

# 超大質量生物粒子的質譜研究

## Mass Spectrometry of Ultrahigh-Mass Bioparticles

朱志強、張煥正

Zhiqiang Zhu, Huan-Cheng Chang

測量超大質量 ( $m > 1$  MDa) 的生物粒子的質量是目前質譜學研究的一項挑戰。利用新近發展的軟離子化方法—雷射誘導聲波脫附法，結合四極式離子阱或圓柱型離子阱質譜儀及電荷感應偵測器，我們成功地測量了一些完整的生物粒子 (包括病毒、細菌與動物細胞等) 的質量，其範圍涵蓋  $1 \times 10^8$  Da— $1 \times 10^{14}$  Da，粒徑大小約為 100 nm—10  $\mu$ m。有別於傳統的質譜學，筆者進行的是單個粒子的質量量測。

Measuring masses of ultrahigh-mass bioparticles ( $m > 1$  MDa) has been a challenge in the field of mass spectrometry. Combining the techniques of laser-induced acoustic desorption, charge-sensitive detection, and quadrupole ion traps as the mass analyzer, we have successfully measured the masses of intact bioparticles such as viruses, bacteria, and cells in the gas phase for the first time. These particles have sizes ranging from  $\sim 100$  nm to  $\sim 10$   $\mu$ m, with masses spanning up to 6 orders of magnitude ( $10^8$ — $10^{14}$  Da). Different from conventional mass spectrometry, we measured the masses of these bioparticles individually.

### 一、引言

在近代生命科學的研究中，質譜技術扮演著相當關鍵的角色<sup>(1)</sup>。對生物分子而言，每個分子的質量雖大，但仍會有差異，分子的質量就相當於它們的指紋特徵。理論上，精確的測定某一個分子的質量，就可以確定該分子的種類，這項特性使得質譜技術成為當代基因體學和蛋白質體學研究的重要利器。同樣的道理，根據精確測量的細菌或病毒的質量，也可能可以推斷它是何種的細菌或病毒，因此發展一套能夠精確測量完整細胞或病毒質量的技術是現代質譜學一塊亟待開發的領域，也是一項重大的挑戰。

傳統的測量生物粒子質量的方法是結合流式計數法 (flow cytometry) 與秤重法 (gravimetric measurement)，這個方法雖然有足夠高的準確度，但過程複雜，而且很耗時間<sup>(2)</sup>。新近發展的懸臂式感測器 (cantilever transducers) 可以用來測量單顆病毒或細胞的質量<sup>(3-5)</sup>，引起了人們廣泛的興趣，雖然這個方法具有非常高的靈敏度，但準確性差了一些，誤差通常大於 10%。主要原因是懸臂式感測器所測量的是樣品的「濕重」，即樣品裡含有水，而含水量的微小變化就可以引起顯著的測量誤差。相反的，質譜術測量的是樣品的「乾重」，因此能夠提供比較準確的參數來表徵及確認生物分子與生物粒子。目前市售的質譜儀並不適用於生物粒子質

量的測量，主要的原因有二：

- (1) 檢測上的限制：常用的質譜儀都裝備有電子倍增管 (electron multipliers) 當作偵測器，這些裝置主要偵測的是離子撞擊後所產生的二次電子，但對於超大質量的離子，它們的反應效率很低<sup>(6)</sup>。
- (2) 離子化的困難：一般的生物粒子如病毒或細胞並沒有堅固的封套或外殼保護，因此很容易碎裂、毀損。為了要產生氣相的、完整的離子化生物粒子，我們需要嶄新的軟離子化技術<sup>(7)</sup>。

電噴灑游離法 (electrospray ionization, ESI)<sup>(8)</sup> 和基質輔助雷射脫附游離法 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)<sup>(9, 10)</sup> 的發明，是當今質譜技術最重要的發展，為現代質譜學開啟了新的一頁。這兩項軟離子化方法可以讓一些大質量的生物分子帶上電荷，並形成完整的氣相分子，它們的質量分析得以完成。本實驗室曾在 2004 年利用 MALDI 的方法將完整的細菌粒子如大腸桿菌離子化，並帶到氣相中，運用自行研發的四極式離子阱質譜儀，以偵測雷射散射光的方式，首次成功地測量了單一顆完整細菌的質量<sup>(11)</sup>。但應用 MALDI 這個方法來產生帶電的、完整的、沒有硬殼壁的細胞和病毒則是不可行的。原因是雷射直接激發基質時，反應過於猛烈，生物粒子在 MALDI 的過程中容易碎裂，結果變得十分複雜。而 ESI 雖然有較高的普適性，幾乎可以使所有的粒子離子化，但必須從溶液開始，對實驗設備的要求高，而且樣品消耗量大，因此並不適合細胞和病毒方面的應用。

