

# 高效液相層析質譜法在微生物辨識上的應用

## Microbial Identification Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

吳志弘、何彥鵬

Chi-Hung Wu, Yen-Peng Ho

液相層析能夠除鹽、濃縮及分離複雜樣品，配合質譜儀鑑定分子結構的能力，液相層析質譜法非常適合分析細菌樣品，藉由各種生物標籤如脂質及蛋白質的分離及分析，再搭配質譜比對及蛋白質資料庫搜尋，可辨識細菌等微生物。

High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is suitable for the identification of microorganisms. The technique is capable of performing sample clean-up, concentration, separation as well as structural characterization. Microorganisms can be differentiated or identified by the LC-MS analysis of biomarkers such as lipids and proteins. The microbial identification is based on the biomarker profiles or protein database search.

### 一、前言

鑑定細菌的方法有相當多種，例如培養分離菌落的形態與顏色、細胞的形態與葛蘭染色的差異，甚至可以 DNA：DNA 雜交的方式來分析。而以質譜法辨識細菌，通常是分析其特有的生物標籤 (biomarkers)，也就是所謂的化學分類法。生物標籤亦有許多種，如苯二酮、色素、脂肪酸、脂質、醣類及蛋白質等。層析法有簡化微生物內複雜成分的功能，常被用來與質譜儀結合，早期分析細菌，因為是根據小分子生物標籤，多是利用氣相層析來分離，以液相層析分離生物標籤並不多，主要是以

分離脂質及蛋白質為主，其辨識的方式分為質譜比對及蛋白質資料庫搜尋。

### 二、質譜圖比對法

如何分析各種生物標籤以辨識臨床醫學上及環境中有害的微生物，是一個重要的課題<sup>(1,2)</sup>。質譜圖比對法是建立各種微生物特有生物標籤的質譜圖，利用圖譜的差異來分辨微生物，我們也可以建立這些圖譜的資料庫，作為日後比對的依據。一個微生物中所具有的生物標籤數目可以非常多，且可以到達幾個數量級。以蛋白質為例，大腸桿菌中的蛋白

質數目，估計有超過 5000 個<sup>(3)</sup>，在如此多的蛋白質中，只有少數被當作細菌辨識時所用的生物標籤。近來，在質譜游離及偵測技術上的進步，已經能提供一個較好的方法來辨識生物大分子。目前，基質輔助雷射脫附游離質譜法 (MALDI-MS) 較常被用來取得細菌樣品中蛋白質的質譜<sup>(4-15)</sup>。

基質輔助雷射脫附游離質譜法所分析的蛋白質組成能否成功的作為細菌辨識，要根據其質譜的再現性 (reproducibility) 程度來決定。然而，由如此複雜系統所得到的圖譜，跟許多的實驗條件及生物因素息息相關<sup>(9,16,17)</sup>。例如，(a) 基質的選擇；(b) 樣品－基質的製備方法；(c) 細菌樣品的前處理；(d) 細菌的培養時間。這些實驗條件都需要仔細地控制才能得良好的再現性。而 MALDI-MS 很難與樣品前處理及分離技術線上結合，所以不易應用在自動化系統上。因為是否能自動偵測為處理實際細菌樣品時的重要考量點之一，上述的限制造成許多困難處。

電噴灑游離質譜法 (ESI-MS) 分析在大氣壓下直接由液態樣品產生的離子，所以，此方法能夠與樣品清洗裝置、濃縮及分離等技術線上連結，這些技術包含微生物分解、固相萃取、液相層析及毛細管電泳等<sup>(18,19)</sup>。液相層析－電噴灑游離質譜法已經能夠從細菌樣品中得到具有再現性的蛋白質分布<sup>(20)</sup>。而彼此沒連接的 LC 及 MS 裝置也曾被報導用來分析細菌樣品<sup>(21,22)</sup>。Vaidyanathan 等人最近發表<sup>(23)</sup>沒有使用前分離就直接以 ESI-MS 來分析整個細菌細胞。但由於 ESI-MS 對於緩衝液、鹽類及清潔劑還是頗敏感<sup>(24)</sup>，因此藉由與分離方法連結，ESI-MS 可以得到較有再現性的圖譜資料。

### 三、蛋白質資料庫搜尋

此法與前述質譜圖比對法最大的不同在於不需要再現性良好的質譜圖。在 90 年代，有關生物方面的資訊增加及網際網路帶來的便利性造就了一門新的科學研究領域－生物資訊學。現今，微生物中已有超過 100 組的基因序列被完整解開了<sup>(25)</sup>，且儲存在公開的資料庫中。藉由生物資訊的演繹，微生物中已知 DNA 序列的完整蛋白質組可以被建構出來。Fenselau 的研究小組提出可藉由質譜及蛋白質資料庫的搜尋來做微生物辨識<sup>(26)</sup>。他們將所得到的質譜訊號拿來與資料庫中的蛋白體做比較，再將每個訊號所有可能的細菌來源列出，最好的符合率 (也就是最多相符的細菌) 應該是最正確的細菌。使用此方法時，質譜訊號的相對強度將不是所強調的重點，蛋白質的質量 (mass) 才是微生物辨識能否成功的關鍵。由於不同微生物中有些蛋白質的質量會有所重疊，導致錯誤的辨識，尤其是當質量的準確性低或是蛋白體太大時常會發生。假如對於資料庫搜尋結果感到存疑，可以利用 Fenselau 及其研究小組提出的信心程度測試 (significance level testing) 來評估此結果的意義<sup>(27,28)</sup>。

