知識天地

新質譜功能之開發 — 同步雙電性質譜法

王亦生助研究員(基因體研究中心)

概述

質譜儀(mass spectrometer)是最靈敏的物質分析工具之一，其工作原理是將待測物質游離成為離子後，以質量分析器依各離子的質量電荷比(mass-to-charge ratio，或稱質荷比)分離、偵測，並記錄下來。所有質譜儀的質量解析原理，都是依據電磁場對於不同質荷比的離子造成作用力差異，而在空間或時間上將其分離。因為質譜分析所耗用的樣品量通常少於數毫克，且質量準確度與分離效率極高，所以它特別適合複雜或稀有樣品的分析。尤其在1980年代末期因為二大關鍵游離技術的發明，質譜分析更立刻在生物化學領域上蓬勃地發展起來。這二大技術分別是適用於固態樣品的基質輔助雷射脫附游離法(matrix-assisted laser desorption/ionization，簡稱MALDI) [1]，與適合液態樣品的電噴灑法(electrospray ionization，簡稱ESI) [2]。短短二十多年間，質譜儀已經變成生物實驗上最重要的分析工具之一，也成為化學、環境、材料與生物醫學領域上無可取代的主流技術。目前國內致力於質譜技術發展的實驗室雖然不多，但研究成果相當受到國際質譜學界肯定[3-5]。

質譜儀在物理化學領域中，常與其他技術整合以研究小分子的物理化學性質，例如結合雷射來研究分子光譜或是化學動力學。然而，傳統光譜學與化學動力學技術還無法有效運用在質量與結構複雜性很高的生物分子上，所以質譜便成為唯一在生化分析上可提供有用資訊的技術。不過傳統質譜儀不外乎就是提供樣品分子或者是其碎片的質荷比，所以最大的功能就是幫助解析樣品分子結構。其他的重要資訊如樣品濃度或化學性質等，由質譜儀上所得到的資訊卻不甚可靠。目前生化分析上只能以質譜訊號來做相對定量分析，而難以做到絕對定量。若論解析生物分子結構的功能，質譜儀卻又遠不如核磁共振儀般可以直接解析樣品的立體結構來得有用。以蛋白質分子為例，質譜儀只能解析一級結構，而對於研究二級結構以上卻幫助有限。若要論質譜儀最為重要的特性，就無非是其無可取代的質量解析度與靈敏度。這二大獨特優勢成為近代質譜技術研發的重點，但也相對造成質譜新功能開發未被充分重視，無法幫助使用者解決樣品其他層面的問題。

質量解析之外

在近年重大的質譜功能發展中，最受重視的例子即是影像質譜技術(imaging mass spectrometry)的開發[6]。該方法讓質譜與樣品的空間分佈連結起來，使質譜儀也可像顯微鏡般將物質的影像表現出來。此技術最為重要的應用是在於分析生物組織切片，但所得到的質量影像所代表的是分子的空間分佈，所以資訊遠比傳統顯微鏡更豐富。另外一個值得一提的是近年來離子遷移(ion-mobility)技術的進步，使得離子立體結構的資訊能夠與質譜數據合併分析[7]。以此方法，許多立體結構不同但有相同分子量的複雜生物分子，也可以在質譜圖上分辨出來。這二個例子都是以傳統質譜儀為基礎，而成功開發出新功能以解決更多生化問題的成功範例。因此，為突破質譜儀目前較被侷限的應用框架，質譜學應適當跳脫於提升早已無可取代的絕對優勢面(或稱之為垂直式發展)，轉而發展本身所欠缺的功能面(或稱之為水平式發展)。

在實驗中以最高效率收集各種可用資訊，是所有分析儀器的設計目標。雖然質譜儀也是依此為主要訴求，但是傳統質譜儀卻存在有電性選擇性(polarity-bias) 的缺點。電性選擇性指的是無法同時針對正離子與負離子進行分析，主要是因為傳統離子源的設計只能引導單一電性的離子進入質量分析器，而反電性的離子則會被壓抑在離子源區無法脫離而快速消滅。然而，各樣品分子可能因組成份之差異，造成各自擁有獨特的化學性質與偏好電性，所以單次單電性的質譜分析可能只擷取了一半的樣品資訊。例如在生物系統內常見到的後轉譯修飾以及代謝物分析等，都時常需要正、負離子的完整資訊。如果分次測量，除了耗費時間與增加樣品消耗，單獨紀錄的正、負離子訊號之間失去對應關係。這不但嚴重限制了質譜儀執行高通量分析(high-throughput analysis)的效率，也使得探討分子間化學作用的研究難以進行。因此，雙電性質譜儀的開發，成了我們選定提升質譜儀功能與效率的重要方向之一。

