

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5955032号  
(P5955032)

(45) 発行日 平成28年7月20日(2016.7.20)

(24) 登録日 平成28年6月24日(2016.6.24)

(51) Int.Cl.

H01J 49/10 (2006.01)  
G01N 27/62 (2006.01)

F 1

H01J 49/10  
G01N 27/62  
G01N 27/62  
G01N 27/62G  
F  
V

請求項の数 18 (全 18 頁)

(21) 出願番号

特願2012-45920 (P2012-45920)

(22) 出願日

平成24年3月1日(2012.3.1)

(65) 公開番号

特開2013-181840 (P2013-181840A)

(43) 公開日

平成25年9月12日(2013.9.12)

審査請求日

平成27年2月24日(2015.2.24)

(73) 特許権者 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(74) 代理人 100094112

弁理士 岡部 譲

(74) 代理人 100174230

弁理士 田中 尚文

(74) 代理人 100096943

弁理士 白井 伸一

(74) 代理人 100101498

弁理士 越智 隆夫

(74) 代理人 100096688

弁理士 本宮 照久

(74) 代理人 100107401

弁理士 高橋 誠一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イオン化方法、質量分析方法、抽出方法及び精製方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

物質のイオン化方法であって、

(i) プローブの一端を基板の表面に近接させた状態で該プローブの一端から該基板の表面に液体を供給し、該プローブの一端と該基板の表面との間に前記物質を含む液体による液架橋を形成する工程と、

(ii) 前記プローブと前記基板から離隔し該基板の表面に対向して配置されたイオン引き出し電極との間に電圧を印加して、前記プローブの一端の前記イオン引き出し電極側の側面と前記イオン引き出し電極との間の前記液体に含まれる前記物質をイオン化する工程と、を有し、

前記プローブの一端を前記プローブの長軸と交差する方向に振動させることで、前記工程(i)と前記工程(ii)とを交互に生ぜしめることを特徴とするイオン化方法。

## 【請求項 2】

前記工程(i)と前記工程(ii)との間では、前記プローブの一端の位置が異なっている請求項1に記載のイオン化方法。

## 【請求項 3】

前記工程(ii)において、前記液体は、前記プローブの一端の前記イオン引き出し電極側の側面でテイラーコーンを形成する請求項1または2に記載のイオン化方法。

## 【請求項 4】

前記基板の表面と前記プローブの長軸とが角度を有するように配置されており、  
前記イオン引き出し電極が前記基板および前記プローブの上方に配置されている請求項  
1から3のいずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項5】**

前記工程(i)において、前記液体の一部が前記プローブの一端から帶電液滴として脱離する請求項1から4のいずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項6】**

前記工程(ii)において、前記液体の一部が前記プローブの一端に形成されたテイラーコーンから帶電液滴として脱離する請求項3に記載のイオン化方法。 10

**【請求項7】**

前記帶電液滴はレイリー分裂を生じる請求項5または6に記載のイオン化方法。

**【請求項8】**

前記プローブは複数の流路を有する請求項1から7のいずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項9】**

前記プローブは突起物を有する請求項1から8のいずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項10】**

前記突起物を構成する材料は白金を含む請求項9に記載のイオン化方法。 20

**【請求項11】**

前記物質は前記基板上に固定されており、前記液体は前記液架橋と該基板とが接触する領域で該物質を溶解させることを特徴とする請求項1から10のいずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項12】**

前記プローブが前記基板に対して走査することを特徴とする請求項11に記載のイオン化方法。

**【請求項13】**

前記工程(i)と前記工程(ii)とが大気圧環境下で実施される請求項1から12の  
いずれか1項に記載のイオン化方法。

**【請求項14】**

請求項1から13のいずれか1項に記載のイオン化方法を利用して前記物質をイオン化し、該イオン化された物質を質量分析計へ導き質量分析を行うことを特徴とする質量分析方法。 30

**【請求項15】**

請求項1から13のいずれか1項に記載のイオン化方法を利用して前記物質をイオン化し、該イオン化された物質を電界によって前記液体から分離することを特徴とする物質の抽出または精製方法。

**【請求項16】**

基板の表面に近接させて該基板の表面に液体を供給するための一端を有するプローブと 40

、該基板から離隔し該基板の表面に対向して配置されたイオン引き出し電極と、

前記プローブと前記イオン引き出し電極との間に電圧を印加するための電圧印加手段と

、前記プローブの一端と、前記基板の表面と、の間に前記液体による液架橋を形成する液体付与手段と、

前記プローブの一端を前記プローブの軸と交差する方向に振動させる手段と、

を含む、物質のイオン化装置であって、

前記振動させる手段が前記プローブの一端を振動させ、

前記プローブの一端と前記基板の表面との間に前記物質を含む液体による液架橋の形成と、

前記プローブの一端と前記基板の表面との間に前記物質を含む液体による液架橋の形成と、 50

前記プローブの一端の前記イオン引き出し電極側の側面と前記イオン引き出し電極との間の前記液体に含まれる前記物質のイオン化と、  
を交互に生ぜしめることを特徴とする物質のイオン化装置。

**【請求項 17】**

前記振動させる手段が、前記液架橋の形成、および前記物質のイオン化を、大気圧環境下で実施する請求項 16 に記載のイオン化装置。

**【請求項 18】**

請求項 16 または 17 に記載のイオン化装置と、該イオン化装置でイオン化された物質を分析する質量分析計と、を有する質量分析装置。

**【発明の詳細な説明】**

10

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、物質のイオン化方法およびこれを用いた質量分析方法に関する。また、本発明は、物質の抽出方法、精製方法に関する。

**【背景技術】**

**【0002】**

成分分析法の一つである質量分析法は、試料中の成分をイオン化し、その質量電荷比（質量数／電荷数）を計測する技術である。

**【0003】**

20

近年、固体試料表面に存在している成分の分布を画像化する技術が開発されている。例えば、特定の成分の分布を質量画像として可視化することで、試料の状況を判断することができる。このような技術の一例として、ガン組織を有する病理検体の質量画像を元に、病理診断の根拠となるデータを示す方法が開発されている。質量画像は、通常、試料表面の複数の測定点で試料をイオン化し、発生したイオン化の質量電荷比をそれぞれの測定点ごとに求め、試料表面の位置とイオンの情報を対応づけることにより取得する。そのため、得られる質量画像の空間分解能を向上するために、試料表面の微小領域をイオン化する技術が求められている。

