

## 一、緒論

蛋白質有各種催化及生理機能，是細胞的主要工作機器，其功能乃源自蛋白質分子所具有的特定構形及催化活性；此種構形的形成，又因於組成蛋白質的胺基酸排列次序。各種長短的蛋白質有不同的胺基酸組成與排列，造就了多樣而多功的蛋白質繽紛世界。許多胺基酸連接在一起組成了蛋白質，因此蛋白質的性質基本上可由胺基酸的性質來推衍；但是因為一個個的胺基酸連成了長鏈，蛋白質的構造因此不但比較複雜，而且衍生出胺基酸所無法想像的次元與功能。蛋白質的一級構造就是其胺基酸的序列，早期是一個一個直接把 N-端的胺基酸切下來，再看是何種胺基酸，F. Sanger 如此定出了胰島素的序列，也得到他的第一個諾貝爾獎。

當蛋白質以水解方式打斷其鍵結將可得到胺基酸，它是構築這些巨大分子之基本單位。正如其名所示，胺基酸同時含有鹼性之胺基與酸性之羧基，因此它乃是具有酸性與鹼性之雙性分子（amphoteric molecules）。胺基酸具有極不尋常之高熔點，例如 glycine ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) 晶體之熔點約  $230^\circ\text{C}$ ，其結構相關化合物甲胺 ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{H}$ ) 與醋酸 ( $\text{H}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) 在室溫下卻分別為氣體與液體。高沸點乃因晶格中強靜電力之作用難被打斷之故，因

為 glycine 與大部分之胺基酸多以雙離子化之兩性離子存在，導致它們不像一般低分子量之有機物，反倒像無機鹽類。胺基酸之側鏈 (side chain, R) 也有可能被離子化而具有正 (或負) 電荷。其電荷種類決定於溶液之 pH 值，而這些側鏈也是決定胜肽或蛋白質之酸鹼性之因子。在生物系統中胺基酸屬於動態平衡，大部分胺基酸用於合成蛋白質，過剩部分則去胺，其碳骨架被氧化或轉化為碳水化合物及脂肪。而生物體中胺基酸、胜肽及蛋白質的質子化，或與金屬離子的鍵結是個非常重要的研究方向。實例：許多酵素或基因活化分子，都需要金屬離子參與其分子構造中：荷爾蒙受體 Glucocorticoid hormone receptor : [Cys-X-X-Cys]---Zn<sup>2+</sup> ；蛋白酶 Carboxypeptidase (metal protease) : [Glu-His-His]---Zn<sup>2+</sup>，近年來由於質譜儀離子源的進步，使得利用質譜分析生物分子的質子化，或生物分子與金屬之間的反應更為方便。

## 1.1 文獻探討

在許多生物分子中，金屬鍵結的區域和胺基酸性質或位置有很大的影響，例如： $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 或 $\text{Fe}^{2+}$ 金屬離子會優先鍵結在 histidine (His)、cysteine (Cys) 或 methionine (Met) 的殘基上，然而， $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 或 $\text{K}^+$ 金屬離子會與 aspartic acid (Asp) 和 glutamic acid (Glu) 殘基上的氧有顯著的鍵結【1】。這個選擇性主要是由於胜肽或蛋白質獨特的區域與金屬離子的鍵結所決定，但是也會因溶劑效應所影響【1】。直到 1981 年，Cooks 等人首先利用動力學方法研究質子親和力大小【2,3】，1987 年 Bojesen 首先以快速原子撞擊法 (Fast Atom Bombardment, FAB) 結合動力學方法，研究 20 種常見胺基酸之質子親和力，同時作者也將 20 種胺基酸之質子親和力相互比較 (表 1.1-a)。實驗結果發現，當質子化的位置是在  $\alpha$ -NH 時，結構會因偶極 (dipole) 之電荷誘導與側鏈相互反應，而使結構趨於穩定，相反地，當質子化的位置是在羧酸時，部分胺基酸 (如 Ser、Cys、Asp 和 Asn) 側鏈結構與羧酸位置因偶極 (dipole) 之電荷誘導相互反應，而使結構更加不穩定。至於 Arg、Lys、Gln 及 Glu，其質子化會在側鏈環上鹼基的位置上形成【4】。1990 年 Kimio Isa 等人，利用 3 KeV 的氬 (Ar) 快速原子撞擊槍 (FAB Gun)，且碰撞室氣體控制在  $2 \times 10^{-6}$  torr 下，研究胺基酸之質子親和力，結果發現，在

此環境之下，可以得到較強且乾淨的訊號，並將其結果置於表 1-1-b【5】。1986 年 Russell 等人首先利用 FAB/MS/MS 研究簡單胜肽與鹼金屬之間的鍵結關係，實驗結果發現，金屬半徑越大，其離子化相對強度越強，而金屬所需離子化電位越大與所形成的離子之相對強度就越弱，如圖 3.11 所示【6】。1993 年 Bojesen 再次利用快速原子撞擊法研究胺基酸分別與  $\text{Li}^+$  及  $\text{Na}^+$  之金屬親和力，並將所得之金屬化陽離子異二聚體叢聚離子 (heterodimer ion)  $\text{A}_1-\text{Na}^+-\text{A}_2$ ，以動力學方法來研究其金屬親和力大小，如表 1.1-c 所示【7】。1995 年 Wesdemiotis 等人利用快速原子撞擊法研究胺基酸與  $\text{Cu}^+$  之金屬親和力，並將所得之金屬化陽離子異二聚體叢聚離子  $\text{A}_1-\text{Cu}^+-\text{A}_2$ ，以動力學方法來研究其金屬親和力大小，如表 1.1-d 所示【8】。

到目前為止，已有相當多的研究致力於使用快速原子撞擊或電噴灑離子化 (Electrospray Ionization, ESI) 來探討在氣相中金屬離子和胜肽之鍵結作用【9-23】。在碰撞活化解離下，這些研究顯示了幾個金屬離子可能鍵結的位置，包含胺基酸的鹼基 (N-端或側鏈)【6,9】及羧基上的氧原子等【10-14】。由上敘結果可歸論，胜肽與金屬離子鍵結後，在碰撞活化解離下有兩個常見的特性：一、產生有用的主幹斷裂 (單分子斷裂)，二、斷裂胜肽中包含鹼基的位置。

表 1.1 胺基酸質子親和力及金屬親和力

胺基酸 \ 作者	Bojesen(a)	Isa(b)	Lias (a*)	Lias (b*)	Bojesen(c)	Wesdemiotis(d)
Arg	1	1	—	1	1	1
His	2	2	1	2	2	3
Lys	3	3	2	3	6	2
Gln	4	4	9	5	3	6
Trp	5	6	—	4	5	4
Glu	6	8	14	15	6	10
Pro	7	5	4	11	10	13
Asn	8	7	6	7	4	11
Tyr	9	9	3	8	8	8
Met	10	10	5	6	13	5
Phe	11	11	7	10	10	9
Ile	12	12	—	12	15	15
Thr	13	13	8	9	12	14
Leu	14	14	10	13	15	16
Asp	15	16	13	17	9	12
Val	16	15	11	16	17	17
Ser	17	17	12	13	14	18
Cys	18	18	16	18	18	7
Ala	19	19	15	19	19	19
Gly	20	20	17	20	20	20

※：(a) Bojesen, (b) Isa 以快速原子撞擊法，研究胺基酸質子親和力之大小。(a\*)(b\*) Lias 分別在 1984 及 1998 年以理論計算得到的胺基酸質子親和力大小。(c) Bojesen 以快速原子撞擊法，研究胺基酸與鈉金屬親和力大小。(d) Wesdemiotis 以快速原子撞擊法，研究胺基酸與亞銅金屬親和力大小。

## 1.2 研究動機

胺基酸、胜肽及蛋白質和不同金屬離子所形成的陽離子化錯合離子，引起學者的興趣，尤其是金屬離子與胺基酸之間的反應，因為他們在生化過程中常扮演許多重要的角色，例如：馬腎臟中的鎘結合物質 metallothionein (MT)，除了鎘之外，鋅及銅亦為結合的對象；其功能主要可能與細胞內金屬平衡有關【24】。研究發現，在許多生物程序中，金屬離子與胺基酸、胜肽或蛋白質鍵結後會使得結構更加安定，且金屬鍵結的區域與胺基酸有很大的影響，舉例來說： $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Cu^{+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  或  $Fe^{2+}$  金屬離子會優先鍵結在 histidine (His)、cysteine (Cys)、methionine (Met) 的殘基上，然而  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^{+}$  或  $K^{+}$  金屬離子會與 aspartate (Asp) 及 glutamate (Gln) 殘基上的氧有顯著的鍵結【25】。我們研究的目標為瞭解胺基酸質子親和力、金屬親和力及胺基酸與金屬離子在氣態中的鍵結情形，可做為爾後研究胜肽或蛋白質與金屬離子鍵結位置的參考。本實驗使用儀器的離子源為液態二次離子撞擊 (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS)，質量分析器為四極矩 (quadrupole) 之串聯質譜儀 (MS/MS) 來研究胺基酸 (A) 與質子 (H) 所得到  $[A+H]^{+}$  及  $[A_1+H+A_2]^{+}$  的錯合離子，並利用碰撞活化解離來獲得質子親和力之大小；同時實驗研究胺基酸與金屬離子 (M) 所產生  $[A_1+M+A_2]^{+}$ 、

$[A_1 + A_2 - H + M]^+$  及  $[A_1 + A_2 + MCl]^+$  的錯合離子，並以碰撞活化解離所得到的結果，來判斷胺基酸與金屬親和力之大小及胺基酸與金屬離子間鍵結的訊息。利用此儀器最主要的優點為：一、可分析高極性、熱不安定及低揮發性之化合物；二、操作簡單且只需少量的樣品，即可在極短的時間內得到良好的圖譜，因此液態二次離子撞擊法相當適合於胜肽及蛋白質樣品的質譜分析。在文獻中並沒有太多以串聯質譜儀分析真實生物分子與金屬鍵結之研究，而胜肽與蛋白質之基本單位：胺基酸，與金屬間親和力大小或金屬鍵結的研究也良莠不齊（表 1.1 所示）。於是，我們從胺基酸著手，包括：glycine、alanine、valine、serine、threonine、phenylalanine、tyrosine、aspartic acid、glutamic acid、glutamine、arginine、histidine、cysteine 和 methionine 等 14 種胺基酸，及金屬鹵化物：LiCl、NaCl、KCl、RbCl、CsI、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、SrCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub> 及 AgNO<sub>3</sub> 等，分別加以研究他們之間鍵結的差異。

## 二、實驗部分

### 2.1 儀器簡介【26】

本次實驗所使用的質譜儀器為英國 Fisons 公司所出產的 VG-Quattro 機型，此機型同時具有串聯質譜儀之功能。一部質譜儀的基本組成包括：入口系統 (inlet)、離子化室 (ion source)、質量分析器 (mass analyser) 及偵測器 (detector) 如圖 2.1 所示。此實驗所用之入口系統為直接插入偵測 (direct insert patrol, DIP)，離子化方法為快速離子撞擊法 (FIB) 或稱液態二次離子撞擊法 (LSIMS)，而質量分析器為三段式四極矩質量分析器，並以光倍增管為偵測器。

#### 2.1.1 離子化方法

本實驗所採用的離子化方式為液態二次離子撞擊法 (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS)，此一質譜儀的游離技術非常類似快速原子撞擊法。早在 1981 年 Dr. Micheal Barber 等人首先提出 FAB 方法【27】，他們是以 2~8 keV 的快速氬 (Ar) 原子撞擊到預先溶解在介質 (matrix) 中的固態樣品表面上，在此能量粒子濺射 (sputtering) 過程，質譜中常形成高靈敏的假分子離子 (pseudo-molecular ion) 分別是正離子質譜中的  $[M+H]^+$  和負離子



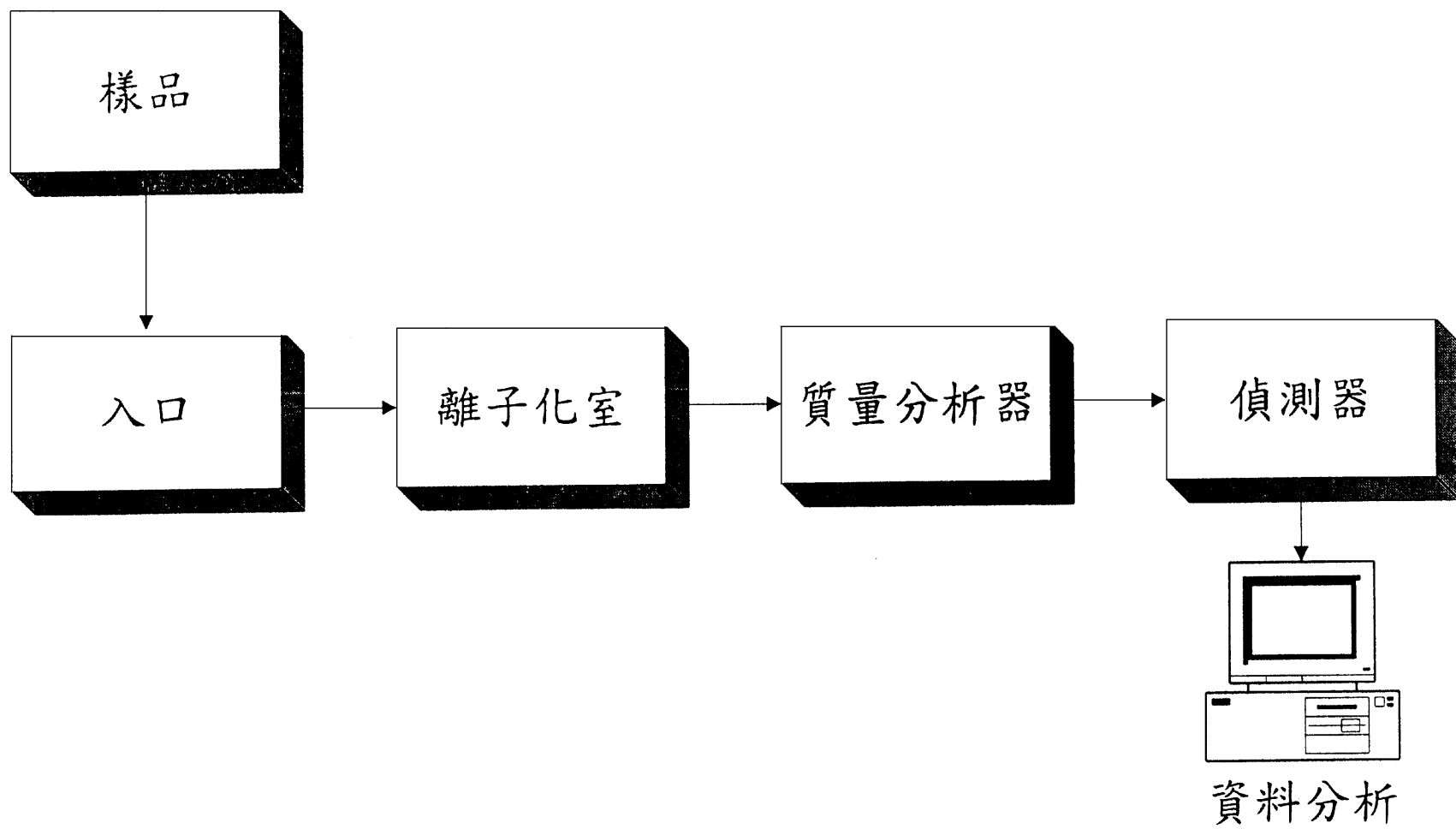


圖 2.1 質譜儀基本組件

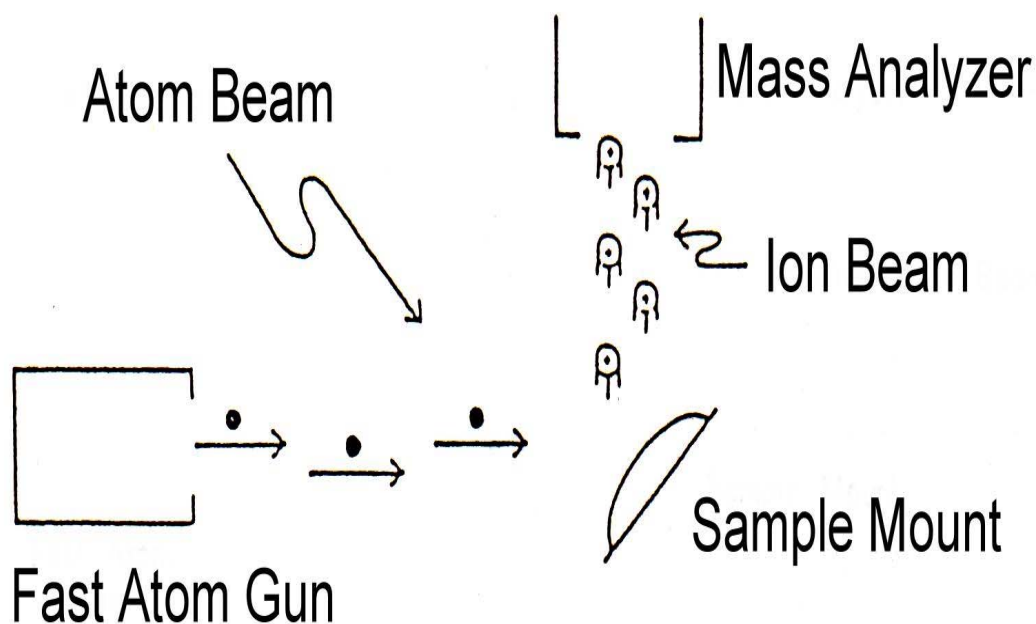
質譜中的[M-H]<sup>-</sup>【28,29】。其中 2~8 keV 的一級 Ar 原子束，最初是來自陽極所釋放出的 Ar 離子，經電場加速到一定能量（2~8 keV）後通過 10<sup>-3</sup>-10<sup>-4</sup> torr Ar 氣體碰撞室，在碰撞室中，快速 Ar<sup>+</sup>會與 Ar 氣體進行電荷交換，且電荷交換過程幾乎沒有能量的損失，此現象可簡單的表示如下：



因此，產生了具有與初始等能量（2~8 keV）的 Ar<sup>+</sup>及 Ar 兩種成份之能量粒子，其中 Ar<sup>+</sup>成份可經由簡單電場而偏離之，最後得到 2~8 keV 的 Ar 原子則由 FAB 槍內射出。高能原子以約 60°~70°角度撞擊探針（probe）金屬面上的樣品，產生最佳的分析效果，如圖 2.2 所示。目前質譜儀上使用的 FAB 離子源大概分為 3 keV 的 Ar 原子槍【27,29】和 10 keV 的氙（Xe）原子槍【30,31】。一般而言，分子量越大、能量越高的離子源對分析效果也越好，故時下最常用的 FAB 離子源為 10 keV 的 Xe 原子槍。

1986 年 Falick 等人新發展的 LSIMS 乃使用 20 keV 的銫（Cs<sup>+</sup>）離子槍為離子源【32】。他們將 LSIMS 離子源與標準的 Kratos MS-50

(a)



(b)

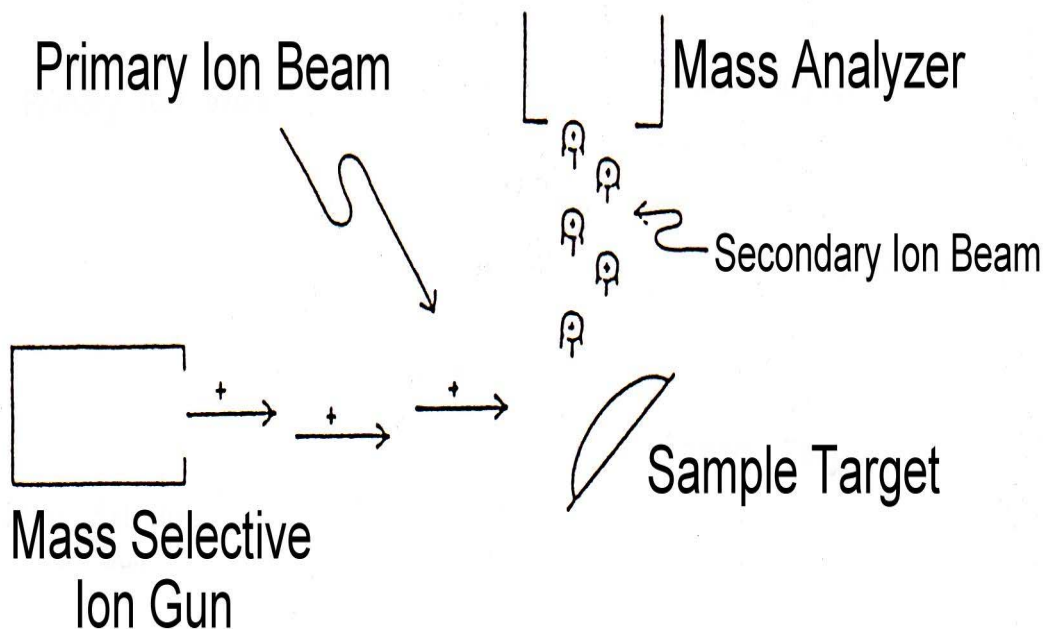


圖 2.2 (a)快速原子撞擊 (FAB) 離子源之構造  
(b)快速離子撞擊 (FIB&LSIMS) 離子源之構造

FAB 離子源 (Xe) 比較結果，提出 LSIMS 離子源具有改良的高電位場 (20 keV)，及機械式的 Cs<sup>+</sup> 離子槍正電流調節器以及更有效率的二次離子聚焦菱鏡。他們在分析樣品時發現，質譜中假分子離子 (AH<sup>+</sup> 或 A+Na<sup>+</sup>) 的最大強度均以 LSIMS 技術所得的效果為佳。

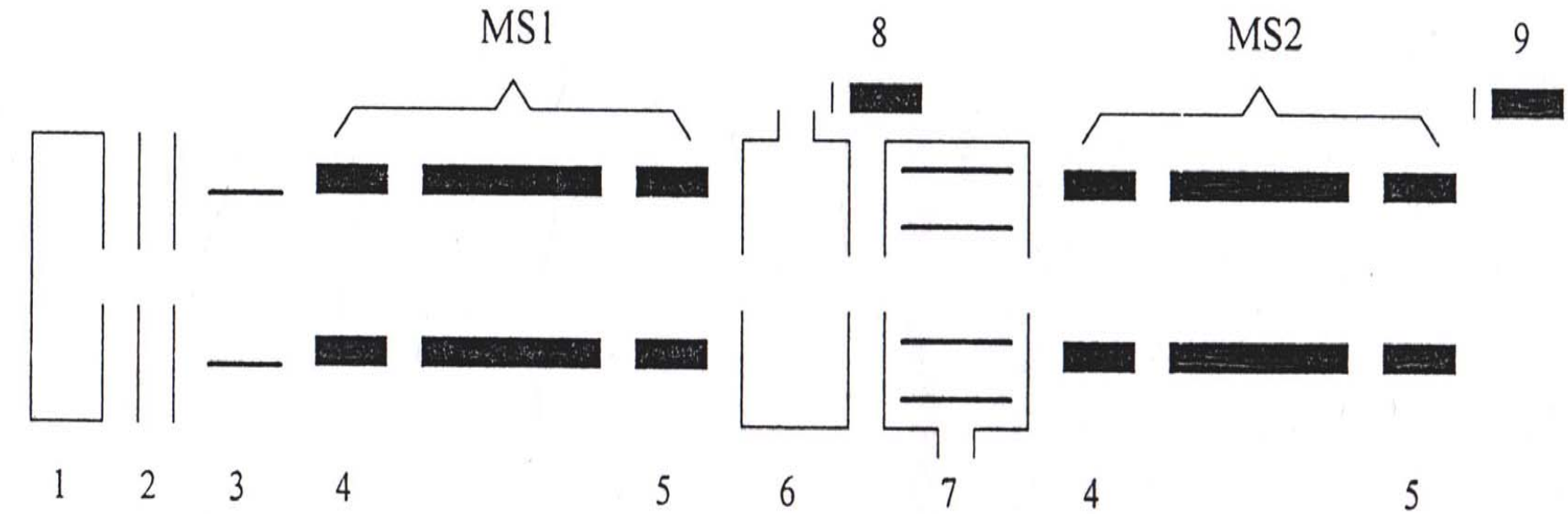
本實驗所採用的離子化方法是 LSIMS，其原理是加 10 keV 的電壓於一塊含有銫鋁矽酸鹽 (cesium alumina silicate) 的鹽片上，使其產生銫離子當作一級離子 (primary ion)，撞擊樣品的表面，經由一次離子所傳遞之能量，部分會被樣品內部的質子接受，內部的原子可以自由移動，從原來所在的晶格位置移動到其他地點，造成晶格破壞 (lattice damage) 和原子混合 (atomic mixing) 等改質 (material modification) 效果。所以被撞離原始位置的樣品內部原子，若具有足夠的能量，將啟動類似階式碰撞動作，並將其稱為反跳原子 (recoil atom)，能量累積大到足以克服表面束縛能 (surface binding energy)，因此得以碎裂而濺射脫離樣品表面。除了產生質子和電子外，濺射粒子 (sputtering particles) 中極大多數是中性，不帶任何電荷，其中有部分在激發態，只有少部分帶正 (負) 電荷的離子，這些離子稱為二次離子；利用鏡片加速銫離子撞擊樣品所產生的二次離子，再以 11 keV 的能量使二次離子聚焦並加速，增加圖譜的訊號強度。

實驗證明 LSIMS 通常優於傳統的 FAB，因為：第一、它可以得

到較佳的訊號強度。第二、是樣品存在的時間較傳統的快速原子撞擊法久，而且銫離子束會比中性的 Ar 原子容易控制強度、能量、和聚焦，因為只要控制電壓就可以改變整個離子束的流通量(flux)。第三、可以降低整個離子化室的污染，尤其是離子化室的狹縫(source slit)，因為整個離子化室不會有過多的 Ar 存在而需要常常清洗。第四、離子槍可以被緊密的包在離子化室中，且不需要額外的空間。第五、銫離子槍的離子化式壓力較低，因為銫離子槍的離子源不需要導入 Xe 氣體，故離子化室具有較高的真空度，而增進分析的靈敏度。例如，以血管舒緩激態 (MetLys-bradykinin) 為樣品時，二級離子游離法以 0.1  $\mu\text{A}$  激發銫離子槍，使樣品離子化時所得的訊號是傳統的快速原子撞擊法以 40  $\mu\text{A}$  激發 Ar 原子使樣品離子化時所得訊號的兩倍。以 1 $\mu\text{A}$  激發銫離子槍則是傳統快速原子撞擊法的五倍。將樣品離子化時所得的訊號強度與樣品被離子化的持續時間相乘積，則液態二級離子游離法是傳統快速原子撞擊法的 10-20 倍【33】。

### 2.1.2 三段式四極矩串聯質譜儀 (triple quadrupole tandem mass spectrometry)

三段式四極矩質譜儀是將三個四極矩串聯起來，第一段及第三段四極矩質譜儀為質量分析器，第二段為碰撞室組合而成的，如圖 2.3。利用改變  $V_{dc} / V_{rf}$  值可以在第一段四極矩中選擇從離子源射出的離子，只讓所選取特定之離子通過到達第二段四極矩，在第二段四極質譜儀中控制  $V_{dc} = 0$  只掃描  $V_{rf}$ ，通過碰撞氣體，再利用第三段四極矩質譜儀掃描，即可得到串聯質譜圖。而串聯質譜 (MS/MS) 技術的觀念最早可追溯到 1913 年，Thomson 發現可用帶正電的離子於磁場中產生不同的拋物線而分離時，即已發現帶電的離子在進入磁場前，可能會與儀器中的氣體發生碰撞而產生電荷或質量的變化，因此形成第二級質譜 (secondary spectrum) 【35】，即得到目前通稱的間穩離子 (metastable ion)，會造成圖譜判斷上的困難，而解決的方法，就是提高儀器的真空度。直到 1945 年 Hipple 和 Condon 觀察並由質譜中所得到的間穩離子來解釋離子的斷裂途徑，MS/MS 的技術才慢慢的被開發出來。在 1960 年代以後，儀器的發展分為兩部分，一是在扇型質譜儀器介入加速電壓掃描 (accelerating voltage scan)，或在飛行時間質量分析器上加上阻撓柵



1 Ion Source  
 2 Focussing Lenses  
 3 Entrance Filter

4 Pre-filter  
 5 Post-filter  
 6 Altrincham Lenses

7 Hexapole Collision Cell  
 8 Detector 1  
 9 Detector 2

圖 2.3 VG Quattro 三段式質譜儀之構造

(retarding grid) 和 漂浮空間 (drift space)，以分離間穩離子及穩定離子 (stable ion) 【36】；另一個發展為通入碰撞氣體進入質譜儀中以增加間穩離子的量及強度。像這種利用碰撞氣體將能量轉移至分子離子，使其裂解成較小離子的方式，即所謂的碰撞活化解離 (CAD)，也有人稱為碰撞誘導解離 (Collision Induced Dissociation, CID)，這也是我們實驗所使用的方法。在這之前，CAD 技術都是用來探討物理現象解釋方面，直到 1973 年，Cooks 等人【37】出版 metastable ion 一書之後，才將 MS/MS 的應用由間穩離子進行物理有機的探討，延伸到分析化學上的應用。近 20 年來，MS/MS 的應用已發展到同分異構物離子的結構鑑定及混合物的定性及定量分析；MS/MS 用於微量分析 (trace analysis) 上相當靈敏，對於複雜的混合物，如尿素、血液、動物或植物組織的萃取液、或環境樣品分析的偵測極限 (limit of detection) 可以到十億分之一 (parts per billion) 或兆分之一 (parts per trillion) 以下。



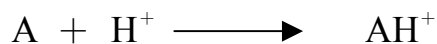
### 2.1.3. 收集圖譜的方式

圖譜收集的方式為子離子掃描 (daughter ion scan)，也就是在第一段質譜儀 (MS1) 設定一個母離子 (parent ion) 之質荷比 ( $m/z$ )，只讓它通過。當母離子進入通以碰撞氣體 (collision gas) 的碰撞室 (collision chamber) 時，欲分析之離子因撞擊此撞擊氣體，而使離子的動能因碰撞轉換成內能，離子因內能的增加而激發並斷裂成較小離子，這種裂解過程稱為碰撞活化解離，斷裂的離子就由串聯質譜儀的第二段質譜儀 (MS2) 掃描，而得到碰撞活化解離質譜圖。因此，子離子掃描常用於鑑定母離子的結構。

當樣品被離子化後，在第一段質譜儀中會有許多種母離子可以被選擇。若是選擇  $[A_1 + M]^+$  為母離子進行子離子掃描的步驟，其目的是找出錯合離子中胺基酸與金屬鹵化物離子間作用力的形式。若是選擇  $[A_1 + M^{2+}X^-]^+$ 、 $[A_1 - H + M^{2+}]^+$ 、 $[2A_1 + M]^+$ 、 $[2A_1 + M^{2+}X^-]^+$  及  $[2A_1 - H + M^{2+}]^+$  等為母離子進行子離子掃描的步驟，其目的是比較胺基酸單體與金屬氯化物單價離子、離子團的作用力或是比較胺基酸二聚體與金屬氯化物單價離子、離子團的作用力。比較不同胺基酸單體和金屬氯化物單價離子或離子團的相對親合力強度，則必須選擇  $[A_1 + A_2 + M]^+$ 、 $[A_1 + A_2 + M^{2+}X^-]^+$  或  $[A_1 + A_2 - H + M^{2+}]^+$  為母離子進行子離子掃描的步驟。

