

電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀

Electrospray-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry

謝建台

Jentaie Shiea

電噴灑輔助雷射脫附游離法是一種結合電噴灑游離法及雷射脫附游離法的新式大氣壓力游離法。電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀主要由雷射、電噴灑系統、樣品平台及質量分析器所組成，其原理為利用高能雷射將樣品表面之化學物種脫附，再使脫附之分析物分子與由電噴灑游離所產生之帶電溶劑液滴反應，形成帶單價或是多價電荷之分析物離子。此儀器可在不需任何樣品前處理下，直接且快速地分析各種固體及液體樣品表面上之化學組成物質。

Electrospray-assisted laser desorption ionization (ELDI), a combination of electrospray ionization and laser desorption, is an ambient ionization source developed in our laboratory. ELDI MS is consisted of a laser set, electrospray system, sampling platform and mass analyzer. The principle of this instrument is to laser desorb the chemicals from the surface of solid or liquid; the desorbed molecules are then post-ionized in an ESI plume to form singly or multiply charged ions; these ions are subsequently detected by the mass analyzer attached to the source. Sample pretreatment in ELDI MS analysis is minimum or unnecessary.

一、前言

電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀 (electrospray-assisted laser desorption ionization, ELDI MS) 乃是將電噴灑游離法 (electrospray ionization, ESI) 及雷射脫附游離法 (laser desorption ionization, LDI) 相結合的一種新的大氣壓力游離質譜儀，其基本作法是以高能雷射聚焦並照射於樣品表面，使存在表面之化學物質脫附形成氣態分子，這些氣態分子脫離樣品後，會往其上方移動，進入一正以有機溶劑 (如甲醇) 進行電噴灑之帶電液滴區域內，並經由氣態分

析物分子與帶電液滴之反應，產生分析物離子，再以其後之質量分析器進行偵測這些離子，而得到樣品表面的化學組成。

電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀的裝置如圖 1 所示，主要構造是由雷射系統、電噴灑系統、樣品平台及質量分析器所組成。圖 2 所示為 ELDI 的游離過程中，以雷射照射位於金屬板上之分析物，造成其脫附，並進入位於樣品點上方之電噴灑區域而被游離。圖 2 右方所示之管狀物為質量分析器之離子入口管。

