

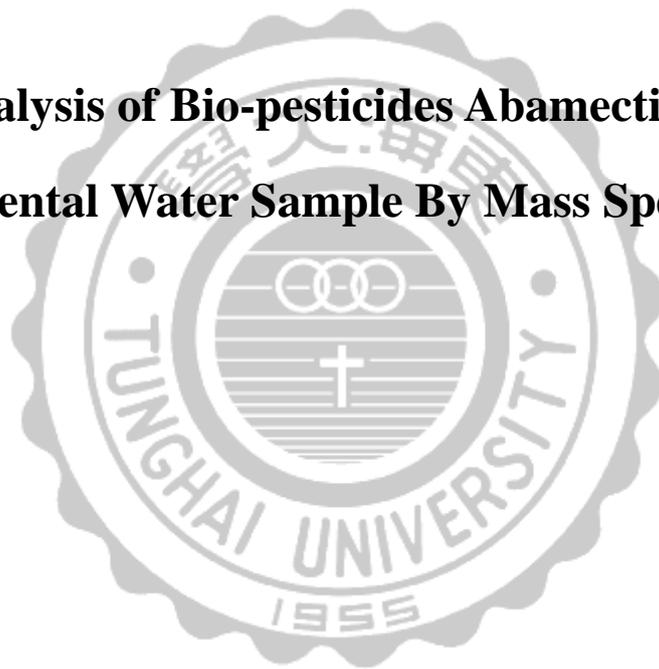
東海大學應用化學研究所

碩士論文

指導教授：劉建忠 博士

環境水樣中生物農藥阿巴汀的質譜檢測

**Analysis of Bio-pesticides Abamectin in
Environmental Water Sample By Mass Spectrometry**



研究生：劉致君 撰

中華民國一百零二年六月

謝誌

在這阿勃勒盛開的季節，我完成了碩士的學位，在這段研究所求學的過程中，承蒙指導老師劉建忠 博士，不但讓我在學業得到寶貴的知識，也在實驗技巧與設計上得到許多指導。更在做人處事上給予不材的我諄諄教誨。讓我在挫折與失敗能有再次挑戰的勇氣並不斷的警惕自己在做人處事上該有的態度，對於我在將來生活上將終身受用。在此獻上不材學生我心中最誠摯的謝意。老師，謝謝你！

感謝論文口試委員鄧宗禹 教授與趙奕娣 博士對於論文提供寶貴的意見，才能讓論文內容更加完善。

同時感謝際唐學長，佺瑄學妹，在實驗、課業與生活上提供不少的照顧與幫忙。並在我實驗上遇到挫折時，提供寶貴的方向與適度的歡樂，讓我度過於到挫折的這段時間。由衷的感謝大家的幫忙。

最後感謝父親劉木榮、母親王玉霞，給予我最大的支持與幫助，妹妹思奴、育玫的鼓勵。在我感到灰心時，做為我的依靠，讓我可以不斷的挑戰直到成功的那一刻。

最後僅以此論文獻給這我的家人、朋友與無法看到我畢業的爺爺劉阿維，願你們可以一起分享這份成就與喜悅。

摘要

阿巴汀為蟲害防治藥劑主要成分之一，常用於柑桔、漿果與十字花科葉菜等農作物的蟎與線蟲防治。本論文以分散式液液微萃取法，結合基質輔助雷射脫附游離飛行質譜儀，對阿巴汀進行鑑定分析，具有快速、簡單、高靈敏度與高選擇性等優點。

實驗中利用分散式液液微萃取技術，探討萃取劑種類、萃取劑體積、分散劑種類、分散劑體積、pH 值、離心時間等因素對於萃取效率的影響，在最佳化的實驗條件下，所測得的分析物檢量線，濃度線性範圍在 0.01 μM 至 1 μM 之間，相關係數 (R^2) 為 0.9953，偵測極限可以達到 0.72 ng/mL。

將此分散式液液微萃取法，應用於取自苗栗縣西湖溪上游，大片柑桔園附近的溪水樣品，進行阿巴汀化合物的質譜檢測，經分析後發現該溪水中檢測不出任何阿巴汀的藥物成分。另外，以阿巴汀的標準溶液，添加於該溪水樣品中，經由濾紙與 0.45 μm 的濾膜過濾後，所測得的阿巴汀化合物檢量線，濃度線性範圍在 0.01 μM 至 1 μM 之間，相關係數 (R^2) 為 0.9981、偵測極限為 1.92 ng/mL。

關鍵詞：阿巴汀、分散式液液微萃取法、質譜儀、萃取劑、分散劑。

英文摘要

Abamectin is the main ingredients of pest control pharmaceutical, commonly used in citrus fruits, berries, cruciferous vegetables and other crops to prevention and cure mites and nematodes. This study use distributed liquid-liquid microextraction combined with MALDI-TOF MS to identify the abamectin compound. It has the advantages of quick, simple, high sensitivity and high selectivity.

For the distributed liquid-liquid microextraction there are several important experimental conditions, such as the kind and the volume of extraction and dispersive solvents, pH value 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) 0.9953 and the limit of detection 0.72 ng/mL.

This analysis method is applied to the water sample obtained from Xihu Creek of Miaoli County, that has large tracts of citrus orchards on upstream. Our experiment results showed, it can't detect any abamectin in the water sample. In addition, abamectin standard solution is added to the sample and filtered by a filter paper and a 0.45 μm membrane. The analytical results showed a linear calibration curve in the concentration ranged from 0.01 μM to 1 μM with a correlative coefficient (R^2) 0.9981 and the limit of detection 1.92 ng/mL.

Keywords: abamectin, dispersive liquid-liquid microextraction method, MALDI-TOF MS, extraction solvent, dispersive solvent.

目錄

摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
壹、前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究動機.....	4
1.3 研究目的.....	4
貳、文獻回顧.....	6
2.1 阿巴汀的檢測分析.....	6
2.2 各種萃取方法的優缺點.....	8
2.2.1 固相萃取法.....	9
2.2.2 固相微萃取法.....	9
2.2.3 單滴微萃取法.....	10
2.2.4 超臨界流體萃取法.....	11
2.2.5 基質固相分散萃取法.....	11
2.2.6 分散式液液微萃取法.....	12

參、實驗方法、藥品及儀器設備.....	15
3.1 實驗方法.....	15
3.1.1 分散式液液微萃取法最佳實驗條件.....	15
3.1.2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀最佳操作條件.....	15
3.1.3 樣品溶液的配製.....	16
3.1.4 分散式液液微萃取參數.....	17
3.1.5 質譜儀操作條件.....	18
3.2 化學藥品.....	21
3.3 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀.....	22
3.3.1 基質輔助雷射脫附游離法的發展史.....	22
3.3.2 基質的特性與功能.....	24
3.3.3 基質輔助雷射脫附游離法樣品製備方式.....	28
3.3.4 基質輔助雷射脫附游離法離子形成機制.....	29
3.3.5 飛行時間質量分析儀的原理與構造.....	34
3.3.6 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的優點.....	37
3.4 儀器設備.....	40
肆、結果與討論.....	41
4.1 萃取效率最佳化.....	41
4.1.1 萃取劑.....	41

4.1.2 分散劑.....	47
4.1.3 樣品溶液的 pH 值.....	52
4.1.4 離心時間.....	54
4.1.5 分散式液液微萃取法的最佳實驗條件.....	56
4.2 質譜樣品的製備.....	58
4.2.1 基質選擇.....	58
4.2.2 添加鈉離子溶液.....	62
4.2.3 用 seed-layer 方式結晶製備樣品.....	63
4.3 標準溶液的檢量線與偵測極限.....	65
4.4 環境水樣品的質譜檢測.....	67
4.4.1 樣品的前處理.....	67
4.4.2 質譜檢測.....	69
4.4.3 環境水樣品的檢量線與偵測極限.....	71
伍、結論.....	72
陸、參考文獻.....	73

圖目錄

【圖一】Avermectin 的化學結構圖.....	2
【圖二】阿巴汀化合物化學結構.....	3
【圖三】分散式液液微萃取流程圖.....	14
【圖四】桌上型 Micro-flex 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀.	19
【圖五】基質輔助雷射脫附游離法的離子化示意圖.....	30
【圖六】直線型與反射型的飛行時間質譜儀.....	36
【圖七】MALDI plate.....	39
【圖八】萃取劑對於訊號增強係數的影響.....	44
【圖九】萃取劑體積對訊號增強係數的影響.....	46
【圖十】萃取劑體積與沉積液體積關係圖.....	46
【圖十一】分散劑對於訊號增強係數的影響.....	48
【圖十二】分散劑體積對於訊號增強係數的影響.....	50
【圖十三】分散劑體積與沉積液體積關係圖.....	50
【圖十四】分散劑體積與樣品回收率的影響.....	51
【圖十五】樣品溶液的 pH 值對訊號增強係數的影響.....	53
【圖十六】樣品溶液的 pH 值對樣品回收率的影響.....	53
【圖十七】離心時間對沉積液體積之影響.....	55

【圖十八】離心時間對樣品回收率的影響.....	55
【圖十九】Abamectin 溶液經過 DLLME 萃取後所測得的質譜.....	57
【圖二十】以不同的基質測量 Abamectin 化合物所獲得的質譜圖.....	60
【圖二十一】以緩衝溶液配置 Abamectin 標準溶液所測得質譜圖.....	62
【圖二十二】樣品盤上的樣品與基質溶液以不同方式配製結晶圖....	64
【圖二十三】Abamectin 標準溶液的檢量線.....	66
【圖二十四】溪水樣品經過樣品前處理所測得的質譜圖.....	69
【圖二十五】環境樣品中 Abamectin 的檢量線.....	71

表目錄

【表一】常用的萃取方法.....	8
【表二】重要的儀器參數設定值.....	20
【表三】常見的有機酸基質.....	26
【表四】分散式液液微萃取的最佳實驗參數.....	56

壹、前言

1.1 研究緣起

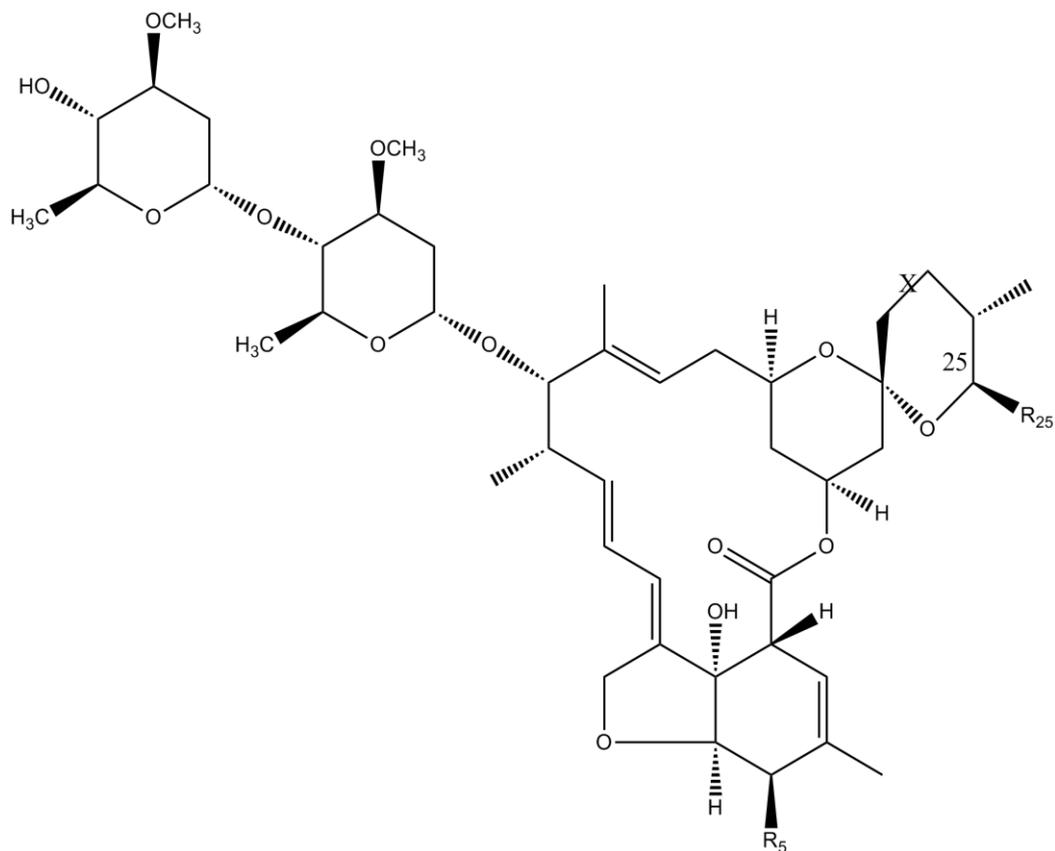
阿維菌素(ivermectin) 由日本 Kitasato 大學的 Satoshi Ōmura 等人和美國 Merck 公司，首先開發出的一種灰色鏈黴菌(streptomyces avermitilis)，此鏈黴菌發酵產生具有殺蟲、殺蟎、殺線蟲活性的十六員大環內酯化合物。^{1,2} 天然的阿維菌素中含有 8 個組成，即 A1a、A2a、B1a、B2a、A1b、A2b、B1b 和 B2b。目前市售阿維菌素農藥是以阿巴汀(abamectin)為主要殺蟲成分，以 B1a 的含量做為標識。

阿巴汀對蟎類和昆蟲具有觸殺和餵毒作用³，但對蟲卵並無任何殺傷作用。藥液噴到植物葉面後，會迅速滲入葉肉內形成微型藥囊，蟎類成蟲、幼蟲和昆蟲幼蟲與阿維菌素接觸後即出現麻痹症狀，不活動、不進食，2 至 4 天後死亡。阿巴汀農藥調製容易，將製劑倒入水中稍加攪拌即可使用，對作物亦較為安全，不會發生藥害。適用作物有十字花科蔬菜、草莓、柑橘、番茄等；防治對象:如小菜蛾、潛葉蛾、二點葉蟎、紅蜘蛛、斑潛蠅與蚜蟬等，對抗性害蟲有極佳的撲殺效果。

ivermectin 是一種用於農作物防治昆蟲、蟎與線蟲^{1,2,4,5,6,7,8} 或

用於治療畜禽線蟲病、蟎和寄生性昆蟲病^{9,10,11,12,13} 的用藥，由

鏈黴菌發酵產生^{1,14}，其化學結構如【圖一】所示。



AVERMECTIN

A : $R_5 = OCH_3$ B : $R_5 = OH$

1 : $X = \begin{array}{c} \text{---C=C---} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$

2 : $X = \begin{array}{c} \text{H}_2 \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{---C---C---} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$

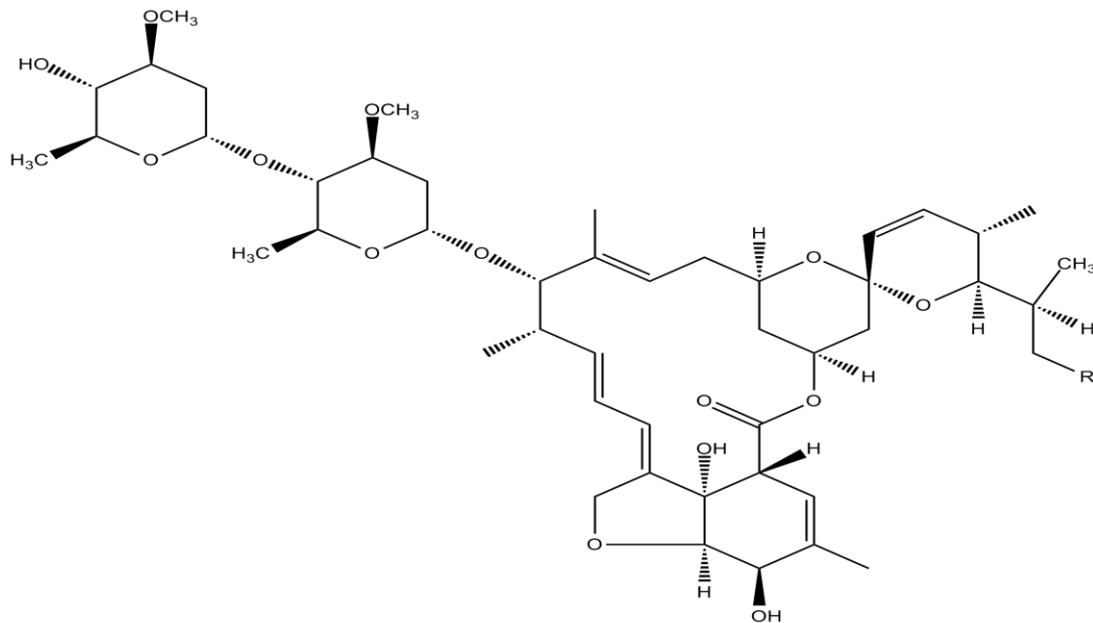
a : $R_{25} = \begin{array}{c} \diagup \\ | \\ \diagdown \end{array}$ b : $R_{25} = \begin{array}{c} \diagup \\ | \\ \diagdown \end{array}$

【圖一】 avermectin 的化學結構圖。

阿巴汀的藥理作用^{1,3,7} 機制與一般殺蟲劑不同，它經由干擾神經的生理活動，刺激釋放 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)，對節肢動物的神經傳導具有抑制的作用。

