

分子のイオン化法

日立製作所中央研究所
平林 集

はじめに

□分子のイオン化法は、質量分析分野を中心に発達。

□以下では、気相、液相、固相サンプルに対し、
各々代表的なイオン化法を駆け足で紹介。

□イオン化法:

- ・昔から知られるイオン化現象を利用。
- ・効果があれば実用化。

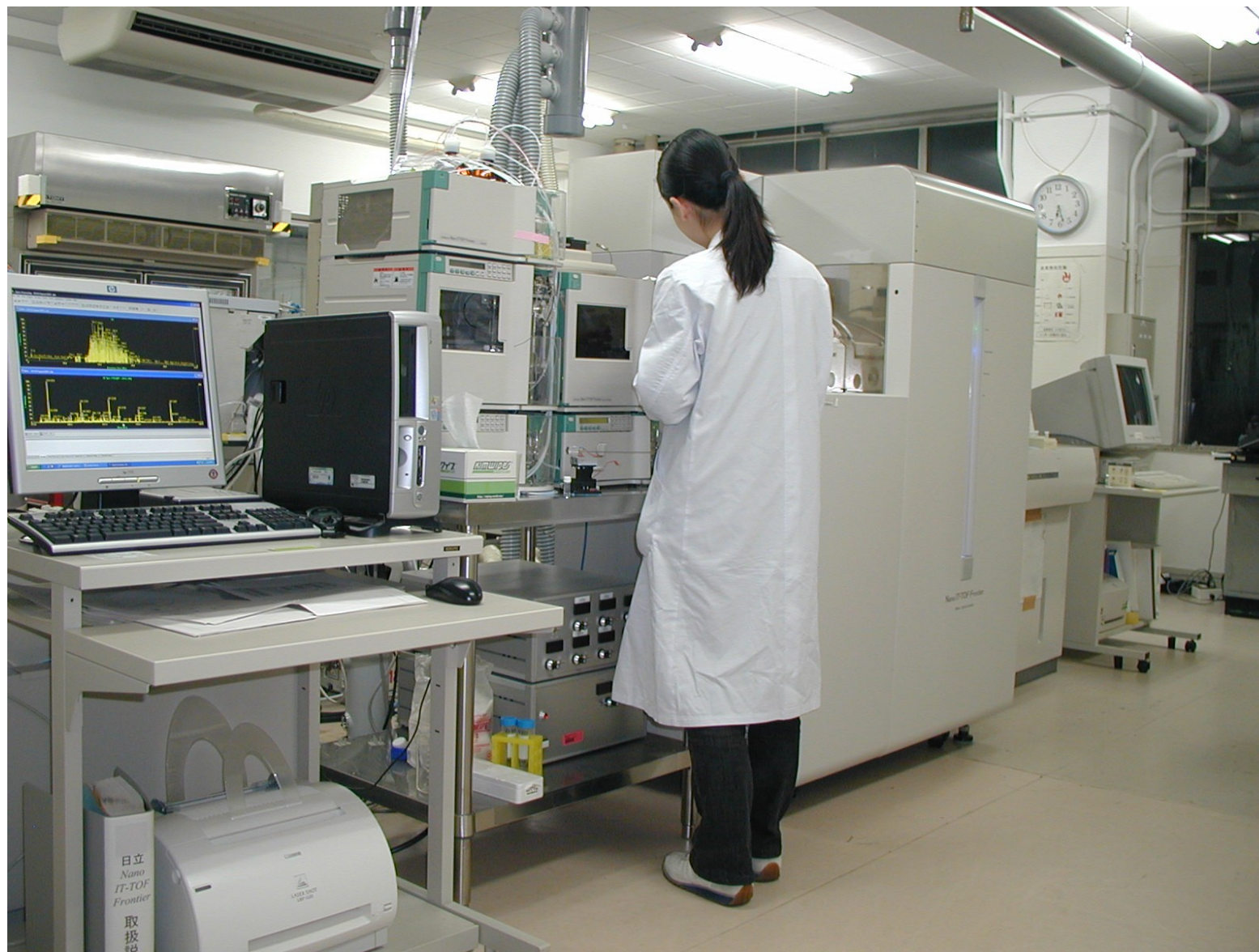
□エネルギー領域は、数eVが主。



目次

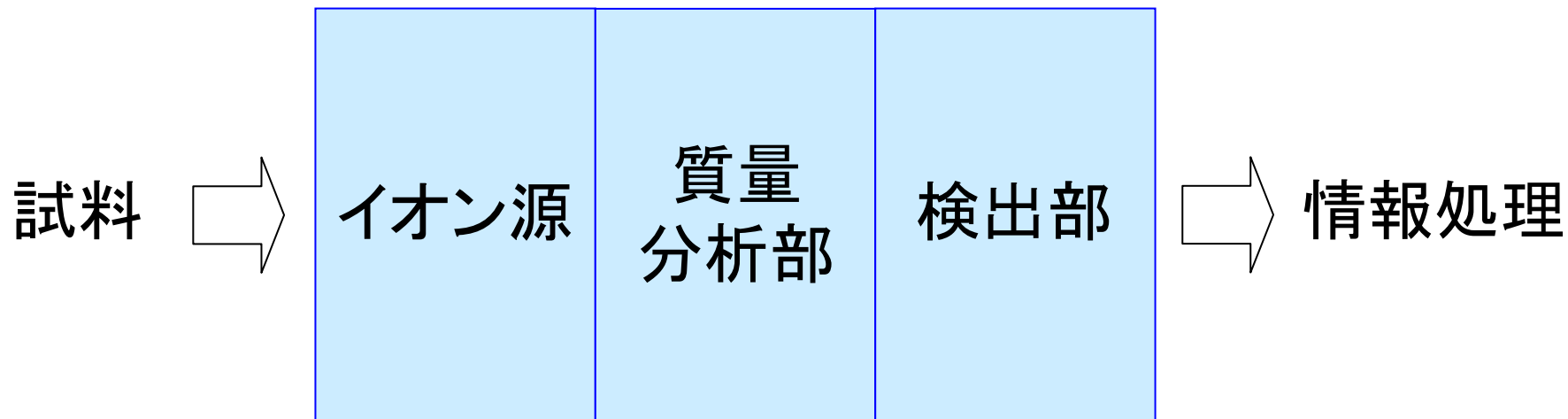
1. はじめに
2. 質量分析法の応用
3. 気相分子のイオン化
4. 液相分子の噴霧イオン化
5. 固相分子の脱離イオン化

タンパク質解析用の質量分析装置



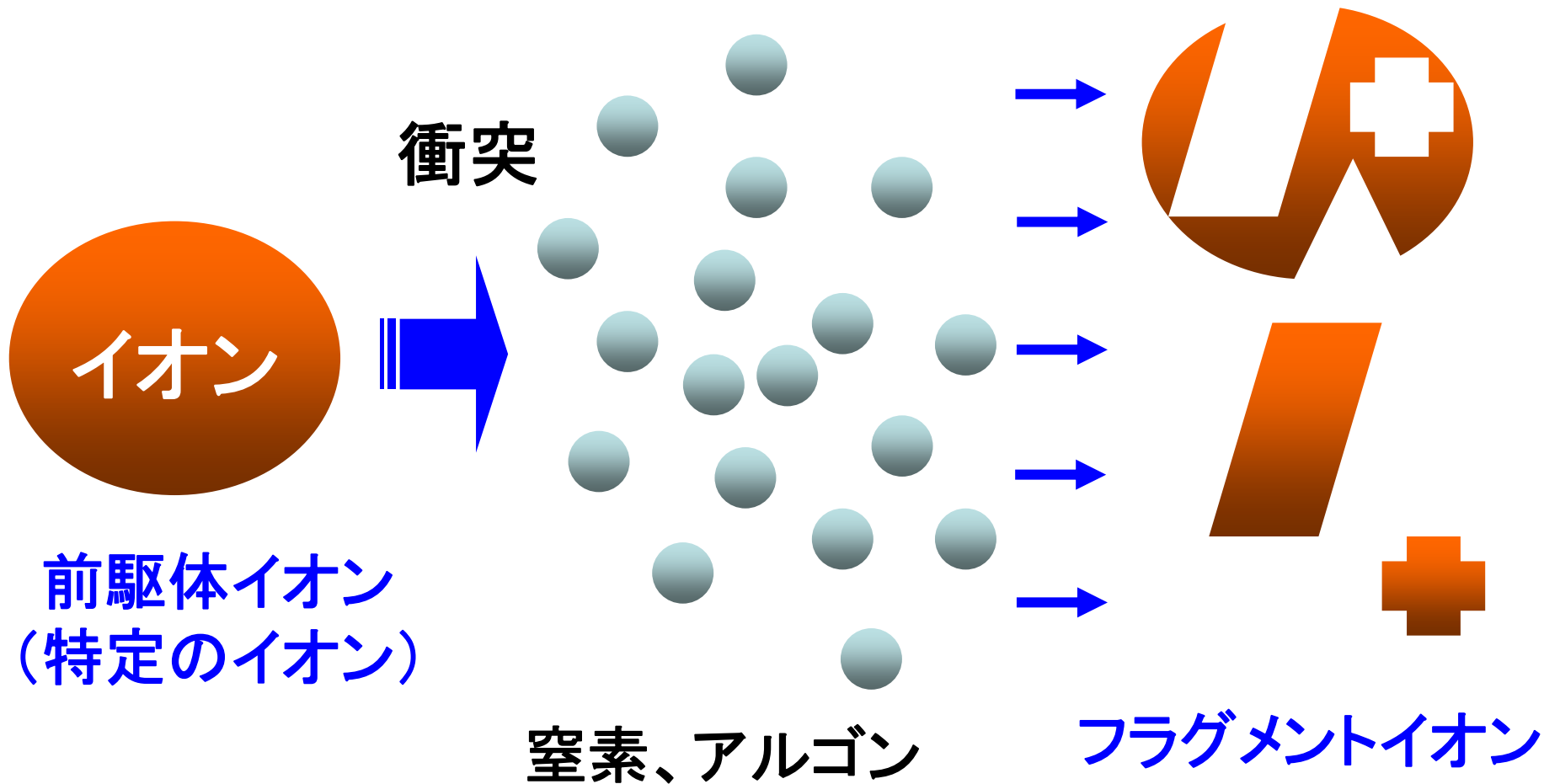
質量分析計とは

質量分析計



質量分析法におけるイオン生成

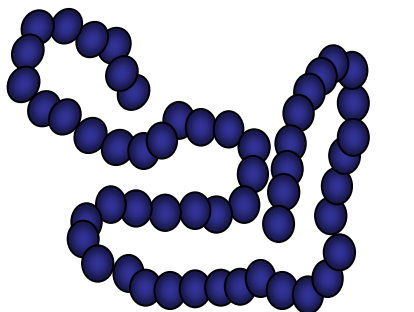
衝突誘起解離(CID)を用いたMS/MS分析



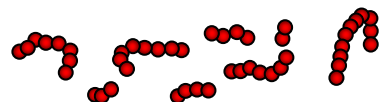
質量分析法におけるイオン生成

気体分析 ➡ 不揮発性物質、生体物質の分析

ポイント: 分子量関連イオンの高効率生成。



イオン化



破壊的なイオン化

電子
イオン化

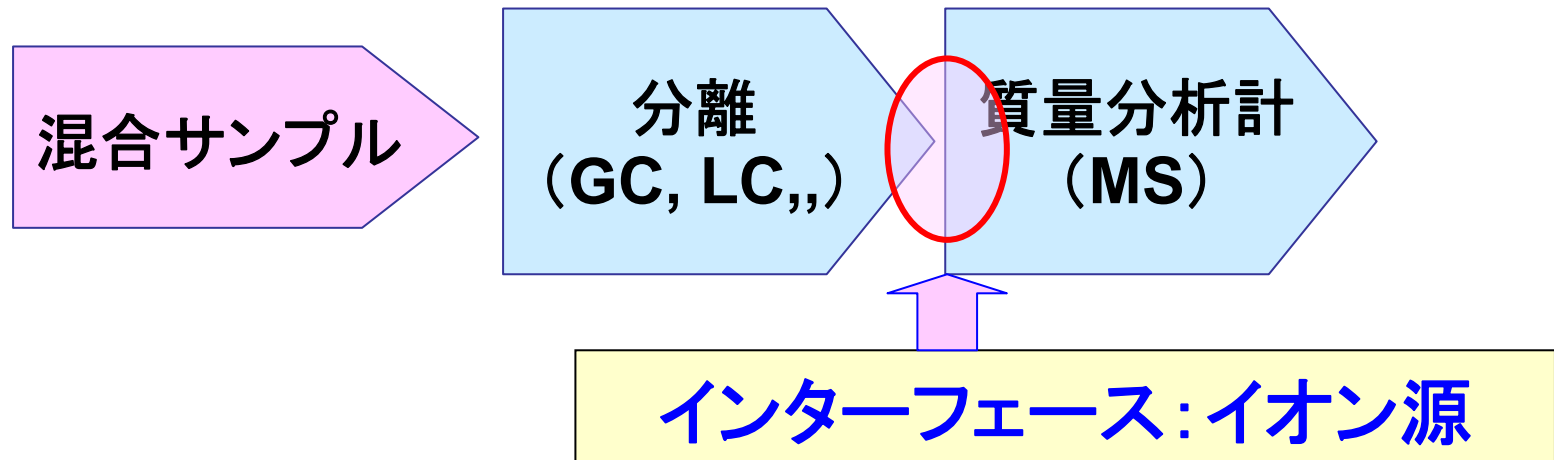


電界イオン化
表面イオン化
光イオン化
化学イオン化
噴霧イオン化
脱離イオン化

2. 質量分析法の応用

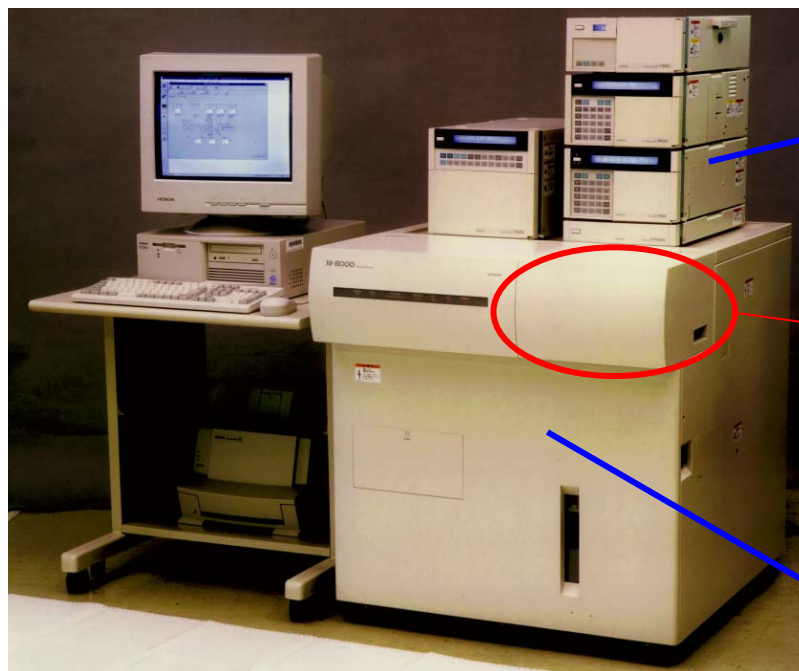
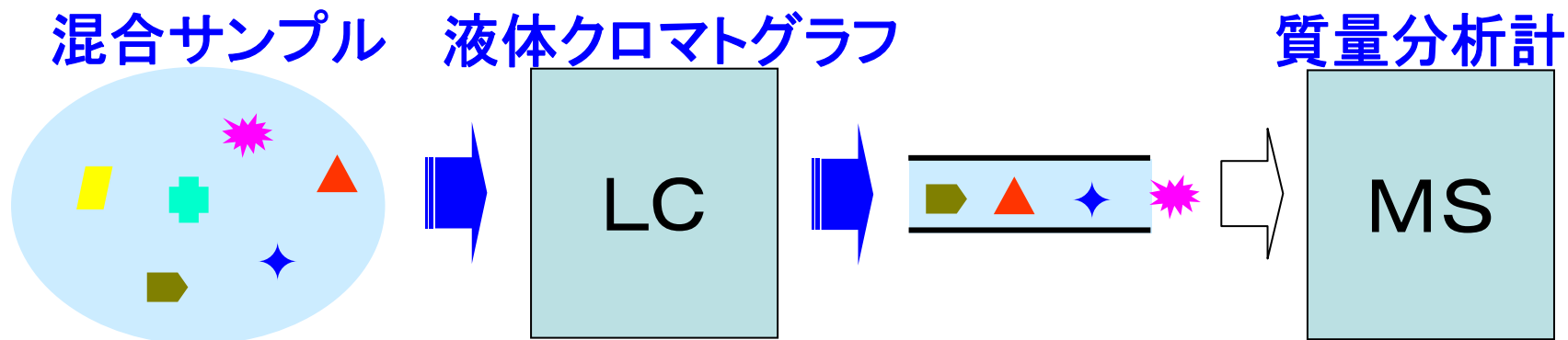
GC/MSやLC/MSによる分析

