

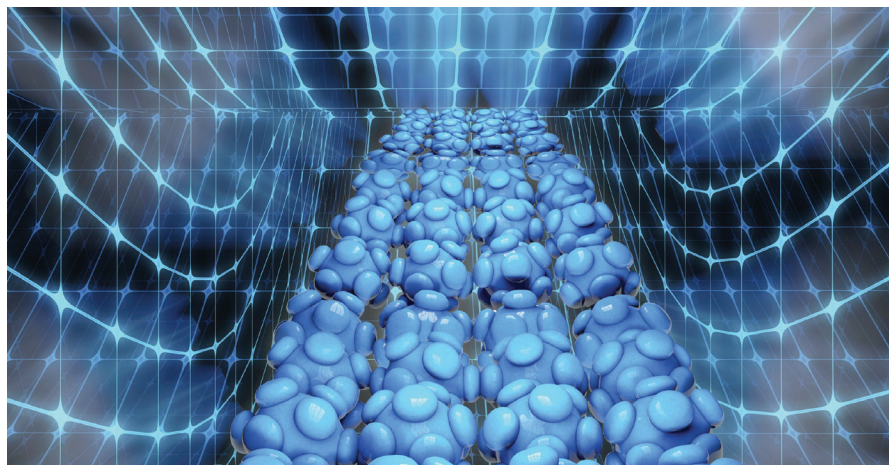
ICP-MS を使用した 水溶性サンプル中ナノ粒子の特性解析

白書

著者

Steve Wilbur、山中 理子、
Sebastien Sannac

アジレント・テクノロジー



概要

ICP-MS は、溶液中のナノ粒子を検出および特性解析する際に一般的に選ばれる分析手法となっています。ICP-MS では、1 回の高速分析でナノ粒子のサイズ、サイズ分布、元素組成、個数濃度に関する情報を獲得できるという点で、他の手法より優れています。また、サンプル中に溶解した分析対象物の濃度を同時に測定できるのは ICP-MS のみです。

ICP-MS は 2 つのモードで使用できます。個々の粒子の特性を解析するには単一粒子モードを使用し、バルクサンプルの特性を解析するには、フィールドフロー分別やキャピラリー電気泳動などの分離手法と組み合わせて使用します。それぞれの方法にはメリットと制約がありますが、併用することで補完されます。



Agilent Technologies

はじめに

ナノ粒子は、寸法が 10^9 m から 10^7 m の範囲内で、あらゆる形状をした天然または人工 (工業) の微細粒子です (IUPAC)。半導体材料から食品、薬品、化粧品、消費財までの幅広い製品の性能または性質を強化する目的で、工業ナノ粒子の使用は急増しています。このような材料は今までにない物理的特性や化学的特性を持つため、多くは、その環境動向や毒性が知られないままとなっています。その結果、幅広い種類のサンプルでナノ粒子の特性解析と定量を実施できる、精度と感度に優れた高速テクニクに対するニーズが高まっています。ICP-MS は、近年、アプリケーションに特化した拡張をハードウェアとソフトウェアの両方に対して実装することで、このような要件への対応能力を実証してきました。

ナノ粒子の検出、特性解析、定量における ICP-MS の主なメリットは、その高い感度と特異性に関係しており、動的光散乱法などのその他のテクニクと比べてより多くの情報を提供することです。また、ICP-MS は高速であり、走査型電子顕微鏡法 (SEM) や透過電子顕微鏡法 (TEM)、原子間力顕微鏡法 (AFM) などのテクニクや、分画遠心分離法などの分離テクニクと比べると、サンプル前処理もほとんど必要ありません [1]。

ただし、ICP-MS によるナノ粒子分析に固有の課題がないわけではありません。ICP-MS による検出を使用したナノ粒子の特性解析には、2 種類のうちいずれかの方法が用いられますが、それぞれにメリットと課題があります。

表 1. ナノ粒子の特性解析における単一粒子 ICP-MS とハイフナーテッド ICP-MS の長所と短所の比較 (Heithmar 2011 [2] により修正)

単一粒子 ICP-MS	ハイフナーテッド ICP-MS
粒子個数濃度 (粒子数/mL)、個々の粒子中の金属質量、サイズ分布を測定	粒子サイズ分率の関数として合計金属濃度を測定
粒子の形状や直径に関する直接情報の提供なし	ICP-MS の感度による最小粒子サイズへの制限なし
ICP-MS の感度、バックグラウンド、溶解 (イオン化) した元素成分により、測定できる最小粒子サイズへの制限あり	粒子数や個々の粒子の特性に関する直接情報の提供なし

