

基質輔助雷射脫附游離質譜法

(MALDI-MS)

在刑事鑑識及反恐領域的應用

鄭思齊 / 國立中山大學化學系

摘要

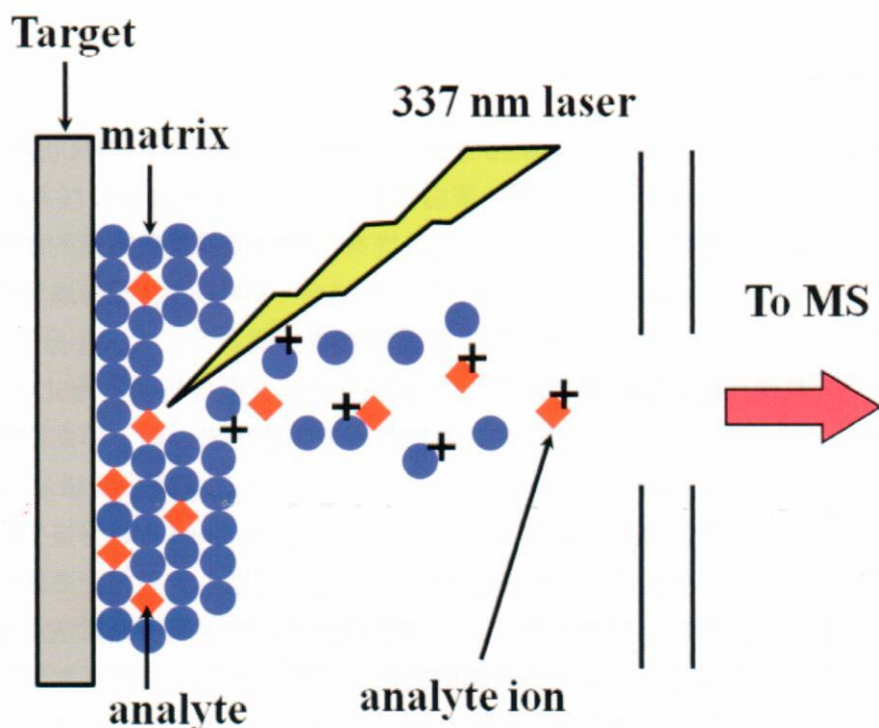
基質輔助雷射脫附游離法(matrix-assisted laser desorption ionization)是一種近代所開發出來的質譜游離技術，它可以游離藥物、代謝物及染劑等小分子化合物和胜肽、蛋白質等生化大分子，所需樣品量少、前處理非常簡單，分析速度快、操作方便、耐鹽度高，並且可進行自動化分析。本文將介紹基質輔助雷射脫附游離法的發展歷史、操作原理，以及在刑事鑑識與反恐領域的幾種應用，包括有(1)墨水的快速分析、(2)生化戰劑的檢測與傷患的診斷、及(3)不同來源之微量血跡偵測。

**關鍵字****基質輔助雷射脫附游離質譜法、
筆墨分析、生化戰劑檢測、
血液分析****一、前言**

基質輔助雷射脫附游離法(matrix-assisted laser desorption ionization、MALDI)是一種近代所發展出來的質譜游離技術¹²，它可以將胜肽、蛋白質及DNA等生化大分子及胺基酸、脂質、藥物、代謝物、染劑及聚合物等化合物離子化，使其成為帶正電荷或是負電荷的離子，藉著與飛行時間質譜儀(time-of-flight mass spectrometer、TOF)的結合，MALDI-TOF已被廣泛應用在生物醫學、蛋白質體學、有機材料、藥物分析及刑事鑑識等領域，偵測各式大、小分子。因為MALDI進行樣品分析時，其使用脈衝雷射轟擊表面，以脫附及游離表面分析物，因此MALDI屬於脫附游離法(desorption ionization、DI)的一種。在MALDI技術被開發出來以前，早期的脫附游離質譜技術常使用雷射脫附游離法(laser desorption ionization、LDI)，二次離子質譜法(secondary ion mass spectrometry、SIMS)及快速原子撞擊法(fast atom bombardment、FAB)等技術進行分析，雷射脫附游離法是使用脈衝雷射光轟擊固體樣品表面，樣品表面極小範圍內受高能量雷射轟擊，造成分析物從表面脫附並形成分析物離子，二次離子質譜法與快速原子撞擊法則分別使用加速的離子或是原子束撞擊樣品表面，進行分析物的脫附及游離；雖然，這三種脫附游離質譜法均可以應用在胺基酸、核苷酸、藥物及代謝物等小分子(分子量在2000 Da以下)的偵測，但是對於分子量達數萬Da以上的樣品(如蛋白質)，則只能偵測到分析物分子在高能量脫附過程中，因為碎裂而產生的碎片離子，並無法得到分子離子峰訊號。

