

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果 報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※
※ 快速及微區分析之質譜相關技術之發展與應用 ※
※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 89-2113-M-002-071-
執行期間： 89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：何國榮
共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：
赴國外出差或研習心得報告一份
赴大陸地區出差或研習心得報告一份
出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台灣大學化學所

中 華 民 國 91 年 1 月 15 日

Part A: 可程式化鞘流溶液於 毛細電泳質譜儀之應用

一、中文摘要

當以鞘流界面將反電滲流毛細電泳與質譜儀連接時，鞘流溶液的組成對毛細電泳的分離效率有明顯的影響。當使用反電滲流毛細電泳與質譜分析三氮并除草劑時，使用低 pH 鞘流組成雖然可以提高離子化效率，但是卻導致毛細管柱分離效率降低，雖然分離效率可以使用與毛細電泳緩衝溶液相近 pH 的鞘流組成來改進，但是卻降低了偵測的靈敏度。而使用程式化鞘流界面則可利用分析物流出分離管柱之前使用與緩衝溶液相同的鞘流溶液維持分離的解析度，待分析物流出管柱時使用低 pH 鞘流溶液以增加離子化的效率。

關鍵字: 程式化、毛細電泳、質譜、鞘流溶液

Abstract: In our previous work, composition of sheath liquid was found to be critical in the coupling of reversed EOF CE with ESI-MS. For the separation of triazine mixture, low pH sheath liquid enhances ionization efficiency, but results poor CE-MS resolution. The reason is due to migration of proton from sheath liquid in to the separation column. The effect of sheath liquid on the formation of moving ionic boundary has been reported by Barry Karger. Resolution of electropherograms can be improved by using sheath liquid with higher pH as running buffer. In order to enhance the ionization efficiency and maintaining the resolution of electropherograms, programmable sheath liquid was used in this study. Sheath liquid with the same composition as running buffer before analytes come out from CE column for

maintain the separation resolution, when analytes come out from CE column sheath liquid was than switch to low pH composition which enhances ionization efficiency of analytes.

Keywords: Programmable、Capillary Electrophoresis、Mass spectrometry、Sheath Liquid

二、緣由與目的

以質譜儀作為毛細管電泳偵測器可以提供一個除了電泳速率以外加上以樣品分子量或是特徵斷裂分離及鑑定樣品的方法⁽¹⁻³⁾。而鞘流界面可說是目前最方便且被廣泛使用的界面，以鞘流界面將毛細管電泳與質譜儀連接時，鞘流溶液扮演著幾個角色，第一、維持毛細電泳分離的電通路。第二、有機相的鞘流組成降低表面張力以增加電灑效應。第三、使用不同的 pH 針對具有不同酸性或是鹼性機團的化合物提高離子化的程度。然而，鞘流界面在許多應用上仍然有存在的困難，本計畫嘗試將在鞘流界面上使用程式化的鞘流組成，針對毛細電泳分離出的化合物對質譜儀的靈敏度最佳化，達到更低的偵測極限。並解決先前於毛細電泳質譜上所遭遇到的困難，使毛細電泳質譜術更廣泛的應用於其他分離模式上。

根據本實驗室的研究，在分析 Triazines 時以 CTAB 做 Dynamic Coating 的方式修飾管壁可得到最好的分離效果⁽⁴⁾，此方法最先由 Terabe et al 發表⁽⁵⁾，此技術目前已被應用在分離維他命⁽⁶⁾，DNA⁽⁷⁾，Phenol⁽⁸⁾ 這一些化合物上。當加入的 CTAB 濃度到達一個值以後，管壁會帶正電，當管壁帶正電且毛細管電泳高電壓為正極時，電滲流會往樣品的注入端流去⁽⁹⁾。由於電滲流的速度較樣品的電

泳速度還要大，因此為了要讓樣品能往質譜端移動則必須切換毛細管電泳高電壓成負極。而當毛細管電泳高電壓為負極時，我們發現鞘流溶液的 pH 值會影響毛細電泳分離的解析度，這是因為氫離子的電泳速率極大會克服電滲流的流速而進入到毛細管柱中使得管柱中的溶液 pH 發生變化。因此必需使用高 pH 值的鞘流溶液，但這卻降低了電灑法的靈敏度。一般而言使用較低 pH 的鞘流溶液可使得電灑法質譜儀分析正離子時有較高的靈敏度。為了使得低 pH 值的鞘流溶液不會影響毛細管電泳分離解析度，本計畫嘗試對分析時所使用的鞘流溶液最佳化，在不同的分離時段使用不同組成的鞘流溶液希望一方面維持管柱分離的解析度，另一方面在質譜上得到更高的靈敏度。

三、結果與討論

使用反電滲流毛細管電泳／質譜儀分析八種 Triazine 時，由於分析物較易與質子結合而帶正電，因此我們以 pH 值較低的甲醇／水 (80／20) 溶液添加 0.1%TFA 作為鞘流溶液以增加樣品的離子化效率 (圖一所示)。結果顯示，毛細電泳的分離效率受到鞘流溶液的影響而降低。為了確定分離效率是受鞘流溶液的影響，因此使用反電滲流毛細管電泳／紫外光的系統比較了使用不同毛細管出口端溶液所得到的結果 (圖二所示)。當使用低 pH 值的出口端溶液，由圖二(b)所示，八種 Triazine 均無法分開。若是使用較高 pH 的出口端溶液則可分離八種 Triazine 的混和物 (如圖二(b)所示)。由於出口端溶液的 pH 值會影響毛細電泳分離的解析度，因此推測此現象是因毛細管出口端溶液中氫離子濃度與毛細管內相差太多所導致。

反電滲流毛細管電泳會有上述的現象是因此系統使用 CTAB 將管壁修飾成正電，分離的高電壓必須是負極才可使電滲流向偵測端流去，由於氫離子的電泳速率極大會克服電滲流的流速而進入到毛細管柱中使得管柱中的溶液 pH 發生變化而降低分離解析度。為了要解決鞘流溶液組成對毛細電泳分離的影響，我們嘗試使用可程式化鞘流的設計，此設計是利用樣品還未離開管柱之前，使用相同於緩衝溶液組成的鞘流溶液，當分析物快要離開分離管柱時，立即將鞘流溶液切換成低 pH 的組成，如此即可在不犧牲毛細電泳分離效率下還可以增加質譜儀偵測分析物的靈敏度。

為了測試可程式化鞘流界面的可行性。圖三為使用反電滲流毛細管電泳／紫外光偵測的方式，在樣品快要到達偵測端時 (大約十二分鐘)，毛細管出口端的溶液由緩衝溶液切換成低 pH 值組成的鞘流溶液 (甲醇／水 (80／20) + 0.1%TFA)。由圖三可看出藉由切換毛細管出口端溶液的方式可以在不犧牲分離解析度的狀況下，仍可使用低 pH 值的出口端溶液。圖四則是將可程式化鞘流界面應用在毛細電泳質譜上所得到的結果。相較於圖一使用傳統的鞘流介面，可程式化鞘流界面可以在不犧牲毛細電泳的解析度下，使用低 pH 的鞘流組成以提升樣品的偵測靈敏度。

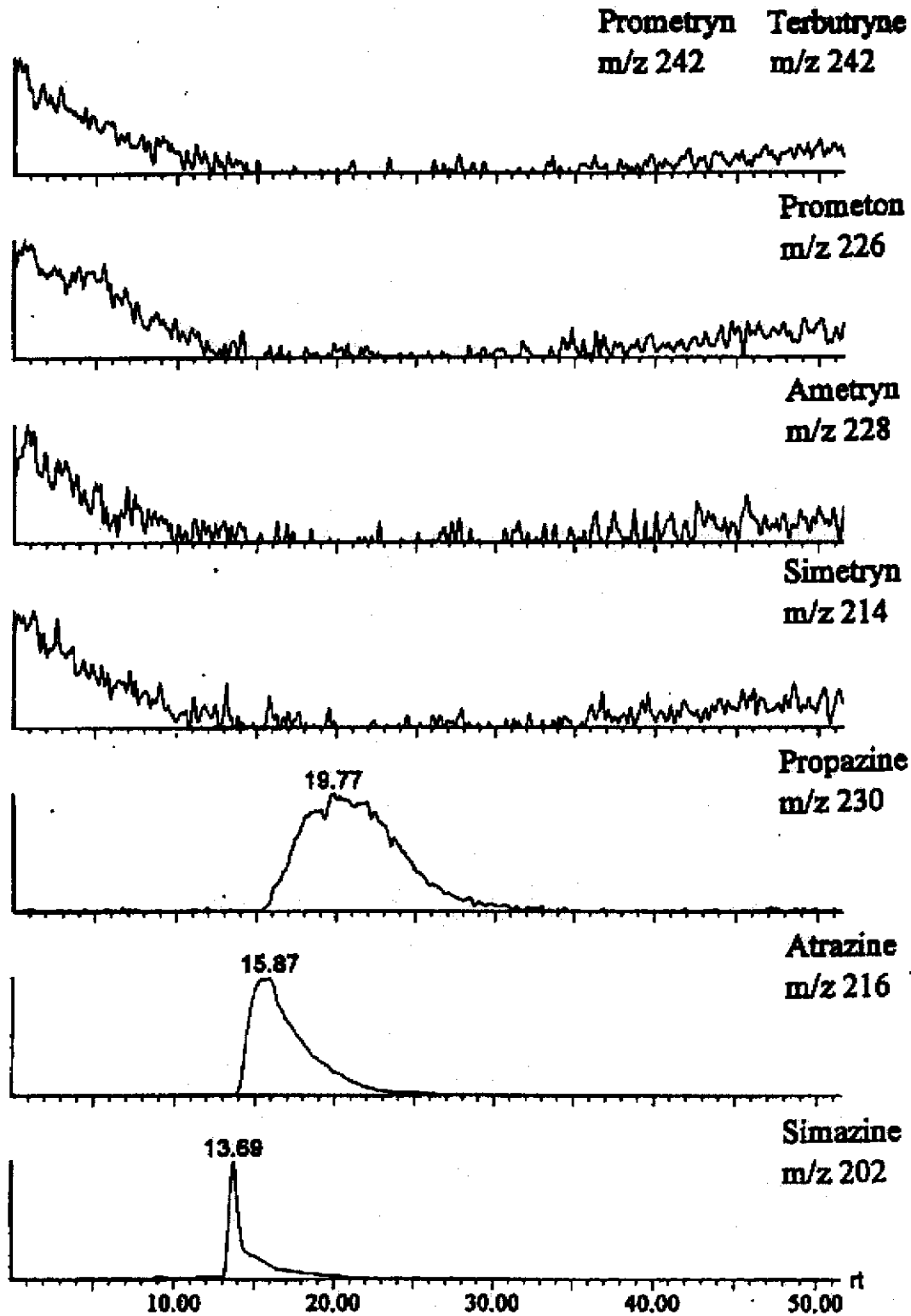
四、計畫成果自評

1. 建立一套使用可程式化鞘流溶液的毛細電泳質譜界面。
2. 此設計使得反電滲流毛細電泳／質譜可以在不犧牲毛細電泳分離的效率下提升靈敏度。
3. 此設計不但可以應用在反電

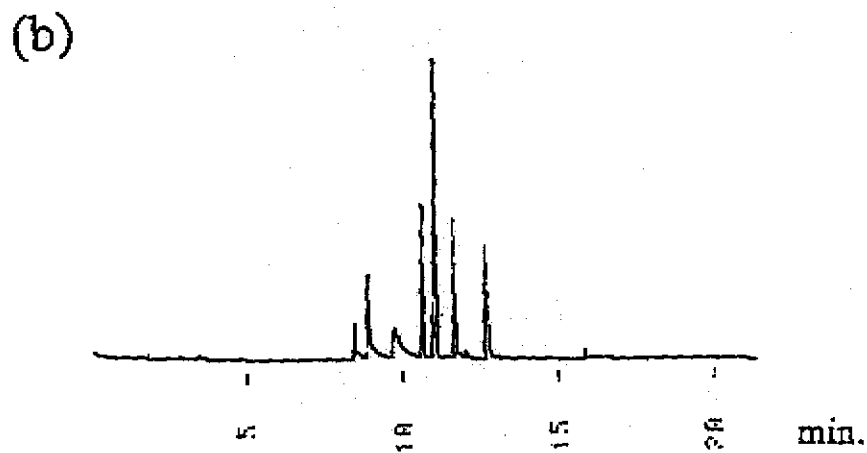
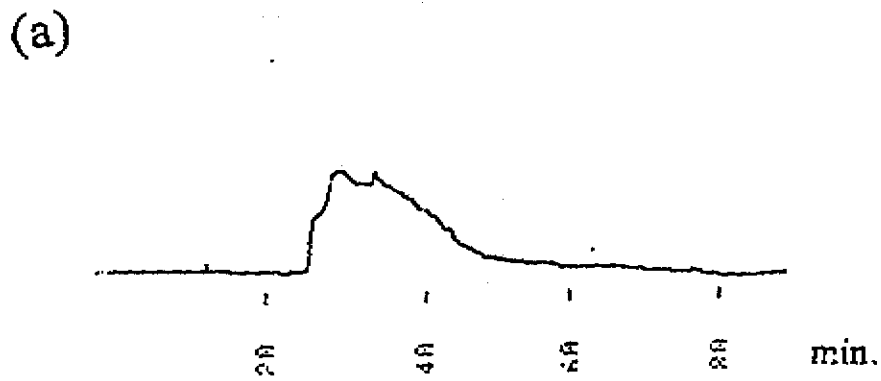
滲流毛細電泳／質譜上，還可以針對從毛細管分離出的數個化合物做鞘流組成的切換，如此便可最佳化每一個化合物的偵測靈敏度。