単一粒子 ICP-MS

ICP-MS を使用して、プラズマ中に導入された単一粒子を原子化およびイオン化することで生成されたシグナルを直接検出および定量

一般的に「単一粒子モード」と呼ばれる方法です。単一粒子モードは、理論的には単純です。噴射した液体に懸濁している粒子が、液体エアロゾルのドロプレット中に含まれるプラズマに移動します。ドロプレットは順次、脱溶媒化され、その成分が原子化およびイオン化されることで、質量分析計に入るイオンのブルームが生成されます。分析計では、イオンが質量/電荷比 (m/z) で分離され、時間分析 (TRA) 採取モードにて検出されます (図 1)。溶液中のナノ粒子数から見て、サンプルが十分に希釈されている場合、同時に複数の粒子がプラズマに入ることはありません。結果として生じるイオンブルームは別個の信号パルスとして測定され、元の粒子中の、選択した測定元素の質量に比例します。粒子に含まれる元素成分の質量および密度と、イオンキャリブレーション標準に基づく元素レスポンス係数が分かっている場合は、理論上の粒子サイズを球体として見積もり、算出できます。さらに、ネブライザからプラズマへの移動効率が判明している場合、粒子個数濃度を算出できます [3]。

ただし、この他に次の前提が必要になります。

- これまでのデータ分析機能は粒子の形状が球形であることを前提としている
- 粒子は固体であり、空洞はない
- すべての元素組成が判明しているか、測定可能である
- 元素組成は粒子全体で均一に分散しており、粒子構造は層状になっていない
- 元素の測定に干渉は発生しない

- プラズマ内で粒子はむらなく完全に原子化およびイオン化されており、マトリックス効果は生じない (イオン化効率がイオンキャリブレーション標準溶液および参照物質と一致する)
- ネブライザ効率の正確な測定が可能であり、参照物質とサンプル間で一定のままである

上記前提のうちの一部は、既知の制限によって容認されます。たとえば、粒子が球形であるという前提は、多くの粒子タイプで当てはまります。粒子が球形でない (管状、針状、星形など) 場合も、算出される球形の容量に相当する直径は仮定に過ぎないと理解したうえで、粒子の質量と容量を把握することが有用です。粒子形状が不明の場合、電子顕微鏡やその他の手法による粒子形状の確認が有効な補助テクニックです。

上記の前提事項のすべてを検証できる訳ではありませんが、テクニックと ICP-MS を慎重に選んで最適化することで、いくつかの前提事項を適用でき、また、最小限に抑えるか、除外することもできます。コントロール可能な前提事項は次のとおりです。

- ヘリウムコリジョンモードを使用することで、大半の元素に対して干渉を排除できます。これはほとんどの多原子干渉に共通するため、複数の金属を含むナノ粒子の測定全般に適用できます。ただし、複数の元素を測定すると、データ採取時間が長くなり、質量急上昇によるセトリング時間が発生するため、単一のナノ粒子イベントに対して取得できるス

キャンの数が少なくなります。シリコンやチタンなど、工業ナノ粒子中に存在することの多い元素には多原子干渉を強く受けるものがあり、従来の四重極 ICP-MS ではこれを完全に排除することはできません。このような場合は、トリプル四重極 ICP-MS の MS/MS 機能の使用をお勧めします。

- 一貫性のある完全な原子化およびイオン化には、高い温度と堅牢性を備えたプラズマ条件が必要です。プラズマの堅牢性は、 CeO^+/Ce^+ 比で測定されるプラズマ中の耐火性酸化物の解離をモニタリングすることで簡単に測定できます。高口バストなプラズマは CeO^+/Ce^+ が 1% 以下になります。

分離テクニックである FFF (通常は図 2 に示した非対称流フィールドフローフラクショネーション (AF4)) または キャピラリー電気泳動 (CE) に、単一粒子モードによる検出を組み合わせることで、1 回の分析から得られる情報が増える可能性が出てきます。

