

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22350040

研究課題名(和文) ナノ粒子の集積体表面を利用した新規な大気圧レーザー脱離ソフトイオン化法の開発

研究課題名(英文) Development of atmospheric-pressure laser desorption/ionization technique using nano particles and nanostructural surfaces

研究代表者

荒川 隆一 (ARAKAWA, Ryuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00127177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円、(間接経費) 3,510,000円

研究成果の概要(和文)：金属ナノ粒子を利用した表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)は、低分子量域(<500 Da)に妨害イオンがなく良好なスペクトルが得られる。本研究の目的は、低分子量の化合物を簡便に質量分析(MS)するための新しい“大気圧(AP)”-SALDIの開発である。新規に創製したナノ粒子構造体を用いてAP-SALDIのイオン化の特性を調べたが、AP-SALDIはソフトなイオン化であるが検出感度は低かった。SALDIの新規技術として、1) 局在表面プラズモン共鳴とSALDI-MSを結合した分子同定法、2) 磁性ナノ粒子によるアフィニティーSALDI-MS、3) Pt蒸着によるMSイメージングを開発した。

研究成果の概要(英文)：Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) using nanoparticles and nanostructured surfaces, as compared to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using organic matrices, affords low-noise background (<500 Da). In this study, new atmospheric pressure(AP)-SALDI-MS was developed to achieve easily high-throughput analysis for low molecular weight compounds such as pollutants in environment, pharmaceutical products, and industry materials. Novel nanostructured surfaces and nanoparticle aggregates were designed to study effectiveness on AP-SALDI. The ionization mechanism of AP-SALDI is elucidated, compared with vacuum-SALDI. We could propose three new MS applications; 1) a complementary analytical methodology combining localized surface plasmon resonance (LSPR) sensing with SALDI-MS, 2) affinity SALDI-MS using magnetic nanoparticle, and 3) platinum vapor deposition SALDI-MS imaging for small molecules.

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：ナノ粒子 レーザー脱離イオン化 SALDI-MS アフィニティーSALDI-MS MSイメージング 局在表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)は、生命科学における高分子化合物を測定するための基盤技術として広く利用されている。しかし、MALDI 法ではレーザー光を吸収するための有機マトリックス分子を必要とするので、それに由来するクラスターイオンが低分子量域に強く観測される。そのために、我々がターゲットにしている分子量が 500 以下の環境汚染物質、医薬品、食品・工業材料の添加剤などの分析が困難となっている。したがって、マトリックスを用いない表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)は、低分子量域の妨害イオンが観測されず、MALDI に比べて定量性に優れている。さらに、重要なことはマトリックスを用いないことで、ハイスループット分析が実現できることである。

研究代表者は、質量分析化学が専門領域である。この数年間、金属ナノ粒子を利用した SALDI イオン化過程の解明および有機低分子の高感度分析への展開をはかってきた。一方、分担者の川崎は、自己集合体を銻型構造(反応場)に用いた貴金属ナノ材料の合成を専門とし、棒状や三角形の形態の金ナノロッドや単結晶質白金ナノシートの合成に初めて成功した。我々はこれまでに尿素修飾した TiO₂ ナノ粒子、FePtCu 合金、修飾グラファイトシート、高分子/金ナノ粒子積層基板を利用した高感度質量分析の成果を報告した。たとえば、高分子/金ナノ粒子積層基板を利用した SALDI-MS により、耳かき一杯の環境規制物質(数十 mg)が琵琶湖(総水量:275 億トン)に溶けていても、検出できる世界最高レベルの高感度を実現できた。これらの成果は、二人の得意分野である「レーザー脱離イオン化質量分析(荒川)」と「ナノ粒子および表面構造の凸凹制御と表面修飾の機能化(川崎)」の異分野技術を融合したものである。よって、本課題の新規技術である大気圧下での SALDI イオン化メカニズムの解明および SALDI を利用した新規な計測技術の開発に期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境中の低分子量の汚染物質、医薬品、食品・工業材料の添加剤を簡便にハイスループット質量分析(MS)するための新しい「大気圧」表面支援レーザー脱離イオン化法(AP-SALDI)を開発することである(図 1)。この AP-SALDI-MS を実現するために、1) 大気圧(AP)下で効率的なイオン化を実現する新規な表面構造体およびナノ粒子集合体を創製、2) 大気圧下のナノ粒子表面で起こる試料分子のレーザー脱離ソフトイオン化のメカニズムを解明すると共に、3) SALDI イオン化を利用した簡便・高感度な質量分析の新規応用技術の実現を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 自己組織化・自己集積を

