

分子のイオン化法

1. はじめに

分子のイオン化技術は、質量分析分野を中心として発達してきた。質量分析法が初めて使用されたのは、気体ネオン等の同位体分離が目的であり、今から80年以上前のことである[1]。当時のイオン源には、気体放電や後述の電子イオン化法 (Electron Ionization: EI) が採用された。

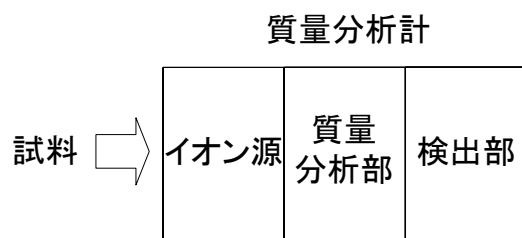


Fig. 1 質量分析計の構成。

質量分析計は、イオン源と質量分析部、検出部から構成される。そして、イオン源では、試料分子から気体状のイオンが生成される。生成された気体状のイオンは質量分析部に導入される。次に、質量分析部では、気体状イオンが、その m/z に応じて電場や磁場により分離される。現在、質量分析部で利用されている質量分析方式としては、四重極質量分析型、四重極イオントラップ質量分析型、飛行時間型質量分析型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析型、磁場型質量分析型などが挙げられる。そして、質量分離された気体状イオンは、検出部において電子増倍管あるいはマルチチャンネルプレート等の検出器により検出され、電気信号に変換され、情報処理される。そのため、質量分析計による分析を行うためには、イオン源において試料分子から気体状のイオンを生成させることが必要条件となる。

分子のイオン化において重要なことは、分子イオンやプロトン化分子などの分子量関連イオン

を効率よく生成させることである。イオン化過程において、分子が複雑に解離すると、解離イオン (フラグメントイオン) を解析することが困難となる。一方、分子量関連イオンの生成に成功すれば、分子量が推定できる。そのうえ、分子構造情報の取得が必要な場合には、真空装置内で分子量関連イオンを前駆体イオンとして分子との衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation: CID) などによりフラグメントイオンを発生させ、その質量スペクトルを解析すればよい。このような分析をタンデム質量分析あるいは MS/MS 分析と呼び、得られる質量スペクトルを MS/MS スペクトルと呼ぶ。CID における衝突エネルギーを最適化することにより、物質を特定する分子構造情報を得易い MS/MS スペクトルを取得することが出来る。

さて、先に述べた放電や EI では、気体状態の原子や分子のイオン化しかできないうえ、多原子分子のイオン化においてはフラグメントイオンの発生を無視できない。また、揮発性の低い有機物質などのイオン化は困難である。そもそも、このような物質の気体分子を生成するために、分子を直接的に加熱して気化させようとしても、熱分解などの問題が発生する。一方では、質量分析計は多原子分子の高感度分析が原理的に可能である。そのため、低揮発性分子の分析に向けて、様々なイオン化法が継続的に開発・改良された[2]。その結果、質量分析計の高感度化と相まって質量分析法は、石油化学関連の高分子材料、半導体、医薬品、生体分子など、時代の産業構造に応じた発展を遂げることができた。

現在、様々な種類のイオン化法が利用されている。本稿では、先ず、質量分析法の使用例について、簡単に触れたい。それから、気相、液相、固相分子に対する代表的なイオン化法について述べる。特に、液相や固相分子のイオン化においては、気体状中性分子を経ずに、直接イオン化する手法を紹介する。すなわち、液体の噴霧現象を利用するスプレーイオン化法や、固体表面のスパッター現象を利用する脱離イオン化法である。いづれも、従来から知られるイオン化現象を巧みに利用している。

2. 質量分析法の応用

混合試料の質量分析には、試料をそのままイオン源に導入して分析することも可能だが、分離手段を併用するオンライン分析が一般的である。すなわち、ガスクロマトグラフ (Gas Chromatograph: GC) や液体クロマトグラフ (Liquid Chromatograph: LC) などの分離手段を質量分析計に直接結合させた GC/MS (ガスクロマトグラフ/質量分析装置) や LC/MS (液体クロマトグラフ/質量分析装置) などが使用される。GCあるいはLCで分離された試料は順次質量分析計のイオン源 (あるいはインターフェース) に導入され、質量分析計の出力において分離ピークとして検出される。これらの分離手段を結合した装置は、高感度分析や定量分析に有利である。以下では、簡単に応用例について触れたい。

2.1. 農薬の多成分一斉分析

LC/MS の応用例として、農薬混合サンプルの分析例を Fig. 2 に示す。プロトン付加した農薬分子が検出されるが、この図では検出イオンの m/z に対するイオン強度の時間変化 (マスクロマトグラム) を各々のイオンに対して示している。図に示すように、分離成分は異なる時間 (保持時間) に分離ピークとして質量分析装置で検出されている。予め標準試料を用いて、検出イオン (前駆体イオン) に対するタンデム質量分析を行っておくと、実サンプルの分析において検出イオン (前駆体イオン) に対するタンデム質量分析を行い、前駆体イオン、及び、フラグメントイオンの m/z を照合することにより、元の成分を同定 (特定) することができる。また、未知成分が検出された場合にも、タンデム質量分析により元の分子を推定することができる。

一方、定量分析によりサンプル量や濃度を求める場合には、予め特定の濃度の標準試料を分析し、対応するマスクロマトグラムのピーク面積から、Fig. 3 のような検量線を作成する。次に、濃度が未知である実試料を分析し、対応するピーク面積から検量線を利用することにより、濃度を決定することができる。

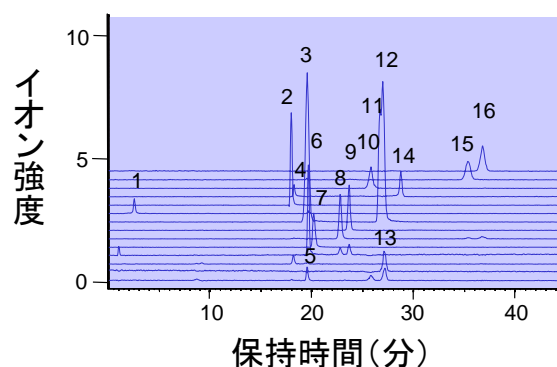


Fig. 2 農薬の LC/MS による一斉分析例。各農薬のプロトン化分子に対するイオン強度の時間変化 (マスクロマトグラム) を重ねて示す。番号が付けられたピークがプロトン化農薬分子 [3]。

このような農薬の多成分一斉分析は、水道水や食品中の残留農薬に対して実施されている。分析対象となる農薬の種類が増加しても、このことが分析コストに反映され難い点が特徴的である。

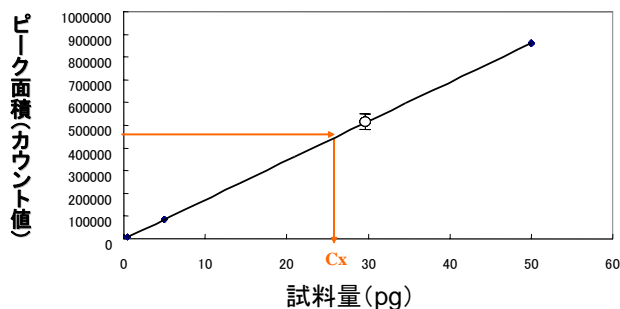


Fig. 3 マスクロマトグラム面積と試料量との関係を示す検量線。

創薬における薬物動態分野においても、LC/MS 分析が精力的に用いられている。この分野では、医薬品 (候補) が投与された実験動物やヒトにおける血液や尿を採取し、投与された医薬品 (候補) や代謝産物の濃度を、高感度で精度よく測定する

ことが要求される。試料の前処理にも依存するが、 $\mu\text{g/L}$ 程度の濃度において定量分析を行うことができる。

2.2. プロテオーム解析

遺伝子情報に基づき発現するタンパク質には、疾患に関連するものがある。そこで、これらタンパク質の機能を解明したり、その機能に基づいた医薬品を開発するため、タンパク質に関する研究が盛んに行われている。体内において発現するタンパク質の種類は（生物種により）数千から数十万と非常に多いが、一度に多種類のタンパク質を解析する試みがプロテオーム解析である。このプロテオーム解析において、高感度・高スループット分析に適した質量分析法が主要な分析手段として利用されている[4]。

