

國立交通大學

應用化學學系

碩士論文

二氧化鈦溶膠凝膠材料輔助雷射脫附游離質譜法之研究

Study of TiO₂-sol-gel assisted laser desorption/ionization
mass spectrometry

指導教授：陳月枝 博士

研究生：陳振泰

中華民國九十二年七月

二氧化鈦溶膠凝膠材料輔助雷射脫附游離質譜法之研究

學生：陳振泰

指導教授：陳月枝 博士

國立交通大學應用化學系研究所 碩士班

摘要

基質輔助雷射脫附游離質譜法已被廣泛地使用於各類型樣品的分析，而用以輔助樣品脫附游離之基質的選擇，常常決定了分析結果的好壞。而使用傳統基質輔助樣品之分析時，需要考慮到基質是否可和分析物具有很好的互溶性，及基質是否和分析物形成良好的共同結晶。為了改善傳統基質之使用可能衍生出的問題，本論文嘗試以溶膠凝膠法合成的無機二氧化鈦薄膜，當做輔助樣品在雷射脫附游離中的基材，此無機基材並不需要和樣品互溶及進行共結晶化，所以可以改善傳統基質使用上的缺點，並且可以簡化樣品的處理程序。目前本論文發展的這個方法質量上限可達 8.5 kDa 左右，但在低分子量範圍仍有二氧化鈦薄膜自身產生的背景離子，故較適合用於分子量大於 500 Da 分析物的分析。

為了改善此方法之偵測靈敏度，本論文也探討二氧化鈦薄膜表面性質對輔助樣品脫附游離的影響，結果發現添加聚乙二醇於二氧化鈦薄膜中並經過高溫 500°C 處理後，會使得薄膜表面粗糙度增加，並且使得薄膜在波長 337 nm 的吸收率上升，在質譜中的分析物的訊號強度因而得以增強。

除此之外，因為二氧化鈦溶膠凝膠材料是一良好的分子轉印材料，所以本論文也嘗試使用二氧化鈦輔助溶膠凝膠雷射脫附游離質譜法，用以發展分子辨識質譜法。在論文中以 α 型環糊精分子為轉印分子，即將 α 型環糊精分子混入二氧化鈦溶膠凝膠材料中，並將此混成材料塗佈在玻璃片上形成薄膜後，再利用水洗法將 α 型環糊精分子洗去，而留下具有 α 型環糊精分子結構孔洞的薄膜，用以當做辨識 α 型環糊精之模板。利用此模板為探針親合萃取 α 型環糊精，並直接以質譜法為偵測方法，實驗結果顯示具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦薄膜可專一選擇水中微量的 α 型環糊精分子。除了孔洞結構可讓 α 型環糊精嵌入外，孔洞表面的羥基可能可以藉由氫鍵作用力親和固定 α 型環糊精分子於孔洞中，此方法對 α 型環糊精的辨識最低濃度為 50 ppb (18ml)。

Study of TiO₂-Sol-Gel Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Student: Cheng-Tai Chen

Advisor: Dr. Yu-Chie Chen

Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University

Hsinchu 300, Taiwan

ABSTRACT

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) has been widely used in the analysis for various types of analytes. The analysis results mainly rely on the selections of MALDI matrices. The solubility and co-crystallization between analytes and matrices are the major concerns in MALDI analysis. A new matrix system was developed to replace the usage of conventional MALDI matrix to avoid these problems. The TiO₂ sol-gel-deposited thin film was employed as the sample substrate to assist the UV laser desorption/ionization of analytes in laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. Only one step of sample preparation by simply depositing the analytes on the TiO₂ film was required before sending the sample into the mass spectrometer. Thus, the concerns about the solubility and co-crystallization between analytes with matrices do not arise in this approach. The detectable molecule with the greatest molecular weight was about 8.5 kDa. Owing to the strong interference contributed by the TiO₂ film in the low-mass region, this approach is only suitable for molecular sizes with masses larger than 500 Da.

It was also found that the roughness on the surface of the TiO₂ film might affect the detection limit in the analysis. Various amounts of polyethylene glycol (PEG) were added into the TiO₂ sol during sol-gel process. The TiO₂ sol-gel/PEG hybrid material was spin-coated on a glass slide. PEG in the TiO₂ film was removed during heated at a temperature of 500°C, which resulted in generating a rough surface for the TiO₂ film. Furthermore, the absorption capacities of the TiO₂ films were increased as the degree of the roughness increased at a wavelength of 337 nm. The intensities of analytes signals in the MALDI mass spectra were enhanced when the analytes was desorbed from a TiO₂ film with a rougher surface.

Additionally, owing to the characteristic of TiO₂-sol-gel being a good molecularly imprinted material, a molecular recognition-based mass spectrometry based on using TiO₂-sol-gel as the molecular-imprinting material was developed. α -Cyclodextrin (CD) was selected as the template molecule and doped into the TiO₂-sol-gels in a sol-gel reaction. The molecularly imprinted TiO₂ sol was spin-coated on a glass slide, and appropriate template cavities in the TiO₂ sol-gel material were formed after the template molecules were removed. This modified glass slide can be used to select α -CD from a sample solution; α -CD was directly detected from the modified glass slide by TiO₂ sol-gel assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. In addition to size complementarity between α -CD and the cavities imprinted in the TiO₂ film, it is believed that the hydroxyl groups located around the binding pocket are involved in discriminating between analytes through significant hydrogen bonding interactions. The detectable concentration for α -CD was about 50 ppb for an 18mL of sample solution.

誌 謝

看著螢幕發呆，思緒卻空白了好久，這篇論文寫到這裡，是該結束的時候了。努力回想過往的歲月，剛退伍的徬徨、考進交大的欣喜、無法畢業的挫折與壓力，竟是如此雲淡風清。

人生似乎有做不完的選擇題，得與失卻像是無解的是非題。很慶幸也很感謝 陳月枝 老師，在我失意無助的時候，願意提供這樣的機會給沒有分析化學背景的我，並且在生活和實驗中熱心地給予我許多幫助和指導，也才有這篇論文的誕生。同時也要衷心感謝 余艇 老師、李積琛 老師及陳俊顯 老師對本論文的悉心指正與建議，使得本論文更趨正確與完善。

對於家人，除了滿心的感謝之外，還有許多的抱歉。謝謝我的父親，在人生轉彎的地方，給我全心的支持與鼓勵；謝謝我的母親，能夠諒解我的忙碌與壓力，沒有太多的時間陪陪您；謝謝我一對可愛又貼心的妹妹，都能夠陪在爸媽身邊分憂解勞，讓我沒有後顧之憂，可以全心全意在實驗室裡打拼。

三百多個日夜晨昏裏，感謝實驗室的夥伴們給我許許多多的幫助。亞玄、阿雄、威佑、小建、坤展、蕙筠、阿伯、茂峰和逸婷，因為有你們點點滴滴的累積，才能匯集成這篇論文的字字句句。特別要謝謝的是逸婷，一直陪在我身邊，幫我加油打氣，否則也許在許多關頭，我早就放棄了，真的謝謝妳！

實驗總是難以想像，總是會有許多的挑戰，總是會讓我有一種想要去一探究竟的欲望。僅以此篇論文，獻給我所愛的和愛我的人。

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝	III
目錄	IV
圖表目錄	IX

壹、緒論	1
一、前言	1
二、MALDI-TOF MS 的背景介紹	3
2-1 MALDI 的發展歷史	3
2-2 基質的特性與功能	4
2-3 樣品在 MALDI 中的脫附游離機制	8
2-4 MALDI 中形成的離子特徵	11
2-5 飛行時間質量分析儀 (TOF) 的原理	12
2-6 MALDI-TOF 的優點	13
2-7 影響分析物訊號的因素	14
三、溶膠凝膠材料	16
3-1 溶膠凝膠材料的發展歷程與現況	16
3-2 溶膠凝膠材料的合成	17
3-2-1 酸性條件下 ($\text{pH} < 3$) 的水解縮合反應機構	18
3-2-2 中性及鹼性條件下的水解縮合反應機構	18
3-2-3 聚合反應機構	19
3-2-4 催化與反應速率	19

3-2-5 影響溶膠凝膠反應的因素·····	20
四、分子轉印技術與分子辨識·····	22
4-1 分子轉印技術與分子辨識的概念·····	22
4-2 分子辨識的原理·····	23
4-3 分子轉印技術的類型·····	24
4-3-1 分子轉印高分子·····	24
4-3-2 溶膠凝膠分子轉印材料·····	26
4-4 分子轉印技術的應用與發展·····	28
4-4-1 感測器應用·····	28
4-4-2 配位基鍵結分析·····	29
4-4-3 分離方法·····	29
4-4-4 樣品預濃縮·····	30
4-5 分子辨識的方法與盲點·····	30
4-6 分子轉印技術發展的挑戰·····	31
五、無機材料輔助雷射脫附游離的發展·····	33
5-1 無機材料輔助雷射脫附游離質譜法之發展歷程·····	33
5-2 溶膠凝膠材料輔助雷射脫附游離質譜法之研究·····	33
5-3 二氧化鈦的簡介·····	34
5-4 鈦系化合物為基質的發展歷程·····	36
六、論文目標·····	38
貳、實驗·····	39
一、實驗藥品及材料·····	39
二、實驗儀器·····	40

三、實驗步驟與流程	40
3-1 二氧化鈦溶膠凝膠材料	40
(1) 二氧化鈦溶液的合成	41
(2) 二氧化鈦溶膠凝膠薄膜的製備	41
(3) 測試二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助雷射脫附質譜法的基材	41
3-2 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 Polyethylene glycol (PEG) 之實驗設計	42
(1) 二氧化鈦溶液混摻 PEG	42
(2) 薄膜的製備	43
(3) 高溫處理	43
(4) 二氧化鈦薄膜的吸光性質及厚度的偵測	43
(5) 測試二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助雷射脫附質譜法的基材	43
3-3 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻環糊精模板分子實驗設計	44
(1) 二氧化鈦溶液混摻環糊精	44
(2) 薄膜的製備	45
(3) 利用水洗法移除在二氧化鈦溶膠凝膠上的 α 型環糊精	45
(4) 直接點樣偵測	45
(5) 進行分子辨識的程序，並以雷射脫附質譜法為偵測方法	45
3-4 MALDI 質譜儀的操作條件	46

參、結果與討論	47
一、二氧化鈦溶膠凝膠材料	47
(1) 二氧化鈦薄膜做為基質的可行性	47
(2) 二氧化鈦薄膜的特性	52
(3) 以二氧化鈦薄膜為乘載 MALDI 樣品的基材在 MALDI 的偵測極限	52
二、二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 所製造之薄膜表面性質探 討	55
(1) 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 PEG 的特性	55
(2) 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 PEG 後的薄膜表面型 態	55
(3) 二氧化鈦溶膠凝膠薄膜經過高溫處理後的 UV 吸 收	56
(4) 二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 之薄膜經過高溫處理 後的 UV 吸收	57
(5) 薄膜的性質對分析物訊號強度的影響	63
三、二氧化鈦溶膠凝膠材料分子辨識模板之製造	73
(1) 以二氧化鈦溶膠凝膠材料轉印 α 型環糊精分子	73
(2) 以環糊精為分析物直接以已洗去 α 型環糊精的二 氧化鈦為 MALDI 基質分析之偵測極限探討	74
(3) 以洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜為分子辨識探 針親和萃取水中微量之 α 型環糊精	74
(4) 以二氧化鈦薄膜為萃取探針對環糊精分子萃取能 力之探討	84

(5) 混合溶液的辨識能力.....	84
(6) 萃取時間對分子辨識效果的影響.....	85
(7) 分子構形大小對分子辨識效果的影響.....	85
肆、結論.....	97
伍、未來展望.....	99
參考文獻.....	100

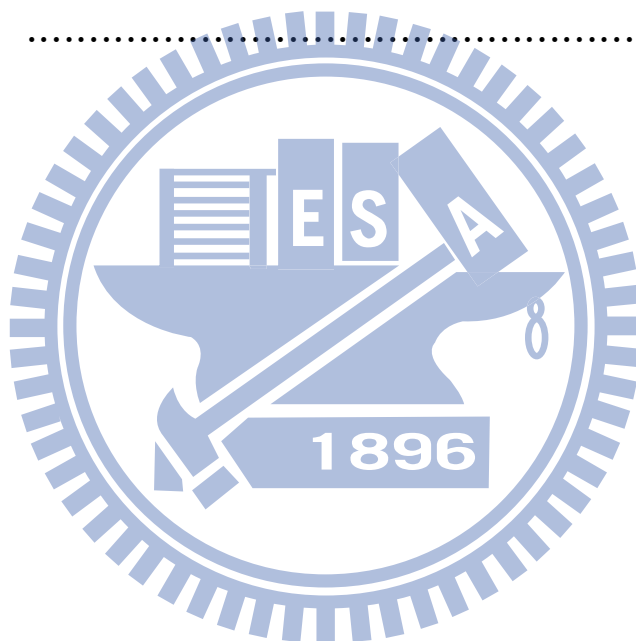


圖 表 目 錄

表一、常用的 MALDI 基質及適用的分析物.....	7
表二、銳鈦礦與金紅石的基本物理性質.....	35
表三、不同二氧化鈦薄膜在波長 337 nm 的吸收率比較.....	65
圖 1、分子轉印高分子原理示意圖.....	25
圖 2、分子轉印高分子錯合物的形成方式.....	26
圖 3、以二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為 MALDI 之基質的實驗流程圖.....	42
圖 4、製作不同表面粗糙度二氧化鈦薄膜之實驗流程圖.....	44
圖 5、以二氧化鈦溶膠凝膠材料轉印 α -CD 分子的實驗流程圖.....	46
圖 6、TiO ₂ 薄膜的 UV-vis 吸收光譜圖.....	49
圖 7、以 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基 材的 MALDI 質譜圖.....	49
圖 8、以 PP 為容器合成之 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖.....	50
圖 9、以 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Insulin (1000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基材在 Linear 模式下操作所得的 MALDI 質譜圖.....	50
圖 10、以 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Insulin (3000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基材在 Reflectron 模式下操作所得的 MALDI 質譜圖.....	51
圖 11、以 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Ubiquitin (1000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基材 的 MALDI 質譜圖.....	51
圖 12、以 TiO ₂ 薄膜為輔助 MALDI 分析在 MALDI 質譜圖中之背景圖	53
圖 13、以 TiO ₂ -sol-gel 為輔助 Bradakinin (190 fmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖.....	53

圖 14、以 TiO_2 -sol-gel 為輔助 Insulin (340 fmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖	54
圖 15、以 TiO_2 -sol-gel 為輔助 Ubiquitin (11.6 pmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖	54
圖 16、組成為 TiO_2 :PEG2000=100:1 (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖	58
圖 17、組成為 TiO_2 :PEG2000=100:1 (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖	58
圖 18、組成為 TiO_2 :PEG400=1:1 (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖	59
圖 19、組成為 TiO_2 :PEG400=1:1 (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖	59
圖 20、二氧化鈦薄膜之 AFM 圖	60
圖 21、以 TiO_2 :PEG400=1:2 為溶膠凝膠組成之薄膜表面 AFM 圖	60
圖 22、二氧化鈦溶膠凝膠薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收圖	61
圖 23、二氧化鈦溶膠凝膠粉末經過高溫處理後的 x 光繞射圖	61
圖 24、二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 之薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收圖	62
圖 25、以 Prometryn (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品、二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO_2 (b) TiO_2 :PEG400=1:0.5 (c) TiO_2 :PEG400=1:1 (d) TiO_2 :PEG400=1:1.5 (e) TiO_2 :PEG400=1:2 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖	66

圖 26、以 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO ₂ (b) TiO ₂ :PEG400=1:0.5 (c) TiO ₂ :PEG400=1:1 (d) TiO ₂ :PEG400=1:1.5 (e) TiO ₂ :PEG400=1:2 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	67
圖 27、以 Melittin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO ₂ (b) TiO ₂ :PEG400=1:0.5 (c) TiO ₂ :PEG400=1:1 (d) TiO ₂ :PEG400=1:1.5 (e) TiO ₂ :PEG400=1:2 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	68
圖 28、二氧化鈦薄膜厚度的 SEM 圖.....	69
圖 29、經過高溫處理後的 TiO ₂ 薄膜的 MALDI 背景質譜圖.....	70
圖 30、以 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO ₂ : PEG 400= 1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	70
圖 31、以 Melittin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO ₂ :PEG400= 1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	71
圖 32、以 Insulin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO ₂ :PEG400= 1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	71

圖 33、以 Ubiquitin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品, 組成為 TiO ₂ :PEG400=1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質, 在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	72
圖 34、以 Cytochrome c (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品, 組成為 TiO ₂ :PEG400=1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質, 在 MALDI 分析下所得之質譜圖.....	72
圖 35、以 TiO ₂ : α -CD=300:1 (莫耳比) 為組成之溶膠凝膠薄膜直接進行 MALDI 分析之質譜圖.....	76
圖 36、以 TiO ₂ : α -CD=300:1 (莫耳比) 為組成之溶膠凝膠薄膜, 在水洗後直接進行 MALDI 分析之質譜圖.....	76
圖 37、 α , β , γ 型環糊精分子的大小結構示意圖.....	77
圖 38、(a) 二氧化鈦薄膜混摻 α 型環糊精示意圖.....	77
(b) 以水洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜示意圖.....	
圖 39、水洗 3 片塗佈有二氧化鈦薄膜 (組成為 TiO ₂ : α -CD=300:1 (莫耳比)) 蓋玻片, 取其水洗液 (0.2 μ l) 以純二氧化鈦薄膜為 MALDI 分析之基質進行 MALDI 分析所得之質譜圖.....	78
圖 40、以與圖 34 相同水量 (15 ml) 水洗 7 片塗佈有二氧化鈦薄膜 (組成為 TiO ₂ : α -CD=300:1 (莫耳比)) 蓋玻片, 取其水洗液 (0.2 μ l) 以純二氧化鈦薄膜為 MALDI 分析之基質進行 MALDI 分析所得之質譜圖.....	78

圖 41、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α -CD 1000 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖.....	79
圖 42、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 β -CD 1000 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖.....	79
圖 43、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 γ -CD 1000 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖.....	80
圖 44、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α -CD 100 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖.....	80
圖 45、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 β -CD 50 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖.....	81
圖 46、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 γ -CD 100 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖.....	81
圖 47、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 α -CD (100 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識（萃取時間 2 小時），萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖.....	82

圖 48、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 α -CD (10 ppb, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖.....	82
圖 49、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 β -CD (50 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖.....	83
圖 50、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 γ -CD (50 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖.....	83
圖 51、以水洗後的 TiO_2 薄膜為基質，以 α -CD 50 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖.....	87
圖 52、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針，萃取 α -CD 10 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖.....	87
圖 53、以水洗後的 TiO_2 薄膜為 MALDI 基質，以 β -CD 50 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖.....	88
圖 54、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，萃取 β -CD 10 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖.....	88
圖 55、以水洗後的 TiO_2 薄膜為 MALDI 基質，以 γ -CD 100 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖.....	89
圖 56、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，萃取 γ -CD 50 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖.....	89

圖 57、以二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α, β, γ -CD 10 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖.....	90
圖 58、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α, β, γ -CD 100 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖.....	90
圖 59、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (50 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	91
圖 60、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (10 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	91
圖 61、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (1 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	92
圖 62、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (100 ppb) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	92
圖 63、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (5 ppm) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	93
圖 64、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (1 ppm) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖.....	93

- 圖 65、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (100 ppb) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖..... 94
- 圖 66、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (50 ppb) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖..... 94
- 圖 67、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 3,5-DABA (500 ppm, 0.2 μ l) 為分析物之 MALDI 質譜圖..... 95
- 圖 68、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (500 ppm, 18 ml) 的溶液之萃取，以 MALDI 為分析方法所得之質譜圖..... 95
- 圖 69、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (500 ppm) 與 α 型環糊精 (50 ppm) 的混合溶液 (18 ml) 之萃取，以 MALDI 為偵測方法所得之質譜圖..... 96
- 圖 70、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (50 ppm) 與 α 型環糊精 (5 ppm) 的混合溶液 (18 ml) 之萃取，以 MALDI 為偵測方法所得之質譜圖..... 96

壹、緒論

一、前言

質譜儀 (Mass spectrometer) 在 20 世紀初由 J.J. Thomson 發明之後，¹至今已有一世紀之久，而質譜法在經過不斷的創新與發展後，已經成為分析化學中最重要的分析方法之一。

雷射脫附質譜儀 (Laser desorption) 在 1960 年初期發展出來，²⁻⁴主要是使用在無機、有機小分子的分析研究上。1987 年，田中耕一 (K. Tanaka) 發表了利用鈷金屬的奈米粉末混合甘油為基質的軟性雷射脫附游離法，並且能夠用以偵測到分子量約在 34000 Da Carboxypeptidase A 的分子離子。⁵Hillenkamp 和 Karas 在 1988 年提出了在雷射脫附質譜法的樣品中，添加具有吸收雷射能量 (266 nm) 的有機物-尼古丁酸，可以測得如牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 和溶菌酶 (Lysozyme) 等大分子的離子訊號，並將這種方法稱做基質輔助雷射脫附游離質譜法 (Matrix-assisted laser desorption/ionization, 簡稱 MALDI)。⁶而由於 MALDI 非常適合用於分析生化分子，因此在近幾年蛋白體學的快速發展，MALDI 扮演著舉足輕重的角色，K. Tanaka 更因此而獲得了 2002 年諾貝爾化學獎。

傳統的 MALDI 基質，多屬於具有芳香環的有機酸小分子，除此之外，各種不同的無機材料也相繼被研究開發並成為適用於 MALDI 的基質。⁷⁻¹¹使用無機材料做為 MALDI 基質有相當多的優點，如不需考慮基質與樣品的互溶性及結晶好壞等問題。本論文主要的研究方向，在以四

丁氧基鈦 (Titanium n-butoxide) 無機材料作為前驅物，利用溶膠凝膠法 (Sol-gel) 合成的二氧化鈦薄膜做為 MALDI 的基質，研究其可用性，並在二氧化鈦溶液中添加不同比例 Polyethylene glycol (PEG)，討論薄膜性質對改善分析物訊號強度的研究。另外本論文也嘗試在二氧化鈦溶液中混摻環糊精作為轉印分子，以水洗法洗去環糊精並利用此模板為探針，用以親和萃取水中微量的環糊精，而以雷射脫附游離質譜法為偵測方式，藉以發展分子辨識的分析方法。以下將針對 MALDI 的背景及相關資料做一介紹，並對溶膠凝膠材料及分子辨識的原理做一簡介。



二、MALDI-TOF MS 的背景介紹

一般 MALDI 以配備飛行時間 (Time-of-Flight, TOF) 質量分析儀為主，而 MALDI-TOF 主要組成元件為雷射、樣品游離室、TOF 質量分析儀、離子偵測器及訊號處理系統。而 MALDI 的樣品製備方法，是將約 0.5 μl 的基質 (10~30 mg/ml) 以特定莫耳比例與待測分析物混合後，取約 1 μl 置於樣品探針上，待有機溶劑揮發後，樣品會形成類似結晶狀的固體，即可將此探針送入質譜儀進行分析。當雷射照射在樣品與基質的混合物上，基質可以吸收雷射能量並扮演能量傳遞的媒介，將所吸收的能量傳給周圍的樣品分子，使樣品分子得到足夠的能量而在瞬間脫附游離至氣相，並在外加固定高電壓下，獲得特定的加速動能而進入固定長度的飛行管，依據到達偵測器時間的不同而達到質量分析的目的。

2-1 MALDI 的發展歷史

早在 1960 年代，就有研究學者利用高能量的雷射光束照射在固體表面上，可從表面脫附出完整的氣相分子離子，並由質譜儀直接進行偵測。²⁻⁴1978 年 M. A. Posthumus 等人利用雷射脫附質譜法成功地分析核苷酸、胺基酸、胜肽、醣類等生化小分子。¹²直到 1985 年，利用雷射脫附質譜法所能得到的質量上限均侷限在 2000 Da 以下。¹³

在 1987 年的一項學術會議中，⁵日本 Shimadzu 公司的研發部門工程師田中耕一 (K. Tanaka) 發現了當蛋白質分子混以金屬奈米級粉末 ($\sim 300\text{\AA}$) 與甘油組合的基質，利用波長 337 nm 的氮雷射進行照射可將完整蛋白質

分子離子脫附游離而被質譜偵測。次年，田中正式在期刊上發表了以鈷金屬粉末 ($\sim 300\text{\AA}$) 混以甘油的系統做為基質，¹⁴再加入樣品溶液充分混合，利用波長337 nm的氮雷射進行脫附游離質譜分析的方法，可以偵測到Chymotrypsinogen (25,717 Da)、Carboxypeptidase A (34,472 Da) 以及 Cytochrome c (12,360 Da) 的分子離子訊號，這是使用無機材料輔助樣品在雷射脫附游離的肇始。而在同年，德國的研究學者M. Karas和F. Hillenkamp也發表了一種稱為基質輔助雷射脫附游離質譜法的技術，即MALDI。⁶利用波長在266 nm的Nd-YAG雷射為照射光源，而在樣品中混入在266 nm波長有相當吸收率的尼古丁酸 (Nicotinic acid)，一舉將所能偵測質量範圍擴展至100 kDa左右。由於尼古丁酸能夠吸收並傳遞雷射能量以提供足夠能量來輔助蛋白質分子從凝相態過渡至氣相離子，便將這種具有輔助性質的有機小分子稱為基質 (Matrix)。自此之後，許多的研究學者陸陸續續加入此一研究領域，而開發出各種適合不同樣品的基質，¹⁵以下將簡介目前常用的MALDI基質。

2-2 基質的特性與功能

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基質，藉以輔助樣品分子的脫附游離。一般商業化的 MALDI-TOF 主要以配備波長在 337 nm 的氮雷射為主，也有在波長 355 nm 產生自三倍頻的鈹鈿鋁石榴石雷射或 2.94 μm 的 IR 雷射可供選擇。一般而言，適合 UV-MALDI 的基質均具有共軛雙鍵或芳香族環的小分子，而 IR-MALDI 的基質取得較方便，凡是具有特定 IR 波長吸收率的化合物如水皆可用來當做 MALDI

基質。一般來說，良好的 MALDI 基質必須具備兩個要件：(1) 基質和分析物分子需有良好的互溶性；(2) 基質對在 MALDI 所使用的雷射波長需有相當的吸收率 ($500\sim 15000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。¹⁶

一般基質和待測樣品的莫耳比例通常需調整在 100：1 到 50000：1 之間，且會隨著待測樣品分子愈大，所需比例也愈高，如此基質才可提供足夠能量給分析物以進行脫附。綜合上述，基質主要有三個功能：¹⁷

(1) 防止分析物聚集 (Aggregation)

基質在樣品的比例通常遠高於分析物，目的是以基質隔離分析物分子並防止分析物聚集在一起。如此可使得分析物和基質有較好的共同結晶化而能加強雷射能量的傳遞及樣品分子的脫附游離化率。

(2) 具有吸收特定雷射波長能量的能力

基質需具有吸收雷射能量的能力，並且能夠將能量傳遞至鄰近分析物的分子，以提供足夠的能量而將樣品瞬間從凝相態轉換成氣態。

(3) 幫助分析物游離化

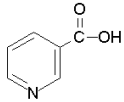
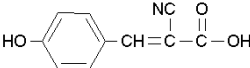
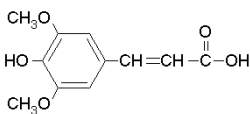
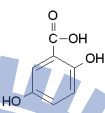
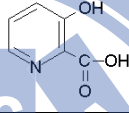
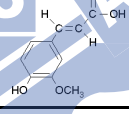
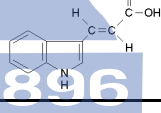
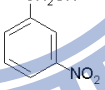
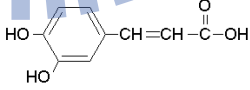
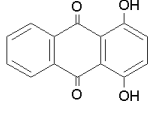
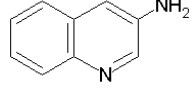
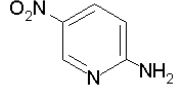
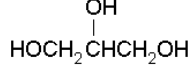
基質大多為具有酸性官能基的芳香族有機物，能夠有效提供氫離子給分析物，因此分析物在過渡至氣相時，可經一連串的離子-分子反應由基質得到氫離子而被離子化。

因為基質與分析物形成共同結晶化的好壞，會影響能量傳遞給分析物的效率，因此針對不同極性的分析物分子所選用的基質也應作適當調整。不同類型的分析物，其適用的基質也不同。如 Sinapinic acid 常用於分析蛋白質、胜肽；醌茜 (1,4-Dihydroxyanthraquinone) 適用於高分子的

分析；而 3-HPA (3-Hydroxypicolinic acid) 適用於核苷酸的分析。表一為常用的基質結構及其適用的分析物類型。^{15, 18, 19-20}



表一、常用的 MALDI 基質及適用的分析物

基質名稱	分子量	結構式	型態	適用分析物
3-pyridine carboxylic acid (Nicotinic acid)	123 Da		固體	蛋白質、胜肽 核醣核酸
α -cyano-4-hydroxy- cinnamic acid (α -CHCA)	189 Da		固體	蛋白質、胜肽
3,5-dimethoxy-4-hydroxy- cinnamic acid (Sinapinic acid, SA)	224 Da		固體	蛋白質、胜肽
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)	154 Da		固體	蛋白質、胜肽 碳水化合物
3-hydroxypicolinic acid (3-HPA)	139 Da		固體	寡核苷酸 去氧核醣核酸
3-methoxy-4-hydroxy- cinnamic acid (Ferulic acid)	192 Da		固體	蛋白質、胜肽
trans-3-indoleacrylic acid (IAA)	187 Da		固體	蛋白質、胜肽 高分子
3-nitrobenzyl alcohol	153 Da		液體	蛋白質、胜肽
3,4-dihydroxycinnamic acid (Caffeic acid)	180 Da		固體	蛋白質、胜肽
1,4-dihydroxyanthraquinone (醌茜)	240 Da		固體	高分子
3-aminoquinoline	144 Da		固體	多醣體
2-amino-5-nitropyridine	139 Da		固體	核苷酸
glycerol (甘油)	92 Da		液體	蛋白質、胜肽

2-3 樣品在 MALDI 中的脫附游離機制

在 MALDI 中，樣品從凝態相過渡至氣相形成氣相離子，主要包含兩個過程：即脫附和游離。當固態或液態樣品分子在瞬間 (\sim ps) 受到雷射照射吸收能量後，使得樣品分子有足夠能量進行相轉移，即由固相過渡到氣相，且當此相轉移的速率大於受熱分解的速度時，仍能保持樣品分子結構的完整性而能脫附游離至氣相，此現象稱為脫附 (Desorption)。而在此過程中，電荷轉移的反應會同時進行，即一連串的離子-分子反應發生，樣品分子因而可被游離化而帶上電荷，稱為游離化 (Ionization)。

事實上，基質如何輔助分析物脫附游離的機制，及分析物如何在高能量的雷射照射下仍能維持其分子本身的完整性並能瞬間從凝相態過渡成氣態離子，目前其作用機制尚未能夠被完全了解，但已有許多的 MALDI 機制被提出，例如相爆炸、^{21, 22}多光子游離、^{23, 24}激發態氫離子轉移模型等，^{25, 26}Zenobi 和 Knochenmuss 歸納目前所提出來有關 MALDI 的離子游離機制，將其歸納為兩大類：²⁷即一次離子游離及二次離子游離。一次游離即中性分子在經一次游離時即可形成離子；二次游離即指分析物離子的形成，是先經由基質離子形成，再經由基質離子與分析物碰撞反應才形成。如果能夠了解在 MALDI 中形成氣相離子的機制，將有助於樣品分析的進行，以下將對文獻中已提出之機制做一簡介：²⁸

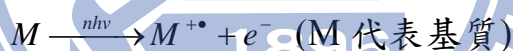
(1) 相爆炸 (Phase explosion) 模型

MALDI 中的凝相態分子如何能夠在高能量的雷射照射下，脫附游離成為氣相離子？Sunner 等人針對液態二次離子質譜法 (Liquid Secondary

Ion Mass Spectrometry, LSIMS) 所提出的相爆炸模型應該可以解釋在 MALDI 過程中為何可以產生完整的氣相分子離子。此模型說明當高能量束撞擊在凝態的樣品上時，樣品會被快速加熱至一相當高的溫度，當達到所謂臨界超熱 (Critical superheat) 溫度以上時，樣品分子會變得相當不穩定，而產生相爆炸的現象，此時能量用於將樣品分子從凝相轉移至氣相，而此相轉移的速度大於熱分解的速率，因此樣品分子得以保持其完整性。^{21, 22}

(2) 多光子游離 (Multiphoton ionization, MPI) 模型

Ehring 等人所提出的多光子游離模型是目前最常用來解釋 UV-MALDI 的離子形成原因。^{23, 24} MPI 模型說明了離子的產生是由於具有吸收雷射能量的基質，在吸收了多個光子後會激發至游離態，而產生了基質自由基：

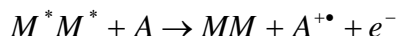


這個游離步驟被視為其他 MALDI 離子形成前的前驅反應，由於有基質自由基離子的產生，才能進行後續的連鎖反應，並產生一系列的其他離子。而波長為 337 nm 的氮雷射只能提供約 3.7 eV 的能量，因此一般的有機基質需吸收至少兩個光子 (7.5~9 eV) 的能量才能由基態激發至激態而被游離。

(3) 能量聚集 (Energy pooling) 模型

能量聚集模型的提出在於解釋基質分子如何在光照射下由基態激發至激態。²⁹⁻³² 如果單一基質分子吸收兩個光子的能量不足以使其分子激發，而連續吸收三個光子的發生機率又太低，那麼如果將好幾個已吸收

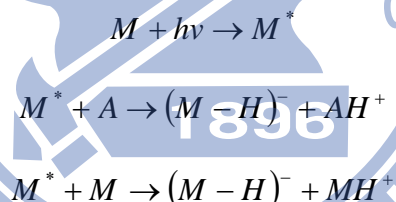
兩個光子的基質分子的能量加起來，應該足以將一個基質分子激發至激態而游離成帶自由基之陽離子，下列的式子可以說明這個模型：



(M 代表基質；A 代表分析物；*代表激發態)

(4) 激發態氫離子轉移 (Excited state proton transfer)

激發態氫離子轉移是另一個常用來解釋 MALDI 中游離化的機制。即當基質分子吸收一個光子的能量之後，會導致此基質分子比在基態時還樂於提供氫離子給周圍的分子，而扮演提供氫離子的供給者，使得周圍的分析物分子更易得到氫離子而被游離化。²⁵⁻²⁷ 離子形成的過程可以假設如下：



(5) 二相基質系統的離子形成機制

二相基質系統的離子形成機制不同於以有機酸為基質的 MALDI 離子形成機制，由於液態基質不吸收雷射光，因此可能的機制為無機粒子吸收雷射光能量之後以熱傳遞的方式將能量傳遞給分析物分子，進而導致脫附游離的發生。^{23, 27} 因此所使用的無機粒子尺寸愈小時，會有愈大的表面積，而使得能量的傳遞更有效率。

(6) 氫離子及陽離子加成物的形成

在二次離子游離機制的探討中，氫離子及金屬離子加成物的形成是

最常討論的兩種反應。²⁷ 在氣相中，基質離子與分析物的碰撞反應是否會進行，取決於基質與分析物的氣相鹼度，即質子親和力。Zenobi 等人根據文獻中的報導整理出常用的基質其質子親和力約介於 183-225 kcal/mole 之間，^{27,33} 而 Harrison 等人測量一般的蛋白質及胜肽發現其質子親和力約為 240 kcal/mole 左右，³⁴ 所以在碰撞反應中質子由基質離子轉移到蛋白質或胜肽是一個較容易進行的放熱反應 ($\Delta G < 0$)。

鹼金屬離子加成游離化的反應，常發生在具有羥基官能基的極性分析物，而過渡金屬離子的加成反應則是一些偏非極性的分析物主要的游離化方式。^{35,36} 例如銅、銀離子其 d 軌域和非極性分子中雙鍵的 π 鍵具有相當強的引力，而可以與非極性分子形成鍵結，因此將這些過渡金屬添加至非極性的樣品如高分子中，可以輔助高分子游離進而能夠被 MALDI 分析。

