

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 毛細電泳/質譜，醣體及多醣分析技術之開發與應用(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-002-049-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：何國榮

計畫參與人員：李福安，白珮瑾，陳朝容，曾美郡，莊育傑，簡邱堂，張家豪，蔡竺芸，周伯鴻

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

計畫編號：NSC 92-2113-M-002 -049 -  
執行期限：92年8月1日至93年7月31日  
主持人：何國榮 台灣大學化學系

## 第一部分：毛細電泳質譜儀相關技術之發展與應用

### A. 毛細管電泳/脈衝式電灑法質

#### 譜界面之開發與應用

##### 一、中文摘要

毛細管電泳具有高分離速度極高分離效率等優點，因此被廣泛應用於分子生物、生醫、藥物等領域。微量快速分析也成為毛細管電泳質譜受重視主要原因。

毛細管電泳與質譜間的界面傳統上最主要有鞘流界面，此類是利用補償液補足毛細管流速不足，但補償液會造成樣品有稀釋效應的缺點，所以採用無鞘流界面有較高的靈敏度。

建立一套簡單、便宜且高再現性電灑噴頭導電技術，對於普及毛細管電泳質譜有很大幫助。另外大部分無鞘流界面皆為利用降低電灑噴頭口徑來配合毛細管電泳的低流速，使質譜訊號有良好靈敏度及穩定性，但拉尖噴頭壽命短，易阻塞。

由於傳統電灑游離法皆為連續式，電灑噴頭口徑需要配合毛細管電泳的流速。若改用自製脈衝高電壓裝置產生不連續式的脈衝電灑游離法，

則可利用脈衝的工作週期來配合流速，所以可在不須降低電灑噴頭口徑，適合毛細管電泳低流速也能得到很好的穩定性。最後把開發的界面用於中藥摻西藥分析的毛細管電泳分析。

**關鍵字：**脈衝式電灑,毛細電泳,質譜

##### Abstract:

An important area of electrospray mass spectrometry (ESI/MS) interfacing is with capillary electrophoresis(CE), which combined fast, high-resolution separation and high sensitive, information-rich detection. The CE/MS interface is most commonly achieved with a sheath liquid. However, sheath liquid interface has one major disadvantage; overall sensitivity may be degraded since the analytes are diluted substantially by the sheath liquid. To overcome the problem of sample dilution, the development of sheathless CE/MS interface has attracted significant attention.

In this work, a new method was developed for preparing a conductive rubber-coated fused-silica capillary for use in sheathless CE/ESI/MS. The

conductive rubber coated capillary was found to be highly stable and successful used for over 90 hours.

In sheathless CE/ESI/MS, it often requires a tapered tip with small o.d. (<25 $\mu$ m), but a tapered emitter can easily be blocked during capillary cleaning or the hydrodynamic injection. An approach which does not require the use of a tip with small o.d. is investigated. It is found out that discontinuous ESI(pulsed ESI) with low pulse frequency and duty cycle can be used to connect a 50 $\mu$ m-rubber-coated tip with mass analyzer. The utility of this interface is demonstrated with the analysis of synthetic chemical drugs in adulterated Chinese medicine.

Keywords: pulsed spray, capillary electrophoresis, mass spectrometry

## 二、緣由與目的

在毛細管電泳與質譜儀連接的界面當中，鞘流界面可說是目前最方便且被廣泛使用的界面。在鞘流界面中，鞘流溶液除了提供毛細電泳的電通路外，並可增加毛細電泳緩衝溶液的選擇範圍。藉由在鞘流溶液添加酸性或鹼性的物質也可以幫助樣品形成預成離子以增加偵測的靈敏度。然而，鞘流界面在某些應用上仍存在一些問題，其中最常被提出的就是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靈敏度的下降。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。由於無鞘流界面的電灑法流速完全決定在毛細電泳的電滲流上。而電滲流流速一般而言

是在數十到數百 nl/min 的範圍，因此無鞘流界面使用微電灑法與質譜儀銜接。這樣的組合使得此界面具有高離子化效率及高靈敏度的特質。製作無鞘流界面最大的挑戰就是如何達到電泳電流通路又同時達到電灑所需要的電準位，因此無鞘流界面必須要一個接觸性的導電方式來達到電通路，所以如何在末端形成良好堅固的導電界面變成非常重要。

無鞘流界面的製作方式中<sup>1-6</sup>，末端塗碳<sup>7</sup>的使用壽命大約只有八小時，不符現今的應用。2002年，本實驗室陳逸然學長用導電銀漆筆法塗佈方式完成研究與應用。本實驗採用導電橡膠塗佈使無鞘流界面的製造更快速且堅固。

電灑法靈敏度與樣品注入流速有著直接的關係。在一個流速範圍內，電灑法的靈敏度隨著流速上升而上升，當操作在這個條件下時，質譜儀所表現出來的是一個質量流靈敏的偵測器。當注入流速高過某一流速範圍後，電灑法質譜儀的靈敏度便不再隨流速升高而升高，而隨著分析物的濃度升高，此時電灑法質譜儀便成為濃度靈敏的偵測器，此範圍內的流速，由於可使電灑法的靈敏度最佳化，因此我們稱操作在此範圍的流速為最佳流速。為了要得到高再現性和靈敏度的要求，一般電灑法操作的流速都必須在最佳流速的範圍內。

然而達到最佳靈敏度的流速則會隨著管柱口徑的不同而不同，一般而言管柱口徑越小，最佳流速就越低。我們實驗室早先就發現質譜訊號的最佳靈敏度與毛細管電泳的流速、於毛細管尖端口徑大約在 20  $\mu$ m 是最好的

安排，其理想流速約在 150-200 nl/min 之間，而大部分 50  $\mu$ m 分離毛細管電泳流速就在此範圍之內。降低流速以降低起始液珠有較高的游離化效率低和較高的抗鹽能力，所以傳統的界面為以縮小口徑操作在最低流速且能到達質譜取樣極限(高過最佳流速)。但是對於連接液相層析而言，縮小口徑可能會使層析峰因為內徑變小而使峰變寬和容易在出口端因不潔物而阻塞。

所以如何能不需要縮小口徑就能達到電灑理想狀成為本實驗室的一研究主題。因此本實驗將開發新界面應用於大口徑低流速模式，希望利用非連續性電灑來使用於大口徑的毛細管。脈衝式電灑法一直以來被用於研究電灑行為，尚未接上層析使用。對於低流速的適應是本章節主要的研究動機，我們希望脈衝式電灑能夠適用於低流速的毛細管電泳。最後並以中藥摻西藥的電泳應用於脈衝式電灑模式中。

### 三、結果與討論

#### 3-1 比較鉛筆碳、導電銀筆、導電橡膠塗佈

導電橡膠在一般的電子商場或是電腦商場就能買到，此導電修補液具有很強韌的彈性應力，對於脆弱的拉尖毛細管電灑噴頭而言，導電橡膠不失為一很好選擇。除此之外導電橡膠主要成分亦為60%的銀成分，所以與導電銀同屬於高導電度的導電材質。

塗鉛筆碳界面中，導電層的壽命決定在塗碳層-油性塗佈層以及油性塗佈層-毛細管之間的附著力。而在導電銀筆與導電橡膠中，由於只有單層的塗佈所以導電層的壽命直接決定在導電層與毛細管之間的附著力。一般而言，導電塗佈之所以會剝落的原因除了電灑法放電產生高熱之外，另一個

主要的原因就是毛細電泳所使用的溶液對導電層的侵蝕。為了比較導電層的耐用度，我們將三種塗佈界面同時浸入含有20%甲醇的水溶液當中並同時放到超音波震盪槽中震盪。鉛筆碳界面經過不同的震盪時間後，在顯微鏡下觀察導電塗佈層的情形如圖1，我們發現在20分鐘後，塗鉛筆碳界面的導電即開始剝落。在120分鐘後，塗銀界面的導電層才開始有些微的剝落的現象。而180分鐘時導電橡膠只有些微剝落的現象，一直到200分鐘導電橡膠才出現剝落的現象。所以我們就實際應用耐用度而言，塗鉛筆碳噴頭使用電灑壽命約8小時，而導電銀筆陳逸然有測試過連續3天的測試，而導電橡膠則通過十五次以上毛細管電泳/電灑使用(每次使用6小時以上)還未損壞。

導電橡膠擁有比導電銀筆塗佈更高耐用度的優點之外，導電橡膠還有較佳的機械性，輕微撞擊也不會使噴頭斷裂，這也是此法優於其他兩法的特性。

#### 3-2 脈衝工作頻率與週期

圖2中可顯示當施加電壓為1kV時液珠為累積狀態，當施加電壓為2kV時液珠被噴灑出去。實驗中利用不同頻率與不同的工作週期去尋找最適當的條件使脈衝式電灑能得到最穩定且最強的訊號。如圖3中，可看出在工作頻率20Hz下不同的工作週期中以20%時可得最強訊號，而固定工作週期為20%時不同的工作頻率中以20Hz的條件下可得較穩定且密集的訊號。因此本實驗以20Hz頻率，20%工作週期為脈衝電灑條件。

#### 3-3 脈衝電灑對於連續式電泳質譜分析的比較

本實驗初步階段以五種西藥 mefenamic acid、phenylbutazon、sulindac、indomethacine、prednisolone

作為脈衝式電灑電泳質譜的測試藥物並與連續式電灑電泳質譜做比較。質譜圖皆為一個微掃描組成一張全掃描模式且未經高斯曲線平均。由圖4、5中可發現,脈衝式電灑電泳的層析時間會比連續式電灑電泳的層析時間還長,其推論為脈衝式電灑時其液珠在噴口端的累積造成管柱的背壓使電滲流減少因此層析時間較連續式電灑電泳質譜長。另一方面其層析峰的強度較連續性電灑電泳高出二到八倍。

#### 四、計畫成果自評

- 1.我們成功開發出製造更易,更堅固的無鞘流介面。
- 2.開發出脈衝式電灑,並成功的找出條件使脈衝式電灑訊號比連續式電灑訊號更高。
- 3.成功應用五種西藥分析於脈衝式電灑電泳質譜中。

#### 五、參考資料

- (1)Olivares, J. A.; Smith, R. D.,*Anal. Chem.* 59, 1230(1987).
- (2) Kriger, M. S.; Cook, K. D.; Ramsey, R. S.,*Anal. Chem.* 67, 385(1995)
- (3) Figeys, D.; Oostveen, I. Aebersold, R.,*Anal. Chem.* 68,1822(1996).
- (4) Wilm, M.; Mann, M.,*Anal. Chem.* 68, 1(1996).
- (5)Kelly, J. F.; Ramaley, L.; Thibault, P.,*Anal. Chem.* 69, 51(1997).
- (6)Barraso, M. B.; deJong, A. P., *J. Am.*

- Soc. Mass Spectrom.* 10, 1271(1997).
- (7)Chang, Y. Z.; Her, G. R., *Anal. Chem.* 72, 626(2000).
- (8) Cheng, H. L.; Her, G. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15 ,1473(2001).