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合により一次的に結合した高分子であり、分子量が5千から数十万程度もある。（より分子量の低いものはペプチドと呼ばれる。）このような巨大分子のイオンを直接的に質量分析することは、質量分析計の分解能や質量範囲により限界がある。そこで、一旦タンパク質を酵素で消化し、分子量が数千以下のペプチドに断片化し、それらをLC/MSを用いてタンデム質量分析するショットガン解析が盛んに行われている。

Fig. 4に、プロトンが2つ付加したペプチド分子に対し、衝突誘起解離（CID）により得られるフラグメントイオンの質量スペクトル（MS/MS スペクトル）を示す。プロトン付加ペプチド分子のCIDによる主要な解離部位は、アミノ酸間のペプチド結合部位である。そのため、アミノ酸が一つづつ外れた一連のフラグメントイオンが Fig. 4において観測されている。ショットガン解析では、この特徴的な解離パターンを利用する。

現在、様々な生物に対する遺伝子情報がデータベース化され、利用可能な状況にある。そして、これらの遺伝子の塩基配列情報を利用すると、3塩基で1アミノ酸をコードする関係にあるので、遺伝子情報の産物であるタンパク質のアミノ酸配列情報を得ることができる。そこで、MS/MS ス

ペクトルにおけるフラグメントイオンや前駆体イオンの m/z 情報に対し、データベース情報に基づくアミノ酸配列情報を照合することにより、元のタンパク質、及び、ペプチド（LVNELTEFAK）を同定（特定）することができる。

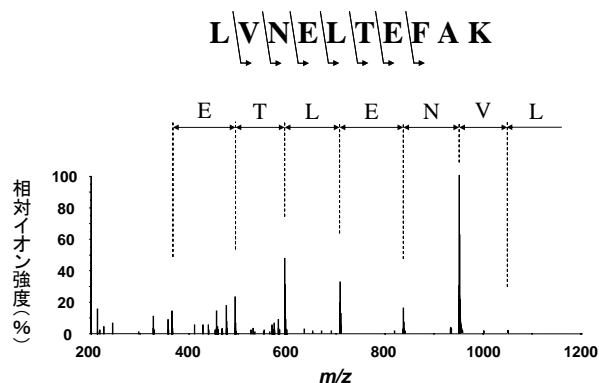


Fig. 4 二価のプロトン付加ペプチド分子 ($m/z=582.35$) に対する MS/MS スペクトル。アルファベットは解読されるアミノ酸を示す。MS/MS 分析の前駆体には、一価イオンよりも多価イオンを選択する方が、得られる MS/MS スペクトル情報は豊かになる傾向がある。

実際には、体内に発現するタンパク質の種類は非常に多く、これらのタンパク質混合物の酵素消化産物（ペプチド混合物）では種類が更に一桁以上増加する。このような複雑なサンプルを直接 LC/MS 分析するには限界がある。そのため、前処理においてある程度サンプルを単純化した後、微量サンプルの分離に有利なナノ LC（流量 $\sim 100\text{nL/分}$ ）と高スループット分析が可能な質量分析装置を結合させたナノ LC/MS により分析される。（LC における液体流量が 1mL/分 程度のは汎用 LC、 0.2mL/分 程度のはセミマイクロ LC と呼ばれ、区別されている。）また、オフライン分析として、ナノ LC で分離された成分をサンプルプレートに塗布し、MALDI-TOFMS（マトリックス支援レーザー

一脱離イオン化—飛行時間型質量分析計) を用いた分析も盛んに行われている。

3. 気相分子のイオン化

本節では、気相分子の代表的なイオン化法として、電子イオン化法 (EI) と化学イオン化法、及び、大気圧化学イオン化法を紹介する。電子イオン化法 (EI) と化学イオン化法は、GC/MS のインターフェースに用いられている。

3.1. 電子イオン化法 (EI)

電子を気体分子に衝突させると、電子エネルギーに応じて、分子の回転状態や振動状態、電子状態が励起される。そして、大抵の分子のイオン化エネルギーは 10eV 程度なので、それ以上のエネルギーの電子を衝突させると、大抵の分子はイオン化が可能である。しかし、イオン化効率が電子のエネルギーに依存し、70eV 程度の時に最大となる場合が多い。そのため、電子エネルギーは 70eV 程度に設定されることが多い。

電子イオン化法では、真空中で一定のエネルギーを有する電子ビームを発生させ、そこに試料である気体分子が導入される。分子に電子が衝突することにより、電子を1個失った正イオン (M^+) が生成される。この電子イオン化法の特徴は、電子のエネルギーが分子のイオン化エネルギーより十分に高いので、イオン解離によるフラグメントイオンも生成される点である。このフラグメントイオンの質量やイオン強度を調べることで、試料分子を同定 (識別) したり、分子の構造を調べたりすることができる。

Fig. 5 に、代表的なイオン源の断面図を示す。圧力が 1×10^{-4} Pa 程度の真空中に設置されるイオン源では、導入される試料ガスに、電子ビームが照射される。イオン源内部は半密閉構造であり、導入される試料ガス圧力は 10^{-2} Pa 程度に設定される。そして、電子ビームの発生には、タングステンやレニウム線フィラメントを用いられる。フィラメントに電流を流して 2000K 以上に加熱し、イオン源本体に対して電圧を印加することにより、1mA 程度の熱電子をフィラメント表面から得るこ

とが出来る。この電子に対して、数十mTの磁場をビームが発生する方向に印加することにより、密度の高い電子ビームを形成することができる。そして、電子ビーム照射により生成されるイオンは、リペラー電極に印加された電圧により、イオン源のイオン放出穴 (スリット) から外部に放出され、静電レンズによりイオンビームが形成される。電子ビームは、イオン源のイオン放出穴 (またはスリット) から 1mm 程度の距離に照射されることにより、生成イオンが効率よく質量分析部に向けて排出される。

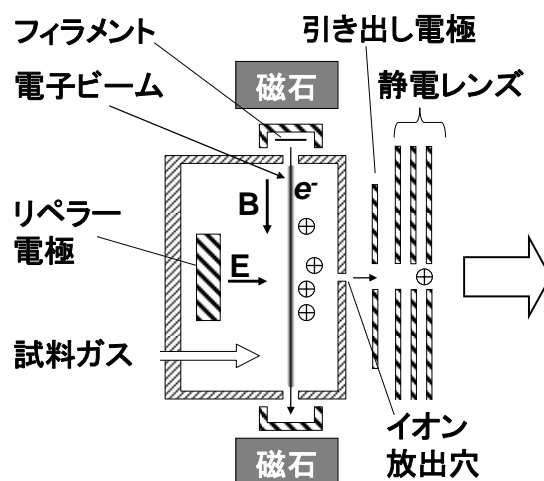


Fig. 5 EI イオン源の断面図。

3.2. 化学イオン化法(CI)と反応イオン

化学イオン化法 (Chemical Ionization: CI) では、試料分子と反応イオンとの衝突による気相イオン分子反応により、試料分子のイオン化が行われる [5]。イオン化が反応イオンとの衝突によるため、ガス圧力が高いほど衝突頻度が高くなり、イオン化効率も高くなる。

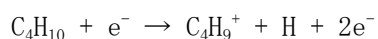
気相イオン分子反応では、発熱を伴う。しかし、過剰なエネルギーは周囲の分子との衝突で速やかに緩和されるため、フラグメントイオンの生成

は抑制される。そのため、比較的分子量の大きな有機物質の分子量関連イオン生成が可能である。

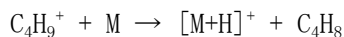
さて、化学イオン化法 (CI) では、予め反応イオンの生成が必要である。実際には、CI イオン源は EI とイオン源が共通化され、反応イオン生成に EI が用いられることが多い。イオン源のガス圧力が EI の場合に比較して二桁程度高い条件でも、電子ビームを安定に発生させることができるためである。より高圧での化学イオン化は大気圧下で行なわれるが、反応イオンの生成においては電子イオン化法を使用することができない。(後述)

