

壹、緒論

一、前言

過去因為傳染病的蔓延，讓抗生素^[1-4]的發現可說是當時最重要的里程碑。在 1928 年英國科學家 Alexander Fleming 發現了史上第一個抗生素-盤尼西林^[5] (penicillin)，1938 年正式應用在病人身上，更在二次世界大戰中救活了數以千計的生命，因此陸陸續續有新的抗生素問世。胺基配醣體類抗生素(Aminoglycoside Antibiotics)通常是用來治療革蘭氏陰性菌和陽性菌所引起的系統性感染^[6]，而立即性的療效也使得這類的抗生素普遍的使用於現今的社會，但是當用量過多時也帶來了耳毒性與腎毒性等副作用的產生，因此密切監控病人體內的血中濃度以避免副作用的發生是必要的。



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 MALDI 發展史

雷射脫附法(laser desorption; LD)起源於1960年代，當時即有研究指出可利用高能量之雷射光束集中照射於固體的表面上，固體樣品可脫附游離成離子，因而可用質譜儀加以分析。直到1978年波薩瑪斯^[7] (M. A. Posthumus) 等人有了重要的發展，這個團隊成功的利用雷射脫附質譜法(laser desorption mass spectrometry ; LD-MS)分析出核苷酸、胺基酸、胜肽、醣類等生化小分子，此方法普遍地應用於分析小分子的有機化合物。但由於高能的雷射光束直接照射於分析物上時，將會有許多的離子碎片產生，因此會造成圖譜判斷上的困難，且此技術所能偵測到分析物的質量上限約在2000 Da^[8]，對於分子量較大的生化分子和有機聚合物卻沒辦法偵測到分子離子。所幸於1985年時由M. Karas 和F. Hillenkamp^[9]首先提出了以基質(matrix)來幫助分析物脫附游離的概念，他們用可吸收雷射能量的色胺酸(tryptophan)當做基質和不吸光的胺基酸混合，接著用Nd :YAG(266 nm)雷射照射樣品後，發現了色胺酸可輔助分析物脫附游離的現象，首先引進了基

質輔助雷射脫附之概念。

在1987年的一場學術會議中，日本的田中耕一^[10] (Koichi Tanaka) 等人發表了利用細微的鈷金屬粉末(~300埃)與甘油混合做為蛋白質之基質，接著用氮氣雷射(337 nm)照射於蛋白質樣品上，此方法成功地脫附了分子量近14 KDa的溶菌黴(lysozyme)之生化大分子，次年並在期刊中發表了可偵測到分子量為34 KDa的carboxypeptidase A^[11]離子訊號，他是成功地使用此技術於生化大分子上的第一人。1988年德國的Hillenkamp^[12]團隊也發表了以有機酸(尼古丁酸)做為基質，搭配Nd :YAG(266 nm)雷射成功地偵測出白蛋白(albumin ; 67000 Da)和albumin cluster的訊號，將分析物質量範圍擴展到100 KDa。上述中，由於鈷粉末有取得不易、價格昂貴且具毒性，若吸入會對人體造成傷害，相對地Hillenkamp是使用小分子有機酸做為基質，且樣品製備較簡單又迅速，所以之後所發展的基質多以Hillenkamp等人所提出的有機酸為主，而目前已開發的基質有數十種之多^[13-14]。也因為上述等人的研究將MALDI的偵測範圍擴展至可以偵測到生化大分子的地步，使得後來商品化的MALDI-TOF MS普遍地應用在蛋白質、胜肽..等方面的鑑定^[15-20]，成為分析生化分子不可或缺的一種工具。

2-2 MALDI 樣品製備方式

一般傳統的製備方式，是將有吸光性質之有機酸溶於適合的有機溶劑中當做基質溶液，基質溶液通常濃度皆趨於飽和狀態，接著將基質溶液以適當比例跟分析物溶液均勻混合，最後取1 μL ~2 μL 混合液置於樣品盤上在空氣中自然風乾(air-dried)。由於混合液中含有大量的小分子有機酸與少量的分析物，因此等溶液中的水與有機溶劑揮發後，在樣品盤上會形成共結晶(co-crystallization)，此時即可將樣品盤置入質譜儀中進行分析。然而在分析時是否可以得到分析物的訊號，基質與樣品溶液的配製是重要的因素，基質與分析物的莫耳比、溶劑之極性等均會影響共結晶的形成而造成結果的差異，一般來說，基質與分析物的莫耳濃度比大約都在1000：1以上，但對於一些生物巨分子而言，會因為其分子愈大，而基質的莫耳濃度也需要調整至較高的濃度^[21]。

將含有樣品的樣品盤送入離子源後，以脈衝式雷射光照射並於真空的環境下進行脫附游離，產生氣相分析物離子後，以質量分析器進行偵測。由於在共結晶中基質的含量遠多於分析物，因此當雷射照射時，雷射能量會由基質吸收且在極短的時間內將能量傳遞給所環繞的分析物分子^[22]，此區域內的分子會在真空的狀態下，在極短的時間內被迅速加熱，而由固相(or液相)轉變為氣相，此時當相轉移的速率大

於分析物受熱分解的速度時，分析物即不會分解，即可保持分析物結構之完整性並脫附至氣態，此過程即為脫附(desorption)，而在過程中，電荷轉移反應也會同時進行，產生一連串離子-分子反應，分子因而被游離化而產生電荷，乃游離化之過程(ionization)。

2-3 基質的特性與功用

上述有提到使用色胺酸(tryptophan)當做基質是第一個引進以基質來幫助分析物脫附游離的概念，早期的雷射脫附游離法因為沒有基質輔助分析物脫附游離，一直沒有辦法將待測分析物的質量上限提高，所以基質所扮演的角色就顯得格外重要。基質的選擇需搭配可吸收雷射能量的波長而有所改變，例如：氮氣雷射(337 nm)、二氧化碳雷射(10.6 μm)..等，而目前商品化的MALDI-TOF MS通常配備波長337 nm的氮氣雷射，另外基質通常都具低揮發性，因為質譜在真空狀態下操作，若是基質容易揮發則無法穩定覆蓋於分析物的周圍扮演好基質的功用，這樣會造成分析上和圖譜判斷上的困擾，因此一般而言，基質需要具備以下三種必要的功用^[23,24]：

(1) 吸收特定雷射能量

不同的基質都具有吸收不同波長雷射能量的特性，通常隨著雷射光波長的不同，而所選用的基質結構上也會有差異，一般來說，適合

UV-MALDI分析所選用之基質都具有共軛雙鍵或是芳香族的小分子酸。

(2) 有效地防止分析物聚集

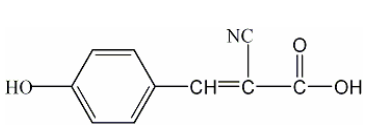
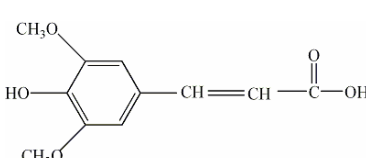
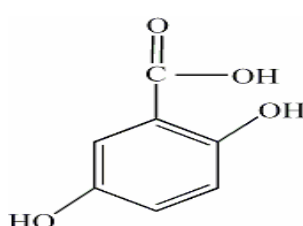
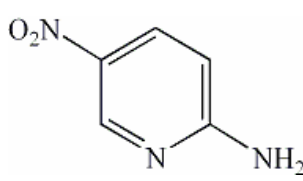
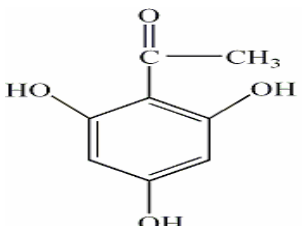
如果在共結晶的過程中，分析物太過於集中將會影響能量傳遞的效率以及脫附游離的過程。因此基質分子的含量通常高於分析物，以便於有效地將分析物分子隔開而形成較佳的共結晶，這樣才能更有效率的進行分析的工作。

(3) 提供氫離子，幫助分析物游離化

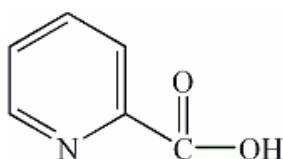
基質大多數為具酸性官能基的芳香族有機物，可有效地提供氫離子給分析物，使分析物帶上電荷，而獲取質子的方式主要是由於分析物分子與基質離子在氣相中進行一連串離子-分子反應，使分析物形成分子離子。基質在此所扮演的角色為氫離子供應者，可幫助分析物游離化。

符合上述三種功能的基質，依化學結構來看，早期被發展出來的有具芳香環的有機酸，例：尼古丁酸(nicotinic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、桂皮酸(cinnamic acid)..等，然而近來也發現，有些具鹼基的芳香族類也可當成基質使用^[25]。表(一)為最常用的基質結構和相對應的雷射波長，而不同類型之分析物所選用的基質也有所差異，例如:SA常用在分析蛋白質上，而 α -CHCA常用在分析胜肽^[26,27]上。

表(一)常見MALDI基質與相對應雷射吸收波長^[28-30]

基質名稱	結構式	適用雷射波長 (nm)	主要適用的分析物
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)		266,337,355	胜肽 蛋白質
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid, SA)		266,337,355	胜肽 蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)		266,337,355	胜肽 蛋白質 碳水化合物
2-amino-5-nitropyridine		337,355	核苷酸
2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)		337,355	胜肽 核苷酸

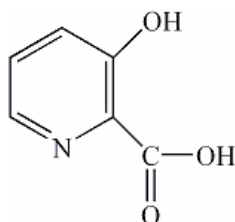
2-pyridine
carboxylic acid
(picolinic acid)



266

胜肽
蛋白質
核糖核酸

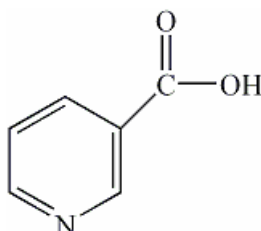
3-hydroxypicolinic acid
(3-HPA)



266,355

核苷酸
核糖核酸

3-pyridine
carboxylic acid
(nicotinic acid)



266

胜肽
蛋白質

2-4 MALDI 離子形成機制探討

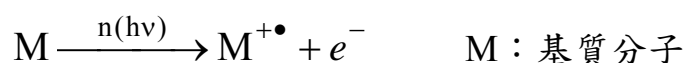
MALDI 離子形成的機制至今雖然有很多的探討與研究，但是仍侷限於在脫附游離分析物的過程中時間極短暫，且不易觀察，因此現今還沒有很詳細的 MALDI 離子形成的機制，到現在還有不少學者在探索中。由於 MALDI 中能量的來源是不同波長之雷射光，因此在脫附游離分析物的過程中，並不只是一連串離子-分子反應，其中還包括了氣相中的光游離^[31,32]及光化學反應、激發態質子轉移(excited-state proton transfer)、不均勻反應(disproportionation)、能量聚集(energy pooling)..等。

目前的研究顯示，MALDI 的離子形成機制大致上可歸類成兩大類：

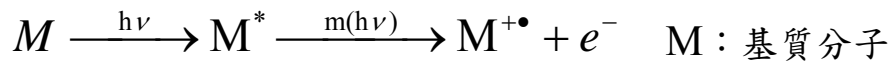
(1) 一次離子形成^[33] (primary ion formation)

主要是指中性分子在真空中游離成離子的階段，通常是指基質離子。而在這過程中，有幾個形成機制的模型被提出來解釋，其中包括了由 Sunner 等人提出之相爆炸模型^[34] (phase explosion)，主要在解釋當高能的能量束撞擊於凝相態之樣品上時，樣品會在短時間內即處於極高溫的環境中，當溫度到達臨界超熱(critical superheat)以上時，則樣品分子會處於不穩定的狀態，而產生相爆炸之現象，也就是將能量用於樣品分子使其從凝相態過渡至氣相態之轉移位能，而此過程中，由於相轉移的速率快於分析物分子熱分解的速率，因此不會有熱分解的現象發生，使得分析物可保持完整性而不會造成圖譜鑑定上的困擾，此模型可解釋在 MALDI 中為何可產生完整的氣相分子離子。

另外還有多光子游離模型(multiphoton ionization)，此模型是由 Ehring 等人在 1992 年所提出，是目前較常用來解釋 UV-MALDI 離子形成機制的模型^[35,36]，而此模型主要在說明離子的形成，主要是由於具有吸光性質的基質，在吸收了多個光子後會激發至激發態，而產生了自由基陽離子：



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

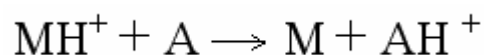


一般來說，對於基質分子的游離位能而言，大致上在吸收了約7~9 eV(2個以上之光子)能量後，才能由基態激發至激發態，最終游離成離子。此外，尚有能量聚集模型、激發態質子轉移模型、不均勻反應模型..等，都是被提出用來解釋一次離子形成機制的模型。

(2) 二次離子形成^[37] (secondary ion formation)

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

(M：基質分子 A：分析物分子)



而在上述式子中，由基質離子和分析物分子碰撞所形成的二次離子形成反應是否進行取決於一要素，即是質子親和力 (proton affinity)，它可決定由哪些分子可獲得質子而被游離化，而根據文獻說明，一般的有機基質之質子親和力通常介於183-225 kcal/mol^[38,39]，而由實驗證明一般蛋白質之質子親和力約為240 kcal/mol^[38]，因此在氣相中，質子從基質離子轉移到一般蛋白質的過程，是一個較容易進行的自發反應，所以當分析物的質子親和力較基質分子高時，質子轉移反應為放熱反應，因此如何選擇最適當的基質是相當重要的。此外，尚有電子轉移模型 (electron transfer)、電荷補償模型 (charge compensation)、氣相陽離子加成物形成模型 (gas-phase cationization) 等，都是被提出用來解釋次離子形成機制的模型。

質譜法只能分析帶電荷之樣品離子，因此必須將樣品游離成帶電荷之離子，才能被偵測出來，而一般在MALDI的圖譜中所觀測出的離子峰通常都是 $[M+H]^+$ ，這是因為大部份基質如表(一)為具芳香環之有機酸，為很好的氫離子供給者，但如有鈉、鉀存在時，加成物離子 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 也常存在於圖譜中，且因為MALDI透過基質為媒介為一軟性游離法，因此極少有碎片離子產生，只有在低質量範圍內 (MW<500) 才有基質產生之碎片離子。

2-5 飛行時間(TOF)質量分析器的原理

MALDI通常都是搭配飛行時間^[40-41] (time-of-flight)質量分析器為主，這是因為TOF理論上具有無質量上限的優勢，因此很適合用來偵測高分子量的生化分子。而TOF中的飛行管管長通常在1~1.5公尺之間，當樣品進行脫附游離後形成離子時會被施加一加速電壓，使所形成之離子在電場下均具有同樣的動能，此時會因不同離子之質荷比(m/z)大小而有不同的飛行速度，而飛行時間與質荷比的關係可由下式表示：

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

v：離子的速度

m：離子的質量

z：離子的電荷數

e：電子的電荷量

KE：動能

V：電場加速電位

另外，假設飛行管長度為 L 時，離子於飛行管中的飛行時間為 t 表示，則可求得質荷比與飛行時間的關係如下：

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

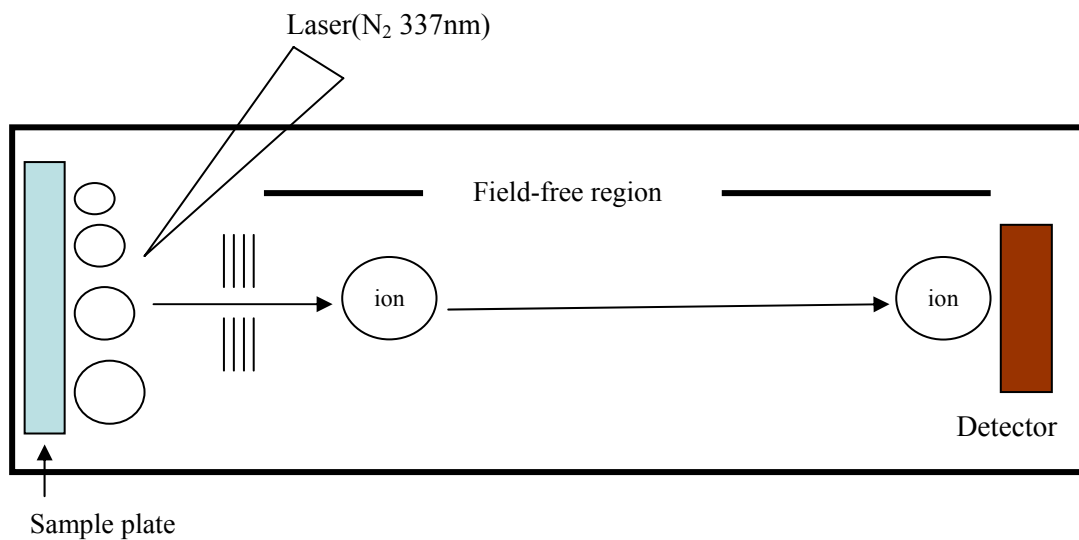
$$\Rightarrow \frac{m}{z} = 2eV \left(\frac{t}{L} \right)^2$$

由上述關係式可知，對攜帶相同電荷的離子而言，分子量愈大的離子飛行時間愈長，因此較晚到達偵檢器中，通常離子從被脫附游離出來到達偵測器的時間以微秒為單位，所以要得到一張質譜圖理論上僅需很短的時間。

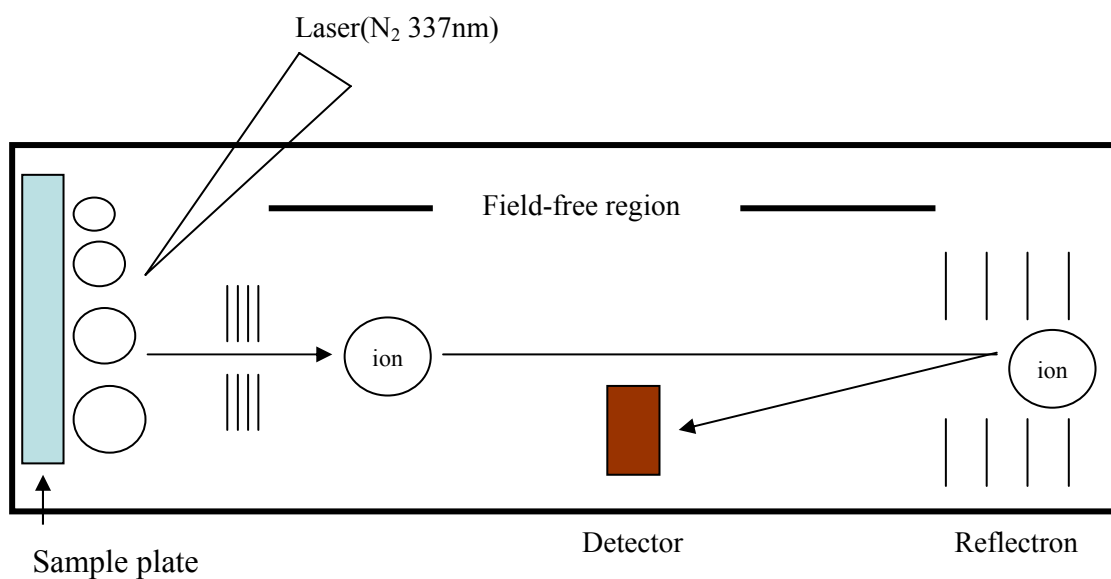
飛行時間質量分析器的結構相當簡單，主要是由一根不銹鋼的管子所組成，其測定時不用進行電壓掃瞄等其他繁雜之工作，因此擁有快速測定之優點，加上具有無質量上限、分析時間極短等特色，使TOF近年來不斷有新技術發展出來，目前商業化的飛行時間質量分析器是以直線型(linear)和反射型(reflectron)為最常用的機型，其直線型和反射型的結構如(圖一)所示。另外，直線型飛行時間質量分析器有解析度較差之缺點，主要是因為當分析物分子在游離的過程中，相同質荷比之離子被游離化的時間，可能會因為時間、空間和動能的分佈而導致些微的差距，以至於無法同時到達偵檢器而使解析度因此而下降，一般來說，直線型 TOF 的解析度約為三千，但還是會根據分析物分子量的大小而有所改變，目前已有數種用來提高解析度的方法被提出如下：

(1)反射型飛行時間質譜儀^[42-44]

反射型的設計，主要是在直線型飛行管末端，以多組電極片施加強度遞減之正電場，使正離子進入此區域後會因為電性相斥的關係而



Linear TOF



Reflectron TOF

圖(一)直線型和反射型 TOF

減速，直到速度為零時，受到此電場之作用力而轉向並反向加速，接著通過反向的飛行管到達另一端的偵檢器中進行偵測。此時，若有相同質荷比卻具不同動能的離子經過反向電場時，動能較大之離子會進入較深的反射區使飛行路徑增加，並和相同質荷比動能較小之離子同時到達偵檢器，因此相較於直線型 TOF 有較高的解析度，一般來說，反射型 TOF 解析度可到一萬以上，但會隨著分析物分子量大小不同而有所改變。

另外利用反射型 TOF 之結構設計也可發展出一種叫做游離源後碎裂^[45] (post source decay, PSD)之技術，這是一種類似 MS/MS 功能的分析技術，主要是藉由某些介穩離子(metastable ions)在飛行的過程中，會因為內能過高導致在飛行時碎裂，此時碎裂的子離子和母離子的動能不同，但具有相同的飛行速度，若用直線型 TOF 偵測時，會因為其飛行速度相同而同時到達偵檢器，而無法分辨出子離子和母離子之分子量差異，而反射型 TOF 因為可依據動能不同而加以區分，因為動能較小的碎裂離子會較快地被反向電場減速轉彎，因此會較快到達反射型 TOF 之偵檢器，反之，動能較大的碎裂離子會較慢到達偵檢器，因此可區分碎裂後的碎裂離子，此方法可應用於樣品之結構鑑定。

(2)離子遲滯時間法(delayed extraction, DE)^[46]

