生体分子のエレクトロスプレー

山下 雅 道*

(受理2003年 8 月26日, 掲載決定2003年11月 1 日)

Electrospray Ionization of Bio-molecules

Masamichi YAMASHITA

Institute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA)

3-1-1 Yoshinodai, Sagami-hara, Kanagawa, 229-8510, Japan

(Received August 26, 2003, Accepted November 1, 2003)

1. 生体分子の質量測定

いまやステーキは特上のごちそうとみられてはいないし、ファミリーレストランでは肉の碎片を型に入れて規格の形状にしあげたステーキを供することもあるのだが、ステーキ肉をつくっている分子の質量を知るにはどうしたらよいだろうか。

1923年にノーベル物理学賞を受賞した R. A. Millikan は、微細な油滴を大気中で帯電させて、沈降運動の速度が電場中で変化するのを観察した¹⁾。沈降運動は、空気の粘性と油滴の大きさに支配される粘性抵抗、油滴の質量(半径と密度)に作用する重力によって決まる。そして、油滴のついた電荷が印加した電場から受ける力により沈降運動の速度は変化する。この実験により、電荷が離散的な値をとることが明らかにされ、電子の電荷を測定することができた。Millikan が実験で使った油滴の半径はおよそ $3\mu\text{m}$ であって、油の密度も既知であった。私たちは Millikan により定められた素電荷量をもとに、油滴ならぬステーキ肉分子の質量を逆に求めることができるだろう。どのようにステーキ肉からステーキ肉分子を生成するかは後で検討することにして、Millikan の実験装置をそのまま転用するなら、分子量が 10^{13} ほどの分子の質量を測定できる。もうすこし工夫して、イオントラップのような 3 次元的な交流電場上下方向の直

流電場を重畳させて、帯電した小さな凝縮核(氷晶)を空間に保持し、その成長を観察するといった実験もかつてなされている。

油滴実験相当の分子では大きすぎるというのなら、半径が nm クラスの大きさの分子を考えよう。これなら、密度として 10^3 kg m^{-3} を仮定すると、分子量は 10^4 になり、一般的なタンパク分子のたぐいとなる。ではこのようなスケールの粒子の、地球表面での重力・常温常圧の空気中での運動はどのようなものだろうか。ここで登場するのがブラウン運動である。ブラウン運動は、1827年に R. Brown が報告したもので、水面に浮かぶ花粉を顕微鏡下で観察すると、花粉から微粒子がとびでて、ジグザグに動くという現象である。このランダムな運動の理論的な解析は、A. Einstein により1905年に発表されており²⁾、分子拡散現象とみることができる。ブラウン運動は、熱的な運動をしている媒質分子が粒子に衝突して粒子へ与えられる運動量により駆動される。したがって、媒質分子と着目する粒子の質量比が1に近づくと、粒子がランダムに運動する度合いは高まる。重力による沈降運動とブラウン運動の効果は、およそ10 nm の半径の粒子(分子量 10^7 相当)において均衡してしまう。すなわち空気中での沈降運動から重量を正確にはかることは、熱的な雑音により不可能になる。

そこで、分子ほどに小さな質量を精度よく測定するには、周囲の気体分子の熱的な運動による擾乱のない真空中で測定することになる。分子をイオンとしたうえ、電場や磁場により、その電荷に力を加える。イオンの運動

* 宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部(〒229-8510 相模原市由野台 3-1-1)

の加速度は、力を質量で除したものとなる。イオンの軌跡や飛行時間から、イオンの質量/電荷比を測定でき、既知の素電荷をもとに分子の質量を求めることができる。あるいは、既知の質量の分子での測定と比較して分子量を求めるのが、一般的な方法である。

2. 生体分子のイオン化

質量分析の第一歩は、試料から分子を生成し、それをイオン化することにある。まず第一段目のステーキ肉からステーキ肉分子を作る方法を考えてみよう。肉は、分子と分子がからみあい、分子間の相互作用によって引きあってその形を作っている。物質を熱すると、温度が上昇し、分子の熱運動は盛んになる。分子は分子同士が引きあうのを脱し、分子はばらばらにほどけて蒸発する。それでは、ステーキ肉を加熱したらどうだろうか。ステーキ肉分子が蒸発することではなく、柔らかな肉は堅く変性する。さらに加熱を続けると、炭素分が多くなるのを反映して褐色に焦げて、最後はいくらかの脂質と水などの蒸気と炭状の固形物質になってしまい、ステーキ肉分子を得るという目的を達成することはできない。