GC(ガスクロマトグラフ)、LC(液体クロマトグラフ)を結合

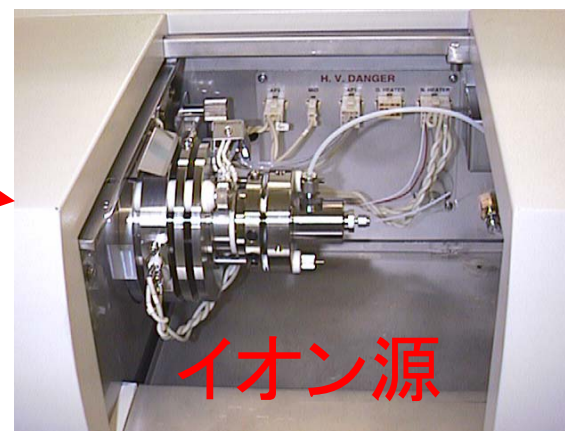


- m/z が重なるイオンを識別。
- イオン強度の定量性を確保。

LC/MSを用いた農薬の一斉分析



液体クロマトグラフ

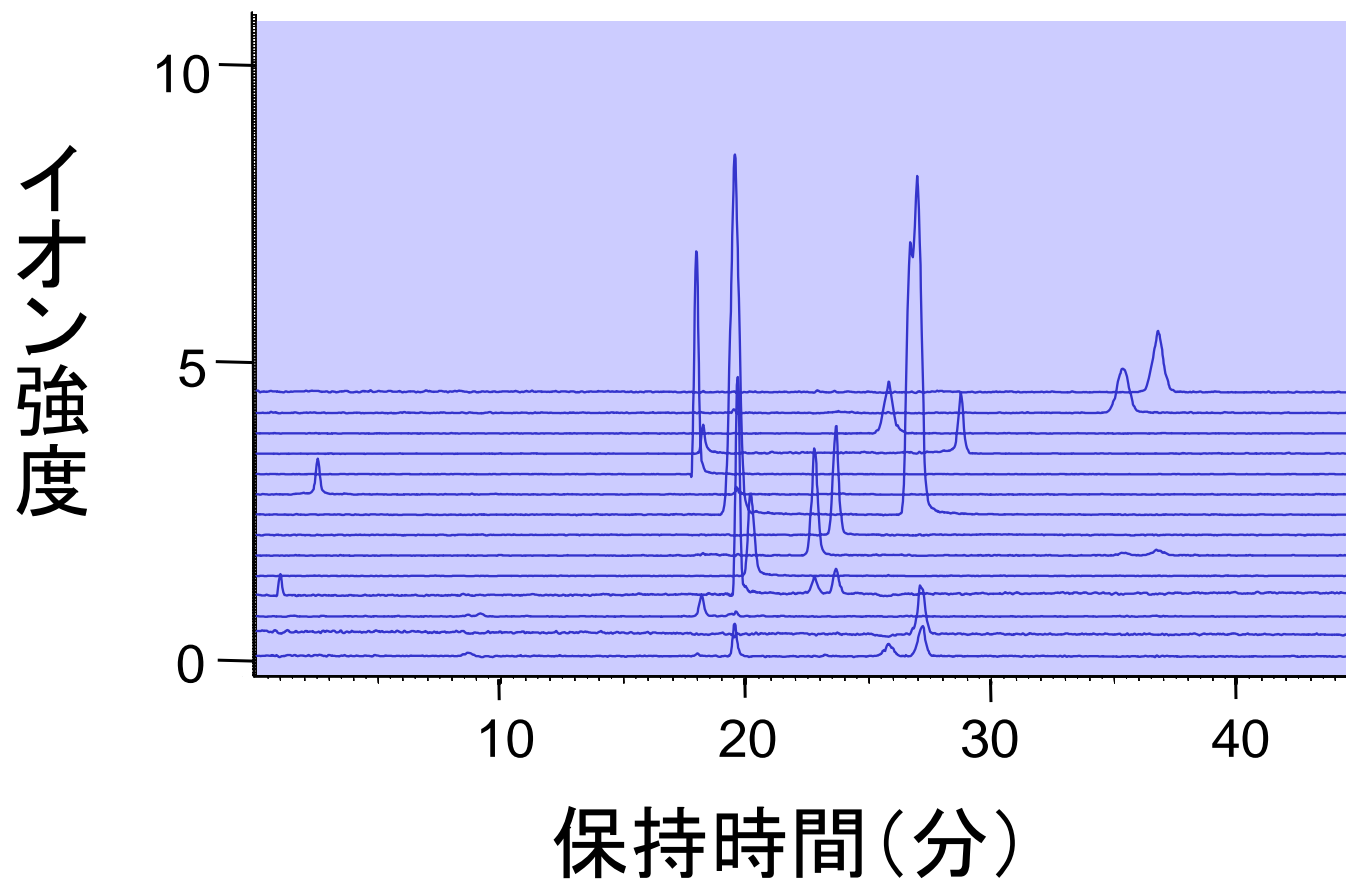


質量分析計

LC/MSを用いた農薬の一斉分析

マスクロマトグラム

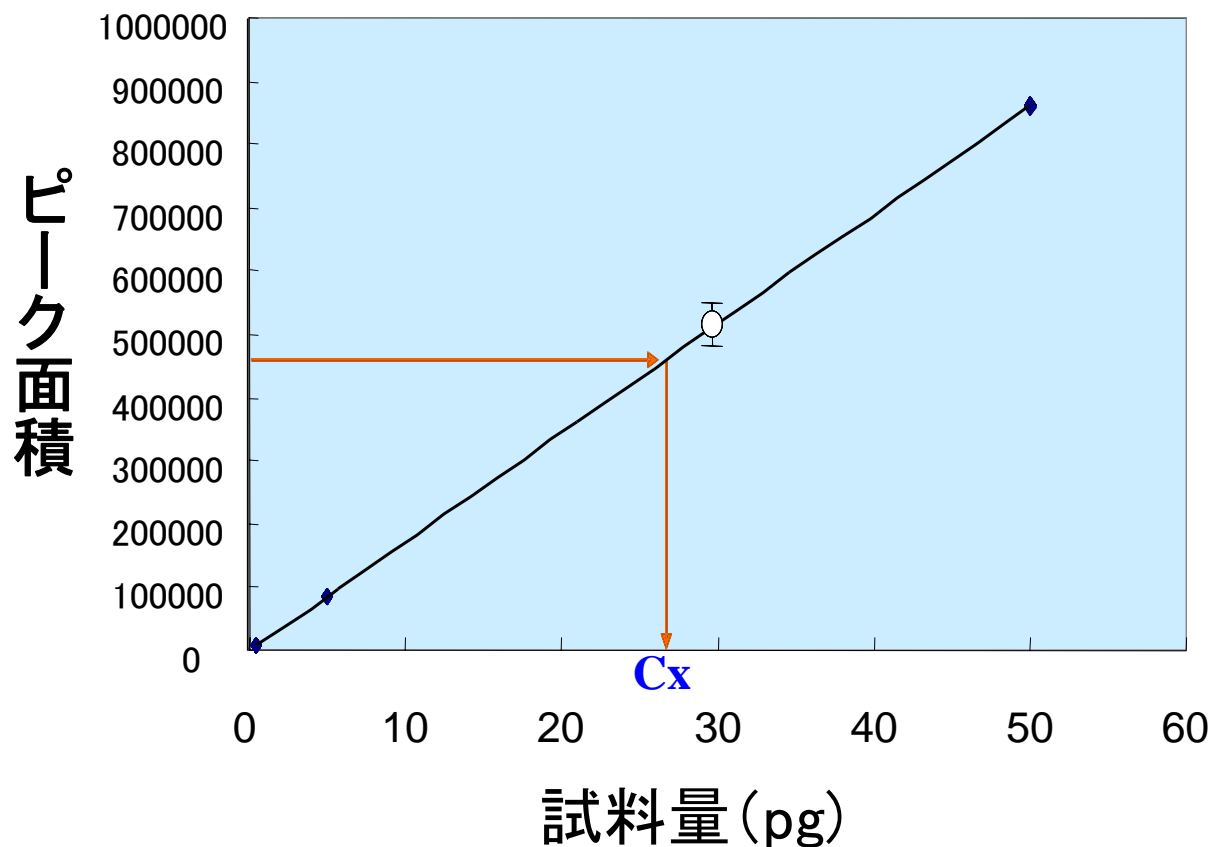
(特定の m/z におけるイオン強度の時間変化)



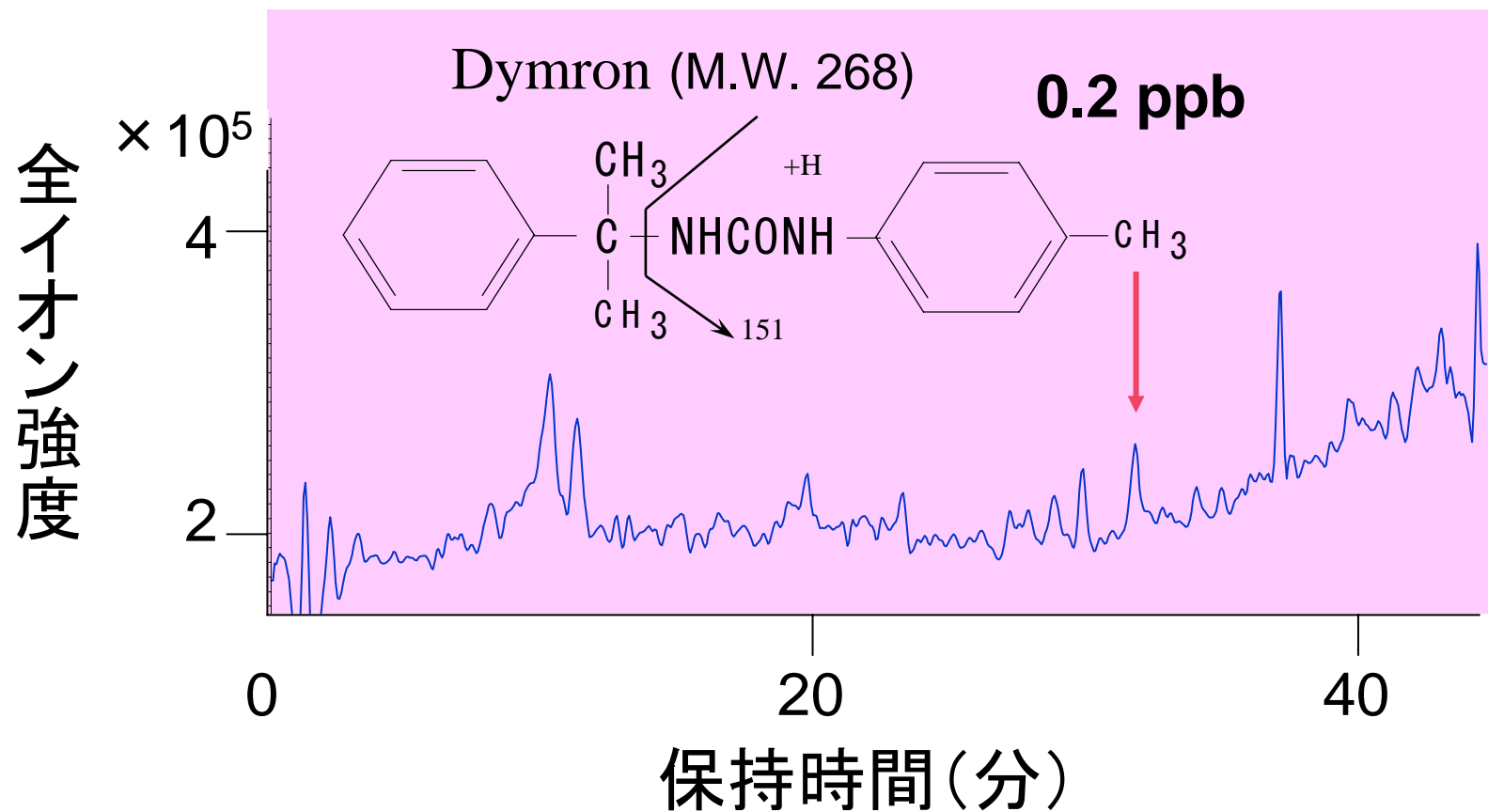
LC/MSを用いた農薬の一斉分析

標準物質による検量線

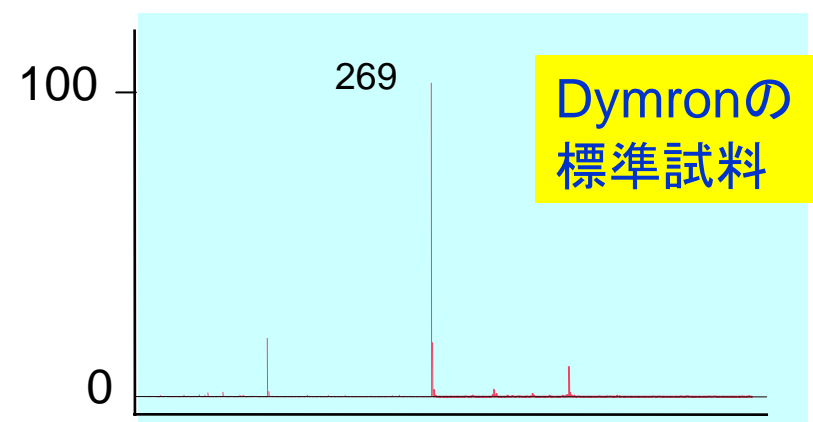
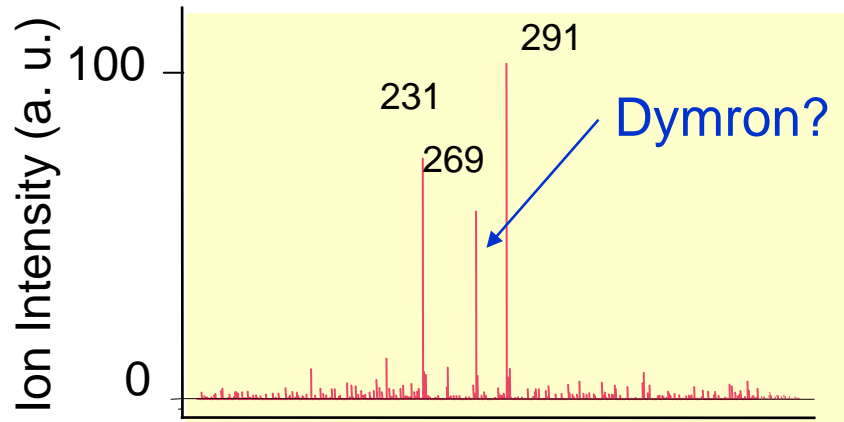
(ピーク面積より、実サンプル量を決定)



LC/MSを用いた農薬の一斉分析



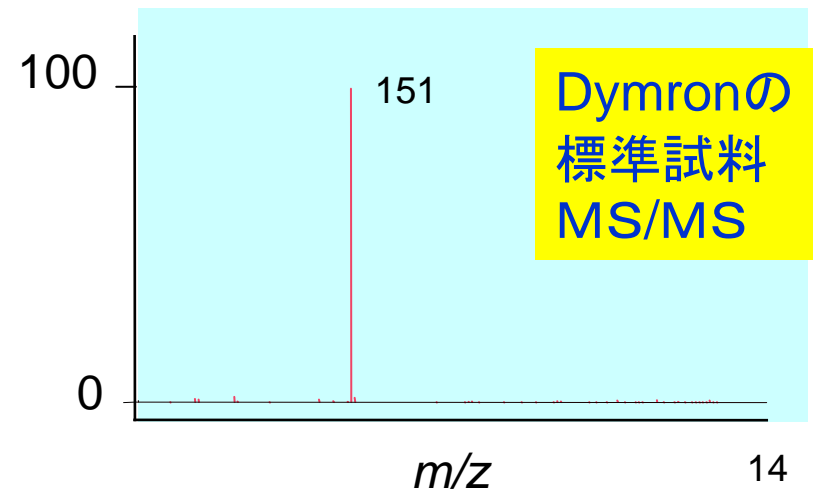
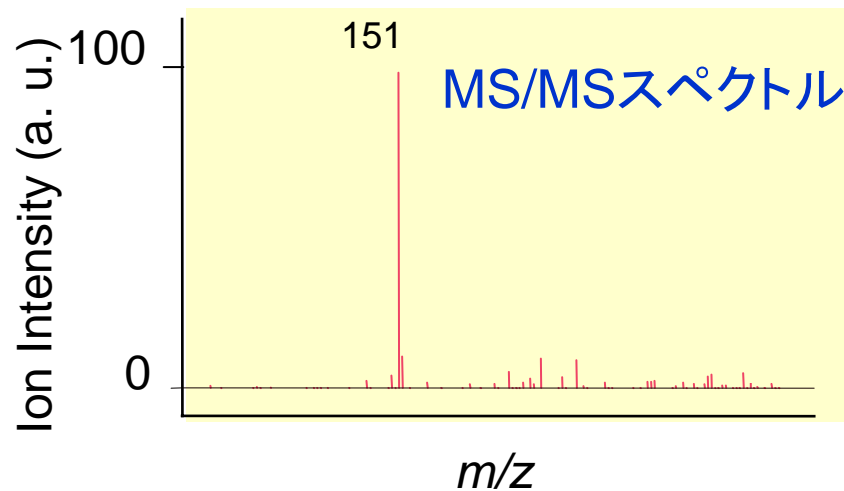
LC/MSを用いた農薬の一斉分析



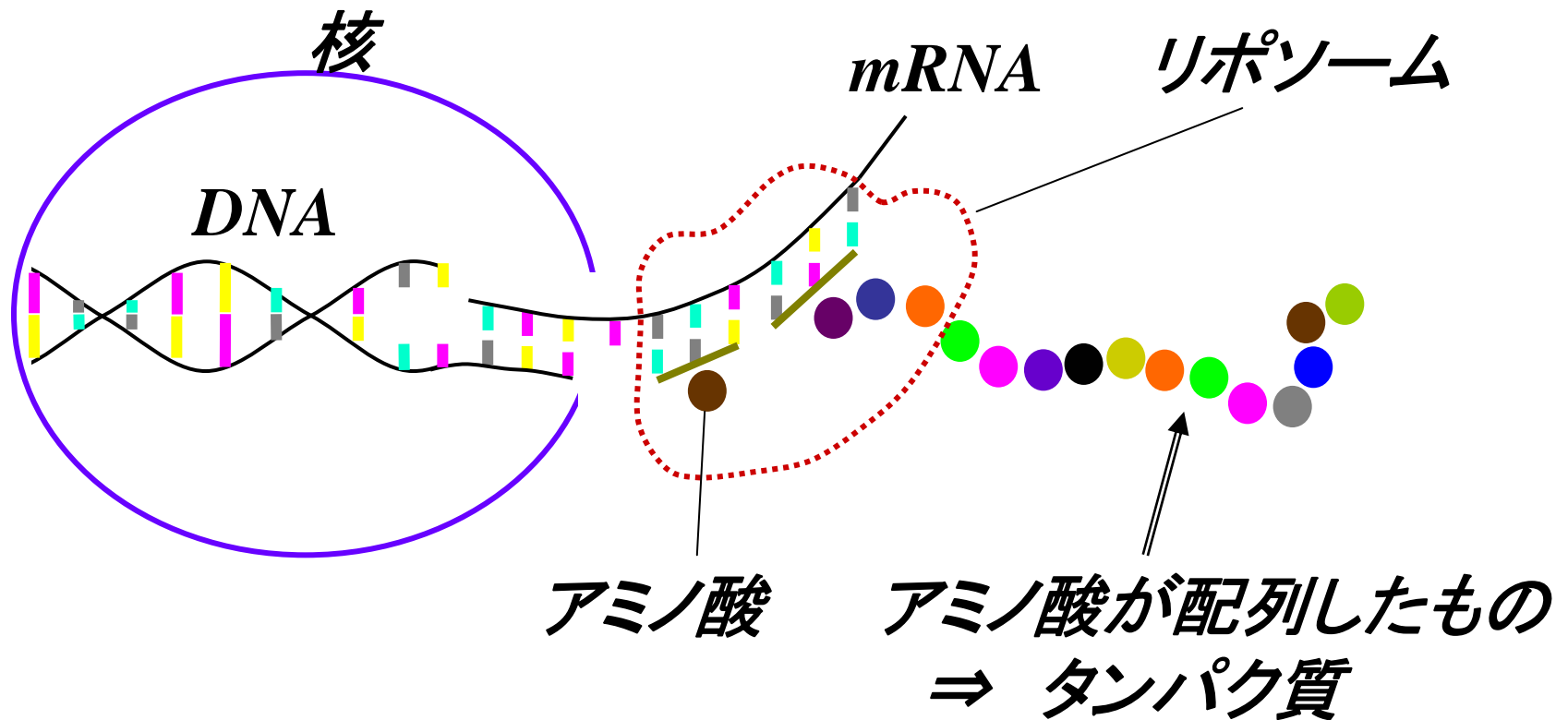
m/z

衝突誘起解離 (CID)

m/z



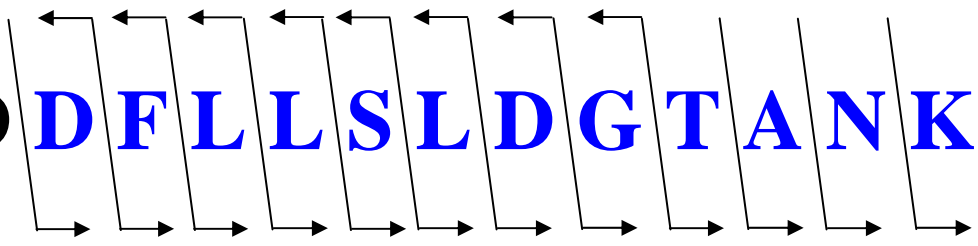
タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)



遺伝子情報 → タンパク質

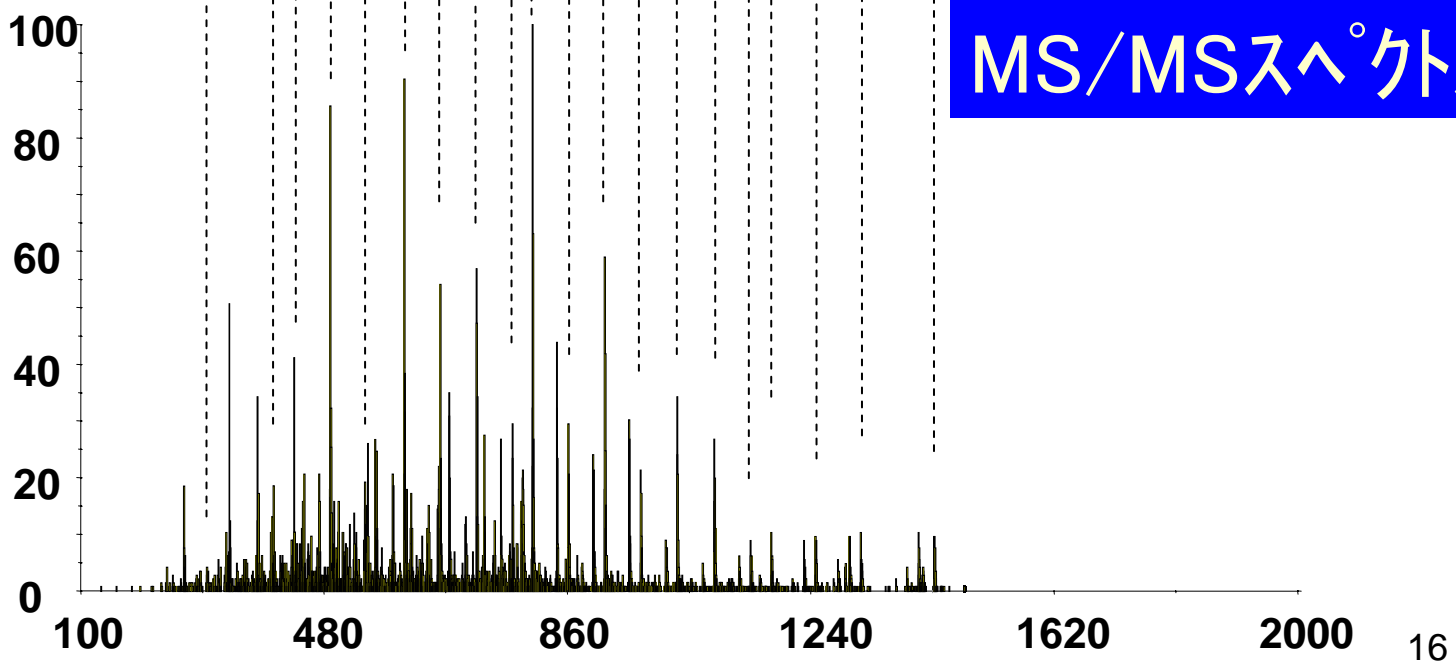
タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)

