

發明專利說明書 2006222

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93141290

※申請日期：93.12.30

※IPC 分類：G01N30/72

一、發明名稱：(中文/英文)

金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法

METAL OXIDE-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS
SPECTROMETRY

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立交通大學

NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

張俊彥/CHANG, CHUN-YEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹市大學路 1001 號

1001 Ta-Hsueh Rd., Hsinchu, Taiwan R.O.C.

國籍：(中文/英文)

中華民國/R.O.C

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 陳月枝

2. 陳振泰

3. 林亞玄

國籍：(中文/英文)

1.~3. 中華民國/R.O.C

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：93 年 7 月 4 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種之不需外加基質、簡單快速且成本低廉的金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其係包括(a)以具有光吸收能力的無機金屬氧化物做為雷射脫附游離質譜法中輔助分析樣品進行脫附游離的基材，及(b)以檸檬酸緩衝溶液做為提供分析樣品質子化的來源。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種不需外加基質、簡單快速且成本低廉的金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法。

【先前技術】

質譜法 (Mass Spectrometry, MS) 是以各種不同的游離法將樣品分子氣化游離後，產生氣相離子或碎片離子，再經電場或磁場分離，經由質荷比之測量，依照質荷比的大小順序排列的圖譜、離子的質量，快速地決定關於分析物品或混合物試樣中各組成之分子質量、化學結構、元素分析等各種有價值數據的技術。

基質輔助雷射脫附游離 (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization, MALDI) 質譜法和電噴灑游離 (Electrospray Ionization, ESI) 質譜法是誕生於 1980 年代末期的新穎游離技術。由於它們具有高靈敏度和高質量偵測範圍的優點，使得質譜儀能夠用來鑑定分子量高達幾萬到幾十萬的巨大生物分子，並且能夠準確且快速地分析 fmol (10^{-15} mole) 甚至 amol (10^{-18} mole) 的微量樣品，從此質譜技術真正走入了生命科學的研究領域，造就了生化科技突破性的發展，並開啓了「蛋白質體學」的新時代。

MALDI 和直接雷射脫附 (Laser Desorption, LD) 質譜法的主要不同點在於：MALDI 的樣品中添加了可吸收特定雷射波長能量的有機小分子做為基質 (matrix)，藉以輔助樣品分子的脫附游離，也因此基質的選擇對分析的結果有決定性

的影響。雖然有許多相關的研究及改良的方法，可使 MALDI 在質量解析度、靈敏度和正確性上獲得極大的進展，但是在使用傳統基質上仍然存在著許多問題，例如樣品處理程序複雜，基質本身對分析物訊號造成的干擾，以及因為基質與分析樣品之間的互溶性不佳、共結晶化不良產生的訊號集中點 (Sweet spots)，導致分析結果的再現性偏低。

以無機材料做為輔助雷射脫附游離的發展歷程可以追溯到 1987 年由 K. Tanaka 以鈷金屬粉末 (粒徑約為 300 Å) 混以甘油為基質所發展的軟性雷射脫附質譜法 (Soft laser desorption, SLD)。而在 1995 年 Sunner 等人提出以微米大小的碳粉末當作吸收雷射能量及傳遞能量的媒介，可以取代鈷金屬在基質中所扮演的角色，稱為表面輔助雷射脫附游離質譜法 (Surface-assisted laser desorption/ionization, SALDI)。

近期以無機材料輔助雷射脫附游離的重要進展是在 1999 年 Siuzdak 等人發表了以具有 UV 吸收的多孔性矽基材作為基質而發展的矽表面直接脫附游離質譜法 (Desorption/Ionization On Silicon, 簡稱 DIOS)，即利用半導體製程技術加工的多孔性矽材做為雷射脫附游離質譜法中輔助分析樣品脫附游離的基材。由於多孔性矽材本身能夠吸收雷射的能量，因此在樣品製備的過程中並不需要添加傳統基質來輔助分析物的脫附游離，可以有效地避免基質對分析物訊號造成的干擾，適用於小分子的偵測。

然而，多孔性矽材的化學性質較不穩定，容易因氧化而失去作用，所以在一般保存及實際使用上有著許多的限制，

並且由於其加工製程繁複費時、生產成本較高，因此目前雖然已有商業化的產品上市，仍舊無法普及。再者，DIOS 並非完全沒有背景訊號產生，通常需要較高濃度的樣品(根據其商業化產品之使用說明約 $>50 \text{ pmol}$) 才有較佳的效果，而且也會觀察到如同使用傳統基質時訊號互相抑制的現象；一般 DIOS 的質量偵測上限約為 6 kDa 左右，並不適用於蛋白質等較大分子的偵測，並且由於其只能以薄膜型態點樣進行偵測，其應用性及選擇性也相對受限許多。

因此，亟待開發出一種不需要外加基質 (Matrix-free)、分析物分布均勻、簡單快速、成本低廉且型態多樣之雷射脫附游離質譜法，藉以有效改善使用傳統基質所造成的問題，並且具有較高的質量偵測範圍及較廣泛的應用性質。

【發明內容】

爲了改善上述使用傳統基質所可能衍生出之問題點，本發明人乃刻意地進行研究，發現：一種不需外加基質之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，至此始完成本發明。也就是說，本發明係提供一種不需要和分析物互溶及進行共結晶化，以具有光吸收能力的金屬氧化物材料，當做輔助樣品在雷射脫附游離中的無機基材之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法。