此概念的用意最主要是用來修正因樣品離子化的時間差，導致空

間位置、時間及起始動能分布不均而使解析降低的一種技術。其原理是當雷射照射樣品時，不立即施加加速電壓，而延遲至數十到數百奈秒(ns)之後才開啟外加電壓，此方法可使離子具相同的起始動能，因此而增加解析度。

(3) 二階段式電場導出法^[47] (two stage extraction)

此方法是在 TOF 飛行管前設計二階段加速電場，使樣品在游離後先被較小的加速電位加速，然後再經由第二階段加速電位加速而進入 TOF 管中，也是用來增加解析度的技術。目前商業化的 TOF 除了上述有提及的直線型、反射型 TOF 外，近年來也發展出 W 型和多次折返型^[48]的 TOF 儀器，是能產生更高解析能力的儀器。

2-6 MALDI-TOF MS 的優勢

MALDI-TOF MS 在目前的使用已愈來愈普遍，已經成為偵測生化分子與有機高分子必備的儀器之一，這都該歸功於它本身具有一些其他質譜儀所沒有的特點，其主要的特點如下：

(1)操作簡單且快速分析

主要操作流程為將點好樣品之樣品盤放入 MALDI-TOF MS 中，等待真空抽至所設定之值(通常為 5×10^{-6} torr)後即可操作，通常從雷射轟擊在樣品上而獲得一張圖譜的時間僅需數秒鐘，因此相當適合用來鑑

定各種生化分子。

(2) 簡易之樣品製備且所需樣品少

傳統 MALDI 的樣品製備，通常只需要將等量基質溶液和分析物均勻混合，最後取 1 μL 混合液置於樣品盤上，由空氣中自然風乾即可進入 MALDI-TOF MS 進行分析，且總共所需樣品量僅需數 μL 即可，通常適合偵測不易取得的微量生化樣品。

(3) 高靈敏度

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

(4) 高質量範圍

因為MALDI通常搭配TOF質量分析器，且導入了以基質來輔助分析物脫附游離之觀念，因此只要選擇適當之基質，便可偵測高分子量範圍之生化分子，至今有許多文獻說明可偵測出數百kDa左右之巨分子和有機高分子^[49]。

(5) 高通量(high throuput)

MALDI 通常可同時偵測多種分析物，這是因為其放置的樣品盤(target)通常能同時點入數十至數百個樣品，其 target 如下圖(二)

所示，這是 MALDI-TOF MS 其中一個型號所搭配之 target，由圖中
可得知最多可同時將 96 個樣品點至樣品盤上進行分析。



圖(二)Microflex target

2-7 MALDI 中抑制現象之解決方法

MALDI-TOF MS 現今雖然已經成為分析生化分子不可缺少的技術，但還是有其無法避免之問題要克服，例如：基質與分析物的共結晶不均勻而導致某些結晶點的訊號特別高、雷射能量調太高或太低導致無訊號或基線過高、來自於樣品中的鹽類物質和界面活性劑會抑制離子訊號，其中較大的問題，就是一般有機酸基質因為其本身的高離

子化效率，導致在低質量範圍內(MW<500)產生許多的基質離子峰產生背景訊號干擾的問題^[50-52]，常常會影響到低質量分析物信號之判斷，因此根據上述問題有幾個比較常見之解決方法如下：

(1) 去除鹽類

樣品中如含有大量鹽類時對 MALDI 來說是很大的致命傷，會造成定量上之困難，含量過高時甚至無分析物訊號產生，因此可購買已有商品化之 Zip-Tip 來去除樣品中之鹽類物質。

(2) 選擇適當的基質

選擇不同的基質和分析物混合均會造成不同的共結晶形成，因此在測量分析物時，先了解分析物的各種物理性質是必要的，以便於找尋適當的基質和基質比例。若分析物在低質量範圍(MW<500)內，此時一般有機酸基質(如： α -CHCA)就容易產生訊號峰干擾的問題，需要使用其他較高分子量基質或一些無機物質來取代傳統有機酸基質。

2-8 奈米粒子在 MALDI 中的應用

「奈米(nanometer)」是長度單位，即十億分之一公尺(10^{-9} m)，而當物質經奈米化後，表面原子數相對於總原子數之比例大幅提高，表面原子數也相對地提高，繼而使總體表面位能增加，所以奈米粒子具有高化學活性，容易和一些物質起反應，除此之外，尚有小尺寸效應、量子尺寸效應..等，且奈米化後之其他性質如：光學、化學、電學、

熱學性質..等，都會隨大小不同而隨之改變，這些性質有些已經普遍地商品化和廣泛地應用在各個領域上。

奈米粒子(nanoparticles)的粒徑尺寸極小，一般範圍介於一至一百奈米(nm)之間，而目前奈米粒子在 MALDI 中的應用過去幾年也有許多研究被報導，下面主要說明幾項奈米粒子在 MALDI-TOF MS 中常見的應用：

(1) 替代傳統有機酸基質^[53-55]

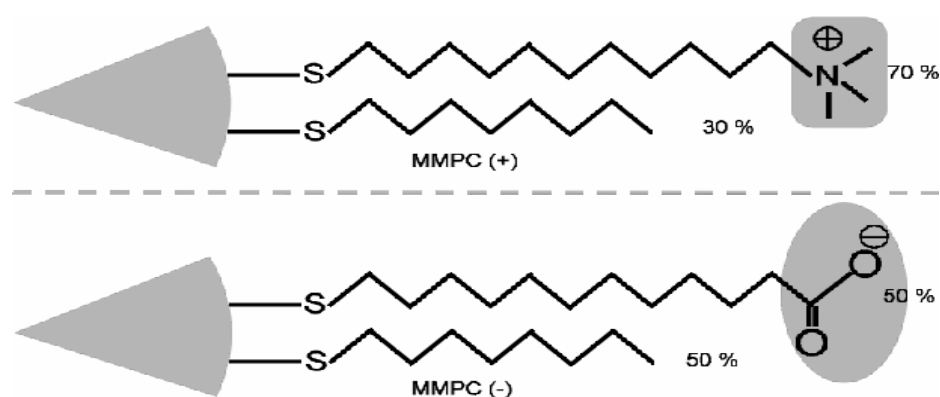
目前已經有一些論文報導用奈米粒子替代有機酸基質，如：金奈米、銅奈米..等，其最主要原因為傳統有機酸基質會產生低質量範圍背景訊號干擾，且一般有機酸基質容易有共結晶不均勻的問題，因此現今有愈來愈多學者在研究以解決此一問題，如近幾年常有文獻報導利用金、銀奈米粒子當做基質來偵測分子量較低之小分子，主要原因為奈米粒子在低質量範圍內之基質峰訊號干擾較少，且奈米粒子與分析物的共結晶也比較均勻，較不會有訊號集中點(sweet spots)的產生。

(2) 捕捉分析物

這類相關研究在近幾年相當熱門，主要是將奈米粒子的表面修飾上不同的官能基，藉由修飾之物質來選擇性地捕捉特定的分析物，而上述兩者之間的作用力通常包括如靜電作用力、疏水性作用力..等。

其中靜電作用力通常是由各式不同碳鏈組成的(-COO⁻)或(-NH₃⁺)

官能基，藉由控制 pH 值可使表面修飾之官能基形成帶正或負電之探針，藉由靜電吸引力(主要作用力)來捕捉所要分析的分析物，圖(三)為過去文獻中^[56]利用靜電作用力來捕捉分析物的主要型式，此方法通常



(圖三)過去文獻中利用靜電作用力作為捕捉探針^[56]

能提升靈敏度，適合用在真實樣品中含量較低的分析物上。

過去文獻^[57]有記載將 SiO_2NPs 表面上-OH 基解離後，可捕捉帶正電的胜肽物質，其偵測極限差異約 50 倍之多，另外，有文獻^[56]則是利用 AuNPs 表面修飾較容易之優點，因此選用 AuNPs 當作表面修飾的粒子，文獻中主要在 AuNPs 表面修飾上-COOH 官能基，因此可用來捕捉帶正電之蛋白質 cytochrome C 和 myoglobin，並且能夠在 500 pM bradykinin 的水溶液中偵測出分析物的離子訊號，有極佳的靈敏度，而上述用來分析蛋白質的方法也可用在羧酸化鑽石奈米粒子上^[58]，此文獻主要也是利用控制 pH 值使蛋白質帶正電，再利用鑽石奈米顆粒上帶負電之探針來捕捉 cytochrome C 和 myoglobin，此外^[59]carbon

nanotubes (CNTs)也可做為親合性探針，用來分析胜肽和蛋白質，此分析方法從較早之小分子^[60-62]延伸至較大的蛋白質，主要也是利用 CNTs 當負電探針來捕捉分析物，而文獻中 CNTs 具較大的粒徑大小(250 nm)和管徑長度(60 μm)，此方法可從 4.0×10^{-8} M melittin 溶液中偵測出分析物的離子訊號。

過去也有學者在探討表面修飾之碳鏈長度與分析物訊號強度的比較^[63]，發現修飾之碳鏈長度愈長，會因為疏水性作用力增加而使分析物訊號強度隨之增加，代表了碳鏈多寡確實在分析物的捕捉上也會造成影響。另外對於含硫醇類之分析物，過去文獻說明可利用 AuNPs 本身與含硫醇(-SH)官能基之間的作用力(S-Au)來捕捉^[64-65]，此奈米粒子具選擇性，文獻將同濃度的 glutathione(含硫醇)和 arginine(不含硫醇)混合後加入 AuNPs 萃取，將上清液和 AuNPs 放入 MALDI 中分析，發現上清液皆殘留 arginine 的離子訊號，而奈米粒子上主要是 glutathione 的離子訊號，此結果表示此 AuNPs 具選擇性，且 glutathione 在使用 AuNPs 萃取後其偵測極限(LOD)比使用 AuNPs 當基質直接分析低了 40 倍，代表利用 S-Au 之間的作用力不僅具選擇性且有濃縮的效果。

上述為大部份文獻所用來捕捉特定分析物之方法，而此方法的觀念也可於病原和抗體上，有許多報導在研究將具高專一性之抗體修飾

在奈米粒子表面上，以檢測人體血液中受病毒感染之標記蛋白質，此類研究大多使用磁性奈米粒子。

(3)磁性奈米粒子的應用

磁性奈米粒子在分析實驗中的優點在於能不用經過離心的步驟，便能用磁鐵將磁性奈米粒子從混合液中分離出來，此方法不僅可減少實驗所花費的時間，且如果奈米粒子粒徑太小或太輕時，在離心過程中，可能會造成無法完全離心下來的問題，而導致樣品量的流失，此時若使用磁性奈米粒子則可解決此問題。

近年來有許多文獻，皆是利用磁性奈米粒子來捕捉磷酸化胜肽(phosphopeptide) [66-68]的研究，文獻中將磁性奈米粒子的表面鍍上各種金屬物質包括 Al_2O_3 、 TiO_2 、 ZrO_2 等，來萃取水溶液中含磷酸化胜肽的物質，成功地從牛奶中偵測出磷酸化胜肽和蛋白質的離子訊號，代表上述奈米粒子皆具選擇性，另外，也有文獻 [69-70] 將磁性奈米粒子用來捕捉分析物的方法，結合微波輔助(microwave-assisted)的概念，成功地使萃取時間可縮短至 30 秒左右，不過磁性奈米粒子(如：氧化鐵、四氧化三鐵)於 MALDI 的分析中，通常不像金、銀奈米粒子..等本身可當做基質，還是需要搭配傳統有機基質使用，因此在低分子量範圍內會有磁性奈米粒子與有機基質的訊號峰干擾，此時則沒辦法偵測低分子量之分析物樣品，所以磁性奈米粒子常用來偵測分子量較大之胜

肽、蛋白質等生化分子如：胰島素，而利用磁性奈米粒子來捕捉分析物樣品通常可使靈敏度提升，再搭配粒子收集容易的優點使得這方面的應用愈來愈廣泛。

磁性奈米粒子在生物醫學上的應用^[71-72]主要是結合免疫分析法的概念，先將特定的抗體修飾在磁性奈米粒子的表面上，使磁性奈米粒子具有選擇活性，此生物探針的選擇是使用與待測物具高專一性及強力結合性的抗體和抗原，因此可用來捕捉溶液中特定的抗原目標物，例如細菌和細胞等，再用磁鐵將磁性奈米粒子分離開來，此步驟可除去溶液中其他的雜質與有機體等，此方法使得臨床上也可用來作為人體內藥物傳輸的利用。

三、氨基配醣體類抗生素(Aminoglycoside Antibiotics)

藥理性質與分析方法

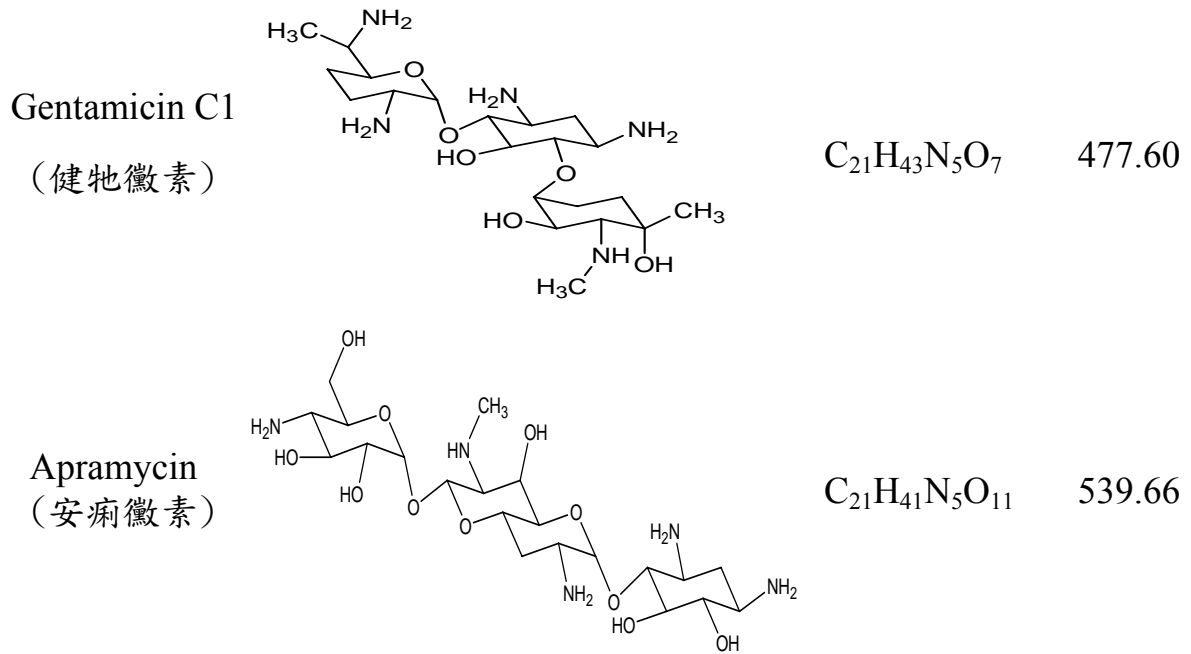
3-1 氨基配醣體類抗生素藥理性質簡介

氨基配醣體類抗生素係指分子結構中含至少一個氨基環醇(aminocyclitols)和一個或多個氨基糖分子，由配糖鍵相連接的藥物，為廣效性之抗生素，可用來治療革蘭氏陰性菌和陽性菌以及綠膿桿菌所引起的系統性感染，也成功地應用於肺結核、敗血症等的治療，對於由細菌引起的感染有非常好的療效，其抗菌機制主要是利用藥物作用，在細菌細胞內的核糖體上阻擾蛋白質之合成過程，達到抗菌的效果。由於使用此類抗生素(主要為 streptomycin、gentamycin、neomycin)過量的患者，會因為氨基配醣體類抗生素與體內鐵質結合，產生傷害內耳細胞的游離自由基，因而導致耳朵受損的後遺症，例如：聽力喪失、平衡感失調等副作用，另外，腎臟組織也可能會因為長期在這些高濃度藥物的破壞下，導致腎功能受損^[73]，且此類藥物一但停用也可能繼續惡化，因此解決的辦法就是避免氨基配醣體類抗生素的藥物在人體中過量。

本研究所探討的氨基配醣體類抗生素有五種，其結構如表(二)所示，以下為此五種抗生素之介紹：

表(二) 本實驗中胺基配醣體類抗生素的結構式

抗生素名稱	結構式	分子式	分子量
Paromomycin (巴龍黴素)		$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$	615.63
Neomycin B (新黴素)		$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	614.64
Kanamycin A (卡那黴素)		$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	484.50



(1) 巴龍黴素(Paromomycin)^[74]

巴龍黴素是從鏈黴菌(*streptomyces rimosus*)的培養液中獲得的一種胺基配醣體類抗生素藥物。是治療腸道帶原可以選用的藥物，用於治療急性阿米巴痢疾有顯著的療效，但對慢性阿米巴痢疾的療效不到百分之五十，其副作用包括：腸胃道不適、皮疹、頭痛等，較不易引發耳毒性及腎毒性。

(2) 新黴素(Neomycin)^[75]

新黴素組成又區分為包括 Neomycin A、B、C 三種，其主要組成為 Neomycin B、C，其中 Neomycin B 佔其中百分之九十以上，Neomycin A 則不到百分之一，本研究所探討為 Neomycin B，新黴素為一廣效性用藥，口服較不易吸收，一般用於降低血中膽固醇值，對革蘭氏陰性

菌、金葡菌、白喉桿菌、炭疽桿菌、大腸桿菌等有良好的抗菌作用，主要供局部應用，不適合在全身性感染的情況下使用，其較常見的副作用包括：腹瀉、腹痛、耳及腎毒性等，且有過敏性體質不適合使用此藥物治療。

(3) 卡那黴素(Kanamycin)^[76]

卡那黴素組成又可區分為 Kanamycin A、B、C 三種，其自然界中多以 Kanamycin A、B 型式存在，Kanamycin B 又稱 Bekanamycin，本研究探討為 Kanamycin A，其臨床上可用於敗血症、上呼吸道感染、泌尿道感染、骨髓炎及菌痢等，其使用方式多為肌肉注射，但副作用為耳毒及腎毒性較大。

(4) 健牠黴素(Gentamicin)^[77]

健牠黴素組成又可區分為 Gentamicin C1、C1a、C2、C2a、C2b 五種型式，其主要組成為 Gentamicin C1、C1a、C2 三種，本研究探討為 Gentamicin C1，健牠黴素為水溶性抗生素，其用途為可治療結膜炎、角膜炎、角膜潰瘍、眼瞼炎、淚囊炎等於眼睛相關之疾病，其對過敏者也不宜使用，而此藥物所產生的耳毒性也有相關的研究與解決辦法，其副作用包括：結膜上皮缺損、結膜充血、耳毒性..等。

(5) 安痢黴素(Apramycin)^[78]

安痢黴素是 1967 年發現的一種廣效性抗生素，主要用於家禽類中

因革蘭氏陰性菌引起的腸道感染，如：大腸桿菌病、沙門氏菌病、白痢，對新生之家禽類特別有效，當作飼料添加劑能增加家禽體重，其吸收率會因為家禽年齡增長而減少，其使用方式可分為肌肉注射、口服或拌入飼料中給藥，大部分藥物以原型通過腎臟排出，如果家禽類長期或大量使用會引發腎毒性和耳毒性。

3-2 血中濃度監測

胺基配醣體類抗生素若不易從腎臟排出則容易屯積於體內，此時若屯積過量，則容易產生毒性而造成耳朵及腎臟方面的損害，其中腎毒性通常在停藥後會立即減緩其症狀，但耳毒性卻不同，一但發生即可能會永久性地聽力喪失，且目前臨床上要評估其發生還是有困難性，因此要避免上述毒性之發生，除了在治療期間隨時監測病人血中濃度外，每隔一段時間就要評估其腎功能和聽力狀況。在過去文獻^[79]中，有記載相關胺基配醣體類抗生素在血清中濃度之治療量，其中 gentamicin、kanamycin、neomycin、paromomycin 皆為 2.0-10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，若濃度過量即可能會有耳毒性和腎毒性產生，因此要密切監測，但影響藥物在血中濃度^[80]之因素很多，尤其是懷孕時服用會造成胎兒的傷害，因此要同時評估其腎功能和聽力狀況。

3-3 過去分析方法比較

過去文獻中對於胺基配醣體類抗生素的分析包括有微生物測定法^[81] (microbiological assay)，此方法成功地從動物的飼料中分析出各種抗生素，其中 hygromycin B、neomycin、streptomycin 之偵測極限分別是 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ ^[82]，然而此分析方法的缺點包括：耗費時間長、誤差大、靈敏度不足等。此外，免疫分析方法也是常用的分析方法，如：放射免疫分析法^[83] (radioimmunoassay；RIA)、酵素免疫分析法^[84] (enzyme immunoassay；EIA)、螢光免疫分析法 (fluoroimmunoassay；FIA)^[85]等，其中酵素免疫分析法曾用於分析牛奶中 streptomycin、gentamicin、neomycin 等含量，其偵測極限分別是 6.0 ng/mL 、0.7 ng/mL 、3.6 ng/mL ^[86]，而 gentamicin 在人體血清中之偵測極限可到達 0.5 ng/mL ^[87]，有較佳之靈敏度，但此方法整體分析時間長達 18 小時以上，且再現性不佳(牛奶中 RSD：23.0-60.0%)，上述免疫分析方法對某些特定之胺基配醣體類抗生素的分析都有不錯的結果，但是並不是全部的胺基配醣體類抗生素都適用於免疫分析方法，因此化學分析方法也相繼地被使用。

過去有許多文獻發表利用高效能液相層析法^[88]、毛細管電泳^[89]偵測胺基配醣體類抗生素，其中液相層析常搭配紫外光(LC-UV)和螢光(LC-FL)偵測器來進行胺基配醣體類抗生素的分析^[90]如表(三)所示，

表(三)近年來 HPLC 方法分析胺基配醣體類抗生素

分析物	偵測器/衍生劑 ^a	管柱	LOD/樣品
Gentamicin	Fl. 340/430 nm OPA-ME	Spherisorb ODS2 (150×4.6 mm)	54 ng/ml ^[91] (milk extract)
Paromomycin	Fl. 340/440 nm OPA-ME	Inertsil C ₈ (250×4.5 mm)	500 ng/ml ^[92] (aqueous soln.)
Neomycin	Fl. 260/315 nm FMOC-Cl	Supelcosil LC-304 (250×4.6 mm)	170 ng/ml ^[93] (muscle extract)
Spectinomycin	Fl. 340/460 nm OPA-ME	Spherisorb SCX (250×4.6 mm)	100 ng/ml ^[94] (plasma extract)
Spectinomycin	Fl. 340/460 nm OPA-ME	Spherisorb SCX (250×4.6 mm)	70 ng/ml ^[95] (tissue extract)
Isepamicin	Fl. 338/450 nm OPA-ME	Hypersil ODS (150×4.6 mm)	100 ng/ml ^[96] (plasma)
Netilmicin	Fl. 337/437 nm OPA-ME	10- μ m LiChrosorb RP18(300×4.0 mm)	7 ng/ml ^[97] (dilute plasma)
Apramycin	Fl. 230/389 nm OPA-ME	Nova-Pak C ₁₈ (300×3.9 mm)	23 ng/ml ^[98] (tissue plasma)
Gentamicin (C1, C1a, C2, C2a, C2b)	Fl. 260/315 nm FMOC-Cl	3- μ m Hypersil ODS (200×4.6 mm)	10 ng/ml ^[99] (tissue plasma)
Paromomycin	UV 350 nm DNFB	Zorbax SB-C ₁₈ (250×4.6 mm)	150 ng/ml ^[100] (plasma extract)
Tobramycin	UV 365 nm DNFB	4- μ m Nova-Pak C ₁₈ (150×3.9 mm)	3000 ng/ml ^[101] (aqueous soln.)

