

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 91-2113-M-002-020

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：何國榮 執行機構：國立台灣大學化學系

計畫參與人員：陳逸然、鄭杏玲、沈振峰、曾美郡、李福安、王志宏、白珮瑾、林佩怡、周秉鋒

一、 中文摘要

本計劃主要分成三個方向

(1) 毛細電泳質譜相關技術之發展與應用。

利用結合兩個斜口毛細管製成低輔助流毛細電泳質譜介面，介面中的兩個斜口毛細管，一個作為毛細電泳分離用，另一個作為供給輔助溶液之用。使用斜口的設計不但降低了液體流速的需求，並且不需輔助氣體，因而提升界面的靈敏度。由於本界面並沒有任何死腔體積(dead volume)的存在，樣品的毛細電泳分離效率並不會因為界面而降低分離解析度。另外，此界面不須減小毛細管開口口徑，並且使用一般毛細電泳常用的毛細管規格(375 μm o.d., 75 μm i.d.)，因此本界面較一般的低流速界面耐用且容易操作。

除了有效正確的鑑定樣品外，為了增加分析通量，縮短樣品分析時間，而發展多重毛細管電泳/電灑法質譜儀。使用四根鞘流式電灑探針並列在質譜儀進樣孔前，進樣孔和電灑探針間，配置一片具缺口的金屬圓轉盤。實驗結果顯示此裝置可以把四根不同毛細管電泳同步分析所得的訊號於同一段時間內平行收集，而得到個別毛細管電泳的層析質譜訊號，達到省時、高通量的目標。

針對 carbonyl 化合物，以 pentafluorophenylhydrazine(PFPH) 為衍生試劑，進行衍生化反應生成其 PFP-衍生物(hydrazone)，嘗試瞭解其於大氣壓下電子捕

捉離子化反應的情形。初步以 Nabumentone 及 Testosterone 為分析物，觀察其 PFB-衍生物的反應。結果顯示在負大氣壓化學離子化模式(negative APCI)下，PFP-衍生物皆生成 $[M-20]^-$ 離子，此現象和傳統低壓下所進行 ECNCI 的結果類似。Nabumentone-PFP 及 Testosterone-PFP 之偵測極限分別為 500fg 及 1pg (SIM mode)，和正大氣壓化學離子化(positive APCI)比較，靈敏度提升了 300 及 25 倍，和正電灑法(positive ESI) 比較，靈敏度提升了 30 及 5 倍。

選定實驗室曾以毛細電泳分析之西藥化合物，做為研究的分析物，改變不同靈敏度之分析物的濃度探討共流析(coanalyte)對於目標分析物訊號。由實驗得知當存在離子化效率好且濃度高的化合物會抑制分析物質譜訊號，所以有必要提高層析的解析度。

(2) 醣類分析技術之開發應用

負離子電灑法-質譜分析直鏈和分支寡醣之鍵結點與分支點。先以已知結構之直鏈寡醣使之閉環標記(非還原胺化標記法)上對胺基苯甲酸乙酯後，在質譜/質譜和質譜/質譜/質譜分析下，觀測到具有鍵結點的特徵裂解離子。寡醣還原端的特徵裂解相似於對胺基苯甲酸乙酯閉環標記雙糖之特徵裂解，然而還原端以外的鍵結點，特徵裂解與未衍生化之雙糖情形類似。基於這些特徵裂解離子，將之應用於分析直鏈之寡醣，其所有鍵結點皆可明確地被分析。

一般看來，位在分支點的糖之特徵裂解與直鏈之情況有些不同。然而，許多的特徵離子亦產生於特定分支點。藉由這些特徵斷裂再加上用於直鏈寡醣之判斷方法，具有分支之寡醣其所有鍵結點皆可被分析。

(3) 快速分析系統之自動化

吹氣捕捉氣相層析法對於環境中揮發性有機化合物的微量分析而言乃是廣泛被採用的方法之一。由於傳統吹氣捕捉氣相層析質譜法並不具線上偵測的能力，因此我們結合了連續式吹氣捕捉系統以及快速氣相層析質譜儀兩項技術建立一套具有線上偵測能力的快速分析系統。本研究使用非親水性高分子聚合吸附劑〈Tenax-TA〉進行樣品捕捉與濃縮，並利用致冷晶片幫助降溫，以縮短分析時間；配合氣相層析質譜儀上的事件與繼電器、電動閥門之整合，即可完成此系統的自動化。目前已成功以此系統進行線上自來水中消毒副產物的自動化分析。

關鍵詞：毛細電泳質譜、低流速、多重毛細管電泳質譜、高通量、pentafluorophenylhydrazine (PFPH)、大氣壓下電子捕捉離子化、醣類結構、鍵結點、分支點、質譜/質譜、自動化快速分析吹氣捕捉氣相層析法、快速氣相層析質譜儀、非親水性高分子聚合吸附劑〈Tenax-TA〉、致冷晶片、消毒副產物、自動化

Abstract

There are three major directions in this research proposal

(1) The development and applications in CE/MS

A simple and rugged capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) interface with low make-up flow has been developed for interfacing capillary zone electrophoresis (CZE) with electrospray-spectrometry (ESI-MS). The

use of dual beveled tips capillaries as the ESI emitter in this interface reduces the requirement of make-up flow rate to operate at optimal performance. In return, sample dilution by make-up flow was minimized and sensitivity was enhanced.

In addition to the sample characterization, how to increase the throughput and minimize the analysis time has been an important subject. Multi-channels CE/MS is studied in this research. Four sheath-flow electrospray probes are placed in front of the sample inlet of the mass spectrometer. Between the probes and the sample inlet, a round metal disk is used as a shield. The results demonstrated that the interface could be used in multi-channels CE/MS analysis and the throughput was increased by a factor of 4.