**【0004】**

30

試料表面の微小領域の成分をイオン化する技術として、これまでに、振動するカンチレバー型プローブを用いて、固体物質表面の成分をイオン化する方法が提案されている（特許文献 1、非特許文献 1）。この方法では、一端に尖った先端を有し、逆の端部をカンチレバーに固定したプローブを、プローブの尖った先端が試料と質量分析装置のイオン取り込み口の前との間を往復するように運動させる。試料の微小領域に接触して試料の成分が付着したプローブの尖った先端部分に、イオン取り込み口の前で電圧やレーザー光を照射することで、プローブの尖った先端に付着した当該微小領域の成分のみをイオン化することが可能になる。

**【0005】**

40

また、固体試料表面の微小領域に溶媒を付与して当該微小領域に存在する成分を溶解し、溶解した成分を大気圧環境下でイオン化する方法が提案されている（非特許文献 2）。この方法では、固体試料中の成分を溶解するための溶媒を試料の表面に供給するための第一のキャピラリと、成分が溶媒に溶解した混合溶液をイオン化部分まで移動させるための第二のキャピラリとが用いられている。固体試料の表面に二本のキャピラリが近接した状態で、第一のキャピラリから溶媒が供給されることで、二本のキャピラリの先端部と試料表面との間に液架橋が形成される。この液架橋において固体試料の接触部分のみが溶解された後に、第二のキャピラリに導入される。溶媒には高電圧が印加されており、第二のキャピラリの先端部でイオン化される。この方法を用いることで、微小領域のイオン化が可能となる。また、大気圧環境下でイオン化をすることにより、処理時間の短縮化および装置の小型化が可能となり、特に数多くの試料の分析を行う際に有利である。

**【0006】**

50

なお、生体組織などの生物由来の材料の質量分析においては、イオン化する際に分子が

非選択的に切断されて断片化した場合、成分の特定が困難になるため、生体成分を壊すことなくイオン化するソフトイオン化も求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第6566653号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Dong Weon Lee et al., "Switchable cantilever for a time-of-flight scanning force microscope" Applied Physics Letters, 84, 1558 (2004) 10

【非特許文献2】Patrick J. Roach et al., "Nanospray desorption electrospray ionization: an ambient method for liquid extraction surface sampling in mass spectrometry" Analyst, 135, pp 2233-2236 (2010).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

特許文献1および非特許文献1に開示されている方法では、測定される成分は、原子または少数の原子から構成される分子である。この方法では、脂質・糖・蛋白質などの高分子をイオン化しようとすると、尖ったプローブ先端に高分子の構造を保持したまま付着させ、その後に脱離・ソフトイオン化（分子構造が切断されずにイオン化される）を発生させることが困難であるという課題がある。 20

【0010】

非特許文献2に開示されている方法では、二本のキャピラリの先端部の最近接距離よりも小さなサイズの液架橋を作ることが困難であり、イオン化する領域を小さくすることによる空間分解能の向上が困難であるという課題がある。また、この方法では、二本のキャピラリを精度良く合わせて近接させるための仕組みが必要であり、装置を構成する部品点数が増加し、装置自体も複雑なものになるという課題もある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明のイオン化方法は、液体に含まれる物質のイオン化方法であって、(i)プローブから基板上に液体を供給し、該プローブと該基板との間に該物質を含む液体による液架橋を形成する工程と、(ii)前記液体が接する前記プローブの導電性部位とイオン引き出し電極の間で電界を形成する工程と、を有することを特徴とする。 30

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、大気圧環境下で微小な量の物質をイオン化するにあたり、より容易に空間分解能の向上を達成することができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の第一の実施形態を説明する図。

40

【図2】本発明の第二の実施形態を説明する図。

【図3】本発明の第三の実施形態を説明する図。

【図4】本発明の第四の実施形態を説明する図。

【図5】実施例1において、液架橋が形成された状態および、イオンが発生している状態を高速カメラで観察した結果を表す図。

【図6】実施例2において用いた試料の形態を表す図。

【図7】実施例2で得られた質量電荷比50から1000の質量スペクトル。

【図8】実施例2でプローブが組織切片上をスキャンしたときのイオン強度の時間変化を表す図。

【図9】実施例2で得られた質量電荷比1000から2000の質量スペクトル。

50

**【発明を実施するための形態】****【0014】**

以下、本発明の方法について図面を示して説明する。本発明を実施する形態の一例を図1に示す。図1において、1は液体が通過する流路を内部に有するプローブ、2はプローブ1を振動させる振動提供手段、3は基板、4はプローブ1と基板3との間に形成された液架橋、5はテイラーコーン、6は帯電した微小液滴、7は質量分析装置にイオンを取り込むためのイオン引き出し電極を有するイオン取込部、8は基板を支持する試料ステージである。9はプローブ1に液体を供給する液体供給装置、10は電圧印加装置、11は導電性の流路、12は電圧印加装置、13は試料ステージ制御装置、14は電圧印加装置、15は質量分析装置である。

10

**【0015】**

本発明においては、液体供給装置9から供給された液体は基板3とプローブ1との間で液架橋4を形成する。さらに、液架橋4に寄与した液体が、プローブ1の振動と電圧印加装置10及び電圧印加装置14による電界とによって帯電した微小液滴6になることにより、測定対象の成分をイオンとしてイオン取込部7に取り込むことが可能となる。

**【0016】**

すなわち、本形態においては、プローブが基板上への液体の付与手段であり、物質の取得手段であり、イオン化のための好適な位置への液体の移送手段であり、イオン化のためのテイラーコーンの形成手段となっている。

**【0017】**

液体供給装置9は、基板3上に固定された試料に含まれる被分析物を溶解するための溶媒又は被分析物と被分析物を溶解している溶媒との混合溶液（以下、これらの溶媒と混同溶液とをあわせて単に液体と記す）を供給する。液体供給装置9から供給された液体は、導電性の流路11を経由してプローブ1内部の流路へと導かれ、その際に、導電性の流路11を介して電圧印加装置10から液体に電圧が印加される。液体には直流電圧、交流電圧、パルス電圧又はゼロボルトのいずれかが印加される。