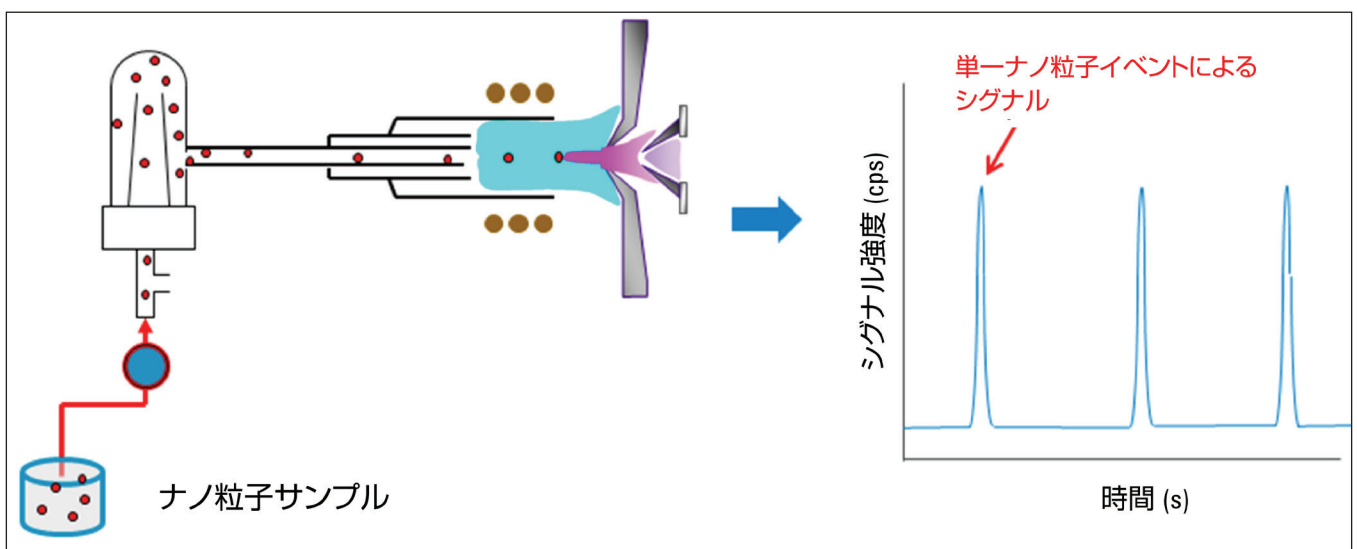


図 1. サンプルから ICP-MS インターフェースまでの粒子移動の概略図と、質量分析計によって生成された時間分析シグナル。

ハイフナーテッド ICP-MS

ハイフナーテッドシステムの一部として、オンライン分離ステップの後に元素固有の高感度検出器として ICP-MS を使用

ナノ粒子の質量およびサイズ範囲に最適なフィールドフローフラクショネーションは、分離ステップとしてもっともよく使用されています。フィールドフローフラクショネーション (FFF) は開発中のオンラインフラクショネーションテクニックであり、数 nm から最大数 μm までのサイズに対する優れた分解能により、サイズや化学組成、密度に応じて、高分子やコロイド、ナノ粒子、微粒子を分離します。分解やろ過、分解能の低下、望ましくない吸着など、その他の分離テクニックに課される制約の多くは FFF によって克服できます。FFF の原理は、Calvin Giddings 氏によって 1966 年に開発されました。FFF では、サンプルフローに対して垂直な外部分離フィールドを適用することで、空のチャンネル内で分離を実行します。さまざまなサイズの粒子が、このフィールドに対して異なる速度 (粒子が小さいほど高速) で拡散するため、粒子が別々のフロー層に分離します (図 2)。層状の溶液フローの放物面体プロファイルは、個々の層が異なる速度で移動していることを示して

います。その結果として、分析対象分子または粒子が順番に (小さいものが先に) 出現します。FFF テクニックを使用することで、固定相を使用せずに、空のチャンネル内でサンプルの特性を解析できるため、その他の分離テクニックでのバイアスの原因を排除できます。

最近では、キャピラリー電気泳動 (CE) と ICP-MS の併用により、サプリメントやその他の複雑なマトリックスに含まれる幅広い微細金属ナノ粒子を、優れた分解能で分離できることが実証されています [5, 6]。CE-ICP-MS には、FFF より大幅に短い分析時間や、高い分解能、小さいサンプルサイズ要件などの潜在的なメリットがあります。