有鑑於此，本研究團隊發展了一套新的軟離子化方法—雷射誘導聲波脫附法 (laser-induced acoustic desorption, LIAD)<sup>(7)</sup>，可以輕易地氣化與離子化生物粒子 (如紅血球)，並保持其完整性。我們進一步的自行設計建造一台頻率掃描式四極離子阱質譜儀 (frequency scan quadrupole ion trap mass spectrometer)<sup>(12)</sup>，搭配電荷感應偵測器 (charge-sensitive detector)<sup>(13, 14)</sup>，同時測量這些生物粒子的電荷 (charge) 與荷質比 (mass-to-charge ratio) 來得到質量，用此方法所測量的一系列動物的紅血球細胞的結果與用傳統的方法所得到的結果非常接近。更有趣的是，從實驗結果中不但可以清晰地分辨出健康的成年人和患有貧血

病人的血球細胞的差異，也可以區別出人類和動物 (如奶牛) 紅血球細胞的不同<sup>(15)</sup>。為了進一步擴展實驗技術的應用範圍至粒徑較小的生物粒子，如細菌與病毒等，我們也以一個自製的圓柱型離子阱 (cylindrical ion trap, CIT) 來取代常用的四極式離子阱 (quadrupole ion trap, QIT)，並利用鍍有透明導電膜的玻璃平板來取代兩端的雙曲面電極，經由收集雷射光散射 (laser light scattering) 的方法，成功地測量得到單個細菌與病毒的質量<sup>(16)</sup>。

利用這兩套技術，我們研究了不同類型的生物粒子，包括腺病毒 (adenovirus)、牛痘病毒 (vaccinia virus)、大腸桿菌 (*E. coli* K-12) 及紅血球細胞 (red blood cell) 等，測量的質量範圍涵蓋了  $1 \times 10^8$  Da (或重 160 ag)– $1 \times 10^{14}$  Da (或重 160 pg) 的這個區間段，相應的粒子直徑範圍約為 100 nm–10  $\mu$ m。

## 二、歷史及背景

測量單一個巨型離子的質量最早可以追溯到一百年前密立根 (R. A. Millikan) 的研究工作。在他著名的油滴實驗裡<sup>(17)</sup>，密立根測量的是電子的電荷，具體說是讓已知質量的油滴帶上電荷，並置於兩塊平行的電極板中，通過仔細地調節重力和靜電力的平衡來計算出油滴所帶的電量。經過多次重複的測量，密立根發現他所測量得到的電量數值，總是某一個恒定數值的整數倍，因此推論，這些測量結果的最大公約數就是電子所攜帶的電量，即基本電荷  $e = 1.602 \times 10^{-19}$  C。這可以說是人類最早測量得到的量子單元，為即將到來的量子力學建立了堅實的基礎。因為這項傑出的研究工作，密立根獲得 1923 年的諾貝爾物理學獎。有了這個基本常數，反過來，就可以利用密立根的油滴實驗裝置來測量其他種帶電懸浮粒子的質量<sup>(18)</sup>。然而，密立根的實驗裝置並不適合長時間的將帶電粒子懸浮在自由空間裡，更適用的裝置是 1950 年代末 Paul 等人<sup>(19)</sup> 所發明的射頻四極式離子阱 (radio-frequency quadrupole ion trap, RF-QIT)。

最早發現四極式離子阱具有捕捉單一個粒子功能的科學家是 Wuerker、Shelton 和 Langmuir<sup>(20)</sup>，他們於 1959 年發展出測量單粒子質荷比的方法。

通過仔細地調節離子阱的參數，他們成功的囚禁單一個帶電粒子，並觀察該粒子在離子阱中三度空間的運動行為。圖 1 是一個典型的離子運動軌跡的平面投影圖，理論上可歸屬為 2:1 的 Lissajous 圖形。當加在離子阱兩端電極上的交流電壓頻率與該粒子軸向的運動頻率達到共振時，粒子的運動軌跡在  $z$  軸的方向變得不穩定，由此可以得到軸向的運動頻率 ( $\omega_z$ )，再用下面的關係式計算出該粒子的質荷比 ( $m/Ze$ )：

$$\frac{m}{Ze} = \frac{\sqrt{2}V_{ac}}{\omega_z r_0^2 \Omega} \quad (1)$$

其中， $Z$  是粒子所帶的電荷數， $e$  是基本電荷， $\Omega$  是射頻頻率， $V_{ac}$  是射頻電壓幅度， $r_0$  是環電極的半徑。此方法的精確度可以達到  $10^{-3}$  量級。

