

國立台灣大學醫學院臨床藥學研究所

碩士論文

指導教授：何蘊芳 博士

李旺祚 博士



Tetrahydrobiopterin 測定方法之建立及其
於發育遲緩兒童腦脊髓液含量探討

研究生：林怡君 撰

中華民國九十五年三月



特別致謝

感謝財團法人罕見疾病基金會給予本論文的獎助，本論文獲得第六屆（93 年）博碩士論文獎助學金，在此特別表達感謝之意。



致謝

由衷的感謝在我研究生三年生活當中曾經給予我幫助的每一個人！

感謝給予論文上指導的何蘊芳老師、李旺祚醫師、蔡東湖老師；感謝在研一時指導學生的所有老師、醫師和藥師前輩們在實習方面的指導與提醒，以及課業上面的教授，臨藥所就學期間真的學到了許多的知識，是我人生中學習最豐富的時刻。

感謝臨藥所一起成長的同學，辛苦的研究生活中如果沒有你們的陪伴與提醒，我想我會走得更加辛苦。

感謝親愛的家人在我延畢這一年給予的支持，雖然每次打電話回家都會被問到底哪時候畢業；感謝親愛的程翔對我的包容與鼓勵。

最後要感謝在實驗上曾經給予我幫助的所有人，包括教我做實驗的黃大剛學長、幫我做 LC/MS-MS 實驗的中國醫藥研究所吳育澤同學、收檢體時常幫助我的緊急檢驗室簡組長、借機器給我做實驗的林慧玲老師家助理以及李旺祚醫師家助理惠而。

有了以上各位的幫助與支持我才能順利的畢業於台大臨床藥學所，心中只有無限的感激。

摘要

Tetrahydrobiopterin (BH_4) 屬人體之內生性物質，其重要生理功能之一係做為體內某些胺基酸代謝所需之輔酶，參與神經傳導物質 dopamine 與 serotonin 生合成之過程，缺乏時將會導致體內特定胺基酸與神經傳導物質 dopamine、serotonin 平衡失調，稱為 tetrahydrobiopterin 缺乏症 (tetrahydrobiopterin deficiency, BH_4 deficiency)。Tetrahydrobiopterin 缺乏症為國內衛生署公告罕見疾病之一，臨床上和幼童發育遲緩有密切之關係，早期的診斷與治療對病患相當大的助益。目前國內臨床上尚無常規直接檢測腦脊髓液中 pterins 相關物質含量之措施，本研究擬以高效液相層析法及液相層析串聯質譜分析方法，期建立適當的分析條件，以應用於病患腦脊髓液檢體之檢測。

本研究探討不同緩衝溶液、pH 值及流速對高液相層析方法分離效果之影響；並將電化學提供電位由低至高尋找出最適宜偵測 BH_4 之電位。液相層析串聯質譜方法則依據化合物之分子量，設定適當之參數測量。

本研究所建立分析 pterins 之方法可分為三個部份：

第一部份以高效液相層析法同時測定 neopterin 與 biopterin：分析使用 5 μm 逆相碳 18 管柱 (150 $\times$ 4.6 mm I.D.)，移動相為 5 mM 檸檬酸緩衝溶液，

pH 調整為 5.2，螢光偵測設定激發波長 350 nm，放射波長 448 nm，流速為 0.5 mL/min。偵測極限可達 200 pg (20 nM, 5 ng/mL, 40 μ L)。

第二部分仍以高效液相層析法測定 BH₄：分析使用 5 μ m 逆相碳 18 管柱 (150 $\times$ 4.6 mm I.D.)，移動相為 10 mM 磷酸緩衝溶液，pH 調整為 2.5，電化學偵測設定 700 mV，流速 0.4 mL/min。偵測極限可達 80 pg (6.4 nM, 2 ng/mL, 40 μ L)。

第三部份為以液相層析串聯質譜儀方法同時測定 neopterin、biopterin、BH₂ 與 BH₄：分析使用 5 μ m 逆相碳 18 管柱 (250 $\times$ 4.6 mm I.D.)，移動相為 5% 甲醇，pH 調整為 2.5。偵測極限最低可達 1 pg (0.4 nM, 0.1 ng/mL, 10 μ L)。

本研究進一步以上述建立之方法應用於病患檢體檢測。在西元 2004 年 11 月 10 日至 2005 年 12 月 31 日期間，共納入台大醫院小兒科門診或住院病患中有發育遲緩現象病童 54 名，收集其腦脊髓液檢體保存以待測量。

病患檢體以高效液相層析串聯質譜分析，皆無可測得之 neopterin、biopterin、BH₄ 或 BH₂ 波峰，或許是由於大部份國人腦脊髓液中這些 pterins 的含量較低，導致測不出 pterins 含量。因此未來宜進行人數更多、規模更大之檢測，以期建立國內小兒腦脊髓液中 pterins 相關物質之參考範圍及病

患之致病範圍，藉以做為診斷 BH_4 缺乏症之依據，並可進一步用於監測其治療控制之情形。



Abstract

Tetrahydrobiopterin (BH₄) is an endogenous factor in human body, one of its important functions is to act as a coenzyme for certain amino acid hydroxylases. Tetrahydrobiopterin participates in the synthesis of neurotransmitters such as dopamine and serotonin. Deficiency in BH₄ will lead to the disturbance of homeostasis of certain amino acids in the body, especially dopamine and serotonin, and is called tetrahydrobiopterin deficiency (BH₄ deficiency).

Tetrahydrobiopterin deficiency is one of the Department of Health-declared rare diseases in Taiwan. Clinically, it correlates closely with developmental delays in children. Early diagnosis is beneficial for victims. Presently, there is no analytical method applied routinely to measure the amount of pterins in cerebrospinal fluids in Taiwan. The present study tried to employ and optimize applicable analytical conditions, including buffer systems, pH value, flow rate, and voltage (electrochemical detection), by using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). The application of suitable assay methods to the measurement of patients' cerebrospinal fluid (CSF) samples was also attempted.

The established analytical conditions in the study are as follows:

The first was for the simultaneous detection of neopterin and biopterin by reversed-phase HPLC with fluorescence detector. Chromatographic conditions were as follows: column 150 x 4.6 mm packed with 5 μm C₁₈, mobile phase 5 mM citric buffer, pH adjusted to 5.2, flow rate 0.5 mL/min, excitation

wavelength 350 nm and emission wavelength 448 nm. The detection limit was 200 pg.

The second was for the determination of BH_4 by using reversed-phase HPLC with electrochemical detector. Chromatographic conditions were as follows: column 150 x 4.6 mm packed with 5 μm C_{18} , mobile phase 10 mM phosphoric buffer, pH adjusted to 2.5, flow rate 0.4 mL/min, applied voltage was 700 mV. The detection limit was 80 pg.

The third was for the simultaneously detection of neopterin, biopterin, BH_4 , and BH_2 by utilizing LC/MS-MS, using reversed-phase 5 μm C_{18} column (250 x 4.6 mm, I.D.) for separation. The mobile phase consisted of 5% methanol in water (pH 2.5), with a flow-rate of 0.8 mL/min. The detection limit was 1 pg.

The analytical methods described above were applied to the assay of human CSF samples. During Nov. 10, 2004 to Dec. 31, 2005, fifty-four patients with developmental delays were recruited into the study from the outpatient and inpatient services of the NTUH Department of Pediatrics. CSF samples were collected for analysis.

Results showed that neopterin, biopterin, BH_4 , and BH_2 were not detectable in all CSF samples by employing LC/MS-MS, even though our detection limit was comparable to previous Western reports. One possible explanation is that the CSF pterin levels of our population was significantly lower than the Caucasian population and, thus, the quantification was hampered by undesirable detection limit. For aiding in the diagnosis, treatment, and monitoring of BH_4 deficiency and therapy, larger-scale trials with both healthy and diseased

subjects are needed for setting up reference values for our population in the future.



目錄

摘要.....	I
Abstract	IV
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
縮寫及全稱對照表.....	XII
 第一章 文獻探討	 1
第一節 前言.....	1
第二節 Tetrahydrobiopterin 之生理功能及作用	4
第三節 Tetrahydrobiopterin 之生合成及轉換.....	6
第四節 Phenylketonuria	10
第五節 Tetrahydrobiopterin 缺乏症	13
第六節 體液中 Pterins 含量與其他疾病相關性之研究	19
第七節 Tetrahydrobiopterin 及相關化合物之物性及化性資料	21
第八節 Tetrahydrobiopterin 之 HPLC 分析方法	24
 第二章 動機與目的	 32
 第三章 實驗試劑與儀器	 33
第一節 實驗藥品與試劑.....	33
第二節 實驗儀器.....	34
 第四章 實驗方法.....	 36
第一節 Tetrahydrobiopterin 最適定量條件建立	36

第二節 Neopterin 及 Biopterin 最適定量條件之建立	38
第三節 Neopterin、Biopterin 與 BH ₄ 之 HPLC 分析方法	40
第四節 HPLC 分析方法之確效	41
第五節 運用 LC/MS-MS 方法定量 Pterins	43
第六節 HPLC 與 LC/MS-MS 分析方法應用於人類腦脊髓液檢體之上	45
第五章 結果.....	47
第一節 Tetrahydrobiopterin 之 HPLC 測定結果.....	47
第二節 Neopterin 與 Biopterin 之 HPLC 測定結果.....	53
第三節 HPLC 分析條件之整理	58
第四節 HPLC 測定 Neopterin 與 Biopterin 之確效.....	59
第五節 LC/MS-MS 測定 Pterins 之結果	62
第六節 測定人類腦脊髓液內 Pterins 之結果.....	66
第六章 討論.....	70
第一節 HPLC 分析方法之建立	70
第二節 分析方法之比較.....	72
第三節 偵測極限之探討	76
第四節 高效液相層析方法之研究限制.....	77
第七章 結論及未來方向	79
第八章 參考文獻.....	80
附錄 臨床試驗計畫申請通過文件	91

圖目錄

圖 1- 1BH ₄ 在特定胺基酸代謝所扮演的角色.....	4
圖 1-2 Pteridine、pterin 與 biopterin 化學構造式.....	6
圖 1- 3、BH ₄ 的生合成步驟簡圖.....	7
圖 1- 4 BH ₄ 的生合成步驟詳圖.....	9
圖 4-1 標準溶液之配製與前處理.....	44
圖 4-2 檢品前處理步驟與分析流程.....	46
圖 5-1 高效液相層析圖，在電位 700 mV，流速 1 mL/min 下於各類緩衝溶液系統中分析濃度 50 ng/mL 之 BH ₄ ，b 之分離效果最佳.....	48
圖 5-2 測定電位與 BH ₄ 層析峰下面積之關係，從 100 mV 測到 900 mV，電位越大，層析峰下面積亦越大.....	49
圖 5-3 高效液相層析圖，電化學偵測器設定電位 600~900 mV 測定濃度 2.2 μg/mL 之 BH ₄ 。電位越大，雜訊亦越大.....	49
圖 5- 4 高效液相層析圖，不同流速下以電化學偵測器測定 BH ₄ ，流速越慢分離效果越好，但層析峰會擴散開來.....	51
圖 5-5 高液相層析圖，以移動相做檢品自動注入系統之清洗液測定 BH ₄ ，影響訊號消失了.....	52
圖 5-6 Neopterin 與 biopterin 之紫外光吸收，紫外光波長由 300 nm 到 500 nm，最大值在 344 nm.....	53
圖 5-7 Neopterin 與 biopterin 在激發波長 344 nm 放射波長 370-520 nm 之間所放射之螢光強度圖，最大在 448 nm.....	54
圖 5-8 比較激發波長 344 nm 與 350 nm 之螢光放射強度.....	55
圖 5-9 高效液相層析圖，不同緩衝溶液中以螢光偵測器測定濃度各為 50 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin。緩衝溶液 a 分離效果最佳.....	56
圖 5-10 高效液相層析圖，不同流速下以螢光偵測器測定濃度為 50 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin 流速越低，層析峰下面積越大，波峰越擴散.....	57
圖 5-11 高效液相層析圖，以螢光偵測器測定濃度 5 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin，為 neopterin 與 biopterin 之定量與偵測極限.....	61
圖 5-12 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 1 ng/mL 之 neopterin、BH ₄ 、biopterin 與三者之總和.....	62
圖 5-13 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 0.5 ng/mL 之 neopterin、BH ₄ 、biopterin 與三者之總和.....	63

圖 5-14 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 0.1 ng/mL 之 neopterin、BH ₄ 、biopterin 與三者之總和	63
圖 5-15 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH ₂ 濃度為 1 ng/mL)	64
圖 5-16 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH ₂ 濃度為 0.5 ng/mL)	64
圖 5-17 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH ₂ 濃度為 0.1 ng/mL)	65
圖 5-18 Folic acid	67
圖 5-19 Folinic acid	67
圖 5-20 Methotrexate	68
圖 5-21 Trimethoprim	68
圖 5-22 高效液相層析串聯質譜之層析圖，腦脊髓液檢體來自發育遲緩之 13 歲男孩	69
圖 5-23 高效液相層析串聯質譜之層析圖，腦脊髓液檢體來自發育遲緩並有癲 癇症之 9 個月大女嬰	69



表目錄

表 1-1 衛生署公告之十八類罕見疾病	1
表 1-2 特定內生性胺類缺乏的相關症狀	13
表 1-3 不同型式 BH ₄ 缺乏症尿液中 pterins 類氧化產物之含量	15
表 1-4 體液中 pterins 濃度參考範圍	17
表 1-5 修改自 BIODIEF 資料庫各型式 BH ₄ 缺乏症與 PKU 之生化數值	18
表 1-6 Neopterin、biopterin、BH ₄ 與 BH ₂ 之化學特性	21
表 1-7 國內核可之 tetrahydrobiopterin 藥品劑型與含量	23
表 1-8 不同研究中抗氧化之方式	24
表 1-9 保存方式對 BH ₄ 標準溶液及 CSF 中 BH ₄ 濃度之影響	25
表 1-10 各研究螢光偵測條件設定之比較	29
表 4-1 本研究用層析管柱特性	36
表 4-2 各緩衝溶液之條件比較	37
表 4-3 各緩衝溶液系統之條件比較	39
表 5-1 不同分析流速下層析峰滯留時間	50
表 5-2 分析不同緩衝系統所使用之 pH 值與流速	56
表 5-3 HPLC 分析條件設定值	58
表 5-4 Neopterin 同日內與異日間精確度與準確度試驗結果	59
表 5-5 Biopterin 同日內與異日間精確度與準確度試驗結果	60
表 5-6 Neopterin、biopterin、BH ₄ 與 BH ₂ 之偵測極限	65
表 5-7 Neopterin、biopterin、BH ₄ 與 BH ₂ 之滯留時間	68

縮寫及全稱對照表

全稱	縮寫
Aromatic amino acid decarboxylase	AADC
Cerebrospinal fluid	CSF
Dihydrobiopterin	BH ₂
Dihydrobiopterin reductase	DHPR
Dithioerythritol	DTE
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate	EDTANa ₂
Ethylenediaminetetraacetic acid tetr sodium salt dehydrate	EDTANa ₄
Guanosine triphosphate cyclohydrolase	GTPCH
Hyperphenylalaninemia	HPA
Nitric oxide	NO
Nitric oxide synthase	NOS
Phenylalanine 苯丙胺酸	Phe
Phenylketonuria 苯酮尿症	PKU
Pterin 4a-carbinolamine dehydratase	PCD
6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	PTPS
Tetrahydrobiopterin 四氫基喋呤	BH ₄
Tryptophan 色胺酸	Trp
Tyrosine 酪胺酸	Tyr

第一章 文獻探討

第一節 前言

所謂的罕見疾病是指罹患率極低，患病人數極少的疾病。其中大部份是遺傳性疾病，部份為非遺傳性或原因不明的疾病。美國依據其於 1983 年通過之「孤兒藥品法」(Orphan Drug Act) 定美國境內罹病人數低於二十萬人之疾病為罕見疾病；日本依據其於 1993 年對藥事法修訂增加有關罕用藥管理之「孤兒藥法」定日本境內罹病人數低於五萬人之疾病為罕見疾病；台灣則是依照「罕見疾病及藥物審議委員會」於 2000 年的「罕見疾病盛行率標準」公告，以疾病年盛行率低於萬分之一做為罕見疾病認定的標準。¹ 我國目前已公告的罕見疾病共分為十八類，如下表所列

表 1-1 衛生署公告之十八類罕見疾病

胺基酸/有機酸代謝異常	尿素循環代謝異常	其他代謝異常
心肺功能失調	消化系統失調	泌尿系統失調
腦部或神經病變	皮膚病變	肌肉病變
骨頭病變	結締組織病變	造血功能異常
免疫疾病	內分泌疾病	不正常細胞增生（瘤）
外觀異常	染色體異常	其它未分類或不明原因

其中第一到三類為先天性代謝異常疾病，包括胺基酸/有機酸代謝異常、尿素循環代謝異常以及其他代謝異常疾病。

其中國人較耳熟能詳的 phenylketonuria (PKU, 苯酮尿症) 即是胺基酸/有機酸代謝異常疾病中的一種, phenylalanine (Phe, 苯丙胺酸) 屬於遺傳性的疾病, 遺傳模式是以體染色體隱性遺傳的方式傳給下一代。² Phe 為人體的必需胺基酸之一, 其主要的代謝反應為 Phe 經氧、phenylalanine hydroxylase (PAH, 苯丙胺酸烴化酶)、和輔酶 tetrahydrobiopterin (BH₄, 四氫基喋呤) 的作用而烴化成 tyrosine (Tyr, 酪胺酸)。當此 PAH 功能缺乏時, 將導致 Phe 無法轉換成 Tyr, 而致在腦內大量堆積時, 會干擾其他大分子胺基酸如 Tyr 與 tryptophan (Trp, 色胺酸) 進入腦中。³ 病人若不早期治療及嚴格控制血中 Phr 之濃度於理想範圍內 (2-6 mg/dL, 120-360 μM),³ 將會造成腦部傷害及嚴重的智力障礙, 此腦部傷害是漸進性的, 所以出生的嬰兒多無症狀, 約在三至四個月後症狀才會慢慢的出現。⁴ 其症狀有嘔吐、皮膚毛髮顏色變淡、濕疹、生長發育遲緩、尿液和體汗有霉臭味、抽攣、顫抖等異常的動作。若等到此階段才開始治療, 往往腦部神經已造成無法彌補的傷害了。^{2,3}

Phenylketonuria 又可分為 typical (典型) 以及 atypical (異型) 的 PKU。Atypical PKU 為因缺乏輔酶 BH_4 而導致 Phe 在體內堆積，於西元一九七四年時被發現，稱為 atypical PKU 或 malignant hyperphenylalaninemia (HPA)，⁵ 此 BH_4 缺乏症和 PKU 不管在臨床症狀或是致病機轉上都有許多相似之處。Typical PKU 的發生率由愛爾蘭人的四、五千分之一，到日本的十萬分之一，各人種出入很大；據文獻報告，一般白人的發生率平均在一、二萬分之一，其中因 BH_4 缺乏而引起的 PKU 只佔百分之一到百之三的比例。目前台灣地區 PKU 的發生率約為四萬分之一，其中約卻有三分之一是因 BH_4 缺乏而引起的，和西方國家的結果大不相同。^{2, 5-7}

台灣在 1984 年一月起至 1993 年九月期間，進行一個新生兒 HPA 的篩檢，並且對 HPA 的新生兒進行 BH_4 缺乏症的篩檢，根據篩檢結果，在篩檢出的 27 位 HPA 新生兒中，發現有 4 位有 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS) 缺乏而有 1 位是有 dihydrobiopterin reductase (DHPR) 缺乏；而台灣有 HPA 新生兒的 BH_4 缺乏症發生率則是 19%。⁸ 酵素 PTPS 與 DHPR 介紹容後詳述。

第二節 Tetrahydrobiopterin 之生理功能及作用

BH₄ 在體內有許多重要的功能，分述如下：

一、在 Phe、Tyr 及 Trp 經 aromatic amino acid hydroxylase（芳香胺氨基酸水解酶）水解生成 catecholaminergic 神經傳導物質如 dopamine、serotonin 及 melatonin 等時，BH₄ 是決定其生成速率的重要因子；^{9, 10}

Phenylalanine 透過 PAH 及 BH₄ 的作用之後會產生 Tyr；Trp 再透過 tryptophan hydroxylase 及 BH₄ 的作用之後則會產生 5-hydroxytryptophan（5-OH-Trp）；Tyr 在透過 tyrosine hydroxylase 及 BH₄ 的作用之後會產生 Dopa。而 BH₄ 經過這些水解酵素作用之後轉變為 quinonoid dihydrobiopterin（q-BH₂），之後 q-BH₂ 再經過 DHPR 的作用並由 NAD⁺ 提供電子，還原成原來的 BH₄。⁹ 如圖 1-1：¹¹

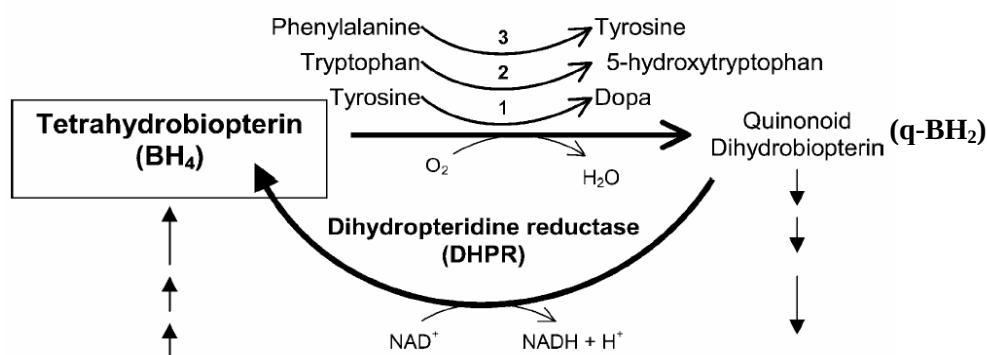


圖 1-1、BH₄ 在特定胺基酸代謝所扮演的角色¹¹

1、2、3 各為 tyrosine、tryptophan、phenylalanine hydroxylase

由 Tyr 轉變而來的 Dopa 而在體內經過 AADC 的作用會生成 dopamine；由 Trp 來的 5-OH-Trp 也經過 AADC 的作用之後生成 serotonin。Dopamine 跟 serotonin 都是腦中重要的神經傳導物質。因此 BH₄ 是神經傳導物質 dopamine 與 serotonin 生成時決定其速率的重要因子。

