

# 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(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-002-033-

執行期間：93年08月01日至94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

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 94 年 6 月 8 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：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日  
主持人：何國榮 台灣大學化學系

## 第一部分：毛細管電層析質譜儀 相關技術之發展與應用

### A. 毛細管電層析/電灑法質譜儀 之開發與應用

#### 一、中文摘要

毛細管電層析 (capillary electrochromatography, CEC) 是結合毛細管電泳與高效能液相層析之特性的分離技術，藉由此特性可分離帶電荷及中性的分析物。以電灑法 (electrospray ionization, ESI) 質譜儀做為偵測器時，可以由滯留時間與質量做為定性的依據。

在毛細管區帶電泳下，分析市售常見的八種除草劑，卻無法有效的達到分離效果；實驗室曾經使用微胞電動電泳 (MEKC)，成功的分離這八種除草劑，但是在接上質譜儀分析後，由於緩衝溶液中加入非揮發性的添加劑 (介面活性劑 SDS)，造成在離子化的過程中，添加劑與分析物互相競爭液珠過量電荷而抑制質譜訊號；本實驗的目的在捨去介面活性劑 (SDS) 的使用，避免 SDS 對除草劑質譜訊號的抑制，改以開管式毛細管 (C8) 與填充式

毛細管 (C18) 為分離工具，利用靜相與除草劑間的作用力達到分離的效果；此外，實驗中將緩衝溶液醋酸銨的濃度降低，使醋酸銨對除草劑的抑制現象降到最低。

**關鍵字：**毛細管電層析 (CEC)，質譜儀，微胞電動電泳 (MEKC)

#### Abstract:

Capillary electrochromatography (CEC) can be considered to be a hybrid of capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) that has the potential to become a powerful separation tool for the analysis of charge and neutral mixtures. Electrospray ionization (ESI)-MS is the best chromatography detector available for both retention time and mass analysis.

The eight commercial triazines cannot be separated effectively by capillary zone electrophoresis (CZE). Thus, in our earlier work, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been investigated and the method can successfully separate the eight triazines. However, when MEKC was

coupled with MS, the surfactant-SDS competed with the analyte about the surface charge of droplet. Therefore, the sensitivity is degraded. To overcome the effect of ionization suppression, ot-CEC and packed-CEC were studied. The results showed that seven out of the eight triazines could be separated and the sensitivity was found to be 10 and 5 times better than MEKC and CZE approaches respectively.

**Keyword:** capillary electrochromatography, MEKC, mass analyzer

## 二、緣由與目的

傳統上，毛細管電泳是依靠分析物本身在電場的作用下，根據分析物的離子遷移率達到分離的效果。然而中性物質卻會隨著電滲流同時被沖提出來，因此中性物質是無法在毛細管區帶電泳中被分離的；1984年 Terabe(1)等人提出微胞電動毛細管層析電泳(MEKC)的方法，它是一種結合微胞液相層析與毛細管區帶電泳的分離方法，分離的機制主要是利用分析物在微胞相與水相之間的分配作用，產生分離的效果，因此可以有效的分離中性物質。例如：介面活性劑(如：SDS)，在電泳的分離過程中，陰離子表面活性劑分子(SDS)和微胞會向陽極端移動，與電滲流的方向相反，但是電滲流的流動還是比微胞的移動速率快，因此微胞最終移動的方向還是與電滲流方向一致。

然而將微胞電動毛細管層析電泳銜接上質譜後，由於微胞會隨著分析物一起流析出來，經過電灑的過程中，

帶電荷液珠同時包含著分析物與微胞。因為介面活性劑是帶有長鏈型的碳鏈，所以其表面活性大，容易移動到電灑液珠的表面而形成離子簇，使得分析物無法有效的游離化，因此分析物的質譜訊號就會被抑制。

為了降低介面活性劑對質譜訊號的干擾，本實驗以固定式的靜相(CEC)，取代介面活性劑(MEKC)。實驗中利用固定式的靜相，藉由八種除草劑在動相與靜相間分配係數的不同，對除草劑達到分離的效果，因為沒有介面活性劑的抑制，可有效的提升分析物的質譜訊號。

## 三、結果與討論

毛細管電層析有多種的製作方式，本實驗中選擇了開管式毛細管及填充式毛細管，做為分離八種除草劑的分離工具。選擇此兩種毛細管的特性分別介紹如下：(1)開管式毛細管：使用溶膠凝膠製作(2~3)的 C8 開管式毛細管，它的缺點就是塗佈的表面靜相薄，造成對樣品的承載量(loading capacity)很低，所以如何有效的尋找分離條件，且能夠發揮開管式毛細管對樣品的滯留能力，是實驗中重要的問題；(2)填充式毛細管：需要高壓裝置幫助填充，普遍上填充式毛細管經常被使用的原因是由於其在靜相的選擇方面是相當多變化的。本實驗使用 C18 的靜相，利用長碳鏈端與分析物作用。在分析的過程中，frit 或填充顆粒間的氣泡需要小心的除去，避免造成斷電或導致分析帶的變寬，尤其是燒結 frit 的毛細管處，相當的脆弱需要小心的使用，避免造成 frit 端的毛細管斷裂。

毛細管電層析與質譜儀銜接的界面，本實驗採用實驗室之前所設計的低流速鞘流界面，其目的乃降低傳統鞘流界面對於分析物的稀釋效應，因此實驗所採用的毛細管電層析/質譜儀界面，皆使用低流速鞘流界面，以利於分析物訊號的提升。

### 3-1、毛細管電層析\電灑法界面的使用概念

毛細管電層析與質譜儀銜接的界面中，比較常使用的有兩種，一個為無鞘流界面，一個為鞘流界面，以下個別介紹。(1)無鞘流界面：文獻上(4~8)毛細管電層析/質譜儀使用無鞘流界面的文章不多，因為其製備不易及施加高電壓於毛細管電灑噴頭端易導致電化學反應，造成塗附的導電物質剝落。一般若是毛細管電泳以純水相的緩衝溶液作為分離條件的話，容易因為水的表面張力過大，使得噴灑電壓過大，造成放電的現象，不利於電灑離子的形成，然而毛細管電層析使用的緩衝溶液中，含有一定比例的有機溶劑，恰好符合無鞘流界面的使用，不過有機溶劑在流經塗附的導電物質時，也會因為化學反應導致導電物質脫落，造成毛細管使用壽命的減短，所以本實驗不採用無鞘流界面。(2)鞘流界面：文獻上(9~13)使用鞘流界面的文章居多，因為鞘流溶液界面以鞘流溶液作為毛細管電層析的接地極(ground)，維持毛細管電層析的電通路，所以使用上較無鞘流界面方便許多，特別是利用毛細管電層析分離八種除草劑時，因為它們的 pKa 值介於 1.62 ~ 4.3 之間，當緩衝溶液的 pH 值調至 7.0 時，大部分除草劑皆為中性

的分子，除草劑經過逆相毛細管電層析分離後，進入鞘流溶液中，因為鞘流溶液中加入少許的酸，除草劑即可有效的形成“預成離子”，有助於分析物的離子化。

但是鞘流界面始終存在著一個問題，那就是一般電灑法為了達到穩定噴灑與高靈敏度的訊號，通常分析的流速操作在最佳流速(optimum flow rate)的範圍，也就是在這個流速下，電灑的靈敏度不再隨著流速的增加而上升，僅隨分析物的濃度上升而訊號上升。一般毛細管電層析在銜接質譜儀時，由於電滲流產生的流速只有 100 nl/min 以下，而傳統鞘流電灑法界面的最佳流速為 3~5  $\mu$ l/min，因此需要外加溶液，補足電灑流速來達到最佳流速，所以會造成分析物被鞘流溶液稀釋；而在 1996 年時 Wilm 和 Mann(14)曾提出縮小毛細管末端口徑，即可降低電灑法的最佳流速，此電灑的技術稱為微電灑法(nanospray)。根據實驗室之前的研究，使用低流速鞘流界面時，將電灑毛細管末端口徑開成 25  $\mu$ m 後，此時電灑最佳流速約為 200~300 nl/min，對於毛細管電層析所產生的電滲流流速在 100 nl/min 以下的流速而言，低流速鞘流溶液只需要補充約 100~200 nl/min，即可達到電灑訊號的最佳流速。因此相較於傳統電灑法界面而言，低流速鞘流界面對於分析物的稀釋作用較低，所以本實驗採用低流速鞘流界面避免分析物被鞘流溶液大量稀釋。

### 3-2、開管式毛細管\質譜儀的分離

開管式毛細管因為塗佈的靜相僅有薄薄的一層 C8 靜相，因此對於分析物

的承載量 (sample capacity) 低，所以在選擇分離條件時相當重要。實驗中曾經嘗試使用緩衝溶液條件為 (50 mM 醋酸銨 pH 值為 7.0)，首先以毛細管區帶電泳測試八種除草劑的分離狀況，由 CE-UV 圖 (圖 1.a) 得知，只有兩根層析峰，推測由於 pH 值為 7.0 時，絕大部分的除草劑以中性分子為主，幾乎隨著電滲流一起流析出來，最後僅能靠高濃度的醋酸銨 (50 mM) 達到些許的分離。以相同的緩衝溶液條件，測試開管式毛細管電層析的分離狀況，由 ot-CEC-UV 圖 (圖 1.b) 發現，因為開管式的靜相很薄，C8 靜相幾乎沒有任何分離上的貢獻，所以八種除草劑幾乎都在同一個時間出來，甚至層析峰的尾端有拖尾的現象。

由上述實驗可知，將緩衝溶液的 pH 值調至 7.0，此時幾乎所有除草劑為中性分子，又由於開管式毛細管的相比比例 (phase ratio) 過低，所以沒有任何的分離效果。因此，為了遷就開管式毛細管相比比例低的問題，所以一開始在選擇緩衝溶液條件時，就必須選擇有良好分離的最佳條件。

首先緩衝溶液的比例配製成 50 mM 醋酸銨於 80% 的乙腈 (acetonitrile, ACN) 中，將 pH 值調整至 3.85。由 (圖 2) 中觀察，三個 pKa 相似且含 -Cl 的除草劑，幾乎沒有分開的現象，這樣的情形就像在毛細管區帶電泳一般，推測的原因是因為在高達 80% 的乙腈，除草劑與 C8 靜相的作用時間短，因此幾乎同時流析出來。至於 Prometon、Simetryn、Ametryn 的分離狀況也幾乎與毛細管區帶電泳相似，帶有 -OCH<sub>3</sub> 的 Prometon 最快被流析出來。而 Terbutryne 與 Prometryn 推測因為其

兩者的碳鏈非極性端較其他除草劑來的高，所以與 C8 靜相的作用力也較強，連帶著遷移的時間也增長了，其中 Terbutryne 的層析峰有變胖的現象，推測是由於靜相的承載量過低，再加上分析物自身的電泳遷移所致，而造成分析帶變寬。

於是試著降低乙腈的比例，增加分析物與靜相間的作用時間。將緩衝溶液的比例配製成 50 mM 醋酸銨於 50% 的乙腈中，將 pH 值調整至 3.85。由 (圖 3) 發現，因為乙腈比例的降低，三個含 -Cl 的除草劑與 C8 靜相間的作用時間增加而達到分離，且三種含 -Cl 的除草劑分離順序，與微胞電動毛細管層析電泳 (見圖 4) 的分離順序相同，出來時間依序為 Simazine、Atrazine、Propazine，主要因為三個含 -Cl 的除草劑，其末端非極性大小 (碳鏈個數) 依序為 Simazine < Atrazine < Propazine。至於 Prometon、Simetryn、Ametryn 的分離狀況與 80% 的乙腈相似，不過 Simetryn 與 Ametryn 似乎有些微的分開。而 Terbutryne 由於乙腈的比例降低，層析峰有越來越胖的趨勢，幾乎快要與背景值相同，造成難以分辨層析峰。Prometryn 的層析時間和在 80% 乙腈不同，層析峰並未與三個含 -Cl 的除草劑重疊在一起，推測此三個中性的除草劑與 C8 靜相作用時間增加，使得流析出來的時間增長，不再與 Prometryn 重疊在一起。

雖然降低乙腈的比例，增加除草劑在動相與靜相間的作用時間而分離八種除草劑。但是缺點為：第一、分離時間過長，需要花費將近五十分鐘的時間。第二、受限於需要使用毛細管區帶電泳的最佳分離條件，緩衝溶液

的濃度(50 mM 醋酸銨)仍舊會造成質譜訊號的抑制。

為了解決開管式毛細管相比比例過低的缺點，與 50 mM 醋酸銨對分析物質譜訊號的抑制效應，接下來選擇填充式毛細管，做為分析八種除草劑的分離管柱。

### 3-3、填充式毛細管\質譜儀的分離

填充式毛細管最常使用的原因為：第一、所使用的填充顆粒，可以選擇一般 HPLC 所填充的靜相。第二、文獻上有許多製作填充式毛細管的流程(15~18)。第三、填充式毛細管的靜相對於分析物的承載量(sample loading capacity)高過於開管式毛細管。但是填充式毛細管最大的困難就是 frit 的影響。

有鑑於出口端 frit 會造成氣泡的產生，於是本實驗將毛細管以拉尖的方式製作成填充式毛細管，而且拉尖後的毛細管，僅需要製作入口端的 frit，而真正造成氣泡的主要原因卻是末端的 frit，所以拉尖的填充式毛細管能夠避免上述氣泡對實驗所造成的影響。

一開始緩衝溶液的比例配製成 5 mM 醋酸銨於 90%的乙腈(acetonitrile, ACN)，測試毛細管電層析/質譜儀的分離，由(圖 5)發現，只有 Terbutryne 是分開的，其它七種除草劑幾乎跟在毛細管區帶電泳下一樣都重疊在一起，雖然可以看到些微的分離，主要是因為除草劑在 90%的乙腈動相中與 C18 靜相間的分配效率太低，幾乎沒有太大的滯留效果，只有 Terbutryne 與 C18 的作用時間較長，得以分離出來。

因此，將乙腈的比例降低，讓除草劑在動相與靜相間的作用時間增加，以達到分離的效果，由(圖 6)把乙腈的比例調至 80%時，大致上八種除草劑可以分出七根層析峰，只有 Propazine 和 Simetryn 兩個分析物明顯的重疊在一起，無法有效的分離開來，但是可以利用質譜儀對質量的選擇而區別出 Propazine(m/z 230)與 Simetryn(m/z 214)兩者。雖然不能利用毛細管電層析對分析物的滯留時間判斷分離，不過卻可以根據質量不同達到鑑定的功能。

