

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)	
研究期間：2008～2009	
課題番号：20750060	
研究課題名 (和文)	金ナノ微粒子に基づくチップ電気泳動-レーザー Sprey イオン化質量分析検出法の開発
研究課題名 (英文)	Development of Chip Electrophoresis-Laser Spray Ionization Mass Spectrometry Using Gold Nanoparticles
研究代表者	
	北川 文彦 (KITAGAWA FUMIHIKO)
	京都大学・工学研究科・講師
	研究者番号：20362452

研究成果の概要 (和文) : ナノスプレーを直接加工した電気泳動分析用チップを用いて, 金ナノ微粒子に基づくレーザー Sprey イオン化質量分析 (LSI-MS) 検出について検討した。試料を溶解した緩衝液に金ナノ微粒子を分散し, インフュージョンモードで MS 検出器へ導入した。ナノスプレー先端に 532 nm のレーザーを照射したところ, 負イオンモードでは信号強度が 12 倍に増加したことから, 金ナノ微粒子を用いる LSI においては, アニオン性試料成分に対して感度増幅効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In this study, development of laser spray ionization-mass spectrometry (LSI-MS) using gold nanoparticles was investigated on nanospray directly integrated electrophoresis chips. A sample solution containing gold nanoparticles was introduced from the nanospray to the MS detector by the infusion mode. When a 532-nm CW-laser was irradiated to the tip of the nanospray, 12-fold increase in the MS signal intensity was observed in the negative mode. Therefore, it was revealed that LSI-MS using gold nanoparticles gave the MS signal enhancements for anionic analytes.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：マイクロチップ電気泳動, 質量分析, レーザー Sprey イオン化, ナノスプレー, 金ナノ微粒子, 局在プラズモン, 熱レンズ顕微鏡, シクロオレフィンポリマー

1. 研究開始当初の背景

近年のメタボロミクスの進展に伴い, 高速に分離した試料を質量分析 (MS) 検出により分析するシステムの構築が求められている

が, 分離の手段としてのマイクロチップ電気泳動 (MCE) 分析とエレクトロスプレーイオン化 (ESI) - MS 検出との結合がその有力な手法として期待されている。しかしながら,

MCE-ESI-MS の開発は 1990 年代の終わりから今世紀初頭にかけて活発になされてきたものの、最近ではその例を見るのが少なくなかった。これは MCE におけるイオン化のインターフェースの作製が困難であることと検出感度が低いためであることは明白である。通常の ESI では、最大でも試料全体の 1/100 程度の分子数しか検出されないため、分析する試料の絶対量が極小 (~10 pL) な MCE ではイオン化のさらなる高効率化が必要とされており、新規な方法論の導入が必須である。

これまでに開発されてきた MCE-ESI-MS のインターフェースは主に 2 種に大別される。すなわち、キャピラリー電気泳動 (CE)-MS 用のシース液・ネブライザーガスを導入するインターフェースを転用する方法と、シース液・ネブライザーガスを使わずにナノスプレーを利用する方法である。前者の方法では安定な ESI が実現できるものの、MCE では試料の絶対量が少ないためにシース液による希釈の影響が大きく、検出感度の低下を招く。一方、チップの端面にナノスプレーを接続し、スプレー先端に ESI 電圧を印加する方法では、上記の問題は生じないものの、流量が低いために ESI に必要なテイラーコーンが安定に形成せず、イオン化効率が低下し、MS 検出感度の低下を招くことが問題となっている。これはナノスプレーの先端径/流量比が ESI に適していないために起こる現象で、この観点からはシース液やネブライザーガスの導入が望ましい。このように従来のインターフェースでは検出感度の低下が避けられず、MCE-MS に適したイオン化法、すなわち極低流量の系に適した手法の導入が求められている。

2. 研究の目的

MCE-ESI-MS における検出感度の向上を目的として、金ナノ微粒子 (GNP) の光熱変換現象を利用した新規な分離検出法を開発する。この目的にあたり、GNP を含む分離溶液を用いて MCE 分離を行い、スプレー先端に高強度に集光したレーザーを照射することで、脱溶媒およびイオン化の効率を向上させ、高感度なレーザープレーイオン化 (LSI) 法を構築する。MCE-LSI-MS 実験の最適化および基礎的性能評価を行い、高速分離・高感度検出の実現について検討を行う。