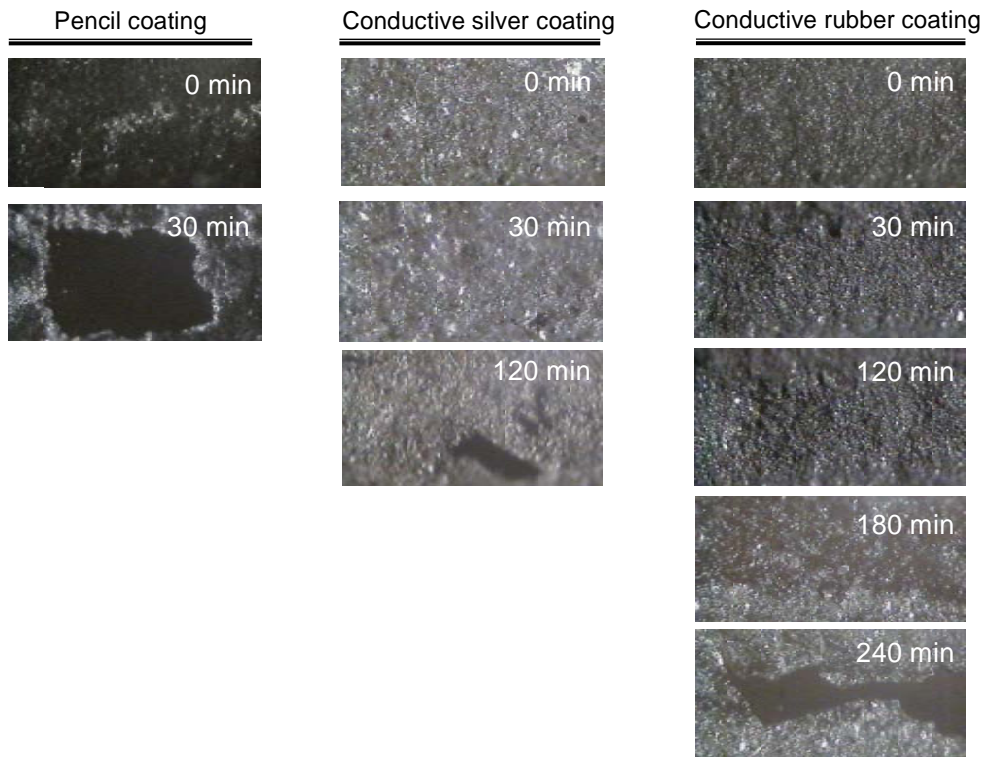


圖 1、三種塗佈侵蝕實驗。

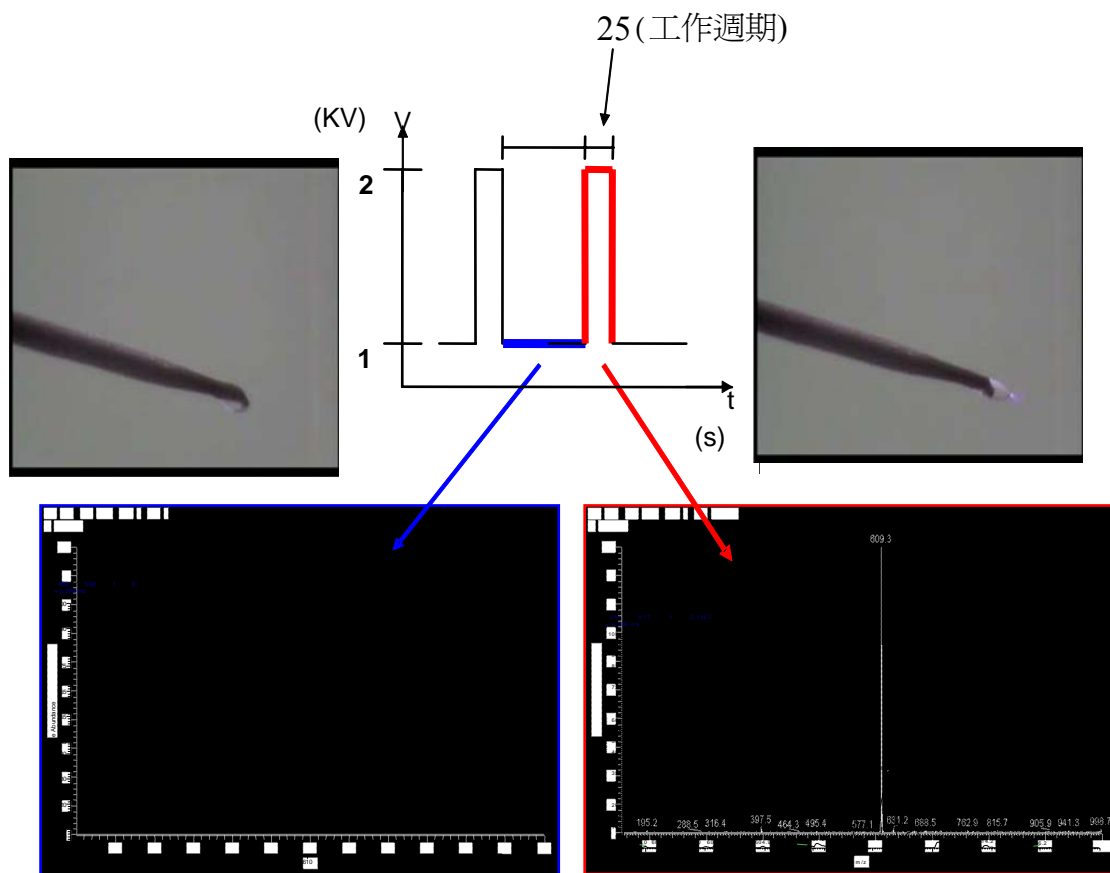


圖 2、脈衝式電灑。

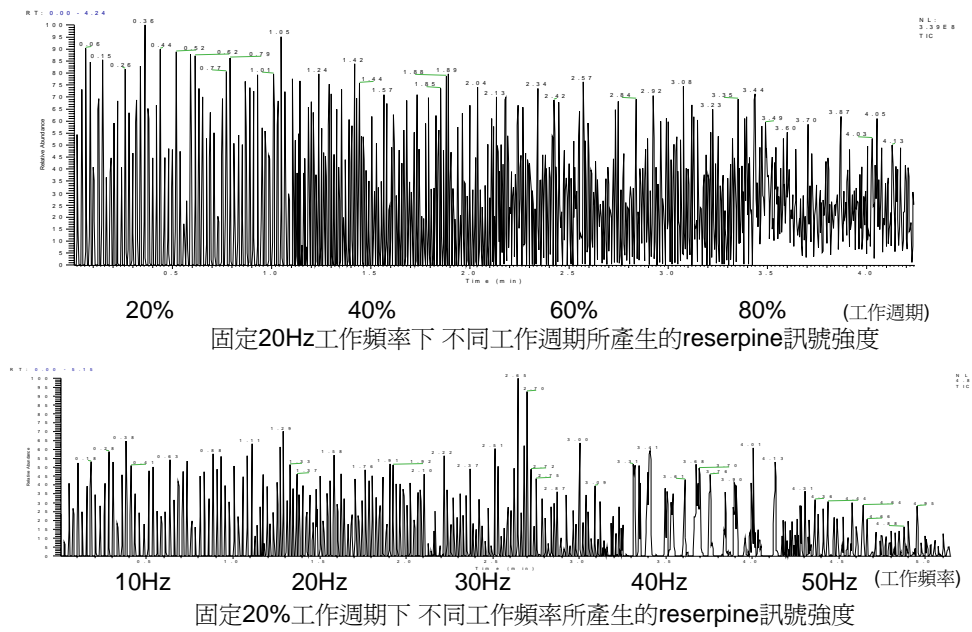
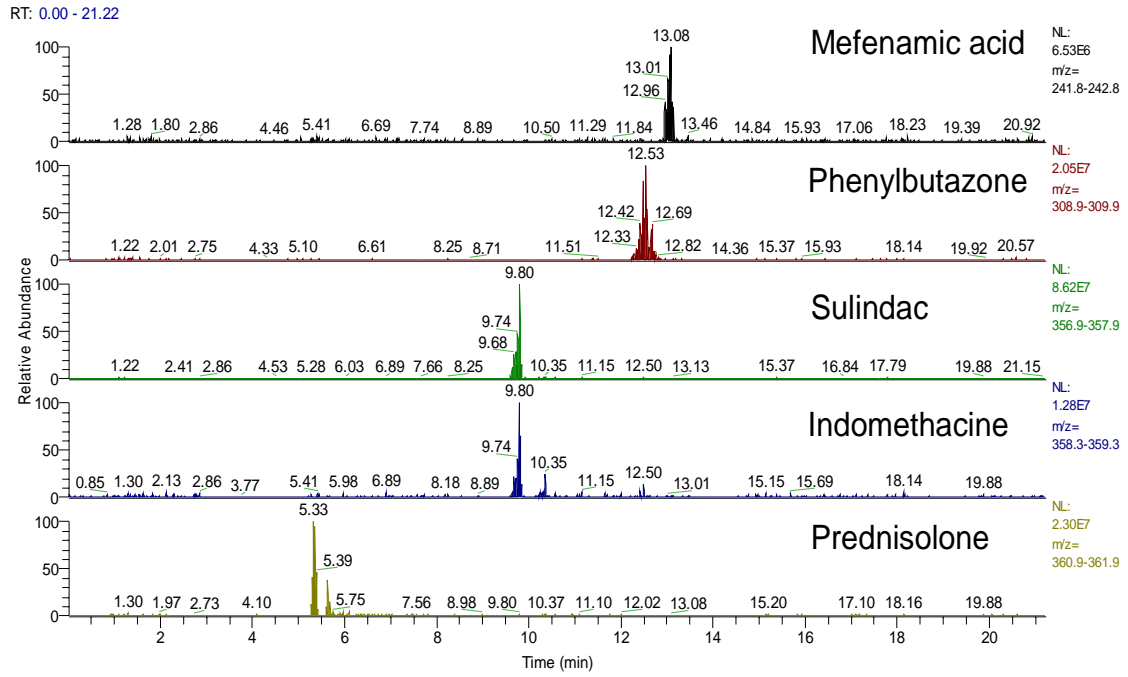


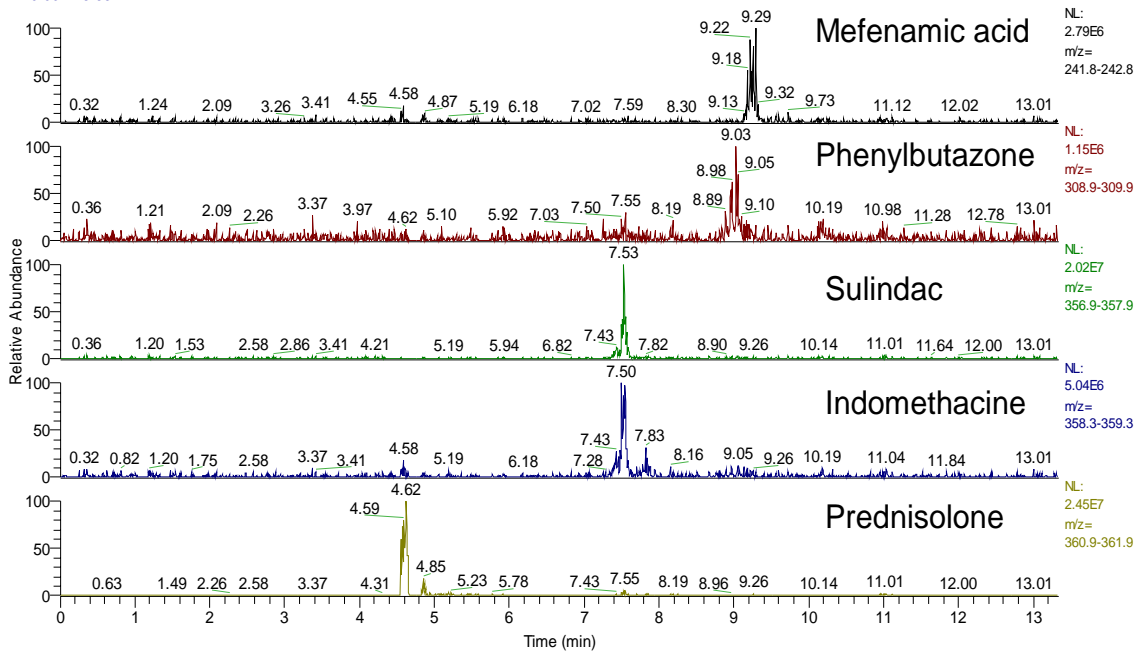
圖 3、脈衝工作頻率與週期對訊號的影響。





圖四、脈衝式電灑電泳質譜於五種西藥之分析。緩衝溶液:ACN/H<sub>2</sub>O=8:2 + 1% ammonia acetate。

RT: 0.00 - 13.33



圖五、連續式電灑電泳質譜於五種西藥之分析。緩衝溶液:ACN/H<sub>2</sub>O 8:2 + 1% ammonia acetate。

## B. 多重晶片電泳/質譜儀之發展

### 一、中文摘要

質譜儀是近來分析基因、蛋白質及藥物研發最重要的技術之一。建構於微小化裝置上的晶片電泳是化學分離技術的一種，晶片電泳具有靈敏度、速度、儀器尺寸、花費及定量的優點，將晶片電泳與電灑式質譜儀系統相結合可大幅的增加毛細管電泳於生物分析的功能。

本研究中，晶片電泳與質譜儀的界面採外接一毛細管電灑噴頭的設計，設計中，電灑噴頭與分離管道的連接是一重要的問題，以高分子材料 PMMA 為基材使用壓線的方法來製作晶片，壓製的方法為線材套一半圓的不銹鋼管壓出連接空間管道，使得插入的電灑噴頭能對準分離管道，這樣的壓印方法不需要精密的鑽洞後再膠黏即可將電灑噴頭對準分離管道出口，實驗結果顯示這樣的界面可產生穩定的電灑訊號。

**關鍵字:** 晶片電泳, 質譜

Abstract:

Microfabricated analytical devices are receiving growing interest due to their potential to enhance sensitivity and speed, as well as for reduction of instrument size, cost, and weight. A variety of microdevices have been constructed including chemical separation techniques, e.g., capillary electrophoresis (CE). Mass spectrometry (MS) is one of the most important techniques for analysis of a broad range of samples related to genomics, proteomics, and drug discovery. The coupling of chip CE to ESI/MS systems would greatly expand the potential of both CE and ESI/MS for biotechnological applications.

In this work, the chip

electrophoresis is coupled with ESI-mass spectrometer using an attached capillary sprayer. Chip CE was fabricated on poly(methyl methacrylate) substrate by wire-imprinting technique. The coupling of the ESI sprayer with the separation channel was found to be the most difficult challenge of this design. To align the separation channel with the attached ESI sprayer, a semicircle stainless tube is bushed with the wire before the wire-imprinting. As a result, the ESI sprayer could be precisely aligned with the exit of the separation channel without precision drilling followed by gluing the sprayer. The performance of the device was tested with reserpine and myoglobin and the results indicated that this design could produce a stable electrospray.

