

國立臺灣大學醫學院法醫學研究所



碩士論文

Department of Graduate Institute of Forensic Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

使用極致高效液相層析串聯質譜儀與化學同位素標記法檢測

已知與未知的血紅蛋白加成物

Targeted and untargeted analysis of hemoglobin adducts using  
ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem  
mass spectrometry and chemical isotope labeling

朱柏穎

Bo-Ying Chu

指導教授：翁德怡 博士，陳冠元 博士

Advisor: Te-I Weng, MD. Ph.D., Guan-Yuan Chen, Ph.D.

中華民國一百一十二年六月

June 2023

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書



MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE  
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

使用極致高效液相層析串聯質譜儀與化學同位素標記法檢測

已知與未知的血紅蛋白加成物

Targeted and untargeted analysis of hemoglobin adducts using  
ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem  
mass spectrometry and chemical isotope labeling

本論文係朱柏穎君 (R07452003) 在國立臺灣大學法醫學研究所完成之  
碩士學位論文，於民國一一二年六月二十七日承下列考試委員審查通  
過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of forensic medicine on 27<sup>th</sup>, June 2023  
have examined a Master's thesis entitled above presented by Bo-Ying Chu (R07452003) candidate  
and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

翁德怡

(指導教授 Advisor)

許曉偉

陳冠廷

系主任/所長 Director:

翁德怡

## 誌謝



感謝翁德怡教授、陳冠元教授在這五年來的栽培，手把手的儀器教學、文獻閱讀，以及法醫毒物學的重要觀念，都是收藏在我腦海中的寶物。雖然我是藥學系畢業，可當年滿懷熱忱進入法醫所，才發現自己的毒藥物學問還很有限，甚至可以說是貧乏。直到重新進入實驗室後，才又一步步導正自己的觀念。因此亦很感激實驗室的學長姐們：儒佑、宜芳、依庭、易潔，還有玫陵、李大哥、家緯、育樑、映慈、志遠等人的鼓勵與協助。我會記得假日跟半夜都坐在 TOF 前苦思的時光。

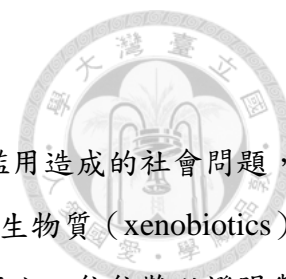
我自國中以來，便受嚴重強迫症所擾，所以在做實驗這件事上，自然也辛苦些，例如，我會一直去想剛剛那個樣品有沒有加到，接著可能開始懷疑自己，就整個翻桌重來。因此，學到最初步的一點是，研究者應如何檢驗自己的研究方法，並檢討在過程中發生的不順利，也就是陳教授所說的 trouble-shooting，重要度高過於無懈可擊的實驗數據。這兩年來不斷訓練我的，其實是耐心跟適應在忙碌課業下，事情永遠做不完的感覺，這也是身為一個大學生還無法體會的。

我在大學時並未對研究有相當興趣，但很奇妙的是，做研究後卻漸漸投入其中，並且對新學的東西開始有懷疑，更會去設想我們以前認為理所當然的觀念，到底是怎麼被驗證的？這才發現原來我這幾年來，只是在背書而已。此外，研究另一個迷人的地方，乃不在於成果跟理想一樣的成就感（也或許只是我沒機會體驗），而是克服困難的感覺，還有途中出現的新發現、小火花，雖然要用很多的時間成本去換，但這經驗也許是此生獨一無二了。

因此，我會繼續精進法醫毒物學。希望之後在工作之餘，可以再回來實驗室學習、研究討論，還有做出更完整的結論。一方面是覺得匆忙停在這裡實為可惜，另一方面是我實在捨不得學習跟進步的感覺。人生就像研究，也許花大部分時間在摸索、修改，就為了找尋有意義的事物。希望自己能成為臺灣第一位傳授法醫毒物學的法醫師。

最後必須謝謝我的家人，能夠進入法醫所就讀，並非我有過人的智商或學習能力，只是因為從小我便有可以專心學習的背景環境，今天走到半山後回顧這片風景，才明白在背後無回報支持我、包容我壞脾氣的家人，才是最偉大的。

## 摘要



談到法醫毒物學，一般大眾首先想到毒殺、中毒、酒精與毒品濫用造成的社會問題，但不可忽視的還有「環境汙染與公害」。隨經濟與科技發展，稱作異性生物質 (xenobiotics) 的環境毒物，亦無聲無息地影響人類健康，而慢性影響導致的病害與死亡，往往難以證明與鑑定，成為法醫毒物學的一大挑戰。

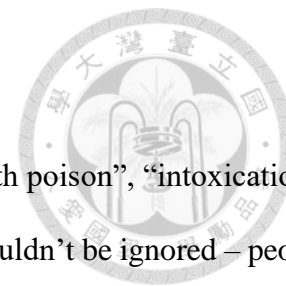
其中由生活上單純飲食攝入之異型性生物質，更可說是無人能倖免。這些分子改變了人體組織結構，也可能因此造成病變。好比存在高溫烹調澱粉食物中的丙烯醯胺 (acrylamide)，惡名昭彰，乃因丙烯醯胺為一  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl 化合物，可和血紅蛋白形成加成物 (acrylamide adduct)。又血紅蛋白有容易取得、半衰期長的特性，使 acrylamide adduct 在過往文獻中，已引起許多討論，亦被當作丙烯醯胺暴露指標 (biomarker)。然而，加成物與疾病的關聯仍尚未明朗，學者們也正試圖發現除丙烯醯胺外，更多未知的血紅蛋白加成物。

因此，本研究一方面透過現今準確度最高之液相層析儀—極致高效液相層析 (UPLC) 串聯質譜儀，在萃取最佳化後，測試臨床不孕症病患 (N=29) 血中 acrylamide adduct 濃度，一方面使用 UPLC 串聯高解析度質譜儀，搭配化學同位素標記法 (chemical isotope labeling) 與統計，找出一般血中可能含有的未標定加成物，及比較受汙染之血液可能出現的加成物。結果為臨床檢體有 4 位測得 acrylamide adduct，濃度由 41.17pmol/g Hb 至 117.58pmol/g Hb；而未標定加成物方面，篩出 79 至 105 對可能為加成物 (或其碎片) 之分子，然受汙染血液和空白血液並未有加成物上之明顯差異。若須明確鑑定出是何種分子形成加成物，則需進一步分析，例如使用串聯質譜儀 (MSMS) 方法產生離子碎片。

研究應用則期待，未來能以成熟 UPLC-MS 方法檢驗 acrylamide adduct，及其他已知結構之血紅蛋白加成物；也能以 CIL-UPLC-HRMS 方法，初步篩出不同族群血液中，所存在未知結構之血紅蛋白加成物。俾利法醫毒物學家對環境汙染物之健康影響，獲得更深入的了解，以及可靠的鑑定依據。

關鍵字：環境汙染物、丙烯醯胺、血紅蛋白加成物、化學同位素標記法、極致高效液相層析、高解析質譜儀

## Abstract



When it came to forensic toxicology, most of us brought “murder with poison”, “intoxication”, and “drugs and alcohol abuse” into mind. However, one more thing that couldn’t be ignored – people were always affected by environmental pollutants. With the development of science and technology, many poisonous substances called xenobiotics also came up. Unconsciously, these toxins affected our health, even causing irreversible disease as well as death. Although very challenging, forensic toxicology took the responsibility of identifying the controversial xenobiotics and their disadvantages to health.

Xenobiotics from foods would be an issue. These small molecules somehow changed tissue structure in human bodies. The most notorious one, acrylamide, an  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl compound common in carbohydrate-rich foods cooked at high temperatures ( $>120^{\circ}\text{C}$ ), would form covalent adducts with hemoglobin (known as “acrylamide adduct”). Owing to the accessibility and long lifetime of the red blood cells, acrylamide adducts had been discussed in much literature and regarded as a biomarker of acrylamide exposure. Even though the relationship between adduct level and human disease was still not fully understood, many scientists were dedicated to exploring unknown-structured (in other words, untargeted) hemoglobin adducts simultaneously.

In our study, intending to study acrylamide adduct levels in infertility patients from NTUH, we applied Edman degradation and UPLC-MS system as analytical procedures. Different from traditional LC-MS, UPLC-MS was invented with higher sensitivity and accuracy. Furthermore, for detecting untargeted hemoglobin (Hb) adducts, we designed a chemical isotope labeling (CIL) method together with UPLC-HRMS (Q-TOF) analysis; meanwhile, we compared the background Hb adducts in polluted blood samples to those in unpolluted blood samples.

Results showed acrylamide adduct was detected in 4 of 29 infertility patients, with levels ranging from 41.17 pmol/g Hb to 117.58 pmol/g Hb; concerning untargeted adducts analysis, 79 to 105

possible adducts (fragments) were screened out. However, there was no obvious background adduct difference between polluted samples and unpolluted samples. Besides, MSMS mode was suggested for adduct fragmentation to identify real Hb adducts.

In conclusion, our idea emphasized the future work of detecting acrylamide adducts or other targeted adducts via the UPLC-MS approach; on the other hand, with an application of CIL-UPLC-HRMS, scientists could rapidly screen out untargeted Hb adducts in specific groups like smokers. Working with that reliable evidence, forensic toxicologists could come to conclusions without prejudice.

**Keywords:** Environmental pollutants, acrylamide, Hb adduct, CIL, UPLC, HRMS

# 目錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
第一章 緒論.....	1
1.1. 前言：環境毒物與人類健康.....	1
1.2. 血紅蛋白加成物與埃德曼反應.....	2
1.3. 傳統分析方法.....	2
1.4. 分析方法面臨的挑戰.....	3
1.5. 同位素化學標記法－未標定之血紅蛋白加成物.....	3
1.6. 研究目標.....	4
第二章 研究方法.....	6
2.1. 化學品與試劑.....	6
2.1.1. 化學品.....	6
2.1.2. 溶劑.....	6
2.1.3. 儀器.....	6
2.2. 合成標準品衍生物.....	6
2.2.1. 合成 AA-[ <sup>5</sup> <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N]VAL-PTH 與內標準品 AA-[ <sup>5</sup> <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N]VAL- d <sub>5</sub> -PTH.....	6
2.2.2. 質譜儀分析.....	7
2.2.3. 試管內合成陽性對照品.....	7
2.3. 血漿樣品.....	7
2.3.1. 樣品來源.....	7
2.3.2. 血紅蛋白定量.....	8



2.3.3. 血紅蛋白之萃取.....	8
2.4. 埃德曼降解反應.....	9
2.5. 儀器分析.....	9
2.6. 標定分析 acrylamide adducts.....	10
2.6.1. 資料處理.....	10
2.6.2. 方法確效：線性範圍.....	10
2.6.3. 方法確效：再現性.....	10
2.7. 非標定分析 all adducts.....	11
2.7.1. 資料處理.....	11
第三章 實驗結果與討論.....	12
3.1. Acrylamide adduct 分析方法開發.....	12
3.1.1. 化學同位素標記法（CIL）與合成標準品結果.....	12
3.1.2. 前處理最佳化.....	12
3.1.3. 方法確效.....	13
3.2. 臨床應用－泌尿部病人實驗結果.....	14
3.3. 非標定分析.....	15
3.3.1. 方法建立過程.....	15
3.3.2. 非標定加成物分析結果.....	16
3.3.3. 加成物反應機制.....	17
3.4. 實驗限制.....	17
第四章 結論與展望.....	19
4.1. 結論.....	19
4.2. 展望.....	19
參考文獻.....	47



## 圖目錄



圖一、非標定分析原理表示 .....	20
圖二、AA-VAL-PTH 裂解模式 .....	20
圖三、UPLC (in UPLC-QqQ-MS) 之移動相濃度梯度 .....	21
圖四、UPLC (in UPLC-Q-TOF-MS) 之移動相濃度梯度 .....	21
圖五、DDA 模式下，MS/MS 之撞擊電壓梯度圖 .....	22
圖六、LabelPick 系統語言 .....	23
圖七、非標定分析總流程圖簡示 .....	24
圖八、替代標準品、內標準品與 <i>in vitro</i> 合成之陽性對照品訊號圖 ...	25
圖九、基質 pre-spike 內標準品質譜圖 .....	26
圖十、基質 post-spike 內標準品質譜圖 .....	26
圖十一、純內標準品以 25% 甲醇稀釋 .....	26
圖十二、由 MTBE 萃取出之 AA-VAL-PTH 訊號圖 .....	27
圖十三、Phenyl-D5 isothiocyanate 衍伸之 phenylthiohydantoin derivatives (AA-VAL-d5-PTH) .....	27
圖十四、萃取乳化現象 .....	27
圖十五、內標準品萃取率比較 .....	28
圖十六、acrylamide adduct 之檢量線 .....	28
圖十七、臨床檢體 acrylamide adduct 濃度 .....	29
圖十八、Positive 對照 negative 結果 .....	30
圖十九、診斷碎片示意圖 .....	31
圖二十、Untargeted analysis 之 peak pair 分布圖(1) .....	32
圖二十一、Untargeted analysis 之 peak pair 分布圖(2) .....	33
圖二十二、無基質時之沖洗背景 .....	34
圖二十三、四組檢體 peak pair 平均數量圖 .....	34

圖二十四、四組檢體 peak pair m/z 分布 .....	35
圖二十五、四組檢體比較之火山圖 .....	36
圖二十六、四組檢體 PCA 與 PLS-DA 圖 .....	37
圖二十七、四組檢體之質譜分析熱圖 .....	38
圖二十八、陽性對照組 306/311 peak pair .....	39
圖二十九、陽性對照組 289/294 peak pair .....	40
圖三十、M/M+10 peak pair .....	41
圖三十一、血紅蛋白加成物反應機構圖 .....	42



## 表目錄



表一、Volatiles organic calibration mix 組成 .....	43
表二、標準品與內標準品離子碎片表 .....	44
表三、臨床檢體之血紅蛋白定量濃度 .....	44
表四、再現性試驗結果 .....	45
表五、四組檢體所產生之 peak pair 數 .....	45
表六、實驗結果與 Carlsson, H. 等人之研究發現之血紅蛋白加成物比較 .....	46

# 第一章 緒論

## 1.1. 前言：環境毒物與人類健康 (*Environmental xenobiotics and human health*)

法醫毒物學 (forensic toxicology) 乃涉獵廣泛的學問，舉凡急性中毒死亡、毒物鑑定、酒精中毒與犯罪、藥物濫用等，都是其中熱門的研究話題。然而，容易被忽視的領域是，環境污染物引起的公害。環境污染物除了漸進殘害大眾健康外，亦有可能造成突發性的群體中毒與死亡案件，甚至對族群後代造成重大傷害。不難想像，科技與經濟迅速發展的同時，大眾容易接觸許多環境污染物。如植物中生物鹼、藥物、農藥、食品添加劑、工業排放化學廢棄物等，這些在生物體內發現的非自然產生物質，即被稱作異型生物質 (xenobiotics) [1]。據過往研究表示，人類在一生中可能會接觸多達 100 萬至 300 萬種異型生物質[2]，經長久暴露下，這些物質可對人體生理、代謝產生各種影響。

歷史上不乏訴諸法律的案例，如台灣 1990 年間爆發的 RCA 案[3]，便懷疑員工暴露在含有機廢料的水源後，陸續出現癌變致死亡的情況；以及 2008 年三鹿毒奶粉事件[4]，不肖業者摻入三聚氰胺與三聚氰酸於奶粉中販賣，導致數以萬計嬰兒食用後產生腎結石等泌尿道症狀等。諸如上述，在糾紛中鑑定污染物與病害的因果關係，亦是法醫毒物學責任所在。

至於異型生物質在人體產生何種機轉，造成組織變性，甚至死亡，學者們仍深入探索中。一般認為，累積在組織或器官內的異形生物質，會和細胞中分子形成共價鍵結，即所謂加成物 (adducts)：例如一次世界大戰時，德軍所使用的芥氣 (sulfur mustard)，便會和 DNA 及血漿蛋白形成共價鍵結合，使組織壞死或是癌變[5]。

值得注意的是，人類也有可能僅透過日常飲食，攝入某些異型生物質。有如：存在黴變穀物中的黃麴毒素 B1，會與 DNA 形成 AFB1-DNA adduct，可能導致 DNA 雙股斷裂，成為突變的原因[6]；以及被 IARC 列為 group 2A 之可能致癌物的丙烯醯胺 (acrylamide) [7]，產生於高溫加熱後的澱粉類食物 (烤麵包、炸薯條、洋芋片等)，攝入後會與 DNA 及血紅蛋白形成共價鍵結加成物，由動物實驗知，可能是造成神經毒性與致癌性之機轉[8]。又或者只要攝入糖分，糖分就會和血紅蛋白生成糖化血色素 HbA1c[9-11]，而 HbA1c 則應用於臨床上監測糖尿病患者的病況。

儘管會和異型生物質形成加成物者，多為體內之蛋白質、DNA，數量不勝枚舉，但是，異型生物質在攝入人體後，即分布至體內各處，與組織、器官結合，證

據難以直接測量。惟紅血球中之血紅蛋白，量大利於採檢，且紅血球生命週期長達120天，可回溯加成物質數月間的暴露。基於這些優勢，血紅蛋白加成物成了十分恰當的觀察標的，也被視為一生物性指標 (biomarker)。



### **1.2. 血紅蛋白加成物與埃德曼反應 (Hemoglobin adducts and Edman reaction)**

最有機會和血紅蛋白反應，形成加成物之異型生物質，通常為親電子之有機小分子 (electrophilic organic compounds)，以改變血紅蛋白構型的方式，影響蛋白功能[12, 13]。血紅蛋白結構上，纈氨酸胺基端 (N-terminal valine) 為其中一形成加成物之點位[14]，藉由生物化學上定序多肽之埃德曼降解法 (Edman degradation) [15]，以埃德曼反應物「異硫氰酸苯酯 (phenylisothiocyanate, 下稱 PITC)」將經加成之胺基酸分離，便能由此小分子 (或稱 phenylthiohydantoin (PTH) derivatives) 結構，分析加成物種類。

再以丙烯醯胺與其代謝物為例，丙烯醯胺也是親電子之有機小分子，含特殊官能基  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl group，在許多文獻裡，已記載人體暴露丙烯醯胺後，會生成許多神經性的病變、癌化現象[16, 17]；也記載暴露如吸菸、改變飲食習慣後，體內產生丙烯醯胺血紅蛋白加成物 (下稱 acrylamide adduct) 的情形[18, 19]。2002年 E. Tareke 等人[20]更研究了每天食用高溫 (大於  $120^{\circ}\text{C}$ ) 烘培食物 (烤餅乾) 後，體內 acrylamide adduct 的增加情況。綜上所述，要觀察丙烯醯胺之暴露情形，acrylamide adduct 已是個成熟的研究目標。

但即便如此，acrylamide adduct 或其他加成物，與許多特定疾病的關聯，仍尚未有定論。例如，排泄毒物重要的腎與泌尿道系統疾病，還有不孕症等。

### **1.3. 傳統分析方法 (Traditional analysis methods)**

至於加成物在研究上，也須有靈敏的分析方法。自古以來，檢測有機小分子化合物 (藥物、毒物) 的傳統分析方法，有古典化學呈色法、薄層層析法，至近日的氣相層析法 (gas chromatography, GC) 等，檢驗藥物的精確度日益進步；近年更發展了解析度與靈敏度皆高的液相層析儀 (liquid chromatography, LC) 與質譜儀 (mass spectrometry, MS)。在法醫學實務中，對於檢驗藥毒物之黃金準則，即是使用液相層析儀與質譜儀，串聯使用，以標準品建立資料庫後，再檢出感興趣之分

