報 文

ORIGINAL PAPERS

アミノ酸の In Beam EI スペクトル

In Beam EI Spectra of Amino Acids

大 橋 守*・中 山 登*・工 藤 均*・山 田 修 三*

MAMORU OHASHI, NOBORU NAKAYAMA, HITOSHI KUDO AND SHUZO YAMADA

(1977年1月12日受理)

In Beam EI spectra of amino acids are described. To obtain IBEI spectra a sample was loaded on an end of the quartz tip of a modified direct inlet probe and inserted until the electron beam was interrupted. Except cystine and arginine IBEI spectra of amino acids so far studied always exhibited clearly $M+1$ peaks. Relative intensities of M and $M+1$ peaks in IBEI and conventional EI spectra are listed in Table 1. The complete spectrum was apparently a combination of a conventional EI spectrum and the $M+1$ peak. This technique is quite useful for detection of $M+1$ peaks of thermally unstable compounds such as creatine or glutamic acid of which conventional EI spectrum scarcely exhibits the M or $M+1$ peak. The spectral features are somewhat similar to those obtained from closed source instruments.

In the case of phenylalanine, effects of measuring conditions such as source temperature, ionization voltage, sample position and time factor on the ratio of $[M+1]/[M]$ were examined.

When a sample was mixed with ammonium chloride, the $M+1$ peak in the IBEI spectrum was completely suppressed, which must be useful for identification of the $M+1$ peak.

1. 緒 言

電子衝撃イオン化 (EI) 法によるマスマスペクトロメトリーは広範なフラグメンテーションのデータが蓄積され構造研究に欠くべからざる機器手法となっている。その最大の欠点は衆知のごとく電子衝撃により分子に与えられるエネルギーが大きいために分子イオンピークの検出されない化合物も多く、又気体試料に電子衝撃を与えることを基本とするので揮発性物質や熱分解を受けやすい物質に対しては直接導入系を用いても化合物自身のスペクトルが得難い場合も多い。この欠点を改善する手法として最近化学イオン化 (CI) 法、脱着電場イオン化 (FD) 法が特に注目されて来ている。

これらのスペクトルはそれぞれ特徴を有し、従来のEI法では得られない情報を得るものとして重用されるが、スペクトルから得られる情報量に関してはEI法には及ばない。最近 Williams らは Echinomycin の構造研究に関して従来の直接導入系を改良し固体試料を衝撃電子流に接触させることによりFD法による分子イオン検出に優り、分子イオンのみならず多様なフラグメントイオンを検出し、その解析から貴重な情報を得ることに成功している。¹⁾ この固体試料を直接熱電子流に接触させる方法は、Anhalt と Fenselau によっても菌体同定用に利用され成功をおさめており、²⁾ 又、McLafferty と Baldwin は CI イオン源にこの方法を用いていわゆる "Direct Chemical Ionization" の手法を開発し、

* 電気通信大学材料科学教室 (東京都調布市調布ヶ丘1の5)

Department of Materials Science, The University of Electro-Communications Chofu, Tokyo 182, Japan

ペプチド類の構造研究に有用な知見を得ている³⁾。我々は日立RMU-6MG型単収束分析計の直接法導入系を改良してきわめて簡単に固体試料を熱電子流に接近させ得るようにし、これを用いて2, 3の熱不安定物質の質量スペクトルを観測した⁴⁾。これらのスペクトルは固体試料に直接電子流があたって生じたものかどうかは疑問であり、必ずしも正確な表現ではないが Williamsらの呼称に従いIn Beam EIスペクトル (IBEI) と呼ぶ。本報ではアミノ酸類のIBEIスペクトルを従来の直接導入 (DI) スペクトルと比較し、その特性を明らかにすると共に、IBEIスペクトルに与えるさまざまな因子の影響の検討結果を報告する。

