

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 6日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21750079

研究課題名（和文） 表面プラズモン励起を利用した新規超高感度非解離レーザー脱離イオン化質量分析

研究課題名（英文） New non-destructive laser desorption/ionization mass spectrometry with ultra high sensitivity by using surface plasmon excitation

研究代表者

芝本 幸平 (Shibamoto Kohei)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：50457834

研究成果の概要（和文）：本研究課題において、申請者は自ら開発した金ナノ微粒子表面に誘起される表面プラズモン励起に基づく増強効果を利用した新規超高感度非解離レーザー脱離イオン化質量分析法の脱離イオン化機構の解明を進めた。その結果、電磁場増強効果、電荷移動効果、熱の局所化効果といった脱離イオン化機構に関連する効果の分離抽出に成功した。更にその得られた知見を活かし、本法を更にバックグラウンドフリー化させた高性能化に成功した。

研究成果の概要（英文）： In this project, I had carried out understanding of desorption/ionization mechanism of our new non-destructive laser desorption/ionization mass spectrometry with ultra high sensitivity by using surface plasmon excitation, and then succeeded in abstraction of main three effects related to the mechanism, which are electromagnetic enhancement effect, charge transfer effect and localized heat effect. Further, by using obtained many findings, I succeeded in improvement of our method with background free analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：表面プラズモン、レーザー、イオン化法、金ナノ微粒子、超高感度

1. 研究開始当初の背景

申請者は、2005年にSP励起を用いた超高感度レーザー脱離イオン化質量分析法（SP-LDI法）を開発し、この手法を用いて色素分子を数100（数万個程度）zeptomoleの極微量検出に成功した。現在、この検出限界は世界最高水準である。以下に申請者が、SP-LDI法を開発するに至った研究動機とその研究背

景を述べる。

マトリクス支援LDI法（MALDI法）は、従来の手法では非常に同定が困難であったたんぱく質や生体関連物質などの巨大分子に対して飛躍的に同定能力が向上したため、それらの分子の分析技術として圧倒的な地位を築いてきた[Tanaka et al., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1988]。しかし一方で、分子量が500以下となる低質量数領域にターゲ

ット分子が含まれる場合、このMALDI法では大過剰に添加するマトリクス分子自身が強いバックグラウンドピークとして検出されてしまうため、その高い分析性能を著しく低下させてしまう。この低質量数領域には学術的だけではなく、医学、バイオ、環境学など様々な分野において同定分析が期待されている重要な分子の多くが含まれるため、これらの分子に対して高い同定分析能を持つ手法の開発が求められている。

この問題を解決するために、マトリクス分子を用いずに様々な表面の吸収を利用する表面支援LDI (SALDI)法が開発されてきた。しかしながら、これらのSALDI法では低質量数領域のバックグラウンドピークの低減により同定能力は向上したが、絶対的な感度不足という問題が生じた。以上の背景から、申請者はSALDI法において飛躍的な感度の向上を目指す動機を得た。

そこでまず申請者は、SALDI法の本質がどこにあるのかという観点から、SALDI法におけるイオン化プロセスを次頁の図のように細分化した。従来のSALDI法の研究では、レーザーエネルギーをイオン化基板にどれだけ蓄えられるか？が議論の中心であったが、申請者はさらに踏み込み、蓄えられたエネルギーが実際に試料分子へ移動する際のエネルギー形態と試料分子の受け取り方という新しい観点を独自に付け加えた。

まず、試料分子へ供給されるエネルギー形態に着目した。従来法で議論される熱は非常に重要なエネルギー源であるが、申請者はよりイオン化に直結し、単一分子にダイレクトに高効率なエネルギー供給が期待されるSP励起に基づく電荷の相互作用に初めて着目した。この着眼が本研究の最大の特色であり、独創性である。SP励起とは、ナノ構造を有する金属表面などにレーザーが照射されるとその表面には非常に高密度な励起電子が局在化する現象である。

さらに申請者は、試料分子がどのような状態であれば効率的にエネルギーを試料分子が受け取れるかに着目した。従来法のSALDI法で一般的に試料調整法として用いられている滴下乾燥法では、基板に厚く塗布される。しかし実際にイオン化基板表面に発生する効果(熱、電場、電荷の相互作用)は、表面一層から長くても光の波長程度の距離にまでしか作用しないため、この距離の意識が重要であると考え、実際にその距離の重要性を示してきた。このような議論自体が、LDI研究においては皆無であり、非常に独創性の高い着眼点である。