直到1985年，任職於日本島津公司(Shimadzu Corporation)的工程師田中耕一(Koichi Tanaka)將直徑為300 Å的鈷金屬粉末與甘油混合作為基質(matrix)，基質與分析物混合均勻後，再以波長為337 nm的氮氣雷射轟擊樣品，結果成功地獲得分子量約34500 Da之蛋白質(carboxypeptidase A)分子離子訊號，因為本方法可以游離分子量達數十萬Da以上的蛋白質生化大分子，並減少碎片離子的產生，相對於LDI、SIMS、FAB等脫附游離法而言，本方法是一種較為軟性的游離源，因此田中將它稱之為soft laser desorption (SLD)¹。在田中發表SLD技術之後，德國科學家Hillenkamp進一步使用可以吸收UV雷射波長、且不具毒性的有機酸小分子取代無機金屬粉末作為基質，大量的有機酸與分析物溶液混合後(莫耳數比約為1000 : 1)，將混合溶液置於不鏽鋼樣

品盤上，待其乾燥形成有機酸與分析物之共結晶，再使用UV (337 nm)脈衝雷射轟擊共結晶表面，共結晶受雷射轟擊後，有機酸與分析物從固態脫附成為氣相分子，而大量的有機酸可以吸收雷射能量，避免分析物直接受雷射光照射而碎裂(decompose)形成碎片分子(fragment molecule)，有機酸並可提供質子(proton)給分析物，促進分析物離子的形成，Hillenkamp教授將這種使用有機酸作為基質的雷射脫附游離技術稱為基質輔助雷射脫附游離法(matrix-assisted laser desorption ionization、MALDI)²，圖一為使用MALDI進行分析物脫附及游離的示意圖。



圖一、以MALDI進行分析物脫附及游離之示意圖。

在MALDI技術被發表之後，相關研究團隊陸續使用了各種有機小分子[如sinapinic acid (SA)、2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5 DHB)、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)]及無機材料(如氧化鐵奈米粒子、金奈米粒子、奈米碳管及碳粉)作為基質以進行質譜分析，並衍生出其它游離技術，如表面輔助雷射脫附游離法(surface-assisted laser desorption ionization、SALDI)及矽晶片表面脫附游離法(desorption ionization on silicon、DIOS)³⁴。使用不同的基質進行MALDI分析之優點為:(1)降低來自樣品本身的基質干擾(matrix effect)，例如尿液樣品中的鹽類干擾；(2)減低MALDI基質本身的離子訊號強度；(3)選擇性提高特定分析物的離子訊號等。目前已知有上百種基質被應用在MALDI分析上。除了基質的選擇外，基質與分析物所形成的共結晶亦是影響分析物離子

訊號的原因之一，目前已知有氣體乾燥（air dry）、電噴灑沈澱（electrospray deposition）、真空乾燥（vacuum dry）、三明治（sandwich）以及固態樣品製備法（solid sample preparation）等各種形成共結晶的方法。

自從人類基因序列解碼之後，科學家將研究焦點轉向基因的產物-蛋白質，分析蛋白質的結構、活性及蛋白質彼此之間的作用力，以得知蛋白質表現對於生物體的影響，因為MALDI可游離分子量達數十萬Da以上的分析物、分析速度快(數秒)、操作過程簡單，所需要的樣品量少(小於0.1 μ L)，偵測靈敏度佳(fmol: 10^{15} ~amol: 10^{18})，本技術得以應用在蛋白質的偵測及其胺基酸序列分析，這促使了蛋白質體學(proteomics)的興起及快速發展，Tanaka本人也因為MALDI技術的開發而與John Fenn (electrospray ionization發明人)一同榮獲2002年諾貝爾化學獎。