子。在學術上，LC/MS 也用作研究小分子有機物、蛋白質體學之重要工具，讓許多新興藥物或小分子物質更容易被篩出、檢驗。

加成體學(adductomics)研究亦常運用 LC/MS。如 2007 年 Sylvie 等人在 *Journal of chromatography A* 上發表的研究[21]中，就使用了 LC/MS 系統，針對了法國吸菸族群，與未吸菸之族群比較 acrylamide adduct 濃度差異，並發現了 acrylamide adduct 在吸菸族群有顯著較高濃度。

#### 1.4. 分析方法面臨的挑戰 (*Challenges of analytical methods*)

然而，並非所有的有機分子，在傳統液相層析都能達到很好的分離：若使用更小粒徑之管柱，反而會使壓力壓縮移動相；傳統之質譜儀在進樣時，也可能受到雜質影響分析訊號，致定量不夠精確。若要檢驗未知物質，都須花一段時間優化檢驗方法，以達相當穩定度。有鑑於此，至今工程師仍不懈於改良 LC/MS 系統[22]。

新一代的 LC 稱作極致高效液相層析(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) [23]，有辦法在 15,000 psi 下，精準穩定移動相，使峰型不受影響，維持解析度，進而使定量更精確；而質譜儀方面則設計進樣角度，有效去除中性分子，並增加了與各種層析儀的相容度，提高分析方法的靈活度[24]。

此外，除了丙烯醯胺以外，尚有許多外來親電子之小分子，會與血紅蛋白形成加成物。例如已知 1, 3-butadiene、ethylene oxide 等，也會和血紅蛋白形成加成物 [25]。若有已知加成物（已標定，targeted）之標準品，定量分析並無太大阻礙；但是，若想研究未知加成物（未標定，untargeted），在缺少標準品情況下，即無法辨認加成物種類。又加成物標準品成本不菲，需特殊合成、純化，取得便利性亦有限。若透過高解析質譜儀（high resolution mass spectrometry，HRMS），例如時間飛行式質譜儀（Q-TOF-MS），可以克服傳統方法中，缺乏精確質量靈敏度的問題；Q-TOF 經校正後，能準確定位分析物分子量至小數點後四位，搭配質量計算與資料庫查詢，可方便地推測未標定加成物。

#### 1.5. 同位素化學標記法—未標定之血紅蛋白加成物

關於人體中未標定加成物，2014 年 Balbo 等人[26] 使用 Orbitrap 質譜儀，串聯 MS/MS/MS 進行 DNA 加成物之分析，辨識出各種鹼基之 DNA 加成物；瑞典學

者 H. Carlsson 與 M. Tornqvist 等人，則對未標定之血紅蛋白加成物有極大興趣[27]，使用 fluorescein isothiocyanate (FITC) 作為新埃德曼降解法反應物，將吸菸者與未吸菸者血紅蛋白 N-terminal adduct 萃出，以 Qtrap (ESI) 進行 MS screening 分析，接著以 MSMS 施予撞擊電壓，藉此發現了 7 個可推知分子式的加成物，與 14 個未知分子式的加成物。儘管如此，若要在短時間內，找出所有未標定的加成物訊號，仍是不容易的事。

因此考慮，未標定 (untargeted) 代謝體學分析常用之化學同位素標記法 (chemical isotope labeling, CIL) [28]。此方法使用有同位素標記 (heavy labeled) 之衍生化反應物 (derivatization reagents)，與未有同位素標記 (light labeled) 之衍生化反應物，分別對分析物進行衍生化反應，所得之兩種衍生物因帶有同樣的官能基，及相似的極性性質、離子化性質，故可在相近的滯留時間，觀察到強度相近的兩訊號 (即 heavy labeled and light labeled derivatives)。常用的衍生反應物有 DnsCl、BzCl 等，前述埃德曼降解法所使用之 PITC，亦為一種衍生化反應物。

是以，若使用 PITC 與 d<sub>5</sub>-PITC 進行 CIL，分別對血紅蛋白行埃德曼降解法，萃取出衍生化之加成物 (即 PTH-derivatives) 後再混合，經層析，在高解析質譜儀下，預期可見 m/z M 與 M+5 之成對離子，如圖一所示。接著以統計分析，找出所有 M 與 M+5 之成對離子，此即可能為血紅蛋白加成物之分子，再以分子量分析，確認是否真為血紅蛋白加成物。

## 1.6. 研究目標

本研究將分兩個部分：其一為使用 ACQUITY® UPLC I-Class PLUS System 串聯 Xevo® TQ-S Micro 三段四極桿質譜儀 (下稱 UPLC-QqQ-MS)，測量臺大醫院泌尿部不孕症病人血中 acrylamide adduct 濃度，以探討極致高效液相層析儀串聯質譜儀，對最常被討論之 acrylamide adduct 靈敏度，並觀察加成物濃度與疾病關聯；其二為使用 ACQUITY® UPLC H-Class PLUS System 串聯 SYNAPT® XS 高解析度質譜儀 (下稱 UPLC-Q-TOF-MS)，搭配化學同位素標記法，以分析軟體 MSDIAL 輸出實驗數據，再以統計軟體 R-Studio 篩選出各種受污染檢體中，可能形成或已存在之血紅蛋白加成物。並且使用生化統計工具 Metaboanalyst，行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 與偏最小平方判別分析 (partial least squares

discriminant analysis, PLS-DA) ，分析質譜數據、比較受汙染檢體間，加成物之差異。

至於遠程目標亦有二：一為應用 UPLC/MS 方法，檢驗各種已知之血紅蛋白加成物，並觀察加成物與特殊疾病之關聯；二為透過本研究，持續優化 CIL-UPLC/HRMS 方法，分析出過往文獻未提及、未標定之血紅蛋白加成物。俾利提供客觀數據予環境醫學、生物化學與法醫毒物學等領域，證明異型生物質對人體產生之毒害影響。



## 第二章 研究方法



### 2.1. 化學品與試劑 (Chemicals and reagents)

#### 2.1.1. 化學品 (Chemicals)

丙烯醯胺 (acrylamide, 純度>99%)、phenylisothiocyanate (PITC) 與 d<sub>5</sub>-phenylisothiocyanate (d<sub>5</sub>-PITC)、揮發有機氣體混合物 volatiles organic calibration mix (VOCs, 含 benzene 等 54 有機物, 見表一)、Hemoglobin Assay Kit MAK115, 皆購自 Sigma-Aldrich® (USA)。同位素標記之丙烯醯胺加成長肽鏈標準品 (N-(2-Carbamoyl-ethyl)-[5<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-OH, in fluoroacetate salt, 50% MeOH, 濃度 1 μmol/mL), 則由科羅耐國際科技有限公司 (臺灣) 代製。

#### 2.1.2. 溶劑 (Solvents)

Methanol, 2-propanol, hexane and ethyl acetate (HPLC grade), hydrochloric acid, tert-butyl methyl ether (MTBE), ethyl acetate, formamide, 皆購自 Sigma-Aldrich® (USA)。雙蒸水 (double distilled water) 取自實驗室設備。

#### 2.1.3. 儀器 (Instruments)

ACQUITY® UPLC I-Class PLUS System 串聯 Xevo® TQ-S Micro 三段四極桿質譜儀 (UPLC-QqQ-MS)、ACQUITY® UPLC H-Class PLUS System 串聯 SYNAPT® XS 高解析度質譜儀 (UPLC-Q-TOF-MS), 皆為 Water™ 公司 (USA) 產品。管柱使用 Hypersil Gold™ C18 Selectivity HPLC Columns (50 x 2.1 mm, 粒徑 1.9 μm, ThermoFisher®, USA)。分光光度計使用 SpectraMax® ABS and ABS Plus absorbance microplate readers (Molecular Devices, USA)。

### 2.2. 合成標準品衍生物 (Syntheses of standard derivatives)

#### 2.2.1. 合成 AA-[5<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-PTH 與內標準品 AA-[5<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-d<sub>5</sub>-PTH

取同位素標記之丙烯醯胺加成長肽鏈標準品 0.2 mL, 加入 formamide 至 1.5 mL。新埃德曼降解法(modified Edman degradation)參考自 Fennell et al.的做法[29]: 上述溶液再加入 5 μL NaOH (1M) 與 15 μL phenylisothiocyanate (PITC), 在室溫下轉動混合至少一晚。反應完成後, 置於乾熱器中 45°C 中 90 分鐘。產物加入 2

mL 雙蒸水後，以 4 mL tert-butyl methyl ether (MTBE) 萃取 2 次，取出有機相後置於氮氣下 30 分鐘吹乾，吹乾產物回溶 50% methanol 至總體積 1 mL。此合成之標準品 AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-PTH，理論濃度為 62.4  $\mu\text{g/mL}$ 。

至於內標準品之合成，大致上同 AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-PTH，但由 15  $\mu\text{L}$   $\text{d}_5$ -phenylisothiocyanate ( $\text{d}_5$ -PITC) 取代 PITC。萃取後吹乾，回溶於 50% methanol 至總體積 1 mL。此合成之內標準品 AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL- $\text{d}_5$ -PTH，理論濃度為 63.4  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2.2. 質譜儀分析 (MS analyses)

由 2.2.1. 合成標準品，使用 Xevo<sup>®</sup> TQ-S Micro 三段四極桿質譜儀進行 infusion 測試。約取 6 ng 溶於 1 mL 50% methanol，在電噴灑游離法 (electrospray ionization source, ESI) 之正電模式進行。Flow rate: 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，cone voltage 為 30 eV，collision energy 為 10 至 50 eV。主要離子碎片 m/z transition 分別為 312.1381 $\rightarrow$ 295.0871 與 317.1381 $\rightarrow$ 300.1519，詳如表二所示。另有取未知濃度 AA-VAL-PTH 進行測試，主要之 m/z transition 為 306.224 $\rightarrow$ 289.089。

### 2.2.3. 試管內合成陽性對照品 (In vitro synthesis of positive control sample)

取丙烯醯胺 1.5 mg 溶於 1 mL 甲醇中，製成濃度 1.5 mg/mL 之丙烯醯胺標準液 (stock solution)。取 10  $\mu\text{L}$  之丙烯醯胺標準液，加入含 5  $\mu\text{L}$  NaOH (1M) 之 150  $\mu\text{L}$  健康受試者血液，於室溫下旋轉反應一日後，放入 4°C 冰箱冷藏貯存。

合成之 acrylamide adduct 陽性對照品 (AA-VAL-PTH)，產生之 transition 為：306.224 $\rightarrow$ 289.09、306.224 $\rightarrow$ 247.01、306.224 $\rightarrow$ 84.005、306.224 $\rightarrow$ 72.034、306.224 $\rightarrow$ 54.99，裂解模式如圖二所示。

## 2.3. 血漿樣品 (Blood samples)

### 2.3.1. 樣品來源 (Sample sources)

臨床樣品，來自台大醫院泌尿部去識別化之不孕症患者全血檢體 (N=29)，保存於 -20°C 冰箱 3 年；試管內合成陽性對照品，全血來源為一健康受試者，保存於 -20°C 冰箱約 2 個月。待三段四極桿質譜儀 (UPLC-QqQ-MS) 測試 acrylamide adduct

濃度。

而受污染血液檢體，全血來源為一健康受試者與一法醫檢體，並由健康受試者全血進行試管內 (*in vitro*) 污染反應：取兩試管，第一試管加入 1 mL 全血與 10  $\mu$ L VOCs、5  $\mu$ L NaOH (1M)；第二試管充滿燃燒一支香菸之煙霧，加入 1 mL 全血與 5  $\mu$ L NaOH (1M)，兩試管在室溫下於旋轉盤上轉動反應約 5 天後，各分成 3 份複製品 (replicates, N=3)。法醫檢體則為一服用 N,N-Dimethyl-p-toluidine 死亡的 30 歲男性，一樣分成 3 份複製品。由健康受試者空白對照血液、菸油污染、VOCs 污染，與法醫檢體共四組 12 份檢體，保存於 4°C 冰箱。待用 CIL 法—高解析度質譜儀 (UPLC-Q-TOF-MS)，測量未標定血紅蛋白加成物。

### 2.3.2. 血紅蛋白定量 (*Quantification of hemoglobin*)

臨床檢體與健康受試者、法醫檢體 (下稱所有受試者) 之血紅蛋白前處理，與 PITC 進行 modified Edman reaction 方法，皆參考 2007 年 Sylvie 等人之研究[21]。

血紅蛋白定量使用 Hemoglobin Assay Kit MAK115 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)，檢體為全血稀釋於 100 倍雙蒸水 (水為空白試劑)。50  $\mu$ L 雙蒸水加入 50  $\mu$ L 校正品 (calibrator) 於 96 孔盤，再加入 200  $\mu$ L 至此混合液中，此稀釋後校正品約等於 100 mg/dL 之血紅蛋白。

接著於 96 孔盤中加入 50  $\mu$ L 之樣本，然後加入 200  $\mu$ L 反應劑 (reagent)，輕拍以使之充分混合，於 5 分鐘後測量其 400nm 處吸光值 ( $A_{400}$ )。檢體校正後之血紅蛋白濃度如表三所示，所有受試者之血紅蛋白濃度，定量之值為 9.64 g/dL 至 14.48 g/dL。

### 2.3.3. 血紅蛋白之萃取 (*Hemoglobin extraction*)

所有受試者血液，經離心後取出紅血球，以 0.9%NaCl 洗後加入雙蒸水將紅血球打破，置於-20°C 保存。取此 hemolysate 2 mL，加入 12 mL 之含 50 mM HCl 之 2-propanol，用力上下搖晃後進行離心。離心後再加入 8mL ethyl acetate，置 4°C 冰箱至少 2 小時。爾後取出離心，以 5 mL ethyl acetate 與 hexane 洗淨後，以氮氣吹乾，萃出之血紅蛋白置-20°C 保存。



#### 2.4. 埃德曼降解反應 (Edman degradation reaction)

取臨床樣本與對照品萃出之血紅蛋白 20 mg，溶於 1.5 mL 之 formamide，加入 5  $\mu$ L NaOH (1M) 與 15  $\mu$ L 之 PITC，置旋轉盤上反應一天後，進行 45°C 溫浴 90 分鐘。產物加入 2 mL 雙蒸水後，加入內標準品 10  $\mu$ L，以 4 mL ethyl acetate 萃取 2 次，取出有機相置於氮氣下 30 分鐘吹乾，吹乾產物回溶 25% methanol 至總體積 1 mL。反應產物皆保存於 -20°C，待 UPLC-QqQ-MS 進行分析。

同樣取污染檢體 (健康受試者、菸霧汙染物、VOCs 汙染物、法醫檢體) 萃出血紅蛋白，但取 40 mg : 20 mg 溶於 1.5 mL formamide，加入 5  $\mu$ L NaOH (1M) 與 15  $\mu$ L 之 PITC；另外 20 mg 溶於 1.5 mL formamide，加入 5  $\mu$ L NaOH (1M) 與 15  $\mu$ L 之 d<sub>5</sub>-PITC，兩離心管置旋轉盤反應一天後，行 45°C 溫浴 90 分，再以 4 mL ethyl acetate 萃取 2 次，以氮氣吹乾後回溶至 1 mL，製成 PITC 與 d<sub>5</sub>-PITC 衍生產物。產物皆保存於 -20°C，待進行 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

#### 2.5. 儀器分析 (Instrumental analysis)

UPLC-QqQ-MS 於電噴灑游離法與正電模式下操作，注射體積為 10  $\mu$ L。管柱使用 Hypersil Gold™ C18 Selectivity HPLC Columns ( 50 x 2.1 mm，粒徑 1.9  $\mu$ m ) (ThermoFisher®)。移動相 A 液為含 0.1% 甲酸之雙蒸水，移動相 B 為含 0.1% 甲酸之甲醇，流速為 0.3 mL/min，共流 6.5 分鐘。如圖三所示，濃度梯度由一開始 80%A/20%B，在 2 分鐘內變更至 5%A/95%B，等濃度梯度維持 1 分鐘，在第 5 分鐘時回復至原本狀態，平衡 1.5 分鐘。質譜分析方法使用 MRM transition 模式。(其他參數：Mass detector conditions were: ESI needle voltage 5.0 kV, heated capillary temperature 350 °C, capillary voltage 35 V, tube lens offset 87 V, MS/MS collision energy 18 eV)

UPLC-Q-TOF-MS 也於電噴灑游離法與正電模式下操作，注射體積為 2  $\mu$ L。所用管柱同 UPLC-QqQ-MS 實驗。移動相 A 液為含 0.1% 甲酸雙蒸水，移動相 B 為含 0.1% 甲酸之甲醇，流速為 0.3 mL/min。濃度梯度起始 90%A/10%B，在 4 分鐘內變更至 50%A/50%B，並在 6 分鐘時達 2%A/98%B，等濃度梯度維持 4 分鐘，在第 10.2 分鐘時回復至原本狀態，平衡約 3 分鐘，總時程約 13 分鐘，濃度梯度如圖四所示。

質譜分析方法使用數據依賴擷取 (Data-Dependent Acquisition, DDA) 模式，此模式先以 full scan 紀錄 50 至 800Da 之離子碎片，取訊號強度大於 1000 之 10 母離子進行碎片分析，MS/MS 之碰撞電壓為漸升式 (ramping)：低分子量者由 10 至 30 V，高分子量者由 40 至 60 V，電壓梯度如圖五所示。

## 2.6. 標定分析 acrylamide adducts (Targeted analysis of acrylamide adducts)

步驟 2.4. 完成之臨床樣本與陽性對照品檢體，直接取 200  $\mu$ L 放入小瓶 (vial) 中，以 UPLC-QqQ-MS 進行分析。

### 2.6.1. 資料處理 (Data processing)

使用 UPLC-QqQ-MS 所搭載之電腦軟體 MassLynx，直接編輯與觀察質譜圖。質譜輸出為 .raw 檔案，將檔案輸入至統計軟體 Skyline 21.2，修正峰型與滯留時間，並製作檢量線、進行定量分析以及方法確效。

### 2.6.2. 方法確效：線性範圍 (Method validation: linearity)

所有方法確效皆遵循 FDA draft guidance[30]，包括線性範圍 (linearity)、偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ)，以及精確性和準確性試驗 (precision and accuracy)。Acrylamide adduct 的測量與定量，使用內標準法檢量線。以 2.2.1. 合成之 AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-PTH 為標準品，AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-d<sub>5</sub>-PTH 為內標準品，皆以 25% methanol 稀釋。標準品最終濃度為 6.24 ng/mL、3.12 ng/mL、1.56 ng/mL、0.78 ng/mL、0.39 ng/mL、195 pg/mL、97.5 pg/mL、48.8 pg/mL、24.4 pg/mL。內標準品最終濃度為 0.634 ng/mL。

### 2.6.3. 方法確效：再現性 (Method validation: reproducibility)

精確性測試 (precision test) 使用三種濃度之標準品稀釋液，分別為高濃度標準液 (high concentration quality control, HQC, 1.56 ng/mL)、中濃度標準液 (medial concentration quality control, MQC, 0.39 ng/mL)、低濃度標準液 (low concentration quality control, LQC, 97.5 pg/mL)。單日內準確試驗 (intra-day accuracy test) 為單日內測試 5 次，日間準確試驗 (inter-day accuracy test) 則為不同 3 天之內共測試 15 次之結果。