^aOPA-ME = *o*-phthaldialdehyde-2-mercaptoethanol
 FMOC-Cl = 9-fluorenylmethyl chloroformate
 DNFB = 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene

由表中可知此方法可分析大部份氨基配醣體類抗生素，且回收率大多可達 80.0% 以上^[102]，是分析此類藥物非常有用的工具之一，但缺點包括：前處理較繁雜、需耗費大量溶劑等。另一個有效的分析技術為毛細管電泳，此技術在過去也普遍地被應用，已有文獻說明利用毛細管區帶電泳(CZE)搭配 UV 偵測器，可成功地分離出 12 種不同的氨基配醣體類抗生素，此方法有良好的再現性(RSD < 3.0%)，且偵測極限可達到 0.2-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[103]，但上述方法以 LC-UV、LC-Fl 和 CE 來分析氨基配醣體類抗生素，均需進行衍生反應，會造成實驗上時間的增加，步驟較繁雜等缺點。而近年來又以質譜儀為此類抗生素之最佳鑑定工具之一，如：LC-MS、LC-MS/MS、ESI-MS/MS^[104]等，可先利用層析技術先分離出樣品中的分析物，再以質譜進行偵測的工作，此方法很有好的靈敏度和專一性，其中 gentamicin 在經過 SPE 管柱前處理後經由 LC-MS/MS 分析，在尿液(urine)樣本中的定量極限(LOQ)為 3.8 ng/mL ^[105]，也成功地在血漿樣品中偵測出 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (spiked)之 neomycin、kanamycin、tobramycin、amikacin、gentamicin 混合液，且在 intra-day 和 inter-day(n=5)的分析中，其 RSD < 5.8%^[106]，此方法有極佳的靈敏度與再現性，但樣品在分析前，通常要先經過 SPE 的步驟，在處理過程中較為繁瑣。上述為過去文獻中分析氨基配醣體類抗生素的方法，其中尚有一些缺點待改善，其優缺點列於表(四)，因此本研究

表(四)胺基配醣體類抗生素分析方法比較

分析方法	優點	缺點
Microbiological assay	1.操作簡便	1.靈敏度不足 2.分析時間長
Radioimmunoassay (RIA) Enzyme immunoassay (EIA)	1.靈敏度佳 2.專一性強	1.誤差較大 2.非全部抗生素皆適宜用此方法 3.分析時間長
High performance liquid chromatography (HPLC)	1.靈敏度佳 2.再現性佳(RSD<3.0%) 3.應用性廣	1.耗費大量溶劑污染環境 2.前處理步驟多
Capillary electrophoresis (CE)	1.樣品注射量小 2.分離效率高 3.解析度高 4.靈敏度佳	1.各種抗生素需找尋適當衍生劑 2.再現性較 HPLC 差
Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS、LC-MS/MS)	1.靈敏度佳 2.應用性廣	1.前處理繁瑣 2.價格昂貴

利用 MALDI-TOF MS 搭配銀奈米做胺基配醣體類抗生素的分析，
建立一套快速且靈敏的分析方法。

四、研究動機

抗生素是近代醫學最廣泛用於治療細菌感染的藥品，隨之而來的是「濫用」的問題，過去有許多人將此類藥物視為神丹妙藥地使用，而不去了解這些藥物的基本用藥知識，導致用藥過量而產生副作用，一般對於此類藥物通常會有藥劑上的管控。本研究所探討的對象為胺基配醣體類抗生素，此類藥物當用量過多時會有耳毒性與腎毒性副作用的產生，因此監控病人體內的血中濃度以避免副作用的發生是非常重要的。

本研究所探討的抗生素分子量為低質量範圍介於 400~650 之間，而一般有機基質在低質量範圍常出現背景訊號干擾，因此本研究利用銀奈米粒子替代有機基質，且銀奈米粒子表面經過化學修飾後，會形成帶負電之探針，可用來捕捉和濃縮溶液中帶正電之胺基配醣體類抗生素，此方法可有效提升靈敏度，經過簡單清洗的步驟後便可由 MALDI-TOF MS 進行分析。

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀具有高質量範圍、高靈敏度、高解析度等特點，加上具備高樣品通量(high throughput)的特性，

使得本研究所探討的五種胺基配醣體類抗生素可同時點入樣品盤中進行分析，可節省大量的分析時間達到快速分析的目地，所以本研究使用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀搭配銀奈米粒子進行胺基配醣體類抗生素的分析，可建立一套快速且靈敏的分析方法，本論文中最重要的幾項研究目地整理如下：

(1)利用 MALDI-TOF MS 的特點達到快速分析的目地

(2)使用銀奈米粒^[107]子替代有機基質游離小分子分析物

(3)利用修飾後的銀奈米粒子可形成帶負電之探針的特性，來捕捉和濃

縮本實驗的分析物，可有效地提升靈敏度，並去除干擾的物質。

(4)研究胺基配醣體類抗生素在血液中治療範圍的分析，以建立監控病

人體內血中濃度的新方法。

貳、實驗

一、藥品

1. Au@Ag Nanoparticles：平均粒徑大小為 $38.9 \pm 5.1 \text{ nm}$ ，由中正大學化學暨生物化學系實驗室提供。
2. Kanamycin A sulfate($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)：Sigma-Aldrich 公司 (Louis,MO,USA) 產品，純度：78%。
3. Paromomycin sulfate($\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{14} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)：Sigma-Aldrich 公司 (Louis,MO,USA) 產品，純度：75%。
4. Gentamicin sulfate($\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)：Sigma-Aldrich 公司 (Louis,MO,USA) 產品。
5. Apramycin sulfate($\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)：Sigma-Aldrich 公司 (Louis,MO,USA) 產品，純度：95%。
6. Neomycin sulfate($\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{13} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)：Sigma 公司 (Louis,MO,USA) 產品，純度：95%。
7. Trisodium phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：Aldrich 公司 (Milwaukee, WI, USA) 產品。
8. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)：係 Sigma 公司 (Louis, MO, USA) 產品，純度 99%。
9. Sodium dihydrogenphosphate(NaH_2PO_4)：係 Aldrich 公司 (Milwaukee,

- WI, USA) 產品，純度 99%。
10. Trifluoroacetic acid (TFA ; CF_3COOH) : FisherChemical 公司
(Pittsburgh,PA,USA)產品，純度 99.8%。
 11. Methanol (CH_3OH) : E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany) 產品，
HPLC 級試藥，純度 99.9%。
 12. Acetonitrile (ACN ; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) : E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品，HPLC 級試藥。
 13. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA ; $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$) : Aldrich
公司 (Milwaukee, WI, USA) 產品，純度 97%。
 14. 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA ; Sinapinic acid ;
 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$) : Sigma 公司 (Louis, MO, USA) 產品，純度 98%。
 15. 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB ; $(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH}$) : Aldrich 公
司 (Milwaukee, WI, USA) 產品，純度 97%。
 16. Hydrochloric acid (HCL) : E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
產品。
 17. Sodium hydroxide (NaOH) : Tedia 公司 (Fairfield, Ohio, USA) 產
品，分析級試藥，純度 98.5%。

二、儀器設備

1. 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)裝置：Bruker Daltonics 公司(Germany)產品， 型號：microflex
2. 震盪器：Thermolyne 公司(USA)產品， 型號：M37615。
3. Stirrer/Hot plate：CORNING 公司(USA)產品， 型號：PC-420。
4. 超音波震盪器：Branson 公司(USA)產品， 型號：2210-DTH。
5. 酸鹼度計：Suntex 公司(台灣)產品， 型號：SP-701。
6. 天平儀：日本 A&D 株式會社(Tokyo,Japan)產品， 型號：GR-202。
7. 高速離心機：Hettich Zentrifugen 公司(Germany)產品， 型號：MIKRO20
8. 高速冷凍離心機：Hettich Zentrifugen 公司(Germany)產品， 型號：MIKRO22R
9. 超純水機 (deionization ultrapure system)：Barnstead 公司(USA)產品

三、實驗方法

3-1 藥品配製

1. MALDI 基質溶液配製

(1)飽和 α -CHCA 溶液:用天平稱取 10 mg 的 α -CHCA 溶於 1 mL 的 0.1 %TFA 之溶劑中，其溶劑含 50%的 ACN 及 50%的純水。

(2)飽和2,5-DHB溶液:用天平稱取 10 mg 的2,5-DHB溶於 1 mL 的 0.1 %TFA 之溶劑中，其溶劑含 50%的 ACN 及 50%的純水。

(3)飽和 SA溶液:用天平稱取 15 mg 的 SA溶於 1 mL 的 0.1%TFA 之溶劑中，其溶劑含 50%的 ACN 及 50%的純水。

2. 標準品溶液(aminoglycoside)的配製

配製 1 mM 各式抗生素的的標準品水溶液，以純水或磷酸緩衝溶液將分析物稀釋至所需濃度，將分析物溶液調至所需的 pH 值，儲存於 -20°C 的冰箱中保存。

3.不同 pH 值標準品溶液配製

(1)pH 值為 4、5、6 標準品溶液:使用 NaOH 或 HCl 將 10 mM NaH_2PO_4 標準品溶液分別調至 pH 值為 4、5、6

(2)pH 值為 8 標準品溶液:使用 NaOH 或 HCl 將 10 mM Na_2HPO_4 標準品溶液調至 pH 值為 8

(3)pH 值為 10 標準品溶液:使用 NaOH 或 HCl 將 10 mM Na_3PO_4 標準

品溶液調至 pH 值為 10。

3-2 樣品盤(target)清洗步驟

主要以拭鏡紙沾甲醇先將已偵測完之樣品擦拭掉，去除掉大部份污染物，接著放入含有清潔劑的燒杯中用超音波震盪器震盪約 15 分鐘，取出樣品盤用去離子水清洗樣品盤表面，以清洗掉表面的清潔劑，最後放入含 50% 甲醇水溶液的燒杯中，用超音波震盪器震盪約 15 分鐘，取出樣品盤後用拭鏡紙沾甲醇進行最後擦拭，待溶劑揮發後即清洗完畢。

3-3 血漿樣品的前處理與製備

本研究的真實樣品為血漿，是經由檢驗所抽取血液後經由離心所得之血漿樣品，保存於 -20°C 的冰箱中。血漿樣品前處理為將 300 μL 的樣品，加 600 μL ACN 混合，將混合液離心 15 分鐘(轉速 6000 g)後，取上清液 450 μL 添加 50 μL 各式胺基配醣體類抗生素標準溶液，此 500 μL 溶液即為實驗樣品，而血漿空白樣品的配製是將 450 μL 血漿樣品添加 50 μL 去離子水。而回收率試驗中，則在去蛋白前(加入 ACN 去蛋白)將 450 μL 血漿樣品添加 50 μL 各式抗生素標準溶液，再添加 1000 μL ACN 去蛋白。

3-4 MALDI 樣品的製備

本研究進行 MALDI-TOF MS 分析時，分為直接分析與萃取後分析，直接分析是將 100 μL Au@AgNPs 離心後，將 Au@AgNPs 與 1 μL 分析物溶液混合，將混合液直接點入樣品盤上進行偵測；而萃取後分析是指取出固定量分析物溶液後，加入 100 μL Au@AgNPs 吸附萃取後，將銀粒子收集後，置於樣品盤上，待溶劑揮發後進 MALDI-TOF MS 分析。

3-5 Au@AgNPs 的製備與表面修飾

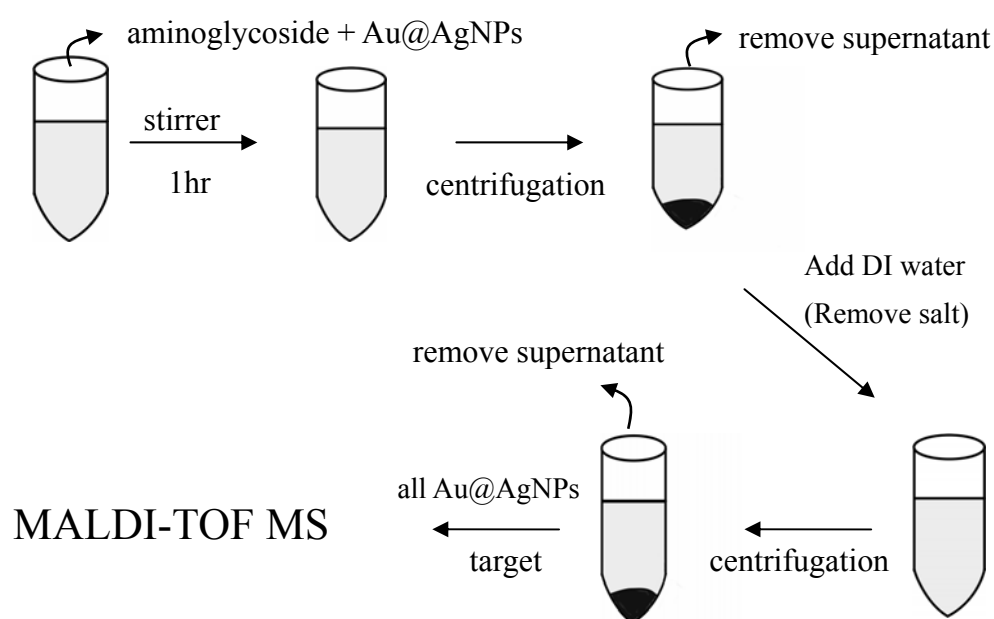
本研究中的奈米粒子(Au@AgNPs)由中正大學實驗室^[107]所提供，而此奈米粒子製備方法如下：

為了控制奈米粒子的粒徑大小，製備流程使用兩步驟製備，第一個步驟為製備金奈米粒子溶液，使用 standard citrate reduction method^[108]，首先製備 79 mL 水溶液，其中包括了 4 mL 1% trisodium citrate dehydrate 和 3 mL 1% tannic acid 和 25 mM Potassium carbonate(最終濃度)，接著配製 1 mL 1% chloroauric acid 水溶液，在兩溶液混合之前先分別攪拌並預熱至 60°C，會發現膠體金溶液很快地顏色從淺黃色轉變成深紅色，接著等溶液沸騰後再將兩溶液混合，接著要進行第二個步驟即是將奈米銀覆蓋於奈米金的表面上^[109]，首先取上述膠體金

溶液 5 mL，接著將 60 μL 0.1 M silver nitrate 水溶液加入混合攪拌，慢慢地滴入 110 μL 0.01 M hydroquinone 溶液並持續攪拌，最後為了增加整體的 reducing rate，使用 NaOH 調整溶液的 pH 值到適合的鹼性環境下，製備步驟因此完成。

3-6 Au@AgNPs 為探針之實驗

此部份主要在說明以 Au@AgNPs 為探針來捕捉分析物之整體的實驗流程圖如圖(四)所示：



首先將 500 μL 分析物溶液與 100 μL Au@AgNPs 加入 vial 中，攪拌一小時，開始捕捉分析物分子，之後進行離心(16000 rpm; 28620 g)約十分鐘後，Au@AgNPs 即沉澱至 vial 的底部，此時將上清液移除並加入 100 μL 去離子水清洗，主要在清除顆粒表面的干擾物質，並

用超音波震盪使 Au@AgNPs 與去離子水能均勻混合，之後再進行離心(16000 rpm；28620 g)十分鐘，取出上清液後，將 Au@AgNPs 點入樣品盤上，待樣品乾燥後送入 MALDI-TOF MS 進行分析。

3-7 質譜儀操作條件

本實驗之 MALDI-TOF MS 為 MicroFlex，具備一波長為 337 nm 的氮氣脈衝式雷射，其飛行模式可分為直線型和反射型，飛行管長度分別為 1.05 m 和 1.96 m，各自有一偵檢器進行偵測，而本研究皆使用反射型模式進行操作，其操作參數設定如表(五)所示：

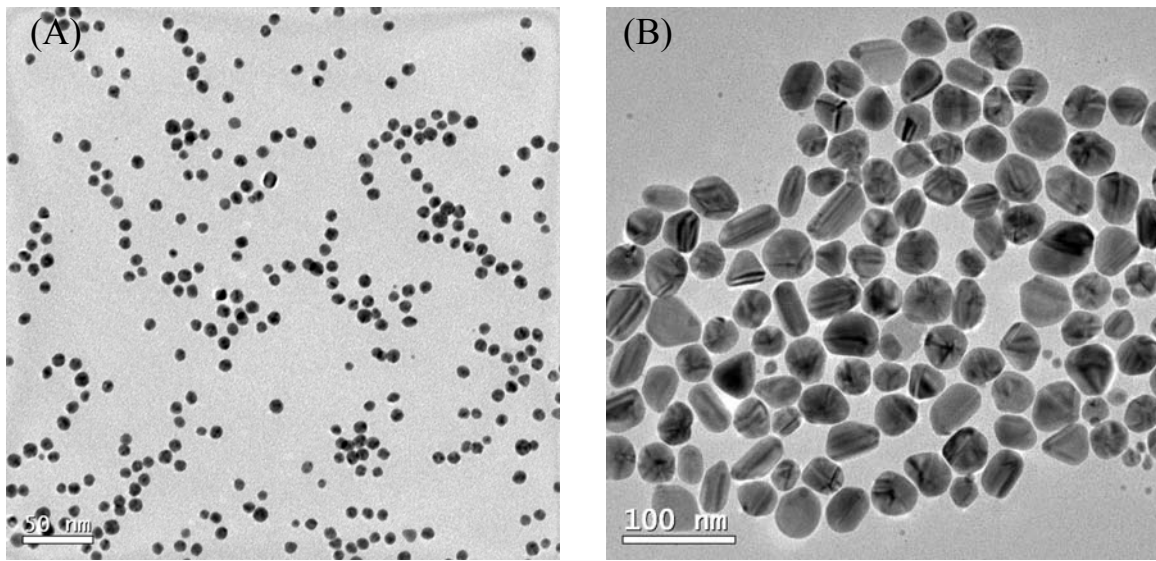
操作參數	Reflector mode
Laser Frequency(Hz)	20
Ion Source 1(kv)	19
Ion Source 2(kv)	16.25
Len (kv)	9.55
Reflector (kv)	20
Pulsed Ion Extraction(ns)	60
Number of shots	50
Laser energy(μ J/pulse)	16-20

參、結果與討論

一、奈米粒子

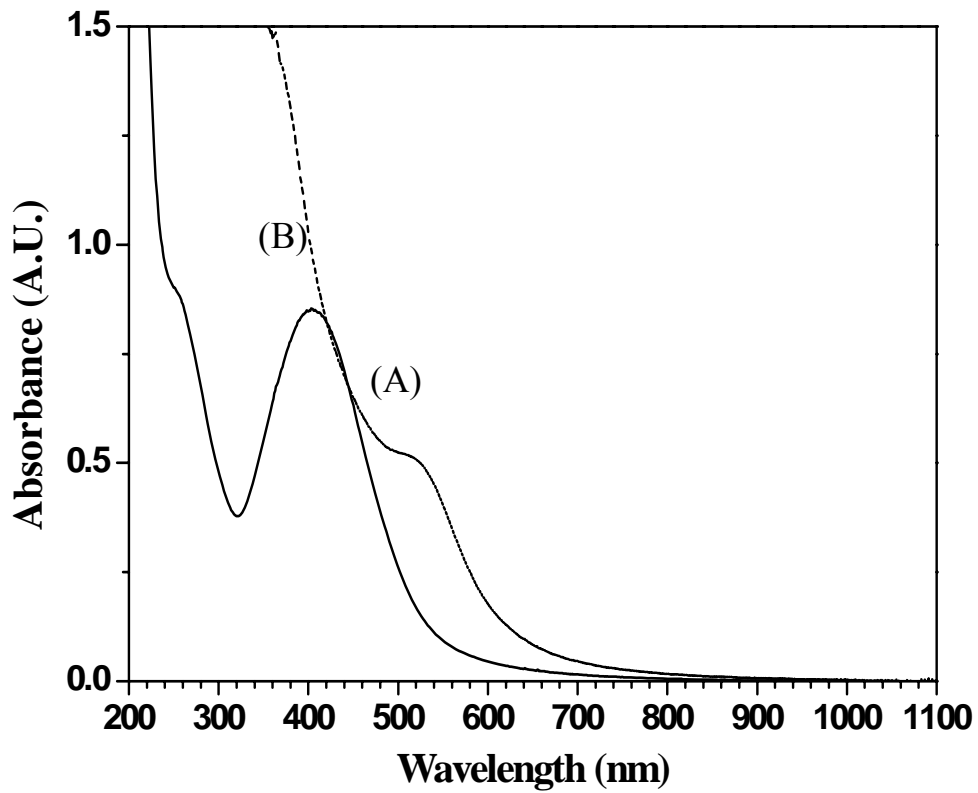
圖(五)A 與 B 分別是利用 TEM 所檢測之粒徑分佈圖，A 為還未經由 silver coating 的 AuNPs 粒徑分佈圖，由圖中可觀察其平均粒徑大小為 8.9 ± 1.0 nm，而 B 為 AuNPs 經由 silver coating 所形成的 Au@AgNPs 粒徑分佈圖，其平均粒徑大小為 38.9 ± 5.1 nm。

