

摘要

本論文提出一項新的分析技術，以分散式液液微萃取法結合雷射脫附游離飛行質譜儀，對強心配醣體藥物毛花苷進行鑑定分析。

利用分散式液液微萃取技術，可以同時達到萃取與濃縮分析物的效果，將萃取劑(碘甲烷)與分散劑(四氫呋喃)，快速注入樣品溶液中，形成混濁狀的溶液，此時分析物通過分散劑被萃取至萃取劑中，經由離心將沉積相分離，取出離心管底部的沉積液並且與基質溶液 α -CHCA 混合，以基質輔助雷射脫附游離飛行質譜法進行分析物的偵測。實驗中探討萃取劑的種類與體積、分散劑的種類與體積、pH 值、萃取時間、離心時間等因素對於實驗結果的影響，在最佳化的實驗條件下，所得到的分析物檢量線，濃度線性範圍為 0.01 μ M 至 1 μ M，相關係數(R^2)為 0.9911，偵測極限可達到 1.06 nM。

將此分析方法應用於人體尿液樣品的偵測，可成功地檢測出毛花苷化合物的成份，偵測極限為 13.1 nM。另外，此分析方法也可進一步應用於檢驗尿液樣品中，含有多種強心配醣體藥物(毛地黃毒苷、毛地黃素和毛花苷)，達到同步偵測之目的。

關鍵詞：分散式液液微萃取法、雷射脫附游離飛行時間質譜儀、強心配

醣體、萃取劑、分散劑

英文摘要

Lanatoside C, a kind of cardiac glycoside was determined by a novel dispersive liquid-liquid microextraction method coupled with MALDI-TOF MS. The appropriate mixture of extraction solvent (CH_3I) and dispersive solvent (THF) was rapidly injected into a sample solution. It formed a cloudy solution and Lanatoside C was extracted into the extraction solvent by the dispersive solvent. After centrifugation, the sediment solvent was mixed with α -CHCA before determined by the MALDI-TOF MS. Several important experimental condition, such as the kind and the volume of extraction solvents, dispersive solvent, extraction time and centrifugation time were investigated. Under the optimal conditions, our experiment results showed a linear calibration curve in the concentration ranged from 0.01 μM to 1 μM with a correlative coefficient (R^2) 0.9911 and the limit of detection for a standard solution of Lanatoside C was 1.06 nM. This method had been successfully applied for the analysis of Lanatoside C in urine. In addition, a mixture of Digitoxin, Digoxin and Lanatoside C solution could be analysed simultaneously.

Keyword: dispersive liquid-liquid microextraction method, MALDI-TOF

MS, Cardiac Glycoside, extraction solvent, dispersive solvent

目錄

摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
壹、 緒論.....	1
1.1. 前言.....	1
1.2. 強心配醣體簡介.....	2
1.2.1. 藥理作用.....	3
1.2.2. 相關文獻回顧.....	4
1.3. 常用的萃取法簡介.....	10
1.3.1. 固相微萃取法.....	10
1.3.2. 霧點萃取法.....	11
1.3.3. 分散式液液微萃取法.....	12
1.4. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀簡介.....	15

1.4.1. 基質輔助雷射脫附游離法的發展史.....	15
1.4.2. 基質的特性與功能.....	17
1.4.3. 基質輔助雷射脫附游離法樣品製備方式.....	21
1.4.4. 基質輔助雷射脫附游離法離子形成機制.....	22
1.4.5. 飛行時間質量分析儀的原理與構造.....	26
1.4.6. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的優點.....	31
1.5. 研究動機.....	34
貳、材料與方法.....	35
2.1. 化學藥品.....	35
2.2. 儀器設備.....	38
2.3. 實驗方法.....	40
2.3.1. 樣品溶液配製.....	40
2.3.2. 生化樣品的前處理與製備.....	42
2.4. 分散式液液微萃取法參數.....	43
2.5. 質譜儀操作條件.....	45
參、結果與討論.....	47
3.1. 樣品與基質的製備.....	47

3.1.1. 最適當的基質	47
3.1.2. 以 seed-layer 方式製備樣品	50
3.1.3. NaH ₂ PO ₄ 緩衝溶液	52
3.2. 分散式液液微萃取法的最佳實驗條件	54
3.2.1. 萃取劑的選擇	54
3.2.2. 分散劑的選擇	57
3.2.3. 萃取劑的體積	60
3.2.4. 分散劑的體積	63
3.2.5. 溶液的 pH 值	66
3.2.6. 萃取時間	69
3.2.7. 離心時間	74
3.2.8. 鹽類的添加	76
3.2.9. 最佳的實驗條件	78
3.3. 標準溶液的檢量線與偵測極限	81
3.4. 生化樣品的檢測	83
3.4.1. 沒有經過前處理的尿液樣品	83
3.4.2. 經過去離子水稀釋的尿液樣品	85

3.4.3. 經過冷凍沉澱法處理的尿液樣品.....	87
3.4.4. 尿液樣品的檢量線與偵測極限	88
3.5. 同步偵測多種強心配醣體藥物	89
3.5.1. 標準溶液中強心配醣體的偵測	89
3.5.2. 尿液中強心配醣體的偵測	91
肆、 結論與未來展望.....	92
伍、 參考文獻	93

圖目錄

圖 1：Lanatoside C 的化學結構.....	4
圖 2：分散式液液微萃取流程圖	14
圖 3：基質輔助雷射脫附游離法離子化示意圖	22
圖 4：直線型與反射型飛行時間質譜儀	29
圖 5：Microflex target.....	33
圖 6：桌上型的 Micro Flex 儀器	45
圖 7：Lanatoside C 以不同的基質所測得的質譜圖.....	48
圖 8：添加與未添加 Lanatoside C 所測得的基質背景質譜圖	49
圖 9：樣品之結晶圖像.....	51
圖 10：以 NaH_2PO_4 配製 Lanatoside C 標準溶液所測得的質譜圖.....	53
圖 11：不同的萃取劑對於訊號增強係數之影響	56
圖 12：不同的分散劑對於訊號增強係數之影響	58
圖 13：萃取劑體積對於訊號增強係數的影響.....	61
圖 14：萃取劑使用量與沉積液體積的關係圖.....	62
圖 15：分散劑體積對於訊號增強係數之影響.....	64
圖 16：分散劑使用量對於沉積液體積之影響.....	64
圖 17：分散劑體積對於樣品回收率之影響.....	65
圖 18：樣品溶液的 pH 值對於訊號增強係數之影響	67

圖 19：樣品溶液的 pH 值對於樣品回收率之影響	68
圖 20：萃取時間對於濃縮倍率之影響	71
圖 21：萃取時間對於沉積液體積之影響.....	71
圖 22：萃取時間對於樣品回收率之影響.....	72
圖 23：萃取時間對於訊號增強係數之影響.....	72
圖 24：離心時間對於沉積液體積之影響.....	74
圖 25：離心時間對於樣品回收率之影響.....	75
圖 26：NaCl 的添加量對於訊號增強係數之影響.....	77
圖 27：Lanatoside C 標準溶液經過 DLLME 萃取後所測得的質譜圖 ...	80
圖 28：Lanatoside C 標準溶液的檢量線	82
圖 29：添加 Lanatoside C 標準溶液於未經任何前處理的尿液樣品溶液所 測得的質譜圖	84
圖 30：以去離子水稀釋尿液樣品溶液所偵測得的質譜圖	86
圖 31：經過冷凍沉澱法進行樣品前處理所測得的質譜圖	87
圖 32：尿液樣品中 Lanatoside C 化合物的檢量線.....	88
圖 33：Digitoxin、Digoxin 及 Lanatoside C 混合的標準溶液經過 DLLME 萃取後所測得的質譜圖	90
圖 34：添加 Digitoxin、Digoxin 及 Lanatoside C 於尿液中經過 DLLME 萃取後所測得的質譜圖	91

表目錄

表 1：強心配醣體藥物的化學結構	2
表 2：Lanatoside C 分析方法的比較	8
表 3：常用的有機酸基質	20
表 4：基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的操作參數	46
表 5：分散式液液微萃取法的最佳實驗條件	79

壹、緒論

1.1. 前言

強心配醣體(cardiac glycosides)自十八世紀以來便為醫藥界所採用^{1,2}，能增加心肌收縮力，恢復心臟排血量，用於慢性心臟衰弱、心肌充血、心肌輸出量減低者，都具備良好的治療效果。

本類藥物可由長葉毛地黃(digitalis lannate)所萃取出³，其中乙醯長葉毛地黃毒苷(lanatoside C)，是一種速效強心苷。此藥強心利尿，藥效比毛地黃(digitalis)、長葉毛地黃苷(digoxin)快，但比毒毛花苷(strophanthine K)稍慢，由於此藥排泄較快，故積蓄性較小。

毛地黃對心臟血管有多重的作用⁴，同時具有治療與毒性引發心律不整的結果，嚴重時甚至心肌纖維顫動可造成死亡。此外，對於中樞神經以及腸道、腎臟亦有不良作用⁵。加上治療劑量範圍狹小，且易貯基於體內，若長期服用的劑量控制不當或併用利尿劑，造成血鉀過低，均易產生中毒現象，故需定期監測病人體內的濃度，防止中毒的情形產生發生。

1.2. 強心配糖體簡介

強心配糖體(cardiac glycosides)是一種用於治療充血性衰竭 (congeative heart failure ; CHF) 的藥物，其來源包括長毛洋地黃與洋地黃、地中海海洋蔥、馬利筋屬植物及其他熱帶與溫帶植物，此藥物結構龐大，主要結構由一個多醣基加上一個含類固醇結構之無醣體 (aglycone) 組成，[表1]為主結構圖以及常見的強心配糖體藥物的名稱與化學結構⁶。

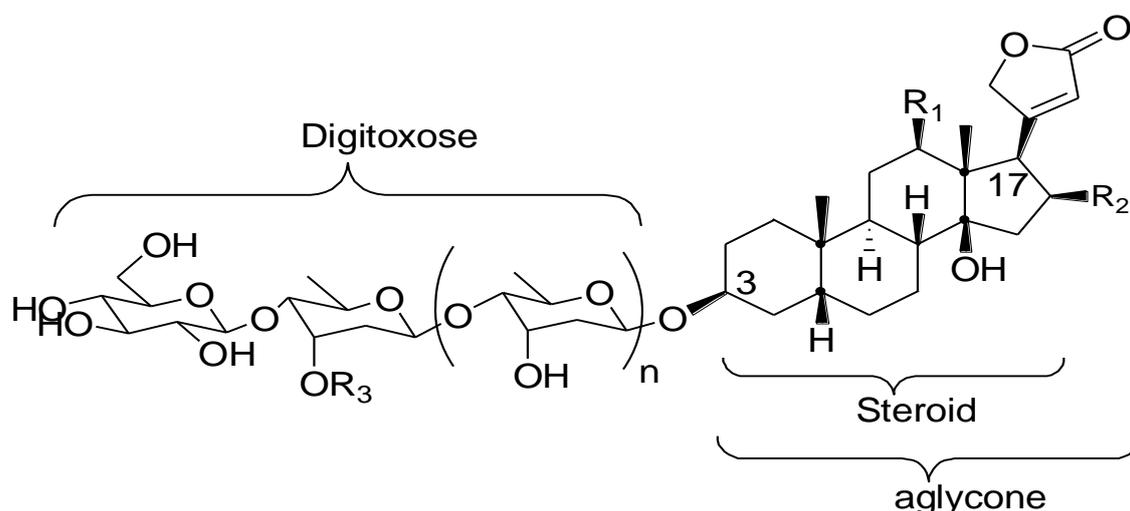


表 1：強心配糖體藥物的化學結構。

Compound	n	R ₁	R ₂	R ₃	Formula	Molecular weight
Digitoxin	1	H	H	H	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	764.9
Digoxin	1	OH	H	H	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	780.9
Lanatoside C	2	OH	H	COCH ₃	C ₄₉ H ₇₆ O ₂₀	985.1
Deacetyl lanatoside C	2	OH	H	H	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉	943.1

在結構上可以發現在 C-17 的位置接一不飽和的五邊內酯環⁷，在核心 C-3 的位置接一連串糖基，在構造與活性的研究指出內酯環與類固醇核心是活性所必須，指出其主要強心藥力來自於無糖體的部分。此外其他的取代物，特別是在 C-3 的糖分子，會影響藥物動力學的參數，包括吸收、半衰期以及代謝。

1.2.1. 藥理作用^{3,8}

強心藥物主要是用來治療一般慢性心臟衰弱的患者，多是植物性配糖體。心臟衰弱時，部分循環血液可能在身體的某部分滯留，心肌肉無力壓出足夠量的血液供身體各組織的需要。而毛地黃藥物可抑制心肌細胞的鈉-鉀腺核苷三磷酸酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$)，使 Na^+ 與 K^+ 的交換無法進行。

細胞內的 Na^+ 逐漸增加 K^+ 逐漸減少，而細胞內 Na^+ 又可抑制 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 的互換，使細胞內 Ca^{2+} 的濃度提升，增強心肌收縮力，使心輸出血流量增加，減少靜脈充血，縮小肥大的心臟，減少耗氧量。在臨床上的觀察，對健康的人並無特別的效用，獨對心律不整、心輸出量低者、心臟衰弱者有效用。除此之外可增加腎血流量使尿量增大，使鈉及水份大量排出，對於充血性衰竭引起的水腫具有療效。

本篇論文所研究的強心藥物為乙醯長葉毛地黃毒苷(Lanatoside C)結構如[圖1]所示，由長葉毛地黃中萃取而得，為中效型強心藥，

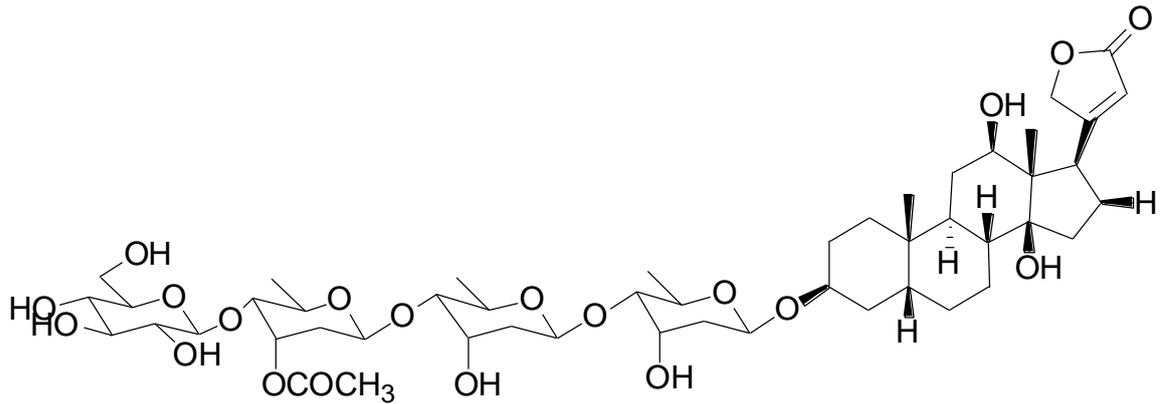


圖 1：Lanatoside C 的化學結構。

此藥物多以口服，亦使用靜脈注射或肌肉注射。1~2 小時內可見效果³，且與蛋白質結合率只有 20%~25%，主要由腎排泄，半衰期約 32~36 小時積蓄性小，主代謝物 80% 為原型，17% 為 Digoxin，治療量與中毒量之間的差距較大於其他毛地黃強心配糖體。

雖然強心配糖體對於多種原因所導致的心臟功能不全有一定的療效，但是治療劑量範圍狹小，一般治療量已經接近中毒劑量的 60%，當使用劑量過大時易造成毛地黃中毒現象，造成腸胃不適、視覺異常、疲憊、頭痛等現象，嚴重有誘發心律不整、心室纖維顫動等致死原因。因此有效且快速、準確的掌控病人體中的藥物濃度是很重要的。

1.2.2. 相關文獻回顧

過去文獻中用來偵測 Lanatoside C 的方法並不多，以下為其相關

文獻的敘述：

放射免疫法(radioimmunoassay ; RIA)雖然較常使用在強心配糖體的偵測上⁹⁻¹¹，但是此方法具有選擇性，只對某一部分的強心配糖體有效力。在 1975 年時，Karjalainen J.和 Ojala K.曾提出利用此方法偵測血液中 Lanatoside C 的濃度¹²。結果顯示使用鈷放射可測定血液中含有的藥物濃度在 4 ~ 5 ng/mL 以上，可以應用在臨床血液中 Lanatoside C 的測量上。此外，其他文獻指出 Lanatoside C 在血液中的消失速率甚快¹³，故將 RIA 應用在血液中的測量，則需再進一步確定。

Ikeda 等人在 1992 年利用高效能液相層析法(high-performance liquid chromatography ; HPLC)^{14, 15}，偵測長葉毛地黃葉片中的 Lanatoside C 含量且應用在分析發酵的葉片粉上，以固相萃取法(solid-phase extraction ; SPE)進行前處理，再藉由高效能液相層析法偵測其濃度，所得到的偵測極限可至 20 µg/mL，回收率約在 97.5 ~ 100 %之間。在 Pellati 的文獻中，同樣地以高效能液相層析儀進行毛地黃葉中強心配糖體的成份偵測⁶，先以固相微萃取(solid-phase microextraction ; SPME)劑術成功地將強心配糖體的成份分離出來，再進行儀器分析，對於 Lanatoside C 化合物所測得到的偵測極限為 1.53 µg/mL，相對標準偏差(relative standard deviation ; RSD)為 1 %，

顯示具有良好的再現性。

以上所提到的分析方法對於強心配醣體類藥物的定性鑑定，無法提出有力的證明，且前處理步驟不僅複雜亦耗費大量的有機溶劑。

質譜技術的發明及應用，在定性上給予了很大的改善，因為可藉質譜獲得化合物的分子量及分子結構訊號，故對於化合物的定性確認上可提出有效的證明，具有極佳的鑑定效果，常成為藥物與生化樣品的最佳偵測工具。例如，以氣相層析質譜儀(gas chromatographic - mass spectrometric ; GC-MS)、高效液相層析串聯質譜儀(high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry ; HPLC-MS/MS)進行化合物的分析，可利用層析的技術先將樣品進行分離再以質譜偵測，擁有很好的靈敏度和專一性。

1997 年在 Tracqui 等人的文獻上報導¹⁶，利用高液相層析儀結合離子噴灑質譜儀(high-performance liquid chromatography-ionspray mass spectrometry ; HPLC-ISP-MS)進行血漿中強心配醣體的成份偵測，以液液萃取法(liquid-liquid extraction)進行樣品前處理，再進行偵測。此方法對於 Lanatoside C 具有極佳的靈敏度，偵測極限為 0.6 µg/mL 及近 97% 的良好回收率；但在進行層析時，易有共滯留的問題產生。此外，尚有 Fujii 等人也提出利用逆相薄層色層分析技術(reversed-phase thin-layer chromatography ; RP-TLC)¹⁷，偵測長葉毛

地黃葉片中的強心配醣體。

結合上述的文獻所提出的方法可發現，在樣品分析前均需進行繁瑣又耗時的萃取及層析過程，對於強心配醣體類藥物的分析，仍有改善之處。故本研究論文，嘗試以分散式液液微萃取法(dispersive liquid-liquid microextraction ; DLLME)結合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ; MALDI-TOF MS)的偵測技術，對 Lanatoside C 進行分析。[表 2]列出過去的文獻及本論文所提出對 Lanatoside C 的分析方法，並將其優缺點做一比較。

表 2：Lanatoside C 分析方法的比較。

分析方法	優點	缺點
Radioimmunoassay (RIA)	<ul style="list-style-type: none"> ● 具有專一性 ● 靈敏度佳 (< 5 ng/mL) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 誤差較大 ● 具有放射性需特殊預防措施
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> ● 靈敏度佳 (20 µg/mL) ● 再現性佳 (RSD ≈ 1%) ● 應用性廣 	<ul style="list-style-type: none"> ● 耗費大量有機溶劑 ● 前處理步驟繁瑣 ● 無法做定性的確認
High-Performance Liquid Chromatography-ionspray mass spectrometry (HPLC-ISP-MS)	<ul style="list-style-type: none"> ● 靈敏度佳 (0.6 µg/mL) ● 應用性廣 ● 良好的回收率(97%) ● 可做定性確認 	<ul style="list-style-type: none"> ● 前處理步驟繁瑣 ● 層析時易有共滯留的問題 ● 儀器價格昂貴
reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC)	<ul style="list-style-type: none"> ● 操作時間短 	<ul style="list-style-type: none"> ● 靈敏度不高 ● 需回收才可做定量及定性的分析

分析方法	優點	缺點
本論文提出的方法：	<ul style="list-style-type: none"> ● 環保 	<ul style="list-style-type: none"> ● 使用含鹵素溶劑
DLLME 結合	<ul style="list-style-type: none"> ● 可做定性的確認 	<ul style="list-style-type: none"> ● 只適合基質較單
MALDI-TOF MS	<ul style="list-style-type: none"> ● 操作簡單 ● 再現性佳 ● 靈敏度佳 <p>(1.04 ng/mL)</p>	<p>純的樣品</p>



1.3. 常用的萃取法簡介

樣品製備是整個分析技術中一道主要的程序¹⁸，目的是將分析物由樣品基質中萃取出來，與可能干擾物質分離；經由濃縮目標分析物後，利用儀器分析，進一步進行定量等偵測。近年來環保意識抬頭，1990年以後綠色化學逐漸的受到重視¹⁹，由於傳統的樣品前處理，須使用大量的有機溶劑，不僅危害人體也易造成環境汙染；故一個理想的樣品製備需具備使用溶劑少、操作簡單、價格便宜、效率高、有選擇性且容易和其他分析方法搭配，使用及應用範圍廣泛等特性。

1.3.1. 固相微萃取法(solid-phase microextraction ; SPME)^{20, 21}

固相微萃取法在1990年被Arthur和Pawliszyn所提出，主要是利用一塗有高分子聚合物之纖維的吸附物質，使待測分析物從樣品基質萃取至塗覆纖維上，當達到濃縮的目的後，將塗覆纖維放入儀器中，使分析物由塗覆纖維上脫附下來，進行定量分析。

儀器的構造是利用化學材質塗覆製成一細小棒狀纖維，固定於不銹鋼伸縮注射器內，藉由伸出探針吸附待測物。對於現有技術的應用包含了頂空(head space)和液相(liquid phase)，配合碳針塗覆的材質選擇，皆可有效的對揮發性及半揮發性有機物進行萃取。