生命が水の中で始まったことにも由来して、生物体を構成したり、あるいは代謝される分子やそれを構成する小さな分子は、水によく溶ける。私たちの体をみると、摂食した食物は消化器のなかで物理・化学的な仕組み、さらには微生物の働きにより小さく分解される。分解された分子は、消化管の壁の細胞によりとりこまれ、血管中を循環する血液中に溶けて体中の細胞へと運ばれる。植物にしても、光合成産物やさまざまな情報をコードした化学種は、細胞を越え、また道管・師管といった循環路をとおり、植物体の内部を水溶化した状態で輸送され、植物体が構築され、生命活動がいとなまれる。

ある分子が別の分子の液相によく溶けるかどうかを決めるのは、Like to Like Rule とよばれる。分子の性質が似ていたり、それぞれの分子間の相互作用が似ているかが、溶けあう条件になる。水とよく溶けあう分子は、いろいろな性質が水分子に似ている。あるいは、その分子の周囲に水分子が強く結びつくことにより、その外側の水分子からすれば、その分子そのものではなく結びついた水分子を見ることになるのでよく溶けあう。

溶けあうために似るべき分子の性質のひとつは、分子の双極子モーメントである。水分子との親和性が高い生体分子は総じて極性が強い分子が多い。分子と分子の間の相互作用のありさまと、その相互作用を生みだす起源には、いくつかの類型がある。極性分子同士の相互作用には強いものがあるので、加熱して分子の熱的な運動を盛んにすることによって、相互作用している他の分子か

らふりほども、分子を蒸発させることは困難である。高温条件下で蒸発する以外に化学的な反応の経路がある分子では、蒸発する前に変性したり焦げてしまう。

液体クロマトグラフと質量分析計を組み合わせる生体化合物の分離と分析・同定が盛んに行われるようになる前は、化合物の極性基を化学的に修飾して分子の性質を変えることにより、気化して分析することもあった。いったん分子を気化することができれば、ガスクロマトグラフと質量分析計の組み合わせは強力な分析の手段であった。生体分子を選択的に高感度で質量分析する方法が求められ、生体分子に適応したイオン化法がいくつか登場したのである。

極性分子は、水溶液中で水素イオンを付加したりあるいは失うことにより分子イオンとして溶存したり、あるいは他のイオンとの親和性が高い傾向にある。このような極性の強い生体分子の性質を利用して、その分子が溶存している液体試料から直接分子イオンを生成しようというのが、エレクトロスプレー法である。エレクトロスプレーにより分子イオンを生成するのは、大気圧下でなされるのだが、その理由は後で説明しよう。分子イオンの質量分析は真空中でおこなうので、ここに一工夫が必要になる。

3. ポスト・ゲノム研究に寄与するエレクトロスプレー

John B. Fenn 博士は巨大タンパク分子の多電荷イオンをエレクトロスプレー法により生成し質量分析する方法を作り上げたことで2002年ノーベル化学賞を受賞した。エレクトロスプレーは溶液中の生体分子を選択的に効率よく、しかもソフトに壊さず分子イオンとして試料液中から取り出せる。これに加えて、多電荷イオンを生成し質量/電荷比を小さな値とすることで、分析系の質

図1 Berea College に掲げられる Fenn 博士ノーベル賞受賞記念額の中に示されるエレクトロスプレーの概念図。

量走査範囲を格段に拡大でき、分子量10万におよぶタンパク分子も分析可能であるという特徴をもっている。

分子生物学の急速な進歩によって、遺伝子の配列の多くが解読されている。それを基礎とするポスト・ゲノム時代の研究の焦点は、遺伝子のコードするタンパク分子とその生物学的な機能の解明に移っている。ところで、近代化学の確立のひとつの基礎は、化学反応にともなう質量の変化と総質量の保存を明らかにしたところにある。着目するタンパク分子の質量を測定し決定することは、ポスト・ゲノム研究の基盤となる。巨大な生体分子の立体的な構造を、核磁気共鳴法により解明し、分子の生体機能の理解を進める研究とともに、巨大生体分子のソフトイオン化による分子量の測定に2002年ノーベル化学賞が与えられた。これは、分子生物学の知識が集積され、それが有効な手段となり、生物学や医学が際だってホットな研究分野として急激な展開と発展をみせていることへの質量分析の貢献が認められたことによる。