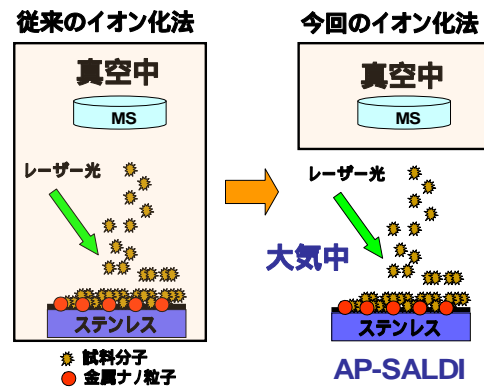


図 1. AP-SALDI の概念図

利用した固体表面 2 次元ナノ粒子の構造制御、(2) 構造制御された 2 次元ナノ粒子基板を利用したソフトイオン化過程の解明、及び(3) 新規な形態の金属ナノ粒子、構造体基板を利用したバイオ・環境関連分野でのスクリーニング分析への応用を計画した。

4. 研究成果

本研究では、大気圧 (AP) および真空 SALDI-MS のための(1) Pt スパッタ蒸着マイクロウェルスライド、(2) 新規な白金ナノフラワー構造体および(3) 局在表面プラズモン共鳴(LSPR)と MALDI-MS を結合した高感度な分子同定のためのナノ粒子基板を開発した。また、それらのイオン化特性および有効性を検討した。さらに、SALDI-MS を利用した新規な計測技術として、(4) アフィニティー SALDI-MS、(5) Pt スパッタ蒸着法による SALDI-MS イメージング技術を開発した。

(1) Pt スパッタ蒸着マイクロウェルスライド基板

AP-MALDI はスライドガラスに塗布したサンプルに、大気圧下でレーザーを照射することで、帯電したマトリックスの液滴が形成し、ESI のようなメカニズムでイオンが生成すると考えられ、多価イオンが生成することが報告されている。Pt スパッタ蒸着マイクロウェル基板を用いて真空と大気圧 SALDI/MALDI および ESI の 5 種類のイオン化特性を検討した。アンジオテンシン、医薬品のペラパミル塩酸塩、C₈F₁₇SO₃H (PFOS)の試料はどのイオン化においてもイオンを検出することができた。アンジオテンシンの AP-MALDI と ESI でのみ多価イオンが観測された。このことは AP-MALDI が ESI-like なイオンであることを示す。しかし、C₈F₁₇COOH (PFOA)の場合は、真空 SALDI/MALDI においてイオンを検出できなかった。その理由は明確ではないが、PFOA のカルボニル基が壊れやすく、余剰の内部エネルギーにより分解されると考えられる。一方、大気圧中では大気分子との衝突により余剰なエネルギーを失うためにソフトな大気圧イオン化法である ESI, AP-MALDI, AP-SALDI でしか検出できなかったと考えられる。本課題である

AP-SALDI のイオン化特性は、測定装置が異なるので直接比較することはできないが、真空 MALDI/SALDI と比較して、よりソフトなイオン化であるが、検出感度が低いことがわかった。

(2) 白金ナノフラワー基板

これまでの SALDI 効果の研究から、貴金属 Pt、Au、Cu、Ag の中で Pt ナノ粒子が最もイオン化効率が高いことを報告した。さらにデンドリックな突起形状を有する白金ナノフラワー(PtNf)が試料の高感度分析に適していることを示した。SALDI-MS では、PtNf の突起形状部分で試料が Pt 上から脱離する際の局部加熱の促進と電荷脱離による試料の高感度検出が期待される。今回、我々は PtNf 基板を簡便に作製する新しい技術を開発した。n 型シリコンウェーハ 15×15 mm にサンドペーパーを用いて、基板表面を 1 方向に傷つける。この基板を 46% フッ化水素酸水溶液中に数分間浸漬したのち、ガルバニック置換メッキ法を用いて PtNf 基板の作製を行った。5 M フッ化水素酸と 1 mM 塩化白金酸水溶液のメッキ溶液中に基板を 1 時間浸漬させて PtNf 作製した(図 2)。図 3a は、水溶液中の微量ピレンの正イオン SALDI マススペクトルであり、還元されたピレンのピーク $[M+2H]^+$ が強く検出することができた。また、ペンタクロロフェノール(PCP)では、負イオンモードで、脱水素化した PCP の負イオンが高感度で検出できた(図 3b)。この結果より、炭化水素を表面修飾した PtNf により、水溶液中にわず