2. 研究の目的

(1) SP励起に基づくイオン化機構を詳

細に追跡する。

(2) SP-LDI法の分析性能の向上と実試料への展開に関する基礎検討を行う。

3. 研究の方法

(1) SP励起に基づくイオン化機構の詳細な追跡

SP励起が誘起された表面からその表面に接触する試料分子へのエネルギー移動にかかわる要素を可能な限り抽出し、それぞれの要素とイオン化機構との関連性を議論する。この議論により、SP励起に基づくイオン化機構が明らかにされるものと期待される。

① SP励起に由来する試料分子へのエネルギー供給形態の洗い出し。

本申請課題では、金属ナノ微粒子をSP励起種として利用する。この現象は様々な分野で応用されているが、主にこの局在化された高密度励起電子が作る増強電場(EM)効果とその励起電子自身が作用する電荷移動

(CT)効果、さらにそれらの複合効果が議論されている。一方で、LDI法でも議論されているレーザー吸収体から生じる熱エネルギー(Heat)効果も議論すべきである。現段階で議論されるこの3つのエネルギー形態と、更に議論すべき新たなエネルギー形態の探索も行う。各エネルギー形態が顕著になる実験系の設計を行う。

② CT効果の抽出

CT効果は、SP励起種(金属ナノ微粒子)表面に直接吸着する分子にのみ作用するため、試料を単層膜に吸着させる。CT効果の大きさは吸着種、吸着状態、SP励起種などにより変化するが、申請者のSERS研究をはじめ様々な研究報告例と質量分析測定(マスペクトル)結果とを慎重に比較しながら、CT効果がマスペクトルパターンに与える影響(感度、非解離性など同定能力に反映される要素)を抽出していく。

③ EM効果の抽出

EM効果はCT効果と比較して、その効果が届く距離は非常に長い。本実験系では金属ナノ微粒子を用いるが、この場合ではその粒子径程度までEM効果は作用する。そこで、右図のように試料分子とSP励起種の間絶縁性のスペーサーを導入し、CT効果を遮蔽する。EM効果は、SP励起種や励起効率により変化するが、前項と同じくマスペクトルパターンとの比較から、この効果の与える影響を抽出していく。

④ Heat効果の抽出

レーザーを照射するため、熱による影響は必ず生じる。そのため本実験系では、熱の寄与の大きさを変化させる。SP励起は金属表面の吸収に起因するが、実際にレーザー光の吸収はSP励起としての吸収と通常のパル

クの吸収の総和となる。バルクの吸収は金属種に依存するが、SP励起による吸収は金属種の形状に依存する。本実験系では、金属ナノ微粒子の粒子径を変化させることにより、二つの吸収の比率を制御する。その比率とマスペクトルパターンからこの熱の与える影響を抽出していく。

⑤ その他のエネルギー形態の探索

前項②③④より得られた知見から、各効果の寄与を重ね合わせていく。理論的に予測される結果と実験結果の整合性を検証することにより、その他のエネルギー形態の議論の必要性を検討する。

⑥ 前項(②-⑤の項)の議論を可能とする高再現性基板の作製

現在、申請者は金属ナノ微粒子を2次元最密充填に配列させたイオン化基板の作製に成功しているが、基板ごとの充填率にはまだばらつきがある。本項では、現象を理解するためにはもっと均一な秩序構造を持ったイオン化基板が必要と考え、申請者の保有する技術の高度化を行う。

⑦ 各効果のイオン化への寄与の追跡

イオン化機構を議論するために、各効果のマスペクトルへの影響をまとめ、イオン化に直結する効果とそれぞれの寄与率を体系的に整理する。このような整理を照射するレーザーのフルエンス (mJ/cm^2) ごとに行い、データベース化する。

これらの結果から、各効果が与える影響の中で、感度(イオン量)、同定能(試料分子の解離)などの分析性能を決定付ける各要素に対して、メリットとなるのか、デメリットとなるのか、あるいはほとんど寄与しないのかを明らかにする。さらに、イオン化して検出するためには、試料分子は「脱離」あるいは「イオン化」のプロセスが必要であるが、それぞれのプロセスに対しての寄与も追跡する。

(2) SP-LDI法の分析性能の向上と実試料への展開

イオン化機構に対して得られた知見から、対象とする試料系が求める分析性能を作り出すためにイオン化基板を設計する。

① 試料分子の立場からSP-LDI法の分析性能の向上

EM効果やHeat効果に関しては、それらの効果が届く距離と同じ厚さを持つ薄膜状の試料を基準として、厚みを変えた試料を測定することにより、最適な厚みを検証することが可能となる。一方で、CT効果に関しては、表面第一層のみしか作用しないが、その作用は吸着状態により大きく左右される。申請者は申請前にその知見を得てはいるが、CT効果に対して最適な吸着状態を決定しているとは言いがたい。(新しい効果があれば、その効果に応じた塗布方法も模索する。)