2-4 MALDI 中形成的離子特徵

由於質譜法只能分析帶有電荷的離子，而大部分的基質為具有芳香環的有機酸，為很好的氫離子 (Proton) 供給者，分析物分子藉此能夠得到一氫離子而被游離化。因此當樣品分子 (M) 在正離子的偵測模式下，我們主要觀察到的訊號為帶上一氫離子的假分子離子 (MH^+)。如果在環境中有鈉、鉀的存在，所形成的鈉加成物 (MNa^+) 和鉀加成物 (MK^+) 也會在圖譜中被發現。而 MALDI 是一種軟性游離法，因此大部分以完整的分子離子存在，離子碎裂程度並不嚴重。

2-5 飛行時間質量分析儀 (TOF) 的原理

當樣品在游離源室 (Ion source) 經由雷射照射而脫附游離時，會同時被給予一相同的加速電壓 (20~30 kV)，離子因而可獲得足夠的動能進入飛行時間管。根據 $eV=KE=mv^2/2$ (eV 是電場所提供的位能， KE 是動能， m 代表分析物的質量， v 是飛行速度)，當離子得到相同的動能時，質量較小的離子會有較快的飛行速度，質量較大的則反之，在經過一定長度的飛行管後，根據不同質量的離子到達偵測器時間的不同，可以區分不同質量的離子，而將到達時間轉換成質荷比 (m/z) 即可得到質譜圖。

飛行管主要由一支長約 1~1.5 公尺的金屬管所組成，金屬管需維持在一定的真空狀態 ($<10^{-6}$ torr) 下，並且整支金屬管接地，即外加電壓為零，處於無電場狀態。一般商業化的 TOF 質量分析儀主要可分為線型式 (Linear) 和反射式 (Reflectron)。以往 TOF 質量分析儀被認為是低解析度的質譜，這是因為有三種因素可能會導致低解析度的結果，即當樣品分子受到雷射光照射而游離時，在游離源內質荷比相同的離子被游離化的時間可能有些微的差異，並且可能在不同的空間被游離，所得到的起始動能也可能有些微不同，因而造成相同質荷比的離子到達偵測器的時間不同，使得線型飛行時間質譜儀的解析度 ($m/\Delta m$) 僅約 200~300 左右。

為了改善線型飛行時間質譜儀的解析度過低的問題，許多方法陸續被提出以降低時間、空間及動能分佈對質量解析度的影響。

目前一般商業化較常見用以提高解析度的方法有如下幾項：

- (1) 二階段式電場導出法^{37, 38}

二階段式電場導出法的設計當樣品離子在游離源形成後，會經由一較小的電位加速至第一階段 (V_0 至 V_1) 然後再經由第二階段 (V_1 至 0) 加速而進入 TOF 管中。這個方法可以改善因相同離子在不同空間形成離子化而造成到達偵測器的時間不同的差異，進而提高了解析度。

(2) 離子延遲導出游離源法 (Delayed extraction)³⁸

離子延遲導出游離源法是在雷射脈衝啟動後經過數十至數百奈秒 (ns) 的延遲才開啟外加加速電壓，這個方法可以修正因樣品離子本身的起始動能不同而造成解析度變差的影響。

(3) 反射式飛行時間質譜儀³⁹

其設計是在線型飛行管末端加上一個減速反向電場，當離子進入這一段電場後，會漸漸被減速而停止，而後因為電性相斥而使得離子被反向加速再進入飛行管被另一端的偵測器所偵測。而利用此設計，也發展出一種稱為游離源後碎裂的功能 (Post source decay(PSD))，⁴⁰ 即分析物離子在飛行過程中，因為本身內能過高導致碎裂產生的母離子與碎裂離子，可經由反射式飛行時間質譜儀區分出來並可應用於分析物結構的判定。

2-6 MALDI-TOF 的優點

(1) 高靈敏度

MALDI 是一種分析所需時間短且具有高靈敏度的質譜法，在適當的基質與分析物比例下，其偵測極限可低至 fmol 至 amol 左右，十分適用於微量的生化樣品分子分析。

(2) 高質量範圍

如果選擇適當的基質，高分子量的樣品就有機會以完整的結構脫附游離至氣態形成氣相離子，配合可偵測高分子量上限的飛行時間質譜儀而被偵測到。根據文獻報導 MALDI 可偵測到分子量在 500 kDa 左右的生化大分子，¹⁷ 而分子量在 1500 kDa 的合成高分子已可被 MALDI 所分析。⁴¹

2-7 影響分析物訊號的因素

因為 MALDI 能夠分析的樣品範圍十分廣泛，從生化分子到高分子，從極性到非極性，均需要配合適當的樣品製備方法，才能得到最佳的結果，有幾點在樣品製備需要特別注意的地方，詳述如下：

(1) 基質的選擇

雖然選用的基質在 MALDI 所使用的雷射波長都具有一定的吸收率，但同一種基質並非適用於所有的樣品，針對不同的樣品需使用不同的基質才能得到較好的脫附游離效率。再者，傳統的基質需與分析物有良好的互溶性並形成共結晶化才能得到不錯的結果，如果在共結晶化過程中樣品在基質中分佈不均勻會形成所謂的訊號集中點 (Sweet spots)，使得再現性降低而增加了分析上的困難。

(2) 基材的選擇

生化樣品中經常有一些鹽類、界面活性劑等污染物質，在進行質譜分析時會干擾分析物的訊號，於是一些研究提出了使用不同的基材可以改善這種情形。例如使用疏水性高分子 PTFE (poly-tetrafluoroethylene)

為基材用以承載 DNA 及蛋白質之類的樣品以進行 MALDI 分析可以提升這些生化分子在 MALDI 的靈敏度及降低鹽類對分析物訊號的影響。⁴² 而之後更有研究指出使用親水性高分子如 Polyacrylamides 及 Nafion 能夠得到更好的效果。⁴³ 此外，也有研究利用自組裝 (Self-assembly) 技術在金的基材上修飾一層疏水性材料，並在點樣處修飾上一層親水性且帶負電的高分子，可同時具備樣品濃縮、去除鹽類干擾的效果。⁴⁴

(3) 基質的添加物

以傳統 MALDI 基質偵測 DNA 時，通常會有許多鹽類的加成物訊號而使得判圖困難且影響可偵測極限，因此在樣品製備時通常需包含鹽類的去除程序。一般鹽類的去除方式是在基質中直接添加四級銨鹽或多氫鹽如 Spermine，以達到抑制鹽類在 MALDI 形成加成物訊號的效果。⁴⁵ 此外有研究指出在基質中添加碳水化合物如 Fucose，此混合物在受到高能雷射照射時會迅速分解成 $\text{CO}_2(\text{g})$ 及 $\text{H}_2\text{O}(\text{g})$ ，因而在脫附時能降低氣相離子的溫度並減少碎片離子產生。⁴⁶

(4) 基質與分析物的比例

依據分析物的分子量大小，需適當調整分析物與基質的莫耳比例才能得到最佳的分析結果，通常分子尺寸愈大的分析物，在樣品製備中基質所佔的莫耳比例也需相對提高。

三、溶膠凝膠材料

3-1 溶膠凝膠材料的發展歷程與現況

溶膠凝膠法首次被提出可以應用於無機光學材料，如氧化矽玻璃，是由法國化學家 M. Ebelmen 首先在 1845 年的研究論文中報導。⁴⁷ 在實驗中 M. Ebelmen 發現矽酸酯可以被水氣緩緩水解而形成含氫氧基的化合物，此氫氧化合物可以進一步反應而形成透明氧化矽聚合體，他當時即認為此類反應過程可以用來製作氧化物光學材料。

雖然溶膠凝膠技術早在一百多年前就被提出，其發展卻十分緩慢。1984 年，Avnir 等人才提出以溶膠凝膠技術包埋有機分子；⁴⁸ 同年，Schmidt 以有機矽烷氧基前驅物發展有機修飾陶瓷 (Ormocer) 或有機修飾玻璃 (Ormosil)。⁴⁹ 1985 年 Wilkes 等人以溶膠凝膠技術合成無機修飾有機聚合物 (Ceramer)，⁵⁰ 1990 年，Avnir 等人更發表了一系列論文，即以溶膠凝膠材料包埋酵素，酵素仍能維持原有的性質，即可以獲得與自然狀態相比接近 100 % 的活性。⁵¹ 經過這幾個階段的研究發展，具無機結構的溶膠凝膠材料可經修飾後而可具有有機分子的物理及化學特性，因此而受到科學界極大的重視。

所謂的有機-無機混成溶膠凝膠乃是具奈米級孔洞結構無機結構的溶膠凝膠混合了有機的物質製備成有機-無機複合材料。溶膠凝膠技術具有下述的優點：⁵²⁻⁵⁴

- (1) 反應可直接在室溫下進行。
- (2) 大部分的前驅物 (Precursors) 是液體，因此在製備上相當容易處理。

(3) 形成的產物的均勻度良好。

(4) 材料性質可塑性高，可藉修飾溶膠凝膠材料上的官能基或添加有機、無機加成物即可達到改良材料機械性質的目的。

今天，以溶膠凝膠法製備光學元件，無論是在玻璃光纖、光學鍍膜、模造光學鏡片上在目前均已佔有一席之地，以溶膠凝膠法來連結功能性有機高分子與高穩定性無機化合物是最新的發展領域之一。根據 1984~1999 年期間所公告之美國專利統計結果，發現與溶膠凝膠相關之專利申請案，大約每年平均以 18% 之速度成長，而目前應用最多的領域依次為觸媒應用、半導體鍍膜應用、有機-無機混成材料、記憶材料、與感測器材料。⁵⁵

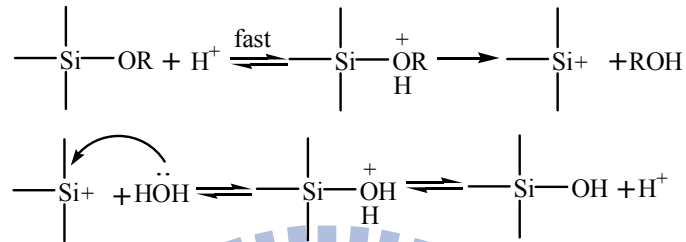
3-2 溶膠凝膠材料的合成

基本的溶膠-凝膠反應起始物包含以下四種成分：金屬烷氧化物、溶劑、催化劑和水，調配成均勻相溶液 (Homogeneous solution)，金屬烷氧化物則在催化劑的催化下先進行水解 (Hydrolysis) 及縮合反應 (Condensation)，再進行高分子化 (Polymerization) 反應而形成無機高分子。烷氧基矽的水解與縮合反應是同時進行的，以下分別就不同的催化環境討論其水解及縮合之反應機構，以及影響溶膠凝膠反應的因素做一說明：

3-2-1 酸性條件下 (pH < 3) 的水解縮合反應機構

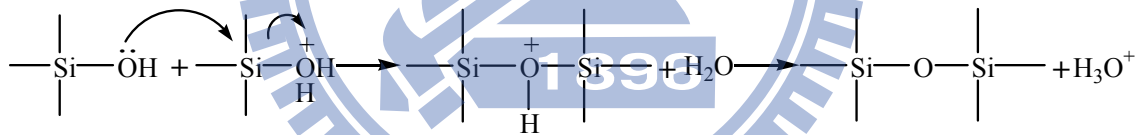
(1) 水解反應機構

在酸性催化條件下，一般認為水解是以 S_{N1} 反應進行。⁵⁶



(2) 縮合反應機構

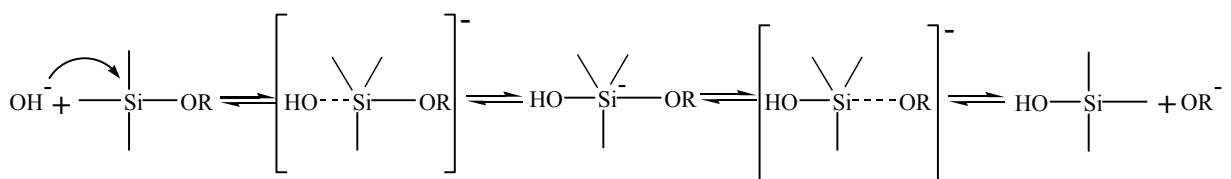
在溶液中烷氧基矽水解產物先生成一質子化的矽醇 (Protonated silanol) 中間物，再進行親核取代反應。其反應如下：



3-2-2 中性及鹼性條件下的水解縮合反應機構

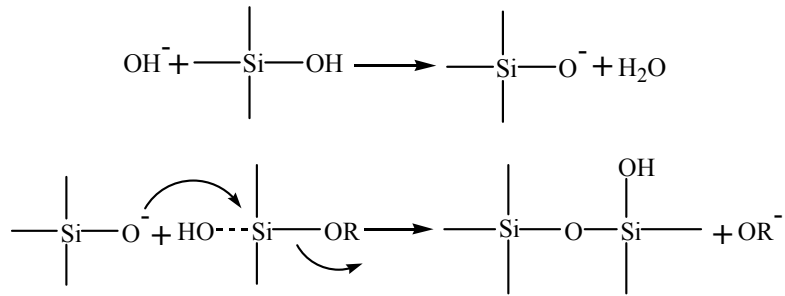
(1) 水解反應機構

在中性或鹼性催化條件下，水解是 S_{N2} 反應進行。⁵⁶ 羥基 (OH⁻) 攻擊四配位的矽原子，形成五配位的過度狀態中間物，接著 OR⁻ 基離開，矽原子又回到四配位，於是矽醇生成。



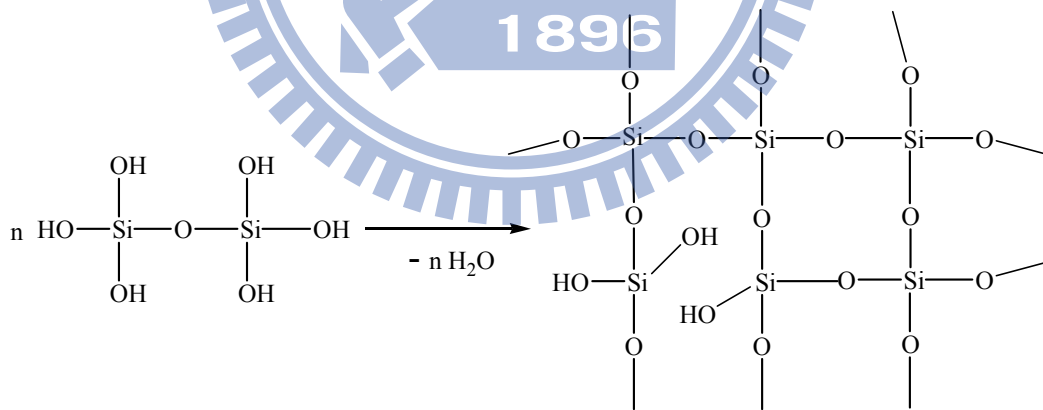
(2) 縮合反應機構

矽酸表面可能為去質子的矽醇物 (Deprotonated silanol) 所覆蓋，再進行親核的取代反應：



3-2-3 聚合反應機構

當縮合反應不斷發生時會使得溶膠逐漸形成二氧化矽網狀結構的聚合物，最後生成具有多孔洞性、高比表面積的凝膠。



3-2-4 催化與反應速率

一般而言，Sol-gel 反應在鹼性或酸性溶液中皆可以被催化水解，而 Sol-gel 反應在鹼性溶液中水解速度慢，但是縮和聚合快，會造成聚合膠

體產物有不均勻的現象。因此，在特殊用途中 Sol-gel 才會利用鹼性溶液來催化；而 Sol-gel 反應在酸性溶液中水解快，但縮和聚合慢，與在鹼性溶液中反應相反，而若 Sol-gel 反應與高分子一起反應時，縮和聚合慢即表示網狀結構慢慢生成，可將高分子緩緩架住，使高分子能貫穿在網狀結構中，而若縮合反應過快，則高分子與矽氧化物溶液會有相分離現象出現，故利用高分子與矽氧化合物進行 Sol-gel 反應時，在酸性溶液中為佳。雖然矽氧化物與高分子溶液並不相容，但若高分子溶液具有酸性，則可利用高分子所含的酸基來催化 Sol-gel 反應，如此可增加高分子與矽氧化物之間的相容性，且提高其透明度。

3-2-5 影響溶膠凝膠反應的因素

溶膠凝膠反應經水解和縮合反應可形成高度交聯之網路，若控制在適當的反應條件下，可得到性質更佳的混成材料，而反應常受下列因素影響：

(1) 起始物及溶劑效應

起始物及介質對溶膠凝膠反應產物有重大的影響。⁵⁶ 低烷基烷氧化物通常形成較大的高分子，它的凝膠有較高的氧化物組成；而溶劑對水及部分水解物的擴散速率有較高的影響，所以在低級醇中得到的水解物有較高的氧化物含量，亦即較大程度的聚合。

(2) 水與烷氧化物比例的效應

$H_2O/Si(OR)_n$ 的比例會影響聚合度和有機高分子的含量，也影響到混成複合材料的結構，高含水量凝膠的交聯度較高，且有較多的烷氧基

(-OR) 被取代，所以凝膠的強度較好。⁵⁶1985 年 Brinker 等人發表利用 TEOS (Tetraethoxysilane) 在酸性催化下，高水量時聚合鏈 (Polymer chains) 會重排導致小的緻密粒子；⁵⁴反之，低水量實由於線性鏈的纏結，減少自由體積 (Free volume) 在兩鏈之間的分子尺度 (Molecular scale)。1986 年 Yoldas 在研究烷氧矽 (Siloxane) 的反應發現，在高水量的反應條件下，其分子大小有明顯增加，相反的低水量溶液中則無此現象發生。⁵⁷

(3) 濃度的影響

保持 $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}(\text{OR})_n$ 的比例固定，以中性溶劑改變濃度，在稀濃度時水解反應比縮合反應快，反之高濃度則有利縮合反應，因此聚合度隨濃度的增加而增加。

(4) 催化劑效應

水解及縮合反應的速率會受加入之催化劑影響。在酸性溶液中， H^+ 催化水解反應，所以殘留的未水解之 $-\text{SiOR}$ 很少，且此時聚合的高分子，有許多的支鏈。而鹼性溶液中， OH^- 催化聚合反應，亦在鏈端發生水解反應，所以會得到較長鏈的高分子，故在酸性溶液中所得到的凝膠，其強度會較鹼性溶液的凝膠來得強。

(5) 反應溫度的效應

在較高溫度能促進反應物的擴散，導致反應速率變快，縮合及聚合速度因而加快。

四、分子轉印技術與分子辨識

4-1 分子轉印技術與分子辨識的概念

赤足踩在未乾的水泥地上，待水泥固化之後，地上便會留下一個腳印；這個腳印無論在形狀或大小上，都會與原來的腳相合，而分子轉印技術 (Molecular imprinting) 的概念與此十分相似。早在 1940 年，分子轉印技術的概念就由 Linus Pauling 所提出，Pauling 假設生物體中的聚縮氨酸 (Poly-peptide) 鏈會與抗原中的作用點產生作用，改變三度空間的結構，因此抗體中的許多活性點將與抗原進行組合作用，而此抗原可被視為一種模板，用來複製具有選擇性的人造抗體，雖然此想法現今已證明並不完全正確，但 Pauling 是第一位提出分子辨識概念的人。⁵⁸ 西元 1966 年，第一個以分子轉印技術而成功商業化的產品出現，即在香菸濾嘴上附上吸附有害的尼古丁模板濾嘴。1970-1980 年代，分子轉印的概念逐漸被應用在材料合成方面，而應用有機高分子為分子轉印的材料。⁵⁹ 具有多樣化的官能基之有機高分子，在做為分子辨識轉印的模板基材之改善有顯著的提升。

分子模板轉印的概念起源很早，但一直沒有被用來合成辨識材料，直到近年來才大量被應用在分析化學方面。1894 年時 Fischer 提出一個有名的「鎖和鑰匙」之間關係的理論，⁶⁰ 這個理論有點像生化中受質 (Substrate) 與酵素 (Enzyme) 作用的概念，其原理是將鑰匙分子和鎖一同建造混合，即酵素表面的活性點以幾何形狀互補的方式鎖住受質，接著由鎖中將分子鑰匙取出，而鎖會具有辨識性的功能而只認得原來的分子

鑰匙。分子鑰匙可以是任何物質的分子，小如藥物物質、氨基酸或類固醇荷爾蒙，大如核酸或蛋白質，不過若選擇之鑰匙分子過大，則會造成轉印材料製作上的困難，但如細胞和濾過性病毒亦可使用為轉印模板。分子轉印技術即是利用模板分子做為模印，將模板分子移除後的孔洞可與原分子進行再鍵結。而由於孔洞大小與原來的模板分子契合度極高，因此就算是在一群結構相近的混合物中，此孔洞也會優先與模板分子結合，即達到「分子辨識」的效果。

4-2 分子辨識的原理

分子辨識 (Molecular recognition) 一直是化學家及分子生物學家等相當有興趣的課題，自然界中早就存在著許多極佳分子辨識的範例。生物體中有極完美的分子辨識系統，但是我們對它的了解在早期只有抽象的概念；一直到進入分子尺度的研究後才逐漸對分子辨識有進一步的認識。

分子間的辨識存在有兩個要素：一是分子間作用力 (Intermolecular interaction) 及互補的結構 (Complementary structure)。而推動分子辨識的主要動力是「分子間的作用」；受質與受體分子間具備愈多的作用力存在，則分子辨識愈有效。然而，設計並製造一個分子辨識單元並不容易，有大量研究者付出心力在設計具強親和力 (Strong affinity) 且具有專一性 (Specificity) 的受體上。通常分子間作用力包含靜電作用、氫鍵、凡得瓦力及疏水性作用。

具有愈好的辨識效果的受質-受體間，需要具有愈高的結合自由能

(Association free energy)，即愈高的結合常數 (Association constant, K_a)。分子間的作用力，若相較於形成共價鍵或離子作用力，大部分只算是弱的作用力 (Weak interaction)。除了考慮分子間的作用力外，在結構上還需要具有互補單元，空間上剛好互相嵌入，才能達到最大的效果，即分子間作用一定要有互相加成的空間排列。例如 15-crown-5-ether 的環狀多醚其孔洞 (Cavity) 對鈉離子 (Na^+) 的親和力較好，⁶¹ 因此具有相當強的結合能力，而未形成大環的多醚類，雖然有相似的分子作用力官能基，當辨識基團在辨識時，需要額外付出「能量」引導它朝向正確的方位，因此其對鈉離子的選擇性及親和力都是很差的。

4-3 分子轉印技術的類型

分子轉印技術依基材的性質不同可分為高分子及溶膠凝膠材料兩類，目前使用最普遍的是高分子材料，而溶膠凝膠材料的應用也愈來愈廣泛，現就兩種材料應用在分子轉印技術的原理及性質做一簡介：

4-3-1 分子轉印高分子

分子轉印高分子 (Molecular imprinting polymers, MIPs) 的轉印原理是利用帶有特殊官能基的單體 (Functional monomer) 與模板分子 (Template) 作用，兩者之間以共價或非共價鍵結形成錯合物，再與交聯劑作用產生聚合反應，經移除模板分子後，就可在高分子之結構中，形成了轉印分子的形狀，最後此高分子便產生具有選擇性，而具有辨識轉印分子的功能，如圖 1 所示。⁶²

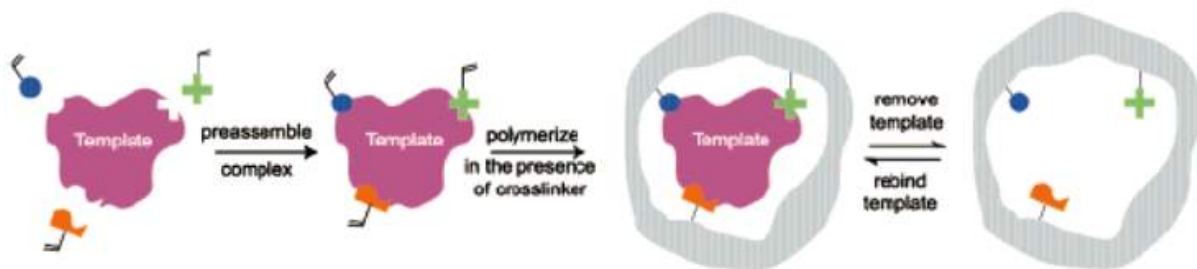


圖 1、分子轉印高分子原理示意圖⁶²

分子轉印高分子除了有明顯的辨認模板分子之性質之外，它們的物理和化學性質都頗理想。以此建構出的高分子，其辨識性亦不會隨著使用次數或時間的多寡而消失。

目前分子轉印高分子依錯合物的的鍵結方式可分為兩種，如圖 2 所示，一是共價鍵鍵結，其鍵結反應較慢但鍵結較強，以致模板移除較難，可選用的單體也較少，目前最常見的是以具有硼酸官能基 (-B(OH)₂) 化合物為單體；⁶³ 另一種是由非共價或金屬配位鍵所形成的自我組合方法，其轉印的步驟較簡單，⁶⁴ 首先根據分子模板的特性去選擇適當官能基單體，加上能夠把單體聚合的交聯劑，再選擇一個可以溶解三者的溶劑，使分子模板、單體及交聯劑形成均相的溶液，分子模板與單體中的官能基會因為氫鍵、離子作用力、凡得瓦力及疏水性等作用力互相吸引，驅使單體與模板分子移動而進行自我組合，形成一種複合體，此時模板與單體具有空間位置互補的關係。

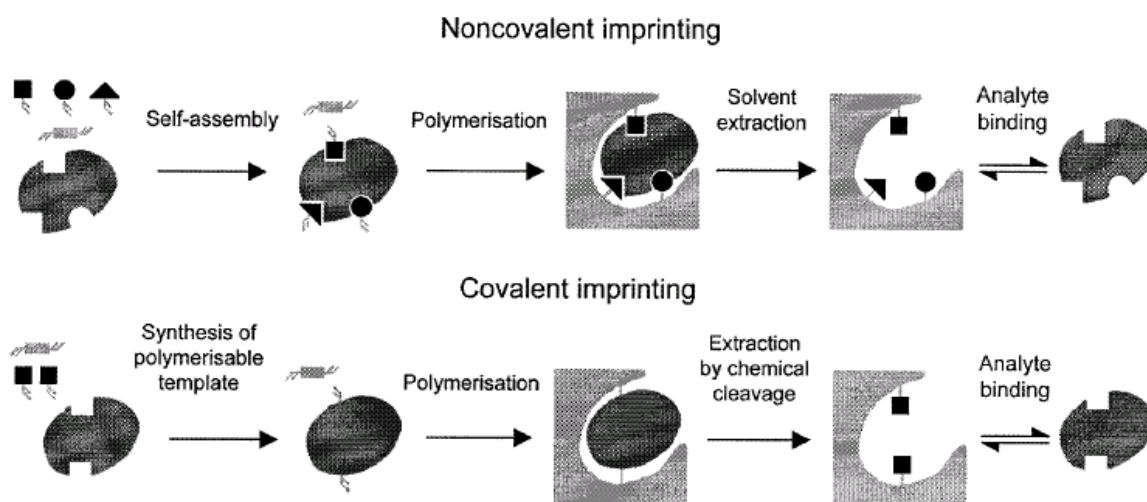


圖 2、分子轉印高分子錯合物的形成方式⁶⁵

在分子模板高分子形成後，必須再將分子模板移除，才能得到具有記憶性的分子辨識高分子。通常分子模板與單體官能基的結合作用必須是一種弱的結合鍵，例如非共價鍵結合或可逆的共價鍵結合，弱鍵結合才能透過溶劑洗滌將分子模板從高分子包圍中移除。在轉印過程中，溶劑的選擇扮演著舉足輕重的角色，因它除了會影響高分子的型態之外，也會牽涉到非共價鍵的強度。極性愈大的溶劑會影響非共價鍵，使辨識效果變弱，造成欲辨識分子較難接近辨識位置。通常所使用的溶劑為氯仿、甲醇、乙醇、水等為清洗劑進行移除模板分子的步驟，最後可得到具有分子孔洞的辨識物質，對特定形狀及尺寸的分具有專一的選擇性。

4-3-2 溶膠凝膠分子轉印材料

無機單體的使用在分子模板的發展歷史上佔有十分重要的地位，最初於 1949 年由 Frank Dickey 報導使用。⁶⁶ 典型以溶膠凝膠法合成分子轉印材料在室溫下即可進行反應，即利用一選定的分子模板導入金屬烷氧

之前驅物中，利用金屬烷氧之羥基團與分子模板間產生氫鍵作用或離子對作用力及凡得瓦力，經過水解縮合的步驟在分子模板周圍形成網狀結構，再以鍛燒或溶劑萃取的步驟移除網狀結構中的分子模板，產生具分子模板辨識位置的孔洞基材。根據溶膠凝膠合成產生的網狀結構上看，溶膠凝膠材料應可以提供很高的表面積、孔隙率及交聯密度，並且其合成步驟較高分子來得簡單，分析物的擴散也較快，具有結構穩定性高、剛性強、膨潤問題較小等優點。

目前溶膠凝膠材料應用在分子轉印技術可大略分為兩類，一是以矽的烷氧化合物為前驅物，例如 1997 年 C.E. Barnes 等人利用 TMOS (Tetra-methyl orthosilicate) 為前驅物的溶膠凝膠材料結合時間解析螢光光譜來辨識鈾氧基 (Uranyl ions)，⁶⁷ 之後陸續有研究指出此種溶膠凝膠材料可以成功地應用在辨識神經傳導物質多巴胺 (Dopamine)、⁶⁸ 殺蟲劑 (DDT)⁶⁹ 及具有構形選擇性的觸媒。另一種是以鈦的烷氧化合物為前驅物，例如 T. Kunitake 等人利用 TiO_2 薄膜並結合石英震盪感測天平 (Quartz crystal microbalance, QCM) 可以辨識一些含有苯環的有機酸，⁷⁰ 或者結合離子敏感場效電晶體 (Ion-sensitive field effect transistor, ISFET) 來辨識除草劑 (Herbicides)。⁷¹ 近年來， TiO_2 薄膜在生化感測器上的應用引起了許多研究學者的興趣，有文獻指出利用氨基酸或其衍生物做為分子模板的 TiO_2 薄膜可以達到分辨對掌異構物 (Enantiomers) 的效果，更有研究以 TiO_2 薄膜表面轉印酵母菌 (Yeast) 並結合 QCM 可以成功地達到辨識酵母菌的效果。⁷²

4-4 分子轉印技術的應用與發展

分子轉印技術是以選擇性的分子辨識為基礎，可應用在化學分析上，並能夠提供如具選擇性、高專一性等的優點，主要可應用在下列四類的分析方法：感測器應用、配位基鍵結分析、化學分離及樣品預濃縮，茲分述如下：

4-4-1 感測器應用

化學感測技術是目前快速成長的研究領域之一，⁷³ 許多研究學者嘗試著將化學裡的基本概念導入分子轉印技術並製成感測元件，發展快速偵測分析的方法。通常感應元件如酵素、抗體或受體是固定在感應器與分析樣品之間的界面上，藉由分析物與辨認元件之結合程序產生對應之化學訊號並將其轉換成電子訊號，經訊號放大處理轉換為可加以定量之輸出訊號。感測元件可以被設計為針對任何分子的偵測，然而在這類感測器中，模板或其類似物與接受器的結合後，必須產生可供偵測的反應或訊號。目前成功發展中的系統是以修飾電極 (Electrode) 為分子辨識元件的電化學分析方式居多。其他例如以溶膠凝膠材料塗佈在 QCM 的表面，可成功地應用在感測氣相及液相分析物中的特定分子，而利用一些獨特的性質，如在分子轉印高分子上結合發射螢光的標幟基團、或結合表面電漿共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 及表面增強拉曼散射 (Surface enhanced raman spectroscopy, SERS) 可以增強所產生訊號的偵測靈敏度，也有極大的發展潛力。

4-4-2 配位基鍵結分析

配位基鍵結分析 (Ligand binding assays) 是利用分子轉印概念為基礎的另一種技術，它的原理與酵素免疫分析法 (ELISA) 中抗體與抗原的作用十分類似，即利用 Ligand binder 與 Ligand 之間的專一性和選擇性藉此達到辨識的效果。⁷³ 因其具有製備快速及成本低廉等優點，極有可能被商業化並取代 ELISA。英國的研究學者 Turner 及其研究小組利用分子轉印技術製成的高分子平板，其對小分析物如麻黃素或如蛋白質般的大分子均具有良好的選擇性鍵結。而瑞典 Kempe 等人開發的辨識元件，可藉由分子轉印技術製成辨識元件來選擇辨識 Penicillin G，這種應用於生化技術的特定吸附劑，具有相當的實用性。⁷⁶

4-4-3 分離方法

將分子轉印技術應用在層析系統中，可增強層析管柱的解析度。利用 MIPs 作為高效能液體層析儀的靜相 (Stationary phase) 是分子轉印高分子在分析化學中應用最廣且被研究最多的主題，這主要是因為它提供了一個可供定性 (Qualitative) 的檢驗方式，將合成好的 MIPs 過篩後填充到管柱中，當帶有模板分子的溶液通過後，模板分子會被 MIPs 孔洞抓取住而被留在管柱內，因此可以針對特定製程產出的轉印效率進行評估。目前大部分的焦點集中於對掌性異構性 (Chiral) 化合物的解析 (Resolution)，這說明了「分離」這個步驟在分析與合成化學上的重要性，也顯示這項技術可以用來進行專一的辨識。

在毛細管電泳系統裡，MIPs 也具有相當良好的分離效果。⁷³ 利用在毛細管中填充 MIPs 的顆粒或直接在毛細管壁上進行高分子反應做管壁修飾或連續床，依據分析物在毛細管電泳中的移動速度不同以及和管壁上 MIPs 之間所具有的交互作用力而達到分離的效果。由於對掌性異構化合物 (Chiral compounds) 的藥理活性差異相當大，如果左旋結構是藥，往往右旋結構就是對身體有害的毒化物。因此在製藥動力學領域中，對於如何有效分離光學活性物質是一相當重要的研究主題，由於分子轉印技術適用於開發具有量身訂做鏡像分離功能的功能性材料，因此可以在以此目的的研究中扮演舉足輕重的角色。⁷⁴

4-4-4 樣品預濃縮

對大部分的生物檢驗來說，當樣品分析物的濃度過低或是可容納樣品的體積很小時，必須經過樣品預濃縮的前處理步驟，因此 MIPs 可以當做固相萃取中的靜相，藉此達到預濃縮特定分析物以及清除干擾物的效果。

4-5 分子辨識的方法與盲點

簡單的分子辨識感測器必須要有兩個基本部分：一是分子辨識單元、二是訊號轉換單元。分子辨識單元可藉由分子轉印技術製成辨識元件，而訊號轉換單元則可將辨識訊息轉換為可供儀器偵測的訊號。通常我們無法以肉眼看到受質是否被分子辨識單元「辨識」，因此感測器中應具備感受訊號的讀出單元 (Readout unit)，即將分子的辨識行為直接轉換為可被讀出的訊號。常用的轉換訊號方式有兩種：電化學訊號或光學訊

息。電化學訊號可以利用導電度 (Conductivity) 的改變或電位 (Electric-potential) 變化來表現；光學訊息則包括有顏色的改變，或是較靈敏的螢光強度 (Fluorescence intensity) 的增減或波長的移動。⁷⁷ 但無論是哪一種訊號轉換方式，都是利用間接的偵測以達到辨識的目的，容易受到環境的干擾且靈敏度不高，並非最佳的偵測方式，如何針對分析物分子作直接而快速的辨認是發展分子辨識方法所必須解決的問題。