アミノ酸配列: **A V D D F L L S L D G T A N K**



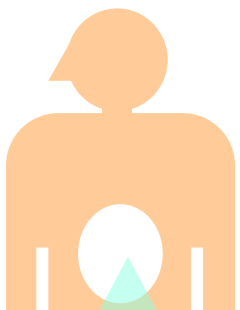
D F L L S L D G T A N K
G D L S L L F

相対イオン強度(%)

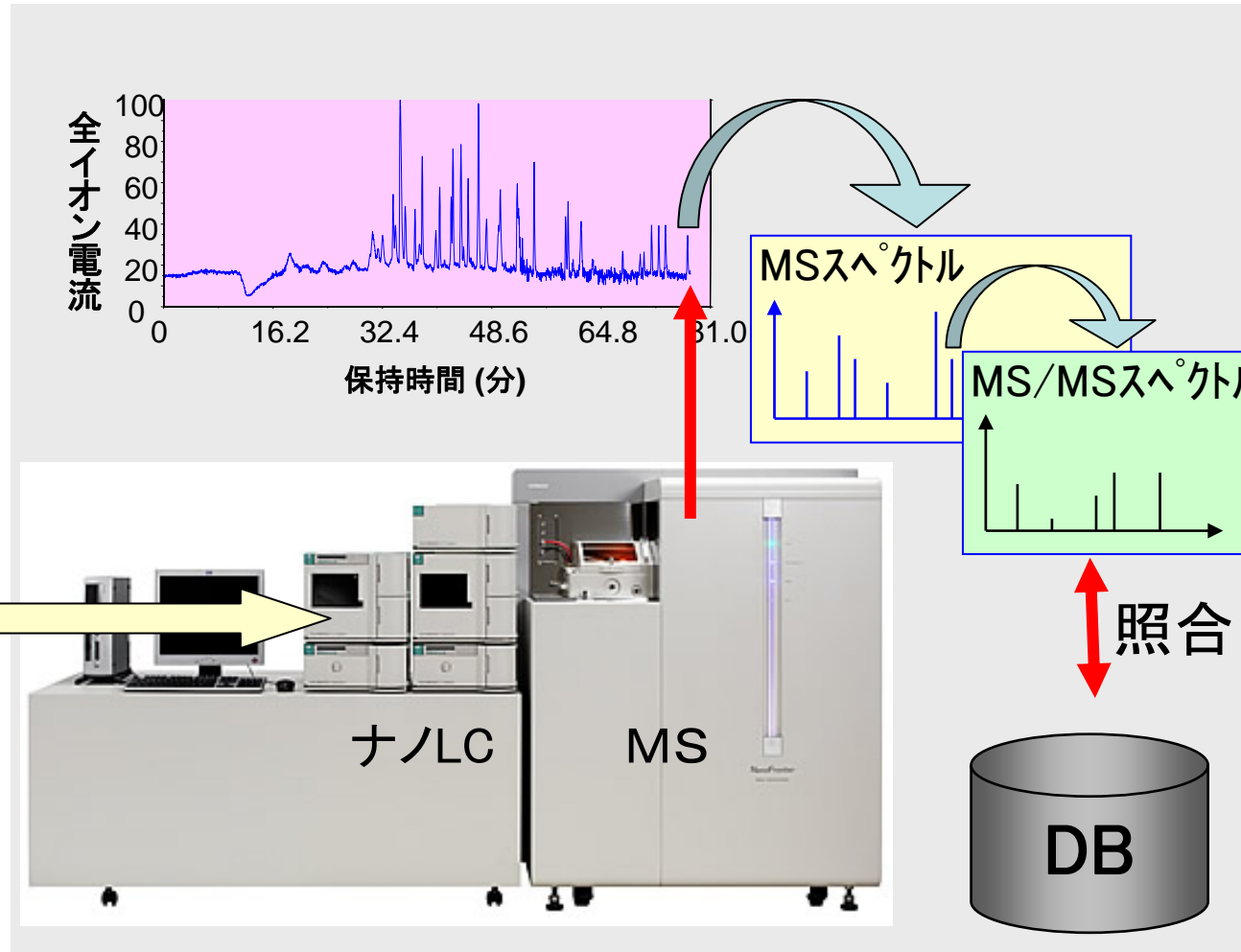


m/z

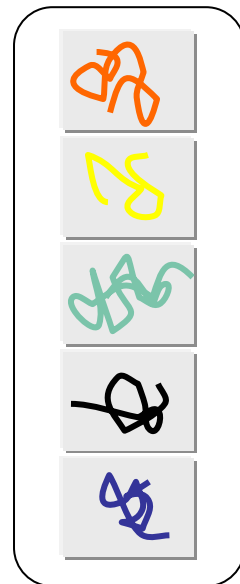
タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)



タンパク質
サンプル

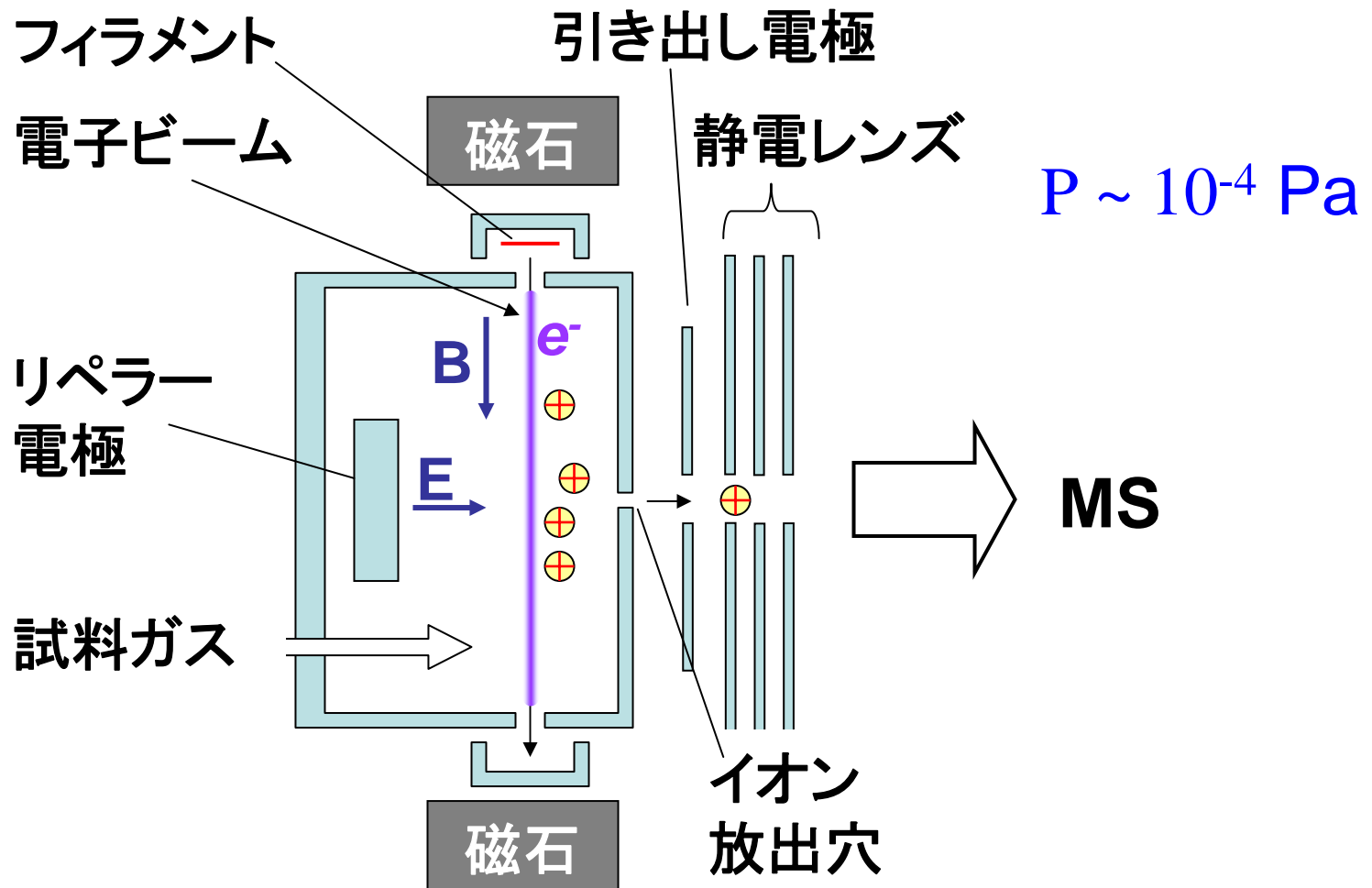


同定タンパク質



3. 気相分子のイオン化

I. 電子イオン化法 (EI)



I.電子イオン化法(EI)

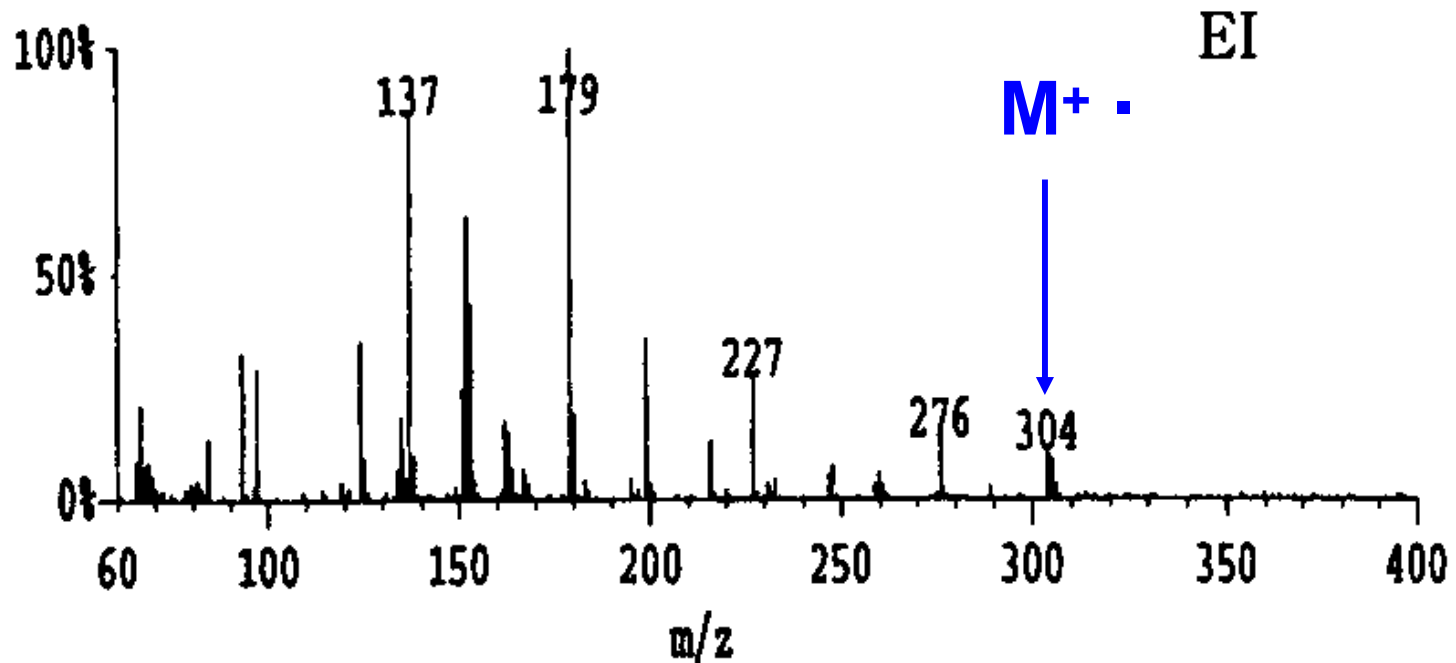
イオンは、分子量関連イオンまたはフラグメントイオン



- 分子量が1000以下の揮発性有機化合物の分析に有効。
(炭化水素、油脂、アルカロイド、ステロイド、農薬、ダイオキシン、香料、芳香剤など)
- 豊富なフラグメントイオン情報により、物質の特定に有利。

I.電子イオン化法(EI)

ダイアジノン(M.W. 304)の質量スペクトル



大抵は、正イオンが検出。

質量スペクトルDB利用可能。<http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>

Ⅱ.化学イオン化法(CI)

CIイオン源は、EIイオン源で気体圧力を約10倍上昇させたもの。

⇒ イオン源で、イオンと分子との衝突回数が増加。

⇒ 分子量関連イオン生成に有利。

①反応イオンの生成
(イソブタンの例)



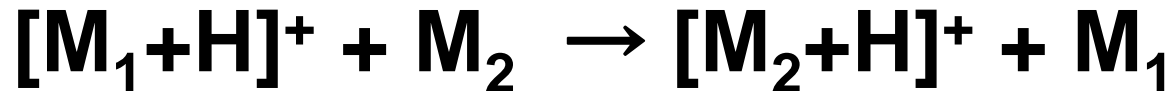
②化学イオン化
(イオン分子反応)



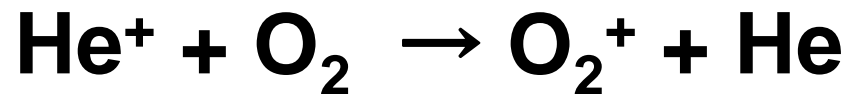
Ⅱ.化学イオン化法(CI)

代表的なイオン分子反応

1. **プロトン移動反応**:プロトン親和力が支配



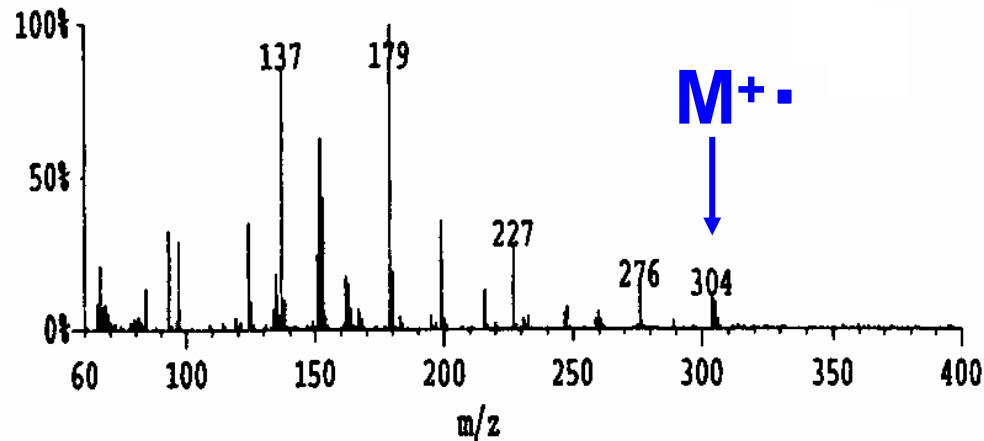
2. **電荷移動反応**:イオン化エネルギーが支配



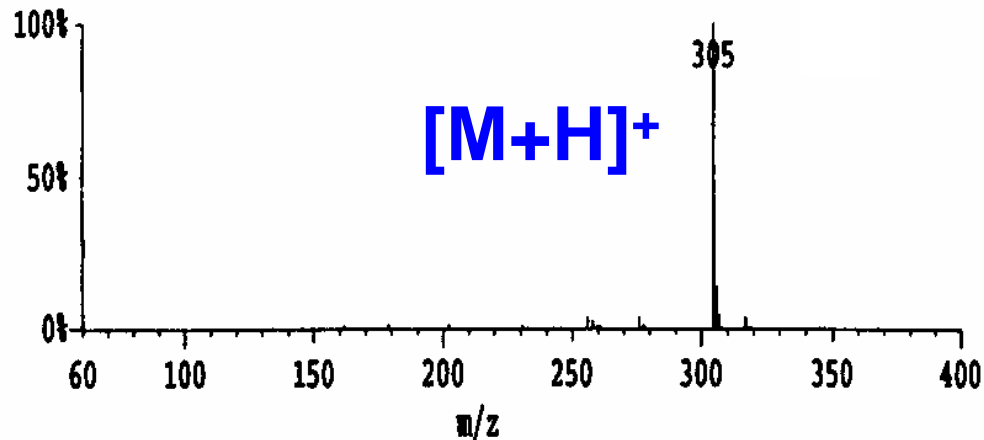
II. 化学イオン化法 (CI)

ダイアジノン (M.W. 304) の質量スペクトル

EI



CI



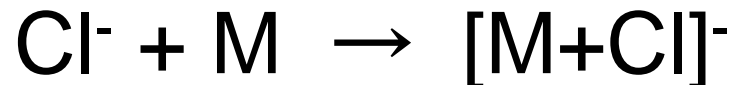
Ⅱ.化学イオン化法(CI)

負イオン検出にも有利。

1. 電子捕獲(付着)反応: 電子親和力(EA)の高い物質に有効。
(電子の多数回衝突→低エネルギー電子の発生)

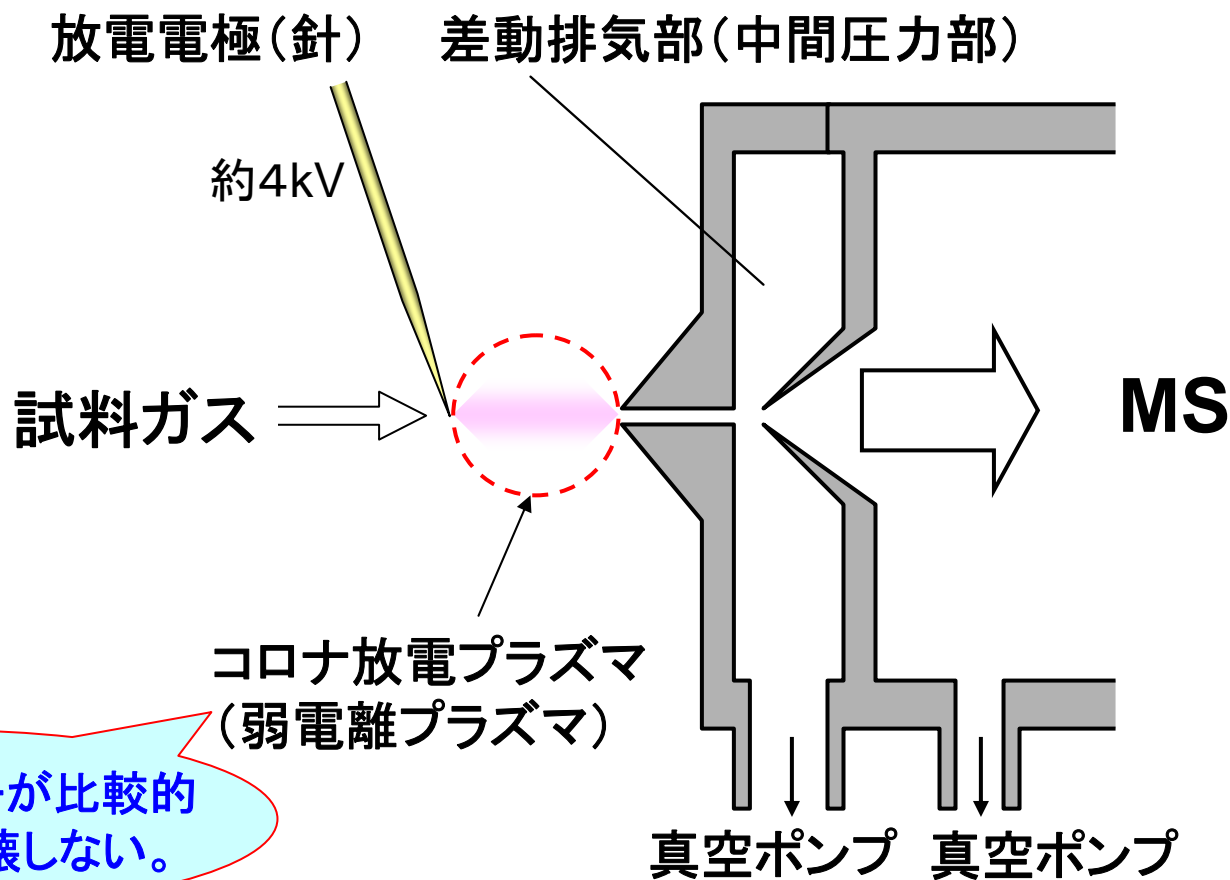


2. アニオン付加反応
(ハロゲン化合物ガスによるF⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻,等の反応イオン発生)