4. エレクトロスプレー法の開発の歴史

エレクトロスプレー質量分析の初出論文が掲載されたのは1984年9月に発行されたJ. Phys. Chem. 誌である。この号は、当時Yale大学に在職していたFennの65歳を祝う特集として編集された。Fennもその発展に寄与した分子線化学によりノーベル化学賞を1986年に受賞するHerschbach教授らが心温まる序文³⁾をこの号に寄せている。同誌の発行された1984年までのFennの発表論文リストが巻頭にまとめられ、そのリストに続いて綴られたのがYamashita & Fennのエレクトロスプレー論文⁴⁾であった。この論文はFenn特集号の冒頭に掲載され、かつ先の論文リストの掉尾を飾った。その題名は、'Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme' とされ、普通であれば引退の65歳をすぎて、それまでの専門であった分子線・流体反応化学から生体分子の質量分析という新しい研究分野に転進することを高らかにうたっている。そして、超音速自由噴流や気体反応について築きあげてきたFennの学問の基礎の上に、85歳にしてノーベル賞受賞という輝かしい評価を得たエレクトロスプレーによる巨大生体分子の質量分析という成果を花咲かせた。

生体分子の質量を測定するのに、試料分子を分解することなくソフトに分子イオンとし、また高効率に多くの電荷をもつ分子イオンを生成する技術を開発するには、その過程で乗り越えるべきいくつかの要石があった。

ところで、エレクトロスプレー現象そのものはおよそ一世紀前にもすでに知られ、Yale大学のJ. Zelenyは1914年にこの現象を記載している⁵⁾。エレクトロスプレ

ーは、さまざまに活用されており、自動車の塗装方法として採用され、また宇宙で小さな推力を発生させるスラスターでの推進剤の供給に利用できるか検討する研究もなされている。一風変わった使われ方には、化粧品の皮膚への塗布もなされ、その器具を質量分析に応用している例⁶⁾もある。

さて、エレクトロスプレー現象の応用の一つとして、M. Doleはポリスチレン・ポリマーの質量測定法を考案して1968年に報告している⁷⁾。ポリマーの(電子付加)イオンをエレクトロスプレーで生成し、そのイオンを共存する気体の流れにのせて超音速自由噴流として真空中に導入した。ポリマーイオンは気体分子により加速されて大きな運動エネルギーを得る。その運動エネルギーを阻止電圧法で測定し、ポリマー分子の質量を推定する巧みな方法である。巨大分子のエレクトロスプレーということではDoleが創始者である。しかし、その後エレクトロスプレー・マクロイオンについての研究は継続されなかった。Doleらの採用したイオン化過程や真空中へのイオンの導入で、実際にどんな現象が起こり、したがってマクロ分子イオンの実用的な分析法としてエレクトロスプレーを確立するにはどのような点が改善されなければならなかったのかは、エレクトロスプレー・イオン化過程や真空中への導入で生起する現象のFennらによる解明をまって初めて明らかになった。

Fennがエレクトロスプレーに興味を持ったのは、Fennらが創始したシード分子線の手法をDoleが採用したことにあった。気体のつまった部屋に小さな孔をあけ、気体分子を真空中に導くとしよう。孔の径が気体分子の自由行程(他の分子と衝突してから次に衝突するまでに運動する距離)よりも小さければ、運動する気体分子でたまたまその小さな孔の部分にむかった分子が真空の部屋側に漏れ出る。孔の径を大きくしていくと、孔(ノズル)に向かって気体の流れこみ、ノズルの一番狭いスロート部で音速となり、その下流で超音速にまで加速される自由噴流が形成される。

熱的な平衡状態にある気体分子の並進運動のエネルギーの分布と平均値は、分子量によらず温度のみで定まる。分子の平均の並進速度は同じ温度では分子量の $-1/2$ 乗に比例するので、小さくて軽い分子の熱的な並進運動の速度は早い。少量の重い分子を軽い分子の気体に混ぜた気体を真空中に超音速自由噴流で導入すると、膨張しながら加速される気体の流れの速度は主成分である軽い分子により支配される。重い分子は軽い分子の流れのなかで加速される。加速された重い分子の分子線は、大きな質量のおかげで大きな並進エネルギーを獲得する。これをシード・ビーム法と呼び、Doleの阻止電圧法に

よるマクロイオンの質量測定に応用された。Dole と Fenn は、エレクトロスプレー質量分析が高い評価を得たあとにアメリカの質量分析学会の会場で初めて対面したが、2 人のあたたかいふれあいの様子はエレクトロスプレー質量分析の成書⁹⁾に寄せた Fenn による序文に詳しい。