### 四、脂質等的分離與鑑定

類異戊二烯苯二酮 (isoprenoid quinone) 是細胞質膜和列線體膜的主要成分 (圖 1)，其在電子轉移中扮演重要的角色，在葛蘭氏陰性菌中主要的苯二酮為 ubiquinone，在葛蘭氏陽性菌中的苯二酮則為 menaquinone<sup>(29)</sup>，其測鏈的長度是另一個可供細菌辨識的部分。脂質是細胞膜的主要成分，葛蘭氏陰

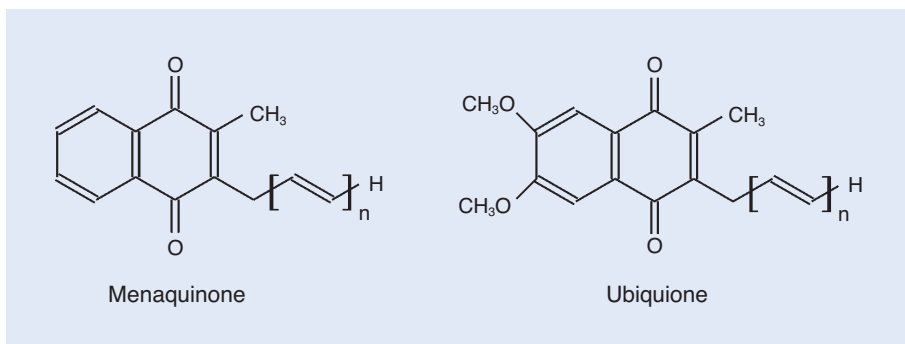


圖 1. 兩種類異戊二烯苯二酮的結構。

性菌因有兩層脂質層，脂質的含量很豐富，葛蘭氏陽性菌有單層脂質層，脂質的含量相對較少。細菌內脂質主要成分為磷脂 (phospholipid)，通常包含一個甘油骨架、極性官能基和兩個脂肪酸 (圖 2)。以前使用氣相層析分析脂質時，只能分析其水解後的脂肪酸，並不能得到原來脂質的真正結構，因此分析出的脂肪酸是所有各類脂質的整體貢獻，完全失去原有脂質的分布訊息，而且以此法得到不同菌種的脂肪酸有時缺乏專一性<sup>(30,31)</sup>。

分析完整脂質早期是使用快速原子撞擊 (fast atom bombardment) 質譜儀，但是由於這個分析法需要使用基質 (matrix)，化學干擾常造成分析脂質混合物的困擾<sup>(2)</sup>，而且其靈敏度也不佳。電噴灑游離法不需要使用基質，最重要的是可跟液相層析結合，已被用來直接分析脂質結構，並且對細菌萃取出之脂質混合物進行定量分析。以分析脂質來辨識細菌的方法必須有良好的分離能力與靈敏度，特別是分析環境中的微生物，其含量可能微乎其微，液相層析質譜法具有上述之優點，分析時是將脂質萃取出物乾燥後溶於甲醇，以逆相管柱分離，質譜儀設定在正電及負電模式定出脂質的結構，表 1 為細菌

*Methylosinus trichosporium* 萃取出各種脂質的組成，每一特定脂質的脂肪酸組成亦可解出<sup>(32)</sup>。Fang 等人比較以氣相層析質譜儀分析脂肪酸組成和以液相層析質譜儀分析脂質組成來分辨細菌的差異<sup>(31)</sup>，他們發現五種不同 *Pseudomonas* 脂肪酸組成相當接近，並不能有效分辨出菌種的不同；相反地，以液相層析分離出的各類脂質的組成則可以成功地分辨出五種不同 *Pseudomonas* 菌種或是菌株。