電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀是在 2005 年

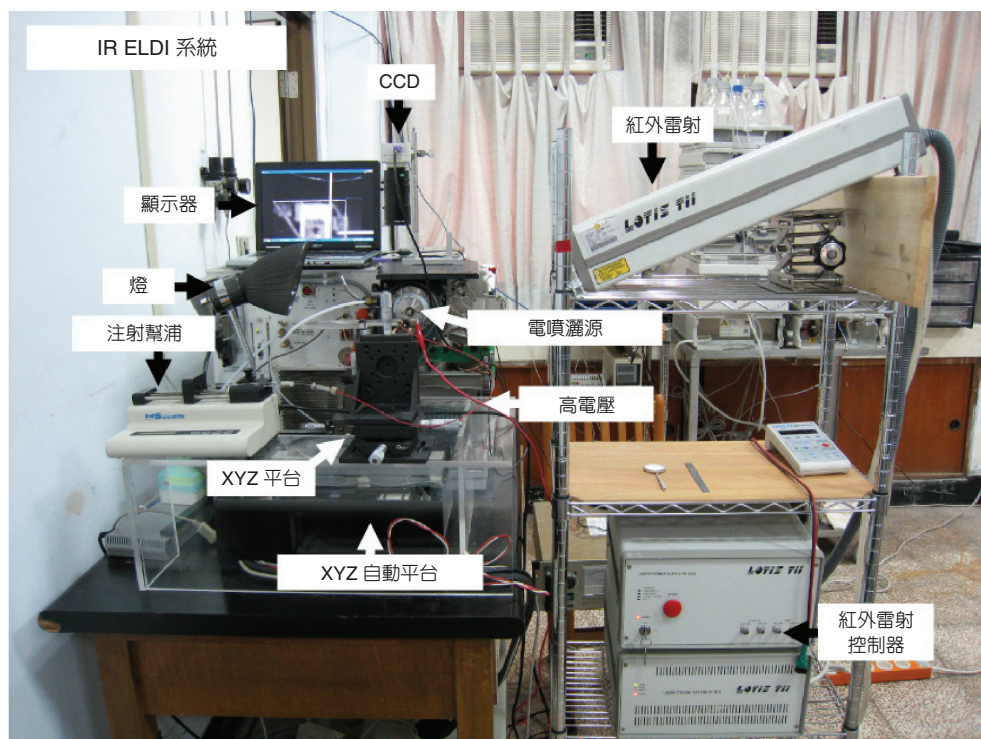


圖 1. ELDI MS 實驗裝置照片。

由筆者實驗室所開發出來的⁽¹⁻⁷⁾。在 2006 年發表的論文中顯示電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀可以直接偵測到組織、乾燥的各式生物體液 (如血液、眼淚、口水) 中所含的主要蛋白質的訊號，因此該儀器除了可用於化學小分子的偵測外，也適合於生化大分子如蛋白質和胜肽的分析⁽⁴⁾。此外，在電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀中用來脫附分析物所用的雷射能量，較諸其他現存之大氣壓力質譜法如 desorption electrospray ionization (DESI)、atmospheric solids analysis probe (ASAP) 及 direct analysis in real time (DART) 等加諸於分析物之能量均來得大許多，因此電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀也可應用在具堅硬固體表面上化學分子的直接分析，如 CD 片、塑膠及其他高分子聚合物材料等⁽⁹⁾。

二、電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀之脫附游離機制

ELDI 的脫附游離機制雖尚未完全了解，但根據實驗所得資料，可以推測並略述如下：首先是有關分析物被雷射照射後的脫附機制，這包括分析物

因直接吸收雷射能量而產生脫附現象，另一種可能是樣品在被置於金屬樣品平台後，平台因承受雷射部分能量，導致溫度升高，並使位於其上的分析物質被氣化。

之前的報導曾指出，以高能雷射照射固體樣品表面時，大多數樣品會以微小顆粒狀態離開樣品平台，而這些顆粒尺寸則多介於 $1\ \mu\text{m} - 10\ \mu\text{m}$ 之間。無可否認的，在雷射直接照射下，位於雷射光焦距

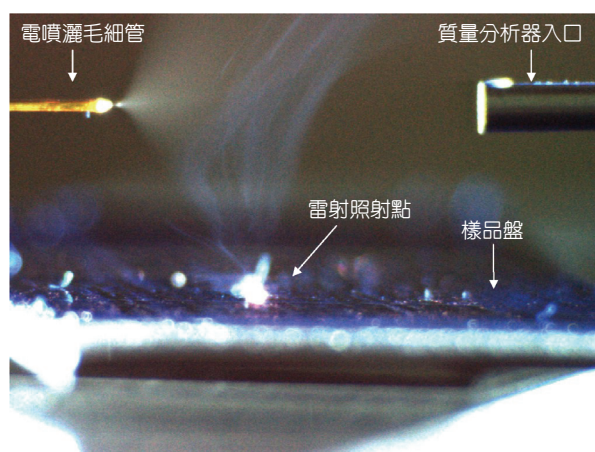


圖 2. ELDI 游離過程實際照片。

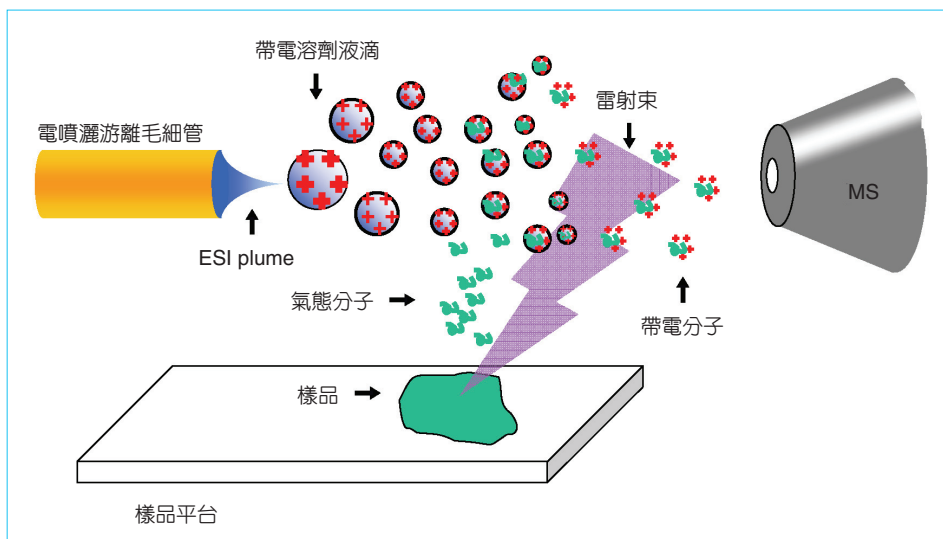


圖 3. ELDI 樣品之雷射脫附及電噴灑游離過程示意圖。

中心的分析物極有可能會因承受雷射所帶來之巨大能量而被分解破壞，但對於大多數存在上述各式顆粒內之分析物，則可不被分解，保持在 intact 狀態。這可能是為何完整的蛋白質分子離子可在電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀中被偵測到的主要原因。

