

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

毛細電泳/質譜、醣類分析及快速分析技術之發展與應用

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2113-M-002-053

執行期間：90年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：何國榮 教授

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學化學所

中華民國 93 年 2 月 9 日

## 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

#### 一、摘要

毛細電泳界面當中，鞘流界面由於使用容易，堅固耐用，並且對緩衝溶液的限制較少因此是目前最廣泛被使用的界面。然而鞘流界面主要的問題在於毛細電泳分離出的分析物遭受鞘流溶液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。然而無鞘流界面一直無法被廣泛使用的原因在於此界面需要使用末端小口徑毛細管，因此很容易堵塞或是斷裂，並且此界面需要在毛細管末端鍍上一層導電層，導電層的製備不易並且壽命短，再加上緩衝溶液在選擇時受限於電灑法離子化的要求，因此這一個高靈敏度界面一直無法被廣泛的使用。

有鑑於此，本實驗室曾嘗試改進這些問題，針對末端小口徑毛細管造成毛細管壽命降低的問題，我們使用大口徑的斜口毛細管來取代一般無鞘流界面所使用的小口徑毛細管，使用斜口的設計所得到了靈敏度與縮小口徑的毛細管相近，此外由於開口較大，因此壽命以及耐用度上均較較小口徑毛細管長。至於毛細管末端導電的問題，我們採用導電銀筆將毛細管末端導電化，使用此塗佈方式不但可以得到導電度極佳導電層之外，塗佈的壽命以及對抗有機溶液的侵蝕能力均有所提升。

為了解決無鞘流界面緩衝溶液限制的問題，我們發展了三套使用低流速輔助溶液的毛細電泳質譜界面。這些設計結合了無鞘流以及鞘流界面的優點，由於這些界面對輔助溶液的需求不高，不像鞘流界面有嚴重的稀釋問題，因此較傳統無鞘流界面有較高的靈敏度。相較於無鞘流界面，由於使用輔助溶液，因此對毛細電泳緩衝溶液的限制較少，並且可以很穩定的操作在負離子模式下。

在這三個低輔助流界面中，使用微電灑針頭製成的低流速鞘流界面是最先發展的設計，此設計雖然具有不錯的靈敏度，但由於此界面使用縮小口徑的毛細管以及微電灑針頭的設計，因此界面的壽命較短。再加上此界面無法直接控制鞘流溶液的流速，因此我們便發展了雙斜口界面。雙斜口界面由於不需要縮小毛細管開口的口徑，因此界面的壽命較縮小口徑的界面來得長。並且此界面還可以使用針筒幫浦控制輔助溶液的流速使此界面能進一步的最佳化。此外，此界面的死腔體積極小，因此使用此界面所得到的分離解析度以及靈敏度都均較前一個設計佳。為了更進一步的將低輔助流界面普及化，我們嘗試改進最普遍使用的商業化鞘流界面，將界面的鞘流管以及毛細管均磨成斜口製成斜口鞘流界面。此方法可以有效的降低鞘流界面對鞘流溶液的要求。此設計除了可以控制鞘流界面的流速之外，在操作上也和傳統鞘流界面一樣容易，雖然此界面對鞘流溶液的需求較雙

斜口界面高，但此界面由於製作容易，因此有利於低輔助流界面的普及。

除了界面本身的改進之外，本計畫並針對毛細電泳質譜濃度靈敏度不佳的問題提出改進的方法。針對靈敏度不佳的問題我們將微電灑針頭低流速鞘流界面和大體積樣品注入法結合，藉由這樣的組合，使用微電灑針頭界面時分析酚類化合物時可以達到 ppb 的靈敏度。

**關鍵字：**低輔助流、毛細電泳質譜、線上濃縮。

## **Abstract:**

With the increasing availability of electrospray-mass spectrometry (ESI-MS), the interest to interface this ionization technique with liquid-based separation has also increased. An important area of ESI-MS interfacing is with capillary electrophoresis (CE), a combination offers fast, high-resolution separations, sensitive and information-rich detection.

The CE-MS interfacing is most commonly achieved with a liquid sheath. The sheath liquid interface is the most widely used because of its relative ease of implementation and versatility. The sheath liquid provides electrical contact with the outlet end of the separation capillary, and allows CE-ESI-MS operation with a wide range of buffer systems. Although the sheath liquid interface has facilitated the progress in CE-ESI-MS, it has one major disadvantage; the addition of sheath liquid in the interface may degrade overall sensitivity since the analyte band is diluted with a relatively large volume of sheath liquid, prior to being dispersed into a fine aerosol mist.

Without using sheath liquid, the development of sheathless CE-MS interface has attracted significant attention. In this interface, a conductive capillary tip is employed to eliminate the requirement of a liquid sheath to maintain the continuity of the electrophoresis circuit, and therefore, sample bands were not diluted. The sheathless interface, because of the use of a single capillary for sheathless CE-ESI-MS, several practical issues arise. First, the diameter of the tip needs to be carefully considered to maintain reasonable migration times and ESI stability. Second, fabrication of conductive coated capillary is required. Third, it is required to find a CE separation buffer solution optimized for separation and ESI stability.

For the first problem described above, a tapered capillary tip containing a beveled edge has been developed for use in sheathless interface. The optimal flow rate and sensitivity of a 75- $\mu\text{m}$ -i.d., beveled tapered capillary tip was similar to a conventional flat tapered tip with a 25- $\mu\text{m}$  orifice. Although both tips offer similar CE/ESI-MS sensitivity, the beveled tapered capillary tip is more rugged and durable than a

conventional 25- $\mu\text{m}$  tapered capillary because of the larger outer and inner diameter.

Considering the merits and drawbacks of conventional sheath liquid and sheathless interfaces, an interface of low make-up flow rate would provide a better alternative. Unlike the sheathless interface, the selection of running buffer is less limited because the running buffer can be diluted with sheath liquid. In addition, the sensitivity of a low flow interface would be better than the conventional sheath liquid interface because of the low dilution factor by the low flow make-up liquid. In this work, three low make-up flow CE-MS interfaces were developed.

The first interface is the low flow sheath liquid interface. In this interface, the use of a tip of small orifice as the electrosprayer reduces the requirement of sheath liquid flow rate and thus decreases sample dilution. Because of low dilution and the better ionization efficiency of a smaller tip, the sensitivity of this interface was found to be significantly better than the conventional sheath liquid interface.

The second low make-up flow interface is the dual beveled tip CE-ESI-MS interface. In this interface, one beveled tip capillary was used for CE separation and the other was used for supplying make-up liquid. Unlike the first low make-up CE-MS interface, the make-up liquid in this interface was mixed with the separation fluid at the very end of the interface. Due to the very small mixing volume exist at the capillary tip, band broadening caused by dead volume was kept to a minimum. The use of dual beveled tips capillaries as the ESI emitter reduces the requirement of decreasing the orifice diameter, therefore, the capillary lifetime was longer than the low flow interface using tapered capillary. Furthermore, because the make-up liquid was supplied by a separate capillary, the flow rate can be easily controlled by a syringe pump.

The third interface is the beveled tip sheath liquid interface. Because the interface is based on conventional sheath liquid interface, the interface is simple and easy to use. The use of beveled tip decreases the requirement of sheath liquid flow rate but without decreasing the capillary i.d. and o.d.. Thus, the interface was rugged and durable.

The analysis of analytes at trace levels (e.g. ppb) has been hindered primarily as a consequence of extremely small injection volumes. Large volume sample stacking (LVSS) is one of the very promising techniques to overcome the limitation of nanoliter injection volumes. In this work, low flow sheath liquid interface and a tri-beveled tip interface were studied to couple a CE with LVSS. With phenols as the model compounds, ppb level sensitivity has been achieved.

**Key word:** low make-up, capillary electrophoresis, CE, electrospray-mass spectrometry, ESI-MS, Large volume sample stacking, LVSS.

## 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。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  $\text{nL}/\text{min}$ ）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 所提出並經過多方面的改良與設計，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。

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。

一般而言，電灑法質譜儀最佳的適用流速與液體出口之管徑有關，而一般鞘流介面所使用的管徑大約  $300\sim 400\mu\text{m}$ ，此管徑的最佳流速大約在數個  $\mu\text{L}/\text{min}$  的範圍，然而在無鞘流界面的設計上，由於毛細管電泳的流速極低（大約在  $\text{nL}/\text{min}$ ），無法達到最佳流速的要求，為了使電灑法的最佳流速範圍符合毛細管電泳的流速，使用出口拉尖的毛細管則可將電灑法適用的最佳流速降低到毛細管電泳流速的範圍，拉尖的程度大約是毛細管原來口徑的二分之一或三分之一或是更低。雖然使用拉尖的毛細管使電灑法離子化效率最佳化，但口徑的縮小卻使得毛細管電泳的電滲流受到阻礙而降低分離效率，也使得毛細管的拉尖部分也變得極容易阻塞或是斷裂。

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，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，一個提供毛細電泳的分離，另一個提供極低流速（ $\sim 300$  nL/min）類似鞘流介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電泳緩衝溶液使用上的限制。

除此之外，為了更大幅度的提昇靈敏度，本計畫還嘗試以低輔助流毛細電泳界面與可以提昇數十到數百倍靈敏度的毛細電泳大體積樣品堆積法(LVSS: Large Volume Sample Stacking)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。本計劃將以低輔助流鞘流界面與樣品堆積的技術做結合，以達到更低的偵測極限。

### 三、結果與討論

使用斜口毛細管由於在尖端的電場較其他位置高，因此自毛細管流出的液體會在斜口尖端的部分形成泰勒錐，並且此泰勒錐的體積可以和口徑小三分之一的平口毛細管相近，若是將兩個斜口最尖端的地方結合在一起的話，兩個毛細管中流出的液體就可以互相混合形成泰勒錐。又因斜口毛細管在低流速電灑穩定的特性，因此我們便以此構想設計一個可在低流速操作的毛細電泳質譜界面。此界面除了可以結合斜口毛細管的耐用性之外，也可以有目前的低流速鞘流界面的優點。而且使用結合兩個毛細管的方式可以很容易的藉由控制輔助溶液的流速穩定電灑法的泰勒錐以及控制稀釋倍率。

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兩毛細管所產生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  $400\ \mu\text{m}$  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  $400\ \mu\text{m}$  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，如此便導致界面對輔助溶液的需求的大幅提高。因此一般在設計低流速鞘流界面時便會考慮縮小界面整體的開口來降低界面對鞘流溶液的需求，就像是 Hsieh F. 等人或是 Kirby 等人的設計方式。

由於本界面的設計可以使用極低流速的輔助溶液，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，同時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隨著上升。此外，本界面幾乎沒有所謂的死腔體積，若是嚴格來說的話也僅在泰勒錐的部分，同時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泰勒錐過大而導致分離解析度的下降。

由於我們可以製作出雙斜口界面，在實際應用到毛細電泳質譜之前，我們對此界面所產生的泰勒錐作了一些觀察，希望藉由對泰勒錐的觀察，瞭解實際上界面所產生的泰勒錐是否與實驗一開始設計時的構想相同。

當我們將界面中的一個毛細管以針筒幫浦通入緩衝溶液(CHES 20 mM pH=10 流速 300 nl/min)，另一毛細管通入輔助溶液(MeOH:H<sub>2</sub>O=4:1 + 1 % Acetic Acid 流速 200 nl/min)時。加上電灑法高電壓後，便可在雙斜口界面的最尖端的位置觀察到泰勒錐的產生，並且本界面的泰勒錐極小且很穩定。

圖 2 所示為本界面的架構圖。將製作好的界面用膠帶固定在顯微鏡用的載玻片上再放置到微電灑界面的 XYZ 移動平台上，並與電灑法的電源供應器連接。之後使用 XYZ 移動平台的位置旋鈕調整界面與質譜入口處的相對距離，並將提供輔助液體的毛細管接上針筒幫浦，並調整適合的輔助溶液流速，以得到最穩定的電灑。接下來的步驟就如同一般的毛細電泳操作方法進行分析。

圖 3 所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，使用 CHES 20 mM pH=10 的水溶液作為緩衝溶液，80 % MeOH + 1 % Acetic Acid 作為輔助溶液，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，使用本界面的信號強度可以明顯的提升。而相較於無鞘流界面，本界面因為有稀釋的問題所以靈敏度有一些下降。

圖 4 為在負離子模式下，使用本界面所得到的結果。注入的分析物為 40 ppm 的酚類化合物，注入的方式為重力注入 15 mbar 15 秒。分離的緩衝溶液為 20 mM 的 CHES 緩衝水溶液(pH=10)。輔助溶液為 80 % 的 IPA 再加上 0.5 % NH<sub>4</sub>OH。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。我們曾經嘗試使用 80 % MeOH + 0.5 % NH<sub>4</sub>OH 作為輔助溶液，然而此輔助溶液需要較高的流速(~800 nl/min)才能穩定。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。與傳統鞘流界面比較，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。

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先前所提到的樣品堆積法中將電滲流反向的步驟，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。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，因此此方法過於麻煩且複雜。

因此，如何成功的將 LVSS 與毛細電泳質譜結合最主要就是要先解決 LVSS 反向電滲流步驟中毛細管末端緩衝溶液補充的問題。

首先，使用低流速鞘流界面。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。

圖 5 為使用本界面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。

另外，由於雙斜口界面在毛細管的出口端沒有一個空間可以提供 LVSS 反相電滲流的緩衝溶液，因此我們便以再加一個斜口毛細管的方式，使用此毛細管提供反相電滲流所需的緩衝溶液，此毛細管位於分離毛細管的旁邊。圖 6 為三斜口毛細管的示意圖。

三斜口界面在操作上與雙斜界面類似，唯一不同的只有在 LVSS 電滲流反相時，第三斜口毛細管注入分離所使用的緩衝溶液補充到分離毛細管中，為了防止輔助溶液被吸入到分離毛細管中，此時必須停止輔助溶液的供給。為了能夠有效的提供反相電滲流的緩衝溶液，本界面在第三斜口毛細管上使用相較於毛細電泳而言較高的流速提供緩衝溶液，此流速約為 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。由於被吸入毛細管的緩衝溶液流速僅有數百個  $\text{nl}/\text{min}$ ，因此就會有緩衝溶液累積在界面的尖端。由於緩衝溶液是純水相的關係，因此若是堆積完成後便無法直接進行電灑。

為了移除緩衝溶液的堆積，有幾個辦法，第一個辦法就是使用高流速的輔助溶液將純水相的液體累積沖掉，這一個辦法的優點就是不需移動界面，並且直接使用此界面的設計即可，但此方法需要一段時間才能完全的將累積的液體移除。另一個辦法就是與微電灑低流速鞘流界面一樣把界面移近質譜入口處讓質譜的真空將過多的液體移除，這一個方法很容易，也很迅速，缺點就是需要移動界面。還有一個辦法就是利用氣體將多餘的緩衝溶液移除，此方法的優點就是可以很快的將多餘液體移除，不需移動界面，而缺點就是需要再加一段的氣體的線路到界面之中。

等到樣品堆積完成後，將多餘液體移除後，界面的操作就如同雙斜口界面的操作方式。即開始注入輔助溶液，毛細電泳高電壓切換回分析用的高電壓進行分析。

在實際的操作上，我們發現所得到的結果還是不是很穩定。在實驗的觀察中，堆積過程的電流不是非常的穩定，推測主要原因還是第三斜口毛細管補充的效率不佳所導致。因此我們還無法與微電灑低流速鞘流界面作比較，由於此實驗再現性不甚理想，因此我們還要繼續的在此界面上作一些改進。若是此界面能夠順利的解決 LVSS 的問題，一方面此界面有較佳的靈敏度之外，另外此設計將可以很容易的自動化。



#### 四、計畫成果自評

1. 本研究成功的發展出低輔助流鞘流界面。
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。
4. 將此界面與大體積樣品堆積法(LVSS)結合，則可以進一步的解決毛細電泳進樣體積有限的問題，使得樣品的濃度靈敏度有效的提升。在本研究中，我們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。另外，在本研究中，我們發展了一套使用三斜口毛細管的設計，此設計也可以使毛細電泳質譜與 LVSS 結合。但由於本界面在電滲流反相的步驟中無法維持穩定的電流，因此本界面仍然需要繼續的改進。

#### 五、參考資料

1. J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 207 (1988).
2. J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, Anal. Chem., 59, 1230 (1987).
3. R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, and H.R. Udseth, Anal. Chem., 60, 436 (1988).
4. D. Figeys, I. van Ostveen, A. Ducret. and R. Aebersold, Anal. Chem., 68, 1822 (1996).
5. D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, H. Rapp, and K. Hjort, Rapid Commun. Mass Spectrom., 13, 994 (1999).
6. M.S. Kriger and K.D. Cook, Anal. Chem., 67, 385 (1995).
7. J. F. Kelly, L. Ramaley, and P. Thibault, Anal. Chem., 69, 51 (1997).
8. Y. Z. Chang, G. R. Her, Anal. Chem., 72, 626 (2000).
9. E.C. Huang, T. Wachs, J.J. Conboy, J.D. Henion, Anal. Chem., 62, 713A (1990).
10. K. Vanhoutte, W. Van Dongen, E.L. Esmans, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 15 (1998).
11. D.P. Kirby, J.M. Thore, W.K. Gotzinger and B.L. Karger, Anal. Chem., 68, 4451 (1996).
12. 張耀仁，博士論文”微電灑法與毛細管電泳質譜儀界面之研究與探討”。
13. 陳逸然，博士論文”無輔助流及低輔助流毛細電泳質譜界面的發展與應用”。

