

東海大學化學研究所

碩士論文

指導教授：劉建忠 博士

應用功能化磁性奈米粒子結合
基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀
於槲皮素的定量檢測分析

Application of Functionalized
Magnetic Nanoparticles for the Quantification of
Quercetin by MALDI-TOF MS

研究生：林宗賢 撰

中華民國一零五年六月

摘要

槲皮素(Quercetin)為廣泛地分佈於植物界的類黃酮分子，許多研究證實它對人體具保健功能及效用。

傳統的槲皮素定量分析方法，在樣品的製備過程中具有許多缺點包括：相當耗費時間、成本高昂、不適合做高通量的分析篩選，且常需使用大量有機溶劑。

本論文提出一個新的檢測方法，應用氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾成具有胺官能的結構，增加從樣品溶液中萃取分析物的效率。利用晶種層的點樣方法，以提升分析物與基質的共結晶均勻性，結合基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法，對槲皮素進行定量檢測分析。

在最佳化的實驗條件下，所得到的分析物檢量線，濃度線性範圍為0.5mg/L 至 20mg/L，線性係數(R^2)值為 0.993。

關鍵字：槲皮素、磁性奈米粒子、晶種層法、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法

Abstract

Quercetin is the most widely distributed flavonoid molecule in the plant kingdom. Many studies have confirmed that quercetin has its health effect or efficacy for the human body. Traditional methods for the quantitative analysis of quercetin have the limitations of being time-consuming, costly, not suitable for high throughput screening analysis, and needed to use large amounts of organic solvents in the sample preparation procedures. In this study, we propose a new method for the quantitative analysis of quercetin by the application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticle, which surface was modified by the the amine functional group to improve the extraction efficiency of analyte from sample solution. Additionally, better homogeneity of analyte/matrix crystallization was formed by using seed-layer method. A new strategy by the combination of matrix and magnetic nanoparticle was employed for rapid identification and quantification of quercetin by MALDI-TOF MS. The results for quantitative determination of quercetin showed the linear dynamic range was from 0.5 mg/L to 20 mg/L with a correlation coefficient (R^2) of 0.993.

Keywords: quercetin, magnetic nanoparticle, seed-layer method, MALDI-TOF MS

目錄

摘要.....	01
英文摘要.....	02
目錄.....	03
圖目錄.....	05
表目錄.....	06
壹、緒論.....	07
1.1. 前言.....	07
1.2. 槲皮素簡介.....	08
1.3. 常見的萃取方法.....	09
1.4. 傳統分析小分子的方法.....	10
1.4.1. 氣相層析質譜儀.....	10
1.4.2. 液相層析質譜儀.....	10
1.5. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀.....	11
1.5.1. MALDI 的發展史.....	11
1.5.2. MALDI 基質的特性與功能.....	12
1.6. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀之優點.....	15
1.7. MALDI-TOF MS 對於分析物定量分析之限制.....	16
1.8. MALDI-TOF MS 對於定量分析限制之改善方法.....	17
1.8.1. 內標法.....	17
1.8.2. 基質樣品之製備.....	17
1.8.2.1. 離子液體型基質.....	17
1.8.2.2. 電噴灑樣品製備.....	18
1.8.2.3. 乾燥後粉碎晶體.....	18
1.8.2.4. 旋轉塗佈法.....	18
1.8.3. MALDI 的樣品之配製方法.....	19
1.8.4. 兩層點樣法.....	19
1.9. 磁性奈米粒子於 MALDI 之應用.....	20
1.9.1. 磁性奈米粒子之性質.....	20
1.9.2. 磁性奈米粒子之表面修飾.....	21
1.9.3. 磁性奈米粒子作為吸附劑.....	21
1.10. 吸附.....	22
1.10.1. 原理.....	22
1.10.2. 恆溫吸附模式.....	22
1.11. 研究目的.....	25

貳、實驗.....	26
2.1. 材料及儀器設備.....	26
2.2. 藥品配製.....	27
2.2.1. Quercetin 標準液之配製.....	27
2.2.2. MALDI 基質溶液之配置.....	28
2.3. 氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾.....	29
2.3.1. 表面的矽化處理.....	29
2.3.2. 修飾 NH ₂ 官能基.....	30
2.3.3. 紅外線光譜儀原理及樣品檢測.....	31
2.3.4. 修飾後檢測.....	32
2.4. 實驗方法.....	35
2.4.1. 修飾後磁性奈米粒子捕捉 Quercetin 之方法.....	35
2.4.2. 實驗條件之最佳化.....	36
2.4.3. 校正曲線之實驗步驟.....	38
2.4.4. 回收率之實驗步驟.....	38
參、結果與討論.....	39
3.1. 分析物之鑑定.....	39
3.2. 最佳化基質溶液之製備.....	40
3.2.1. 基質溶劑之選擇.....	42
3.2.2. 點樣法之選定.....	45
3.2.3. 基質溶劑之混合比例.....	47
3.3. 吸附條件最佳化之研究.....	49
3.3.1. 不同吸附劑對吸附效率之影響.....	49
3.3.2. 吸附劑量對吸附效率之影響.....	51
3.3.3. pH 值對吸附效率之影響.....	53
3.3.4. 反應溫度對吸附效率之影響.....	55
3.3.5. 反應時間對吸附效率之影響.....	57
3.4. 實驗方法之確認.....	59
3.4.1. 校正曲線.....	59
3.4.2. 市售樣品之測試.....	61
肆、結論.....	63
參考文獻.....	64

圖目錄

圖一、槲皮素(Quercetin)的化學結構圖.....	08
圖二、傳統基質在圖譜低質量區域的干擾.....	13
圖三、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀.....	16
圖四、Seed-layer 兩層點樣法.....	19
圖五、粒徑大小對於磁力之關係圖.....	20
圖六、Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂ 的巨觀吸附現象.....	21
圖七、Fe ₃ O ₄ 磁性奈米粒子表面修飾之流程圖.....	30
圖八、市售氧化鐵磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜.....	33
圖九、Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜.....	33
圖十、Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂ 磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜.....	34
圖十一、Ninhydrin 試劑之檢測結果.....	34
圖十二、磁性奈米吸附劑捕捉 Quercetin 之流程圖.....	35
圖十三、槲皮素之質譜圖及斷裂離子之化學結構與質荷比.....	39
圖十四、使用傳統基質和奈米基質所測得之質譜圖.....	41
圖十五、傳統基質影像圖.....	43
圖十六、單層及雙層點樣法所測得之質譜圖.....	46
圖十七、不同的溶劑混合比例對樣品點結晶狀況之影像.....	48
圖十八、吸附劑與訊號強度之關係圖.....	50
圖十九、吸附劑量與訊號強度之關係圖.....	52
圖二十、pH 值與訊號強度之關係圖.....	54
圖二十一、反應溫度與訊號強度之關係圖.....	56
圖二十二、反應時間與訊號強度之關係圖.....	58
圖二十三、標準品濃度對訊號強度比之校正曲線圖.....	60
圖二十四、添加標準溶液的茶葉樣品之質譜圖.....	61

表目錄

表一、常見的萃取方法.....	09
表二、MALDI 常用的基質.....	14
表三、溶劑的表面張力、沸點及極性.....	44
表四、不同溶劑及樣品點內外層所測得的訊號強度及標準偏差值.....	44
表五、單層及雙層點樣所測得的訊號強度及標準偏差值.....	48
表六、不同的溶劑混合比例所測得的訊號強度及標準偏差值.....	48
表七、不同吸附劑之測試結果.....	49
表八、不同吸附劑數量測試結果.....	51
表九、不同 pH 值之測試結果.....	53
表十、不同反應溫度之測試結果.....	55
表十一、不同反應時間之測試結果.....	57
表十二、不同濃度的標準品之測試結果.....	60
表十三、檢測茶葉及洋蔥樣品之訊號強度比值及回收率.....	62

壹、緒論

1.1. 前言

槲皮素(Quercetin)，又稱為五羥黃酮，係廣泛分佈於植物界的黃酮類化合物，具有廣泛的藥理活性^[1]。大量研究證實它對人體具療效或保健效果，包括抗炎活性、抗過敏性、抗菌、抗病毒、抑制腫瘤生長和轉移、清除體內自由基、抗氧化^[2-9]等作用。

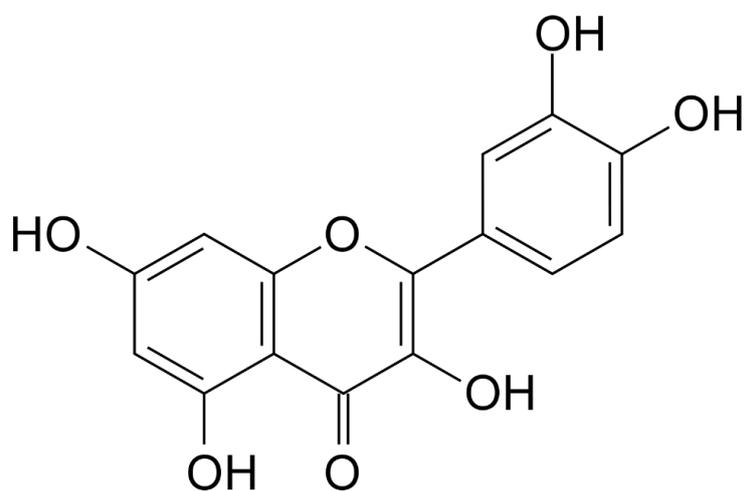
磁性奈米材料具有獨特的物理及化學特性，且具有表面易修飾等特性經過表面修飾後的磁性奈米粒子能穩定分散於溶液中，具有極佳的選擇性可與分析物做結合達到萃取濃縮的目的。本實驗研究的目標是將氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾上胺官能基，形成可以捕捉分析物的吸附劑，最後利用 MALDI-TOF 進行質譜分析。

MALDI-TOF 質譜儀具有高靈敏度、高通量、操作簡單快速、樣品量少、高質量範圍等優點。近年來廣泛應用於大分子分析物，如蛋白質、胜肽、去氧核糖核酸(DNA)及聚合物之分析鑑定。但是對於分子量較小的小分子分析物，仍然是一項挑戰，這是受限於在 500 Da 以下範圍內會有許多傳統基質所產生的訊號干擾，抑制分析物的訊號。

本篇論文提出一項新的基質製備方是，將奈米粒子與有機酸混合，以取代傳統的方法由於奈米粒子與有機酸基質間具有很強的共價鍵，不容易被雷射光打斷，也能保有傳統基質的特性，可以克服低質量範圍內的基質干擾問題，成功地偵測到小分子量的目標分析物。

1.2. 槲皮素簡介

槲皮素的化學結構如圖一所示，化學式為 $C_{15}H_{10}O_7$ ，分子量是 302.23 g/mol。槲皮素為分佈於植物界中含量最多之類黃酮分子，天然資源十分豐富。在茶葉、洋蔥、蘋果、紅酒、綠花椰菜、刺人參、中草藥等，均含槲皮素成分，槲皮素存在於植物之花、莖、葉片、種子和核果等部位。槲皮素通常為植物之主要活性成分^[10-11]。近幾年研究結果發現槲皮素具有多項有益人體健康之作用，包括抗氧化、抗炎、抗過敏性、抗菌、抗病毒、抑制腫瘤生長和轉移、清除體內自由基、抗氧化等作用^[2-9]。有關抗腫瘤、抗癌之研究已獲得初步正面之實驗結果。另外針對槲皮素對胃腸運動的影響及其機制的研究，發現槲皮素具有舒張胃腸平滑肌的作用^[12]。槲皮素的測定方法有很多種，例如：劉圓等人利用 RP-HPLC 測定扯根菜中槲皮素含量^[13]，王瑯等人利用催化動力學光度法 (Catalytic kinetic photometry) 在槲皮素標準溶液中測定槲皮素^[14]，嚴蕾等人利用 HPLC 測定桑葉等植物中槲皮素的含量^[15]，楊馳等人利用 HPLC 測定銀杏葉中槲皮素含量^[16]，這些方法對於槲皮素的定量分析都可以達成特定的檢測效果。



【圖一】槲皮素的化學結構圖。

1.3. 常見的萃取方法

樣品的前處理是分析實驗中的一道主要程序^[17]，目的是將分析物由樣品基質中萃取出來，將可能干擾的物質分離，經由濃縮分析物以後，再利用儀器進行分析檢測。常見的萃取方法有有固相萃取法(SPE)、固相微萃取法(SPME)、液相微萃取法(LPME)、分散液相微萃取法(DLLME)、冷凝懸浮有機液滴液相微萃取法(SFO)及冷凝分散液相微萃取法(DLLME-SFO)。由於傳統的樣品前處理，須使用大量的有機溶劑，不僅危害人體也易造成環境的汙染。近年來環保意識逐漸抬頭，1990年後綠色化學逐漸受到重視^[18]，理想的樣品製備程序需具備溶劑使用量少、操作簡單、價格便宜、效率高、有選擇性、容易和其它分析法搭配以及應用範圍廣泛等特性。

【表一】常見的萃取方法。

方法	優點	缺點
磁性固相微萃取法	不需溶劑 操作簡單 材料便宜	變因較多
固相萃取法	僅使用少量溶劑 回收率高	準確度較低
固相微萃取法	操作簡單 不需溶劑	需使用特定材質的纖維 纖維耗損高、花費多
單液滴微萃取法	操作快速 材料便宜	變因較多 不易控制
分散式液液微萃取法	操作簡單 萃取時間短	不易形成沉積液 使用不環保的鹵化物
基質固相分散萃取法	僅使用少量溶劑 萃取與純化同時進行	只適合小量樣品 純化效率差
超臨界流體萃取法	僅使用少量溶劑 萃取時間短	設備昂貴

1.4. 傳統分析小分子的方法

傳統分析小分子化合物的方法有氣相層析質譜法(Gas chromatography mass spectrometry, GC/MS)、液相層析質譜法(Liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS)、高效液相層析法(High-performance liquid chromatography, HPLC)、毛細管電泳法(Capillary electrophoresis, CE)。其中又以氣相層析質譜法(GC/MS)和液相層析質譜法(LC/MS)最常被使用。

1.4.1. 氣相層析質譜儀

氣相層析質譜儀是一個化學分析常用的儀器，它是根據分子被撞擊後的碎片(Fragmentation)來鑑定分子量和組成元素，進一步來判定化合物。雖然GC/MS具有良好的靈敏度及再現性，但無法同時偵測多個分析樣品，且只能夠分析分子量較低的分析物。對於極性高、不易揮發或是熱不穩定這類分析物而言，也不適合直接使用GC/MS進行分析研究，分析物必須先經過前處理^[19-21]，步驟較為繁瑣且所需時間也較冗長。

1.4.2. 液相層析質譜儀

液相層析質譜儀應用範圍廣，可以直接分析熱不穩定或較高極性不易揮發的樣品。雖然具有高度的選擇性和再現性，但層析時間冗長，不適合檢測大量的樣品^[22-24]。當檢測含鹽的分析物時，必須先經過去鹽處理，因為鹽的存在會增強背景雜訊而抑制分析物的訊號，不僅繁瑣且所需時間冗長^[24-25]。

相較於氣相層析質譜儀和液相層析質譜儀，基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀不但可以精確地定性檢測分析物，且具有靈敏、快速、高通量、樣品消耗量低、可分析大分子量分析物等優點^[19-20,23-25]。

1.5. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀

1.5.1. MALDI 的發展史

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)的發展起源於 1960 年代的雷射脫附法(Laser desorption, LD)，當時是利用高能量的雷射光束照射在分析物表面上，可以從分析物表面脫附出分析物離子，再用質譜儀進一步分析研究。在 1978 年時 Posthumus, M.A. 等人利用雷射脫附質譜法成功分析胺基酸、核苷酸、胜肽、醣類等生化小分子，此方法廣泛地應用在分析小分子的有機化合物上，但由於高能的雷射光束直接打在分析化合物上，容易造成分析物碎裂，產生許多離子碎片訊號，造成圖譜分析上的困難。對於分析大分子量的分析物，不易偵測到完整的圖譜訊號，偵測範圍在 2000 Da^[26]以下。

在 1985 年 Karas 和 Hillenkamp^[27]以及日本科學家 Tanaka^[28]分別提出偵測生化分子及高分子的近代質譜技術。1987 年的一場學術會議中，日本的 Koichi Tanaka 等人^[29]發表了利用顆粒大小約 30 nm 鈷粉末與甘油混合作為分析高分子化合物的基質，隔年的期刊中^[30]發表了成功偵測分子量為 12,360 Da 的 Cytochrome C 和分子量為 25,717 Da 的 Chymotrypsinogen 以及分子量為 34,372Da 的 Carboxypeptidase A 分子離子訊號。同年，德國的研究團隊 Karas 和 Hillenkamp^[31]發表利用波長在 266 nm 的 Nd-YAG 雷射，而在樣品中混入同樣擁有 266 nm 波長吸收能力的尼古丁酸(Nicotinic acid)，成功偵測白蛋白(Aalbumin, 67kDa)的分子離子訊號，將 MALDI-TOF MS 可偵測質量範提升至 100 kDa 以上^[35-36]。

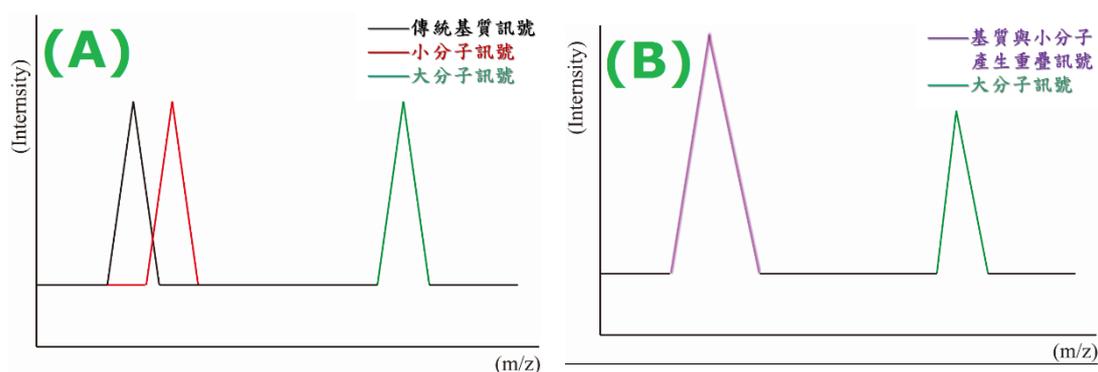
其中 Tanaka 等人所提出的方法中，由於鈷金屬粉末取之不易且價格昂貴，加上有高度毒性對於健康造成很大傷害等問題。此外，該方法的解析度及靈敏度皆不如有機酸基質，因此目前所使用的 MALDI 基質廣泛以 Hillenkamp 等人所提出的有機酸基質為主。利用有機酸作為基質時樣品製備簡單又迅速，至今已開發的基質已達數十種^[32-34]之多。由於 MALDI 屬於軟性的游離質譜方法 (Soft ionization)，使得較為脆弱的生化樣品在進行脫附游離時不易碎裂，可以保留完整分子離子，且偵測範圍擴大至生物巨分子的階段，使得 MALDI-TOF MS 目前普遍應用在生化樣品的分析研究上。