従って、本項目では、それぞれの効果についておぼろげに見えてきている効果的な試料塗布方法を、それぞれさらに効果的な手法に昇華させるとともに、これらの効果が複合的に与えられる試料塗布方法を模索する。更に、各効果の寄与のバランスを制御することにより、様々な試料種に対応できるようにする。

② SP励起を誘起する基板の立場からSP-LDI法の分析性能の向上

試料の塗布方法と同様にSP励起を誘起するイオン化基板も、それぞれの効果を効率的に引き出せるように、2次元最密充填基板を高性能化する。具体的には、金属ナノ微粒子間の距離、配列パターン、金属ナノ微粒子の形状およびサイズ、というパラメータを制御することにより、各効果のバランスを制御する。この制御により、目的試料種ごとの効率的な脱離イオン化が期待される。

③ 実試料への応用展開のための基礎検討

実試料へ応用展開するためには、様々な分子に対して高い検出能を示すことが必要である。特に、実試料の同定分析を行うにあたっては、非常に少ない量を構造を壊すことなくイオン化することが必要となってくる。前項にまでに、様々なモデル試料分子種に対して超高感度非解離イオン化への可能性を探ってきたが、モデル試料と実試料においては現実的には様々な障害が存在する。その最も大きなものは、複合系への対応である。単一成分子のモデル試料で、出来ることが複合系で出来るとは限らない。本項では、その障害を知り、その対応を検討するという最後のつめにむけての基礎検討を様々な観点から議論する。

4. 研究成果

H21

本年度は、SP励起に基づく脱離イオン化機構に関わる要素(CT、EM、Heat効果)の抽出を試みた。まず、CT効果の抽出には、申請者が他の研究からCT効果の大きさを見積もった色素分子を測定試料としてLDI-MSを行った。得られた各色素分子のイオン信号強度は見積もったCT効果の大きさと正の相関を持ち、CT効果の寄与を明らかにした。

次に、金ナノ微粒子表面にスパーサーとしてアルカンチオールを修飾し、CT効果を遮断した。上記と同様の実験を行った結果、各色素分子のイオン信号が強く得られた上、その信号強度はアルカンチオールの分子長(金属表面からの距離)に強く相関があった。これはEM効果のみでも強い寄与があることを意味する。一方で、試料分子の解離性に関しては、金属表面に近接するほど大きくEM効果のみでは実用性に乏しいことも示唆された。

更に詳細に距離依存性を信号強度および解離性から検討したところ、金属表面からの生じる電子衝突も関与していたことが示唆された。これは上記の CT 効果と異なり、高いエネルギーを持ったエネルギー供給であり、実用性にはその抑制も検討すべきである。一方、本手法の脱離イオン化機構における Heat 効果の役割を議論するため、SP 効果の大きさを一定にする必要がある。そこで、粒子径が異なる 2 種類の金ナノ微粒子を用いて、マススペクトルのレーザーフルエンス依存性を比較した。その結果、供給される熱量の大きさが脱離イオン量に関連性があった。更に詳細にするために、熱供給に鋭敏に反映されるイオン性分子を測定した結果、SP 励起に起因する Heat 効果により脱離量が著しく増大した。以上から、本手法の脱離イオン化機構において Heat 効果は脱離機構に対して重要な役割を担っていることを示した。以上の成果は、SP 励起に基づく脱離イオン化機構を理解する上で重要な知見となりうることを期待される。

H22

昨年度に引き続き本年度も、SP 励起に基づく脱離イオン化機構に関わる要素 (CT、EM、Heat 効果) の抽出を試みた。まず、CT 効果の抽出のために、申請者が以前の研究から CT 効果の大きさを見積もった色素分子を効率的に CT 効果が誘起できる第二光源を測定装置に導入し、2 光波レーザー脱離イオン化質量分析を行った。その結果、第二光源の波長と脱離イオン量には大きな依存性が見られ、CT 効果が誘起出来ないような波長においては変化がなく、強く誘起する波長では信号が大きく増大していた。第二光源は試料分子がレーザーエネルギーを吸収しても脱離しない程度の光量を有する連続波レーザーであるため、本結果で得られた CT 効果と脱離イオン量との強い相関は、その脱離イオン化機構を解明する上で大きな知見となった。