實驗結果顯示，以蛋白質標準品作為樣品，經電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀分析後，所得到的

質譜圖和以 ESI/MS 所得十分類似 (見圖 4)，這也顯示 ESI 過程在以電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀分析蛋白質時應該扮演了主要的游離角色。依此實驗結果推測在 ELDI 之游離過程中，不論經雷射脫附所產生的是分析物的氣相分子，或是分析物的微小顆粒，它們在被脫附並離開樣品平台後，馬上會進到由一電噴灑毛細管所產生的帶電荷溶劑液滴以

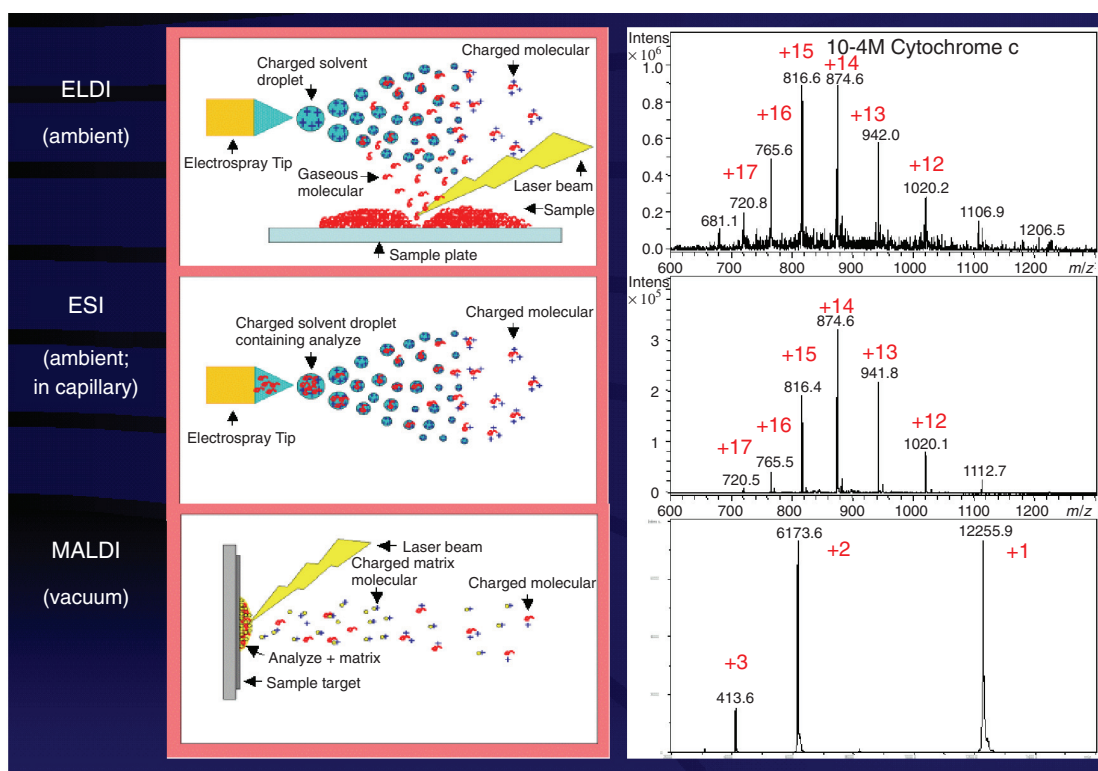


圖 4. 以 ELDI、ESI 與 MALDI 分析細胞色素 (cytochrom C) 實驗結果比較。

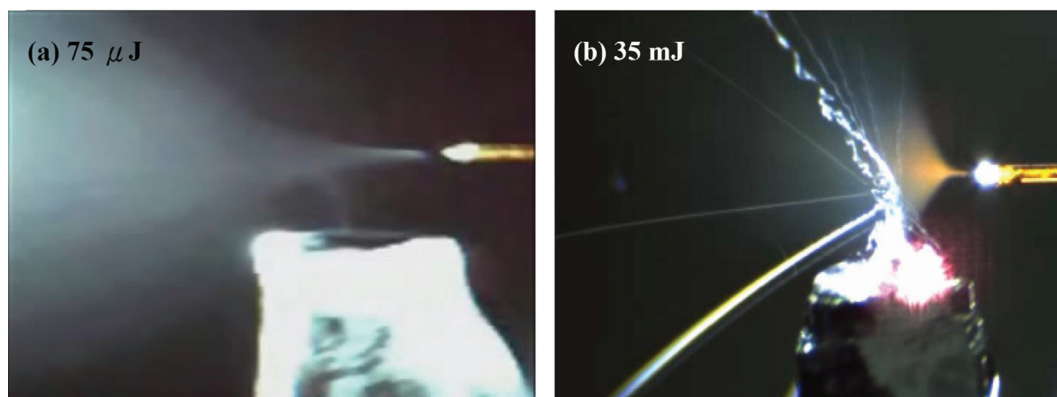
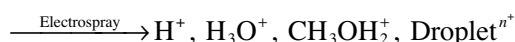
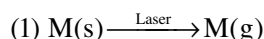
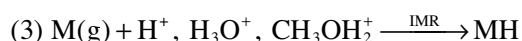


圖 5.
液態樣品以不同雷射能量照射後溶液之脫附情形。

及各式的溶劑離子所組成的區域。這些物質就可以藉著和帶電荷的電噴灑溶劑離子來進行離子分子反應 (ion molecule reactions, IMR)，而產生具單價電荷之分析物離子，或是先融入帶電荷溶劑液滴內，這些液滴再繼續經 ESI 游離過程，而產生具多價電荷之分析物離子。圖 3 顯示 ELDI 可能的游離過程，上述電噴灑輔助雷射脫附游離的游離機制可整理如下：



對小分子的游離 (離子-分子反應，IMR)：



對大分子的游離 (液滴融合，並結合 ESI 游離)：



三、電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀之實驗裝置及架構