1.5.2. MALDI 基質的特性與功能

MALDI 與傳統 LD 的最大不同之處在於樣品離子化的方式有所不同。目前 MALDI 儀器最常使用氮氣雷射，因為氮氣雷射的價格低廉，所以被廣泛使用。基質需在雷射特定波長範圍內有相當莫爾的吸收率(約 $500\sim 15000\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，但吸收太多能量時，也可能產生分析物的碎裂片段訊號。MALDI 在進行分析時加入可以吸收雷射波長能量的基質，輔助分析樣品離子化。MALDI 使用的基質有很多種，對於不同類型的分析物而言，選擇適合的基質與分析物形成良好的結晶，可以得到較好的分析結果，因此針對不同的分析樣品，需發展出不同的基質。[表 2] ^[35-36]MALDI 常用的基質，包含 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)、2,5-Dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)、9-Aminoacridine (9-AA)、Sinapic acid (SA)。而不同基質也適用於不同類型的分析物，如： α -CHCA 適合分析小分子量的胜肽，2,5-DHB 適合分析醣類，9-AA 適合分析小分子 ^[38]，SA 適合分析大分子量的蛋白質。迄今為止已有至少八十種以上的 MALDI 基質被發展出來^[32-39]。

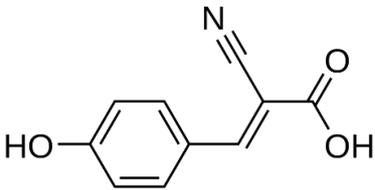
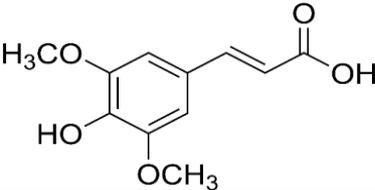
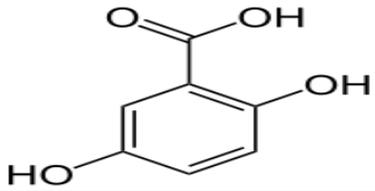
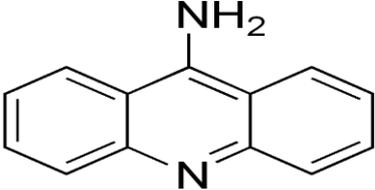
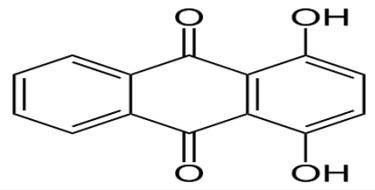
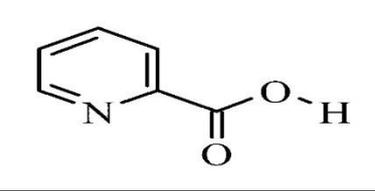
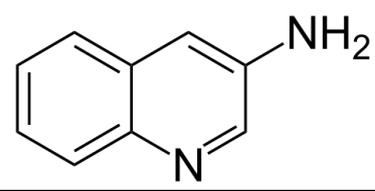
但傳統基質對於低分子量(< 500 Da)的圖譜會產生嚴重的基質干擾，影響分析物的訊號強度(如圖二)。雖然 9-AA 有機鹼基質適合分析小分子化合物，但在 192.94($[M-H]^-$)和 228.88($[M+Cl]^-$)有基質訊號干擾^[39]，此外，還有一些文獻報導對於小分子化合物的分析方法，例如溶膠凝膠衍生基質薄膜法(Sol-gel-derived matrix film)^[40-42]、表面強化雷射脫附離子化法(Surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI)^[43-45]、晶片上的脫附游離法(Desorption/ionization on silicon, DIOS)^[46-47]。但這些方法無法在複雜環境下分析特定的小分子，因此，需另找合適的基質，近年來研究指出以金屬無機材料當作基質，可消除基質對於分析物的干擾，有效解決這些問題^[48-52]。

磁性奈米粒子(Magnetic nanoparticles, MNP)結合傳統基質 2,5-DHB，可以保留傳統基質的優點，增加分析物的游離效率；並增加磁性奈米材料的特性，在低分子量範圍內沒有基質的訊號干擾^[52]，可以精確地在複雜環境下分析小分子分析物^[53-55]。本研究論文選用 DHB@MNP(修飾上 DHB 有機酸的磁性奈米粒子)當作基質，應用於低分子量(< 500 Da)化合物的分析。



【圖二】 傳統基質在圖譜的低質量區也會有訊號產生(圖 A)，在檢測小分子分析物時，容易造成波鋒的重疊，而影響分析物的訊號(圖 B)。

【表二】MALDI 常用的基質。

基質名稱	結構式	適用雷射 波長(nm)	適用的 分析物
α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α -CHCA)		266 337	胜肽 蛋白質
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid, SA)		355	蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid(2,5-DHB)		226 337 355	有機分子
9-aminoacridine (9-AA)		226 337 355	小分子
1,4-dihydroxyanthraquinone		337 355	高分子
2-pyridine carboxylic acid		266	胜肽 蛋白質 核糖核酸
3-aminoquinoline		337 355	多醣體

1.6. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀之優點

(1) 樣品製備簡單

在 MALDI 的樣品製備上，僅需將樣品與基質混合後直接點上樣品盤上，待樣品與基質混合液乾燥結晶後，直接將樣品盤送入儀器中分析。從雷射轟擊樣品到獲得一張圖譜只需短短數秒的時間，且樣品不需經過層析儀分離，在一張圖譜可以獲得多種化合物的分析結果，非常適合用來鑑定各種化合物。

(2) 高靈敏度

在樣品與基質混合比例適當時(約 1000:1，分子量越大比例也需提高)，偵測極限可低於 1 fmol 範圍，適合用於鑑定真實樣品中含量低的分析物。

(3) 高質量範圍

MALDI 通常會搭配偵測極限無上限的 TOF 分析器，能將樣品游離成結構完整的氣相離子，配合飛行時間質譜儀為質量分析器，分子量較大的分子飛行速度較慢，反之則較快，因此可篩選不同質量的游離化分子，只要選擇適當的基質來輔助分析物脫附游離，即可偵測。至今已經有很多文獻證明可以檢測出數百 kDa 的巨分子和有機分析物^[56-57]。

(4) 少量樣品

一般來說，僅需少量樣品與基質混合，即可完成樣品的製備，最後取約 1 μ L~2 μ L 的樣品與基質混合液滴於樣品盤上，在空氣中自然風乾，便可使用 MALDI-TOF MS 來進行分析，整個實驗過程僅需要的樣品量約數 μ L 即可。

(5) 高通量

MALDI 的樣品盤(Targer)能同時點入數十至數百個樣品，每次偵測可以達到極高的檢測數量。

1.7. MALDI-TOF MS 對於分析物定量分析之限制

雖然基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀擁有準確且快速等優點，但是對於小分子分析物的定量上，還是有很大的限制。相較於其它的質譜方法，MALDI-TOF MS 並不適合作為小分子分析物的定量分析，除了低質量範圍內的基質雜訊干擾外，另一個限制在於分析物訊號的低再現性，這是由於分析物與基質混合液在樣品盤上結晶的過程中，產生不均勻的共結晶(Sweet spot)^[58-59]，造成分析物的訊號強度再現性差。若能夠改善分析物訊號的再現性問題，MALDI-TOF MS 便可成為一個理想的定量分析工具。



【圖三】基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀。

1.8. MALDI-TOF MS 對於定量分析限制之改善方法

近年來有數種改善小分子於 MALDI-TOF MS 訊號再現性的方法，主要分成兩類：(1)加入內標準品^[60-63]，(2)改善分析物與基質共結晶均勻度，使得分析物訊號強度更穩定^[64-65]，以下舉例幾種可以增加 MALDI-TOF MS 分析物訊號再現性的方法。

1.8.1. 內標法(Internal Standard Method)

MALDI-TOF MS 常用內標法來改善訊號 Sweet spot 所造成的訊號不穩定。在小分子的定量檢測分析，內標法已經被發表^[66-68]，是一種比較準確的定量方法。為了接近分析物的游離效率，在樣品中加入一定量的內標準品，內標準品應盡量選擇與分析物具有類似物理及化學性質(如結構、極性、在溶劑中的溶解度)的化合物。此外，內標準品的質譜訊號不能與分析物產生重疊，避免標準品干擾分析物的質譜訊號。本實驗選用與槲皮素有類似化學及物理性質的楊梅黃酮(Myricetin)來當作本實驗的內標定物，進行分析物的定量分析實驗。

1.8.2. 基質樣品之製備

近幾年，已有許多改善分析物與基質不均勻共結晶的研究報導，進一步改善定量檢測分析再現性低的問題。以下舉例出一些比較常用的製備方法。

1.8.2.1. 離子液體型基質(Ionic Liquid Matrix, ILMs)

利用離子液體基質^[69-71](離子液與基質所合成的有機體，如 $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$)，作為 MALDI-TOF 質譜儀的基質，可以使分析物與基質濃縮在一個小點上，這種方法具有良好的再現性，可以用於小分子的分析。然而，離子液體型基質依然會造成質譜解析度低、背景訊號強、游離效率低及儀器汙染等問題。

1.8.2.2. 電噴灑樣品製備(Electrospray sample preparation, ESI)

電噴灑樣品製備方法^[72-73]係由金屬毛細管針頭與相對電極間加以高電壓差，並在毛細管內通入分析物溶液，再藉由霧化氣體(Nebulization gas)誘導水溶液帶電並形成極微小的液滴，可以改善結晶的均勻度並減少溶液分離的現象，但在含有鹼金屬陽離子存在的樣品溶劑中，會干擾質譜中的分析物訊號^[74]。

1.8.2.3. 乾燥後粉碎晶體(Crushing the crystals after drying)

乾燥後粉碎晶體的這個方法^[75-76]是將分析物與基質混合液點在樣品盤上，結晶後以不鏽鋼壓碎晶體。利用壓碎乾燥液滴的方法(Dried-droplet method)，可以壓出擁有高均勻度的結晶薄層，改善 MALDI-TOF MS 定量分析時的再現性。然而，此方法的缺點在於需要花費較多的時間，且在壓碎晶體過程中容易因為力道拿捏不對，而破壞晶體薄層。

1.8.2.4. 旋轉塗佈法(Spin Coating)

旋轉塗佈這個製備方法^[77-78]是將分析物與基質混合的混合液旋轉塗佈在金屬表面上。樣品點的直徑大小與旋轉的速度有關。在最佳化的條件下，旋轉塗佈法可以讓分析物與基質共結晶均勻分佈在金屬表面上。這種方法在分析蛋白質和聚合物上有良好的再現性，並且可以分析 300~15000 Da 的小分子。但對於不對稱的小分子不易脫附游離。

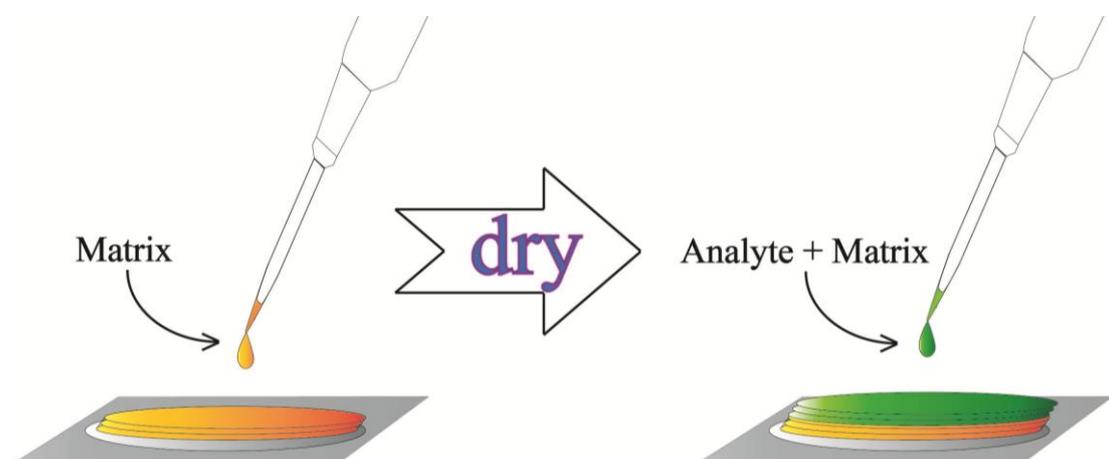
1.8.3. MALDI 的樣品之配製方法

一般 MALDI 樣品的製備步驟，是將分析物與基質以體積比為 1：1 方式混合後，取 1~2 μ L 混合液點在 MALDI 樣品盤上，在室溫下自然乾燥，最後進行質譜分析。但是這種點樣法容易造成分析物與基質混合液形成不均勻的共結晶 (Sweet spot)^[58-59]，影響到分析訊號的再現性。

1.8.4. 兩層點樣法(Seed-layer method)

兩層點樣法^[79-86]，在早期的文獻報導中係使用在蛋白質與胜肽的分析上。最早是由 Mann et. al.發表提出，是將基質溶在高揮發性的溶劑裡，乾燥後用於胜肽樣品的分析。Fan Xiang 和 C.Bavis 兩位科學家使用兩層點樣法製造出比單層點樣法擁有更高均勻度的結晶薄層，用於蛋白質的分析。上述研究中指出，預先在樣品盤鋪上一層晶種層可以改善分析物與基質間的互溶性。

兩層點樣法是將基質溶在高揮發性的溶劑中，並在樣品盤上點樣乾燥，形成均勻的基質結晶層(晶種層)，接著將分析物與基質混合液滴在晶種層上。該方法已經被很多文獻證實可以有效改善分析物與基質的共結晶均勻度，進一步提高分析物的靈敏度與再現性。

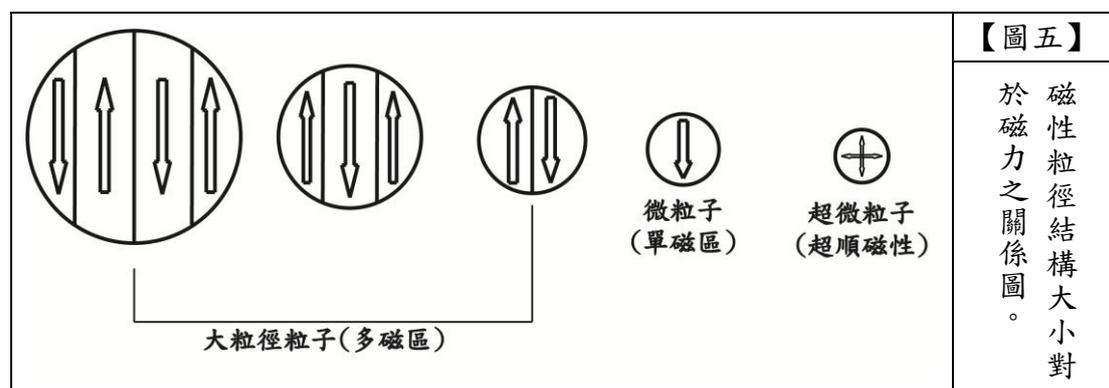


【圖四】Seed-layer 點樣法。

1.9. 磁性奈米粒子於 MALDI 之應用

1.9.1. 磁性奈米粒子之性質

奈米粒子泛指粒子尺寸大小約在 100 nm 內的材料，稱為奈米粒子。當粒子在奈米的尺寸下時，許多物質的現象會受到改變，如表面積提升、體積變小、獨特的化學與物理性質，普遍應用在環境檢測和生物醫學應用。而奈米金及奈米銀等材料在紫外光區段擁有高吸收的特性，低質量範圍的訊號干擾少，近期廣泛應用在 MALDI 低分子量化合物的分析。四氧化三鐵(Fe_3O_4)粒子在奈米尺寸時具有超順磁性(如圖五)，當下磁性是由外加磁場所引起，超順磁性的奈米粒子彼此間並不會相互因磁性而導致聚集現象發生，當外加更大的磁場時，導致粒子會往磁場方向聚集，當磁場移除後，聚集現象將會消失。其它還有高活性、小尺寸、易表面修飾、生物相容性高等優點，使得磁性奈米粒子在生物醫學上被廣泛應用。磁性奈米粒子僅需外加磁場(例如磁鐵)，便可以快速的收集，進一步於 MALDI-TOF MS 進行分析研究，另外表面上修飾與分析物相關親和力性質的官能基，將修飾後的粒子加入分析物中，便能進行分析物的萃取與濃縮，過程快速且方便^[87-88]。四氧化三鐵粒子並不能吸收雷射能量，無法進一步脫附游離分析物，所以需另外加入有機酸基質才能使分析物脫附游離，但此類基質會在低分子量範圍內產生嚴重的背景雜訊干擾，因此若將氧化鐵粒子鍍上 SiO_2 後再修飾上有基酸基質，則可以替代傳統有機酸基質，避免在低分子量範圍內產生背景雜訊的干擾^[52-55]。