圖(六)是上述兩奈米粒子懸浮液的 UV-VIS 吸收光譜圖，圖中之 A、B 兩曲線分別代表 AuNPs、Au@AgNPs，由圖中可知 A 曲線在 523 nm 時有吸收，而 B 曲線在 410 nm 時有吸收，且由 B 曲線所代表的 Au@AgNPs 光譜圖發現在 523 nm 時並無吸收，此現象說明了金奈米粒子完全地被銀奈米粒子所包覆，而 Au@AgNPs 的粒子數為 1.8×10^{10} particle/mL，濃度為 3.0×10^{-11} M。此外，Au@AgNPs 整體上是分佈於 citrate 的系統下，每一個 Au@AgNPs 皆被 citrate group 所包圍，而檸檬酸之 pka 介於 3~5 之間，代表當溶液 pH 值 >3 時，檸檬酸上之 -COOH 基轉變為 -COO⁻，形成帶負電荷之 Au@AgNPs，再利用靜電作用力來捕捉水溶液中的胺基配醣體類抗生素，如圖(七)所表示。

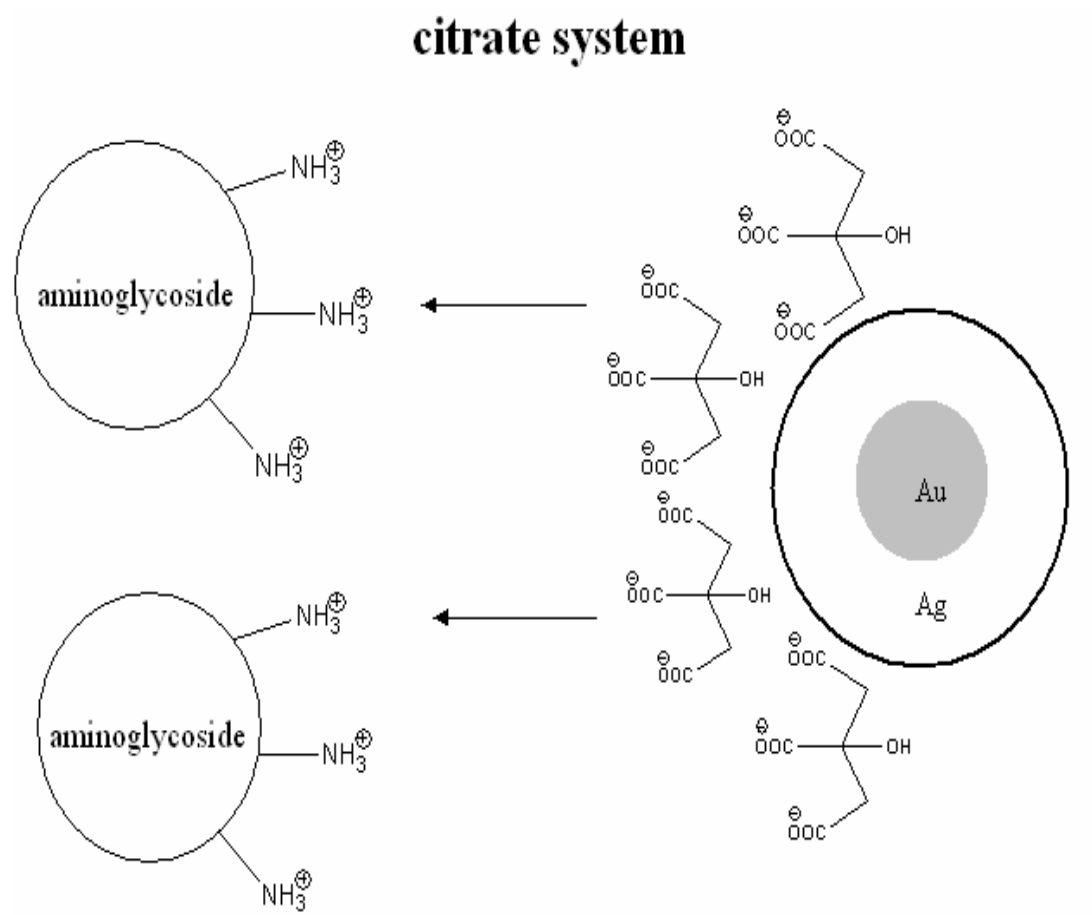


圖(五)TEM 粒徑分佈圖^[107] (A)AuNPs，粒徑大小: 8.9 ± 1.0 nm

(B)Au@AgNPs，粒徑大小: 38.9 ± 5.1 nm



圖(六)UV-Vis 光譜圖(A)AuNPs (B)Au@AgNPs



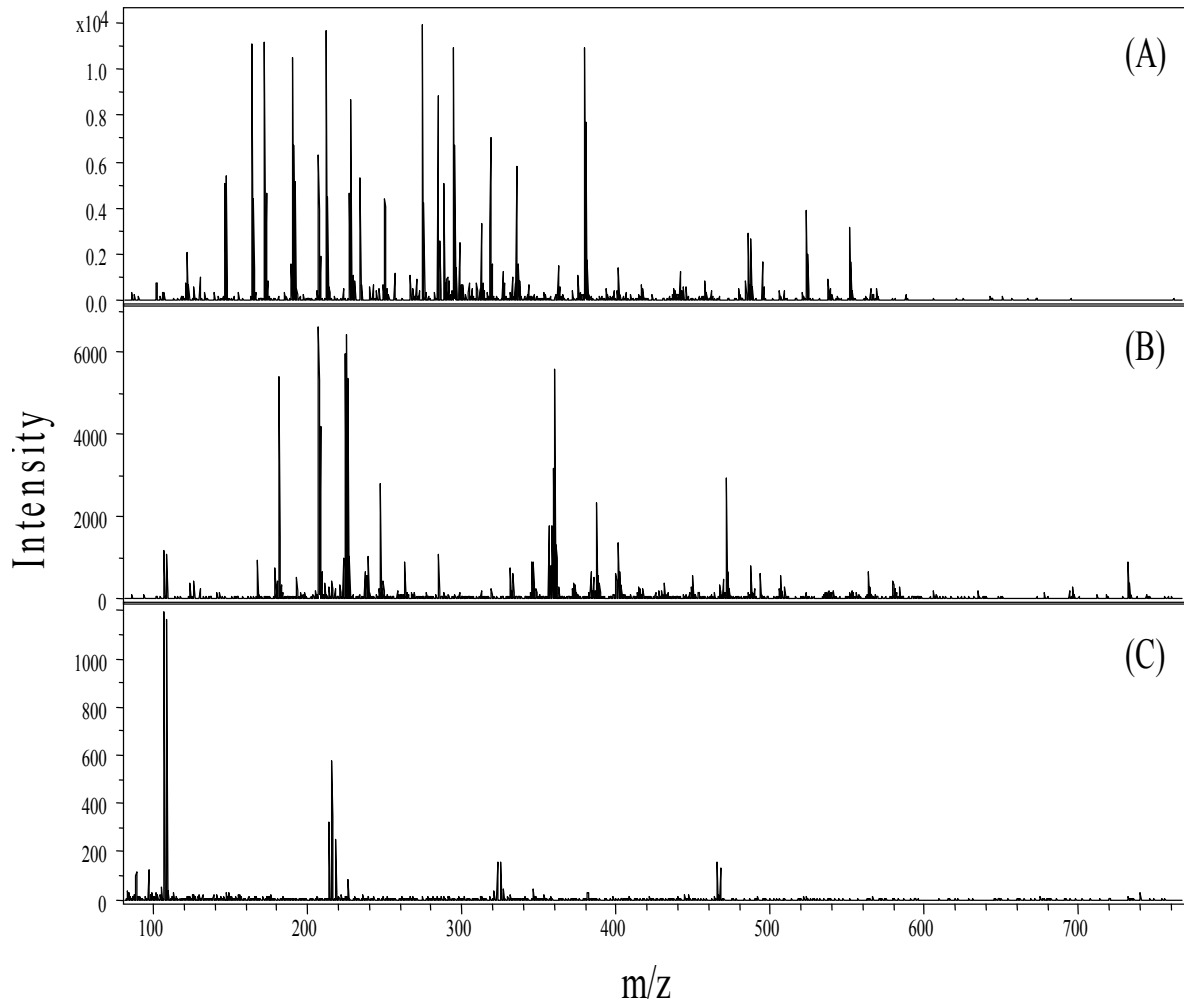
圖(七)Au@AgNPs 捕捉胺基配醣體類抗生素之機制圖

二、基質的選擇

基質的選擇對於分析物離子化的效率有相當大的影響，所以在做研究時首要步驟就是找出最適當的基質，這其中包括互溶性、共結晶的形狀..等，皆會影響分析物的訊號強度，下面針對基質做一連串的探討。

2-1 基質背景訊號的探討

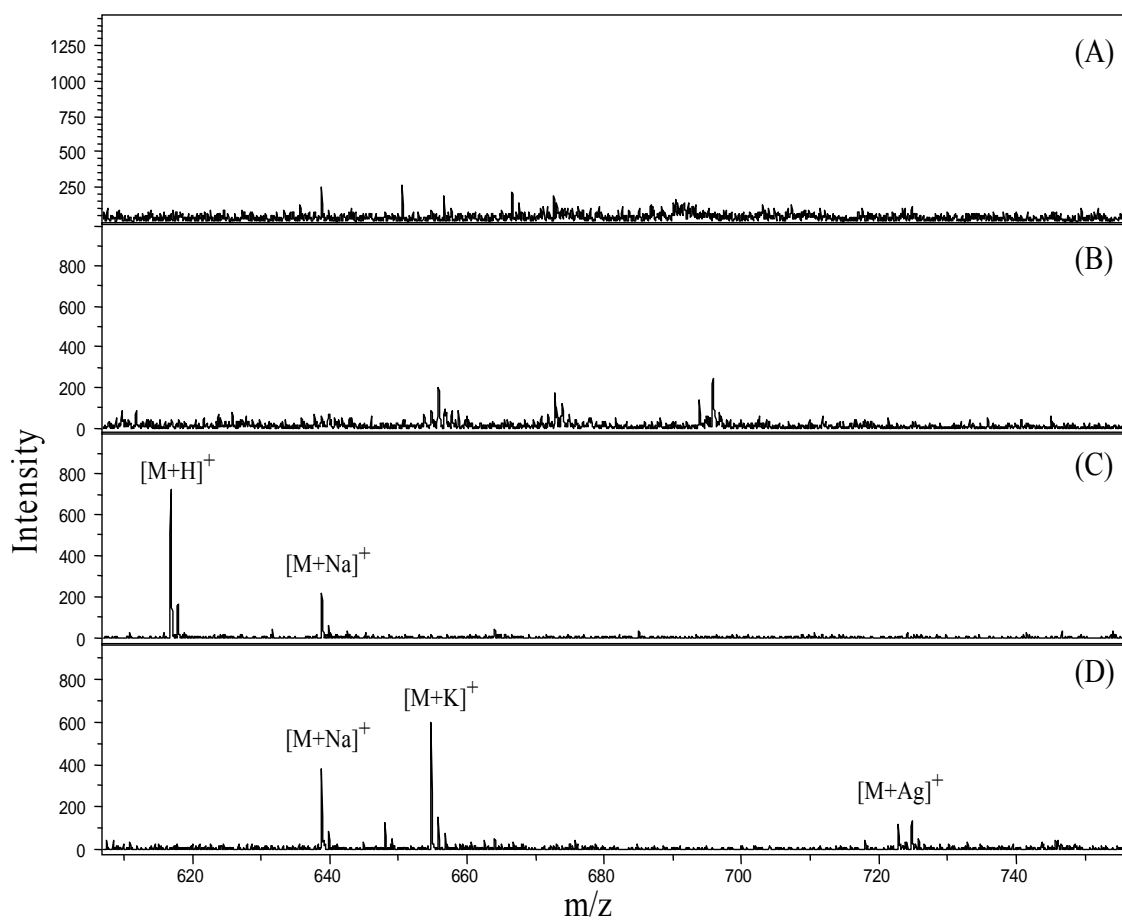
本研究所探討的分析物皆為胺基配醣體類抗生素，其分子量介於 400~650 之間，因此本研究利用奈米粒子替代傳統有機基質，不但可解決傳統有機基質在低分子量範圍造成的訊號干擾與抑制現象，並且因為奈米粒子當做基質時，可以更均勻地跟分析物混合，而使共結晶較均勻，進而使信號的再現性較佳。圖(八)A、B 和 C 為一般有機基質 α -CHCA 和 SA 與本實驗所使用的奈米粒子 Au@AgNPs 之質譜圖，由圖中可發現 α -CHCA 和 SA 在低分子量範圍時有大量的基質訊號，對於低分子量分析物質譜圖上的判斷較為困難，有基質訊號與分析物訊號重疊的可能，反觀 Au@AgNPs 的圖譜相較於 α -CHCA 和 SA 有著比較乾淨的背景訊號，最主要的訊號以 $[\text{Ag}]^+$ 、 $[\text{Ag}_2]^+$ 、 $[\text{Ag}_3]^+$ 為主，較不會跟分析物有訊號干擾與重疊上的問題。



圖(八) 基質背景訊號的質譜圖(A) α -CHCA(B)SA(C) Au@AgNPs

2-2 分析物的離子訊號

本實驗首先針對 Paromomycin 此胺基配醣體類抗生素，做加入各式基質的比較。圖(九)A、B、C 和 D 的質譜圖各分別代表以 α -CHCA、SA、DHB 和 Au@AgNPs 為基質所獲得的質譜圖，由圖中可發現 α -CHCA 和 SA 無法順利產生 Paromomycin 的離子訊號， α -CHCA 無訊號產生可能是因為 α -CHCA 和 Paromomycin 的共結晶不均勻導致離子化效率不佳，且 α -CHCA 因本身於低分子量範圍會產生離子化加成物造成訊號干擾與抑制現象，所以無訊號產生，而 SA 無法成功地游離 Paromomycin 則是因為 SA 一般適用於蛋白質等大分子。DHB 可成功地游離 paromomycin，且分析物訊號以 $[M+H]^+$ 為主，因為有機基質 DHB 本身會提供氫離子給分析物幫助分析物游離化，在 $[M+Na]^+$ 也有出現較弱分析物訊號，使用 Au@AgNPs 當基質也能成功地游離分析物，其分析物訊號以 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 為主，因為以無機金屬^[110]如：金奈米粒子、銀奈米粒子..當基質時，分析物訊號以 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 為主。圖(九)說明了即使 Paromomycin 在較高濃度 10^{-5} M 的環境下與基質混合，也只有以 DHB 和 Au@AgNPs 當基質看得到分析物訊號，且訊號強度都只有數百毫伏。



圖(九)胺基配醣體類抗生素 Paromomycin 與各式基質游離化之質譜圖

(A) 10 mg/mL α -CHCA (B) 15 mg/mL SA (C) 10 mg/mL DHB

(D) Au@AgNPs

($[M+H]^+ = 616.86$ m/z、 $[M+Na]^+ = 638.82$ m/z、 $[M+K]^+ = 654.81$ m/z)

實驗條件：

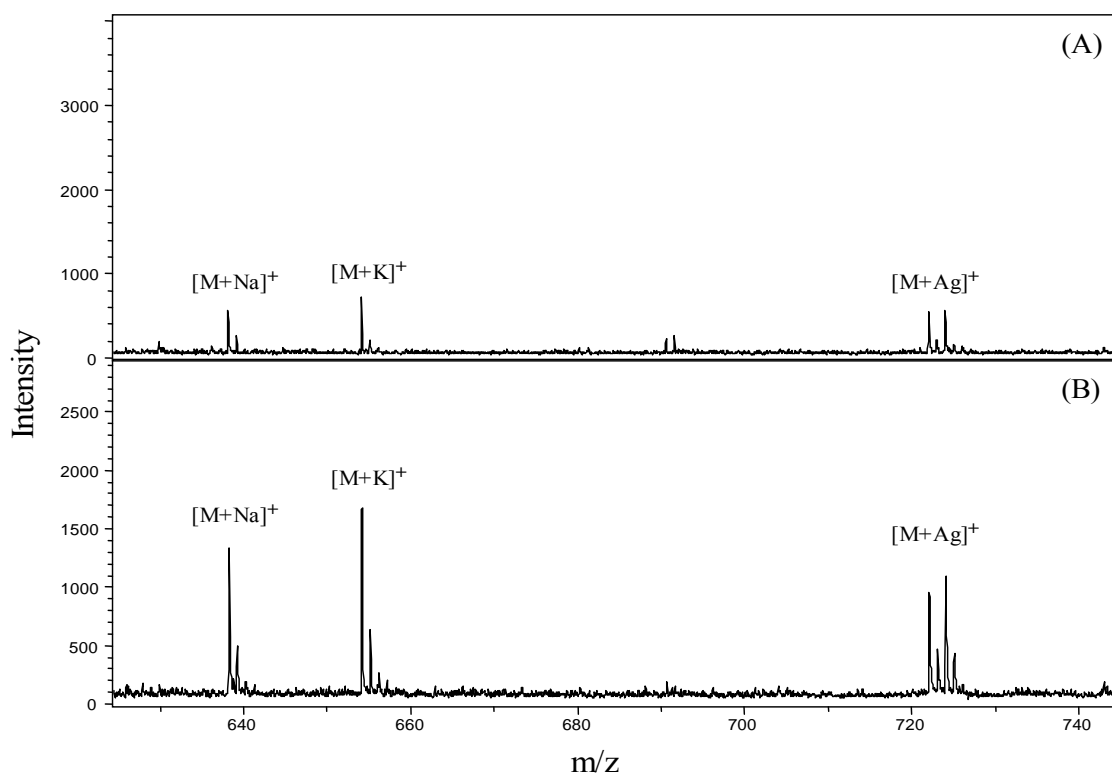
分析物： 10^{-5} M Paromomycin 溶於 DI water

三、以 Au@AgNPs 萃取 aminoglycoside 條件最佳化

本實驗接著要探討基質與分析物混合後，進行濃縮步驟的條件最佳化，因為這些因素皆會影響到 Au@AgNPs 捕捉分析物的數量，因而影響了所偵測出來的圖譜其分析物訊號的強弱，因此本實驗接著針對攪拌方式、攪拌時間、Au@AgNPs 添加量、緩衝溶液、不同 pH 值環境等條件做一系列的探討。

3-1 攪拌方式

本實驗首先針對 Au@AgNPs 與胺基配醣體類抗生素做攪拌方式的探討，主要的比較方式有二，一者為將 vial 放置於振盪器上做上下振盪，另一方式是在加熱板上，於 vial 中放置小磁石於底部攪拌，攪拌時間設定為五分鐘，結果如圖(十)所示，A 為使用振盪器振盪之質譜圖，而 B 為放置小磁石攪拌之質譜圖，圖中顯示小磁石攪拌之質譜圖其分析物 Paromomycin 之主要訊號 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 皆比使用振盪器振盪之分析物訊號為高，代表於 vial 中放置小磁石攪拌方式效果較佳，其主要原因可能為使用振盪器振盪時，因為是上下振盪的關係，有時會於攪拌完時在 vial 中混合液之上端部份，發現有少許黑色液體依附於 vial 管壁上，此物質可能是 Au@AgNPs 與表面之界面活性劑在振盪過程中造成脫落的現象，因此造成部份 Au@AgNPs 的流



圖(十)胺基配醣體類抗生素 Paromomycin 與 Au@AgNPs 混合液之不同攪

拌方式的質譜圖(A)使用震盪器上下振盪(B)使用小磁石於 hot plant

板上進行攪拌

($[M+Na]^+ = 638.23 \text{ m/z}$ 、 $[M+K]^+ = 654.72 \text{ m/z}$ $[M+Ag]^+ = 722.14 \text{ m/z}$)