ELDI 游離源主要架構是以 (1) 雷射、(2) 電噴灑裝置，再加上 (3) 固定或可移動式樣品平台所組成的。

1. 雷射系統

ELDI 所使用之雷射脫附裝置如圖 1 和 5 所

示，其主要用途是將分析物自樣品表面脫附出來。目前曾使用的雷射有三種，分別為 (1) 輸出能量介於 $150 \mu\text{J} - 750 \mu\text{J}$ ，波長 $266 \text{ nm} - 1064 \text{ nm}$ 的 Nd:YAG 雷射，(2) 輸出能量介於 $75 \mu\text{J} - 200 \mu\text{J}$ ，波長為 337 nm 的氮氣 UV 雷射，以及 (3) 輸出能量約為 30 mJ ，波長 1064 nm 的 Nd:YAG IR 雷射 (圖 1)。

當分析堅硬表面的樣品時，會選擇使用輸出能量較高的 Nd:YAG 雷射，而在分析液體或是具軟性表面的樣品時 (如動植物組織切片)，則會使用輸出能量較弱的氮氣雷射。圖 5(a) 所示為以 $75 \mu\text{J}$ 的氮氣雷射照射液態樣品表面的情形，圖中可見到接受雷射照射的區域產生如噴泉般的液滴，以及其進入並與電噴灑液滴融合的情形。圖 5(b) 為以高能的 Nd:YAG 雷射照射相同液態樣品表面時的情形，由於雷射能量過大，因此雖可得到強的分析物訊號，但因為每次照射時樣品脫附的程度皆不相同，因此所產生的離子信號穩定度較差。一般在進行 ELDI 實驗時，往往會以較低的雷射輸出能量來脫附分析物，除此之外，雷射的波長、帶寬、入射角及雷射頻率也會影響樣品的脫附程度。一般而言，在以 337 nm 的 UV 雷射進行樣品的脫附時，其操作條件為：能量控制在約 $100 \mu\text{J}$ ，雷射帶寬為 $4 \text{ nm} - 5 \text{ nm}$ ，雷射入射角約在 45° ，頻率則為 $5 \text{ Hz} - 10 \text{ Hz}$ 。