### 3-4、開管式 v. s. 填充式 CEC/質譜儀

開管式與填充式毛細管電層析對分離而言，最大的不同便是相比比例的大小問題。由實驗得知將緩衝溶液的 pH 值調為 7.0 時，對開管式毛細管電層析(圖 1.b)而言，由於相比比例過低靜相幾乎對分析物沒有任何分離的貢獻，所以沒有分離的效果；對填充式毛細管電層析(圖 6)而言，由於其靜相對分析物的高承載量，因此分離效率遠比開管式毛細管好。

而為了彌補開管式毛細管的缺點，實驗中採用毛細管區帶電泳的最佳分離條件(50mM 醋酸銨 pH 3.85)。因此，開管式毛細管電層析與毛細管區帶電泳的分離圖譜比較相近，分離的概念主要是先依靠分析物本身電泳遷移速率的不同達到初步的分離效果，再加上分析物與 C8 靜相的作用而分離。但是因為使用的緩衝溶液為 50mM 醋酸銨、pH 值為 3.85，所以電滲流相當的慢，再加上使用 50%的乙腈，使得整體分析的時間變的相當長(55 分鐘)。填充式毛細管電層析，使用的緩衝溶

液為 5mM 醋酸銨、pH 值為 7，在這個條件下，可以增快電滲流縮短分析的時間(22 分鐘)。

對質譜訊號抑制而言，填充式毛細管使用的緩衝溶液為 5mM 醋酸銨，對於分析物的質譜訊號抑制可以有效的降低由圖 7。而開管式毛細管受限於必須使用高濃度之緩衝溶液(50mM 醋酸銨)才能有好的分離條件，因此開管式毛細管緩衝溶液條件對分析物的抑制效應高過於填充式毛細管。不過兩者對於除草劑訊號的提升，都較微胞電動毛細管層析電泳來的好，見(表 1)。

### 3-5、填充式 CEC v. s. MEKC/質譜儀

填充式毛細管電層析(圖 6)與微胞電動毛細管層析電泳(圖 4)的緩衝溶液之條件皆將 pH 值調至 7.0，所以此時除草劑幾乎為中性分子，若由兩者的分離圖譜互相比較，可以發現其兩者的分離機制非常相似，靠著動相與靜相間的分配不同，將除草劑分離開來，首先含-Cl 的三個除草劑依照其非極性度的大小 Simazine <Atrazine <Propazine 依序的流析出來，其後跟著含-SCH<sub>3</sub>的 Simetryn、Ametryn 及含-OCH<sub>3</sub>的 Prometon 出現，接著是含-SCH<sub>3</sub>的 Prometryn 與 Terbutryne。隨著除草劑的非極性度越大(碳鏈的增加)，除草劑與靜相間的作用力越強，滯留的時間也跟著增加，而達到分離的效果。

另外，將兩種分離方法的訊號互相比較得知(表 2)，由於填充式毛細管以 C18 靜相取代 SDS 的功用，再加上緩衝溶液醋酸銨的濃度降到 5mM，推測可以有效增加除草劑的訊號強度。由表中發現毛細管電層析(CEC)的八種

除草劑訊號強度都大過於微胞電動毛細管層析電泳(MEKC)的除草劑訊號強度約 10 倍以上；再由訊號雜訊比(S/N)的資訊得知，毛細管電層析因為沒有微胞對質譜訊號的抑制效應，所得到的訊號及雜訊訊號大小，都較微胞電動毛細管層析電泳來的好，大致上訊號雜訊比值(S/N)上升約 3~14 倍之多。

### 四、計畫成果自評

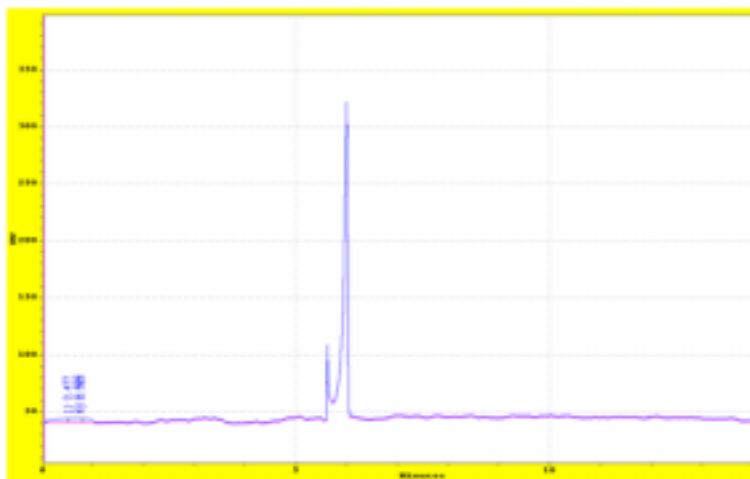
1. 毛細管電層析以固定式的靜相(CEC)，取代 SDS(MEKC)的使用，可捨去因 SDS 競爭液珠表面電荷，而造成除草劑質譜訊號的抑制。
2. 降低緩衝溶液醋酸銨(NH<sub>4</sub>OAc)的濃度，可減少緩衝溶液對除草劑質譜訊號的抑制
3. 使用低流速鞘流介面，除了保持鞘流溶液的優點外，尚可降低鞘流溶液對分析物的稀釋效應。
4. 質譜儀搭配毛細管電層析：
  - (1)開管式毛細管因為相比比例(phase ratio)較低，所以需要搭配毛細管區帶電泳的最佳分離條件，才可有效的分離八種除草劑，但是分析的時間仍過長。
  - (2)填充式毛細管雖然無法像微胞電動毛細管層析電泳完全的分離八種除草劑(可分離七種)，但是捨棄微胞(SDS)的使用與降低緩衝溶液醋酸銨的濃度，確實可以有效的提升分析物的訊號。

### 五、參考資料

1. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchikya and T. Ando., *Anal. Chem.*, **56**, 111, (1984).
2. A. Malik, *Electrophoresis*, **23**, 3983, (2002).
3. Y. Guo and L.A. Colon, *Anal. Chem.*, **67**, 2511, (1995).
4. G.A. Lord, D.B. Gordon, P. Myers and B.W. King, *J. Chromatogr. A*, **768**, 9, (1997).
5. J.T. Wu, P. Huang, M.X. Li, M.G. Qian and D.M. Lubman, *Anal. Chem.*, **69**, 320, (1997)
6. G.M. Gaspari, M. Walhagen, K. Vreeken, R.J. Verheij and E. R. van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 1448, (2000)
7. R.N. Warriner, A.S. Craze, D.E. Gaes and S.J. lane, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1143, (1998)
8. A.R. Ivanov, C. Horvath and B.L. Karger, *Electrophoresis*, **24**, 3663, (2003).
9. C. Desiderio and S. Faali, *J. Chromatogr. A*, 895, 123, (2000).
10. K. Walhage, M. Gaspari, U.R. Tjaden, G.P. Rozing and van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 878, (2001)
11. S.J. Lane and M.G. Tucker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 947, (1998)
12. V. Spikmans, S.J. Lane and N.W. Smith, *Chromatographia*, **51**, 18, (2000)
13. A.H. Que, A. Palm, A.G. Baker and M.V. Novotny, *J. Chromatogr. A*, **887**, 379, (2000)
14. M. S. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.*, **68**, 1, (1996).
15. L.A. Colon, T.D. Maloney and A.M. Fermier, *J. Chromatogr. A*, **887**, 43, (2000).
16. A. Malik, W. Li and M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.*, **5**, 361, (1993).
17. C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R.N. Zare and D.J. Reksraw, *Anal. Chem.*, **67**, 2026, (1995)
18. R. Stol, M. Mazereeuw, U.R. Tjaden and J. van der Greef, *J. Chromatogr. A*, **873**, 293, (2000).



(a) CE-UV



(b) ot-CEC-UV

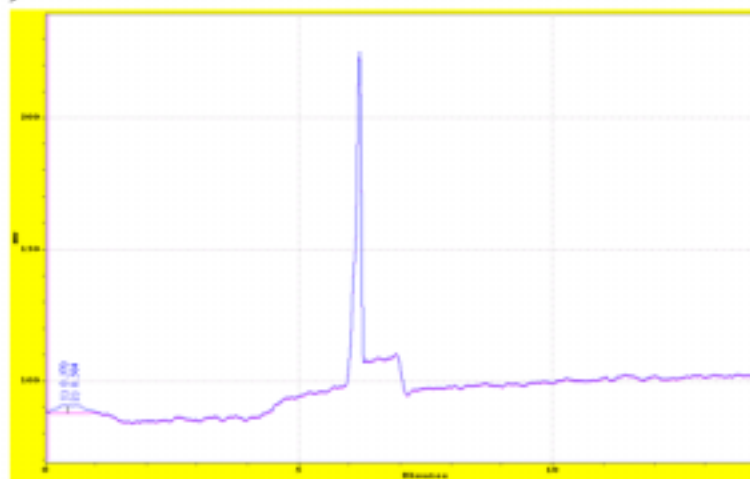


圖 1、(a)以毛細管電泳分析八種除草劑之 CE-UV 圖。

(b)以開管式毛細管電層析分析八種除草劑之 ot-CEC-UV 圖。  
緩衝溶液為 50 mM 醋酸銨 pH 值為 7.0，分離電壓為+20 kV

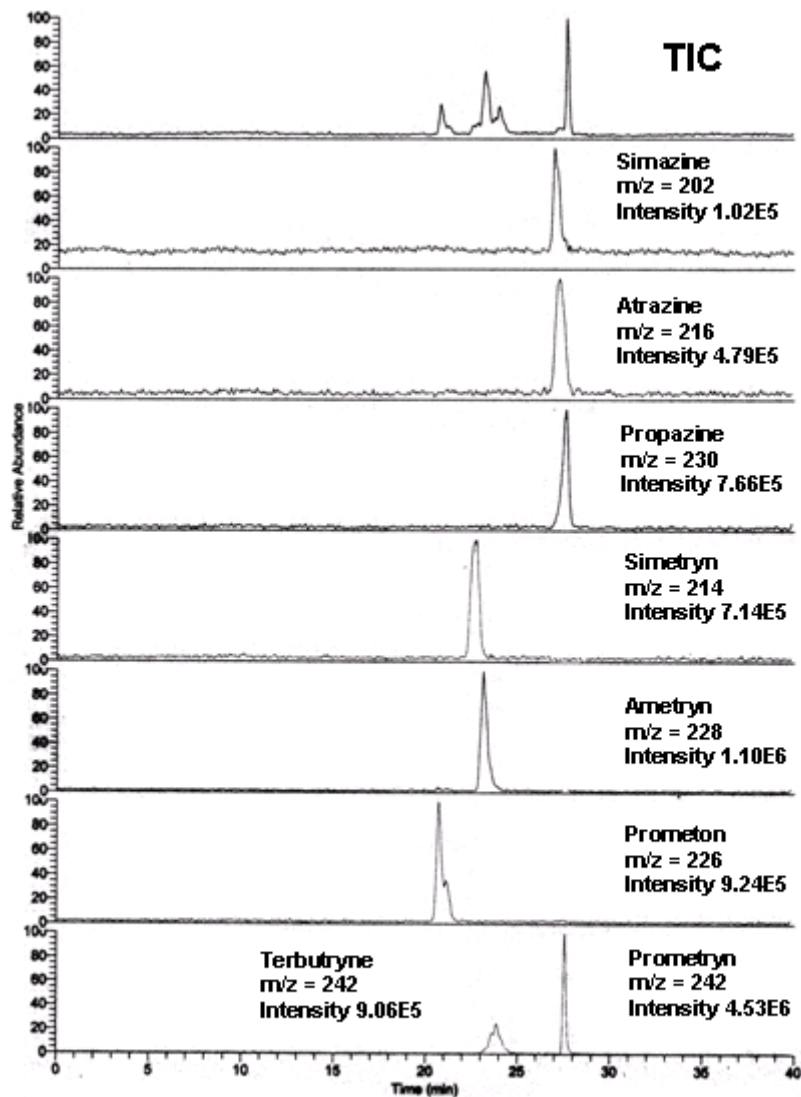


圖 2、使用低流速鞘流界面，以開管式毛細管電層析分析八種除草劑之質譜層析圖。分離的緩衝溶液為 50 mM 醋酸銨於 80% 的乙腈(acetonitrile)中( pH =3.85)，鞘流溶液為 70 % 甲醇 + 1 % 醋酸，電灑電壓為 +2 kV，毛細電泳分離電壓為 +22 kV

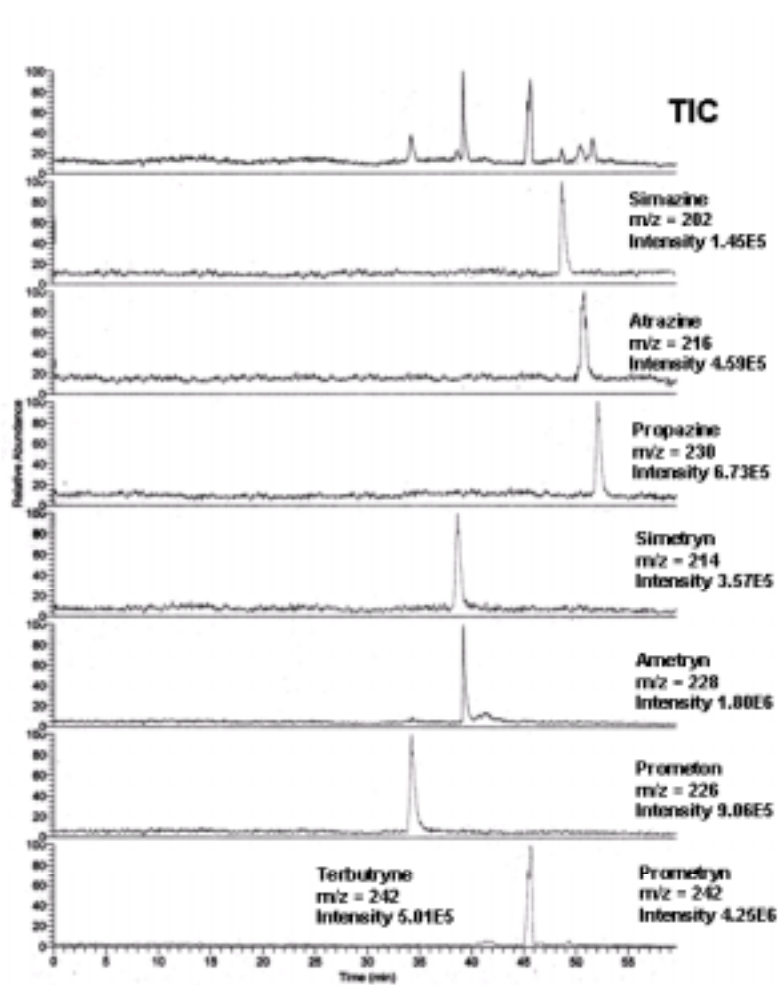


圖 3、使用低流速鞘流界面，以開管式毛細管電層析分析八種除草劑之質譜層析圖。分離的緩衝溶液為 50 mM 醋酸銨於 50% 的乙腈(acetonitrile)中 (pH = 3.85)，鞘流溶液為 70 % 甲醇 + 1 % 醋酸，電灑電壓為 + 2 kV，毛細電泳分離電壓為 +22 kV

