

奈米粒子於雷射脫附游離質譜分析 與表面增強拉曼散射光譜之應用

Applications of Nanoparticle Matrices for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

黃銘峰、李昆鴻、林宗宏、江政剛、張煥宗

Ming-Feng Huang, Kun-Hong Lee, Zong-Hong Lin, Cheng-Kang Chiang, Huan-Tsung Chang

本文將介紹以奈米粒子作為質譜及拉曼光譜基質的分析技術。由於奈米粒子在紫外光—可見光範圍有高的吸收係數，且容易用生物分子修飾成可選擇性辨識分析物之粒子，故近年來已有許多研究專注在奈米粒子作為表面輔助雷射脫附游離化質譜儀 (SALDI-MS) 之基質以偵測小分子。另外，由於貴重金屬奈米粒子的電磁場增強效應明顯，故於表面增強拉曼散射光譜的原理探討與生醫偵測方面的應用也漸受重視。

This article briefly reviews the use of nanoparticles as matrices for the determination of small molecules using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) and as surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)-active substrates. It is easy to prepare bioconjugated nanoparticles that have great surface area for selective recognition of analytes of interest. In addition, nanoparticles having high molar absorptivity in the UV-Vis region are effective inorganic matrixes for the analysis of small molecules by SALDI-MS. Recently, attention has turned toward the development of SERS-active nanoparticle substrates for use as an ultrasensitive platform for the detection of biological molecules.

一、前言

雷射脫附游離質譜法 (laser desorption ionization mass spectrometry, LDI-MS) 是將紫外光雷射光源的能量傳遞給分析物，讓分析物脫附，並解離以進行其質量分析的技術統稱。為了避免雷射能量過強破

壞分析物，所以需透過能吸收雷射能量的基質，將能量間接傳遞到分析物。基質可分為兩種：一是有機基質，一是無機基質，其中利用無機基質的技術則稱為 surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS)。

拉曼散射 (Raman scattering) 的現象在 1928 年

由 Raman 發現，其原理是當入射光子把能量給了分子，使分子處於振動或轉動的激發狀態，待與周圍分子碰撞後，其去激發後能量若不產生變化者，稱之為雷利散射 (Rayleigh scattering)。但若能量產生變化，可分為：(a) Stoke shift，散射光能量小於入射光；(b) anti-Stoke shift，散射光能量大於入射光。此能量的改變即稱為拉曼位移 (Raman shift)，單位是以波數 (wavenumber, cm^{-1}) 表示。在 1974 年 Fleischmann 等人發現當 pyridine 吸附在粗糙銀電極的表面後，會有拉曼訊號增強的現象發生，此一現象即稱為表面增強拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS)⁽¹⁾。

表面輔助雷射脫附游離化質譜與表面增強拉曼散射光譜的共同特徵在於分析物需先吸附在基材的表面，再以高能量的光源照射基材，光的能量由基材吸收後再間接傳遞給分析物。此兩項技術因其靈敏度高，且可提供分析物結構訊息，近來已成為極重要之生物分析技術。本篇文章旨在介紹結合奈米粒子及 SALDI-MS 或 SERS 之相關技術，其中重點將以本研究室近年來之研發成果為主。

二、表面輔助雷射脫附游離化質譜

利用紫外光雷射光源作為脫附游離分析物之技術的開發，開啟了日後以質譜儀廣泛且有效的分析生物分子之範疇。Karas 和 Hillekamp 在 1987 年提出利用吸收紫外光之有機基質 (chemical matrix) 與分析物混合來偵測蛋白質⁽²⁻⁴⁾。此技術一般稱為基質輔助雷射脫附游離質譜法 (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-MS)。質譜分析前，先將分析物與具有吸收紫外光之有機基質，如 α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid、2,5-dihydroxybenzoic acid 與 sinapinic acid 等混合而形成共結晶，有機基質吸收光子能量後，會快速地将能量轉移到分析物上，使分析物脫附與游離，氣化的分析物離子被帶入質量分析器 (mass analyzer)，在電場下會依照分析物本身質荷比 (m/z) 的不同來進行分析。MALDI-MS 的缺點在於有機基質具有強背景訊號，對質荷比小於 2000 的小分子易形成偵測上的干擾，故未能廣泛地應用於複雜

樣品中 (如血液、尿液) 生物小分子的定性或定量分析上⁽⁵⁻⁷⁾。此外，倘若有機基質與分析物間的互溶性不佳，容易造成其共結晶性的不均勻，會在不同的結晶點上得到不同強度之樣品訊號 (此現象稱為 sweet spots)，因此會導致我們在分析定量上的誤差及再現性差等問題。

Tanaka⁽⁸⁾ 在 1988 年則提出了用鈷粒子混合甘油的懸浮基質來偵測質荷比達 10^5 的蛋白質與聚合物，鈷粒子的功用是吸收雷射能量，甘油則可幫助分析物質子化，因為鈷粒子為無機基材，不與蛋白質等分析物形成共結晶，因此樣品在樣品盤上分布不均的問題可大為改善。1995 年 Sunner 與 Dale 等人應用相同的觀念，使用屬於無機物的石墨粉末與矽元素混合甘油，成功地分析胜肽樣品⁽⁹⁾，Sunner 並在此提出了 SALDI 這個名詞，以與 MALDI 作為區分，因為 SALDI 不需使用有機基質，因此可降低有機基質離子在低分子量區的干擾，與樣品混合的均勻度亦較佳，因此較 MALDI 更適合來偵測小分子。隨後，Siuzdak 等人在 1999 年提出以奈米尺度多孔性矽基材 (nano-structured porous silicon thin film) 脫附產生氣態離子分析物之概念，使分析物可以在不添加有機基質條件下，經雷射光照射後，直接於矽材料表面脫附游離出⁽⁴⁾。這項技術可有效地偵測到分子量小於 3000 Da 之生物分子，其偵測極限可達 femtomole (fmol, 10^{-15} 莫耳) 的範圍。