2. 電噴灑裝置

ELDI 游離源所使用之電噴灑裝置如圖 6 所示。它以一個三通閥為中心 (圖 6(a))，閥之右方連結到一注射幫浦 (syringe pump)，以提供電噴灑溶

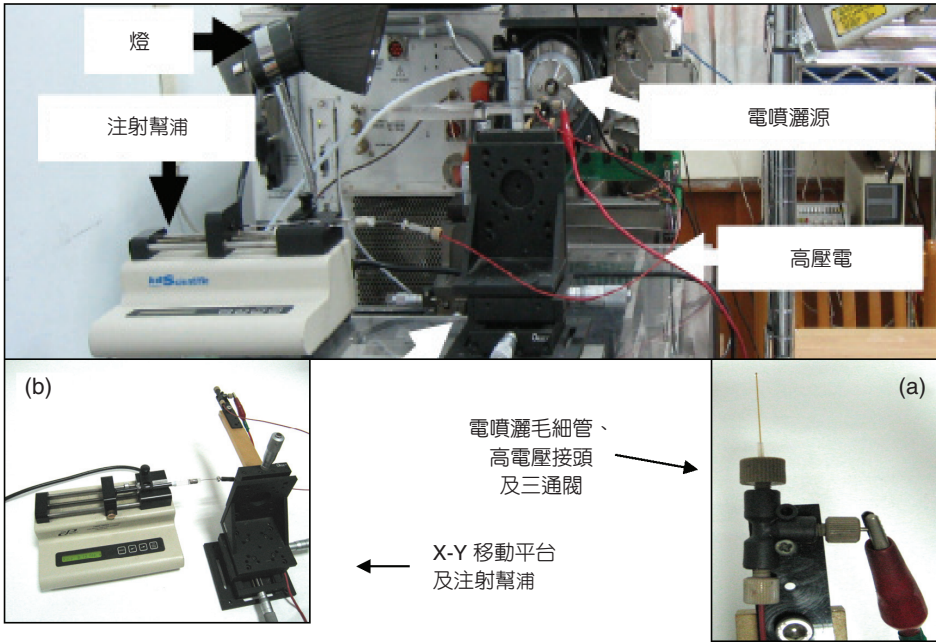


圖 6. ELDI 游離源內的電噴灑游離裝置。

液進入，閥之上端則插入一導電用之金屬線，並連接到高壓電源供應器。其主要目的是將高電壓施加上到流經三通閥內的電噴灑溶液，溶液再流向由閥左端所接之毛細管，並在毛細管出口尖端產生電噴灑。電噴灑溶液的流速、所施加之高電壓、毛細管管徑，及毛細管出口端距質量分析器之離子入口端的距離等，皆會對分析物之離子訊號造成影響。在進行實驗時需調整上述各項參數，以得到穩定的電噴灑。一般在進行分析時所使用的參數為：電噴灑

溶液組成為含 0.1% 三氟醋酸的甲醇溶液，其流速為 $1 \mu\text{L} - 2 \mu\text{L}$ ，施加之高電壓視電噴灑裝置之不同而有不同之數值，一般約在 $3000 \text{ V} - 5000 \text{ V}$ ，毛細管內徑為 $100 \mu\text{m}$ ，毛細管管口距離質量分析器之離子入口約為 $5 \text{ mm} - 10 \text{ mm}$ 。

圖 7 所示為施加不同高電壓下電噴灑裝置中溶液的噴灑情況。在施加之高電壓為 4 kV 時，由於電場強度太小，無法使流至毛細管末端的溶液產生 ESI 噴灑，溶液因而在毛細管末端累積。在施加電

