奈乙醯胺)、114 % (加保利) 和 138 % (奈乙酸)。

七、定量

將以上實驗所得的最佳分離條件列於 Table 6，應用此條件可在 13 分鐘內完全分離 5 種農藥。使用最佳化的條件找出各樣品標準品的線性範圍。因為貝芬替在放射波長為 336 nm 時靈敏度較低，故偵測極限的測定是以 309 nm 為放射波長，結果如 Table

7。腐絕之線性範圍 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ，LOD 為 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($0.1 \mu\text{g/mL}$)，LOQ 為 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 。奈乙醯胺、加保利及奈乙酸的線性範圍皆為 $5 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ，LOD 為 $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($0.056 \mu\text{g/L}$ 、 $0.060 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.056 \mu\text{g/mL}$)，LOQ 為 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。貝芬替線性範圍 $5 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ，LOD 為 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($0.191 \mu\text{g/mL}$)，LOQ 為 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 。

腐絕本身最強的螢光放射波長未在 336 nm ，但為了能同時偵測，所以還是用 336 nm 作偵測，因此 LOD 最低只能達到 0.1 ppm ，剛剛好是食物所能容許殘留量中的最小值，如使用其最佳的放射波長，應能達到更低的 LOD。而貝芬替因為本身的螢光強度弱，雖然已經使用其最佳的放射波長偵測，但所得到的 LOD 還是無法達到最低容許的含量偵測。除此之外，奈乙醯胺、加保利及奈乙酸皆能達到 0.06 ppm 以下的偵測。

八、應用

(一) 自然界水質的檢測

為了驗證此方法在偵測真實樣品上的可行性，確認有無嚴重的基質干擾，故採集了實驗室的自來水、台東森林公園湖水下游(樣品一)、森林公園湖水上游(樣品二)、森林公園內地下水(樣品三)、台東自然湧泉泉水(樣品四)和台東人工湖湖水(樣品五)的水質樣品，為了真實的測試出水樣的基質影響，故在配製樣品時測試了有無在樣品添

加 10 % 的甲醇影響，發現無太大差異。故在真實樣品的配製中皆未使甲醇的含量達到 10 %。在所有的水質樣品中都添加 5×10^{-6} M 加保利、奈乙醯胺、腐絕、奈乙酸及 1×10^{-5} M 貝芬替進行實驗。電泳圖如 Fig. 37~Fig. 42，皆可在添加農藥後的水質樣品中清楚的看到各個農藥的波峰，雖然基線略為不穩，但對樣品峰無明顯的干擾，分離度也在可接受的範圍內。

接著測試其回收率，貝芬替的螢光強度以放射波長 309 nm 偵測，結果如 Table 8。發現回收率從 93.5 % 至 118.4 % 之間，可能是因為真實樣品配製時未含有 10 % 甲醇且基質不同所引起的誤差。

（二）商業農藥（立倍利）之偵測

立倍利的外包裝如 Fig. 43，內含為 85 % 的加保利，針對不同的蟲害，取建議的藥量加水稀釋後噴灑於作物上。因為一般農民在使用時，都以水作為溶劑，因此本研究分別以水和甲醇作為溶劑，偵測其結果有無差異。電泳圖見 Fig. 44。圖中(a)為以水為溶劑的電泳圖，與(b)以甲醇為溶劑的相比，發現樣品較小，且使用本研究的最佳化條件不需要經過任何前處理，直接加水稀釋即可偵測，在電泳時沒有其他的基質干擾發生。

使用校正曲線計算農藥的含量，以純水為溶劑，測得

的濃度為 6.26×10^{-4} M，重量百分比為 56.7 %，以甲醇為溶劑，測得的濃度為 1.09×10^{-3} M，重量百分比為 85.8 %，由此實驗結果得知，以甲醇為溶劑時，較符合樣品包裝上的標示，證明以甲醇為溶劑可以完全將樣品中的加保利溶出，可真實的算出樣品中的加保利含量。以甲醇為溶劑時所得的濃度約為以水為溶劑的 1.5 倍，本研究中樣品稀釋倍率約為 2250 倍，外包裝上的稀釋倍率依照病蟲害的不同從 420~8500 倍之間都有，所以，農民在使用此農藥時，加保利並不會全部都溶解於水中，真正會產生效用的農藥量會少於加入的量，未產生效用的加保利就可能污染到土壤及地下水中。

第四章 結論

本研究開發了分離偵測常用的五種農藥的分析方法，使用毛细管電泳連接螢光偵測器，探討了許多分離因素。得到最佳化的條件為 15 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 6.47) 添加 15 mM CTAB 作為分離的界面活性劑、10 % 正丙醇為有機修飾劑，並以 10 mM HP- β -CD 於緩衝溶液中及 5 mM HP- β -CD 於樣品中作為螢光增強試劑，螢光增強的強度可從 8 % 到 38 %。使用 -25 kV 進行電泳時，可在 13 分鐘內完成所有的分離。對五種農藥的偵測極限，最低可達 0.06 ppm (加保利)，最高為 0.191 ppm (貝芬替)。應用在六種自然界的水質樣品上，無特殊前處理步驟，可在無干擾的狀態下，偵測加保利、奈乙醯胺、腐絕及奈乙酸皆達到 10^{-6} M，貝芬替最低可偵測到 5×10^{-6} M，但回收率可從 93.5 % 至 118.4 %。應用在市面上的農藥 (立倍利) 偵測上，可成功的偵測及定量出加保利，並比較不同的溶劑所得到的加保利含量，可知以甲醇為溶劑時，所溶解的加保利約為同體積的水溶解的含量的 1.5 倍，且甲醇為溶劑時的加保利含量符合農藥上所標示的含量。驗證了本研研究所得到的分析方法及條件可應用在水質及農藥成品上的偵測及定量。未來可對食物中的農藥殘留及噴灑完農藥的田地土壤、附近的水質作一個有效且快速的檢測。

第五章 參考文獻

1. 黃鳳娟（民95年6月5日）。解讀2005年永續發展指標 落實國家永續發展。民96年5月23日，取自：
<http://e-info.org.tw/node/8874>
2. 加保利(carbaryl)(1999,August 4) Retrieved May 30 ,2007, from the World Wide Web:
<http://www.dfmg.com.tw/member/chemical/safe/7427.html>
3. 劉達修（無日期）。農藥安全使用。民96年5月25日，取自：
http://www.tdais.gov.tw/science/good_food/safemdc.htm
4. Petropoulou, S-S E.; Gikas, E.; Tsarbopoulos, A.; Siskos, P. A. J. *Chromatogr. A* **2006**, 1108, 99.
5. 卡貝特（民75）。農藥生化學（葉枚耕譯）。台北市：國立編譯館。
6. Thiabendazole. (2007, May 5). In *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. Retrieved June 7, 2007, from <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Thiabendazole&oldid=128385454>
7. 行政院農委會動植物防疫檢疫局-農藥資訊服務網。農藥檢驗方法。民96年5月25日，取自：

http://pesticide.baphiq.gov.tw/standard_1.aspx

8. 行政院衛生署食品資訊網。發布農藥容許量中文。民96年5月11日，取自：

<http://food.doh.gov.tw/chinese/ruler/發布農藥容許量中文.doc>

9. Pawlowski, T. M.; Poole, C. F. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3124.
10. Abad, A.; Moreno, M. J.; Pelegrí, R.; Martínez, M. I.; Saez, A.; Gamon, M.; Montoya, A. *J. Chromatogr. A* **1999**, *833*, 3.
11. Horne, E.; Coyle, T.; O'keeffe, M.; Alvinerie, M.; Galtier, P.; Brandon, D. L. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5552.
12. Singh, S. B.; Foster, G. D.; Khan, S. U. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 105.
13. Wang, J.; Cheung, W.; Grant, D. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 528.
14. Haib, J.; Hofer, I.; Renaud, J-M. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 173.
15. Codognoto, L.; Tanimoto, S. T.; Pedrosa, V. A.; Suffredini, H. B.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 253.
16. Orea, J. M.; Besco's, B.; Montero, C.; Gonzalez Ureña, A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 491

17. Ito, Y.; Goto, T.; Oka, H.; Matsumoto, H.; Miyazaki, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 861
18. Soto-Chinchilla, J. J.; García-Campaña, A. M.; Gámiz-Gracia, L.; Cuadros-Rodríguez, L.; Vidal, J. L. M. *Analytica Chimica Acta* **524** (2004) 235.
19. Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. *Anal. Chem. Acta* **2003**, *488*, 193.
20. Hinsmann, P.; Arce, L.; Ríos, A.; Valcárcel, M.; *J. Chromatogr A* **2000**, *866*, 137.
21. Rodríguez, R.; Picó, Y.; Font, G.; Manñes, J. *J. Chromatogr A* **2001**, *924*, 387.
22. Molina, M.; Wiedmer, S.K.; Jussila, M.; Silva, M.; Riekkola, M.-L. *J. Chromatogr. A* **2001**, *927*, 191.
23. da Silva, C. L.; de Lima, E. C. ; Tavares, M. F.M. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1014*, 109.
24. Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Ramírez, S. C.; Pancorbo, A. C.; GUTIÉRREZ, A. F. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5791.
25. Picó, Y.; Rodríguez, R.; Manñes, J. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 133.
26. Hernández-Borges J.; Frías-García, S.; Cifuentes, A.; Rodríguez-Delgado, M.A. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 947 .