20

**【0018】**

なお、本実施形態において、プローブとは、プローブ1の内部の流路や接続用配管に導電性の流路11の全部又は一部分が包摂されている場合は、これらの総称を意味する。また、プローブ1の内部の流路や接続用配管に導電性の流路11が包摂されていない場合にも、本実施形態におけるプローブは、広義には、これらの総称を意味する。すなわち、プローブを形成する素材の少なくとも一部分が導電性であればよい。導電性を有する材料には、金属・半導体などが挙げられるが、電圧印加装置から電圧が印加された場合に、再現性のある一定の電圧値を示す性質を有するものであればいかなるものでもよい。つまり、本実施形態において、プローブの導電性部位に電圧を印加することで、液体に電圧を印加している。

30

**【0019】**

本実施形態でプローブに電圧を印加するとは、後述のイオン引き出し電極の電位とは異なる電位を、プローブの少なくとも一部分を形成する導電性部位に付与し、プローブの少なくとも一部分を形成する導電性部位と後述のイオン引き出し電極の間で、電界を形成することを意味する。この電界が達成される限りにおいて、ここで印加される電圧がゼロボルトであってもよい。流路11の材料は導電性の物質であれば良く、例えばステンレス・金・白金などを用いることができる。

40

**【0020】**

プローブ1、導電性の流路11及び液体供給装置9を接続する接続用配管としては、例えば、シリカキャピラリやメタルキャピラリ等の細管などの、微小体積の液体を供給する細管を利用することでき、その電気伝導性は絶縁体・導電体・半導体のいずれであってもよい。なお、導電性の流路11は、液体供給装置9から供給された液体がプローブ1内部を通り、液体供給装置9とは反対側のプローブ1の先端まで導かれる流路の一部分を構成すればよく、その位置は特に限定されない。例えば、プローブ1の内部の流路や接続用配

50

管に導電性の流路 11 の全部又は一部分が包摂されていても良く、このような構成として、ステンレス線、タンクステン線、白金線などの導電性物体がシリカキャピラリに插入されたプローブなどを用いることができる。

【0021】

プローブ 1 そのものが導電体の場合、導電性の流路 11 に印加された電圧がプローブ 1 に伝播し、プローブ 1 内部の流路の液体に電圧が印加される。このような実施形態の詳細は、本明細書の第二の実施形態に記載されている。一方、プローブ 1 が絶縁体の場合、導電性の流路 11 に印加された電圧はプローブ 1 に伝播することができないが、流路 11 に流れる液体に電圧が印加され、その液体がプローブ 1 に導入されるため、プローブ 1 に電圧が伝播されていない場合にも、液体に電圧を印加し、液体を帯電させることになる。

10

【0022】

液体供給装置 9 から供給された液体は、プローブ 1 の先端から基板 3 上へと提供される。このとき、試料を基板上にあらかじめ固定化しておき、基板 3 上の試料に含まれる被分析物としての特定の成分をプローブ 1 から供給された溶媒に溶解させてもよいし、あらかじめ被分析物が溶媒と混合された混合溶液を基板 3 上に供給してもよい。

【0023】

これにより、大気圧環境下で微小な量の物質を高分解能でイオン化することが可能となる。

【0024】

本実施形態では、上記構成において、さらにプローブ 1 が振動する。なお、本発明でプローブ 1 が振動するとは、プローブ 1 の基板 3 側の先端の位置が空間的に変位するようにプローブ 1 が運動することをいう。特に、プローブの軸方向と交差する方向にプローブを屈曲振動させることが好ましい。振動提供手段 2 からの機械的な振動を与えることでプローブ 1 を振動させることができるが、振動供給手段 2 を利用せずに、プローブ 1 の自発的な共振をそのまま利用してもよい。

20

【0025】

一般に、片持ち梁型の物体の 1 次モードの固有振動周波数は、梁の長さ、密度、断面積、ヤング率、断面二次モーメントにより表現できることが知られている。本実施形態におけるプローブも片持梁型のプローブに類似しているため、プローブの材質、サイズ、プローブに供給する液体の種類と体積、およびプローブとイオン取込部との間の電界の大きさを調整することで、プローブの固有振動周波数を制御することができる。後述の実施例ではプローブの材質としてシリカを用いたが、他の材質でもよく、例えばシリコン、ポリマー材料、金属材料を使用することもでき、材料の密度・ヤング率の異なるプローブを利用しても良い。振動供給手段 2 は振動を発生させる物体であればよく、例えばピエゾ素子・振動モータなどを用いる事ができる。プローブ 1 の振動は、連続的振動・断続的振動のいずれであってもよく、振動周波数は共振周波数・非共振周波数のいずれでもよい。液体への電圧を印加するタイミング及び、プローブ 1 に振動を供給するタイミングは、任意に決定することができる。

30

【0026】

プローブ 1 の振動の周波数や振幅は、任意の値に設定することが可能であり、一定値に保持しても良いし、変調をかけても良い。例えば、振動提供手段 2 に電気的に接続した電圧印加装置 12 から出力される電圧値または電流値を変更することにより、振動の周波数を任意に調整することができる。また、振幅の大きさは、液架橋の形成とイオン化の発生がそれぞれ両立するように設定され、プローブの種類や電界の大きさを変更した場合には適宜設定を変更することができる。

40

【0027】

プローブ 1 の振動の方向についても、例えばプローブ 1 に 2 つの独立した振動提供手段 2 を接触させ、互いに直交する方向の振動を発生させることにより、任意の方向の屈曲振動をプローブ 1 に与えることができる。このような振動の種類としては、一軸振動・回転運動・螺旋運動などが挙げられる。一軸振動ではプローブが特定の周波数および振幅で一

50

軸方向に振動する。例えばカンチレバー型のプローブの振動がこれに該当し、振動を正弦波で近似することができる。また、回転運動では、互いに直交する二軸方向の振動をプローブに与えることで、プローブが特定の周波数および振幅で振動する。このとき、振動は2つの正弦波の合成で近似することができ、リサージュ図形として知られている。

【0028】

なお、プローブ1を対向する複数の振動提供手段2で挟むことで、プローブ1に安定して振動を与えることもできる。

【0029】

本実施形態においては、プローブ1が振動することにより、プローブ1と基板3とが液体を介してつながった状態と、プローブ1と基板3が離れた状態を分離して発生させることができる。2つの物体が液体を介してつながった状態は、一般に液架橋と呼ばれる。本実施形態において、液架橋4とは、プローブ1から供給された液体が、少なくとも、プローブ1及び基板3の両方に物理的に接触している状態のことをいう。

