INTEGRATED PAPER

大気圧スプレー (APS) 法による
擬似分子イオンの生成Production Mechanisms of Quasi-Molecular Ions in
Atmospheric Pressure Spray (APS) Ionization

平 林 集*

Atsumu HIRABAYASHI

(Received December 22, 1992)

Atmospheric pressure spray (APS) ionization can produce quasi-molecular ions of biological molecules from their aqueous solution, and has therefore been developed as an interface for LC/MS. In this article, we first outline models of the ion production mechanisms developed for spray ionization methods such as thermospray and electrospray. Then, the experimental results using APS are presented. We investigate whether the quasi-molecular ions are produced by ion-molecule reactions in the gas phase, by ion evaporation (in which ions are produced by the spray), or by both mechanisms. It is concluded that a volatile molecule such as ammonia is produced by the spray and protonated by an ion-molecule reaction in the gas phase. For nonvolatile molecules such as sucrose and amino acids, however, their quasi-molecular ions are produced partly by ion evaporation and partly by the gas phase reaction. It is also shown that the relative intensities of the protonated amino-acid molecules produced by ion evaporation are not necessarily determined by the equilibrium in the bulk liquid. A qualitative explanation is proposed on the basis of the Gibbs energy of hydration.

1. はじめに

大気圧スプレー (APS: Atmospheric Pressure Spray) 法は 1989 年に著者らのグループで偶然に見出された。すなわち、大気圧化学イオン化法 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) の実験中に、イオン生成に不可欠なコロナ放電を発生させていないにもかかわらず、微量ながらイオンが生成されていることが確認された。さらに、正イオンに比較して負イオンがほとんど生成されないことが見いだされた¹⁾。この現象はサーモスプレー (TS: Thermospray) 法^{2)~6)}やエレクトロスプレー (ES: Electrospray) 法^{7)~9)}などの従来のスプレーイオン化法では見られない特徴である。これまでに、APS 法ではアミノ酸、ペプチド、多糖類、脂質などの不揮発性で熱に弱い物質にプロトン付加あるいは Na^+ や K^+ 付加した擬似分子イオンが生成されることが明らかにされた。また、溶液流量を 0.5~2 ml/min と広範囲に設定することができるので、APS 法は LC/MS のインターフェースに適用でき、特に糖類の分析に有効であることが示された¹⁾。

APS 法では先端部約 3 cm を 400°C 程度に加熱された内径 0.1 mm の金属細管 (キャピラリー) に試料溶液を導入すると、キャピラリー先端から蒸気のジェットに含まれてイオンが生成される。この現象

* 株式会社日立製作所中央研究所 (〒185 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1-280)
Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd. (Kokubunji, Tokyo 185, Japan)

は不可解であるだけに面白く、多くの研究者の興味をひいている。また、TS 法や ES 法と比較すると、APS 法により生成される擬似分子イオンの種類が一部異なる。特に、ES 法では数十価といった多価イオンが生成されるが、APS 法ではそのような多価イオンは生成されない。一方、糖類の擬似分子イオンは APS 法では生成されるが、ES 法では困難である。その差異は噴霧時における帯電液滴の生成過程が異なるため、生成された液滴の直径や電荷数などが異なることに起因すると考えられる。しかし、噴霧により生成された液滴から擬似分子イオンが生成される過程にはスプレーイオン化法に共通する視点を構築できるかもしれない。

スプレーイオン化法におけるイオン生成過程は帯電液滴の生成過程と帯電液滴からの擬似分子イオン生成過程との二段階に分離される。さらに、後者においてはイオン蒸発過程と気相イオン分子反応が寄与しうると考えられる。本稿では、APS 法を例にとり擬似分子イオン生成過程について著者らの研究を中心に述べる。すなわち、擬似分子イオン生成におけるイオン蒸発過程と気相イオン分子反応の寄与の有無について述べ、さらに帯電液滴中におけるアミノ酸分子のプロトン付加過程について述べる。詳細に入る前に、次章では APS 法の概略を述べ、第 3 章ではイオン蒸発過程における一般的な議論の整理を試みる。

2. APS 法におけるイオンの生成

2.1. イオン源

イオン生成過程を調べるにはイオン源で生成されるイオン種やイオン量の再現性が高いことが必要条件となる。イオン源に蒸留水を導入すると、 H_3O^+ の他に、場合によっては Na^+ や K^+ が多量に生成されることがある。そのため、試料溶液には蒸留水をイオン交換した水が使用される。また、イオン源に気泡が混入すると噴霧が不安定になるため、試料溶液は真空装置で 10 分間脱気されたものが使用される。さらに、生成されるイオンの再現性はイオン源におけるキャピラリーの加熱方法にも依存する。その主な理由は次節で述べるように、生成されるイオン量がキャピラリー温度に強く依存するからである。

