

單細菌粒子質譜儀的介紹

An Introduction to Mass Spectrometry of Single Bacterial Whole Cells

彭文平、楊易昌、康名慰、高顯璋、李遠哲、張煥正

Wen-Ping Peng, Yi-Chang Yang, Ming-Wei Kang, Hao-Wei Kao, Yuan T. Lee, Huan-Cheng Chang

單一完整微生物質量之量測，對現代生物技術來說是一項挑戰。為了迎接這個挑戰，我們開發一個新的技術，可以精確的測量單一細菌的質量。我們以四極離子阱為基礎，並提供交流電場，以捕捉單一帶電粒子於真空環境中。細菌粒子在真空中，由雷射基質輔助脫附法電離，並偵測粒子的散射光，取得其空間軌跡的訊息。對單顆大腸桿菌 K-12 的質量量測而言，其量測精度可達 0.1%，且對六十個大小不同的粒子質量作量測，其質量分布亦有 $\pm 3\%$ 之譜。這是史上第一次對任何質量超過 1×10^{10} Da 的完整微生物，提供一個高精度質量量測的報告。這個方法，開啟了一條新的路徑，闡明由質譜學的測定方法，也可以提供另一種快速鑑定不同微生物的途徑。

Measuring masses of single intact microorganisms represent a challenge to modern biotechnology. To take on this challenge, we have developed a novel method to precisely measure the masses of single bacterial whole cells using a quadrupole ion trap as an electrodynamic balance. The bacterial cells were introduced into the ion trap by matrix-assisted laser desorption/ionization, confined in space by audio-frequency ac fields, and detected by elastic light scattering. Mass measurement accuracy approaching 0.1% was achieved for *Escherichia coli* K-12, with a mass distribution of (3% form 60 repetitive measurements of the particles and their clusters. This is the first high-precision mass measurement reported to date for any intact microorganisms with masses greater than 1×10^{10} Da. The method opens new avenues for high-precision mass measurement microbial particles and offers an alternative approach for rapid identification of microorganisms by mass spectrometry.

一、前言

當帶電粒子的尺度超過奈米或微米時，其質譜的探測難度會增加好幾個數量級。因為傳統的探測器，如二次電子倍增型、微通道倍增板，對帶電的

小離子具有良好的反應及訊噪比，然而當分子的質荷比大於 10^6 以上時，由於離子的速度及動能不足，難以產生足夠的離子訊號來偵測⁽¹⁾。另外有熱感應型的超導體型偵測器被用來作偵測器，然而其需運作於 30 mK 的低溫下，大大地限制了其實際

的用途，而且其反應時間需 $1 \mu\text{s}$ ，比起傳統的微通導管慢約 1000 倍，且其探測截面約 1 mm^2 是傳統型的 25 分之一。上述理由皆限制了其實際上的用途⁽²⁾。在本文裡，我們提出以探測光子來取代探測電子或聲子的可能性⁽³⁾，我們以偵測分子的散射光為出發點⁽⁴⁾，以三維離子阱將單一粒子囚禁於真空中，結合我們所發展出來的理論，能有效的求得此帶電粒子的質量。

在科學及質譜學界，對完整微生物質量的量測，一直具有高度的興趣。例如，生物質量的量測，對細胞生長速率及產量是很重要的，且生物質量在發酵過程中與其基質濃度也有相關性⁽⁵⁾。傳統測量生物質量的方法，包括流動細胞計數器和重力天平分析法，此二法皆具精確度，但費力費時。新的技術發展，例如石英晶體微平衡器⁽⁶⁾、超導量子干涉儀⁽⁷⁾、微小機械力振盪器^(8,9) 等，都已被發展來偵測單一細菌及病毒粒子的重量，並且達到其最高的靈敏度，然而其量測誤差，普遍來說是大於 10% 的。隨著軟離子化技術發展，例如電灑電離法及雷射基質輔助脫附法^(10,11)，在氣相中進行單一細菌質量的量測是有可能的^(12,13)。在這個工作中，我們提供一個用四極離子阱來進行單一質量量測的