#### 2.1.4. 質子親和力 (Proton Affinity, PA)

質子親和力 (PA) 可以下列反應式定義：

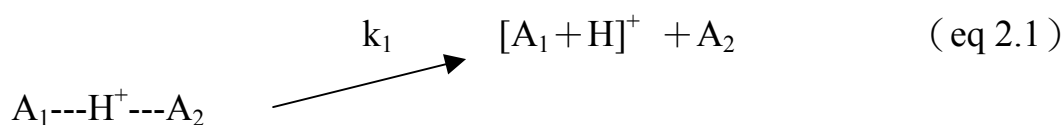


則  $PA = -\Delta H = -\{\Delta H_f(AH^+) - \Delta H_f(H^+) - \Delta H_f(A)\}$

即 A 得到一個質子的反應熱  $\Delta H$ 。而測量質子親和力的方法，可分為絕對的質子親和力及相對的質子親和力，絕對的質子親和力主要為熱化學循環 (thermochemical cycle) 而相對的質子親和力可以 Equilibrium constant、Bracketing 及 Kinetic method 等方法求得。本實驗是以動力學方法 (Kinetic method) 研究胺基酸與質子或金屬間親和力之關係，故在 2.1.5 中對動力學方法加以詳述。

#### 2.1.5. 動力學方法 (kinetic method) 【4,38】

1981 年，Cooks 等人首先利用動力學方法研究質子親和力大小，而動力學方法的基本原理是假設兩種不同胺基酸單體 ( $A_1, A_2$ ) 和質子 ( $H^+$ ) 或金屬離子 ( $M^+$ ) 形成的異二聚體叢聚離子  $[A_1 + H + A_2]^+$  或  $[A_1 + M^+ + A_2]^+$ ，並藉由碰撞活化解離的方式，異二聚體叢聚離子會斷裂成含有質子或金屬的單體，而斷裂途徑會行兩種不同裂解方向進行，並且只有單分子裂解 (unimolecular dissociation)，而沒有其他斷裂下，記錄裂解後的產物，如 eq 2.1 及 eq 2.2。



從轉換狀態 (transition state) 理論 (eq 2.3), 可得到分解的速率常數 (rate constant)。

$$k = (RT_{\text{eff}}/h) (Q^*/Q) e^{-\varepsilon_0/RT_{\text{eff}}} \quad (\text{eq 2.3})$$

R = 氣體常數

h =

$T_{\text{eff}}$  = 二聚體分解時的溫度 (effective temperature)

Q = 基態的 partition function

$Q^*$  = 激發態的 partition function

$\varepsilon_0$  = 反應活化能 (activation energy)

將 eq 2.3 應用到競爭反應 eq 2.1 及 eq 2.2; 因為路徑 eq 2.1 及 eq 2.2

活化能的差異, 可表示為  $\Delta \varepsilon_0$ 。

$$\ln(k_1/k_2) = \ln(Q_1^*Q_2/Q_2^*Q_1) + \Delta \varepsilon_0/RT_{\text{eff}} \quad (\text{eq 2.4})$$

此兩種路徑如來自於相同的反應離子, 即  $[A_1+H+A_2]^+$  或  $[A_1+M^++A_2]^+$

時， $Q_1 = Q_2$ 。假如 $[A_1 + H + A_2]^+$ 或 $[A_1 + M^+ + A_2]^+$ 只是鬆散的鍵結，且為簡單的斷裂（eq 2.1 及 eq 2.2）時，可將 $\Delta PA$ （Proton Affinity）或 $\Delta M^+A$ （Metal ion Affinity）視為 $\Delta \varepsilon_0$ ，即可得到 eq 2.5:

$$\ln(k_1/k_2) = \ln(Q_1^*/Q_2^*) + \Delta PA/RT_{\text{eff}} \quad (\text{eq 2.5})$$

eq 2.5 中  $\ln(Q_1^*/Q_2^*)$  相當於  $\Delta T_{\text{eff}}(\Delta S_{H^+}^0)$ ，同樣地， $A_1$  與  $A_2$  如果為相同物種的化學品時， $\Delta S_{H^+}^0$  趨近於零，且  $Q_1^* \doteq Q_2^*$ ，並可將方程式簡化成 eq 2.6：

$$\ln(k_1/k_2) \doteq \Delta PA/RT_{\text{eff}} \quad (\text{eq 2.6})$$

$A_1$  與  $A_2$  競爭質子的速率常數比率 ( $k_1/k_2$ ) 即為  $[A_1 + H]^+ / [H + A_2]^+$  訊號強度的比值。簡單的說，測量動力學的方法是根據 eq 2.1 及 eq 2.2 的相對速率。並且有兩項條件：第一項、異二聚體叢聚離子  $[A_1 + H + A_2]^+$  或  $[A_1 + M + A_2]^+$  解離時，基本性質相同的胺基酸會互相競爭吸引質子或金屬離子，而且是在相同的裂解頻率下。第二項、異二聚體叢聚離子解離時，裂解的方式是簡單的斷裂。反應進行時，逆向反應的活化能應該是零或者是非常小。裂解的速率和方向是由兩種不同方向的相對活化能差值所決定，如圖 2.4。異二聚體叢聚離子裂解的速率越大，產生子離子  $[A_1 + H]^+$  或  $[A_2 + H]^+$

的量越大。子離子的相對含量顯示金屬離子對胺基酸作用力的大小；  
越弱的鍵，裂解越快，所得到的訊號越大。

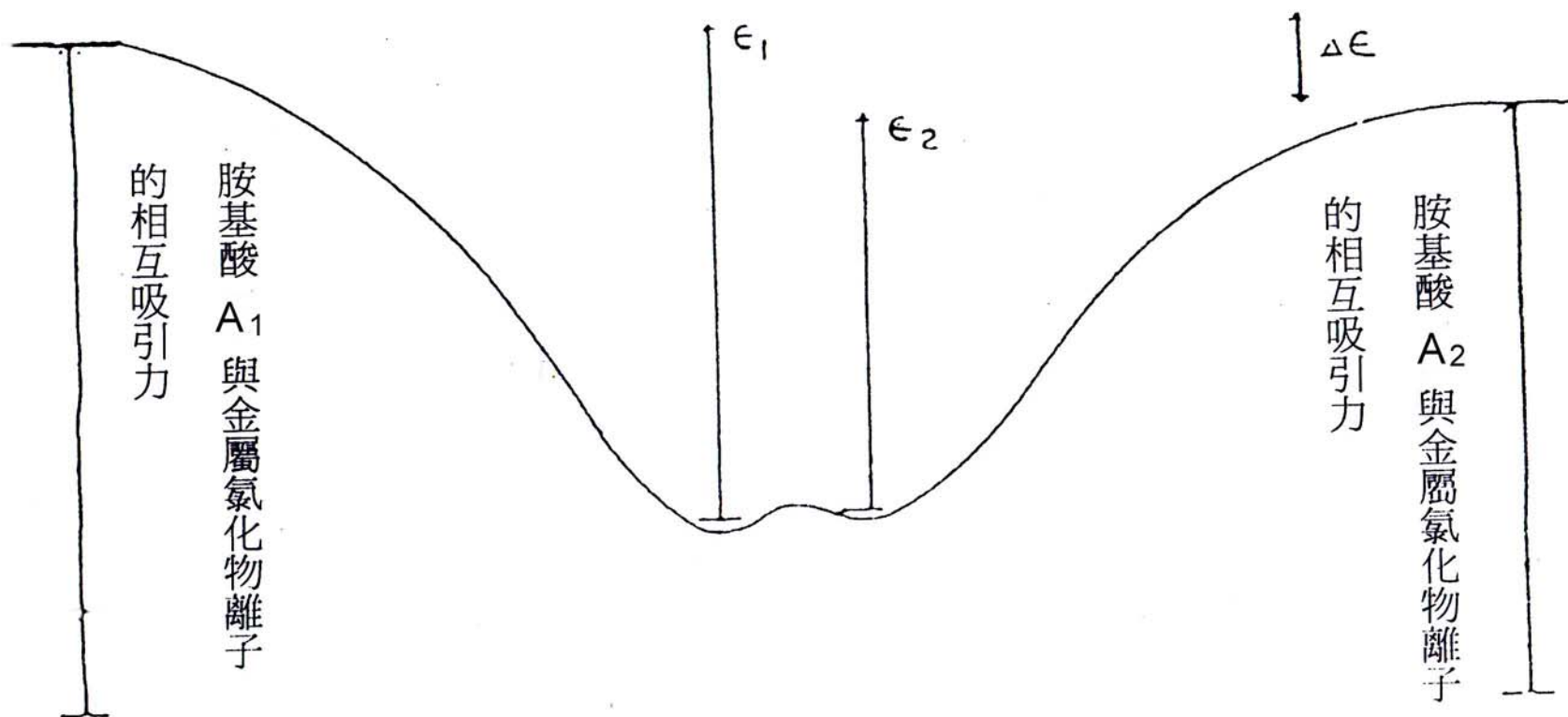
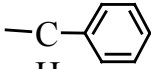
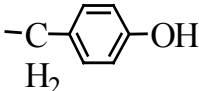
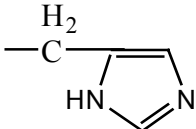


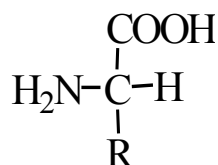
圖 2.4 兩種不同胺基酸與金屬氯化物離子形成錯和離子，生成與解離的熱力學位能圖

## 2.2 胺基酸的結構與分類

我們選擇烷基、芳香族、酸性、鹼性及含硫之胺基酸，以比較不同類型胺基酸對質子或金屬之間的錯和反應加以研究。

Class	Abbreviation	R group
<b>Aliphatic</b>		
(1) glycine	Gly (G)	-H
(2) alanine	Ala (A)	-CH <sub>3</sub>
(3) valine	Val (V)	-CH-CH <sub>3</sub>   CH <sub>3</sub>
(4) serine	Ser (S)	-CH <sub>2</sub> -OH
(5) threonine	Thr (T)	-CH-CH <sub>3</sub>   OH
<b>Aromatic</b>		
(6) phenylalanine	Phe (F)	-C-  H <sub>2</sub>
(7) tyrosine	Tyr (Y)	-C-  H <sub>2</sub>
<b>Acidic&amp;Amide</b>		
(8) aspartic acid	Asp (D)	-CH <sub>2</sub> -COOH
(9) glutamic acid	Glu (E)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
(10) glutamine	Gln (Q)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
<b>Basic</b>		
(11) arginine	Arg (R)	$\begin{array}{ccccccc} & \text{H}_2 & & \text{H}_2 & & \text{H}_2 & \text{H} \\ &   & &   & &   &   \\ -\text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{N} & - & \text{C} & - & \text{NH}_2 \\ & & & & & &    & & & & \\ & & & & & & \text{N} & & & & \text{H} \end{array}$
(12) histidine	His (H)	-C- 
<b>Sulfur-containing</b>		
(13) cysteine	Cys (C)	-CH <sub>2</sub> -SH
(14) methionine	Met (M)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>

※ :



## 2.3 樣品與試藥

1. Deionized Water (去離子水)
2. Glycerol ( $C_3H_8O_3$ ) Aldrich 公司產品
3. Thio-glycerol ( $C_3H_7OSH$ ) Aldrich 公司產品
4. Lithium Chloride ( $LiCl$ ) Aldrich 公司產品
5. Sodium Chloride ( $NaCl$ ) Aldrich 公司產品
6. Potasium Chloride ( $KCl$ ) Aldrich 公司產品
7. Rubidium Chloride ( $RbCl$ ) Aldrich 公司產品
8. Cesium Iodide ( $CsI$ ) Aldrich 公司產品
9. Magnesium Chloride ( $MgCl_2$ ) Aldrich 公司產品
10. Calcium Chloride ( $CaCl_2$ ) Aldrich 公司產品
11. Strontium Chloride ( $SrCl_2$ ) Aldrich 公司產品
12. Barium Chloride ( $BaCl_2$ ) Aldrich 公司產品
13. Iron Chloride ( $FeCl_3$ ) Aldrich 公司產品
14. Cobalt Chloride ( $CoCl_2$ ) Aldrich 公司產品
15. Nickel Chloride ( $NiCl_2$ ) Aldrich 公司產品
16. Copper Chloride ( $CuCl_2$ ) Aldrich 公司產品
17. Silver Nitrate ( $AgNO_3$ ) Aldrich 公司產品
18. Glycine ( $C_2H_5NO_2$ ) Lancaster 公司產品



19. Alanine ( $C_3H_7NO_2$ )	Lancaster 公司產品
20. Valine ( $C_5H_{11}NO_2$ )	Lancaster 公司產品
21. Serine ( $C_3H_7NO_3$ )	Lancaster 公司產品
22. Threonine ( $C_4H_9NO_3$ )	Lancaster 公司產品
23. Phenylalanine ( $C_9H_9NO_3$ )	Lancaster 公司產品
24. Tyrosine ( $C_9H_{11}NO_3$ )	Lancaster 公司產品
25. Aspartic acid ( $C_4H_7NO_4$ )	Lancaster 公司產品
26. Glutamic acid ( $C_5H_9NO_4$ )	Lancaster 公司產品
27. Glutamine ( $C_4H_{10}N_2O_3$ )	Lancaster 公司產品
24. Arginine ( $C_6H_{14}N_4O_2$ )	Lancaster 公司產品
23. Histidine ( $C_6H_9N_3O_2$ )	Lancaster 公司產品
24. Cysteine ( $C_3H_7NO_2S$ )	Lancaster 公司產品
25. Methionine ( $C_5H_{11}NO_2S$ )	Lancaster 公司產品

## 2.4.實驗條件

### 2.4.1 介質 (matrix) 的選擇與樣品製備

操作 LSIMS 實驗時，首先需將樣品溶解於揮發性低的溶劑或介質中，同時固定於金屬探針 (probe) 上，因此，LSIMS 實驗是否有效偵測到分析物的特性離子，主要取決於分析物之介質的正確選擇【39,40】。我們也清楚知道分析物與介質的物理及化學性質將密切影響到分析物的離子化效率；對於某類特定化合物必有其最適用的介質，故 LSIMS 實驗的完善，第一步是正確選擇溶解分析物之溶劑或介質才能在質譜中得到高產率的分析物特性離子。有關介質的選用則須考慮到最基本的兩個條件：一、分析物必須與介質互溶。二、形成的分析物特性離子相對於使用的介質必須具有穩定性【41】。

我們對胺基酸在 LSIMS 研究中得知，分析物與介質得正確結合才可得到高產量的分析物離子。有關介質的一些重要物理性質【42】如下：一、介質的蒸氣壓 (vapor pressure, v.p.)，當介質具有較低的蒸氣壓時，所形成的總離子電流越小，可維持在金屬探針上的持續性越久，故取得質譜的時間越長。二、介質的黏滯性 (viscosity) 及擴散係數 (diffusion constant)，兩者都直接影響到分析物傳送至液態介質表面的速率，導致樣品有不同的表面活性，其中，介質的黏滯性還關係到液態樣品在金屬探針上的下垂程度。三、介質的分子量

(molecular weight)，藉此，我們可明瞭介質形成在質譜中背景離子的干擾位置。四、介質的偶極距 (dipole moment)，其將影響介質對分析物的溶解性與介質對離子的溶合作用。五、介質的介電常數 (dielectric constant)，此則影響溶劑中離子對的存在。六、介質的熔點 (m.p) 及沸點 (b.p)，它可指示介質的液態範圍。綜觀以上六點，我們為了增進實驗的效率，故在表 2.3 列出三種 LSIMS 實驗時常用之介質 (甘油、硫代甘油、間硝基苯甲醇) 的一些物理性質，以供我們對介質選用及質譜分析時的參考。另外，使用介質的優點是，在介質內部的樣品，會不停的擴散至表面，更新樣品，使得樣品的質譜訊號不致於中斷。良好的介質通常具備：低的揮發性、高的穩定度、即不易與樣品發生反應及安全無毒等特性【43】。

實驗中發現，以丙三醇 (Glycerol, G) 為介質是最佳的選擇，因為丙三醇比另一常用的介質硫代甘油 (Thioglycerol, Tg) 可維持較久的質譜訊號，而間硝基苯醇 (3-nitrobenzyl alcohol, NBA) 與胺基酸的互溶性低。另為最適當的樣品與介質體積比約為 1:1 或 2:1 之間，因為，如果介質量太多，質譜圖將出現較大的化學雜訊 (chemical noise) 或是化學干擾 (chemical background)【44】；同樣的，如果樣品量太多，則在抽真空時介質將很容易揮發殆盡。

表 2.1 甘油 (G)、硫代甘油 (Tg) 及間硝基苯醇 (NBA) 的物理性質

性質\基質	G	Tg	NBA
分子量	92.09	108.16	153.14
蒸氣壓	1.287×10 <sup>-4</sup> torr(23°C) 20 torr(182°C) 4 torr(147.87°C)	5 torr(118°C)	3 torr(180°C) 1.9 torr(80°C)
沸點	290°C	118°C	175-180°C
溶點	20°C		30-32°C
擴散係數	1.37×10 <sup>-8</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> (20°C)		
黏滯度	19.9 cp(20°C) 9.13 cp(40°C)		13.5 cp(25°C)
偶極距	2.63 D(cal) 2.68 D(obs)		
介電常數	42.5		

※: (obs):觀測值

#### 2.4.2. 二次質譜的實驗條件設定

在二次質譜圖 (MS/MS) 的取得上，所使用的碰撞氣體 (collision gas) 為 Ar，經過數次的實驗測試後發現，當 Source pressure 及 Analyser pressure  $< 2.0 \times 10^{-6}$  mbar、Inlet pressure  $< 5.0 \times 10^{-3}$  mbar、gas cell pressure 保持在  $1 \times 10^{-4}$  mbar 左右、Probe Temperature =  $30^\circ\text{C}$ 、陽極電位 (anode) = 11 keV 及碰撞能量 (collision energy) 定為 100 eV，以子離子掃描方式 (daughter ion scan) 可以取得最佳的二次質譜圖。若碰撞能量太高或碰撞氣體的壓力太大，則斷裂的訊號會被雜訊所覆蓋；若碰撞能量太低或碰撞氣體壓力太小時，則母離子的斷裂訊號會顯著地降低，而無法得到完整的二次質譜圖。

### 三、結果與討論

#### 3.1 氣態下胺基酸質子親和力大小的探討

##### 3.1.1 質譜條件的建立

利用質譜儀進行胺基酸之質子親和力測試，首先必須對液態二次離子質譜分析中介質的選擇，求其最佳的條件。而介質的選擇必須考慮其和樣品混和均勻度、樣品訊號出現的強弱（圖 3.1）、訊號留存時間的長短（圖 3.2）、是否干擾欲偵測的質量範圍或離子峰，以及介質本身提供及接受質子的能力，是否影響樣品質子化分子離子的產生【45】等因素。

由於胺基酸皆溶於水，故選用較為極性介質：硫代甘油（Thioglycerol, Tg）及甘油（Glycerol, G）進行實驗，並觀察比較。

由實驗結果發現使用 G 為介質所形成質子化離子 $[A_1 + H]^+$ 、 $[A_2 + H]^+$ 、 $[A_1 + H + A_2]^+$ 及總離子數（Total Ion Count, TIC）皆大於使用 Tg 為介質（圖 3.3、3.4）。使用 Tg 為介質時可得到極強的  $AH^+$  離子峰且亦可觀察到叢聚離子的訊號，其歸因於 Tg 具有較酸性的-SH 官能機，在離子化過程中極易提供  $H^+$  到分析物上；雖 Tg 的黏滯度小，樣品會具有較高的表面活性及 Tg 的高揮發性可促使能量粒子在揮發過程中有大量離子產生，基於以上諸多因素雖可造成質譜中產生較強

(a)

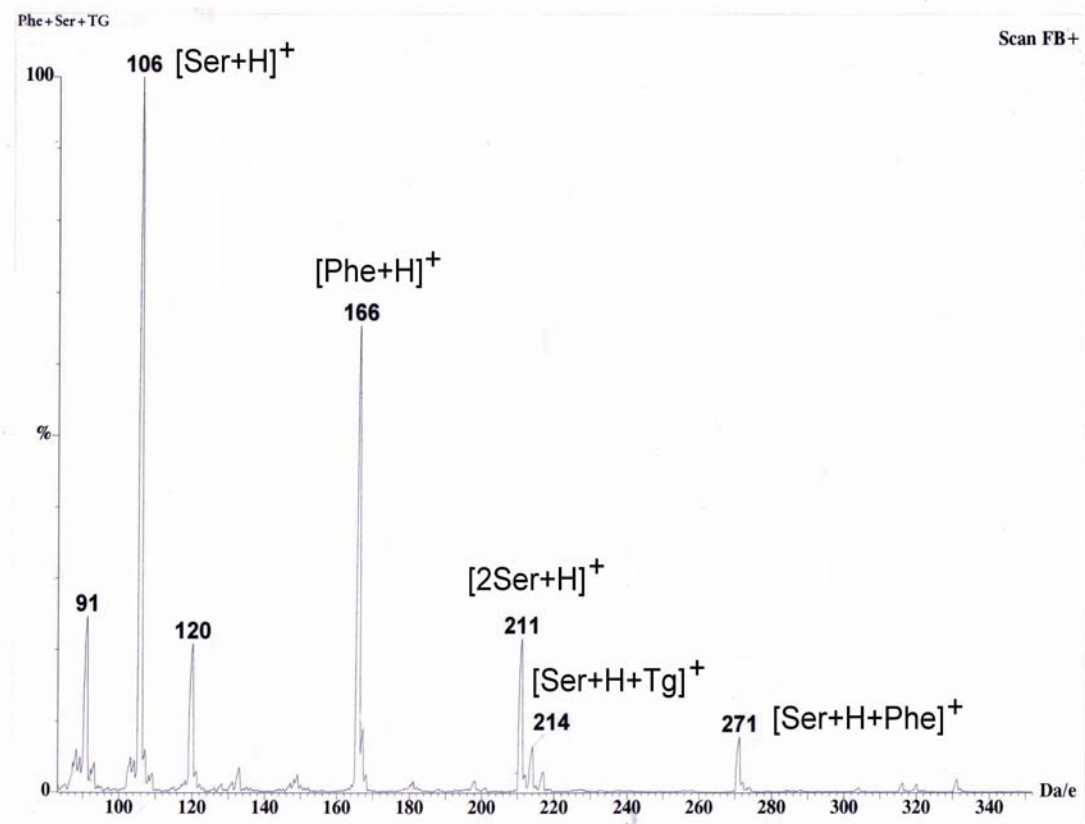
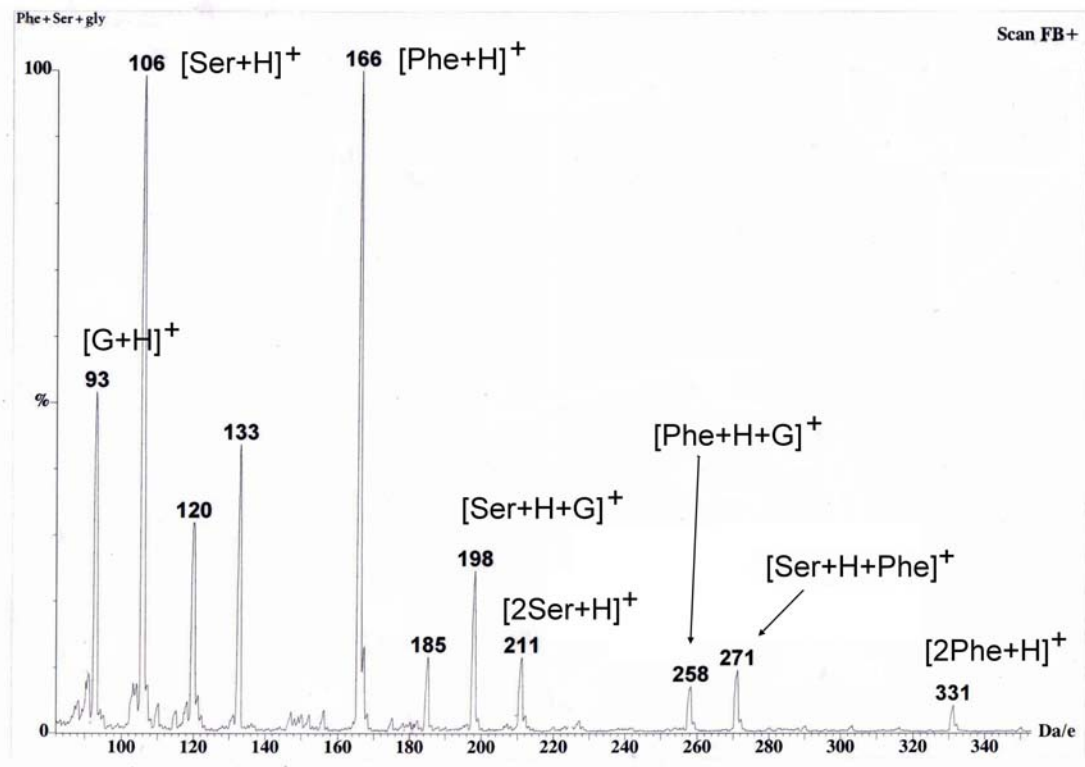


圖 3.1 (a)以 G 及 Tg 為介質，在實驗時間 30 秒時所得的訊號強度

(b)

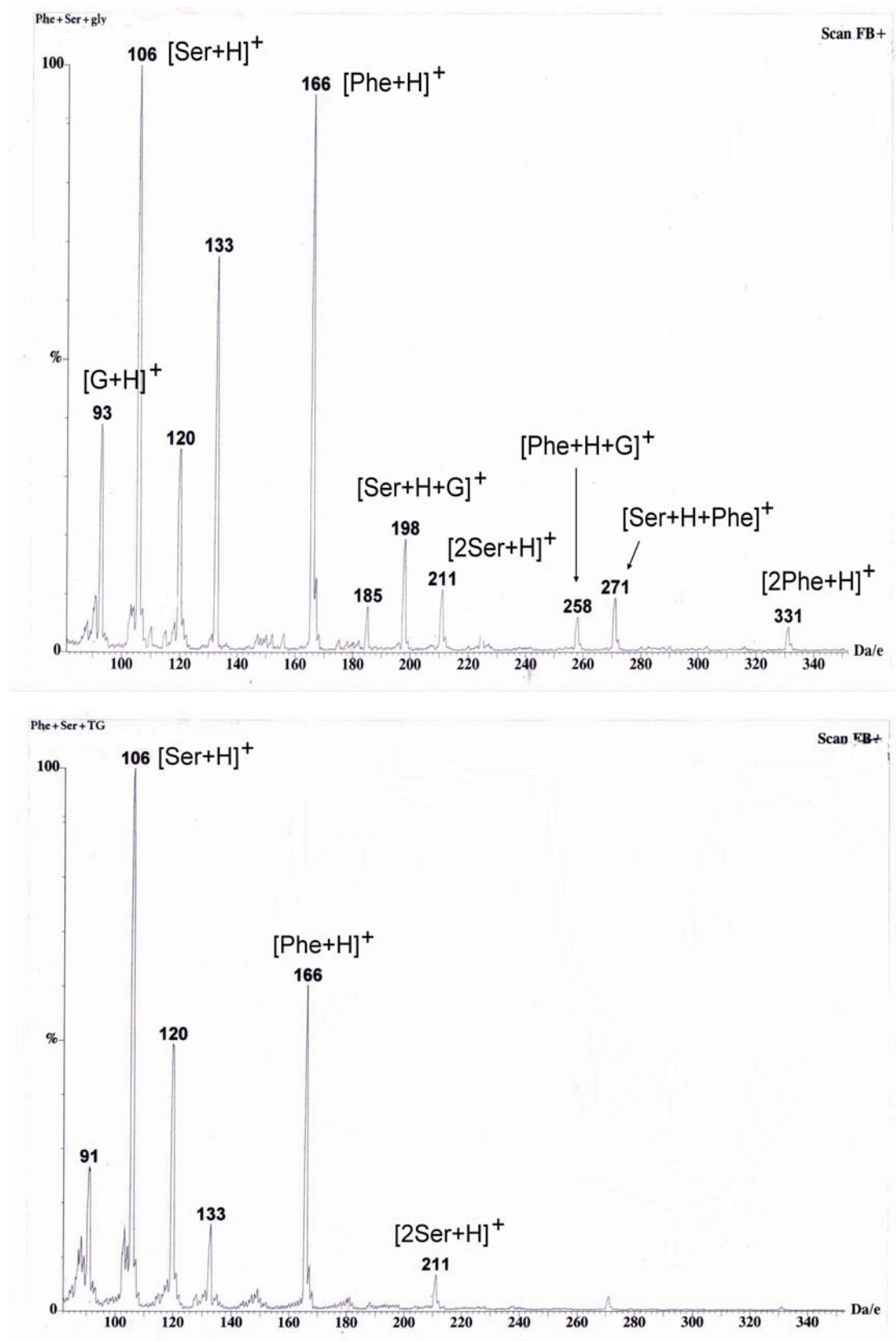


圖 3.1 (b)以 G 及 Tg 為介質，在實驗時間 120 秒後所得的訊號強度



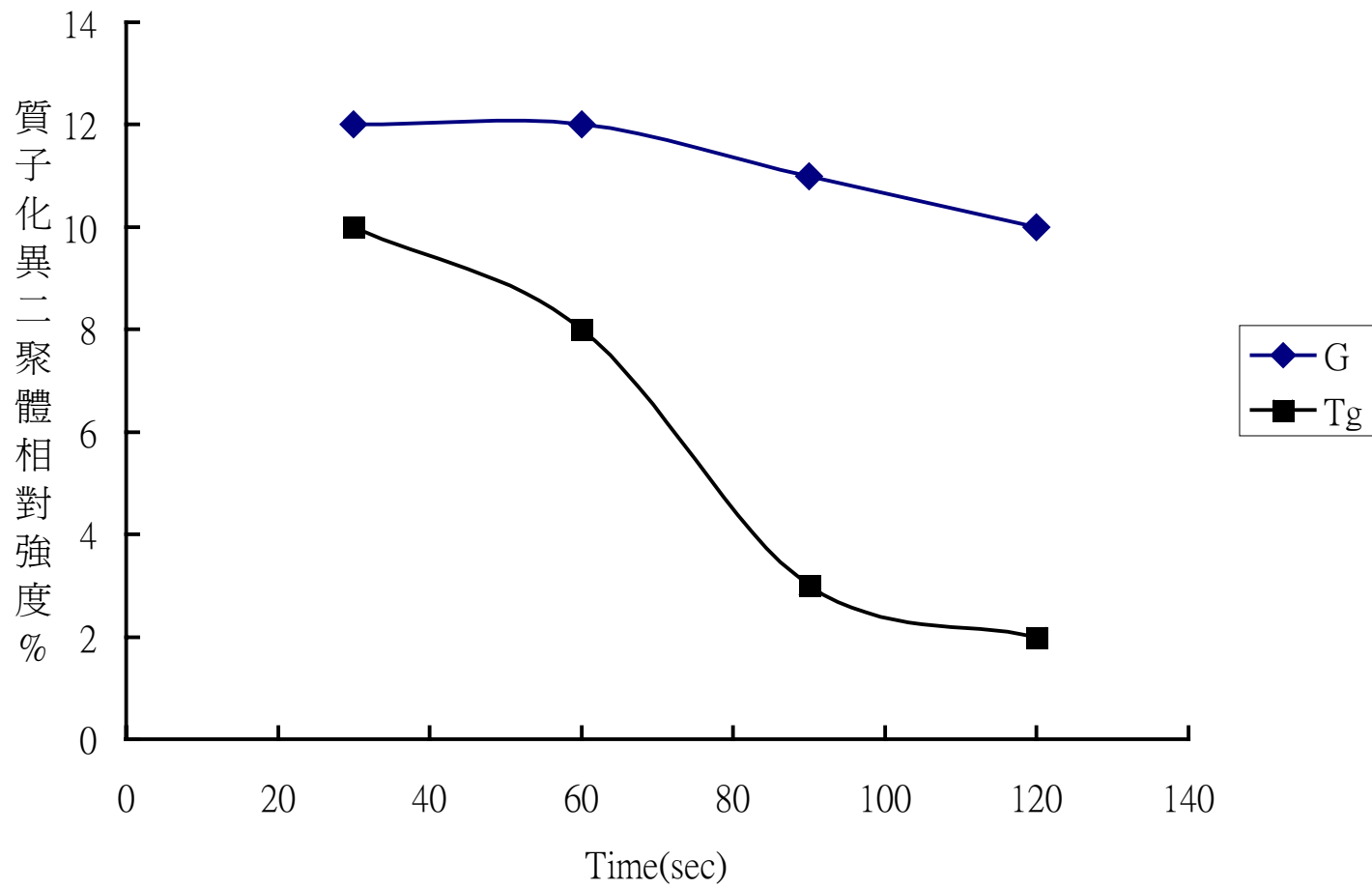
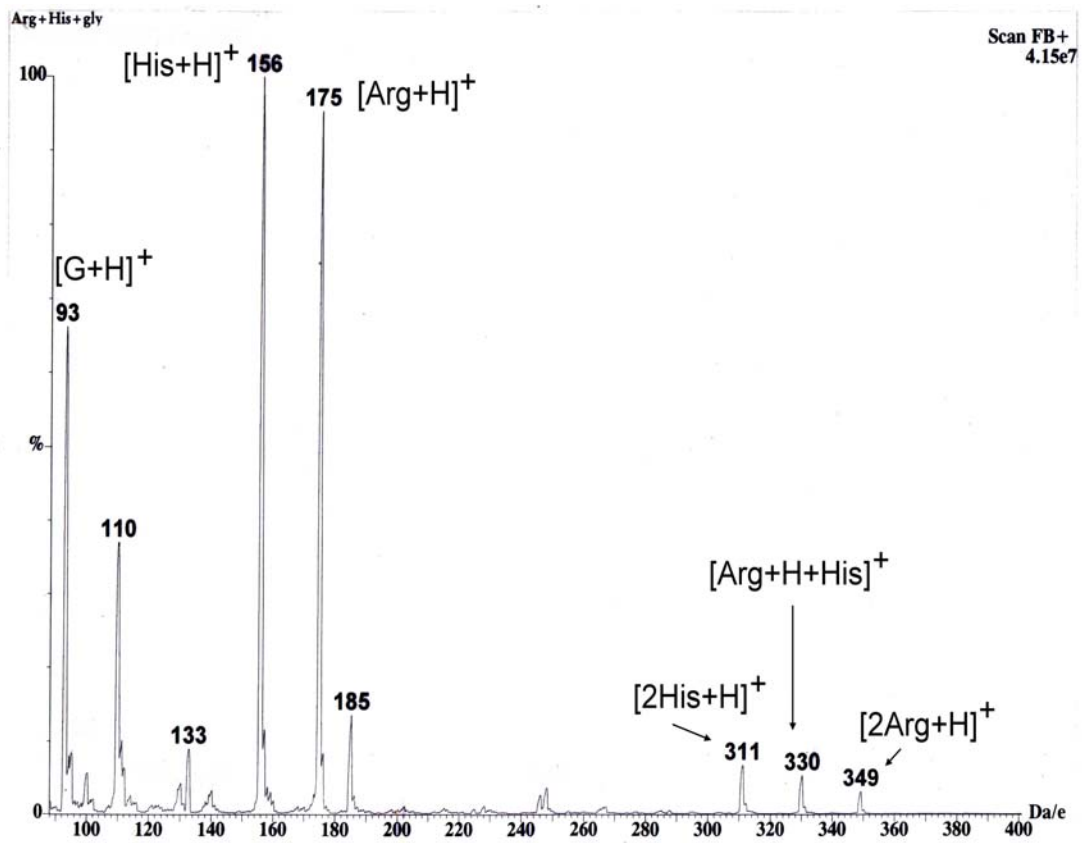


