

# 摘要

研究藥物的代謝，在生醫領域方面有其重要的應用價值，因為有些藥物在進入人體以後，實際被吸收的成份，可能不是藥物原來的結構，而是以其代謝的副產物為主，所以探討藥物在人體的實際代謝情況，成為藥物學上一個很重要的課題，但這些代謝產物通常是小分子化合物，其質譜圖容易受到基質干擾不易偵測，因此如何克服基質的問題，便顯得十分重要。本論文利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀，新發展出應用奈米膠體金為基質，取代傳統的有機酸基質，可以有效的去除低質量範圍的干擾，成功地分析洛伐他汀、辛伐他汀等藥物以及核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、蔗糖等化合物，搭配飛行時間串聯質譜儀，具有快速、簡單、可大量分析、操作容易、高靈敏度和高解析度的特點，也成功地運用在人體血糖的測量。

關鍵詞：雷射脫附游離、飛行時間質譜儀、奈米膠體金、  
洛伐他汀、葡萄糖、基質干擾

# Abstract

Drug metabolism plays an important role in the field of biology and medicine, because the drug metabolites along with the drug itself are absorbed and affect the body physiology after medicine administration. Therefore the investigation of drug metabolism and the analysis of drug metabolites investigation of drug metabolism and the analysis of drug metabolites become a very important item in the pharmacology. In this study, a nano-gold assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(NALDI-TOF-MS) for statin drugs and carbohydrate analysis in the serum was developed. Owing to the novel characteristics of nano-gold colloid, a very clean mass spectrum was obtained in contrast with the conventional matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, in which various confusing peaks resulted from conventional matrix fragmentation always appear and mix with the analyte peaks in the sub 1000 Da range. Finally, a good calibration curve was also established for the quantitative analysis of serum glucose in the range of 1mM to 10mM by NALDI-TOF MS.

Keywords : laser desorption、time-of-flight、nano-gold colloid、  
mevinolin、glucose、matrix background interference

# 謝誌

在經過漫長的研究生生涯之後，終於到了畢業的時候，雖然研究所的畢業之路不是走的很順遂，但終於走到了畢業這一步，求學的過程中常常遇到許多挫折，但人或許就是要經過磨練才能成長，許多事要到出了社會才能體會得到其中的深意。「研究」對科學家而言是孤獨而艱難的考驗，但是研究的成果卻可帶給人們極高的貢獻，因此「研究」對科學家是一輩子的課題，所以畢業只是到了人生的一個階段，未來還有許多「研究」的課題等我去學習。

本論文工作之完成必須感謝家人永遠在背後支持我的決定，感謝劉建忠老師的支持與鼓勵，讓我能在挫折中鼓起勇氣再次接受挑戰，謝謝李得響和蔡正宗老師對本論文的指導與建議，謝謝李瑞成先生的協助與建議，讓我在實驗上獲益良多，感謝美商布魯克道爾頓台灣分公司技術部王廉雍經理在質譜儀上之幫忙，並感謝程俊嘉先生與官孝勳先生在實驗上的幫助，實驗才得以順利完。

## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
謝誌.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VII
表目錄.....	X
壹、序論.....	1
一、前言.....	1
二、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法.....	3
2.1、基質輔助雷射脫附游離法的發展.....	3
2.2、基質輔助雷射脫附游離法的原理與離子形成的機制.....	4
2.3、基質的選擇.....	5
2.4、干擾因子與測定偏差.....	7
2.5、儀器構造與功能.....	10
2.6、儀器的特點.....	22
三、奈米粒子的簡介.....	23
3.1、奈米粒子的性質.....	23

3.2、奈米粒子的製備.....	23
3.3、奈米膠體金粒子 <sup>[25-29]</sup> 的簡介.....	25
四、降膽固醇藥物—史他汀類 <sup>[30-34]</sup> 簡介.....	27
五、醣類的簡介.....	29
六、研究動機與目的.....	30
貳、實驗.....	31
一、藥品.....	31
二、儀器設備與實驗器材.....	33
三、實驗方法.....	35
3.1、藥品配製.....	35
3.2、血液樣品前處理.....	37
3.3、樣品盤(target)前處理.....	38
3.4、基質輔助雷射脫附游離法樣品之配製.....	38
3.5、內、外標準校正法.....	38
參、結果與討論.....	40
一、實驗參數與最佳條件探討.....	40
1.1、基質的選擇.....	40
二、史他汀類藥物的研究.....	47
2.1、史他汀類藥物與基質的探討.....	48

2.2、史他汀類藥物與膠體金添加量的探討.....	51
2.3、史他汀類藥物添加氫氧化鈉的探討.....	53
三、醣類的研究.....	55
3.1、醣類與基質的探討.....	56
3.2、醣類與膠體金添加量的探討.....	59
3.3、醣類添加氫氧化鈉的探討.....	62
四、真實樣品中血糖的量測.....	64
4.1、檢量線的製作.....	65
4.2、血糖的測量.....	69
肆、結論與未來展望.....	73
參考文獻.....	74

## 圖目錄

圖一、離子源之構造圖與游離/脫附原理 .....	11
圖二、直線式質量分的構造圖與原理.....	13
圖三、介穩離子在直線式質量分析器的飛行模式圖與原 理 .....	15
圖四、MALDI-TOF/TOF質譜儀反射式質量分析器之構造圖 與原理 .....	17
圖五、以 (A) 直線式及 (B) 反射式質譜分析器所測得 的胜肽質譜圖 .....	18
圖六、LIFT 的儀器構造圖 .....	20
圖七、LIFT 的電壓示意圖 .....	21
圖八、基質輔助雷射游離/脫附-飛行時間串聯質譜儀(A) 外觀及(B)內部結構照片 .....	34
圖九、有機酸基質 (A) $\alpha$ -CHCA、(B) DHB 及 (C) SA 所 產生的背景訊號質譜圖 .....	41
圖十、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜 圖，延遲時間設定為 (A) 100 ns、(B) 200 ns 及 (C) 300 ns .....	43

圖十一、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜 圖雷射頻率設定為(A) 20 Hz、(B) 40Hz 及(C) 100 Hz.....	45
圖十二、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜 圖相對電壓參數設定為 (A) 80、(B) 86、(C) 90 及 (D) 92.....	46
圖十三、以有機酸基質 (A) $\alpha$ -CHCA 10 mg/mL、(B) DHB 及 (C) SA 分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的 質譜圖 .....	49
圖十四、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀及辛伐 他汀所獲得的質譜圖 .....	50
圖十五、膠體金體積稀釋 (A) 1 倍、(B) 5 倍、(C) 50 倍及 (D) 500 倍分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲 得的質譜圖.....	52
圖十六、在 100 $\mu$ L 的奈米膠體金溶液中加入 (A) 1 $\mu$ L、 (B) 10 $\mu$ L 及 (C) 20 $\mu$ L 的 0.1% NaOH 水溶液分 析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的質譜圖 .....	54
圖十七、五種醣類化合物分別以 (A) $\alpha$ -CHCA、(B) DHB、 及 (C) SA 為基質所獲得的質譜圖 .....	57



圖十八、以奈米膠體金粒子為基質分析 (A) 核糖、(B) 果糖、(C) 半乳糖同位素、(D) 葡萄糖同位素及 (E) 蔗糖所獲得的質譜圖 .....	58
圖十九、以奈米膠體金粒子為基質分析核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素與蔗糖混合溶液所獲得的質譜圖 .....	60
圖二十、原始膠體金溶液，體積稀釋 (A) 1 倍、(B) 5 倍、(C) 50 倍及 (D) 500 倍分析糖類混合溶液所獲得的質譜圖 .....	61
圖二十一、添加 (A) 1 $\mu$ L、(B) 10 $\mu$ L 及 (C) 20 $\mu$ L 的 0.1% NaOH 分析醣類混合溶液所獲得的質譜圖 .....	63
圖二十二、葡萄糖之標準檢量線 .....	67
圖二十三、葡萄糖的精確度 .....	68
圖二十四、血清血糖及添加內標準葡萄糖同位素的質譜圖 .....	71
圖二十五、(A) 血清血糖及 (B) 葡萄糖標準溶液所形成的 [Glucose +Na] <sup>+</sup> 訊號之串聯質譜圖 .....	72

## 表目錄

表一、基質 CHCA、DHB 及 SA 的特性 .....	6
表二、史他汀類藥物結構 .....	47
表三、醣類結構式 .....	55

# 壹、序論

## 一、前言

近年來生物科技廣泛地應用於醫療、藥物學、食品科學、基因改造、環境保護等產業之中，在日新月異的發展下，建立一個快速而正確的化學分析方法是科學家所迫切追求的，其中，檢測物質的分子量是一個最簡單快速的分析方法之一，能夠了解樣品的純度及化合物的含量及種類，也是判斷有機、無機化合物及生化樣品如胜肽或蛋白質等最重要的實驗數據之一，尤其在近年來十分熱門的蛋白質體學中，更扮演不可或缺的角色。正確分子量檢測，可以鑑定蛋白質的種類與結構，在生醫領域上，能更深入的探討若干疾病的產生。由於質譜儀技術對於化合物的分子量測定，具有高準確度、高靈敏度、所需樣品量少、操作快速簡單等優點，並可從串聯質譜儀的斷裂子離子訊號，判斷分析物之結構，另外，對於分子量高達 40 萬以上的生物大分子，質譜儀的測量誤差為 0.1%~0.001%，遠遠高於目前常規應用的二維膠體電泳與高效凝膠色譜技術，因此，質譜儀的檢測方法已被廣泛地應用在生化領域上。

傳統的質譜游離方法，如電子游離法（electron ionization, EI）及化學游離法（chemical ionization, CI）必須先將樣品加熱，揮發成氣相的狀態才能進行游離，因此其應用範圍只能侷限在具熱穩定性與高揮發性的有機化合物，而大部份的生物巨分子具有高極性、低揮發性、熱不穩定性等性質，使得傳統的質譜游離方法並不適合分析生物巨分子，為能順利偵測此類生物巨分子，陸續有許多新的質譜游離技術被發展出來，而基質輔助雷射脫附游離法（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI），為其中最具代表性的方法之一。雖然 MALDI 技術成功地突破以往對於蛋白分子偵測的困難，在蛋白質體學具有重大的貢獻，但是對於分子量較小（ $< 1000\text{Da}$ ）的小分子化合物，因為受限於基質的干擾問題，一直有很大的偵測困難度存在。

本篇論文的研究目標，在於利用基質輔助雷射脫附游離質譜儀的技術，以奈米膠體金粒子，具有高表面積、能吸收雷射光、沒有普通基質容易碎裂等特性，取代傳統的有機酸基質，克服基質干擾的問題，對於小分子化合物的檢測，期望能發展出一套快速、容易、準確性高的分析方法。

## 二、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)

### 2.1、基質輔助雷射脫附游離法的發展

基質輔助雷射脫附游離法，最早是由 1985<sup>[1]</sup>年德國研究學者 Karas 和 Hillenkamp 以吸光的色胺酸 (tryptophan) 混和不吸光的 valine、tyrosin，用 Nd:YAG 雷射照射，發現了吸光的色胺酸能幫助不吸光的 valine、tyrosin 脫附游離，此為基質輔助樣品分子脫附游離的基礎概念。

但後來一直無法突破大分子游離的困境，直到 1987 年的一場中國-日本的聯合會議中，日本 shimadzu 公司的研發部門工程師田中耕一<sup>[2]</sup> (K. Tanaka) 等人，發表了利用無機金屬顆粒大小約 300 埃 (angstrom, Å,  $10^{-10}$  meter) 的鈷金屬粉末與甘油混合的基質，利用波長 337nm 的氮氣雷射，成功的脫附游離完整的蛋白質分子、溶菌酶 (lysozyme, 14KDa)，再質譜儀進行質荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) 的偵測。次年，田中正式在期刊上發表此一結果，可偵測分子量 12,360Da 的 cytochrome C 和分子量 25,717 Da 的 chymotrypsinogen 以及分子量 34,372Da 的 carboxypeptidase<sup>[3]</sup>

，這是第一次使用雷射脫附質譜法，偵測到如此巨大分子量的生生物質，使得他榮獲2002年的諾貝爾化學獎。

同年Karas和Hillenkamp<sup>[4]</sup>也利用同一技術加以改進，以尼古丁酸（nicotinic acid）為基質，對波長 266nm 的Nd:YAG雷射具有良好的吸收效率，成功的游離白蛋白（albumin, 67kDa），使的質譜分析的測量範圍擴展至接近100kDa以上。

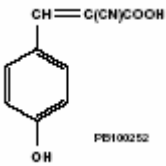
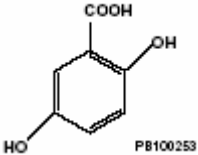
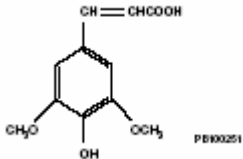
## 2.2、基質輔助雷射脫附游離法的原理與離子形成的機制

基質輔助雷射脫附游離法的主要原理，可能是基質與分析物產生共結晶後，利用基質容易吸收UV雷射波長的特性在極短的時間內傳遞巨大的雷射能量於分析物，使分析物在被脫附汽化成氣態分子，並由周圍的環境中接受質子而游離成正離子，在飛行時間質譜儀的離子源中，經由電場加速取得動能，進入飛行管中進行分離及質荷比的檢測。但基質輔助雷射脫附游離法發展至今，關於其離子的形成機制，尚未能被科學家所證實，因為分析物被脫附游離的時間非常短，其中不只有離子-分子反應，還牽涉到光游離與光化學反應，因此目前離子形成的機制，均只能以用推論的方式來說明。

### 2.3、基質的選擇

基質輔助雷射脫附游離法中，最重要的關鍵步驟就是基質種類的選擇與製備。日本學者田中耕一先生所使用的鈷金屬粉末，因為取得不易、價格昂貴、容易吸入對人體有害、靈敏度和再現性差等缺點，後來基質輔助雷射脫附游離法的發展均以Karas和Hillenkamp<sup>(5-7)</sup>所提出的方法為主，並陸續研究出許多不同種類的有機酸基質，其中最常用的基質為 $\alpha$ -氰基-4-羥基桂皮酸 ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid,  $\alpha$ -CHCA)、3,5 二甲氧基-4-羥基桂皮酸基桂皮酸 (Sinapic acid, SA)、二羥基苯甲酸 (2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB)，基質的選擇以CHCA較適合於小分子量的胜肽分析，SA較適合於大分子量的蛋白質分析，而DHB則較適合用在糖類分析。表一列出這三種基質的特性，由表中基質的化學結構可知，這些基質都具有能與雷射產生共振吸收的苯環或不飽和鍵，以及具有能提供質子的羧酸官能基。而適當的基質，要具備以下三種特性：(1) 具有雷射吸收能力，基質要可以吸收雷射能量，能在短時間內吸收雷射光所傳遞的能量給分析物，使其能從固體成功地脫附成氣體分子；(2) 能幫助分析物游離，基質須具有羧酸的官能基，為好的質子提供者，能提供質子

表一、基質CHCA、DHB及SA的特性

Matrix	Applications/Color	Matrix Solution Concentration	Characteristic Matrix Ions (monoisotopic)
<p>Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (<math>\alpha</math>CHCA) MW 189.04 Da</p> 	<p><b>Applications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptides</li> <li>• Proteins</li> </ul> <p><b>Color of crystals/solution:</b> Yellow</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mg/ml in 50:50 water/acetonitrile (0.1% TFA final conc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 164.047</li> <li>• 195.050</li> <li>• 172.040</li> <li>• 379.093</li> <li>• 212.032</li> <li>• 294.076</li> </ul>
<p>2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) MW 154.03 Da</p> 	<p><b>Applications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptides (mixtures)</li> <li>• Carbohydrates</li> <li>• Glycolipids (negative ion mode)</li> <li>• Polar synthetic polymers</li> </ul> <p><b>Color of crystals/solution:</b> White</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mg/ml in water</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 155.034</li> <li>• 154.027</li> <li>• 137.024</li> <li>• 273.040</li> </ul>
<p>Sinapinic acid MW 224.07 Da</p> 	<p><b>Applications:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptides</li> <li>• Proteins</li> </ul> <p><b>Color of crystals/solution:</b> White</p> <p><b>NOTE:</b> Matrix powder may also contain orange crystals. Do not use crystals when preparing solutions.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mg/ml in 70:30 water/acetonitrile (0.1% TFA final conc.)</li> <li>• 10 mg/ml in 50:50 water/acetonitrile (0.1% TFA final conc.) if sample contaminated</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 225.076</li> <li>• 224.068</li> <li>• 207.066</li> <li>• 431.134</li> </ul>



給已脫附的氣態分析物分子，使其帶有質子而游離成正離子；（3）能與分析物產生共結晶，基質要能與分析物產生良好的共結晶，才不會使分析物本身聚集在一起，而沒能發揮基質輔助脫附游離的效果。

正確的基質的選擇，對分析結果具有決定性的影響，目前使用的基質大多以有機酸為主，但根據不同的分析物，近年也有越來越多研究以無機金屬<sup>[8]</sup>當作基質，本研究論文選擇以奈米基膠體金粒子為基質，應用於小分子化合物<sup>[9-12]</sup>的測量。

#### 2.4、干擾因子與測定偏差

利用基質輔助雷射脫附游離法所獲得的質譜圖，影響分析物訊號的干擾因子與測定偏差包括以下幾個重要因素：

##### （1）適合的基質

如表一所列，不同種類的分析物有其適合的基質，如以CHCA為基質，分析大分子量的蛋白質，可能會因為其吸收雷射的能量沒有SA多，不容易使蛋白質汽化游離，而得不到良好質譜圖，因此，選擇適合的基質在基質輔助雷射脫附游離分析法，是最主要的第一步。

##### （2）基質與分析物濃度比

通常基質與分析物濃度比，大約維持在 100：1 到 50,000：1 之間，且隨者分析物的分子量越大，比例也隨之增高，盛至達到  $10^8$ ：1，因為當分析物過多而基質過少時，基質不能有效的傳遞能量給分析物，無法發揮基質的最大功用，造成訊號變差。

### (3) 基質溶劑

研究發現基質溶劑的極性大小與揮發速率，會影響溶劑與分析物的互溶性與共結晶的形成，結晶差的基質傳遞能量的效率也會跟著降低，進而影響圖譜結果，因此是當的溶劑的組成也極為重要。

### (4) 雷射能量

針對不同的分析物與基質，最適當的雷射能量並不相同，太低的能量無法使分析物與基質游離，過高的雷射能量會造成背景基線不平整或基線過高而使解析度變差。

### (5) 訊號集中點(sweet spots)

使用基質的一項缺點為，分析物容易與基質產生不均勻的共結晶，且不同基質晶型不同，造成有些區域分析物訊號高，有些分析物訊號低，因此，操作者必須找到最強訊號集中點，才能得到好的質譜圖。

## (6) 雜質干擾

樣品大多沒經過前處理即上機分析，這是基質輔助雷射脫附游離法能進行快速分析的優點，但也有其缺點，樣品中的鹽類、界面活性劑或緩衝溶液，容易降低基質與樣品的共結晶化效率，進而影響分析結果，並大大降抵分析的靈敏度。因此，可依需要作一些去鹽的處理，最廣為使用的是在基質中添加四級銨鹽或多胺鹽如 Spermine，以達到抑制鹽類加成物的形成。

## (7) 游離競爭

在分析物中，樣品的濃度與訊號高低並不必然成正比的關係，因為不同種類的分析物如胜肽或蛋白質等，具有不同的游離能力，有時游離能力強的物質甚至會抑制游離能力弱的物質，使分析物的訊號變弱，這也是為何基質輔助雷射脫附游離，只能達到半定量的檢測結果之主要原因。針對目標分析物如果有出現被抑制的現象，可以嘗試調整偵測範圍，避開游離能力強的物質，使其不要游離以提升分析物的偵測訊號。

## (8) 校正誤差

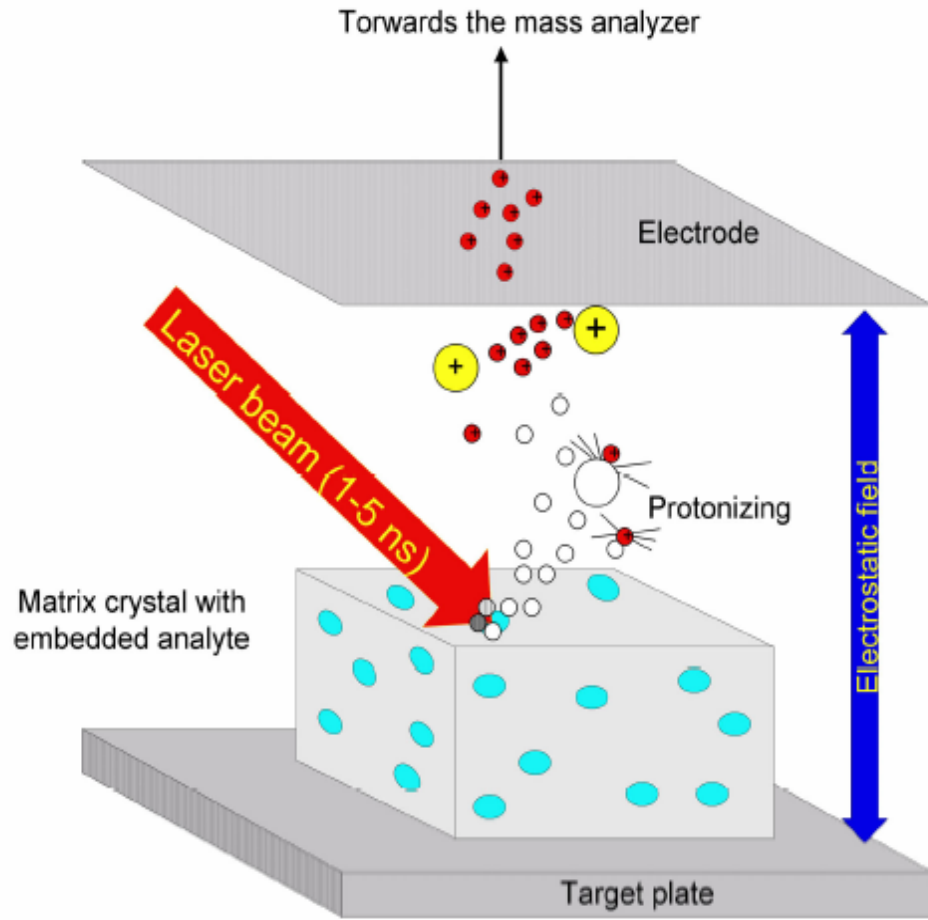
由質譜圖所獲得的分子量訊號，是判定化合物的主要

依據，如果分子量出現誤差，即容易對化合物的鑑定造成錯誤。質譜儀的校正方式，可分為內標準校正法與外標準校正法，外標準校正法，主要是以標準品校正儀器後，再測量待測物，內標準校正法，則是將校正品與分析物混合在一起校正儀器，正確的選擇校正方式，才能得到正確的分子量。