二、BH₄ 同時亦是三種 nitric oxide synthase (NOS) isoforms，即

iNOS、nNOS 與 eNOS 作用生成 nitric oxide(NO)時的輔因子；

^{8, 12-15} 在 arginine (Arg) 生成 NO 與 Citrulline 的過程中 BH₄

所扮演的則是一個電子提供者的角色。除了扮演電子提供者的

角色之外，BH₄ 尚可以穩定 NOS 並且增加其和 Arg 的親和力，

使 Arg 容易鍵結上來而能進一步生成 NO。¹⁶ 在細胞內 BH₄ 濃

度下降的時候，NOS 不再生成 NO 而是生成 superoxide anions，

人體內自有其調控系統。¹⁷

三、在 alkyl-ether 經 glyceryl ether monooxygenase 代謝時 BH₄ 也是

伴演著輔因子的角色。^{9, 18}

第三節 Tetrahydrobiopterin 之合成及轉換

Tetrahydrobiopterin 的結構屬於 unconjugated pterins，pterins 是 pteridines 的一種。Pteridines 的基本結構如圖 1-2(a)，¹⁹ 有一個 pyrazino pyrimidine 的結構，而帶有 2-amino-4-oxo 結構之 pteridines 稱為 pterins 如圖 1-2(b)。¹⁹ Pterins 又可分為兩類，一類是帶有 p-aminobenzoate 及 glutamate 構造的，稱為 conjugated pterins；另一類則是在第六個碳上帶有一個親脂性支鏈的構造，稱為 unconjugated pterins。biopterin 如圖 1-2(c)¹⁹ 也是一個 unconjugated pterins 的例子。

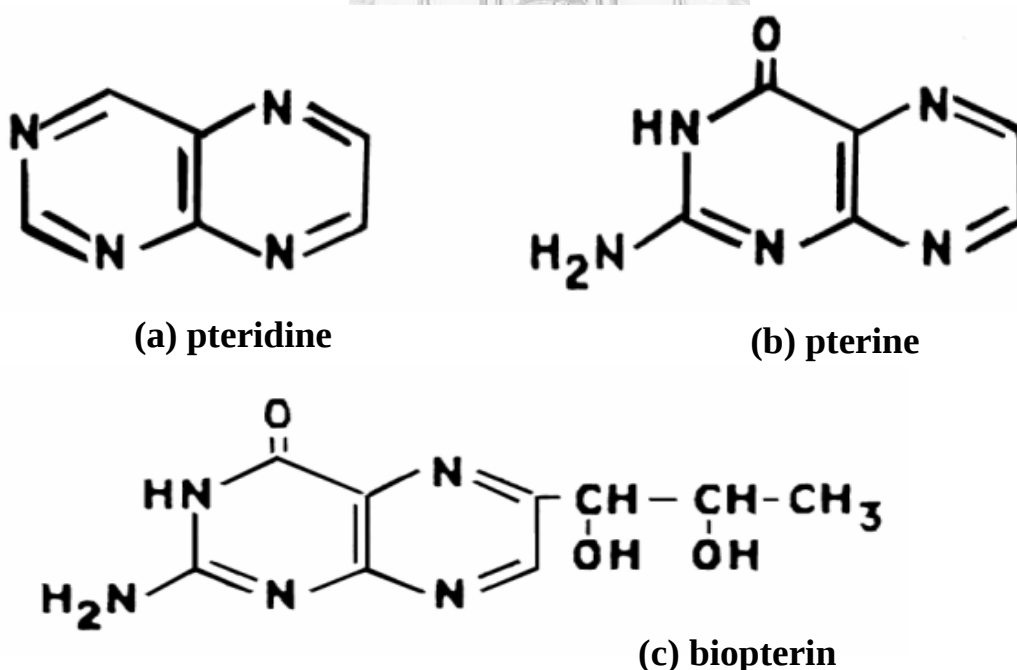


圖 1-2 Pteridine、pterin 與 biopterin 化學構造式¹⁹

由於 BH_4 透過腸道的吸收不佳，因此在體內是經由 guanosine triphosphate (GTP)，透過三個酵素的作用而生成，或經做為輔酶而再生回來，¹⁰ 生成步驟中先經過 GTP cyclohydrolase (GTPCH) 的作用，將 GTP 轉變成 7,8-dihydroneopterin triphosphate、再透過 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS) 的作用，轉變成 6-pyruvoyl tetrahydropterin，最後再經過 sepiapterin reductase (SR) 的作用轉變成 BH_4 ；^{5, 15, 20} 其生成的步驟如圖 1-3 與 1-4：

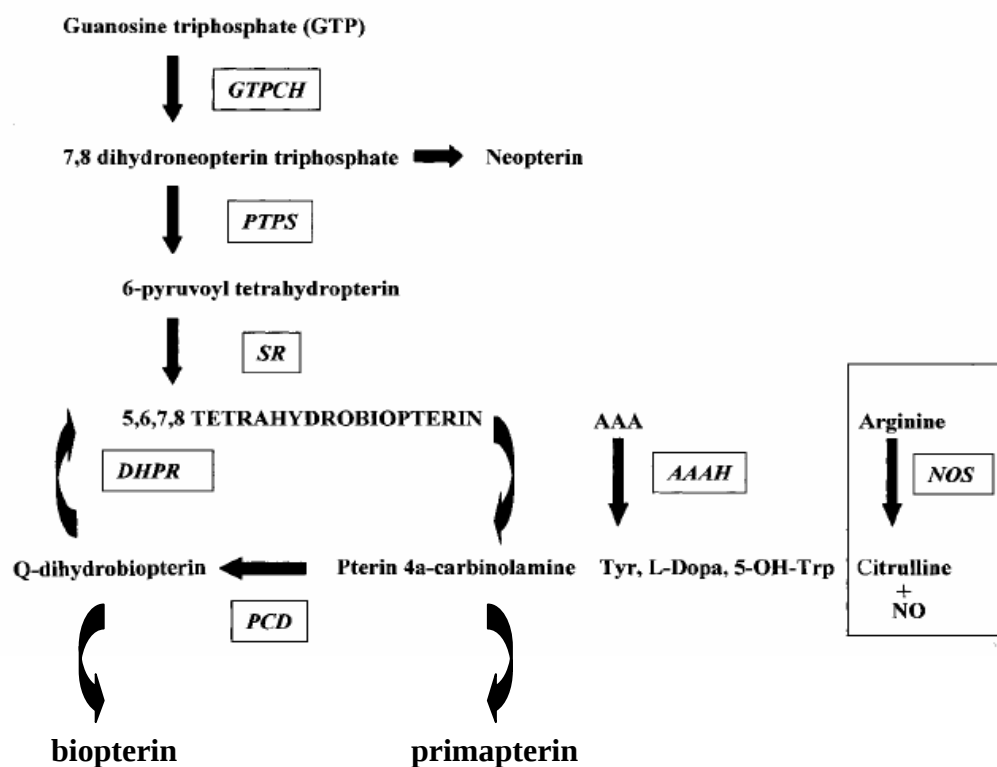


圖 1-3、 BH_4 的生合成步驟簡圖¹⁵

GTPCH, guanosine triphosphate cyclohydrolase; PTPS, 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase; SR, sepiapterin reductase; DHPR, dihydrobiopterin reductase; AAAH, aromatic amino acid hydroxylase; NOS, nitric oxide synthase; PCD, pterin 4a-carbinolamine dehydratase

如圖 1-3，Tyr、L-Dopa、5-OH-Trp 及 NO 的生成皆需要 BH₄ 的存在，而 BH₄ 則會轉變為 pterin 4a-carbinolamine 再經過 pterin 4a-carbinolamine dehydratase (PCD) 的作用轉變成 Quinoid-dihydrobiopterin 簡稱 q-BH₂，之後再經過 DHPR 的作用再轉變回 BH₄，完成 BH₄ 在體內的轉換，此轉換則為其做為輔酶之再生循環過程。^{8, 10, 15} 由圖 1-4 可以知道 GTP 生成 7,8-dihydroneopterin triphosphate 之後會繼續氧化生成 Neopterin；BH₄ 轉變成 pterin-4a-carbinolamine 之後會再轉變成 7,8-dihydro-7-biopterin 接著再轉變成 7-biopterin (primapterin) 排到尿中；³ pterin-4a-carbinolamine 經 PCD 形成 q-BH₂ 後會先氧化成 BH₂ 之後再繼續氧化生成 biopterin；⁵

Neopterin、biopterin 與 primapterin 等這些 pterins 的氧化產物在體內所產生的量的多寡可做為診斷 BH₄ 缺乏症的依據，並且可進一步判斷病患為哪一種類型的 BH₄ 缺乏症，例如：因缺乏 GTPCH 而造成的 BH₄ 缺乏症病患，尿液中 neopterin 及 biopterin 的量會下降，

¹⁸ 於第五節中將會有更多的說明。

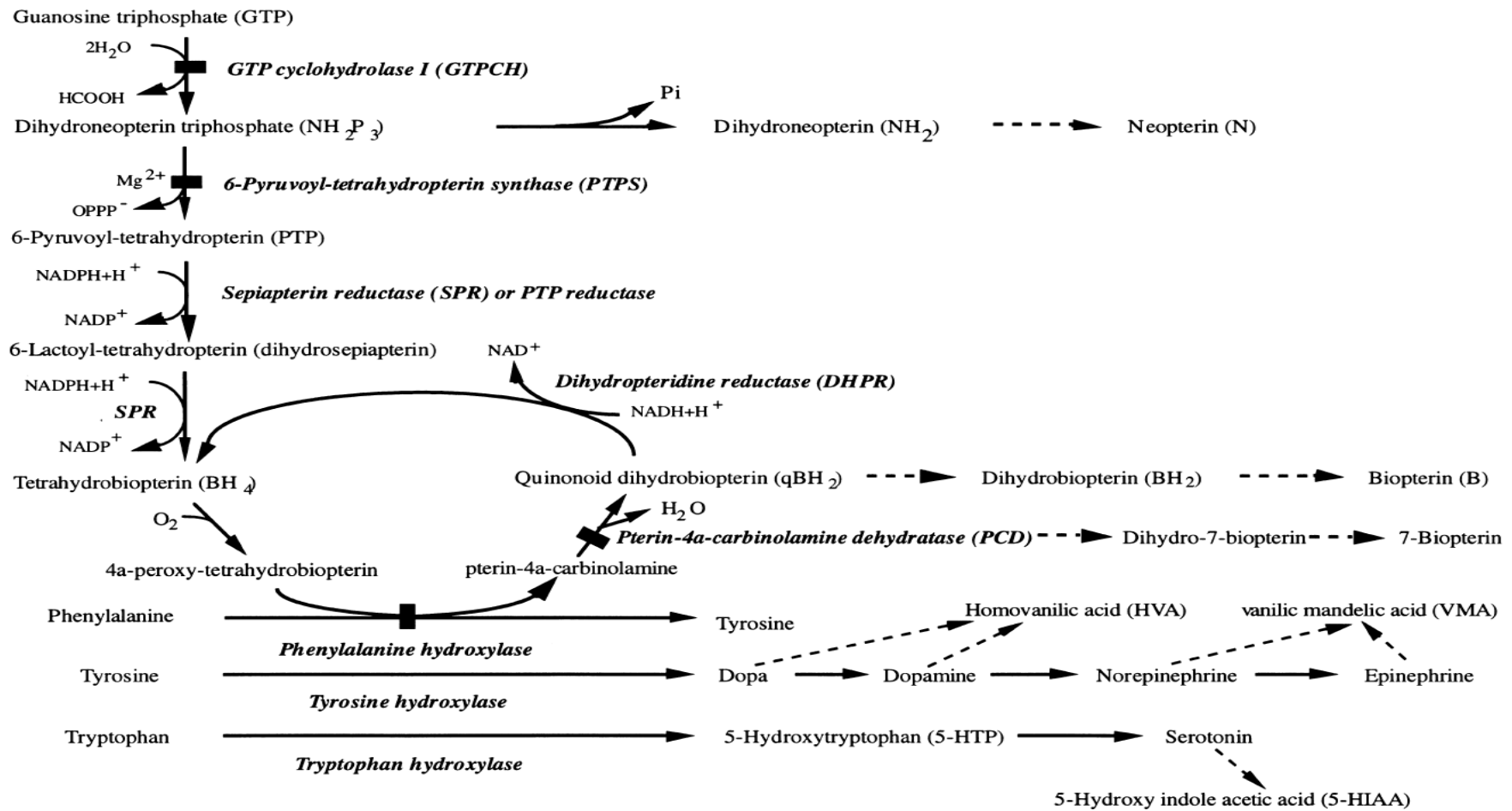


圖 1-4 BH_4 的生合成步驟詳圖²¹

第四節 Phenylketonuria

Phenylketonuria 正如先前所提過的，是因為缺乏 PAH 酵素造成 Phe 無法代謝而在體液及中樞神經系統內堆積，而干擾了其他如 Tyr 及 Trp 等神經傳導物質的前驅物進入中樞而產生病變；此外，還會附帶產生一些有毒的代謝物，如 phenylacetate 及 phenylpyruvate 等稱為 phenylketones 的物質排到尿液中。^{3, 22} Phe 本身對 DHPR 作用不大，但 phenylpyruvate 卻對會抑制 DHPR 的作用達 20%，此外 phenylpyruvate 這些 phenylketones 會使病童身上帶有一種類似霉臭的味道，而這正是 PKU 這個名稱的由來。^{3, 22}

Phenylalanine 在血液中的濃度參考值是 1.0-2.0 mg/dL；臨床上只要病人血液中的 Phe 濃度高於 20 mg/dL，伴隨著正常或偏低的血液中 Tyr 濃度，且尿中有 phenylketones 即可確定診斷為 typical PKU。²² 而一般只要幼兒血液中 Phe 濃度超過 6 mg/dL 即應該開始依 typical PKU 病患之處置方式治療。³ PKU 可以透過新生兒先天代謝異常疾病篩檢盡早的診斷出來，任何新生兒或者是較大的孩子只要血中 Phe 較高（高於 2 mg/dL）或者出現神經學上的異常現象，就應該做 BH₄ 缺乏症的鑑別診斷，⁴ 以免耽誤必要的治療。⁸

目前國內例行的新生兒篩檢共包括六項疾病：先天性甲狀腺低能症（congenital hypothyroidism）、PKU、高胱氨酸血症（homocystinuria）、半乳糖血症（galactosemia）、葡萄糖-6-磷酸鹽去氫缺乏症（glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD deficiency, 俗稱蠶豆症）。²³

在治療方面，typical PKU 必須要嚴格的控制飲食中 Phe 的攝取量，以控制患者血液中 Phe 的濃度接近正常值，亦即介於 2-6 mg/dL 之間，³ 只要這嚴格的飲食控制在病患出生三週起就開始實行，便可以避免一些嚴重並且不可回復的腦部傷害。²² 台大小兒科沈友仁教授在 1973 年發表的一篇研究中也證實，病人血清 Phe 維持在 3-7 mg/dL 者治療效果較佳。²⁴ 一般建議這樣的飲食控制需至少持續到青春期，並且最好是一輩子都維持這樣的飲食控制，²² 即使很晚才開始飲食控制，雖然無法改善智力，仍能幫助控制患者一些過動的情形。²⁴ 飲食控制方面必須要和醫師以及營養師密切的配合，很多患者在飲食上面有所鬆懈的時候，會發生智力或行為能力上面的退化，尤其是在其 Phe 血中濃度高於 18 mg/dL 的時候更容易發生，²² 因此飲食控制是絕對不能鬆懈的。除了在新生兒篩檢檢測出來有 PKU 的病童需要限制 Phe 的攝取，懷孕的婦女如果有血中 Phe 濃度

較高的情形時，孕婦也必須嚴格控制 Phe 的攝取，否則即使寶寶本身的酵素活性正常，孕婦仍有可能會生出有腦部病變、心智發育遲緩或一些其他方面天生異常的寶寶。²²



第五節 Tetrahydrobiopterin 缺乏症

從 BH₄ 的生合成及轉換來看，BH₄ 的缺乏可能來自於生合成步驟中所需要的任何一個酵素有缺失；或者是在轉換過程當中有任何一個酵素不正常，因此 BH₄ 缺乏症（ICD-9-CM 編號 270.1）可以幾種不同的型式來表現，雖然 BH₄ 缺乏症有不同的表現型式，卻都有相類似的臨床症狀。

有關 BH₄ 缺乏症之症狀、診斷、分類及治療茲分述如下：

一、臨床症狀：

因缺乏神經傳導物質如 dopamine 與 serotonin 及 epinephrine 與 norepinephrine 而引起一些神經症狀，⁵ 產生像巴金森氏症的一些肌肉張力異常現象以及失眠、憂鬱等因缺乏 serotonin 的表現；¹⁸ 與心智發育遲緩等現象。²⁰ 一些因內生性胺類缺乏的症狀如表 1-1 所列。

表 1-2 特定內生性胺類缺乏的相關症狀¹⁸

Dopamine	Serotonin	Noradrenaline
Immobility	Depression	Axial hypotonia
Parkinsonism	Altered thermogenesis	Cerebellar symptoms
Sleepiness	Insomnia	Ptosis
Dystonia		
Eye rolling		
Hypersalivation		
Swallowing difficulties		

二、診斷方法：

Tetrahydrobiopterin 缺乏症之診斷可以從三個方面來著手：當患者的血清中 Phe 的濃度高於 200 $\mu\text{mol/L}$ (3.3 mg/dL) 時，²⁵ 第一個是測量體液，尤其是尿液中 neopterin 及 biopterin 的濃度，這些變化請容後敘（下一頁）；第二個是做 BH₄ loading 測試，先使受檢者血中的 Phe 濃度上升至 6-7 mg/dL，經過三小時後再給予口服 7.5 mg/kg 的 BH₄，若是 BH₄ 缺乏的患者其血中 Phe 濃度應該在 4-6 小時之內降回到正常值 (1-2 mg/dL)，³ 若是 DHPR 的患者則其血中 Phe 濃度降得較慢或是對較高劑量的 BH₄ (20 mg/kg) 才能反應；^{8, 19} 第三個診斷方式則是做酵素活性測試，去測試可能導致 BH₄ 缺乏症的各種酵素之活性。³ 目前這些酵素在基因上的定位也都已經被找出來了，可以在胎兒出生前就先利用絨毛膜穿刺取出組織切片去做基因定序分析的檢測，^{3, 8} 以檢測這些酵素有無異常的現象。

三、Tetrahydrobiopterin 缺乏症之類型：

不同型式的 BH₄ 缺乏症則可從患者尿液中一些 pterins 類氧化產物的含量推斷出來。^{3, 5, 18}

表 1-3 不同型式 BH₄ 缺乏症尿液中 pterins 類氧化產物之含量

全稱	簡稱	尿液中表現
Guanosine triphosphate cyclohydroxylase deficiency	GTPCH 缺乏	neopterin 大幅下降、 biopterin 大幅下降
6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency	PTPS 缺乏	neopterin 大幅上升、 biopterin 大幅下降
Pterin 4a-carbinolamine dehydratase deficiency	PCD 缺乏	neopterin 上升、 primapterin 出現
Dihydropteridine reductase deficiency	DHPR 缺乏	neopterin 輕微上升或 不變、biopterin 上升

在這些不同型式的 BH₄ 缺乏症當中，最常見的是 PTPS 缺乏，^{3, 7, 18, 21, 25, 26} 其次是 DHPR 缺乏，而由 PCD 缺乏與 GTPCH 缺乏所引起之 BH₄ 缺乏症則佔少數。²⁵

四、例外情形：

前述酵素缺乏所造成的 BH₄ 缺乏症患者在血液中都可發現有 hyperphenylalaninemia (HPA) 的情形，但在兩個情形之下病人表現出來的是沒有 HPA 的情形。第一個情形是有 SR 缺乏症的病患，^{4, 27, 28} 原因如上節圖 1-6 所示，在從 6-pyruvoyl-tetrahydropterin 轉變成 BH₄ 過程中，除了必須藉由 SR 酵素之外，還有一些替代的酵素可以在這一步驟來產生作用，替代的酵素有 aldose reductase (AR) 及 carbonyl reductase (CR)，因此雖然缺乏 SR 卻不會有 HPA 的情形發生。第二個情形是以體染色體顯性遺傳方式在 GTPCH I 基因處產生

突變所造成的 Dopa-responsive dystonia，原稱為 Segawa disease 或遺傳性漸近性肌失調症（hereditary progressive dystonia）的疾病，^{9, 27-29} 所表現出來的則是另一個不會產生 HPA 的情形。^{4, 27, 28}

在此兩個不會表現出 HPA 的情形之下，新生兒篩檢則只能透過測量腦脊髓液中 pterins 及神經傳導物質代謝物的濃度來偵測。⁴

五、治療：

在治療方面：前一節提到 typical PKU 的患者只要好好控制其飲食中 Phe 的量即可控制其病情；atypical PKU，也就是 BH₄ 缺乏症卻不能單單藉著控制飲食還必需調整體內缺乏神經傳導物質的情況，來抑制其神經方面的退化，除了飲食控制之外並且需要再給予 BH₄ 的補充；⁴ 對於 GTPH 缺乏與 PTPS 缺乏的病患，每天 5-10 mg/kg 的補充應是足夠的，而對於 DHPR 缺乏的病患則可能需要每天 12-20 mg/kg 才能達到足夠的補充。⁵ 此外有研究提出 DHPR 和腦中 pterins 及葉酸維持在還原態的比例有關，²⁶ 缺乏之除了會造成 BH₄ 缺乏之外還會造成 tetrahydrofolate 的缺乏，因此 DHPR 缺乏之病人需要時也要補充葉酸，^{5, 8, 26} 也有研究指出，在 DHPR 缺乏之病人及早補充 folinic acid，能避免不可逆之神經傷害。³⁰ 另外 BH₄ 缺乏症病患還必需額外補充一些神經傳導物質的前驅物質如

L-dopa 及 5-hydroxytryptophan 等，以避免神經學方面的病變並調節體內神經傳導物質的失衡。^{3, 5, 7}

六、體液中 pterins 濃度參考範圍：

表 1-4 體液中 pterins 濃度參考範圍^{4, 20, 31-33}

研究者 (年代)	Ye <i>et al</i> (2002) ³¹	Blau <i>et al</i> (2005) ⁴	Dobbie <i>et al</i> (2000) ³³	Ramaekers <i>et al</i> (2002) ³²	Dobbie <i>et al</i> (2000) ³³
檢體來源	尿液 (mmol/molCr [#])		血液 (nM)		腦脊髓液 (nM)
Neopterin	0.28-2.6	1.1-4.0 (newborns)	3-11	9-30 (1m-2y)	15-35 (newborns)
		1.1-4.0 (0-10y)			12-30 (0-1y)
		0.2-1.7 (>10y)			9-20 (>2y)
Bioppterin	0.35-2.96	0.5-3.0 (newborns)	4-18	10-40 (1m-2y)	20-70 (newborns)
		0.5-3.0 (0-10y)			15-40 (0-1y)
		0.5-2.7 (>10y)			10-30 (>2y)
% B	42.7-75.9		---		---
BH ₄	---		---	30.2-38	
BH ₂	---		---	2.9-4.9 ; <14 [*]	