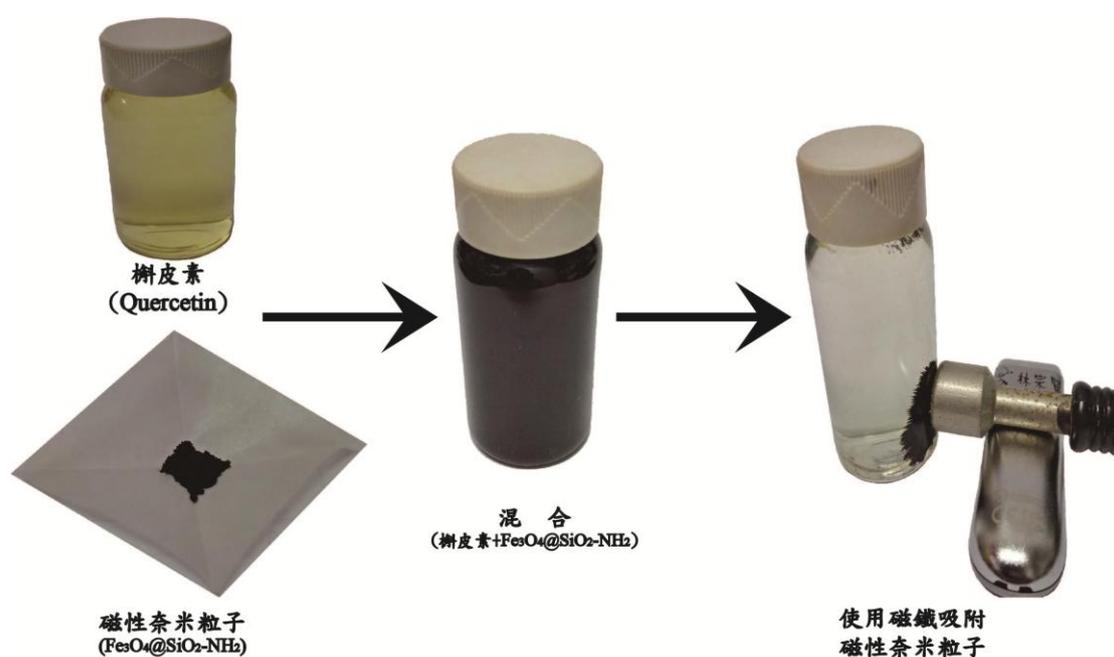


1.9.2. 磁性奈米粒子之表面修飾

磁性奈米粒子的應用，主要是以奈米粒子作為載體，粒子表面修飾上官能基，使粒子具有選擇性可與分析物做結合，達到分析物萃取濃縮的目的。本實驗是利用溶膠-凝膠方法來進行粒子表面修飾。

1.9.3. 磁性奈米粒子作為吸附劑

磁性顆粒透過適當的表面化學修飾，使得磁性奈米粒子除了具有磁性外，並且具有其修飾後的吸附親和功能，可以克服水溶液中分析物的回收問題，或者作為藥物的傳輸載體，在環境分析與生物醫學上有很大的用途^[89-90]。



【圖六】 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 的巨觀吸附現象。

1.10. 吸附

1.10.1. 原理

吸附(Adsorption)作用，這裡是指利用吸附劑(Adsorbent)將溶液中的分析物(或稱吸附物質，Adsorbate)結合於吸附劑表面的一種現象。吸附作用還可以區分為物理性吸附(Physical adsorption)以及化學性吸附(Chemical adsorption)這兩大類。物理性吸附的吸附能通常小於 10 Kcal/mole，親和作用力主要為凡得瓦力(Van der Waals)，當溶液中吸附劑與附物質之間的吸引力大於附物質與溶劑之間吸引力時，吸附物質即被吸附於吸附劑上，這是一種可逆的吸附反應。化學性吸附的吸附能通常大於 10 Kcal/mole，親和作用力主要為吸附劑與吸附質之間的活性位置形成化學鍵結，是一種不可逆的吸附反應。

1.10.2. 恆溫吸附模式

恆溫吸附模式比較常用的有兩種，一種是 Langmuir 吸附模式，另外一種為 Freundlich 吸附模式，當含有機物的溶劑中被加入吸附劑，均勻混合使其充分的接觸，有機物溶質即被吸附劑吸附。當吸附的時間充分，溶質的濃度會從起始濃度 C_0 降至平衡濃度 C_e 。吸附劑的恆溫吸附過程可以用 Langmuir 等溫吸附模式和 Freundlich 等溫吸附模式來說明。

Langmuir 等溫吸附模式：

1. 吸附劑上頭有許多具有吸附能力的活性位置(Activate site)，且每一個活性位置均具有吸附分子的能力。
2. 每個吸附位點對吸附分子的作用力均相同。
3. 當分子吸附於一活性位點上後不再脫附，也不影響其它吸附分子的吸附行為。
4. 吸附劑的最大吸附量是指每一活性位置均充分吸附了單一層的吸附分子。

Langmuir 等溫吸附公式如下：

$$\frac{x}{m} = X = \frac{aKC_e}{1 + KC_e}$$

a = 當吸附飽和時，被吸附的質量與吸附劑之比

K = 實驗常數

a, K 值可以使用下面方法求得：

將上方程式的左、右兩邊各取倒數得

$$\frac{1}{X} = \frac{1}{aKC_e} + \frac{1}{a}$$

將 1/X 對 1/Ce 作圖，即可獲得一直線，直線的斜率為 1/aK，截距為 1/a。

Freundlich 等溫吸附模式：

$$x/m = X = KC_e^{1/n}$$

式中

x = 被吸附的溶質質量，mg

m = 吸附劑的質量，g

X = 單位質量吸附劑所能吸附的溶質質量，mg/g。

C_e = 達到平衡時，溶液中的溶質濃度，mg/mL。

K, n = 吸附常數

K, n 值可以經由實驗結果加以求得，其方法如下：

在全對數座標的紙上，y 軸代表每單位質量吸附劑所吸附的質量濃度(X)，x 軸代表平衡時的濃度 C_e，將實驗結果繪至於圖紙上，而各點所連接起來的等溫吸附曲線圖應為一直線，其斜率為 1/n，截距為 log (K)。或者是將等溫吸附式兩端各取對數得到 $\log (X) = \log K + (1/n)\log C_e$ ，在直角座標圖上，以 log (X) 對 log (C_e) 數值繪圖，獲得斜率為 1/n，截距為 log (K)。在 Freundlich 等溫吸附式中，當 C_e = C₀ 時，n 值與 x/m 值會愈大，愈適用於吸附劑的吸附作用。

1.11. 研究目的

傳統的分析方法在樣品製備及偵測過程是相當耗費時間且成本高昂，因此不適合高通量的分析篩選，不但速度慢，步驟繁雜，且常需使用大量有機溶劑。開發乾淨環保的分析方法是近年來熱門的研究主題。如果有一個快速且具有高通量的分析方法，則可以節省定量檢測分析所需要的金錢與時間，因此，本研究採用了磁性奈米粒子結合小分子分析技術，並利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀來偵測槲皮素在相關產品中的含量。但由於基質的抑制效應以及分析物與基質所產生的非均勻共結晶，使得基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀在小分子的定量檢測分析上，還有很大的限制。為了克服這些限制，我們使用奈米基質結合雙層點樣法，改進了分析物與奈米基質在共結晶時的均勻性，應用於槲皮素這類小分子化合物的定量檢測分析。

貳、實驗

2.1. 材料及儀器設備

材料及設備名稱	購買廠商
Quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)95%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Myricetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₈)96%	
Tetraethyl orthosilicate (TEOS)98%	
(3-Aminopropyl)trimethoxysilane (APS)97%	
Ammonium hydroxide solution (NH ₄ OH)28-30%	
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (C ₁₀ H ₇ NO ₃ , α -CHCA)99%	
2,5-dihydroxybenzoic acid (C ₇ H ₆ O ₄ , 2,5-DHB)97%	
9-Aminoacridine (C ₁₃ H ₁₀ N ₂ , 9-AA)99.5%	
Iron(II, III)oxide (Fe ₃ O ₄)98%	
Ethanolamine (C ₂ H ₇ NO)99%	Acros organics
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)95%	ECHO Chemicals Co., Ltd
Dimethyl sulfoxide (DMSO)99.7%	Merck, Whitehouse Station, NJ USA
MALDI-TOF MS	Bruker Daltonics, Bremen, Germany
磁石加熱攪拌器	Pantech
超音波洗淨機(型號: 2200)	廣華電子
天秤(型號: 125A)	Precisa

2.2. 藥品配製

2.2.1. 槲皮素(Quercetin)標準液之配製

1000ppm 的 Quercetin

精秤 0.025g 的 Quercetin 於 25mL 定量瓶內，加入甲醇至刻度線，搖盪使其均勻混合。

20ppm 的 Quercetin

取 2mL Quercetin(1000ppm)於 100mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

10ppm 的 Quercetin

取 12.5mL 的 Quercetin(20ppm)於 25mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

5ppm 的 Quercetin

取 12.5mL 的 Quercetin(10ppm)於 25mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

2ppm 的 Quercetin

取 5mL 的 Quercetin(10ppm)於 25mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

1ppm 的 Quercetin

取 2.5mL 的 Quercetin(10ppm)於 25mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

0.5ppm 的 Quercetin

取 2.5mL 的 Quercetin(5ppm)於 25mL 定量瓶內，再加入 20% 甲醇水溶液至刻度線，並充分搖盪混合。

2.2.2. MALDI 基質溶液之配置

(a) 飽和 α -CHCA 基質溶液：

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

(0.1% TA 為 50.0% Acetonitrile(ACN)與 49.9%的去離子水(D.I. water)含 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)所組成)

(b) 飽和 2,5-DHB 基質溶液：

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

(0.1% TA 為 50.0% ACN 與 49.9%的 D.I. water 含 0.1% TFA 所組成)

(c) 飽和 9-氨基吡啶(9-Aminoacridine, 9-AA)基質溶液：

秤取 10mg 的 9-AA 溶於 1mL 的 80%EtOH 溶劑中。

(d) DHB@MNP 奈米基質的製作：

秤取 30mg 的四氧化三鐵加入 3mL 的水和 0.5mL 的丙醇中，並在室溫下超音波震盪 30min 使其分散，再加入 0.4mL 氨水(25% w/w)和 0.1mL 的矽酸四乙酯(Tetraethyl orthosilicate, TEOS)於 55°C 下反應 10min。接著加入 20mg 2,5-DHB 和 0.5mL 丙醇，反應 12 小時，接著使用離心機離心，離心機設定為(8000rpm,15min)。所形成的黑色產物再用丙醇和水各沖洗三次，接著加入 0.1N 的 NaOH 反應 10min。最後，將黑色粒子再用純水沖洗五次，即可以得到奈米基質(DHB@MNP)，保存於 4°C 冰箱。

2.3. 氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾

磁性奈米粒子表面修飾的方法有很多種，例如：溶膠-凝膠法^[91]、沉澱法、雷射合成法、氧化還原法，而本研究採用溶膠-凝膠的合成方法，主要機制是以金屬無機鹽作為前導物在本實驗中使用 TEOS 為前導物，經由水解聚合生成聚集的溶膠，再經過乾燥的處理溶膠會進一步轉換為凝膠，再將凝膠經由烘箱乾燥去除水分即可得到修飾的奈米粒子。

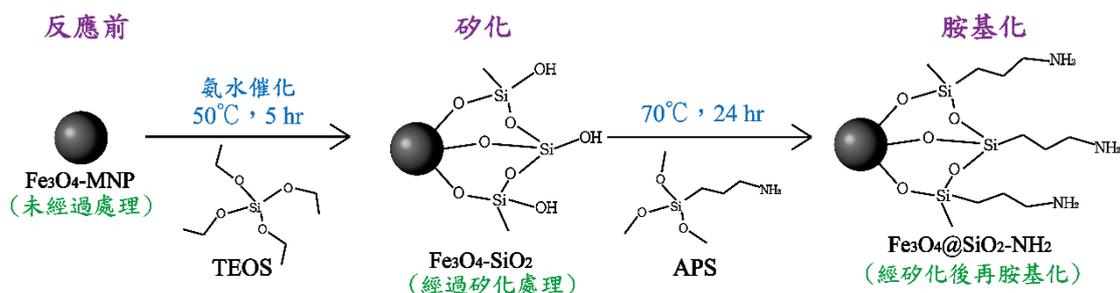
本實驗利用溶膠-凝膠法修飾磁性奈米粒子的步驟如下：首先將氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾一層二氧化矽，再進一步於磁性奈米粒子表面修飾上 NH₂ 官能基。

2.3.1. 表面的矽化處理

秤取 200 mg 98% 的 Fe₃O₄ 磁性奈米粒子置於反應瓶內，加入 40mL 95% 的乙醇，以超音波洗淨機震盪清洗磁性奈米粒子 30 分鐘，使用強力磁鐵吸引反應瓶內的磁性奈米粒子，去除上清溶液，再加入 95% 的乙醇和 300μL Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 溶液於反應瓶內，之後緩慢加入 6mL 28% 氨水當作催化劑，放入磁石，將反應瓶置於磁石加熱攪拌器上，溫度設定 50°C，反應 5 個小時。反應完成後，使用強力磁鐵吸引反應瓶內的磁性奈米粒子，去除上清溶液，再以 95% 的乙醇清洗數次，以 Ninhydrin Test 檢測是否有殘留的氨水未去除，清洗完成後，放入設置 110°C 的烘箱中乾燥，即可獲得 Fe₃O₄@SiO₂ MNP，可以使用 FI-IR 儀器進行確認，檢測是否成功修飾上 Si-O 官能基。

2.3.2. 修飾 NH₂ 官能基

秤取 100mg 的 Fe₃O₄@SiO₂ MNP 置於反應瓶內，並加入 20mL 2% 的 (3-Aminopropyl) trimethoxysilane，將反應瓶置於磁石加熱攪拌器上，溫度設定 70°C，反應 24 個小時。反應完成後，使用強力磁鐵吸引反應瓶內的磁性奈米粒子，去除上清溶液，再以 95% 的乙醇清洗數次，以 Ninhydrin Tes 檢測，確定是否成功胺基化。最後將奈米粒子放入設置 110°C 的烘箱中乾燥，即可獲得 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ MNP，此時可以使用 FI-IR 儀器進行確認，檢測是否成功修飾上 NH₂ 官能基。



【圖七】 Fe₃O₄ 磁性奈米粒子表面修飾之流程圖。

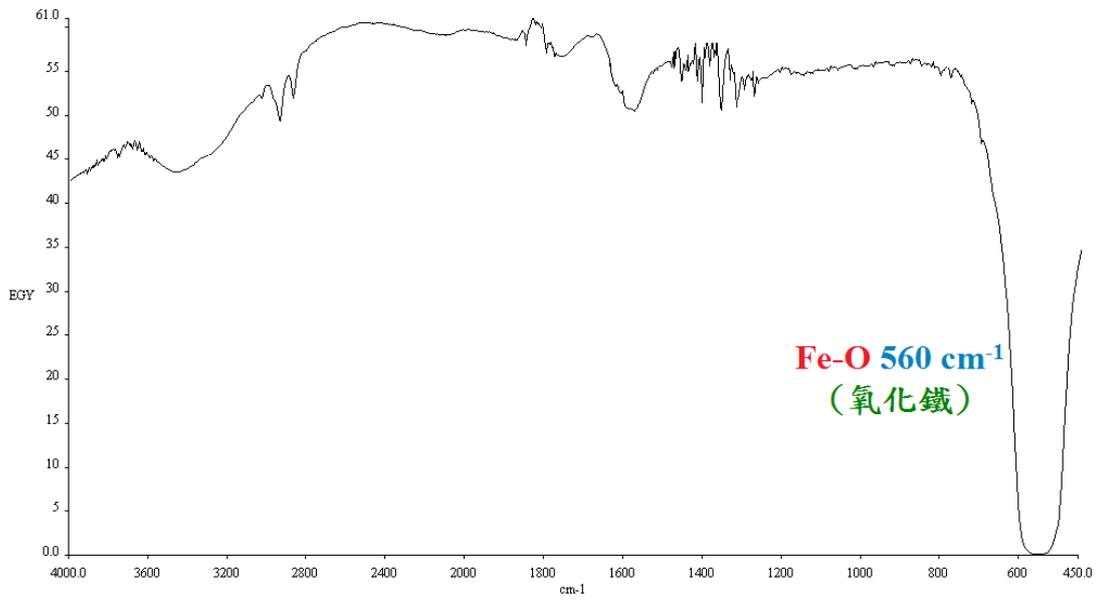
2.3.3. 紅外線光譜儀原理及樣品檢測

在磁性奈米粒子的製備過程中，經過矽化和修飾胺官能基反應後，都需要使用傅立葉轉換紅外線光譜儀(Fourier Transform Infrared Spectrometer ; FT-IR)進行矽化鍵結與胺官能基的分析檢測。紅外線光譜儀發射紅外線被待測的分析物吸收，此於分析物的分子轉動與振動相關，使得分子由基態躍遷至激發態，造成分子的淨偶極矩發生改變，因此會伴隨著分子轉動及振動的頻率改變。物質的官能基有其特徵的吸收光譜，因而藉由光譜圖的訊號，可以確認該物質的構造。紅外線可以依據不同的波長範圍區分為三個部分：12800~4000 cm^{-1} 為遠紅外線吸收區，4000~200 cm^{-1} 為中紅外線吸收區，200~10 cm^{-1} 為近紅外線吸收區，而有機物的重要吸收區均位於中紅外線吸收區。

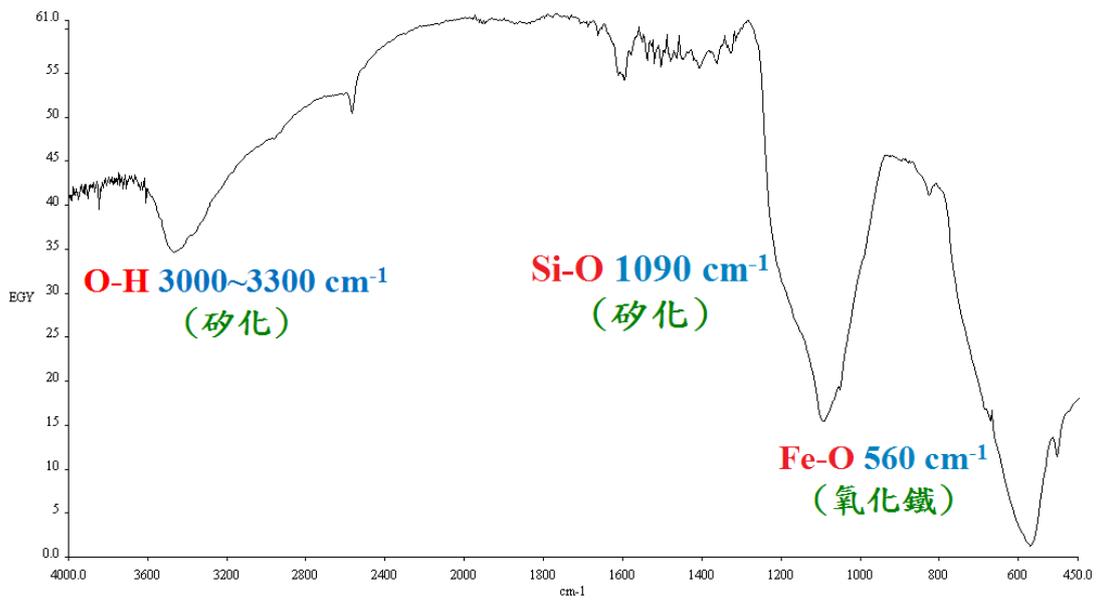
紅外線光譜儀的樣品製備，是利用 KBr 與分析物混合(比例為 50：1)，混合後壓製成薄片，放入 13mm KBr 的樣品盤中，將樣品盤放入 FT-IR 光譜儀中，即可開始分析研究。