以上所列出的干擾因子與測定偏差，皆為影響質譜圖好壞的主要原因，實驗中必須一一檢視，儘可能排除或降低這些干擾因子，即能減少測定的偏差，而得到好的分析質譜圖。

## 2.5、儀器構造與功能

基質輔助雷射脫附游離質譜儀，主要構造包括：(1)離子源(Ion Source)，(2)質量分析器(Mass Analyzer)及(3)偵測器(Detector)三個部份。離子源係利用雷射光激發基質使之汽化，並傳遞能量和質子給待測物，而產生帶正電之離子(見圖一)；質量分析器則採用飛行時間質量分析器，利用離子飛行時間的差異，分析不同質荷比的離子；偵測器則採用微通道(Micro-Channel)二次電子增大器(Secondary Electron Multiplier, SEM)，可以提高離子偵測的靈敏度。



圖一、離子源之構造圖與游離/脫附原理

### 2.5.1、直線式質譜分析器

基質輔助雷射脫附游離法以搭配飛行時間質量分析儀為主，其分析質荷比之原理為假設離子在離子源中形成後，同時給予一相同的加速電壓，使得全部的離子在經過相同的電場時具有相同的動能，離子所獲得的動能可由公式一表示：

$$E_{kin} = (1/2)mv^2 = zeU \dots\dots\dots(\text{公式一})$$

$E_{kin}$ : 離子源中產生離子的動能

$m$ : 離子之質量

$z$ : 離子帶電荷數

$v$ : 離子飛行速度

$e$ : 每電荷之電量

$U$ : 離子源中之電位差

離子脫離離子源進入飛行管，如圖二所示，在無電場的狀態中，自由飛行所花費之時間為  $t$ ，飛行管之長度為  $L$ ，則該離子之飛行速率  $v$ ，可由公式二表示：

$$v = L/t \dots\dots\dots(\text{公式二})$$

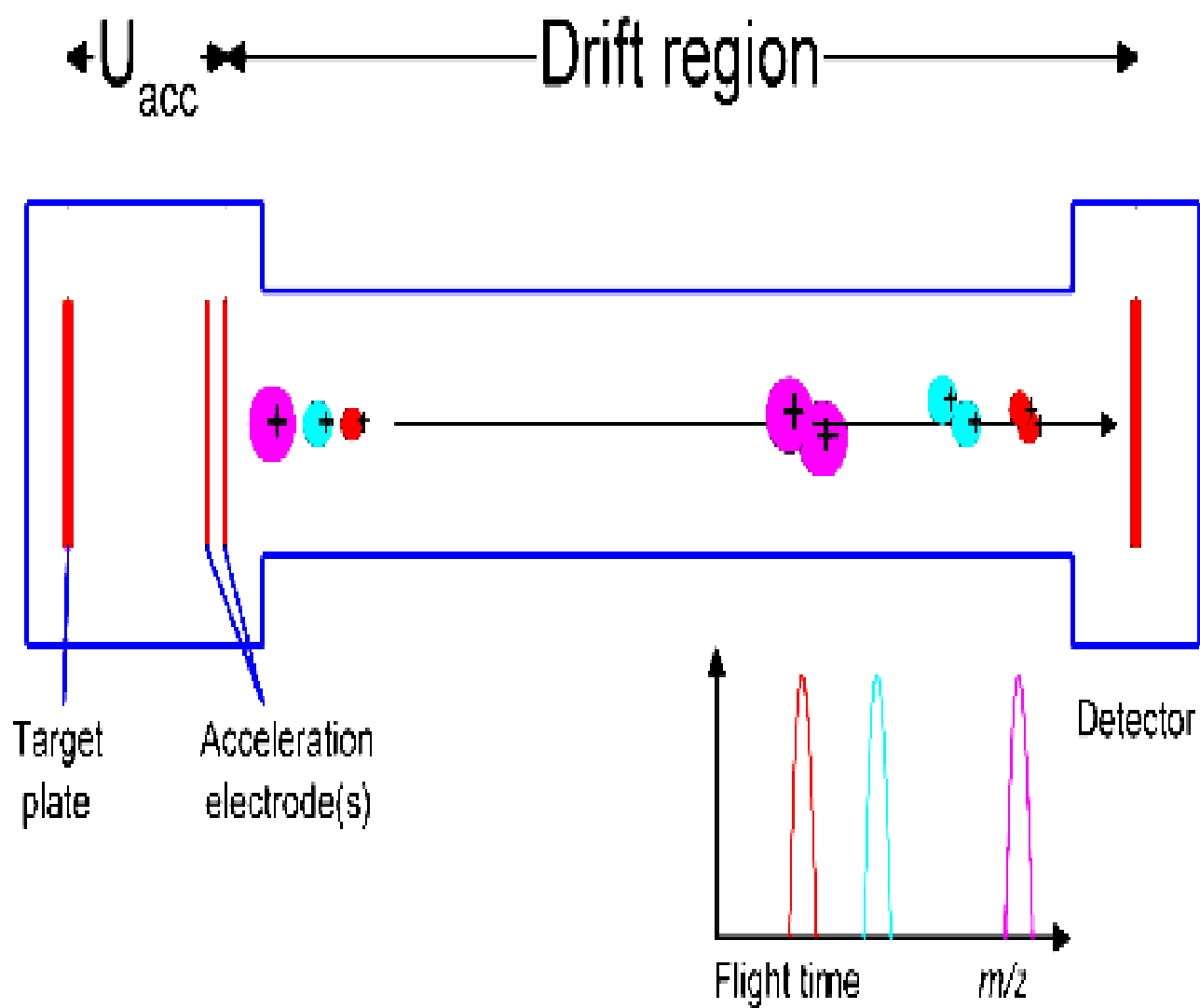
以公式二帶入公式一，可得公式三：

$$E_{kin} = (1/2)m (L/t)^2 = zeU \dots\dots\dots(\text{公式三})$$

將公式三重新整理，可得公式四：

$$m/z = (2eU/L^2)t^2 = Kt^2 \dots\dots\dots(\text{公式四})$$

$m/z$  即為待測離子之質荷比，由於  $2eU/L^2$  可視為質譜儀固定常數( $K$ )，故  $m/z$  與飛行時間之平方成正比關係，由公式可知當所有離子得到相同動能而進入無重力場飛行管時，離子會因為質荷比不同而有不同的速度。對均一價的正電荷離



圖二、直線式質量分析器的構造圖與原理

子而言，質量較小的離子飛行速度較快，質量大的飛行速度較慢，因此，根據到達偵測器時間的不同，可以區分不同質荷比的離子，此即為飛行時間質譜儀的基本原理，而一張質譜圖只需 5~100 微秒即可完成。

根據質譜儀解析度 (Resolution, R) 之定義：

$$R = m/\Delta m = m/(m_2 - m_1) \dots \dots \dots (公式五)$$

公式四帶入公式五，可得公式六：

$$R = t^2/(t_2 - t_1) = t^2/\Delta t^2 \dots \dots \dots (公式六)$$

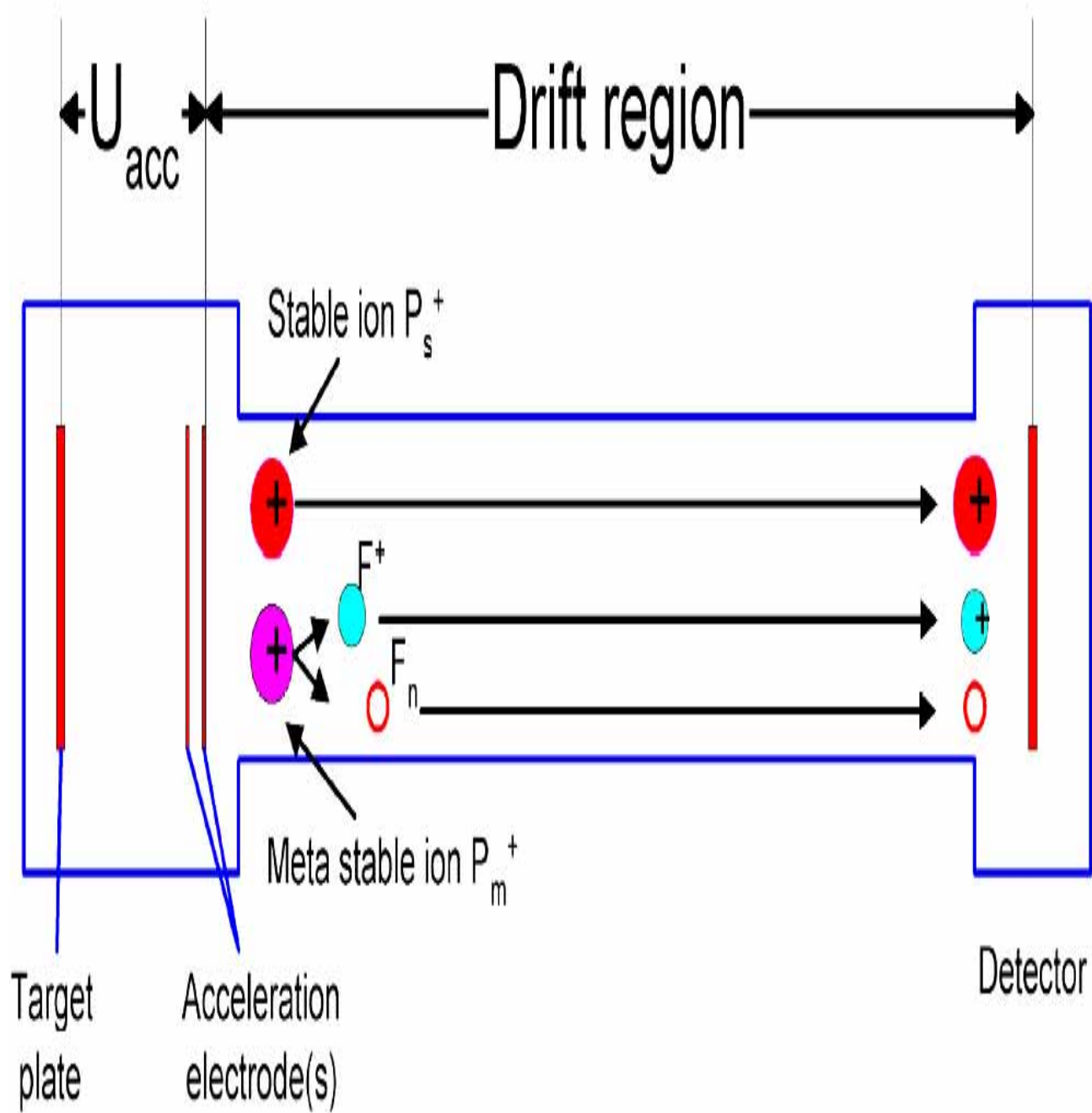
由公式六得知質譜分析之解析度係與飛行時間之平方有關，分子量越大之化合物，飛行時間越長，需要越高的儀器解析度，越不易測量。

### 2.5.2、反射式質譜分析器

在直線式質譜分析器中，待測物分子在離子源受到雷射能量游離時，可能因為起始動能有些微不同，而使得相同質荷比的離子無法同時抵達偵測器，或是有介穩離子

(metastable ion) 的存在，因其本身的內能過高而導致在飛行時產生碎裂，由於未碎裂前的完整離子與碎片後所產生的離子的動能不同但速度一樣，因此抵達偵測器的時間一致而

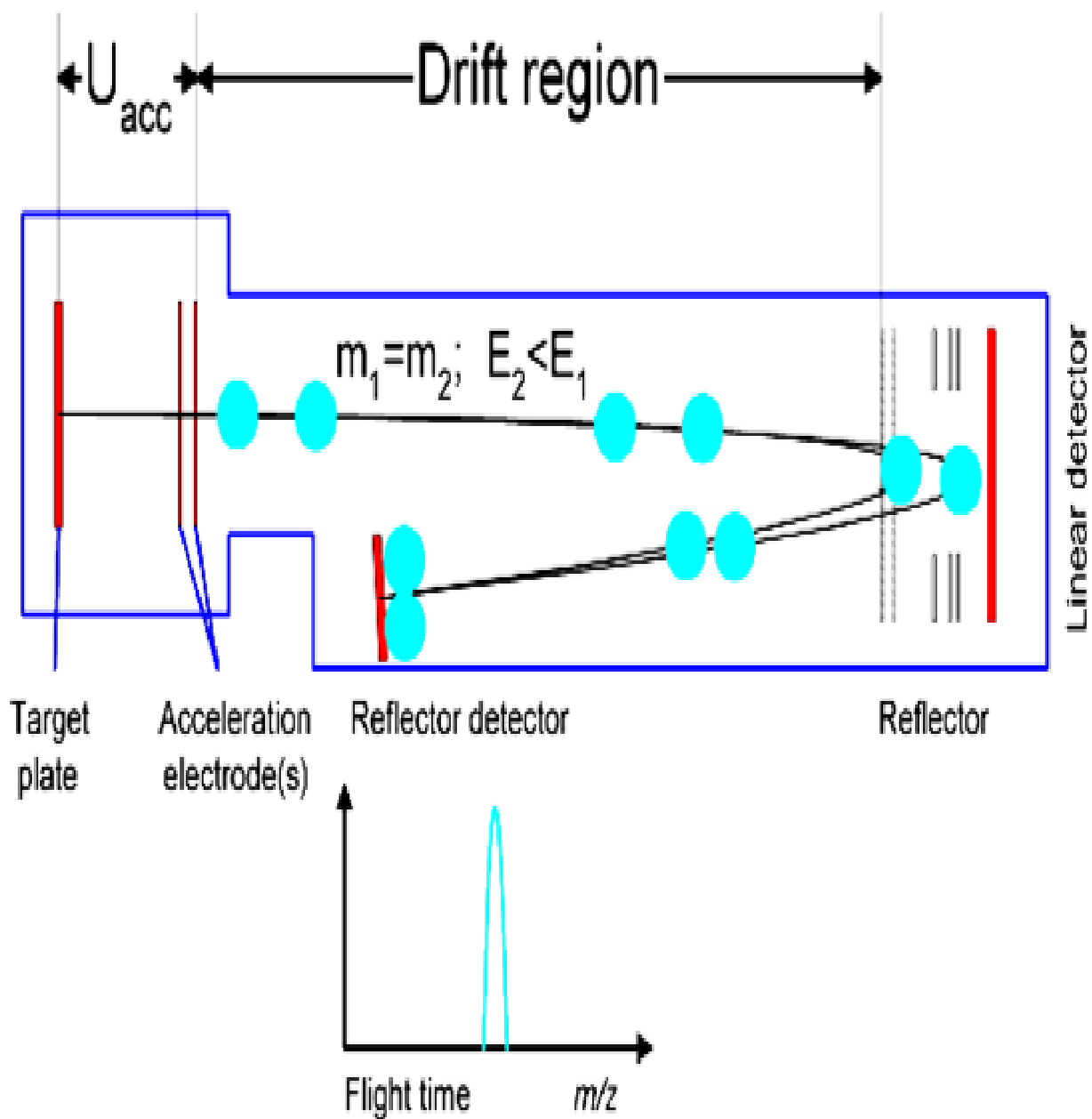




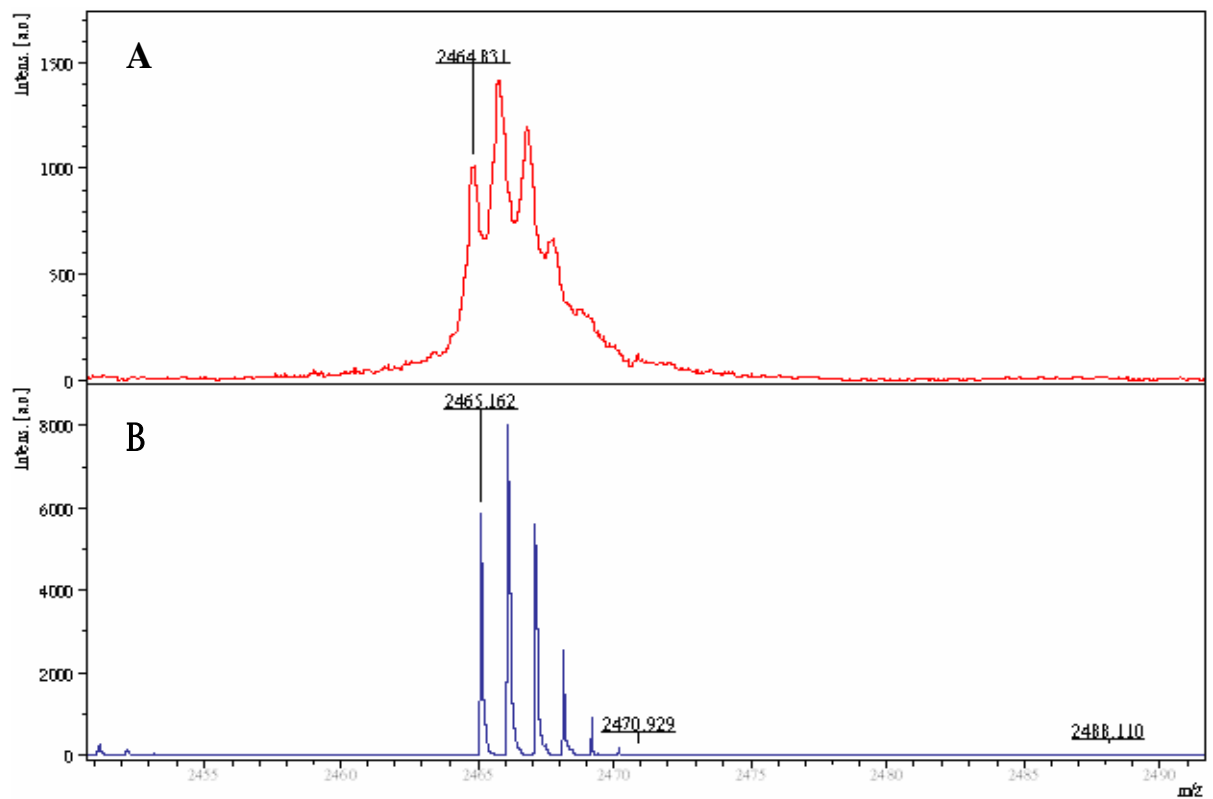
圖三、介穩離子在直線式質量分析器的飛行模式圖

無法分辨，如圖三，由於以上這些因素，使得直線式飛行質譜儀的解析度降低。

Mamyrin 於 1971 年發展出反射式飛行質譜儀，以校正因動能分佈造成解析度降低的影響。反射式質譜分析器的構造如圖四所示，在直線式飛行管末端加裝多片電極，施加強度遞減的正電場，使得正離子進入此區後，會減速直到速度為零而停止，並因為電性相斥受到減速而彎曲，再受此正電場作用，使得離子被反向加速進入另一端的飛行管，而被偵測器所偵測。當質荷比相同的離子，若具有不同的動能，經過反向電場時，動能較大的離子會進入較深的反射區使得路徑增加，動能較小的離子路徑較短，藉此修正它們動能上的誤差，讓它們得以同時抵達偵測器，因此相較於直線式質譜分析器，反射式質譜分析器有較高的解析度。圖五為某一胜肽化合物，分別以直線式及反射式質譜分析器測量其質譜圖，此較 (A) 圖與 (B) 圖，印證反射式質譜分析器具有較高的儀器解析度。