10

【0030】

すなわち、本実施形態においては( i )プローブから基板上に液体を供給し、該プローブと該基板との間に該物質を含む液体による液架橋を形成する工程と、( i i )前記液体が接する前記プローブの導電性部位とイオン引き出し電極の間でイオンを発生させるための電界を形成する工程とが、プローブの一端を振動させることにより、交互に変更して達成されている。

振動によるプローブの一端の位置を異ならせることで、( i )工程と( i i )工程をそれぞれ実施する好適な配置関係に設定することができる。

20

【0031】

プローブ1から連続的または断続的に液体が供給されることで、液架橋4が形成される。液架橋4が形成される際に、プローブ1は基板3に接してもよいし、接しなくてもよい。プローブ1が基板3に接する場合には、液架橋4をより安定して形成することができる。

【0032】

振動によりプローブ1が基板3から離れた状態において、液架橋4を形成していた液体は、電圧印加装置14と電気的に接続されたイオン引き出し電極を有するイオン取込部7に近づく。この際に、液体は、導電性の流路11を通じて電圧が印加された液体自身の電位と電圧印加装置14により電圧が印加されるイオン引き出し電極による電位との間の電界により、プローブ1のイオン取込部7側の側面に移動し、ティラーコーン5を形成する。ここで側面とは、エレクトロスプレーが発生する箇所を意味している。図1にはプローブの長軸方向を形成する連続面にティラーコーン5が形成されているが、この位置はイオン取り込み部7と液体の間の電界、およびプローブ1の液体との濡れ性等により影響を受けるため、これ以外の面を含む位置にティラーコーン5が形成されても良い。

30

【0033】

ティラーコーン5の先端部分では電界が大きくなり、混合溶液からエレクトロスプレーが発生し、微小な帶電液滴6が発生する。電界の大きさを適当に設定することで、帶電液滴がレイリー分裂を生じ、特定の成分のイオンを発生させることができる。帶電液滴やイオンは気流の流れと電界に従ってイオン取込部7へと導かれる。このとき、ティラーコーンを形成する溶液の周囲の電界が大きくなるように、プローブの振動はイオン取込部7に近接する方向への運動を含むことが好ましい。ここで、レイリー分裂とは帶電液滴6がレイリー極限に達し、帶電液滴中の過剰な電荷が、二次液滴として放出される現象のことを行う。液体がティラーコーンを形成し、ティラーコーンの先端部分から帶電液滴が含まれるエレクトロスプレーが発生し、レイリー分裂が生じている間に、帶電液滴に含まれる成分が気相イオンとして発生することが知られている。また、エレクトロスプレーが発生するしきい電圧Vcは $V_c = 0.863 (d / r_c)^{0.5}$  ( : 液体の表面張力、d : 液体とイオン引き出し電極間の距離、r\_c : プローブの流路の開口部の半径、 $r_c$  : 真空の誘電率 ) であることが知られている。( J. Mass Spectrom. Soc 50

40

50

. Jpn. Vol. 58, 139-154, 2010).

**【0034】**

イオン取込部7は室温から数百度の間の特定の温度に加熱され、さらに電圧が印加されている。このとき、イオンが発生するように適切な電界が生じるように、電圧印加装置10から液体に印加される電圧と電圧印加装置14によりイオン引き出し電極に印加される電圧とを調整する必要がある。電圧印加装置14からの電圧としては、直流電圧、交流電圧、パルス電圧若しくはゼロボルトのいずれか又はそれらの任意の組み合わせを用いることができる。なお、イオンを発生させるための電界は、プローブの導電性部位である導電性の流路11に印加した電位と、イオン取込部4の電位と、液体とイオン取込部4との距離により規定される。そのため、イオン化したい物質や溶媒の種類に従って、適切な電界が生じるように、これらを設定する必要がある。10

**【0035】**

その後、イオンはイオン取込部7と接続されている質量分析装置15へ差動排気系を通じて導入され、そこでイオンの質量電荷比が計測される。質量分析装置15としては、四重極型質量分析計、飛行時間型質量分析計、磁場偏向型質量分析計、イオントラップ型質量分析計、イオンサイクロトロン型質量分析計など任意のものを利用することができる。また、イオンの質量電荷比（質量数／電荷数、以下m/zと記す）とイオンの発生量の相関を計測することで、質量スペクトルを得ることもできる。

**【0036】**

テイラーコーン5のサイズは液体の流量、液体の組成、プローブ1の先端形状、プローブ1の振動周波数、電界の大きさなどにより変化する。テイラーコーン5が非常に小さい場合、その形態は顕微鏡などで確認されない場合があるが、イオンが安定して発生していればよい。20

**【0037】**

本実施形態では、振動するプローブを用いることで、液体による液架橋4が形成される工程と、テイラーコーン先端部分でエレクトロスプレーが生じ、物質がイオン化される工程とのタイミングが分離され、それぞれの工程が異なるタイミングで実施される。

**【0038】**

エレクトロスプレーの発生において、その時間変化は、エレクトロスプレーが発した状態とエレクトロスプレーが停止した状態が交互に発生し、その周期はおよそ数百ミリ秒であることが知られている。これは、帯電した液体がテイラーコーンを形成し、エレクトロスプレーを発生するためには、液体中に過剰な電荷密度を供給することが必要であり、一度エレクトロスプレーが発生すると、この過剰な電荷がテイラーコーンから放出され、再びエレクトロスプレーが発生するまでに電荷の供給が必要となるからである（J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. Vol. 58, 139-154, 2010）。

**【0039】**

本実施形態では、振動するプローブを利用して液架橋を形成するタイミングと計測対象の成分が溶解した溶液をエレクトロスプレーの発生を生じるタイミングとを分離するように制御し、従来は困難であった、エレクトロスプレーを発生させるタイミングとその回数の制御が容易になる。このことにより、後述する質量イメージを取得する際に、イオン化される試料の位置におけるエレクトロスプレーの回数を一定に保ち、質量イメージにおけるイオン強度の比較を容易にすることが可能になる。従来のエレクトロスプレーでは、帯電液滴が発生するタイミングと、エレクトロスプレーが停止するタイミングを正確に制御することが困難であるが、プローブを適切に振動させることによりこれらを制御することができるようになった。40

