

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

無機材料輔助雷射脫附及電噴灑游離質譜法之研究(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2113-M-009-024-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立交通大學應用化學系

計畫主持人：陳月枝

計畫參與人員：林亞玄，陳威佑，鄧建勳，何坤展，楊志雄，陳振泰，陳蕙筠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 13 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

無機材料輔助雷射脫附及電噴灑游離質譜法之研究

Inorganic Material-assisted Laser Desorption/ionization and Electrospray
Ionization Mass Spectrometry

計劃編號：NSC 91-2113-M-009-024

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：陳月枝 交通大學應用化學系

一、中文摘要

本報告是為期三年國科會計劃之第一年執行結果摘要。主要的研究成果為成功地發展了溶膠凝膠材料為輔助雷射脫附游離質譜法的基材，並且可應用於有機小分子、胜?、蛋白質，及寡糖核?酸的分析，除此之外，更將此新型雷射脫附游離質譜法和固相微萃取法組合應用於水中微量多環芳香性化合物的分析。

關鍵字：溶膠凝膠、雷射脫附質譜法、蛋白質，寡糖核?酸、固相微萃取法

ABSTRACT

This report summarizes the results of the first year for the three-year project supported by National Science Council (NSC). Major achievement involves the development of a new laser desorption/ionization mass spectrometry, namely sol-gel assisted laser desorption/ionization (SGALDI) mass spectrometry (MS). SGALDI-MS was successfully applied to the analysis of small organics, peptides, proteins and oligonucleotides. Additionally, a new combination method, namely solid phase microextraction (SPME) coupling with SGALDI-MS, was also developed. Trace amount (sub ppb level) of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in aqueous solution could be detected by using this SPME-SGALDI combination method.

Keywords: sol-gel, laser desorption mass spectrometry, proteins, oligonucleotides, and solid phase microextraction (SPME)

二、緣由與目的

自1988年基質輔助雷射脫附游離質譜法(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS))被發展以來，^{1,2}MALDI已被廣泛地應用在分析各種的分析物。然而以MALDI分析有機小分子，並不適合，原因為MALDI的基質常在低質量範圍造成嚴重的干擾，因此有不少研究群是以MALDI為基礎，以發展可分析小分子的分析物為目標。³⁻²⁴例如混合無機粉末如碳粉等與不吸收雷射的甘油為基質，³⁻¹⁵可大幅降低基質在低分子量的干擾。

而利用多孔性矽晶片為承載樣品的基材，且可同時當做輔助樣品在雷射脫附質譜法的分析，是一種不需要基質 (matrix-free) 的雷射脫附質譜法，稱為 DIOS (Desorption/ ionization on porous silicon)¹⁶⁻²⁰ 因此使用 DIOS 當做質譜分析方法所得的質譜圖基質背景相當少，可測得分子量範圍在 6k Da 以下，適用於小分子之分析。

本計劃第一年的目標是致力於以無機材料為發展輔助雷射脫附質譜法的基材，改善並避免傳統 MALDI 所隱藏的缺點。我們研發的策略為利用無機材料-溶膠凝膠材料為製造基材，利用溶膠凝膠材料為材質的原因是此類材料在室溫下利用溶膠凝膠材料的前驅物如 tetraethoxy silane (TEOS) 在酸性或鹼性條件下加水就可進行水解、縮合、聚合合成反應。且在溶膠凝膠反應的過程當中可以加入有機或無機物進行混成反應，可容易地改變所合成的溶膠凝膠產物的性質。一般由矽氧化合物為前驅物所合成的溶膠凝膠在波長 337 nm 並沒有任何吸光率，而此波長是一般商業化 MALDI 所配備之雷射波長。因此如果欲以溶膠凝膠材料為輔助雷射脫附游離的材料，首先要改變溶膠凝膠材料的性質。而如前所提，只要在合成反應的過程加入特定化合物就可以改變溶膠凝膠材料性質，所以在反應進行當中加入可吸收特定波長雷射光的有機物，理論上可將在特定波長並沒有吸收能力的溶膠材料轉變成一吸光材質。因此在實驗中我們嘗試了各種一般常用的 MALDI 基質為反應添加物，我們發現 2,5-dihydroxyl benzoic acid (2,5 -DHB) 為最適合的有機添加物，並且發現 2,5-DHB 可以在反應的過程中和溶膠凝膠的結構有共價鍵結產生，因而導致 2,5-DHB 嵌入溶膠凝膠網狀結構後相當堅固，提供了 DHB 吸光性質於材料中，但在雷射光的照射下不易被脫附游離出來。所以在低質量範圍沒有 DHB 之基質背景干擾，如此的結果，符合了我們預期想要達到的實驗目標，即創造了一無基質背景干擾的質譜圖，避免了傳統 MALDI 缺點，並可將其應用於一般極性有機小分子、生化分子的分析。