Keywords: chip capillary electrophoresis, mass spectrometry

### 二、緣由與目的

本研究目的在於研製晶片電泳與質譜儀的連接界面，希望能將微晶片這樣的微小化分析裝置，與質譜儀這樣具有高靈敏度及高選擇性的偵測器相結合，以望能達到晶片電泳的分離，甚至高通量的樣品分析以及偵測上的高鑑定性，並且希望將製程低成本化、簡單化、操作自動化，以將其應用於生化方面的分析上。

而為了能產生良好質譜訊號，在晶片電泳/質譜的界面設計上採用外接電灑噴頭的設計。並且在晶片的製作上儘量的減小晶片與外接電灑噴頭的死腔體積以避免影響電泳的分離效率。基於晶片電泳的低流速與微電灑流速相符合的關係，電灑噴頭的設計上採用拉尖毛細管，並控制出口端口徑以符合電灑法的最佳流速(optimum flow rate)，希望藉由上述的設計研製晶片與質譜儀界面上的連接。

### 三、結果與討論

外接電灑噴頭的設計，最大的問題在於晶片管道與毛細管電灑噴頭內徑管道的對準及黏接。對於晶片管道與電灑噴頭內徑管道的對準問題的解決則是使用鎢絲末端套一半圓不銹鋼管的壓製方式，分離管道出口端所壓出來的半圓部份，如圖 1 所示。因為壓出來的深度約為  $200\ \mu\text{m}$ ，兩片 PMMA 相接合時分離管道出口端約有  $400\ \mu\text{m}$  直徑大小的孔洞，毛細管電灑噴頭( $375\ \mu\text{m}$  o.d,  $75\ \mu\text{m}$  i.d)的內徑管道可以精準插入並對準晶片的分離管道。如此藉由鎢絲套一半圓不銹鋼管的壓印方式不但壓出了管道及連接電灑噴頭的空間也解決了管道與電灑噴頭內徑對準的問題。而且這樣的壓印方式不僅簡單容易操作也不需要精密的對準對位特殊儀器的使用。並且須適當地膠黏以減小死腔體積所造成的影響。所以在膠黏的過程中在管道的另一端通以氮氣防止環氧樹脂流進分離管道以求適當地膠黏以減小死腔體積，但膠黏後的再現性並不是很高，可能是未來極需解決的問題，

完成的晶片，分別在三個儲槽上膠黏滴管(pipet tip)以做為樣品、緩衝溶液的添加與白金微電極的放置。完成的晶片如圖 2。

於晶片電泳/質譜實驗部份，首先必須測試完成的晶片於電泳分離過程中電灑穩定及最佳化的設置，由於電灑噴頭的出口口徑為  $50\ \mu\text{m}$ ，因此使用的電泳流速必須符合最佳流速以達穩定及靈敏的電灑訊號。圖 3 為使用 100ppm 的 reserpine 於 CE 緩衝液持續電泳電灑 10min 所產生的電灑訊號穩定的情形，可以發現結果滿穩定的，

電灑訊號 TIC 的變化約在相對強度 100-85%之間。毛細電泳質譜進樣採用 Pinched sample loading 的模式，進樣時間 15 秒。圖 4 在 5.1 分鐘左右有一明顯的波峰出現，經由其質譜圖的質量分析其為  $m/z$  609 為 Reserpine。但是並沒有看到 Myoglobin 的訊號出現，根據 CE-UV 的結果其出現的遷移時間約在 3 分鐘左右。推測其沒有看到 Myoglobin 的原因可能是因為外接電灑噴頭為毛細管所製作，因而造成 Myoglobin 吸附在毛細管管壁所以看不到其訊號。但在 CE-UV 的結果上卻沒有出現這樣的情形，所以還需要作進一步的實驗探究其原因。

### 四、計畫成果自評

1. 此外接電灑噴頭的 CE/MS 界面可以產生穩定的電泳電灑訊號。
2. 藉由電腦 labVIEW 軟體的及硬體配合達到自動化的要求。

### 五、參考資料

1. Manzs, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. *Sens. Actuators* **1990**, *B1*,244.
2. Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fetting, J. C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H. M. *J. Chromatogr.* **1992**, *593*,253.
3. Harrison, D. J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C. S.; Manz, A. *Science* **1993**, *261*,895.
4. Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*,720.
5. Woolley, A. T.; Sensabaugh, G. F.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*,2181.
6. Zeleny, J. *Phys. Rev.* **1917**, *10*, 1.
7. Dole, M.; Hines, R. L.; Mack, L. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. *Macromolecules* **1968**, *1*, 96.
8. Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys.*

- Chem.* **1984**, 88, 4451.
9. Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671.
  10. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675.
  11. Bruins, A. P.; Covey, T. R.; Henion, D. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2642.
  12. Cohen, A.; Karger, B. L. *J. Chromatogr.* **1987**, 397, 409.
  13. Tsuda, T. *J. High Resolut. Chromatogr. Comm.* **1987**, 10, 623.
  14. J. Kameoka, ; H.G. Craighead, ; H. Zhang, ; J. Henion, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1935.
  15. C.S. Effenhauser, ; G. J. M. Bruin, ; A. Paulus, ; M. Ehrat, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3451.
  16. M.A. Roberts, ; J.S. Rossier, ; P. Bercier, ; H. Girault, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2035.
  17. L. Martynova, ; L.E. Locascio, ; M. Gaitan, ; G.W. Kramer, ; R.G. Christensen, ; W.A. MacCrehan, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4783.
  18. Y.H. Chen, ; S.H. Chen, *Electrophoresis.* **2000**, 21, 165.
  19. **Y.Z. Chang**, ; **G.R. Her**, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 626.
  20. Jacobson, S.C. ; Hergenroder, R. ; Koutny, L.B. ; Warmack, R.J. ; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1107.