Ref 29 為中國大陸學者在 2002 年所做的研究³¹

Cr, creatinine

*出自 Bonafe *et al* (2001)²⁰

表 1-5 修改自 BIoDEF 資料庫各型式 BH₄ 缺乏症與 PKU 之生化數值^{4, 25}

GTPCH deficiency			PTPS deficiency		DHPR deficiency		PCD deficiency		PKU		Controls ^a (1m- 2y)
Plasma (μmol/L)			severe	250-2500	severe	180-2500			Classical ^f	> 1200	
Phenylalanine			90-1200				180-1200		Atypical ^f	600-1200	< 120
			mild	240-2200	mild	280-600			Benign ^f	120-600	
Urine (mmol/mol creatinine)	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range	
Neopterin	0.14	0.09-0.20	21.86	4.95-51.16	6.22	0.48-23.23	15.38	4.07-22.48	4.60	1.11-16.94	0.3-4.0
Biopterin	0.09	0.04-0.18	0.14	0-0.45	10.19	3.78-25.56	1.11	0.67-1.47	3.00	1.21-8.14	0.5-3.0
Primapterin	nd		nd		traces		0.76	0.44-0.93	traces		traces
%Biopterin	36.9	24.1-54.25	1.0	0-5.0	66.5	25.3-93.5	12.4	3.2-26.6	32.3	12.8-75.2	44-77
CSF (nmol/L)	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range	
Neopterin	1.0	0.05-3.0	173	11-449	19	11-70	50	43-117	37	6-118	9-40
Biopterin	4.8	1.5-7.5	10	0.8-42	51	25-117	44	16-96	75	15-143	10-50
%Biopterin	87	65-99	3	1-9	74	46-86	49	22-78	68	25-88	32-87
Homovanillic acid	34	15-48	152	11-368	90	19-204	384	170-602	378	47-1174	100-900
5-Hydroxyindoleacetic acid	112	61-183	57	5-154	24	4-75	205	135-300	188	14-471	120-500
Residual enzyme activity (%)	< 1 ^b		30 ^c		< 1 ^d		?		< 1 ^b		
Loading test with BH ₄ ^e											
20 mg/kg body weight	+		+		+		+				
7.5 mg/kg body weight	+		+		+/-		+				

nd = not detectable; ^aRange; ^bLiver; ^cErythrocytes; ^dFibroblasts; ^e+ indicates a reduction in plasma phenylalanine concentration following oral BH₄ loading test; f, PAH deficiency; BIoDEF, International Database of Tetrahydrobiopterin Deficiencies; GTPCH, guanosine triphosphate cyclohydrolase; PTPS, 6-pyruvolytetrahydropterin synthase; DHPR, dihydropteridine reductase; PCD, pterin-4a-carbinolamine dehydratase; PKU, phenylketonuria

第六節 體液中 Pterins 含量與其他疾病相關性之研究

Milstien 等人 (1980)³⁴ 的研究中顯示，正常的成人或孩童其尿中排出的 biopterin 大部份是以四個氫的型式，也就是 BH₄ 存在；而在確認診斷為 DHPR 缺乏的患者所排出的尿液中卻只含有少量或甚至是沒有 BH₄ 的存在，因此提出篩檢 DHPR 缺乏症，測量尿液中 biopterin 還原態存在的濃度是一個快速且非侵入性的方法。

除了在各種型式的 BH₄ 缺乏症病患有 BH₄ 的代謝異常之外，在許多疾病也都有證據顯示有 BH₄ 代謝異常的現象，如巴金森氏症、阿茲罕默症、肌張力異常 (dystonia)、以及憂鬱症 (depression) 的患者，其組織或腦脊髓液中 BH₄ 的濃度皆較正常為低，^{26, 35, 36} 而在中樞系統發炎急性期或自閉症患者以及 Rett syndrome 病患腦脊髓液內則有 BH₄ 濃度較高的現象。³⁶

在 Hreidarsson 等人 (1982)²¹ 的研究中首次發現周邊型的 PTPS 缺乏 ((mild) peripheral form of PTPS deficiency)，即是沒有神經症狀而僅有 hyperphenylalaninemia 表現之 BH₄ 缺乏症，在周邊型 PTPS 缺乏的患者其 PTPS 酵素的活性較中樞型 PTPS 缺乏的患者高，³⁷ 這

些患者被發現其腦脊髓液中的 biopterin 與神經傳導物質的濃度正常，而尿液測試卻顯示有 PTPS 缺乏。³⁸ 顯示出周邊與中樞神經系統不一定有同步表現的情形，周邊型的 PTPS 缺乏大約佔所有 PTPS 缺乏的 17%。³⁷ 雖然周邊型 PTPS 缺乏病人在中樞的 pterins 濃度正常，但仍建議給予 L-DOPA、5-HTP 等物質，並且等長大一點之後，要再做一次檢驗確認。^{39, 40}

Sawada 等人 (1999)³⁸ 發表的研究中指出，1 歲以下幼兒在尿液與腦脊髓液中 neopterin 與 biopterin 的濃度有相反的趨勢，在尿液中 N/B 最高為 1-7 天新生兒的 5.7，而在腦脊髓液中 N/B 最高則為 7-11 個月幼兒的 0.97，再次驗證了 pterins 的濃度在腦脊髓液與其他體液中存在不等同的關係。

CSF 中 BH_4 的濃度反應出腦中的 BH_4 濃度以及相關胺類在中樞的活性。⁴¹ 由以上幾篇研究得知，測量腦脊髓液中 BH_4 濃度可反映出腦中特定神經傳導物質之平衡狀態，因此直接測定腦脊髓液中 BH_4 的濃度是有必要的。

第七節 Tetrahydrobiopterin 及相關化合物之物性及化性資料

一、化學特性^{42, 43}

表 1- 6 Neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 之化學特性

	Neopterin	Biopterin	BH ₄	BH ₂
分子量	253.21	237.22	241.25	239.23
外觀	白色粉末	白色粉末	白色結晶粉末	淡黃色結晶粉末
儲存條件	2-8℃ 避光儲存	-20℃ 避光儲存(2-8℃)	-20℃ 避光儲存	-20℃ 避光儲存
溶解度	溶於 1N 氯化氫	於水 0.7 mg/mL (20℃) ; 4 mg/mL (90℃) ; 於乙醇、乙醚、丙酮、苯 < 0.1 mg/mL ; 於 1N NaOH 、 1N HCl > 25 mg/mL	帶兩個鹽酸根者可溶於水 ; 帶一個硫酸根者於水 2.3 g/100mL (22℃)	可溶於水
特性	於中性或鹼性溶液中可放出強藍色螢光 ; 酸性溶液中具微弱螢光	於鹼性溶液中可放出藍色螢光	於中性及鹼性溶液中易與氧作用	

二、BH₄ 藥品特性

已上市之 BH₄ 產品有兩種含量，分別為 10 mg 與 50 mg，每一錠中包含有 ascorbic acid、N-acetyl-L-systeine 及其他賦型劑。

三、BH₄ 健保相關使用規範⁴⁴

中央健康保險局（健保局）於民國 91 年 11 月 29 日公告健保審字第 0910023533 號，「全民健康保險罕見疾病用藥免事前專案審查品項及作業方式」將 BH₄ 10 mg 列為免事前專案審查藥物之一，自同年 12 月 1 日起實施。於民國 93 年 12 月 23 日公告增列 BH₄ 50 mg 為免事前專案審查藥物，自 94 年 2 月 1 日起實施。於此時，使用 BH₄ 不需經過事前專案審查，特約醫療院所只需在保險對象初次使用時，向健保局總局及相關分局報備，並於每年一月與七月向健保局總局提供前半年期間實施罕見疾病治療個案之療效評估資料。

另外，健保局於 94 年 10 月 17 日審字第 0940068691 號公告自 94 年 11 月 1 日，免除初次使用 BH₄ 之報備，且每年一月與七月不需提供前半年期間實施罕見疾病治療個案之療效評估資料，但仍需依實際使用情形申報及審查。

此外健保局針對罕見疾病藥費方面是全額補助的。

表 1-7 國內核可之 tetrahydrobiopterin 藥品劑型與含量

藥品代碼	X000040100	X000072100
藥品名稱	Tetrahydrobioptein (BH ₄)	Tetrahydrobiopterin (BH ₄)
成份含量	10 mg	50 mg
劑型	錠劑	
價格 (元)	73	300
起迄日期	092.05.01 迄今	094.02.01 迄今
代理商	科懋企業有限公司	

第八節 Tetrahydrobiopterin 之 HPLC 分析方法

一、檢品抗氧化方式之選擇

由於 BH_4 在空氣中不穩定，很容易氧化成 q-BH_2 ，而 q-BH_2 又會很快的進行重組反應形成 BH_2 ，並接著氧化變成 biopterin，^{5, 45-48} 因此為了要避免在處理檢體或分析時 BH_4 之氧化，必須採用一些抗氧化方法來解決這個問題，^{46, 47} 下表 1-6 就是一些類似的研究中所使用的方式。

表 1-8 不同研究中抗氧化之方式

作者 (年)	檢體	保存方式	移動相抗氧化
Hyland (1985) ⁴⁵	尿液	ascorbic acid 1 mg/mL 尿液，於 -70°C 保存	20 mg/L EDTA 及 24.7 mg/L DTE
Howells and Hyland (1986) ³⁵	腦脊髓液	DTE 及 EDTA 各 1 mg/mL 腦脊髓液，於 -70°C 避光保存	24.7 mg/L DTE
Howells and Hyland (1987) ⁴⁹	腦脊髓液	DTE 及 DETAPAC 各 1mg/mL 腦脊髓液，於 -70°C 避光保存	14 mg/L EDTA 及 24.7 mg/L DTE
Powers <i>et al</i> (1988) ⁴⁶	血漿	DTE 及 EDTA 各 1 mg/mL 血漿，於 -70°C 保存（提出在加入 DTE 及 EDTA 於 -70°C 保存之下不會有檢體氧化的情形出現）	10 mg/L EDTA 及 50 mg/L DTE
Candito <i>et al</i> (1994) ⁵⁰	腦脊髓液	DTE 及 EDTA 各 1 mg/mL，於液態氮中保存	20 mg/L EDTA Na_2 及 150 mg/L DTE

DTE, dithioerythritol; EDTA, ethylenediaminetetra-acetic acid; DETAPAC, diethylenetriaminepenta-acetic acid

其中 Howells 與 Hyland (1987)⁴⁹ 之研究是在比較不同保存方式對於 BH₄ 標準溶液及 CSF 中 BH₄ 濃度的影響：

表 1-9 保存方式對 BH₄ 標準溶液及 CSF 中 BH₄ 濃度之影響⁴⁹

樣本	保存條件		實驗結果
	溫度	保存方法	
BH ₄ 標準溶液 32.13 μ M	4°C	無抗氧化劑	在 20 小時內約有 88% 的 BH ₄ 氧化成 BH ₂ 及 biopterin
BH ₄ 標準溶液 32.13 μ M	4°C	5.7 mM ascorbic acid 並通入氫氣	BH ₄ 標準溶液 32.13 μ M：20 小時內不被氧化
BH ₄ 標準溶液 41.5 nM			BH ₄ 標準溶液 41.5 nM：4 小時內不被氧化
CSF + 0.32 μ M BH ₄			CSF + 0.32 μ M BH ₄ ：在 75 分鐘後約有 30% 的 BH ₄ 被氧化
CSF + 0.32 μ M BH ₄	4°C	28.3 mM ascorbic acid 及 2.54 mM DETAPAC	可減少 BH ₄ 氧化但無法避免其氧化
CSF + 0.32 μ M BH ₄	4°C	2-mercaptoethanol 及 EDTA	無法避免 BH ₄ 氧化，1 小時後約有 50% 的 BH ₄ 被氧化
CSF + 0.32 μ M BH ₄	4°C -70°C	6.48 mM DTE 與 2.54 mM DETAPAC 並通入氫氣	4°C 下可完全防止 BH ₄ 氧化達 5 小時； -70°C 下可使 CSF 安定至少一年的時間

二、檢體純化及去蛋白質步驟

文獻中對於體液檢體純化或去蛋白質常見的方法如下所列：

- (一) 通過多次如 Dowex、Sephadex 之樹脂管柱或來純化檢體；^{48, 51}
- (二) 加入 trichloroacetic acid (TCA)、⁵² acetonitrile (ACN) 或來除去檢體中的蛋白質；
- (三) 以 Mr 100,000 cut-off membranes 過濾稱為 micropartition 系統；⁴⁶

三、分析條件之設定及檢體保存方式

以下是文獻中幾種常被用於處理含 pterins 類化合物檢體的方法與其所需配合使用的偵測器：

- (一) 先將所有還原態之 pteridines 以化學藥劑如 iodine、hydroxy peroxide 或 manganese dioxide 等氧化成為氧化狀態，使用螢光偵測器來偵測本身即會發螢光的氧化狀態 pteridines；^{34, 51, 53-56}
- (二) 還原態 pteridines 本身存在還原電位，因此可使用電化學偵測器來偵測還原態的 pteridines；^{47, 48, 54, 57-59}
- (三) 串聯電化學與螢光偵測器，在分析檢品通過管柱分離之後提供電壓將還原態 pteridines 氧化使其能為螢光偵測器所偵測，此法可同時偵測不同狀態的 pteridines；^{35, 45, 49, 50}

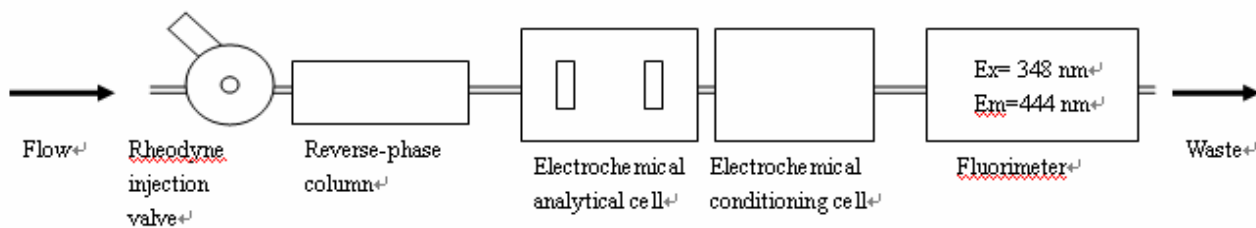


圖 1- 7 串聯電化學與螢光偵測器之示意圖³⁵

Ex, excitation wavelength; Em, emission wavelength;

(四) 在分析檢品通過管柱分離之後，再通以化學氧化劑使之氧化，接著再測螢光；⁶⁰

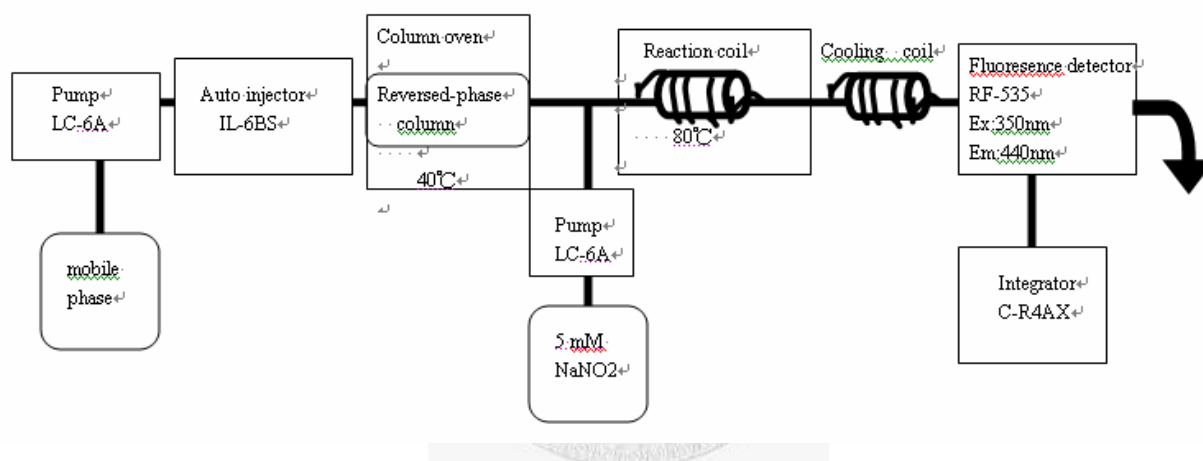


圖 1- 8 檢品通過管柱後通以化學劑氧化檢品之示意圖⁶⁰

(五) 以轉換閥串接一個 pre-column 及一個 analytical column，在不同時間點通入不同移動相，使分析物先通過 pre-column，在經過 analytical column 時將檢品保持在 analytical column 內，通入清洗液清洗 pre-column，後再讓 analytical column 內的檢品（已先經過氧化步驟）流出，之後再利用螢光或電化學偵測器偵測。重點是去除一些不必要的雜質或干擾物；^{19, 52, 61}

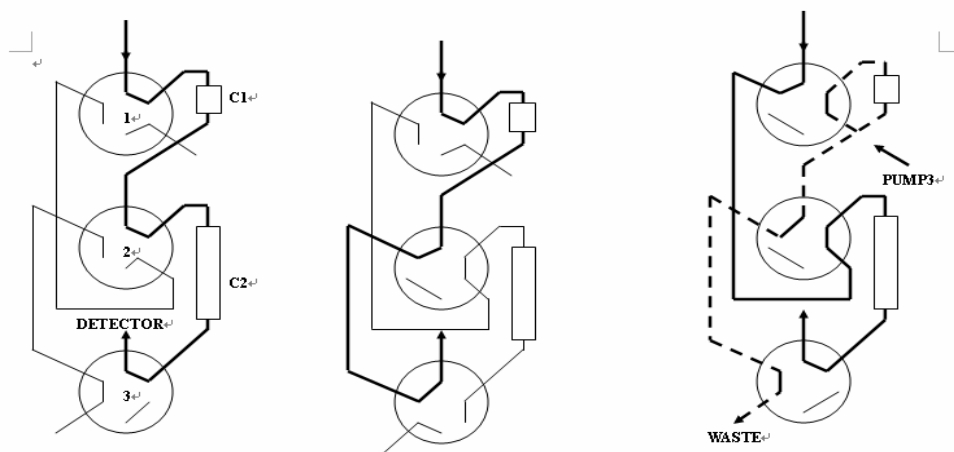


圖 1-9 管柱轉換示意圖¹⁹

C1, column 1; C2, column 2

(六) 使用同步固相萃取分析檢品，先經過固相萃取，沖洗掉不必要的雜質之後，將待測檢品通過分析管柱，以螢光偵測器偵測之。⁶²

四、近年之研究分析方法

在 1996 年之後有一些研究，^{38, 63-75} 不管是量測血液、尿液或者是腦脊髓液中的 neopterin、biopterin 或 BH₄，最常引用的就是前述第一種方法中 Fukushima & Nixon⁵³ (1980) 所發表的步驟；另外，在 1990 年後較常被引用的方法尚有 Niederwieser⁵² (1984)^{8, 15, 39, 52, 56, 76} 之第五種及 Werner⁶² (1987)^{74, 75, 77} 之第六種方法；而由 Hommes 在 1991 年出版的 Techniques in diagnostic human biochemical genetics 書中有一專章在介紹 pterins 的，¹⁹ 其中也包括測量的方法，此書也常被引用。^{32, 71, 78, 79}

以下表格中所列為本實驗尋找適合條件時所參考之主要文獻：

表 1- 10 各研究螢光偵測條件設定之比較

Authors (year)	Analytical Column	Fluorescence Detection (nm)		Mobile Phase	Flow Rate (mL/min)	Sample
		Ex [*]	Em ^{\$}			
Fukushima (1980) ⁵³	Whatman Partisil 10ODS (4.6 mm x 250 mm),	350	410	Isocratic solvent system of 5% or 20% methanol in water	1	standard and rat tissue
Tani and Ishihara (1990) ⁵⁴	5C ₁₈ 3 µm, 4.6 x 250 mm	350	440	50 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 5% methanol and 0.1 mM EDTANa ₂	0.8	standard
Palfrey and Labib (1993) ⁵⁵	Spherisorb C ₈ 3 µm, 4.6 x 100 mm	350	440	15 mM potassium phosphate pH 6.5	0.8	Serum (neopterin)

*Ex, excitation; \$Em, emission

表 1- 5 各研究中電化學偵測條件設定之比較

Authors (year)	Analytical Column	Electrochemical detection (mV)	Mobile Phase	Flow Rate (mL/min)	Sample
Brautigam and Dreesen (1982) ⁵⁷	ODS-Hypersil 5-µm, 4.6x125 mm	100-900 (BH ₄ →200, BH ₂ →850)	pH 3.3 citrate phosphate buffer (13.3 mM citric acid and 6.6 mM Na ₂ HPO ₄), 60 uM EDTA, 14 mM octanesulfonic acid monohydrate	2.0	standard
Lunte and Kissnger (1983) ⁵⁸	Biophase C ₁₈ 5-µm (25 cm x 4.6 mm)	300	3 mM octyl sodium sulfate buffered to pH 2.5 with a 0.1 M phosphate buffer	1.0	urine

Tani and Ishihara (1990) ⁵⁴	ODS column 4.6 x 150 mm (35°C)	750 mV vs. Ag/AgCl	0.6 % triethylamine, 8% acetonitrile, 0.1 mM EDTANa ₂ , 10 mM heptanesulphonate Na pH adjusted with orthophosphoric acid to 2.7	0.8	rat brain
---	--------------------------------------	--------------------	--	-----	-----------

表 1- 6 各研究中串聯螢光與電化學偵測條件設定之比較

Authors (year)	Analytical Column	Electrochemical Detection (mV)	Fluorescence Detection (nm)		Mobile Phase	Flow Rate (mL/min)	Sample
			Ex	Em			
Lunte and Kissinger (1986) ⁴⁸	Biophase ODS 5 µm (30°C)	I : +800 II : -700	348	444	3mM octylsodium sulfate in pH 2.5 0.1 M sodium phosphate buffer contained 5% methanol	1.3	CSF
Howells and Hyland (1986) ³⁵	Apex 5 µm ODS 4.5x250 mm (25°C)	I : -200 II : -500 Cond* : +1000	348	444	6.8 g sodium acetate, 1.05 g citric acid, 20 mg EDTA, and 24.7 mg DTE in 800 mL distilled water, adjusted pH to 5.22 with NaOH or glacial acetic acid to final volume 1L	1.3	CSF
Candito <i>et al</i> (1994) ⁵⁰	Ultrasphere ODS 5 µm, 4.6x250 mm	I : + 500 II : - 100 Aux ^{\$} : 1000	340-370	430-470	6.8 g/L sodium acetate, 1.05 g/L citric acid, 150 mg/LDTE and 20 mg/L EDTA(Na) ₂ , pH 5.2	N/A	CSF

* cond, conditioning \$ aux, auxiliary

在以上三個比較表中，有些研究使用陽離子交換，有些使用逆相層析，也有些是使用離子對色層分析管柱，就經驗上來說陽離子交換與離子對色層分析管柱較適用於分析不同氧化態的 pteridines，藉著其在第五個與第八個氮上的鹼強度不同來分析。逆相色層分析管柱則適合用於分離完全氧化態，但帶有不同支鏈的 pterins。⁸⁰



第二章 動機與目的

由 BH_4 缺乏所造成的異型 PKU 在國內和在西方國家相比較之下發現， BH_4 缺乏在國內相對的佔有比較重要的地位，並且在臨床上發現有許多不明原因造成心智功能發育遲緩的孩童，懷疑跟腦脊髓液中 BH_4 的濃度有關係；而目前國內尚無一個穩定的方法能夠去測量腦脊髓液中的 BH_4 以及相關 pterins 濃度，因此本研究嘗試參考並修改文獻上所使用的方法，以測定有心智功能發育遲緩現象之小朋友腦脊髓液中 BH_4 以及相關 pterins 濃度，期望能藉以發現腦脊髓液中 BH_4 的濃度和心智功能發育之間的關聯。同時測定神經系統發育正常小朋友^註腦脊髓液中 BH_4 的濃度，藉此建立一個國人腦脊髓液中 BH_4 以及相關 pterins 濃度的參考範圍。

註：因腦脊髓液取得不易，因此取台大醫院小兒血液腫瘤科病房的病童或者疑有腦膜炎或因其他原因而做脊椎穿刺術孩童的腦脊髓液做為對照組，建立參考範圍

第三章 實驗試劑與儀器

第一節 實驗藥品與試劑

試藥	製造廠	產地
1,4-Dithioerythritol (DTE)	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin dihydrochloride	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
6-Biopterin	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
7,8-Dihydro-L-biopterin	Fluka	Buchs, Switzerland
Citric acid monohydrate	Merck	Darmstadt, Germany
D-erythro-Neopterin	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA Na ₂)	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt tetrahydrate (EDTA Na ₄)	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
Ortho-phosphoric acid 85%	Merck	Darmstadt, Germany
Potassium hydrogen phosphate	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.
Sodium hydroxide	Merck	Darmstadt, Germany
Sodium phosphate	Sigma	St. Louis, MO, U.S.A.