此種含 2,5-DHB 的溶膠凝膠材料可以容易地鍍在具有矽氧結構的玻璃或光纖表面，因此我們嘗試將此溶膠凝膠材料塗佈在光纖表面，將此光纖當做固相微萃取法 (Solid Phase Microextraction, SPME) 之探針，一旦樣品分子被吸附到 SPME 光纖探針表面，則可直接送入雷射脫附質譜中進行偵測，不需再將樣品脫附出來，或加入任何基質以利 MALDI 的分析。

除此之外，我們也將這種以溶膠凝膠材料為基礎的質譜法應用於 DNA 的分析，DNA 在 MALDI 分析中存在 2 大問題：(1) DNA 結構中，磷酸根為結構骨架中重要的一環，帶負電的磷酸根離子很容易和鹼金屬陽離子如鈉、鉀離子因正負吸引形成鈉、鉀離子加成物，因而影響到 DNA 在 MALDI 可被偵測到的質量上限及偵測極限，甚至是 DNA 在質譜圖中的離子？解析度。(2) 通常 DNA 在 MALDI 中的碎裂程度蠻嚴重的，在較低分子量會觀察到 DNA 之碎片離子。因此以 DNA 為樣品的

MALDI 分析研究主題，主要以改善此兩大問題為方向。我們嘗試在溶膠凝膠材料中加入 Diamino benzoic acid(DABA)，DABA 為在波長 337 nm 具吸光性的有機物，且根據已報導的文獻顯示含有氨基(R-NH₂)或銨鹽(NH₄⁺)的有機物添加在 MALDI 分析的 DNA 樣品中，通常可以抑制 DNA 加成物的產生，²⁵⁻³²原因為含有這些官能基的化合物可以和鹼金屬陽離子競爭 DNA 骨架上與磷酸根鍵結的位置，並且在 MALDI 的脫附游離過程中留下氫質子給 DNA，因而抑制鹼金屬陽離子加成物的生成，DABA 具有兩個氨基所以應具有氨基化合物在 MALDI 分析中扮演去鹽的角色，而實驗結果也證實了我們的想法。

三、實驗

(1) SGALDI 分析之樣品製備

將 4.5mL 溶膠凝膠的前驅物 Tetraethoxysilane (TEOS) 加入已稱好重量的 2,5-DHB，再陸續加入 1mL 的水及 0.5mL 的 0.01N 鹽酸，在室溫下(約 30°C)攪拌 24 小時。即可用來當作 SGALDI 的基材。進行 SGALDI 的分析時，為避免溶膠凝膠材料直接點樣在 MALDI 樣品盤時，不易清洗的問題，先用導電性的雙面碳膠黏附 Parafilm 於樣品盤上，然後才將 0.1 μL 的 SGALDI 溶膠凝膠基材加在 Parafilm 上，乾燥 20 分鐘後，再在溶膠凝膠材料形成的薄膜表面上加上 0.1 μL 的樣品溶液，此時溶液因表面張力的關係，並不會擴散平鋪開來，而會凝聚成一小滴。等此小滴之液體揮發後，即可送樣品盤至 MALDI-TOFMS 進行質譜分析。