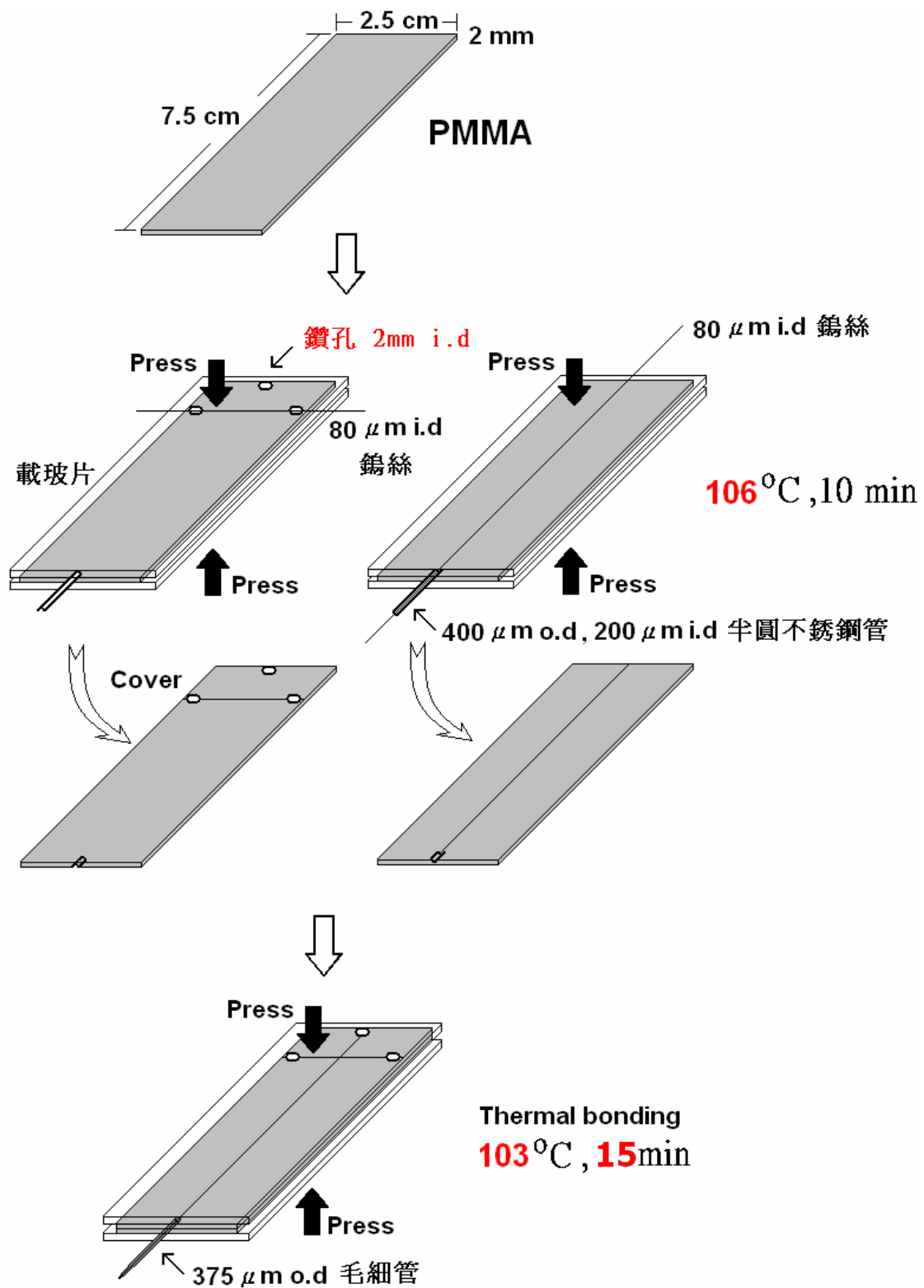


圖 1 壓線式方法晶片製作流程。

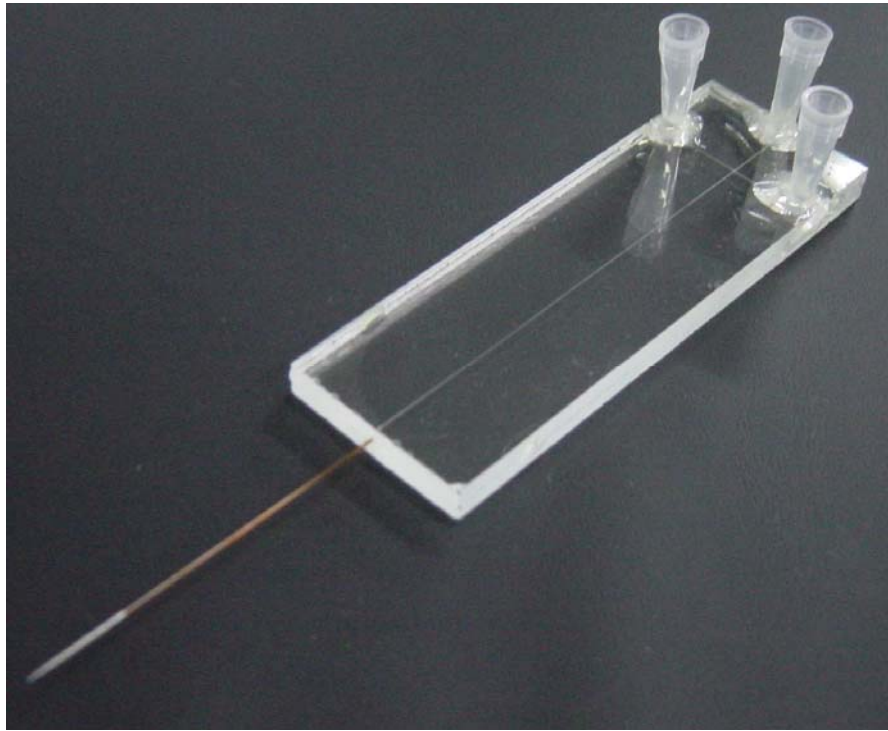


圖 2 整體完成的晶片照片。

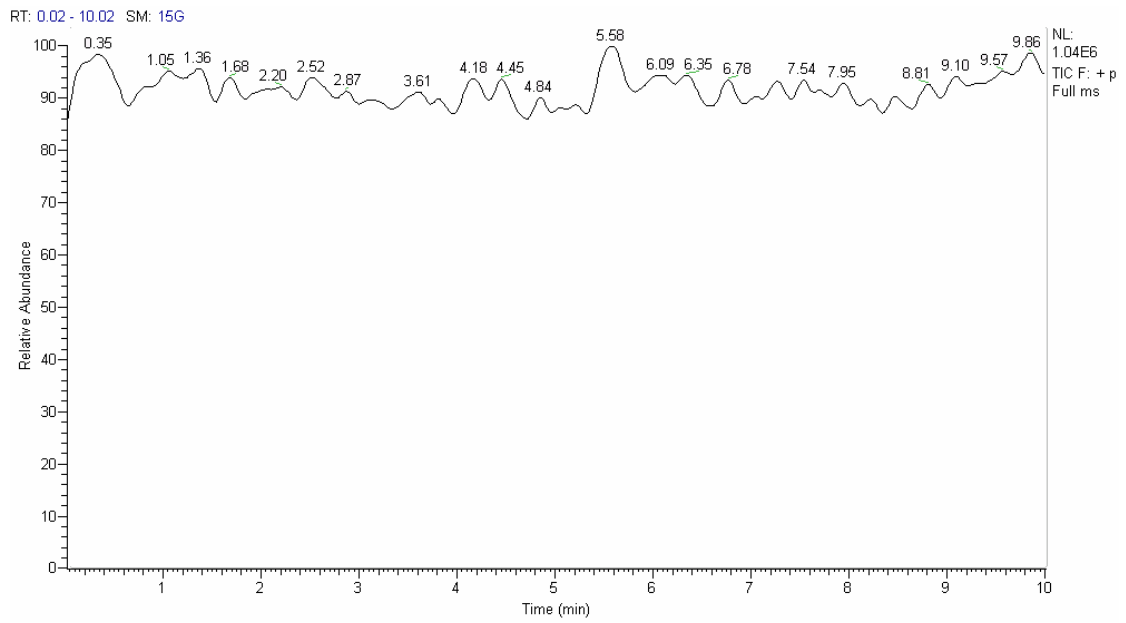


圖 3 電灑 10 分鐘 TIC 圖。

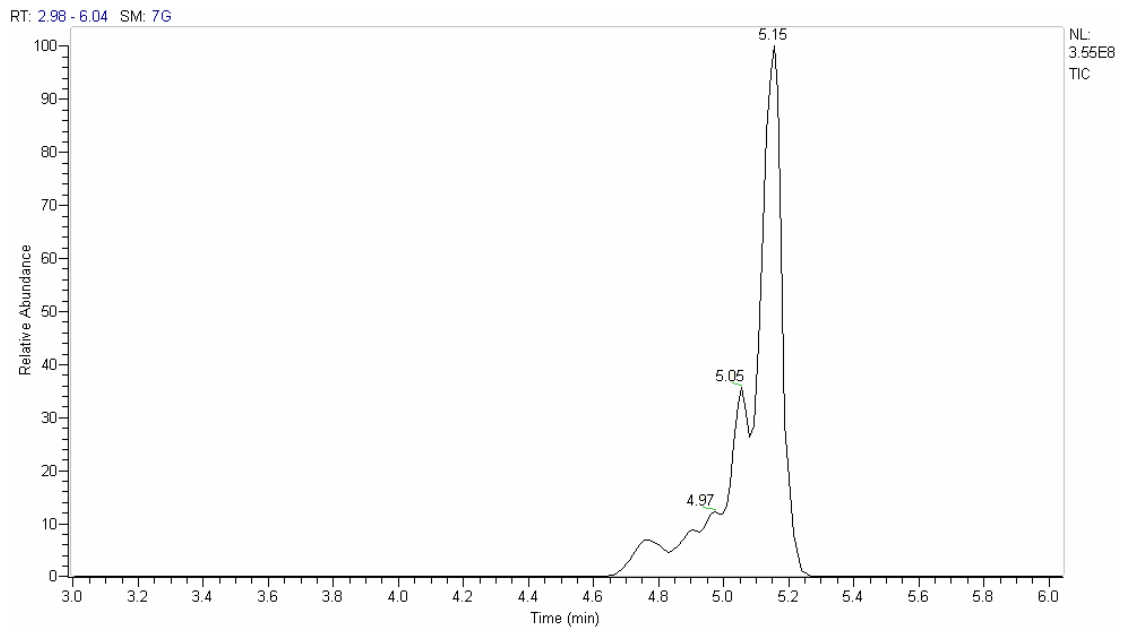


圖 4 Reserpine & Myoglobin 100ppm 混合物的質譜電泳圖。



## C. 低揮發性緩衝液毛細電泳/質譜界面之研究

### 一、中文摘要

在做毛細電泳分離時，所使用的緩衝溶液系統大都是非揮發性的無機鹽類(如硼酸鈉鹽，磷酸鈉鹽等)，或者是添加一些非揮發性的界面活性劑(如 SDS 等)來提高分離效率。然而，當毛細電泳與電灑法質譜儀相銜接時，這些無機鹽類很可能在離子化過程中與分析物互相競爭而抑制質譜訊號。因此，為了改善這些抑制效應，便朝兩部分進行，一方面是仍然使用常用的非揮發性緩衝溶液系統，但是設計界面來降低其抑制效應;而另一方面則是尋找適當的緩衝溶液使其既能保有良好的分離效果，又較不會抑制分析物的訊號來取代目前的非揮發性緩衝溶液。

**關鍵字:** 低流速,毛細電泳,質譜

**Abstract:**

The combination of CE with electrospray ionization-mass spectrometry has proven to be a useful towards improved sensitivity and increased certainty in peak identification. Unfortunately, it is difficult to couple directly nonvolatile buffer CZE and MEKC with ESI-MS because the nonvolatile buffers and surfactants are known to suppress the signals of analytes. Consequently, volatile buffers or volatile additives were used in most CE/MS applications. However, nonvolatile buffers often provide better separation than volatile buffers in many CZE applications. Therefore, suitable CE/ESI-MS interfaces needs to be developed for MEKC and nonvolatile buffer CZE/ESI-MS analysis.

**Keywords:** low flow, capillary electrophoresis, mass spectrometry

### 二、緣由與目的

微胞電動毛細管層析法 (MEKC)<sup>(1)</sup>，它主要的分離機制是利用溶質在微胞與介質溶液之間的分配作用而產生分離的效果。這項技術最大的特點是使毛細管電泳法除了使用在離子型物質的分離之外，同時能夠應用在中性物質的分析。

然而當微胞電動毛細管層析法 (MEKC)與電灑法質譜儀相銜接時，SDS 是一種帶有長碳鏈的界面活性劑，其表面活性較大<sup>(2-15)</sup>，所以容易佔據電灑法所產生的液滴表面，並且搶走表面所帶有的正電荷(如  $\text{Na}^+$ )，進而排斥分析物離子導致分析物無法移動至表面，而不易從液滴中脫附出形成氣態離子，而使得靈敏度下降，另外一個原因就是非揮發性鹽類所產生的干擾雜訊。在電灑的過程中，液珠分裂後的母液珠有大約 15 % 的電荷移到分裂出的液珠，而本身的大小卻只減小了 2 %<sup>(16)</sup>，因此使得母液珠的電荷密度下降，若電荷密度不夠則無法再行分裂，故液珠會因為溶劑揮發而持續縮小，縮小後的母液珠鹽類濃度高過鹽類飽和濃度時，就會產生所謂的離子簇(ion cluster)的訊號。由於此過程會產生許多不同大小及不同電荷量的離子簇，使分析物訊號會被界面活性劑的離子簇訊號抑制。

有鑑於此，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 (~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。

### 三、結果與討論

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。

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。

圖 2-a 顯示使用傳統鞘流界面，以 Atrazine 溶於 20 mM 醋酸銨緩衝溶液中，以電滲流方式進樣，並且將鞘流溶液流速固定為 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，以全掃描方式偵測，圖譜中可以看到 Atrazine 的訊號  $m/z$  216。而圖 2-b 則是將分析物 Atrazine 溶於 20 mM 醋酸銨和 25 mM SDS 緩衝溶液中，以相同方式進樣，圖譜中可以發現大量界面活性劑的離子叢訊號，此外，分析物的訊號強度也下降了十倍。圖 3-a 則是使用低流速鞘流界面，以同樣方式將同濃度的 Atrazine 溶於 20 mM 醋酸銨緩衝溶液中，以電滲透方式進樣，以全掃描方式偵測。而圖 3-b 則是同樣的將 Atrazine 溶於 20 mM 醋酸銨和 25 mM SDS 緩衝溶液中，由圖譜中可以發現，相較於傳統鞘流界面，界面活性

劑的離子簇較少，此外分析物的訊號強度也只下降了三倍。使用低流速鞘流界面時，會因為在低流速下可以產生較高電荷密度的帶電液珠，因此分析物在帶電的液珠中不需要等到液珠體積縮到很小，液珠內的電場強度就可以將分析物從液珠中脫附出來，同時非揮發性的界面活性劑也因為不需要經過多次揮發，所以其濃度不會持續增加因而減少了與分析物的競爭效應。

### 四、計畫成果自評

1. 本研究計畫利用低輔助流流速鞘流界面和連接微胞電動毛細管層析法和，並成功克服界面活性劑的抑制
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。

### 五、參考資料

1. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando., *Anal. Chem.*, **56**, 111, (1984).
2. K. L. Rundlett, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, **68**, 3493, (1996)
3. J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, **39**, 1027, (1967).
4. J. Cai, Z.E. Rassi, *J. Chromatogr.*, **608**, 31, (1992)
5. H. Ozaki, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, **794**, 317, (1998).
6. S. A. Shamsi, *Anal. Chem.*, **73**, 5103, (2001).
7. Y. Takada, M. Sakairi, H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 488, (1995),
8. M. H. Lamoree, U. R. Tjaden, J. V. D. Greef, *J. Chromatogr. A*, **712**, 219, (1995).

- 9 S. Terabe, H. Ozaki, Y. Takada, M. Sakairi, H. Koizun, Proceedings of the Seventh International Symposium on *High Performance Capillary Electrophoresis*, **53**, (1995).
10. W. M. Nelson, Q. Tang, A. K. Harrata, C. S. Lee, *J. Chromatogr., A*, **749**, 219, (1996).
11. S. K. Wiedmer, M. Jussila, M. L. Riekkola, *Electrophoresis*, **19**, 1711, (1998).
12. P. G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr., A*, **802**, 3, (1998).
- 13 Y. Takada, Y. Kishimoto, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr., A*, **817**, 49, (1998).
14. J. Suomi, S. K. Wiedmer, M. Jussila, M. L. Riekkola, *Electrophoresis*, **22**, 2580, (2001).
15. L. Yang, A. K. Harrata, C. S. Lee. *Anal. Chem.* **69**, 1820, (1997).
16. P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **35**, 804, (2000).

Second capillary with 155  $\mu\text{m}$  o.d. 50  $\mu\text{m}$  i.d. and 25  $\mu\text{m}$  orifice to deliver make-up liquid by syringe pump

Microcentrifuge Tube

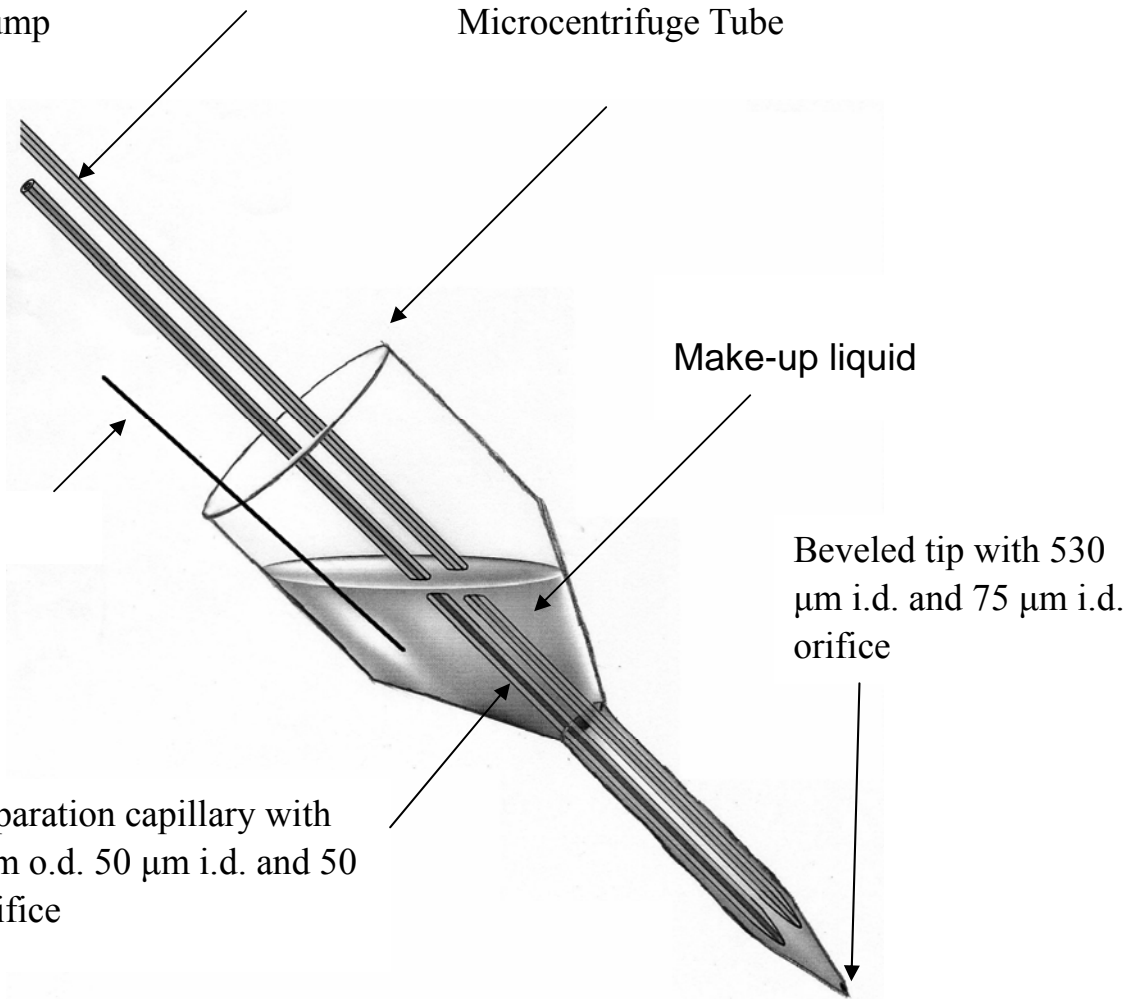
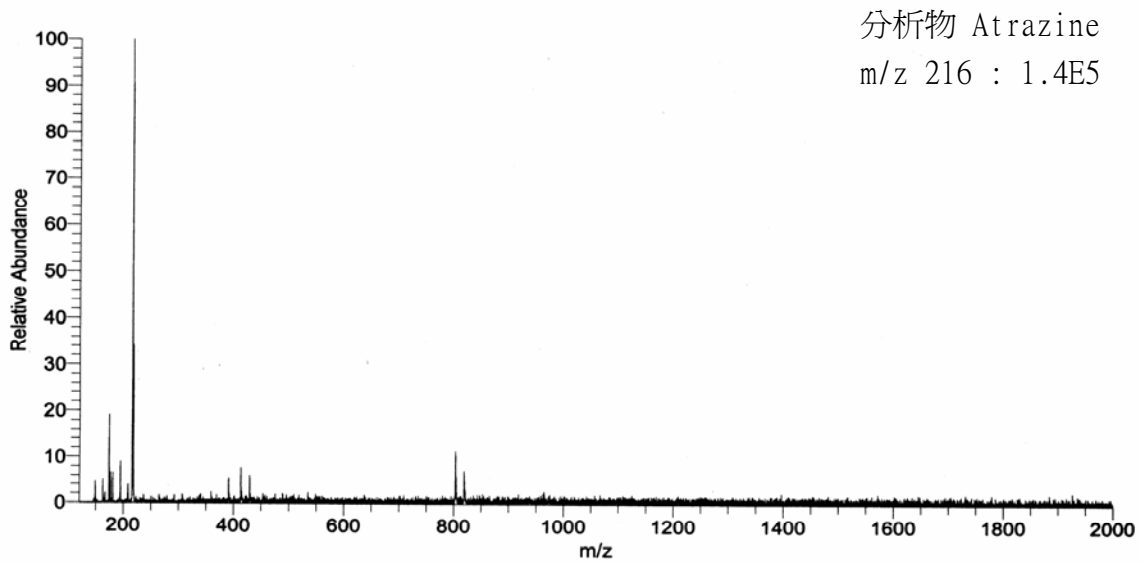