圖 3.2 胺基酸質子化異二聚體的相對訊號強度與時間的關係圖。(◆Gly, ■T<sub>g</sub>)

(a)



(b)

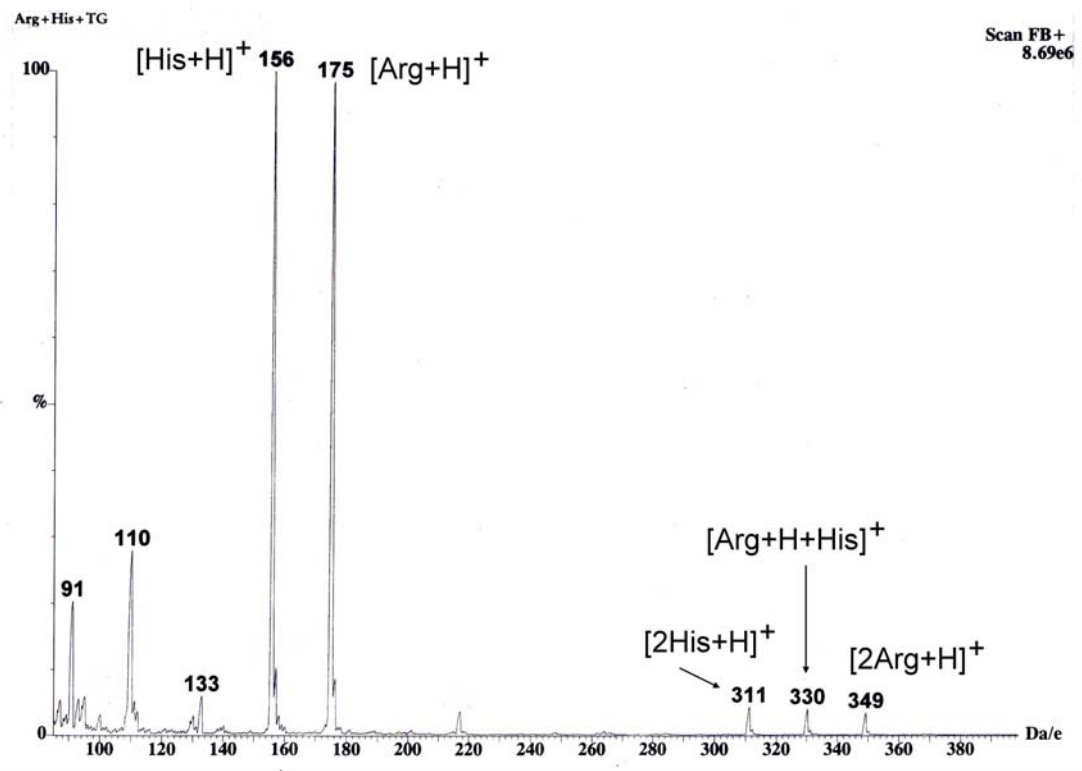


圖 3.3 以(a)G； (b)Tg 為介質，胺基酸 Arg、His 之質譜圖

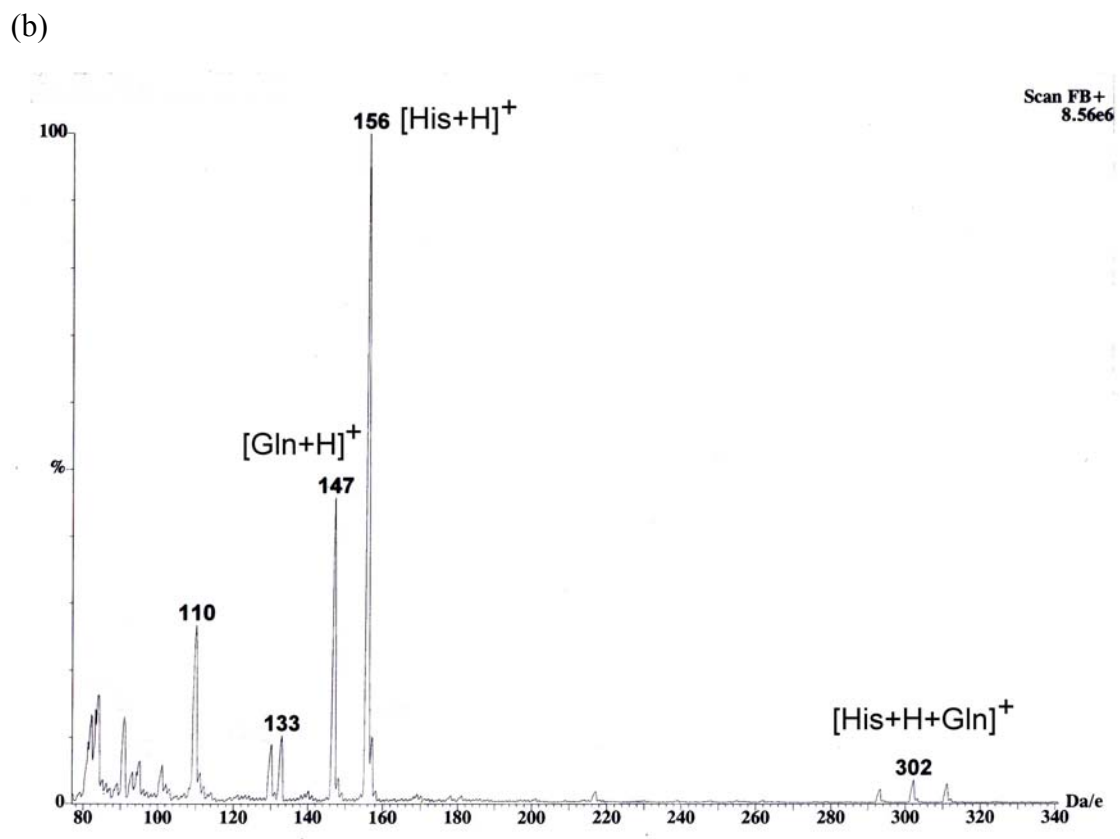
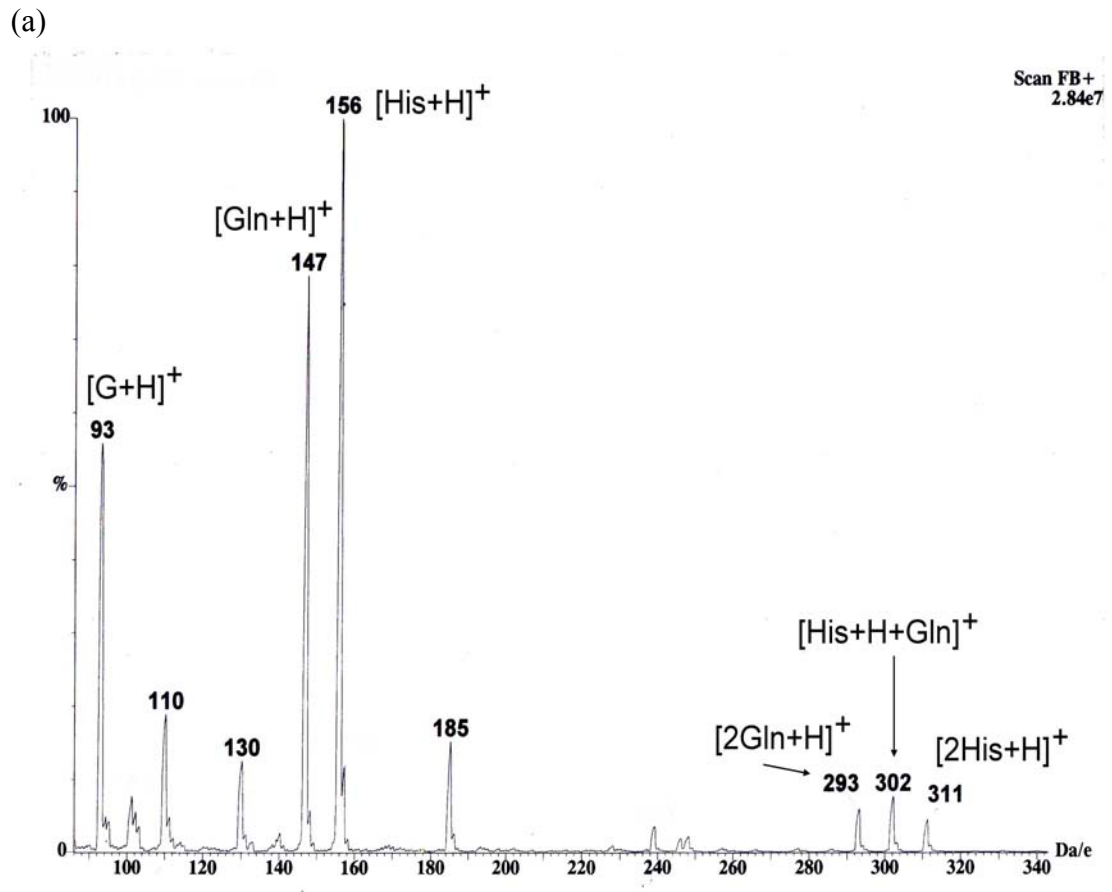


圖 3.4 (a)G ; (b)Tg 為介質，胺基酸 His、Gln 之質譜圖

的分析物特性離子峰，但 Tg 的高揮發性也使得維持樣品的持續性短，故取的分析物特性離子峰的時間亦短，收集成效不佳。另外，G 為 FAB 和 LSIMS 實驗中最普遍被使用的基質且 G 含有三個-OH 基的高極性短鏈分子，與極性水溶液系統的互溶性佳。其黏滯性大，對樣品的固定性好，雖可能降低樣品的表面濃度，但其蒸氣壓低，對樣品持續性時間長，效率較 Tg 高（表 3.1、3.2）因此，一般質譜儀中 FAB 與 LSIMS 使用 G 有大於 Tg 的趨勢，這顯然反映出，Tg 與 G 二者間一些物理性質及化學性質的差異將導致分析物的離子化效果有顯著的不同。

表 3.1 以甘油為介質，胺基酸 A<sub>1</sub> 與 A<sub>2</sub> 所形成的主要離子之相對強度

No.	compound A <sub>1</sub> +A <sub>2</sub>	[A <sub>1</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[A <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[2A <sub>1</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[2A <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[A <sub>1</sub> +H+A <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (%)
1.	Arg + His	97	100	4	9	7
2.	His + Gln	100	80	5	8	10
3.	Gln + Met	100	96	10	5	7
4.	Met + Tyr	10	-	-	-	-
5.	Tyr + Thr	-	6	-	-	-
6.	Thr + Phe	90	100	4	8	9
7.	Phe + Ser	99	100	-	16	15
8.	Ser + Glu	40	55	3	3	5
9.	Glu + Val	88	100	7	12	10
10.	Val + Asp	30	10	-	-	-
11.	Asp + Cys	20	73	-	8	5
12.	Cys + Ala	71	80	8	5	12

※ 表中 (-) 代表相對強度趨近於零。

表 3.2 以硫代甘油為介質，胺基酸 A<sub>1</sub> 與 A<sub>2</sub> 所形成的主要離子之相對強度

No.	compound A <sub>1</sub> +A <sub>2</sub>	[A <sub>1</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[A <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[2A <sub>1</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[2A <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (%)	[A <sub>1</sub> +H+A <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (%)
1.	Arg + His	90	100	4	6	4
2.	His + Gln	100	50	4	3	4
3.	Tyr + Thr	-	2	-	-	-
4.	Thr + Phe	100	70	3	-	5
5.	Phe + Ser	60	100	-	19	6
6.	Ser + Glu	65	100	5	-	3
7.	Glu + Val	100	50	2	-	4
8.	Val + Asp	80	100	3	-	8
9.	Asp + Cys	31	100	-	10	3
10.	Cys + Ala	70	100	9	7	12

※ 表中 (-) 代表相對強度趨近於零。

### 3.1.2 胺基酸的質子親和力

由於 LSIMS，是一種柔性 (soft) 的游離方法，不論其介質是使用 G、Tg，或是 NBA，所產生的質譜圖除了保留完整的分子離子峰外甚至會因樣品本身結構的差異，而出現叢聚式離子，由圖 3.5 得知，胺基酸在氣相中易形成質子化單體 (monomer)、二聚體 (dimer) 及異二聚體 (hetero-dimer) 的叢聚離子。

影響這些質子化叢聚離子形成，最主要的原因為分子間氫鍵【46-48】。在氣相中形成這些叢聚離子是相當本質的，並可利用分子間的氫鍵性質來解釋在沒有任何溶劑干擾下，分析物本身可藉由分子內的 O、N 或 S 與另一個分子內的 H 形成分子間的氫鍵以造成叢聚式離子訊號。單一分子可以因氫鍵作用力，形成質子化二聚體 (protonated dimer)，但通常質子化二聚體離子【48,49】在 LSIMS 中形成的方式是由氫質子配位在單一分子上，藉由架橋 (proton-bridged) 再與另一個分子結合成質子化二聚體，且由一次質譜圖發現，質子化胺基酸在氣相中會有分子量 46 的中性丟失，如圖 3.4， $[\text{His}+\text{H}]^+$ ,  $m/z=156$  失去  $\text{HCOOH}$  (分子量 46)，產生  $m/z=110$  的斷裂離子；圖 3.5-a 也有相同的斷裂模式 ( $m/z=166 \rightarrow m/z=120$ )，推測此一斷裂模式可能為丟失  $\text{H}_2\text{O}$  及  $\text{CO}$ ，或  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$ ；其斷裂途徑如下圖：

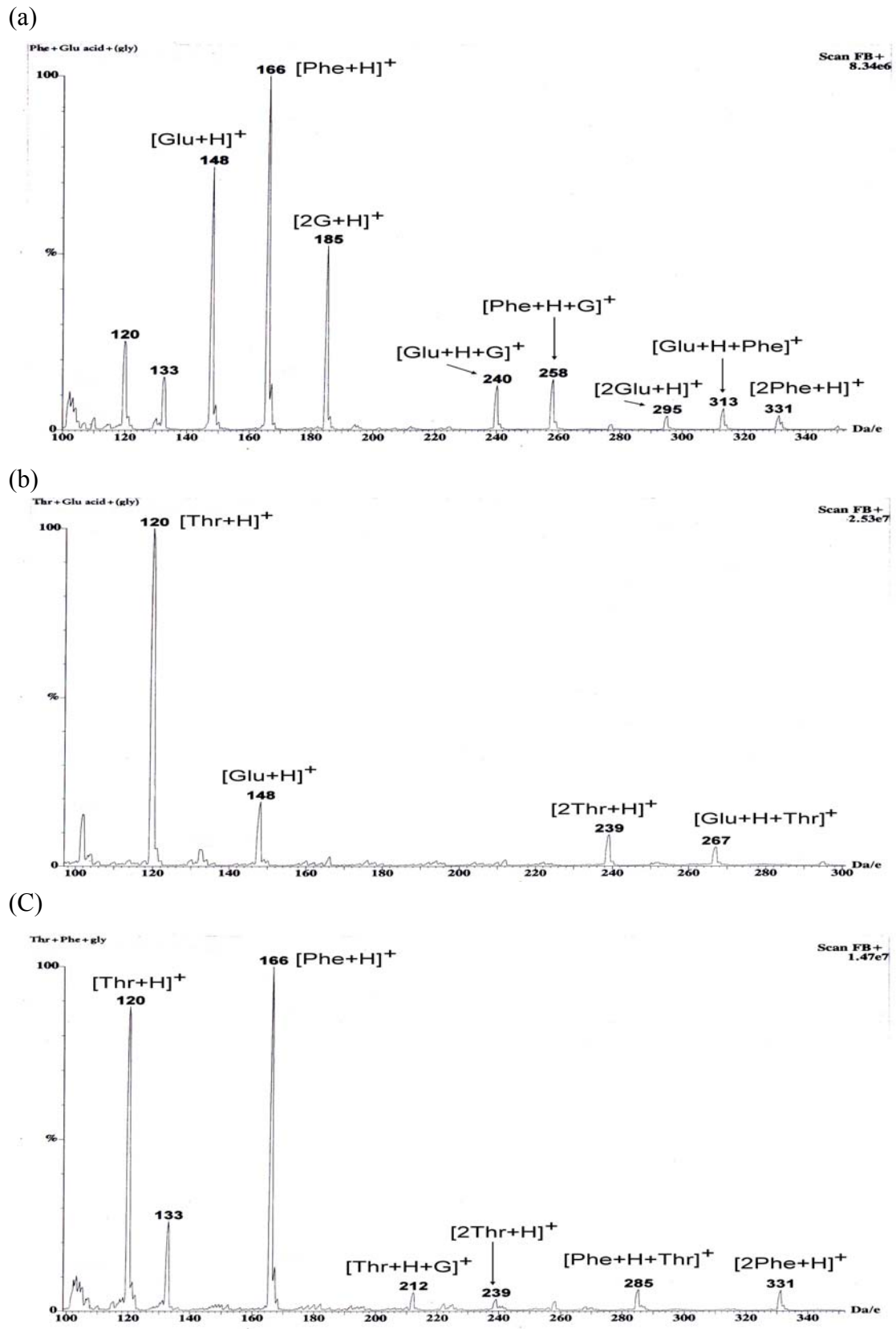
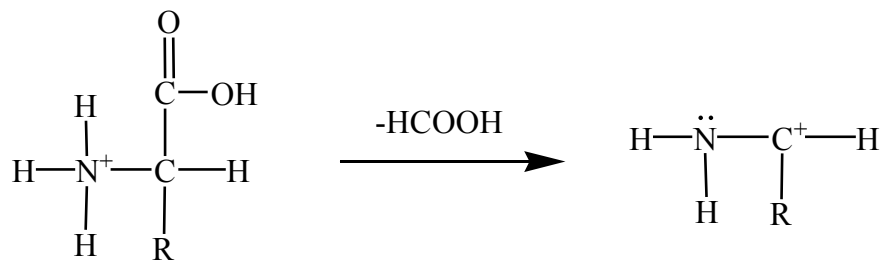
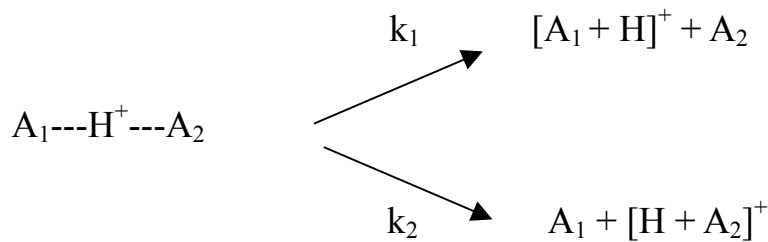


圖 3.5 胺基酸  $A_1$  與  $A_2$  所形成的質子化單體、二聚體及異二聚體之質譜圖。(a)  $A_1 = \text{Glu}$ 、 $A_2 = \text{Phe}$ ；(b)  $A_1 = \text{Glu}$ 、 $A_2 = \text{Thr}$ ；(c)  $A_1 = \text{Phe}$ 、 $A_2 = \text{Thr}$





分子間氫鍵作用力焓 (enthalpy) 值範圍，一般在 1~10 Kcal/mol 之間，遠低於共價鍵作用力【50】，這種非共價鍵結合的離子錯和物 (noncovalent ion complex) 只是鬆散的結合在一起，經過碰撞活化解離，將非常容易釋出完整的中性分子，成為單體形式之質子化分子離子，並可由動力學方法來解釋：



兩種不同胺基酸與 G 混和物於質譜儀中均能呈現質子化二聚體  $[\text{A}_1 + \text{A}_2 + \text{H}]^+$  離子峰之特性，因此利用質譜儀技術，以動力學方法，進行 CAD 步驟，並假設在相同實驗條件、環境及裂解頻率下，兩種不同的胺基酸會互相競爭吸引質子。而質子化異二聚體裂解時只是簡單的單分子斷裂，如圖 3.6 所示，以  $[\text{glutamine} + \text{H} + \text{phenylalanine}]^+$ ， $m/z=313$  為母離子，經過碰撞活化解離後只產生簡單的子離子  $[\text{phenylalanine} + \text{H}]^+$ ， $m/z=166$  及

$[\text{glutamine} + \text{H}]^+$ ,  $m/z=148$ 。子離子的相對含量（訊號高度）顯示胺基酸單體與質子間作用力的相對強度，由圖得知，phenylalanine 與質子作用力弱，裂解較快且易，相對的  $[\text{glutamine} + \text{H}]^+$  訊號就越高，所以 glutamine 的質子親和力大於 phenylalanine；而 glutamine 與 threonine 比較結果發現， $[\text{glutamine} + \text{H}]^+$  訊號大於  $[\text{threonine} + \text{H}]^+$ ，glutamine 的質子親和力也大於 threonine，於是再對 phenylalanine 與 threonine 比較，結果發現  $[\text{phenylalanine} + \text{H}]^+$  訊號大於  $[\text{threonine} + \text{H}]^+$ ，由以上三種結果可初步預估  $\text{glutamine} > \text{phenylalanine} > \text{threonine}$ 。置換一系列不同的胺基酸，會有不同程度的單分子裂解現象，並將其結果歸納於表 3.3。

就胺基酸結構而言，鹼性胺基酸 arginine 之側鏈含有三個 N，且周圍還有烷類推電子基，使 H 質子容易以誘導（inductive）方式鍵結在  $\text{C}=\text{NH}$  的 N 上，形成 1 級胺；而 histidine 之側鏈雖也含有 N 及烷基，但整體而言鍵結引力來的比 arginine 弱，所以 arginine 的質子親和力會大於 histidine。而酸性胺基酸 aspartic acid、glutamic acid 與醯胺類 glutamine 結構相比較，發現 H 質子容易鍵結在側鏈羧基上的氧，且 glutamine 側鏈上含有一個 N，結構上較偏鹼性，所以質子親和力會大於 aspartic acid 及 glutamic acid；而 glutamic acid 含較多的推電子基，電子密度大，吸引質子的能力又較 aspartic acid 強。

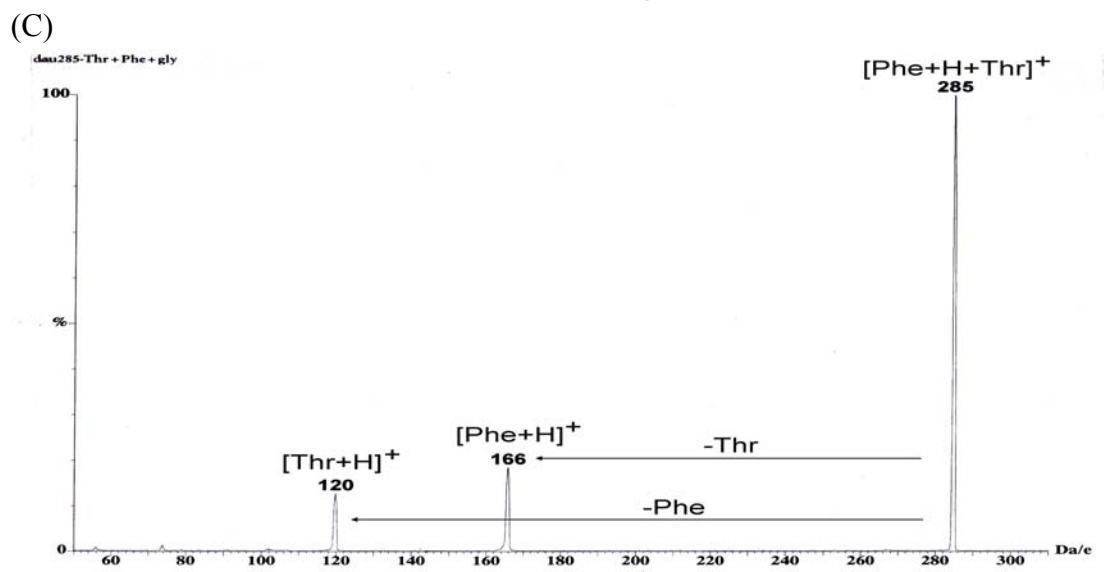
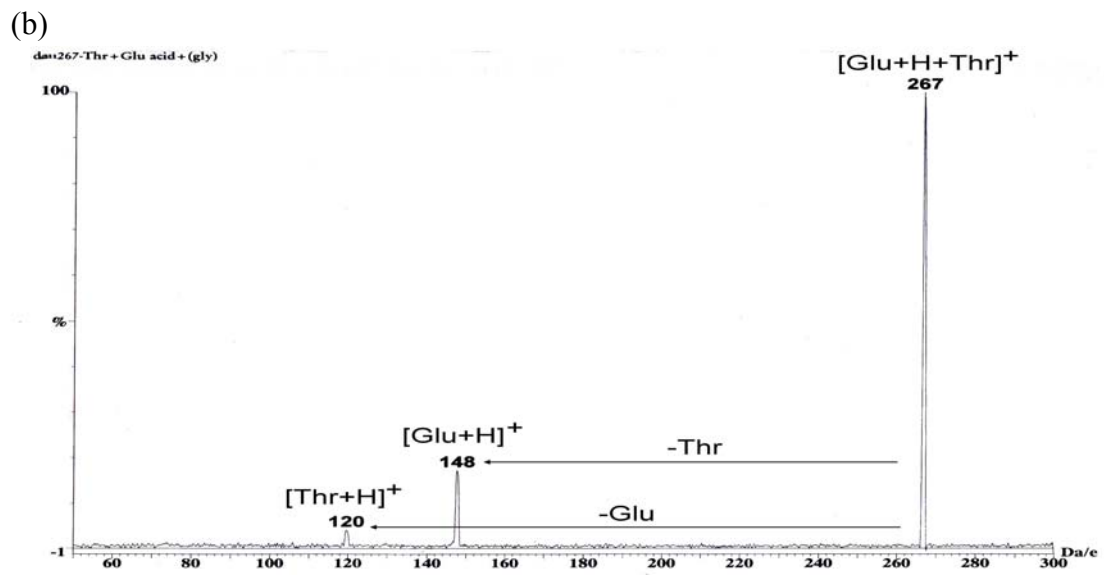
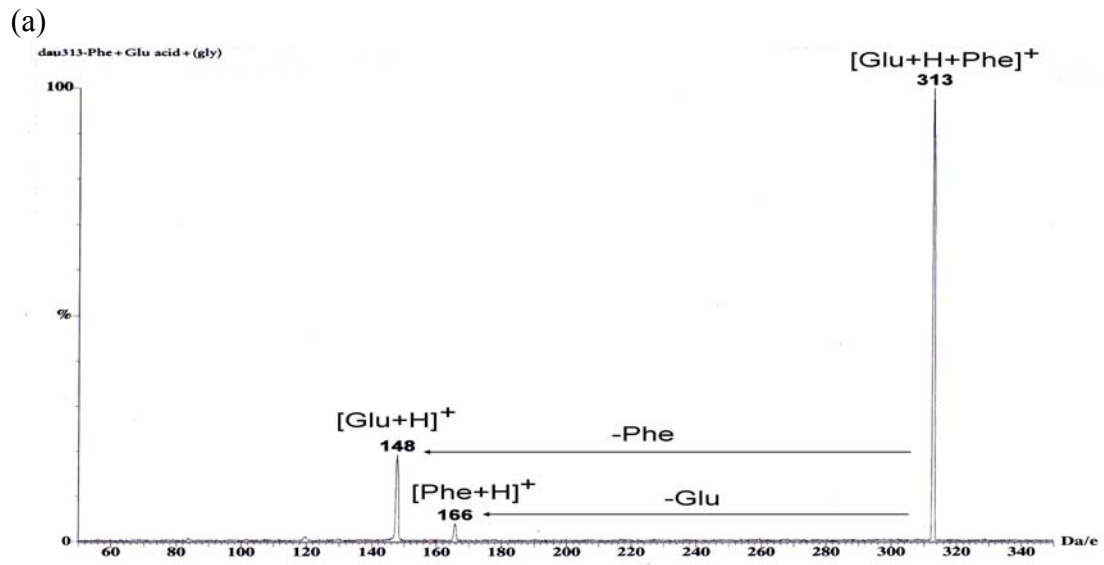


