

REGULAR PAPER

DIOS 法を利用した合成高分子の質量分析
—DIOS チップ作製の最適化—Mass Spectrometric Analysis of Synthetic Polymers Using
Desorption/Ionization on Porous Silicon (DIOS)
—Optimal Etching Conditions for DIOS Chips—奥野昌二^{a)}・下前幸康^{b)}・小原一真^{b)}・藤原博樹^{b)}・
大山 淳^{b)}・大本将義^{b)}・和田芳直^{a), c)}・荒川隆—^{a), *b)}Shoji OKUNO, Yukiyasu SHIMOMAE, Kazuma OHARA, Hiroki FUJIWARA,
Jun OHYAMA, Masayoshi OHMOTO, Yoshinao WADA, and Ryuichi ARAKAWA

(Received February 6, 2004; Accepted April 12, 2004)

Desorption/ionization on porous silicon (DIOS) is a novel matrix-free variant of laser desorption/ionization (LDI) techniques for mass spectrometry. The DIOS chips are produced by electrochemical etching of silicon wafers under light exposure. In the present report, the optimal conditions, regarding resistivity of silicon wafer, etching current density and etching time, for making DIOS chip with better ionization performance are described. In addition, the DIOS mass spectra of various synthetic polymers including polyethyleneglycol, nonylphenolpolyethoxylate, nonylphenolpolyethoxylatesulfate, polymethylmethacrylate are compared with the matrix-assisted LDI mass spectra.

1. はじめに

合成高分子の構造解析のためには、主として核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance, NMR) や赤外分光法 (infrared spectrometry, IR) が用いられてきた。IR や NMR では、合成高分子の全体の平均的な構造情報は得やすいが、繰返し単位の数や末端基が異なり複雑に存在する一つの成分を詳細に解析することはできない。しかしながら、合成高分子の物性をより高度に理解するには、IR や NMR で得られないこれらの構造情報についても知る必要がある。

田中ら¹⁾および Hillenkamp ら^{2)~4)}が開発したマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser

desorption/ionization, MALDI) や Fenn らによるエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI)^{5)~7)} により、熱に不安定な物質や高分子量物質のソフ

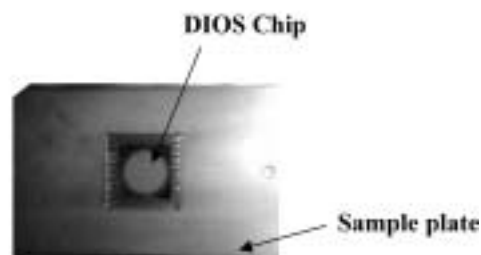
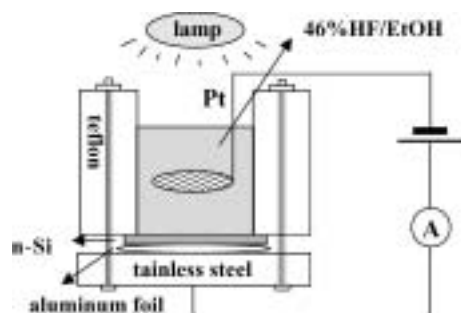


Fig. 1. Schematic representation of electrochemical etching device for preparing DIOS chips (upper). A DIOS chip is taped on a stainless sample stage which was prepared in-house to offset the chip thickness (lower).

^{a)} 科学技術振興機構和田プロテオミクスプロジェクト (☎594-1144 和泉市テクノステージ 3-1-10)

Japan Science and Technology Agency, Wada Proteomics Project (3-1-10 Technostage, Izumi, Osaka 594-1144, Japan)

^{*b)} 関西大学工学部応用化学科 (☎564-8680 吹田市山手町 3-3-35)

Department of Applied Chemistry, Kansai University (3-3-35 Yamatecho, Suita, Osaka 564-8680, Japan)

^{c)} 大阪府立母子保健総合医療センター (☎594-1101 和泉市室堂町 840)

Osaka Medical Center and Research Institute for Material and Child Health (840 Murodo-cho, Izumi, Osaka 594-1101, Japan)