2. 実験

2.1. IBEI スペクトルの測定

日立RMU-6MG型単収束質量分析計を用いた。従来の直接導入系の試料保持石英棒を引き伸し (直径約1mm) 先端付近の表面を摺りとし、この表面に固体試

料を付着させる。試料は直接ぬりつけても良いし、又一度溶液とし、この溶液に保持石英棒を浸した後溶媒を蒸発させてもよい。電子加速電圧, イオン源温度, イオン加速電圧を適当に決めておき熱電子流にこの試料保持棒を接近させ、イオン化用電子電流が減少する直前の位置まで試料を挿入し、Total Ion Monitorによりイオン流の生成を認めたら直ちにスペクトルを記録する。Fig. 1にDI法とIBEI法の差を模式的に示す。

通常測定の場合電子加速電圧, 20eV, 電子電流 $80\mu\text{A}$, イオン加速電圧3.2kV, イオン源温度200~230℃, 試料は特に加熱しないという条件を用いた。

2.2. 試料

市販の試料を精製することなく用いた。

味の素社製試薬: グリシン, L-アラニン, L-バリン, L-ロイシン, L-イソロイシン, L-セリン, L-トレオニン, L-シスチン, L-メチオニン, L-フェニルアラニン, L-チロシン, L-プロリン, L-ヒドロキシプロリン, L-トリプトファン, L-リジン, L-アスパラ

Fig. 1. Schematic diagrams of the DI and IBEI ion sources used.

ギン酸, L-グルタミン酸

日本理化学薬品特級試薬: L-システイン, L-ヒスチジン, L-アスパラギン, L-グルタミン

東京化成工業特級試薬: クレアチン, L-アルギニン

2.3. 塩化アンモニウムとの混合試料

試料とその約10倍量の塩化アンモニウムをメノウ乳鉢を用いて良く混合し, 石英製試料保持棒にIBEIスペクトル測定と同じ方式で付着させ, 同様な条件下で測定する。

3. 結 果

3.1. アミノ酸のIBEIスペクトル

通常測定条件下で, シスチンを除くすべてのアミノ酸に $(M+1)^+$ イオンの生成を認めた*。難揮発性のアルギニンでは $(M+1)^+$ に相当するピークは存在するが, それより高い m/e 値に熱分解ピークが連続し, 明確なスペクトルは得られなかった。一般にフラグメントイオンは従来のDIスペクトルとほとんど変わらない^{5~7)} Table 1. に各アミノ酸の各IBEIおよびDIEIスペク

トルにおける M^+ および $(M+1)^+$ イオンの相対強度を示す。この結果IBEIスペクトルはDIスペクトルおよび比較的分解し難い $(M+1)^+$ イオンピークおよびそのフラグメントピークの重ね合わせたものに相当することがわかる。アミノ酸類のCIスペクトルは, メタンを反応ガスに用いた時には $(M+1)^+$ イオンピーク以外EIスペクトルと共通のピークが多く,⁸⁾ 又イソブタンを反応ガスに用いると $(M+1)^+$ イオンが圧倒的に多い。¹⁰⁾ メチオニンのIBEIスペクトルには m/e 104, 133イオン強度がわずかにDIスペクトルに比べて強められておりこれはCIスペクトルにみられるように,⁸⁾ $(M+1)^+$ イオンから由来するものと考えられる。従ってIBEIスペクトルはCIおよびEIスペクトルの重ね合わせたものとしても理解でき, Kuhlmanらにより報告されている Closed Ion Source⁹⁾ を用いたスペクトルと類似した性格を有するものと考えられる。クレアチンはEI, CI, FI法によっては, M^+ イオンを示さず, クレアチニンの分子イオンに相当する $(M-18)^+$ イオンが検出されるに過ぎず, FD法によってのみ $(M+1)^+$ イオンの観測が報告されている¹⁰⁾ が, IBEI法では明らかに $(M+1)^+$ イオンの存在が検出され, 熱

*) 本報告を通じて $(M+1)^+$ イオン強度は M^+ に由来する同位元素ピークの補正をおこなったものである。

Table 1. Relative Intensities of M^+ and $M+1^+$ ions of Amino Acids in the DI and IBEI Spectra (20 eV)