Atmospheric pressure chemical ionization is a sensitive and widely applicable technique. The chemical ionization process is initiated through a corona discharge and the HPLC eluents usually are served as chemical ionization reagent at relatively high pressure. Negative APCI of compounds with acidic functional group usually gives the [M-H]⁻ ions with a proton transfer process. Recently, Ian A. Blair et al. demonstrated the attomole sensitivity of several PFB-derivatives in electron capture APCI¹. In this study, two carbonyl drugs, nabumentone and testosterone were derivatized with pentafluorophenylhydrazine(PFPH). All PFP-derivatives were identified with LC/MS and they all gave (M-20)⁻ ions. The limit of detection of nabumentone-PFP and testosterone-PFP were 500 fg and 1 pg respectively. These results were 300 and 25 fold sensitive than positiveESI.

In previous work, sixteen synthetic drugs had been analysis by CE/ESI-MS. These drugs were chosen as target analytes. To study the effect of coanalyte, compounds with different ESI-MS sensitivities and concentrations were studied. The results showed that analyte with high ESI sensitivity and concentration suppressed the signals of

other analytes.

(2) Linear as well as branched oligosaccharides were labeled with p-aminobenzoic ethyl ester (ABEE) using the glycosylamine closed-ring labeling approach and analyzed by negative-ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Linkage specific fragment ions of ABEE labeled linear oligosaccharides were proposed based on the MS² and MS³ data for several ABEE labeled linear oligosaccharides with known linkage configurations. Fragmentation at the reducing end was similar to that observed for ABEE disaccharides whereas the fragmentation pattern not involving the reducing end was similar to underivatized disaccharides. Based on these ions, all the linkages of linear oligosaccharides could be unambiguously determined. The fragmentation pattern at the branched sugar was in general not quite the same as the linear one. However, many linkage specific fragment ions were also observed for linkages at the branched sugar. These ions along with the ions proposed for linear oligosaccharides were found to be quite useful for the determination of all the linkages of branched oligosaccharides.

(3) In our study, an analytical method based on continuous-flow purge-and-trap and fast gas chromatography mass-spectrometry has been developed for on-line monitoring of trihalomethane (THMs) in drinking water. Connection the gas chromatography event with the automated valve by using a relay, the system could be automated. An automated system is more suitable for on-line sample analysis.

Keywords: CE/MS, low flow, high-throughput, multi-channel CE/MS APCI, electron capture, carbonyl, pentafluorophenylhydrazine(PFPH), structure of carbohydrates, linkage, branch, MS/MS, fast automated analysis, continuous-flow purge-and-trap and fast gas chromatography mass-spectrometry, on-line monitoring, trihalomethane (THMs).

二、緣由與目的

Part. A 低輔助流毛細電泳質譜界面的設計以及於樣品線上濃縮的應用

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 L/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⁾。

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（Preformed Ion）的分析物靈敏度不佳。通常調整緩衝溶液的 pH 值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電泳的分離效率。其中第二、三點縮小了毛細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。

在最近的研究中我們發現，使用斜口的毛細管可以在不降低出口口徑的條件下，藉由改變不同毛細管出口的幾何形

狀，降低電灑法最佳流速的範圍。使用斜口的設計可使得在電灑的過程中泰勒錐 (Taylor Cone) 只在斜口的最尖端形成。相較於傳統平口的設計，斜口的泰勒錐可以產生較小泰勒錐。由於泰勒錐的大小與流速有關⁽²²⁾，越低流速所形成的泰勒錐就越小，然而相同口徑的平口毛細管並無法形成如此小的泰勒錐。這樣的設計使得電灑法質譜儀可以在毛細管電泳的流速範圍下，不須任何輔助液體就可達到靈敏度的最佳化。

雖然使用斜口毛細管可以解決毛細管電泳流速與電灑法最佳流速無法配合的問題。然而無鞘流界面緩衝溶液選擇有限的問題仍待解決。有鑑於此，本計劃利用合併兩個斜口毛細管設計一個新的毛細管電泳界面。此界面綜合了傳統鞘流以及無鞘流界面的優點。兩個毛細管中，一個提供毛細管電泳的分離，另一個提供極低流速 (~300 nL/min) 類似鞘流界面所使用的輔助溶液。相較於傳統鞘流界面，由於本界面使用斜口的設計，不需很高流速的輔助溶液就可達到電灑法的最佳流速。因此輔助溶液所產生稀釋的效應並不大。而相較於無鞘流界面，低流速的輔助溶液減少了毛細管電泳緩衝溶液使用上的限制。

Part. B 負離子電灑法質譜/質譜分析標記發色團寡糖之鍵結點和分支點

本研究中採用保有還原糖環狀結構的閉環標記衍生化(非還原胺化法)寡糖，在負離子電灑法-質譜/質譜進行分析，此方法先前已成功應用於鑑別雙糖之鍵結點、簡單三糖 (maltotriose、isomaltotriose、panose)、及全為 1-4 鍵結的五糖 (maltopentaose) 之分析³。然而，可否用於不同鍵結種類之直鏈寡糖？對於具有分支之寡糖其鍵結點與分支點的分析可否適用？單以質譜/質譜、或(和)質譜/質譜/質譜方法能分析到多大的寡糖？面對此一極限，我們勢必需要尋求能逐步水解較大糖鏈的方法，而此方法最好能自寡糖的還原端逐一將單糖水解下來(非還原端的結構訊息常是較微弱的)！我們期望能將此分析方法拓展至所有糖蛋白

之糖鏈鍵結點與分支點分析，從水解糖蛋白的糖鏈、至？化(可藉由閉環標記的一特殊優點：有益於液相層析分離後的 UV 偵測且？化後各個糖型式的閉環標記可去除)、分析各個糖型式、最後獲取各個糖型式所有鍵結點與分支點之結構訊息！作一系列的方法開發與探討！