27. D. N. Heiger, *High performance capillary electrophoresis-An introduction*, Hewlett-Packard Company, 1992.



Table 6. Optimum conditions for capillary electrophoresis experiment

buffer	15 mM phosphate buffer(pH 6.47)
surfactant	15 mM CTAB
Organic modifier	10 % n-propanol
The concentration of HP- β -CD	10 mM
Applied voltage	-25 kV
Sample preparation	10 % methanol, 5 mM HP- β -CD

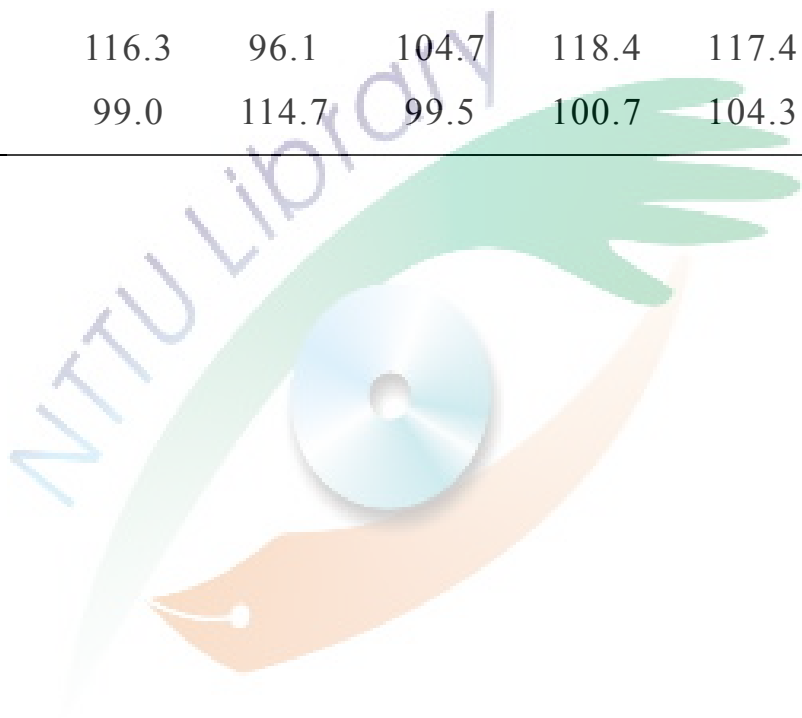


Table 7. The linear range, LOD, LOQ and linear range of the proposed method

	TBZ	NAD	CAR	NAA	CAB
Linear range (M)	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-6} \sim 7 \times 10^{-5}$
R^2	0.9977	0.9997	0.9979	0.9959	0.9977
LOD (M)	5×10^{-7}	3×10^{-7}	3×10^{-7}	3×10^{-7}	1×10^{-6}
LOQ (M)	1×10^{-6}	5×10^{-7}	5×10^{-7}	5×10^{-7}	5×10^{-6}

Table 8. Recovery values of pesticides in different water sample

Sample analytes	Recovery (%)					
	Tap water	1	2	3	4	5
TBZ	99.0	94.8	96.6	97.9	104.2	98.7
NAD	100.1	103.5	96.3	99.9	108.7	101.6
CAR	102.5	93.5	100.5	103.8	108.0	99.9
NAA	116.3	96.1	104.7	118.4	117.4	99.6
CAB	99.0	114.7	99.5	100.7	104.3	108.2



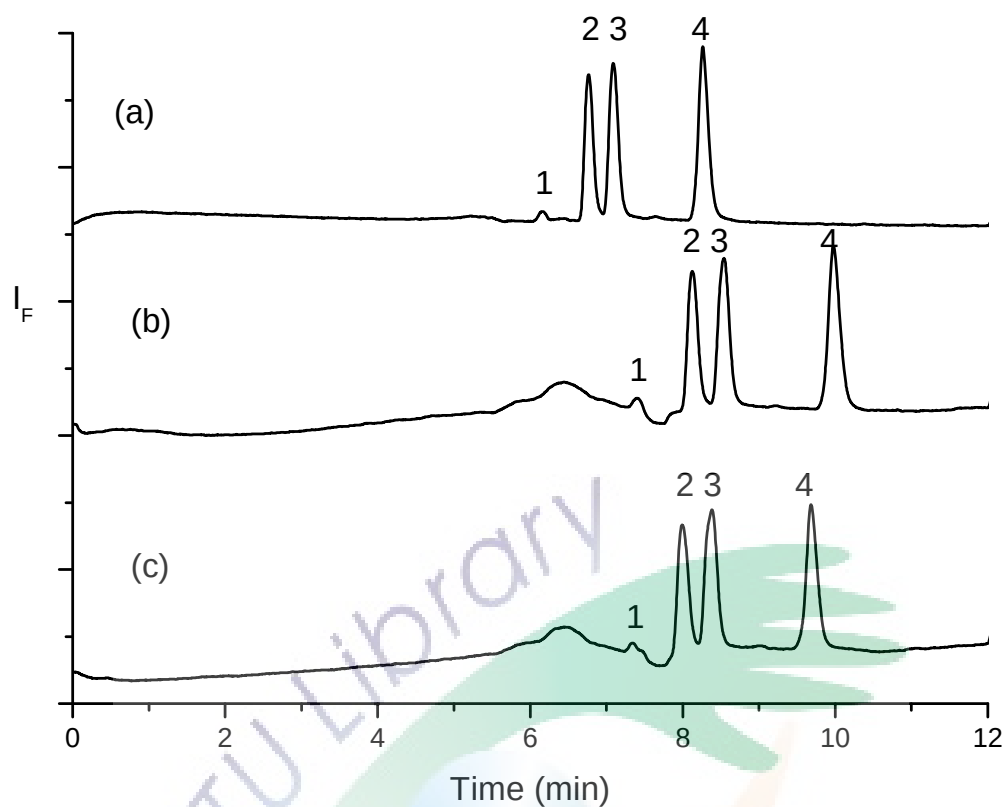


Fig. 26. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer with 15 mM TTAB and 10 % n-propanol at various pH value. (a) pH 6.47; (b) pH 7.00; (c) pH 7.61, Operating condition: -28 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks: (1)CAB; (2)TBZ; (3)NAD; (4)CAR.

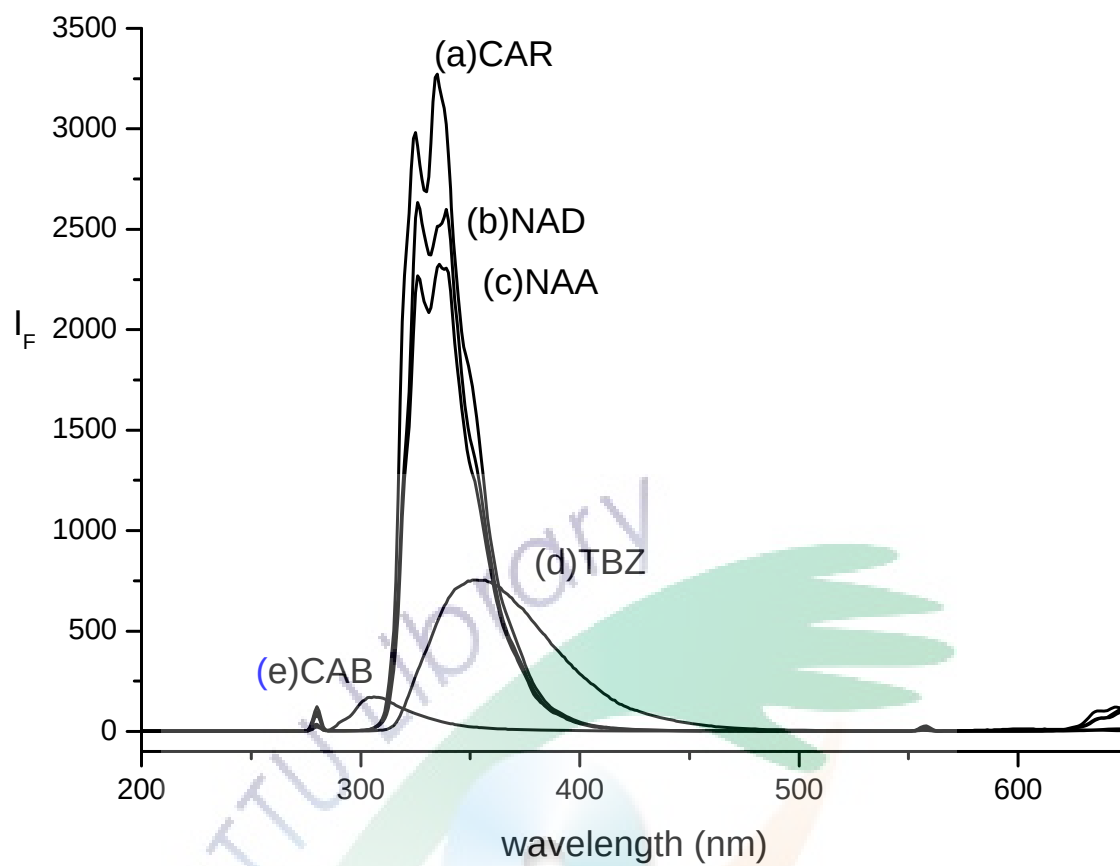


Fig. 27. The fluorescence intensity of pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) .The concentration of samples are 5×10^{-5} M. $\lambda_{ex}=280$ nm.