(2) SGALDI-MS 和 SPME 之組合的研究

將 6cm 左右的光纖浸入 H₂SO₄:H₂O₂ = 7:3 (v/v)之溶液 3 分鐘，以移除光纖表面上的不純物，接著再用甲醇沖洗光纖表面。再將此光纖的前端 2cm 長浸入含有 2,5-DHB 之溶膠凝膠溶液(製備方式如(1)所描述)，取出後在室溫下乾燥 24 小時。進行 SPME 分析時，就將已處理過的光纖當做 SPME 探針，浸入 15mL 的含有微量分析物的樣品溶液萃取，萃取時間由 30 分鐘至 2 小時不等，視萃取情況而定。

(3) 應用 SGALDI-MS 在 DNA 的分析

SGALDI 基材的配製原料和(1)略有差別，將有機添加物 2,5-DHB 換成 DABA，而溶膠凝膠/DABA 材料的合成則為取 113.4mg 的 3,4-DABA 加入 4.5mL 的 TEOS，再陸續加入 1.6mL 的甲醇，1.4mL 的水及 60 μL 的鹽酸(30%)，同樣在室溫下反應 24 小時。而點樣方式則和(1)所用一樣，在已鋪有 Parafilm 的 MALDI 樣品盤上，點上此溶膠凝膠基材，經過 30 分鐘之乾燥後，再在溶膠凝膠薄膜上加上樣品溶液，待揮發性液體揮發後，即可將樣品盤送入質譜進行分析。

四、結果與討論

圖 1 為溶膠凝膠/2,5-DHB 合成物的假想結構，即在矽氧網狀結構中嵌入 2,5-DHB，並且以共價鍵結固於此高分子網狀結構中，而由 UV 吸收的圖也可知道此合成產物，在波長 337nm 左右確有相當的吸收率。如圖 2 所示。在波長 337nm 的吸收係數約為 $1995\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，因此可以用來輔助樣品在質譜脫附游離之分析，不需再額外加入任何 MALDI 基質。

圖 3 為使用溶膠凝膠/2,5-DHB 為基材所得之 SGALDI 質譜圖，分析物為長鏈烷類銨鹽之界面活性劑混合物，即 decyltrimethylammonium bromide($\text{C}10^+$)，dodecyltrimethyl ammonium bromide($\text{C}12^+$)及 tetradecyltrimethyl ammonium bromide ($\text{C}14^+$)。圖中只顯現出這三個界面活性劑之去溴假分子離子，並沒有觀察到任何背景離子，且 SGALDI 之空白背景質譜圖相當乾淨，沒有出現任何離子。

圖 4 為將 SGALDI-MS 使用在生化分子如胜? 和胺基酸之分析，圖 4a 只有在 m/z 1061 出現胜? bradykinin 加一氫質子之假分子離子，在低質量範圍並未有任何基質背景離子出現。除此之外，SGALDI-MS 也可用在生化分子混合物之分析，如圖 4b 為胺基酸和胜? 之混合物分析，同樣只得到分析物假分子離子?，沒有任何其他背景離子干擾。由於 SGALDI-MS 已證明可被用在生化分子混合物之分析，因此我們取一蛋白質 cytochrome C 做直接樣品盤上酵素消化反應，結果發現酵素消化實驗可在 5~10 分鐘內完成，且可利用消化產物之離子? 上網進行蛋白質比對，可比對出相當高的分數，因此我們擬將這個方法應用在蛋白質混合物之分析，以加快應用於蛋白質確認的分析速度。

圖 5 為 SPME-SGALDI 組合進行水中微量苯苐 (benzo(a)pyrene) 的分析之裝置流程圖。圖 6 則為所得到的 SPME-SGALDI 分析結果，圖 6a 為萃取苯苐 (1ppb, 15ml) 1 小時所得之 SGALDI 質譜圖，打星號為苯苐之分子離子 ($m/z=252$)，圖 6b 為萃取 500ppt, 15ml 的苯苐樣品溶液 1 小時所得到之 SGALDI 質譜圖，為目前 SPME-SGALDI 的偵測極限，結果證明 SPME-SGALDI 的組合方法是可行的。