同步雙電性質譜技術

（一）雙極式飛行時間式質譜儀

基於提升質譜儀效能與研究離子產率的雙重目的，我們研發了以MALDI離子源為基礎，搭配二組飛行時間式質譜儀(time-of-flight mass spectrometer，簡稱TOF-MS)的同步雙電性質譜儀[8]，如圖一。這個分析技術是生物質譜

偵測觀念上的突破，而其中雙極式MALDI離子源與高偏壓偵測器電路的研發為二項技術關鍵，也是至今傳統質譜儀無法提供雙電性分析的主要障礙。

雙極式MALDI-TOF MS最重要的功能在於它提供了最正確的正、負離子間相互關係，而這個優勢在於離子對(ion pair)的研究上完全展現出來。MALDI法是以雷射照射固態樣品以產生正、負離子，再以一高電壓電極板引導離子進入分析器。而離子對假說是目前廣為接受的離子生成反應之一，其主要是描述雷射激發基質雙分子後，引發電子或質子轉移而產生基質正離子與基質負離子。此外，另有多光子游離機制或預先離子生成假說，但目前卻無實驗可以有效驗證各假說的正確性。這個問題在使用雙極式質譜儀檢測2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)後，有了初步的結論：因為產生DHB正、負離子所需的最低雷射通量(threshold laser fluence)不同，且正、負離子之訊號變異並不同步，所以離子對的假說對於DHB而言可能並非必要過程[9]。目前我們已掌握光游離機制對於DHB分子而言是極為容易進行的反應，而這個機制對於MALDI整體過程的貢獻，則正在研究當中。這個發現對於以低雷射功率來減少醣分子熱分解，但又同時可產生大量電荷的實驗原則來說，顯得非常有價值，也正在研究當中。

目前雙極式MALDI-TOF MS正朝向高度自動化的方向開發，以因應分析複雜生物樣品的需求。這不只是要迎合使用者對方便性的要求，更重要的是高度自動化才能進行目前非常重要的影像質譜分析。目前以單極性質譜儀進行影像質譜分析時，雷射照射生理組織切片之後造成組織表面破壞，則切換電性後再重複第二次的檢測勢必無法還原最初的組織狀態，也因此正、負離子的對應關係必然不夠正確。有了同步雙電性的設計，不但可以解決此問題，也不需耗費額外的時間與樣品，大大地增加了研究品質與效率。

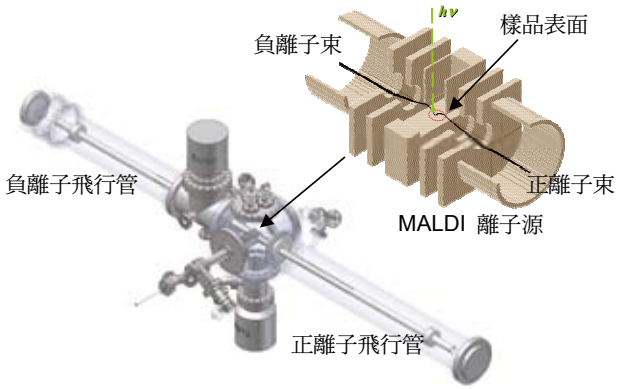
（二）雙極式電噴灑式質譜儀

相對於固態樣品，液態樣品分析更能顯示出雙電性質譜功能的優點。這是因為液態樣品通常更為複雜多元，故各個電性的離子資訊更為豐富。因此，為了完整收集正、負離子的訊號，配置傳統ESI離子源的質譜儀必須在樣品流過液態層析儀後的噴灑過程中，快速來回切換離子源與質譜儀的電性，以反覆偵測相反電性的離子。但自液態層析儀分離出的樣品出現時間約僅維持數秒，且每次切換電性後需要一段時間讓離子訊號穩定，所以切換電性的方式使得樣品無法被充分利用。

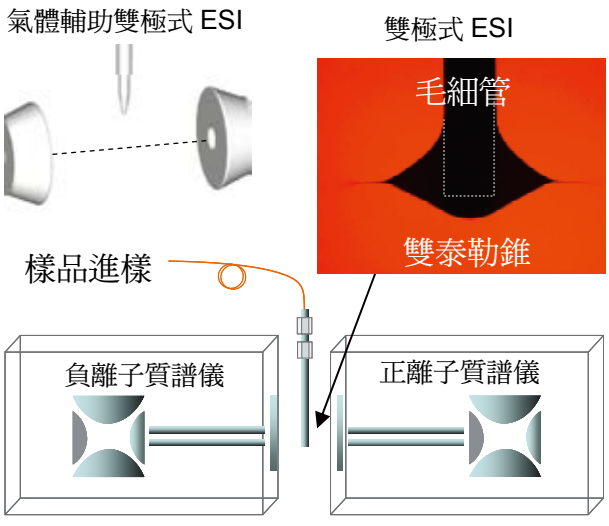
相對於MALDI法中以雷射激發產生離子的方式，雙電性ESI法的開發更具挑戰性。這是因為ESI是靠偏壓電場去吸引毛細管末端液體內的特定電性離子（例如正電壓吸引負離子），使其聚集於液體表面形成泰勒錐(Taylor cone)後，導致離子牽引微小液滴脫離液體表面，而帶電液滴再逐步揮發形成獨立的離子。但是當特定電荷離子聚集時，其反電性離子則會被抑制在液體內部而無法脫離液體表面，如此同步雙電性離子源的目標也無法達成。