APS イオン源にはキャピラリー加熱のために APCI で用いられているようなカートリッジヒーターを埋め込んだ金属ブロックを用いることができる。この場合、温度が安定するまでに 1 時間程度を要するが、熱容量が大きいためイオンは安定に生成される。そのため、特にインジェクターを使用した実験には有利である。しかしながら、金属ブロックを用いたイオン源では、キャピラリーの加熱を均一に行うことが困難であるという難点を有する。すなわち、イオン源の製作過程ではキャピラリーと金属ブロックを外から銀蠟を流して密着させる。ところが、銀蠟は金属ブロック内部に 1 cm 程度しか流入することができず、その流入の仕方も不均一となる。そのため、キャピラリーの加熱が不均一になり、その不均一さはイオン源ごとに異なる。その結果、金属ブロックを用いたイオン源では生成されるイオン種やそれらの強度がイオン源ごとに多少差が生じる。そのため、本研究では、イオン源に赤外線加熱法を採用している。

Fig. 1 にイオン源の断面図を示す。赤外線加熱法では、キャピラリー加熱が均一でイオン生成の再現性が高い。そのうえ、加熱開始から温度が安定するまでに要する時間が短く、15 分程度ですむという利点を有する。試料水溶液は LC ポンプにより通常流量 1 ml/min でニッケル製キャピラリー（内径 0.1 mm、外径 1.6 mm）に導入され、大気圧下で噴霧される。キャピラリー先端部 3 cm は石英管（内径 1.7 mm、外径 3.5 mm）を介してカンタル線（直径 1 mm）ヒーターからの赤外線照射により加熱される。キャピラリー内面の温度は測定できないが、キャピラリー先端にスポット溶接されたクロメル・アルメル熱電対により温度のモニターを行う。モニター温度は通常 400°C に設定される。（キャピラリー内面の温度はモニターされる温度より低い。）カンタル線の外側にはヒーターの加熱効率を高めるためのセラ

Fig. 1. Cross sectional view of the APS ion source.

Fig. 2. Total current of ions produced by the ion source from deionized water as a function of the temperature monitored at the capillary tip.

ミック製のカバーが設けられている。これより、試料水溶液のほぼ完全な気化が可能となり、キャピラリー先端からは正に帯電したガスのジェットが発生する¹⁰⁾。

2.2. 帯電液滴の生成

キャピラリーの加熱領域では、帯電液滴が生成され急速に蒸発気化される。液体状態では試料溶液がキャピラリー内の加熱領域を通過する時間は約 14 ms であると見積られる。そのため、加熱噴霧時に帯電液滴が存在する時間はそれ以下である。大気圧下に生成された噴霧ガス中には中性分子と正イオンが含まれる。負イオンは通常観測されないが、 Cl^- が観測されることがある。

生成される全イオン電流はキャピラリー温度に依存する。Fig. 2 に APS イオン源に純水（イオン交換水）を導入した場合に生成される全イオン電流のキャピラリー温度依存性を示す。全イオン電流は 400°C で 0.1 μA 程度であり、約 290°C で最大（約 1 μA ）になる。300°C 以下で生成されたイオンは高度に水クラスター化された帯電液滴である。さらに低温の 200°C 以下では噴霧が不安定である。純水の代わりに酢酸アンモニウムや水酸化ナトリウムなどの塩水溶液 (0.1 mM) を導入した場合にも Fig. 2 と同一の結果が得られる。（生成されるイオン種は全く異なる。）

全イオン電流はキャピラリーの加熱領域の長さにも依存する。すなわち、加熱領域の長さは短いほど、生成される全イオン電流は多くなる傾向がある。このことは加熱による試料溶液の温度上昇が急激であるほど、生成される全イオン電流は多くなると理解される。しかし、加熱領域が短すぎるとヒーター電力などに限界があるため、気化に必要な熱エネルギーを試料溶液に与えることができない。そのため、加熱領域の長さは先に述べたように 3 cm に設定するのが現実的である。

また、全イオン電流はキャピラリー上の加熱領域の位置にも依存し、加熱領域がキャピラリー先端にある場合にイオン電流は最大となる。例えば、加熱領域をキャピラリー先端から数 mm 離すと全イオン電流は数十%減少する。このこと的主要理由はキャピラリー内部で生成されるイオンや帯電液滴が大気中に噴霧される前に金属キャピラリー内面と接触し電荷を失うためであると考えられる。また、Fig. 1 では、300°C 以上の高温で全イオン電流が温度の増加とともに減少している。このこともイオンや帯電液滴の生成がキャピラリーの内部で実現されるためと考えられる。

水溶液の加熱噴霧により帯電液滴が生成されるという現象は摩擦による帯電現象の一種であると考えられるが、詳細は不明である。金属キャピラリーの代わりに絶縁体である石英製キャピラリー（内径 0.1 mm）を用いても、正イオンがほぼ同量生成される。そのため、高温の金属表面に水クラスター分子が衝突し、金属表面の仕事関数と水クラスター分子のイオン化エネルギーとの兼ね合いにより水クラスター分子が正イオンになるという表面イオン化機構¹¹⁾では説明されない。金属表面の仕事関数は石英表面のそれよりも十分に小さいと考えられ、金属キャピラリーの方が正イオンの生成効率が高いはずだからである。

負イオンが生成されない理由の一つには水の負イオンクラスターの不安定性があると考えられる。例えば、 $(\text{H}_2\text{O})_2$ の電子親和力は約 3 meV と計算され、室温のエネルギー (26 meV) に比較して小さい¹²⁾。電荷の担い手である電子がクラスター全体に拡散されるからである。従って、水の負イオンクラスターは生成直後に近辺の金属などに電子が吸収されて中性化されると考えられる。水の正イオンクラスターは生成されると速やかに H_3O^+ の水クラスターに変化する。この正イオンは安定に存在することができる。