Part. C 電子捕捉大氣壓下化學離子化法於血漿中西藥成分之分析

近來，液相層析儀串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 在分析各種生化樣品中藥物成分方面，展現出極高的靈敏度及廣泛的應用性。然而有報導指出；在生化樣品複雜的基質下，電灑法較易受不同基質影響而有不同程度之離子抑制現象，進而對定量分析的精密度及準確度造成誤差⁽¹⁾。大氣壓下化學離子化法 (atmospheric chemical ionization, APCI) 是另一應用相當廣泛的一種大氣壓下離子化法⁽²⁻³⁾，其原理是利用電暈放電 (corona discharge) 游離周遭氣體成分生成試劑離子，再和分析物進行一連串離子-分子反應，產生分析物離子。大氣壓下化學離子化法通常進行的是質子傳遞反應 (proton transfer)，生成 [M-H] 或 [M+H]⁺ 離子。近來發現⁽⁴⁾，利用電暈放電過程中產生之熱電子以 PFB-衍生物 (pentafluorobenzyl-derivatives) 進行電子捕捉離子化可獲得和傳統低壓下所進行 ECNCI 類似的結果，靈敏度上亦有 25-100 倍的提升。本研究針對 carbonyl 化合物，進行衍生化反應生成其 PFP-衍生物 (hydrazone)，嘗試瞭解其於大氣壓下電子捕捉離子化反應的情形。

Part. D 建立與設計可程式化自動化連續式吹氣捕捉法結合快速氣相層析質譜儀與薄膜送樣結合樣品前濃縮/快速氣相層析質譜儀兩系統

目前實驗室已建有一套連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統¹，其是以傳統吹氣捕捉氣相層析質譜法的分析流程為基礎，採用連續式的吹氣捕捉系統以減少樣品前處理的步驟並縮短樣品前處理的時間。其在快速氣相層析質譜儀方面，則藉

由使用較短的層析分離管柱來縮短分析時間，利用快速氣相層析技術來將待測物進行初步分離，然後再由質譜儀加以測定。因此本實驗研究的主要目標為改良目前實驗室已建有之連續式吹氣捕捉法結合快速氣相層析質譜儀系統外，並且要將此系統自動化²，以符合在實際應用上之需求。最後希望能將系統成功的實際應用於分析偵測水中消毒副產物-----三鹵甲烷，並能夠提供即時而有用的數據。

Part. E 多重毛細管電泳/質譜儀介面之發展

近年來由於人類基因圖譜計畫、蛋白質體學或是組合化學等新興科學，所產生的大量待檢樣品，對分析化學界所帶來的衝擊是一種新的挑戰。分析技術的開發除了要求準確外，分析時間也經常是另一個層次的考量。然而近年來儀器不斷的精進，遂使得分析速率的瓶頸漸漸轉移到儀器以外的分析方法上，故有不少分析方法的發展，著重在如何減少樣品的前處理步驟，期藉此縮短勞力需求以及人工操作誤差及時間的損耗。而這樣的做法僅能做到讓單一樣品的分析時間盡量壓縮，時間上若要再縮短其效益已然不大。故近來有研究轉向到如何讓多個樣品於同一時間同步分析上，進而更進一步的縮短整批樣品的分析時間。

Part. F 鞘流溶液、緩衝溶液、分析物之解離常數及界面活性劑對於毛細電泳質譜分析靈敏度的影響

在質譜儀眾多之游離技術中，近年來以電灑法最引人重視，因為具有操作方便，液體可直接導入，再加上具有良好的靈敏度、分析速度、再現性及廣泛的分析範圍¹⁻⁴等優點，儘管電灑游離法有以上的優點，但是溶液中的其他介質與目標分析物之間的相互影響，造成無法直接從質譜所觀測的訊號強度來推算溶液中的分析物濃度⁵。因此本實驗主要目的將若以毛細電

泳電灑法質譜儀分析樣品，其層析解析度不佳致使樣品同一時間流析出來之後進入質譜儀被分析時，是否會因共流析分析物(coanalyte)與目標分析物在離子化過程互相競爭，導致在定量上造成誤差。

三、結果與討論

Part. A 低輔助流毛細電泳質譜界面的設計以及於樣品線上濃縮的應用

圖 1 所示為本界面的示意圖，此界面由兩個斜口毛細管所結合而成。當兩個斜口毛細管結合在一起後原先的泰勒錐也會結合在一起，此時兩個管柱的溶液就會互相混合共同形成一個泰勒錐。在毛細電泳質譜的操作上，我們使用一個斜口毛細管負責樣品的毛細電泳分離，另一個斜口毛細管負責補充輔助液體。此設計與一般傳統或是低流速鞘流界面最大的不同點就是輔助液體是平行的補充，而不是利用同軸的外管補充鞘流液體至毛細管尖端。利用同軸鞘流包覆分離毛細管會使得泰勒錐體積大幅的提高，就像傳統界面的設計，使用一個約為 400 μm 內徑的金屬管提供鞘流溶液，這使得泰勒錐的體積就類似於 400 μm 內徑的金屬管作電灑法所產生的大小，由於產生較大的泰勒錐，因此需要高流速的液體維持穩定電灑，因而導致界面對輔助溶液的需求的大幅提高。

雙斜口介面所產生的泰勒錐極小，因此此介面不需要高流速便維持穩定的電灑，因此界面的設計可以大幅度的降低樣品受到輔助溶液的稀釋效應，也可得到輔助溶液所帶來的好處(電灑法穩定，可使用幫助離子化的添加劑)。由於電灑法質譜儀是屬於濃度靈敏度的儀器，因此當分析物進入質譜的濃度上升時樣品的偵測靈敏度也會上升。此外，本界面的死腔體積(dead volume)，僅在泰勒錐的部分，而本界面為一低流速的界面，泰勒錐極小，因此毛細電泳的分離效率不會因為界面的死腔體積過大而導致分離解析度的下降。

圖 2 示為使用本界面在正離子模式下分離黃連指標成分的結果，此條件的電滲流流速約為 400 nl/min。本界面在正離子模式下使用輔助溶液流速在 250 nl/min 時可得到穩定的電灑信號。相較於傳統的鞘流界面(圖 3 所示)，使用本界面的信號強度可以明顯的提升。

圖 4 為在負離子模式下，使用本界面所得到的結果。在本實驗中，輔助溶液的流速在 500 nl/min 可以得到低稀釋倍率，電灑法穩定的結果。在圖 4 我們可以看到，所有的化合物均可在 15 分鐘內被分離開來。而圖 5 為使用傳統鞘流界面所得到的結果。比較兩個界面所得到的結果可以瞭解使用本界面在負離子模式下也能得到較高的靈敏度。