5. 多電荷分子イオンのエレクトロスプレーによる生成

さて、エレクトロスプレーでは、気化しにくい生体分子の溶液を溶存状態のままイオン化する。注射針に試料溶液を送りつつ高電圧を印加し、その電圧を上昇させていくと、注射針先端の電界により帯電した液体が引き出され、初めはぼたぼたと先端から落下していた液滴の大きさが小さくなる。射出される液滴は対向する電極板にむけて運動し、電圧の上昇により射出される周期は短くなっていく。さらに印加電圧を増大すると、注射針の先に円錐状の液柱が形成される。円錐の尖った先端にはそこの曲率半径に反比例する急峻な電場勾配がつくられる。強い電界は、帯電した円錐先端に伸びる細い液柱をちぎり、プラス(負の高電圧を印加するときはマイナス)の多くのイオンを表面にのせた微細な帯電液滴が円錐状液柱の先端から噴霧される。

このような強い電界中で帯電液滴を生成して噴霧するというプロセスにより、イオン(プラスイオンを生成する場合には一般的に水素イオン)を噴霧液滴の表面に高密度に分布させることができる。試料分子が液滴中に含まれれば、液滴から溶媒分子が蒸発していく過程で、その分子と液滴表面に分布する多数のイオンが会合し、最後に多電荷分子イオンが生成される。微細な液滴の表面に高密度で分布する電荷により、液滴表面の小さな曲率も寄与して急峻な電場が形成され、分子イオンが液滴から電場の作用によって離脱する機構も提唱されている。

電界により試料溶液を噴霧することで多くの電荷をもつ分子イオンを容易に生成できるエレクトロスプレーの特質は、類似のイオン化法、たとえば注射針周囲の強い気流により液体試料を噴霧してイオン化するという方法に対するエレクトロスプレーの優位性を際だたせている。液体試料を流体力学的な方法で噴霧しても、液滴にふくまれる正負のイオンの数はいずれかにかたより電気的中性は保たれない。したがって、分子イオンを生成することは可能であるのだが、多電荷分子イオンを生成することはできない。分子量が10万にもおよぶ巨大な生体分子を多電荷分子イオンにすることで、エレクトロスプレー法は普通の質量分析計でこれらの巨大分子を分析するのを可能にした。

注射針に高電圧を印加して、円錐状の液柱を形成し、その先端に強い電界を生成するのがエレクトロスプレーのみそである。ところが、円錐状の液柱を形成するには条件がある。溶媒分子の双極子モーメントなどの特性、液体の組成によりきまる粘性などいくつかの物性、イオンの濃度などに依存して、エレクトロスプレー法を適用できるかが決まる。常に新鮮な試料溶液によって鋭い液柱の先端がつくられ、また極性の強い生体分子を選択的にイオン化できる。長所は短所となり、試料溶液の組成や試料分子のタイプによってはイオン化することができないという弱点をエレクトロスプレー法はもっている。

6. エレクトロスプレーによる分子イオンの生成過程

大気圧下でエレクトロスプレーにより液滴を噴霧すると、微細で表面積が大きいために蒸発が盛んにおこる。帯電液滴から溶媒分子が蒸発すると、液滴表面のイオン同士の反発が表面張力を上回るようになる。液滴を球状の形態にまとめている表面張力がイオンの反発により打ち消されると、周囲からの摂動により表面波が励起され、液滴はいくつかの小滴に分裂する。液滴の分裂は体積に比べて表面積を大きくし、さらに蒸発は加速される。周囲気体の熱浴効果は、蒸発の潜熱により冷却される液滴にエネルギーを供給して、迅速な蒸発を継続させる。

熱浴気体の効果は、蒸発の促進ばかりではない。イオンや電子が電界で加速され高いエネルギーを得て、たとえば分子イオンに衝突してそれを分解してしまうような反応を熱浴気体は抑止する。すなわち、熱浴分子との頻繁な衝突により、電界中で加速される荷電粒子のエネルギーを常温での熱エネルギーのレベル以上には上げない効果がある。負イオンを生成するエレクトロスプレー⁹⁾では、とがった先端から電子が容易に放出される。熱浴気体に電子親和性の強い分子を加えることにより、電子などが電界中で加速されて引き起こす放電反応を抑制する。このように、エレクトロスプレーによるイオン化は、正負いずれの分子イオンであっても、およそ試料溶液中に溶存していたときとかわらない状態で分子イオンを得ることができ、試料分子を分解しないソフトなイオン化法と特徴づけられる。