2.3. TS 法と ES 法における帯電液滴の生成

他のスプレーイオン化法である TS 法や ES 法においては、生成される帯電液滴の直径や電荷密度、さらに帯電液滴からの溶媒分子の蒸発速度が異なり、その結果、観測される擬似分子イオンに差が生じると考えられる。そこで、以下では TS 法と ES 法における帯電液滴生成の概略を述べ、APS 法との相違点に触れる。

TS 法のイオン源は APS 法のイオン源と構造がほとんど同一である上、試料溶液の流量も 1 ml/min と同一に設定できる³⁾。しかし、TS 法ではキャピラリー温度が 250°C 程度に設定され、3 Torr 程度の真空中でイオン源を動作させるため、溶液試料の気化が不完全であることが特徴である。生成される液滴には正に帯電したものも負に帯電したものも含まれ、噴霧ガスは全体として中性である。この TS 法における帯電液滴の生成は噴霧により生成される液滴の電荷が水溶液中のイオンの分布の統計的な揺らぎにより決定されるという Dodd の統計的帯電理論¹³⁾により説明される。生成されるイオン電流は溶液中の塩濃度の 1/2 乗に比例するため、試料溶液に塩を通常 1 mM 程度まで添加する⁶⁾。一方、大気圧下で動作される APS 法では、250°C でも通常負イオンは生成されない。また、生成される全イオン電流が溶液の塩濃度にはほとんど依存せず、イオン交換水からでもイオンは生成される。APS 法と TS 法では、イオン源温度と外部の圧力が異なるが、このことが結果的に帯電液滴の生成過程の差に反映されると結論される。

ES 法では、帯電液滴は大気圧下での静電噴霧現象により生成される。すなわち、2~5 kV の高電圧がキャピラリー先端と質量分析計の入口細孔との間に印加され^{7)~9)}、生成される全イオン電流は溶液中の塩濃度に依存する。生成された帯電液滴はカウンターガスフローなどにより乾燥される。そのため、キャピラリー温度はカウンターガスの温度 (80°C 程度) と同程度になるが、室温であっても生成される全イオン電流はほとんど同じである。印加電圧の極性を反転させることにより、正に帯電した液滴も負に帯電した液滴も生成される。試料溶液の流量は 1~200 $\mu\text{l}/\text{min}$ と比較的 low に設定される。APS 法や TS 法と比較して、静電噴霧現象により生成される帯電液滴の電荷密度は極めて高いと考えられ、数十価といった多価のタンパクなどの擬似分子イオンが観測される。しかし、溶液中で電荷を持たない糖などの物質の擬似分子イオンを生成することは困難である。

3. 帯電液滴からのイオンの生成

帯電液滴からの擬似分子イオンの生成過程はイオン蒸発過程あるいは気相イオン分子反応によると考

えられる。気相イオン分子反応自体はこれまで物理化学の分野でさまざまな研究がなされてきた¹⁴⁾。それに対して、イオン蒸発過程は直径がミクロンオーダー以下の帯電液滴からほとんど脱溶媒された擬似分子イオンが生成される現象を指すが、その詳細は不明な点が多い。

イオン蒸発過程による擬似分子イオン生成に対する考え方は今のところ二通り存在する。Röllgen らは液滴が Rayleigh 分裂する際に直径の極めて小さい液滴のジェットが付随的に発生し、これらの液滴が乾燥（脱溶媒）して擬似分子イオンが生成するというモデルを提案している。一方、Iribarne と Thomson は噴霧により生成された帯電液滴が Rayleigh 分裂を繰り返し直径が特定の条件より小さくなると、静電力によりイオンが蒸発できるというモデルを提案している。本章では、これらのモデルの概要を述べ、その問題点を整理する。

3.1. Rayleigh 分裂と Röllgen らのモデル

噴霧により生成された μm オーダーの帯電液滴が溶媒の蒸発に伴いその直径が減少すると、液滴内の同符号のイオン間に働く反発力が液滴の表面張力よりも大きくなる。その臨界条件は次式で与えられ、Rayleigh の不安定条件と呼ばれる¹⁵⁾。

$$\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2 N^2}{d} = 2\pi\sigma d^2 \quad (1)$$

ここで、 e は単位電荷、 N は液滴の電荷数、 σ は表面張力、 d は液滴の直径である。不安定条件 (1) に達した帯電液滴は分裂し、複数個の帯電液滴となる。Fig. 3 に Rayleigh の不安定条件を示す。最初に生成される帯電液滴は N に対し d が十分に大きい。液滴から溶媒が蒸発すると、 N は一定のまま d が連続的に減少する。Rayleigh の不安定条件に達すると、Rayleigh 分裂により N と d が離散的に減少する。さらに溶媒の蒸発が促進されれば、これらの帯電液滴は再度 Rayleigh の不安定条件を満たすため分裂し直径のより小さな帯電液滴となる。したがって、溶媒の蒸発が停止しない限り、帯電液滴は Rayleigh 分裂を繰り返し、最後にはイオンを 2 個以上含まない小さな液滴になる。

