

成像質譜術於生醫領域之應用

Imaging Mass Spectrometry and Its Biomedical Applications

凌永健、李佩玲、殷裕勝、雷秀玲、柯耀棠、邱文達、麥富德

Yong-Chien Ling, Pei-Ling Lee, Yu-Sheng Yin, Shiu-Ling Lei, Yao-Tang Ke, Wen-Ta Chiu, Fu-Der Mai

成像質譜術結合微區取樣 (micro-area sampling)、化學分析 (chemical analysis) 與空間解析的能力，可提供樣品原子 (或分子) 組成與空間分布關聯性的資訊，逐漸成為生醫研究領域中不可或缺的重要分析工具。本文依序介紹各原子 (或分子) 成像質譜術 (二次離子質譜術、基質輔助雷射脫附游離質譜術、雷射剝蝕感應耦合電漿質譜術) 之基本原理，簡述其於生醫領域之研究現況及國內現有相關硬體資源，以供感興趣讀者對此一新興研究領域之參考。

Imaging mass spectrometry combining the ability of micro-area sampling, chemical analysis, and spatial resolution is capable of providing spatially-resolved atomic (or molecular) composition information, which makes it becoming an indispensable research tool for biomedical fields. Herein, we briefly introduce the principles of imaging mass spectrometry including secondary ionization mass spectrometry (SIMS), matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS), and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICPMS) first, followed by reviewing its current applications in biomedical researches.

一、前言

質譜術 (mass spectrometry) 具有高靈敏度 (high sensitivity) 與低偵測極限 (low detection limits) 的優點，為現今可應用於元素、同位素、表面特性與有機化合物結構分析之重要技術之一⁽¹⁾，基本原理為樣品由適當的游離源 (ionization source) 離子化後，由質量分析器 (mass analyzer) 利用各離子的質荷比 (m/z) 差異予以分離，達到元素 (或分子) 鑑定的目的⁽²⁾。質譜術的發展隨著新穎的游離技術，如電灑游離 (electrospray ionization, ESI)、基質輔助雷射脫附游離 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) 等發展，研究範圍得以延伸至

生化大分子，成為生醫領域不可或缺的重要分析工具^(3,4)。成像質譜術 (imaging mass spectrometry) 為近年來新開發出的質譜術，主要是模擬光學顯微鏡 (optical microscope) 可提供樣品的光學影像 (每一像點 pixel，以光子表示)，質譜儀以離子顯微鏡 (ion microscope) 呈現樣品的化學影像 (每一像點 pixel，表示原子或分子)，表示特定位置的化學組成，可提供之資訊遠比廣泛使用的光學顯微鏡更為豐富，因此成像質譜術在新興的生醫研究領域裡 (基因體學、蛋白質體學、金屬質體學、代謝質體學與脂質體學，如圖 1) 日益倍受重視，尤其是研究生化現象侷限於特定區域的生醫樣品。目前常見的原子 (或分子) 成像質譜術均結合固態表面的

表 1. 各成像質譜術之概述。

成像質譜術	取樣／游離化	樣品製備	質量分析器	應用
二次離子質譜術	一次離子束撞擊固態樣品表面 (高真空度下)	1. 軟組織樣品：冷凍或乾燥切片 2. 硬組織樣品：適當前處理後直接至於載台 3. 需有導電性	1. 飛行時間式 2. 雙聚焦扇形磁場式 3. 四極柱式	1. 元素／分子影像 2. 小分子 (< 1000 Da) 3. 空間解析：0.1–5 μm
基質輔助雷射脫附游離質譜術	脈衝式聚焦雷射光束照射混有基質的樣品 (中真空度下)	1. 軟組織樣品：冷凍切片 2. 需添加基質	1. 飛行時間式 2. 串聯式 3. 離子遷移式 4. 傅立葉轉換離子迴旋共振式	1. 分子影像 2. 大分子 (< 100000 Da) 3. 空間解析：20–50 μm
雷射剝蝕感應耦合電漿質譜術	聚焦雷射光束剝蝕固態樣品表面 (常壓下)	1. 軟組織樣品：冷凍切片於載台 2. 硬組織樣品：直接至於載台	1. 四極柱式 2. 雙聚焦扇形磁場式 3. 飛行時間式	1. 元素／金屬影像 2. 微量／金屬分析 3. 空間解析：5–200 μm

表 2. SIMS 常用質量分析器比較表。

種類	質量解析度	適用質量範圍 (m/z)	二子離子穿透率	成像方式
四極柱式	$10^2 - 10^3$	10^3	0.01–0.1	掃描式
磁場式	10^4	$> 10^4$	0.1–0.5	掃描式／直接式
飛行時間式	$10^3 - 10^4$	10^5	0.5–1.0	掃描式

取樣過程 (sampling process)，如表 1 所示，可分為使用一次離子束 (primary ion beam) 的二次離子質譜術 (secondary ion mass spectrometry, SIMS) 及使用聚焦雷射 (focusing laser) 的基質輔助雷射脫附游離質譜術 (matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-MS) 與雷射剝蝕感應耦合電漿質譜術 (laser ablation inductively coupled mass spectrometry, LA-ICPMS)⁽¹⁾。本文將依序介紹各成像質譜術之基本原理及其在生醫領域中相關質體學之研究現況。

擊固態樣品表面，受到一次離子束撞擊的表面原子層當中，少於 1% 的粒子會以帶電荷離子 (稱為二次離子，secondary ions) 的型態被濺離樣品表面，經由離子聚焦系統汲取進入質量分析器中，依據其質荷比 (m/z) 進行偵測，由其離子片段判斷元素或分子的組成。一般常用於 SIMS 的質量分析器有三種，分別為：四極柱式 (quadrupole)、雙聚焦扇形磁場式 (double focusing magnetic sector) 與飛行時間式 (time-of-flight, ToF)，各質量分析器的比較如表 2 所示⁽³⁾。

二、SIMS 於生醫成像之應用

1. 基本原理

SIMS 為應用於分子組成、元素及同位素分析之質譜術，自 1910 年湯姆生 (J. J. Thomson) 從金屬板撞擊試驗，觀察到離子引發產生中子與帶正電荷離子的現象，發展至今已廣泛地被應用於材料表面科學與相關研究^(3,5)。SIMS 儀器的組成主要可分為離子源、樣品室、質量分析器、偵測器、電腦控制與數值／影像處理系統等五部分。其基本原理如圖 2 所示，利用一次離子束，以一定的入射角度撞

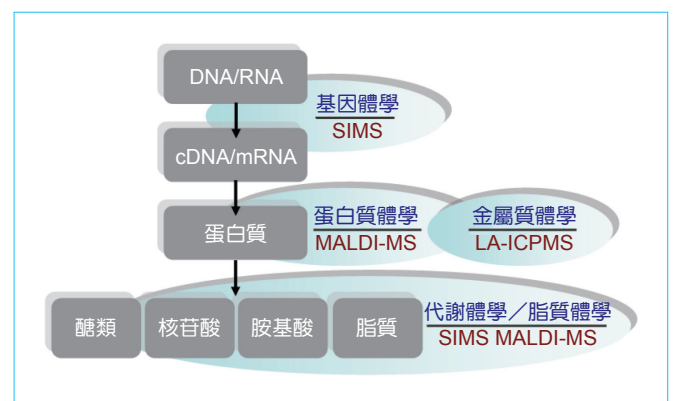


圖 1. 質體學與各成像質譜術之關聯性。

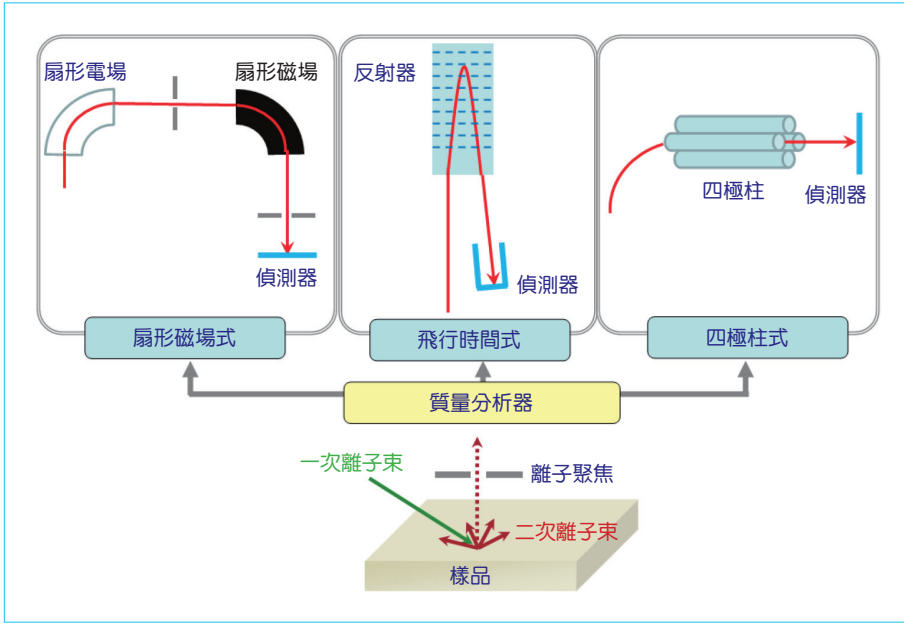


圖 2. 二次離子質譜儀之原理示意圖。

SIMS 依操作模式可分為：一維 (1D-)、二維 (2D-) 與三維 (3D-) SIMS，1D-SIMS 主要以質譜 (mass spectrum, 離子強度對質荷比如圖 3(a)) 與縱深剖析 (depth profile, 離子強度對深度如圖 3(b)) 分析為主；2D-SIMS (如圖 3(c)) 為二度空間 X-Y 座標與離子強度的關聯，稱為離子影像 (ion image) 分析；3D-SIMS (如圖 3(d)) 為三度空間 X-Y-Z 座標與離子強度的關聯，稱為離子斷層 (ion tomogram) 分析。SIMS 因此可提供豐富的樣品組成資訊，輔以化學計量 (chemometrics)，可以解讀埋藏其中數據的意義，提供更完整的資訊，有助於生醫成像研究之推廣應用。SIMS 應用於元

素成像質譜的研究，最早源自於 1962 年 Castaing 與 Slodzian 的研究，顯示 SIMS 可以如同光學顯微鏡採用離子透鏡 (ion lens) 以直接成像，利用離子光學收集系統 (ion-optical collection system)，記錄自樣品表面進入偵測器中離子的空間關係 (spatial relationship)⁽⁶⁾。使用聚焦離子束掃描樣品表面的成像質譜概念，則是直到 1984 年鎘液態金屬離子槍 (liquid metal ion gun, LMIG) 的問世，將離子束聚焦到 20 nm 以下，能提供具有高空間或側向解析 (spatial or lateral resolution) 的元素成像質譜分析⁽⁷⁾。若調整一次離子劑量 (primary ion dose) 至低於特定劑量時，可減少分子碎裂，得到訊號較強的