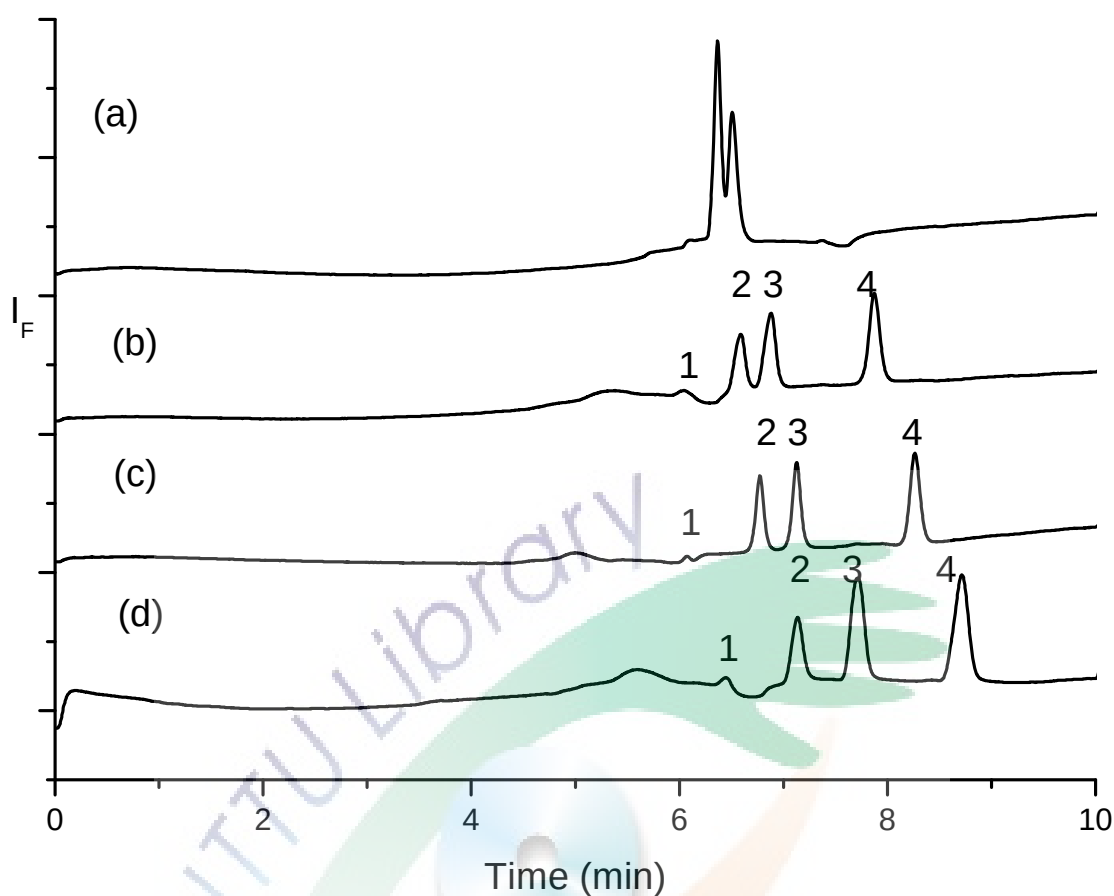


Fig. 28. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with different surfactant and 10 % n-propanol. (a) DTAB; (b) TTAB; (c) CTAB; (d) SDS Operating condition: (a)(b)(c)-25 kV, (d)25 kV; 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig. 26.

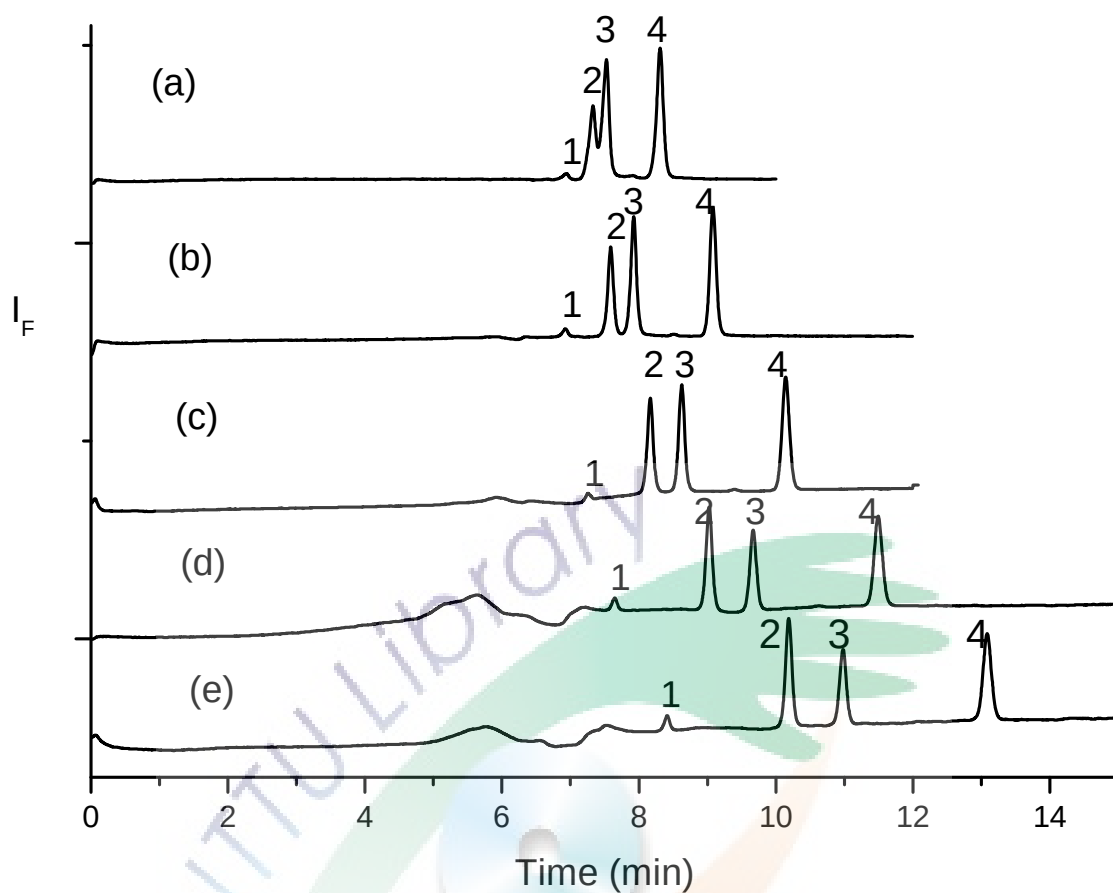


Fig. 29. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with different concentration of CTAB and 10 % n-propanol. (a) 5 mM ; (b) 10 mM ; (c) 15 mM ; (d) 30 mM ; (e) 40 mM Operating condition: -25 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig. 26.