## 2.7. 非標定分析 *all adducts* (*Untargeted analysis of unknown hemoglobin adducts*)

非標定分析主要針對四組檢體：健康受試者對照檢體(BK)、菸油汙染(TBC)、法醫檢體(GR)、VOCs 汙染物(VOC)。每組取其步驟 2.4 後段完成之 PITC 與 d<sub>5</sub>-PITC 衍生產物各 100 μL，混合成 200 μL，每組 3 份複製品，裝入小瓶中上機。

### 2.7.1. 資料處理 (*Data processing*)

使用 UPLC-Q-TOF-MS 所搭配之電腦軟體 MassLynx 4.2 檢視質譜，並將 .raw 檔案其轉換成 .abf 檔案，輸入 MSDIAL 4.80 軟體中，可以在二維平面 ( $m/z$  vs RT) 上觀察所有測得之訊號；再將訊號資料轉為 excel 數據檔案，整理輸入設計好之 R-Studio 9.2 指令碼「LabelPick」，統計程式碼如圖六所示，可將荷質比 ( $m/z$ ) 相差約 5.031 (五個氘與氫原子質量數之差)、分子量介於 200 至 800 之兩配對波峰找出，稱之「成對峰 (下稱 peak pairs)」，藉此發現所有可能的血紅蛋白加成物，並與文獻對照、嘗試解析分子。

最後使用網頁版 VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR>) 進行火山圖分析，以 Metaboanalyst 5.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)) 進行主成分分析 (Principal component analysis, PCA)、偏最小平方判別分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 與熱圖，比較受汙染質譜圖之組間差異。總體流程如圖七所示。

## 第三章 實驗結果與討論



### 3.1. Acrylamide adduct 分析方法開發 (Method development)

#### 3.1.1. 化學同位素標記法 (CIL) 與合成標準品結果

為避免內生性長肽鏈 (AA-Hb 分子) 干擾檢驗，並減少測量誤差，我們改用經同位素標記之長肽鏈標準品，合成替代標準品 (AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-PTH, MW=311)，以及內標準品 (AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-d<sub>5</sub>-PTH, MW=316)，如步驟 2.2.1。

另外，合成陽性對照品 (步驟 2.2.3.)，以證明 acrylamide 的確會和血紅蛋白形成加成物。訊號如圖八所示，替代標準品、內標準品與陽性對照品滯留時間約為 2.04 分鐘。其中 *in vitro* 合成之 acrylamide adduct 陽性對照品出現高強度訊號 (波峰)。

#### 3.1.2. 前處理最佳化 (Optimization of pretreatment)

一般而言，在定量測試中，內標準品常使用同位素取代之目標物 (isotopically labelled analogues)，其優點為，在 ESI 下，會有和目標物有相同的裂解模式，且在 LC-MS/MS 下也有和目標物受一樣的基質效應 (matrix effect)。

參考文獻多用醚類萃取埃德曼產物，如 T. Schettgen 等人的實驗[31]中，先加入了 400 $\mu\text{L}$  的飽和食鹽水 (NaCl 溶液) 溶液，增加萃取效率，再由 ethyl ether 進行萃取 2 次。本實驗則原先參考 Chevolleau, S. 等人的方法[21]，使用 MTBE 萃取目標物與內標準品，但萃取後內標準品並未出現理想訊號，懷疑是由 MTBE 萃取過程中，分析物未能順利分離至有機層，萃取率太低所致。

為探討 MTBE 萃取效率，分成三組進行測試：其一為正常萃取步驟 (pre-spike)，其二為進行萃取後，加入內標準品至萃出之有機層測試 (post-spike)，其三為內標準品以 25% 甲醇稀釋後測試。結果如圖九至圖十一所示，滯留時間約 1.97 分鐘時，pre-spike 僅有 317.14 $\rightarrow$ 300.15 可見之弱訊號，而 post-spike 與純內標準品稀釋 (pure) 皆可見到 317.14 $\rightarrow$ 300.15、317.14 $\rightarrow$ 89.01、317.14 $\rightarrow$ 58.96 訊號，且訊號強度兩者相似，惟雜訊與干擾仍非常多。是以，可推論 MTBE 萃取內標準品並未如文獻所示有效率。

不過，陽性對照品 (positive control) 係由丙烯醯胺標準溶液，加入空白全血合成，亦由 MTBE/ddH<sub>2</sub>O 萃取、吹乾回溶而得，但待測之 306.2 $\rightarrow$ 247.0、306.2 $\rightarrow$

84.0、306.2→72.0、306.2→55.0 訊號皆良好（如圖十二所示），表示本萃取方法可以萃取出 AA-VAL-(d<sub>0</sub>-)PTH（母離子 m/z=306），但未能成功萃取出 AA-[5<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-d<sub>5</sub>-PTH（母離子 m/z=317）。原因可能為，本實驗衍伸化之試劑 phenyl-D5 isothiocyanate（d<sub>5</sub>-PITC），氘取代位於分子之苯環上，與大多文獻[21, 27, 32]所使用之內標準品，氘取代多位於 valine 上不同。氘取代之苯環增加了其衍生物（即內標準品，圖十三）之極性，導致難溶於醚類有機相中。

再者，本次實驗僅用 MTBE/ddH<sub>2</sub>O 液相層析法（LLE）進行萃取，與多數文獻[21, 27, 32]再進行固相萃取（SPE）不同。近年的研究，如 Yamamoto, J.[33]與 von Stedingk, H.[32]等人的方法，更只由 1.6 毫升 acetonitrile 沉澱蛋白質後，加入 ammonium hydroxide 進行固相萃取。基於時間與研究成本因素，我們並沒有進行固相萃取，是否因此步驟導致萃取效率不同，亦值得探討。為優化實驗方法，我們換上新管柱，且將萃取液由 MTBE 改成 ethyl acetate。

此外，埃德曼降解法產物，加入水層與有機相搖晃，容易產生乳化現象，因而不好分層；離心過後，位在有機相與水相間之中間層（interface），出現大量類似凝膠樣之半固體（圖十四），不利吸取有機相，懷疑亦是造成萃取效率不佳因素，因此須設法減少乳化現象產生。

乳化原因可能為，經 PITC 衍生過之血紅蛋白，含有兩相均不溶的雜質或顆粒，導致萃取時未經猛烈搖晃，即產生乳化現象。一般而言，可減少乳化現象的方法有靜置、離心，加入飽和食鹽水，或者提高萃取液體積，我們決定提高有機相之體積萃取，並減少水相體積。然結果雖減少乳化現象，但萃取效率仍有限，因此改為延長萃取後靜置時間，並放入 4°C 冰箱冷藏，再輔以多次離心，約 2 天後終使凝膠狀中間層溶解，萃取液也分成清晰兩層，順利取出有機相處理。萃取率也明顯提高，以 MTBE 和 ethyl acetate 分別萃取 10 次測試結果，如圖十五所示。

### 3.1.3. 方法確效 (Method validation)

檢量線使用 Skyline 21.2 軟體製作，如圖十六所示，線性回歸係數接近 1 ( $r^2 = 0.9993$ )。標準品濃度點由 24.4 pg/mL 至 6.24 ng/mL，內標準品(AA-[5<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-d<sub>5</sub>-PTH) 濃度固定為 0.634 ng/mL，由 light to heavy 比率計算樣品濃度。偵測極限（limit of detection, LOD，訊噪比為 3 時）為 3.91 pmol/g Hb，而定量極限（limit



of quantification, LOQ, 訊噪比為 10 時) 則估為 7.81 pmol/g Hb, LOD 與 LOQ 皆與文獻[21, 34]參考值相近。

如表四所示, LQC 的相對標準差 (relative standard deviations, RSDs) 為 3.4% 與 7.6%, MQC 的 RSDs 為 2.8% 與 3.3%, HQC 的 RSDs 為 8.3% 與 2.9%; LQC 的準確性為 96.6%/100%, MQC 則為 95.7%/96.0%, HQC 則為 98.8%/96.9%。

### 3.2. 臨床應用—泌尿部病人實驗結果

在臨床檢體 (N=29) 中, 有 4 位定量出 acrylamide adduct (S2、S4、S23、S29), 而其他臨床檢體之峰型不明顯, 無法確定是否存在 acrylamide adduct。4 位定量濃度分別為 117.58 pmol/g Hb、48.27 pmol/g Hb、41.88 pmol/g Hb、41.17 pmol/g Hb。整理如圖十七與圖十八所示。

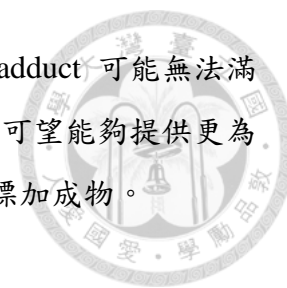
過往文獻在人體血液中, 檢測出人體可能存在之 acrylamide adduct, 濃度約在 7-453 pmol/g Hb 之間[31, 35-37], 而本次實驗僅有 4 位有測出, 可能有以下解釋:

(一) 病人血紅蛋白丙烯醯胺加成物濃度低於 LOD (二) 萃取效率偏低, 而未能將低濃度加成物萃取出 (三) 檢體已放置三年, 有可能受衰變影響, 而無法測得低濃度加成物。過往研究[38]表示, 在短時間內如 48 小時之內進行檢體處理, 測得 acrylamide adduct 濃度可和採檢後立即處理幾乎相同。此外, 個體間也存在可能影響 acrylamide adduct 生成的因素, 例如血液 pH 值、暴露丙烯醯胺時間, 或是其他胺基酸干擾生成; 血液若含高濃度糖分, 也可能會競爭顯氨酸, 形成糖化血色素 (HbA1c) [39]。因此個體間的 acrylamide adduct 濃度也可能有相當程度之差異。

即便如此, 有測出 acrylamide adduct 之臨床樣品, 濃度皆在文獻參考範圍內。而 *in vitro* 合成之陽性對照品, 則證明丙烯醯胺在一定條件下, 確實可與紅血球血紅蛋白中, 顯氨酸胺基端形成加成物。

但須注意的是, 一般認為 acrylamide 透過 CyP450 2E1 之代謝物 glycidamide[40], 在 *in vitro* 實驗中, 被發現比起 acrylamide, 更容易和 DNA 形成加成物 (glycidamide-DNA adducts) [41], 因此被認為可能是 acrylamide 誘發突變的主要機轉。是以, 在過往如 Chevolleau, S.[21]、Schettgen, T.[31] 的研究中, 都一併做了樣本中 glycidamide 的定量分析, 再計算出 GA-VAL/AA-VAL 的比率, 作為測量指標, 例如研究吸菸族群與未吸菸族群的差異。若僅測量 acrylamide adduct 濃度, 恐尚不足

推論 acrylamide adduct 血中濃度與特殊疾病之關聯。顯見單一 adduct 可能無法滿足研究環境毒物暴露對於病程之影響，因此，開發非標定加成物可望能夠提供更為豐富之環境毒物累積資訊，或許更能作為探尋其他有意義之指標加成物。



### 3.3. 非標定分析 (*Untargeted analysis of unknown Hb adducts*)

據過往研究，除了 acrylamide 以外，尚有許多親電有機分子可形成加成物，例如吸菸產生之芳香胺類 (aromatic amines) [42]，簡單的甲基化 (methyl)、乙基化 (ethyl)、acrylonitrile 形成血紅蛋白加成物[43]，更有非常多尚未標定(not identified, untargeted)之分子加成，都有可能在人體內產生[27]。而這些文獻也一致同意，在吸菸者體內血紅蛋白加成物的種類較多，濃度也較未吸菸者高。

因此，為了發現除 acrylamide 外，其他在實際案件 (如 RCA 案) 發生之成分複雜污染中，可能會和血紅蛋白加成的分子，我們繼續進行非標定分析。考慮到高危險群為吸菸者或環境汙染接觸者，所以我們選擇以香菸煙霧、揮發有機氣體混合物，加入健康受試者全血於試管內反應，連同對照檢體與法醫檢體，經過往文獻未曾嘗試過的同位素化學標記法與 UPLC-Q-TOF-MS 分析後，再相互比較。

#### 3.3.1. 方法建立過程 (*Method development*)

設計 UPLC-Q-TOF-MS 方法時，收集資料選用數據依賴擷取 (Data-Dependent Acquisition, DDA) 模式進行。此模式特色在於，可讓特定之分析物 (通常為 m/z 達一定強度者) 母離子進入 MSMS 進一步進行碎片分析。優點是操作簡單、省時，常用於蛋白質學分析之 target analysis。

接著參考 Carlsson, H. 等人的想法[27]，他們認為，所有血紅蛋白加成衍生物，經過 MSMS 撞擊碎裂後，皆會有相同之碎片產生，並稱之為診斷碎片 (diagnostic fragments)，並使用 fluorescein isothiocyanate (FITC) 衍生，經 MSMS 分析，辨認出 21 個已知與未知結構之 hemoglobin adducts。我們參考其研究，也畫出一未標定加成物由 PITC 衍生成 PTH 後，若進入 MSMS，預計可觀察到的診斷碎片圖，如圖十九所示。

擷取所有數據後，除了可以直接使用附屬軟體 MassLynx 檢視、編輯圖譜，更需要執行更便利的「可視化 (visualization)」，因此將.raw 檔案輸入至 MSDIAL，

可在二維平面上直接選擇資料點觀察；輸出數據後使用「LabelPick」（自 R-Studio 編輯），則能快速在數以千計強弱不一的訊號中，找出 M/M+5 之 peak pairs，初步篩出所有可能的加成物。最後，為了更直觀檢視此四組檢體間的差異，以 VolcanoR 製作火山圖，以 Metaboanalyst 5.0 執行 PCA 與 PLS-DA。

### 3.3.2. 非標定加成物分析結果 (Analysis of untargeted Hb adducts)

圖二十至圖二十二表示，由 UPLC-Q-TOF-MS，各組(每組 N=3)實驗之結果。對照檢體組分別產出 79、87、91 對 peak pairs，香菸煙霧組分別產出 91、99、102 對，法醫檢體組分別產出 94、105、96 對，揮發有機氣體混合物組分別產出 85、92、88 對，無基質時之沖洗背景 (wash) 結果為產出 0 對。

經整理，統計出荷質比大於 PTH 衍生物基本結構 ( $m/z$  235) 之 peak pairs 數，以及各組與對照檢體之差異，結果如圖二十三與表五所示：四組之  $m/z$  大於 235 之 peak pairs 約介在 35 至 47 對間，異於對照檢體 peak pair 數分別為 6 至 11 對。而所有 peak pairs 分布圖則如圖二十四所示。

下一步試著辨認如 Carlsson, H. 研究 [27] 所找出之已知與未知結構之 hemoglobin adduct，結果如表六所示，僅有  $m/z$  249、288、266、341、361 之母離子廣泛在四組中被測得。

接著，質譜數據可由火山圖進行組間訊號之比較 (圖二十五)，可觀察出受污染檢體相較對照檢體，有顯著較多 PTH 形成趨勢，可推測其複雜成分較多，與我們的想像相符；又經 Metaboanalyst，使用 PCA 與 PLS-DA 及熱圖分析，結果表示：受污染的血液檢體 (香菸煙霧、法醫檢體、揮發有機氣體混合物) 與未受污染之血液檢體 (對照檢體) 經由 PCA 相比，並未有顯著差異，說明受污染檢體與對照血液檢體，形成之 peak pairs (可能之加成物) 仍然相似。而若由 PLS-DA、sPLS-DA 或是熱圖比較，則可略分出組間差異 (圖二十六與圖二十七)。

最後，也測試 2.2.3. 合成之陽性對照品，相較於對照檢體，確實可以看見代表 acrylamide adduct 之 peak pairs ( $306/311$ ，AA-VAL-PTH 之  $m/z$  值/AA-VAL-d<sub>5</sub>-PTH 之  $m/z$  值) (圖二十八) 並可見其碎片  $289/294$  之 peak pairs (圖二十九)。又檢視圖譜，除了可見 M/M+5 之 peak pairs，也在其他滯留時間意外發現許多 M/M+10 (difference = 10.062) 如  $229/239$  之 peak pairs (圖三十)，推測其有可能

為衍生兩次之 PTH 產物，值得深入探討其生成機轉。

此外有先前研究[44]提及，樣品在儲藏過程中，有可能受外界影響，產生額外的 *in vitro* 加成物，例如 ethylene oxide 之血紅蛋白加成物。雖然沒有方法能阻止此類加成物生成，但仍建議在分離出血紅蛋白後，反應前皆先置於-20°C，或更低溫之冰箱保存。這也提醒我們，須採有效方法，方能分辨背景加成物 (background adducts) 與真正活體內生成之加成物 (*in vivo* adducts)。

### 3.3.3. 加成物反應機制 (Mechanism of Hb adduct formation)

於緒論 1.2. 有提及，血紅蛋白之加成點位常於 N-terminal valine，其反應機制有二：一為希夫鹼生成反應 (Schiff base formation)，如糖化血色素 HbA1c[11]，便由肽鏈上一級胺攻擊葡萄糖醛基，加成而得；二為麥克爾加成反應 (Michael addition reaction)，例如血紅蛋白肽鏈上一級胺，攻擊丙烯醯胺之  $\alpha, \beta$  不飽和雙鍵，進行親核性共軛加成 (1,4-nucleophilic conjugate addition) 而得。

原先以為，揮發有機氣體混合物內含 54 種有機物，其中含雙鍵、共軛雙鍵者不在少數，加入全血混合後，可合成「血紅蛋白-VOCs 加成物」。然而，麥克爾加成反應條件有限制性，血紅蛋白並不會與所有不飽和碳鏈有機物進行加成反應。例如，像 VOCs 中 cis-1,3-dichloropropene，結構雖包括 vinyl halide，含不飽和碳鏈及拉電子基團，但並非  $\alpha, \beta$ -不飽和羰基化合物 ( $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl compound)，所以無法進行麥克爾加成反應、形成加成物；反之，丙烯醯胺結構特殊，為  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl compound，因此容易進行加成反應 (圖三十一)。這可解釋為何與 VOCs 混合後，沒有從分子式推算找出對應的加成物 (VOC-adducts)，實驗結果仍和對照檢體相似，peak pair 類型與數量皆相去不遠。

### 3.4. 實驗限制 (Limitation and future works)

在標定分析 acrylamide adducts 時，考量研究時間與成本，並未直接取得廠商或另外實驗室合成之 AA-VAL-PTH 與 AA-VAL-d<sub>5</sub>-PTH 之標準品，改自行以簡單材料 in house 合成 AA-[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-PTH 與 AA-[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-d<sub>5</sub>-PTH，並製作檢量線。而也許 AA-[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]VAL-PTH 化學性質，仍和人體內 (*in vivo*) 能見之 AA-VAL-PTH 有些微差異，分析上並不能完全取代 AA-VAL-PTH 精準定量。若今

有充分資源，則應以 AA-VAL-PTH/AA-VAL- d<sub>5</sub>-PTH 之值進行定量。

又如 3.2.後段所述，若要討論檢體中加成物是否可能造成人體損害，則應一併做出 glycidamide 的定量分析，再計算出 GA-VAL/AA-VAL 的比率，才有意義。再者，雖陽性對照品 (positive control) 足證確實可由 acrylamide 水溶液與血紅蛋白形成加成物 AA-VAL-PTH，但活體外合成 (*in vitro* synthesis)，仍不能取代活體內 (*in vivo*) 生化環境下反應，其反應環境與結果不一定相當。

而本實驗並未從所有臨床樣品測出 acrylamide adduct，究竟因檢體存放過久受腐敗影響，或者族群本身不易測出加成物僅屬偶然，亦需細究。因此，建議除尋求精確標準品外，需優化萃取液 (pH 值與混合成分等)、實驗溫度，以及 LC 測試，以提升萃取率與良好峰型；在實際測試中，採取更多實驗對象之新鮮檢體，並且加上實驗對照組，更能比較出目標族群與一般人血中濃度之差異。