第二節 實驗儀器

一、以 HPLC 測定 neopterin、biopterin 與 BH₄ 之部份

儀器名稱、型號與廠牌 產地		
高效能液相層析系統		
System controller	SCL-10Avp Shimadzu,	Kyoto, Japan
Fluorescence detector	RF551 Shimadzu,	Kyoto, Japan
Electrochemical detector	LC-4C BAS,	Lafayette, LA, U.S.A
Auto injector	SIL-10A Shimadzu,	Kyoto, Japan
Pump	LC-10AD Shimadzu,	Kyoto, Japan
Degaser	SCL-10Avp Shimadzu,	Kyoto, Japan
高效能液相層析管柱		
Luna 5 μ C ₁₈ (2) column, 4.6 mm id x 150 mm, 5 μ m particle size, Phenomenex		Torrance, CA, U.S.A
SecurityGuard guard cartridge, 3 mm i.d. x 4 mm, C ₁₈ , Phenomenex		Torrance, CA, U.S.A
其它儀器		
純水製造儀	NANOpure Barnstead	Dubuque, IA, U.S.A.
超音波震搖機	Ultrasonik NEYTECH	New York, NY, U.S.A.
超高速冷凍離心機	Centrifuge 5804 R Eppendorf	Hamburg, Germany
管柱加熱器	CH-500 Eppendorf	Hamburg, Germany
附濾膜微量離心管	Ultrafree-MC Millipore	Billerica, MA, U.S.A.
分光光度計	SpectraMax Plus	Molecular devices, CA, U.S.A.

螢光光度計	SpectraMax GeminiXS	Molecular devices, CA, U.S.A.
酸鹼度計	CyberScan 500 Eutech	Singapore

二、以 LC/MS-MS 測定 neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 之部份

	儀器名稱、型號與廠牌	產地
HPLC 系統	Alliance 2690 Waters	Milford, Massachusetts, U.S.A
層析管柱	Inertsil ODS-2 column 4.6 mm id x 150 mm, 5 µm particle size, Phenomenex	Torrance, CA, U.S.A
離心機	Centrifuge 5402 Eppendorf	Hamburg, Germany
質譜儀	Quattro Ultima TM Micromass	Manchester, England
固相萃取裝置	SPE-Oasis [®] Waters	Milford, Massachusetts, U.S.A

第四章 實驗方法

第一節 Tetrahydrobiopterin 最適定量條件建立

本研究使用 HPLC 系統之偵測器為電化學偵測器 (BAS LC-4C)，其餘包括自動注入裝置 (Shimadzu SIL-10A)、高壓幫浦 (Shimadzu LC-10AD)、系統控制器 (Shimadzu SCL-10AVP) 則為 Shimadzu LC-10A 系列；並且使用層析管柱加熱器 (Eppendorf CH-500)、C₁₈ 保護管柱 (Phenomenex Security Guard) 及 C₁₈ 層析管柱 (Phenomenex LUNA 5 μ C₁₈ (2) column) (5 μ m particle size ; 4.6 x 150 mm)。層析管柱加熱器溫度設定在 30°C 進行分析，注射量 40 μ L。

表 4-1 本研究用層析管柱特性

廠牌/ 型號	Phenomenex/ Luna
填充	C18, endcapped
規格	4.6 x 150 mm
耐壓	220 psi
耐酸鹼度	pH 1.5-10.0

一、不同緩衝溶液對分離效果的影響

本研究分別配製磷酸、檸檬酸與醋酸緩衝溶液以用於分析 BH₄，並依據其分離效果的不同，擇定一個較適合用於分析 BH₄ 的緩衝溶液

系統。

表 4-2 各緩衝溶液之條件比較

	磷酸緩衝溶 液	磷酸緩衝溶 液	檸檬酸緩衝 溶液	醋酸緩衝溶 液
溶質化學式	K_2HPO_4	H_3PO_4	$C_6H_8O_7$	CH_3COONa
溶質濃度	100 mM	50 mM	50 mM	100 mM
pH 值	2.75		2.5	
pKa 值	pKa ₁ = 7.20	pKa ₁ = 2.15	pKa ₁ = 3.13	pKa= 4.76
	pKa ₂ = 12.35	pKa ₂ = 7.20	pKa ₂ = 4.76	
		pKa ₃ = 12.35	pKa ₃ = 6.40	

二、緩衝溶液 pH 值對 BH_4 滯留時間之影響

配製不同 pH 值之移動相，觀察 pH 值對滯留時間之影響。

三、分析 BH_4 最適電位之找尋

將電化學偵測器的電位依序設定在 100~900 mV 間進行分析，以選出一個最適合分析 BH_4 的電位。

四、流速影響之探討

分別以每分鐘流速 1.0、0.8、0.4 與 0.3 mL 來分析，探討不同流速對 BH_4 分析所造成的影響。

第二節 Neopterin 及 Biopterin 最適定量條件之建立

本研究使用 HPLC 系統之螢光偵測器為 Shimadzu RF-551，其餘包括自動注入裝置（Shimadzu SIL-10A）、高壓幫浦（Shimadzu LC-10AD）、系統控制器（Shimadzu SCL-10AVP）則為 Shimadzu LC-10A 系列；並且使用層析管柱加熱器（Eppendorf CH-500）、C₁₈ 保護管柱（Phenomenex Security Guard）及 C₁₈ 層析管柱（Phenomenex LUNA 5 μ C₁₈ (2) column）（5 μ m particle size；4.6 x 150 mm）。層析管柱加熱器溫度設定在 30°C 下進行分析，注射量 40 μ L。

一、適合分析 neopterin 與 biopterin 之激發波長與放射波長之選擇

首先利用分光光度計，紫外光波長設定 300~500 nm，尋找 neopterin 與 biopterin 之紫外光最大吸收波長。

其次利用螢光光度計，設定激發波長為上一步所尋找出之波長，放射波長從 370~520 nm，尋找發出最大螢光訊號之波長。

二、緩衝溶液與其 pH 值對 neopterin 與 biopterin 滯留時間和分離效果之影響

本實驗配製不同濃度與 pH 值之緩衝溶液，如表 4-3，分析不同緩衝溶液系統與其 pH 值對 neopterin 與 biopterin 滯留時間及分離效果之

影響，並藉此選定最適合分析 neopterin 與 biopterin 的條件。

表 4-3 各緩衝溶液系統之條件比較

緩衝溶液	磷酸	檸檬酸	檸檬酸	檸檬酸
溶質化學式	H_3PO_4	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
溶質濃度	50 mM	50 mM	5 mM	5 mM
pH	2.5	4	5.2	5.5

三、流速影響之探討

分別以每分鐘流速 1.8、1.0 與 0.5 mL 來分析，探討不同流速對 neopterin 與 biopterin 分析所造成的影響。



第三節 Neopterin、Biopterin 與 BH_4 之 HPLC 分析方法

一、標準溶液之保存與前處理

先秤 DTE 及 EDTA Na_4 各約 1 mg，並分別置入 1.5 mL 棕色微量塑膠離心管中，置於 -20°C 冰箱中保存，於欲收取腦脊髓液之前再從冰箱拿出。每管約收集 1 mL 的腦脊髓液，立即置入液態氮筒中，再移至 -80°C 冷凍櫃中保存。分析前取出退冰，在 10,000 g 下離心 10 分鐘後再進行分析。

二、HPLC 分析過程中抗氧化處理

在每公升之移動相中加入 20 毫克的 EDTA Na_2 及 150 毫克的 DTE，以避免在分析過程中檢品氧化所造成的不穩定情形。

第四節 HPLC 分析方法之確效

取預先配製好儲存於 -80°C 冰箱之標準溶液，以移動相(分析 BH_4 以 pH 2.5 之磷酸緩衝溶液；分析 neopterin 與 biopterin 則以 pH 5.2 之檸檬酸緩衝溶液)稀釋，配製濃度各為 5、10、50 與 100 ng/mL。

一、同日內與異日間之精確度與準確度 (Intraday and Interday Precision and Accuracy)

配製濃度各為 5、10、50 與 100 ng/mL 之標準溶液，以高速冷凍離心機在 12,000 g 下離心 40 分鐘後，注入 HPLC 中分析，得到標準品之層析峰面積；以各配製濃度為橫軸，標準品層析峰面積為縱軸，各建立三條檢量線 ($n = 3$)，每個濃度點皆配製三個檢品，於同一批次 (同日內) 以及不同批次 (異日間) 分析完畢。計算各檢測濃度之平均值 (mean)、標準差 (standard deviation, SD)、變異係數 (coefficient of variation, CV) 及準確度 (accuracy)，而準確度的求法則如下式，由建立之檢量線計算回推濃度。準確度 = (回推濃度 / 配製濃度) $\times 100\%$

除最低可定量濃度及定量極限 (limit of quantification, LOQ) 之層析峰面積，可容忍之 CV 為 20% 與準確度為 80 ~ 120% 外，其餘各濃度皆應在 CV 為 15% 與準確度為 85 ~ 115% 的範圍內。^{81, 82}

二、檢量線之直線性 (Linearity)

以標準品所配製之濃度值為橫軸，以測得之層析峰面積值為縱軸，作圖所建立曲線之相關係數 (correlation coefficient, r^2) 應大於 0.99。

三、偵測極限 (LOD) 與定量極限 (LOQ)

LOD (limit of detection)：訊號/雜訊比= 3 時之標準品濃度

LOQ (limit of quantitation)：為校正曲線之最低點，至少為 LOD 之兩倍且同日內、異日間之變異係數要小於 20%，準確度須在 80-120 % 的範圍內。



第五節 運用 LC/MS-MS 方法定量 Pterins

一、實驗儀器

本實驗所使用之 LC/MS-MS 為 Waters Alliance 2690 系列之系統，包含有幫浦、自動注入系統及管柱控溫系統，連接於以化學電灑為離子化源（electrospray ionization，ESI）之質譜儀 Quattro Ultima。化合物之分離使用 Phenomenex 逆相層析管柱 Inertsil（150 x 4.6 mm i.d.），移動相 C 成份為 0.1 % formic acid，pH 2.46；D 成份為 MeOH，系統保持移動速度為 0.8 mL/min，移動相比例 95%C 與 5%D，注射量為 10 μ L。



二、分析條件設定

表 4- 4 LC/MS-MS 分析條件之設定

Electrospray interface parameter 設定

Capillary voltage	2.5 V for positive mode
Source temperature	80°C
Desolvation temperature	380°C
Con gas flow	102 L/hr
Desolvation gas flow	616 L/hr
Cone voltages	30 V
Collision energy	-17 eV

三、標準溶液前處理：

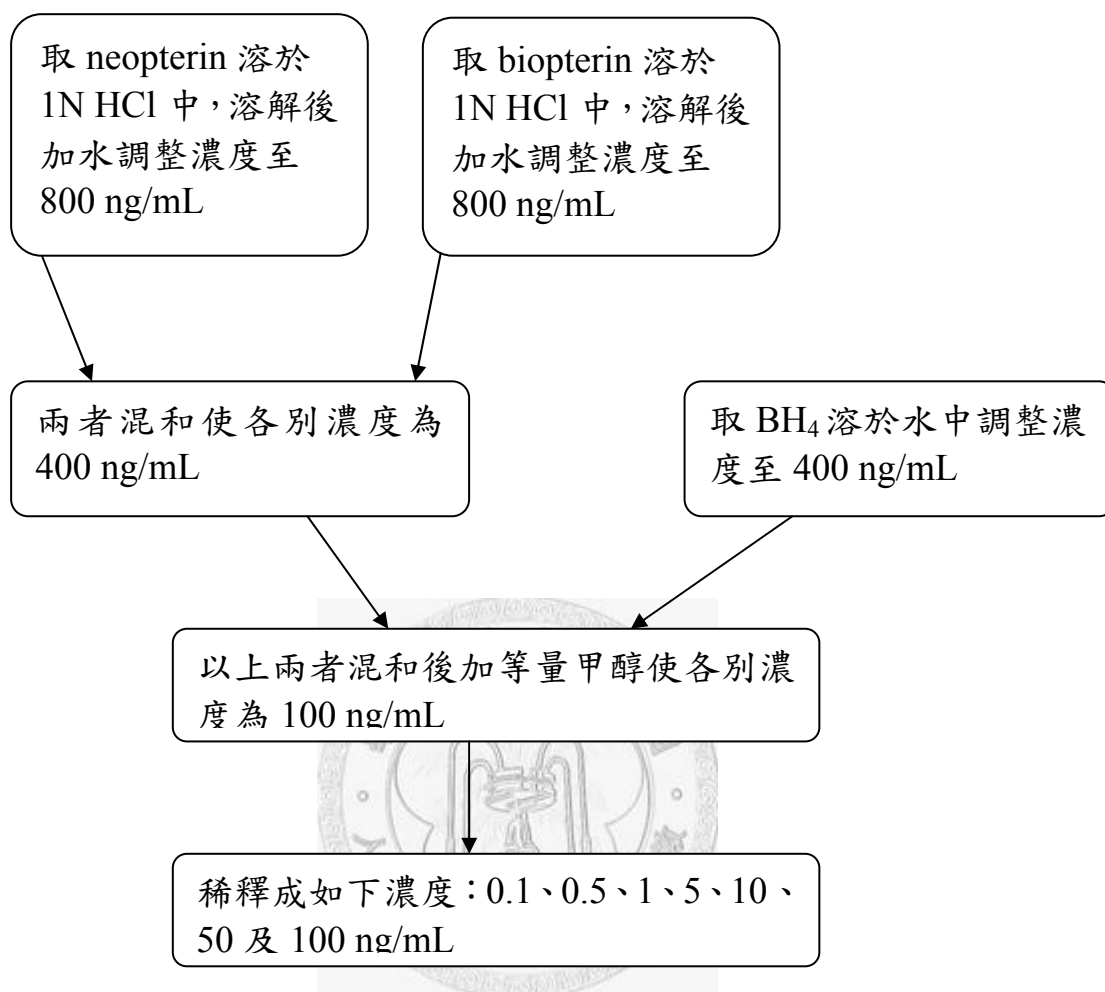


圖 4-1 標準溶液之配製與前處理

第六節 HPLC 與 LC/MS-MS 分析方法應用於人類腦 脊髓液檢體之上

一、檢體的保存與前處理

先秤 DTE 及 EDTA Na₄ 各約 1 mg，並分別置入 1.5 mL 棕色微量塑膠離心管中，置於 -20°C 冰箱中保存，於欲收取腦脊髓液之前再從冰箱拿出。每管約收集 1 mL 的腦脊髓液，立即置入液態氮筒中，再移至 -80°C 冷凍櫃中保存。

二、實驗組檢體之收集

實驗組納入之條件為：台大醫院小兒部住院病房內有身心發展遲緩情形之孩童，並且在收集檢體之當時排除同時存在有如腦出血、感染或神經學方面急性疾患之病童，並且有由家長簽署之受試者同意書。臨床試驗計畫核准書副本附於附錄。

三、檢體前處理步驟與分析流程

以不同方式處理檢體，並運用不同的偵測器測定不同成份，分別以螢光偵測器測定 neopterin 與 biopterin、以電化學偵測器測定 BH₄ 及以 LC/MS-MS 分別測定 neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 在 CSF 中的含量。

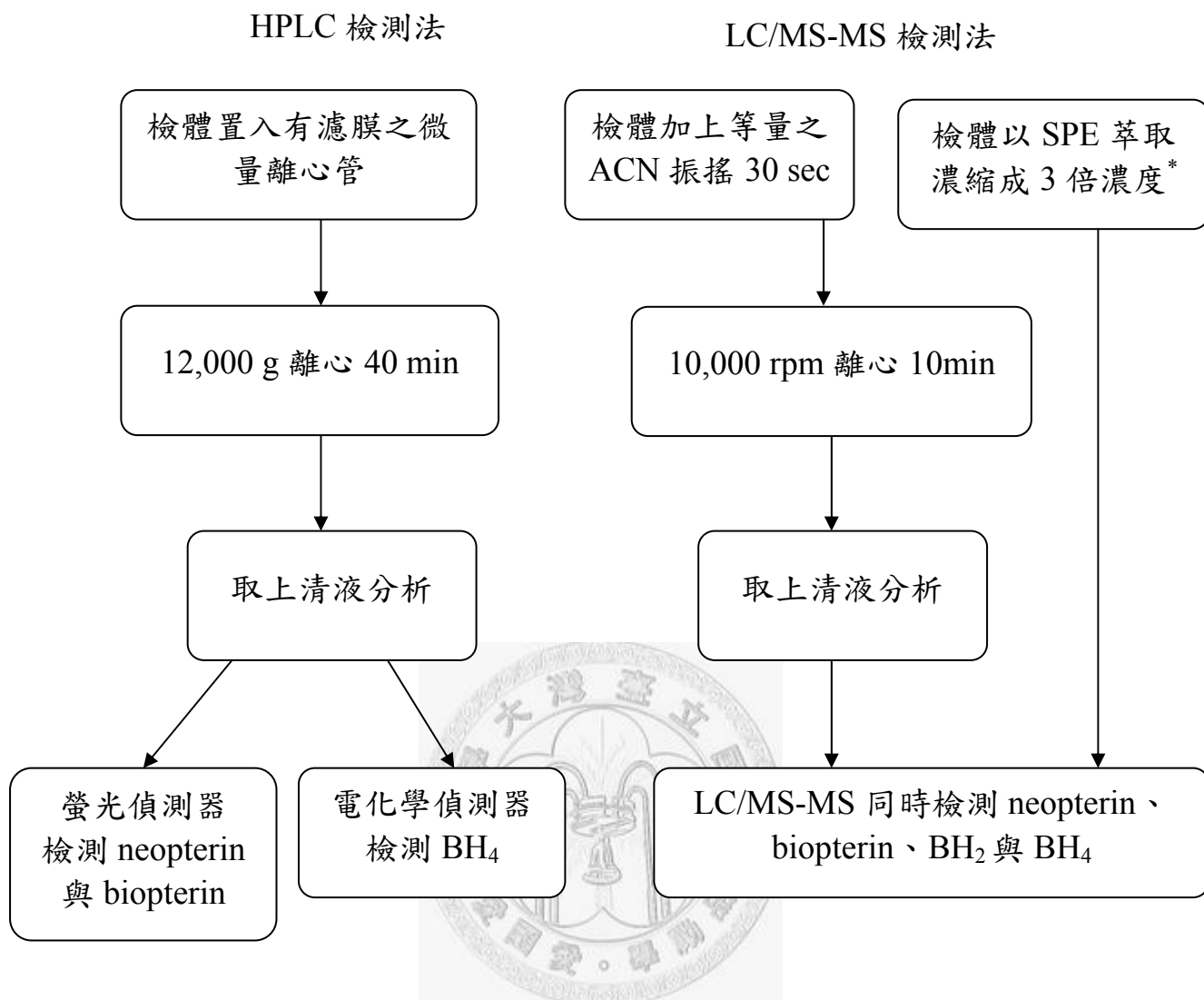


圖 4-2 檢品前處理步驟與分析流程

* SPE, solid phase extraction；以 Waters 之 oasis SPE 做固相萃取，步驟為先將裝備以甲醇與蒸餾水活化之，流出後棄置，接著填入檢體 300 μ L，以 5% 甲醇抽提，再加入甲醇 1 mL，之後使甲醇揮發，得到固體；最後再以含 1% acetic acid 之 50% 甲醇 100 μ L 溶解之後，取適量注入分析系統。

第五章 結果

第一節 Tetrahydrobiopterin 之 HPLC 測定結果

本實驗使用 Shimazu LC10A 系列之幫浦、系統控制器及自動注入系統，分析管柱為 Phenomex LUNA 5 μ C₁₈，分析管柱溫度控制在 30 °C。偵測器使用 BAS LC-4C 電化學偵測器，電化學偵測器電極操作方向為 parallel，設定偵測器輸出 range 為 20 nA；filter 為 0.5 Hz 以測定 BH₄，注射量為 40 μ L。

一、各類緩衝溶液對分離效果之影響

配製不同之緩衝溶液系統在電化學偵測器設定電位為 700 mV、流速 1 mL/min 之下分析濃度為 50 ng/mL 之 BH₄ 所得到的結果如圖 5-1。分離效果最佳者為磷酸緩衝系統。

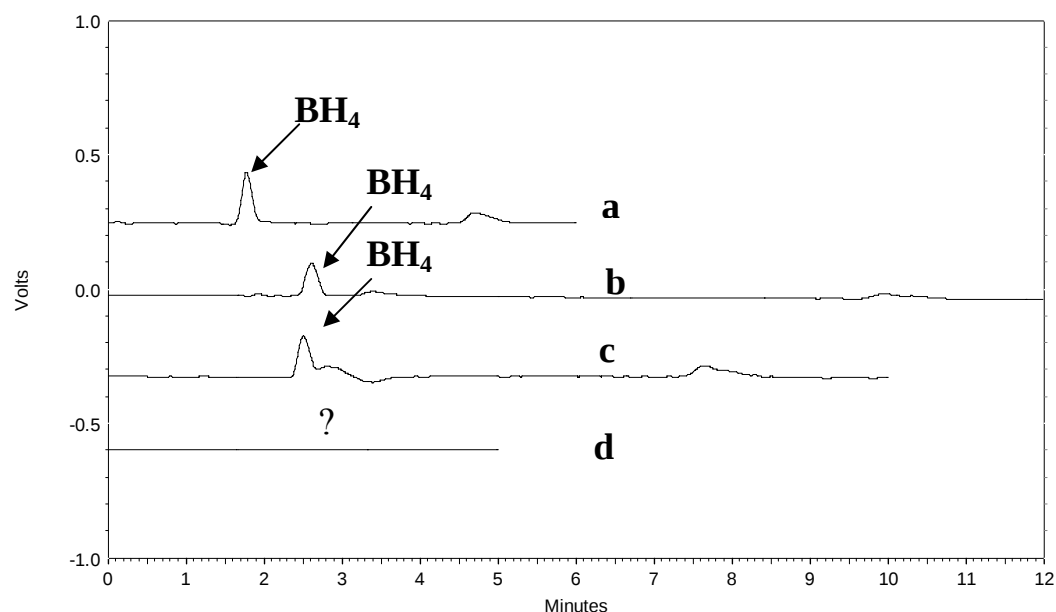


Fig. 5-1 The electrochemical chromatogram of 50 ng/mL BH_4 at different buffer systems.