為克服ESI電荷選擇性的缺點，我們在毛細管兩側分別施加相反電性的高電壓。經由仔細調整毛細管與二側高偏壓電極的位置與施加之電壓強度，液體內的正、負離子會各自聚集於毛細管的相對應兩側。當二端電壓強度平衡增加，正、負離子分別累積於毛細管前端的液體二側並形成特殊的雙泰勒錐(如圖二)，最後分別脫離液體形成離子。以此方法，我們成功地以ESI法開發出了同步雙電性離子源，並連接兩台商業離子阱質譜儀[10]。自此，偵測液體樣品中的正、負離子訊號將不再需要做電性切換，可以直接由二台質譜儀做穩定且長時間的量測。

另外，傳統ESI法也常搭配使用霧化氣體流經毛細管



圖一　雙極式MALDI-TOF MS之結構與離子源放大圖



圖二　雙極式ESI所產生之雙泰勒錐放大圖與雙極式ESI-MS之結構。左上圖為氣體輔助雙極式ESI噴灑頭與二台質譜儀入口的相對位置圖

尖端，以高速氣流幫助帶電液滴脫離泰勒錐液體表面。這種氣體輔助式ESI法也同樣可以搭配二個相反電性的高偏壓電極，讓正，負離子分別脫離毛細管而進入相對應的質譜儀。此種氣體輔助式的雙極式ESI也特別適合於含水成分高的液體樣品分析，主要因為水的表面張力高且導電性低，使得泰勒錐的產生需要過高的偏壓而造成噴灑過程不穩定。霧化氣體的使用可以讓離子在泰勒錐形成之前就脫離液體表面，讓離子產生過程可以在較低的偏壓下進行，穩定雙極式ESI的噴灑環境。目前我們正進行以雙極式ESI進行醣質譜的實驗，研究以同步偵測正、負離子的方式來增加醣分子結構的分析效率與正確率。

結語

質譜儀發展至今，雖然在偵測靈敏度與解析度上不斷提升，但質譜儀的功能性開發則相對較為緩慢。若可以運用質譜儀快速、靈敏、與準確的特性，對生物分子功能與交互作用上提供多方面數據，應可大大地幫助生化學家解決更多重要問題。同步雙電性質譜儀的觀念是目前我們的發展方向之一，其所代表的意義不僅在於提升質譜儀的效率以滿足現有使用者的需求，更進一步期望推廣質譜儀於各個不同領域，以研究更多層面的問題。生物系統是一個最為重要也極為複雜的開端，以此為研究目標可以激發出最為完整與實用的檢測技術。未來的質譜儀發展，除了朝輕便、快速、準確、簡單等方向努力之外，多功能與整合其他檢測儀器應是非常值得開發的方向。

參考文獻

1. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 78(1987), 53.
2. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, Science 246(1989), 64.
3. W.-P. Peng, H.-C. Lin, H.-H. Lin, M. Chu, A. L. Yu, H.-C. Chang and C.-H. Chen, Angew. Chem. Int. Edit. 46(2007) 3865.
4. W.-P. Peng, Y.-C. Yang, M.-W. Kang, Y.-K. Tzeng, Z. X. Nie, H.-C. Chang, W. Chang and C. H. Chen, Angew. Chem. Int. Edit. 45(2006), 1423.
5. J. Shiea, M. Z. Huang, H. J. HSu, C. Y. Lee, C. H. Yuan, I. Beech and J. Sunner, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19(2005), 3701.
6. R. M. Caprioli, T. B. Farmer and J. Gile, Anal. Chem. 69(1997), 4751.
7. D. E. Clemmer and M. F. Jarrold, J. Mass Spectrom. 32(1997), 577.
8. S.-T. Tsai, C. W. Chen, L. C.-L. Huang, M.-C. Huang, C.-H. Chen and Y.-S. Wang, Anal. Chem. 78(2006), 7729.
9. B.-H. Liu, Y. T. Lee and Y.-S. Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20(2009), 1078.
10. H.-K. Chen, C.-K. Chang, C.-C. Wu, M.-C. Huang and Y.-S. Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20(2009), 2254.