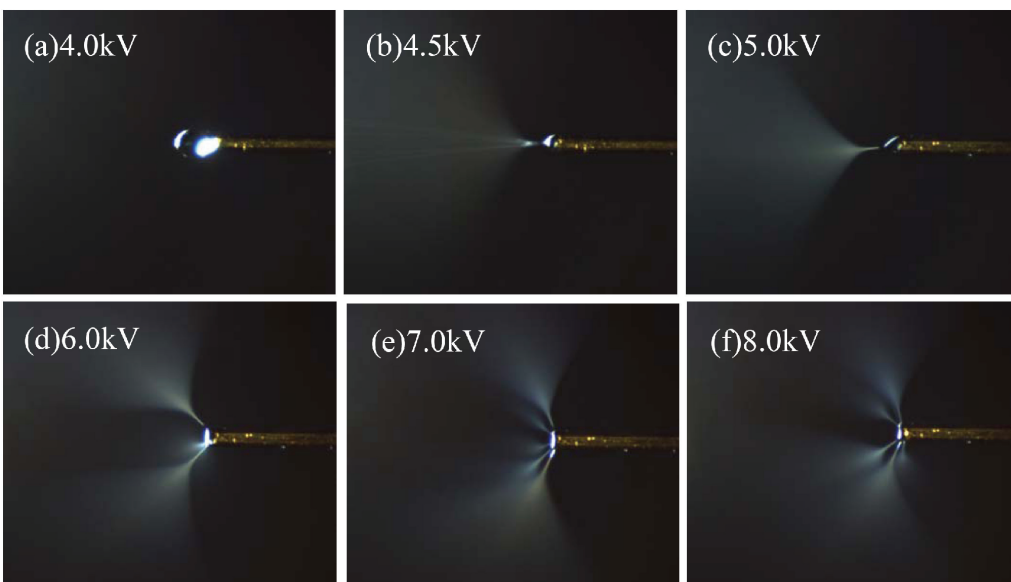


圖 7. 使用不同電壓下所得之電噴灑情形。

壓為 4.5 kV 時，可清楚地看到毛細管末端有電噴灑及泰勒錐 (Taylor cone) 的產生，但是電噴灑現象並不穩定。在施加電壓為 5 kV 時，所產生的電噴灑不僅可看到泰勒錐的生成，並可以得到相當穩定的電噴灑現象。而當電壓施加到 6 kV 時，由於電場強度過大，使得流至毛細管末端的溶液在未形成泰勒錐時，即沿著毛細管壁向外噴灑出去，形成兩個分裂的噴灑區。若高電壓分別再往上增加至 7.0 kV 及 8.0 kV 時，可看到其電噴霧沿著毛細管壁向外噴灑的狀況更為明顯，如此一來，會使得離子訊號變得極為不穩定。

3. 樣品

在樣品部分，因為 ELDI 是以雷射能量將分析物自樣品表面上脫附出來，再使其進入電噴灑溶液中進行離子分子反應或是電噴灑游離，以產生分析物離子，因此可適於被 ELDI 分析之樣品並無任何限制。由於氣態分子並不需要被雷射氣化，由此可將其直接導入電噴灑區域內使其游離。總之，ELDI 可以分析以固態、液態及氣態存在之樣品。

4. 樣品容器及移動平台

一般而言，在 ELDI 的樣品平台上進行電噴灑輔助雷射脫附游離質譜分析時，並不需要以特殊容器承載樣品，只需將上面放置有固體或是液體樣品之平台置於電噴灑裝置與質譜儀入口下方，再以雷射照射樣品表面，即可得到存在表面上分析物之質譜訊號，如圖 8 所示。但在進行特殊的應用研究時，則可針對樣品之承載平台加以修改，以符合需求。例如在進行樣品上特定分析物之組成影像分布研究時，是將樣品 (組織切片) 放置於可精密移動的 x-y 平台上，藉由連續精密而緩慢的移動樣品，可以不斷地改變雷射照射樣品的位置，如此一來，即可得到樣品表面上各部位所含分析物的質譜訊號，這就是所謂的分子影像技術 (molecular imaging)。圖 9 所示為以 ELDI 影像技術分析一靈芝切片中特定三萜分析物之分布結果。

若以電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀連續監測液態溶液中進行之化學反應變化時，則可將反應試劑置於反應槽內，再以雷射連續照射不斷攪拌之溶液表面，並以 ESI 游離所脫附之分子，如此一來，