3. 研究の方法

レーザーを組み合わせたイオン化法を MCE に適用することで MS 検出感度の向上を目的とし、図 1 のような LSI システムの構築を目指した。LSI は通常の ESI スプレーの先端に対して、赤外レーザーを照射し微小液滴の発熱および蒸発を誘起することで、高い

イオン化効率を得る手法であるが、非常に高強度のレーザー光を必要とする。そこで、GNP が市販の緑色レーザーの波長域に強い局在プラズモン吸収を示すことに着目し、光励起された GNP の無輻射失活に伴う熱発生の利用について検討を行った。

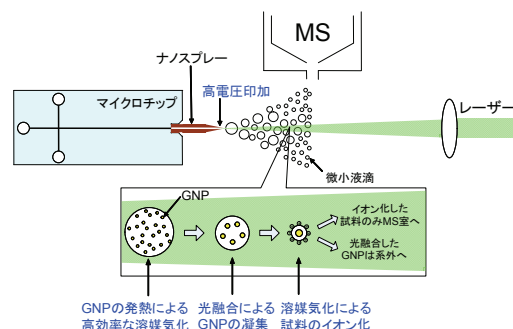


図 1 LSI-MS の原理

ESI では、ナノスプレー先端への電界集中を利用して液滴を帯電・微小液滴化することで、溶液の噴霧・溶媒の蒸発・試料分子のイオン化というプロセスを行っているが、今回開発した LSI 法では GNP を含む泳動液を用いて MCE 分離を行った後、スプレー先端に集光したレーザーの照射および高電圧の印加によりイオン化を行う。このナノスプレー先端におけるレーザーアブレーションにより、高効率な微小液滴形成・溶媒気化が誘起されるため、検出感度の向上につながるものと期待される。さらに、このように局所的な溶媒気化を瞬時に誘起することで、生じた気体がネブライザーガスとして機能するために安定なイオン化が期待され、MCE では困難であったネブライザーガスの導入がデッドボリュームなしで達成出来るものと考えられる。

通常の MS 検出においては GNP のような微粒子が泳動液中に含まれていると、MS 室の汚染および検出感度を招くおそれが指摘されているが、図に示したようなスプレーと MS オリフィスが 90° の方向をなす場合には、比較的サイズの大きなナノ微粒子の侵入確率が大きく減少することが知られている。GNP は溶媒蒸発に伴う凝集によってサイズが大きくなるものと予想され、MS 室内への GNP の侵入は最小限に抑制されるものと考えられる。したがって、GNP を含む泳動液と LSI を組み合わせることにより、イオン化効率の向上が達成され、検出の高感度化が期待される。

以上のような特徴を有する GNP を利用した LSI-MS 法の構築にあたり、次の項目について検討を行った。

(1) GNP の光熱変換を利用した CE 分析

本研究で目指す LSI-MS においては、GNP を分散した分離溶液を用いて分析を行い、

GNP の光熱変換現象を利用してスプレー効率の向上を図る。この目的に際し、GNP を含む分離溶液を用いた電気泳動について検討することは重要である。そこで、GNP を含む分離溶液を用いた CE において、光熱変換現象を利用する新規分離検出法の開発について検討した。

(2) ナノスプレーを直接接合した電気泳動分析用ポリマー製マイクロチップの作製

LSI-MS と MCE の結合にあたり、ナノスプレーを直接接合した MCE 分離用チップの作製について検討した。MCE 分析においては、使い捨てチップの需要が高まっていることを鑑み、シクロオレフィンポリマーを基板としたチップの開発を目指した。

(3) LSI-MS による MCE 分析の高感度化

(1)および(2)で実証した GNP の光熱変換を利用した電気泳動分析とナノスプレーを接合したマイクロチップを組み合わせることで、MCE-LSI-MS システムの構築を目指した。

(4) マイクロヒーター集積化チップを用いるタンパク質分析の高感度化

MCE-LSI-MS 分析のさらなる高感度化を目指し、タンパク質をマイクロヒーター上で濃縮してから、LSI-MS 検出するためのチップデバイスの試作を行った。

4. 研究成果

(1) GNP の光熱変換を利用した CE 分析

熱レンズ顕微鏡 (TLM) 検出においては、分析対象が TLM の励起波長付近 (488~532 nm) に吸収を示す必要があるため、分析対象の拡充法の開発が求められている。そこで、500 nm 付近に局在プラズモン共鳴に由来する吸収を示し、無輻射失活過程において熱を放出する GNP を含む泳動液を CE-TLM 測定へ適用することで、可視域に吸収をもたないアミノ酸のラベルフリー検出を目指した。