Ⅲ. 大気圧化学イオン化法 (APCI)

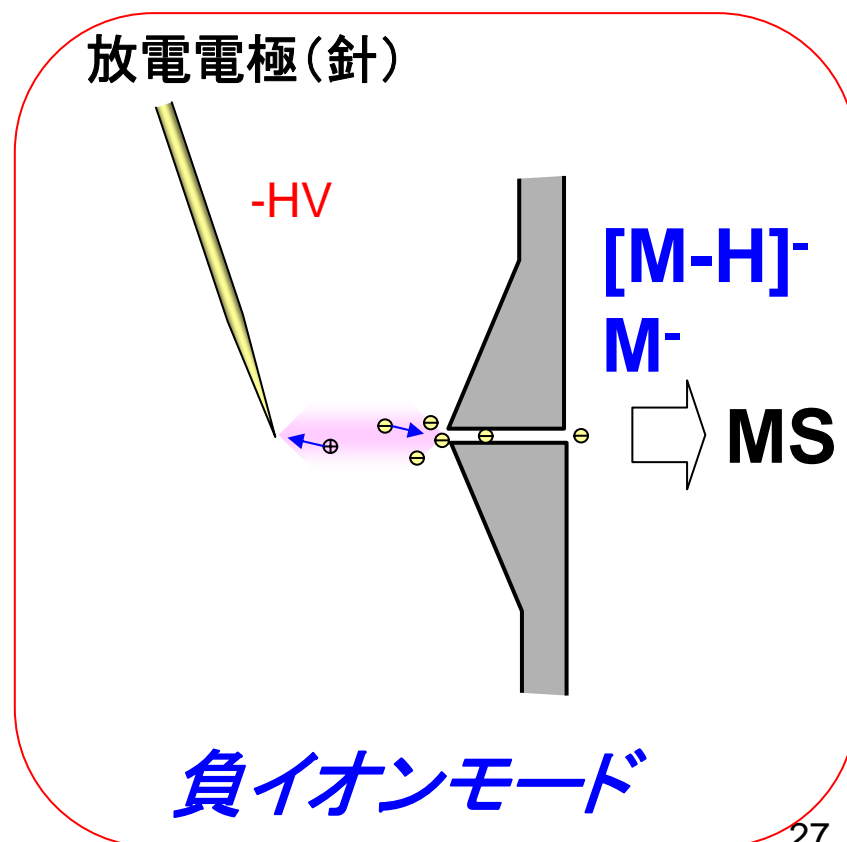
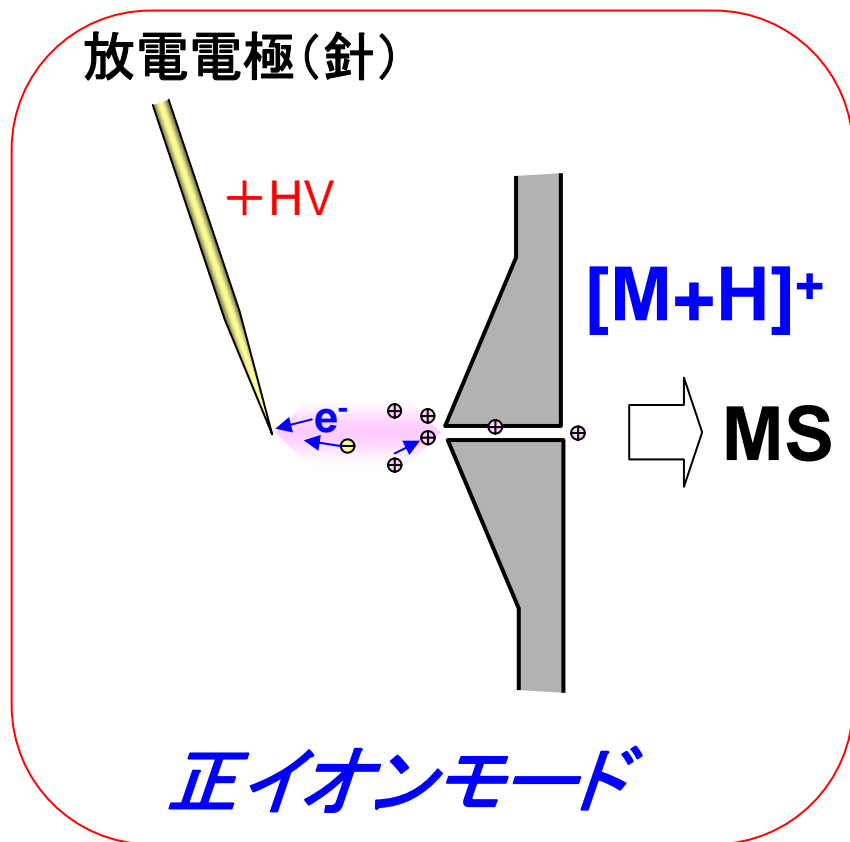
CIは、イオン源圧力が高いほど、イオン化(反応)効率が低い。
⇒ イオン源を真空中から大気中に移動(大気圧CI: 圧力 10^6 倍)
⇒ 反応イオン生成には、コロナ放電を利用。(電子ビーム利用困難)



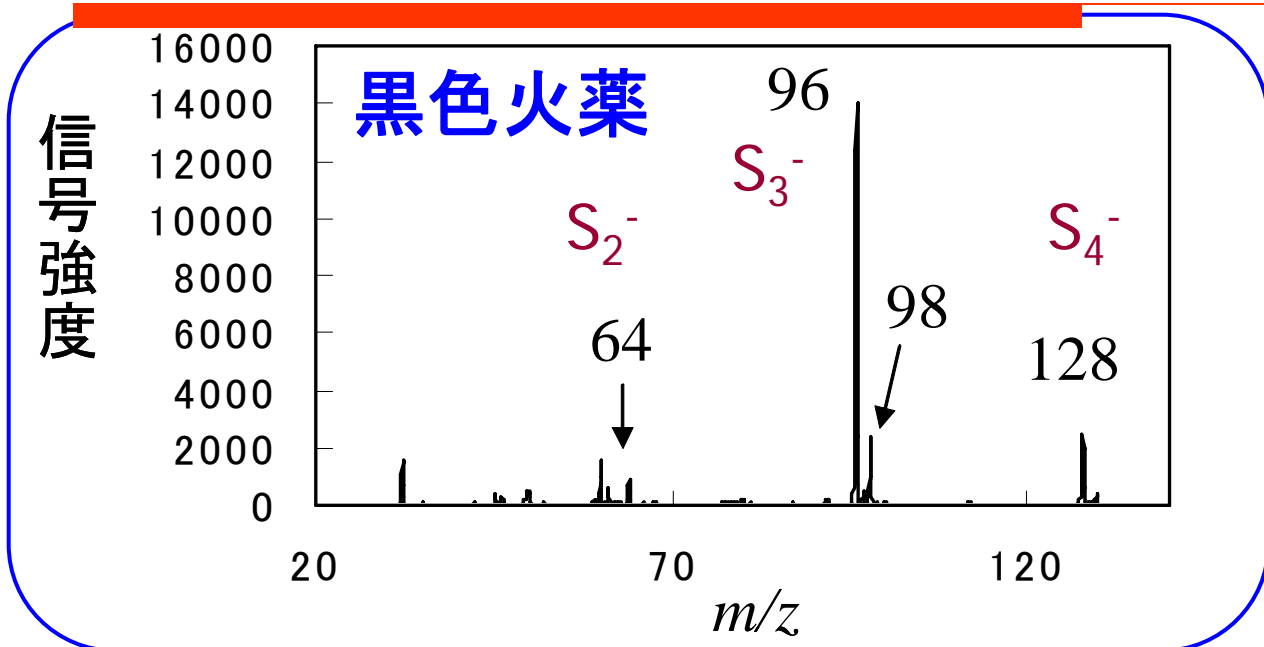
電子エネルギーが比較的
低く、試料を破壊しない。

Ⅲ. 大気圧化学イオン化法 (APCI)

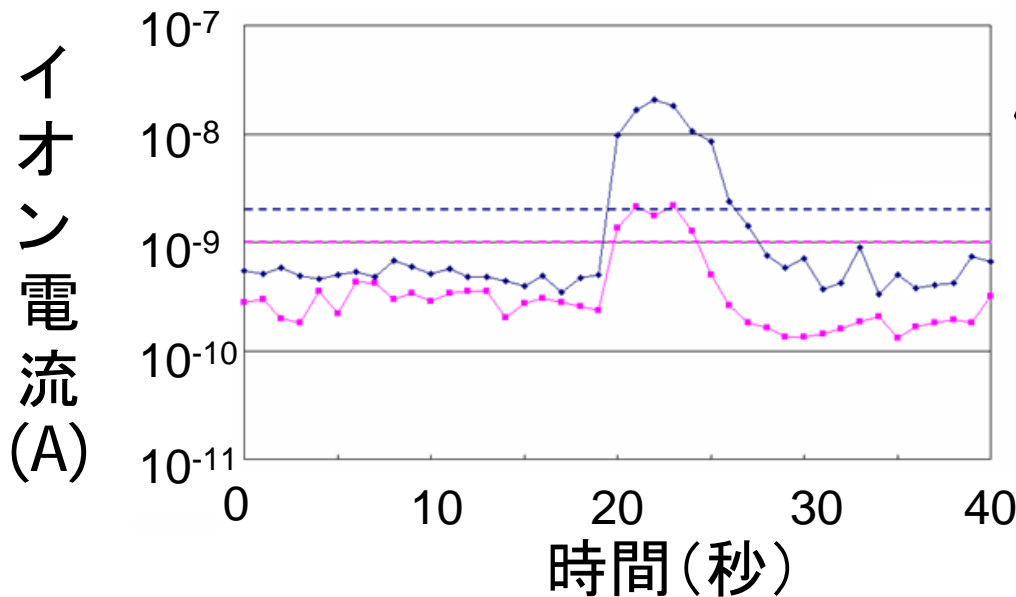
放電プラズマは全体で中性だが、正負イオンは分離される。
⇒ APCIでは、放電電極への印加電圧の極性に応じて、
分析イオンの極性を変更することができる。



Ⅲ. 大気圧化学イオン化法 (APCI)



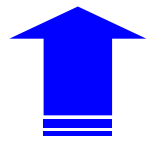
危険物の
実時間
モニター



青線: $m/z = 96$
赤線: $m/z = 98$

難揮発性物質のイオン化

加熱による気化？



熱分解し、分子量関連イオンが生成しない。

気体化せずに直接イオン化する？

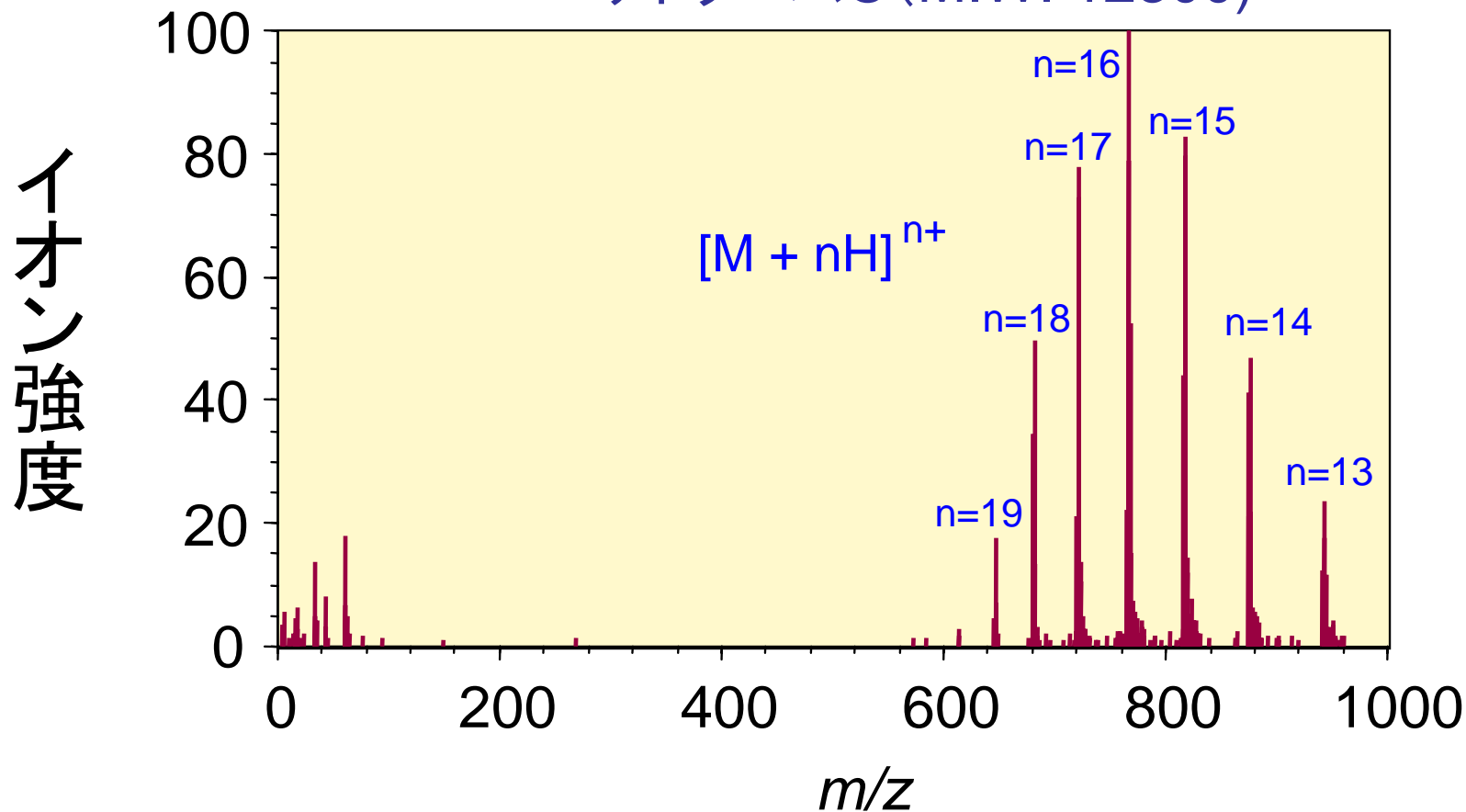
1. 噴霧イオン化現象の利用
2. 脱離イオン化現象の利用

4. 液相分子の噴霧イオン化

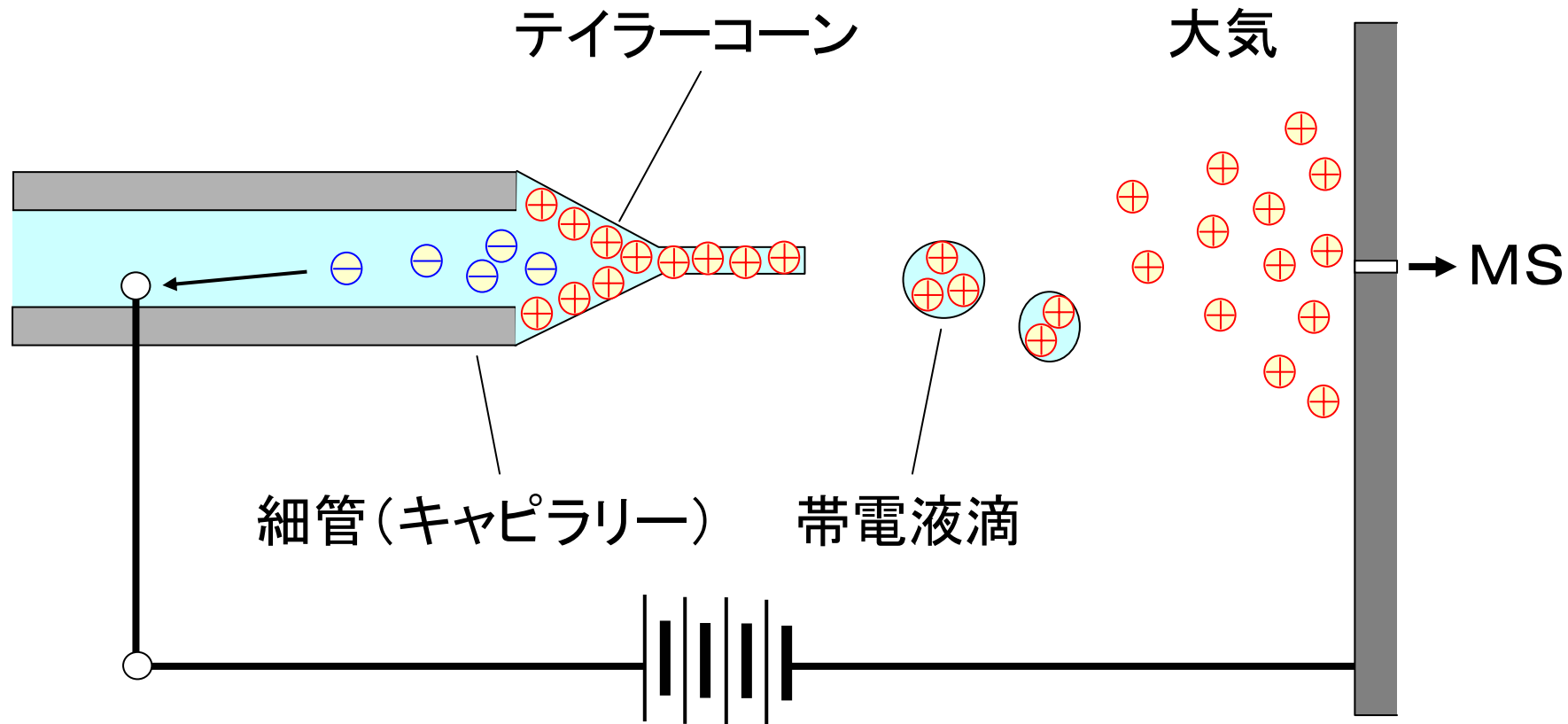
I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

プロトン付加分子が生成、高極性物質の場合は多価イオン生成。

チトクロムC (M.W. 12300)