次に、金ナノ微粒子表面にスペーサーとしてアルカンチオールを修飾し、CT 効果を遮断した上で脱離機構を抽出するための試料設計を行った。その結果、アルカンチオールのより直接的な金表面との接触が遮断されている試料分子の検出に成功した。これはアルカンチオールが脱離補助剤として脱離することにより試料分子を過剰なエネルギー供給することなく脱離することができたことと考えられる。この結果から、脱離機構を解明する上で大きな知見を得た。また、金表面に直接化学結合しているアルカンチオールの検出にも成功しており、この検出は従来法では非常に困難であるため、本課題で提案する手法の応用開拓にも非常に優れた結果となった。

H23

本年度は、表面プラズモン (SP) 励起による超高感度レーザー脱離イオン化質量分析 (LDI-MS) 法の素過程抽出により得られた知見を活かして、応用的な試みを行った。

その結果、金ナノ微粒子 (AuNP) の表面に誘起されるこの SP 励起がその表面のみを選択的にアブレーションさせ、その飛散物が脱離剤として作用することで、表面に吸着している試料分子を非解離に脱離イオン化させる新しい表面支援 LDI-MS (SALDI-MS) 分析法として昇華させることに成功した。この手法において最も特筆すべきは、AuNP 表面のみをアブレーションさせることであり、この場合検出される試料分子以外の信号は、金クラスターイオンのみである。従来のマトリクス支援 LDI-MS (MALDI-MS) 法では、脱離イオン化を補助するマトリクスは有機分子であり、これが同時に多量の阻害ピークとして検出されることで解析が複雑化するが、本法では全くその心配がない。

更に本法では、AuNP 表面にアルカンチオールを化学結合させ、MALDI-MS 法におけるマトリクス分子の役割を付与させ、効率的な脱離イオン化を目指した。本法において重要な結果は、アルカンチオールが結合した金クラスターは負イオンモードで検出されるが、試料分子は正イオンモードで検出されるため、正イオンモードではバックグラウンドフリーで試料の測定が可能となった。

以上の成果は、SP 励起に基づく脱離イオン化機構の理解が本研究課題により進んだことにより、発展的に新しい分析法へと昇華できたことを意味し、その結果、非常に高い同定分析法の確立への大きな可能性を見出せたと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① K. Shibamoto, K. Sakata, K. Nagoshi and T. Korenaga “Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry by Using Surface Plasmon Excitation on Gold Nanoparticle” *J. Phys. Chem. C* **2009** 113 17774-17779
- ② Keishiro Nagoshi, Kazuhiro Sakata, Kohei Shibamoto and Takashi Korenaga “Ionization Mechanism in Surface Plasmon Enhanced Laser Desorption / Ionization” *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **7** (2009) 93-96

[学会発表] (計19件)

国際学会 (ポスター)

- ① Takayuki Matsuoka, Kohei Shibamoto, Tatsuya Fujino, Takashi Korenaga “Study on resonantly-excited state of Crystal Violet molecule adsorbed on gold nanoparticle surface by using LDI mass spectrometry with pulse and CW double laser system” 2010 *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii*, 15-20 December 2010
- ② Keishiro Nagoshi, Kohei Shibamoto, Tatsuya Fujino, Takashi Korenaga “Detection of alkanethiol-gold complex anions desorbed from chemically-modified gold nanoparticle surface by using LDI-MS” 2010 *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii*, 15-20 December 2010
- ③ Keishiro Nagoshi, Kohei Shibamoto, Tatsuya Fujino, Takashi Korenaga, “Approach for Characterization of Surface Reaction on Alkanethiol Molecules Chemisorbed on Gold Nanoparticles by Using Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry” ICAS2011 (International Congress on Analytical Science 2011), Kyoto, May 22-26 2011
- ④ Kohei Shibamoto, Takayuki Matsuoka, Takashi Korenaga “Detection Behavior of Resonantly-excited Adsorbed Molecules on Gold Nanoparticle Surface in Two-laser Desorption Ionization Mass Spectrometry” ICAS2011 (International Congress on Analytical Science 2011), Kyoto, May 22-26 2011

国内学会 (口頭)