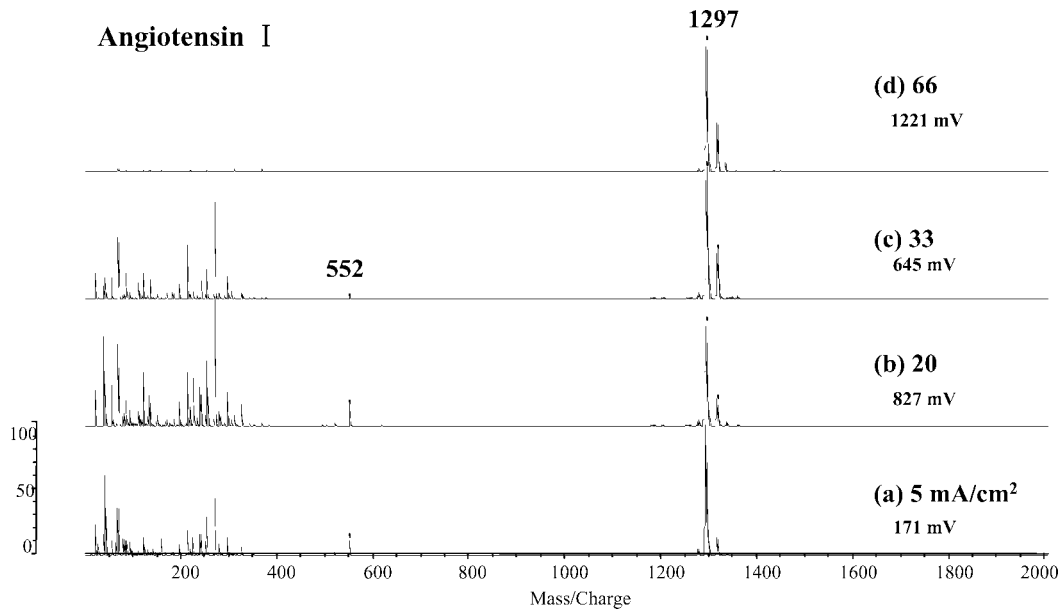


Fig. 2. Effect of etching current density on the positive ion DIOS mass spectra of angiotensin I: (a) 5, (b) 20, (c) 33, and (d) 66 mA cm⁻². The mV values represent the peak intensity of a base peak.