實驗條件：

分析物： 10^{-6} M Paromomycin 溶於 DI water

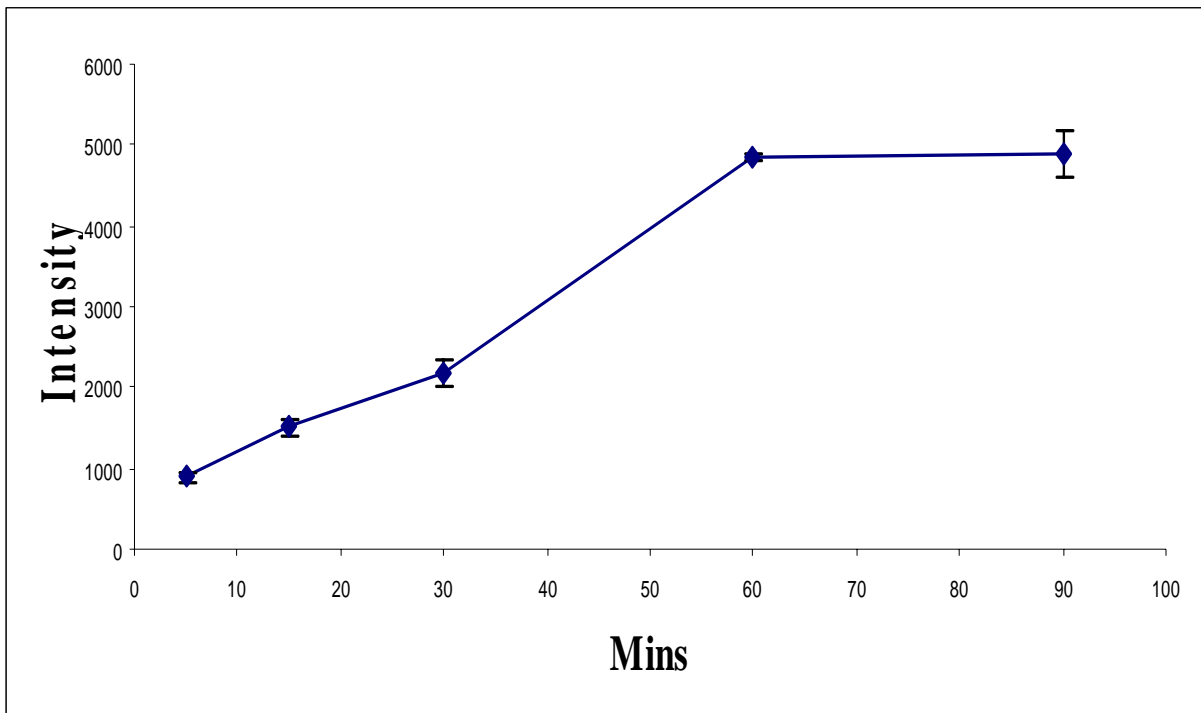
吸附時間：5 分鐘

Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

失，導致訊號強度減弱，而放置小磁石攪拌的方式因為在攪拌時，其小磁石於全程皆在混合液底下進行攪拌的工作，較不容易有上述的情況發生，在比較完兩圖譜的分析物訊號後，決定之後進行基質與分析物的攪拌方式為利用小磁石放置於 vial 的混合液中，於加熱板上進行攪拌的動作。

3-2 攪拌時間

攪拌時間的探討主要是了解 Au@AgNPs 在補捉 Paromomycin 的過程中，何時會使分析物訊號達到最佳化，本實驗將 Paromomycin 與 Au@AgNPs 之混合液分別進行了 5、15、30、60、90 分鐘的攪拌時間，其各時間的平均分析物訊號如圖(十一)所示，由圖中可發現在 5 至 60 分鐘期間，其分析物訊號隨著時間增加而增加，這代表了在 60 分鐘之間，其 Au@AgNPs 表面所吸附 Paromomycin 的量仍未達到飽和，但在 60 至 90 分鐘之間，可發現 Paromomycin 的訊號強度有趨於水平的趨勢，代表此階段所吸附的量以接近飽和，因此考慮到實驗中時間的節省，之後的攪拌時間皆採用 60 分鐘，因為 60 分鐘與 90 分鐘其訊號強度的差異不大，而過去文獻^[111]中，其他奈米粒子之萃取分析物的時間大都介於 60 至 120 分鐘之間。



圖(十一)不同攪拌時間對分析物訊號的影響。(此實驗之縱軸以主 peak $[M+K]^+ = 654.72 \text{ m/z}$ 為主，訊號強度之相對標準偏差(RSD)皆在 10%之內)

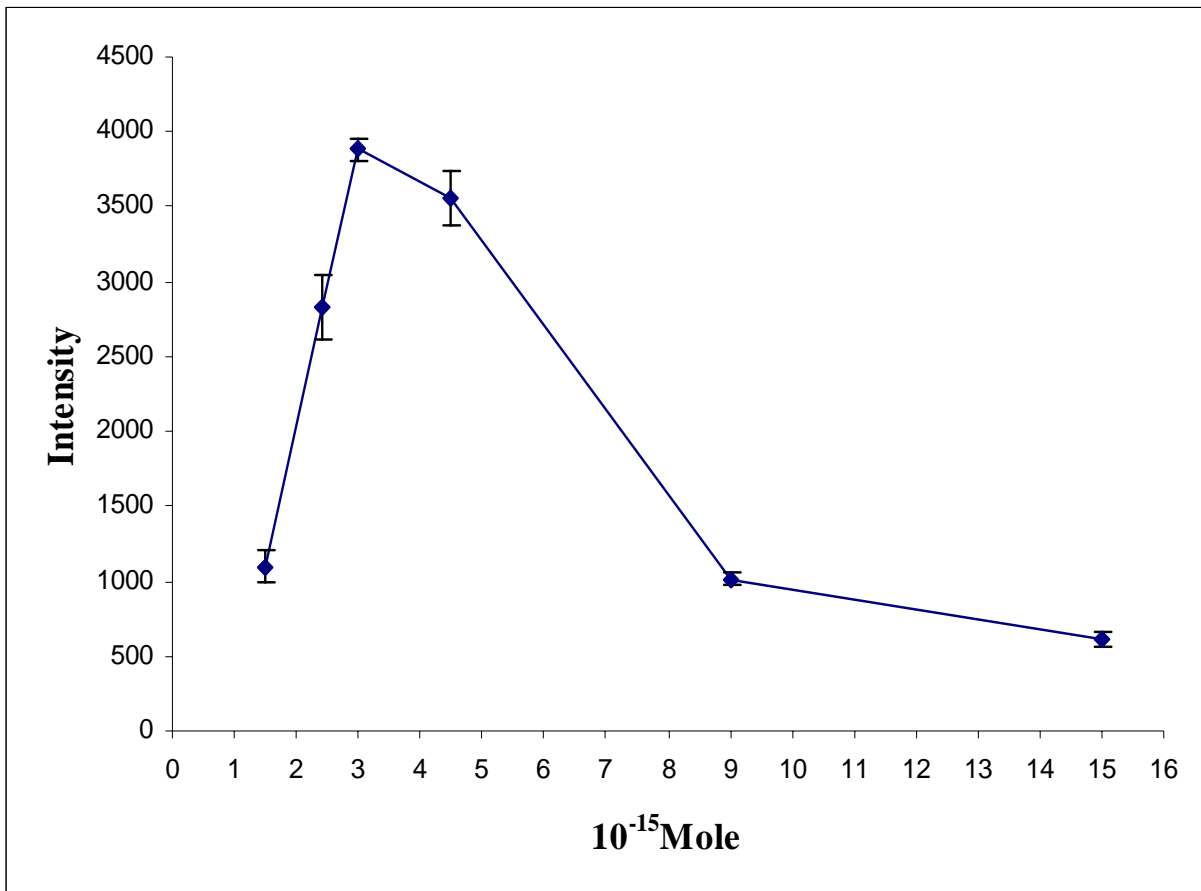
實驗條件：

分析物： 10^{-6} M Paromomycin 溶於 DI water

Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

3-3 Au@AgNPs 的量

此實驗主要在探討添加 Au@AgNPs 的量對訊號強度的影響，因為當 Au@AgNPs 數量太低時，會使 Au@AgNPs 無法捕捉足夠的分析物吸附於 Au@AgNPs 的表面上，因此會使質譜圖中分析物的訊號減弱，當 Au@AgNPs 添加量太高時，此時分析物的量固定，則每個奈米粒子所能捕捉分析物的數目會下降，而導致分析物的訊號減弱。實驗首先將分析物 Paromomycin 固定為 500 μL ，和不同量的 Au@AgNPs 做混合，而混合溶液的總體積固定為 1 mL，其結果如圖(十二)所示，由圖中可發現當 Au@AgNPs 為 3.0×10^{-15} moles 時，其分析物的訊號為最高點，當 Au@AgNPs 的量小於 3.0×10^{-15} moles 時，其銀顆粒數太低，以致於訊號強度較弱，而當 Au@AgNPs 的量大於 3.0×10^{-15} moles 時，此階段分析物的訊號逐漸減弱至最低點，代表此階段其銀顆粒數太高，此圖說明了添加銀顆粒的量必須要適當，太低和太高皆會影響整個圖譜的結果，在最佳信號時，每個銀粒子約吸附了 1.7×10^5 個分析物分子。



圖(十二)不同 Au@AgNPs 添加量對分析物訊號的影響。(此實驗之縱軸以主 peak $[M+K]^+ = 654.72 \text{ m/z}$ 為主，訊號強度之相對標準偏差 (RSD)皆在 10%之內)

實驗條件：

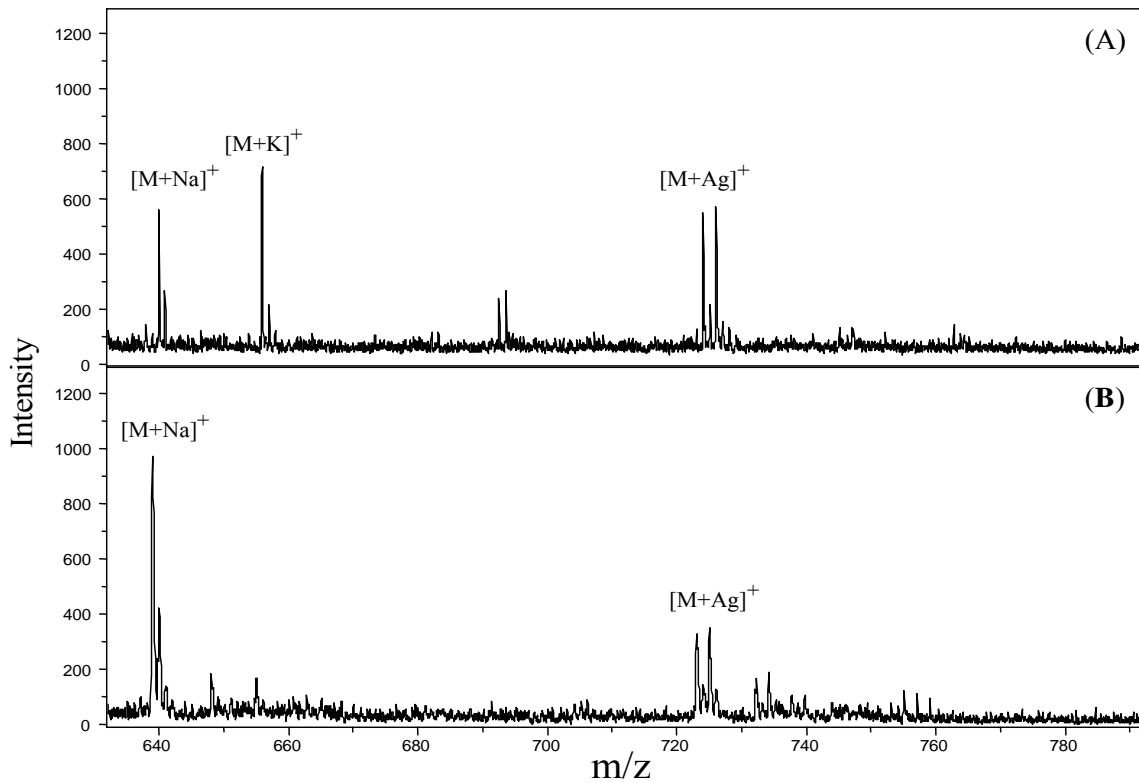
分析物： $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ Paromomycin 溶於 DI water

吸附時間：一小時

3-4 緩衝溶液

在上述實驗的圖譜中，常可發現分析物訊號通常以 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 甚至是 $[M+Ag]^+$ 的形式一起出現，這會造成圖譜在判斷上的困難性，尤其是當數個分析物混合在一起時，有時甚至會出現訊號重疊的現象，所以本實驗此時的目地在找到適當的 buffer solution，使分析物偵測出的訊號能夠簡單化。

過去文獻中^[112]有記載可以利用添加適當的陽離子化劑，來幫助訊號的簡單化，因此本實驗利用 NaH_2PO_4 當做 buffer solution，藉此可減少 $[M+K]^+$ 和 $[M+Ag]^+$ 的訊號，使圖譜簡單化，圖(十三)A、B 各表示以 DI water 和 NaH_2PO_4 來配製 Paromomycin 所偵測出的質譜圖，以 DI water 來配製 Paromomycin 的質譜圖中可觀測到分析物訊號 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 和 $[M+Ag]^+$ ，其主要訊號以 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 為主，而同濃度下以 NaH_2PO_4 當 buffer 的質譜圖中卻可清楚地發現主要的分析物訊號剩 $[M+Na]^+$ 及帶有少許 $[M+Ag]^+$ 的訊號，原來的 $[M+K]^+$ 的訊號幾乎無法觀測到，這代表了 NaH_2PO_4 buffer 提供了 Na^+ 離子使分析物的主 peak 變成 $[M+Na]^+$ 訊號，而 $[M+K]^+$ 的訊號消失，所以符合此階段使圖譜簡單化的目地，因此後續實驗皆以 NaH_2PO_4 buffer 當做分析物的溶劑做配製。



圖(十三) 胺基配醣體類抗生素 Paromomycin 與 Au@AgNPs 以不同溶劑配製之質譜圖(A)使用 DI water 配製(B)使用 NaH_2PO_4 buffer 配製

$([M+Na]^+ = 638.41 \text{ m/z}, [M+K]^+ = 654.11 \text{ m/z}, [M+Ag]^+ = 722.37 \text{ m/z})$

實驗條件：

分析物： 10^{-6} M Paromomycin 溶於 DI water

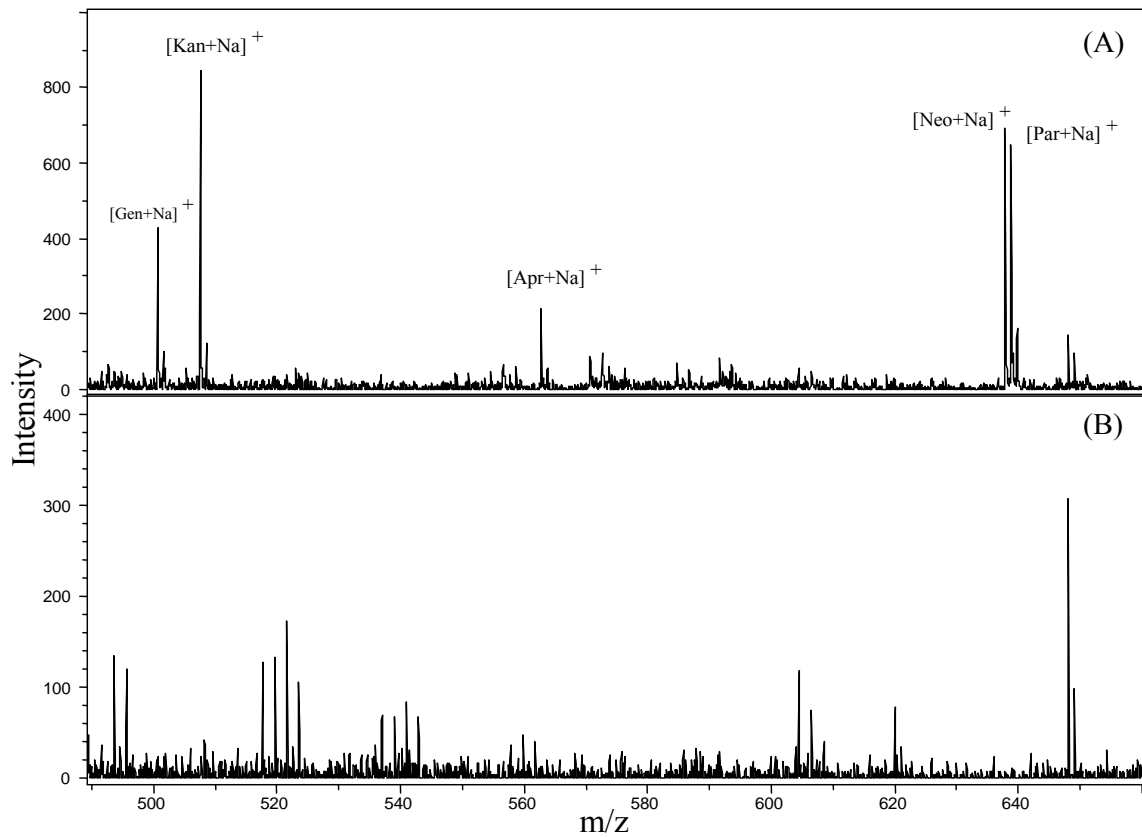
10^{-6} M Paromomycin 溶於 10 mM NaH_2PO_4 buffer

NaH_2PO_4 buffer 濃度：10 mM pH=5.2

吸附時間：5 分鐘

Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

上述實驗可証明 NaH_2PO_4 buffer 能提供 Na^+ 幫助 Paromomycin 之游離，因此接下來同時混合五種胺基配醣體類包含 Gentamicin、Kanamycin、Apramycin、Neomycin 和 Paromomycin，圖(十四)A 為此五種抗生素之混合溶液所偵測之質譜圖，而 B 為 Au@AgNPs 在此區間分子量範圍的 blank 圖，由圖中可清楚地觀測到此五種抗生素 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的訊號，其中 Neomycin 和 Paromomycin 因為其分子量差異僅為 1，因此可觀測到相鄰的兩根 peak，結果代表了使訊號簡單化的優點，即使加入了數種抗生素的混合液，還是能夠判斷出分析物的訊號。



圖(十四) 五種胺基配醣體類抗生素混合溶液之質譜圖

($[\text{Gen}+\text{Na}]^+=500.70 \text{ m/z}$ 、 $[\text{Kan}+\text{Na}]^+=507.63 \text{ m/z}$ $[\text{Apr}+\text{Na}]^+=562.72$
 m/z 、 $[\text{Neo}+\text{Na}]^+=637.81 \text{ m/z}$ 、 $[\text{Par}+\text{Na}]^+=638.82 \text{ m/z}$)

實驗條件：

分析物： $2.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ Paromomycin 溶於 $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ buffer

$4.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ Gentamicin、Kanamycin、Apramycin、Neomycin

溶於 $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ buffer pH=5

吸附時間：60 分鐘

Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

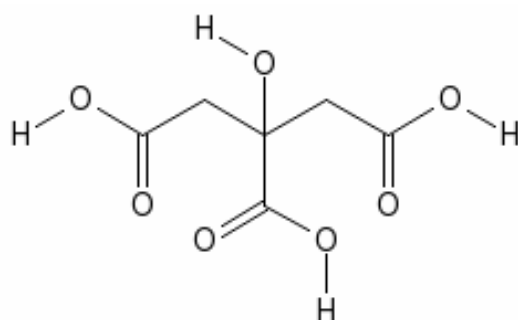
3-5 pH 值之探討

溶液中的 pH 值將影響胺基配醣體類抗生素的帶電情形，因此 pH 值的控制就顯得相當重要，本實驗以表(六)中胺基配醣體類抗生素 -NH₂ 基的 pka 來說明：

表(六)本實驗中胺基配醣體類抗生素之 pka 值^[113-114]

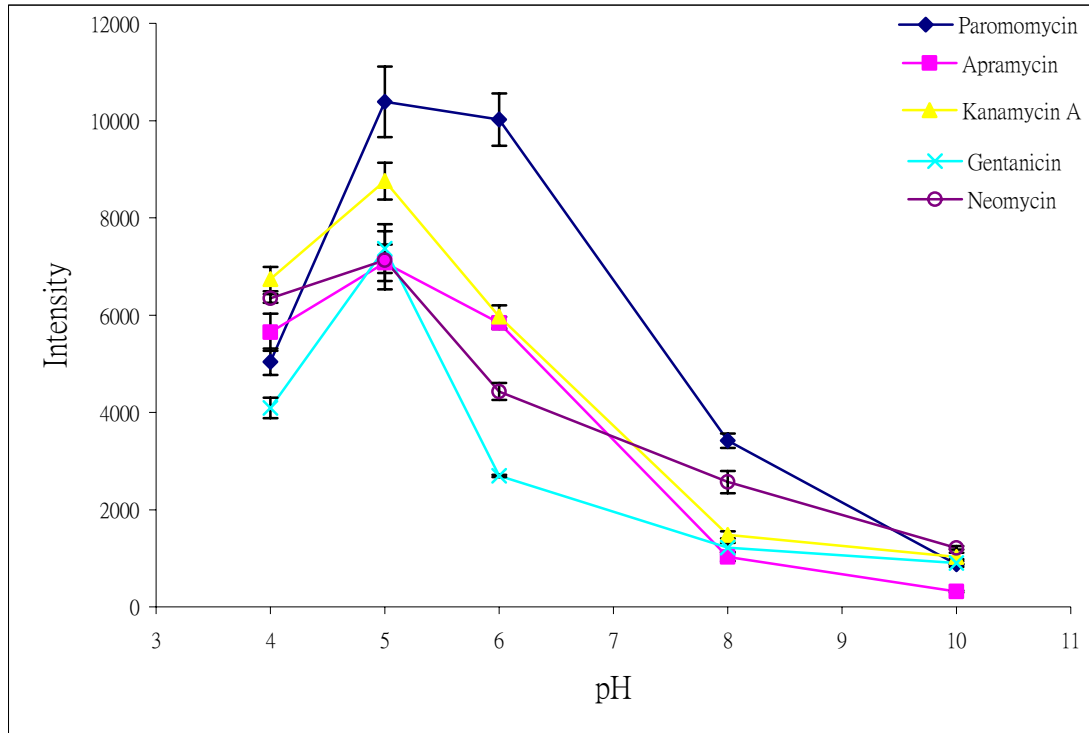
Aminoglycoside	pka value(-NH ₂)					
Paromomycin	7.1	8.3	8.3	8.6	9.5	
Neomycin B	6.9	8.3	8.3	8.8	9.2	9.5
Kanamycin A	6.2	7.4	7.4	7.6		
Apramycin	6.6	6.7	7.5	7.7	8.2	
Gentamicin C1	5.5~9					

上述可知 Neomycin 結構中的-NH₂ 基其 pka 由 6.9 至 9.5，而 Paromomycin 結構中的-NH₂ 基其 pka 由 7.1 至 9.5，因此理論上只要將 pH 值控制在 6.9 以下就能將所有 Neomycin 與 Paromomycin 的-NH₂ 基轉變成-NH₃⁺，使之帶最多的正電荷，此時即可利用 pH 值將 Au@AgNPs 表面修飾成帶負電之探針的特性，用靜電吸引力來補捉帶正電之胺基配醣體類抗生素，所以接下來要探討如何使 Au@AgNPs 表面修飾上的官能基帶負電，Au@AgNPs 表面修飾的物質為 citrate group，其結構式如下：