4-6 分子轉印技術發展的挑戰

雖然分子轉印技術及分子辨識在學理上可行且已有許多成功的應用實例，特別是在層析分離方面，^{75, 76} 但是分子轉印技術仍舊面臨著許多的限制與挑戰。例如分子模板與單體對溶劑的溶解度限制，在非極性及有機溶劑中會導致有些生化分子產生結構的變形，對於分子轉印基材上的辨識位點之官能基位置並無專一性，或者因為產生不可逆的共價鍵結，造成模板分子清洗不易或者模板分子移除後導致喪失選擇性。另外高分子本身材質也可能會因為吸水產生膨潤、選擇性不高、容積率無法提高、鍵結位置不專一以及穩定性的問題。其次，轉印技術的溶劑極性影響不容忽視，而生化分子有許多屬於水溶性，所以使用水為轉印之溶劑是未來十分重要的趨勢，有幾個研究團體已證實，⁷⁵ 使用於有機溶劑之轉印高分子，在水介質中也能成功使用，但其中很少可在極性介質中完成其轉印步驟，故仍舊需要加以改進。除了延伸轉印技術所能進行的溶劑環境範圍，對於擴展模板分子進行轉印之尺寸則需要更多的研究，目前只有針對小分子尺寸的設計（藥物、氨基酸、殺蟲劑等）有成功的例子，較大的分子如胜肽、蛋白質及微生物細胞等此類報告很少，⁷⁵ 部分問

題在於傳統轉印方式並不完全適用，而且尺寸較大的分子模板容易導致模板產生變形崩潰，對於研究者而言，如何解決這些潛藏的問題是一個很大的挑戰。



五、無機材料輔助雷射脫附游離的發展

5-1 無機材料輔助雷射脫附游離質譜法之發展歷程

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 ($\sim 300\text{\AA}$) 混以甘油為基質所發展的軟性雷射脫附質譜法 (Soft laser desorption, SLD)。⁵ 然而，由於奈米級的鈷金屬粉末不易取得且具有易吸入肺部的危險性存在，因此在 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，並命名為表面輔助雷射脫附游離質譜法 (Surface-assisted laser desorption/ionization, SALDI)，具有低基質干擾、樣品製備簡易等優點。⁷⁸ 而 1999 年，Siuzdak 等人在 Nature 期刊上發表了以具有 UV 吸收的多孔性矽基材作為基質而發展的 DIOS (Desorption/ionization on silicon)，⁷⁹ 在不需傳統基質 (Matrix-free) 的條件下仍然具有十分良好的脫附游離效果。DIOS 的發展開啟了無機材料輔助雷射脫附游離質譜法的新時代，許多相關的研究和應用也相繼發表，⁸⁰⁻⁸² 後續的發展十分令人期待。

5-2 溶膠凝膠材料輔助雷射脫附游離質譜法之研究

本實驗室最近發展了以溶膠凝膠材料做為輔助雷射脫附游離質譜法的新質譜方法，⁸³ 即利用含矽溶膠凝膠的無機高分子材料以共價鍵結傳統的 MALDI 基質，如 2,5-Dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)，能夠讓原本在波長 337 nm 不具有吸光能力的溶膠凝膠材料，因為 2,5-DHB 的嵌入而改變其性質，變成具有吸收雷射能量的材料。由於 2,5-DHB 是以共價

鍵結在溶膠凝膠材料的網狀結構中，不容易因雷射照射而脫附游離至氣相，所以以此溶膠凝膠材料做為 MALDI 的基質，可以得到幾乎沒有基質訊號干擾的質譜圖，且樣品的製備較傳統 MALDI 簡單，不需考慮基質與樣品的互溶性以及共結晶化好壞的問題，對於小分子的分析是相當有幫助的，目前可偵測質量上限約在 16000 Da 左右。

由於溶膠凝膠材料的應用範圍相當廣，因此本實驗室成功開發的溶膠凝膠輔助雷射脫附游離質譜法 (Sol-gel assisted laser desorption/ionization, SGALDI) 具有相當大的發展空間，例如結合固相微萃取法的研究以及在 MALDI 分析 DNA 分子中去除鹽類干擾的應用，也都證明其可行性。^{84, 85} 然而，在本論文進行有關以質譜法進行分子辨識的研究過程中，我們發現含矽溶膠凝膠與傳統基質形成的高分子材料在水相環境中的性質並不是十分穩定，或者會因為額外的分子加入而影響其鍵結程度，而失去其吸光特性，因此將其當成轉印分子的材料並不可行。因此，合成本身即具有吸光性質的溶膠凝膠材料是發展分子辨識質譜法的關鍵。在文獻中已顯示二氧化鈦溶膠凝膠在波長 337 nm 具有相當的吸收率，⁸⁶ 因此本論文嘗試合成具有吸光性質的二氧化鈦溶膠凝膠材料探討其輔助雷射脫附游離質譜法的可行性及進行其做為分子轉印材料的研究。

5-3 二氧化鈦的簡介

鈦 (Ti)，是地球上含量居第四位的金屬元素，排名在鋁 (Al)、鐵 (Fe)、鎂 (Mg) 之後，是一種質輕、強度高，可抵抗化學腐蝕及生物侵害的穩定優良金屬之一。因為鈦金屬的淬取生產成本很高，因此只見於在

航太工業及一些化學品的生產設備，而二氧化鈦化合物被廣泛使用在工業產品上。

二氧化鈦可製成 n 型半導體，基本分子結構屬閃鋅晶格，係以鈦原子為中心，周圍有 6 個氧原子形成配位數為 6 之八面體結構。二氧化鈦常以銳鈦礦 (Anatase, A type)、金紅石 (Rutile, R type) 及板鈦礦 (Brookite) 三種結晶組態存在自然界中，其中銳鈦礦與金紅石結構最廣為被使用，而後者極為罕見，表二為銳鈦礦與金紅石的基本物理性質。銳鈦礦為低溫穩定相，具有吸收紫外光的特性，用於光觸媒及太陽能電池。而金紅石則為高溫穩定相，俗稱鈦白粉，是一種具有優異遮蓋效果的白色顏料，通常用於油漆、塗料、塑膠、橡膠、造紙、油墨、陶瓷等。⁸⁷ 由於其對光線的折射係數 (Refractive index) 遠較其他任何白色顏料為高，因此被廣泛地使用在要求不透光效果的產品上。奈米級的金紅石利用光散射作用具有阻絕紫外光之功用，是一種強而有效之美白聖品，目前市售化妝品中有多種美白產品均以金紅石為主所衍生出來的。⁸⁸

表二、銳鈦礦與金紅石的基本物理性質

性質 (Properties)	Anatase	Rutile
密度 (Density) (g/cm ³)	3.9	4.2
折射係數 (Refractive index)	2.52	2.71
介電常數 (Dielectric constant)	31	114
熔點 (Melting point) (°C)	晶相轉移成 rutile	1858

1972 年 Fujishima 和 Honda 在 Nature 期刊上發表關於 TiO₂ 電極上光分解水的論文，⁸⁹ 也開啟了一個多相光催化的新時代。激發二氧化鈦所需的能量間距為 3.2 eV，相對所需光能量的波長相當於 388 nm。當波長小於 388 nm 之紫外光照射在二氧化鈦奈米顆粒時，在價電帶的電子被紫外線的能量激發而跳升至傳導帶，同時，在價電帶產生帶正電之電洞，進而形成一組電子電洞對 (Electron-hole pair)，其反應時間僅數微秒 (μsec)。電子與電洞具有強大的還原能力，能夠與二氧化鈦表面的水分子反應而形成具有強大氧化能力的氫氧自由基 (OH·)，而具有光觸媒的特性，其光催化反應可分為下列幾個步驟：

1. 反應物、氧氣及水分子吸附於二氧化鈦表面；
2. 經紫外線光照射後，二氧化鈦產生電子及電洞；
3. 電子和電洞被捕捉而分別存在二氧化鈦表面；
4. 電子電洞與氧及水分子形成氫氧自由基；
5. 氫氧自由基與反應物進行氧化反應；
6. 產物再由二氧化鈦表面脫離。

在上述的幾項反應式中，光照的強度、溶氧量及二氧化鈦觸媒本身的性質等，均是影響光催化反應的因素。其中觸媒的特性，如顆粒的大小、比表面積、孔洞大小、表面氫氧基的密度等，深深地影響著電子電洞對的產生或再結合 (Recombination) 的速率以及表面吸脫附的過程。

5-4 鈦系化合物為基質的發展歷程

以鈦系無機化合物做為 MALDI 的基質在文獻中已被廣泛地討論，主

要是使用 Titanium nitride (TiN) 或 Titania (TiO₂) 的粉末。例如 F. Hillenkamp 等人以 TiN 的奈米粉末 (35 nm) 與甘油混合做為基質並利用波長為 1064 nm 的 Nd:YAG 雷射可以成功地偵測到 Carbonic anhydrase (~29 kDa) 的分子離子；⁸T. Kinumi 等人利用 TiO₂ 的粉末 (1 μm) 與甘油混合做為基質具有低背景干擾的優點，其偵測質量上限約為 2500 Da，適合用來做小分子的分析，⁹但都是以鈦粉末當成基質成分之一。



六、論文目標

傳統的 MALDI 基質，多以具有吸收雷射能量能力的有機酸小分子為主，各種不同類型的無機材料也相繼被研究開發並嘗試以其為基質。而本實驗室所發展的二氧化矽混成 2,5-DHB 為承載樣品及輔助樣品之雷射脫附游離已證明其可行性，基於此基礎，將發展二氧化鈦溶膠凝膠材料為輔助雷射脫附游離之基材。

本論文的主要目標，(1) 發展含鈦溶膠凝膠為輔助雷射脫附游離質譜法的基材 (TiO_2 -sol-gel assisted laser desorption/ionization, TiO_2 -SGALDI)：含鈦溶膠凝膠在波長 337 nm 具有相當的吸收率⁸⁶，因此應可做為輔助樣品在雷射照射下的脫附游離，因此將嘗試合成適當的含鈦溶膠凝膠為輔助雷射脫附游離的方法。此外，也將合成不同表面性質的含鈦溶膠凝膠薄膜，探討薄膜表面性質對於分析物在脫附游離中訊號強度的影響。(2) 本論文的另一個目標在於結合 TiO_2 溶膠凝膠的特點，發展新的雷射脫附質譜法，並結合分子轉印技術及分子辨識的概念，研究以質譜法直接當做分子辨識的偵測方法。

貳、實驗

一、實驗藥品及材料

1. Titanium (IV) n-butoxide, 99% (Acros, New Jersey, USA)
2. Methanol, HPLC Grade (Tedia, Ohio, USA)
3. Ethanol, 99.5% (Showa, Tokyo, Japan)
4. Nitric acid, 69-70% (J.T. Baker, Phillipburg, USA)
5. Hydrogen peroxide, 35% (Showa, Tokyo, Japan)
6. Sulfuric acid, ACS Regent Grade (Pharmco, Brookfield, USA)
7. Deionized water (Millipore, Billerica, USA)
8. Polyethylene glycol (PEG), Average MW. ca. 400,
(Fluka, St. Gallen, Switzerland)
9. Polyethylene glycol (PEG), Average MW. ca. 2000,
(Berlin, Germany, Riedel-de Haën)
10. 3,5-Diaminobenzoic acid, 98% (Aldrich, St. Louis, USA)
11. Glycerol, 99% (Berlin, Germany, Riedel-de Haën)
12. Prometryn, MW=241 (Riedel-de Haën, Berlin, Germany)
13. Bradykinin, MW=1060 (Sigma, St. Louis, USA)
14. Melittin, MW=2846 (Fluka, St. Gallen, Switzerland)
15. Insulin, MW=5733 (Sigma, St. Louis, USA)
16. Ubiquitin, MW=8564 (Sigma, St. Louis, USA)
17. Cytochrome c, MW=12360 (Sigma, St. Louis, USA)
18. α -Cyclodextrin, MW=972.9, 100% (Sigma, St. Louis, USA)

19. β -Cyclodextrin, MW=1135, 98% (Sigma, St. Louis, USA)
20. γ -Cyclodextrin, MW=1297, 99% (Sigma, St. Louis, USA)
21. 蓋玻片 (1.8 cm \times 1.8 cm \times 0.15 mm, Matsunami, Osaka, Japan)

二、實驗儀器

1. 加熱攪拌器：Corning, model: PC-420 (Corning, USA)
2. 旋轉塗佈機：琦太企業有限公司 (台北市，台灣)
3. 高溫爐：Thermolyne furnace 1400 (Iowa, USA)
4. 分析天平：Scaltec, model: SBC22 (Göttingen, Germany)
5. 超音波震盪器：Delta, model: DC150H (新竹市，台灣)
6. 紫外-可見光光譜儀：Agilent 8453 (California, USA)
7. 掃描式電子顯微鏡：Hitachi S-4000 (Tokyo, Japan)
8. 原子力顯微鏡：Digital Instrument Nanoscope E (Woodbury, USA)
9. x 光繞射儀：Bruker AXS D8 Advance (Leipzig, Germany)
10. MALDI-TOF：Bruker Daltonics Biflex III (Leipzig, Germany)

三、實驗步驟與流程

3-1 二氧化鈦溶膠凝膠材料

本實驗的主要目的，在以四丁氧基鈦 (Titanium (IV) n-butoxide) 作為前驅物，利用溶膠凝膠法 (Sol-gel) 合成二氧化鈦薄膜，並以二氧化鈦

薄膜做為 MALDI 的基質，嘗試用以分析 Insulin、Ubiquitin 等蛋白質，實驗步驟及流程如圖 3 所示。

(1) 二氧化鈦溶液的合成

由於四丁氧基鈦在空氣中容易吸收水氣而快速進行水解縮合反應，因此在合成的過程中必須加入較多的溶劑且置於冰浴環境下以減緩其反應速率。合成條件如下：取 Titanium (IV) n-butoxide 3.4 ml 與乙醇 1.5 ml 混合攪拌 30 分鐘後置入冰浴中，另外取乙醇 1.5 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，並於冰浴環境下攪拌 10 分鐘，將混合溶液置於室溫下攪拌 3 分鐘後再置於溫度控制在 35°C 水浴下反應 12 小時。

(2) 二氧化鈦溶膠凝膠薄膜的製備

取蓋玻片 (1.8 cm \times 1.8 cm \times 0.15 mm) 以雙氧水：硫酸=1：2 (v/v) 的混合溶液浸泡 30 分鐘後，再以去離子水及甲醇清洗，乾燥後將蓋玻片固定在旋轉塗佈機上，取 0.15 ml 的二氧化鈦溶液以 700 rpm 的轉速旋轉 15 秒、1500 rpm 的轉速旋轉 10 秒的條件均勻塗佈在蓋玻片上，在室溫下乾燥 20 分鐘即可。

(3) 測試二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助雷射脫附質譜法的基材

在乘載 MALDI 樣品的樣品盤 (Target) 上貼上一層導電碳膠，再將塗佈有 TiO₂ 薄膜的蓋玻片黏貼在碳膠上，分析物樣品 (Bradykinin、Insulin、Ubiquitin) 皆配製於水溶液，取 0.2 μ l 直接點樣在已修飾有 TiO₂ 薄膜的蓋玻片表面上，待揮發性溶劑揮發後即可將樣品盤送至質譜儀中進行偵測。

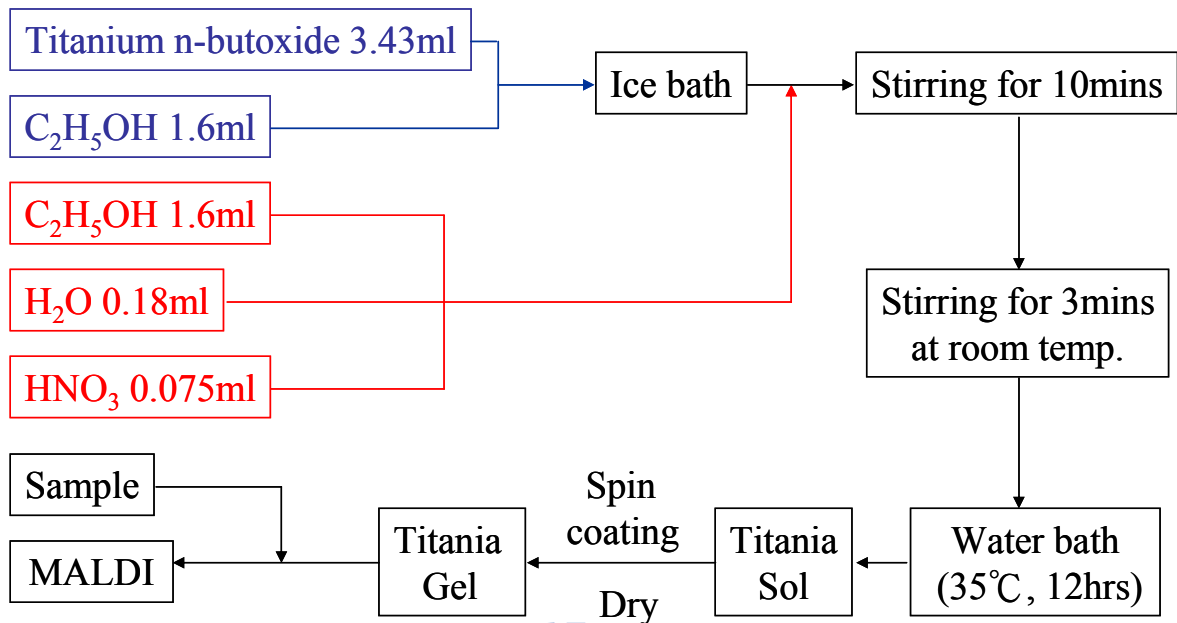


圖 3、以二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為 MALDI 之基質的實驗流程圖

3-2 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 Polyethylene glycol (PEG) 之實驗設計

本實驗的主要目的是在二氧化鈦溶膠凝膠合成過程中添加不同比例的聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG)，利用高溫處理除去 PEG，嘗試得到表面粗糙度不同的薄膜，並以此薄膜做為 MALDI 的基質，討論薄膜表面性質對分析物訊號強度的影響性。實驗步驟及流程如圖 4 所示。

(1) 二氧化鈦溶液混摻 PEG

取 Titanium (IV) n-butoxide 3.4 ml 與乙醇 1.5 ml 混合攪拌 30 分鐘後置入冰浴中，另外取乙醇 1.5 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 分鐘後迅速加入不同莫耳比例之 PEG，將混合溶液置於室溫下攪拌 3 分鐘後再置於 40°C 水浴下反應 30 分鐘。

(2) 薄膜的製備

取蓋玻片以雙氧水：硫酸=1：2 (v/v) 的混合溶液浸泡 30 分鐘後，再的去離子水及甲醇清洗，乾燥後將蓋玻片固定在旋轉塗佈機上，取 0.15 ml 的二氧化鈦與不同莫耳比例的 PEG 的混合溶液以 1000 rpm 的轉速旋轉 10 秒、2500 rpm 的轉速旋轉 10 秒的條件在 45°C 的環境下均勻塗佈在蓋玻片上，在室溫下乾燥 20 分鐘即可。

(3) 高溫處理

將蓋玻片置於高溫爐中，以 500°C 高溫處理 10 分鐘後，取出蓋玻片在室溫下冷卻 20 分鐘。

(4) 二氧化鈦薄膜的吸光性質及厚度的偵測

將已處理好的蓋玻片利用紫外-可見光光譜儀及掃描式電子顯微鏡分別測試其吸光性質及二氧化鈦薄膜厚度。

(5) 測試二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助雷射脫附質譜法的基材

在乘載 MALDI 樣品的樣品盤 (Target) 上貼上一層導電碳膠，再將蓋玻片黏貼在碳膠上，分析物樣品 (Prometryn、Bradykinin、Insulin) 皆配製於水溶液，取 0.2 μ l 直接點樣在蓋玻片上，待乾燥後樣品盤即可送進質譜儀中進行質譜分析。

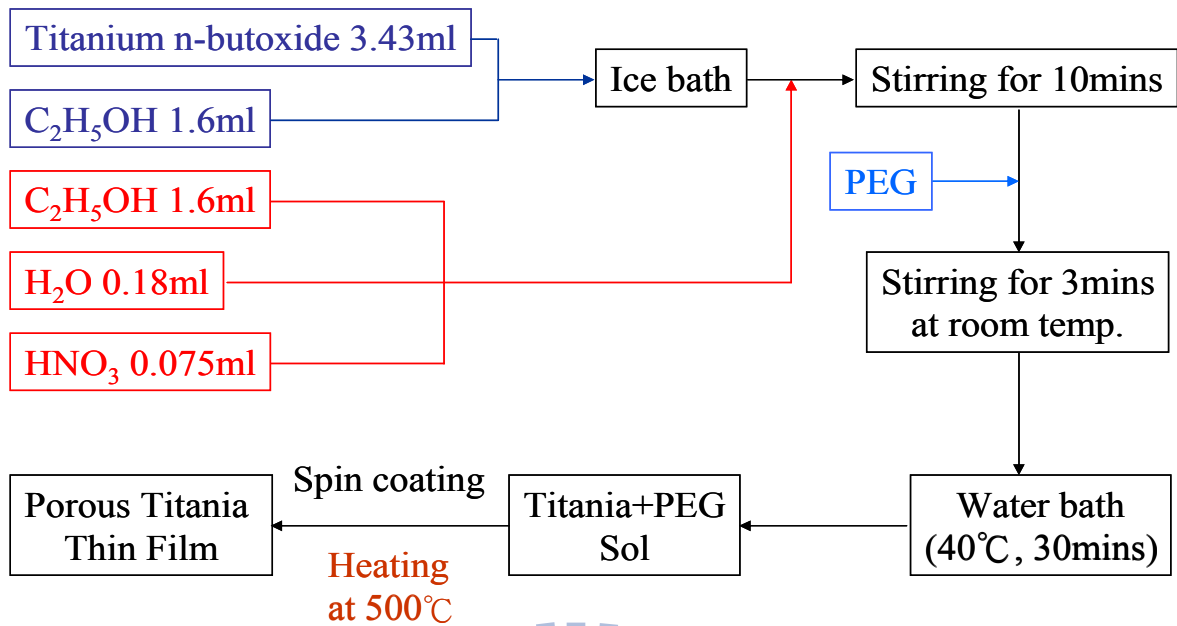


圖 4、製作不同表面粗糙度二氧化鈦薄膜之實驗流程圖

3-3 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻環糊精模板分子實驗設計

本實驗的主要目的，是在二氧化鈦溶液中混合摻雜做為分子模板的環糊精，環糊精分子是一種具有環狀結構的化合物，其中空的孔洞具有非極性的特性，而外環則為親水性。環糊精分子被廣泛地應用在製藥工程、食品工業、分離科學等。⁸⁸ 本實驗利用水洗法洗去在二氧化鈦薄膜中的轉印模板分子，利用具有環糊精孔洞的二氧化鈦薄膜為萃取探針並結合雷射脫附游離質譜法為偵測方式，藉以發展分子辨識的分析方法。實驗步驟及流程如圖 5 所示。

(1) 二氧化鈦溶液混摻環糊精

取 Titanium (IV) n-butoxide 3.4 ml 與乙醇 1.5 ml 混合攪拌 30 分鐘後置入冰浴中，另外取乙醇 1.5 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 35.8 mg 的 α 型環糊精，使得混合莫耳比例為 $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$: α 型環糊

精=300:1，將混合溶液置於室溫下攪拌 3 分鐘後於溫度控制在 35°C 水浴下反應 12 小時。

(2) 薄膜的製備

取蓋玻片以雙氧水：硫酸=1：2 (v/v) 的混合溶液中浸泡 30 分鐘後，再的去離子水及甲醇清洗，乾燥後將蓋玻片固定在旋轉塗佈機上，取 0.1 ml 的二氧化鈦與 α 型環糊精的混成溶液以 700 rpm 的轉速旋轉 15 秒、1500 rpm 的轉速旋轉 10 秒的條件均勻塗佈在蓋玻片上，將此蓋玻片在室溫下乾燥 20 分鐘即可進行後續流程。

(3) 利用水洗法移除在二氧化鈦溶膠凝膠上的 α 型環糊精

將蓋玻片放入 500 ml 去離子水，在 35°C 的溫度下水浴攪拌 2 小時，用以移除環糊精，拿出蓋玻片後在室溫下乾燥 20 分鐘，才進行做為輔助雷射脫附質譜法之測試。

(4) 直接點樣偵測

在乘載樣品盤上貼上一層導電碳膠，再將蓋玻片黏貼在碳膠上，分析物樣品 (α , β , γ -Cyclodextrin) 皆配製成水溶液，取 0.2 μ l 之樣品溶液直接點樣在蓋玻片上，待乾燥後即可將樣品盤送進質譜儀中進行偵測。

(5) 進行分子辨識的程序，並以雷射脫附質譜法為偵測方法

配製不同濃度的樣品，樣品溶液體積固定為 18 ml，將蓋玻片以鑽石刀均分為二並以其為分子辨識基材進行水溶液中特定分析物之萃取。萃取時間為 2 小時，待玻片探針乾燥後貼在樣品盤上即可直接送入質譜儀中進行偵測。

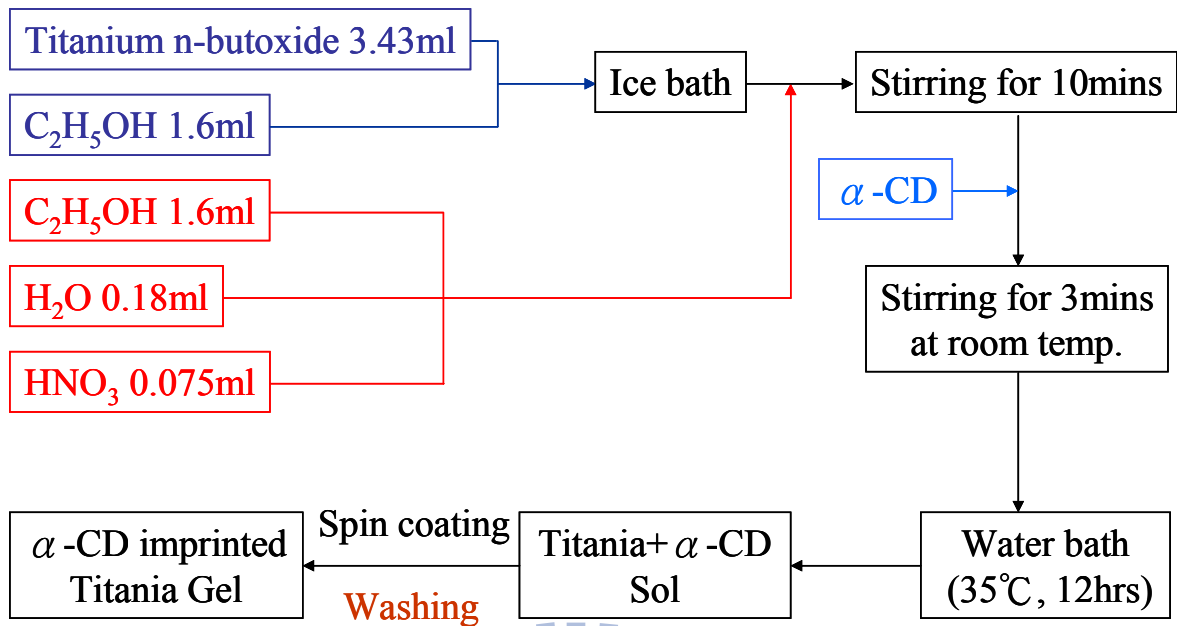
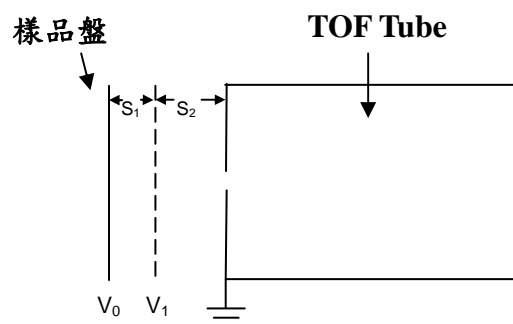


圖 5、以二氧化鈦溶膠凝膠材料轉印 α -CD 分子的實驗流程圖

3-4 MALDI 質譜儀的操作條件

本實驗所用之 MALDI-TOF 質譜儀配備有一吸收波長在 337 nm 的氮氣脈衝雷射，長度為 1.25 公尺的飛行時間管，可以在線型或反射式模式下操作。本實驗以線型及反射式模式條件操作，雷射的打擊頻率皆設定為 3 Hz，打擊次數為 100。而加速電壓則依分析物分子量的大小而有所改變。當分析物分子量小於 2 kDa 時，加速電壓設為 $IS_1=19$ kV, $IS_2=17.5$ kV；分析物分子量大於 2 kDa 時，加速電壓設為 $IS_1=19$ kV, $IS_2=18$ kV，而反射式模式則是在 $IS_1=19$ kV, $IS_2=16.2$ kV 的條件下操作。



參、結果與討論

一、二氧化鈦溶膠凝膠材料

(1) 二氧化鈦薄膜做為基質的可行性

本實驗主要的研究目的，是嘗試以溶膠凝膠法合成的二氧化鈦薄膜做為 MALDI 的基質，而當做 MALDI 基質的基本要素之一，是需要 MALDI 所使用的雷射波長（一般為 337 nm）具有一定的吸收率。圖 6 為 TiO₂ 溶液以旋轉塗佈機在蓋玻片上製成薄膜之 UV 吸收光譜圖，在波長 337 nm 有些微的吸收，由此 UV 吸收的結果可推測 TiO₂-sol-gel 可當做輔助樣品脫附游離的基質。圖 7 是以 bradykinin (MW=1060) 為分析物，利用此合成之 TiO₂-sol-gel 薄膜為基材所得到的 MALDI 質譜圖，可以觀察到除了有 Bradykinin 加一個氫質子 (MH⁺) 的假分子離子訊號外，其鈉、鉀離子的加成物訊號也分別出現在 m/z=1083 (MNa⁺) 及 1099 (MK⁺)，鈉、鉀離子的加成物訊號常出現在正離子操作模式，這比一般在傳統 MALDI 中所看到的訊號強度高。由於本實驗合成過程中所使用的容器為低鉀含量的硼玻璃，而為了瞭解鈉、鉀離子的可能來源，我們嘗試以 PP 材質的容器合成二氧化鈦溶膠凝膠材料，並以 Bradykinin 為分析物進行 MALDI 分析，但是仍然可以觀察到強度甚高的鈉、鉀離子的加成物訊號，如圖 8 所示，推測可能是在實驗的藥品中存在大量的鈉、鉀離子所致。以同樣的方法我們也可以觀察到 Insulin (MW=5733) 帶上一個氫離子之假分子離子訊號，只是離子峰解析度很差，可能是因為大量鈉、鉀加成物存在無法解析開而導致，若以 Reflectron 模式操作則可以得到解析度較好的 MALDI 質譜圖，如圖 9、10 所示。目前以二氧化鈦溶

膠凝膠薄膜為基質可以觀察到分析物的質量上限大約為 8.5 kDa 左右，
如圖 11 為分析物 Ubiquitin (MW=8564) 的 MALDI 質譜圖。



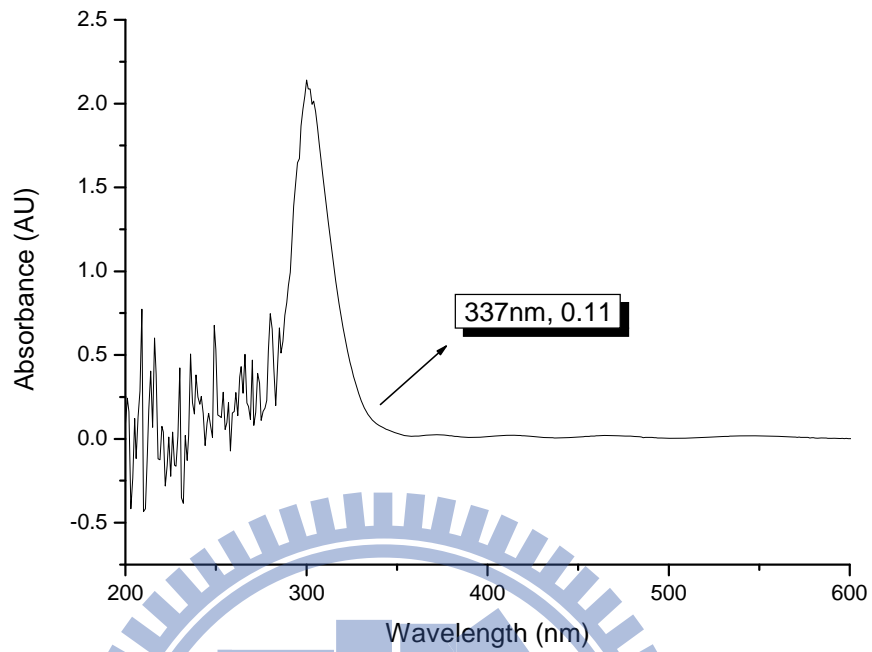


圖 6、TiO₂ 薄膜的 UV-vis 吸收光譜圖

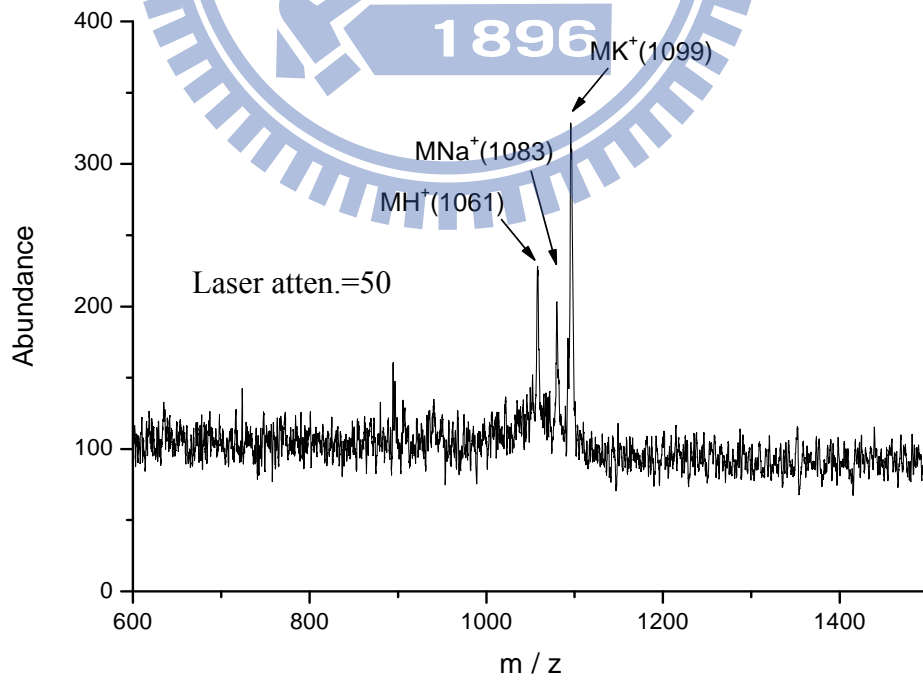


圖 7、以 TiO₂-sol-gel 為輔助 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

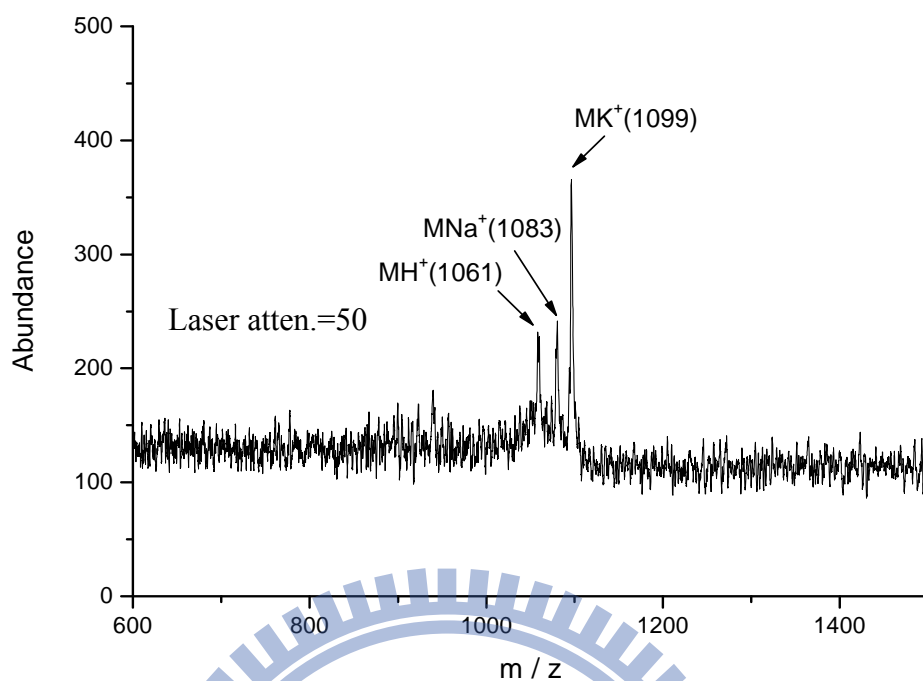


圖 8、以 PP 為容器合成之 TiO₂-sol-gel 為輔助 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μl) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