除了MALDI游離技術的發展之外，在質量分析器及操作軟體方面亦有所進展，如TOF質量分析器有delayed extraction及反射模式(reflector mode)等相關技術的開發，這大大地提昇了TOF質譜儀的離子訊號解析度；質譜影像系統(imaging system)的發展使得MALDI-TOF可掃描固體表面，並獲得特定分析物在表面的分佈狀況⁵，例如偵測癌化組織中所含的各式脂質(phosphatidylcholine: PC, phosphatidylethanolamine: PE, phosphatidylserine: PS, 及sphingomyelin: SM)、海綿生物中的生物鹼(alkaloids)、小鼠腎臟及大腦組織中的三聚氰胺(melamine)及藥物等分析物在組織中的分佈情形，此分子影像有助於生物醫學、生物學、藥物學的研究及疾病的診斷與治療。

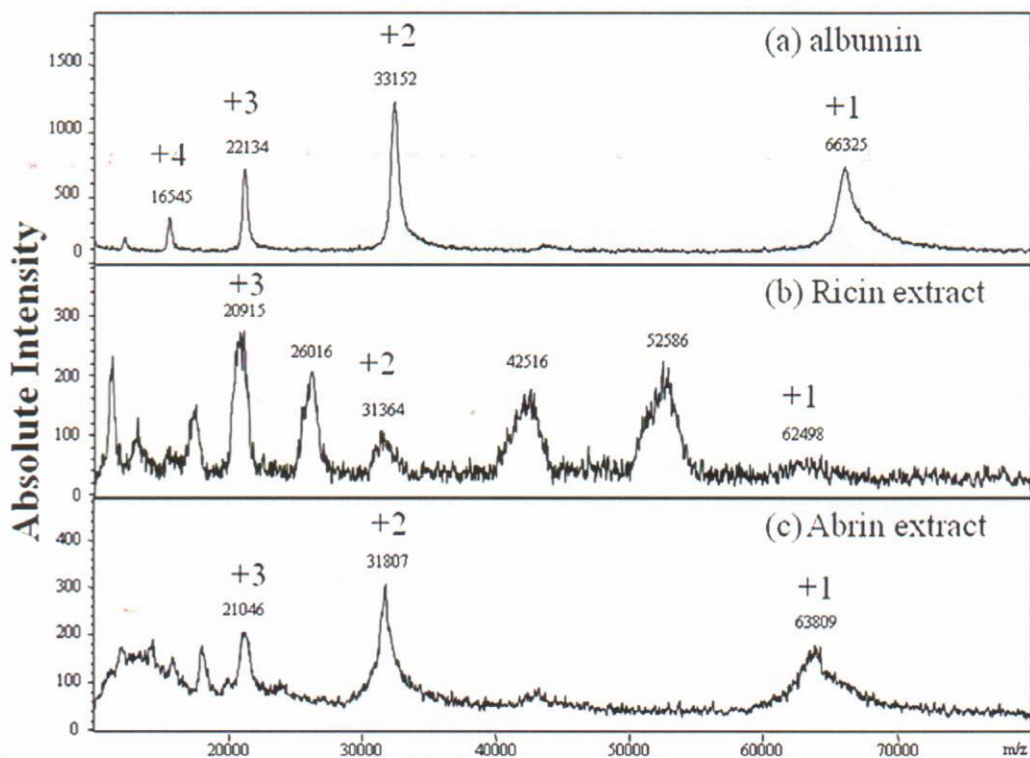
二、基質輔助雷射脫附游離質譜法 在刑事鑑識及反恐領域的應用

因為MALDI-TOF質譜分析法具有偵測極限低、所需要的樣品量少、樣品前處理非常簡單、分析速度快、質量範圍廣、且無樣品殘留問題等優點，本技術可應用在刑事鑑識及反恐領域，偵測存在於不明粉末、液體、斑跡及血跡中之藥物、代謝物、染劑、生化戰劑或是蛋白質等分析物。