種々の緩衝液 (20 mM リン酸塩, 20 mM ホウ酸塩, 10~50 mM グリシン-クエン酸ナトリウム (GC)) (pH 7.0) に 25% (v/v) GNP 分散液を加えたものを泳動液として CE-TLM 測定を行ったところ、10 mM GC 緩衝液で最も安定したベースラインが得られた。これは GNP の凝集と関連しており、低濃度の緩衝液とクエン酸イオンが GNP を安定化させるためと考えられる。Glu を試料とし CE-TLM 測定を行ったところ、上向きの鋭いピークが検出され、このピークの段数は 290000 であった。また、このピーク面積は試料濃度に依存しており、検出限界は 25 ppm であった。Glu は可視域に吸収を有しておらず、GNP を用いた CE-TLM により Glu のラベルフリー検出が可能になったことは、GNP の高い光熱変換効率を反映したものである。この GNP を含む分離溶液を用いて Glu と Lys の混合試料を測定

したところ、良好な分離が得られた。GNP に対する保持係数の算出より、保持は試料の電荷よりも、試料に含まれる窒素原子の対電子との相互作用が支配的であることが示唆された。以上の結果より、GNP を~500 nm のレーザーで励起すると、高い効率

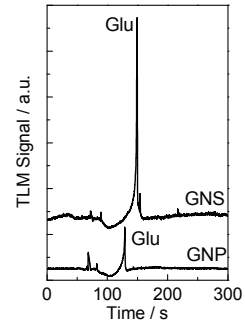


図2 Glu の CE-TLM 測定における GNP と GNS の効果

で熱に変換されることが示された。この現象を LSI に応用することで、高感度な MS 検出を実現できると期待される。

より高感度な検出を目指し、GNP より敏感に局在プラズモンによる吸収強度が周囲の環境に反応して変化する中空型金ナノ微粒子 (GNS) を泳動液に添加して Glu の CE-TLM 測定を行ったところ、GNP を用いた場合に比べ約 4 倍のピーク高さで Glu を検出することができた (図 2)。今後、GNP や GNS 表面に化学修飾を施し、試料との相互作用を制御することにより、さらなる分離能の向上が期待される。

(2) ナノスプレーを直接接合した電気泳動分析用ポリマー製マイクロチップの作製

シクロオレフィンポリマー (COP) は有機溶媒に対する良好な耐性を示し、基板自体に含まれる不純物が少なく、さらに金属をメッキしやすいという特徴を有していることから、MCE-MS チップへの適用が期待される。そこで、COP マイクロチップの端面にナノスプレーを直接加工したチップを作製し、性能評価を行った。

フォトリソグラフィ技術により作製したシリコン鋳型を用い、クロス型流路パターンを転写した COP 基板を作製し、蓋となる基板と接合することで MCE 分離用 COP チップとした。このチップの分離流路終端の開口面に対し、微細機械加工技術により ESI ナノスプレーを作製し、電子ビーム蒸着により金薄膜をナノスプレー表面に作製した。マイクロチップの分離部のチャンネルは幅 50 μm となっており、ナノスプレー部は先端でのチャンネル幅が 10 μm となるようなテーパ型の構造とした (図 3)。

このチップ先端に電圧を印加しながら、電気浸透流による送液を行ったところ、スプレーチップの先端角が 60° のときには、テーパーコーンの形成は確認されたものの、断続的なスプレーとなってしまい、その周波数は ~3 Hz であった。そこで、より鋭角なスプレーチップ (先端角 30°) を作製したところ、連

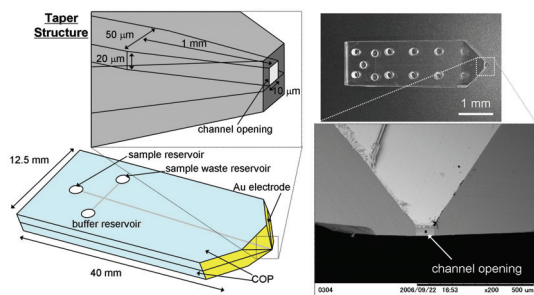


図3 作製したCOPマイクロチップ

統的なスプレーの発生に成功した。この先端角 30° のマイクロチップのサンプルリザーバーにカフェイン溶液を満し、泳動電圧 1.0 kV を印加するインフュージョン分析をポジティブモードで行ったところ、カフェインの $[M+1]^+$ に相当する $m/z = 195$ の安定なベースラインが得られ、その強度の相対標準偏差は 7.2% であった。さらに、カフェインとアルギニンの混合試料を用いて MCE-MS 分析したところ、カフェインとアルギニンに由来するピークが検出され、分離度 1.0 の分離を達成した。