これらを含むハイフナーテッド分離テクニックの改善が進むことで、現在のシステムが抱える制約が軽減されることが期待されています。

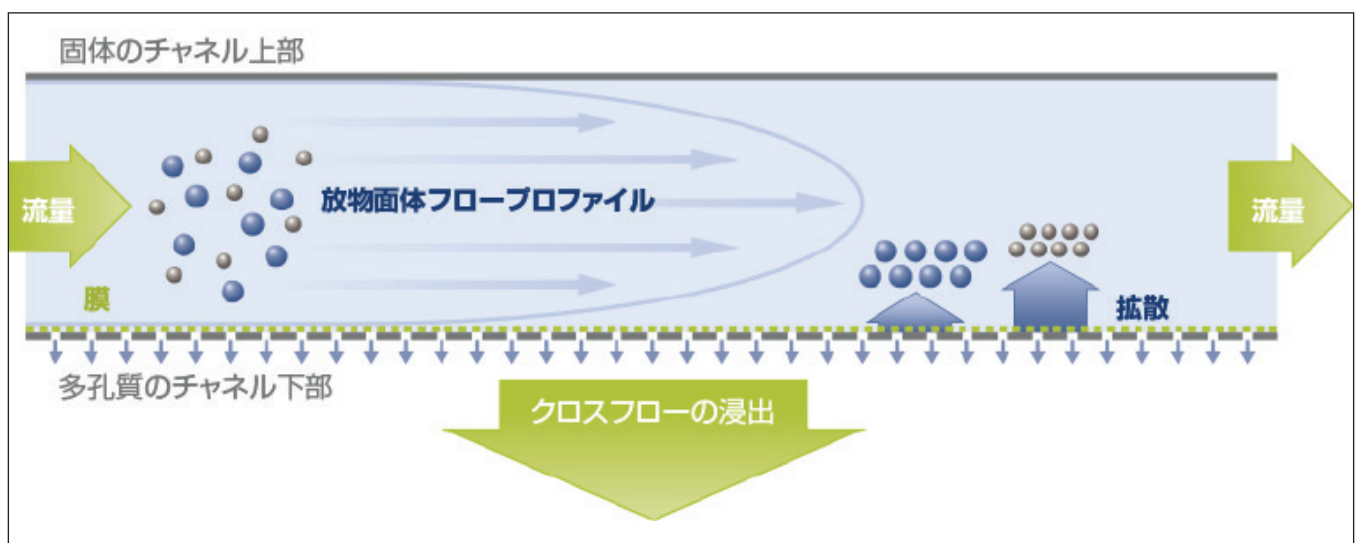


図 2. フィールドフローフラクショネーションチャンネルの概略図 (概略図提供 - PostNova Analytics)。

検出可能な最小粒子径 (単一粒子モード)

上記の前提の制約内で、単一粒子 ICP-MS によって測定できる最小粒子径は、バックグラウンド信号による厳しい制約を受けます。単一粒子分析の場合、バックグラウンドを構成するのは機器ノイズやスペクトル干渉、溶解イオン濃度です。たとえば、銀のナノ粒子は、マトリックス組成とサンプル前処理によっては、一部がマトリックスに溶解し、溶解銀と粒子状の銀を含む溶液になります(図 3)。このため、粒子質量が測定可能になる前に、すべてのオンマスバックグラウンドを補正する必要があります。また、多くの場合、サンプル中に溶解したイオン金属の濃度を定量して、分析対象システム of ナノ粒子のダイナミクスを十分に理解する必要があります。

球形ナノ粒子が金や銀など単一元素のみで構成される単純なケースでは、粒子の容量 (v) は、バックグラウンド補正したイオンブームの合計質量を、単純に元素密度で割ったものになります。合計質量の測定は機器の感度による制限を受けます。積分時間が非常に短い場合、この影響はさらに大きくなります。

球体の容量は $\frac{4}{3}\pi r^3$ に等しく、粒子容量は、ICP-MS によって提供される粒子質量 m_p を密度 ρ で割ることで算出できるため、球体容量相当の直径 d は次の方程式で求められます。

$$d = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot m_p}{\pi \cdot \rho}}$$

球体の容量 (質量) は直径の 3 乗に関係するため、粒子径が半分になると (たとえば 60 nm から 30 nm)、質量とシグナルが 1/8 に減少します。15 nm の粒子が生成するシグナルは、60 nm の粒子のわずか 1/64 です。この粒子サイズによるシグナルの急激な減少は、特に積分時間が非常に短い場合やバックグラウンドが高い場合に、小さい (< 10 μ m) ナノ粒子を単一粒子モードで分析するための主な制約になります。この分析では、可能な限り感度を高め、可能な限りバックグラウンドを低減することが不可欠です。