Under E_{app} 700 mV, flow rate 1 mL/min; b line represents the best separation.

圖 5-1 高效液相層析圖，在電位 700 mV，流速 1 mL/min 下於各類緩衝溶液系統中分析濃度 50 ng/mL 之 BH_4 ，b 之分離效果最佳。

a, pH 2.5 acetic buffer; b, pH 2.5 phosphoric buffer; c, pH 2.5 citric buffer; d, dihydrogen phosphoric buffer

二、Tetrahydrobiopterin 之最適電位選定

Tetrahydrobiopterin 的層析峰隨著電位增加有逐漸增大的趨勢。電位越大，所得之層析峰下面積越大，如圖 5-2；但電位越高，雜訊的干擾也跟著變大，如圖 5-3，將電位 600~900 mV 部份放大來看，可看到 800 與 900 mV 所得到的雜訊明顯增大許多，選定 700 mV 做為最適合測定 BH_4 之電位，亦和 Tani (1990)⁵⁴ 所使用的 750 mV 類似。

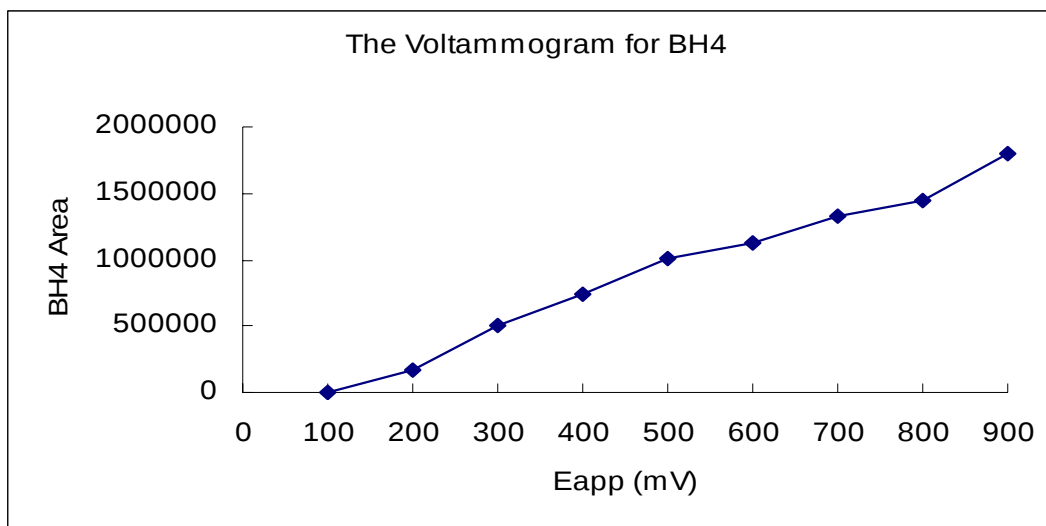


Fig. 5-2 The voltammogram for BH₄ from 100 mV to 900 mV.

The larger the potential, the bigger the BH₄ undercurve area.

圖 5-2 測定電位與 BH₄ 層析峰下面積之關係，從 100 mV 測到 900 mV，電位越大，層析峰下面積亦越大。

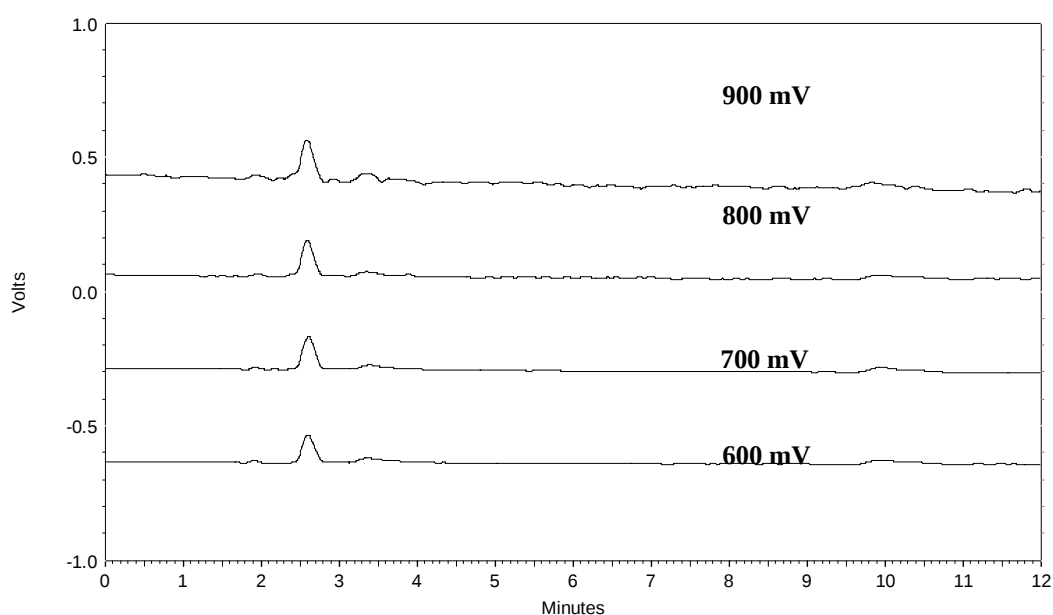


Fig. 5.3 The electrochemical chromatogram of 2.2 µg/mL BH₄ at E_{app} 600 ~ 900 mV.

The larger the potential, the bigger the noise signal.

圖 5-3 高效液相層析圖，電化學偵測器設定電位 600~900 mV 測定濃度 2.2 µg/mL 之 BH₄。電位越大，雜訊亦越大。

三、流速之影響

由表 5-1 與圖 5-4 可得知 pH 2.5 之磷緩衝系統在不同流速下，層析峰的滯留時間、分離效果以及層析峰下面積或層析峰高度都會有所不同；在流速為 1.0 mL/min 時， BH_4 層析峰與後面的背景峰相連接，分離的效果並不是很理想。在流速減低至 0.8、0.4 與 0.3 mL/min 時， BH_4 層析峰和後面背景峰的分離效果越來越好，而層析峰下的面積與層析峰的高度也越來越大，推想是由於流速減慢，電化學偵測器所提供的氧化反應時間變長，因此得到較大的層析峰。一般以電化學偵測器測定相關神經傳導物質之流速亦常使用 0.4 mL/min，因此選定 0.4 mL/min 測定 BH_4 。

Table 5-1 The flow rate versus retention time using pH 2.5 phosphoric buffer

表 5-1 不同分析流速下層析峰滯留時間

pH 2.5 phosphate buffer				
FR (mL/min)	1.0	0.8	0.4	0.3
RT (min)	2.68	3.07	5.96	7.90

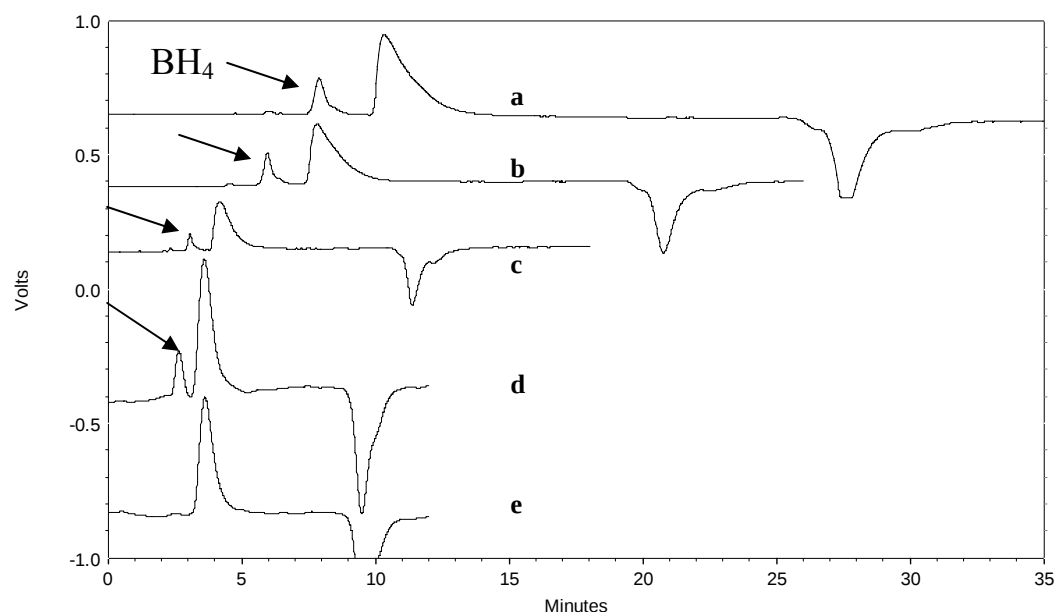


Fig. 5.4 The electrichemical chromatogram of 50 ng/mL BH_4 at different flow rate.

The slower the flow rate, the better the separation, but the peak will be widened.

圖 5- 4 高效液相層析圖，不同流速下以電化學偵測器測定 BH_4 ，流速越慢分離效果越好，但層析峰會擴散開來。

a, 0.3 mL/min; b, 0.4 mL/min; c, 0.8 mL/min; d, 1.0 mL/min; e, blank buffer without BH_4 in it

四、影響訊號

在上述所有 BH_4 層析圖譜中，在 BH_4 通過後皆各出現一個向上與向下的影響訊號，此影響訊號的來由是因為本實驗過程中，檢品的注入採自動注入系統，而此自動注入系統在注射每個檢品之後，皆會抽取一旁的清洗液來確保自動注入系統的乾淨，此清洗液為 ACN 與純水 1：1 的溶液，與移動相的成份相差甚遠，因此影響極為靈敏的電

化學偵測器。

在將清洗液置換成分析檢品所使用的移動相之後，此兩個影響訊號即消失，此後應採取相同的作法，將清洗液置換成分析檢品所使用的移動相，以消除此影響訊號。如圖 5-5：

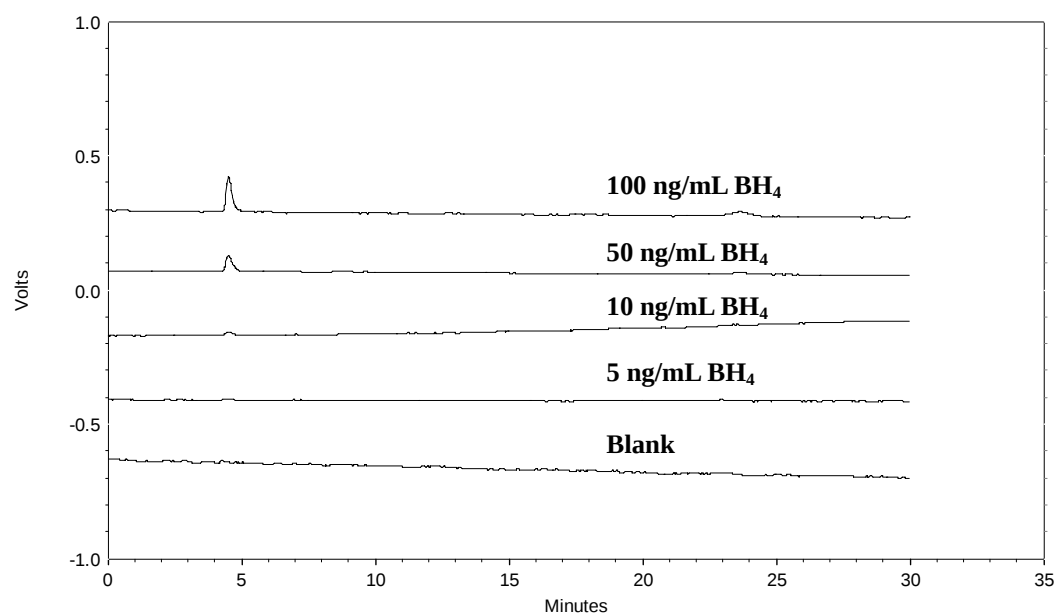


Fig. 5-5 The eletrichemical chromatogrm of BH_4 at E_{app} 700 mV with buffer as the washing material.

The interfering peaks were disappeared.

圖 5-5 高液相層析圖，以移動相做檢品自動注入系統之清洗液測定 BH_4 ，影響訊號消失了。

第二節 Neopterin 與 Biopterin 之 HPLC 測定結果

利用螢光偵測器測定 neopterin 與 biopterin，本實驗使用 shimazu LC10A 系列之幫浦、系統控制器及自動注入系統，分析管柱為 phenomex LUNA 5 μ C18，分析管柱溫度控制在 30 $^{\circ}$ C。偵測器使用 Shimazu RF-551 螢光偵測器，注射量 40 μ L。

一、激發波長與放射波長之選定

Neopterin 與 biopterin 最大紫外光吸收波長為 344 nm

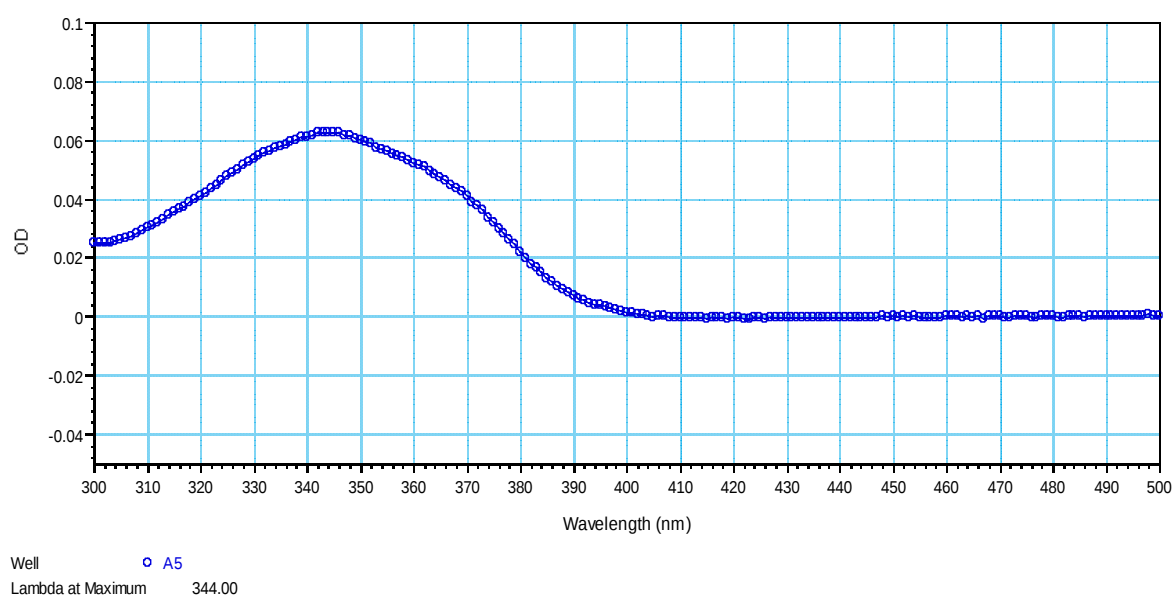


Fig. 5-6 The ultraviolet absorption graph of neopterin and biopterin screened wavelength from 300 nm to 500 nm, maximum 344 nm

圖 5-6 Neopterin 與 biopterin 之紫外光吸收，紫外光波長由 300 nm 到 500 nm，最大值在 344 nm

設定激發波長 344 nm 測 neopterin 與 biopterin 在放射波長 370～520 nm 間平均最大之螢光吸收為 448 nm。

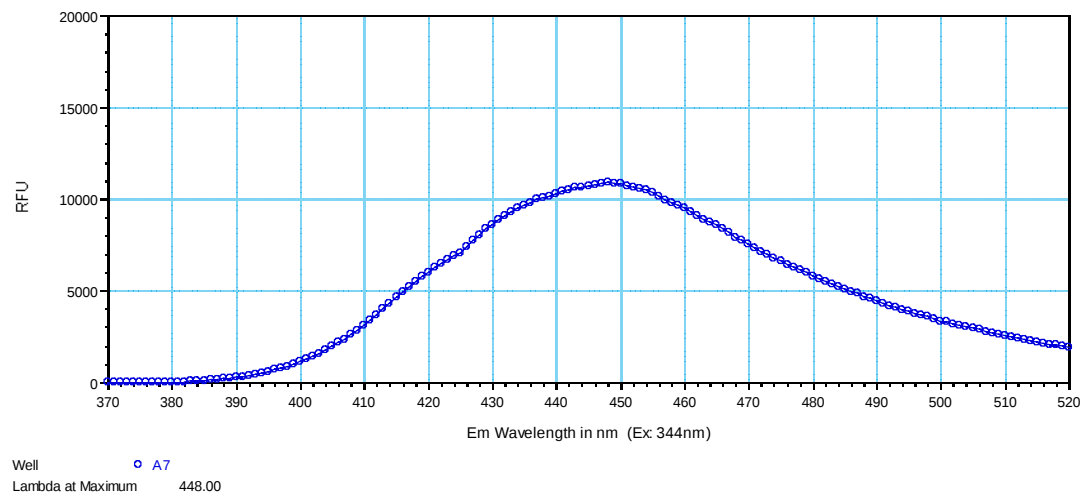


Fig. 5-7 The fluorescence graph of neopterin and biopterin at excitation wavelength 344 nm and emission wavelength from 370-520 nm, maximum at 448 nm.

圖 5-7 Neopterin 與 biopterin 在激發波長 344 nm 放射波長 370-520 nm 之間所放射之螢光強度圖，最大在 448 nm

另外設定激發波長為 350 nm，所得之螢光吸收皆較 344 nm 大，因此最後選定激發波長 350 nm、放射波長 448 nm 做為本實驗之波長。

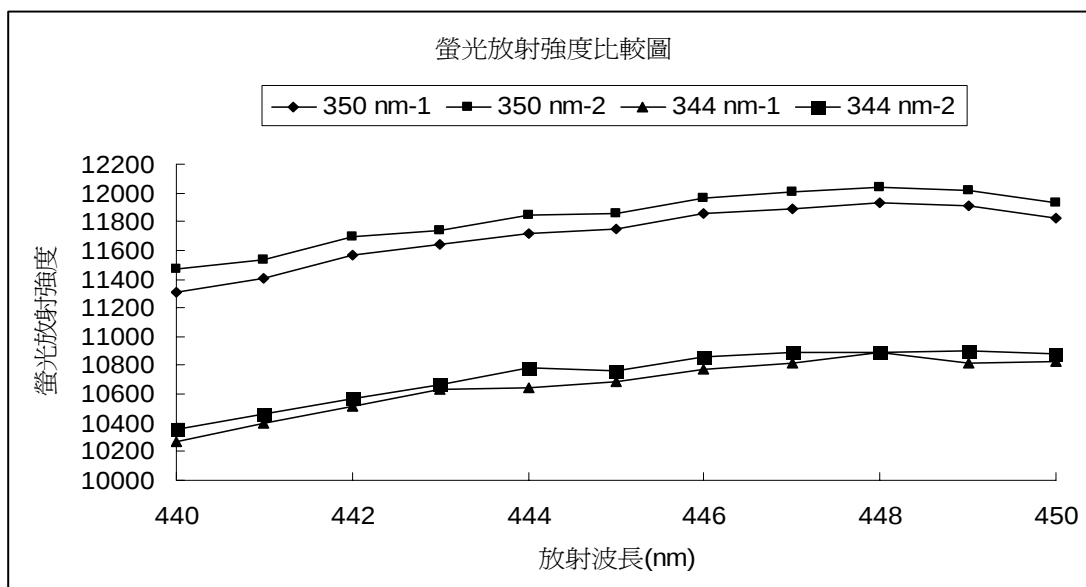


Fig 5-8 Comparison of emitting fluorescence between excitation wavelength 344 nm and 350 nm.