Amino acid (M)	Base peak*		M^+		$M+1^+$	
	DI	IB	IB	DI	IB	DI
glycine (75)		30	17	9	4	—
alanine (89)		44	< 1	—	< 1	—
Valine (117)		72	—	—	3	—
leucine (131)		87	—	—	4	< 1
isoleucine (131)		87	< 1	< 1	5	< 1
serine (105)		60	—	—	2	< 1
threonine (119)		75	—	—	14	< 1
cysteine (121)		76	5	3	8	< 1
methionine (149)	130	150	9	29	100	3
phenylalanine (165)		74	2	3	31	< 1
tyrosine (181)		107	9	10	3	—
proline (115)		70	< 1	< 1	15	< 1
hydroxyproline (131)		86	—	< 1	76	H 1
tryptophan (204)	130		10	7	2	—
creatine (131)		113	4	2	4	—
lysine (146)		84	1	2	11	2
histidine (155)		82	3	4	3	< 1
aspartic acid (133)		88	—	—	8	< 1
asparagine (132)		87	—	—	4	< 1
glutamic acid (147)		84	—	—	3	< 1
glutamine (146)		84	—	—	1	—

* m/e of the most intense peak in the spectrum.

不安定物質に対する有用性が示される。メチオニンでは $(M+1)^+$ イオンが最強ピークとなっている。一例としてフェニルアラニンおよびメチオニンのDIおよびIBEIスペクトルを比較してFig. 2, 3に示す。

3.2. IBEI スペクトルに及ぼす測定条件の影響

3.2.1. 電子加速電圧 電子衝撃分解の常として電子加速電圧をあげればフラグメントイオンの強度が増大し、相対的に M^+ および $(M+1)^+$ イオン強度は減少するが $(M+1)^+$ イオンは電子加速電圧に関係なく出現する。通常測定条件下でのフェニルアラニンにおける電子加速電圧変化に伴う $[M+1]/[M]$ の相対強度比は次の通りであった。; 10eV, 13.5; 20eV, 15.6; 70eV, 22.9; 70eVでこの比が大きくなっているが、これは M^+ 強度の減少に由来するものと考えられる。

3.2.2. 測定時間 フェニルアラニンについて時間に対する全イオン電流の変化をFig. 4に示す。各時

間について得られた $[M+1]/[M]$ 比を併記しておく。Fig. 4において全イオン電流は、2個の極大を示している。仮に40秒以内に出現する第一の極大を第一のイオン群、それ以後の極大を第二のイオン群と呼べば、第一のイオン群は $(M+1)^+$ イオン量が多く、逆に第二のイオン群は M^+ のイオン量が多い。第一のイオン群はIBEI modeであり第二のイオン群はDI modeであることから第二のイオン群は恐らく熱電子流からはなれた位置にある試料がイオン源壁面からの輻射熱をうけて加熱酸化してえられたものであろう。全イオン量と $[M+1]/[M]$ 比が直線関係にないことから $(M+1)^+$ イオンはイオン-分子間反応によって得られたCI modeによるものと言い切ることはできない。第一群のイオンの生成はかなり濃厚密度のサンプル蒸気が一気に電子衝撃を受け、ついでイオン分子間反応に基づくCI modeによるものか、あるいは会合状態にある分子が電子衝撃を受けたものとも考えられるが明確で

Fig. 2. DI and IBEI spectra of phenylalanine (20 eV).

Fig. 3. DI and InBEI spectra of methionine (20 eV).

はない。 $(M+1)^+$ イオン生成機構の解明は今後の問題である。一般にアミノ酸や糖類¹¹⁾では $(M+1)^+$ イオンの生成がみられるが化合物によっては観測されないこともあり¹²⁾試料の性質に依存する所が大きい。

3.2.3. イオン化室温度 通常測定条件下でのフェニルアラニンの $[M+1]/[M]$ 比はイオン化室温度に依存する。次のように観測された；160℃, 0.4；180℃, 0.6；200℃, 15.6；215℃, 5.0；225℃, 2.3。このことからIBEIスペクトルを得るにはある程度の加熱気化が必要であることがわかる。最適温度はサンプルによりまちまちであるが良好なスペクトルを得るには条件設定が重要であることがわかる。