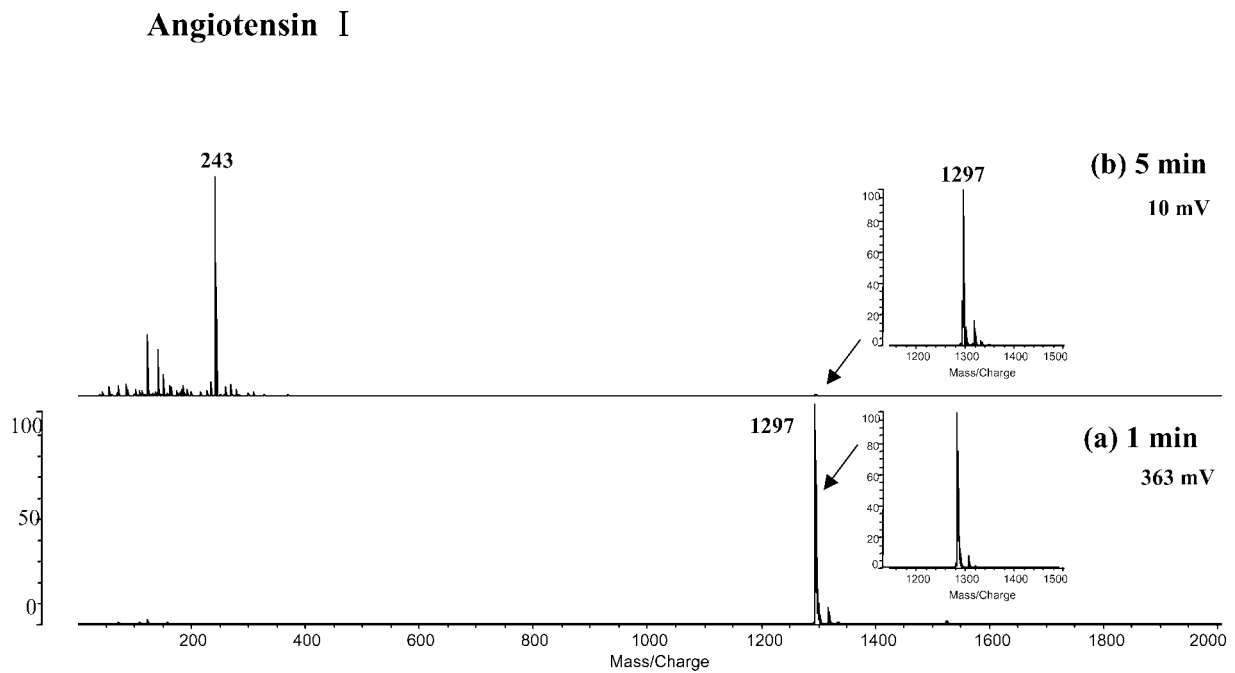


Fig. 3. Effect of etching time on the DIOS mass spectra of angiotensin I: (a) 1 min and (b) 5 min.

トイオン化が可能となり、質量分析法はいまや生命科学の研究にとって必要不可欠な分析技術である。さらに内分泌攪乱物質・合成高分子・金属錯体などさまざまな物質の構造解析にも質量分析 (MS) が用いられるようになった^{8)~14)}。MALDI-MS の測定では、レーザー光を吸収する低分子量の有機分子のマトリックスを用いるために、マトリックスの分子イオンやそのクラスターイオンが低分子量領域に観測される。そのために、低分子量物質の測定ではこれらのイオンが妨害になって、解析が困難になる場合が

ある。しかし、合成高分子の物性を理解するためには、低分子量領域の成分の構造情報が重要な場合が多い。このことが、MALDI-MS による合成高分子の分析の弱点であった。

Ayorinde らはこの問題を回避するために、マトリックスとして比較的分子量が高い 10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin (F20TPP) (MW 975) を用い、低分子量のオクチルフェノールポリエトキシレートを測定した¹⁵⁾。得られたマススペクトルにおいて、質量電荷比