雖然此方法有零溶劑的優點，但對於高鹽含量或是複雜基質的樣

品(如尿液、血清、果汁等)，可能引起探針的樣品殘留問題，目前也有相對的方法可以克服，以提高回收率與萃取率。但是塗覆纖維探針很脆弱，有時運用在 GC 入口的升溫注射時，因溫度太高而遭到破壞不堪使用；且有使用的壽命期限，此外價格上也不便宜。

1.3.2. 霧點萃取法(cloud-point extraction ; CPE)²²⁻²⁵

霧點萃取法是由 Watanabe 等人在 1976 年所提出²⁶，是一種利用微胞萃取技術(micelle-mediated extraction)達到分離濃縮的模式。此方法使用非離子型界面活性劑取代揮發性有機溶劑，先利用錯合試劑金屬生成錯合物，再加入界面活性劑，促成金屬錯合物形成微胞，當超過臨界微胞濃度(critical micelle concentration ; CMC)時，包有金屬錯合物的微胞會產生分離現象。

非離子型界面活性劑在一般溫度低時易與水互溶，故可以水當溶液避免環境污然，是一項很好的綠色分析技術，當溫度增加到一定程度後，原本澄清的溶液會因微粒結合而形成大分子使溶液變混濁，驅使界面活性劑析出，並且分為上層的水相和下層的界面活性劑相，再以底層的界面活性劑相進行儀器分析。但在 GC 和 HPLC 的應用上²⁴，²⁵，界面活性劑的選擇常帶來分析者在分析上的麻煩^{21, 22}。

霧點萃取法可藉由 pH 值、溫度或是壓力、離子強度等控制變因，

將疏水性物質與親水性物質分離，這些因素與萃取後的濃縮率息息相關，故在萃取過程中必須謹慎的控制各個因素。

1.3.3. 分散式液液微萃取法²⁷

2006 年 Rezaee 等人提出了分散式液液微萃取樣品前處理技術，此萃取法類似於 HLLME(homogeneous liquid -liquid extraction)²⁸ 與 CPE 將適當的萃取劑與分散劑混合後，利用注射針快速將其注射入樣品水溶液中，此時萃取劑、分散劑和水溶液會形成混濁相，經由離心分層後使用微量注射針將萃取劑沉積相取出，就可直接進入 GC、HPLC 等儀器分析，而本論文採用 MALDI-TOF MS 進行化合物的分析鑑定。

[圖 2]為 DLLME 整個操作流程，其操作過程說明如下：(a) 取 5 mL 樣品水溶液至 15 mL 的玻璃尖底離心管中；(b) 利用注射針抽取配製好的分散劑(包含了萃取劑)，快速將其注射入樣品水溶液中；(c) 此時萃取劑、分散劑和水溶液會形成霧狀混濁相；(d) 經由離心的步驟後，萃取劑會產生沉積液；(e) 利用微量注射針將沉積液取出；(f) 將沉積液與 α -CHCA 均勻混合，直接點在 target plate 上，空氣中待乾後送入 MALDI-TOF MS 中，即可進行偵測。

此方法不僅操作簡單且不耗時，又有低流失、高回收率、使用溶劑量少及高濃縮倍率等優點，也避免了固相微萃取存在的交叉污染問題，故本實驗採用此萃取方法配合具有高靈敏性、高解析度及專一性優點的基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行分析，樣品溶液不需先經過耗時的層析步驟純化分離，可直接進行化合物的偵測，提高了此一分析技術的應用價值。

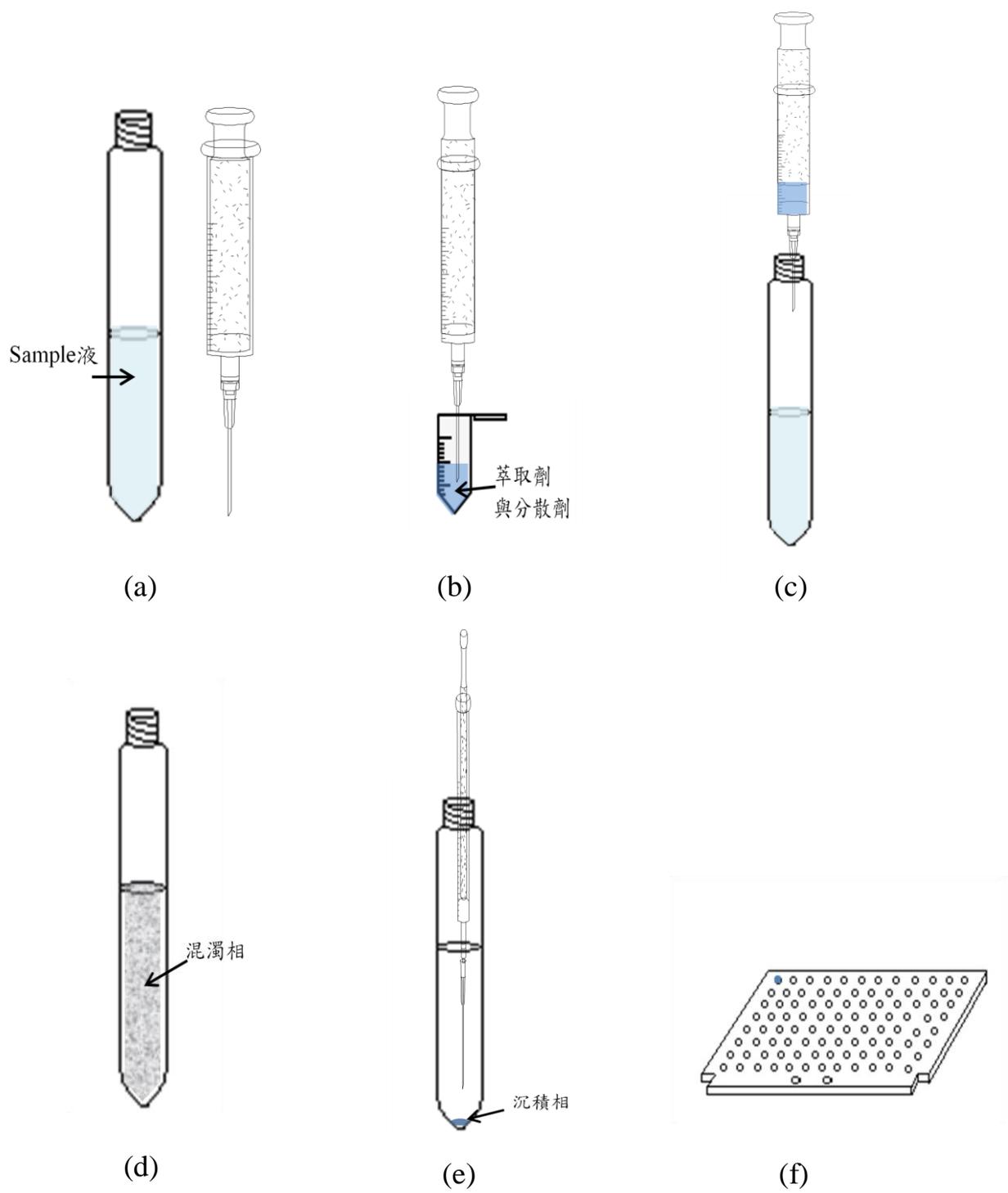


圖 2：分散式液液微萃取流程圖。

1.4. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀簡介

1.4.1. 基質輔助雷射脫附游離法的發展史

基質輔助雷射脫附法的發展起源於1960年代的雷射脫附法 (laser desorption ; LD)，當時根據研究利用高能量的雷射光束照射在固體表面上，可從表面脫附出完整的離子，再用質譜儀進一步分析。在1978 年時Posthumus, M.A.等人利用雷射脫附質譜法成功地分析核苷酸、胺基酸、胜肽、醣類等生化小分子²⁹，此方法廣泛地應用在分析小分子的有機化合物上。但由於雷射光束的能量很高，將高能的雷射光束直接打在化合物上，容易產生許多的離子碎片，造成圖譜辨別上比較困難，所以對於分子量較大的有機聚合物和生化分子無法偵測到分子離子，此技術在當時僅能偵測到分析物的質量上限在2000 Da 以下。

在1980年代末期，德國物理學家Hillenkamp和日本化學家Tanaka先後提出了具有偵測高分子巨分子能力及分析生化的現代質譜分析技術。在1985年時Karas和Hillenkamp首先提出以基質(matrix)幫助分析物脫附游離的概念³⁰，利用可吸收雷射能量的色胺酸(tryptophan)當做基質和不吸光的胺基酸混合，用雷射波長266 nm的Nd:YAG雷射照射，成功的偵測到胺基酸的訊號，發現了色胺酸可以輔助分析物脫附

游離的現象。接著在1987年的一場學術會議中，日本的田中耕一 (Koichi Tanaka) 等人發表了利用細微的鈷(Co)金屬粉末³¹，顆粒大小約300 Å與甘油混合當作基質，再加入蛋白質樣品溶液充分混合，利用波長337 nm的氮氣雷射照射在樣品上進行脫附游離，成功地脫附了分子量近14 KDa的溶菌酶(lysozyme)以及高達70 KDa的lysozyme cluster的生化大分子訊號，隔年在期刊中發表了可偵測到分子量達34 KDa的carboxypeptidase A 離子訊號³²，亦是成功利用此技術偵測生化大分子的第一人。德國的Hillenkamp團隊也在1988年報導了以有機酸(尼古丁酸)作為基質和蛋白質分子混合後³³，用波長266 nm的Nd:YAG雷射成功地偵測白蛋白(albumin; 67KDa)以及分子量高達十萬的albumin cluster的離子訊號，將分析物的質量偵測範圍提高到100 KDa。

其中Tanaka等人所提出的方法，由於鈷金屬粉末價格昂貴且取得不易，加上對人體有高度毒性等問題。此外，所得到的質譜圖訊號在靈敏度及解析度均較以有機酸為基質時差，因此目前所使用的MALDI基質多以Hillenkamp所提出的有機酸為主。利用有機酸做為基質時樣品製備簡單又迅速，至今已開發的基質已達數十種³⁴⁻³⁶之多。由於上述等人的研究將MALDI的偵測範圍擴增至生物巨分子的程度，使得MALDI-TOF MS目前可普遍地應用在生化樣品的分析上。

1.4.2. 基質的特性與功能

MALDI與早期的LD最大的差別在於，進行分析時添加了基質幫助分析物分子進行脫附游離。如此MALDI可以藉基質先吸收雷射能量後，再將能量傳遞給分析物，使之脫附游離得到完整的分子離子訊號。在早期被研究發展出來的基質多屬於具芳香環的有機酸如 sinapinic acid 及 2,5-dihydroxybenzoic acid 等，會在UV範圍內吸收雷射能量，迄今已有八十餘種此類基質被發展出來³⁵⁻³⁷。

根據研究顯示，對於不同類型的分析物而言，選擇了適合的基質與分析物形成良好的結晶後，可以得到較好的分析結果，因此針對不同的分析樣品，需發展出不同的基質。[表3]為常用的有機酸基質包含 α -CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)、SA (sinapinic acid)、2,4,6-trihydroxyacetophenon、2,5-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)、HPA (3-hydroxypicolinic acid) 等，以及基質相對應的雷射波長與主要適用的分析物類型。

基質的選擇需依可吸收雷射能量的波長而有所改變，因為質譜在真空下操作，基質須具備低揮發的性質且在真空下為穩定的，若基質容易揮發則無法穩定的覆蓋於分析物周圍將能量有效的傳遞，會造成分析上和圖譜判斷上的困擾。因此，成為良好的MALDI基質需具備以下三種功能及特性^{38, 39}：

(1) 有效的吸收雷射能量並傳遞給分析物

基質本身應具有吸收雷射能量的能力，並且能夠在短時間內有效率的將能量傳遞給相鄰的分析物分子，使得分析物分子能夠獲得足夠的能量由固相轉變成氣相，進行脫附游離。

(2) 避免分析物聚集

在結晶的過程中，分析物太過於集中時會降低能量傳遞的效率，故大量的基質扮演著有效將分析物分子隔開的角色，避免分析物分子聚集在一起，而影響到能量傳遞的效率以及脫附游離的反應。

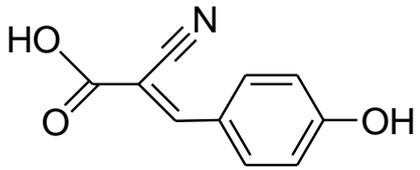
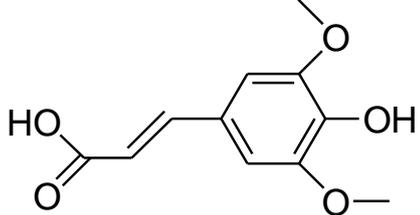
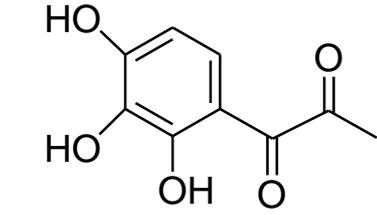
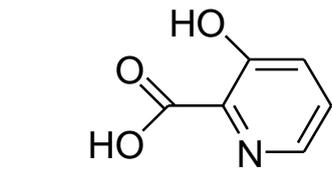
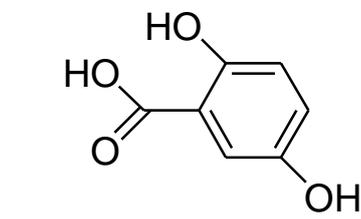
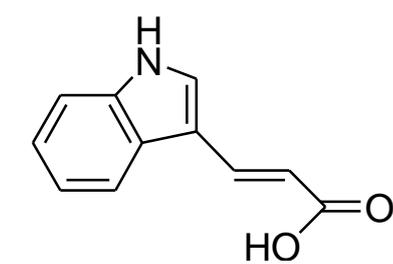
(3) 提供氫離子給分析物，幫助分析物游離化

MALDI在經過脫附游離的過程後，分析物大多以質子化離子 (MH^+) 的形式被偵測到，根據脫附游離的機制探討研究顯示，在使用 MALDI 此種游離技術時，分析物若要獲取質子的方式較可能是藉助分析物分子和具 H^+ 之基質離子在氣相中進行離子-分子反應 (ion-molecule reaction; IMR) 而獲得分子離子 MH^+ ，因此基質在游離的過程中必須要提供氫離子給分析物。目前常使用的基質多為具有羧酸基的有機分子，因為解離的關係可有效的提供氫離子給分析物，使分析物帶上電荷。

基質的選擇會影響分析物在 MALDI-TOF MS 中的分析結果，雖然可藉由以上的特性作為挑選依據，但由於分析物與基質溶液間的莫

耳數比例、溶劑間混合均勻度、極性的差異及溶劑揮發的速度等相關的因素太多，均會影響結晶的形成，不好的結晶體會影響基質將能量傳遞給分析物的效率，進而影響到分析結果，為MALDI使用上很重要的一環。

表 3：常用的有機酸基質。

基質名稱	結構	適用雷射 波長(nm)	適用的 分析物
α -CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)		266	蛋白質/胜肽
SA (sinapinic acid)		337 355	(protein/ peptide)
2,4,6,-THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone)		337 355	寡核酸 (oligonucleotide)
HPA (3-hydroxypicolinic acid)		266 355	
2,5-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)		266 337 355	有機分子
IAA (Trans-3-indoleacrylic acid)		337	聚合物

1.4.3. 基質輔助雷射脫附游離法樣品製備方式

MALDI樣品的配製是先將具有吸收特定雷射波長之有機酸溶於水或有機溶劑中，此為基質溶液，接著再將基質溶液取約1 μL ~ 2 μL 與分析物樣品溶液約1 μL (濃度約1 μM)，以1：1或特定比例均勻混合，最後取約1 μL 混合液置於樣品盤(target)上，混合後的溶液含有大量的小分子有機酸基質與少量的分析物，在室溫下自然風乾，待溶液中的水與有機溶劑揮發後，便在樣品盤上形成結晶，在樣品盤上形成一層固態樣品。

在 MALDI 分析中，是否能得到分析物訊號的最重要決定因素，在於選擇適當的基質與樣品溶液的調配。過去的研究中發現，基質與分析物混合的莫耳數比例與所使用的溶劑其極性的差異與揮發的速度，均會影響結晶的形成以及分析物的訊號強弱而影響分析結果。例如，當混合後分析物濃度太高時，基質無法有效的隔絕分析物，雷射能量不能有效傳遞，而使得分析物的解析度和離子訊號強度降低。因此，一般在進行 MALDI 分析時，基質與分析物莫耳濃度比例大約都調整在 100：1 到 50000：1 之間，需依分析物的特性及實驗狀況來決定。

1.4.4. 基質輔助雷射脫附游離法離子形成機制

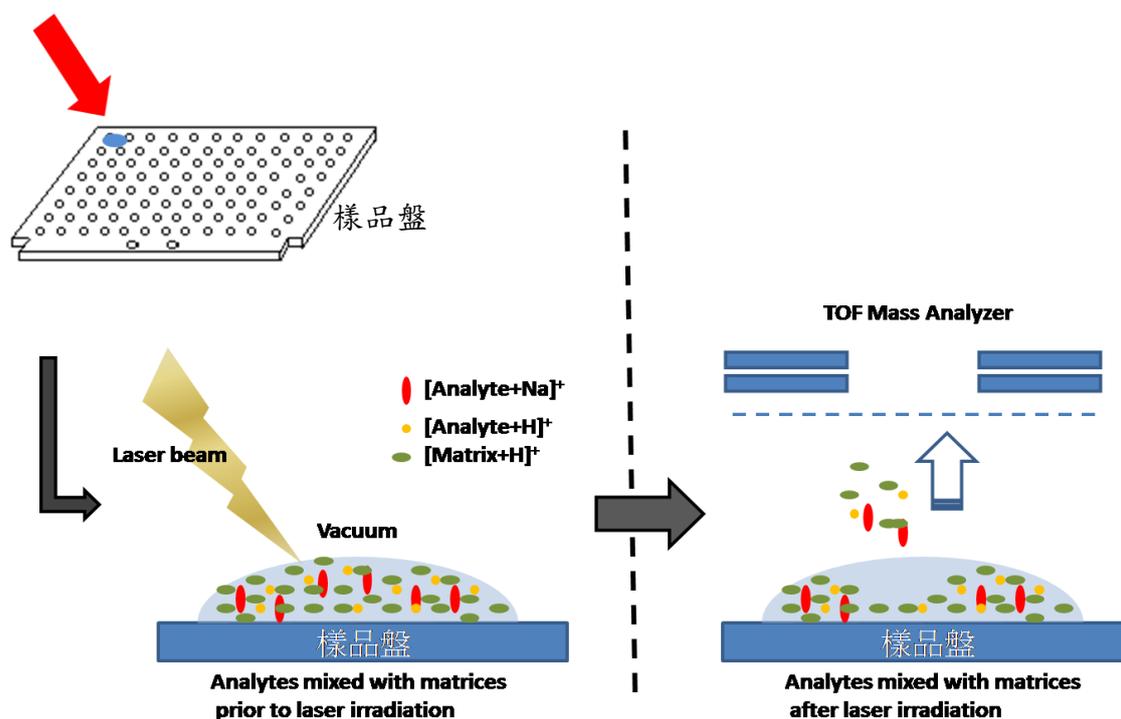


圖 3：基質輔助雷射脫附游離法離子化示意圖。

將含有分析物與基質結晶之樣品盤，送入質譜儀之離子源內，以脈衝式雷射光源照射此樣品點，由於在結晶中基質的含量遠較分析物分子為多，因此樣品被脈衝雷射照射時，大部分的雷射能量會由基質分子所吸收，再將能量傳遞給所環繞的分析物分子⁴⁰。

如[圖3]所示，當固態或液態分析物分子在瞬間吸收雷射能量後，導致相轉移，由凝相(固相或液相)昇華到氣相，此現象稱為脫附 (desorption)。此時相轉移的速率大於受熱分解的速度時，分析物分子不會因受熱而分解，仍可保持分析物分子結構的完整性並能脫附游

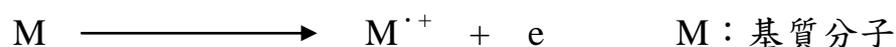
離至氣相。過程中電荷轉移的反應會同時進行，即一連串複雜的離子-分子反應發生，樣品分子因而帶上電荷，稱為游離化(ionization)。

由於MALDI是以雷射光做為能量的來源，因此在脫附游離分析物的過程中，並不單純只有一連串離子-分子反應，其中還包括了光化學反應、能量聚集、氣相中的光游離等。但因脫附游離分析物的過程時間太短不易觀察，至今仍有不少學者在探索中，本論文只介紹現今較為大眾所能接受的游離機制，可歸類為兩大類^{37, 41}：

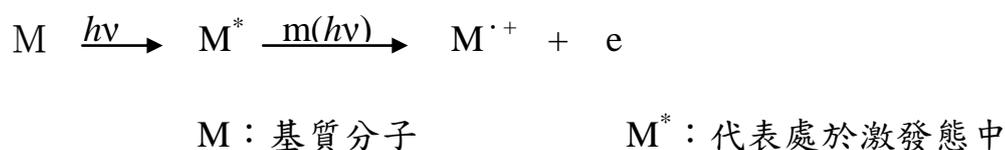
(1) 一次離子形成(primary ion formation)⁴²

主要是指中性分子在真空中游離成離子的階段，通常是指基質離子。在這過程中，有幾個形成機制的模型被提出來解釋，其中包括了由Sunner等人提出之相爆炸模型(phase explosion)⁴³。主要在解釋當高能的能量術撞擊於凝相態之樣品上時，樣品會在短時間內即處於極高溫的環境中，當溫度到達臨界超熱(critical superheat)以上時，此時樣品分子會處於不穩定的狀態，而產生相爆炸之現象，也就是將能量用於樣品分子使其從凝相態過度至氣相態之轉移位能。而此過程中由於相轉移的速率快於分析物分子熱分解的速率，因此不會有熱分解的現象發生，使得分析物可保持完整性而不會造成圖譜鑑定上的困擾，此模型可解釋為何在MALDI中可產生完整的氣相分子離子。

另外還有多光子游離模型(multiphoton ionization)，此模型是由 Ehring 等人在1992年所提出，是目前較常用來解釋UV-MALDI離子形成機制的模型^{36,37}，而此模型主要在說明離子的形成，是由於具有吸光性質的基質在吸收了多個光子後會激發至激發態，而產生了自由基陽離子：