1. 無機奈米基質之發展

由於奈米 (nanometer, nm) 材料具有比表面積大、高紫外光範圍吸收係數 (molar absorptivity) 等特點，已逐漸成為 SALDI 的基質選擇。除了能解決 sweet-spots 的問題，以及避免低分子量範圍基質訊號的干擾外，利用奈米粒子大比表面積與對特定分子有強作用力的特性，也能對樣品進行分離及濃縮。理論上，只要能吸收足夠光能量之奈米粒子皆可應用於 SALDI-MS 來偵測小分子，但以一般質譜儀器配有紫外光雷射及紫外光能量較高之特性，開發在紫外光區具有高吸收係數之奈米材料，如銀、金、二氧化鈦及金銀複合材料等乃為首選。另外，金對含硫醇化合物、鈦對含磷化合物具有選擇性，因此其可應用於許多重要生物分子之偵測。



在金屬奈米粒子表面修飾具生物辨識力之分子，更可提高其樣品選擇性。但由於此類奈米粒子於小分子量處會產生背景訊號，且一般生物樣品中含極高濃度之鹽類及生物小分子，因此用 SALDI-MS 來偵測小分子仍有其困難度。

Russel 等人提出直接用金奈米粒子作為 SALDI-MS 之無機基質⁽¹⁰⁾，筆者利用不同粒徑之金奈米粒子 (2–10 nm) 來進行胜肽及蛋白質樣品的分析。研究發現無論在正離子或負離子模式中，都可以看到胜肽樣品之訊號，且隨著尺寸越小有訊號越強之趨勢 (2nm > 5nm > 10 nm)，偵測極限可達到 100 fmol。當金奈米粒子的尺寸越大時，所偵測的金團簇 (gold clusters) 訊號也隨之增強。此金團簇的訊號一般會造成圖譜鑑定上之誤差，因此可藉由選擇粒徑較小之金奈米粒子來降低其背景訊號之干擾。

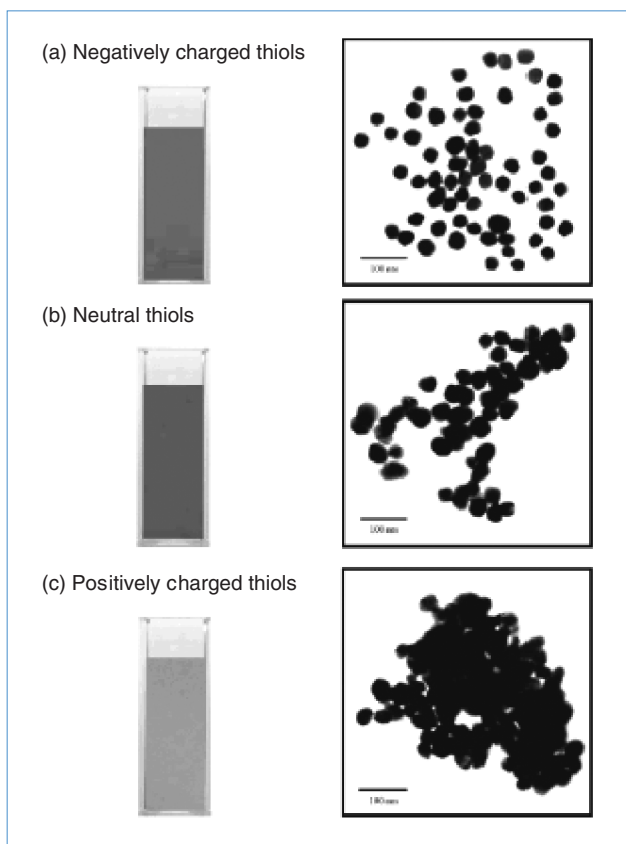


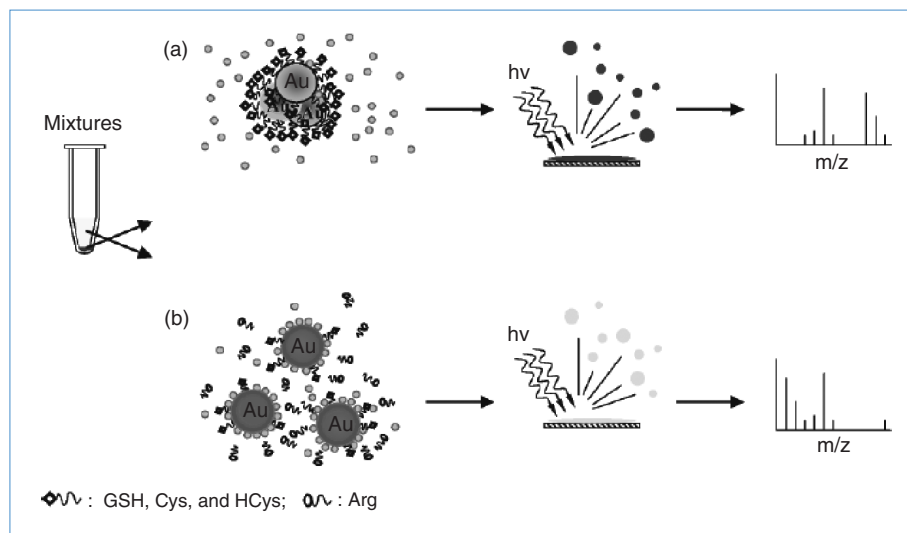
圖 1. NRAu NPs 修飾不同電性之硫醇分子後的外觀顏色及穿透式電子顯微鏡圖。(a) 負電性硫醇分子、(b) 中性硫醇分子、(c) 正電性硫醇分子。