五、參考資料

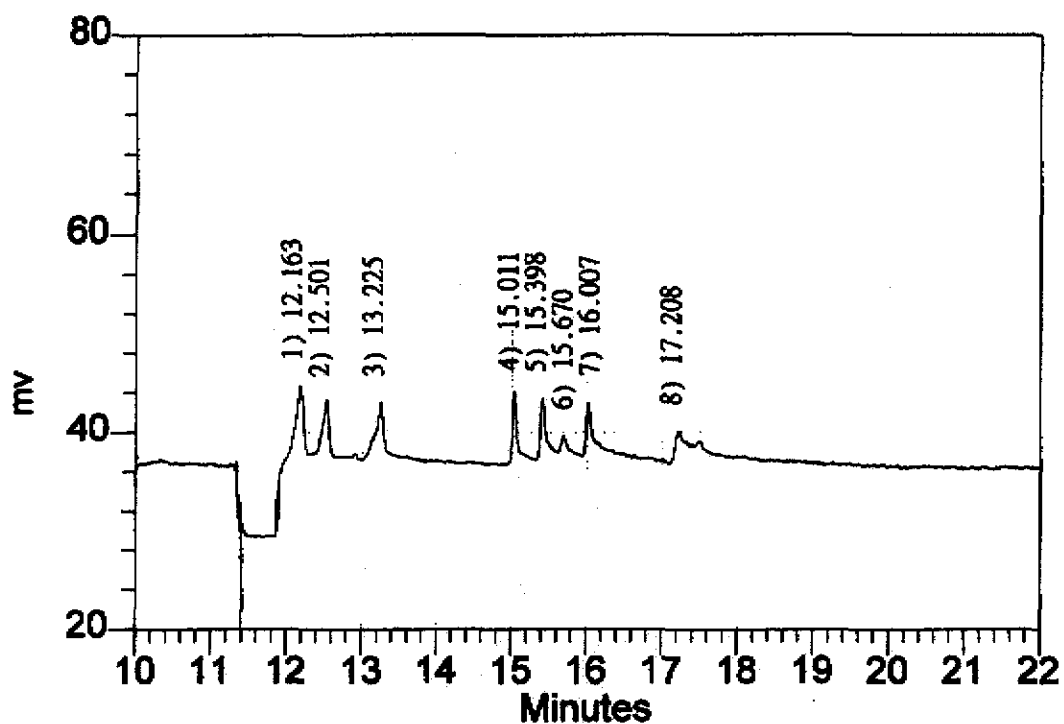
1. J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2 (1988) 207.
2. R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 4 (1990) 54.
3. R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1 (1990) 53.
4. C. Y. Tsai, Y. R. Chen, G. R. Her, J. Chromatogr. A, 813(2) (1998) 379-386.
5. S. Terabe, K. Ishikawa, K. Utsuka, A. Tsuchiya and T. Ando, *Proceedings of the 26th Internal Liquid Chromatography Symposium, Kyoto, Jan. (1983) 25-26.*
6. B. B. VanOrman and G. L. McIntire, *J. Microcolumn Sep.*, 1 (1989) 289.
7. T. J. Kasper, M. Melera, P. Gozel and R. G. Brownlee, *J. Chromatogr.*, 458 (1988) 303.
8. S. M. Masselter and A. J. Zemmann, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1047.
9. T. Kaneta, S. Tanaka and M. Taga, *J. Chromatogr. A*, 653 (1993) 313.



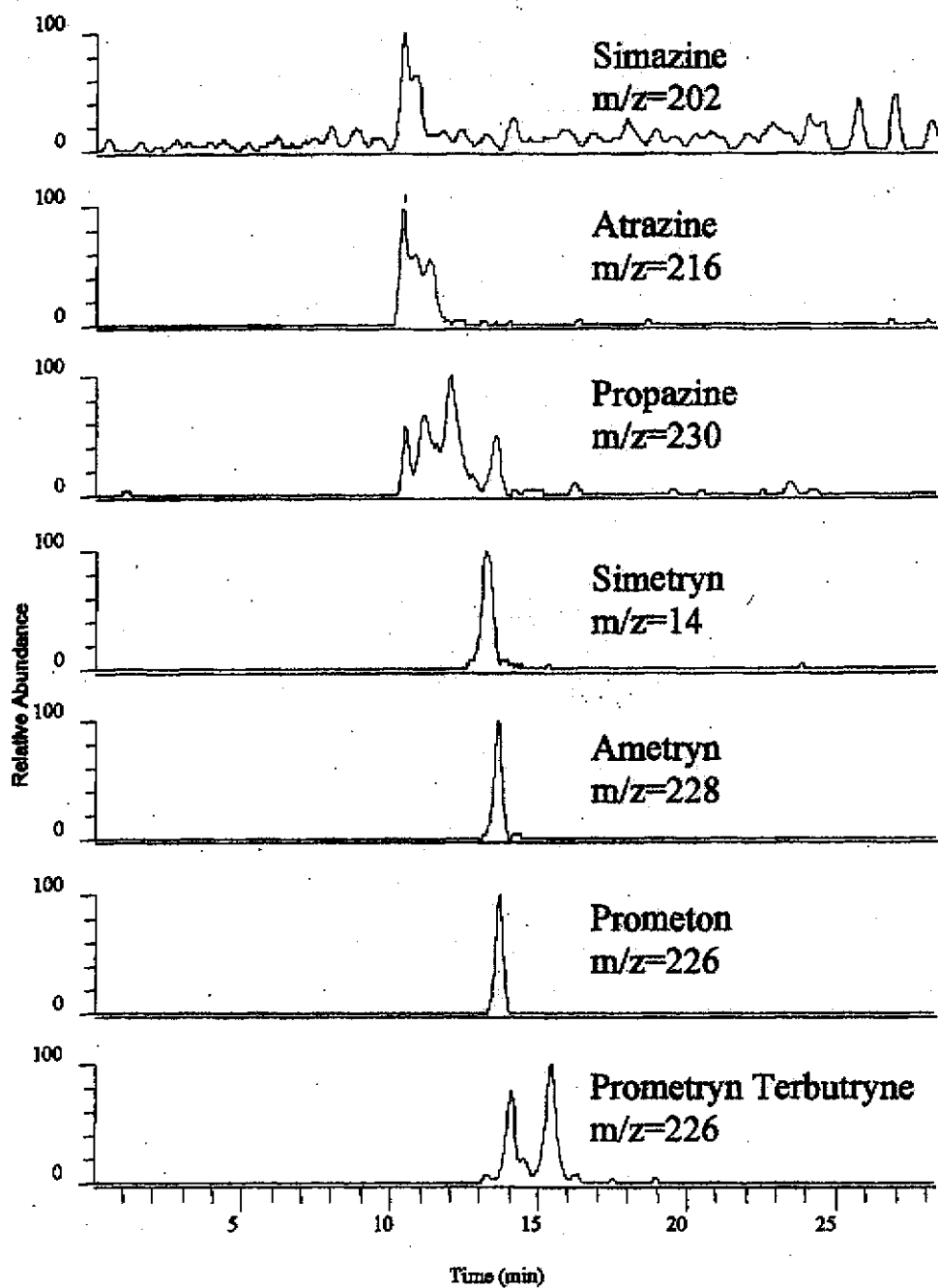
圖一、反電滲流毛細管電泳/質譜儀分析八種 Triazine 之層析圖，毛細管電泳分析電壓：-20kV。所使用的緩衝溶液為：50mM 醋酸銨添加 0.7mM CTAB (pH=3.85)。鞘流溶液的組成為：甲醇/水 (80/20) 溶液添加 0.1%TFA。



圖二、利用反電滲流／紫外光測試鞘流溶液對毛細管電泳層析效果的影响。毛細管電泳出口端的緩衝溶液為(a) 甲醇／水(80／20)溶液添加0.1%TFA。(b) 甲醇／水(80／20)溶液添加0.1%冰醋酸。使用的波長為230nm，其他條件同圖一。



圖三、利用反電滲流／紫外光的系統測試可程式化鞘流界面的可行性，毛細管出口端溶液組成：0-12min 緩衝溶液，12-22min 甲醇／水（80／20）溶液添加 0.1%TFA。其他條件同圖二。



圖四、可程式化鞘流界面於反電滲流毛細管電泳/質譜上的應用，鞘流溶液組成：0~10min 緩衝溶液，10~30min 甲醇/水(80/20)溶液添加 0.1%TFA。其他條件同圖一。

Part B: 低流速鞘流界面的設計與應用

一、中文摘要

本研究綜合了毛細管電泳/電灑法質譜儀各種界面的優缺點，截長補短比較了數種介於鞘流與無鞘流界面間的毛細管電泳/電灑法質譜界面，設計一個使用極低流速(50~200 $\mu\text{L}/\text{min}$)作為鞘流溶液的界面。此界面由於使用的鞘流溶液流速極低，稀釋效應並不大，且相較於無鞘流界面而言低流速的鞘流溶液加上毛細管電泳的流速可以補足電灑效應的流速所需，並減少了毛細管電泳緩衝溶液使用上的限制。

除此之外，為了要與樣品堆積法結合，此界面可在毛細管出口端保留一個極小的體積使得在樣品堆積時毛細管的尖端可以保留足夠的緩衝溶液以供應樣品堆積步驟所需。藉由與場放大的結合，在酚類化合物的分析上可提升大約 500 倍靈敏度。

關鍵字:低流速、鞘流界面、樣品堆積

Abstract: A simple and rugged low flow sheath liquid CE-ESI-MS interface was developed. The use of nanospray tip as the ESI emitter reduces the requirement of sheath liquid flow rate to make the interface operating at optimal flow rate. Thus, sample dilution by sheath liquid was minimized and sensitivity was improved.

In large volume sample stacking (LVSS) operation, the body of the

nanospray tip can be acted as a microreservoir of separation buffer. Therefore, the continuity of CE electrical circuit could be maintained during EOF stacking. With phenols as model compounds, about 500fold enrichment and ppb level detection limits was achieved.

Keywords: low flow、sheath liquid interface、sample stacking

二、緣由與目的

以質譜儀作為毛細管電泳偵測器可以提供一個除了電泳速率以外加上以樣品分子量或是特徵斷裂分離及鑑定樣品的方法⁽¹⁻³⁾。而鞘流界面可說是目前最方便且被廣泛使用的界面，以鞘流界面將毛細管電泳與質譜儀連接時，鞘流溶液扮演著幾個角色，第一、維持毛細管電泳分離的電通路。第二、有機相的鞘流組成降低表面張力以增加電灑效應。第三、使用不同的 pH 針對具有不同酸性或是鹼性機團的化合物提高離子化的程度。

然而，鞘流界面在某些應用上仍存在著一些缺點，其中最常被提出的就是一般所使用的鞘流溶液流速(數個 $\mu\text{L}/\text{min}$)要較毛細管電泳的流速(每分鐘數百 nL/min)高出許多。這使得從毛細管電泳分離出的分析物勢必遭受到大量的稀釋而導致偵測靈敏度下降。為了解決稀釋的問題最直接的方法就是使用無鞘流界面的設計，這個界面的原始設計首先由 R. D Smith 所提出⁽⁴⁾並經過多方面的改良與設計⁽⁵⁻²⁰⁾，其中則以金屬毛細管末梢金屬化界面具有最好的靈敏度與層析效果。然而在製備末端鍍金毛細管時常常需要使用特殊設備，如真空蒸

鍍或濺鍍機，在鍍金過程中步驟不但煩瑣費時，再加上製作好的毛細管鍍層只有幾天的使用壽命。這種種的缺點，使得無鞘流界面無法廣泛的被使用。有鑑於此，本實驗室曾發展出一套簡單方便的毛細管末端塗碳的方法製備毛細管末梢導電界面，此界面不但容易製備，並且也保有無鞘流界面的好處，十分有利於無鞘流界面的普及⁽²¹⁾。

雖然無鞘流界面有上述的優點，但無鞘流界面本身仍然存在著幾個問題，第一、毛細管電泳的流速及使用的管徑與電灑法的最佳流速無法配合，導致電灑過程較不穩定。第二、由於沒有鞘流溶液中所含有機相的輔助，降低溶液表面張力，增加電灑效率以及降低放電的機率，使得緩衝溶液被限制為必須含有一定比例以上的有機溶液組成才適用。第三、對於一些不易在緩衝溶液中形成預成離子 (Preform Ion) 的分析物靈敏度不佳。就一些狀況而言調整緩衝溶液的 pH 值則可幫助這類分析物形成較多的預成離子並提昇偵測靈敏度，但這卻有可能降低毛細管電泳的分離效率。其中第二、三點縮小了毛細管電泳緩衝溶液選擇的範圍，使得在某些狀況下必須在靈敏度與分離效率這兩個因素上作取捨。

本計劃綜合了毛細管電泳/電灑法質譜儀各種界面的優缺點，截長補短比較了數種介於鞘流與無鞘流界面間的毛細管電泳/電灑法質譜界面，並嘗試設計出最合適的設計，此界面除了要解決鞘流界面的大量稀釋問題外，還需解決無鞘流界面電灑過程不穩定、選擇緩衝溶液的範圍有限等缺點。除此之外，為了更大幅度的提昇靈敏度，此界面還將嘗試與可以提昇數十到數百倍靈敏度的毛細管電泳大體積樣品堆積法 (LVSS: Large Volume Sample Stacking)⁽²²⁻²⁴⁾ 作結合，目前一般以鞘流或是無鞘流作為

毛細管電泳電灑法界面的質譜儀並無法直接進行大體積樣品堆積法的步驟，其原因乃是在樣品堆積濃縮時電滲流的方向改往注入端流去，由於毛細管末端無法有效地將溶液補充到毛細管內，使得高電壓通路被迫形成斷路。本實驗室曾嘗試加裝一個樣品槽將其放置於界面末端以得到較佳的堆積效果⁽²⁵⁾。而之前使用的界面長度足足有 35 cm，在重力進樣時會使得毛細管柱彎曲的幅度過大而影響進樣的體積，為避免管柱過度的彎曲必須將電灑界面從質譜中取出。由於此方法過於麻煩且複雜。

綜合以上的需求，本計劃將設計一個使用極低流速 (50 ~ 200 $\mu\text{L}/\text{min}$) 作為鞘流溶液的界面。此界面由於使用的鞘流溶液流速極低，稀釋效應並不大，且相較於無鞘流界面而言低流速的鞘流溶液加上毛細管電泳的流速可以補足電灑效應的流速所需，並減少了毛細管電泳緩衝溶液使用上的限制。除此之外，為了要與樣品堆積法結合，此界面需在毛細管出口端保留一個極小的體積使得在樣品堆積時毛細管的尖端可以保留足夠的緩衝溶液以供應樣品堆積步驟所需。

三、結果與討論

圖一為低流速鞘流界面與質譜銜接的簡單示意圖。在此界面中，所加入的鞘流溶液除了可以維持毛細管電泳的電通路之外，還可以降低毛細管電泳緩衝溶液的表面張力，使得我們使用純水相的緩衝溶液時可以有效降低電灑法的起始電壓 (Onset Voltage)，以降低發生放電的機率。除此之外，也可藉由控制鞘流溶液的 pH 幫助分析物形成預成離子，以提昇樣品的靈敏度。至於電灑法電壓的供給，在這之前本實驗室曾經使用插