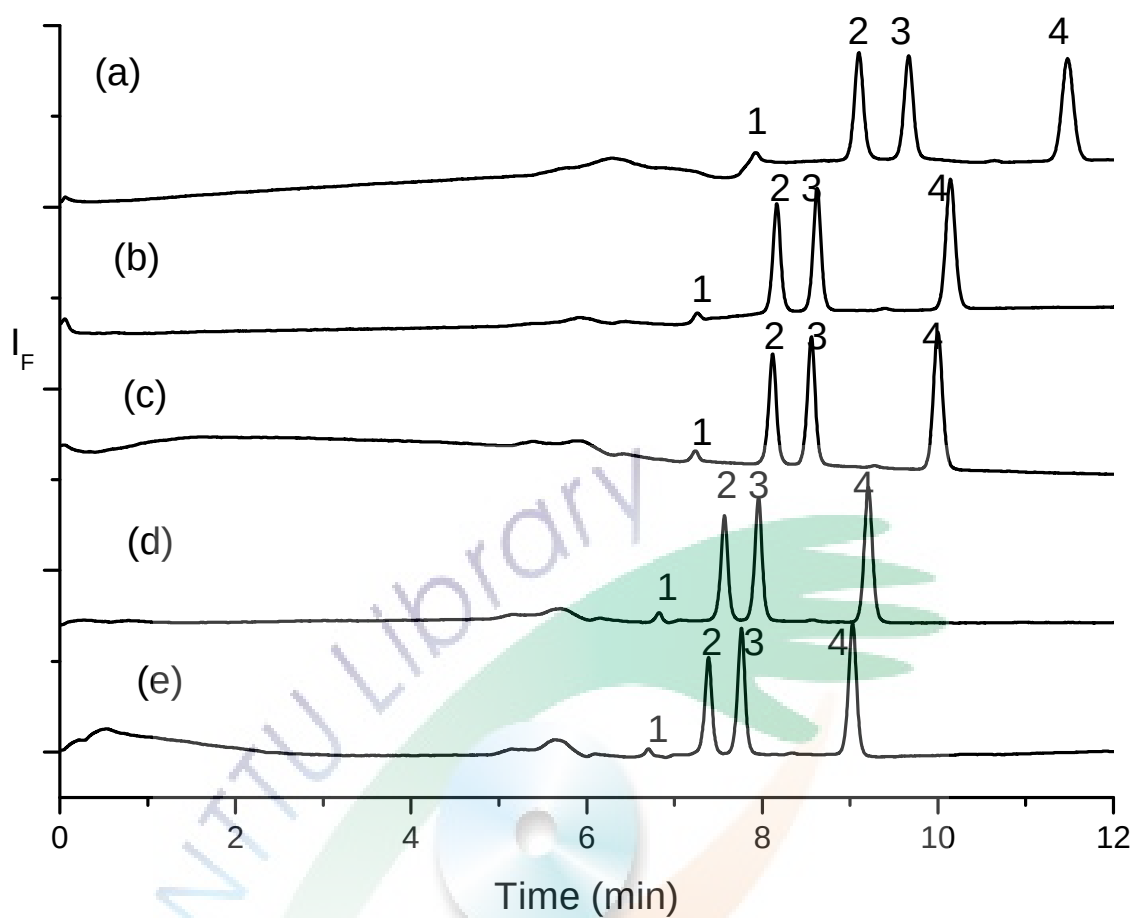


Fig. 30. Electropherograms of the four pesticides in various concentration of phosphate buffer (pH 6.47) containing 15 mM CTAB and 10 % n-propanol. (a) 5 mM; (b) 15 mM; (c) 20 mM; (d) 30 mM; (e) 45 mM. Operating condition: -25 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig. 26.

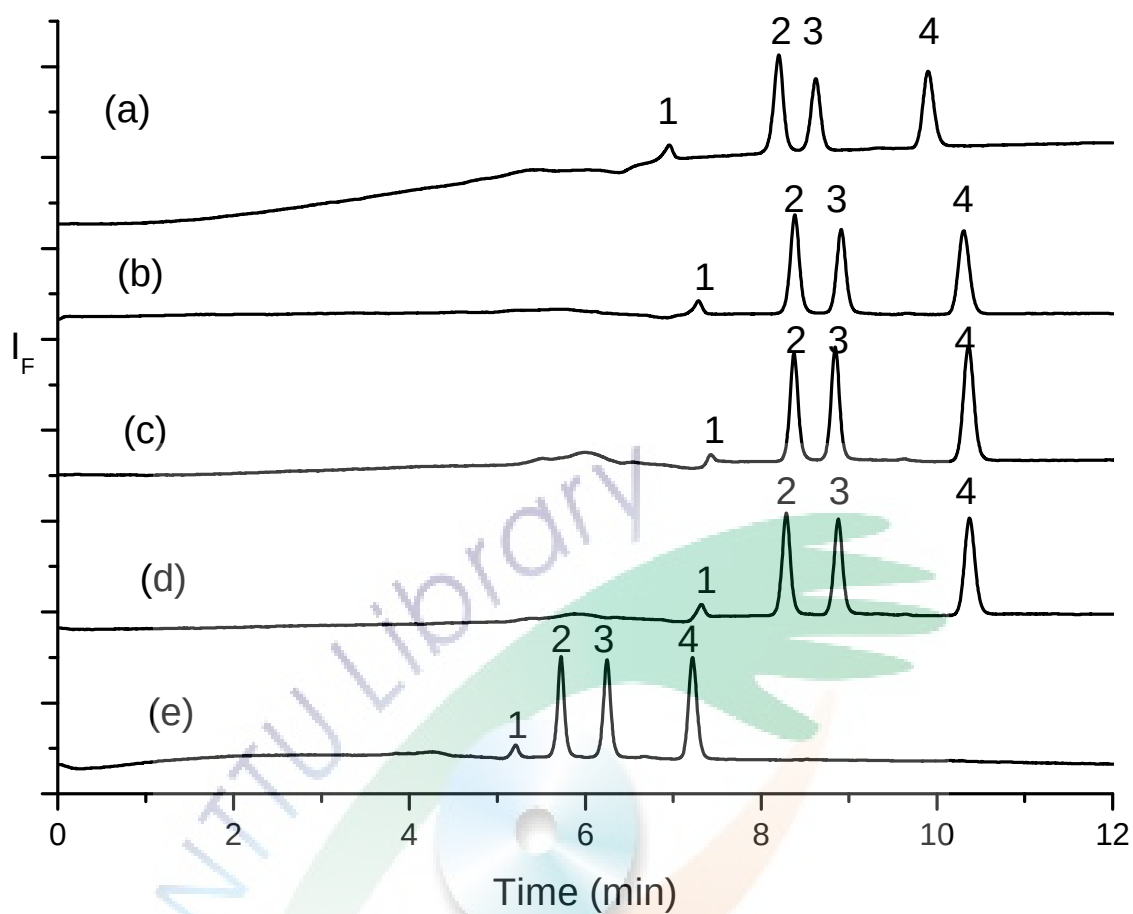


Fig. 31. Electropherograms of the four pesticides in 15mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % organic solvent. (a) methanol ; (b) ethanol ; (c) n-propanol ; (d) iso-propanol ; (e) ACN. Operating condition: -25 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig. 26.

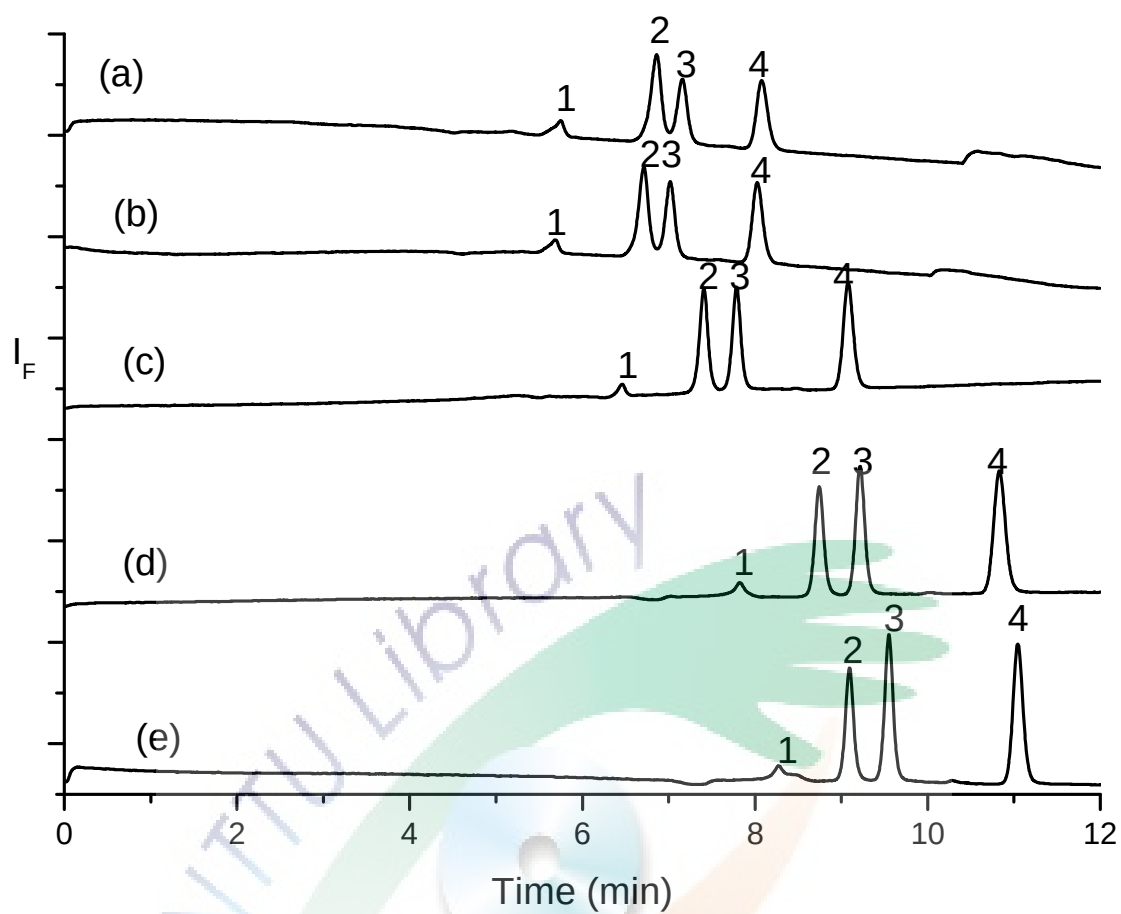


Fig. 32. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and (a) 0 %; (b) 2 % ; (c) 6 % ; (d) 10 % ; (e) 12 % n-propanol. Operating condition: -25 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig 26.