GCのキャリアーガスとして、イソブタンがしばしば用いられている。そこで、イソブタンを反応イオン化する場合の例を下に示す。反応イオンとして生成された $C_4H_9^+$ が、様々な試料分子 M と衝突し、気相イオン分子反応により、試料分子の分子量関連イオン ($[M+H]^+$ など) が生成される。

① キャリアーガス (イソブタン) の反応イオン化

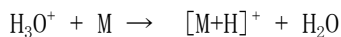


② 化学イオン化 (イオン分子反応)

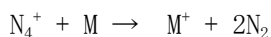


一般的に、化学イオン化に関与するイオン分子反応は、プロトン移動反応や電荷移動反応が主である。

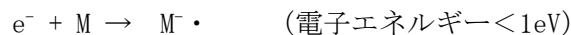
プロトン移動反応の例



電荷移動反応の例



また、CI では負イオンを生成させることもできる。即ち、ガス圧力が高いので、分子と多数回衝突した電子のエネルギーは低減し、電子親和力の高いハロゲン化合物などの電子捕獲によるイオン化が可能である。



3.3. 大気圧化学イオン化法 (APCI)

大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI) は、CIの一種だが、大気圧下で気相イオン分子反応が行われる点が特徴的である [6]。そして、反応イオンの生成には、コロナ放電が使用される。Fig. 6 に示すように、大気圧下で、放電電極の針と質量分析計のイオン取り込み細孔 (金属製) との間に 4kV 程度の直流高電圧を印加することにより、コロナ放電を発生させる。コロナ放電は、電子エネルギーが比較的 low、気体分子の一部だけがイオン化する弱電離プラズマである。それでも、放電電流は数 μ A なので、気相イオン分子反応に用いる反応イオンの量としては十分に得ることができる。このコロナ放電プラズマに気体状の試料分子を導入することにより、気相イオン分子反応により、試料分子のプロトン化分子などが生成される。CI の場合に比較して、ガス圧力が約 10^7 程度高いため、イオン分子反応に寄与する衝突の頻度が増加し、イオン生成効率も向上する。そのため、非常に高感度な気体状の分子の分析が可能になる。

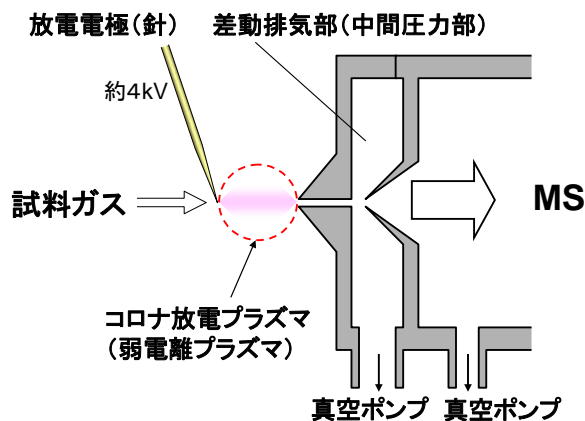


Fig. 6 APCI インターフェースの断面図。

また、放電電極の針に印加する直流高電圧の極性（正負）を切り替えることにより、正負イオンモードを切り替えることができる。例えば、正の高電圧を印加すると、静電力により正イオンが質量分析計のイオン取り込み細孔（金属製）に集まり、正イオンが質量分析計に優先的に取り込まれる。

Fig. 6 に示すように、大気中で生成されるイオンは、直径 0.4mm 程度の細孔から真空装置に導入される。そして、質量分析部が設置された高真空部に導入される前に、中間的な圧力の差動排気部を通過する。イオンを大気圧から高真空部に直接的に導入することは、真空ポンプの負担が過大であり、現実的ではない。そのため、大気中でイオン化を行う大気圧イオン化法では、必ず差動排気部が設けられる。詳細は 4.9 節で述べる。

4. 液相分子の噴霧イオン化

4.1. 静電噴霧現象とイオン化

静電噴霧とは、点状の液体と電極との間に高電圧を印加することにより、液体が電極に向かって噴霧され、荷電粒子が発生する現象である[7]。この現象は、今から 100 年程前には知られ、ペンキの塗装などに用いる噴霧技術として利用されていた。質量分析分野に向けたエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray Ionization: ESI) に発展させたのは、山下と Fenn である[8]。

当時、有機物質のイオン化においては、一価イオンが主に生成されると考えられていた。そのため、質量分析範囲が非常に広い質量分析計を使用しても、分子量が数万以上のタンパク質を分析することは困難であると考えられていた。ところが、ESI では、ペプチドやタンパク質をイオン化すると、Fig. 7 に示すように、多価イオンが生成されることが 1988 年に判明した[9]。すなわち、これらの分子は液相で多価のイオン状態を取るものが多く、このことが生成イオンにある程度反映されることが分かった。この発見により、質量分析範囲が比較的狭い（コンパクトな）四重極型

質量分析計などで、タンパク質やペプチドなどの分析が可能となった。この多価イオン分析に伴う質量分析計のコンパクト化が、タンパク質分析などの広い分野で受け入れられている。

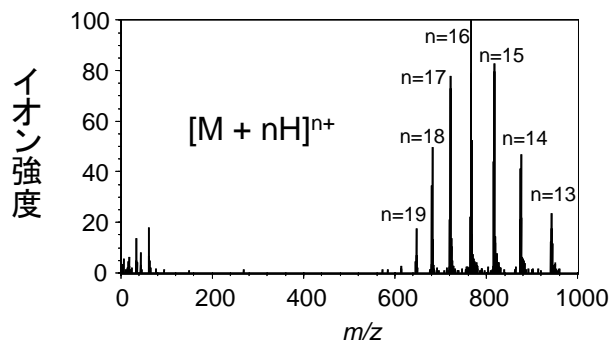


Fig. 7 チトクロムCタンパク質（分子量 12300）の溶液より得られた質量スペクトル。多数のプロトンが付加した多価イオンが検出される。

4.2. ESI におけるテイラーコーンの形成

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) は、典型的な噴霧イオン化法として、広く利用されている。

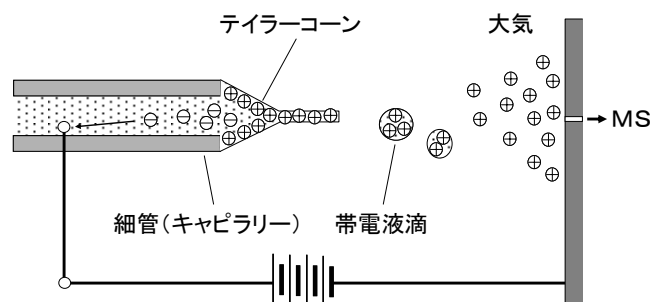


Fig. 8 ESI によるイオン生成の模式図。

Fig. 8 に示すように、金属製キャピラリー（細管）に試料溶液が導入される。そして、金属製キャピラリー末端部の試料溶液と対向電極（質量分

析計イオン取り込み細孔)との間に、高電圧が印加される。その結果、金属製キャピラリー末端の試料溶液は、高電界により、質量分析計の方向に引っ張られ、円錐型の液体コーンが形成される。このテイラーコーン (Taylor cone) と呼ばれる液体コーンの内部では、試料溶液の正イオンがコーン先端部に移動するとともに、負イオンは上流側に移動する。そして、金属キャピラリー表面での電気化学反応により、負イオンから電子に電荷の担い手を変換される[10]。その結果、テイラーコーンにおいて試料溶液中の正負イオンが分離され、テイラーコーン先端部では正イオンが極限的に濃縮される。そして、テイラーコーン先端から、溶媒分子の蒸発により、正に帯電した液滴が静電力により放出される (静電噴霧現象)。

帯電液滴の気化に従い、試料分子のプロトン化分子など、分子量関連イオンが生成される。金属製キャピラリーを介して試料溶液に印加される電圧の極性を反転させることにより、負イオンを生成させることもできる。