圖四、MALDI-TOF/TOF 質譜儀反射式質量分析器之構造圖  
與原理



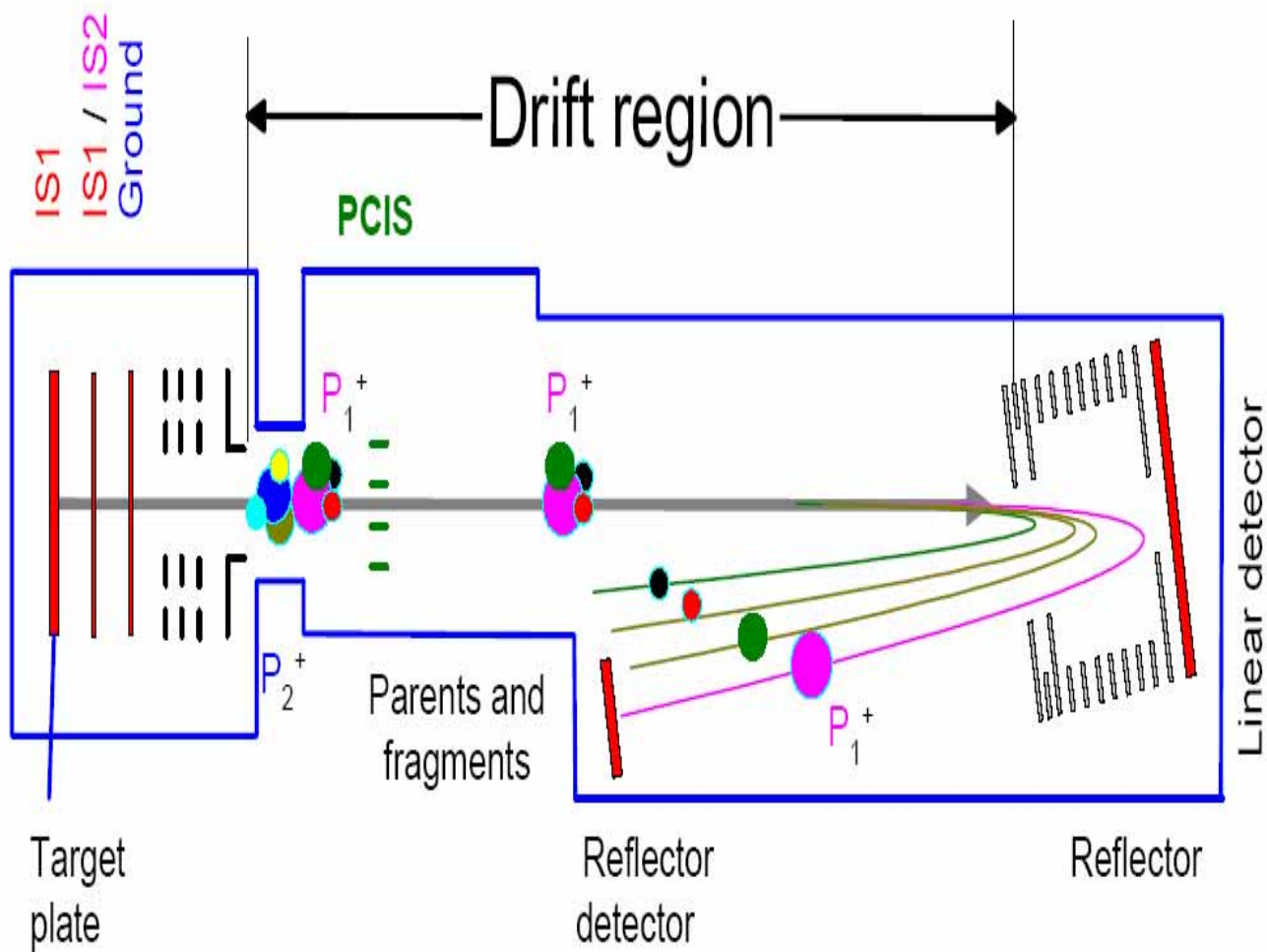
圖五、以 (A) 直線式及 (B) 反射式質譜分析器所測得的胜肽質譜圖

### 2.5.3、LIFT(Laser Induced Fragmentation Technology)

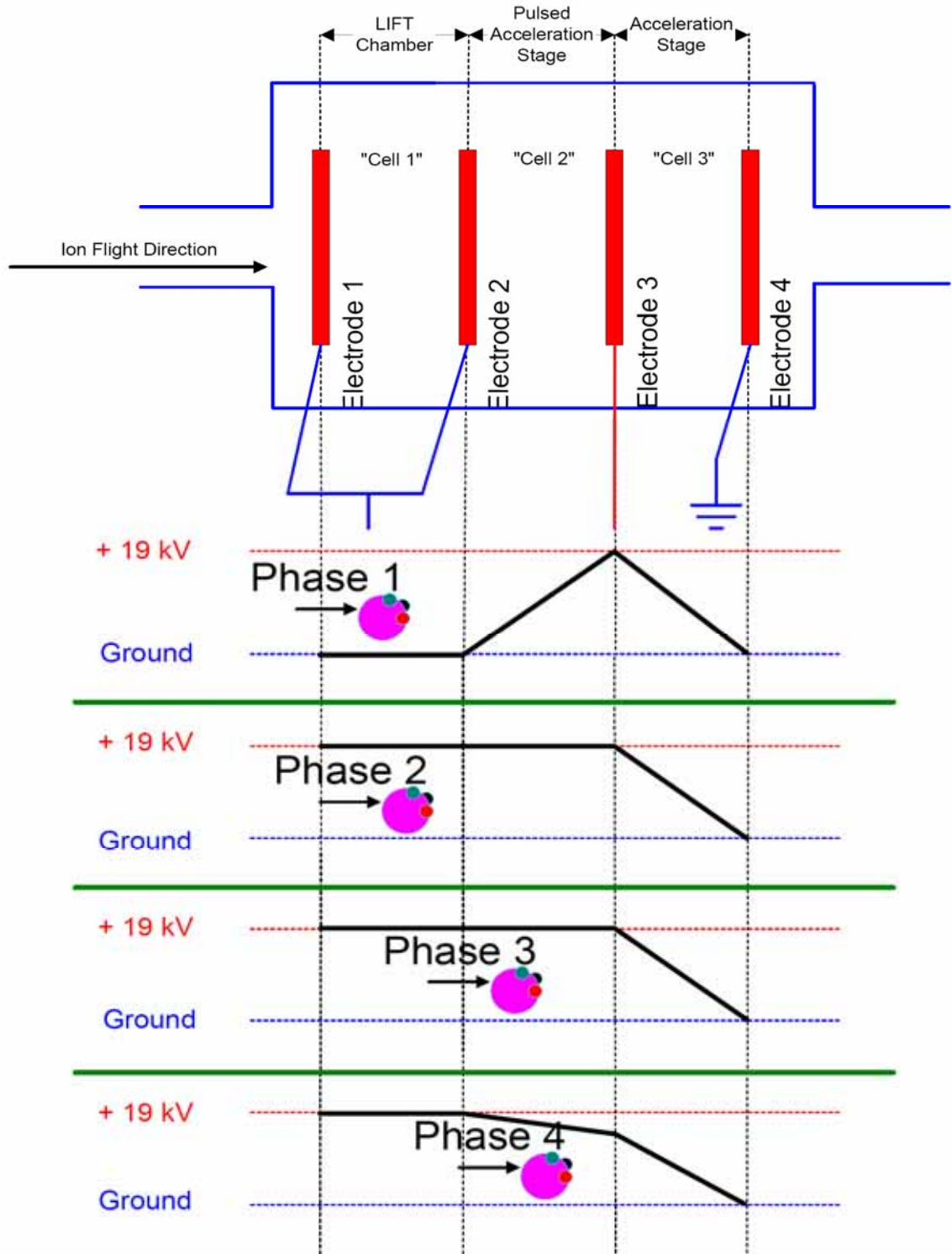
質譜可以得到單一分子離子的質荷比，但無法分辨質荷比相同但化學結構不同的化合物，為了解決這個難題，發展出串聯質譜儀 (Tandem mass spectrometers) 的分析技術。串聯質譜有許多種類<sup>[13]</sup>，在本實驗中所使用的裝置叫做 LIFT，其儀器的構造及原理，如圖六所示，在第一次質譜中，

用離子選擇器 (Pre Cursor Ion Selector, PCIS), 選取所需的特定質荷比的離子作為母離子 (parent ion), 在第二次質譜中, 以更高的雷射能量撞擊母離子, 使它帶有更多的能量, 當帶有高能量的介穩離子經過LIFT的phase 1、phase 2時, 參見圖七, 前後的電壓升高, 使得介穩離子的速度受阻, 因本身高內能的影響產生碎裂, 在phase 3 因為前後電壓一樣所以緩慢移動, 在phase 4 一邊的電壓開始下降, 因此離子又開始往前飛行, 形成一系列子離子 (daughter ion), 這時排列序列不同會產生不同的子離子碎片, 如此一來, 便可分辨組成相同但排列序列不同的同分子。而一般蛋白質分子內的胜肽鍵 (peptide bond) 是屬於比較弱的鍵結, 因此在胜肽的碰撞分析上, 是以氨基酸為最小單位進行斷裂, 目前已經有蛋白質資料庫的建立, 可以連上資料庫進行比對確認身分。

以飛行時間串聯質譜儀進行分析, 它的質量分析器必須是反射式的。當介穩離子因本身的內能過高而導致在飛行時產生碎裂, 由於母離子與碎片離子的動能不同但速度一樣, 因此抵達偵測器的時間一致, 而無法以直線式的質量分析器, 偵測碎裂離子的串聯質譜圖。



圖六、LIFT 的儀器構造圖



圖七、LIFT 的電壓示意圖

## 2.6、儀器的特點

### (1) 高靈敏度

質譜儀在這十幾年的快速發展下，已具備靈敏度的特性，基質輔助雷射脫附游離質譜儀更具有簡單、快速且靈敏的優點，分析一個樣品大約只需五至十分鐘，且只需少量的樣品與基質之混和（ $\sim 1 \mu\text{L}$ ）即可進行，另外，基質的選擇非常重要，在適當的基質與分析物充分配合下，偵測極限可低至 1 fmole 左右，非常適合取得不易且怕溫度破壞的微量生化樣品之檢測。

### (2) 高質量偵測範圍

基質輔助雷射脫附游離法是一種軟性游離方式（soft ionization），它能使高分子量化合物如蛋白質、DNA 及 RNA 等，間接的靠基質吸收能量，以完整的結構脫附成氣態離子，配合適合的基質，可分析這些具有高質量的生物巨分子。

### (3) 簡易的樣品製備

基質輔助雷射脫附游離法的樣品製備非常簡單，一般是將約  $1 \mu\text{L}$  的基質（ $10\sim 30 \text{ mg/mL}$ ）與  $1 \mu\text{L}$  分析物混合，以微量吸管滴約  $1 \mu\text{L}$  於樣品盤上，待樣品的溶劑揮發後，形成結晶狀的固體，即可將樣品送入質譜儀中進行分析。



### 三、奈米粒子的簡介

#### 3.1、奈米粒子的性質

奈米材料是指尺度大小約在一至一百奈米之間的微小物質，當物質的尺寸小到奈米的範圍時，由於粒徑尺寸縮小，粒子數目增加，而表面原子數的佔有比例相對增加，而表面能量也增加，使得奈米粒子具有很高的活性，再加上量子效應與小尺寸效應，使得奈米粒子會有很多不同於其本來的物理化學性質，如光學性質、電學性質、磁學性質、擴散、材料強度、延展性、催化能力及磁性等，這些性質也會隨著粒徑大小不同而有變化，具備潛在的發展價值，因此，奈米材料的相關研究，在近幾年相當受到重視，其應用因而也更為廣泛。

#### 3.2、奈米粒子的製備

目前奈米粒子的製備大約可以分為三類：

##### (1) 雷射消融法<sup>[14-17]</sup>(laser ablation method)

雷射消融法主要是利用高能量雷射射擊在塊材上，將塊材打成奈米尺度大小。在傳統的氣體研究中，雷射消融法有利於金屬氣體分子的形成，但如要形成固態金屬粒子，在

氣相中進行，非常的不便利。因此後來多半把金屬放在各式溶液中，再將高能量之雷射入使金屬消熔，而溶液所提供之低溫環境及穩定劑(stabilizing reagent)，能使奈米金屬例子均勻分散於溶液中，並免於進一步發生融合(coalescence)。

## (2) 金屬氣相合成法<sup>[18]</sup>(metal vapor synthesis)

金屬氣相合成法主要是利用各種原子化法，將金屬汽化成氣態原子，再控制其冷凝過程，使其聚集成奈米尺度大小之固態粒子。此法最早是由 Roginski 與 Schalnikoff 所發表，將鎘、鉛或銻加熱蒸發後，與苯或甲苯(有機稀釋劑)蒸氣，在液態空氣所冷卻之冷卻棒上共凝聚(cocodensation)，再藉由加熱分離之程序，獲得此金屬之膠體懸浮液。後來發展成將真空抽至一定之真空度以上，充入低壓之惰性氣體(氬或氫)，利用惰性氣體的導流使得由加熱坩鍋中蒸發之金屬煙霧向上移動，靠近充滿液態氬之冷卻棒，此時金屬蒸氣和惰性氣體產生多次碰撞而損失能量，是以在冷卻棒上漸漸冷卻，形成過飽和蒸氣團而析出，並在其表面積聚成奈米尺度大小之金屬顆粒，再進一步分離即可。其中可藉由控制惰性氣體的壓力、溫度及蒸發物質的溫度來控制奈米顆粒粒徑大小，不過由於此方法不利於大量製備，又較費時間，因

為需將真空腔抽到一定之真空度以上方可進行，在實際應用上受到較多限制

### (3) 化學還原法<sup>[19-24]</sup>(chemical reduction method)

化學還原法主要是將各種溶液中之氧化態金屬離子，利用合適的還原劑與溶液中的其他的離子、原子或基團相互碰撞，還原成奈米尺度大小之零價金屬粒子，其直徑取決於金屬鍵的強度和金屬鹽類與還原劑的氧化還原電位差異，以控制奈米粒子的成長方向與形狀，常用於 Ni、Cu、Co、Fe、Au、Ag 等奈米粒子的製備。

### 3.3、奈米膠體金粒子<sup>[25-29]</sup>的簡介

膠體粒子 (colloidal particle) 是指尺度大小在 1 至 100 奈米之間的微粒，一般無法以肉眼鑑別，看似一般透明有色溶液。膠體粒子表面皆以正電荷或負電荷形式存在，使得粒子之間互相排斥，因此可以穩定的懸浮在溶液中不會凝聚。電荷的產生是為了防止結塊凝聚 (coagulation) 的發生，在製程時常加入穩定用的 ligands, polymers 或 surfactants 而產生陽離子或陰離子，此種離子存在於固體表面的現象稱為吸附作用 (adsorption)。另外，當粒徑小於 50 奈米時，在布朗運動的作用下，膠體粒子足以抵抗地心引力，因此可以

得到穩定的懸浮液體，短時間內，甚至長達數月，都不會有明顯的沉澱現象。

金奈米粒子照光後，這些顆粒表面的自由電子被激發，吸收特定波長的光子能量，產生瞬間誘導式偶極，並以此特定頻率進行偶極震盪（collective dipolar oscillation），稱之為表面電漿共振（Surface Plasmon Resonance, SPR）。金奈米粒子會吸收何種波長的光子能量進行偶極震盪，完全是根據顆粒的大小和形狀，如果顆粒為球形對稱，會吸收 520 nm 波長的光子能量，溶液呈紅色；然而這些球形對稱的顆粒若是彼此聚集在一起，則對於 600~800 nm 波長的光會產生共振而有吸收的現象，溶液進而呈現藍色。這個現象在許多文獻中已有詳細的探討，可以藉由古典靜電場理論來描述，起源於非對稱巨集形狀及偶極之間的相互作用力，所造成在電磁場下產生的表面電漿共振吸收。如果顆粒為圓柱形狀，則根據長短軸比值的不同，而有不同的吸收波帶位置，當粒子之長短軸比值愈小時，吸收波長愈偏向 520 nm，溶液呈現藍色，當粒子之長短軸比值愈大時，吸收波長愈偏向 800~900 nm 或更長，溶液則呈褐色或再度返回紅色，由於溶液的顏色和粒子的形狀以及在溶液中分散的狀態有關，所以一般可

以藉由溶液所呈現的顏色，來判斷懸浮性金奈米粒子的結構狀態。因為金的吸收範圍很大，所以雖然他最大的吸收峰值通常在 520nm 或更長，但是在本實驗使用的雷射波長 355nm 的地方也有吸收值。

本實驗中所使用的奈米膠體金粒子是從 sigma 公司所購得，奈米尺寸為 5~10 nm，主要由化學還原法所製備。

#### 四、降膽固醇藥物—史他汀類<sup>[30-34]</sup>簡介

從 80 年代至今，肥胖與高血脂已成為美國成年人中的常見症狀，而肥胖與高血脂症還會誘發冠心病與急性心肌梗死。默沙東公司開發上市了全球第一個降血脂新藥洛伐他汀，洛伐他汀上市後，短短幾年即成為美國和歐洲市場上的熱門銷售藥品，此後，西方各大製藥公司又相繼開發上市了辛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀等他汀類藥物，由於降血脂效果明顯，加上肥胖者和冠心病患者人數眾多，故他汀類藥物在國際市場的增長速度十分快速，包括默克、輝瑞、先靈葆雅、諾華、百時美施貴寶和阿斯利康等大公司都有他汀類的生產線。德國拜耳公司將獨立開發的降血脂新藥西立伐他汀(cerivastatin，拜斯亭，Baycol)推出美國市場，

因其降脂效果很好，當年，即開出了 200 多萬張處方，但在 2001 年，美國 FDA 藥物不良反應監測中心，接到全美各地發來的有關西立伐他汀存在嚴重不良反應的多起事故報告，在美國服用這一降脂藥的病人中，共計發現有 400 多例橫紋肌溶解症，其中 31 人不治。橫紋肌溶解症是由於骨筋肌變性及壞死而引發的四肢無力、肌痛、麻木、強硬、腫脹等症，嚴重時能堵塞尿細管造成急性腎功能不全，美國醫學界發現，引起世界幾百人死亡的橫紋肌溶解症並非因單純使用西立伐他汀所引發，而是美國和歐洲一些醫生為了能以最快的速度將患者的血脂降下來，而將另一種降脂藥物吉非羅齊(gemfibrozi)與西立伐他汀合用，從而加劇了後者的橫紋肌溶解不良反應。

史他汀 (statin) 類藥物仍是目前最廣為使用的降血脂藥，使用史他汀類藥物患者，出現各種肌肉痠痛的比率為 5% 至 18%，平均約為 10%。服用史他汀類藥最嚴重的副作用，就是出現橫紋肌溶解症，根據文獻，目前全球約有一百多名病人因橫紋肌溶解症致死。對史他汀類藥物的藥動學研究早已有文獻報導，這些文獻大多以 HPLC 為主要的研究工具，但是對於史他汀類的藥物在人體的代謝方面過程卻還不是

很清楚。基質輔助雷射脫附游離法近年來發展出一套有關組織造影 (tissue image) 方面的技術，強調能直接從組織上得到相關的胜肽與蛋白質等訊息，當然目前還有許多困難在突破中，有許多科學家也想利用基質輔助雷射脫附游離法分析組織上的藥物代謝情形，但遭遇嚴重的基質干擾問題無法克服。在本論文中，提出利用奈米膠體金粒子為基質，克服傳統的有機酸基質干擾，研究組織上的藥物代謝，並以最常使用的辛伐他汀和洛伐他汀兩種史他汀類藥物為監測對象。

## 五、醣類的簡介

醣類在人的生活中一直是不可或缺的要素，有許多科學家積極地在研究醣類跟人體的特殊關係，例如美國德州大學西南醫療中心臨床營養學副教授伊莉莎白帕克斯<sup>[35]</sup>等人，發表在「營養學期刊 (Journal of Nutrition)」的研究結果顯示，當使用果糖取代葡萄糖時，醣類轉成脂肪的過程明顯增加，而且早餐前攝取果糖較多者，即使是四個小時後才吃午餐，身體也傾向將更多午餐能量存進肝臟變成脂肪，而非將其燃燒做為能量。

在眾多的醣類的研究中，以用基質輔助雷射脫附游離法

的方法，進行醣類的分析，較為少見，因為醣類的質量範圍太接近基質的分子量，容易有基質干擾的問題產生，在本論文中，以奈米膠體金粒子為新的基質，希望能克服此項問題，實驗所使用的醣類有核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖及蔗糖等。

## 六、研究動機與目的

基質輔助雷射脫附游離法具有樣品使用量少、操作快速簡單、高樣品通量（high throughput）、高靈敏度、高解析，對於鹽類與緩衝溶液的影響具有較高的耐受性等優點，蛋白質體學中扮演不可或缺的角色。經由質譜儀的測量，可以獲的分析物正確的分子量訊號，在鑑定蛋白質的身分或研究新發現的蛋白質，具有高度的應用研究價值。

本論文有三個研究目標：

- (1) 利用基質輔助雷射脫附游離法的優點，史他汀藥物和醣類。
- (2) 以奈米膠體金粒子取代有機酸基質，減少低質量範圍的干擾。
- (3) 藉由簡單的樣品前處理，去除生化樣品的干擾。



## 貳、實驗

### 一、藥品

- 1、核糖 (D-(-)-Ribose ;  $C_5H_{10}O_5$  ; MW=150.13) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 99\%$ 。
- 2、葡萄糖同位素 (D-Glucose- $^{13}C_6$  ;  $^{13}C_6H_{12}O_6$  ; MW=186.11) : 係Aldrich公司產品，同位素含量為99 atom %  $^{13}C$ 。
- 3、葡萄糖 (D-(+)-Glucose ;  $C_6H_{12}O_6$  ; MW=180.16) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 99.5\%$ 。
- 4、半乳糖同位素 (D-Galactose-1- $^{13}C$  ;  $^{13}CC_5H_{12}O_6$  ; MW=181.15) : 係Aldrich公司產品，同位素含量為99 atom %  $^{13}C$ 。
- 5、果糖 (D-(-)-Fructose ;  $C_6H_{12}O_6$  ; MW=180.16) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 99\%$ 。
- 6、蔗糖 (Sucrose ;  $C_{12}H_{22}O_{11}$  ; MW=342.30) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 99.5\%$ 。
- 7、辛伐他汀 (Simvastatin ;  $C_{25}H_{38}O_5$  ; MW=418.57) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 97\%$ 。
- 8、洛伐他汀 (Mevinolin ;  $C_{24}H_{36}O_5$  ; MW=404.54) : 係Sigma公司產品，純度 $\geq 98\%$ 。
- 9、膠體金 (Gold colloid solution ; Au ; MW=196.97) : 係Sigma公司產