2.3.4. 修飾後檢測

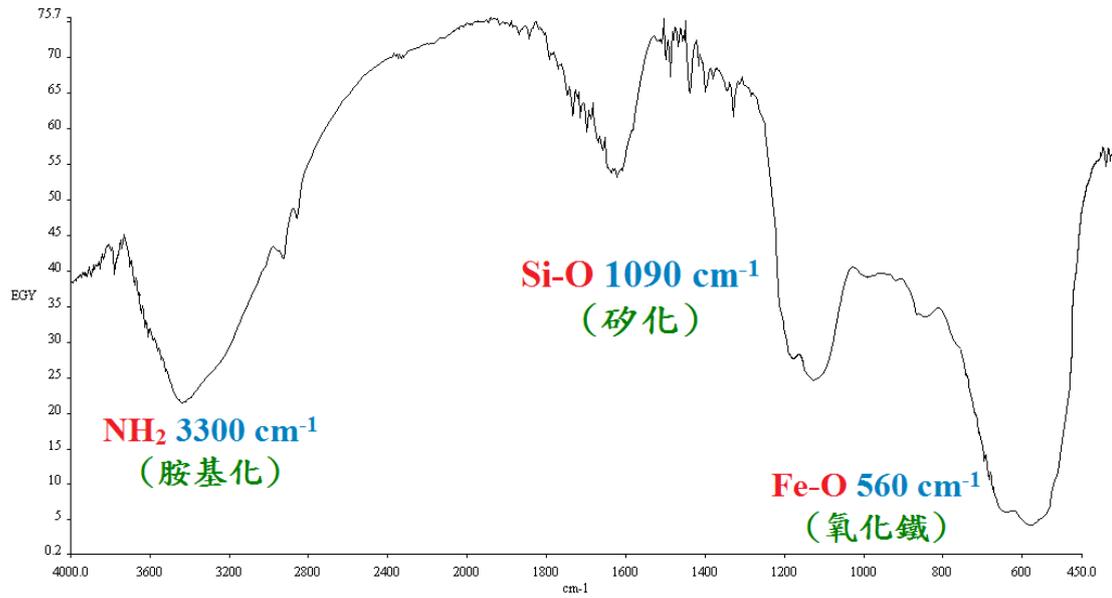
氧化鐵磁性奈米粒子經過表面修飾後，可以使用紅外線光譜儀 FT-IR 來檢測確認。根據文獻報導^[92]，Fe-O 的紅外線吸收區大約在 580cm^{-1} 這附近(圖八)。另外，經過表面矽化處理後，磁性奈米粒子在 1090cm^{-1} 處有很強的紅外線吸收訊號(圖九)，根據文獻指出，由於 Si-O 的紅外線吸收訊號約出現在 1035cm^{-1} 附近，可以推測此訊號為 Si-O。矽化後的磁性奈米粒子利用胺化反應，進行 NH_2 官能基的表面修飾，N-H 的紅外線吸收約在 3300cm^{-1} 至 3500cm^{-1} 之間(圖十)，但由 FT-IR 圖譜中發現，N-H 紅外線吸收區間有 O-H 的訊號干擾產生，不易觀察胺化情況。因此這部分可以使用 Ninhydrin 試劑進行 NH_2 官能基的檢測，因為修飾上 NH_2 官能基的磁性奈米粒子為一級胺，會與 Ninhydrin 試劑反應呈現藍紫色，若是未成功修飾上 NH_2 官能基，則不會與 Ninhydrin 試劑反應，呈現無色透明(圖十一)。



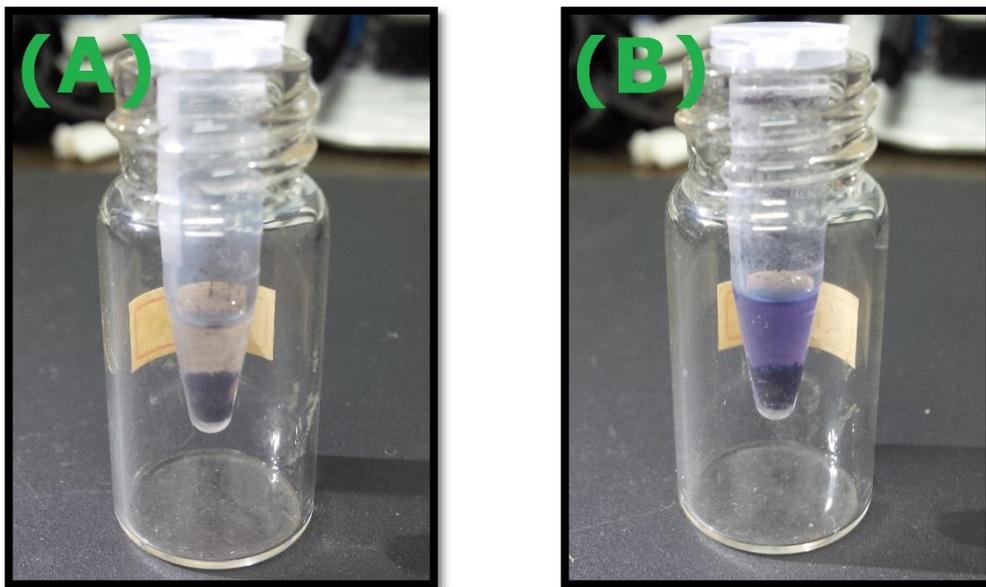
【圖八】市售氧化鐵磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜。



【圖九】 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜。



【圖十】 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ 磁性奈米粒子經由 FT-IR 檢測之圖譜。

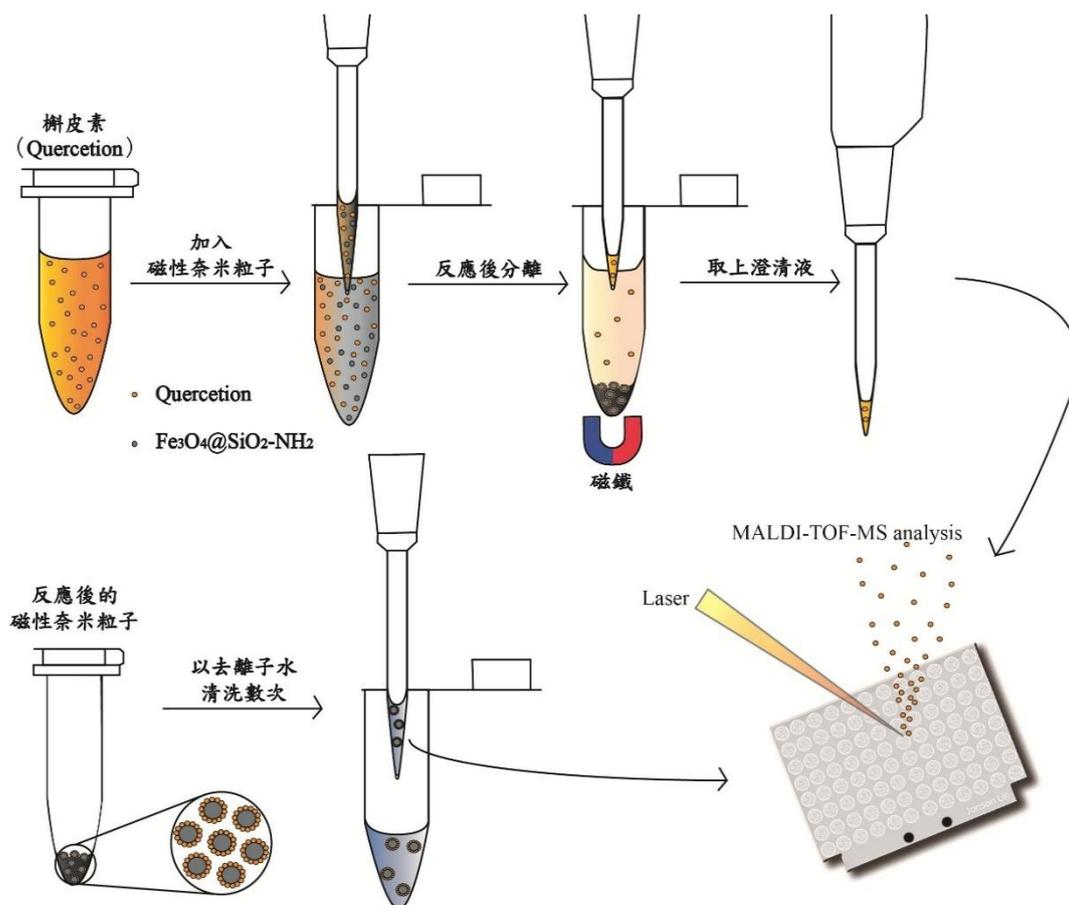


【圖十一】Ninhydrin 試劑之檢測結果，(A)胺化反應前(或胺化未成功)；(B)胺化反應後的奈米粒子。

2.4. 實驗方法

2.4.1. 修飾後磁性奈米粒子捕捉 Quercetin 之方法

首先取槲皮素(20ppm)試液 3.0mL，在 40°C 的水浴中預熱 3 分鐘，加入 0.5mg 修飾之磁性奈米粒子作為吸附劑，並於 40°C 的水浴中震盪 10 分鐘。反應完成後，使用強力磁鐵吸附磁性奈米粒子，接著從瓶內取 2 μ L 的上清液，採用 Seed-layer 方法進行質譜分析。移除上清液後，以去離子水清洗奈米粒子數次，留 10 μ L 的水於瓶內，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在樣品盤上，使用 Seed-layer 點樣法，等待磁性奈米粒子乾燥以後形成第一層晶種層，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在晶種層上，乾燥以後進行 MALDI-TOF MS 分析。



【圖十二】磁性奈米吸附劑捕捉 Quercetin 之流程圖。

2.4.2. 實驗條件之最佳化

吸附劑種類

為探討不同材質的吸附劑對槲皮素吸附效率之影響，實驗分別使用了 Fe_3O_4 MNP、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ MNP 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2-NH_2$ MNP 三種材料作為實驗的吸附劑，重覆磁性奈米粒子捕捉槲皮素的實驗步驟，分別做三次後，求其最佳之變因。

吸附劑使用量

為探討吸附劑於不同數量時對槲皮素吸附效率之影響，實驗中控制槲皮素濃度為 20ppm，吸附劑數量分別為 0.2mg、0.5mg、1.0mg、2.0mg 和 3.0mg，重覆磁性奈米粒子捕捉槲皮素的實驗步驟，分別做三次後，求其最佳之變因。

pH 值

為探討吸附劑於不同水溶液 pH 值下對槲皮素吸附效率之影響，實驗中控制槲皮素濃度為 20ppm，水溶液 pH 值介於 3~9 之間，重覆磁性奈米粒子捕捉槲皮素的實驗步驟，分別做三次後，求其最佳之變因。

反應溫度

為探討吸附劑於不同反應溫度下對槲皮素吸附效率之影響，實驗中控制槲皮素濃度為 20ppm，分別設定反應溫度為室溫、40°C、50°C 和 60°C，重覆磁性奈米粒子捕捉槲皮素的實驗步驟，分別做三次後，求其最佳之變因。

反應時間

為探討吸附劑於不同反應時間下對槲皮素吸附效率之影響，實驗中控制槲皮素濃度為 20ppm，反應時間分別為 2min、10min、30min 和 60min，重覆磁性奈米粒子捕捉槲皮素的實驗步驟，分別做三次後，求其最佳之變因。

2.4.3. 校正曲線之實驗步驟

首先取不同濃度的 Quercetin 試液各 3.0mL，在 40°C 的水浴中預熱 3 分鐘，加入 0.5mg 經過矽化及胺基修飾後之磁性奈米粒子作為吸附劑，並於溫度 40°C 的水浴中震盪 10 分鐘。反應完成後，使用強力磁鐵吸附磁性奈米粒子，移除上清液，以去離子水清洗奈米粒子數次，留 8 μ L 的水於瓶內，並加入 20ppm 的內標定物 2 μ L，混合均勻後，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在樣品盤上，使用 Seed-layer 點樣法，等待磁性奈米粒子乾燥以後形成第一層晶種層，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在晶種層上，液滴乾燥後進行 MALDI-TOF 質譜分析。以上步驟，分別做三次，最後做出不同濃度樣品與訊號強度的線性關係圖。

2.4.4. 回收率之實驗步驟

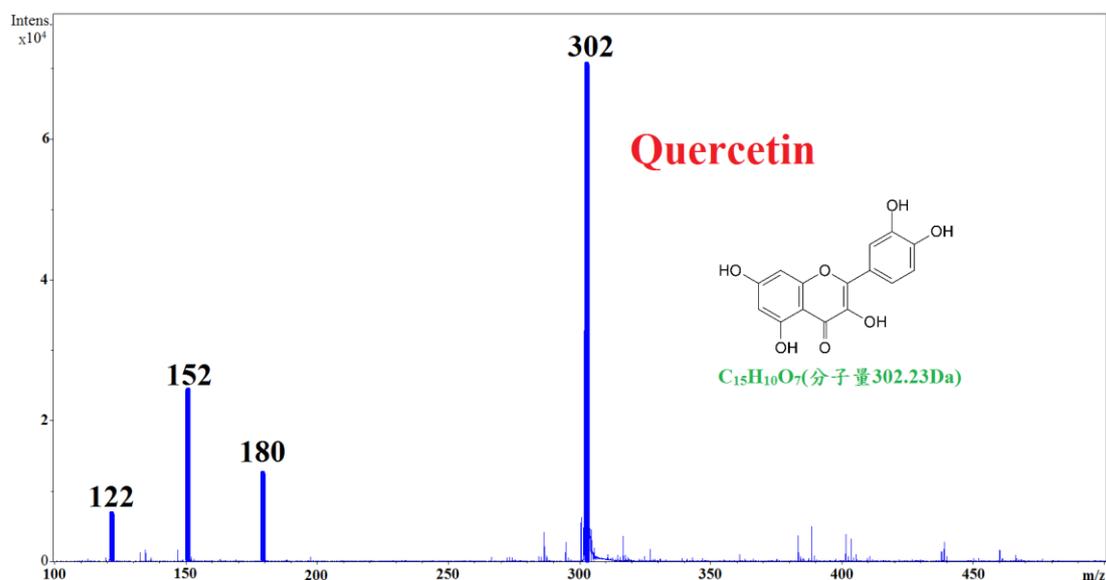
取 2 公克茶葉樣品，放入離心管並加入純甲醇 20mL，劇烈震盪 10 分鐘後，取上層液 10mL，再以去離子水稀釋至 50 mL。

分別將吸附後的奈米粒子加於含有 4ppm 內標定物的 2ppm 及 10ppm 標準樣品溶液 10 μ L 中，及混合均勻後，使用 Seed-layer 點樣法，乾燥後進行 MALDI-TOF MS 分析，最後算出分析物在各種不同濃度下的樣品回收率。

參、結果與討論

3.1. 分析物之鑑定

為了正確鑑定分析物，我們提升 MLADI-TOF MS 的雷射能量，使分析物因吸收過多的能量而產生裂解，進一步從質譜圖分析碎片離子的訊號。根據文獻資料指出^[93]，槲皮素在分子離子峰 m/z 121、 m/z 151、 m/z 179 處會有分析物的碎片訊號產生，正好與下方 MLADI-TOF 質譜圖(圖十三)相符合，由此可證明該圖屬於槲皮素的質譜圖，可以作為檢測目標分析物的鑑定依據。



Fragment(1)	Fragment(2)	Fragment(3)
m/z 121.5	m/z 151.6	m/z 179.5

【圖十三】槲皮素之質譜圖及斷裂離子之化學結構與質荷比。

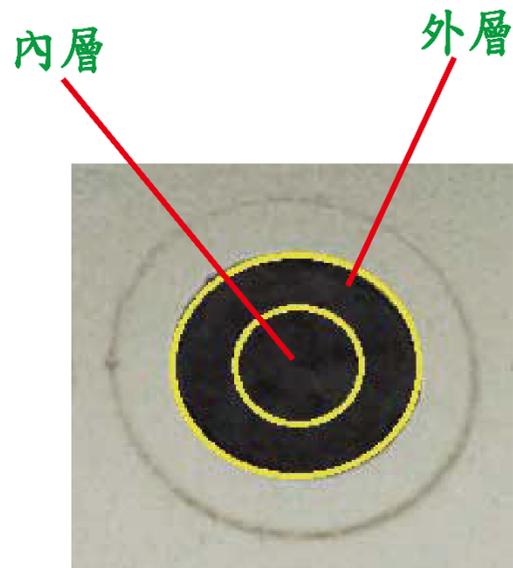
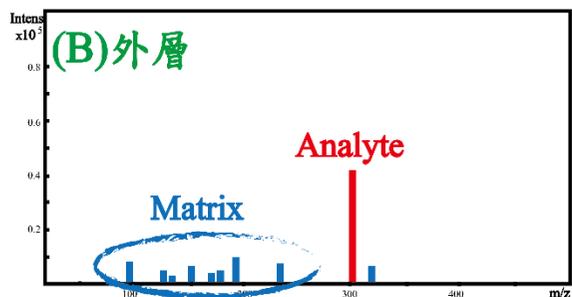
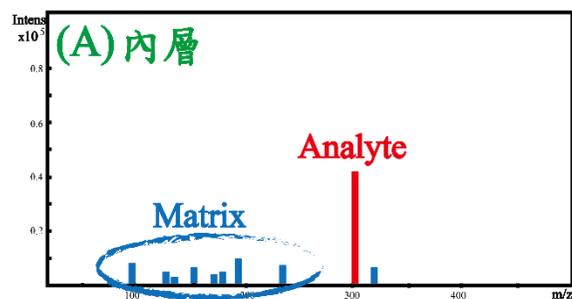
3.2. 最佳化基質溶液之製備