其 pka 值有三個，分別為 3.15、4.77、5.19，此時將 pH 值控制在 pka 值之上，其官能基-COOH 則會轉變為-COO⁻形成帶負電荷形式，因此本實驗分別將五種胺基配醣體類抗生素配製於 pH 值 4、5、6、8、10 的緩衝溶液中，找尋最適當的 pH 值，圖(十五)五條曲線則分別代表了五種胺基配醣體類抗生素訊號強度對 pH 值之曲線圖，而圖中可看出 pH 值由 6 至 10 的訊號強度逐漸變低，這是因為胺基配醣體類抗生素在此 pH 值範圍內，所帶正電荷數目隨著 pH 值的上升而下降，

但此階段仍有訊號的原因，推測為雖然此階段所帶正電荷數目逐漸減少，靜電吸引力因此下降，但所帶正電荷數目還是有 1 至 3 個電荷之間，直到 pH 為 10 時訊號強度才減至最低，而氫鍵作用力也有可能發生，產生互相輔助的效果，因為氫鍵作用力常在氫氧根-羧基和氨基-羧基之間發生。另外，pH 值由 4~5 之間其訊號強度逐漸增加，則代表了此時其 citrate group 上的羧基-COOH 開始解離形成帶負電的探針，且胺基配醣體類抗生素此時帶最多的正電荷，代表此階段的靜電吸引力理論上達到最大值，其訊號強度皆有明顯的增加，而此五種胺基配醣體類抗生素因為其結構上的相似，因此結果差異並不大，都是在 pH 值為 5 時效果最佳，而又以 Paromomycin 的訊號強度最高。



圖(十五) 不同 pH 值對分析物訊號的影響。(此實驗之縱軸以主 peak $[M+Na]^+$ 為主，其訊號強度之相對標準偏差(RSD)皆在 10% 之內)

實驗條件：

pH 為 4、5、6： 10^{-6} M all aminoglycoside 溶於 10 mM NaH_2PO_4 buffer

pH 為 8： 10^{-6} M all aminoglycoside 溶於 10 mM Na_2HPO_4 buffer

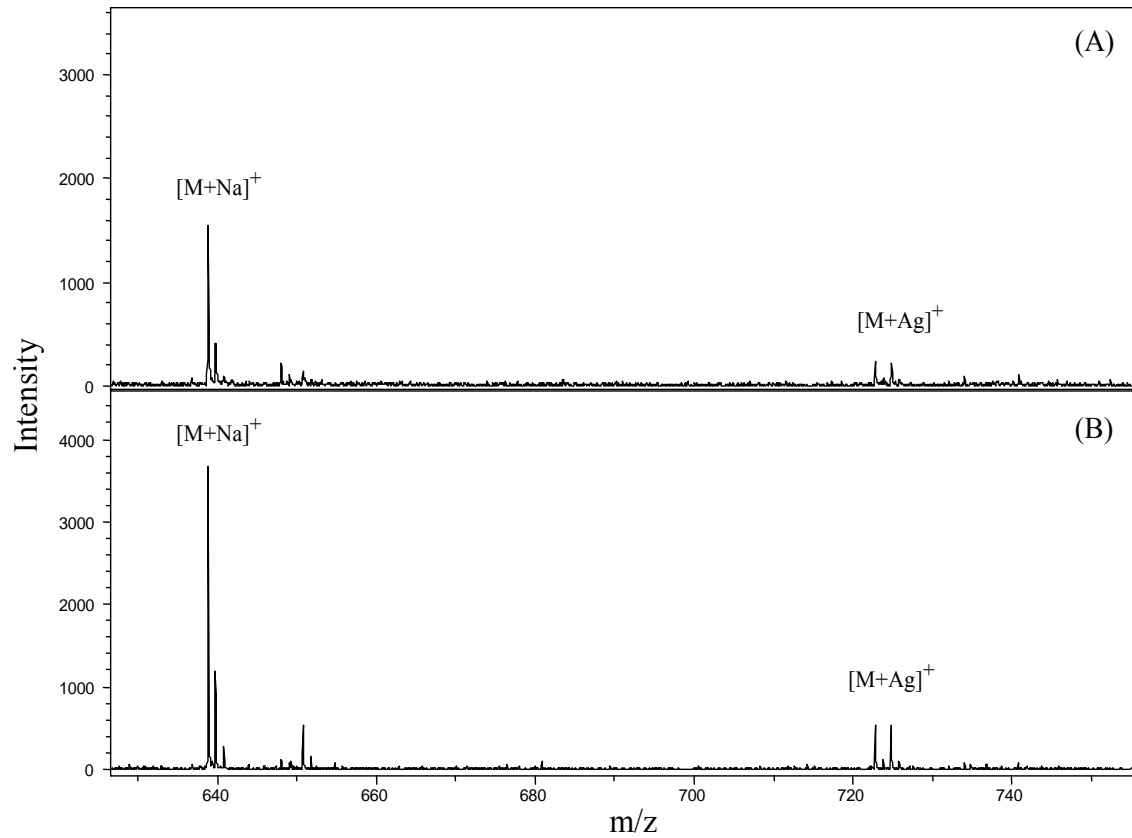
pH 為 10： 10^{-6} M all aminoglycoside 溶於 10 mM Na_3PO_4 buffer

吸附時間：60 分鐘

Ag@AuNPs：100 μ L 分析物溶液：500 μ L

3-6 Au@AgNPs 萃取後之清洗

進行質譜分析時，若分析物中含有其他雜質時會影響樣品製備時共結晶的好壞，而在胺基配醣體類抗生素的樣品溶液中，或多或少會有其它雜質的出現。因此本階段實驗主要在探討當 Au@AgNPs 吸附完分析物後，經過離心使 Au@AgNPs 至 vial 最底部後，此時將分析物溶液取出，接著進行 Au@AgNPs 表面水洗的步驟，加入 100 μL DI water 於 Au@AgNPs 中，進行超音波震盪 3 分鐘左右徹底洗滌殘留於 Au@AgNPs 中的雜質，能藉此而觀察溶液中的雜質是否對 MALDI-TOF MS 的偵測會造成影響，圖(十六)A 代表了 Au@AgNPs 吸附完 Paromomycin 後直接將 Au@AgNPs 點入樣品盤上，而 B 則將收集的顆粒以去離子水清洗後，所獲得的質譜圖，由圖中可發現兩者之背景訊號雖然差不多，但是有進行清洗之 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 訊號強度明顯較高，且其 S/N 值也較大，此結果說明了在水洗的過程中，確實能將 Au@AgNPs 表面之雜質移除，繼而降低干擾，因此後續的實驗皆在 Au@AgNPs 吸附完分析物後，先進行清洗顆粒的動作，以去除雜質所造成的干擾。



圖(十六) Au@AgNPs 萃取後之清洗對分析物訊號的影響

(A)不經由 DI water 水洗(B) 經由 DI water 水洗之質譜圖

($[M+Na]^+ = 638.80 \text{ m/z}$ 、 $[M+Ag]^+ = 722.80 \text{ m/z}$)

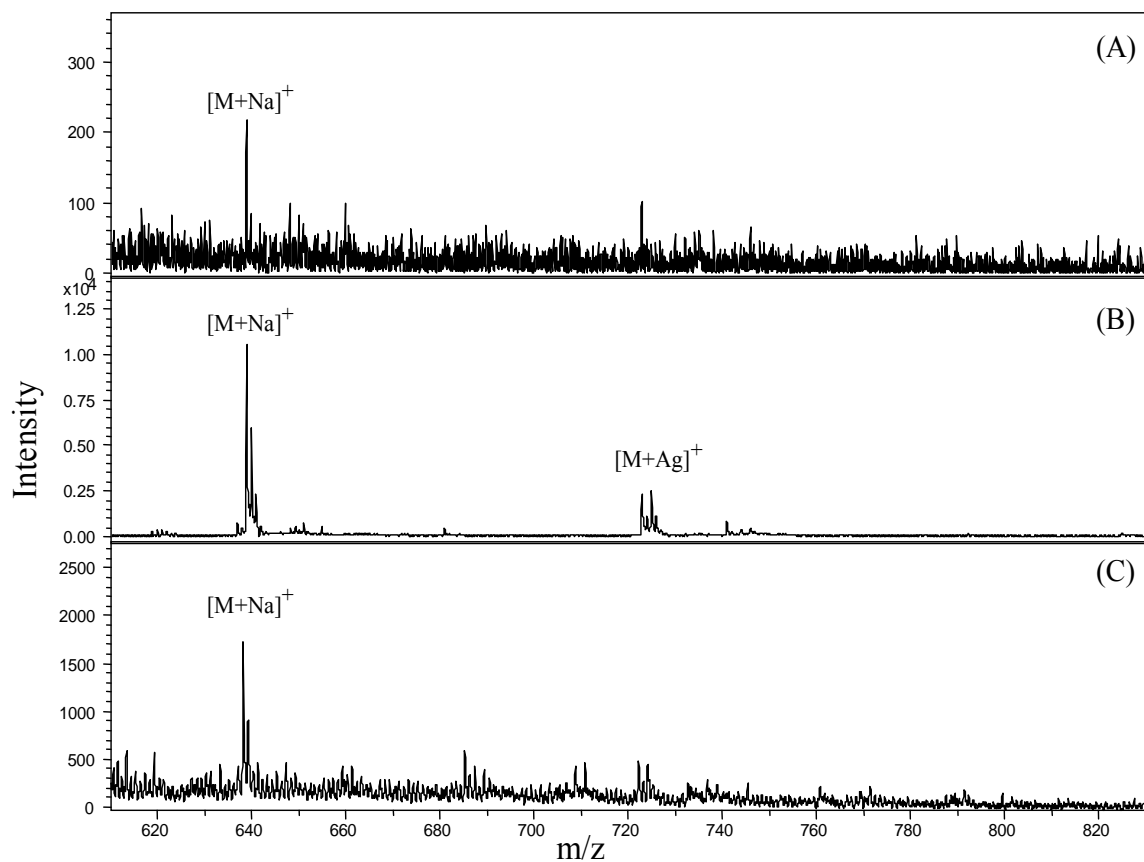
實驗條件：

分析物： $5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ Paromomycin 溶於 $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ buffer

吸附時間：60 分鐘

Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

為了比較胺基配醣體類抗生素在萃取過後靈敏度之差異性，因此本實驗接著將 Au@AgNPs 與 Paromomycin 混合並萃取 60 分鐘，實驗首先將 Paromomycin 配製於較低濃度 5.0×10^{-6} M 和 5.0×10^{-8} M 的環境下，圖(十七)A 代表了以 Au@AgNPs 當基質不經過濃縮步驟在 Paromomycin 於 5.0×10^{-6} M 的環境下所得之質譜圖，由圖中可計算出此分析物 peak 其 S/N 值為 3，而圖 B 是在相同的環境下進行濃縮的步驟所得出的質譜圖，由圖中可計算出此分析物 peak 其 S/N 值為 115，其訊號強度和 S/N 值皆有明顯提高，另外還可在主 peak 右邊觀測到較低 peak 的訊號，此為 $[M+Ag]^+$ 的訊號。而圖 C 代表以 Au@AgNPs 當基質並經過濃縮的步驟在 Paromomycin 於低濃度 5.0×10^{-8} M 的環境下所測得的質譜圖，由圖中可發現在 5.0×10^{-8} M 的環境下還是可觀察到分析物訊號，且分析物濃度比圖(十七)A 中 5.0×10^{-6} M 時還低了 100 倍左右，提升了整體實驗的靈敏度。



圖(十七)胺基配醣體類抗生素 Paromomycin 與 Au@AgNPs(A) 非經由濃縮處理： 5×10^{-6} M (B)經由濃縮處理： 5×10^{-6} M (C)經由濃縮處理： 5×10^{-8} M ($[M+Na]^+ = 638.82$ m/z、 $[M+Ag]^+ = 722.82$ m/z)

實驗條件：

分析物： 5.0×10^{-6} M Paromomycin 溶於 10 mM NaH_2PO_4 buffer

5.0×10^{-8} M Paromomycin 溶於 10 mM NaH_2PO_4 buffer

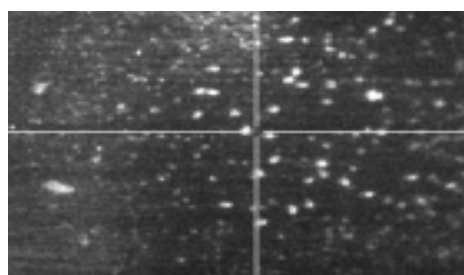
Ag@AuNPs：100 μL

四、檢量線的製作

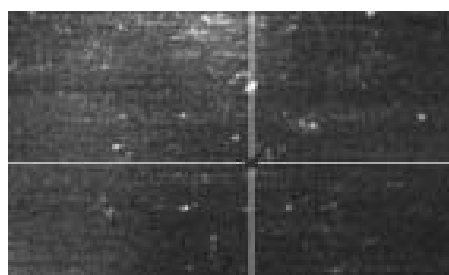
檢量線的製作是依據上述各階段最佳離子化條件下，以訊號強度對濃度做圖求得，而檢量線濃度範圍設定在 $1.0 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 3.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 之間，此外，在檢量線的製作上其再現性的探討是必要的，如果在檢量線製作的過程中發現再現性不佳，則會導致實驗中定量上的困難性，因此本實驗接首先針對再現性的問題進行探討。

4-1 再現性的探討

本實驗首先以 Paromomycin 為胺基配醣體類抗生素的代表作為再現性的探討，而過去文獻中^[33]對於 MALDI-TOF MS 定量上最主要的問題，在於其分析物與基質的非均質性導致其共結晶不佳，如此會造成即使在完全相同的環境下製備同濃度的樣品，在樣品盤上同一點中的相鄰區域(intra-sample)和同環境下點與點之間(inter-sample)所偵測出的質譜圖，其訊號強度皆會有所差異，下圖為傳統有機基質 α -CHCA 與本實驗所使用的基質 Au@AgNPs 分別與 Paromomycin 混合而形成的共結晶圖：



α -CHCA



Au@AgNPs

圖中可發現 α -CHCA 所形成的共結晶有其不均勻性，代表用雷射轟擊兩不同區域時其訊號強度皆會有所差別，因此其再現性也會相對較低，反觀其 Au@AgNPs，其均勻性明顯較佳，而再現性相對地也較高。本實驗接著在樣品盤上製備 10^{-6} M Paromomycin 相同程序樣品共三個，為了驗證樣品盤上不同樣品(sample-to-sample)和同樣品點與點之間(spot-to-spot)的分析結果無顯著的差異，可利用雙因子變異數分析：無重覆實驗(ANOVA)在 95%信心程度內來檢測，其結果如表(七)所示，其欄與列之 F 值皆小於其臨界值，代表之前所驗證的結果成立，其 inter-sample 與 intra-sample 的 RSD 分別為 2.1%和 7.4%。

4-2 檢量線及偵測極限

檢量線的製作是將五種胺基配醣體類抗生素配製於 10 mM、pH 為 5 的磷酸緩衝溶液中，其所得之檢量線線性範圍及相關係數列於表(八)，檢量線範圍濃度設定為 1.0×10^{-8} M~ 3.0×10^{-6} M 之間，線性相關係數(r)皆為 0.99 以上，而 Paromomycin、Neomycin、Kanamycin A、Gentamicin、Apramycin 之偵測極限(S/N=3)分別為 3 nM、15 nM、25 nM、30 nM、38 nM，而又以 Paromomycin 的偵測極限(LOD)為最低，圖(十八)為 Paromomycin 在 10^{-8} M 時偵測之質譜圖，其 S/N 值為 9，可證明此分析方法可用於分析低濃度之胺基配醣體類抗生素。

表(七) 雙因子變異數分析：無重覆實驗(ANOVA)

n	1	2	3	4	5	6	7
sample-1							
(intensity,mv)	10210	10392	9421	10585	10250	9599	10540
sample-2							
(intensity,mv)	11040	10854	8777	10171	9250	11570	12406
sample-3							
(intensity,mv)	9311	10354	9046	11295	11124	9067	12165

<i>SUMMARY</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Row 1	7	70988	10141.14	207830.5
Row 2	7	74068	10581.14	1631339
Row 3	7	72362	10337.43	1535210
Column 1	3	30552	10184	747577
Column 2	3	31600	10533.33	77481.33
Column 3	3	27244	9081.333	104620.3
Column 4	3	32051	10683.67	323145.3
Column 5	3	30624	10208	879292
Column 6	3	30236	10078.67	1738812
Column 7	3	35111	11703.67	1030110

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Rows	680224.4	2	340112.2	0.447425	0.649516	3.885294
Columns	11124424	6	1854071	2.439071	0.088968	2.99612
Error	9121853	12	760154.4			
Total	20926502	20				

[表(七)中數值：樣品重覆製備 3 次，每樣品隨機取 7 點，每點取 50

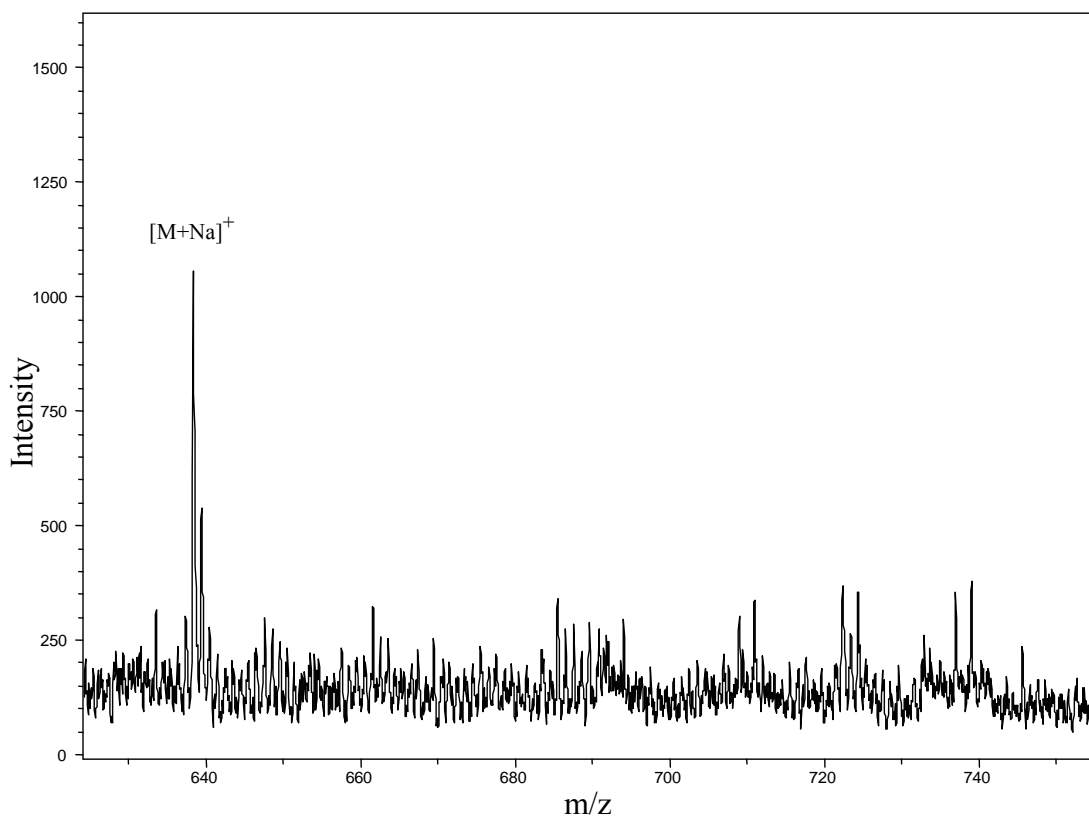
shots 質譜圖平均]

表(八)標準品檢量線與偵測極限

分析物	濃度範圍(M)	Slope ^a (mV/M)	Intercept ^a	r	偵測極限(nM) ^b
Paromomycin	1.0x10 ⁻⁸ ~1.0x10 ⁻⁶	1.04x10 ¹⁰	5.67x10 ²	0.9924	3
Neomycin	5.0x10 ⁻⁸ ~2.0x10 ⁻⁶	6.01x10 ⁹	5.20x10 ¹	0.9903	15
Kanamycin A	8.0x10 ⁻⁸ ~3.0x10 ⁻⁶	4.06x10 ⁹	3.24x10 ²	0.9948	25
Gentamicin	8.0x10 ⁻⁸ ~3.0x10 ⁻⁶	3.76x10 ⁹	3.39x10 ²	0.9948	30
Apramycin	8.0x10 ⁻⁸ ~2.0x10 ⁻⁶	4.82x10 ⁹	1.09x10 ²	0.9947	38

^a y 為[M+Na]⁺；x 為分析物濃度(M)

^b 偵測極限(LOD)：S/N=3



圖(十八) 胺基配醣體類抗生素 Paromomycin 於低濃度 10^{-8} M 偵測之
質譜圖

($[M+Na]^+ = 638.35 \text{ m/z}$ 、 $[M+Ag]^+ = 722.36 \text{ m/z}$)

實驗條件：

分析物： 10^{-8} M Paromomycin 溶於 10 mM NaH_2PO_4 buffer(pH=5)