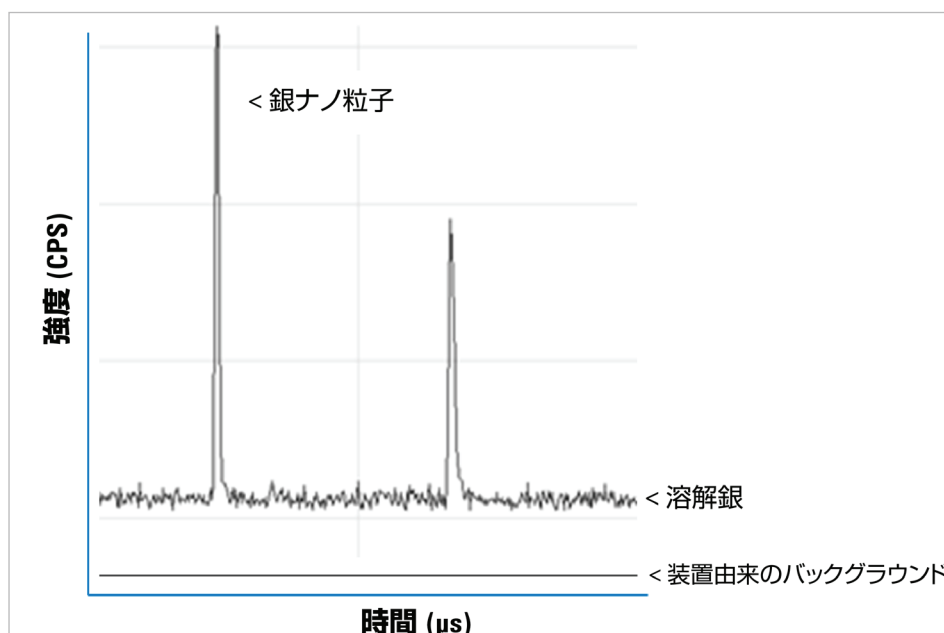


図 3. 2つの銀ナノ粒子イベントから補足したシグナルの拡大図。溶解 Ag に起因する粒子間ベースラインは、ナノ粒子の質量計算前に差し引く必要があります。

積分時間 (ドウェルタイム) による効果

さまざまな論文で、積分時間を短くすることで小さい粒子の検出が可能になると指摘されてきました。これは、合計バックグラウンドカウントがドウェルタイムに比例して減少する一方で、粒子ブルームから生じるシグナルは減少しないためです [2, 8]。この場合、シグナル/ノイズ比が大きくなります。ただし、これが当てはまるのは、イオンのブルーム全体が単一のドウェルタイムに含まれる場合のみです。ドウェルタイムがブルーム時間よりも短い (通常は 500 μs 前後) 場合、ドウェルタイムの短縮とともに分析対象のシグナルも減少します。また、時として引き合いに出される非常に短い積分時間 (10 μs) では、カウント統計によって測定エラーが大幅に増える可能性があります。例を挙げると、10 μs のドウェルタイムでの 0 カウントと 1 カウントの差異は、100,000 cps の違いに相当します。これらの理由から、できるだけ高い感度 (シグナル/ノイズ比) と適切な積分時間を使用することで、統計的に有効なカウント率を維持することが重要です。

また、複数のドウェルタイムに対する合計シグナルの積分で、粒子のブルーム時間よりも短いドウェルタイムを使用する場合、特に小さい粒子に対しては、負の粒子サイズバイアスが生じる可能性があります。これは、ガウス分布の両端では小さいシグナルを検出できないためです (図 6)。一般に、100 μs から 10 ms までの間が最適な積分時間として指摘されています [7, 8]。バックグラウンドシグナルの増大以外で、長すぎるドウェルタイム (ブルーム時間を上回る) に対する最大の制約は、1 回のドウェルタイム内に複数の粒子がカウントされる可能性があることです (図 4 および 5)。この場合、粒子サイズ分布に正バイアスが生じ、粒子個数濃度に負バイアスが生じます。このため、適切なサンプルの流量や希釈により、単位時間あたりにプラズマに入る粒子の数をコントロールすることが重要です。理想的には、10 回に 1 回のドウェルタイムに 1 つの粒子が含まれると、残りのドウェルタイムでバックグラウンドシグナルを正確に測定できます。300 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で、250,000 粒子/mL の粒子濃度の場合、積分時間を 50 μs から 1 ms にすると、60 nm の Au 粒子に対して、正確かつ一貫して粒子サイズを算出できます [8]。

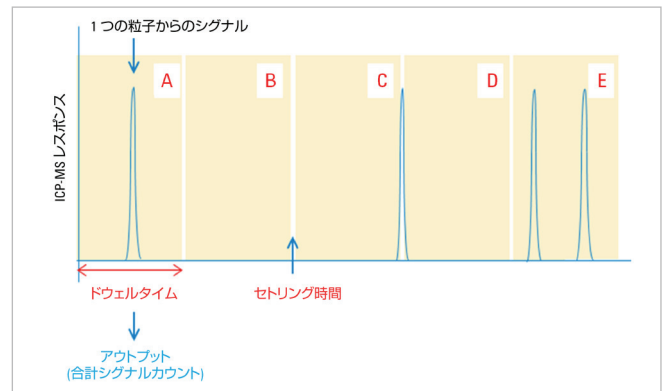


図 4. ドウェルタイムは粒子ブルーム時間よりも大幅に長くなっています。
A-理想的な状況、単一粒子全体が積分シグナル時間内に測定されています。
B-容認可、このドウェルタイム中に測定された粒子はありません。
C-要回避、粒子が 2 回のドウェルタイムに分割されています。
D-要回避、1 回のドウェルタイム内に 2 つの粒子が測定されているため、単一粒子のシグナルが 2 倍になります。