2. 應用選擇性金奈米基質偵測胺基酸硫醇

胺基酸硫醇 (aminothiols)，如麩胱甘肽 (glutathione, GSH)、半胱胺酸 (cysteine, Cys) 和類胱胺酸 (homocysteine, HCys)，為人體新陳代謝及體內平衡之重要指標⁽¹¹⁻¹³⁾。胺基酸硫醇在人體中具有抗氧化、解除某些有毒化學物質與病菌毒性、調節免疫反應等功能，因此決定生物體樣品中 (如血液或尿液) 胺基酸硫醇的含量，是了解生理機能和疾病檢測上相當重要的一環。筆者實驗室則是首次利用 SALDI 來偵測氨基酸硫醇分子，我們嘗試引入先前已建立的尼羅紅 (Nile red, NR) 修飾金奈米粒子系統⁽¹⁴⁾ 來當作 SALDI-MS 的基質材料，並藉由 Au 與 SH 間的強作用力，在不受生物體樣品中複雜基質的干擾下，選擇性分離並濃縮含有硫醇的胺基酸分子，再由質譜儀進行分析⁽¹⁵⁾。

尼羅紅為一種放光波長在 650 nm 的紅色染料，當它吸附在金奈米粒子表面上時稱之為 NRAu NPs，由於染料所放出來的螢光 (fluorescence) 會與金奈米粒子間產生能量轉移 (energy transfer) 及碰撞的現象，此時螢光會被消光 (quenching)。藉由 Au NPs 的催化，吸附在表面上的 NR 會形成 NR 產物 (放光波長在 610 nm)。當加入的硫醇分子將吸附在表面的 NR 產物取代出來釋放到溶液中時，在 610 nm 位置的螢光會慢慢增加。由於不同硫醇分子在取代過程中因本身帶電性不同會影響 Au NPs 的分散與聚集，如圖 1 電子顯微鏡圖所示，因此我們可以藉由觀察 NRAu NPs 的顏色以及螢光之雙重變化來偵測硫醇分子。選用 NRAu NPs 來當作 SALDI-MS 的基質，除了可利用吸收及螢光的訊息來決定硫醇分子存在與否以外，其應用在質譜分析上優於傳統有機基質的優點在於可以降低複雜生物環境中其他分析物的干擾。樣品不須經過繁雜的前處理步驟，即可簡單的藉由 NRAu NPs 選擇性的偵測一些重要的胺基酸硫醇分子，因此可以有效的用 NRAu NPs 作為 SALDI-MS 的基質，並應用在生物體樣品的偵測。當硫醇和非硫醇分子同時和 NRAu NPs 混合時，硫醇分子較容易取代 NR 產物，且中和 Au NPs 表面電荷，使 Au NPs 沉澱；反之，非硫醇分子由於其與 NRAu NPs 的表面作用力較弱，因此會存在於溶液中。用 NRAu NPs

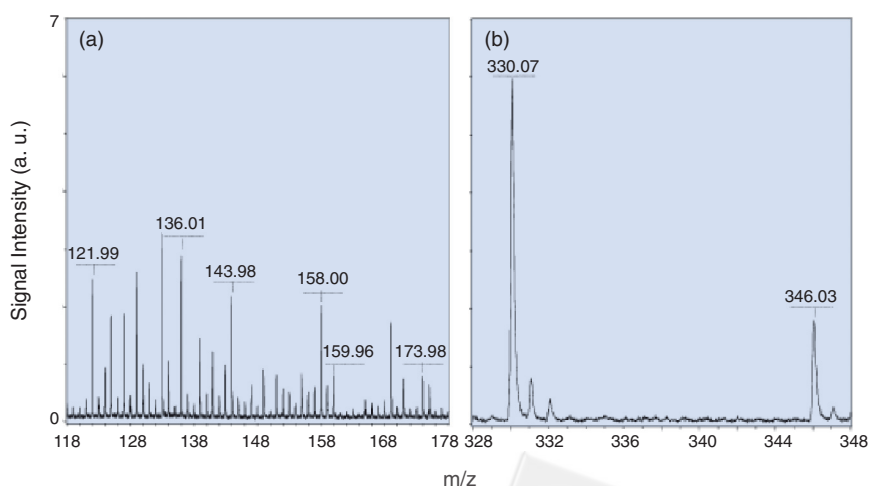
圖 2.
以 NRAu NPs 分離具硫醇基與
不具硫醇基的氨基酸分子示意
圖。



簡單快速的分離硫醇及非硫醇分子，如圖 2 所示。在簡單分離後，各別取出上清液與下層沉澱物做 SALDI-MS 的偵測。若將系統中各個條件，如 NRAu NPs 的大小及濃度、緩衝溶液的種類及 pH 值和雷射強度最佳化後，以 SALDI-MS 定量 GSH、Cys 和 HCys 的結果，其偵測極限分別為 1.0、2.0 及 1.3 μM ，若再經由離心濃縮的步驟，可進一步降低 GSH 的偵測極限至 25 nM。因此藉由 NRAu NPs 對硫醇的選擇性，同時混入三種胺基酸硫醇的標準品，我們可以藉由質譜儀來分別區分三種胺基酸硫醇之訊號 (圖 3)。最後以 NRAu NPs 為基質的 SALDI-MS 應用在分析真實樣品時，可以發現即使在很複雜的紅血球細胞 (red blood cells) 萃