當目標害蟲接觸或食入刺激受體時，產生大量的神經傳導物質 γ -氨基丁酸，導致神經過度興奮，肌肉不自主收縮而痙攣至死^{15,16,17,18}。

本篇論文所研究的阿巴汀化合物¹⁹，其化學結構如【圖二】所示。



- (i) R = CH₃
- (ii) R = H

分子式與分子量：(i) C₄₈H₇₂O₁₄ (avermectin B1a)；873.1 g/mol

(ii) C₄₇H₇₀O₁₄ (avermectin B1b)；859.1 g/mol

【圖二】阿巴汀化合物的化學結構。

1.2 研究動機

阿巴汀對於農作物防治與畜禽治療上雖然效果良好，但它仍屬於劇毒殺蟲劑。其毒性以原藥大鼠經口服用，所測得的 LD50 值為 10 mg/kg，經皮膚注射，所測得的 LD50 值大於 380 mg/kg，大鼠經呼吸系統吸入，所測得的 LC50 值大於 5.7 mg/L^{20,21}。對於水中生物更有高致死率，對虹鱒魚的 96 小時 LC50 值為 3.6 µg/L，藍鰓翻車魚的 96 小時 LC50 值為 9.6 µg/L，鯉魚的 96 小時 LC50 值為 42 µg/L²²，斑馬魚的 48 小時 LC50 值為 33 µg/L²³。對於一些不敏感魚類雖然需要較高的致死劑量，然而在 2011 年，Mohammed 提出²⁴Tilapia Fish（台灣俗稱吳郭魚）暴露在 20 µg/L 的環境下 96 小時，每克魚肉中所含的蛋白質、脂質與碳水化合物都有明顯的下降。而阿巴汀藥物的使用，可由各種途徑流入河川，進而破壞各物種之間的生態平衡系統。因此，有效且快速、準確的掌控河川中的阿巴汀藥物的濃度是很重要的課題。

1.3 研究目的

本論文之目的主要分為兩部分，第一部分為萃取效率的最佳化，將針對各項影響分析效果的實驗因素深入探討，包括萃取劑的種類與使用量、分散劑的種類與使用量、分離時間及樣品溶液的 pH 值等。第二部分為質譜的樣品製備，將針對各項對影響質譜訊號的實驗因素

深入探討，包括基質的選擇，鈉離子的添加與否與樣品結晶的製備方式等。最後將所獲得的最佳實驗條件，應用於標準樣品與真實的溪水樣品中，進行 abamectin 的檢測分析。過去多以 HPLC-UV、HPLC-FL、HPLC-ESI-MS、HPLC-MS/MS 等方法，進行 abamectin 化合物的分析與偵測。但使用 HPLC 的缺點為在分離分析物的過程中，需要使用大量的有機溶劑且操作過程極為耗時。因此，為了快速且準確地偵測 abamectin 藥物，本研究論文將結合分散式液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction ; DLLME)技術與基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF MS)，進行 abamectin 化合物的檢測分析，能縮短實驗步驟與時間(由 HPLC 的約 20 多分鐘縮短到 MALDI 的約 7 分鐘)，有效地萃取濃縮分析物，提升分析物的偵測極限與靈敏度，以取代需要耗時、耗費大量有機溶劑的傳統萃取方式，降低實驗過程中有機溶劑的使用量(由 SPE 的約 20 幾 mL 減少到 DLLME 的約 1 mL)，以減輕對生態環境所造成的衝擊。本論文主要研究目的歸納如下：

1. 分散式液液微萃取條件最佳化。
2. 質譜偵測條件最佳化。
3. 以分析物的標準樣品製作檢量線探討偵測極限。
4. 將此分析方法應用於環境水樣品的偵測。

貳、文獻回顧

2.1 阿巴汀的檢測分析

在過去所發表的文獻有關於偵測阿巴汀化合物的分析方法，整理探討如下：

高效液相層析儀(high-performance liquid chromatography ;HPLC)最常應用在阿巴汀的偵測上^{25,26}，Cobin 等人在 1995 年所發表的文獻中²⁵，提出以高效能液相層析儀，進行蘋果內 abamectin 的成份分析偵測，利用固相萃取(solid-phase extraction ; SPE)技術成功地將 abamectin 成份分離出來再進行儀器分析，對於 abamectin 化合物的偵測極限可達 1 µg/kg。Li 等人²⁶在 1996 年提出以免疫親和管柱進行樣品前處理，再以高效能液相層析儀，搭配紫外線偵測器檢驗牛血、牛肉與鱷梨中 abamectin 化合物的殘留量，偵測極限可達 2 µg/kg。另外，在 1999 年時，Diserens 和 Henzelin 等人²⁷提出利用樣品經由 SPE 技術與螢光化衍生反應，以高效能液相層析儀，搭配螢光偵測器偵測水果與蔬菜中阿巴汀的殘留量，結果顯示使用此方法的濃度定量極限的約在 0.002 至 0.005 mg/kg 之間，可以成功地應用在真實樣品中 abamectin 的檢測分析。

上述所提到的分析方法需要耗費大量的有機溶劑與時間的前處

理步驟，才能進行 abamectin 定性與定量的分析。隨著近來質譜技術廣泛地應用與普及化後，對於各種化合物的定性與定量不論在準確度、再現性與靈敏度上都有很大地提升，可藉由化合物的分子量及結構訊號，能夠有效且準確地對各種分析化合物做精確的定性及定量檢測且效果極佳，因此，常被選為藥物與食品分析的最佳工具，如高效液相層析串聯質譜儀（high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry；HPLC-MS/MS）、氣相層析質譜儀(gas chromatographic - mass spectrometric；GC-MS)，利用前段 HPLC 或 GC 的分離技術先將樣品進行層析分離，再以後端所連接的質譜儀進行分析物定性、定量偵測，所獲得的結果，具有良好的靈敏度和專一性。

2000 年在 Yoshii 等人²⁸的文獻上報導，以固相萃取技術進行樣品前處理，再利用高效液相層析儀結合電灑質譜儀(HPLC-ESI-MS) 檢測蔬菜中 abamectin 的成份，結果顯示此方法對於 abamectin 具有極佳的靈敏度，偵測極限為 0.3 ng/kg 及 80% 以上的回收率。在 2001 年 Valenzuela AI 等人²⁹則將 LC-UV、LC-FL 與 LC-ESI-MS 三種分析技術做一比較，所測得的定量極限分別為 0.03 mg/kg、0.0005 mg/kg 和 0.0025 mg/kg。此外，Danaher M 等人³⁰在 2001 年提出以超臨界流體萃取技術，對肝臟樣品進行前處理，再以高效液相

層析搭配螢光偵測，定量極限為 2 µg/kg。

2.2 各種萃取方法的優缺點

【表一】歸納出常用的萃取方法優點與缺點，在本論文中所採用的分散式液液微萃取法，具有操作簡單，使用溶劑量少，高濃縮倍率、高回收率等優點。

【表一】常用的萃取方法。

方式	優點	缺點
固相萃取法	1.使用較少量溶劑 2.回收率高	精密度較低
固相微萃取法	1.不需溶劑 2.操作簡便	1.需使用特定的纖維 2.纖維耗損率高
單滴微萃取法	1.快速、簡便 2.價格便宜	變因較多、控制不易
超臨界流體萃取法	1.溶劑使用量較少 2.萃取時間快	設備昂貴
基質固相分散萃取法	1.節省溶劑 2.萃取純化同時進行	1.純化效果差 2.只適合小量樣品
分散式液液微萃取法	1. 操作簡便 2. 萃取時間短 3. 高濃縮率 4. 高回收率	1.不易形成沉積液 2.使用鹵化物不環保

2.2.1 固相萃取法³¹

固相萃取法最早由St Onge LM 等人在1979年所提出之後即廣為分析化學家所應用。它是一種利用固相萃取管柱，填充具有吸附能力的正相(normal phase)或逆相(reverse phase)吸附劑當作靜相，例如C₈、C₁₈或PSDVB 等不同物性、化性的物質，這些吸附劑與分析物經由分配平衡作用，利用靜相吸附分析物，再以適當的溶劑將分析物沖提出來。其操作步驟如下，先將管柱活化，接著將樣品溶液注入固相萃取管柱，再以特定比例的有機溶劑沖洗，最後利用適合的有機溶劑，將分析物由管柱沖提出來，再進行分析。

2.2.2 固相微萃取法^{32,33}

第一篇關於固相微萃取法這門新型萃取技術的文獻，是由加拿大Pawliszyn 教授實驗室於1990 年所發表，其裝置共分二個部分，固定器(holder)和熔融矽纖維(fused silica fiber)，組成固定器為一不鏽鋼管，其作用為固定並支撐熔矽纖維，以利控制纖維的伸縮及調節，此鋼管採用可耐高溫的環氧樹脂連結一段纖維，並在纖維上塗覆一層固體靜相，不鏽鋼管通過一個Hamilton 7000 型注射針針頭，並突出於注射針之外，然後再將不鏽鋼之另一端以環氧樹脂接合，主要作用原理是利用塗有高分子聚合物之纖維，在樣品基質與靜相之間的分配平衡作用達到萃取的效果。當待測分析物從樣品基質萃取至塗覆纖維後，

再將纖維放入儀器中進行偵測。此萃取方式的特色是能一步完成分析物的採樣、萃取及濃縮，具有儀器設備操作簡單，不需使用有機溶劑，高再現性及高靈敏度等優點。然而當樣品的基質複雜時（如尿液、血清等），因為探針上樣品殘留的問題，無法得到良好的效果；另外探針的價格不便宜，有使用的期限限制，均為固相微萃取法待改進的缺點。

2.2.3 單滴微萃取法(drop-in-drop system)^{34,35}

單滴微萃取法是由 Liu Hanghui 的實驗室在 1996 年首先提出，為第一個將溶劑萃取法微量化的實驗，根據傳統的液液萃取法，待測物在水相與有機相之間，分配係數差異的原理，進行分配平衡反應以達到萃取的效果。此萃取方法操作步驟如下：取一定體積（mL）的樣品溶液於有密封隔膜密封塞的萃取容器內，將萃取容器置於攪拌器上，接著以微量注射器抽取微量（ μL ）的萃取溶劑，使它固定在萃取容器的上方，再將微量注射器針尖穿過密封塞，插入萃取容器內，以針頭直接浸沒於樣品溶液內，經過一定的攪拌速度攪拌樣品溶液。當達到最佳的萃取時間以後，再將微滴回收到注射器內，送入適當的儀器中進行分析。此萃取方式具有極高的濃縮倍率、有機萃取溶劑使用量少及高再現性等優點，但液滴控制不易，常在實驗操作的過程損失液滴是此方法的缺點。

2.2.4 超臨界流體萃取法^{36,37,38}

超臨界流體具備氣體的高擴散性及液體的高溶解能力，更有低黏度和低表面張力的特性，使得超臨界流體能滲透進入物質的微孔隙，在進行萃取時，其速率會比一般液體萃取的速度快且有效率。目前所使用的超臨界流體多為二氧化碳，因其具有無毒、無色、無臭、不可燃性、不會產生光化學反應、對環境友善、可回收再利用等優點。

超臨界流體萃取的原理是利用控制溫度及壓力的改變，提升溶解分析物的能力，使其能夠有選擇性地依極性大小及分子量高低，將分析物萃取出來，最後再經過減壓、升溫的步驟後，使為二氧化碳成為氣體揮發之後，萃取物自動由二氧化碳中析出。達到萃取和分離一步完成的效果。

2.2.5 基質固相分散萃取法³⁹

基質固相分散萃取法(matrix solid-phase dispersion; MSPD)，在 1989 年由美國 Louisiana 州立大學的 Steven Barker 首次提出並給予理論解釋，其基本原理是將樣品直接與適量反相填充物(C_8 或 C_{18} 矽膠)研磨、混勻製成半固態物質，然後填裝於管柱中，再以沖提劑沖提。根據分析物在聚合物與組織基質中分散的程度以及溶劑的極性差異，可將分析物迅速分離，再送入分析儀器中進行檢測。此萃取法具有萃取與純化同步進行、低溶劑用量等優點，但也具有樣品需與填

充物混和研磨，實驗步驟難以自動化，純化效果不如固相萃取法等缺點。

2.2.6 分散式液液微萃取法⁴⁰

分散式液液微萃取法(dispersive liquid-liquid microextraction)，在2006年由Rezaee教授等人以均質液液萃取(homogeneous liquid-liquid extraction, HLLE)和雲點萃取法(cloud point extraction, CPE)的概念所提出的一套新的樣品前處理方法。

此法將適當的萃取劑、分散劑混和後，利用注射針快速將其注入樣品水溶液中形成混濁相，經由離心機離心後，使萃取劑與水溶液分開產生沉積相，再以微量注射針將離心管底部的沉積相取出，送入GC、HPLC或本論文所選擇的MALDI-TOF MS等儀器進行分析。

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，也可以改善傳統的樣品前處理方式，能夠有效地降低大量使用有機溶劑的缺點，減少對於環境的污染與衝擊。因此，本論文選擇以此萃取方法並搭配具有高解析度、高靈敏性及專一性的基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀，進行 abamectin 化合物的分析。

分散式液液微萃取法的流程示意圖，如【圖三】所示，操作過程

如下：

- (A) 取 5 mL 樣品水溶液至 15 mL 的玻璃尖底離心管。
- (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。
- (C) 此時萃取劑、分散劑和水溶液會形成霧狀混濁相。
- (D) 經由離心機的離心作用，萃取劑會在離心管的底部產生沉積液。
- (E) 利用注射針將沉積液取出。
- (F) 以微量注射針將沉積液與 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid 均勻混合，直接點在樣品盤上，待乾燥後送入 MALDI-TOF MS 中，進行偵測。

(A)



(B)



(C)



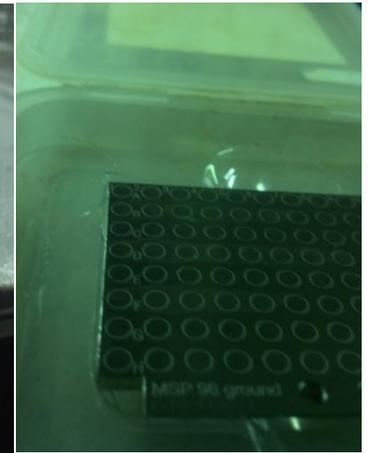
(D)



(E)



(F)



【圖三】分散式液液微萃取流程圖。

參、實驗方法、藥品及儀器設備

3.1 實驗方法

3.1.1 分散式液液微萃取法最佳實驗條件

本論文將探討以下實驗條件對於萃取效果的影響，以獲得最佳的分析物檢測結果。

- (1) 萃取劑種類以及萃取劑的使用量。
- (2) 分散劑種類以及分散劑的使用量。
- (3) 樣品溶液的 pH 值。
- (4) 離心時間長短。

3.1.2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀最佳操作條件

利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀偵測 Abamectin 化合物，所設定的實驗操作條件，對於分析物的質譜訊號具有重大的影響。本論文將探討以下三項影響質譜訊號的主要因素，以獲得最佳的檢測分析效果。

- (1) 最佳基質的選擇。
- (2) 添加鈉離子溶液。
- (3) 比較 seed-layer 與 dried-droplet 方式製備樣品結晶。

最後結合上述所有的實驗條件來分析並製作標準溶液與溪水樣品的檢量線與偵測極限，探討本研究提出的分析方法的實際應用的可行性。

3.1.3 樣品溶液的配製

1. 基質溶液

(A) α -CHCA 基質溶液：

稱取 10 mg 的 α -CHCA 溶於 1 mL 0.1% 的 TA 溶劑中。

(B) SA 基質溶液：

稱取 15 mg 的 SA 溶於 1 mL 0.1% 的 TA 溶劑中。

(C) DHB 基質溶液：

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

(D) 用於 seed-layer 的基質溶液：

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

(E) 0.1% 的 TA：

取 50 mL 的 acetonitrile 與 49.9 mL 的 D.I. water 加 0.1 mL 的 TFA 混合而成。

2. 緩衝溶液：稱取 120 mg 的 NaH_2PO_4 溶於 100 mL 的 D.I. water，配製成 10 mM 的緩衝溶液。

3. 分析物樣品溶液：將 abamectin 溶於 acetonitrile : H₂O 為 1 : 1

的溶劑中，配製成 1.0 mM 標準樣品溶液，放置 4°C 中貯存，

以緩衝溶液進行稀釋，配製成所需濃度的分析物標準溶液。

3.1.4 分散式液液微萃取參數

分散式液液萃取法是一種具有操作簡易、低消耗萃取溶劑、操作時間短和高濃縮率的方式。此方法的原理乃是利用萃取劑、分散劑與樣品水溶液三種不同溶液系統之間分配平衡(distribution equilibrium)的作用，使目標分析物在巨量的樣品水溶液中，透過有機相的萃取劑與分散劑進行分配，將分析物萃取至微量的有機相萃取劑中，以達到高倍率的萃取濃縮效果。分析物的訊號增強係數與回收率計算定義，如公式(1) 與 (2)所示。

本研究中將獲得的沉積液全部點至樣品盤上，所以將 C_{sed}/C_0 定義為分析物的訊號增強係數(signal enrichment factor ; Signal E_f)，其關係式如下：

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

C_{sed} : 分析物於沉積液之濃度

C_0 : 分析物在水相中之原始濃度

分析物的萃取回收率(extraction recovery ; ER%) 為有機相萃取到的

分析物含量佔總量比例，如下列公式所示：

$$ER\% = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_o \times V_{aq}} \times 100 \text{ -----(2)}$$

V_{aq} ：樣品水溶液之體積(μL)

3.1.5 質譜儀操作條件

本實驗所使用的 MALDI-TOF MS 為德國布魯克公司所生產的桌上型 Micro-flex 儀器(如【圖四】)。儀器所提供的雷射配備為具有波長 337 nm 的 N_2 脈衝雷射；儀器的操作模式可選擇直線型與反射型兩種偵測模式，直線型的飛行管長度為 1.05 m、反射型為 1.96 m；儀器的偵測器為 Microchannel Plate Detector，具有偵測正電荷與負電荷的功能。本論文採用反射型飛行模式進行分析物的偵測，重要的儀器操作參數如【表二】所示。



【圖四】桌上型 Micro-flex 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀。

【表二】重要的儀器參數設定值。

操作參數	設定值	單位
雷射頻率	20	Hz
離子源 1	19.00	kV
離子源 2	16.25	kV
聚焦電壓	9.55	kV
反射電場	20.00	kV
脈衝時間	100	ns
雷射轟擊次數	100	shot
雷射能量	27-33%	$\mu\text{J}/\text{pulse}$