Fenn らは、通常の質量分析計で測定可能な範囲の分子量をもつ生体分子を試料としてまづ使い、測定された質量スペクトルからエレクトロスプレー・イオン化にどのような現象が関与しているのかを明らかにした。エレクトロスプレーによれば、分子を分解してフラグメント・イオンを生じたりすることなく、もとの分子の質量

をそのままに残すインタクトな分子イオンを与えることを実証した。エレクトロスプレーの動作条件によっては、溶媒和した分子イオンが得られるのを示し、エレクトロスプレーを実用的なイオン化源とするための指針を与えた。

7. 流体力学の質量分析への貢献

分子イオンの精度の高い質量の測定は、熱的な運動をしている周囲の気体分子との衝突による妨害を避けるため真空中でなされる。そこで、大気圧下でエレクトロスプレーにより生成した分子イオンの質量を分析するためには、分子イオンを真空中へ導入しなければならない。このときに、熱浴気体も分子イオンと同時に真空中に膨張しながら噴出する。エレクトロスプレーを実用的なイオン源へと発展させるには、この真空中への自由噴流についての深い理解が求められた。

Fenn のすぐれた業績と科学への貢献は、流体力学と化学をつなぎ分子線化学をはじめたところにある。Fenn は1940年に Yale 大学で溶液化学の研究により学位を取得した後、ラム・ジェット・エンジンの開発にたずさわって、流体力学と化学の境界領域を研究分野とした。米海軍研究所のロンドン駐在勤務中（1955-56年）にドイツの分子線研究に触れ、超音速自由噴流を活用した分子線化学の創始者の一人となった。とりわけ、重い分子を混ぜて高エネルギーの分子線を生成するシード・ビーム法は Fenn の得意技であった。Dole によるマクロイオンの質量分析もそうだが、シード・ビーム技術に関連する応用の一つは、ガスクロマトグラフと質量分析計をつなぐインターフェースとして用いられるジェット・セパレータである。ヘリウムなどの軽いキャリアガスの中に含まれる重い試料分子を濃縮して質量分析計に導入するために、超音速自由噴流の特性を応用し、噴流の中心部での重い分子の割合が分子の熱的な並進速度の質量依存性もあって増大するという流体力学的な効果が、このインターフェースに活用されている。

エレクトロスプレーでの Fenn らの貢献は、真空中にノズルから噴出する超音速自由噴流中で気体が断熱膨張し急激に温度がさがり分子の凝縮が進行することへの鋭い洞察のもとに、そのような凝縮を防止する手だてを工夫したことにもある。噴流中の温度は膨張する前の試料ガスの絶対温度の1/100ほどにも急激に低下する。凝縮性の分子が膨張する噴流気体中に存在するなら、凝縮の過飽和度の高い領域が形成されて容易に凝縮が進む。膨張の過程で温度ばかりでなく気体分子の密度もまた急激に低下する。自由噴流の下流では、分子と分子の衝突も起こらなくなり、自由噴流中で反応した生成物は凍結さ

れて保存される。自由噴流中では、このように温度と密度が急激に低下するので、凝縮現象を初めとする気体反応の素過程を研究する反応の場として活用されてきた。

Fenn らは、気体分子の凝縮の素過程を超音速自由噴流法により調べていた経験¹⁰⁾もあって、エレクトロスプレー技術を実用化する要点に、このような凝縮過程が自由噴流中で容易にすすむこと、またそれを制御する必要のあることを的確に探り当てることができた。

さて、分子イオンと極性を持つ分子との間の相互作用は、異なる符号の電荷を有する二つの粒子間に働くクーロン力による相互作用に次いで強く、またその作用は遠くまで達する。これにもとづいて、分子イオンと極性分子の会合反応の断面積は大きい。C. T. R. Wilson は、霧箱による宇宙線の研究で1927年のノーベル物理学賞を受賞している。過飽和のアルコールなどの蒸気をいれた箱の中に宇宙線が入射すると、その飛跡にそって気体分子が電離し、生成したイオンが凝縮核となって蒸気が凝縮し、宇宙線の飛跡を可視化することができる。