上述的游離過程為UV-MALDI中一次離子形成之步驟，由於有來自基質的自由基離子產生，才能進行一連串的后續反應。另外，因UV-MALDI在游離的過程中能夠在很短的時間內將基質直接躍遷至激發態，及代表基質在吸收多個光子後會產生許多的自由基陽離子與電子：

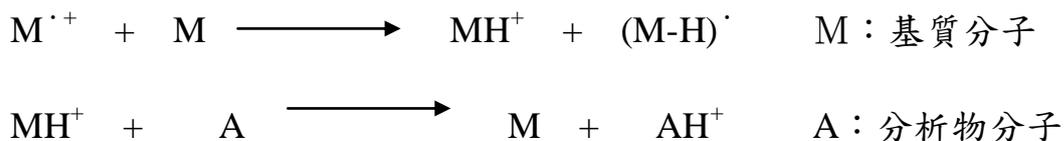


一般對於基質分子的游離位能而言，大致在吸收了約7 - 9 eV(兩個以上之光子)能量後，才能由基態激發至激發態，最終游離成離子。此外，尚有激發態質子轉移模型、能量聚集模型、不均勻反應模型等，

都是被提出用來解釋一次離子形成機制的模型。

(2) 二次離子形成(secondary ion formation)⁴⁴

與一次離子不同的是指不需經由一次離子形成的過程，即能直接產生的離子，通常是指分析物離子。當基質吸收雷射光能量後變成激發態分子和自由基，因此容易提供質子給分析物和其他基質分子離子，而這些跟基質有關之離子再和分析物分子進行一連串質子轉移反應 (proton transfer)，即為二次離子形成的主要步驟：



在上述式子中，由基質離子和分析物分子碰撞所形成的二次離子反應是否進行，取決於質子親和力 (proton affinity)，它可決定由哪些分子可獲得質子而被游離化。根據文獻說明，一般的有機基質之質子親和力通常介於183 ~ 225 kcal/mol^{42, 45}，而由實驗證明一般蛋白質之質子親合力約為240 kcal/mol⁴⁵，因此在氣相中，質子從基質離子轉移到一般蛋白質的過程，是一個較易進行的自發反應，所以當分析物的質子親和力較基質分子高時，質子轉移反應為放熱反應，因此如何選擇最適當的基質是相當重要的。

此外，尚有電子轉移模型(electron transfer)、電荷補償模型(charge compensation)、氣相陽離子加成物形成模型(gas-phase cationization)等，都是被提出用來解釋次離子形成機制的模型。質譜法只能分析帶電荷之樣品離子，因此必須將樣品游離成帶電荷之離子才能被偵測出來。因為大部分基質如[表2]為具有芳香環之有機酸，為很好的氫離子供給者，故一般在MALDI的圖譜中所觀測出的離子峰通常都是 $[M+H]^+$ 。但如有鈉、鉀存在時，加成物離子 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 也常存在於圖譜中，且因為 MALDI透過基質為媒介與FAB相似為軟性游離法，因此極少有碎片離子產生，只有在低質量範圍(M.W. < 500 Da)才有基質產生之碎片離子。

1.4.5. 飛行時間質量分析儀的原理與構造

MALDI最常以飛行時間質量分析器(time-of-flight mass analyzer ; TOF-MS)做為搭配⁴⁶⁻⁴⁸，因為MALDI所分析的樣品多半是大分子量的生化樣品，且TOF具有無理論質量上限的優勢與離子利用率高的特性，所以一般均連接TOF進行質量分析。

TOF基本構造為一中空飛行長管，一般長度為1~1.5公尺。當樣品進行脫附游離後形成離子時，離子在介於MALDI游離源及TOF飛行管之間的加速區，被施加一加速電壓，使所形成的離子在電場下均具

有相同的動能，之後再進入無磁場力之飛行管中飄移。由於動能相同，因此不同離子會因為質荷比(m/z)的不同而有不同的飛行速度，使其在不同時間到達偵檢器而被偵測到，此時飛行速度與荷質比的關係如下列公式所示：

$$\frac{1}{2}(mv^2) = KE = zeV \quad \longrightarrow \quad v = \left(\frac{2zeV}{m} \right)^{\frac{1}{2}}$$

v ：離子的速度 m ：離子的質量 z ：離子的電荷數
 KE ：動能 V ：電場加速電位 e ：電子的電荷量

若假設飛行管長度為 L 時，分析物離子於飛行管中的飛行時間以 t 表示，則可得到下列質荷比與飛行時間的關係式：

$$t = \frac{L}{v} = L \left(\frac{m}{2zeV} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \longrightarrow \quad \frac{m}{v} = 2eV \left(\frac{t}{L} \right)^2$$

從上面的關係式可得知，對攜帶相同電荷的離子而言，分子量越大的離子因飄移速度較慢，故飛行時間較長而較晚到達偵檢器；相對的，分子量較小的離子飄移速度較快，飛行時間短而較早到達偵檢器。通常離子從被脫附游離出來到達偵檢器的時間以微秒為單位，因此理論上僅需要很短的時間即可得到一張質譜圖。

TOF 常用的機型如[圖 4]所示，分為直線型(linear)與反射型

(reflective) 兩種，因為直線型飛行時間質量分析儀有解析度較差之缺點，主要是因為當分析物分子在游離的過程中，相同質荷比之離子被游離化的時間，可能會因為時間、空間和動能的不同而導致些微的差距，使得同質荷比之離子無法同時到達偵檢器而降低解析度。

反射型TOF主要在直線型飛行管末端增加一多組電極⁴⁹⁻⁵¹，使之產生強度遞減的正電場，當正離子在進入此段區域後，因電性相斥的關係而減速。當速度為零時再受此正電場的作用力轉向反方向加速，通過反向的飛行管後由另外一端的偵檢器所偵測到。因為可以有效地在反射電場中減少動能不同但相同質荷比離子的速度差，相較於直線型TOF有較高的解析度，一般可到一萬以上，但隨分析物分子量大小不同而異。

此外反射型TOF也可以利用序列式變更反射電場電壓進行和MS/MS功能類似的游離源後碎裂(post source decay; PSD)⁵²之技術，主要是藉由某些介穩離子(metastable ions)在飛行的過程中，因為內能過高導致在飛行時碎裂，此時碎裂的子離子和母離子的動能不同，但具有相同的飛行速度，再利用反射型TOF可依據動能不同而加以區分，動能較小的碎裂離子會較快地被反向電場減速轉彎，而較快到達偵檢器；換言之，動能較大的碎裂離子會較慢到達偵檢器，故可以區分碎裂後的碎裂離子，且得到選定母離子後的子離子質譜圖，進而可以應用在生化分子的結構分析上。

除了上述的方法改善了TOF/MS的解析度，尚有離子遲滯時間法(delayed extraction ; DE)⁵³之技術，主要用來修正因樣品離子化的時間差異，導致空間位置、時間及起始動能分佈不均而使解析度降低。其原理是當雷射照射樣品時，不立即施加加速電壓，待延遲至數十到數百奈秒(ns)之後才施加一加速電壓，此方法可使離子具相同的起始動能，進而提高解析度。

目前商業化的 TOF 儀器仍持續有新技術發展出來，現今已有直線型、反射型、W 型及多次折返型等，目前較常用的 TOF/MS 為直線、反射可切換式機型，而 W 型與多次折返型是近年所發展出的新機型，是更能提高解析能力的儀器。

1.4.6. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的優點

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀在目前的使用已經越來越普遍化，為偵測生化分子、聚合物以及藥物必備的儀器之一，在過去的文獻中，偵測 Lanatoside C 所使用的儀器與方法都比較耗時，故本論文以 MALDI-TOF MS 進行分析物的偵測，具備以下幾個主要的特點：

(a) 操作簡單且檢驗快速

將點好樣品之樣品盤送入 MALDI-TOF MS 中，待儀器真空值到達設定值時(5×10^{-6} torr)後即可開始操作。從雷射轟擊在樣品上而獲得一張圖譜的時間僅需數秒，且樣品混合物不需先經過層析儀分離，在同一張圖譜可同時獲得多化合物的分析結果，相當適合用來鑑定各種生化分子。

(b) 樣品量少且製備簡易

樣品製備上，通常只需要將等量的基質溶液和分析物均勻混合，最後取 1 μ L 混合液置於樣品盤上的樣品點，在空氣中自然風乾後，即可進入 MALDI-TOF MS 的儀器進行分析。過程中僅需的樣品量約數 μ L 即可，適合用以偵測微量的生化樣品。

(c) 高靈敏度

MALDI 是一個高靈敏的分析方法，通常在適當的基質與分析物比例下(約 1000：1，若分子量越大比例隨之提高)，一般的生化分子其偵測極限可低至 fmole 左右，適合用來偵測真實樣品中含量較低的分析物。

(d) 高質量範圍

MALDI 常搭配無偵測質量上限的 TOF 質量分析器，在進行高分子量範圍之化合物偵測時，使用基質來輔助分析物脫附游離，只要選擇適當的基質，即可偵測。以往至今，已有多數的文獻說明可偵測出數百 kDa 左右的巨分子和有機高分子⁵⁴。

(e) 高通量

MALDI 的樣品盤通常能同時點入數十至數百個樣品，[圖 5]為本論文所使用的樣品盤，最多可同時將 96 個樣品，點至樣品盤上進行分析，故可以同時偵測多種分析物。

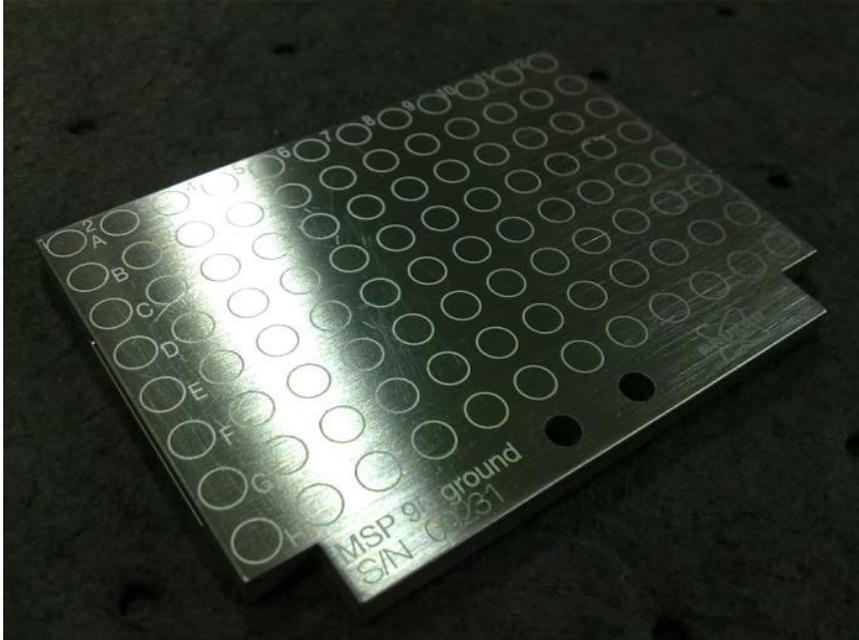


圖 5 : Microflex target 。

1.5. 研究動機

經由前面的文章敘述，得知文獻上已經有多位學者，曾提出利用 HPLC、RIA、HPLC-ISP MS 等方法，應用在強心配醣體類中 Lanatoside C 的偵測。

本實驗參考近年論文⁵⁵，為能準確測量極微量的 Lanatoside C 成份，提出以分散式液液微萃取技術結合基質輔助雷射脫附游離飛行質譜儀的分析方法，將樣品簡單、快速有效的濃縮，使偵測極限降低，取代以往需耗時且耗費有機溶劑的層析過程，期望達到縮短分析時間、簡化萃取步驟及達到減少溶劑使用的綠色分析目的。實驗過程中經由萃取劑、分散劑種類的選擇，適合的萃取劑與分散劑使用量、pH 值及最佳萃取時間等影響變因，得到最適合的分散式液相微萃取條件，再將此條件進一步應用於真實樣品中，Lanatoside C 成份的檢測。

貳、材料與方法

2.1. 化學藥品

1. Lanatoside C ($C_{49}H_{76}O_{20}$) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 95%。
2. Digitoxin ($C_{41}H_{64}O_{13}$) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 98%。
3. Digoxin ($C_{41}H_{64}O_{14}$) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 98%。
4. Acetone ($(CH_3)_2CO$) : ALPS 公司產品，LC 光譜級，純度 99.7%。
5. Acetonitrile (CH_3CN ; ACN) : ALPS 公司產品，LC 光譜級，純度 99.7%。
6. Methyl Alcohol (CH_3OH ; MeOH) : E.Merck 公司(Darmstadt,Germany)產品，純度 $\geq 99.9\%$ 。
7. Ethyl Alcohol (C_2H_5OH ; EtOH) : shimakyu's 公司產品，純度 99.5%。
8. Tetrahydrofuran (C_4H_8O ; THF) : J. T. Baker 公司產品，HPLC 級，純度 99.9%。
9. Dichloromethane (CH_2Cl_2) : 景明化工公司產品，試藥級，純度 99.9%。
10. Chloroform ($CHCl_3$) : ALPS 公司產品，LC 光譜級，純度 99.0%。
11. Carbon tetrachloride (CCl_4) : Aldrich (Milwaukee, WI, USA)公司

- 產品，HPLC 級，純度 99.9%。
12. Iodomethane (CH_3I)：昭和化學株式會社產品，試藥級，純度 95.0 %。
 13. Trisodium phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：Aldrich 公司(Milwaukee, WI, USA)產品。
 14. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)：Sigma 公司(Louis, MO, USA)產品，純度 99%。
 15. Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4)：Sigma 公司(Milwaukee, WI, USA)產品，純度 99%。
 16. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$ ； α -CHCA)：Aldrich 公司(Milwaukee, WI, USA)產品，純度 97%。
 17. 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ；sinapinic acid；SA)：Sigma 公司(Louis, MO, USA)產品，純度 98%。
 18. 2,5-dihydroxybenzoic acid ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ ；DHB)：Aldrich 公司(Milwaukee, WI, USA)產品，純度 97%。
 19. 膠體金(gold colloid solution；5 nm Au， $M_w = 196.97$)：Sigma 公司產品，0.01% HAuCl_4 含緩衝劑 (0.01% tannic acid ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$)、0.04% trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、0.26 mM potassium carbonate (K_2CO_3)以及 0.02% sodium azide (NaN_3))。

20. Trifluoroacetic acid (CF_3COOH ; TFA) : Alfa Aesar 公司產品，純度 99.0% 。

21. Sodium hydroxide (NaOH) : Panreac Quimica SA 公司產品，純度 98.0~100.5% 。

22. Hydrochloric acid (HCl) : Sigma-Aldrich (Riedel-de Haën, Germany) 公司產品，純度 37% 。

23. Potassium chloride (KCl) : Panreac Quimica SA 公司產品，純度 98.0-100.5% 。

24. Sodium chloride (NaCl) : Panreac Quimica SA 公司產品，純度 99.5% 。

2.2. 儀器設備

1. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀：具備波長為 337 nm UV-light 的 N₂ 雷射，Bruker Daltonics 公司(Germany)產品，
型號：Micro Flex。
2. 螺蓋玻璃離心管：KIMBLE 公司產品，AK73785C。
3. 塑膠離心管 15 mL。
4. 冰箱：SOWA，型號：SWR-432F。
5. 超音波洗淨機：Branson (USA)公司產品，型號：2200。
6. 離心機：HSIANGTAI，型號：CN-10H。
7. 高速離心機：HITACHI，型號： CR5B。
8. 加熱攪拌器：Thermolyne (USA)公司產品，Cimarec2。
9. 酸鹼度計：Suntex 公司(台灣)產品，SP-701。
10. 天平儀：Precisa，型號：125A，可讀至 0.0001 g。
11. 超純水機： Barnstead (USA)公司產品。
12. 注射針：
 - (1) Hamiltone 公司產品，25 μL 微量注射針。
 - (2) Hamiltone 公司產品，100 μL 微量注射針。
 - (3) ITO CORPORATION 公司產品，2500 μL 微量注射針，
型號：MS*GAN250

13. Micropipette :

- (1) eppendorf : 0.1 ~ 2.5 μL .
- (2) Hamilton : 10 μL .
- (3) ViPR Ω : 100 ~ 1000 μL .
- (4) V3-SERIES : 20 ~ 200 μL , 型號 VE200 .

2.3. 實驗方法

2.3.1. 樣品溶液配製

1. 基質溶液

(a) α -CHCA 基質溶液：

秤取 10 mg 的 α -CHCA 溶於 1 mL 0.1% 的 TA 溶劑中
(0.1% 的 TA 為 50.0 % 的 acetonitrile 與 49.9 % 的 D.I. water
加 0.1 % 的 TFA 混合所組成)。

(b) SA 基質溶液：

秤取 15 mg 的 SA 溶於 1 mL 0.1% 的 TA 溶劑中。

(c) DHB 基質溶液：

秤取 20 mg 的 2,5-DHB 溶於 1 mL 0.1% 的 TA 溶劑中。

(d) 用於 seed-layer 方式時的 α -CHCA 基質溶液：

秤取 1.5 mg 的 α -CHCA 溶於 1 mL 的 acetonitrile 溶劑中。

2. 緩衝溶液

秤取 60 mg 的 NaH_2PO_4 溶於 50.0 mL 的 D.I. water，配製成
濃度為 10 mM 的緩衝溶液。

3. 分析物樣品溶液

(a) Lanatoside C：

將 Lanatoside C 溶於 acetonitrile:H₂O 為 1:1 的溶劑中，

配製成 1.0 mM 的標準品溶液，放置 4°C 中保存，以緩衝溶液進行稀釋，製備成所需濃度的分析物標準溶液。

(b) Digitoxin、Digoxin：

將 Digitoxin 和 Digoxin 分別溶於 acetonitrile:H₂O 為 2:1 的溶劑中，配製成 1.0 mM 的標準品溶液，放置 4°C 保存，以緩衝溶液進行稀釋，製備成所需濃度的分析物標準溶液。

4. 不同 pH 值溶液

用 D.I. water 配製 10 mM 的 NaHPO₄、Na₂HPO₄、Na₃PO₄ 溶液，加入 NaOH 或 HCl，在酸鹼度計下調整 pH 值，使之為 4、6、8、10、11.74 的溶液。

5. 不同重量百分比的 NaCl 溶液

用 D.I. water 配製好所需的 10 mM Na₂HPO₄ 溶液，將 pH 值調整為 8 後，分別秤 0.25 g、0.5 g、0.75 g 和 1 g 的 NaCl，溶於 25 mL 的緩衝溶液中，即為 1%、2%、3% 和 4% 的 NaCl 溶液。

2.3.2. 生化樣品的前處理與製備

實驗中所使用的生化樣品為人體的尿液，所取得的新鮮尿液均放置於密封的血清瓶當中，於 -10°C 中貯存一星期。

1. 全尿液中樣品溶液：

將 10^{-3} M 的 Lanatoside C 加入未處理過的尿液中，再以尿液稀釋至 10^{-6} M 。

2. 稀釋的尿液樣品溶液：

尿液於室溫中冷卻 2 小時後取上層尿液離心，將經過前處理的尿液與 pH 為 8 的緩衝溶液，以體積比為 1：2 的方式，配製成稀釋溶液，再以此稀釋溶液將 10^{-3} M 的 Lanatoside C 分析樣品標準溶液稀釋至 $10^{-6}\text{ M} \sim 10^{-7}\text{ M}$ 。

3. 多樣品的尿液樣品溶液：

尿液於室溫中冷卻 2 小時後取上層尿液離心，將經過前處理的尿液與 pH 為 8 的緩衝溶液，以體積比為 1：1 的方式，配製成稀釋溶液，再以此稀釋溶液將混合的分析樣品溶液(Lanatoside C、Digitoxin 和 Digoxin 均為 10^{-3} M)稀釋至 10^{-6} M 。

2.4. 分散式液液微萃取法參數

分散式液液微萃取是一個僅操作簡單且不耗時，又有低流失、高回收率及高濃縮倍率的萃取方法，此方法利用三種不同溶劑系統，使分析物 A 在水相中，透過兩相的有機溶劑與有機相的有機溶劑間進行分配，進行分析物的萃取；以下為其訊號增強係數、濃度濃縮倍率及回收率的計算定義，公式(1)~(3)。

本實驗中將所有的沉積液體積點至樣品盤上，故將 C_{sed}/C_0 定義為分析物的訊號增強係數(signal enrichment factor ; *Signal E_f*)，關係式如下：

$$Signal E_f = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad \text{-----} \quad (1)$$

C_0 ：分析物在水相中每 μL 之原始濃度

C_{sed} ：分析物於沉積液之濃度

若除去沉積液體積的影響因素，則定義為分析物的濃度濃縮倍率 (concentration enrichment factor ; *Conc. E_f*)，其計算方式可表示為：

$$Conc. E_f = \frac{(C_{sed}/V_{sed})}{C_0} \quad \text{-----} \quad (2)$$

V_{sed} ：沉積液之體積(μL)

$\frac{C_{sed}}{V_{sed}}$ ：分析物於沉積液中每 μL 之濃度

C_{sed} 的計算由濃度 $10^{-3} \text{ M} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 之 Lanatoside C 檢量線得之。

而分析物的萃取回收率 (extraction recovery ; ER) 則可經由以下公式

計算：

$$\text{ER}\% = \frac{C_{sed} \cdot V_{sed}}{C_o \cdot V_{aq}} \times 100 = \text{Conc. } E_f \times \frac{V_{sed}}{V_{aq}} \times 100 \quad \text{----- (3)}$$

V_{aq} : 樣品水溶液之體積(μL)

2.5. 質譜儀操作條件

本論文所使用的 MALDI-TOF MS 如[圖 6]所示，為桌上型的 Micro Flex 儀器，具備一波長為 337 nm 的 N₂ 脈衝式雷射，內部有直線型與反射型的飛行模式，飛行管長度分別為 1.05 m 與 1.96 m，偵測器為可偵測正電荷與負電荷功能的 Microchannel Plate Detector (MCP)。本研究使用反射型正電荷的模式下進行操作，[表 4]列出儀器重要的操作參數設定值。



圖 6：桌上型的 Micro Flex 儀器。

表 4：基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的操作參數。

操作參數	設定值	單位
Laser Frequency	20	Hz
Ion Source 1	19.00	kV
Ion Source 2	16.25	kV
Lens	9.55	kV
Reflector	20.00	kV
Pulsed Ion Extraction	100	ns
Number of shots	100	shot
Laser energy	15 - 20%	$\mu\text{J}/\text{pulse}$