而在未標定分析方面，執行 DDA 模式後，我們發現可如理想，統計得到許多 M/M+5 之 peak pairs。然遺憾的是，在靈敏度有限情況下，訊號若未達一定強度，不會經過 MSMS 將母離子打碎，即無從由前述之「診斷碎片」確認其是否真為某種血紅蛋白加成物 (hemoglobin adduct)，還是其他由埃德曼降解法所產生之胺基酸衍生物 (phenylthiohydantoin derivatives, PTHs)。

但是，若由 DIA (Data-independent acquisition) 模式起手，雖然可以得到所有離子碎片資訊，但會導致檔案太過龐大、較為不易分析獲得之資料 (raw data)，掃描時間也因此增加。因此本次實驗心得為，建議先使用 DDA 模式找到所有的 peak pairs (如果只挑分子量大於 235 之母離子，可從約 900 至 1000 個 peak data 篩出約 35 至 45 對 peak pairs，可稱作 peak pair candidates)，再指定其母離子之 m/z 值，進入 MSMS 給予電壓撞擊打碎，分析碎片模式。另外，在檢體內加入內標準物 (如 AA-VAL-PTH)，以便評估 Q-TOF 之靈敏度。

最後，整體血紅蛋白前處理過程，實為冗長：沉澱蛋白質需靜置一至二小時，血紅蛋白溶於甲醯胺需數小時不等，埃德曼降解法需十二至十八小時 (overnight)；而液相萃取時若不幸產生乳化現象，經多次離心、靜置冰箱等待溶解，需時一至三天不等，整體過程加總需要三到五天。因此如何縮短前處理過程、增加分析效率，也是將來可以努力的方向。

## 第四章 結論與展望



### 4.1. 結論

以 UPLC-QqQ-MS 標定分析測量 29 位台大醫院泌尿部病人的血紅蛋白檢體，共有 4 位測得 acrylamide adduct，濃度分別為 117.58 pmol/g Hb、48.27 pmol/g Hb、41.88 pmol/g Hb、41.17 pmol/g Hb，LOD 為 243.8 fg，LOQ 為 7.81 pmol/g Hb，LOQ 與測得濃度皆在參考研究範圍內。對照品方面，則證實 acrylamide 可和血紅蛋白形成加成物。

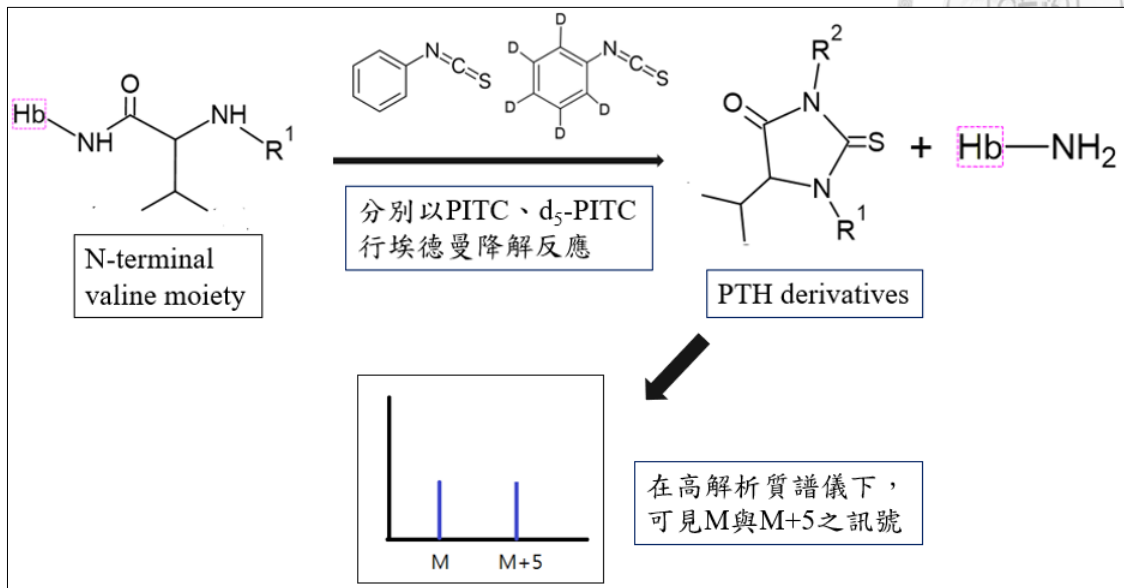
而以化學同位素分子標記 (Chemical isotope labeling, CIL) 搭配 UPLC-Q-TOF-MS 方法，進行未標定分析，篩選四組樣品裡，可能存在的所有血紅蛋白加成物，雖然有找到 35 至 45 組候選加成物 (peak pair candidates)，但與過往文獻比較，只找到部分對應之血紅蛋白加成物。若要進行確認試驗，建議再使用 MSMS 方法，將感興趣之分子打碎，找出診斷碎片，以確認其為血紅蛋白加成物。使用 PCA 並未發現四組樣品間的顯著差異，但可藉 PLS-DA 將四組樣品分組辨識。在含內標準物 (*in vitro* 合成之 AA-VAL-PTH) 之對照組圖譜中，則可辨識出母離子之 peak pairs ( $m/z$  306/311) 與其離子碎片之 peak pairs ( $m/z$  289/294)。

### 4.2. 展望

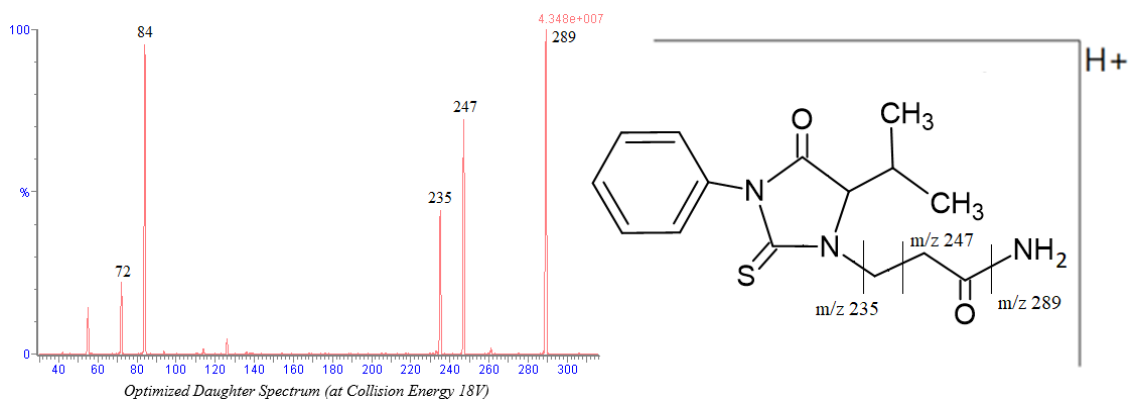
藉本次研究可體會，UPLC-MS 分析對於蛋白質體學有非常大的幫助，靈敏與精確的特性，能檢驗與定量出人體中非常微量的加成物分子；若使用高解析質譜儀與同位素化學標記法，則可快速篩出質量精確的未知加成物分子，後續發展亦是值得深加探究的。

遠程目標則可精進本文方法，進行研究如 case control study，觀察這些人體中之加成物，是否對生理造成影響，或是與特殊疾病有所關聯；另一方面，分析高解析質譜儀數據，解析分子結構，辨識出未知加成物之種類，進而探討異型生物質可能的來源。更進一步地，將成果運用在法醫毒物學上，提供客觀證據，證明異性生物質對人體的傷害，以及與死亡的因果關係。

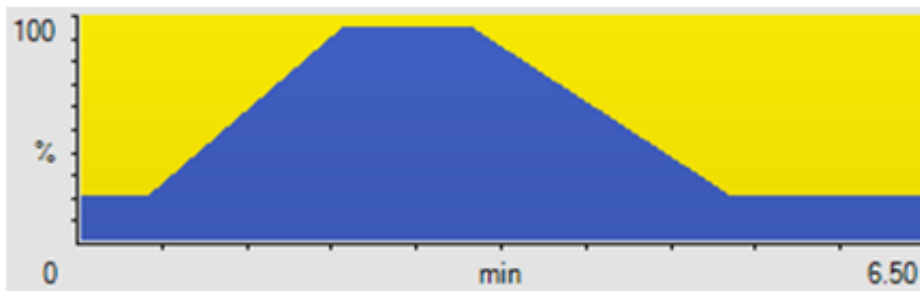
## Figures



圖一、非標定分析原理表示。血紅蛋白樣品以 PITC 與  $d_5$ -PITC 衍生後，得衍生物 PTH 與  $d_5$ -PTH derivatives。共同在高解析質譜儀下分析，可同時見 M 與 M+5 之訊號。設法找出所有衍生物 peak pairs，即可能為血紅蛋白加成物之分子，接著進行後續分析。（R1：形成加成物之親電小分子基團，R2： $C_6H_5$  或  $C_6D_5$ ）

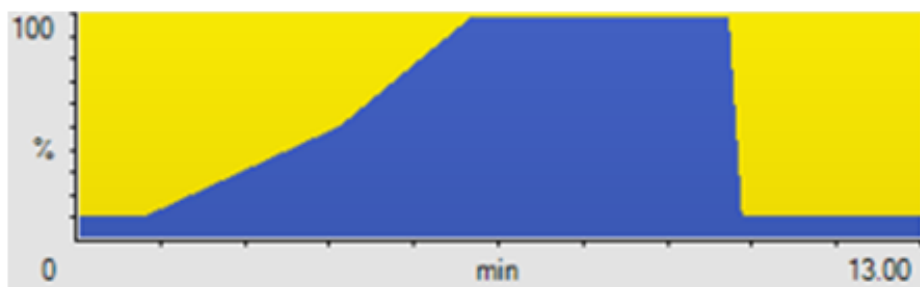


圖二、AA-VAL-PTH 裂解模式。AA-VAL-PTH ( $m/z=306$ )，在電噴灑游離法 (ESI) 正電模式下的碎片模式。撞擊電壓：18V。



Min	%B	Flow (mL/min)	Min	%B	Flow (mL/min)
0	20	0.3	3	95	0.3
0.5	20	0.3	5	20	0.3
2	95	0.3	6.5	20	0.3

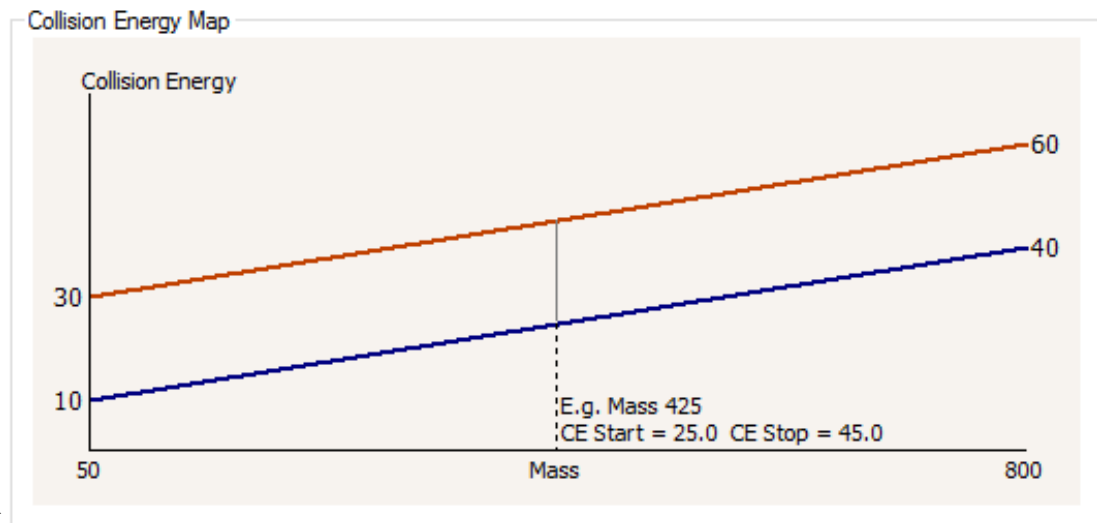
圖三、UPLC (in UPLC-QqQ-MS) 之移動相濃度梯度圖。



Min	%B	Flow (mL/min)	Min	%B	Flow (mL/min)
0	10	0.3	10	98	0.3
4	50	0.3	10.2	10	0.3
6	98	0.3	13	10	0.3

圖四、UPLC (in UPLC-Q-TOF-MS) 之移動相濃度梯度圖。





圖五、DDA 模式下，MS/MS 之撞擊電壓梯度圖（collision energy map）。



```
setwd(choose.dir()) ### set up working director
### import result table ###
mPKs=read.csv(choose.files(),header=T) ### column name must contain "mz", "rt" and "response"
B=A=mPKs

## parameters ##
mz.diff = 1.0063 ### H=>D; 1.0063
nN = 5 ### e.g.d5-PITC

rtT = 0.1 ##### RT tolerance
inTR = 0.1 ###
mz.low.cutoff = 50 ###
mz.high.cutoff = 800 ###
mzt = 0.001
#####

mzT = c(mz.diff * nN) * c(1-mzt, 1+mzt)
pair = matrix(0, nrow=nrow(mPKs), ncol=4)
pair[,1] = 1:nrow(mPKs)
PL = B[order(B[, "mz"]),]
PL = PL[PL[, "mz"]>=mz.low.cutoff,]
PL = PL[PL[, "mz"]<=mz.high.cutoff,]

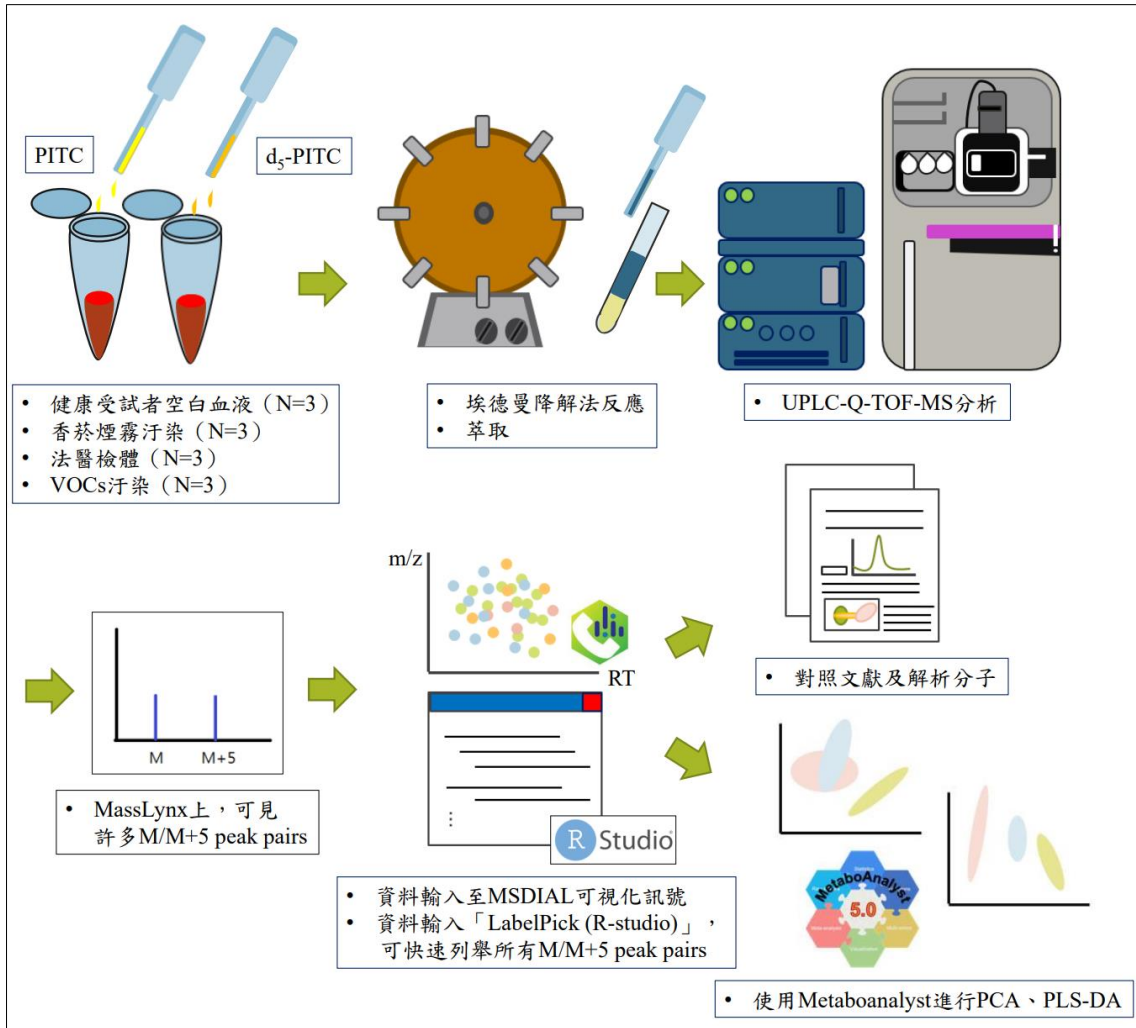
i1=i2=i3=i4=i5=0
for(i in 1:(nrow(PL)-1))
{
  if(i%%100==0) (print(i))
  for(j in (i+1):(nrow(PL)-1))
  {
    if(PL[j, "mz"] - PL[i, "mz"] < mzT[1]){
      i1 = i1+1
      next
    }else if(PL[j, "mz"] - PL[i, "mz"] > mzT[2]){
      i2=i2+1
      break
    }else if(abs(PL[j, "rt"] - PL[i, "rt"]) > rtT){
      i3=i3+1
      next
    }else if(min(PL[c(i, j), "response"])/mean(PL[c(i, j), "response"]) < inTR){
      i4=i4+1
      next
    }else if((PL[j, "rt"] - PL[i, "rt"]) > 0){
      i5=i5+1
      next
    }
    pair[i,2] = j;
    break
  }
}
index = pair[pair[,2]>0,]

windows(width=600,height = 500)
plot(PL[index[,1],c("rt", "mz")], pch=16, xlab="Retention Time", ylab="m/z")
points(PL[index[,2],c("rt", "mz")], pch=1, col=2)
legend("topright", c("Light", "Heavy"), pch=c(16,1),col=c(1,2),bty="n")
legend("topleft", paste("Peak pairs : ", nrow(index),sep=""))

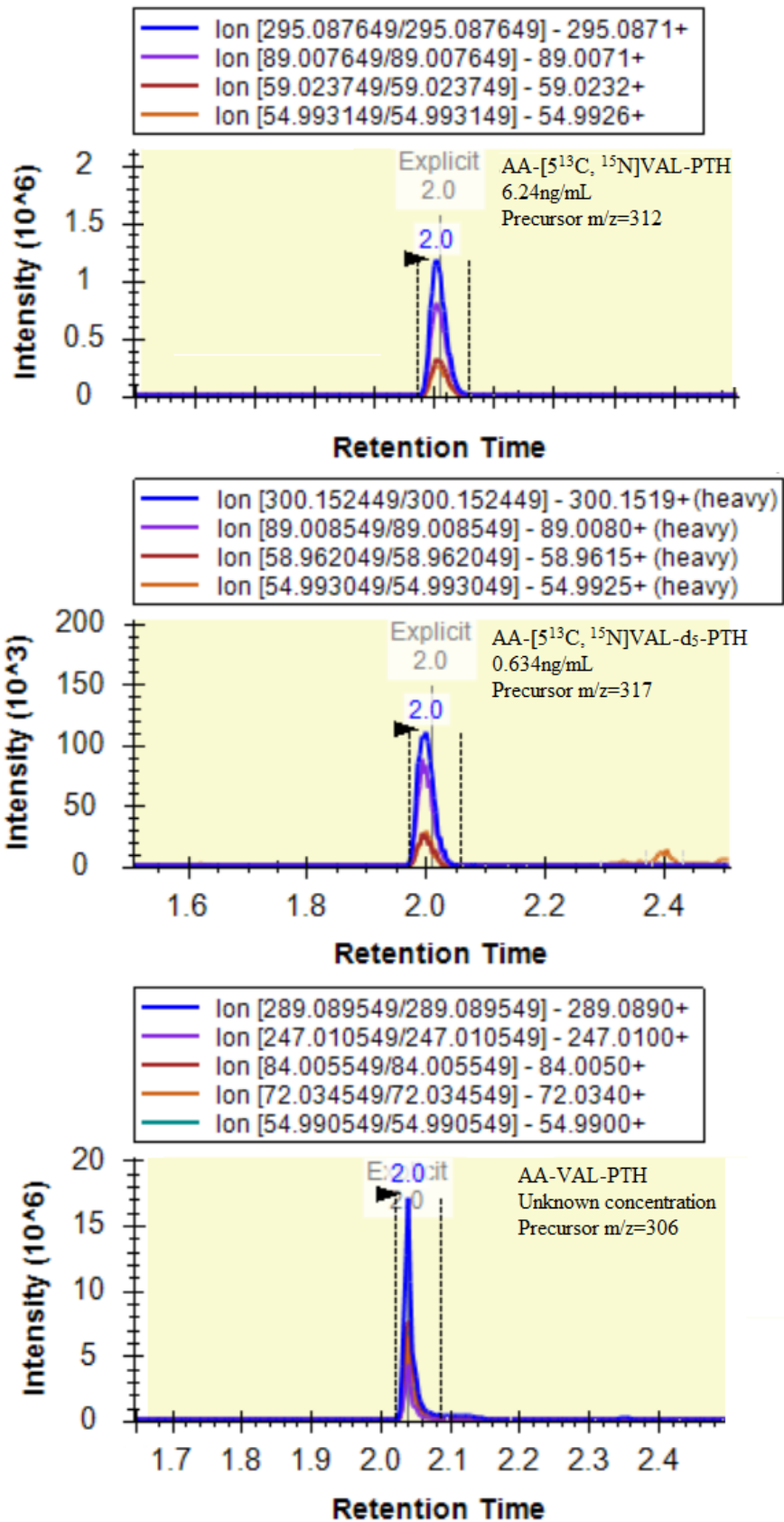
RR=log(PL[index[,2], "response"]/PL[index[,1], "response"],2)

PTab=cbind(PL[index[,1],c("rt", "mz")],PL[index[,2],c("rt", "mz")],RR)
colnames(PTab)=c("L_RT", "L_mz", "H_RT", "H_mz", "log2Fc")
write.csv(PTab,"PTab.csv")
```