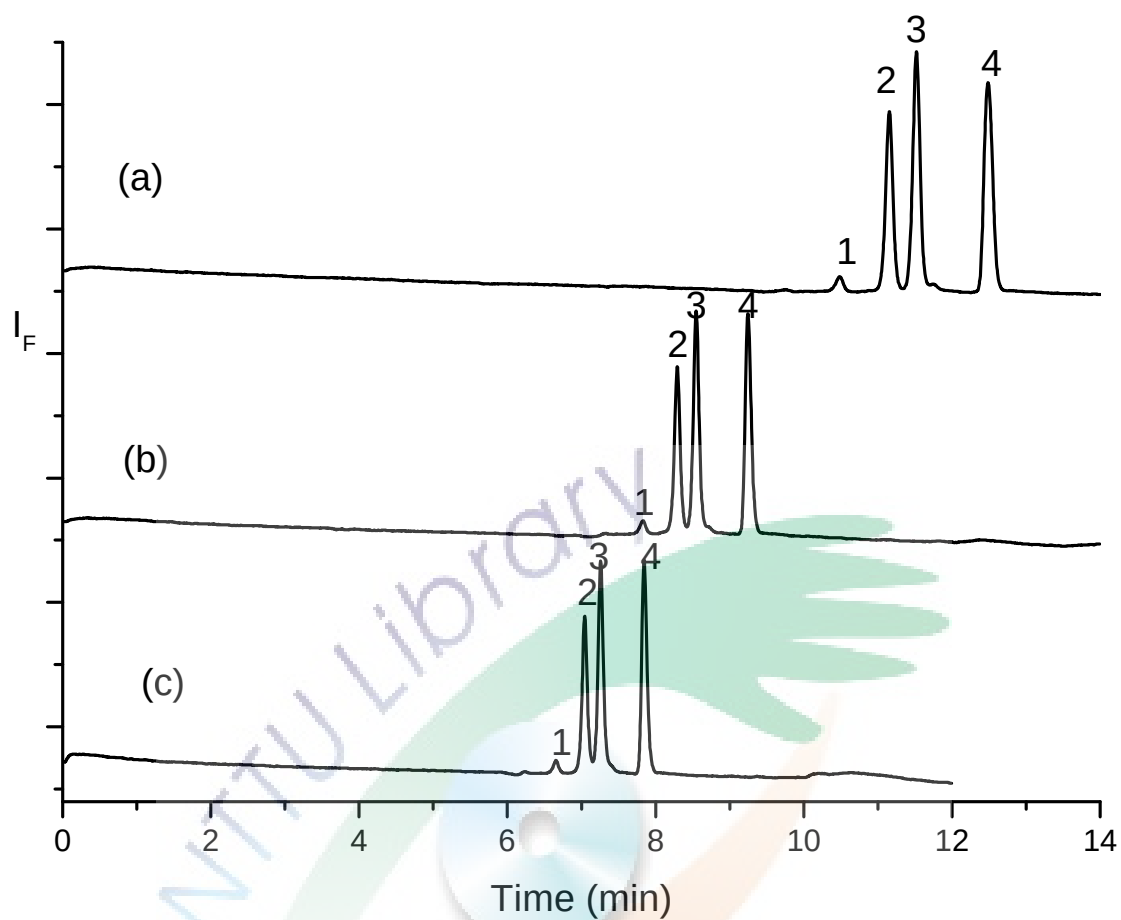


Fig. 33. Electropherograms of the four pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % n-propanol. Operating condition: (a) -28 kV; (b) -25 kV; (c) -20 kV, 100 psi, 10 s injection. Peaks as Fig. 26.

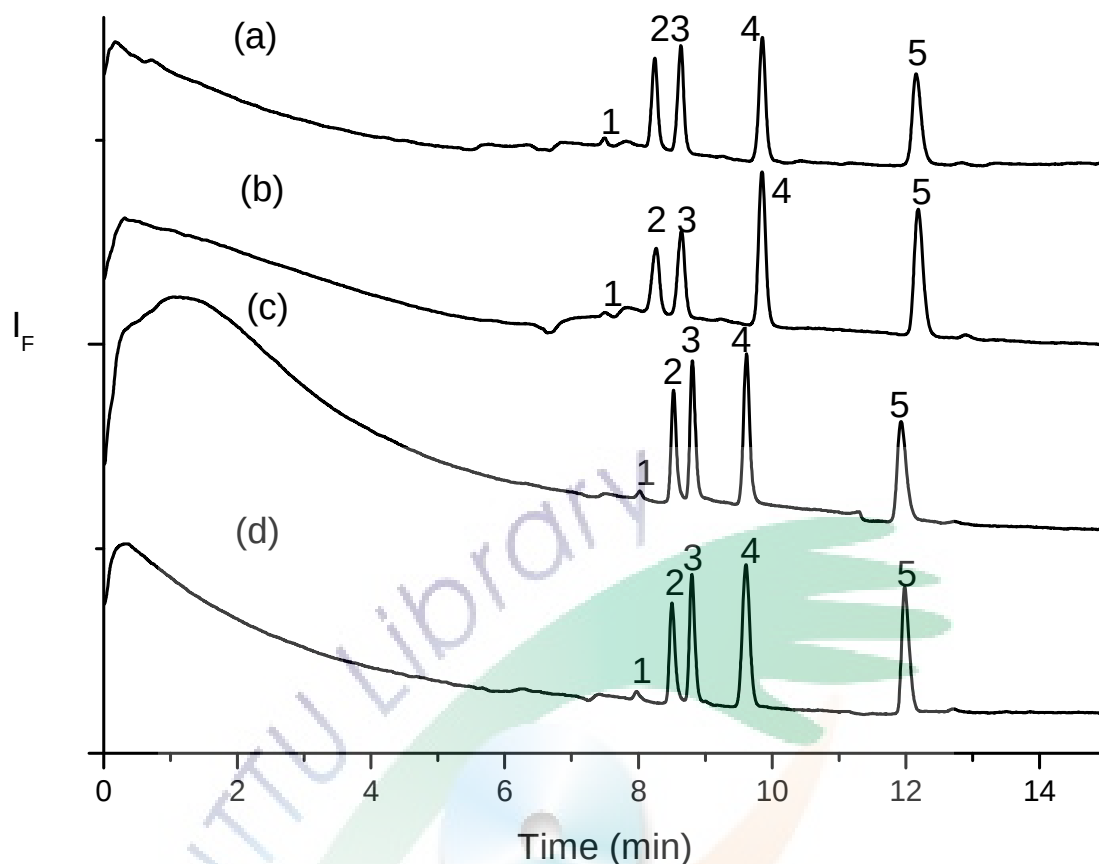


Fig. 34. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB, 10 % n-propanol, and (a) no HP- β -CD in sample and buffer; (b) 5 mM HP- β -CD in sample and no HP- β -CD in buffer; (c) 10 mM HP- β -CD in buffer and no HP- β -CD in sample; (d) 5 mM HP- β -CD in sample and 10 mM HP- β -CD in buffer. Operating condition: -25kV, 22 cm high, 20 s injection. Peaks: (1)CAB; (2)TBZ; (3)NAD; (4)CAR; (5)NAA.

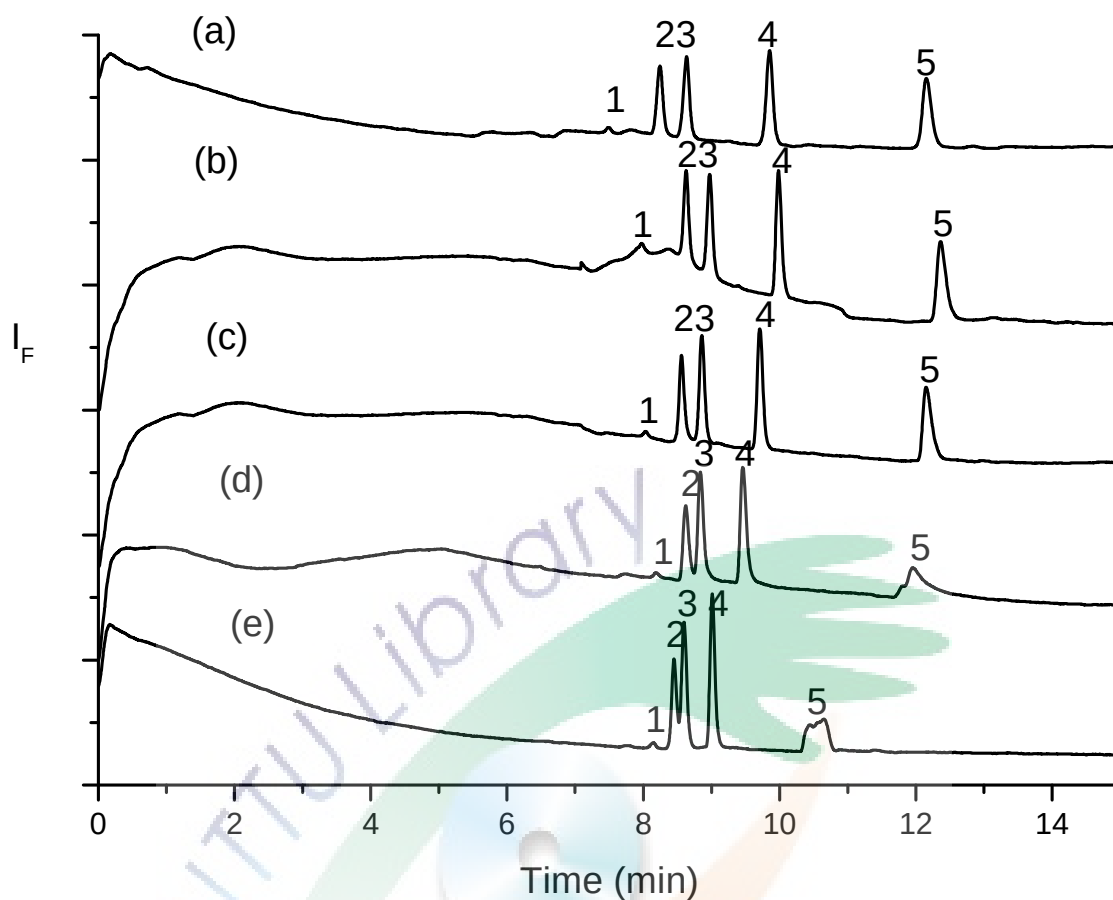


Fig. 35. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB and 10 % n-propanol, addition (a) 0 mM; (b) 5 mM; (c) 10 mM; (d) 15 mM; (e) 20 mM HP- β -CD. Other condition as Fig. 34.