(一) 分析筆跡墨水中的染劑小分子

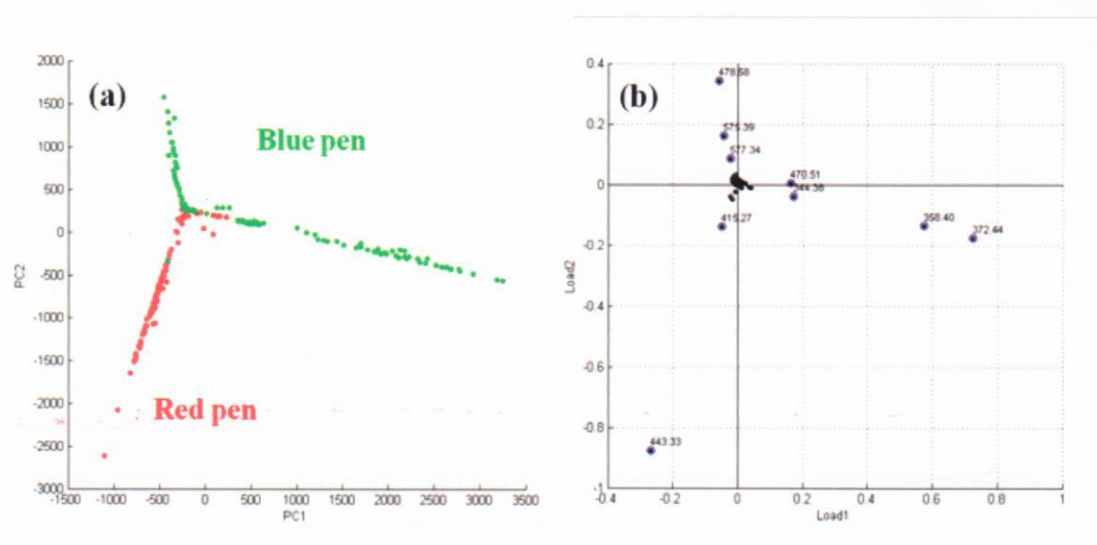
分析字跡墨水之化學組成為文書鑑定的項目之一，在一般的分析流程中，常使用有機溶劑萃取紙張表面的墨水，再以薄層層析法(thin layer chromatography、TLC)、氣相層析法(gas chromatography、GC)及液相層析法(liquid chromatography、LC)等分離法將墨水中所含各式化學組成分離，最後進行UV-Visible、螢光偵測或是質譜分析。因為MALDI-MS具有快速分析、樣品不需進行分離即可直接偵測的優點，所以近年來有許多的研究人員利用MALDI-MS來分析墨水中的化學組成⁶。本文以MALDI-TOF直接分析Pentel原子筆、SKB油性筆及SANDER中性筆等三種藍色筆樣之墨水，首先使用50%甲醇溶液將墨水溶解，再與2,5-DHB基質溶液混合進行MALDI分析，因

為染劑分子的分子量大多是在1000 Da以下，所以TOF質量分析器設定在反射式模式(reflectron)進行離子偵測，以獲得較高分解度的質譜圖。圖二為MALDI-TOF質譜圖，在Pentel藍色原子筆墨水中偵測到結晶紫(crystal violet、 m/z 372)的離子訊號(圖二a)， m/z 358及344離子訊號為結晶紫分子經過降解反應(degradation)後所形成的產物($M-CH_2$ 、 $M-C_2H_4$)；圖二b為SKB藍色油性筆墨水之質譜圖，可測得basic blue 7 (m/z 478)及其降解產物(m/z 450、 $M-C_2H_4$)的離子訊號。相關研究指出，筆跡中的染劑分子受文件外在環境的影響，會進行降解反應並形成降解產物，分析筆跡墨水中所含染劑分子及其降解產物的訊號強度關係，將有助於瞭解字跡與書寫時間的關係⁷，這可用於區分同一紙張上的新、舊筆劃，及鑑別文件是否曾遭塗改或變造，然而在本實驗中，分析新鮮筆墨結果仍可偵測到染劑分子降解產物的離子訊號(圖二a及b)，顯示筆蕊墨水中早已存在有染劑降解產物，因此回推筆跡書寫時間時，應再分析原筆樣墨水，以避免誤判時間。以MALDI-TOF分析SANDER藍色中性筆墨水結果(圖二c)，主要離子峰為來自聚合物的訊號($M = 437 + 44n$ 、 $n = 0\sim 11$)，因為聚合物訊號峰之間的質量差(Δm)為44 Da，研判該聚合物為聚乙二醇[poly(ethylene glycol)、PEG]。上述墨水樣品經MALDI之後，樣品盤上之共結晶可使用有機溶劑清洗，以去除殘留的分析物，因此MALDI質譜法可以有效地避免樣品殘留問題。