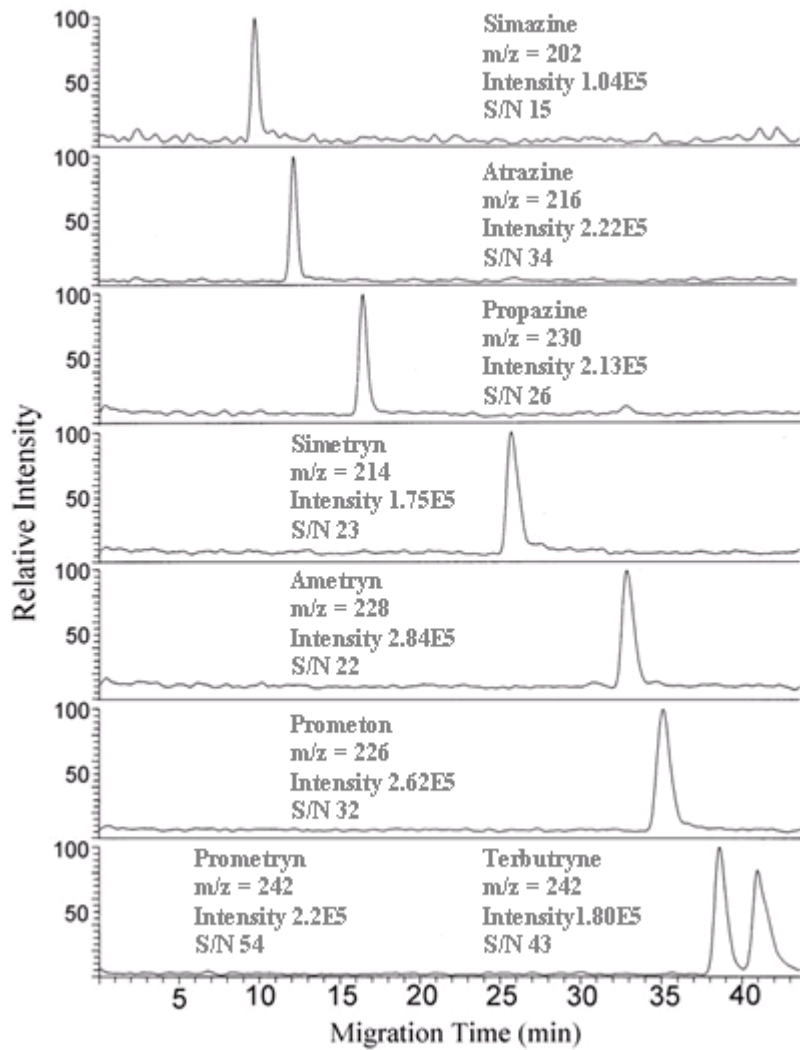


圖 4、使用低流速鞘流界面，以微胞電動毛細管層析電泳 (MEKC) 分析八種除草劑之質譜層析圖。分離的緩衝溶液為 20 mM 醋酸銨+ 25 mM SDS( pH = 7)，鞘流溶液為 70 % 甲醇+1 % 醋酸，電灑電壓為+ 2 kV，毛細電泳分離電壓為+22 kV

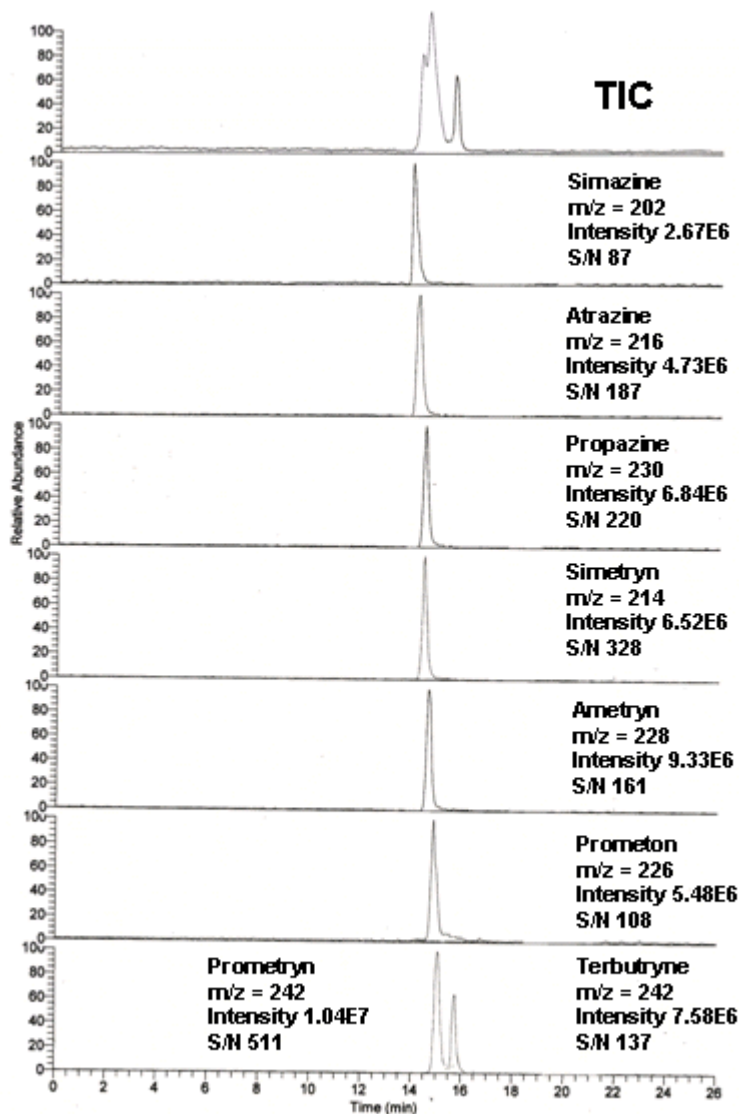


圖 5、使用低流速鞘流界面，以填充式毛細管電層析分析八種除草劑之質譜層析圖。分離的緩衝溶液為 5 mM 醋酸銨於 90% 的乙腈(acetonitrile)中 (pH = 7)，鞘流溶液為 70 % 甲醇 + 1 % 醋酸，電灑電壓為 + 2 kV，毛細電泳分離電壓為 + 22 kV

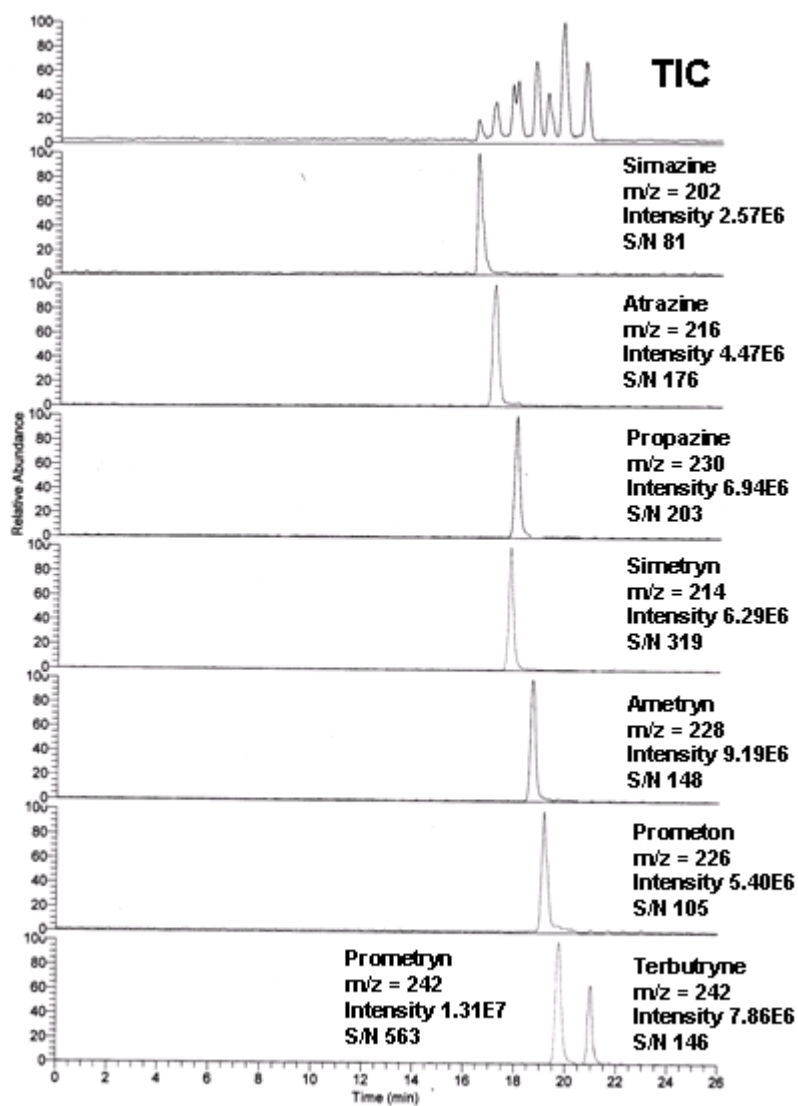


圖 6、使用低流速鞘流界面，以填充式毛細管電層析分析八種除草劑之質譜層析圖。分離的緩衝溶液為 5 mM 醋酸銨於 80% 的乙腈(acetonitrile)中 (pH = 7)，鞘流溶液為 70 % 甲醇 + 1 % 醋酸，電灑電壓為 + 2 kV，毛細電泳分離電壓為 + 22 kV

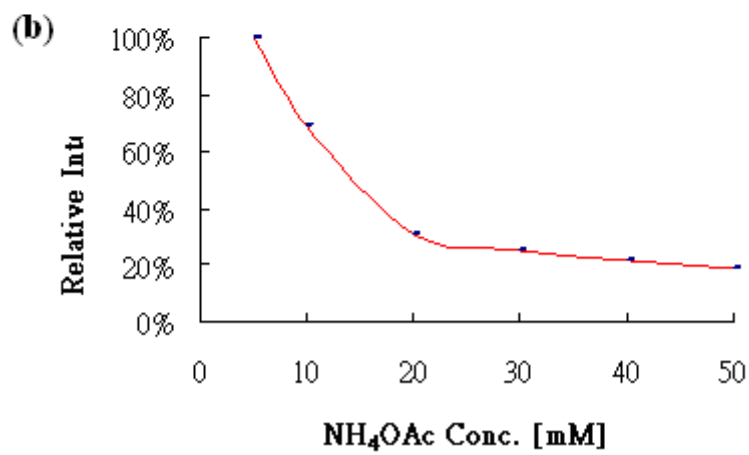
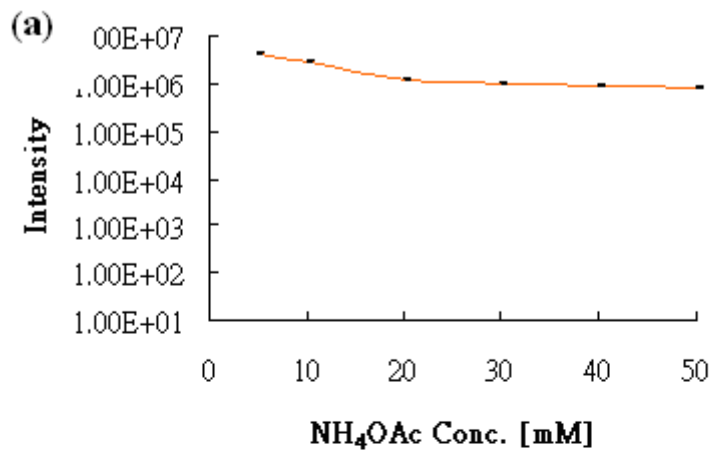


圖 7、(a) 將 Atrazine 溶於不同濃度的醋酸銨中，以電滲流方式連續注入，在不同醋酸銨濃度下分析物的絕對訊號大小  
(b) 在不同醋酸銨濃度下，分析物相對訊號的差異性

表 1、填充式毛細管電層析、開管式毛細管電層析與微胞電動毛細管層析電泳/質譜儀的訊號比較

	packed-CEC/MS Intensity	ot-CEC/MS Intensity	MEKC/MS Intensity
Simazine	2.57E+06	1.45E+05	1.04E+05
Atrazine	4.42E+06	4.59E+05	2.22E+05
Propazine	6.94E+06	6.73E+05	2.13E+05
Simetryn	6.29E+06	3.57E+05	1.75E+05
Ametryn	9.09E+06	1.80E+06	2.84E+05
Prometon	5.40E+06	9.06E+05	2.62E+05
Prometryn	1.31E+07	5.01E+05	2.20E+05
Terbutryne	7.86E+06	4.25E+05	1.80E+05



表 2、填充式毛細管電層析與微胞電動毛細管層析電泳/質譜儀的訊號比較

	CECMS Intensity	MEKCMS Intesity	CECMS S/N	MEKCMS S/N	Ratio
Simazine	2.57E+06	1.04E+05	<b>81</b>	<b>15</b>	<b>5.4</b>
Atrazine	4.42E+06	2.22E+05	<b>176</b>	<b>34</b>	<b>5.2</b>
Propazine	6.94E+06	2.13E+05	<b>203</b>	<b>26</b>	<b>7.8</b>
Simetryn	6.29E+06	1.75E+05	<b>319</b>	<b>23</b>	<b>13.9</b>
Ametryn	9.09E+06	2.84E+05	<b>148</b>	<b>22</b>	<b>6.7</b>
Prometon	5.40E+06	2.62E+05	<b>105</b>	<b>32</b>	<b>3.3</b>
Prometryn	1.31E+07	2.20E+05	<b>563</b>	<b>54</b>	<b>10.4</b>
Terbutryne	7.86E+06	1.80E+05	<b>146</b>	<b>43</b>	<b>3.4</b>