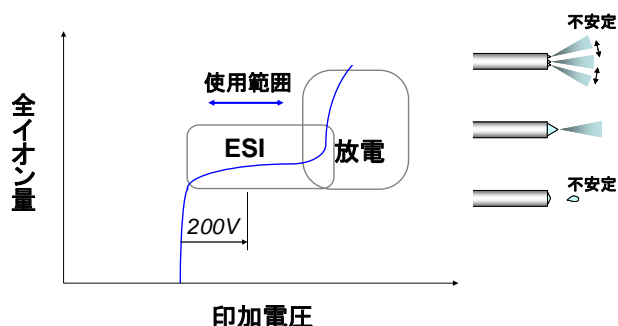


Fig. 9 ESI において生成される全イオン量の印加電圧依存性の模式図。イオン生成の閾値電圧から 200V 程度高い電圧を印加すると、安定したイオン生成が実現することが多い。

Fig. 9 に、噴霧により生成される全イオン量の印加電圧依存性を模式的に示す。エレクトロスプレー発生には、以下のように近似される閾値電圧

V_{on} がある[11]。(この式は、安定なテイラーコーンが形成されることを前提としている。)

$$V_{on} \approx 1.4 \times 10^5 \sqrt{\gamma d_{out}} \ln \left(\frac{2L}{d_{out}} \right) \quad (4-1)$$

ここで、 γ は試料溶液の表面張力、 d_{out} はキャピラリーの外径、 L は細管末端から対向電極までの距離である。距離 L は、2 から 30mm程度の範囲で設定されることが多い。通常、閾値電圧より 200V程度高い電圧に設定すると、イオン量が印加電圧にあまり依存しなくなる。この条件下では、安定なテイラーコーンを形成し、安定にイオン生成することが多い。さらに高い電圧を印加すると、テイラーコーンの向きが変動し、複数のテイラーコーンが形成されるなど、不安定化する。印加電圧がさらに高い場合、キャピラリー先端と質量分析計イオン取り込み口との間にコロナ放電が発生する。不安定なイオンが解離するなど、分子量関連イオンの生成に悪影響を与えることがある。

ESIのイオン生成においては、安定なテイラーコーンの形成が重要である。典型的に表面張力が高い純水などを噴霧する場合には、(電気伝導度を調整しても) 閾値電圧 V_{on} が高くなり、放電の発生を避けられないことがある。

また、試料溶液の電気伝導度が高すぎると、電界による正負イオンの分離ができず、テイラーコーン自体が形成できない。一方、電気伝導度が低すぎても、電界による正負イオンの分離はできるが、テイラーコーンを形成するほどにイオン濃度が増加しない。そのため、試料溶液や LC 移動相の液体には、電離度の低い酢酸や蟻酸を 0.1 から 1%程度添加することが多い。なお、電離度の高い TFA (トリフルオロ酢酸) の使用は、電気伝導度が高くなり過ぎるため、噴霧の不安定化の要因となることがある。

さらに、ESI で噴霧される液体の最適流量は、キャピラリーの外径に依存する。すなわち、キャピラリー外径が 1 mm 程度の場合には、液体流量を 1 から 10 μ L/分程度に設定すると、安定なイオン生成が実現する。この流量では、汎用 LC/MS (液

体流量～1mL/分) やセミマイクロ LC/MS (液体流量～0.2mL/分) のインターフェースには直接利用できず、LC からの溶出液を分岐させるなどの工夫が必要である。一方、ナノ LC/MS のインターフェースに用いる場合には、液体流量を 300nL/分以下に設定する必要がある。この場合には、キャピラリー末端だけを 10 μ m 程度に細くしたナノ ESI 用の石英製噴霧キャピラリーが用いられる。このナノ ESI では、テイラーコーンの表面積が大きいと、溶媒成分の蒸発速度の方が試料溶液流量より高くなり、安定なテイラーコーンを形成することができなくなる。そのため、噴霧キャピラリー末端を細くすることにより、テイラーコーンの表面積を低減させている。

これまで述べたように、安定したテイラーコーンを形成させるためには、表面張力や電気伝導度、導入する液体の流量が一定の条件を満たすことが必要である。この条件を定量的に表現することは困難だが、液体の流量が低いほど緩和される傾向にある。

4.3. ESI における帯電液滴のサイズ

安定したテイラーコーンが形成されている場合には、噴霧により最初に生成される帯電液滴の直径 d は、数 μ m 程度であり、殆ど分布が見られない [12]。

$$d = g(\epsilon) \sqrt[3]{\epsilon \epsilon_0 Q / K} \quad (4-2)$$

ここで、 $g(\epsilon)$ は 1 程度の定数であり、 ϵ 、 ϵ_0 、 Q 、 K は、それぞれ液体の誘電率、真空の誘電率、液体流量、電気伝導度である。これより、流量が非常に低いナノ ESI では、噴霧により生成される帯電液滴の直径が、流量が高い場合の ESI に比較してより微細になることが示される。

4.4. Rayleigh 分裂

噴霧により生成されたミクロン程度の帯電液滴は、溶媒の蒸発に伴い、直径が減少し、液滴内の同極性のイオン間に働く反発力が液滴の表面張

力と同等になる。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 [13]。

$$\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^2 N^2}{d^2} = 2\pi\gamma d \quad (4-3)$$

ここで、 e は単位電荷、 N は液滴の電荷数である。不安定条件 (4-3) に達した帯電液滴は、もはや一個の液滴として存在することができず、分裂する。実際には、帯電液滴の形が厳密に球形ではなく変動するため、上式で示される電荷数の 7 割程度で、Rayleigh 分裂することがある [14]。

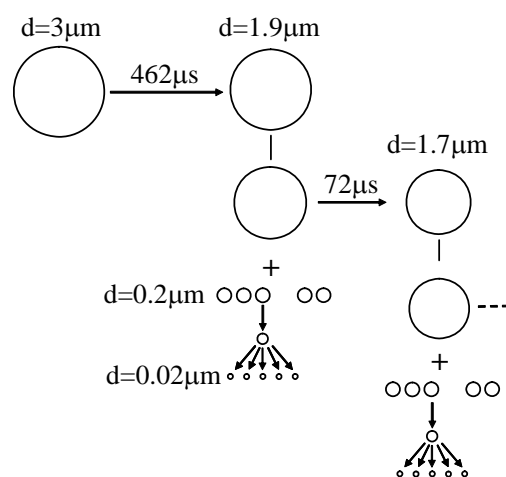


Fig. 10 帯電液滴の気化に伴う Rayleigh 分裂の模式図 [15]。

帯電液滴が Rayleigh 分裂する際には、不均等な分裂が起こることが知られる。その結果、元の帯電液滴と殆ど同等の直径で 85% の電荷を有する帯電液滴と、元の帯電液滴の 1/10 の直径で 0.75% の電荷を有する 20 個程度の比較的サイズが揃った帯電液滴が生成される [16]。この微細な帯電液滴は、元の帯電液滴に比較して電荷密度が一桁増加している。さらに、溶媒の気化が促進されれば、これらの微細な帯電液滴は再度 Rayleigh の不安定条件を満たし、分裂する。このような

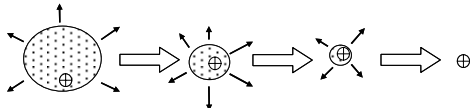
Rayleigh 分裂を繰り返すことにより、非常に微細で高い電荷密度を持つ帯電液滴が生成される。

非常に微細な帯電液滴からのイオンの生成は、以下で述べる電荷残留やイオン蒸発によると考えられている。いずれの過程においても、極めて微細な帯電液滴の生成が、イオン生成に本質的に重要である。そのため、イオン化効率においては、噴霧により最初に生成される帯電液滴のサイズが微細であり、電荷数が高いことが要求される。

4.5. 電荷残留モデル

噴霧により生成された帯電液滴が気化することにより、これまで述べた Rayleigh 分裂を繰り返し、最終的に一個のイオンを有する帯電液滴が生成される。この液滴から中性分子が完全に蒸発することにより、気体状イオンが結果的に生成され得る。Dole は、希薄溶液を噴霧することにより生成される気体状イオンを観測し、この電荷残留モデルを提案した[17]。

電荷残留



イオン蒸発

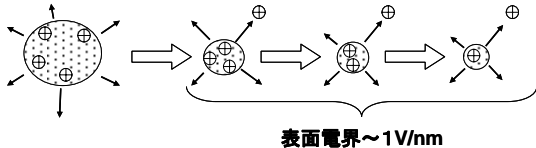


Fig. 11 微細帯電液滴からのイオン生成。イオン蒸発過程と電荷残留過程の二通りの過程が寄与する。

帯電液滴から気体状イオンが生成される過程は、この電荷残留モデル[17]か、次に述べるイオン蒸発モデル[18]により説明されると考えられている。de la Mora は、分子量が 3,300 以上である