圖 1 低流速輔助流界面設計圖。

(a)

216



(b)

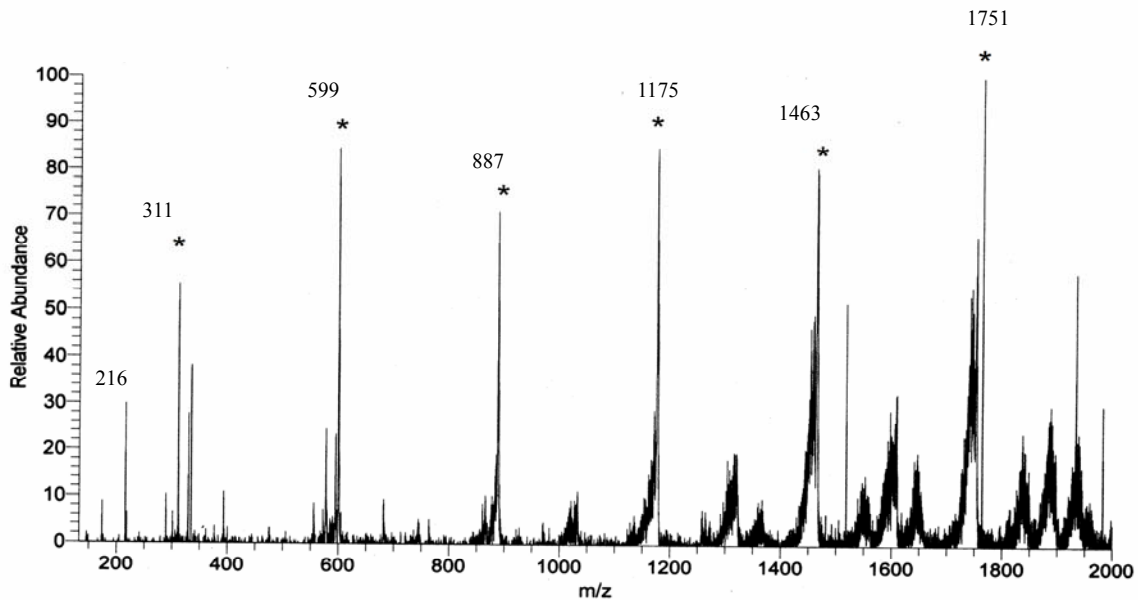


圖 2、(a)傳統鞘流界面，將 Atrazine ( $m/z=216$ )溶於 20 mM 醋酸銨中並以電滲流方式連續注入，鞘流溶液為 70 % 甲醇+1 % 的醋酸其流速為 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，在正離子模式下以全掃描方式偵測之質譜圖。

(b)傳統鞘流界面，將 Atrazine( $m/z=216$ )溶於 20 mM 醋酸銨並添加 25 mM SDS 中並以電滲流方式連續注入，鞘流溶液為 70 % 甲醇+1 % 的醋酸其流速為 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，在正離子模式下以全掃描方式偵測之質譜圖。(\*代表 SDS cluster 的分子量)。

(a)

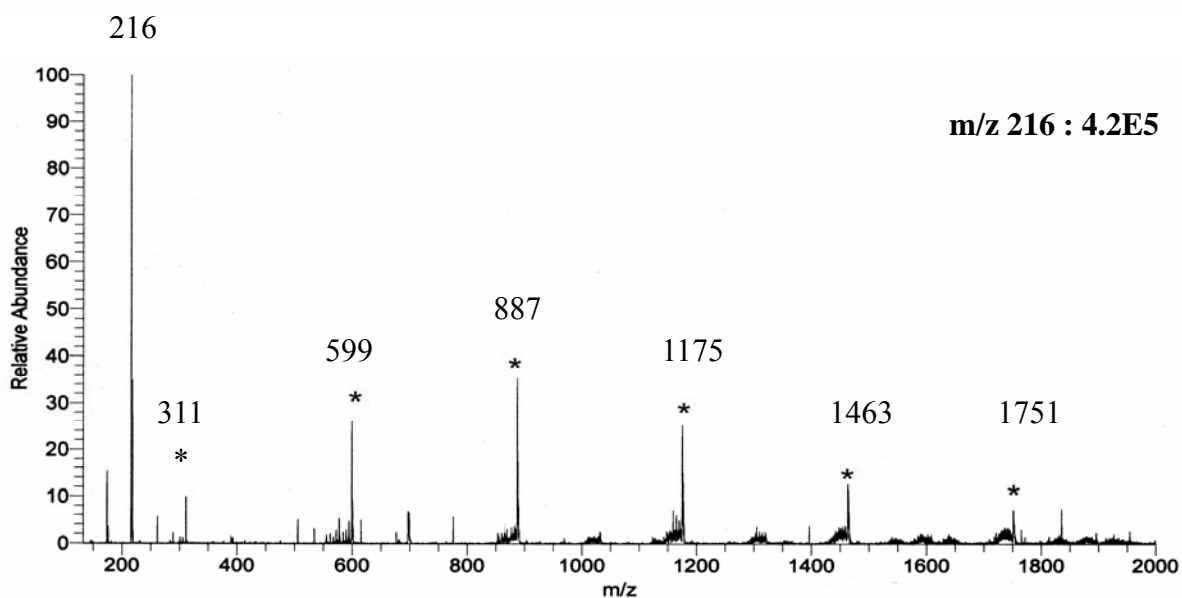
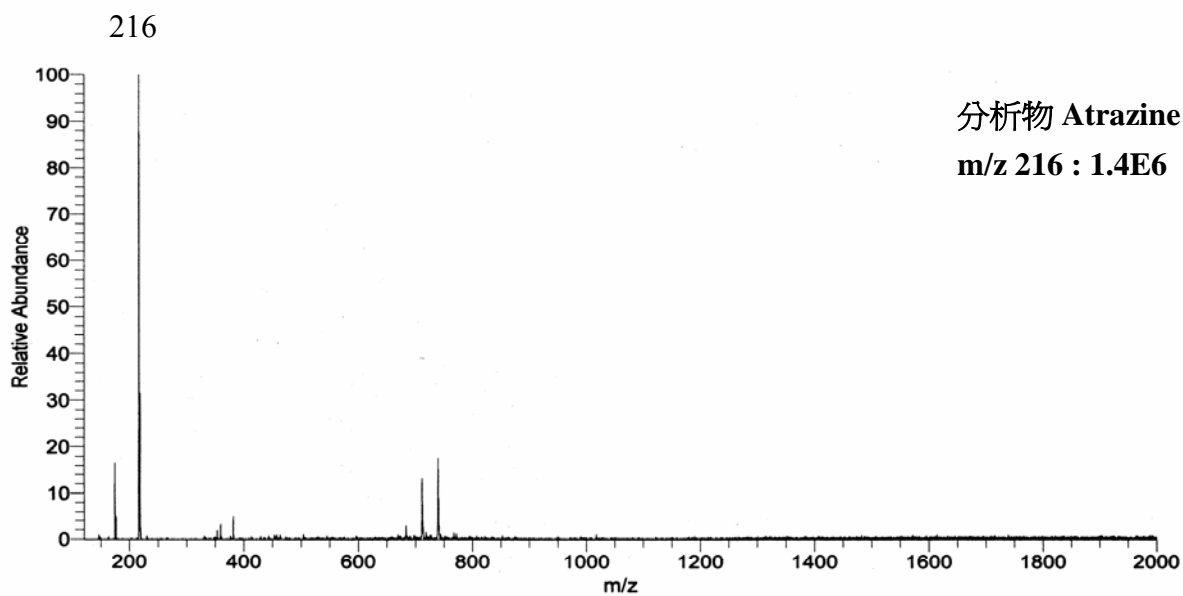


圖 3、(a)低流速鞘流界面，將 Atrazine( $m/z=216$ )溶於 20 mM 醋酸銨中並以電滲流方式連續注入，鞘流溶液為 70 % 甲醇+1 % 的醋酸，在正離子模式下以全掃描方式偵測之質譜圖。  
(b) 低流速鞘流界面，將 Atrazine( $m/z=216$ )溶於 20 mM 醋酸銨並添加 25 mM SDS 中並以電滲流方式連續注入，鞘流溶液為 70 % 甲醇+1 % 的醋酸，在正離子模式下以全掃描方式偵測之質譜圖。(\*代表 SDS cluster 的分子量)。

## 第二部分：質譜於醣蛋白分析之研究

### A. 發展醣探針於醣體學之研究

#### 一、中文摘要

本研究於醣體學上首先開發可同時觀察各種不同連接型式醣蛋白醣鏈之分布的方法。此方法利用非專一性的蛋白質酵素(Pronase)水解醣蛋白,以得到只具一個氨基酸之醣胜肽,經由石墨固相萃取消純化並同時去除干擾質譜訊號之鹽類後以電灑法離子阱質譜儀分析,即可得到各種醣連接型醣蛋白之醣鏈分布的資訊。並且利用離子阱質譜儀具多重質譜/質譜之功能,可進一步分析醣鏈之結構。

**關鍵字:** 醣體學, 醣鏈, 質譜

Abstract:

A simple approach for determine the distribution of glycans from different linkages of glycol- proteins has been developed. Glycoproteins were digested with Pronase which is nonspecific protease yielding glycopeptides containing only one amino acid and glycan. Glycopeptides were purified and desalted using carbon graphitic cartridges and analyzed by electrospray-ion trap mass spectrometry (ESI-IT MS). In addition, the structures of glycans were also identified by MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup>.

Keywords: glycomics, glycans, mass spectrometry

#### 二、緣由與目的

人體中約有 35,000 個基因會表現出蛋白質,但由於轉譯後修飾(post-translational modification)、突變以及 RNA 剪切等機制而大幅增加蛋白質的種類。要在這種複雜的環境中,有系統性的鑑定細胞在不同狀態下基

因所表現出蛋白質的差異,其中包含蛋白質種類和表現差異量的程度,以及蛋白質與蛋白質的交互作用等,會是一個很大的挑戰。質譜儀因對蛋白質分析上具有極佳的質量準確度、靈敏度再加上分析速度快等優點,而成為蛋白質體學中不可或缺的一個技術。

醣化是蛋白質最常見的後轉譯修飾,哺乳類的蛋白質大約 60~90% 是醣蛋白。醣蛋白的醣鏈與生命現象有著密切的關係,許多醣蛋白的醣鏈在受精、發炎、免疫反應、癌症、血型等方面都扮演了重要的角色。細胞上醣蛋白的醣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。另外,醣蛋白的醣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的疊合。這些重要的功能皆來自於醣蛋白上醣鏈的差異,因此了解醣蛋白在細胞不同狀態下,醣鏈的分布及量的差異,對於蛋白質在生物體內的作用會有更深入的了解。而此種研究細胞在某一個狀態下,所有醣蛋白上的醣鏈稱為醣體學(glycomics)。

然而於 1999 年由 Steven P. Gygi 等人所提出的 ICAT(isotope-coded affinity tag)技術,只能偵測蛋白質表現量的差異,無法得知蛋白質上後轉譯修飾程度的改變,因此本研究利用 ICAT 技術的概念,應用到偵測不同狀態的細胞在醣蛋白上醣鏈的分布及量的差異,也就是對兩種不同狀態下的細胞,進行醣體學的分析。然而,在進行醣體學分析前,須先尋找一有效的方法得以觀察醣蛋白醣鏈之分布的方法,且此方法不受限於任一醣連接型式,之後才可有效進行醣體學之分析。