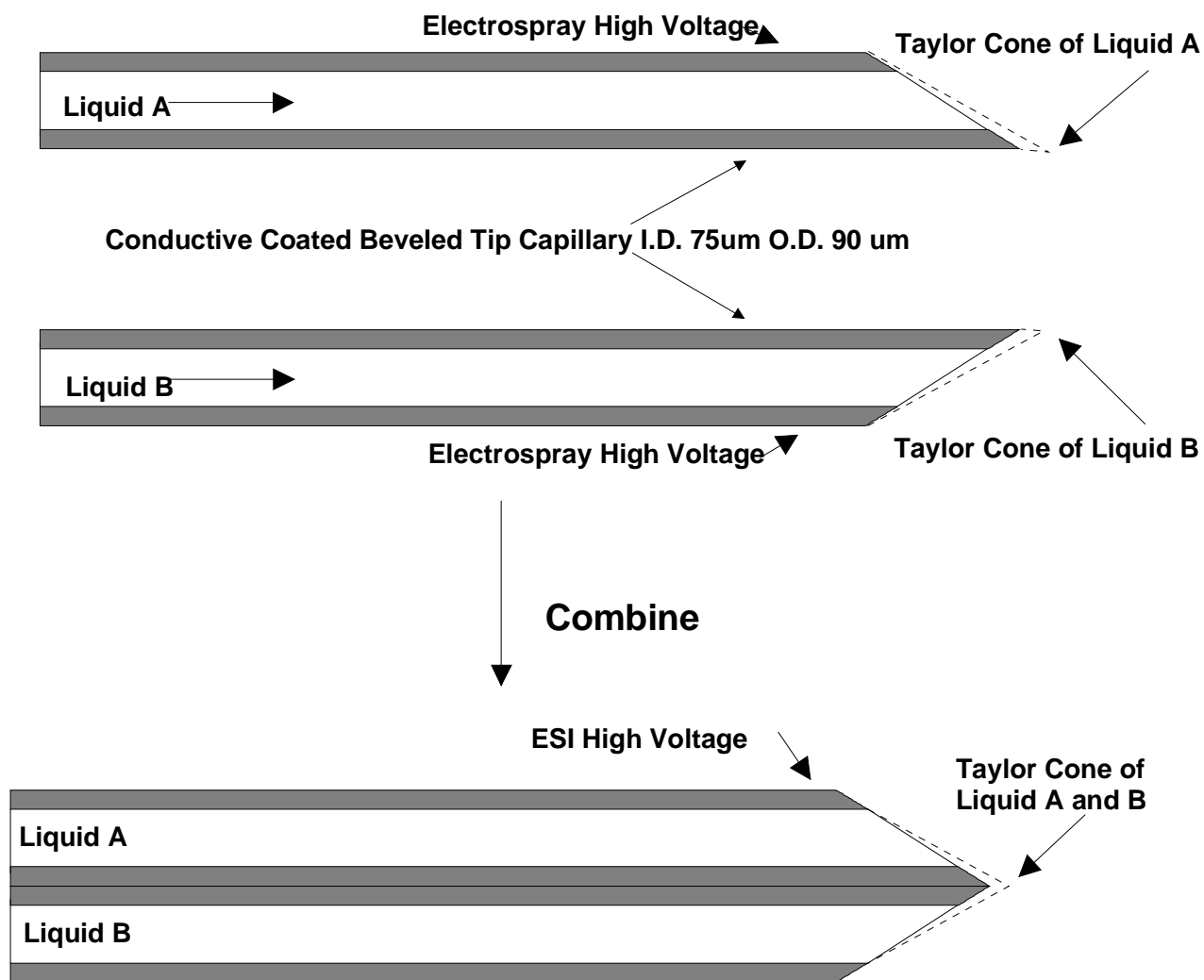


圖 1 雙斜口界面示意圖。

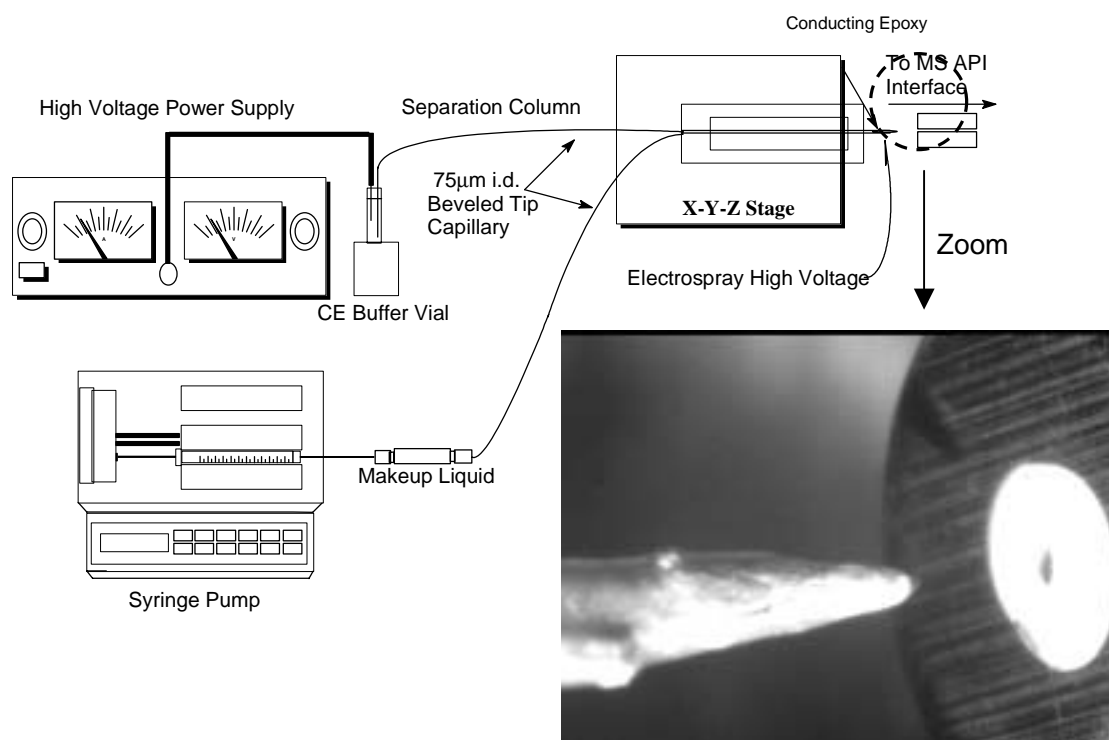


圖 2 雙斜口界面系統架設示意圖。

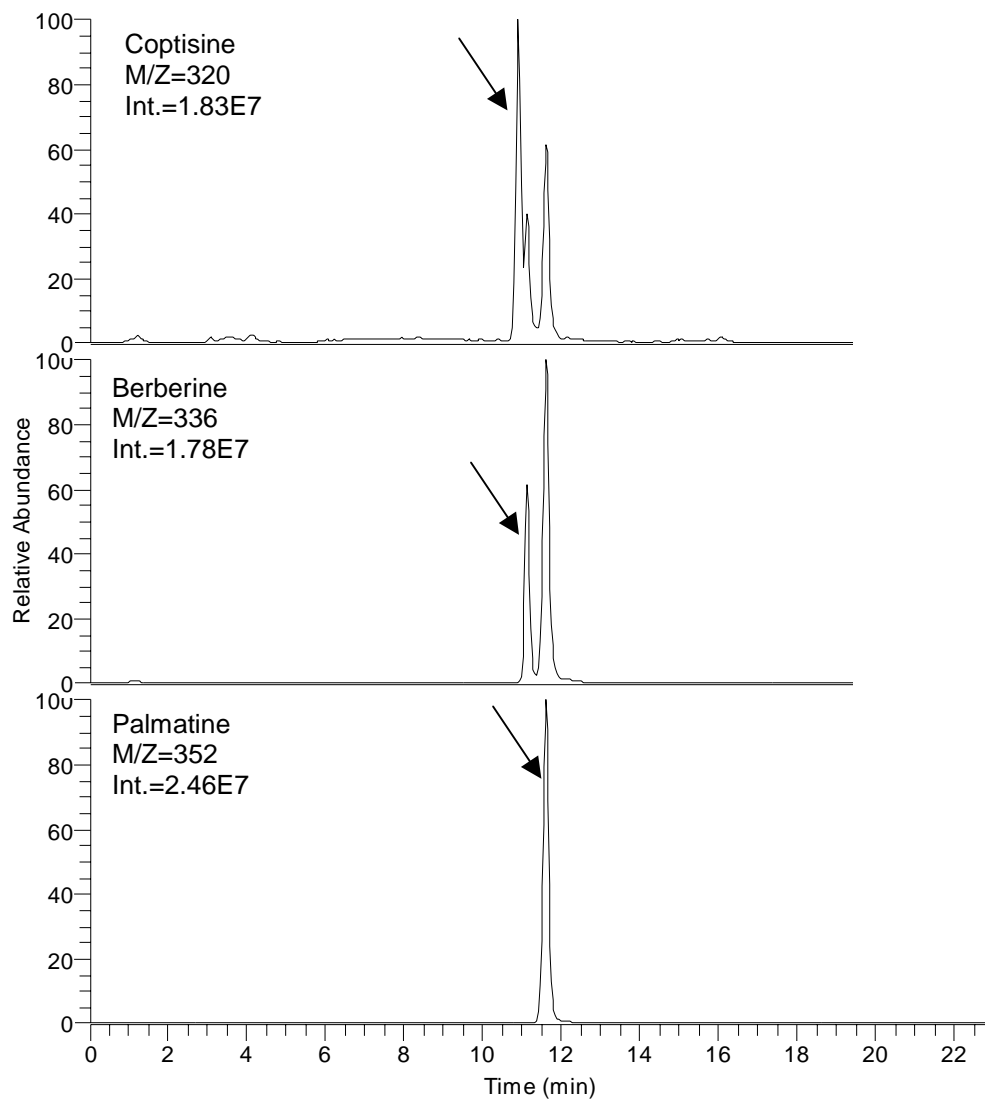


圖 3 雙斜口界面在正離子模式下分離黃連指標成分的結果，使用 CHES 20mM pH=10 作為緩衝溶液。MeOH:H<sub>2</sub>O=4:1+1% Acetic Acid 作為輔助溶液，流速為 250 nl/min，電灑法電壓為 2.5 kV。

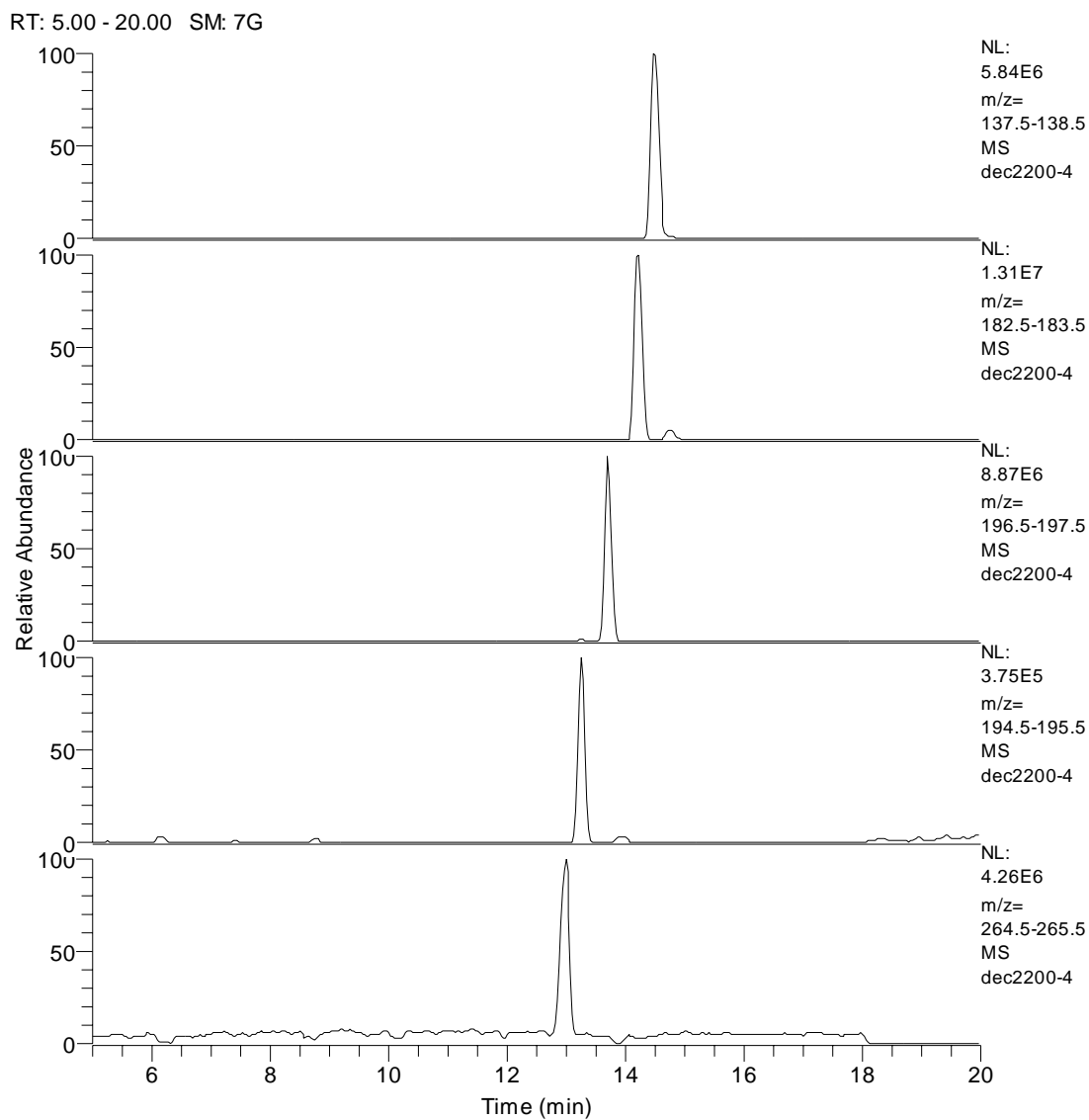


圖 4 雙斜口界面在負離子模式下分析 40 ppm 的酚類化合物，注入的方式為使用重力注入 15mbar, 15 秒。分離的緩衝溶液為 20 mM CHES pH=10 緩衝水溶液。輔助溶液為 80 % 的 IPA 再加上 0.5 % NH<sub>4</sub>OH，流速為 500 nl/min。電灑法電壓為 -2 kV。

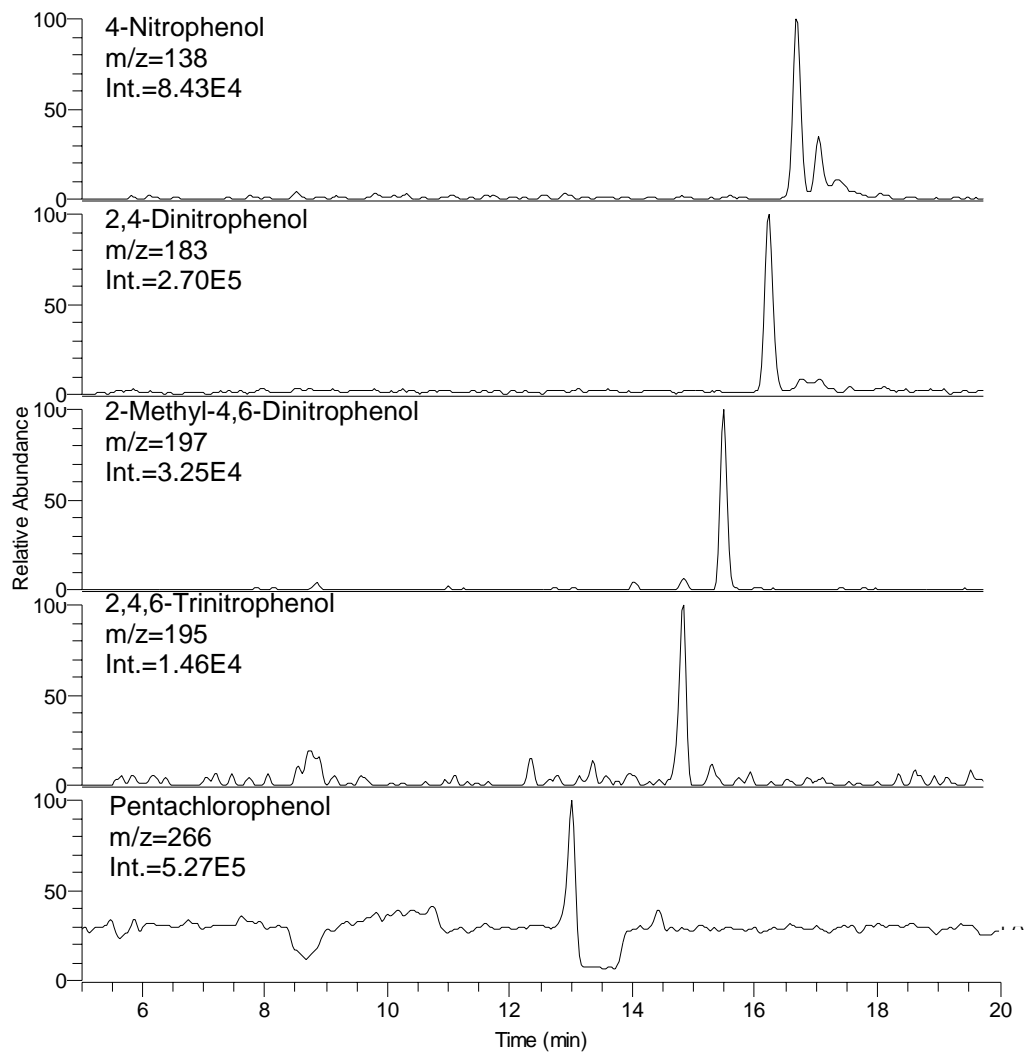


圖 5 使用大體積樣品堆積法(LVSS)分析酚類化合物所得到的結果(緩衝溶液：CHES 20 mM at pH=10，鞘流溶液：IPA：H<sub>2</sub>O = 4:1 + 0.5 % NH<sub>4</sub>OH，樣品濃度為 200 ppb 溶在 H<sub>2</sub>O 中)。

