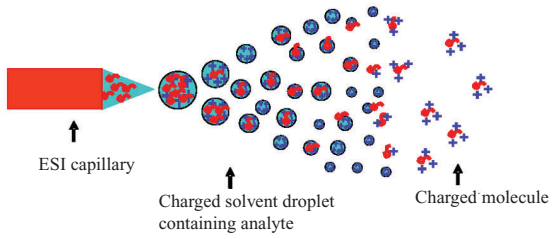
大氣壓力游離質譜法

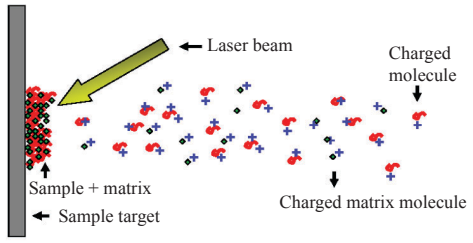
中山大學化學系　謝建台

1980 年代中期，質譜界有兩項新的質譜(mass spectrometry, MS)游離技術—電噴灑游離法(electrospray ionization, ESI) [1-2]，以及基質輔助雷射脫附游離法(matix-assisted laser desorption ionization, MALDI) [3-5]被開發出來。使用此二種游離技術的質譜儀在與高效率的化學或生化分離技術結合後，可以自微量生物樣品中，偵測並鑑定複雜的蛋白質混合物。這也是生命科學領域能自 1990 年代前以基因體學(genomic)研究爲主，到 1990 年代末期得以轉爲以蛋白質體學(proteomic)爲主要研究領域的原因之一。

(A) Electrospay ionization (ESI)



(B) Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)

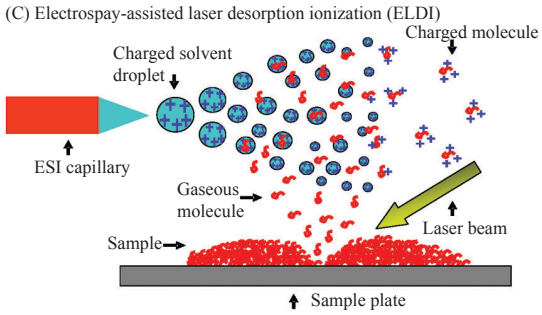


ESI 是在一大氣壓力(atmospheric pressure)下進行分析物的游離，而傳統 MALDI 則是在眞空下進行分子的游離。在大氣壓力下進行游離，在操作上有許多在眞空中進行游離所沒有的優點，這包括了樣品分析時間短，轉換樣品(sample switch)快速、容易，以及可以和液相層析(liquid chromatography)及毛細管電泳(capillary electrophoresis)分離技術連接等。適合大氣壓力游離的樣品可以是以固體、液體、或氣體，而可以適合眞空下操作的 MALDI 游離的樣品則是以乾燥的固體爲主。ESI 雖然是一種大氣壓力游離法，然而僅適合分析液態樣品，因此一般應用在固體生化樣品分析時，均須先進行萃取、純化、除鹽、濃縮、及分離後才以 ESI/MS 進行分析，相當費時費工。由於傳統 ESI 及 MALDI 在分析上有前述的種種問題，因此開發能在大氣壓力下不需，或是只需極簡單的樣品前處理步驟，就可直接對固體樣品進行揮發性或非揮發性紅成份分析的質譜游離技術，就成爲近代非常重要的一項研究課題。以下謹就近代已發展出來的各式大氣壓力質譜游離技術略述其發展歷史，技術原理，以及可能的應用範圍。

1. Electrospray-assisted Laser Desorption Ionization (ELDI) [6-8]:

電噴灑輔助雷射脫附游離法(ELDI)基本上是 ESI 和 LD 兩種技術的結合，此技術是由我們實驗室是在 2005 年所開發出來的一種新的大氣壓力質譜游離法。在 2006 年我們證實 ELDI 可以直接偵測到組織，乾燥的各式生物體液(如血液、眼淚、口水)中所含的主要蛋白質的訊號。此外也可應用在堅硬固體表面分子的直接分析(如 CD 片、塑膠及其他高分子聚合物材料等)。

(C) Electrospay-assisted laser desorption ionization (ELDI)