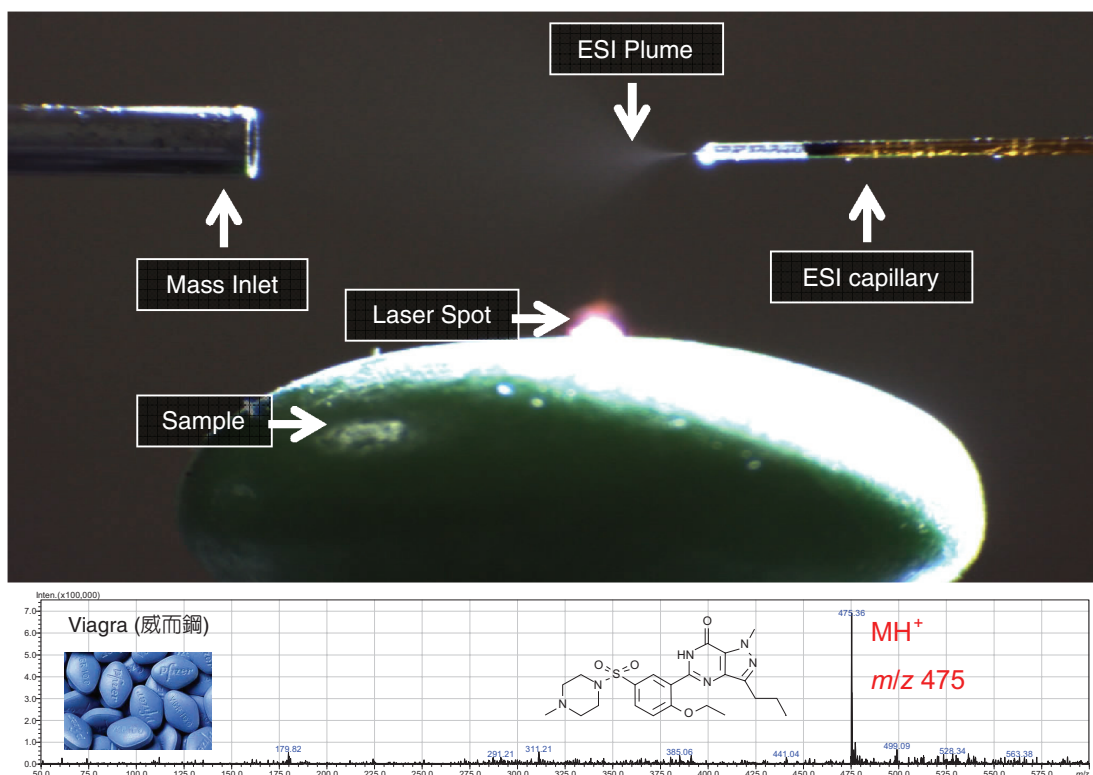


圖 8. 以 ELDI MS 分析藥錠之照片及實驗結果。

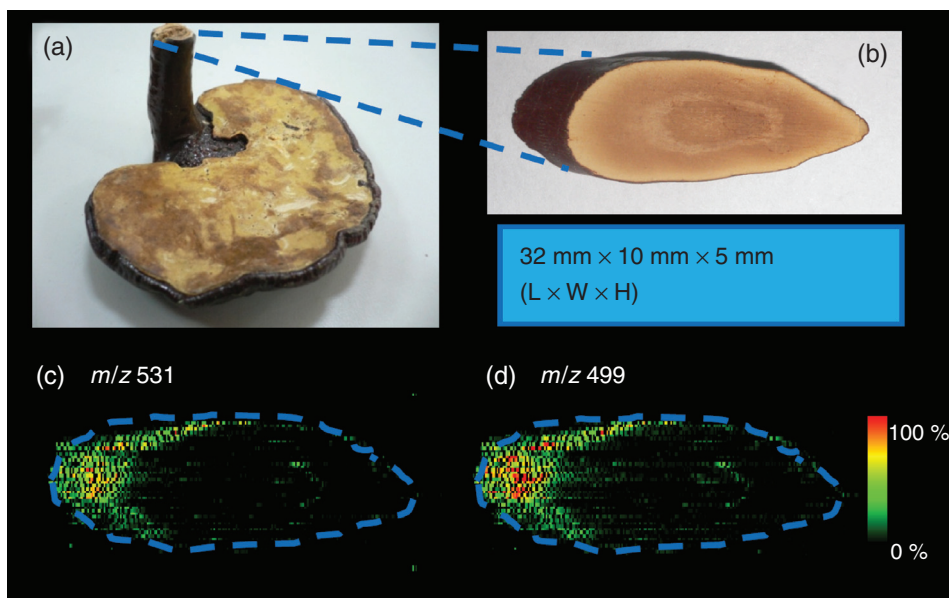


圖 9. 以 ELDI MS 分析靈芝組織切片，再依不同分子組成 m/z 所繪製之分子影像圖。

因化學反應的進行，即可獲得溶液中不斷改變組成的相關資訊。圖 10 所示為連續監測一環氧化學反應所得的結果。由圖 10 可看出在雷射開始照射溶液表面後，反應物的訊號就會出現。在添加了試劑雙氧水之後，反應物訊號雖因氣泡的產生而增加，但是仍然沒有生成物的訊號，直到溶液呈現鹼性後 (添加 NaOH)，馬上可以見到環氧化產物訊號的產生。

5. 質量分析器

ELDI 的游離過程中，主要是以 ESI 作為游離雷射所脫附之分子，因此在質量分析器方面，只要是配備有 ESI 游離源的市售質譜皆可裝設 ELDI 游離源。截至目前為止，我們已成功地將 ELDI 游離源裝設在四極柱、離子阱、三段式四極柱、四極飛行時間式以及傅立葉轉換式質量分析器上。