圖 3.6 質子化異二聚體 $[A_1+H+A_2]^+$ 之 CAD 圖譜。(a)  $A_1=\text{Glu}$ 、 $A_2=\text{Phe}$ ；(b)  $A_1=\text{Glu}$ 、 $A_2=\text{Thr}$ ；(c)  $A_1=\text{Phe}$ 、 $A_2=\text{Thr}$

含 S 之胺基酸 methionine 與 cysteine 中，methionine 的質子親和力會大於 cysteine，主要是因為 methionine 側鏈結構上含較多的推電子基，使 H 質子容易被吸引至電子密度較高的 S 上，而此種理論也可以解釋 Aliphatic 類的 serine 與 threonine 上，故 threonine 質子親和力大於 serine。芳香族 (Aromatic) 胺基酸 phenylalanine 與 tyrosine 的結構差異，主要為 tyrosine 側鏈的苯環對位多了一個 OH group，使質子易鍵結在此位置，且共振 (resonance) 效應使結構更加穩定。而 Aliphatic 中的 glycine、alanine 及 valine，基本上質子鍵結的位置唯有主鏈上羧基上的氧，可是質子親和力的大小，會受到側鏈烷基的多寡所有所不同，由結果發現側鏈 C 數越多，相對的質子親和力也就越大。由實驗結果表 3.3 中  $[A_1 + H]^+ / [A_2 + H]^+$  的數據，且以 glycine 的訊號強度為基準，可簡單地排出胺基酸相對質子親和力的大小為：arginine ( $3.0 \times 10^5$ ) > histidine ( $1.4 \times 10^4$ ) > glutamine (1038.47) > glutamic acid (148.35) > methionine (78.08) > tyrosine (44.62) > phenylalanine (37.18) > threonine (32.33) > valine (29.39) > serine (17.81) > aspartic acid (16.19) > cysteine (4.76) > alanine (4.33) > glycine (1.0)。

表 3.3 胺基酸 A<sub>1</sub> 與 A<sub>2</sub> 之質子親和力比值(A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>)及相對強度

A <sub>1</sub> \ A <sub>2</sub>	Gly	Ala	Cys	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Tyr	Met	Glu	Gln	His	Arg
Ala	4.33													
Cys	4.5	1.10												
Asp		3.70	3.40											
Ser		3.90	3.50	1.10										
Val		6.50	6.0	1.80	1.60									
Thr				1.90	1.75	1.10								
Phe					2.0	1.25	1.15							
Tyr						1.45	1.33	1.20						
Met						2.33	2.20	2.1	1.75					
Glu					8.0	4.33	4.33	3.8	3.2	1.90				
Gln										13.0	7.0			
His												13.33		
Arg													21.67	
Relative intensity	1.0	4.33	4.76	16.19	17.81	29.39	32.33	37.18	44.62	78.08	148.35	1038.47	1.4×10 <sup>4</sup>	3.0×10 <sup>5</sup>

※ Relative intensity ⇨ 假設 Gly 質子親和力=1，乘以一系列胺基酸訊號比值。

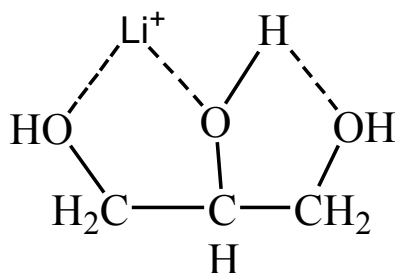
## 3.2 氣態下胺基酸與鹼金屬親和力大小的探討

### 3.2.1 質譜條件的建立

探討胺基酸與鹼金屬的陽離子化反應之前，我們首先研究 FAB 及 LSIMS 中較常用的介質：甘油(G)或硫代甘油(Tg)，與鹼金屬及胺基酸在氣相質譜儀環境下，觀察比較其陽離子化現象。圖 3.7 為胺基酸 arginine、histidine 飽和溶液在介質 G 的條件下加入 LiCl 飽和溶液，由圖發現， $[G+Li]^+$  為基峰 (base peak)，我們推測  $[G+Li]^+$  離子的形成，主要可能來自氣相直接結合反應 eq 3-1 或是經由 eq 3-2 的轉換機制所形成。



而此圖也指出 G 介質對  $Li^+$  的強親和力，我們熟知，液態溶液中 G 為鹼金屬離子的二牙基 (didentate ligand)，鉗合 (chelate) 作用乃發生在鄰近的 -OH 基上；且由文獻得知，氣相中  $[G+Li]^+$  離子可再經由 G 分子第三個 -OH 基來形成分子內氫鍵，而提高氣相中  $[G+Li]^+$  離子的穩定性。其  $[G+Li]^+$  離子的穩定構形如下【51】：



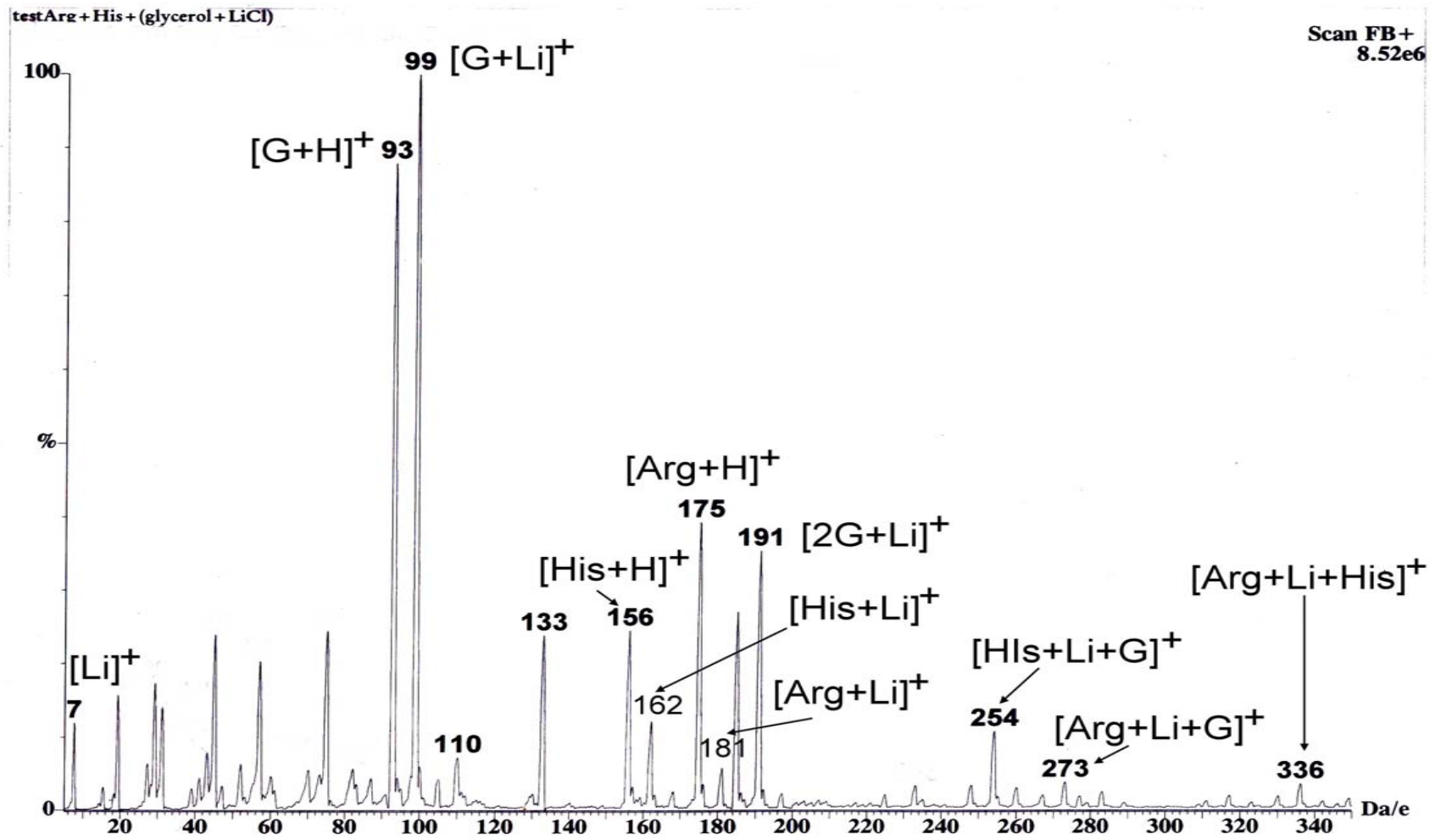


圖 3.7 以 G 為介質，胺基酸 Arg、His 與 LiCl 之質譜圖

由圖 3.7 證實 G 對鹼金屬離子的強親和性【52】，故在 G 與胺基酸競爭鹼金屬離子反應 eq 3-3 的結果，通常會降低分析物之陽離子化分子離子產量，使得我們所要觀察胺基酸與鹼金屬的陽離子化分子離子訊號相對降低。



因此，我們進一步研究 FAB 及 LSIMS 中常用於分析極性分析物的另一介質：Tg，摻入不同的鹼金屬鹵化物後，所得到一系列陽離子訊號強度，如表 3.5 所示。並且與介質 G 所得的結果（表 3.4）相互比較，由表 3.4、3.5 中  $GM^+/\sum I_i$  及  $TgM^+/\sum I_i$  比較時發現，表 3.4 中  $GM^+/\sum I_i$  的相對強度比值皆大於表 3.5 中  $TgM^+/\sum I_i$  的相對強度比值，此現象指出，介質 G 與胺基酸競爭鹼金屬離子比介質 Tg 強，即介質 Tg 對鹼金屬離子的親和性較 G 來的弱，也意味 Tg 較不會與胺基酸競爭鹼金屬離子，因此我們選用 Tg 為介質來研究胺基酸與鹼金屬在 LSIMS 下胺基酸的金屬親和力。



表 3.4 以 G 為介質，胺基酸 Arg、His 及鹼金屬鹵化物，所形成的陽離子之相對含量

Alkali Metal		$I_i^+ / \Sigma I_i^+$				
M	$M^+$	G+ $M^+$	2G+ $M^+$	Arg+ $M^+$	His+ $M^+$	Arg+ $M^+$ +His
Li	0.064	0.532	0.186	0.149	0.059	0.011
Na	0.203	0.524	0.057	0.102	0.073	0.006
K	0.342	0.380	0.027	0.068	0.170	0.004
Rb	0.439	0.302	0.050	0.072	0.137	-
Cs	0.549	0.236	0.005	0.082	0.121	0.005

※ 表中 (-) 為訊號太低，無法積分。

$\Sigma I_i^+$ =總離子強度

表 3.5 以 Tg 為介質，胺基酸 Arg、His 及鹼金屬鹵化物，所形成的陽離子之相對含量

Alkali Metal		$I_i^+ / \Sigma I_i^+$				
M	$M^+$	Tg+ $M^+$	2Tg+ $M^+$	Arg+ $M^+$	His+ $M^+$	Arg+ $M^+$ +His
Li	0.114	0.286	0.107	0.114	0.321	0.057
Na	0.281	0.228	0.057	0.076	0.334	0.019
K	0.461	0.225	0.034	0.090	0.169	0.022
Rb	0.539	0.202	0.020	0.069	0.196	0.010
Cs	0.650	0.096	0.016	0.065	0.163	0.008

### 3.2.2 胺基酸對鹼金屬離子的親和力

鹼金屬離子在氣相環境下，通常以離子對【53】的形式存在，而且容易丟失一個電子，形成穩定的電子軌域，使其類似零族氣體結構 (noble gas structure)，如表 3.6。

表 3.6 鹼金屬離子的電子組態

	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Rb <sup>+</sup>	Cs <sup>+</sup>
Electronic configuration	1s <sup>2</sup>	[He]2s <sup>2</sup> 2p <sup>6</sup>	[Ne]3s <sup>2</sup> 3p <sup>6</sup>	[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>6</sup>	[Kr] 4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup> 5p <sup>6</sup>

本實驗利用動力學方法研究胺基酸與鹼金屬離子的親和力大小，鹼金屬離子與胺基酸分子很容易在氣相下以靜電力結合成 [A + M]<sup>+</sup>，同時將碰撞壓力 (collision pressure) 固定在 4.0×10<sup>-5</sup> mbar、母離子加速電位固定為 100 eV，經由 CAD，可得到子離子圖譜非常的單純，只有 [A + M]<sup>+</sup> 及斷裂所產生的 [M]<sup>+</sup> 訊號，而此錯合離子的鍵結強度，除了受胺基酸分子的結構特性影響外，金屬離子半徑及電荷密度 (表 3.7) 的大小也會使錯合離子的金屬鍵能有所不同，如圖 3.8 所示。

再者，當鹼金屬離子與兩種不同胺基酸形成 [A<sub>1</sub> + M + A<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 錯合離子後，在串聯質譜儀的碰撞活化解離過程中，對所有與胺基酸鍵

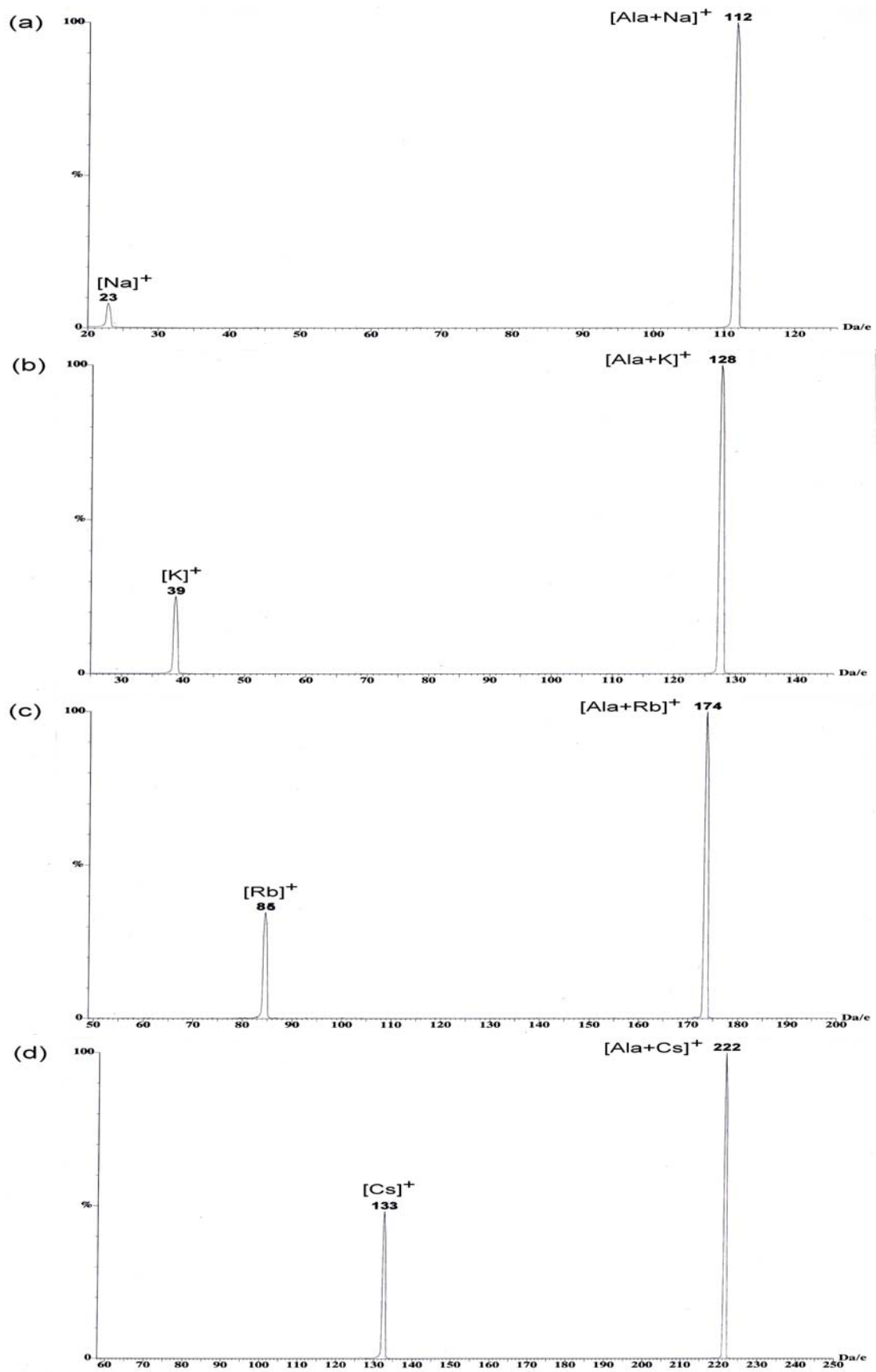


圖 3.8 胺基酸 Ala 與鹼金屬鹵化物: (a) NaCl ; (b) KCl ; (c) RbCl ; (d) CsI 形成 [Ala+M]<sup>+</sup> 之 CAD 圖。

結的鹼金屬而言，有一個最大的特性，就是出現金屬離子的碎裂峰；而且隨著金屬離子半徑加大，電荷密度降低，使金屬離子與胺基酸分子鍵結的鍵能減弱，因而更容易釋出（released）金屬離子，如圖 3.9。

以鹼金屬中的 Li 離子為例，其半徑比 K、Rb、Cs 等離子小【54】，如表 3.7。當分子與 Li<sup>+</sup>緊密結合形成加合物（adduct），會使此金屬鍵的活化能增高，如果分析物本身的共價鍵鍵能比金屬鍵的活化能低時，將會造成分析物的骨幹斷裂訊號。由於 Li<sup>+</sup>質荷比（m/z）=7 太小，很難由質譜儀偵測得到，但可確定的是因鋰離子其半徑較小，不易造成空間障礙，形成錯合離子間的金屬鍵結相當緊密，經碰撞活化解離後，分子仍有其他骨幹斷裂。

表 3.7 鹼金屬離子半徑大小

<b>Metal ion</b>	<b>Radius(Å)</b>
Li <sup>+</sup>	0.68
Na <sup>+</sup>	0.97
K <sup>+</sup>	1.33
Rb <sup>+</sup>	1.47
Cs <sup>+</sup>	1.67

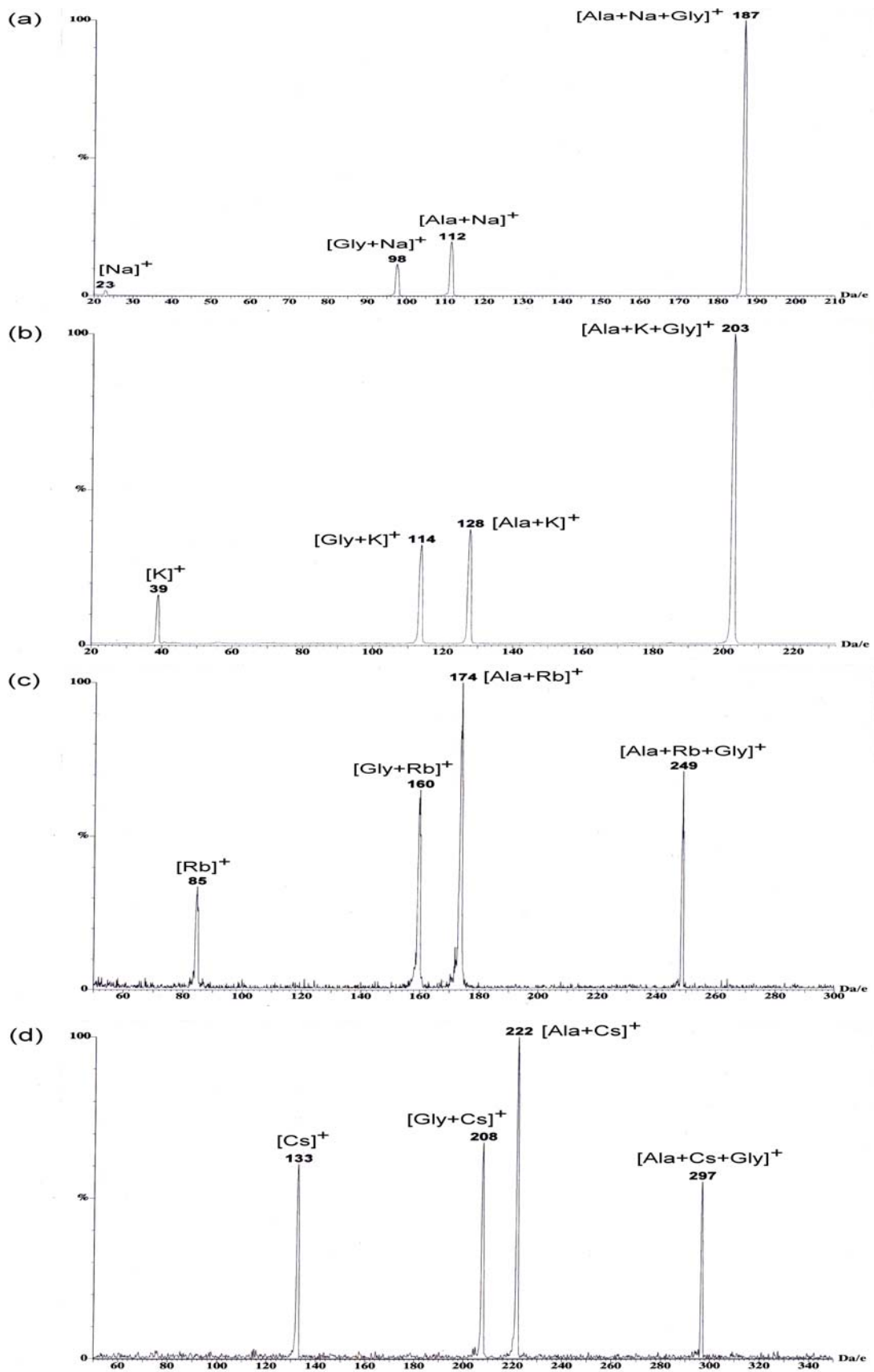


圖 3.9 胺基酸 Ala、Gly 與鹼金屬鹵化物：(a) NaCl；(b) KCl；(c) RbCl；(d) CsI 形成  $[\text{Ala}+\text{M}+\text{Gly}]^+$  錯合離子之 CAD 圖。

相對於半徑較大的金屬離子如  $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Cs}^+$  等，其與胺基酸分子所形成的錯合離子，由於空間效應使分子與金屬間的鍵結能力越來越弱，在經過碰撞活化解離後，這些錯合離子的裂解形式只進行簡單的去錯合反應 (decomplexation reaction)，而不會引起任何的骨幹斷裂 (圖 3.9)。

因此金屬離子的大小，對胺基酸的鍵結會有不同的結果，隨著金屬離子增大，所形成的加合物，表現在碰撞活化解離圖譜，離子訊號就越趨於單純化，因為離子與分子間只是微弱的靜電力吸引在一起，單鍵斷裂的能量路徑 (energy pathway) 偏向於低能量的去錯合反應；相反的，半徑較小的金屬離子與分子間會以共價鍵緊密的鍵結，則能量路徑將不同於丟失金屬離子，而會有骨幹斷裂的現象伴隨發生，如圖 3.10-b 所示；此現象顯示出本實驗與文獻【6】，對鹼金屬與離子電位及離子半徑大小相吻合 (圖 3.11)，也印證分析物親和力大小為： $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$ ，即相同電荷的鹼金屬離子半徑越小，親和力越大。

另外，分子結構也會影響  $[\text{A}+\text{M}]^+$  鍵結強度，由於結構上陰電性較高 (electronegativity) 較高的原子如 O、N、S，可利用其未鍵結電子對 (lone pair) 與金屬離子形成錯合離子，其鍵結程度的強弱將受到分子上電負度高的原子影響，即胺基酸分子如果具有許多陰電

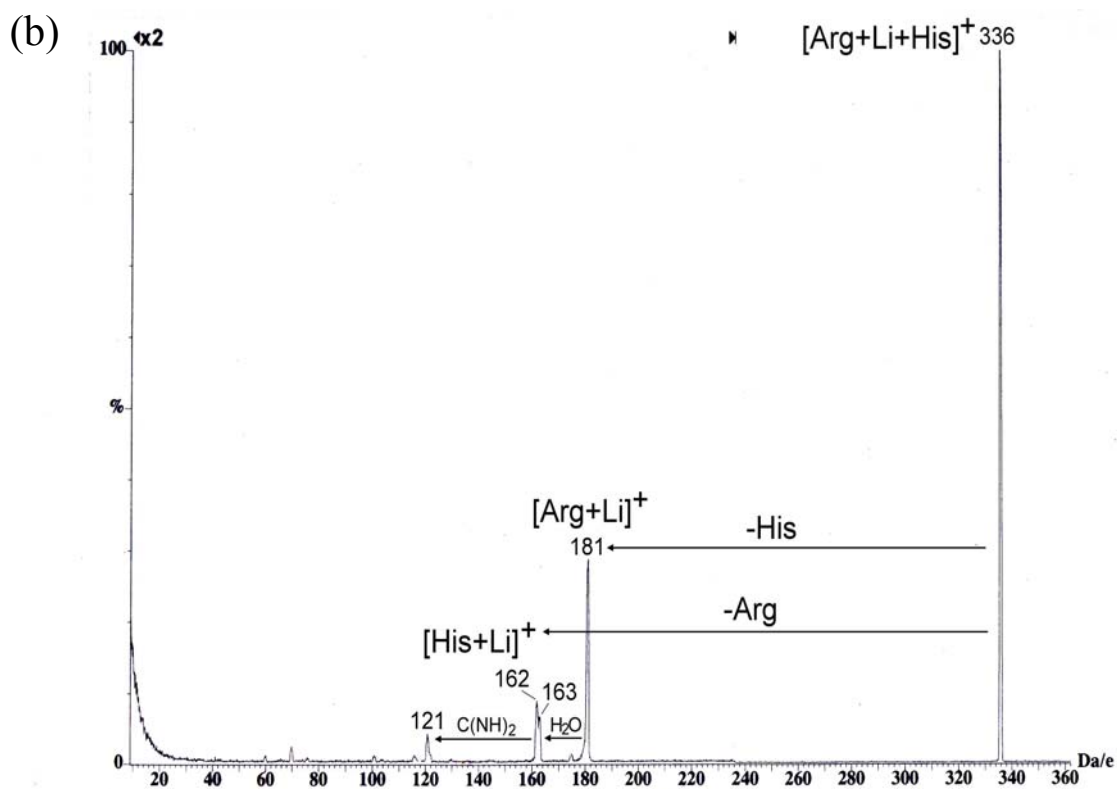
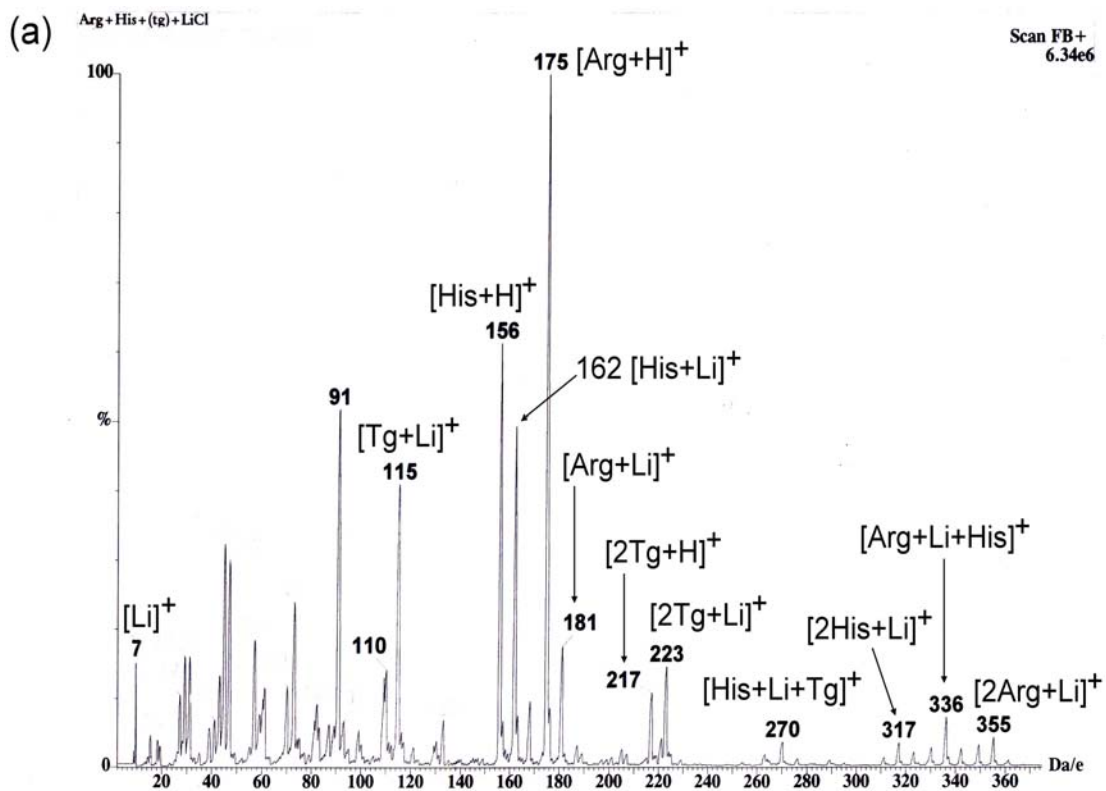