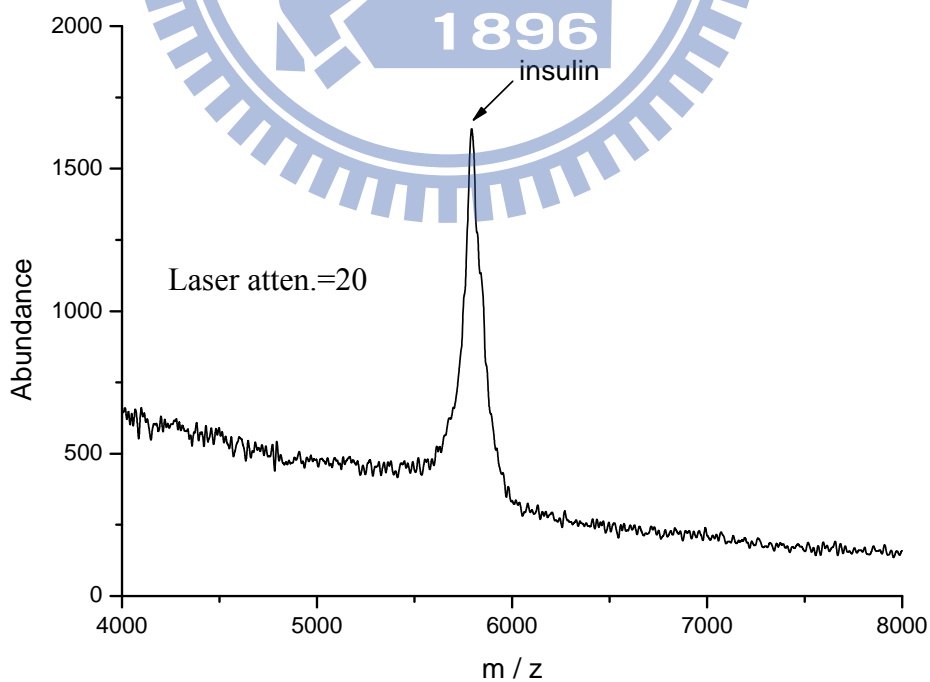


圖 9、以 TiO₂-sol-gel 為輔助 Insulin (1000 ppm, 0.2 μl) 脫附游離基材在 Linear 模式下操作所得的 MALDI 質譜圖

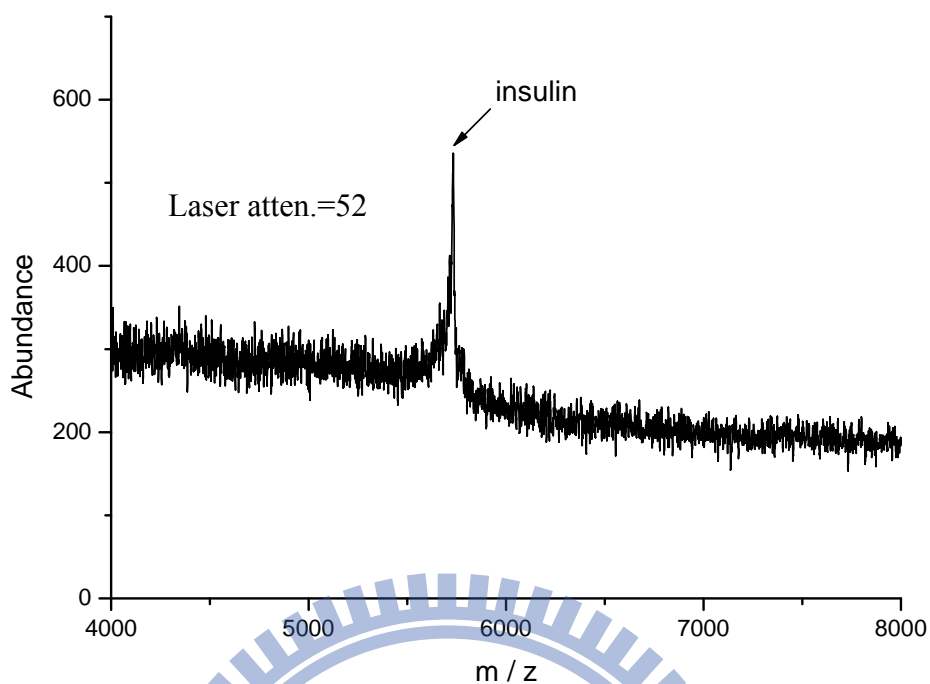


圖 10、以 TiO_2 -sol-gel 為輔助 Insulin (3000 ppm, 0.2 μl) 脫附游離基材在 Reflectron 模式下操作所得的 MALDI 質譜圖

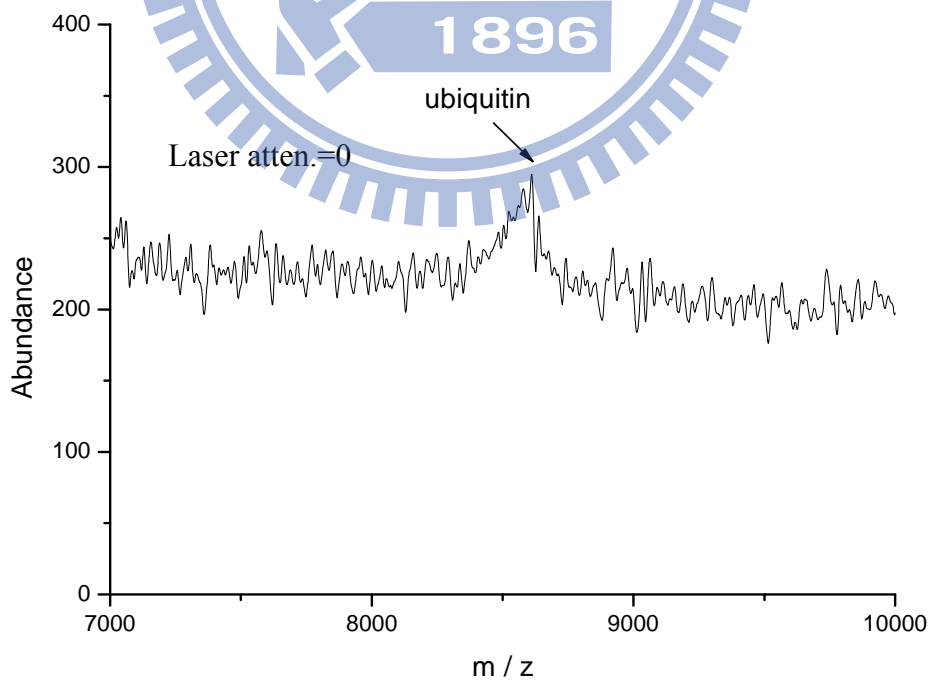


圖 11、以 TiO_2 -sol-gel 為輔助 Ubiquitin (1000 ppm, 0.2 μl) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

(2) 二氧化鈦薄膜的特性

在分子量 < 500 Da 的 TiO_2 -sol-gel SGALDI 圖譜中，我們可以發現有許多二氧化鈦薄膜所貢獻的基質訊號，如 $m/z=64, 81, 144, 161, 224, 241, 304, 384, 464$ 依序相對應於 $\text{TiO}^+, \text{TiO}_2\text{H}^+, \text{Ti}_2\text{O}_3^+, \text{Ti}_2\text{O}_4\text{H}^+, \text{Ti}_3\text{O}_5^+, \text{Ti}_3\text{O}_6\text{H}^+, \text{Ti}_4\text{O}_7^+, \text{Ti}_5\text{O}_9^+, \text{Ti}_6\text{O}_{11}^+$ ，顯示二氧化鈦薄膜在吸收雷射能量後其本身十分容易產生斷裂，因此可以在圖譜中觀察到二氧化鈦相關叢集 (cluster) 離子的訊號，如圖 12 所示，顯示二氧化鈦薄膜為 MALDI 基材在質譜的低質量範圍有嚴重的基質干擾。

(3) 以二氧化鈦薄膜為乘載 MALDI 樣品的基材在 MALDI 的偵測極限

根據以上的實驗結果，不含傳統有機酸基質的 TiO_2 製成之溶膠凝膠薄膜可以直接做為乘載 MALDI 樣品的基質以進行脫附游離，不需考慮基質與樣品之間的互溶性及共結晶性質所造成的不均勻問題，且其質量上限目前可偵測到 8.5 kDa 左右。而本實驗所合成的二氧化鈦薄膜為輔助 MALDI 分析之基材在 MALDI 之偵測極限約為 Bradykinin—190 fmol，Insulin—340 fmol，Ubiquitin—11.6 pmol，詳見圖 13~15 為目前以 TiO_2 -sol-gel 薄膜為基材在 MALDI 分析中所得之可偵測極限圖。

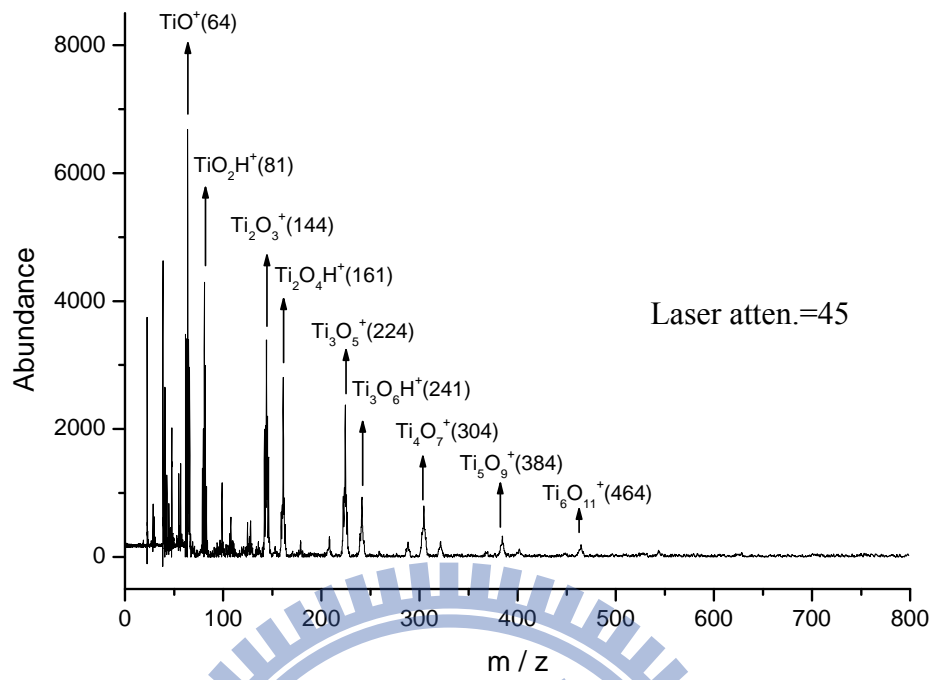


圖 12、以 TiO_2 薄膜為輔助 MALDI 分析在 MALDI 質譜圖中之背景圖

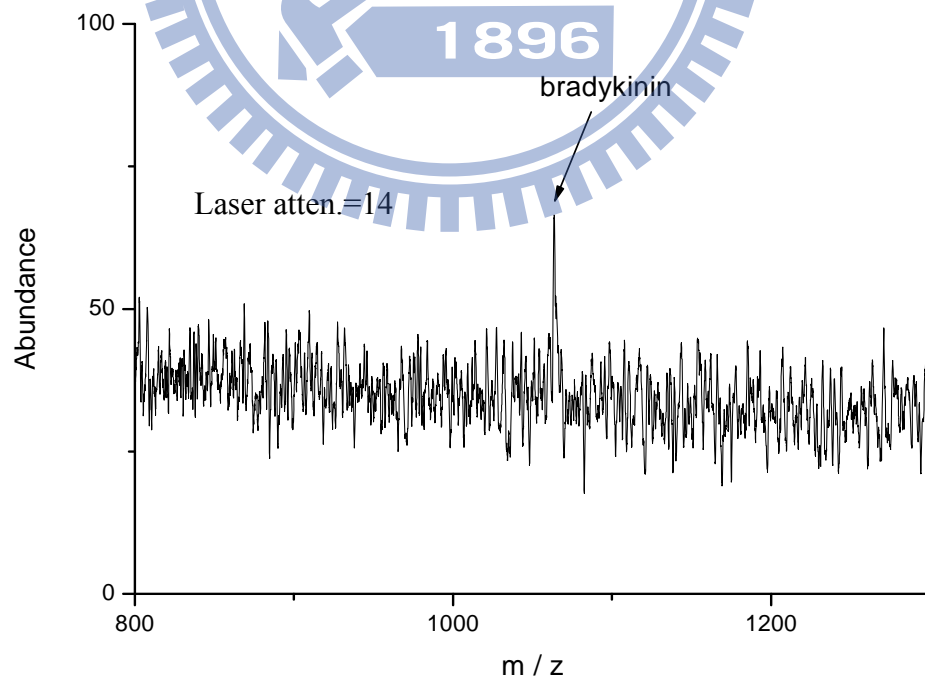


圖 13、以 TiO_2 -sol-gel 為輔助 Bradakinin (190 fmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

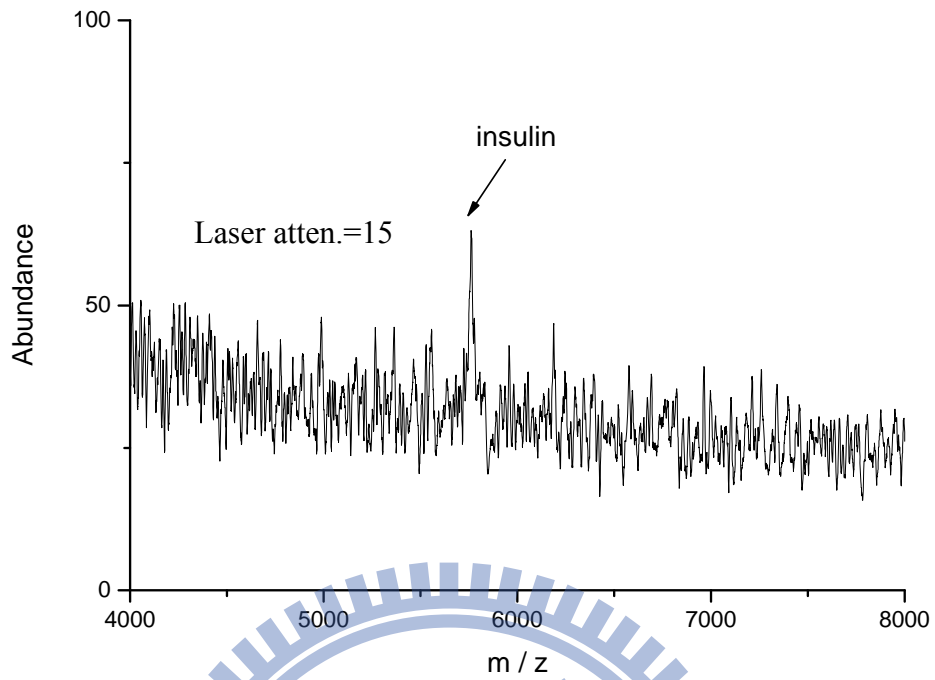


圖 14、以 $\text{TiO}_2\text{-sol-gel}$ 為輔助 Insulin (340 fmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

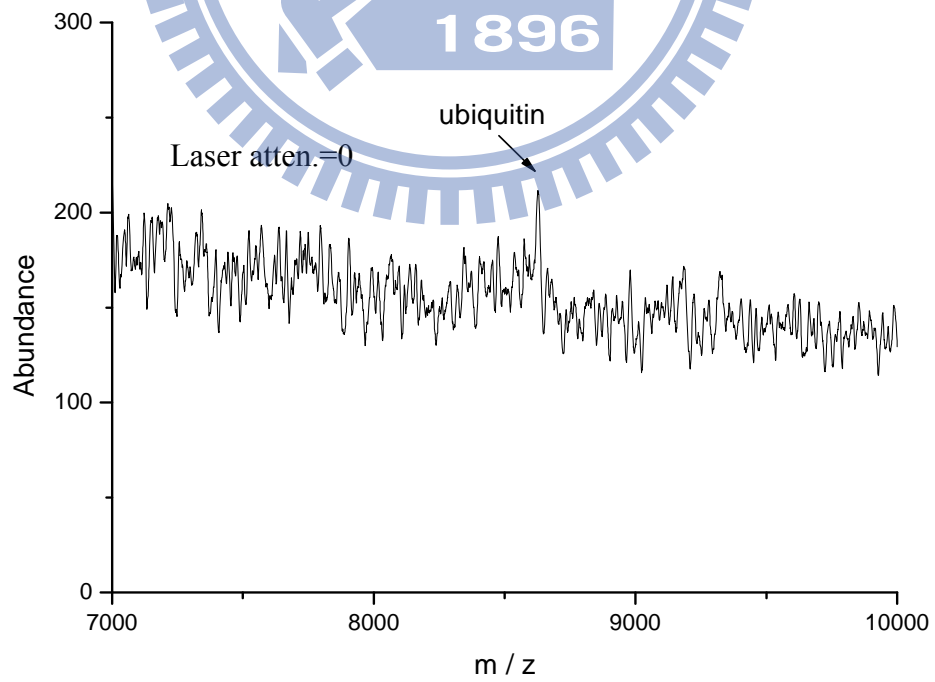


圖 15、以 $\text{TiO}_2\text{-sol-gel}$ 為輔助 Ubiquitin (11.6 pmol) 脫附游離基材的 MALDI 質譜圖

二、二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 所製造之薄膜表面性質探討

為了改善以純粹二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助 MALDI 分析之基材的偵測極限，本論文也進一步探討在改變二氧化鈦薄膜表面性質後，是否可對在 MALDI 分析有所助益及改善。

(1) 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 PEG 的特性

1998 年，日本京都大學的 K. Kajihara 等人發表了一系列以二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 PEG 的研究，⁹¹⁻⁹⁵ 其結果指出利用 PEG 並結合高溫處理可以得到具有孔洞性質的二氧化鈦薄膜，而孔洞的形成性質與溶劑的種類、空氣的溼度、水與前驅物的比例、PEG 的分子量及浸鍍 (Dip coating) 的條件有十分密切的關係。二氧化鈦薄膜的表面型態主要是由三個互相競爭的現象所決定：溶劑揮發所造成的流動性變差，薄膜吸收空氣中的水氣所造成的聚合加速以及相分離，當相分離及溶劑揮發的速度皆小於聚合的速度時，只能得到平滑而無明顯孔洞的薄膜。

(2) 二氧化鈦溶膠凝膠材料混摻 PEG 後的薄膜表面型態

溶膠凝膠材料是一種具有多孔性的無機材料，由於由前面的結果顯示已經可以成功地利用二氧化鈦溶膠凝膠材料做為 MALDI 的基質，而薄膜表面的性質如孔洞及粗糙度在吸收雷射能量及分析物脫附游離的過程中可能扮演十分重要的角色。^{77, 96} 因此本實驗嘗試在二氧化鈦溶膠凝膠材料的製程中混摻 PEG，探討薄膜的表面性質對質譜分析訊號的影響。

實驗中我們首先嘗試利用分子量約為 2000 的 PEG 來做為形成孔洞的模板分子 (Template)，在與二氧化鈦溶液均勻混合後以高溫煅燒法去除

PEG 而形成具有孔洞性質的二氧化鈦薄膜，其表面的型態經由掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscope, SEM) 可以觀察到在薄膜上有明顯的孔洞分佈，其大小約為 200~300 nm，如圖 16 所示。但是由於此二氧化鈦薄膜呈現嚴重龜裂 (Crack) 且不連續的型態，如圖 17 所示，因此當我們嘗試將分析物點樣在薄膜上時，樣品溶液會迅速擴散並且滲入薄膜中，會導致分析物在薄膜表面的濃度降低，而難以進行 MALDI 分析。

因此，合成能夠承載樣品並且具有不同表面性質的二氧化鈦薄膜為本實驗所需要克服的關鍵技術。我們嘗試選用分子量較小的 PEG，其分子量約為 400，因為其與二氧化鈦溶液的相容性十分良好，會抑制相分離的發生，因此當我們使用旋轉塗佈法將混合溶液塗佈在蓋玻片上並進行高溫處理後，可以觀察到薄膜表面除了有明顯的裂縫外，皆為均勻且連續的型態，並且似乎有孔洞的產生，如圖 18、19 所示。而經由原子力顯微鏡 (Atomic force microscope, AFM) 的偵測，我們可以看出有 PEG 混摻的二氧化鈦薄膜其表面的平均粗糙度會增加，如圖 20、21 所示。

(3) 二氧化鈦溶膠凝膠薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收

二氧化鈦薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收光譜圖如圖 22 所示，我們可以觀察到在經過高溫處理後二氧化鈦薄膜的 UV 吸收會增加且會有紅位移的現象，這與文獻中的描述相符合，⁹⁷ 其原因推測為薄膜中的二氧化鈦晶粒成長所造成的。而將二氧化鈦溶膠凝膠粉末經過高溫處理後的晶型由 x 光繞射儀的偵測 (Scan rate=0.5⁰/min) 與文獻中的圖譜比對證實為銳鈦礦 (Anatase)，¹⁰⁵ 如圖 23 所示。

(4) 二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 之薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收

圖 24 為二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 之薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收圖，我們可以觀察到隨著混摻的 PEG 含量增加，薄膜的 UV 吸收會有藍位移的現象。許多文獻指出，^{98, 99} 奈米級二氧化鈦的物理及光化學性質與二氧化鈦塊材 (Bulk) 有明顯的不同，而通常以藍位移的能階呈現，¹⁰⁰ 例如 Anatase 晶型的二氧化鈦塊材的 UV 吸收起始於 387 nm，而 3.8 nm 的二氧化鈦奈米顆粒其 UV 吸收起始於 375.1 nm。^{99, 101} 而本實驗所合成之二氧化鈦薄膜的 UV 吸收大約起始於 365 nm，且隨著 PEG 的含量愈高，其藍位移的現象愈明顯，顯示此二氧化鈦薄膜為奈米結構，而 PEG 的含量扮演著十分重要的角色。文獻指出二氧化鈦的晶核與 PEG 的長鏈之間會有氫鍵的作用力，而添加 PEG 會使得二氧化鈦溶液的黏度增加，基於這兩個因素，會使得二氧化鈦的晶核不易聚集，而造成了藍位移的現象¹⁰²。

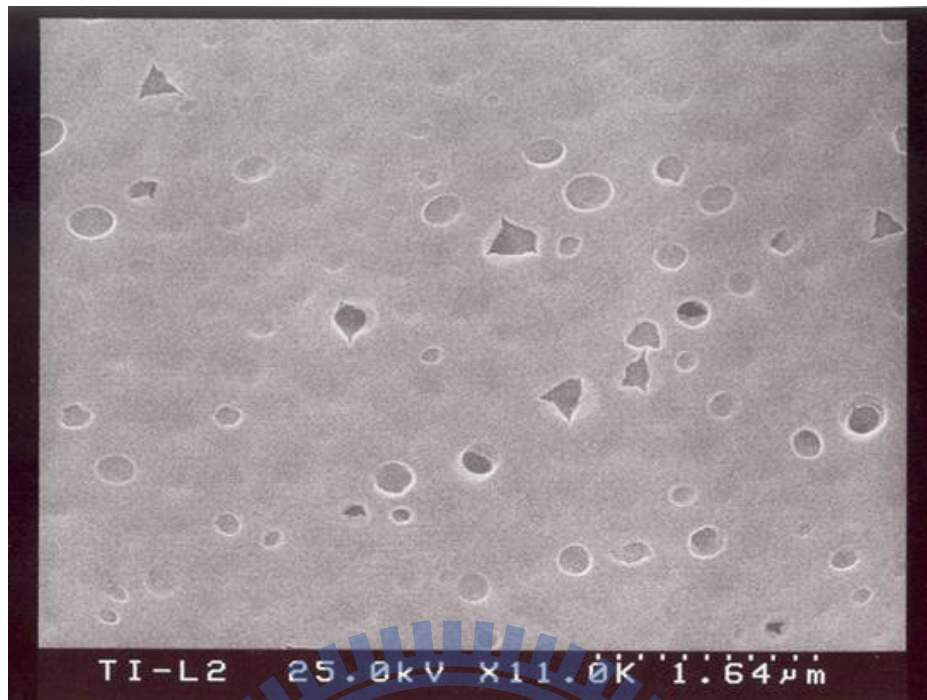


圖 16、組成為 $\text{TiO}_2\text{:PEG2000}=100\text{:}1$ (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖

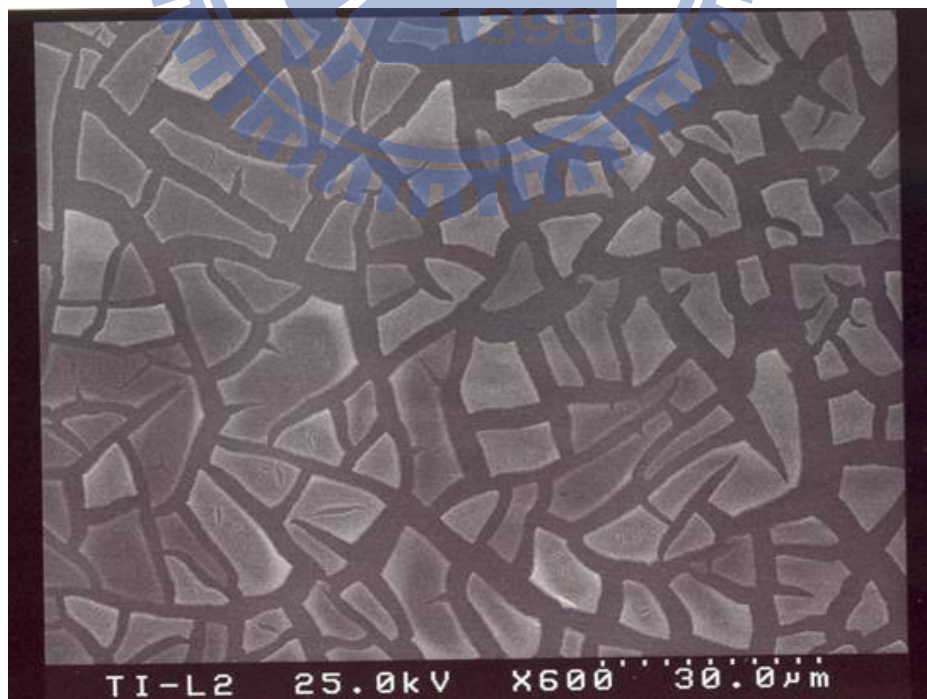


圖 17、組成為 $\text{TiO}_2\text{:PEG2000}=100\text{:}1$ (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖

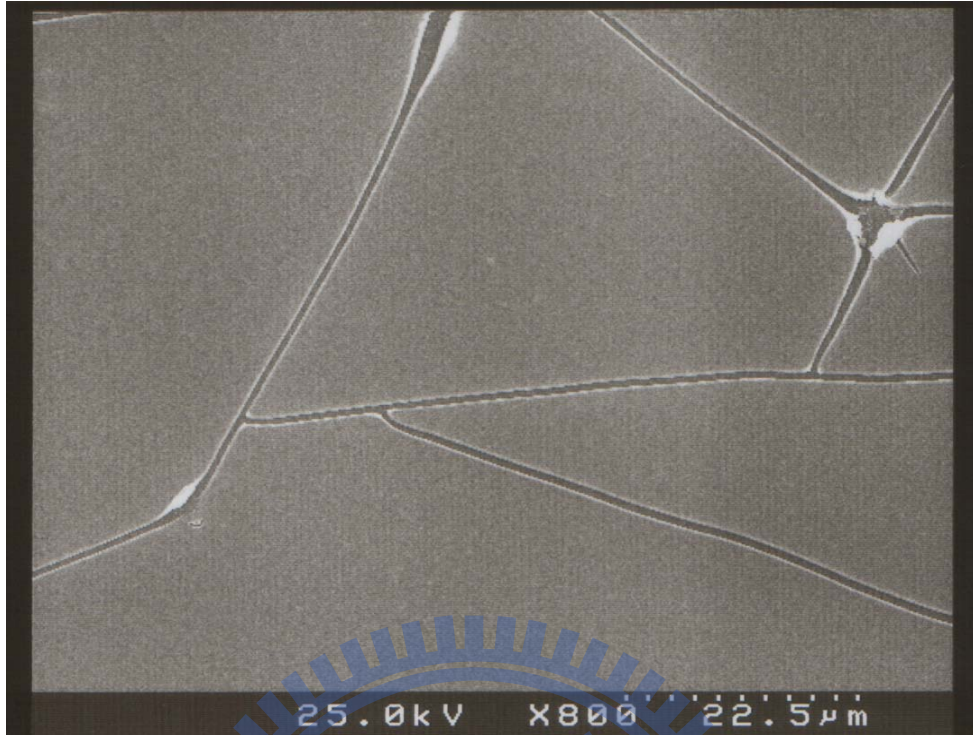


圖 18、組成為 $\text{TiO}_2\text{:PEG400=1:1}$ (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖

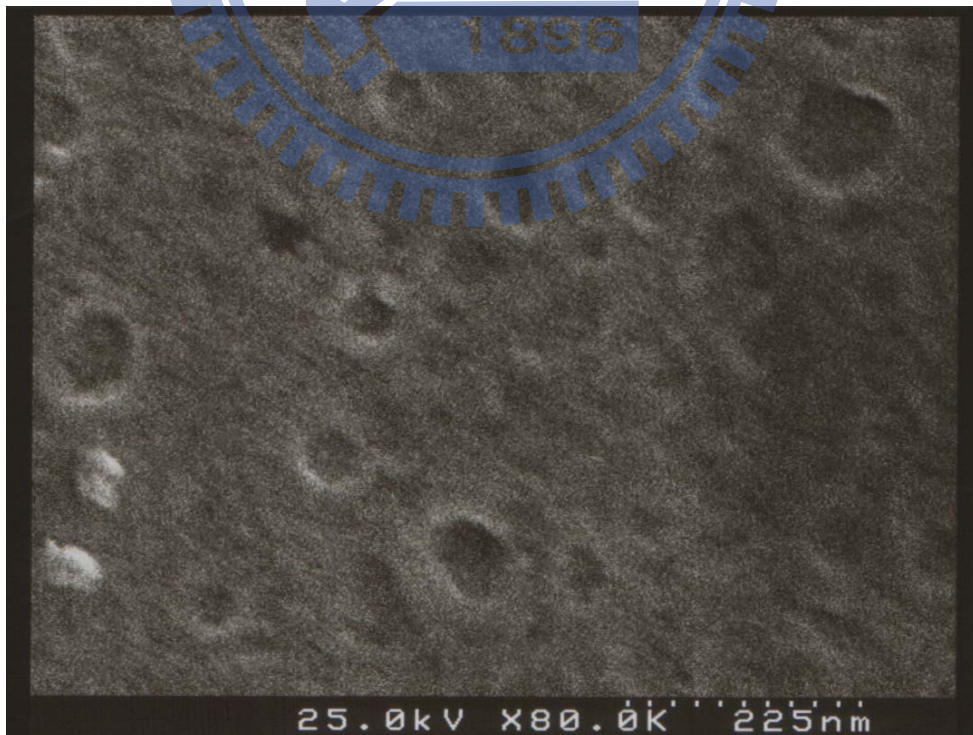


圖 19、組成為 $\text{TiO}_2\text{:PEG400=1:1}$ (Molar ratio) 的二氧化鈦薄膜的 SEM 圖

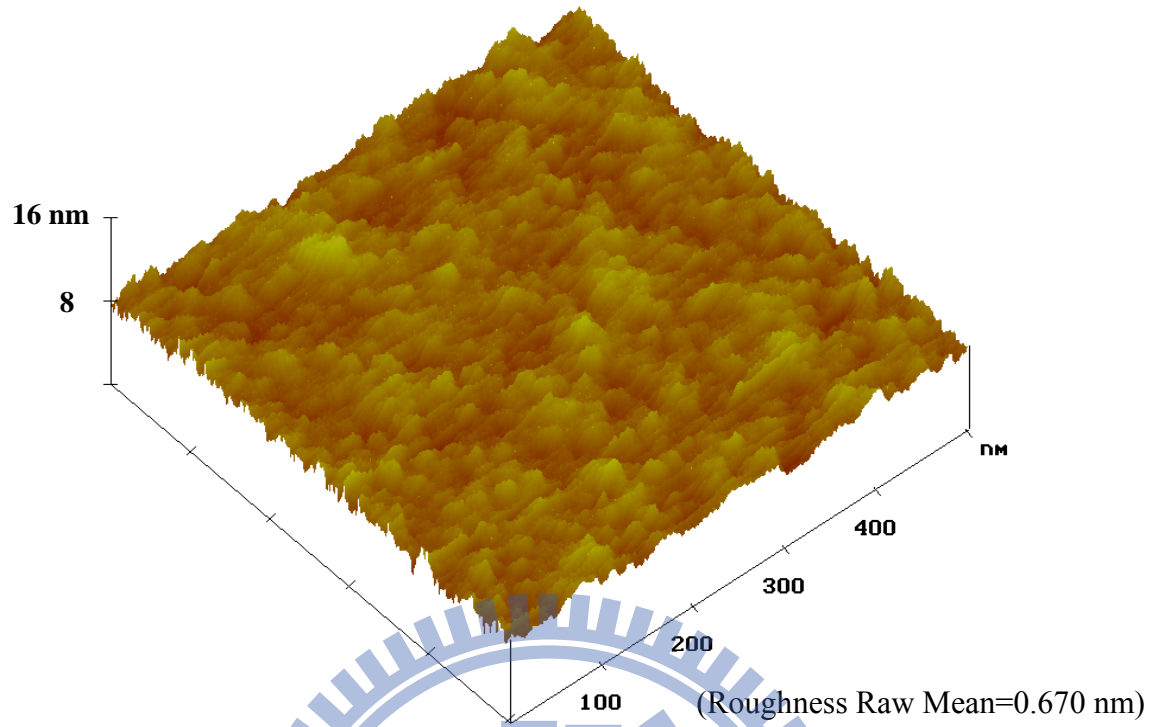


圖 20、二氧化鈦薄膜之 AFM 圖

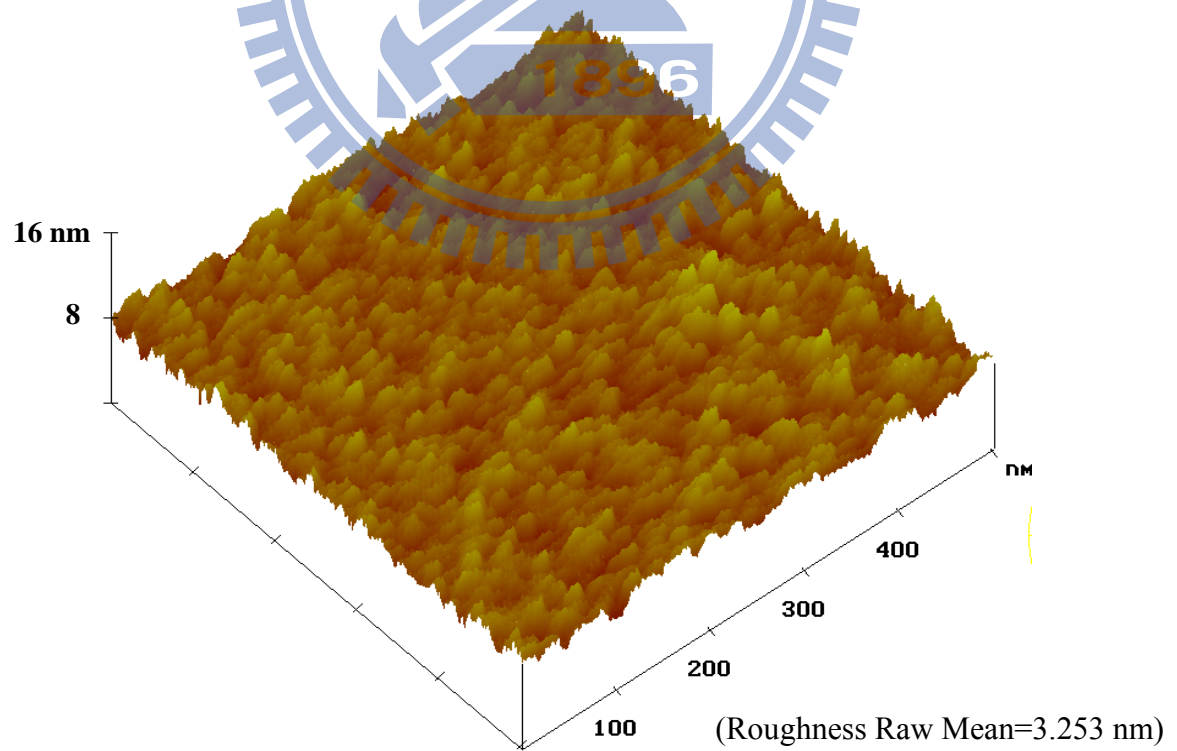


圖 21、以 $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:2$ 為溶膠凝膠組成之薄膜表面 AFM 圖