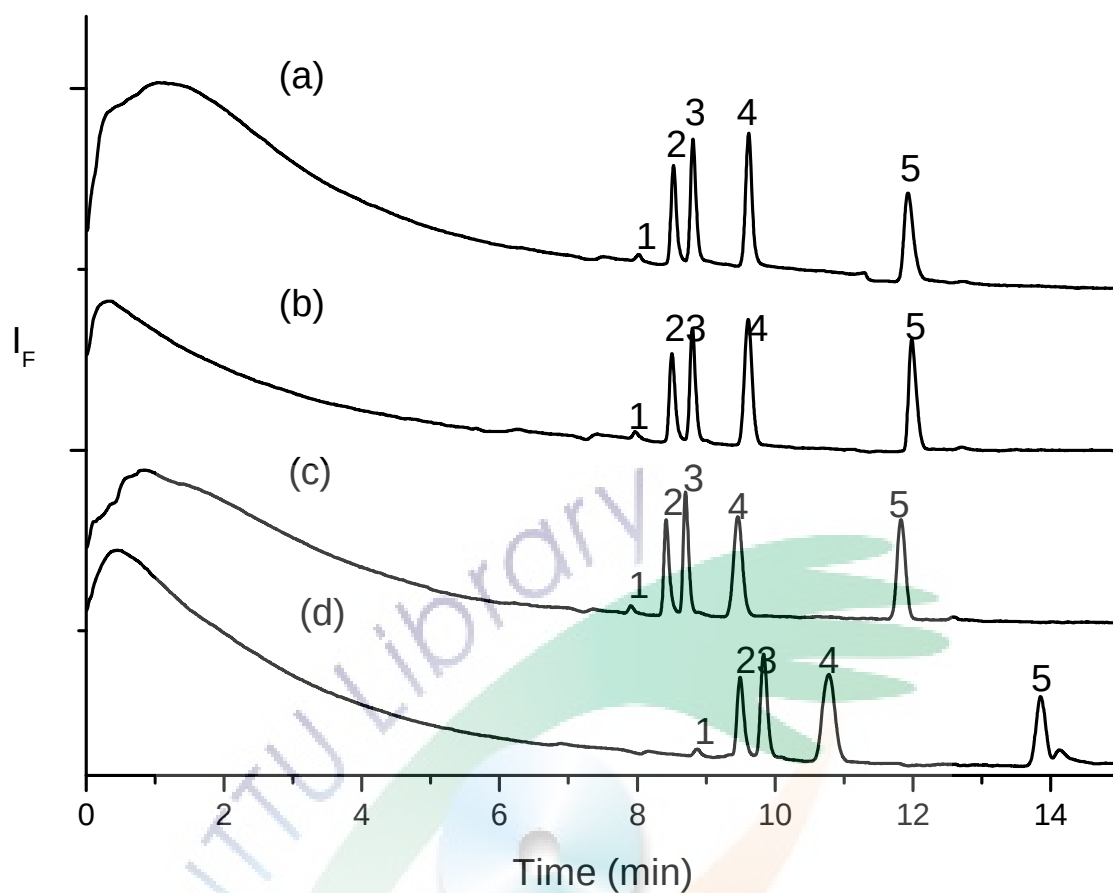


Fig. 36. Electropherograms of the five pesticides in 15 mM phosphate buffer (pH 6.47) with 15 mM CTAB, 10 mM HP- β -CD and 10 % n-propanol, (a) 0 mM; (b) 5 mM; (c) 10 mM; (d) 15mM HP- β -CD in sample. Other condiction as Fig. 34.

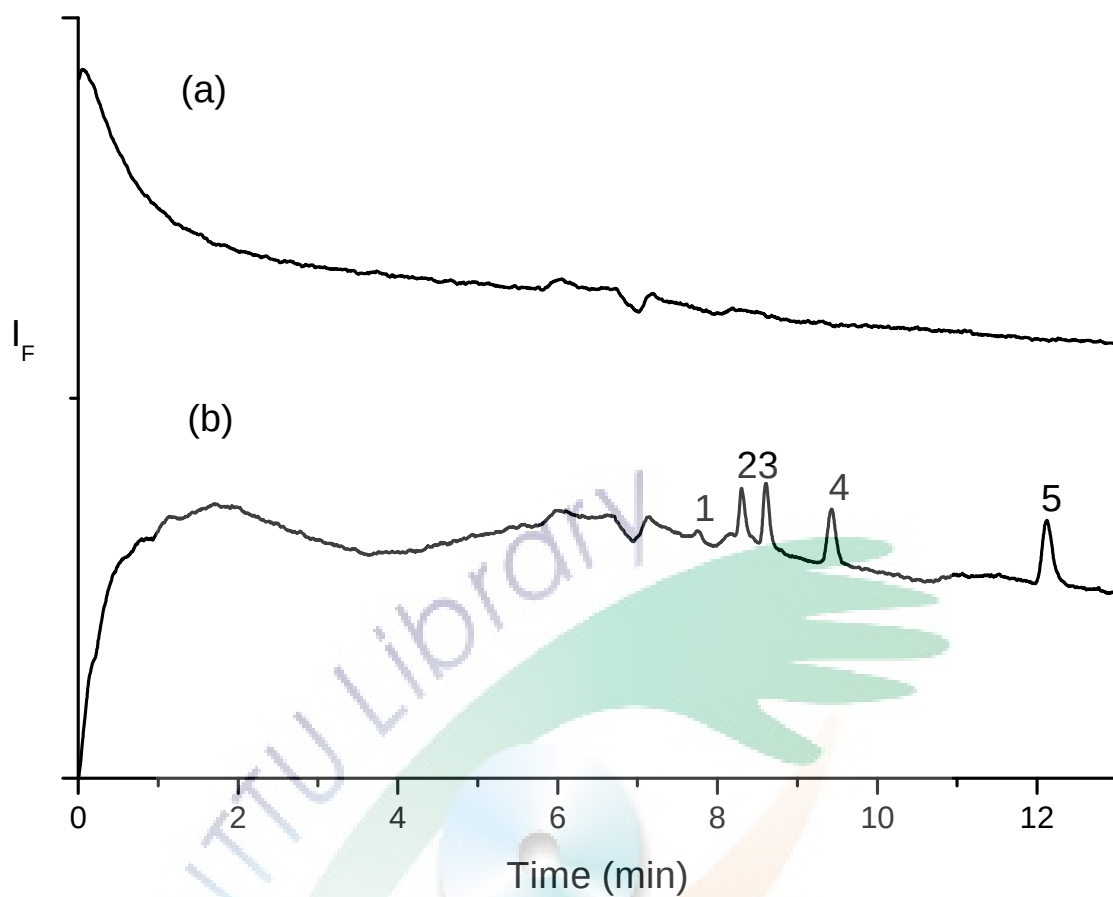


Fig. 37. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in tap water. Analytical parameters of the electrophoresis experiment are as Table 6. Peaks: (1)CAB spiked 5×10^{-6} M; (2)TBZ; (3)NAD; (4)CAR; (5)NAA spiked 10^{-6} M.