取液和血漿 (plasma) 樣品中，只要將其中會干擾偵測訊號的大量蛋白質以 80% CAN 沉澱移出，再簡單的與 NRAu NPs 混合後，即可選擇出樣品中的胺基酸硫醇分子，經由離心清洗移除生物樣品中的高鹽類後進行質譜分析，便可在質譜圖上清楚觀察到血液中 GSH 和 Cys 的訊號，再利用標準添加法，可分別定量出紅血球中 GSH 的含量為 $3.71 (\pm 1.51) \mu\text{M}$ ，血漿中 Cys 的含量為 $11.4 (\pm 1.0) \mu\text{M}$ ，濃度也與文獻所報導的範圍相吻合。因此開發以 NRAu NPs 為基質的 SALDI-MS 來取代傳統有機基質，提供了選擇性佳、偵測靈敏度高、再現性好，以及簡便的樣品處理等優點。此優勢有利於快速篩選大量樣品。

圖 3.
以表面輔助雷射脫附游離質譜法分
析三種氨基酸硫醇分子：GSH (20.0
 μM)、Cys (40.0 μM)、HCys (40.0
 μM)。訊號峰鑑定：(a) $[\text{Cys} + \text{H}]^+$,
 $m/z = 121.99$ ； $[\text{Cys} + \text{Na}]^+$, $m/z =$
 143.98 ； $[\text{Cys} + \text{K}]^+$, $m/z = 159.96$ ；
 $[\text{HCys} + \text{H}]^+$, $m/z = 136.01$ ； $[\text{HCys} +$
 $\text{H}]^+$, $m/z = 158.00$ ； $[\text{HCys} + \text{K}]^+$, $m/z =$
 173.98 、(b) $[\text{GSH} + \text{Na}]^+$, $m/z =$
 330.07 ； $[\text{GSH} + \text{K}]^+$, $m/z = 346.03$ 。



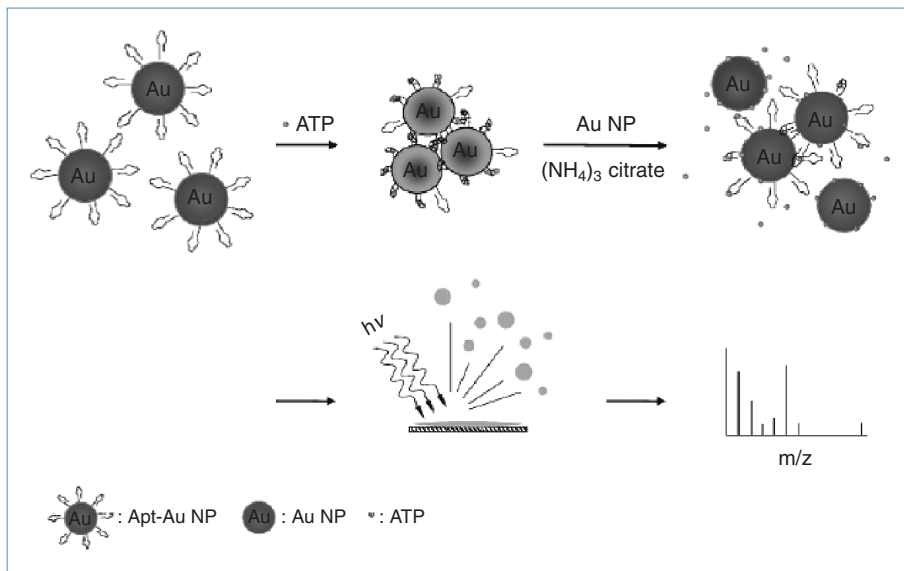


圖 4.

以 Au NPs 作為 SALDI-MS 基質分析 ATP 分子之示意圖。ATP 先與 apt-Au NP 作用後，再加入少許 Au NP 作為 SALDI-MS 基質，進行質量分析後可得到 ATP 之訊號。

3. 應用選擇性金奈米基質偵測三磷酸腺苷

金奈米粒子對於含硫醇官能基的樣品具有良好選擇性，但相對的，對於與金粒子沒有強作用力的分子，如三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)，偵測上便相對困難。ATP 可藉由氮原子與金形成金－氮鍵結，故仍能藉此讓金奈米粒子作為偵測 ATP 的 SALDI-MS 基質，但其親和力遠較金－硫鍵小，故當 ATP 與其他含硫醇的化合物 (如 GSH) 混合後，便偵測不到 ATP 的訊號。此項缺點將導致無法在成分複雜的真實樣品中偵測 ATP，為了克服這個缺點，在金奈米粒子表面修飾針對分析物的辨識分子是可行的研究方向。我們選用可辨識 ATP 的適合體 (aptamer)，適合體是一種以隨機序列合成出來的寡聚核苷酸的統稱，如果與某標的分子有強親和力，即可作為該分子的適合體。實驗結果發現利用修飾適合體的金奈米粒子 (apt-Au NPs) 作為基質，當 GSH 與 ATP 同時與 apt-Au NPs 混合後，ATP 藉由與 aptamer 的強親和力而被吸附在 apt-Au NPs 表面，離心去除未吸附的分析物後，再和少量 Au NP 混合之後，以 SALDI-MS 即可偵測到 ATP 訊號 (圖 4)，偵測極限達到 $0.48 \mu\text{M}^{(16)}$ 。我們進一步將乳癌細胞 (MDA-MB-231) 萃取液中會干擾訊號的蛋白質以濾膜去除後，再簡單的與 apt-Au NPs 混合，即可選擇出樣品中的 ATP 分子，經由離心清洗移除生物樣品中的高鹽類後進