圖二、以MALDI-TOF分析(a) Pentel BK 65D-C藍色原子筆、(b) SKB CD-18藍色油性筆，及(c) SANDER GP-2000藍色中性筆墨水所得之質譜圖。

墨水樣品經MALDI-TOF分析後，該質譜圖可進一步使用主成份分析(principal component analysis、PCA)軟體處理，以進行分群。圖三為395支不同來源的紅筆(200支)及藍筆(195支)墨水經MALDI偵測及PCA軟體處理後的結果，Score plot圖譜顯示紅色(以紅點表示)及藍色(以綠點表示)墨水之分佈維度並不相同(圖三a)，此外，藍色墨水可再區分為兩個不同的子族群，而Loadings plot圖譜顯示羅丹明分子(Rhodamine、m/z 433)為紅色墨水中最常使用的染劑成分(圖三b)，結晶紫(m/z 372)及basic blue 7 (m/z 478)則使用於藍色墨水中；本結果顯示：監測墨水質譜訊號中的羅丹明、結晶紫及basic blue 7離子峰可快速區分紅色及藍色墨水。MALDI-TOF質譜法與PCA軟體結合的分析策略，除了可用來區分含有不同染劑成份的墨水樣品，未來可進一步應用在不同極性(水性、中性及油性筆)之墨水，及不同書寫時間之字跡分析上。



圖三、395支不同來源的紅、藍色筆樣墨水，經MALDI-TOF分析及PCA統計軟體分析所得之(a) Score plot、及(b) Loadings plot圖譜。

(二) 分析生化戰劑及傷患診斷

生化武器是一種使用細菌、真菌、病毒或毒性化學物質所製作而成的武器，依照原料區分，生化武器可細分為以病毒、真菌、細菌及毒素(蛋白質)等生化大分子所製作而成的生物戰劑(biological warfare agent)，及以小分子毒性化學物質所製作的化學戰劑(chemical warfare agent)兩種。常見的生物戰劑包括有炭疽桿菌、黃熱病毒及肉毒桿菌毒素等，化學戰劑則有沙林(Sarin)、芥子毒氣、催淚瓦斯及光氣等等；與核武比較，因為生化武器的製造成本較低，同時具有極廣的殺傷範圍，所以成為恐怖攻擊的手段之一，例如1995年日本東京地下鐵遭釋放沙林毒氣，結果造成了13人死亡及6000餘人受傷；2001年9月11日美國紐約發生民航機撞擊世貿大樓的恐怖攻擊事件，恐怖份子並將封存炭疽桿菌的信件寄送到美國各政府單位，展開另一波的