## B. 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。

晶片電泳技術銜接電灑質譜做線上(on-line)分析的主要困難在於電灑介面的製作。外接式毛細管電灑介面不易製做，通常是通道不易對準或是上膠時易塞住通道，甚或接口端上膠不均而產生無效體積(Dead Volume)。本研究中，採用高分子塑膠材料 PMMA 為基材，製作電泳晶片。電灑介面則利用高黏稠之環氧樹脂膠(epoxy)黏接已拉尖之毛細管電灑噴頭。方法是將 30 $\mu$ m 鎢絲的一端穿入電泳晶片出口通道(50 $\mu$ m)中，另一端則穿入一段 1cm 長之斜口毛細管噴頭(口徑 30 $\mu$ m)，塗環氧樹脂膠於晶片及毛細管噴頭接點間，環氧樹脂膠會微滲入而填補接縫，待環氧樹脂膠聚合硬化後抽離鎢絲，即可於出口端接上電灑噴頭。

此介面不僅易於製作且可減小無效體積(< 0.5nl)對層析解析度之影響。電灑測試結果顯示，此介面在最佳流速下電灑可長時間穩定操作，並進行晶片電泳電灑質譜於胜<sup>o</sup>(peptides)混合物分析之評估

**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 facilitate the alignment of the separation channel with the attached ESI sprayer, one end of a metal wire (30 $\mu$ m) is inserted into the separation channel (50 $\mu$ m) of the chip. The other end is inserted into the tapered ESI tip. Then the epoxy is applied to the junction. After the epoxy is hardened thoroughly, withdraw out the wire. As a result, the ESI sprayer could be precisely aligned

with the exit of the separation channel. The performance of the device was evaluated with the analysis of peptides mixtures. The results indicated that this design could produce a stable electrospray for long-time operation.

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。

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無效體積(Dead volume)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是利用高黏稠之環氧樹脂膠(epoxy)黏接 30 $\mu\text{m}$  已拉尖之毛細管電灑噴頭。方法是將外徑 30 $\mu\text{m}$  鎢絲的一端穿入電泳晶片通道(50 $\mu\text{m}$ ) 出口中，另一端則穿入一段約 1cm 長之斜尖口毛細管噴頭(口徑 30 $\mu\text{m}$ ) (圖 2)，塗環氧樹脂膠於晶片及毛細管噴頭接點間，利用環氧樹脂膠的高黏滯性，微滲入而填補接縫，待環氧樹脂膠聚合完全硬化後抽離鎢絲，即可於出口端接上電灑噴頭。此製作方法可有效的避免製作電灑介面時所導致的膠封通道的問題。另外，也免除通道對準的困難，簡化介面製作的流程，省時也大幅的增進電灑晶片製作的成功率。

圖 1(a)中，電灑電壓是透過尖端導電塗佈施加，方法是利用商業化導電橡膠的 B 部分(導電橡膠部分)，塗佈於已拉尖且內通氣流的毛細管尖端上，再經強力氣流(100psi)逆向吹拂，均勻地推平導電橡膠於尖端外表面，置於 45 $^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘烤約 3 分鐘以加速硬化。

晶片的設計如圖 1(a)，使用簡單的十字進樣設計，進樣通道內徑為 50 $\mu\text{m}$ ，進樣電場約 650V/cm，最大進樣電流 60 $\mu\text{A}$ 。進樣及分離之施加電壓如圖 1(b)所示，進樣時利用電動聚焦(pinched injection)減緩樣品擴散現象。但是分離管道的另一端是無鞘流介面，無緩衝液可補充進通道，因此不施加聚焦電壓(pinched voltage)，以避免斷電現象的產生。圖 1(c)簡示實際的進樣帶寬現象。

圖 3 為晶片電泳電灑裝置藉由電滲流推動樣品溶液連續電灑做穩定測試。由於晶片電泳的分離管道短，分析的時間通常較少超過 5 分鐘，因此

以每 5 分鐘為一個測試週期，強度差異約可維持在 10~15%的範圍內，顯示電滲流足以維持電灑的穩定。

圖 4 是以 5 個 20 $\mu$ M 的胜肽標準品混合物進行晶片電泳分離評估。進樣時間 30 秒，每次分析擷取 5 分鐘層析圖，分離電場 300V/cm。分析物約在 1 分鐘後沖提出，半高峰寬約在 12~20 秒左右。

#### 四、計畫成果自評

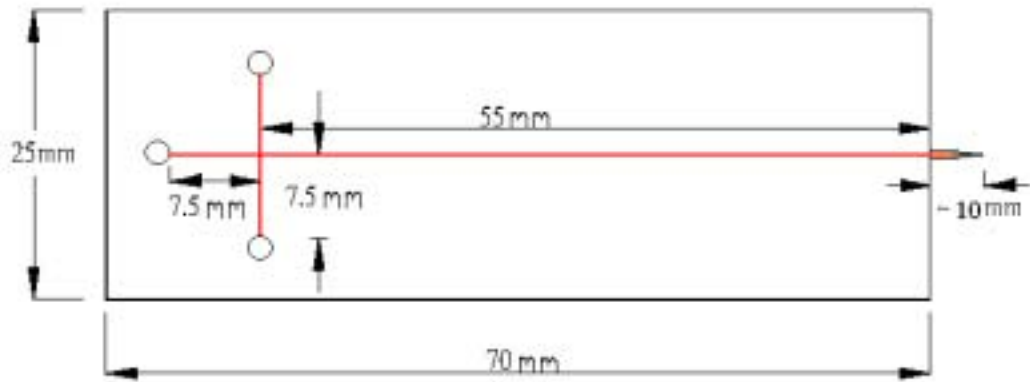
1. 此膠黏式外接電灑噴頭的 Chip-CE/MS 界面可以產生穩定的電泳電灑訊號。
2. 以胜<sup>o</sup>標準品混合物成功進行晶片電泳的分離評估。

#### 五、參考資料

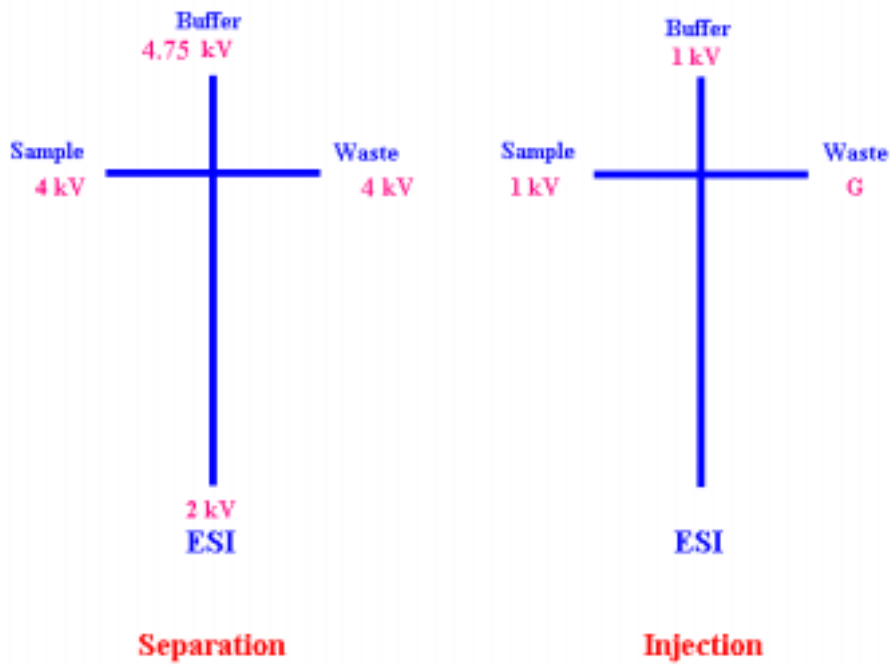
1. Manzs, A.; Graber, N.; Widmer, H.M. *Sens. Actuators* **1990**, B1,244.
2. Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettinger, J. C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H. M. *J. Chromatogr.* **1992**, 593,253.
3. Harrison, D. J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C. S.; Manz, A. *Science* **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. Chen, Y. H.,; Chen, S. H., *Electrophoresis.* **2000**, 21, 165.
19. Chang, Y. Z.; Her, G. R., *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.
21. Zhang, Z.; Foret, F.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2675.
22. Lazar, I. M.; Li, L.; Yang, Y.;

Karger, B. L., *Electrophoresis* **2003**,  
24, 3655.

(a)



(b)



(c)

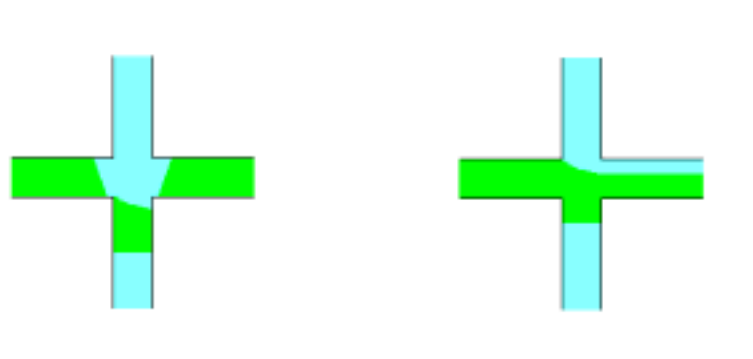


圖 1. (a)PMMA 晶片尺寸設計。(b)電壓施加圖示。(c)實際樣品、緩衝液流動模擬圖示。



圖 2. 30  $\mu\text{m}$  斜尖口電灑噴頭(未導電塗佈)。拉尖侵蝕後，於 2000 番號的水砂紙上以斜角  $30^\circ$  先磨成斜口，再左右旋轉  $90^\circ$  磨成尖口。

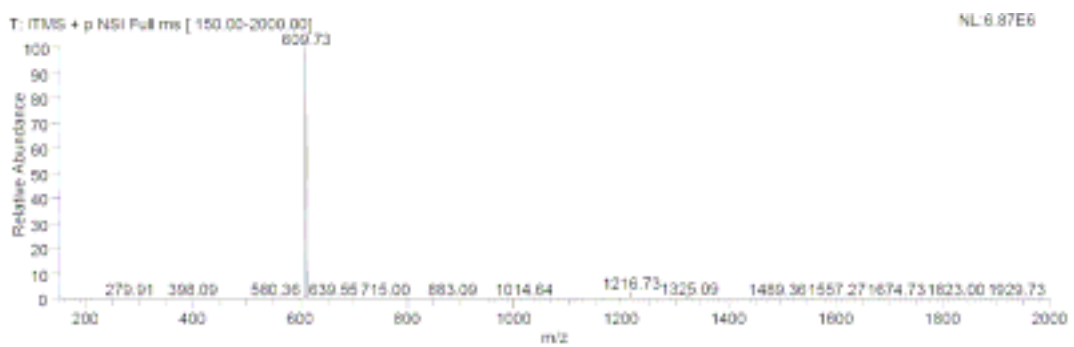
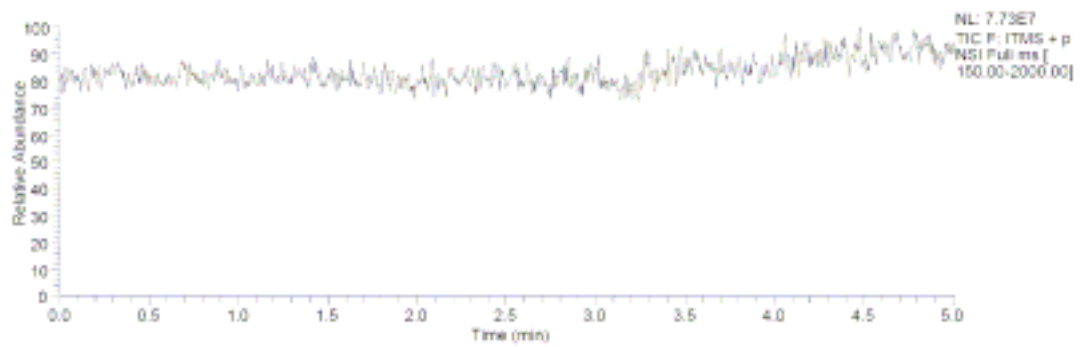


圖 3. 電灑電泳晶片裝置連續電灑 5 分鐘之 TIC 圖。樣品為 1ppm reserpine 於 MeOH/H<sub>2</sub>O=1:1, 1%HOAc, pH=3.5。