MALDI-TOF MS 的檢測技術通常無法應用於偵測分子量較小的分析物，因為在 500 Da 以下的低分子量範圍內，會有許多由傳統基質所產生的訊號干擾，影響分析物的偵測效果。由於本實驗的分析物 Quercetin 分子量為 302 Da，屬於小分子量範圍，不適合使用傳統的有機酸基質進行質譜分析。

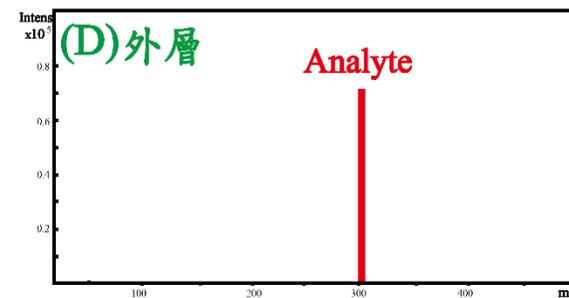
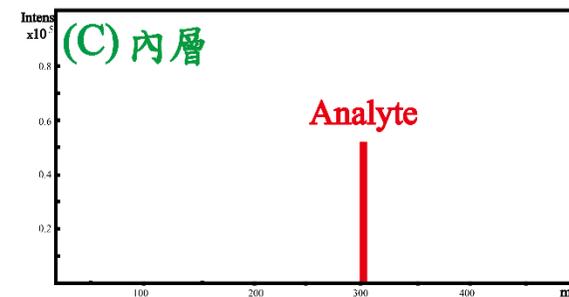
為了進一步了解以磁性奈米粒子捕捉分析物後，上清液所殘留的分析物濃度變化情形，我們以槲皮素作為標準品，探討在選用不同基質材料的情形下，對分析物的偵測訊號所造成的影響。由於不同的基質選擇會影響分析物的偵測訊號強弱，因此我們比較只使用傳統的有機酸(DHB)作為基質和使用磁性奈米粒子混合 DHB 所形成的 DHB@MNP 作為基質，對分析物訊號強度的差異。由圖十四(A)和(B)以傳統的有機酸(DHB)作為基質所測得的圖譜顯示，在 500 Da 以下的低質量範圍內有嚴重的基質訊號干擾，導致槲皮素游離效果不佳，因而抑制了分析物的訊號強度；另外，從圖十四(C)和(D)以奈米基質(DHB@MNP)所測得的圖譜顯示，由於奈米粒子與傳統基質間有很強的共價鍵，不容易被雷射光打斷，所以使用奈米材料作為基質時，在低質量範圍內無基質的干擾訊號產生，可以提昇分析物的游離效率，增加槲皮素的訊號強度，得到較好的偵測效果。

由以上的實驗結果得知使用奈材料為基質時，確實可以改善槲皮素的游離化，並成功克服低質量範圍內基質訊號干擾的問題，且提高了訊號靈敏性，使得 MALDI-TOF MS 適合應用於小分子化合物的分析研究。

傳統基質



奈米基質



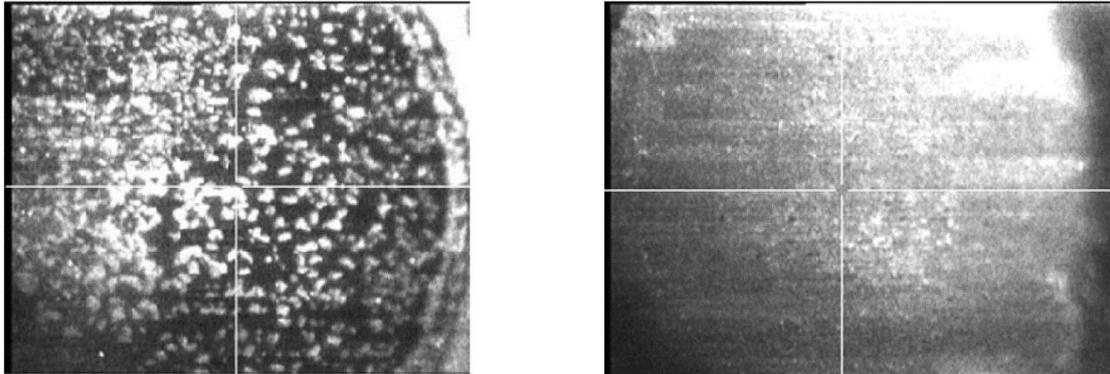
【圖十四】 傳統基質(DHB)和奈米基質(DHB@MNP)所測得之質譜圖(A)傳統基質內層；(B)傳統基質外層；(C)奈米基質內層；(D)奈米基質外層。

3.2.1. 基質溶劑之選擇

從文獻^[94]得知，分析物訊號的強弱會受到奈米基質與不同溶劑間互溶性的影響。為了要提升槲皮素的偵測訊號強度，我們將奈米基質溶在不同溶劑中，進行質譜分析觀察分析物訊號的變化情形，找出槲皮素與奈米基質間互溶性最佳的溶劑。由於奈米基質與不同溶劑之間的相容性會影響槲皮素在 MALDI-TOF 質譜中的訊號強度，因此選擇適當的溶劑是改善分析物訊號強度的重要因素。我們測試一系列不同的溶劑，例如水、甲醇、乙醇及乙腈等，以挑選出製備基質溶液的最適當溶劑，這些溶劑的表面張力、沸點及極性大小等基質特性，詳列於表三。

由於奈米基質無法與傳統基質一樣，可以從外觀得知結晶的情況，必須透過質譜儀分析樣品點內、外層訊號強度的差異，判斷結晶的狀況。從質譜檢測的結果發現(表四)，將奈米基質溶於乙醇時，由於乙醇表面張力小而造成分析物不易集中在樣品點內，使得整體的檢測效果不佳，所測得的分析物平均訊號強度數值最小。使用甲醇為溶劑時，由於甲醇與槲皮素的互溶性佳，雖然提升了分析物的偵測訊號強度，但由於甲醇的表面張力較小容易擴散，使得整體訊號再現性降低，檢測效果也不佳。當奈米基質溶於水或乙腈時，由於槲皮素容易濃縮在樣品點內，可以達到提升訊號強度 3 倍至 4 倍的效果。但由於水的沸點高及表面張力大，導致樣品點內外層的揮發速度不同，造成分析物在樣品點內外層的訊號強度差異較大，所測得的相對標準偏差值(RSD)較高為 23.0%。相較於奈米基質溶於乙腈時，由於乙腈與奈米基質互溶性較差，使得分析物的平均訊號強度較小，但由於乙腈的沸點較低揮發較速度快，相對地形成的共結晶較為均勻，能夠提昇分析物訊號的再現性，所測得的 RSD 數據明顯降低為 8.1%。

從實驗結果得知，當奈米基質溶於水的時，可以得到較佳的訊號強度；而當奈米基質溶於乙腈時，可以得到良好的訊號再現性。因此，本實驗選用將水與乙腈兩者混合作為奈米基質的溶劑。



【圖十五】傳統基質影像圖(A)單層；(B)雙層點樣法。

【表三】 溶劑的表面張力、沸點及極性。

Solvent	H₂O	MeOH	EtOH	ACN
Intensity				
Surface tension (mN/m)	72.8	22.6	22.8	29.3
b.p.(°C)	100 °C (373.15 K)	64.7 °C (337.8 K)	78.4 °C (351.6 K)	82 °C (355 K)
Polarity	9.0	6.6	5.2	6.2

【表四】 不同溶劑及樣品點內外層所測得的訊號強度及標準偏差值。

Solvent	Intensity (Outer)	Intensity (Inner)	Average	RSD(%)
H₂O	38144	23880	31012	23.0
	34829	24687	29758	17.0
	33847	24523	29185	16.0
MeOH	11956	5816	8886	34.5
	10071	5128	7600	32.5
	8267	5352	6810	21.4
EtOH	9581	3583	6582	45.6
	7290	2891	5091	43.2
	6598	2681	4640	42.2
ACN	27223	23155	25189	8.1
	26485	23579	25032	5.8
	25847	23026	24437	5.8

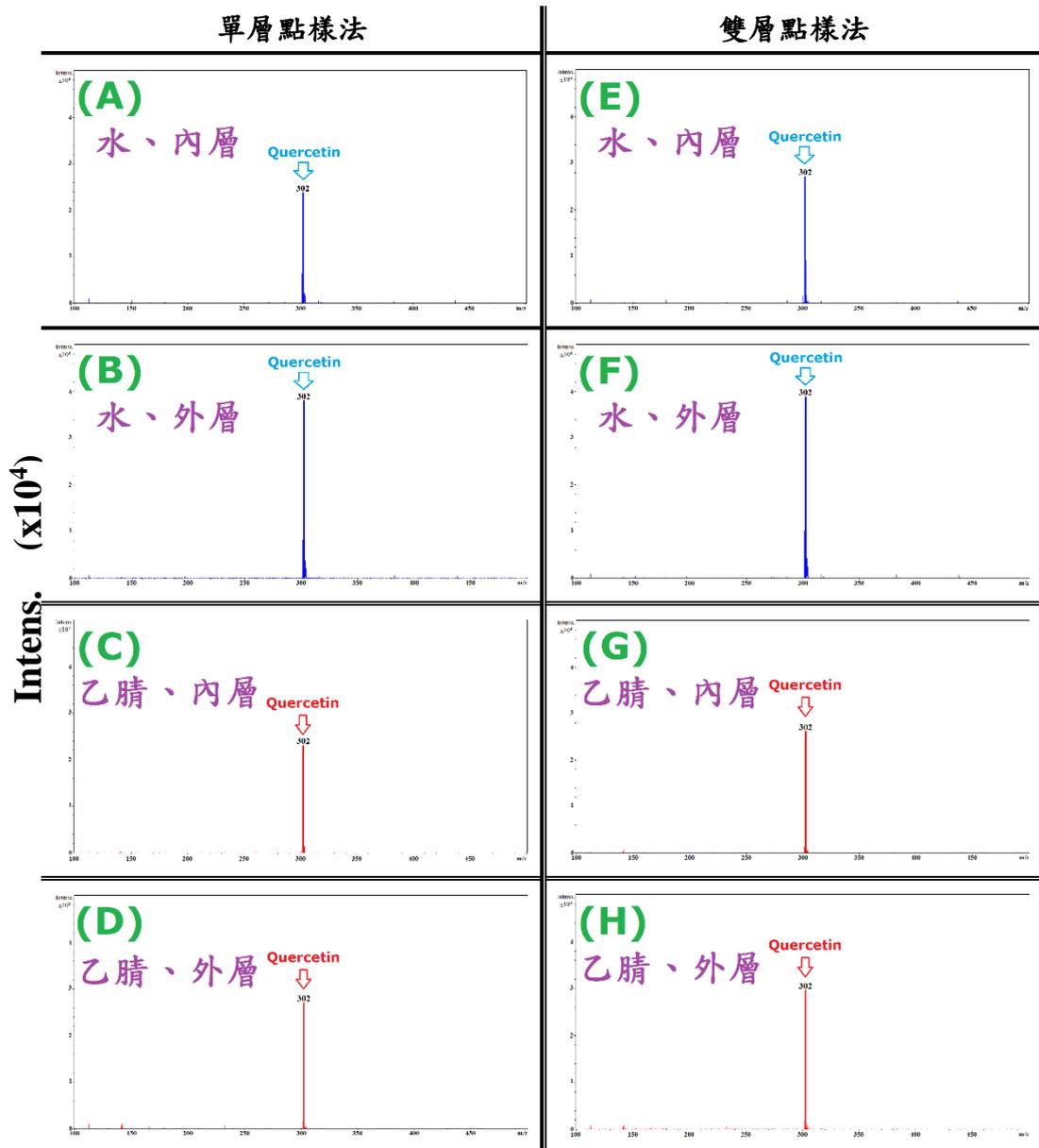
3.2.2. 點樣法之選定

在分析物定量上，使用單層點樣法主要限制在於分析物與基質共結晶的不均勻性，使得分析物訊號強度的再現性降低。為了改善結晶均勻度的問題，我們使用雙層點樣法，以克服分析物訊號強度再現性差的問題。

雙層點樣法如下：首先取 2 μ L 的基質溶液在樣品盤上點樣，在乾燥箱乾燥結晶，形成基質的結晶層(第一層)，再將分析物與基質以相同體積混合均勻，取 2 μ L 的分析物與基質混合液置於基質結晶上，在乾燥箱內乾燥，形成分析物與基質結晶層(第二層)。在先前文獻研究證實使用雙層點樣法可以有效地改善結晶均勻性和分析物訊號強度，且雙層點樣法也已廣泛地應用在蛋白質與肽的 MALDI-TOF 質譜檢測分析上。

為了證實使用雙層的樣品點樣方法，可以改善槲皮素分析物的整體訊號強度，我們將利用質譜的檢測技術，比較使用單層與雙層的樣品點樣方法，對分析訊號的影響。圖十六為奈米基質分別溶於水及乙腈中，以單層及雙層的點樣法，針對樣品點的內、外層，進行質譜檢測所獲得的質譜圖。表五歸納分析物的訊號強度及相對標準偏差值。從實驗結果發現，當奈米基質溶於水並以雙層的方式點樣時，分析物的訊號強度及再現性都優於以單層的方式點樣；當奈米基質溶於乙腈時，也有類似的結果。

從上述的實驗結果得知，當奈米基質以雙層點樣法時，確實可以提升槲皮素分析物的訊號強度及訊號再現性，因此本實驗使用雙層點樣法結合 MALDI-TOF 質譜儀，進行分析物 Quercetin 的定量檢測分析。



【圖十六】 單層及雙層點樣法所測得之質譜圖。

3.2.3. 基質溶劑之混合比例

訊號的靈敏性與再現性是定量檢測分析非常重要的因素，為了得到最佳的分析方法，使用 Seed-layer 雙層點樣法，可以改善結晶均勻性，並提升分析物的訊號再現性。

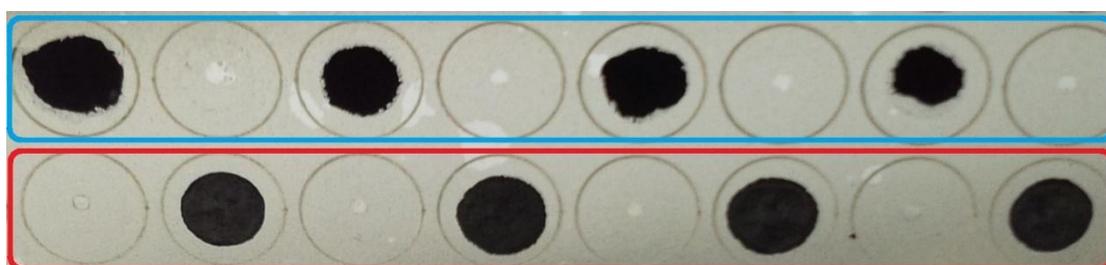
由於雙層點樣法，基質、分析物與溶劑之間的相互作用和溶劑的揮發速度快慢，這些因素都會對分析物訊號的靈敏度與再現性造成影響。因此，本實驗使用雙層點樣法，將奈米基質分別溶在不同比例的水和乙腈溶劑系統中，由所測得的分析物訊號強度，判斷最佳的基質溶劑混合比例，以進行分析物的質譜檢測分析。從實驗結果(表六)得知，將奈米基質溶在一系列不同比例的溶劑中，當水的比例提高時，可以測得較強的分析物訊號，但是相對標準偏差值也較大，顯示訊號的再現性降低，這是由於水與分析物的互溶性較佳，相對地提升了分析物游離化效率，得到較強的偵測訊號強度；但由於水的高沸點及高表面張力性質，使得樣品點內、外層的揮發速度不同，造成分析物在樣品點內、外層的訊號再現性差，所測得的 RSD 值較大。相反地，當乙腈的比例提高時，分析物的訊號強度較低，但標準偏差卻變小，訊號的再現性提高，這是由於乙腈與分析物的互溶性較差，相對地降低了分析物游離化效率，所測得的分析物訊號強度降低，但由於乙腈的揮發速度較快，在樣品點內、外層的揮發速度較一致，所形成的共結晶現象較均勻，使得分析物的檢測數據呈現較高的再現性，所測得的 RSD 值較小。當水與乙腈以 3：1 的比例混合時，可以獲得最佳的訊號強度及圖譜再現性，分析物的整體訊號較佳，樣品點的結晶狀況也較均勻，如圖十七所示。因此選擇水與乙腈以 3：1 的比例，作為最佳的基質溶劑混合比例，進行 Quercetin 的質譜檢測分析。

【表五】 單層及雙層點樣法所測得的訊號強度及相對標準偏差值。

Solvent	Preparation mode	Intensity (Outer)	Intensity (Inner)	Average	RSD(%)
H ₂ O	Dry-droplet	38144	23880	31012	23.0
	Seed-layer	38908	27190	33049	17.7
ACN	Dry-droplet	27223	23155	25189	8.1
	Seed-layer	29810	26443	28126	6.0

【表六】 不同的溶劑混合比例所測得的訊號強度及相對標準偏差值。

Solvent	Intensity (Outer)	Intensity (Inner)	Average	RSD(%)
H ₂ O	38908	27190	33049	17.7
ACN	29810	26443	28127	6.0
H ₂ O : ACN (1 : 1)	33424	28751	31088	7.5
H ₂ O : ACN (1 : 3)	32050	27874	29962	7.0
H ₂ O : ACN (3 : 1)	35205	30169	32687	7.7