參、結果與討論

3.1. 樣品與基質的製備

在探討各種最佳化的實驗條件時，都必須經由 MALDI-TOF MS 偵測而得到結果，所以首先探討質譜儀使用上的最佳化條件。選擇正確的基質對於 MALDI-TOF MS 的分析是很重要的，不同的基質對於分析物的離子化效率，有相當大的影響，包含基質與分析物的互溶性與結晶的均勻性、傳遞雷射能量給分析物的效率等，均會影響分析物離子的訊號強度，關係質譜訊號品質的高低。

3.1.1. 最適當的基質

由於傳統有機酸基質會在低分子量(小於 500 Da)的範圍，造成嚴重的背景干擾、訊號的重疊與抑制現象。根據文獻報導⁵⁶⁻⁵⁸，使用奈米膠金粒子取代傳統有機酸基質，可以使結晶情形均勻化，不易有訊號集中點(sweet spots)的情形產生，且背景訊號僅有 Au^+ 、 Au_2^+ 與 Au_3^+ 等，不會造成複雜的斷裂碎片離子，故此類基質在偵測小分子量的分析物時，可明確的偵測到低分子量的化合物。但本論文的主要分析物為強心配醣體類藥物 Lanatoside C，其分子量是 985.1 g/mol，故對於低分子量的背景干擾較不受到影響，加上儀器具有抑制低質量訊號的功能，可將小分子有機酸基質所產生的背景干擾皆消除。

本實驗條件選用奈米金膠、傳統有機酸包含 DHB、SA、 α -CHCA 作為基質，比較在相同的雷射強度下，何種基質對於分析物具有較好的游離效率，結果如[圖 7]所示，由圖中可發現在相同的雷射強度轟擊下，僅有[圖(B)]的有機酸基質 α -CHCA 有明顯的訊號產生，且有好的訊號雜訊比(signal-to-noise ratio ; S/N)，其他基質則需提高約一倍的雷射能量下，才可以偵測到分析物的訊號，因此選用 α -CHCA 當作基質進行之後的所有實驗。

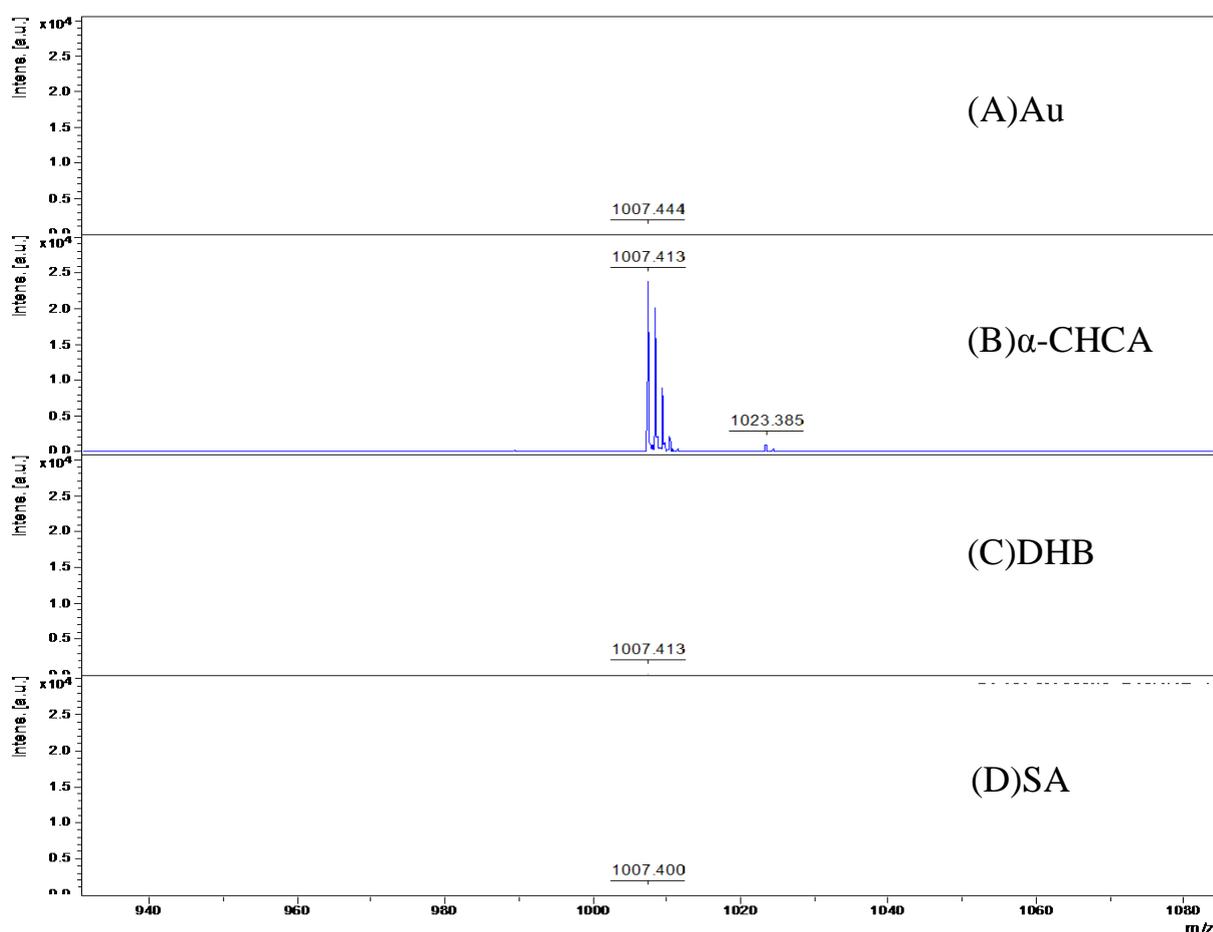


圖 7: Lanatoside C 以不同的基質(A)Au; (B) α -CHCA; (C)DHB; (D)SA 所測得的質譜圖。

選擇 α -CHCA 為適當的基質後，為了確定分析物的圖譜訊號，將添加分析物[圖 8(A)]與未添加分析物[圖 8 (B)]的質圖譜做比較，可明顯得到分析物 Lanatoside C (分子量 985.1 Da)，主要以 $[M+Na]^+$ ($m/z = 1007.1$) 與 $[M+K]^+$ ($m/z = 1023.1$) 的訊號等存在，往後的實驗條件均以 $[M+Na]^+$ 的訊號為主，做分析物的評估。

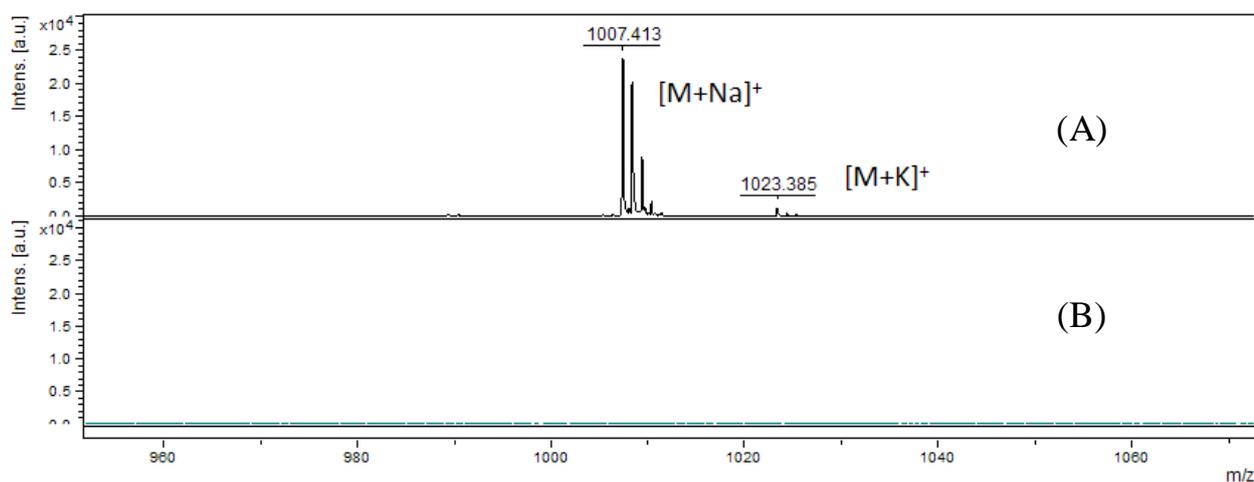


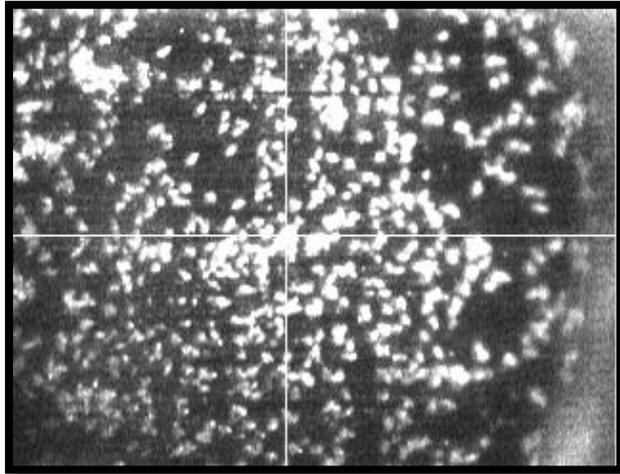
圖 8：(A)添加；(B)未添加 Lanatoside C 所測得的基質背景質譜圖。

3.1.2. 以 seed-layer 方式製備樣品

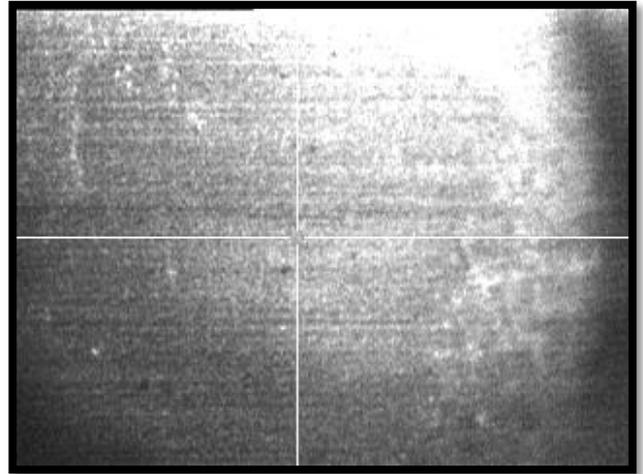
在 MALDI-TOF MS 的使用上，分析物與基質混合的結晶，易有不均勻的現象產生，會造成某些區域的分析物訊號較高，而某些區域則毫無分析物訊號。此外，雷射能量的高低也會明顯影響分析物訊號的強弱，所以操作者必須不斷的尋找能產生訊號最強的集中點(sweet spots)，才能得到較好的實驗結果，提高 shot-to-shot 的再現性。

1999 年 Patrik 發表一種能使結晶均勻化的樣品配製方式⁵⁹，稱為 seed-layer。此方法可使結晶表面均勻化、提升點對點的再現性、且可應用在各式的有機酸基質如 α -CHCA 及 SA 等。其製備方式為將 1.5 mg 的 α -CHCA 固體溶於 1 mL 的 acetonitrile 中，先取 1 μ L 點在樣品盤上，待其乾燥後形成一層種晶層，再將分析物與 10 mg/mL 的 α -CHCA 溶液以等體積比例混合後，點至種晶層上使其形成均勻的結晶。根據文獻上報導，利用此方法製作含內標的檢量線，其 RSD 值為 3%。

[圖9]為樣品與基質溶液直接混合或採用 seed-layer 配製樣品後，樣品盤上所呈現的圖像。由圖像發現[圖(A)]的結晶情形較差，並且有許多集中點的產生；而[圖(B)]的結晶情形則較均勻，因此本實驗採用 seed-layer 的方式配製樣品至 target plate 上，再進入儀器中進行偵測。



(A)



(B)

圖 9：(A)樣品與基質直接混合；(B)以 seed-layer 方式配製樣品之結晶圖像。

3.1.3. NaH₂PO₄ 緩衝溶液

分析物 Lanatoside C 經 MALDI-TOF MS 偵測後，所形成之訊號以 [M+Na]⁺ 與 [M+K]⁺ 為主，若添加適當的陽離子化劑，提供 Na⁺ 或 K⁺ 的來源，可幫助儀器靈敏度的提升。

本實驗以 10 mM 的 NaH₂PO₄ 當作緩衝溶液，希望由緩衝溶液所提供的 Na⁺ 與分析物形成 [M+Na]⁺ 的訊號，以達到提升儀器靈敏度的目的。[圖 10] 為比較去離子水[圖(B)] 與 10 mM 的 NaH₂PO₄ 緩衝溶液[圖(A)]，配製濃度為 10⁻⁴ M 的 Lanatoside C 標準溶液，所偵測到的質譜圖。在相同的樣品濃度(10⁻⁴ M)情況下，當樣品配製在 10 mM NaH₂PO₄ 的緩衝溶液時，僅形成 [M+Na]⁺ 的訊號，沒有 [M+K]⁺ 訊號形成，圖譜較簡單且分析物的訊號強度有所提升(S/N = 495.7)；當樣品溶液為去離子水時，分析物的訊號除了 [M+Na]⁺ 以外，還有 [M+K]⁺ 的訊號出現，質譜圖的訊號較複雜且強度較低(S/N = 217.4)。因此，往後的實驗皆以 10 mM 的 NaH₂PO₄ 緩衝溶液，稀釋 Lanatoside C 標準溶液。

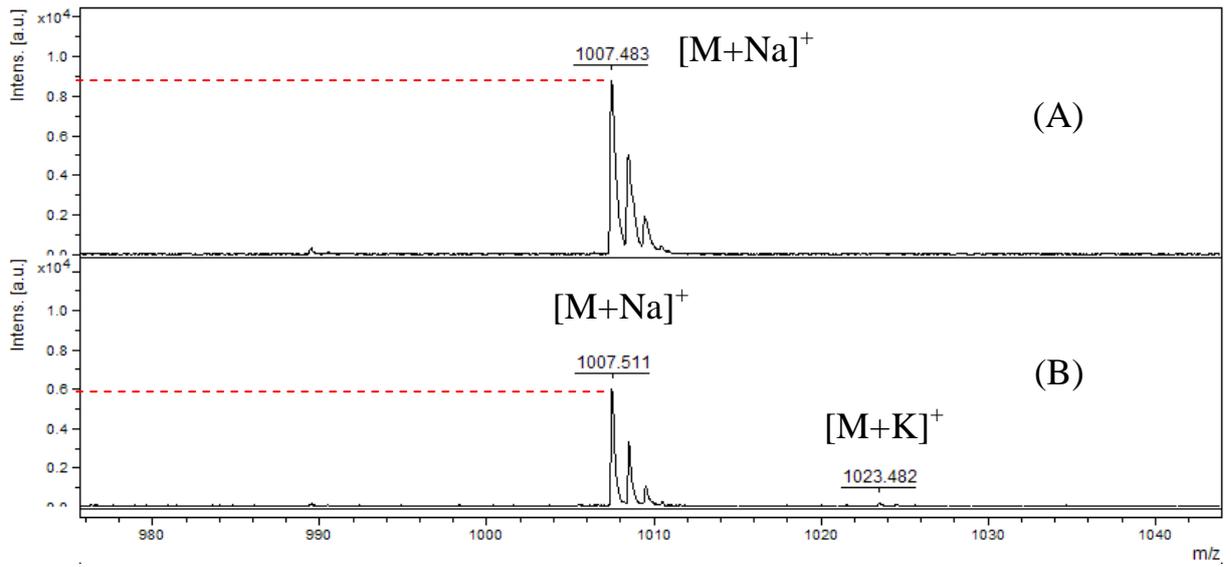


圖 10：以(A) 10 mM 的 NaH_2PO_4 緩衝溶液；(B)去離子水配製 10^{-4} M 的 Lanatoside C 標準溶液所測得的質譜圖。

3.2. 分散式液液微萃取法的最佳實驗條件

進行分散式液液微萃取時²⁷，有許多實驗條件會影響分析物萃取的效果，例如萃取劑的選擇、分散劑的選擇、萃取劑與分散劑的體積比、樣品溶液的 pH 值等，都會與濃縮倍率、回收率等實驗結果息息相關，以下將針對這些因素進行深入探討。

3.2.1. 萃取劑的選擇^{60, 61}

在 DLLME 的實驗中，萃取劑的選擇是影響萃取效率的重要因素。良好的萃取劑需具備以下條件：首先萃取劑密度必須大於分散劑與樣品水溶液，如此才能利用離心的步驟將樣品水溶液與萃取劑分離；其次，萃取劑須不易與樣品水溶液互溶，且對於分析物的溶解能力要大於分散劑，以保證得到良好的回收效率。一般含有鹵素的有機溶劑密度都較大，所以常選用鹵素溶劑當作萃取劑，例如鹵苯、氯仿、四氯化碳等。

本實驗的目標分析物 Lanatoside C，易溶於甲醇、pyridine 等有機溶劑但不溶於水，從[圖 1]可以觀察此分析物接了三個糖基，而糖基上面接有很多的 OH 官能基，使此分析物親水性提高，但此分析物結構上某部分由類固醇組成，有機性強疏水性也相對提高，即使水的極性大卻不溶於水，故推測此分析物易溶於極性大且疏水性的有機溶劑。

參考以往的文獻^{55, 62, 63}，分別以 dichloromethane(CH_2Cl_2 ；密度為 1.32 g/mL)、iodomethane(CH_3I ；密度為 2.28 g/mL)、chloroform(CHCl_3 ；密度為 1.48 g/mL)、carbon tetrachloride(CCl_4 ；密度為 1.58 g/mL)極性由大到小的四種溶劑作為萃取劑，進行 Lanatoside C 的分析。首先分別以溶解度做計算，預估所需的萃取劑體積，再以 1 mL 的 THF 為分散劑，將 5 mL 的 10^{-6} M Lanatoside C 樣品溶液，依照 DLLME 的萃取流程[圖 2]進行實驗，測試這四種溶劑對樣品萃取效果的差異性。

[圖 11]為不同的萃取劑與訊號增強係數的實驗結果，根據實驗結果，發現以 CH_2Cl_2 為萃取劑時，經由離心後並無任何沉積液的產生，完全不具濃縮分析物的效果；以 CCl_4 為萃取劑雖然有沉積液，但得到的圖譜卻無分析物的訊號，可能是因為萃取效果不佳所致；此外，以 CHCl_3 或 CH_3I 為萃取劑皆有萃取及濃縮分析物的效果，但以 CH_3I 的訊號濃縮效果較佳。

由以上的結果證實，極性較小的 CHCl_3 、 CCl_4 對分析物的溶解度不好，導致沒有好的萃取效率，而極性較高的 CH_2Cl_2 則需要更大量的萃取劑體積才会有沉積液的產生，因此本論文的研究，選擇以 CH_3I 做為 DLLME 的最佳萃取劑。

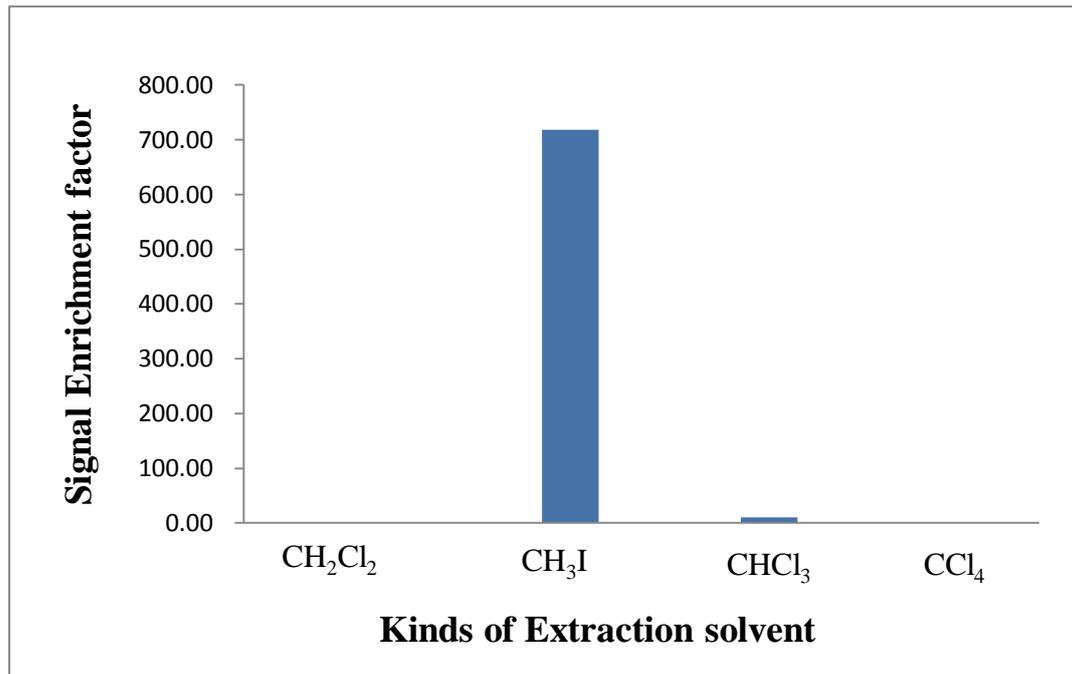


圖 11：不同的萃取劑對於訊號增強係數之影響。

實驗條件：

- 以 10 mM NaH₂PO₄ 的緩衝溶液，製備 10⁻⁶ M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑 CH₂Cl₂、CHCl₃、CCl₄ 分別取 16 μL、CH₃I 取 35 μL。
- 分散劑為 1 mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。

3.2.2. 分散劑的選擇

分散劑的選擇是影響萃取效率的另一個關鍵因素，分散劑扮演著中間橋樑的角色，不僅要在萃取劑中有良好的溶解性也必須與水溶液互溶。當包含著萃取劑的分散劑，利用注射針將其注入樣品溶液時，可以使萃取劑在水相中分散成微小的液滴，均勻的分散在水溶液中增大其與分析物的接觸面積以提高萃取效率，此時便形成水-分散劑-萃取劑的混濁相。