3.2 化學藥品

1. Abamectin ($C_{48}H_{72}O_{14}$) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 97%。
2. Acetone ($(CH_3)_2CO$) : ALPS 公司產品，HPLC 級，純度 99.7%。
3. Acetonitrile (CH_3CN) : ALPS 公司產品，HPLC 級，純度 99.7%。
4. Methyl Alcohol (CH_3OH) : E.Merck 公司產品，純度 $\geq 99.9\%$ 。
5. Tetrahydrofuran (C_4H_8O) : J.T. Baker 公司產品，HPLC 級，純度 99.9%。
6. Methyl iodide (CH_3I) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 99.5%。
7. Chloroform ($CHCl_3$) : ALPS 公司產品，LC 光譜級，純度 99.9%。
8. Carbon tetrachloride (CCl_4) : Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 公司產品，HPLC 級，純度 99.9%。
9. Diiodomethane (CH_2I_2) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 99.9%。
10. Trisodium phosphate dodecahydrate ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) : Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 公司產品。
11. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) : Sigma 公司產品，純度 99%。
12. Sodium Dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) : Sigma 公司產品，純度 99%。
13. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ($C_{10}H_7NO_3$) : Sigma-Aldrich

公司產品，純度 97%。

14. 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid ($C_{11}H_{12}O_5$) :

Sigma-Aldrich 公司產品，純度 98%。

15. 2,5-dihydroxybenzoic acid ($C_7H_6O_4$) : Sigma-Aldrich 公司產品，
純度 97%。

16. 奈米膠體金粒子(gold colloid solution) : Sigma 公司產品。

17. Trifluoroacetic acid (CF_3COOH) : Alfa Aesar 公司產品，純度 99
%。

18. Sodium hydroxide (NaOH) : Panreac Quimica SA 公司產品，純
度 98 ~ 100.5%。

19. Hydrochloric acid (HCl) : Sigma-Aldrich 公司產品，純度 37%。

3.3 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀

3.3.1 基質輔助雷射脫附游離法的發展史

基質輔助雷射脫附法，主要是由傳統的雷射脫附法 (laser desorption,LD) 改良而來。基質輔助雷射脫附法的發展起源於1960年代的雷射脫附法，其方法一開始是利用高能量的UV或IR雷射光轟射在固體分析物上，使分析物的離子從表面完整的脫附出來，最後進入到MS做進一步分析。

1978 年Posthumus等人將其應用於葉綠素、核苷酸、胺基酸、

醣類等較小的生化分子的研究⁴¹。但由於雷射的能量很高，直接打在分析物上會產生許多的離子碎片，導致圖譜訊號比較複雜，分析困難，使得大分子量的樣品時，會因高能量雷射造成分子碎裂干擾大於小分子量的樣品，而無法得到完整的分析物離子訊號，當時此技術受限於分析質量範圍在2000 Da 以下，而應用性並未受到重視。

直到1980年代由德國Hillenkamp及日本Tanaka 教授等人發展出基質輔助雷射脫附游離法(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)，才成功地解決了分析質量範圍在2000 Da 以下的限制，使得相關領域的應用受到重視。

在1985年時Karas和Hillenkamp首先提出一個新的構想，是利用基質(matrix)幫助分析物脫附游離⁴²，利用可吸收雷射能量的色胺酸(tryptophan)當做基質和不吸收雷射能量的胺基酸valine、tyrosine混合，再以波長266 nm的Nd:YAG雷射轟射，可以成功地偵測到胺基酸的訊號，並發現了色胺酸可以有效地輔助分析物脫附游離。

Tanaka等人⁴³在1987 年提出利用極細微的鈷金屬粉末混合甘油做為基質，再加入蛋白質樣品溶液充分混合後，利用波長337 nm的氮氣雷射照射在樣品上進行脫附游離，能夠成功地偵測到分子量近14 KDa的溶菌酶(lysozyme)以及70 KDa的lysozyme cluster的生化大分子訊號，隔年更成功地以相同的分析技術，偵測到分子量34 kDa 的

Carboxypeptidase A 分子離子訊號⁴⁴。

同年，Hillenkamp 等人發表了以有機酸(尼古丁酸)做為基質與蛋白質分子混合，搭配波長266 nm的 Nd:YAG雷射成功地偵測白蛋白成功的得到分子量高達十萬的白蛋白(Albumin, 67,000 Da)的離子訊號⁴⁵。由於Tanaka等人提出的方法使用微小的鈷金屬粉末製作困難、價格昂貴、取得不易、具有高度毒性，且較以有機酸做為基質時所得到的質譜圖其解析度與靈敏度皆較差，故目前所使用的MALDI基質多以Hillenkamp 等人所提出的有機酸。至今已開發的基質已達數十種^{46,47,48}之多。由於上述等人的研究將MALDI的偵測範圍成功地突破質量在2000 Da 以下的限制，成為至今廣泛地使用於生化樣品分析上。

3.3.2 基質的特性與功能

MALDI 和直接雷射脫附游離法(LD)的最大不同處在於、MALDI 在的樣品製備中會加入可吸收雷射能量的基質(matrix) 輔助分析物分子進行脫附游離，藉由基質的輔助先吸收雷射能量後，再將能量傳遞給分析物，可將需要離子化分析物的雷射能量降低，避免因雷射能量太強使得欲分析的樣品過度斷裂產生雜訊。因此，基質的添加亦是此游離技術能提高分析質量上限的主因。

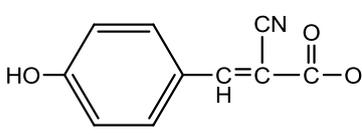
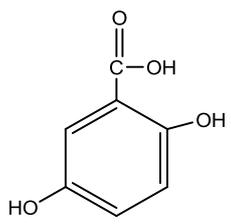
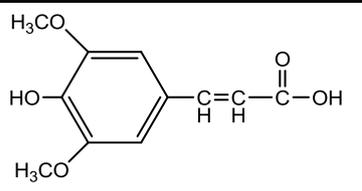
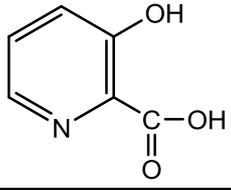
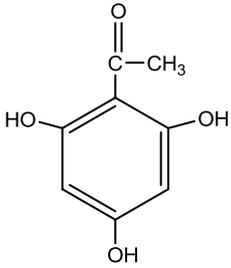
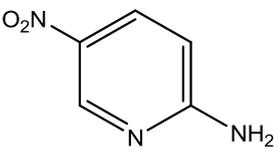
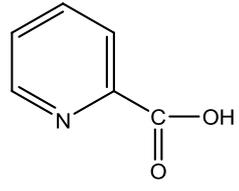
在早期被研究發展出來的基質多屬於可以在紫外光(UV) 範圍

內吸收雷射能量具芳香環的有機酸如sinapinic acid及2,5-dihydroxybenzoic acid等，至今已有八十餘種此類基質被開發出來^{48,49}，良好的基質不僅要能與分析物有良好的互溶性，對MALDI所使用的雷射波長也要有良好的吸收率，與分析物所形成的結晶效果均勻，因此對於不同的分析樣品，也發展出各種不同的對應基質，各種常用的基質與相對應的用途如下：

1. α -CHCA：適合分析分子量 < 10k Da 的蛋白質或是胜肽。
2. DHB：無分子量範圍的限制，但製備出來的樣本較不均勻，可以用來增強含糖分析物的離子化，因此常做為分析糖蛋白 (glycoprotein)或是糖胜肽(glycopeptides)的基質。
3. SA：適合分析分子量大於 10k Da 以上的蛋白質。
4. 奈米膠體金粒子溶液：適合分析分子量小的化合物，不會出現有機酸基質在低分子量範圍間的圖譜干擾現象。

【表三】列出常用的有機酸基質名稱、化學結構、適用的雷射波長與分子量的資訊。

【表三】常見的有機酸基質。

基質名稱	結構	適用波長 (nm)	分子量
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid		337 nm	189.04
2,5-dihydroxybenzoic acid		337 nm	154.03
Sinapinic acid		337 nm	224.07
3-hydroxypicolinic acid		337 nm	139.03
2,4,6-trihydroacetophenone		337 nm	168.15
2-amino-5-nitropyridine		337 nm	139.11
2-pyridine carboxylic acid		266 nm	123.04

選擇基質需依照可吸收雷射能量的波長做改變，因為質譜是在真空下操作，所以基質需在真空下為穩定的且具備低揮發的性質，倘若基質具高揮發則無法穩定且完全的將分析物的周圍進行覆蓋並有效的傳遞雷射能量，造成圖譜分析和判斷上的困擾。因此，一個良好的 MALDI 基質必需具備以下三種功能及特性^{50,51}：

(i) 有效的吸收雷射能量並傳遞給分析物：能吸收雷射能量是基質本身應具有的基本條件，且須能夠快速、效率的將能量傳遞給相鄰的分析物分子，使得分析物分子得到足夠的能量由固相轉變成氣相，達到脫附游離的效果。

(ii) 防止分析物聚集：在形成結晶的過程中，如果分析物太過於集中時會降低基質傳遞雷射能量的效率，因此，需要大量的基質將分析物分子有效地隔離，降低分析物分子過度聚集在一起的情況，避免雷射能量的傳遞效率以及脫附游離的反應受到影響。

(iii) 提供氫離子幫助分析物游離化：在 MALDI 的脫附游離的過程中，分析物大多以質子化離子(MH⁺)的形式被偵測到，根據過去對脫附游離機制的研究中顯示，使用 MALDI 游離技術時，分析物其獲得質子的方式有可能是由分析物分子和基質中的 H⁺離子在形成氣相過程中進行離子-分子反應 (ion-molecule reaction ; IMR) 而生成分子離子 MH⁺，因此基質在游離的過程中扮演提供氫離子的角色，

將氫離子提供給分析物。一般常用的基質為具有羧酸基的有機分子，因為其可有效的提供氫離子給分析物進行游離，並帶上電荷。

不同的基質將會影響到分析物在 MALDI-TOF MS 分析時是否會有結果，雖然可依上面的特性做為挑選適合基質的標準，但溶液的混合均勻度、分析物與基質溶液間的莫耳數比例、極性的差異及溶劑揮發的速度等相關的因素，都會對結晶的形成產生影響，而結晶不良將會降低基質傳遞能量給分析物的效率，進而影響到 MALDI 上分析結果。

3.3.3 基質輔助雷射脫附游離法樣品製備方式

樣品的配製中需先配製基質溶液，而基質溶液是將具有吸收特定雷射波長的有機酸溶於水或有機溶劑中配製而成，緊接著取基質溶液約 1~2 μL 與分析物樣品溶液約 1 μL ，採用 1:1 或一定比例均勻混合，最後取約 1 μL 混合液點於樣品盤的樣品點上，在混合的溶液中含有大量的有機酸基質與少量的分析物，在室溫下自然乾燥，等待混合液中的水與有機溶劑揮發後，便會在樣品盤上形成一層固態樣品結晶。

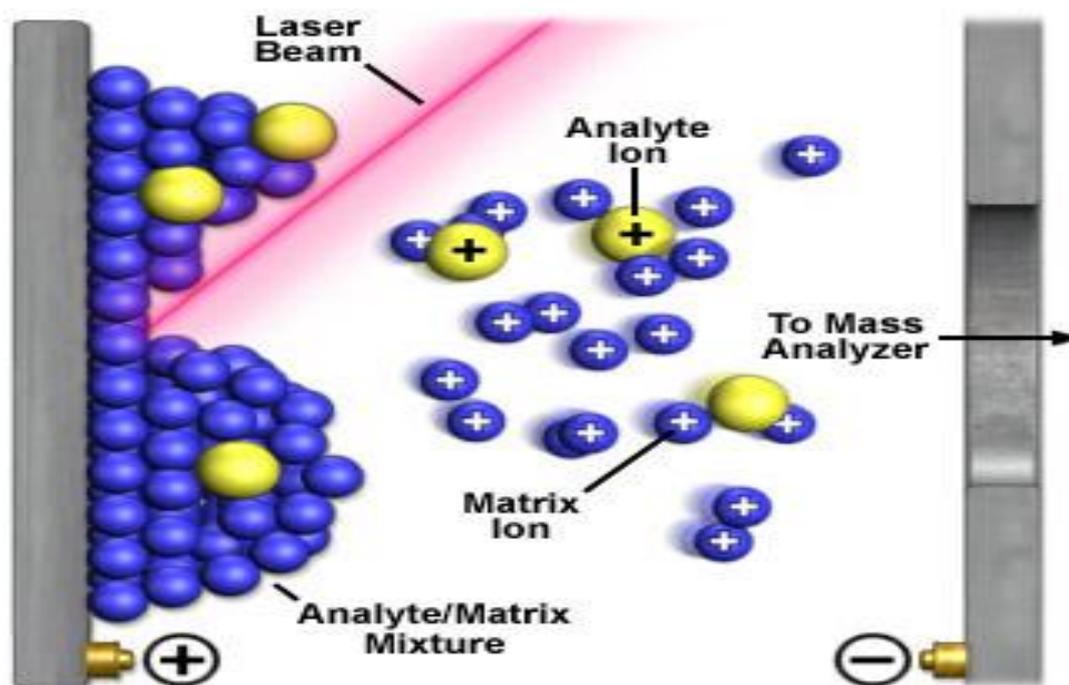
選擇適當的基質與樣品溶液進行調配是分析物在 MALDI 分析中是否獲得到訊號的最重要決定因素。在以往的研究中發現，基質與分析物混合的比例與所使用溶劑的極性的差異與揮發的速度，會對於

分析物的訊號強弱以及結晶的形成在分析結果上產生一定的影響。如，當混合液中分析物的濃度太高時，將使得基質無法有效的隔絕分析物，而無法將雷射能量進行更有效地傳遞，最後造成分析物的離子訊號強度和解析度降低。因此，一般而言，將基質與分析物莫耳濃度比例調控在大約在 100：1 到 50000：1 之間來進行 MALDI 分析，但還是需視欲分析物的特性來做進一步調整比例。

3.3.4 基質輔助雷射脫附游離法離子形成機制

將分析物與基質結晶後的樣品盤，送入質譜儀內，以脈衝式雷射轟射此樣品點，在結晶的基質中含較多的分析物分子，因此，樣品經過脈衝雷射轟射後，大部分的雷射能量會由基質分子所吸收，再傳遞給環繞於基質周圍的分析物分子⁵²。

由【圖五】所示，固態或液態分析物分子在吸收雷射能量的瞬間產生了相轉移現象，由固相直接昇華到氣相，此現象稱為脫附 (desorption)。因為相轉移的速率高於受熱分解的速度，所以分析物分子不會因為受熱而產生分解的現象，得保有分析物分子的完整結構並使其脫附游離成氣相。在這段過程中會同時進行電荷轉移的反應，經過一連串複雜的離子-分子反應發生，使得分析物分子因此帶上電荷，這現象稱為游離(ionization)。



【圖五】基質輔助雷射脫附游離法的離子化示意圖。

(取自 National High Magnetic Field Laboratory)

雷射光是分析物在 MALDI 中進行脫附游離時能量的來源，因此在脫附游離的過程中，並不只是單純地一連串離子-分子反應，其中還包括了能量聚集、光化學反應、氣相中的光游離等。但脫附游離過程的時間短不易觀察，因此不少學者仍在探索其機制中，本論文介紹較為多數人接受的可能游離機制，分為兩大類⁵³：

(1)一次離子形成(primary ion formation)⁵⁴

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)⁵⁵。主要在解釋當高能的能量束撞擊於固相之樣品上時，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渡至氣相態之轉移位能。

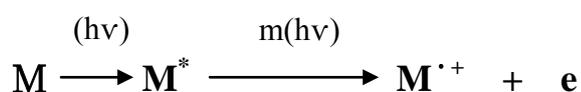
而此過程中由於相轉移的速率快於分析物分子熱分解的速率，因此不會有熱分解的現象發生，使得分析物可保持完整性而不會造成圖譜鑑定上的困擾，此模型可解釋為何在 MALDI 中可產生完整的氣相分子離子。

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^{48,49}，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：



M：基質分子

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：

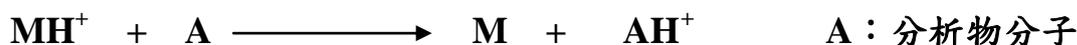


M：基質分子 M*：代表處於激發態中

有關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，方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)⁵⁶

與一次離子不同的地方在於不需經由一次離子形成的過程，即能產生的離子，一般是指分析物離子。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)，此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/mol⁵⁷，而由實驗證明一般蛋白質之質子親合力約為 240 kcal/mol，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，還有電子轉移模型(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二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【表三】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。

3.3.5 飛行時間質量分析儀的原理與構造

MALDI 常搭配飛行時間質量分析器 (time-of-flight mass analyzer) 做為分析器^{58,59,60}，由於所分析的樣品多為大分子量的生化樣品，而 TOF 具有無質量上限與離子利用率高的優點，所以一般多連接 TOF 進行分析。

TOF 的構造基本上為一段中空的飛行長管，一般長度約為 1 ~ 1.5 公尺。當樣品脫附游離形成離子後，離子在 MALDI 游離源及 TOF 飛行管之間的加速區，被施加一加速電壓，使所有的離子在電場下都得到相同的動能，之後進入無磁場力的飛行管進行飄移。由於動能相同，因此各離子間會因為其各自質荷比 (m/z) 的不同而有不同的飛行速度，使其在被偵檢器偵測到的時間有所不同，此時飛行速度與荷質比的關係如下列公式所示：