行質譜分析，便可在質譜圖上清楚地觀察到樣品中 ATP 的訊號，再利用標準添加法來定量細胞萃取液中 ATP 的含量為 $1.9 (\pm 0.3) \text{ mM}$ ，與文獻所記載的範圍相吻合⁽¹⁷⁾。

4. 以二氧化鈦基質分析烯二醇結構分子

相較於金屬奈米粒子，二氧化鈦奈米粒子為一種常見的光觸媒 (photocatalysis) 材料，在紫外光的照射下會產生自由離子 ($\cdot\text{OH}$ 及 $\text{O}^{\cdot-}$)，與附著物產生反應，以進行殺菌及分解有機分子。由於二氧化鈦奈米粒子在紫外光區具有很高的吸收係數，因此其亦適合作為 SALDI-MS 的基質材料。將二氧化鈦奈米粒子製備成薄膜且混入甘油，已被證實可以有效的當作 SALDI-MS 的基質材料，用來偵測如 cytochrome C 等蛋白質分子⁽¹⁸⁾。由於二氧化鈦分子表面上的 Ti^{4+} 分子會與具有烯二醇 (enediol) 結構之分子選擇性鍵結，故有此結構之分子，如兒茶素 (C)、表兒茶素沒食子酸酯 (ECG) 與表沒食子兒茶素沒食子酸酯 (EGCG) 等，都可與二氧化鈦奈米粒子進行作用。

筆者實驗室即利用二氧化鈦奈米粒子作為選擇性探針，在溶液中選擇性鍵結此三種分子後，再利用二氧化鈦奈米粒子作為 SALDI-MS 之基質，直接利用質譜儀進行分析⁽¹⁹⁾。實驗中發現傳統上有機基質常出現的 sweet spot 問題可以有效解決，點

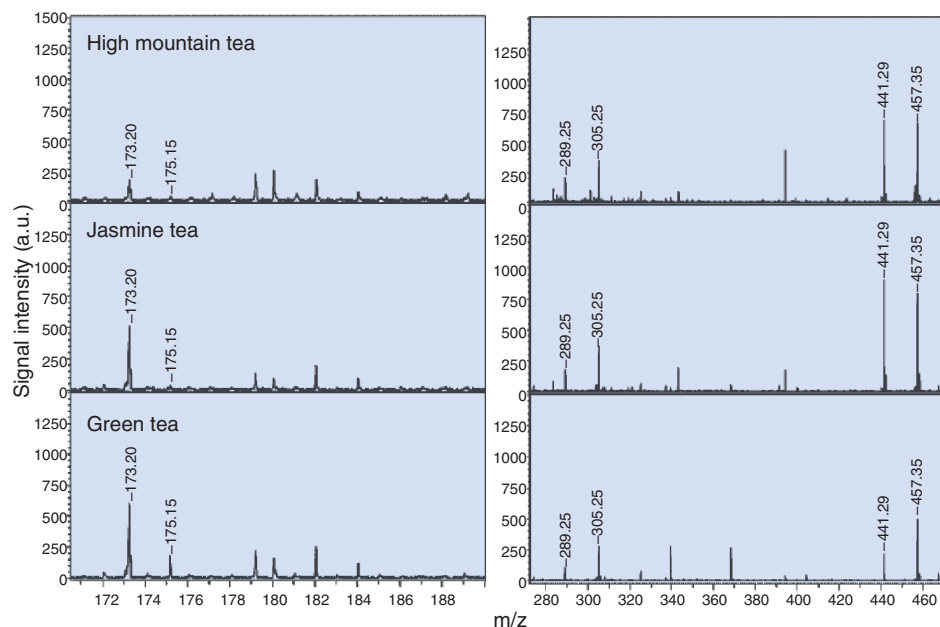


圖 5.

以二氧化鈦奈米粒子作為選擇探針偵測常見茶類樣品中多酚類物質之質譜圖。

與點之間的再現性可以有效的提升，而此三種分子利用此分析方法可達到 0.45、1.85 與 0.65 μM 的偵測極限。圖 5 為利用此種方法偵測市售常見的綠茶粉、茉莉花茶茶包與綠茶罐裝飲料之結果，藉由標準添加法，可以在實驗時間 30 分鐘內偵測這些多酚類物質於樣品中的含量。

三、表面增強拉曼散射光譜

早在 1923 年 Smekal 就已用理論計算推測光會有非彈性散射 (inelastic scattering) 的現象發生⁽²⁰⁾。到了 1928 年 Raman 和 Krishnan 即利用實驗觀察到了這個現象⁽²¹⁾，他們並發現經由這種非彈性散射出來的光，比起彈性散射光的強度要弱很多。Raman 因此項發現而在 1930 年獲頒諾貝爾物理獎，這種非彈性散射的現象也被命名為拉曼散射。拉曼散射是由於分子振動或轉動所造成的，不同分子都有其個別的振動方式，再加上拉曼散射所造成的光譜其譜帶都夠窄，所以用於鑑定不同分子或官能基都極為方便及準確，且水的拉曼散射強度極弱，所以對於一些存在於水相的生醫樣品，也可用拉曼散射的技術來檢定。然而拉曼散射雖然有以上這些優點，但卻也有先天上的缺點，就是它的散射截面積 (scattering cross section) 太小，和螢光比