- ⑤ 芝本幸平、名越慶士郎、松岡隆之、伊永隆史 “無機ナノ微粒子の特異的な光応答性が与えるレーザー脱離イオン化機構への影響評価” 日本分析化学会 第70回分析化学討論会、和歌山大学、2009年5月17日
- ⑥ 松岡隆之、芝本幸平、伊永隆史 “微弱光源により共鳴励起された試料分子の状態を評価するレーザー脱離イオン化質量分析法” 日本分析化学会 第58年会、北海道大学、2009年9月24日
- ⑦ 名越慶士郎、芝本幸平、伊永隆史 “金ナノ微粒子2次元アレイ構造体基板を利用したレーザー脱離イオン化質量分析法の応用” 日本分析化学会 第58年会、

北海道大学、2009年9月25日

- ⑧ 名越慶士郎、芝本幸平、伊永隆史、「表面修飾金属ナノ微粒子のLDI-MSにおけるmetal-thiol クラスタライオンの検出挙動と表面プラズモン励起との関連」、第78回分析化学討論会 島根 2010/5/16
- ⑨ 松岡隆之、芝本幸平、伊永隆史、「レーザー脱離イオン化質量分析法における金ナノ微粒子表面吸着種の検出挙動と共鳴励起状態との相関」、第78回分析化学討論会 島根 2010/5/16
- ⑩ 松岡隆之、芝本幸平、藤野竜也、伊永隆史、「共鳴励起された金ナノ微粒子表面吸着種の状態を評価する2光波レーザー脱離イオン化質量分析法」、日本分析化学会 第59年会 仙台 2010/9/16
- ⑪ 名越慶士郎、芝本幸平、伊永隆史、「Approach for Characterization of Surface Reaction on Alkanethiol Molecules Chemisorbed on Gold Nanoparticles by using Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry」、JAIMA discussion on Analytical Science and Technology 幕張 (千葉) 2011/9/17

国内学会 (ポスター)

- ⑫ 名越慶士郎、芝本幸平、伊永隆史 “金ナノ微粒子上に誘起される表面プラズモン励起を利用したSALDI法における増強電磁場の寄与” 日本質量分析学会 第57回質量分析総合討論会、大阪市、2009年5月14日
- ⑬ 松岡隆之、芝本幸平、伊永隆史 “表面プラズモン励起を利用したレーザー脱離イオン化法の脱離イオン化機構における熱の影響” 日本質量分析学会 第57回質量分析総合討論会、大阪市、2009年5月15日
- ⑭ 名越慶士郎、芝本幸平、伊永隆史、「金ナノ微粒子を表面修飾するアルカンチオールのSALDI-MS検出」、第58回質量分析総合討論会 つくば 2010/6/16
- ⑮ 名越慶士郎、芝本幸平、藤野竜也、伊永隆史、「アルカンチオール修飾金属ナノ微粒子表面を用いた新しいレーザー脱離イオン化質量分析法」、日本分析化学会 第59年会 仙台 2010/9/16

招待講演

- ⑯ 芝本幸平 “生体分子研究の未来とそれを可能にするMS” 日本質量分析学会 BMS研究会、第36回BMSコンファレンス、高知市、2009年7月5-6日
- ⑰ 芝本幸平、名越慶士郎、藤田隆史、松岡隆之、清水伸幸、古屋大輔、伊永隆史 「レーザー照射方法とイオン化基板開発の立場からのレーザー脱離イオン化法の分析性能向上へのアプローチ」、第58回質量

- 分析総合討論会 つくば 2010/6/16
- ⑱ 芝本幸平「機能性ナノ微粒子薄膜の作製とその応用」ナノテク部会第39回研究会 東京 2010/11/8
- ⑲ 芝本幸平「特異的な光応答性を持つ微粒子で作製した機能性薄膜を用いた表面支援レーザー脱離イオン化法」日本質量分析学会 春季シンポジウム 「最先端質量分析研究の未来と戦略」 東京虎ノ門 2011年5月19日

〔図書〕(計2件)

- ① 春田正毅監修、新材料・新素材シリーズ「金ナノテクノロジー—その基礎と応用— (Gold Nanotechnology: Fundamentals and Applications)」、シーエムシー出版、第22章 283~293 (2009)
- ② 山田淳監修、新材料・新素材シリーズ「プラズモンナノ材料の最新技術 (Latest Trends in Plasmonic Nanomaterials)」、シーエムシー出版、第5章計測・センシング応用技術 質量分析への応用展開 204~213 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：金属ナノ微粒子表面の有機分子の解析方法

発明者：芝本幸平、名越慶太郎、伊永隆史

権利者：芝本幸平、伊永隆史

種類：特許出願

番号：特願 2009-205617

出願年月日：平成 21 年 9 月

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝本 幸平 (Shibamoto Kohei)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：50457834