利用這種三維的離子阱，Philip 等人<sup>(21)</sup> 作了類似於密立根的實驗，成功的測得單顆聚乙炔基甲苯的氣溶膠粒子 (直徑  $2.35 \mu\text{m}$ ) 所攜帶的電荷數目，經由質荷比換算後得到的質量是  $6.84 \text{ pg}$ ，不準確度只有  $\pm 1.5\%$ 。Schlemmer 與 Gerlich 等人<sup>(22)</sup> 進一步優化了這項技術，他們仔細的記錄和分析單一個囚禁粒子所產生的散射光，利用粒子的運動對散射光的訊號有調幅的作用，經由快速傅氏變換法 (fast Fourier transform, FFT) 得到該粒子的運動頻率，最後再由 (1) 式算出該粒子的質荷比，測量精確度可以提高到  $10^{-4}$  量級。使用此法，他們成功地測量粒徑在  $500 \text{ nm}$  以內  $\text{SiO}_2$  粒子的質量。

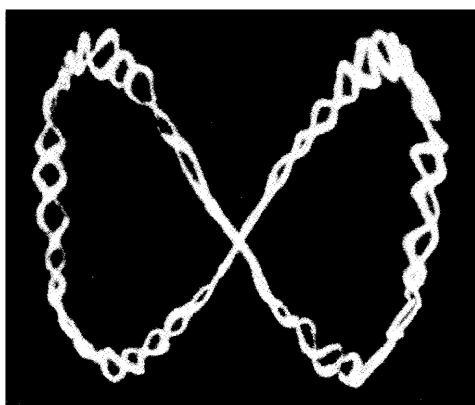


圖 1. 單一個帶電粒子在四極式離子阱中運動軌跡的平面投影圖<sup>(20)</sup>。

值得一提的是，幾乎在四極式離子阱發明的同時，Shelton 等人<sup>(23)</sup> 發展了一項直接測量巨型粒子質量的裝置—電荷感應管 (charge induction tube)，它可以同時測得粒子所攜帶的電荷量 ( $Ze$ ) 及其質荷比 ( $m/Ze$ )，非常簡便。此電荷感應管其實就是一個簡單的飛行管，兩端是用柵網隔絕並接地的保護層。當帶電粒子通過這個飛行管時，會在管壁上產生感應電勢，感應電勢的大小正比於系統的電容，通過一些簡單的關係式即可算出該粒子所帶的電量，而這個感應信號的持續時間即為該粒子在飛行管內的飛行時間。如果能夠測量出該粒子的速度和帶電量，並結合粒子的加速電壓，就可以計算出該粒子的質量。Fuerstenau 等人<sup>(24)</sup> 使用了這一項特殊的裝置，並用 ESI 的方法使完整的病毒帶上電荷，然後分別測量該病毒粒子的  $m/Ze$  和  $Ze$  值，從而首次測量了一些已知質量的病毒質量。他們測試的病毒包括有水稻黃斑駁病毒 (rice yellow mottle virus, RYMV) 及煙草花葉病毒 (tobacco mosaic virus, TMV)。圖 2 顯示的是他們的實驗結果，所測量到的質量誤差約為  $\pm 15\%$ 。雖然這一個方法的準確度不高，但優點是快速便捷，上千顆病毒粒子可以在半小時內分析完成。

### 三、實驗方法及結果

#### 1. 離子化方法

雷射誘導聲波脫附法的原理是利用脈衝式雷射 (脈寬約  $7 \text{ ns}$ ) 來轟擊矽晶片 (厚度約  $0.5 \text{ mm}$ ) 的背面，矽晶片吸收到雷射的能量後，產生晶格的振動，這些振動在晶格內快速的傳播而形成聲波 (聲子)。當聲波傳遞到矽晶片的前表面時，會引起吸附在表面上待測樣品分子的振動。當這些振動的能量足夠大，大到足以打斷矽晶片與吸附樣品分子間的鍵結時，樣品分子就會脫離表面的束縛而游離出來，進入氣相中。由於樣品分子間有靜電力作用，它們脫離表面時常會帶有淨電荷，自然形成帶電的粒子 (如圖 3(a) 插圖所示)。此法是借用雷射濺射 (laser ablation) 矽晶片來達到樣品脫附的目的，既沒有基質輔助，雷射也沒有直接激發樣品分子，因此氣化的粒子能夠帶正電，也能夠帶負電，機率大