- 品，平均奈米尺寸 3.0-5.5nm (monodisperse)，濃度~0.01% H<sub>2</sub>O。
- 10、3,5-二甲氧基-4-羥基桂皮酸 (Sinapic acid; C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; MW=224.22) (SA)：係 Bruker Daltonics 公司產品。
- 11、 $\alpha$ -氰基-4-羥基桂皮酸 ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid; C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>; MW=189.17) ( $\alpha$ -CHCA)：係 Bruker Daltonics 公司產品。
- 12、二羥基苯甲酸 (2,5-Dihydroxybenzoic acid; C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>; MW=154.12)(DHB)：係 Bruker Daltonics 公司產品。
- 13、甲醇 (Methanol; CH<sub>3</sub>OH)：係 E. Merck 公司產品，HPLC 級試藥。
- 14、乙醇 (Ethanol; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)：係 E. Merck 公司產品，HPLC 級試藥。
- 15、三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid; CF<sub>3</sub>COOH) (TFA)：係 Fisher Chemical 公司產品，純度  $\geq 99.8\%$ 。
- 16、丙酮 (Acetone; CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>)：係 E. Merck 公司產品，HPLC 級試藥。
- 17、氫甲烷 (Acetonitrile; C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) (ACN)：係 E. Merck 公司產品，HPLC 級試藥。

## 二、儀器設備與實驗器材

1、質譜儀型號與規格：本實驗使用的儀器名稱為基質輔助雷射脫附游離-飛行時間串聯質譜儀，簡稱為MALDI-TOF-MS 係 Bruker Daltonics 公司(Germany)產品，model:Ultraflex III。

其外觀及內部結構如圖八的照片所示，主機大小：長 230 公分\*寬 78.4 公分\*高 133.2 公分，屬平躺式，總重量約 550 公斤。連接控制用電腦及氣體鋼瓶與管線，約佔 4 平方公尺之地面面積。雷射系統屬於 Nd-YAG 固體雷射射(solid-state smartbeam)雷射波長為 355 nm，激發能量可高達 300 $\mu$ J，質譜分析器具有直線(Linear)與反射(Reflectron)模式及二次質譜(MS/MS)的功能

2、毒氣操作台：台灣海博特公司出品 HP-90 型免排氣式毒氣操作台。

3、微量注射器(Micro syringe)為進階生物科技股份有限公司出品。

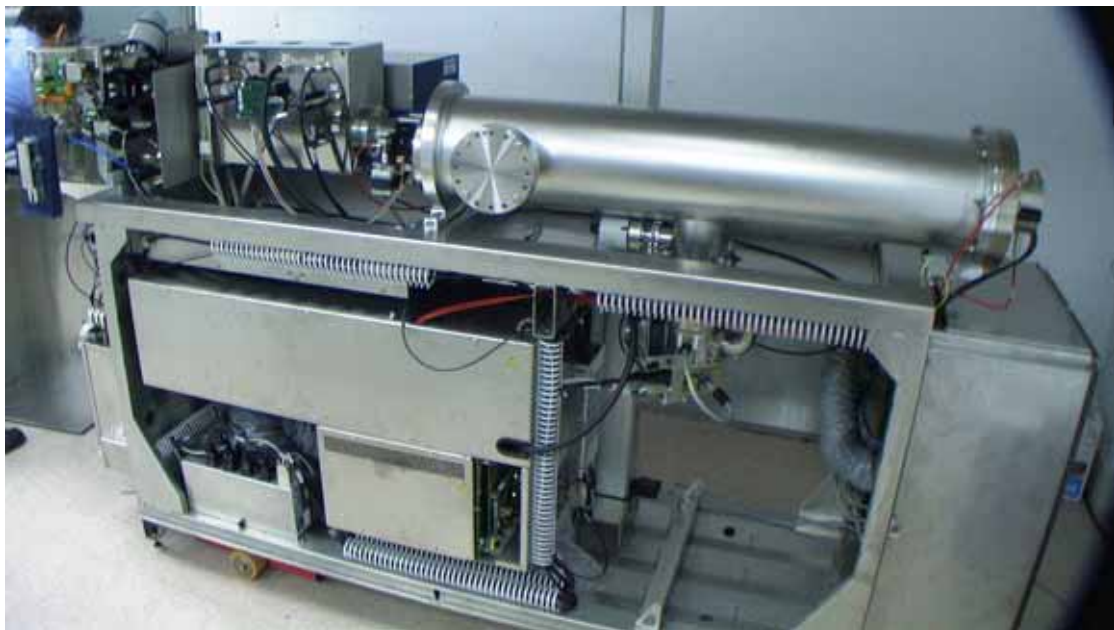
4、高速離心機為伯新科技公司出品，denville 260D 型。

5、4°C 冰箱：瑞興冷凍公司出品，RW-53CB 型。

(A) 外觀



(B) 內部結構



圖八、基質輔助雷射游離/脫附-飛行時間串聯質譜儀(A)外觀及(B)內部結構照片

### 三、實驗方法

#### 3.1、藥品配製

##### (一) 基質溶液配製

(A)  $\alpha$ -CHCA 基質溶液：稱取 10 mg  $\alpha$ -CHCA 溶於 1 mL 的 0.15% TFA 溶劑中，其溶劑為 50% 的 ACN 及 50% 的純水。

(B) 2,5-DHB 基質溶液：稱取 10 mg 的 2,5-DHB 溶於 1 mL 的 0.15% TFA 溶劑中，其溶劑為 50% 的 ACN 及 50% 的純水。

(C) SA 基質溶液：稱取 15 mg 的 SA 溶於 1 mL 的 0.15% TFA 溶劑中，其溶劑為 50% 的 ACN 及 50% 的純水。

(D) 奈米膠體金：原始溶液取出使用即可，如要調整濃度時，以純水稀釋。

##### (二) 史他汀類藥物之配製

##### (A) 洛伐他汀

製備  $10^{-3}$  M 的儲存溶液，稱取所需重量，用乙醇溶解，儲存在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中。於實驗進行前配置，working solution，以乙醇稀釋  $10^{-3}$  M 的儲存溶液至所需濃度。

##### (B) 辛伐他汀

製備  $10^{-3}$ M 的儲存溶液，秤取所需重量，用乙醇溶解，儲存在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中。於實驗進行前配置 working solution，以乙醇稀釋  $10^{-3}$ M 的儲存溶液至所需濃度。

### (三) 醣類之配製

#### (A) 核糖

製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。

#### (B) 果糖

製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在常溫中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。

#### (C) 半乳糖同位素

製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在常溫中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。

#### (D) 葡萄糖同位素

製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在常溫中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於

實驗前配製。

(E) 蔗糖

製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在常溫中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。

(四) 氫氧化鈉之配製

製備 0.1% 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存常溫中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。

(五) 葡萄糖內標準之配製

製備葡萄糖和葡萄糖同位素的製備 0.1M 儲存溶液，秤取所需重量，用水溶解，儲存在 -4 °C 冰箱中，working solution 以水稀釋到所需濃度，於實驗前配製。作內標準檢量線時，取 1  $\mu$ L、0.1M 葡萄糖同位素的儲存溶液分別稀釋到  $10 \times 10^{-3}$  M、 $7.5 \times 10^{-3}$  M、 $5 \times 10^{-3}$  M、 $2.5 \times 10^{-3}$  M、 $1.0 \times 10^{-3}$  M，共配製五種葡萄糖濃度。

### 3.2、血液樣品前處理

取 2  $\mu$ L 人的血清加 1  $\mu$ L 內標準葡萄糖同位素，再加 7  $\mu$ L 丙酮去蛋白，離心（轉速 12,000rpm）5 分鐘即可取上層澄清

液使用。

### 3.3、樣品盤(target)前處理

實驗前用拭鏡紙沾取分析級甲醇擦拭樣品盤，先去除樣品盤上大部分的污染物，再浸入含有 50% 甲醇溶液的燒杯中，超音波震盪 20 分鐘，移除廢液，以去離子水沖洗樣品盤表面，沖掉殘留物，再用拭鏡紙沾取分析級甲醇擦拭樣品盤一次，待表面溶劑揮發後即可使用。

### 3.4、基質輔助雷射脫附游離法樣品之配製

以基質輔助雷射脫附游離法進行分析時，分析物與基質以適量比例混和後，取 1  $\mu$ L 混合液，點在樣品盤上，待溶劑揮發後形成乾燥的固態樣本後，即可進行基質輔助雷射脫附游離質譜法分析。

### 3.5、內、外標準校正法

外標準校正法是使用已知分子量的物質來當標準品，且質量範圍以能涵蓋待測物的質量範圍為主，而外標準校正法主要是先用標準品校正儀器之後再測量待測物。內標準校正法主要是把標準品和待測物混合在一起上機校正儀器，利用標準品校正儀器後，即可測量待測物，因為標準品和待測物



混合在一起，校正標準品時，待測物的質量誤差也會跟著修正，因此內標準校正法的誤差會比外標準校正法低，但缺點是要先找到不會干擾抑制待測物的物質。

在測量小分子的實驗中可以同時使用內、外標準校正法。取  $1\mu\text{L}$  的  $\alpha\text{-CHCA}$  點在樣品盤上，使用  $\alpha\text{-CHCA}$  已知的碎片訊號，當作外校正標準品校正儀器，而內標準校正法可以利用金本身的訊號，當作內校正標準品校正儀器，同時使用內、外標準校正法，較能降低儀器本身所產生的誤差。

# 參、結果與討論

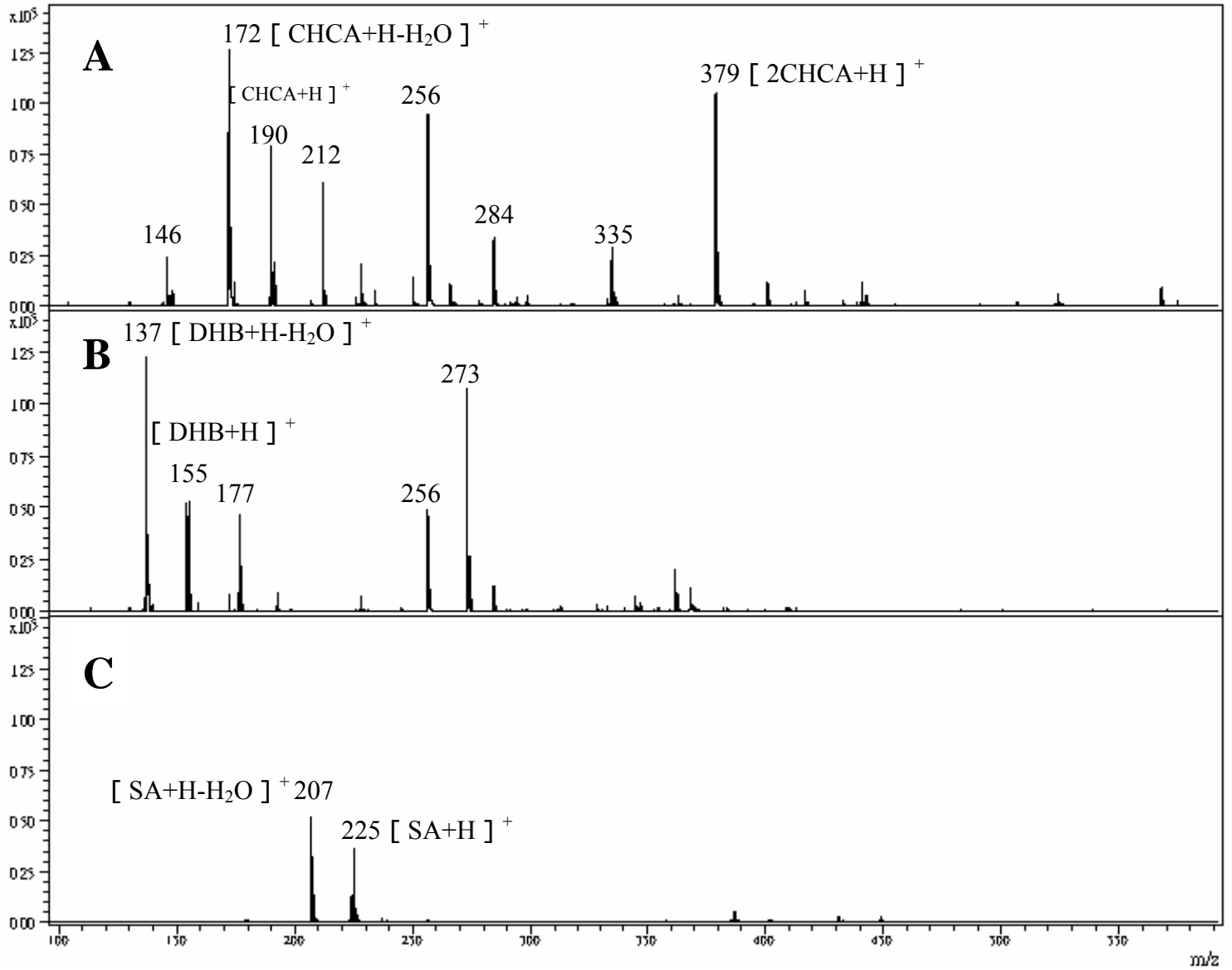
## 一、實驗參數與最佳條件探討

### 1.1、基質的選擇

基質的選擇在基質輔助雷射脫附游離質譜分析法中，對於分析物離子化的效率有很大的影響。圖九為一般常用的有機酸基質  $\alpha$ -CHCA、DHB、SA 之質譜圖，由圖九可知這三種基質在低分子範圍有許多訊號，這些訊號都是基質本身吸收雷射能量，造成斷裂所產生的碎片，過多的碎片易造成訊號與分析物的重疊干擾，增加分析物判讀的困難，其易吸收雷射能量的特性，也會導致基質本身的訊號強度太強而抑制分析物的訊號。

奈米膠體金粒子為無機材料，本身並不會有斷裂碎片的情形，主要的訊號以  $[\text{Au}]^+$ 、 $[\text{Au}_2]^+$ 、 $[\text{Au}_3]^+$  金離子加成訊號為主，這些簡單的訊號，較不會跟分析物有訊號干擾與重疊上的問題。本研究利用奈米膠體金粒子取代有機酸基質，排除低質量的基質干擾問題，希望能成功地分析小分子的化合物。

Intensity



圖九、有機酸基質 (A)  $\alpha$ -CHCA、(B) DHB 及 (C) SA 所產生的背景訊號質譜圖

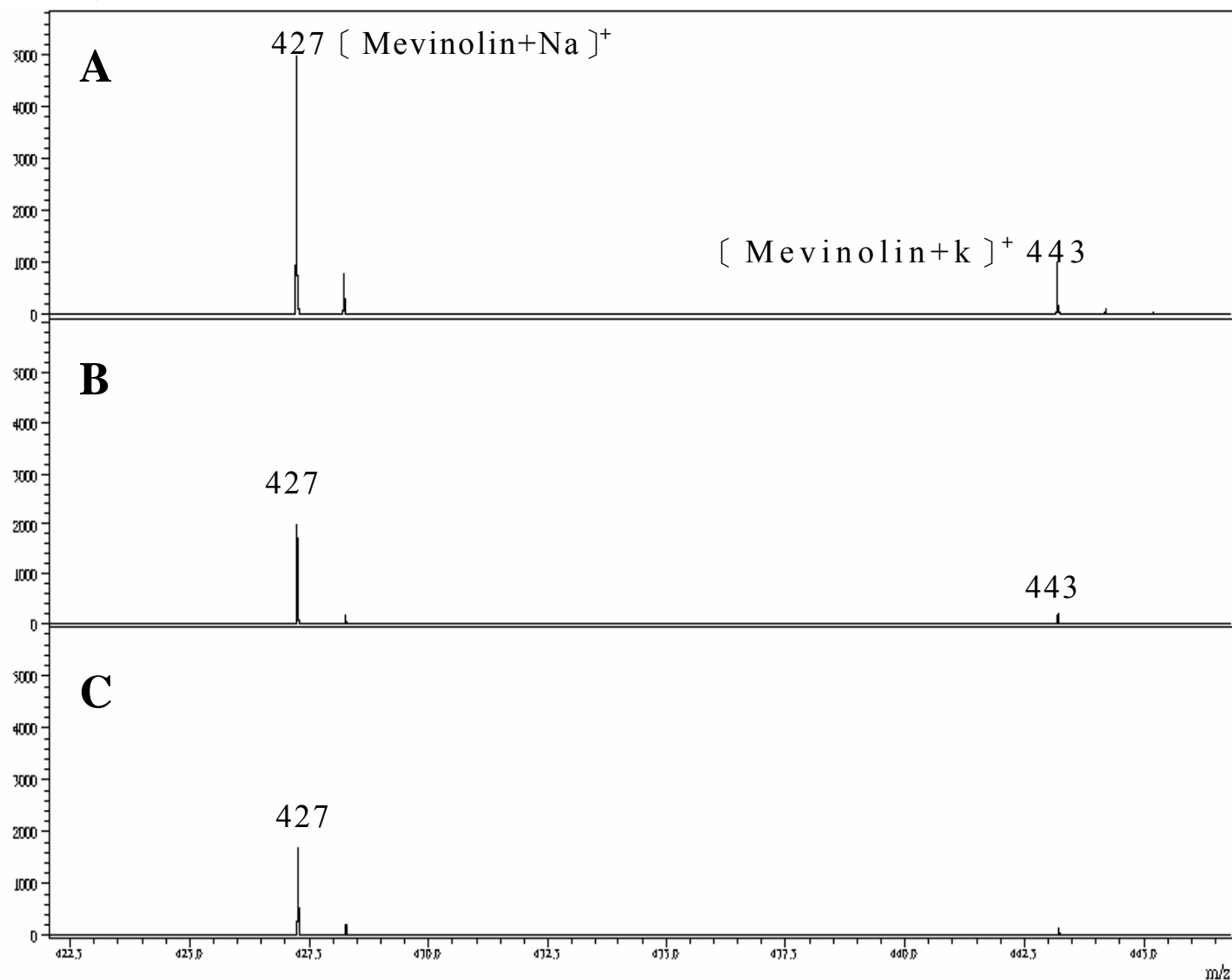
## 1.2、儀器參數設定

本實驗之基質輔助雷射脫附游離質譜法，其雷射波長為 355 nm，屬於 Nd-YAG 固體雷射，激發能量可高達 300  $\mu$ J，飛行模式有直線式與反射式兩種，反射式對於分析物解析度較好，因此本實驗研究皆使用反射式進行偵測。有幾個儀器參數的設定如延遲時間 (Delay time)、雷射頻率 (Laser Frequency) 及相對電壓 (%IS1) 等，會大大影響到分析物訊號的解析與強度，本實驗先利用 1mM 的洛伐他汀溶液，搭配奈米膠體金粒子為基質，測試這些儀器參數對於測量小分子化合物的最佳操作條件。

延遲時間是為了改善解析度，而使得離子的起飛時間延後，圖十 (A) 為檢測洛伐他汀將延遲時間設定在 100 ns、200 ns、300 ns 所獲得的質譜圖，從圖 (A)、(B) 及 (C) 中可看出延遲時間對於小分子的解析度差異不大，但是隨著時間的拉長，訊號強度有下降的趨勢，這可能是因為延遲時間拉的越長，已經游離的氣體還是會逸失些許的離子，因而造成訊號下降，所以選擇以延遲時間 100 ns 為最佳條件。

圖十一將雷射頻率調整為 20 Hz、40 Hz、100 Hz，測量洛伐他汀所獲得的質譜圖，從圖上可看出，隨著雷射的頻率

Intensity



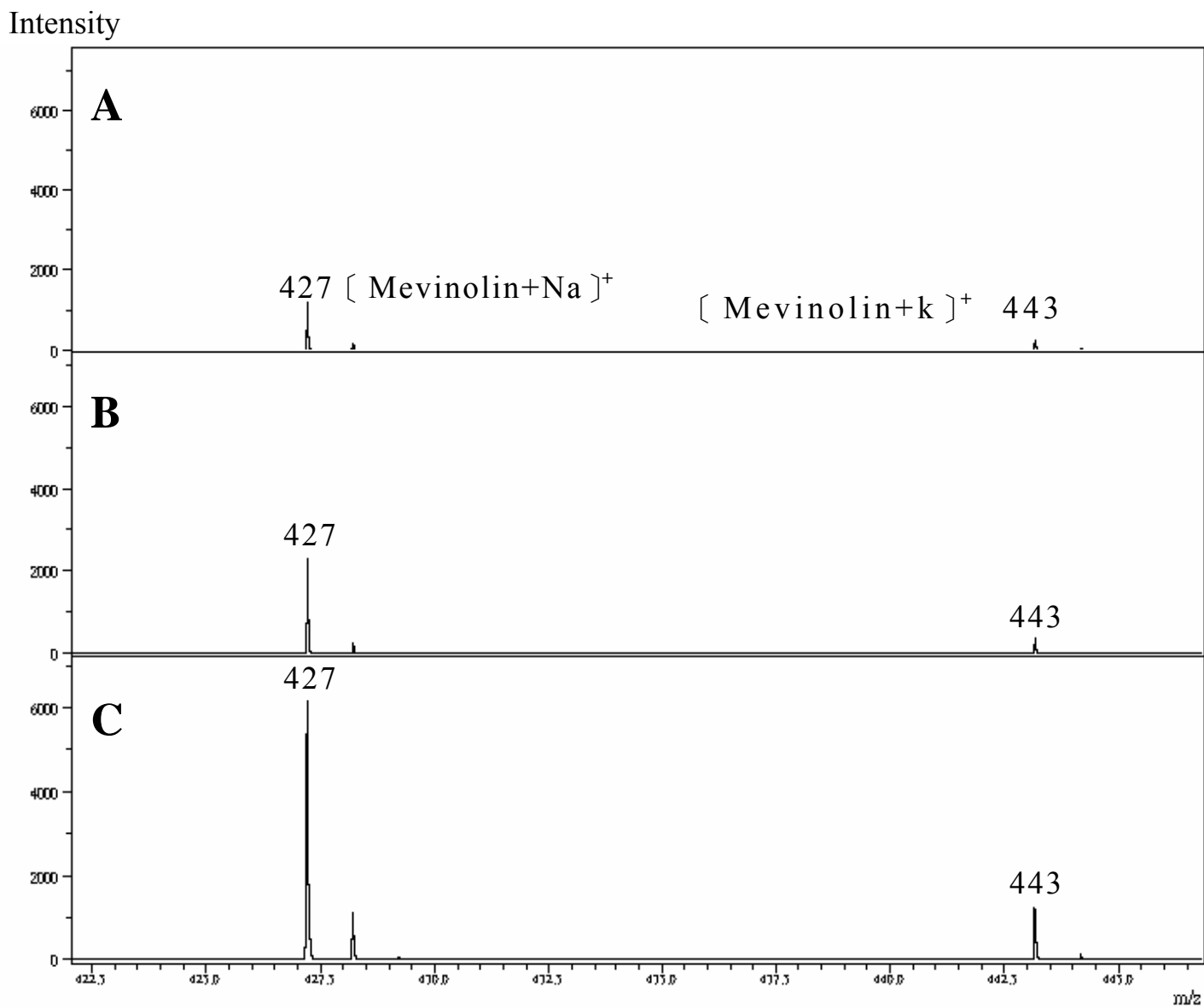
圖十、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜圖，延遲