良好的分散劑須具備下列條件：分散劑須與萃取劑和水溶液均有好的互溶性；此外，萃取劑在分散劑的分配係數須比在樣品水溶液的分配係數大，且不干擾圖譜結果。常用的分散劑包括甲醇(methanol ; MeOH)、乙醇(ethyl alcohol ; EtOH)、丙酮(acetone)、乙腈(acetonitrile ; CAN)及四氫呋喃(tetrahydrofuran ; THF)。本實驗利用以上五種常用的分散劑，進行 DLLME 實驗，結果如[圖 12]所示，當以 THF 為分散劑時，訊號增強係數最高，而以其他四種分散劑進行實驗時，樣品溶液經離心後皆無沉積相產生，無法測得任何分析物的訊號。

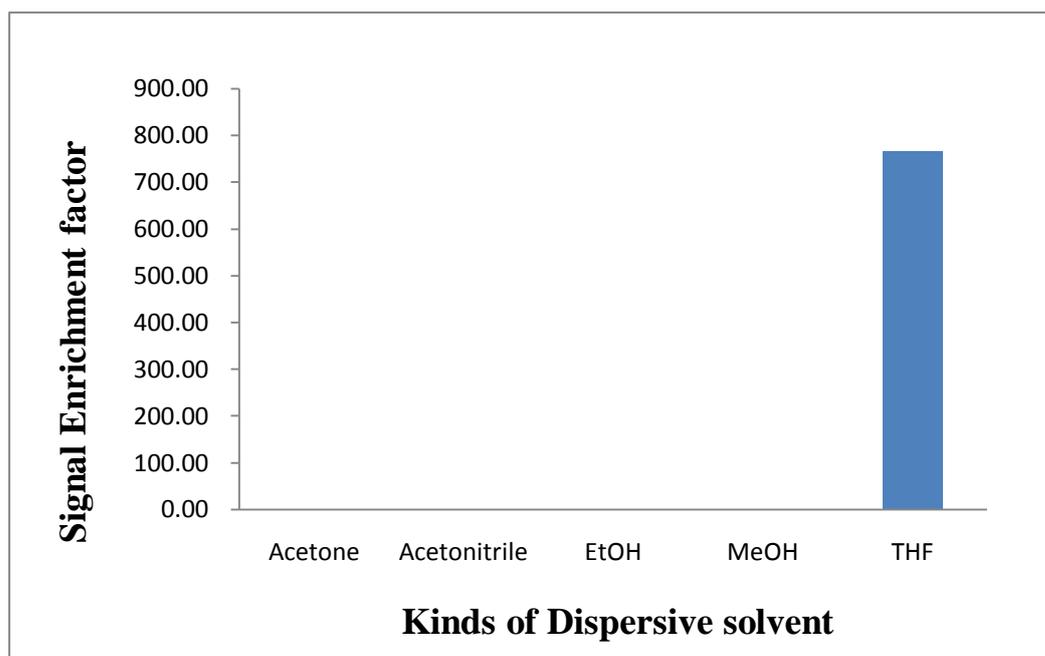


圖 12：不同的分散劑對於訊號增強係數之影響。

實驗條件：

- 以 10 mM NaH_2PO_4 的緩衝溶液，製備 10^{-6} M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35 μL 的 CH_3I 。
- 分散劑分別為 1 mL 的 Acetone、ACN、EtOH、MeOH、THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。

根據實驗結果推測，以 MeOH、EtOH、Acetone 或 ACN 當作分散劑時，因其親水性質較強，使得萃取劑對於樣品水溶液的互溶性大大提高而無法產生沉澱液；然而以 THF 作為分散劑，因為 THF 的親水性較以上四種溶劑弱，所以樣品溶液經離心後，萃取劑會因比重大與疏水性質較接近 THF 而產生沉澱液，可以成功地將分析物由大體積(5 mL)的水相溶液，萃取並濃縮至小體積(35 μ L)的有機相 CH_2I_2 萃取溶劑中。

3.2.3. 萃取劑的體積

經由實驗確定最適合的萃取劑與分散劑分別為 CH_3I 與 THF 後，接著對萃取劑的使用量進行探討。將分散劑 THF 的使用量固定為 1 mL，而萃取劑的使用量分別設定為 30 μL 、35 μL 、40 μL 、50 μL 、60 μL 以及 70 μL ，每次實驗皆在相同的分散劑與時間條件下進行。實驗結果由[圖 13]顯示，當萃取劑達到一定的量(35 μL 以上)時，所萃取到的分析物，其訊號增強係數達到最大值，但隨著萃取劑體積增加，離心後所得到的沉積液體積也隨之增加[圖 14]，甚至超越了所加入的萃取劑體積，推測其原因可能是在萃取的過程中，萃取劑夾帶一些分散劑，導致沉積液的體積大於萃取劑的體積；若萃取劑太少時，不僅無法達到好的萃取效果，沉積液的體積也相對的減少，容易造成實驗上的困擾，不易以微量注射針(micro-syringe)抽取沉積液，不利於進行分析物的偵測。由以上的實驗結果發現以萃取劑的體積為 35 μL 時，所獲得的分析物萃取效果最佳且能滿足離心後樣品的質譜測定所需的體積。

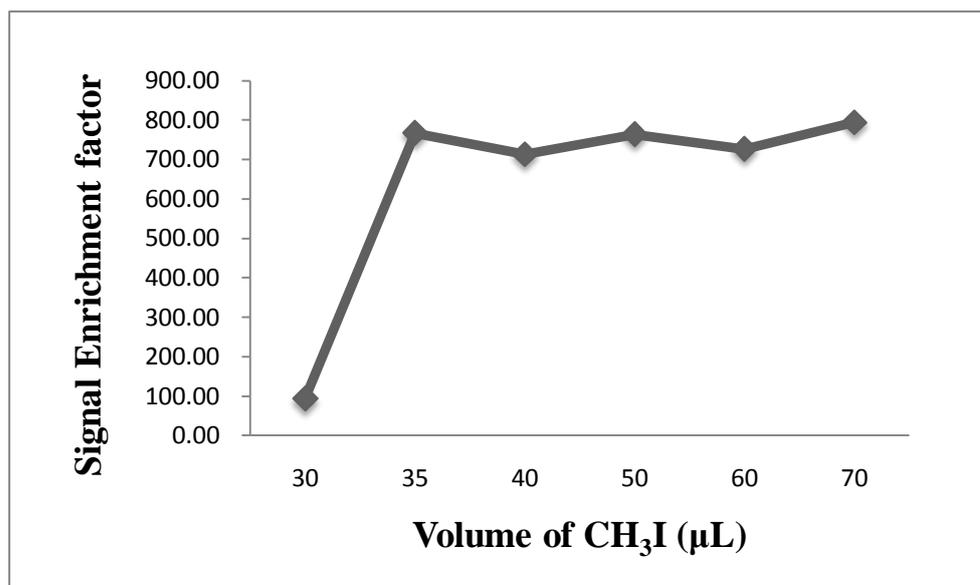


圖 13：萃取劑體積對於訊號增強係數的影響。

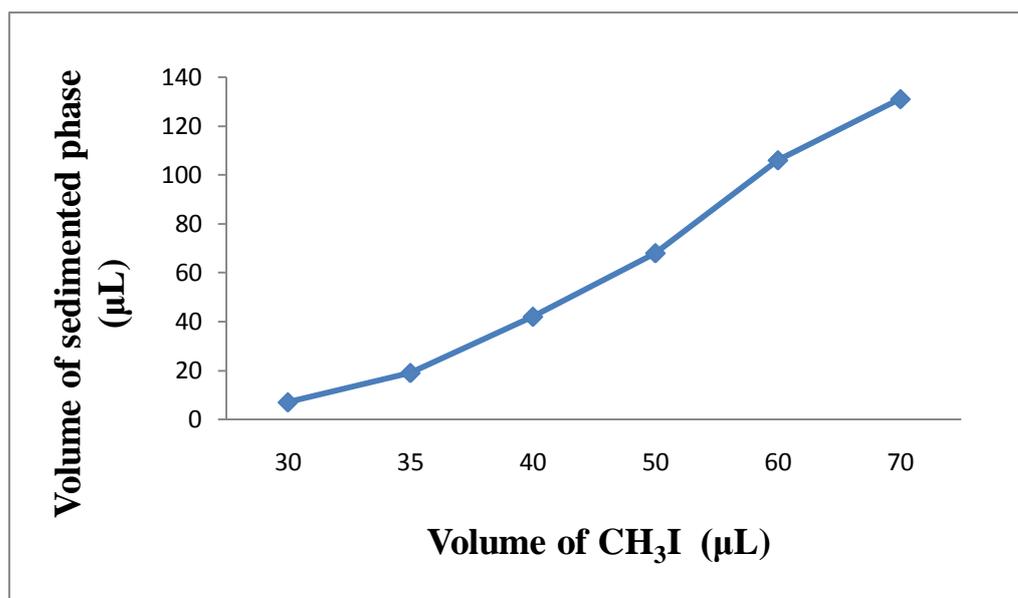


圖 14：萃取劑使用量與沉積液體積的關係圖。

實驗條件：

- 以 10 mM NaH₂PO₄ 的緩衝溶液，製備 10⁻⁶ M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑分別為 30 μL、35 μL、40 μL、50 μL、60 μL 以及 70 μL 的 CH₃I。
- 分散劑為 1mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。
- 重複測量 5 次 (n = 5)、相對標準偏差 (RSD) 0.3 ~ 8.0%。

3.2.4. 分散劑的體積

分散劑體積會直接影響水-分散劑-萃取劑的混濁相之形成，因分散劑扮演著中間橋樑的角色，會影響萃取劑在水中的分散程度，進而影響萃取效率。因此，在本實驗中，將探討不同體積的分散劑 THF 使用量對分析物的萃取效果之影響。以最佳的萃取劑 CH_3I 的使用量 ($35 \mu\text{L}$)，分別針對不同體積的 THF 0.50 mL 、 0.75 mL 、 1.00 mL 、 1.25 mL 及 1.50 mL ，在相同的萃取時間條件下進行分析物的 DLLME 實驗，所獲得的結果如[圖15]所示。

由[圖15]發現當分散劑的使用量過少(小於 1 mL)時，雖然對離心後所形成的沉積液總體積沒有太大的影響(如[圖16]所示，THF 的體積為 0.50 mL 、 0.75 mL 或 1.00 mL 時，沉積液的體積均介於 $20 \sim 25 \mu\text{L}$ 之間)，但實驗上所產生的混濁相，無法在樣品溶液中均勻的分散，使得萃取效率降低且樣品的回收率不佳(如[圖17]所示，THF 的體積為 0.50 mL 或 0.75 mL 時，回收率均明顯的下降)。反之，當分散劑過多(大於 1.00 mL)時，會間接的提高萃取劑與水溶液的互溶性，使得沉積液的總體積減少，萃取所獲得的分析物總含量降低，訊號增強係數因而下降。根據以上的結果顯示，當分散劑的使用量為 1.00 mL 時，分析物的萃取效果[圖15]以及回收率[圖17]均達最佳狀態，故將以 1.00 mL 的分散劑使用量進行往後的實驗。

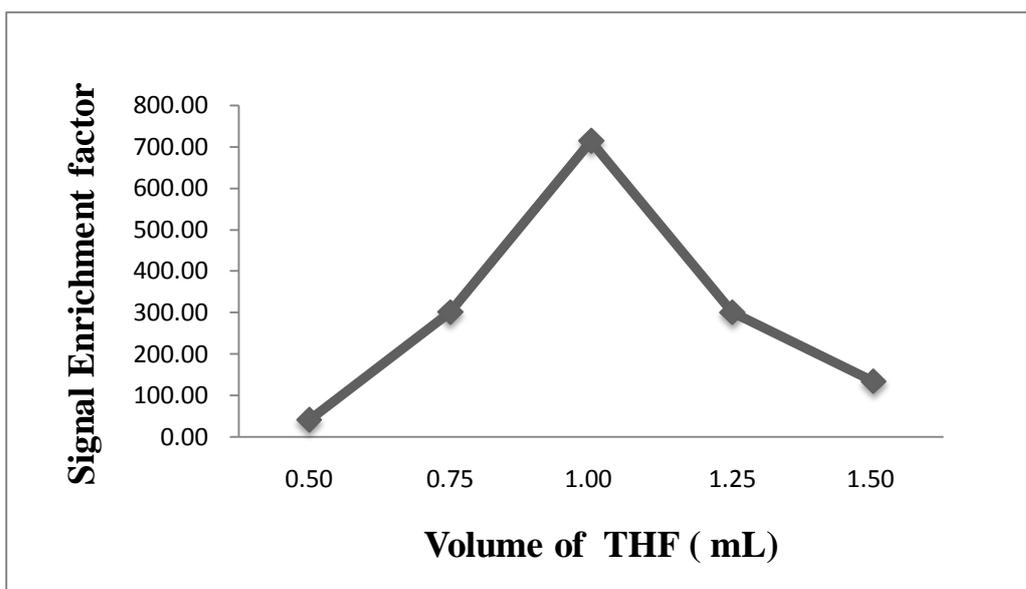


圖 15：分散劑體積對於訊號增強係數之影響。

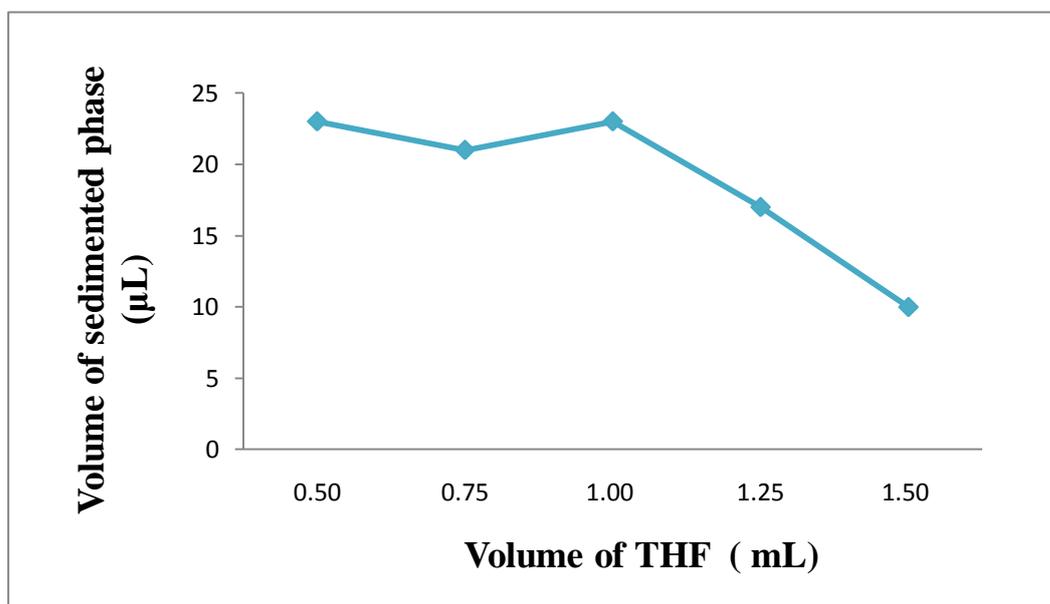


圖 16：分散劑使用量對於沉積液體積之影響。

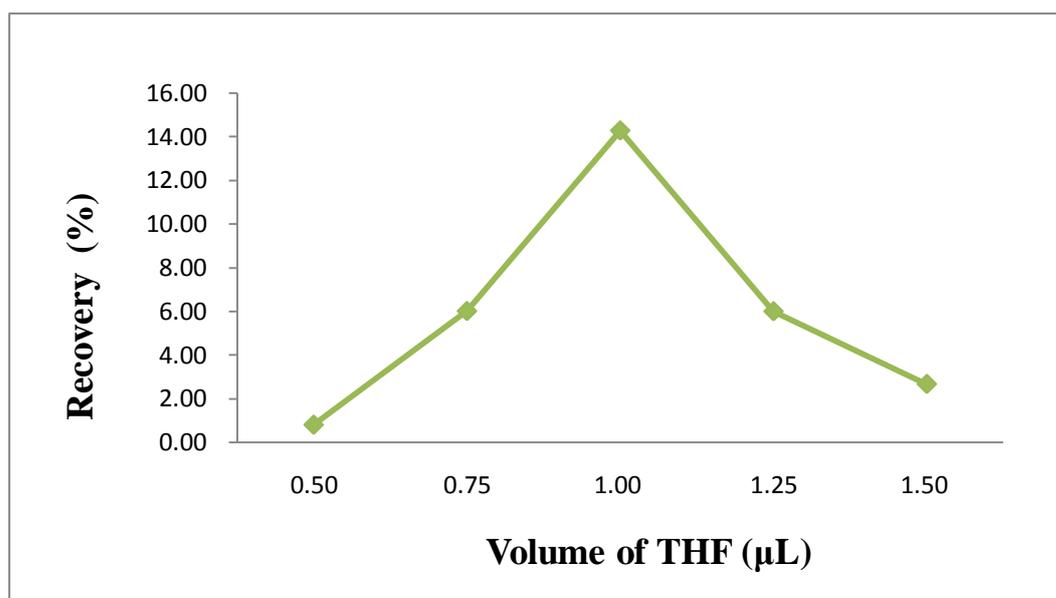


圖 17：分散劑體積對於樣品回收率之影響。

實驗條件：

- 以 10 mM NaH_2PO_4 的緩衝溶液，製備 10^{-6} M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35 μL 的 CH_3I 。
- 分散劑分別為 0.50 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.25 mL、1.50 mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。
- 重複測量 5 次 ($n = 5$)、相對標準偏差 (RSD) 2.4 ~ 7.0%。

3.2.5. 溶液的 pH 值

調整樣品溶液的 pH 值，主要是為了避免分析物在過酸或過鹼的溶液中解離，盡量使分析物以中性的形式存在，才能有效地進行 DLLME 實驗。將實驗條件的 pH 值分別設置介於 4 到 12 之間，利用 NaOH 與 HCl 溶液，將樣品溶液分別調整至實驗所設定的 pH 值(介於 4 到 12 之間)，然後進行分析物的萃取實驗，再經由 MALDI-TOF MS 偵測所萃取出分析物之質譜圖及定量數據，進一步獲得樣品溶液的 pH 值對於訊號增強係數[圖 18]與樣品回收率[圖 19]的影響之關係圖。

由[圖 18]及[圖 19]的結果發現，當樣品溶液過酸(pH 值為 4)或過鹼(pH 值為 10 或 11.74)時，不僅濃縮效果不好且回收率也不佳，而樣品溶液接近中性(pH 值為 6 或 8)時，濃縮效果與回收率為最佳。分析物在偏酸的环境下⁷，可能會被質子化形成正離子或水解；在偏鹼的环境下，可能解離出質子形成負離子或內酯環切開的現象發生，使得分析物在有機相萃取劑的溶解度降低，造成訊號偏低的情況；然而，在中性溶液的环境下，分析物較不易解離，所形成的 $[M+Na]^+$ 訊號較強；另外，沒有解離的中性分析物也較容易溶於有機相的萃取溶劑中，有助於萃取效率的提升，故在本論文中選擇以 pH 值為 8 作為最佳的實驗條件。

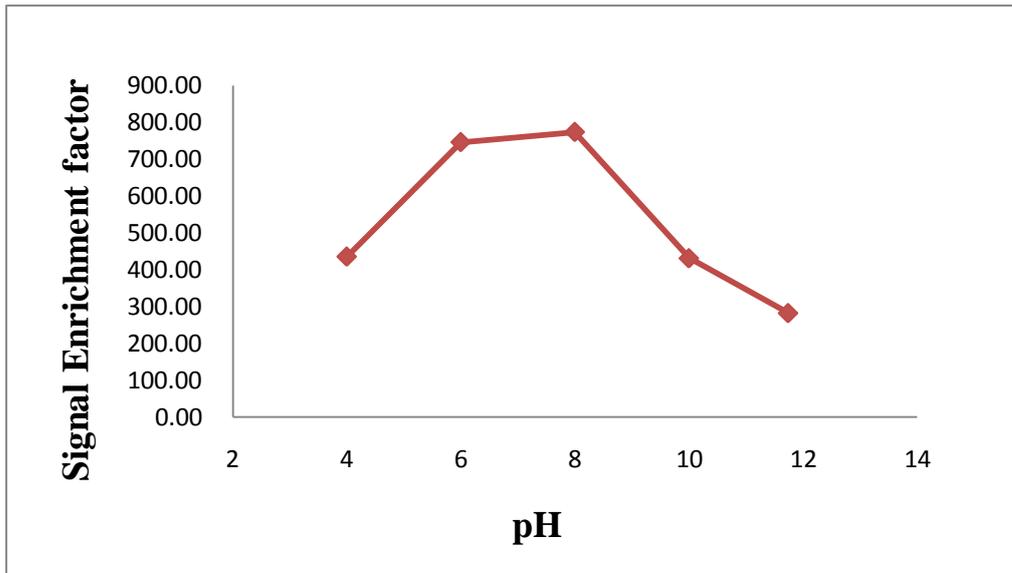


圖 18：樣品溶液的 pH 值對於訊號增強係數之影響。

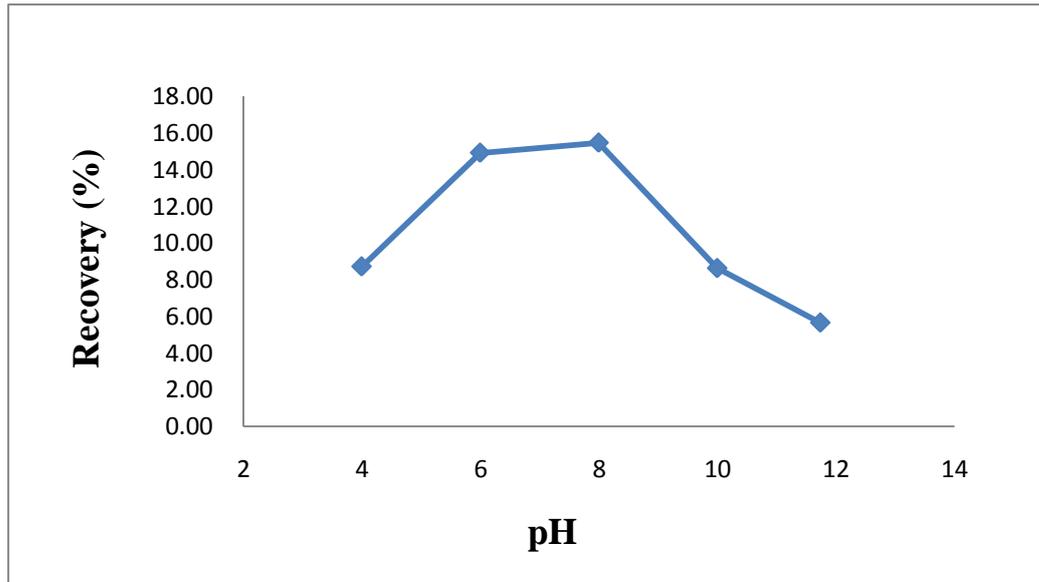


圖 19：樣品溶液的 pH 值對於樣品回收率之影響。

實驗條件：

- 分別以 10 mM 的 NaH_2PO_4 配製 pH = 4 和 6、 Na_2HPO_4 配製 pH = 8 和 10、 Na_3PO_4 配製 pH = 11.74 的緩衝溶液，再將其分別製備成 10^{-6} M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35 μL 的 CH_3I 。
- 分散劑為 1.00 mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。
- 重複測量 5 次 ($n = 5$)、相對標準偏差 (RSD) 1.3 ~ 2.5 %。