具體而言，本發明之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法是一種不需外加基質 (Matrix-free) 的質譜法，乃是利用金屬氧化物本身具有吸收雷射能量的特性。依照本發明，係可以在樣品中添加適當的質子化來源如檸檬酸緩衝溶液，藉以

有效地輔助樣品在雷射照射下的脫附游離，並且可以避免了使用甘油做為質子化來源時所造成的真空度下降的問題，同時也可以進行大量樣品的分析。又，依照本發明，分析樣品溶液可以直接點樣在金屬氧化物基材上，待乾燥後即可送入質譜儀進行分析，不需要外加基質和樣品互溶及進行共結晶化，因此可以有效降低使用傳統基質所造成的訊號互相抑制現象及訊號集中點的問題，並且簡化樣品的處理程序。

可以使用於本發明之具有吸光能力的金屬氧化物，舉例來說，例如其可以是二氧化鈦(TiO_2)、氧化鋅(ZnO)、二氧化錫(SnO_2)、二氧化鋯(ZrO_2)等金屬氧化物。在本發明中，較佳為使用具有強氧化能力、高化學性安定、而且不具毒性之二氧化鈦。另外，二氧化鈦的穩定性質佳，經過長時間的一般環境保存後仍然具有輔助分析物脫附游離的能力，不像 DIOS 晶片在多孔性矽材遇氧之後會被氧化而失去其效能，需要繁複的再處理程序，又且以溶膠凝膠的方法製備過程簡單快速且成本低廉；因此二氧化鈦非常適用於本發明。二氧化鈦是近年來相當熱門的光觸媒材料，也是一種半導體，分別具有銳鈦礦(Anatase)、金紅石(Rutile)及板鈦礦(Brookite)三種結晶結構，其中只有銳鈦礦結構具有光觸媒特性。

可以使用於本發明之二氧化鈦薄膜，舉例來說，例如其可以在製備二氧化鈦過程中添加適量的聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)，藉以得到經過高溫處理之具有多孔性且分布均勻的銳鈦礦晶型(Anatase)之二氧化鈦薄膜。依照本發明之方法，因為可以使樣品溶液均勻地分布在

二氧化鈦薄膜上，所以在進行分析時不會產生「訊號集中點」的不良情形，而且訊號互相抑制的現象也較不明顯。使用本發明做為二氧化鈦薄膜的基底材質，可以為鋁，只要是導電性質佳、有助於分析物的脫附游離之材料均可以使用，並沒有特別地限定，較佳為使用鋁。

二氧化鈦基材的背景訊號極少，可以偵測到約 70 fmol 的界面活性劑混合物，而沒有背景訊號的產生。又，在樣品溶液中加入高濃度的檸檬酸緩衝溶液，能夠提供分析物質子化的來源並有效地抑制鹽類加成物的訊號，因此所觀察到分析物的質譜圖以假分子離子訊號 (MH^+) 為主。以二氧化鈦薄膜輔助雷射脫附游離質譜法的質量偵測上限約為 24 kDa；當以胜肽做為分析樣品時的靈敏度約為 10~100 fmol 左右，而在偵測胰島素 (insulin) 時其靈敏度約為 900 amol。

以二氧化鈦基材目前的資料來比較，金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法的質量偵測上限優於 DIOS 技術，且在一般生化樣品的偵測上兩者的效果相去不多。然而由於此質譜法並不限定金屬氧化物的型態，即金屬氧化物薄膜及粉末皆具有吸收雷射能量及協助分析物脫附游離的效果，比起 DIOS 只能以薄膜的型態進行分析，金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法相對具有較廣泛且多樣性的應用性質。

【實施方式】

以下，列舉實施例更進一步詳細地說明本發明，然而本發明並未僅限定於此等實施例之物而已。

(製作例 1) 製備具有二氧化鈦薄膜之鋁片

首先，取四丁氧基鈦 (Titanium n-butoxide) 3.4 mL 與乙醇 1.6 mL 混合攪拌 30 分鐘後置入冰浴中，另外取乙醇 1.6 mL 與去離子水 0.18 mL 及 60% 的硝酸 75 μ L 混合均勻後緩慢地滴入前述溶液中並在冰浴環境下攪拌 10 分鐘後迅速加入聚乙二醇 (分子量 = 600) 使得四丁氧基鈦 : 聚乙二醇 = 1 : 2.5 (莫耳比)，將混合溶液置於室溫下攪拌 3 分鐘後再置於 40 $^{\circ}$ C 水浴下反應 30 分鐘而製得混摻聚乙二醇之二氧化鈦溶液。

然後，取鋁片 (2 cm x 2 cm x 0.2 mm)，以丙酮及甲醇超音波震盪清洗 5 分鐘，乾燥後將鋁片固定在旋轉塗佈機上，取 0.2 ml 的上述所製得的混摻聚乙二醇之二氧化鈦溶液，以 850 rpm/15 秒及 1500 rpm/10 秒的條件均勻塗佈在鋁片上，在室溫下乾燥 20 分鐘。然後，將此塗佈有混摻聚乙二醇之二氧化鈦溶液的鋁片置於高溫爐中，以 500 $^{\circ}$ C 高溫處理 1 小時後，取出鋁片在室溫下冷卻 5 分鐘而製得具有二氧化鈦薄膜之鋁片。