圖 3.10 (a) 胺基酸 Arg、His 與 LiCl 之質譜圖。(b) [Arg+Li+His]<sup>+</sup> 錯和離子之 CAD 圖

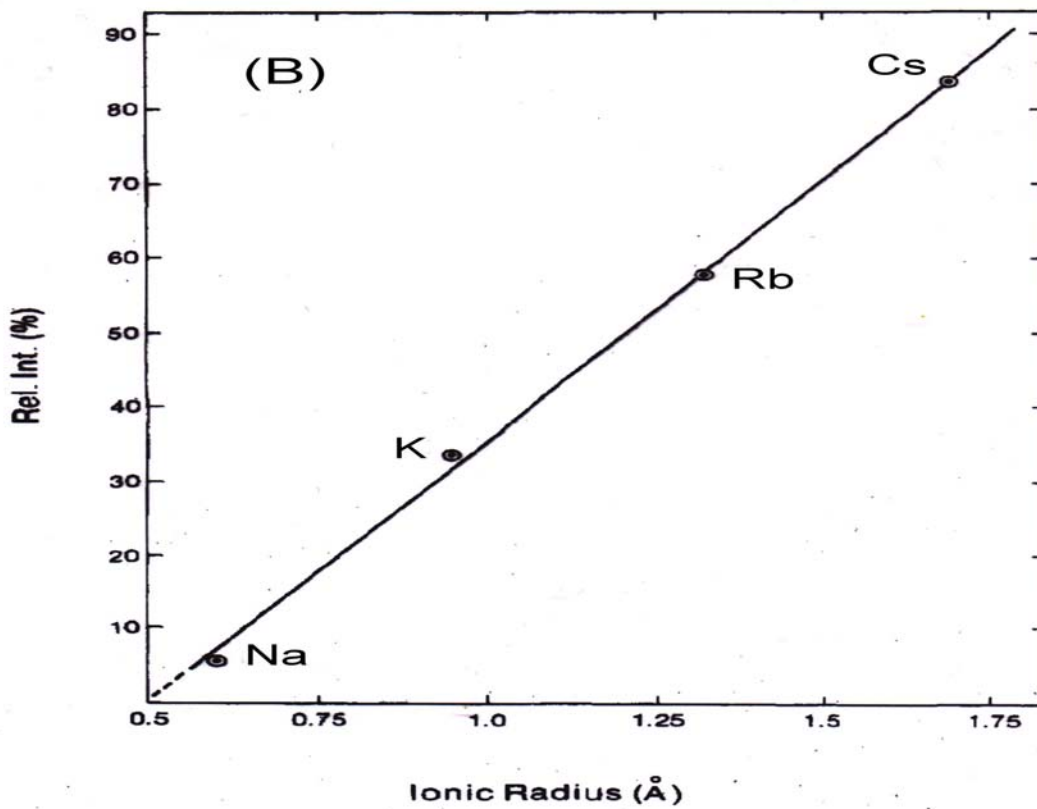
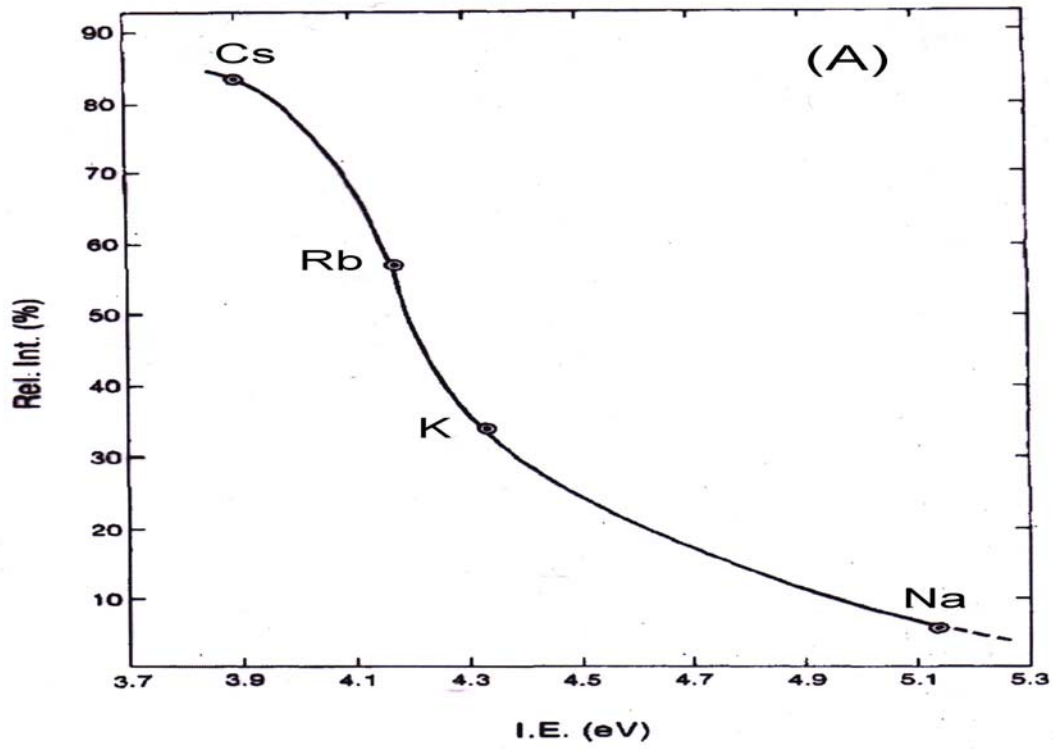


圖 3.11 (A)離子化電位大小與金屬離子相對強度之關係圖。  
 (B)金屬離子半徑大小與鹼金屬離子相對強度之關係圖。

此圖資料來源：【6】



性高的原子，而且彼此相鄰近，再加上金屬離子較偏好於電子多的地方 (electron rich site)，這種現象將有助於金屬離子與分析物緊密結合形成錯合離子，如果胺基酸分子結構上電負度高的原子零散分佈，所形成錯合離子間的金屬鍵結僅以微弱的靜電力相結合。

胺基酸與金屬離子親合力的比較是利用動力學方法研究兩種不同的胺基酸與鹼金屬鹵化物混和，形成三明治型的錯合離子  $[A_1 + M + A_2]^+$  (圖 3.10-a)，經碰撞活化解離，母離子斷裂成  $[A_1 + M]^+$  及  $[A_2 + M]^+$ ，比較這兩個斷裂離子的強弱，來判斷胺基酸與鹼金屬的親合力，其離子訊號高的表示胺基酸與鹼金屬離子之間的鍵結越強，即胺基酸與鹼金屬離子的親合力越強，如圖 3.10-b 錯合離子  $[\text{Arg} + \text{Li} + \text{His}]^+$ ， $m/z=336$  經碰撞活化解離得到  $[\text{Arg} + \text{Li}]^+$ ， $m/z=181$  及  $[\text{His} + \text{Li}]^+$ ， $m/z=162$ ，甚至出現骨幹斷裂的訊號  $m/z=163$  及  $m/z=121$ ，主要乃因鋰離子半徑較小，不易造成空間障礙，形成錯合離子間的金屬鍵結相當緊密，而使此金屬鍵的活化能增高，如果分析物本身的共價鍵鍵能比金屬鍵的活化能低時，則能量路徑將不同於丟失其他金屬離子，將會造成分析物的骨幹斷裂訊號。就金屬親和力的比較，由圖得知  $[\text{Arg} + \text{Li}]^+$  離子訊號大於  $[\text{His} + \text{Li}]^+$ ，因此推測 arginine 對鋰離子的親合力會大於 histidine。

經過一系列的實驗，置換不同的胺基酸  $A_1$ 、 $A_2$ ，比較

$[A_1 + Li + A_2]^+$  錯合離子中，兩種不同胺基酸與鹼金屬鋰的相對親合力，其結果為：arginine > histidine > glutamine > methionine > glutamic acid > aspartic acid > threonine > tyrosine > phenylalanine  $\approx$  serine > valine > cysteine > alanine > glycine，如表 3.8 所示。

同理，以同樣的方法觀察胺基酸與  $Na^+$  (圖 3.12)、 $K^+$  (圖 3.13)、 $Rb^+$  (圖 3.14) 及  $Cs^+$  (圖 3.15) 的相對親和力，其結果歸納於表 3.8 及 3.9。

表 3.8 胺基酸與鋰離子之親和力比值及相對強度

A <sub>1</sub> \ A <sub>2</sub>	Gly	Ala	Cys	Val	Ser	Phe	Tyr	Asp	Thr	Glu	Met	Gln	His	Arg
Ala	2.50													
Cys	3.33	1.33												
Val		2.10	1.64											
Ser		3.33	2.50	1.67										
Phe		3.50	2.67	1.67	1.0									
Tyr		3.50	2.67	1.67	1.0	1.0								
Asp		7.0	5.25	3.33	2.0	2.0	2.0							
Thr				5.0	2.50	2.30	2.33	1.20						
Glu				5.2	3.10	3.25	3.25	1.65	1.38					
Met							3.50	1.80	1.80	1.23				
Gln										7.80	6.40			
His												4.0		
Arg													3.40	
Relative intensity	1.0	2.50	3.33	4.45	9.11	9.11	9.11	18.22	21.86	30.17	37.11	237.52	950.07	3230.22

※Relative intensity ⇨ 假設 Gly 金屬親和力=1，乘以一系列胺基酸訊號比值。

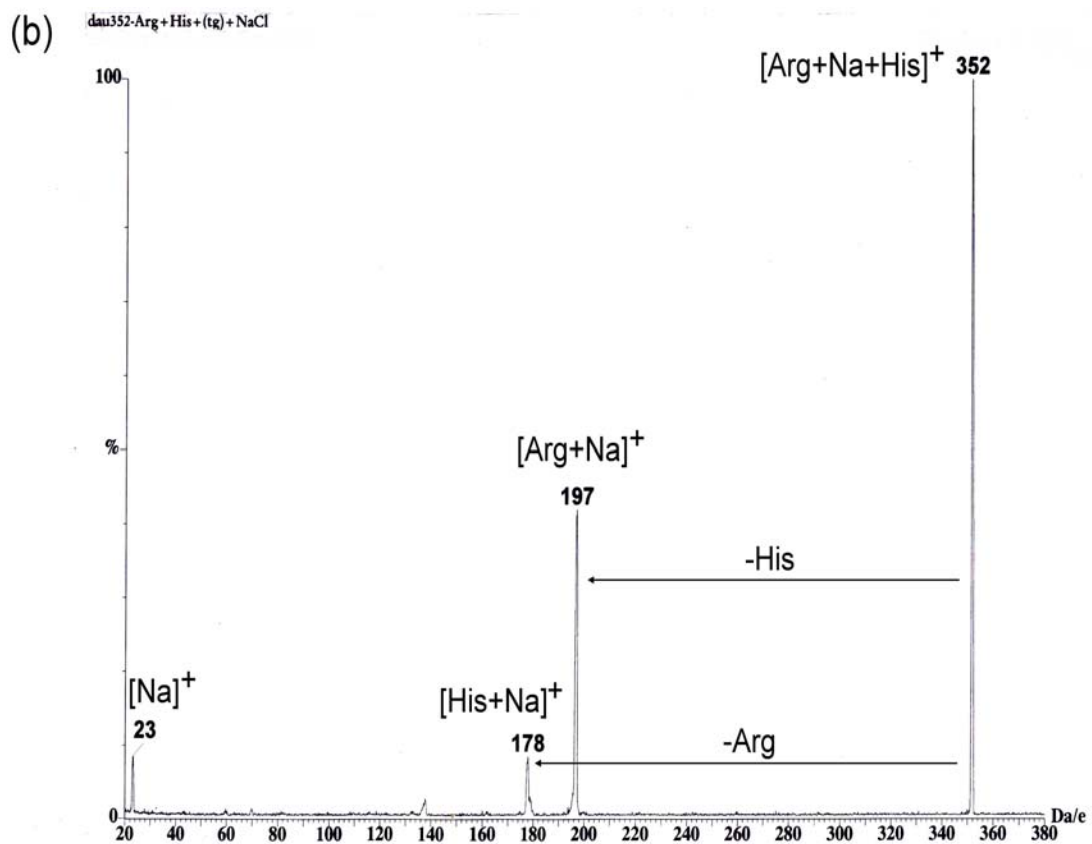
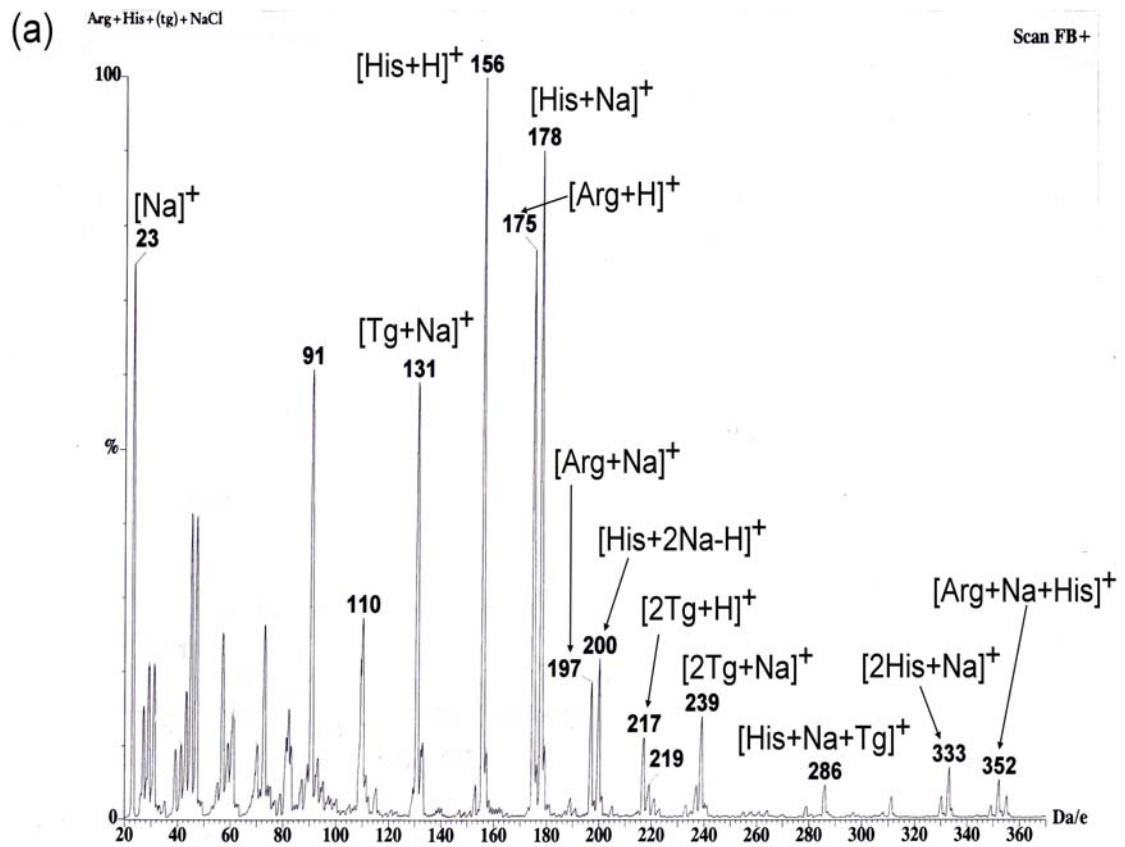


圖 3.12 (a)氨基酸 Arg、His 與 NaCl 之質譜圖。(b)  $[Arg+Na+His]^+$  錯和離子之 CAD 圖。

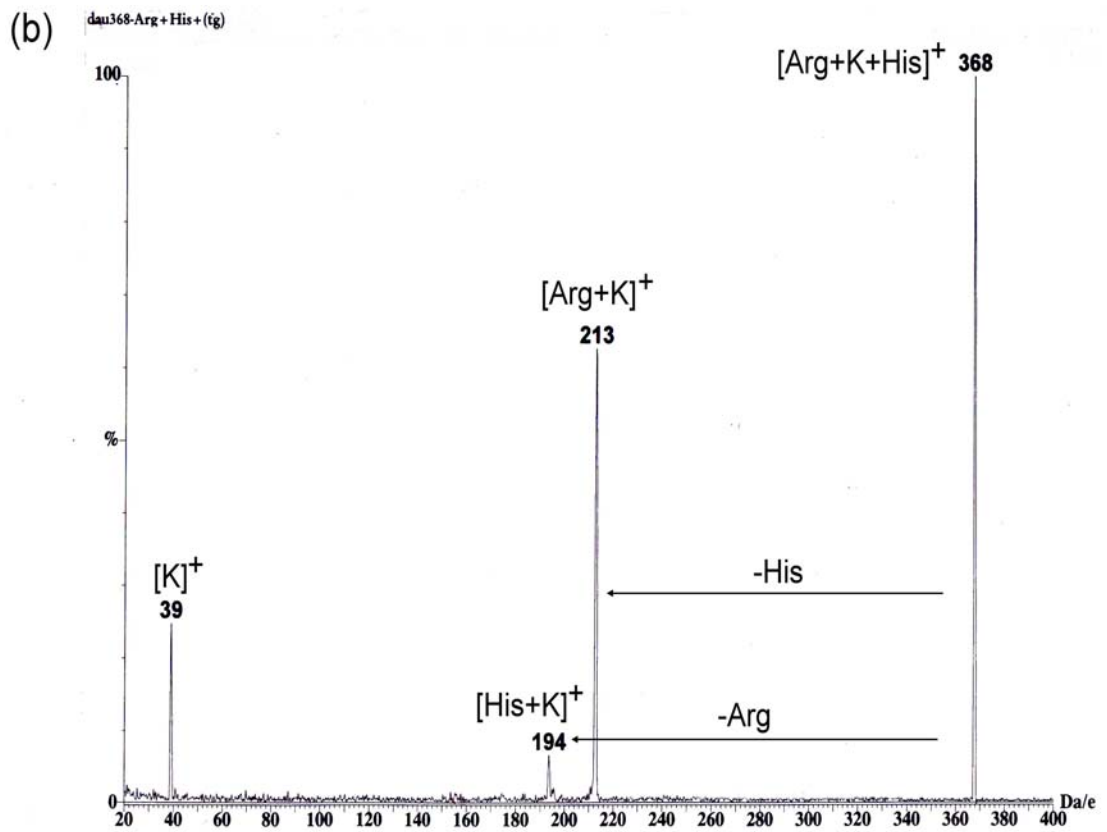
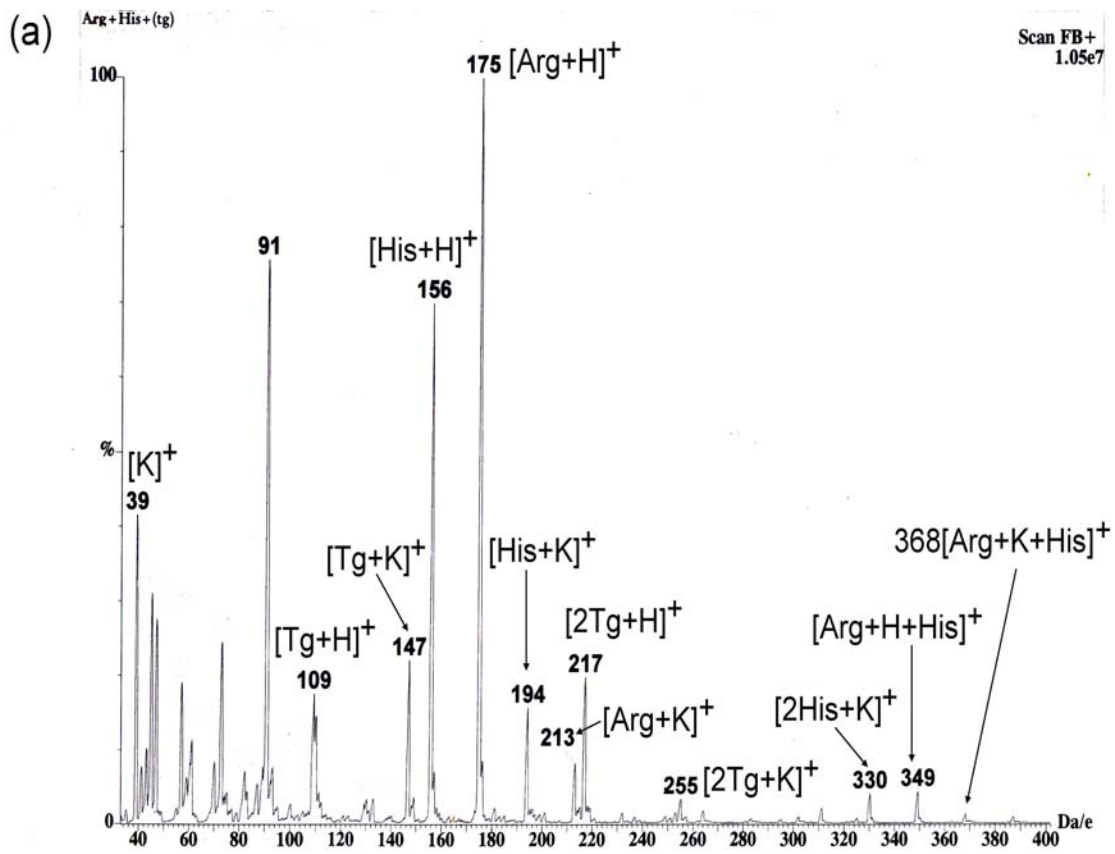


圖 3.13 (a) 胺基酸 Arg、His 與 KCl 之質譜圖。(b) [Arg+K+His]<sup>+</sup> 錯和離子之 CAD 圖。

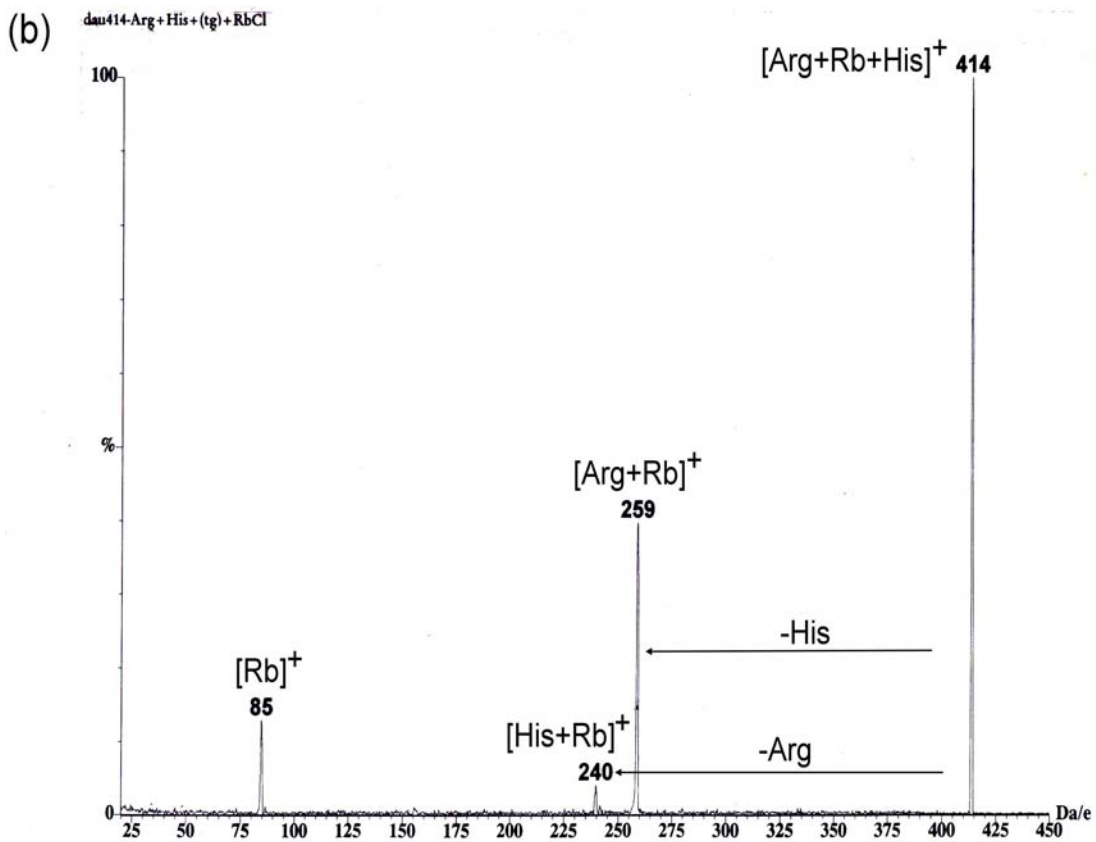
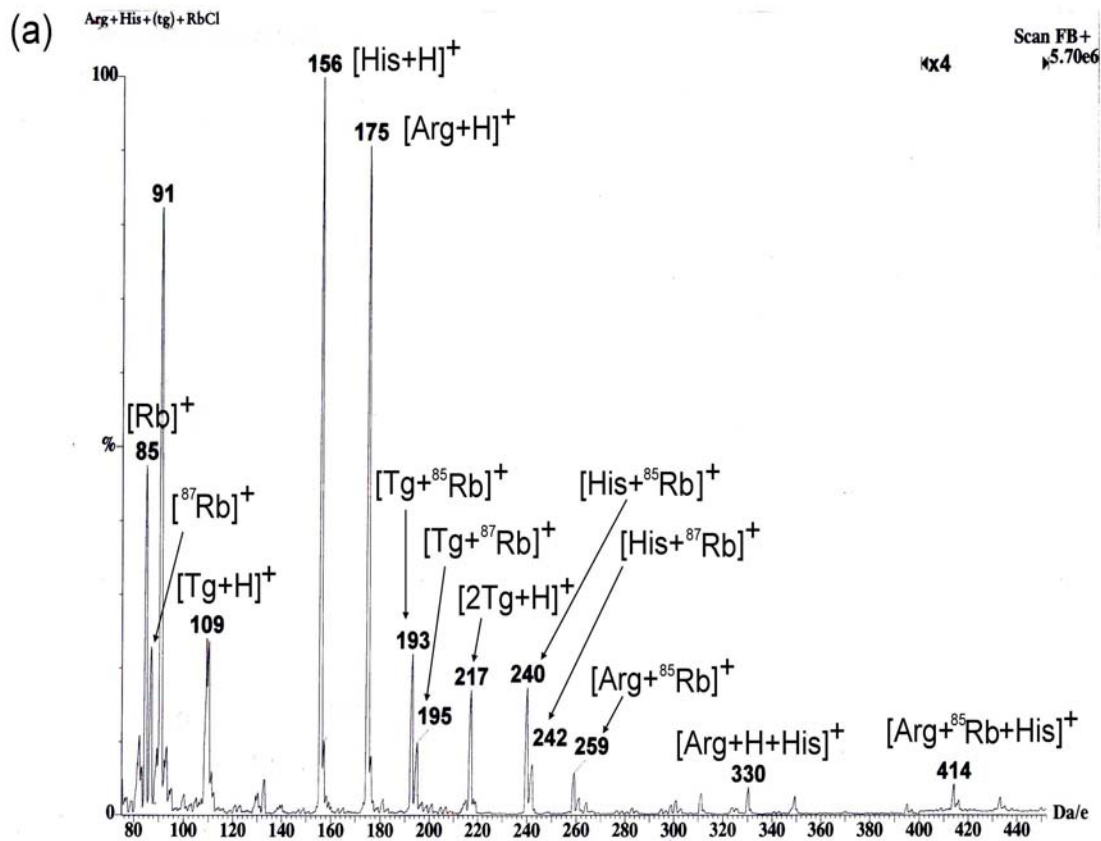


圖 3.14 (a) 胺基酸 Arg、His 與 RbCl 之質譜圖。(b) [Arg + Rb + His]<sup>+</sup> 錯和離子之 CAD 圖。

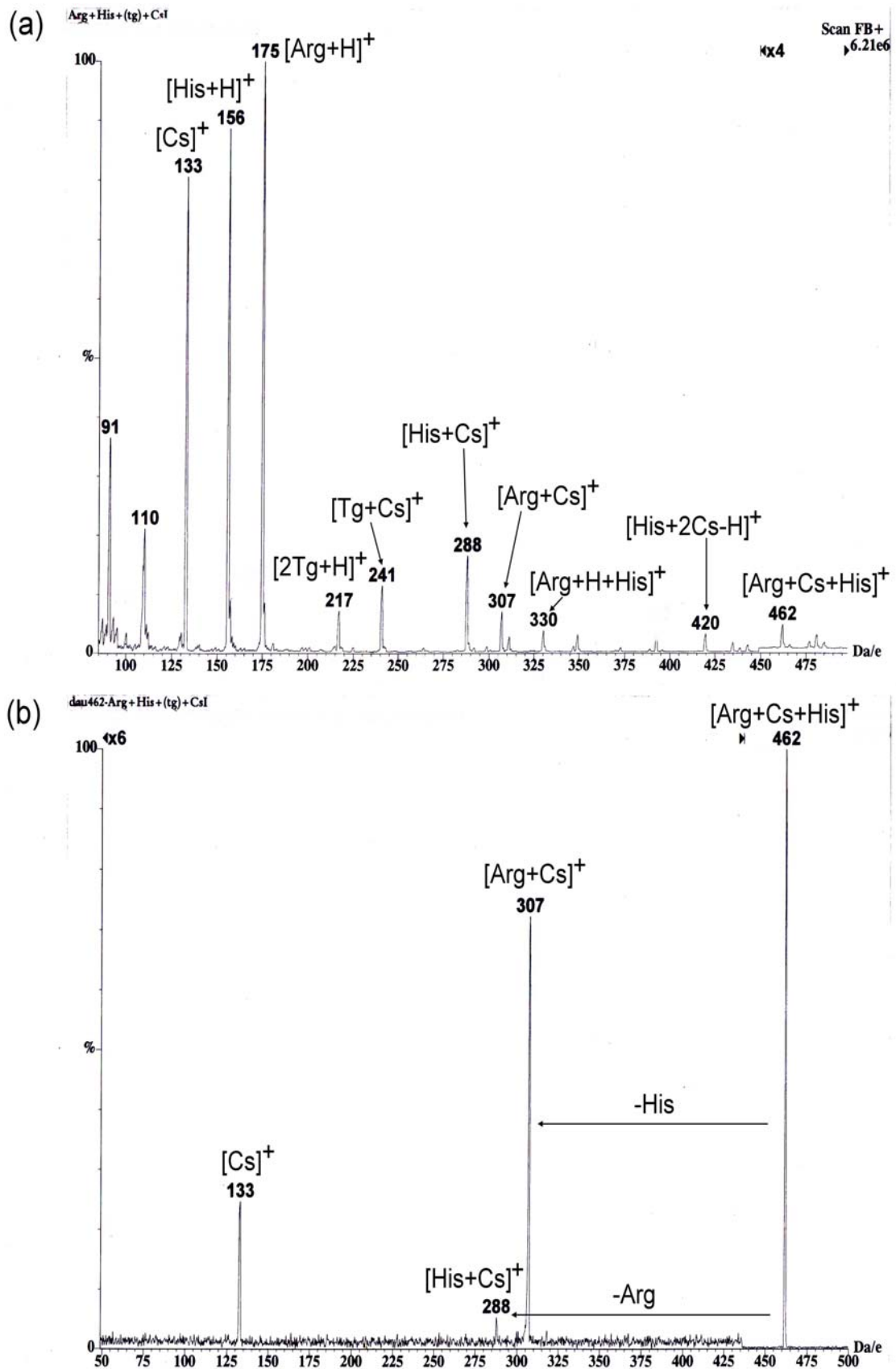


圖 3.15 (a) 胺基酸 Arg、His 與 CsI 之質譜圖。(b)  $[Arg+Cs+His]^+$  錯和離子之 CAD 圖。

表 3.9 胺基酸與鹼金屬離子之相對親和力

M <sup>+</sup> \ A <sub>1</sub>	Gly	Ala	Cys	Val	Ser	Phe	Tyr	Thr	Met	Asp	Glu	Gln	His	Arg
Na	1.0	1.64	1.77	1.91	4.21	4.21	5.05	6.14	7.07	7.08	7.65	56.53	150.93	688.23
K	1.0	1.40	1.40	2.05	3.54	6.12	6.12	4.09	6.15	5.82	7.66	56.36	69.99	559.88
Rb	1.0	1.29	1.29	1.63	1.79	3.59	3.59	3.27	5.59	3.55	3.59	20.28	21.09	210.90
Cs	1.0	1.10	1.10	1.53	1.64	2.20	2.20	1.96	3.52	3.48	3.51	14.09	15.09	105.59