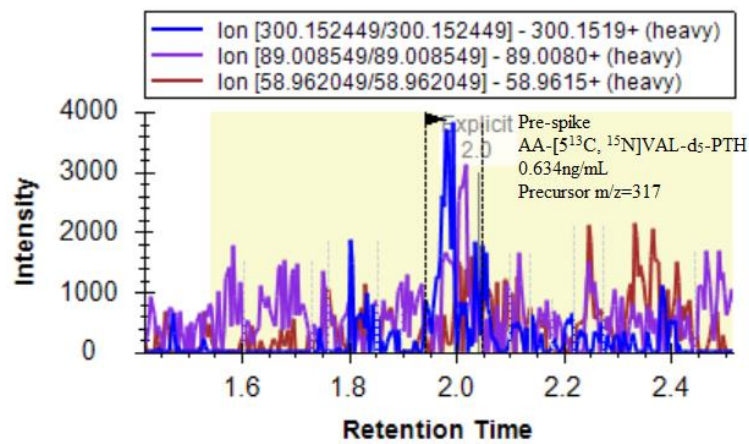
圖六、LabelPick 系統語言。



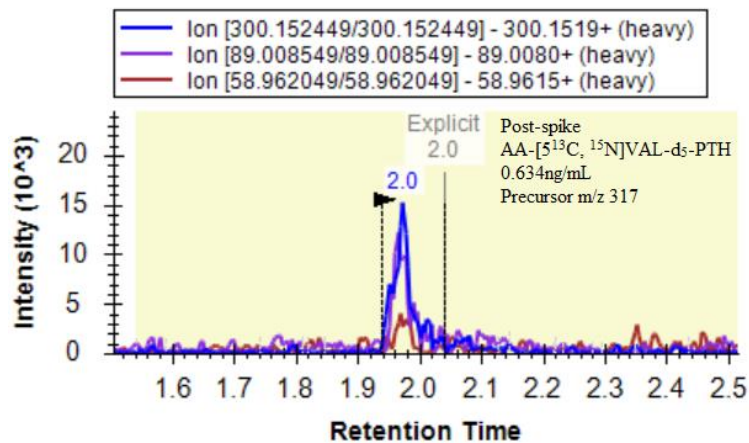
圖七、非標定分析總流程圖簡示。



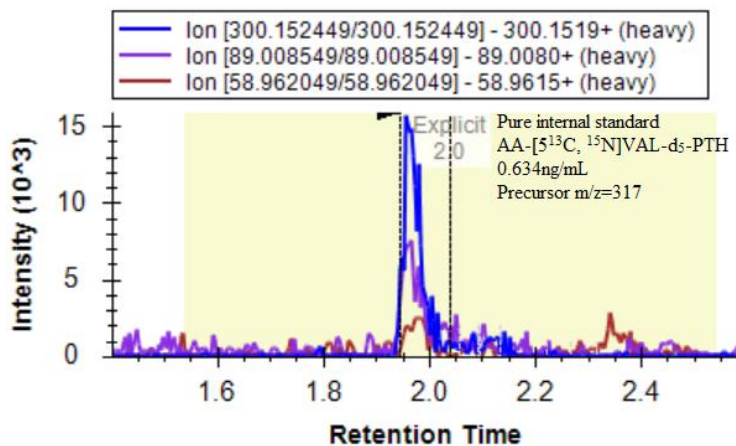
圖八、替代標準品、內標準品與 *in vitro* 合成之陽性對照品訊號圖。



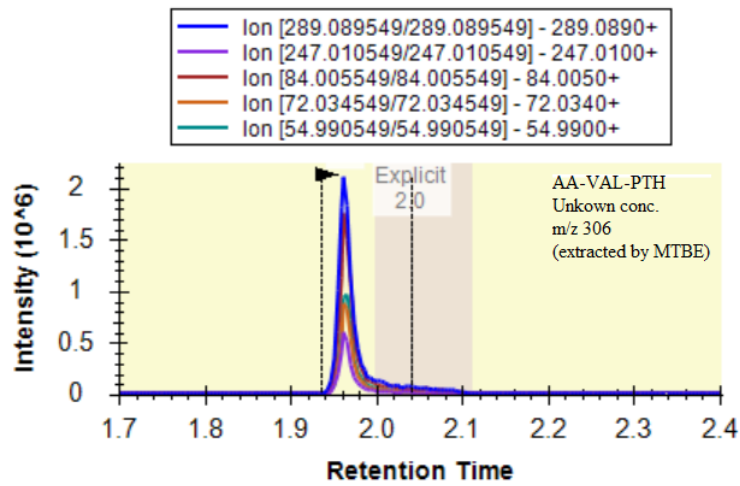
圖九、基質 pre-spike 內標準品之質譜圖。由圖見經 MTBE 萃取過後訊號不明顯(滯留時間約 1.97 分鐘)。



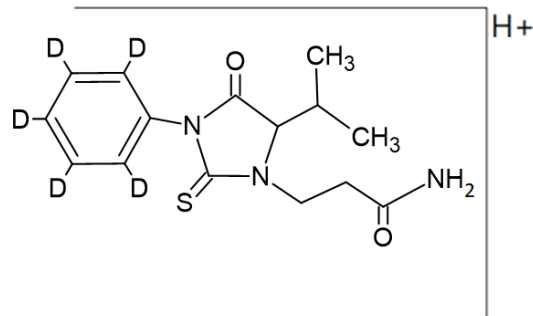
圖十、基質 post-spike 內標準品之質譜圖。由圖見在 MTBE 萃取後才加入內標準品，訊號較明顯(滯留時間約 1.97 分鐘)。



圖十一、純內標準品以 25% 甲醇稀釋。訊號較明顯(滯留時間約 1.97 分鐘)。



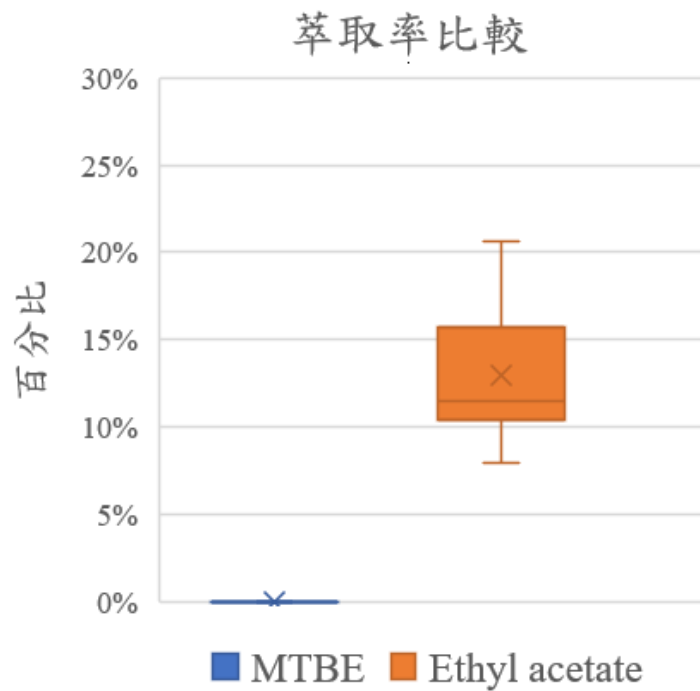
圖十二、由 MTBE 萃取出之 AA-VAL-PTH ( $m/z=306$ ) 訊號圖。



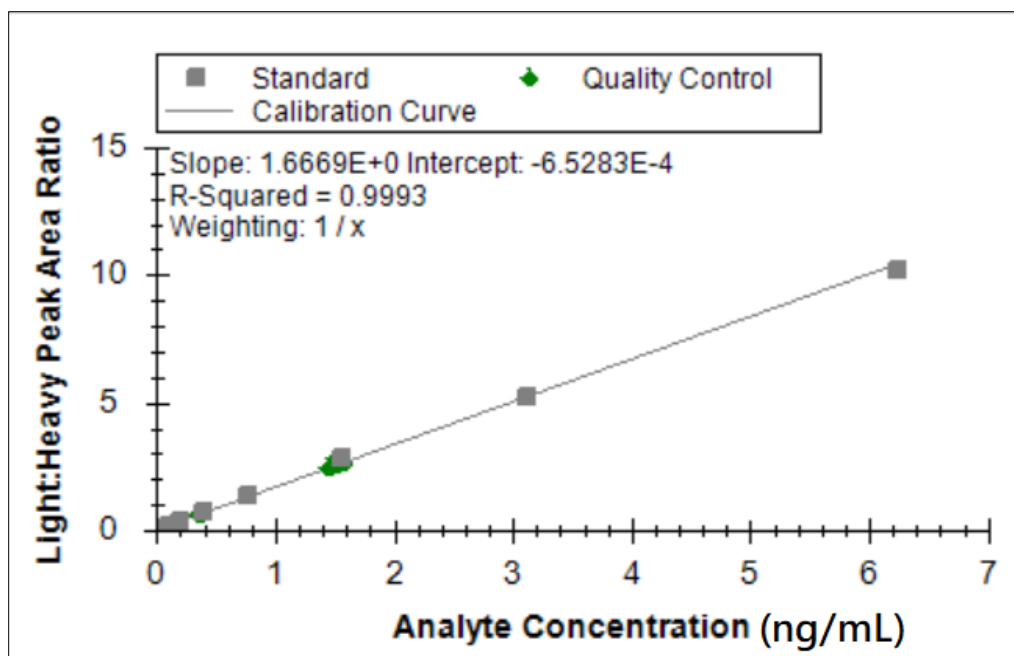
圖十三、Phenyl-D5 isothiocyanate 衍伸之 phenylthiohydantoin derivatives (即 AA-VAL-d<sub>5</sub>-PTH)。



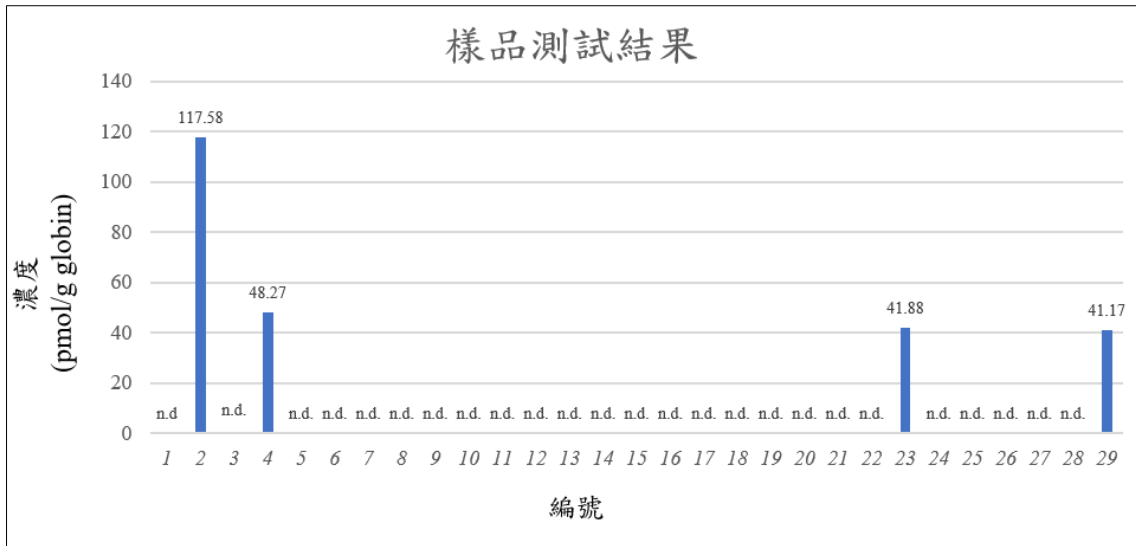
圖十四、萃取乳化現象。以 ethyl acetate 或 MTBE 萃取後，水層與透明有機層之間，存在半透明凝膠狀之難溶物質 (圓圈圈起處)。



圖十五、內標準品萃取率比較。MTBE 與 ethyl acetate 各萃取內標準品 10 次之萃取率比較。

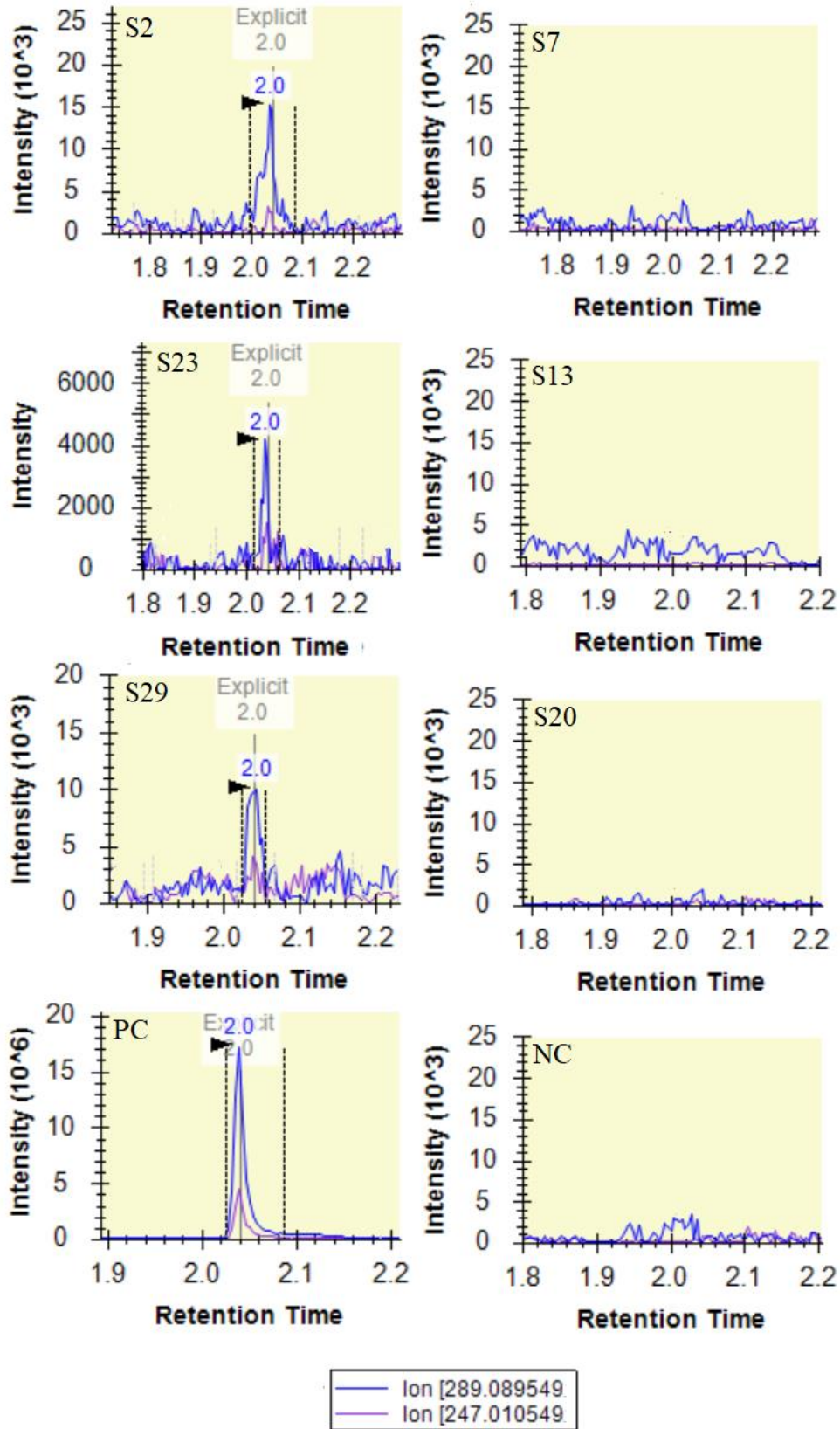


圖十六、acrylamide adduct (AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-PTH/AA-[ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]VAL-d<sub>5</sub>-PTH) 之檢量線。