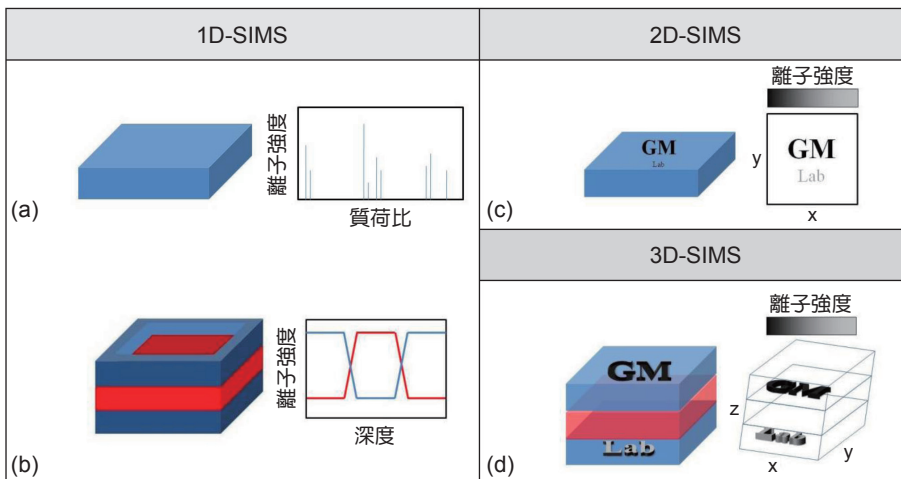


圖 3. SIMS 操作模式示意圖：(a) 質譜分析、(b) 縱深剖析、(c) 2D 離子影像分析與 (d) 3D 離子斷層分析。

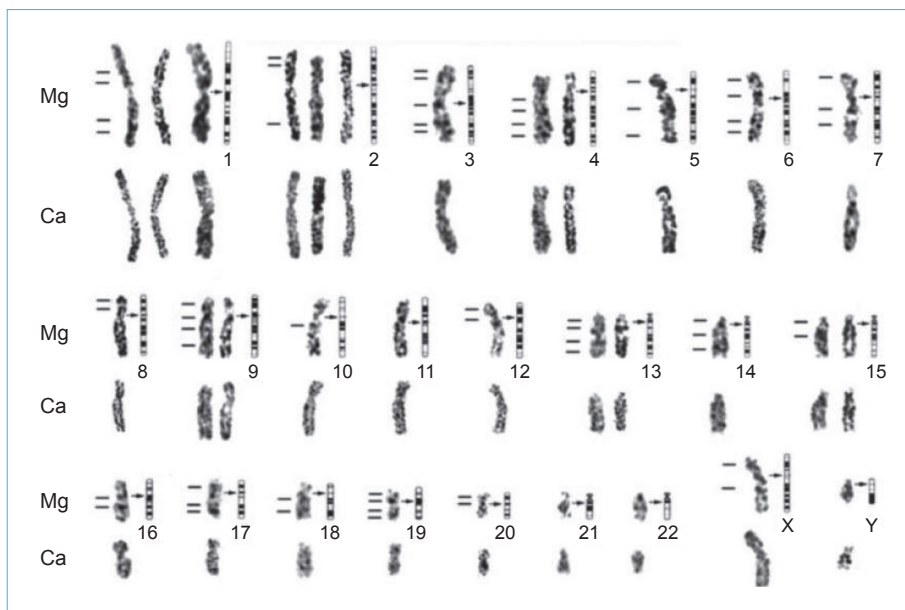


圖 4. 高解析動態 SIMS 之 Mg^{2+} 與 Ca^{2+} 離子影像重建人類 46 條染色體之染色體組。Strissel *et al.* (2004) 許可轉載，版權所有者 2004 Elsevier。

碎裂離子，搭配可同時快速進行多重離子測定的 ToFMS (如：ToF-SIMS)，即可進行分子成像質譜分析⁽⁶⁾。ToF-SIMS 結合 LMIG 與 ToF 的技術，提供良好空間解析 (< 100 nm)、質量解析 (> 1000)、較廣之質量範圍 (~10,000) 與可同時偵測二次元素離子與分子離子等優點，因此成為 SIMS 近年來在質譜生醫成像領域的主流，以下將簡述 SIMS 於質譜生醫成像研究之現況。

2. 研究現況

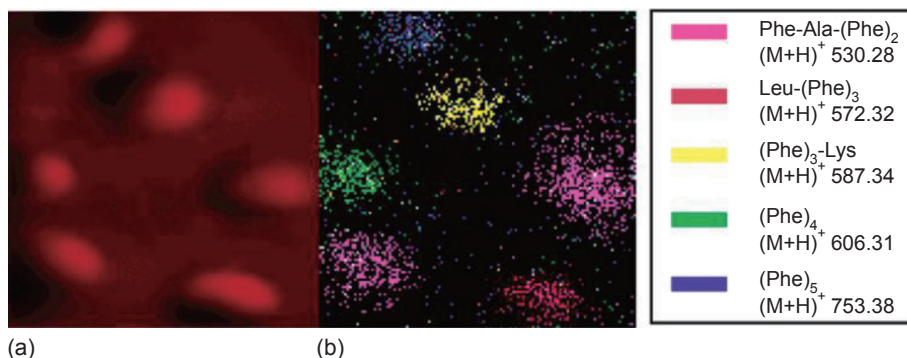
SIMS 於生醫成像研究涵蓋甚廣，舉凡動植物細胞與組織、細菌、生醫材料研究等，都可利用 SIMS 對樣品中有機分子、無機元素的分布進行成像分析。以下將概述 SIMS 於基因體學、代謝質體學與脂質體學之研究現況。

(1) 基因體學

新型成像儀器具有快速成像能力，有助於組合資料庫 (combinatorial libraries) 和其他陣列分析的快速研究。Strissel 等人利用高解析動態 SIMS (dynamic SIMS)，以 Mg^{2+} 與 Ca^{2+} 離子影像重建人類 46 條染色體 (chromosomes) 的染色體組 (karyotype)，如圖 4 所示⁽⁸⁾。Xu 等人使用 ToF-SIMS 搭配 C_{60} 一次離子源分析胜肽 (peptides)，快速鑑定固相合成胜肽組合資料庫。圖 5 所示為五個胜肽單元組合資料庫的分子離子成像圖，圖中可清楚地鑑別出五個胜肽的分布，有助於胜肽片段的快速定序分析⁽⁹⁾。Brandt 等人則運用 ToF-SIMS 快速成像的特性，利用磷酸根 (phosphate) 分子離子影像快速鑑定胜肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 陣列與 DNA 雜合 (hybridization) 的現象⁽¹⁰⁾。

圖 5.

ToF-SIMS 搭配 C_{60} 一次離子源應用於固相合成胜肽組合資料庫之快速鑑定。(a) 為總離子影像 (total ion image) 圖，(b) 為胜肽分子片段離子成像圖。Xu *et al.* (2004) 許可轉載，版權所有者 2004 American Chemical Society。



9 × 9 mm²

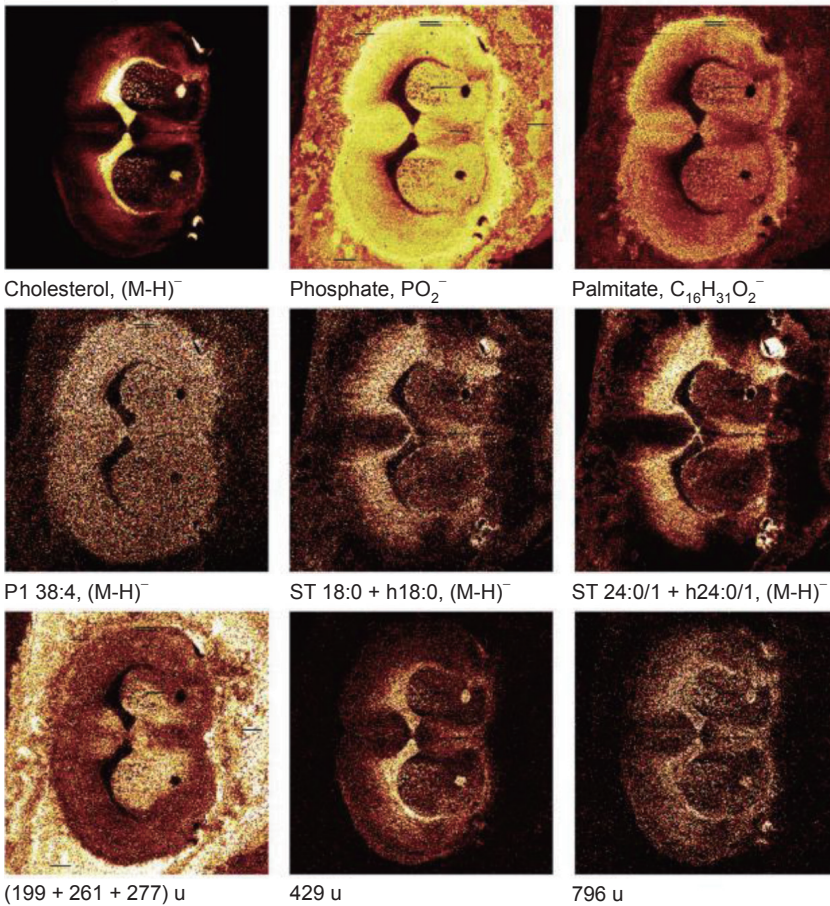


圖 6.

ToF-SIMS (離子源：Au₃⁺) 應用於鼠腦冷凍乾燥組織切片之成像分析。Sjovall *et al.* (2004) 許可轉載，版權所有者 2004 American Chemical Society。

(2) 代謝體學／脂質體學

許多疾病和免疫反應的發生，多與生物分子的空間分布 (spatial distribution) 或修飾 (modification) 有關。Sjovall 等人以金團簇 (Au₃⁺) 一次離子源，利用 ToF-SIMS 進行鼠腦之脂質成像 (imaging of lipids) 分析，結果如圖 6 所示，脂質的成分如：膽固醇 (cholesterol)、磷脂 (phosphatidyl, PI) 與磷酸脂肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 於切片中的分布成像清楚⁽¹¹⁾。研究指出膽固醇的上升會引發澱粉樣蛋白 (β -amyloid) 前驅物的累積，造成阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD) 疾病的發生⁽¹²⁾，相關脂質的成像分析因此將有助於疾病的臨床研究⁽¹¹⁾。SIMS 亦被應用於組織內藥物與代謝物空間分布之成像研究⁽¹³⁾。基礎生物學研究為 SIMS 成像質譜術應用範疇之一，Ostrowski 等人曾使用高解析 ToF-SIMS 研究單細胞纖毛蟲 (Tetrahymena) 交配時生物膜融合 (fusion) 的現象，結果如圖 7 所