【圖十七】 不同的溶劑混合比例對樣品點結晶狀況之影響。
上排(藍圈) 100%的純水；下排(紅圈) 25%的乙腈水溶液。

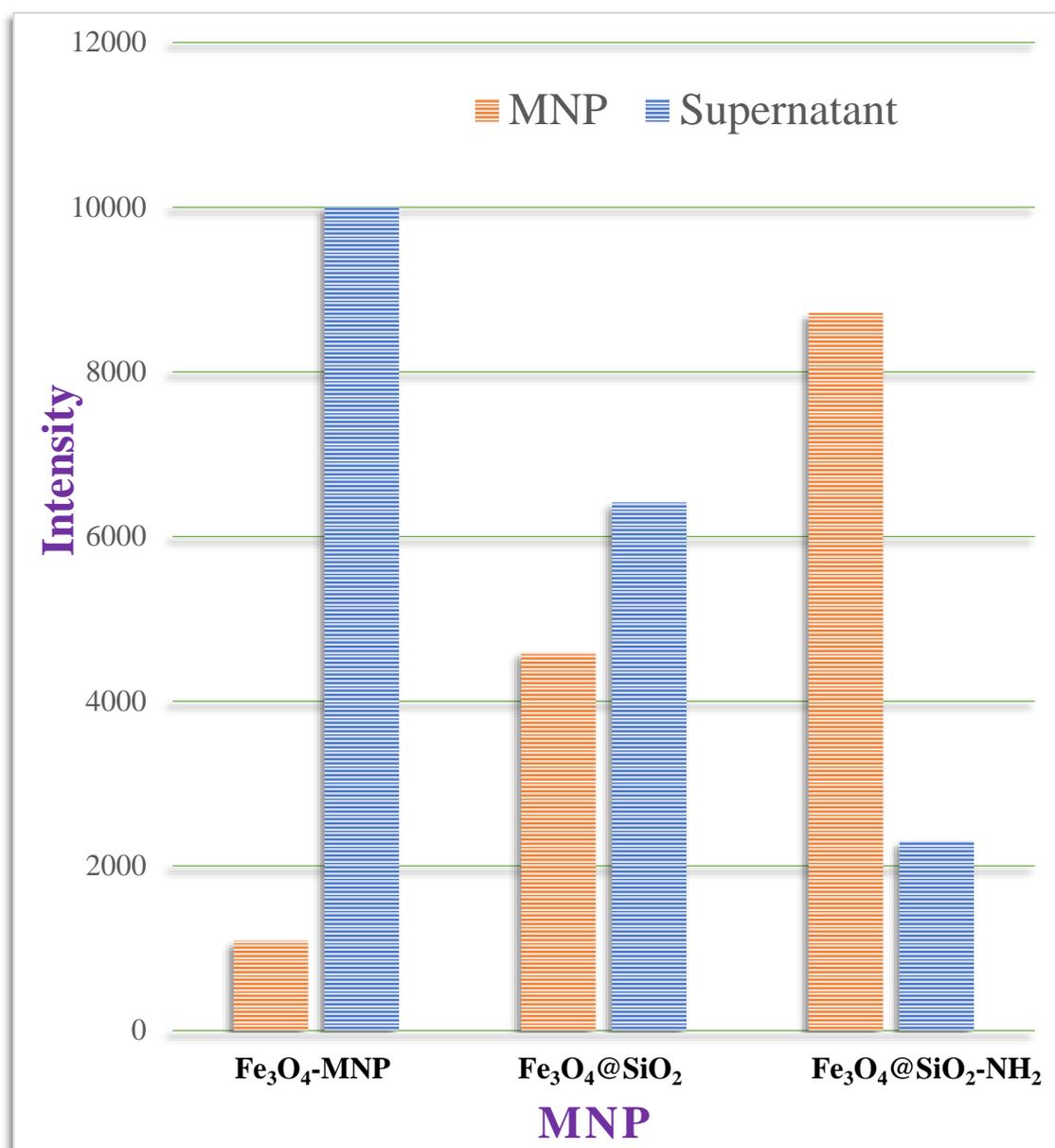
3.3. 吸附條件最佳化之研究

3.3.1. 不同吸附劑對吸附效率之影響

以未經過處理、經過矽化處理及經過矽化後再胺基化的氧化鐵奈米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$)，進行分析物 Quercetin 的吸附萃取實驗，探討不同種類的吸附劑對吸附效率之影響，所測得的分析物訊號強度及變異係數實驗數據，詳列於表七。當使矽化後再用胺基化的奈米材料($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$)作為吸附劑時，可測得最大的分析訊號強度(圖十八)，吸附效率最佳；相對地，殘留於上清液未被奈米粒子吸附的分析物含量最少，所測得的訊號強度最低。由於經過胺基化處理的奈米粒子，具有良好的鍵結特性，能夠與 Quercetin 形成鍵結，提高吸附劑在樣品溶液中對分析物 Quercetin 的吸附效率。因此以經過矽化後再胺基化的氧化鐵奈米粒子作為最佳的吸附劑。

【表七】 不同吸附劑之測試結果。

吸 附 劑						
吸附劑	1	2	3	平均	SD	CV%
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MNP}$	1057	1083	1130	1090	37	3.4
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	4827	4572	4385	4595	222	4.8
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	8710	8201	9243	8718	521	6.0
上 清 液						
吸附劑	1	2	3	平均	SD	CV%
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MNP}$	11760	10542	7706	10003	2080	20.8
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	5184	6435	7622	6414	1219	19.0
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	2307	2823	1775	2302	524	22.8



【圖十八】吸附劑與訊號強度之關係圖。

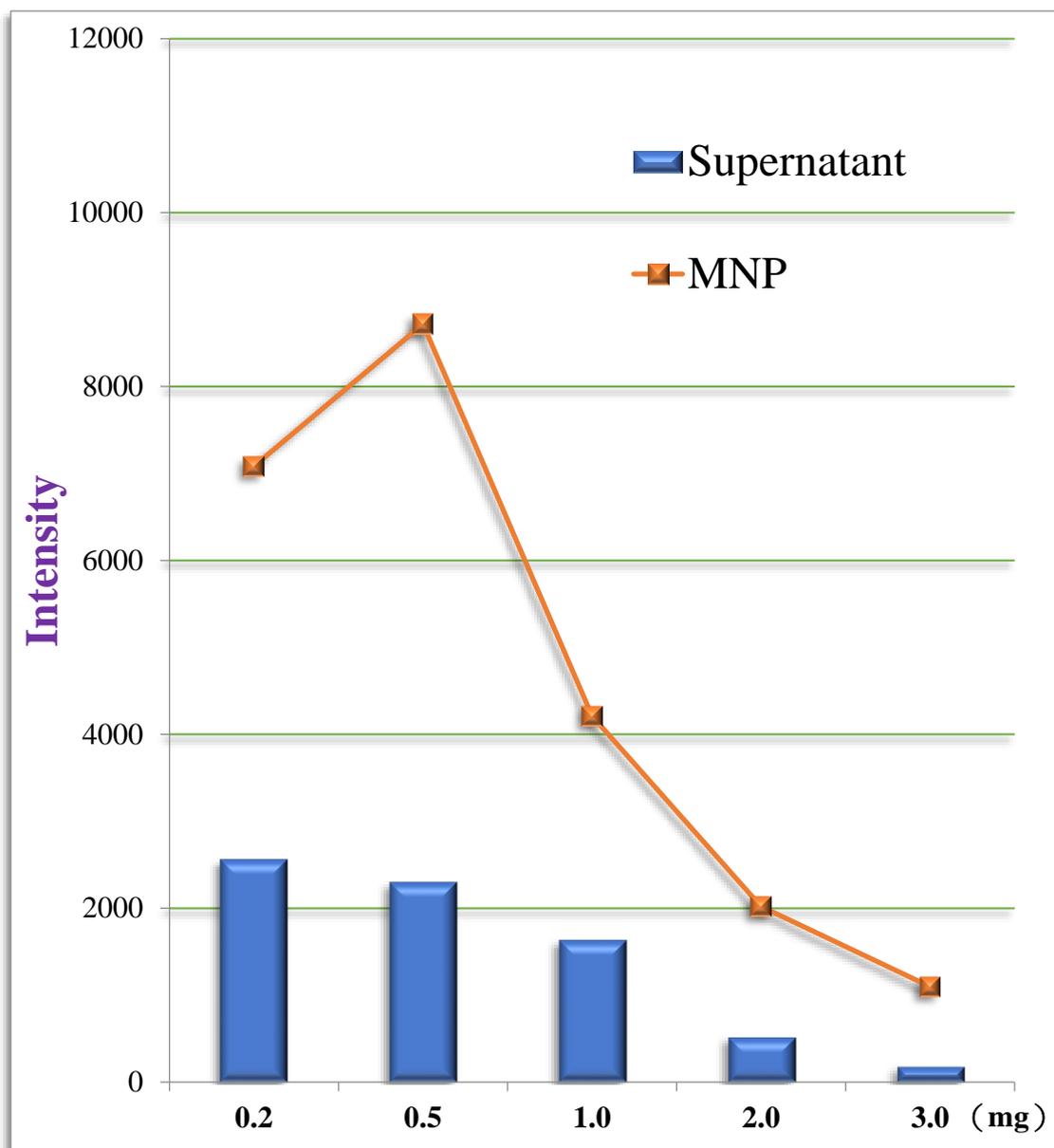
實驗條件	
吸附材料	0.5 mg
Quercetin	3.0 ml (20ppm)
溶液 pH 值	4.0
反應溫度	40°C
反應時間	10 min
MALDI 操作條件	Laser energy : 45%
	Number of shots : 100

3.3.2. 吸附劑量對吸附效率之影響

根據表八吸附劑量與訊號強度的實驗數據，所做成的關係圖(圖十九)，我們可以發現不同的吸附劑量對於實驗結果具有很明顯的影響，如圖十九所示，當吸附劑量為 0.5mg 時，具有最大的吸附量，這是由於吸附劑的使用量若少於 0.5mg，以雙層點樣法製備樣品會導致結晶不均勻的現象，容易產生訊號沙漠區(訊號較低的區域)，使得訊號再現性降低；另一方面，若吸附劑的使用量大於 0.5mg，所測得的訊號強度則明顯降低，因為樣品溶液在相同標準品濃度(20ppm)的測試條件下，使用越多的吸附劑量，每單位重量的吸附劑所能吸附的 Quercetin 數量越低。因此以吸附劑量以 0.5mg 執行實驗的操作。

【表八】 不同吸附劑量之測試結果。

吸 附 劑						
質量	1	2	3	平均	SD	CV%
0.2mg	7747	5437	8065	7083	1434	20.3
0.5mg	8710	8201	9243	8718	521	6.0
1.0 mg	4242	4004	4382	4209	191	4.5
2.0 mg	2017	1954	2092	2021	69	3.4
3.0 mg	1117	1121	1058	1099	35	3.2
上 清 液						
質量	1	2	3	平均	SD	CV%
0.2mg	2605	2751	2335	2567	211	8.2
0.5mg	2307	2823	1775	2302	524	22.8
1.0 mg	1557	1993	1357	1636	325	19.9
2.0 mg	645	419	497	520	115	22.1
3.0 mg	150	141	253	181	62	34.3



【圖十九】吸附劑量與訊號強度之關係圖。

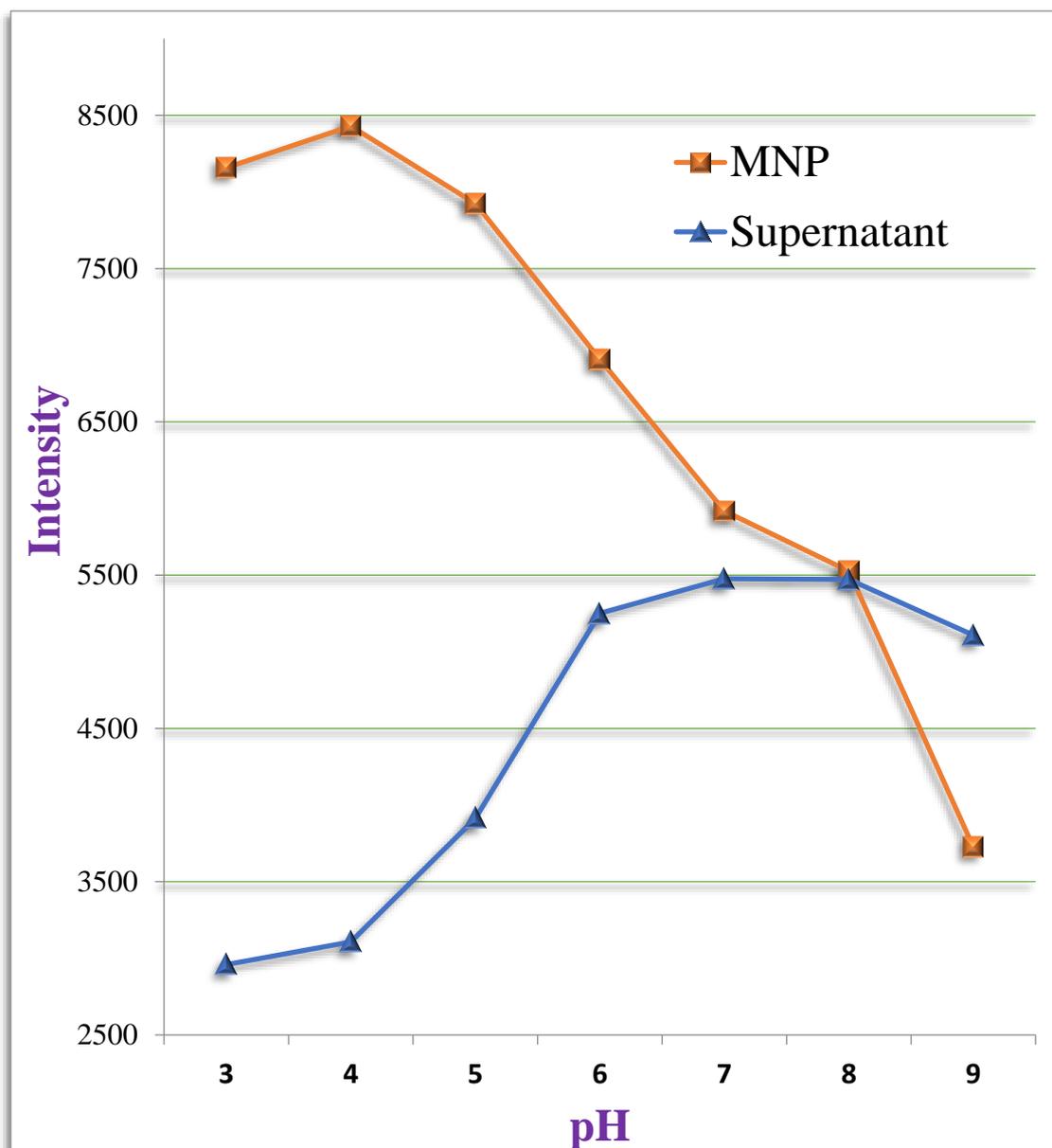
實驗條件	
Quercetin	3.0 ml (20ppm)
溶液 pH 值	4.0
反應溫度	40°C
反應時間	10 min
MALDI 操作條件	Laser energy : 45%
	Number of shots : 100

3.3.3. pH 值對吸附效率之影響

表九歸納出磁性奈米吸附劑及上清液，在不同的 pH 值溶液中所測得的分析物訊號強度及標準偏差值數據。由 pH 值與訊號強度的關係圖(圖二十)顯示，當水溶液的 pH 等於 4 時，磁性奈米吸附劑對 Quercetin 的吸附量可達最大值(黃線);相對地，在上清液所殘留的 Quercetin 含量也最低(藍線)。因為在酸性的條件下，可以使胺基化磁性奈米吸附材料的質子化現象增加，形成帶有正電荷的吸附劑，可以與 Quercetin 分子結構上的陰離子結合而達到吸附的目的。當水溶液的 pH 值大於 8 時，因為大於胺基化磁性奈米吸附材料的等電點，導致吸附劑表面轉變為帶負電荷，而降低對 Quercetin 分子的吸附能力，因此，在本實驗中選擇以 pH 等於 4 為最佳的實驗條件，進行分析物的檢測分析。

【表九】 不同 pH 值之測試結果。

吸 附 劑						
pH 值	1	2	3	平均	SD	CV%
3	8757	8052	7667	8159	553	6.8
4	7753	8992	8543	8429	627	7.4
5	7924	8417	7433	7925	492	6.2
6	7385	6567	6774	6909	425	6.2
7	6371	6027	5358	5919	515	8.7
8	6159	5477	4944	5527	609	11.0
9	4459	3657	3064	3727	700	18.8
上 清 液						
pH 值	1	2	3	平均	SD	CV%
3	2349	3082	3447	2959	559	18.9
4	3684	2598	3039	3107	546	17.6
5	3962	3473	4305	3913	418	10.7
6	4777	5589	5387	5251	423	8.1
7	5131	5317	5984	5477	449	8.2
8	4871	5478	6067	5472	598	10.9
9	4271	5178	5877	5109	805	15.8



【圖二十】 pH 值與訊號強度之關係圖。

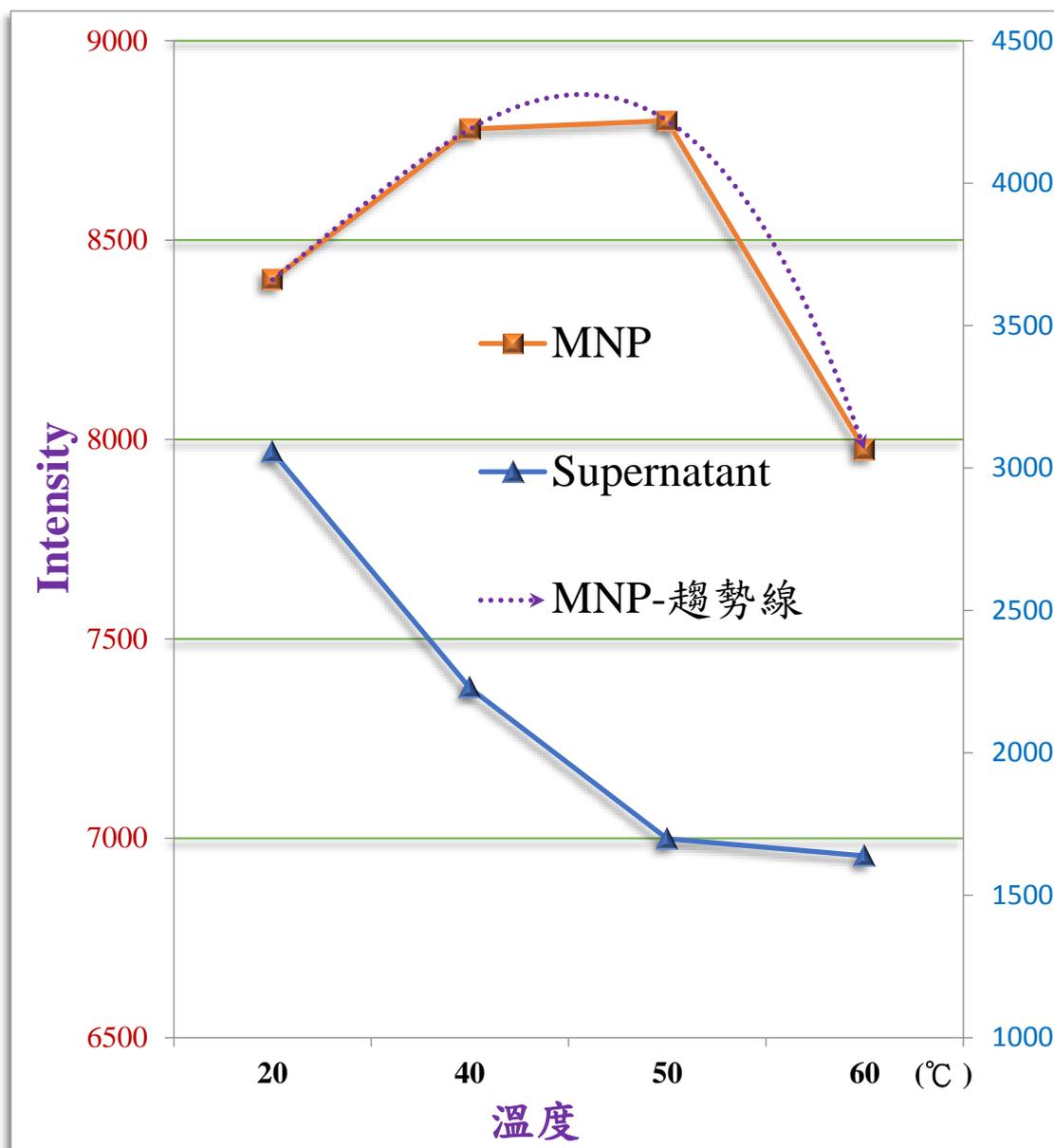
實驗條件	
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	0.5 mg
Quercetin	3.0 ml (20ppm)
反應溫度	室溫
反應時間	10 min
MALDI 操作條件	Laser energy : 45%
	Number of shots : 100