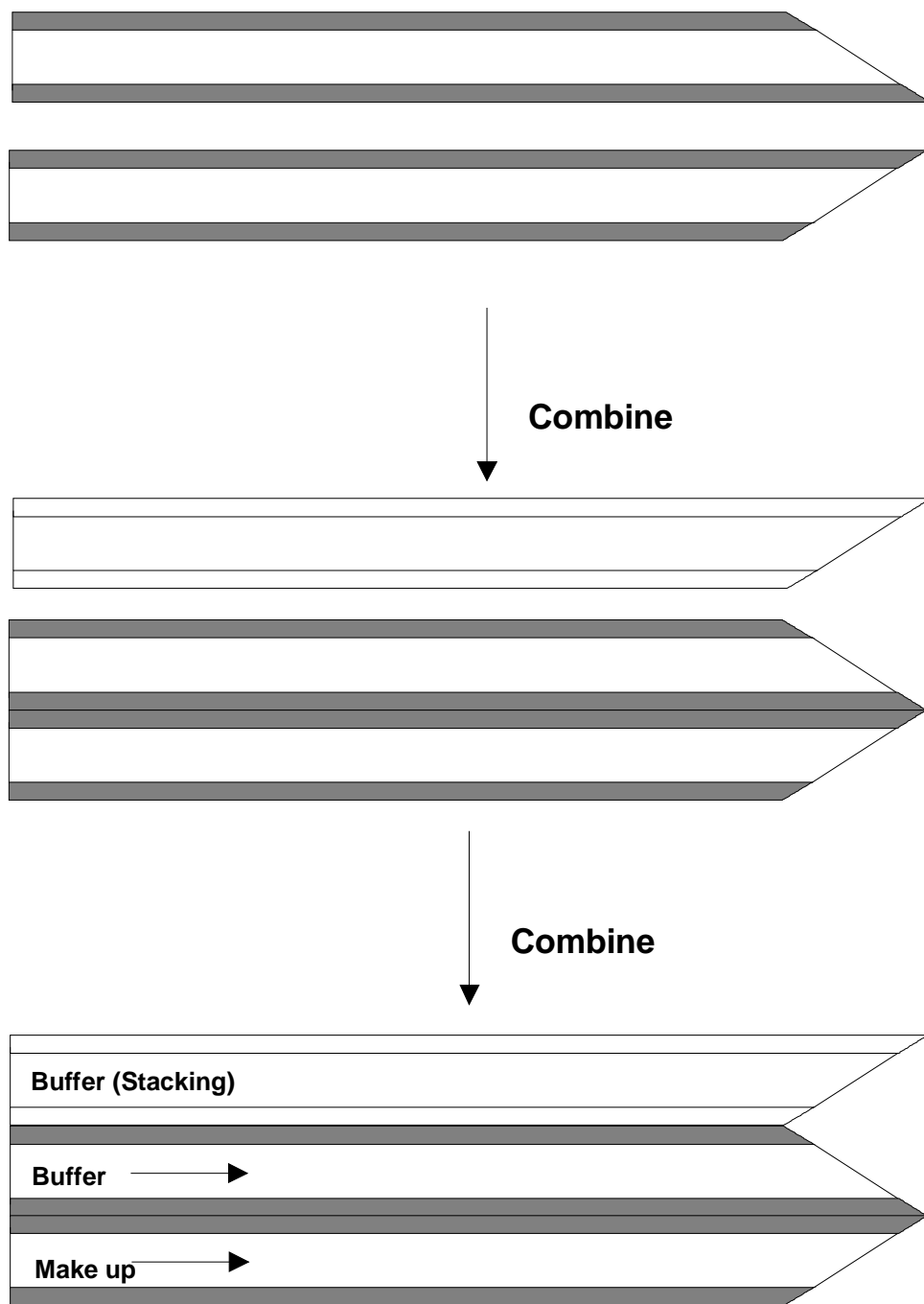


圖 6 三斜口低輔助流界面示意圖。

## 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順序、鍵結點和分支點

### 一、摘要

負離子電灑法-質譜分析質鏈和分支寡糖之鍵結點與分支點。先以已知結構之直鏈寡糖閉環標記(非還原胺化標記法)對胺基苯甲酸乙酯 (ABEE) 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。寡糖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糖, 所有鍵結點皆可明確地被分析。一般而言, 位在分支點的糖之特徵裂解與直鏈之情形顯然有些不同。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糖之判斷方法, 具有分支之寡糖(六糖以下)其所有鍵結點皆可被分析。

對於六糖以上的糖鏈, 非還原端的結構訊息常相當微弱, 而無法獲得。實驗證實經由鹼逐步水解, 順序的將還原端的單糖一一去除, 所生成之還原端、較小的寡糖, 再經由發色團閉環標記/負離子電灑法-質譜/質譜, 可逐步鑑定較大寡糖之各個鍵結點。對於含唾液酸糖鏈, 導入唾液酸的保護基(形成 1, 3- $\alpha$ 呋啉衍生物)有助於穩定唾液酸, 使其不會於鹼逐步水解過程丟失。糖蛋白的糖鏈含有許多糖型式, 未經分離, 很難避免來自其他糖鏈及其水解片段的干擾, 因此, 本實驗提出一套分析糖蛋白糖鏈的所有鍵結點與分支點的方法: 以 ABEE 閉環標記所有糖鏈, 於液相層析分離後, 得到單一純化的糖鏈, 在除去閉環標記(因標記會阻止鹼水解), 繼之鹼水解反應, 最後將由質譜/質譜和質譜/質譜/質譜分析, 獲得所有鍵結點與分支點結構訊息。

**關鍵字:** 糖鏈、鍵結點、電灑法、發色團。

### Abstract:

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  $MS^2$  and  $MS^3$  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.

For oligosaccharides larger than hexasaccharides, linkages near the non-reducing end were not clear in MS<sup>2</sup> of the intact oligosaccharide. A strategy based on sequential degradation before ABEE closed-ring labeling and negative ion ESI-MS analysis was proposed to analyze the oligosaccharides larger than hexasaccharides. Oligosaccharides were sequentially hydrolyzed from the reducing end. All the linkages could be gradually picked up based on MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> of the degradation products. Unlike neutral oligosaccharides, a protecting group was introduced for sialylated oligosaccharides to stabilize the sialic acid during degradation. The special treatment along with the strategy proposed for neutral oligosaccharides were found to be quite useful for the determination of all the linkages of sialylated oligosaccharides. For the analysis of an N-linked glycan that was cleaved from a glycoprotein, an integrated strategy was proposed from purification to the analysis of all the linkage information. The sequence of the analysis is ABEE labeling, HPLC separation, ABEE delabeling, sequential degradation, ABEE labeling and MS<sup>2</sup> analysis.

**Key words:** oligosaccharides, linkage, electrospray, ESI, closed-ring labeling.

## 二、緣由與目的

分析細胞內蛋白質表現，以及基因表現如何因應特定環境變化（如疾病或藥物處理）而改變的蛋白組分析 (Proteomics) 即是繼基因組分析二十一世紀新興重要研究領域。蛋白組 (Proteome) 是指在某組織或分化細胞內所表現之所有蛋白質，其分析研究即稱為蛋白組分析。大多數的蛋白質皆經過後轉譯修飾 (post-translational modification)，糖化為最常見之後轉譯修飾，哺乳類的蛋白質大約 60-90% 是糖蛋白<sup>1</sup>。糖蛋白的糖鏈與生命現象有著密切的關係，對蛋白質的重要性包括影響蛋白質的物理化學性質(例如：水溶性、穩定性)和生物活性(例如：免疫反應、受酵素水解性)。另外，細胞上糖蛋白的糖鏈提供細胞間確認的依據，可以很精確的辨認受體的特異性，例如：精蟲可以辨認同種的卵子，或是某些毒素反應的受體或附著體<sup>2-4</sup>。糖蛋白的糖鏈對於蛋白質三度空間的構形亦極為重要，使得蛋白質可以順利地疊合成隨意螺線(random coils)至棒狀結構(rod-like structure)<sup>5-8</sup>，例如：黏蛋白的氧連結型糖鏈及許多膜蛋白的糖鏈。這些重要的功能皆來自於糖鏈結構的差異，因此了解糖鏈結構對解開生命的奧妙有著極大的重要性。

質譜儀解醣類結構較以核磁共振儀 (NMR) 有更多的優點，例如：樣品的量需求少 (少於 1 毫克)，純度需求不似以核磁共振儀高，且核磁共振儀需有相似結構的醣類樣品作比對。以質譜儀解醣類一級結構就不似蛋白質和核酸簡單，蛋白質和核酸各個單體質量不同，可以解其序列，因此目前質譜儀能解的醣類結構仍舊有限。

醣類的一級結構包括單糖的組成成份、結點順序、鍵結點、異位組態以及分支點。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)寡醣，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、簡單三醣 (maltotriose、isomaltotriose、panose)、及全為 1-4 鍵結的五醣 (maltopentaose) 之分析<sup>9</sup>。然而，對於不同鍵結種類之直鏈寡醣，以及具有分支之寡醣其鍵結點與分支點的分析之適用性，再加上單以質譜/質譜、或(和)質譜/質譜/質譜方法能分析到多大的寡醣等問題，勢必需要尋求能逐步水解較大醣鏈的方法，而此方法最好能自寡醣的還原端逐一將單糖水解下來(非還原端的結構訊息常是相當微弱的)！本實驗能將此分析方法拓展至所有醣蛋白之醣鏈鍵結點與分支點分析，從水解醣蛋白的醣鏈、至純化(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 偵測且純化後各個醣型式的閉環標記可去除)、分析各個醣型式、最後獲取各個醣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！

### 三、結果與討論

本實驗首先要得知 ABEE 閉環標記-直鏈寡醣的特徵裂解離子，因此使用各種不同鍵結的寡醣標準品(Laminarihexaose、maltoheptaose、isomaltohexaose 分別為 1-3、1-4、1-6 鍵結的寡醣)，以 ABEE 閉環標記之，再進行負離子電灑法-質譜/質譜及(/或) 質譜/質譜/質譜實驗。根據此實驗，提出一新的判定寡醣鍵結點的方式，結果整理於表 1。

對於鍵結點在分支點的特徵裂解離子，則藉由磷脂酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>，簡寫 PLA) 醣蛋白切下的醣鏈，其中 PLA-2、PLA-3A 以及 PLA-3B 為具有各種鍵結分支的寡醣，將 PLA 以醣胜肽酶切下醣鏈，標記 ABEE 後的醣鏈，以微管柱高效能液向層析儀( $\mu$ -HPLC)分離，並以直譜儀當作偵測器，進行負離子電灑法-質譜/質譜及(/或) 質譜/質譜/質譜實驗。基於此實驗，提出一方法來鑑定在分支點的鍵結點，列於表 2。

利用表 1 及表 2 分析含有分支的寡糖 LNDFH，測試可否鑑定其所有的鍵結點。LNDFH 是來自人乳的醣鏈。圖 1 為 ABEE 閉環標記-LNDFH 質譜/質譜圖。 $m/z$ 920(<sup>0,2</sup>A<sub>5</sub>-18)離子建議有一 1-4 鍵結在還原端。在  $m/z$  836 (C<sub>4</sub>)和  $m/z$  674 (C<sub>3</sub>)之間的質荷比沒有跨環離子，所以第二個鍵結點為一 1-3 鍵結。 $m/z$  348 (C<sub>3</sub>/Z<sub>3 $\alpha$</sub> -H)離子則相當於有一雙糖(326 Da)自末端的四醣(C<sub>3</sub>， $m/z$  674 離子)丟掉，此亦指出

第三個糖上 C-3 上的羥基被一雙糖所取代(即第三個糖有一分支的 1-3 鍵結)，而第三個糖上另外一鍵結的鑑定，則藉由  $C_3$  ( $m/z$  674)離子的質譜/質譜/質譜圖(圖 2)。除了有微弱的 1-4 鍵結特徵裂解離子  $m/z$  554( $^{0,2}A_3-18$ )之外， $m/z$  288 ( $^{0,4}X_1/Z_{1\alpha}-H$ )離子亦指出此 1-4 鍵結是在一含有 1-3 分支的糖上。最後，我們選擇  $C_2$  ( $m/z$  325)離子作質譜/質譜/質譜，以了解最末端的鍵結。圖 3 為  $m/z$  325 離子的質譜/質譜/質譜圖。 $m/z$ 307 ( $C_2-18$ )、247( $^{0,4}A_2$ )和 205( $^{1,3}A_2$ )等離子指出 LNDFH 的非還原端是一 1-2 鍵結。由以上的質譜/質譜和質譜/質譜/質譜圖的幫助，LNDFH 的所有鍵結點皆可被鑑定出。

保有還原糖環狀結構的非還原胺化的衍生化產物藉由負離子電灑法-質譜/質譜(ESI-MS/MS)，會產生許多具有鍵結點訊息的特徵裂解離子，但是對於六醣以上的醣鏈，非還原端的結構訊息常是非常微弱的。因此，本實驗經由鹼逐步水解，順序的將還原端的單醣一一去除，所生成之還原端、較小的寡醣，再經由發色團閉環標記/負離子電灑法-質譜/質譜，可逐步鑑定較大寡醣之各個鍵結點。將此方法應用於分析核糖核酸酶 B(ribonuclease B)的 M5G2 醣鏈的結構。核糖核酸酶 B 的醣鏈以醣肼肽酶 F 切下後，理論上應將各個醣型式的醣鏈分離，再進行逐步水解，以避免來自其他醣鏈及其水解片段的干擾，但核糖核酸酶 B 最主要的醣 M5G2，佔所有醣型式的 57%，及次要含量 M6G2 佔 31%，其他醣型式顯得十分稀少。因此忽略來自其他醣鏈的貢獻，直接對切下的醣鏈進行鹼水解、ABEE 閉環標記、而後以質譜/質譜或(和)質譜/質譜/質譜分析 M5G2 醣鏈結構。將核糖核酸酶 B 的醣鏈在 20 mM NaOH, 60 °C 反應 8 小時，繼以 ABEE 閉環標記，圖 2 為其結果。M5G2 確實自還原端水解下較多的單糖，有  $m/z$  1380、1177 和 974，分別表示完整、自還原端水解下一個 GlcNAc 及自還原端水解下兩個 GlcNAc 的寡醣，分別對這些離子進行質譜/質譜或(和)質譜/質譜/質譜實驗，以獲得其鍵結點。

圖 3 為 ABEE 閉環標記-M5G2 ( $m/z$  1380)的質譜/質譜圖。 $m/z$  1114 ( $^{0,2}A_5-18$ )離子指出第一個鍵結為 1-4 鍵結。 $m/z$  929 ( $^{0,2}A_4$ ) 和  $m/z$  911 ( $^{0,2}A_4-18$ ) 指出第二個鍵結亦為 1-4 鍵結。可由  $m/z$  647 ( $C_3/Z_{3\beta}-H$ ) 離子得知有一 1-3 鍵結在分支點上，因為此離子象徵一完整單糖(180 Da)從  $m/z$  827( $C_3$ )(末端五醣)丟失。而剩餘的特徵裂解離子皆較微弱，有不易判斷之難處。

自還原端丟掉一 GlcNAc 的 M5G2，閉環標記上 ABEE 後( $m/z$  1177)的質譜/質譜為圖 4(a)。 $m/z$  911 ( $^{0,2}A_4-18$ ) 指出 M5G2 的第二個鍵結是 1-4 鍵結，這與之前所得結果相同。於此圖譜中，明顯  $m/z$  647 ( $C_3/Z_{3\beta}-H$ )指出有一 1-3 分支在 M5G2 第三個糖上----一完整單糖(180 Da)從  $m/z$  827( $C_3$ )(末端五醣)丟失。我們進一步的選取  $m/z$  647 作質譜/質譜/質譜以了解 M5G2 第三個糖的另一鍵結點，圖 4(b)為其結果， $m/z$  629 ( $C_3-18$ )、575 ( $^{0,3}A_3$ )、545 ( $^{0,4}A_3$ )，缺乏  $^{0,2}A_3$  ( $m/z$  605)離子，這指出 M5G2 第三個糖上有一 1-6 鍵結在 1-3 分支上，因此，M5G2 第三個糖是 1-3 和 1-6 鍵結構成的分支。

自還原端再丟掉一 GlcNAc 的 M5G2，閉環標記上 ABEE 後( $m/z$  974)的質譜



記-A2 醣鏈自還原端水解下一個 GlcNAc，此二離子皆帶-2 價，而 m/z 983 為 ABEE 閉環標記-A2 完整分支醣鏈，m/z 821 為 ABEE 閉環標記-A2 完整分支醣鏈水解下一個 Man，m/z 617 為 ABEE 閉環標記-A2 完整分支醣鏈水解下 Man-GlcNAc。接著以質譜/質譜或(和)質譜/質譜/質譜分析運鐵蛋白醣鏈 A2 之結構。

圖 7 為 ABEE-A2(m/z 1185)的質譜/質譜圖。-2 價的 m/z 1051 ( $^{0,2}A_{7-18}$ )離子指出第一個鍵結為 1-4 鍵結。另二個-2 價的裂解離子 m/z 959( $^{0,2}A_6$ )和 m/z 950 ( $^{0,2}A_{6-18}$ )指出第二個鍵結亦為 1-4 鍵結。-1 價的 m/z 979( $C_5/Z_{3x-H}$ )表示一 1-3 鍵結上完整寡醣(836 Da)從  $C_5$ (m/z 907.5) 丟失，這亦意味著 A2 的第三個糖上有一 1-3 鍵結分支。剩餘的特徵裂解離子(非還原端)於此圖譜中，由於非常微弱而無法判斷其鍵結點。

自還原端丟掉一 GlcNAc，閉環標記上 ABEE 的離子 m/z1083 的質譜/質譜圖為圖 8(a)。m/z 950 ( $^{0,2}A_{6-18}$ )帶-2 價的離子指出此醣的還原端(即 A2 的第二個鍵結)為 1-4 鍵結。如同上述所言，m/z 979( $C_5/Z_{3x-H}$ )指出 A2 的第三個糖上有一 1-3 鍵結分支。我們進一步的選取 m/z 979 作質譜/質譜/質譜以了解第三個糖的另一鍵結點，圖 8(b)為其結果，m/z 961 ( $C_3-18$ )、908 ( $^{0,3}A_3$ )、878 ( $^{0,4}A_3$ )及缺乏 m/z 938 ( $^{0,3}A_3$ )，指出 A2 第三個糖上有一 1-6 鍵結接於 1-3 分支(表 2.4)，因此，A2 第三個糖是 1-3 和 1-6 鍵結構成的分支。