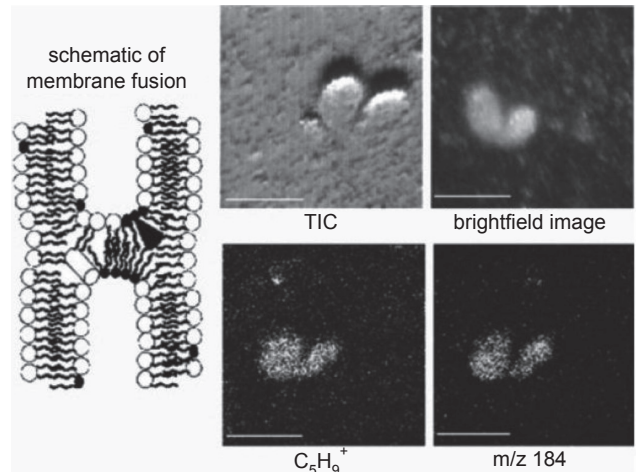


圖 7. 膜融合示意圖。高解析 SIMS 成像顯示 m/z 69 (C₅H₉⁺) 和 m/z 184 (為磷酸膽鹼的碎裂片段) 的分布，其中 m/z 69 與 184 可分別對應到所有脂質與磷酸膽鹼的分布。Ostrowski *et al.* (2004) 許可轉載，版權所有者 2004 The American Association for the Advancement of Science。

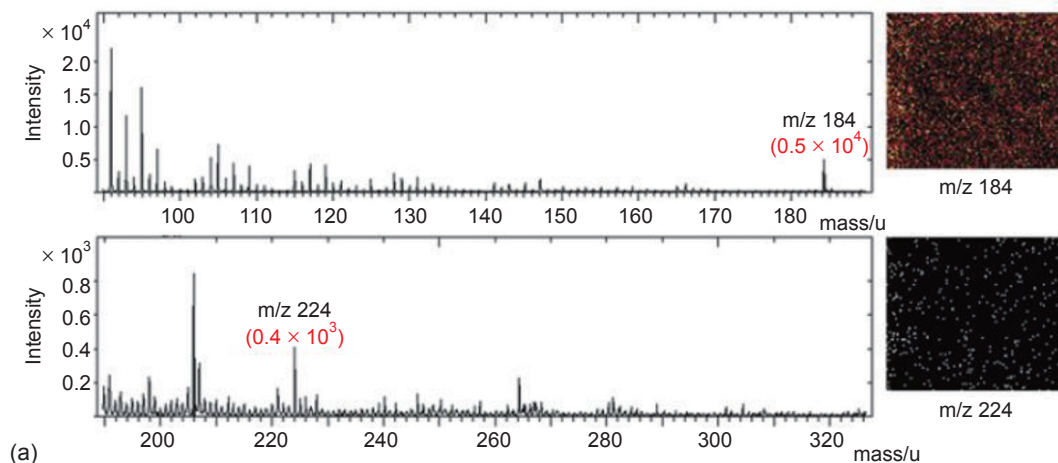
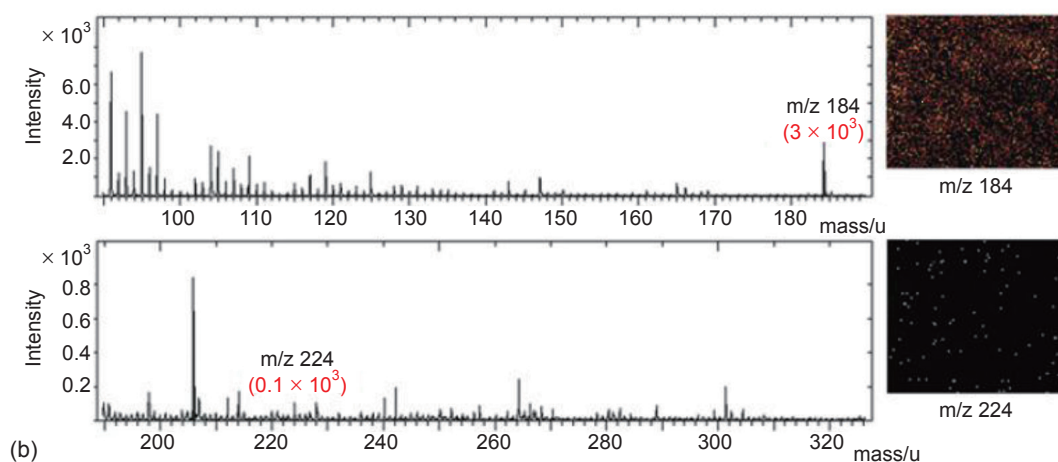


圖 8.

(a) 未經睡眠剝奪的正常老鼠，與
(b) 經睡眠剝奪處理的老鼠肝臟組織切片之 ToF-SIMS 質譜圖與影像圖。
Chang *et al.* (2008) 許可轉載，版權所有者 2008 John Wiley and Sons。



示，由 m/z 69 ($C_5H_9^+$ ，為磷脂之醯鏈片段) 和 m/z 184 (為磷酸膽鹼的碎裂片段) 的離子成像結果，顯示接合區 (conjugation junction) 呈現脂質的異質性 (heterogeneity)，且在接合區內磷脂膽鹼的含量較低⁽¹⁴⁾。Chang 等人利用 ToF-SIMS 分子離子成像技術，研究老鼠經睡眠剝奪後，肝臟組織切片之脂質體學現象⁽¹⁵⁾。結果如圖 8 所示，經睡眠剝奪處理後之磷脂結構片段 ($m/z = 184$ 與 224 ，圖 8(a)) 強度較控制組 (即正常老鼠，圖 8(b)) 低，說明睡眠剝奪會降低肝臟中磷脂醯膽鹼的表現。延續睡眠剝奪與分子離子成像之研究，該團隊 (Mai 等人) 進一步運用 ToF-SIMS 元素離子成像之功能，觀察經睡眠剝奪後老鼠腦極後區 (area postrema, AP) 鈣離子的表現⁽¹⁶⁾，結果如圖 9 所示。正常老鼠 AP 區內的鈣離子影像較弱 (圖 9(a)、(b))，經睡眠剝奪處理後，可清楚觀察到鈣離子累積於 AP 嘴側 (rostral) 區 (以

箭頭標示於圖 9(c)、(d))，AP 尾端 (caudal) 區內鈣離子的累積則較不顯著 (圖 9(e)、(f))。搭配穩定同位素標定 (stable isotope labeling) 技術，SIMS 可應用於組織切片、細胞、脂質相關之成像研究，如：Kleinfeld 等人使用 ^{13}C 標定油酸 (oleic acid) 搭配高空間解析 SIMS 成像技術，追蹤長鏈脂肪酸進入脂肪細胞 (adipocytes) 後的分布， ^{13}C 的成像結果顯示，油酸進入細胞後會儲存於脂肪滴 (lipid droplets) 的胞器中，且細胞質內的濃度較胞外的濃度低⁽¹⁷⁾。

(3) 相關技術發展

相較於 ESI 與 MALDI，SIMS 對於質荷比 (m/z) 超過 500 的分子之游離效果較差，導致 SIMS 分析生化分子的質量範圍仍受限於訊號微弱。因此 SIMS 在生醫成像方面的技術發展，主要以一

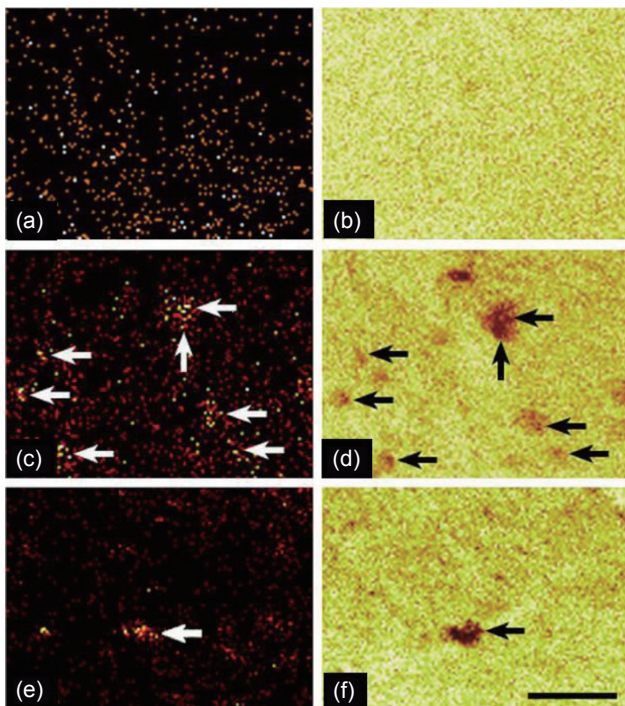


圖 9. ToF-SIMS 觀察睡眠剝奪後老鼠腦極後區鈣離子的表現。(a) 正常老鼠，其 AP 區的鈣離子影像較弱，(c) 經睡眠剝奪處理後老鼠，鈣離子則累積於 AP 嘴側區 (箭頭標示處)，(e) 於 AP 尾端區鈣離子的累積則較不顯著 (箭頭標示處)。(a、c、e) 為二次離子影像圖，(b、d、f) 為光學顯微影像圖。Mai *et al.* (2010) 許可轉載，版權所有者 2010 Elsevier。

次離子源的改善、同位素標定與樣品前處理的發展為主。在改善一次離子源方面，簇離子源 (如： Au_n^+ 、 Bi_n^{x+} 、 C_{60}^{x+}) 在近年來廣被使用，其優點為對於樣品破壞程度小、二次離子產率高，且可提供空間解析與感度皆佳的分子影像⁽¹⁸⁾。同位素的標定如前述，使用 ^{13}C 標定油酸分子有助於 SIMS 偵測油酸於脂肪細胞內示蹤之成像分析⁽¹⁷⁾。近年來硼中子捕獲治療 (boron neutron capture therapy, BNCT) 逐漸被應用於腫瘤疾病的臨床治療，因含硼 (^{10}B) 藥物可選擇性地標定腫瘤細胞， ^{10}B 受到熱中子的照射後能釋放出短射程 ($< 10 \mu\text{m}$ ，相當於一個細胞的直徑) 的阿爾伐粒子 (α particle) 與鋰離子，間接殺死鄰近微米區域內的細胞 (主要為癌細胞)，達到治療的效果⁽¹⁹⁾，不會有傳統放射治療會同時直接殺死大量正常細胞之副作用。改

善 BNCT 的治療效果，提升藥物在腫瘤細胞中利用率極為重要。Smith 等人利用高解析動態 SIMS 成像技術，研究腫瘤細胞對於對位-硼苯丙胺酸 (*p*-boronophenylalanine, BPA) BNCT 藥物的利用率，其結果說明在血腦障壁未破裂的情形下，以頸動脈注射方式施予 BPA 藥物，在主要腫瘤肉塊 (main tumor mass, MTM) 區與鄰近正常腦組織 (contiguous normal brain tissue, CNT) 區 ^{24}Mg 和 ^{10}B 的分布較不顯著；然而在血腦障壁破裂的情形下， ^{24}Mg 和 ^{10}B 在 MTM 中的含量較 CNT 為顯著⁽²⁰⁾。透過樣品製備改善感度的方法分為兩種：基質增強式 SIMS (matrix-enhanced SIMS, ME-SIMS)⁽²¹⁾ 與樣品金屬化式 SIMS (sample metallization, Meta-SIMS)⁽²²⁾。ME-SIMS 是利用 MALDI 的概念與樣品製備方式，透過基質輔助提升化學游離的效率，可以提升低質量數離子的感度，但其增強機制可能不同於 MALDI，如 Lei 等人運用氧化鋅奈米粒子，增加大腸桿菌脂質膜 (lipid membrane) 成分之二次離子的強度⁽²³⁾。Meta-SIMS 則將數奈米厚度的金或銀沉積在樣品表面改善導電性，提升待測物與分子圖譜資訊。多變量分析 (multivariate analysis) 統計技術於二次離子質譜術之應用，如主成分分析 (principal component analysis, PCA) 等，扮演著重要角色⁽²⁴⁾。為得到資訊更豐富的 2D 與 3D SIMS 生醫成像，先進的市售儀器，如 NanoSIMS 50，具有 50 nm 的側向解析力和高感度的元素分析能力，最適合生醫樣品內的微量元素及其同位素的成像分析⁽²⁵⁻²⁸⁾，學界普遍看好其研究潛力。