3.2.6. 萃取時間

DLLME 技術是一種利用分散劑與萃取劑混合後，快速將其注入置有樣品溶液的離心管中，使分析物在水相與有機相之間進行分配的平衡反應，當反應達成平衡時，同時達到萃取與濃縮分析物的目的。萃取的效率會因分析物的性質、分析物在水相與有機相的溶解度等因素而影響。

在 DLLME 中，樣品溶液注入分散劑與萃取劑後，直到進行離心前的這段時間稱為萃取時間⁶⁴，在任何萃取過程中，萃取時間均為影響萃取效率的一項重要因素。為了觀察萃取時間對萃取效率的影響，分別將萃取時間設置為 0、2、4、6、8 與 10 分鐘進行實驗，結果發現當分散劑與萃取劑注入後，在萃取時間接近 0 分鐘時(萃取後立即進行離心)，即可達到良好的分析物濃縮倍率(concentration enrichment factor)，如[圖 20]所呈現的數據。當萃取時間增長時，對萃取效率並無顯著的影響，這是由於在形成水-分散劑-萃取劑的混濁液時，分散劑可以幫助萃取劑在短時間內均勻的分佈在樣品水溶液中，此時分析物可以迅速由水相轉移到有機相，並達到兩相平衡，此一現象亦為 DLLME 技術的優點之一。

雖然萃取劑藉由分散劑均勻的分散在樣品水溶液中，在短時間內可達到良好的萃取效果，但由[圖 21]萃取時間對於沉積液體積的影響，

所獲得的實驗數據呈現，當萃取時間越長時得到的沉積液體積卻逐漸減少；另外，由[圖 22]萃取時間與樣品回收率的關係圖發現，在萃取時間接近 0 分鐘時，可以得到最好的樣品回收率，但萃取時間增長(2 ~ 10 分鐘)時，樣品回收率只有持平的現象。造成此結果的因素可能為，當萃取時間增加時，溶液間達到完全平衡，微量的萃取劑會經由分散劑而互溶於水溶液中，導致沉積液的體積逐漸減少；相對的，當萃取時間接近 0 分鐘時，部份的萃取劑尚未完全透過分散劑提升與水的互溶性時，就以離心機進行分離使得有機相與水相快速分離，故得到較多的萃取劑沉積液，如[圖 21]所示。而短時間內萃取劑可藉由分散劑均勻的分散在樣品水溶液，當萃取時間越短(如接近 0 分鐘)時，分析物被萃取至萃取劑中，已達到相當的濃縮倍率，若萃取劑的沉積液體積增加(萃取時間接近 0 分鐘)時，則所得到的質譜儀訊號增強係數也因而提升，如[圖 23]所示。

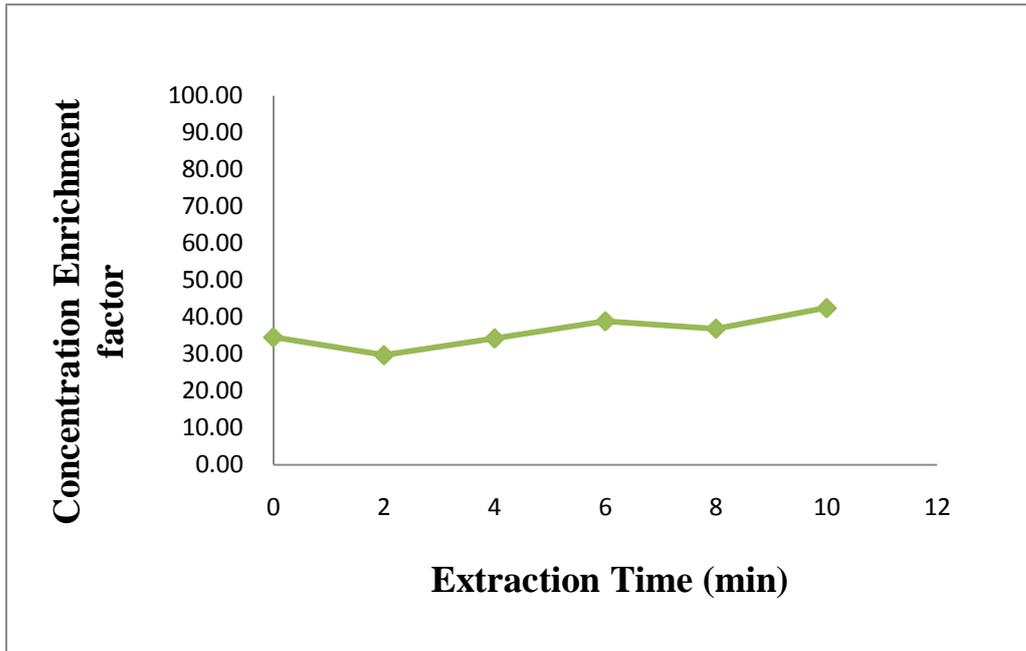


圖 20：萃取時間對於濃縮倍率之影響。

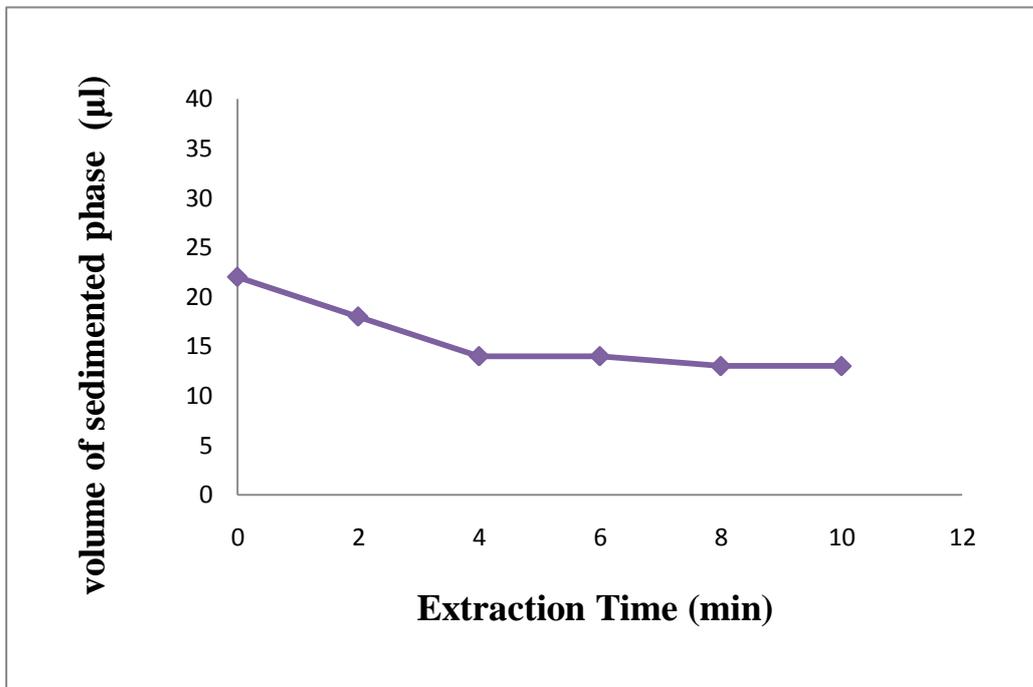


圖 21：萃取時間對於沉積液體積之影響。

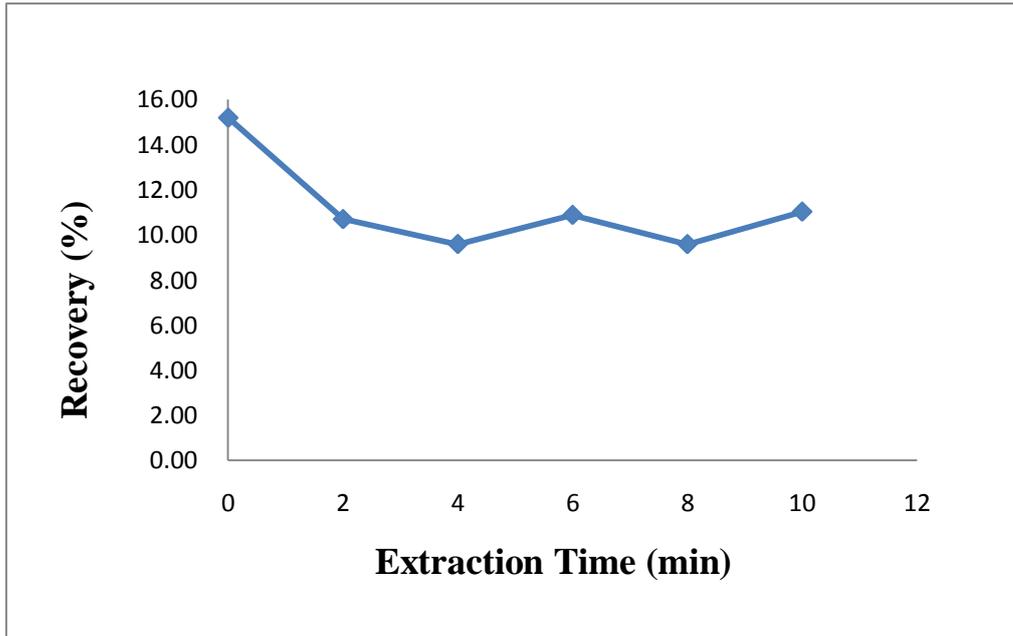


圖 22：萃取時間對於樣品回收率之影響。

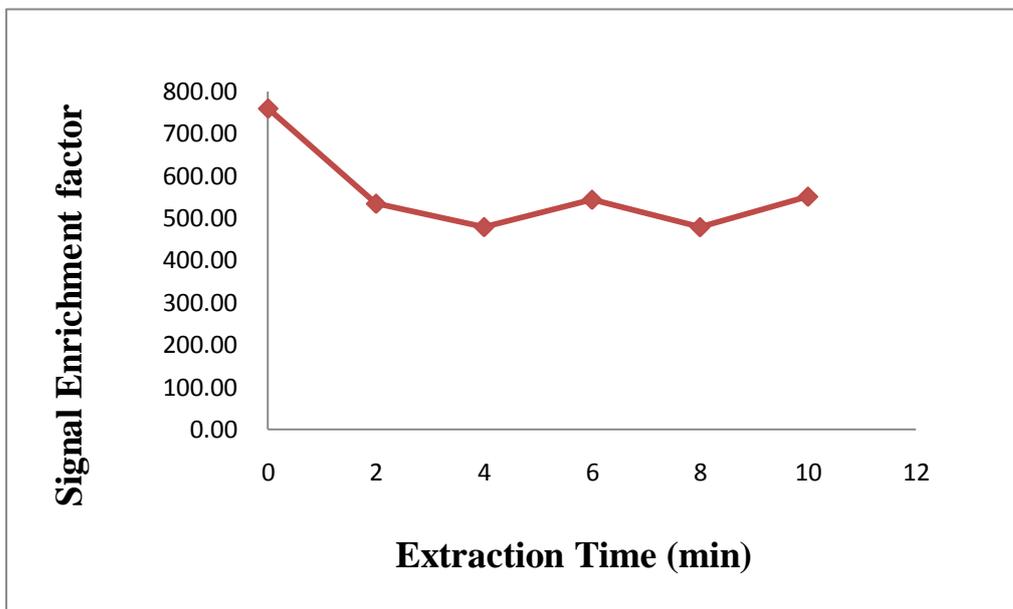


圖 23：萃取時間對於訊號增強係數之影響。

實驗條件：

- 以 pH = 8 的 10 mM Na₂HPO₄ 緩衝溶液，製備成 10⁻⁶ M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35 μL 的 CH₃I。
- 分散劑為 1.00 mL 的 THF。
- 將萃取時間設置成 0 ~ 10 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 5 分鐘。
- 重複測量 5 次 (n = 5)、相對標準偏差 (RSD) 2.0 ~ 7.1 %。

3.2.7. 離心時間

離心時間在 DLLME 技術中，扮演著將萃取劑與樣品溶液分開的角色⁶⁵。若離心時間太短時，可能無法將全部的沉積液離心下來，為了探討離心時間對於分析物萃取效果的影響，分別將離心時間設為 3、5、8、10、12 及 16 分鐘，在 3000 r.p.m 的轉速下做離心。從[圖 24]的實驗數據得知，在離心時間為 3 分鐘時，沉積液體積為 20 μ L，離心時間超過 3 分鐘後，沉積液的體積提升 23 μ L 25 μ L 之間，離心時間再增長沉積液的體積並無明顯的增加。

[圖 25]為離心時間對於樣品回收率的影響，在離心時間為 10 分鐘後，樣品回收率無明顯的增加，表示此段時間足夠將沉積液完全離心。因此以離心時間為 10 分鐘作為此實驗的最佳條件。

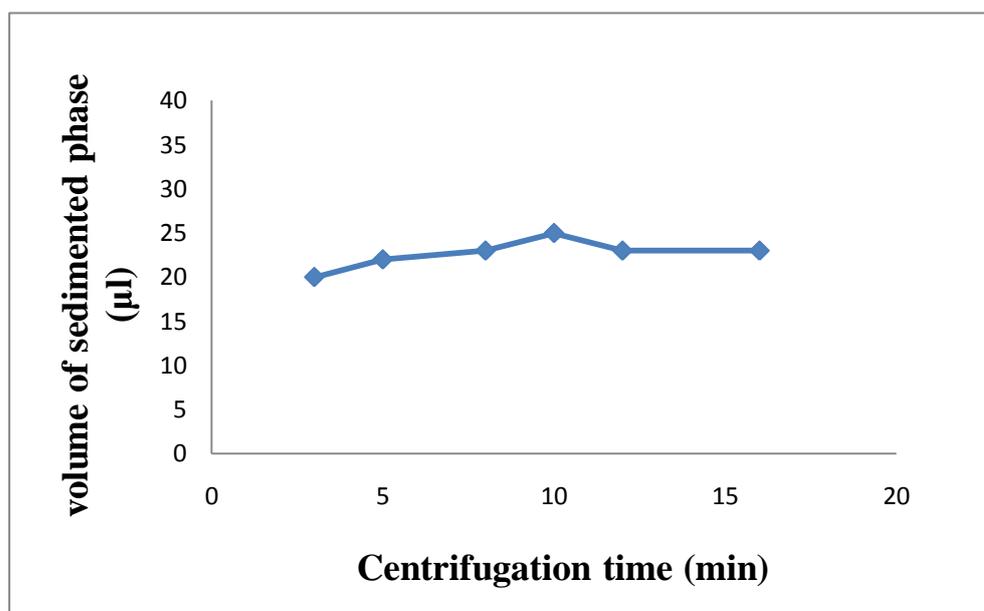


圖 24：離心時間對於沉積液體積之影響。

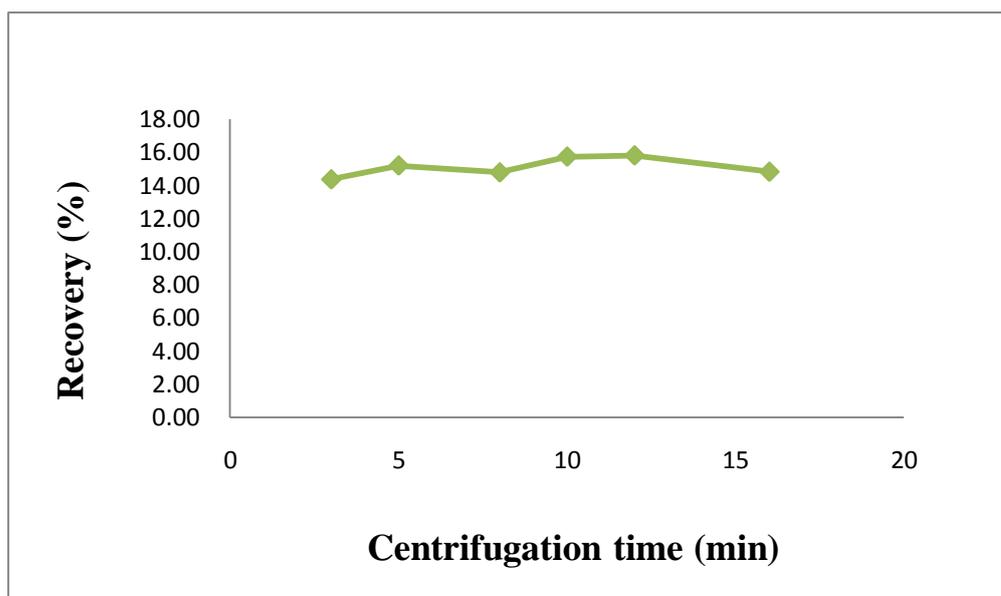


圖 25：離心時間對於樣品回收率之影響。

實驗條件：

- 以 pH = 8 的 10 mM Na₂HPO₄ 緩衝溶液，製備成 10⁻⁶M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35 μL 的 CH₃I。
- 分散劑為 1.00 mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心，離心時間分別為 3、5、8、10、12 及 16 分鐘。
- 重複測量 5 次 (n = 5)、相對標準偏差 (RSD) 0.5 ~ 5.3 %。

3.2.8. 鹽類的添加

鹽析效應在固相微萃取與液液微萃取中為一重要的影響參數，利用添加適量的鹽類增加其離子強度，以降低分析物在水相中的溶解度，使待測物不易溶於水溶液，能相對提升其分配作用以提高萃取效率⁶⁶。但實際上根據分析物本身的特性，添加鹽類對萃取效率可能會有不同程度的影響⁶²。我們分別添加了不同重量百分比的 NaCl (0 ~ 4% (w/v)) 以進行鹽析效應對於萃取效率的影響之實驗，實驗結果顯示隨著 NaCl 濃度的增加，沉積液的體積也跟著增加，但對於訊號增強係數並無明顯的提升，如[圖 26]所示。

在樣品溶液中添加鹽類⁶⁷，會使溶液的離子強度增加，造成有機相與水相的互溶性降低，導致沉積液的體積增加；另外，本實驗的分析物具有疏水性質，使得分析物原本在水相中的溶解度並不高，對於添加鹽類後，更無明顯的影響；綜合以上的推論，隨著鹽類添加比例的提升，沉積液的體積會增加，但萃取劑對於分析物的濃縮倍率卻下降，導致訊號增強係數並無明顯的提升[圖 26]。

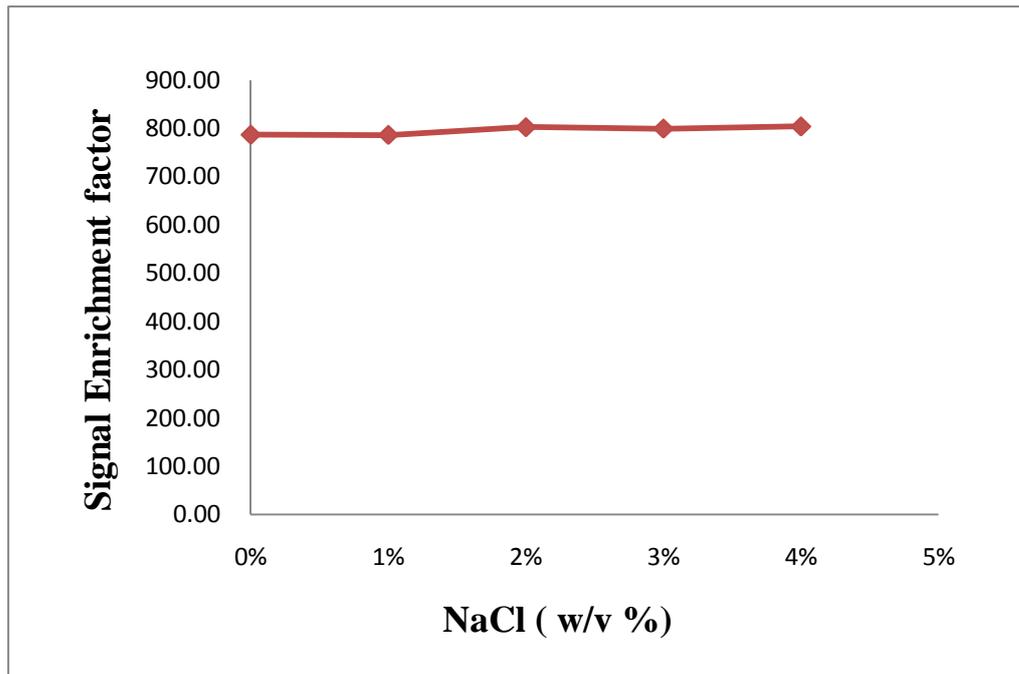


圖 26：NaCl 的添加量對於訊號增強係數之影響。

實驗條件：

- 以 pH = 8 的 10 mM Na₂HPO₄ 緩衝溶液，分別添加 0%、1%、2%、3% 和 4% 的 NaCl，製備成 10⁻⁶ M 的 Lanatoside C 樣品溶液，取樣品溶液 5 mL。
- 萃取劑為 35μL 的 CH₃I。
- 分散劑為 1.00 mL 的 THF。
- 萃取時間為接近 0 分鐘。
- 在室溫下設定轉速為 3000 r.p.m 離心 10 分鐘。
- 重複測量 5 次 (n = 5)、相對標準偏差 (RSD) 0.1 ~ 1.0 %。