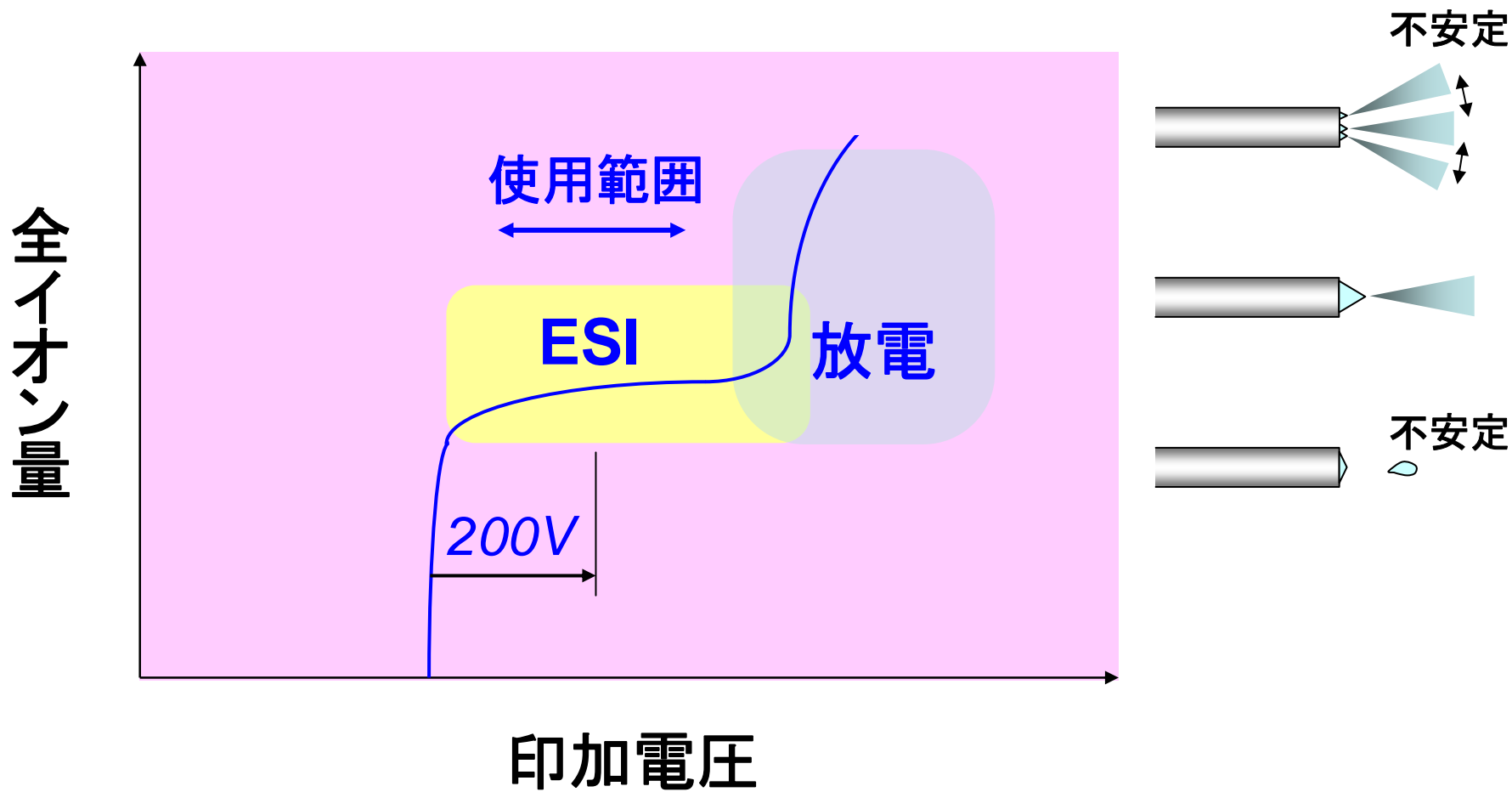


I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

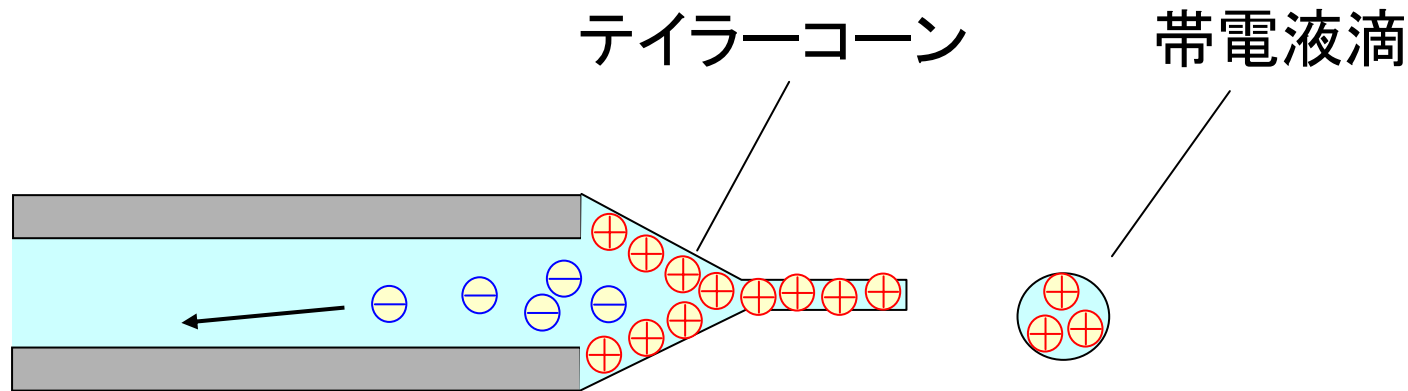


1. 高電界により液体コーンが形成。
2. 先端から帯電液滴が静電力により生成。

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)



I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)



安定なテイラーコーン ⇒ 直径の揃った帯電液滴

$$d = g(\varepsilon) \sqrt[3]{\varepsilon \varepsilon_0 Q / K} \sim 1 \text{ ミクロン}$$

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

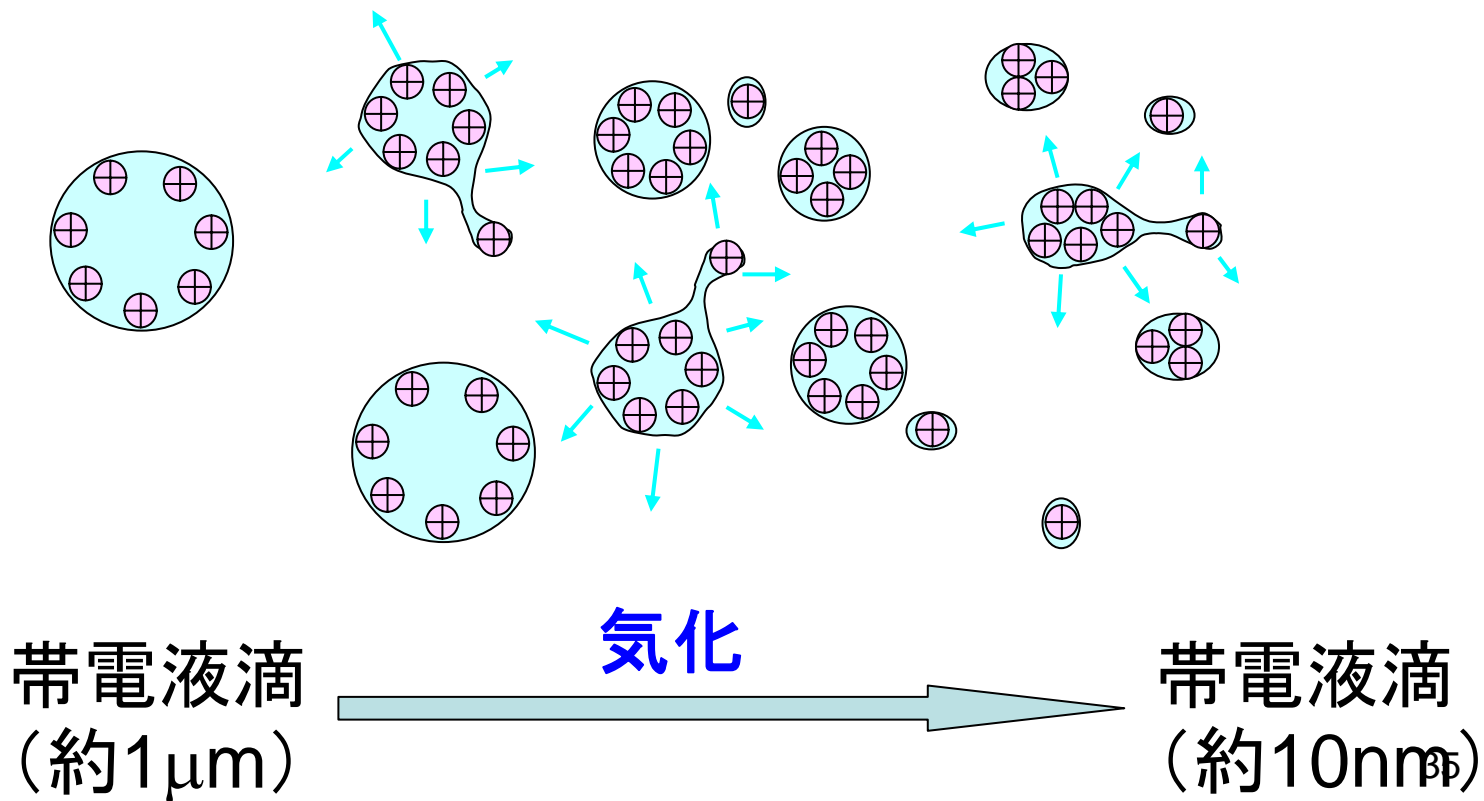
レイリー限界

溶媒の蒸発

イオン間静電反発力と
液体表面張力が同等に。

液滴は不安定化、
複数の液滴に分裂

噴霧



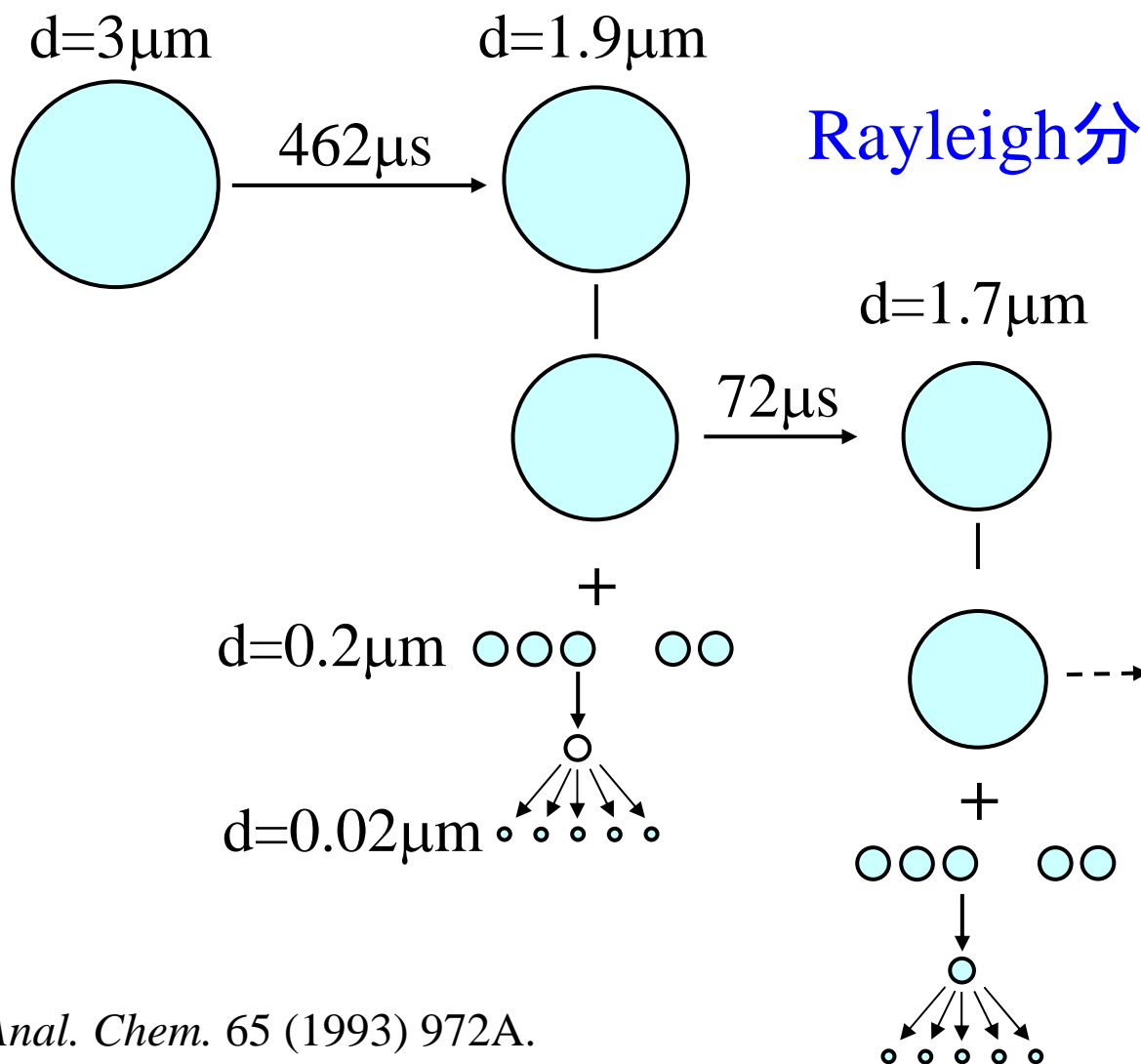
I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

Rayleighの不安定条件

クーロン反発力が液体の表面張力と同等になると、
液滴は分裂する (Rayleigh分裂)

$$\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2 N^2}{d^2} = 2\pi\gamma d$$

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

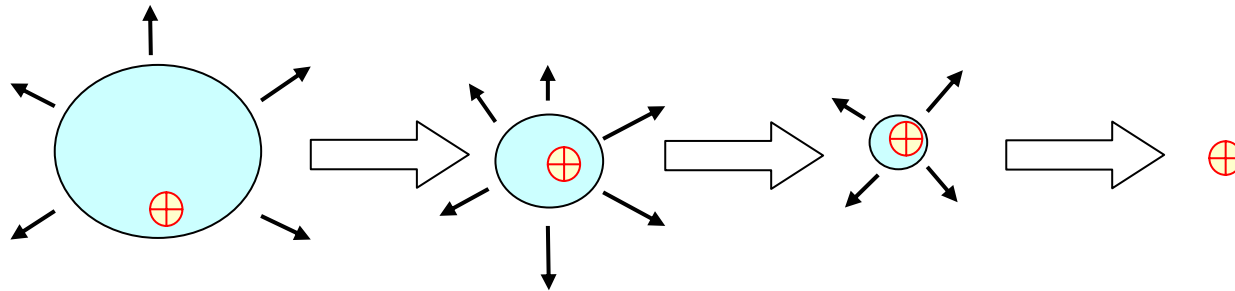


Anal. Chem. 65 (1993) 972A.

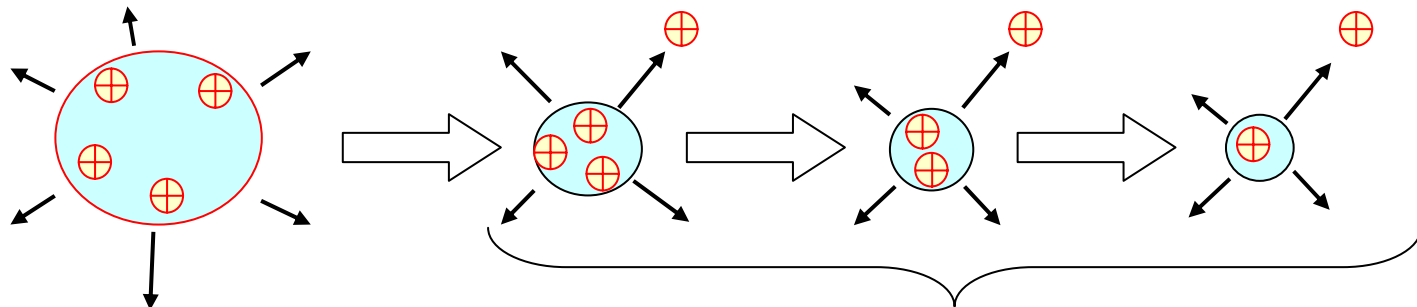
I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

帯電液滴からのイオン生成

電荷残留

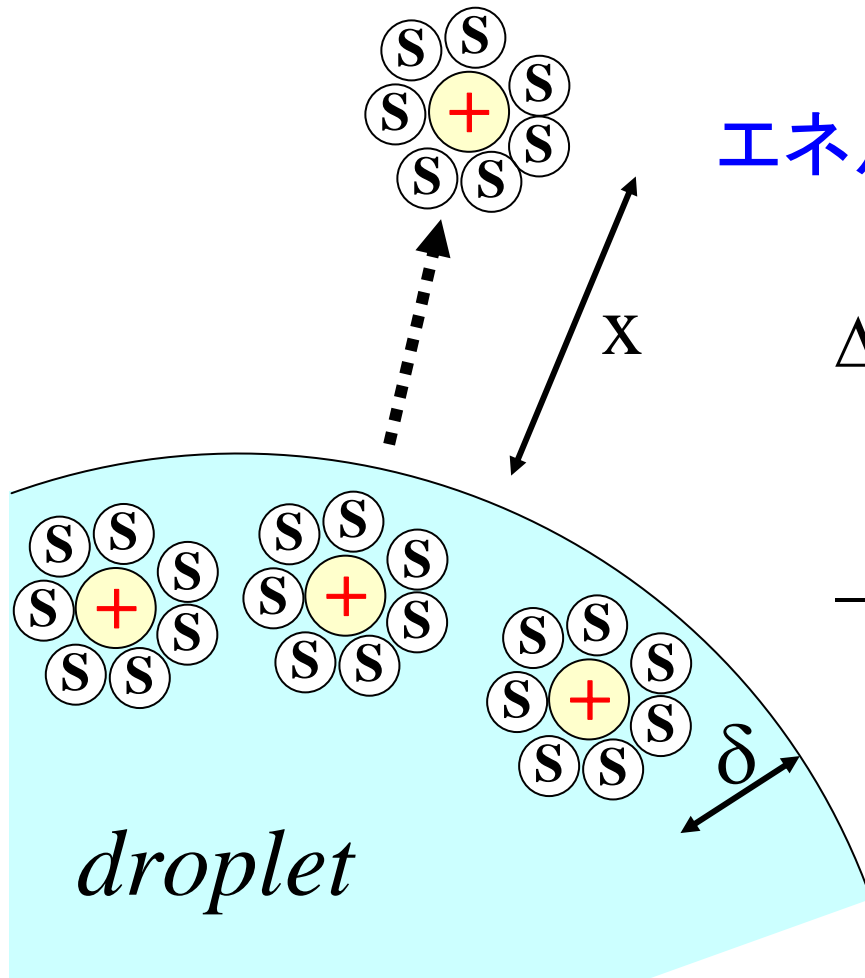


イオン蒸発



表面電界 $\sim 1\text{V/nm}$

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

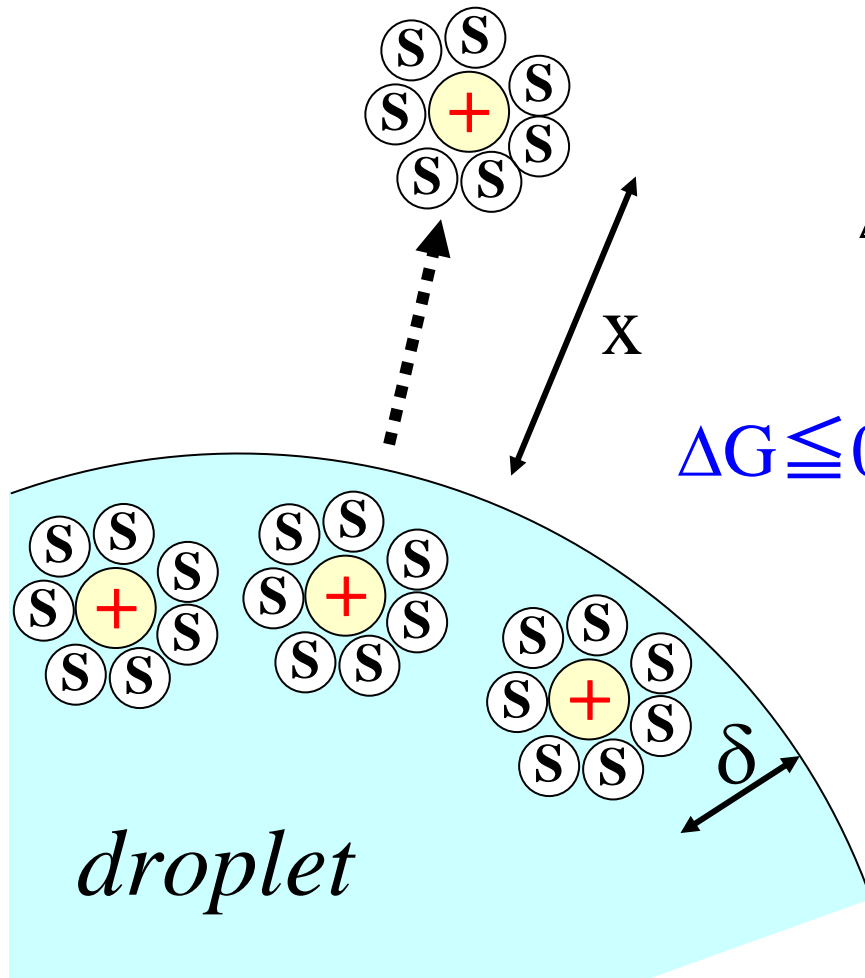


エネルギー障壁 ΔG : ΔG_x の最大値

$$\Delta G_x = \left\{ \frac{Ne^2}{2\pi\epsilon_0(d+2x)} - \frac{e^2}{16\pi\epsilon_0 x} \right\} - \left\{ \Delta G_s + \frac{Ne^2}{2\pi\epsilon_0(d-2\delta)} \right\}$$