三、MALDI-MS 於生醫成像之應用

1. 基本原理

MALDI-MS 如同一般的質譜儀，儀器組成分為樣品注入、游離源、質量分析器、偵測器及訊號處理輸出系統等五部分，其中以樣品製備部分最為特別，如圖 10 所示，待測物需先與特定基質均勻混合後，方能以雷射照射樣品，進行脫附游離的程序，而詳細的脫附游離機制至今仍未有一個完整的解釋。一般最常用於 MALDI-MS 之雷射有脈衝式的紫外光雷射 (如：波長為 337 nm 的氮氣雷射⁽²⁹⁾) 和紅外光雷射⁽³⁰⁾ 兩種，前者可在極短的時間 (3 奈

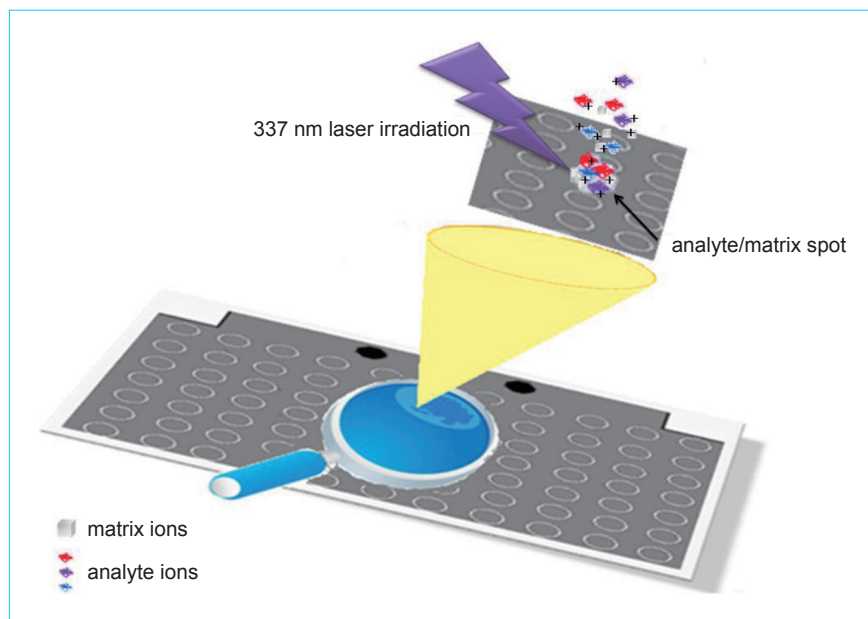


圖 10. 基質輔助雷射脫附游離法之機制示意圖。

秒) 內將雷射能量藉由基質吸收，然後再傳遞給鄰近的分析物進行脫附游離，所使用的基質都含有苯環 (或共軛雙鍵) 的有機分子來吸收雷射光能量，適用於胜肽、核苷酸與蛋白質等大分子的分析。但在低質量範圍內，使用紫外光雷射往往會形成多碎裂片的分子峰，導致分析不易，因此也有人使用紅外光雷射及選用適當的基質吸收能量聚集熱來脫附分析物，改善多碎裂片的問題。最常配備的質量分析器為 ToFMS，脫附游離後，帶電荷離子經固定電場加速通過無電磁場力作用的飛行管，依抵達偵測器的飛行時間與質荷比成反比的關係，進行偵測。基質輔助雷射脫附游離法需在極短的時間內，將脈衝式雷射源的能量迅速地轉移至基質中，ToFMS 的運作方式，搭備脈衝式離子源的分析，兩者結合可發揮儀器的最大功能，尤其適合大分子的分析。採用直線型 (linear mode) 的 MALDI-ToFMS 的操作模式，受限於離子的空間分布 (space distribution)、時間分布 (time distribution) 與動能分布 (kinetic distribution) 不足的問題，無法滿足高質譜解析度的需求。新型的儀器多配有反射式操作模式 (reflection mode) 或遲滯離子汲取法 (delayed-ion extraction) 等功能，大幅提升 MALDI-ToFMS 的質譜解析度，有助於獲得良好的質譜分析結果⁽³⁾。

2. 研究現況

(1) 蛋白質體學

阿茲海默症屬於認知退化伴隨行為躁動不安、日常生活障礙的漸行性神經退化性疾病，為導致老年癡呆的主要原因之一，病患的病理特徵主要為前驅澱粉樣蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 裂解產生分子量 4000–5000 Da 的澱粉樣蛋白 ($A\beta$) 胜肽，並積聚形成老化斑塊 (senile plaques)。Rohner 等人利用 MALDI-MS 成像分析 AD 老鼠的腦部組織切片，結果如圖 11 所示，分別觀察不同序列分子量的 $A\beta$ 胜肽，可清楚地看出 $A\beta_{1-40}$ (圖 11(c)) 的空間分布最明顯，以大腦頂葉和枕葉 (parietal and occipital cortical lobe) 區域含量最多，海馬迴區的側腦裂 (sylvian fissure) 含量最少⁽¹²⁾。 α -水晶體蛋白為眼球水晶體中的主要結構性蛋白，具有維持和穩定眼球透明度的特性。以小牛的水晶體為例，Han 等人利用 MALDI-MS 研究 αA -水晶體蛋白的聚集現象，其成像結果可呈現小牛眼球的最外層，並指出 αA -水晶體蛋白 (分子量 19832) 有聚集的現象發生⁽³¹⁾。

(2) 代謝體學

奧氮平 (Olanzapine) 屬於抗精神病藥物，對多巴胺 (dopamine) 與血清素 (serotonin) 接受器

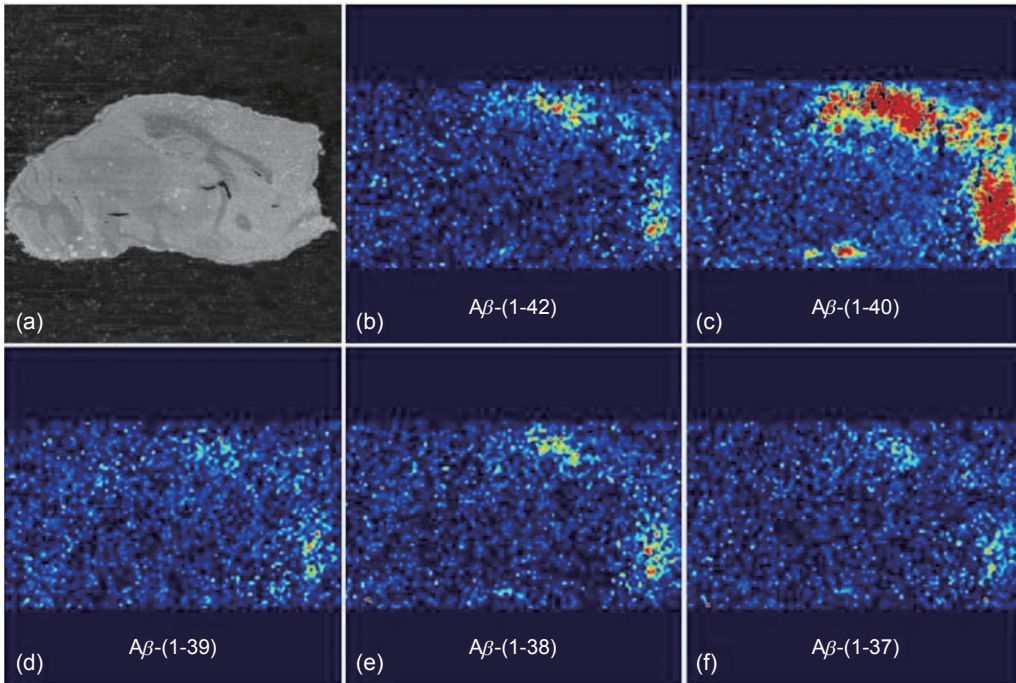


圖 11. 阿茲海默症澱粉樣蛋白 ($A\beta$) 胜肽分布於腦組織切片的成像質譜圖。(a) 縱切剖面光學影像圖，(b) $A\beta$ -(1-42)， m/z 4515.1，(c) $A\beta$ -(1-40)， m/z 4330.9，(d) $A\beta$ -(1-39)， m/z 4231.7，(e) $A\beta$ -(1-38)， m/z 4132.6，(f) $A\beta$ -(1-37)， m/z 4075.5。Rohner *et al.* (2005) 許可轉載，版權所有者 2005 Elsevier。

(receptor) 有阻斷作用，因此常被使用來治療精神分裂症 (schizophrenia) 等疾病。全身自動放射顯影術 (whole-body autoradiography, WBA) 為美國食品藥物管理局 (FDA) 核准可用於藥物空間分布與定量評估的技術之一。為評估奧氮平藥物的代謝行為，Khatib-Shahidi 等人設計定量餵食老鼠奧氮平的實驗，利用 MALDI 搭配串聯式飛行時間式質譜術 (MALDI-ToF/ToF-MS) 結合 WBA 概念，成像分析動物全身組織藥物代謝。餵食六小時後老鼠全身成像分布如圖 12 所示，相較於餵食兩小時後的成像分布，奧氮平在脊椎神經 (spinal cord) 與腦部的訊號明顯偏低，在肺部的含量最高，次之為肝臟、膀胱、睪丸與胸腺，但代謝物 *N*-desmethyl 與 2-hydroxymethyl 在肺部、肝臟與膀胱的含量並未改變⁽³²⁾。

(3) 相關技術發展

靈敏度、掃描速度及空間解析度等的改善為 MALDI-MS 成像質譜術發展的主軸。Scherl⁽³³⁾ 及 Altelaar⁽³⁴⁾ 等人嘗試在 MALDI 的樣品載台表面塗佈一層金，藉由降低測定時的樣品電荷累積 (charge accumulation) 問題，以提升解析度及串聯質譜術的靈敏度。Spengler 等人建立一套完整的

光學系統，利用物鏡控制雷射聚焦點，能量更集中，有效地脫附表面組織的離子，進而提升離子影像的空間解析度⁽³⁵⁾。圖 13 所示為以該系統成像分析 β -環精 (β -cyclodextrin) 的結果，空間解析度可以達到 10 μm 以下。為得到更完整的結構影像，Crecelius 等人利用三度空間成像技術分析蛋白質的分布，方法如圖 14 所示，將老鼠大腦等份切割成十份，分別對不同組織的區域，以 MALDI-MS 成像分析胼胝體 (corpus callosum) 的八種髓磷質 (myelin)，可以獲得三度空間分布成像圖⁽³⁶⁾。