接著，進行光譜分析而得到如第 1 圖之吸收光譜圖。由吸收光譜圖的結果，可知本發明之二氧化鈦薄膜在 337 nm 波長下具有相當的吸收能力，證明上述所製得的該二氧化鈦薄膜能夠輔助分析樣品在 337 nm 波長之雷射照射下進行脫附游離。然後，以電子顯微鏡觀察上述所製得的二氧化鈦薄膜之表面，得到如第 2 圖所示之電子顯微鏡照片。觀察結果，顯示出此二氧化鈦薄膜具有多孔性質，其孔洞大小約為 10 nm，且晶粒分布十分均勻，因此能夠有效地降低訊號集中點的現象。

(配製例 1) 檸檬酸緩衝溶液 (C1) 之配製

配製一供偵測分子量小於 5000 Da 的分析物用之檸檬酸緩衝溶液 (C1)。取檸檬酸氫二銨 (diammonium hydrogen citrate) 及檸檬酸 (citric acid) 溶液，以檸檬酸氫二銨 (50mM)/檸檬酸 (100 mM)=3:1(體積比)之比例，室溫下充分攪拌混合而配置成 pH =4 之檸檬酸緩衝溶液 (C1)。

(配製例 2) 檸檬酸緩衝溶液 (C2) 之配製

配製一供偵測分子量大於 5000 Da 的分析物用之檸檬酸緩衝溶液 (C2)。取檸檬酸氫二銨及檸檬酸溶液，以檸檬酸氫二銨 (200mM)/檸檬酸 (200 mM)=5:1.1(體積比)之比例，室溫下充分攪拌混合而配置成 pH =4.5 之檸檬酸緩衝溶液 (C2)。

(實施例 1)

首先，配製一由溴化十六基三甲基銨 (C_{16}^+ , 68 fmol)、溴化十四基三甲基銨、(C_{14}^+ , 74 fmol) 溴化十二基三甲基銨 (C_{12}^+ , 80 fmol) 以及溴化癸基三甲基銨 (C_{10}^+ , 90 fmol) 等四種不同碳鏈長的陽離子型界面活性劑所組合而成之混合溶液做為分析樣品 (D1)。

其次，將製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片固定在 MALDI 承載樣品用的樣品盤上，然後取 0.2 μ L 之分析樣品 (D1) 直接點樣在該二氧化鈦薄膜上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 3 圖所示之質譜圖。質荷比 (m/z)=284、256、228、200 分別為分析樣品失去一個溴分子的離子訊號，而其碎片 $NH(CH_3)_3^+$ 訊號則出現在質荷比

(m/z)=60。由此結果顯示：陽離子型界面活性劑本身十分容易游離，可以直接點樣進行分析而不需要添加檸檬酸緩衝溶液做為質子化的來源，並且沒有觀察到二氧化鈦的背景訊號。

(實施例 2)

首先，配製一由配製例 1 所製得的檸檬酸緩衝溶液 (C1)、和濃度為 940 fmol 的緩動素 (Bradykinin)，以緩動素：檸檬酸緩衝溶液 = 1:1 (體積比) 之比例充分攪拌所形成之混合溶液做為分析樣品 (D2)。

其次，將製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片固定在 MALDI 承載樣品用的樣品盤上，然後將 0.2 μ L 之上述分析樣品 (D2) 點樣在該二氧化鈦薄膜上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 4 圖所示之質譜圖。結果顯示：由於檸檬酸緩衝溶液能夠提供質子化來源並有效地抑制鹽類加成物的訊號，因此可以觀察到緩動素的假分子離子訊號 (M_bH^+) 為圖譜中主要的離子峰。又，質荷比 (m/z) = 39、70、231、269 分別為 K^+ 、 AlO^+ 和檸檬酸之鉀離子加成物 ($[M+K^+]^+$ 、 $[M-H^++2K^+]^+$) 的訊號。

(實施例 3)

首先，配製一由配製例 2 所製得的檸檬酸緩衝溶液 (C2)、和濃度為 8.7 pmol 的胰島素，以胰島素：檸檬酸緩衝溶液 = 1:1 (體積比) 之比例充分攪拌所形成之混合溶液做為分析樣品 (D3)。

其次，將製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片，

保存在乾燥皿中 (a)一天 (b)十五天 (c)三十天，而得到的鋁片 (a)、(b)及 (c)。然後，將該鋁片 (a)、(b)及 (c)分別固定在 MALDI 承載樣品用的樣品盤上，接著將 0.2 μ L 之上述分析樣品 (D3)點樣在該鋁片 (a)、(b)及 (c)之二氧化鈦薄膜上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 5 圖所示之質譜圖。結果發現：二氧化鈦薄膜在經過長時間的保存後依然能夠具有輔助分析樣品脫附游離的功能，因而皆能夠觀察到胰島素的假分子離子訊號 (M_iH^+)。

(實施例 4)

首先，配製一由配製例 2 所製得的檸檬酸緩衝溶液 (C2)、和濃度為 8.5 pmol 的胰蛋白酶原 (Trypsinogen)，以胰蛋白酶原：檸檬酸緩衝溶液 = 1:1 (體積比)之比例充分攪拌所形成之混合溶液做為分析樣品 (D4)。