※Relative intensity ⇨ 假設 Gly 質子親和力=1，乘以一系列胺基酸訊號比值。



### 3.3 胺基酸與鹼土金屬所形成錯合離子之鍵結特性

#### 3.3.1 鹼土金屬的基本性質

鹼土金屬，具有極高之活性 (reactivity) 僅次於鄰近的鹼金屬。鈹原子是最小的金屬離子，其大部分的化合物中，鈹都是以共價鍵和其他元素相結合，這是因為鈹要形成  $\text{Be}^{2+}$  時需要很大的能量。其他鹼土金屬卻只能形成正二價的陽離子，諸如  $\text{Ca}^{2+}$  與  $\text{Ba}^{2+}$ ，而成為離子化合物。鹼土金屬及鹼金屬中，原子越大的元素，就越容易放出價電子，活性也就越大。

大致說來，鹼土金屬及鹼金屬元素物理性質的趨向是相同的。鹼土金屬元素的原子和離子半徑都較鹼金屬元素小，如表 3.10 所示【55】。

表 3.10 鹼土金屬離子半徑及電荷密度大小

Metal ion	Radius(Å)	Charge density $\times 10^{20}$ (Columb/A <sup>3</sup> )
$\text{Be}^{2+}$	0.35	178.00
$\text{Mg}^{2+}$	0.66	26.80
$\text{Ca}^{2+}$	0.99	7.90
$\text{Sr}^{2+}$	1.12	5.46
$\text{Ba}^{2+}$	1.34	3.17

這乃因為鹼土金屬原子核的電荷引力較大所致。而在化合物中，除了鈹的化合物外，所有鹼土金屬的化合物都是離子化合物，其鹵化物就是很典型的離子化合物。同時，鹼土金屬元素所形成的陽離子比與相鄰鹼金屬的離子要小的多，而電荷卻高出很多。

### 3.3.2 胺基酸與鹼土金屬在氣態下的鍵結情形【55】

胺基酸與鹼土金屬所產生的離子訊號，有別於鹼金屬。鹼金屬為正一價的離子，較易直接與胺基酸分子結合生成正一價的離子化合物，而鹼土金屬為正二價離子，因此鹼土金屬氯化物與胺基酸結合時，通常會以丟失一個 HCl 的形式或以去質子化 (deprotonation) 反應，與胺基酸形成  $[A_1 + \text{MCl}]^+$ 、 $[A_1 - \text{H} + \text{M}]^+$ 、 $[A_1 + A_2 + \text{MCl}]^+$  或  $[A_1 + A_2 - \text{H} + \text{M}]^+$  錯合離子。圖 3.16-a 為胺基酸 arginine 與 histidine 加入氯化鎂 ( $\text{MgCl}_2$ ) 後所得到的一次質譜圖，由圖譜發現，除了質子化  $[\text{His} + \text{H}]^+$ ，質荷比 (m/z) 156 及  $[\text{Arg} + \text{H}]^+$ ，質荷比 175 的訊號外，還得到  $[2\text{G} - \text{H} + \text{Mg}]^+$ ，質荷比 207、 $[\text{His} + \text{MgCl}]^+$ ，質荷比 214、 $[\text{G} + \text{His} - \text{H} + \text{Mg}]^+$ ，質荷比 270 及  $[\text{Arg} + \text{His} - \text{H} + \text{Mg}]^+$ ，質荷比 352 錯合離子訊號，而這些訊號在鹼金屬與胺基酸混合物質譜圖中是不曾出現的。另外，對於  $[A_1 + \text{MCl}]^+$  或  $[A_1 + A_2 + \text{MCl}]^+$  錯合離子，可以利用自然界中氯同位素的分佈 ( $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = 3 : 1$ )，進一步判斷及印證錯合離子的組成是否含有氯的成份，這也是質譜儀重

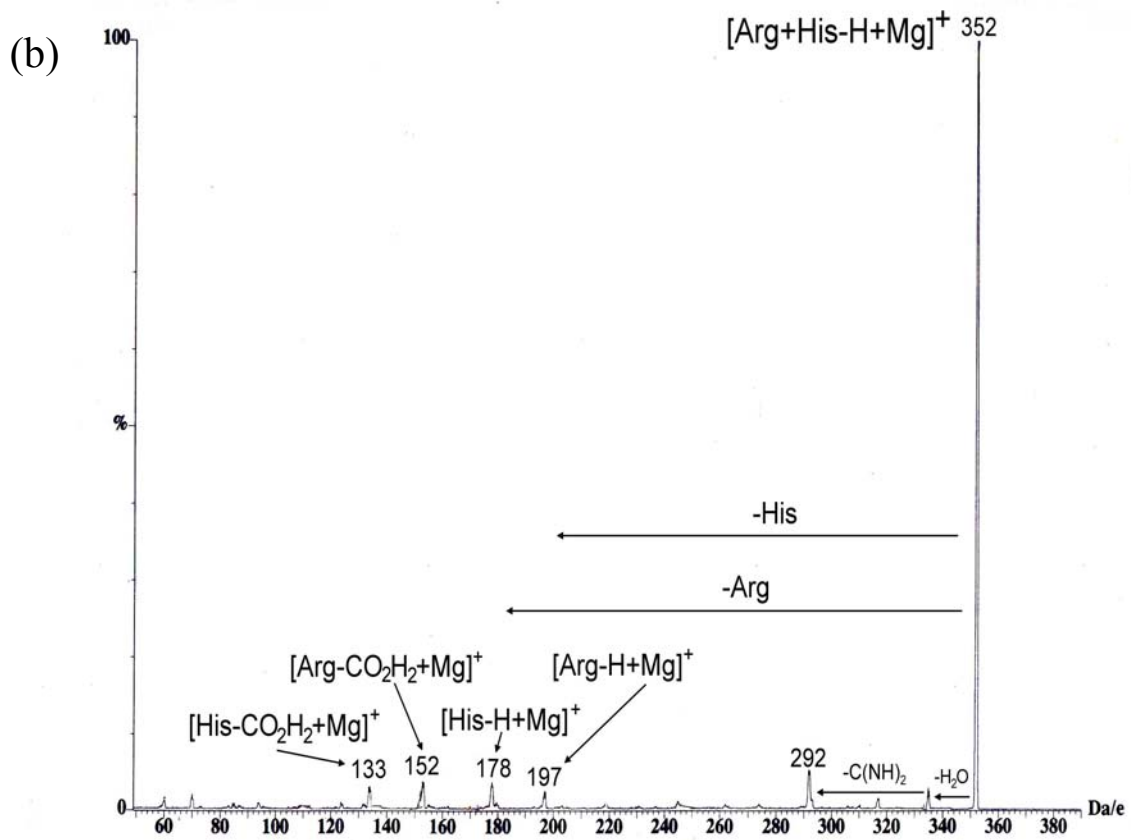
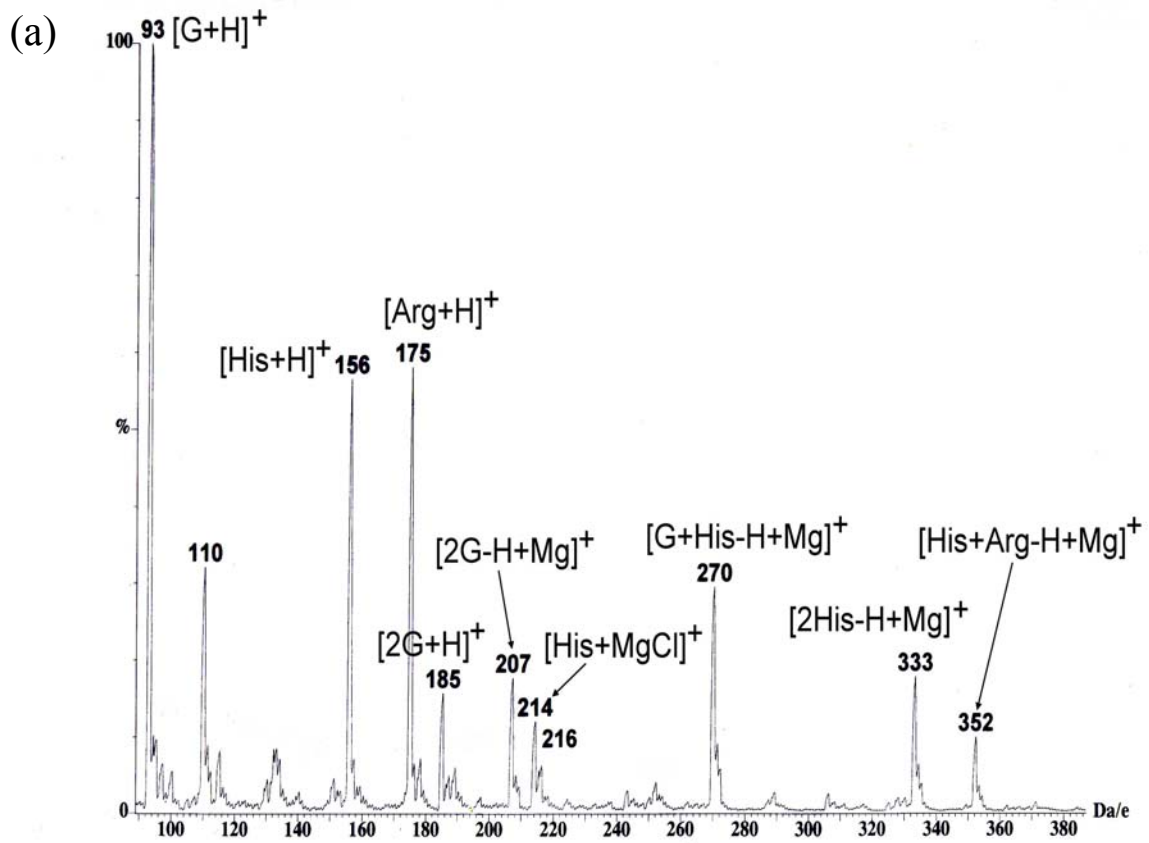


圖 3.16 (a) 胺基酸 Arg、His 與  $MgCl_2$  之質譜圖。(b)  $[Arg+His-H+Mg]^+$  錯和離子之 CAD 圖

要的功能之一。

為了得知胺基酸與金屬之間的鍵結關係，我們選取質荷比(m/z) 352 的  $[\text{Arg} + \text{His} - \text{H} + \text{Mg}]^+$  錯合離子，對其進行碰撞活化解離實驗，如圖 3.16-b 所示，以了解胺基酸與鹼土金屬之間的鍵結關係，由圖譜結果發現，鹼金屬與胺基酸錯合物母離子 (parent ion)  $[\text{A}_1 + \text{M} + \text{A}_2]^+$  的 CAD 圖譜只是簡單的單分子斷裂，而鹼土金屬與胺基酸錯合物母離子  $[\text{A}_1 - \text{H} + \text{M} + \text{A}_2]^+$  的 CAD 圖譜就複雜多了，其主要的差別在於鹼金屬為一價離子，而鹼土金屬為二價離子。雖然一價的鹼金屬與二價鹼土金屬的電子軌域分佈是一樣的，如  $\text{Na}^+$  與  $\text{Mg}^{2+}$  其電子軌域分佈皆為  $1s^2 2s^2 2p^6$ ，沒有 d 軌域與空的 p 軌域可以與胺基酸產生鍵結，所以其鍵結能力主要是受靜電引力 (electrostatic force) 的影響，電荷密度大且離子半徑小的二價鹼土金屬對胺基酸的吸引力比一價的鹼金屬來的大，所以鍵結能力較強，其 CAD 圖就不像鹼金屬圖譜只有單分子的斷裂及金屬離子來的訊號那麼簡單，而是包含胺基酸結構的斷裂。

鹼土金屬離子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  和  $\text{Ba}^{2+}$  與兩個不同胺基酸在質譜儀中所形成的錯合離子，其圖譜顯示，皆可得到  $[\text{A}_1 + \text{MCl}]^+$ 、 $[\text{A}_1 - \text{H} + \text{M}]^+$ 、 $[\text{A}_1 + \text{A}_2 + \text{MCl}]^+$  或  $[\text{A}_1 + \text{A}_2 - \text{H} + \text{M}]^+$  等相類似的錯和離子訊號，如圖 3.17 所示。然而，從圖譜 3.17 中比較發現，改變

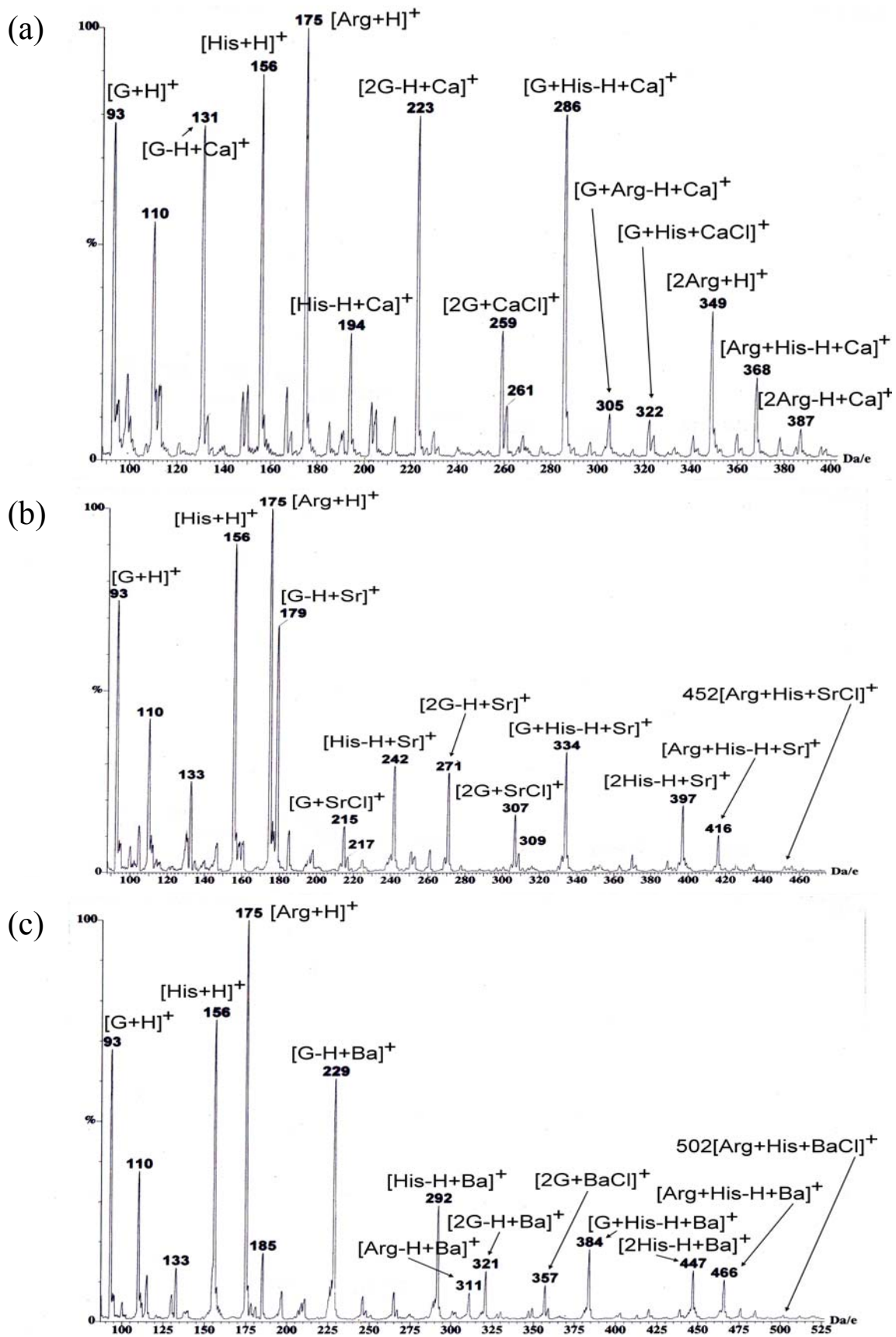


圖 3.17 胺基酸 Arg、His 與(a) $\text{CaCl}_2$ ；(b) $\text{SrCl}_2$ ；(c) $\text{BaCl}_2$  之質譜圖

不同的鹼土金屬，其 $[A_1 + MCl]^+$ 、 $[A_1 - H + M]^+$ 、 $[A_1 + A_2 + MCl]^+$ 或 $[A_1 + A_2 - H + M]^+$ 錯合離子的訊號越來越低，而造成這些差異之主要原因有：一、電荷密度大小，二、離子半徑大小。由一次質譜圖發現，金屬離子半徑越小，電荷越集中，電荷密度相對也越大，所以對胺基酸的離子/分子吸引力也會越大，相對的胺基酸與金屬離子的訊號也就越強。

接著，我們選取胺基酸與金屬氯化物離子所得訊號 $[A_1 + A_2 + MCl]^+$ ，作碰撞活化解離實驗，其斷裂模式與原本預期只會斷裂 $A_1$ 、 $A_2$ 及 $A_1 + A_2$ 而得到 $[A_2 + MCl]^+$ 、 $[A_1 + MCl]^+$ 及 $[MCl]^+$ 的結果有極大的差異；以胺基酸 arginine、histidine 與金屬氯化物 $SrCl_2$  混和後所得的 $[Arg + His + Sr^{35}Cl]^+$ ，質荷比 (m/z) 452 及 $[Arg + His + Sr^{37}Cl]^+$ ，質荷比 (m/z) 454 為例，對其作碰撞活化解離實驗，由圖 3.18-a 發現，母離子會有 $H^{35}Cl$ 的中性丟失(neutral loss)，而產生質荷比 416 的 $[Arg + His - H + Sr]^+$ 子離子 (daughter ion) 訊號，同時，在圖譜中還可得到 (m/z) 261、242 及 175 的訊號，推測其結果主要由 $[Arg + His - H + Sr]^+$ 分別再丟失 histidine、 arginine 而得到 $[Arg - H + Sr]^+$ ，質荷比 261、 $[His - H + Sr]^+$ ，質荷比 242 及 $[Arg + H]^+$ ，質荷比 175 等訊號。由圖 3.18-b，針對氯同位素 $[Arg + His + Sr^{37}Cl]^+$ ，質荷比 (m/z) 454，所測得的二次質譜圖訊號，

可進一步印證此一推論。另外，由  $[A_1 + A_2 - H + M]^+$  的二次質譜圖皆只單純的得到  $[A_1 - H + M]^+$ 、 $[A_2 - H + M]^+$  等訊號，也證實  $[A_1 + A_2 - H + M]^+$  可能行上述的斷裂途徑。圖 3.19 發現，我們加大其碰撞能量對  $[Arg + His - H + M]^+$  訊號作其碰撞活化解離，同時放大斷裂訊號圖譜，發現  $[Arg + His - H + M]^+$  的二次質譜圖還可發現到質荷比 243、219、201 及 197 等訊號，而在其他組合的胺基酸中並不會發現此訊號，如圖 3.20 所示。此結果顯示這些訊號分別為含有胺基酸 arginine 所丟失質荷比 18 的  $H_2O$  及 42 的  $C(NH)_2$  而得到的特定訊號。

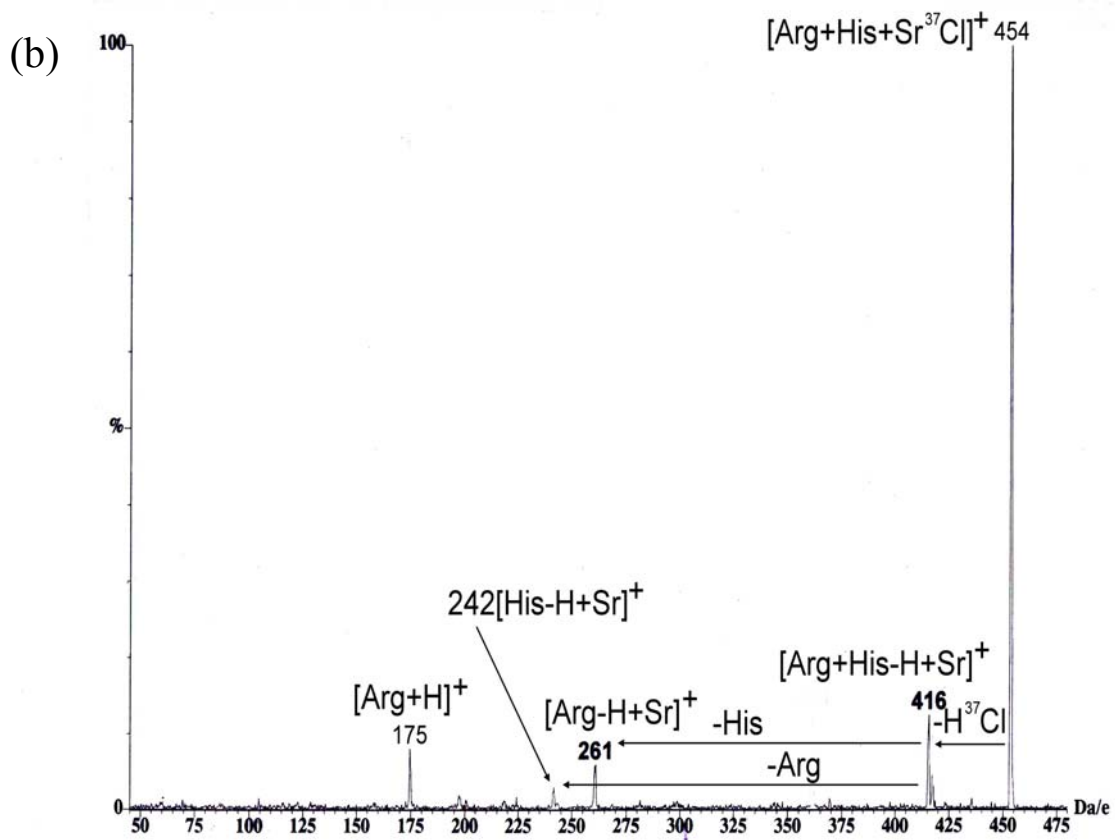
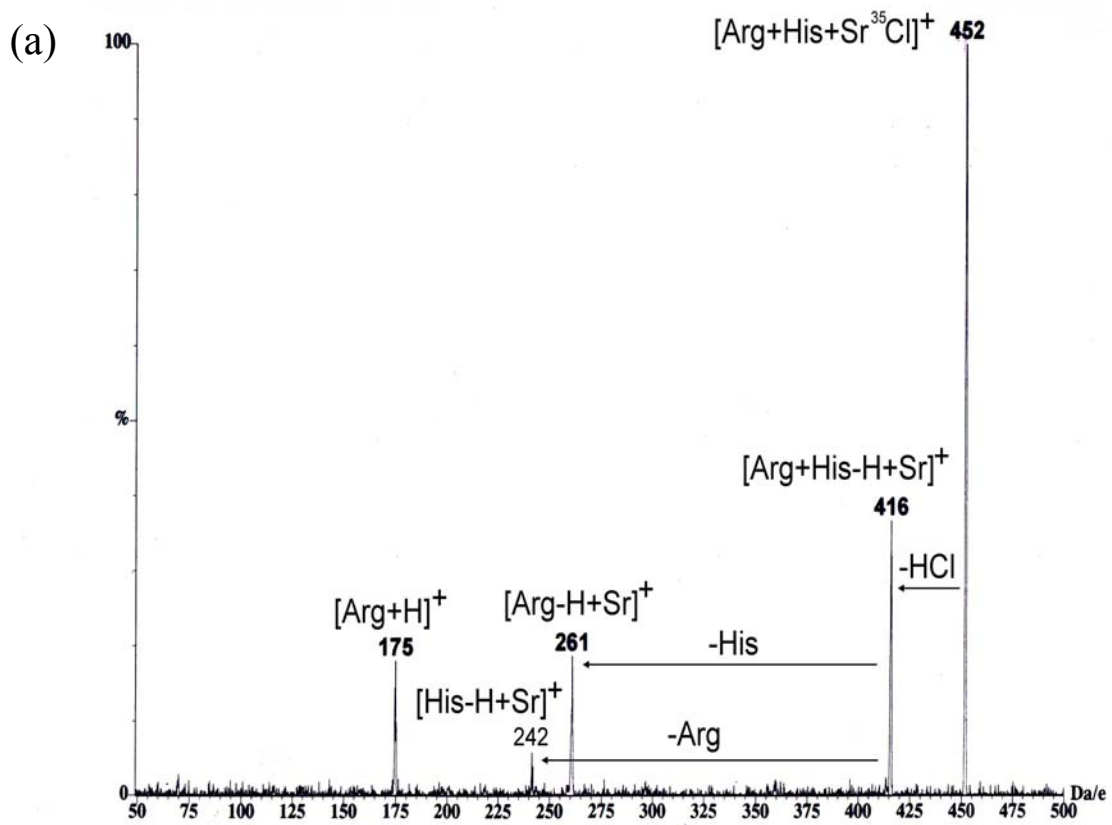


圖 3.18 (a) $[\text{Arg}+\text{His}+\text{Sr}^{35}\text{Cl}]^+$  ; (b) $[\text{Arg}+\text{His}+\text{Sr}^{37}\text{Cl}]^+$  錯和離子之 CAD 圖



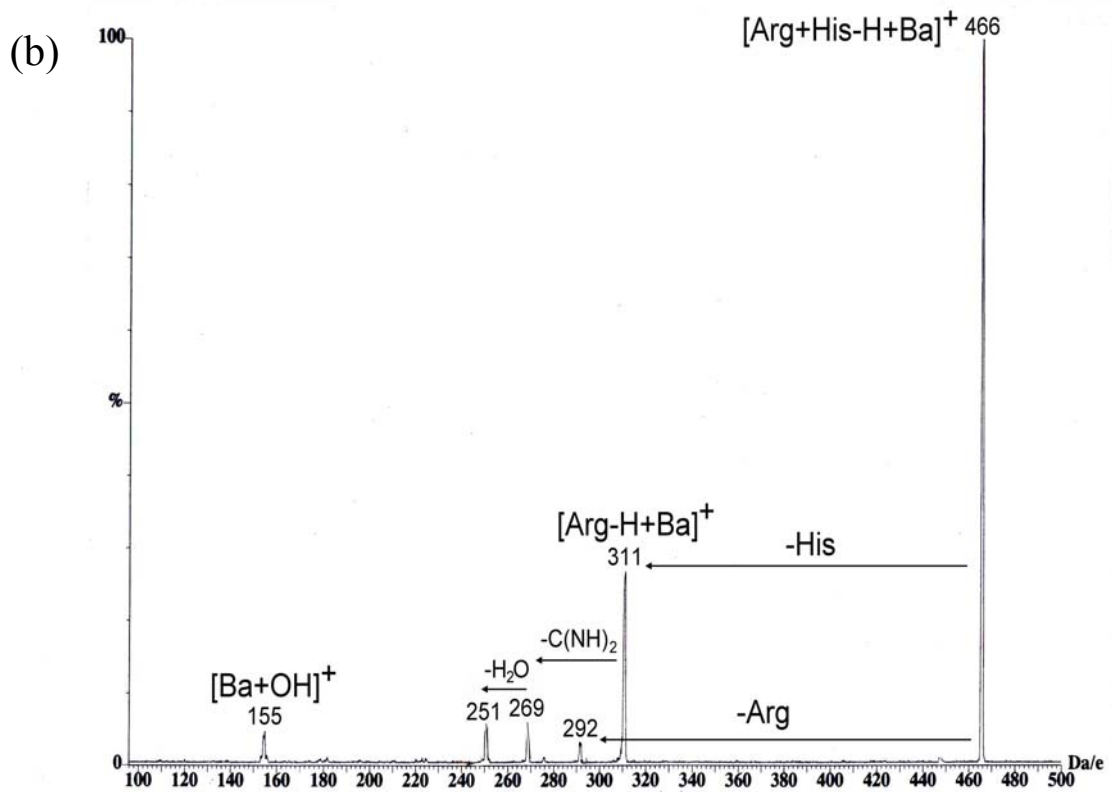
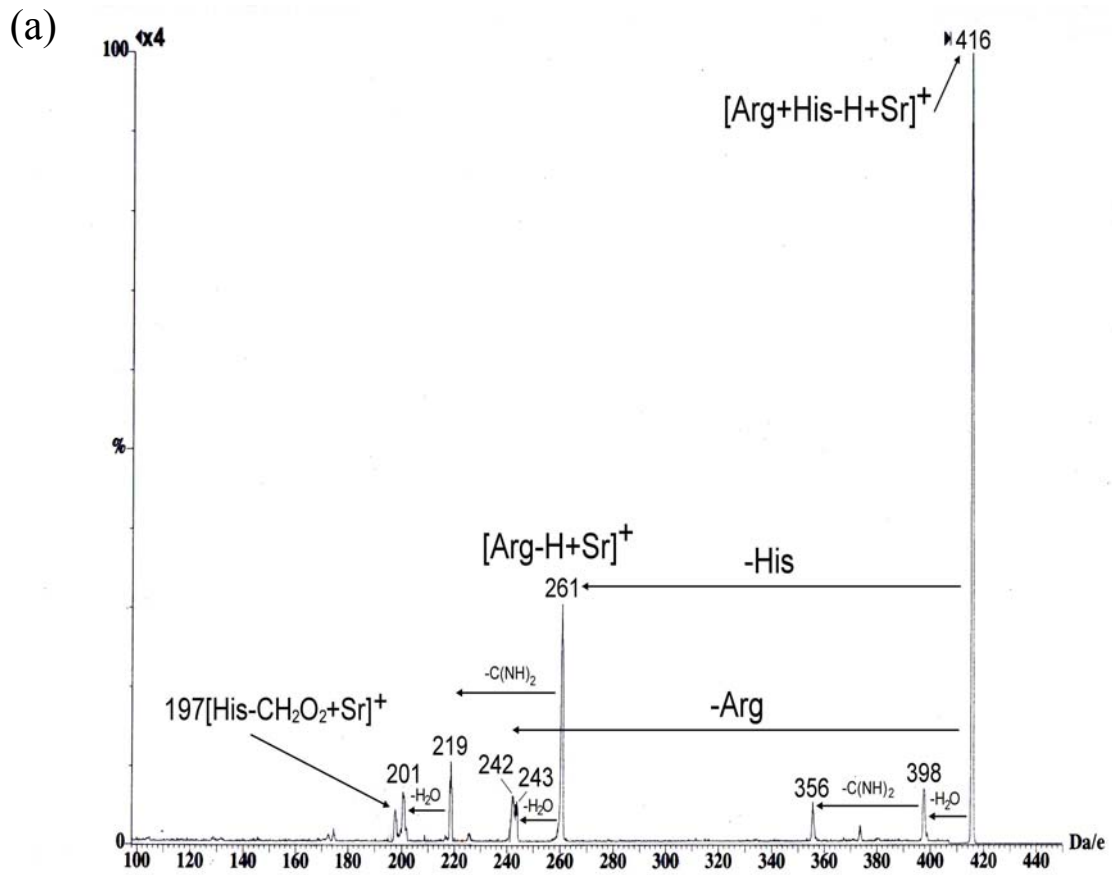