方法，其量測精度可提高二個數量級以上。

我們選擇大腸桿菌 K-12 當作試驗樣品，因為其結構、生理及分子的資訊已被廣泛的了解。此細菌是大小約 1 微米的棒狀體，可以輕易地由散射光偵測。大腸桿菌 K-12 是一種革蘭氏陰性細菌樣品，包含細胞蛋白多糖套膜層於內外脂質層之間⁽¹⁴⁾。這個套膜相當堅固，所以細菌在離子化及傳送到氣相的過程中，依然能維持它的完整性。有一些以雷射基質輔助脫附質譜法尋找生物細胞標記方法，也已經被發展出來幫助鑑定不同的微生物，此類生物細胞標記法，是從細胞萃取物或完整細胞懸浮物中求得的⁽¹⁵⁻¹⁸⁾。此外大腸桿菌 K-12 的完整基因序列 (4,639,221 基本對) 也已經被定序出來⁽¹⁹⁾。

不同於其他人的作法，我們的策略是以質譜學的方法⁽²⁰⁾，在氣相中量測單一細菌的質量。我們運用三維的四極離子阱作為捕捉帶電離子的工具，以雷射基質輔助脫附法游離並產生細菌離子於真空中⁽²¹⁾，並偵測帶電細菌粒子的散射光⁽²²⁾。圖 1 是實驗儀器設計圖，以雷射基質輔助脫附法產生細菌離子於離子阱中。此單一帶電細菌粒子的散射光，在徑相平面上，經由適當調整音頻驅動頻率，與粒子運動達到共振，呈現一個駐波的星形運動模式⁽²³⁾。經

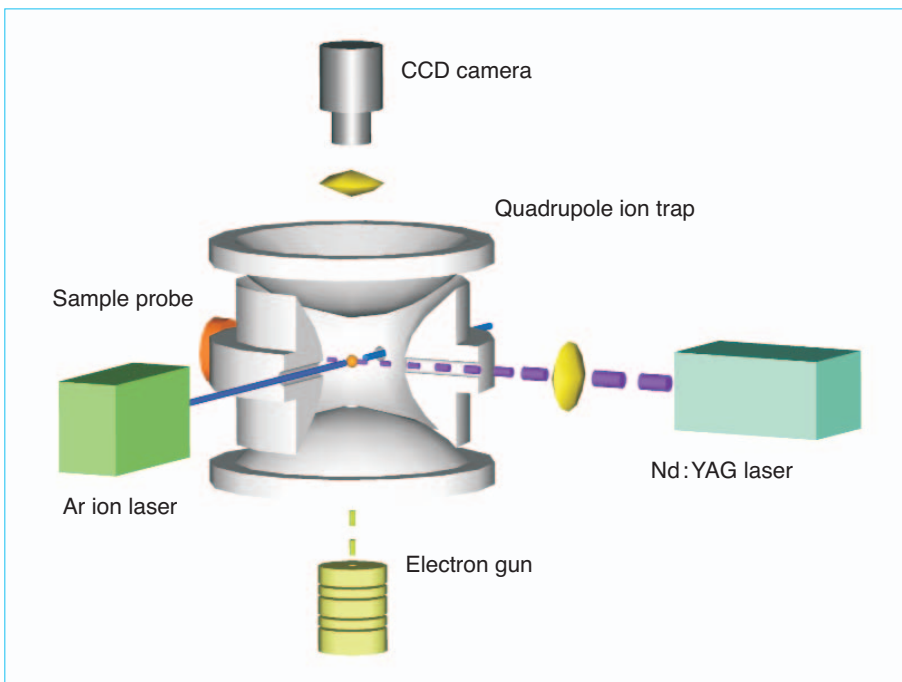


圖 1.
單一細菌粒子質譜儀裝置。

由計數此穩定態的星狀分枝數目，可以求得高精度的細菌質荷比訊息。而細菌絕對質量的決定，可用電子槍以二次電子放射方式改變帶電粒子的電荷數目而得到⁽²⁴⁻²⁶⁾。

二、理論

在 1995 年，Hars 和 Tass 提出星狀分枝計數方法的初步理論分析⁽²³⁾。他們以帶電粒子在離子阱的運動為簡諧振盪作為出發點，得到一個低階的解析公式，因而他們的模型只適用於離子阱常數小於 0.4 的條件下 ($q_z \leq 0.4$)。為了求得高精度的質荷比數值，我們引進一個較廣義的理論，在穩定星狀運動滿足時，即 $\Omega = n\omega_r$ 的條件下，其中 Ω 是音頻驅動頻率，而 ω_r 是運動粒子的本徵頻率 (eigenfrequency)， n 則為星狀分枝數目，經由引進高階修正項，一個完整的解析公式可推導如下^(27,28)：

