

エミッタ内の電気化学反応を防ぐ 両極性エレクトロスプレーエミッタの開発

小森亮輝*・鈴木理久・韓 忠保・チェンリーチュイン
山梨大学

In conventional ESI, electrochemical reactions occur at the interface between the emitter electrode and the solution. This study deals with “bipolar electrospray ionization,” in which positive and negative ions are generated simultaneously, with the aim of preventing electrochemical reactions in the emitter. The voltage-current and flow rate-current relationships of bipolar electrospray were found to be similar to the standard electrospray. The application of bipolar ESI to the mass spectrometry of melittin without electrochemical oxidation is demonstrated.

Key words: Bipolar electrospray ionization, Electrochemical reaction, Porous material

(Received August 30, 2023; Accepted October 2, 2023)

1. はじめに

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) は、質量分析に利用されているイオン化法の中で極めてソフトな手法であり、試料分子を分解することなく気相イオンに変換することが可能である。この手法では、ESIエミッタに高電圧を印加することで試料を含有する溶液の帯電液滴ジェットと噴霧を起こす。帯電液滴の脱溶媒により試料分子の気相イオンが生成され、エミッタ電圧の正負に応じて正イオンもしくは負イオンが生成される。また、ガラスなどの絶縁性エミッタを用いる場合は電極をキャピラリーに挿入することで液体との電氣的接触を得る。連続かつ安定なエレクトロスプレーを達成すると液体と電極界面に電気化学反応が起きるため、Kearleらは「ESIは特別な種類の電気化学反応場である」¹⁾と述べた。従来の手法では、高電圧が印加されたエミッタ、もしくは電極と溶液の界面で電気化学反応が起こり、溶液に過剰電荷が供給されるため、試料が酸化もしくは還元されることが考えられる。その結果、測定試料に由来しない異なるマススペクトルが観察される恐れがある。電気化学反応の影響として、ESIで長時間スプレーを発生させた際に溶液のpHが変化すること²⁾や、エミッタが劣化すること³⁾が報告されている。

電気化学反応を防ぐ手法はいくつか考案されており、透析膜 (半透過性メンブレン) を使用して電気化学反応生成物が試料溶液に流入することを防ぐ手法⁴⁾や、電気化学反応物を溶液から取り除く手法^{5),6)}が報告されている。もう一つは Martinez-Sanchez が提案した両極性ESI⁷⁾である (図1)。正と負の電極をエミッタの対面にそれぞれ設置することでエミッタ内での電気化学反応を防ぐことが予測されるが実際の性能評価はまだ報告されていない。一つのマイクロ液滴から正負イオンを同時に生成する電場誘導イオン化法 Field-induced droplet ionization (FIDI) も存在する^{8),9)}。われわれの研究室で行った簡易FIDI予備実験の結果を図2に示す。上部のガラスチューブから試料を電極間に滴下し、双方向にスプレーを発生させる手法であるが、テイラー

コーンが大きいため再現性が低く、安定したスプレーを得ることが困難であった。そこで本研究では、より再現性が高く安定した両極性エレクトロスプレー (Bipolar ESI) を開発し、特性評価を行った。その結果、両極性エレクトロスプレーを用いた場合、従来の方式と比べて酸化スペクトルの増加を防ぐことが確認できたので報告する。一部の結果はJASMSに報告された¹⁰⁾。

2. 実験方法

2.1 両極性エレクトロスプレーエミッタの作製

今回作製した両極性エレクトロスプレーエミッタには、シリンジポンプを用いて試料を送液するオンライン型 (Online Bipolar) (図3a) と、あらかじめ試料溶液をエミッタ内に充填するオフライン型 (Offline Bipolar) (図3b) の