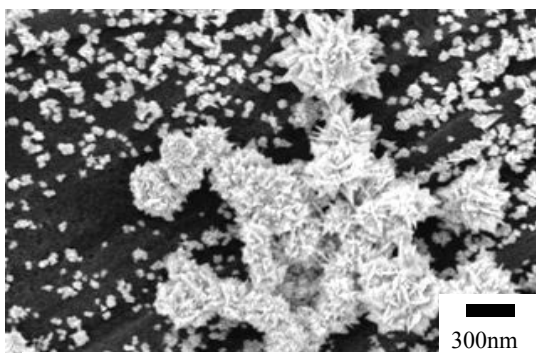


図 2. 白金ナノフラワーの SEM 像

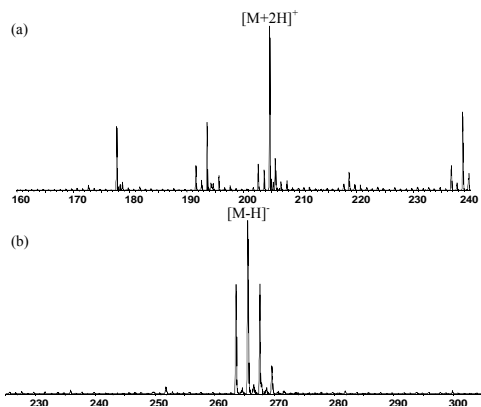


図 3. a)ピレンと b)ペンタクロロフェノール(PCP)の SALDI-MS スペクトル

かに溶解した芳香族化合物を PtNf 基板表面へ濃縮した試料を抽出操作なしで、直接に真空 SALDI-MS により検出できることがわかった。この PtNf 基板を用いて、Pt スパッタ蒸着マイクロウェルスライド基板と同様に AP-SALDI のイオン化特性を検討したが、真空 MALDI/SALDI に比べてやはり検出感度が良好ではなかった。(論文:1,4-6,12-15)

(3) 局在表面プラズモン共鳴(LSPR)と MALDI-MS を結合した高感度な分子同定技術

LSPR センシングでは、表面修飾したナノ粒子に検体が結合することで生じるナノ粒子周囲の屈折率変化に伴い、LSPR 吸収ピークがシフトや強度増加することを利用して、検体の結合を検出する。しかし、結合した検体の同定や分子構造に関する情報は得ることができないので、両方を迅速に解析できる計測手法の開発が求められている。LSPR センシングの高感度化に向けて薄片状の三角形銀ナノプレート(AgNPL)を合成し、その表面を酵素タンパク質であるトリプシン(Tryp)で修飾した。この Tryp 修飾 AgNPL を固定したガラス基板を用いて、検体である Tryp 阻害剤との相互作用解析、さらにレーザー脱離イオン化質量分析による結合した分子の同定を行った。

LSPR センシング後の AgNPL 固定基板について MALDI-MS 測定を行ったところ、 $m/z=20,100$ 付近に Tryp 阻害剤の分子イオンが検出された。よって、LSPR センシングによる吸光度変化は、Tryp 阻害剤の吸着によるものであることが明らかになった。LSPR と MALDI-MS を組み合わせた本計測システムは、標的タンパク質と薬物との相互作用や抗原-抗体反応などを解析、結合した分子の同定・構造解析をする新たな手法としての展開が期待される。(論文:2,11)

(4) アフィニティーSALDI-MS

アフィニティーSALDI-MS は、磁性ナノ粒子表面に混合試料中の目的試料を吸着させて磁石で抽出・濃縮し、この磁性ナノ粒子を直接 SALDI-MS することで目的試料を簡便に検出する技術である。新規な磁性ナノ粒子として、磁性炭化コバルトナノ粒子(CoC)に着目した。CoC はコバルトナノ粒子を 2, 3 層のグラフェンで被覆したもので、平均粒径が約 30 nm で表面積が大きく、バルクコバルトに匹敵する強い磁性を示す。特に、本研究では CoC 表面にフェネチルアミンを修飾した CoC-NH₂ をアフィニティーSALDI-MS に用いることで、環境汚染物質として国際的に問題となり規制が開始されている“パーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)”を混合試料から簡便・迅速・高感度に検出をすることを目標とした。環境試料として水道水を用いた。500 mL の水道水に PFOS を加えて 5 ppt の PFOS 溶液を調製した溶液のアフィニティー