圖 7 為利用溶膠凝膠/DABA 為 SGALDI 基材，以寡糖核? 酸 CCTCTGGTCTCC 為樣品所得到之 SGALDI 質譜圖，可以明顯看出鈉加成物被明顯抑制，而在較低分子分子量有碎片離子出現，多為 y_n 或 w_n 離子，預測之可能碎裂片段也顯示在此圖譜上。此法證明以 DABA 添加到溶膠凝膠材料中，不僅可使此衍生物有輔助樣品雷射脫附的作用且可達到去鹽的效果，改善 DNA 質譜圖之品質。

四. 計劃成果自評

第一年的研究成果達成了計劃預定目標，成功地建立以無機材料輔助雷射脫附質譜法的系統，並可將其應用到有機小分子、胜?、蛋白質及 DNA 的分析，且利用所建立的 SGALDI-MS 系統為發展組合 SPME 和雷射脫附質譜法連結的方法。

在這一年的計劃執行期間，我們發表相關論文計會議論文 9 篇，³³⁻⁴¹ 期刊雜誌論文二篇，^{42, 43} 另有論文正接受審核、撰寫準備發表。

五、參考資料

1. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
2. Tanaka, M.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, T.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
3. Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y.-C. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4335-4342.
4. Dale, M.J.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3321-3329.
5. Dale, M.J.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 136-142.
6. Kraft, P.; Alimipiev, S.; Drats, E.; Sunner, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 912-924.
7. Kang, W.; Kim, J.; Paek, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 941-944.
8. Park, K.-H.; Kim, H.-J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1494-1499.
9. Dietemann, P.; Edelmann, M.; Meisterhans, C.; Pfeiffer, C.; Zumbuhl, S.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Helvetica Chim. Acta.* **2000**, *83*, 1766-1777.
10. Chen, Y.-C.; Tsai, M.-F. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1278-1284.
11. Chen, Y.-C.; Sun, M.-C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2521-2525.
12. Wu, J.-Y.; Chen, Y.-C. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 85-90.
13. Kinumi, T.; Saisu, T.; Takayama, M.; Niwa, H. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 417-422.
14. Zhang, Q.; Zou, H.; Guo, Z.; Zhang, Q.; Chen, X.; Ni, Jianyi. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 217-223.
15. Lai, E.P.C.; Owega, S.; Kulczycki, R. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 554-564.
16. Wei, J.; Buriak, J.M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243-246.
17. Kruse, R. A.; Li, X.; Bohn, P.W.; Sweedler, J.V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3639-3645.
18. Thomas, J.J.; Shen, Z.; Blackledge, R.; Siuzdak, G. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *442*, 183-190.
19. Shen, Z.; Thomas, J.J.; Averbuj, C.; Broo, K.M.; Engelhard, M.; Crowell, J.E.; Finn, M.G.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 612-619.
20. Bhattacharya, S.; Raiford, T.J.; Murray, K.K. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2228-2231.
21. Cuiffi, J.D.; Hayes, D.J.; Fonasj, S.J.; Brown, K.N.; Jones, A.D. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1292-1295.
22. Rechthaler, J.; Allmaier, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 899-902.
23. Zhan, Q.; Wright, S.J.; Zenobi, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 525-531.
24. Vestling, M.M.; Fenselau, C. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, *14*, 169-178.
25. Simmons, T.A.; Limbach, P.A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 567-572.
26. Simmons, T.A.; Limbach, P.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 668-675.
27. Piles, U.; Zürcher, W.; Schär, M.; Moser, H.E. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191-3196.
28. Currie, G.J.; Yates, J.R., III. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 955-963.
29. Zhu, Y.F.; Taranenk, N.I.; Allman, S.L.; Martin, S.A.; Haff, L.; Chen, C.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1591-1596.
30. Cheng, S.-W.; Chan, T.-W.D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 907-910.