圖 5-8 比較激發波長 344 nm 與 350 nm 之螢光放射強度

二、緩衝溶液之 pH 值對 neopterin 與 biopterin 滯留時間與分離效果之影響

於不同緩衝溶液系統測定 neopterin 與 biopterin 如圖 5-9，不同緩衝溶液系統之 pH 值與分析流速如表 5-2。

由圖 5-9 可得知使用 pH 2.5 之磷酸緩衝溶液為移動相，所得分離效果最差；pH 5.5 之 citrate 與 acetate 緩衝溶液為移動相，所得層析峰不尖銳，理論上在較高流速之下，層析峰應該更尖銳更對稱，因此不選擇 citrate 與 acetate 這個緩衝系統來分析 neopterin 與 biopterin。Citrate 緩衝系統在 pH 5.2 有較大的吸收波峰，因此選定用於測定 neopterin 與 biopterin。

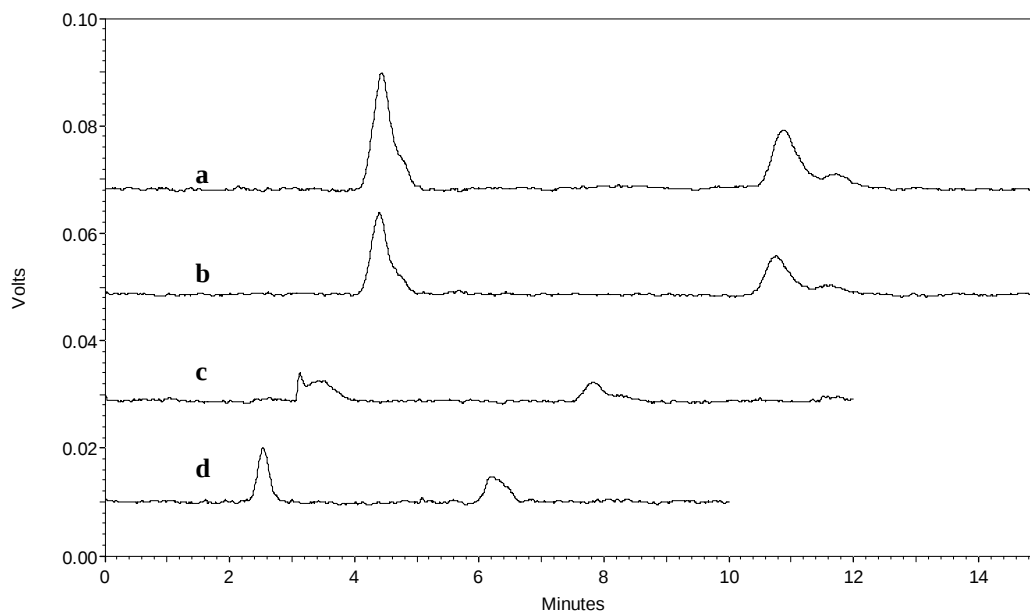


Fig. 5-9 The fluorescence chromatogram of 50 ng/mL neopterin and biopterin at different pH.

A line represents the best separation.

圖 5-9 高效液相層析圖，不同緩衝溶液中以螢光偵測器測定濃度各為 50 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin。緩衝溶液 a 分離效果最佳。

a, citrate buffer pH 5.2; b, citrate buffer pH 4.0; c, phosphate buffer pH 2.5; d, citrate and acetate buffer pH 5.5

Table 5-2 The pH and flow rate of different buffer system

表 5-2 分析不同緩衝系統所使用之 pH 值與流速

	Buffer system	pH	Flow rate
a	5 mM citrate buffer	5.2	1.0
b	50 mM citrate buffer	4.0	1.0
c	Phosphate buffer	2.5	1.0
d	Citrate and acetate buffer	5.5	1.8

三、流速之影響

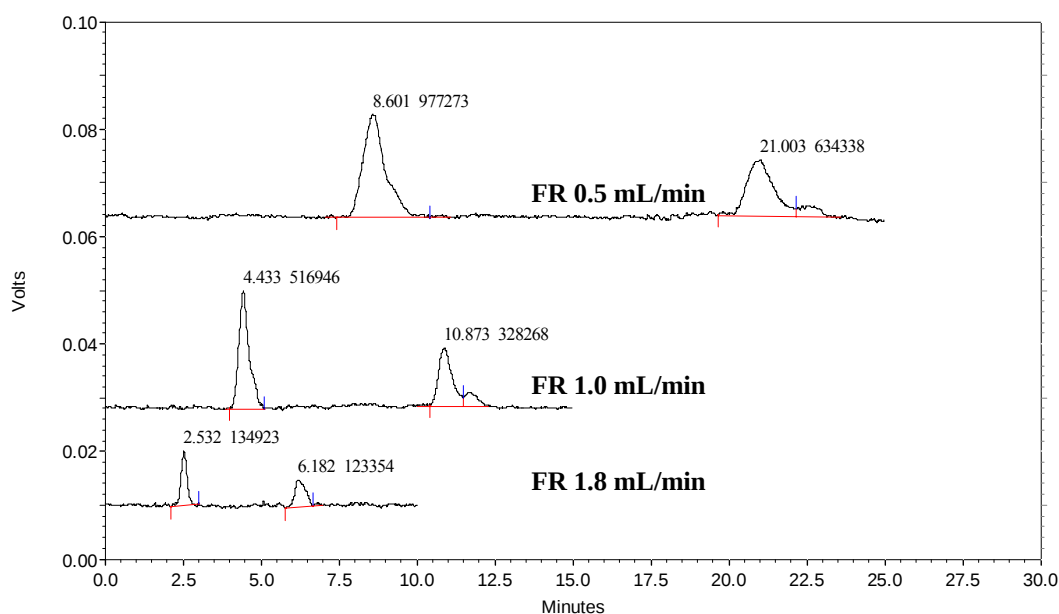


Fig. 5-10 The fluorescence chromatogram of 50 ng/mL neopterin and biopterin at different flow rate.

The slower the flow rate, the bigger the area under the curve, but the peak will be widened.

圖 5-10 高效液相層析圖，不同流速下以螢光偵測器測定濃度為 50 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin 流速越低，層析峰下面積越大，波峰越擴散。

由圖 5-10 得知流速越慢，層析峰下之面積越大，推論也是與反應時間相關，但流速太慢又會使通過層析管柱分離出來的層析峰擴散掉，層析峰峰型也會越來越不尖銳，因此選定流速 0.5 mL/min 為測定 neopterin 與 biopterin 的移動相流速。

第三節 HPLC 分析條件之整理

表 5-3 HPLC 分析條件設定值

偵測器		條件設定
Fluorescence (用於分析 neopterin 與 biopterin)		Em : 350 nm Ex : 448 nm
Electrochemical (用於分析 BH ₄)		E _{app} : +700 mV
分析流速	Fluorescence	0.5 mL/min
	Electrochemical	0.4 mL/min
移動相成份	Fluorescence	5 mM citric acid 並且加入 20 毫克 EDTANa ₂ 與 150 毫克 DTE 以 1N NaOH 滴定至 pH 值為 5.2
	Electrochemical	0.5 mM sodium phosphate 並且加入 20 毫克 EDTANa ₂ 與 150 毫克 DTE 以純 phosphoric acid 滴定至 pH 值為 2.5
層析管柱控溫		30°C
注射量		40 µL

第四節 HPLC 測定 Neopterin 與 Biopterin 之確效

以線性迴歸法計算，不管同日內或異日間之分析，在濃度 5-100 ng/mL 內之檢量線方程式，有良好之線性關係， R^2 皆達到 0.99 以上。如表 5-4、5-6、5-8、5-10。

在同日內與異日間分析之變異係數與準確度皆符合要求，變異係數小於 15%，準確度介於 85-115%，而最小可測定濃度之變異係數小於 20%，準確度亦介於 80-120%。如表 5-3、5-5、5-7、5-9。

最低可測定濃度為 5 ng/mL，最低可定量濃度為 10 ng/mL。實驗結果顯示此分析方不論是在同日內或異日間之精密度及準確度皆在可接受範圍內，即此分析系統在濃度 5-100 ng/mL 範圍內具有良好之靈敏度及再現性。

一、精確度與準確度試驗結果

表 5-4 Neopterin 同日內與異日間精確度與準確度試驗結果

配製濃度 (ng/mL)	同日內			異日間		
	測量濃度 (ng/mL)	精確度 (CV%)	準確度 (CV%)	測量濃度 (ng/mL)	精確度 (CV%)	準確度 (CV%)
5	5.03 ± 0.61	2.81	12.17	5.60 ± 0.81	9.15	14.41
10	10.51 ± 0.33	2.26	3.14	10.57 ± 0.78	6.23	7.39
50	48.37 ± 1.74	3.88	3.40	50.16 ± 1.87	3.09	3.74
100	100.68 ± 0.71	1.05	0.71	100.76 ± 1.28	1.21	1.27

數值以 mean $\pm$ SD 表示，(n = 6)

表 5-5 Biopterin 同日內與異日間精確度與準確度試驗結果

配製濃度 (ng/mL)	同日內			異日間		
	測量濃度 (ng/mL)	精確度 (CV%)	準確度 (CV%)	測量濃度 (ng/mL)	精確度 (CV%)	準確度 (CV%)
5	5.35 $\pm$ 0.34	3.79	6.40	5.41 $\pm$ 0.50	4.93	9.32
10	10.41 $\pm$ 0.63	7.33	6.09	10.24 $\pm$ 0.84	9.48	8.25
50	48.77 $\pm$ 1.01	2.34	2.08	49.78 $\pm$ 1.25	5.18	2.50
100	100.58 $\pm$ 0.47	2.73	0.46	100.19 $\pm$ 0.53	2.69	0.53

數值以 mean $\pm$ SD 表示，(n = 6)

三、直線性

以線性回歸法計算，在濃度 5 ng/mL $\sim$ 1 μ g/mL 範圍內之校正曲線方程式，具有良好之線性關係 ($R^2 > 0.999$)。

以線性回歸法計算同日內或異日間濃度 5 $\sim$ 100 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin，其檢量方程式具有良好線性關係 ($R^2 > 0.998$)。

四、再現性

在總共 162 次分析當中，neopterin 的滯留時間有所不同，平均為 8.18 $\pm$ 0.17 (CV 為 2.10%)，neopterin 波峰出現在第 8 及第 8.3 分鐘這兩個時間點；而 biopterin 的滯留時間亦不完全相同，平均為 20.57 $\pm$

0.80 (CV 為 3.87%)，在第 19、19.7、21 及 21.4 分鐘都曾有 biopterin 波峰出現，不同批次之分析有不同之滯留時間。

五、偵測極限與定量極限

定訊號與雜訊層析峰高度比 3：1 為偵測極限（如圖 5-11），偵測極限之兩倍為定量極限；本實驗之偵測為 5 ng/mL，200 pg；定量極限為 10 ng/mL，400 pg。

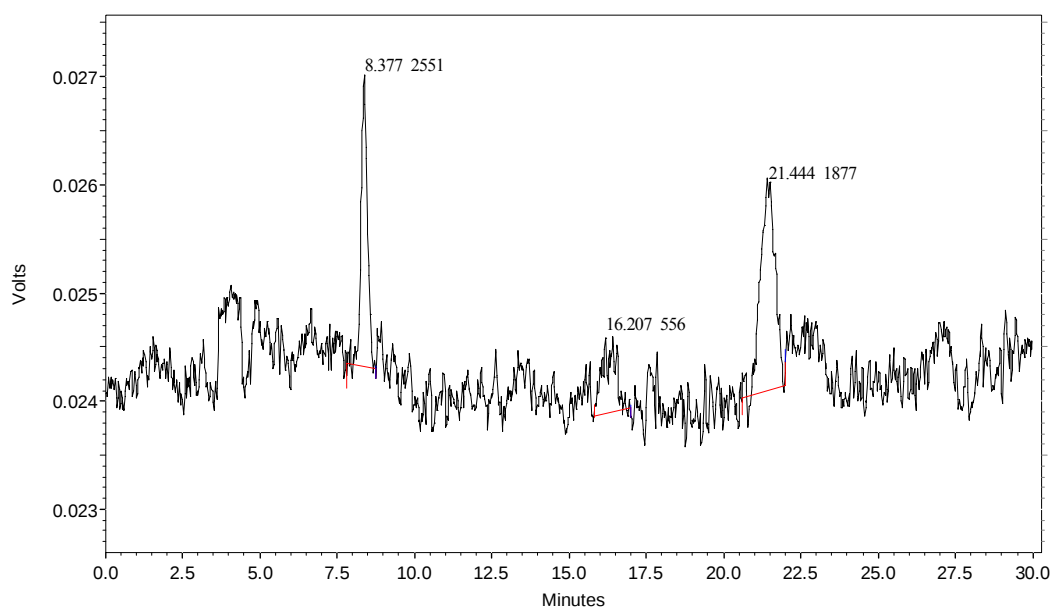


Fig. 5-11 The fluorescence chromatogram of 5 ng/mL neopterin and biopterin.

The LOD and LOQ of neopterin and biopterin.

圖 5-11 高效液相層析圖，以螢光偵測器測定濃度 5 ng/mL 之 neopterin 與 biopterin，為 neopterin 與 biopterin 之定量與偵測極限。

第五節 LC/MS-MS 測定 Pterins 之結果

本實驗使用 Waters Alliance 2690 系列系統，層析管柱為 Inertsil，連接至以化學電灑為離子化源之質譜儀 Quattro Ultima。分析條件設定為以 pH 2.46，5% 甲醇（95% 水中含 0.1% 甲酸）為移動相成份，流速 0.8 mL/min 來分析 neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂。MRM (multiple reaction monitoring) 之 precursor-ion/ product ion 設定為 neopterin : m/z 254→206；biopterin : m/z 238→220；BH₄ : m/z 240→196；BH₂ : m/z 242→166。

一、Neopterin、Biopterin 與 BH₄ 之測量

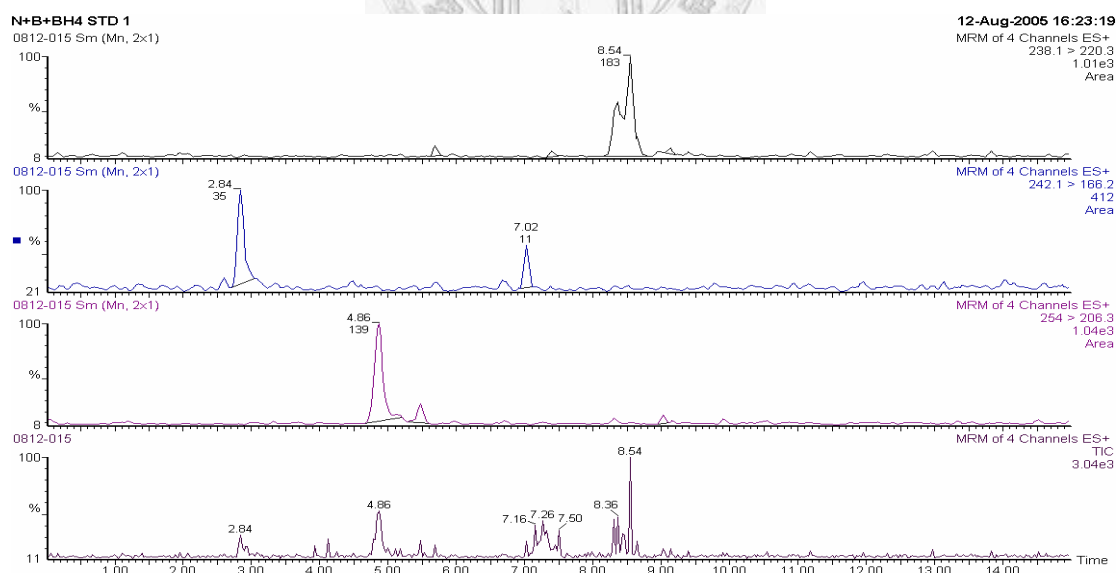


Fig. 5-12 LC/MS-MS chromatograms of 1 ng/mL neopterin、BH₄、biopterin. and all three compound from the top to the button.

圖 5-12 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 1 ng/mL 之 neopterin、BH₄、biopterin 與三者之總和。

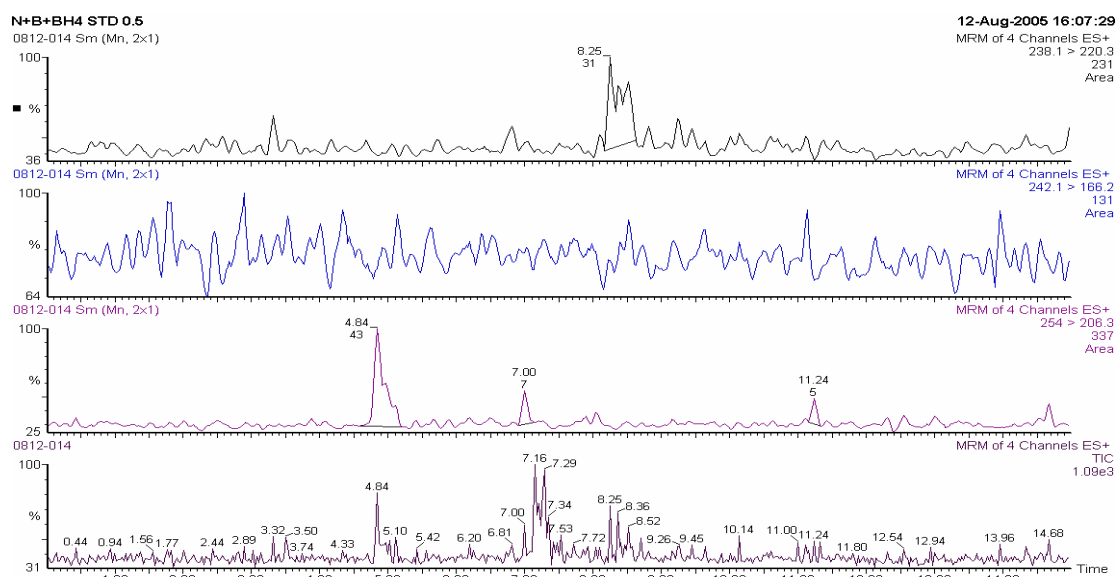


Fig. 5-13 LC/MS-MS chromatograms of 0.5 ng/mL neopterin、BH₄、biopterin and all three compound from the top to the button.

圖 5-13 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 0.5 ng/mL 之 neopterin、BH₄、biopterin 與三者之總和。

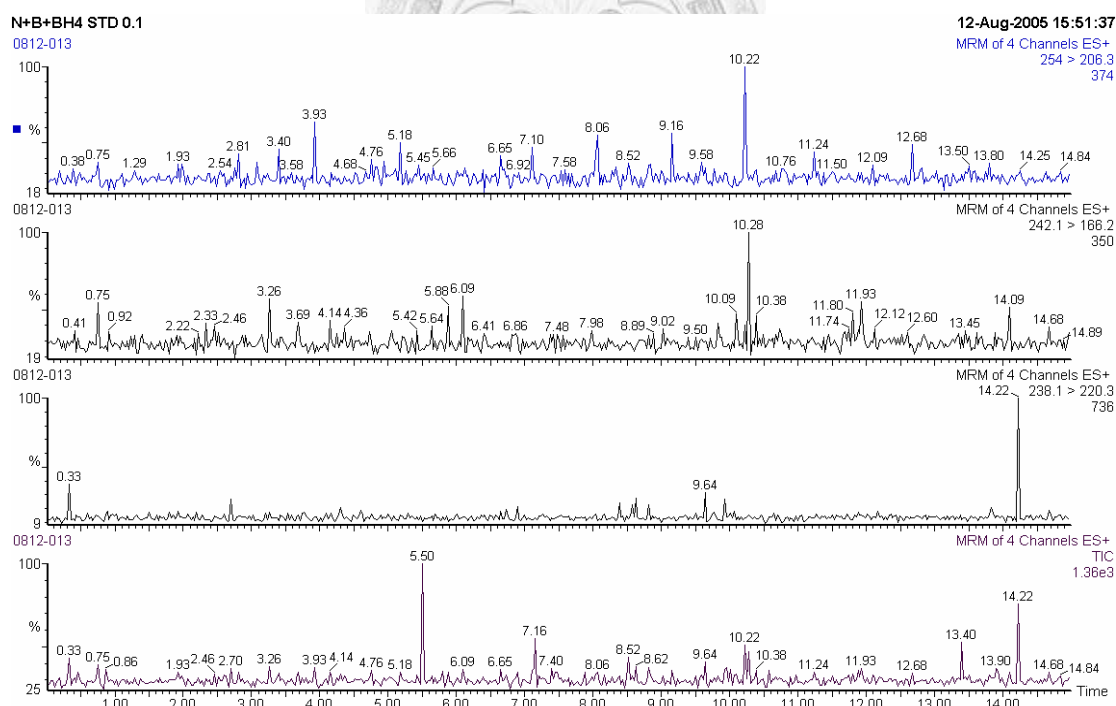


Fig. 5-14 LC/MS-MS chromatograms of 0.1 ng/mL neopterin、BH₄、biopterin and all three compound from the top to the button.