較，就足足小了 10^{14} 倍以上，所以拉曼散射訊號的強度太小是極需克服的重點。

1974 年 Fleischmann 等人發現 pyridine 吸附在粗糙銀電極的表面可產生 SERS 效應後，在 1977 年有兩個研究團隊分別提出了不同的機制，來解釋拉曼訊號在金屬表面為何會增強。一是由 Creighton 等人所提出⁽²²⁾，稱之為化學增強效應 (chemical enhancement)，指的是吸附分子 (adsorbate) 與金屬基質 (metal substrate) 間產生新的電荷轉移能階，類似於共振拉曼散射 (resonant Raman scattering) 機制，而有表面增強拉曼散射之效果，一般增強效果約 $10-10^2$ 倍。另一則是由 Van Duyne 等人所提出⁽²³⁾，稱之為電磁場增強效應 (electromagnetic enhancement)，或一般又統稱為表面電漿共振 (surface plasmon resonance) 效應。我們簡單的以一金屬球形粒子來做例子，當入射光子與此金屬球形粒子碰撞時，其能量會使得金屬球形粒子的表面電子做偶極震盪 (dipole oscillation)，而此產生的電場，對於吸附分子即有表面增強拉曼散射之效果，其增強效果約 10^4-10^7 倍。Van Duyne 教授當初是通過實驗和計算發現，吸附在銀電極表面的 pyridine 分子對拉曼散射訊號的貢獻是溶液中 pyridine 分子的 10^6 倍，而此電磁場增強效應也為表面增強拉曼散射的主要原因，至今仍為最多人所

欲探討的現象。本節文章即著重在奈米粒子的材質、形狀及複合材質對電磁場增強效應的影響，進而改變表面增強拉曼散射效應。

1. 電磁場增強效應

由於上述表面增強拉曼散射通常都是在粗糙的金屬表面才會比較明顯，且粗糙的程度通常又以奈米大小最佳。近幾十年來，奈米科技蓬勃發展，許多材料皆可以被合成侷限在奈米尺寸，故探討奈米材料在拉曼散射光譜上的增強及其機制是目前極為熱門的領域。當金屬材料介於奈米尺寸時，其大小的變化，常伴隨著表面電漿共振能量的改變；甚至形狀的改變，也會出現不同方向的表面電漿共振，其中又以金奈米棒 (gold nanorod) 的例子最為著名⁽²⁴⁾。

當金為奈米球形時，其表面電漿共振的吸收波帶約在 520 nm 處，但為奈米棒狀時，除了會發現有短軸表面電漿共振的吸收波帶，一樣是在約 520 nm 處，更會在較長波長的位置發現長軸的表面電漿共振吸收波帶，且隨著棒子的長／短軸比值 (aspect ratio) 越大，長軸的表面電漿共振吸收波帶也有紅位移 (red shift) 的趨勢。由參考文獻 25 中我們可以發現，當入射光的波長越接近金屬材料的表面電漿共振波帶位置時，其所可以產生的誘導電場是最大的，這也意味著，若入射的雷射光波長越接近粗糙的金屬電極表面或金屬奈米粒子產生表面電漿共振波帶的位置，其所產生的電磁場增強效應會越明顯，而有著更大的表面增強拉曼散射效應。如 Nie 等人即利用銀奈米粒子，在 1997 年就做到了單分子的偵測，並發表在 Science 上⁽²⁶⁾，其偵測的分子為 rhodamine 6G (R6G)。

Halas 教授的研究團隊在製備金和銀的奈米殼層材料 (nanoshell) 有非常卓越的表現^(27, 28)，加上他們發現金屬奈米殼層材料的表面電漿共振吸收波帶也會隨著殼層厚度的變化，而有位移的趨勢，故他們藉由改變銀奈米殼層材料的厚度，來探討不同位置的表面電漿共振吸收波帶與單一波長 (1064 nm) 的入射光所能產生的誘導電場大小，其所選用的分子為 para-mercaptoaniline，在溶液的狀態下，此系統可以達到 10^{12} 的表面增強拉曼散射效應。他們也進一步探討別的雷射激發波長 (782 nm) 與不同

厚度的金、銀奈米殼層材料間的表面增強拉曼散射效應，發現也可以達到 2.5×10^{10} 的效果⁽²⁹⁾。

除了金、銀以及銅之外，其他金屬應用在表面增強拉曼散射效應上的效果皆沒有那麼好⁽³⁰⁾，尤其過渡金屬為最，那是因為大多數過渡金屬奈米材料的表面電漿共振在可見光沒有特徵的吸收波帶，所以一般在可見光區的激發雷射波長，並無法使其產生較大的電磁場增強效應。這個傳統觀念也在奈米材料的形狀不為均勻的球狀時，而有了變化。美國華盛頓大學化學系的 Xia Younan 教授在 2005 年對鈀 (palladium, Pd) 的奈米材料做了最好的詮釋⁽³¹⁾，他分別合成了三角形與六角形的鈀奈米材料，並發現其表面電漿共振的吸收波帶位置也會有所不同，甚至可以位移到約 800 nm 處，他也對這些不同形狀的鈀奈米材料做表面增強拉曼散射效應的探討，所選用的分子為 4-mercaptopyridine，激發雷射波長為 785 nm。他發現當表面電漿共振吸收波帶位置越接近激發雷射波長時，也會有越大的表面增強拉曼散射效應。用六角形的鈀奈米材料可提供最強的效應 (1.3×10^4)，效果較用不規則形狀的鈀奈米粒子聚集物好上許多 (190 倍)⁽³²⁾。