帯電液滴から溶媒和イオン蒸発

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)



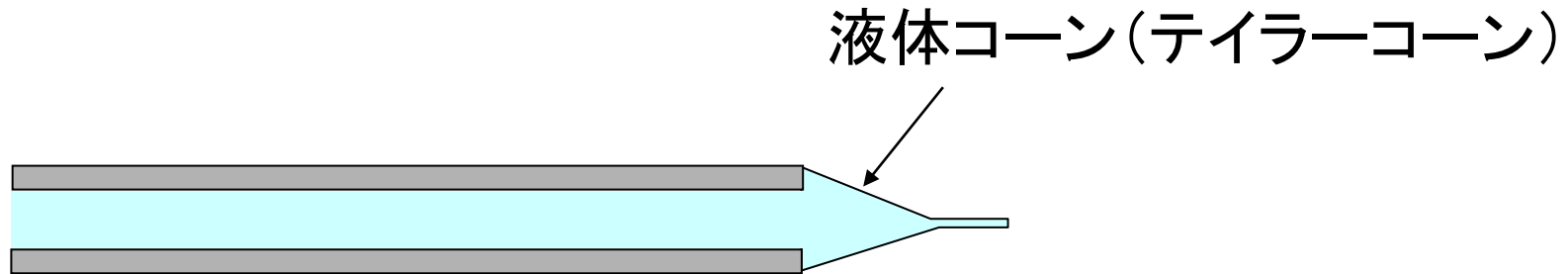
$$\Delta G = -\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\sqrt{N}-1}{2d} - \Delta G_s$$

$\Delta G \leq 0$ の場合にイオン蒸発が発生。
 $\Rightarrow N \propto d^2$ の関係が成立。

$E \sim 10^9 \text{ V/m}$ の場合に、
イオン蒸発を確認。

帯電液滴から溶媒和イオン蒸発

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

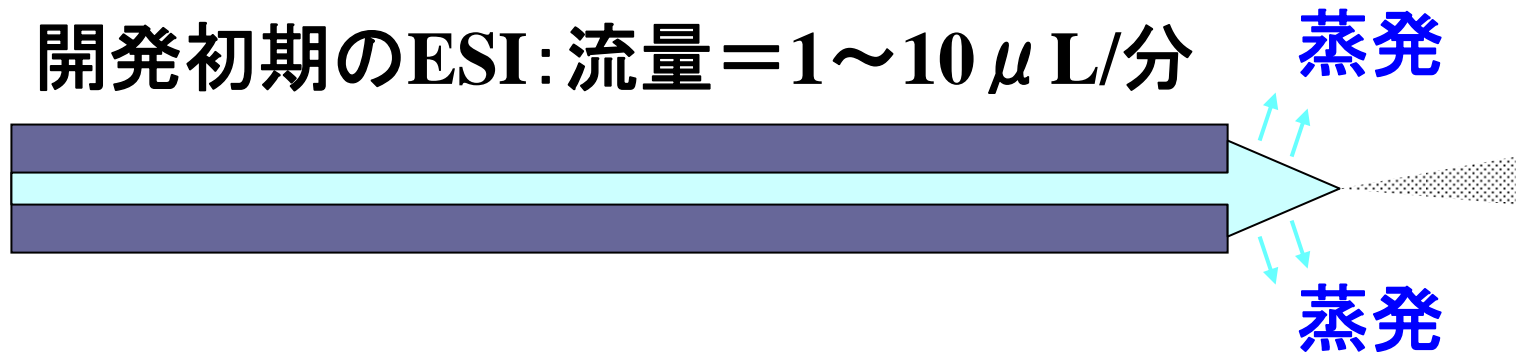


安定なテイラーコーン形成が重要。

- ・液体の**電気伝導度**、**表面張力**、**流量**により決定。
純水(低い電気伝導度、高い表面張力)の噴霧は困難。
通常、液体に酢酸や蟻酸を0.1-1%だけ添加。

I .エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

開発初期のESI: 流量 = $1 \sim 10 \mu\text{L}/\text{分}$

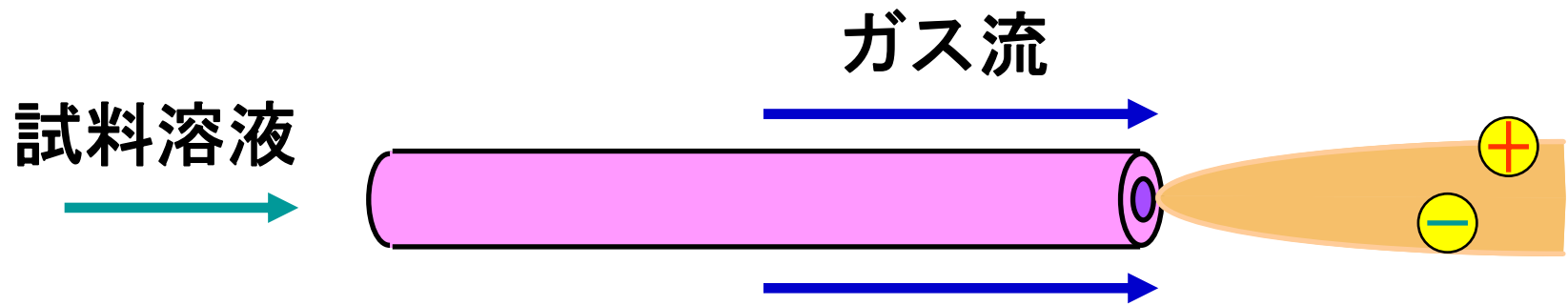


ナノESI: 流量 $\leq 1 \mu\text{L}/\text{分}$



蒸発効果抑制 → 安定な液体コーン形成

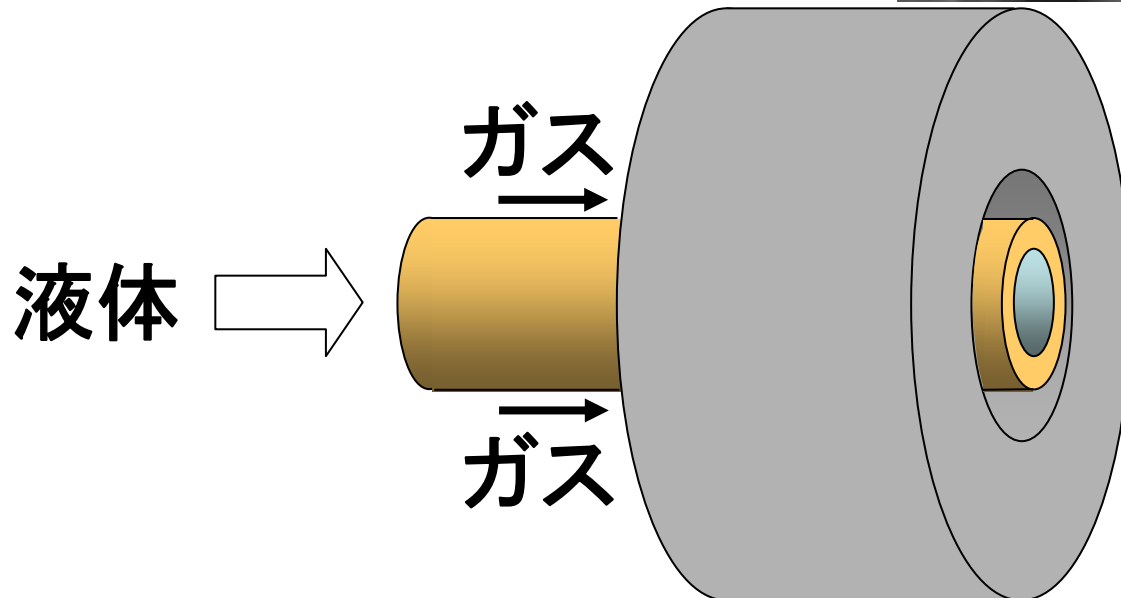
Ⅱ. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)



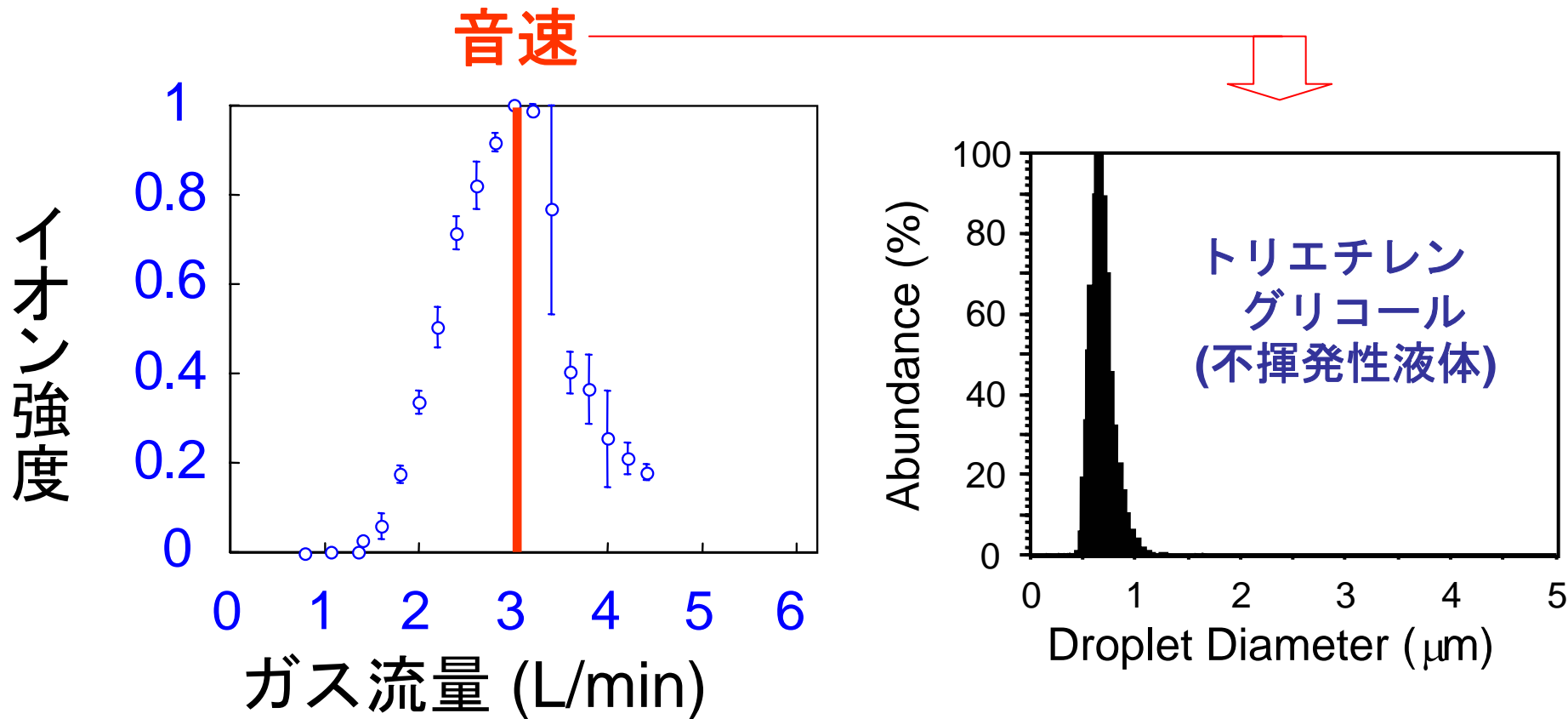
- ・高速ガス流を用いた噴霧により、イオン生成。
- ・生成イオン量はガス流速に依存し、音速時に最大。

Ⅱ. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)

10ns-flash shadowgraph



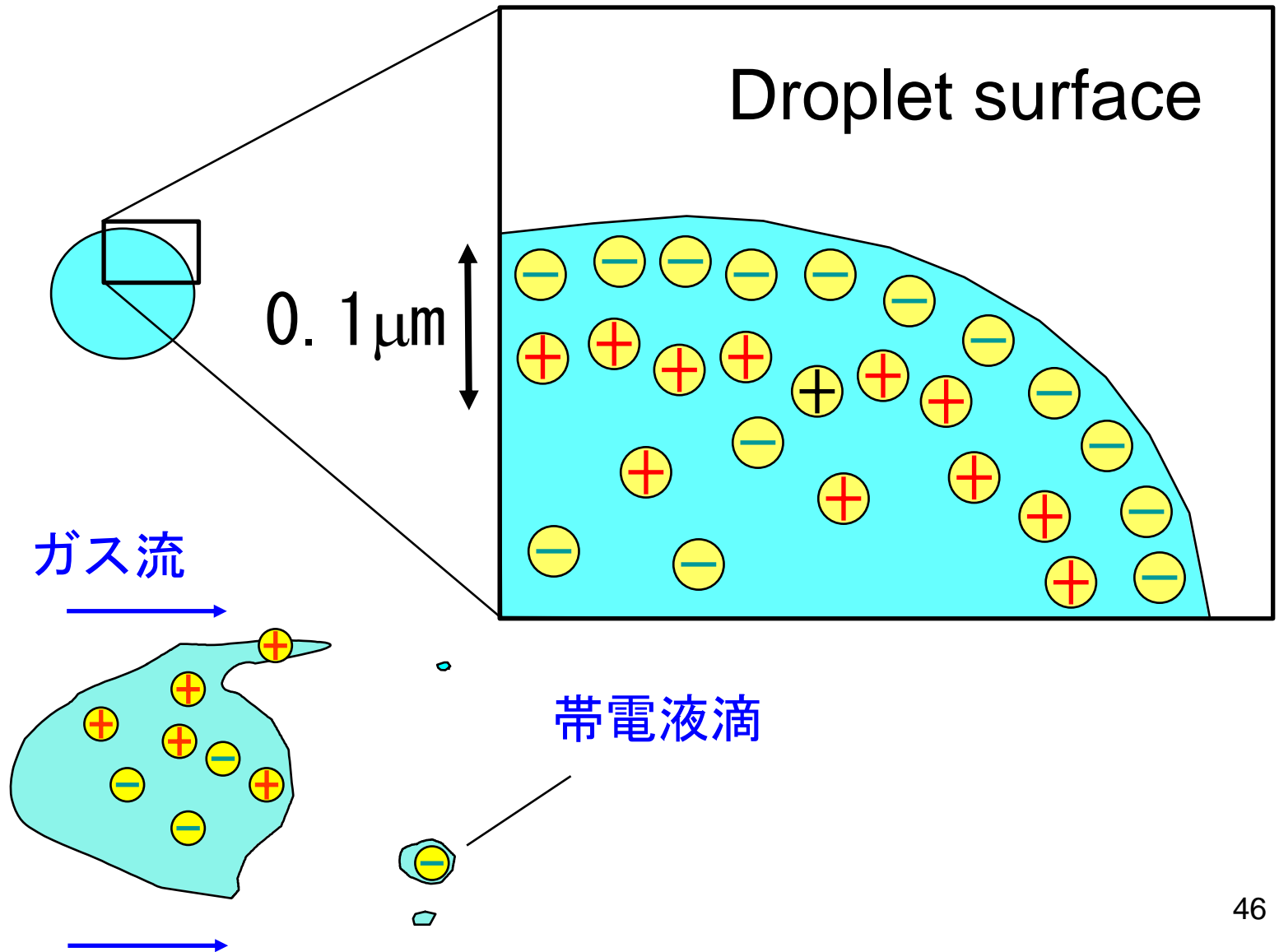
Ⅱ. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)



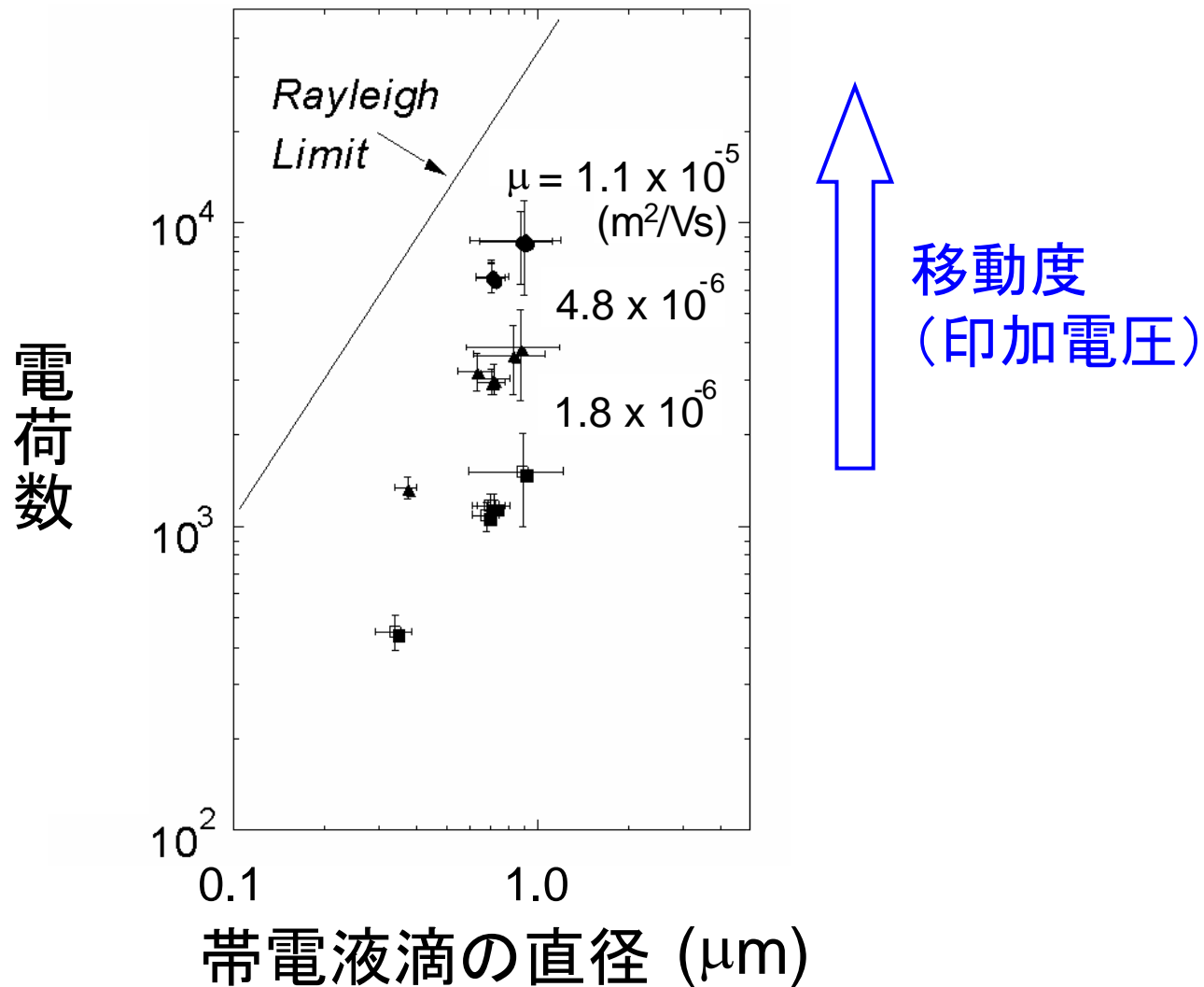
噴霧により生成される液滴のサイズは音速時に最小。

Anal. Chem. 66 (1994) 4557.