31. Asara, J.M.; Allison, J. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2866-2870.
32. Vandell, V.E.; Limbach, P.A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 2014-2021.
33. 林亞玄，陳月枝 (2002)具低基質背景干擾之新型雷射脫附游離質譜技術—溶膠凝膠輔助雷射脫附游離質譜法，化學年會，台北。
34. 鄧建勳，陳月枝 (2002)固相微萃取法與表面輔助雷射脫附游離質譜法結合之改良應用於水中微量苯苄之分析，化學年會，台北。
35. 吳逸婷，翁茂峰，陳月枝 (2002) 毛細管電泳連結雷射脫附游離質譜法之界面探討，化學年會，台北。
36. 陳奎伯，陳月枝 (2002) 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法分析革蘭氏陽性球菌，化學年會，台北。
37. 林亞玄，陳月枝 (2002) 晶片式溶膠凝膠材料雷射脫附游離質譜法，化學年會，台北。
38. 陳威佑，陳月枝 (2002) 應用含氮化合物為雷射脫附質譜法基質之研究，化學年會，台北。
39. 何坤展，陳月枝 (2002) 雙羥基苯甲酸溶膠凝膠混成產物為 SGALDI 基質之探討，化學年會，台北。
40. 陳振泰，陳月枝 (2002) 探討孔洞性質對溶膠凝膠材料輔助雷射脫附游離質譜法之影響，化學年會，台北。
41. Yu-Chie Chen (2003) Sol-gel assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. 分析小組交流研討會, March 8. 中央大學, 中壢.
42. Ya-Shiuan Lin and Yu-Chie Chen* (2002) Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on Sol-Gel-Derived 2, 5-Dihydroxybenzoic Acid Film. *Anal. Chem.* 74, 5793-5798.
43. Chien-Hsun Teng and Yu-Chie Chen* (2003) Fiber Introduction Mass Spectrometry: Coupling Solid-Phase Microextraction with Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. 17, 1092-1094.