さて、Rayleigh 分裂の際には非常に小さな帯電液滴（直径は 10 nm 以下と見積られる）のジェットの発生が伴う。そこで、この Rayleigh 分裂の際に発生するジェットが擬似分子イオン生成において本質的な役割を果たす、というのが Röllgen らのモデルである^{16), 17)}。

3.2. Iribarne と Thomson のモデル

大きな液滴中のイオンは自由イオン状態に比較してエネルギー的に安定している。イオンが溶媒和されるうえ、イオンが蒸発する際に液滴に鏡像ポテンシャルが生じるからである。しかしながら、液滴中のイオンは同符号のイオン間のクーロン斥力も受け、その大きさは液滴の直径が小さくなるほど大きくなる。その結果、帯電液滴の直径がある程度以下になると、イオンは溶媒和された状態で上記のエネルギー障壁を超えて液滴から蒸発することができる。これが Iribarne と Thomson が提案するモデルである^{18), 19)}。このモデルによると、イオン蒸発速度 K は次式で与えられる。

$$K = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G}{kT}\right) \quad (2)$$

$$\Delta G = -\Delta G_h - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2}{2d} \left(4\sqrt{N} - 1 + \frac{4Nd'}{d-d'}\right) \quad (3)$$

ここで、 k と h はそれぞれボルツマン定数、プランク定数であり、 T は絶対温度、 ΔG_h は溶媒和されたイオンに対するギブス自由エネルギー変化 (≤ 0) であり、 d' は蒸発するイオンの直径である。(3) 式で、 d が大きいときは ΔG が正となり (2) 式によりイオン蒸発は無視されるが、 d が十分に小さくなると ΔG が負となりイオン蒸発が実現する。実際には、液滴からの中性分子の蒸発速度よりもイオン蒸発速度 K が大きくなければイオン蒸発が実現する前に液滴は消滅する。 $d' = 0.7 \text{ nm}$ 、 $\Delta G_h = -268 \text{ kJ/mol}$ とし、

$K=10^6\text{s}^{-1}$ に対するイオン蒸発条件を Fig. 3 に示す. これより, d が大きい場合は Rayleigh 分裂が優先するが, Rayleigh の不安定条件とイオン蒸発の臨界条件との交点 (Fig. 3 では $d=17\text{ nm}$) より直径の小さな液滴では Iribarne と Thomson の提案するイオン蒸発過程が優先することが示される.

3.3 イオン蒸発モデルと擬似分子イオンの生成過程

Röllgen らのモデルは直観的に理解されやすいが, 定量的な議論ができないという弱点を持つ. このことは Iribarne と Thomson のモデルが定式化された理論であることと対照的である. ところが, Iribarne と Thomson のモデルでは実際に生成される擬似分子イオンの強度を定量的に説明することが困難である. その主な理由は溶媒和されたイオンに対する ΔG_h のデータがほとんど存在しないことや, 直径や電荷密度の揃った帯電液滴を生成させることが困難であるからである. また, Iribarne と Thomson のモデルでは, 静電力の見積り方がしばしば問題になる. 例えば, Röllgen らは (3) 式においてイオン蒸発に要する電場が 2 倍程度小さく見積られているため Iribarne と Thomson の提案するイオン蒸発の実現は困難である, と指摘している^{16), 17)}. また, Katta ら⁵⁾は電場の強さを TS 法を用いた実験により $8 \times 10^8\text{ V/m}$ と求めている. しかし, どちらのイオン蒸発モデルが有効であるかについて明確な結論は得ていない. 結局, 帯電液滴からの擬似分子イオンの生成におけるイオン蒸発過程が主に Rayleigh 分裂によるのか, 静電力に誘起された蒸発過程によるかはまだ議論の余地があり, 詳細はよくわかっていない.

ところで, 擬似分子イオン生成効率の向上に関する指針を得ることが擬似分子イオン生成過程を研究する目的である. しかしながら, このことは今まで述べたイオン蒸発モデルからは得られない. また, 生成するイオン種がスプレーイオン化法により異なることを説明することもイオン蒸発モデルでは困難である.

擬似分子イオン生成効率の観点においては, 溶液の噴霧により生成されるイオンがバルクの溶液状態をそのまま反映しているか否かを調べるのが重要であると考えられる. 噴霧により生成した帯電液滴において, 試料分子へのプロトン付加過程などが実現し, それが擬似分子イオン生成効率に関与している可能性が考えられるからである.

APS 法では, キャピラリー温度が 400°C 以上の場合にはほぼ完全に気化した噴霧ガスを生成することができる. このとき, 質量分析計で分析できないような質量の巨大な帯電液滴はほとんど消滅する. そのた

Fig. 3. Critical conditions for Rayleigh instability and the ion evaporation model proposed by Iribarne and Thomson.

Fig. 4. Experimental setup.