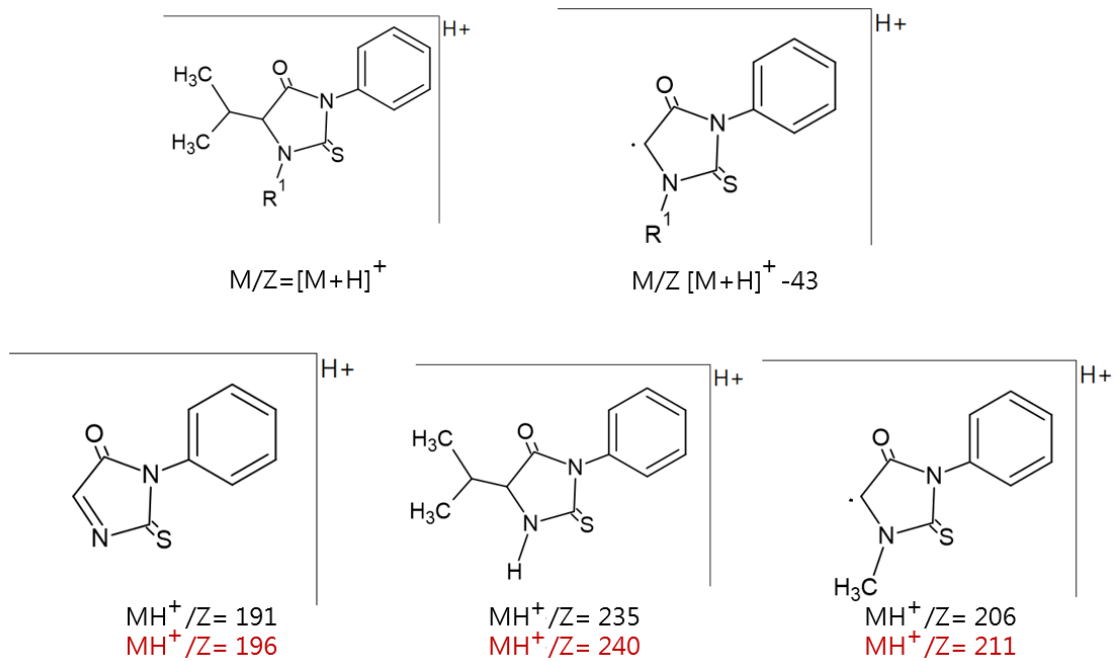


圖十七、臨床檢體 acrylamide adduct (AA-VAL-PTH) 濃度。

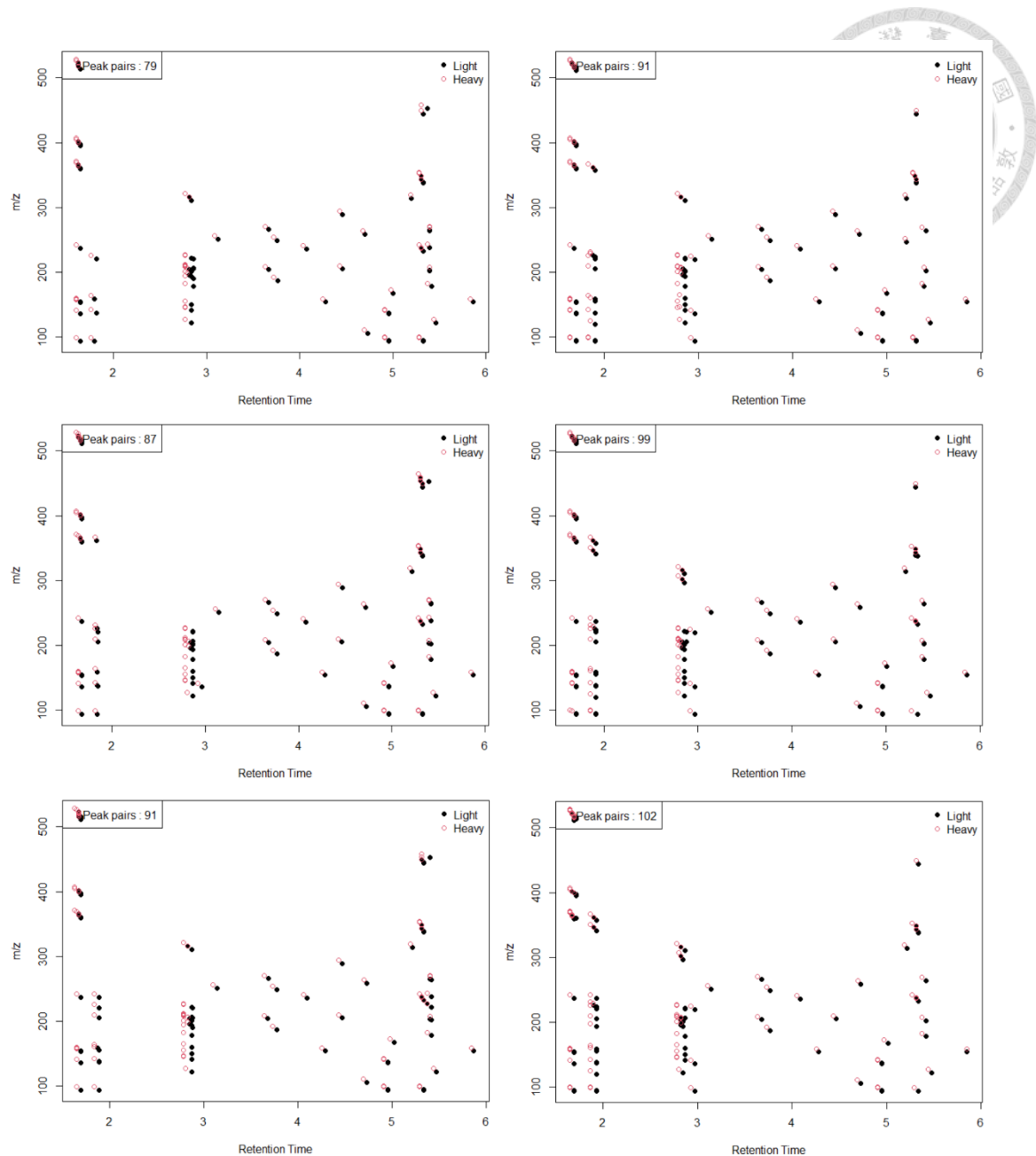




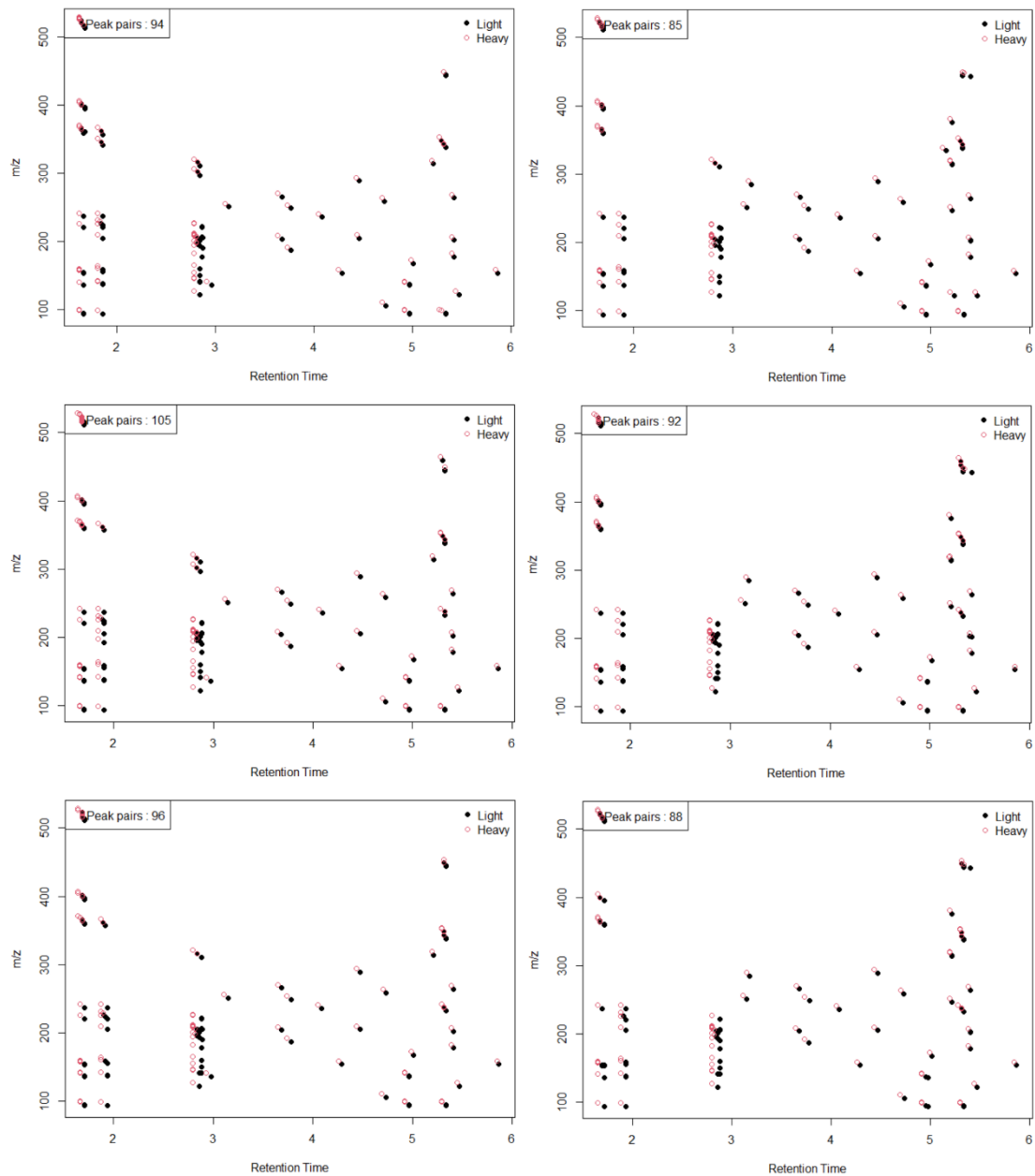
圖十八、Positive (左欄如 S2、S23、S29、PC) 對照 negative (右欄如 S7、S13、S20、NC) 結果。PC=positive control，NC=negative control。



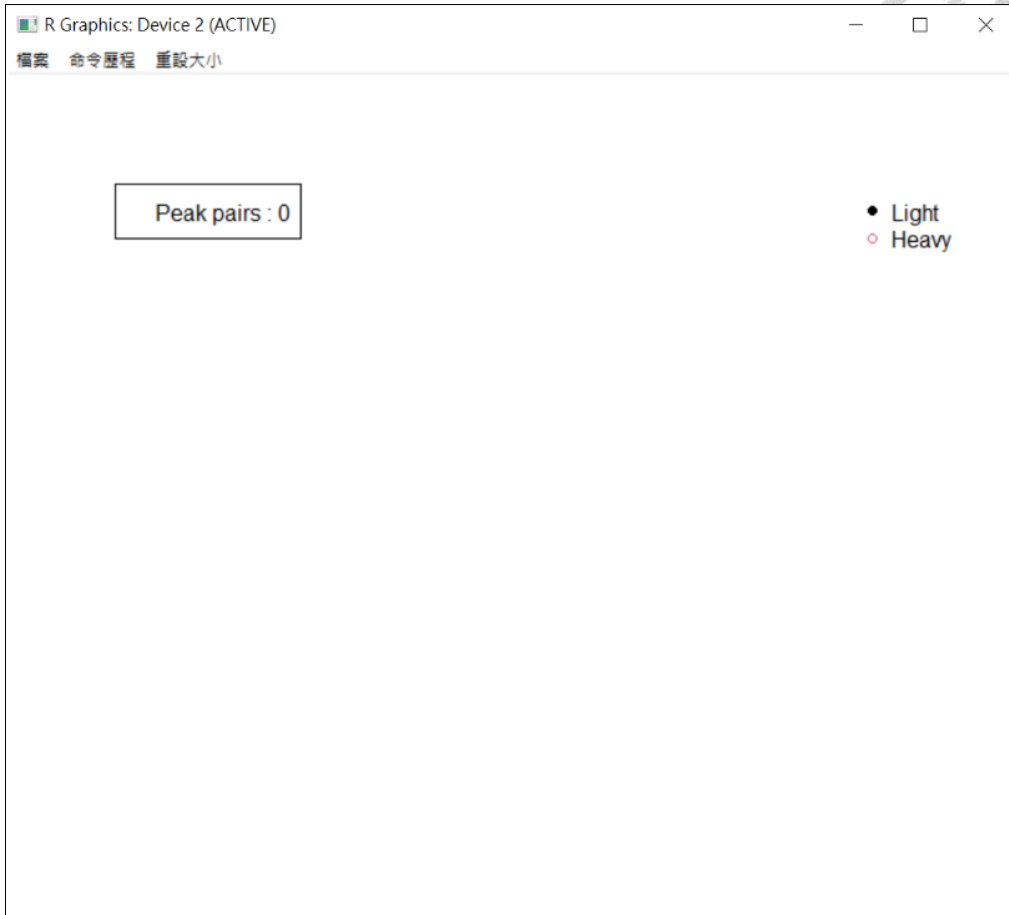
圖十九、診斷碎片示意圖。理想中，經血紅蛋白加成物由 PITC 衍生成 PTH 後，進入 MSMS 後可產生的診斷碎片 (diagnostic fragments)。上列黑字為  $d_0$ -PTH 之  $m/z$  值，下列紅字為  $d_5$ -PTH 之  $m/z$  值。診斷碎片本身也可為 peak pairs。



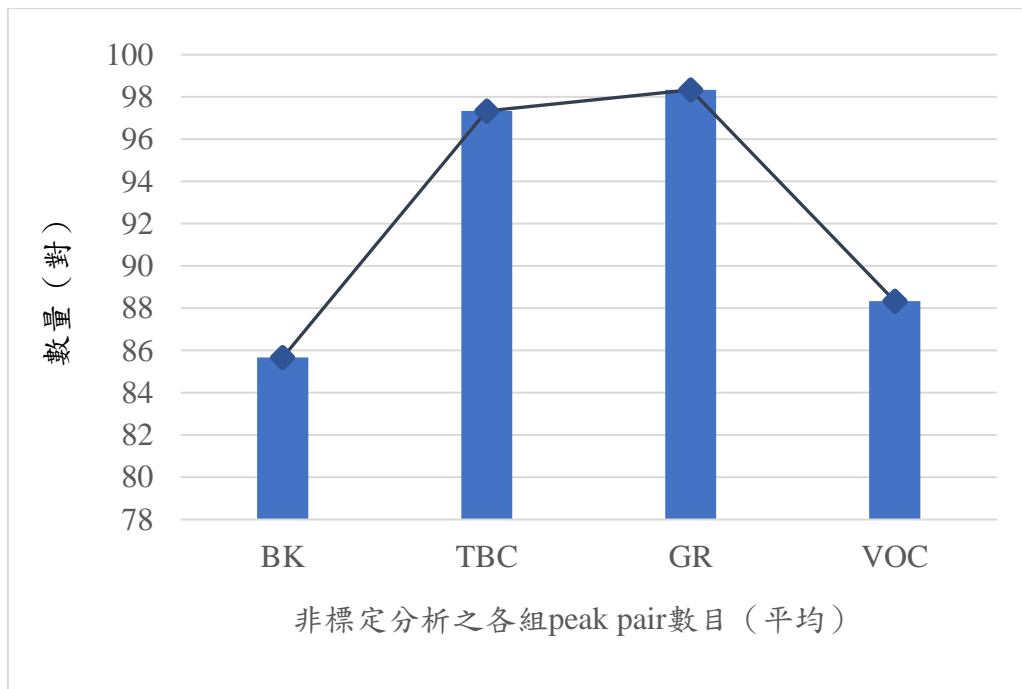
圖二十、Untargeted analysis 之 peak pair 分布圖(1)。左欄：對照檢體，右欄：遭香菸煙霧污染檢體。各測試三次之 peak pair 對數。對照檢體分別出現 79、87、91 對，遭香菸煙霧污染檢體分別出現 91、99、102 對。



圖二十一、Untargeted analysis 之 peak pair 分布圖(2)。左欄：法醫檢體，右欄：遭揮發有機氣體混合物污染檢體。各測試三次之 peak pair 對數。法醫檢體分別出現 94、105、96 對，遭揮發有機氣體混合物污染檢體分別出現 85、92、88 對。



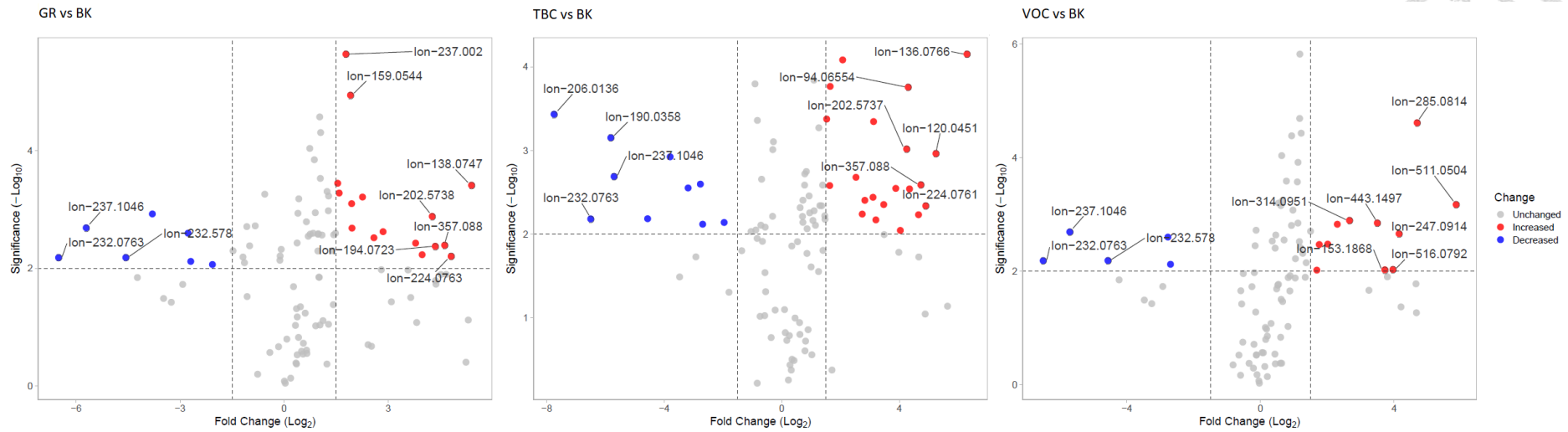
圖二十二、無基質時之沖洗背景 (solvent blank)。沒有出現任何 peak pairs。