3.2.4. 試料位置 熱電子流からの試料距離を正確に算出することは難しい。試料保持棒を熱電子流中に挿入すると電子電流が減少する(80μA → 30μA)ので、この影響がみられない程度に距離をおいて測定

した。フェニルアラニンの場合この電流に影響がみられる位置から3mm離れた所で $[M+1]/[M]$ 比は約3であり、6mmでは約15となり、9mmでは1.4程度に減少する。通常のDIスペクトル測定位置は約20mm程度離れている。したがって試料位置がIBEIスペクトルに与える影響は非常に大きく、試料の揮発性を考慮する必要がある。

3.3. 塩化アンモニウムの影響

試料に凡そ10倍量の塩化アンモニウムを混合し、IBEIスペクトルの測定条件で測定したところ、フェニルアラニン、メチオニンで $(M+1)^+$ イオンピークが完全に消失し、通常のDIスペクトルが得られた。 $(M+1)^+$ イオン消失の原因は単に試料濃度の減少によりイオン-分子間反応が阻害されたものか、あるいは会合状態分子が解離してしまった為か、それとも $(M+1)^+$ 分子とアンモニア分子とのイオン-分子間反応

Fig. 4. Variations of the total ion current and $[M+1]/[M]$ of phenylalanine at different measurement times.

により水素イオン転位をおこして電荷を消失してしまったためかはっきりしない。いずれにしてもこの現象は $(M+1)^+$ イオンピークの確認には有用な手段となりうる。

4. 結 論

アミノ酸のIBEIスペクトルはシスチン、アルギニンを除いて測定可能であり、すべて $(M+1)^+$ イオンの

検出を認めた。スペクトルの様相は比較的分解し難い $(M+1)^+$ イオンピークとDIスペクトルの重なりとして解析される。熱分解をうけやすいクレアチン、グルタミンでも明瞭に $(M+1)^+$ イオンが検出されることは、熱電子流に固体サンプルを極端に接近させることが熱分解を防ぎ、かつ揮発性のすくない試料にかなり有効であり、一方電子衝撃に敏感な分子では逆に比較的分解し難い $(M+1)^+$ イオンを観測することで従来のDI法と比べて遥かにスペクトルが改善されることがわかった。このIBEI法はアミノ酸に限らず難揮発性、熱不安定物質の質量スペクトルを得る有用な手段となることは明らかである。^{11,12)}

イオン源の改善に御協力頂いた日立製作所那珂工場、菱田真三郎、中嶋康雄、安田昭善、田島英司の各氏に厚く感謝致します。

文 献

- 1) A. Dell, D. H. Williams, H. R. Morris, G. A. Smith, J. Feeney and G. C. K. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2497 (1975).
- 2) J. P. Anhalt and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **47**, 219 (1975).
- 3) M. A. Baldwin and F. W. McLafferty, *Org. Mass. Spectrom.*, **7**, 1353 (1973).
- 4) M. Ohashi, K. Tsujimoto, and A. Yasuda, *Chem. Lett.*, **1976**, 439.
- 5) K. Biemann and J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3192 (1962).
- 6) G. Junk and H. Svec, *ibid.*, **85**, 839 (1963).
- 7) K. Heyns and H. Grützmacher, *Ann.*, **667**, 194 (1963).
- 8) G. W. A. Milne, T. Axenrod and H. M. Fales, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5170 (1970).
- 9) C. F. Kuhlman, T. L. Chang and G. L. Nelson, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1581 (1975).
- 10) H. M. Fales, G. W. A. Milne, H. U. Winkler, H. D. Beckey, J. N. Damico and R. Barron, *Anal. Chem.*, **47**, 207 (1975).
- 11) 山田修三, 工藤均, 大橋守, 第11回有機化合物のマススペクトロメトリー討論会講演予稿集 p 127 東京 (1976).
- 12) 二之宮昭夫, 岩井利明, 佐藤弘, 第11回有機化合物のマススペクトロメトリー討論会講演予稿集 p 121 東京 (1976); および文献 4)