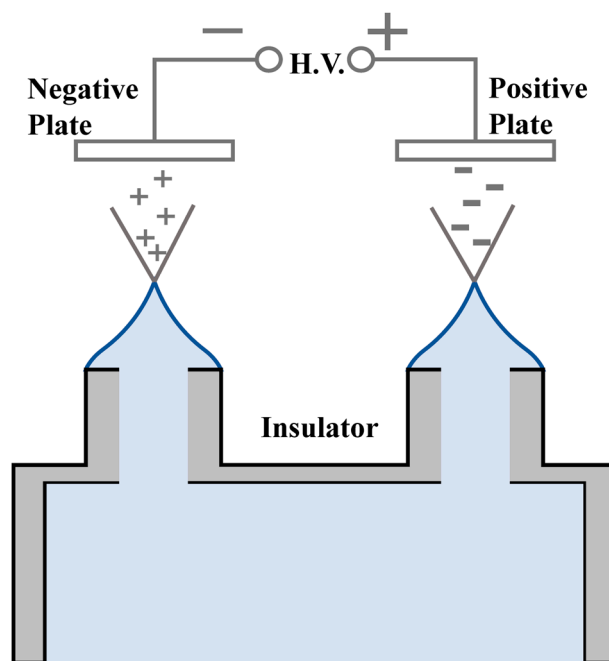


図1. Martinez-Sanchezが提案した両極性ESI (文献7より作成)。

* 山梨大学医工学総合教育部 工学専攻 電気電子工学コース, G22TE011@yamanashi.ac.jp



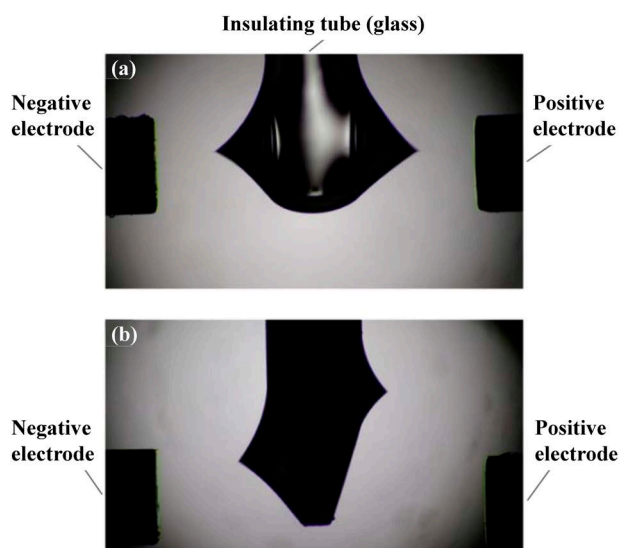


図2. FIDI (Field-induced droplet ionization) 方式を用いた Bipolar ESI. 上部のガラスチューブから試料が滴下される。
(a) 成功例. テイラーコーンが左右対称に形成された。
(b) 左右非対称の場合.

2種類がある。オンライン型ではプラスチックシリンジと精密シリンジポンプを使用し、一定の流量で試料溶液を供給した。ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 製の絶縁 Tユニオンを用いて液体を双方向に分離し、エミッタには内径0.1 mmのPEEKキャピラリーを用いた。電極をエミッタの延長線上にそれぞれ配置し、対向電極間に高電圧を印加することで双方向から噴霧を発生させた。オフライン型では、最大容量10 μL のマイクロピペットチップを最大容量200 μL のマイクロピペットチップに2つ接合させた。エミッタはマイクロピペットチップにPEEKキャピラリーを挿入して作製した。オンライン型ではシリンジポンプを用いて流量を制御していたのに対し、オフライン型では電極間に印加される電圧によって流量が制御された。表面張力の高い溶液の場合、大気圧下での噴霧は困難なため、密閉チャンバーを用いて超大気圧下 (~4 barゲージ圧) で動作させた。マススペクトルの測定は卓上型オービトラップ質量分析計 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) を用いて行った。

2.2 電圧制御とスプレー電流の測定

対向電極間の電位差を変化させることで両極性エレクトロスプレーのスプレー電流と電圧の関係性について評価を行った。高電圧 (H.V.) はプログラマブル直流電源 (E3620A Agilent) を介してPCで制御し、スプレー電流はグラウンド側の電極に接続された1 M Ω の抵抗によって測定した。測定値はマルチメータ (8846A FLUKE) とPCを使って記録した。また、オフライン型ではエミッタを電子天秤 (XS205 Mettler Toledo) に乗せ、スプレーを発生させながら溶液の重量を0.14秒間隔で計測することで流量を測定した。