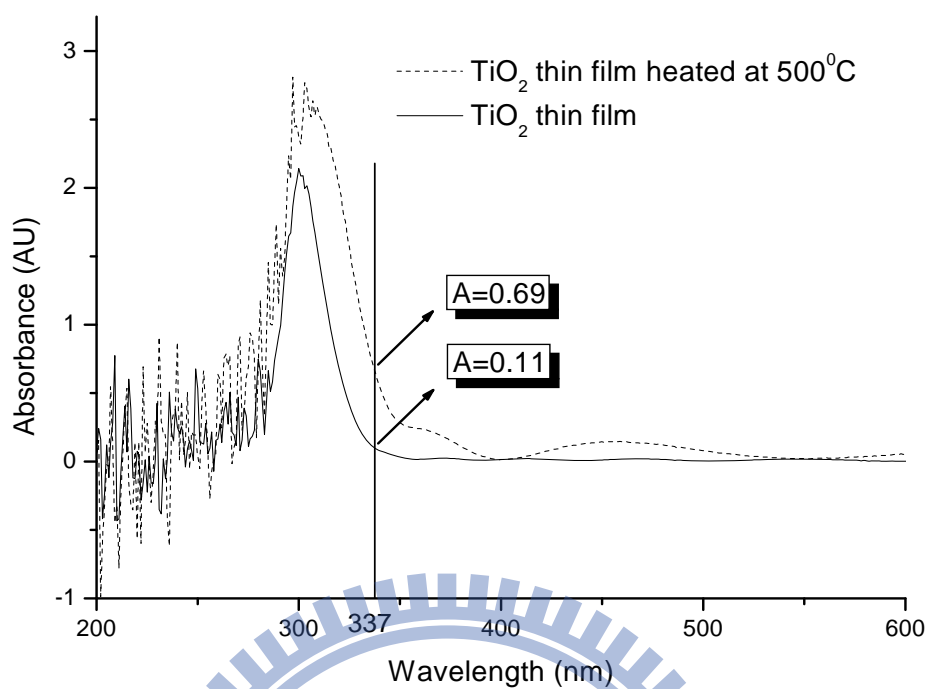


圖 22、二氧化鈦溶膠凝膠薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收圖

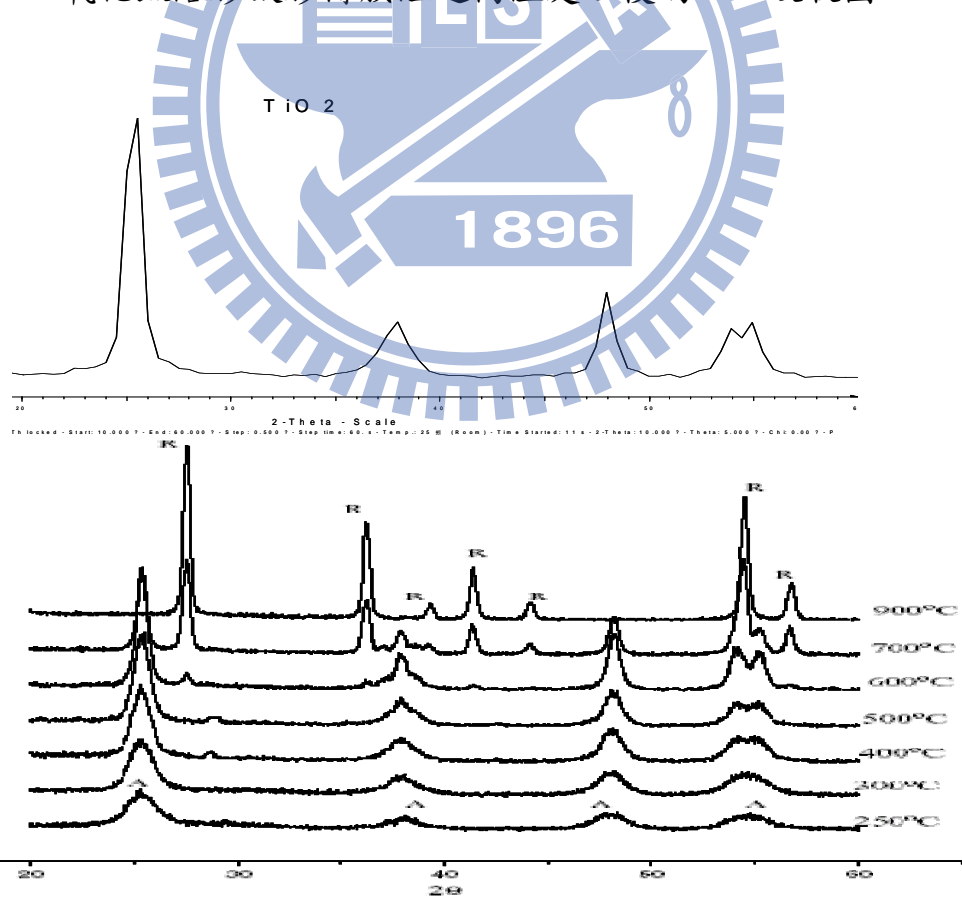


圖 23、二氧化鈦溶膠凝膠粉末經過高溫處理後的 X 光繞射圖

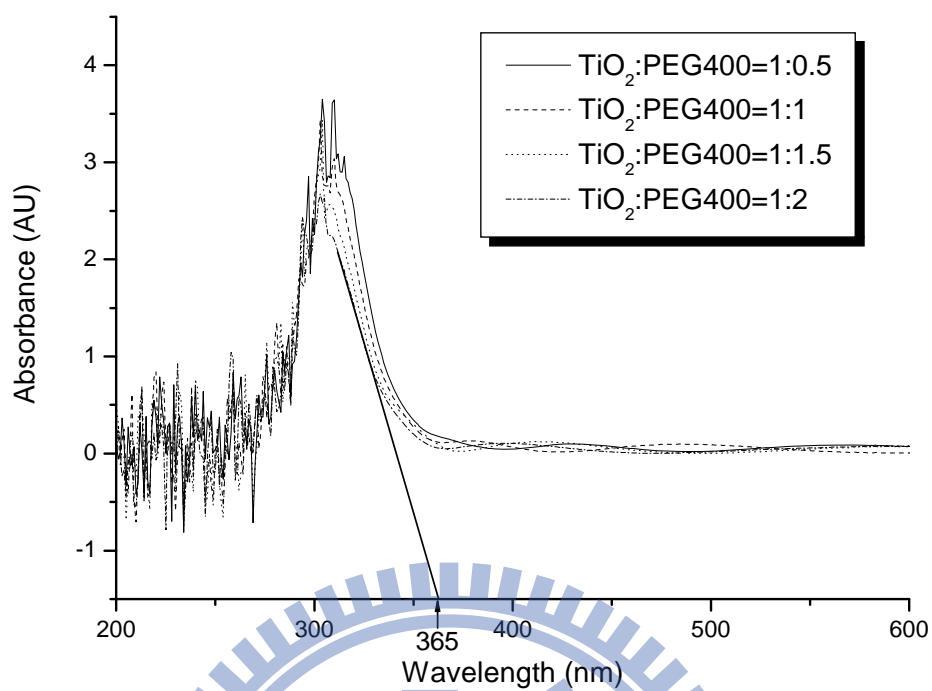
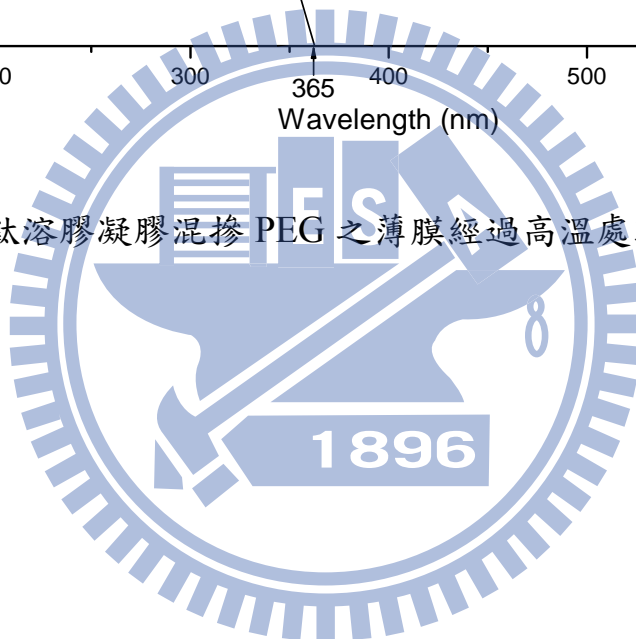


圖 24、二氧化鈦溶膠凝膠混摻 PEG 之薄膜經過高溫處理後的 UV 吸收圖



(5) 薄膜的性質對分析物訊號強度的影響

以具有不同性質的二氧化鈦薄膜為基質，我們嘗試在相同的操作條件下（打擊頻率、次數及雷射能量）觀察分析物的訊號強度是否有所變化。由圖 25~27 的比較圖中可以觀察到在相同條件下，不同的分析物如 Prometryn, Bradykinin, Melittin 的訊號皆會隨著 PEG 含量的增加而增強。為了進一步了解薄膜性質對分析物訊號的影響，我們以掃描式電子顯微鏡測量薄膜的厚度，如圖 28，並根據文獻中的公式¹⁰¹ ($\alpha = 2.303 \frac{1}{d} A$ ， α =吸收率， d =薄膜厚度， A =吸收度) 計算其在波長 337 nm 的吸收率，整理結果如表三所示。我們可以發現二氧化鈦薄膜在經過高溫處理後，其吸收率有大幅的增加，而添加 PEG 後也會使得吸收率上升，但是 PEG 的含量多寡似乎對二氧化鈦薄膜的吸收率沒有太明顯的影響，可能是因為 PEG 之含量之差距不大，但是 PEG 如再提高其在二氧化鈦溶膠凝膠的含量，則無法呈均相。對照圖 25~27 所得到的實驗結果，我們可以觀察到幾個現象：

(1) 二氧化鈦薄膜在經過高溫處理後，以其為基質所觀察到的質譜圖皆為分析物的假分子離子 (MH^+) 訊號，而沒有觀察到鈉、鉀離子的加成物訊號，而且二氧化鈦薄膜在經過高溫處理過後其碎裂程度會降低許多，如圖 29 所示，僅出現 $m/z=48, 64, 81, 97$ 相對於 $Ti^+, TiO^+, TiO_2H^+, TiO_3H^+$ 之離子。

(2) 二氧化鈦薄膜在經過高溫處理後，其表面仍然存在著較多的裂縫，因此在點樣時，樣品溶液仍會有些許的擴散，導致樣品的濃度下降，

加上高溫處理的過程薄膜孔洞中殘存的質子化來源如酸等均被移除，因而降低了分析物被質子化 (Protonation) 率，使得以高溫處理後的二氧化鈦薄膜為基質其質量偵測上限大約為 3 kDa，較未經過高溫處理的二氧化鈦薄膜低。為了進一步驗證質子化來源對以高溫處理後的二氧化鈦薄膜為基質進行 MALDI 分析有十分重要的影響性，我們以組成為 TiO_2 : PEG400=1:2 (莫耳比) 並經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜為基質，在薄膜上先加上一層甘油/甲醇 (15 %, 0.2 μl) 的溶液做為質子化的來源，再加入分析物 (0.2 μl)，並在乾燥後進行 MALDI 分析。圖 30 及 31 分別為以 Bradykinin 及 Melittin 為分析物所得到的 MALDI 質譜圖，可以觀察到分析物假分子離子訊號 (MH^+) 的解析度有明顯的改善，而鈉、鉀離子的加成物訊號也可以被觀察到，可能是甘油與甲醇的混合溶液中含有的鈉、鉀離子所致。利用此方法進行 MALDI 分析，我們可以觀察到 Insulin、Ubiquitin、Cytochrome c 的分析物訊號，其質量偵測上限有大幅度的提升，如圖 32~34，顯示二氧化鈦薄膜在經過高溫處理後具有相當的吸收率，如果能提供良好的質子化來源，能夠有效地改善其輔助分析物脫附游離的效率，而有利於進行分析。

(3) 添加 PEG 後得到的二氧化鈦薄膜在經過高溫處理後其吸收率較未添加 PEG 的二氧化鈦薄膜來得高，所以我們可以觀察到分析物的訊號會有增強的趨勢。至於為何分析物的訊號強度似乎有隨著 PEG 的含量增加而增強的趨勢，其作用機制尚未十分清楚，但是根據文獻中的研究指出，在 DIOS 及 SALDI 的脫附游離機制中，矽基材或石墨的表面孔洞性質及粗糙度扮演十分重要的角色。⁹⁶ 多孔性的矽基材能夠捕捉住分析物及

溶劑，利用其具有吸收 UV 雷射能量的特性，將能量傳遞給分析物，並結合矽基材的高熱傳導性質進而協助分析物的脫附游離。^{79, 81, 104} 而本實驗的結果可以推論為較粗糙的表面由於具有較大的比表面積，所以能夠吸收較多的雷射能量進而傳遞給分析物，因此分析物的訊號強度會隨著 PEG 的含量增加而增強。

表三、不同二氧化鈦薄膜在波長 337 nm 的吸收率比較

樣品名稱 (Sample)	吸收度 (Absorbance) (AU)	薄膜厚度 (Thickness) (nm)	吸收係數 (Absorption) coefficient (10^6 m^{-1})	絕對標準 偏差 (10^6 m^{-1})
TiO ₂	0.1355	447	0.69	0.07
TiO ₂ (heated)	0.8077	565	3.30	0.13
TiO ₂ :PEG400=1:0.5 (heated)	0.7044	298	5.44	0.10
TiO ₂ :PEG400=1:1 (heated)	0.6874	276	5.74	0.08
TiO ₂ :PEG400=1:1.5 (heated)	0.5781	251	5.31	0.16
TiO ₂ :PEG400=1:2 (heated)	0.5011	201	5.75	0.07

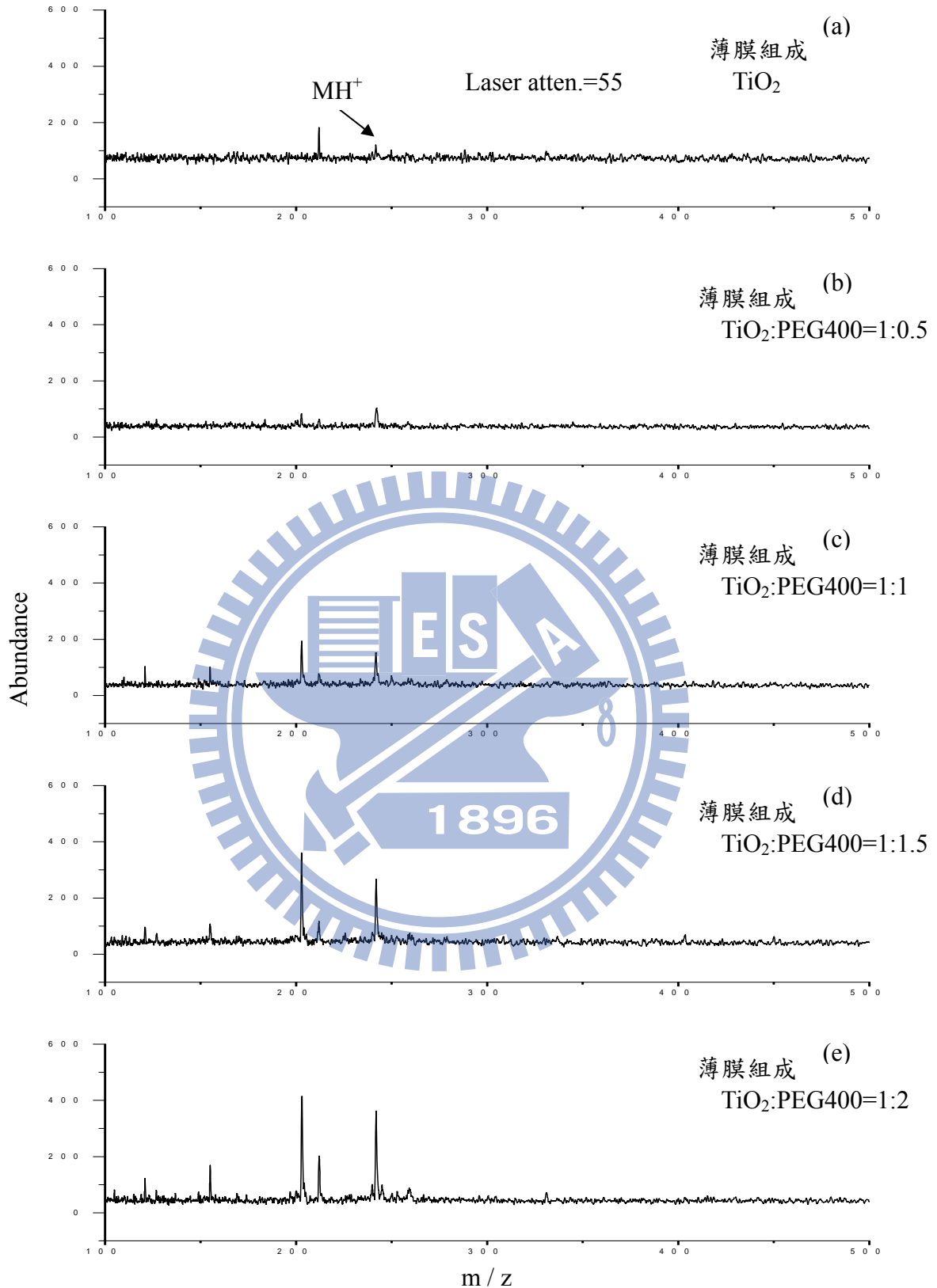


圖 25、以 Prometryn (1000 ppm, 0.2 μl) 為分析樣品，二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO_2 (b) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:0.5$ (c) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1$ (d) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1.5$ (e) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:2$ 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

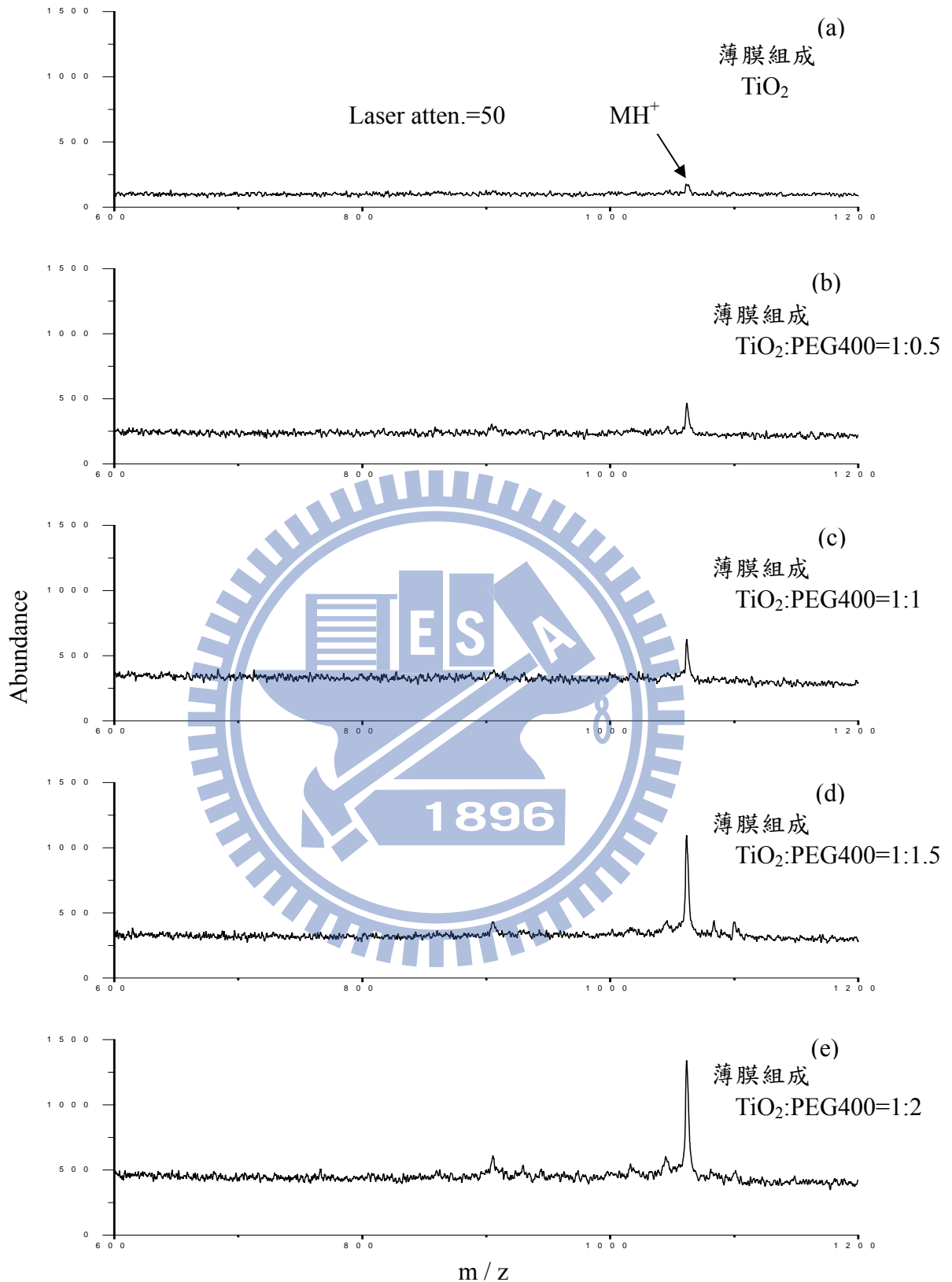


圖 26、以 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μl) 為分析樣品，二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO_2 (b) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:0.5$ (c) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1$ (d) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1.5$ (e) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:2$ 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

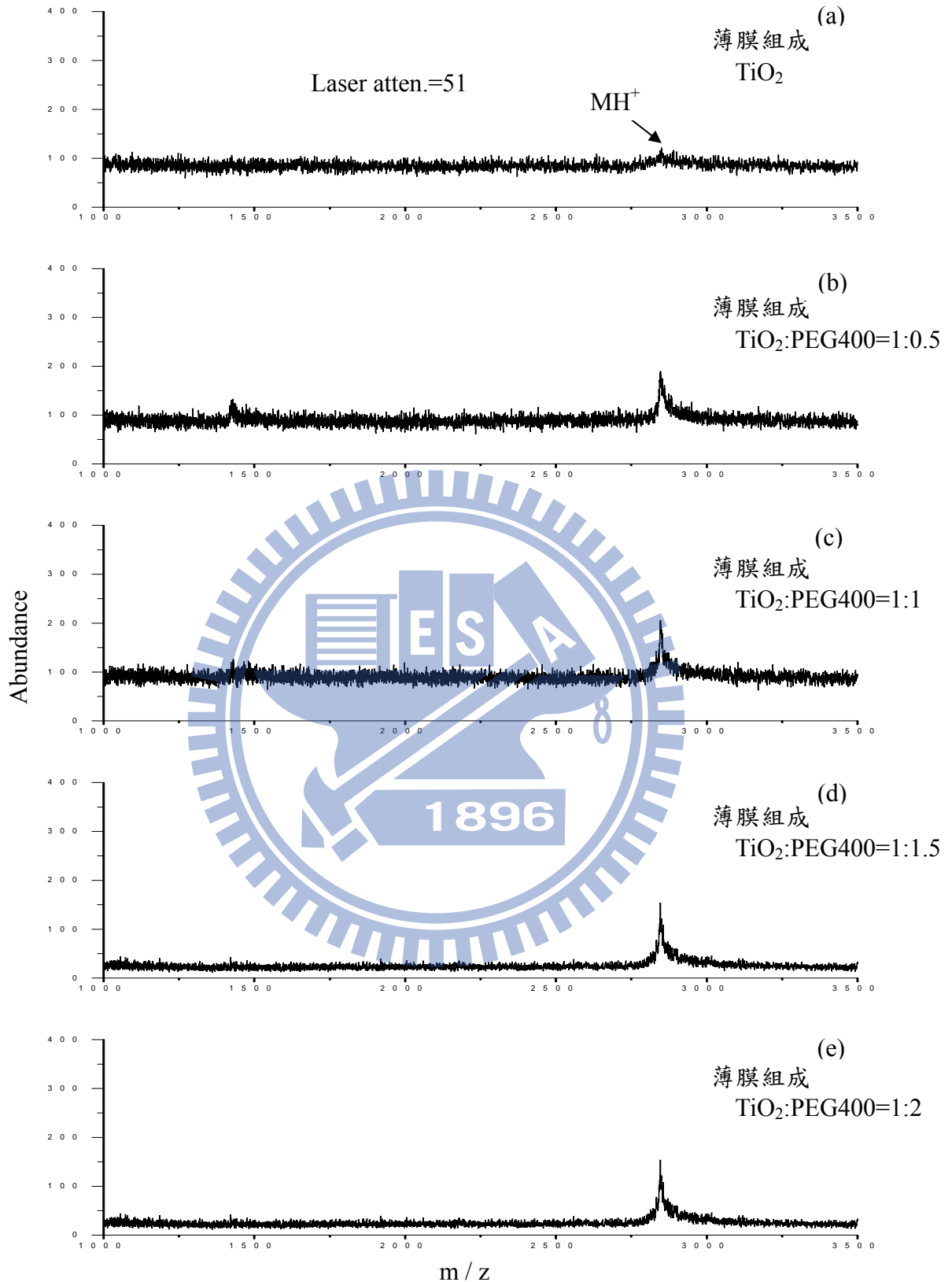
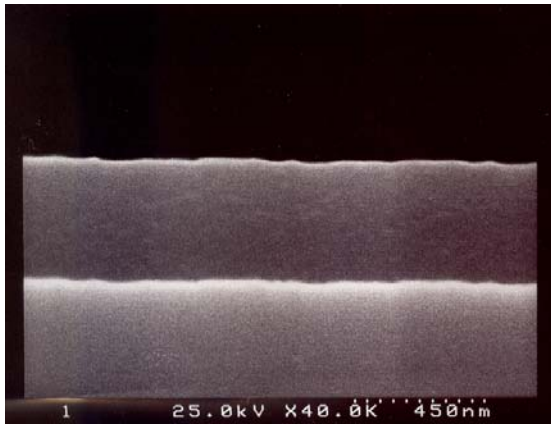


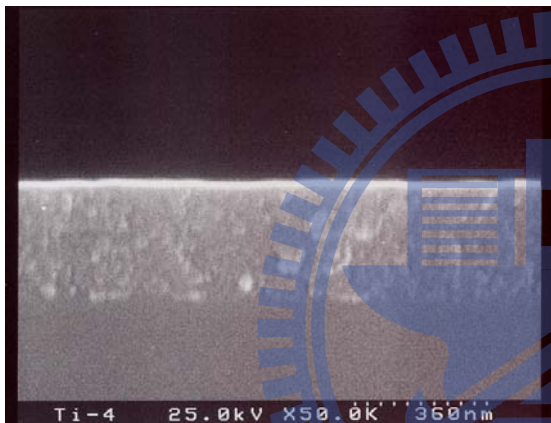
圖 27、以 Melittin (1000 ppm, 0.2 μl) 為分析樣品，二氧化鈦混摻不同莫耳比例的 PEG 之薄膜 (a) TiO_2 (b) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:0.5$ (c) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1$ (d) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1.5$ (e) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:2$ 經過高溫處理後為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖



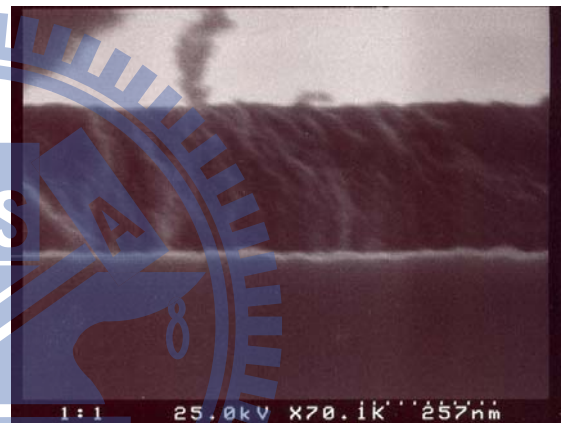
(a) TiO_2



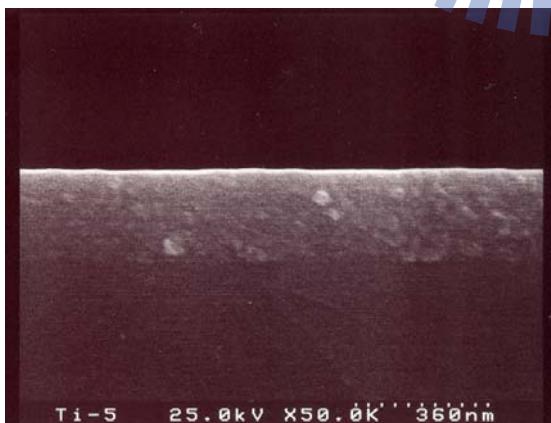
(b) TiO_2 heated at 500°C



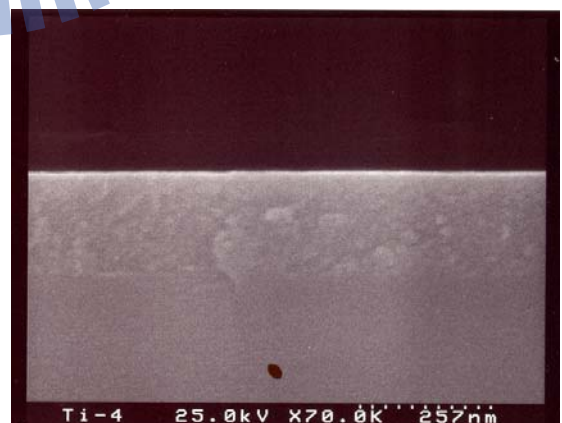
(c) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:0.5$



(d) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1$



(e) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:1.5$



(f) $\text{TiO}_2:\text{PEG400}=1:2$

圖 28、二氧化鈦薄膜的厚度之 SEM 圖

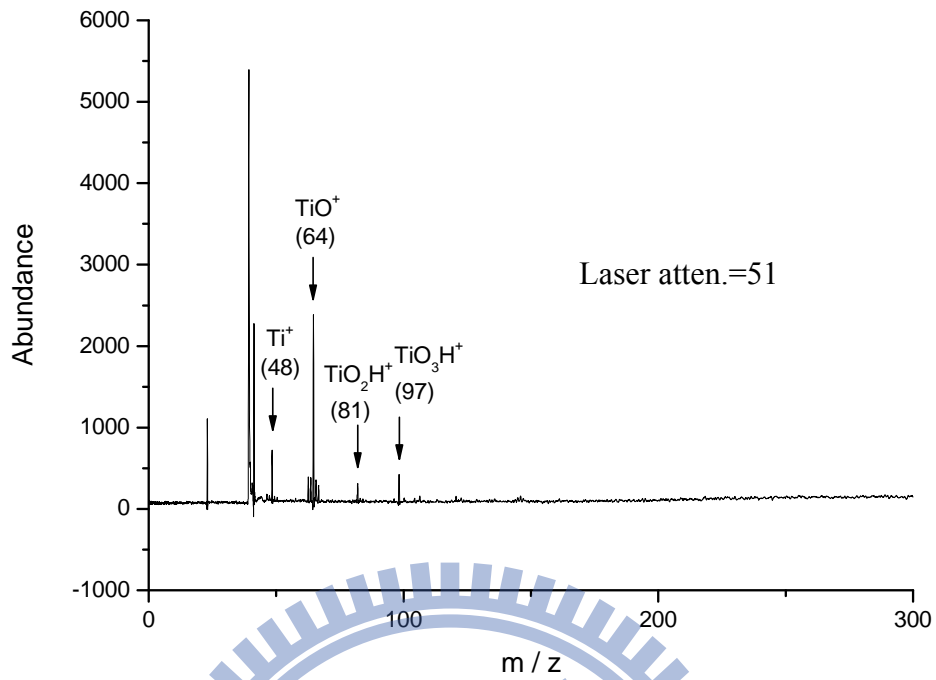


圖 29、經過高溫處理後的 TiO_2 薄膜的 MALDI 背景質譜圖

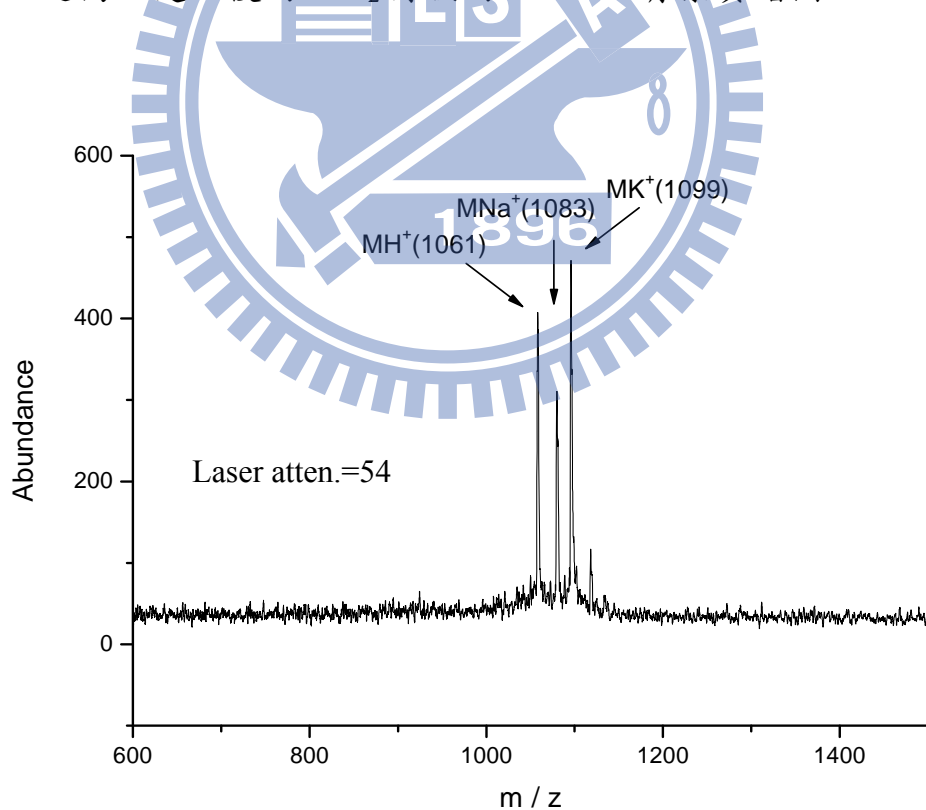


圖 30、以 Bradykinin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO_2 :PEG400=1:2(莫耳比)經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