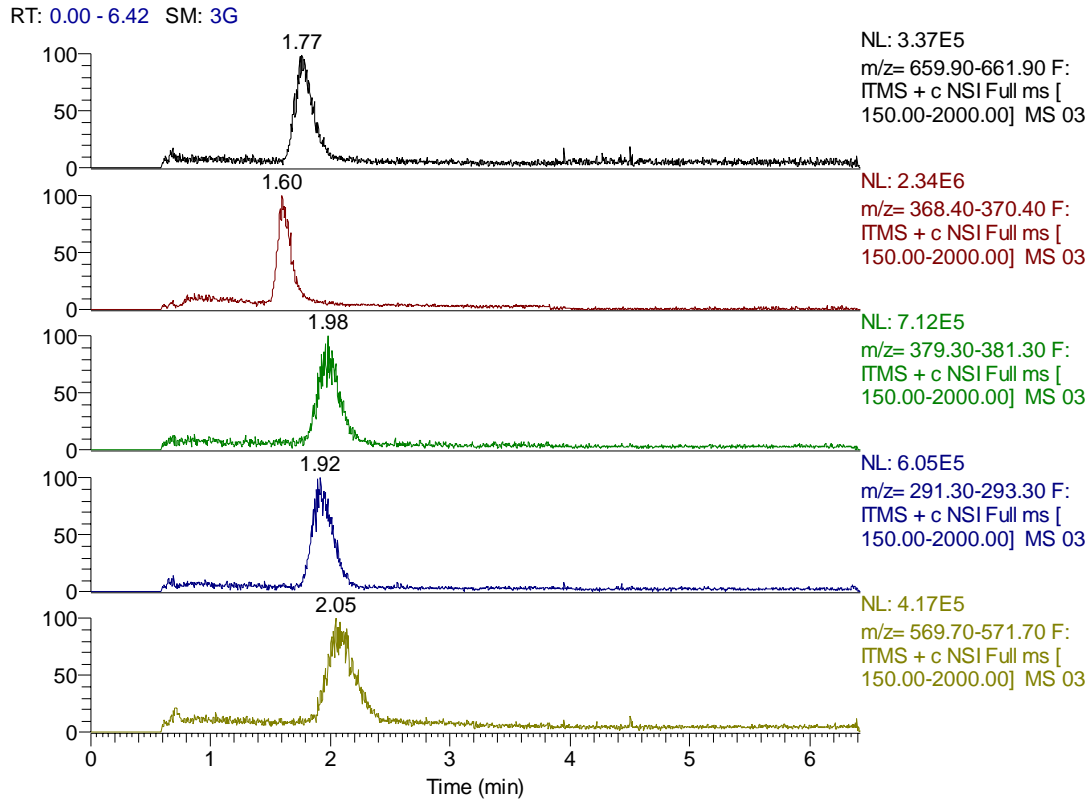


圖 4. 20 $\mu$ M 胜肽混合物之晶片電泳分離。分離條件為 Buffer: MeOH/H<sub>2</sub>O=1/9, 0.3% Formic Acid, pH=2.5。分離電場 300V/cm。

## 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持良好的分離效果，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. I

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

#### 二、緣由與目的

微胞電動毛細管層析法 (MEKC)(1)，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 (2-15)，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 Na<sup>+</sup>)，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。

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。而實驗室已成功的利

用此界面分離 trazine 化合物，相較於傳統鞘流界面，本界面還可以提高分析物的訊號並且降低界面活性劑對分析物的抑制效應。

而另外一個抑制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。因此我們利用此界面於非揮發性緩衝溶液區帶毛細電泳/電灑法之負離子模式下分離酚類化合物和神經節苷脂，並在維持毛細電的解析度下得到最佳靈敏度。

### 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2a為使用傳統鞘流界面時，分離六種西藥化合物的質譜層析圖，圖2b則是使用斜口鞘流界面所得到的質譜層析圖，比較兩張圖可以得知，使用斜口鞘流界面所得到的分析物訊號強度和訊號雜訊比，主要原因除了稀釋比例小外，界面與質譜的入口處距離較短，再加上不需要輔助氣體的幫助，進樣效率也較高。圖3a為經由最佳化輔助溶液分離七種酚類化合物的質譜層析，實驗發現利用斜口低輔助流界面所得到的訊號強度，相較於在相同條件下使用的低流速界面(圖 3b)提高了二至五倍，並且七種酚類化合物皆可看到，主要的原因為可控制輔助溶液的稀釋，因而可以降低界面活性劑的濃度，減少抑制，雖然在此同時，分析物也被稀釋了，但相對於分析物跑至表面的機率就變大，如此分析物的訊號強度便可提高。圖3a 為使用傳統鞘流界面分離神經節苷脂，所得到質譜層析圖，我們發現使用硼酸銨鹽緩衝液和硼酸鈉鹽系統相比，可以明顯減少緩衝溶液的抑制效應，而若鞘流溶液的pH值控制在9，也有助於訊號的提升但只能看到GD1a的分析物訊號，而從圖 3b，若使用斜口低輔助流界面來分析神經節苷脂，訊號雜訊都能大幅提升。

#### 四、計畫成果自評

1. 我們成功開發出低輔助流鞘流界面。
2. 透過低輔助流鞘流界面，可以尋找到輔助溶液流速的最佳條件。
3. 成功應用西藥、酚類和神經苷節脂的分析，並跟傳統鞘流界面和低流速鞘流界面比較，有較好的質譜訊號。

#### 五、參考資料

1. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchikya 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

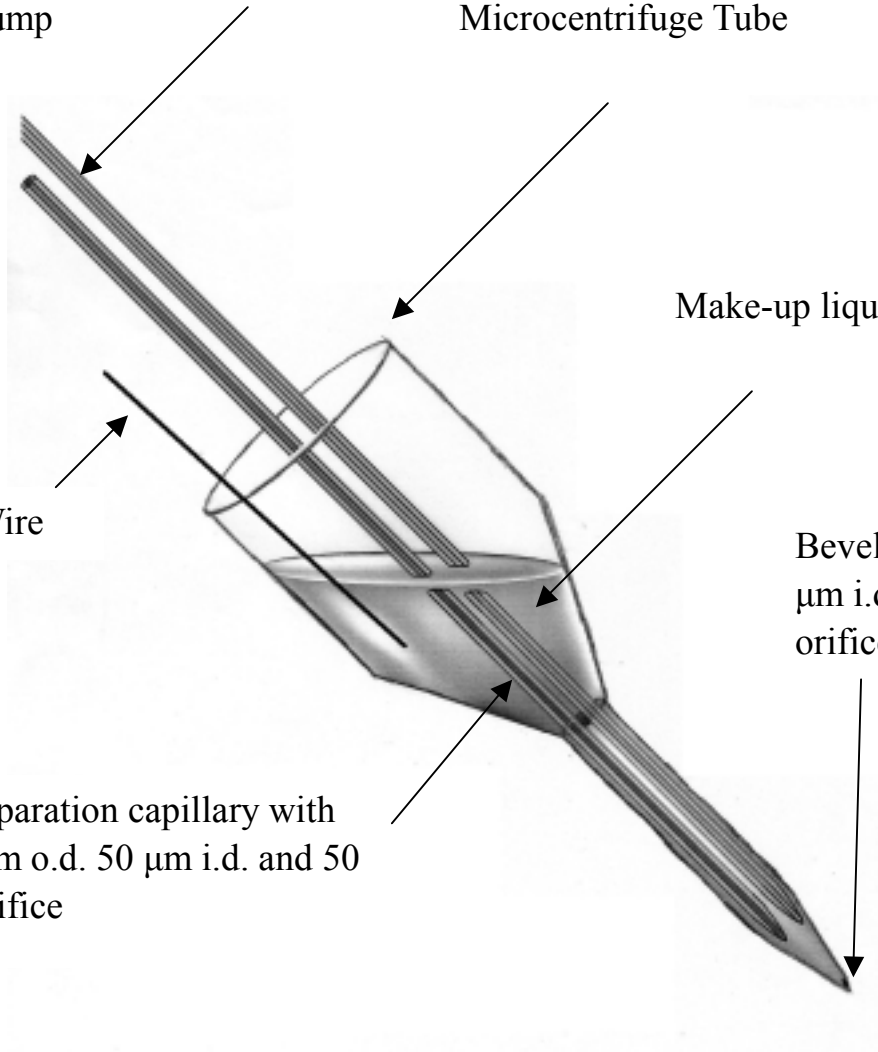
Make-up liquid

Pt Wire

Beveled tip with 530  $\mu\text{m}$  i.d. and 75  $\mu\text{m}$  i.d. orifice

CE separation capillary with 155  $\mu\text{m}$  o.d. 50  $\mu\text{m}$  i.d. and 50  $\mu\text{m}$  orifice

圖 1 低流速輔助流界面設計圖



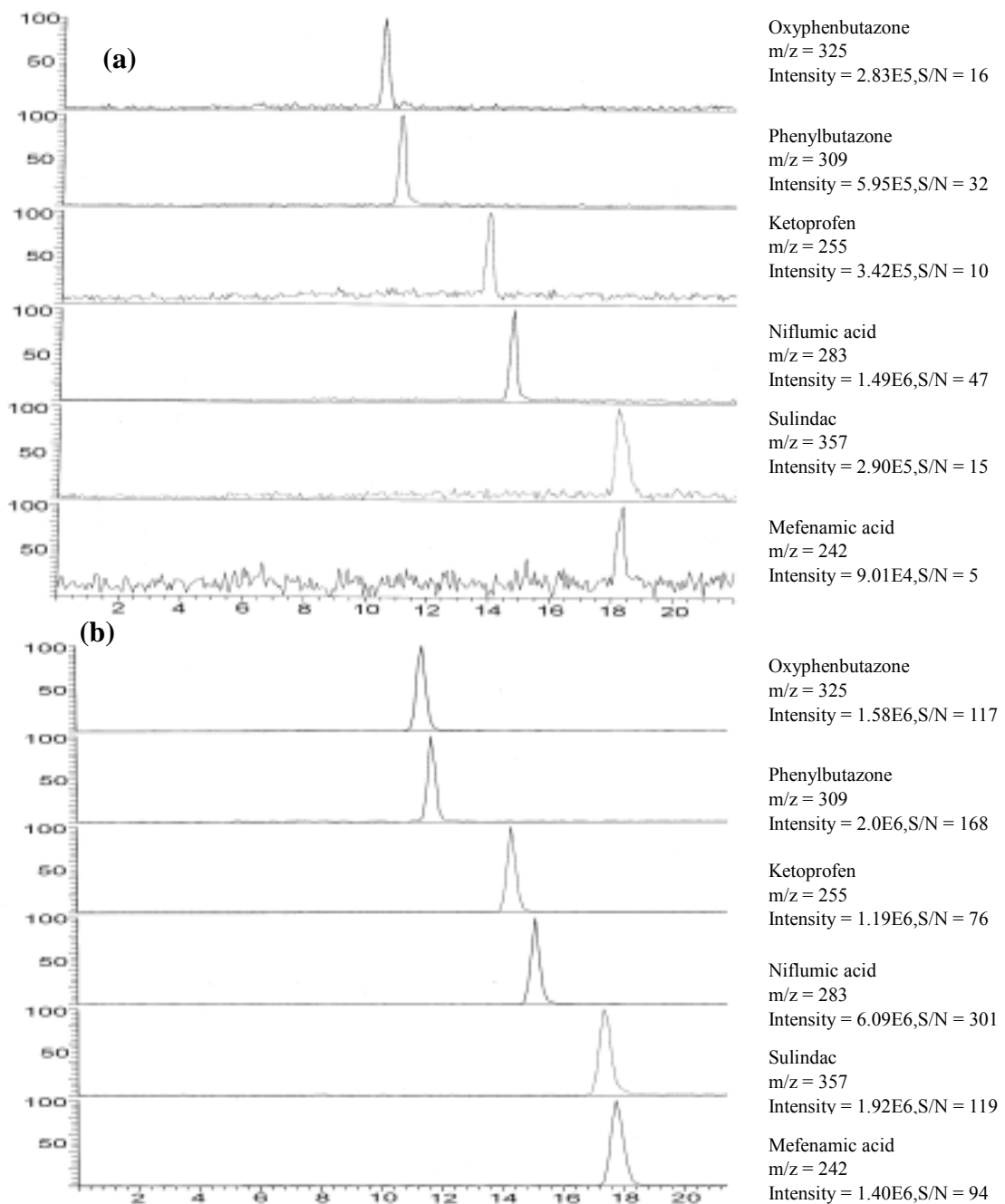


圖 2 使用(a)傳統鞘流界面鞘流流速為 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，電灑電壓為+ 4 kV 毛細電泳分離電壓為+24 kV。和(b)斜口鞘流界面鞘流流速為 0.6  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，電灑電壓為+ 2 kV，毛細電泳分離電壓為+22 kV 在正離子模式下分析西藥化合物之 SIM 質譜層析圖。分析物的注入方式為使用重力注入 10 mbar, 10 秒。分離的緩衝溶液為 40 mM 醋酸

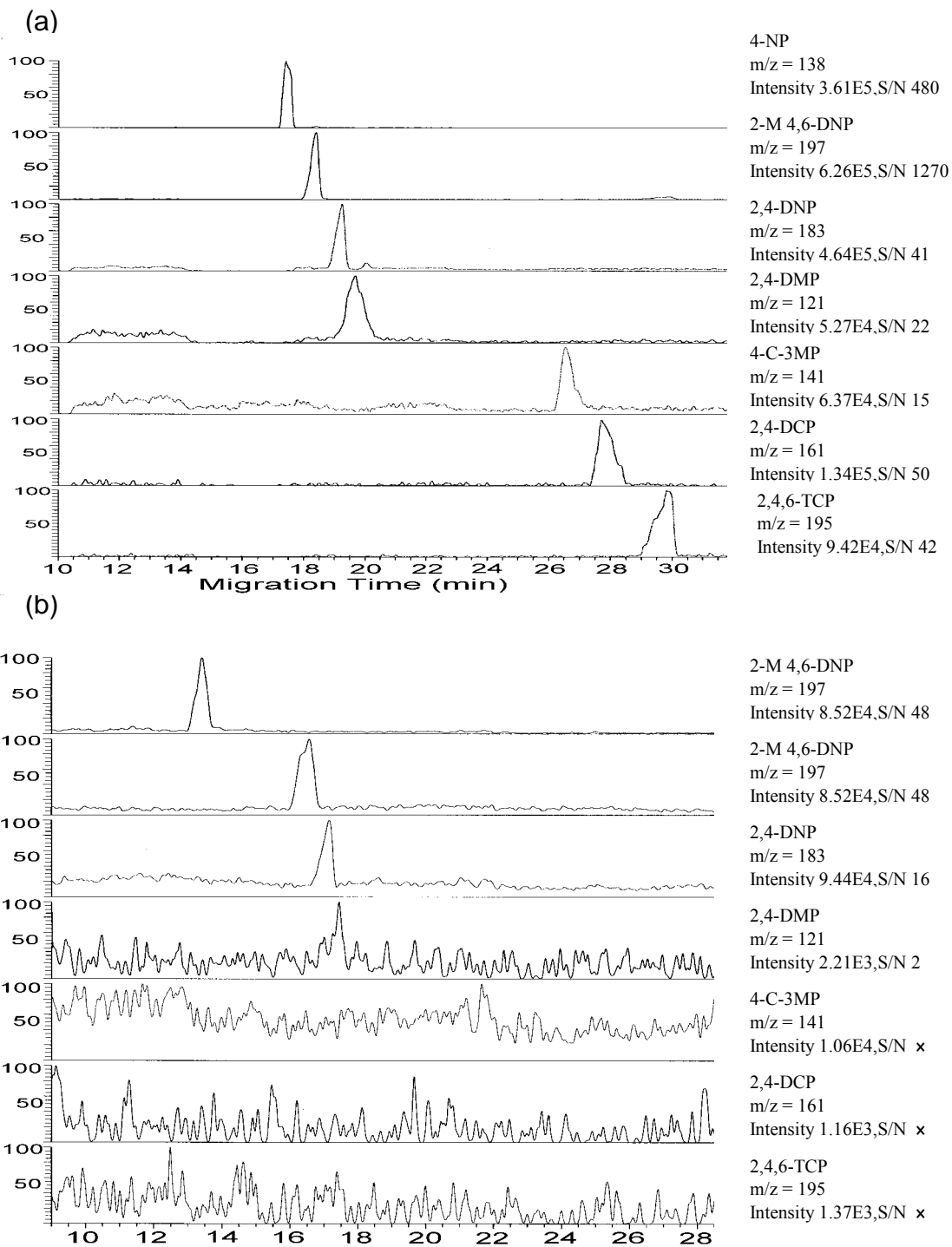


圖 3 使用(a)斜口鞘流界面輔助溶液的流速為 0.4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，電灑電壓為 -1.6kV，毛細電泳分離電壓為 +18.4 kV (b)低流速鞘流界面，電灑電壓為 -2 kV，毛細電泳分離電壓為 +18 kV 分析酚類化合物之 SIM 質譜層析圖。分析物以用重力注入 10 mbar, 10 秒進樣。分離的緩衝溶液為 pH=7 的 20 mM CHES 加上 40 mM SDS，輔助溶液為 80% 異丙醇+1% 氨水。