分子のイオン生成には、電荷残留モデルが有効であることを示した[19]。

4.6. イオン蒸発モデル

帯電液滴では、イオンは溶媒和により真空中よりもエネルギー的に安定化されるが、同符号のイオンによるクーロン斥力も受け、その強度は溶媒分子の気化により液滴の直径が小さくなるほど高くなる。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帯電液滴におけるエネルギー障壁 ΔG を越えて液滴から蒸発することができる。これが、Iribarne と Thomson が提案するイオン蒸発モデルである[17]。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。

$$K = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G}{kT}\right) \quad (4-4)$$

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 は絶対温度である。

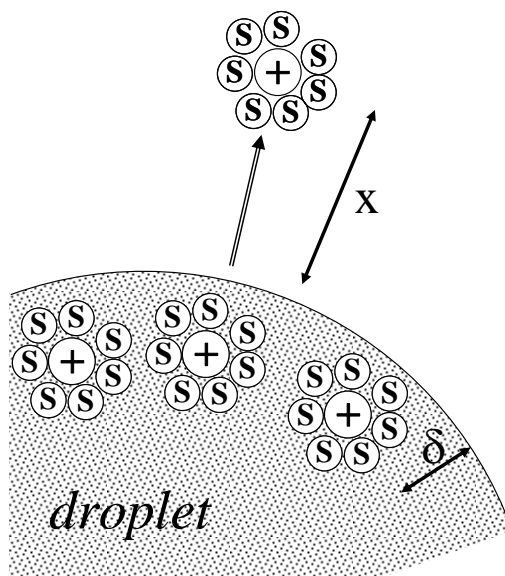


Fig. 12 イオン蒸発の模式図。帯電液滴において溶媒分子 (s) に溶媒和されたイオン (+) は、液滴表面での電界強度が増加すると溶媒和された状態で液滴から放出 (蒸発) される。

さて、Fig. 12 に示すように、帯電液滴表面から深さ δ にある溶媒和されたイオンが、液滴表面から距離 x だけ離れた場所へ移動するモデルを想定する。そうすると、溶媒和されたイオンの帯電液滴からの蒸発に要するギブス自由エネルギー変化 ΔG_x は、近似的に以下のように表すことができる。

$$\Delta G_x = \left\{ \frac{Ne^2}{2\pi\epsilon_0(d+2x)} - \frac{e^2}{16\pi\epsilon_0 x} \right\} - \left\{ \Delta G_s + \frac{Ne^2}{2\pi\epsilon_0(d-2\delta)} \right\} \quad (4-5)$$

ここで、 d は液滴の直径、 ΔG_s 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) である。上式右辺において、第一項は帯電液滴と距離 x だけ離れたイオンとの静電反発によるポテンシャルエネルギー、第二項は映像電荷に関するものである。さらに、第三項は帯電液滴中で溶媒和されたイオンのギブス自由エネルギー変化であり、第四項は帯電液滴中でのイオン間静電反発を表している。 ΔG_x の最大値がエネルギー障壁 ΔG であり、 δ は d よりも十分に小さいことを考慮すると、以下のように記述できる。

$$\Delta G = -\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\sqrt{N}-1}{2d} - \Delta G_s \quad (4-6)$$

上式より、帯電液滴の直径 d が一定の値まで減少すると、 $\Delta G \leq 0$ となり、イオン蒸発が実現することが示される。そこでは、 d は $N^{1/2}$ に比例するため、電界強度は一定となる。

実験的には、帯電液滴から溶媒分子の気化に伴って気体状イオンが生成される現象が観測されている。そして、帯電液滴の移動度を測定することにより、液滴表面の電界強度が 10^9 V/m程度となることが分かっている[20]。すなわち、気化が進む帯電液滴では、溶媒分子の蒸発に伴って溶媒和されたイオンも蒸発し、液滴表面では電界強度がほぼ一定に保たれる。なお、帯電液滴から放出

される溶媒和されたイオンは、大気中分子との衝突により速やかに脱溶媒される。

イオン蒸発モデルでは、溶媒和されたイオンに対する ΔG_s の値を知ることにより、実測されるイオンの強度を定量的に評価することが可能であると考えられる。しかし、溶媒和されたイオンの状態が充分に解明されておらず、 ΔG_s を見積もることは困難である。

4.7. 分子の表面活性とイオン化

生体関連物質には、液体の pH あるいは水素イオン濃度に応じて電離度が異なるものがある。すなわち、液体中でイオン状態をとるものと中性状態をとるものが、pH に依存する比率で混在することがある。

生体関連物質の溶液から生成される帯電液滴では、液相で最初から液滴と同極性のイオン状態にあるものは、液滴表面近傍に分布する。一方、中性状態のものは、表面活性（疎水性）が高いと液滴表面近傍に多く分布するが、表面活性が低いと液滴中心部に集中する。そして、帯電液滴においては、表面近傍の pH はバルク溶液の状態に比較して現象として低減するうえ、溶媒の気化によっても pH は低減する。このことに従い、表面近傍に分布する表面活性の高い中性分子の一部は、イオン状態を取るようになる。したがって、液相で電離度が高く、表面活性の高い分子は、帯電液滴表面でイオン状態となるものの比率が高い。そして、帯電液滴の気化が充分に進行すれば、このような帯電液滴表面近傍にあるイオンが、気体状イオンとして強く検出される結果となる。

4.8. ソニックスプレーイオン化法 (SSI)

ソニックスプレーイオン化法 (Sonic Spray Ionization: SSI) は、ESI とは異なり、広い範囲の液体流量に対応できる噴霧イオン化法である。このイオン化法では、高速のガス流を用いて試料溶液を噴霧することにより気体状イオンが発生するという現象を利用している。生成されるイオン量はガスの流速に依存し、音速の場合に最大となる[21]。一方、ガス流速が低速の場合には、ガ

ス噴霧により液滴は生成されるが、イオンは生成されない。

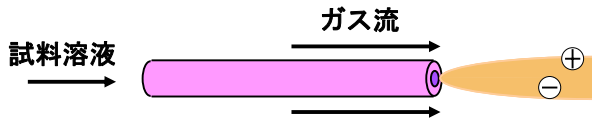


Fig. 13 SSI の概念図。試料溶液をキャピラリー（内径 0.1mm、外径 0.2mm 程度）に導入し、その末端において同軸状に音速ガス流を流すことにより、気体状イオンが生成される。

このイオン化法では、高速のガス噴霧により帯電液滴が発生し、帯電液滴から ESI と同様に気体状イオンが生成されると考えられる。SSI の特徴は、電圧を印加しなくても帯電液滴が生成される点である。帯電液滴の生成過程については、以下に述べる液滴中イオンの不均一分布により説明される場合と、統計的帯電[22]による場合がある。

まず、液滴中イオンの不均一分布に起因する帯電液滴の生成について述べる。噴霧により最初に生成される液滴の直径は、ガス流速に依存し、音速の場合に最小となり $1\mu\text{m}$ 以下となる。このサブミクロンサイズの液滴には、正負イオンが平均的に同数含まれ、電気的に中性（帯電しない）と考えられる。しかし、大気と接する液滴表面には表面電界が発生するため、液滴表面から $0.1\mu\text{m}$ 程度の深さまでは、（電氣的二重層により）正負イオン濃度の分布が不均一となる[23]。Fig. 14 に示すように、このような不均一なイオン濃度を有する液滴から、音速ガス流により、表面の液体が剥ぎ取られると、より微細な帯電液滴が生成される。このような微細な帯電液滴では、さらに正負イオン濃度分布の不均一性は増大し、音速ガス流により、より細かな帯電液滴が生成される。このような帯電液滴の気化が促進されると、Rayleigh 分裂が起こり、帯電液滴表面における電界強度が