圖 3.19 (a) $[Arg+His-H+Sr]^+$ ；(b) $[Arg+His-H+Ba]^+$ 錯和離子之CAD圖。

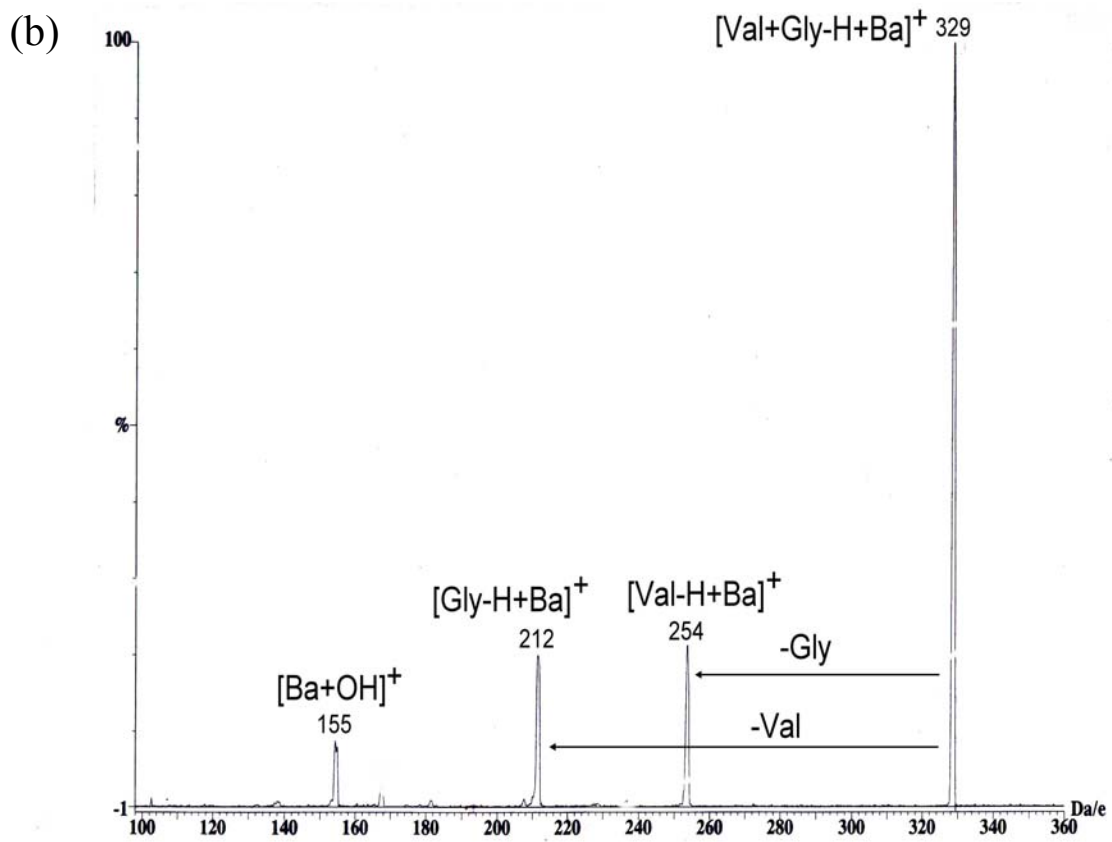
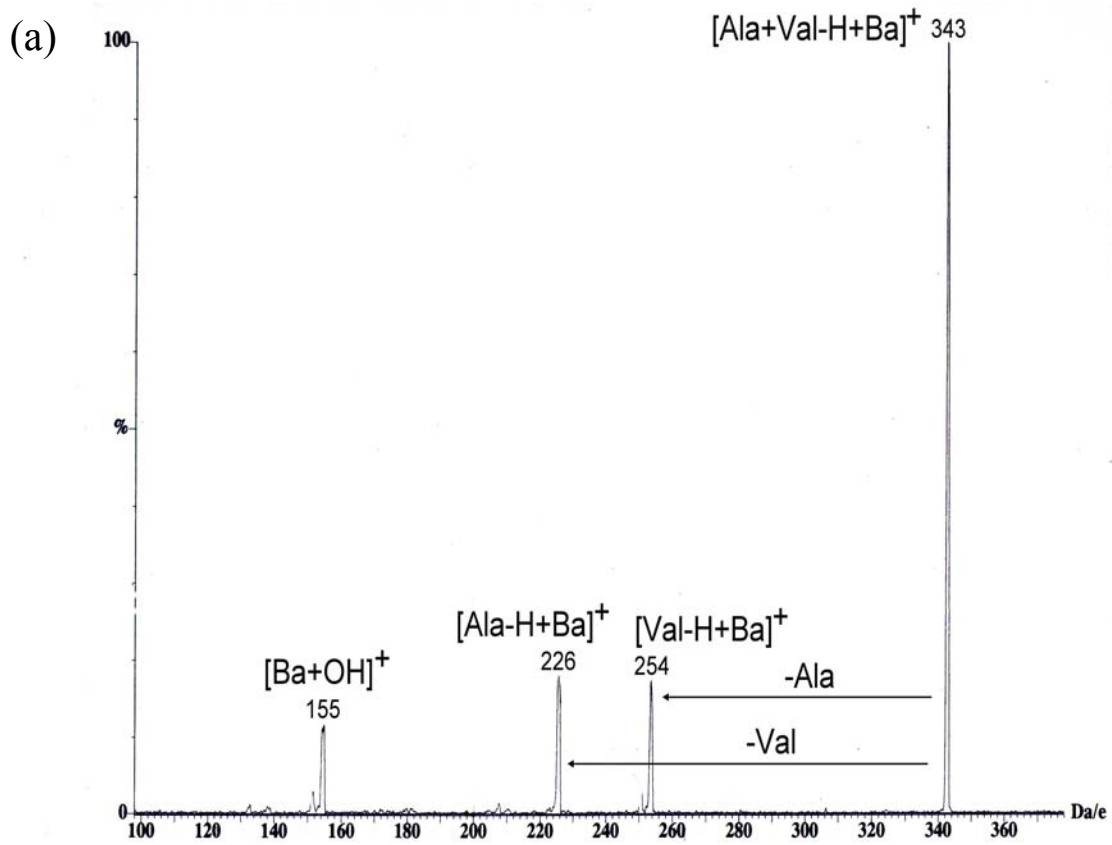


圖 3.20 (a) $[\text{Ala}+\text{Val}-\text{H}+\text{Ba}]^+$  ; (b) $[\text{Val}+\text{Gly}-\text{H}+\text{Ba}]^+$  錯和離子之 CAD 圖。

### 3.4 胺基酸與過渡金屬所形成錯合離子之鍵結特性

#### 3.4.1 過渡金屬的基本性質

過渡金屬與前面敘述之鹼金屬及鹼土金屬最大的不同在於過渡金屬離子  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  及  $\text{Ag}^+$  皆為軟酸，而胺基酸結構中之供體原子 N 或 O 原子都為硬鹼，根據硬軟酸鹼理論：硬酸偏好與硬鹼結合，而軟酸偏好與軟鹼結合，所以這些過渡金屬離子較不易與胺基酸形成各式的錯合離子。

在週期表相同電荷的離子其半徑由左至右大小漸減、有效核電荷增加、陰電性增加，以及失電子的能力遞減。而本實驗選擇同一週期之 Fe、Co、Ni 及 Cu 過渡金屬，其離子半徑大小差不多，主要的性質差異在於 *d* 軌域的電子數目，其電子組態如下：



另外，選取  $\text{AgNO}_3$  與胺基酸混和溶液來探討過渡金屬中電荷數的差異與胺基酸混和溶液在氣相環境下之鍵結情形。

### 3.4.2 胺基酸與過渡金屬在氣態下的鍵結情形

本實驗所使用之過渡金屬為  $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$  及  $\text{AgNO}_3$ ，由硬軟酸鹼理論中得知，過渡金屬離子  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  及  $\text{Ag}^+$  皆為軟酸，而胺基酸結構中之供體原子 N 或 O 原子都為硬鹼，從單體的錯合上發現，這些過渡金屬離子比具有硬酸性質的鹼金屬及鹼土金屬離子較不易與胺基酸形成各式的錯合離子，因此，也較不易發現含胺基酸與過渡金屬的異二聚體錯合離子。

實驗結果發現， $\text{FeCl}_3$  與兩不同胺基酸 ( $A_1$ 、 $A_2$ )，所得到的一次質譜 (MS) 圖大多為： $[\text{A} + \text{FeCl}]^+$ 、 $[\text{A}_1 + \text{A}_2 + \text{FeCl}]^+$  及  $[\text{A}_1 + \text{A}_2 - \text{H} + \text{Fe}]^+$  等訊號。如圖 3.21，胺基酸 arginine、histidine 與金屬氯化物  $\text{FeCl}_3$  及胺基酸 serine、valine 與金屬氯化物  $\text{FeCl}_3$  之 MS 圖中並未發現胺基酸與三價鐵所形成的錯合離子，由此可知，正三價鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 還原成正二價鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ )，使我們在 MS 圖譜中皆觀察到與  $\text{Fe}^{2+}$  所形成的錯合離子【3】。同時，我們選取  $[\text{2His} - \text{H} + \text{Fe}]^+$  與  $[\text{Arg} + \text{His} - \text{H} + \text{Fe}]^+$  錯合離子作其碰撞活化解離，發現  $[\text{2His} - \text{H} + \text{Fe}]^+$  與  $[\text{Arg} + \text{His} - \text{H} + \text{Fe}]^+$  所產生的訊號不盡相同，如圖 3.22 所示。比較圖 3.22 (a) 及 (b) 的結果，證明含有胺基酸 arginine 會中性丟失質分子量 18 的  $\text{H}_2\text{O}$  及 42 的  $\text{C}(\text{NH})_2$  而得到  $m/z=324$  的訊號。另外，我們從一次質譜圖中的  $[\text{A}_1 + \text{A}_2 + \text{FeCl}]^+$

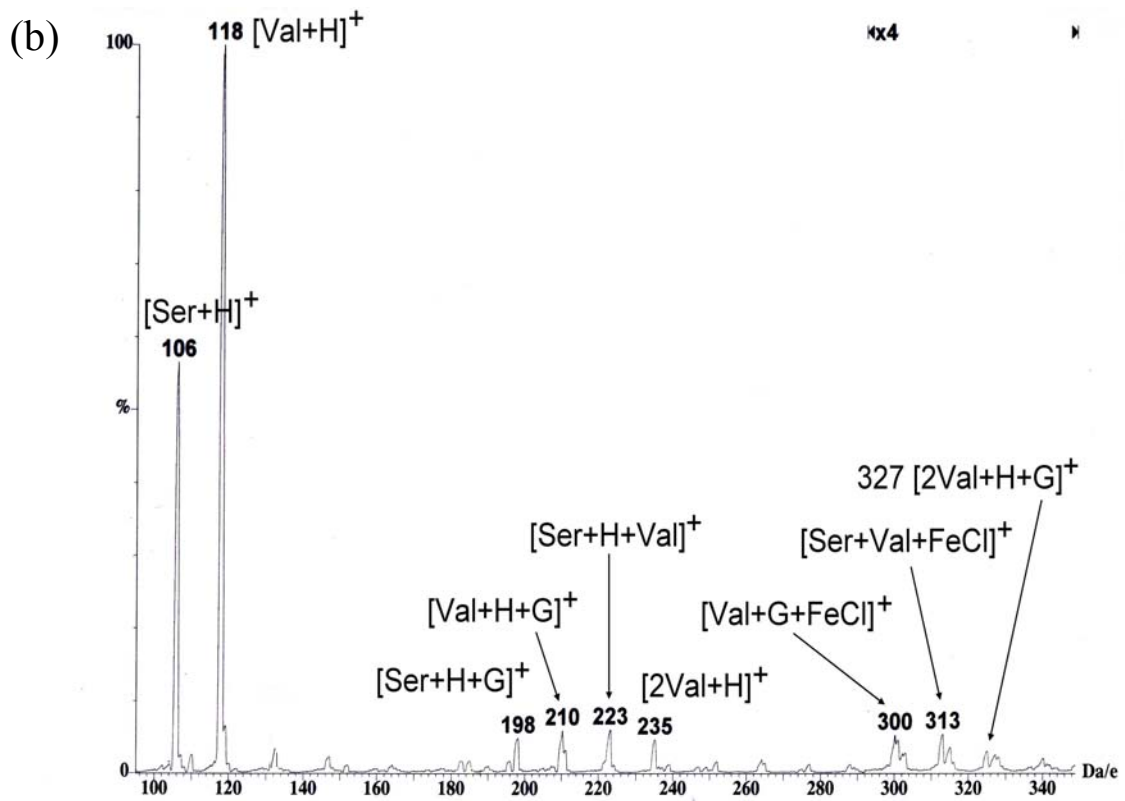
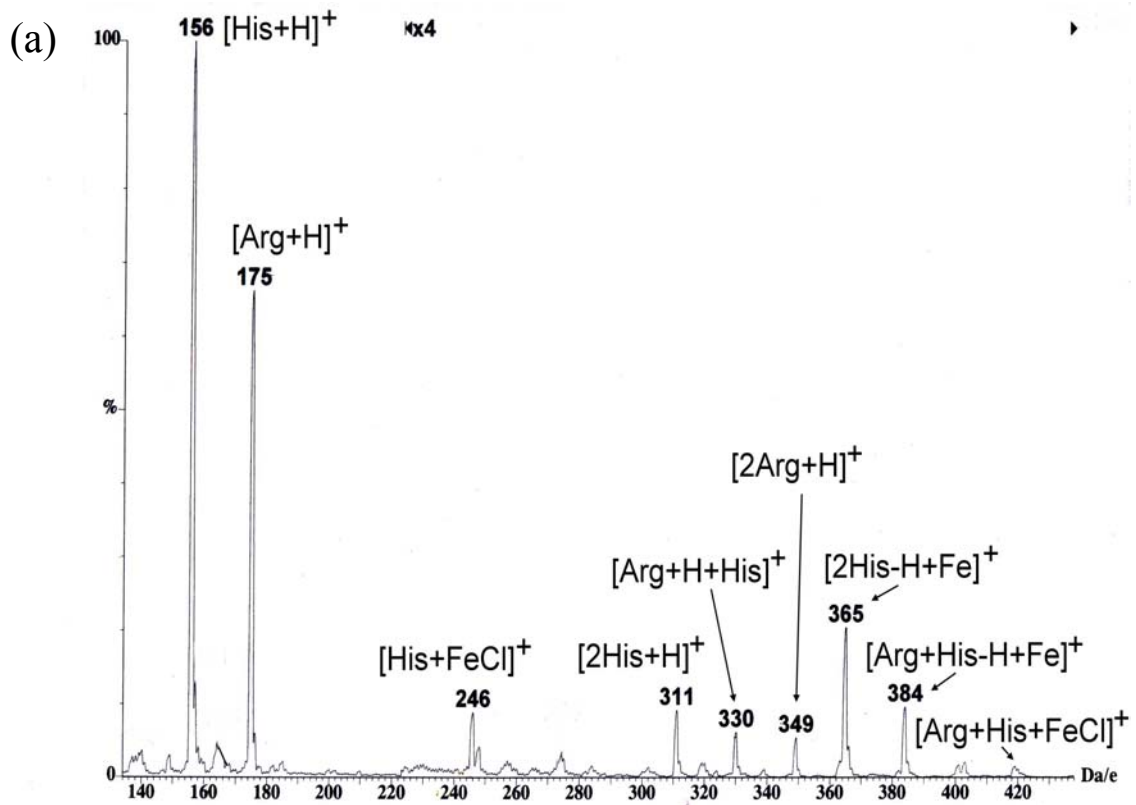


圖 3.21 (a)胺基酸 Arg、His 與 FeCl<sub>3</sub> 之質譜圖。(b)胺基酸 Ser、Val 與 FeCl<sub>3</sub> 之質譜圖。

離子訊號，作其碰撞活化解離，結果發現 $[A_1 + A_2 + FeCl]^+$ 的二次質譜圖卻與正二價之鹼土金屬所形成的 $[A_1 + A_2 + MCl]^+$ 錯合離子之斷裂途徑有明顯的不同，而研判最有可能的原因是 Fe 為軟酸，而胺基酸之 O、N 皆為硬鹼，所得胺基酸與金屬離子可能只是微弱的靜電力吸引。

而  $CoCl_2$  或  $NiCl_2$  與兩不同胺基酸 ( $A_1$ 、 $A_2$ )，所得到的一次質譜 (MS) 圖也大多為： $[A + MCl]^+$ 、 $[A_1 + A_2 + MCl]^+$  及  $[A_1 + A_2 - H + M]^+$  等訊號。如圖 3.24(a) 為胺基酸 threonine、phenylalanine 與  $CoCl_2$  混和溶液的一次質譜 (MS) 圖，同時，我們選取一次質譜圖中質荷比(m/z)378 的  $[Thr + Phe + Co^{35}Cl]^+$  離子訊號，作其碰撞活化解離，結果發現 $[Thr + Phe + Co^{35}Cl]^+$ 的二次質譜圖皆只單純的得到質荷比 342 的  $[Thr + Phe - H + Co]^+$ 、質荷比 258 的  $[Phe + CoCl]^+$ 、質荷比 213 的  $[Thr + CoCl]^+$ 、質荷比 166 的  $[Phe + H]^+$  及質荷比 120 的  $[Thr + H]^+$  等訊號，此結果更證實二價過渡金屬離子與胺基酸所形成的錯合離子有相同的斷裂途徑，如圖 3.24(b) 所示。

$CuCl_2$  及  $AgNO_3$  與胺基酸所得之圖譜有別於  $FeCl_3$ 、 $CoCl_2$  及  $NiCl_2$  與胺基酸所得之圖譜，由實驗圖譜結果發現， $CuCl_2$  與兩不同

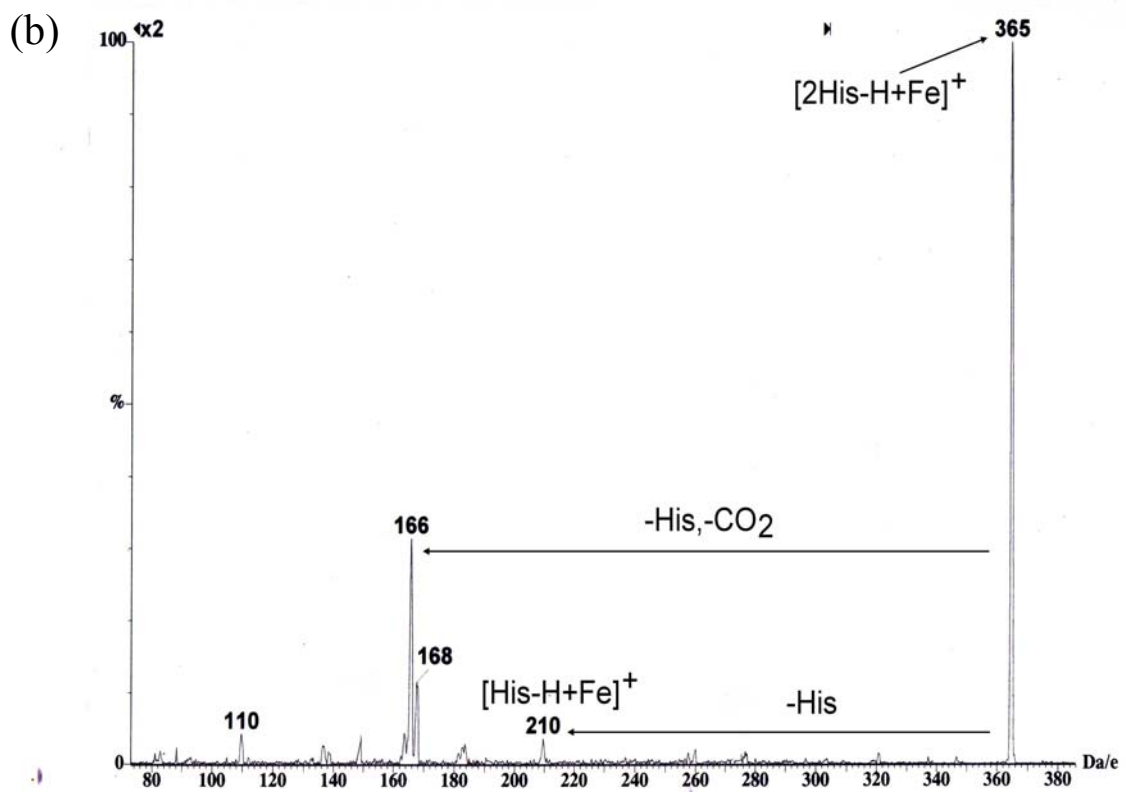
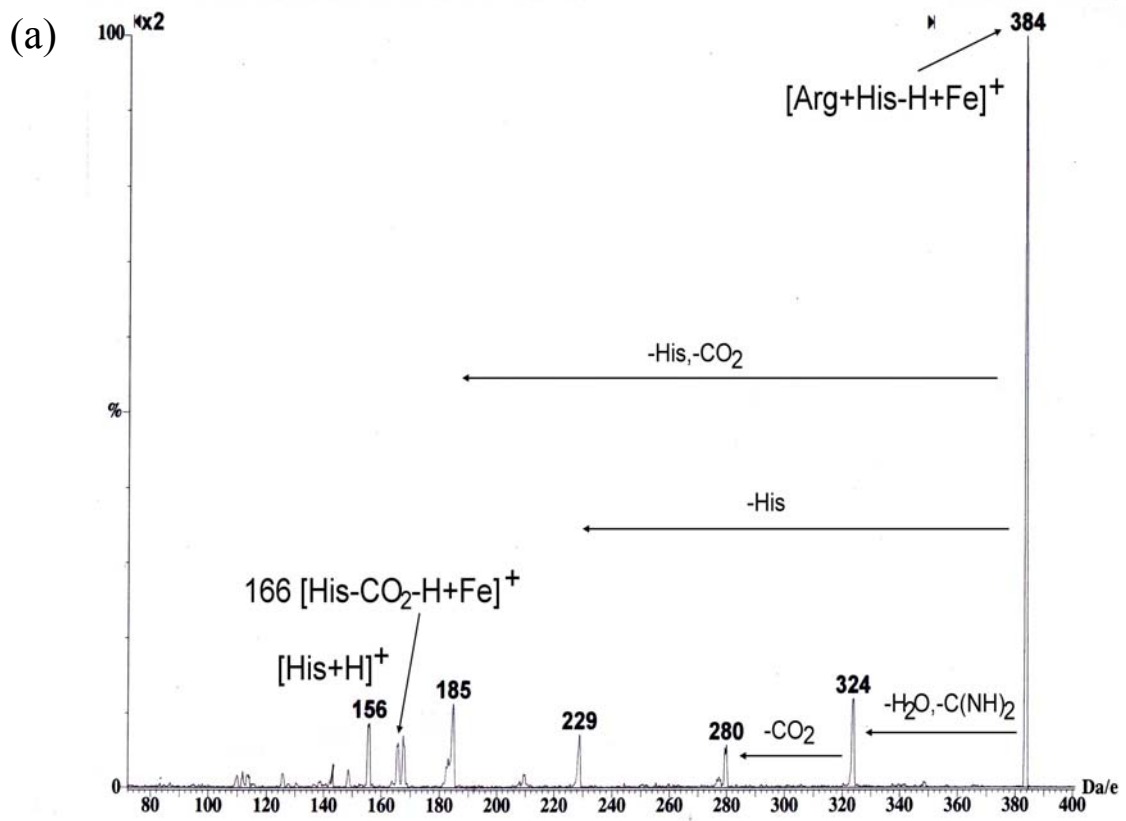


圖 3.22 (a) $[\text{Arg}+\text{His}-\text{H}+\text{Fe}]^+$  ; (b) $[2\text{His}-\text{H}+\text{Fe}]^+$ 之 CAD 圖。

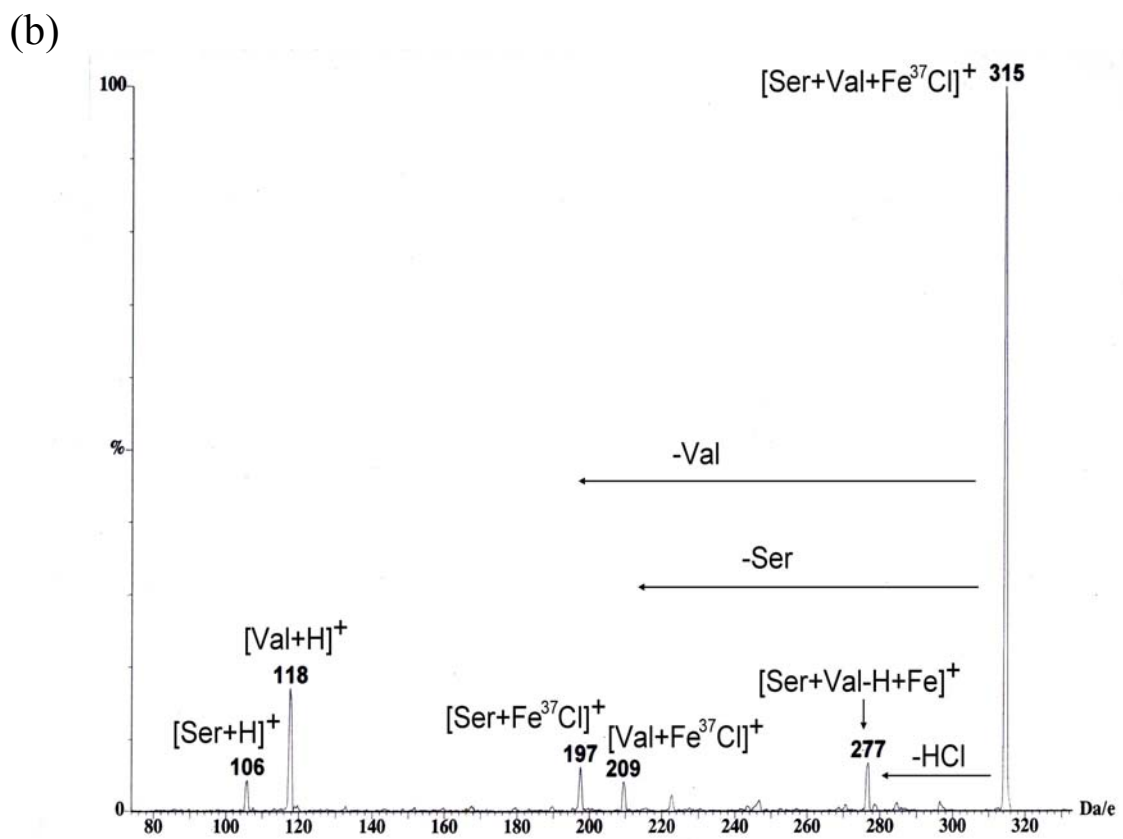
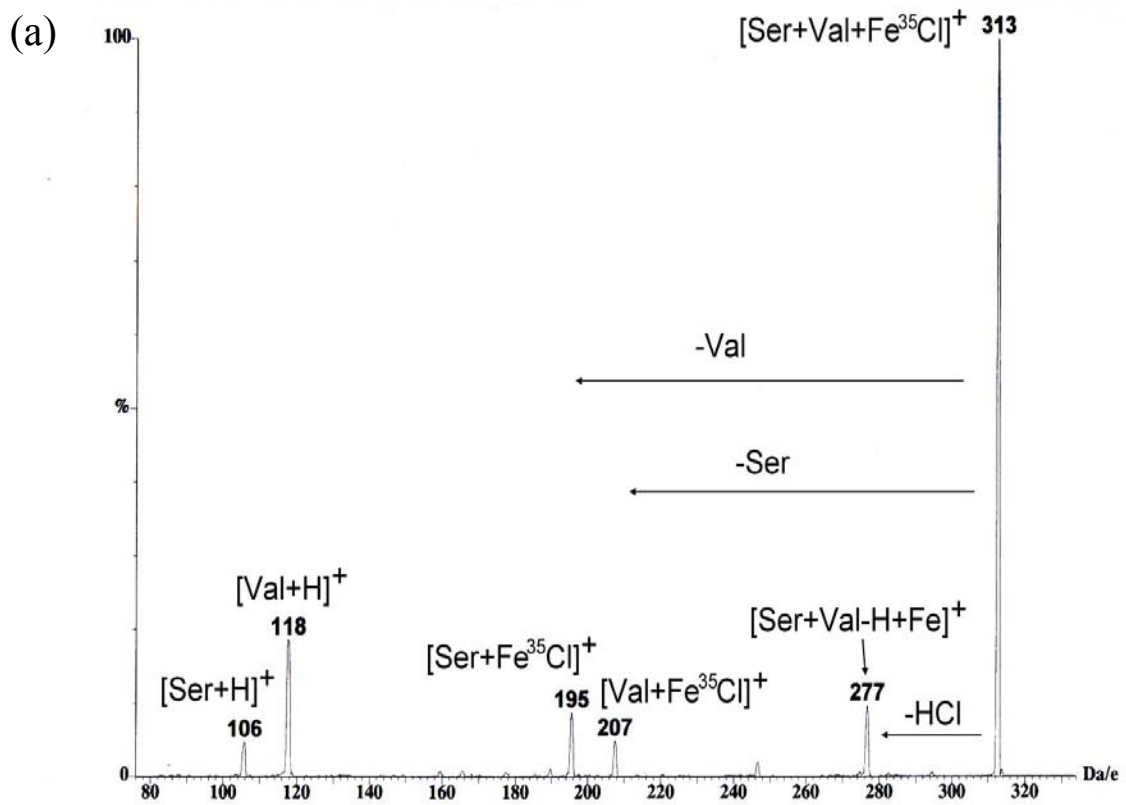


圖 3.23 (a) $[\text{Ser}+\text{Val}+\text{Fe}^{35}\text{Cl}]^+$ ; (b) $[\text{Ser}+\text{Val}+\text{Fe}^{37}\text{Cl}]^+$ 之 CAD 圖。