入一個金屬針頭再將毛細管放入針頭中，然而此設計不易將毛細管放入微電灑針頭中並且針頭無法深入到離心管底部，深入太多容易將微電灑針頭擠出來或是把針頭敲碎。另外本實驗室也曾經使用極細的金屬絲插入微電灑的針頭中，但是此方法很容易在微電灑針頭中產生氣泡，一旦針頭中產生氣泡，則電灑法的電壓，或是毛細電泳的電通路就無法維持下去。因此我們使用較簡單的設計，即在此界面中將一白金線則插入到離心管的底部，利用白金線導入電灑法電壓以及維持毛細電泳的電通路。

在本界面中，最需要注意的問題就是電灑針頭的口徑選擇，因為此界面是藉著電灑法帶動整個界面的液體流動，因此口徑決定界面的總流速以及稀釋的倍率。對於針頭口徑的選擇。若是口徑過大，則界面的總流速需求會過大，會導致鞘流溶液的流速需求升高，最後則會導致稀釋倍率過大使得靈敏度下降。若是針頭口徑過小則會降低界面的總流速，一旦界面的總流速小於毛細電泳的電滲流流速，自毛細電泳中流出的分析物就會滯留在界面中致毛細電泳分離解析度降低，此外容易堵塞也是口徑過小的另一個缺點。在此界面中，25 μm 口徑可以得到的界面總流速大約在 300~400 nl/min ，此流速符合一般文獻上所報導的最佳流速。

為了要維持毛細電泳的分離解析度，在此界面中不可忽略的一點就是毛細管的出口與微電灑針頭間的死腔體積 (Dead Volume)。若此體積過大則會因擴散的問題導致分離解析度下降。為了要降低這段體積，則將毛細管拉尖後置入微電灑針頭中。雖然拉的越尖死腔體積 (Dead Volume) 就可以越小，但毛細管的拉的越尖就越容易斷裂、堵塞以及增加分析的時間。此外拉的過尖也很容易的將微電灑針頭戳破。因此，為了顧

慮到毛細電泳的分離解析度，以及界面的易用性，我們選擇的拉尖毛細管的外徑約為 40 μm ，內徑約為 30 μm 。

圖二為質譜儀在負離子模式下，使用本界面分析酚類化合物所得到的結果，使用的緩衝溶液為 20 mM CHES pH=10 的水溶液，鞘流溶液為異丙醇比水 4:1 加上 0.5 % 氬水的溶液。相較於使用傳統界面所得到的結果(圖三)，本界面可以得到較高的訊號強度。

由於本界面所使用的鞘流溶液的流速(約 200 nl/min)較傳統鞘流界面的流速(約 5000 nl/min)低許多。因此自毛細管中流析出的分析物不會被鞘流溶液大量稀釋。由於電灑法的偵測器屬於濃度靈敏的偵測器，因此減少鞘流溶液稀釋樣品的程度勢必增加樣品進入質譜的濃度而提升偵測靈敏度。此外，由於本界面與質譜的入口處的距離極短，再加上本界面不需要輔助氣體的幫助，因此本界面的進樣效率要較傳統的界面來得高。

在此界面中，由於毛細管出口與微電灑針頭之間有一個空間存在，因此我們便嘗試利用此空間提供毛細管末端反向電滲流所需的緩衝溶液。我們在進行此步驟時將原先放置鞘流溶液的離心管換成放置少量的緩衝溶液。等到堆積步驟完成之後再將緩衝溶液換回適合電灑的鞘流溶液組成。

在操作上，本界面進行 LVSS 的操作有幾個步驟。首先將 100 μl 的緩衝溶液 (20 mM CHES at pH=10) 注入到原先裝入鞘流溶液的地方(離心管)，由於緩衝溶液是純水相不易進入到微電灑針頭中，因此我們將界面的微電灑針頭移到質譜的入口一段時間，此時質譜儀的真空會將緩衝溶液從離心管吸到微電灑針頭中。之後再將樣品注入到毛細管中。待樣品注入完成後，接下來在毛細電泳的注

入端加上反相的高電壓，此時樣品就會在緩衝溶液與樣品溶液的界面上堆積並縮小樣品區帶的體積。在此步驟中，堆積時間的控制是決定放大比例的最重要因素。若是堆積時間過短，則樣品無法很有效的濃縮並且進樣體積過大，導致解析度與靈敏度同時下降。若是堆積的時間過長，則樣品可能會被完全的移出分離管柱。一般而言，決定堆積的時間可利用堆積時的電流決定。由於樣品在一開始堆積時管柱中大部分是低電導的樣品溶液，因此電流很低，而在堆積的過程中，樣品溶劑會慢慢的被排出毛細管外，因此電流會慢慢上升。堆積完成的電流值一般是設定在毛細管柱充滿緩衝溶液時電流值的 98%。

圖四為使用本界面加上場放大法分析酚類化合物的結果。相較於沒有任何場放大效應的條件，本界面使用大體積樣品堆積法(LVSS)可以降低偵測濃度的極限至 50 ppb 以下。表一為各化合物在不同條件所得到波峰面積的積分所估計的 LVSS 提升倍率。

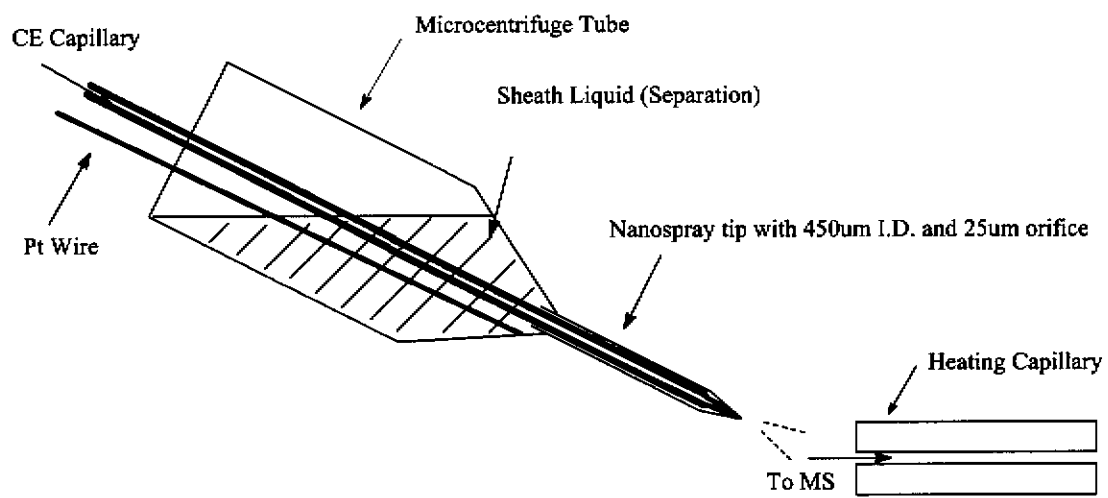
四、計畫成果自評

1. 本研究成功的發展低流速鞘流界面。
2. 微電灑針頭低流速鞘流界面結合了無鞘流以及鞘流界面的優點。除了改進無鞘流界面緩衝溶液選擇有限的問題之外，也改進了鞘流界面大量稀釋樣品的問題。
3. 我們除了改進了此界面的設計，使這一個界面更容易使用外，也將此系統應用於一般低流速鞘流界面較少應用的負離子模式上來分析酚類化合物。
4. 成功的將微電灑低流速鞘流界面與 LVSS 結合，使用 LVSS 則可明顯的提升分析酚類化合物的毛細電泳質譜靈敏度到 ppb 的等級。

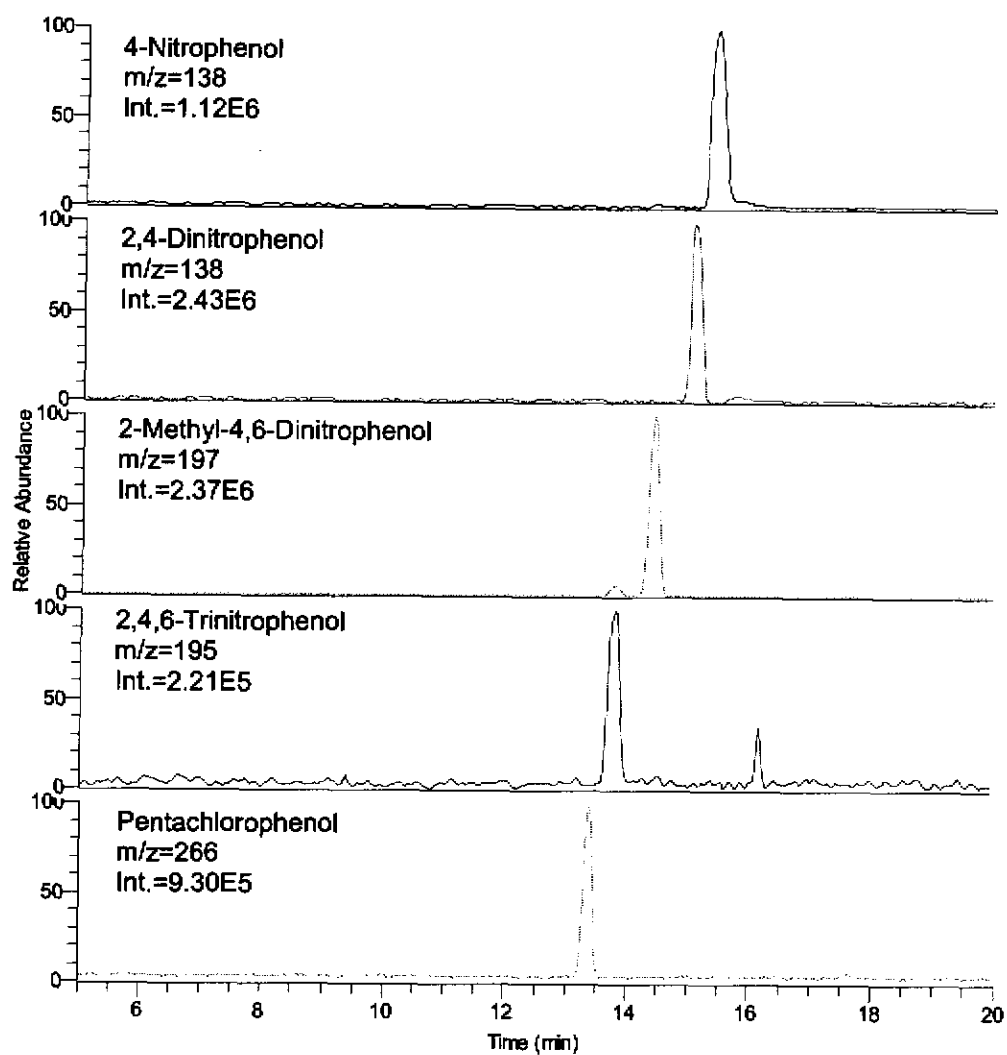
五、參考資料

1. J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2 (1988) 207.
2. R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 4 (1990) 54.
3. R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1 (1990) 53.
4. R.D. Smith, J. H. Wahl, D. R. Goodlett and S. A. Hofstadler, *Anal. Chem.*, 65, 574A (1993).
5. 3. J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 59, 1230 (1987).
6. 4. R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, and H.R. Udseth, *Anal. Chem.*, 60, 436 (1988).
7. J. H. Wahl and R. D. Smith, *J. Cap. Elec.*, 1, 62 (1992)
8. J. H. Wahl, D. C. Gate and R.D. Smith, *J. Chromatogr.*, 659, 217 (1994).
9. D. Figeys, I. van Ostveen, A. Ducret. and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, 68, 1822 (1996).
10. D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, H. Rapp, and K. Hjort, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13, 994 (1999).
11. M.S. Kriger and K.D. Cook, *Anal. Chem.*, 67, 385 (1995).
12. J. F. Kelly, L. Ramaley, and P. Thibault, *Anal. Chem.*, 69, 51 (1997).