3.3.4. 反應溫度對吸附效率之影響

表十列出在不同的反應溫度條件下，所測得的分析物訊號強度及標準偏差數據；圖二十一為反應溫度與訊號強度的關係圖。由圖二十一所示，當反應溫度為40°C時，所測得的變異係數最小、偵測效果最佳。因此將實驗的反應溫度設定為40°C來執行整個實驗的操作。

【表十】 不同反應溫度之測試結果。

吸 附 劑						
溫度	1	2	3	平均	SD	CV%
20°C	9027	8153	8023	8401	546	6.5
40°C	8791	8297	9247	8778	475	5.4
50°C	9283	8301	8814	8799	491	5.6
60°C	7436	8519	7967	7974	542	6.8
上 清 液						
溫度	1	2	3	平均	SD	CV%
20°C	2449	3293	3427	3056	530	17.3
40°C	2212	2707	1763	2227	472	21.2
50°C	1198	2203	1694	1698	503	29.6
60°C	2173	1095	1646	1638	539	32.9



【圖二十一】反應溫度與訊號強度之關係圖。

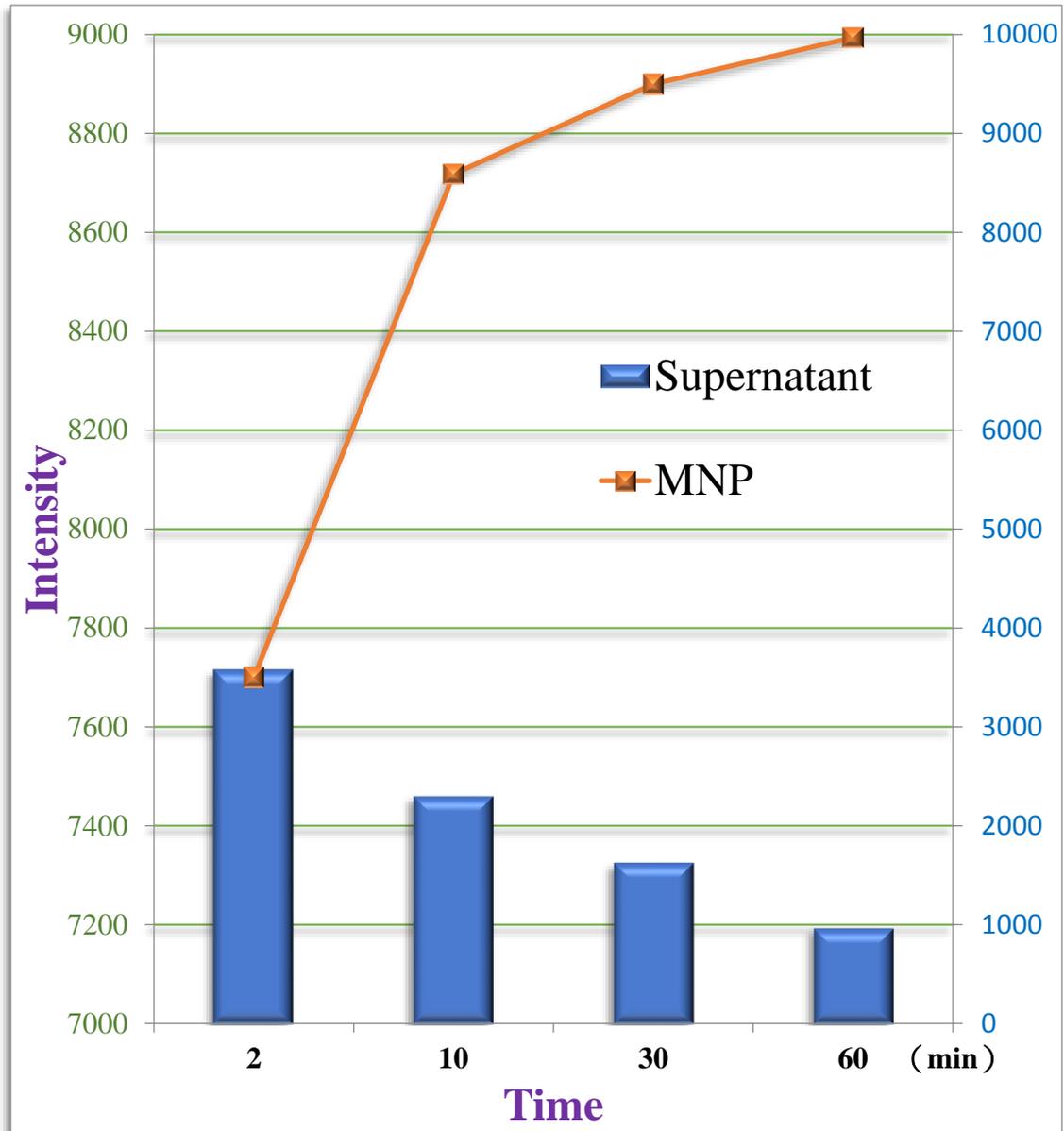
實驗條件	
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	0.5 mg
Quercetin	3.0 ml (20ppm)
溶液 pH 值	4.0
反應時間	10 min
MALDI 操作條件	Laser energy : 45%
	Number of shots : 100

3.3.5. 反應時間對吸附效率之影響

在本實驗中，將測試不同的反應時間的條件下，以探討磁性奈米基質吸附劑對樣品溶液中的分析物 Quercetin 吸收效率之影響，由實驗數據(表十一)發現，當反應時間為 2min 時，所測得的訊號強度最低(圖二十二)，代表反應時間太短，吸附劑未能充分吸附樣品溶液中分析物 Quercetin 的成分，導致吸附效率降低，對分析物的檢測靈敏度造成不利的影響。當反應時間為 10min、30min 和 60min 時，所測得的訊號強度十分近，反應溫度與訊號強度的關係曲線明顯趨緩，表示吸附劑對 Quercetin 的吸附量趨近飽和。由於本實驗以達成快速定量檢測分析為目的，所以選擇以反應時間較短的 10min 進行實驗的操作。

【表十一】 不同反應時間之測試結果。

吸 附 劑						
時間	1	2	3	平均	SD	CV%
2min	8727	7647	6728	7701	1001	13.0
10min	8710	8201	9243	8718	521	6.0
30min	9317	8538	8845	8900	392	4.4
60min	9334	8991	8657	8994	339	3.8
上 清 液						
時間	1	2	3	平均	SD	CV%
2min	2570	3631	4543	3581	987	27.6
10min	2307	2823	1775	2302	524	22.8
30min	1179	2016	1702	1632	423	25.9
60min	693	990	1227	970	268	27.6



【圖二十二】反應時間與訊號強度之關係圖。

實驗條件	
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -NH ₂	0.5 mg
Quercetin	3.0 ml (20ppm)
溶液 pH 值	4.0
反應溫度	40°C
MALDI 操作條件	Laser enrgy : 45%
	Number of shots : 100

3.4. 實驗方法之確認

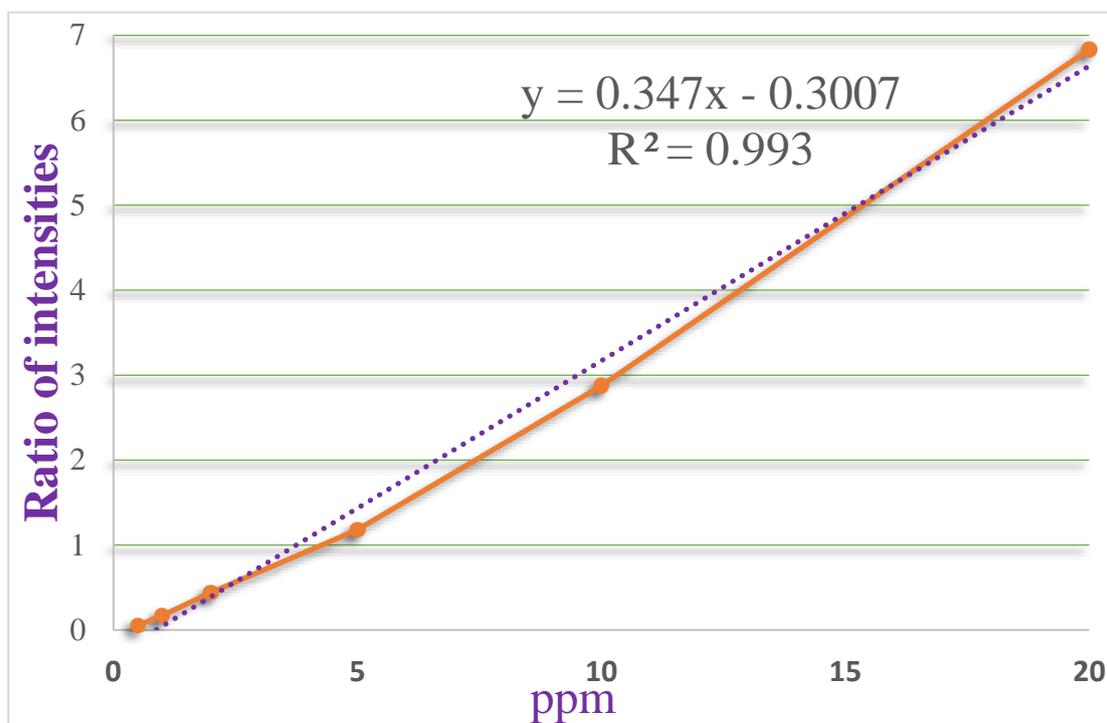
3.4.1. 校正曲線

分別製備不同濃度(0.5ppm、1ppm、2ppm、5ppm、10ppm及20ppm)的 Quercetin 標準溶液各 3.0mL，在 40°C 的水浴中預熱 3 分鐘，加入 0.5mg 經過矽化及胺基化修飾的磁性奈米粒子作為吸附劑，並於溫度 40°C 的水浴中震盪 10 分鐘。反應完成後，使用強力磁鐵將磁性奈米粒子吸附固定於樣品溶液中，接著移除上清液，再以太離子水清洗存留的磁性奈米粒子數次，保留 8 μ L 的水於瓶內，加入 20ppm 的內標定物 2 μ L，混合均勻後，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在樣品盤上，使用 Seed-layer 雙層點樣法，等待磁性奈米粒子乾燥以後形成第一層晶種層，再從瓶內取 2 μ L 磁性奈米粒子與水的混合物滴在晶種層上，等液滴乾燥以後進行 MALDI-TOF MS 定量檢測分析。

經過上述的實驗步驟後，以 MALDI-TOF MS 偵測磁性奈米粒子吸附劑在各種不同濃度的標準品溶液中，目標分析物 Quercetin 的含量，所測得的實驗數據如表十二所示。以標準品的濃度對訊號強度的比值(標準品訊號強度除以內標定物訊號強度)作圖，所獲得的校正曲線圖(圖二十三)顯示，在本實驗所檢測的標準品溶度範圍內(由 0.5ppm 至 20ppm)，訊號強度與標準品濃度之間具有極佳的線性關係，相關係數 r^2 值為 0.993。

【表十二】 不同濃度的標準品之測試結果。

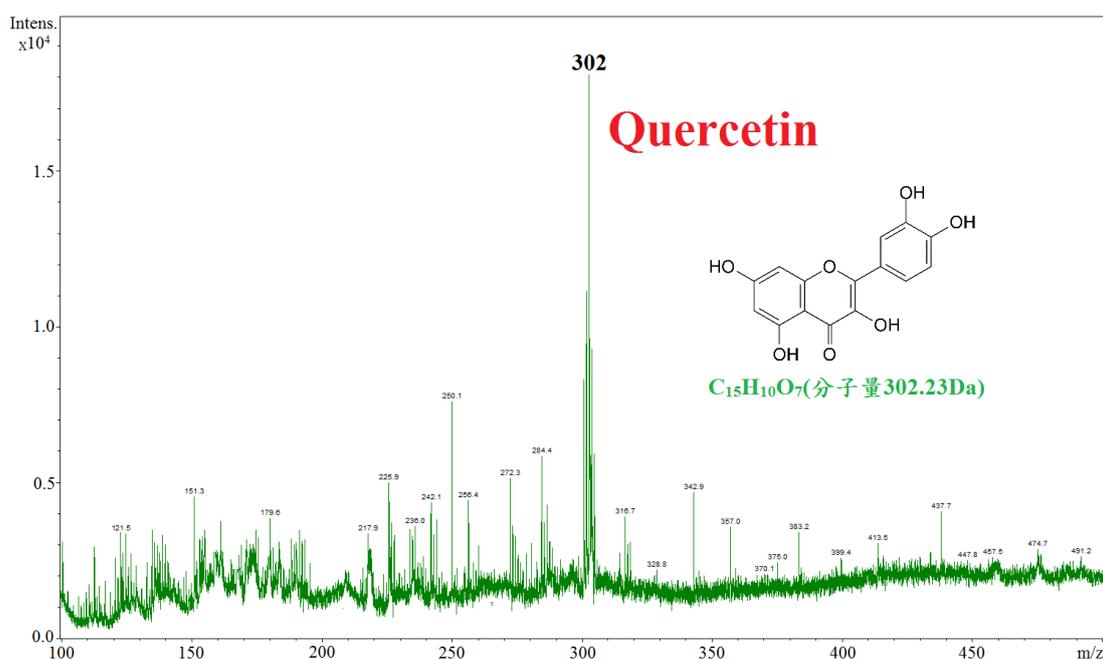
濃度 次數	0.5ppm	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
標準品對內標定物訊號強度之比值						
1	0.033	0.204	0.520	1.064	2.786	7.268
2	0.046	0.143	0.428	1.108	2.498	6.641
3	0.062	0.166	0.378	1.368	3.336	6.599
平均強度	0.054	0.171	0.442	1.180	2.937	6.836
標準偏差	0.015	0.031	0.072	0.164	0.467	0.375
變異係數	26.95	18.27	16.27	13.89	15.896	5.49
標準品的訊號強度						
次數						
1	170	857	2057	4274	11485	24582
2	227	674	1779	4572	9558	25419
3	278	724	1648	5275	11957	22877
內標定物的訊號強度						
次數						
1	5215	4191	3957	4016	3763	3382
2	4924	4728	4158	4125	3826	3445
3	4513	4357	4358	3857	3584	3852



【圖二十三】 標準品濃度對訊號強度比值之校正曲線圖。

3.4.2. 市售樣品之測試

綜合本論文所獲得的實驗結果，以最佳化的實驗條件，進一步應用於市售樣品的檢測分析。圖二十四為檢測茶葉樣品所獲得的質譜圖，由圖中 $m/z=302$ 的訊號可以明顯地偵測出目標分析物槲皮素的成分及含量。茶葉及洋蔥樣品經過測試以後，所獲得的茶葉及洋蔥實驗數據及樣品回收率，詳列於表十三。由表中的實驗數據顯示，茶葉中槲皮素的含量約介於 710ppm 至 780ppm 之間，樣品回收率則介於 100% 至 120% 之間；洋蔥中槲皮素的含量約介於 300ppm 至 350ppm 之間，樣品回收率則介於 60% 至 105% 之間。



【圖二十四】添加標準溶液的茶葉樣品之質譜圖。

【表十三】 檢測茶葉及洋蔥樣品之訊號強度比值及回收率。

次數	比值							
	$I_{std.1}/I_{int.}$	$I_{std.2}/I_{int.}$	$I_{茶}/I_{int.}$	$I_{蔥}/I_{int.}$	$I_{std.1+茶}/I_{int.}$	$I_{std.1+蔥}/I_{int.}$	$I_{std.2+茶}/I_{int.}$	$I_{std.2+蔥}/I_{int.}$
1	0.52	2.79	1.94	0.94	2.53	1.32	5.83	4.20
2	0.43	2.50	1.59	0.82	1.98	1.03	5.06	4.16
3	0.38	3.34	1.19	0.70	1.58	0.97	4.49	3.27
平均強度	0.44	2.87	1.57	0.82	2.03	1.11	5.13	3.88
標準偏差	0.07	0.43	0.38	0.12	0.48	0.19	0.67	0.53
變異係數	16.11	14.82	24.15	14.18	23.44	17.23	13.10	13.60

std.1+茶葉 回收率(%)	std.2+茶葉 回收率(%)	還原後茶葉濃度 (ppm)
103	124	715-784

std.1+洋蔥 回收率(%)	std.2+洋蔥 回收率(%)	還原後洋蔥濃度 (ppm)
64.8	106.3	300-349

註：

$I_{std.1}$ 、 $I_{std.2}$: 2ppm、10ppm 標準溶液中，所測得的 Quercetin 訊號強度。

$I_{int.}$: 4ppm 內標溶液中，所測得的 Myricetin 訊號強度。

$I_{茶}$ 、 $I_{蔥}$: 茶葉、洋蔥樣品溶液中，所測得的 Quercetin 訊號強度。

$I_{std.1+茶}$ 、 $I_{std.1+蔥}$: 添加 2ppm 標準品於茶葉、洋蔥樣品溶液中，所測得的 Quercetin 訊號強度。

$I_{std.2+茶}$ 、 $I_{std.2+蔥}$: 添加 10ppm 標準品於茶葉、洋蔥樣品溶液中，所測得的 Quercetin 訊號強度。

肆、結論

目前已經有很多種槲皮素的檢測方法被開發出來，但這些方法不是需要經過特殊的前處理方式，就是需要使用大量的溶劑，容易造成環境的汙染，且分析時間往往較為冗長，若要做大量的樣品檢測，需要支出相當高的成本。