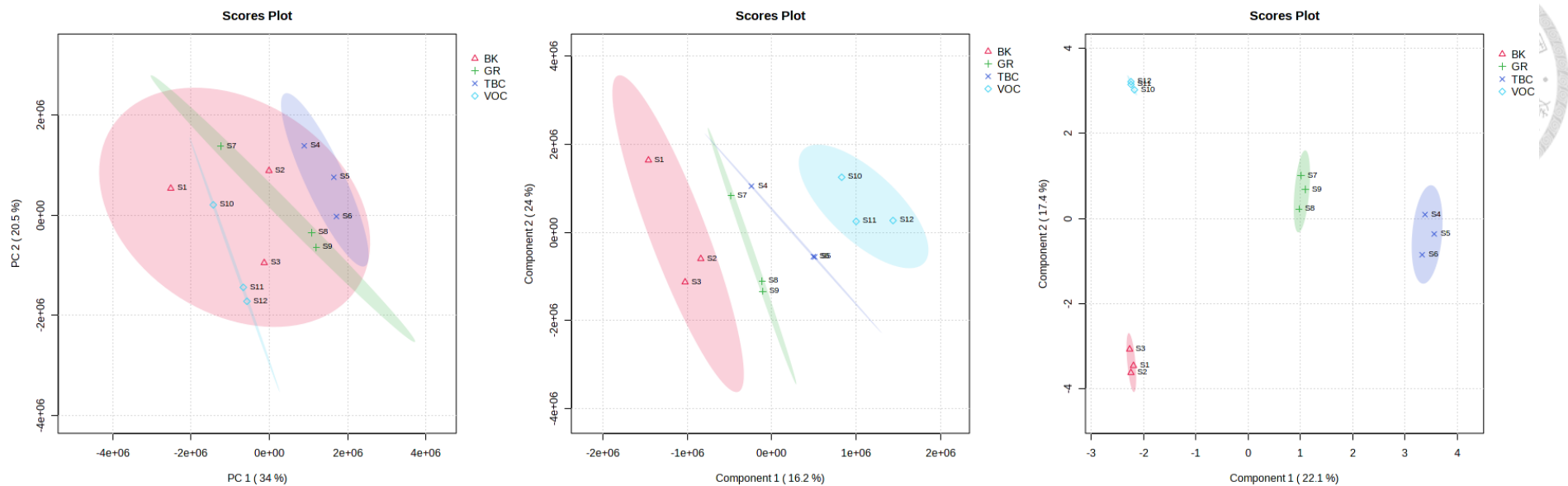
圖二十三、四組檢體 peak pair 平均數量圖。



圖二十四、四組檢體 peak pair m/z 分布圖。

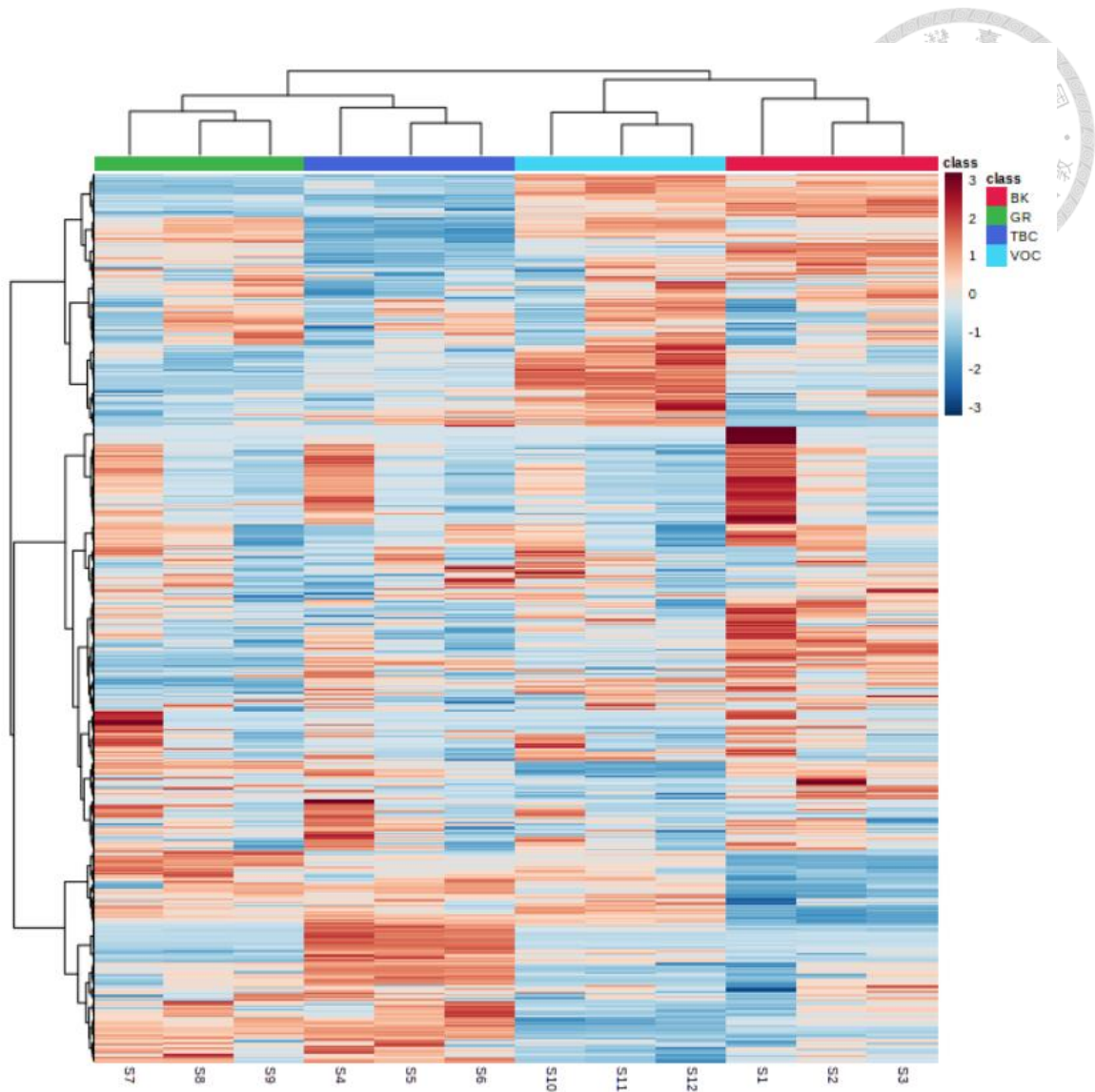


圖二十五、四組檢體比較之火山圖 (volcano plot)。左圖為法醫檢體比較對照檢體，中圖為香菸煙霧污染檢體比較對照檢體，右圖為揮發有機氣體混合物污染檢體比較對照檢體。座標橫軸為訊號強度之 fold change，縱軸為  $-\log P$  值，越往圖左、右上方者，表訊號強度相對越強，且有較顯著之差異。由圖可看出，三受污染檢體有較多 PTH 形成趨勢，可推測複雜成分顯著較多，與我們的期待相符。

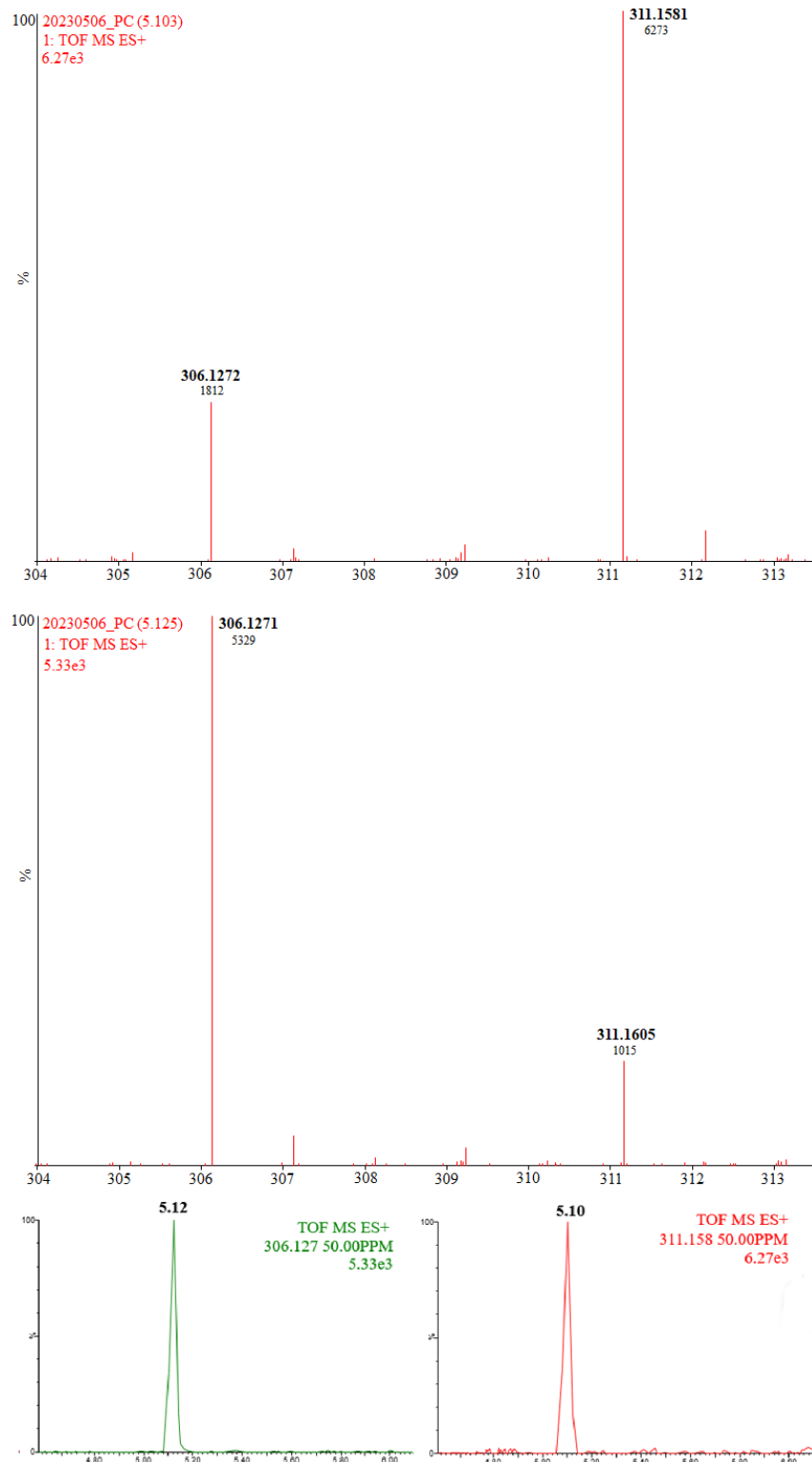


圖二十六、四組檢體 PCA 與 PLS-DA 圖。PCA 未能有效區別空白檢體組與其他三組污染檢體（左圖）。而 PLS-DA 則較能看出組間的差異，但組內差異仍大（中圖）；最後若使用 sPLS-DA 分析，因為減少部分變數（variables），所以較能分出四組間差異（右圖）。

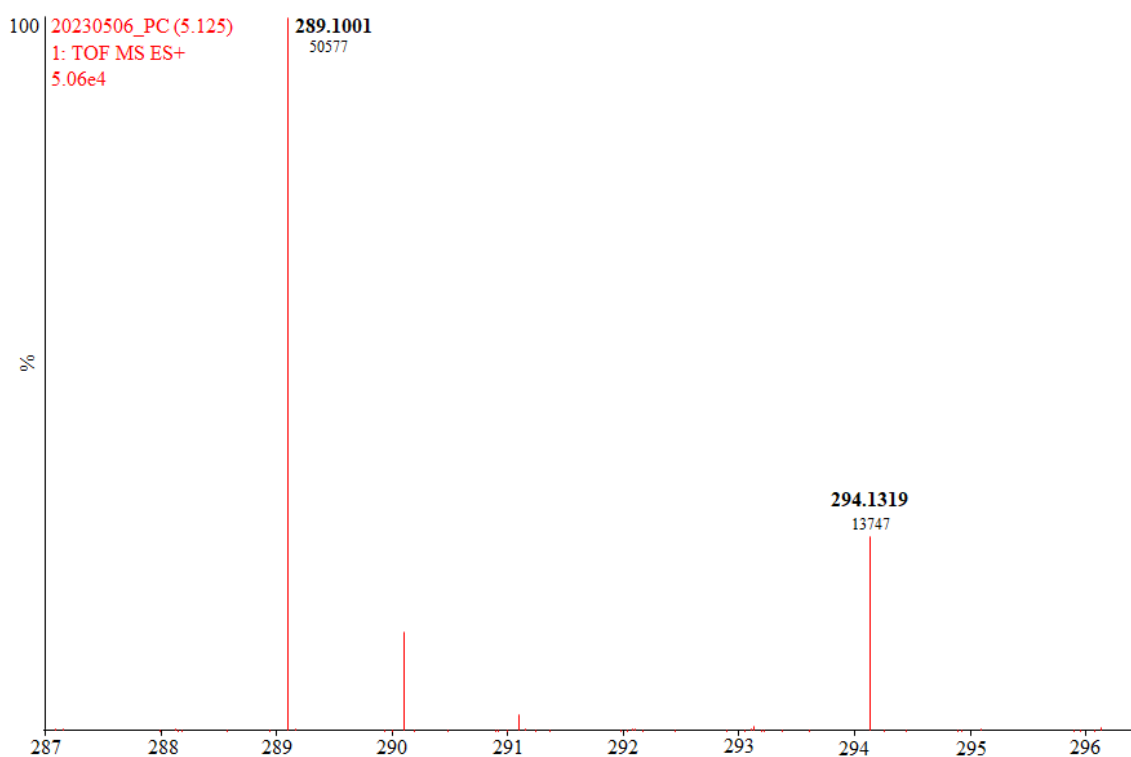
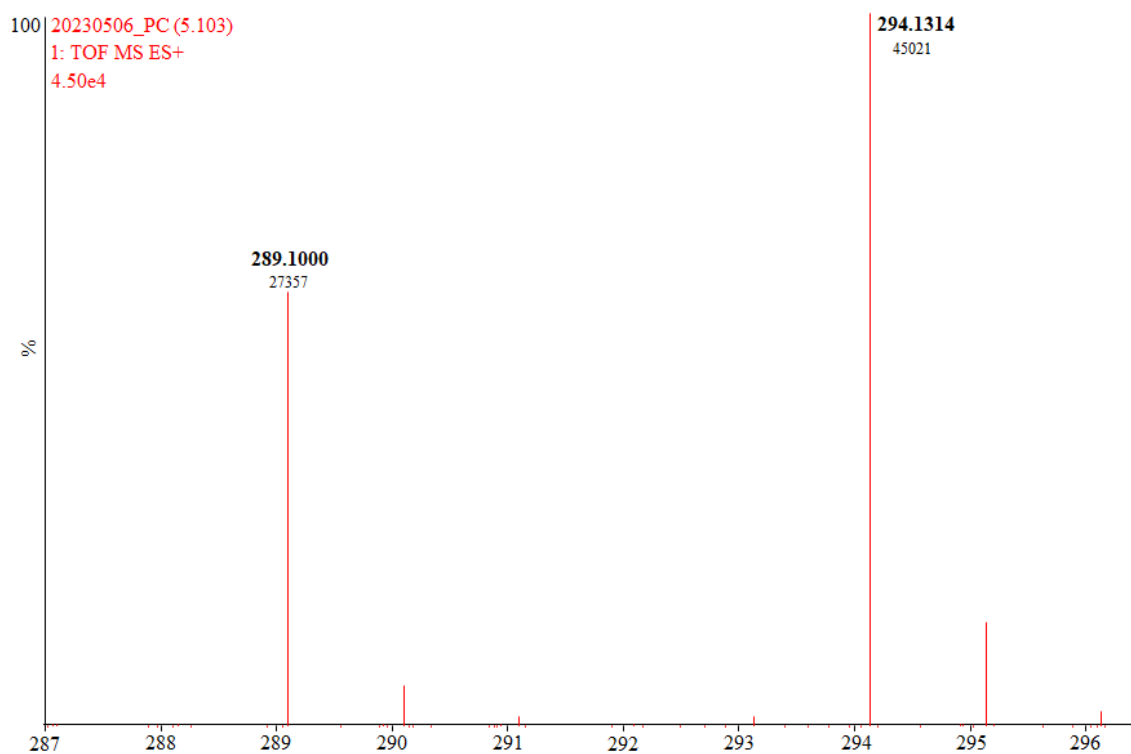




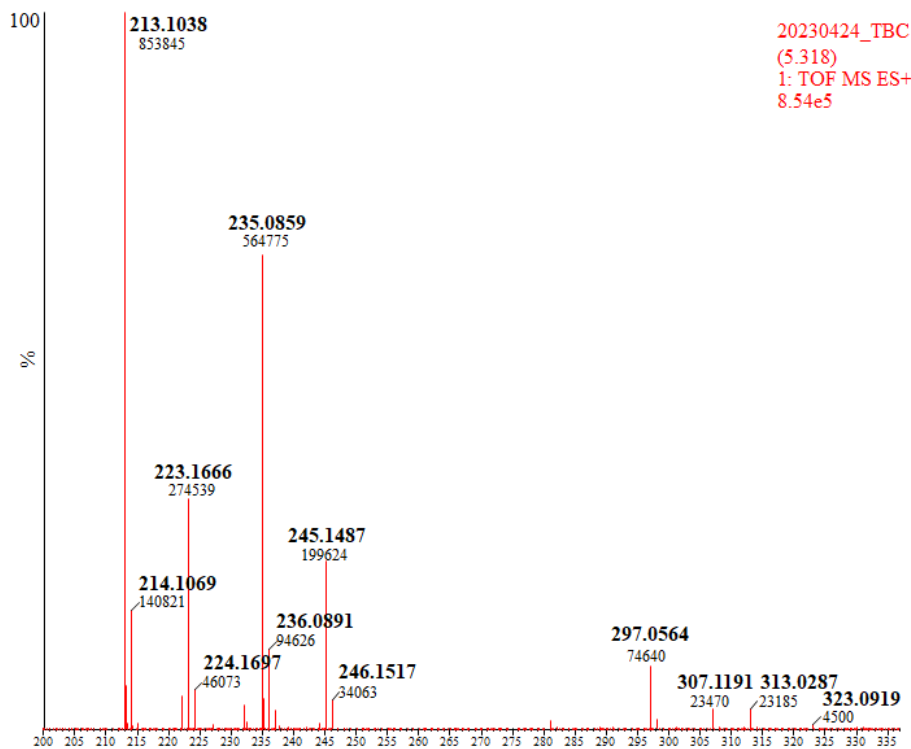
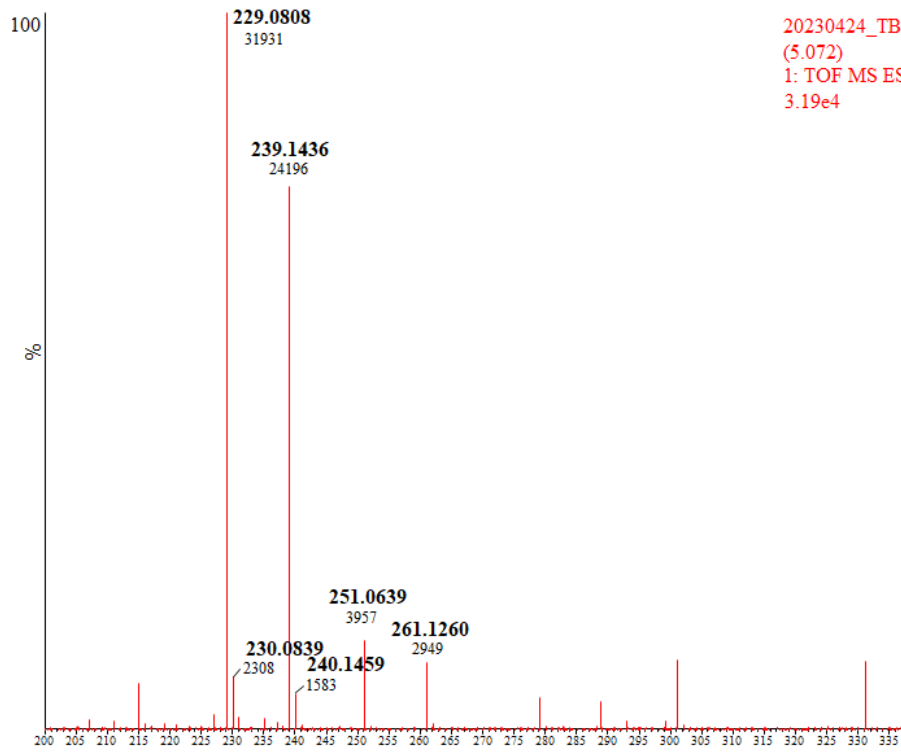
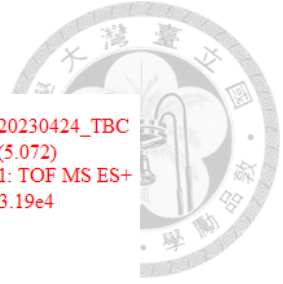
圖二十七、四組檢體之質譜分析熱圖。熱圖最上四欄色塊表示檢體種類，而每列則代表 DDA 模式下，產生的 m/z 值與其訊號強度。