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

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

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

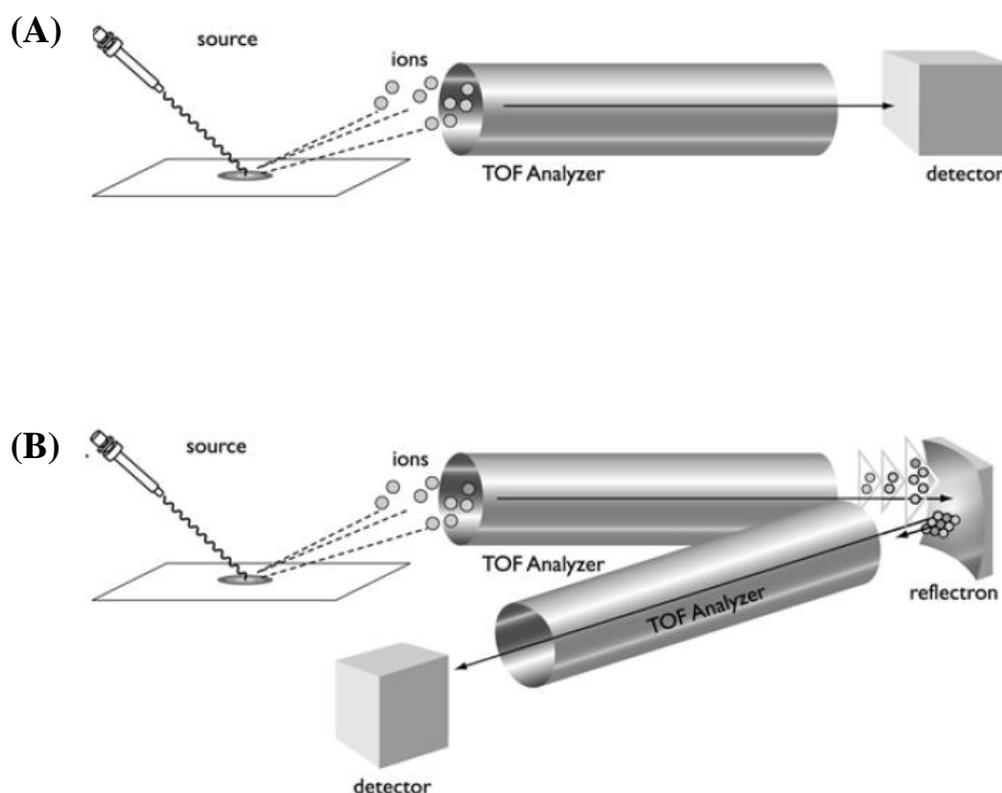
$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \longrightarrow \frac{m}{v} = 2eV \left(\frac{t}{L}\right)^2$$

由上面的公式得知，對於帶有相同電荷的離子而言，分子量越大的離子則飄移速度較慢、飛行時間較長，而較晚到達偵檢器；反之，分子量較小的離子飄移速度較快，飛行時間短而較早抵達偵檢器。一般而言，離子的飛行時間以微秒為單位，因此可以在極短的時間便得到一張質譜圖。

常用的 TOF 機型分為直線型 (linear) 與反射型 (reflective) 兩種，如【圖六】所示，直線型的 TOF 存在著解析度較差的缺點，其主要的原因是因為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不同離子間的只有些微的時間差距，使得同質荷比之離子無法同時到達偵檢器而降低解析度。

而反射型 TOF 主要是在直線型飛行管末端再增加一多組電極^{63,64,65}，使其產生強度遞減的正電場，當正離子在進入此段區域後，因電性相斥的原理而使離子產生減速。當速度降至為零時，再受此正

電場的作用力往反方向進行加速，通過反向的飛行管後由另外一端的偵檢器所偵測到。因此，可以有效地減少動能不同但相同質荷比離子間的速度差異，相較於直線型 TOF 有較高的解析度(resolution)，可達到約一萬以上，但因分析物分子量大小有所不同。



【圖六】(A)直線型；(B)反射型 的飛行時間質譜儀。

(取自 Humana Press 2002 年 Introduction to Proteomics-Tools for the New Biology P.69)

除此之外，反射型 TOF 也可以利用序列式變更反射電場電壓進行類似 MS/MS 功能的游離源後碎裂 (post source decay; PSD)⁶⁴ 技術，主要原理是藉由某些介穩離子 (metastable ions) 在飛行的過程中，因

為離子具有較高的內能導致在飛行時發生碎裂的現象，此時碎裂產生的子離子和母離子的動能不同，但擁有相同的飛行速度，再依據動能不同利用反射型 TOF 加以區分，動能較小的碎裂離子會較快地被電場減速轉彎，而較快抵達偵檢器；反之，動能較大的碎裂離子會較慢抵達偵檢器，可以有效地區分碎裂後的碎裂離子，並得到選定母離子後的子離子質譜圖，進一步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，還有離子遲滯時間法(delayed extraction ; DE)⁶⁵ 技術，主要是用來修正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得解析度降低的情況。原理是當以雷射轟射樣品時，不立刻施加電壓加速，延遲至數十到數百奈秒(ns)之後才開始施加一加速電壓，此方法可使離子起始動能一致化，來提高解析度。

目前的 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 仍為直線、反射可切換式機型，而 W 型與多次折返型是近年新發展出的機型，更能提高儀器的解析能力。

3.3.6 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的優點

現今使用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行實驗分析的情況越來越普及，是偵測聚合物、藥物以及大質量分子的優質儀器

之一，本論文選擇 MALDI-TOF MS 進行 abamectin 的偵測，是其具備以下幾個主要的特點：

(A) 操作簡便、快速且能同時分析多種化合物

將樣品盤送入 MALDI-TOF MS 中，待儀器到達設定的真空值時 (4.5×10^{-6} torr) 後即可開始操作。而從雷射轟射樣品到得到一張圖譜只需數秒的時間，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，非常適合用來鑑定各種化合物。

(B) 需樣品量少且製備簡易

一般來說，只需要將等量的基質溶液和分析物均勻混合，即可完成樣品的製備，最後取 1 μ L 混合液置於樣品盤上的樣品點，在空氣中乾燥後，便可使用 MALDI-TOF MS 的來進行分析。整個過程中僅需的樣品量約數 μ L 即可。

(C) 高靈敏度

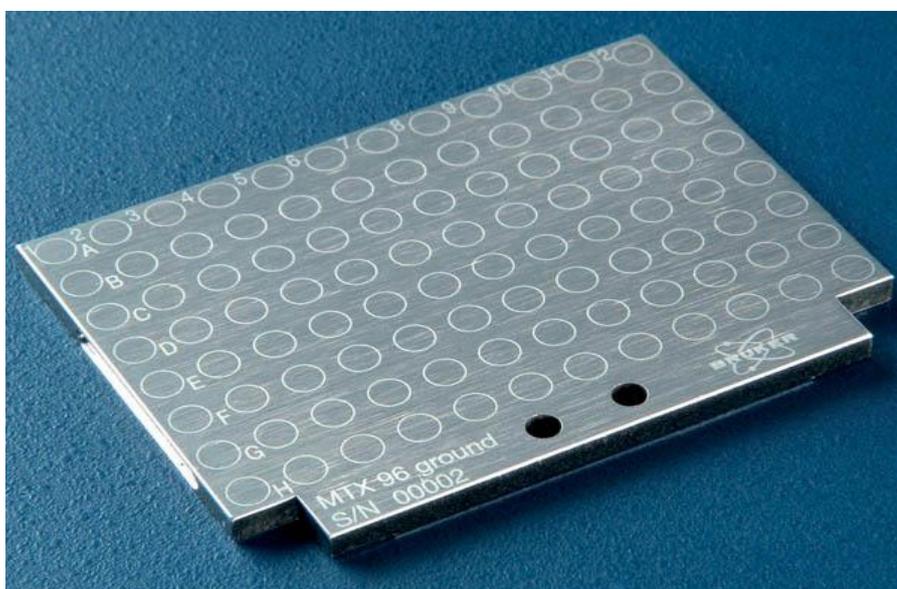
通常在適當的基質與分析物比例下(約 1000:1，分子量越大比例也需提高)，對於一般的生化分子其偵測極限可低至 f mole 的程度，十分適合用來偵測真實樣品中低含量的分析物，可稱得上是個高靈敏的分析方法。

(D) 高質量範圍

因為 MALDI 通常搭配偵測質量無上限的 TOF 分析器一起使用，當偵測高分子量範圍之化合物時，只要選擇適當的基質來輔助分析物脫附游離，即可偵測。以往已有多數的文獻指出可偵測出數百 kDa 左右的巨分子或有機高分子⁶⁵。

(E) 高樣品通量

MALDI 所使用的樣品盤通常能同時點上數十個樣品，如【圖七】為本實驗室所使用的樣品盤類別，一次最多可以同時將 96 個樣品送進 MALDI 進行分析，故可以一次同時偵測多種分析物與多種樣品。



【圖七】 MALDI plate (取自 <http://www.bruker.jp>)。

3.4 儀器設備

1. 基質輔助雷射脫附遊離飛行時間質譜儀：Microflex 型具備波長為 337 nm UV-light 的 N₂ 雷射，Bruker Daltonics 公司，2006 年購入。

基質輔助雷射脫附遊離飛行時間質譜儀是用雷射轟擊樣品與基質形成的結晶，基質從雷射中吸收能量傳遞給分析物，使分析物離子化；在電場作用下加速飛過飛行管，根據到達檢測器時間不同而測定離子的質荷比(m/z)。

2. 螺蓋玻璃離心管：KIMBLE 公司產品。

3. 塑膠離心管 15 mL。

4. 冰箱：SOWA。

5. 離心機：HSIANGTAI。

6. 酸鹼度計：Suntex 公司產品。

7. 超純水機：Barnstead 公司產品。

8. Micropipette：

(1) eppendorf：0.1 ~ 2.5 μL。

(2) Hamiltone：10 μL。

(3) ViPRΩ：100 ~ 1000 μL。

(4) V3-SERIES：20 ~ 200 μL。

9. 0.45 μm Millipore

肆、結果與討論

4.1 萃取效率最佳化

在樣品溶液中，分散式液液微萃取法對於分析物的萃取效率，會受到萃取劑的種類與使用體積、分散劑的種類與使用體積、樣品溶液的 pH 值及離心時間等因素影響。本論文先利用實驗室所配置的 10^{-6} M abamectin 標準水溶液，以分散式液液微萃取法，將分析物由巨量 (5mL) 的水溶液，濃縮萃取至微量 (10 μ L) 的有機萃取溶劑中，探討影響萃取效率的因素，再將實驗所獲得的最佳萃取條件，進一步應用在真實的環境水樣品中 abamectin 分析物的質譜分析，以達到最準確、靈敏的檢測效果。

4.1.1 萃取劑^{67,68}

在分散式液液微萃取實驗中，良好的萃取劑需具備以下條件：

- (一) 萃取劑必須與樣品水溶液不互溶。
- (二) 分析物在萃取劑中須有極高溶解度，才能有好的萃取效果。
- (三) 萃取劑的密度必須大於水，才能以高速離心機將無機相的樣品水溶液與有機相的萃取劑分離，在離心管底部形成沉積液。

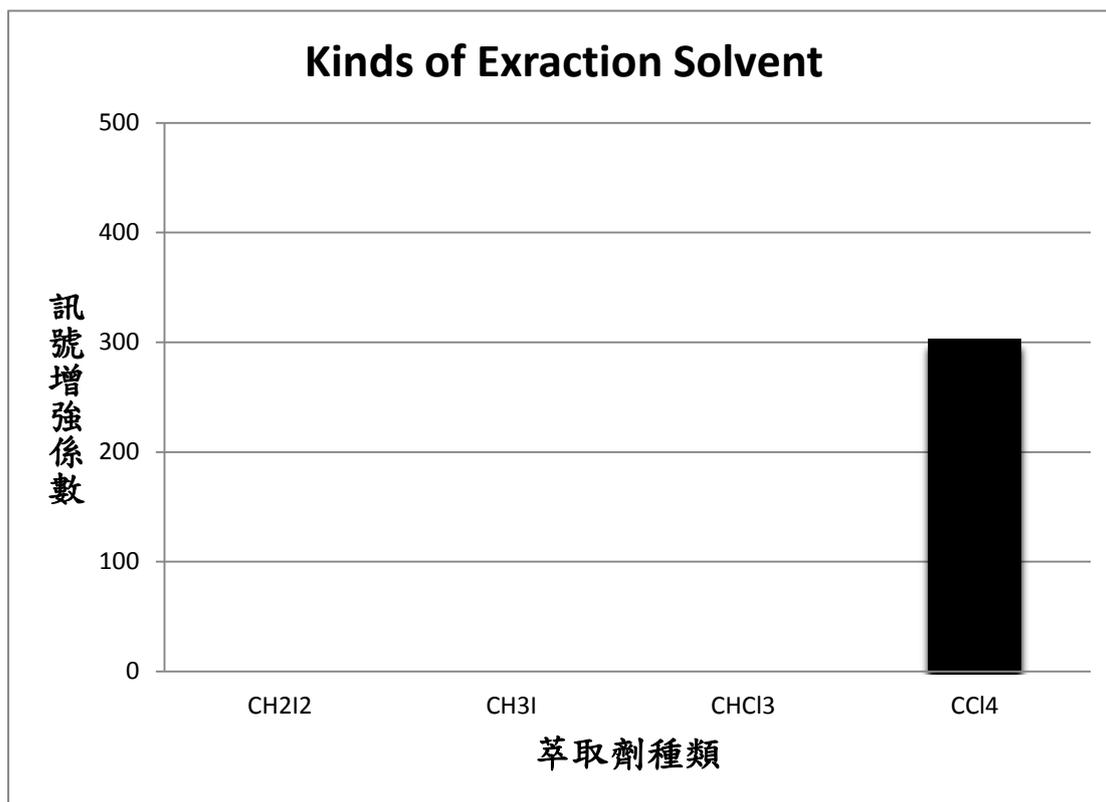
參考有關於分散式液液微萃取的文獻^{67,68}，通常以密度高於水含鹵素的有機溶劑如氯仿(CHCl_3)、四氯化碳(CCl_4)、二碘甲烷(CH_2I_2)或鹵苯(halogen benzene)等做為萃取劑。在分散式液液微萃取實驗中，選擇良好的萃取劑種類，可以提升樣品溶液中分析物的萃取效率。另外，萃取劑的使用體積也會影響到萃取效率、濃縮倍數及進行質譜偵測時所獲得的訊號增強係數之數值大小，當所使用的萃取劑體積太多時，會稀釋分析物在萃取劑中的濃度，造成質譜的偵測訊號強度降低；當所使用的萃取劑體積過少時，則不易經由離心機的離心作用形成沉積液，無法獲得分析物的萃取溶液進行質譜分析。因此，適當的萃取劑體積使用量也是影響萃取效率的重要因素之一。

本實驗將先針對萃取劑的種類，再針對萃取劑體積的使用量，進行分散式液液微萃取的實驗，探討這個實驗因素對於分析物萃取效率的影響。首先選擇以下四種密度均高於水、含有鹵素的有機溶劑做為萃取劑，其密度如下：

- (一) 二碘甲烷(Diiodomethane, CH_2I_2 ；密度：3.325 g/mL)
- (二) 碘甲烷(Methyliodide, CH_3I ；密度：2.28 g/mL)
- (三) 氯仿(Choroform, CHCl_3 ；密度：1.48 g/mL)
- (四) 四氯化碳(Carbon tetrachloride, CCl_4 ；密度：1.58 g/mL)

實驗的進行步驟是先以 1.00 mL 的四氫呋喃做為分散劑，再分別以上述的四種有機溶劑 10.00 μL 做為萃取劑，將兩者混合後，以注射針快速注入到 5.00 mL 10^{-6} M 的分析物 abamectin 標準溶液中，經過高速離心以後，取出離心管底部含有分析物的萃取沉積液，再以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行分析，所得的實驗結果如【圖八】所示。以 CH_2I_2 、 CH_3I 和 CHCl_3 做為萃取劑時，離心後發現並無任何沉積液的形成，無法進行分析物的質譜檢測；而以 CCl_4 做為萃取劑時，離心後會有沉積液產生，經由質譜儀所測得的分析物訊號增強係數，比沒有經過分散式液液微萃取前，分析物在標準溶液中 (10^{-6} M) 所測得的數據，提升約 300 倍左右，證明以 CCl_4 做為分散式液液微萃取法的萃取劑時，對於分析物 abamectin 具有極佳的萃取效果，而以 CH_2I_2 、 CH_3I 和 CHCl_3 做為萃取劑時，萃取效果極差。

因此，本論文選擇以 CCl_4 做為最佳的萃取劑，進行分散式液液微萃取實驗。



【圖八】萃取劑對於訊號增強係數的影響。

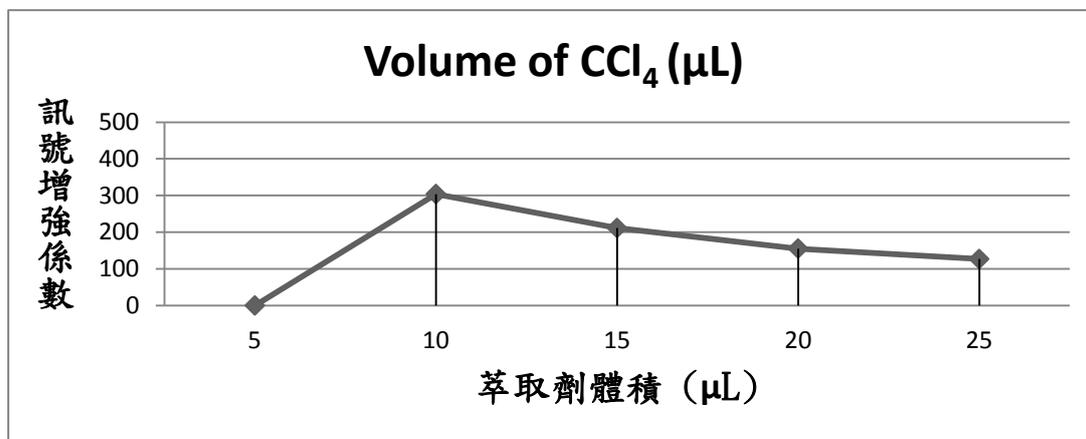
實驗條件：

1. 取 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 標準溶液。
2. 萃取劑分別各取 10.00 μ L，分散劑為 1.00 mL 四氫呋喃。
3. 3100 r.p.m. 離心 10 分鐘。