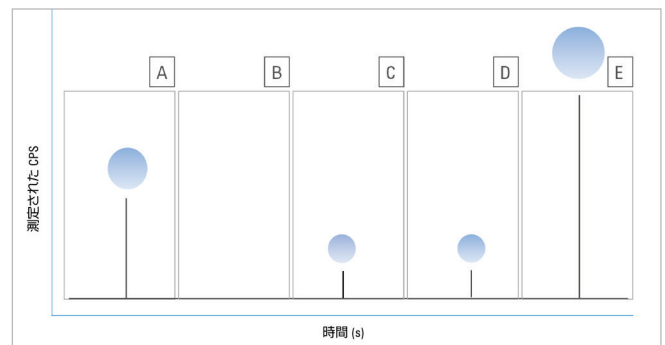


図 5. 図 4 の例の結果の質量スペクトル (各ドウェルタイムに対して積分されたシグナル) と概算粒子サイズ。

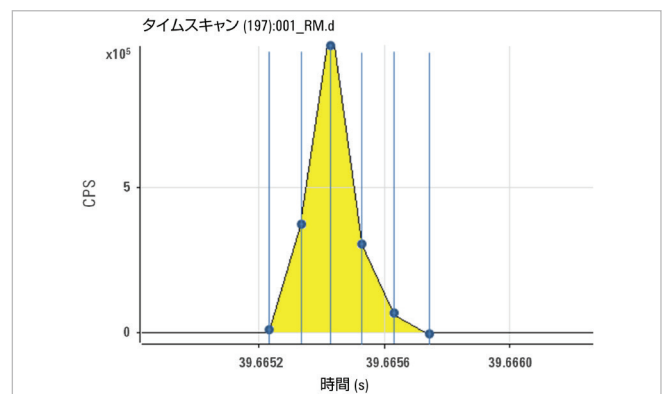


図 6. 非常に高速な時間分析 (TRA) モードで、100 μs のドウェルタイムとセトリング時間なしで測定した単一ナノ粒子イベント。色付きの領域は、5 回のドウェルタイムに対して合計したイオン数を表します。右端のドウェルタイム内の小さい領域は、理想的とはいええない条件下でベースラインノイズに埋もれた可能性があります。

単一粒子データ分析に対する特別な要件

単一粒子のデータ分析には、いくつかの困難な課題があります。第一に、通常は極めて短い積分時間 (50 から 100 μs) が使用されるため、非常に多くのデータポイントが生成されます。100 μs のドウェルタイムで、1 秒あたり 10,000 個のデータポイント (質量ごとの時間と強度) が作成されます。このような大きなデータファイルを適切な速度で管理および処理することが非常に重要です。初期の研究者は、概して、データを CSV 形式で保存してエクスポートし、Microsoft Excel で処理していました。しかし、Microsoft Excel がサポートする最大行数の制限により、処理できるデータファイルサイズが限定されていました。最近では、MassHunter ソフトウェアに統合された専用データ分析ソフトウェアによって、このファイルサイズに対する制限が解消されたため、必要な場合は高頻度の採取と長時間の分析が可能になっています。

Microsoft Excel を使用するか、機器に組み込まれたソフトウェアを使用するかにかかわらず、単一ナノ粒子のデータ分析は次のプロセスに従います。

1. データが採取され TRA データファイルに保存されます。各データポイントは、積分中にモニタリングした質量の強度を測定したものです。生の TRA データを時間に対する強度 (CPS) としてプロットしたものを図 7a に示します。
2. ナノ粒子ピーク間のシグナルから平均バックグラウンドを算出し、生データから差し引きます。こうすることで、各ナノ粒子に対して生成される合計シグナルが、溶解金属や機器のバックグラウンドシグナルに起因するものではなく、粒子のみに起因するものになります。
3. ドウェルタイムが粒子イベント持続時間よりも短い場合、粒子ピーク内の各ドウェルタイムに対するシグナルを積分することで、粒子に対する合計シグナルを算出します。
4. 測定された粒子数を参照物質中の既知の粒子数と比較することで、ネブライザ効率を計算します。あるいは、既知の粒子数の参照物質からネブライザ効率を計算できます。
5. バックグラウンド補正した積分データをレスポンスでソートし、図 7b に示すようにプロットします。積分した各シグナルの強度は粒子質量に比例するため、粒子サイズの相対分布を容易に視覚化できます。
6. 検出した粒子数をネブライザ効率に対して補正することで、合計粒子数を算出します。
7. 補正したレスポンスと、イオンキャリブレーション標準に基づいて測定した元素に対して算出した元素レスポンス係数、測定した元素の密度を使用して、レスポンス分布をサイズ分布プロファイルに変換します。球形の粒子形状と元素の均質性に関する前提を適用します (図 7c)。