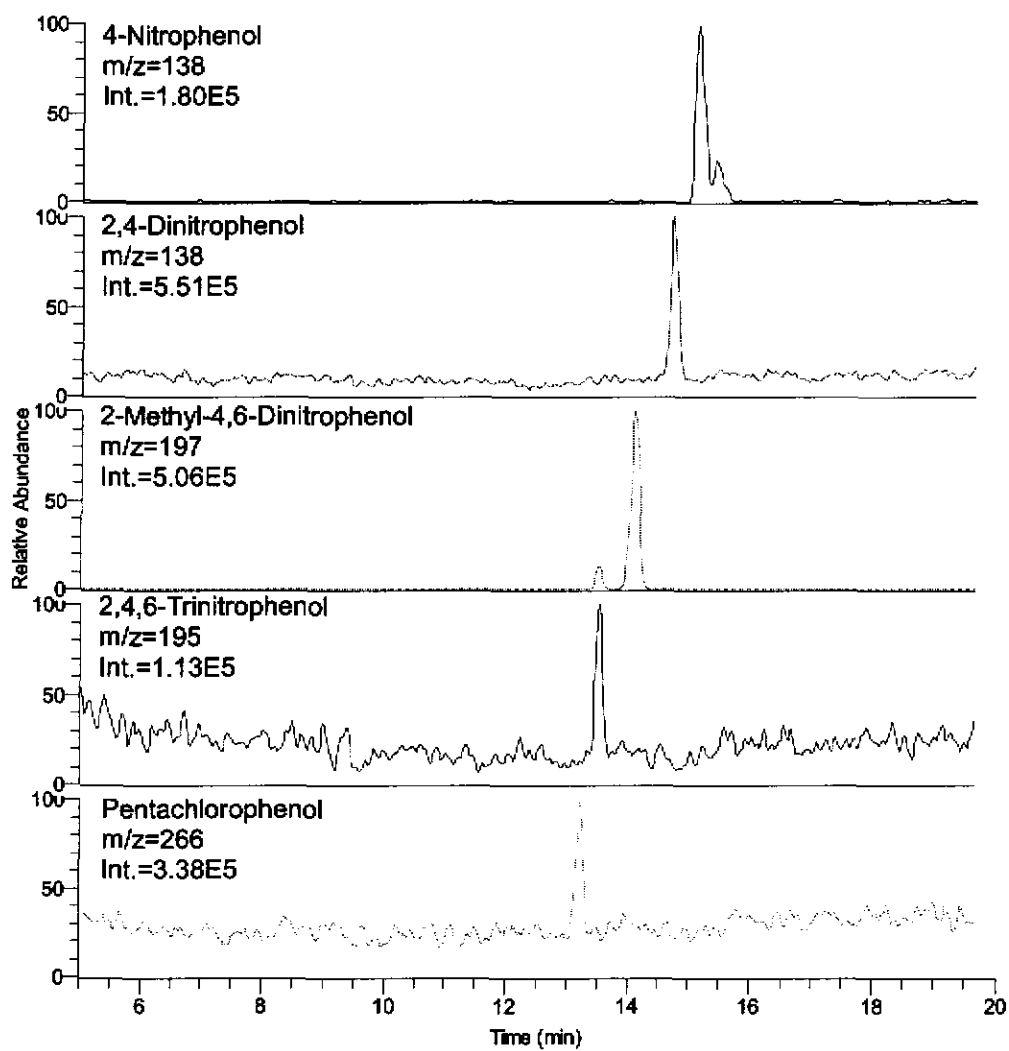
13. Severs, J. C.; Harms, A. C.; Smith, R.D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10, 175(1996).
14. Severs, J. C.; Smith, R.D. *Anal. Chem.*, 69, 2154 (1997).
15. J. N. Alexander IV G. A. Schultz, and J. B. Poli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 1187 (1998).
16. K. P. Bateman, R. L. White, and P. Thibault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 307 (1997).
17. K. P. Bateman, R. L. White, M. Yaguchi and P. Thibault., *J. Chromatogr. A* , 794, 327, (1998).
18. 18. L. Fang, R. Zhang, E.R. Williams and R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 66, 3696 (1994).
19. P. Cao, and M. Moini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 561 (1998).
20. M. Mazereeuw, A. J. P. Hofte, U.R.Tjaden and J. van der Greefi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 981(1997).
21. Y. Z. Chang, G R. Her, *Anal. Chem.*, 72, 626 (2000)
22. S. E. Moring, J. C. Colburn, P. D. Grossman and H. H. Lauer; *LC-GC Intl.* 3 46-52 (1990)
23. R. L. Chien and D. S. Burgi; *Anal. Chem.* 64 489A-496A (1992)
24. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts and Th. P .E. M. Verhegn; *J. Chromatogr.* 169 1-10 (1979)
25. Tsai, Cheng-Yuan; Her, Guor-Rong; *J. Chromatogr. A*, 743(2), 315-321 (1996)



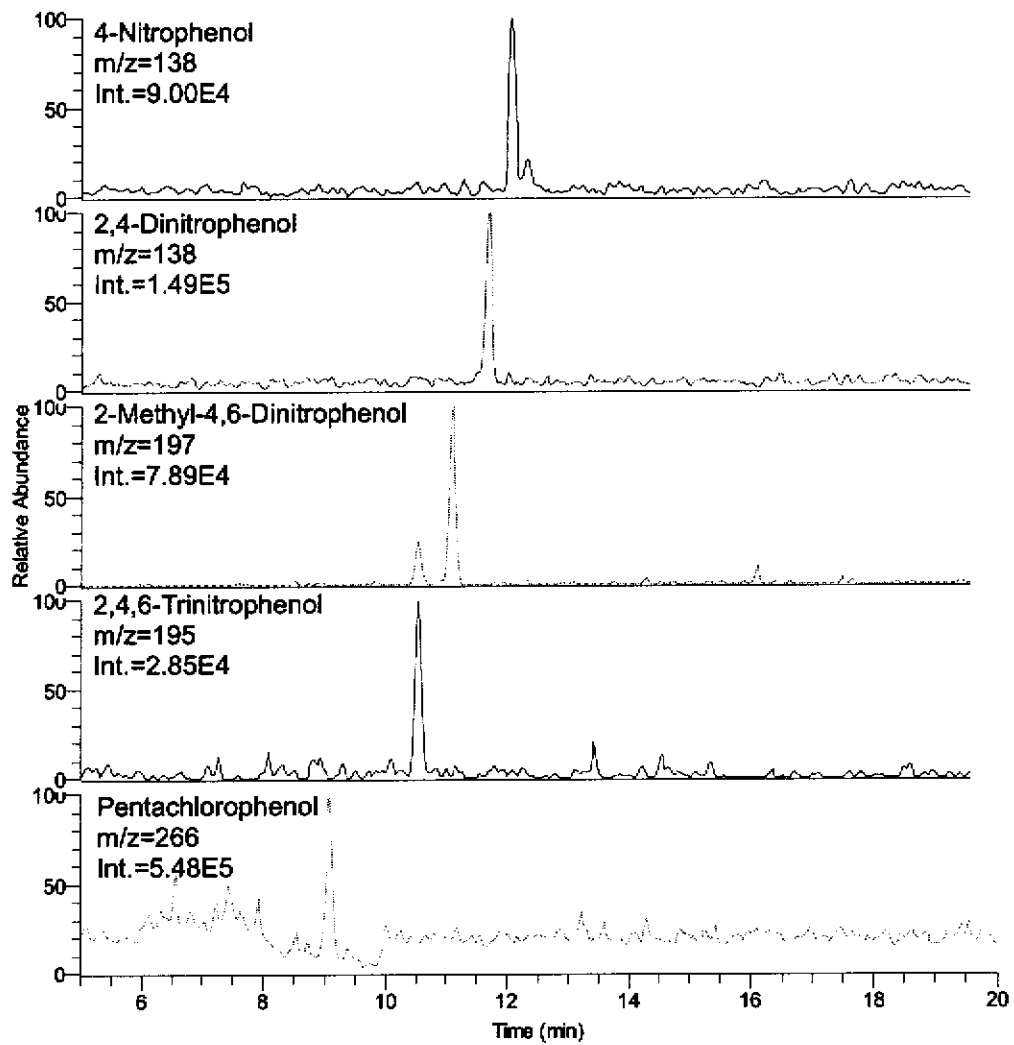
圖一、低流速鞘流界面毛細管電泳電灑法質譜介面示意圖。



圖二、低流速鞘流界面分析酚類化合物 (緩衝溶液：CHES 20mM at pH=10，鞘流溶液：IPA : H₂O = 4:1 + 0.5 % NH₄OH，樣品濃度為 40 ppm 溶在 H₂O 中)。



圖三、傳統鞘流毛細電泳介面分析酚類化合物 (緩衝溶液：CHES 20mM at pH=10，鞘流溶液：IPA:H₂O = 4:1 + 0.5% NH₄OH at 5 μl/min，樣品濃度為 40 ppm 溶在 H₂O 中)。



圖四、使用大體積樣品堆積法(LVSS)分析酚類化合物所得到的結果(緩衝溶液：
CHES 20mM at pH=10，鞘流溶液：IPA : H₂O = 4:1 + 0.5 % NH₄OH，樣品
濃度為 50 ppb 溶在 H₂O 中)。

Compound	M/Z	200ppm in Buffer		40ppm in H2O		50ppb LVSS	
		Peak Area	Amplification Ratio	Peak Area	Amplification Ratio	Peak Area	Amplification Ratio
4NP	138	2.23E+07	1.00	1.73E+07	3.90	8.04E+05	144.61
2,4DNP	183	4.54E+07	1.00	2.83E+07	3.12	1.05E+06	92.86
2M4,6DNP	197	2.51E+07	1.00	2.73E+07	5.44	6.02E+05	95.89
2,4,6-TNP	195	4.35E+06	1.00	2.67E+06	3.06	1.88E+05	172.60
PCP	265	1.56E+07	1.00	8.78E+06	2.82	3.00E+06	769.43
						Average	255.08

表一、各化合物在不同條件下的提升倍率。

Part C: 薄膜送樣結合樣品前濃縮快速氣相層析/質譜偵測水中三鹵甲烷

一、中文摘要

薄膜送樣質譜技術乃是一種無需樣品前處理且具有線上/即時分析能力的快速分析技術⁽¹⁻⁸⁾，其結構主要分為薄膜送樣及質譜分析兩部分。由於薄膜送樣質譜技術並不具有分離的能力，故難以利用於複雜基質樣品分析。因此，本實驗利用快速氣相層析技術將穿透薄膜的待測物快速分離後，再經由質譜儀偵測。

於分析水中消毒副產物三鹵甲烷時，配合脈動注入進樣方式，可有效降低系統的記憶效應，確實測得各採樣時間內水樣中三鹵甲烷的濃度。實驗中雖然顯示樣品中的水分子會對分析結果產生影響，但是，可以藉由控制注入溫度及注入時間來加以克服。本分析系統對水中三鹵甲烷的偵測極限可以達到 ppt 的濃度範圍，顯示本分析系統確實可以用來線上/即時分析環境中低濃度之三鹵甲烷。

關鍵詞：薄膜送樣質譜技術、快速氣相層析技術、三鹵甲烷

Abstract

Analytical methods based on membrane introduction and fast gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) have been developed for the analysis of volatile organic compounds in drinking water. Combining chromatography with MIMS offers the possibility of taking advantage of both chromatography as a separation method and mass spectrometry as an identification method. While maintaining the on-line monitoring characteristic of traditional membrane introduction mass spectrometry (MIMS), the difficulty of distinguishing isobaric ions in MIMS was overcome by rapid GC separation. With pulse sample introduction real time concentration was obtained and also the

memory effect was reduced. In this experiment, the sample moisture would affect the result. With controlling of injection temperature and injection time, the problem of sample moisture can be overcome.

The detection limit of this method for the analysis of trihalomethane (THMs) in the drinking water was found to be ppt. With this system, the concentration of THMs in the drinking water was successfully obtained.

Keywords: membrane introduction、mass spectrometry、memory effect、trihalomethane

二、緣由與目的

水是維持生命的重要要素，人類生活對於自然水源依賴甚深。水在人類生活中扮演多種角色，除了日常飲用水，它也被用作灌溉農田、水力發電、各種工業之製造用水、冷卻用水、運輸、遊憩等功能。當人類發現疾病可能和飲水有關，才開始對飲用水加以簡單的過濾、消毒處理，並提倡水必須煮沸才能飲用。隨著工業發展，陸續發生飲用水受到污染，比較重要之水媒疾病有傷寒病 (typhoid fever)，副傷寒 (Paratyphoid fever)，痢疾 (dysenteries)、胃腸炎 (gastroenteritis)、傳染性肝炎 (infectious hepatitis)、霍亂 (cholera)、血吸蟲病 (schistosomiasis) 等，造成種種疾病。因此，經過層層濾淨、殺菌處理的自來水處理技術便應運而生。

目前所使用的消毒法大部份採用氯氣或次氯酸鹽，有些歐美國家使用臭氧消毒。由於我國飲用水水質標準中規定配水管網中必須維持一定之餘氯量，而臭氧無法維持餘量，加以設施標準亦規定自來水消毒應使用氯劑，目前國內各淨水廠均使用加氯消毒。除了氯劑外，其他消毒方法在國內尚未被認可。氯劑之優點為消毒效果完全，可應用於各種大小水量之消毒，且水中之餘氯仍具消毒效力等。

根據美國哈佛及威斯康辛醫學院研究報告指出，自來水供應系統加氯過程中產生的消毒

副產物，會輕微增加致癌機率，惟美國自一九七九年加嚴飲用水中加氯消毒副產物的水質標準後，此致癌風險已大為降低。另該研究強調不會停止加氯，因為減少或停止加氯會導致飲用水中微生物污染的風險提高，且比起致癌的風險要高出許多，美國南部某些地區曾因停止加氯，而發生疑似霍亂、傷寒等水媒疾病的流行。總三鹵甲烷為飲用水中最主要的加氯消毒副產物，目前我國飲用水水質標準中總三鹵甲烷的標準值為 0.1 毫克/公升，與美國、日本等國家之最新標準相同，其致癌風險為百萬分之一，亦即以七十公斤重的成年人，每天喝二公升的水，水中總三鹵甲烷的濃度為 0.1 毫克/公升，連續喝七十年後，每一百萬人中會有一人有致癌的可能。這是一個合理的致癌風險，也是全世界所接受的一個致癌風險。

自 1974 年經 Rook 等人證實加氯消毒會有如氯仿等消毒副產物之誘發效應以來，近二十年也相繼證實有氯仿、溴仿、一氯二溴甲烷、二氯一溴甲烷等通稱為三鹵甲烷的消毒副產物存在。八十年代隨著儀器精進及分析方法的開發，陸續證實有包括一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸、一溴乙酸、二溴乙酸及一溴一氯乙酸等鹵乙酸氯化消毒副產物，美國環保署也將其列為飲用水水質之管制項目。國內現行飲用水消毒程序仍沿用加氯消毒為主要方法，鑒於鹵化物氯化消毒副產物對於人體健康之危害，國內環保署已將其列為未來飲用水管理條例之列管項目。因此建立飲用水中鹵化物氯化消毒副產物之分析方法乃為迫切之要務。臺灣行政院環保署針對飲用水中三鹵甲烷之檢測方法主要有於民國八十三年四月公佈的吹氣捕捉氣相層析法；民國八十六年十一月公佈吹氣捕捉/氣相層析質譜法⁷ (Purge-and-trap/ GC/MS) 以及吹氣捕捉毛細管柱氣相層析/光離子化偵測器法 (Purge-and-trap/ GC/PID)，此外，吹氣捕捉毛細管柱氣相層析/電解導電感應偵測法 (Purge-and-trap/ GC/ELCD) 亦可做三鹵甲烷的檢測。而環檢署亦於民國八十九年

三月公佈的水中揮發性有機化合物檢測方法-吹氣捕捉氣相層析質譜法⁸，其偵測極限較之前所提之方法更低。

就傳統上用以偵測水中消毒副產物三鹵甲烷的方法而言，雖然在分離及監測上有良好的效果，但由於整個樣品前處理的程序較為複雜，而且分析時間較長，因而無法有效的進行線上監測，本實驗的目的是設計一套可連續式進樣的方法，利用薄膜萃取期望達到樣品前處理過程的簡單方便，以應用於水中三鹵甲烷的線上偵測，並將此方法結合快速氣相層析質譜儀，利用其快速分析的優點將分離時間縮短，並準確的定性與定量，使系統能夠提供即時而有用的參考數據。