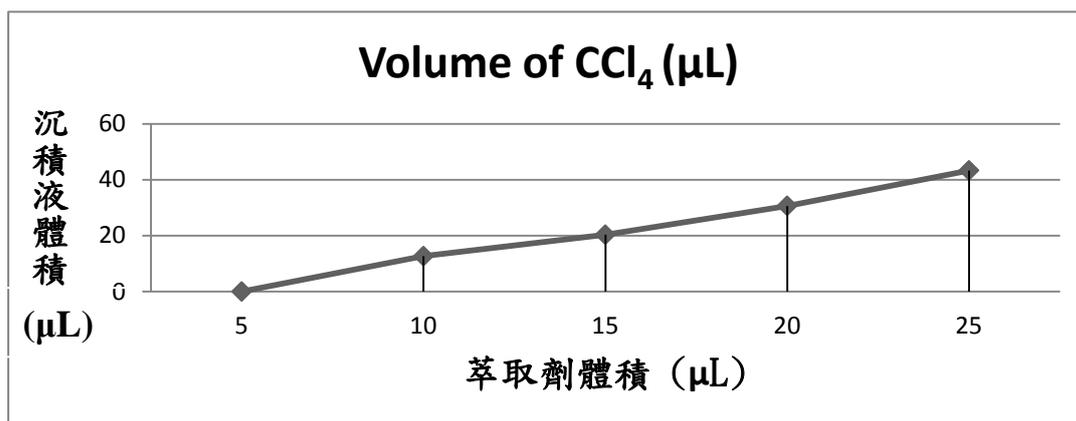
影響分散式液液微萃取法對於分析物的萃取效率，除了選擇良好的萃取劑種類外，萃取劑體積的使用量，也是重要的影響因素之一。本實驗將針對最佳的萃取劑使用量進行探討。首先，取 1 mL 的四氫呋喃溶劑，分別與 5.00 μL 、10.00 μL 、15.00 μL 、20.00 μL 及 25.00 μL 的萃取劑 CCl_4 混合，再以注射針快速注入到 5.00 mL 的 10^{-6} M abamectin 標準溶液中，經過離心以後，取出沉積液，進行質譜分析，所獲的實驗結果如【圖九】所示。當萃取劑的使用量為 10.00 μL 時，對於分析物 abamectin 在樣品水溶液中，具有最佳的萃取效率，訊號增強係數達到最大值（300 倍）；若萃取劑的體積增加（如【圖九】；25 μL ），所測得的 abamectin 訊號增強係數則隨之下降，顯示使用過多的萃取劑體積會降低分析物的萃取效率，推測造成此結果的原因，可能為經過離心以後所獲得的沉積液，除了含有萃取劑以外，也可能包含了部份的分散劑，使得離心後的沉積液體積增加，如【圖十】所示，萃取劑體積增加沉積液的體積也隨之增加，導致分析物的濃度被過多的體積稀釋，造成訊號增強係數下降。另外，由【圖十】的結果也發現，當萃取劑的使用體積太少（5.00 μL ）時，離心後並無任何沉積液的產生，可能因為萃取劑完全溶於分散劑中的緣故，導致沒有任何萃取效果。

綜合以上述的實驗結果，本論文選擇以 CCl_4 做為最佳的萃取劑，

以 10.00 μL 做為最佳的萃取劑體積使用量。



【圖九】萃取劑體積對訊號增強係數的影響。



【圖十】萃取劑體積與沉積液體積關係圖。

實驗條件：

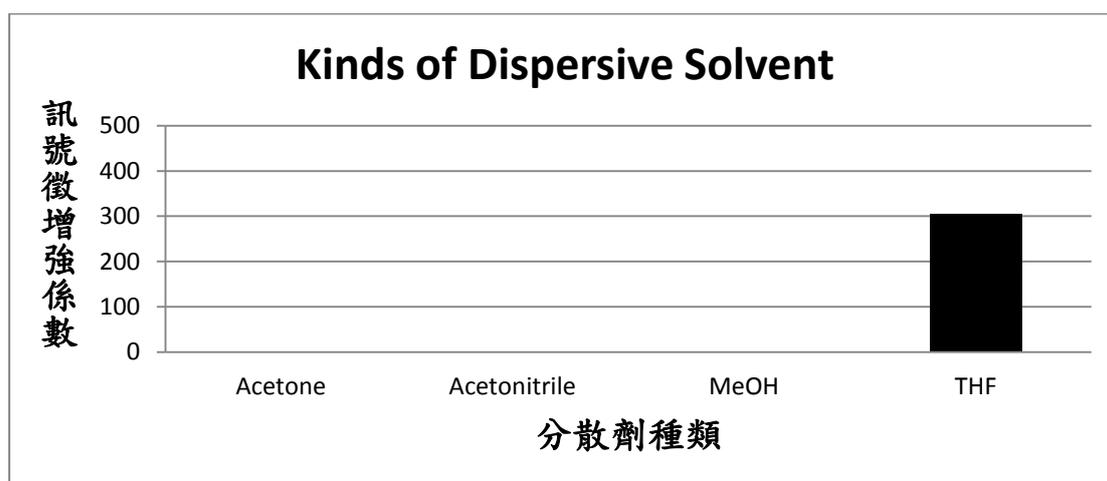
1. 取 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 標準溶液。
2. 萃取劑 CCl_4 分別各取 5.00 μL 、10.00 μL 、15.00 μL 、20.00 μL 及 25.00 μL ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 每個實驗數據重複測三次：相對標準偏差(RSD)介於 0.5 ~ 3.8 %

4.1.2 分散劑

在分散式液液微萃取的實驗中使用分散劑的主要功能是做為萃取劑與樣品水溶液之間互溶的橋梁，幫助兩者進行混合，增加萃取劑與分析物的接觸面積，提高萃取效率。因此，選擇最佳的分散劑種類，必須考慮分散劑與萃取劑、水溶液之間的互溶性；另外，所選用的分散劑也必須能讓萃取劑在水溶液中均勻的分散為微小液滴，使得水溶液呈現白色混濁狀。在過去的文獻中^{67,68}，最常使用的分散劑種類包括甲醇(methanol)、丙酮(acetone)、乙腈(acetonitrile)和四氫呋喃(tetrahydrofuran; THF)等。本論文選擇以上四種常用的分散劑，進行最佳分散劑種類的測試。

首先以 10.00 μL 的 CCl_4 做為萃取劑，分別以上四種不同的分散劑 10.00 mL，將萃取劑與分散劑混合後，以注射針快速注入到 5.00 mL 的 10^{-6} M abamectin 標準溶液中，經過高速離心之後，取出底部的沉積液，再以質譜儀進行分析物的檢測分析，所得的實驗結果如【圖十一】所示。在實驗的過程中發現，雖以甲醇、丙酮或乙腈做為分散劑，可以產生白色的混濁狀現象，然而經過離心以後卻無法產生任何萃取劑的沉積液，導致使用這些種類的分散劑進行分散式液液微萃取實驗，對於分析物並沒有達到任何萃取的效果；反之，使用四氫呋喃做為分散劑時，經過離心以後，可以獲得萃取劑的沉積液，在送入質

譜儀中，進行質譜分析，可以得到分析物的訊號增強係數，比沒經過分散式液液微萃取前，提升約 300 倍以上，具有最佳的萃取效果。使用不同種類的分散劑對於分析物的萃取效果會有如此大的差異性，推測其可能的原因為甲醇、丙酮或乙腈的親水性過高，導致萃取劑與水溶液的互溶性提高，無法經由離心產生沉積液；反之，四氫呋喃的親水性較低，可以成功地將分析物由 5.00 mL 的水溶液中，萃取並濃縮至 10.00 μL 的 CCl_4 萃取劑中，經離心後形成沉積液，得到極佳的萃取效果如【圖十一】。因此本論文選擇四氫呋喃為最佳分散劑。



【圖十一】分散劑對於訊號增強係數的影響。

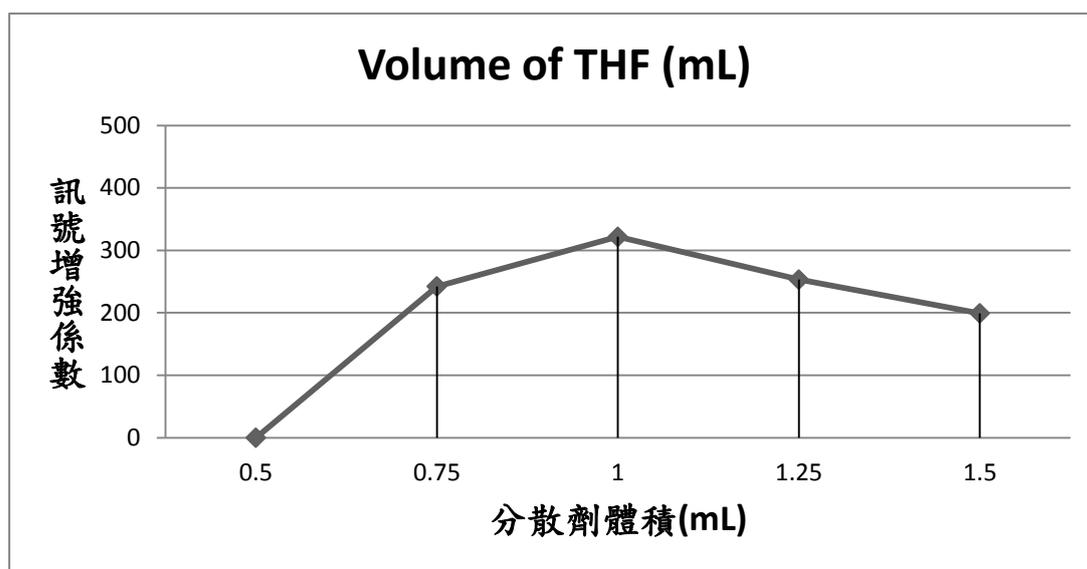
實驗條件：

1. 取 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 標準溶液。
2. 萃取劑為 10.00 μL 的 CCl_4 ，分散劑分別各取 1.00 mL。
3. 3100 r.p.m.，離心 10 分鐘。

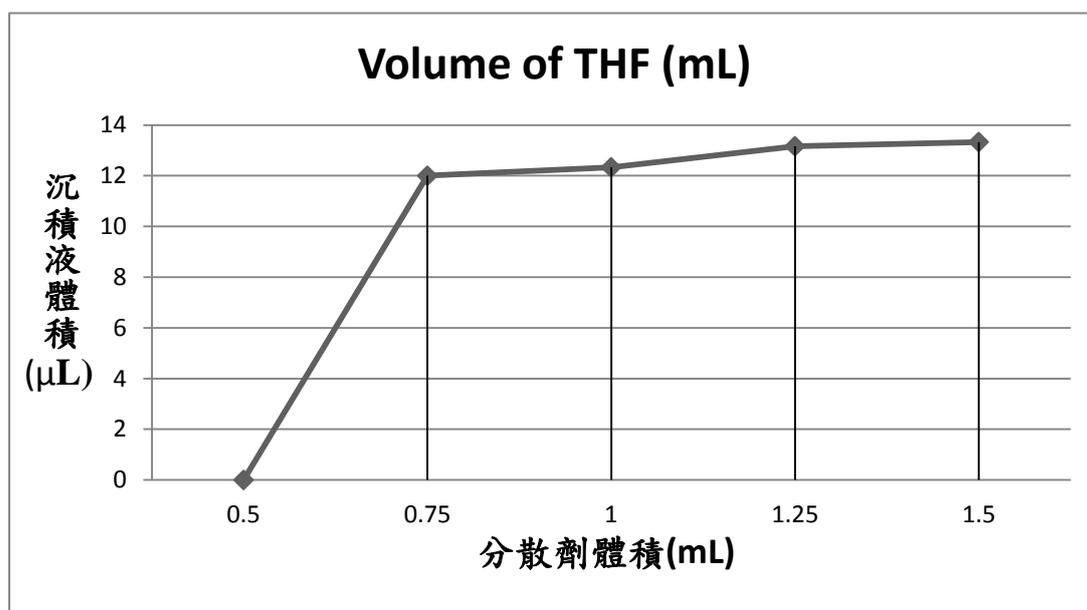
分散劑的使用量對於分析物的萃取效率也是一個重要的影響因素，其使用量會大大影響到萃取劑在水溶液的分散情形。當分散劑使用量太少時，注入樣品水溶液後，會形成較大的液滴，使得萃取劑在水溶液的分散情形變差，導致萃取效率下降。但當分散劑的使用量過大時，可能會增加分析物溶於分散劑的情況，不利於萃取劑效率的提升。因此，本實驗將探討不同的萃取劑使用量，對於萃取效率的影響，以獲得分散式液液微萃取實驗，最佳的分散劑使用量。

首先固定萃取劑 CCl_4 的使用量為 10.00 μL ，分別搭配 0.50 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.25 mL 或 1.50 mL 的四氫呋喃做為分散劑，以注射針快速注入到 5.00 mL 的 10^{-6} M abamectin 標準溶液中，經過離心以後，取出沉積液，再以質譜儀進行分析，探討不同的分散劑體積對於分析物的萃取效率影響。實驗結果如【圖十二】及【圖十三】所示。當分散劑的使用量為 0.50 mL 時，因為體積過小，無法使萃取劑均勻的分散在樣品水溶液中，經過離心以後並沒有任何沉積液的產生如【圖十三】，無法測得任何質譜訊號如【圖十二】。另外，當分散劑的使用量為 1.25 mL 或 1.00 mL 時，因為體積過大，造成訊號增強係數如【圖十二】與回收率如【圖十四】的下降，推測其可能的原因乃是因為 abamectin 化合物對於四氫呋喃分散劑具有一定的溶解，如果分散劑的體積增加，分析物溶於分散劑的量增多，溶於萃取劑的減少，

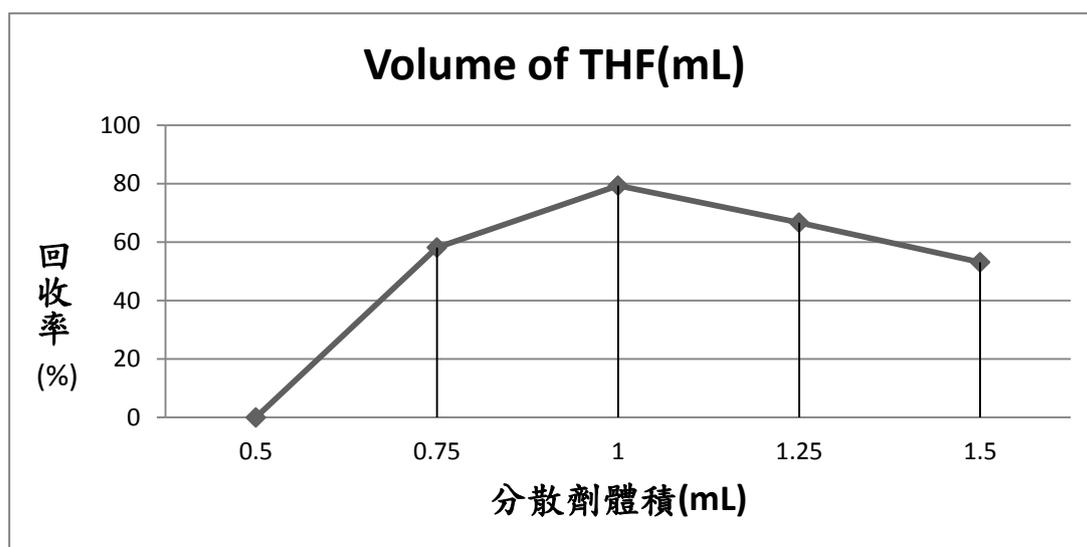
導致分析物的質譜訊號增強係數與回收率降低。綜合以上的數據發現，以 1.00 mL 的四氫呋喃搭配 10.00 μL 的萃取劑 CCl_4 ，對於分析物 abamectin 可以獲得最佳的萃取效果。



【圖十二】分散劑體積對於訊號增強係數的影響。



【圖十三】分散劑體積與沉積液體積關係圖。



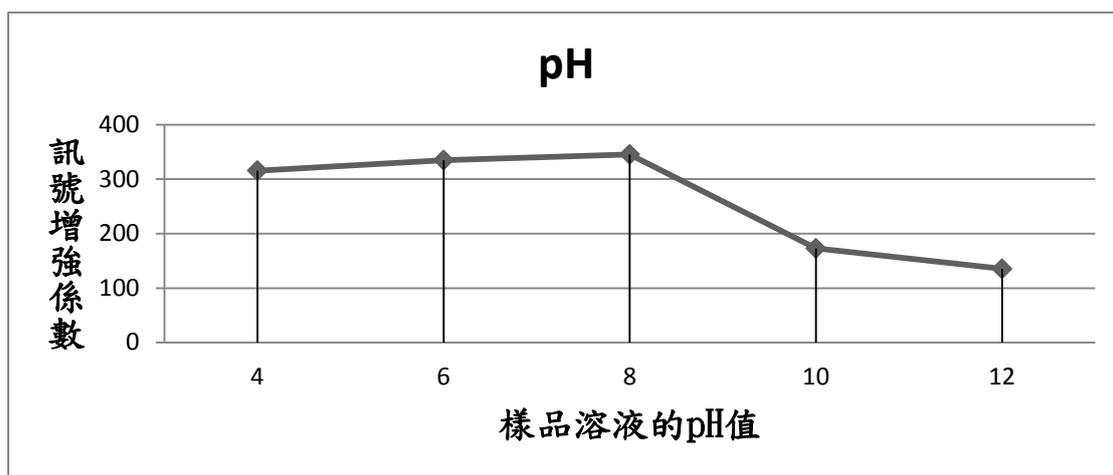
【圖十四】分散劑體積與樣品回收率的影響。

實驗條件：

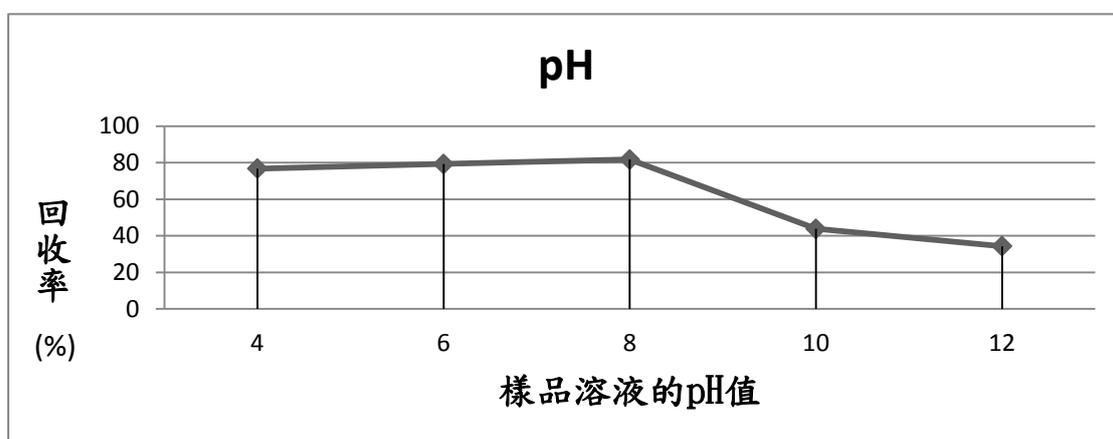
1. 取 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 標準溶液。
2. 萃取劑為 10.00 μ L 的 CCl_4 ，分散劑四氫呋喃分別取 0.50 mL、0.75 mL、1.00 mL、1.25 mL 及 1.50 mL。
3. 每個實驗數據重複測三次：相對標準偏差(RSD)介於 3 ~ 7.3 %。