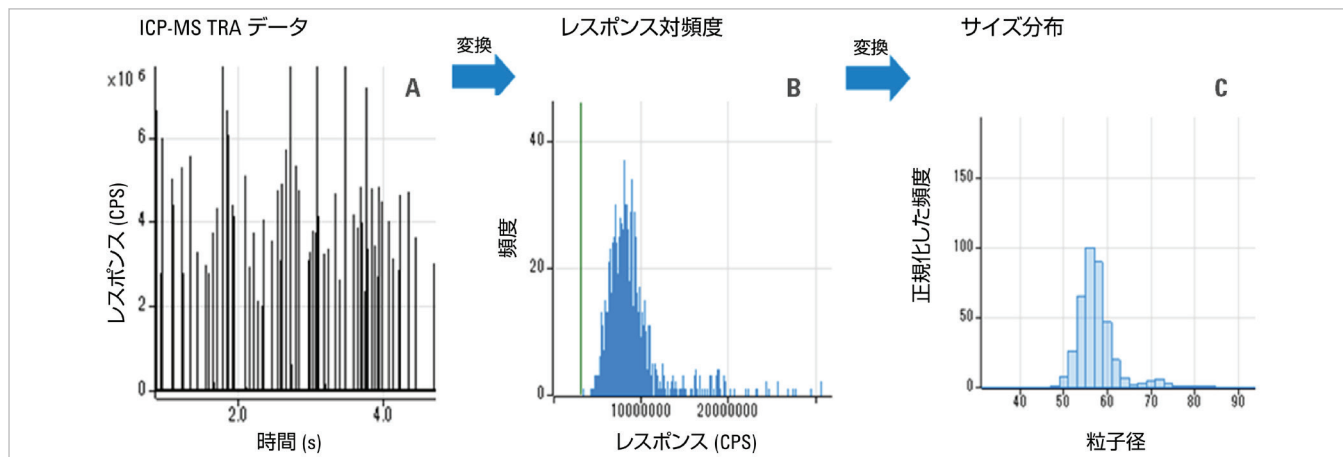


図 7. A. TRA CPS データ、B. レスポンスでソートしたドウェルタイムあたりの TRA データ (バックグラウンドの差し引き後)、C. サイズの似た粒子群に対して算出されたサイズ分布。

MassHunter Single Nanoparticle Analysis Module での最終的なレポートを図 8 に示します。すべての MassHunter データ分析モジュールに共通する、読みやすいインタラクティブな「Batch at a Glance」形式で、すべての標準、参照物質、サンプルが表形式で表示されます。表からサンプルを選択すると、個々のサンプルの詳細結果がグラフィカル表示されます。可能な限り最善の結果を最終的に印刷またはアーカイブ化できるようにするため、強力な手動データの最適化および検証ツールが提供されています。