三、結果與討論

本實驗顯示薄膜送樣系統結合快速氣相層析質譜儀具有直接分析水中濃度低至 ppt 範圍之揮發性有機化合物的能力，於一般操作條件下，其分析速度可以達到每小時 20 個樣品以上，所以並不會喪失其線上/即時分析的特性，而且在不經過任何樣品前處理步驟的情形下，可以同時分析水溶液樣品中的多種化合物。

實驗中，三鹵甲烷的四個化合物與內標準物（氘化的甲苯）可以於一分鐘內完全分離測得，而且系統對三鹵甲烷進行分析的偵測極限可以達到數十個 ppt 的濃度範圍（如圖 1），證明本分析系統確實保存了薄膜送樣質譜技術所具有的快速、靈敏特性，並兼具了快速分離待測物的能力。另外，研究過程中雖然發現分析結果會受到來自穿透薄膜之水分子的干擾，但是這干擾可以藉由控制層析溫度獲控制注入溫度來加以克服。控制注入溫度雖然在操作步驟上比控制層析溫度多，所花的時間也較長，但其效果比控制層析溫度好，應用範圍也較廣。由於受限於質譜儀的掃描速度不夠快，偵測太多化合物時，會因為偵測的點數太少，無法忠實呈現各訊號峰形狀以確實定量，此則為本系統的主要問題。

此外於分析水中消毒副產物三鹵甲烷時，使用連續流送樣的方式雖然無法免除薄膜的記憶效應，但具有較高的靈敏度；而分析系統若是配合脈動注入送樣方式，則可以有效降低系統的記憶效應，確實測得各採樣時間內水樣中三鹵甲烷的濃度。

在本分析系統配合脈動注入送樣方式中（如圖 2），利用氣體來推動樣品進入分析系統，氯仿及二氯一溴甲烷的靈敏度在薄膜溫度 70°C 時較傳統流動注入分析模式下略低，一氯二溴甲烷與傳統流動注入分析結果相近，而溴仿的靈敏度則比傳統流動注入分析模式高，而且三鹵甲烷穿透薄膜的效率遠較傳統流動注入分析模式快很多，這對真實樣品分析時，雖然喪失了部分氯仿及二氯一溴甲烷的靈敏度，可是這兩種化合物在水中的濃度一般而言都較高，因此並不影響其測定；但是對一氯二溴甲烷及溴仿這兩種在自來水樣中濃度較低的分析物而言，其能夠有效的提升其靈敏度，有助於分析的進行。

四、計畫成果自評

本分析系統基本上已足以滿足快速分析的要求，既無需樣品前處理步驟，也可以快速分離測定各個待測物。其應用在一些需要即時得知分析結果，藉以控制環境條件的領域，如發酵過程、作業環境中的有害污染物濃度等，應有其實際應用的價值。不過，本系統於實際應用上，上有一些問題有待解決。例如系統的自動化、液態氮的供應系統以及環境樣品是否能夠長時間且順利的通過送樣系統；使否需要其他措施的配合，如預先過濾樣品中的固體，以避免管路阻塞等問題，都需要更進一步的研究與探討，並配合實際應用的環境來加以考量。

五、參考文獻

1. Kotiaho, T.; Lauritsen, F. R.; Choudhury, T. K.; Cooks, R.G.; Taso, G.T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 875A.
2. Wong, P.S.H.; Cooks, R.G.; Cisper, M.E.;

Hemberger, P.H. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 215A.

3. Bauer, S. *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 202.

4. Kotiaho, T. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1.

5. Srinivasan, N.; Johnson, R.C.; Kasthurikrishnan, N.; Wong, P.; Cooks, R.G.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *350*, 257.

6. Lauritsen, F.R.; Kotiaho, T. *Rev. Anal. Chem.* **1996**, *15*, 237.

7. 中華民國八十三年四月十二日（83）環署檢字第 00551 號公告，NIEA W785.50A.

8. 中華民國八十九年三月二十二日（83）環署檢字第 14989 號公告，NIEA W785.51B.

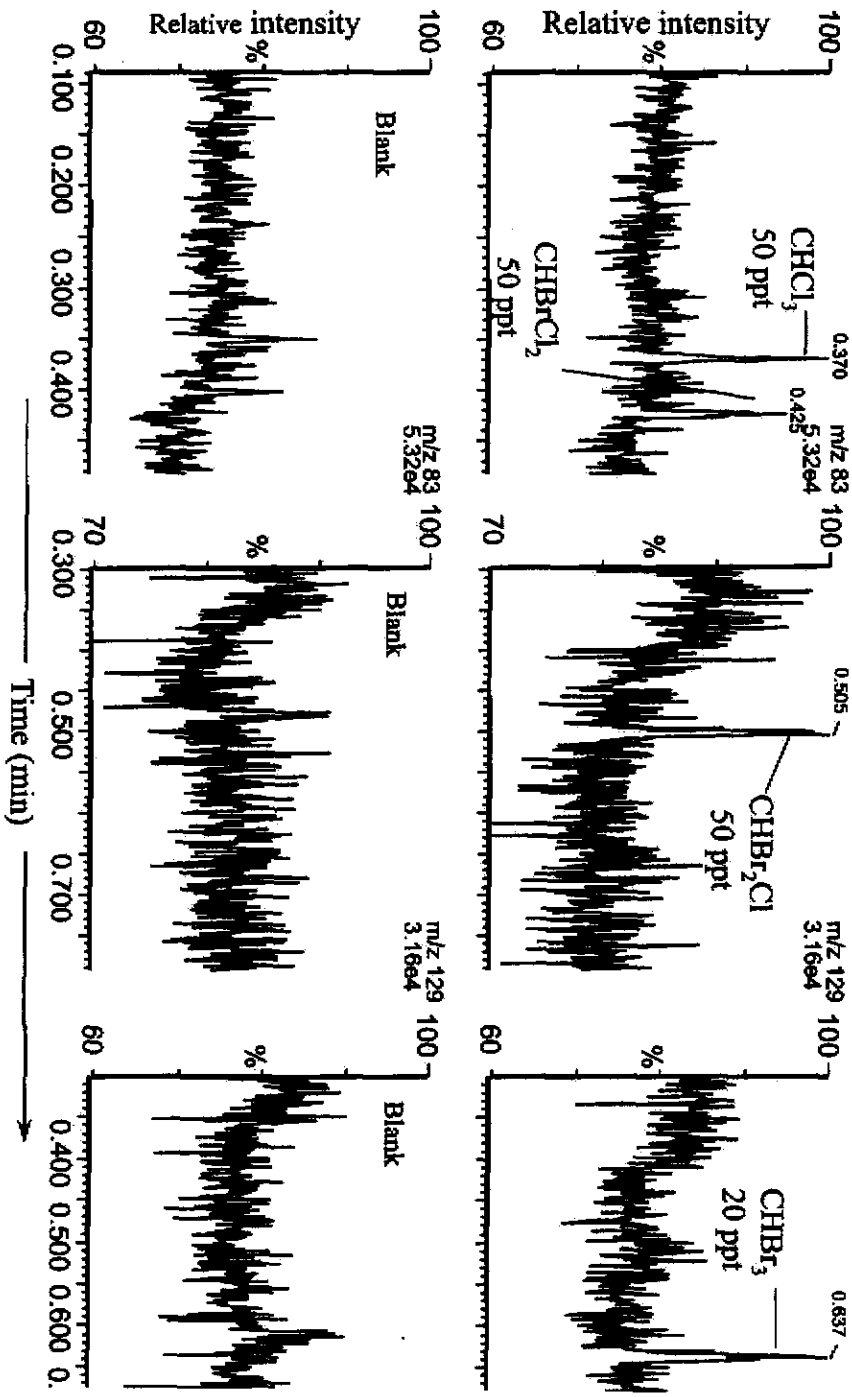


圖 1. 系統對三鹵甲烷之偵測極限分析結果

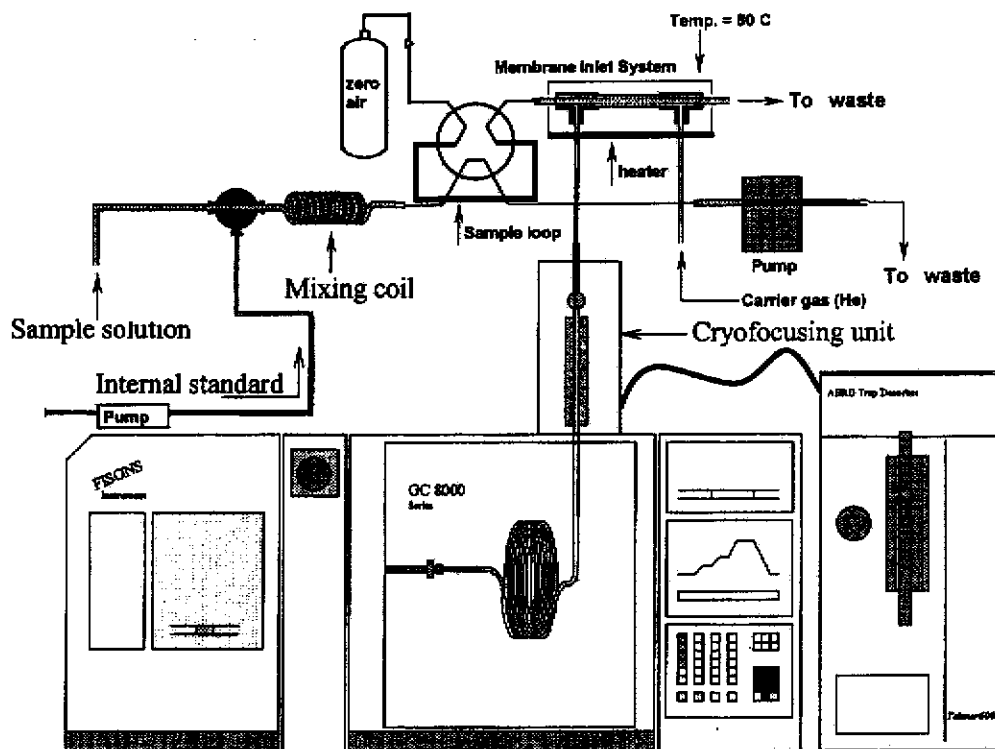


圖 2. 脈動注入送樣方式

Part D: 飛行式質譜儀於高分子添加劑之研究

一、中文摘要

本研究中係以介質輔助雷射脫附--飛行式質譜儀來研究分析聚乙烯中的添加劑。由於介質輔助雷射脫附游離法是一種軟離子化法，所以在實驗中所分析之添加劑主要產生分子離子 MH^+ 和 MNa^+ 及少數的裂解離子，可以容易的判斷聚乙烯萃取液中添加劑的數目和分子量。再者，配合質譜/質譜的技術將各添加劑產生的分子離子進行離子源後裂解與碰撞引致裂解分析，由子代離子的結構訊息來增加定性分析的可信度。另外，藉由飛行式質譜儀可分析高分子量的特性，來針對一些較大分子量的添加劑進行分析。在真實樣品分析上，我們採用丙酮溶劑，降低萃取液中聚乙烯的含量，改善了聚乙烯干擾的問題，成功的鑑定出雨衣中所含的 Erucamide、Irganox1076、Irganox1010 和 Naugard 524 四種添加劑。

關鍵詞：介質輔助雷射脫附法、飛行質譜儀、高分子添加劑

Abstract: Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) in combination with mass spectrometry proved to be a viable method for identifying additives in polyethylene extracts. The MALDI mass spectra of additives standards were found to be very simple consisting of $[M+H]^+$ and/or $[M+Na]^+$ pseudo molecular ions with little fragment ions. For real samples, which often contain more than one additive, the production of only one or two ions for each additive makes the tentative assignment much easier. Collision induced dissociation (CID) of the pseudomolecular ion is used to confirm the tentative assignment. The analysis of high molecular weight additives, such as Chimassorb 944 and Tinuvin 622 indicated that MALDI was superior to other ionization

techniques such as electrospray ionization (ESI), desorption chemical ionization (DCI) and fast atom bombardment (FAB) in the analysis of high molecular weight polymer additives. Sample preparation was found to be more critical than DCI in the analysis of real sample. The signals were interfered by the low molecule weight polyethylene molecules, which were co-extracted with the additives. This problem was partially overcome by using acetone instead of methanol to precipitate the low molecular weight polyethylene molecules.

