

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05552

研究課題名(和文) 有機溶存物質のエアロミセル化・水マトリックス支援ソフトイオン化による直接質量分析

研究課題名(英文) Development of a new direct mass analysis technique for trace liquid organic matter by combining aeromicelle and water matrix assisted laser desorption and ionization mass spectrometry

研究代表者

古谷 浩志 (Furutani, Hiroshi)

大阪大学・科学機器リノベーション・工作支援センター・准教授

研究者番号：40536512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：界面活性剤を添加した水溶液試料を噴霧させると、表面が界面活性剤分子に被膜された液滴粒子が生成されエアロミセルが生成される。表面被覆のために内包する溶液成分の揮発が大きく抑制され真空中でも液滴粒子状態が保持される。このエアロミセル中の水を支援マトリックスとし、中赤外パルスレーザー光をレーザー脱離・イオン化に用いることで、水溶液中の微量有機物質を壊すことなくソフトにイオン化する水マトリックス支援中赤外レーザー脱離・イオン化質量分析法を、単一微粒子質量分析計(ATOFMS)をベースに開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エアロミセルは表面が界面活性分子によって被覆された液滴(エアロゾル)であるが、その表面被覆のために、真空中においても内包する液体成分の揮発が抑制され液滴状態が保持される。このエアロミセル化技術を活用することで、水溶液試料を液体状態のまま直接に質量分析計に導入でき、また直接に高感度の質量分析ができると期待される。また、本研究ではエアロミセル中の水をレーザー脱離・イオン化の支援マトリックスとして活用することによって、水溶液中の微量有機物質を壊すことなく高感度に直接質量分析できるようにもなり、“水”が関係する物質に関する質量分析の新しい分析法の1つとして活用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：When an aqueous solution sample containing a surfactant is sprayed, droplet particles whose surfaces are coated with surfactant molecules are generated and aeromicelles are formed. The surface coating greatly suppresses the volatilization of the solution components contained within, and the droplet particles are maintained in a droplet state even in a vacuum. Using the remained water in the aeromicelle as an assisting matrix for soft laser desorption and ionization, a novel direct liquid organic analysis technique (water matrix-assisted mid-infrared laser desorption/ionization mass spectrometry) has been developed based on a single particle mass spectrometer (ATOFMS).

研究分野：地球環境化学・質量分析・分析化学

キーワード：エアロミセル 微粒子 単一微粒子質量分析 ソフトイオン化 マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 水マトリックス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

河川水や地下水、降水や海水に含まれる環境汚染物質、尿や血液に含まれる代謝物や老廃物といった生化学物質や疾病マーカー物質、食品に含まれる残留農薬や食品添加物など、液体試料に含まれる有機成分物質の分析は、日常的に行われる化学分析の1つである。ごく微量しか存在しない場合が多いため、その分析には、高い検出感度を持つ「質量分析法」が広く用いられている。

例えば、生化学物質である代謝物質・たんぱく質、環境有機物質の質量分析では、有機分子を壊さずにイオン化（ソフトイオン化）させる必要があり、エレクトロスプレーイオン化を用いた質量分析法（ESI-MS）が広く用いられている。ルーチン的に得られる検出感度はフェムトモル程度（ $1\text{ fM} = 10^{-15}\text{ mol} = 6.02 \times 10^8\text{ molecules}$ ）であるため、物質量がフェムトモルに満たない物質は検出できない。すなわち、現在の生化学物質分析や環境物質分析は、フェムトモル程度の「測定できる有機物質だけを見ている」だけである。

ESI法など「液体試料の質量分析」では、まず大気圧条件下で目的有機物質をガス化・イオン化させ、続いてイオンを真空下にある質量分析部へ輸送・導入する—というアプローチが一般的である。しかし、これらの大気圧イオン化法では、①真空ポンプの排気能力の制約から、試料のごく一部や生成されたイオンのごく僅しか真空システムに導入できず、さらに、②大気圧（ 10^5 Pa ）から 10^4 Pa 程度の真空下にある質量分析部へイオンを輸送する過程でイオンロスが生じる。検出感度を大幅に向上させることは、これらの質量分析技術の根幹に関わる制約を解決する必要があり、容易ではない。「これまで見えなかった物質」を測定し、科学研究を更に発展させるには、これらの基本的制約を打ち破る「新機軸」が必要である。