4.1.3 樣品溶液的 pH 值

對於分析物 abamectin 而言，在不同的 pH 值溶液中可能使其化學結構產生解離現象，而 DLLME 實驗是以分配作用的原理，將分析物由無機相的樣品水溶液，萃取至有機相的萃取溶液中，當分析物受到溶液中 pH 值的影響，而以不同形式的分子或離子形態存在時，會使得萃取的效果與回收率受到影響。因此，本實驗將探討樣品水溶液的 pH 值，對於萃取的效率所造成的影響。根據過去所發表的文獻⁶⁹指出，abamectin 化合物在酸性(pH 值小於 3) 與(pH 值大於 9)的環境中，較容易產生水解的現象。本實驗將樣品溶液的 pH 值調整在 4 到 12 之間，以 pH 值每增加 2 為間隔做設定，進行分析物的萃取效率檢測分析，實驗所獲的結果如【圖十五】及【圖十六】所示。當樣品水溶液的 pH 值為 10 或 12 時，分析物 abamectin 在鹼性的溶液中容易解離，萃取效率明顯地下降；當樣品溶液的 pH 值調整在 4 與 8 之間時，分析物的結構較為穩定，不易產生解離的現象，萃取效率較佳，所測得的分析物訊號增強係數最高，只有略微的差異，實驗結果顯示，當樣品溶液的 pH 值為 8 時，所得到的萃取效率，略優於 pH 值為 6 或 4 的萃取效率，因此，本論文選擇以 pH 值等於 8，做為樣品溶液的最佳萃取條件。



【圖十五】樣品溶液的 pH 值對訊號增強係數的影響。



【圖十六】樣品溶液的 pH 值對樣品回收率的影響。

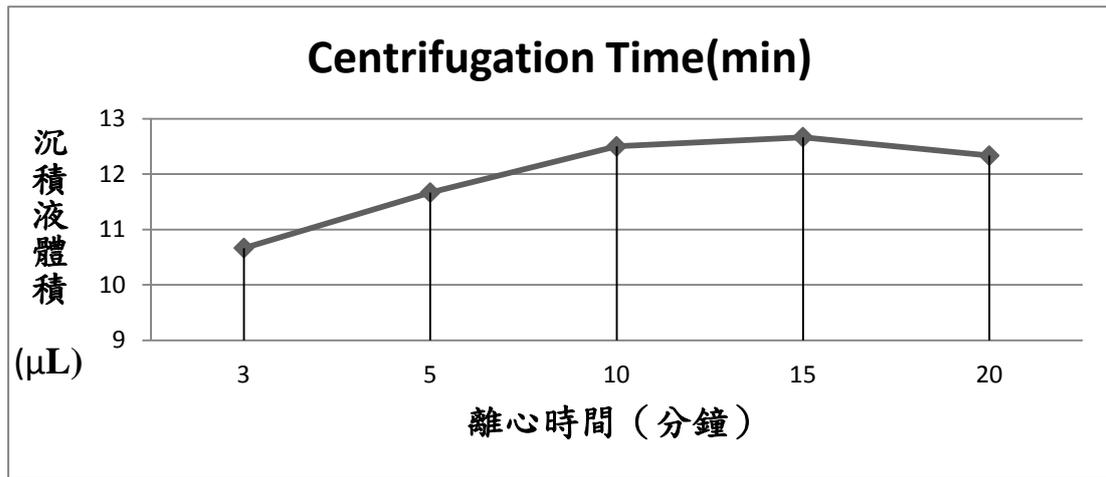
實驗條件：

1. 取 pH 4、6、8、10 和 12 的 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 的標準溶液。
2. 萃取劑為 10.00 μ L 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 每個實驗數據重複測三次：相對標準偏差(RSD)介於 0.7 ~ 7.4 %。

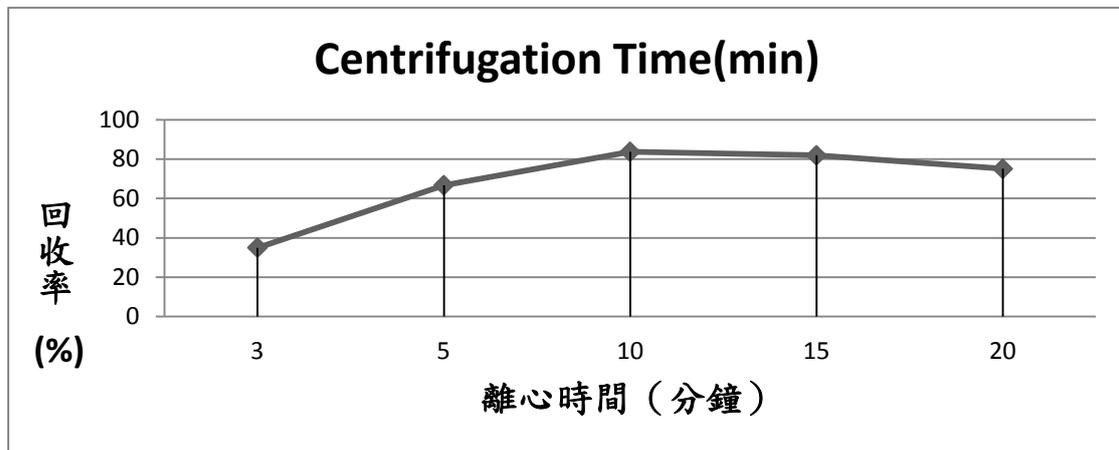
4.1.4 離心時間⁷⁰

在分散式液液微萃取的實驗中，利用高速離心機所產生的離心作用，可以將密度較大的萃取劑與密度較低的水溶液分離，而離心時間的長短關係到所能離心下來的萃取劑體積，當離心時間過短時，可能離心作用不完全，無法形成大量的沉積液，導致萃取效率下降；當離心的時間過長時，所有的萃取劑均已形成沉積液，對於萃取效率的提升沒有實質的幫助。

本實驗中，將探討離心時間的長短，對於萃取效率的影響。以 3100 r.p.m. 轉速的高速離心機，分別設定離心時間為 3、5、10、15 及 20 分鐘進行測試，從【圖十七】及【圖十八】得知，當離心時間大於 10 分鐘時，沉積液的體積【圖十七】及分析物的回收率【圖十八】均達到最大值，代表密度較大的萃取劑，經由離心作用均已在離心管底部形成沉積液，萃取劑與水溶液已經達到完全的分離效果；反之，當離心時間小於 10 分鐘時，沉積液的體積及分析物的回收率均呈現下降的情況，顯示離心時間太短，無法有效地將所有在水溶液中的萃取劑給離心下來，使得沉積液體積減少，導致樣品回收率也降低；因此本論文選擇 10 分鐘為最佳的離心時間。



【圖十七】離心時間對沉積液體積的影響。



【圖十八】離心時間對樣品回收率的影響。

實驗條件：

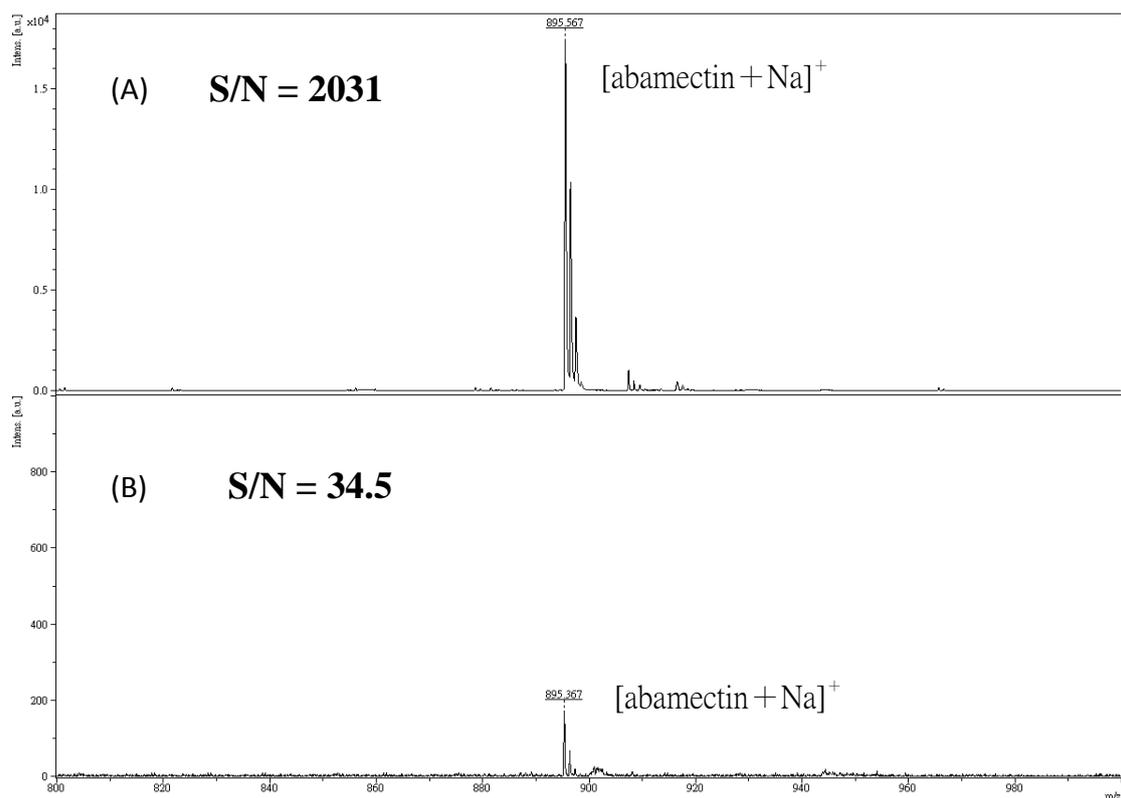
1. 取 5.00 mL 10^{-6} M abamectin 標準溶液。
2. 萃取劑為 10.00 μ L 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 離心時間分別設定為 3、5、10、15、20 分鐘。
4. 每個實驗數據重複測三次：相對標準偏差(RSD)介於 2.2%~3.2%

4.1.5 分散式液液微萃取的最佳實驗條件

綜合前面分散式液液微萃取實驗所得到的最佳萃取條件，將其結果表列於【表四】。由表中得知以 10.00 μL 的 CCl_4 做為萃取劑搭配 1.00 mL 的四氫呋喃為分散劑，調整樣品溶液的 pH 值為 8，在 3100 r.p.m. 轉速下離心 10 分鐘，最後再經由質譜儀進行分析物的檢測分析，可以獲得最佳的實驗結果如【圖十九】所示，當樣品溶液經過 DLLME 方式萃取後，質譜所測得的分析物訊號 $[\text{abamectin} + \text{Na}]^+$ ($M/Z=895$)，訊號雜訊比(S/N ratio)大幅地提升，S/N 值由未經 DLLME 萃取前的 34.5(圖 B)提升到經過 DLLME 後的 2031(圖 A)，S/N 值增加將近 60 倍之多，證明此分析技術具有良好的萃取與濃縮效果。

【表四】分散式液液微萃取的最佳實驗條件。

DLLME 實驗參數	最佳化條件
萃取劑	CCl_4
萃取劑體積	10 μL
分散劑	THF
分散劑體積	1 mL
溶液 pH 值	8
離心時間	10 min.



【圖十九】 10^{-6} M abamectin 標準溶液(A)經過 DLLME 萃取後；(B) 未經過 DLLME 萃取所測得的質譜圖。

實驗條件：

1. 取 pH 8 的 10^{-6} M abamectin 標準溶液 5.00 mL。
2. 萃取劑為 10.00 μ L 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 於 3100 r.p.m. 離心時間分別設定為 10 分鐘。

4.2 質譜樣品的製備

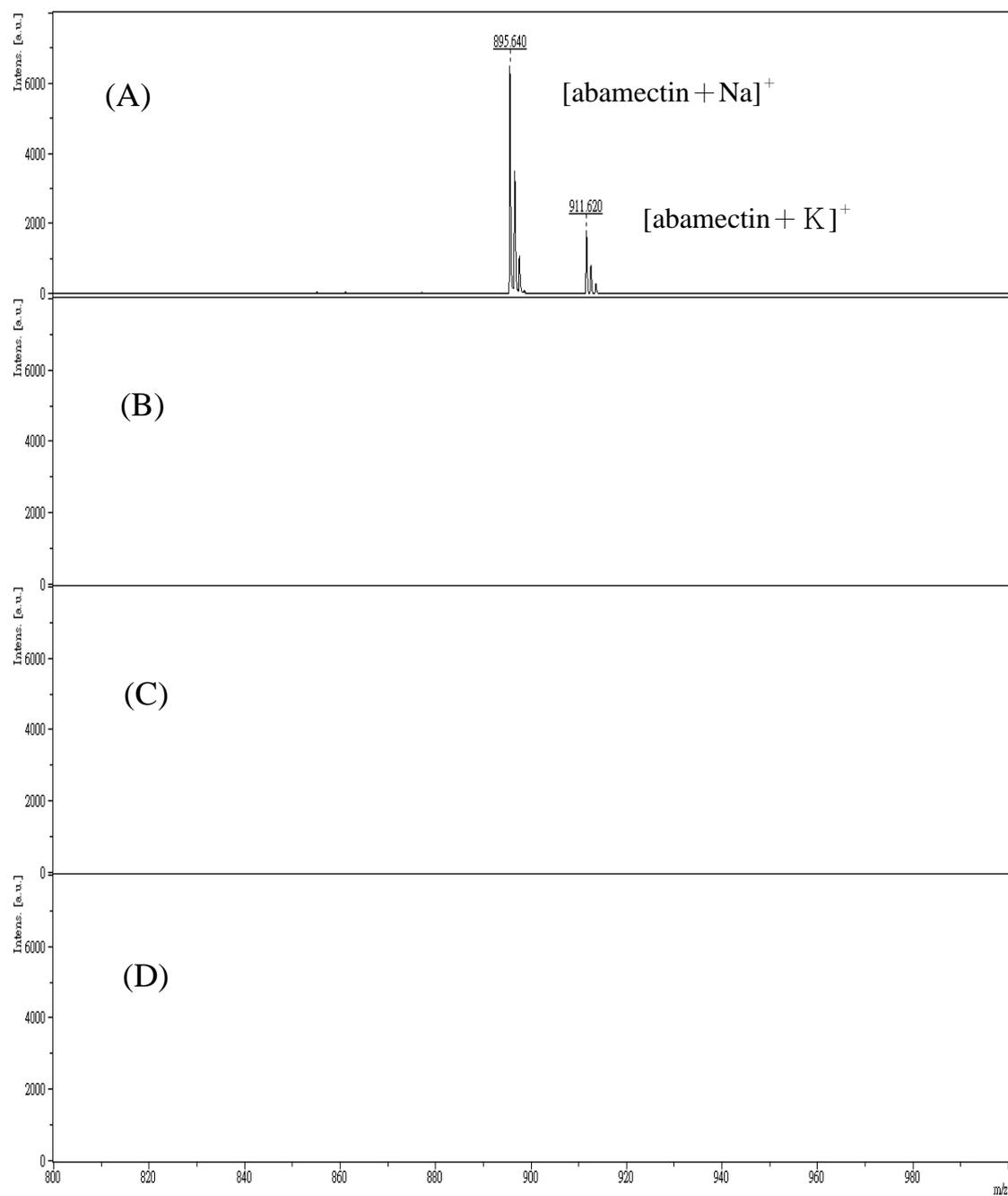
4.2.1 基質選擇

由於各種待測分析物其化學結構上的差異，對於基質輔助雷射脫附游離飛行時間所使用的基質，存在著不同的離子化效率，因此，在檢測分析物之前，必需找出最適合個別分析物所使用的基質；舉凡基質與樣品的互溶程度、傳遞雷射能量給分析物的效率、結晶的均勻度等，都是選擇一個適合的基質必須考慮的因素。常使用的基質為無機態的奈米膠體金屬離子以及有機態的有機酸基質如 α -CHCA、DHB 及 SA 等。

應用 MALDI-TOF MS 進行質譜分析時，若以有機酸做為基質，在低於 500 Da 的質量範圍，容易產生圖譜干擾，基質本身所形成的質譜訊號可能與分析物訊號產生重疊或抑制的現象，使得 MALDI-TOF MS 在分子量低於 500 Da 的化合物檢測分析上備受限制。為了改善此應用上的限制，在有關的文獻中^{71,72,73}提出，利用奈米膠體金屬粒子溶液，取代有機酸做為基質的概念，在小分子的範圍內，只有金屬離子的相關質譜訊號。以改善於 500 Da 所產生的圖譜干擾現象。因此近年來常以奈米膠體金屬粒子做為基質，應用 MALDI-TOF MS 分析分子量低於 500 Da 的化合物。然而對於 abamectin 而言，其分子量為 873.1 g/mol 大於 500 Da，選擇有機酸

做為基質進行質譜分析時，不會在其分析的範圍內產生嚴重的圖譜干擾，因此本實驗將利用各種常用的有機酸做為基質，進行分析物的檢測，探討不同的基質對分析物的質譜訊號所造成的影響。