Keywords: matrix laser-desorption ionization、time of flight mass soectrometry、polymer additives

二、緣由與目的

隨著高分子(polymer)工業的進步，高分子產品已成了人們生活中食、衣、住、行、育、樂上的一部份，具有其無可取代的地位，也正因為其與人們生活關係之密切，所以為確保其產品之安全性與可靠性，故對高分子產品的品管也越形重要。良好的控管生產的品質，可確保產品的使用精良無礙；而市場上高分子產品可以被有效的分析檢驗，才足以防止劣質的產品對使用者造成傷害。本研究主要以介質輔助雷射脫附(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)--飛行式質譜儀(Time of Flight mass spectrometry)來對高分子化合物添加劑進行相關的分析研究。

分析聚合物中的添加劑是一項具有挑戰性之工作，為了因應不同使用的功能及為了使用不同種類的聚合物而發展出來的添加劑相當多，且同一類型的添加劑結構相當類似，常造成分析上的困擾。此外，添加劑在聚合物介質中的含量通常很低在數百 ppm 至百分之五左右，因此在分析時，常因伴隨著高分子聚合物的背景訊號而造成干擾。另外在聚合物中常添加多項添加劑，使聚合物同

時具有數種改進的效能，添加劑種類越多對色層分析而言，分離的過程越加困難。甚至對一些化性不穩定的添加劑，在萃取或分析過程中會因產生其他化合物而增加分析上的困擾。

近年來，許多研究人員基於質譜儀不但能夠得到待測化合物的分子量，更可以提供化合物結構上的相關資訊，因此以質譜儀來分析高分子添加劑，以期能更正確地掌握高分子添加劑的特性。由於質譜儀可以測得待測化合物的絕對質量，因此只要能得到高分子化合物的分子離子，即可免除了缺少適當標準品的困擾。所以各種軟性離子化方法均被應用來分析高分子添加劑，如快速原子撞擊法(Fast Bombardment, FAB)^[1,2]、化學揮離法(Desorption Chemical Ionization, DCI)^[3,4]、雷射脫附法(Laser Desorption, LD)^[5-10]、電灑法(Electrospray Ionization, ESI)^[11]以及大氣壓化學游離法(atmospheric pressure chemical ionization APCI)^[12,13]。

介質輔助雷射脫附法(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)，是近十幾年來新興的一種質譜游離法，主要是藉由介質的幫助使雷射的能量大部分被介質所吸收，在間接傳遞能量給待測物，可成功的產生分子量高達數萬的待測物離子，因此解決了過去高分子量化合物不易產生分子離子的問題。另外，此離子化法是一種軟性的離子化技術，可用來分析脆弱的化合物分子而不會有嚴重的裂解，因此近年來主要應用於合成高分子及生化高分子的研究^[14,15]。

本研究中主要以介質輔助雷射脫附/飛行式質譜儀來研究分析高分子樣品中的添加劑，希望藉由介質輔助雷射脫附游離法的軟離子化來避免分子離子的裂解，以得知添加劑的分子離子，並配合質譜/質譜技術使分子離子裂解，以產生判斷添加劑所需的裂解離子訊息，增加定性分析的可信度。此外M，由於高分子產品需求增加，添加劑的型態也隨之改變，部分添加劑漸漸走向高分子化，因此也希望藉由介質輔助雷射脫附/飛行式

質譜儀在理論上無質量上限的優點，增加高分子添加劑質量上分析的困難。

三、結果與討論

本研究是以介質輔助雷射脫附游離法來分析聚乙烯中的添加劑。所謂介質輔助雷射脫附離子化法，是利用介質來吸收雷射光而獲得能量，再將部份能量傳遞給待測物，使待測物離子化後進行分析，因此必須選擇適當的介質，以得到最佳的分析效果。而選擇介質的先決條件是必須能吸收雷射能量，此外希望介質與待測物能均勻溶在相同的溶劑中，使在結晶的過程中能形成良好的共結晶。所以，我們考慮所使用的雷射種類(氬氣雷射 337nm)，並參考文獻分析高分子的經驗，選擇了 Dithranol、Ferrulic acid 和 2,5-dihydroxybenzoic acid(2,5-DHB)三種介質進行測試。其結果發現使用 Dithranol 和 Ferrulic acid 均不易使添加劑離子化(如圖 1)，而添加劑在 2,5-DHB 中則有較好的離子訊號。因此選擇了 2,5-DHB 作為本實驗的介質。

由於介質輔助雷射脫附游離法是一種軟離子化法，所以在實驗中所分析的添加劑主要是以產生分子離子 MH^+ 和 MNa^+ 以及少數的裂解離子，可以容易地判斷聚乙烯萃取液中添加劑的數目與分子量。再者，配合質譜/質譜(MS/MS)的技術將各添加劑產生的分子離子進行離子源後裂解(Post source decay, PSD)，與碰撞引致裂解(Collision induced dissociation, CID)分析，藉由子代離子的結構訊息來增加定性分析的可信度。其實驗結果發現，抗氧化劑的添加劑容易產生阻礙基上丁基的掉落形成相隔 56 的離子峰，另外也容易產生 $m/z=219$ 穩定的 Benzylic 離子，這些裂解離子是證實此類抗氧化劑有利的證據。而在紫外線安定劑方面，若為共振較強的苯基疊氮紫外線安定劑，雖其結構較穩固，但還是能提供相當程度的結構訊息。在另一類阻礙性胺類(HALS)的紫外線安定劑則容易產生掉落 Piperidine 環的離子與環本

身裂解的離子，這些裂解離子是這類添加劑所特有的。

表 1 和表 2 為紫外線安定劑與抗氧化劑之質譜/質譜分析的整理。

此外，本研究也藉由介質輔助雷射脫附/飛行式(Time-of-Flight, TOF)質譜儀針對先前本實驗室運用化學揮發離子化法和快速原子撞擊離子化法無法有效測得的一些較大分子量添加劑來進行分析。其結果如圖 2-a 顯示 Chimassorb 944 是以相差一個重複單位的高分子序列增加($m/z=599$ 、 1198 、 1797 等)，而 $m/z=944$ 則是相對於此添加劑的二聚體少一個三疊氮基團的分子離子訊號，同樣的也以相差一個重複單位的高分子序列增加(994 、 1593 、 2191 、 2790 等)。在另一個高分子量添加劑 Tinuvin 622 以 MALDI-TOF 分析結果顯示(如圖 2-b)，此寡聚合物添加劑主要以線性形式存在，其單體分子離子為 $m/z=316$ ，而且也以重複單位序列增加(599 、 882 、 1165 等)。此外也可發現此寡聚合物添加劑的環狀形式離子訊號($m/z=567$ 、 850 、 1133 等)。

在真實樣品分析上，由於甲苯萃取液中所含的聚乙烯會破壞分析物的結晶性，造成分析上的困擾。因此採用丙酮溶劑，藉由溶劑極性之調整來減少溶在甲苯中聚乙烯的量，以改善聚乙烯干擾的問題。其結果顯示(如圖 3)，可以鑑定出市售簡易型聚乙烯雨衣中添加劑，分別為 Erucamide 的 $m/z=338$ 和 $m/z=360(MH^+$ 與 $MNa^+)$ 離子對; Irganox 1076 的 $m/z=530$ 與 $m/z=553(M^+$ 與 $MNa^+)$ 離子對; Naugard 524 氧化物的 $m/z=663$ 與 $m/z=685(MH^+$ 與 $MNa^+)$ 離子對 Irganox 1010 的 $m/z=1199(MNa^+)$ 離子訊號。

四、計畫成果自評

1. 建立介質輔助雷射脫附--飛行式質譜儀分析高分子添加劑的相關變數之資料。
2. 藉由特徵斷裂離子的圖譜，建立介質輔助雷射脫附--飛行式質譜儀分析不同種類高分子添加劑的資料庫。

3. 將質譜分析技術應用於實際高分子樣品分析，並藉由質譜分析結果，預測高分子樣品特性。
4. 將本計畫所發展之技術，配合分析其他各子計畫所新合成之高分子樣品，回饋及時資訊給各子計畫，以供修正研究策略之用。

五、參考文獻

- [1] Lay, J. O.; Barbara, Jr.; Miller, J. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1323A.
- [2] Freeman, H. S.; Hao, Z.; Sokolowska-Gajda, J.; Breemen, R.B.; Le, J. C. *Dyes Pigments* **1991**, *16*, 317.
- [3] Chen, S. W.; Her, G. R. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 844.
- [4] Juo, C. G.; Chen, S. W.; Her, G. R. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *331*, 153.
- [5] Lattimer, R. P. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **1993**, *26*, 65.
- [6] Asamoto B.; Young, J. R.; Citerin, R. J. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 61.
- [7] Harad, K. I., Masuda K.; Suzuki, M., *Biological Mass spectrom.* **1991**, *20*, 522.
- [8] Johlman, C. L.; Wilkin, C. L.; Hogan, J. D.; Donovan, T. L.; Youssefi, M. J. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1167.
- [9] Zhan Qiao; Zenobi Renato; Wright, S. J.; Langridge-Smith, P.R.R.. *Macromolecules*, **1996**, *29*, 7865.
- [10] Wright, S. J.; Dale, M. J.; Langridge-Smith, P. R. R.; Zhan Qiao; Zenobi Renato; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3585.
- [11] Jackson, A. T.; Buzy, Armelle; Jennings,

- K. R.; Scrivens, J. H. *Eur. Mass Spectrom.*,
1996, *2*, 115.
- [12] Carrott, M. J.; Jones, D. C.; Davidson, G.
Analyst, **1998**, *123*, 1827.
- [13] Yu, K.; Block, E.; Balogh, M.. *LC-GC*,
2000, *18*, 162.
- [14] Jackson, A. T.; Jennings, K. R.; Scrivens,
J. H. *Rapid Commun. Mass spectrometry*,
1996, *10*, 1449.
- [15] Kornfeld, R. A.; Trengove, R. D.
*Proceeding of the 45th ASMS Conference
on Mass Spectrometry and Allied s*
1997, 419.

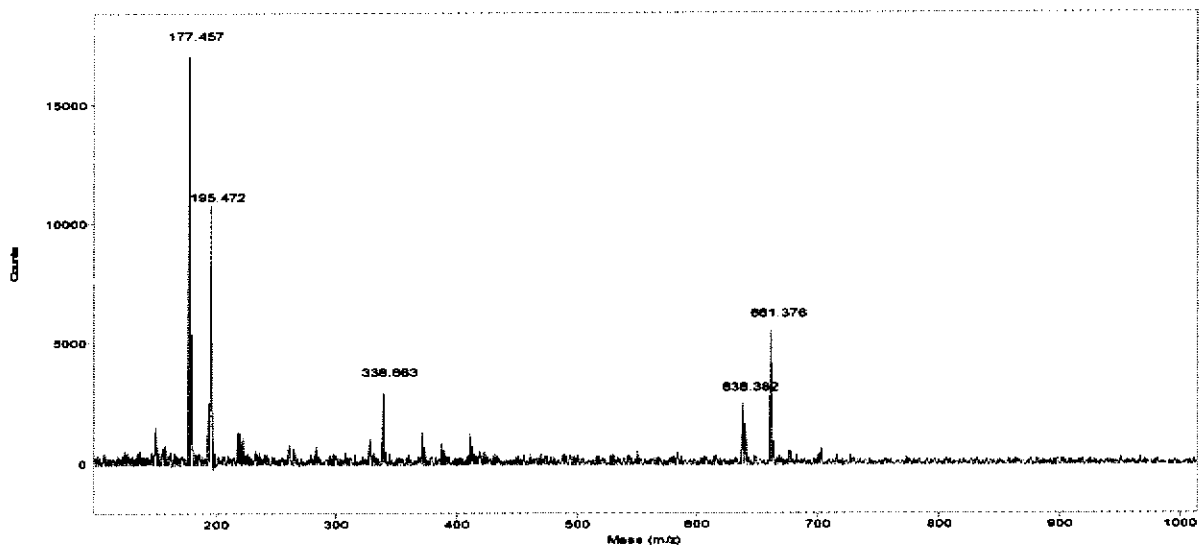
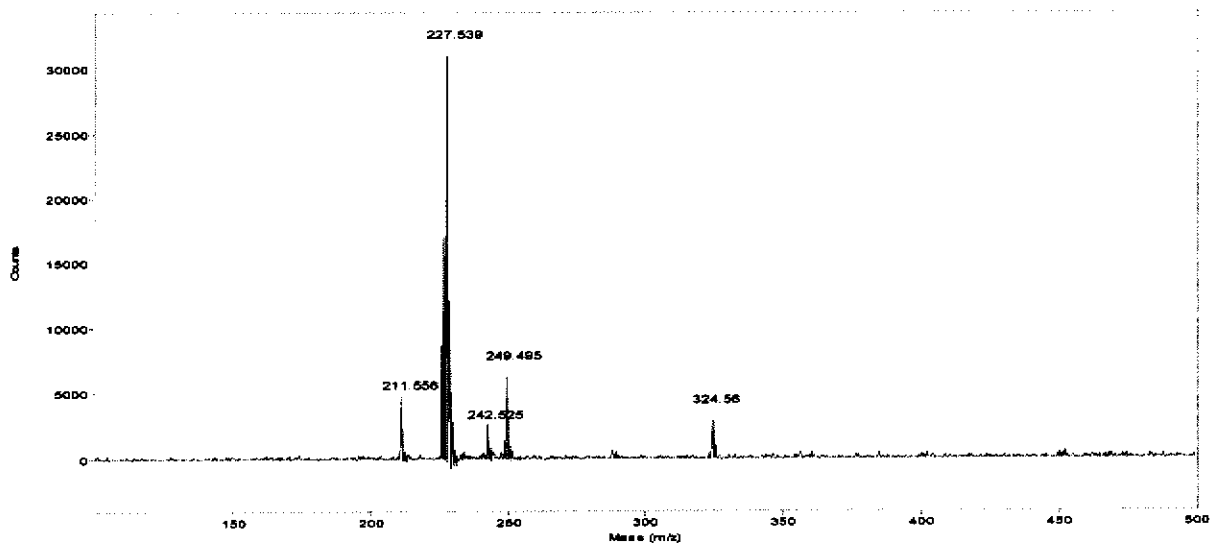


圖 1 (a) Tinuvin 320 之 MALDI 質譜圖 (Dithranol)
 (b) Irganox 259 之 MALDI 質譜圖 (Ferulic acid)
 (* : 表示介質的離子訊號)