**【0040】**

さらに、本実施形態では、液架橋を形成するタイミングではエレクトロスプレーが発生されず、このタイミングでは液体には電荷が供給されるだけであり、液体からの電荷の放出は抑制される。このことで、エレクトロスプレーを生じるタイミングでは、液体に十分

10

20

30

40

50

な電荷が蓄積された状態となり、効率的にエレクトロスプレーを発生させることができる。さらに、本実施形態において、エレクトロスプレーが発生された状態では、プローブ先端部の液体に対して大きな電界が生じ、帶電液滴がイオン取込部に引き込まれる作用が生じていることに加えて、プローブの振動方向がイオンの引き込まれる方向に調整されることで、プローブの振動エネルギーがエレクトロスプレーを形成する液体に付与され、ティラーコーン先端部の電荷密度を上昇し、エレクトロスプレーの発生を促進する効果を生じると考えられる。

#### 【0041】

さらに、本実施形態において、試料表面を振動するプローブが走査する場合、固体試料表面とプローブとの相互作用時間が小さくなり、凹凸の大きな固体試料表面へのダメージを抑制する効果がある。振動しないプローブを用いて、凹凸の大きな固体試料を走査した場合、プローブが試料表面を切削し、表面形状が変化してしまう場合がある。

10

#### 【0042】

本実施形態においては、液体の流量やプローブ1の振動振幅や振動周波数を制御して液架橋4の形成時間を調整することで、液架橋4を構成する液体の容量を容易に制御することができる。そのため、あらかじめ被分析物が溶媒と混合された混合溶液をプローブから供給する際は、イオン化する被分析物の量を微細に調節することができる。また、基板3上に試料を固定してプローブから供給する溶媒に溶解するときも、液架橋4の形成時間を調整することで、液架橋4が接する領域の大きさを制御することができ、任意の大きさの領域の成分のみをイオン化することが可能になる。

20

#### 【0043】

また、基板上に試料を固定してイオン化する場合、試料ステージ制御装置13により基板ステージ8の位置を変化させることにより、試料のうちイオン化される位置の座標を制御することができる。さらにイオン化した位置の座標と、得られた質量スペクトルとを対応付けることで、質量スペクトルの二次元分布を得ることができる。この方法で得られるデータは、イオン化された位置の座標（X座標およびY座標）及び質量スペクトルにより構成される3次元データとなる。異なる位置でイオン化及び質量スペクトルの取得を行った後に、任意の質量電荷比のイオン量を選択し、その分布を表示することで、成分ごとの質量イメージを得ることができ、試料表面の特定の成分の分布を捉えることもできる。試料の移動方法は、プローブ1により形成される液架橋4が、測定したい任意の平面内を走査するように設定すればよい。

30

#### 【0044】

本発明の第二の実施形態において、図2に示すように、液体が通過する流路を内部に有するプローブ21を介して液体に電圧を印加しても良い。このとき、プローブ21は電圧印加装置10と電気的に接続されており、液体供給装置9から供給される液体にプローブ21を介して電圧が印加される。なお、上述の実施形態と同様に、プローブに電圧を印加するとは、イオン引き出し電極による電位とは異なる電位をプローブの少なくとも一部分を形成する導電性部位に付与して、イオンの発生が可能な電界を、イオン引き出し電極とプローブの間に形成することを意味し、この電界が達成される限りにおいて、ここでプローブの少なくとも一部分を形成する導電性部位に印加される電圧がゼロボルトであってもよい。プローブ21の材料は導電性の物質であれば良く、例えばステンレス・金・白金などの金属、または金属が一部分を被覆しているガラスなどの誘電体を用いることができる。

40

#### 【0045】

また、本発明の第三の実施形態において、図3に示すように、複数の種類の液体を供給することができるプローブ31用いても良い。図3において、プローブ31は、液体を供給する第一の流路32及び液体を供給する第二の流路33を有する。第一の流路32と基板3との間には液架橋4が形成される。一方で、第二の流路33の先端部は試料と接触しないように振動の振幅やプローブの角度を調整することで、第二の流路33から出た液体は液架橋を形成しないようにする。なお、この時、流路32を流れる第一の液体及び流路

50

3 3 を流れる第二の液体には、それぞれ異なる導電性の流路を通じて、異なる電位を独立して与えることもできる。

【 0 0 4 6 】

第一の流路 3 2 及び第二の流路 3 3 には、別種類の液体を流してもよいし、同一種類の液体を流してもよい。例えば、別種類の液体を用いる場合、試料表面の成分を溶解する溶媒を第一の流路 3 2 に導入し、第一の液体に含まれる特定の成分と反応する分子種を含む溶媒を第二の流路 3 3 に導入することで、特定の成分を選択的にイオン化させることができる。

【 0 0 4 7 】

また、同一の液体を用いる場合、例えば、試料表面と接触し、液架橋を形成するための液体を第一の流路 3 2 及び第二の流路 3 3 の両方に導入する。このとき、プローブ 3 1 の側面が第二の流路 3 3 から出た液体で常に洗浄されることにより、プローブ先端部分の側面の汚染を防ぎ、質量イメージの空間分解能の低下を防ぐことができる。

【 0 0 4 8 】

なお、ここで示したのは一例であり、上記流路の空間的な位置関係が異なっていても、3 種類以上の流路を内包するプローブを用いても良い。

【 0 0 4 9 】

また、本発明の第四の実施形態において、図 4 に示すように、プローブの先端部分の近傍に金属線などによる突起物を形成することにより、テイラーコーンの形成及びイオン化を安定化させることもできる。図 4 において、プローブ 4 1 には液体を流すための流路 4 2 が形成されている。このとき、プローブ 4 1 に金属線 4 3 を挿入し、プローブ 4 1 の先端部分で金属線 4 3 の一部分が露出した構造を形成する。このような構造を形成するためには、例えば、流路 4 2 に白金などの金属線を挿入し、プローブ 4 1 の先端部分で白金線を露出した上でイオン取込部 7 の方向に曲げる。白金線のもう一方は流路 4 2 の内壁部分に接触し、プローブ 4 1 からは容易に脱落しない形状に加工されている。この方法を用いると、プローブ 4 1 と基板 3 との間で液架橋を形成した液体は、プローブ 4 1 の金属線部分に沿って自発的に移動するため、突起物部分で安定してテイラーコーンが形成される。このように、微小な突起物を形成することで、帯電した液体をプローブ 4 1 の先端部分で滞在させることができ、安定してイオン化をることができる。突起物は必ずしも金属線 4 3 のような形態である必要はなく、任意に曲げられた金属線 4 4 や、直線状の金属線 4 5 を用いることもできる。金属線以外の物質を利用することもできる。例えばエポキシ系の樹脂などのポリマー材料を、プローブ先端部分に設置することにより、突起物 4 6 を形成することもできる。