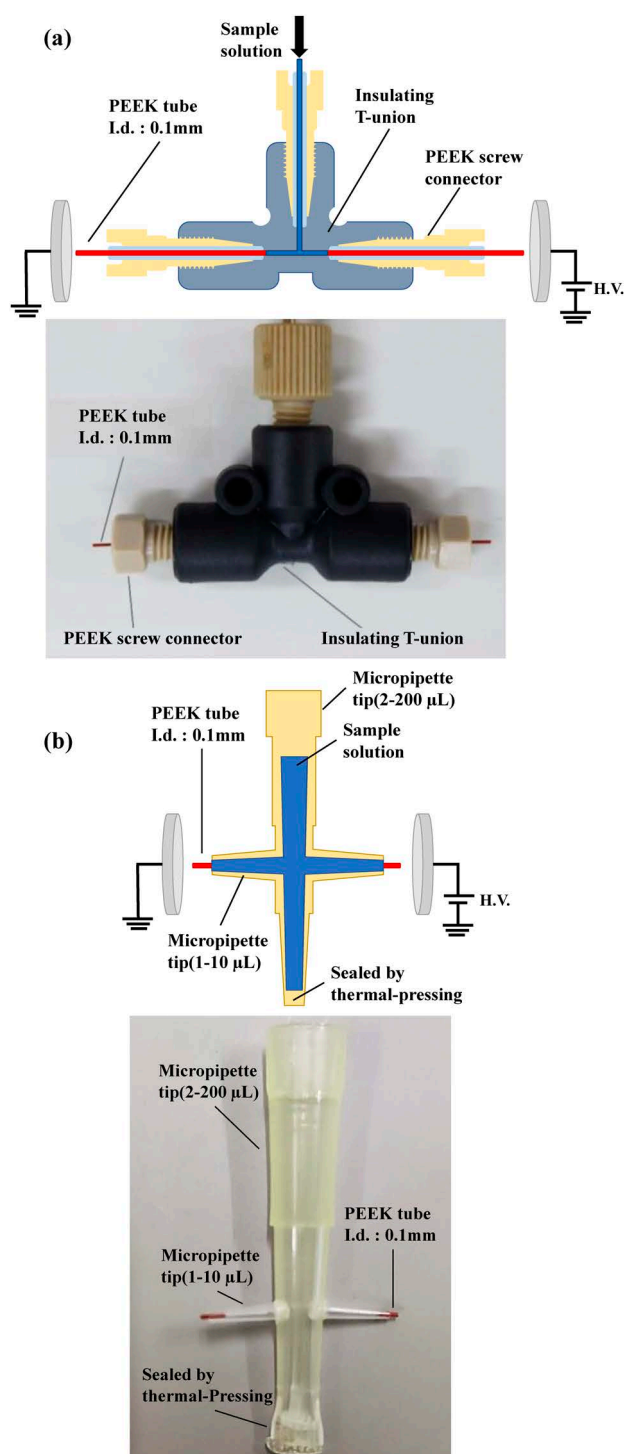


図3. 本研究で作製した両極性エレクトロスプレーエミッタ。
(a) シリンジポンプを使う Online Bipolar.
(b) シリンジポンプを使わない Offline Bipolar.

3. 結果と考察

3.1 スプレー電流と電圧の関係

図4に各イオン源を用いた場合の、スプレー電流と電圧の関係を示す。従来のESI (図4a) では流量を5 μL に設定し、PEEKキャピラリーと同程度の内径のステンレスキャピラリーを用いた。電圧はまず1.7 kVから3.6 kVまで増加させ、同様の速度で1.7 kVまで再び減少させた。電圧が低い