10^9 V/m に達すると、イオン蒸発により気体状イオンが放出されると考えられる。

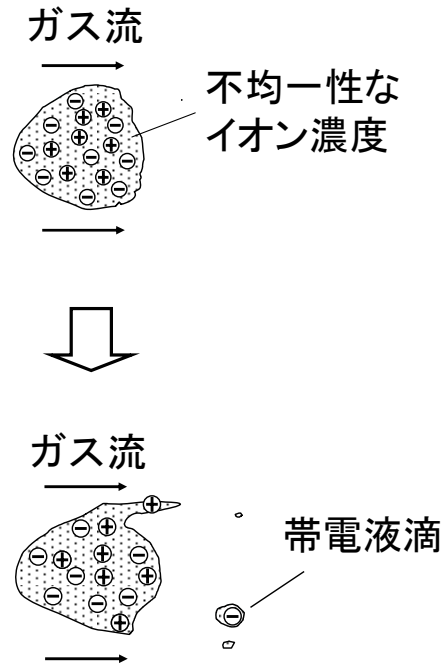


Fig. 14 サブミクロンサイズの液滴表面における正負イオンの分布不均一性と高速ガス流による微細帯電液滴の生成。

液滴中イオンの不均一性は、液体中の酸や塩濃度が高くなると減少し、イオン生成効率は低減する結果となる。しかし、より高濃度の酸や塩基が含まれる液体を噴霧すると、イオンの生成効率は増加する[24]。この現象は、統計的帯電モデル[22]で説明される。すなわち、高速ガス噴霧により最初に生成される液滴には、正負イオンが平均的に同数含まれる。しかし、正負イオン濃度の分布には統計的なゆらぎがあるため、正または負に帯電する液滴が同数発生する結果となる。

試料溶液に高電界を印加すると、キャピラリー末端部で試料溶液中の正負イオンを分離することができる。そのため、噴霧により最初に生成される液滴は一様に帯電し、高速ガス流と Rayleigh 分裂との双方による液滴微細化を実現すること

ができる[25]。最初に生成される液滴はガス噴霧によるせん断力のみにより生成されるため、その液滴の直径は印加電圧に依存しない。Fig. 15に、不揮発性液体の噴霧により最初に生成される帯電液滴の直径と電荷数との関係を示す。印加電圧を増加させると、直径は同一だが、移動度 μ が増加し、帯電液滴の電荷数は増加する。しかし、電荷数が、Rayleighの不安定条件(4-3)を超えることはない。

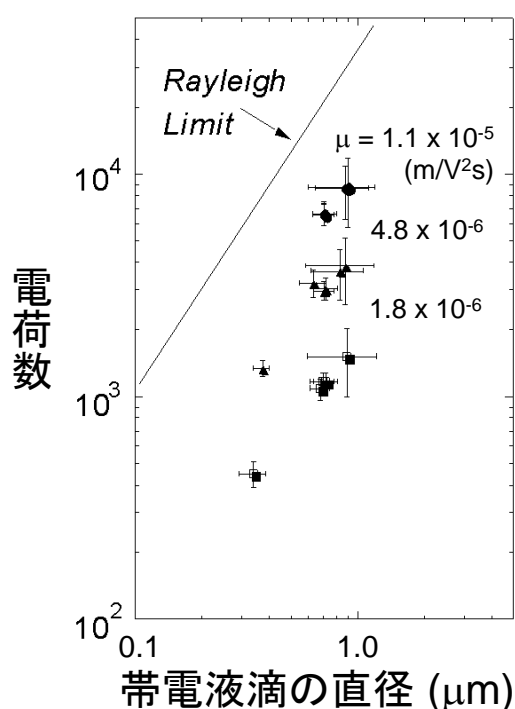


Fig. 15 帯電液滴の直径と電荷数。直線はレイリーの不安定条件を示す[26]。イオン源の印加電圧を0.5、1、1.5kVと増加させると、液滴直径は同一だが移動度 μ が増加し、電荷数も増加する。

SSIでは、印加電圧に応じて、帯電液滴の電荷数を制御することが可能である。すなわち、噴霧キャピラリー末端に電界を加えることにより、液体中での正負イオンの分離ができ、噴霧により生成される液滴を帯電させることができる。印加電

圧が0Vの場合には、一価や二価イオンは生成されるが、四価以上の多価イオンは殆ど生成されない。一方、1kV程度の高電圧を印加すると、ESIと同様に多価イオンを効率よく生成することができる。このような多価イオンの生成は電荷残留によるためと説明される。

4.9. ガス噴霧支援 ESI イオン源

汎用やセミマイクロ LC/MS のインターフェースでは、液体流量が1から0.2mL/分程度に設定する必要がある。そのため、ESIでは、このような条件で安定したテイラーコーンを形成し、イオン生成を行うことは困難である。しかしながら、ESIイオン源のキャピラリー外周に沿って窒素ガスなどの不活性ガスを流し、噴霧を支援することにより、イオン生成を実現させることができる。このガス噴霧支援ESIと呼ばれるイオン化法では、液体からの帯電液滴の生成が、静電力のみならずガス流によるせん断力にもよる点が特徴的である[27]。帯電液滴からの気体状イオンの生成過程は、ESIやSSIと同様である。代表的なガス噴霧支援ESIイオン源の構造をFig. 16に示す。

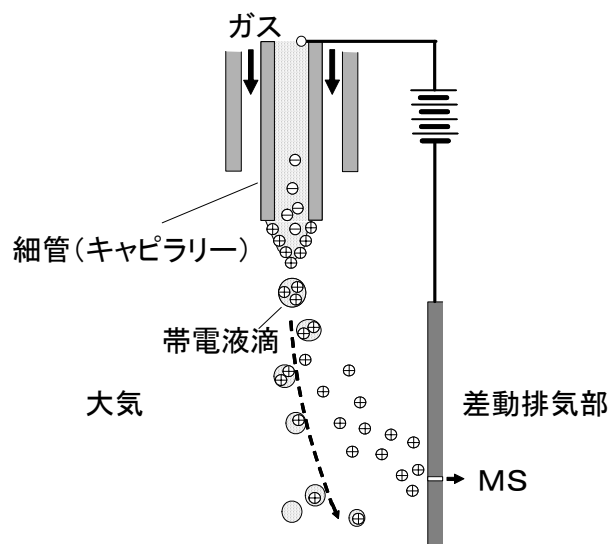


Fig. 16 直交噴霧方式を採用したガス噴霧支援ESIイオン源。

ガス噴霧支援ESIでは、特に液体流量が高い場合に、気化が不十分な帯電液滴が多量に発生する。これらが真空装置内部に導入されると、電極などに付着して空間電荷効果を発生させ、イオン透過率低減などの原因となる。そのため、気体状イオンのみを優先的に質量分析計イオン取り込み細孔から差動排気部に導入することが望ましい。そこで、Fig. 16 に示すような直交噴霧方式がしばしば用いられる。気体状イオンの移動度は $5 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{Vs}$ 以上であるのに対し、帯電液滴の移動度はせいぜい $3 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{Vs}$ である[28]。この移動度の差を利用して、移動度の低い帯電液滴をイオン取り込み口より下流側にガス流で押し流すことにより、真空装置への導入を抑制することができる。

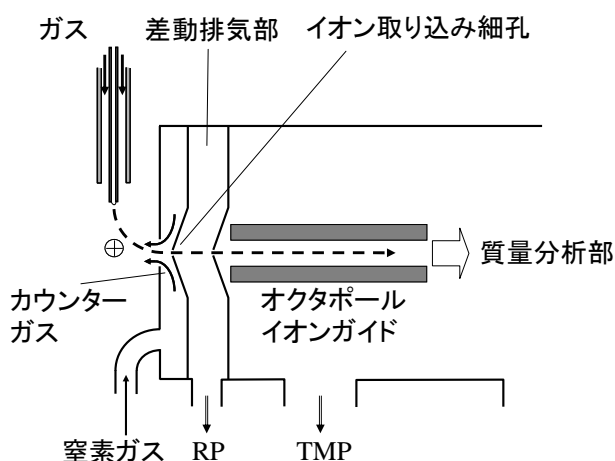


Fig. 17 ガス噴霧支援ESIインターフェース。

Fig. 17 に、典型的なガス支援ESIインターフェース（断面図）を示す。この例では、帯電液滴が真空装置内に導入されることを抑制するために、カウンターガスも用いられている。内径が 0.4mm 程度のイオン取り込み細孔は、150℃程度にヒーターで加熱される。電極表面における汚れの抑制のみならず、イオンのクラスター化を抑制するためである。すなわち、イオン取り込み細孔の出口