時間設定為 (A) 100 ns、(B) 200 ns 及 (C) 300 ns

增加，樣品訊號強度有增加的趨勢，推測可能是雷射頻率越快，越能帶動分析物周圍的分子汽化游離，使得分析物的訊號增加，因此選擇雷射頻率 100 Hz 為最佳條件。

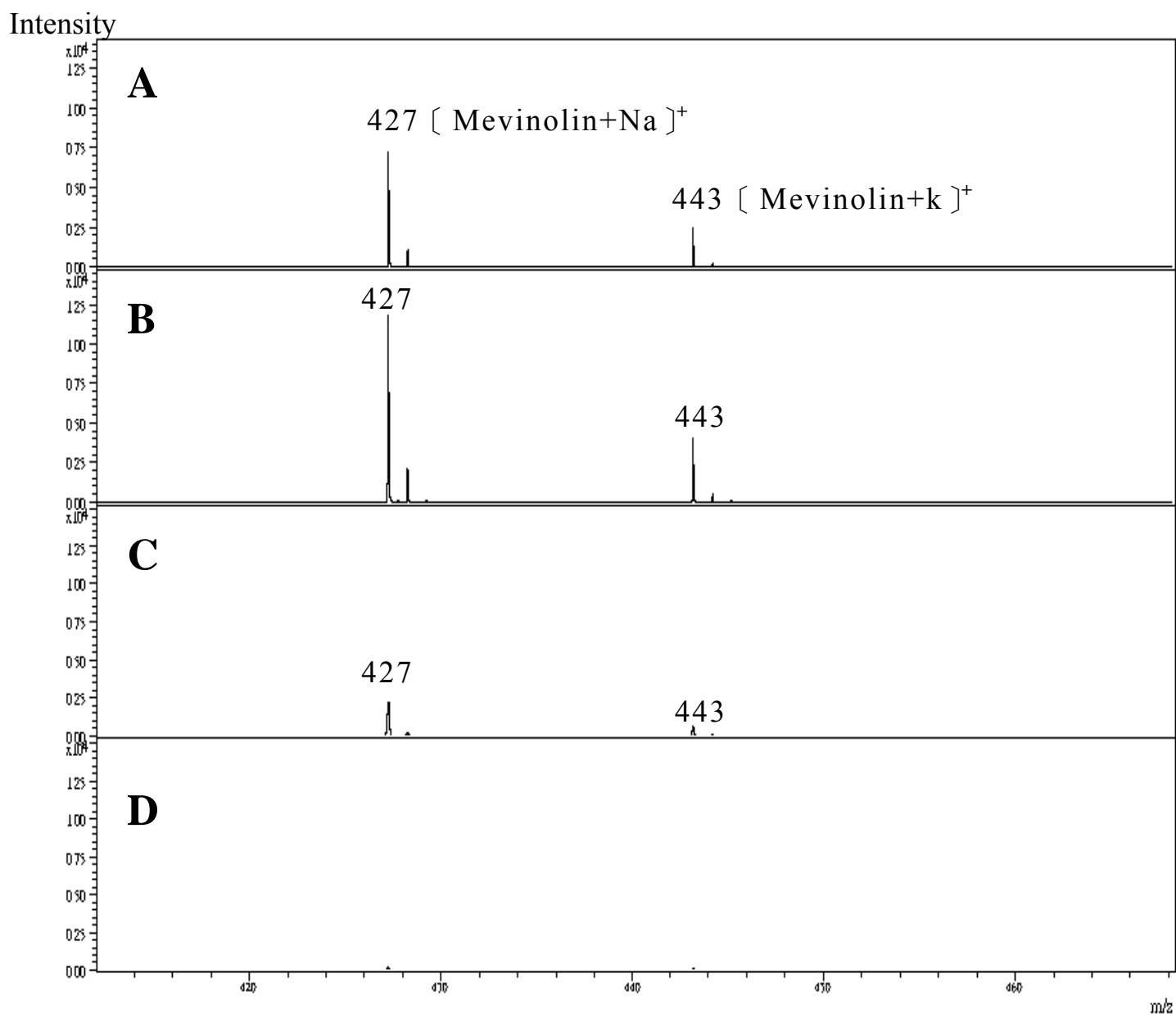
相對電壓參數主要是調整 IS2 對 IS1 的相對電壓。圖十二將相對電壓分別設定成 80、86、90、92，測量洛伐他汀樣品所獲得的質譜圖，如圖十二所示，由圖中可看出，(B)圖的相對電壓為 86，可測得最強的分析物訊號，而(C)圖及(D)圖的相對電壓分別為 90 和 92 時，分析物訊號強度有遞減的趨勢，另外，(A)圖中當相對電壓參數為 80，所測得的分析物訊號強度也比(B)圖低。這可能是因為相對電壓越大，離子飛行的越慢，所以不利於小分子的訊號產生，但對於大分子的測量則較為適合，相反的，若相對電壓太小，離子飛行得太快，不利於偵測器的感應，使得訊號強度減弱，因此選擇相對電壓 86 為最佳條件。

綜合以上三種儀器參數的調整，比較圖十、圖十一及圖十二，可以發現在圖十二中，調整相對電壓參數對訊號強度的影響，差異性最大，由此也可看出這項儀器參數設定的重要性。



圖十一、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜圖雷

射頻率設定為(A) 20 Hz、(B) 40Hz 及(C) 100 Hz



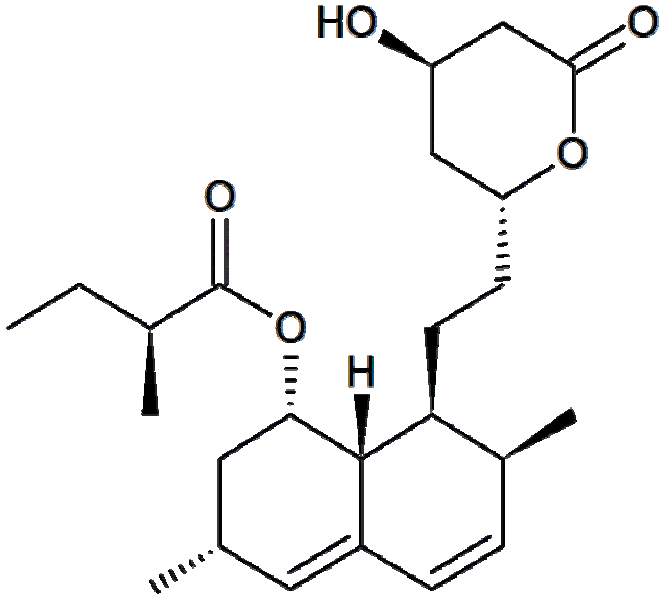
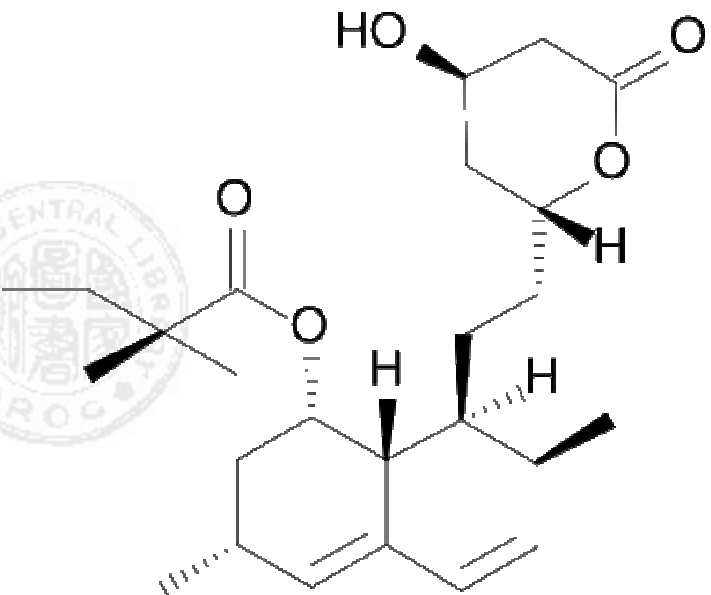
圖十二、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀的質譜圖相對  
電壓參數設定為 (A) 80、(B) 86、(C) 90 及 (D) 92



## 二、史他汀類藥物的研究

本實驗使用兩種常見的史他汀類藥物洛伐他汀和辛伐他汀，其分子式、分子量及化學結構式如下：

表二、史他汀類藥物結構

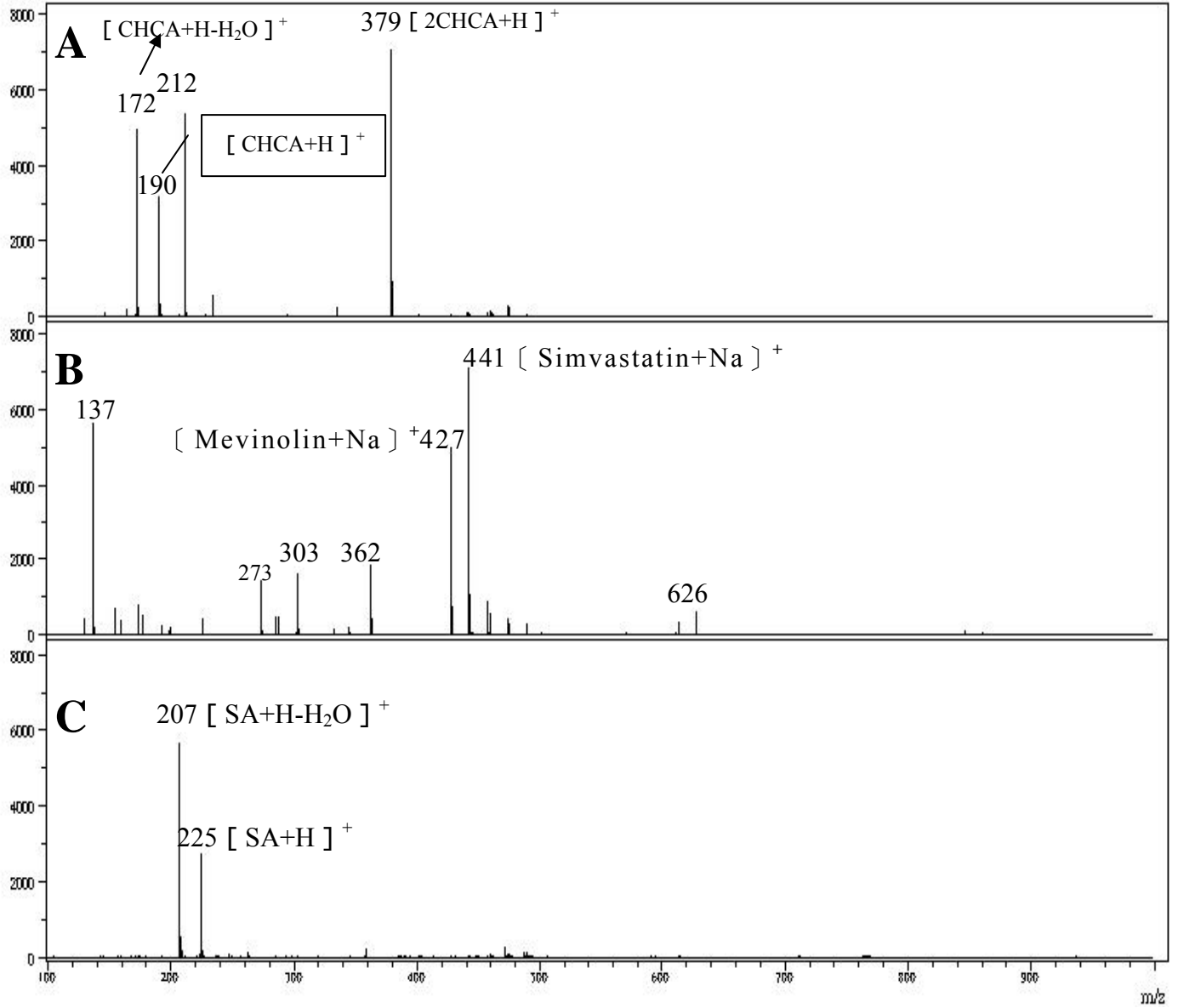
<p>洛伐他汀 Mevinolin <math>C_{24}H_{36}O_5</math> MW=404.54</p>	
<p>辛伐他汀 Simvastatin <math>C_{25}H_{38}O_5</math> MW=418.57</p>	

## 2.1、史他汀類藥物與基質的探討

為了選擇適當的基質，進行洛伐他汀與辛伐他汀的分析，分別以傳統的有機酸基質與本論文所發展出的新技術，應用奈米膠體金粒子作為基質，探討並比較兩種基質對分析的測量之影響。圖十三為使用有機酸基質 $\alpha$ -CHCA、DHB及SA所獲得之質譜圖，由圖中可以發現，以 $\alpha$ -CHCA與SA為基質，分析洛伐他汀和辛伐他汀，根本無法使這些分析物游離，因此在圖(A)和(C)中，只出現基質本身及其碎片所產生的訊號，而圖(B)以DHB為基質，雖然能打出屬於分析物的訊號，如 $m/z=427$ 、 $[\text{Mevinolin}+\text{Na}]^+$ 及 $m/z=441$ 、 $[\text{Simvastatin}+\text{Na}]^+$ ，但是基質本身及其碎片所產生的訊號也很多、很強、很複雜，造成嚴重的基質干擾問題；圖十四為使用奈米膠體金粒子，取代有機酸基質所獲得的質譜圖，從圖上可以清楚看出 $m/z=427$ 、 $[\text{Mevinolin}+\text{Na}]^+$ 及 $m/z=441$ 、 $[\text{Simvastatin}+\text{Na}]^+$ 及 $m/z=457$ 、 $[\text{Simvastatin}+\text{K}]^+$ 屬於分析物的訊號非常明顯，而且背景雜訊相對於圖十三的有機酸基質而言非常乾淨，能將雜訊抑制到一定程度以下。

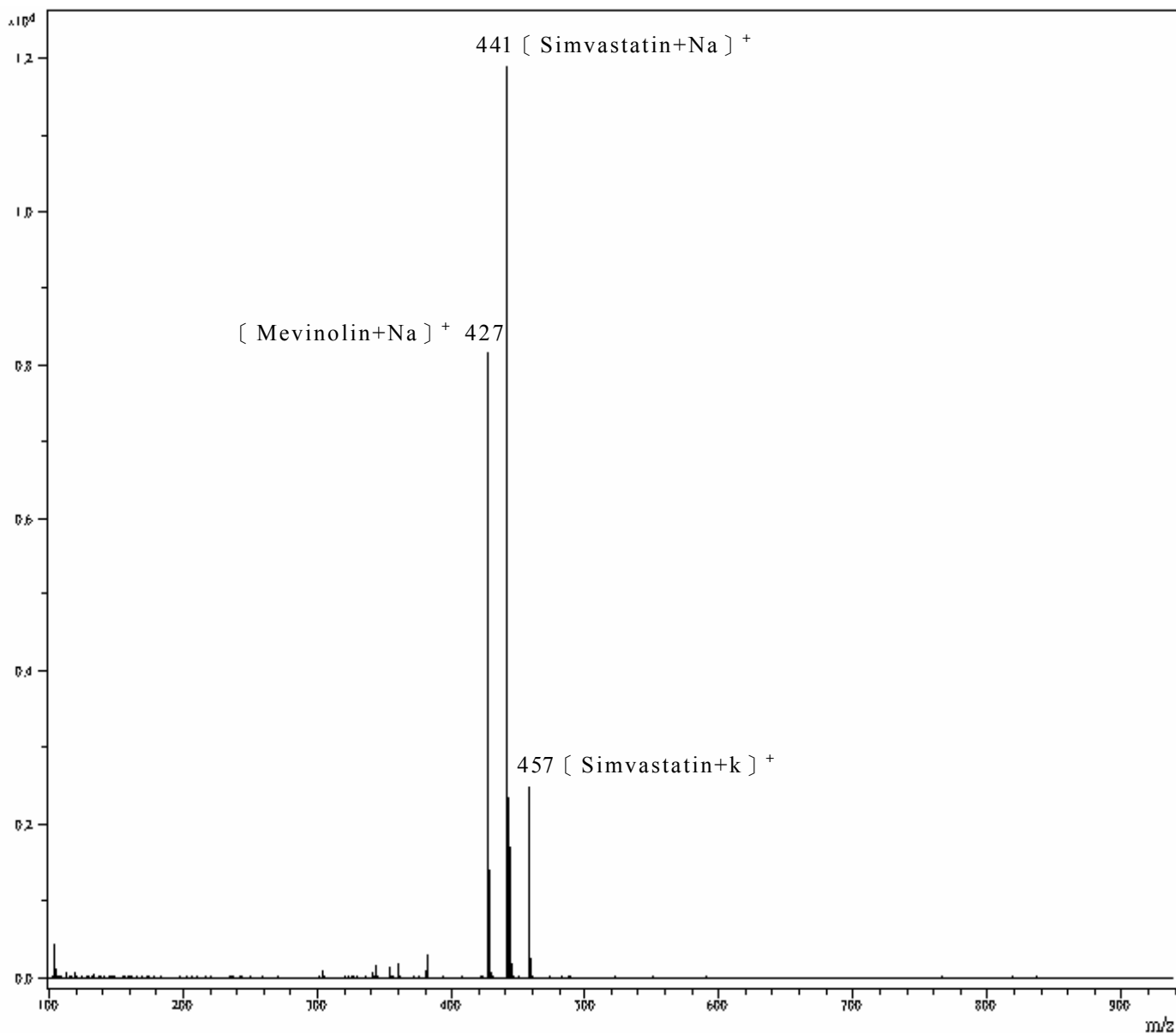
這表示使用奈米膠體金粒子當基質，的確能幫助分析物

Intensity



圖十三、以有機酸基質 (A)  $\alpha$ -CHCA 10 mg/mL、(B) DHB 及 (C) SA 分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的質譜圖

Intensity



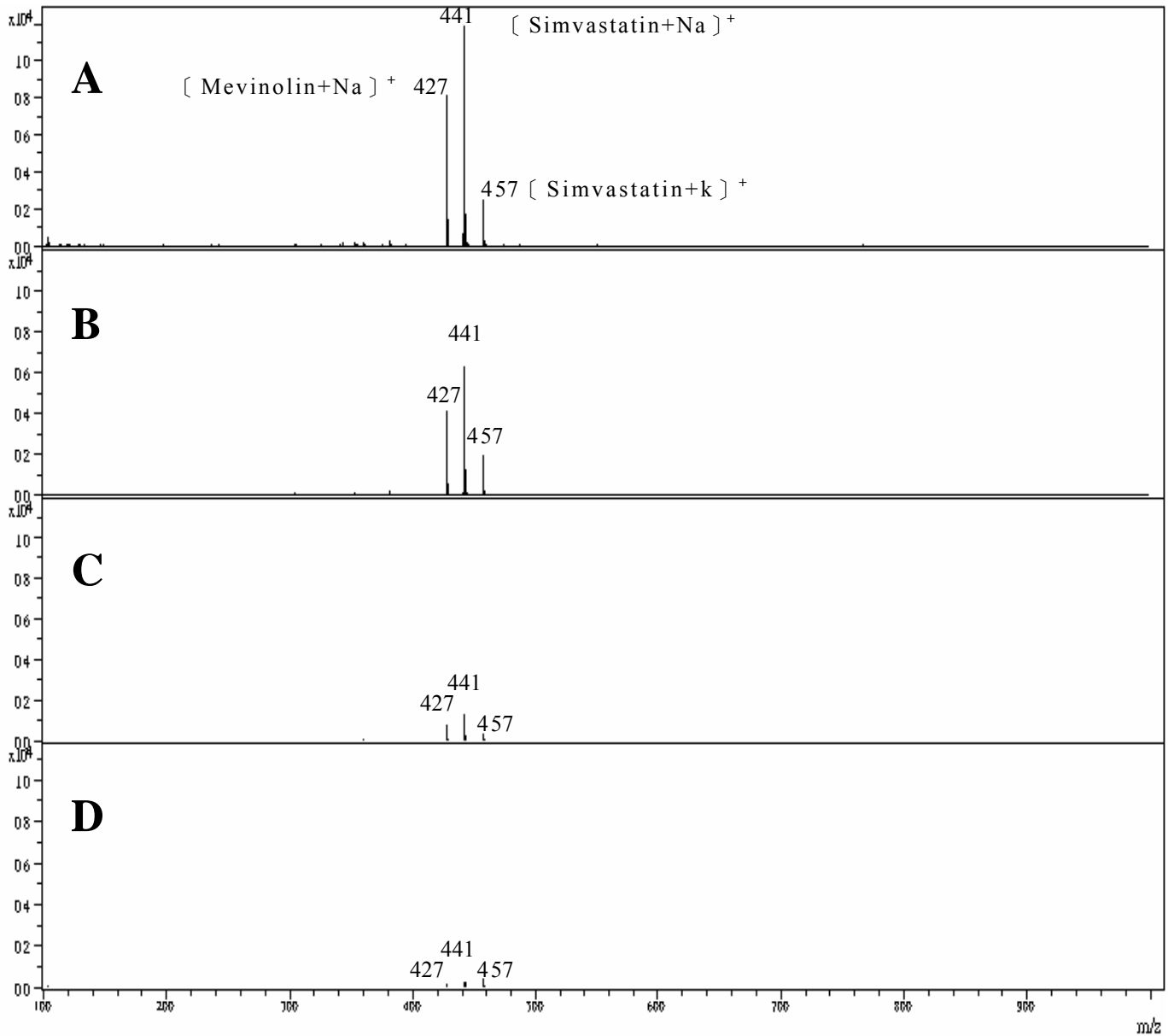
圖十四、以奈米膠體金粒子為基質分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的質譜圖