兩完整支鏈的水解片段，閉環標記上 ABEE 後的離子(m/z 983)的質譜/質譜圖為圖 9(a)。m/z 862( $^{0,2}X_1$ )指出此支鏈還原端的第一個鍵結是 1-2 鍵結；m/z 572 ( $^{0,2}A_3$ )、554 ( $^{0,2}A_{3-18}$ )指出支鏈的第二個鍵結是 1-4，雖然，圖譜中第二個鍵結的第二個特徵裂解離子 m/z 554 並不是很清楚，我們可藉由支鏈更進一步水解所得結果(m/z 821 離子)，確定其鍵結點。

自支鏈丟掉一 Glc 的水解片段，閉環標記上 ABEE 後的離子 m/z 821 的質譜/質譜圖為圖 9(b)。m/z 554( $^{0,2}A_{3-18}$ )清楚的指出支鏈的第二個鍵結是 1-4。最後的鍵結可從支鏈依序丟掉 Glc、GlcNAc 後形成的水解片段，閉環標記上 ABEE 後的離子 m/z 617 的質譜/質譜-圖 9(c)。m/z 410 ( $^{0,2}A_2$ ) 和 m/z 380( $^{0,3}A_2$ )指出非還原端的鍵結為 2-6 鍵結。經由逐步水解/閉環標記-質譜/質譜分析，運鐵蛋白醣鏈 A2 所有的鍵結可清楚地被鑑定。

醣蛋白的醣鏈含有許多醣型式，未經分離，很難避免來自其他醣鏈及其水解片段的干擾，因此，本實驗提出一套分析醣蛋白醣鏈的所有鍵結點與分支點的方法：以 ABEE 閉環標記所有醣鏈，於液相層析分離後，得到單一純化的醣鏈，在除去閉環標記(因標記會阻止鹼水解)，繼之鹼水解反應，最後將由質譜/質譜和質譜/質譜/質譜分析，獲得所有鍵結點與分支點結構訊息。除去閉環標記的方法為將 ABEE 標記之醣鏈以 2%的醋酸在 65 °C 反應 48 小時，而此策略亦可用於含唾液酸之寡醣，只是需要更溫和的條件，我們將反應時間縮減至 2.5 小時並以較低反應溫度進行反應，則可達到除去閉環標記的目的。以此策略則可以將核醣核酸酶 B(ribonuclease B)的 M6G2 醣鏈(為醣型式之次要含量，佔所有醣型式的 31%)之所有鍵結解開。

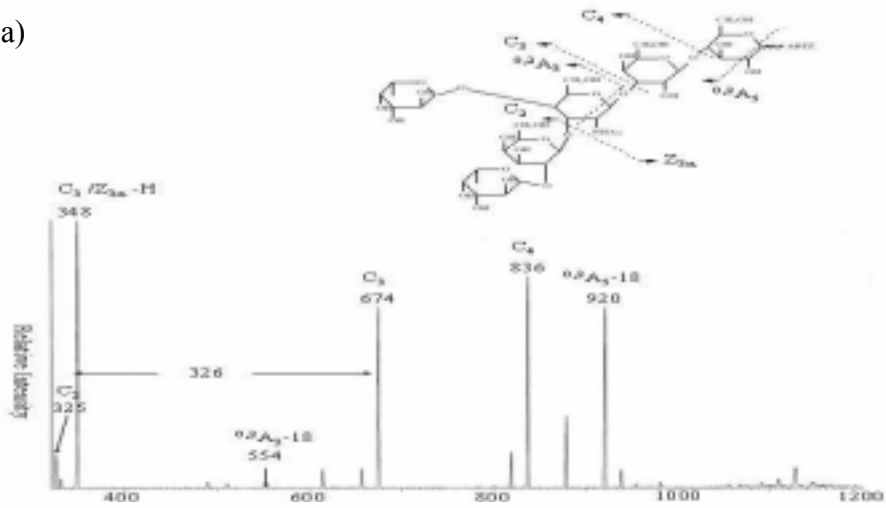
#### 四、計畫成果自評

1. 以負離子/電灑法/質譜/質譜可成功地判定寡醣之鍵結點順序、鍵結點和分支點。
2. 寡醣逐步水解條件之最佳化，成功地判定較長鏈寡醣之鍵結點順序、鍵結點和分支點。
3. 本實驗提出一套分析醣蛋白醣鏈的所有鍵結點與分支點的方法：ABEE閉環標記/液相層析/脫去ABEE閉環標記獲得純的醣鏈後，再經由逐步水解得到較小的寡醣，及ABEE閉環標記-質譜/質譜和質譜/質譜/質譜分析可將醣蛋白醣鏈的所有鍵結點及分支點解開。

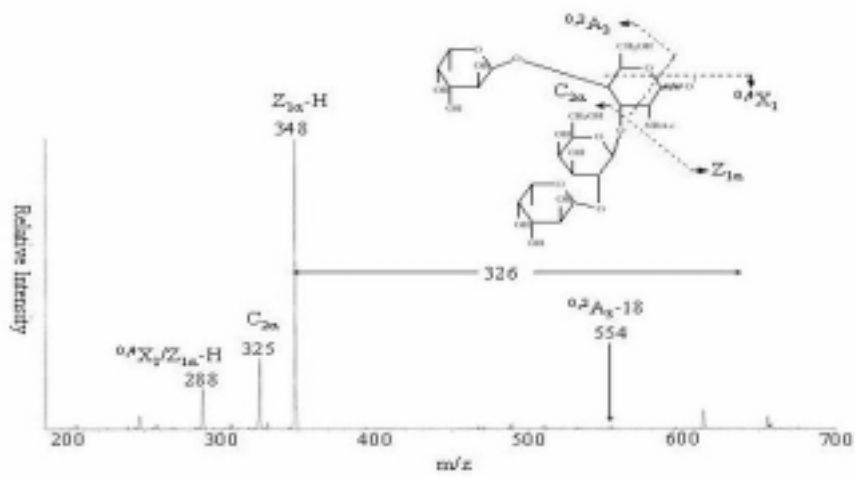
#### 五、參考資料

1. A. Varki, *Glycobiology* **3**, 97 (1993).
2. N. Sharon and H. Lis, *Science* **227** (1989).
3. N. Sharon and H. Lis, *Science* **82** (1993).
4. R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96**, 683 (1996).
5. T. A. Springer, *Nature* **346**, 425 (1990).
6. L. A. Lasky, *Science* **258**, 964 (1992).
7. S. Ratner, *Invasion Metastasis* **12**, 61 (1992).
8. J. M. White, *Curr. Biol.* **3**, 596 (1993).
9. D. T. Li and G. R. Her, *Anal. Biochem.* **19**, 250 (1993).
10. G. Reuter, H. Gabius, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **377**, 325 (1996).
11. R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **89**, 6338, (1992).
12. L.D. Cahan, J.C. Paulson, *Virology* **103**, 505, (1980).
13. T. Stehle, Y. Yan, T.L. Benjamin, S.C. Harrison, *Nature* **369**, 160, (1994).
14. L.D. Power, D. Sgroi, E.R. Sjoberg, I. Stamenkovic, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **268**, 7019, (1993).
15. W. Weis, J.H. Brown, S. Cusack, J.C. Paulson, J.J. Skehel, D.C. Wiley, *Nature* **333**, 426, (1988).
16. G.R. Hayes, A.M. Williams, J.J. Lucas and C.A. Enns *Biochemistry* **36**, 5276 (1997).
17. E. Landberg, P. Pahlsson, A. Lundblad, A. Arnetorp and J.O. Jeppsson *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 267 (1995).
18. G. Spik, V. Debryne, J. Montreuil, H. van Halbeek and J.F.G. Vliegthart *FEBS* **183**, 65 (1985).
19. W. Mo, T. Takao, H. Sakamoto, Y. Shimonishi, *Anal. Chem.* **70**, 4520 (1998).
20. D.M. Sheeley, V. N. Reinhold, *Anal. Chem.* **70**, 3053 (1998).
21. 鄭杏玲，博士論文，發色團閉環標記/負離子電灑法-質譜/質譜分析醣蛋白寡醣之結構，(2002)。

(a)



(b)



(c)

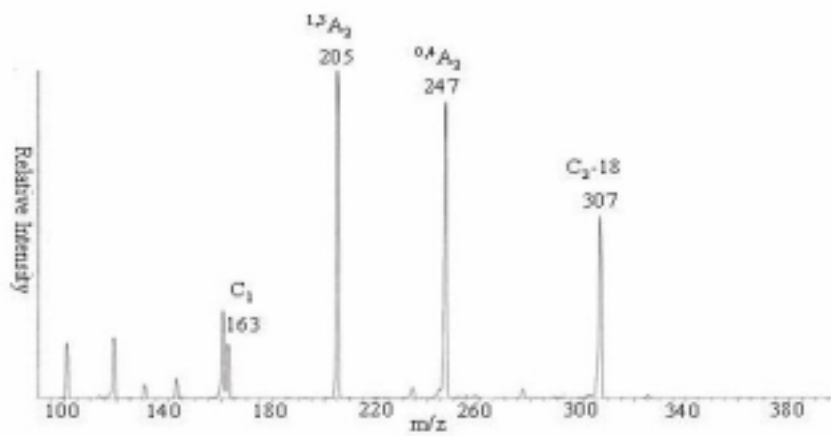


圖 1 ABEE 閉環標記-LNDFH (a)質譜/質譜， $m/z$  1146 (b)質譜/質譜/質

譜， $m/z$  1146 $\rightarrow$ 674 $\rightarrow$  (c) 質譜/質譜/質譜， $m/z$  1146 $\rightarrow$ 325 $\rightarrow$ 。