其次，將製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片固定在 MALDI 承載樣品用的樣品盤上，然後將 0.2 μ L 之上述分析樣品 (D4)點樣在該二氧化鈦薄膜上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 6 圖所示之質譜圖。結果顯示：使用本發明二氧化鈦薄膜可以成功地進行偵測胰蛋白酶原，這也是目前此二氧化鈦薄膜輔助雷射脫附游離質譜法的最高偵測質量。又，在第 6 圖中除了觀察到胰蛋白酶原的假分子離子訊號 (M_iH^+) 外，尚可以觀察到雙價離子 ($[M_i+2H]^{2+}$) 及三價離子 ($[M_i+3H]^{3+}$) 的訊號，而質荷比 (m/z) = 13802 是胰蛋白酶原自行消化反應產生的片段訊號。

(實施例 5)

首先，配製一由配製例 2 所製得的檸檬酸緩衝溶液 (C2)、和濃度為 10^{-5} M 的細胞色素 C (Cytochrome C) 經過胰蛋白酶 (trypsin) 消化反應後的胜肽片段，以胜肽片段：檸檬酸緩衝溶液 = 1:1 (體積比) 之比例充分攪拌所形成之混合溶液做為分析樣品 (D5)。

其次，使用傳統基質 (a) 芥子酸 (濃度為 20 mg/mL) (b) α -氫 -4-羥基肉桂酸 (飽和溶液) (c) 2,5-二羥基苯甲酸 (濃度為 30 mg/mL) 及 (d) 依製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片進行分析。傳統基質 (a), (b), 及 (c) 皆配置於乙晴 (acetonitrile)：水 = 2:1 (體積比) 並含有 0.1% 三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid) 的混合溶液中，將胜肽片段與傳統基質 (a), (b), 及 (c) 以體積比 = 1:1 之比例充份混合後，取 0.2 μ L 之混合溶液直接點樣在 MALDI 的樣品盤上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 7 圖所示 (a), (b), 及 (c) 之質譜圖。然後，將製作例 1 所製得的具有二氧化鈦薄膜的鋁片固定在 MALDI 承載樣品用的樣品盤上，並將 0.2 μ L 之上述分析樣品 (D5) 點樣在該二氧化鈦薄膜上，待乾燥後以 MALDI 質譜儀進行質譜分析，而得到如第 7 圖所示 (d) 之質譜圖。結果顯示：由於分析樣品能夠均勻地分散在本發明之二氧化鈦薄膜，因此與傳統基質分析所得到的質譜圖相較能夠觀察到較多的離子訊號，即有效地降低傳統基質所產生的訊號互相抑制的問題。而將二氧化鈦薄膜分析所得的胜肽片段訊號送入蛋白質資料庫進行比對，結果可以比對到具有可信賴性的目標細胞色素 C，顯示本發明之二氧化鈦薄膜能夠

成功地應用於蛋白質體學的研究。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明製作例 1 所製得經過高溫處理後的混摻聚乙二醇之二氧化鈦薄膜的吸收光譜圖。