## 五、蛋白質的分離與鑑定

以蛋白質分辨菌種是較新的觀念，除了蛋白質的專一性較高外，基質輔助雷射脫附游離和電噴灑游離法的發明是另一個推升這一新辨識法的動力。蛋白質的分離可用毛細管液相層析儀，細菌培養 24 小時後，取得細胞，並用水清洗 3 次，冷凍乾燥儲存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。把蛋白質從細胞中萃取出來所需的溶劑包括有水、0.1% 三氟醋酸 (TFA)、10 mM 磷酸溶液 (PBS) 和 acetonitrile-water (40 : 60) 等。將凍乾的細菌配成濃度為 5 mg/mL 的懸浮液，細胞懸浮液用不同方法處理之，這些方法包括漩渦法、超音波震盪法及冷凍-融化等方法。對於漩渦法而言，需要多旋轉幾次。對於用液態氮所做的冷凍-融化法，則需要重複步驟 5 次，以使細胞破裂。把細胞的懸浮液離心，用 4.5  $\mu\text{m}$  的 PVDF 濾膜過濾之，懸浮液經濃縮除鹽，即可進行液相層析質譜分析。樣品若不除鹽，則利用 SpeedVac 濃縮。液相層析部分通常是用  $\text{C}_8$  填充的管柱，也有以非孔性  $\text{C}_{18}$  管柱分離。

由於以基質輔助雷射脫附游離分析細菌蛋白質，一般只能偵測到少數低於 20000 Da 的蛋白質，因此 Lubman 等人採用離線的方式，先以液相層析將蛋白質分離，再用基質輔助雷射脫附游離質譜分析這些蛋白，他們證明這個方法比直接偵測有明顯的優勢，有相當數量的蛋白質被偵測到，而且可以容忍鹽類或是雜質的存在。偵測極限可到 picomole 的程度，根據蛋白質質譜圖的差異，細菌的分辨可到物種的階層。1999 年，Krishnamurthy 等人利用線上毛細管液相層析-質譜儀成功地分辨出 *Bacillus anthracis*、*Brucella melitensis*、*Franciscella tularensis*

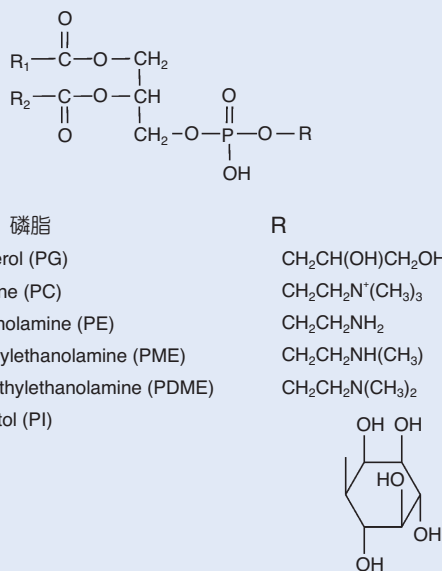


圖 2. 磷脂的結構，包含一個甘油骨架、極性官能基、和兩個脂肪酸。

編號	磷脂	滯留時間 (min)	莫爾百分率 (%)
1	C16:1/C16:1-PG	31.99	0.6
2	C18:1/C16:1-PG	32.53	11.2
3	C18:1/C18:1-PG	33.71	0.9
4	C16:1/C18:1-PI	34.96	0.6
5	C16:1/C18:1-PE	35.42	0.7
6	C18:1/C16:1-PDME	37.46	24.5
7	C18:1/C18:1-PDME	42.00	40.0
8	C18:1/C16:1-PME	47.58	4.8
9	C16:1/C18:1-PC	52.16	0.5
10	C18:1/C18:1-PME	56.23	16.1

表 1.

由細菌 *Methylosinus trichosporium* 萃取出各種脂質的組成

和 *Yersinia pestis* 等人類致命細菌，而 *Bacillus anthracis* 與其極相近的物種 *Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis* 和 *Bacillus thuringiensis* 亦可輕易地從其質譜圖的差異分辨出來。此一線上的作法提供了一個可除鹽、濃縮、分析的自動化細菌分析模式。

另外，非孔性  $C_{18}$  管柱可以較短的時間及較高的解析度分離蛋白質，已被用來分析大腸桿菌與人類 erythroleukemia 等細胞蛋白，在 30 分鐘內可分離出 erythroleukemia 細胞上百個蛋白質，而且非孔性管柱可避免蛋白質吸附於孔洞的損失，增加偵測極限。

由於細菌蛋白質極為複雜，一般的全離子層析圖 (total ion chromatogram) 並不能呈現出所有的訊號峰，而一般的軟體只能處理有訊號峰的質譜圖，因此要自動處理所有的蛋白質質譜圖是有困難的。為解決這個問題，可以在全離子層析圖中加入人工訊號峰，強迫電腦軟體處理可能在這些人工訊號下的蛋白質訊號。以細菌大腸桿菌的蛋白質分析為例，沒有加入人工訊號峰層析圖中，只能找到約 20 個蛋白質訊號，加入人工訊號峰後，可以找到 29 個蛋白質訊號，避免了額外人工分析的需要。