2. 金－碲複合材料之表面增強拉曼散射效應

筆者的實驗室目前則開發出金與其他材質的複合材料應用於表面增強拉曼散射光譜⁽³³⁾。先以液相成核法合成三角結晶碲 (tellurium) 奈米線，隨著合成時間增加，碲奈米線的長度變化可以從 251 nm 到 879 nm。隨著長度增加，其表面電漿共振的吸收譜帶也隨著增加，可以到達 650 nm。選用長度為 547 nm 的碲奈米線作為模版，加入四氫金酸鈉將金原子還原沉積在碲奈米線表面，控制不同的反應時間，可以分別得到啞鈴、豌豆與珍珠鍊等不同形狀的金－碲複合奈米材料，形狀如圖 6 所示。由穿透式電子顯微鏡的結果觀察到反應時間長短直接影響金還原在碲奈米線上的數目，金的比例以珍珠鍊形最多，啞鈴形最少。把 R6G 分子修飾在金－碲複合奈米材料去偵測其 SERS 訊號 (如圖 7)，發現啞鈴形的 SERS 增強係數最差，原因在於其金原子比例過少，且原子間的距離過長所致，但豌豆型 SERS 增強係數已可達到 2.2×10^6 。若與 13 nm

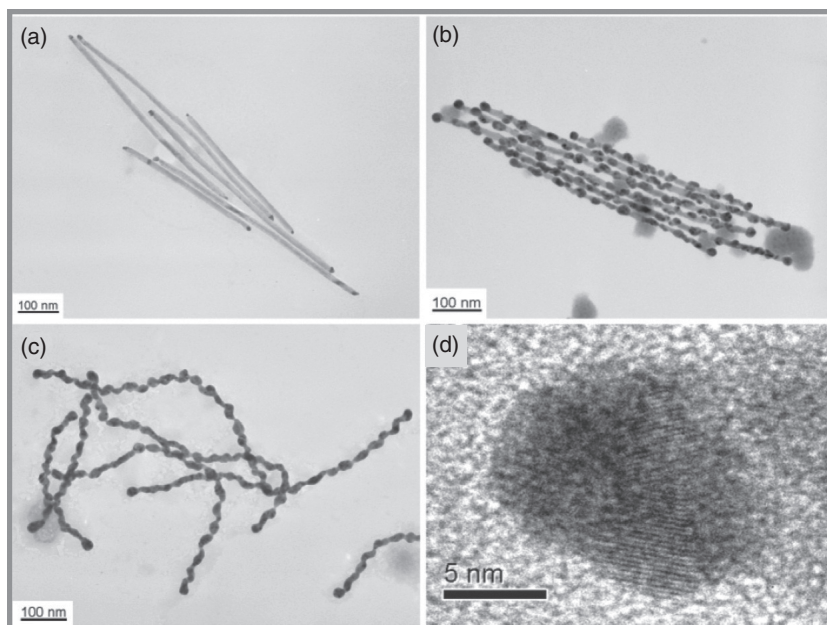


圖 6.

金-碲複合奈米材料之電子顯微鏡照片：(a) 哑鈴形狀、(b) 豌豆形狀、(c) 珍珠鍊形狀。(d) 為 (a) 之材料於高解析之電子顯微鏡底下之構形。

金奈米粒子聚集後所測得的 1.9×10^6 或是花狀的銀奈米粒子 (2.4×10^6) 相較，其增強係數已差不多相當。珍珠鍊形的增強係數則可達到 5.1×10^9 ，推測其原因是因為將金原子還原在碲奈米線上會形成密集且較粗糙的表面，因此其電磁場放大的效應更明顯，SERS 訊號相對加強。在此例子中，R6G 分子的偵測極限可因此達到 2.5 pM。

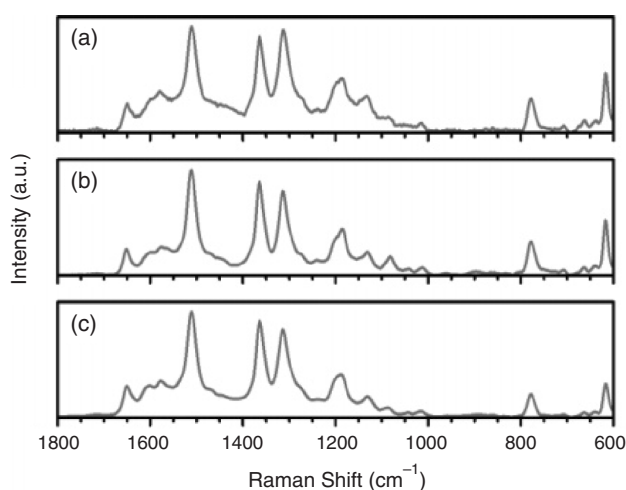


圖 7. 以 R6G 作為拉曼光譜分析物質，分別吸附於：(a) 金-碲哑鈴、(b) 豌豆、(c) 珍珠鍊構形之材料上，圖中 R6G 濃度分別為： 8.5×10^{-6} 、 9.5×10^{-10} 、 1.8×10^{-11} 。