游離，並且減少基質干擾的發生，因為沒有基質的干擾，不會有基質的訊號出現，使得圖譜較乾淨，容易判讀屬於分析物的訊號，也因為沒有基質的干擾，大大的提高儀器偵測的靈敏度，此項結果成功地達到本實驗所設定的目標。

## 2.2、史他汀類藥物與膠體金添加量的探討

膠體金顆粒的多寡可能會影響分析物脫附/游離的能力，因此本實驗將探討添加不同濃度的膠體金對於分析物的影響。取洛伐他汀和辛伐他汀各 1 mM 混合後，分別加入體積稀釋 1 倍、5 倍、50 倍及 500 倍的膠體金，混合點樣後進行質譜儀分析。以不同濃度的膠體金為基質，分析洛伐他汀和辛伐他汀所得到的質譜圖，如圖十五所示，從圖中可以發現，當奈米膠體金的濃度降低時，訊號強度也跟著下降，以圖(A)濃度較高的膠體金(體積稀釋 1 倍)，所產生的訊號強度最強，可能是因為膠體金的濃度較低，吸收雷射的能量相對減少，使得分析物無法藉由膠體金充分吸收雷射能量而汽化脫附/游離，因此奈米膠體金添加量的最佳條件，為使用體積稀釋 1 倍的膠體金。

Intensity

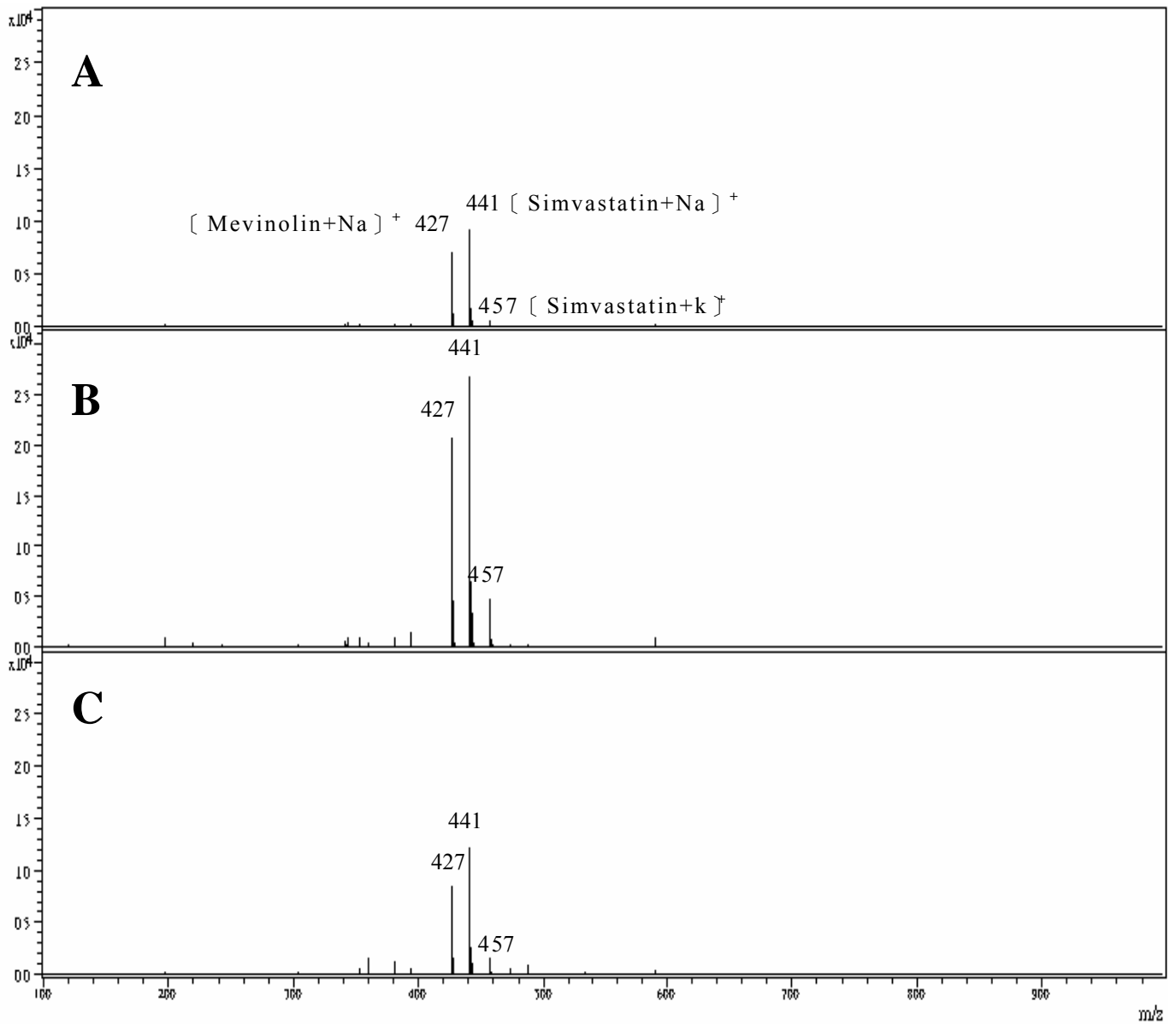


圖十五、膠體金體積稀釋 (A) 1 倍、(B) 5 倍、(C) 50 倍及 (D) 500 倍分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的質譜圖

### 2.3、史他汀類藥物添加氫氧化鈉的探討

使用傳統的有機酸基質時，因為這些基質具有羧酸的官能基結構，本身容易提供質子給分析物，幫助分析物游離，因此分析物所形成的訊號，主要是以質子化的  $[M+H]^+$  結構存在。使用無機金屬當基質時，分析物所產生的訊號，則以形成  $[M+Na]^+$  或  $[M+k]^+$  的結構為主，為了能夠提升分析物的偵測訊號，添加少量的氫氧化鈉，以增加鈉離子的含量，進而增強屬於分析物的  $[M+Na]^+$  訊號。圖十六為 100  $\mu\text{L}$  奈米膠體金原始溶液，分別加入 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$  的 0.1% NaOH 水溶液，分析洛伐他汀和辛伐他汀所獲得的質譜圖，從圖上可以看出，當 0.1% NaOH 添加量從 1  $\mu\text{L}$  增加到 10  $\mu\text{L}$  時，分析物的訊號強度明顯提升了，但是當 0.1% NaOH 添加量從 10  $\mu\text{L}$  再增加到 20  $\mu\text{L}$  時，分析物的訊號強度卻下降了，這可能是因為在一般基質輔助雷射脫附游離質譜分析法上，鹽類或界面活性劑的存在，通常會干擾分析物訊號測量，適量的 NaOH 能提升訊號，而過多的鹽類卻造成分析物與膠體金非均質化與高污染化，使得分析物的離子化能力下降，訊號強度也隨之減弱，所以在 100  $\mu\text{L}$  奈米膠體金中，添加 10  $\mu\text{L}$  的 0.1% NaOH 水溶液為最佳的實驗條件。

Intensity



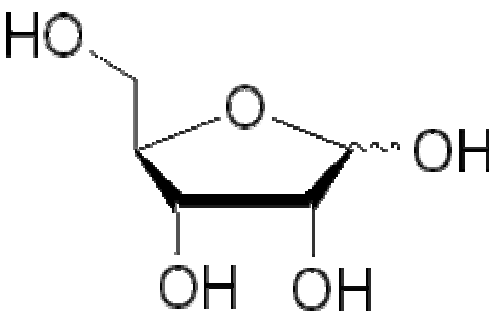
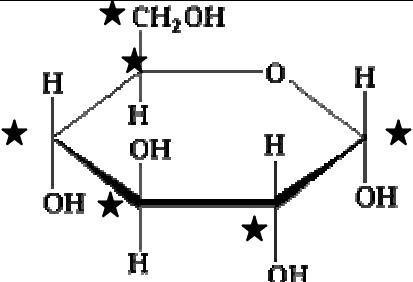
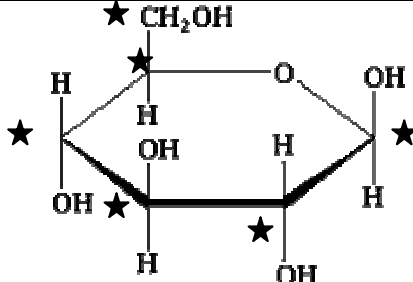
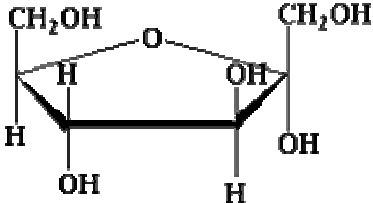
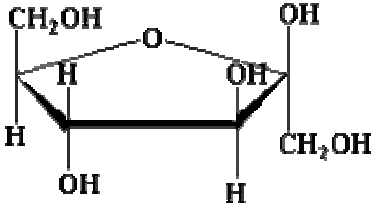
圖十六、在  $100 \mu\text{L}$  的奈米膠體金溶液中加入 (A)  $1 \mu\text{L}$ 、(B)  $10 \mu\text{L}$  及 (C)  $20 \mu\text{L}$  的  $0.1\%$  NaOH 水溶液分析洛伐他汀及辛伐他汀所獲得的質譜圖

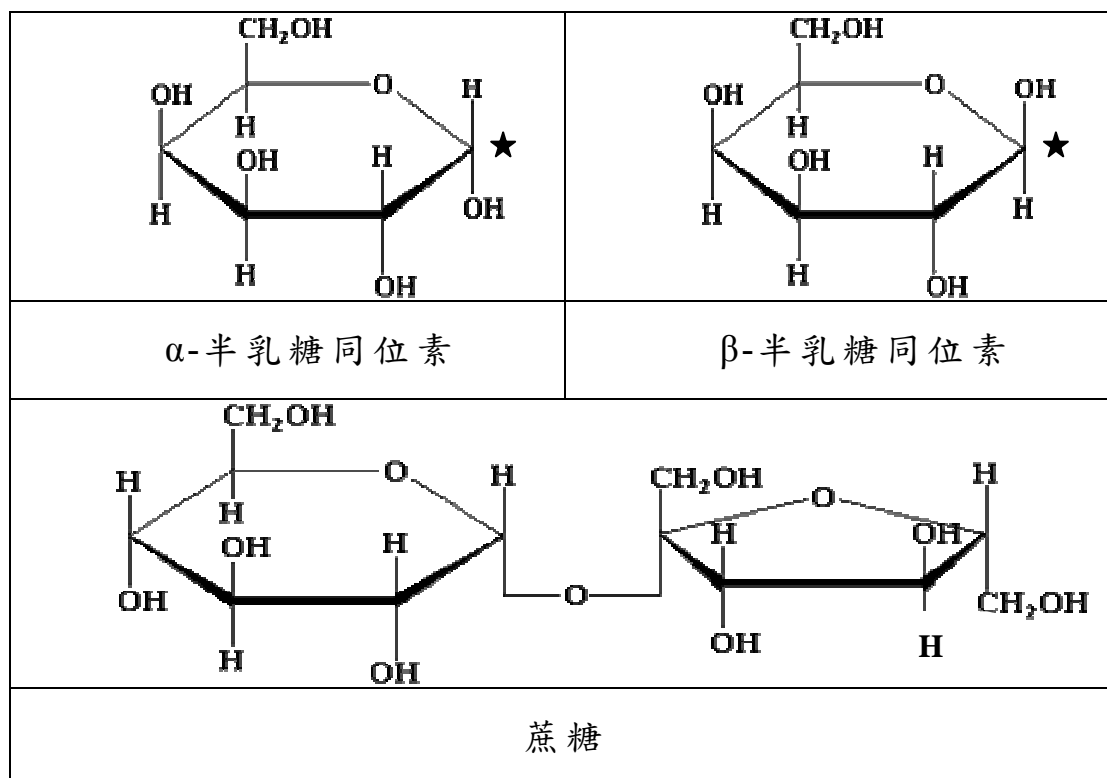


### 三、醣類的研究

在本實驗中，選擇五種常見的醣類進行分析檢測，這些醣類包括：核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素和蔗糖等，其結構如下（★為碳十三同位素）：

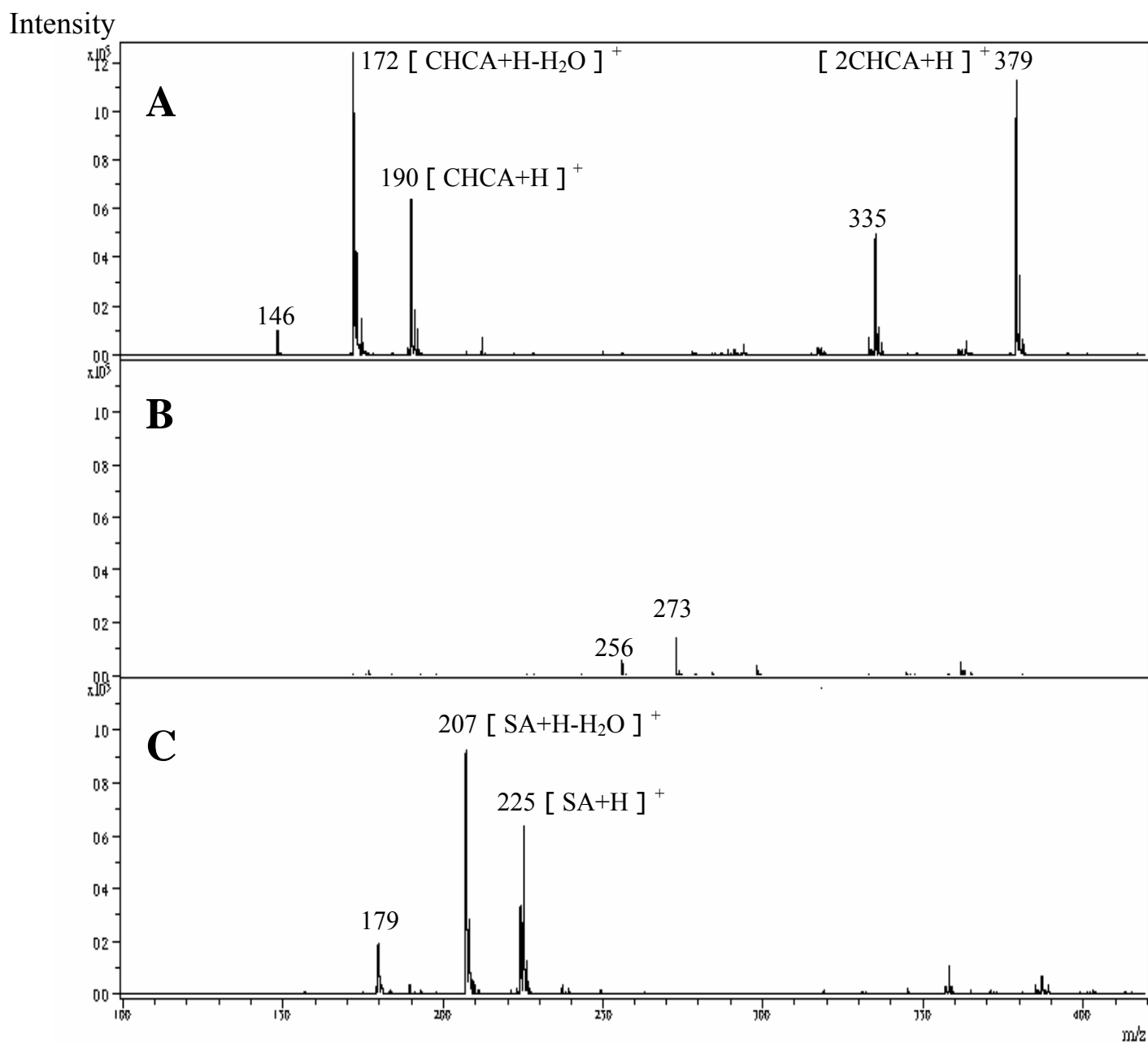
表三、醣類結構式

	
核糖	
	
α-葡萄糖同位素	β-葡萄糖同位素
	
α-果糖	β-果糖



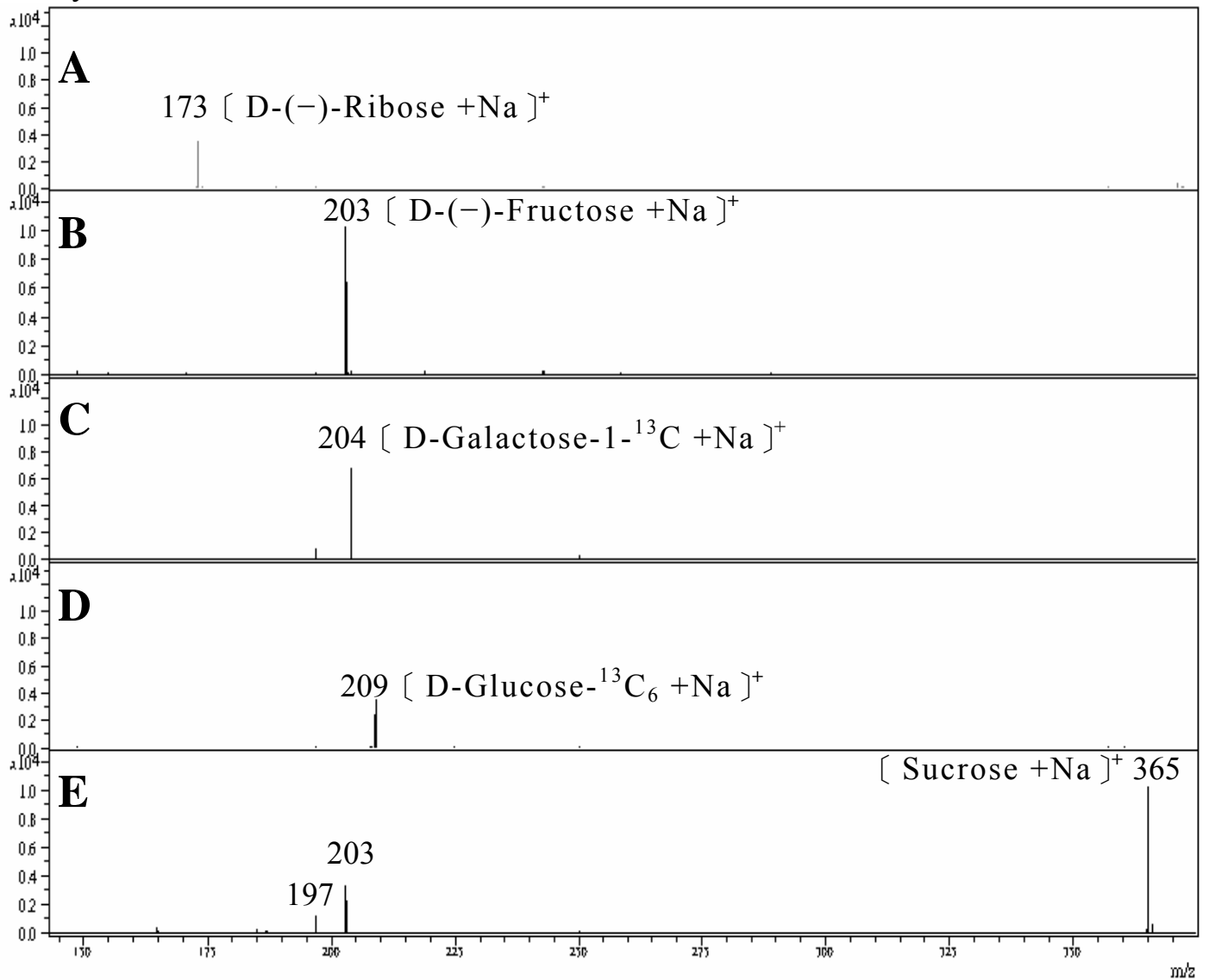
### 3.1、醣類與基質的探討

為了解不同的基質對糖類的分析所造成的影響，我們分別使用傳統的有機酸基質與本論文所提出的新技術，應用奈米膠體金粒子為基質，進行醣類的分析，並做一比較。圖十七為使用有機酸基質  $\alpha$ -CHCA、DHB 及 SA，對五種醣類分析，所獲得之質譜圖，從圖中可以發現，使用傳統的有機酸基質，無法將醣類分析物有效地游離，圖譜中並沒有任何屬於分析物的訊號出現，只有基質本身及其碎片所形成的訊號。圖十八為核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素及蔗糖等五種醣類，以奈米膠體金粒子為基質所獲得的質譜圖