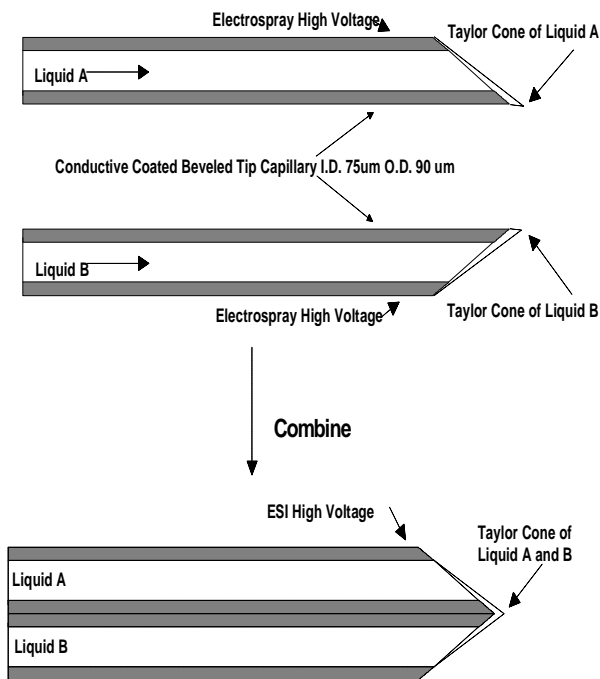


圖 1、雙斜口介面示意圖。

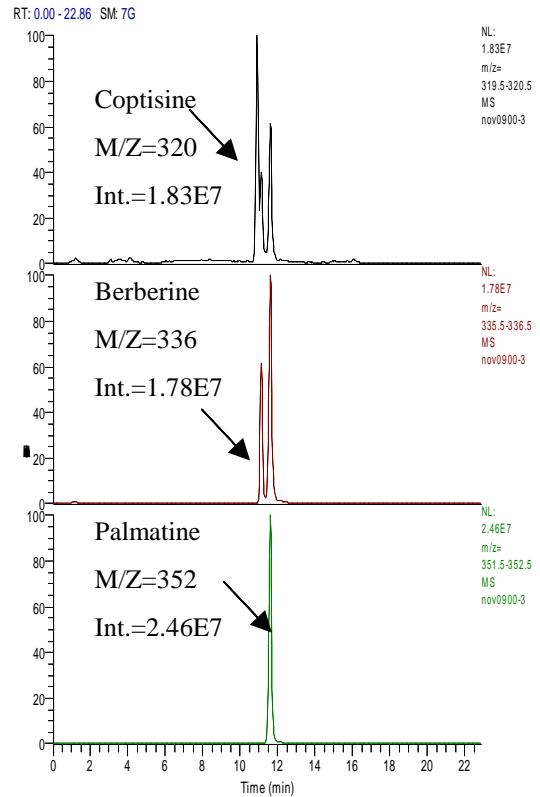


圖 2、雙斜口介面在正離子模式下分離黃連指標成分的結果，使用 CHES 20mM pH=10 作為緩衝溶液。MeOH:H₂O=4:1+1% Acetic Acid 作為輔助溶液，流速為 250 nl/min。

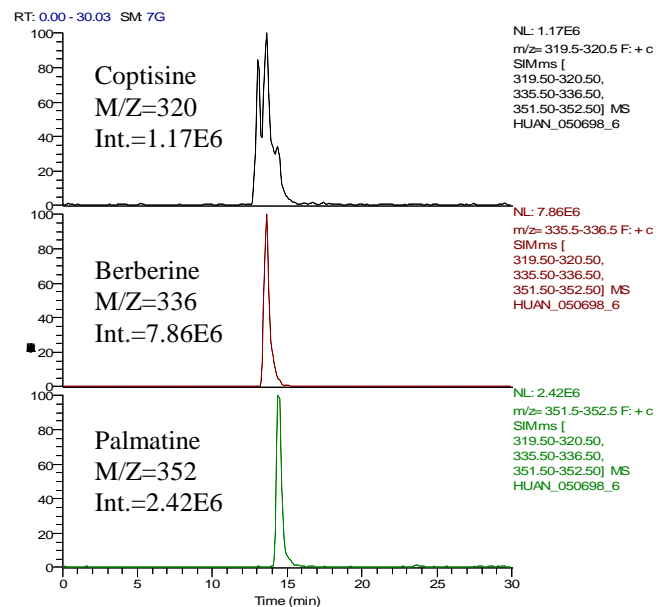


圖 3、傳統鞘流介面在正離子模式下分離黃連指標成分的結果。使用 CHES 20mM pH=10 作為緩衝溶液。MeOH:H₂O=4:1+1% Acetic Acid 作為鞘流溶液，流速為 5000 nl/min。