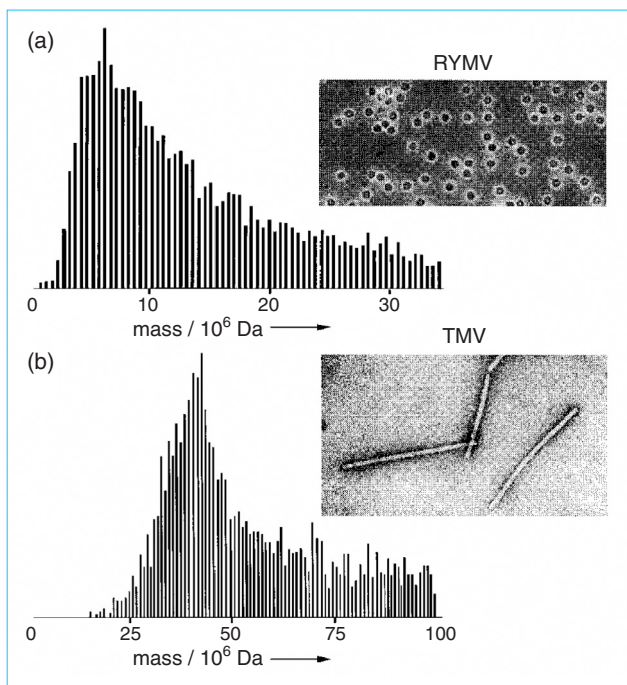


圖 2. (a) 水稻黃斑駁病毒及 (b) 煙草花葉病毒的 ESI-TOF 質譜圖。右方插圖是相對應的電子顯微鏡拍攝結果。已知 RYMV 和 TMV 的質量分別是 6.5 及 40.5 MDa<sup>(24)</sup>。

致相同 (參見圖 3(a))。相對的，基質輔助雷射脫附游離法產生的粒子則以帶正電的居多 (見圖 3(b))。

當然，聲子也可能引起吸附在矽晶片表面分子內部的振動，而導致樣品的碎裂。但通常分子內的振動頻率在  $10^{12} - 10^{14}$  Hz 範圍之間<sup>(25)</sup>，這些頻率遠高於由雷射產生的聲波振動頻率  $10^8 - 10^{11}$  Hz。後者事實上比較接近分子與表面的鍵振動頻率， $10^{11} - 10^{13}$  Hz，很容易產生共振。因此由這種方法產生的樣品分子比較可能是完整的，而不像 MALDI 那樣容易把大的分子或待測粒子打碎。正是利用這一項特性，我們首次產生了氣相的、完整的、離子化的病毒與細胞。

## 2. 質量分析裝置

常用的質量分析裝置有飛行式時間質譜儀 (time-of-flight mass spectrometer)、線性四極式質譜儀 (linear quadrupole mass spectrometer)、四極式離子阱質譜儀 (quadrupole ion trap mass spectrometer)、線性四極式離子阱質譜儀 (linear quadrupole ion trap

mass spectrometer)，以及傅氏變換離子迴旋共振儀質譜儀 (Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) 等<sup>(1)</sup>，我們所採用的是一套自製的音頻掃描式四極離子阱質譜儀 (請見圖 4)。

### (1) 四極式離子阱質譜儀及紅血球細胞的檢測<sup>(15)</sup>

四極式離子阱基本上是由一個環電極 (ring electrode) 和兩個帽端電極 (end-cup electrode) 所組成，電極的外形都是旋轉的雙曲面。實驗中在環電極上加一個可調頻的交流電壓，而保持兩個帽端處於接地狀態，這樣就可以產生一個勢阱，使得滿足一定質荷比條件的離子都可以在這個勢場內作穩定的運動。由於這種穩定的運動嚴格依賴於離子的質荷比，當外部條件 (如電場的頻率或振幅) 改變時，這種運動的穩定性亦隨之改變。當此運動變得

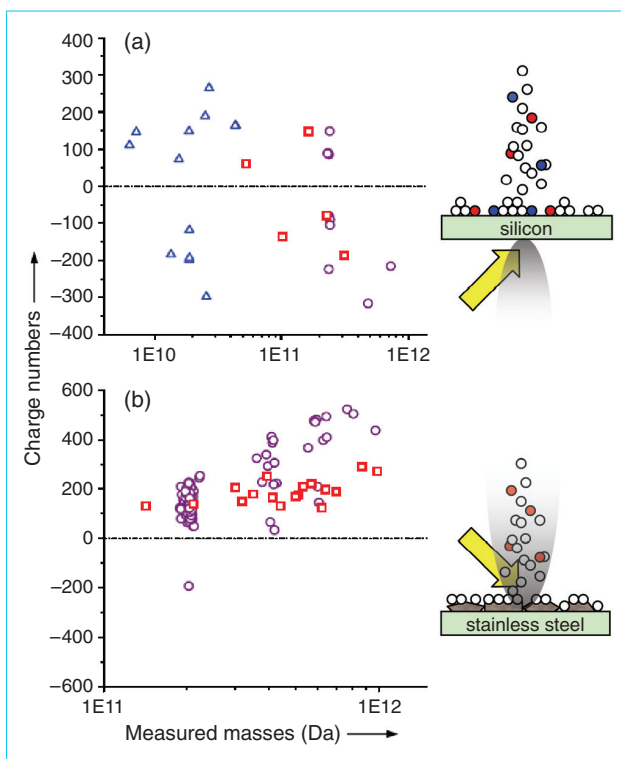


圖 3. (a) 雷射誘導聲波脫附法與 (b) 基質輔助雷射脫附游離法之示意圖及其實驗結果 (○: 1- $\mu$ m NIST polystyrene size standards, □: *E. coli* K-12 bacteria; △: vaccinia viruses)。右插圖中紅球、白球與藍球分別代表帶正電、中性與帶負電的粒子<sup>(7)</sup>。