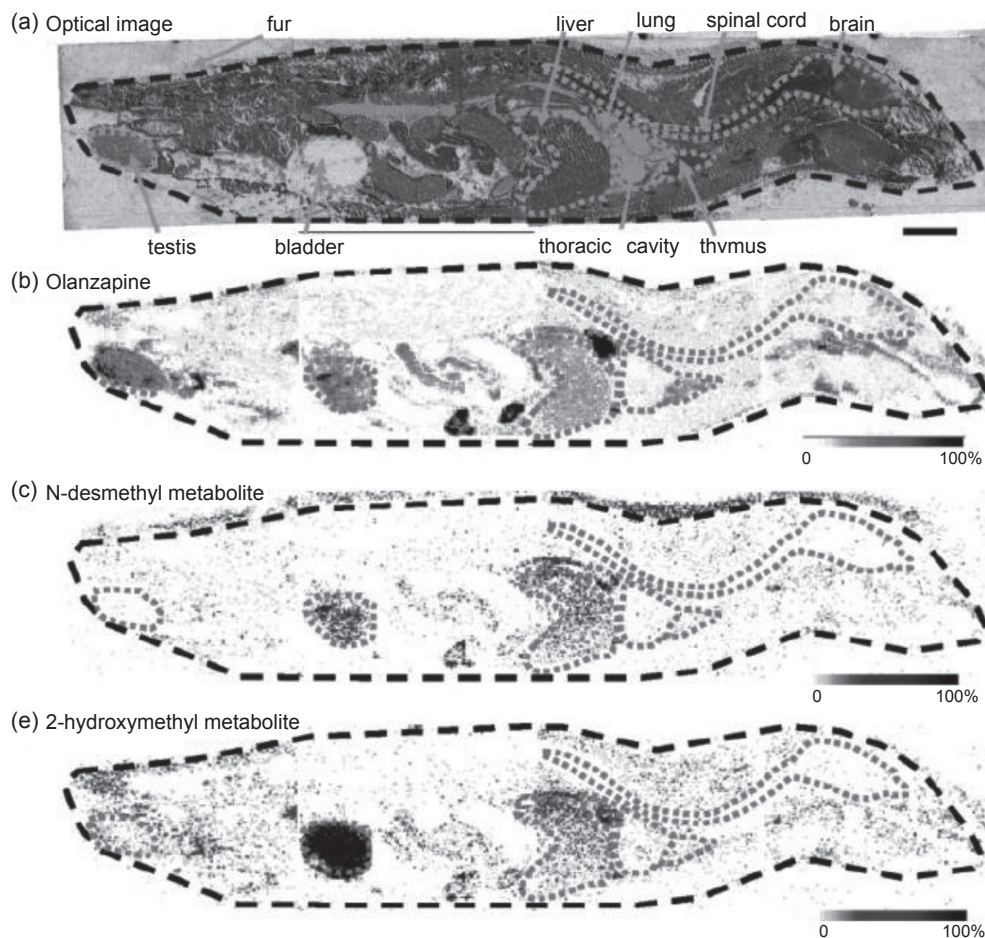
四、LA-ICPMS 於生醫成像之應用

1. 基本原理

ICPMS 屬於元素及同位素分析技術，於 1978 年由 Houk 等人首次成功地利用離子萃取 (ion extraction) 介面串連感應耦合氫電漿與四極式質譜儀⁽³⁷⁾，ICPMS 結合 ICP 激發源之絕佳游離能力及質譜儀之高靈敏度和同位素測定之能力，發展至今，已被廣泛地應用於各類基質樣品的分析⁽³⁸⁻⁴¹⁾。ICPMS 儀器的組成如圖 15(a) 所示，主要包括六大部分：樣品導入系統、ICP 離子源、介面系統、離子聚焦系統、質譜儀及偵測器。典型的

圖 12.

MALDI 搭配串聯式飛行時間式質譜術 (MALDI-ToF/ToF-MS) 進行動物全身組織藥物代謝之成像分析。(a) 老鼠組織切片的光學影像剖面圖，(b) 使用 MS/MS 質譜進行某特定組織區域的奧氮平含量分布，(c) 使用 MS/MS 質譜進行 *N*-desmethyl 代謝物的影像質譜分布，(d) 使用 MS/MS 質譜進行 2-hydroxymethyl 代謝物的影像質譜分布。Khatib-Shahidi *et al.* (2006) 許可轉載，版權所有者 2006 American Chemical Society。



ICPMS 測定過程，樣品溶液先經霧化器 (nebulizer) 霧化生成氣膠，藉由載流氣體 (carrier gas) 的載送，進入霧化室 (spray chamber) 進行氣膠顆粒篩選後，再由載流氣體的載送，進入在大氣壓力下操作的感應耦合電漿 (圖 15(b)) 中進行一連串去溶劑 (desolvation)、汽化 (vaporization)、原子化 (atomization) 及離子化 (ionization) 的反應⁽⁴²⁾。樣品在高溫電漿環境中所產生之離子，經由取樣錐 (sampler cone) 及削減錐 (skimmer cone) 介面系統進入真空系統後，再利用一系列的離子透鏡收集、聚焦和傳送，進入質譜儀或具有去除複合離子干擾與離子聚焦之碰撞/反應室 (collision/reaction cell)⁽⁴³⁻⁴⁴⁾ 中。新型的 ICPMS 多設計有碰撞/反應室，藉由碰撞/反應氣體 (He/H₂) 的加入，可去除複合離子的干擾，並達到離子二次聚焦的效果。最後再由質量分析器 (如：四極柱式) 選定特定質荷比 (*m/z*) 之離子，進入偵測器⁽⁴⁵⁾。

因應不同基質樣品的微量元素分析需求，隨著樣品前處理 (sample pretreatment) 技術與樣品導入 (sample introduction) 裝置的開發，ICPMS 的應用更為廣泛，如：微波消化/萃取 (microwave digestion/extraction) 技術、流動注入分析 (flow injection analysis) 系統、電熱汽化法 (electrothermal vaporization)、氫化產生 (hydride generation) 系統、微透析 (microdialysis) 取樣與雷射剝蝕 (laser ablation, LA) 技術等⁽⁴⁶⁾。LA 技術的發展，改變傳統的固態樣品分析方法，尤其是須先用化學前處理技術將樣品溶解，或經由適當的濃縮與分離步驟，才能上機分析的繁瑣程序。LA 系統如圖 16 所示，操作原理為將高能量的雷射光束 (如：摻釹鈮鋁石榴石雷射，俗稱 Nd:YAG 雷射) 聚焦在剝蝕腔體內之固態樣品表面，被剝蝕、汽化後的待測物被霧化氣流 (如：氬氣) 載流進入分析儀器 (如：ICPMS) 中進行測量。LA 的優點為可以分析樣品

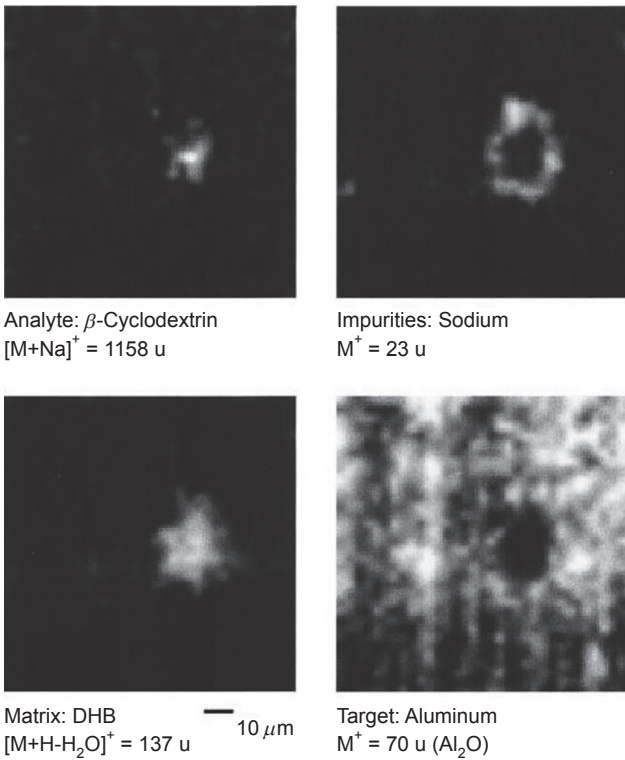


圖 13. 掃描微探針式 MALDI-MS。以 2, 5-DHB 為基質分析鋁靶材 β -環精 (β -cyclodextrin) 之成像分析。Spengler *et al.* (2002) 許可轉載，版權所有者 2002 Elsevier。

中特定區域之元素分布，且隨著雷射光束剝蝕次數或時間的增加，可漸續剝蝕固態樣品的內層，得到元素分布與樣品深度間關係的結果，這是其他樣品導入方法所難以做到的⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾。結合 LA 固體直測與 ICPMS 高靈敏度和同時分析多重元素之優點，LA-ICPMS 分析在環境科學與鑑識科學之應用外⁽⁴⁹⁾，更可延伸至生物醫學領域之研究，以下將簡介 LA-ICPMS 在生醫成像之研究現況。

2. 研究現況

生物系統中的金屬元素 (如：銅、鐵、鋅、鉛)、類金屬元素 (如：硒) 及非金屬元素 (如：硫、磷、碘) 的含量與分布，一直為生醫領域相關研究之重點。某些微量金屬可抵抗許多疾病與反應性氧物種 (reactive oxygen species, ROS) 的產生，如銅元素屬於生物體中的基本元素，主要功能為酵素之輔因子 (cofactor) 組成及調節腦中的神經傳導等；元素的缺乏或過量也都有可能造成健康上的危害⁽¹⁾，了解這些元素在生物體中的分布與含量，成為現代生醫分析技術發展的當務之急。一般元素在生物樣品 (如：組織) 中的分布不均勻，因此具有優勢空間解析 (spatial resolution) 與高訊雜比 (低值

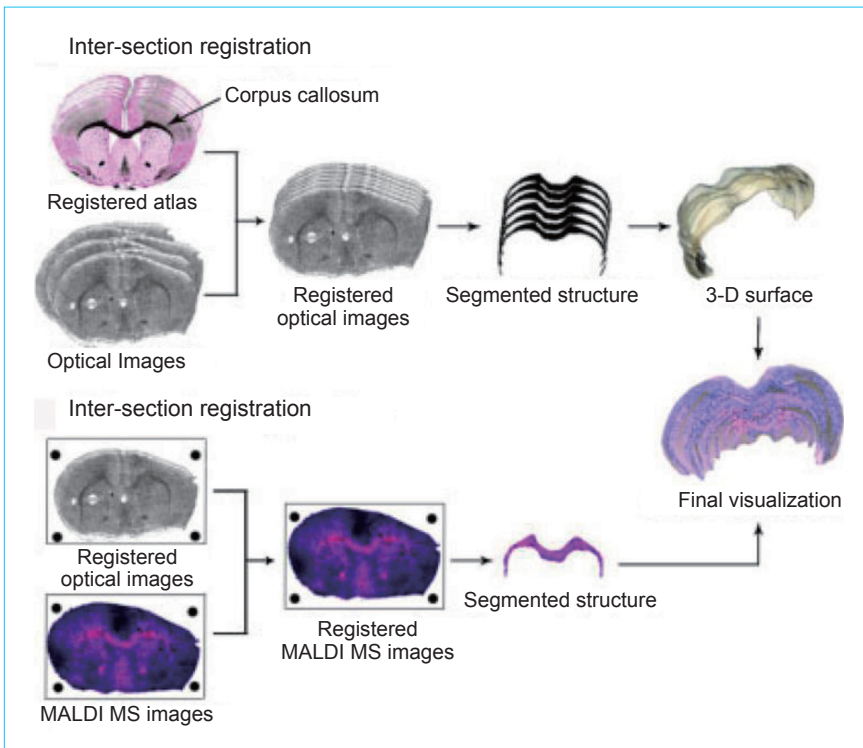


圖 14. MALDI-MS 分析鼠腦組織切片之三度空間蛋白質分布成像示意圖。Creelius *et al.* (2005) 許可轉載，版權所有者 2005 Elsevier。