$$\frac{2}{n} = \frac{q_r}{\sqrt{2}} \left(1 + \frac{25}{128} q_r^2 + \frac{34951}{294912} q_r^4 - \frac{7925}{294912} q_r^6 - \frac{100489}{10616832} q_r^8 \right) \quad (1)$$

其中

$$q_r = \frac{4ZeV_{ac}}{mr_0^2\Omega^2} = C \frac{V_{ac}}{(\Omega/2\pi)^2} \quad (2)$$

我們定義 $C \equiv Ze/mr_0^2\pi^2$ ，其中 Z 是電荷數目， e 是基本電荷單位， V_{ac} 是驅動交流電壓振幅， m 是粒子質量， r_0 是環形電極半徑。當我們將實驗數據以 $2/n$ 對 $V_{ac}/(\Omega/2\pi)^2$ 作圖時，將可以得到高精度的質荷比。在這公式中，僅有 C 值是唯一的擬合參數，而此 C 值正是待測粒子的質荷比。其中， n 與 Z 皆是一個整數值，因團簇聚集的關係，所測量的質量彼此之間也具有倍數的關係，所以 m/Ze 的測定是由 r_0 、 V_{ac} 及 Ω 等參數所決定的，因此唯有 V_{ac} 及 Ω 是需要量測的，在我們的實驗中此二參數的量測各具 100 ppm 和 50 ppm 的精確度。值得注意的是，重力在這個實驗中並無任何作用，因為這個方法只考慮在徑向的振盪頻率。

三、材料及方法

1. 樣品製備及產生細菌大離子的方法

大腸桿菌 K-12 樣品是由 Sigma 公司取得。我們準備三種基質來測試，以確定在氣相中，基質輔助雷射脫附的細菌細胞仍具完整性。共有下列三種基質被採用作測試：sinapic acid (SA)、4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid (4HCCA) 和 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)。將細菌 (濃度為 1×10^9 個/毫升) 和基質 (將 SA、4HCCA 和 HABA 合併 70:30 (v/v) 的氰化甲烷和水的比例形成過飽和溶液) 混和並沉積在不鏽鋼探棒上。置乾燥盒中乾燥後，樣品形成多晶排列結構，將樣品置放在離子阱環形電極其中一個洞上 (直徑 3.8 毫米)，以 Nd-YAG 雷射 (波長 355 nm、300 μ J/shot) 照射，被脫附的帶電細菌粒子被交流電場限制在離子阱中，外加 1 mTorr 的氬氣以降低帶電細菌粒子的動能並侷限於離子阱的中心。氬離子雷射 (波長 488 nm，100 mW) 照射帶電細菌粒子，其散射光則由透鏡收集透過 CCD 至 17 吋螢幕顯像。為了在基質輔助雷射脫附過程中，使細菌的整個細胞傷害達到最小，雷射保持在較低能量 ($\sim 10^6$ MW/cm²) 且儘量避免將樣品重複照射雷射。在對照的實驗中，若只有純的基質樣品而無細菌混合其中，則沒有散射光被偵測到，因而確定觀察到的訊號是來自帶電的細菌粒子。經由後面離子團簇的分析，則更進一步說明在實驗中，沒有發現由基質的原子團簇形成大的帶電粒子。

2. 單一帶電大腸桿菌粒子的捕捉及控制

帶電的細菌粒子運動軌跡是在真空下 (背景壓力約 1×10^{-6} Torr) 來分析的。為使單一帶電細菌粒子能被侷限在離子阱中，帶電粒子的捕捉條件一般為 $\Omega/2\pi = 300$ Hz 和 $2V_{ac} = 715$ V。由於此參數的設定，造成捕捉效率非常低，因此絕大部分的實驗狀態下，只有單一帶電粒子被捕捉住，若有多顆帶電粒子同時被捕捉時，可調整音頻驅動源的頻率，使得懸浮在離子阱中的粒子依序由軸向被拋出，直到只剩一顆置於離子阱中。藉由調整音頻驅動源頻率，使得螢幕出現穩定的星狀圖案，因此可以決定