圖十七、五種醣類化合物分別以 (A)  $\alpha$ -CHCA、(B) DHB、  
及 (C) SA 為基質所獲得的質譜圖

Intensity



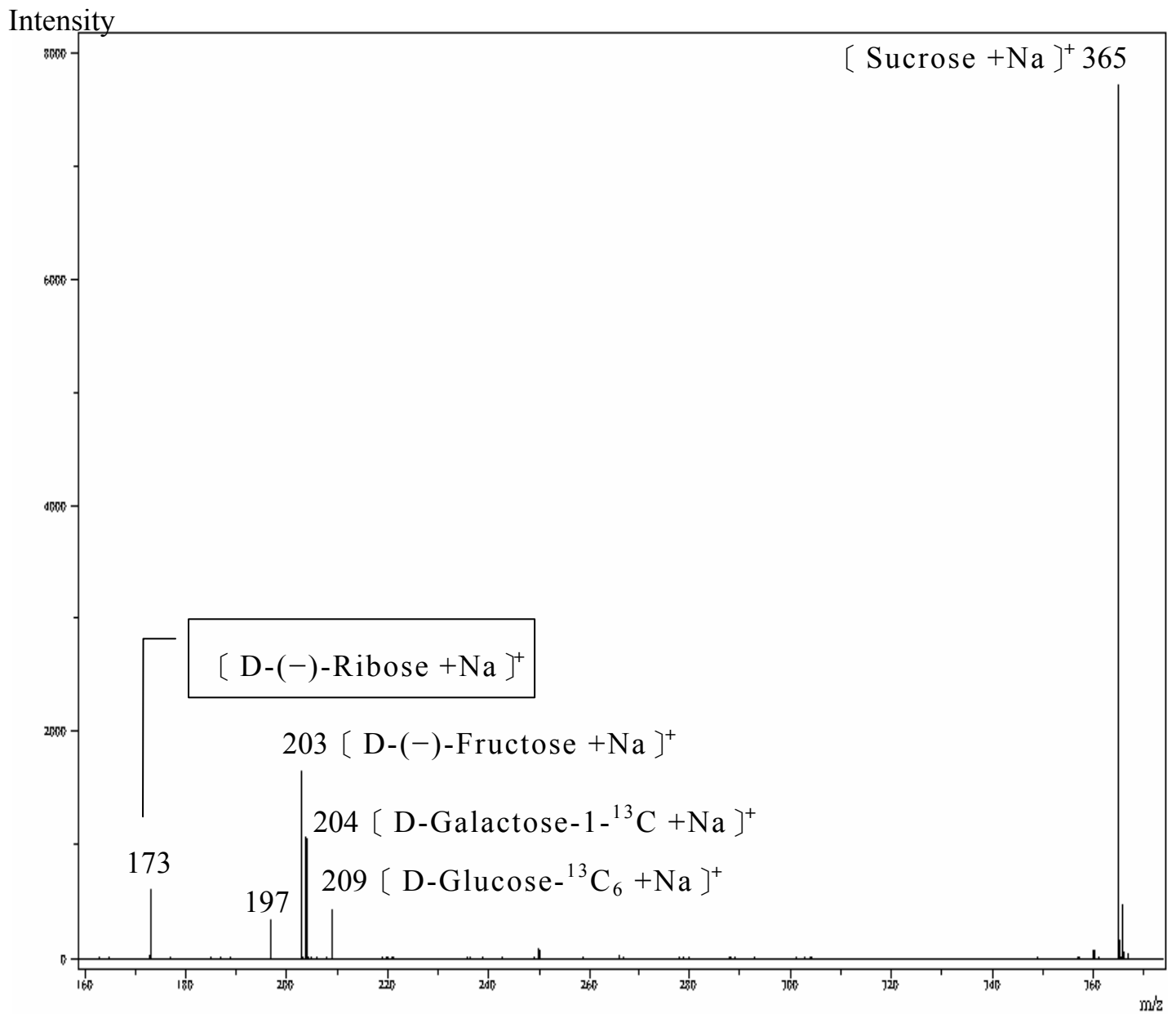
圖十八以奈米膠體金粒子為基質分析 (A) 核糖、(B) 果糖、(C)

半乳糖同位素、(D) 葡萄糖同位素及 (E) 蔗糖所獲得的質譜圖

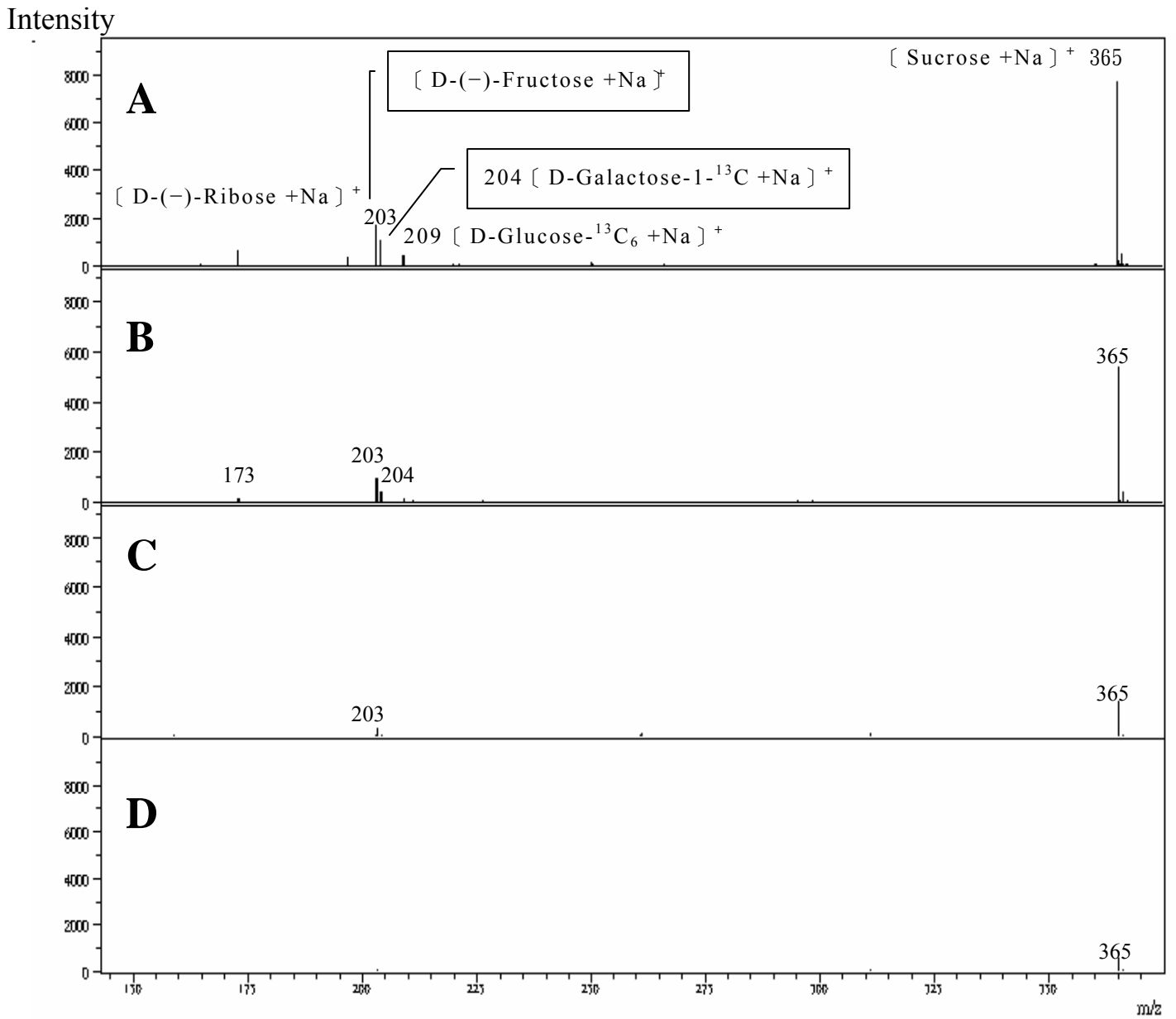
，從圖中可以清楚的檢測出  $[D(-)\text{-Ribose} + \text{Na}]^+$ 、 $[D(-)\text{-Fructose} + \text{Na}]^+$ 、 $[D\text{-Galactose-}1\text{-}^{13}\text{C} + \text{Na}]^+$ 、 $[D\text{-Glucose-}^{13}\text{C}_6 + \text{Na}]^+$ 及  $[\text{Sucrose} + \text{Na}]^+$ 等醣類分析物的訊號，而且背景雜訊相對於圖十七而言非常乾淨，證明以奈米膠體金粒子為基質，顯著地改善傳統有機酸基質干擾的問題，能將雜訊抑制到一定程度以內。以奈米膠體金粒子為基質，分析五種醣類的混合溶液質譜圖如圖十九所示，圖中五種醣類分析物均有極高的訊號強度出現，代表本論文所提出的偵測方法，對於醣類的混合樣品，可以同步進行多種化合物的分析檢測。

### 3.2、醣類與膠體金添加量的探討

在本實驗中，將探討添加不同濃度的膠體金，對於醣類的分析結果所造成的影響，並找出最佳的實驗條件。取核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素及蔗糖各 1mM 充分混合後，分別加入體積稀釋 1 倍、5 倍、50 倍及 500 倍的膠體金，製備不同濃度膠體金的醣類混合溶液，進行質譜儀分析。圖二十為五種醣類的混合溶液，在不同濃度膠體金的條件下，所獲得的質譜圖，由圖上可以看出，當奈米膠體金的濃度降低時，由(A)圖至(D)圖，分析物的偵測訊號強度也



圖十九、以奈米膠體金粒子為基質分析核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素與蔗糖混合溶液所獲得的質譜圖



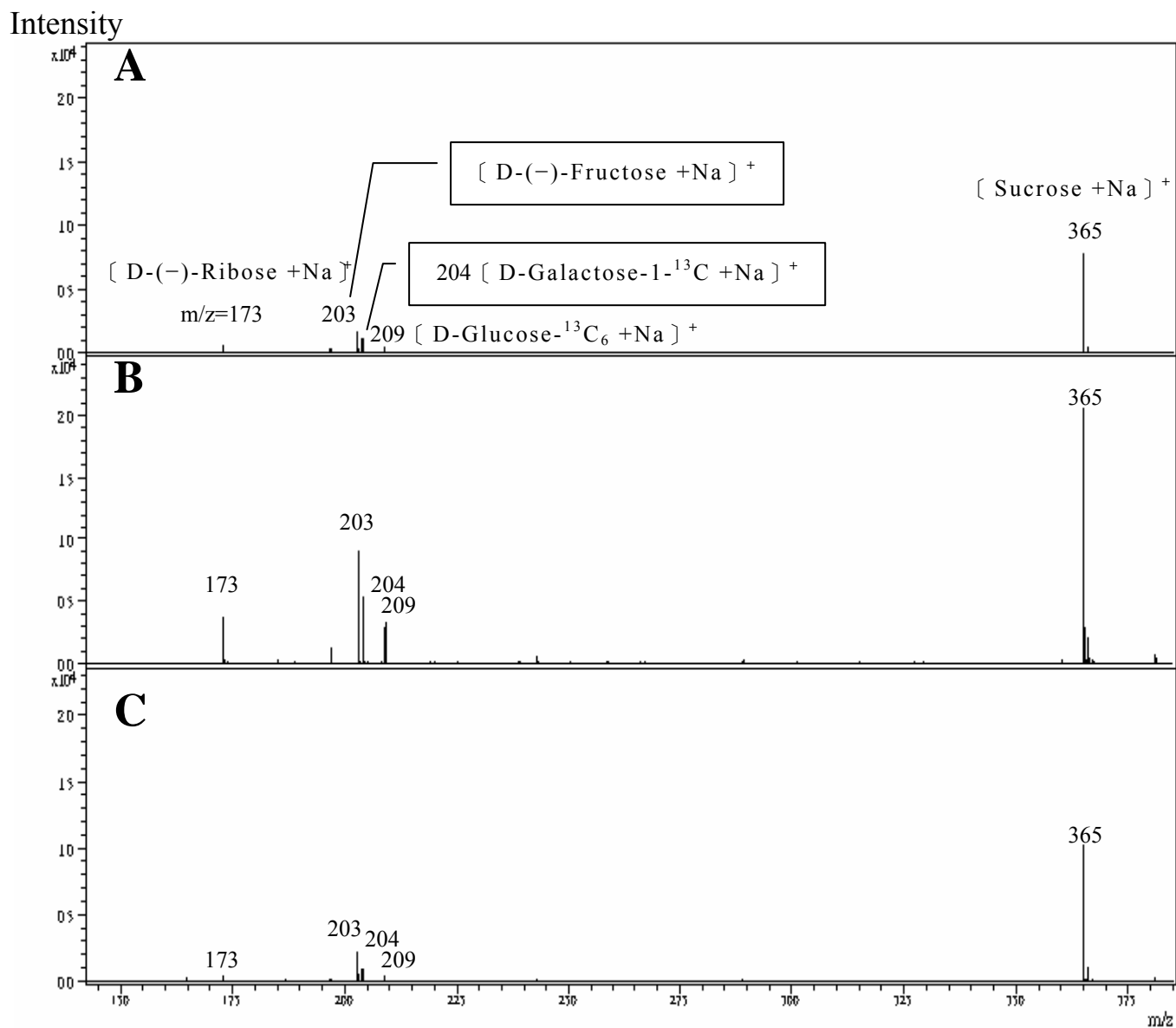
圖二十、原始膠體金溶液，體積稀釋 (A) 1 倍、(B) 5 倍、  
(C) 50 倍及 (D) 500 倍分析糖類混合溶液所獲得的質譜圖

跟著下降，(A)圖濃度較高的膠體金(體積稀釋 1 倍)，分析物整體的訊號強度較強，印証當膠體金的濃度降低時，分析物無法藉由膠體金充分吸收雷射能量，減少汽化脫附/游離的比例，使得偵測訊號強度減弱，因此，對於醣類化合物的分析，最佳的實驗條件為使用體積稀釋 1 倍的膠體金。

### 3.3、醣類添加氫氧化鈉的探討

為了能夠提升分析物的訊號強度，我們在實驗過程中，添加氫氧化鈉，希望能在高真空的質譜儀環境下，增加鈉離子的含量，進而增強分析物  $[M+Na]^+$  的訊號強度。在  $100\ \mu\text{L}$  的奈米膠體金原始溶液中，分別加入  $1\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$  及  $20\ \mu\text{L}$  的  $0.1\%$  NaOH 溶液對核糖、果糖、半乳糖同位素、葡萄糖同位素及蔗糖的混合樣品，進行質譜分析，如圖二十一所示，由圖中可以看出，當  $0.1\%$  NaOH 的添加量從  $1\ \mu\text{L}$  增加到  $10\ \mu\text{L}$  時，訊號強度明顯的提升了，但是當  $0.1\%$  NaOH 的添加量從  $10\ \mu\text{L}$  再增加到  $20\ \mu\text{L}$  時，醣類的訊號強度卻下降了，証明適量的 NaOH 的確能提升分析物的訊號強度，而過多的鹽類卻會造成分析物與膠體金非均質化與高污染化，使得離子化能力下降，降低分析物的訊號強度，所以最佳的氫氧化鈉添加量，為  $20\ \mu\text{L}$  的  $0.1\%$  NaOH 溶液。





圖二十一、添加 (A)  $1\mu\text{L}$ 、(B)  $10\mu\text{L}$  及 (C)  $20\mu\text{L}$  的 0.1% NaOH 分析醣類混合溶液所獲得的質譜圖

#### 四、真實樣品中血糖的量測

為驗證本實驗所發展出的新技術，以奈米膠體金粒子為基質，能應用在生醫領域研究的上，我們以人類的血清為真實樣品，進行血清中葡萄糖的含量測定。

血糖的測量對於糖尿病患者非常重要，糖尿病是一種症候群，包括許多代謝異常和各種神經、血管病變等，但目前糖尿病的診斷幾乎全靠血糖高低來決定，測定血中胰島素、升糖素、酮體、C 胜、糖化血色素和果糖胺的濃度，均不能取代血糖對糖尿病診斷的絕對地位。血糖的定量，常用的檢體有全血，血漿或血清等，其檢測的結果，因檢體的不同而有些微的差異，但血清、血漿葡萄糖的結果卻非常類似。根據 2004 年美國糖尿病協會所訂定的標準，如果符合以下任何一個條件並再確定一次，即可診斷為糖尿病患者：

- 1、出現糖尿病三多一少的症狀（吃多、尿多、喝多和體重減少），加上隨機血漿血糖值（無論空腹與否，所測得的血糖值即為隨機血漿血糖值） $\geq 200$  毫克/分升 (mg/dl)
- 2、空腹 8 小時靜脈血漿糖值  $\geq 126$  毫克/分升
- 3、75 公克（小兒劑量為每公斤 1.75 公克，總量至多 75 公克）口服葡萄糖耐量試驗（OGTT），2 小時的靜脈血漿

糖值  $\geq 200$  毫克/分升。

在以前文獻<sup>[36]</sup>研究中，有學者應用質譜儀技術，測定尿液中葡萄糖的含量，期望能對糖尿病的檢測，提出一個快速、有效的分析方法，但文中使用spike的方法，注射葡萄糖到尿液中，其準確性可能與實際的情形有所差異，再者，尿液中含糖量高者，不一定就是糖尿病患者，而患有糖尿病的人，尿液中也不一定含有較高的糖量，因為這跟人的腎功能有關。在這篇論文中，我們發展出以奈米膠體金粒子為基質的新技術，取代傳統的有機酸基質，期望能快速有效的診斷人類的血糖值，並得到精確的定量數據。

#### 4.1、檢量線的製作

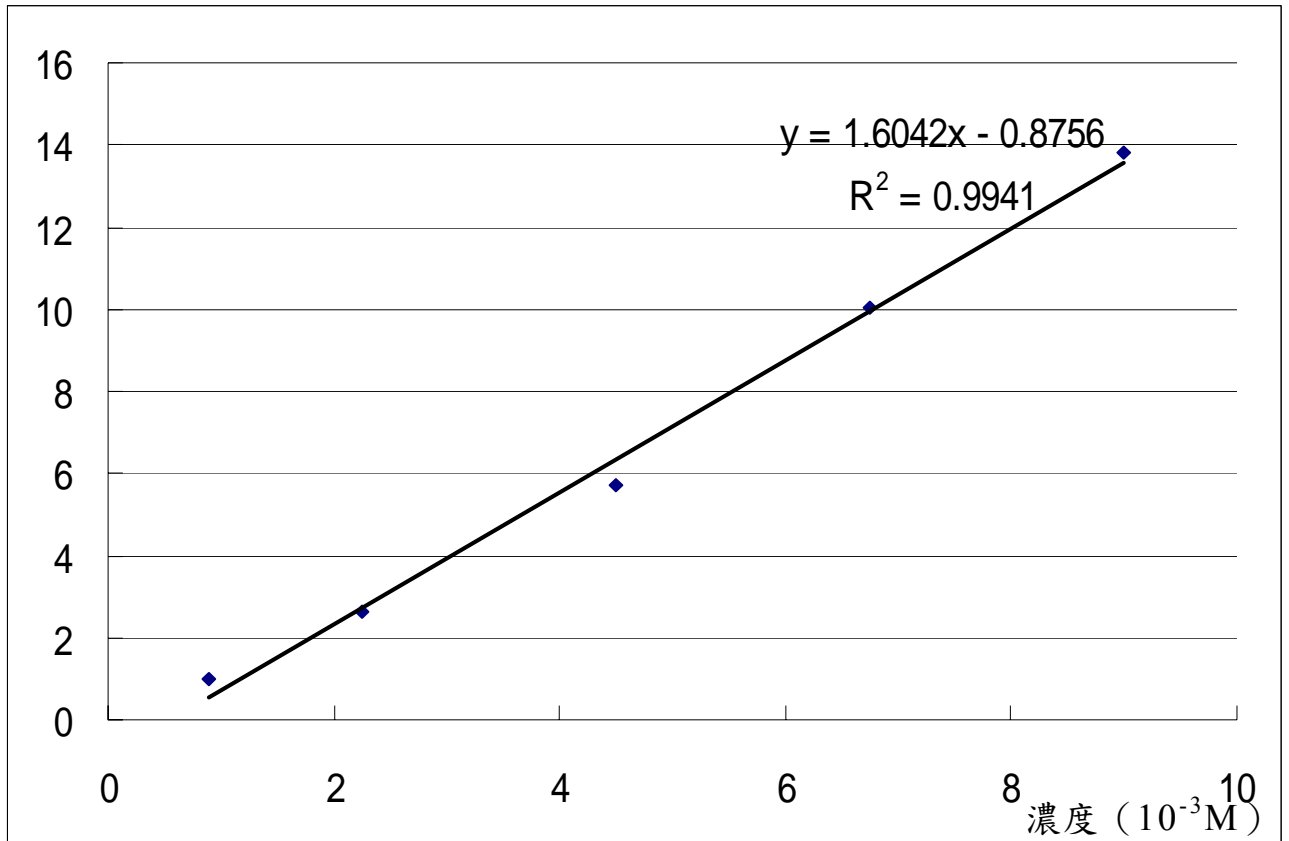
以質譜儀的雷射脫附游離法測量分析物時，通常樣品的濃度與訊號的高低或面積並不成正比，因為不同種的分析物具有不同的游離能力，游離能力強的物質甚至會抑制游離能力弱者，使分析物的訊號變弱，所以此一分析方法大多只能達到半定量的檢測結果。