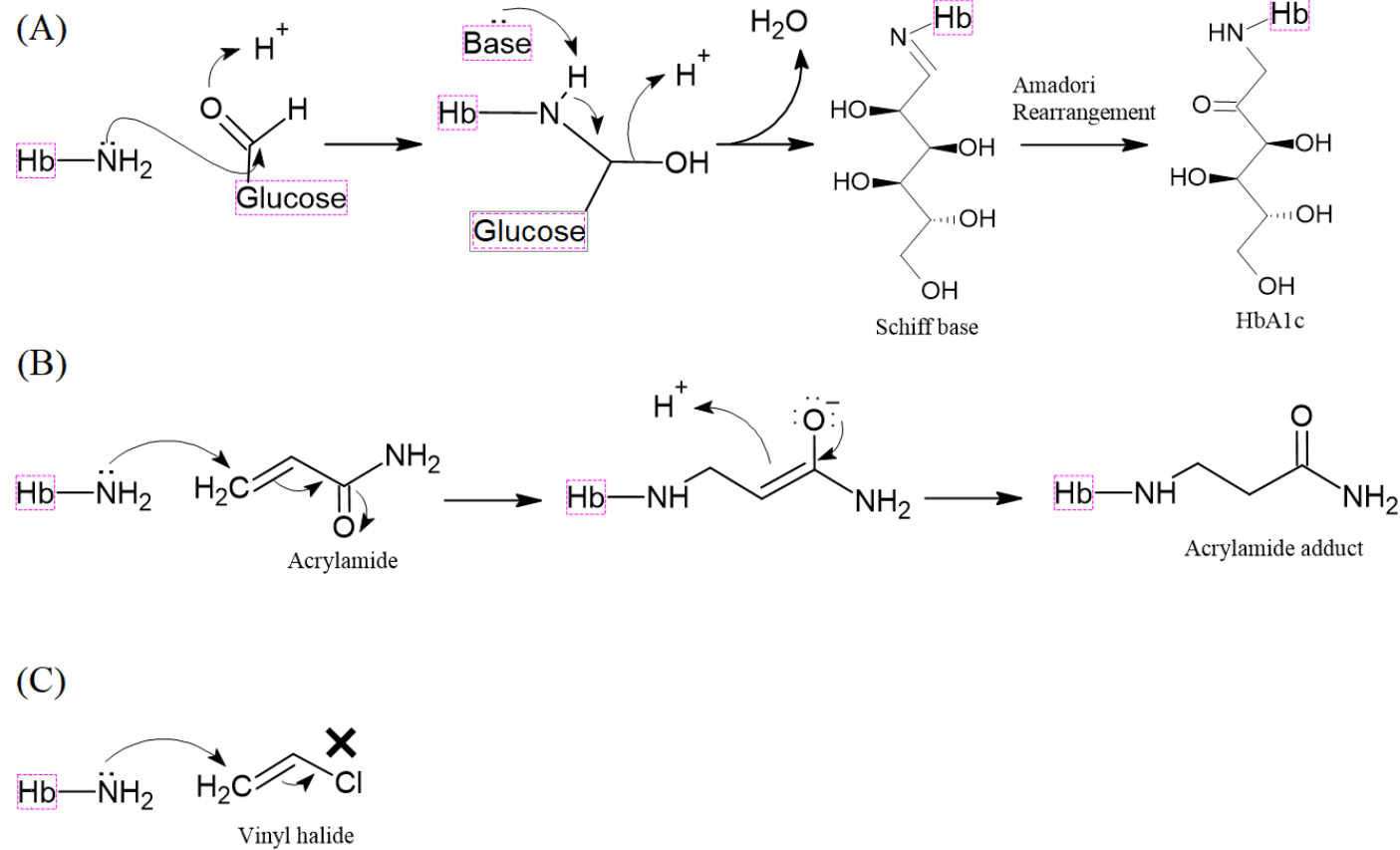
圖二十八、陽性對照組 306/311 peak pair。對照組（含內標準物（*in vitro* 合成之 acrylamide adducts）之血液檢體），可見在 HRMS MS screen 下，AA-VAL-PTH 與 AA-VAL-d<sub>5</sub>-PTH 之 peak pairs (m/z : 306.1271 at 5.125 min, 311.1581 at 5.103 min)。由於氘取代衍生物會較早出峰，所以不會在同時看見等強度之訊號。



圖二十九、陽性對照組 289/294 peak pair。承圖二十八，同時，可見 AA-VAL-PTH 與 AA-VAL-d<sub>5</sub>-PTH 之掉落 -NH<sub>3</sub> 之碎片 peak pairs (m/z : 289.1001 at 5.125 min , 294.1314 at 5.103 min) 。



圖三十、M/M+10 peak pairs。以香菸煙霧污染組為例，5.07 分鐘時可見 M/M+10 之 peak pairs 如 229/239、230/240、251/261 等（上圖）；5.318 分鐘時可見 213/223、214/224、235/245、236/246、297/307、313/323。並非只有 M/M+5 peak pairs 出現。



圖三十一、血紅蛋白加成物反應機構圖。(A)：希夫鹼生成反應 (Schiff base formation) 形成糖化血色素 (HbA1c)。(B)：麥克爾加成反應 (Michael addition reaction) 形成 acrylamide adduct。(C)：VOCs 中常有的 vinyl halide 結構，不能作為 Michael acceptor，無法進行麥克爾加成反應形成加成物。

## Tables

Benzene	Bromobenzene	Bromochloromethane
Bromodichloromethane	Bromoform	Butylbenzene
sec-Butylbenzene	tert-Butylbenzene	Carbon tetrachloride
Chlorobenzene	Chloroform	2-Chlorotoluene
4-Chlorotoluene	Dibromochloromethane	1,2-Dibromo-3-chloropropane
1,2-Dibromoethane	Dibromomethane	1,2-Dichlorobenzene
1,3-Dichlorobenzene	1,4-Dichlorobenzene	1,1-Dichloroethane
1,2-Dichloroethane	1,1-Dichloroethylene	cis-1,2-Dichloroethylene
trans-1,2-Dichloroethylene	Dichloromethane	1,2-Dichloropropane
1,3-Dichloropropane	2,2-Dichloropropane	1,1-Dichloro-1-propene
cis-1,3-Dichloropropene	trans-1,3-Dichloropropene	Ethylbenzene
Hexachloro-1,3-butadiene	Cumene	p-Cymene
Naphthalene	Propylbenzene	Styrene
1,1,1,2-Tetrachloroethane	1,1,2,2-Tetrachloroethane	Tetrachloroethylene
Toluene	1,2,3-Trichlorobenzene	1,2,4-Trichlorobenzene
1,1,1-Trichloroethane	1,1,2-Trichloroethane	Trichloroethylene
1,2,3-Trichloropropane	1,2,4-Trimethylbenzene	Mesitylene
m-Xylene	p-Xylene	o-Xylene

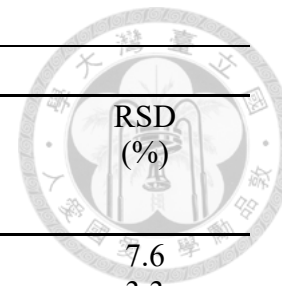
表一、Volatiles organic calibration mix 組成。

	AA-[ <sup>5</sup> 13C, <sup>15</sup> N]VAL-PTH	AA-[ <sup>5</sup> 13C, <sup>15</sup> N]VAL-d <sub>5</sub> -PTH
Transitions (Parent m/z→ daughter m/z)	312.1381→54.9926	317.1381→54.9925
	312.1381→59.0232	317.1381→58.9615
	312.1381→89.0071	317.1381→89.0080
	312.1381→295.0871	317.1381→300.1519
Cone voltage (eV)	26	30
Collision energy (eV)	8-50	10-42

表二、標準品 AA-[<sup>5</sup>13C, <sup>15</sup>N]VAL-PTH 與內標準品 AA-[<sup>5</sup>13C, <sup>15</sup>N]VAL-d<sub>5</sub>-PTH 之離子碎片表。

ID	conc.(g/dL)	ID	conc.(g/dL)
1	9.64	16	10.52
2	10.76	17	12.32
3	13.72	18	13.8
4	13.64	19	12.16
5	14.48	20	13.52
6	14.48	21	12.08
7	12.76	22	14.32
8	13.28	23	13
9	10.88	24	11.16
10	11.12	25	13.76
11	13.24	26	10.84
12	13.88	27	10.84
13	13.56	28	13.92
14	12.4	29	14.36
15	12.32	PC	13.2

表三、臨床檢體之血紅蛋白定量濃度。



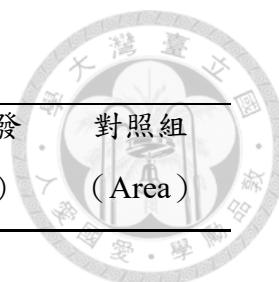
Sample ID	Theoretical concentration (ng/mL)	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=15)		
		Calculated concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	RSD (%)	Calculated concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	RSD (%)
LQC	0.0975	0.0964±0.0129	98.8	3.4	0.0975±0.0151	100	7.6
MQC	0.390	0.373±0.015	95.7	2.8	0.374±0.033	96.0	3.3
HQC	1.56	1.51±0.07	96.6	8.3	1.51±0.07	96.9	2.9

表四、再現性試驗結果。

	第一次	第二次	第三次	異於對照檢體 peak pair 數
對照檢體 (BK)	79 (35)	87 (40)	91 (41)	-
香菸煙霧 (TBC)	91 (36)	99 (40)	102 (44)	22 (11)
法醫檢體 (GR)	94 (40)	105 (47)	96 (39)	22 (11)
揮發有機氣體混合物 (VOC)	85 (39)	92 (42)	88 (38)	9 (6)

表五、四組檢體所產生之 peak pair 數 (分子量>235 之 peak pair 數)。

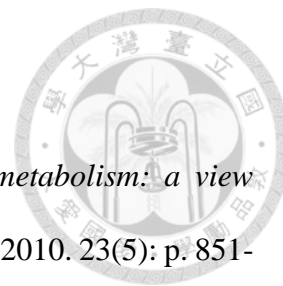




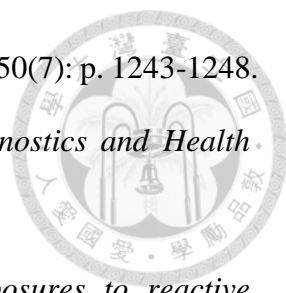
發現分子 (m/z)	空白檢體 (Area)	香菸煙霧 (Area)	長庚綠血 (Area)	有機揮發 (Area)	對照組 (Area)
已知結構 (known)					
249	6035.97	15942.87	15768.51	13882.88	4809.21
263	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
279	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
288	8308.41	4168.91	4662.99	6962.9	n.d.
305	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
306	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>9415.16</b>
322	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
未知結構 (unknown)					
266	5084.52	12099.12	7937.4	9677.28	4894.38
293	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
307	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
307	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
319	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
321	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
323	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52310.9
326	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
339	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
341	n.d.	15720.7	12315.46	n.d.	n.d.
361	39778.82	61306.16	74793.45	60461.72	n.d.
363	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
371	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
377	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

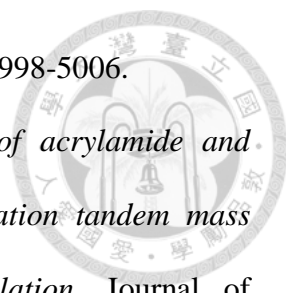
表六、實驗結果與 Carlsson, H. 等人研究[27]發現之血紅蛋白加成物比較。可能基於檢測方法不同，大部分他們有找到的，本研究都沒有測出。對照組為含 *in vitro* 合成之 AA-VAL-PTH 之檢體。已知的血紅蛋白加成物 m/z 值分別為：249 (Methyl)、263 (Ethyl)、279 (Ethylene oxide)、288 (Acrylonitrile)、305 (Methyl vinyl ketone)、306 (Acrylamide)、322 (Glycidamide)。

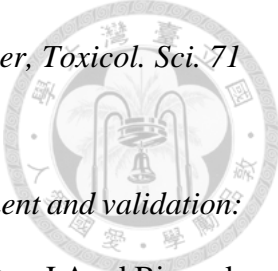
## References

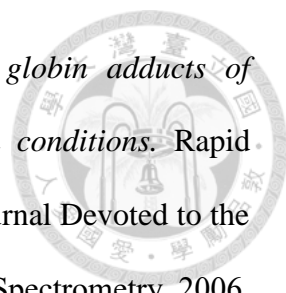


1. Patterson, A.D., F.J. Gonzalez, and J.R. Idle, *Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer*. *Chemical research in toxicology*, 2010. 23(5): p. 851-860.
2. Idle JR, G.F., *Metabolomics*. *Cell Metab.* , 2007: p. 348–351.
3. Jobin, P., H. Chen, and Y.-p. Lin, *Translating Toxic Exposure: Taiwan RCA*. Toxic News, 2018.
4. Pei, X., et al., *The China melamine milk scandal and its implications for food safety regulation*. *Food policy*, 2011. 36(3): p. 412-420.
5. Chen, B., et al., *A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019. 411: p. 3405-3415.
6. Kolars, J.C., et al., *Aflatoxin B1-adduct formation in rat and human small bowel enterocytes*. *Gastroenterology*, 1994. 106(2): p. 433-439.
7. IARC, IARC, *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals*, vol. 60, Lyon, 15–22 February, 1994, pp 389–433.
8. Ishii, Y., et al., *Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung*. *Mutagenesis*, 2015. 30(2): p. 227-235.
9. Rahbar, S., *The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005. 1043(1): p. 9-19.
10. John, G. and E. English, *IFCC standardised HbA1c: should the world be as one?*

- 
- Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2012. 50(7): p. 1243-1248.
11. Rydosz, A., *Diabetes Without Needles: Non-invasive Diagnostics and Health Management*. 2022: Academic Press.
  12. Rappaport, S.M., et al., *Adductomics: characterizing exposures to reactive electrophiles*. Toxicology letters, 2012. 213(1): p. 83-90.
  13. Carlsson, H. and M. Törnqvist, *Strategy for identifying unknown hemoglobin adducts using adductome LC-MS/MS data: Identification of adducts corresponding to acrylic acid, glyoxal, methylglyoxal, and 1-octen-3-one*. Food and Chemical Toxicology, 2016. 92: p. 94-103.
  14. Fennell, T.R., et al., *Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans*. Toxicological Sciences, 2005. 85(1): p. 447-459.
  15. Smith, J.B., *Peptide sequencing by Edman degradation*. eLS, 2001.
  16. Costa, L.G., et al., *Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: behavioral, neurochemical and morphological studies*. Toxicology, 1995. 98(1-3): p. 151-161.
  17. Riboldi, B.P., Á.M. Vinhas, and J.D. Moreira, *Risks of dietary acrylamide exposure: A systematic review*. Food chemistry, 2014. 157: p. 310-322.
  18. Hagmar, L., et al., *Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose*. Scandinavian journal of work, environment & health, 2001: p. 219-226.
  19. Hagmar, L., et al., *Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2005. 580(1-2): p. 157-165.
  20. Tareke, E., et al., *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*.

- 
- Journal of agricultural and food chemistry, 2002. 50(17): p. 4998-5006.
21. Chevolleau, S., et al., *Analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, as exposure biomarkers in French population.* Journal of Chromatography A, 2007. 1167(2): p. 125-134.
  22. Barceló, D. and M. Petrovic, *Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. 26(1): p. 2-11.
  23. Waters™. 2023, *UPLC 初學者指南*, Retrieved May 27, 2023, from <https://www.waters.com/nextgen/tw/zh/education/primers/beginner-s-guide-to-uplc.html>.
  24. Waters™. 2023, *Xevo TQ-S Micro 三段四極桿質譜儀*, Retrieved May 27, 2023, from: [https://www.waters.com/waters/zh\\_TW/Xevo-TQ-S-micro-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134798856&locale=zh\\_TW](https://www.waters.com/waters/zh_TW/Xevo-TQ-S-micro-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134798856&locale=zh_TW).
  25. Ogawa, M., et al., *Hemoglobin adducts as a marker of exposure to chemical substances, especially PRTR class I designated chemical substances.* Journal of occupational health, 2006. 48(5): p. 314-328.
  26. Balbo, S., et al., *Application of a high-resolution mass-spectrometry-based DNA adductomics approach for identification of DNA adducts in complex mixtures.* Analytical chemistry, 2014. 86(3): p. 1744-1752.
  27. Carlsson, H., et al., *LC–MS/MS screening strategy for unknown adducts to N-terminal valine in hemoglobin applied to smokers and nonsmokers.* Chemical research in toxicology, 2014. 27(12): p. 2062-2070.
  28. Zhao, S. and L. Li, *Chemical isotope labeling LC-MS for metabolomics.* Cancer Metabolomics: Methods and Applications, 2021: p. 1-18.

- 
29. T.R.Fennell, *T.R. Fennell, R.W. Snyder, W.L. Krol, S.C. Sumner, Toxicol. Sci.* 71 (2003) 164.
30. Meesters, R. and S. Voswinkel, *Bioanalytical method development and validation: from the USFDA 2001 to the USFDA 2018 guidance for industry.* J Appl Bioanal, 2018. 4(3): p. 67-73.
31. Schettgen, T., et al., *Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population.* International journal of hygiene and environmental health, 2004. 207(6): p. 531-539.
32. von Stedingk, H., et al., *Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide, and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark.* Chemical research in toxicology, 2011. 24(11): p. 1957-1965.
33. Yamamoto, J., et al., *Acrylamide–Hemoglobin Adduct Levels in a Japanese Population and Comparison with Acrylamide Exposure Assessed by the Duplicated Method or a Food Frequency Questionnaire.* Nutrients, 2020. 12(12): p. 3863.
34. Bjellaas, T., et al., *Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide.* Toxicological sciences, 2007. 98(1): p. 110-117.
35. Bergmark, E., *Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers.* Chemical research in toxicology, 1997. 10(1): p. 78-84.
36. Schettgen, T., et al., *A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany.* International journal of hygiene and environmental health, 2003. 206(1): p. 9-14.

- 
37. Vesper, H.W., et al., *Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 2006. 20(6): p. 959-964.
38. Xie, J., et al., *Acrylamide hemoglobin adduct levels and ovarian cancer risk: a nested case-control study*. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 2013. 22(4): p. 653-660.
39. Shimamura, Y., et al., *Factors Influencing the Formation of Chemical-Hemoglobin Adducts*. *Toxics*, 2021. 10(1): p. 2.
40. Fennell, T.R. and M.A. Friedman. *Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents*. in *Chemistry and Safety of Acrylamide in food*. 2005. Springer.
41. Besaratinia, A. and G.P. Pfeifer, *Genotoxicity of acrylamide and glycidamide*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004. 96(13): p. 1023-1029.
42. Bryant, M.S., et al., *Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. 85(24): p. 9788-9791.
43. Fennell, T.R., et al., *Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: effects of glutathione S-transferase T1-null and M1-null genotypes*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000. 9(7): p. 705-712.
44. Törnqvist, M., *Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during strong of blood samples*. *Carcinogenesis*, 1990. 11(1): p. 51-54.