SALDI-MS を行った。その結果、pH4 に調製したときに 5 ppt の PFOS を検出することができた。水道水に含まれる夾雑物の影響で PFOS との競合吸着が起こり、pH7 の水道水中では PFOS を検出できなかった。他方、pH4 にすることで強酸性物質の PFOS が CoC-NH₂ との静電相互作用で選択的に CoC-NH₂ 捕捉され、PFOS を検出できたと考えた。(論文: 7,8)

(5) Pt 蒸着による SALDI-MS イメージング

MALDI イオン化法を用いた質量分析イメージング(MSI)技術は、現在、生体試料中の脂質、代謝物、薬物などの分布解析に広く利用されている。しかしながら、MALDI-MS イメージングは、1) マトリックスの塗布時に溶媒により試料が拡散する、2) 非導電性の試料に対して感度が低下するなどの問題点がある。そのために試料の薄片化の前処理が必要である。本研究では、それらの問題点を解決する白金スパッタ蒸着による SALDI-MS イメージング法を開発し、様々な形態の試料について表面の低分子成分の分布解析を試みた。

Pt をスパッタ蒸着したコロジオン膜について TEM 観察を行った結果、矢印に示すような空孔を持つナノ構造体が形成されていた。3 種の染料(Crystal Violet, Rhodamine B, Rhodamine 123)をスポットした TLC プレートについて、Pt 蒸着および Au 蒸着 SALDI と LDI 測定を行い、ピーク強度を比較した結果、LDI と比べて金属蒸着 SALDI で大幅な感度向上の効果を確認し、Au に比べて Pt 蒸着の方が高感度であることを示した。実試料の検討として、一部の領域を UV 照射した紙印刷物について Pt 蒸着 SALDI-MS イメージング測定を行った。その結果、「(1)印刷領域」「(2)UV 照射印刷領域」「(3)非印刷領域」「(4)UV 照射非印刷領域」の 4 領域のマスペクトルが得られた。特徴的なピークについて、そのマスイメージ図を示す(図 4)。(a)の $m/z=603$ の染料成分は「(1)印刷領域」に存在し、UV 照射領域(図 4 の点線領域)では消失することが確認された。さらに、(b)のインクの添加剤と予想される $m/z=172$ のアミン成分も同様の傾向がみられ、UV 照射領域で減少していた。一方、(c)の $m/z=188$ の成分は「(2)UV 照射印刷領域」で特異的に観測され、(b)のアミン成分が UV 照射で酸化された反応物と予想された。また、非印刷領域で観測

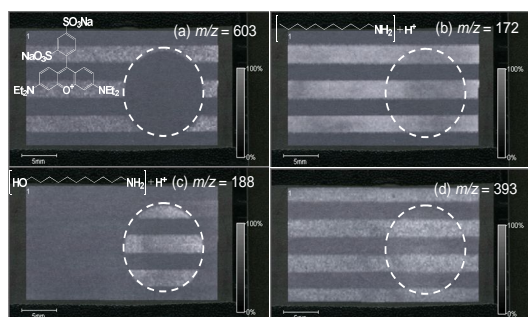


図 4. 紙印刷物の SALDI-MS イメージング

される(d)の $m/z=393$ の成分は、UV 照射による変化は確認されなかった。Pt 蒸着 SALDI-MS イメージングにより、有機材料中の低分子成分の分布が解析できるだけでなく、特定の領域で起こる反応解析にも有用であることが示唆された。(論文: 5)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

M. Kusano, S. Kawabata, Y. Tamura, D. Mizoguchi, M. Murouchi, H. Kawasaki, R. Arakawa, and K. Tanaka, Laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) of lipids with iron oxide nanoparticle-coated targets, Mass Spectrometry, 査読有, 3, 2014, A0026
DOI: 10.5702/massspectrometry.A0026

M. Inuta, R. Arakawa, and H. Kawasaki, Protein-modified silver nanoplates for the complementary analytical method of localised surface plasmon resonance and matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry, Analytical Methods, 査読有, 5, 2013, 5031–5036
DOI: 10.1039/C3AY40708J

Yasuda, T. Ishimaru, S. Nishihara, M. Sakai, H. Kawasaki, R. Arakawa and Y. Shigeri, A thiophene-containing compound as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and the electrical conductivity of matrix crystals, Eur. J. Mass Spectrom., 査読有, 19, 2013, 29–37
DOI: 10.1255/ejms.1215

T. Yonezawa, H. Tsukamoto, S. Hayashi, Y. Myojin, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Suitability of GaP nanoparticles as a surface-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy. Inorganic matrix and their soft ionization ability, Analyst, 査読有, 138, 2013, 995-999
DOI: 10.1039/c2an36738f