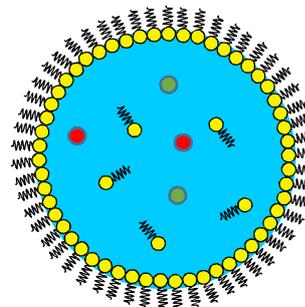


図1 エアロミセルの構造(予想図)。液滴粒子の表面を界面活性分子が被覆する逆ミセル構造を持つ。これを「エアロミセル」と呼称している。

2. 研究の目的

申請者の研究グループでは、質量分析計に「液体試料を全量・直接導入」する画期的な新手法として、真空中においても液体成分の揮発を大幅に抑制する「液体試料のエアロミセル化法」を開発した（液滴粒子と液滴粒子の生成方法および生成装置，特願 2018-20497）。

エアロミセルとは、その立体構造を実際に確認するには至っていないものの、本研究グループによる種々の実験の結果から、図1に示す「表面が界面活性剤で被覆された逆ミセル状構造をもった液滴粒子」であると考えられている。また申請者の研究グループによる実験から、(1)界面活性分子が、液滴粒子の表面を1-4分子層ほど被覆すると液滴粒子からの液体揮発が大幅に抑制され、(2)真空中でも少なくとも数秒間は消失しないこと、(3)セシウム（Cs）濃度が、わずか 10 nM （ $10 \times 10^{-9}\text{ mol/L}$ ）の水溶液から生成されたエアロミセルを、単一微粒子質量分析計（ATOFMS）で質量分析し、単一エアロミセル中のCsが検出できること、(4)その際、エアロミセル1個に含まれるCs量は、約 $5.2 \times 10^{-21}\text{ mol}$ （ 5.2 zM ：原子数約3100に対応、 zM はzeptomol）と推定され、「エアロミセル化による液体試料の直接導入・直接質量分析によって、zeptomol（ zM ）レベルの極微量物質を直接・連続的に測定できる」ことが示されている（嘉藤ら，第66回質量分析総合討論会，2018）。

本研究では、「液体試料を質量分析計に全量・直接導入」できる画期的なエアロミセル化技術を活用して、「有機溶存物質の直接・超高感度質量分析」を「エアロミセル化水マトリックス支援レーザー脱離・イオン化法」（AM-Water-MALDI: Aeromicelle-Water-Matrix Assisted Laser Desorption Ionization）を実現する。そのため、エアロミセルに含まれる多量の「水」を、レーザー脱離・イオン化（LDI: Laser Desorption/Ionization）の「支援マトリックス」として使い、単一微粒子質量分析計においてナノ秒中赤外パルスレーザー（波長 $2.7\text{-}3.1\text{ }\mu\text{m}$ ）を用いて、水分子（中赤外波長域に強い光吸収を持つ）を励起することで、有機分子を壊すことなくイオン化させ、高感度に検出する。

3. 研究の方法

「エアロミセル化による液体試料の直接導入」と、中赤外パルスレーザーを使った「水マトリックス支援レーザー脱離・ソフトイオン化」とを組み合わせ、液体試料中の極微量有機分子の直接導入・直接測定する新たなAM-Water-MALDI質量分析法を開発した。

これを実現するために、まずエアロミセルを生成させるための試料溶液噴霧装置（ $1\text{-}10\text{ }\mu\text{L/min}$ で試料溶液を送液）に関して、噴霧装置内部のデッドボリュームを極力減らし、短時間の洗浄だけで前試料のコンタミネーションを受けずに、迅速に次試料を噴霧できるシステムを開発した。また中赤外レーザーを単一微粒子質量分析計（ATOFMS）に組み込むために必要なATOFMSの改造を行い、レーザー導入光学系を介して安定的に中赤外レーザー光を質量分析部に導入できるようにした。続いて、開発したAM-Water-MALDI質量分析法を用いて有機化合物試料の測定を行った。