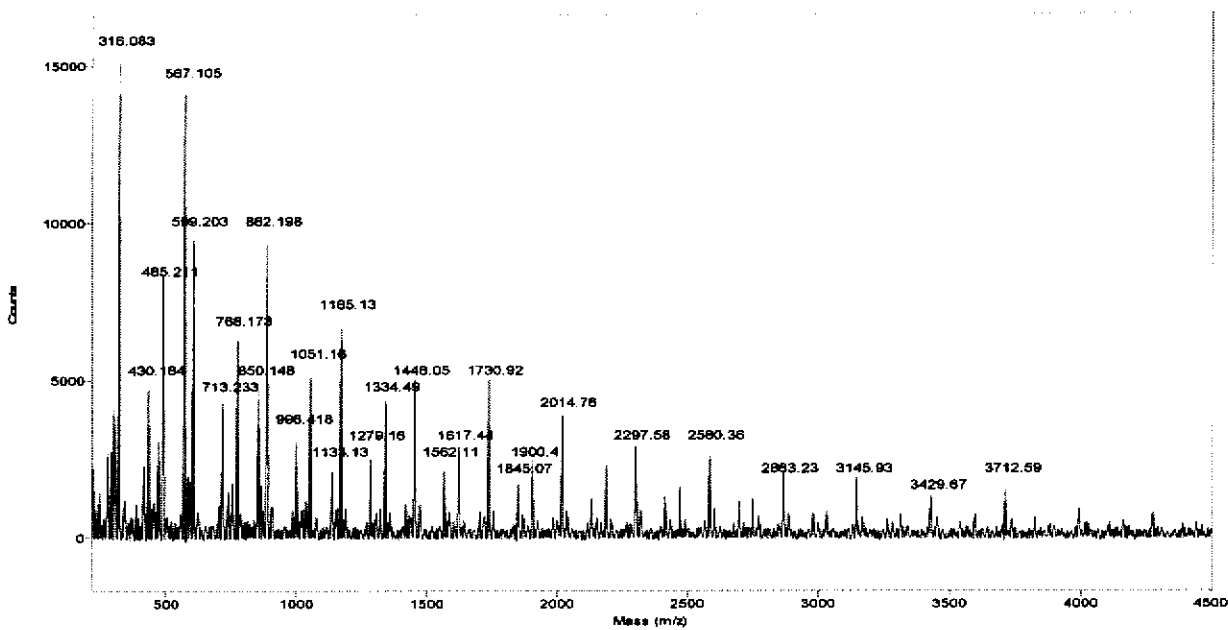
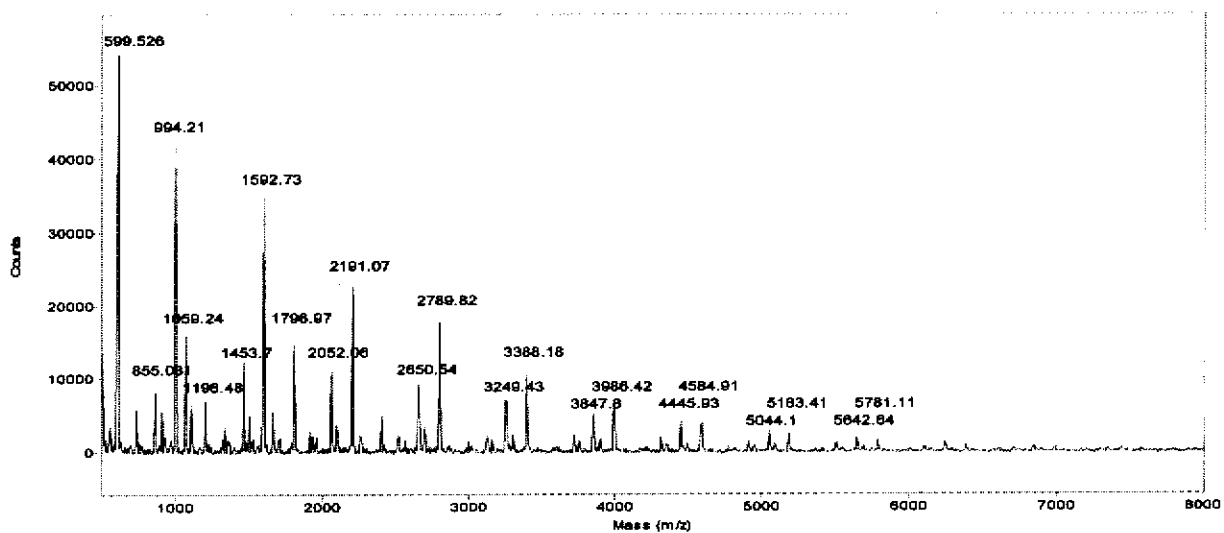


圖 2、a) Chimassorb944 與 b) Tinuvin622 之 MALDI 質譜圖

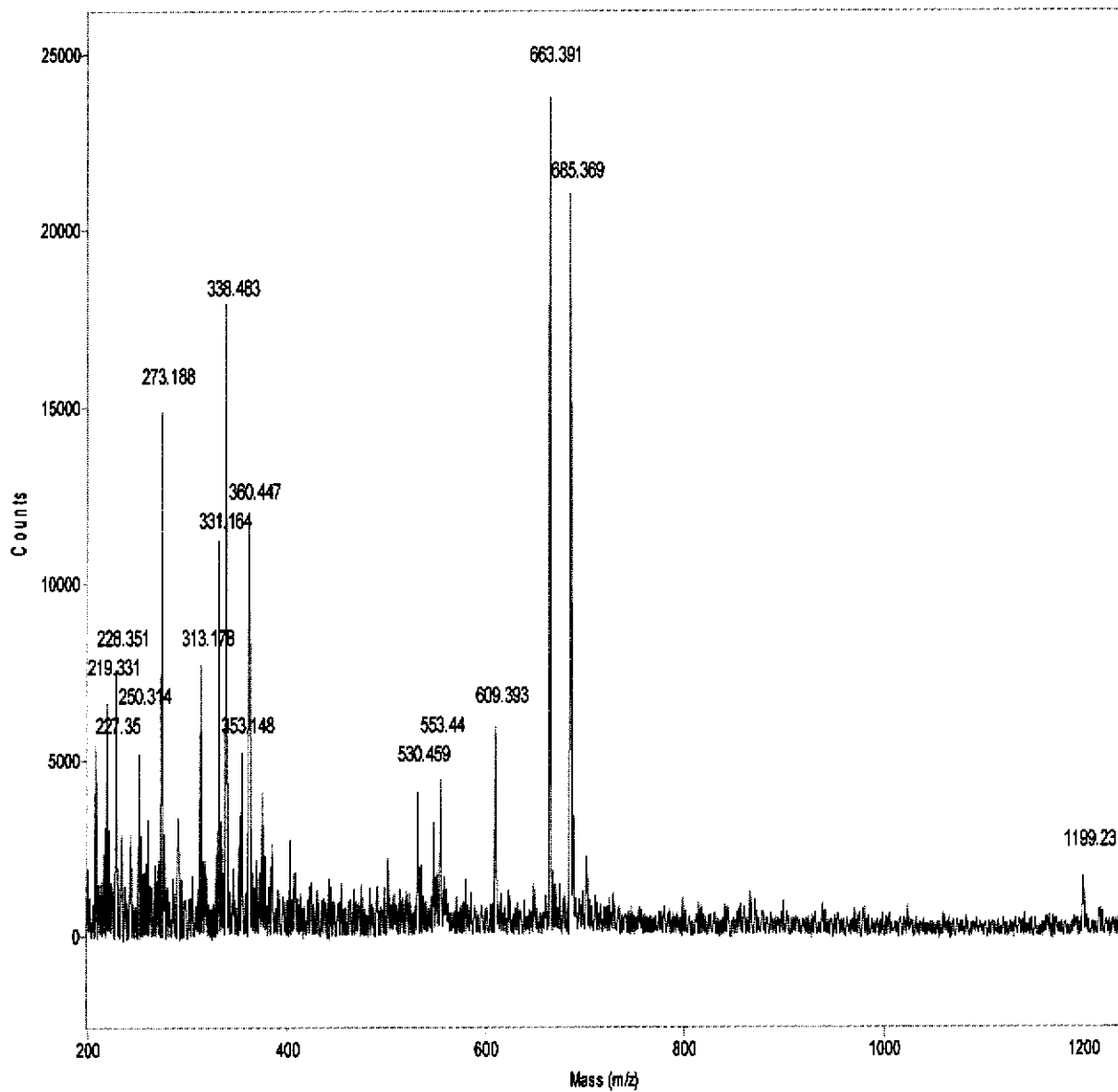


圖 3、市售簡易型雨衣添加劑之分析

表 1 紫外線安定劑之質譜 / 質譜分析整理

編號	簡稱 分子式	前驅離子 (precursor ion)	操作模式		主要裂解離子(fragment ion)
1	Tinuvin 144 <chem>C22H27N2O5</chem>	685	PSD	遲滯推出	532, 154, 72
				連續推出	532, 154, 72
			CID	遲滯推出	532, 219, 154, 138, 123, 72
				連續推出	532, 219, 154, 138, 123, 72
2	Tinuvin 440 <chem>C25H45N3O3</chem>	436	PSD	遲滯推出	418, 394, 377, 321, 100
				連續推出	418, 394, 377, 321, 100
			CID	遲滯推出	418, 394, 377, 321, 110, 100, 58
				連續推出	418, 394, 377, 321, 110, 100, 58
3	Tinuvin 770 <chem>C28H52N2O4</chem>	481	PSD	遲滯推出	342, 140, 124, 58
				連續推出	342, 140, 124, 58
			CID	遲滯推出	342, 212, 199, 140, 124, 58
				連續推出	342, 212, 199, 140, 124, 58
4	Tinuvin 320 <chem>C20H25N3O</chem>	324	PSD	遲滯推出	308, 268, 57
				連續推出	308, 268, 212, 57
			CID	遲滯推出	308, 268, 212, 57
				連續推出	308, 268, 212, 57
5	Tinuvin 326 <chem>C17H16ClN3O</chem>	316	PSD	遲滯推出	300, 260, 57
				連續推出	300, 260, 57
			CID	遲滯推出	300, 260, 57
				連續推出	300, 260, 57
6	Tinuvin 328 <chem>C22H29N3O</chem>	352	PSD	遲滯推出	322, 282, 71
				連續推出	322, 282, 71
			CID	遲滯推出	336, 322, 282, 71
				連續推出	322, 282, 71
7	Tinuvin P <chem>C13H11N3O</chem>	226	PSD	遲滯推出	120, 107
				連續推出	120, 107, 92
			CID	遲滯推出	120, 107, 92
				連續推出	120, 107, 92

表 2 抗氧化劑之質譜 / 質譜分析整理

編號	簡稱 分子式	前驅離子 (precursor ion)	操作模式		主要裂解離子(fragment ion)
1	Irganox 245 C ₃₄ H ₅₀ O ₈	593	PSD	遲滯推出	530,474,368,263
				連續推出	530,474,368,263,177
			CID	遲滯推出	530,474,368,263,198,190,177,161
				連續推出	530,368,263,198,190,177,161
2	Irganox 259 C ₄₀ H ₆₂ O ₆	645	PSD	遲滯推出	582,526,470,378,322,259,219
				連續推出	582,526,470,378,322,259,219
			CID	遲滯推出	582,526,470,378,322,259,219,203
				連續推出	582,526,470,378,322,259,219,203
3	Irganox 1010 C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1183	PSD	遲滯推出	952,905,899,219
				連續推出	952,905,899,219
			CID	遲滯推出	1120,1064,1009,952,899,259,219,203
				連續推出	905,899,259,219,203
4	Irganox 1024 C ₃₄ H ₅₂ N ₂ O ₄	553	PSD	遲滯推出	497,441,385,293,259,219
				連續推出	497,441,385,219
			CID	遲滯推出	497,441,385,293,259,232,237,219,203
				連續推出	497,441,385,293,259,232,237,219,203
5	Irganox 1076 C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530	PSD	遲滯推出	515,475,259,232,219
				連續推出	515,475,259,232,219
			CID	遲滯推出	515,475,232,219,203
				連續推出	515,475,259,232,219,203
6	Irganox 1098 C ₄₀ H ₆₄ N ₂ O ₄	637	PSD	遲滯推出	581,525,469,377,321,259,219
				連續推出	581,525,469,377,321,259,219
			CID	遲滯推出	581,525,469,377,321,259,219,203,163
				連續推出	581,525,469,377,321,259,219,203,163
7	Irganox 3114 C ₄₈ H ₆₉ N ₃ O ₆	790	PSD	遲滯推出	565,436,354,346,260,219,203
				連續推出	565,436,354,346,260,219,203
			CID	遲滯推出	565,436,354,346,260,219,203,163
				連續推出	436,354,346,260,219,203,163

*PSD 表示離子源後裂解分析之意

*CID 表示碰撞引致裂解分析之意

Part. E: 毛細電泳/質譜對單蜂醣蛋白 磷脂酶 A₂ 醣型式之微量分析

一 中文摘要

使用毛細電泳/質譜 (CE/MS) 分析單蜂醣蛋白磷脂酶 A₂ 各醣型式比例的變化。水解醣蛋白後所得的醣胜肽，胜肽部份具有 UV 吸收與易電灑游離的特質有利於進行醣胜肽分離後的 UV 或質譜偵測。由於胜肽本身具有了 1.5 kDa 的質量，使醣胜肽分子量增至 ~3 kDa，這讓各個醣型式間微小的差異不易經由層析獲得良好的分離度。因此將醣蛋白上的醣鏈切下來以增加各個醣型式間的差異來提昇分離度，而達到偵測所有醣型式，知道各醣型式的含量比例與蜂齡大小的關聯性。

關鍵字：毛細電泳/質譜、微液相層析/質譜、單蜂磷脂酶 A₂ 醣型式

Abstract: The N-linked oligosaccharides were released from the phospholipase A₂ (PLA) with glycopeptidases and reductively aminated with the chromophore, *p*-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE). The ABEE labeled oligosaccharides were separated by microbore high performance liquid chromatography (HPLC) using a reverse-phase column and analyzed by electrospray mass spectrometry. Differentiation between -1,3 and -1,6 core-fucosylated glycans was achieved by comparison the glycans released by glycopeptidases Peptide-N-glycanase A (PNase A) and Peptide-N-glycanase F (PNase F). All N linked oligosaccharides except 3B and 3C could be identified in this approach. The analysis of PLA oligosaccharides from the venom of individual bees indicated that glycosylation patterns between the younger and the older bees were similar.