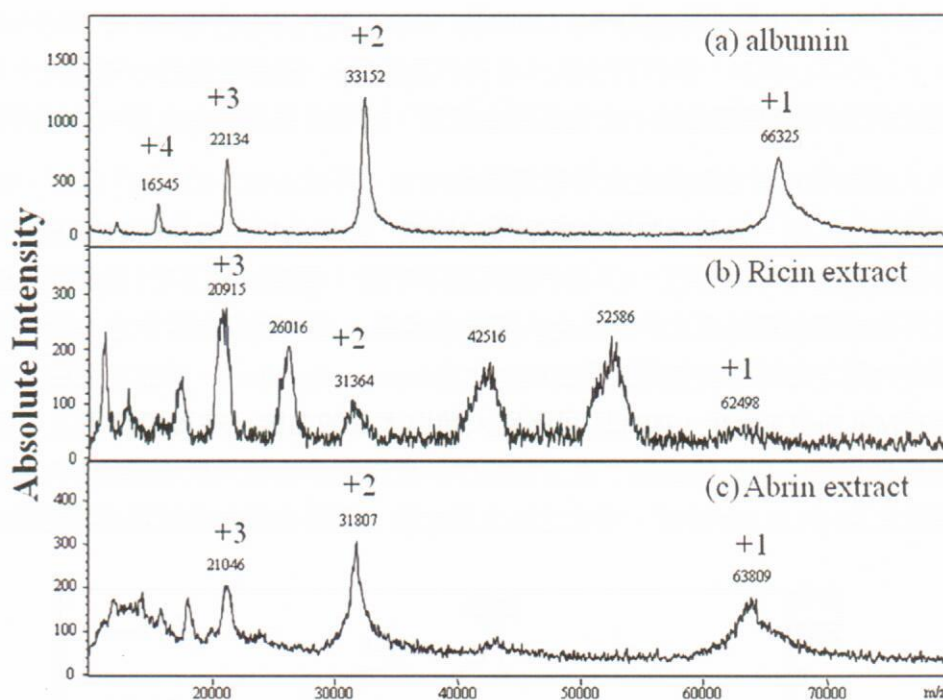
生化攻擊，結果造成數人死亡；2013年5月，美國總統歐巴馬及紐約市長彭博紛紛接獲含有不明粉末的郵件，經檢測結果該粉末為蓖麻毒素；2013年8月則有發生在敘利亞的沙林毒氣攻擊事件，造成上千人傷亡。由上述事件可知，生化武器攻擊容易造成人員大量傷亡，若能快速偵測及確認生化戰劑，便可將傷害減至最低。

傳統的生化戰劑偵測方法包括有DNA序列分析、免疫分析法等生化分析方法，以及針對小分子化學戰劑GC/MS、LC/MS層析質譜法。因為MALDI-TOF具有分析大分子化合物的能力，可快速鑑定病毒及細菌種類，因此亦可以應用在生物武器中病毒、細菌及毒素的偵測。本文使用MALDI-TOF偵測蓖麻及雞母珠毒素作為偵測大分子生物戰劑的範例，蓖麻毒素(ricin)是一種植物性蛋白質，存在於一種名為蓖

麻 (*Ricinus communis*) 的植物之中，該毒素由ricin a chain及ricin b chain兩個分子量約30 kDa的蛋白質所構成，a chain與b chain之間以雙硫鍵鍵結，構成總分子量約60kDa的蓖麻毒素，因為蓖麻毒素會抑制蛋白質的合成，所以可造成生物體的傷害及死亡，此外，存在於雞母珠植物中的雞母珠毒素(abrin)其蛋白質結構與蓖麻毒素相似，同樣可造成中毒死亡。

人類血清白蛋白(albumin)、蓖麻及雞母珠毒素等三種蛋白質分析物之分子量均在60 kDa以上，因此無法使用GC/MS進行分析，以LC/MS偵測人類血清白蛋白則有：(1)層析峰形易變寬拖尾，(2)層析管柱容易阻塞等缺點，免疫分析法雖然具有專一性，但單一試劑無法偵測多種蛋白質分析物，MALDI-TOF可同時偵測多種蛋白質，樣品耐鹽度高，且無GC及LC的缺點。圖四為人類血清白蛋白標準品、蓖麻種子及雞母珠種子萃取溶液之MALDI-TOF質譜圖，人類血清白蛋白標準品質譜圖中可得到分子離子峰(正一價、 m/z 66325)、及多價電荷(正二至四價)的離子訊號(圖四a)，在質譜圖中並未發現碎片離子的訊號；在蓖麻種子萃取溶液中則是偵測到以正一價離子(m/z 20915)為主要訊號峰的蓖麻毒素，及 m/z 52586、42516及26016等其它蛋白質的訊號(圖四b)，雞母珠種子萃取液中可得到雞母珠毒素正一價(m/z 63809)至正三價的離子訊號(圖四c)。