在本實驗中，我們以分析物的分析物的同位素為內標準物，利用內標準法來克服這個問題。分析物的同位素與分析物本身具有幾乎相同的化學性質，但分子量卻有明顯的差

異，因此，同位素常成為質譜儀檢測技術的理想內標準物。在製作葡萄糖檢量線的實驗中，先配製五種不同濃度（ $10^{-3}\text{M}$ 、 $2.5\times 10^{-3}\text{M}$ 、 $5.0\times 10^{-3}\text{M}$ 、 $7.5\times 10^{-3}\text{M}$ 、 $1.0\times 10^{-2}\text{M}$ ）的葡萄糖溶液，再分別加入固定濃度（ $10^{-2}\text{M}$ ）的葡萄糖同位素（D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$ ），並與奈米金混合後，即可上機測量，得出的檢量線，如圖二十二所示。

檢量線的製作方式為分別測量五種不同濃度的葡萄糖溶液，每一個濃度，重複測量取得五個平均值，每個平均值由五次重複的實驗所獲得，總共收集 125 張圖譜所獲得的總平均值，即為圖二十二的一個檢量點。由這條檢量線的線性相關係數  $R^2 = 0.9941$ ，數值十分接近於 1，可發現儀器的偵測訊號強度與葡萄糖的濃度之間，具有極佳的線性關係。圖二十三列出實驗的精確度分佈範圍，每個濃度的標準偏差都在 0.34449 以內。

葡萄糖訊號／葡萄糖同位素訊號強度



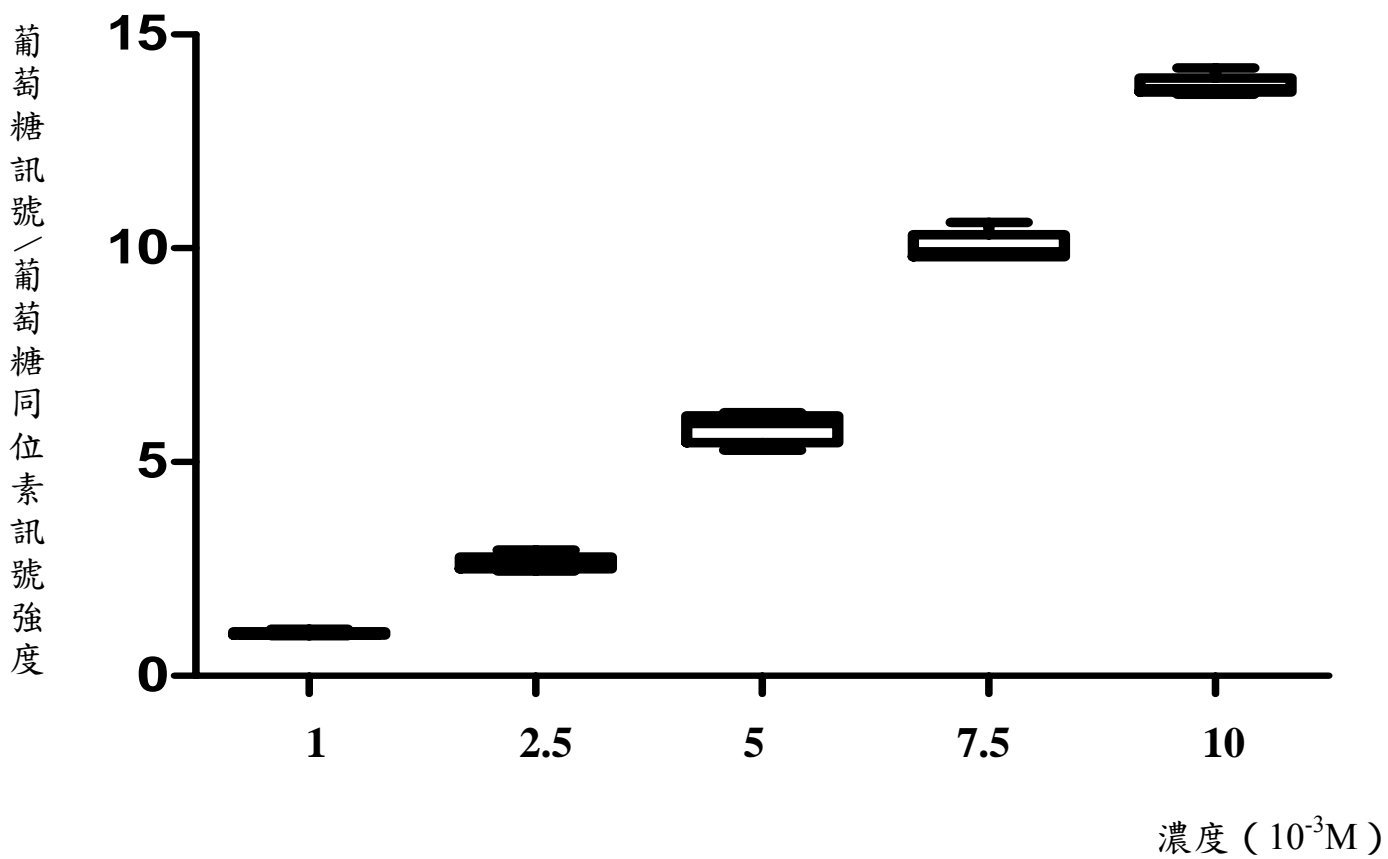
圖二十二、葡萄糖之標準檢量線

實驗條件：

分析物： $10^{-3}M$ 、 $2.5 \times 10^{-3}M$ 、 $5.0 \times 10^{-3}M$ 、 $7.5 \times 10^{-3}M$ 、

$10 \times 10^{-3}M$  葡萄糖 (D-(+)-Glucose)

內標準：葡萄糖同位素 (D-Glucose- $^{13}C_6$ )  $10^{-2}M$



圖二十三、葡萄糖的精確度

實驗條件：

分析物： $10^{-3}M$ 、 $2.5 \times 10^{-3}M$ 、 $5.0 \times 10^{-3}M$ 、 $7.5 \times 10^{-3}M$ 、

$10 \times 10^{-3}M$  葡萄糖 (D-(+)-Glucose)

內標準：葡萄糖同位素 (D-Glucose- $^{13}C_6$ )  $10^{-2}M$

## 4.2、血糖的測量

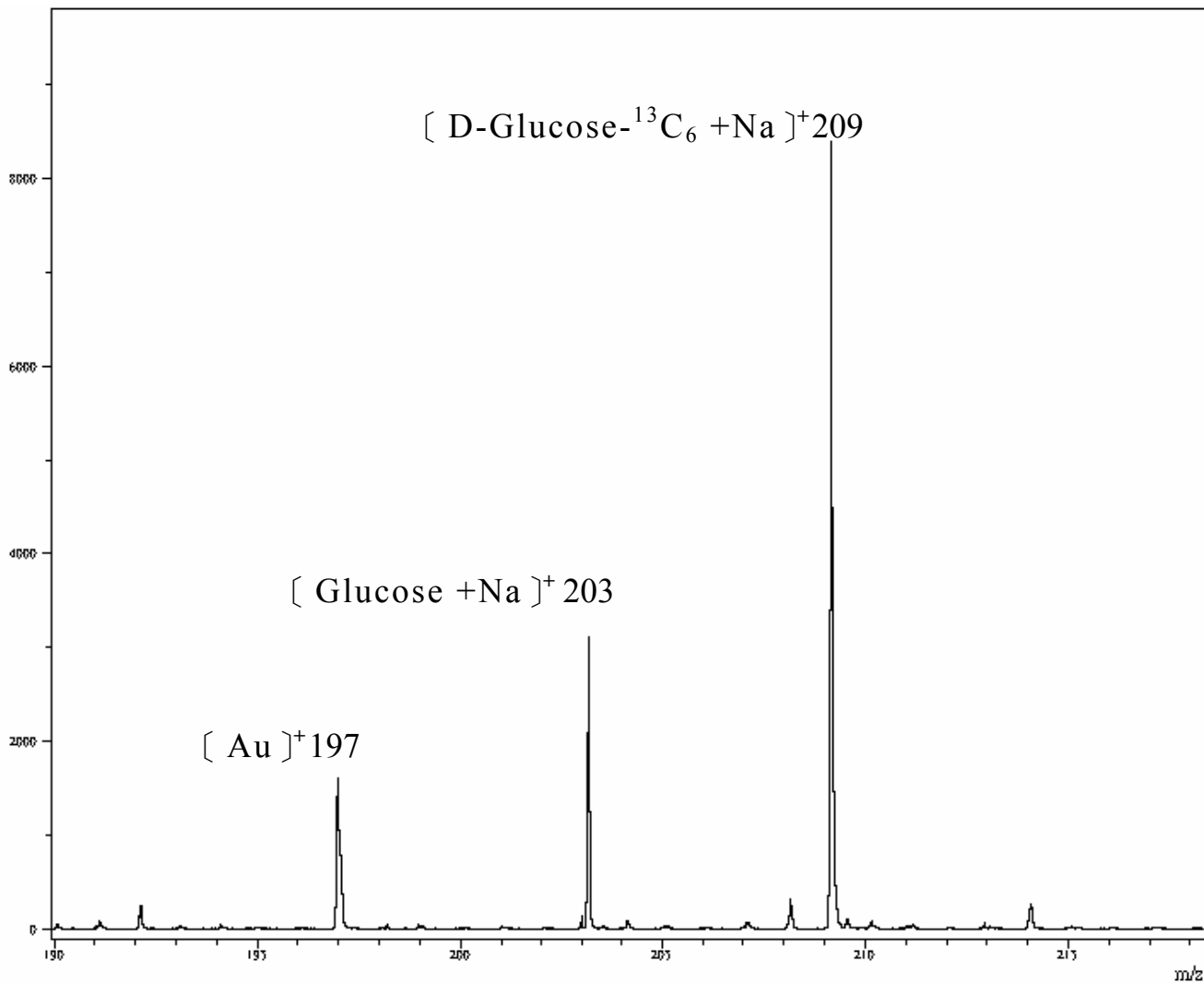
將葡萄糖同位素 (D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$ ) 的內標準物加入血清樣品溶液中，並以丙酮去除血清中的蛋白成份，再經過離心機分離 5 分鐘後，取上層澄清液，即可以質譜儀進行樣品的測量，對於向來十分複雜的生化樣品前處理來說，本論文所採用樣品前處理的方法，具有快速、簡單、高效率的特性及優點。由離心機分離所取得的上層澄清液，加入奈米膠體金粒子，搭配基質輔助雷射脫附游離法，測量血清中的葡萄糖及添加的葡萄糖同位素之質譜圖，如圖二十四所示，從圖上可以看到  $m/z=203$ 、 $[\text{Glucose}+\text{Na}]^+$  和  $m/z=209$ 、 $[\text{D-Glucose-}^{13}\text{C}_6+\text{Na}]^+$  的訊號，另外，也有  $m/z=197$  的  $[\text{Au}]^+$  訊號出現。為了進一步確認  $m/z=203$  即為葡萄糖  $[\text{Glucose}+\text{Na}]^+$  的訊號，利用串聯質譜儀技術，以  $m/z=203$  為母離子收集子離子圖譜，並與已知的葡萄糖標準溶液子離子圖譜相互比對，由圖二十五的 (A) 圖及 (B) 圖均出現相同的斷裂碎片 ( $m/z=143$ )，可以推論在圖二十四的血清質譜圖中， $m/z=203$  即為血清中的葡萄糖，所形成的訊號，其結構應為  $[\text{Glucose}+\text{Na}]^+$ 。另外，血清樣品中葡萄糖的濃度，可以參考圖二十二的檢量線而獲得，血清樣品由五次重複的實驗，所測得的血糖平均血糖值

應為  $1.7129 \times 10^{-3} \text{ M}$ ，因為血清樣品由  $2 \mu\text{L}$  被稀釋到  $10 \mu\text{L}$ ，所以實際的血糖值應為  $8.5645 \times 10^{-3} \text{ M}$ 。

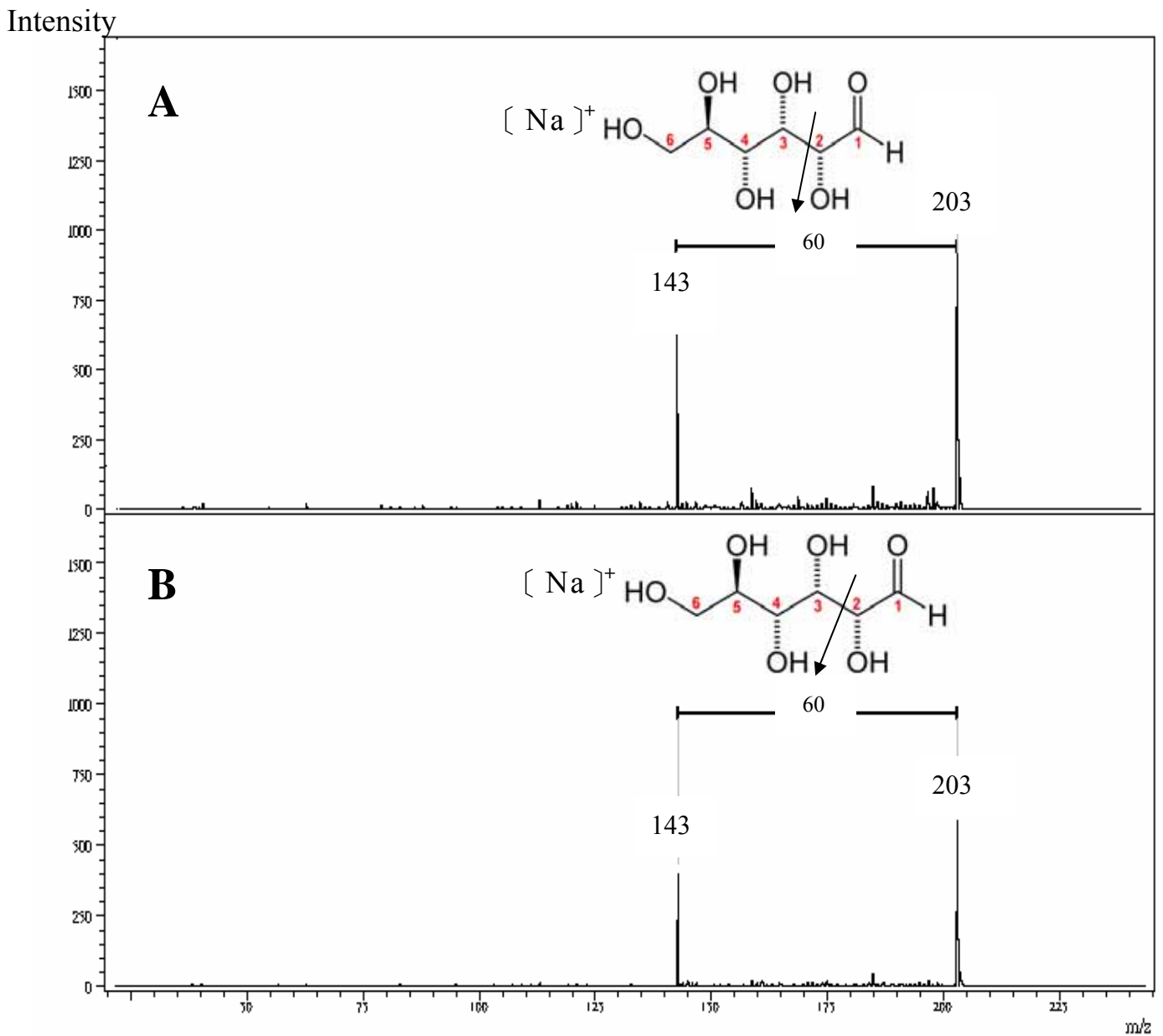
本論文的檢測方法，應用在真實樣品中，測量正常人的血清血糖值，所獲得的最佳實驗數據  $8.5645 \times 10^{-3} \text{ M}$ ，比較糖尿病患者的隨機血糖值  $200 \text{ mg/dl}$  (約為  $11 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) 低，表示為一合理的測量結果。



Intensity



圖二十四、血清血糖及添加內標準葡萄糖同位素的質譜圖



圖二十五、(A) 血清血糖及 (B) 葡萄糖標準溶液所形成的  
 $[\text{Glucose} + \text{Na}]^+$  訊號之串聯質譜圖

實驗條件：人類的去蛋白血清標準葡萄糖  $10^{-2}\text{M}$

## 肆、結論與未來展望

本研究利用奈米膠體金粒子，成功地分析辛伐他汀、洛伐他汀等史他汀類藥物及核糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、蔗糖等醣類化合物。奈米膠體金粒子能與分析物產生較均勻的共結晶現象，減少訊號集中點的發生，提高樣品檢測的再現性，並能去除來自於傳統有機酸在低質量範圍的干擾，這個方法也成功地運用在人體血糖的測量，其簡單、快速、有效率的前處理過程，大異於一般複雜的生化樣品前處理，可以建立一個快速且準確的分析方法，達成我們預期的研究目標。

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀本身具有高靈敏、操作簡單快速、高通量的特點，加上本研究所發展出的新分析方法，可測量低分子量分析物的優點，未來可以進一步應用在藥物代謝等相關的研究領域，對於生醫科技能有所助益。

## 参考文献

- 1.M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1985**, 57 (14), pp 2935–2939
- 2.K Tanaka, Y Ido, S Akita, Y Yoshida, T Yoshida, Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry, pp.185-188(1987)
- 3.Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2(8), pp151–153
- 4.M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1988**, 60 (20), pp 2299–2301
- 5.M. Schürenberg, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (1), pp 221–229
- 6.M. Karas, Ute. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarbopoulos, B. N. Pramanik, *Anal. Chem.*, **1995**, 67 (3), pp 675–679
- 7.Shankai. Zhao, Kasi V. Somayajula, Andrew G. Sharkey, David M. Hercules, Franz. Hillenkamp, Michael. Karas, Arndt. Ingendoh *Anal. Chem.*, **1991**, 63 (5), pp 450–453
- 8.T. Yalcin, W. E. Wallace, C. M. Guttman, L. Li, *Anal. Chem.*, **2002**, 74 (18), pp 4750–4756
- 9.L. H. Cohen, A. I. Gusev, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373, pp 571–586
- 10.L. S. Santos, R. Haddad, N. F. Höehr, R. A. Pilli, M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (7), pp 2144–2147
- 11.G. McCombie and R. Knochenmuss, *Anal. Chem.*, **2004**, 76 (17), pp 4990–4997
- 12.H. J. Kim, J. K. Lee, S. J. Park, H. W. Ro, D. Y. Yoo, D. Y. Yoon,

- Anal. Chem.*, **2000**, 72 (22), pp 5673–5678
- 13.R. S. Brown, J. Lennon, *Anal. Chem.*, **1995**, 67 (13), pp 1998–2003
- 14.Mafuné, F.; Kohno, J.-Y.; Takeda, Y.; Kondow, T.; Sawabe, H. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 8333-8337.
- 15.Mafuné, F.; Kohno, J.-Y.; Takeda, Y.; Kondow, T.; Sawabe, H. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 9111-9117.
- 16.Mafuné, F.; Kohno, J.-Y.; Takeda, Y.; Kondow, T.; Sawabe, H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5114-5120.
- 17.Yeh, M.-S.; Yang, Y.-S.; Lee, Y.-P.; Lee, H.-F.; Yeh, Y.-H.; Yeh, C.-S. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 6851-6857.
- 18.Bradley, J. S., The Chemistry of Transition Metal Colloids. In *Clusters and Colloids*; Schmid, G., Ed.; VCH Publishers: New York, NY(USA), **1994**; pp 459-537.
- 19.Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801-802
- 20.Puntes, V. F.; Krishnan, K. M.; Alivisatos, A. P. *Science* **2001**, 291, 2115-2117.
- 21.Guo, L.; Huang, Q.; Li, X.-Y.; Yan, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3, 1661-1665.
- 22.Park, S.-J.; Kim, S.; Lee, S.; Khim, Z. G.; Char, K.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8581-8582.
- 23.Yu, Y.-Y.; Chang, S.-S.; Lee, C.-L.; Wang, C. R. *Chris. J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 6661-6664.
- 24.Kortenaar, M. V. ten.; Kolar, Z. I.; Tichelaar, F. D. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 2054-2060.
- 25.Okitsu, K.; Bandow, H.; Maeda, Y. *Chem. Mater.* **1996**, 8, 315-317.
- 26.Okitsu, K.; Mizukoshi, Y.; Bandow, H.; Yamamoto, T. A.; Nagata, Y.; Maeda, Y. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 5470-5472.

27. Mizukoshi, Y.; Okitsu, K.; Maeda, Y.; Yamamoto, T. A.; Oshima, R.; Nagata, Y. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 7033-7037.
28. Yu, H.; Gibbons, P. C.; Kelton, K. F.; Buhro, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9198-9199.
29. Crooks, R. M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 181-190.
30. Mahley RW, Bersot TP. Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw Hill; **2001**: 971–1002.
31. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* **2002**; 360: 7–22.
32. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation.* **2002**; 106: 3143–3421.
33. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, et al. *Pharmacol Ther.* **1999**; 84: 413–428.
34. Omar MA, Wilson JP. *Ann Pharmacother.* **2002**; 36: 288–295.
35. Parks Elizabeth J; Skokan Lauren E; Timlin Maureen T; Dingfelder Carlus S, **2008**;138(6):1039-46.
36. Chih-Lin Su and Wei-Lung Tseng. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (4), pp 1626–1633