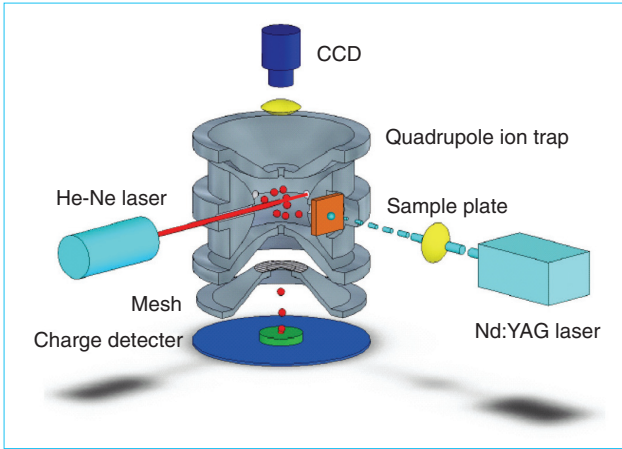


圖 4. 頻率掃描式四極離子阱質譜儀的剖面圖<sup>(15)</sup>。

非常不穩定時，離子會從  $z$  軸方向被拋出阱外，這些被拋出的離子，其質荷比可以由公式 (2) 來確定：

$$\frac{m}{Ze} = 4V_{ac}q_{eject}r_0^2\Omega_{eject}^2 \quad (2)$$

其中  $q_{eject} \sim 0.908$ ， $\Omega_{eject}$  是離子被拋出瞬間時交流電場的圓頻率。在本實驗中掃描的是電場頻率，而非振幅，被拋出的粒子是以感應電流 (inductive current) 的方式被偵測出來。如前所述，此感應電流的大小反映出來的是該粒子所攜帶的電荷數目 (如圖 5 所示)，此數目與其質荷比作比較，立即可以得知該生物粒子的質量，這是一種快速又簡便的方法，可以用來檢測大量的樣品，得到相當精確的結果。

正常人紅血球細胞的直徑大小約為  $8 \mu\text{m}$ ，厚度約為  $2 \mu\text{m}$ ，表面很容易帶帶上千個電荷，因此可以用電荷感應偵測器來偵測它們。我們首先用脈

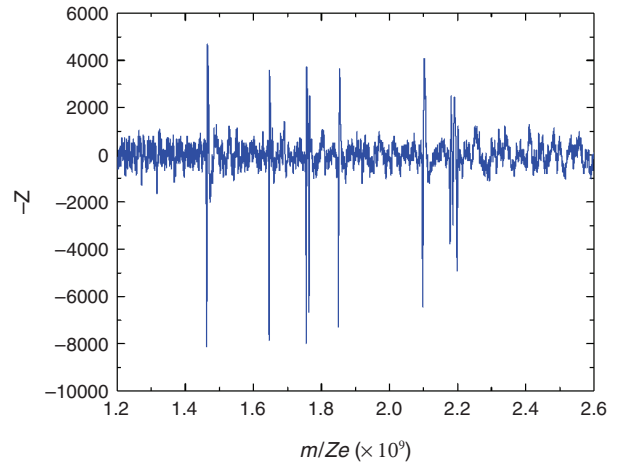


圖 5. 電荷感應偵測器所測得的訊號。感應電流 (Y 軸訊號) 的大小即反映出該粒子所攜帶的電荷數目 ( $Z$ )<sup>(15)</sup>。

寬約為  $7 \text{ ns}$ 、能量約為  $30 \text{ mJ}$  的  $532\text{-nm}$  Nd:YAG 雷射來轟擊矽晶片背面，產生氣化的、帶電的、完整的紅血球細胞，並運用四極式離子阱來抓住這些離子。當交流電場的頻率持續下降時，一些帶電粒子的運動將會變得不穩定而被拋出阱外，被電荷感應器所偵測。這是一項快速簡便的技術，我們可以在 1 小時內完成 600 多個細胞的質量分析。圖 6 所示的是正常人、缺鐵型貧血 (iron deficiency) 病人、和地中海式貧血 (thalassemia) 病人的紅血球細胞的實驗結果，這三種細胞在質量上有很明顯的差異。圖 7 所示的是正常人的和奶牛的紅血球細胞混合樣品 (比例 1:2) 的實驗結果，它的差異可以很明顯的看出來，證明我們開發的方法可以清晰的分辨出這兩種不同的細胞，因此這項技術很有希望被實際的應用於血液檢測方面。