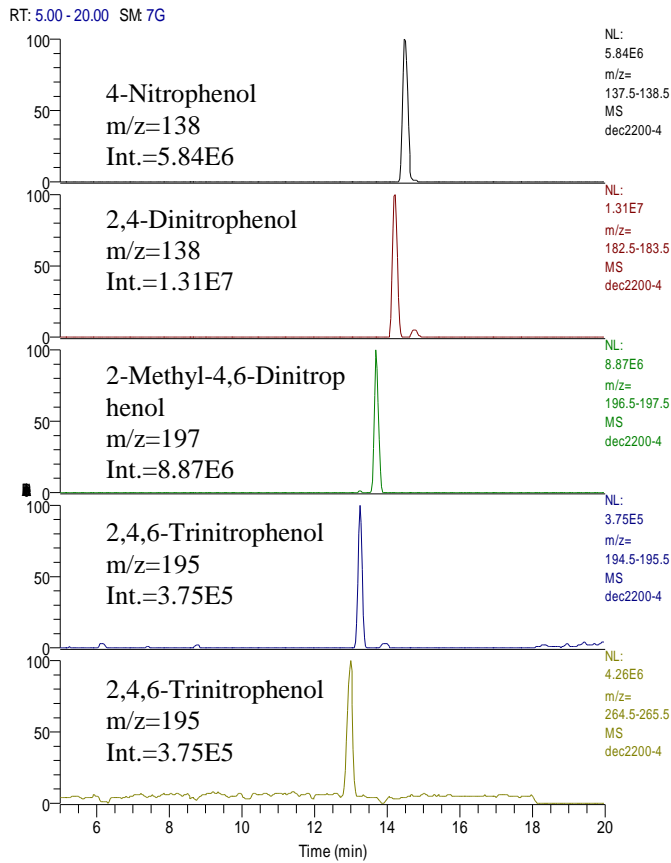


圖 4、雙斜口界面在負離子模式下分析 40 ppm 的酚類化合物，注入的方式為使用重力注入 15mbar, 15 秒。分離的緩衝溶液為 20mM CHES pH=10 緩衝水溶液。輔助溶液為 80% 的 IPA 再加上 0.5 % NH₄OH，流速為 500 nl/min。

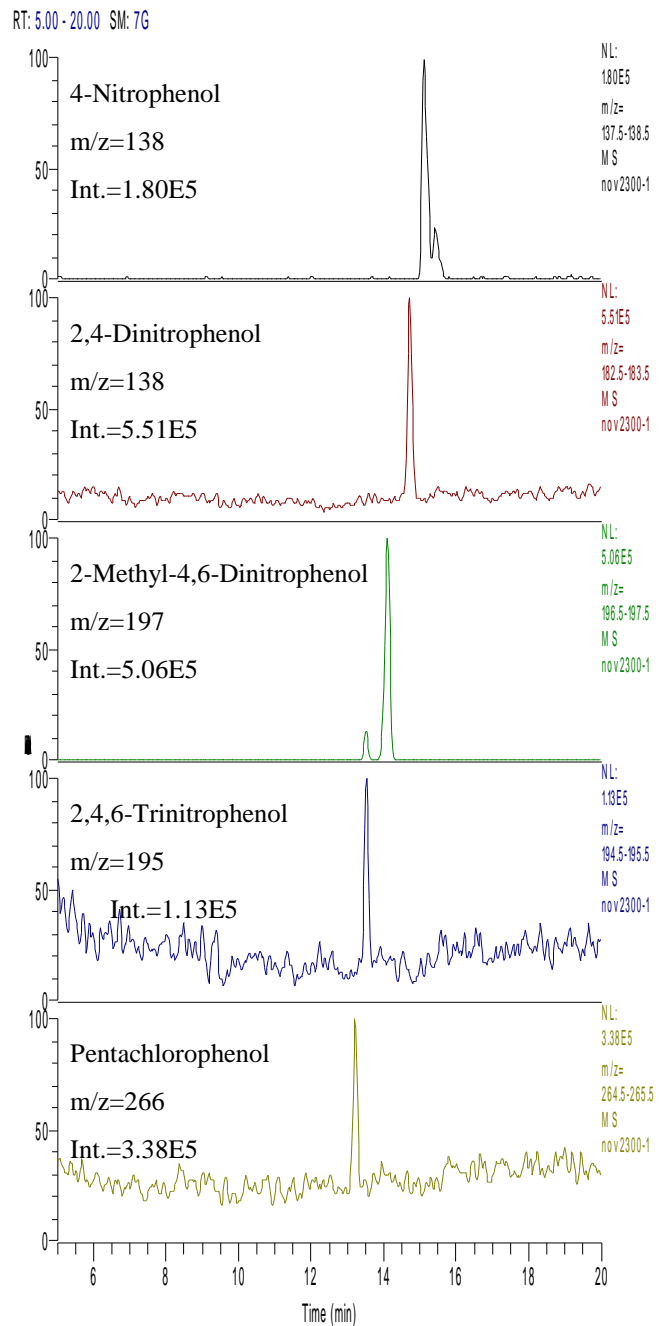


圖 5、傳統鞘流介面在負離子模式下分析 40 ppm 的酚類化合物，注入的方式為使用重力注入 15mbar, 15 秒。分離的緩衝溶液為 20mM CHES pH=10 緩衝水溶液。輔助溶液為 80% 的 IPA 再加上 0.5% NH₄OH，流速為 5000 nl/min。

Part. B 負離子電灑法質譜/質譜分析標記發色團寡醣之鍵結點和分支點

1. 直鏈寡醣的第一鍵結之裂解與 ABEE 閉環標記雙糖之裂解相似，而第一鍵結以外的鍵結則與未衍生化的裂解相似，如表 1 所列 ABEE 閉環標記直鏈寡醣的特徵裂解離子。
2. 大致來說，在分支點的鍵結特徵裂解離子與直鏈的並不相同，因此導入表 2 來鑑定分支點的鍵結。
3. 藉由 ABEE 閉環標記/負離子電灑法-質譜/質譜及(或) 質譜/質譜/質譜實驗並利用表 1 和表 2 可清楚地可鑑定出直鏈及分支寡醣的所有鍵結點。
4. 六醣以上之寡醣，非環原端特徵裂解離子訊號微弱，需要逐步水解還原端，產生較小的醣，即可得非環原端結構訊息。

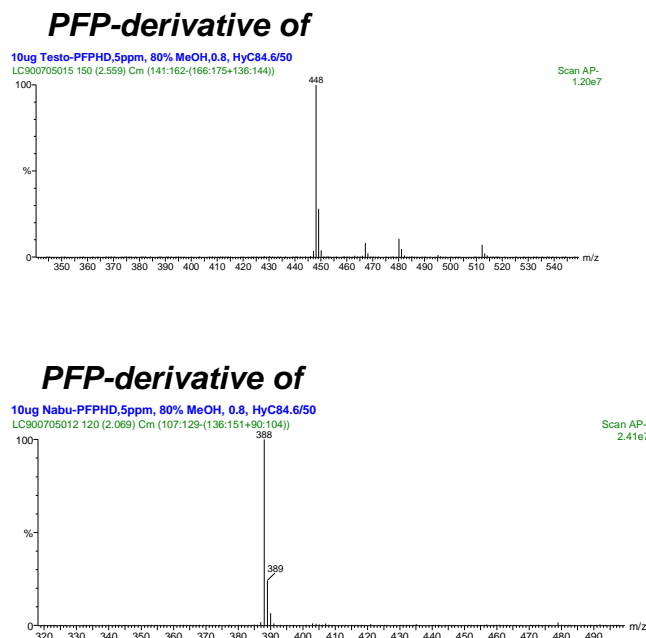
Table 1. Specific linkage fragment ions for ABEE closed-ring labeled linear oligosaccharides.