Ⅱ. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)

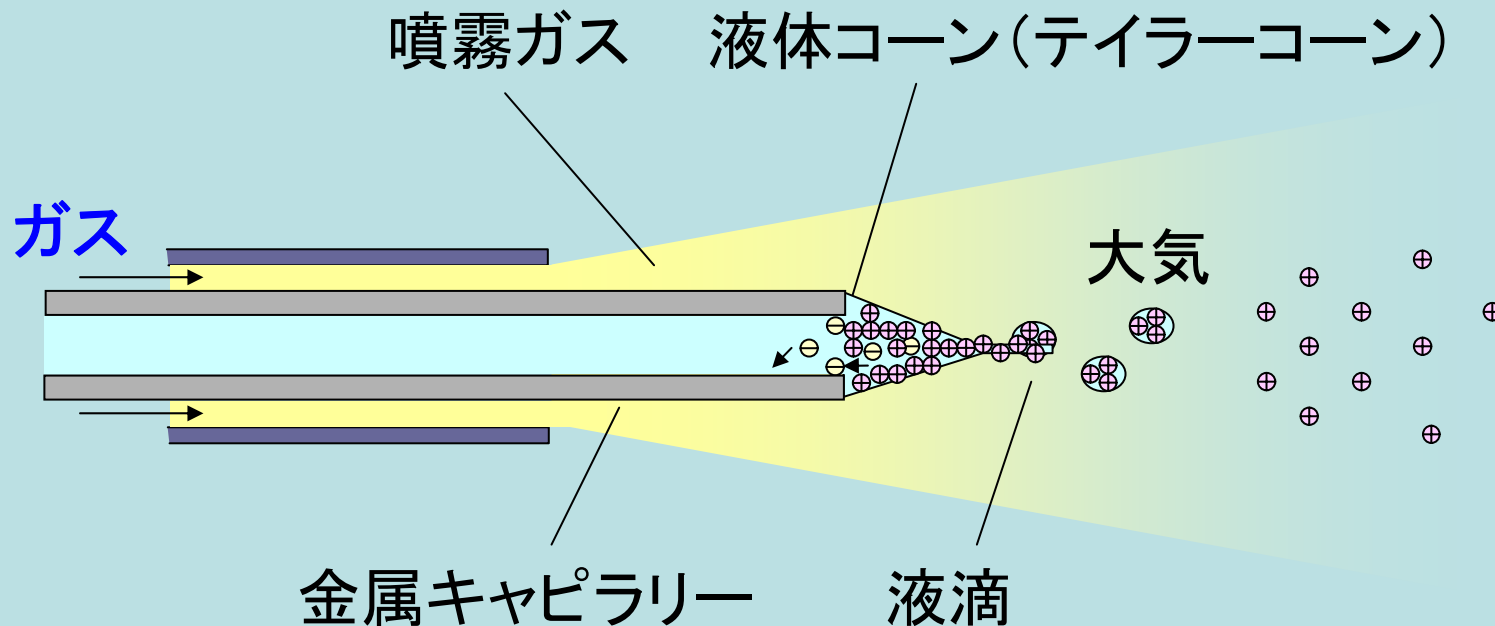


Ⅱ. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)