第 2 圖為本發明製作例 1 所製得經過高溫處理後的混摻聚乙二醇之二氧化鈦薄膜的電子顯微鏡照片。

第 3 圖是依照本發明實施例 1 偵測分析陽離子型界面活性劑溶液所得之質譜圖。

第 4 圖是依照本發明實施例 2 偵測分析緩動素所得到之質譜圖。

第 5 圖是依照本發明實施例 3 偵測分析胰島素所得到之質譜圖。

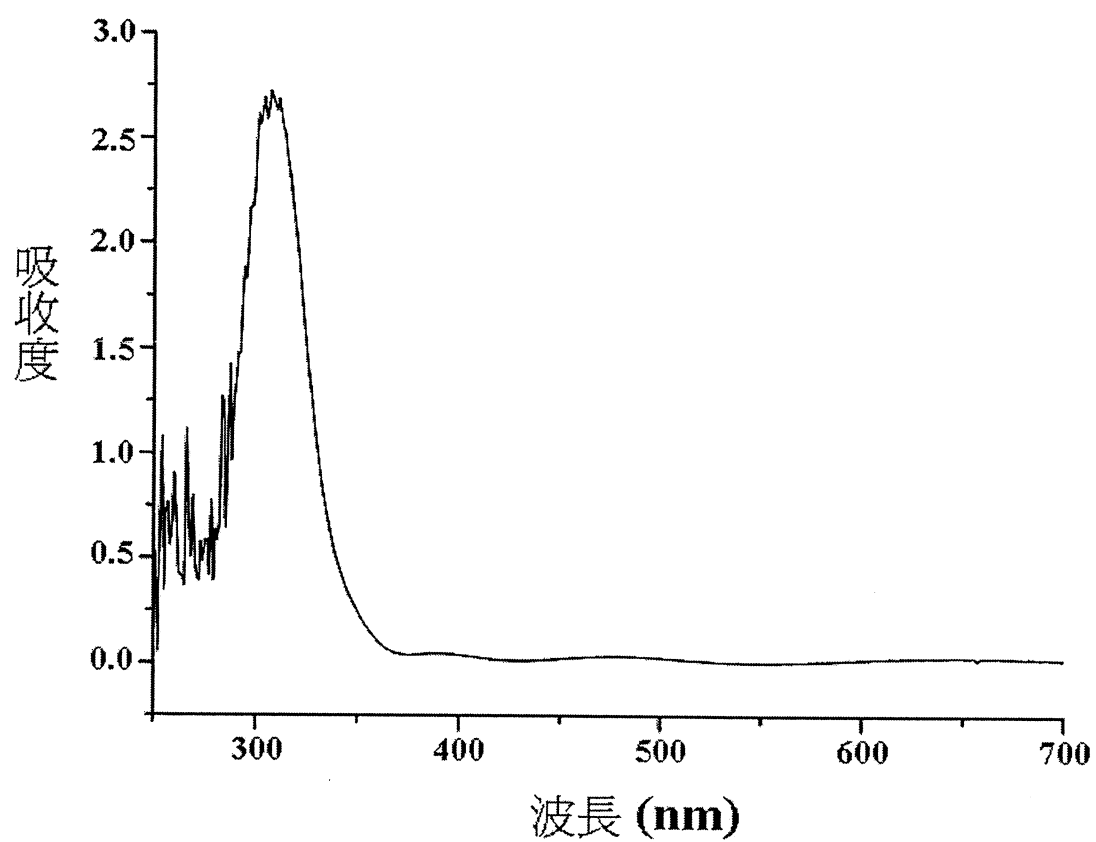
第 6 圖是依照本發明實施例 4 偵測分析胰蛋白酶原所得到之質譜圖。

第 7 圖是依照本發明實施例 5 偵測分析細胞色素 C 消化反應後的胜肽片段所得到之質譜圖。

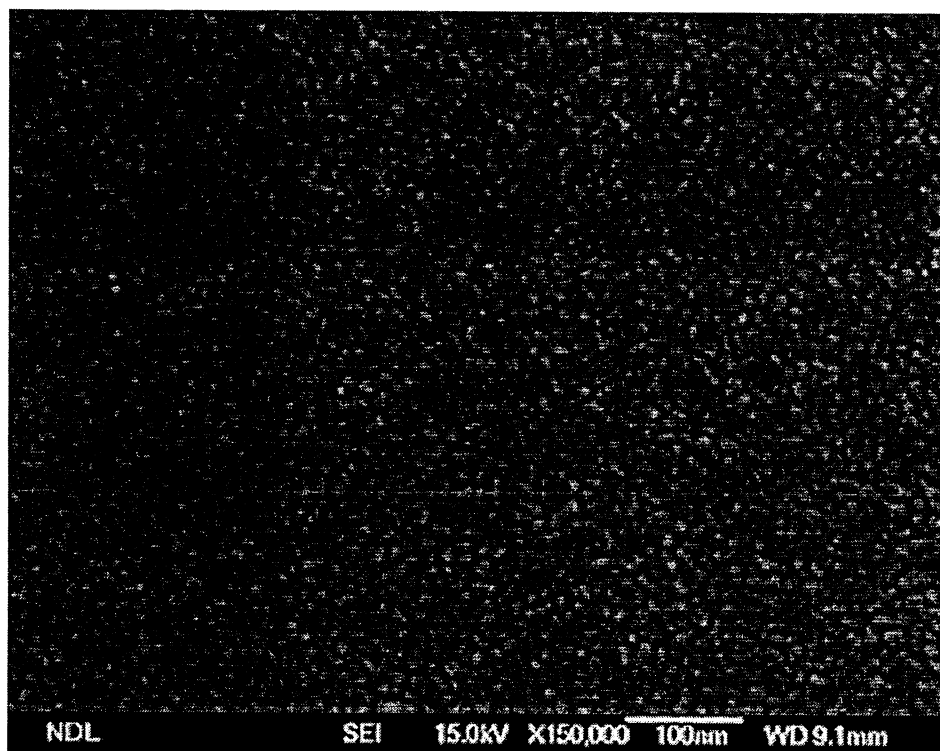
十、申請專利範圍：

1. 一種金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其係包括：
 - (a) 以一具有光吸收能力之金屬氧化物材料做為輔助雷射脫附游離質譜法的基材；以及
 - (b) 以檸檬酸緩衝溶液做為提供分析樣品質子化的來源。
2. 如申請專利範圍第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其中金屬氧化物材料具有紫外光至紅外光波長範圍的吸收能力。
3. 如申請專利範圍第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其中所使用的雷射波長為紫外光至紅外光範圍。
4. 如申請專利第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其係不需要外加有機基質(matrix-free)。
5. 如申請專利第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其係直接以基質輔助雷射脫附游離質譜儀(MALDI-MS)進行分析。
6. 如申請專利第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其中雷射係使用高於傳統基質輔助雷射脫附游離質譜法所需之能量。
7. 如申請專利第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其中分析樣品係與檸檬酸緩衝溶液混合後直接以金屬氧化物進行質譜分析。
8. 如申請專利第 1 項之金屬氧化物輔助雷射脫附游離質譜法，其中金屬氧化物經過表面修飾或改質後仍然具有輔助分析物脫附游離之能力。