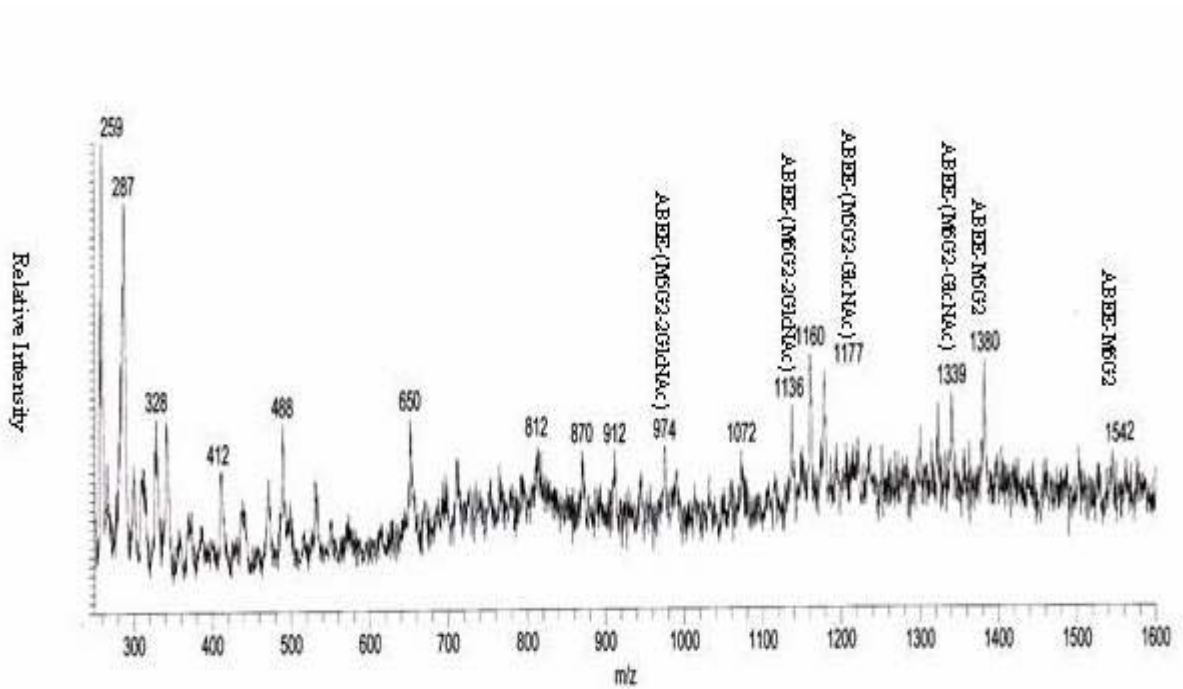


圖 2 核糖核酸酶 B 的醣鍵經 20 mM NaOH, 60 °C 反應 8 小時，繼以 ABEE 閉環標記之結果。



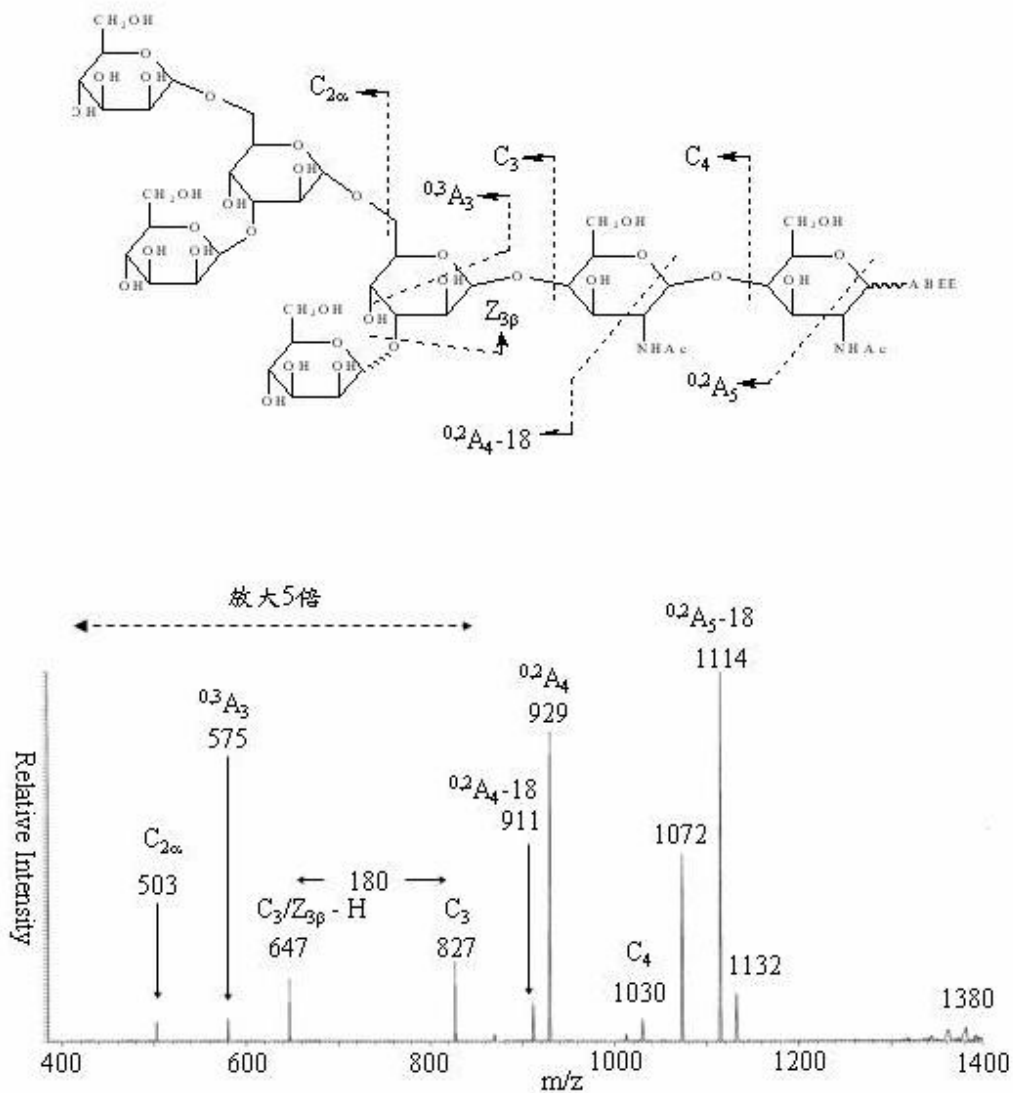


圖 3 ABEE 閉環標記的完整 M5G2 的質譜/質譜， $m/z$  1380。

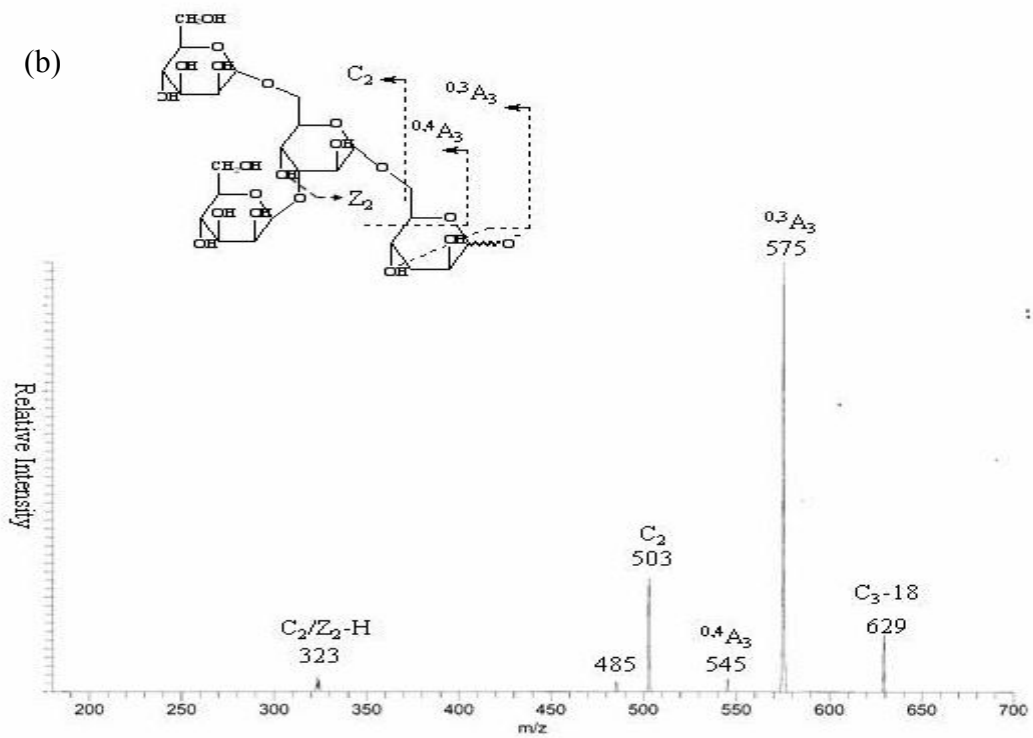
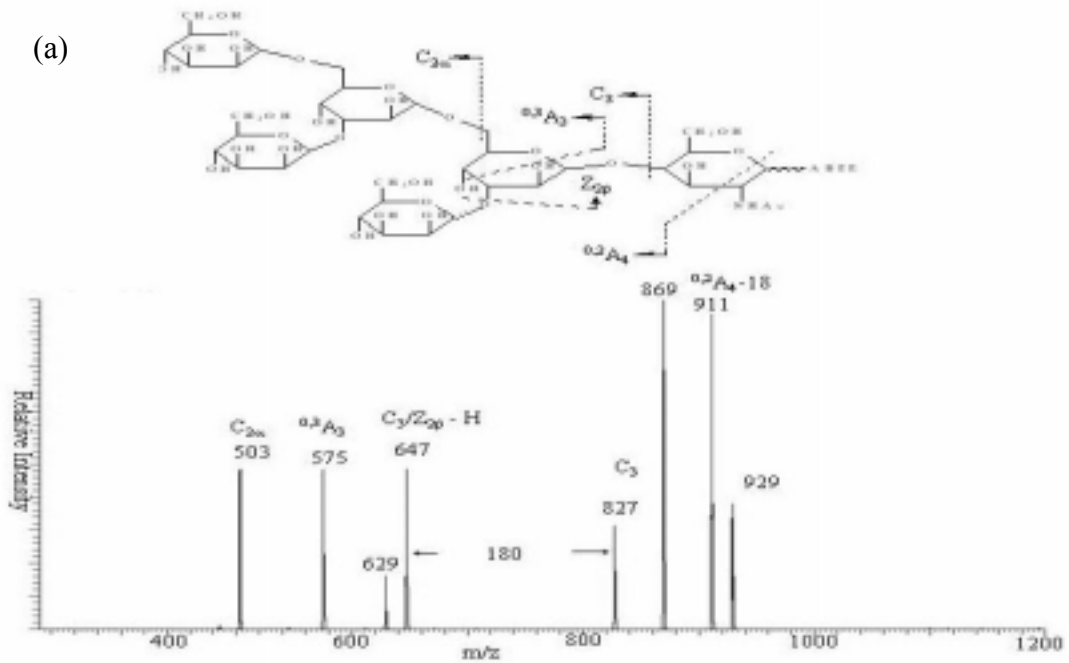


圖 4 ABEE 閉環標記的 M5G2-GlcNAc (a)質譜/質譜,  $m/z$  1177 (b)質譜/質譜,  $m/z$  1177 $\rightarrow$ 647 $\rightarrow$ 。

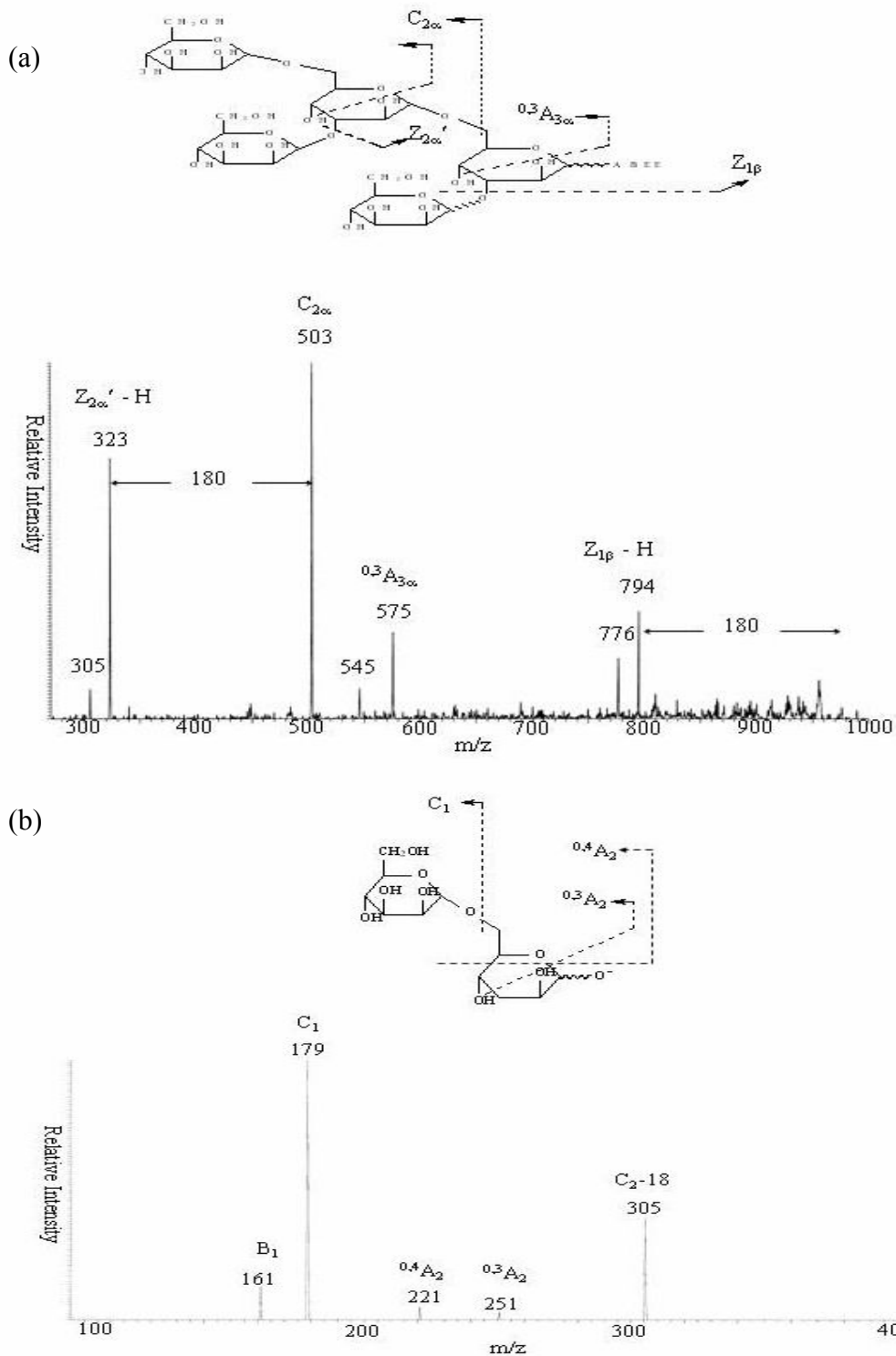


圖 5 ABEE 閉環標記的 M5G2-2GlcNAc(a)質譜/質譜，m/z 974 (b)質譜/質譜，m/z 974→323→。

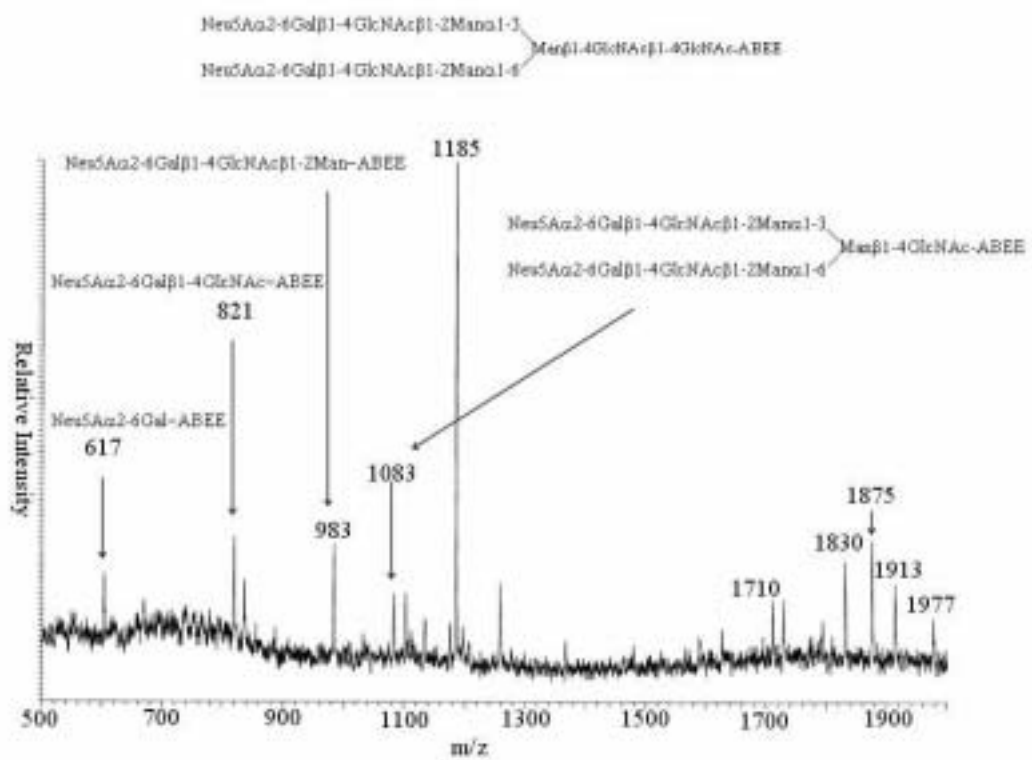


圖 6 切糖的緩衝液換成 1 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，運鐵蛋白糖鏈切下後，以 C18 固相萃取管柱純化，再形成 1,3-β-噁唑啉保護衍生物、經驗水解、最後以 ABEE 閉環標記衍生化之結果。

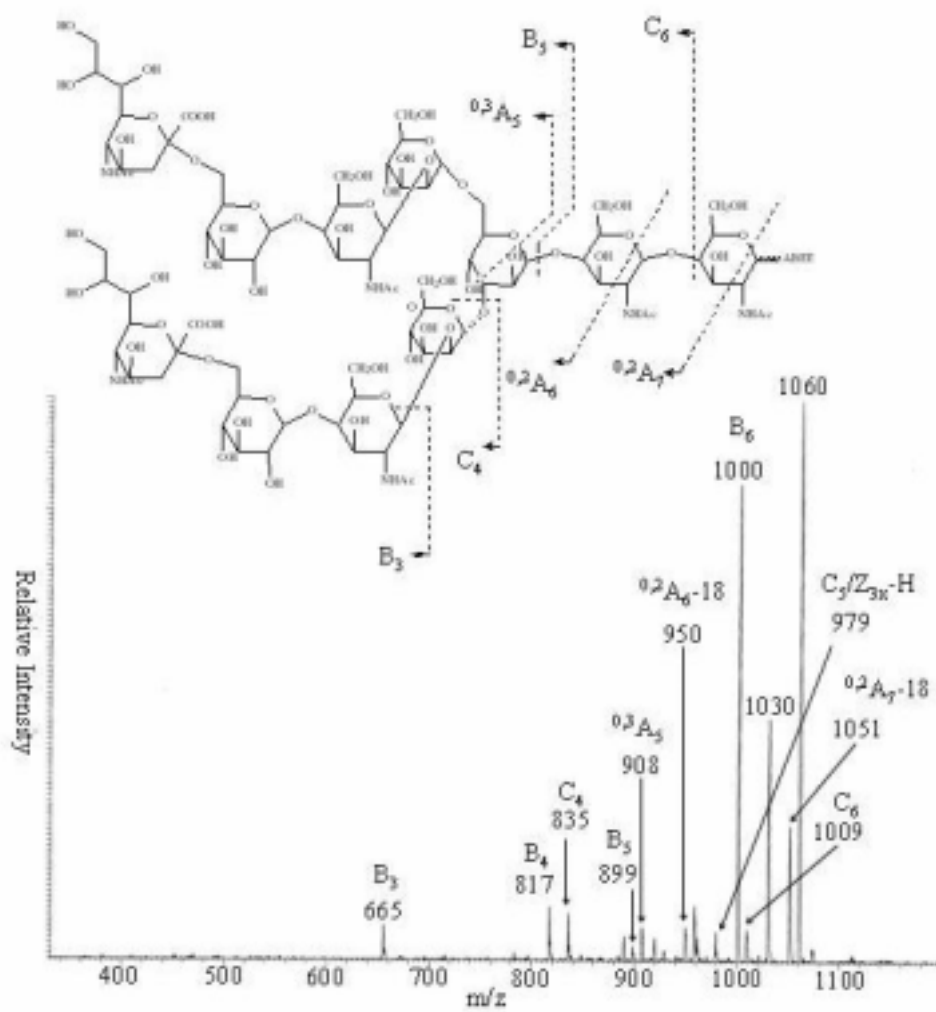
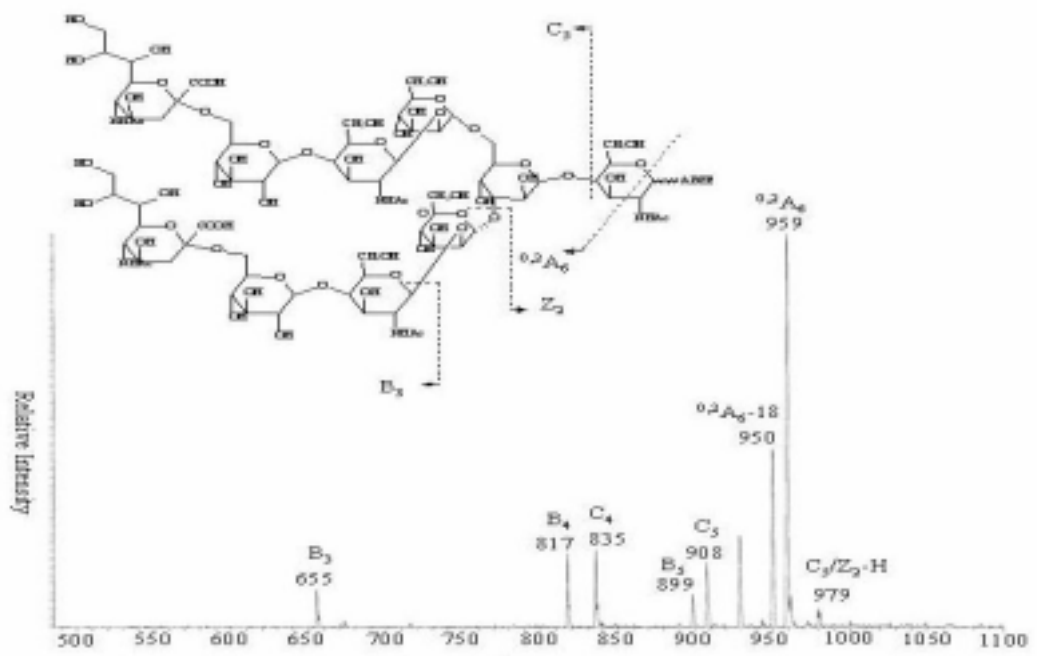


圖 7 ABEE 閉環標記-A2 的質譜/質譜，m/z 1185。

(a)



(b)

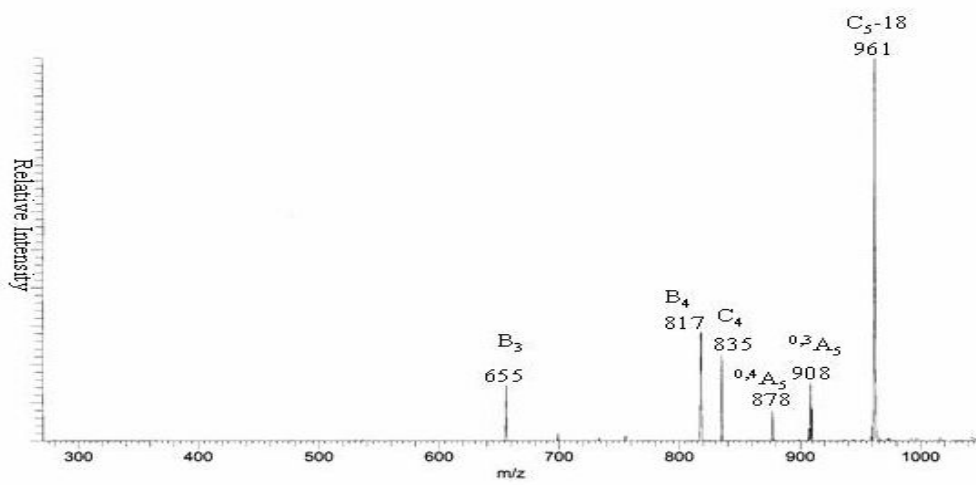


圖 8 ABEE 閉環標記-(A2-GlcNAc) (a)質譜/質譜， $m/z$  1083 (b) 質譜/質譜/質譜， $m/z$  1083 $\rightarrow$ 979 $\rightarrow$ 。