さらに ESI スプレーの耐久性および分析の再現性について検討した。試料としてカフェインを用いて分析を行い、得られたピーク高さを測定回数に対してプロットしたところ、10 回程度の測定であればほぼ同じようなピーク高さが得られることがわかった。これに対し、14 回目の測定ではピークは検出されず、このときのスプレー先端は金薄膜が剥離していることがわかった。測定回数が多くなるにつれて、スプレー先端における偶発的な放電による金薄膜の剥離が進行するものと考えられ、ESI 電圧が印加できなくなり、ピークが検出されなくなったものと考えられる。したがって、作製したマイクロチップは 10 回の測定には十分耐えられることが明らかとなり、使い捨て測定デバイスとして利用できることが示された。なお、この分析におけるピーク高さの RSD は 9.4% となり、マイクロデバイスにおける分析再現性としては十分許容範囲内であることが確認された。分離能および検出感度は不十分であるため改善の余地はあるものの、COP というポリマー基材を用いることで MCE-MS 分析が可能なデバイスを安価に作製できることから、使い捨てチップの需要が大きな医療診断分野などへの応用が期待される。

(3) LSI-MS による MCE 分析の高感度化

ナノスプレーを直接加工した MCE 分析用 COP 製チップを用いて、GNP に基づく LSI-MS 検出について検討した。試料として、カフェインまたはイブプロフェンを溶解し

たグリシン-クエン酸塩緩衝液に金ナノ微粒子を 100 pM になるように分散したものを用い、インフュージョンモードで MS 検出器へ導入した。

図 1 に示すように、ナノスプレーが MS オリフィスに対して、 90° となるように配置し、ナノスプレー先端にイオン化電圧 (1.8 kV) を印加しながら、レーザー (532 nm) を照射した際のカフェインの信号強度について検討したところ、ピコ秒パルスレーザー (1~10 μ W) を照射した際には、ベースラインが不安定となった (図 4a)。また、レーザーを照射し続けたところ、金ナノ微粒子の凝集体がスプレー先端に生成し、流路を閉塞したため、パルスレーザーは有効ではなかった。

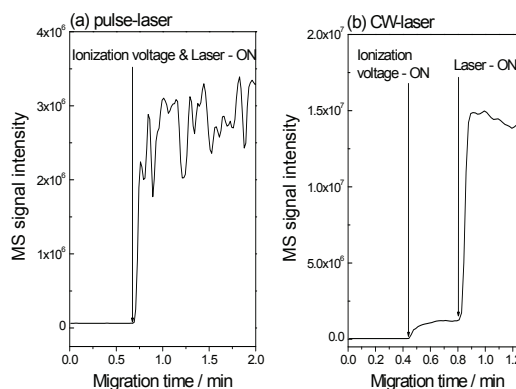


図4 金ナノ粒子を利用した LSI-MS
(a) パルスレーザー (b) CW-レーザー

一方、イオン化電圧 (1.8 kV) を印加しながら CW レーザー (532 nm, 1~10 mW) を照射したところ、カフェイン (正イオンモード) の検出感度に有意な差はなかったのに対し、イブプロフェン (負イオンモード) では信号強度が増加した (図 4b)。イオン化電圧のみを印加した場合の信号強度と、CW レーザー照射を組み合わせたときの強度を比較したところ、レーザー照射により検出感度が 12 倍向上することがわかった。したがって、金ナノ微粒子を用いる LSI-MS においては、負イオンモードで感度増幅効果があることが示された。しかしながら、ピークの再現性の点では未だ難があり、今後のシステム改良が必要である。

(4) マイクロヒーター集積化チップを用いるタンパク質分析の高感度化

MCE-LSI-MS のさらなる高感度化を目指し、タンパク質をマイクロヒーター上で濃縮してから、LSI-MS 検出するためのチップデバイスの試作を行った。ポリジメチルシロキサン基板にチャネルを形成し、幅 1 mm の銀薄膜を埋め込んでヒーターとした。タンパク質の変性剤を含む泳動液を満したチャネ