3.2.9. 最佳的實驗條件

綜合前面各項實驗所得到的 DLLME 的最佳實驗條件結果，列於 [表 5] 之中，以這些最佳的實驗條件，分析含有 Lanatoside C 的樣品溶液，如 [圖 27] 所示。樣品溶液經由 DLLME 萃取之後，分析物所形成的 $[M+Na]^+$ 訊號強度由 171 [圖 27(A)] 大大提升至 23000 [圖 27(B)]，質譜儀的偵測訊號增強係數，可達 130 倍以上，證明本論文所提出的分析方法，對於分析物 Lanatoside C 具有極佳的萃取與濃縮效果。此外，將 10^{-6} M 的 Lanatoside C 標準溶液濃度稀釋 100 倍後，再以 DLLME 進行分析物的萃取實驗，結果顯示經過稀釋的樣品溶液仍有一定程度的萃取效果，分析物的訊號強度 [圖 27(C)] 明顯高於沒有經過 DLLME 實驗的結果 [圖 27(A)]。

表 5：分散式液液微萃取法的最佳實驗條件。

DLLME 的實驗變數	最佳結果之條件
萃取劑	CH ₃ I
分散劑	THF
萃取劑的體積	35 μL
分散劑的體積	1.00 mL
pH 值	8
萃取時間	0 min
離心時間	10 min
鹽類的添加濃度	0 %

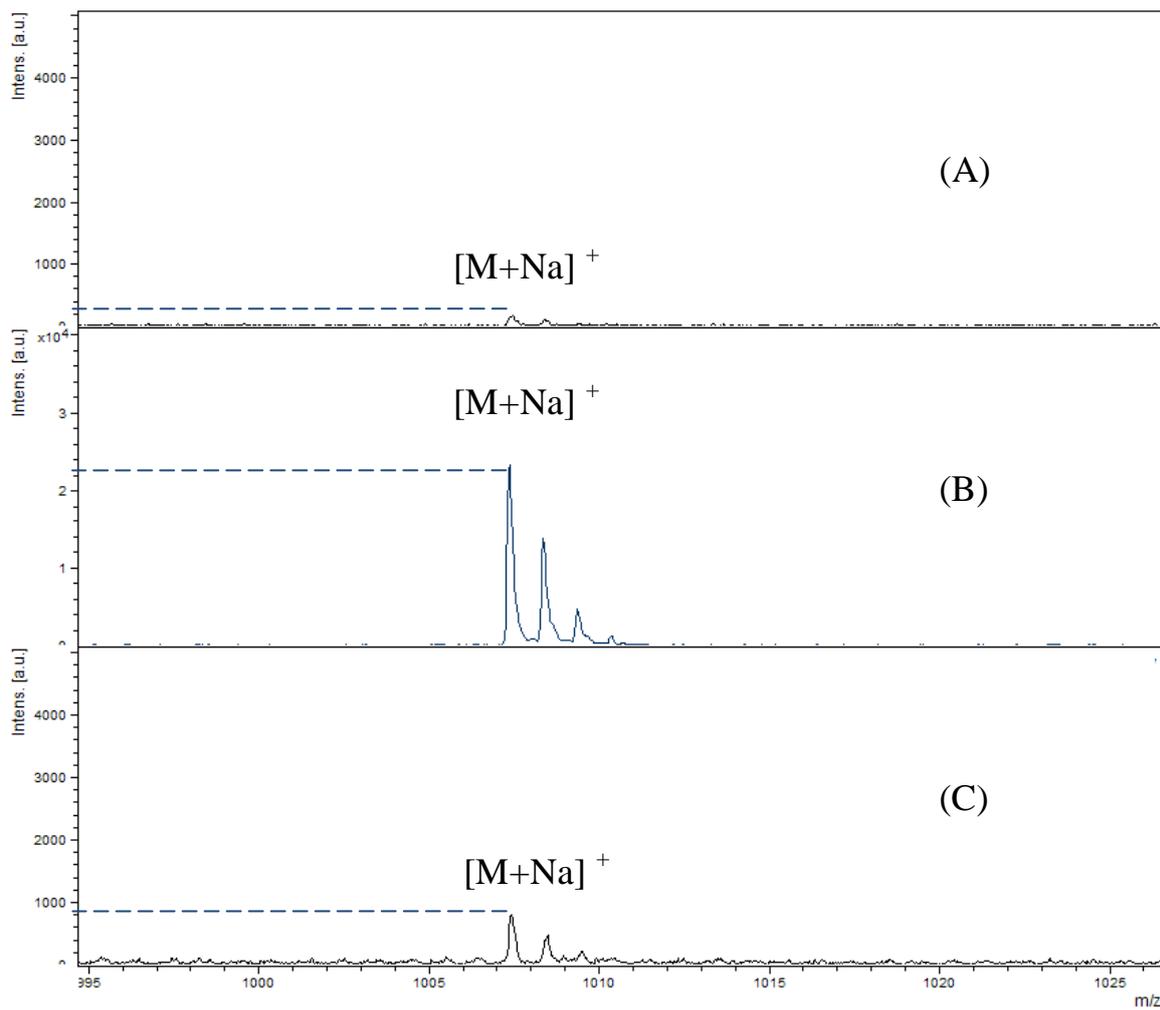


圖 27： 10^{-6} M 的 Lanatoside C 標準溶液(A)沒有經過；(B)經過；(C)稀釋 100 倍再經過 DLLME 萃取分析物所測得的質譜圖。

3.3. 標準溶液的檢量線與偵測極限

分析物檢量線的製作是將濃度分別為 0.01 μM 、0.05 μM 、0.1 μM 、0.5 μM 及 1.0 μM 的 Lanatoside C 標準溶液，以最佳的 DLLME 實驗條件，進行分析物的萃取與預濃縮，再結合 MALDI-TOF 質譜儀鑑定分析，每一個標準溶液均做 5 次的重複測量，所獲得的實驗數據，如 [圖 28] 所示。由圖中可知，分析物的濃度與質譜偵測的訊號強度，具有良好的線性關係，相關係數 (correlation coefficient, R^2) 值為 0.9911。

分析物偵測極限 (limit of detection; LOD) 的測量，則以訊號雜訊比為 3 時，所對應的濃度定義之。由實驗結果得知，本論文所提出的分析方法，對於毛地黃毒苷化合物的偵測極限為 1.06 nM (約等於 1.04 ng/mL)；偵測定量極限 (limit of quantitation; LOQ) 為 3.5 nM (約等於 3.47 ng/mL)。

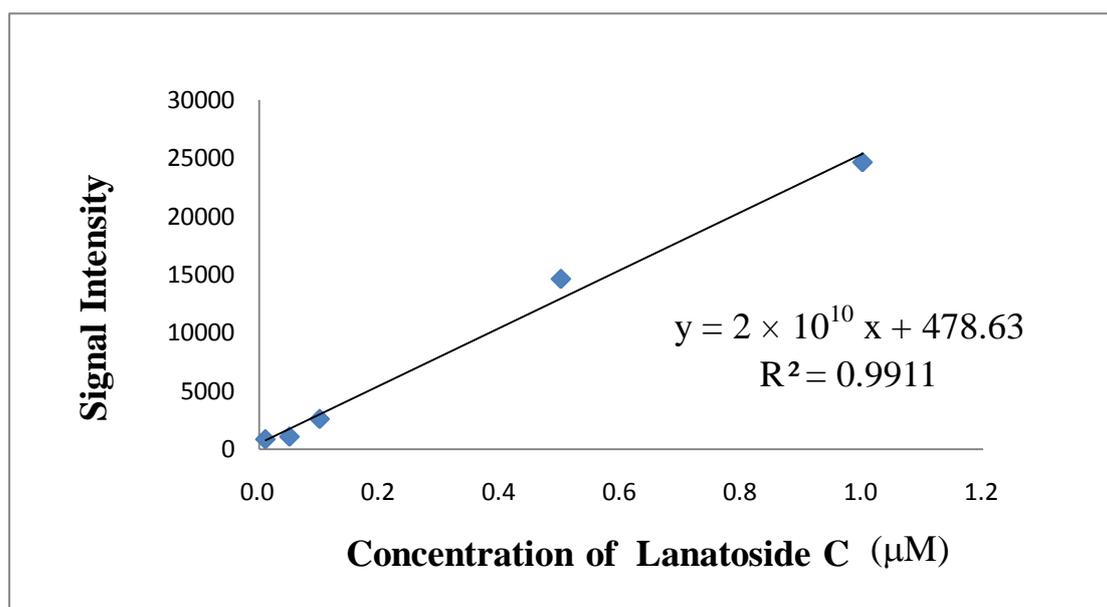


圖 28：Lanatoside C 標準溶液的檢量線。



3.4. 生化樣品的檢測

為評估此分析方法應用於真實的生化樣品檢測之適用性，實驗採用將 Lanatoside C 標準溶液添加(spike)於人體尿液中，配製成樣品溶液後再進行分析，實驗所使用之尿液樣品皆取自於同一人。

尿液中除水分以外尚有無機鹽、尿素、尿酸等體內的代謝物質，具有複雜的基質成份，因此在微量分析的應用上，必須先進行樣品溶液的前處理步驟，以降低這些基質對於分析物訊號的干擾。在過去的文獻中^{55, 68}，有關於去除尿液中蛋白質及鹽類基質干擾的方法，以有機溶劑去除蛋白質最有效率，亦有利用去離子水稀釋尿液，以降低基質干擾的簡易方式。

3.4.1. 沒有經過前處理的尿液樣品

本實驗先嘗試在沒有經過任何前處理的尿液樣品中，直接添加 10^{-6} M 的 Lanatoside C 標準溶液再進行 DLLME 的實驗，以觀察經過簡易的萃取步驟後，在複雜的尿液基質環境中，是否可以直接偵測到分析物的訊號。實驗結果發現[圖 29]，在沒有經過任何樣品前處理的尿液中，樣品溶液經過 DLLME 萃取後，質譜儀可偵測到微弱的分析物訊號($[M+Na]^+$ 、 $m/z = 1007.56$)，且此在訊號範圍內無任何尿液基質所產生的訊號重疊干擾現象，證明本論文所提出的分析方法，具有極高的萃取效率，在沒有經過任何樣品前處理的步驟，成功地從具有

複雜基質成份的尿液中，萃取出分析物並進行鑑定分析。

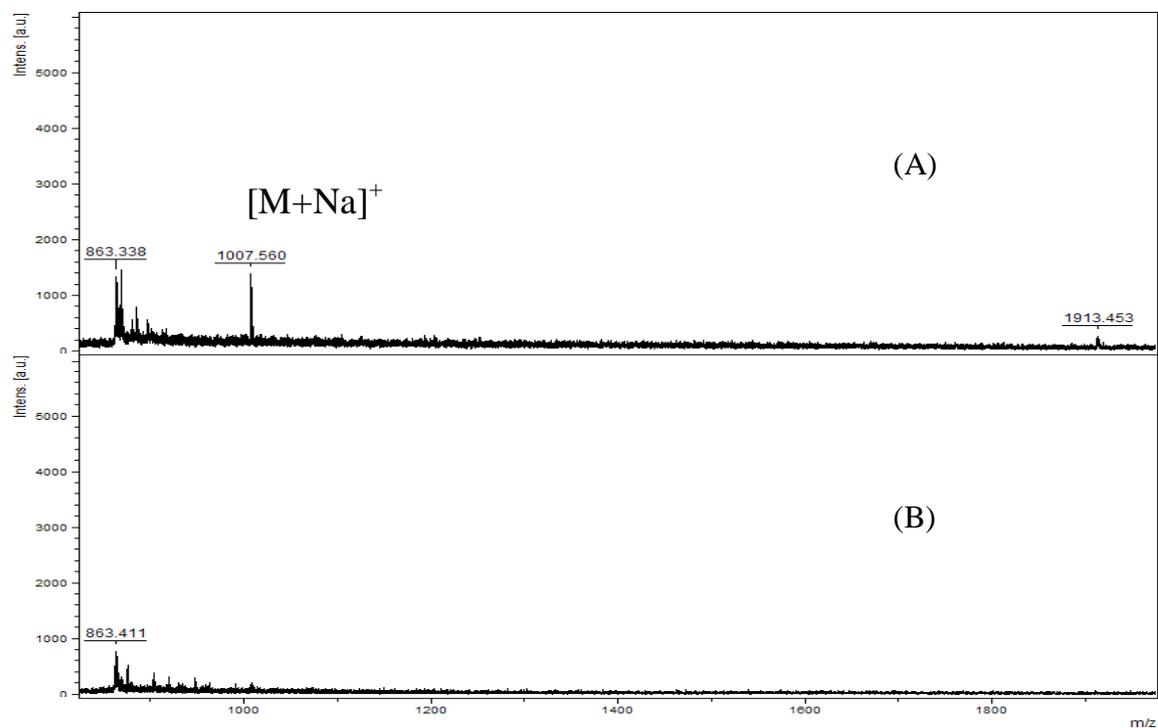


圖 29：(A)添加；(B)沒有添加 10^{-6} M 的 Lanatoside C 標準溶液於未經任何前處理的尿液樣品溶液，所測得的質譜圖。

3.4.2. 經過去離子水稀釋的尿液樣品

利用簡易的濃度稀釋方法，以 1 倍或 2 倍體積的去離子水稀釋尿液樣品溶液，降低尿液中的基質干擾後，再添加 10^{-6} M 的 Lanatoside C 標準溶液進行 DLLME 的實驗，所測得的質譜圖如[圖 30]所示。由圖中發現，樣品溶液經過去離子水稀釋後(圖(A)及圖(B))，尿液基質所產生的干擾訊號明顯降低了許多，但是當體積的稀釋大於 2 倍以上時，則失去在具有複雜基質的真實尿液樣品環境下，偵測分析物的目的，所以採用 2 倍體積的去離子水稀釋尿液樣品溶液，作為最佳的實驗條件。

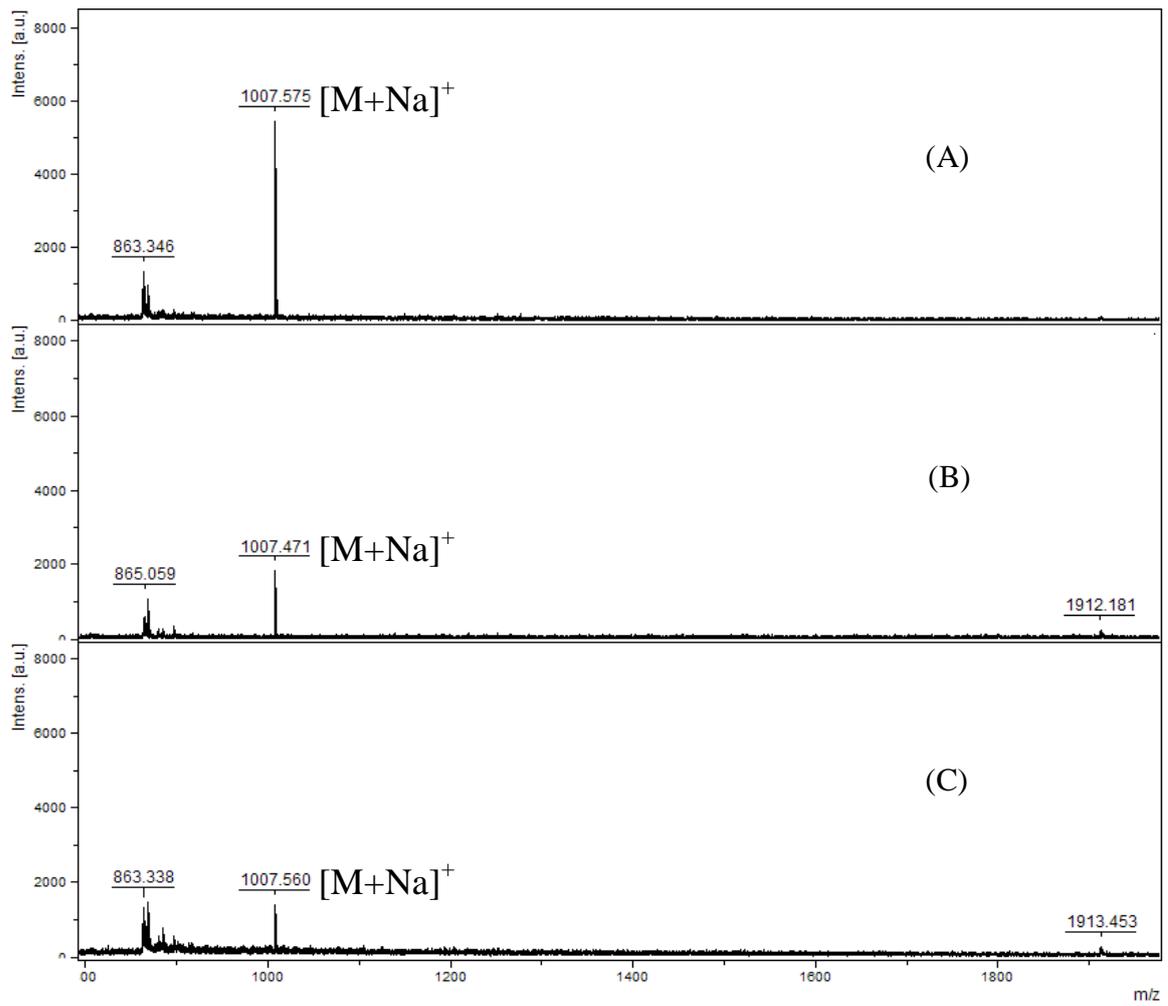


圖 30：以(A) 2 倍；(B)1 倍；(C)0 倍體積的去離子水，稀釋尿液樣品溶液經過 DLLME 後所測得的質譜圖。

3.4.3. 經過冷凍沉澱法處理的尿液樣品⁶⁹

為了更進一步降低尿液的基質背景干擾因素，本實驗再選擇以冷凍沉澱法進行樣品的前處理，將取得的尿液放置在 -10°C 的冰箱中至少6小時以上，再移至室溫靜置2小時，取上層澄清液，在 4°C 下以4000 r.p.m的轉速離心20分鐘，取上層溶液以2倍體積的 Na_2HPO_4 緩衝溶液稀釋後，再添加入 10^{-6}M 的Lanatoside C標準溶液，經過DLLME後，所偵測到的分析物訊號，訊號雜訊比(Signal-to-noise ratio ; S/N)為147.8，比沒有經過冷凍沉澱法進行樣品前處理的結果，有小幅的提升，如[圖 31]所示。

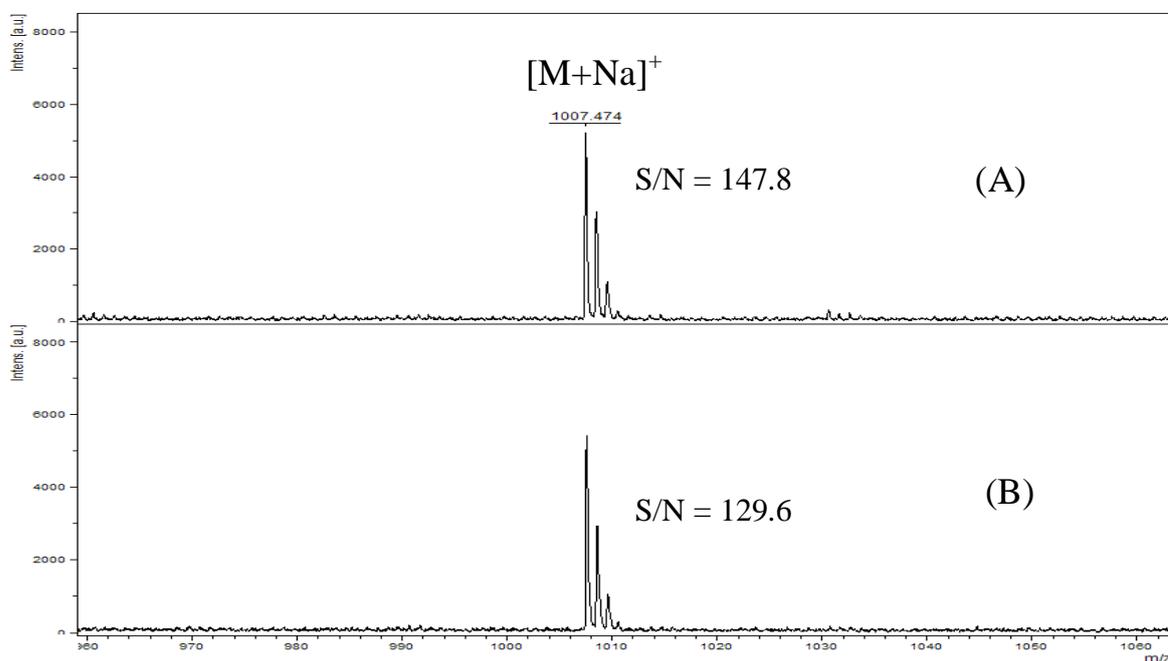


圖 31：(A)經過；(B)沒有經過冷凍沉澱法進行尿液樣品前處理所測得的質譜圖。

3.4.4. 尿液樣品的檢量線與偵測極限

在尿液樣品溶液中，添加入 0.10 μM 、0.25 μM 、0.50 μM 、0.75 μM 及 1.0 μM 的 Lanatoside C 標準溶液，一個標準溶液均做 5 次的重複測量，所獲得的分析物檢量線如[圖 32]所示。實驗結果顯示，即使在具有複雜基質的尿液樣品中，而且沒有經過繁瑣的前處理步驟，仍然可以獲得極佳的分析物檢量線($R^2 \approx 1$)，代表本論文所提出的分析方法，可以應用於真實的生化樣品溶液中，對於 Lanatoside C 化合物的偵測，其偵測極限約為 13.1 nM(約等於 12.9 ng/mL)。