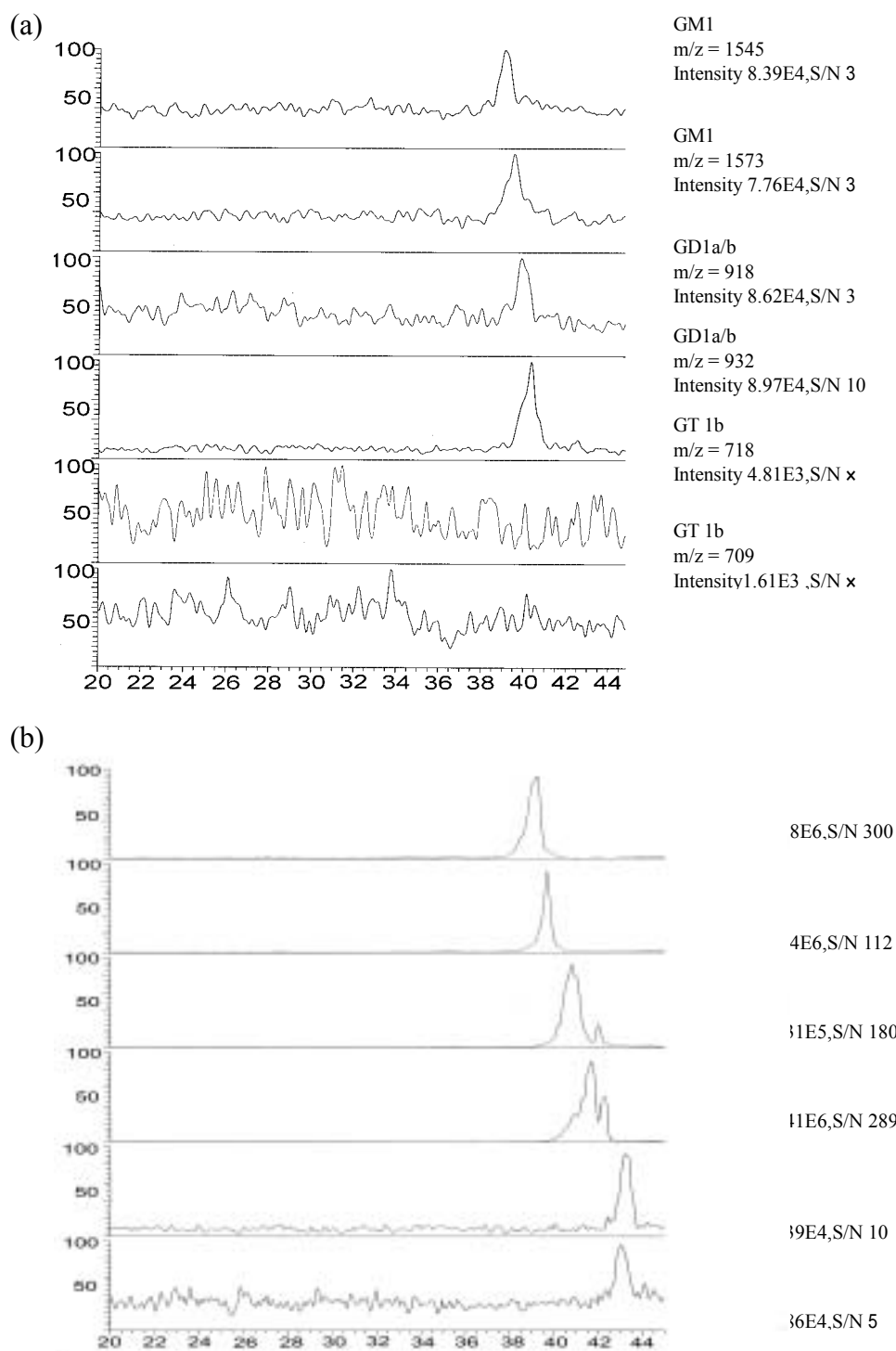


圖 4 使用(a)使用傳統鞘流界面流速為 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，電灑電壓為-4 kV，毛細電泳分離電壓為+16 kV (b)斜口低輔助流界面外加輔助流速為 0.4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，電灑電壓為-1.6 kV，毛細電泳分離電壓為+18.4 kV 分析神經節苷脂化合物之 SIM 質譜層析圖。分析物以重力注入 10 mbar, 10 秒進樣。分離的緩衝溶液為 20 mM  $\alpha$ -CD + 40 mM 硼酸銨鹽在 pH = 10.6，輔助溶液為 80 % 異丙醇 pH=9。



## 第二部分:質譜於蛋白質/醣蛋白質體學相關研究與應用

### A. 毛細液相層析與拋棄式奈灑

#### 探針電灑法質譜/質譜於蛋白質鑑定之開發與應用

##### 一、中文摘要

在後基因體時代的今日，蛋白質體學是重要的課題，主要為蛋白質的鑑定、相關的定量分析與蛋白質間的交互作用。近年來質譜儀在靈敏度、分析速度、方便性等方面的快速進步，及高靈敏度軟離子化方法的發展而使質譜儀成為分析這些生化分子的核心技術；蛋白質鑑定為協助了解蛋白質功能、與疾病發生的關係及藥物的研究，相對於Edman定序儀，質譜儀分析較快速，可以用較少的樣本量即可完成分析，加上質譜儀分析技術的自動化，提供了一個高通量分析工具，能對許多微量蛋白質快速分析，這對進行蛋白質體研究有極大的幫助。目前鑑定蛋白質身分的高可信度技術為將蛋白質經酵素消化成肽，接著經由層析的方法分離，以串聯式質譜技術作序列分析，經由資料庫比對來鑑定蛋白質。

本研究第一部分為建立毛細液相層析電灑法串聯式質譜儀，成功地鑑定大白鼠第二型肺泡細胞特有胞器-層質體 (lamellar bodies) 之組成蛋白質，以研究此胞器之形成及其功能行使分子機轉，有助於未來臨床上對呼吸窘迫症病患的處理與治療。第二部分鑑於

層析方法過於耗時，而開發具簡單且可拋棄式的奈灑探針，將消化後的肽直接送入串聯式質譜儀進行分析，可達到快速鑑定蛋白質及無樣品殘留之問題；以標準樣品 (the tryptic digest of Myoglobin)，蛋白質身分鑑定的極限可至 2.5 fmol，具有使用方便及低樣品消耗的優點。第三部分我們以濃縮為主訴求，希望能開發簡單、實用且能線上淨化的方法，真正予以應用在真實樣品的鑑定上，而開發線上淨化微電灑串聯質譜儀，大幅提高濃縮倍率及減少分析時間，實際應用於層質體的蛋白質體，得到高可信度的蛋白質鑑定結果。

**關鍵字:** 蛋白質、質譜

##### **Abstract:**

In this study, we set up on-line micro capillary reversed phase liquid chromatography interfaced to a tandem mass spectrometry ( $\mu$ LC-MS/MS) for protein identification. Protein identification of lamellar bodies proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis was achieved by applying  $\mu$ LC-MS/MS. However, the current technique is time consuming. We developed a disposable device that could be on-line clean up and infusion unseparated proteolytic peptides into an ESI tandem MS. It was demonstrated that several proteins of lamellar bodies could be successfully identified by using this on-line clean up method. Compared to  $\mu$ LC-MS/MS, this method could identify proteins rapidly and be without cross-contamination although the

peptide sequence coverage was lower.

Keywords: protein identification, mass spectrometry

## 二、緣由與目的

進入後基因時代後，蛋白質體成為科學家們研究所著重之目標，而蛋白質之鑑定已然成為研究重心之一，質譜技術不斷進步，加上電腦自動化以及生物資訊技術上的突破，使得蛋白質體學得以快速發展，成為後基因體時代最重要的課題。其中蛋白質身分鑑定 (protein identification, protein ID) 已是一個可例行性操作的技術，然而質譜分析技術必須要不斷創新的發展，以面對蛋白質體學的種種需求。

本研究希望以二維膠體電泳結合質譜，建立毛細液相層析以串聯式質譜儀作為高可性度蛋白質身分鑑定，並希望開發更為經濟有效率的分析方法，應用於真實樣品。

## 三、結果與討論

### 3-1 毛細液相層析電灑法串聯式質譜儀

本系統仿效之前提出的系統而設計，主要分為兩個部分，Precolumn 與 Separation column；Precolumn 主要功能為保護 Separation column 且減少整個流程的時間，進樣流速以  $\mu\text{L}/\text{min}$  而非  $\text{nL}/\text{min}$  送至 precolumn 上作濃縮與去鹽，再由六向閥的切換造成的壓力差以  $200 \text{ nL}/\text{min}$  流速將濃縮於 Precolumn 中的樣品送至 Separation column，進行分離及質譜儀線上偵測。梯度設計為 20 分鐘 15-40%B，再加上平衡時間，分析一個樣品需 35 分鐘，選擇較快速的梯度設計原因是我

們的分析物較單純，通常含 1 個或 2 個蛋白質，我們希望以較快的方式即可完成鑑定的工作。

系統建立好後注射標準分析物樣品 300 fmol (the tryptic digest of bovine serum albumin) 作為測試，平均半高寬為 15 秒以內，經資料庫搜尋的結果可信度很高，且有 67% 胜肽序列涵蓋度 (Peptide Sequence Coverage)

本實驗以蛋白質體學的研究方法，將純化自大白鼠肺泡細胞的胞器層質體以二維膠體電泳方式，pH 3-10 作第一維 IEF 依等電點分離再以 15% SDS gel 作第二維分子量的分離，SYPRO Ruby 染色後以螢光偵測蛋白質點，得到層質體的二維膠體電泳圖 (圖 1)。將有興趣的點用酵素 trypsin 對蛋白質中的 Lysine (Lys, K) 與 Arginine (Arg, R) 的胜肽鍵消化水解，再以毛細液相層析串聯式質譜儀系統鑑定蛋白質的身分。蛋白質鑑定結果如表 (表 1)，鑑定結果具可信度，平均胜肽序列涵蓋度 (Peptide Sequence Coverage) 於 20% 以上。

### 3-2 拋棄式奈灑探針電灑法串聯式質譜儀

上一節毛細液相層析電灑法串聯式質譜儀，成功地鑑定真實樣品，建立起蛋白質身分鑑定的平台，然而鑑於層析方法過於耗時，且容易有前個樣品殘留的問題，而欲開發具簡單且可拋棄式的奈灑探針，將消化後的胜肽直接送入串聯式質譜儀進行分析，可達到快速鑑定蛋白質。

操作方法利用毛細現象以拉尖處吸取溶液非常好操作，不僅沒有樣品運送的損失，也不會在探針裡有氣泡

的產生，真的可以作到只需很少的溶液即可作分析。估計流速在70-100 nL之間。

我們用標準樣品 (the tryptic digest of Myoglobin) 序列稀釋，再分別吸取約500 nL的樣品來分析，成功地鑑定蛋白質的身分，我們將所使用的絕對量與鑑定結果如表所示 (表2)

### 3-3 線上淨化微電灑串聯式質譜儀

上一節我們希望以直接電灑法質譜/質譜 (ESI-MS/MS) 的方式，將蛋白質經酵素消化成胜肽作序列分析以鑑定蛋白質身分，而設計了拋棄式的探針，製作上非常簡單，具有使用方便及消耗很少樣品的優點；然而省去液相層析的步驟，我們將胜肽樣品經 ZipTip<sub>C18</sub>除鹽濃縮，再以探針吸取作分析，以自製的標準樣品 (the tryptic digest of Myoglobin) 序列稀釋作分析，蛋白質身分鑑定的偵測極限可以至2.5 fmol，雖然大大省去時間，但濃縮倍率有限且不是線上分析，在面臨真實樣品時恐怕無法達到此表現，因此我們承襲快速分析的初衷，希望能開發簡單、實用且能線上分析的方法，真正予以應用在真實樣品的鑑定上。

系統設計如圖 (圖2)，測試可行性後，我們取層質體 (lamellar bodies) 的二維膠體中其中幾點作分析，成功地鑑定蛋白質的身分，將結果與之前使用毛細液相層析電灑法串聯式質譜儀得到的資料相比對，如表所示兩技術鑑定的結果為一致 (表3)。

將兩技術相比較，此法操作簡單方便，省去質譜分析的時間也不需高壓幫浦的設備，且淨化管柱是拋棄式

的不會有前個樣品殘留的問題，雖然此技術的胜肽序列涵蓋度 (Peptide Sequence Coverage) 可能較低，但當面對不是非常複雜的真實樣品時，平均5分鐘可完成一個樣品的蛋白質身分鑑定與液相層析至少30分鐘相比，是非常符合經濟效益的。