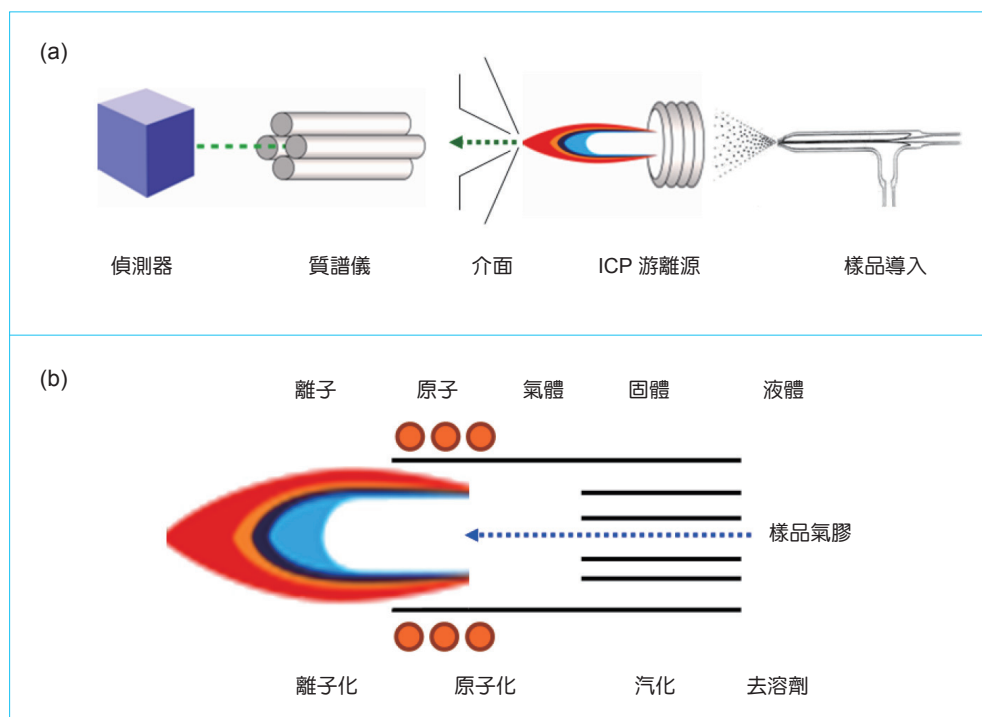


圖 15.
(a) ICPMS 儀器構造示意圖，(b) 感應耦合電漿及離子化過程示意圖。

測極限) 的特性，為成像質譜術成功地應用於生醫成像之首要條件。近年來 LA-ICPMS 具有高樣品分析通量 (high sample throughput)，也是目前軟／硬生物組織元素成像分析最靈敏的技術，為生醫領域元素成像分析的另一項新的選擇。以下將簡介 LA-ICPMS 成像技術在金屬質體之研究現況。

(1) 金屬質體學

微量金屬的作用、攝取、傳輸與儲存，對蛋白質的正常功能扮演著非常重要的角色，促使金屬質體學 (metallomics) 或金屬蛋白質體學 (metalloproteomics) 研究方法的發展日趨重要。德國尤利希國家研究中心 (Forschungszentrum Juelich) 貝克 (J. Sabine Becker) 教授等人於 2010 年陸續發表三篇有關 LA-ICPMS 成像質譜術於生醫影像研究之回顧性文章^(1, 50-51)，提到 LA-ICPMS 應用於腦組織切片的成像分析之偵測極限大約在 $\text{sub } \mu\text{g/g}$ ，空間解析約為 $5-200 \mu\text{m}$ 。在成像與定量方面，Becker 等人將已知濃度之基質匹配 (matrix-matched) 標準品，固定於含有樣品之玻璃載台上，使用載台上不同濃度的標準品作為定量用檢量線，

如圖 17(a) 與 (b) 所示，離子成像結果如圖 17(c) 所示，顯示利用 LA-ICPMS 分析人類海馬迴 (human hippocampus) 腦組織切片中銅元素的分布與光學影像具有良好之關聯性，定量分析的線性回歸係數大於 0.9⁽¹⁾。ICPMS 具有分析同位素的功能，因此利用 LA-ICPMS 進行離子成像分析時，可選擇分析兩種以上的同位素 (如： $^{63}\text{Cu}^+$ 與 $^{65}\text{Cu}^+$ 或 $^{64}\text{Zn}^+$ 與 $^{66}\text{Zn}^+$) 分布應該相同，以驗證影像的合理性。

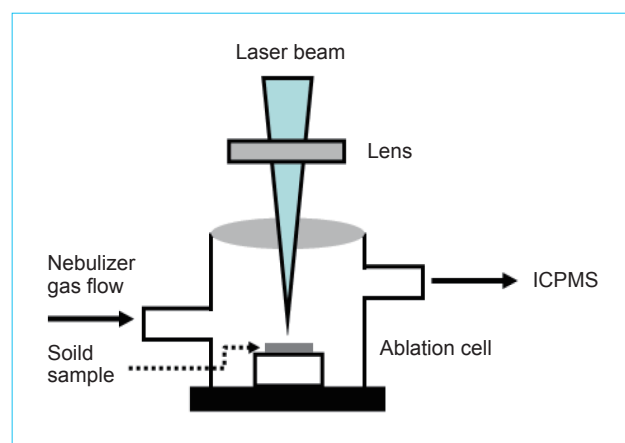


圖 16. 雷射剝蝕系統示意圖。

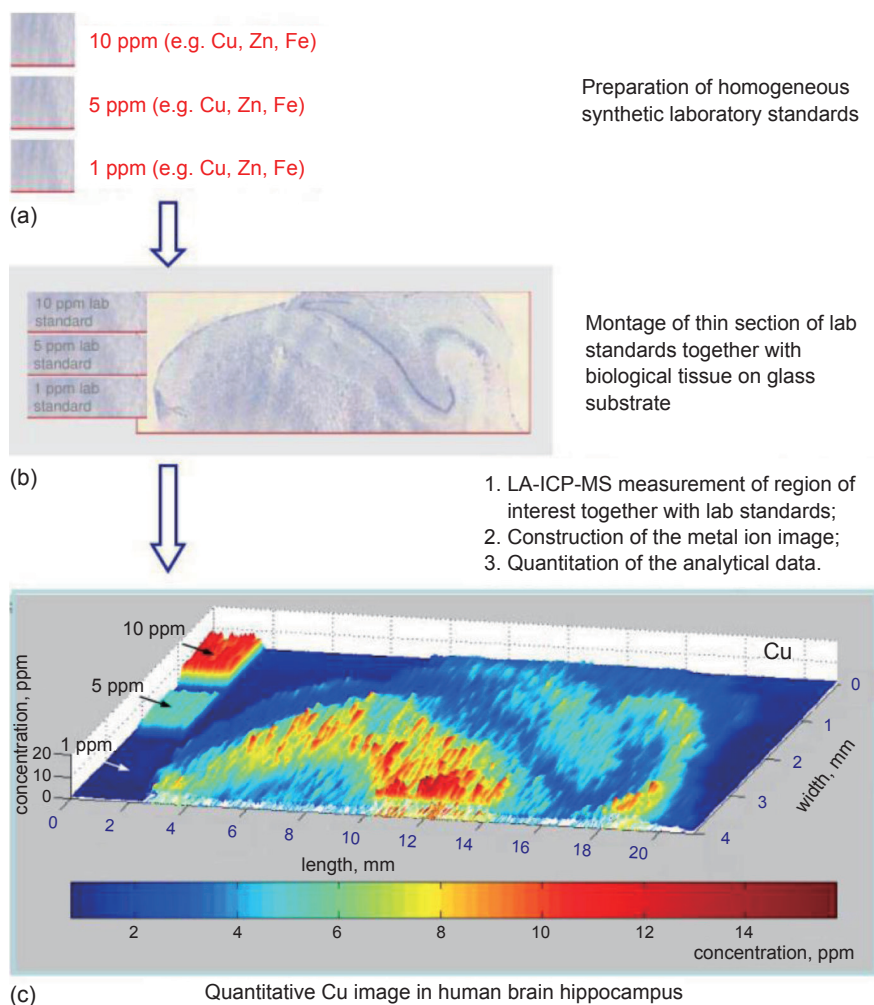


圖 17. LA-ICPMS 分析人類海馬迴腦組織切片之成像與定量技術。Becker *et al.* (2010) 許可轉載，版權所有者 2010 John Wiley and Sons。

對於干擾的問題，一般可使用雙聚焦扇形磁場式 ICPMS 提供所需的質量解析度，或是使用碰撞／反應室的技術以去除干擾，以乾式電漿 (dry plasma) 狀態為主的 LA-ICPMS，干擾問題比一般濕式進樣的 ICPMS 少。Becker 等人⁽⁵²⁾ 評估均質化 (添加已知濃度標準品之 0.65 g 腦組織切片，經均質化、離心與冷凍後，再切片成厚度約為 20 μm 的試片) 與非均質化 (相鄰的且未均質之腦組織切片) 樣品的分析再現性 (reproducibility)，測值的相對標準偏差百分比分別為 2–3% 與 5–8%。綜合上述，利用 LA-ICPMS 成像分析生醫樣品 (如：腦組織切片)，完整的分析流程 (圖 18) 須包含樣品製備 (冷凍切片，厚度大約為 20 μm)、影像分析 (定性) 與數據分析 (定量) 等步驟⁽⁵¹⁾。Becker 等人利用 LA-ICPMS 進行帕金森氏症 (Parkinson's disease) 相關研究^(1, 53)。結果如圖 19 所示，相較於

對照組 (control，未注射誘導帕金森氏症之藥物)，注射 1-甲基-4-酚基-1,2,3,6-四氫嘔啉 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 誘發帕金森氏症之老鼠，注入藥物 7 與 28 天後，在大腦導水管 (aqueduct) 處可見到銅離子濃度的增加；在腦角尖核 (interpeduncular nucleus, 於圖中簡稱 IPN) 處可發現鐵離子濃度的增加。McLeod 等人利用銻 (Eu) -與鎳 (Ni) -結合抗體標定阿茲海默症基因轉殖鼠 (transgenic mouse) 腦組織切片中的澱粉樣蛋白 (β -amyloid)，續以 LA-ICPMS 成像分析腦組織切片上 ^{153}Eu 與 ^{60}Ni ，以評估澱粉樣蛋白在阿茲海默症基因轉殖鼠腦組織中的分布⁽⁵⁴⁾。