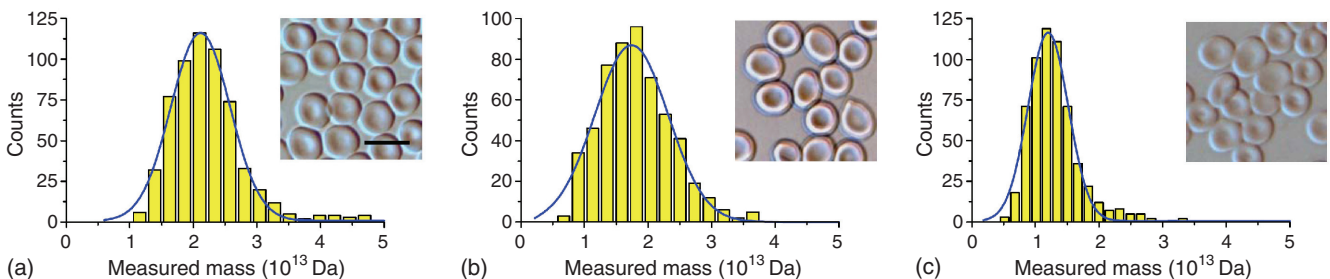


圖 6. (a) 正常人、(b) 缺鐵型貧血病人、(c) 地中海式貧血病人的紅血球細胞的質量測量結果。右插圖為相應的細胞影像圖 (比例尺長為  $10 \mu\text{m}$ )<sup>(15)</sup>。

表 1 總結了一系列動物及正常和患有貧血病人的紅血球細胞的實驗結果，由表中可見，我們的質量測量實驗結果與用傳統方法測量平均血球血紅素量 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) 的結果一致。通過誤差分析，我們還可以知道紅血球細胞間的質量差異，可能並不完全來自於各個細胞所含的血色素總量的差異，可能還有其他的來源。這一項訊息是目前醫院或健康檢查中心所使用的方法無法得到的，因此我們的技術可以作為血液分析的一個輔助工具。

## (2) 圓柱型離子阱質譜儀及單一個細菌和病毒的質量測<sup>(16)</sup>

相對於紅血球，細菌和病毒的粒徑尺度小了一到兩個數量級，因此其表面所帶電荷數目也少了許多 (假設電荷數與表面積成正比)，這時用電荷感應器來偵測這些帶電粒子變得相當困難，因此我們改用收集雷射散射光的方法來作為偵測方式，為此我們自行設計建造一個半透明式圓柱型離子阱來測量單個病毒粒子的質量。具體地說是使用一個圓柱電極代替環電極，用鍍有氧化銻錫 (indium tin oxide, ITO) 導電膜的透明玻璃平板電極來取代帽端電極 (圖 8)。這項改進的優點是離子阱的幾何構型簡單，收集散射光的效率非常高 (> 10%)，因此很適用於奈米粒子的偵測。而且此裝置的體積小、容易操作，可以與其他的光學方法 (如顯微鏡技術) 結合使用。

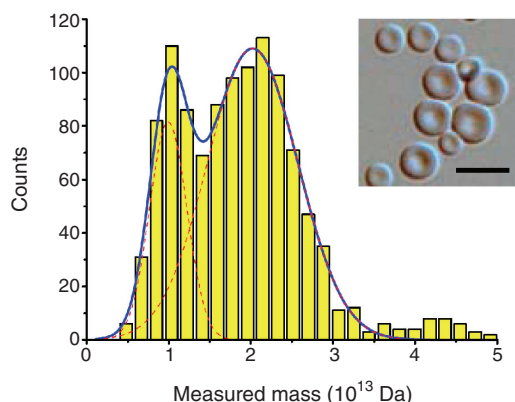


圖 7. 正常人和奶牛的紅血球細胞混合樣品 (比例為 1 : 2) 的質量測量結果。右插圖為細胞影像圖 (比例尺長為 10  $\mu\text{m}$ )<sup>(15)</sup>。

當一個帶電粒子在四極式離子阱中作穩定運動時，其軸向的運動頻率  $\omega_z$  可以表示為：

$$\omega_z = \frac{\sqrt{2}V_{ac}}{(m/Ze)r_0^2\Omega} \quad (3)$$

此公式是由 (1) 式轉換而來，它不僅適用於四極式離子阱，也適用於圓柱型離子阱，因為在後者的阱中心，其勢場亦為四極式的。因此通過觀察粒子運動的頻率，也就能得知其質荷比。如果再利用電子槍來改變該粒子所帶的電荷數目 (如密立根實驗所為)，重複測量其運動的頻率，並計算出新的質荷比 ( $m/Ze$ )，反覆多次後，經由電腦分析，就可推知該粒子的絕對質量。

Sources	MCW (pg)	RDW <sub>m</sub> (%)	MCV (fL)	RDW (%)	MCH (pg)	MCH/MCW
Human (normal)	34.8	15	88.9	12	31.0	0.89
Human (iron deficiency)	28.8	27	80.4	17	26.5	0.92
Human (thalassemia)	20.6	20	66.5	18	21.5	1.04
Goat	9.6	16	34.4	30	—	—
Cow	15.5	20	40.4	27	14.8	0.95
Mouse	18.4	11	46.2	20	16.2	0.88
Pig	20.7	17	60.4	22	19.3	0.93
Chicken	46.5	13	130.8	9	33.5	0.72

註：MCW: Mean corpuscular weight; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; RDW: red cell distribution width; RDW<sub>m</sub>: red cell distribution width determined by the total dry mass measurement.