ELDI 的做法，是以聚焦氮氣雷射照射乾燥樣品表面，以脫附樣品中的分子，再以 ESI 游離這些被脫附的氣相分析物分子。ELDI 的脫附游離機

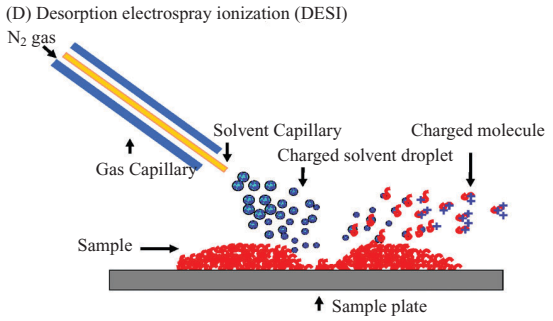
制尚未非常明確，但推測有下列幾種可能：首先是分析物的脫附可藉由分析物或是分析物周邊的物質直接吸收雷射能量而產生氣化現象，其次是金屬樣品平台承受雷射能量，導致溫度昇高，並瞬間氣化位於其上的分析物質。之前的報導曾提出，經雷射脫附的物質，多以顆粒狀物質離開樣品平台，而這些顆粒尺寸則多介於 1-10μm 之間。無可否認的，在雷射直接照射下，位於雷射光焦距中心的分析物極有可能會因呈受過大能量而分解，但對於大多數存在上述各式顆粒內之分析物，則可以得以不被分解，保持 intact 狀態。

實驗結果顯示，對蛋白質分子而言，經 ELDI/MS 分析後，所得到的分析物離子均和 ESI/MS 所得之圖譜幾乎一樣。顯示 ESI 在 ELDI 的分析物游離中扮演很重要的角色。依此推論在 ELDI 游離過程中，不論經雷射脫附所產生的是氣相分析物分子，蛋白質分解產物，或是微小顆粒，在離開樣品平台後馬上會遇到來自電噴灑毛細管（放置在樣品平台上方約 2-4 mm）所產生的帶電荷溶劑液滴（如甲醇，甲醇／水等）以及各式帶電荷的溶劑離子。而這些經雷射脫附或氣化的物質就可以藉和帶電荷的電噴灑溶劑離子，進行離子分子反應(ion-molecule reactions, IMR)而產生帶單價之分析物離子，或是融入帶電荷溶劑液滴內，而 ESI 游離過程繼續自這些液滴進行，而產生具多價電荷之分析物離子。另外一種可能的游離過程是氣相分析物分子和帶多價電荷之溶劑液滴進行電荷轉移反應，而產生具單價或是多價電荷之分析物離子。

以往由於以 laser desorption/ ionization (LDI) 並無法偵測到大分子如蛋白質的離子訊號，因此很多科學家都認爲在雷射照射下，像蛋白質等生化分子很容易會被高能雷射所摧毀，但在添加有機或是無機基質後（也就是所謂的 MALDI），則可得到 intact 蛋白質的離子訊號。ELDI 成功的以 LD 結合 ESI 方式得 intact protein 的訊號，証實了以 LD 對生化大分子的脫附成效較以往的認知實在有很大的差異。由於雷射能量的變化範圍可以非常大（由幾十個μJ 到幾十個 mJ），雷射波長也可以改變（由 UV，Vis 到 IR 等）。加上照射頻率，及聚焦程度等變數，使得未來應用 LD 於固體樣品的脫附研究將有非常大的發展空間。ELDI MS 除了已証實可以應用在各式乾燥生物體液內及組織中所含蛋白質及脂質的直接分析，也可以應用在合成高分子，固態化學材料，以及化學薄膜的成份分析。由於分析是在大氣壓力下進行，加上雷射可以聚焦到相當小的範圍，因此未來極有潛力可以進行生物組織分子影像的高解析度分析。

2. Desorption Electrospray Ionization (DESI) [9-12]:

脫附電噴灑游離法(DESI)是由普渡大學的 R.G. Cooks 研究小組所開發出來的一種大氣壓力質譜游離技術。由於以此技術可以直接自固體樣品表面在不經過任何前處理下，快速得到分析物的訊號（含大分子如蛋白質及化學及生化小分子等），因此在短期內，此技術就成爲很熱門的一項質譜游離技術。首篇關於 DESI 的論文是發表在 2004 年的 Science 期刊上，也突顯了科學界對此領域重視的程度，而此裝置也在論文發表後，隔年就有市售儀器了。