LA-ICPMS 也被應用於癌症生化指標物 (Biomarker) 之研究，如 McLeods 等人利用銀 (Ag) 輔助免疫金染色 (immunogold staining) 技術，標定人類乳癌組織切片中之抗原 (MUC-1)，續以 LA-

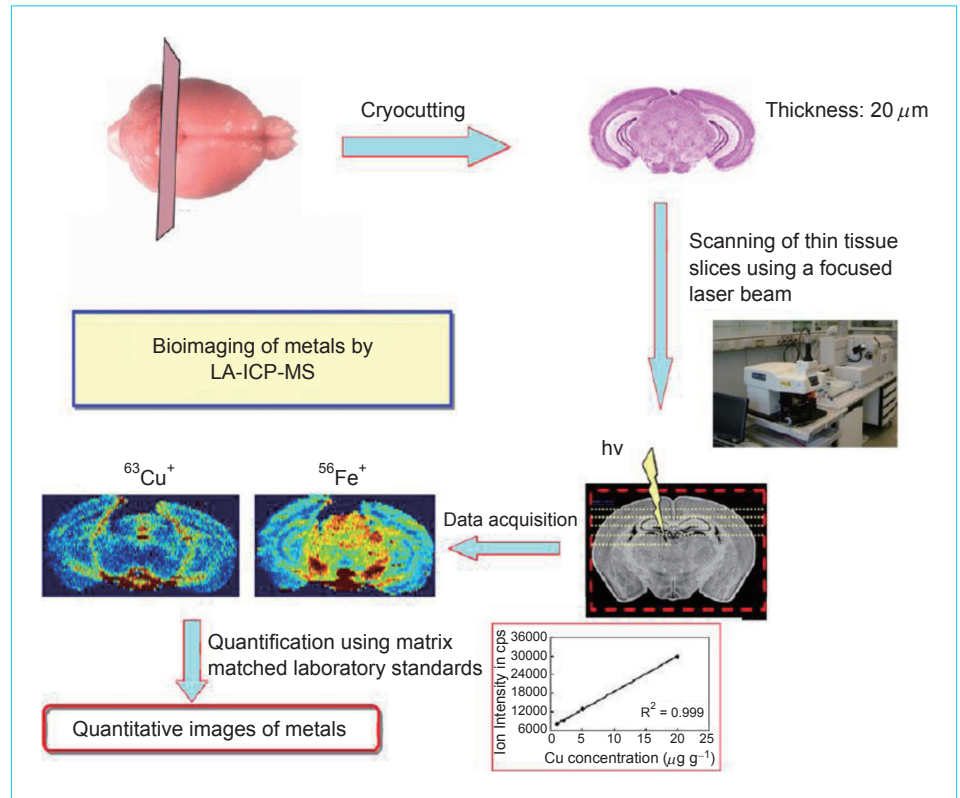


圖 18.

生醫樣品 (如：腦組織切片) 之 LA-ICPMS 成像分析流程，包含樣品製備 (冷凍切片，厚度大約為 $20 \mu\text{m}$)、影像分析 (定性) 與數據分析 (定量)。Beck (2010) 許可轉載，版權所有者 2010 Elsevier。

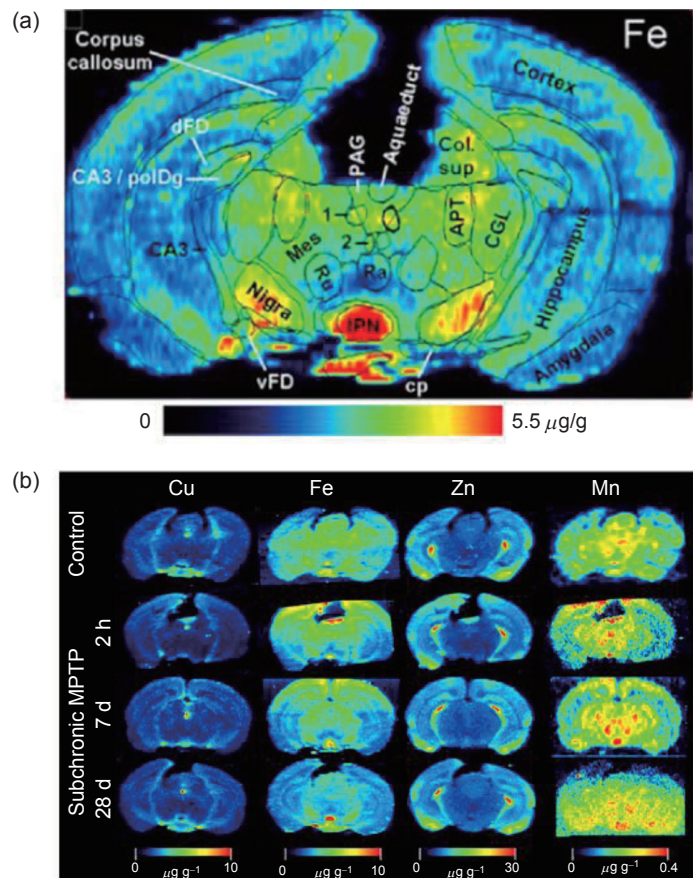


圖 19.

LA-ICPMS 應用於帕金森氏症之研究。(a) 腦組織切片各部位概述，(b) 相較於對照組 (control，未注射誘導帕金森氏症之藥物)，注射 MPTP 誘發帕金森氏症之老鼠於 7 與 28 天後，其大腦導水管處可見到銅離子濃度的增加，腦角尖核處可發現鐵離子濃度的增加。Matusch *et al.* (2010) 許可轉載，版權所有者 2010 Elsevier。

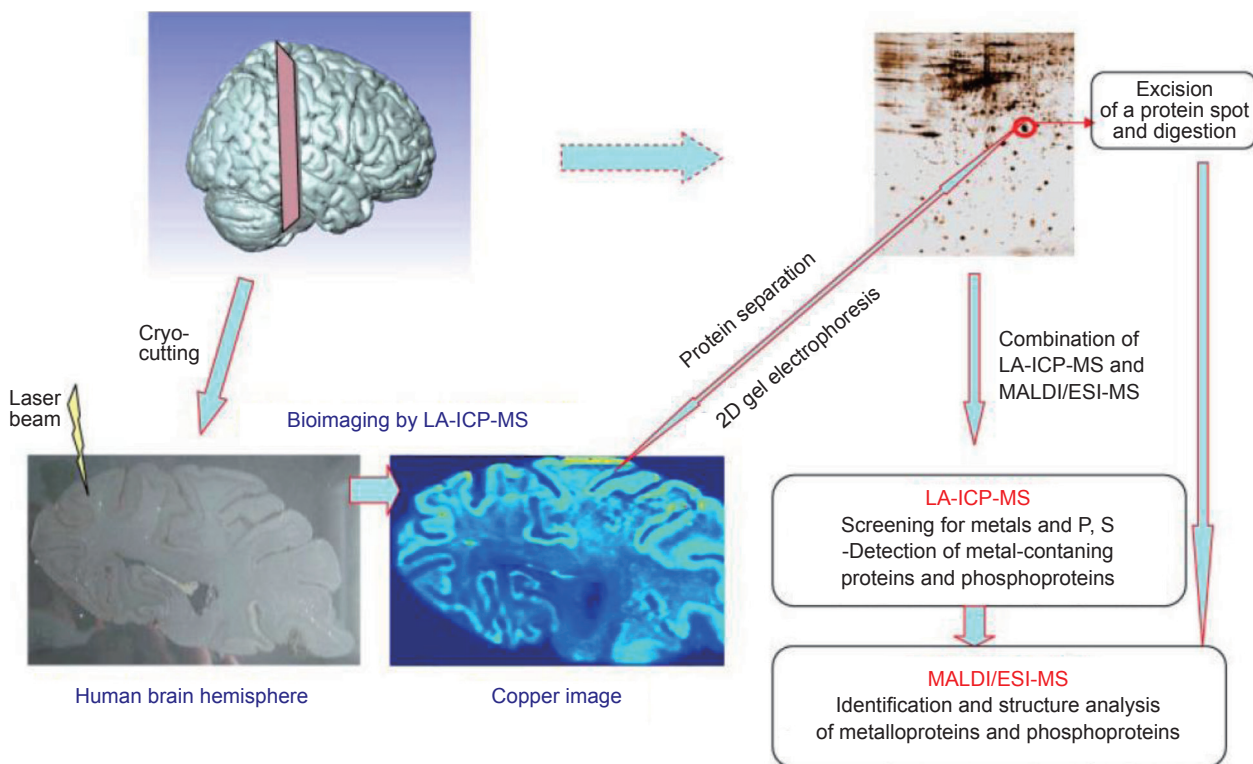


圖 20. LA-ICPMS 成像技術結合蛋白質體學方法 (二維凝膠電泳及 MALDI/ESI-MS 分析) 應用於腦組織研究之分析。Becker *et al.* (2010) 許可轉載，版權所有者 2010 John Wiley and Sons。

ICPMS 成像分析 Ag^+ 與 Au^+ ，評估 MUC-1 在乳癌組織切片中之分布⁽⁵⁵⁾。

先進的元素分析平台 LA-ICPMS 技術，常應用於金屬蛋白質的定性、定量與功能等性質的研究，如圖 20 所示，Becker 等人在第一階段以冷凍切片方式取得人類大腦半球 (human brain hemisphere) 試片，以 LA-ICPMS 成像分析組織切片中的銅元素。在第二階段利用一維或二維凝膠電泳 (1D/2D electrophoresis gel) 篩選特定的蛋白質，以 LA-ICPMS 分析凝膠試片中金屬、磷與硫的含量，評估金屬蛋白與磷酸化蛋白 (phosphoproteins) 在組織中的含量與分布。最後以胰蛋白酶 (trypsin) 水解含有金屬與磷酸化蛋白的凝膠，再以 MALDI- 或 ESI-MS 進行結構與序列的鑑定⁽¹⁾。顯示結合 LA-ICPMS 生物元素質譜術與 ESI-MS 或 MALDI-MS 等生物分子質譜術有助於進一步鑑定金屬蛋白質 (metalloproteins) 結構之特性。

(2) 相關技術發展

面對生醫樣品的多樣性 (如：單細胞或更小

的層次) 與微奈米區域 (micro-/nanolocal) 分析的必需性，空間解析與偵測極限的改善一直為成像質譜術持續發展與成功應用的關鍵。Becker 等人提出 nano-LA-ICPMS 的概念，結合原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM) 的技術，將銀質探針 (Ag needle) 插入散焦 (defocused) 雷射束中，產生近場效應 (near-field effect)，得以聚焦光子於探針的針尖 (tip) 上，提升聚焦效果至 300 倍，可改善 LA-ICPMS 的空間解析度至奈米等級 ($\sim 50 \text{ nm}$)^(51, 56)。Ballihaut 等人則提出紅外線 (1030 nm)、高頻 (10 kHz) 與低功率 ($39 \mu\text{J/pulse}$) 之飛秒 (femtosecond) 雷射 LA-ICPMS 技術，分析凝膠試片中的硒蛋白 (selenoproteins)，大幅改善偵測靈敏度約 40 倍⁽⁵⁷⁾。