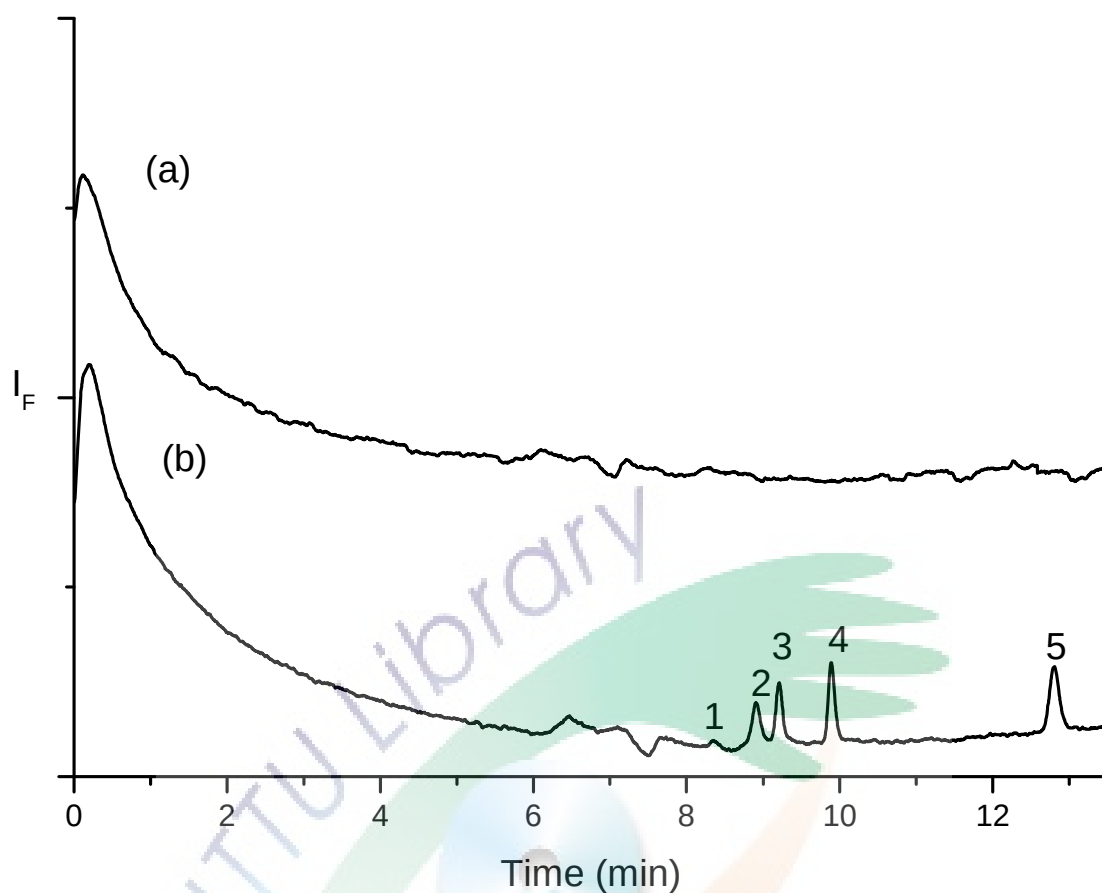


Fig. 38. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 1. Analytical parameters of the electrophoresis experiment are as Table 6. Peaks: (1)CAB spiked 10^{-5} M; (2)TBZ; (3)NAD; (4)CAR; (5)NAA spiked 10^{-6} M.

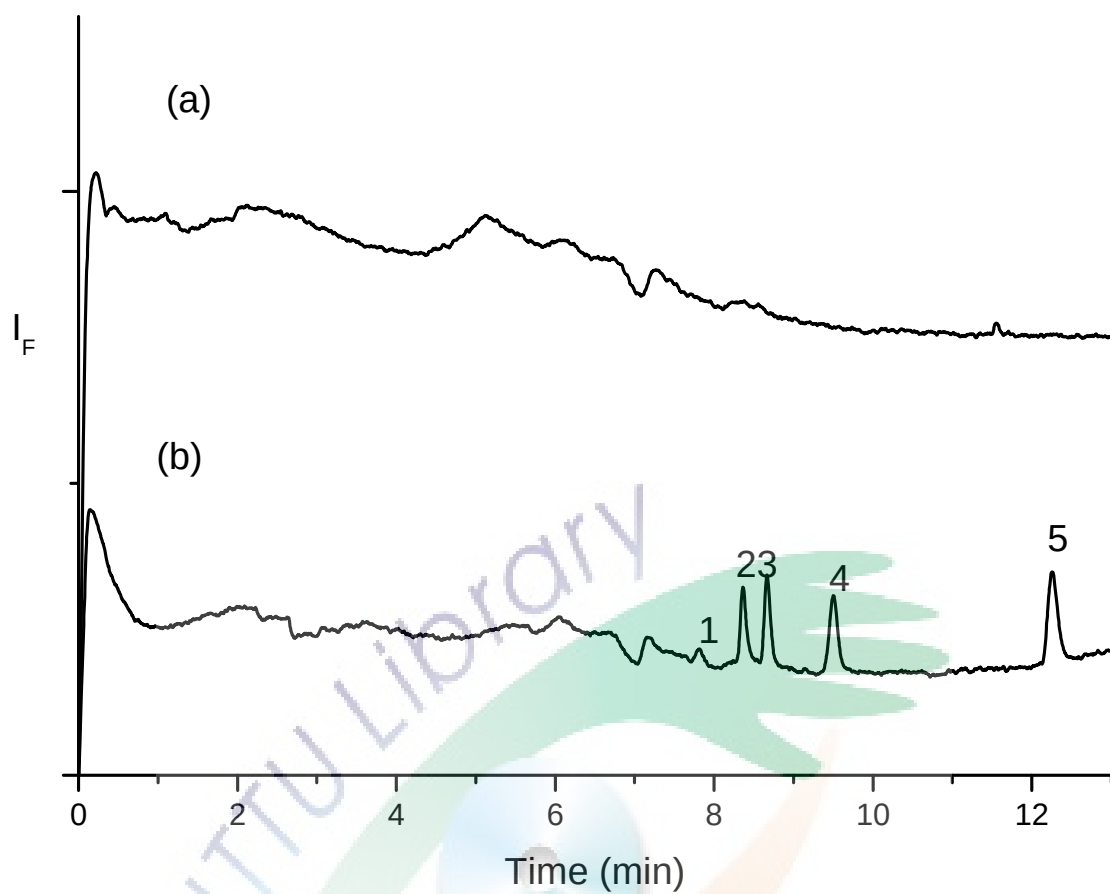


Fig. 39. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 2. Other conditions as Fig. 38.

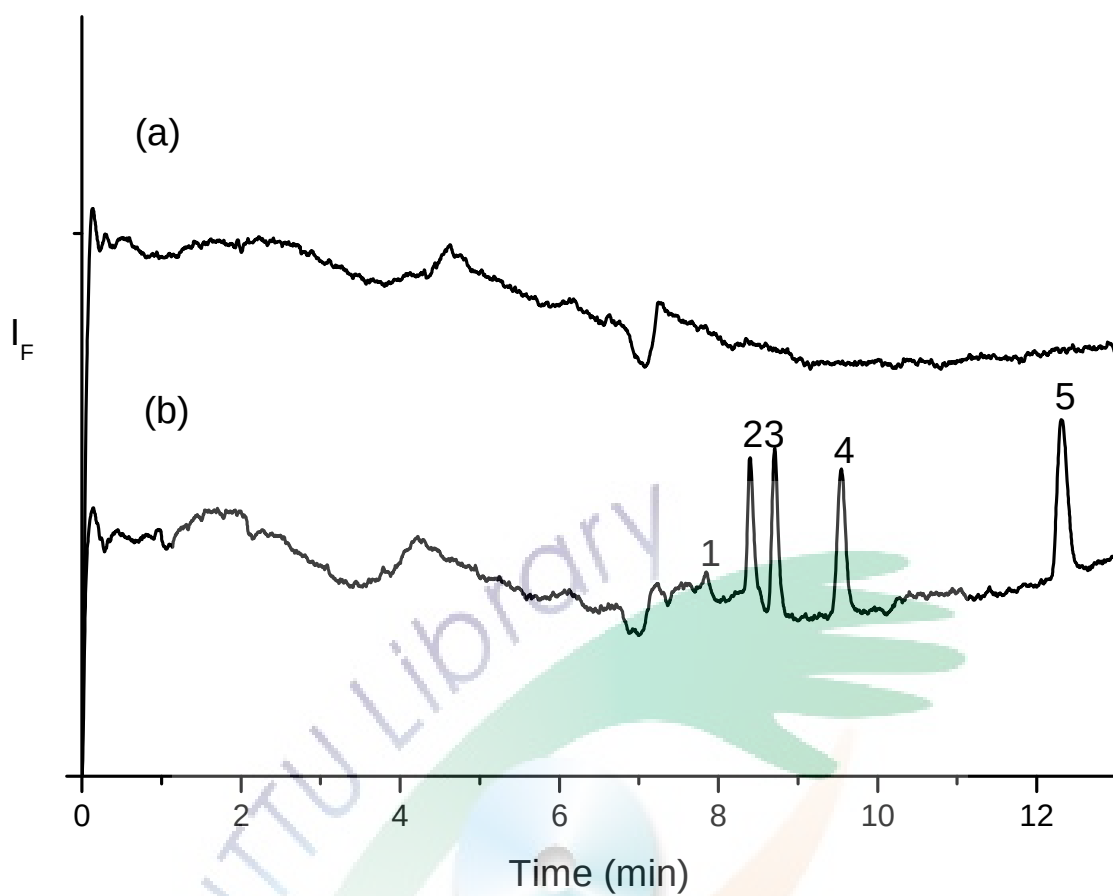


Fig. 40. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 3. Other conditions as Fig. 38.