め、例えば、噴霧時に生成した液滴における電荷の担い手の一種であるプロトンは質量分析計で H_3O^+ などのプロトン付加イオンとして大抵検出される。以下では、擬似分子イオン生成過程について著者等の研究結果について述べる^{10), 20)}。

4. 気相イオン分子反応とイオン蒸発

本章では揮発性物質であるアンモニアと不揮発性物質であるショ糖やアミノ酸を例にとり、これらの擬似分子イオンの生成が気相イオン分子反応だけによるのか、イオン蒸発過程だけによるのか、あるいは両方の過程によるのかを区別する実験を紹介し、揮発性物質の擬似分子イオンはイオン蒸発過程によっては生成されないことを示す。

4.1. 実験

Fig. 4 に APS 法を用いた二重収束型質量分析計 (日立 M80) とのインターフェースを示す。質量分析部の真空度は 1×10^{-6} Torr であり、中間圧力部 (0.5 Torr) はメカニカルブースターポンプ (1600 l/min) とロータリーポンプ (670 l/min) で排気される。メカニカルブースターポンプとロータリーポンプの間には液体窒素を用いた真空トラップが設けられ、水蒸気の除去によりロータリーポンプの劣化が防止される。大気圧下で生成されたイオンは第一細孔 (直径 0.3 mm) を通過して中間圧力部に導入され、さらに、第二細孔 (直径 0.2 mm) から質量分析部へ導入される。イオン源キャピラリーの中心軸と第一第二細孔の中心軸は一致し、第一細孔とキャピラリーとは同電位に保たれる。第一細孔と第二細孔との間 (30 mm) にはドリフト電圧 (40 V) が印加され、イオンの第二細孔透過率を向上させるほか、残留分子との衝突によりイオンの水クラスターを解離させ、質量スペクトルを単純化させている²¹⁾。第二細孔に印加された高電圧 (3 kV) によりイオンは加速され、質量分析部に導入される。分析されたイオンは二次電子増倍管により検出され、その出力はデータ処理システムに取り込まれる。

大気中でのイオン分子反応の寄与を調べるために、キャピラリー先端と質量分析計第一細孔との距離 L を 5 mm から 30 mm まで変化させ、得られる質量スペクトルの変化を調べた (Fig. 4 参照)。さらに、距離 L を一定に保ち、観測される擬似分子イオン強度の試料水溶液濃度依存性を調べた。もし、擬似分子イオンが気相イオン分子反応だけによるならば、擬似分子イオン強度は溶液濃度に比例するはずである。

4.2 アンモニウムイオンの生成

Fig. 5(a) に、アンモニア水溶液 (5 μM) より得られたイオンの全イオン強度を 100% としたときのそれぞれのイオンの相対強度を距離 L の関数として示す。 H_3O^+ や NH_4^+ の水クラスターが観測されるが、水和数は質量分析計の動作条件に依存する。その理由は 1) 大気圧部から中間圧力部に導入される際に断熱膨張による冷却を受けイオンの水クラスター化が促進される、2) 中間圧力部でドリフト電圧により加速されたイオンが残留ガスと衝突し、水クラスターが解離される、ためである。しかし、観測されるイオンの水クラスターの相対強度の和は中間圧力部のドリフト電圧にほとんど依存せず再現する。そのため、以下ではこれらの水クラスターの相対強度の和で議論する。Fig. 5(a) において、距離 L が増加すると、 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ 相対強度は減少するが、それに対応して $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 相対強度は増加する。さらに、距離 L が 0 に近づくにつれ $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 相対強度は 0 に近づく。この傾向より、噴霧によりまず中性アンモニア分子あるいはその水クラスター $\text{NH}_3(\text{H}_2\text{O})_l$ が生成され、大気中で H_3O^+ あるいはその水クラスター $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ と衝突し、イオン分子反応 (プロトン移動反応) により $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ が生成されることが分かる。

ここで、 l, m, n は水和数である。

Fig. 5. (a) Intensities of positive ions relative to that of all the observed cations produced from an aqueous solution of ammonia ($5 \mu\text{M}$) as a function of distance L . Error bar shows statistical error. (b) Solution concentration dependence of the relative intensity of $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ obtained at $L = 10$ mm. The solid line has a slope of 1.0.

アンモニア分子のプロトン親和力は 852 kJ/mol であり、水分子のそれ (697 kJ/mol) よりも大きい²²⁾。それぞれの分子に多少水クラスターが結合しても、プロトン親和力の大小関係は変わらないと考えられる。そのため、(4) 式の反応が実現すると説明される。Fig. 5 (b) に $L = 5 \text{ mm}$ における $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 相対強度のアンモニア水溶液濃度依存性を示す。濃度が $1 \mu\text{M}$ 以上では、 $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 相対強度はアンモニア濃度に比例している。このことにより $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ が気相プロトン移動反応により生成されることが確認される。一方、低濃度では $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ に比べて $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 相対強度がやや多い。これは大気中に含有されるアンモニアのイオン化によるためである。

希薄なアンモニア水溶液中ではほとんどのアンモニア分子にはプロトンが結合している。しかしながら、噴霧によってそれらのイオンがそのまま大気中に放出されることはなく、中性分子として生成される。これはアンモニアが揮発性物質であるためと説明される (後述)。