### 三、結果與討論

本研究利用蛋白質水解酵素-Pronase 具有非專一性水解蛋白質之特性，藉由適當調控酵素之濃度與水解時間來破壞醣蛋白上所有的肽鍵，以得到只具單一氨基酸之醣肽，經由質譜分析即可得知其醣鏈分佈的情形，且由於是針對蛋白質進行水解，所以無論是何種醣連接型式之醣蛋白皆可適用於此方法。若酵素水解不完全，則可能得到同一個醣鏈卻接上一個、兩個甚至三個以上之氨基酸，如此一來，不但是訊號強度會因為分散至多個醣肽上而造成訊號下降，並且會造成圖譜判別上的困擾，因此能得到單一氨基酸之醣肽是較為適當的選擇。此單一氨基酸之醣肽經由石墨固相萃取管純化，並同時去除干擾質譜訊號之鹽類後，以電灑法離子阱質譜儀分析，即可得到醣鏈分佈的資訊。並且利用離子阱質譜儀具多重質譜/質譜之功能，可進一步分析醣鏈之結構。

本研究以醣蛋白-核糖核酸酶 B 來測試此方法，核糖核酸酶 B 為氮連接型式之醣蛋白，只具有一個醣化的位點並且具有五種醣鏈，分別為 Man5、Man6、Man7、Man8、Man9，其相對之含量分別為 57%、30%、4%、7%、1%。經由實驗結果可發現當酵素與醣蛋白比例為 2.5，且於 37°C 下反應 60 小時，可得到僅含有一個氨基酸之醣肽，如圖 1 所示，圖 1 為使用 ESI-IT MS 全掃描模式分析核糖核酸酶 B 以蛋白質水解酵素 Pronase 水解之結果。從圖中可清楚看到前四種醣肽，但其比例與理論上有些許之出入，並且無法得到 Man9 的訊號。於是改以較為靈敏之選擇離子模式來分析，如圖 2 所示，圖 2 中即可清楚看出五種醣肽的訊號且彼此的相對強度與理論上的比例較為接近。接下來便進一步選擇 Man5+Asn 之醣肽離子，進行 MS<sup>2</sup>

的分析以得知醣鏈之結構，如圖 3 所示。圖 3 中可得到大部分的醣鏈結構，但由於受限於離子阱質譜儀在 MS<sup>2</sup> 具有質量下限，因此於 400 m/z 以下的訊號無法得到，所以最後三個醣的結構無法由圖譜中解讀出，若欲得到所有的醣鏈結構，可進一步針對 C<sub>2</sub> 離子 (503 m/z) 進行 MS<sup>3</sup> 之分析，應可得到最後三個醣之結構。

### 四、計畫成果自評

1. 本研究開發可觀察各種不同連接型式醣蛋白醣鏈之分布的方法。
2. 此方法應用於醣蛋白-核糖核酸酶 B，所得之醣鏈分布與理論上相似，且利用 MS<sup>2</sup> 可得知部分醣鏈結構。
3. 預期此方法可協助進行往後醣體學之分析。

### 五、參考資料

1. B. Ray and W. N. Randall, *Mol. pharmacol* **60**, 405 (2001).
2. N. L. Anderson, A. D. Matheson and S. Steiner, *Curr Opin Biotechnol* **11**, 408 (2000).
3. S. D. Patterson, *Curr Opin Biotechnol* **11**, 413 (2000).
4. S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Felb and R. Aebersold, *Nature Biotechnol* **17**, 997 (1999).
5. S. P. Gygi, B. Rist and R. Aebersold, *Curr Opin Biotechnol* **11**, 396 (2000).
6. S. P. Gygi and R. Aebersold, *Curr Opin Chem Biol* **4**, 489 (2000)
7. A. Varki, *Glycobiology* **3**, 97 (1993).
8. N. Sharon and H. Lis, *Science* **227** (1989).



9. N. Sharon and H. Lis, *Science* **82** (1993).
10. R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96**, 683 (1996).
11. T. A. Springer, *Nature* **346**,425 (1990).
12. L. A. Lasky, *Science* **258**, 964 (1992).
13. S. Ratner, *Invasion Metastasis* **12**, 61 (1992).
14. J. M. White, *Curr. Biol.* **3**, 596 (1993).
15. W. F. Patton, *J Chromatogr B* **771**, 3 (2002).
16. T. Steinberg, K. Pretty On Top, K. Berggren, C. Kemper, L. Jones, Z. Diwu, R. Haugland and W. Patton, *Proteomics* **1**, 841 (2001).
17. I. Bouchez-Mahiout, C. Doyen and M. Lauriere, *Electrophoresis* **20**, 1412 (1999).
18. H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts and R. Aebersold, *Nature Biotechnol* **19**, 512 (2002).
19. Y. Qiu, E. A. Sousa, R. M. Hewick and J. H. Wang, *Anal. Chem.* **74**, 4969 (2002).
20. J. F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*, p.345~364 (1998).