## 六、蛋白質的分析配合資料庫的搜尋

配合蛋白質資料庫的搜尋是最新的細菌辨識法，理論上，利用資料庫的搜尋鑑定細菌是和實驗條件沒有相關的，蛋白質的分布可能會改變，但仍

舊可以提供正確的生物辨識。此方法大部分是根據 MALDI-MS 所獲得的細菌樣品圖譜為依據。由於 MALDI-MS 所能分析的蛋白質質量大多小於 20,000，因此最近有人使用 LC-MS 來分析<sup>(33)</sup>，可觀察到更多及更大的蛋白質。利用 Sequence Retrieval System (Expasy, Swiss Bioinformatics Institute)，依據蛋白質的分子量對於 SWISS-PROT 或 SWISS-PROT/TrEMBL 資料庫進行搜尋。Query form 提供了一系列的查詢參數供資料庫的搜尋。以平均的蛋白質分子量作為其主要參數，可容許的質量範圍為  $\pm 3$ ，且限定在細菌的蛋白質搜尋。每個分子質量的搜尋結果均提供此蛋白質的特性及可能細菌的來源。以下探討數種樣品萃取溶劑及萃取方法對於液相層析蛋白質分布的影響程度，並且檢視蛋白質分布對於資料庫搜尋之細菌辨識有何影響。

### 1. 液相層析質譜分析

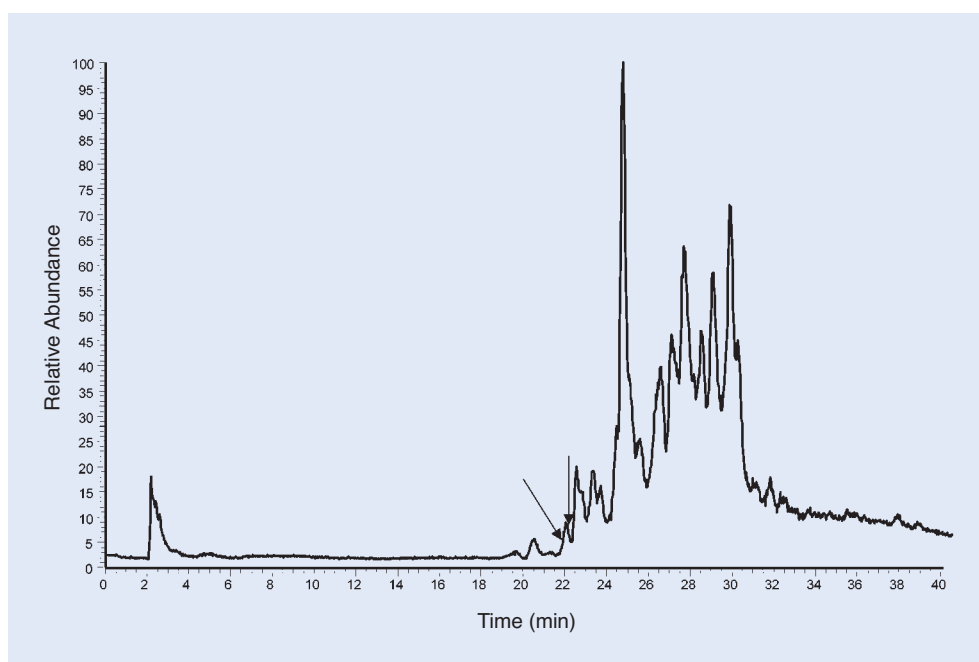
在不同實驗條件下所得細菌的蛋白質分布是會有所不同的，這些條件包括樣品的萃取溶劑、萃取方法等等。圖 3 顯示出當使用水為溶劑時，所得到的蛋白質全離子層析圖，由此層析圖頂多只能觀察到 20 個訊號峰。然而，仔細分析質譜卻可以分辨出 43 種蛋白質，這就是使用質量分析器的優點。圖 4 顯示從圖 3 分離出的細菌蛋白質的 2 張質譜。這兩張圖均來自於相同的訊號峰，差別在於所選取的時間是在 22.2 及 22.4 分鐘的區間附近，此圖譜顯示出即使層析圖只有顯示一個訊號，其中卻可包含了

表 2. 液相層析質譜分析出的大腸桿菌蛋白質 (單位為 Da, 使用水為溶劑, 漩渦萃取 5 分鐘)。

2430	9739	12230	18123	33418
6414	9982	13482	18159	33725
7272	10298	14066	18160	38205
7706	10385	14286	18568	40715
8324	10633	14361	22282	40996
9123	10692	15952	23005	45369
9459	11193	16880	24979	52776
9548	11989	17053	28510	
9573	12214	17552	32374	

數種完全分離的蛋白質。觀察到的蛋白質質量均列在表 2。對於含大腸桿菌的樣品而言, 可能偵測到數千個蛋白質, 但事實上是不可能用單一管柱來分離如此多的蛋白質, 不只是因為那些蛋白質有大範圍的等電點 (pI), 而且也因為許多蛋白質所存在的量其實是很少的。大範圍的等電點限制了水溶性蛋白質的數目, 而且量很少的蛋白質也很難去偵測到。為了分離如此多的蛋白質, 一般需要二維凝膠電泳的分離技術 (two-dimensional gel electrophoresis)。最近, 結合離子交換和逆向層析管柱的多維液相層析已被用來分離蛋白質<sup>(34)</sup>。