吸附時間：60 分鐘

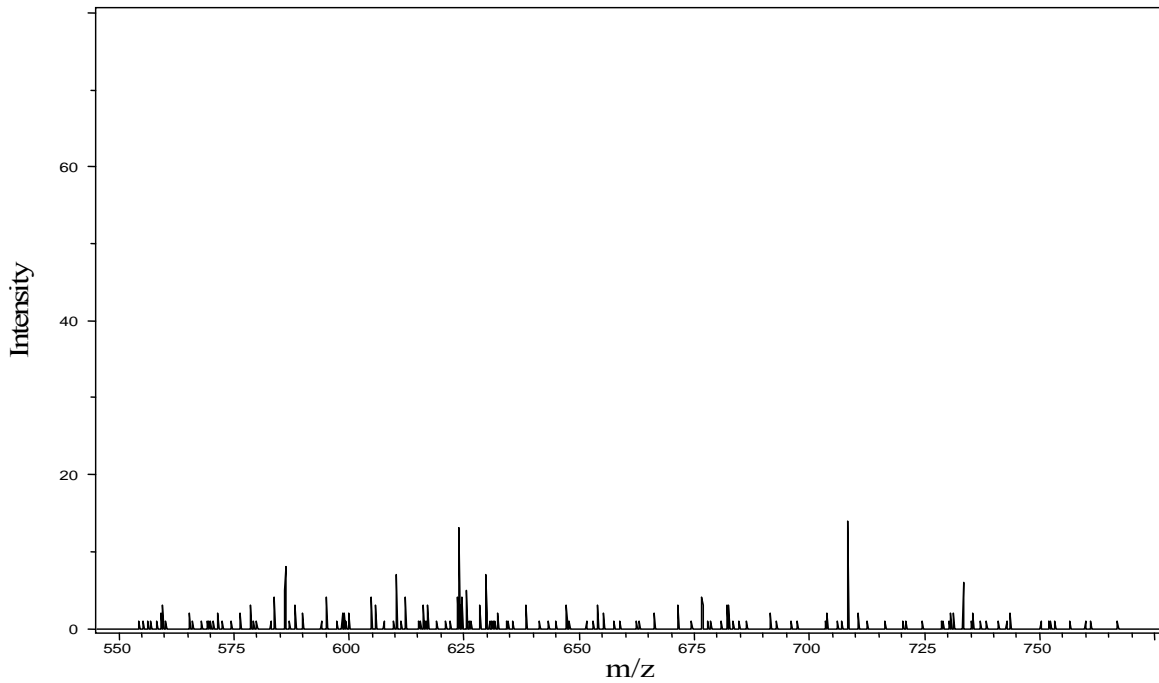
Ag@AuNPs：100 μL 分析物溶液：500 μL

五、血漿中胺基配醣體類抗生素的分析

本研究所選用的真實樣品為血漿樣品，主要是為了評估此方法在臨床和生物分析方法上的適用性。而血漿來源為實驗室學弟妹和本人取得，血漿組成為90%水和10%化學成分，其中包含了許多蛋白質、鹽類、醣類..等物質，這些物質皆會為Au@AgNPs在吸附分析物時造成影響，靈敏度也會隨之下降，因此接下來首要探討解決此問題的方法。

5-1 直接分析

實驗首先將1 mL的血漿樣品pH值調至5，接著取450 μ L血漿樣品，添加50 μ L之neomycin，此時血漿樣品中neomycin濃度為 5.0×10^{-6} M，將500 μ L混合液加入Au@AgNPs後，攪拌一小時，血漿樣品之質譜圖如圖(十九)所示，由圖中可發現無法觀測到分析物的訊號。由於血漿中其他基質成份相當多，因此Au@AgNPs也可能吸附到血漿中其他基質成份如蛋白質..等，因此造成無分析物訊號的產生，此結果代表不經前處理而直接分析的方法是不可行的，必須要找尋可降低血漿中各類基質濃度的方法，所以接下來將要針對血漿樣品前處理的部份做進一步的探討。



圖(十九)將 5.0×10^{-6} M Neomycin spike於未前處理血漿中之質譜圖

實驗條件：

分析物： 5.0×10^{-6} M Neomycin in plasma

吸附時pH值：5

吸附時間：60分鐘

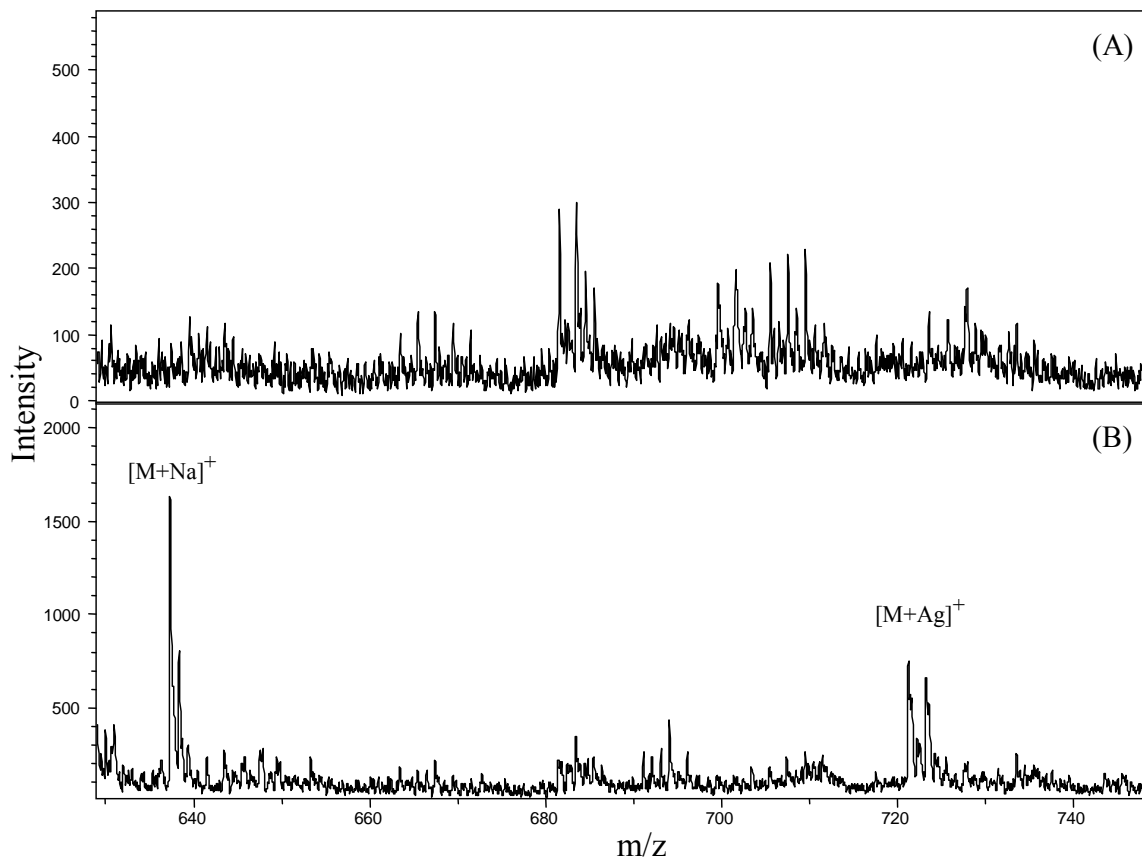
Ag@AuNPs：100 μ L 血漿樣品：500 μ L

5-2 血漿樣品前處理

血漿樣品前處理的部份由文獻中^[115]發現，大部份的方法都包括了經由加入酸或鹼、超過濾、加入有機溶劑等方法，來去除血漿中的蛋白質。

本實驗首先針對超過濾(Ultrafiltration)和加入Acetonitrile去蛋白兩部份做探討，但是在超過濾的部份，發現加入了500 μL 血漿樣品於超過濾瓶中以6000 g離心30分鐘後，發現通過薄膜的血漿樣品量不超過100 μL ，因為量太少的關係，無法進行與Au@AgNPs的混合來吸附分析物，因此轉而探討加入Acetonitrile去蛋白的部份，此部份先將血漿樣品與Acetonitrile的比例分為1：1和1：2進行探討，先加入Acetonitrile去蛋白，接著加入極少量高濃度鹽酸使pH控制在5左右，進行MALDI-TOF MS的分析。

圖(二十) A、B分別表示血漿：ACN以1：1和1：2的方式混合，接著添加固定濃度分析物於血漿樣品中進行分析的質譜圖，從圖中發現A無法偵測出分析物Neomycin的訊號，代表血漿：ACN以1：1的比例混合，沒辦法有效去除大部份血漿中的蛋白質和其他基質，且發現血漿：ACN以1：1的比例混合時，取出血漿溶液時其溶液顏色仍然呈現黃色混濁狀，接著加入Au@AgNPs離心後，會因為Au@AgNPs會與一部份血漿中的基質混合造成取出Au@AgNPs的困難性，上述都是造



圖(二十)將血漿樣品與Acetonitrile的比例以(A)1:1(B)1:2的方式混合，spike 2.0×10^{-6} M Neomycin於血漿中之質譜圖

($[M+Na]^+ = 637.35$ m/z、 $[M+Ag]^+ = 721.28$ m/z)

實驗條件：

分析物： 2.0×10^{-6} M Neomycin in plasma

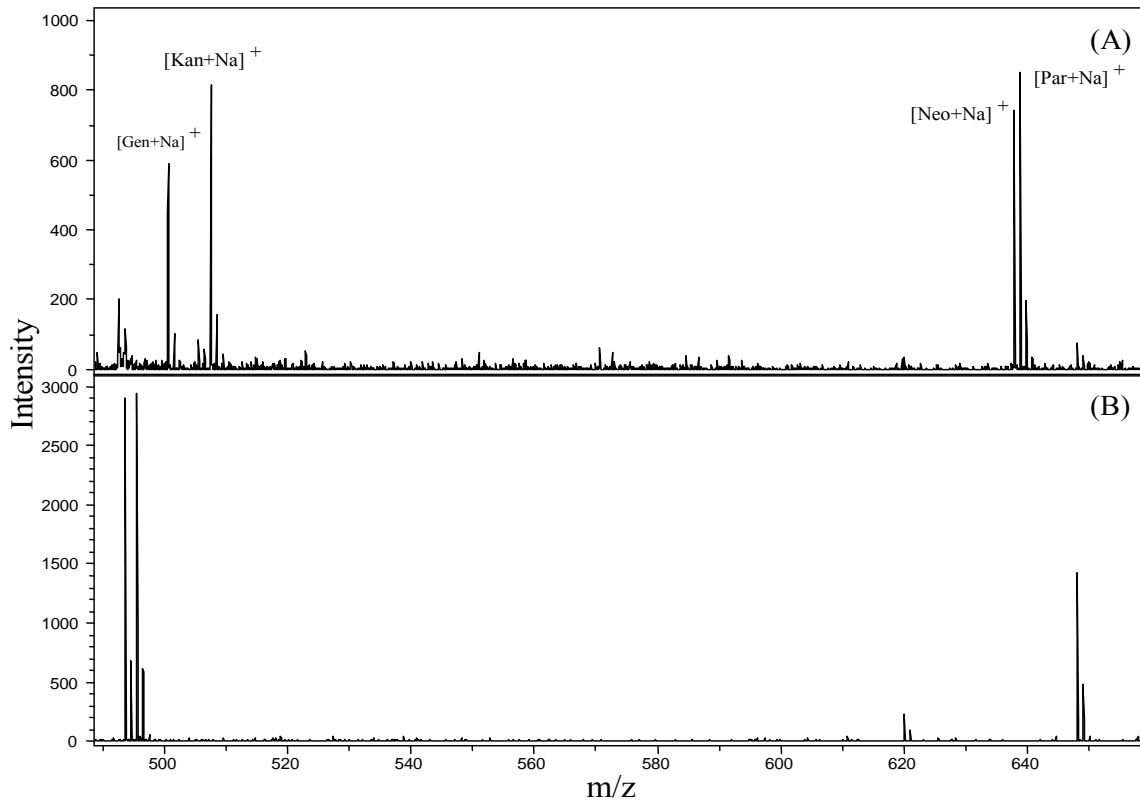
吸附時pH值：5

吸附時間：60分鐘

Ag@AuNPs：100 μ L 血漿樣品：500 μ L

成沒有分析物訊號的原因，反觀以1：2的比例混合時則可清楚觀測到分析物的訊號，代表以1：2的比例混合時能去除血漿中的基質干擾物，且取出的血漿樣品也比較呈現透明狀，所以之後皆以此比例作為血漿樣品的前處理步驟，來進行分析。

上述決定血漿樣品前處理的方法後，接著要探討於血漿中所要分析的四種胺基配醣體類抗生素Paromomycin、Neomycin、Kanamycin A、Gentamicin其分析物訊號是否與血漿中的基質有所重疊，因為Au@AgNPs在吸附的過程中，有可能將血漿中的基質一起吸附於表面上，另外因為Apramycin本身幾乎沒有用在人體內的治療，大多是加入飼料中用來治療一些畜牲的疾病，因此在血漿樣品的實驗只探討上述四種抗生素，圖(二十一)A、B為將四種胺基配醣體類抗生素溶液混合加入血漿中與血漿blank做分析物訊號有無重疊的比較，由圖中可清楚觀測到四種分析物 $[M+Na]^+$ 的訊號，而血漿blank中可發現此四種分析物的訊號皆沒有跟血漿blank圖重疊到，代表此方法確實可以進行血漿中胺基配醣體類抗生素的分析。



圖(二十一)四種胺基配醣體類抗生素於血漿中混合溶液之質譜圖

([Gen+Na]⁺=500.68 m/z、[Kan+Na]⁺=507.61 m/z [Apr+Na]⁺=562.72
m/z、[Neo+Na]⁺=637.78 m/z、[Par+Na]⁺=638.78 m/z)

實驗條件：

分析物： 5.0×10^{-7} M Paromomycin、Gentamicin、Kanamycin、Neomycin
in plasma

吸附時間：60分鐘

吸附時pH值：5

Ag@AuNPs：100 μ L 血漿樣品：500 μ L

5-3 血漿中的校正曲線

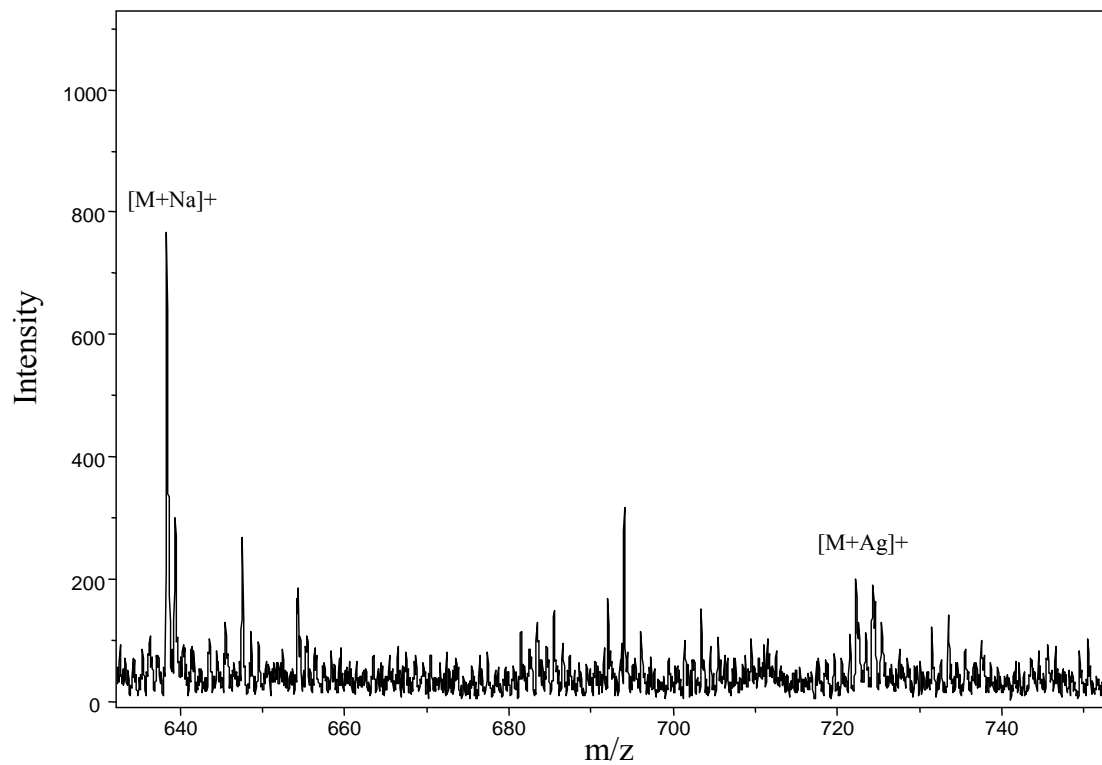
了解血漿中的干擾物沒有與分析物訊號重疊的問題後，則可開始進行檢量線製作的工作，而人體中血漿濃度的治療範圍約在 3.0×10^{-6} M至 2.0×10^{-5} M之間，所以本實驗檢量線濃度範圍設定在 5.1×10^{-7} M至 2.1×10^{-5} M之間，表(九)為四種抗生素於血漿中的檢量線與偵測極限，其Paromomycin、Neomycin、Kanamycin A、Gentamicin偵測極限(S/N=3)分別是9 nM、81 nM、130 nM、180 nM，其檢量線之斜率值部份小於標準品溶液，這代表在去除血漿中干擾物的方法中，僅能大部分降低血漿中的干擾物使之偵測到分析物的訊號，但無法完全去除，因為在Au@AgNPs吸附分析物的過程中，或多或少皆有可能會吸附到血漿中的干擾物如：帶正電荷之蛋白質等。圖(二十二)為Paromomycin於血漿中spike低濃度 3.0×10^{-8} M所偵測之質譜圖，由此圖可說明Au@AgNPs在低濃度的環境下，仍可吸附於血漿中的Paromomycin分子，此peak可計算出其S/N值為10，再次說明其選擇性與濃縮性。

表(九)血漿中胺基配醣體類抗生素檢量線與偵測極限

分析物	濃度範圍(M)	Slope ^a (mV/M)	Intercept ^a	r	偵測極限 (nM)
Paromomycin	$5.1 \times 10^{-7} \sim 2.1 \times 10^{-5}$	5.66×10^8	4.20×10^2	0.9926	9
Neomycin	$5.1 \times 10^{-7} \sim 2.1 \times 10^{-5}$	5.54×10^8	2.25×10^2	0.9928	81
Kanamycin A	$5.1 \times 10^{-7} \sim 2.1 \times 10^{-5}$	5.66×10^8	3.07×10^2	0.9961	130
Gentamicin	$5.1 \times 10^{-7} \sim 2.1 \times 10^{-5}$	3.61×10^8	2.54×10^2	0.9958	180

^a y 為 $[M+Na]^+$; x 為分析物濃度(M)

^b 偵測極限(LOD) : S/N=3



圖(二十二) spike 低濃度 3.0×10^{-8} M Paromomycin 於血漿中偵測之質譜圖

($[M+Na]^+ = 638.36$ m/z、 $[M+Ag]^+ = 722.30$ m/z)

實驗條件：

分析物： 3.0×10^{-8} M Paromomycin in plasma

吸附時間：60 分鐘

吸附時pH值：5

Ag@AuNPs：100 μ L 血漿樣品：500 μ L

六、回收率的探討

本實驗主要以標準添加法定量胺基配醣體類抗生素於血漿中的含量，論文中提到 Paromomycin、Neomycin、Kanamycin A、Gentamicin 在人體血漿中治療範圍約 2.0~10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，換算成濃度大約都在 $3.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 至 $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 之間，超出此範圍則有副作用產生的危險，因此本實驗的回收率添加濃度範圍大致設定在血漿中濃度治療範圍之間。實驗首先在樣品前處理前先 spike 固定濃度胺基配醣體類抗生素於血漿樣品中，加入 ACN 去除蛋白質，接著加入 Au@AgNPs 萃取分析物分子，於萃取後在添加一固定濃度之分析物，以標準添加法定量求得回收率。結果列於表(十)中，其中 Paromomycin、Neomycin、Kanamycin A、Gentamicin 之回收率分別為 80.7%、81.7%、77.7%、76.5%，代表 ACN 於血漿樣品中無法完全萃取此四種胺基配醣體類抗生素，原因推測為血漿中尚有其它帶正電荷之胺基酸，因此會與胺基配醣體類抗生素有競爭反應，而相對標準偏差分別為 4.7%、6.5%、6.7%、4.7%。

表(十) 胺基配醣體類抗生素於血漿樣品中之回收率

	added ^a (pmole)	Found (mean±SD)	Recovery (%)	RSD (%)
Paromomycin	500.0	403.5±3.8	80.7	4.7
Neomycin	500.0	409.3±5.4	81.7	6.5
Kanamycin A	1000.0	776.9±5.2	77.7	6.7
Gentamicin	1000.0	764.7±3.6	76.5	4.7

^a n=3

肆、結論與未來展望

本研究成功地使 Au@AgNPs 表面形成帶負電荷之探針，因而有選擇性地從水溶液中捕捉及濃縮帶正電荷之胺基配醣體類抗生素，加上 Au@AgNPs 本身具有基質的特性，不需添加基質使實驗更簡單化，且使用 Au@AgNPs 當做基質可對低分子量範圍之分析物較無訊號上的干擾與抑制，加上 Au@AgNPs 與胺基配醣體類抗生素混合之共結晶較均勻性，較少有甜點(sweet spot)的發生，此分析方法成功地應用於血漿中胺基配醣體類抗生素的分析，其偵測極限(S/N=3)介於 9 nM~180 nM，而回收率在 76.5~81.7%之間，其相對標準偏差(RSD)在 6.7%之內。

MALDI-TOF MS 本身具有快速和大量分析的特點，加上本研究分析方法可改進再現性不佳的問題和可偵測低分子量範圍分析物的優點，和過去的分析方法比較，本研究所花費的時間較短且靈敏度佳，未來期望可實際應用於抗生素在人的體液中藥物動力學的研究和臨床檢驗上。

參考文獻

1. A. Marzo, L. D. Bo, "Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes : a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications" *Journal of Chromatography A*, Vol. 812 , pp.17-34(1998).
2. P. Gambardella, R. Punziano, M. Gionti, C. Guadalupi and G. Mancin, A. Mangia, "Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography*, Vol. 348, pp. 229-240(1985).
3. Y. Cai, J. Cheng, S. Mou, L. Yiqiang, "Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection" *Journal of Chromatography A*, Vol. 1085 , pp. 124-130(2005).
4. D. A. Stead, "Current methodologies for the analysis of aminoglycosides" *Journal of Chromatography B* Vol. 747 , pp. 69-93 (2000).
5. C. Y. Lu, C. H. Feng, "Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching" *Journal of Chromatography A* , Vol. 1156(1-2), pp. 249-253(2007).
6. C. L. Flurer, "The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , Vol. 13(7), pp.809-816(1995).
7. M. A. Posthumus, P. G. Kistemker, H. L. C. Meuzelaar, "Laser Desorption Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules" *Analytical Chemistry*, Vol. 50, pp. 985-991(1978).