### 四、計畫成果自評

1. 我們以二維膠體電泳結合毛細液相層析質譜，成功地分析出大白鼠肺泡細胞中的層質體之組成蛋白質。
2. 奈灑探針的設計與操作非常簡單且拋棄式，未來可作到自動化，不僅是應用於蛋白質鑑定，對於其他量很少的分析物，這是一個經濟實惠的分析方法。
3. 開發線上淨化微電灑串聯式質譜儀，於真實樣品鑑定上有良好的分析，提供了省時有效率的蛋白質身分鑑定之方法。

### 五、參考資料

1. Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Golley, A. A., Appel, R. D., HumpherySmith, I., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. *Genet. Eng. Rev.* **1996**, *13*, 19
2. Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 830
3. Cleveland, D.W., et al. *J Biol Chem*, **1977**, *252*, 1102
4. Klose, J., U. Kobalz *Electrophoresis*, **1995**, *16*, 1034
5. Zeleny, J. *Phy. Rev.* **1917**, *10*, 1
6. M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451

7. M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671
8. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. *Science*, **1989**, *246*, 64
9. M Dole, R. L. Hines, L. L. Mack, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240
10. J. V. Iribarne and B. A. Thomson *J. Phys. Chem.* **1976**, *64*, 2287
11. L.J. Licklider, C.C. Thoreen, J. Peng, S.P. Gygi, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3076
12. Hookeun Lee, Eugene C. Yi, Bo Wen, Timothy P. Reily, Lance Pohl, Sidney Nelson, Ruedi Aebersold, David R. Goodlett, *J. Chromatogr. B.* **2004**, *803*, 101
13. Kelly, J. F.; Ramaley, L.; Thibault, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 51
14. Valaskovic, G. A.; McLafferty, F. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 825
15. Chang YZ, Her GR. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 626.
16. Fong WY, Chan TW. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 72
17. Jianjun Zhai, Wenqing Shui, Xuejiao Xu, Yanling Yu, Huimin Bao, Xian Chen, Pengyuan Yang *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1177

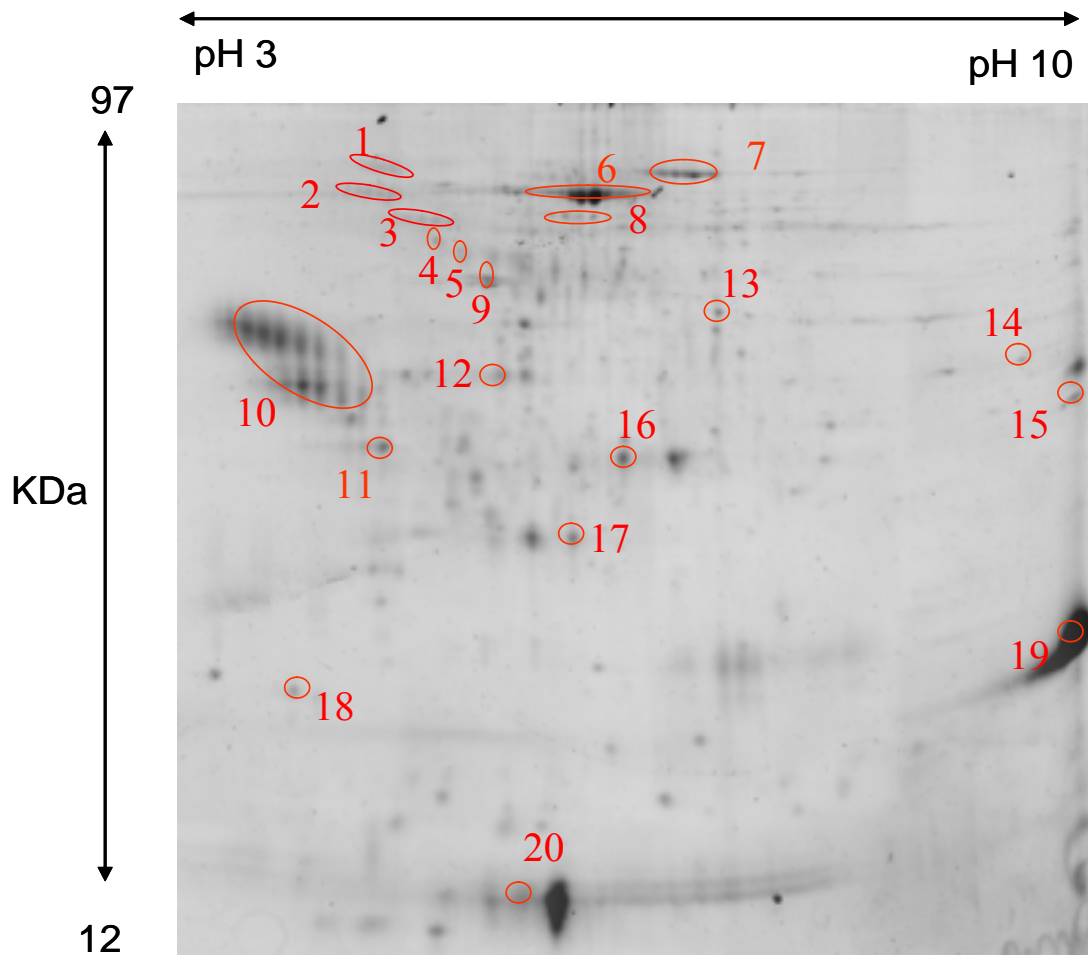


圖 1 層質體的二維膠體電泳圖

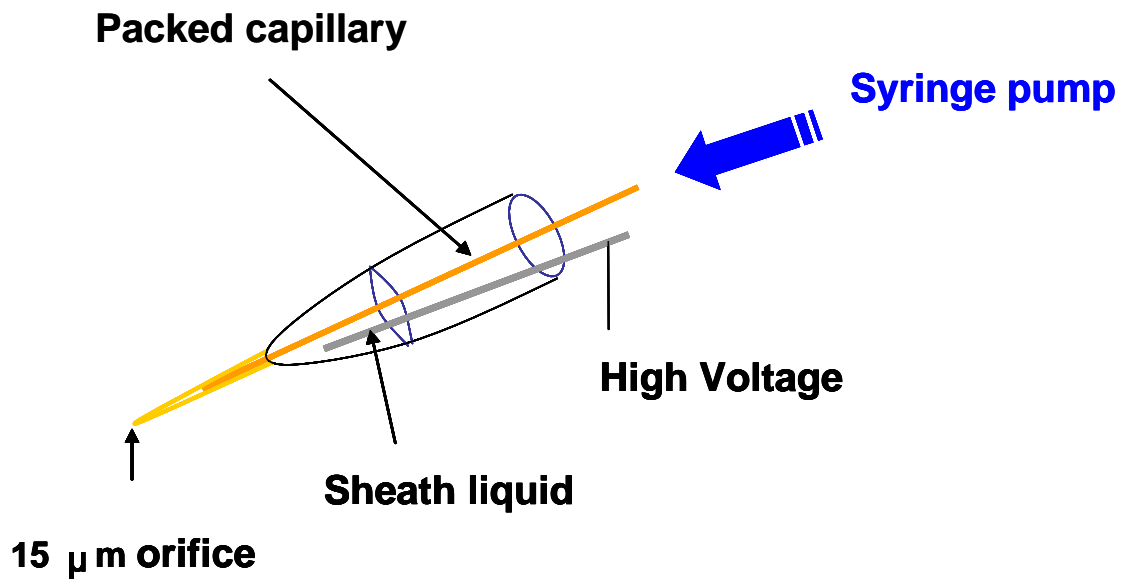


圖 2 低流速鞘流介面線上前濃縮偵測之裝置示意圖

表 1 層質體蛋白質身分鑑定結果

Spot	Protein name	Database accession number	Theor. pI	Theor. Mr (kDa)	Sequence coverage (%)
1	Polymeric-immunoglobulin receptor precursor	P15083	5.07	85	18
2	Contrapsin-like protease inhibitor 3 precursor	P05544	5.48	46	34
3	Alpha-1-antiproteinase precursor	P17475	5.7	46	20
	Vimentin	P31000	5.06	54	24
4	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P10719	5.19	56	48
5	disulfide isomerase A6 precursor	Q63081	4.95	47	16
6	Serum albumin precursor [Contains:Neurotensin-related peptide (NRP)]	P02770	6.09	69	30
7	Serotransferrin precursor	P12346	6.94	76	20
8	Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	5.88	57	43
9	Actin	P60711	5.29	42	48
10	Pulmonary surfactant-associated protein A precursor	P08427	4.79	26	20

<b>Spot</b>	<b>Protein name</b>	<b>Database accession number</b>	<b>Theor. pI</b>	<b>Theor. Mr (kDa)</b>	<b>Sequence coverage (%)</b>
11	Pulmonary surfactant-associated protein A precursor	P08427	4.79	26	20
12	Annexin A4	P55260	5.31	36	18
13	Annexin A1	P07150	7.14	39	18
14	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Q9Z2L0	8.63	31	40
15	Glutathione S-transferase Yc-1	P04904	8.83	25	34
16	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P10719	5.19	56	48
17	Cathepsin H precursor	P00786	8.69	37	19
18	Myosin light polypeptide 6	Q64119	4.46	17	44
19	Lysozyme C	P00697	9.32	17	56
20	Pulmonary surfactant-associated protein B precursor	P22355	6.17	42	11
21	Cathepsin D precursor	P24268	6.66	45	21



表 2 標準樣品 (the tryptic digest of Myoglobin) 序列稀釋鑑定結果

	500 fmol	250 fmol	125 fmol	50 fmol	25 fmol	2.5 fmol
Sequence Coverage (%)	59	43	40	39	26	22
Score	485	406	317	281	180	124

表 3 毛細液相層析與低流速鞘流介面線上前濃縮電灑法串聯式質譜儀鑑定層質體蛋白質之比較

Spot	Protein name	Theor. Mr (kDa)	Sequence coverage (%)	Mascot score	
<b>6</b>	LC-ESI-MS/MS	P02770	69	30	658
	ESI-MS/MS	P02770	69	19	560
<b>7</b>	LC-ESI-MS/MS	P12346	76	20	331
	ESI-MS/MS	P12346	76	14	278
<b>11</b>	LC-ESI-MS/MS	P08427	26	18	223
	ESI-MS/MS	P08427	26	11	115

## B. 發展醣探針於醣體學之研究

Keywords: glycomics, glycans, mass spectrometry

### 一、中文摘要

醣化為蛋白質最主要的後轉譯修飾之一，醣蛋白上的醣鏈在蛋白質的結構與功能上，扮演了重要的角色。一般分析醣鏈於醣蛋白上的分佈，會將醣鏈從醣蛋白上切下，但若醣化的位置不只一個時，便無法得知來自個別醣化位置上醣鏈的分佈，因此本研究以醣胜肽為分析的對象，保留醣化位置的資訊，以胰蛋白酶水解醣蛋白，利用纖維素微晶體純化醣胜肽，再以電灑法線性離子阱質譜儀分析純化後的醣胜肽，來得知各別醣化位置上醣鏈的分佈。然而，醣胜肽經由質譜/質譜所得之片斷多來自於醣苷鍵的斷裂，因此利用線性離子阱多次質譜/質譜的特性得到醣胜肽上來自胜肽的特徵裂片離子，經由資料庫搜尋比對即可達到蛋白質之鑑定並得知醣化的位置。

**關鍵字：**醣蛋白，醣鏈，質譜

### Abstract:

Glycosylation is one of the major posttranslational modifications of protein. The structure diversity inherent in the sugar moieties of a glycoprotein enable subtle changes in protein shapes, charge and volume that could affect its function both temporally and spatially. A simple approach for determine the distribution of glycans from individual glycosylation site of glycoprotein has been developed. Glycoproteins were digested with Trypsin which is specific protease yielding glycopeptides containing a peptide and glycan. Glycopeptides were purified using cellulose microcrystalline and analyzed by electrospray-linear ion trap mass spectrometry. In addition, both the glycoprotein and glycosylation site could be identified using MS<sup>n</sup> analysis.

### 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，醣鏈的分佈及量的差異，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，在進行真實樣品之醣體學分析前，須先尋找一有效的方法得以觀察單一醣蛋白於個別醣化位置上醣鏈之分布，並且克服醣胜肽不易進行蛋白質鑑定的困難，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-胰蛋白酶(Trypsin)具有專一性水解蛋白質之特性，將醣蛋白水解成胜肽以及醣胜肽，再藉由纖維素微晶體與醣胜肽間具有親水性之親和作用力來純化醣胜肽。純化後的醣胜肽包含來自不同醣化位置的資訊，利用 C18 毛細液相層析分離不同醣化位置的醣胜肽，結合電灑法線性離子阱質譜儀進行分析，即可得到來自於個別醣化位置上醣鏈分布的資訊，並且利用離子阱質譜儀具多次質譜/質譜之功能，可進一步得到醣胜肽上來自於胜肽的斷裂碎片，以達到蛋白質鑑定的目的，並可得知醣化位置。

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%。以胰蛋白酶水解後的結果如圖一(A)，圖中可觀察到 Man5、Man6、Man7、Man8、Man9 之醣胜肽與核糖核酸酶 B 其他未含有醣鏈之胜肽，平均來說醣胜肽相對於其他胜肽之訊號較小，為了要使醣胜肽更容易被觀測，因此利用纖維素微晶體具有親水性親和之特性，對醣胜肽做純化，其

純化的結果見圖一(B)，從圖中可觀察出醣胜肽的訊號較為顯著，且其相對比例與實際的醣鏈分佈很接近。由此結果可知，若能將單一醣化位置的醣胜肽做純化，即可藉由質譜圖觀察出個別醣化位置之醣鏈分佈。