圖 3. 使用水為溶劑, 漩渦萃取 5 分鐘, 所得到的蛋白質全離子層析圖。



## 2. 各種樣品前處理方法的影響

使用不同溶劑及不同萃取方法所得到的細菌蛋白質數及分布列於表 3, 本表總結所觀察到的蛋白質數目及蛋白質分布間的相似度。當樣品以 0.1% TFA 漩渦萃取時, 有 43 種蛋白質能被分開及辨識。使用水當溶劑所獲得的蛋白質數目似乎與 0.1% TFA 的結果一致。將其蛋白質的質量拿來比較時, 只有 24 個蛋白質是相同的, 0.1% TFA 的 pH 值大約是 2.0, 而水的大約是 7.0, 細菌蛋白質在這兩種溶劑中的溶解度應該是相當不同的。因此, 對於這兩個實驗所得到的不同蛋白質分布是可以理解的。PBS 緩衝液 (pH~8.5) 可以得到最多的蛋白質數目, 使用水及 PBS 為溶劑所得的實驗結果間, 有 31 個蛋白質是相同的。然而在 PBS 與 0.1% TFA 所得的結果卻只有 17 個是相同的, 因為 PBS 與 0.1% TFA 的 pH 值差距最大, 所以會得到最不同的蛋白質萃取物。

當使用 acetonitrile/water (40:60) 為萃取溶劑時, 有 15 個蛋白質被偵測到。它所獲得的蛋白質數目是最少的, 在其所偵測到的蛋白質中, 有 13 個蛋白質也在以水為萃取溶劑中被發現到, 蛋白質數目的減少可歸因於溶劑極性降低的緣故。當使用一般較低極性的溶劑, 如純的 acetonitrile, 偵測不

樣品處理	測量到蛋白質的數目	相同蛋白質的數目
(a) 溶劑 (5 min vortexing)		
H <sub>2</sub> O	43	—
0.1% TFA	43	24 <sup>b</sup>
PBS	51	31 <sup>b</sup>
Acetonitrile/H <sub>2</sub> O (40:60)	15	13 <sup>b</sup>
(b) 萃取法 (in water)		
Vortexing <sup>a</sup>	43	—
Sonication	38	34 <sup>c</sup>
Freeze-thaw	38	32 <sup>c</sup>
(c) 鹽類處理		
PBS <sup>a</sup> (有除鹽)	51	—
PBS (沒有除鹽)	38	34 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>與 (a) 的 PBS 同    <sup>b</sup>與 H<sub>2</sub>O 相比    <sup>c</sup>與 vortexing 相比    <sup>d</sup>與有除鹽相比

到任何蛋白質。然而，這並不表示沒有蛋白質可以溶在 acetonitrile 中，可能是其所溶解的量太少了偵測不到其訊號。

使用漩渦法、超音波震盪法及冷凍－融化三種萃取法所觀察到的蛋白質數目及其彼此間的相似性列在表 3。在離心前先用漩渦法或超音波震盪 5 分鐘，或是用冷凍－融化 5 個循環來萃取蛋白質。其三者所得的蛋白質數目很類似，且蛋白質間的相似

度也很高，總體來說，此三種蛋白質萃取物中，有超過 30 種蛋白質是共同擁有的。

電噴灑質譜對於樣品溶液所用的緩衝液很敏感，而緩衝液卻有可能將訊號抑制或使質譜訊號變複雜，而降低質譜判讀性。有用除鹽膜與沒用除鹽膜的差異性列在表 3，當沒有使用除鹽膜時，所能觀察到的蛋白質數目較少。為了比較方便，須使用相同的層析梯度，雖然層析分離時應該也能除鹽，