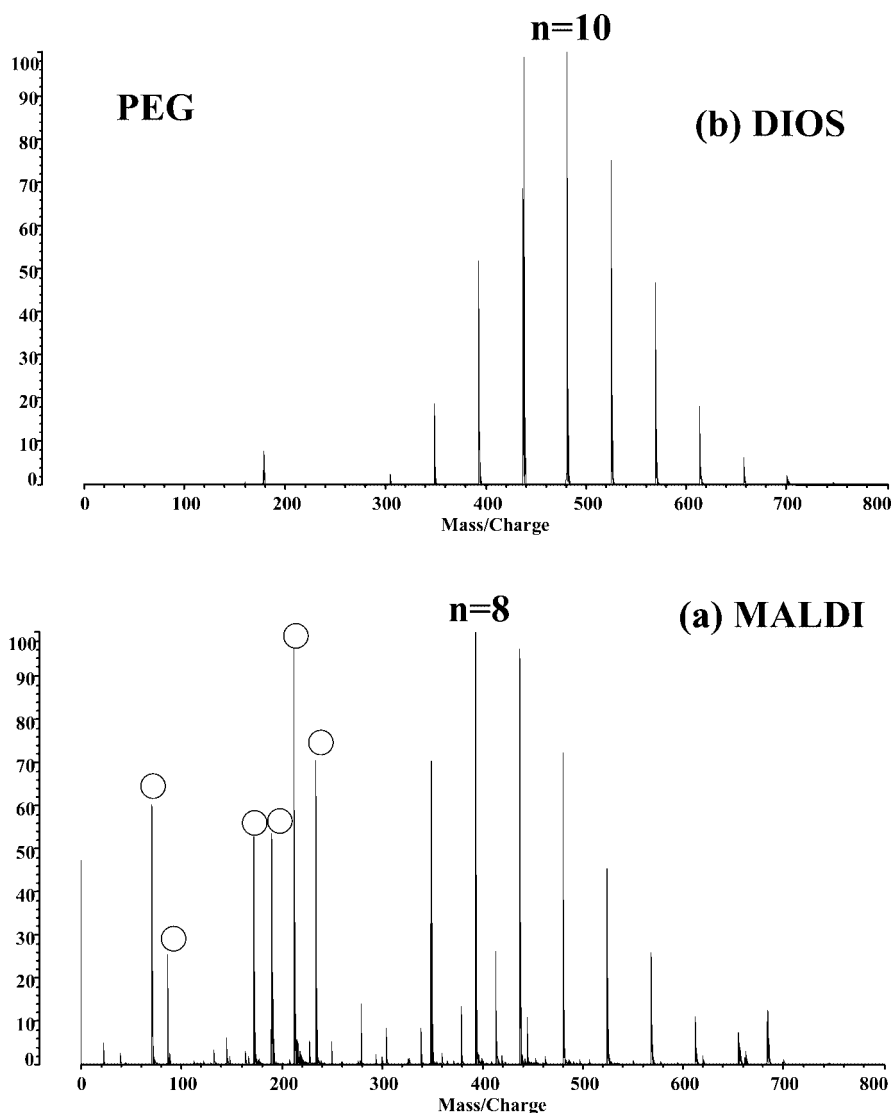


Fig. 4. Positive ion mass spectra of polyethyleneglycol: (a) MALDI and (b) DIOS. The circles indicate the matrix related ions.

(m/z) 975 に F20TPP のラジカルカチオン, それ以外には m/z 796, 822, 861 にそのフラグメントイオンが観測されるだけであった。そのために低分子量のオクチルフェノールポリエトキシレートイオンの解析が容易になった。しかしながら, F20TPP は有機溶媒に対して溶解度が低いので, 使用可能な溶媒がテトラヒドロフラン (THF) やクロロホルムなどに限定された。

マトリックス関連イオンの妨害を避ける別の方法として, マトリックス由来のイオンの生成を抑えるために, マトリックス分子を固相化することが試みられた。Hutchenらは, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) や cinnamamide など化学マトリックスとして用いられる分子をセファロスビーズに固定し¹⁶⁾, Smithらは, 金の表面にレーザー光を吸収する methyl-*N*-(4-mercaptophenyl-carbamate)の自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer; SAM) を作製した¹⁷⁾。Chenらは, ゼルゲル法によって 2,5-dihydroxybenzoic acid をシリコンポリマー

シート中に固定することで, 低分子量領域にマトリックス関連イオンを発生させることなく, 低分子量の有機物, アミノ酸, ペプチドを高感度で測定できることを報告した¹⁸⁾。しかし, これらマトリックス分子を固定する方法は, 検出感度や耐久性に問題があり, また, フラグメントイオンによるノイズを回避できないという欠点があるので, 一般的に利用されるに至っていない。

Siuzdakらは, 電解エッチング法により数百 nm の大きさの孔をもつポラスシリコン板を作製し, その上で試料にレーザー光を当てると, マトリックスがなくても高分子量物質がイオン化できることを見いだした¹⁹⁾。彼らは, このイオン化法を DIOS (desorption/ionization on porous silicon) と名づけ, DIOS チップは Mass Consortium 社から製品化されている。DIOS のイオン化の原理はまだ明確になっていないが, これまで DIOS 法を用いて, 有機化合物, ペプチド, 界面活性剤やポリエチレングリコールなど水溶性の合成高分子のマススペクトルが報告されてい