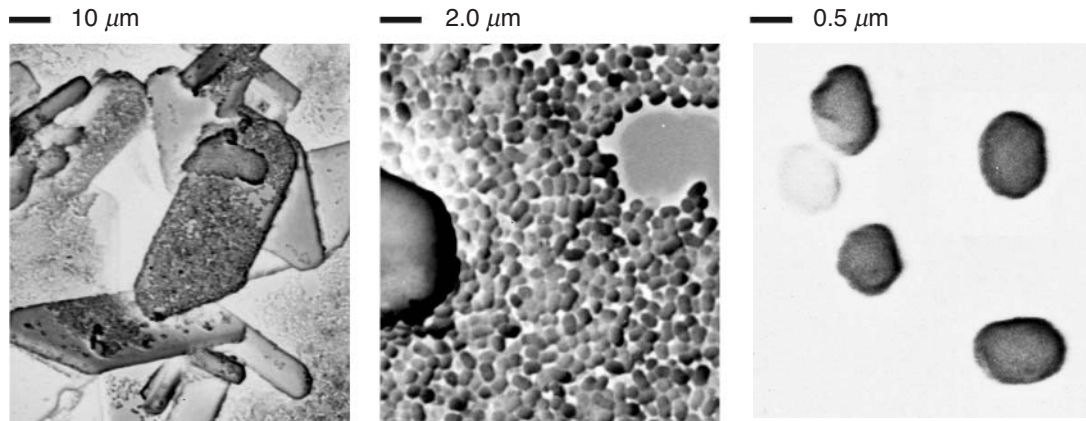


圖 2. 大腸桿菌 K-12 不同尺度電顯影相圖，結晶物為 sinapic acid (SA) 基質。

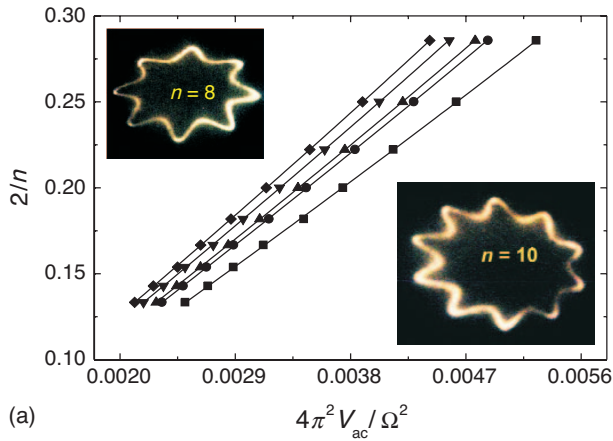
帶電粒子的運動頻率，也就是當 $\omega_c = \Omega/n$ 條件滿足時。重複上述步驟，讀取 $n = 7$ 到 $n = 15$ 時的 $\Omega/2\pi$ 及 V_{ac} 實驗數值。為了得到帶電粒子的絕對質量，我們引進電子槍，使得一道熱鎢絲發射的電子束 (0.1 mA) 穿過離子阱下蓋的小洞 (直徑 3.2 mm)，以改變帶電大腸桿菌粒子的電荷狀態。這個二次電子放射過程通常持續至少一秒。當觀察到帶電粒子電荷數改變時，一個處於穩定態的星形分枝會開始旋轉，此刻關掉燈絲電流，調整新的共振頻率，並重新記錄 $n = 7 - 15$ 的所有穩定態實驗參數。