	Fragments of the first linkage (reducing end)	Fragments other than the reducing end
1-2*	^{0,2} X, ^{0,4} X	C-18, ^{0,4} A-18, ^{1,3} A
1-3	^{0,3} X	No cross-ring fragments
1-4	^{0,2} A-18	^{0,2} A, ^{0,2} A-18
1-6	^{0,3} A	C-18, ^{0,2} A, ^{0,3} A, ^{0,4} A

Table 2. Specific linkage fragment ions for linkages at the branched sugars.

Linkage	the other linkage at the branched point	Fragments for linkages at branch points
1-3	1-4	Z-H (loss of hexose units)
	1-6	Z-H (loss of hexose units)
1-4	1-3	^{0,2} A-18, ^{0,4} X/Z-H
	1-6	^{0,2} A-18
1-6	1-3	C-18, ^{0,3} A, ^{0,4} A
	1-4	^{0,3} A/W

Part. C 電子補捉大氣壓下化學離子化法於血漿中西藥成分之分析



Detection Limits of PFP-derivatives and Non-derivatized Drugs

Ion mode	Naloxone-PFP	Naloxone	Testosterone-PFP	Testosterone
APCI	500 fg		1 pg	
APCI ⁺		150 pg		25 pg
ESI ⁺		15 pg		5 pg

Part. D 建立與設計可程式化自動化連續式吹氣捕捉法結合快速氣相層析質譜儀與薄膜送樣結合樣品前濃縮/快速氣相層析質譜儀兩系統

實驗室已建有之連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統將連續式的吹氣捕捉系統與快速氣相層析質譜儀之優點結合，成為具有快速分離的能力，而又無須繁雜之樣品前處理之線上快速分析系統。由於連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統利用液態

氮將分析物冷凍聚焦於一段毛細空管中，因此其注入之樣品帶 (sample band) 較一般傳統式吸附劑捕捉法為窄，觀察其實驗所得之圖譜上也可發現較窄的層析峰寬 (四個分析物的質譜層析峰帶寬在 2 秒之內)；利用液態氮降溫，可大幅縮短降溫時間，如此則可減少分析的時間，然而，由於連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統為利用空的毛細管進行分析物之吹氣捕捉，若欲將分析物滯留於空管中，則必須使用相當低之吸附溫度，以其實驗為例，其所使用之吸附溫度為 -165°C ，為避免因低溫所凝結之水氣干擾實驗結果，高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統將樣品注射溫度設於 0°C ，然後再進行升溫，但是，此時被冷凍聚焦的水氣會在一瞬間大量的進入質譜儀中，可能會對質譜儀的燈絲造成損害。為了改善此問題，我們將液態氮以填充固體吸附劑配合致冷晶片取代，若選擇適當的吸附劑，可將吸附捕捉的溫度設在室溫，不會凝結水氣；利用致冷晶片，可將降溫的效率提高，有效縮短分析時間。此外，由於連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統乃藉由冷凍聚焦注入系統的低溫將分析物捕捉，但同時隨著吹氣所帶出的水氣也會被冷凍於此。為了避免過量的水氣被凍結成冰而阻塞毛細管，所以在系統必須控制吹氣進樣總體積 (purge volume)，使進樣時間內通過的水氣量在毛細管可以承載的範圍內。所以一旦選定吹氣捕捉毛細管的管徑，可承受的最大進樣總量也就受此限制，以選擇 0.32 mm 內徑的毛細管柱作為樣品捕捉的毛細管為例，其可承受的最大進樣總量約為 3.15mL。此限制了其對三鹵甲烷之吹氣效率。倘若使用吸附劑則無此缺點，因為吸附管溫度可設定在室溫，且可在高溫直接進行樣品注射，而不需要將注射溫度設於 0°C 以凍結水氣，自然不會有因過量的水氣被凍結成冰而阻塞毛細管的問題，即其可承受的最大進樣總量

並不受到水氣的限制，然而，此系統最大進樣總量乃受到吸附劑對分析物的破出體積所限制。以氫仿為例，在吸附管溫度為 20°C 時，Tenax TA 吸附劑對其之破出體積為 19mL/mg，即當使用 1 毫克 Tenax TA 吸附劑時，其最大進樣總量不要超過 19mL，否則氫仿會由吸附劑上脫附出。相比之下，以吸附劑捕捉系統的最大進樣總量限制較連續式高流速吹氣/冷凍聚焦捕捉系統寬鬆的多。同時，若欲以長時間連續偵測而言，液態氮的補充會是一個極大的問題，使用致冷晶片則無此問題。

Part. E 多重毛細管電泳/質譜儀介面之發展

1. 利用質譜儀內部訊號來驅動圓轉盤轉動與質譜儀掃瞄同步化，確認了多重毛細管電泳電灑質譜儀介面的可行性。
2. 由於質譜儀掃瞄時間及電灑探針擺設空間上的限制，目前可達到四重毛細管電泳電灑質譜同步分析。
3. 細心的調整探針位置除了可以避免交叉干擾外更可獲得較佳的靈敏度。
4. 實驗證實四重毛細管電泳電灑質譜系統在濃度高達 2000ppm 仍未發現交叉干擾現象。
5. 若利用減小最大離子進樣時間，或減少微掃瞄次數，以爭取層析峰的點數，有機會達八重毛細管電泳電灑介面。