側にある差動排気部では、圧力が $1 \times 10^2 \text{ Pa}$ 程度にロータリーポンプ (500L/分) 等で排気される。従って、イオン取り込み細孔の出口では、大気圧で導入された溶媒分子やイオンは、断熱膨張により急激な冷却を受け、超音速ガス噴流が形成される。この断熱膨張を伴う超音速ガス噴流は、マッハディスクに達すると、急激に速度が低下するとともに、周囲の残留ガスとの衝突により温度も上昇する。(Fig. 18 参照) しかし、超音速ガス噴流において、イオンは溶媒分子によるクラスター化され、分子量が巨大になることがある。このクラスター化を抑制するために、イオン取り込み細孔を加熱し、差動排気部に導入されるガス（溶媒分子やイオン）の温度を予め上昇させることが有効である。

また、差動排気部と質量分析部との間は、第二の細孔で仕切られる。細孔間の距離は、超音速ガス噴流の長さ l よりも長く設定すると、冷却によりクラスター化したイオンの脱クラスター化に有利である。

$$l = 0.67D \sqrt{\frac{P_0}{P_1}} \quad (4-7)$$

ここで、 D はイオン取り込み細孔の内径であり、 P_1 は差動排気部の圧力、 P_0 は細孔出口での圧力であり、細孔の厚みがゼロの場合には $1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$ (1気圧) となる。

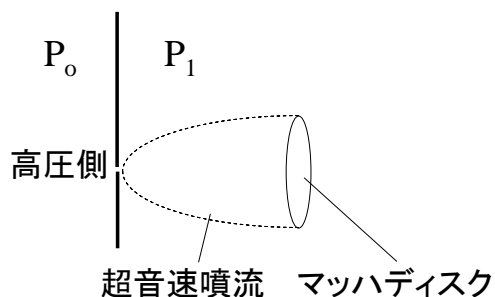


Fig. 18 超音速噴流の模式図。

第二の細孔より下流側には、イオンを効率よく輸送するためにオクタポールやクワドロポールなどのイオンガイドが使用される。これらの多重極ポールでは、ダンピングガスとしてヘリウムや窒素ガスなどが導入され、圧力は 1×10^{-1} Pa 程度に保たれる。高周波電圧を多重極ポールへ印加することにより、イオンの拡散を抑制し、エネルギーが低くて揃ったイオンビームを形成することができる。また、脱クラスター化にも有効である。そのため、質量分析部に効率よくイオンを導入することができる。さらに、高周波電圧や周波数を調整することにより、特定の m/z 範囲にあるイオンを除去することも可能である。

5. 固体分子の脱離イオン化

5.1. レーザー脱離イオン化法

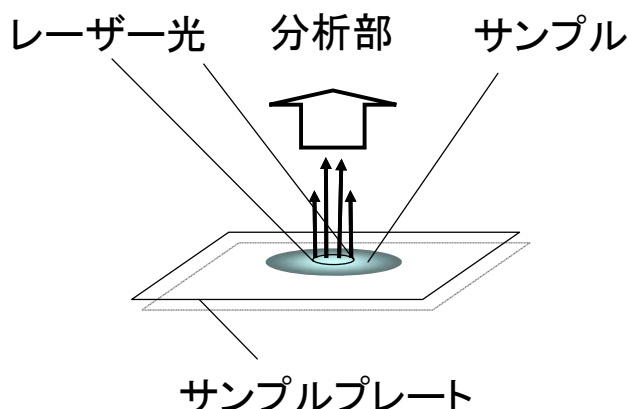


Fig. 19 レーザー脱離イオン化法の模式図。

金属表面にパルスレーザー光を照射すると、スパッター現象により、金属蒸気が発生するとともにイオンも発生する。この現象は、パルスレーザー光の照射直後に、局所的に金属が溶解して金属蒸気を発生させるとともに、金属表面から電子が放出されることによる。その結果、電子イオン化により金属イオン、及び、そのクラスターが生成される[29]。このようにレーザー光照射によるスパッター現象を利用するイオン化法がレーザー脱

離 (Laser Desorption: LD) イオン化法であり、イオン化は真空中で行われることが多い。

ところが、難揮発性で熱的に分解され易い有機物質を金属表面に塗布し、パルスレーザー光を照射すると、解析が困難な様々なフラグメントイオンが生成され、分子量関連イオンは生成されない。このような有機物質を解離させずにイオン化するには、イオン化において、試料分子に過剰なエネルギーが与えられることを防止する工夫が必要である。そこで、試料の有機物質にグリセリンなどの不揮発性物質を添加する手法が考案された。このイオン化を支援するグリセリンなどの添加物質をマトリックスと呼ぶ。

1987年に、田中らは、マトリックスとしてグリセリンに金属 (コバルト) の微粒子を混ぜたものを使用することにより、従来不可能と考えられていた分子量が 34,000 程度のタンパク質のプロトン化分子を生成することに成功した[30]。この結果は、より分子量の高い有機物質のイオン化に対する可能性を示唆し、本格的なマトリックス開発の契機となった。そして、マトリックスを使用するレーザー脱離イオン化法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI) と呼ばれるようになった[31]。

5.2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)

MALDI では、マトリックスに保持された試料に対し、数ナノ秒程度の時間幅を持つパルスレーザー光を照射することにより、パルスのイオン生成を行う。照射されるレーザー光のエネルギーは、マトリックスに優先的に吸収されることが望ましい。そのため、マトリックスには、レーザー光波長に対して高い吸収係数を有するものが使用される。レーザーには、窒素レーザーや Nd:YAG レーザー (3 倍波) などの紫外線レーザーが使用されることが多いが、Nd:YAG レーザー (基本波) などの赤外線レーザーも利用可能である。赤外レーザー光を使用すると、イオン生成効率が低い反面、試料分子を直接電子励起する可能性が低減し、フラグメントイオンの発生が抑制される。

このイオン化法では、レーザー光照射による固体の脱離過程とイオン生成過程が同時に進行する。そのため、イオン化過程については様々な議論がなされており[32]、以下では、現状の認識を簡潔に整理したい。

5.3. 固体表面からの脱離過程

マトリックスは、電気伝導性のあるサンプルプレートに塗布され、乾燥により結晶化される。そして、マトリックス表面には、レンズにより収束されたパルスレーザー光が照射される。その結果、固相マトリックスは局所的に急激な温度上昇を受けるとともに相転移が起こり、マトリックスの大小クラスターがサンプルプレートから垂直方向に放出される。すなわち、ブルームの形成である。マトリックスの添加量を試料に対して大過剰に設定することにより、過剰なエネルギーはマトリックスの気化に費やすことができ、試料分子の解離は抑制される。

サンプルプレート表面における典型的なレーザー光照射スポットは直径 100 μm 程度であり、塗布されたマトリックスよりも十分にサイズが小さいことが望ましい。

レーザー光による脱離には、レーザー光強度の閾値が存在し、その閾値より強い強度のレーザー光を照射する必要がある。しかし、レーザー光強度を過度に高く設定すると、フラグメントイオンが多量に生成され、プロトン化分子などの分子量関連イオンの生成が抑制される。そのため、レーザー光強度は、イオン生成に必要な最低レベルに設定されることが多い。このとき、照射されるレーザー光強度は、数 10 から 100 J/m^2 程度である。そして、照射されたレーザー光は、マトリックスの吸収を受けながら、表面から 0.1 μm 程度の深さまで侵入する。

レーザー光照射された後の固相マトリックス表面には、マトリックスの脱離によるクレーターが形成される。そして、継続して何回もレーザー照射を行うと、クレーターの穴は更に深くなり、最終的には生成されるイオン量が低減する。そのため、サンプルプレート上の同一部位にレーザー

照射する回数は、数 10 回程度に留められることが多い。一方、サンプルプレート上の結晶化されたマトリックスは必ずしも均一とは限らず、照射部位により生成されるイオン量は異なることがある。そのため、サンプルプレートには微動機構が備わっており、レーザー発振に同期して一定の周期でマトリックス上の照射部位が移動する。