4. 研究成果

(1) エアロミセルの安定生成のための試料溶液噴霧装置の開発

まず、本研究の中核要素である「エアロミセル」を、安定的に発生させるための溶液噴霧装置を開発した。当初は、実験データの解析に非常によく単一粒径（単分散）のエアロミセルを発生させることを意図し、単一粒径の液滴粒子を発生させることが可能な振動オリフィスエアロゾル発生装置（VOAG）による液滴粒子発生を試みた。しかし、安定的に単一粒径の液滴粒子を発生できず、VOAG の修理あるいは調整が必要であることが分かった。VOAG は、既にメーカーで生産中止となっており、修理もできないため、VOAG による単一液滴粒子の発生は諦めた。

そこで、シリンジとシリンジポンプを使った従来の液滴粒子発生方法を改良することで、溶液試料の汚染を防ぎ、また安定的に液滴粒子を発生できる溶液試料噴霧システムを製作した。これまでの液滴粒子発生装置の大きな問題は、試料溶液のメモリー効果であった。エアロミセルを発生させる試料溶液には、界面活性剤を添加するが、界面活性剤の添加濃度が異なる試料溶液を続けて噴霧すると、前の試料溶液に含まれる界面活性剤が残留し、次の試料溶液でのエアロミセル生成に大きな影響を与えていた。溶液噴霧装置を 30 分以上フラッシュしても、前の試料溶液の影響が残ることもあり、意図した条件（界面活性剤濃度や試料物質濃度）でエアロミセルを安定に生成することが非常に難しかった。メモリー効果を生み出す原因として、シリンジと噴霧部とを繋げる長さ約 100 cm のテフロンチューブが考えられた。そこで、連結用チューブを省き、シリンジを直接に噴霧部に挿入する新しい溶液噴霧装置を開発した（図 2）。テストの結果、試料溶液ごとに専用シリンジを使うことで、メモリー効果を殆ど除去することができ、意図した条件で安定かつ簡便にエアロミセルを生成できるようになった。

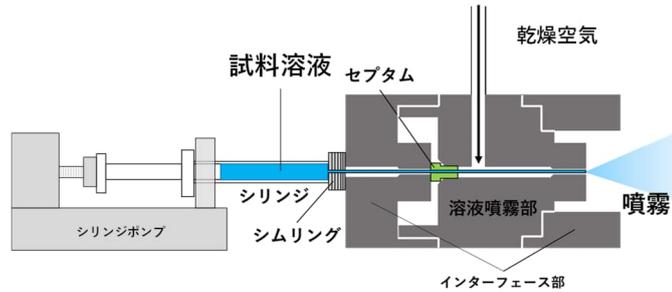


図 2 試料溶液のメモリー効果を低減し、意図した条件で安定にエアロミセルを発生させるために開発した溶液噴霧器。

(2) 中赤外パルスレーザーの単一微粒子質量分析計 (ATOFMS) への組込

近赤外パルスレーザーによるエアロミセルの揮発・イオン化（質量分析）を実現するため、所有する単一微粒子質量分析計（ATOFMS）を改造し、共同研究者が所有する近赤外パルスレーザー装置を組み込んだ。ATOFMS は、フィールド観測に用いることを念頭に設計・開発されており、容易に移動できるようゴム製タイヤ付きのフレームに、装置一式が組み込まれており、飛行時間型質量分析部 (TOF-MS) は、防振ゴムを介してフレームに静置されている。このようなフィールド観測を意識した防振対策のため、ATOFMS の TOF-MS 部はよく振動し、外部から正確に中赤外レーザーパルス光を導入することはできなかった。そこで、図 3 に示すように ATOFMS の TOF-MS 部を床面に静置したフレーム上に固定し、そのフレームに中赤外パルスレーザー装置を設置することとした。ATOFMS に元来用いられている紫外パルスレーザーもテスト実験に使用できるよう、中赤外パルスレーザーは紫外パルスレーザー光とは反対の面より TOF-MS に導入する光学系とした（図 4）。