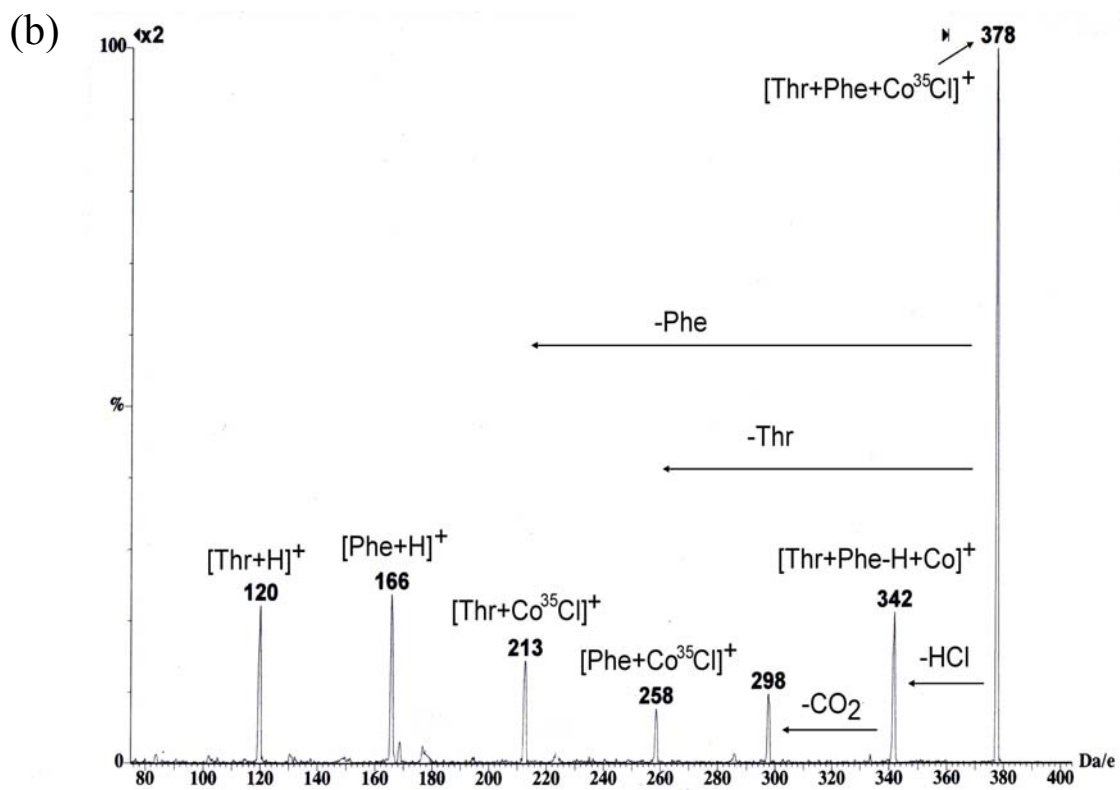
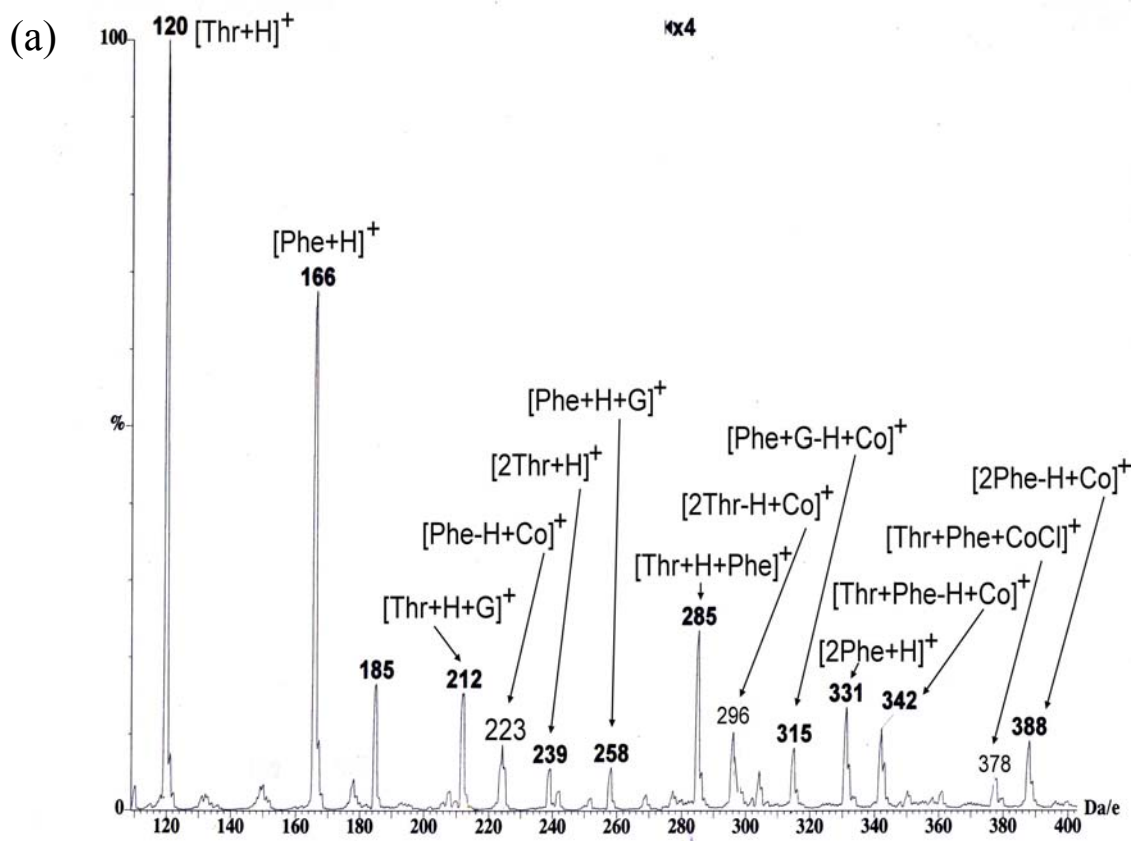


圖 3.24 (a) 胺基酸 Thr、Phe 與  $\text{CoCl}_2$  之質譜圖。  
 (b)  $[\text{Thr}+\text{Phe}+\text{Co}^{35}\text{Cl}]^+$  之 CAD 圖。

胺基酸 ( $A_1$ 、 $A_2$ ) 在氣態環境下，二價的銅離子會還原為一價的銅離子，而得到  $[A + Cu]^+$  及  $[A_1 + A_2 + Cu]^+$  等訊號的一次質譜 (MS) 圖，如圖 3.25(a) 所示。這是因為銅原子的電子組態為  $[Ar] 3d^{10} 4s^1$ ，而正一價的銅離子電子組態為  $[Ar] 3d^{10}$ ，屬於全填滿穩定狀態，所以圖譜中幾乎只看到與  $Cu^+$  所形成的錯合離子，我們選擇  $[A + Cu]^+$  離子訊號，利用銅的同位素 ( $^{63}Cu$ ， $^{65}Cu$ ) 與碰撞活化解離技術，以確認此一錯合離子為正一價的銅離子所形成，如圖 3.25(b) 所示。

另外  $AgNO_3$  與胺基酸所得的一次及二次圖譜似鹼金屬與胺基酸混和後所得之結果，如圖 3.26 及 3.27 所示。似鹼金屬離子主要是銀離子與鹼金屬離子皆為正一價金屬離子，但銀離子為軟酸而鹼金屬離子為硬酸，所以在圖譜上銀與胺基酸所得的訊號，較沒有鹼金屬離子與胺基酸所得的訊號強，主要為胺基酸結構中之供體原子 N 或 O 原子都為硬鹼，就硬軟酸鹼規則而言，硬酸偏好與硬鹼結合，而軟酸偏好與軟鹼結合【56】。

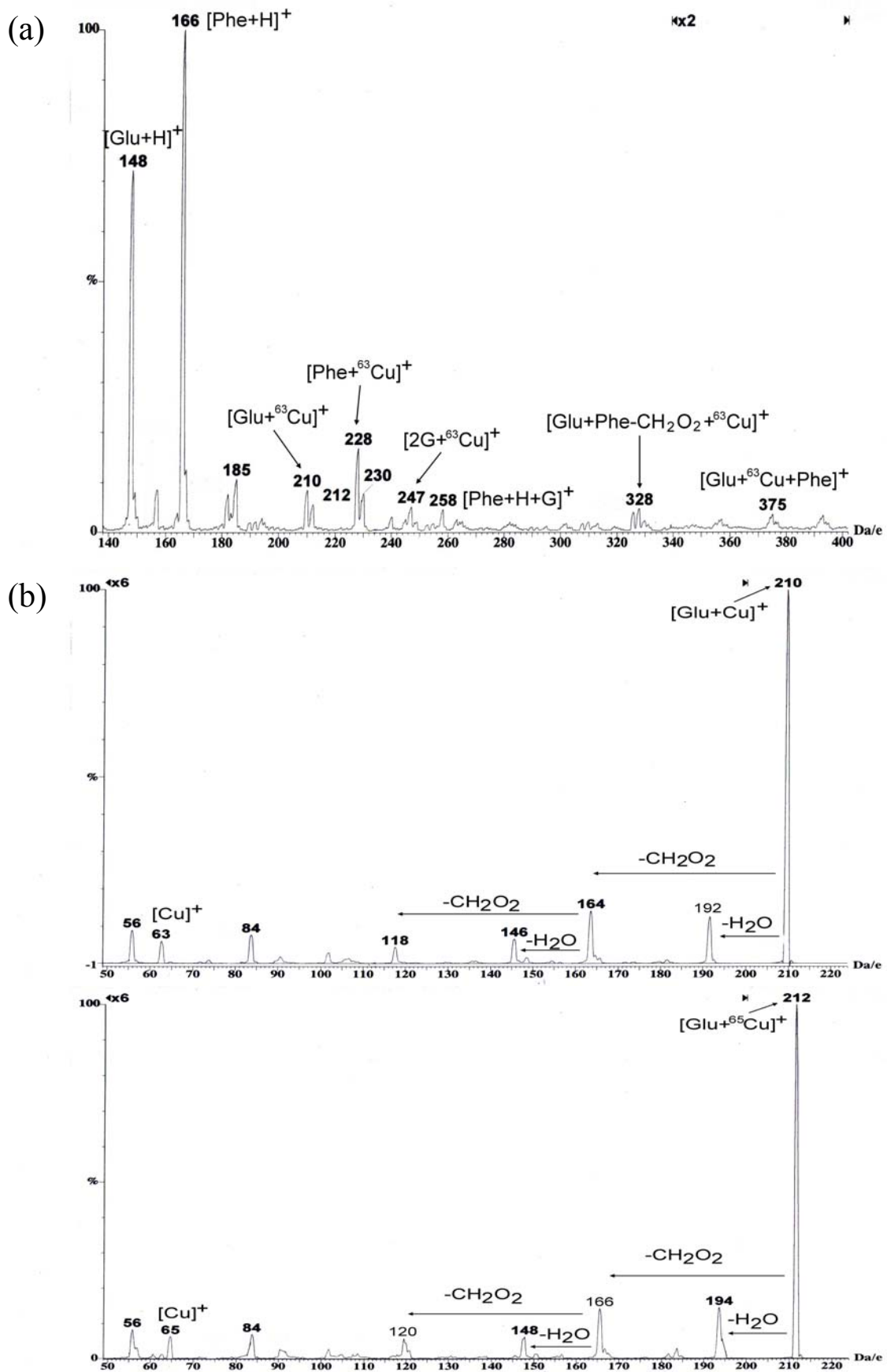


圖 3.25 (a) 胺基酸 Glu、Phe 與  $\text{CuCl}_2$  之質譜圖。  
 (b)  $[\text{Glu}+^{63}\text{Cu}]^+$  與  $[\text{Glu}+^{65}\text{Cu}]^+$  之 CAD 圖。

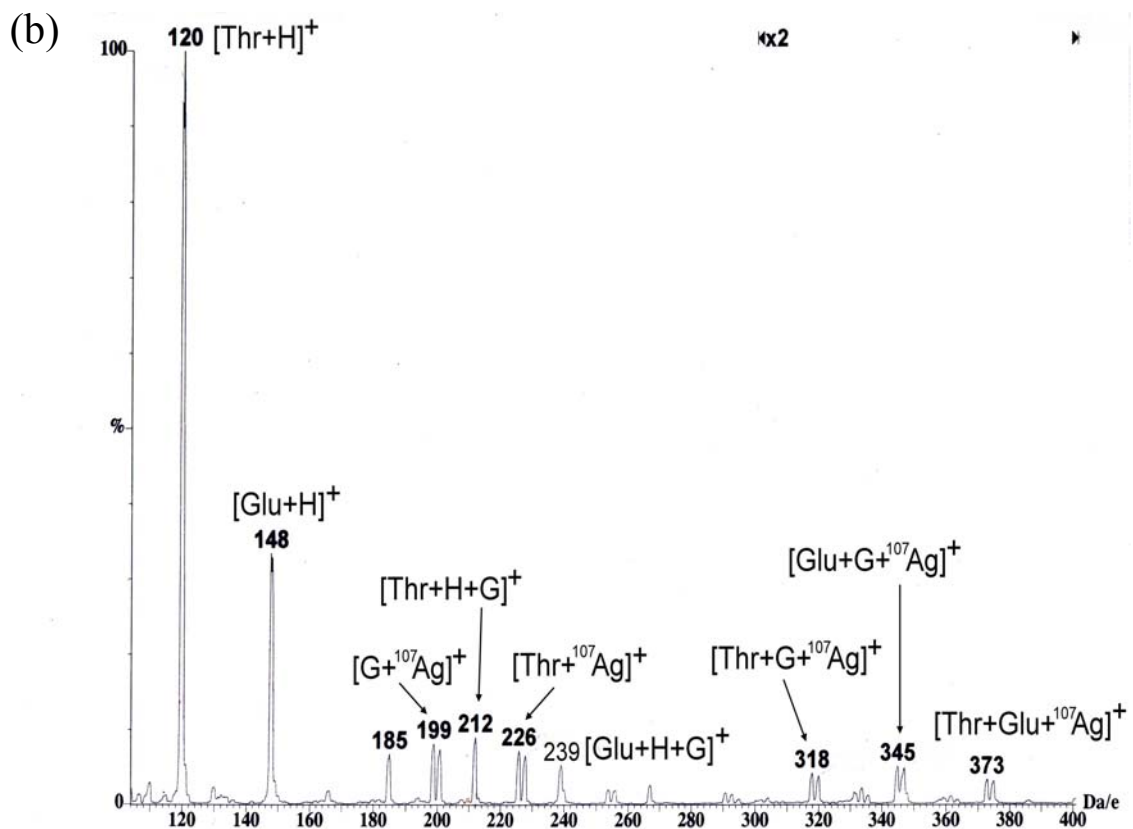
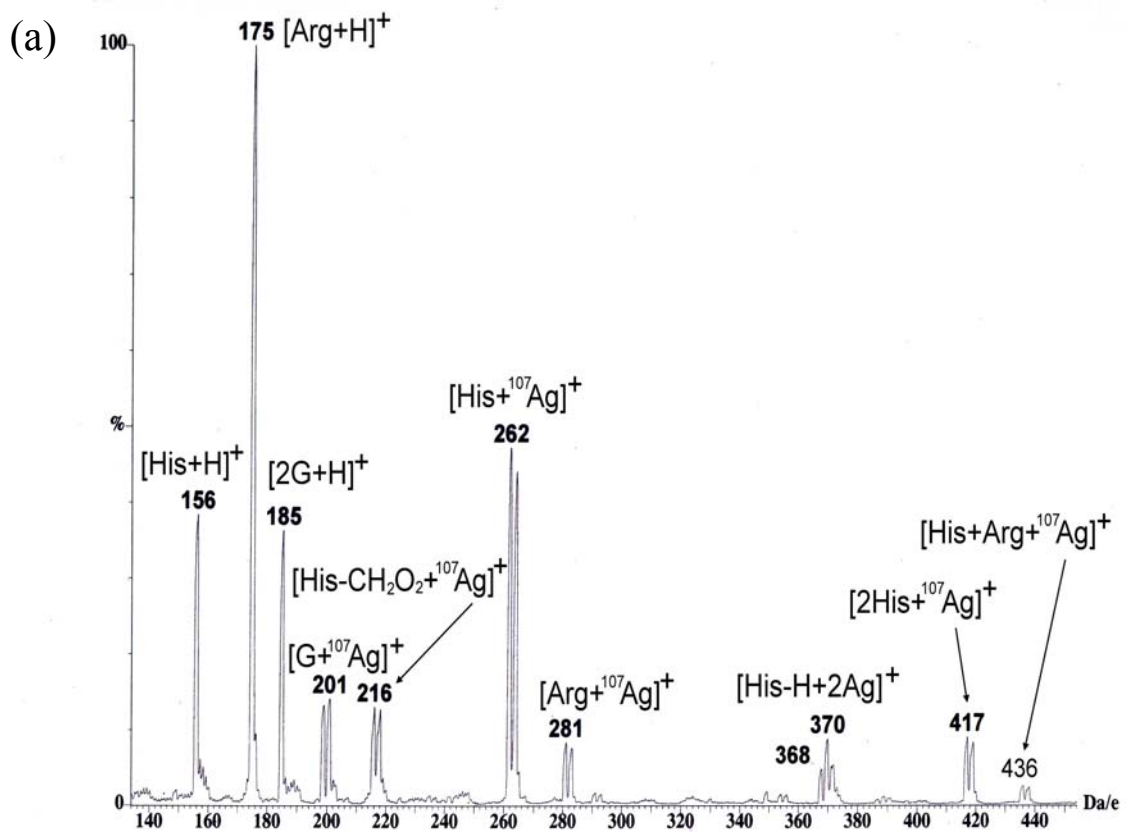


圖 3.26 (a)胺基酸 Arg、His 與  $\text{AgNO}_3$  之質譜圖。(b)胺基酸 Thr、Glu 與  $\text{AgNO}_3$  之質譜圖。

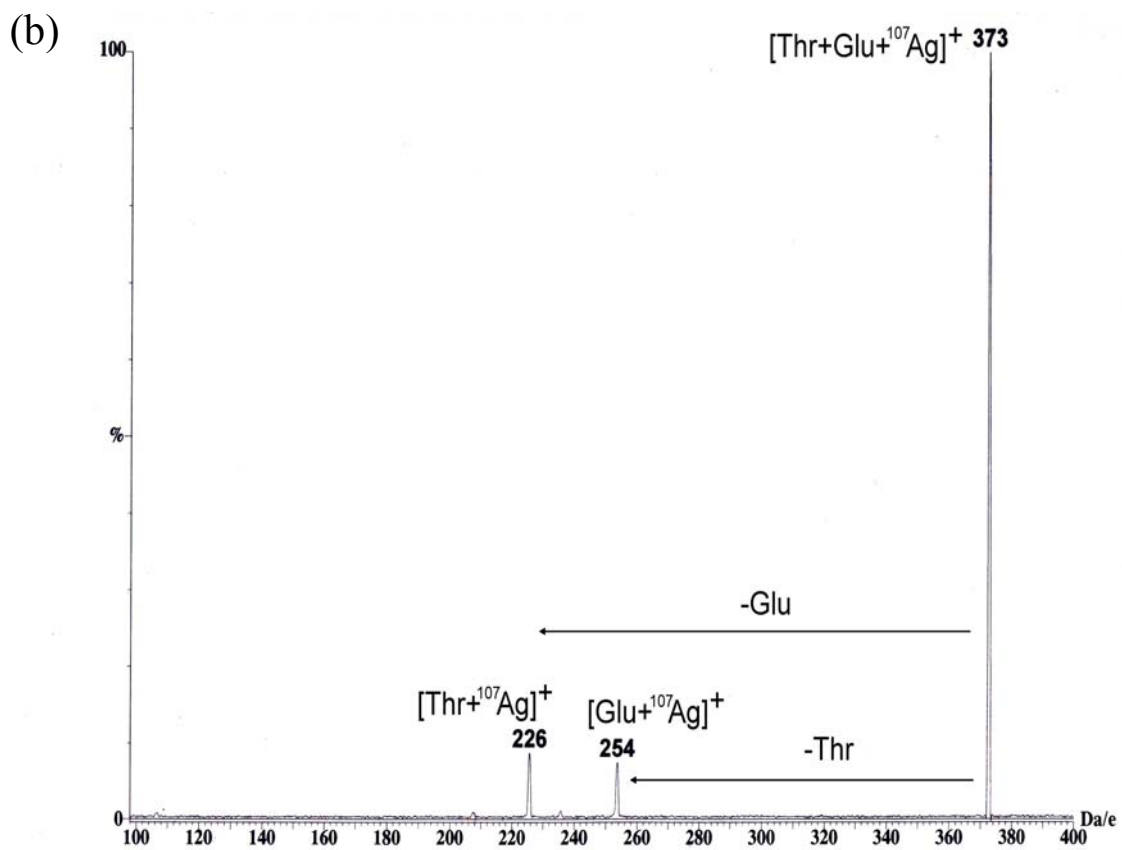
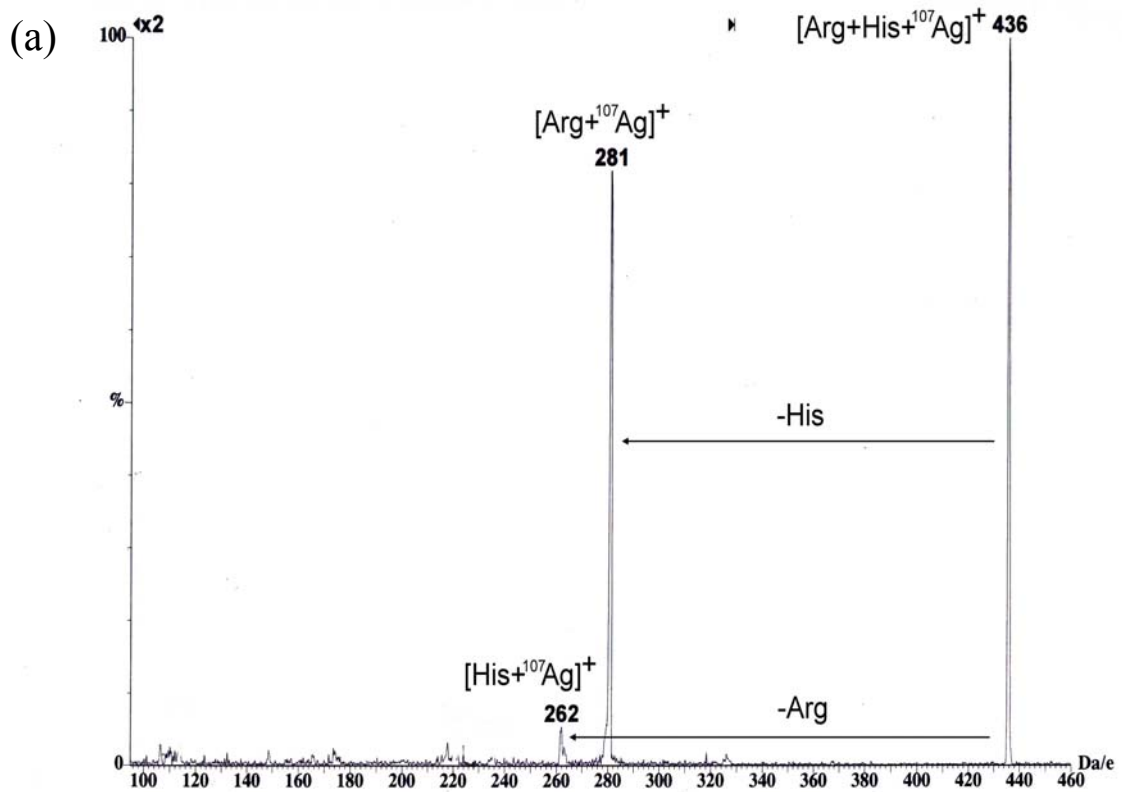


圖 3.27 (a) $[\text{Arg}+\text{His}+^{107}\text{Ag}]^+$ ; (b) $[\text{Thr}+\text{Glu}+^{107}\text{Ag}]^+$ 之 CAD 圖。

#### 四、結論

利用液態二次離子質譜法進行胺基酸之質子親和力或胺基酸之金屬親和力及鍵結關係測試時，必須對分析中所使用之介質詳加選擇，以求其最佳的條件。

胺基酸之質子親和力實驗結果中發現，使用 G 為介質所形成質子化離子  $[A_1 + H]^+$ 、 $[A_2 + H]^+$  及  $[A_1 + H + A_2]^+$  皆大於使用 Tg 為介質。由實驗結果得知，胺基酸在氣相中易形成質子化單體、二聚體及異二聚體的叢聚離子，影響這些質子化叢聚離子形成，最主要的原因為分子間氫鍵。在氣相中形成這些叢聚離子是相當本質的，通常質子化二聚體離子在 LSIMS 中形成方式是由氫質子配位在單一分子上，藉由架橋再與另一個分子結合成質子化二聚體，這種非共價鍵結合的離子錯合物，經過碰撞活化解離，將非常容易釋出完整的中性分子，成為單體形式之質子化分子離子，並可由動力學方法，求得胺基酸之質子親和力。

胺基酸之鹼金屬親和力實驗結果中發現 G 介質對  $Li^+$  有強親和力，主要原因為，液態溶液中 G 為鹼金屬離子的二牙基，鉗合作用乃發生在鄰近的 -OH 基上；推測氣相中， $[G + Li]^+$  離子可再經由 G 分子第三個 -OH 基來形成分子內氫鍵，而提高氣相中  $[G + Li]^+$  離子的穩定性。Tg 與 G 兩者不同介質比較結果發現，Tg 對鹼金屬離子

的親和性較 G 來的弱，也意味 Tg 較不會與胺基酸競爭鹼金屬離子。當鹼金屬離子與兩種不同胺基酸形成 $[A_1 + M + A_2]^+$ 錯合離子後，進行碰撞活化解離過程後發現，隨著金屬離子半徑加大，電荷密度降低，使金屬離子與胺基酸分子鍵結的鍵能減弱，因而更容易釋出金屬離子。另外，分子結構也會影響 $[A + M]^+$ 鍵結強度，例如結構上有陰電性較高的原子，如 O、N、S，同時再加上金屬離子較偏好於電子多的地方，這種現象將有助於金屬離子與分析物緊密結合形成錯合離子，但如果胺基酸分子結構上電負度高的原子零散分佈，所形成錯合離子間的金屬鍵結也僅會以微弱的靜電力相結合。實驗發現不論鹼金屬離子與胺基酸的鍵結強度如何，其 $[A_1 + A_2 + M]^+$ 錯合離子之碰撞活化解離結果，都只是進行簡單的單分子丟失途徑。

而胺基酸與鹼土金屬實驗所產生的離子訊號，有別於鹼金屬。主要為鹼金屬為正一價的離子，而鹼土金屬為正二價離子，因此鹼土金屬氯化物與胺基酸結合時，通常會以丟失一個  $Cl^-$  的形式或以去質子化反應，與胺基酸形成 $[A_1 + MCl]^+$ 、 $[A_1 - H + M]^+$ 、 $[A_1 + A_2 + MCl]^+$  或 $[A_1 + A_2 - H + M]^+$ 錯合離子。

另外，胺基酸與過渡金屬實驗中發現，正三價鐵離子會還原成正二價鐵離子，使我們在 MS 圖譜中皆觀察到與  $Fe^{2+}$  所形成的錯合離子，再者，正二價的 Co 離子或 Ni 離子與胺基酸，所得到的一次

質譜圖及二次質譜圖性質，其結果皆與二價鐵離子雷同。而  $\text{CuCl}_2$  及  $\text{AgNO}_3$  與胺基酸所得之圖譜發現，二價的銅離子會還原為一價的銅離子，這是因為銅原子的電子組態為  $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$ ，正一價的銅離子電子組態為  $[\text{Ar}] 3d^{10}$ ，屬於全填滿穩定狀態，所以圖譜中幾乎只看到與  $\text{Cu}^+$  所形成的錯合離子。另外  $\text{AgNO}_3$  與胺基酸所得的一次及二次圖譜似鹼金屬與胺基酸混和後所得之結果，主要是銀離子與鹼金屬離子皆為正一價金屬離子，但銀離子為軟酸而鹼金屬離子為硬酸，主要為胺基酸結構中之供體原子 N 或 O 原子都為硬鹼，而硬酸偏好與硬鹼結合，而軟酸偏好與軟鹼結合，所以在圖譜上銀與胺基酸所得的訊號，較沒有鹼金屬離子與胺基酸所得的訊號強。

一系列胺基酸分子與質子或金屬離子之間關係的探討，有助於在未來應用到胜肽及蛋白質和不同金屬離子所形成的陽離子化錯合離子之間的研究，同時這也是目前本實驗室發展的目標。



## 參考文獻

1. Cerda, B. A. ; Cornett, L. ; Wesdemiotis, C. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *193*, 205.
2. McLuckey, S. A. ; Cameron, D. ; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1313.
3. Cooks, R. G. ; Kruger, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1279.
4. Bojesen, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5557.
4. Kimio, I. ; Toshiko, O. ; Mitsutaka, A. *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 620.
6. Mallis, L. M. ; Russell, D. H. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1076.
7. Bojesen, G. ; Breindahl, T. ; Andersen, U. N. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1448.
8. Cerda, B. A. ; Wesdemiotis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9734.
9. Morgan, D. G. ; Bursey, M. M. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 473.
10. Leary, J. A. ; Williams, T. D. ; Bott, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 192.
11. Teesch, L. M. ; Adams, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 812.
12. Teesch, L. M. ; Orlando, R. C. ; Adams, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3668.

13. Teesch, L. M. ; Adams, J. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 931.
14. Tang, X. J. ; Thibault, P. ; Boyd, R. B. *Org. Mass Spectrom.***1993**, *28*, 1047.
15. Grese, R. P. ; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5098.
16. Russel, D. H. ; McGlohon, E. S. ; Mallis, L. M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1818.
17. Tang, X. ; Ens, W. ; Standing, K. G. ; Westmore, J. B. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1791.
18. Grese, R. P. ; Cerny, R. L. ; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.***1989**, *111*, 2835.
19. Teesch, L. M. ; Adams, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4110.
20. Hu, P. ; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9153.
21. Hu, P. ; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8821.
22. Hoke, S. H. ; Yang, S. S. ; Cooks, R. G. ; Hrovat, D. A. ; Borden, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4888.
23. Reiter, A. ; Adams, J. ; Zhao, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7827.
24. Kückelmann, U. ; Müller, D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1998**, *172*, 71.

25. Nemirovskiy, O. V. ; Gross, M. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1020.
26. 李東穎, 東海大學應化所碩士論文, **1995**,
27. BarBer, M. ; Bordoli, R. S. ; Sedgwick, R. D. ; Tyler, A. N. *Nature.* **1987**, *293*, 270.
28. Williams, D. H. ; Bradley, C. ; Bojesen, G. ; Santikarn, S. ; Taylor, L. C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5700.
29. Williams, D. H. ; Bradler, C. V. ; Bojesen, G. ; Santikarn, S. *J. Biochem.* **1982**, *201*, 105.
30. Aberth, W. ; Straub, M. K. ; Burlingame, A.L. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2029.
31. 何國榮, 化學, 中國化學協會, **1990**, *48*, 71.
32. Falick, A. M. ; Wang, G. H. ; Walls, F. C. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1308.
33. Aberth, W. H. ; Burlingame, A. L. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1426.
34. 李茂榮, 林孝道等, 質譜分析專輯, 國科會精密儀器中心編譯, **1992**,
35. Thomson, J. J. *Rays of Postive Electricity and Their Applications to Chemical Analysis*, Langmans : London **1913**,
36. Busch, K. L. ; Glisg, G. L. ; Mcluckey, S. A. *Mass Spectrometry / Mass Spectrometry : Techniques and*

- Applications of Tandem Mass Spectrometry, VCH Publishers, Inc, **1988**,
37. Cooks, R. G. ; Beynon, J. H. ; Caprioli, R. M. ; Lester, G. R. *Metastable Ion*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, **1973**,
38. McLuckey, S. A. ; Schoen, A. E. ; Cameron, D. ; Cooks, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 848.
39. Gower, J. L. *Biomed. Mass Spectrom.* **1985**, *12*, 191.
40. Cook, K. D. ; Todd, P. J. ; Friar, D. H. *Biomedical and Environmental Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 492.
41. Connelly, M. J. ; Orth, R. G. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 903.
42. 王貞音, 成功大學化學所碩士論文, **1992**,
43. Douglas, B. E. ; McDaniel, D. H. ; Alexander, J. J. *Concepts and Models of Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. New York, **1994**,
44. 林秀瑁, 東海大學應化所碩士論文, **1996**,
45. Mitsuo, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 309.
46. Phillips, D. R. ; McCloskey, J. A. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, *128*, 61.
47. Michaud, D. P. ; Kyranos, J. N. ; Brennan, T. F. ; Vouros, P. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1069.
48. Sunner, J. A. ; Kulatunga, R. ; Kebarle, P. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1312.

49. Dolnikowski, G. G. ; Heath, T. G. ; Watson, J. T. ;  
Scrivens, J. H. ; Rolando, C. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 481.
50. Vinogradov, S. N. ; Linnel, R. H. Van Nostrand Reinhold,  
New York, **1971**,
51. Davidson, W. R. ; Kebarle, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**,  
*98*, 6125.
52. Davidson, W. R. ; Kebarle, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**,  
*98*, 6133.
53. Haught, G. P. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 420.
54. Shannon, R. D. *Acta Crystallogr. Sect. A : Found. Crystallogr.* **1976**, *57*, 751.
55. 方湘儀, 東海大學應化所碩士論文, **1995**,
56. 戴元柏, 東海大學應化所碩士論文, **1999**,