【 0 0 5 0 】

本実施形態においてイオン化の対象となる試料は、特に限定されることはない。脂質・糖・蛋白質などの高分子からなる有機化合物をイオン化の対象とする際には、本実施形態の方法によれば、これらの物質を容易にソフトイオン化することが可能となる。

【 0 0 5 1 】

また、イオンはそれぞれ固有の質量電荷比を有しているので、イオンの周囲の電界を調整すれば、特定のイオンのみを分離することができる。すなわち、混合物中の特定の成分を抽出・精製することもできる。

【 0 0 5 2 】

特定の成分のみを分離する方法の一例として、複数のイオン種を真空チャンバ内に導入し、電界による分離を行った後に、特定のイオン成分のみを真空チャンバ内の基板に集積する方法が挙げられる。この方法を用いれば、前記成分が集積された基板を真空チャンバから取り出し、適切な溶媒を用いて基板から当該成分を分離することができる。また、真空チャンバ内に人工臓器などの物体を設置し、分離されたイオンを直接付与することもできる。電界を設ける方法の一例として、四重極型電極やイオントラップ型電極などが挙げられる。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

この方法を用いることで、例えば、培養細胞の破碎抽出物に含まれる複数の成分のうち、生体の特定の部位に親和性を有するタンパク質などの物質のみを分離することができる。分離された特定の成分を物質の表面に付与すれば、その成分が有する機能をその物質に付加することも可能になる。また、特定の疾患部位に特異的に反応する成分を薬剤表面に付与すれば、薬効を向上する効果が期待される。また、本発明の方法で分離・精製したタンパク質などの物質を、人工臓器などの生体内で使用される物体の表面に付与すれば、生体内での拒絶反応を抑制する効果も期待される。

【実施例】

【0054】

以下、本発明の評価方法の実施例について、図を参照しながら詳細に説明する。

10

【0055】

(実施例1) イオン化方法の高速カメラによる観察

本発明の方法を用いて、液架橋が形成された状態および、イオンが発生している状態を高速カメラで観察した結果を図5に示す。図5(a)(b)のそれぞれにおいて、図1に記載されている、プローブ、基板、質量分析装置にイオンを取り込むためのイオン引き出し電極を有するイオン取込部(MS-Tube)が記されている。質量分析装置は四重極型質量分析計である、TSQ7000(サーモフィッシューサイエンティフィック)を用いた。プローブとして、先端部分から液体を基板に供給することができるシリカキャビラリが、シリンジの金属針と接続された状態で用いられており、金属針に接続された電圧印加装置を通じて電圧が印加される。シリンジはシリンジポンプに固定されており、一定流量の液体をシリンジからプローブ先端部分に送出することができる。基板にはガラスを、混合溶液には水・メタノール・蟻酸の混合物(水:メタノール:蟻酸=498:498:2)を利用した。プローブには3~6kVの電圧を印加した。溶媒の流量は毎分0.15マイクロリットルであった。基板とプローブの角度は約20度、イオン取込部である金属管の長軸と基板の角度は約40度程度であった。MS-TubeはTSQ7000と接続されており、接続部分に37.5Vの電位が印加され、温度が300度に設定された。プローブを自発的な共振モードで振動させると、図5(a)に示す、基板に最も近接した状態と、図5(b)に示す、基板から最も離れてMS-Tubeに近接した状態とを交互に取ることが観察された。

20

【0056】

30

図5(a)の状態においては、プローブと基板の間に液架橋が形成されていることが認められた。一方、図5(b)の状態では、液架橋が消失し、プローブの一部分でテイラーコーンが形成され、その先端部分に霧状の液滴が認められた。これはエレクトロスプレーであり、電界により帯電した微小な液滴がテイラーコーンの先端から脱離している状態である。この結果から、帯電した液体がプローブの先端部分から流出し、液体の周囲の空間的な電界の影響を受けて、プローブの先端の側壁部分に移動し、テイラーコーンが形成され、微小液滴となってMS-Tubeの方向へ引かれていったと考えられる。テイラーコーンの周囲の空間的な電界は、プローブに提供された電位、MS-Tubeの電位及びMS-Tubeと帯電した液体との間の距離に主に影響を受ける。これに加えて、振動するプローブがMS-Tubeの近傍で一時的に停止し、速度がゼロになる状態では、プローブの加速度が最大になる。この状態においては、プローブに付着している帯電した液体に、プローブの長軸と直交した、MS-Tube方向へかかる力が最大となり、その力学的な作用がテイラーコーンの形成と微小液滴化を促進する効果を生じると考えられる。

40

【0057】

図5(a)の状態において、プローブが基板と接触し、プローブの速度が0になっているときは、プローブ先端の側壁部分の帯電した液体の形は歪み、テイラーコーンは形成されなかった。これは液体に対して、プローブの長軸と直行した、基板方向への力がかかり、テイラーコーンの形成が抑制された結果であると考えられる。

【0058】

図5(a)の状態と図5(b)の状態とが交互に発生している状況において、MS-T

50

u b e から取り込んだイオンの質量分析を行った結果、混合溶液の成分に由来するイオンが検出された。このことから、ティラーコーンの先端部分から帶電した微小液滴が放出され、液滴内部の成分がイオン化したと考えられる。このように、振動するプローブを用いることで、液架橋の形成のタイミングと、ティラーコーンの形成のタイミングを分離することができ、ティラーコーンによりイオン化が安定化することが分かった。