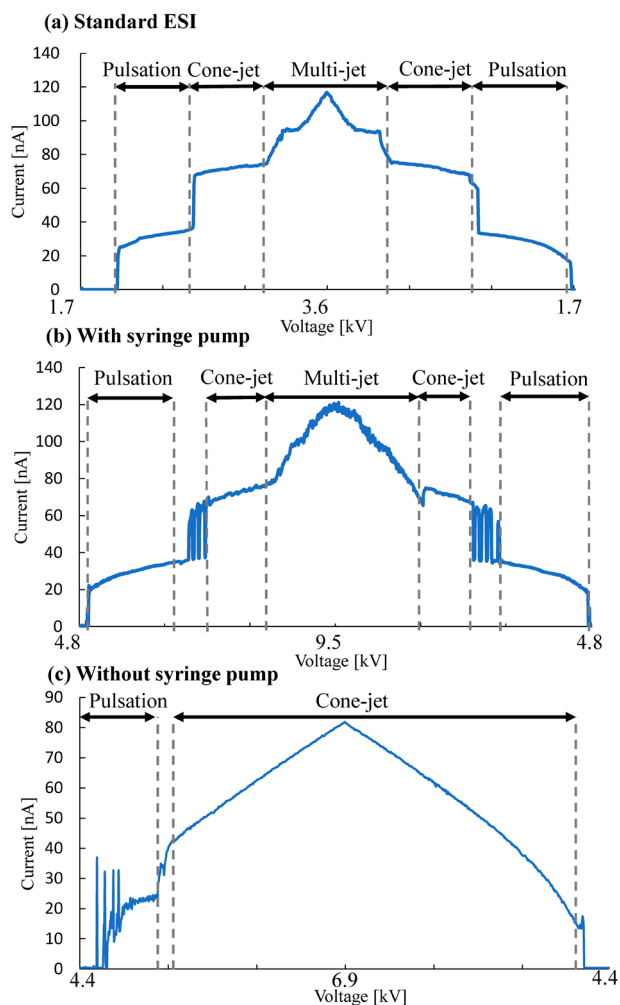


図4. スプレー電流と電圧の関係。試料は75%エタノール水溶液中に溶かした酢酸(0.1%)を使用した。
 (a) ステンレスキャピラリーを用いた従来のESI。
 (b) Online Bipolar。(c) Offline Bipolar。(a)と(b)のエミッターからの流量は5 $\mu\text{L}/\text{min}$ であった。

場合、スプレーの形状が安定しないPulsationモードとなるが、電圧が上昇するにつれスプレーが安定するCone-jetモードとなり、さらに電圧を上げることでジェットが複数本発生するMulti-jetモードへの変化が見られた。図4bはOnline Bipolarの結果である。T-unionに供給する総流量は10 μL に設定し、各エミッターの流量が均等になるように調整をした。Online Bipolarでも従来のESIと同様の電流-電圧 (I - V) 特性が見られたが、Cone-jetモードとPulsationモードの間に準安定状態が存在することが確認された。このとき、エミッターではCone-jetモードとPulsationモードを行き来するような挙動が見られた。準安定状態が生じる理由として、各エミッターにかかる電場が異なることや、Cone-jetモードになるための電圧の閾値が異なることが考えられる。図4cにOffline Bipolarの結果を示す。従来のESIやOnline Bipolarとは異なる I - V 特性が見られた。Cone-jetモードでもスプレー電流が上昇し続けたが、これは流量が電圧に応じて変化したためだと考えられる。