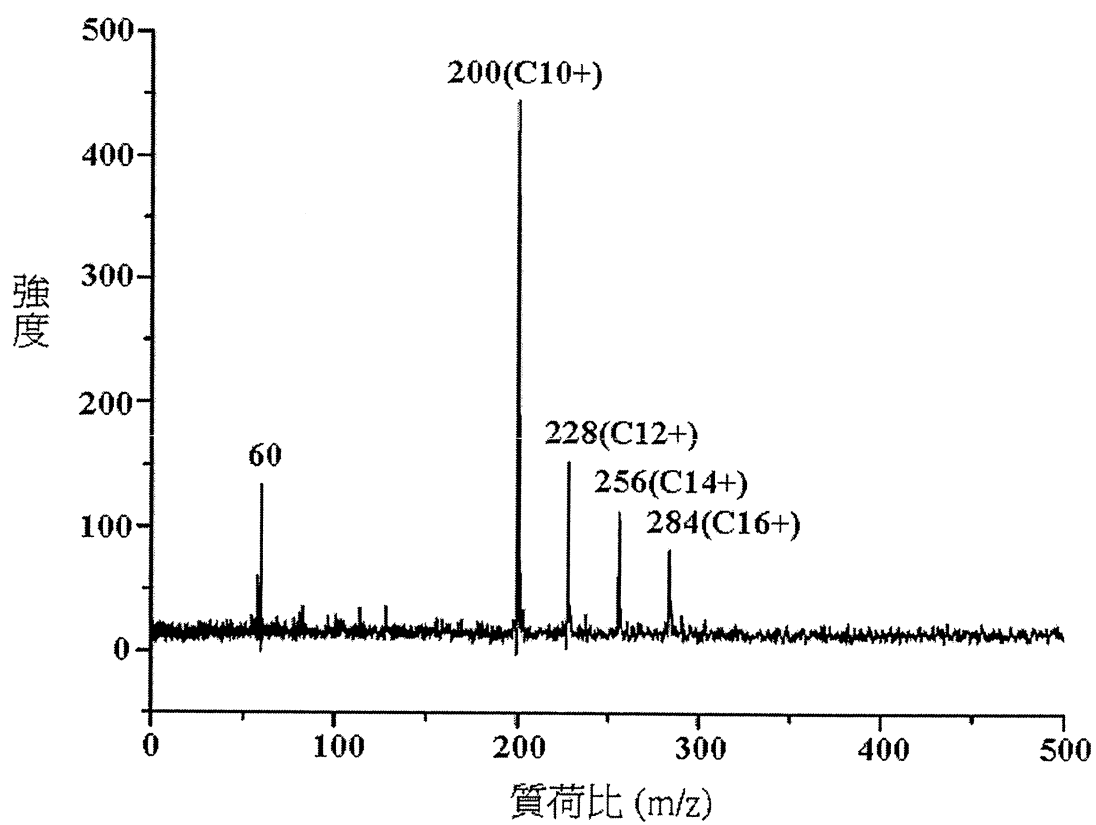
十一、圖式：



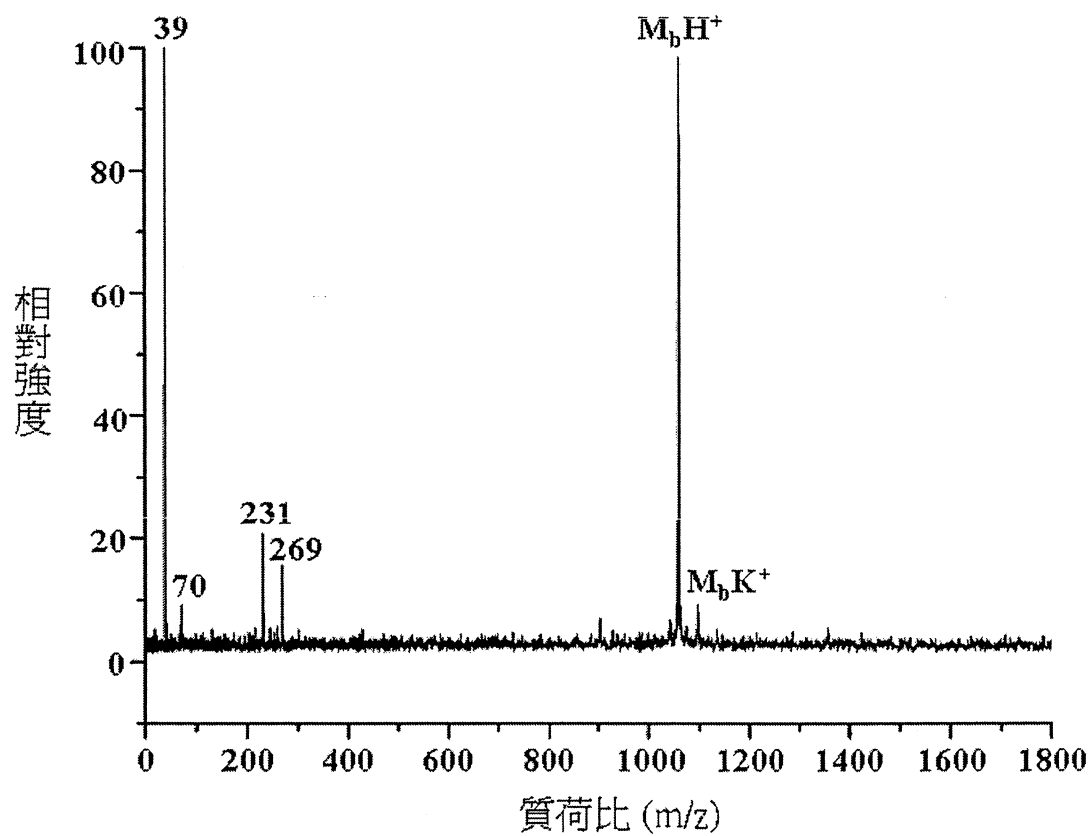
第 1 圖