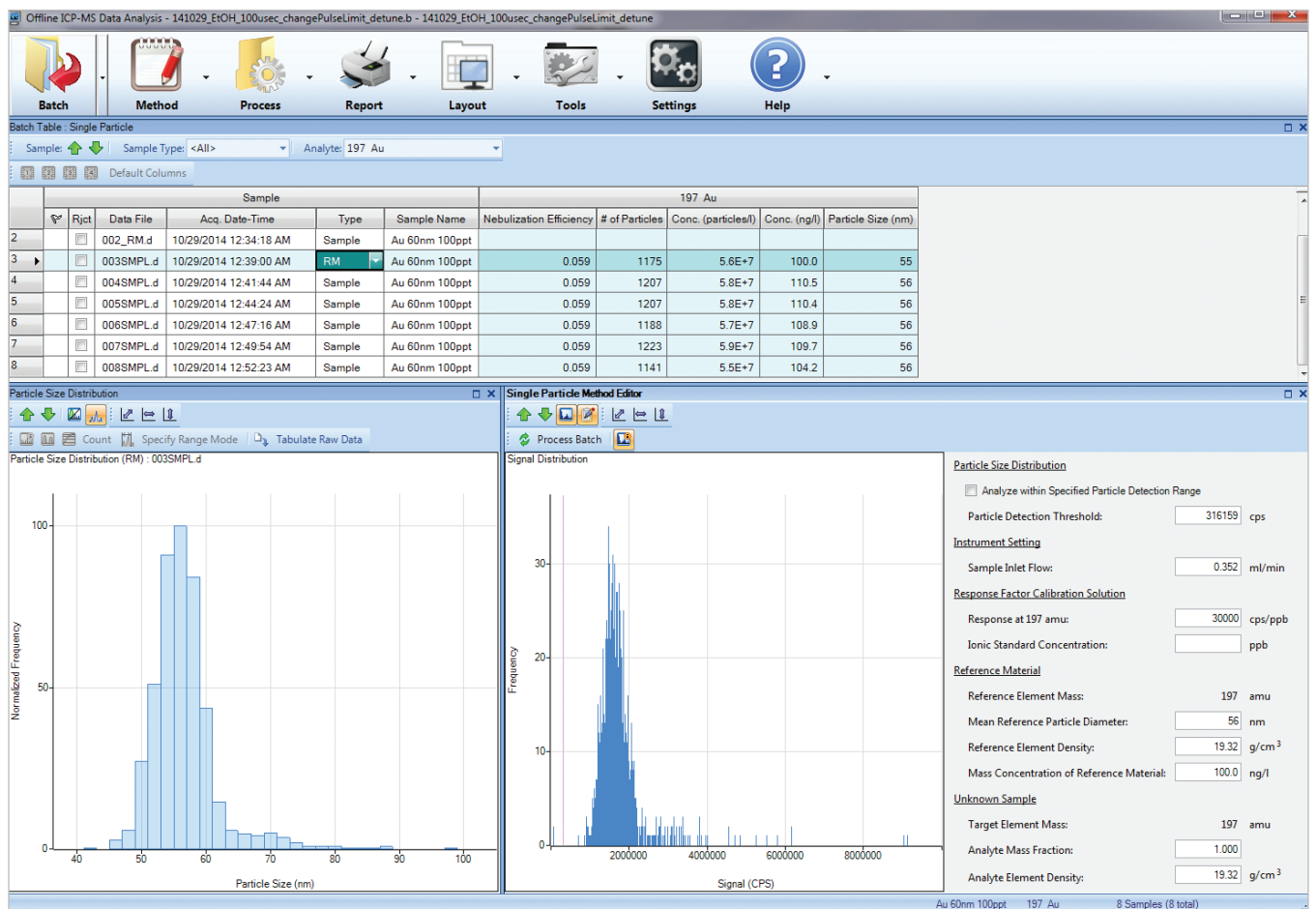


図 8. Agilent MassHunter Single Nanoparticle Analysis Module のデータビュー。すべてのサンプルの結果が画面上部の Batch at a Glance 表内に表形式で表示されます。粒子サイズ分布、シグナル分布、メソッドパラメータを含む、選択したサンプル (表内ではハイライト表示) の結果が下部にグラフィカル表示されます。生の TRA データをグラフィカル表示することもできます。この単一粒子メソッドエディタペインでは、グラフィカルかつインタラクティブに結果を評価および最適化することができ、ワンクリックで単一サンプルまたはバッチ全体に適用できます。

結論

ICP-MS は、水溶性サンプル中のナノ粒子の測定および特性解析を行うための優れたツールです。その他のテクニックでは通常は提供されない幅広い粒子およびサンプル情報を 1 回の分析で提供します。

フィールドフローフラクシオネーションやキャピラリー電気泳動などの分離テクニックと組み合わせると、ICP-MS は、多様な組成のサイズが異なる粒子で構成される、サンプル中の粒子群に関する粒子サイズ情報を提供できます。各粒子サイズ群に含まれる合計金属濃度も提供します。十分な数の粒子が存在し、適切な分解能がある限り、測定可能な粒子サイズに下限はありません。また、1 つの粒子群内で測定できる元素の数に実質的な制限はありません。単一粒子モードを使用する場合、ICP-MS は単一ナノ粒子から生成されたサンプル中のイオンを測定して、そのサイズ (質量)、サイズ分布、個数濃度、化学組成を特定できます。これらのテクニックが提供する情報には若干の違いがあるため、どのテクニックが最適であるかは、サンプルの特性と必要な情報によって異なります。どちらか 1 つだけのテクニックでは必要な情報を得られない場合は、これら 2 つの相補的なテクニックを組み合わせることができます。

いずれのケースでも、ICP-MS を使用した単一ナノ粒子分析におけるもっとも重要な特性は次のとおりです。

- 高い感度 (特に、単一粒子モードで小さい粒子を測定する場合)
- 低いバックグラウンドシグナル (特に、ベースラインシグナルの一因となり、検出可能な最小粒子サイズを制限する多原子干渉)
- イオンバックグラウンドから過剰な積分シグナルを発生することなく、単一ドウェルタイム内で複数の粒子を検出する可能性なしで、単一ナノ粒子からシグナルを捕捉できる高速スキャン能力 (単一粒子モード)
- 最小限またはゼロのスキャン間セトリング時間 (単一粒子モード)
- ロバストなプラズマ ($CeO^+/Ce^+ < 1\%$) によるナノ粒子の完全な原子化およびイオン化と、サンプルと標準物質間でのマトリックス効果の軽減
- 複雑な計算を素早く自動的に実行しながら、簡単かつ視覚的に結果を最適化および検証するデータ分析ソフトウェア (単一粒子モード)

参考文献

1. Sun, X.; Tabakman, S.M.; Won-Seok, S.; Zhang, K.; Zhang, G.; Sherlock, S.; Bai, L; Dai, H.. Separation of Nanoparticles in a Density Gradient: FeCo@C and Gold Nanocrystals. *Ang. Chem.* 2009, 48, 939-942.
2. Heithmar, E.M. Screening Methods for Metal-Containing Nanoparticles in Water. *APM 32*; U.S. Environmental Protection Agency, Las Vegas, NV, 2011.
3. Pace, H.; Rogers, N.J.; Jarolimek, C.; Coleman, V.A.; Higgins, C.P.; Ranville, J.F. (2011). Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2011, 83, 9361-9369.
4. Otte, T. (2012). Introduction to Field-Flow Fraction (FFF) ICP-MS. In *Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications*, 2nd Edition; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, 2012, 112-114.
5. Haiou Qu; Mudalige, T.K.; Linder, S.W. Capillary Electrophoresis/Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Development and Optimization of a High Resolution Analytical Tool for the Size-Based Characterization of Nanomaterials in Dietary Supplements. *Anal. Chem.* 2014, 86, 11620-11627.
6. Liu, L.; He, B; Liu, Q; Yun, Z; Yan, X; Long, Y; Jiang, G. Identification and Accurate Size Characterization of Nanoparticles in Complex Media. *Ang. Comm.* 2014, 52, 14476-14479.
7. Mitrano, D.M.; Barber, A.; Bednar, A.; Westerhoff, P.; Higgins, C.P.; Ranville, J.F. Silver Nanoparticle Characterisation Using Single Particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). *J. Anal. Atom. Spec.* 2012, 27, 1131-1142.
8. Hineman, A.; Stephan, C. Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J. Anal. Atom. Spec.* 2014, 29, 1252-1257.

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017

July 31, 2017
5991-5516JAJP



Agilent Technologies