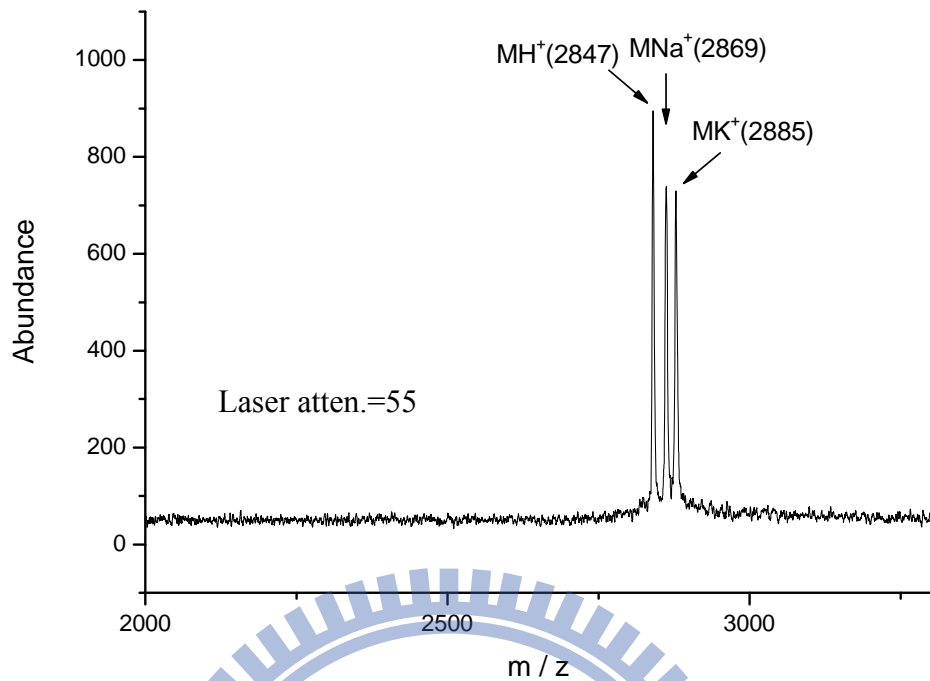


圖 31、以 Melittin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO_2 :PEG400=1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

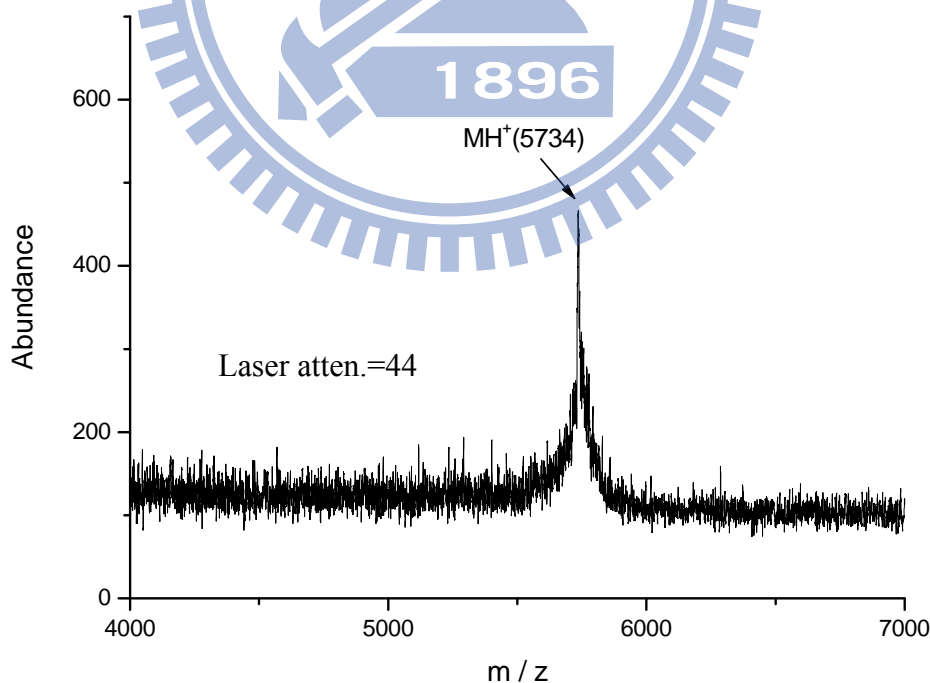


圖 32、以 Insulin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO_2 :PEG400=1:2 (莫耳比) 經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15% 的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

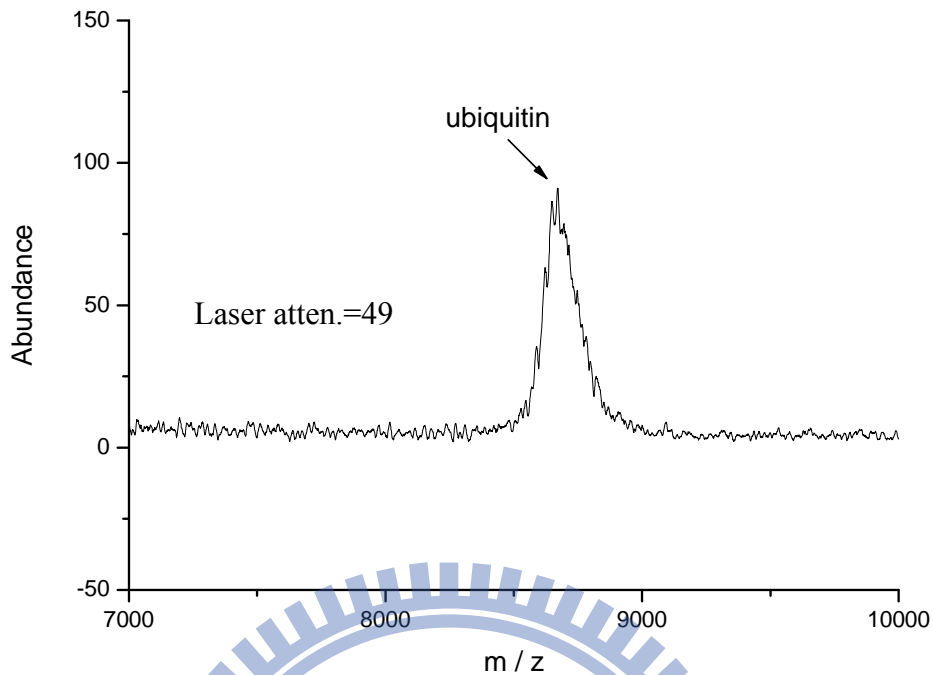


圖 33、以 Ubiquitin (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO_2 :PEG400=1:2(莫耳比)經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15%的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

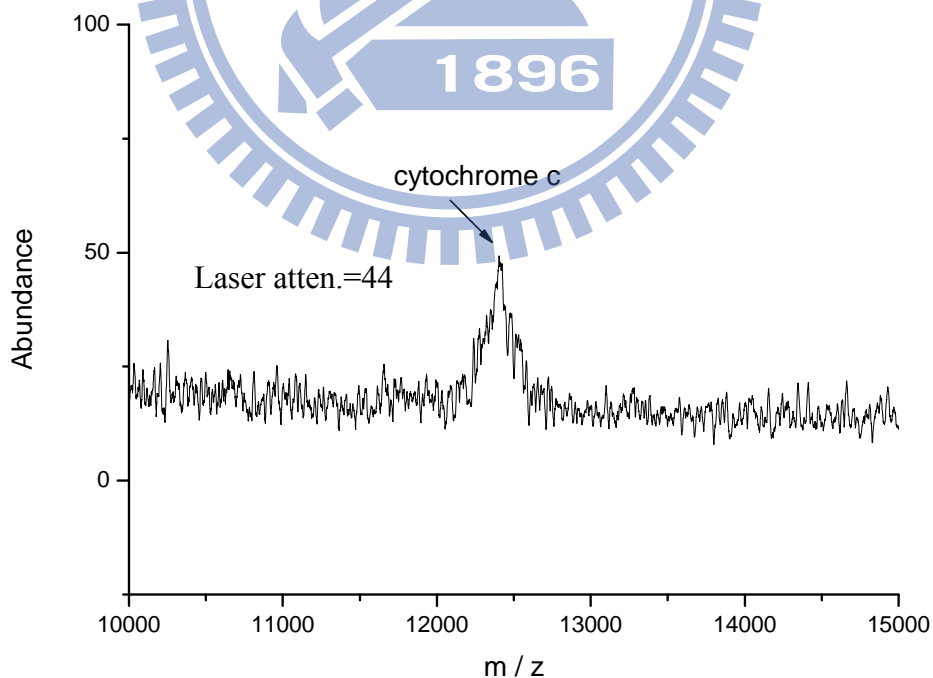


圖 34、以 Cytochrome c (1000 ppm, 0.2 μ l) 為分析樣品，組成為 TiO_2 :PEG400=1:2(莫耳比)經過高溫處理後的二氧化鈦薄膜並添加 15%的甘油溶液 (0.2 μ l) 為 MALDI 基質，在 MALDI 分析下所得之質譜圖

三、二氧化鈦溶膠凝膠材料分子辨識模板之製造

(1) 以二氧化鈦溶膠凝膠材料轉印 α 型環糊精分子

在二氧化鈦溶膠凝膠材料的製程中， α 型環糊精分子被混摻其中，以轉印 α 型環糊精分子於溶膠凝膠材料中。在轉印的過程中，起初試著以高溫處理法除去 α 型環糊精分子，以 α 型環糊精分子結構的孔洞萃取 α 型環糊精分子，但是此模板並無明顯的分子辨識效果，可能是由於高溫處理造成了結構上的破壞，因此使得 α 型環糊精分子的空洞架構無法形成。由於 α 型環糊精分子與溶膠凝膠材料在製作過程當中並未形成共價鍵結，因此我們可以在混成溶膠凝膠薄膜形成後，利用水洗法將 α 型環糊精分子洗去，而留下具有 α 型環糊精分子結構的孔洞，並且孔洞表面的羥基可能能夠藉由氫鍵作用力親和辨識 α 型環糊精分子並將 α 型環糊精分子抓取並固定於孔洞，將此模板經由雷射脫附質譜法進行分析，可達到辨識確認 α 型環糊精的效果。

圖 35 是二氧化鈦混摻 α 型環糊精塗附在蓋玻片的薄膜，未經水洗前在高雷射能量照射下的 MALDI 質譜圖，除了有二氧化鈦薄膜本身的背景訊號外，還可以觀察到 α 型環糊精的鈉、鉀離子的加成物訊號，顯示在二氧化鈦薄膜中的確含有 α 型環糊精。當我們以 500 ml 的水，在 35°C 的水浴下攪拌沖洗 2 小時後，在同樣強度的高雷射能量照射進行此薄膜之雷射脫附質譜法，並沒有觀察到 α 型環糊精的鈉、鉀離子的加成物（如圖 36 所示），可以知道 α 型環糊精已經水洗從薄膜中移除，產生具有 α 型環糊精孔洞的薄膜，其示意圖如圖 37、38 所示。而為了進一步證明 α

α 型環糊精可以以水洗法從薄膜中移去，我們將塗佈有二氧化鈦混摻 α 型環糊精的蓋玻片以 15 ml 的水在 35°C 水浴下攪拌沖洗 2 小時，取其水洗液為分析物並以二氧化鈦薄膜為基質進行分析。圖 39 是由三片蓋玻片的水洗液所得到的 MALDI 質譜圖，我們可以發現到有 α 型環糊精的鈉離子的加成物訊號，顯示 α 型環糊精確實能夠經由水洗法從薄膜中移去。而在相同的水洗條件下，隨著水洗蓋玻片的數目增加， α 型環糊精的鈉離子的加成物訊號也愈強，如圖 40 所示。

(2) 以環糊精為分析物直接以已洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜為 MALDI 基質分析之偵測極限探討

取已洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜為基質，直接在薄膜上點上 α 型環糊精的水溶液進行 MALDI 分析，可以觀察到 α 型環糊精 (1000 ppm, 0.2 μ l) 的鈉、鉀離子的加成物訊號，如圖 41 所示，顯示二氧化鈦薄膜在水洗後仍然具有做為 MALDI 基質的特性，而這也是本實驗中十分重要的發現，如此我們可以以此薄膜在水相中進行特定分析物之微量萃取，而不需另外添加傳統基質即可直接進行偵測。同樣地我們也可以觀察到 β 型環糊精 (圖 42) 及 γ 型環糊精 (圖 43) 的鈉、鉀離子的加成物訊號。而此方法之偵測極限分別為 α 型環糊精—0.2 pmol、 β 型環糊精—8.8 pmol 及 γ 型環糊精—0.77 pmol，如圖 44~46。

(3) 以洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜為分子辨識探針親和萃取水中微量之 α 型環糊精

如圖 47 所示，以洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜為分子辨識探針對水中 α 型環糊精 (100 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識而以 MALDI 為偵測方

法所得之質譜圖，我們可以發現到具有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜對 α 型環糊精具有萃取的效果，而可辨識到的萃取偵測極限為 10 ppb (18 ml)，其偵測極限和直接點樣比較起來約降低了 10000 倍，如圖 48 為萃取後由 MALDI 分析所得之質譜圖。而同樣的二氧化鈦薄膜因為沒有 β 及 γ 型環糊精孔洞，因此並沒有辦法經由辨識而達到萃取濃縮的效果，因此偵測極限並無明顯改善，如圖 49~50 所示，僅在濃度 50 ppm 以上可被偵測，結果和有無進行萃取並無差別，顯示模板並沒有萃取 β 及 γ 型環糊精的效果。由此實驗結果，我們可以得知含有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜對 α 型環糊精具有專一性，在萃取的過程中只允許具有同樣構形大小的 α 型環糊精進入模板中。



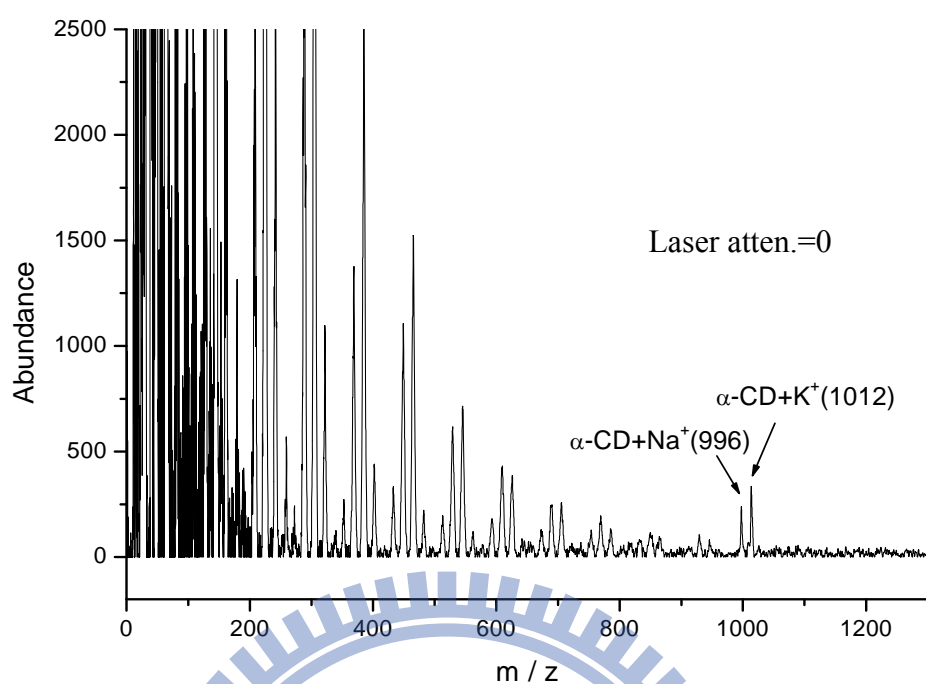


圖 35、以 TiO_2 : α -CD=300:1 (莫耳比) 為組成之溶膠凝膠薄膜直接進行 MALDI 分析之質譜圖

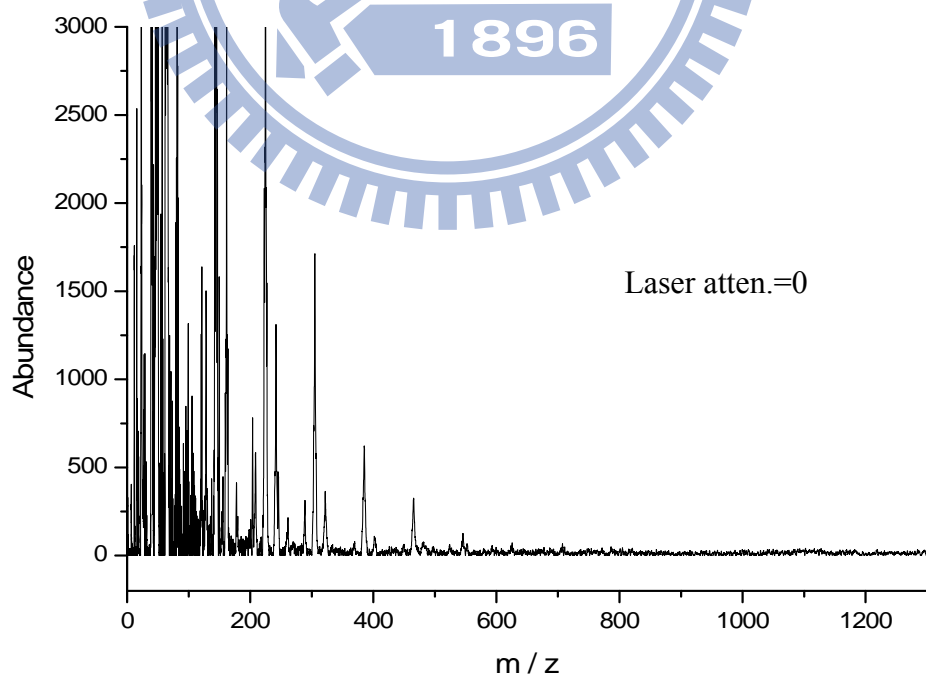


圖 36、以 TiO_2 : α -CD=300:1 (莫耳比) 為組成之溶膠凝膠薄膜，在水洗後直接進行 MALDI 分析之質譜圖

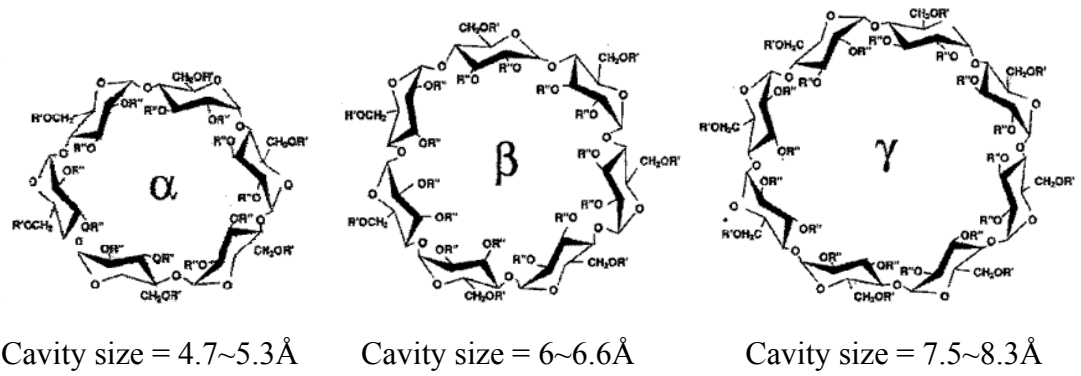


圖 37、 α , β , γ 型環糊精分子的大小結構示意圖

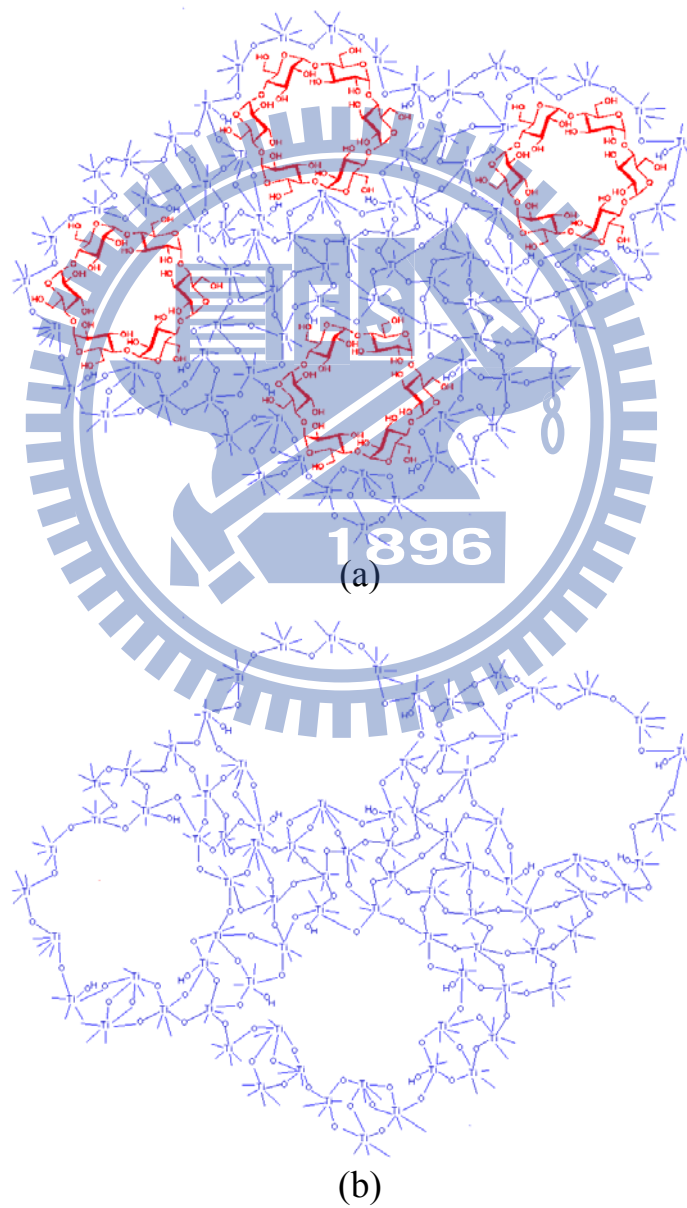


圖 38、(a) 二氧化鈦薄膜混摻 α 型環糊精示意圖
 (b) 以水洗去 α 型環糊精的二氧化鈦薄膜示意圖

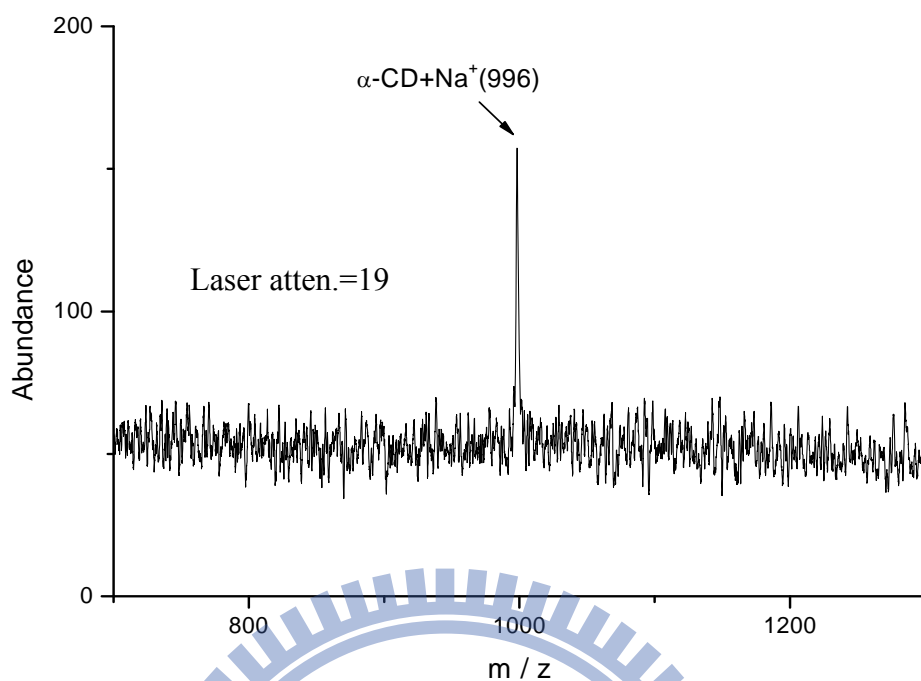


圖 39、水洗 3 片塗佈有二氧化鈦薄膜 (組成為 $\text{TiO}_2:\alpha\text{-CD}=300:1$ (莫耳比)) 蓋玻片, 取其水洗液 (0.2 μl) 以純二氧化鈦薄膜為 MALDI 分析之基質進行 MALDI 分析所得之質譜圖

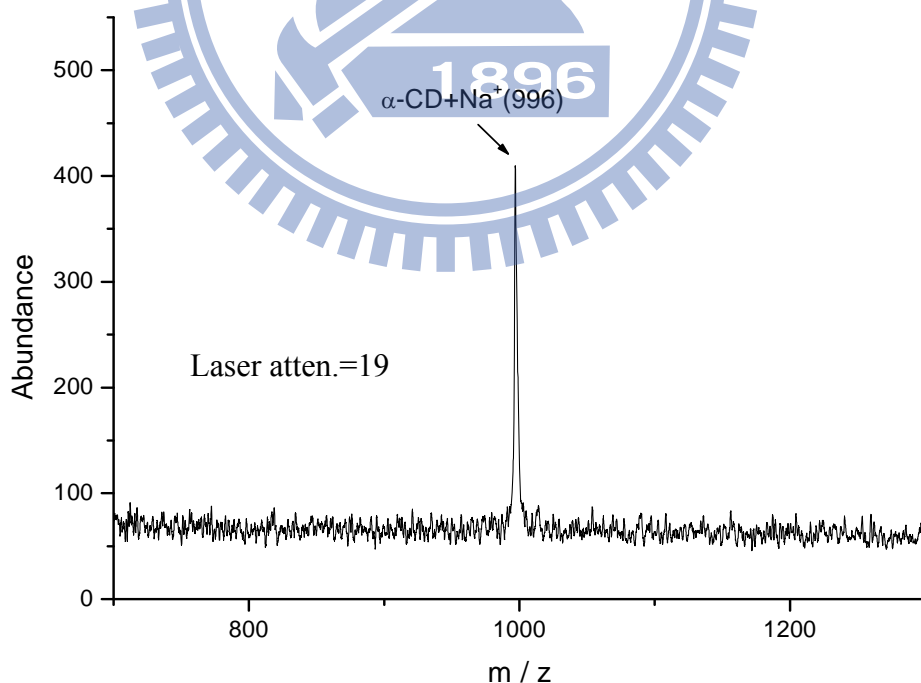


圖 40、以與圖 34 相同水量 (15 ml) 水洗 7 片塗佈有二氧化鈦薄膜 (組成為 $\text{TiO}_2:\alpha\text{-CD}=300:1$ (莫耳比)) 蓋玻片, 取其水洗液 (0.2 μl) 以純二氧化鈦薄膜為 MALDI 分析之基質進行 MALDI 分析所得之質譜圖

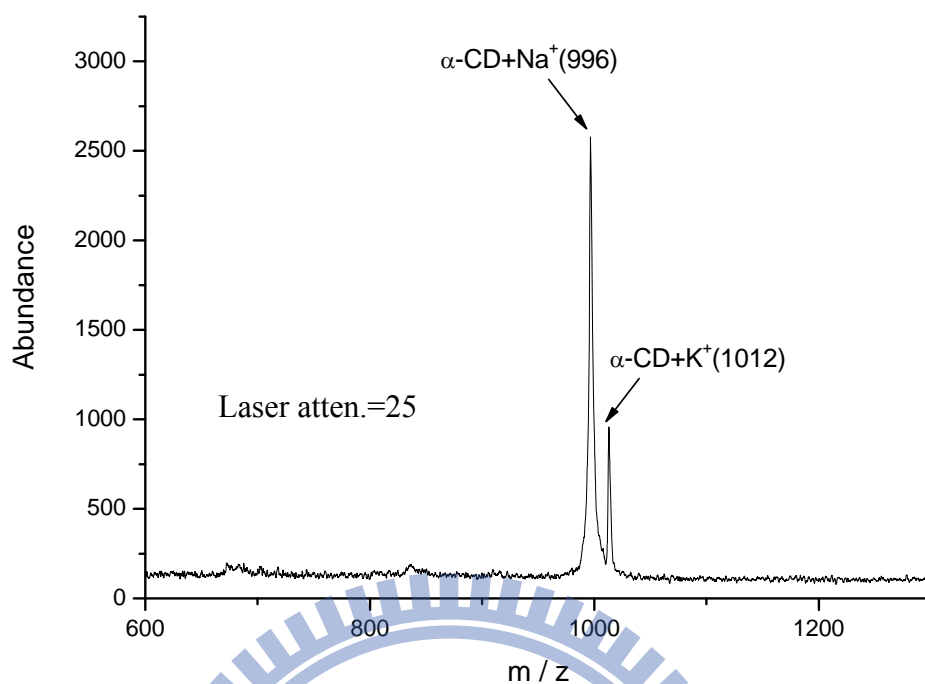


圖 41、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 $\alpha\text{-CD}$ 1000 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖

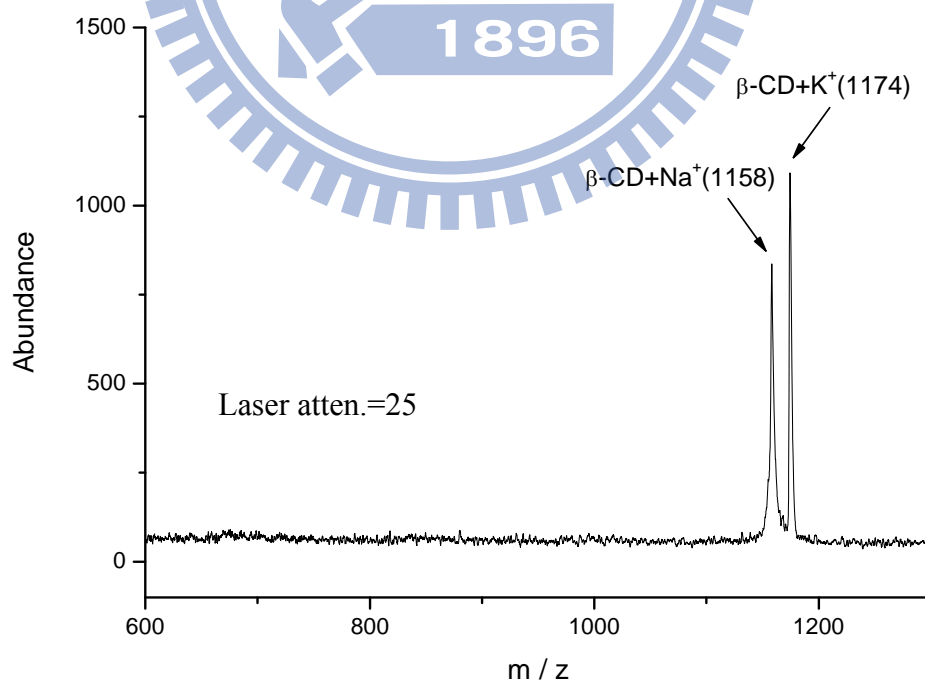


圖 42、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 $\beta\text{-CD}$ 1000 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖

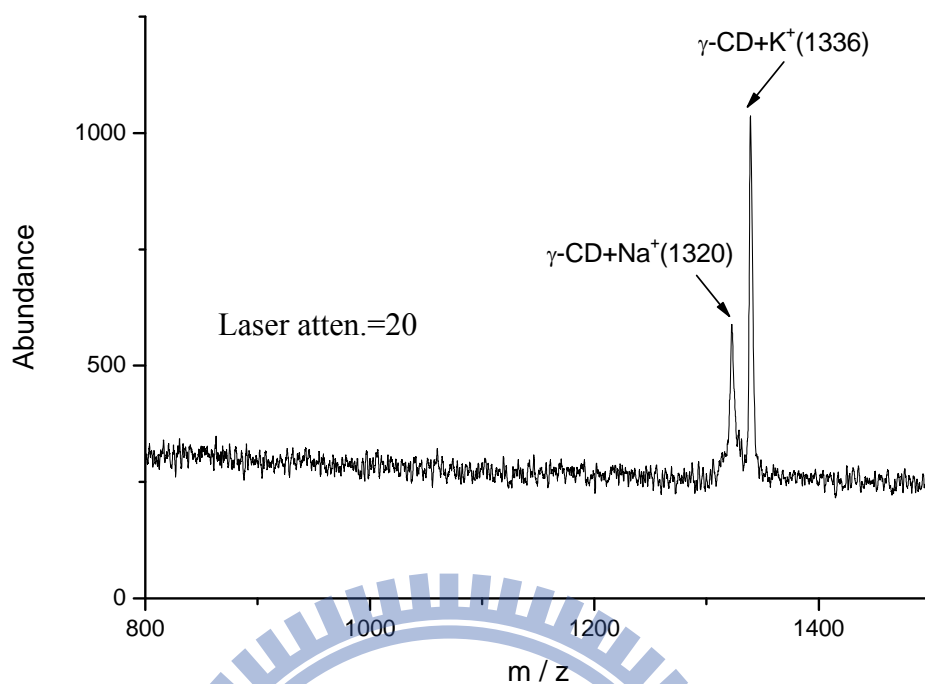


圖 43、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 $\gamma\text{-CD}$ 1000 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖

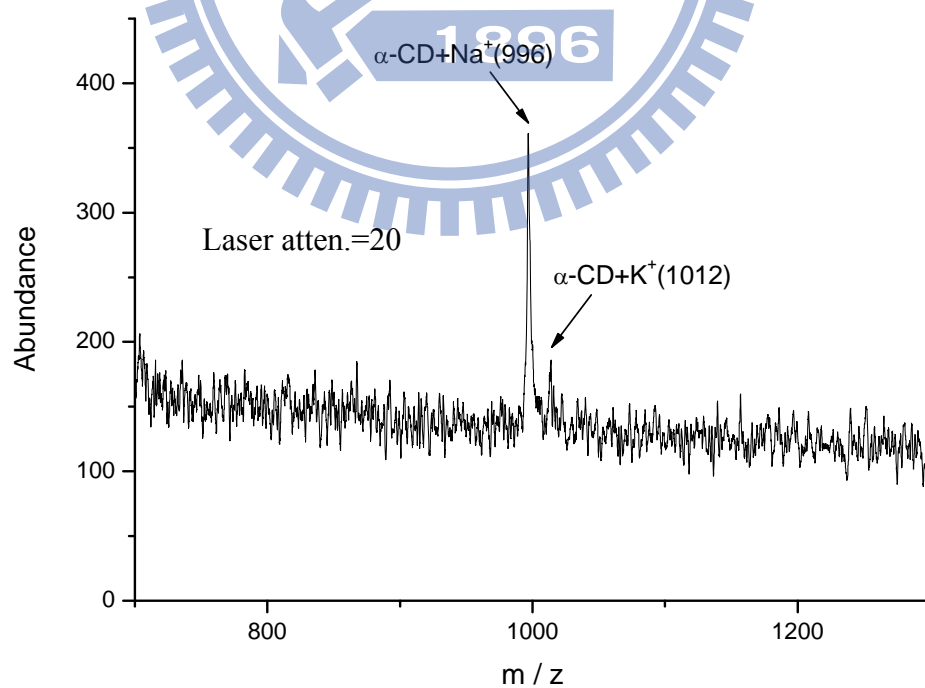


圖 44、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 $\alpha\text{-CD}$ 100 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖

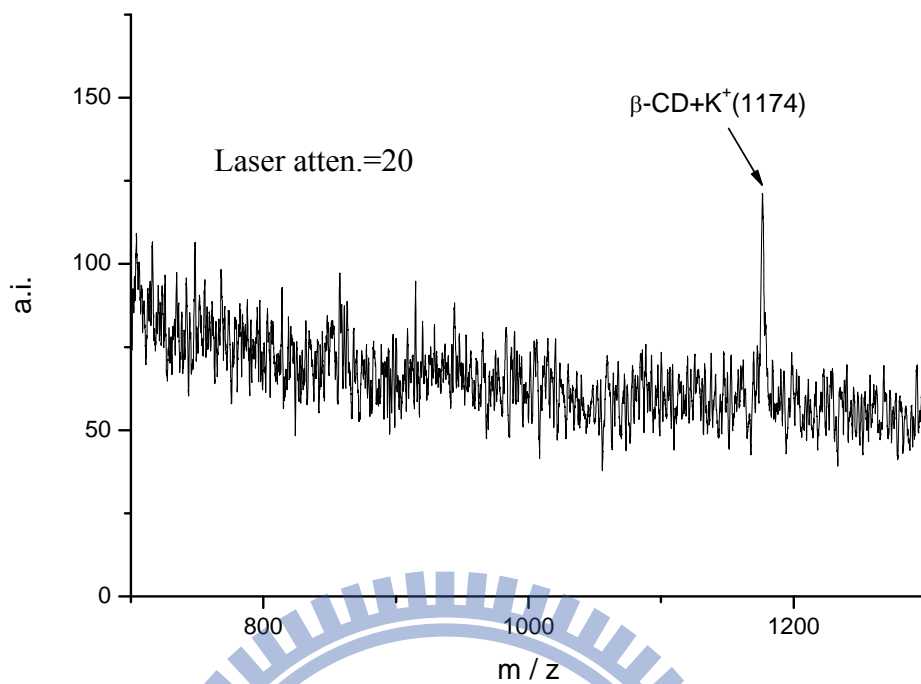


圖 45、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 β -CD 50 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖

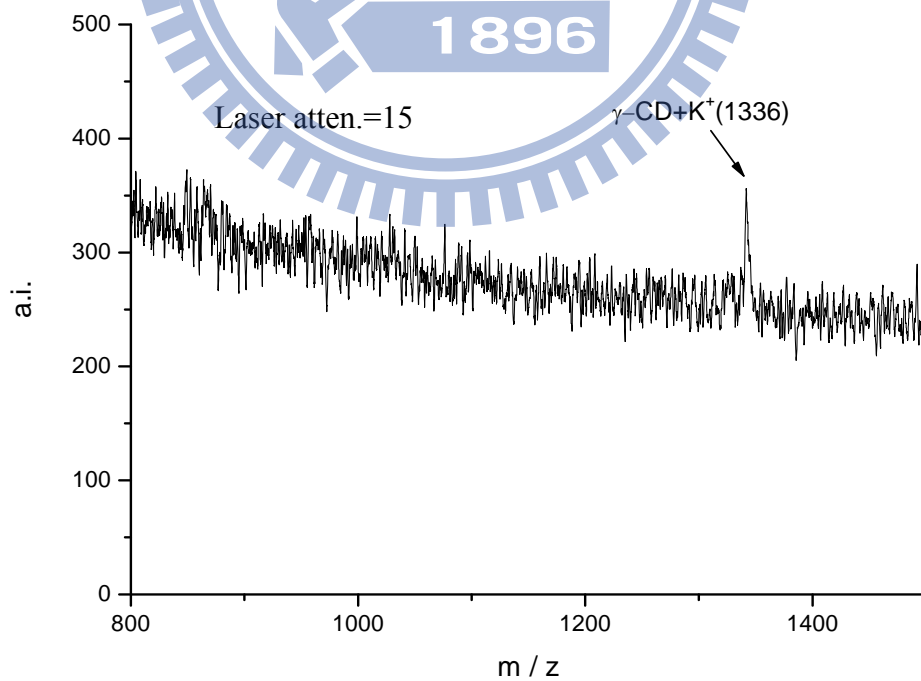


圖 46、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 γ -CD 100 ppm (0.2 μ l) 為樣品進行分析所得的 MALDI 質譜圖

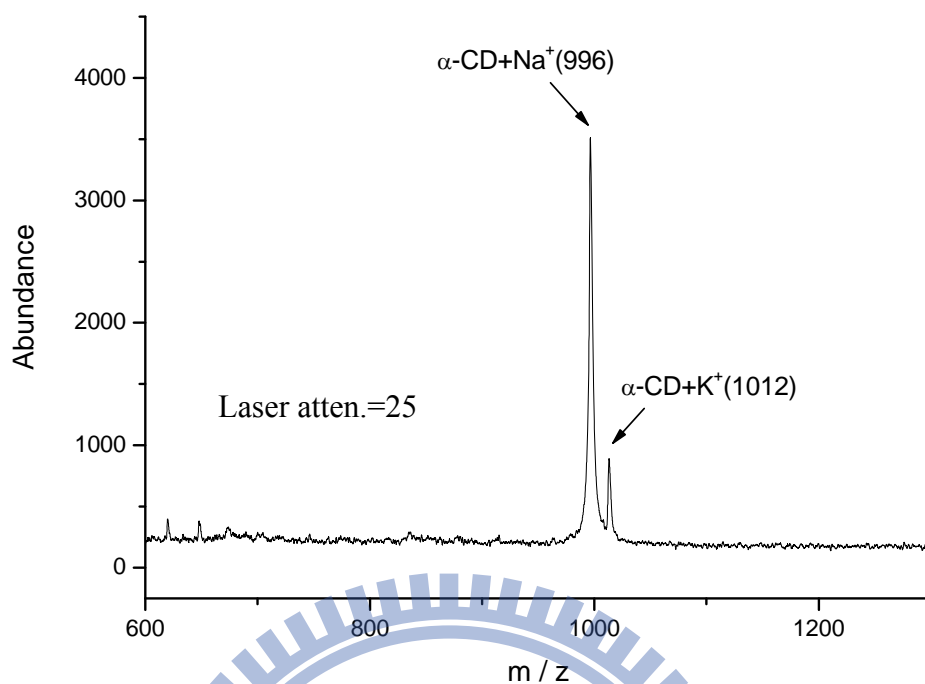


圖 47、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 $\alpha\text{-CD}$ (100 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖

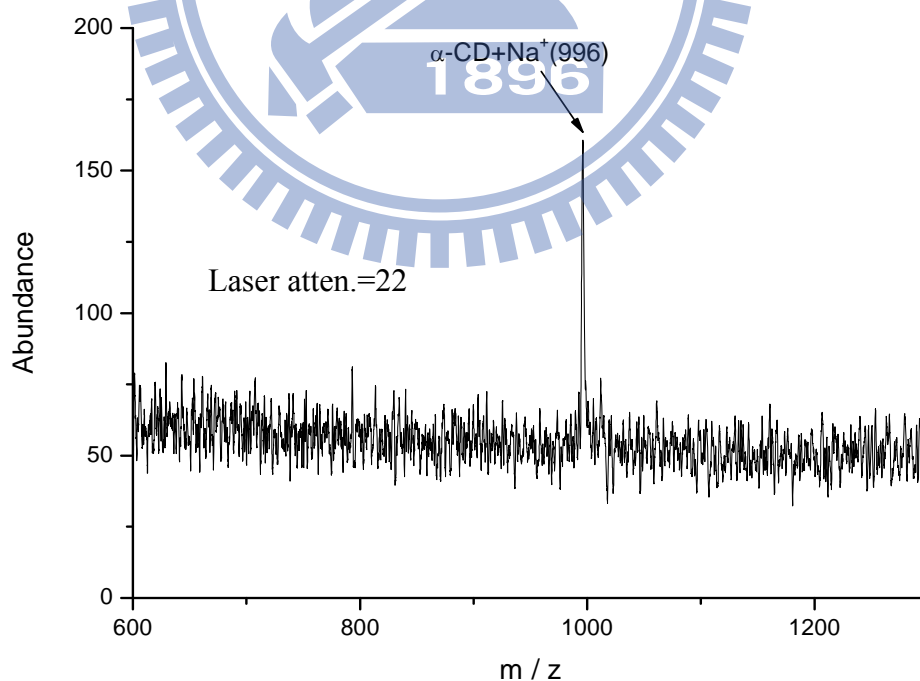


圖 48、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 $\alpha\text{-CD}$ (10 ppb, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖

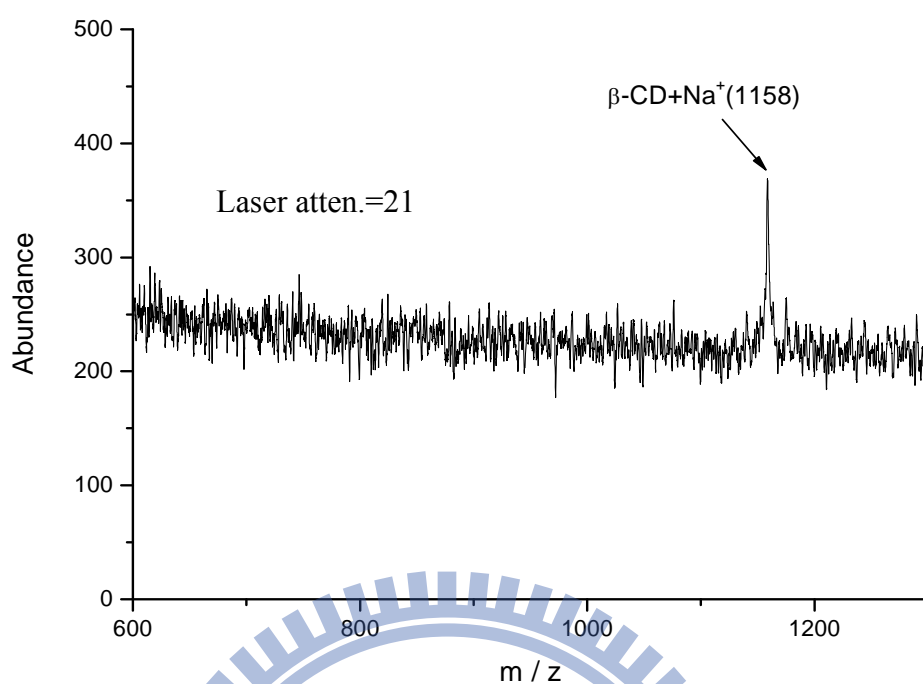


圖 49、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 $\beta\text{-CD}$ (50 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖

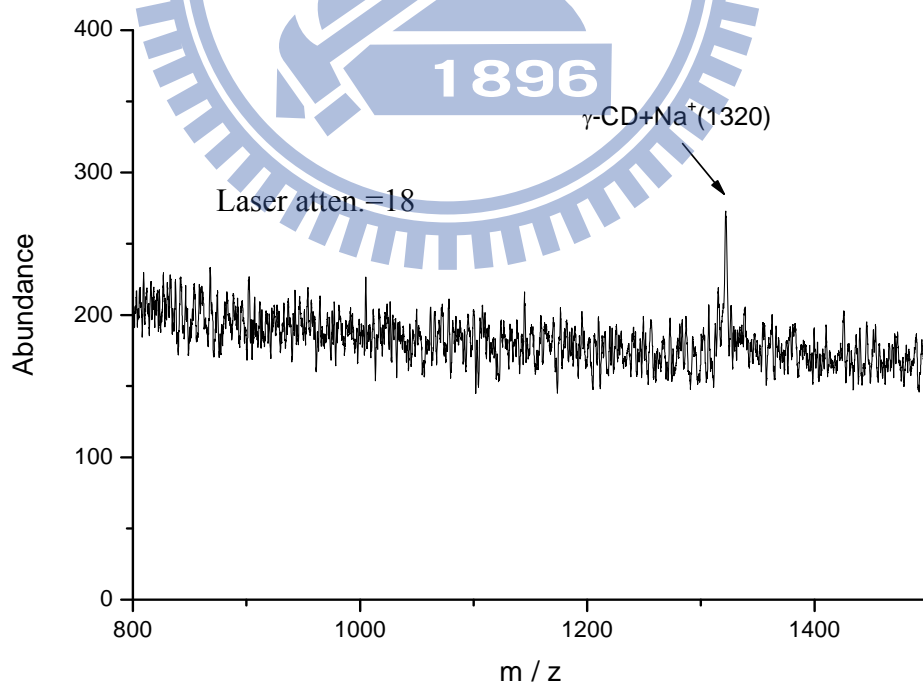


圖 50、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為分子辨識模板，對水中微量 $\gamma\text{-CD}$ (50 ppm, 18 ml) 進行萃取辨識 (萃取時間 2 小時)，萃取模板再以 MALDI 進行分析所得之質譜圖

(4) 以二氧化鈦薄膜為萃取探針對環糊精分子萃取能力之探討

為了驗證含有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜對 α 型環糊精在親和萃取中具有專一辨識效果，我們以在相同水洗條件下的純二氧化鈦薄膜為基質對 α 、 β 及 γ 型環糊精作直接點樣 MALDI 分析，及以純二氧化鈦薄膜萃取 18 ml 之微量環糊精，再以 MALDI 進行分析。由圖 51~56 中我們可以觀察到 α 、 β 及 γ 型環糊精直接點樣的 MALDI 分析偵測極限分別為 50 ppm、50 ppm 及 100 ppm (0.2 μ l)，而萃取後的偵測極限則分別降低為 10 ppm、10 ppm 及 50 ppm (18 ml)，顯示在相同水洗條件下的純二氧化鈦薄膜可能對水中環糊精分子具有些許的萃取能力，而含有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜對 α 型環糊精因具分子辨識孔洞而可達到較低濃度（約小於 1000 倍）之萃取，因此證明了在二氧化鈦薄膜上轉印特定分子的構形而以 MALDI 為偵測方法，可以達到辨識樣品溶液中微量特定分子的目的。

(5) 混合溶液的辨識能力

為了證明含有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜具有辨識 α 型環糊精分子的能力，我們配製了含有相同濃度 α 、 β 及 γ 型環糊精的混合溶液進行直接點樣偵測及萃取。圖 57 及 58 分別為 α 、 β 及 γ 型環糊精的混合溶液以二氧化鈦薄膜及水洗後的二氧化鈦薄膜為基質直接點樣偵測所得之偵測極限濃度，分別為 10 ppm 及 100 ppm。而對混合溶液進行萃取的結果如圖 59~62 所示，我們可以得知在濃度較高時可以觀察到 α 、 β 及 γ 型環糊精的鈉、鉀離子的加成物訊號（圖 59 及 60），而隨著濃度降低，只剩下 α 型環糊精的鈉、鉀離子的加成物訊號（圖 61 及 62），證明了含

有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜能夠在混合溶液辨識出具有 α 型環糊精構形的分子，而其可達「分子辨識」效果的濃度約為 1 ppm (18 ml)。

(6) 萃取時間對分子辨識效果的影響

利用模板為萃取探針，主要的原理是利用分析物在樣品溶液與探針上之吸附劑之間達到分配平衡後，而可得最佳萃取效果，而時間是影響分配係數十分重要的因素。為了瞭解萃取時間對分子辨識效果的影響，我們將萃取的時間自 2 小時延長為 3 小時，得到的結果如圖 63~66 所示。在圖中我們可以發現到萃取時間的增加會使得特定欲辨識的 α 型環糊精的訊號在 MALDI 圖譜中有增強之趨勢；樣品溶液中環糊精的濃度從 1 ppm 降低到約 100 ppb (圖 63)，而萃取時間延長至 3 小時，可在 MALDI 質譜圖中只明顯觀察到 α 型環糊精，在混合溶液濃度降低為 50 ppb 時，二氧化鈦薄膜仍然可以僅辨識 α 型環糊精分子，如圖 66 所示。

(7) 分子構形大小對分子辨識效果的影響

本實驗成功地以具有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜在 α 、 β 及 γ 型環糊精的混合溶液親和辨識 α 型環糊精，而由於 α 型環糊精的分子構形小於 β 及 γ 型環糊精，因此我們十分好奇分子構形小於 α 型環糊精的小分子是否能夠進入 α 型環糊精的孔洞結構中而被選擇萃取。在實驗中我們以 3,5-Diaminobenzoic acid (3,5-DABA) 為分析物，以具有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜為基質進行直接點樣偵測及萃取，選擇 3,5-DABA 的原因為 α 型環糊精之孔洞足以讓 3,5-DABA 分子嵌入，可以發現此二氧化鈦薄膜不具有萃取 3,5-Diaminobenzoic acid 的能力，其直接

點樣偵測及萃取濃縮的偵測極限濃度皆為 500 ppm，表示沒有辨識 3,5-DABA 之作用，詳如圖 67 及 68 為直接點樣和經過二氧化鈦模板萃取濃度為 500 ppm 之 3,5-DABA 所得之質譜圖，顯示構形較小的分子並無法被 α 型環糊精的孔洞所固定住而達到萃取的效果。接著我們配製了 3,5-DABA 500 ppm 與 α 型環糊精 50 ppm 的混合溶液，以具有 α 型環糊精孔洞結構的二氧化鈦薄膜為萃取模板進行萃取，可以發現有 3,5-DABA 及 α 型環糊精的訊號，如圖 69，這可能是因為濃度均在可被直接偵測之範圍，所以可被 MALDI 分析偵測到。而當我們將混合溶液依等比例降低至濃度分別為 50 ppm 及 5 ppm，只有觀察到 α 型環糊精的訊號，如圖 70 所示，顯示此二氧化鈦薄膜具有良好的選擇性，只與具有相同構形的分子產生作用進而吸附，可專一辨識 α 型環糊精。



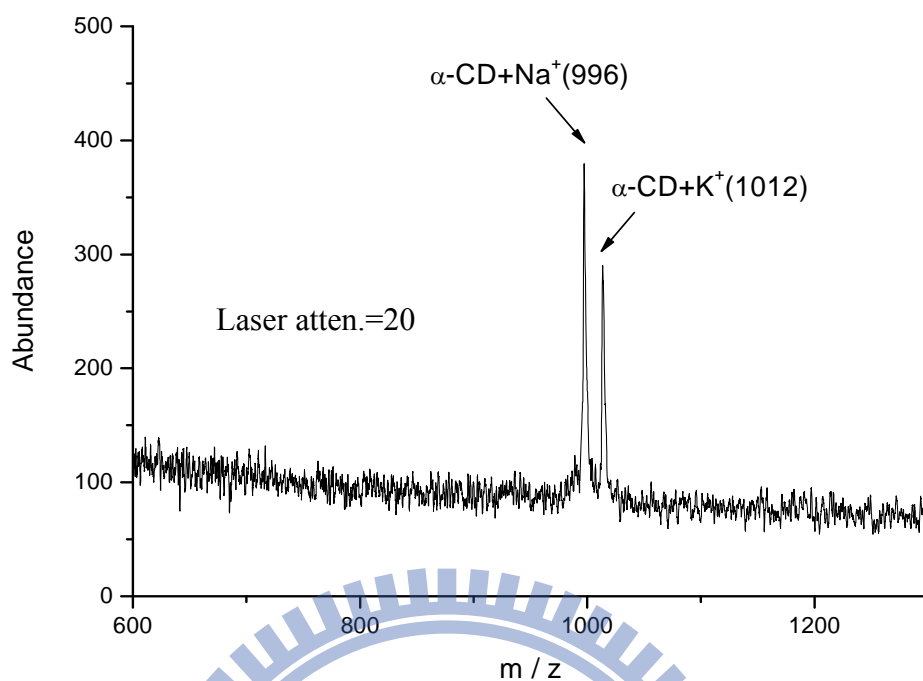


圖 51、以水洗後的 TiO_2 薄膜為基質，以 $\alpha\text{-CD}$ 50 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖

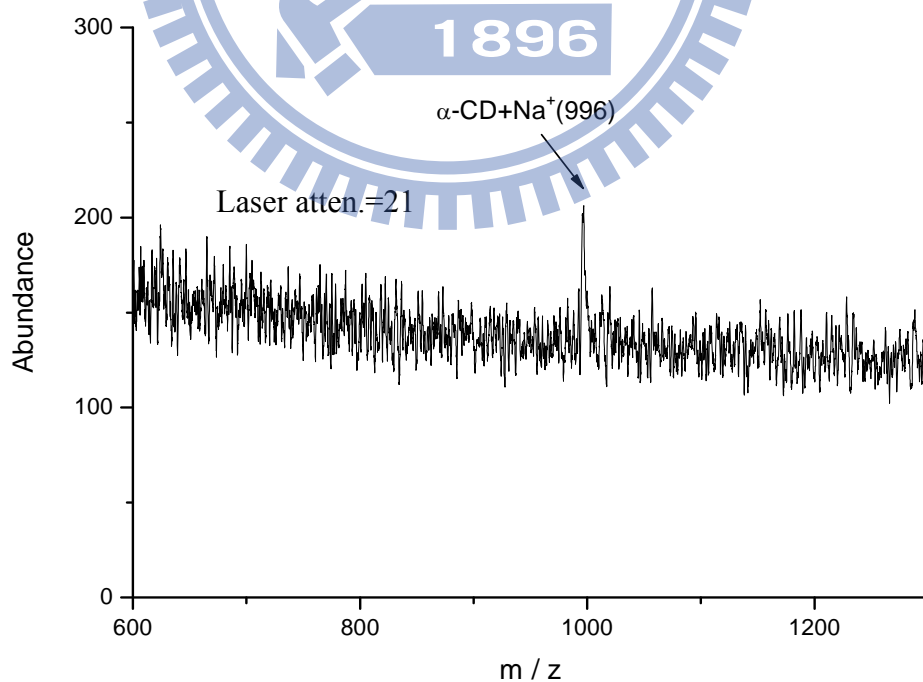


圖 52、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針，萃取 $\alpha\text{-CD}$ 10 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖

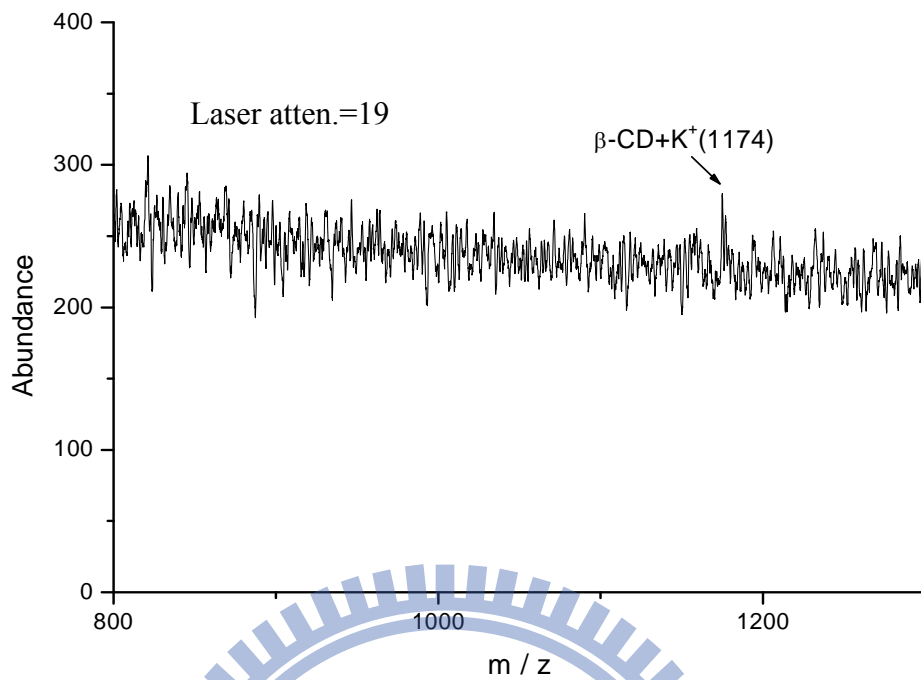


圖 53、以水洗後的 TiO_2 薄膜為 MALDI 基質，以 $\beta\text{-CD}$ 50 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖

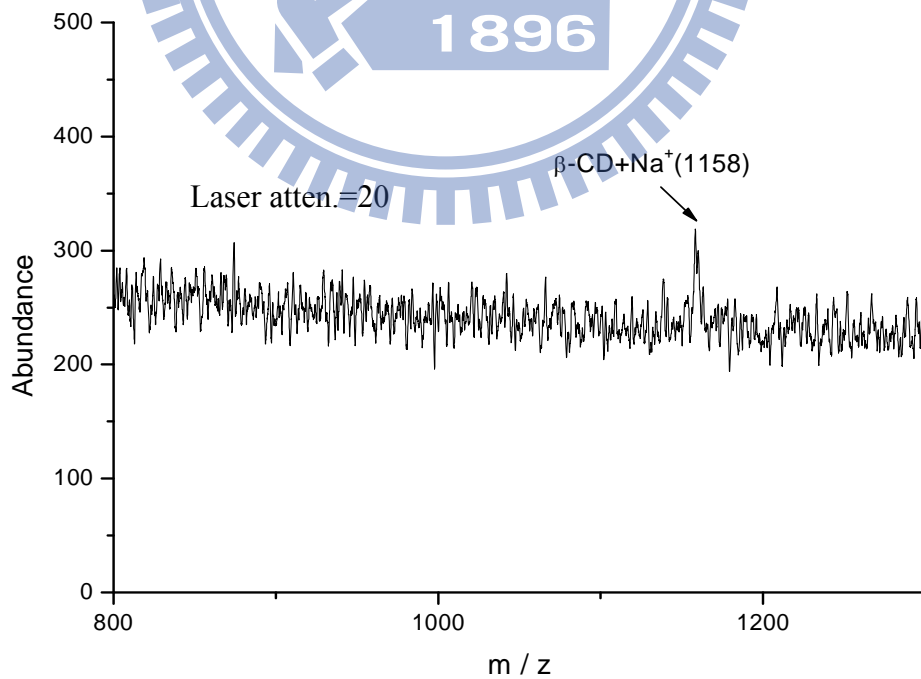


圖 54、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，萃取 $\beta\text{-CD}$ 10 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖

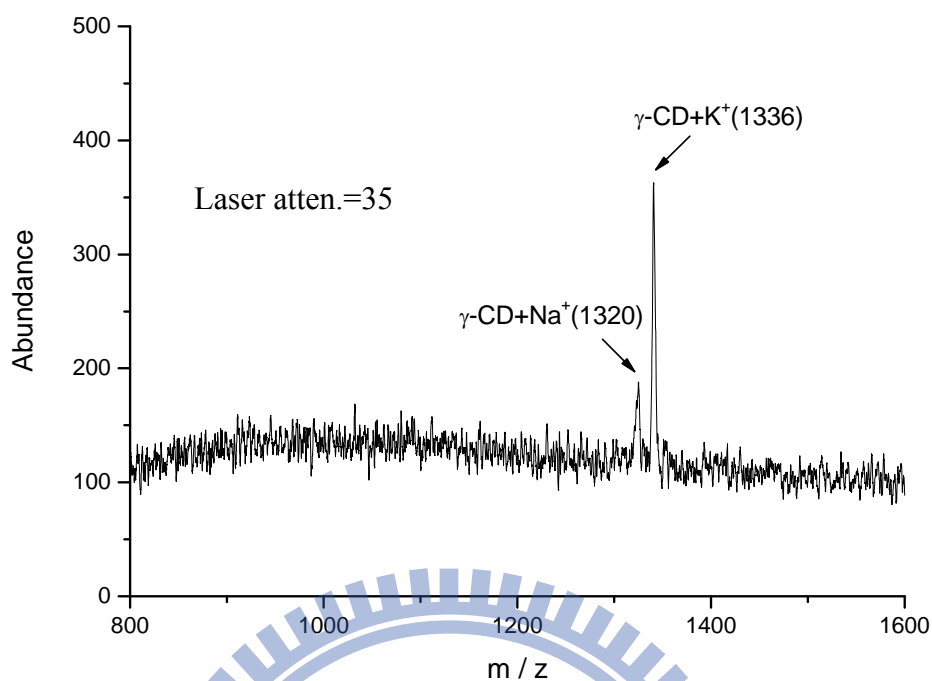


圖 55、以水洗後的 TiO_2 薄膜為 MALDI 基質，以 $\gamma\text{-CD}$ 100 ppm (0.2 μl) 為樣品進行 MALDI 分析的質譜圖

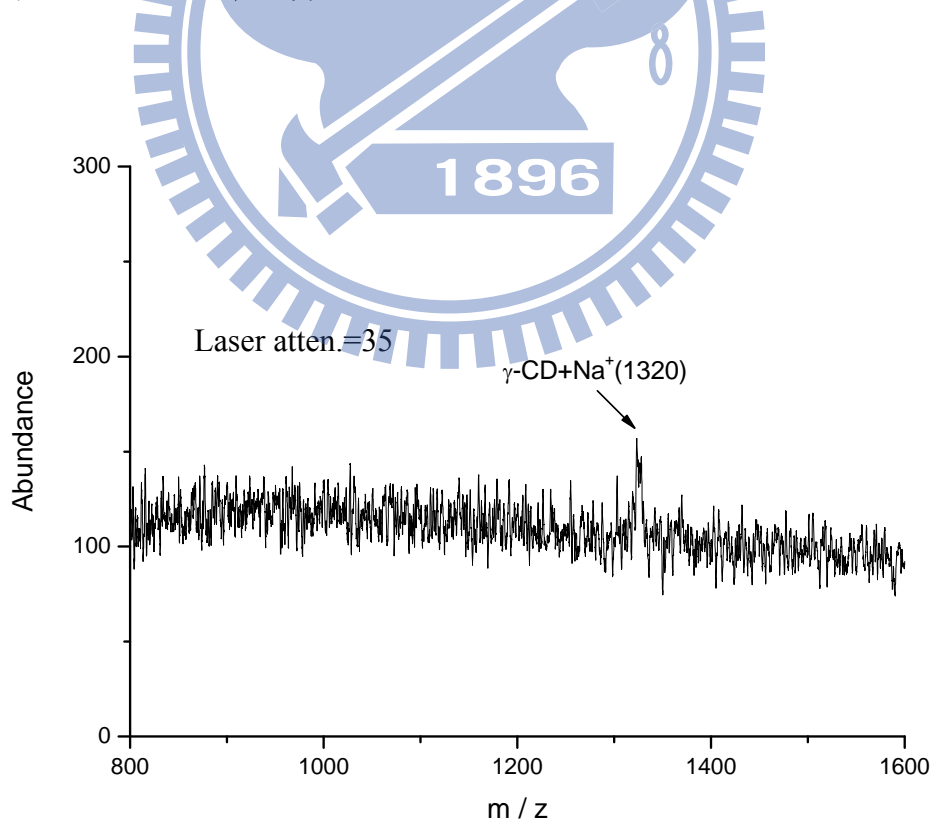


圖 56、以水洗後的 TiO_2 薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，萃取 $\gamma\text{-CD}$ 50 ppm (18 ml) 2 小時所得的 MALDI 質譜圖

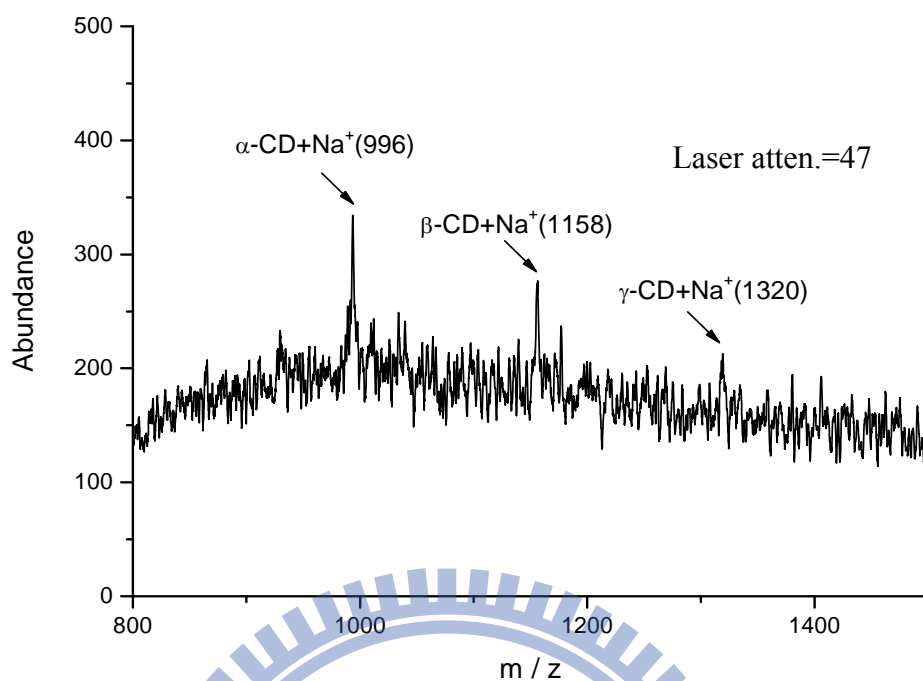


圖 57、以二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α , β , γ -CD 10 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖

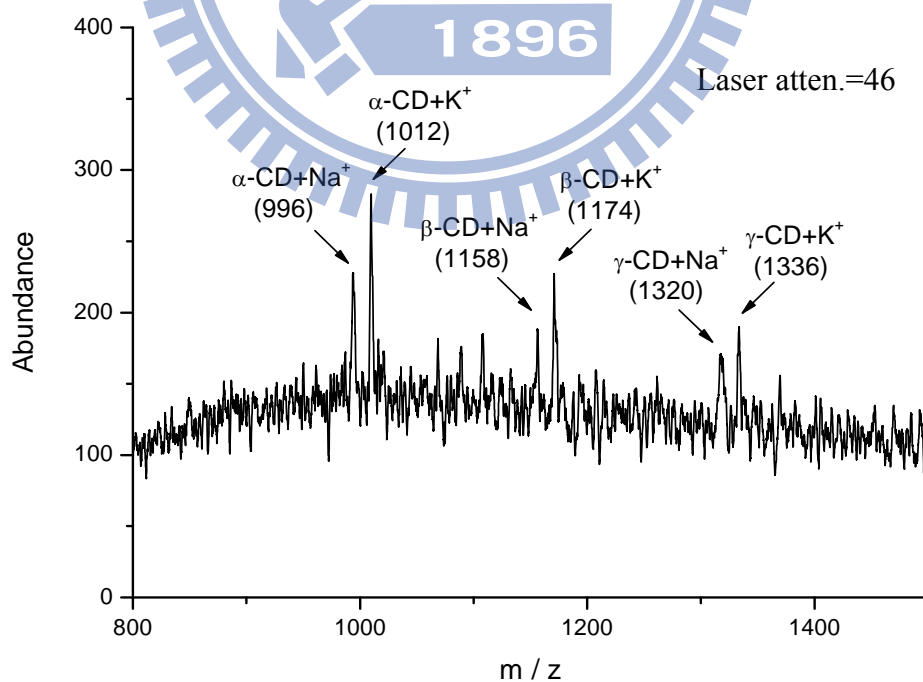


圖 58、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 α , β , γ -CD 100 ppm (0.2 μl) 為樣品進行分析的 MALDI 質譜圖

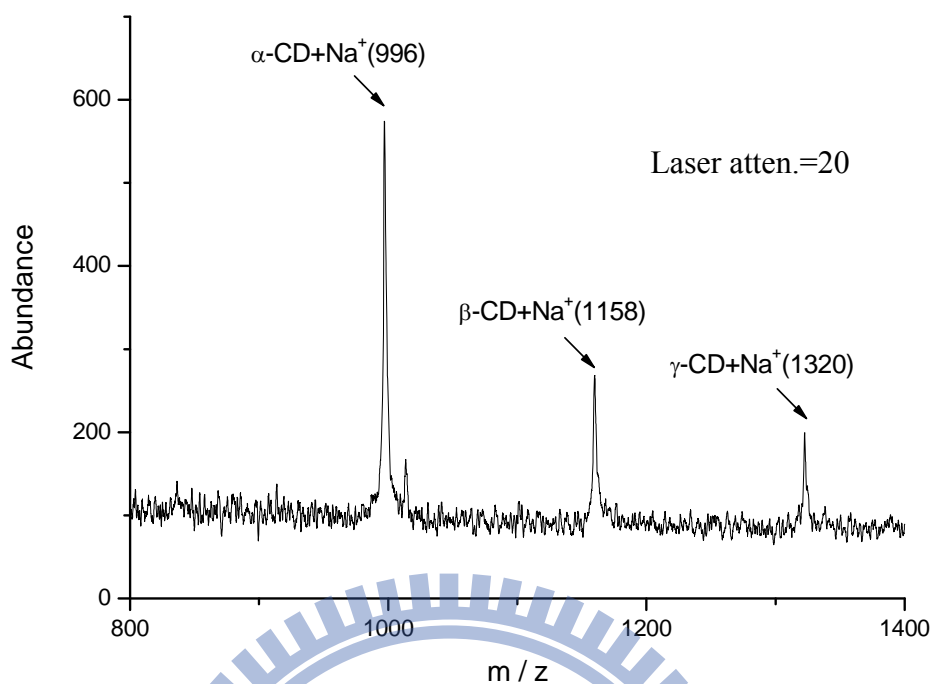


圖 59、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (50 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖