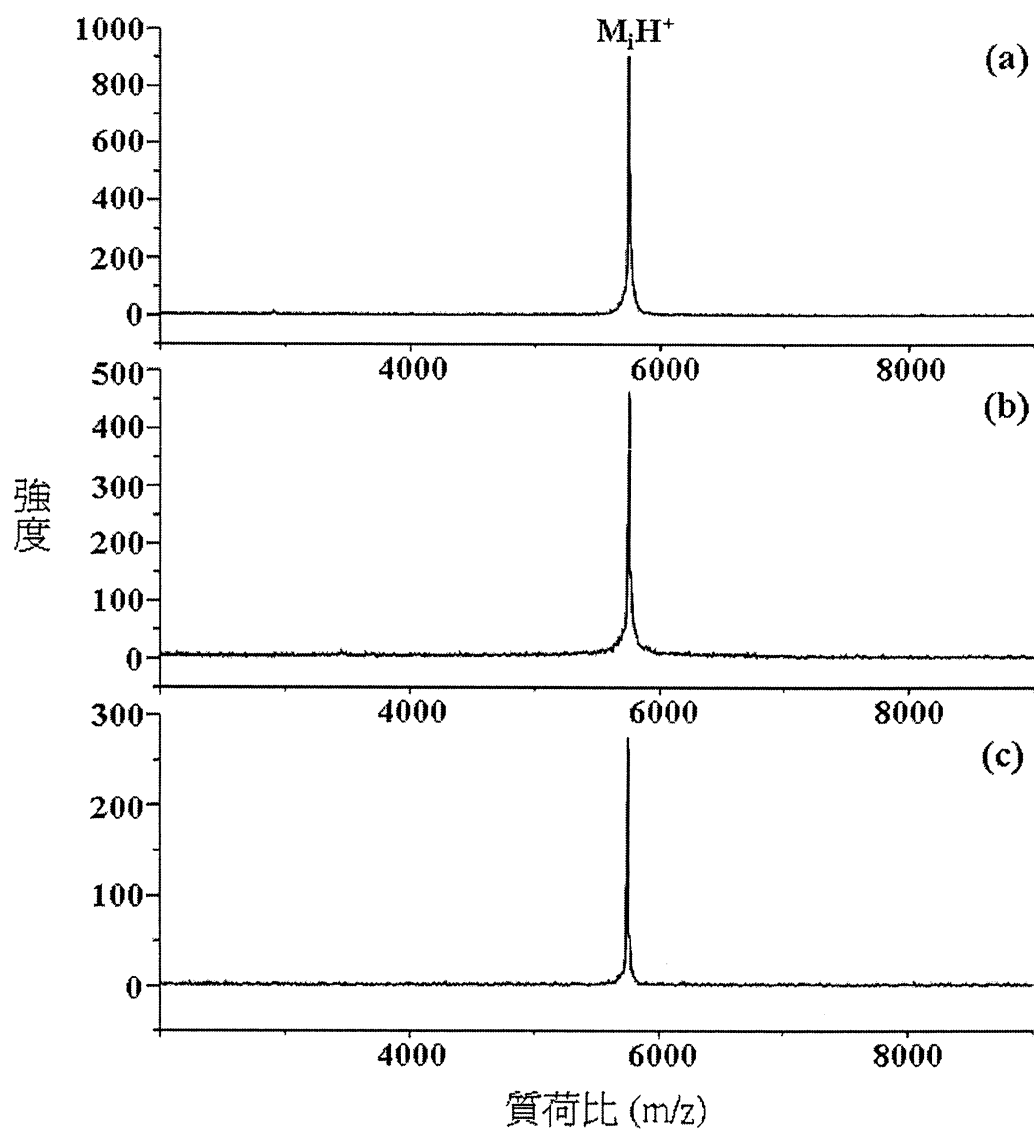
第 2 圖



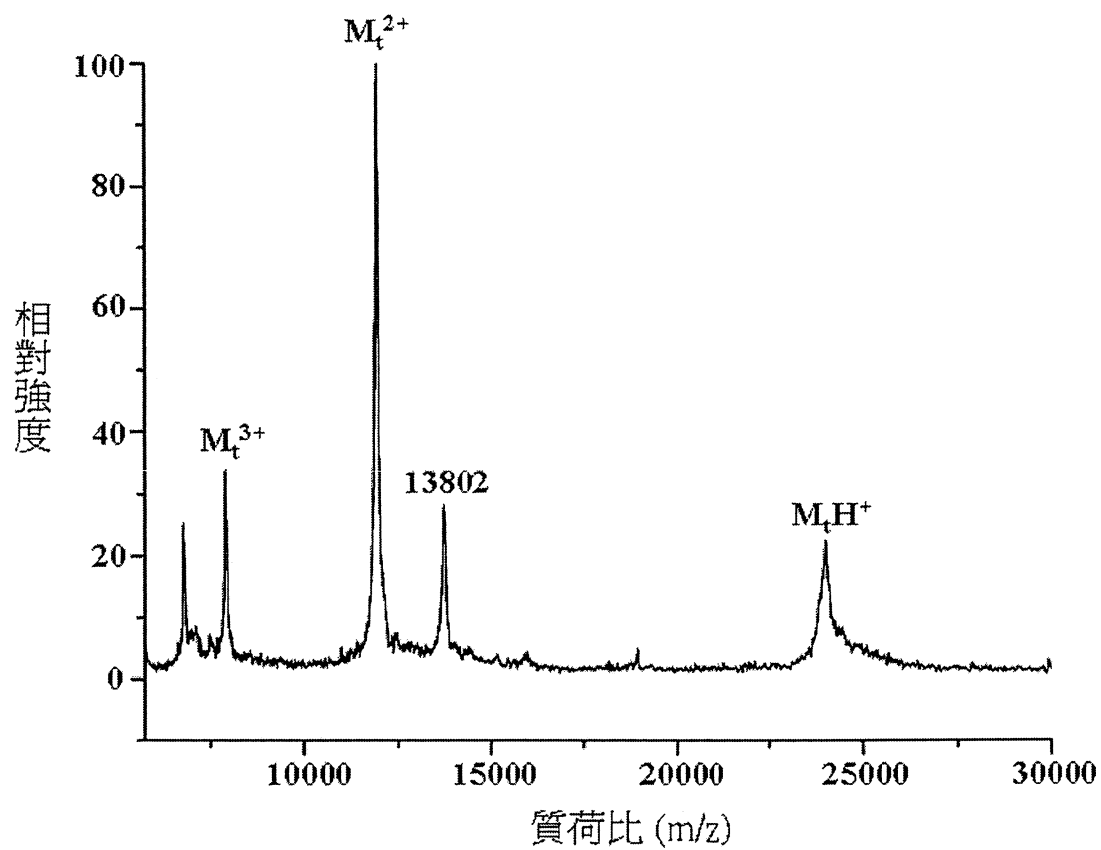
第 3 圖