3. 電子顯微鏡的量測

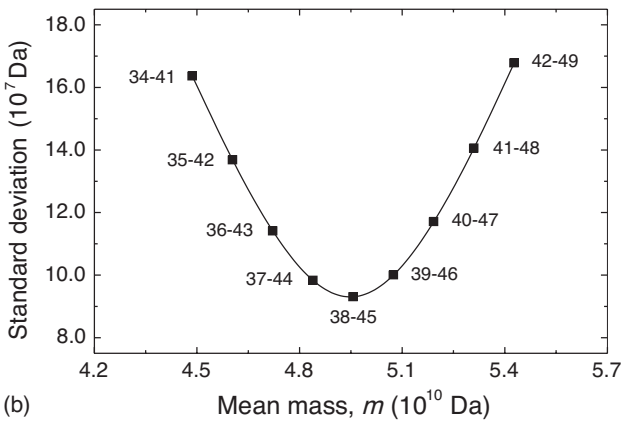
我們使用掃描式電子顯鏡 (JOEL JSM-6300) 來檢驗大腸桿菌和 SA 基質之混合物的形態分布。樣品是如此製備的，將液態混合物滴於載玻片上，將玻片安全地固定在雙面膠上，並由離子濺渡法鍍上金原子層 (~ 23 nm)。圖 2 顯示了這個電顯掃描結果，明顯的觀察到細菌與結晶是互相分離的，但是其表面仍有相當薄的 SA 基質覆蓋其上。由電顯圖中觀察得知，所使用的大腸桿菌 K-12 樣品並沒有鞭毛存在，且其大小形態上是相似的。由於細菌在液態中即呈現聚集的狀態，故當其由液態轉變成固態時，會保留其在液態中最後一刻的組態。在此觀察中，沒有觀察到外觀上斷裂的細菌細胞，這點和 Madonna 以 ferulic acid 當作基質的報告吻合⁽²⁹⁾。

四、結果與討論

圖 3(a) 中的插圖為單一大腸桿菌 K-12 粒子呈現穩定的星狀圖示，在交流電頻率手動調整為 $\Omega = 8\omega_c$ 和 $\Omega = 10\omega_c$ 條件下，使其達到共振。相似的圖案可以出現在分枝數目 $n = 7 - 15$ 。依據公式 (1) 和公式 (2)，以 $2/n$ 對 $V_{ac}/(\Omega/2\pi)^2$ 作圖，經由多項式的迭代求解，我們可以得到此細菌的質荷比。在圖 3(a) 我們可以得到單一大腸桿菌 K-12 在未改變電荷狀態的質荷比 ($m/Ze = 1.37027 \pm 0.013 \times 10^9$)。此量測的不準度約 0.1%。換言之，此質譜儀的解析度，在單一生物粒子質荷比大於 1×10^9 下可達 1000。為了求得細菌的絕對質量，粒子的電荷數經由電子槍隨機轟擊而改變⁽²⁵⁻²⁷⁾。在二次電子放射下，穩定的星狀圖會變成不穩定而旋轉，這過程可清楚地由 CCD 中觀察。重新量測新的一組 $n = 7 - 15$ 數據，而獲得新的 m/Ze 的值。我們改變了四次電荷數目，同一粒子可得到五組不同的 m/Ze 值，即五個量子組態。若對此量子組態作電荷數操作，使標定電荷的數目符合最小的質量標準差，則可求得帶電粒子的絕對質量。在圖 3(b) 中展示了我們對一個粒子給予適當的電子數目值，發現電荷數值 $Z = 38 - 45$ 具有最小的標準差，若對此組電荷數操作各加減一個電荷，將導致質量標準差變大，因而得到此乾燥的大腸桿菌質量 $m = 4.957 \pm 0.020 \times 10^{10}$ Da 或重量 82.3 ± 0.3 fg。



(a)

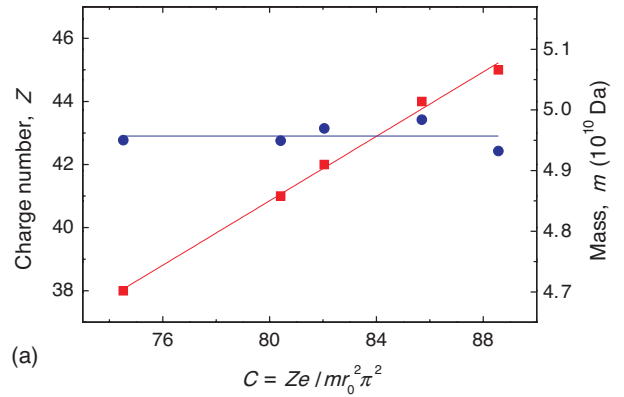


(b)