ルにウシ血清アルブミン (BSA) を注入したところ、非加熱時にはブロードなピークが観察されたのに対し (図 5a), 加熱時には鋭く高いピークが観察された (図 5b)。すなわち、ヒーター上で BSA は熱変性され、これに伴う電気泳動速度変化を利用した濃縮により、検出感度が 5 倍以上に向上した。オンラインで変性させたタンパク質試料を、濃縮により高感度検出できるため、統合的なデバイスへの応用が期待される。

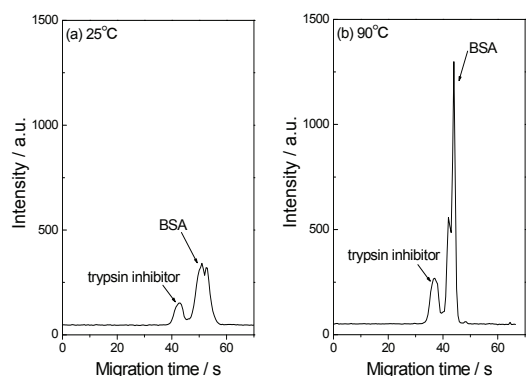


図 5 マイクロヒーターを利用したタンパク質の変性・濃縮と分離; (a) 25, (b) 90 °C

以上に示したように、GNP の高効率な光熱変換を利用した電気泳動分析法およびナノスプレーを接合したチップを開発し、これに基づく MCE-LSI-MS を開発した。GNP の光熱変換現象を MCE-MS 検出に応用した例は他に類を見ず、今後、LSI において擬似的なネブライザーガスが起きていることを証明できれば、学術的にも意義深いものとなる。また、マイクロヒーターにおけるタンパク質のオンライン変性・濃縮技術をナノスプレー接合チップに組み合わせることにより、より高感度な MCE-LSI-MS システムの構築が期待できる。

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) Kitagawa, F.; Akimoto, Y.; Otsuka, K.: Label-free detection of amino acids using gold nanoparticles in electrokinetic chromatography-thermal lens microscopy, *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 2943-2946. (査読あり)
- 2) Shinohara, H.; Suzuki, T.; Kitagawa, F.; Mizuno, J.; Otsuka, K.; Shoji, S.: Polymer Microchip Integrated with Nano Electrospray Tip for Electrophoresis-Mass Spectrometry, *Sens. Actuators B*, **2008**, *132*, 368-373. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Kana Tanigawa, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka: Microchip electrophoresis of proteins using microheater integrated PDMS chip. 3, 25th International Symposium on Microscale Bioseparations (MSB2010), Clarion Congress Hotel Prague, Prague, Czech Republic; 21-25 March 2010.
- 2) 谷川佳奈, 末吉健志, 北川文彦, 大塚浩二: マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる電気泳動分析 (4), 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2009), 近畿大学東大阪キャンパス, 東大阪; 2009 年 11 月 17-19 日.
- 3) 谷川佳奈, 末吉健志, 北川文彦, 大塚浩二: マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる電気泳動分析 (3), 第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 金沢エクセルホテル東急, 金沢; 2009 年 11 月 8-9 日.
- 4) Kana Tanigawa, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka: Microchip electrophoresis of proteins using microheater integrated PDMS chip. 2, International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2009 (ISMM2009), Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa; 7-8 November 2009.
- 5) Kana Tanigawa, Kenji Sueyoshi, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka: Microchip electrophoresis of proteins using microheater integrated PDMS chip, 24th International Symposium on Microscale Bioseparations (MSB2009 Dalian), Dalian, China; 18-22 October 2009.
- 6) 谷川佳奈, 末吉健志, 北川文彦, 大塚浩二: マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる電気泳動分析 (2), 日本分析化学会第 58 年会, 北海道大学, 札幌; 2009 年 9 月 24-26 日.
- 7) 谷川佳奈, 末吉健志, 北川文彦, 大塚浩二: マイクロヒーター集積化 PDMS チップを用いる電気泳動分析, 第 19 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 広島大学東広島キャンパス, 広島; 2009 年 5 月 28-29 日.
- 8) Kenji Sueyoshi, Minako Kai, Kota Hashiba, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka: Enhancing the Detectability in Microscale Electrophoretic Separations; 23rd International Symposium on Microscale Bioseparations (MSB2009 Boston), Boston Park Plaza Hotel & Towers, Boston, MA, USA; 1-5 February 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 文彦 (KITAGAWA FUMIHIKO)
 京都大学・工学研究科・講師
 研究者番号: 20362452

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：