S. Nitta, H. Kawasaki, T. Sukanuma, Y. Shigeri, and R. Arakawa, Desorption/ionization efficiency of common amino acids in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) with nanostructured platinum, J. Phys. Chem. C, 査読有, 117, 2013, 238–245
DOI: 10.1021/jp308380z

H. Kouchi, H. Kawasaki and R. Arakawa, New matrix of MALDI-TOF MS for the analysis of thiolate-protected gold clusters, Anal. Methods, 査読有, 4, 2012, 3600–3603
DOI: 10.1039/C2AY26013A

H. Kawasaki, K. Nakai, R. Arakawa, E. K. Athanassiou, R. N. Grass, and W. J. Stark, Functionalized graphene-coated cobalt nanoparticles for highly efficient surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis, Anal. Chem., 査読有, 84, 2012, 9268–9275

DOI: 10.1021/ac302004g

Y. Iwaki, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Human serum albumin-modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for affinity-SALDI-MS of small-molecule drugs in biological liquid, *Anal. Sci.*, 査読有, 28, 2012, 893-900
DOI: 10.2116/analsci.28.893

H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi, and R. Arakawa, Platinum vapor deposition-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 査読有, 26, 2012, 1849-1858
DOI: 10.1002/rcm.6301

Y. Shigeri, S. Inazumi, Y. Hagihara, A. Yasuda, H. Kawasaki, R. Arakawa and M. Nakata, Ionization efficiency of peptides containing disulfide bonds in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS), *Anal. Sci.*, 査読有, 28, 2012, 295-299
DOI: 10.2116/analsci.28.295

M. Inuta, R. Arakawa, and H. Kawasaki Use of thermally annealed multilayer gold nanoparticle films in combination analysis of localized surface plasmon resonance sensing and MALDI mass spectrometry, *Analyst*, 査読有, 136, 2011, 1167-1176
DOI: 10.1039/C0AN00826E

H. Kawasaki, K. Okumura, and R. Arakawa, Influence of crystalline forms of titania on desorption/ionization efficiency in titania-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 査読有, 58, 2010, 221-228

Osaka, K. Okumura, N. Miyake, T. Watanabe, K. Nozaki, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Quantitative analysis of an antioxidant additive in insoluble plastics by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS using TiO₂ nanoparticles, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 査読有, 58(4), 2010, 123-127

H. Kawasaki, T. Yao, T. Suganuma, K. Okumura, Y. Iwaki, T. Yonezawa, T. Kikuchi, and R. Arakawa, Platinum nanoflowers on scratched silicon by galvanic displacement for an effective SALDI substrate, *Chem. Eur. J.*, 査読有, 16, 2010, 10832-10843
DOI: 10.1002/chem.201001038

T. Yao, H. Kawasaki, T. Watanabe, and R. Arakawa, Effectiveness of platinum particle deposition on silicon surfaces for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides, *Int. J. Mass Spectrom.*, 査読有, 291, 2010, 145-151
DOI: 10.1016/j.ijms

〔学会発表〕(計5件)

K. Nakaia, H. Kawasaki, R. Arakawa, E. K.

Athanassiou, R. N. Grass, and W. J. Stark, Functionalized graphene-coated cobalt nanoparticles as the matrix and magnetic separation for highly efficient SALDI-MS analysis, the 4th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, 2013年7月10日~12日, Taipei(台湾)

H. Kouchi, H. Kawasaki, and R. Arakawa, A new matrix of MALDI-TOF MS for the analysis of thiolate-protected gold clusters, the 4th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, 2013年7月10日~12日, Taipei(台湾)

S. Nitta, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Efficiency of the 20 common amino acids in SALDI-MS with platinum nanoflowers on silicon substrate, International Mass Spectrometry Conference, 2012年9月15日~21日, 国立京都国際会館(京都)

A. Yamamoto, H. Hisatomi, T. Tojo, S. Takemine, D. Ono, M. Kitagawa, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Identification of biodegradation products of highly fluorinated products using (two-dimensional) liquid chromatograph coupled with high-resolution mass spectrometer, 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2012年8月26日~31日, Queensland(Australia)

H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi, T. Higashiisokawa, and R. Arakawa, Platinum Vapor deposition-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules, 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012年5月20日~24日, Vancouver(Canada)

〔図書〕(計1件)

荒川隆一、現代質量分析学、高山ら編、化学同人、2012、p39-61

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kikibun.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 隆一 (ARAKAWA, Ryuichi)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：00127177

(2) 研究分担者

川崎 英也 (KAWASAKI, Hideya)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：50322285