8. B. Linder, U. Seydel, "Laser desorption Mass Spectrometry of Nonvolatiles under Shock Wave Conditions" *Analytical Chemistry*, Vol. 57, pp. 895-899 (1985).
9. M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules" *Analytical Chemistry*, Vol. 57, pp. 2935-2939 (1985).
10. 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 Spectrometry*, pp. 185-188 (1987).
11. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 2, pp. 151-153 (1988).
12. M. Karas, F. Hillenkamp, "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons" *Analytical Chemistry*, Vol. 60, pp. 2299-2301 (1988).
13. M. L. Gross, "Mass Spectrometry in the Biological Sciences: A Tutorial, *Mathematical and Physical Sciences* , pp. 181-197 (1992).
14. K. K. Murray, K. L. Caldwell, "Mid-Infrared Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with a Water/Glycerol Matrix" *Applied Surface Science*, Vol. 127-129, pp. 242-247 (1998).
15. V. Egelhofer, J. Gobom, H. Seitz, P. Giavalisco, "Protein identification by MALDI - TOF MS peptide mapping: a new strategy" *Analytical Chemistry*, Vol. 74, pp. 1760-71(2002).
16. V. Egelhofer, K. Bu1ssow, C. Luebbert, "Improvements in Protein Identification by MALDI - TOF - MS Peptide Mapping" *Analytical Chemistry*, Vol. 72(13), pp. 2741-2750(2000).

17. S. Sechi, B. T. Chait, "Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification" *Analytical Chemistry*, Vol. 70, pp. 5150-5158(1998).
18. M. Takayama, "Study of protein structures using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" *Reza Kenkyu* , Vol. 31(1), pp. 9-12(2003).
19. Z.-Y. Park, D. H. Russell "Thermal denaturation: a useful technique in peptide mass mapping" *Analytical Chemistry*, Vol. 72(11), pp. 2667-2670(2000).
20. R. Tummala; Patrick A. Limbach, "Effect of sodium dodecyl sulfate micelles on peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" *Rapid communications in mass spectrometry*, Vol. 18(18), pp. 2031-2035(2004).
21. D. C. Schriemer, L. Li, "Detection of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, Vol. 68, pp. 2721-2725 (1996).
22. M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and protein Analytes" *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 32, pp. 593-601 (1997).
23. A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, "Matrix-Assisted Infrared-Laser (2.94 μm) Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules" *Rapid communications in mass spectrometry*, Vol. 4, pp. 293-296 (1990).
24. U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, "Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry"

- Analytical Chemistry*, Vol. 348, pp. 783-791 (1994).
25. M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, "Basic Matrixes for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides" *Analytical Chemistry*, Vol. 65, pp. 3204-3211(1993).
 26. I. P. Smirnov, X. Zhu, T. Taylor, Y. Huang, P. Ross, I. A. Papayanopoulos, S. A. Martin, D. J. Pappin, "Suppression of α -Cyano - 4-hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI -TOF Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, Vol. 76(10), pp.2958-2965(2004).
 27. J. Gobom, M. Schuerenberg, M. Mueller, D. Theiss, H. Lehrach, E. Nordhoff, " α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation. A Protocol for MALDI -MS Peptide Analysis in Proteomics" *Analytical Chemistry*, Vol. 73(3), pp.434-438(2001).
 28. M. Karas, U. Bahr, "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry" *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 10, pp. 335-357(1991).
 29. F. Hillenamp and M. Karas, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers" *Analytical Chemistry*, Vol. 63, pp. 1193A-1202A (1991).
 30. Y. C. Wu, C. H. Hsieh, M. F. Tam, "Matrix -assisted laser desorption/ionization of peptides on AnchorChip targets with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and nitrocellulose as matrix" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 20(2), pp. 309-312(2005).
 31. J. Sunner, "Ionization in Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)" *Organic Mass Spectrometry*, Vol. 28, pp. 805-823 (1993).
 32. P. C. Liao, J. Allison, "Ionization Processes in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Matrix-Dependent

- Formation of $[M+H]^+$ vs $[M+Na]^+$ Ions of Small Peptides and Some Mechanistic Comments” *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 30, pp. 408-423 (1995).
33. R. Knochenmuss, “Ion formation mechanisms in UV - MALDI” *Analyst*, Vol. 131(9), pp. 966-986(2006).
 34. J. Sunner, “Ionization in Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS),” *Organic Mass Spectrometry*, Vol. 28, pp. 805-823 (1993).
 35. 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” *Organic Mass Spectrometry*, Vol. 27, pp. 472-480 (1992).
 36. R. Knochenmuss, “Photoionization Pathways and Free Electrons in UV - MALDI” *Analytical Chemistry*, Vol. 76(11), pp. 3179-3184 (2004).
 37. T. Kosaka, T. Kinoshita, M. Takayama, “Ion formation and fragmentation of sinapinic acid in electron ionization, liquid secondary ion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 10(4), pp.405-08 (1996).
 38. A. G. Harrison, “The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides” *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 16, pp. 201-217 (1997).
 39. R. Knochenmuss, “Ion formation mechanisms in UV - MALDI” *Analyst*, Vol. 131(9), pp. 966-986(2006).
 40. G. Osteria, S. Russo, “The Time of Flight electronics for the PAMELA experiment in space” *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, Vol. 589(3), pp. 465-471(2008).
 41. R. J. Cotter, “In: Time-of-Flight Mass Spectrometry” *American*

- Chemical Society*, pp. 19-45 (1997).
42. B. Guan, R. B. Cole, “ Differentiation of both linkage position and anomeric configuration in underivatized glucopyranosyl disaccharides by anion attachment with post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionization linear-field reflectron time-of-flight mass spectrometry” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 21(18), pp. 3165-3168(2007).
 43. A. S. Woods, D. P. Little, T. Cornish, R. J. Cotter, D. P. Little, “Peptide analysis to the attomole level using a curved-field reflectron MALDI- TOF mass spectrometer” *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, Vol. 46(1), pp. 91-96(1998).
 44. C. K. G. Piyadasa, P. Hakansson, T. R. Ariyaratne, “A high resolving power multiple reflection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer” *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , Vol. 13(7), pp. 620-624(1999).
 45. A. Behrens, N. Maie, H. Knicker, I. Kogel-Knabner, “MALDI -TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles” *Phytochemistry*, Vol. 62(7), pp.1159-1170(2003).
 46. W. C. Wiley, and I. H. McLaren, “Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution” *Review of Scientific Instruments*, Vol. 26, pp. 1150-1157 (1955).
 47. B. I. Haukanes, C. Kvam, “Application of Magnetic Beads in Bioassays” *Bio/Technology*, Vol. 11, pp. 60-63 (1993).
 48. C. K. G. Piyadasa, P. Håkansson, and T. R. Ariyaratne, “A High Resolving Power Multiple Reflection Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometer” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 13, pp. 620-624 (1999).

49. O. yanes, A. Nazabal, R. Wenzel, R. Zenobi, Francesc X. Aviles, "Detection of Noncovalent Complexes in Biological Samples by Intensity Fading and High - Mass Detection MALDI -TOF Mass Spectrometry" *Journal of Proteome Research*, Vol. 5(10), pp. 2711-2719(2006).
50. G. McCombie, R. Knochenmuss, "Small - Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect To Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences" *Analytical Chemistry*, Vol. 76(17), pp. 4990-4997(2004).
51. R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi, "The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix -assisted laser desorption/ionization" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 10(8), pp. 871-877(1996).
52. J. M. Asara and J. Allison, "Enhanced Detection of Oligonucleotides in UV MALDI MS Using the Tetraamine Spermine as a Matrix Additive" *Analytical Chemistry*, Vol. 71, pp. 2866-2870 (1999).
53. J. A. McLean, K. A. Stumpo, D. H. Russell, "Size - Selected (2-10 nm) Gold Nanoparticles for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization of Peptides" *Journal of Mass Spectrometry*, Vol.35, pp. 1278-1284 (2000).
54. E. P. C. Lai, S. Owega, R. Kulczycki, "Time -of- flight mass spectrometry of bioorganic molecules by laser ablation of silver thin film substrates and particles" *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 33(6), pp. 554-564(1998).
55. J. D. Cuiffi, D. J. Hayes, S. J. Fonash, K. N. Brown, A. D. Jone, "Desorption - ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films" *Analytical Chemistry*, Vol. 73(6), pp.1292- 1295(2001).
56. B. N. Y. Vanderpuije, G. Han, V. M. Rotello, R. W. Vachet, "Mixed

- Monolayer - Protected Gold Nanoclusters as Selective Peptide Extraction Agents for MALDI-MS Analysis” *Analytical Chemistry* ,Vol. 78(15), pp.5491-5496(2006).
57. K. Agrawal, H. F. Wu, “Bare silica nanoparticles as concentrating and affinity probes for rapid analysis of aminothiols, lysozyme and peptide mixtures using atmospheric-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol.22(3), pp.283-290(2008).
58. X. L. Kong, L. C. L. Huang, C. M. Hsu, W. H. Chen, C. C. Han, H. C. Chang, “High-Affinity Capture of Proteins by Diamond Nanoparticles for Mass Spectrometric Analysis” *Analytical Chemistry*, Vol.77, pp.259-265(2005).
59. W. Y. Chen, L. S. Wang, H. T. Chiu, Y. C. Chen, “ Carbon nanotubes as affinity probes for peptides and proteins in MALDI MS analysis” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* ,Vol.15(11), pp. 1629-1635(2004).
60. S. F. Ren, Y. L. Guo, “Carbon Nanotubes (2,5-Dihydroxybenzoyl Hydrazine) Derivative as pH Adjustable Enriching Reagent and Matrix for MALDI Analysis of Trace Peptides” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* , Vol.17(7), pp. 1023-1027(2006).
61. S. F. Ren, L. Zhang, Z. H. Cheng, Y. L. Guo, “Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI -TOF-MS analysis: Applications to neutral small carbohydrates” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* ,Vol. 16(3), pp. 333-339 (2005).
62. K. Shrivastava, H. F. Wu, “Modified silver nanoparticle as a hydrophobic affinity probe for analysis of peptides and proteins in biological

- samples by using liquid-liquid microextraction coupled to AP-MALDI-Ion trap and MALDI-TOF mass spectrometry” *Analytical Chemistry*, Vol. 80(7), pp. 2583-2589(2008).
63. C. H. Teng, K. C. Ho, Y. S. Lin, Y. C. Chen, “Gold Nanoparticles as Selective and Concentrating Probes for Samples in MALDI MS Analysis” *Analytical Chemistry*, Vol. 76, pp. 4337-4342(2004)
64. Y. F. Huang, H. T. Chang, “ Nile Red - Adsorbed Gold Nanoparticle Matrixes for Determining Aminothiols through Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry” *Analytical Chemistry*, Vol. 78(5), pp. 1485-1493(2006).
65. Y. F. Huang, H. T. Chang, “Analysis of Adenosine Triphosphate and Glutathione through Gold Nanoparticles Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry” *Analytical Chemistry*, Vol. 79(13), pp. 4852-4859(2007).
66. J. Wei, Y. Zhang, J. Wang, F. Tan, J. Liu, Y. Cai, X. Qian, “Highly efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic nanoparticles coated with zirconium phosphonate for phosphoproteome analysis” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 22(7), pp. 1069-1080(2008).
67. C. T. Chen, Y. C. Chen, “A two - matrix system for MALDI MS analysis of serine phosphorylated peptides concentrated by Fe₃O₄/Al₂O₃ magnetic nanoparticles” *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 43(4), pp. 538-541(2008).
68. C. T. Chen, W. Y. Chen, P. J. Tsai, K. Y. Chien, J. S. Yu, Y. C. Chen, “Rapid Enrichment of Phosphopeptides and Phosphoproteins from Complex Samples Using Magnetic Particles Coated with Alumina as the Concentrating Probes for MALDI MS Analysis” *Journal of Proteome Research*, Vol. 6(1), pp. 316-325(2007).
69. W. Y. Chen, Y. C. Chen, “MALDI MS Analysis of

- Oligonucleotides : Desalting by Functional Magnetite Beads Using Microwave-Assisted Extraction” *Analytical Chemistry* ,Vol.79(21), pp. 8061-8066(2007).
70. S.Lin, Z. Lin, G. Yao, C. Deng, P. Yang, X. Zhang, “Development of microwave - assisted protein digestion based on trypsin-immobilized magnetic microspheres for highly efficient proteolysis followed by matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis” *Rapid Communications in Mass Spectrometry* ,Vol. 21(23), pp. 3910-3918(2007).
 71. B. I. Haukanes, C. Kvam, “Application of Magnetic Beads in Bioassays” *Bio/Technology*, Vol. 11, pp. 60-63 (1993).
 72. K. M. Partington, E. J. Jenkinson, G. Anderson, “A Novel Method of Cell Separation Based on Dual Parameter immunomagnetic Cell Selection” *Journal of Immunological Methods*, Vol. 223, pp. 195-205 (1999).
 73. S. J. McLarnon, D. Holden, D. T. Ward, M. N. Jones, A. C. Elliott, D. Riccardi, “Aminoglycoside antibiotics induce pH-sensitive activation of the calcium-sensing receptor” *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,Vol. 297(1), pp. 71-77(2002).
 74. S. Sundar, T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha, S. K. Bhattacharya, “Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India” *New England Journal of Medicine* ,Vol. 356(25), pp. 2571-2581(2007).
 75. D. G. Mascher, C. P. Unger, H. J. Mascher, “Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC- MS / MS” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* ,Vol. 43(2), pp. 691-700(2007).
 76. B. H. Kim, Y. K. Kim, J. H. Ok, “Development of liquid chromatographic method for the analysis of kanamycin residues in varicella vaccine using phenylisocyanate as a derivatization reagent”

- Journal of Chromatography B*, Vol. 752(1), pp.173-177(2001).
77. I. Clarot , P. Chaimbault , F. Hasdenteufel , P. Netter , A. Nicolas,
 “Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection” *Journal of Chromatography A* ,Vol. 1031(1-2), pp. 281-287(2004).
 78. T. Hermann, V. Tereshko, E.Skripkin, Dinshaw J. Patel,
 “Apramycin recognition by the human ribosomal decoding site”
Blood Cells, Molecules, & Diseases, Vol. 38(3), pp. 193-198(2007).
 79. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, “Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem - mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum” *Journal of Chromatography A* ,Vol. 1058(1-2), pp. 197-201(2004).
 80. C. Y. Lu, C. H. Feng, “Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching”
Journal of Chromatography A ,Vol.1156(1-2), pp. 249-253(2007).
 81. David M. Benjamin, John J. McCormack, Dieter W. Gump, “Use of newer amino group reagents for the detection and determination of kanamycin” *Analytical Chemistry*, Vol. 45(8), pp. 1531-4(1973).
 82. F. Kondo, S. Hayashi, “Device and method for monitoring body fluid and electrolyte disorders” *Journal of Food Science* Vol.52, pp.96 (1989).
 83. A. Broughton, James E. Strong, Gerald P. Bodey,
 “Radioimmunoassay of sisomicin” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ,Vol.9(2), pp. 247-50(1976).
 84. I. A. Darwish, A. M. Mahmoud, A.-R. A. Al-Majed, “Generic simple enzyme immunoassay approach to avert small molecule immobilization problems on solid phases: Application to the

- determination of tobramycin in serum” *Talanta* ,Vol. 72(4), pp. 1322-1328(2007).
85. M. E. Jolley, S. D. Stroupe; C. H. Wang, H. N. Panas, C. L. Keegan, R. L. Schmidt, K. S. Schwenger, “Fluorescence polarization immunoassay I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma” *Clinical chemistry* ,Vol. 27(7), pp. 1190-7(1981).
 86. W. Haasnoot, P. Stouten, H. Cazemier, A. Lommen, J. F. M. Nouws, H.J. Keukens, "Search Algorithm for Minimum Reliability Index of Slopes" *Analyst*, Vol.124, pp. 301-308(1999).
 87. A. Y. Kolosova, A. N. Blintsov, J. V. Samsonova, A. M. Egorov, “Development of generic continuous-flow enzyme immunoassay system for analysis of aminoglycosides in serum” *Analytical Chemistry*, Vol.361, pp. 329-330(1998).
 88. R. Tawa, H. Matsunaga, T. Fujimoto, “High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics” *Journal of Chromatography A* ,Vol.812, pp. 141-150(1998).
 89. H. Liu, V. B. Sunderland, “Determination of Sulfate in Aminoglycoside Antibiotics by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* ,Vol. 27(4), pp. 677-687(2004).
 90. D. A. Stead, “Current methodologies for the analysis of aminoglycosides” *Journal of Chromatography B*, Vol.747, pp.69-93 (2000).
 91. P. J. Kijak, J. Jackson, B. Shaikh, “Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection” *Journal of Chromatography B*, Vol. 691, pp.377-382 (1997).
 92. L. L. Olson, J. Pick, W.Y. Ellis, P. Lim, J. Pharm. Biomed, “A

- chemical assessment and HPLC assay validation of bulk paromomycin sulfate” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.15, pp. 783-793(1997).
93. J. A. Reid, J. D. MacNeil, “Ion-association method for the colorimetric determination of neomycin sulphate in pure and dosage forms” *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 59, pp. 663-670(2003).
94. N. Haagsma, P. Scherpenisse, R.J. Simmonds, S.A. Woods, S.A. Rees, “High-performance liquid chromatographic determination of spectinomycin in swine, calf and chicken plasma using post-column derivatization” *Journal of Chromatography B*, Vol. 672, pp. 165-171 (1995).
95. A. A. Bergwerff, P. Scherpenisse, N. Haagsma, “HPLC determination of residues of spectinomycin in various tissue types from husbandry animals” *Analyst*, Vol.123, pp. 2139-2144(1998).
96. C. C. Lin, J. Veals, C. Korduba, M. J. Hilbert, A. Nomeir, “Analysis of isepamicin in human plasma by radioimmunoassay, microbiologic assay, and high-performance liquid chromatography” *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 19, pp. 675-681(1997).
97. M. Santos, E. Garcia, F. G. Lopez, J. M. Lanao, “Determination of netilmicin in plasma by HPLC ” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.13, pp.1059-1062(1995)
98. D. J. Sweeney, M. R. Coleman, “Determination of Apramycin in Swine Kidney Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection” *Journal of AOAC International*, Vol.81, pp. 1141-1145 (1998).
99. D. A. Stead, R. M. E. Richards, “Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid

- chromatography” *Journal of Chromatography B*, Vol. 675, pp. 295-302(1996).
100. J. Lu, M. Cwik, T. Kanyok, “Determination of paromomycin in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrofluorobenzene derivatization” *Journal of Chromatography B*, Vol. 695, pp. 329-335(1997).
101. H. Russ, D. McCleary, R. Katimy, J. L. Montana, R. B. Miller, R. Krishnamoorthy, C. W. Davies, “Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Tobramycin and Its Related Substances in an Ophthalmic Suspension” *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 21, pp.2165-2181(1998).
102. H. Abbasi, K. E. Hellenas, “Modified determination of dihydrostreptomycin in kidney, muscle and milk by HPLC ” *Analyst*, Vol. 123, pp. 2725-2727(1998).
103. X. Fang, J. Ye, Y. Fang, “Determination of polyhydroxy antibiotics by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nickel electrode” *Analytica Chimica Acta*, Vol. 329, pp. 49-55(1996).
104. M. I. Lopez, J. S. Pettis, I. B. Smith, P.-S. Chu, “Multiclass Determination and Confirmation of Antibiotic Residues in Honey Using LC-MS/MS ” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,Vol.56(5), pp. 1553-1559(2008).
105. D. N. Heller, J. O. Peggins, C. B. Nochetto, M. L. Smith, O. A. Chiesa, K. Moulton, “LC/ MS / MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine , milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals” *Journal of Chromatography, B*, Vol. 821(1), pp. 22-30 (2005).
106. C. Y. Lu, C. H. Feng, “Micro - scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid

- chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching” *Journal of Chromatography A* ,Vol. 1156(1-2), pp. 249-253(2007).
107. 本研究之奈米粒子是由中正大學王崇人老師實驗室所製備
108. J. W. slot, H. J. Geuze, J. Eur, “A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cyto-chemistry” *European Journal of Cell Biolog*, Vol. 38, pp. 87-93(1985).
- 109.G. Danscher, “A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy” *Histochemistry and Cell Biology*, Vol. 71, pp. 1-16(1981).
110. C. L. Su, W. L. Tseng, “Gold Nanoparticles as Assisted Matrix for Determining Neutral Small Carbohydrates through Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry” *Analytical Chemistry*, Vol.79(4), pp. 1626-1633(2007).
111. C. H. Teng, K. C. Ho, Y. S. Lin, Y. C. Chen, “Gold Nanoparticles as Selective and Concentrating Probes for Samples in MALDI MS Analysis” *Analytical Chemistry*, Vol.76, pp.4337-4342(2004)
- 112.S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo, “Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” *Analytical Chemistry*, Vol.75(22), pp. 6191-5 (2003).
113. D. P. Arya, R. L. Coffee, I. Charles, “Neomycin - Induced Hybrid Triplex Formation” *Journal of the American Chemical Society* , Vol. 123(44), pp. 11093-11094(2001).
114. J. M. Serrano, M. Silva, “Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine milk by MEKC with LIF detection” *Electrophoresis* ,Vol. 27(23), pp.4703-4710(2006).
115. P. S. Bonato, “Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis”

Electrophoresis ,Vol. 24(22-23), pp. 4078-4094(2003).