表 1. 動物、正常人和患有貧血病人的紅血球細胞的質量測量結果<sup>(15)</sup>。

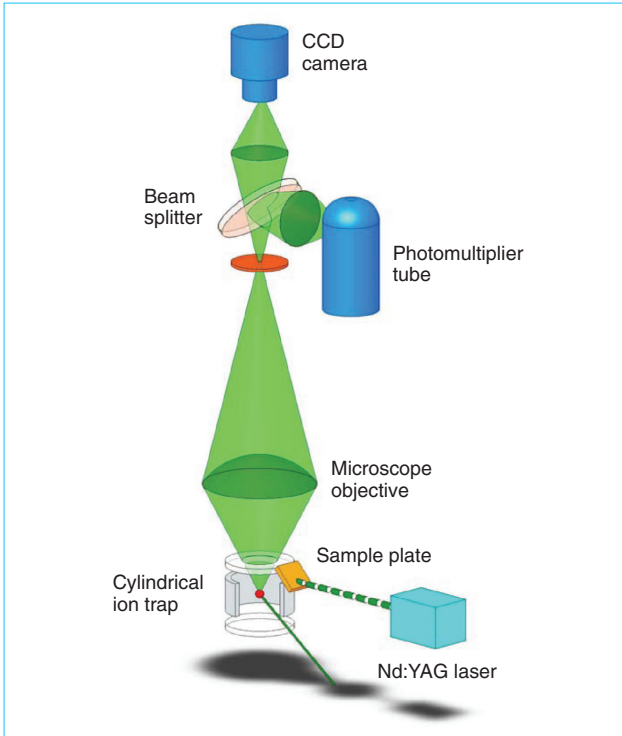


圖 8. 單粒子圓柱型離子阱質譜儀的結構圖<sup>(16)</sup>。

本實驗的裝置如圖 8 所示，首先囚禁單一個粒子（或其團簇）在離子阱中，並測量其運動的頻率。使用的方法是以一台連續式的雷射照射此被囚禁的粒子，用光電倍增管來偵測並收集產生的散射光訊號，經由快速傅氏變換法轉變此訊號，而得到該粒子的軸向運動頻率，最後再利用公式 (3) 算出質荷比。運用此法並多次的改變粒子所攜帶的電荷量，我們成功的測量了多個粒子（對同一種病毒或

細菌樣品) 的質量，取其最大公約數，即為該單一粒子的質量。我們測量了三種病毒分子的質量，它們是人類腺病毒 (recombinant human adenovirus)、鱸魚彩虹病毒 (grouper iridovirus) 和牛痘病毒 (vaccinia virus)。這三種病毒的直徑約為 80 nm、170 nm 及 300 nm，所測得的質量分別約為  $1.72 \times 10^8$ 、 $4.48 \times 10^8$  及  $3.26 \times 10^9$  Da (參見圖 9)。

#### 四、結論

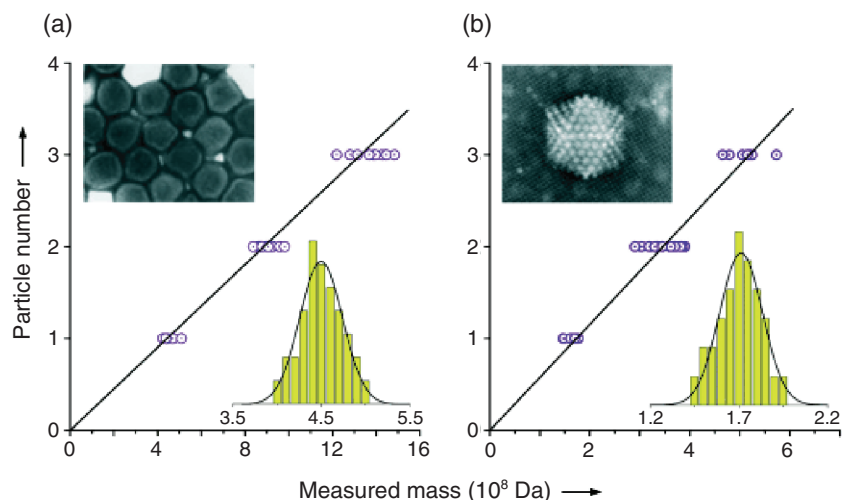
我們發展了新式的軟離子化方法－雷射誘導聲波脫附法，結合四極式離子阱及圓柱型離子阱兩種質譜儀，成功的測量單一個病毒和細菌的質量；並進一步發展了頻率掃描式四極離子阱質譜儀，搭配電荷感應偵測器，可以快速、並大量的測量動物細胞的質量。這兩項技術適用於質量落在  $10^8 - 10^{14}$  範圍間的生物粒子 (包括病毒、細菌、胞器及完整的細胞等)，有廣闊的應用前景。