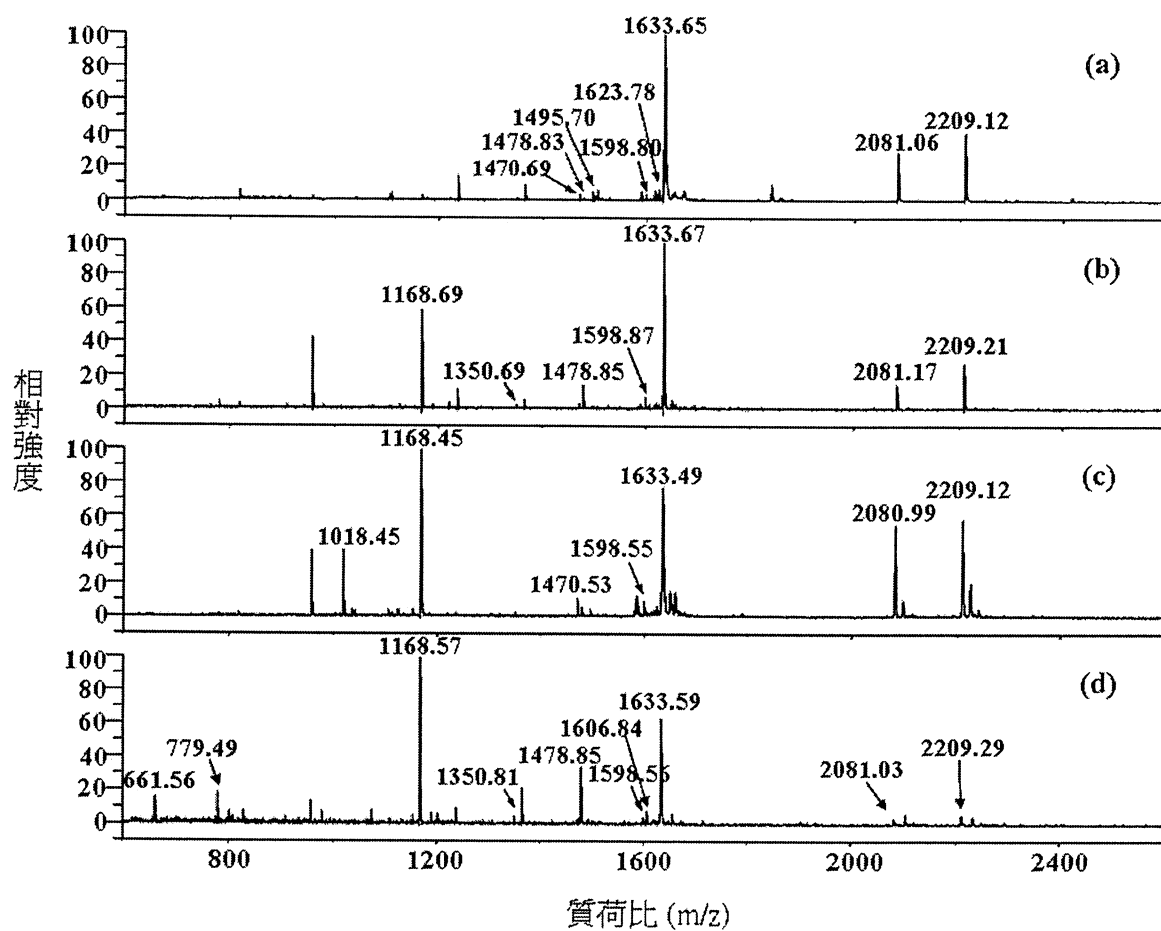
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