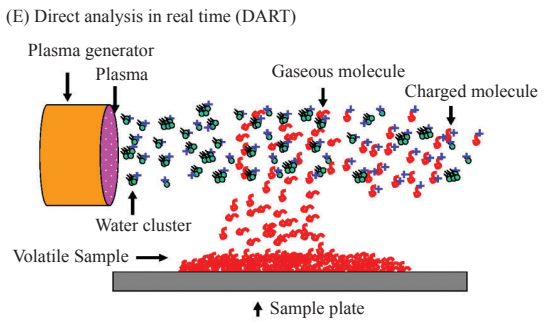


DESI 的原理及裝置非常簡單，儀器本身其實只是一個傳統的以溶劑進行電噴灑游離的裝置。其做法是將樣品溶液先滴在一樣品平台(sample plate)上，待其乾燥後，再由有機溶劑（如水／甲醇／酸）所產生的電噴灑帶電液滴，以一氮氣流帶動，衝擊乾燥之樣品表面（入射角約在 20 – 45°間）。而電噴灑毛細管距離樣品表面的距離小於 5mm。以此方式所產生的分析物離子，再以類似的角度，被反射進入放置在電噴灑毛細管另一端之質量分析器內。由於游離是在一大氣壓力下進行，因此理論上此游離源也可裝置在任何一套具 LC/MS 功能的質譜儀上。我們實驗室也自行組裝了一套 DESI 游離源，並成功的和 FT-MS，Q-TOF，triple quadrupole 及 ion trap 等質量分析器連結，以進行固態樣品的分析。

DESI 中，分析物離子形成的機制，可能有二：(1)在樣品平台上之固體分析物分子被所衝擊的帶電溶劑液滴 pick up（或是融入這些液滴內），而 ESI 過程則持續自內含有分析物分子之帶電液滴進行，以產生分析物離子。(2)在受帶電液滴衝擊時，分析物分子和自 ESI 所產生之各式帶電荷離子或是液滴進行 IMR 或是電荷交換，因而得以產生具多價電荷之分析物離子。DESI 因可以產生具多價電荷之分析物離子，因此其所能分析的質量範圍和 ESI 類似。而適合 DESI 分析的樣品，基本上是以固體爲主，分析物可爲不揮發性（如胜肽、蛋白質、脂質等）或是半揮發性，此技術並不適合具揮發性氣體分子的分析。DESI 自開發以來，已被成功運用在許多固體樣品的直接分析，如藥片組成，乾燥生物體液內的蛋白質，自皮膚滲出之揮發性藥物，蕃茄內之茄紅素，組織內之脂質，棉花上之微量炸藥(TNT) 以及經平板層析(thin-layer chromatography, TLC)所分離之染料等。

3. Direct Analysis in Real Time (DART) [13-14]:

DART 的前身是在 2001 年由兩位在美國 JOEL 公司工作的研發工程師（J. A. Laramee 與 R. B. Cody）所發展出來的大氣壓力熱電子游離源 (Atmospheric-Pressure Thermal Electron Monochromator)。此裝置在結合質譜的質量分析器(mass analyzer)後可以應用在化學試劑的快速監測(chemical agent monitors)以及做爲工業有毒化學物的感應器(toxic industrial chemical senors)。此裝置最初的設計一開始是在大氣壓力下，使用放射性元素 ^{63}鎳(^{63}Ni)或 ^{241}鋂(^{241}Am)來產生電子並以之做爲游離氣相分析物的依據。由於放射性元素的取得，以及使用後的處理均相當不易，因此在 2003 年他們再將此游離源改良爲在大氣壓力下，以高壓放電方式對氮氣或氦氣進行放電(corona discharge)，並以所產生的電漿(plasma)做爲游離時所需要的介質。JOEL 公司並以此爲依據，組裝了第一台 DART^{tm} Mass Spectrometer 原型機。同年夏天在 Edgewood Chemical Biological Center (Edgewood, MD)，也成功的以此裝置偵測到上百種的揮發性化學物質。