本論文提出的樣品前處理方式，是以修飾後的磁性奈米粒子進行分析物的萃取及濃縮，並利用磁性奈米粒子化性穩定及易分離的特性，能夠克服低回收效率的缺點。以磁性奈米粒子混合有基酸作為基質，改良低質量範圍的訊號干擾問題，再運用 MALDI-TOF MS 具有高通量且快速分析的能力，可以有效縮短樣品檢測分析的時間，以達到快速、精確定量分析的效果。

以 25% 的乙腈水溶液製備成奈米基質並結合雙層點樣法，進行 MALDI-TOF MS 的質譜檢測，可獲得偏差小且整體訊號較佳的分析物訊號。經過一系列的測試，實驗條件的最佳化為溶液 pH 值等於 4.0、反應溫度 40°C、反應時間為 10min 及吸附劑 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 使用量 0.5mg，所測得的槲皮素標準品濃度線性範圍約介於 0.5 至 20mg/L，其 r² 值達 0.993。以添加 2ppm 及 10ppm 的標準品應用於市售樣品茶葉及洋蔥的檢測，實驗數據顯示茶葉樣品中目標分析物 Quercetin 的含量約介於 710ppm 至 780ppm 之間，洋蔥樣品中 Quercetin 的含量約介於 300ppm 至 350ppm 之間。本實驗成功地發展出一個快速檢測槲皮素這類小分子的檢測分析技術。

參考文獻

1. 檀君、王伯初、祝連彩，槲皮素金屬配合物的藥理作用研究進展，中國藥學雜誌，2006, 41(22), 1688-1691。
2. P.B. Scambia Gpanici, F.O. Raneuetti, “Quercetin enhance trans-forming growth factor β .secretion by human ovarian cancer cells.Int.” J. cancer., 1994, 57, 211-215.
3. J.L. Castrillo, L. Carrasco, “Action of 3 methylquercetin on poho-irus RNA replication” J. Viro., 1987, 8, 13–25.
4. J.M. Cassady “Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventixe agents.” J. Nat.prod., 1990, 53(1), 23-41.
5. X.R. TAN, W.M. ZHANG, Z.L. GONG, “Research Advance of Functions and Properties of Quercetin”, College of Food Science, Southwest University., 2005, 11, 46-48.
6. G.Y. Zhai, H.Y. MA, Y.D. Duan, W. Zhu, “Quercetin Metal Complexes and Their Biological Activity”, Natural Science Edition., 2010, 23(2), 310-315.
7. 張敏，槲皮素與 5-FU 對兩種人結腸直腸癌細胞株細胞抑製作用的相互關係，1996., 11(3), 127-127。
8. 張瓊，徐明娟，宋亮，槲皮素對於人卵巢癌細胞系增值的影響，第二軍醫大學學報，1999., 20(6), 380-382。
9. 趙靜、謝曉旭，槲皮素對缺血性心肌損傷保護作用的研究，北方藥學，2014, 11(1), 58-58。
10. 譚小蓉、張偉敏、龔正禮，槲皮素功能特性研究概況，2005, 11, 46-48。
11. 劉爽、宋毅、李俊、龔晨睿、程茅偉、張碧雲、劉烈剛，現代預防醫學 2009。
12. 黃傳鋒、歐陽守、林燕飛、張慧，槲皮素對胃腸運動的影響及其機制，2009, 17(18), 1815-1820。
13. 劉圓、尚遠宏、劉超、彭鏞心，PR-HPLC 測定扯根菜中槲皮素含量，2005, 20(6), 559-560。
14. 薛珺、戚琦、賴曉綺、李鳳儀，催化動力學光度法測定槲皮素，2007, 23(5), 589-591。
15. 嚴蕾、石曉昵、孫蓮，液相色譜法測定植物樣品中槲皮素和山萘酚，2008, 18(6), 1056-1057。
16. 楊馳、劉思曼，高效液相色譜法測定銀杏葉中 2 種活性成分含量，2009, 28(8), 43-45。
17. Pawliszyn,J.,Sample preparation:quo vadis anal chem., 2003, 75(11), 2543-2558.
18. 凌永健、李佩玲、邱郁凱、殷裕勝，綠色分析化學，2007, 65(4), 425-437。

19. A.-K.Su, J.-T.Liu, C.-H.Lin, "Rapid drug-screening of clandestine tablets by MALDI-TOF mass spectrometry", *Talanta.*, 2005, 67, 718-724.
20. A.-K. Su, J.-T. Liu, C.-H. Lin, "Rapid drug-screening and quantitation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by MALDI-TOF mass spectrometry", *Anal. chim. acta.*, 2005, 546, 193-198.
21. J.M. Halket, D. Waterman¹, A.M. Przyborowska, R.K.P. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley, "Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS", *J. Exp. Bot.*, 2005, 56, 219-243.
22. D.J. Dietzen, A.L. Weindel, M.O. Carayannopoulos, M. Landt, E.T. Normansell, T.E. Reimschisel, C.H. Smith, "Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22, 3481-3488.
23. A. Koulman, D. Petras, V.K. Narayana, L. Wang, D.A. Volmer, "Comparative High-Speed Profiling of Carboxylic Acid Metabolite Levels by Differential Isotope-Coded MALDI Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 2009, 81, 7544-7551.
24. S. Frison-Norrie, P. Sporns, "Identification and Quantification of Flavonol Glycosides in Almond Seedcoats Using MALDI-TOF MS", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 2782-2787.
25. H. Ørsnes, T. Graf, H. Degn, K.K. Murray, "A Rotating Ball Inlet for On-Line MALDI Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 251-254.
26. M.A. Posthumus, P.G. Kistemaker, H.L.C. Meuzelaar, M.C.T.N.d. Brauw, *Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules.* *Anal. Chem.*, 1978, 50, 985-991.
27. M. Karas, F. Hillenkamp, "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons". *Anal Chem.*, 1988, 60(20), 2299-2301.
28. K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of Flight Mass Spectrometry.*, Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry, Osaka, Japan., 1987, 185-188.
29. M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules," *Anal. Chem.*, 1985, 57, 2935-2939.
30. K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida, "Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry," Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectro., 1987, 185-188.

31. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshoda and T. Toshida, "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, 2, 152-153.
32. K.L. Caldwell, K.K. Murray, "Mid-infrared matrix assisted laser desorption ionization with a water/glycerol matrix." *Appl. Surf. Sci.*, 1998, 127, 242.
33. M. Fitzgerald, G. Parr, L. Smith, "Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides". *Anal. Chem.*, 1993, 65 (22), 3204-11.
34. P. Juhasz, C.E. Costello, K. Biemann, "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry with 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic Acid Matrix". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1993, 4(5), 399-409.
35. F. Hillenkamp, M. Karas, Beavis, R. C.; Chait, B. T., "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers". *Anal Chem* 1991, 63(24),1193A-1203A.
36. Y.C. Wu, C.H. Hsieh, M.F. Tam, "Matrix-assisted laser desorption/ionization of peptides on AnchorChip targets with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and nitrocellulose as matrix". *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006,20,(2),309-12
37. H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, "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.
38. R.L. Vermillion-Salsbury, D.M. Hercules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*,2002, 16(16), 1575-1581.
39. 張森、李彥、李樹奇、孔祥蕾，適用小分子化合物 MALDI 分析的基質研究，2014, 26, 158-166。
40. Y.-S. Lin, Y.-C. Chen, "Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on Sol-Gel-Derived 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Film", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5793-5798.
41. C.-T. Chen, Y.-C. Chen, "Desorption/ionization mass spectrometry on nanocrystalline titania sol-gel-deposited films", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 1956-1964.
42. Y.-S. Lin, C.-H. Yang, Y.-C. Chen, "Glass-chip-based sample preparation and on-chip tryptic digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis using a sol-gel/2,5-dihydroxybenzoic acid hybrid matrix" ,*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 313-318.
43. K.D. Rodland, "Proteomics and Cancer Diagnosis: The Potential of Mass Spectrometry", *Clinical Biochemistry.*, 2004, 37, 579-583.

44. R.E. Banks, A.J. Stanley, D.A. Cairns, J.H. Barrett, P. Clarke, D. Thompson, P. J. Selby, "Influences of Blood Sample Processing on Low-Molecular-Weight Proteome Identified by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry", *Clinical Chemistry.*, 2005, 51, 1637-1649.
45. D.S. Peterson, Q. Luo, E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, "Porous polymer monolith for surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 1504-1512.
46. J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak, "Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Porous Silicon", *Nature*, 1999, 399, 243-246.
47. W.G. Lewis, Z. Shen, M.G. Finn, G. Siuzdak, "Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry : background and applications", *Int. J Mass Spectrom.*, 2003, 226, 107-116.
48. Q. Zhang, H. Zou, Z. Guo, Q Zhang, X. Chen, J. Ni, *Rapid Commun. Mass Spectro.*, 2001, 12, 1186-1192.
49. Y. Zhang, X. Wang, W. Shan, B. Wu, H. Fan, X. Yu, Y. Tang, P. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44(4), 615-617.
50. X. Wen, S. Dagn, V.H. Wysocki, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 434-444.
51. C. Lee, J. Lee, K. Kang, H. Song, I. Kim, H. Rhee, B. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2007, 12(2), 174-179.
52. X. Li, X. Wu, H.M. Kim, S.S. Kim, M. Jin, D.Li. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20, 2167-2173.
53. 何宜錡，功能化磁性奈米粒子結合基質輔助雷射游離脫附質譜技術偵測嗎啡及二氫洋類化合物，私立東吳大學化學系碩士論文，2009。
54. P.-C. Lin, M.-C. Tseng, A.-K. Su, Y.-J. Chen, C.-C Lin, "Functionalized Magnetic Nanoparticles for Small-Molecule Isolation, Identification, and Quantification", *Anal. Chem.*, 2007, 79, 3401-3408.
55. Yi-Chi Ho, Mei-Chun Tseng, Ying-Wei Lu, Chun-Cheng Lin, Yu-Ju Chen, Ming-Ren Fuh, *Anal. Chim. Acta.*, 2011, 697, 1-7.
56. W.C. Wiley, I.H. McLaren, "Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution", *Rev. Sci. Ins.*, 1955, 26, 1150-1157.
57. O. Yanes, A. Nazabal, R. Wenzel, R. Zenobi, F. Aviles, "Detection of noncovalent complexes in biological samples by intensity fading and high-mass detection MALDI-TOF mass spectrometry". *J. Proteome Res.*, 2006, 5(10), 2711-2719.
58. B.A. Garcia, P.J. Heaney, K. Tang, "Improvement of the MALDI-TOF Analysis of DNA with Thin-Layer Matrix Preparation", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2083-2091.
59. L.H. Cohen, A.I. Gusev, "Small Molecule Analysis by MALDI Mass Spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, 571-586.

60. M.W. Duncan, G. Matanovic, A. Cerpa-Poljak, "Quantitative Analysis of low Molecular Weight Compounds of Biological Interest by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1993, 7, 1090-1094.
61. D.C. Muddiman, A.I. Gusev, A. Proctor, D.M. Hercules, R. Venkataramanan, W. Diven, "Quantitative Measurement of Cyclosporin A in Blood by Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2362-2368.
62. D.M. Desiderio, U. Wirth, J.L. Lovelace, G. Fridland, E.S. Umstot, T.M.D. Nguyen, P.W. Schiller, H.S. Szeto, J.F. Clapp, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Quantification of the mu Opioid Receptor Agonist DAMGO in Ovine Plasma", *J. Mass Spectrom.*, 2000, 35, 725-733.
63. M. Petkovi, J. Schiller, J. Müller, M. Müller, K. Arnold, J. Arnhold, "The Signal-to-Noise Ratio as the Measure for the Quantification of Lysophospholipids by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Analyst*, 2001, 126, 1042-1050.
64. P. Ö nnerfjord, S. Ekström, J. Bergquist, J. Nilsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, "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.
65. O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, "Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation", *Anal. Chem.*, 1994, 66, 3281 - 3287.
66. M.A. Alterman, N.V. Gogichayeva, B.A. Kornilayev, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Amino Acid Analysis", *Anal. Biochem.*, 2004, 335, 184-191.
67. P.J. Lee, W. Chen, J.C. Gebler, "Qualitative and Quantitative Analysis of Small Amine Molecules by MALDI-TOF Mass Spectrometry through Charge Derivatization", *Anal. Chem.*, 2004, 76, 4888-4893.
68. J. Zhang, L. Zhang, Y. Zhou, Y.L. Guo, "A Novel Pyrimidine-Based Stable-Isotope Labeling Reagent and its Application to Quantitative Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry", *J. Mass Spectrom.*, 2007, 42, 1514-1521.
69. D.S. Cornett, M.A. Duncan, I.J. Amster, "Liquid mixtures for matrix-assisted laser desorption", *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2608-2613.
70. R. Zenobi, R. Knochenmuss, "Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry", *Mass Spectrom. Rev.*, 1998, 17, 337-366.

71. D.W. Armstrong, L.-K. Zhng, L. He, M.L. Gross, "Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 3679-3686.
72. P. Kebarle, L. Tang, "From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase - the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, 1993, 65, 972A-986A.
73. J. Axelsson, A.-M. Hoberg, C. Waterson, P. Myatt, G.L. Shield, J. Varney, D.M. Haddleton, P.J. Derrick, "Improved Reproducibility and Increased Signal Intensity in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization as a Result of Electrospray Sample Preparation", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997, 11, 209-213.
74. R.R. Hensel, R.C. King, K.G. Owens, "Electrospray Sample Preparation for Improved Quantitation in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997, 11, 1785-1793.
75. A.I. Gusev, W.R. Wilkinson, A. Proctor, D.M. Hercules, "Improvement of Signal Reproducibility and Matrix/Comatrix Effects in MALDI Analysis", *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1034-1041.
76. D.A. Allwood, I.K. Perera, J. Perkins, P.E. Dyer, G.A. Oldershaw, "Preparation of "Near" Homogeneous Samples for the Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Processes", *Appl. Surf. Sci.*, 1996, 103, 231-244.
77. I.K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou, "Spin-Coated Samples for High Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Large Proteins", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1995, 9, 180-187.
78. G. Coullerez, H.J. Mathieu, S. Lundmark, M. Malkoch, H. Magnusson, A. Hult, "Cationization of Dendritic Macromolecule Adsorbates on Metals Studied by Time-of-Fight Secondary ion Mass Spectrometry", *Surf. and Interf. Anal.*, 2003, 35, 682-692.
79. F. Xiang, R.C. Beavis, "A Method to Increase Contaminant Tolerance in Protein Matrix-assisted Laser Desorption-ionization by the Fabrication of Thin Protein-doped Polycrystalline Films", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994, 8, 199-204.
80. A. Westman, C.L. Nilsson, R. Ekman, "Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Analysis of Proteins in Human Cerebrospinal Fluid", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12, 1092-1098.
81. P. Ö nnerfjord, S. Ekström, J. Bergquist, J. Nilsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, "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.
82. Y. Dai, R.M. Whittal, L. Li, “Two-Layer Sample Preparation: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and Protein Mixtures”, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1087-1091.
83. B.A. Garcia, P.J. Heaney, K. Tang, “Improvement of the MALDI-TOF Analysis of DNA with Thin-Layer Matrix Preparation”, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2083-2091.
84. J. Zheng, N. Li, M. Ridyard, H. Dai, S.M. Robbins, L. Li, “Simple and Robust Two-Layer Matrix/Sample Preparation Method for MALDI MS/MS Analysis of Peptides”, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 1709-1716.
85. 莊斯安, “Targeted Protein Quantitation and Variant Screening by Nanoprobe-Based Affinity Mass Spectrometry” 國立中央大學化學系碩士論文 2007。
86. K.-Y. Wang, S.-A. Chuang, P.-C. Lin, L.-S. Huang, S.-H. Chen, S. Ouarda, W.H. Pan, P.-Y. Lee, C.-C. Lin, Y.-J. Chen, “Multiplexed Immunoassay: Quantitation and Profiling of Serum Biomarkers Using Magnetic Nanoprobes and MALDI-TOF MS”, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 6159-6167.
87. C.-T.Chen, Y.-C.Chen “Fe₃O₄ /TiO₂ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO₂ Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, 2006, 77, 5912-5919.
88. W.-Y. Chen, Y.-C.Chen “MALDI MS Analysis of Oligonucleotides: 77Desalting by Functional Magnetite Beads Using Microwave-Assisted Extraction,” *Anal. Chem.*, 2006, 79, 8061-8066.
89. A.C.H. Barreto, V.R. Santiago, S.E. Mazzetto, J.C. Denardin, R. Lavi’n, Giuseppe Mele, M.E.N.P. Ribeiro, Icaro G.P. Vieira, Tamara Gonc ,alves, N.M.P.S. Ricardo, P.B.A. Fechine, “Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy”, *J. Nanopart Res.*, 2011, 13(12), 6545-6553.
90. 張書涵, 陳怡臻, 林雅芬, 邱求三, 合成多胺基磁性吸附劑應用於吸附水中磷酸鹽, 臺灣礦業, 第 64 卷第 1 期, 民國 101 年。
91. Q. Liu, Z. Xu, J. A. Finch, R. Egerton, ”A Novel Two-Step Silica-Coating Process for Engineering Magnetic Nanocomposites”. *Chem. Mater.*, 1998, 10(12), 3939-3940.
92. M.S. Robert, X.W. Francis, J.K. David, ”Spectrometric identification of organic compounds”. Wiley seventh edition, 1963, 89-97.
93. M. P. Delgado de la Torre, F. Priego-Capote and M. D. Luque de Castro. *Journal of Mass Spectrometry*. Article., 2015, 63(4), 1116-1125.
94. 駱盈如, 磁性奈米基質結合薄層樣品配置方法分析應用在基質輔助雷射脫附游離質譜技術上於小分子的定量, 私立東吳大學化學系碩士論文, 2011。