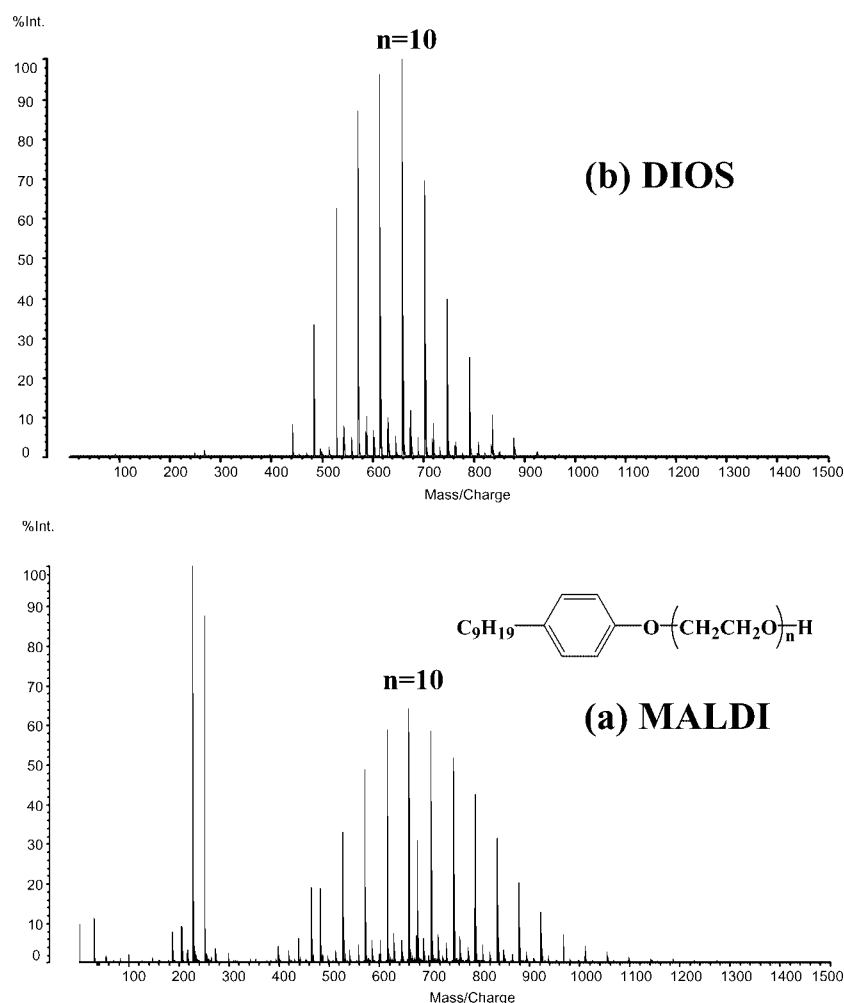


Fig. 5. Positive ion mass spectra of nonylphenolpoly-ethoxylate: (a) MALDI and (b) DIOS.

る^{19)~29)}.

本研究では、DIOSチップ作製のための電解装置を作製し、シリコンウエハーの抵抗率、電流密度、およびエッチングの時間を最適化した。さらに、DIOS法によりさまざまな種類の合成高分子のMS測定を行ったので、その有効性について報告する。

2. 実 験

2.1 試薬

エタノール、アセトニトリル、46%フッ化水素酸 (HF)、ヨウ化ナトリウム (NaI)、THF、アンギオテンシン I は和光純薬工業 (株) より購入した。ポリエチレングリコール (キシダ化学 (株))、ポリメチルメタクリレート (ポリマラーラボラトリー社)、界面活性剤も市販のものを用いた。

2.2 DIOSチップの作製

DIOSチップの作製は、Siuzdakらの報告^{20), 28)}を参考にし、電解法により行った。筆者らが用いたDIOSチップ作製のための電解装置の概略図をFig. 1に示す。電解セルはテフロン製 (内径 20 mm × 外径 30 mm × 高さ 50 mm) で、その下部にシリコンウエハーを固定する。電解液は

46% HF とエタノールの等量混合液である。電解液 6 mL が入ったセルを超音波洗浄機の中で、100 W の白熱灯を 15 cm の距離から照射しながらエッチングを行った。エッチング後、DIOSチップをエタノールで洗浄した。作製したDIOSチップはエタノール中で保存した。シリコンウエハーは、n型で結晶の配向が(100)、抵抗率が0.04~0.08、1~3、3.5~7 Ωcm の3種類のものを用いた。エッチングの電流密度を4~66 mA/cm²・エッチングの時間を0.5~30分で最適化した。筆者らが用いた電解装置では、シリコンウエハー上に直径 20 mm のポーラスシリコン部が作製された (Fig. 1)。

2.3 MS測定

アンギオテンシン I (0.13 mg) を水-アセトニトリル (1 : 1, v/v) 1 mL に溶解した。さらに、種々のポリマー (2 mg) と NaI (4 mg) を THF (1 mL) に溶解した。これらの試料溶液 1.5 μL を DIOSチップ上にのせ、室温で乾燥させた。マトリックス CHCA (15 mg) を THF (1 mL) に溶解した。MALDIの測定には、試料、マトリックス、NaIの溶液を5 : 15 : 1の体積比で混合し、その混合試料の0.5 μL をステンレスの試料板に同様にのせ乾燥させた。