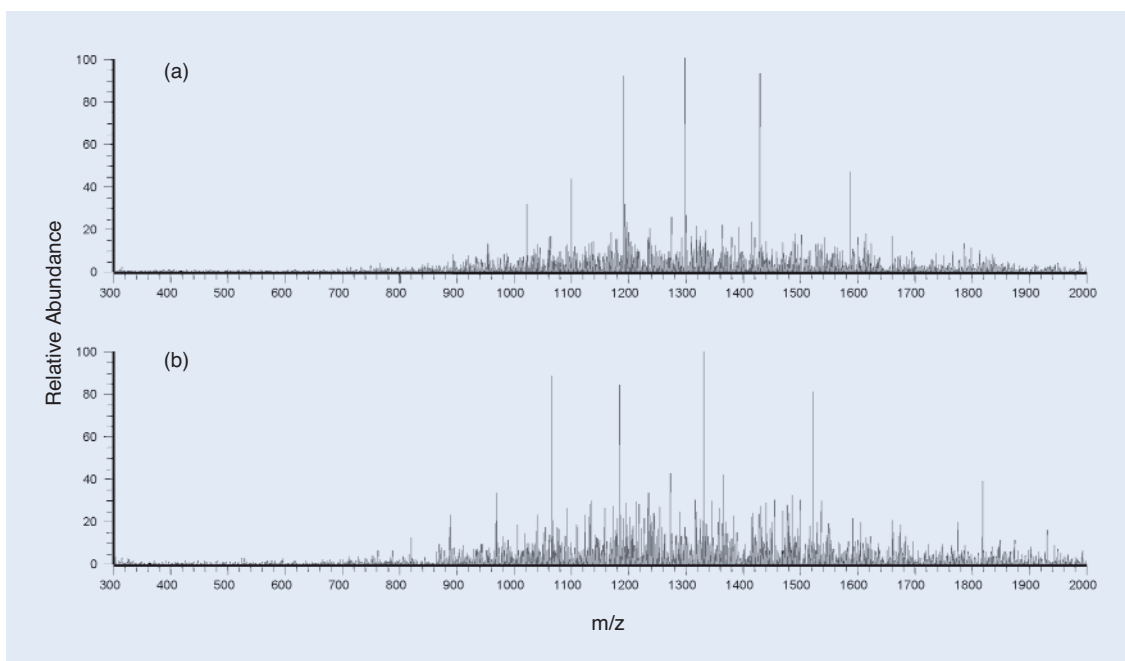


圖 4. 顯示從圖 3 分離出的細菌蛋白質的 2 張質譜。

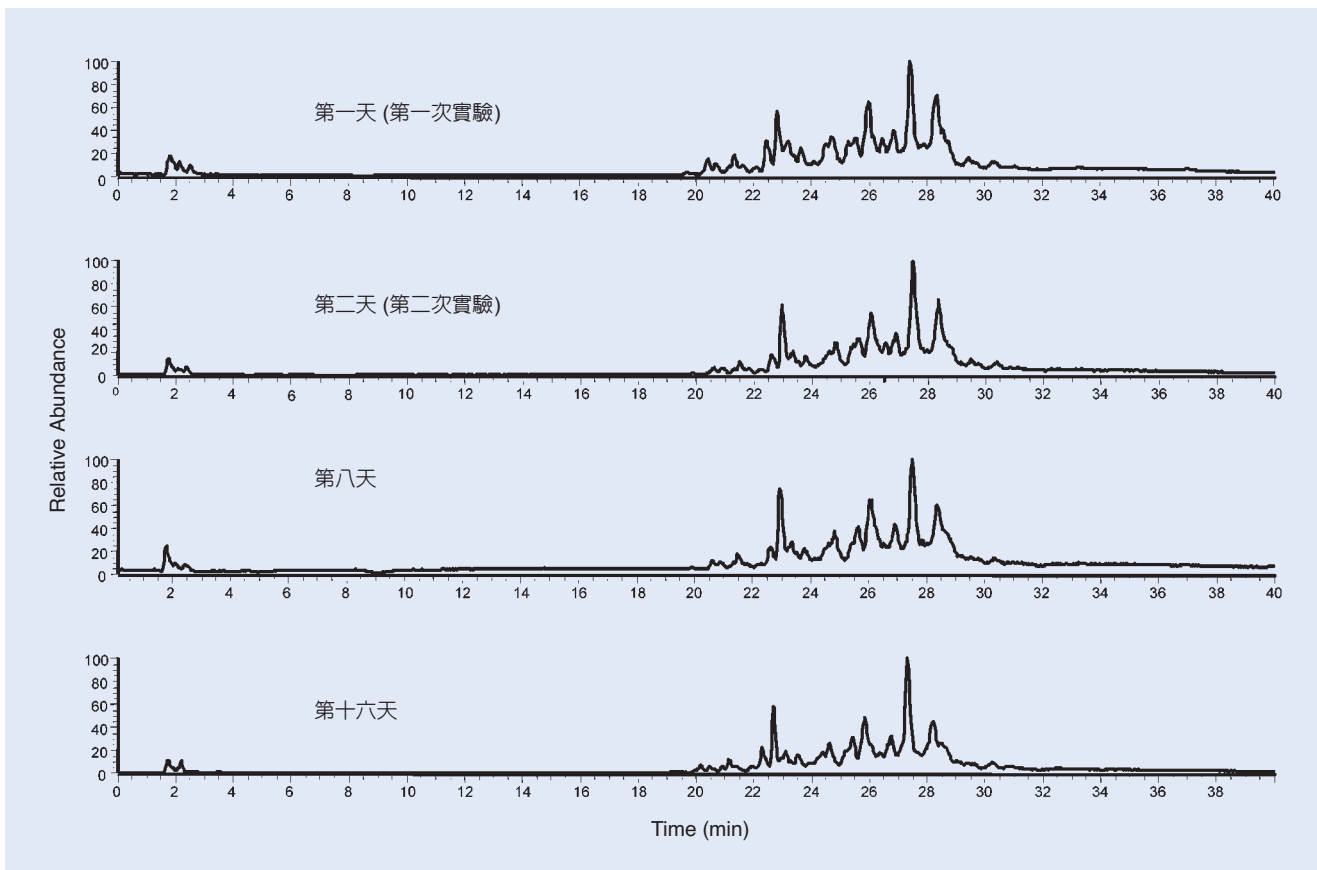


圖 5. 兩個星期間取得的層析圖，均是同一細菌樣品以水漩渦萃取 5 分鐘所得的蛋白質層析圖。

但緩衝容易對於 LC-MS 的訊號偵測還是有相當程度的影響。當分析未除鹽樣品的層析圖時，發現有些訊號消失了，而有些則是由於鹽類所附加的訊號使得圖譜過於複雜而無法進行分析，沒有完全除鹽應是由於梯度的選擇 (從 30–90% B) 所造成的。

### 3. 再現性

圖 5 的層析圖均是自同一細菌樣品以水漩渦萃取 5 分鐘、在 2 個星期內所得到的。雖然液相層析電噴灑游離質譜分離蛋白質應有極佳的再現性，而這些層析圖乍看之下似乎也具有再現性，但其所顯現出來的質譜卻有些差異。這大概是由於細菌細胞中有大量蛋白質的緣故，有些蛋白質可能在某一測量瞬間同時析出，因而使訊號變複雜，要分析這種蛋白質的質量就變得困難。當把這些分離出的蛋白質和表 2 做比較時，可以發現到有些差異，這可能是由於細菌培養環境有些微的不同所造成的結果。

### 4. 蛋白質資料庫的搜尋

當細菌的辨識是根據其細菌樣品所呈現的質譜指紋時，其準確性就全靠良好的圖譜再現性來決定了，由於其所觀察到的指紋圖譜 (fingerprint) 會受到許多實驗參數的影響，因此利用資料庫的搜尋反而可提供另一細菌辨識的良好途徑。我們把利用 LC-MS 分離細菌樣品所得的蛋白質分子量的集合，與資料庫中已知其蛋白質分子量的組織做比對，目前，有超過 50,000 個原核蛋白質的序列是由 genomic open reading frame 與 nongenomic entries 兩種方法得來的，所以，可預期每個觀察到的蛋白質質量會和許多組織中的蛋白質質量相符合。

為了利用資料庫搜尋來分辨微生物，可給予每個微生物一符合率 (matching rate)，符合率最大的那個微生物，就是最有可能的來源，符合率 (matching rate) 定義為所觀察到的蛋白質中，有多少比率是和資料庫中各個微生物組織的蛋白質相符