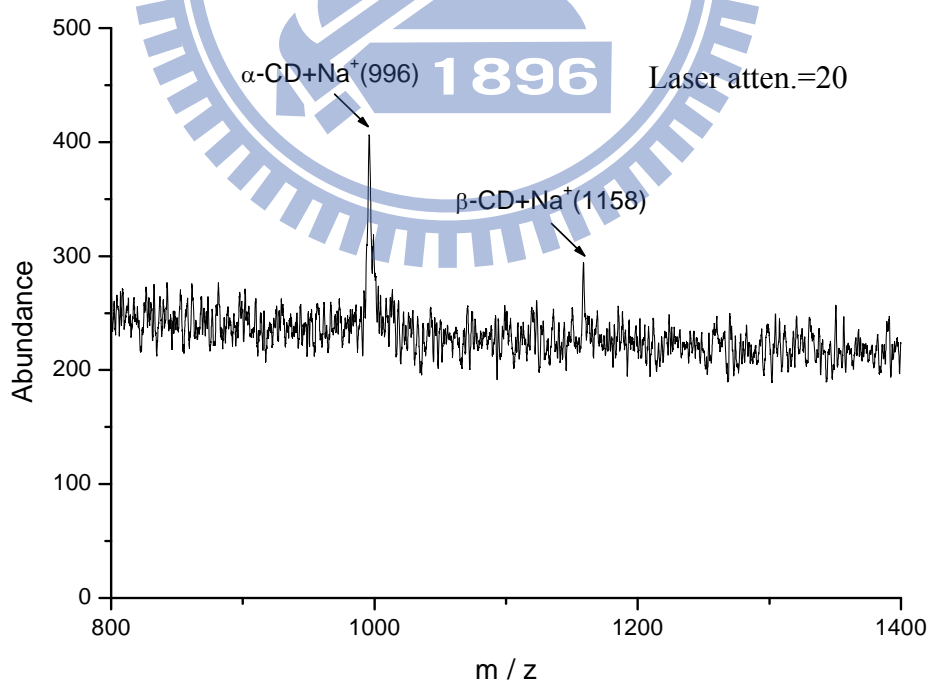


圖 60、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (10 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖

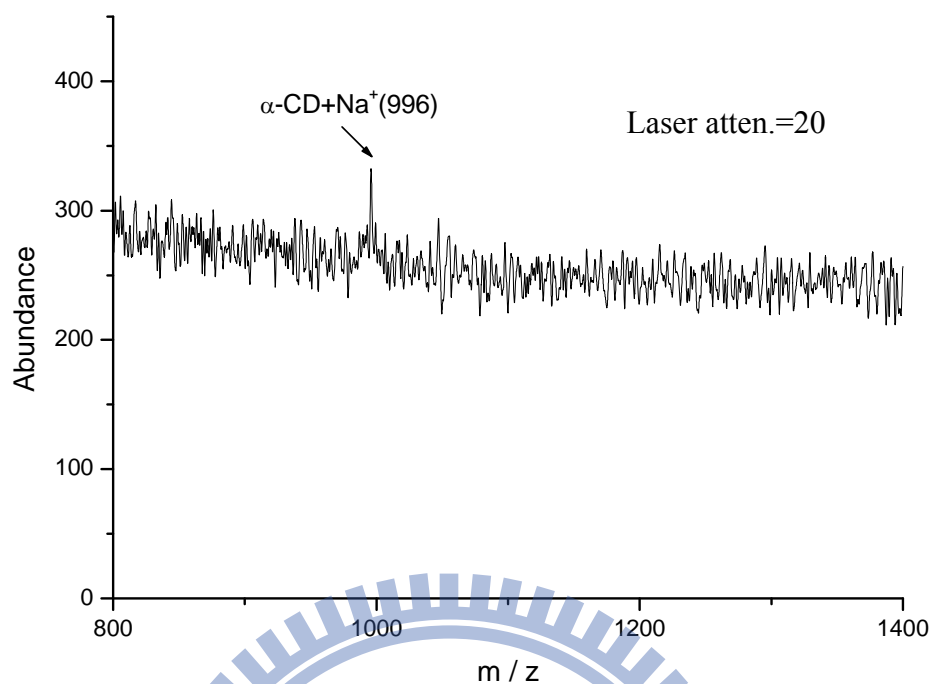


圖 61、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (1 ppm) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖

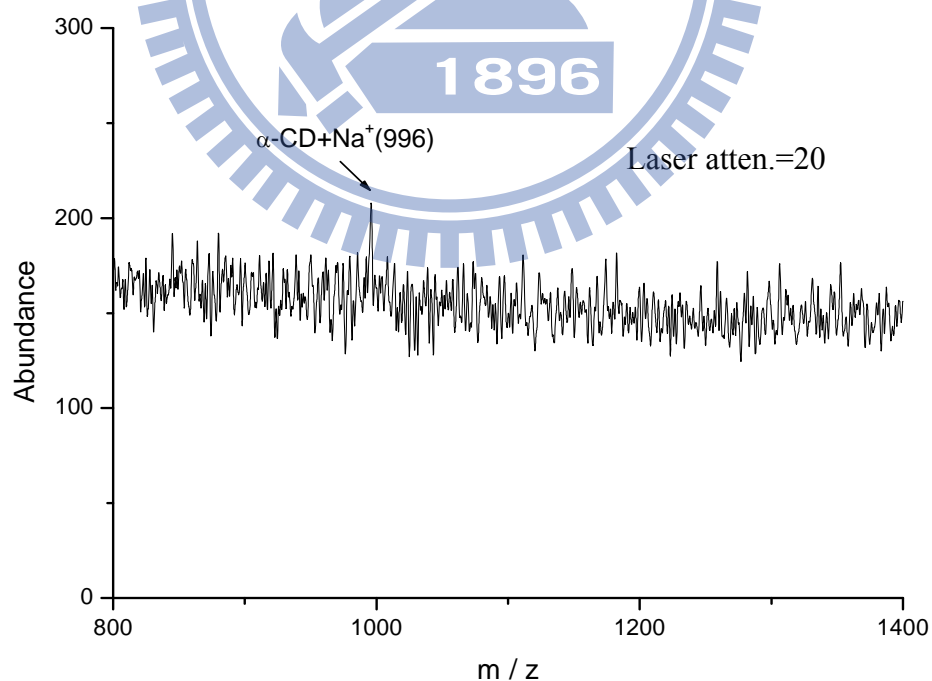


圖 62、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (100 ppb) 之樣品溶液經萃取 2 hrs 的 MALDI 質譜圖

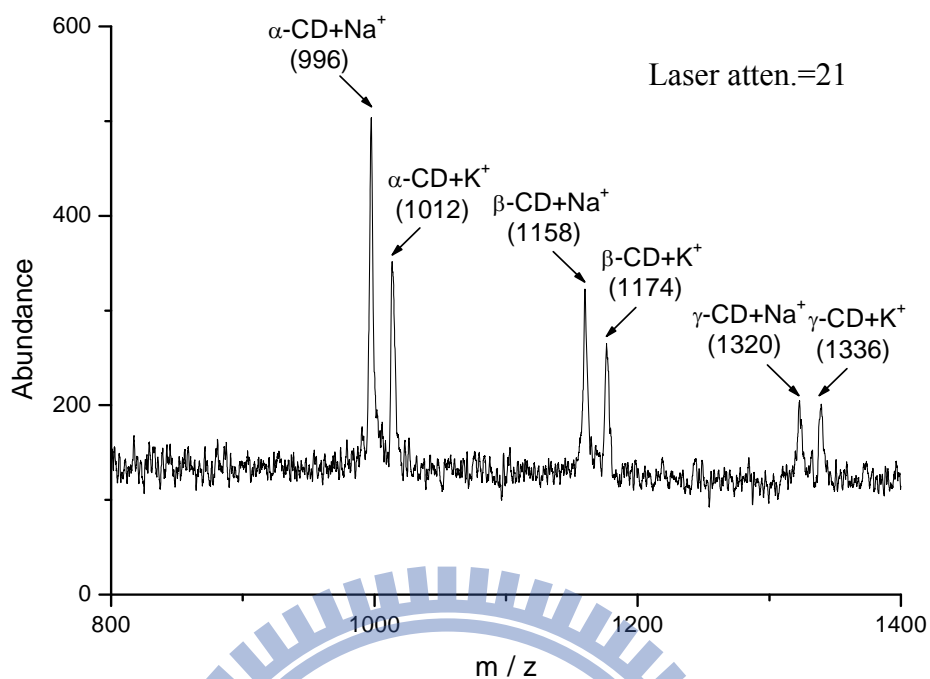


圖 63、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (5 ppm) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖

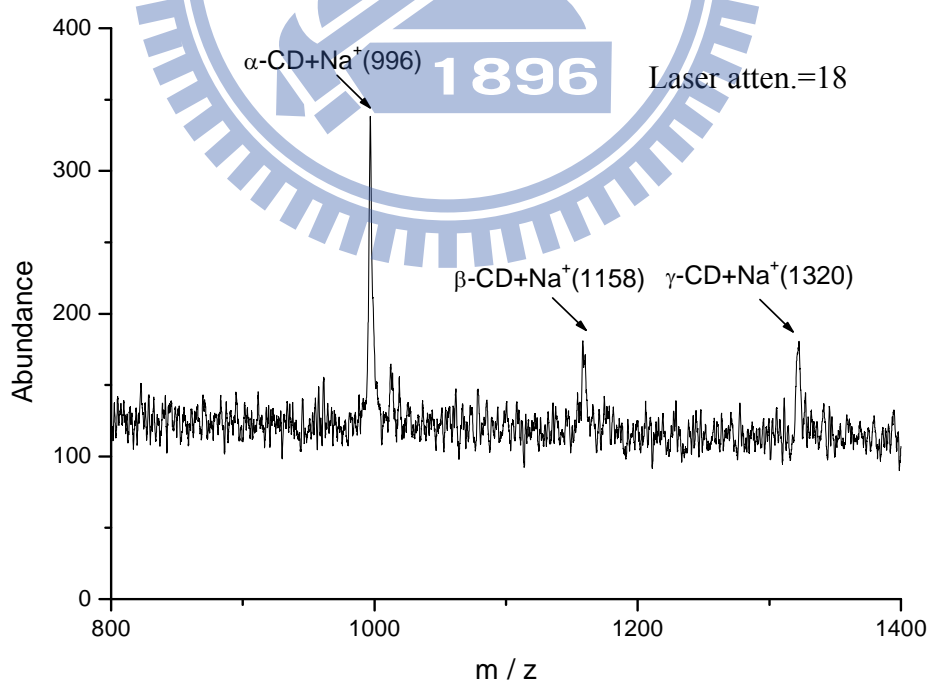


圖 64、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (1 ppm) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖

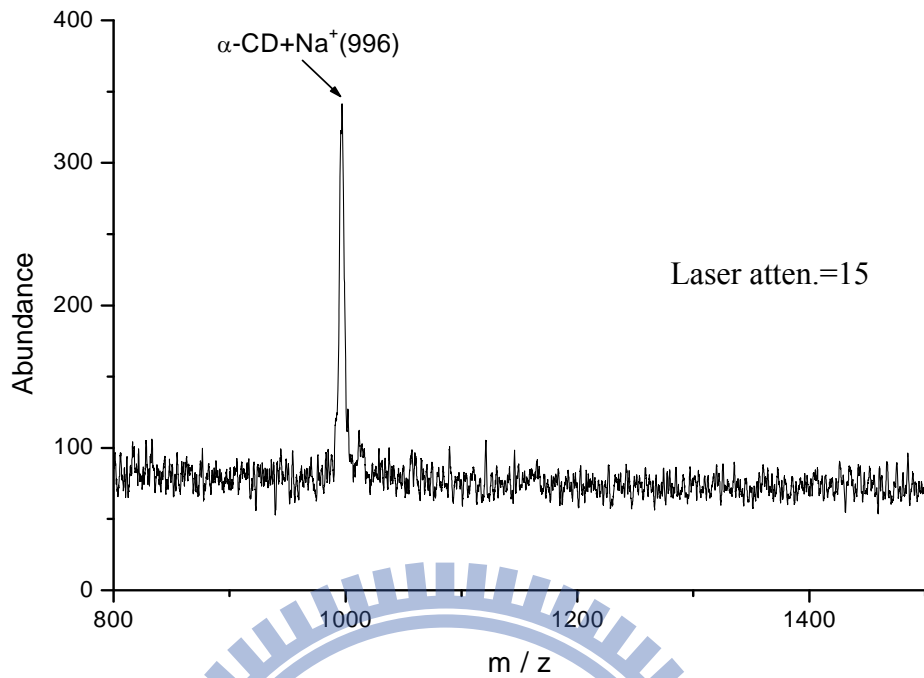


圖 65、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (100 ppb) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖

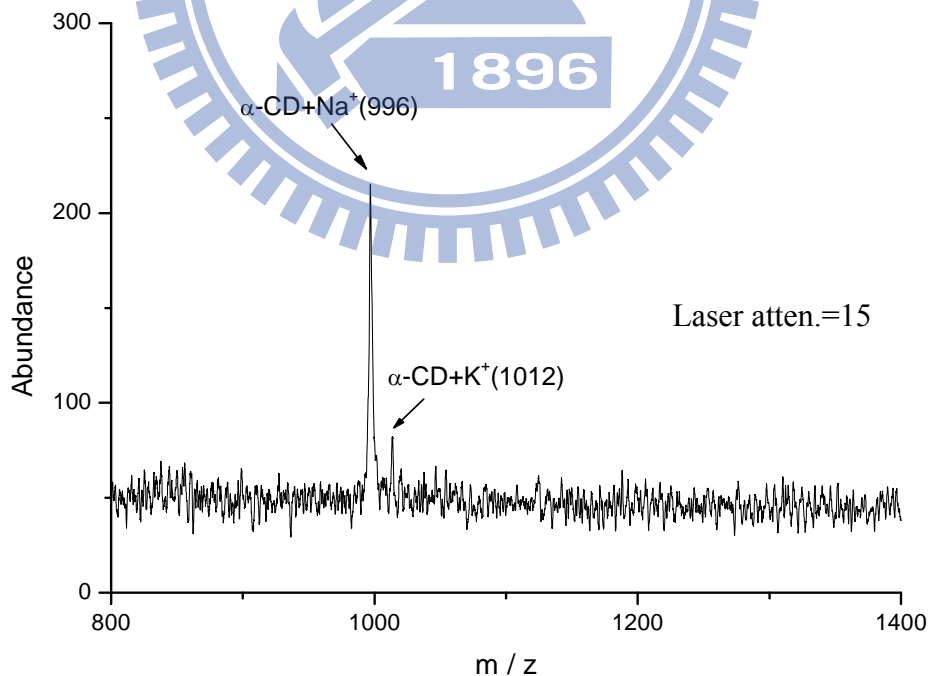


圖 66、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 18 ml 含等濃度 α, β, γ -CD (50 ppb) 之樣品溶液經萃取 3 hrs 的 MALDI 質譜圖

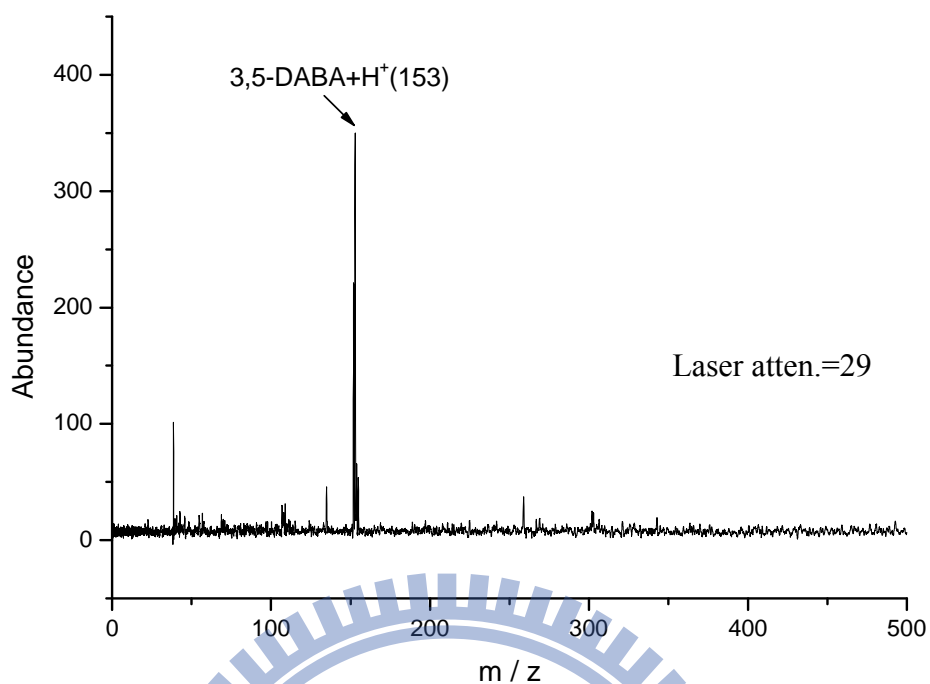


圖 67、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為基質，以 3,5-DABA (500 ppm, 0.2 μ l) 為分析物之 MALDI 質譜圖

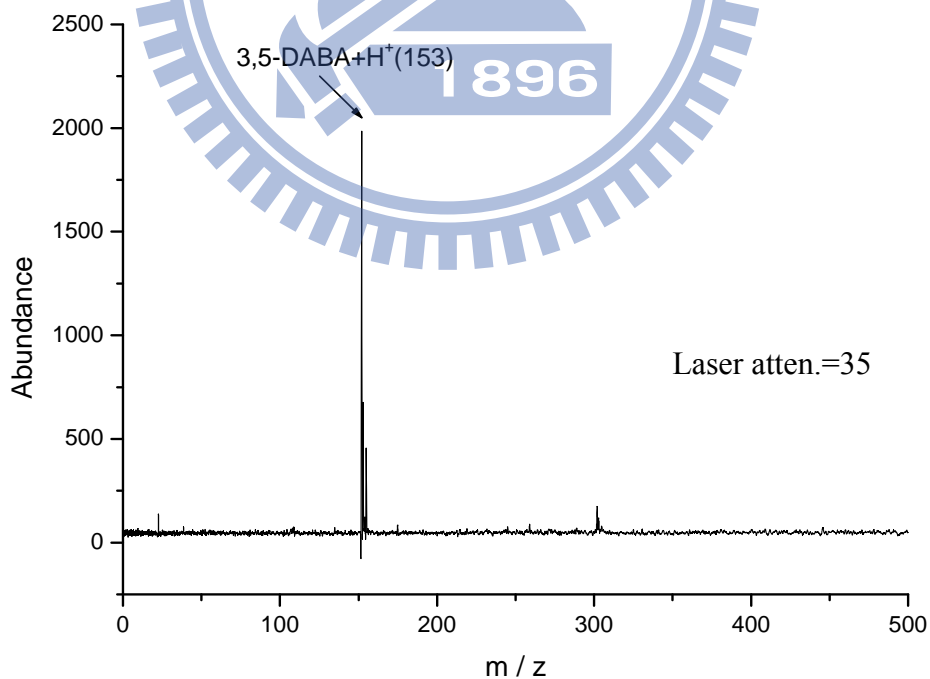


圖 68、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (500 ppm, 18 ml) 的溶液之萃取，以 MALDI 為分析方法所得之質譜圖

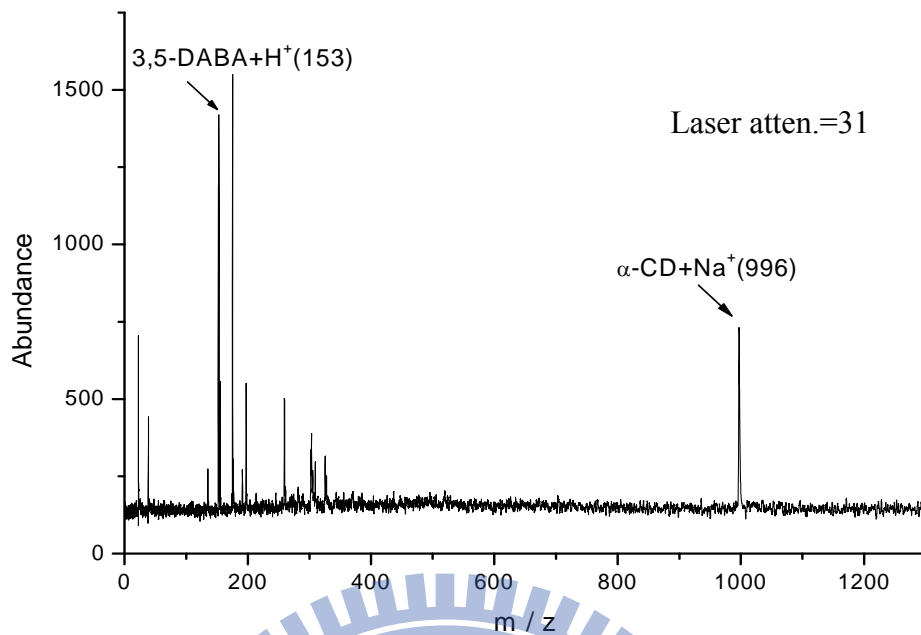


圖 69、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (500 ppm) 與 α 型環糊精 (50 ppm) 的混合溶液 (18 ml) 之萃取，以 MALDI 為偵測方法所得之質譜圖

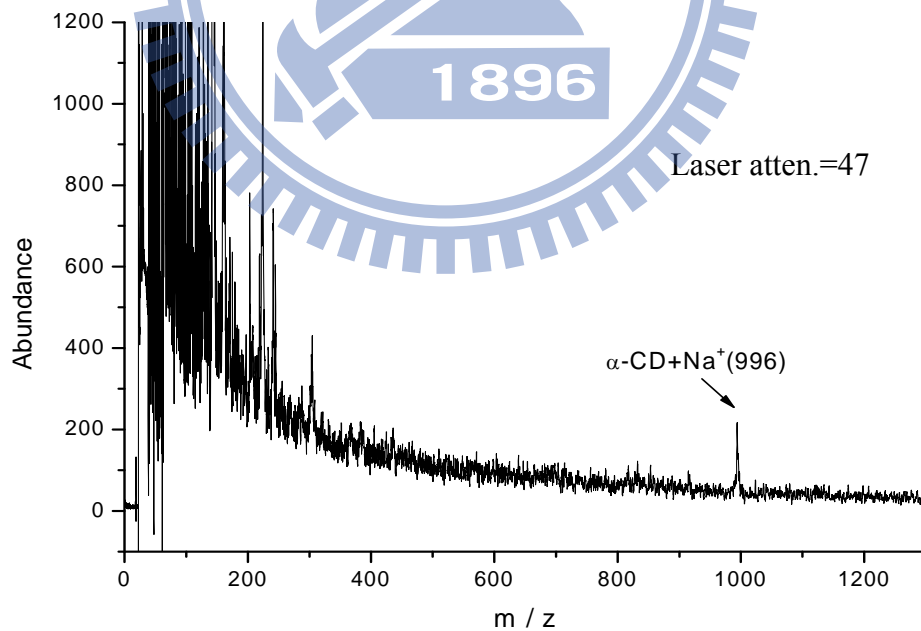


圖 70、以具有 α 型環糊精分子結構孔洞的二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為萃取之探針及 MALDI 基質，進行 2 小時含 3,5-DABA (50 ppm) 與 α 型環糊精 (5 ppm) 的混合溶液 (18 ml) 之萃取，以 MALDI 為偵測方法所得之質譜圖

肆、結論

本論文以溶膠凝膠法合成的二氧化鈦薄膜，在不添加傳統有機酸基質的條件下，可以直接做為乘載樣品的基質以幫助分析物脫附游離進行 MALDI 分析，而不需考慮傳統 MALDI 分析需注意到基質與樣品之間的互溶性及共結晶性質所造成的不均勻問題，目前本論文發展的這個方法質量上限為 8.5 kDa 左右，但在低分子量範圍有嚴重的基質干擾，故不適合用於分子量小於 500 Da 分析物的分析。但在加入液態基質甘油的輔助下，可偵測分子量上限則可提高至 12 kDa (Cytochrome c) 左右。

二氧化鈦溶膠凝膠薄膜的性質對輔助分析物的脫附游離有決定性的影響。高溫處理後的二氧化鈦薄膜雖然具有較高的吸收率，但是由於其表面的裂縫及熱處理後對分析物的質子化能力降低，因此使其質量的偵測上限受到限制，如果在二氧化鈦薄膜上先添加一層甘油溶液做為質子化來源後再加入分析物進行 MALDI 偵測，實驗結果發現其質量的偵測上限會有明顯的提升，顯示質子化來源對以二氧化鈦為 MALDI 基質的分析法具有十分重要的影響。而添加 PEG 並且經過高溫處理製成的薄膜，由於具有較高的吸收率，因此所得到的質譜訊號也較高。PEG 含量的多寡對二氧化鈦薄膜的吸收率並沒有明顯的影響，但在原子力顯微鏡中可以觀察到薄膜的表面粗糙度會隨著 PEG 含量的增加而增加。而以此二氧化鈦薄膜做為 MALDI 的基質可以發現分析物的訊號強度會因薄膜表面粗糙度的不同而有所變化，即隨表面粗糙度的增加而增加，可能的原因還不清楚，但與文獻中有關 DIOS 矽基材粗糙面增強雷射之吸收效果之結果

是相似的。

以二氧化鈦溶膠凝膠材料為轉印材料並直接當做乘載 MALDI 樣品之基材，以 MALDI 進行分析的實驗中，由於轉印分子 α 型環糊精分子與溶膠凝膠材料混成形成薄膜後可以利用水洗法將 α 型環糊精分子洗去，而留下具有 α 型環糊精分子結構的孔洞，可以當做辨識 α 型環糊精之模板。利用此分子辨識模板為探針並進行萃取，並直接以 MALDI 為偵測方法，結果顯示具有 α 型環糊精分子結構的孔洞的二氧化鈦薄膜可專一選擇水中微量的 α 型環糊精分子。除了孔洞結構可讓 α 型環糊精分子嵌入外，孔洞表面的羥基可能藉由氫鍵作用和環糊精的羥基產生親和力輔助辨識 α 型環糊精分子，因此在相當微量的 α 型環糊精 (10 ppb) 存在的樣品溶液中，此具有 α 型環糊精結構孔洞的二氧化鈦薄膜仍能親和萃取此微量之目標物分子後再配合 MALDI 直接分析，可偵測到 α 型環糊精。

本論文成功地發展二氧化鈦溶膠凝膠薄膜為輔助 MALDI 分析的材
料，由於不需再添加傳統基質，因此樣品製備更形簡單、且可加快分析
速度，並且可藉以發展分子辨識質譜法。但是由於在低分子量的基質盪
景干擾太強使得可偵測的分子量範圍受到限制，故仍然有值得改善的空
間。

伍、未來展望

本實驗成功地結合雷射脫附質譜法做為「分子辨識」的分析方法，可以提供分子辨識模板中分子量訊息，具有直接及準確的優點，但是用以辨識分子的時間很長。未來進一步的發展，可利用電化學方法輔助萃取的程序以縮短分析時間，並可將辨識分子的種類範圍擴大到酵素、抗體、蛋白質、DNA，甚至是細胞，應用於辨認特定生化樣品，擴展其可應用範圍。



參考文獻

1. Thomson J.J., *Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis*, Longmans Green, London, **1913**.
2. Hoing, R. E.; Woolston J. R. *Appl. Phys. Lett.* **1963**, 2, 138.
3. Vastola F. J.; Pirone A. J. *Adv. Mass Spectrom.* **1968**, 4, 107.
4. Vastola F. J.; Mumma, R. O.; Pirone, A. J. *Org. Mass Spectrom.* **1970**, 3, 101.
5. Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, **1987**.
6. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299.
7. Edward, P. C. Lai.; Owega, S.; Kulczycki, R. *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33, 554.
8. Schürenberg, M.; Dreisewerd, K.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 221.
9. Kinumi, T.; Saisu, T.; Takayama, M.; Niwa, H. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 417.
10. Yalcin, T.; Wallace, W. E.; Guttman, C. M.; Li, L. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4750.
11. Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S.; Parr, V. J. *Chromatogr. A.* **2002**, 958, 249.
12. Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 985.

13. Linder, B.; Seydel, U. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 895.
14. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151.
15. Overberg, A.; Hassenburger, A.; Hillenkamp, F. *Mass Spectrometry in the Biological Sciences: A Tutorial*, M. L. Gross Ed., Kluwer Academic Publisher press, Netherlands., **1992**, 181-197.
16. Levis, R. J. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1994**, *45*, 483.
17. Overberg, A.; Karas, M.; Bahr, U.; Kaufmann, R.; Hillenkamp, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 293.
18. Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3204.
19. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193A.
20. Karas, M.; Bahr, U. *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 335.
21. Sunner, J.; Ikonomou, M. G.; Kebarle, P. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 98.
22. Sunner, J. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 805.
23. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 427.
24. Liao, P. C.; Allison, J. J. *Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 408.
25. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. Mass Spectrom. Ion Processes.* **1987**, *78*, 53.
26. Krause, J.; Stoeckli, M.; Schlunegger, U. P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1927.
27. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337.
28. 陳月枝，*化學*，第六十卷，第二期，頁 229，民國九十一年

29. Karas, M.; et al. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.
30. Karas, M.; Bahr, U.; Stah-Zeng, J. R. In: *Large ions: Their Vaporization, Detection and Structural Analysis*, Bear, T.; Ng, C. Y.; Powis, I. (Eds.); Wiley: London, **1996**, 27.
31. Ehring, H.; Sundqvist, B. U. R. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1303.
32. Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J. ; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 871.
33. Zhu, Y. F.; Lee, K. L.; Tang, K.; Allman, S. L.; Taranencko, N. I.; Chen, C. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1315.
34. Harrison, A. G. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 201.
35. Llenes, C. F.; O'Malley, R. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 564.
36. Belu, A. M.; De Simone, J. M. ; Linton, R. W. ; Lange, G. W. ; Friedman, R. M. ; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 11.
37. Cotter, R. J. In: *Time-of-Flight Mass Spectrometry*, American Chemical Society, Washington, DC. **1997**, Chap2 (19-45).
38. Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Rev. Sci. Instr.* **1995**, *26*, 1150.
39. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. *Sov. Phys. JETP*, **1973**, *37*, 45.
40. Cotter, R. J. In: *Time-of-Flight Mass Spectrometry*, American Chemical Society, Washington, DC. **1997**, Chap8 (169-201).
41. Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2721.
42. Hung, K.C.; Ding, H.; Guo, B. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 518.

43. Kim, Y. S.; Hurst, G. B. *Microchemical Journal*. **2001**, *70*, 219.
44. Xu, Y. D.; Watson, J. T.; Bruening, M. L. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 185.
45. Asara, J. M.; Allison, J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2866.
46. Distler, A. M.; Allison, J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5000.
47. M. Ebelmen, *Comptes Rendus Acad. Sci. Fr.* **1845**, *21*, 502.
48. Avnir, D., Levy, D., Reisfeld, R. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5965.
49. Philipp, G.; Schmidt, H. *J. Non-Cryst. Solids.* **1984**, *63*, 283.
50. Wilkes, G. L.; Orler, B.; Huang, H. *Polym. Prep.* **1985**, *26*, 300.
51. Braun, S.; Rappoport, S.; Zusman, R.; Avnir, O.; Ottolenghi, M. *Mater. Lett.* **1990**, *10*, 1.
52. Mackenzie, J. D.; *J. Non-Cryst. Solids.* **1982**, *48*, 1.
53. Hench, L. L.; West, J. K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33.
54. Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *J. Non-Cryst. Solids.* **1985**, *70*, 301.
55. 丁原傑，*化工技術*，第八卷，第五期，頁 138，民國八十九年
56. Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science*, Academic Press, **1990**.
57. Yoldas, B. E. *J. Non-Cryst. Solids.* **1986**, *82*, 11.
58. Pauling, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *63*, 2643.
59. Wulff, G.; Sarhan, A.; *Angew. Chem.* **1972**, *11*, 341.
60. Fischer, E.; *Chem. Ber.* **1894**, *27*, 2985.
61. Steed, J. W., Atwood, J.L. *Supramolecular Chemistry*, **2000**, John Wiley & Son. Ltd.
62. Witcombe, M. J.; Vulfson, E. N.; *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467.

63. Wulff, G.; Biffis, A. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, **2001**, 23, Chapter 4.
64. Sundberg, R. J.; Martin, R. B. *Chem. Rev.* **1974**, 74, 471.
65. Haupt, K.; Mosbach, K. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2495.
66. Dickey, F. H. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* **1949**, 35, 227.
67. Dai, S.; Shin, Y. S.; Toth, L. M.; Barnes, C. E. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 5521.
68. Makote, R.; Collinson, M. M. *Chem. Mater.* **1998**, 10, 2440.
69. Graham, A. L.; Carlson, C. A.; Edmiston, P. L. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 458.
70. Lee, S. W.; Ichinose, I.; Kunitake, T. *Langmuir*, **1998**, 14, 2857.
71. Lahav, M.; Kharitonov, A. B.; Katz, O.; Kunitake, T.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 720.
72. Dickert, F. L.; Hayden, O. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1302.
73. *Second International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers*, La Grande Motte, France, **2002**.
74. Armstrong, D. W.; Schneiderheinze, J. M.; Hwang, Y.-S. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3717.
75. 林宗榮、蔡耀慶、周澤川，分子模板拓印技術-仿人造抗體之合成介紹，*科儀新知*，第二十四卷，第三期，頁 91，民國九十一年
76. 林進益，智慧型高分子專利-分子拓印技術進程發展與研究方向，*化工科技與商情*，第二十五期，頁 31，民國九十年
77. Czarnik, A. W., Ed. *Fluorescent Chemosensor for Ion and Molecule Recognition*, **1992**, ACS: Washington, DC

78. Sunner, J.; Dratz, E.; Chen Y.-C. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4335.
79. Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243.
80. Shen, Z.; Thomas, J. J.; Averbuj, C.; Broo, K.M.; Engelhard, M.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 612.
81. Cuiffi, J. D.; Hayes, D. J.; Fonash, S. J.; Brown, K. N.; Jones, A. D. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1292.
82. Kruse, R. A.; Li, X.; Bohn, P. W.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3639.
83. Lin Y.-S.; Chen Y.-C. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5793.
84. Teng C.-H.; Chen Y.-C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1092.
85. Chen W.-Y.; Chen Y.-C. *Anal. Chem.* in press.
86. Yu, J.; Yu, J. C.; Cheng, B.; Zhao, X. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **2002**, *24*, 39.
87. 謝紹銓，*台灣人纖工業會訊*，第十七期，頁 1766，民國九十年
88. 葉孟恆、陳媛孃，*生技時代*，第二十期，頁 21，民國九十二年
89. Fujishima, A.; Honda, K. *Nature* **1972**, *238*, 37.
90. Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U. C. *Biotechnology Advances* **2002**, *20*, 341.
91. Kajihara, K.; Yao, T. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **1998**, *12*, 185.
92. Kajihara, K.; Yao, T. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **1998**, *12*, 193.
93. Kajihara, K.; Yao, T. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **2000**, *17*, 173.
94. Kajihara, K.; Yao, T. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **2000**, *17*, 239.
95. Kajihara, K.; Yao, T. *J. Sol-gel Sci. Technol.* **2000**, *19*, 219.

96. Alimpiev, S.; Nikiforov, S.; Karavanskii, V.; Minton, T.; Sunner, J. J. *Chem. Phys.* **2001**, *115*, 1891.
97. Kavan, L.; Stoto, T.; Gratzel, M.; Fitzmaurice, D.; Shklover, V. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9493.
98. Papavassiliou, G. C. *J. Solid State Chem.* **1981**, *40*, 330.
99. Kormann, C.; Bahnemann, D. W.; Hoffman, M. R. *J. Phys. Chem.* **1988**, *18*, 5196.
100. Brus, L. E. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 4403.
101. Anpo, M.; Shima, T.; Kodama, S.; Kubokawa, Y. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 4305.
102. Tran, T.; Cho, W.-J.; Ha, C.-S. *Materials Lett.* **2003**, *57*, 2746.
103. Sene, J. J.; Zeltner, W. A.; Anderson, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1597.
104. Lewis, W. G.; Shen, Z.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 107.
105. Chen, Y-F.; Lee, C-Y.; Yeng, M-Y.; Chiu, H-T. *J. Crystal Growth* **2003**, *247*, 363.