S#: 1-50 RT: 0.02-1.94 AV: 50 NL: 9.28E4

T: - p ms

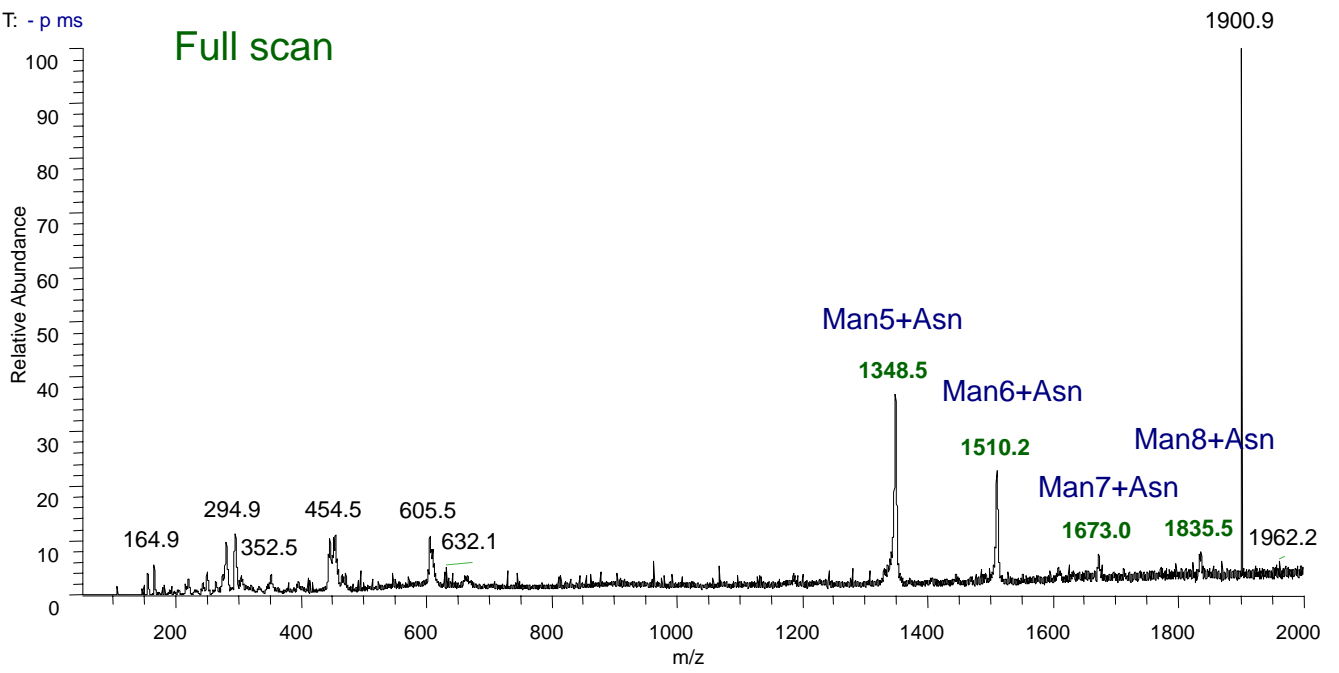


圖 1、以 ESI-IT MS 全掃描模式分析核糖核酸酶 B 以蛋白質水解酵素 Pronase 水解之結果。

S#: 1-50 RT: 0.06-3.95 AV: 50 NL: 3.11E5  
T: -p SIM ms

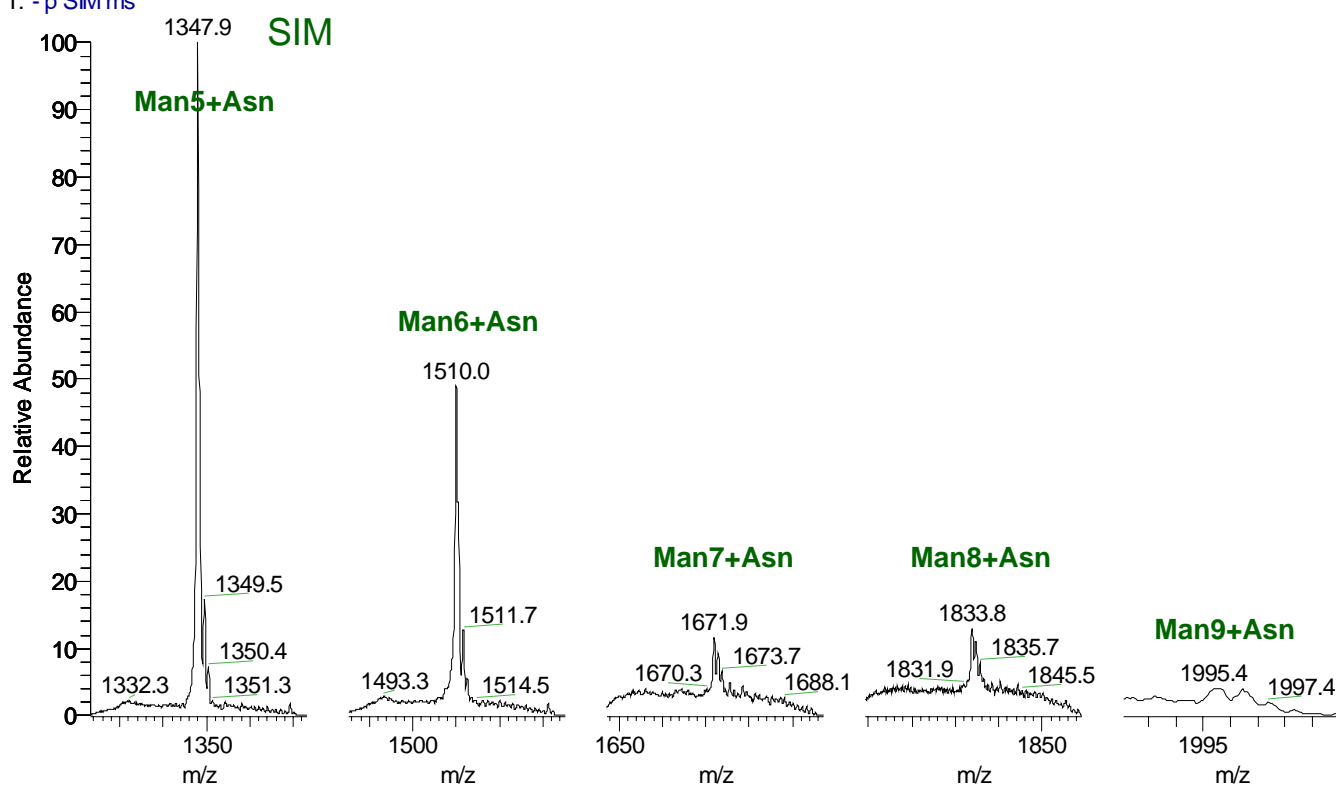


圖 2、以 ESI-IT MS 選擇離子模式分析核糖核酸酶 B 以蛋白質水解酵素 Pronase 水解之結果。

S#: 1-50 RT: 0.01-2.04 AV: 50 NL: 6.48E4  
 T: - p Full ms2 1348.00

### MS<sup>2</sup> for 1348 【Man5+Asn】

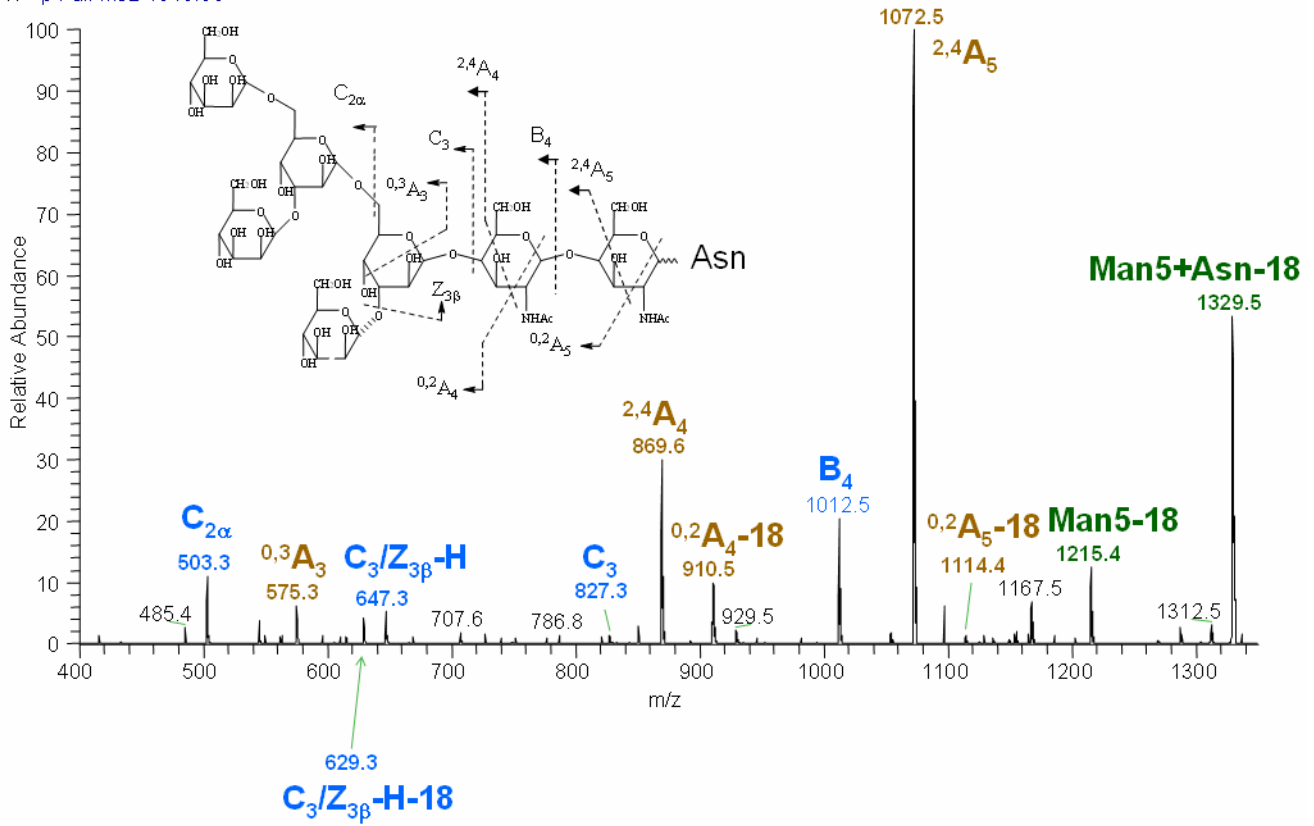


圖 3、以 ESI-IT MS/MS 分析核糖核酸酶 B 以蛋白質水解酵素 Pronase 水解之產物：Man5+Asn 之結果。

## B. 發色團閉環標記/負離子電灑

### 法-質譜/質譜分析醣蛋白

### 連接型(O-linked)醣鏈之鍵結

### 點

#### 一、中文摘要

先前用於分析醣蛋白氮連接型醣鏈鍵結點的發色團閉環標記方法在本研究中應用於醣蛋白氧連接型醣鏈的鍵結點分析。我們採取2001年Novotny等人發展的切醣方法—氨水脫去斷裂法將氧連接型醣鏈由醣蛋白上切下來，因為此切醣方法保持了醣鏈還原端的完整性，利於實驗中發色團閉環標記衍生化的進行。實驗流程如下：將切下來的醣鏈以對氨基苯甲酸乙酯衍生化，再以負離子電灑法—質譜與質譜/質譜分析，以質譜/質譜圖上觀察到的特徵裂解離子判定醣鏈的鍵結點。實驗中以 bovine fetuin 為樣本，分析其上的氧連接型醣鏈：三醣(Neu2-3Gal1-3GalNAc)，三醣水解形成的雙醣(NeuAc  $\alpha$  2-3Gal)，及四醣水解形成的雙醣(NeuAc  $\alpha$  2-6Gal).....等的鍵結點。

**關鍵字：**氧連接型醣鏈，發色團閉環標記，鍵結點分析

**Abstract：**

The closed-ring chromophore labeling approach which was used to determine linkages of N-linked oligosaccharides has been extended and applied to O-linked glycans cleaved

from glycoproteins. An ammonia-based  $\beta$ -elimination procedure which was developed for release of O-linked oligosaccharides rendered the reducing end intact. The O-linked glycans can subsequently be derivatized with *p*-aminobenzoic ethyl ester (ABEE) using glycosylamine closed-ring approach and then analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The strategy involves releasing O-linked glycans from glycoproteins, labeling glycans with ABEE, separating labeled glycans by HPLC, and determining linkages of glycans based on linkage specific fragmentation ions of ABEE labeled oligosaccharides observed in tandem mass analysis. The utility of this strategy to provide linkage information of O-linked oligosaccharides has been demonstrated using fetuin as a model glycoprotein.

**Keywords：** closed-ring chromophore labeling, O-linked glycans, *p*-aminobenzoic ethyl ester (ABEE), fetuin

#### 二、緣由與目的

隨著越來越多的研究發現，氧接型醣鏈在許多特定組織的調節及在疾病中參與的重要性，氧連接型醣鏈已成為研究的新領域。其已知的生理重要性如下：

氧連接型醣鏈常見於蛋白質的某段區域(protein domains)上，如加速衰退因子(decay accelerating factor)、免

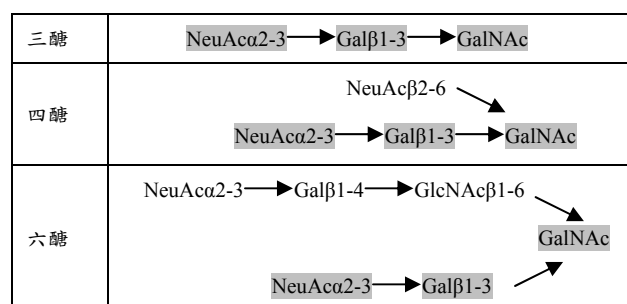
疫球蛋白 A1(IgA1)、低密度脂蛋白受體(LDL receptor)上皆有這樣的區域。此段蛋白質區域常見的功能有，穩定酵素，保護它們不因蛋白水解而分解；在結構上扮演的角色則是促成脊骨結構的改變。若欲進一步探討醣鏈的可能功能需把醣蛋白當成一整體來看，這需要同時明白蛋白質結構並結合醣鏈結構分析的資料才能達成，而其中氧連接型醣鏈的結構是較難分析的，主要的原因及困難在於，(a) 氧連接型醣鏈不像氮連接型醣鏈有共同的基本序列，(b) 有多種特定酵素如 N-glycosidases 和 endoglycosidases 可將氮連接型醣鏈由醣蛋白上切下來，但氧連接型醣鏈缺乏這樣的酵素。

本研究中採取 2001 年 Novotny 等人發展的切醣方法—氫水脫去斷裂法將氧連接型醣鏈由醣蛋白上切下來，切下的醣鏈混和許多小片段肽及鹽類，這些極性皆與醣鏈十分接近，本實驗將探討如何純化才能減少樣品複雜度，以期能達到較低的偵測極限。

另外，ABEE 閉環標記衍生化法已用在氮連接型醣鏈鍵結點的分析，本研究的目的是將此方法擴展至分析醣蛋白上氧連接型醣鏈的鍵結點，探討那些用來鑑定氮連接型醣鏈的特徵裂解離子是否可以同樣應用在判定氧連接型醣鏈的各鍵結點？

基於唾液酸普遍存在於醣蛋白的醣鏈末端且唾液酸對醣蛋白的活性扮演重要角色在生理上提供識別與結合的功能，例如，某些細胞只會辨識  $\alpha 2-6$  或  $\alpha 2-3$  其中一種鍵結。因此，我們選擇以 bovine fetuin 上的氧連接型醣鏈(末端含有  $\alpha 2-3$  及  $\alpha 2-6$  鍵結的唾液酸)來作為分析寡醣鍵結點的樣

品，其醣鏈的結構如下：



除了以 ABEE 閉環標記衍生化法分析各醣鏈的鍵結點外，也期待能區分  $\alpha 2-6$  和  $\alpha 2-3$  唾液酸鍵結點的不同。

### 三、結果與討論：

在切醣的純化步驟中，原本採用的純化方法是以石墨固相萃取管柱來去除肽和多餘的鹽類，但以 Cellobiose 醣鏈測試的實驗結果發現石墨對較短醣鏈的吸附效果並不理想，醣鏈很容易在去離子水洗鹽的過程中已流失大半部分，以致在以 25%ACN 沖提時的回收率並不理想，因此我們改成以 C18 固相萃取管柱來除去肽及雜質將含醣鏈溶液置入管柱後直接以 4ml 95%水/5%乙腈將醣鏈沖提出來。結果如圖 1，可清楚看見荷質比 673.5(三醣)及 470.3(三醣的還原端丟掉一 GalNAc)的訊號。

ABEE 閉環標記後的結果如圖 2 所示，分別可觀察到荷質比 (m/z)821.2(完整三醣+ABEE)、617.8(因鹼水解自三醣還原端丟掉一 GalNAc 的雙醣+ABEE)，及 367.9(從還原端掉下來的單醣 GalNAc+ABEE)。將其中 m/z 617.8(即雙醣 NeuAc  $\alpha$  2-3Gal+ABEE)作質譜/質譜分析，得到的圖譜(圖 3)中出現 2-3 鍵結

的特徵裂解離子  $m/z$  260.1( $Z_1-48$ )與  $m/z$  527.2( $^{0,3}X_1$ )，因此，我們得知此含唾液酸的雙醣是 2-3 而非 2-6 鍵結。再以 zoom scan(高解析度掃描)尋找四醣還原端水解掉下來的 NeuAc  $\alpha$  2-6 GlcNAc 片段  $m/z$  657 (NeuAc  $\alpha$  2-6 GlcNAc+ABEE)，質譜/質譜分析時清楚地看見 2-6 鍵結之特徵解離子  $m/z$  409.2( $^{0,2}A_2$ )與  $m/z$  380.0( $^{0,3}A_2$ )(圖 4)，可以判定此雙醣為 2-6 而非 2-3 鍵結。

在三醣還原端鍵結點分析中將 ABEE 閉環標記的質譜圖上  $m/z$  821.2(673.5+ABEE)作質譜/質譜分析，得到圖 5，圖中清楚看見還原端 1-4 鍵結的特徵裂解離子  $m/z$  554.1( $^{0,2}A_3-18$ )。但文獻報導的 fetuin 氧連接型三醣還原端應為 1-3 鍵結，而非 1-4 鍵結判斷，質譜圖上的 673 三醣訊號可能來自兩個部分：

- (a) 完整的三醣醣鏈 (NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GalNAc)
- (b) 由六醣還原端水解 GalNAc 後得到的三醣 (NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4 GlcNAc)

為了進一步證實此一假設，我們將三醣末端的唾液酸去除得到雙醣訊號  $m/z$  528(381+ABEE)以質譜/質譜分析，得到圖 6 發現其中同時擁有 1-3 鍵結( $m/z$  348.9,  $Z_1$ )與 1-4 鍵結( $m/z$  262.7,  $^{0,2}A_2-18$ )特徵裂解離子。可見三醣訊息的確同時包含兩種同質異構物的雙醣 (Gal  $\beta$  1-3GalNAc 與 Gal  $\beta$  1-4GlcNAc)，但還需進一步以逆相高效能液相層析(reverse phase HPLC)將此兩同質異構物的雙醣分離才能以質譜/質譜個別鑑定其鍵結點。

#### 四、計畫成果自評

1. 本實驗以 C18 純化方法減少醣鏈流失，使醣鏈分析能達到消耗樣品更少及分析結果更明確的目的。
2. 以 ABEE 閉環標記衍生化 bovine fetuin 的氧連接型醣鏈可以判定由三醣水解一 GalNAc 而形成的 NeuAc  $\alpha$  2-3Gal 與由四醣水解產生的 NeuAc  $\alpha$  2-6GalNAc 片段的鍵結點，達到以質譜/質譜特徵裂解離子區分唾液酸 2-3 與 2-6 鍵結的目的。
3. 在三醣鍵結點分析中，同時觀察到還原端 1-3 及 1-4 鍵結的特徵裂解離子，判斷 1-4 特徵裂解離子可能來自自由六醣水解下來的同質異構醣鏈 (NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc)，未來將在質譜分析前先以 HPLC 分離、純化醣鏈，或直接結合 HPLC/MS 連線方式來得到更多鍵結點訊息。

#### 五、參考資料

1. Taj S. Mattu, Louise Royle, *Biochemistry*. 39, 15695(2000)
2. M.V. Novotny, *Anal. Chem.* 73, 6063(2001)
3. Domon, B. and Costello, C.E., *Glycoconjugate J.* 5, 397(1988)
4. K. Yoshino, T. Takao, H. Murata and Y. Shimonishi, *Anal. Chem.* 67, 4028 (1995)
5. White, C. C. and Kennedy, J. F. *An Introduction to The Chemistry of Carbohydrates*, Clarendon Press : Oxford, 1988 ; pp42-67
6. Yunping Huang, Yehia Mechref,

- and Milos V. Novotny, *Anal Chem.* 73, 6063 (2001)
7. D.M. Sheeley, V.N. Reinhold, *Anal. Chem.* 70, 3053 (1998)
  8. Y. Mechref and M.V. Novotny, *Chem Rev.* 102, 321(2002)