合。使用不同樣品前處理方法所得第一及第二高符合率的微生物列在表 4 中，當用水懸浮漩渦萃取大腸桿菌中的蛋白質，所觀察到 43 個蛋白質中有 30 個和 Swiss-Prot 資料庫中大腸桿菌的蛋白質相符合，相當 70% 的符合率。大腸桿菌中不符合的訊號可能是由於鹼性陽離子的附著、轉譯後修飾的蛋白質 (post-translational modification) 或是不完整的蛋白體資料庫所造成的。此符合率比第二個微生物的要高出許多 (18% for *Haemophilus influenzae*)。符合率的大小也和其所使用的資料庫種類有關。例如，若使用 Swiss-Prot/TrEMBL 資料庫的話，對於大腸桿菌的最大符合率是 84%，而對於第二符合的微生物是 55% (*Streptomyces coelicolor*)。

從表 4 可知，使用不同樣品前處理方法所得的實驗結果均能搜尋到正確的細菌來源 (大腸桿菌)。當使用 PBS 為萃取溶劑時，可以得到較多相符的訊號，但其符合率卻只有 61%。而 acetonitrile-water (40 : 60) 卻可獲得一較高的符合率 80%。為了決定是否低極性的溶劑在細菌偵測上較有用，需要較多種微生物的資料，其結果的確指出經由實驗條件的控制可以達到較可靠的細菌辨識。我們也可以比較再現性實驗所得的資料庫搜尋資料 (結果未列出)，即使實驗結果顯示出蛋白質的分布上會有些改變，所有的符合率 (大約 60%) 均指出大腸桿菌為細菌來源。

## 七、結論

液相層析能夠除鹽、濃縮及分離複雜樣品，具有配合質譜儀鑑定分子結構的能力。液相層析質譜法非常適合分析細菌樣品，藉由各種生物標籤如脂質及蛋白質的分離與分析，再搭配質譜比對及蛋白質資料庫搜尋可辨識細菌等微生物，特別是資料庫搜尋不需要像質譜比對一樣依賴再現性良好的質譜圖，極適合分析各種不同的環境與樣品處理下的微生物。液相層析質譜也是目前最容易自動化的方式之一，未來，對於實地監測環境樣品、食物、醫療場所可能的細菌或病毒感染，應有相當的發揮潛力。