四、結論

利用金屬奈米粒子本身與分析物間的化學作用力，或者藉由修飾具生物功能性分子與分析物產生親和力作用 (如酵素與受質) 來作為 SALDI-MS 的基質，不僅可以快速地於複雜的生物樣品中選擇出特定的分析物，透過奈米粒子的聚集沉澱，亦可達到濃縮的效果，未來在診斷癌症指標 (cancer markers) 及藥物研發上確實是具有很大的潛力。然而截至目前而言，SALDI-MS 應用在代謝質體學及蛋白質體學上仍有下列的問題需要克服。(1) 基質干擾：在質量小於 1000 Da 下，仍有許多來自鹽類和基質本身所形成之團簇干擾。(2) 偵測質量之上限：當選用奈米粒子作為基材時，最高可偵測到約 26 kDa 之蛋白質樣品，若利用微米尺度粒子，只能測到約為 12 kDa。(3) 靈敏度：利用 MALDI-MS 分析蛋白質樣品時，其偵測極限可達到 10^{-16} 莫耳等級，而一般以 SALDI-MS 分析時，大多只能達到 10^{-11} 莫耳。(4) 質量解析度 (mass resolution)：當分析物分子量越大時，因其脫附游離更加不易，質量解析度變差 (可能會有數百倍)。因此尋求具特異性及高能量轉移效率之奈米材料仍是重要課題。另外，為了讓 SALDI-MS 能真正應用於代謝質體學及蛋白質體學之研究，利用數種功能性相異之奈米

粒子，且同時使用不同發射波長雷射光源，亦是值得重視之研究方向。

在金屬奈米材料應用於 SERS 方面，經由電磁場增強效應的影響，導致表面增強拉曼散射效應的產生機制，似乎越來越確定，就是金屬材料的表面電漿共振所造成，且若激發雷射的波長越接近表面電漿共振吸收波帶，其所可以誘導的電場會越大，導致表面增強拉曼散射效應也會越大。經由這些經驗，未來應該可以更進一步開發新的材料 (如金銀複合奈米線) 來探討：是否有其他因素可以更增進表面增強拉曼散射效應。另外，我們亦將專注於製備具生物功能性之奈米材料，並以 SERS 來偵測生物分子。

參考文獻

1. M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, **26**, 163 (1974).
2. M. Karas, D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **57**, 2935 (1985).
3. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **78**, 53 (1987).
4. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
5. R. S. Brown and J. J. Lennon, *Anal. Chem.*, **67**, 1998 (1995).
6. M. L. Vestal, P. Juhasz, and S. A. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1044 (1995).
7. L. H. Cohen and A. I. Gusev, *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 571 (2002).
8. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
9. J. Sunner, E. Dratz, and Y.-C. Chen, *Anal. Chem.*, **67**, 4335 (1995).
10. J. A. McLean, K. A. Stumpo, and D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5304 (2005).
11. K. S. McCully, *Am. J. Pathol.*, **56**, 111 (1969).
12. C. J. Boushey, S. A. A. Beresford, G. S. Omenn, and A. G. Motulsky, *J. Am. Med. Assoc.*, **274**, 1049 (1995).
13. G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, *J. Nutr.*, **134**, 489 (2004).
14. S.-J. Chen and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **76**, 3727 (2004).
15. Y.-F. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **78**, 1485 (2006).
16. Y.-F. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **79**, 4852 (2007).
17. A. Szewczyk and S. Pikua, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 333 (1998).
18. C.-T. Chen and Y.-C. Chen, *Anal. Chem.*, **76**, 1453 (2004).
19. K.-H. Lee, C.-K. Chiang, Z.-H. Lin, and H.-T. Chang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2023 (2007).
20. A. Smekal, *Naturwissenschaften*, **11**, 873 (1923).
21. C. V. Raman and K. S. Krishnan, *Nature*, **122**, 169 (1928).
22. M. G. Albrecht and J. A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5215 (1977).
23. D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, **84**, 1 (1977).
24. Y. Y. Yu, S. S. Chang, C. L. Lee, and C. R. Wang, *J. Phys. Chem.*, **101**, 6661 (1997).
25. G. C. Schatz and R. P. Van Duyne, In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; Chalmers, J. M., Griffiths, P. R., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1, 759 (2002).
26. S. Nie and S. R. Emory, *Science*, **275**, 1102 (1997).
27. J. B. Jackson, S. L. Westcott, L. R. Hirsch, J. L. West, and N. J. Halas, *Appl. Phys. Lett.*, **82**, 257 (2003).
28. (a) J. B. Jackson and N. J. Halas, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 2743 (2001). (b) E. Prodan, P. Nordlander and N. J. Halas, *Nano Letters*, **3**, 1411 (2003).
29. J. B. Jackson and N. J. Halas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 17930 (2004).
30. Z.-Q. Tian, B. Ren, and D.-Y. Wu, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9463 (2002).
31. Y. Xiong, J. M. McLellan, J. Chen, Y. Yin, Z.-Y. Li, and Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 17118 (2005).
32. I. Srnová, B. Vlčková, and V. Baumruk, *J. Mol. Struct.*, **201**, 410 (1997).
33. Z.-H. Lin and H.-T. Chang, *Langmuir*, **24**, 365 (2008).

- 黃銘峰先生為國立台灣大學化學博士，現為國立台灣大學化學研究所博士後研究員。
- 李昆鴻先生現為國立台灣大學化學研究所博士班學生。
- 林宗宏先生現為國立台灣大學化學研究所博士班學生。
- 江政剛先生現為國立台灣大學化學研究所博士班學生。
- 張煥宗先生為美國愛荷華大學化學博士，現任國立台灣大學化學系教授暨國立台東大學理工學院院長。
- Ming-Feng Huang received his Ph.D. in chemistry from National Taiwan University. He is currently a postdoctoral fellow in the Department of Chemistry at National Taiwan University.
- Kun-Hong Lee is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Taiwan University.
- Zong-Hong Lin is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Taiwan University.
- Cheng-Kang Chiang is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Taiwan University.
- Huan-Tsung Chang received his Ph.D. in chemistry from Iowa State University, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Taiwan University and the dean of the College of Science and Engineering at National Taitung University.