五、結論

成像質譜術具備的化學分析與空間解析能力，可以提供生物醫學研究更為細微的資料。面對研究範疇與日俱增的多元性，相關分析技術的發展如：

樣品的製備、空間解析度的改善、離子產率的提升與定量技術的開發等，皆有助於延伸成像質譜術的應用至更微小層次(如：次細胞)或其他領域(如：微晶片系統)之研究。彙整文獻及研討會⁽⁵⁸⁾之生醫成像質譜(biomedical imaging mass spectrometry, BIMS)相關研究成果，得知國內目前有BIMS相關設備，包括：國立中山大學與中國醫藥大學的MALDI-MS發表論文多與脂質體學相關、國立清華大學的ToF-SIMS發表論文多與材料相關，以及台北醫學大學建置中的ToF-SIMS及MALDI-MS規劃研究重點為代謝體學。若能以跨領域研究思維，整合生物、醫學、臨床、物理及化學等人員，架構生醫成像質譜研究團隊，有助於國內早日跨入此一新興研究領域，提供生醫代謝體學研究的先進分析平台。

誌謝

感謝國科會(計畫編號 NSC 98-2113-M-007-016-MY3)的經費支持。

參考文獻

1. J. S. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, B. Wu, D. Salber, C. Palm, and J. S. Becker, *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 156 (2010).
2. J. H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, 4th ed., Berlin: Springer (2004).
3. L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren, *Mass Spectrom. Rev.*, **26**, 606 (2007).
4. R. Aebersold and M. Mann, *Nature*, **422**, 198 (2003).
5. 凌永健, 二次離子質譜儀分析, 材料分析, 新竹市: 中國材料學會, 383 (1998).
6. M. L. Pacholski and N. Winograd, *Chem. Rev.*, **99**, 2977 (1999).
7. R. Levisetti, Y. L. Wang, and G. Crow, *J. Phys-Paris*, **45**, 197 (1984).
8. P. L. Strissel, R. Strick, K. L. Gavrilov, and R. Levi-Setti, *Applied Surface Science*, **231-2**, 485 (2004).
9. J. Y. Xu, C. W. Szakal, S. E. Martin, B. R. Peterson, A. Wucher, and N. Winograd, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3902 (2004).
10. O. Brandt, J. Feldner, A. Stephan, M. Schroder, M. Schnolzer, H. F. Arlinghaus, J. D. Hoheisel, and A. Jacob, *Nucleic Acids Research*, **31**, (2003).
11. P. Sjoval, J. Lausmaa, and B. Johansson, *Anal. Chem.*, **76**, 4271 (2004).
12. T. C. Rohner, D. Staab, and M. Stoeckli, *Mech. Ageing. Dev.*, **126**, 177 (2005).
13. J. Clerc, C. Fourre, and P. Fragu, *Cell Biology International*, **21**, 619 (1997).
14. S. G. Ostrowski, C. T. Van Bell, N. Winograd, and A. G. Ewing, *Science*, **305**, 71 (2004).
15. H. M. Chang, F. D. Mai, B. J. Chen, U. I. Wu, Y. L. Huang, C. T. Lan, and Y. C. Ling, *Journal of Anatomy*, **212**, 295 (2008).
16. F. D. Mai, L. Y. Chen, Y. C. Ling, B. J. Chen, U. I. Wu, and H. M. Chang, *Applied Surface Science*, **256**, 4456 (2010).
17. A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, and C. Lechene, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1572 (2004).
18. A. V. Walker, *Analytical Chemistry*, **80**, 8865 (2008).
19. 潘欽, 薛燕婉, 林滄浪, 羅建苗, 科學發展月刊, **29**, 706 (2001).
20. D. R. Smith, S. Chandra, R. F. Barth, W. L. Yang, D. D. Joel, and J. A. Coderre, *Cancer Research*, **61**, 8179 (2001).
21. L. A. McDonnell, T. H. Mize, S. L. Luxembourg, S. Koster, G. B. Eijkel, E. Verpoorte, N. F. de Rooij, and R. M. A. Heeren, *Anal. Chem.*, **75**, 4373 (2003).
22. A. Delcorte, N. Medard, and P. Bertrand, *Anal. Chem.*, **74**, 4955 (2002).
23. S. L. Lei, Y. S. Yin, P. L. Lee, and Y. C. Ling, *Surface and Interface Analysis*, in press (2010).
24. J. W. Park, H. Min, Y. P. Kim, H. K. Shon, J. Kim, D. W. Moon, and T. G. Lee, *Surface and Interface Analysis*, **41**, 694 (2009).
25. K. D. McKeegan, J. Aleon, J. Bradley, D. Brownlee, H. Busemann, A. Butterworth, M. Chaussidon, S. Fallon, C. Floss, J. Gilmour, M. Gounelle, G. Graham, Y. B. Guan, P. R. Heck, P. Hoppe, I. D. Hutcheon, J. Huth, H. Ishii, M. Ito, S. B. Jacobsen, A. Kearsley, L. A. Leshin, M. C. Liu, I. Lyon, K. Marhas, B. Marty, G. Matrajt, A. Meibom, S. Messenger, S. Mostefaoui, S. Mukhopadhyay, K. Nakamura-Messenger, L. Nittler, R. Palma, R. O. Pepin, D. A. Papanastassiou, F. Robert, D. Schlutter, C. J. Snead, F. J. Stadermann, R. Stroud, P. Tsou, A. Westphal, E. D. Young, K. Ziegler, L. Zimmermann, and E. Zinner, *Science*, **314**, 1724 (2006).
26. C. P. Lechene, Y. Luyten, G. McMahon, and D. L. Distel, *Science*, **318**, 570 (2007).
27. M. Nishizawa, S. Maruyama, T. Urabe, N. Takahata, and Y. Sano, *Rapid Commun. Mass Sp.*, **24**, 1397 (2010).
28. I. Kaganman, *Nat Methods*, **3**, 962 (2006).
29. J. Sunner, E. Dratz, and Y. C. Chen, *Anal. Chem.*, **67**, 4335 (1995).
30. E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, and P. F. Crain, *Rapid Commun. Mass Sp.*, **6**, 771 (1992).
31. J. Han and K. L. Schey, *Invest Ophthalm Vis Sci*, **47**, 2990 (2006).
32. S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie, and R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, **78**, 6448 (2006).
33. A. Scherl, C. G. Zimmermann-Ivol, J. Di Dio, A. R. Vaezzadehl, P. A. Binz, M. Amez-Droz, R. Cochard, J. C. Sanchez, M. Gluckmann, and D. F. Hochstrasser, *Rapid Commun. Mass Sp.*, **19**, 605 (2005).
34. A. F. M. Altelaar, I. Klinkert, K. Jalink, R. P. J. de Lange, R. A. H. Adan, R. M. A. Heeren, and S. R. Piersma, *Anal. Chem.*, **78**, 734 (2006).
35. B. Spengler and M. Hubert, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **13**, 735

- (2002).
36. A. C. Crecelius, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant, and B. Bodenheimer, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **16**, 1093 (2005).
37. R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, and C. E. Taylor, *Anal. Chem.*, **52**, 2283 (1980).
38. 江旭禎, 科儀新知, **21** (1), 21 (1998).
39. O. T. Butler, W. R. L. Cairns, J. M. Cook, and C. M. Davidson, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **25**, 103 (2010).
40. A. Taylor, S. Branch, M. P. Day, M. Patriarca, and M. White, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **25**, 453 (2010).
41. S. Carter, A. S. Fisher, P. S. Goodall, M. W. Hinds, S. Lancaster, and S. Shore, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **24**, 1599 (2009).
42. R. Thomas, *Spectroscopy*, **16**, 38 (2001).
43. R. Thomas, *Spectroscopy*, **16**, 26 (2001).
44. R. Thomas, *Spectroscopy*, **17**, 42 (2002).
45. R. Thomas, *Spectroscopy*, **16**, 44 (2001).
46. D. Beauchemin, *Anal. Chem.*, **80**, 4455 (2008).
47. 黃立心, 林金全, 科儀新知, **20** (1), 5 (1998).
48. R. Thomas, *Spectroscopy*, **17**, 26 (2002).
49. S. F. Durrant and N. I. Ward, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **20**, 821 (2005).
50. J. S. Becker, A. Matusch, C. Palm, D. Salber, K. A. Morton, and S. Becker, *Metallomics*, **2**, 104 (2010).
51. J. S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.*, **289**, 65 (2010).
52. M. V. Zoriv and J. S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.*, **264**, 175 (2007).
53. A. Matusch, C. Depboylu, C. Palm, B. Wu, G. U. Hoglinger, M. K. H. Schafer, and J. S. Becker, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **21**, 161 (2010).
54. R. W. Hutchinson, A. G. Cox, C. W. McLeod, P. S. Marshall, A. Harper, E. L. Dawson, and D. R. Howlett, *Anal. Biochem.*, **346**, 225 (2005).
55. J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, and C. Murray, *Proteomics*, **8**, 3775 (2008).
56. M. V. Zoriv, D. Mayer, and J. S. Becker, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **20**, 883 (2009).
57. G. Ballihaut, F. Claverie, C. Pecheyran, S. Mounicou, R. Grimaud, and R. Lobinski, *Anal. Chem.*, **79**, 6874 (2007).
58. 第七屆台灣質譜學會學術研討會暨 2010 年質譜年會論文集, 高雄, 台灣 (2010).



凌永健先生為美國佛羅里達州立大學化學博士，現任國立清華大學化學系教授。

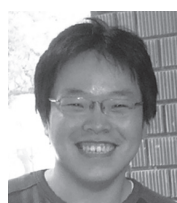
Yong-Chien Ling received his Ph.D. in chemistry from Florida State University,

USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



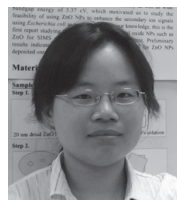
李佩玲小姐為國立清華大學生醫工程與環境科學博士，現任國立清華大學化學系博士後研究員。

Pei-Ling Lee received her Ph.D. in biomedical engineering and environmental sciences from National Tsing Hua University. She is currently a postdoctoral research associate in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



殷裕勝先生為國立清華大學化學系博士班學生。

Yu-Sheng Yin is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



雷秀玲小姐為國立清華大學化學系博士班學生。

Shiu-Ling Lei is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



柯耀棠先生為國立清華大學化學系博士班學生。

Yao-Tang Ke is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



邱文達先生為美國匹茲堡大學流行病學博士，現任台北醫學大學校長。

Wen-Ta Chiu received his Ph.D. in epidemiology from the University of Pittsburgh, USA. He is currently the president of Taipei Medical University.



麥富德先生為國立清華大學化學博士，現任台北醫學大學醫學系生物化學科副教授。

Fu-Der Mai received his Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. He is currently an associate professor in the Department of Biochemistry, School of Medicine at Taipei Medical University.