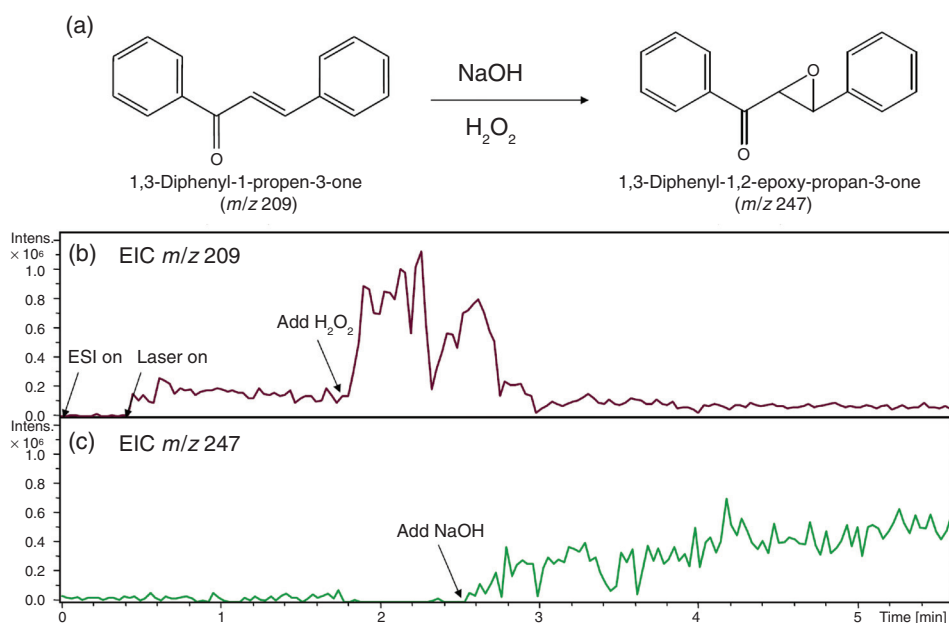


圖 10. 以 ELDI MS 連續監測環氧化反應之實驗結果。

四、結論

總結以上所述，電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀的特性有：(1) 游離是在大氣壓力、常溫下進行；(2) 在大多數情況下樣品並不需要任何製備程序，或僅需極簡單的製備過程；(3) 不論樣品是氣體、液體或是固體樣品都可以直接被分析；(4) 對於任何廠牌之質量分析器，只要具備有電噴灑游離源均可加裝此游離源；(5) 在操作儀器時，可改變之實驗參數較傳統之 ESI 或是 MALDI 要多，這已包括 ESI 溶液之組成、雷射之波長、頻率及能量，樣品平台之移動速率，以及樣品的狀態等。

電噴灑輔助雷射脫附游離質譜儀除了證實可以應用在各式乾燥生物體液及組織中含蛋白質及脂質的直接分析外，也可以應用在合成高分子、固態化學材料以及化學薄膜的成分分析。由於是在大氣壓力下進行分析，加上雷射可以聚焦到相當小的範圍，因此也可針對生物組織分子進行影像分析。

參考文獻

1. J. Shiea, M. Z. Huang, H.-J. Hsu, C. Y. Lee, C.-Y. Yuan, I. Beech, and J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19** (24), 3701 (2005).
 2. 謝建台, 化學, **65** (2), 63 (2007).
 3. 謝建台, 台灣質譜年會論文集 (92 年至 95 年), 484 (2007).
 4. S. Y. Lin, M. Z. Huang, H. C. Chang, and J. Shiea, *J. Proteome Res.*, **79** (22), 8789 (2007).
 5. M. Z. Huang, H. J. Hsu, J. Y. Lee, J. Jeng, and J. Shiea, *Anal. Chem.*, **5** (5), 1107 (2006).
 6. J. Shiea, C. H. Yuan, M. Z. Huang, S. C. Cheng, Y. L. Ma, W. L. Tseng, H. C. Chang, and W. C. Hung, *Anal. Chem.*, **80** (13), 4845 (2008).
 7. C. Y. Cheng, C. H. Yuan, S. C. Cheng, M. Z. Huang, H. C. Chang, W. L. Tseng, C. S. Yeh, and J. Shiea, *Anal. Chem.*, **80** (20), 7699 (2008).
 8. I. X. Peng, R. R. O. Loo, J. Shiea, and J. A. Loo, *Anal. Chem.*, **80** (18), 6995 (2008).
 9. M. Z. Huang, H. J. Hsu, C. I. Wu, S. Y. Lin, Y. L. Ma, T. L. Cheng, and J. Shiea, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21** (11), 1767 (2007).
-
- 謝建台先生為美國蒙大拿州立大學分析化學博士，現任國立中山大學化學研究所教授。
 - Jentaie Shiea received his Ph.D. in analytical chemistry from Montana State University, U.S.A. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Sun Yat-sen University.