3.2 スプレー電流と流量の関係

従来のESIではスプレー電流が安定したCone-jetモード

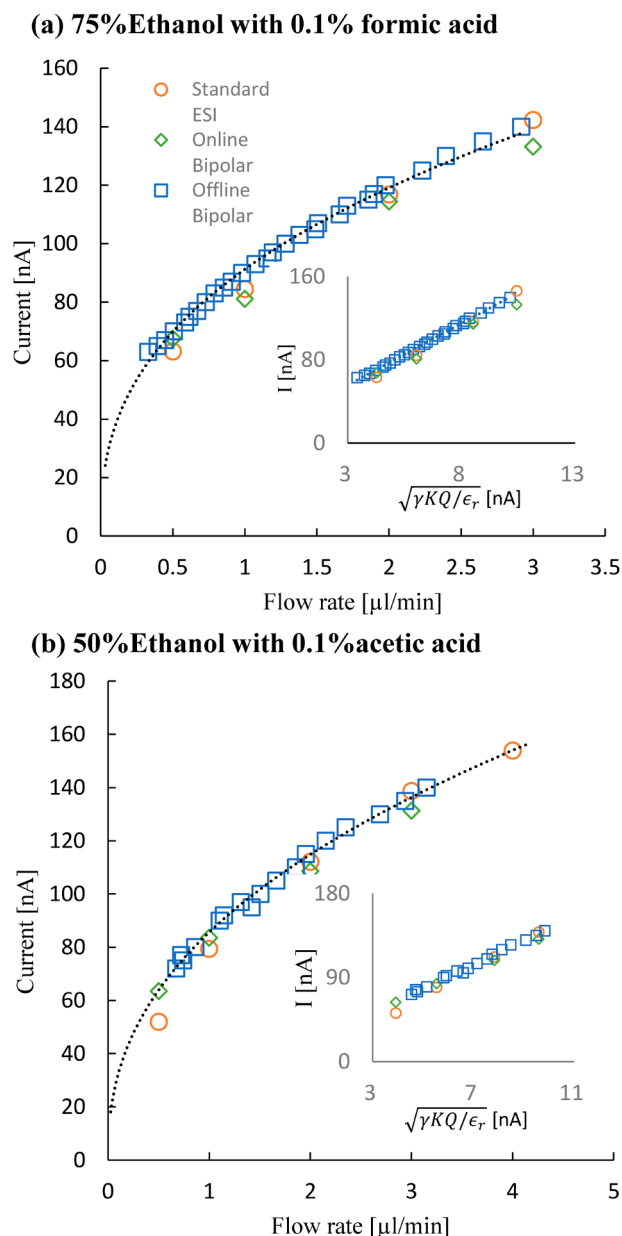


図5. スプレー電流と流量の関係性。
 (a) 75%エタノール水溶液中に溶かしたギ酸(0.1%) ($K=3.36 \text{ mS}/\text{m}$, $\gamma=24.4 \text{ mN}/\text{m}$, $\epsilon_r=38.7$).
 (b) 50%エタノール水溶液中に溶かした酢酸(0.1%) ($K=3.32 \text{ mS}/\text{m}$, $\gamma=29.6 \text{ mN}/\text{m}$, $\epsilon_r=53.4$).

において、スプレー電流 I と流量 Q の間で以下の式¹¹⁾が成り立つことが分かっている。

$$I = f(\epsilon_r) \left(\frac{\gamma K Q}{\epsilon_r} \right)^{1/2} \quad (1)$$

ここで γ は表面張力、 K は導電率、 ϵ_r は比誘電率、 $f(\epsilon_r)$ は ϵ_r に依存する係数である。両極性エレクトロスプレーにおいても式(1)が成り立つかを検証するために、表面張力と誘電率が異なる2種類の試料を用いて計測した結果を図5に示す。図5aは75%エタノール水溶液中に溶かしたギ酸(0.1%)を用いた場合、図5bが50%エタノール水溶液中に溶かした酢酸(0.1%)を用いた場合であり、丸がステンレスキャピラリーを用いた従来のESI、菱形がOnline