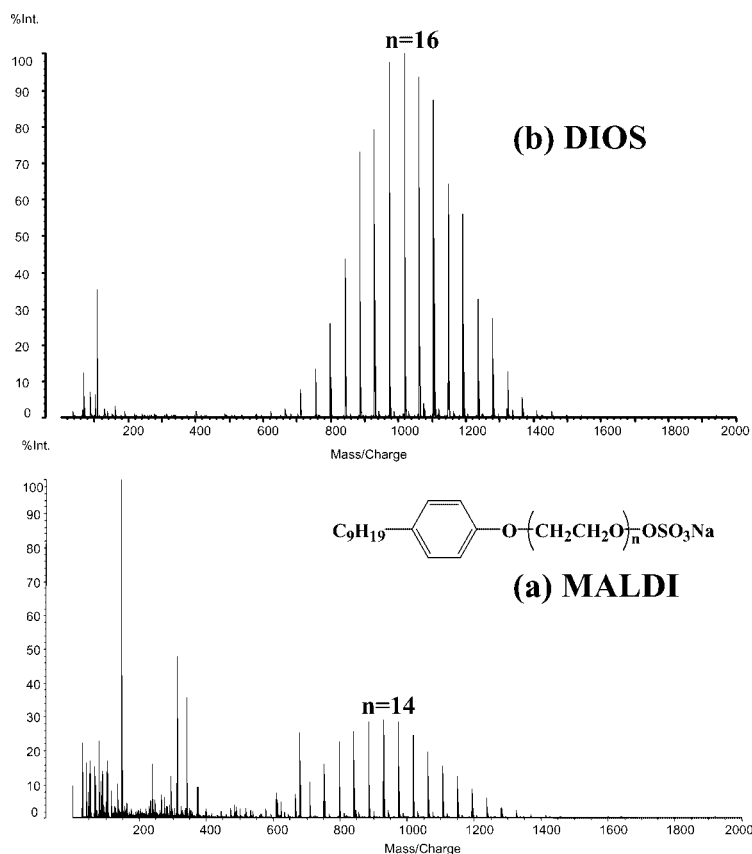


Fig. 6. Negative ion mass spectra of nonylphenolpoly-ethoxylatesulfate sodium salt: (a) MALDI and (b) DIOS.

マススペクトルは、飛行時間型質量分析計 AXIMA CFR ((株)島津製作所)を用い、リニアモードで測定した。シリコンウエハーは、0.5 mmの厚みがあるので、純正のサンプルプレートと同形で、シリコンウエハーの厚さだけを削ったステンレス板を作製し、その上に導電性アルミ箔両面テープ ((株)寺岡製作所)を用いて DIOS チップを貼り付けて装置内に導入した (Fig. 1).

3. 結果と考察

電解法により作製した DIOS チップの性能は、シリコンウエハーの種類、光の強度、電解液の組成、電流密度、エッチング時間などに影響を受けることが報告されている^{20), 27)}。本研究では、DIOS チップ作製におけるシリコンウエハーの抵抗率、エッチング時間、電流密度に注目して最適化を行った。抵抗率が 3.5~7 Ωcm のシリコンウエハーを用い、エッチング時間を 1 分に固定し、電流密度の影響を調べた。アンギオテンシン I のマススペクトルを Fig. 2 に示す。 m/z 1297 の強い $[M+H]^+$ イオンと、 m/z 1319 と 1335 に $[M+Na]^+$ と $[M+K]^+$ イオンが検出できた。 m/z 552 以下のイオンは同定できなかった。電流密度を大きくするに従って、アンギオテンシンのイオン強度が強くなった。さらに、エッチング時間の影響を調べたアンギオテンシン I のマススペクトルを Fig. 3 に示す。エッチング時間が長くなると m/z 243 付近の低分子量領域に多

くの夾雑物ピークを検出した。これらの夾雑物は、ポーラスシリコンが吸着した有機物であると考えられている²⁰⁾。エッチング時間が短くなるに従って夾雑物のイオン強度は小さくなり、しかもそのピークの数も少なくなった。エッチング時間が 1 分の場合、夾雑物のピークはほとんど検出されなかった。エッチング時間が 1 分より短くなるとアンギオテンシンのイオン強度が小さくなった。