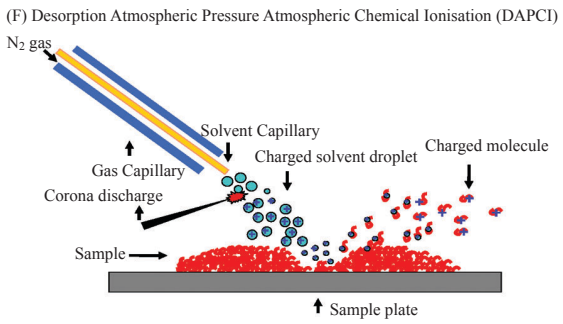


DART/MS 的儀器主要是由質量分析器及電漿產生器所組成，而兩者之間有約 2-5 cm 的距離，待測樣品就是放置於此空間中。以正離子的游離模式爲例，樣品中具揮發性的組成在大氣壓力下離開樣品後，即可先由電漿產生器所產生之介穩定氦氣分子(metastable helium molecule)和大氣中的水分子進行碰撞後產生的水合離子(H_3O^+)。再由水合離子與氣相分析物分子(M)間進行離子-分子反應(ion-molecule reactions)以產生分析物離子(MH^+)。至於負離子的形成，則可能是由電漿中的電子和大氣中的氧分子產生電子捕獲(electron capture)反應，所形成的氧負離子再和分析物分子進行離子-分子反應，以產生帶負電荷的分析物離子。電漿產生器其外型爲圓桶狀直徑約在 10 cm 而厚度約在 5 cm 左右。最外層是以金屬包覆，其內是以施加 1~5kV 的放電電壓對一由外界通入之氦氣產生電漿。而氦氣的流速則是在 1.5~3 L/min 之間。在正離子操作模式中，DART 游離源會在接地電極的後端施加一 100~250V 的正電壓，用來排除電漿中所產生出來具正電荷的離子。而所產生的電漿物種會通過一加熱區域，其一般操作溫度爲 250℃。在電漿產生器出口端還裝有一絕緣墊片，藉此防止在直接分析人體皮膚上的揮發性物質時，觸碰到電極的機會。由於游離是在大氣壓力下進行，因此理論上 DART 是可裝設在任何廠牌只要具 LC/MS 功能的質譜儀上。其連接非常簡單，只要將所產生之離子導到質量分析器之離子入口即可偵測到其訊號，並不需要有任何 interface 之裝置。

4. Direct Atmospheric Pressure Chemical Ionization (DAPCI) [15]:

DAPCI 是由 R. G. Cooks 於 2005 年所提出來的。APCI 自 1973 年由 E. C. Horning 開始發展

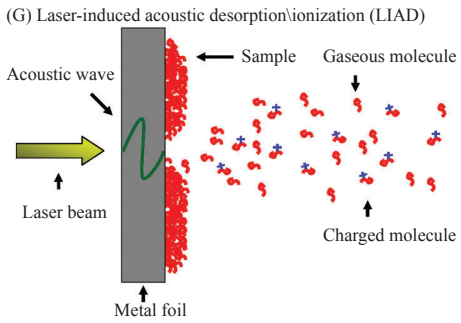
至今，已有超過三十年的歷史。但在此期間，此游離技術都是做爲對高壓液相層析(HPLC)管柱流出之分析物種進行游離之用。其可能游離過程和機制爲分析物分子在流出 HPLC 管柱後，會經過一探針（所謂的 APCI probe），此探針外圍有加熱線圈可對流經探針內之溶液進行加熱，再藉由一霧化氣體之輔助，將分析物溶液噴灑出來。在探針後方，質量分析器之離子入口前方間，則裝置有施加高電壓(~6000V)的不銹鋼針。而流經此針尖端之氣相分子會受到針尖強大電場影響下，進行高壓放電而被游離(所謂的 corona discharge)。由於游離源內主要的氣相分子種類爲樣品溶液內的溶劑分子（如水、甲醇等），因此 corona discharge 會先形成溶劑離子，而溶劑離子再和溶劑分子進行 IMR 形成類似 H_3O^+之水合離子，而這些離子再和氣相分析物分子(M)再進行 IMR。若分析物分子的 proton affinity 大於水合離子(H_3O^+)的話，就可以產生 MH^+離子。由於此種游離法的靈敏度非常高，因此在 1970~1990 年代間以 APCI 結合 HPLC 就成爲幾乎所有製藥公司進行藥物分析最主要的工具。然而因爲 APCI 只能產生具單一價電荷之離子，因此無法以現有質量分析器偵測到大分子如蛋白質的訊號。