圖 5-14 高效液相層析串聯質譜之層析圖，由上至下為濃度 0.1 ng/mL 之 neopterin、BH₄、biopterin 與三者之總和。

二、BH₂之測量

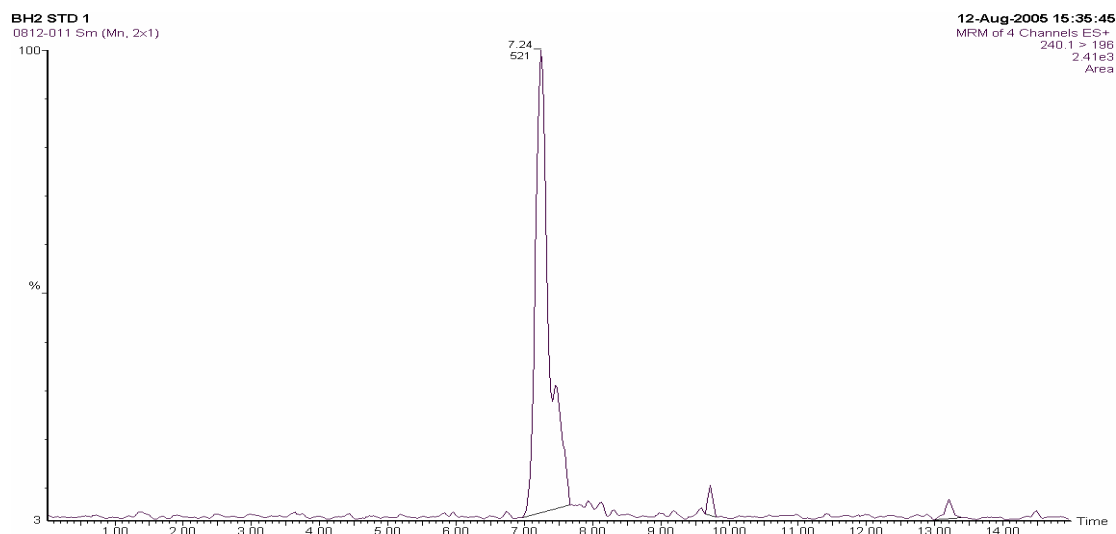


Fig. 5-15 LC/MS-MS chromatograms of 1 ng/mL BH₂

圖 5-15 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH₂濃度為 1 ng/mL)

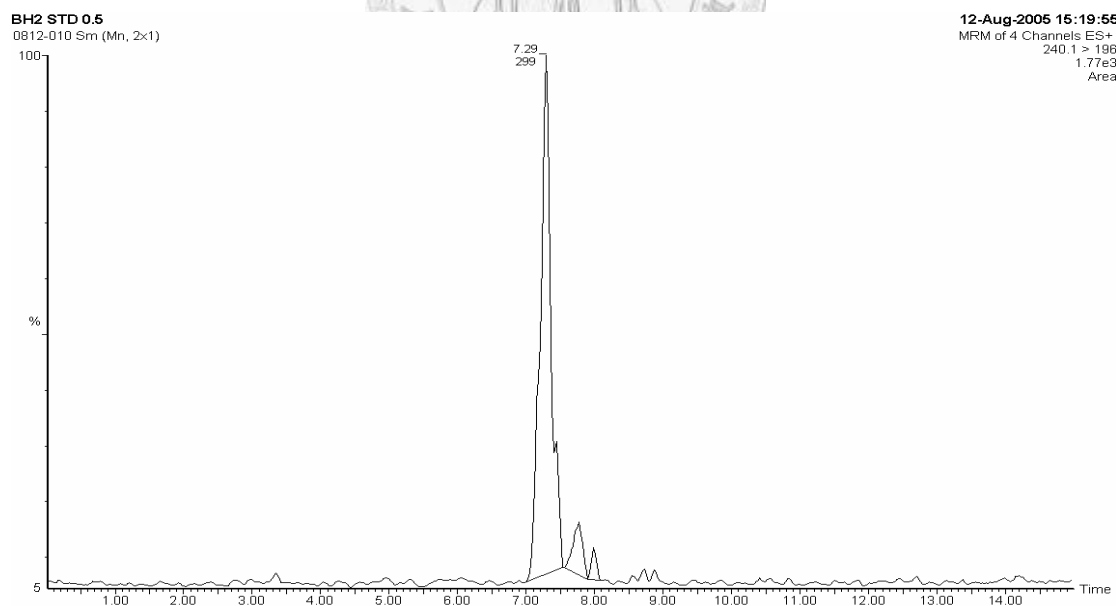


Fig. 5-16 LC/MS-MS chromatograms of 0.5 ng/mL BH₂

圖 5-16 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH₂濃度為 0.5 ng/mL)

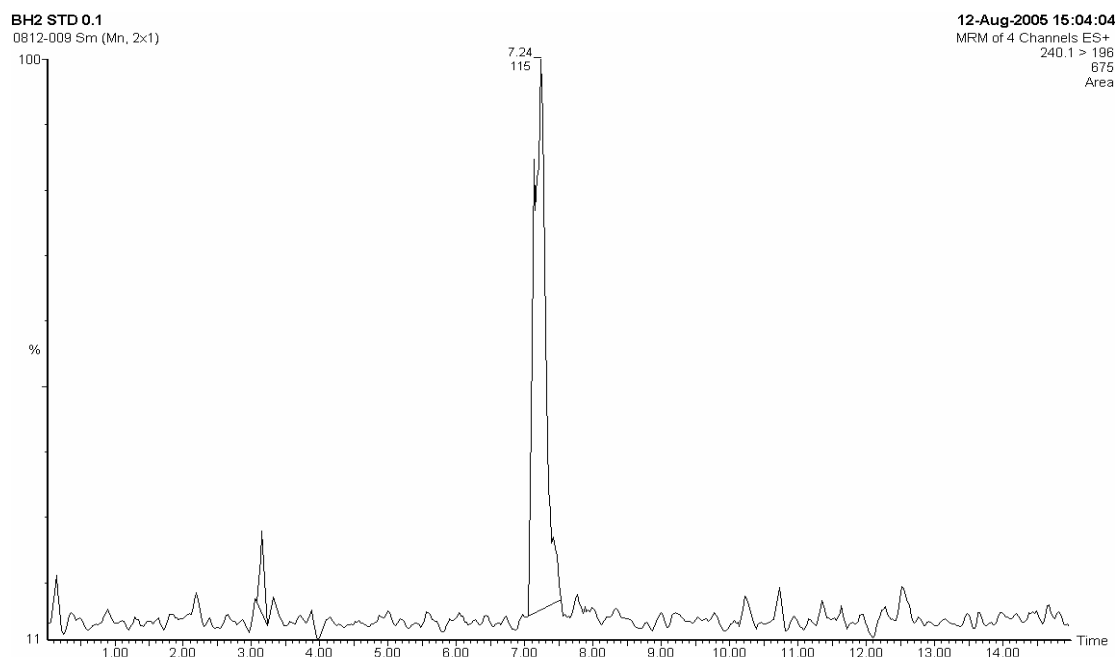


Fig. 5-17 LC/MS-MS chromatograms of 0.1 ng/mL BH₂

圖 5-17 高效液相層析串聯質譜之層析圖。(BH₂ 濃度為 0.1 ng/mL)

三、 偵測極限

定訊號與雜訊比 3 : 1 為偵測極限。以 LC/MS-MS 偵測之各標準

品偵測極限如表 5-11：

Table 5-6 Limit of quantification of neopterin、biopterin、BH₄ and BH₂

表 5-6 Neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 之偵測極限

	偵測極限 (ng/mL)	偵測極限 (pg)
Neopterin	0.5	5
Biopterin	1	10
BH ₄	1	10
BH ₂	0.1	1

第六節 測定人類腦脊髓液內 Pterins 之結果

自 2004 年 11 月 10 日到 2005 年 12 月 27 日止，共收集了發育遲緩住院小兒病患 54 份檢體。

一、病患基本資料

發育遲緩病患	
人數	54
年齡 (歲)	4.67 ± 4.89 (2 天-17 歲)
性別 男/女	23/31
疾病診斷 (人數)	Developmental delay (54), seizure (23), Rett syndrome (3), motility disorder (10), Guillian-Barre syndrome (1), juvenile rheumatoid arthritis (1), myasthenia gravis (1), hyperlacticemia (1),
使用藥品 (人數) *	
Methotrexate	—
Folic acid	+ (3 cases)
Folinic acid	+ (4 cases)

*, + 有使用此藥/ — 無使用此藥 (人數)

二、病患使用藥品

發育遲緩病患使用藥品			
Piracetam	antiepileptic drug	vitamine B ₆ , B ₁₂	pyridostigmine
cisapride	folic acid	antibiotics	IV immunoglobulin
haloperidol	leucovorin (folinic acid)	biperiden	Coenzyme Q10 (ubidecarenone)
steroid			

Folic acid 在化學結構式上和下列藥物有部份相似，如 methotrexate 與 trimethoprim，對於 DHPR 有抑制作用，對 BH_4 缺乏症患者產生不良的反應，並且影響 pterins 與 folic acid 代謝，⁸³ 尤其 trimethoprim 是 co-trimazole 的成份之一，為常用的抗生素，而 methotrexate 則是常常使用在 leukemia 病人身上。其化學結構式如下圖 5-25～圖 5-28：

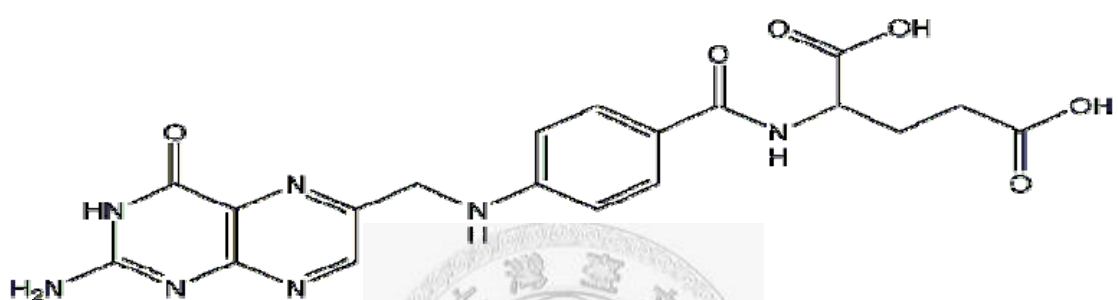


圖 5-18 Folic acid

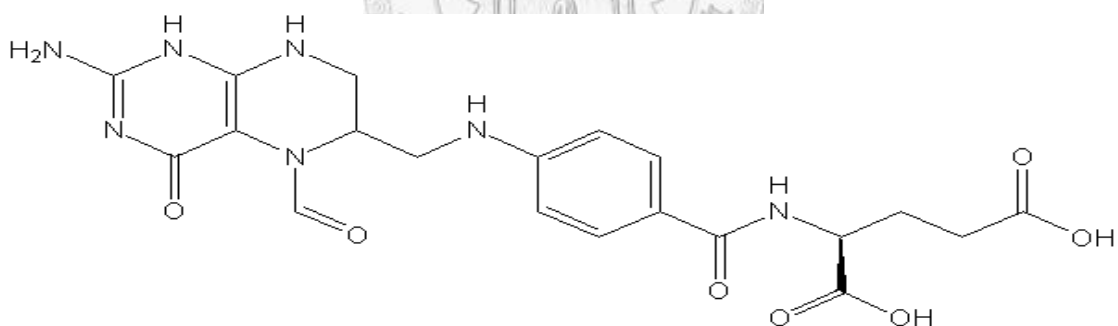


圖 5-19 Folinic acid

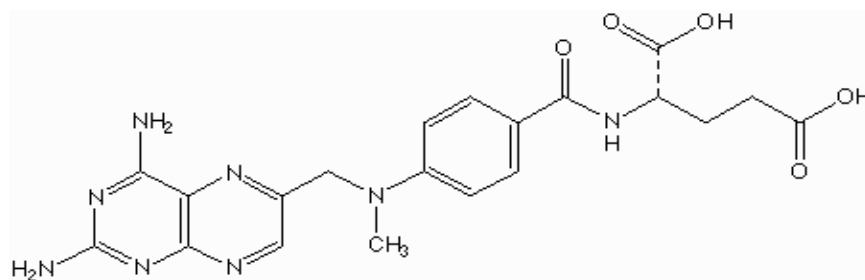


圖 5-20 Methotrexate

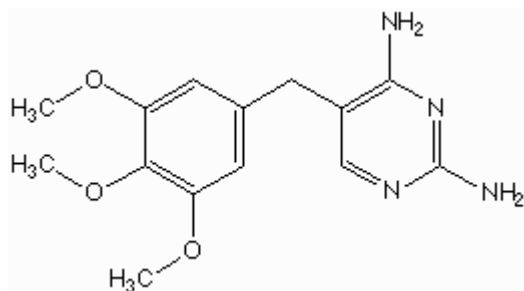


圖 5-21 Trimethoprim

三、小兒部住院疑有發育遲緩病人檢體測定結果

使用 LC/MS-MS 測量患者 CSF 檢體中之 neopterin、biopterin、BH₂ 與 BH₄ 含量，所得到的結果皆無法分辨出這些 pterins 的層析峰，在此僅列出幾個代表性的層析圖譜，所有病人檢體分析之 LC/MS-MS 層析圖譜則附在最後的附錄。

Table 5-7 Retention time of neopterin、biopterin、BH₄ and BH₂

表 5-7 Neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 之滯留時間

	BH ₄	neopterin	biopterin	BH ₂
滯留時間	2.73	4.68	8.17	6.94

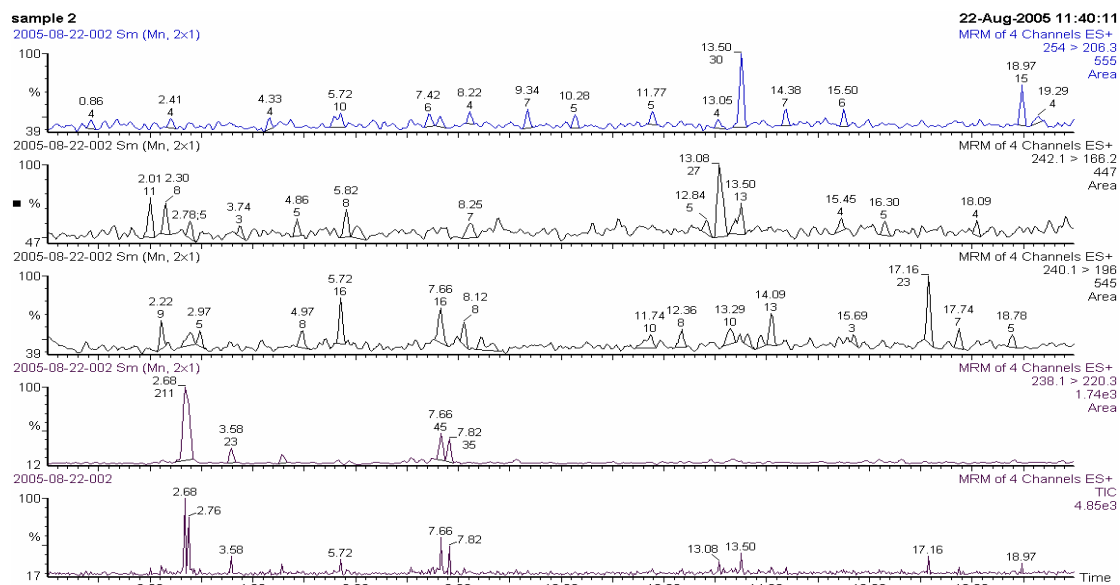


Fig. 5-31 LC/MS-MS chromatograms of CSF sample from a 13-year-old boy having developmental delay.

圖 5-22 高效液相層析串聯質譜之層析圖，腦脊髓液檢體來自發育遲緩之 13 歲男孩。

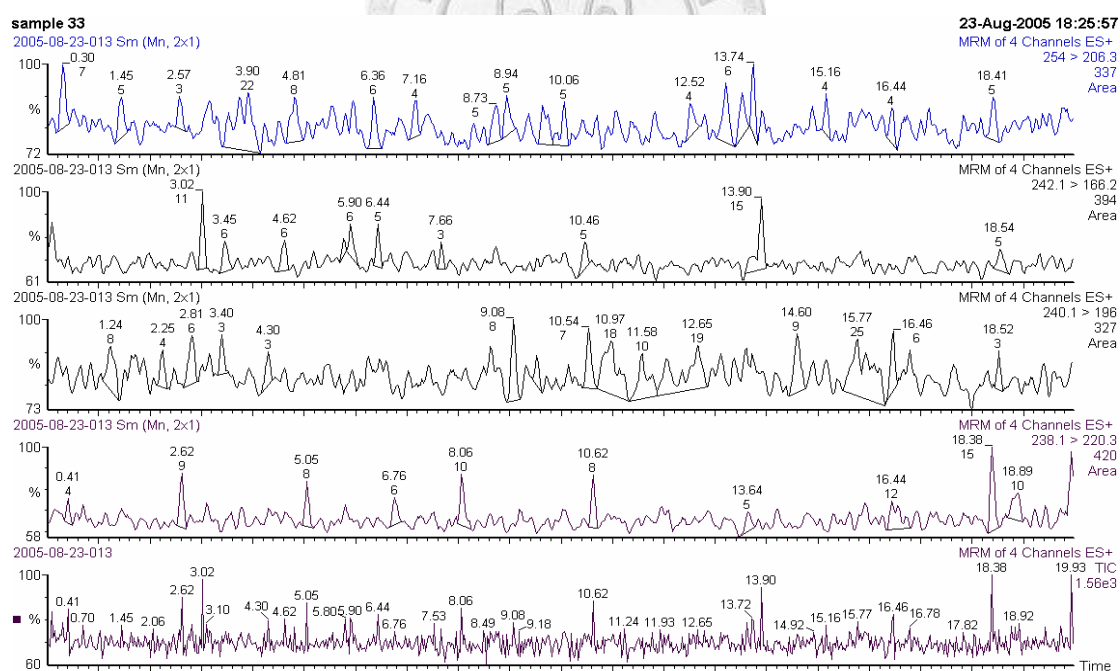


Fig. 5-32 LC/MS-MS chromatograms of CSF sample from a 9 month old female infant having developmental delay and seizure disorder.

圖 5-23 高效液相層析串聯質譜之層析圖，腦脊髓液檢體來自發育遲緩並有癲癇症之 9 個月大女嬰。

第六章 討論

第一節 HPLC 分析方法之建立

先前用於測定 pterins 類的方法有：*Crithidia fasciculata* 活性測定、^{84, 85} 使用 Guthrie cards、⁸⁶ 使用 radioimmunoassay (免疫螢光染色法, RIA)、^{51, 87, 88} radioenzymatic assay、⁸⁷ capillary electrophoresis、⁸⁹ paper chromatography、⁹⁰ gas chromatography-mass spectrometry、^{19, 91} thin layer chromatography⁹² 以及利用 high-performance liquid chromatography (高效液相層析方法)。而高效液相層析法中，各研究往往又採用不同種類的層析管柱，有些研究是利用 ion-pair (離子交換) 管柱、^{51, 93-95} reverse-phase ion-pair (逆相離子對) 層析管柱，^{35, 45, 52, 58} 有些研究則是利用 reverse phase (逆相) 層析管柱。^{35, 45, 49, 50, 54, 94}

本實驗為參考前人所使用液相層析方法，選擇利用現有的逆相層析管柱並使用螢光與電化學偵測器來分析我們有興趣的 pterins 類化合物中的 neopterin、biopterin、BH₂ 以及 BH₄。

本實驗所尋找出最適宜的條件設定為：

一、 螢光偵測 neopterin 與 biopterin 之條件

以 pH 5.2 之檸檬酸緩衝溶液為移動相，在激發波長與放射波長各為 350 及 450 nm 之下以流速每分鐘 0.5 毫升分析。

二、 電化學偵測 BH_4 之條件

以 pH 2.5 之磷酸緩衝溶液為移動相，設定電位 700 mV 之下以流速每分鐘 0.4 毫升分析。

三、 LC/MS-MS 偵測 neopterin、biopterin、 BH_2 與 BH_4 之條件

以 pH 2.5 之 5% MeOH + 95% (2 mL formic acid + 1000 mL 水) 的溶液為移動相，MRM 設定為 biopterin m/z 238 $\rightarrow$ 220；neopterin m/z 254 $\rightarrow$ 206； BH_2 m/z 240 $\rightarrow$ 196； BH_4 m/z 242 $\rightarrow$ 166，以流速每分鐘 0.8 毫升分析。

第二節 分析方法之比較

一、 本實驗所建立與先前較常被引用之文獻中 HPLC 方法之比較

(一) Neopterin 與 biopterin 由於本身即具發螢光性質，因此能夠以螢光偵測器偵測之，也有許多文獻提出類似的方法；不同的是在於各文獻處理檢體之過程以及移動相之組成，有以純水相分析者，亦有以有機溶液分析者。在此提出其中最常被引用之文獻與本實驗建立之螢光偵測系統在各方面之比較，如表 6-1。

表 6-1 本實驗以螢光偵測部份與先前常引用文獻之比較

	本實驗	Fukushima & Nixon (1980) ⁵³	Niederwieser (1984) ⁵²	Werner (1987) ⁶²
檢體來源	標準品與腦脊髓液	大鼠組織以及標準品	尿液	血清
分析目標	neopterin 與 biopterin	neopterin、biopterin、BH ₄ 與 BH ₂	neopterin 與 biopterin	neopterin
檢體保存	各 1 mg/mL DTE 與 EDTA，—80°C 避光保存	—20°C 保存	N.A.	—20°C 保存
前處理	腦脊髓液置入具 0.45 μm 濾膜之微量離心管，於 12,000 g 下離心 40 分鐘取上層液注入分析	標準品分別於酸性與鹼性溶液中以碘氧化檢體再測螢光；組織檢品則同樣氧化後先通過 DOWEX 離子交換樹脂管柱後再進行分析	酸性環境下以 MnO ₂ 氧化檢體後於 2,000 g 下離心 5 分鐘再測螢光	先經固相萃取之後以碘氧化檢體再測螢光
分析主體	逆相層析	逆相層析	逆相層析，管柱	逆相層析

偵測器	轉換			
	螢光	螢光	螢光	螢光
移動相	pH 5.2 citric buffer	5% 乙醇溶於水	乙醇-水 (3:97) 及 異丙醇-乙醇-醋酸 (49:49:2)	pH 6.0 potassium phosphate buffer
條件設定	Ex: 350 nm Em: 450 nm	Ex: 350 nm Em: 410 nm	Ex: 350 nm Em: 450 nm	Ex: 353 nm Em: 438 nm
流速	0.5 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min	0.8 mL/min
偵測極限	200 pg	60 pg	50 pg	

Ex, excitation wavelength; Em, emission wavelength; N.A. not available

(二) Tetrahydrobiopterin 與 neopterin 及 biopterin 性質不同, BH_4

本身容易受到氧的作用, 氧化成其他的氧化狀態如 q-BH_2 、 BH_2 與 biopterin, 因此易於電化學偵測器上顯出反應, 在文獻上也有記載不少以電化學偵測器測量 BH_4 之研究。在此提出幾篇研究和本實驗所建立之偵測方法做比較, 如表 6-2。

表 6-2 本實驗以電化學偵測部份與先前文獻之比較

	本實驗	Lunte and Kissinger (1983) ⁵⁸	Niederwieser (1984) ⁵²	Tani and Ishihara (1990) ⁵⁴
檢體來源	腦脊髓液與標準品	尿液	大鼠腦部	大鼠腦部
分析目標	BH_4	BH_4	BH_4	BH_4
檢體保存	各 1 mg/mL DTE 與 EDTA, — 80°C 避光保存	No	0.1 g/L DTE	
前處理	通過 0.45 μm 濾膜, 12,000 g 下離心 40 分	No, 直接分析	大鼠腦部加 100 mg/L ascorbic acid 在	在 1-2 mL of 0.5 M PCA 下混合均勻, 於 1,700 g 下

	鐘取上層液注入分析		40,000 g 下離心 20 分鐘再測	離心 15 分鐘後取上層液注入分析
分析主體	逆相層析	逆相離子對層析	逆相層析，管柱轉換	逆相離子對層析
偵測器	電化學	電化學	電化學	電化學
移動相	pH 2.5 NaHPO ₄ buffer	pH 2.5 octyl sodium buffer	pH 3.3 Na ₂ HPO ₄ - citric acid- Na ₂ EDTA- octanesulphonic acid- 10% methanol	pH 2.7 orthophosphoric heptanesulphonat e contains 0.6% triethyamine, 8% acetone and EDTA
條件設定	700 mV, range 20 nA	300 mV	250 mV, range 0.2 nA	750 mV, range 5 nA
流速	0.4 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min	0.8 mL/min
偵測極限	80 pg	0.75 picomol	N.A.	20 pg