続いて中赤外パルスレーザーを用いた単一微粒子質量分析を試みた。単一微粒子質量分析計では、質量分析計に導入された微粒子 1 つずつにパルスレーザーを照射し、質量分析を行っている。この微粒子は、粒径に応じて異なる飛行速度（100-200 m/s）で質量分析計内を飛行し、またランダムに質量分析部に飛来する。そのため、微粒子 1 個ずつに対して、飛来のタイミングに同期したパルスレーザー発振・照射が必要であり、ATOFMS は専用のタイミング制御回路を持っている。しかし、中赤外パルスレーザーのレーザー発振シーケンスは従来の紫外パルスレーザーとは大きく異なっていることが分かり、タイミング制御回路をそのまま利用できないことが判明した。そのため、様々なレーザー発振同期方法を試し、質量分析を試みた。

中赤外レーザーを 20 Hz で自由発振させる、励起フラッシュラン

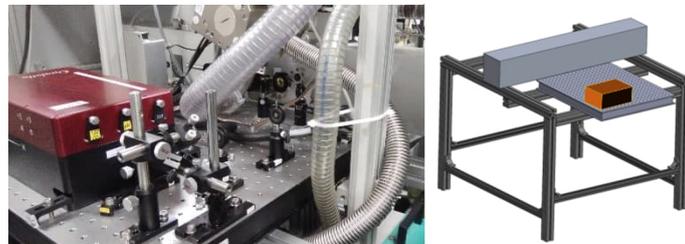


図 3 中赤外パルスレーザーを単一微粒子質量分析計 (ATOFMS) に組み込むための改造と実際のレーザーや光学系の配置。

は自由発振させ、パルスレーザー発振はエアロミセルに同期して行うを試みたが、単一エアロミセルの質量分析はできなかった。後者の場合には低レーザー強度しか得られていなかったため、十分なレーザー光強度を得られるよう、推奨されたレーザー発振シーケンスに固定し、そのシーケンスを維持したまま、最も測定個数が多い特定粒径（粒径 400 nm）のエアロミセルだけを対象に質量分析を行った。しかし、中赤外パルスレーザー照射だけでは質量スペクトルは得られなかった。

そこで、単一エアロミセルから質量スペクトルが得られている紫外パルスレーザーをアシストとして用い、同時に中赤外パルスレーザーを照射し、同中赤外パルスレーザー光照射の効果について測定してみた。エアロミセルは L-チロシン ($C_9H_{11}NO_3$, Mw: 181.19 g/mol) と界面活性剤をそれぞれ 100 μ M 添加した水溶液試料を噴霧・乾燥させて生成した。すると、中赤外レーザーパルスの同時照射によって、添加した L-チロシン由来のイオンピーク強度 (m/z 107・ m/z 165) が増強されていた (図 5)。これは、中赤外パルスレーザー光もエアロミセルに照射されていることが示すものであった。また、中赤外パルスレーザー単独照射だけでは質量スペクトルが得られていない理由が、レーザー装置の不具合やレーザー光照射光学系の不整合ではないことを示すものであった。

中赤外パルスレーザー単独での照射で質量スペクトルが得られない原因を検討した。中赤外パルスレーザーは質量分析部において 0.8 mm x 1.8 mm の楕円形状 (面積 4.5 mm²) に集光されていた。同部分でのレーザーフルエンス (単位面積当たりのレーザー光強度) を試算すると 0.1 J/cm² であった。水をマトリックスとした質量分析などの先行研究を調べてみると、中赤外パルスレーザー照射によってイオン生成が生起するレーザーフルエンスには“しきい値”があり、それが 0.1 J/cm² 以上であることが判明した。そのため、本研究において中赤外パルスレーザー照射だけではエアロミセルから質量スペクトルが得られない原因として、同パルスレーザー光の強度不足が原因であることが推定された。