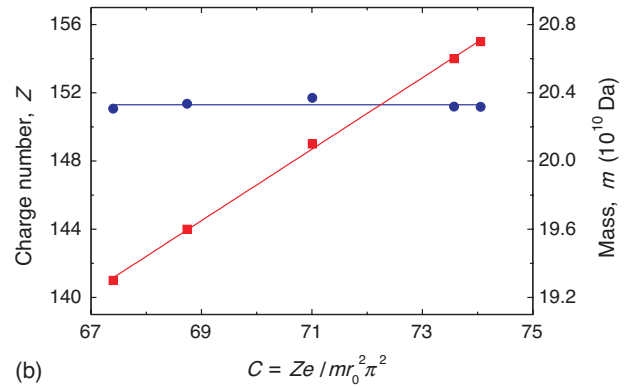
圖 3.(a) 為 $n = 7-15$ 所得的穩定態數據，以 $2/n$ 對 V_{ac}/Ω^2 作圖，並依公式 (1) 擬合，求得五個質荷比 (m/Ze) 數值。其中插圖為 $n = 8$ 與 $n = 10$ 的穩定星狀分枝圖。(b) 是質量最小標準差對不同電荷數標定的分布圖。

在圖 4(a) 中我們以另一種方式來描述所測得的質量，在實際的量測中，形成團簇的細菌，可在氣相中同樣地被觀察到。我們可以很容易地從 CCD 上觀察到這些大的團簇離子是很明亮的。圖 4(b) 展示了對單一團簇細菌粒子質量的分析。此團簇質量約為單個大腸桿菌質量的四倍，所帶的電荷約為單個大腸桿菌的 3.5 倍。在圖 4(a) 和 (b) 中，比較量測的質量，可以清楚地知道此團簇是大腸桿菌的四聚物。

在此實驗中，我們對從 1 個到 16 個大腸細菌組成的團簇進行分析，我們藉由多次反覆測量不同粒子的質量，可以標定其細胞的數目。在這個工作中，由於大腸桿菌整個細胞在大小或質量上是相近



(a)



(b)

圖 4.(a) 和 (b) 是二個不同的大腸桿菌 K-12 粒子，以所標定之電荷數對 C 值作圖，所得的質量分別為 $m = 4.957 \pm 0.020 \times 10^{10}$ Da 和 $20.330 \pm 0.025 \times 10^{10}$ Da，經由比較後，我們可以推測圖 (b) 的細菌粒子是大腸桿菌 K-12 四聚物。

的，我們採用和電荷數目決定方法相同的步驟，來決定大腸桿菌所具有的最佳質量分布。從實驗數據分析，在圖 5 中以 N 對 m 作圖，呈現一個線性關係。假使細胞數目增加或減少一個單位，會使所得的質量標準差增加十倍，這更進一步確定了細胞數目決定的唯一性。對 60 個大小不同的大腸桿菌 K-12 粒子作量測，能得到 $m/N = 5.03 \pm 0.14 \times 10^{10}$ Da 的統計質量平均值。而這個量測質量是遠高於完整的 MS2 病毒質量 (由電灑飛行質譜決定的方式) 約四個數量級⁽¹²⁾。這是目前對任何完整微生物其質量大於 1×10^{10} Da 生物學上的大分子，所達到的第一個高精度質量量測報告。