【圖二十】為在相同的雷射強度下以有機酸 α -CHCA、DHB、SA 及奈米膠體金粒子做為基質時，對於分析物 abamectin 進行質譜分析所獲得的結果，由圖中發現除了 圖(A) 以有機酸 α -CHCA 做為基質，所測得的質譜圖，可以明顯看到分析物的訊號以外，圖(B)、圖(C) 及圖(D)均沒有任何分析物的訊號產生。以 α -CHCA 為基質時，可能是因為 abamectin 化合物對於 Na^+ 與 K^+ 的親和力較 H^+ 來的強，所形成的質譜訊號以 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $m/z=895.1$ 以及 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 、 $m/z=911.1$ 為主。並沒有出現 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的訊號；而以 DHB、SA 及奈米膠體金粒子做為基質時，沒有產生 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 與 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 等分析物的訊號，推測其原因可能因為一些基質與分析物所形成的結晶效果不佳或是因為基質本身無法有效的傳遞雷射能量給予分析物 abamectin 所導致，因此本論文選擇 α -CHCA 做為最佳的基質，進行 MALDI-TOF MS 的質譜檢測分析實驗。



【圖二十】以不同的基質 (A) α -CHCA (B) DHB;(C) SA 及 (D) 奈米膠體金粒子偵測 abamectin 化合物所獲得的質譜圖。

實驗條件：

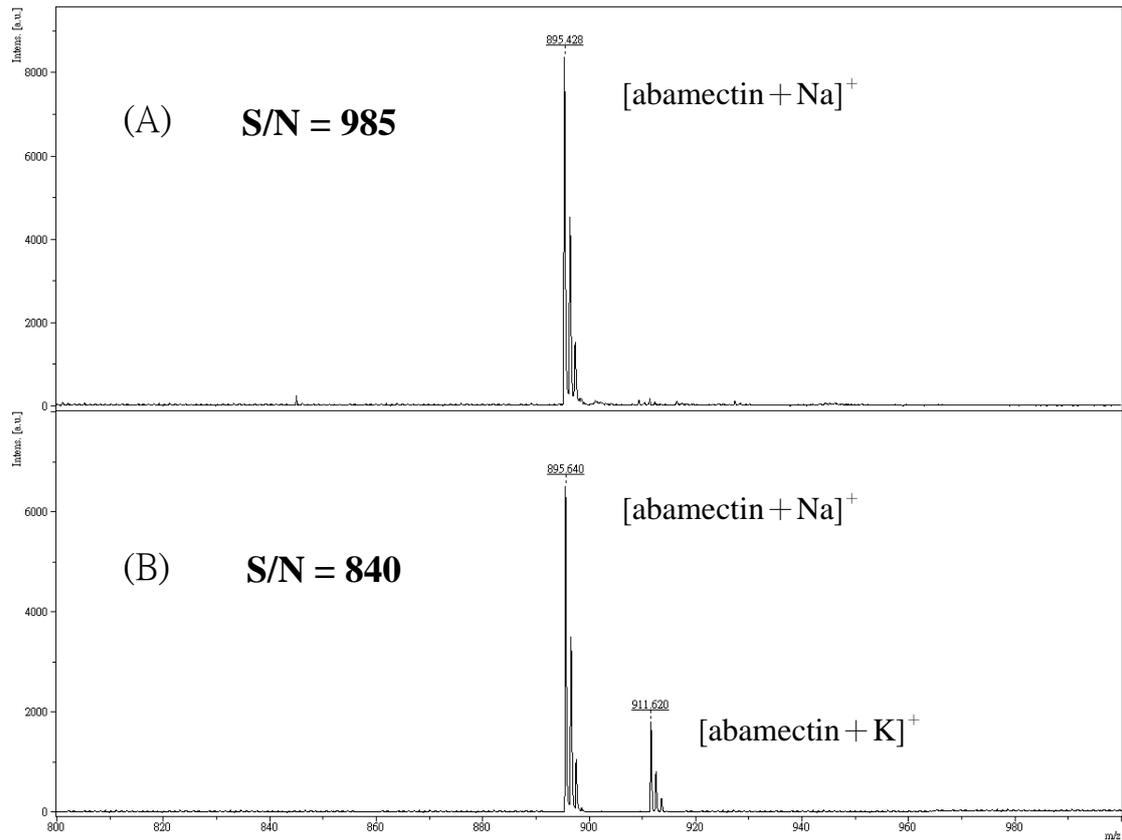
1. 取 10^{-4} M abamectin 標準溶液與等量基質混合。
2. 每個基質做三次重複。

4.2.2 添加鈉離子溶液

由【圖二十】的結果發現以 α -CHCA 做為基質 圖(A)，所測得的分析物質譜訊號，以 $[M+Na]^+$ 與 $[M+K]^+$ 為主，而 $[M+Na]^+$ 的訊號強度比 $[M+K]^+$ 的訊號強度高出將近 4 倍之多，代表 abamectin 化合物較容易與 Na^+ 結合。因此，在 abamectin 的標準溶液中，添加適量的 Na^+ 溶液，可以提供更多的 Na^+ 來源。有助於增加 $[M+Na]^+$ 的質譜訊號強度，以提升分析物 abamectin 的偵測靈敏度。

本實驗將以 10 mM 的 NaH_2PO_4 水溶液，做為鈉離子的添加溶液，以增加 abamectin 與鈉離子結合的機率，進而提升分析物所產生的 $[M+Na]^+$ 質譜訊號強度。

在相同的分析物濃度 (10^{-4} M) 條件下，比較有添加與未添加鈉離子溶液，所測得的質譜圖，如【圖二十一】所示。由圖中顯示以 10 mM 的 NaH_2PO_4 水溶液，做為鈉離子的添加溶液，所測得的 $[M+Na]^+$ 訊號強度接近 9000 圖(A)、S/N 值約 1000 明顯高於只以去離子水、未添加鈉離子溶液配製成的標準溶液所測得的質譜訊號強度 6000 圖(B)、S/N 值約 800，因此，本論文以 10 mM 的 NaH_2PO_4 水溶液做為鈉離子添加溶液，可以有效提升分析物的靈敏度。



【圖二十一】 (A)以 10 mM 的 NaH_2PO_4 水溶液 (B)以去離子水配製成 10^{-4} M 的 abamectin 標準溶液所測得的質譜圖。

實驗條件：

1. 取 10^{-3} M abamectin 標準溶液與 NaH_2PO_4 水溶液與去離子水稀釋到 10^{-4} M。
2. 每個基質做三次重複。

4.2.3 以 seed-layer 方式製備樣品

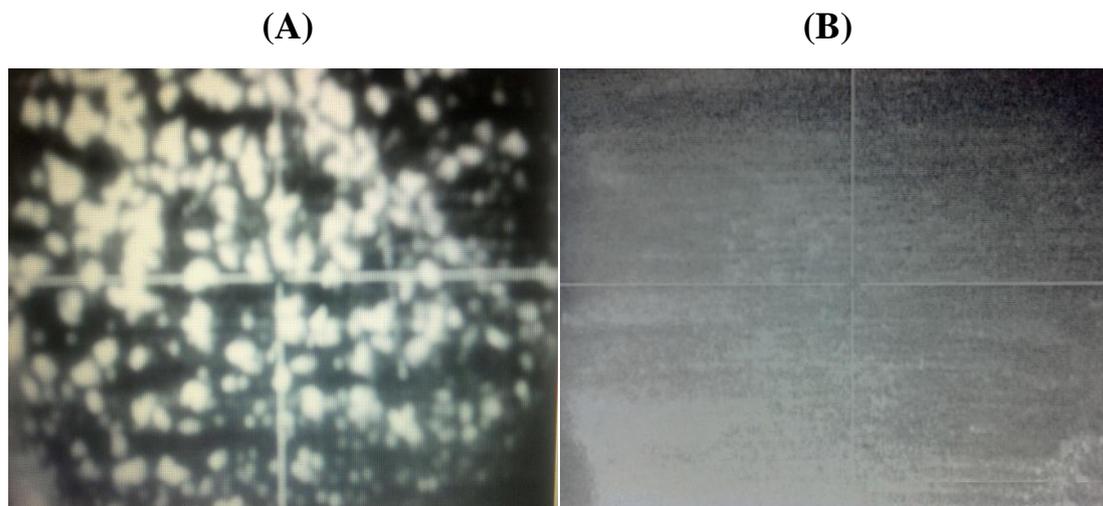
使用 MALDI-TOF MS 做質譜檢測時，常因為在樣品盤上放置分析物的樣品點與點在雷射轟擊的範圍內，再現性不佳，使得進行分析樣品的定量檢測時，相對誤差值差異極大，主要的原因是因為製備分析樣品的方式是將有機酸基質與分析物直接混合後，在空氣中靜置自然乾燥，但此方式所形成的分析物結晶情況容易有分佈不均勻，產生集中點(sweet spot)的現象，使得分析物的訊號強度，再現性極差無法獲得良好的偵測效果。

為了改善傳統的質譜樣品製備方式(dried-droplet)容易產生集中點的缺點，Patrik 等人⁷²在 1999 年發表了一種稱為 seed-layer 的樣品配製方式，使分析物的結晶情況可以達到均勻化的效果，並有效地改善傳統的樣品製備方式雷射轟擊點與點之間再現性差的缺點。根據該文獻的研究結果顯示，使用此種質譜樣品的配製方式，所測得的內標檢量線 RSD 值約為 3%。

本實驗將比較傳統的樣品製備方式與新開發出來的 seed-layer 的方式，對於分析物的質譜訊號所產生的影響。以 seed-layer 的方式製備樣品，是將 1.0 μL 的 α -CHCA 飽和溶液，點到樣品盤上，等待自然乾燥後，形成一層薄薄的結晶，再以微量注射針抽取 1.0 μL 含有分析物與基質 α -CHCA 等量混合的溶液，點於此結晶層上，待自

然乾燥後便會形成均勻的結晶如【圖二十二】。

比較傳統的 dried-droplet 與新的 seed-layer 方式製備質譜樣品，發現以 dried-droplet 方式製備樣品，待自然乾燥後，所得到結晶情況十分地不均勻如圖(A)，相較於以 seed-layer 方式製備質譜樣品，所得到結晶現象十分均勻如圖(B)，沒有大量的集中點產生。因此，本論文的實驗中將採用 seed-layer 的方式製備樣品，再送入質譜儀檢測分析。

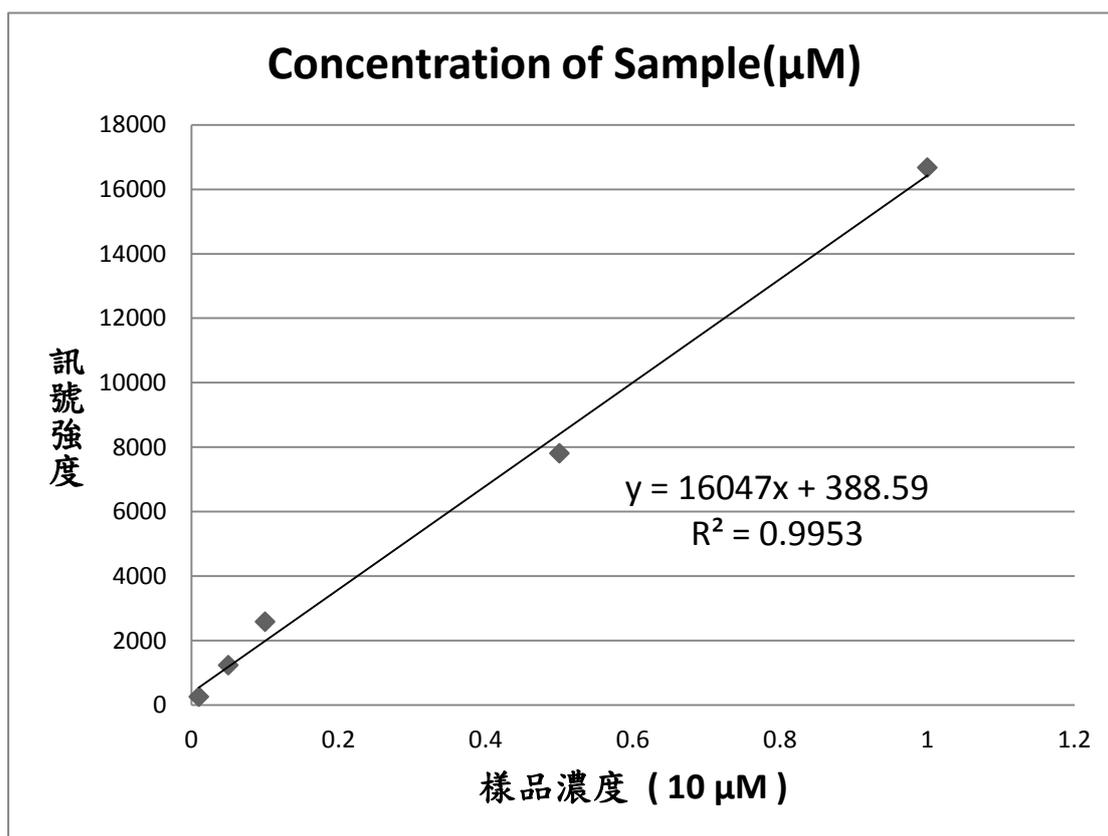


【圖二十二】以(A) dried-droplet; (B) seed-layer 方式配製質譜樣品，待乾燥後所形成的結晶情形。

(圖擷取自 MADLI 儀器操作視窗)

4.3 標準溶液的檢量線與偵測極限

將本論文所獲得的最佳實驗條件，應用於標準溶液中分析物的檢測，以探討分析物的檢量線及偵測極限。實驗的過程如下，將 1.00 mM 的 abamectin 標準溶液，稀釋成 0.01 μ M、0.05 μ M、0.10 μ M、0.50 μ M 及 1.00 μ M 的待測溶液，再分別進行 DLLME 的萃取濃縮，並以質譜儀偵測分析物所形成的訊號強度，製成分析物的檢量線，每一個濃度的標準溶液重複測量三次，實驗結果如【圖二十三】所示。在經由 DLLME 萃取濃縮後，對不同濃度的 abamectin 標準溶液與所測得的訊號強度之間，呈現極佳的線性關係，其相關係數值(R^2)為 0.9953；另外，經計算所得的相對標準偏差值介於 0.4 至 6.9%之間。由【圖二十三】的實驗結果也可以發現分析物的偵測極限(limit of detection, LOD)以訊號雜訊比為 3 時，其所對應的濃度，約為 0.72 ng/mL 與定量極限(limit of quantitation, LOQ) 以訊號對雜訊比為 10 時，其所對應的濃度，約為 2.40 ng/mL。



【圖二十三】 abamectin 標準溶液的檢量線。

實驗條件：

1. 取 pH 8 的 10^{-6} M~ 10^{-8} M abamectin 標準溶液 5.00 mL。
2. 萃取劑為 10.00 μL 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 於 3100 r.p.m. 離心時間分別設定為 10 分鐘。

4.4 環境水樣品的質譜檢測

4.4.1 樣品的前處理^{75,76}

取自苗栗縣西湖溪，上游有種植大片柑橘果園附近的溪水，以棕色玻璃瓶於河川中央處採集表層水，樣品除了可能含有待測的分析物以外，尚有懸浮固體、氨氮、有機鹽類與無機鹽類等複雜的基質，以上各項物質對於分析物的偵測，會有基質干擾的情形產生，使得在應用分散式液液微萃取法時，萃取劑由環境水樣品中，除了能夠萃取 abamectin 化合物以外，也會將這些複雜的基質成份連帶地萃取下來，導致分析物的偵測訊號強度受到基質的干擾而降低，因此，在微量的定量分析實驗中，必需對樣品進行妥善的前處理，以降低基質的干擾，使得分析物的萃取效率以及質譜儀的偵測訊號強度可以有效地提升。

本論文所採用的樣品前處理方法，過程極為方便、簡單，首先是將溪水樣品以重力過濾法進行過濾後，再以 0.45 μm 濾膜過濾，並取一部分的濾液以 1:1 的方式與 NaH_2PO_4 溶液混合，配製成待測的樣品水溶液。

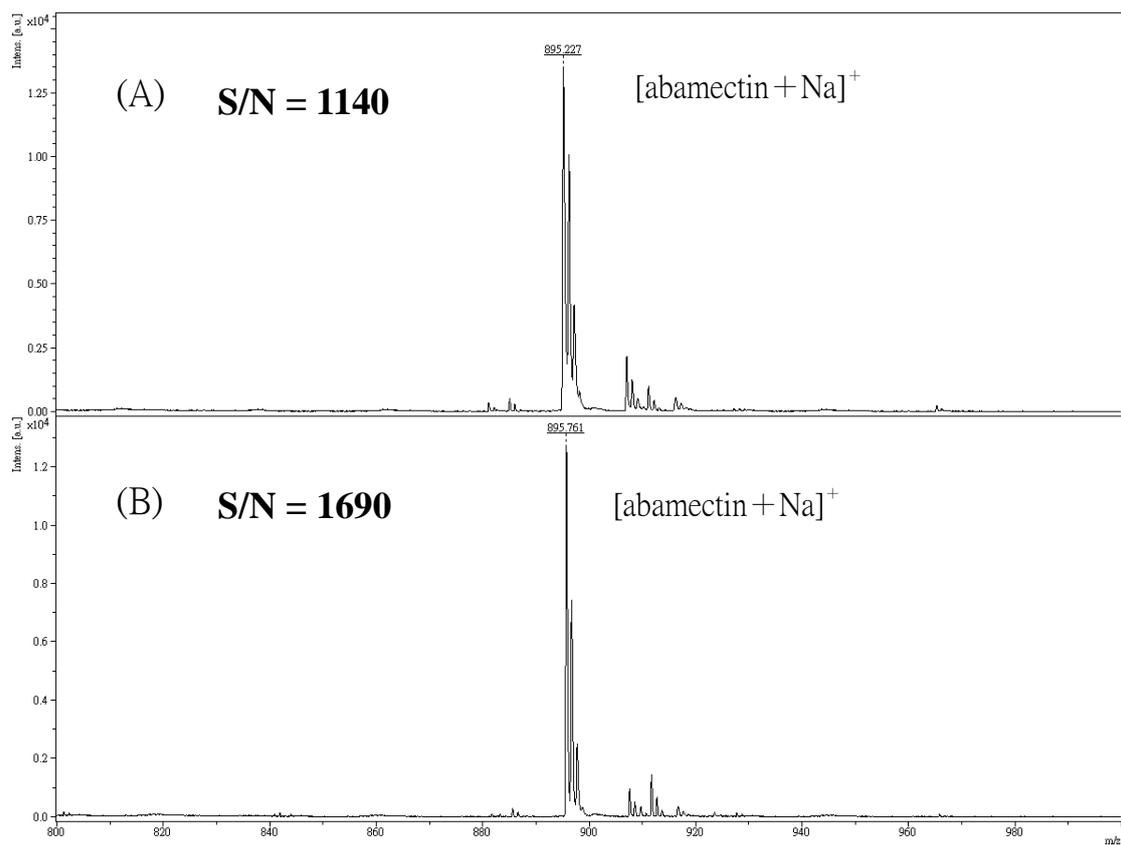
4.4.2. 質譜檢測

由苗栗縣西湖溪上游所採集的溪水樣品，經過樣品前處理之後，以分散式液液微萃取法及 MALDI-TOF MS 進行分析檢測，發現並未

檢驗出任何 abamectin 化合物的成份。推測其原因可能是因為該流域附近的農耕戶並未使用該種農藥，或許是因為採樣的時間已是柑橘類農作物採收的末期，距離噴藥期已有一段時間，導致溪水中殘留的 abamectin 含量，低於本論文所提出的檢測方法之偵測極限 0.72 ng/mL，而無法測得任何分析物的訊號。