抵抗率が異なるシリコンウエハー (0.04~0.08, 1~3 Ωcm) を用い、同様にエッチング時間と電流密度の最適化を行ったが、抵抗率 3.5~7 Ωcm のシリコンウエハーを用いた方が、夾雑物の影響が少なく、イオン強度が強かった。合成高分子であるポリエチレングリコールを用いて同様にシリコンウエハーの抵抗率、エッチング時間、電流密度の影響を調べたところ、ポリエチレングリコールではイオン強度が強いシグナルが得られるために、アンギオテンシンの場合ほど大きな差は見られなかったが、同様の傾向が見られた。 Siuzdak らが最近報告した DIOS チップ作製の最適条件²⁸⁾と筆者らが得た条件とは、電流密度やエッチング時間において異なっていた。これは、光の強度の違い、エッチング装置の構造による違いによると思われる。

ポリエチレングリコールの MALDI および DIOS マススペクトルを Fig. 4 に示す。MALDI スペクトルでは、ポリエチレングリコールの Na 付加イオン以外に、マトリックスの分子イオン、クラスターイオン、フラグメントイオ

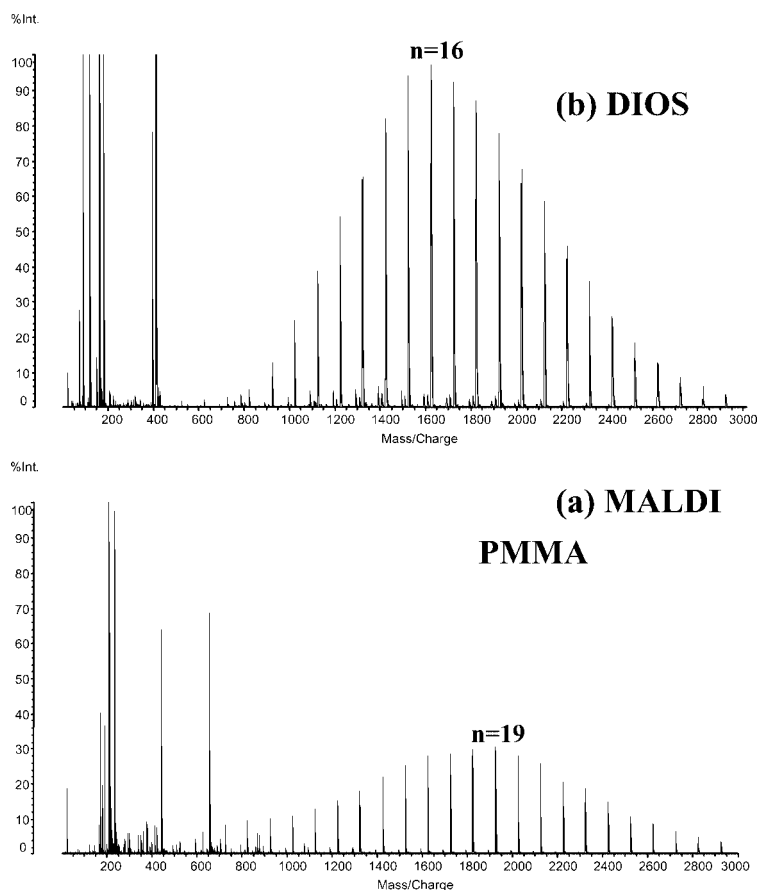


Fig. 7. Positive ion mass spectra of polymethylmethacrylate: (a) MALDI and (b) DIOS.

ンが検出され、スペクトルの解析が困難である (Fig. 4a). それに対して、DIOS スペクトルでは、ポリエチレングリコールの強い分子イオンだけが検出され、低分子量成分の解析に有効であることがわかる (Fig. 4b).

非イオン型界面活性剤であるノニルフェノールポリエトキシレートの DIOS マススペクトルでは、Na 付加イオンだけが検出できた (Fig. 5b). ノニルフェノールポリエトキシレートの分子イオンだけでなく、試料中に不純物として少量含まれるオクチルフェノールポリエトキシレートやデシルフェノールポリエトキシレートのイオンも明確に検出することができた。すでに報告されているように親水性の合成高分子の正イオンモード測定において^{20), 28)}, DIOS が有効であることが確認できた。

陰イオン型界面活性剤であるノニルフェノールポリエトキシレート硫酸エステル塩の負イオンモードのマススペクトルを Fig. 6 に示す。MALDI スペクトルでは、負イオンモードの測定においてもマトリックス由来のスペクトルが多く見られるが (Fig. 6a), DIOS スペクトルではイオン強度が強い、夾雑物によるイオンがほとんどないスペクトルが得られた (Fig. 6b). DIOS が負イオンモードの測定においても有効であることがわかった。