經六十個量測的大腸桿菌 K-12 粒子其質量分布約 $\pm 3\%$ ，這可能是由於細菌本身固有的質量變

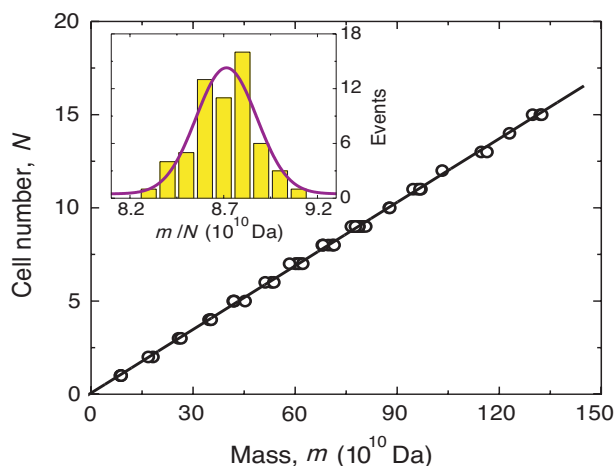


圖 5. 將細胞數目對所測量的六十顆大腸桿菌 K-12 質量作圖，發現細胞數目與所測量的質量有線性關係，若將較高的質量依比例摺回至單個粒子質量，如插圖所示，則可得到單個粒子質量平均分布值 ($m = 5.03 \pm 0.14 \times 10^{10}$ Da)。

化或細菌細胞在基質輔助雷射脫附過程中造成分裂而來的。然而，這個分布並不是由於發生在電子轟擊過程中，或細菌粒子被長時間限制在真空中而造成質量的損失。在一個穩定性測試實驗中，一個團簇離子被捕捉超過十八小時裡，電荷數目被隨機地改變十一次，其質量量測的變化差異度小於 0.1%，這相當於是我們實驗誤差的極限範圍。為了評定細胞在離子化過程被破壞的程度，我們更進一步採用 4HCCA 和 HABA 當作基質來做比較，而各別得到的質量為 $5.02 \pm 0.17 \times 10^{10}$ 和 $5.02 \pm 0.16 \times 10^{10}$ Da。和 SA 基質的結果一起比較，發現所測量質量的誤差只有 0.2%，這闡明了細菌細胞在基質輔助雷射脫附過程中是保持完整的。實際上，細菌粒子只是輕微的接觸並吸附在晶體的表面，而不是和基質結合在一起。當 Nd-YAG 雷射脈衝射到晶體的表面時，晶體吸收雷射的能量，而細菌並不吸收此 355 nm 波長的能量，此刻晶體汽化形成一種氣態的 plume，並經由質子轉移使細菌細胞帶電。這個過程，我們推測是與表面增強淨脫附法 (surface-enhanced neat desorption) 的機制有一定的相關性⁽²⁹⁾。

總的來說，我們證明以單粒子方式量測細菌質量是可行的，個別大腸桿菌 K-12 的量測其精度達

0.1%。這個質量量測的精度與測量的微生物樣品無關⁽³¹⁾，主要的限制是來自於電場的不穩定和離子阱在機械加工上所造成的誤差^(23,32)。這個研究的成果具有應用在單一病毒量測上的潛力，例如 SARS 病毒的測定⁽³³⁾，其尺寸的大小約為大腸桿菌的十分之一左右。只要提高散射光的訊號二個數量級以上即可作量測⁽³⁴⁾。如此依病毒質量的不同來區分其種類是具有可行性的，這是一種由上至下的研究方法⁽³⁵⁾，能由質譜學的方式來達到快速鑑別不同完整微生物的目的。

誌謝

本文作者特別要感謝中央研究院與國科會對其工作的支持，以及台灣大學農化系紀素貞小姐所提供電顯拍照的協助。

參考文獻

1. I. S. Gilmore and M. P. Seah, *Int. J. Mass Spectrom.*, **202**, 217 (2000).
2. M. Frank, S. E. Labov, G. Westmacott, and W. H. Benner, *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 155 (1999).
3. W. P. Peng, Y. Cai, and H. C. Chang, *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 1 (2004).
4. Y. Cai, W.-P. Peng, S.-J. Kuo, Y. T. Lee, and H.-C. Chang, *Anal. Chem.*, **74**, 232 (2002).
5. B. Sonleitner, G. Locher, and A. Fiechter, *J. Biotechnol.*, **25**, 5 (1992).
6. M. A. Cooper, F. N. Dultsev, T. Minson, V. P. Ostanin, C. Abell, and D. Klenerman, *Nature Biotechnol.*, **19**, 833 (2001).
7. H. L. Grossman, W. R. Myers, V. J. Vreeland, R. Bruehl, M. D. Alper, C. R. Bertozzi, and J. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 129 (2004).
8. B. Ilic, D. Czaplowski, M. Zalalutdinov, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, and C. Batt, *J. Vac. Sci. Technol.*, **B19**, 2825 (2001).
9. A. Gupta, D. Akin, and R. Bashir, *Appl. Phys. Lett.*, **84**, 1976 (2004).
10. S. F. Wong, C. K. Meng, and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **92**, 546 (1988).
11. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
12. M. A. Tito, K. Tars, K. Valegard, J. Hajdu, and C. V. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3550 (2000).
13. S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, and G. Siuzdak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 542 (2001).