生体分子を溶解する溶媒は、極性の高い分子の多いことは、Like to Like Rule で説明できる。エレクトロスプレー・イオン源の大気圧のスプレー領域でせいかく溶媒分子が蒸発して裸の生体分子イオンを生成できても、真空中に膨張する自由噴流に溶媒分子が含まれると、瞬く間に分子イオンは溶媒和して雪だるまとなり、もとの姿にもどってしまう。雪だるまとなった分子イオンを質量分析しても、分子の質量は求めることはできない。

この問題に対する流体力学的な解決は、電界により帯電液滴のノズルに向かう運動方向と対向して、乾燥した熱浴気体を流すことであった。除湿器から出る乾燥空気を洗濯物にあて水分を風で吹き飛ばすという、日常におこなう工夫に通じるところがある。帯電液滴を真空中への試料導入部方向へと電界により誘導しながら、蒸発した電荷をもたない溶媒分子を対向する気流で押し流してイオン源から除去する。この工夫により、自由噴流中で雪だるまとなるのをふせぎ、分子イオンのみを真空中に導入して質量分析することが可能になった。

エレクトロスプレーの開発は、後からみれば誰でも思いつく発想を、理詰めで積み上げてその有用性を実証したのである。その発想が単純なだけに、応用範囲は広いものになった。さらに、Fenn の流体力学などの学問的背景は、エレクトロスプレーを液体クロマトグラフといった分析器と質量分析計のインターフェースとして確立するのに、キャピラリー・ノズルを用いて電界に逆らって分子イオンを流体力学的に輸送し真空中に導く技術の発明につながった。このようにして、多くの電荷をもつイオンによる巨大な生体分子のエレクトロスプレー質量分

析法¹¹⁾が, Fenn のもとで確立されたのである。

肌の色, 国籍, 宗派, 政治信条を問わず, 実力あるものをグループに加え研究機会を与えその能力を存分に発揮させるという, アメリカの「強さ」を一人の科学者のなかに具現する暖かな Fenn 博士の人柄は, リベラルな校風で知られる Yale 大学に在籍していたことにもよろうが, ケンタッキー州のアパラチア山中にある Berea College に学んだことによるところが大きい。その歴史は南北戦争 (1861-1865) 直前にさかのぼり, 奴隷解放運動の一環として開学された。ケンタッキー州は南部に属したものの, 北部諸州での工業化を進めた鉄鋼業のための採炭地として「解放」奴隷や, 東欧から移民してきた労働者を吸収していた。Berea College は, 貧しい家庭の多いアパラチア山地の向学心に富む優れた子女を対象に, 学費を徴収することなく, 性や肌の色に関わりなく学ばせてきている。1866年の学生数187のうち過半を占める97人は黒人であった。被差別階層や人種への教育投資を無駄なものとして抑制する動きに真っ向から反対する教育の理念と実践が, Berea College の百年を越す歴史に刻まれている。Fenn 博士のノーベル化学賞受賞を後世につたえる記念額は, この Berea College に掲げられる。

〔文 献〕

- 1) R. A. Millikan: On the elementary electrical charge and the Avogadro constant, *Phys. Rev.*, **2** (1913) 109-143.
- 2) A. Einstein: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Annalen der Physik*, 4 Folge, **17** (1905) 549-560.
- 3) C. E. Kolb and D. R. Herschbach: John Bennett Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 4447-4448.
- 4) M. Yamashita and J. B. Fenn: Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme, *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 4451-4459.
- 5) J. Zeleny: The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at their Surfaces, *Phys. Rev.*, (2nd Series), **10** (1914) 69-91.
- 6) R. Arakawa, S. Uemura, T. Ichihara and I. Katakuse: A handy ionized spray source using a cosmetic ionizer for ESI mass spectrometry, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51** (2003) 477-480.
- 7) M. Dole, L. L. Mack and R. L. Hines: Molecular Beams of Macroions, *J. Chem. Phys.*, **49** (1968) 2240-2249.
- 8) R. B. Cole: Electrospray Ionization Mass Spectrometry, (John Wiley & Sons, New York, 1997).
- 9) M. Yamashita and J. B. Fenn: Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source, *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 4671-4675.
- 10) M. Yamashita, T. Sano, S. Kotake and J. B. Fenn: Dimer Depletion by Solute Species in Free Jet Expansion, *J. Chem. Phys.*, **75** (1981) 5355-5361.
- 11) J. B. Fenn, M. Mann, C.-K. Meng, S.-F. Wong and C. M. Whitehouse: Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, **246** (1989) 64-71.