疎水性の合成高分子であるポリメチルメタクリレートの DIOS スペクトルでは、 m/z 413 にジオクチルフタレート

の Na 付加イオンおよび m/z 164, 180 に不明のピークが見られるが、ポリメチルメタクリレートの Na 付加イオンを明瞭に検出できた (Fig. 7b). このことから、疎水性のポリマーにおいても DIOS が有効であることがわかった。

4. 結 論

本研究では、DIOS チップ作製のための電解装置を製作し、シリコンウエハーの抵抗率、電流密度、およびエッチング時間を最適化した。その結果、低質量域において夾雑物イオンの影響がほとんどないマススペクトルを得ることのできる DIOS チップを作製することができた。そして、DIOS によって親水性合成高分子の正イオンモードおよび負イオンモードの測定でイオン強度の強いスペクトルが得られることがわかった。さらに、ポリメチルメタクリレートのような疎水性の合成高分子に対しても、DIOS 法が有効であることがわかった。

文 献

- 1) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 2) M. Karas, D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **57**, 2935 (1985).
- 3) M. Karas, D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Int. J. Mass. Spectrom.*, **78**, 53 (1987).

- 4) M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 5) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamasita, and J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **57**, 675 (1985).
- 6) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S.F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
- 7) R. B. Cole, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry," Wiley, New York (1997).
- 8) 佐藤浩昭, 大谷 肇, *ぶんせき*, 467 (2001).
- 9) S. D. Hanton, *Chem. Rev.*, **101**, 527 (2001).
- 10) G. Montaudo and R. P. Lattimer (eds.), "Mass Spectrometry of Polymers," CRC, Boca Raton (2001).
- 11) 荒川隆一, 奥野昌二, *ぶんせき*, 502 (2002).
- 12) M. Fujita, *Acc. Chem. Res.*, **32**, 53 (1999).
- 13) G. F. Swiegers and T. T. Malefetse, *Chem. Rev.*, **100**, 3483 (2000).
- 14) 荒川隆一, "大学院錯体化学", 講談社サイエンティフィック (2000), p.184.
- 15) F. O. Ayorinde, P. Hambright, T. N. Porter, and Q. L. Keith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2474 (1999).
- 16) T. W. Hutchens and T. T. Yip, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 576 (1993).
- 17) S. Mouradian, C. M. Nelson, and L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8639 (1996).
- 18) Y. S. Lin and Y. C. Chen, *Anal. Chem.*, **74**, 5793 (2002).
- 19) J. Wei, J. M. Buriak, and G. Siuzdak, *Nature*, **399**, 243 (1999).
- 20) Z. Shen, J. J. Thomas, C. Averbuj, K. M. Broo, M. Engelhard, J. E. Crowell, M. G. Finn, and G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, **73**, 612 (2001).
- 21) J. J. Thomas, D. Blackledge, and G. Siuzdak, *Anal. Chim. Acta*, **442**, 183 (2001).
- 22) J. J. Thomas, Z. Shen, J. E. Crowell, M. G. Finn, and G. Siuzdak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4932 (2001).
- 23) R. A. Kruse, S. S. Rubankhin, E. V. Romanova, P. W. Bohn, and J. V. Sweedler, *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1317 (2001).
- 24) Z. Shen, S. Yao, J. Crowell, G. Siuzdak, and M. G. Finn, *Israel J. Chem.*, **41**, 313 (2002).
- 25) W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 646 (2002).
- 26) V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, B. D. Musselman, and V. M. Doroshenko, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1737 (2002).
- 27) G. Siuzdak, 日本質量分析学会創立 50 周年記念若手講演会要旨集, p. 17 (2002).
- 28) W. G. Lewis, Z. Shen, M. G. Finn, and G. Siuzdak, *Int. J. Mass Spectrom.*, **226**, 107 (2003).
- 29) K. Huikko, P. Ostman, C. Sauber, F. Mandel, K. Grigorous, S. Franssila, T. Kotiaho, and R. Kostianen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1339 (2003).

Keywords: DIOS (desorption/ionization on porous silicon), Laser desorption mass spectrometry, Synthetic polymer