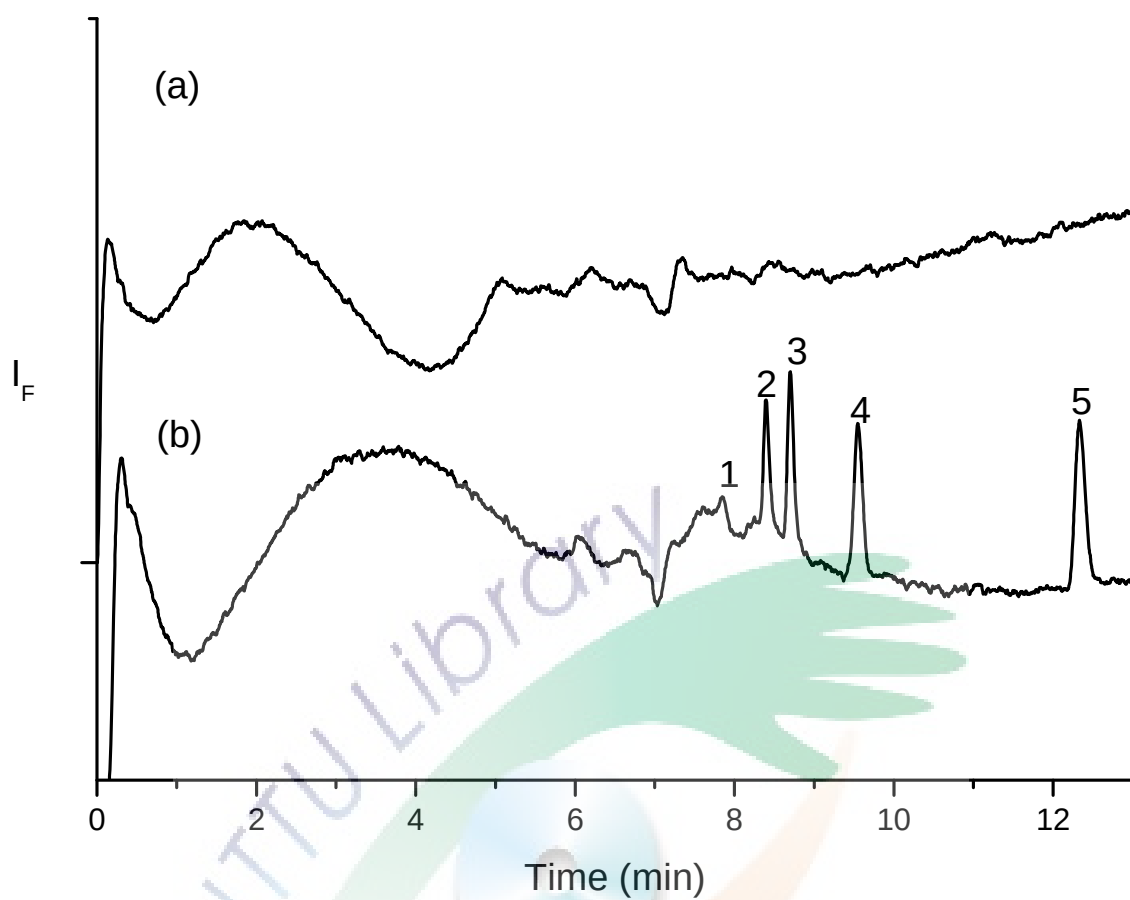


Fig. 41. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 4. Other conditions as Fig. 38.

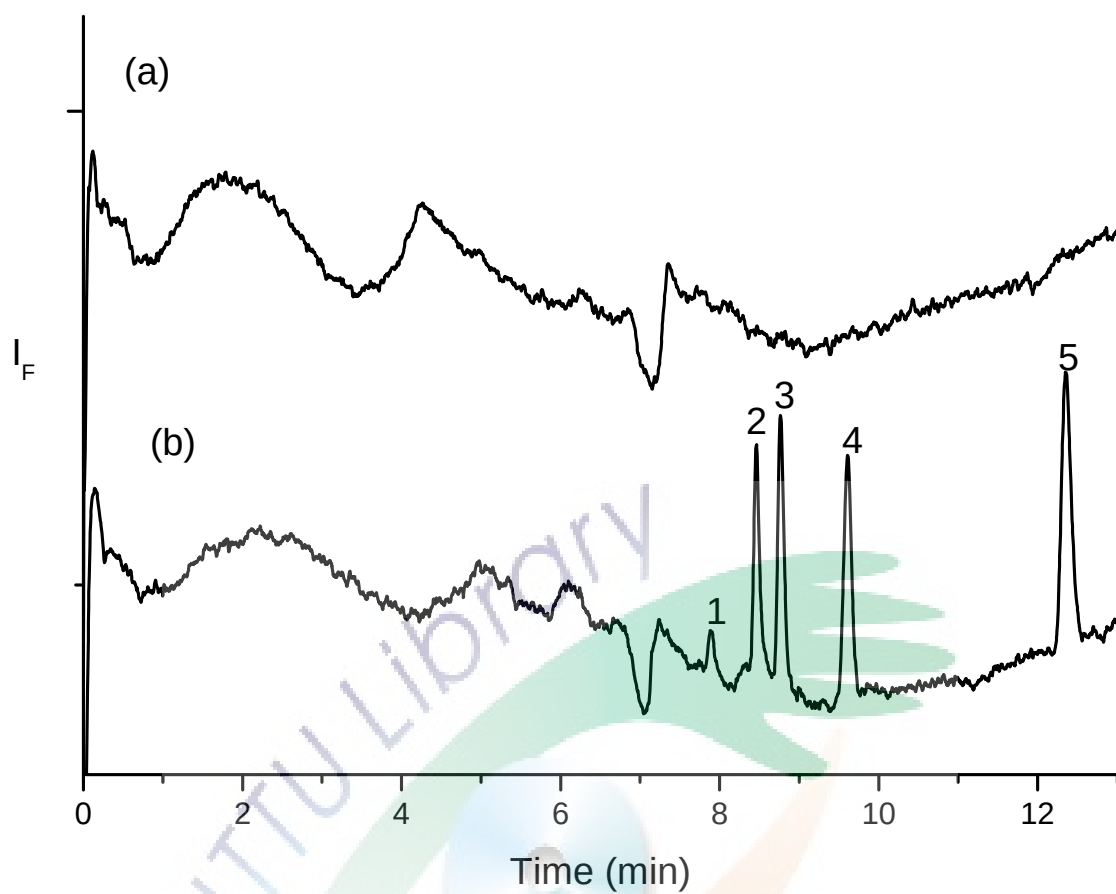


Fig. 42. Electropherograms of the (a) blank; (b) five pesticides spiked in water sample 5. Other conditions as Fig. 38.



Fig. 43. The commercial sample of carbaryl.

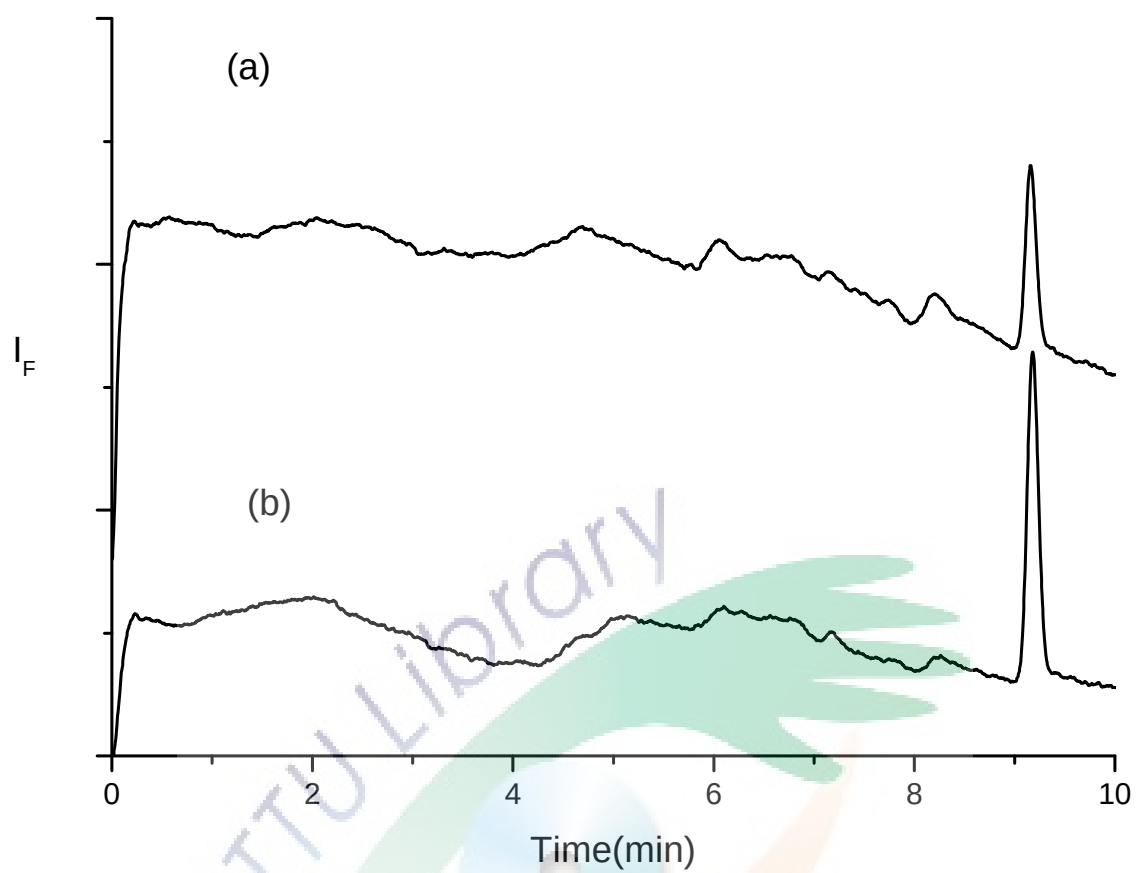


Fig. 44. Electropherograms of the commercial sample dissolved in (a) distilled water (b) methanol. Other condition as Fig. 37.