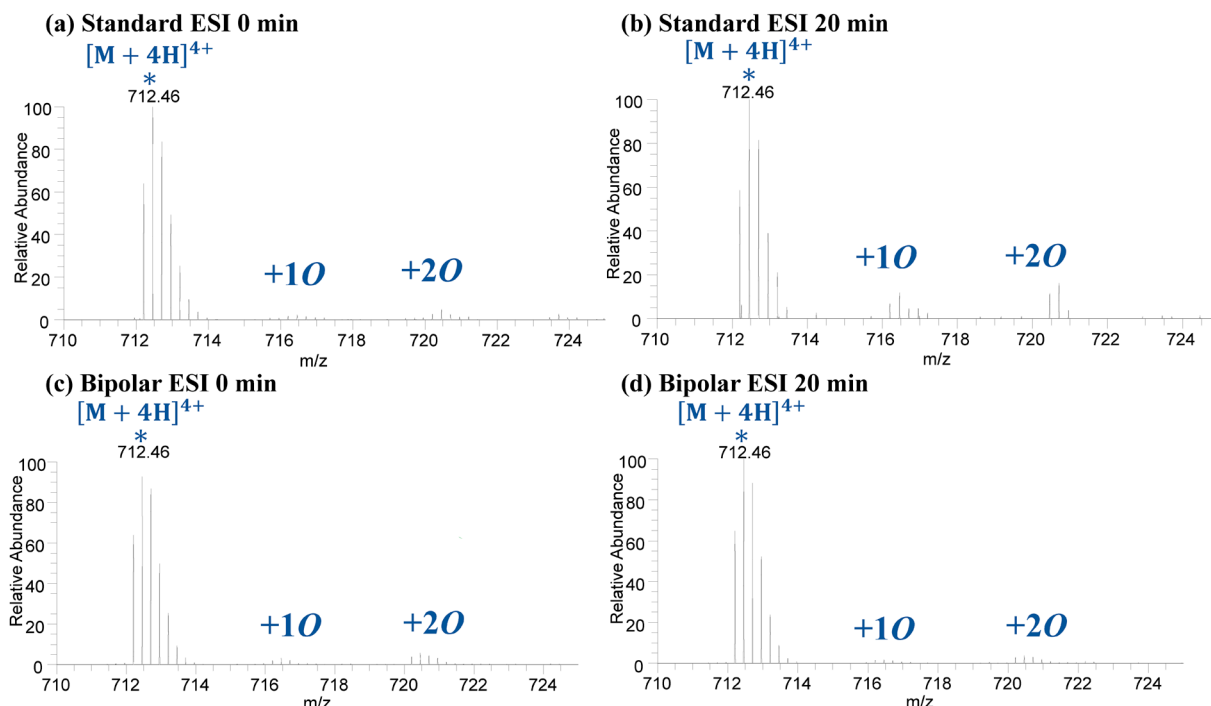


図6. 100 mM酢酸アンモニウム水溶液に溶かしたメリチン (10 μ M) のマスペクトル. 測定はCone-jetモードで行った. (a) 白金電極を用いた高圧下でのOffline ESI. (b) 20分後の白金電極を用いた高圧下でのOffline ESI. (c) 高圧下でのOffline Bipolar ESI. (d) 20分後の高圧下でのOffline Bipolar ESI. *は酸化していないイオン, nOは酸化種を示している. 電圧は (a), (b) は3.5 kV, (c), (d) は9 kVであった.

Bipolar, 四角がOffline Bipolarをそれぞれ示している. なお, 表面張力と比誘電率は文献値^{12), 13)}から引用した. どちらのグラフにおいても, I と $\sqrt{\gamma KQ/\epsilon_r}$ の間には線形性が見られたため, 両極性エレクトロスプレーは式(1)を満たすことがわかった.

3.3 マスペクトルの測定

ペプチドの一種であるメリチンには, トリプトファンやロイシンといった酸化されやすいアミノ酸を含んでおり, 電気化学反応による酸化に敏感であることが報告されている¹⁴⁾. そこで, 100 mM酢酸アンモニウム水溶液に溶かしたメリチン (10 μ M) でESIを行い, 電気化学反応による酸化の有無を観察した. 測定はコロナ放電を防ぐために約5気圧の高圧下で行った. 図6a, 6bは従来の方式でのESIの測定結果である. マイクロピペットチップに試料を充填し, 白金電極ワイヤーを挿入することでスプレーを発生させた. スプレー開始時と20分後のマスペクトルを比較すると, 酸化ピークが増加していることが確認できた. これは, 電気化学反応により溶液と電極の界面で発生した酸化物がスプレーされた結果だと考えられる. 図6c, 6dは同じ試料をOffline Bipolarで測定した結果である. スプレー開始直後と20分後を比較しても酸化ピークの増加は見られず, 一定の強度が保たれた. したがって, 両極性エレクトロスプレーはエミッター内の電気化学反応を防ぐことが確認できた.