表 4. 資料庫搜尋分辨細菌的結果。

	細菌 <sup>a</sup>	
	最符合	第二符合
H <sub>2</sub> O (5 min vortexing)	<i>E. coli</i> (70)	<i>H. influenzae</i> (18)
0.1% TFA	<i>E. coli</i> (60)	<i>H. influenzae</i> (16)
ACN/H <sub>2</sub> O (40:60)	<i>E. coli</i> (80)	<i>B. subtilis</i> (27)
PBS (desalted)	<i>E. coli</i> (61)	<i>H. influenzae</i> (20)
Sonication	<i>E. coli</i> (58)	<i>H. influenzae</i> (18)
Freeze-thaw	<i>E. coli</i> (61)	<i>B. subtilis</i> (18)
PBS (nondesalted)	<i>E. coli</i> (66)	<i>B. subtilis</i> (26)

<sup>a</sup>括號內為符合率 (%)

## 參考文獻

1. P. Kahn, *Science*, **270**, 369 (1995).
2. C. Fenselau, in C. Fenselau (Editor), *Mass Spectrometry for Characterization of Microorganisms*, ACS Symposium Series, V. 541, Washington, DC: American Chemical Society (1993).
3. See the databases at <http://www.expasy.ch>.
4. T. Cain, D.M. Lubman, and W. J. Weber, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 1026 (1994).
5. M. A. Claydon, S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1584 (1996).
6. T. Krishnamurthy, R. L. Ross, and U. Rajamani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 883 (1996).
7. R. D. Holland, J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, Jr., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1227 (1996).
8. Z. Wang, L. Russon, L. Li, D. C. Roser, and S. R. Long, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 456 (1998).
9. R. J. Arnol, J. A. Karty, A. D. Ellington, and J. P. Reilly, *Anal. Chem.*, **71**, 1990 (1999).
10. E. Lynn, M. Chung, W. Tsai, and C. Han, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2022 (1999).
11. A. Haag, S. Taylor, K. Johnston, and R. Cole, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 750 (1998).
12. Y. Hathout, P. A. Demirev, Y. P. Ho, J. L. Bundy, V. Ryzov, L. Sapp, J. Stutler, J. Jackman, and C. Fenselau, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4313 (1999).
13. T. Y. Li, B. H. Liu, and Y. C. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2393 (2000).
14. A. J. Madonna, F. Basile, F. E. Furlong, and K. J. Voorhees, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1068 (2001).
15. B. J. Amiri-Eliasi and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **73**, 5228 (2001).
16. J. O. Lay, *Trends Anal. Chem.*, **19**, 507 (2000).
17. J. J. Dalluge and J. Fresenius, *Anal. Chem.*, **366**, 701 (2000).

18. S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.*, **32**, 677 (1997).
  19. A. P. Snyder, ACS Symposium Series, 619,1 (1996).
  20. T. Krishnamurthy, M. T. Davis, D. C. Stahl, and T. D. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 39 (1999).
  21. X. Liang, K. Zheng, M. G. Qian, and D. M. Lubman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1219 (1996).
  22. Y. Dai, L. Li, D. C. Roser, and S. R. Long, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 73 (1999).
  23. S. Vaidyanathan, J. J. Rowland, D. B. Kell, and R. Goodacre, *Anal. Chem.*, **73**, 4134 (2001).
  24. R. B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, New York: Wiley (1997).
  25. See <http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/>.
  26. P. A. Demirev, Y.-P. Ho, V. Ryzhov, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **71**, 2732 (1999).
  27. F. J. Pineda, J. S. Lin, C. Fenselau, and P. A. Demirev, *Anal. Chem.*, **72**, 3739 (2000).
  28. P. A. Demirev, J. S. Lin, F. J. Pineda, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **73**, 4566 (2001).
  29. M. D. Collins and D. Jones, *Microbiol. Rev.*, **45**, 316 (1981).
  30. I. Brondz and I. Olsen, *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 183 (1991).
  31. J. Fang, M. J. Barcelona, and P. J. J. Alvarez, *Org. Geochem.*, **31**, 881 (2000).
  32. J. Fang and M. J. Barcelona, *J. Microbiol. Methods*, **33**, 23 (1998).
  33. Y. P. Ho and P. H. Hsu, *J. Chromatogr. A*, **976**, 103 (2002).
  34. K. K. Unger, K. Racaityte, K. Wagner, T. Miliotis, L. E. Edholm, R. Bischoff, and G. Marko-Varga, *J. High Res. Chromatogr.*, **23**, 259 (2000).
- 

- 吳志弘為國立東華大學化學系大學部四年級學生。
- 何彥鵬為美國凱斯西儲大學化學博士，現任國立東華大學化學系副教授。
- Chi-Hung Wu is a senior student in the Department of Chemistry at National Dong Hwa University.
- Yen-Peng Ho received his Ph.D. in chemistry from Case Western Reserve University, USA. He is currently an associate professor in the Department of Chemistry at National Dong Hwa University