#### 【0059】

次に、振動を高速カメラで観察した結果、振動の周波数は約200ヘルツ程度、液架橋が形成された位置とエレクトロスプレーが形成された位置のプローブの変位量は約500マイクロメートルであると見積もられた。さらにプローブの長さを長くした場合、振動の周波数が低下することも確認された。ここでは、プローブの自発的な共振を利用したが、プローブの一部分に振動子を接触させた場合にも、プローブが振動することが認められた。このように、プローブの長さを変えることで振動を制御することができる。このほかにも、各パラメータを変更することで、振動を制御することができると考えられる。一般的に、片持ち梁型の物体の1次モードの固有振動周波数は、梁の長さ、密度、断面積、ヤング率、断面二次モーメントにより表現できることが知られている。本実施形態におけるプローブも片持梁型のプローブに類似しているので、プローブの材質、サイズ、プローブに供給する液体の種類と体積、プローブおよびMS Tubeの間の電界の大きさを調整することで、プローブの振動を制御することができると考えられるからである。

#### 【0060】

また、プローブ先端部分の近傍に突起物を形成することにより、ティラーコーンの形成とイオン化を安定化することもできた。キャピラリに白金などの金属線を挿入し、キャピラリ先端部分で白金線を露出し、MS Tube方向に突出させて、同様の実験を行ったところ、キャピラリ先端部分から流出した帶電した液体が、液架橋を形成した後、白金線部分に沿って自発的に移動し、安定してティラーコーンが形成される様子が確認された。

#### 【0061】

(実施例2) マウス臍臓切片の質量スペクトル取得と一次元マッピング  
(質量電荷比: 50から1000)

本発明の方法を用いて、生体成分をイオン化した場合の結果を示す。試料は、マウスの臍臓組織をクライオミクロトームで約10マイクロメートルの厚さに薄切り、ガラス基板上に固定化することで作製した。本発明の方法によりイオン化を行った試料の形態を図6に示す。臍臓組織切片は白いコントラストで示されており、ガラス基板上に5枚の切片が存在している。この試料の矢印の先端部で示されている二点を直線で結ぶ線分上に存在する試料を、本発明の方法でイオン化させた。本実施例では、プローブは振動し、断続的に試料表面とプローブの先端部分に液架橋が形成されていることを確認した。試料は一軸方向に移動するように設定されており、2秒ごとに0.05ミリ移動するように設定された。質量分析装置には四重極型質量分析計(TSQ7000; サーモフィッシュ・サイエンティフィック)を用いた。計測する質量電荷比は50から1000に設定された。そのほかの実験条件は実施例1に記載の内容と同様である。

#### 【0062】

図7に測定で得られた質量スペクトルを示す。臍臓組織とガラス基板のみ(コントロール)のそれぞれのスペクトルを比較すると、臍臓組織に特有のイオンが検出されていることが分かった。代表的な臍臓組織のイオン種のリストを表1に示す。この中で、例えばm/z = 103.97, 146.17はそれぞれ、細胞に含まれているコリン、アセチルコリンの質量に相当し、m/z = 500~800の信号は脂質の成分に由来すると考えられる。一方で、これらの断片に相当するm/zはほとんど検出されなかった。このように、本発明の方法で生体組織の成分を大気圧環境下でソフトイオン化できることが確認された。

#### 【0063】

10

20

30

40

【表1】

m/z	
103.9729	
146.1654	
156.06	
203.1553	
221.1521	
243.1482	
247.2475	10
258.0456	
287.2404	
296.1388	
317.0351	
351.229	
365.4265	
429.12	
443.4127	
496.6032	20
520.5	
534.32	
544.2948	
552.2933	
558.39	
560.39	
574.4894	
576.79	30
582.388	
598.53	
606.48	
614.38	
630.3	
734.67	
758.6567	
782.6525	
796.52	40
812.53	

## 【0064】

次に、プローブが組織切片上をスキャンしたときの、イオン強度の時間変化を示す。図8（B）は、図6で示した試料の光学顕微鏡像を拡大したものである図8（A）の点線部分をスキャンしたときに得られたイオン強度である。図8（B）において、横軸は時間、縦軸は質量電荷比を示し、イオン量は濃淡で示している。時間の変化と共に、プローブが図8（A）の試料上をスキャンしているので、図8（B）では、横軸は試料上のイオンが発生した場所に対応しており、また、白く表示されているところほどイオン量が多いことを示している。以上の結果より、基板上の試料が存在している箇所において、表1に示さ

れたイオンが生成していることがわかった。この結果から、本発明の方法を用いることで、大気圧環境下で固体試料の成分をソフトイオン化し、その一次元分布を捉えられることが確認された。更に、試料表面の成分の二次元分布を得るために、本発明の方法で一次元分布情報を複数取得し、それらを統合すれば良い。

(質量電荷比：1000から2000)

#### 【0065】

図9に、本発明の方法を用いて取得した質量電荷比が1000から2000の質量スペクトルを示す。試料はマウスの臍臓組織切片である。ここでは、プローブが振動した状態で、試料とプローブ先端部分とを断続的に近接させ、液架橋が形成されていか否かを確認しながら、測定を行った。すなわち、試料をスキャンさせず、液架橋が断続的に保持された状態と、プローブと試料の距離を離し、液架橋が消失した状態のそれれにおいて、液架橋の形成と消失が繰り返されることを確認し、質量スペクトルの経時変化を計測した。図9に各々の状態を4回ずつ、連続的に計測した際の実験結果を示す。図9(a)には質量スペクトルを、図9(b)にはイオン強度の時間変化を示す。図9(a)からは、質量電荷比が1000から2000の範囲で複数のイオンが発生していることが確認された。次に、図9(b)の結果から、これらのイオンの発生と消失が、液架橋の有無に対応していることが確認された。このことから、液架橋の形成により試料表面の成分が液架橋に溶解し、その後イオン化されていることがわかる。なお、液架橋が形成されている状態で、イオン強度が時間と共に減少したが、これは、同一の場所で液架橋とイオン化が交互に発生している場合、試料表面の成分が順次イオン化し、試料表面の成分の濃度が減少したためであると考えられる。また、ここで示した方法を用いることで、適切な計測時間を決定できると考えられる。