#### 誌謝

我們感謝中央研究院與國科會對於本計畫的支持，同時筆者也感謝過去多年來實驗室的研究同仁、博士後研究員和學生對於本計畫所作出的貢獻與努力，他們包括李遠哲博士、韓肇中博士、蔡永博士、彭文平、郭善仁、楊易昌、康明慰、林崇偉、曾彥凱、聶宗秀博士、崔芬萍、陳仲瑄博士、朱明禮博士及丁維生先生等人。

圖 9.

(a) 魚彩虹病毒及 (b) 人類腺病毒的質量測量結果。插圖為相對應的細胞影像圖<sup>(16)</sup>。



## 參考文獻

1. C. Dass, *Principles and Practices of Biological Mass Spectrometry*, New York: Wiley (2001).
2. B. Sonnleitner, G. Locher, and A. Fiechter, *J. Biotechnol.*, **25**, 5 (1992).
3. B. Ilic, D. Czaplowski, M. Zalalutdinov, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, and C. Batt, *J. Vac. Sci. Technol. B* **19**, 2825 (2001).
4. A. Gupta, D. Akin, and R. Bashir, *Appl. Phys. Lett.*, **84**, 1976 (2004).
5. T. P. Burg, M. Godin, S. M. Knudsen, W. J. Shen, G. Carlson, J. S. Foster, K. Babcock, and S. R. Manalis, *Nature*, **446**, 1066 (2007).
6. I. S. Gilmore and M. P. Seah, *Int. J. Mass Spectrom.*, **202**, 217 (2000).
7. W.-P. Peng, Y.-C. Yang, M.-W. Kang, Y.-K. Tzeng, Z. Nie, H.-C. Chang, W. Chang, and C.-H. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1423 (2006).
8. S. F. Wong, C. K. Meng, and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
9. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
10. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
11. W.-P. Peng, Y.-C. Yang, M.-W. Kang, Y. T. Lee, and H.-C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11766 (2004).
12. Y. Cai, W.-P. Peng, and H.-C. Chang, *Anal. Chem.*, **75**, 1805 (2003).
13. W.-P. Peng, H.-C. Lin, H.-H. Lin, M.-L. Chu, A. L. Yu, H.-C. Chang, and C.-H. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3865 (2007).
14. W.-P. Peng, H.-C. Lin, M. Chu, H.-C. Chang, H.-H. Lin, A. L. Yu, and C.-H. Chen, *Anal. Chem.*, **80**, 2524 (2008).
15. Z. Nie, F. Cui, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, M. Chu, H.-C. Lin, C.-H. Chen, H.-H. Lin, and A. L. Yu, *Anal. Chem.*, **79**, 7401 (2007).
16. Z. Nie, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, C.-C. Chiu, C.-Y. Chang, C.-M. Chang, and M.-H. Tao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 8131 (2006).
17. R. A. Millikan, *Phil. Mag.*, **19**, 209 (1910).
18. E. J. Davis, *Aerosol Sci. Tech.*, **26**, 212 (1997).
19. W. Paul, *Rev. Mod. Phys.*, **62**, 531 (1990).
20. R. F. Wuerker, H. Shelton, and R. V. Langmuir, *J. Appl. Phys.*, **30**, 342 (1959).
21. M. A. Philip, F. Gelbard, and S. Arnold, *J. Colloid Interface Sci.*, **91**, 507 (1983).
22. S. Schlemmer, J. Illemann, S. Wellert, and D. Gerlich, *J. Appl. Phys.*, **90**, 5410 (2001).
23. H. Shelton, C. D. Hendricks, Jr., and R. F. Wuerker, *J. Appl. Phys.*, **31**, 1243 (1960).
24. S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, and G. Siuzdak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 542 (2001).
25. V. V. Golovlev, S. L. Allman, W. R. Garrett, N. I. Taranenko, and C.-H. Chen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **169/170**, 69 (1997).

- 
- 朱志強先生為中國科學技術大學化學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所博士後研究員。
  - 張煥正先生為美國印第安那大學化學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所研究員。
  - Zhiqiang Zhu received his Ph.D. in chemistry from the University of Science and Technology of China, China. He is currently a postdoctoral fellow at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
  - Huan-Cheng Chang received his Ph.D. in chemistry from Indiana University at Bloomington, USA. He is currently a research fellow at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.