5.4. 脱離におけるイオン化過程

マトリックスから生成されるイオンは、脱離の初期段階に生成されるイオンと、ブルーム中における気相イオン分子反応により遅れて生成されるイオンとに大別される。そして、最終的に検出されるイオンは、主に後者である。

まず、初期段階に生成されるイオンについて述べる。試料溶液は、マトリックスに混合され、サンプルプレートに塗布され、乾燥される。そして、結晶化されたマトリックスの中では、ある程度、試料分子や酸あるいは塩は溶液状態でのイオン化状態が保存されている。すなわち、結晶マトリックス中でも、正負イオンが存在する。

そして、レーザー光照射により、マトリックスのクラスターが瞬時に発生するが、統計的にクラスターに含まれるイオンに依存して、クラスターは正または負に帯電する。そして、マトリックス分子の蒸発により、クラスター中では正負イオンの再結合が起こるが、帯電クラスターからは最終的に正または負イオンが生成される。上記の他に、光化学イオン化によってもマトリックス分子がイオン化されると考えられる。

これまで述べたように、マトリックスの役割は、光の吸収・加熱による脱離だけでなく、試料分子がイオン化し易い環境を提供することにもある。現在、様々な種類のマトリックスが市販されており、試料の化学的性質に応じて、使い分けられている。Table 1 に、代表的なマトリックスを示す。

Table 1 代表的なマトリックス

マトリックス	主な分析対象
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

一方、サンプルプレート表面で発生するプルームは、一時的に高温高压となり、そこでは多数回の衝突が発生する。そのため、気化した中性分子やイオンは、プロトン移動反応や電荷交換反応などの気相イオン分子反応の影響を受ける。その結果、初期段階で多価イオンが生成されても、プルーム中でのイオン分子反応により、そのイオンの電荷数は低減し、最終的に殆ど一価となる。ESIでは多価イオンとして検出される分子も、MALDIでは主に一価イオンとして検出される点の特徴的である。

5.5. Delayed Extraction

MALDI は、パルスのようにイオン生成を行うため、高速分析が可能な飛行時間型質量分析計 (Time of Flight Mass Spectrometer: TOFMS) の利用が、高感度分析に有利である。TOFMS では、イオンにパルスのような電界を与えることにより加速し、イオンに一定の運動エネルギーを与える。そして、イオンの速度差を利用して、質量分離を行う。そのため、TOFMS の加速領域に導入されるイオンは、質量分解能や感度面から、エネルギー的にも空間的にも収束されていることが望ましい。

典型的なMALDIイオン源をFig. 20に示す。イオン源はTOFMSのイオン加速部にあり、TOFMS分析部は 2×10^{-5} Pa程度の真空度に保持される。

レーザービームは、サンプルプレート表面において直径 0.1mm程度のスポットにレンズにより収束される。MALDIにおける脱離は熱的な過程なので、サンプルプレート面に対するレーザー光の照射角度は、イオン生成に殆ど依存しない。イオンは、サンプルプレート面に垂直な方向に向けて生成される。

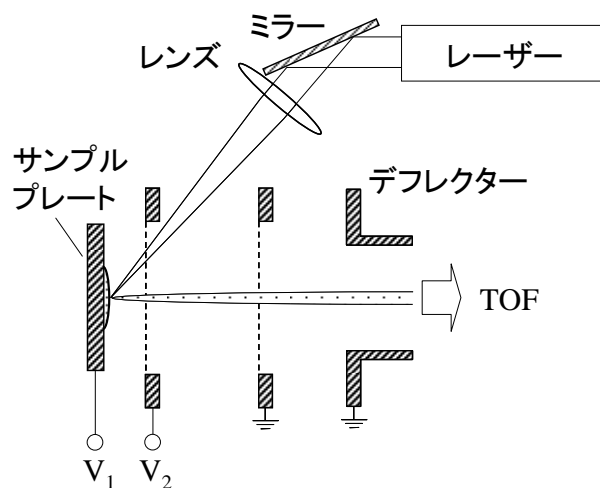


Fig. 20 MALDI におけるイオンビームの発生 [33]。

さて、レーザー光照射直後に生成されるイオンは、同時に脱離されたマトリックスなどと（質量に依存せず）同等の速度を有し、エネルギー的な広がりが無視できない。また、イオン生成はレーザー光照射直後のみならず、しばらく継続する。さらに、電界によりイオンを引き出す際に、マトリックスなどとの衝突により、イオン加速に支障を生じることがある。そのため、レーザー光照射直後に生成されるイオンをTOFMSのイオン加速部に導入しても、質量分解能や感度が十分に得られない。ところが、レーザー光照射後 $1\mu\text{s}$ 程経過すると、気相イオン分子反応も発生しなくなるうえ、冷却によりイオンのエネルギー広がりも低減する。そこで、レーザー光照射から $1\mu\text{s}$ 程度遅延させて加速部にイオンを導入し、イオンを加速さ

せるパルス電界を印加する方法が Delayed Extraction である。Fig. 20 において、レーザー光照射時には、 V_1 と V_2 は同電位（25kV程度）にしておき、所定の時間が経過すると V_1 の電位を矩形的に 3kV程度増加させる。このことにより、イオンは V_2 の印加されたメッシュ電極を通り、接地されたメッシュ電極に向けて加速される。そして、 m/z に応じた速度を得たイオンは、電界のない飛行部に導入され、速度差により分離される。

参考文献

- [1] F. W. Aston, *Phil. Mag.*, 38 (1919) 611-626.
- [2] A. E. Ashcroft 著（土屋正彦・横山幸男 訳）、「有機質量分析イオン化法」、丸善、1999.
- [3] M. Ishikawa, S. Yoshioka, A. Hirabayashi, *BUNSEKI KAGAKU* 50 (2001)149-152.
- [4] 小田吉哉、夏目徹編、「できマス！プロテオミクス」、中山書店、2004.
- [5] K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 28 (1980) 185-209.
- [6] H. Kambara, *Anal. Chem.* 54 (1982) 143-146.
- [7] J. Zeleny, *Phys. Rev.* 32 (1914) 69-91.
- [8] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451-4459.
- [9] J. B. Fenn et.al., *Proc. 36th Annual Conference ASMS*, San Francisco, 1988, p. 773; J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Sci.* 246 (1989) 64-71.
- [10] G. J. Van Berkel, V. Kertesz, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5510-5520.
- [11] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A-986A.
- [12] J. Fernandez de la Mora, I. G. Loscertales, *J. Fluid Mech.* 260 (1994) 155-184.
- [13] Lord Rayleigh, *Phil. Mag.* 14 (1882) 184-186.
- [14] A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids* 6 (1994) 404-414.
- [15] L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3654-3668.
- [16] K. Tang, A. Gomez, *Phys. Fluids* 6 (1994) 2317-2332.
- [17] M. Dole, L. L. Mach, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240-2249.
- [18] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287-2294; B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4451-4463.
- [19] J. Fernandez de la Mora, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 93-104.
- [20] I. G. Loscertales, J. Fernandez de la Mora, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 5041-5060; A. Hirabayashi, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 175 (1998) 241-245.
- [21] A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2878-2882.
- [22] E. E. Dodd, *J. Appl. Phys.* 24 (1953) 73-80.
- [23] J. V. Iribarne, *J. Rech. Atmosph.* 6 (1972) 265-281.
- [24] K. Deguchi, Y. Takegawa, A. Hirabayashi, H. Nakagawa, S. Nishimura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2325-2330.
- [25] A. Hirabayashi, Y. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1703-1705; Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4050-4058.
- [26] A. Hirabayashi, J. Fernandez de la Mora, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 175 (1998) 277-282.
- [27] T. R. Covey, P. Kovarik, R. Jong, *The Encyclopedia of Mass Spectrometry Vol. 6*, Elsevier, 2007, p. 426-435.
- [28] D. T. Shaw (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th edn*, CRC Press, 1995, p. 14-28.
- [29] S. S. Mao, X. Mao, R. Greif, R. E. Russo, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) 3370-3372.

- [30] K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, Osaka, 1987, p. 185-188.
- [31] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1463-1466.
- [32] M. Karas, R. Kruger, *Chem. Rev.* 103 (2003) 427-439.
- [33] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1998-2003.