醣胜肽在碰撞以致裂解(CID)下的訊號，通常會得到來自於醣苷鍵的斷裂，而能用來進行蛋白質鑑定之胜肽片段的訊號，只有當所接的醣鏈只含有一個單糖時才會較為明顯，因此，本研究利用線性離子阱質譜儀具有多次質譜/質譜的特性，嘗試找尋醣胜肽於多次質譜/質譜下的斷裂規則，以期達到蛋白質鑑定及得知醣化位置的目的。核糖核酸酶 B 經胰蛋白酶水解後，以纖維素微晶體所純化之醣胜肽 Man5、Man6、Man7、Man8、Man9 的質譜/質譜圖見圖二，從圖中可觀察出其斷裂的碎片多來自於醣苷鍵的斷裂，然而，只含有一個單糖的醣胜肽為第一或是第二強的訊號。以 Man5 之醣胜肽做個測試，將質譜/質譜圖中只含有一個單糖的醣胜肽  $m/z678.5$  更進一步進行 CID，如圖三(B)，可觀察出圖中最強的訊號，即為 Man5 之醣胜肽去掉醣鏈的完整胜肽訊號 ( $m/z475.3$ )，因此，將此完整胜肽訊號同樣進行 CID 可得圖三(C)，圖中可明顯得到胜肽的序列資訊。將此圖譜送入蛋白質鑑定的軟體：Sequest 進行資料庫的搜尋，其結果顯示於圖四，第一順位的搜尋結果即為核糖核酸酶，並可得此醣胜肽之胜肽序列，由此胜肽序列中只有一個胺基酸具有醣化的可能性，可得知其醣化的位置即為氮端的第一個胺基酸。因此，本研究利用此種規則，設計了讓線性離子阱可自動化分析醣胜肽的方法，此方法除了可得到醣胜肽的醣鏈分佈外，還可以做到蛋白質的鑑定以及醣化位置的確認。

#### 四、計畫成果自評

1. 本研究開發可觀察醣蛋白個別醣化位置醣鏈之分布的方法。
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，且利用線性離子阱質譜儀具有多次質譜/質譜的特性，達到蛋白質鑑定以及醣化位置的確認。
3. 預期此方法結合毛細液相層析便可進行真實樣品醣體學之分析。

#### 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).
21. Wada, Y.; Tajiri, M. and Yoshida, S., *Anal. Chem.* **76**, 6560 (2004)
22. Zhang, S. and Chelius, D., *J Biomol Techn*, **15**, 120 (2004)

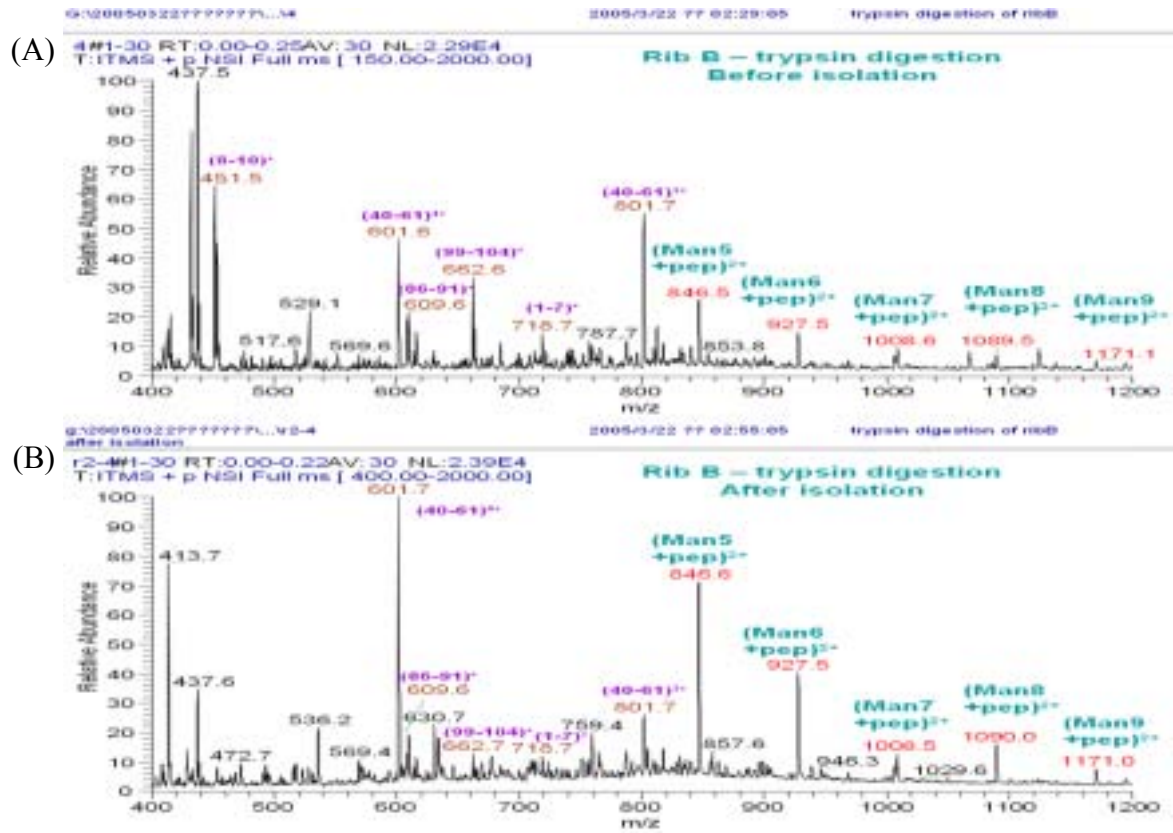


圖 1、以電灑法線性離子阱質譜儀分析核糖核酸酶 B 以胰蛋白酶水解之結果。(A) 未經纖維素微晶體純化醣胜肽(B)已纖維素微晶體純化醣胜肽

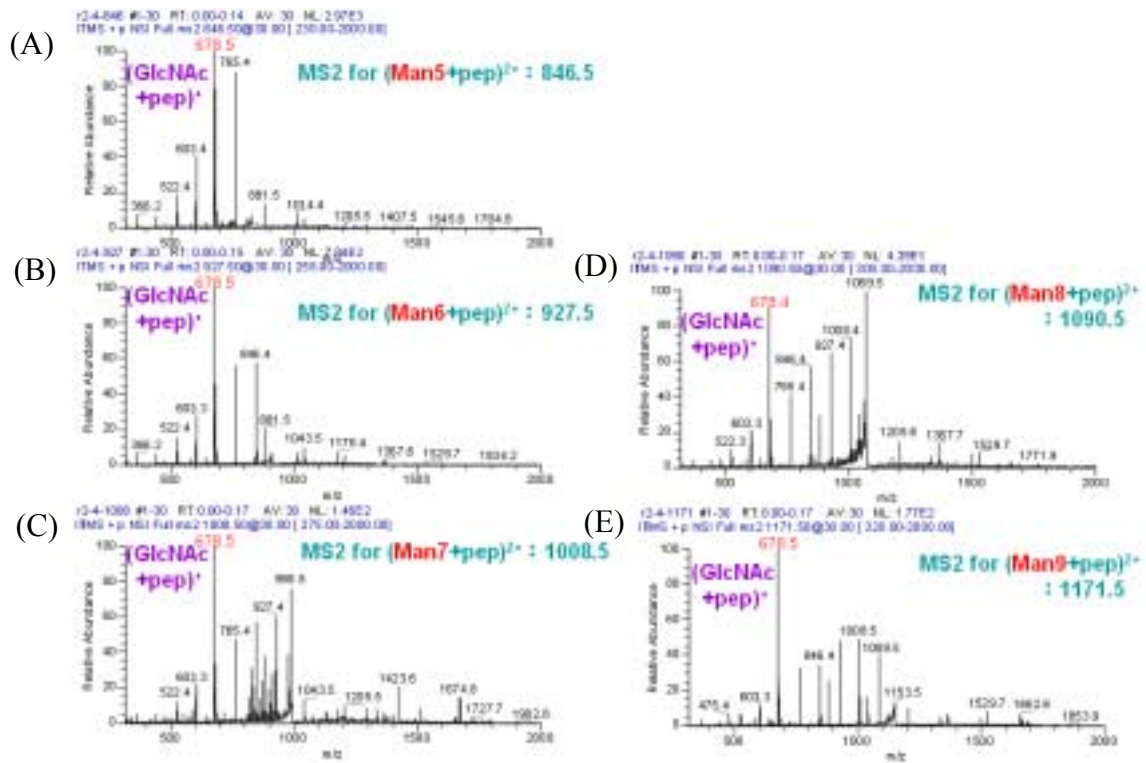


圖 2、核糖核酸酶 B 之醣胜肽的質譜/質譜(A)Man5 之醣胜肽 m/z 846.5(B) Man6 之醣胜肽 m/z 927.5 (C)Man7 之醣胜肽 m/z 1008.5(D) Man8 之醣胜肽 m/z 1090.5(E) Man9 之醣胜肽 m/z 1171.5。

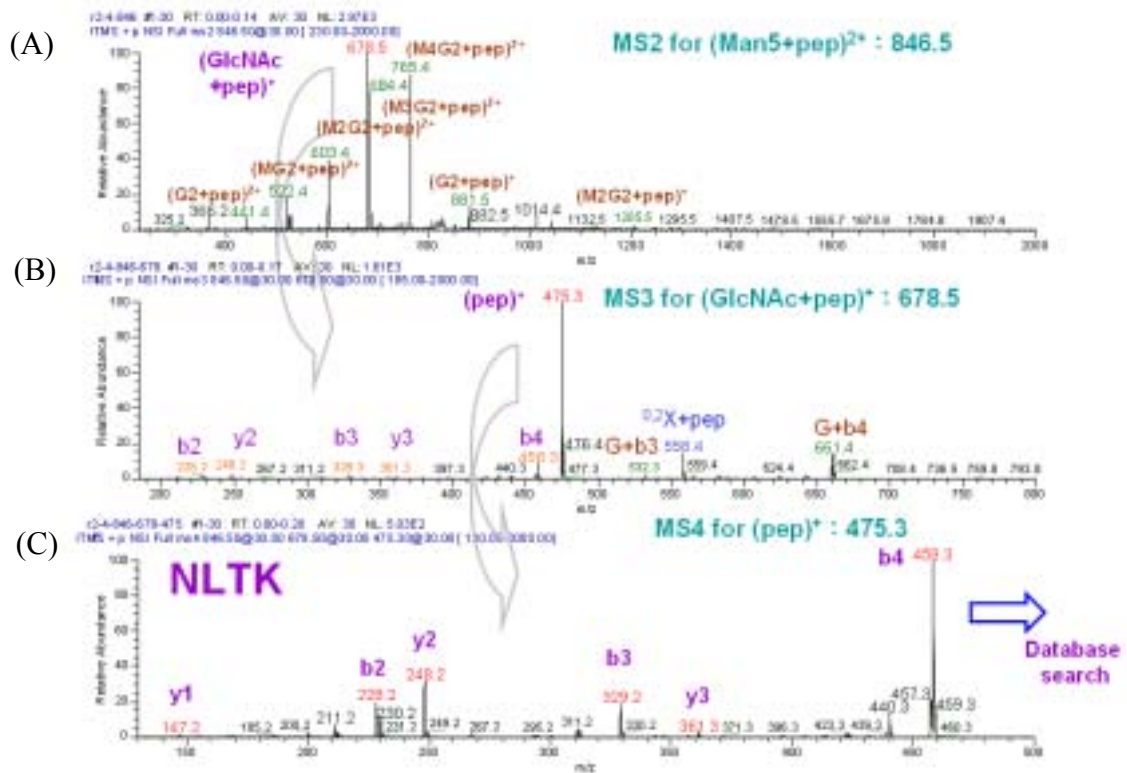


圖 3、以電灑法線性離子阱質譜儀分析核糖核酸酶 B 中 Man5 之醣胜肽(A)質譜/質譜， $m/z$  846.5 → (B)質譜/質譜/質譜， $m/z$  846.5 → 678.5 → (C)質譜/質譜/質譜/質譜， $m/z$  846.5 → 678.5 → 475.3 →。



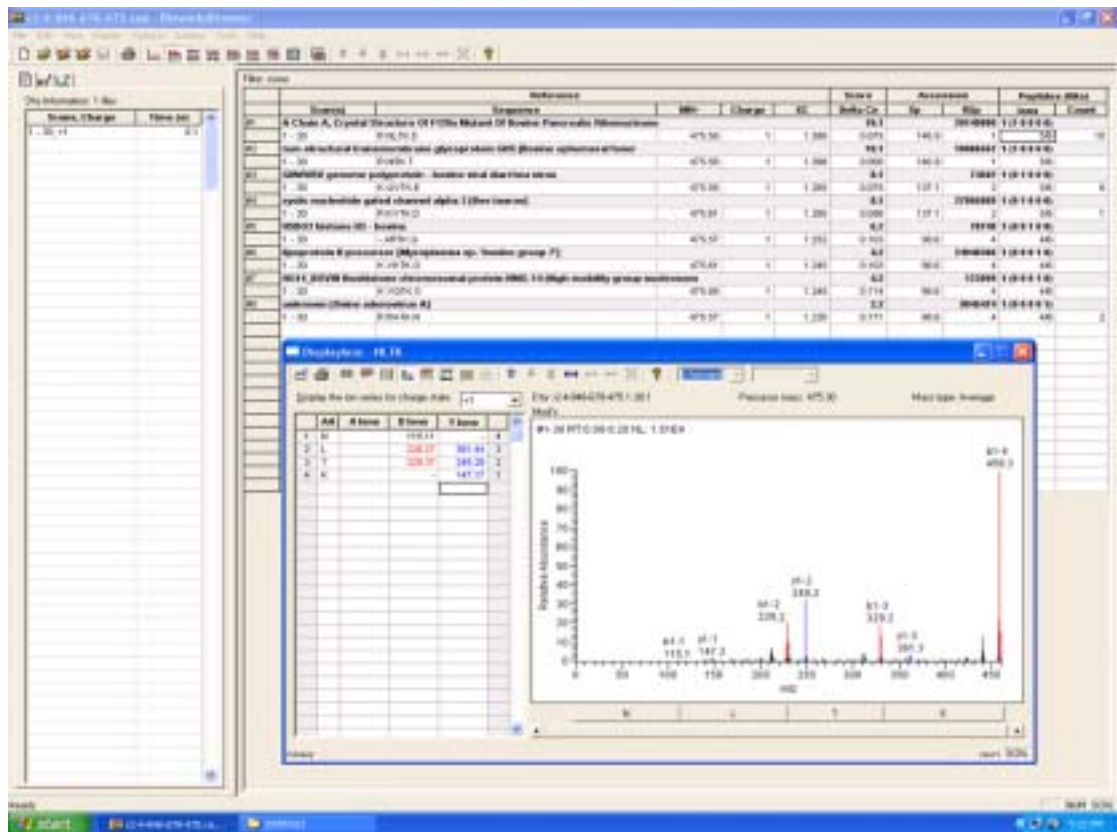


圖 4、以 Sequest 蛋白質鑑定軟體對圖三之 C 圖做資料庫搜尋之結果。