4.3. ショ糖の擬似分子イオン生成

ショ糖に対する実験結果を次に述べる。APS 法ではプロトン付加したショ糖分子は生成されず、 Na^+ や K^+ の付加した擬似分子イオンが生成される。水酸化ナトリウムを添加したショ糖水溶液 ($100 \mu\text{M}$, $\text{NaOH } 0.4 \mu\text{M}$) を用いた場合には、 Na^+ 付加した擬似分子イオン MNa^+ が生成する。Fig. 6(a) に $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_n$, MNa^+ , およびフラグメントイオン ($m/z = 203, 185, 167$) の相対強度を距離 L の関数として示す。 $m/z = 203$ のイオンは MNa^+ のフラグメントイオンであり、 $m/z = 185$ と 167 のイオンは $m/z = 203$ のイオンが脱水したものである。図にはこれらのフラグメントイオン相対強度の和を示す。 MNa^+ とフラグメントイオンの相対強度は $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ のその減少に対応して増加している。このことは MNa^+ とフラグメントイオンが少なくとも気相でのイオン分子反応 (Na^+ 付着反応) により生成されることを示す。Fig. 6(b) に $L = 10 \text{ mm}$ における MNa^+ とフラグメントイオンの相対強度の水溶液濃度依存性を両対数グラフ上に示す。前者に対する直線の傾きが 1.3 であるのに対し、後者は 1.0 である。これより、フラグメントイオンは気相イオン分子反応だけにより生成されるが、 MNa^+ はそのほかに噴霧時にもイオン蒸発により生成されることが示唆される。また、フラグメントイオンは MNa^+ が大気中で解離することにより生成される訳ではないことも示される。もしそうならば、フラグメントイオン相対強

Fig. 6. (a) Distance L dependence of the relative intensities of positive ions produced from an aqueous solution of sucrose ($100\ \mu\text{M}$), where NaOH is added to a final concentration of $0.4\ \mu\text{M}$. As L increases, the relative intensity of $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ decreases and those of the cationized sucrose (MNa^+) and the fragment ions ($m/z = 203, 185, 167$) increases. A sum of the relative intensities of the fragment ions is shown. This shows that the MNa^+ and the fragment ions are produced at least partly by the ion-molecule reaction in the gas phase. (b) Relative intensities of the MNa^+ and the fragment ions as a function of sucrose concentration of the solution. Slopes for the MNa^+ ion and the fragment ions are, respectively, 1.3 and 1.0.

度の濃度依存性は MNa^+ のそれと同一になるからである。

以上の結果より、次のことが示される。すなわち、噴霧時には中性フラグメント分子とショ糖分子 (M), MNa^+ は生成されるが、フラグメントイオンは生成されない。フラグメントイオンが噴霧時に生成されない原因はショ糖分子がフラグメント分子と比較して揮発性が低いためと説明される。すなわち、化学的な性質が同等な物質は質量の小さいものほど揮発性が高いと見做すことができ、質量の軽いフラグメントの方がショ糖分子よりも蒸発しやすいためと説明される。また、前節で述べたアンモニア水溶液の場合には、アンモニアの揮発性が高いため、水溶液中にあったアンモニアは噴霧時に中性分子として蒸発したと説明される。

4.4. 噴霧時におけるアラニンのプロトン付加過程

アミノ酸も不揮発性物質である。アミノ酸の一種であるアラニンの水溶液 (濃度 $5\ \mu\text{M}$) を噴霧した場合の結果を距離 L の関数として Fig. 7(a) に示す。プロトン付加したアラニン分子 (MH^+) の相対強度は L が増加するとともに増加し、 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ の相対強度は減少する。このことより、 MH^+ は気相で $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ との衝突によるプロトン移動反応により生成されることが示される。アラニン分子のプロトン親和力は $899\ \text{kJ/mol}$ であり、水分子のそれ ($697\ \text{kJ/mol}$) より十分に大きい²²⁾。この関係はアンモニウムイオン生成の場合と同様である。しかしながら、Fig. 7(a) では距離 L を 0 に近づけても MH^+ の相対強度は 0 にはならず、30% 付近に近づく。このことは Fig. 5(a) と対照的であり、噴霧時 ($L=0$) において MH^+ はすでに生成されていたことを示唆する。

アラニン水溶液の濃度に対する MH^+ の相対強度を $L=10\ \text{mm}$ において測定した結果を Fig. 7(b) に示す。高濃度では MH^+ の相対強度は直線から外れてくる。これは噴霧により生成されるイオン量ある

Fig. 7. (a) Relative intensity of the positive ions produced from an aqueous solution of alanine ($5\mu\text{M}$). With increasing L , the relative intensity of $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ decreases while that of the protonated alanine (MH^+) increases. This indicates that MH^+ is produced by a proton-transfer reaction in the gas phase by a collision with $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_m$. The $\text{NH}_4^+(\text{H}_2\text{O})_n$ ion is also produced by the proton-transfer reaction; the ammonia molecule is contaminated in the atmosphere. (b) Relative intensity of MH^+ as a function of the solution concentration. The slope of the solid line is 1.2.