中赤外パルスレーザーは、最大出力で運用しているため、これ以上レーザー光強度を大きくすることはできない。そのため、レーザーフルエンスを高めるためには、質量分析部内でのレーザースポット径を更に小さくする必要がある。レーザースポット径を更に小さくするためには、レーザー光の集光光学系において、現在よりも大きな開口径 (NA) でレーザー光を集光する必要がある。それには、中赤外パルスレーザー光のビーム径を一旦大きくした後に集光する一などのレーザー光集光光学系の改修が必要である。このようなレーザー集光光学系の改修を次の研究ステップにおいて行い、中赤外パルスレーザーの単独照射による質量分析や水マトリックス支援レーザー脱離・イオン化質量分析を実現していく予定である。

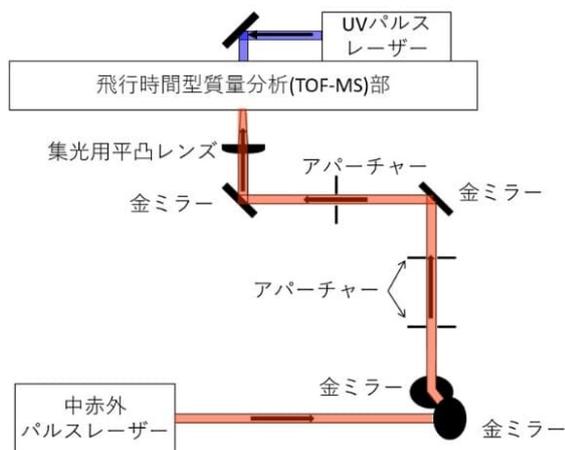


図 4 中赤外パルスレーザーと紫外パルスレーザーの両方を組み込んだ単一微粒子質量分析計 (ATOFS) の概要。

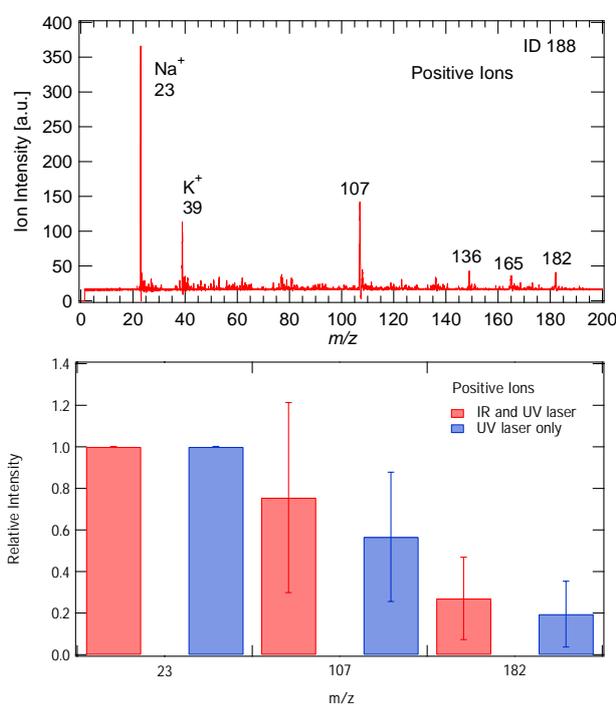


図 5 中赤外パルスレーザーと紫外パルスレーザーの同時照射によって単一のエアロミセルから得られた正イオン質量スペクトル (上)。Na⁺ (m/z 23) のイオンピーク強度で規格化した L-チロシン由来のイオンピーク強度 (m/z 107・ m/z 182) の中赤外パルスレーザー同時照射による効果。エアロミセルは 100 mM の L-チロシンと界面活性剤を添加した水溶液を噴霧・乾燥させて生成。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furutani Hiroshi, Kato Kana, Hinoue Teruo, Kimoto Takashi, Toyoda Michisato	4. 巻 260
2. 論文標題 Aeromicelle? A new form of liquid aerosol for delivering aqueous samples into a single-particle mass spectrometer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 124616 ~ 124616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.talanta.2023.124616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	豊田 岐聡 (Toyoda Michisato) (80283828)	大阪大学・大学院理学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	間 久直 (Hazama Hisanao) (70437375)	大阪大学・大学院工学研究科・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------