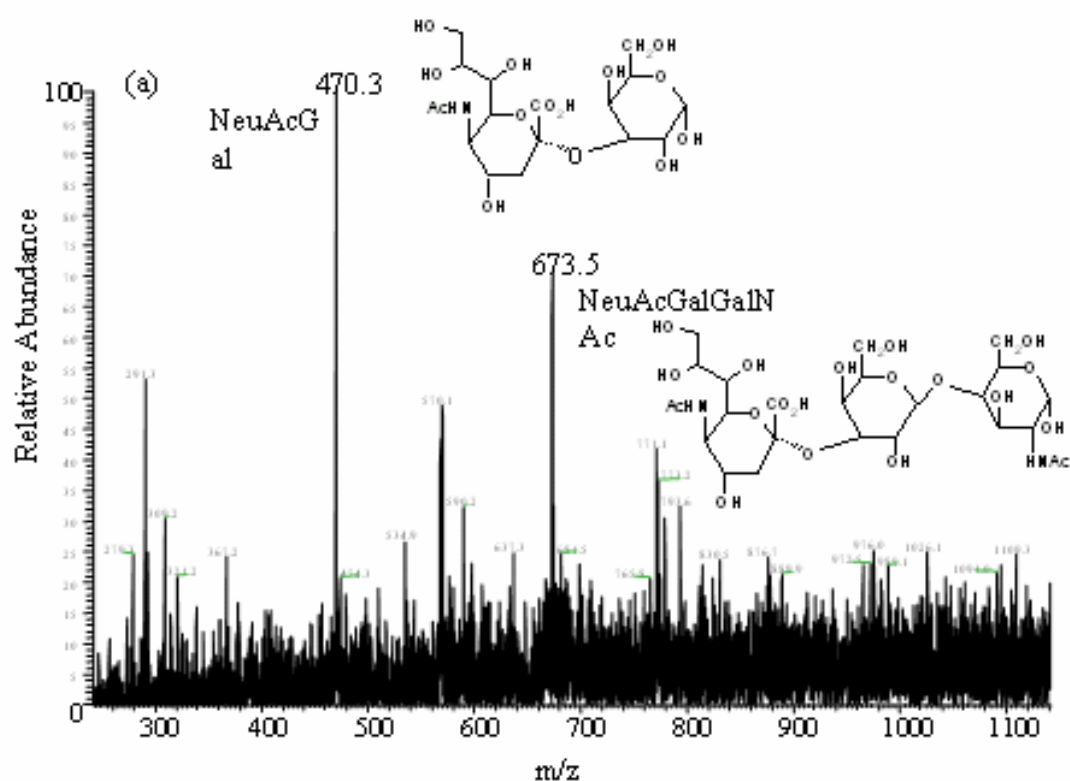


圖1 以C18純化 bovine fetuin 醣鏈後得到的質譜圖

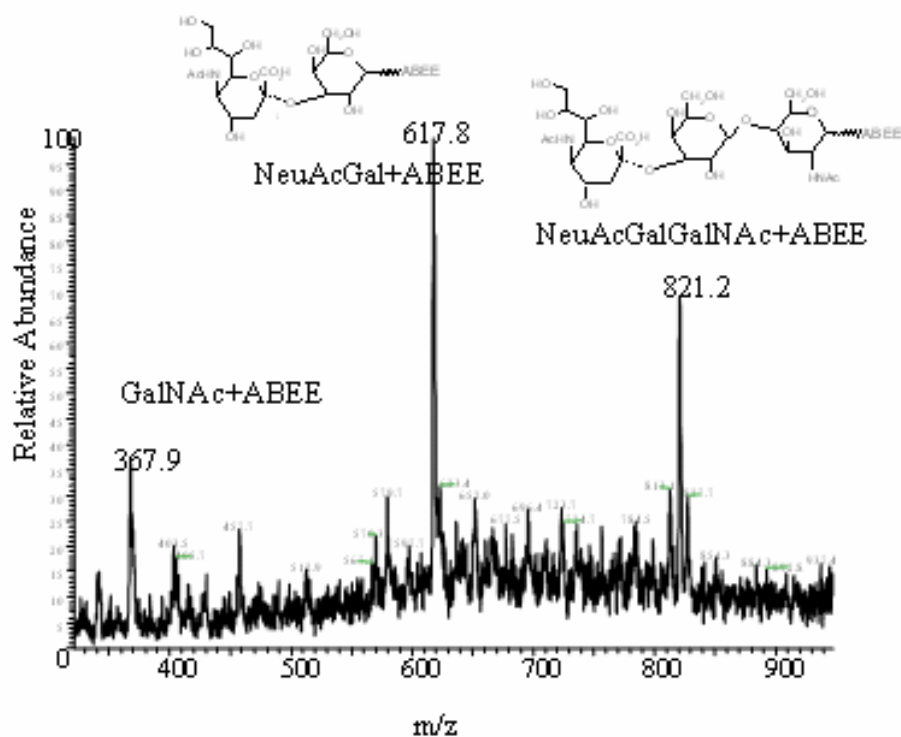


圖2 ABEE閉環標記 bovine fetuin 氧連接型醣鏈

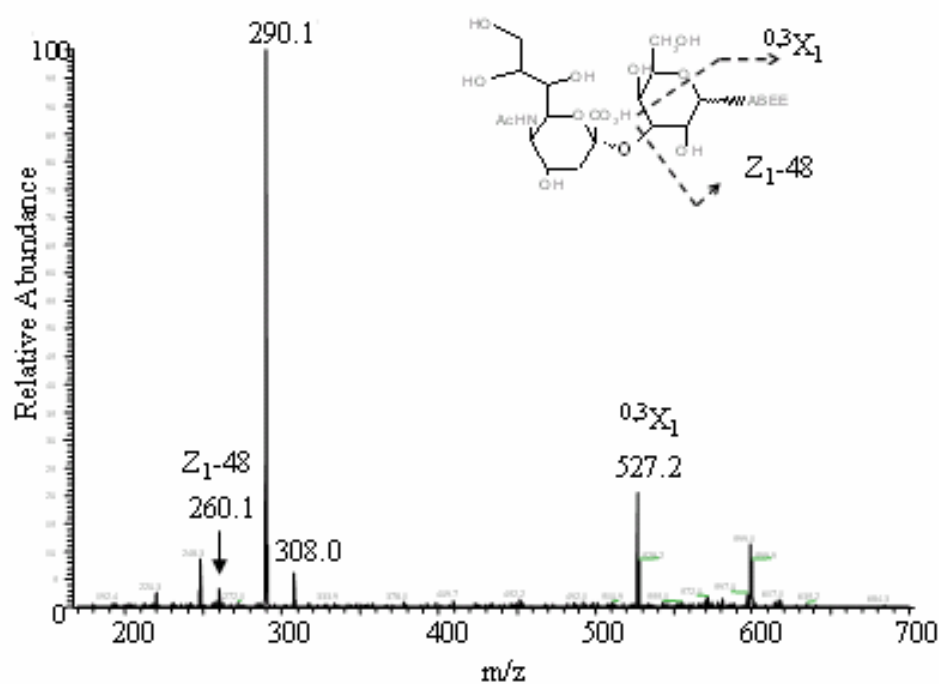


圖 3 ABEE閉環標記bovine fetuine 氧連接型醣鏈之雙醣  
NeuAc $\alpha$  2-3Gal (m/z617)質譜/質譜圖，m/z 617.8

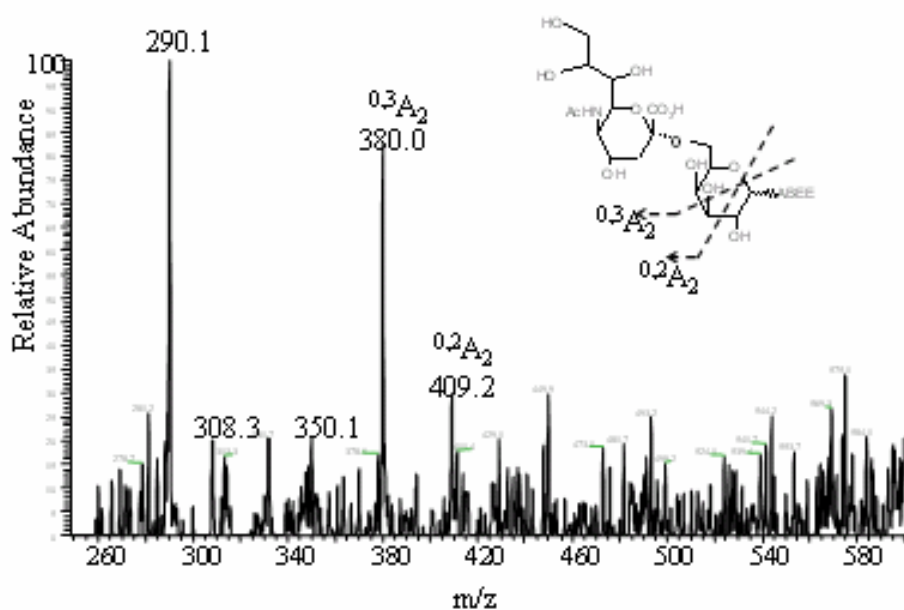


圖 4 ABEE閉環標記bovine fetuin 氧連接型醣鏈之四醣水解片段  
NeuAc $\alpha$  2-6Glc 質譜/質譜圖，m/z 657

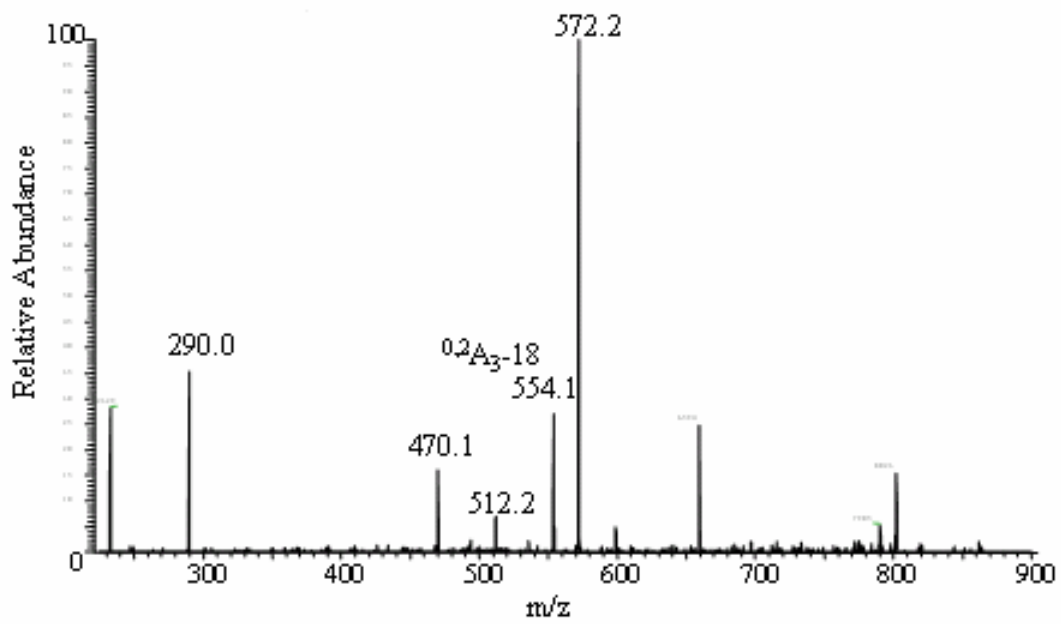


圖 5 (a) ABEE閉環標記bovine fetuine 氧連接型醣鏈之三醣質譜 / 質譜圖，m/z 821.2

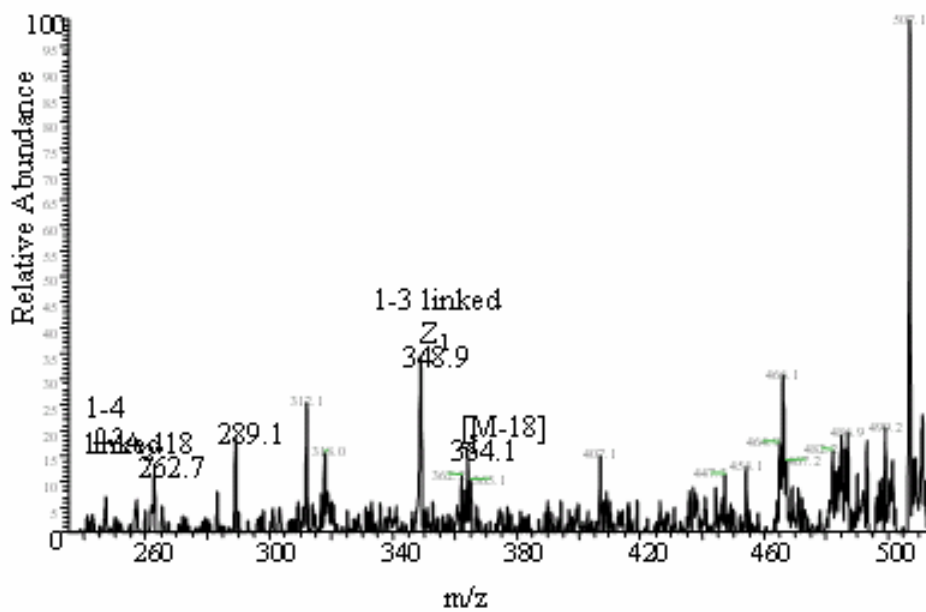


圖 6 ABEE閉環標記bovine fetuin 氧連接型醣鏈之三醣去喹液酸質譜 / 質譜圖，m/z 528