いはプロトンの量がアラニン濃度に依存せず一定であるためであろう。実線の傾きは 1.2 であり、1.0 からは明らかに大きい。このことから MH^+ が気相プロトン移動反応だけでなく、イオン蒸発によっても生成されることが確認される。

以上より、APS 法により生成される擬似分子イオンが気相イオン分子反応によるか、イオン蒸発によるかは試料物質が揮発性か不揮発性であるかにより決定されることが示唆される。

さて、水溶液中ではアラニン分子は負イオン $(\text{M}-\text{H})^-$ 、中性分子 (M)、正イオン (MH^+) の 3 通りの状態をとる。実験に用いた $\text{pH}=5$ の水溶液では、解離定数²³⁾よりそれぞれの存在比が 0.22%, 99.8%, 0.001% であると見積られる。ところが、 $1\mu\text{M}$ の水溶液より生成される噴霧ガス中の M に対する MH^+ の相対密度は水溶液の流量 ($1\text{ml}/\text{min}$)、生成される全イオン量 (0.1mA) や Fig. 7(b) より約 1% であると見積られる。したがって、一部のアラニン分子は噴霧時にプロトン付加されると結論される。すなわち、噴霧過程における帯電液滴中でアラニン分子のプロトン付加過程が実現する。

5. 帯電液滴中におけるアミノ酸のプロトン付加過程

5.1 アミノ酸の擬似分子イオン生成過程

アラニンの実験結果は前章で述べたが、以下では他のアミノ酸におけるプロトン付加過程について述べる。実験に用いたアミノ酸は アラニン、ロイシン、トレオニン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸である。それぞれの水溶液 (濃度 $5\mu\text{M}$) より得られた結果を Fig. 8 にまとめて示す。距離 L が増加すると、 MH^+ の相対強度はアミノ酸の種類によらず同様に増加する。この増加は気相プロトン移動反応による。また、その増加がアミノ酸の種類によらず同程度であることは Table 1 に示すように、アミノ酸のプロトン親和力が水のそれより同程度に大きいことで説明される。しかしながら、例えば $L=10\text{mm}$ では、トレオニンとセリンの MH^+ 相対強度がアスパラギン酸、グルタミン酸のそれよりも高く、ロイシンとアラニンのそれはさらに高い。この傾向は距離 L にも水溶液濃度にも依存しない。そのため、

Fig. 8. Distance L dependence of the relative intensities of the protonated amino-acids produced from aqueous solutions ($5 \mu\text{M}$).

Fig. 9. Abundance of the protonated molecules MH^+ of amino acids in equilibrium $\text{MH}^+ \rightleftharpoons \text{M} \rightleftharpoons (\text{M}-\text{H})^-$ in their aqueous solutions as a function of pH, calculated from the dissociation constants.

Table 1. Proton affinities and Gibbs energies of hydration

Amino acid		Proton affinity ^{a)} (kJ/mol)	ΔG_h (kJ/mol) ^{b)}
Leucine	Leu	913	0
Alanine	Ala	899	- 3.41
Threonine	Thr	915	-20.2
Serine	Ser	907	-27.4
Aspartic acid	Asp	907	-34.2
Glutamic acid	Glu	906	-34.9

^{a)} Reference 22.

^{b)} Obtained from ΔG_h for the *N*-acetyl-*N'*-methyamides of amino acids.²⁴⁾

この規則的な相対強度の差は気相プロトン移動反応では説明されない。したがって、プロトン付加したアミノ酸分子は気相イオン分子反応とイオン蒸発により生成され、イオン蒸発過程の寄与の大きさがアミノ酸により異なることが示される。

5.2 バルク液体中でのプロトン付加

以下では、噴霧時に存在する帯電液滴の中で起こるプロトン付加過程について考察する。Fig. 7(a)に示すように、希薄水溶液から最初に生成されるものは主に H_3O^+ およびその水クラスターである。このことは帯電液滴の電荷の担い手がプロトンであることを意味する。液滴中のアミノ酸分子がバルク液体中に存在する場合と同等と見做せる程度にその帯電液滴が大きい場合、液滴から水分子が蒸発すれば液滴中の pH が小さくなる（プロトン濃度が高くなる）ことになり、平衡移動の観点から一部のアミノ酸分子にはプロトンが付加する。溶解したアミノ酸分子のうちプロトン付加したアミノ酸 (MH^+) の存在比を pH に対して解離定数²²⁾に基づき計算した結果を Fig. 9 に示す。ロイシンとアラニンに対する MH^+ の存在比はほぼ同一であり、トレオニンやセリンのそれよりも高く、アスパラギン酸のそれは最低となる。しかも、この傾向は pH に依存しない。これらの MH^+ の存在比の順序は実験結果 (Fig. 8) に示されるイオン強度の順序と一致する。ところが、グルタミン酸の MH^+ の存在比はアスパラギン酸のそれよりも

Fig. 10. Relative intensities of the protonated amino-acids (MH^+) produced from $5\mu M$ solutions, shown in Fig. 8 at $L = 10$ mm, as a function of the Gibbs energy of hydration of the molecule.