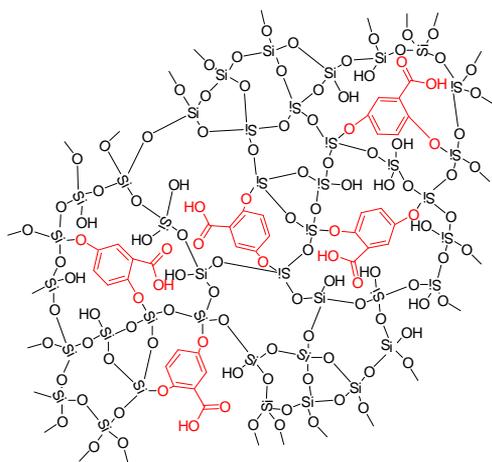


圖 1、溶膠凝膠/2,5-DHB 衍生物之預測結構

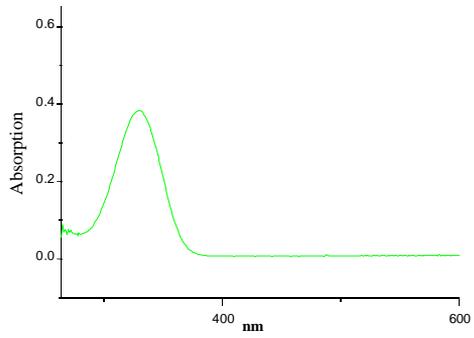


圖 2、溶膠凝膠/2,5-DHB 衍生物之 UV 吸收圖

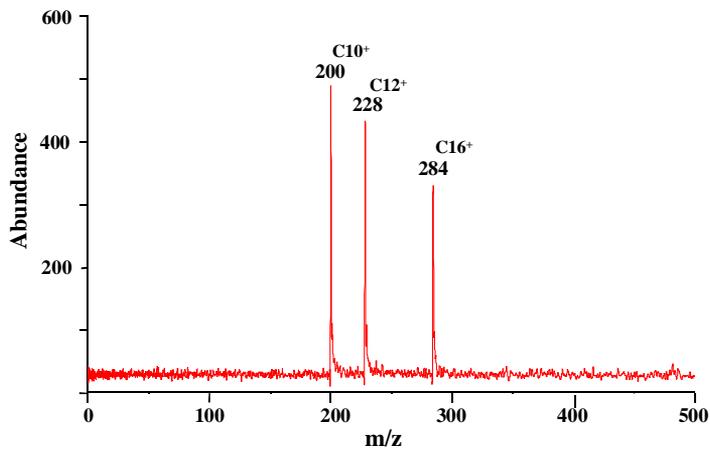


圖 3、界面活性劑混合物之

SGALDI 質譜圖

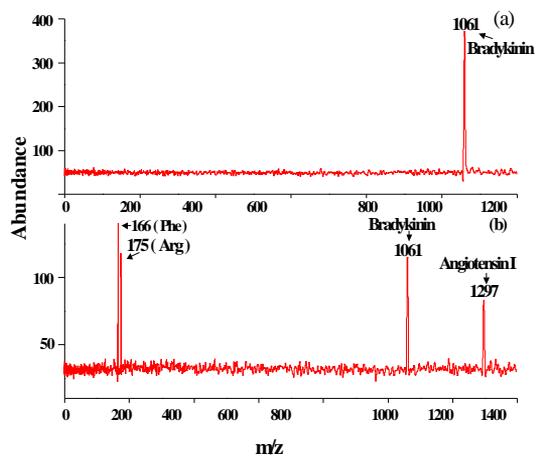


圖 4、生化分子之混合物的 SGALDI 質譜圖

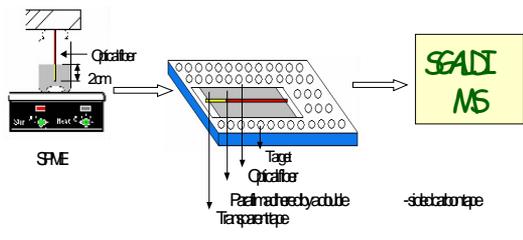


圖 5、SPME-SGALDI 設置圖

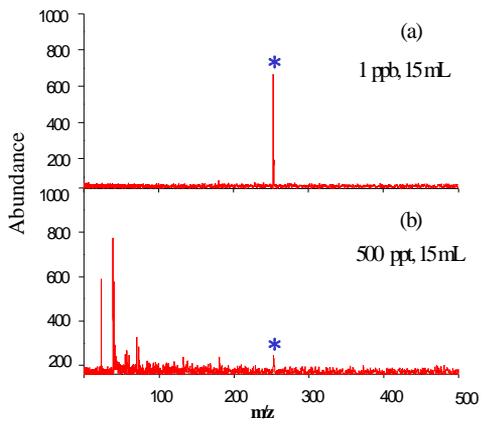


圖 6、苯萃之 SPME (萃取 1 hr)- SGALDI

質譜圖, * 為苯萃分子離子

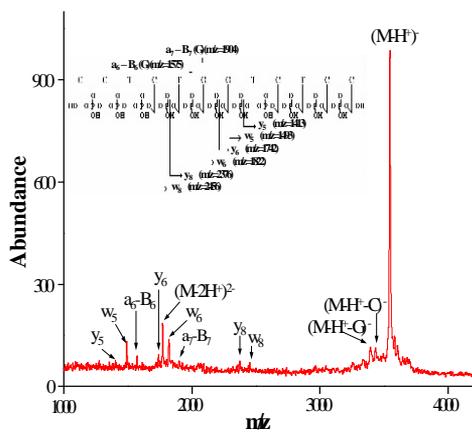


圖 7、CCTCTGGTCTCC 寡糖核? 酸之 SGALDI 質

譜圖