生化毒素樣品除了可使用MALDI-TOF直接分析以獲得分子量的資訊外，更可進一步進行蛋白質消化反應(enzyme digestion、acid digestion)，將蛋白質毒素水解成胜肽(peptide)片段後再進行MALDI-TOF分析，藉由胜肽指紋比對法(peptide mass fingerprinting)、及胜肽胺基酸序列分析(amino acid sequence)，可鑑定各式蛋白質(protein identification)，確認郵件中的不明粉末為何種毒素(如蓖麻毒素、肉毒桿菌毒素或蛇毒)。蛋白質消化反應結合MALDI-TOF偵測的分析策略，亦可應用在細菌、真菌及病毒等樣品的檢測上，快速分析炭疽桿菌粉末、天花及SARS病毒等生物武器。



圖四、以MALDI-TOF直接分析 (a)人類血清白蛋白標準品、(b)蓖麻種子萃取溶液、及(c)雞母珠種子萃取溶液所得質譜圖。

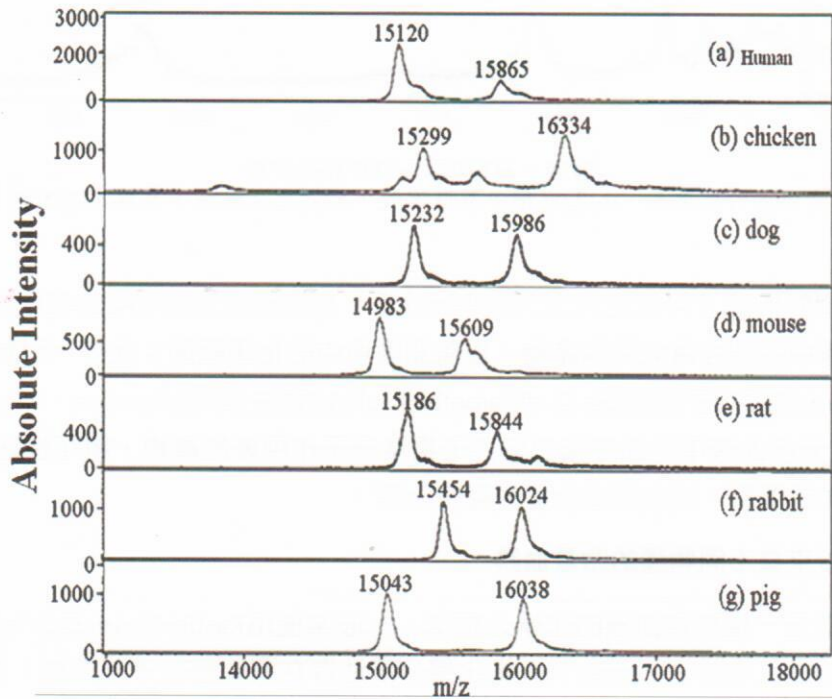
小分子化學戰劑除了可以使用GC/MS進行分析，相關研究曾以MALDI-TOF分析湖水、河水及地下水等水樣中的神經毒氣降解產物，以監測環境中的化學戰劑；此外，因為人體中的血紅蛋白(hemoglobin)會與芥子毒氣[bis-(2- chloroethyl) sulfide]產生作用(alkylation、HD cross-linking)，使用MALDI-TOF分析血液中的血紅蛋白與芥子毒氣分子作用後的產物，將可快速且有效診斷遭受化學戰劑傷害的傷患，這有助於後續的醫院治療⁸。

(三) 分析來自不同物種的微量血跡

呈色試驗法是一種檢測血液的化學分析法，一般常使用Kastle-Meyer及O-Tolidine等呈色試劑偵測血液中的血紅素分子(heme)，但是化學分析法存在有偽陽性干擾問題；使用MALDI-TOF分析血液樣品，可偵測血液中血紅素小分子(m/z 616)及蛋白質大分子之離子訊號，並進行MS/MS鑑定，因此可以避免偽陽性干擾；此外，不同物種的DNA序列並不相同，所以蛋白質(如血紅蛋白)之分子量及胺基酸序列亦有差異，因此MALDI-TOF可鑑定不明斑跡是否為血液，確定血源來自何種動物，且具有極佳的偵測極限。圖五為以MALDI-TOF分析來自人類、雞、狗、小鼠、大鼠、兔子及豬等7種不同來源全血之質譜圖，結果均可得到血液中的血紅蛋白 α chain及 β chain的分子離子峰訊號，不同物種的血紅蛋白分子質譜訊號並不相同，例如人類血紅蛋白的離子訊號為m/z 15120 (α chain)及15865 (β chain)，雞的訊號為m/z 15299及16334，狗的訊號