高い。このことは Fig. 8 に示される実験結果と矛盾している。従って、生成される MH^+ の相対強度をバルク液体中の pH で決定される平衡だけで記述することは困難であると結論される。このことはイオン蒸発により生成されるイオンはバルク水溶液中に存在するイオンが直接蒸発したものであるという考え方が必ずしも正確ではないことを示す。

一方、イオン間の反発力が無視されない程度に帯電液滴の直径が小さい場合、プロトン付加したアミノ酸の相対濃度を pH で記述することは不可能である。ほとんどのイオンが液滴表面に集中するからである。

5.3 帯電液滴中の水和分子に対するプロトン付加

前節ではバルク液体中の平衡に基づいて pH と解離定数によりアミノ酸分子のプロトン付加過程について考察した。以下では、帯電液滴中のプロトン付加過程を別の観点から考察する。すなわち、プロトン付加過程をアミノ酸分子の水和に対するギブス自由エネルギー変化 (ΔG_h) で記述することを試みる。

Table 1 に、ロイシンの ΔG_h を暫定的にゼロとした場合の各アミノ酸の相対的な ΔG_h の計算値²⁴⁾を示す。Fig. 8 の $L=10$ mm におけるイオン相対強度を相対的な ΔG_h に対してプロットした結果を Fig. 10 に示す。これより MH^+ の相対強度が ΔG_h の増加とともに単調に増加することが示される。

以上の結果は次のようなモデルにより理解することができる。すなわち、液相におけるアミノ酸分子の周りには水分子が結合し、水和殻が形成される。水和殻の厚さはその分子の ΔG_h に依存すると考えられる。例えば、 ΔG_h がより小さい分子にはより厚い水和殻が形成される。Fig. 10 の結果は帯電液滴におけるアミノ酸のプロトン付加過程は水和殻の厚さが薄いほど生じやすいことを示す。このことは、プロトン付加過程が水和殻により阻害されることを示唆している。

6. おわりに

スプレーイオン化法における擬似分子イオン生成過程は幾つかのグループで精力的な研究が行われているにもかかわらず、不明点が多い。本論文では、APS 法における擬似分子イオン生成過程について

著者らが行ってきた研究を中心に述べた。アミノ酸を用いた実験により、帯電液滴からイオン蒸発により生成されるプロトン付加分子の存在比がバルク液体の平衡では完全には説明されないことが示された。帯電液滴中のアミノ酸のプロトン付加過程はES法において生成される数十個に帯電した（プロトンが数十個付加した）タンパク分子の生成過程に関係するようと思われる。また、APS法では糖類のカチオン付加した擬似分子イオンが生成されるが、ES法ではそれが困難である。このことを説明する手掛かりはほとんど得られておらず、今後の課題である。

謝 辞 本研究の大部分は長岡技術科学大学の朽津耕三教授をはじめ伊藤治彦助手、学生の梅村雄太君、太田一司君との共同研究です。また、分子科学研究所助手の美斉津文典氏には水クラスターに関する文献を紹介していただきました。日立中研の神原秀記主管研究員、坂入実研究員、高田安章企画員には協力や有益な助言をいただきました。これらの方々の御協力に感謝します。最後に、本総合論文の執筆を助めて下さった山梨大学の平岡賢三教授に感謝します。

文 献

- 1) M. Sakairi and H. Kambara, *Anal. Chem.*, **61**, 1159 (1989).
- 2) C. R. Blakley, J. J. Carmody, and M. L. Vestal, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5993 (1980).
- 3) C. R. Blakley and M. L. Vestal, *Anal. Chem.*, **55**, 750 (1983).
- 4) M. L. Vestal, *Science*, **226**, 275 (1984).
- 5) V. Katta, A. Rockwood, and M. L. Vestal, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **103**, 129 (1991).
- 6) M. L. Vestal, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **46**, 193 (1983).
- 7) M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
- 8) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
- 9) 平岡賢三, 質量分析, **39**, 97 (1991).
- 10) A. Hirabayashi, Y. Takada, H. Kambara, Y. Umemura, H. Ohta, H. Ito, and K. Kuchitsu, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **120**, 207 (1992).
- 11) A. Danon and A. Amirav, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **96**, 139 (1990).
- 12) U. Landman, R. N. Barnett, C. L. Cleveland, D. Scharf, and J. Jortner, *J. Phys. Chem.*, **91**, 4890 (1987).
- 13) E. E. Dodd, *J. Appl. Phys.*, **24**, 73 (1953).
- 14) M. T. Bowers, "Gas Phase Ion Chemistry," Vols. 1~3, Academic Press, New York, 1979.
- 15) L. Rayleigh, *Philos. Mag.*, **14**, 184 (1882).
- 16) F. W. Röllgen, B. Bramer-Weger, and L. Bütfering, *J. Phys. (Paris)*, **48**, C6-253 (1987).
- 17) G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, and F. W. Röllgen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **90**, 139 (1989).
- 18) B. A. Thomson and J. V. Iribarne, *J. Phys. Chem.*, **71**, 4451 (1979).
- 19) J. V. Iribarne and B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287 (1976).
- 20) A. Hirabayashi, Y. Takada, H. Kambara, Y. Umemura, H. Ito, and K. Kuchitsu, *Chem. Phys. Lett.* in press.
- 21) H. Kambara, *Anal. Chem.*, **54**, 143 (1982).
- 22) S. G. Lias, J. F. Liebman, and R. D. Lewin, *J. Phys. Chem. Ref. data*, **13**, 695 (1984).
- 23) D. R. Lide, "CRC Handbook of Chemistry and Physics," 71st Ed., (CRC Press, Florida, 1990).
- 24) T. Ooi, M. Oobatake, G. Nemethy, and H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Sci. U. S. A.*, **84**, 3086 (1987).

Key words

Atmospheric pressure spray

Ion-molecule reactions

Ion evaporation