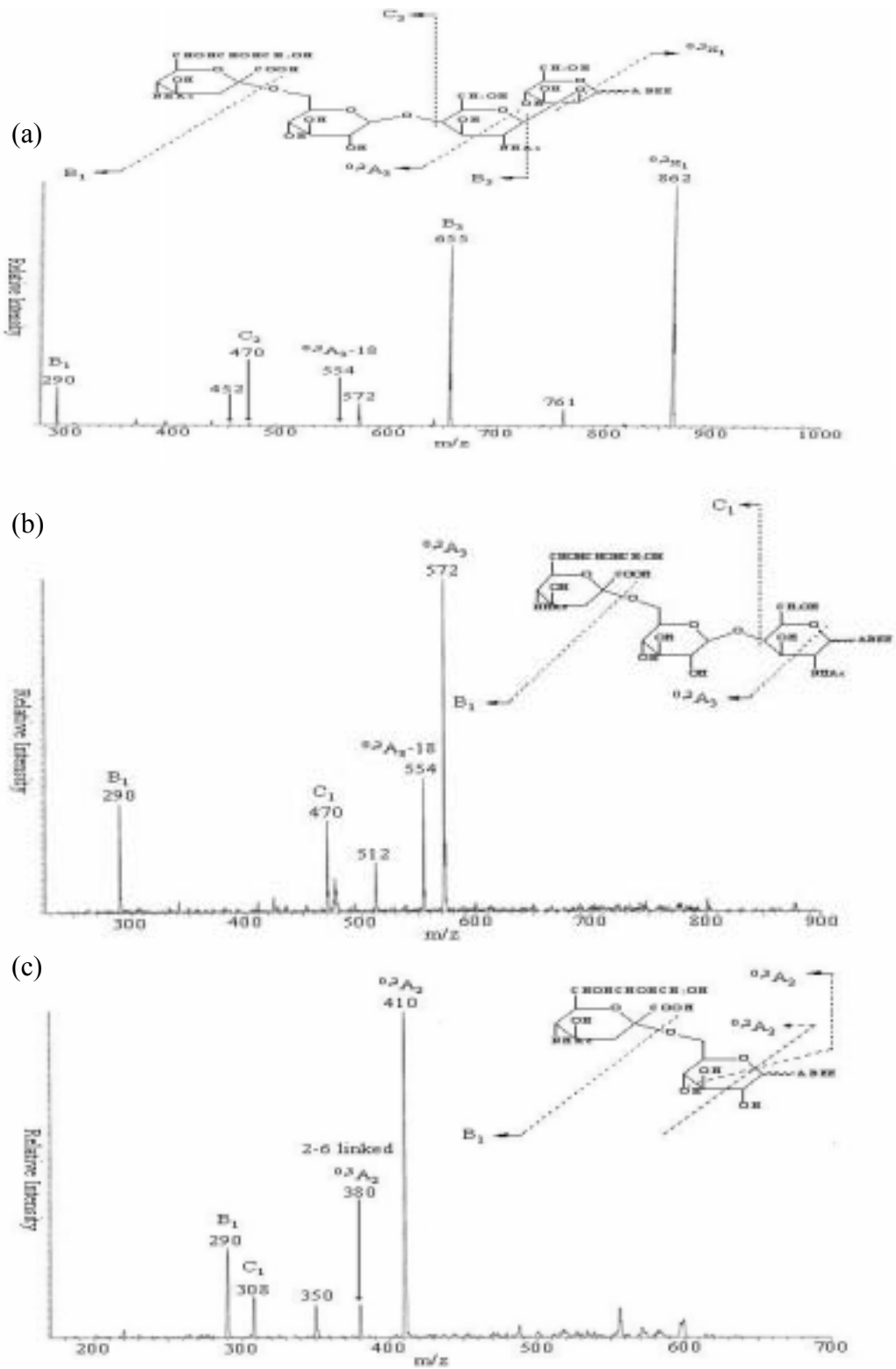


圖 9 (a) ABEE 閉環標記-(A2 的支鏈)的質譜/質譜， $m/z$  983。

- (b) ABEE 閉環標記-(A2 的支鏈-Gal)的質譜/質譜，m/z 821。
- (c) ABEE 閉環標記-(A2 的支鏈-Gal-GlcNAc)的質譜/質譜，m/z 617。

表 1 ABEE 閉環標記-直鏈寡糖的特徵裂解離子。

	還原端的特徵裂解離子	還原端以外的特徵裂解離子
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, $^{0,2}A, ^{0,3}A, ^{0,4}A$

\* 由於缺乏 1-2 鍵結之標準品，還原端的特徵裂解離子是依據 1-2 鍵結之 ABEE 閉環標記雙糖的特徵裂解離子作預測，而還原端以外的特徵裂解離子是依據 ABEE 閉環標記-LDFT 作預測。

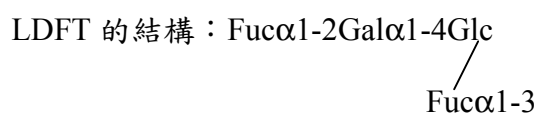


表 2 鍵結點在分支點的特徵裂解斷裂

鍵結點	同在分支點上的鍵結	特徵裂解斷裂
1-3	1-4 or 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 電子捕捉大氣壓下化學離子化法於血漿中西藥成分之分析

### 一、摘要

本研究針對 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進行電子捕捉離子化反應的情形。以 Nabumentone 及 Testosterone 為分析物，觀察其 PFPH-衍生物的反應。結果顯示在負離子大氣壓化學離子化模式( negative APCI )下，PFPH-衍生物皆生成 [ M-20 ]<sup>-</sup> 離子，此現象和傳統低壓下所進行 ECNCI 的結果類似。Nabumentone-PFPH 及 Testosterone-PFPH 之偵測極限分別為 500fg 及 1pg (SIM mode)，和未衍生分析物在正離子大氣壓化學離子化(positive APCI)下比較，靈敏度提升了 300 及 25 倍，和正離子電灑法(positive ESI)比較，靈敏度提升了 30 及 5 倍。此外，本研究以人類血漿為基質，探討 PFPH-衍生物在負大氣壓化學離子化模式下之基質效應(matrix effect)，並將此技術實際應用於血漿中 Nabumentone 及 Testosterone 之分析。其中 Nabumentone 方法偵測極限可達 0.1 ng/ml，血漿中內生性的 Testosterone 亦可清楚偵測。

**關鍵字:** carbonyl 化合物、電子捕捉、質 PFPH-衍生物。

### Abstract:

Two carbonyl drugs, nabumetone and testosterone, were derivatized with pentafluorophenyl hydrazine (PFPH) and the resulted PFPH-derivatives were analyzed with a Z-spray atmospheric pressure chemical ionization source in negative ion mode. The PFPH-derivatives performed the dissociative electron capture in negative ion APCI (ECAPCI) and very intense [M-20]<sup>-</sup> ions were observed. Sub-pg detection limits of nabumetone-PFPH (0.5 pg) and testosterone-PFPH (1.0 pg) were obtained in selected ion monitoring detection mode. The PFPH-derivatives in ECAPCI gave 300-fold and 25-fold lower detection limits than the underivatized drugs in positive ion APCI mode and gave 30-fold and 5-fold lower detection limits than the underivatized drugs in positive ion ESI mode. The sensitivity over positive ion ESI is less significant in comparison with the positive ion APCI. However, the PFPH-derivatives exhibited significant higher tolerance to the plasma matrix than the underivatized drugs in positive ion ESI mode. The LC/ECAPCI/MS/MS method was applied to the analysis of nabumetone and testosterone spiked into the human plasma. Detection limit of nabumetone in plasma was achieved at 0.1 ng/ml. The endogenous testosterone in blank plasma samples was clearly detected and its concentrations were estimated to be in the range of 0.2-6.7 ng/ml.

**Key words:** carbonyl, electron capture, PFPH-derivatives.

## 二、緣由與目的

大氣壓下化學離子化法( atmospheric chemical ionization, APCI )是目前應用相當廣泛的一種大氣壓下離子化法，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，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。除了大氣壓下化學離子化法，電灑法亦是應用相當廣泛的一種大氣壓下離子化法。然而對於結構中無強帶電官能基之化合物容易發生靈敏度不佳的結果，其電灑訊號亦相對的易受其他物質的抑制作用。

本研究針對 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進行電子捕捉離子化反應的情形。並將此技術實際應用於血漿中 Nabumetone 及 Testosterone 之分析。

## 三、結果與討論

圖 1.是 nabumetone 和 testosterone 的 PFPH-衍生物在正、負離子 APCI 條件下所得到的質譜圖，由圖中看來，PFPH-衍生物無論在正、負離子 APCI 下都可以得到不錯的離子訊號。在正離子 APCI 下，nabumetone-PFPH 和 testosterone-PFPH 生成訊號很強的 $[M+H]^+$ 離子(圖 1. (a), (c))，顯見 PFPH-衍生物具有不錯的質子親和力，此 $[M+H]^+$ 的準分子離子亦確認了 PFPH-衍生物的存在。在負離子 APCI 下，nabumetone-PFPH 和 testosterone-PFPH 主要生成 $[M-20]^-$ 的離子，參考文獻上有關 pentafluoropropionic 衍生物在傳統 ECNCI 的結果，我們推測此 $[M-20]^-$ 的離子可能是由 PFPH-衍生物進行解離式電子捕捉反應，先生成 $[M]^-$ 後再脫去一 HF 分子而得到 $[M-HF]^-$ 的離子圖 2. 是 nabumetone-PFPH 及 testosterone-PFPH 在選擇離子偵測模式下的偵測極限，其中 nabumetone-PFPH 的偵測極限約 0.5 pg (m/z 388)而 testosterone-PFPH 的偵測極限約 1.0 pg (m/z 448)。

PFPH-衍生化不僅引入電子捕捉基團到分析物的結構上，同時亦引入了高質子親和力的官能基到分析物的結構上，我們在動相中加入 1 mM 的甲酸以促進 PFPH-衍生物在正離子 APCI 下的質子化反應，同時並測試其在正離子 APCI 下的偵測極限。表 1.列出了未衍生 nabumetone、testosterone 及其 PFPH-衍生物在

不同模式下，我們所測得的偵測極限。比較 PFPH-衍生物在負離子 APCI 下和未衍生分析物在正離子 APCI 下的偵測極限，nabumetone-PFPH/APCI 比 nabumetone/APCI<sup>+</sup> 低了近 300 倍而 testosterone-PFPH/APCI 比 testosterone/APCI<sup>+</sup> 低了近 25 倍。和未衍生分析物在正離子 ESI 下的偵測極限相比，nabumetone-PFPH/APCI 比 nabumetone/ESI<sup>+</sup> 低了近 30 倍而 testosterone-PFPH/APCI 比 testosterone/ESI<sup>+</sup> 低了近 5 倍。PFPH 衍生物在正離子 APCI 下的偵測極限約比 PFPH 衍生物在正離子 APCI 下的偵測極限高了約 3 倍，但仍比未衍生分析物在正離子 APCI 下的偵測極限低得多，和未衍生分析物在正離子 ESI 下的偵測極限相比則差距較小。

我們接著嘗試在 LC/MS/MS 的系統上將 PFPH-衍生化/ECAPCI 的方法應用於血漿中 nabumetone 和 testosterone 的分析。圖 3. 是在 LC/MS/MS 系統中以 PFPH-衍生化/ECAPCI 分析血漿中 nabumetone 的質量層析圖，其 SRM 的離子對設定為 m/z 388>164，其中在 5 ng/ml 的濃度時，可看出 nabumetone-PFPH 的結構異構物被層析管柱分開為兩支訊號峰(圖 3. (b))，方法的偵測極限可達 0.1 ng/ml(圖 3. (c))，同時以分析物面積對添加濃度製作標準曲線，在 0.1-12.5 ng/ml 的範圍得到不錯的線性關係。圖 4. 是分析血漿中 testosterone 的質量層析圖(m/z 448>448)，在濃度 12.5 ng/ml 時可見到 testosterone-PFPH 的異構物被分開成為兩支訊號峰分別在 8.8 min 及 9.4 min 的滯留時間，圖 4. (d)是我們所使用空白血漿的質量層析圖，在 8.76 min 及 9.4 min 測得兩支訊號峰，其中 8.76 min 的訊號可能主要來自內生性的干擾物，而 9.4 min 的訊號則可能是來自內生性的 testosterone。我們以 9.4 min 訊號峰的面積對所外加的 testosterone 濃度製做標準曲線，在 0.1-12.5 ng/ml 的範圍亦得到不錯的線性。

#### 四、計畫成果自評

1. 合成 nabumetone 和 testosterone 的 PFPH-衍生物(hydrazones)在負離子 APCI 下可進行電子捕捉反應生成[M-20]<sup>-</sup>離子，在正離子 APCI 下亦可進行一般的質子化反應生成[MH]<sup>+</sup>離子。
2. nabumetone 和 testosterone 的 PFPH-衍生物(hydrazones)在負離子 APCI 下的偵測極限約 0.5 -1 pg，在正離子 APCI 下的偵測極限約 1.6 -3.3 pg。
3. 以 PFPH-衍生化/ECAPCI 分析血中 nabumetone 在正、負離子 APCI 下其方法偵測極限皆可達 0.1 ng/ml。同時在 0.1-12.5 ng/ml 的範圍亦皆可得到良好的線性。
4. 以 PFPH-衍生化/ECAPCI 分析血中 testosterone 在正、負離子 APCI 下其方法偵測極限分別為 1 ng/ml 及 0.1 ng/ml。在負離子 APCI 下，0.1-12.5 ng/ml 的範圍亦可得到良好的線性。

## 五、參考資料

1. A. P. Bruins, Trends Anal. Chem., 1994, 13, 37.
2. S. Bajic, D. R. Doerge, S. Lowes, and S. Preece, Am. Lab., 1993, 25(2), 40B.
3. R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, Anal. Chem., 2000, 72, 563.
4. R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 2000, 11, 942.
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. Legrand, C.; Dousset, B.; Tronel, H.; Belleville, F.; Nabet, P. J. Chromatogr. B, 1995, 663, 187-192.
7. Choi, M. H.; Chung, B. C.; Kim, M.; Choi, J.; Kim, Y. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1998, 12, 1749-1755.

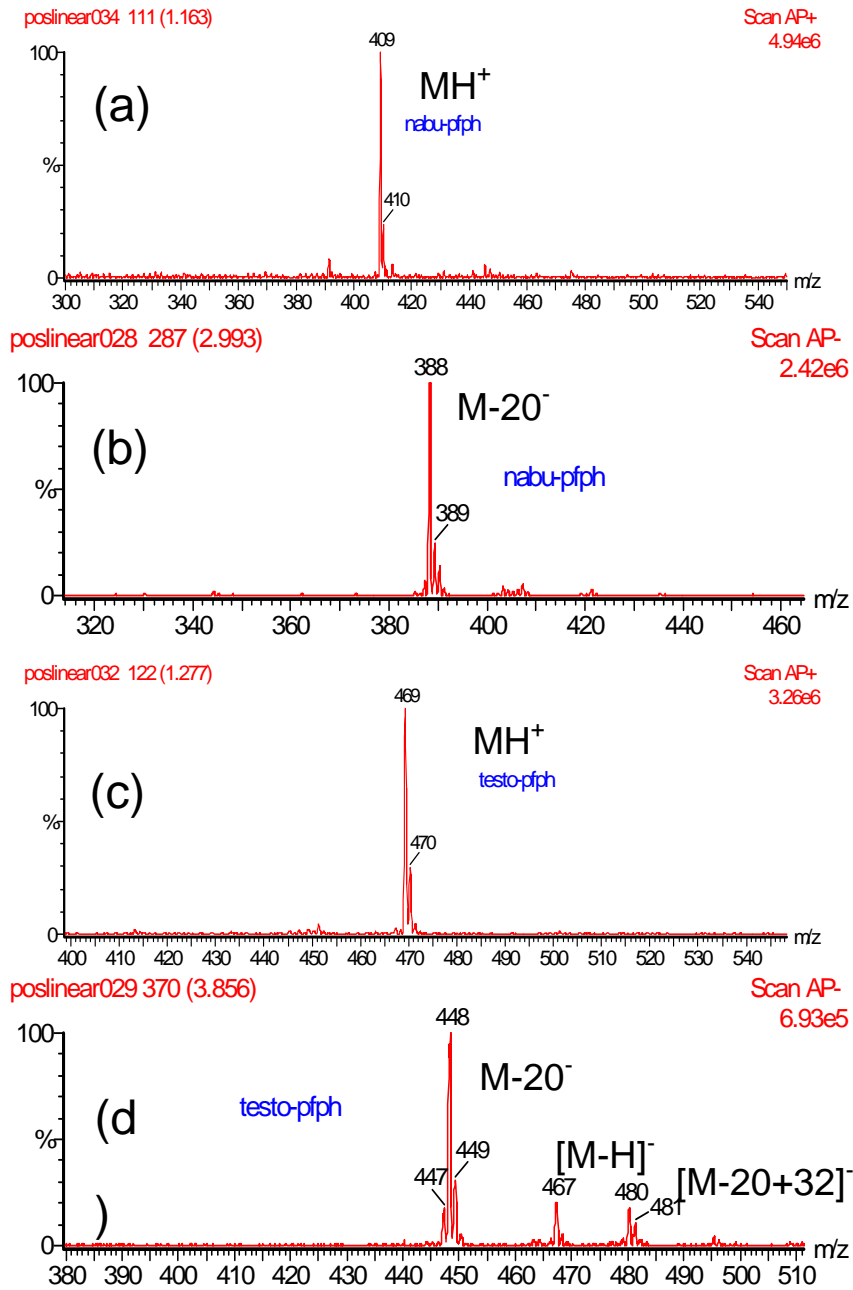


圖1. PFPH-衍生物之正、負離子APCI質譜圖。

- (a) Nabumetone-PFPH in positive APCI.
- (b) Nabumetone-PFPH in negative APCI.
- (c) Testosterone-PFPH in positive APCI.
- (d) Testosterone-PFPH in negative APCI.