儘管分析物在進行 APCI 游離時，必需以氣相狀態存在，但傳統以來，APCI 均使用在經加熱過後溶液樣品的分析，並未用在固態樣品的分析。但其實若能以加熱固態樣品方式，使其中具揮發性物種能自固態樣品釋放出來的話，則理論上 APCI 也可以用在固態樣品的分析。Cooks 將傳統的 APCI 游離源進行簡單改裝後，可使其應用在固體樣品的直接分析。其作法是將一加熱的甲醇氣流，通過一施加有高電壓的金屬針尖端附近，以產生帶電荷的甲醇離子。再藉由輔助氮氣流將這些甲醇離子衝擊到固體樣品表面，以脫附、揮發、及游離樣品中所含的揮發性或是半揮發性的化合物種。此技術雖無法應用在蛋白質的分析上，但確可應用在固體內小分子的分析。唯因需要加熱的關係，所以只能適用於具熱穩定性小分子的分析。由於 DAPCI 的組裝並不困難，因此只要實驗室有市售的 APCI 游離源就可進行改裝，並可將之裝設在各式質量分析器上，以便在大氣壓力下進行固態樣品的分析。

5. Laser Induced Acoustic Desorption (LIAD) [16, 17]:

LIAD 技術最早是在 1985 年由 Lindner 和 Seydel 等人報導，其作法是在一極薄(~10μm)的金屬薄膜上塗敷樣品，待其乾燥後，再於金屬薄膜背面以雷射光照射。位在另一面的分析物會因受雷射照射所產生之震波(acoustic wave)影響而被脫附出來。其中有少部份分析物分子會因此而被游離，但大多數則以中性分子狀態存在。以 LIAD 進行固體樣品分析的過程和前述的 ELDI 有異曲同工之妙，只不過 ELDI 是以雷射直接照射分析物表面，以直接脫附中性分析物分子。而 LIAD 則是以雷射照射樣品所塗敷之金屬薄膜背面，再藉由薄膜傳遞能量以間接脫附分析物分子。然而不論雷射是直接照射或是間接照射在固體樣品，脫附所得的物種均以 intact 物種占大多數。這和一般的預期有很大差距。



參考文獻:

[1] M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).

[2] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).

[3] M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).

[4] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988)

[5] S. Berkenkamp, F. Kirpekar and F. Hillenkamp, *Science*, **281**, 260 (1998).

[6] M. Z. Huang, J. Hsu, C. I. Wu, S. Y. Lin, Y. L. Ma and J. Shiea, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 1767 (2007).

[7] M. Z. Huang, H. J. Hsu, J. Y. Lee, J. Jeng and J. Shiea, *J. Proteome Res.*, **5**, 1107 (2006).

[8] J. Shiea, M. Z. Huang, H. J. HSu, C. Y. Lee, C. H. Yuan, I. Beech and J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Specrtom.*, **19**, 3701 (2005).

[9] Z. Taka´ts, J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks, *Science*, **306**, 471 (2004).

[10] Z. Taka´ts, J. M. Wiseman and R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, **40**, 1261 (2005).

[11] H. Chen, N. Talaty, Z. Taka´ts and R. G. Cooks, *Anal. Chem.*, **77**, 6915 (2005).

[12] N. Talaty, Z. Taka´ts and R. G. Cooks *Analyst.*, **12**, 1624 (2005).

[13] R. B Cody, J. A. Laramee and H. D. Durst, *Anal. Chem.*, **77**, 2297 (2005).

[14] R. B. Cody, J. A. Laramee, J. M. Nilles and H. D. Durst, *JEOL News*, **40**, 8 (2005).

[15] Z. Takats, I. C. Rodriguez, N. Talaty, H. Chen and R. G. Cook, *Chem. Commun.*, 1950 (2005).

[16] B. Linder and U. Seydel, *Anal. Chem.*, **57**, 895 (1985).

[17] V. V. Golovlev, S. V. Allman, W. R. Garrett, N. I. Taranenko, C. H. Chen, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 169/170, 69 (1997)