為 m/z 15232及15986，小鼠的訊號為 m/z 14983及15609，大鼠的訊號為 m/z 15186及15844，兔子的訊號為 m/z 15454及16024，豬的訊號為 m/z 15043及16038。即使全血經水稀釋達十萬(10^6)倍，MALDI-TOF依然可以測得稀釋血液中的血紅蛋白訊號，這將有助於潛在血跡的偵測與發現。

我們將人類血液和其它動物之血液等量混合均勻，再以MALDI-TOF進行分析，結果可以偵測到混合血液中之人類、及其它動物之血紅蛋白訊號，除了人類與大鼠的血紅蛋白訊號不易區分外，其餘混合血液均可以MALDI-TOF分析以區別不來源⁹；因為MALDI-TOF可鑑別來自不同動物的血液，它可分析疑似遭外來血跡污染之人類血液樣品，如漁船喋血案件之人類與魚類混合血液。而人類與大鼠之血跡可以使用胰蛋白酶消化法(trypsin digestion)，將血紅蛋白水解成胜肽分子後，再進行MALDI-TOF分析，如此即可區別人類與大鼠的血跡。在實際應用上，筆者曾經在竊盜案現場採獲呈滴落型態的血點，該血跡經DNA實驗室分析結果無法獲得STR型別，最後藉由蛋白質消化法及MALDI-TOF分析，才確定為老鼠血液，因此排除血跡與竊盜案的關係。



圖五、以MALDI-TOF分析
(a) 人類、(b) 雞、(c) 狗、(d) 小鼠、(e) 大鼠、(f) 兔子、及(g) 豬之全血所得質譜圖。

三、結論

MALDI是一種軟性的質譜游離源，可游離具半揮發性及不具揮發性的分析物，同時避免該分析物的碎裂，藉著與飛行時間質譜儀的結合，MALDI-TOF具有極廣的質量偵測範圍，不論

是分子量在100 Da左右的胺基酸小分子，或是質量達數十萬Da以上的蛋白質分子，均可以使用MALDI-TOF進行偵測，分析物可以是脂質(lipid)、胜肽、蛋白質等生化分子，毒品、藥物及其代謝物、火藥、生化戰劑、墨水染劑及聚合物材料，應用層面相當廣泛。

本文列舉了MALDI-TOF質譜分析法在刑事鑑識領域的三種應用，包括有(1)墨水的快速分析，(2)生化戰劑的檢測及傷患診斷，(3)微量血跡分析。除此之外，MALDI-TOF在生物檢體及有機材料的分析上仍有許多發揮的空間，例如分析指甲、毛髮樣品中之蛋白質成份，可鑑定其為何種生物所遺留，分析膠帶樣品所使用的橡膠及添加劑成份，及不明粉末的快速分析。FACT

參考文獻

1. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. and Matsuo, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151–153.
2. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1193A–1203A.
3. Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y.-C. *Anal. Chem.* 1995, 67, 4335–4342.
4. Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* 1999, 399, 243–246.
5. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nature Medicine* 2001, 7, 493–496.
6. Soltzberg, L. J.; Hagar, A.; Kridaratikorn, S.; Mattson, A.; Newman R. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 2001–2006.
7. Weyermann, C.; Kirsch, D.; Costa-Vera, C.; Spengler, B. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 297–306.
8. Price, E. O.; Smith, J. R.; Clark, C. R.; Schlager, J. J.; Shih, M. L. *J. Appl. Toxicol.* 2000, 20, S193–S197.
9. 吳偵憶 “以基質輔助雷射脫附游離法進行大便潛血及殘餘血跡的快速鑑定” 國立中山大學化學研究所碩士論文, 2006.