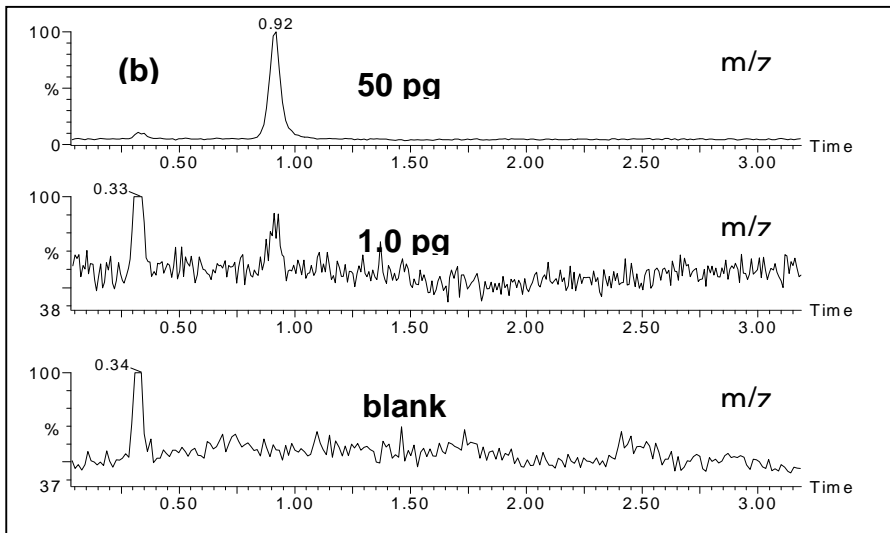
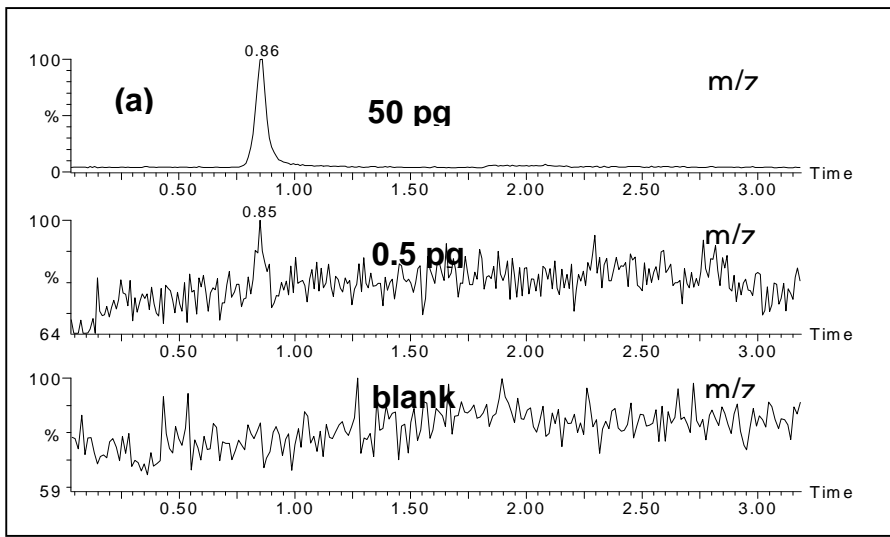


圖2. Nabumetone-PFPH及testosterone-PFPH之負離子  
APCI偵測極限(SIM mode)，(a) nabumetone-PFPH、  
(b) testosterone-PFPH。

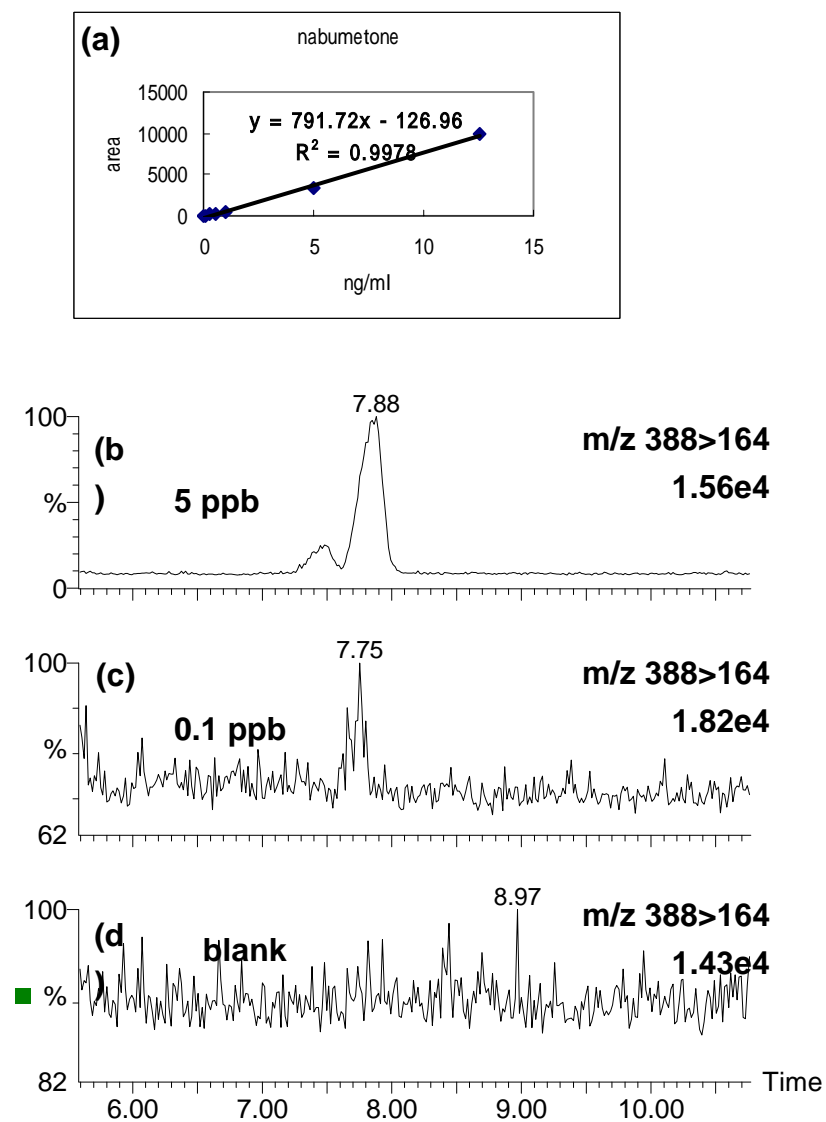


圖3. PFPH-衍生化/LC/ECAPCI/MS/MS分析血漿中nabumetone之離子層析圖。(a)標準曲線(0.1-12.5 ng/ml)，(b)濃度5 ng/ml之血樣，(c)濃度0.1 ng/ml之血樣，(d)空白血樣。

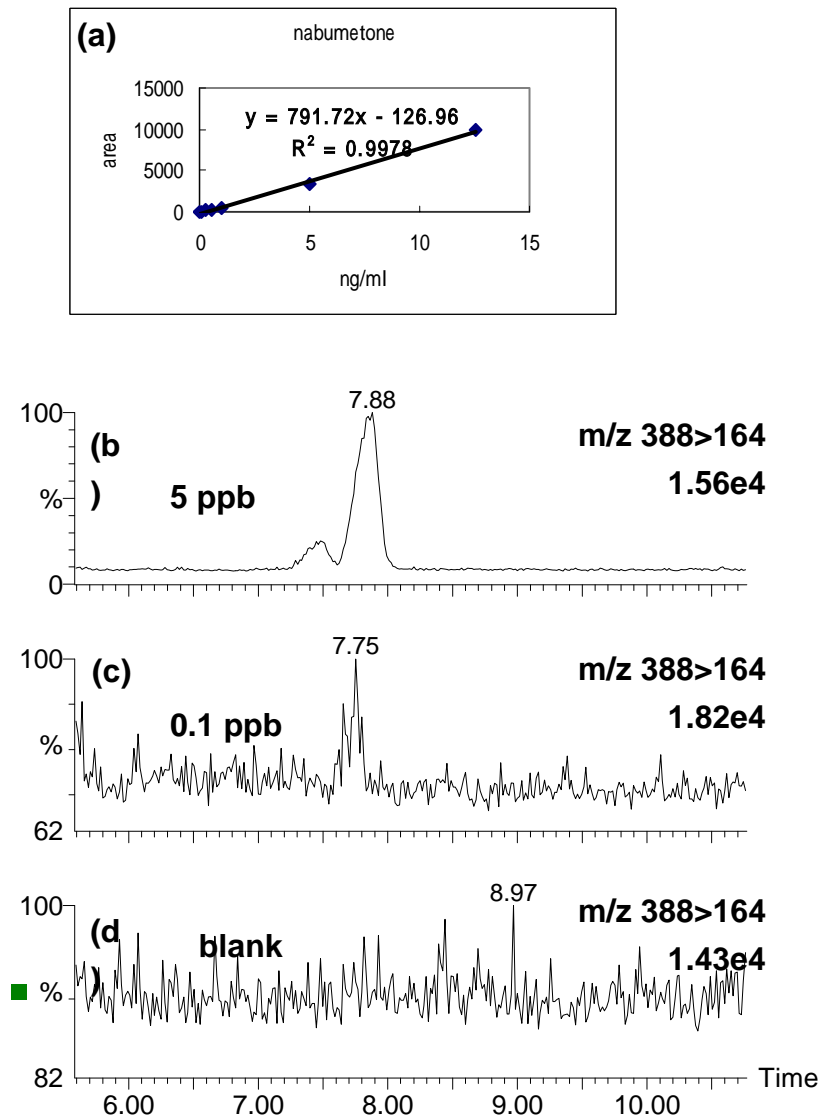


圖4. PFPH-衍生化/LC/ECAPCI/MS/MS分析血漿中nabumetone之離子層析圖。(a)標準曲線(0.1-12.5 ng/ml)，(b)濃度5 ng/ml之血樣，(c)濃度0.1 ng/ml之血樣，(d)空白血樣。



**表1. 未衍生藥物及其PFPH-衍生物在不同離子化模式下之偵測極限。**

	APCI <sup>-</sup>	APCI <sup>+</sup>	ESI <sup>+</sup>
Nabumentone-STD		150 pg	15 pg
Nabumentone-PFPH	0.5 pg	1.67 pg	
Testosterone-STD		25 pg	5 pg
Testosterone-PFPH	1 pg	3.33 pg	

## Part. D 多重毛細管電泳/質譜儀介面之發展

### 一、摘要

除了有效正確的鑑定樣品之外，如何快速的完成樣品分析，長久以來一直是化學家努力的方向之一。而組合化學、人類基因圖譜計畫及蛋白質體學的迅速發展，更增加了快速和高通量樣品分析的需求。毛細管電泳/質譜儀對樣品的分析，因具有微量、高分離效率、快速分離和高定性能力而受到重視。為了進一步增加分析通量，縮短樣品平均分析時間，多重毛細管電泳/電灑法質譜儀是其中的一種選擇。

本設計使用四根鞘流式電灑探針在質譜儀進樣孔前各互呈 90° 十字型上下左右並列，質譜儀進樣孔和電灑探針之間，配置一片金屬圓轉盤，盤上開一缺口。藉由步進馬達帶動圓轉盤上缺口轉至各對應電灑探針位置，停留一段時間以掃描質譜，而轉盤則跟隨質譜訊號做同步連線運轉。因此使得電灑離子只能在缺口對到電灑探針時，才能通過轉盤進入質譜儀分析，其餘未對應至缺口之探針的離子則會被轉盤擋住而無法被質譜儀偵測。

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電泳質譜訊號，達到省時、高通量的目標。

**關鍵字:** 高通量、毛細管電泳質譜、電灑法。

### Abstract:

In addition to the sample characterization, chemists also have their interests in high-speed and high-throughput analytical technique development. The current advances in combinatorial chemistry and the Human Genome Project have brought increasing demands on the speed and throughput of the analytical systems. Capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS) has been recognized as a powerful method because it provides rapid, high-resolution, sensitive separations and ability of qualification for small sample. In order to increase the throughput and minimize the average analysis time, multiplexed capillary electrophoresis/mass spectrometry 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. There is a 90° opening on this shielding disk. While the disk is rotating, the samples from different capillary electrophoresis are electrosprayed from the four different probes. As a result, sample can only be analyzed when the wedged entrance stop in front of the probe, otherwise, it is blocked and not detected. By connecting the signal from the mass spectrometer to our device, the scan event and the movement of the rotating disk can be synchronized. The results demonstrated that this interface could be used in multiplexed capillary electrophoresis/mass spectrometric analysis and the throughput was increased by a factor of 4.

**Keywords:** High-throughput, Capillary electrophoresis/mass spectrometry, CE/MS, Electrophoresis.

### 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。在組合化學快速的發展下，大量的樣品被合成出來而需要被純化和鑑定評估，人體基因計畫也使得大量的基因需要被定序，因此，為了因應這樣的需求，更快速、高通量且精密準確的分析方法也不斷的被發展和更新。在縮短分析

所需的時間，以及樣品的前處理步驟之外，使用多重樣品同時平行分析的技術，可以縮短了單一樣品的分析時間。

液相層析/質譜儀常用在藥物分析上，並有卓越的成果，而多重高效率液相層析/質譜儀之介面串連技術已有多篇論文發表，配合特定儀器規格的商業化產品也可以購得。在 DNA 片段的定序以及蛋白質體學分析上常用的毛細電泳技術，在多重毛細管同時分析的技術卻仍然停留在光學偵測，多重毛細管電泳/質譜儀介面上，至今仍未有完整的論文報導，因此雖然在平均樣品分析時間上可以大幅度的縮短，卻不免在定性上有所捨棄。為了快速而正確的鑑定樣品的成份，有必要建立一套多重毛細電泳/質譜儀分析系統，以加快研究發展的速度。

### 三、結果與討論

傳統上，毛細管電泳電灑質譜儀介面在同一段時間內僅能蒐集單一管的分析量，其設置為將電灑探針正列於質譜儀進樣口前；為了達到更高的分析通量，發展了多重毛細管電泳電灑質譜儀介面。要使多根毛細管同時進行電泳分析及蒐集，介面設置為自行組裝四組具鞘流介面的毛細管電泳電灑探針，將其並列於質譜儀的進樣口前，由於四根要在不同時間被質譜儀偵測，因此利用一金屬遮蓋轉盤，盤上開一小口，當開口轉至對應的電灑探針前，電灑離子才能通過轉盤進入質譜儀的進樣口被偵測，如圖 1 所示，每掃描一次對應到一根毛細管，每一次的掃描分配給一張電泳圖，例如：第一個掃描，轉盤開口對到第一根，掃描的圖譜歸到第一張電泳圖；第二個掃描，轉盤開口對到第二根，掃描的圖譜歸到第二張電泳圖。依序輪流掃描，第一根、第二根、第三根、第四根、第一根、...如此馬達每轉一圈共蒐集到每一根的一個掃描，最後可收到四根毛細管的四張電泳圖。除此之外，配合自寫控制軟體、馬達驅動硬體以及質譜儀軟體設定，完成多重毛細管電泳質譜儀介面的設置。

首先，以雙重毛細管電泳做實驗測試，即單一毛細管電灑配合質譜儀掃描兩個 Event，以注射針連續注入含 Niflumic acid ( $[M+H]^+=283$ ) 標準品於毛細管，在另一個 Event 的位置不放置電灑探針。程式設定馬達每次轉動 800 步，即半圈，轉動速度為 100,000 steps/s、加速度為 100,000 steps/s<sup>2</sup>，判斷中斷時間 300 毫秒。質譜儀設定部分，掃描模式為全圖譜掃描(Full Scan)，離子最大進樣時間為 300 毫秒，最大離子進樣量  $5 \times 10^7$ ，三個微掃描合成一個掃描，掃描質量範圍為 300Da，Event 1：100~400Da，Event 2：101~401Da。這樣的設定是為了將二重毛細管的數據收在同一個檔案時，可以讓質譜儀分辨來自於不同 Event 的數據，因此於質譜儀收數據的方法設定中將兩個 Event 的掃描質量範圍設定為不同的區間。測試結果顯示二重毛細管電泳電灑質譜儀介面可以成功的蒐集分析物訊號，且兩根毛細管的訊號不互相干擾。

如圖 2 顯示，二重毛細管電泳電灑質譜分析混合樣品的結果，其中各毛細管皆注入兩種標準品的混合樣品，分別為 Keyopfen ( $[M+H]^+=255$ )、Phenylbutazone ( $[M+H]^+=309$ )及 Sulindac ( $[M+H]^+=357$ )、Prednisolone( $[M+H]^+=361$ )。

在二重毛細管電泳電灑介面有了不錯的測試結果後，我們進一步測試四重毛細管電泳電灑介面。在二重毛細管電泳電灑介面中各電灑探針於圓盤的相對位置互呈 180°，電灑探針的相互距離大於四重電灑探針互呈 90°的距離，導致四重電灑探針交叉干擾的可能性更

高。

因此必須先評估四重毛細管電泳電灑介面的可行性。作法是以單一毛細管電灑探針配合質譜儀掃描四個 Event 設定，以注射針連續注入含 Niflumic acid( $[M+H]^+=283$ )標準品於毛細管。程式上與二重毛細管電泳電灑系統設定不同的是轉盤每次轉動 400 步，也就是四分之一圈，轉動速度為 200,000 steps/s、加速度為 200,000 steps/s<sup>2</sup>，程式判斷中斷時間 300 毫秒。質譜儀設定方面除了改成掃描四個 Event 設定以外，其餘設定均與前個測試實驗相同，各 Event 的質量掃描範圍分別為 Event 1：100~400Da、Event 2：101~401Da、Event 3：102~402Da、Event 4：103~403Da。觀測 60 分鐘的結果，圖譜中無任何交叉干擾與層析圖失序等現象發生，因此得到初步確認四重毛細管電灑的可行性。

接下來我們進行實際四根毛細管電泳電灑質譜的分析。儀器的設置為將四根電灑探針擺設的位置以上下左右的方式環伺於馬達四周。鞘流液體及氣體各用一個一分四的分流接頭連接，各流量皆為單根毛細管電泳電灑質譜介面的四倍，以提供各電灑之需。其餘的程式設定及質譜儀掃描設定皆與前實驗相同。

選擇 8 個標準品來分析，分別為毛細管 1：Caffeine( $[M+H]^+=195$ )、Diazepam ( $[M+H]^+=285$ )，毛細管 2：Sulindac( $[M+H]^+=357$ )、Prednisolone ( $[M+H]^+=361$ )，毛細管 3：Ketoprofen( $[M+H]^+=255$ )、Niflumic acid( $[M+H]^+=283$ )，毛細管 4：Ethoxybenzamide( $[M+H]^+=166$ )、Bucetin( $[M+H]^+=224$ )。結果如圖 3，四根毛細管同時分析的八個標準品訊號分別可被正確的紀錄，且無任何交叉干擾發生。另外，我們更探討各種可能造成交叉干擾的因素，其中包含探針擺放位置、角度、鞘流氣體流速、馬達轉速及轉盤開口角度等。因此提高標準品的濃度，測試一系列濃度最高到 2000ppm，結果如圖示 4，即使在濃度高達為 2000ppm 的圖譜中，仍未觀察到任何明顯的交叉干擾。

#### 四、計畫成果自評

1. 利用質譜儀內部訊號來驅動圓轉盤轉動與質譜儀掃描同步化，確認了多重毛細管電泳電灑質譜儀介面的可行性。
2. 由於質譜儀掃描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。

#### 五、參考資料

1. J. Cohen, D. B. Kassel, Comb. Chem. High Throughput Screen. 1999, 2, 327.
2. L. Zeng, D. B. Kassel, Anal. Chem., 1998, 70, 4380.
3. L. Zeng, L. Burton, K. Yung; B. Shushhan; B. D. Kassel, J. Chromatogr. A, 1998, 749, 3.
4. T. Wang, L. Zeng, T. Strader, L. Burton, B. D. Kassel, Rapid Commun. Mass Spectrom., 1998, 12, 1123.
5. J. Veals, K. Dunn-Meynell, X. Zhang, G. Tucker, K. A. Cox, C. Lin, W. A. Korfmacher, Rapid Commun. Mass Spectrom., 1999, 13, 1991.