為了印證本論文所提出的分析方法，能夠應用在真實的溪水樣品檢測上，選擇以額外添加標準品到真實溪水的方式，測試添加微量分析物之後的溪水樣品，所獲得的偵測效果，實驗過程如下：

首先將 10^{-3} M 的 abamectin 標準溶液，以經過前處理的溪水稀釋成 10^{-6} M 的待測樣品溶液；另外，以未經前處理的溪水樣品，直接將 10^{-3} M 的 abamectin 標準溶液稀釋成 10^{-6} M 的待測樣品溶液。以上兩種樣品溶液經由 DLLME 萃取後，再以 MALDI-TOF-MS 進行偵測分析。所獲得的實驗結果如【圖二十四】所示。由圖中顯示，不論是經過樣品前處理或是沒有經過樣品前處理，都可以測得明顯的 abamectin 質譜訊號 $[M+Na]^+$ 、 $m/z=895$ ；由圖中也發現，經過樣品前處理所測得的分析物訊號強度圖(B)，S/N 值提升了 1.4 倍左右，表示所採用的樣品前處理方法，可以有效地降低基質干擾的因素，獲得較佳的偵測結果。



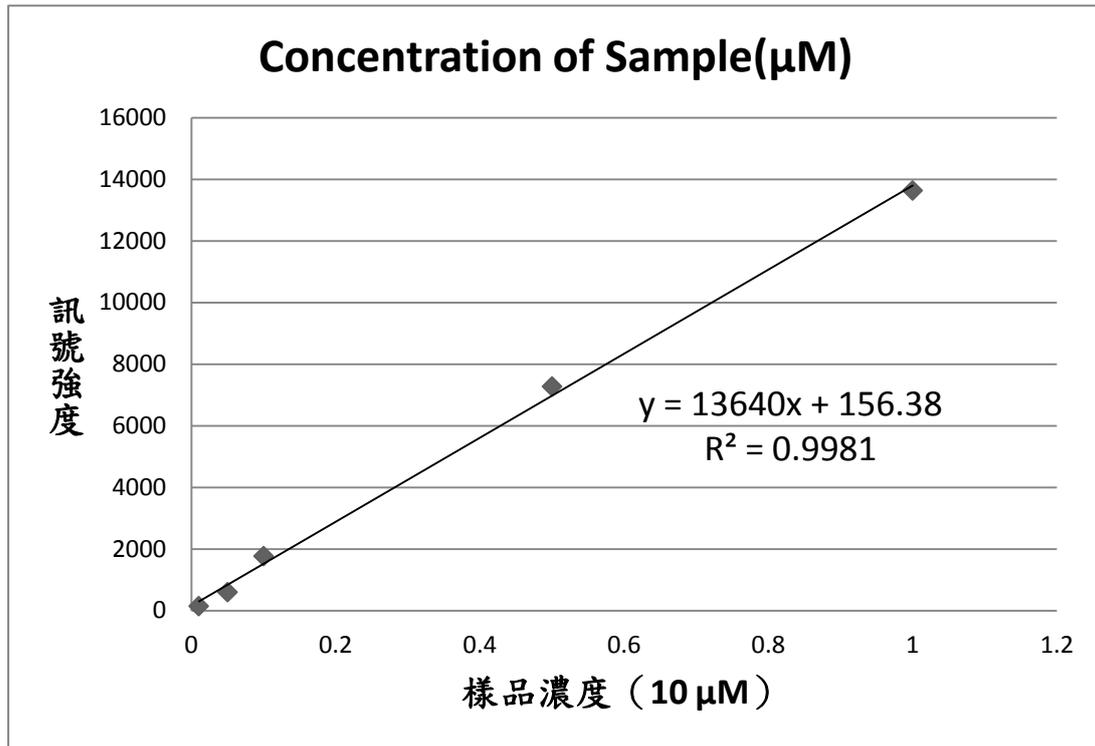
【圖二十四】 添加 abamectin 標準溶液的溪水樣品(A)沒有經過 (B) 經過樣品前處理所測得的質譜圖。

實驗條件：

1. 取 10^{-6} M abamectin 樣品水溶液 5.00 mL。
2. 萃取劑為 10.00 μ L 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 於 3100 r.p.m. 離心時間分別設定為 10 分鐘。

4.4.3 環境水樣品的檢量線與偵測極限

以取自苗栗縣西湖溪上游的溪水，將 10^{-3} M abamectin 標準溶液稀釋成濃度 0.01 μM 、0.05 μM 、0.10 μM 、0.5 μM 、1.00 μM 的樣品溶液，製作環境水樣品 abamectin 化合物的檢量線，所測得的結果如【圖二十五】所示。由分析物的檢量線得知，所測得的分析物濃度與質譜訊號強度之間，具有良好的線性關係；相關係數值(R^2)為 0.9982，代表本論文所提出的偵測方法，可以應用在 abamectin 化合物濃度介於 0.01 μM 至 1.00 μM 的溪水樣品檢測。此外，以 S/N 比值等於 3，所計算得到的分析物偵測極限為 2.20 nM (約 1.92 ng/mL)，此一偵測極限低於虹鱒魚 96 小時的 LC50 值 3.6 ng/mL，具有實際的應用價值。



【圖二十五】環境樣品中 abamectin 的檢量線。

實驗條件：

1. 取 10^{-6} M~ 10^{-8} M abamectin 樣品水溶液 5.00 mL。
2. 萃取劑為 10.00 µL 的 CCl_4 ，分散劑為 1.00 mL 的四氫呋喃。
3. 於 3100 r.p.m. 離心時間分別設定為 10 分鐘。

伍、結論

本論文所採用的分散式液液微萃取技術具有簡易、操作時間短、有機溶劑用量少以及高濃縮率等優點，搭配具有高樣品通量及快速分析等優點的基質雷射脫附游離飛行時間質譜儀，可以成功地偵測分析微量的 abamectin 化合物；經由 seed-layer 方式製備質譜樣品，能夠提高實驗的再現性；此一分析技術應用在 abamectin 標準溶液，具有良好的線性關係與極佳的偵測極限。

對於真實的溪水樣品檢測，透過簡易的過濾方法，做為環境水樣品的前處理方式，可以有效地偵測到溪水中的微量 abamectin 化合物的，具有良好的線性關係，而偵測極限低於水中魚類 96 小時的 LC50 值，提供了一個新的快速、準確的分析方法。

相較於其他的萃取方法來說，使用分散式液液微萃取法，能夠大幅地減少有機溶劑的使用量，但本論文所提的分析方法，需使用四氯化碳做為萃取劑。而四氯化碳對於生態的影響甚大，將來希望可以朝綠色化學的發展方向加以改進，以取代傳統的鹵素有機溶劑，降低鹵素萃取劑對生態所造成的衝擊。

陸、參考文獻

1. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S, “Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation” *Antimicrob Agents Chemother.* 1979, 15, 361-367.
2. Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schönberg G, Jacob TA, “Ivermectin: a potent new antiparasitic agent” *Science.* 1983, 221, 823-828.
3. Terence RR, David HH, “Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides ” *The Royal Society of Chemistry.* 1998, 79-103.
4. Burts EC, “SN 72129 and Avermectin B1, Two New Pesticides for Control of Pear Psylla, *Psylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae).” *Journal of Economic Entomology.* 1985, 78, 1327-1330.
5. Lasota JA, Dybas RA, “Abamectin as a pesticide for agricultural use. ” *Acta Leiden.* 1990, 59, 217-225.
6. Qiao K, Liu X, Wang H, Xia X, Ji X, Wang K, “Effect of abamectin on root-knot nematodes and tomato yield.” *Pest Manag Sci.* 2012, 68, 853-857.
7. Mitchell WC, Saul SH, “Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA.” *Review of Agricultural Entomology.* 1990, 78, 923-930.
8. Wright JE, “Biological Activity of Avermectin B1 Against the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). ” *Journal of Economic Entomology.* 1984, 77, 1029-1032.
9. Molento MB, Nielsen MK, Kaplan RM, “Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins - current situation. ” *Vet Parasitol.* 2012, 185, 16-24.

10. Campbell WC, “History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents.” *Curr Pharm Biotechnol.* 2012, 13, 853-865.
11. Borko C, Marc I, Pogacnik M, Erzen NK, Flajs VC, “Tolerance of therapeutic doses of abamectin and doramectin in Istrian Pramenka sheep.” *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005, 52, 525-528.
12. Bowen JM, Vitayavirasak B, “Contractile activity and motility responses of the dog heartworm *Dirofilaria immitis* to classical anthelmintics and other compounds.” *Vet Parasitol.* 2005, 134, 183-188.
13. Forbes AB, “A review of regional and temporal use of avermectins in cattle and horses worldwide.” *Vet Parasitol.* 1993, 48, 19-28.
14. Fisher MH, “Recent advances in avermectin research Pure & App.” *Chern.* 1990, 62, 1231-1240.
15. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Cully DF, “Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes.” *Mol. Pharmacol.* 1991, 40, 368-374.
16. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Schaeffer JM, Cully DF, “Expression of a glutamate activated chloride current in *Xenopus* oocytes with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin.” *Mol. Brain Res.* 1992, 15, 339-348.
17. Lasota JA, Dybas RA, “Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control.” *Annu. Rev. Entomol.* 1991, 36, 91-117.
18. Schaeffer JM, Haines HW, “Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*: a two-state model for the avermectin binding site. *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38, 2329-2338.
19. 89.5.30 行政院農業委員會 89 農糧字第 890020475 號公告.

20. Hsu DZ, Hsu CH, Huang BM, Liu MY, “Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats.” *Toxicol.* 2001, 165, 189-193.
21. Löwenstein M, Loupal G, Baumgartner W, Kutzer E, “Histology of the skin and determination of blood and serum parameters during the recovery phase of sarcoptic mange in cattle after avermectin (Ivomec) treatment.” *Appl. Parasitol.* 1996, 37, 77-86.
22. Pesticide Ecotoxicity Database Of Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA
23. Novelli A, Vieira BH, Cordeiro D, Cappelini LT, Vieira EM, “Espíndola ELLethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*.” *Chemosphere.* 2012, 86, 36-40.
24. Mohammed AA, “Effect of an Insecticide Abamectin on Some Biochemical Characteristics of Tilapia Fish (*Oreochromis Niloticus*).” *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.* 2011, 6, 62-68.
25. Cobin JA, Johnson NA, “Liquid chromatographic method for rapid determination of total avermectin B1 and 8,9-Z-avermectin B1 residues in apples.” *JAOC Int.* 1995, 78, 419-423.
26. Li J, Qian C, “Determination of avermectin B1 in biological samples by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with UV detection.” *JAOC Int.* 1996, 79, 1062-1067.
27. Diserens H, Henzelin M, “Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography.” *J Chromatogr A.* 1999, 833, 13-18.
28. Yoshii K, Kaihara A, Tsumura Y, Ishimitsu S, Tonogai Y, “Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry.” *J Chromatogr A.* 2000, 896, 75-85.

29. Valenzuela AI, Popa DS, Redondo MJ, Mañes J, “Comparison of various liquid chromatographic methods for the analysis of avermectin residues in citrus fruits.” *J Chromatogr A*. 2001, 918, 59-65.
30. Danaher M, O’Keeffe M, Glennon JD, “Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO₂ with in-line trapping on basic alumina.” *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001, 761, 115-123.
31. St Onge LM, Dolar E, Anglim MA, Least CJ Jr, “Improved determination of phenobarbital, primidone, and phenytoin by use of a preparative instrument forextraction, followed by gas chromatography.” *Clin Chem*. 1979, 25, 1373-1376.
33. Arthur CL, Pawliszyn J, “Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers.” *Anal. Chem*. 1990, 62, 2145–2148.
33. Prosen H, Lucija ZK, “Solid-phase microextraction.” *TrAC trends in analytical chemistry*. 1999, 18, 272-281.
34. Liu H, Dasgupta PK, “Analytical chemistry in a drop solvent extraction in a microdrop.” *Anal. Chem*. 1996, 68, 1817-1821.
35. Liu W, Lee HK, “Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes.” *Anal. Chem*. 2000, 72, 4462-4467.
36. Teja AS, and Eckert CA, “Commentary on supercritical fluids: research and applications.” *Ind. Eng. Chem. Res*. 2000, 39 , 4442–4444.
37. McHugh MA, Krukonic VJ, “Supercritical Fluids Extractions: Principles and Practice, 2nd ed.” 1994, Butterworths-Heinemann, Boston.
38. Dohrn R, Brunner G, “High-pressure fluid-phase equilibria: experimental methods and systems investigated (1988 ~ 1993),” *Fluid Phase Equilibria*. 1995, 106, 213–282.
39. Barker SA, Long AR, Short CR, “Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion.” *J Chromatogr*. 1989, 475, 353-361.

40. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction." *J. of Chrom. A* 2006, 1116, 1-9.
41. Posthumus MA, Kistemker PG, Meuzelaar HLC, "Laser Desorption Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules." *Anal. Chem.* 1978, 50, 985-991.
42. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F, "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules." *Anal. Chem.* 1985, 57, 2935-2939.
43. 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.
- .
44. 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 Commun. Mass Sp.* 1988, 2, 151-153.
45. Karas M, Hillenkamp F, "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal. Chem.* 1988, 20, 2299-2301.
46. Caldwell KL, Murray KK, "Mid-infrared matrix assisted laser desorption ionization with a water/glycerol matrix." *Appl. Surf. Sci.* 1998, 127, 242-247.
47. Fitzgerald M, Parr G, Smith L, "Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides." *Anal. Chem.* 1993, 22, 3204-3211.
48. Juhasz P, Costello CE, Biemann K, "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry with 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic Acid Matrix." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4, 399-409.
49. 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, 472-480.

50. Bahr U, Karas M, Hillenkamp F, Fresenius J, "Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry." *Anal. Chem.* 1994, 348, 783-791
51. 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 Commun. Mass Sp.* 1990, 4, 293-296.
52. 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.
53. Zenobi R, Knochenmuss R, "Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry." *Mass Spectrom. Rev.* 1998, 17, 337-366.
54. Knochenmuss R, "Ion formation mechanism in UV-MALDI." *Analyst.* 2006, 131, 966-986
55. Sunner J, "Ionization in Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)." *Org. Mass Spectrom.* 1993, 28, 805-823.
56. 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 Commun. Mass Sp.* 1996, 10, 405-408.
57. Harrison AG, "The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides." *Mass Spectrometry Rev.* 1997, 16, 201-217.
58. Breemen RBV, Snow M, Cotter RJ, "Time-Resolved Laser Desorption Mass Spectrometry. I. Desorption of Preformed ions." *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1983, 49, 35-50.
59. Osteriaa G, Russob S, "The Time of Flight electronics for the PAMELA experiment in space." *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* 2008, 589, 465-471.

60. Schmida RP, Weickhardt C, "Designing reflectron time-of-flight mass spectrometers with and without grids: a direct comparison." *Int. J. Mass Spectrom.* 2001, 206, 181-190.
61. 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 Sp.* 2007, 21, 3165-3168.
62. Woods AS, Little DP, Cornish T, Cotter RJ, Little DP, "Peptide analysis to the attomole level using a curved-field reflectron MALDI-TOF mass spectrometer." *Journal of the Mass Spectrom. Soci. Japan* 1998, 46, 91-96
63. 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, 620-624.
64. 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." *Phytochem.* 2003, 62, 1159-1170.
65. Wiley WC, McLaren IH, "Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution." *Rev. Sci.c Ins.* 1955, 26, 1150-1157.
66. 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, 10, 2711-2719.
67. 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, 2932-2938.
68. Farajzadeh M, Seyedi S, Shalamzari M, Bamorowat M, "Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water." *J Sep. Sci.* 2009, 32, 3191-3200.

- 69.張 衛，虞雲龍，譚成俠，李少南，吳加倫，樊德方。“阿維菌素水解動力學的研究。” *農業環境科學學報*。2004, 23, 174—176
- 70.Liu y, Zhao W, Gao H, Zaou Z, “Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples.” *J Chromatogr A*. 2009, 6, 885-891
71. McCombie G, Knochenmuss R, “Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences.” *Anal. Chem.* 2004, 76 , 4990-4997.
72. 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, 1278-1284.
73. Cuiffi J, Hayes D, Fonash S, Brown K, Jones A, “Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films.” *Anal. Chem.* 2001, 73 , 1292-1295.
74. 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, 315-322.
- 75.水質檢測方法總則(NIEA W102.51C).
- 76.河川、湖泊及水庫水質採樣通則(NIEA W104.51C).
- 77.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.
- 78.籃品渝,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時間質譜儀分析毛花苷化合物.東海大學碩士論文 2009.
- 79.陶際唐,分散式液液微萃取強心配醣體化合物.東海大學化學碩士論文 2012.