Keywords : CE/MS、 μ -HPLC/MS、oligosaccharides from the phospholipase A₂ of individual bees

二 計畫緣由與目的

文獻上以毛細電泳分析磷脂酶 A₂ 的報導甚少，對於醣型式的分析更是缺乏，因此我們希望建立一套蜂毒中醣蛋白 (磷脂酶 A₂) 分析的前處理方法，來改善需量多、費時及多步驟的傳統蜂毒分析之缺點，並利用毛細電泳/質譜分析醣蛋白中不同醣形式的含量差異。我們將進一步嘗試進行成蜂與幼蜂的醣蛋白間不同醣形式含量差異之分析，希望對於了解蜂毒之形成過程與差異有所助益。

三 結果與討論

1. 利用 Polybrene 塗佈系統可以解決胜肽吸附管壁問題，並具有成本低廉、製備容易、可重複塗佈、離子強度低於 2.5% 甲酸之緩衝液皆適用以及緩衝溶液中不須含有會干擾毛細電泳/質譜連線訊號之塗佈物質等優點。於 Polybrene 塗佈管柱系統中，於 50 mM 醋酸銨 (pH 6.7) 添加 8 mM β -CD 的電泳緩衝溶液中可以得到完整磷脂酶 A₂ 不同醣型式最佳之分離，可以見到 9 根以上部份分離之吸收峰。
2. 毛細電泳質譜層析圖除了含量較少之醣胜肽 T_{1-14-4A} 與 T₁₋₁₄₋₁₀ 之外，其他醣胜肽之訊號皆可測得。於定量分析上，計算醣胜肽不同醣型式的含量比例之變異係數不超過 2%。
3. 建立三層塗佈毛細電泳管柱配合酸性緩衝液作為磷脂酶 A₂ 的電泳分離條件，三層塗佈管柱之耐受性、壽命與穩定性比單層塗佈好。於分析實際單蜂樣品時，由於內含蜂肽、鹽類及其他干擾物，樣品於水解前須先經篩離分子量為 5000 Da 之過濾離心管純化及置換溶

液，才可達到單峰分析之程度，此時除了含量較少之醣胜肽 T_{1-14-4A} 與 T₁₋₁₄₋₁₀ 之外，其他醣胜肽之訊號皆可測得。

4. 對於單峰蜂毒中醣蛋白 (磷脂酶 A₂) 分析的前處理方法，來改善需量多、費時及多步驟的傳統蜂毒分析之缺點，並利用毛細電泳質譜分析醣胜肽不同醣形式的含量差異，應用於真實單峰蜂毒磷脂酶 A₂ 醣型式實驗中，由醣胜肽不同醣形式的含量差異的結果顯示蜂齡與醣型式彼此間之含量比例並無關係存在，如表 1 所示。
5. 利用篩離離心管與石墨固相萃取管柱可純化經水解切下的醣鏈，有效地除去溶液中的蛋白質、胜肽片段與大量的鹽類，不但可直接電灑分析，更提昇標記發色團 (還原胺化法) 的反應效率。
6. 於不同消化系統中，蜂毒醣蛋白磷脂酶 A₂ 經胃蛋白酶消化後再切醣鏈的效率最好。
7. 利用聚合物固相萃取管柱可充分純化標記發色團之醣鏈，有效地除去溶液中過量的發色團試劑 (ABEE) 與鹽類，避免造成分離解析度的降低並可直接電灑分析。
8. 於毛細電泳實驗中分離最好的狀況下與質譜連線時，所使用之緩衝液 (50 mM NH₄OAc, 10 mM β-CD) 使得訊號極不穩定，並無法偵測到醣鏈-ABA。由於我們的目的是在於偵測單峰醣蛋白醣型式的分佈，數度於兼顧分離度與質譜偵測最佳化的嘗試失敗後，改尋求以液相層析 (HPLC) 與質譜 (MS) 連線的方式來解決。
9. 利用 ABEE 可有效標記醣鏈，標記上

ABEE 之醣鏈，以 C₁₈ 管柱可將大部分甚至異構之醣鏈-ABEE 分離開來，醣鏈基部 1-3 鍵結海藻糖對於滯留時間的影響頗大。

10. 利用醣胜肽酶 A 與醣胜肽酶 F 水解醣鏈的不同可分辨基部具有 1-3 或 1-6 鍵結海藻糖的醣鏈，如圖 1 所示。
11. 於液相層析/質譜連線分析，使用選擇離子掃描的模式可以偵測到單峰蜂毒中醣蛋白磷脂酶 A₂ 13 種醣型式，如圖 2 所示。於 13 種醣型式定量分析中，所得數據顯示各醣型式的含量比例與蜂齡大小並無實際上的關聯，如表 1 所示。

四 計畫成果自評

由於目的是在於探討單峰醣型式比例變化的情形，各實驗系統中各單峰間之醣型式比例變化是否明顯為主要觀測重點，不同系統間的差異則顯得較為次要。就如數據所顯示---醣型式的比例並未隨蜂齡增長而巨幅變化。

五 參考文獻

1. E. Habermann, *Science*. 177 (1972) 314.
2. L. Marz, C. Kuhne and H. Michl, *Toxicon*. 21 (1983) 893.
3. K. Kuchler, M. Gmachl, M. J. Sippl and G. Kreil, *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 249.
4. D. L. Scott and P. B. Sigler, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 53.
5. S. L. Nordvall, T. Uhlin, R. Einarsson, S. G. O. Johansson and S. Ohman, *Clin. Allergy*. 14 (1984) 341.
6. A. Weber, H. Schroder, K. Thalberg and L. Marz, *Allergy*. 42 (1987) 464.
7. C. Prenner, L. Mach, J. Glossl and L. Marz, *Biochem. J.* 284 (1992)

- 377.
8. V. Tretter, F. Altmann, V. Kubelka, L. Marz and W. M. Becker, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 102 (1993) 259.
 9. C. A. Akdis, M. Akdis, T. Blesken, D. Wymann, S. S. Alkan, U. Muller and K. Blaser, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 1676.
 10. W. L. Smith, *Biochem.* 259 (1989) 315.
 11. R. C. Murphy, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 5.
 12. V. Escrig, A. Ubeda, M. L. Ferrandiz, J. Darias, J. M. Sanchez, M. J. Alcaraz and M. Paya, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282 (1997) 123.
 13. P. Garica-Pastor, A. Randazzo, L. Gomez-Paloma, M. J. Alcaraz and M. Paya, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 166.
 14. D. A. Cumming, *Glycobiology.* 1 (1991) 115.
 15. A. Varki, *Glycobiology.* 3 (1993) 97.
 16. G. Durand and N. Seta, *Clin. Chem.* 46 (2000) 795.
 17. E. Yamada, Y. Tsukamoto, R. Sasaki, K. Yagyu and N. Takahashi, *Glycoconj. J.* 14 (1997) 401.
 18. K. Shikata, T. Yasuda, F. Takeuchi, T. Konishi, M. Nakata and T. Mizuochi, *Glycoconj. J.* 15 (1998) 683.
 19. M. D. Owen, L. A. Pfaff, R. E. Reisman and J. Wypych, *Toxicon.* 28 (1990) 813.
 20. J. Charlwood, H. Birrell and P. Camilleri, *Anal. Biochem.* 262 (1998) 197.
 21. G. Okafo, J. Langridge, S. North, A. Organ, A. West, M. Morris and P. Camilleri, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4985.
 22. J. Charlwood, J. Langridge, D. Tolson, H. Birrell and P. Camilleri, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 107.
 23. X. Shen and H. Perreault, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 502.
 24. Y. H. Ahn and J. S. Yoo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 2011.
 25. M. Okamoto, K-I Takahashi and T. Doi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 641.
 26. J. Charlwood, H. Birrell, E. S. P. Bouvier, J. Langridge and P. Camilleri, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1469.
 27. J. Charlwood, H. Birrell, A. Organ and P. Camilleri, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 716.
 28. Y. H. Ahn and J. S. Yoo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 855.
 29. C. C. Lai and G. R. Her, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 2012.
 30. N. H. Packer, M. A. Lawson, D. R. Jardine and J. W. Redmond, *Glycoconj. J.* 15 (1998) 737.
 31. M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 73.

表 1 不同實驗方法所得單蜂磷脂酶 A₂ 不同糖型式之含量比例 (平均)。

糖型式	CE/MS (糖胜肽)		μ-HPLC/MS (糖鏈-ABEE)	
	老蜂	幼蜂	老蜂	幼蜂
1	13.1%	12.8%	13.7%	13.9
2, 3A	7.2%	7.1%	6.0%	7.1
3B, 3C	57.3%	58.6%	44.5%	44.2
4B, 5A	7.7%	7.5%	13.3%	12.2
5B	7.5%	7.4%	10.6%	11.0
6	2.9%	3.0%	7.9%	7.7
7	2.2%	2.1%	0.9%	1.0
8, 9	1.6%	1.5%	0.8%	0.6

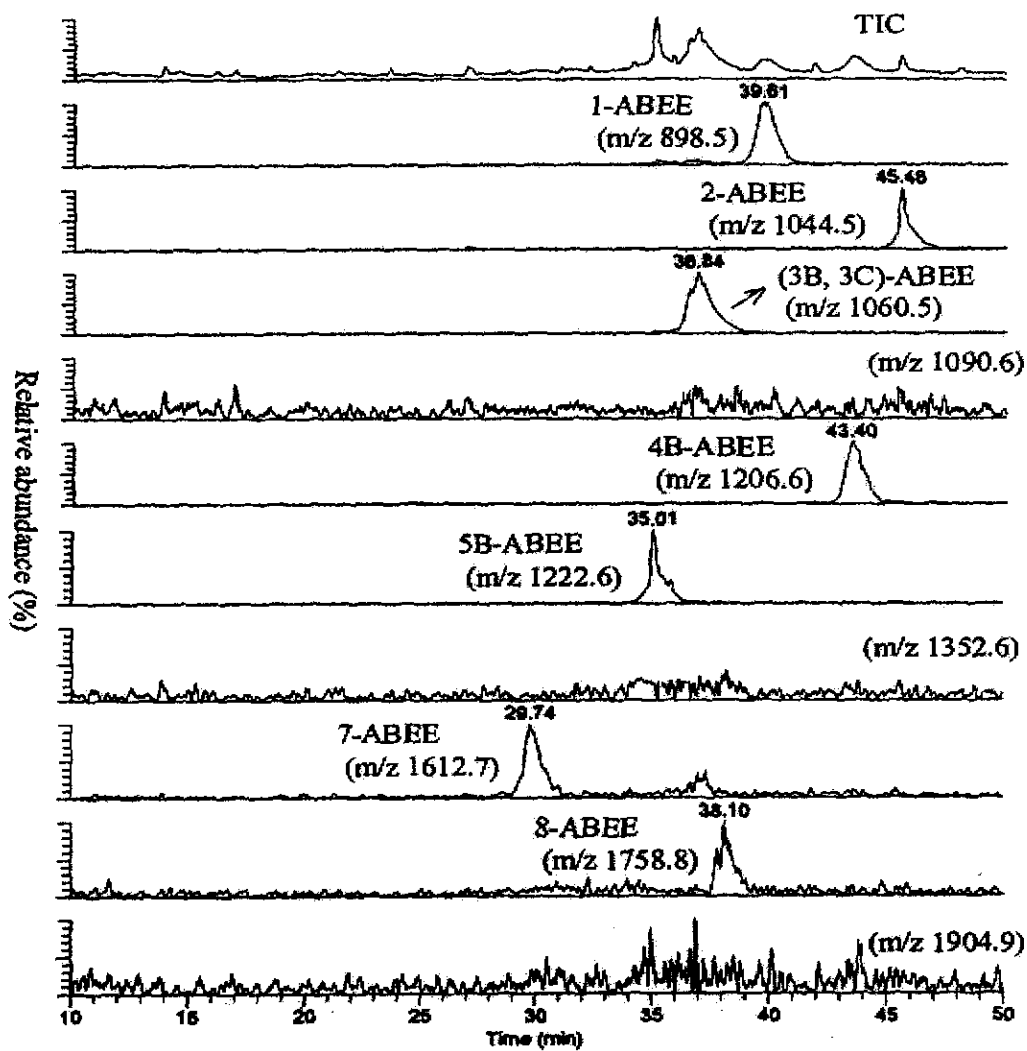


圖 1 經由糖基酶 F 切糖所得 ABEE-糖鏈之 μ -HPLC/MS (全掃描模式) 總離子與選擇離子層析圖。

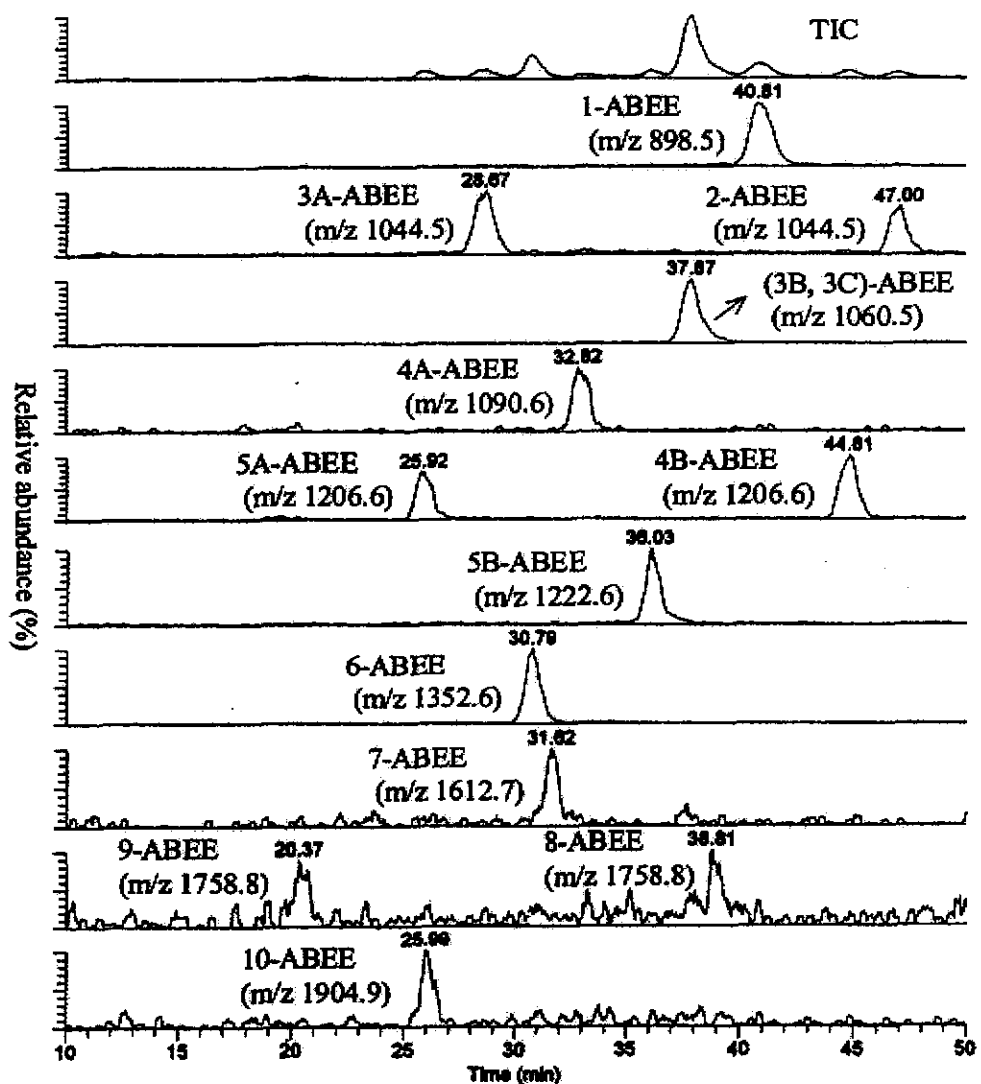


圖 2 經由糖胜肽酶 A 切糖所得 ABEE-糖鏈之 μ -HPLC/MS (選擇離子掃描模式) 各選擇離子層析圖。