Part. F 鞘流溶液、緩衝溶液、分析物之解離常數及界面活性劑對於毛細電泳質譜分析靈敏度的影響

本研究以實驗室曾利用毛細區帶電泳分離 16 種常見的西藥，以其中一組共流析化合物 Ethoxybenzamide 和 Diazepam 來做探討。由圖 1 中可知當存在高濃度且靈敏度好的 Diazepam 時，即使提高

Ethoxybenzamide 的濃度至 10^{-3}M 還是無法達到不含有 10^{-4}M Diazepam 時所測得的質譜訊號。由於表面空間有限，靈敏好且濃度高(10^{-4}M)之 Diazepam，一直佔據著大部分的表面空間，所以即使提高 Ethoxybenzamide 濃度仍然無法與 Diazepam 競爭表面。相較於沒有 10^{-4}M Diazepam 的存在時，表面有足夠的空間讓所有的 Ethoxybenzamide 跑至液滴的表面，所以可以偵測到較強的質譜訊號。因此可得知當混有於質譜的離子化效率好的化合物且濃度達 10^{-4}M 以上就會抑制其他共同存在的分析物。

見圖 2 當 Diazepam 濃度達約 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 便使得 10^{-4}M Ethoxybenzamide 應有的訊號下降了，表示 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ Diazepam 已佔據了相當程度的表面，致使離子化效率較差的 Ethoxybenzamide 維持不住它原有的質譜訊號強度。所以同時存在高濃度且離子化效率較差之分析物似乎不會影響 Diazepam 的訊號。

經由 ACDlabs³⁸ 軟體計算得知 Diazepam、Ethoxybenzamide、Salicylamide 的 pKa ($[M+H]^+ \rightarrow M+H^+$) 分別為, 3.4、-1.18 及 -1.08，以上述的 pKa 值與 10^{-6}M 分析物濃度及溶液 pH 值(pH=2.8)所計算出的離子濃度為 Diazepam $\sim 10^{-6}\text{M}$ 、Ethoxybenzamide $\sim 1 \times 10^{-10}\text{M}$ 、Salicylamide $\sim 1.3 \times 10^{-10}\text{M}$ 可知質譜訊號的相對大小應 Diazepam > Ethoxybenzamide \approx Salicylamide。縱使預測 Ethoxybenzamide \approx Salicylamide 但是所觀測 Ethoxybenzamide 訊號遠大於 Salicylamide，由這兩個分析物的結構來看，Ethoxybenzamide 只比 Salicylamide 一個乙基，因此推測 Ethoxybenzamide 表面親和力大於 Salicylamide，而造成 10 倍左右的訊號的差異。這個實驗顯示出表面親和力對分析物的靈敏度似乎有相當程度的影響。

為了瞭解表面親和力對質譜訊號的影響，我們探討不同表面親和力(不同碳鏈)的四級銨鹽對於 Diazepam 訊號的影響，由圖 3 可知發現當增加表面親和力(碳鏈)對於 Diazepam 的影響越大，於四乙基銨鹽(TEAI)下還看得到低濃度 (10^{-6}M) Diazepam 之訊號，當碳鏈增加至四戊基銨鹽(TPAI)或四辛基銨鹽(TOctAI)時是抑制情形相當嚴重，已經無法看到低濃度 Diazepam 之訊號，至於 TPAI 與 ToctAI 對於 Diazepam 的抑制程度，似乎並未有太大的差異，我們猜測其原因是該濃度(10^{-4}M)已經達到質譜訊號的飽和。

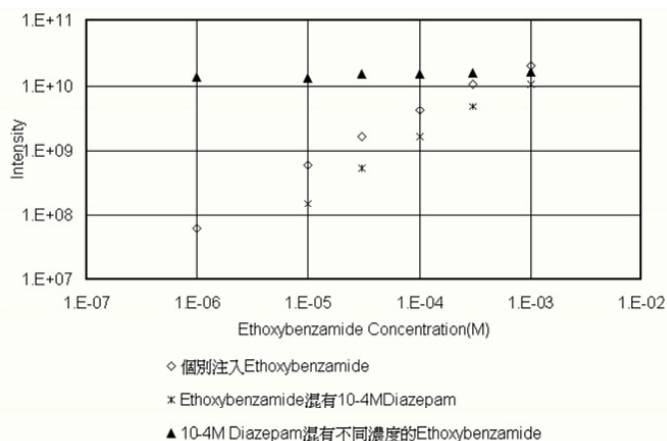


圖 1、固定 Diazepam 濃度於 10^{-4}M 改變 Ethoxybenzamide 的濃度所觀測之質譜訊號

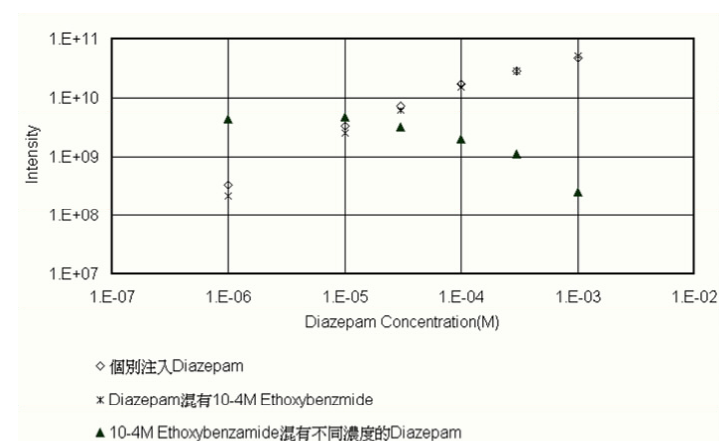


圖 2、固定 Ethoxybenzamide 濃度於 10^{-4}M 改變 Diazepam 的濃度所觀測之質譜訊號

四、計畫成果自評

Part. A 低輔助流毛細電泳質譜界面的設計以及於樣品線上濃縮的應用

1. 本研究成功的發展出低輔助流流速鞘流界面。
2. 雙斜口低輔助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。