6. W. Z. Shou, X. Jiang, B. D. Beato, W. Naidong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15, 466.
7. C. K. V. Pelt, T. N. Corso, G. A. Schultz, S. Lowes, J. Henion, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 582.
8. V. de Biasi, N. Haskins, Organ A. Organ, Bateman R. Bateman, K. Giles, S. Jarvis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 1165.
9. L. Yang, T. D. Mann, D. Little, N. Wu, R. P. Clement, P. J. Rudewicz, *Anal. Chem.*, 2001, 73 (8),1740.
- 10.Y. Shi, P. C. Simpson, J. R. Scherer, D. Wexler, C. Skibola, M. T. Smith, R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, 1999, 71 (23), 5354.
- 11.B. Zhang, H. Liu, B. L. Karger, and F. Foret, *Anal. Chem.*, 1999, 71 (15), 3258.
- 12.G. Nicholson, E. Bayer, A. von Brocke, *Electrophoresis*, 2001, 22, 1251.
- 13.吳明輯，多重毛細管電泳/離子阱質譜儀界面之研究 碩士論文 國立台灣大學化學研究所（2001）
- 14.李福安，四重毛細管電泳/離子阱質譜儀介面之研製 碩士論文 國立台灣大學化學研究所（2002）

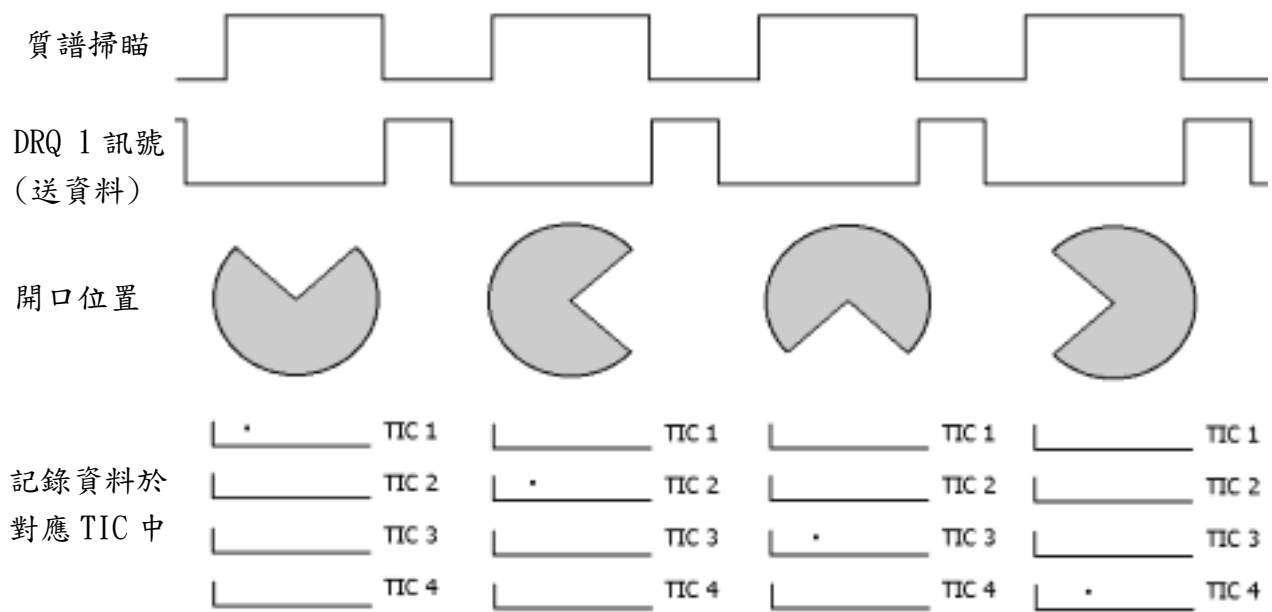
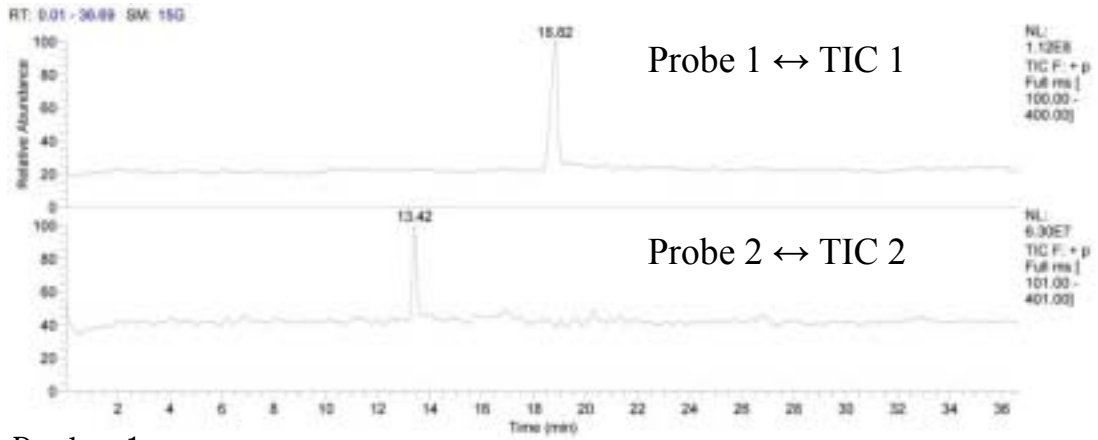
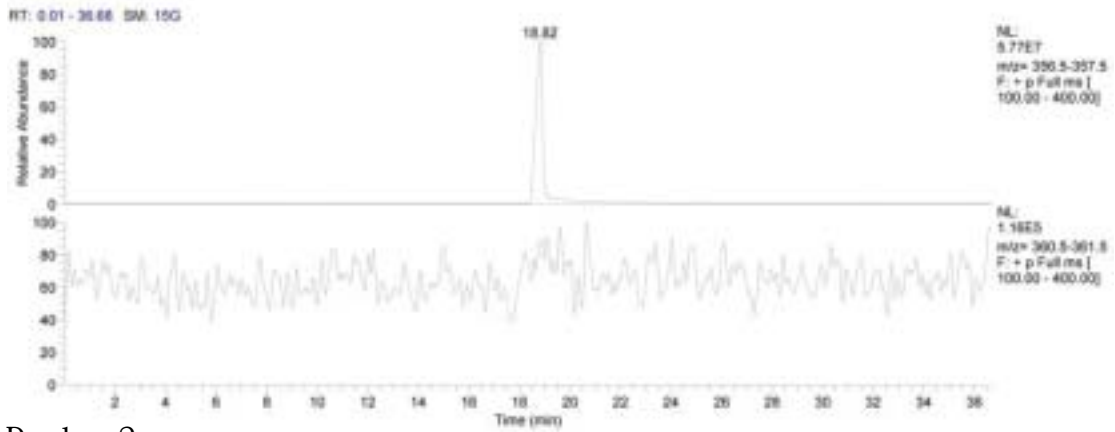


圖 1 訊號與圓盤運動示意圖。

(a) TIC



(b) Probe 1



(c) Probe 2

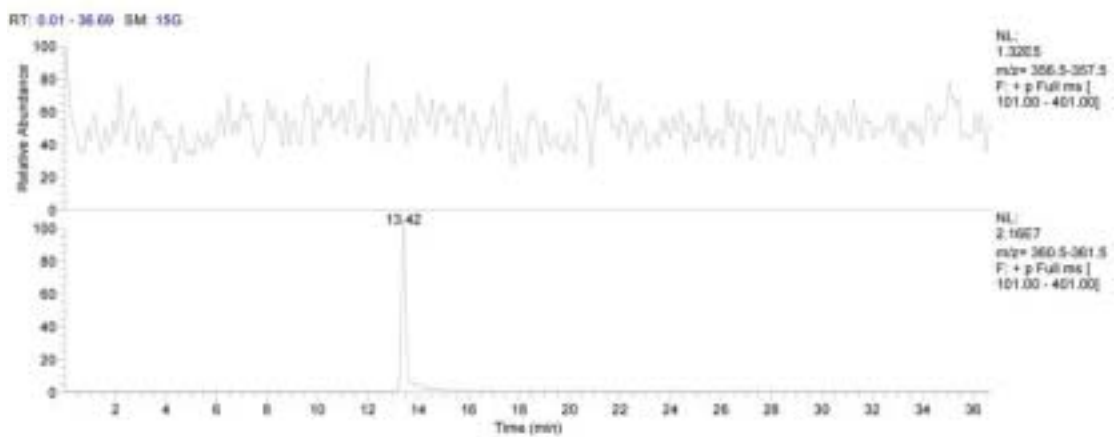


圖 2 二重毛細管電泳電灑質譜同步分析。(a)各管的 TIC 圖，(b)第一張 TIC 中抽出的兩個標準品離子電泳層析圖，(c)第二張 TIC 中抽出兩個標準品離子的電泳層析圖。

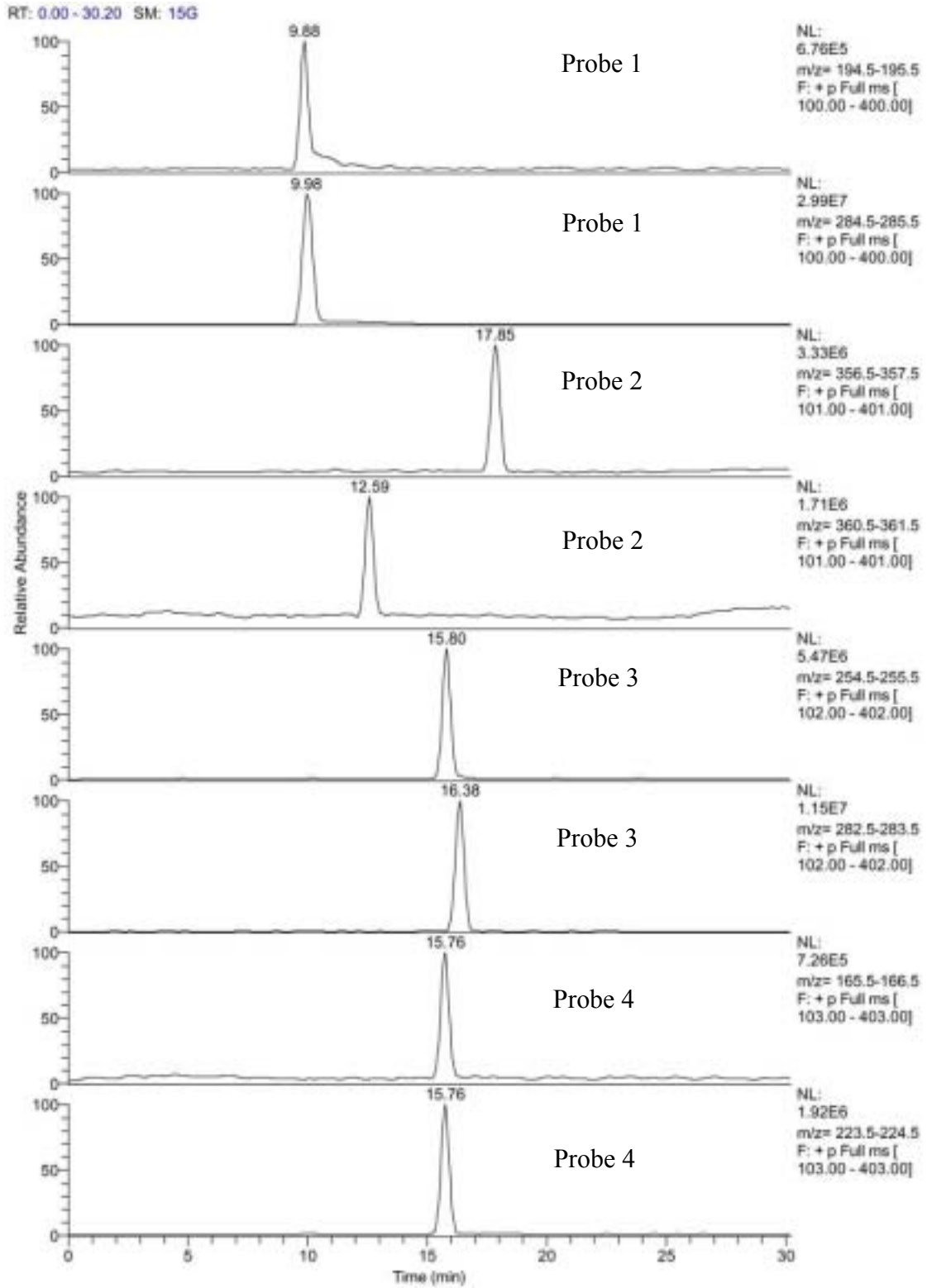


圖 3 四重毛細管電泳電灑質譜分析混合樣品，各管中觀看 8 個標準品分子離子電泳層析圖。



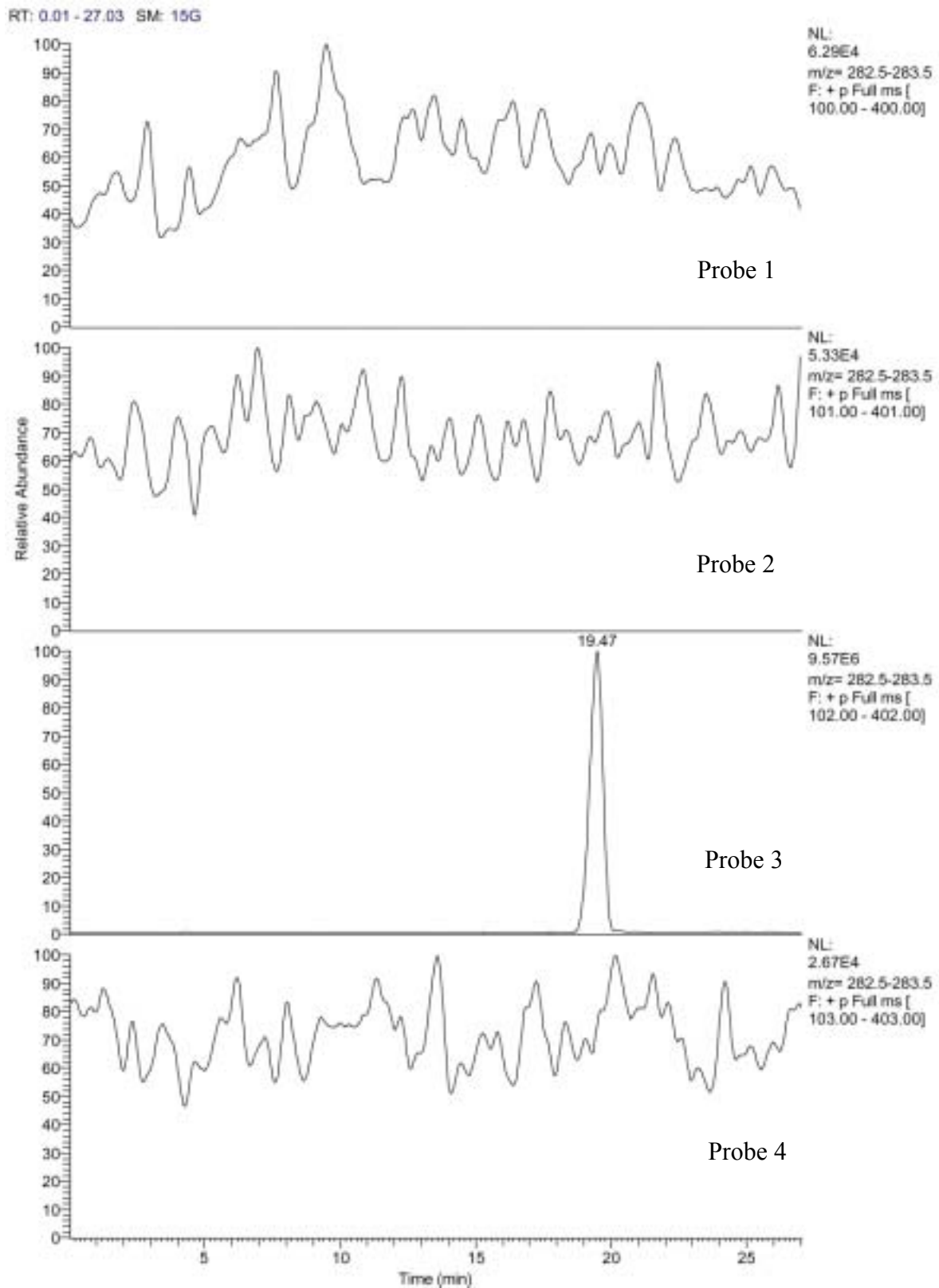


圖 4 濃度對交叉干擾的測試，樣品濃度 2000ppm。