3.4 多孔質材料を用いた両極性エレクトロスプレー

本研究室の目標のひとつとして, ハイスルーブットスクリーニングに向けた, 従来の送液キャピラリーを用いた手

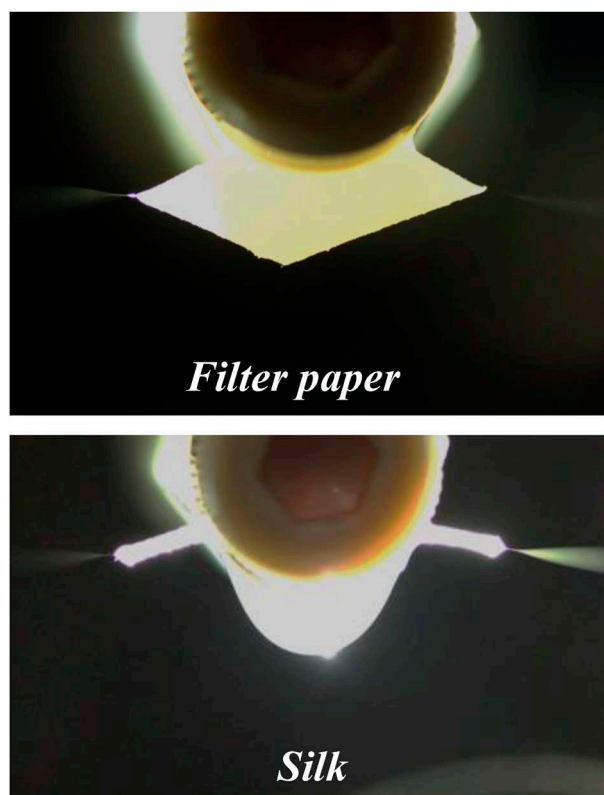


図7. 化学実験用ろ紙 (上) と絹糸 (下) を用いた両極性エレクトロスプレーの様子.

法よりも安価で簡易, コンパクトなエレクトロスプレーの開発がある. そこで注目したのが紙などの多孔質材料であり, 毛細管現象を利用することで送液ポンプを用いる必要

がなくなる。また先行研究として、紙をエレクトロスプレーエミッターとした Paper Spray Ionization がある¹⁵⁾。溶液を浸した紙に高電圧を印加することでイオンを発生させる手法であり、試料の導入が非常に容易である。両極性エレクトロスプレーにおいてもイオン化が可能なのではないかと考え、実験を行った。図7は化学実験用ろ紙と絹糸による両極性エレクトロスプレーの写真である。それぞれ50%エタノール水溶液を含ませ、両端に電極を設置することでスプレーを発生させた。両端の長さはどちらも1 cm程度であり、上部を挟んで固定した。他にも紙やすりやコットンでも同様の実験を行ったが、いずれもスプレーが可能であった。電気的特性の詳細は今後の検討課題である。

文 献

- 1) A. T. Blades, M. G. Ikononou, and P. Kebarle, *Anal. Chem.*, **63**(19), 2109–2114 (1991).
- 2) G. J. Van Berkel, K. G. Asano, and P. D. Schnier, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**(7), 853–862 (2001).
- 3) C. Maolin, D. C. Kelsey, *Anal. Chem.*, **79**(5), 2031–2036 (2007).
- 4) J. C. Severs, A. C. Harms, and R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**(10), 1175–1178 (1996).
- 5) K. Kim, P. D. Compton, T. K. Toby, P. M. Thomas, J. T. Wilkins, R. K. Mutharasan, and N. L. Kelleher, *EuPA Open Proteomics*, **8**, 40–47 (2015).
- 6) C. Lübbert and W. Peukert, *J. Mass Spectrom.*, **54**(4), 301–310 (2018).
- 7) J. Fernandez de la Mora, G. J. Van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, and J. B. Fenn, *J. Mass Spectrom.*, **35**(8), 939–952 (2000).
- 8) R. L. Grimm and J. L. Beauchamp, *J. Phys. Chem. B.*, **107**(51), 14161–14163 (2003).
- 9) R. L. Grimm and J. L. Beauchamp, *J. Phys. Chem. B.*, **109**(16), 8244–8250 (2005).
- 10) Z. Han, R. Komori, R. Suzuki, N. Omata, T. Matsuda, S. Hishida, T. Takiguchi, and L. C. Chen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **34**(4), 728–736 (2023).
- 11) J. Fernández De La Mora and I. G. Loscertales, *J. Fluid Mech.*, **260**, 155–184 (1994).
- 12) J. Wyman, *J. Am. Chem. Soc.*, **53**(9), 3292–3301 (1931).
- 13) G. Vazquez, E. Alvarez, and J. M. Navaza, *C. J. Chem. Eng. Data.*, **40**(3), 611–614 (1995).
- 14) J. Pei, X. Zhou, X. Wang, and G. Huang, *Anal. Chem.*, **87**(5), 2727–2733 (2015).
- 15) J. Liu, H. Wang, N. E. Manicke, J. Lin, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, *Anal. Chem.*, **82**(6), 2463–2471 (2010).

Commentary: Extended Abstract

Development of Bipolar Electrospray Ionization Sources without Electrochemical Reactions in the Emitter

Ryoki KOMORI, Riku SUZUKI, Zhongbao HAN, Lee Chuin CHEN
University of Yamanashi