二、 本實驗所建立之 LC/MS-MS 與先前文獻中質譜分析方法之比較

本實驗所使用之方法為液相層析搭配質譜分析與先前文獻中多使用氣相層析搭配質譜分析方法不同。

三、 本實驗所建立之 HPLC 與 LC/MS-MS 分析方法之比較

本實驗所建立之 HPLC 與 LC/MS-MS 分析方法最大的不同在於前處理步驟與移動相組成以及專一性上的差別。HPLC 之前處理方法是特意簡化過的方法，而 LC/MS-MS 則是採用傳統的沉澱法以及較新

的固相萃取法，以求去除不必要的雜質可能產生的干擾。其餘設定之比較如下表 6-3。

表 6-3 本實驗建立之 HPCL 與 LC/MS-MS 分析方法之比較

	HPLC		LC/MS-MS
	螢光	電化學	
前處理	檢體於分析前皆置入具 0.45 μ m 濾膜之微量離心管於 12,000 g 下離心 40 分鐘取上層液	採用沉澱法，加等量乙氰，振搖後，於 10,000 rpm 下離心 10 分鐘取上層液	採用固相萃取法，以水及甲醇萃取，將檢體濃縮為 1/3 體積
移動相	pH 5.2 之檸檬酸緩衝液	pH 2.5 之磷酸緩衝液	pH 2.5 之 5% 甲醇加 95% 水（含有 0.2% 甲酸）
流速 mL/min	0.5	0.4	0.8
偵測極限	neopterin 與 biopterin 皆為 200 pg	BH ₄ 為 80 pg	neopterin 5 pg、biopterin 10 pg、BH ₄ 10 pg、BH ₂ 1 pg
專一性	neopterin 與 biopterin 本身即具發螢光性質，非常適合以螢光測定	BH ₄ 本身很容易氧化，應該很適合以電化學偵測	使用 LC/MS-MS 雖比 LC-MS 來得有專一性，但對於具有特殊性質的 pterins，專一性仍顯不足

第三節 偵測極限之探討

以訊號雜訊比大於 3 定義為偵測極限，則本實驗所建立方法之偵測極限在以螢光偵測 neopterin 與 biopterin 皆為 200 pg；以電化學偵測 BH₄ 則為 80 pg；以 LC/MS-MS 偵測 neopterin、biopterin、BH₄ 與 BH₂ 則分別為 5 pg、10 pg、10 pg 與 1 pg。

Tani (1993)⁶⁰ 等人發表的研究中，使用逆相離子對液相層析方法，在檢體通過 column 後通以 sodium nitrite 來氧化檢體再測螢光，偵測極限可達 10-20 pg；

Howells (1986)³⁵ 等人發表的研究中，使用逆相層析方法，在檢體通過 column 後提供數個不同電壓使 BH₄ 產生氧化還原反應後以電化學及螢光偵測器記錄，偵測極限可達 11.9-16.9 pg。

Lunte (1983)⁵⁸ 等人發表的研究中，使用逆相層析法，檢體先經過化學氧化之後通過樹脂管柱再以電化學偵測器偵測，偵測極限可達 0.14-0.75 pmole。

LC/MS-MS 之偵測極限較低，仍無法於病患檢體中測出可定量之目標物，推測其原因有二，其一為偵測極限仍不夠低，其二則可能是 LC/MS-MS 對於 pterins 之靈敏度不若螢光或電化學偵測般有專一性。

第四節 高效液相層析方法之研究限制

一、 前處理

將前人的研究所利用的液相層析偵測方法都列在第一章第八節中。本實驗由於希望建立一個不需要複雜前處理步驟的方法，而捨棄了在分析前以化學藥劑氧化檢體的或純化檢體的方法，結果可能造成檢體濃度太低或受到雜質影響而測量不到目標物。

二、硬體

在以電化學偵測 BH_4 方面，因為儀器本身的不足，無法提供多個電位，只能使用單一個電位。

三、偵測極限

在以螢光偵測器偵測 neopterin 與 biopterin 之偵測極限不夠低，僅達 200 pg；和國外的研究最低可達 10 pg 相比，明顯地偵測極限不足。

四、 滯留時間不一致

於不同批次之分析當中發現 neopterin 與 biopterin 之滯留時間會有些許的差異（neopterin 8、8.3 分鐘；biopterin 19、19.7、21、21.4 分鐘）可能原因為分析時室內溫度及冷氣強度有所不同造成，因此建議

在分析檢體時，檢體加入定量 neopterin 與 biopterin 一起測量。

五、 未知目標物濃度

從文獻中只能得到國外資料庫或者是各別研究結果所訂出在人體體液中 pterins 類物質之濃度，如表 1-1；而未知 pterins 類物質存在於台灣正常孩童或 BH_4 缺乏病童體液之濃度範圍，本欲以本實驗建立之方法，建立台灣地區非發育遲緩孩童腦脊髓液中 pterins 類物質之濃度範圍，但收集到的檢體幾乎都無法測到目標物。



第七章 結論及未來方向

本研究原擬建立一步驟單純之檢體處理方式且分析過程簡便之高液相層析方法，但或因檢體處理步驟的簡化，在偵測極限上尚未能達到或超越過往研究，⁶⁰ 因此推測在檢體處理步驟上，以往研究所採用之 iodine、hydrogen peroxide、sodium nitrite、提供電壓以氧化檢體中還原態 pteridines，使其成為具有發螢光性質，繼而以螢光偵測器偵測、定量的方法，應該都是可以嘗試的。

在電化學偵測 BH_4 方法的建立上，本實驗所使用的移動相與電位在簡單測試之下，可以測量到 2~5 ng/mL（注射量每次 40 μL ），需在穩定度上再做測試方可用於檢體分析。

液相層析串聯質譜分析雖然偵測極限較低，和文獻較接近，但仍然測不到目標波峰，可能是腦脊髓液中其他干擾物質太多，應再嘗試純化檢體，再做測試。

也或許是由於大部份國人腦脊髓液中這些 pterins 的含量較低，導致 pterins 檢測不易。因此未來宜進行人數更多、規模更大之檢測，以期建立國內小兒腦脊髓液中 pterins 相關物質之參考範圍及病患之致病範圍，藉以協助偵測及診斷 BH_4 缺乏症及監測治療控制之情形。

第八章 參考文獻

1. 罕見疾病現況. Available at: <http://www.tfrd.org.tw/rare/situation.php>. Accessed April 1, 2005.
2. 罕病分類及介紹---苯酮尿症 Phenylketouria(PKU). Available at: [http://www.tfrd.org.tw/rare/type_infophp?keyword=Phenylketouria\(PKU\)](http://www.tfrd.org.tw/rare/type_infophp?keyword=Phenylketouria(PKU)). Accessed April 1, 2005.
3. Rezvani I. Defects in Metabolism of Amino Acid. In: Behrman RE, Kliegmen RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics, 17th edi. Philadelphia; 2004:397-402.
4. Blau N, Bonafe L, Blaskovics ME. Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, eds. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease. Berlin: Springer; 2005:89-106.
5. Shintaku H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. Curr Drug Metab 2002;3:123-31.
6. 罕病分類及介紹---苯酮尿症- 四氫基喋呤缺乏症. Available at: [http://www.tfrd.org.tw/rare/type_infophp?keyword=\(Phenylketonuria\)-\(Tetrahydrobiopterin%20deficiency\)](http://www.tfrd.org.tw/rare/type_infophp?keyword=(Phenylketonuria)-(Tetrahydrobiopterin%20deficiency)). Accessed April 1, 2005.
7. Chien Y, Chiang S, Huang A, *et al.* Treatment and outcome of Taiwanese patients with 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase gene mutations. J Inherit Metab Dis 2001;24:815-23.
8. Liu TT, Chiang SH, Wu SJ, Hsiao KJ. Tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemia in the Chinese. Clin Chim Acta 2001;313:157-69.
9. Werner-Felmayer GG, G. Werner, E. R. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. Curr Drug Metab 2002;3:159-73.
10. G. C, Hamon B, Blair JA. Tetrahydrobiopterin metabolism in disease. In: Lovenberg W, Levine RA, eds. Unconjugated Pterins in

Neurobiology: Basic and Clinical Aspects. London: Taylor and Francis; 1987:201-13.

11. Altindag ZZ, Baydar T, Engin AB, Sahin G. Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicology in Vitro* 2003;17:533-7.
12. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
13. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:521-31.
14. Hurshman AR, Krebs C, Edmondson DE, Marletta MA. Ability of tetrahydrobiopterin analogues to support catalysis by inducible nitric oxide synthase: formation of a pterin radical is required for enzyme activity. *Biochemistry* 2003;42:13287-303.
15. Franscini N, Bachli EB, Blau N, *et al.* Functional tetrahydrobiopterin synthesis in human platelets. *Circulation* 2004;110:186-92.
16. Osiecki H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Altern Med Rev* 2004;9:32-53.
17. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* 2002;362:733-9.
18. Ponzzone A, Spada M, Ferraris S, Dianzani I, de Sanctis L. Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment. *Med Re Rev* 2004;24:127-50.
19. Curtius HC, Blau N, Kuster T. Pterins. In: Hommes FA, ed. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics*. New York: Wiley-Liss; 1991:377-96.
20. Bonafe L, Thony B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N. Mutations in

- the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet* 2001;69:269-77.
21. Shintaku H, M. A, Sawada Y. Diagnosis and treatment of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Brain Dev* 2000;22 Suppl 1:S118-21.
 22. Evans OB, Parker CC, Haas RH, Naidu S, Moser HW, Bock H-GO. Inborn Errors of Metabolism of the Nervous System. In: Evans OB, ed. *Neurology in Clinical Practice*; 2000:1595-9.
 23. 新生兒篩檢可以發現哪些疾病? Available at: http://www.mama123.com/b/bb/bbe/bbe_03052001/lower.php3. Accessed May 15, 2005
 24. Shen Y-Z, Lin J-Y, Chen T-H. The dietary treatment for four cases of phenylketonuria during the past ten years in Taiwan. *Acta Paediatr Taiwan* 1973;14:136-56.
 25. Blau N, Barnes I, Dhondt JL. International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J Inherit Metab Dis* 1996;19:8-14.
 26. Duch SD, Smith KG. Biosynthesis and function of tetrahydrobiopterin. *J Nutr Biochem* 1991;2:411-23.
 27. Zorzi G, Redweik U, Trippe H, Penzien JM, Thony B, Blau N. Detection of sepiapterin in CSF of patients with sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab* 2002;75:174-7.
 28. Blau N, Bonafe L, Thony B. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab* 2001;74:172-85.
 29. Bonafe L, Thony B, Leimbacher W, Kierat L, Blau N. Diagnosis of dopa-responsive dystonia and other tetrahydrobiopterin disorders by the study of biopterin metabolism in fibroblasts. *Clin Chem* 2001;47:477-85.

30. Irons M, Levy HL, O'Flynn ME, *et al.* Folinic acid therapy in treatment of dihydropteridine reductase deficiency. *J Pediatr* 1987;110:61-7.
31. Ye J, Liu X, Ma X, *et al.* Screening for tetrahydrobiopterin deficiency among hyperphenylalaninemia patients in Southern China. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:217-21.
32. Ramaekers VT, Hausler M, Opladen T, Heimann G, Blau N. Psychomotor retardation, spastic paraplegia, cerebellar ataxia and dyskinesia associated with low 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid: a novel neurometabolic condition responding to folinic acid substitution. *Neuropediatrics* 2002;33:301-8.
33. Dobbie M, Crawley J, Waruiru C, Marsh K, Surtees R. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:284-90.
34. Milstien S, Kaufman S, Summer GK. Hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency: diagnosis by measurement of oxidized and reduced pterins in urine. *Pediatrics* 1980;65:806-10.
35. Howells D, Smith I, Hyland K. Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1986;381:285-94.
36. Komori H, Matsuishi T, Yamada S, Ueda N, Yamashita Y, Kato H. Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of biopterin and biogenic amines. *Acta Paediatr* 1999;88:1344-7.
37. Blau N, Scherer-Oppliger T, Baumer A, *et al.* Isolated central form of tetrahydrobiopterin deficiency associated with hemizyosity on chromosome 11q and a mutant allele of PTPS. *Hum Mutat* 2000;16:54-60.
38. Sawada Y, Shintaku H, Isshiki G. Neopterin and biopterin concentrations in cerebrospinal fluid in controls less than 1 year old. *Brain Dev* 1999;21:264-7.

39. Niederwieser A, Shintaku H, Leimbacher W, *et al.* "Peripheral" tetrahydrobiopterin deficiency with hyperphenylalaninaemia due to incomplete 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency or heterozygosity. *Eur J Pediatr* 1987;146:228-32.
40. Dhondt JL, Farriaux JP. Atypical cases of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1987;146 Suppl 1:A38-43.
41. Williams AC, Levine RA, Chase TN, Lovenberg W, Calne DB. CFS hydroxylase cofactor levels in some neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43:735-8.
42. Catalog of Sigma-aldrich. St. Louis, MO, U.S.A. 2004-2005.
43. O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, eds. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. NJ, USA: Merck & Co.,Inc; 2001.
44. 全民健保法規及公告查詢. Available at: http://www.nhi.gov.tw/inquire/query6.asp?menu=1&menu_id=8 . Accessed Jan 26, 2005
45. Hyland K. Estimation of tetrahydro, dihydro and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection. *J Chromatogr* 1985;343:35-41.
46. Powers A, Young J, Clayton B. Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in plasma by isocratic liquid chromatography with electrochemical and fluorimetric detection. *J Chromatogr A* 1988;432:321-8.
47. Heales S, Hyland K. Determination of quinonoid dihydrobiopterin by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr A* 1989;494:77-85.
48. Lunte CE, Kissinger PT. Determination of pterins by liquid chromatography/electrochemistry. *Methods Enzymol* 1986;122:300-9.

49. Howells DW, Hyland K. Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: prevention of autoxidation during storage and analysis. *Clin Chim Acta* 1987;167:23-30.
50. Candito M, Nagatsu T, Chambon P, Chatel M. High-performance liquid chromatographic measurement of cerebrospinal fluid tetrahydrobiopterin, neopterin, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in neurological diseases. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;657:61-6.
51. Stea B, Halpern RM, Halpern BC, Smith RA. Quantitative determination of pterins in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1980;188:363-75.
52. Niederwieser A, Staudenmann W., Wetzel E. High-performance liquid chromatography with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterins. *J Chromatogr A* 1984;290:237-46.
53. Fukushima T, Nixon JC. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem* 1980;102:176-88.
54. Tani Y, Ishihara T. Simultaneous measurement of tetrahydrobiopterin (THBP) and biogenic amines by liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci* 1990;46:373-8.
55. Palfrey S, Labib M. A simple method for measuring neopterin in serum using HPLC. *Ann Clin Biochem* 1993;30:209-10.
56. Blau N, Kierat L, Heizmann CW, Endres W, Giudici T, Wang M. Screening for tetrahydrobiopterin deficiency in newborns using dried urine on filter paper. *J Inherit Metab Dis* 1992;15:402-4.
57. Brautigam M, Dreesen R, Herken H. Determination of reduced biopterins by high pressure liquid chromatography and subsequent electrochemical detection. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1982;363:341-3.
58. Lunte CE, Kissinger PT. The determination of pterins in biological

- samples by liquid chromatography/electrochemistry. *Anal Biochem* 1983;129:377-86.
59. Brautigam M, Dreesen R. Determination of L-erythro-tetrahydrobiopterin in biological tissues by high pressure liquid chromatography and electrochemical detection. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1982;363:1203-7.
 60. Tani Y, Ohno T. Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid-chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *J Chromatogr* 1993;617:249-55.
 61. Niederwieser A, Staudenmann W, Wetzel E. Automatic HPLC of Pterins with or without Column Switching. In: H. W, Curtius HC, Pfeleiderer W, eds. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*: Walter de Gruyter & Co.; 1982:81-102.
 62. Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Simultaneous determination of neopterin and creatinine in serum with solid-phase extraction and on-line elution liquid chromatography. *Clin Chem* 1987;33:2028-33.
 63. Zhuo S, Fan S, Kaufman S. Effects of depletion of intracellular tetrahydrobiopterin in murine erythroleukemia cells. *Exp Cell Res* 1996;222:163-70.
 64. Hwang O, Choi HJ, Park SY. Up-regulation of GTP cyclohydrolase I and tetrahydrobiopterin by calcium influx. *Neuroreport* 1999;10:3611-4.
 65. Choi HJ, Jang YJ, Kim HJ, Hwang O. Tetrahydrobiopterin is released from and causes preferential death of catecholaminergic cells by oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2000;58:633-40.
 66. Jang YJ, Hong HN, Lee JD, Hwang O. Down-regulation of GTP cyclohydrolase I and tetrahydrobiopterin by melatonin. *Neuroreport* 2000;11:3627-30.
 67. Cho S, Volpe BT, Bae Y, *et al.* Blockade of tetrahydrobiopterin

- synthesis protects neurons after transient forebrain ischemia in rat: a novel role for the cofactor. *J Neurosci* 1999;19:878-89.
68. Ishii M, Shimizu S, Nagai T, Shiota K, Kiuchi Y, Yamamoto T. Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis induced by insulin: possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:65-73.
 69. Galley HF, Le Cras AE, Logan SD, Webster NR. Differential nitric oxide synthase activity, cofactor availability and cGMP accumulation in the central nervous system during anaesthesia. *Br J Anaesth* 2001;86:388-94.
 70. Van Gool AR, Fekkes D, Kruit WH, *et al.* Serum amino acids, biopterin and neopterin during long-term immunotherapy with interferon-alpha in high-risk melanoma patients. *Psychiatry Res* 2003;119:125-32.
 71. Fiege B, Ballhausen D, Kierat L, *et al.* Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Mol Genet Metab* 2004;81:45-51.
 72. Harding CO, Neff M, Wild K, *et al.* The fate of intravenously administered tetrahydrobiopterin and its implications for heterologous gene therapy of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2004;81:52-7.
 73. Berka V, Wu G, Yeh HC, Palmer G, Tsai AL. Three different oxygen-induced radical species in endothelial nitric-oxide synthase oxygenase domain under regulation by L-arginine and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2004;279:32243-51.
 74. Lowe ER, Everett AC, Lee AJ, *et al.* Time-dependent inhibition and tetrahydrobiopterin depletion of endothelial nitric-oxide synthase caused by cigarettes. *Drug Metab Dispos* 2005;33:131-8.
 75. Klatt P, Schmidt K, Werner ER, Mayer B. Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN, and tetrahydrobiopterin. *Methods Enzymol* 1996;268:358-65.

76. Curtius HC, Matasovic A, Schoedon G, *et al.* 7-Substituted pterins. A new class of mammalian pteridines. *J Biol Chem* 1990;265:3923-30.
77. Gruber A, Murr C, Wirleitner B, Werner-Felmayer G, Fuchs D. Histamine suppresses neopterin production in the human myelomonocytoma cell line THP-1. *Immunol Lett* 2000;72:133-6.
78. Blau N, Thony B, Renneberg A, Penzien JM, Hyland K, Hoffmann GF. Variant of dihydropteridine reductase deficiency without hyperphenylalaninaemia: effect of oral phenylalanine loading. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:216-20.
79. Ramaekers VT, Hansen SI, Holm J, *et al.* Reduced folate transport to the CNS in female Rett patients. *Neurology* 2003;61:506-15.
80. Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. High-performance liquid chromatographic methods for the quantification of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;684:51-8.
81. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;686:3-10.
82. U.S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration CfDEaRCaCfVMC. Guidance for industry bioanalytical method validation. 2001.
83. Blau N, Thony B, Cotton RGH, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Childs B, Beaudet AL, *et al.*, eds. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:1725-76.
84. Rothler F, Karobath M. Quantitative determination of unconjugated pterins in urine by gas chromatography/mass fragmentography. *Clin Chim Acta* 1976;69:457-62.
85. Fukushima T, Kobayashi K, Eto I, Shiota T. A differential microdetermination for the various forms of biopterin. *Anal Biochem* 1978;89:71-9.

86. Leeming RJ, Barford PA, Blair JA, Smith I. Blood spots on Guthrie cards can be used for inherited tetrahydrobiopterin deficiency screening in hyperphenylalaninaemic infants. *Arch Dis Child* 1984;59:58-61.
87. Nagatsu T, Yamaguchi T, Kato T, *et al.* Radioimmunoassay for biopterin in body fluids and tissues. *Anal Biochem* 1981;110:182-9.
88. Rokos H, Rokos K. A radioimmunoassay for the demonstration of D-erythro-neopterin. In: Blair J, ed. *Chemistry and biology of pteridines*. Berlin-New York: Walter de Gruyter; 1983:815-9.
89. Han F, Huynh BH, Shi H, Lin B, Ma Y. Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 1999;71:1265-9.
90. Kokolis N, Ziegler I. Reappearance of tetrahydrobiopterin in the regeneration bud of *Triturus* species. *Z Naturforsch B* 1968;23:860-5.
91. Curtius HC, Kuster T, Matasovic A, Blau N, Dhondt JL. Primapterin, anapterin, and 6-oxo-primapterin, three new 7-substituted pterins identified in a patient with hyperphenylalaninemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:715-21.
92. Rokos H, Rokos K, Frisius H, Kirstaedter HJ. Altered urinary excretion of pteridines in neoplastic disease. Determination of biopterin, neopterin, xanthopterin, and pterin. *Clin Chim Acta* 1980;105:275-86.
93. Stea B, Halpern RM, Smith RA. Separation of unconjugated pteridines by high-pressure cation-exchange liquid chromatography. *J Chromatogr* 1979;168:385-93.
94. Hibiya M, Teradaira R, Sugimoto T, Fujita K, Nagatsu T. Simultaneous determination of N²-(3-aminopropyl)biopterin (oncopterin), biopterin and neopterin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;672:143-8.

95. Bailey SW, Ayling JE. Separation and properties of the 6-diastereoisomers of l-erythro-tetrahydrobiopterin and their reactivities with phenylalanine hydroxylase. J Biol Chem 1978;253:1598-605.



國立臺灣大學醫學院附設醫院 函

受文者：本院小兒部李旺祚醫師

速別：

發文日期：中華民國九十三年四月九日

發文字號：（九十三）校附醫研字第九三〇〇〇〇三二六〇號

附件：臨床試驗計畫申請書

主旨：有關本院小兒部李旺祚醫師所主持之「芳香族氨基酸酵素缺乏對神經細胞的影響」（本院案號：9361700498）學術研究案，經本院研究倫理委員會委員審查，符合快速審查條件，同意臨床試驗之進行，請 查照。

正本：本院小兒部李旺祚醫師（含附件）

副本：醫研部臨床研究組

院長 李源德

機關地址：台北市中山南路七號
傳真：（02）23951950
承辦人：林淑惠
電話：（02）23123456分機：3155