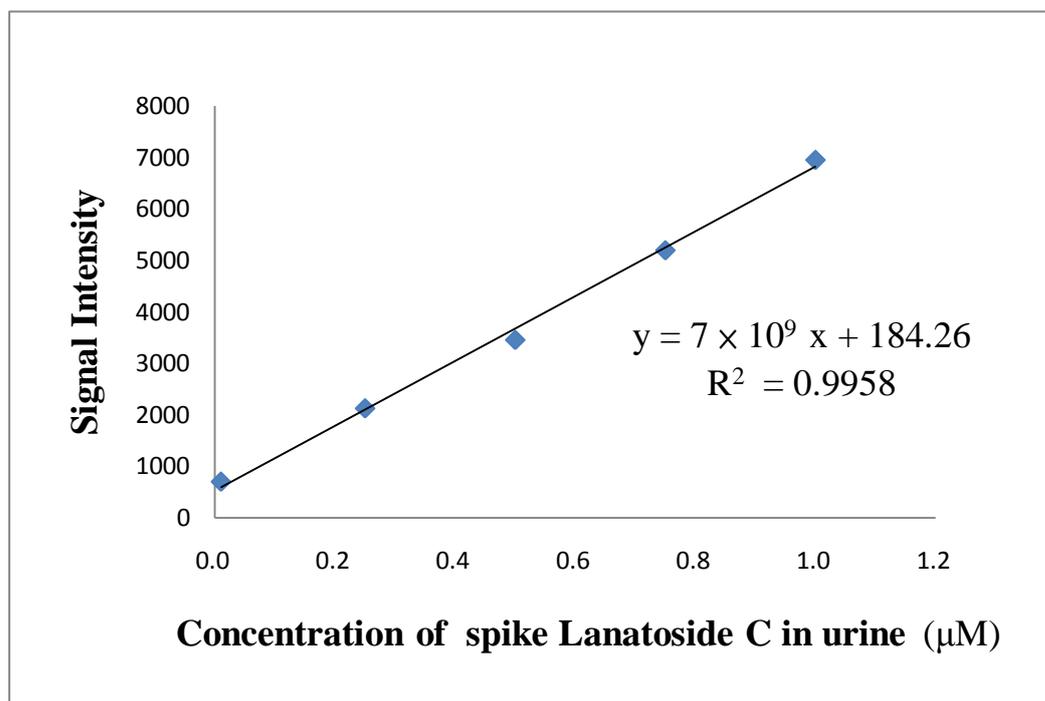


圖 32：尿液樣品中 Lanatoside C 化合物的檢量線。

3.5. 同步偵測多種強心配醣體藥物

MALDI-TOF MS 的一項特點是在偵測含有多種分析物的混合樣品時，不需先經過層析儀的分離，可以直接進行質譜儀的鑑定分析，並同時獲得這些分析物的定性、定量實驗數據，相當適合應用於鑑定含有多種強心配醣體藥物的混合溶液。

3.5.1. 標準溶液中強心配醣體的偵測

將三種強心配醣體化合物 Lanatoside C、Digitoxin 及 Digoxin，以 Na_2HPO_4 緩衝溶液配製成濃度均為 10^{-6} M 的混合標準溶液，利用最佳的實驗條件進行 DLLME 後，送入 MALDI-TOF MS 鑑定分析，所得到的質譜圖如 [圖 33] 所示。從圖中可清楚地觀察到，本論文所提出的分析方法，在沒有經過任何分離步驟的情況下，可以直接地同步偵測出這三種強心配醣體化合物的質譜訊號 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ，分別為 $[\text{Digitoxin}+\text{Na}]^+$ ($m/z = 787.5$)、 $[\text{Digoxin}+\text{Na}]^+$ ($m/z = 803.5$) 和 $[\text{Lanatoside C}+\text{Na}]^+$ ($m/z = 1007.6$)。然而，Lanatoside C 所形成的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 訊號強度，比 Digitoxin 或 Digoxin 所形成的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 訊號強度明顯地降低了許多，推測其原因可能是因為所使用的有機萃取溶劑 CH_3I ，對於少了一個醣基、極性較弱的 Digitoxin 和 Digoxin (參考[表 1])，具有較好的萃取效率所致。

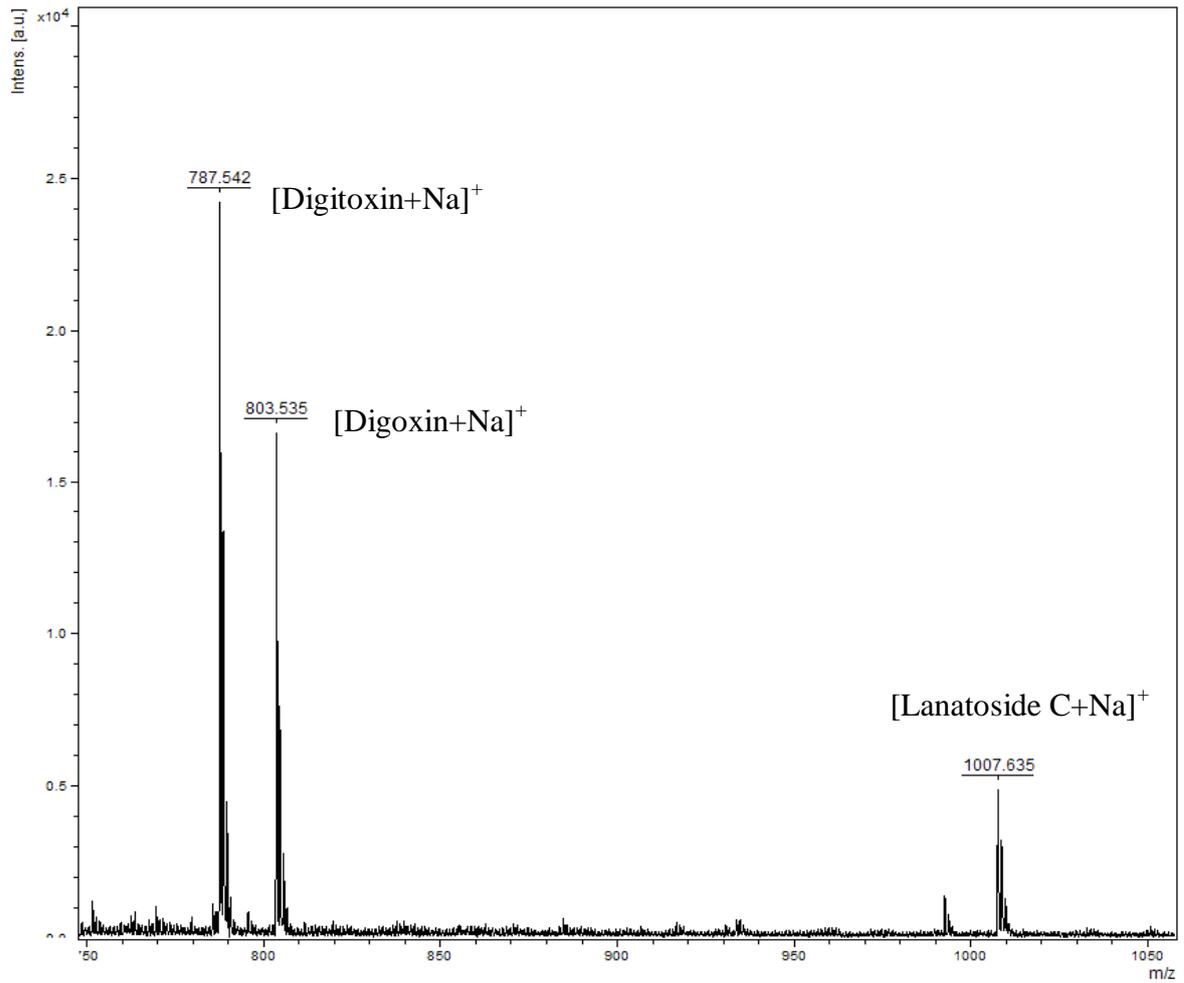


圖 33：濃度均為 10^{-6} M 的 Digitoxin、Digoxin 及 Lanatoside C 混合標準溶液經過 DLLME 萃取後所測得的質譜圖。

3.5.2. 尿液中強心配醣體的偵測

本實驗目的在於印證，在複雜的基質尿液樣品溶液中，是否可以同步偵測出多種強心配醣體藥物的成份。將 Digitoxin、Digoxin 及 Lanatoside C 添加(spike)於人體的尿液樣品中，製備成含有三種強心配醣體化合物濃度均為 10^{-6} M 的混合溶液，經過 DLLME 萃取分析物的步驟後，再進行 MALDI-TOF MS 的偵測，所獲得的圖譜如[圖 34]。由圖中所出現的三個 $[M+Na]^+$ 訊號，證實此分析方法可以進一步應用於尿液樣品中，多種強心配醣體化合物的同步偵測。

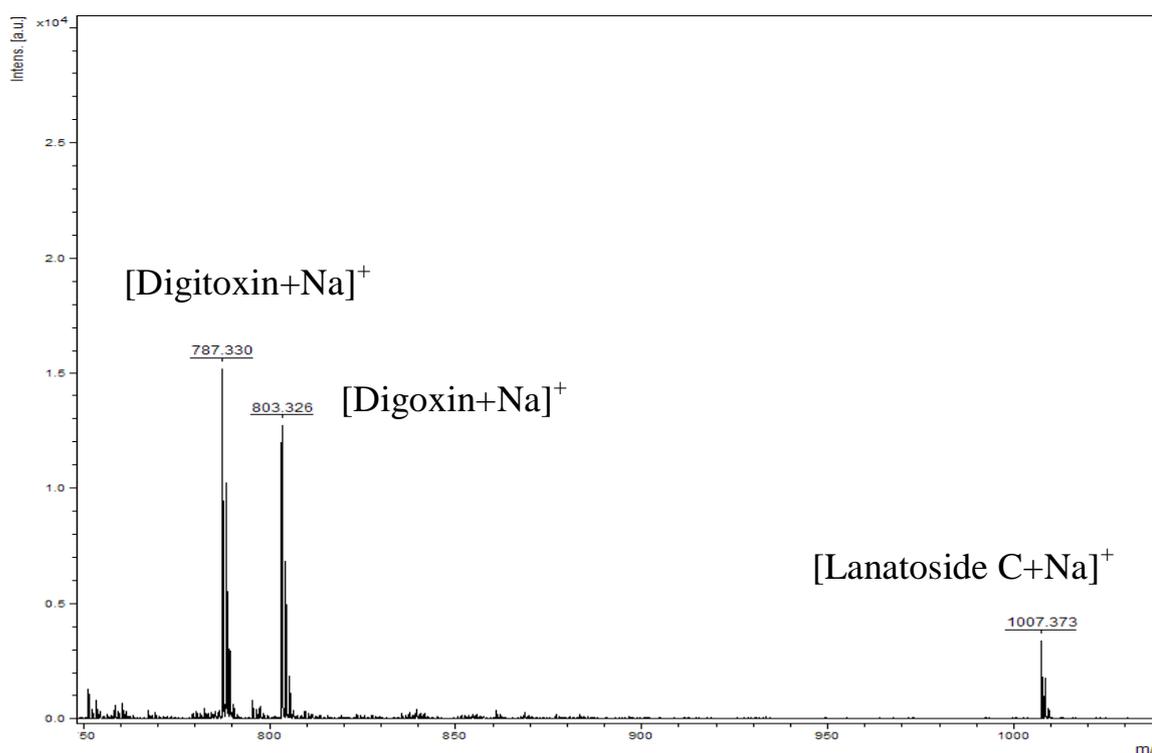


圖 34：添加濃度均為 10^{-6} M 的 Digitoxin、Digoxin 及 Lanatoside C 混合溶液於尿液中，經過 DLLME 萃取後所測得的質譜圖。

肆、結論與未來展望

本研究利用操作簡單且時間短、樣品用量少又具有高濃縮效率的分散式液相微萃取法，結合高靈敏度、樣品製備簡易及高樣品通量的基質雷射脫負游離飛行時間質譜法，成功地應用於偵測微量的 Lanatoside C 化合物，偵測極限(LOD)可達到 1.04 ng/mL，比過去文獻中使用的分析方法更佳靈敏。

實驗中以 seed-layer 方式製備樣品，改善基質與樣品結晶不均勻的現象，降低訊號集中點的情形發生。在尿液的檢測上，使用簡單、快速且不含有機溶劑的前處理步驟，在含有大量尿液基質存在的環境下，仍可完成分析物的檢測，且達到 12.9 ng/mL 的偵測極限。此外，將 Digitoxin、Digoxin 和 Lanatoside C 三種強心配醣體混合後，添加於尿液樣品中，不須經過耗時的層析的步驟，即可同步偵測出三個分析物，證明此分析方法不僅可對單一化合物做分析，也可對多種化合物進行同步分析，可應用於毛地黃植物成份的檢測上。

由於分散式液相微萃取法中，良好的萃取劑大多為含有鹵素且毒性強的有機溶劑^{65, 70, 71}。因此，未來的研究方向，期望能以更符合綠色化學的離子液體⁷² (ionic liquid)，取代傳統有機溶劑，開發出環保、快速且靈敏的分析方法，並廣泛地應用於微量化合物質的偵測。

伍、參考文獻

1. 秦道堅, *近代有機藥物化學(下冊)*. 維新書局: 民國 71 年; p 515.
2. Rahimtoola, S.; Tak, T., The use of digitalis in heart failure. *Curr Probl Cardiol* **1996**, *21* (12), 781-853.
3. 邱傳淞; 林玉淳; 彭紫君, *最新藥物學*. 2th ed.; 匯華圖書出版有限公司: 2001.
4. Katzung, B. G., *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th ed.; 合記圖書: 2004.
5. 蔡靖彥, *Handbook of Common Drugs*. 杏欣出版社: 1999; p 1306.
6. Pellati, F.; Bruni, R.; Bellardi, M.; Bertaccini, A.; Benvenuti, S., Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (15), 3260-9.
7. 蕭來發, *生藥學精要*. 生合成出版社: 民國 71 年; p 79.
8. 楊寶峰; 蘇定馮; 王玲, *Pharmacology 藥理學*. 九州圖書: 2004.
9. Stone, J.; Soldin, S., Improved liquid chromatographic/immunoassay of digoxin in serum. *Clin Chem* **1988**, *34* (12), 2547-51.
10. Stone, J.; Soldin, S., An update on digoxin. *Clin Chem* **1989**, *35* (7), 1326-31.
11. Nore, A.; Storstein, L.; Larsen, A.; Amlie, J., Digitalis glycosides in serum, urine, and cerebrospinal fluid, determined with a commercial radioimmunoassay. *Clin Chem* **1980**, *26* (2), 321-3.
12. Karjalainen, J.; Ojala, K., Therapeutic and toxic lanatoside C serum concentrations in hospital patients. *Klin Wochenschr* **1975**, *53* (14), 685-6.
13. BINE, R. J.; FRIEDMAN, M., The rate of disappearance of lanatoside C. and digitoxin from the blood of rats. *Circulation* **1950**, *1* (5), 1182-3.
14. Ikeda, Y.; Fujii, Y.; Yamazaki, M., Determination of Lanatoside C and Digoxin in

Digitalis Lanata by HPLC and Its application to analysis of the fermented leaf powder.

Journal of Natural Products **1992**, 55.

15. Balakina, M. V.; Zvonkova, E. N.; Dyumaev, K. M.; Bykov, V. A., HPLC CONTROL OF THE QUALITY OF Digitalis lanata RAW MATERIAL.

Pharmaceutical Chemistry Journal **2005**, 39 (11), 24-29.

16. Tracqui, A.; Kintz, P.; Ludes, B.; Mangin, P., High-performance liquid chromatography-ionspray mass spectrometry for the specific determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1997**, 692 (1), 101-9.

17. Ikeda, Y.; Fujii, Y.; Umemura, M.; Hatakeyama, T.; Morita, M.; Yamazaki, M., Quantitative determination of cardiac glycosides in Digitalis lanata leaves by reversed-phase thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* **1996**, 746 (2), 255-60.

18. Pawliszyn, J., Sample preparation: quo vadis? *Anal Chem* **2003**, 75 (11), 2543-58.

19. 凌永健; 李佩玲; 邱郁凱; 殷裕勝 *綠色分析化學*; 2007; p 425.

20. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem* **1990**, 62.

21. Prosen, H.; L., Z. i.-K., Solid-phase microextraction. *trends in analytical chemistry* **1999**, 18 (4), 272-281.

22. 吳松原, 霧點萃取法結合動態反應管感應偶和電漿質譜儀於環境水樣中微量元素分析之應用. *國立中山大學碩士論文* **2008**.

23. Bai, D.; Li, J.; Chen, S.; Chen, B., A novel cloud-point extraction process for preconcentrating selected polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution. *Environ Sci Technol* **2001**, 35 (19), 3936-40.

24. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Moreno-Cordero, B.; Pérez-Pavón, J.; García-Pinto, C.; Fernández Laespada, E., Surfactant cloud point

extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **2000**, *902* (1), 251-65.

25. Ferrer, R.; Beltrán, J. L.; Guiteras*, J., Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming. *Analytica Chimica Acta* **1996**, *330* (1), 199-206.

26. Watanabe, H.; Tanaka, H., A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta* **1978**, *25* (10), 585-9.

27. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116*, 1-9.

28. Oshite, S.; Furukawa, M.; Igarashi, S., Homogeneous liquid-liquid extraction method for the selective spectrofluorimetric determination of trace amounts of tryptophan. *Analyst* **2001**, *126* (5), 703-6.

29. Posthumus, M. A.; Kistemker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C., Laser Desorption Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 985-991.

30. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 2935-2939.

31. Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry* **1987**, 185-188.

32. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass

- Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2, 151-153.
33. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**, 60 (20), 2299-301.
34. Caldwell, K. L.; Murray, K. K., Mid-infrared matrix assisted laser desorption ionization with a water/glycerol matrix. *Appl. Surf. Sci.* **1998**, 127, 242.
35. Fitzgerald, M.; Parr, G.; Smith, L., Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal Chem* **1993**, 65 (22), 3204-11.
36. Juhasz, P.; Costello, C. E.; Biemann, K., Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry with 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic Acid Matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4.
37. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic-Molecules and Relevance for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27.
38. Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Fresenius, J., Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1994**, 66.
39. Overberg, A.; Karas, M.; Bahr, U.; Kaufmann, R.; Hillenkamp, F., Matrix-Assisted Infrared-Laser(2.94 μm) Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Rapid Communications in mass spectrometry* **1990**, 4.
40. Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Martin-Rossel-Larsen; Jakobsen, L.; Gobom, J., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *J. Mass Spectrom* **1997**, 32, 593-601.
41. Zenobi, R.; Knochenmuss, R., Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry.

Mass Spectrom. Rev. **1998**, *17*.

42. Knochenmuss, R., Ion formation mechanism in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131*.

43. Sunner, J., Ionization in Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS).

Organic Mass Spectrometry **1993**, *28*, 805.

44. Kosaka, T.; Kinoshita, T.; Takayama, M., Ion formation and fragmentation of sinapinic acid in electron ionization, liquid secondary ion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10* (4).

45. Harrison, A. G., The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16*.

46. Breemen, R. B. V.; Snow, M.; Cotter, R. J., Time-Resolved Laser Desorption Mass Spectrometry. I. Desorption of Preformed ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1983**, *49*, 5.

47. Osteriaa, G.; Russob, S., The Time of Flight electronics for the PAMELA experiment in space. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **2008**, 589.

48. Schmida, R. P.; Weickhardt, C., Designing reflectron time-of-flight mass spectrometers with and without grids: a direct comparison. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *206*.

49. Guan, B.; Cole, R., Differentiation of both linkage position and anomeric configuration in underivatized glucopyranosyl disaccharides by anion attachment with post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionization linear-field reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21* (18), 3165-8.

50. Woods, A. S.; Little, D. P.; Cornish, T.; Cotter, R. J.; Little, D. P., Peptide analysis to the attomole level using a curved-field reflectron MALDI-TOF mass spectrometer. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **1998**, *46*.

51. Piyadasa, C.; Håkansson, P.; Ariyaratne, T., A high resolving power multiple reflection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *13* (7), 620-4.
52. Behrens, A.; Maie, N.; Knicker, H.; Kogel-Knabner, I., MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry* **2003**, *62*.
53. Wiley, W. C.; McLaren, I. H., Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*.
54. Yanes, O.; Nazabal, A.; Wenzel, R.; Zenobi, R.; Aviles, F., Detection of noncovalent complexes in biological samples by intensity fading and high-mass detection MALDI-TOF mass spectrometry. *J Proteome Res* **2006**, *5* (10), 2711-9.
55. 楊汶凌, 以分散式液液微萃取結合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法應用於強心配醣體化合物的偵測. *東海大學碩士論文* **2009**.
56. McCombie, G.; Knochenmuss, R., Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences. *Anal Chem* **2004**, *76* (17), 4990-7.
57. Chen, Y.; Tsai, M., Using surfactants to enhance the analyte signals in activated carbon, surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2000**, *35* (11), 1278-84.
58. Cuiffi, J.; Hayes, D.; Fonash, S.; Brown, K.; Jones, A., Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films. *Anal Chem* **2001**, *73* (6), 1292-5.
59. Onnerfjord, P.; Ekström, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J.; Laurell, T.; Marko-Varga, G., Homogeneous sample preparation for automated high throughput analysis with matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *13* (5), 315-22.

60. Wang, X.; Fu, L.; Wei, G.; Hu, J.; Zhao, X.; Liu, X.; Li, Y., Determination of four aromatic amines in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *J Sep Sci* **2008**, *31* (16-17), 2932-8.
61. Farajzadeh, M.; Seyedi, S.; Shalamzari, M.; Bamorowat, M., Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. *J Sep Sci* **2009**, *32* (18), 3191-200.
62. Fu, L.; Liu, X.; Hu, J.; Zhao, X.; Wang, H.; Wang, X., Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Anal Chim Acta* **2009**, *632* (2), 289-95.
63. Liang, P.; Xu, J.; Li, Q., Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. *Anal Chim Acta* **2008**, *609* (1), 53-8.
64. Hu, J.; Fu, L.; Zhao, X.; Liu, X.; Wang, H.; Wang, X.; Dai, L., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of polychlorinated biphenyls in soils. *Anal Chim Acta* **2009**, *640* (1-2), 100-5.
65. Liu, Y.; Zhao, E.; Zhu, W.; Gao, H.; Zhou, Z., Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (6), 885-91.
66. 林媽堯, 以微波衍生及液滴微萃取結合氣相層析/火焰光度偵測法應用於金屬鉻的分析. *東海大學碩士論文* **2007**.
67. 陳立倫, 液相微萃取法結合液相層析儀檢測尿液中尼古丁類藥物. *東吳大學碩士論文* **2006**.
68. 林士為, 線上固相萃取結合液相層析質譜儀檢測尿液中氟硝西洋類藥物. *東吳大學碩士論文* **2005**.

69. 謝景雯, 快速偵測尿液中為量蛋白質及血液質譜分析技術的開發. 中山大學碩士論文 **2006**.
70. Fan, Y. C.; Chen, M. L.; Shen-Tu, C.; Zhu, Y., A Ionic Liquid for Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Phenols. *Journal of Analytical Chemistry* **2009**, *64*.
71. He, L.; Luo, X.; Xie, H.; Wang, C.; Jiang, X.; Lu, K., Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. *Anal Chim Acta* **2009**, *655* (1-2), 52-9.
72. Armstrong, D.; Zhang, L.; He, L.; Gross, M., Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **2001**, *73* (15), 3679-86.