14. J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Lippincott Williams & Wilkins (1994).
 15. J. J. Dalluge, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 701 (2000).
 16. M. A. Claydon, S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon, *Nature Biotechnol.*, **14**, 1584 (1996).
 17. J. O. Lay, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 172 (2000).
 18. C. Fenselau, P. A. Demirev, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 157 (2001).
 19. F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, *et al.*, *Science*, **277**, 1453 (1997).
 20. G. Siuzdak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11290 (1994).
 21. E. J. Davis, *Aerosol Sci. Tech.*, **26**, 212 (1997).
 22. Y. Cai, W.-P. Peng, S.-J. Kuo, S. Sabu, C.-C. Han, and H.-C. Chang, *Anal. Chem.*, **74**, 4434 (2002).
 23. G. Hars and Z. Tass, *J. Appl. Phys.*, **77**, 4245 (1995).
 24. S. Arnold, *J. Aerosol Sci.*, **10**, 49 (1979).
 25. M. A. Philip, F. Gelbard, and S. Arnold, *J. Colloid Interface Sci.*, **91**, 507 (1983).
 26. S. Schlemmer, J. Illemann, S. Wellert, and D. Gerlich, *J. Appl. Phys.*, **90**, 5410 (2001).
 27. R. E. March and R. J. Hughes, *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, Wiley, New York (1989).
 28. J. P. Carrico, *Dyn. Mass Spectrom.*, **3**, 1 (1972).
 29. A. J. Madonna, F. Basile, I. Ferrer, M. A. Meetani, J. C. Rees, and K. J. Voorhees, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2220 (2000).
 30. T. W. Hutchens and T.-T. Yip, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 576 (1993).
 31. W.-P. Peng and H.-C. Chang, "Similar mass measurement accuracy has been achieved for Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, and *Micrococcus*" (unpublished results).
 32. Y. Cai, W.-P. Peng, S.-J. Kuo, and H.-C. Chang, *Int. J. Mass Spectrom.*, **214**, 63 (2002).
 33. K. Stadler V. Masignani, M. Eickmann, S. Becker, S. Abrignani, H. D. Klenk, and R. Rappuoli, *Nature Reviews*, **1**, 209 (2003).
 34. H. C. Van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, Wiley, New York (1957).
 35. G. K. Taylor, Y. B. Kim, A. J. Forbes, F. Y. Meng, R. McCarthy, and N. L. Kelleher, *Anal. Chem.*, **75**, 4081 (2003).
-
- 彭文平先生為國立台灣大學物理所博士班學生。
 - 楊易昌先生為國立台灣大學物理所碩士班學生。
 - 康名慰先生為國立交通大學生物科技所碩士，現任中央研究院原子與分子科學研究所專任助理。
 - 高顯璋小姐畢業於國立台灣大學農業化學系。
 - 李遠哲先生為美國加州大學柏克萊分校化學博士，現任中央研究院院長。
 - 張煥正先生為美國印地安那大學化學博士，現任中央研究原子與分子科學研究所研究員。
 - Wen-Ping Peng is a Ph.D. candidate in the Institute of Physics at National Taiwan University.
 - Yi-Chang Yang is currently a master student in the Institute of Physics at National Taiwan University.
 - Ming-Wei Kang received his M.S. in biological science and technology from National Chiao-Tung University. He is currently a research assistant in the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
 - Hao-Wei Kao graduated from the Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University.
 - Yuan T. Lee received his Ph.D. in chemistry from the University of California, Berkeley, USA. He is currently the president of Academia Sinica.
 - Huan-Cheng Chang received his Ph.D. in chemistry from the University of Indiana, USA. He is currently a research fellow in the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.