Part. B 負離子電灑法質譜/質譜分析標記發色團寡醣之鍵結點和分支點

此方法可以成功地分析六醣以下寡醣之鍵結點與分支點。

Part. C 電子捕獲大氣壓下化學離子化法於血漿中西藥成分之分析

已成功利用衍生化反應，針對 carbonyl 藥物引入 PFPH 電子捕獲基團，在大氣壓下進行電子捕獲離子化。相較於未衍生之藥物在 APCI+ 或 ESI+ 模式之靈敏度，PFPH-衍生物接表現出較佳的靈敏度。

Part. D 建立與設計可程式化自動化連續式吹氣捕捉法結合快速氣相層析質譜儀與薄膜送樣結合樣品前濃縮/快速氣相層析質譜儀兩系統

本實驗中利用連續式吹氣/雙閥門/吸附劑捕捉系統與快速氣相層析質譜儀之整合，對於水中的三鹵甲烷可以達到良好的分離及偵測，並且能夠在 6.5 分鐘完成一次樣品分析，使系統具有線上偵測的能力。而系統對於三鹵甲烷的偵測極限皆在低的 ppt 濃度範圍，可實際應用於飲用水中三鹵甲烷的監測。此外由於系統自動化，除了可有效節省人力資源外，還可以

避免人為誤差，同時可以進行連續全天候分析監測。

Part. E 多重毛細管電泳/質譜儀介面之發展

1. 利用質譜儀內部訊號來驅動圓轉盤轉動與質譜儀掃瞄同步化，確認了多重毛細管電泳電灑質譜儀介面的可行性。目前可達到四重毛細管電泳電灑質譜同步分析。
2. 實驗證實四重毛細管電泳電灑質譜系統在濃度高達 2000ppm 仍未發現交叉干擾現象。

Part. F 鞘流溶液、緩衝溶液、分析物之解離常數及界面活性劑對於毛細電泳質譜分析靈敏度的影響

1. 高濃度且高靈敏度的分析物會抑制共流析分析物的質譜訊號。
2. 分析物的表面親和力對於電灑法質譜儀靈敏度有相當程度的影響。
3. 對於同一層析峰存在有高濃度且高靈敏度的化合物會抑制目標分析物的離子化，而產生定量上的問題，所以是有必要提高層析解析度，來避免共流析所造成的問題。

五、參考文獻

Part. A 低輔助流毛細電泳質譜界面的設計以及於樣品線上濃縮的應用

- [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] M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.*, **136**, 167 (1994)
- [23] S. E. Moring, J. C. Colburn, P. D. Grossman and H. H. Lauer; *LC-GC Intl.* **3** 46-52 (1990)
- [24] R. L. Chien and D. S. Burgi; *Anal. Chem.* **64** 489A-496A (1992)
- [25] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts and Th. P. E. M. Verheggn; *J. Chromatogr.* **169** 1-10 (1979)
- [26] Tsai, Cheng-Yuan; Her, Guor-Rong; *J. Chromatogr. A*, **743**(2), 315-321 (1996)

Part. B 負離子電灑法質譜/質譜分析標記發色團寡醣之鍵結點和分支點

- [1] Her, G. R.; Santikarn, S.; Reinhold, V. N.; Williams, J. C. Simplified Approach to HPLC Precolumn Fluorescent Labeling of Carbohydrates: N-(2-pyridinyl)glycosylamines. *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, **6**(1), 129-139.
- [2] Li, D.T.; Her, G.R. Linkage Analysis of Chromophore-Labeled Disaccharides and Linear Oligosaccharides by Negative Ion Fast Atom Bombardment Ionization and Collisional-Induced Dissociation With B/E Scanning. *Anal. Biochem.* **1993**, **211**(2), 250-257.
- [3] Li, D.T.; Her, G.R. Structural Analysis of Chromophore-Labeled Disaccharides and Oligosaccharides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1998**, **33**, 644-652.
- [4] Li, D.T.; Sheen, J.F. Her, G.R. Structural Analysis of Chromophore-Labeled Disaccharides by Capillary Electrophoresis Tandem Mass Spectrometry Using Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, **11**, 292-300.

Part. C 電子補捉大氣壓下化學離子化法於血漿中西藥成分之分析

- [1] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2000**, **11**, 942.
- [2] A. P. Bruins, *Trends Anal. Chem.*, **1994**, **13**, 37.

- [3] S. Bajic, D. R. Doerge, S. Lowes, and S. Preece, *Am. Lab.*, **1993**, 25(2), 40B.
- [4] D. F. Hunt, G. C. Stafford, Jr.; F. W. Crow, J. W. Russell, *Anal. Chem.*, **1976**, 48, 2098.
- [5] Z.L. Cheng, K.W. M. Siu, R. Guevremont and S.S. Berman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 2, 281.

Part. D 建立與設計可程式化自動化連續式吹氣捕捉法結合快速氣相層析質譜儀與薄膜送樣結合樣品前濃縮／快速氣相層析質譜儀兩系統

- [1] 陳作青 連續式吹氣捕捉法與快速氣相層析質譜系統偵測水中消毒副產物 --- 三鹵甲烷 碩士論文 國立台灣大學化學研究所 (2000) .
- [2] 陳思偉 揮發性有機物質自動化分析系統之軟硬體規畫與整合 碩士論文 國立中央大學化學研究所 (1999) .

Part. E 多重毛細管電泳/質譜儀介面之發展

- [1] *Anal. Chem.*, **1999**, 71 (23), 5354.
- [2] *High Throughput Screen.*, **1999**, 2, 327.

Part. F 鞘流溶液、緩衝溶液、分析物之解離常數及界面活性劑對於毛細電泳質譜分析靈敏度的影響

- [1] P.F. Crain, In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*; R. B. Cole, Ed.; John Wiley and Sons: New York, 1997; Vol. 1, pp 421-548.
- [2] Y. Ohasi, In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*; R. B. Cole, Ed.; John Wiley and Sons: New York, 1997; Vol. 1, pp459-498.
- [3] M.R. Emmett, R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 605.
- [4] J.A. Loo, R.O. Loo, In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*; R.B.