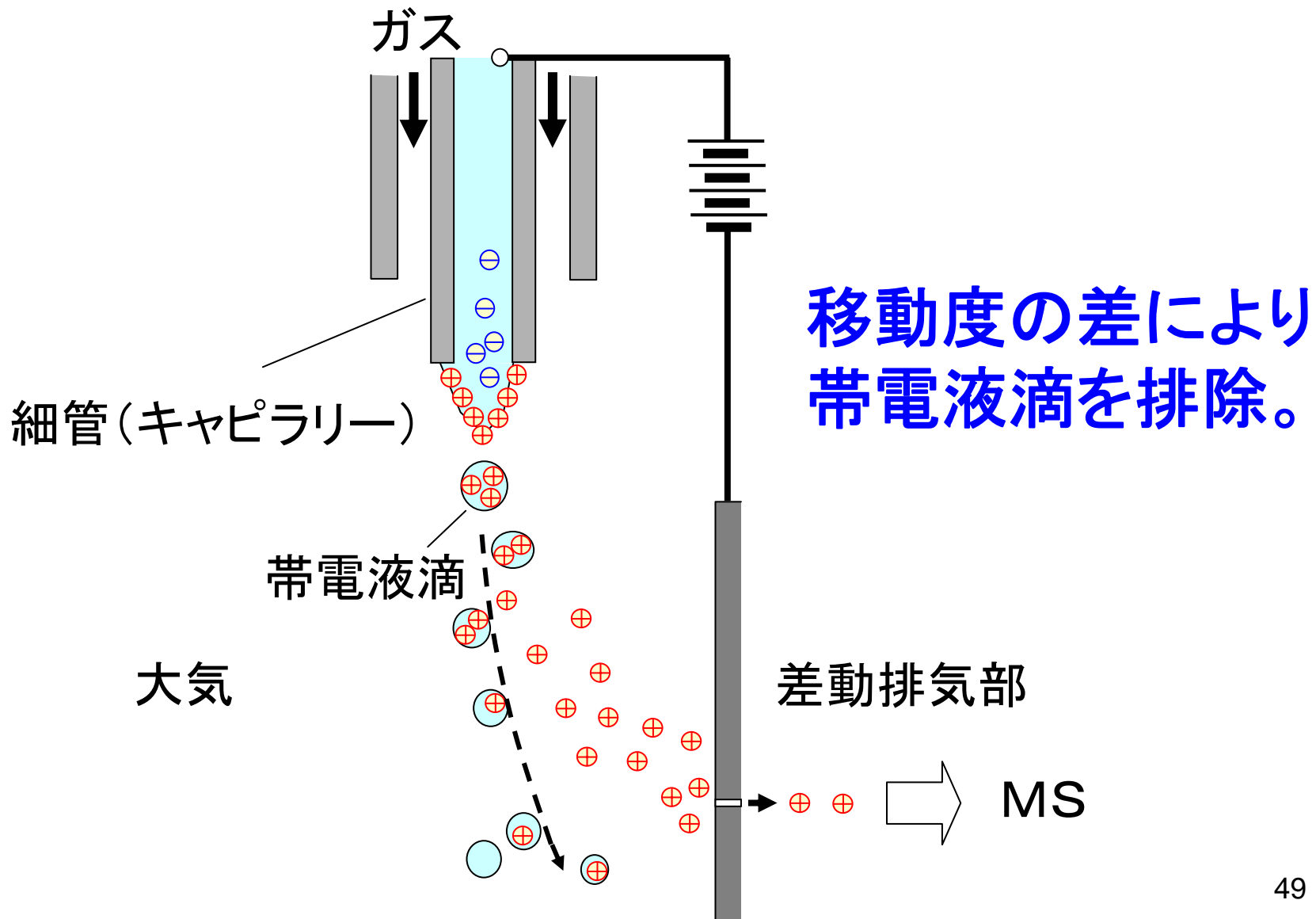
Ⅲ.ガス噴霧支援エレクトロスプレーイオン化法

ガス噴霧支援エレクトロスプレー

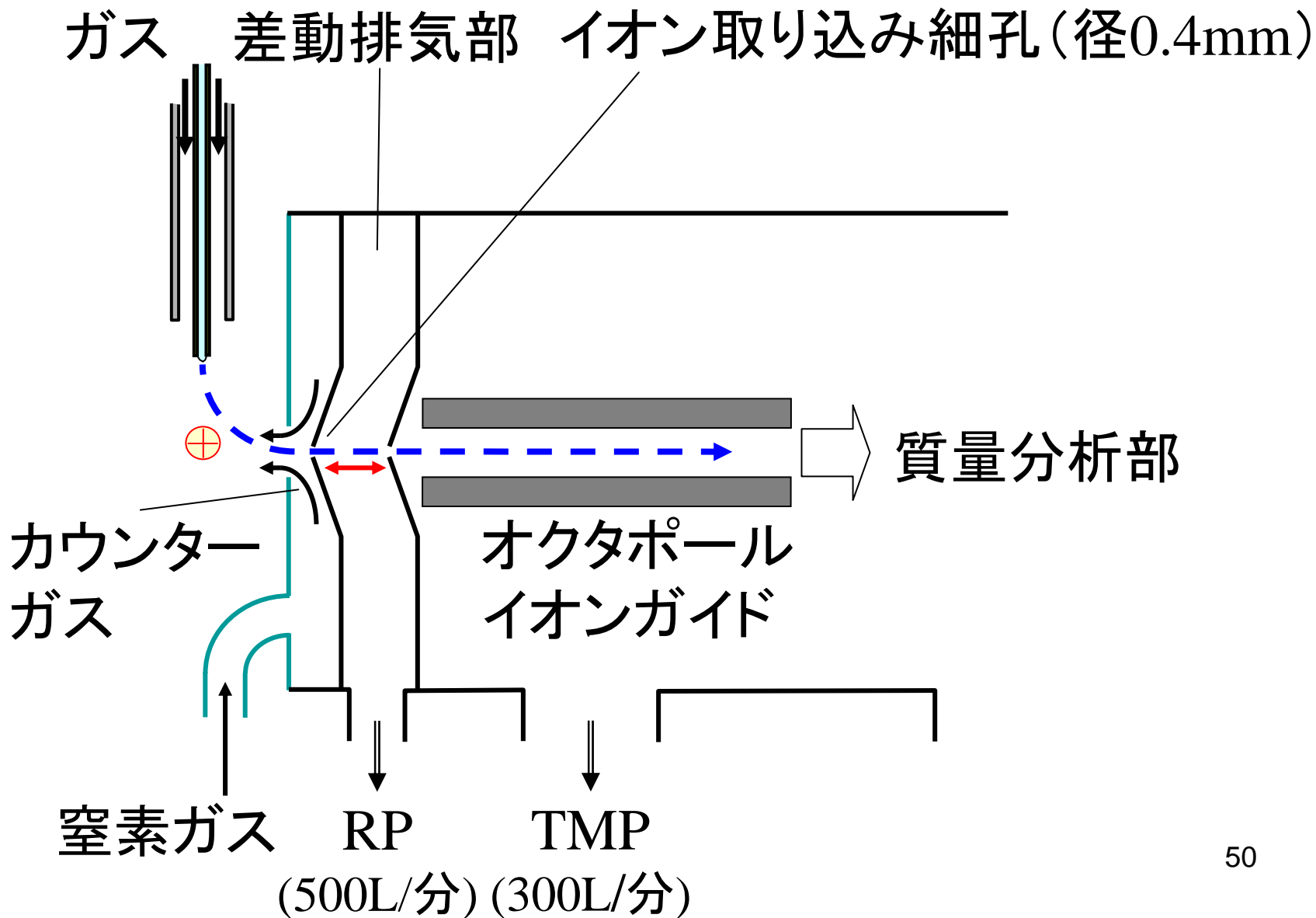


1. ガス噴霧により、帯電液滴の気化を促進。
2. 噴霧ガスには、窒素ガスを使用。
3. 液体流量: 1~1000 μ L/分

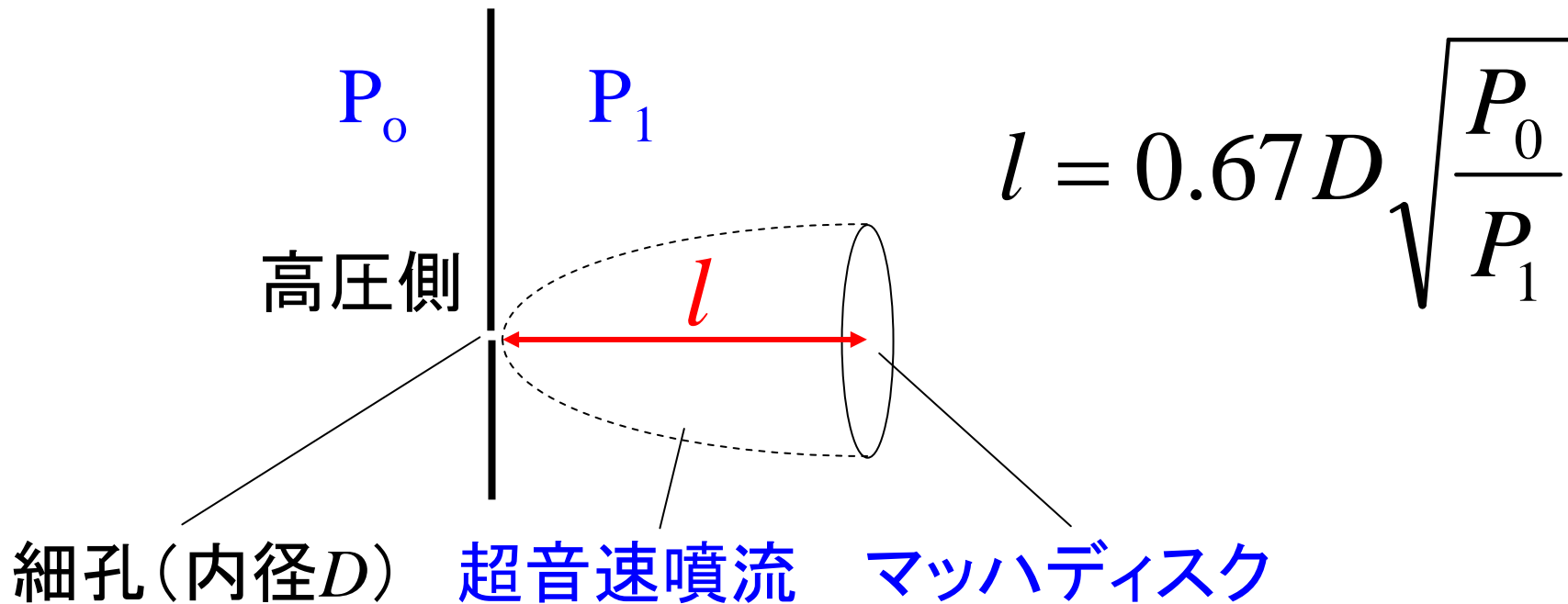
Ⅲ.ガス噴霧支援エレクトロスプレーイオン化法



Ⅲ.ガス噴霧支援エレクトロスプレーイオン化法



Ⅲ. ガス噴霧支援エレクトロスプレーイオン化法

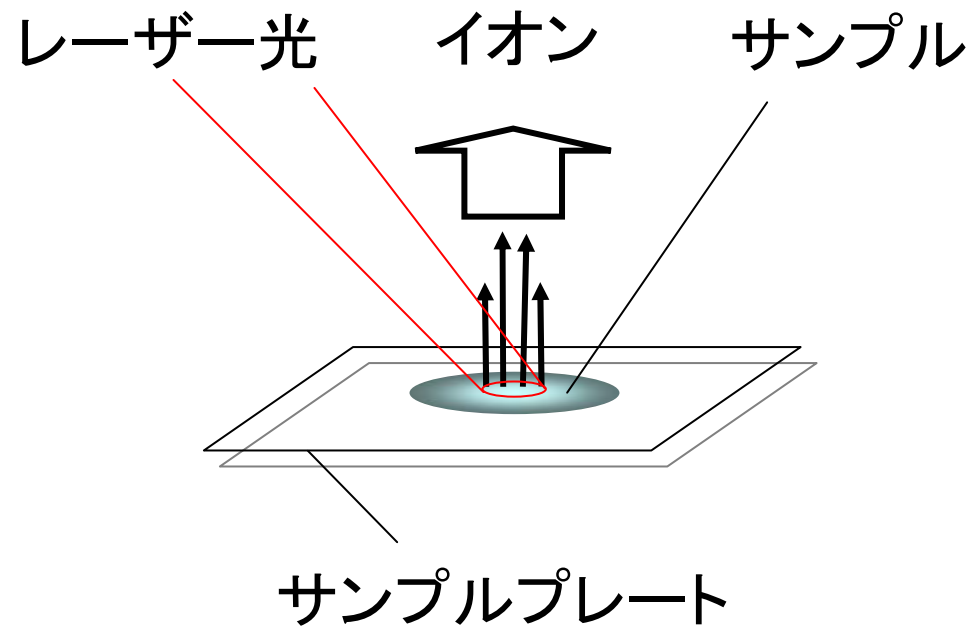


断熱膨張 ⇒ 冷却によるクラスター化

5. 固相分子の脱離イオン化

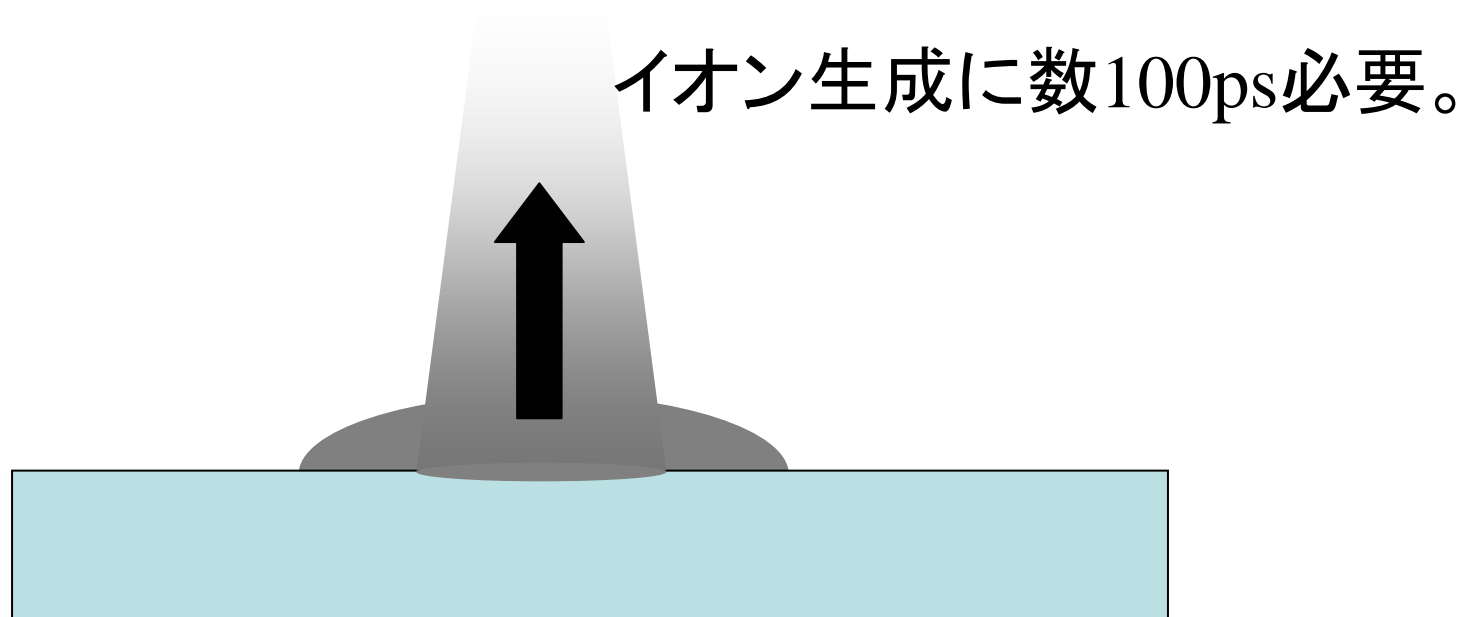
I.レーザー脱離イオン化法

パルスレーザー光照射による
固体表面のスプッター現象を利用。



I.レーザー脱離イオン化

銅板にピコ秒(35ps)のNd:YAGレーザー(λ 1.06 μ m)を照射。



表面の銅が局所的に溶解、気化。
電子(密度 $\sim 10^{26}\text{m}^{-3}$ 、数10eV)が表面から放出。
EIによりイオン化。

I .レーザー脱離イオン化

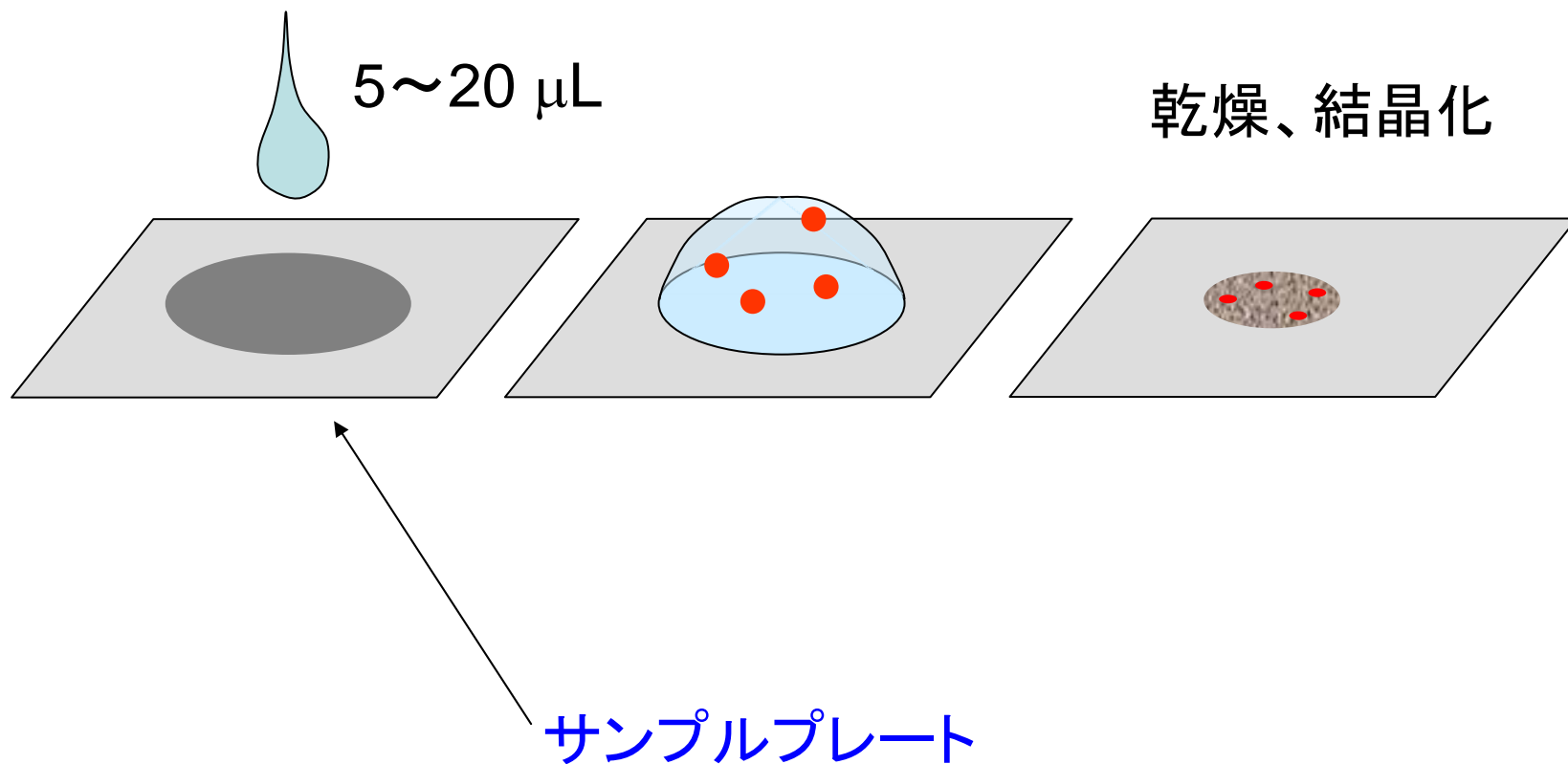
金属表面に有機物を塗布し、レーザー光を照射しても、分子量関連イオンが生成されない。
⇒ 多種類のフラグメントイオンが観測されるが、解析困難。

そこで、
試料にグリセリンなどの難揮発性物質(マトリックス)を混合。

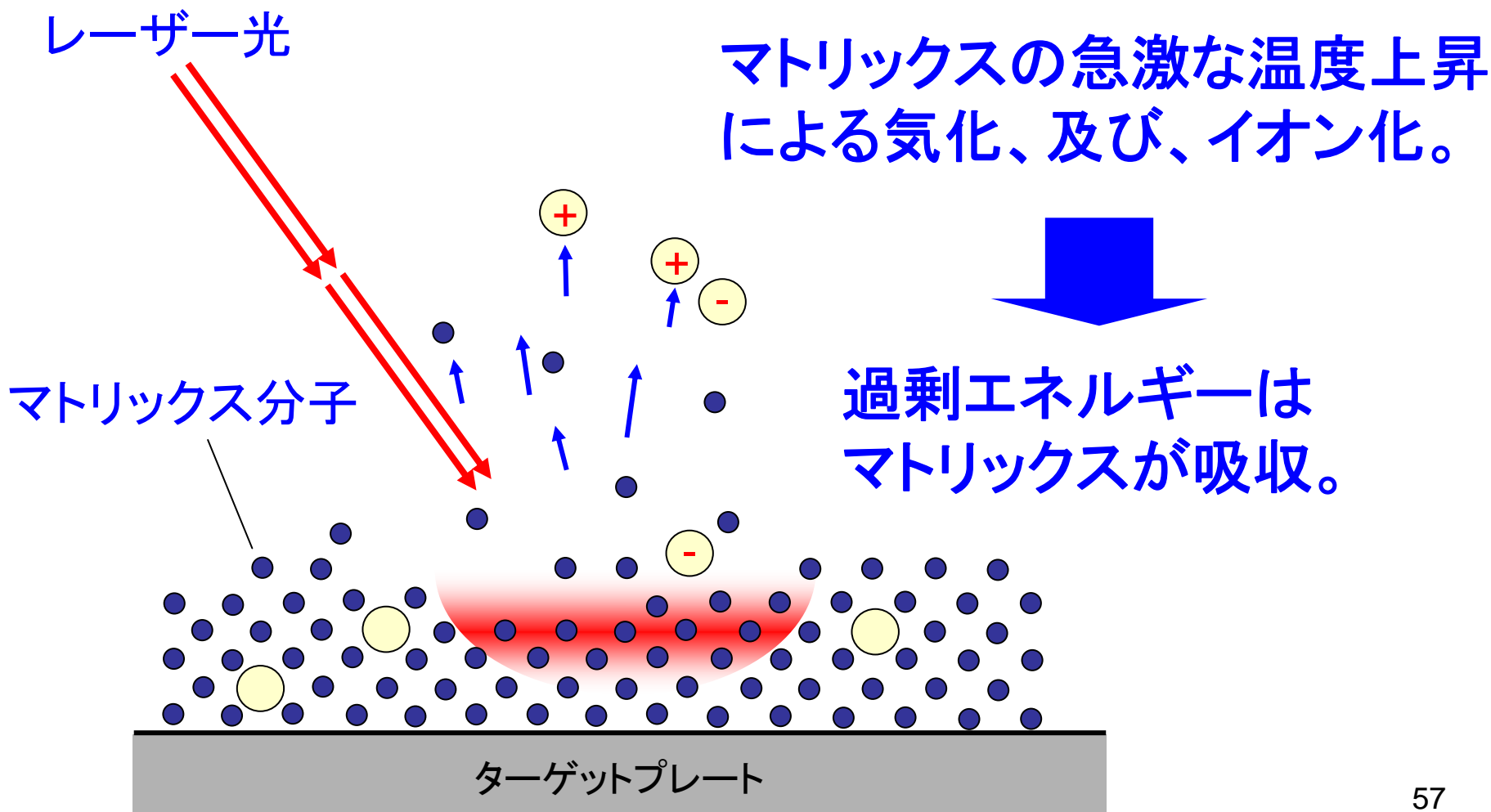
さらに、
金属微粒子をマトリックスに混入。

⇒ 分子量34,000のタンパク質の分析に成功。

Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

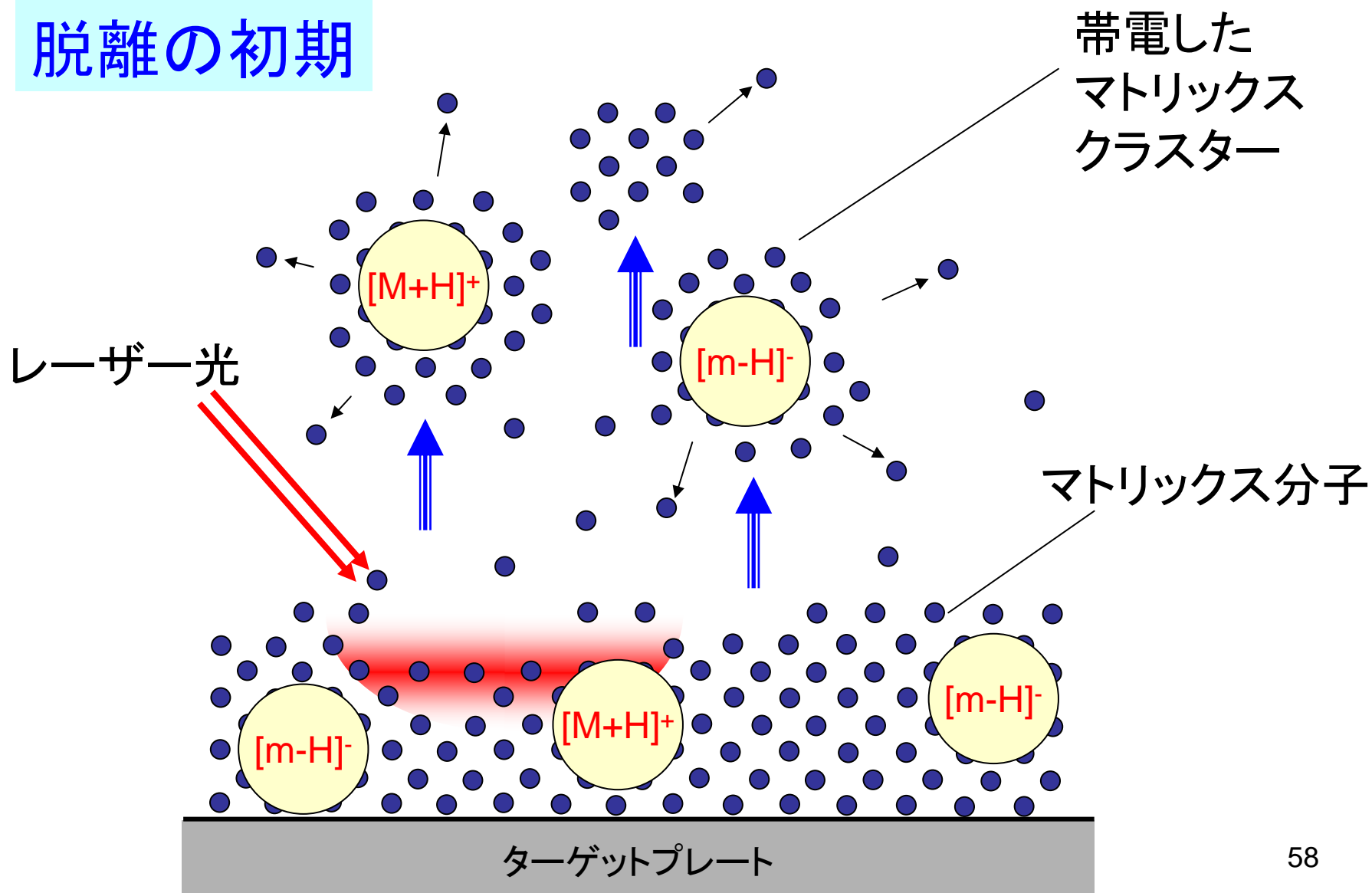


Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)



II. マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)

脱離の初期



Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

1. 脱離の初期:統計的な帯電

結晶中のイオンが、帯電クラスターに。
帯電クラスターからマトリックス分子が気化。

2. 高温、高圧プルーフでの反応

気相イオン分子反応。
(プロトン移動、電荷交換)

Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

1. レーザー(UV, IR)

2. マトリックスの選択 ⇒

- ・レーザー光波長での吸収係数が高い。
- ・試料分子が電荷を帯びる環境を提供。

3. 大過剰マトリックスに試料を混合、結晶化

3. レーザー光強度
(数10~100J/m²)

代表的なマトリックス

マトリックス	主な対象物質
DHBA (2, 5-dihydroxybenzoic acid)	合成高分子、 低分子有機化合物、 糖類
HABA (2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid)	合成高分子、 低分子有機化合物
SA (Sinapinic acid)	タンパク質、 ペプチド
CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)	ペプチド

Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

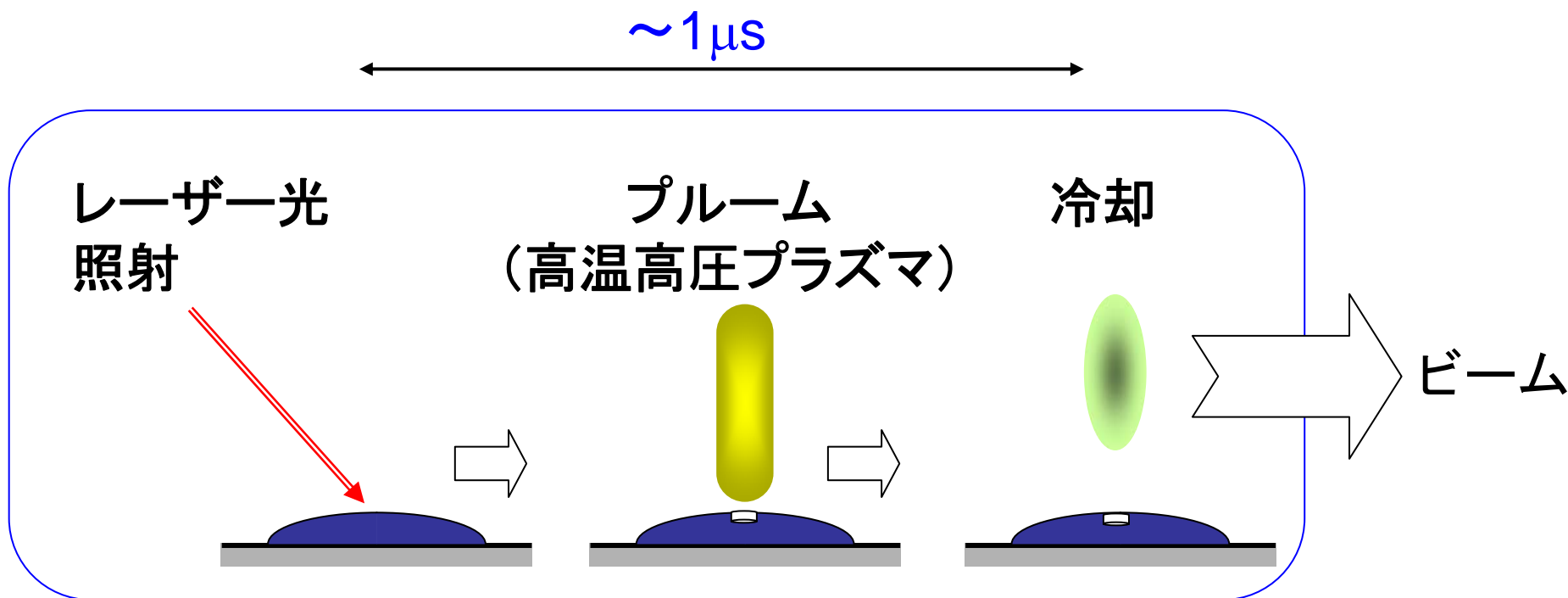
飛行時間型質量分析計(TOFMS)との結合では、

「イオンがエネルギー的、空間的に収束される」

ことが、感度や分解能に重要。

ところが、レーザー光照射直後は、
イオンのエネルギー幅が広い。 ⇒ 待つ。

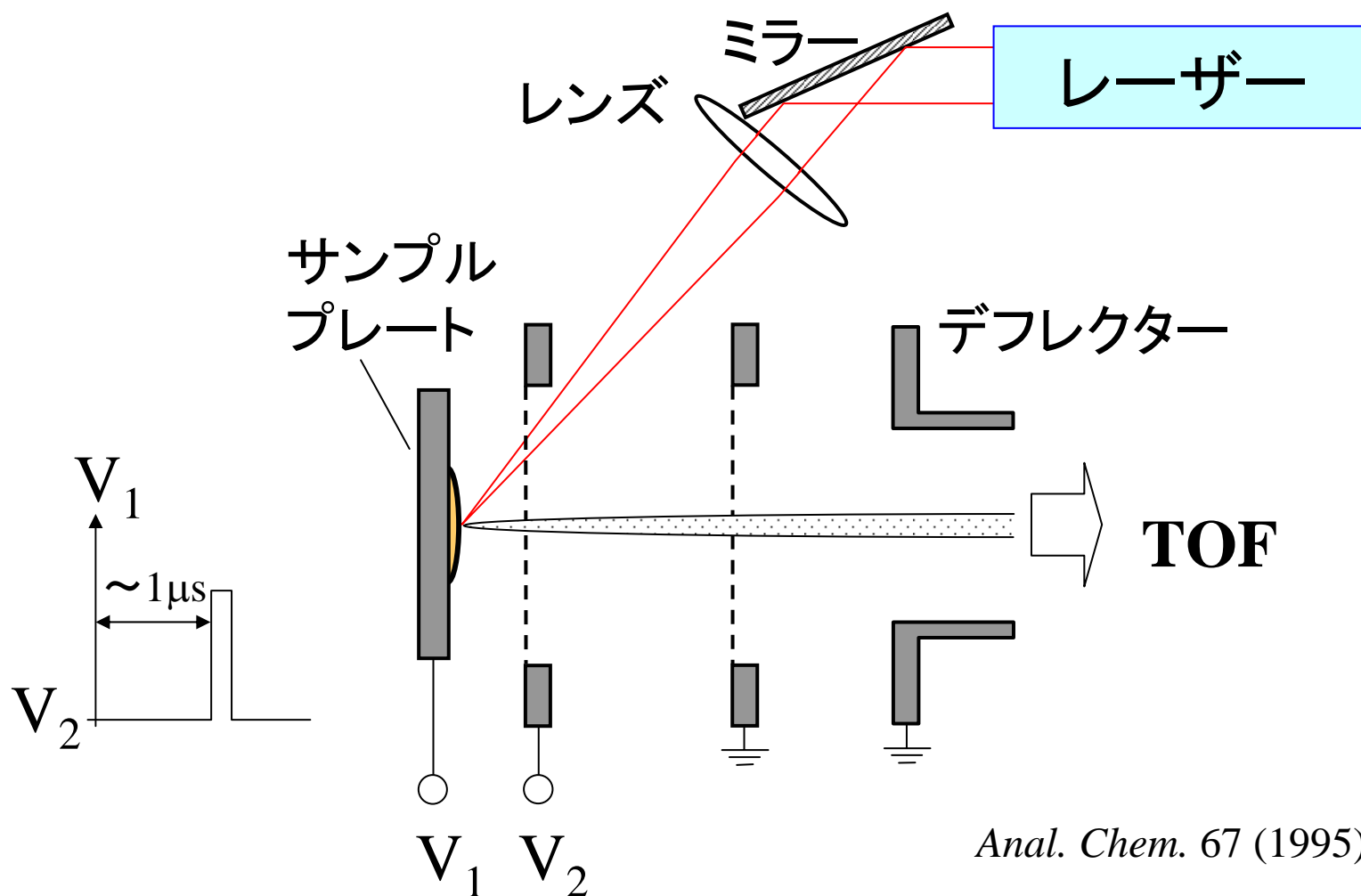
Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)



レーザー光照射から1 μ s程度遅らせ、
イオンビームを発生させる。
⇒ **Delayed Extraction**

Ⅱ.マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

Delayed Extraction法: レーザー光照射後、 $1\mu\text{s}$ 程待つ。



まとめ

□気相分子のイオン化法

EI: 電子との衝突によるイオン化。

CI, APCI: 反応イオンの生成と気相イオン分子反応。

□液相分子の噴霧イオン化法

ESI: 安定な液体コーンからの帯電液滴の静電的な放出。

SSI: 音速ガス流の剪断力による帯電液滴の生成。

噴霧ガス支援ESI: 静電力と剪断力による帯電液滴の生成。

□固相分子の脱離イオン化法

LD: レーザー光照射によるスパッター(溶解、気化、EI)。

MALDI: マトリックス中イオンによる統計的帯電とCI。