#### 【符号の説明】

##### 【0066】

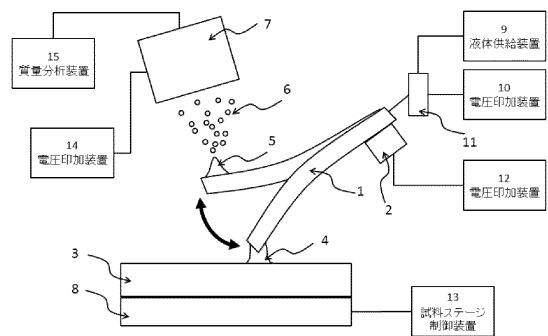
- 1 プローブ
- 2 振動提供手段
- 3 基板
- 4 液架橋
- 5 テイラーコーン
- 6 帯電した微小液滴
- 7 イオン取込部
- 8 試料ステージ
- 9 液体供給装置
- 10 電圧印加装置
- 11 導電性の流路
- 12 電圧印加装置
- 13 試料ステージ制御装置
- 14 電圧印加装置
- 15 質量分析装置

10

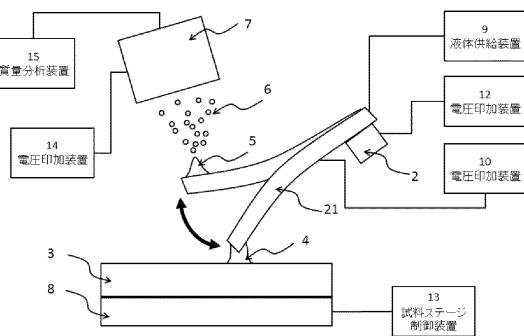
20

30

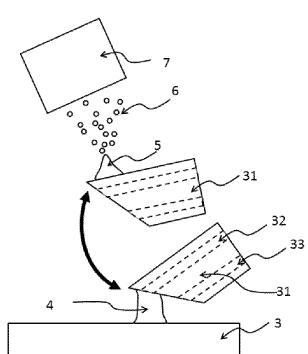
【図1】



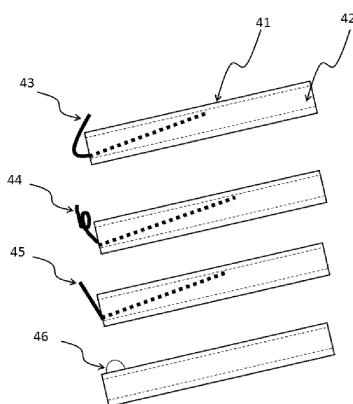
【図2】



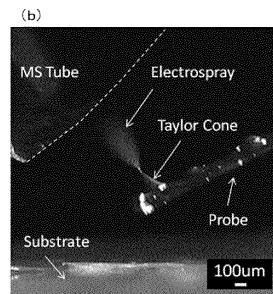
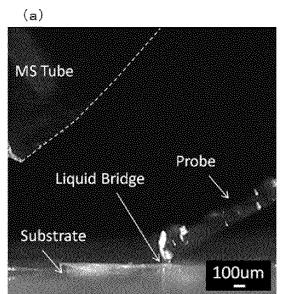
【図3】



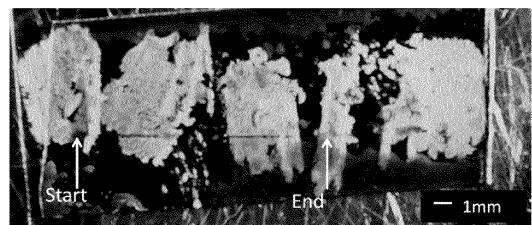
【図4】



【図5】

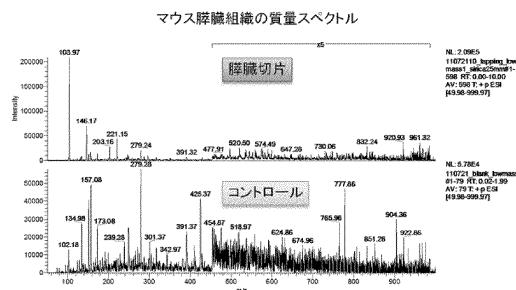


【図6】

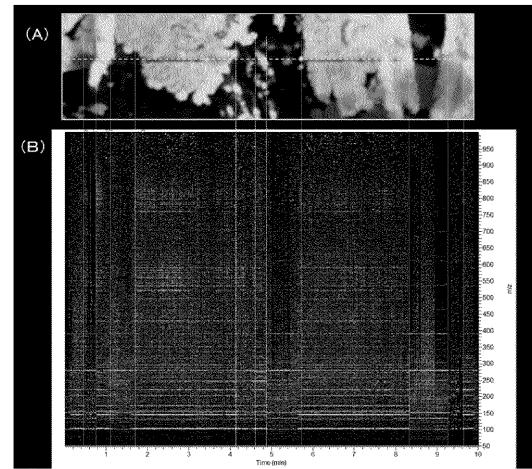


6

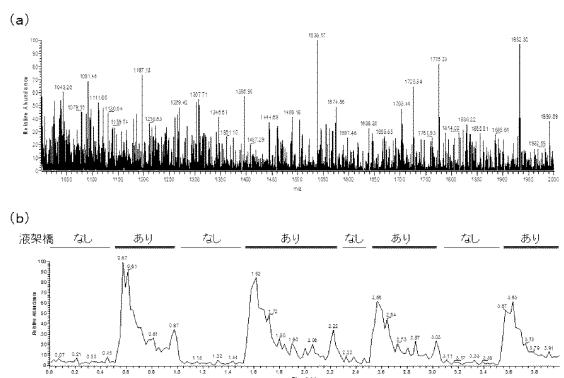
【図7】



【図8】



【図9】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100106183  
弁理士 吉澤 弘司  
(74)代理人 100128668  
弁理士 斎藤 正巳  
(74)代理人 100134393  
弁理士 木村 克彦  
(74)代理人 100160967  
弁理士 濱 口 岳久  
(72)発明者 大塚 洋一  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内  
(72)発明者 荒川 隆一  
大阪府吹田市山手町3丁目3番35号 学校法人関西大学 化学生命工学部内

審査官 遠藤 直恵

(56)参考文献 特開平09-306417 (JP, A)  
米国特許第06566653 (US, B1)  
国際公開第2003/065405 (WO, A1)  
特表2003-519889 (JP, A)  
特開平10-112279 (JP, A)  
Patrick J. Roach et al., Nanospray desorption electrospray ionization: an ambient method for liquid extraction surface sampling in mass spectrometry, Analyst, 2010年, 135, 2233-2236

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

H 01 J 49/10  
G 01 N 27/62