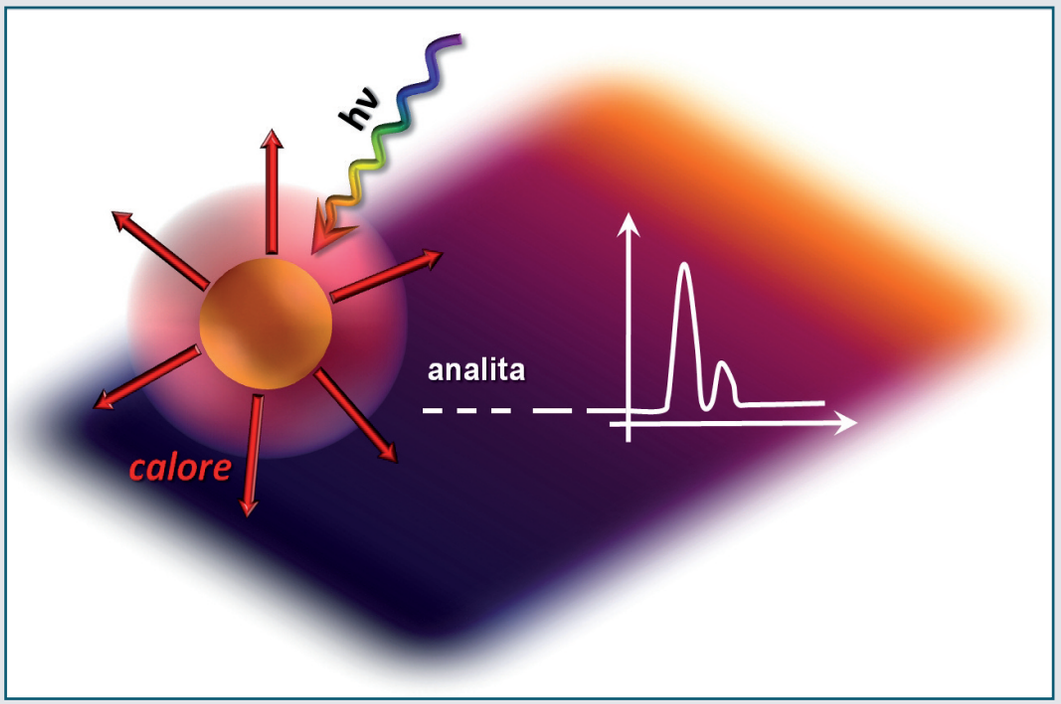

Rosa Pilolli[a],
Lorenzo Colaianni[a],
Valentina De Giorgio[a],
Nicola Cioffi[a,b]
[a]Dipartimento di Chimica
Università di Bari "Aldo Moro"
[b]Centro Interdipartimentale
"S.M.A.R.T."
Università di Bari "Aldo Moro"
cioffi@chimica.uniba.it

NANOMATERIALI PER LDI-MS. SINTESI E CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA

In questo contributo sono descritti i risultati della caratterizzazione spettroscopica di nanostrutture di oro ed argento, con diversa morfologia. I risultati ottenuti sulla composizione chimica delle superfici dei nanomateriali sono stati correlati alle loro prestazioni in spettrometria LDI-MS.

La spettrometria di massa MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) è uno strumento analitico dalle elevate potenzialità. Uno dei principali vantaggi è consentire analisi in un ampio intervallo di massa, da circa 1.000 a 500.000 Da, ulteriormente esteso negli ultimi anni fino ai megaDa [1]. Resta invece poco accessibile con le modalità di analisi convenzionali, la regione spettrale al di sotto dei 1.000 Th, per importanti interferenze spettrali da parte della matrice.

Un primo importante passo effettuato per superare questo limite ha portato allo sviluppo, alla fine degli anni Novanta, dei DIOS (Desorption Ionization on Silicon) ovvero superfici nanoporose a base di silicio che consentono il desorbimento e la ionizzazione diretta di analiti a basso peso molecolare in assenza di matrici organiche [2]. La correlazione dimostrata fra l'enhancement del processo LDI e la struttura nanoporosa ha aperto la strada a numerosi studi sull'impiego di materiali nanostrutturati. In verità, l'uso di nanoparticelle metalliche (NP) in spettrometria di massa era già stata pioneristicamente proposto alla fine degli anni Ottanta da Koichi Tanaka, nella cosiddetta "two phase MALDI": si impiegavano nanoparticelle di cobalto in glicerina per l'analisi di proteine e polimeri fino a 25 kDa [3].

L'importanza della nanostruttura in questi studi, in principio, non è stata del tutto apprezzata, difatti, negli anni successivi, l'uso di matrici organiche come *enhancer* della ionizzazione ha prevalso sull'impiego di NP, soppiantandole quasi del tutto. Ciononostante, negli ultimi due decenni svariati nanomateriali sono stati impiegati in alternativa alle matrici organiche convenzionali. Relativamente all'impiego di nanomateriali

metallici, uno studio condotto dal gruppo di Russell nel 2005 rappresenta senza dubbio una pietra miliare [4]. Per la prima volta si è dimostrato che nanoparticelle di oro in regime di confinamento quantico ed in assenza di ogni altro coadiuvante organico possono sostituire efficientemente le matrici convenzionali. Questo aspetto è stato ampliato in pubblicazioni successive, proponendo funzionalizzazioni della superficie della nanoparticella atte ad aumentare la selettività del responso di massa [5, 6]. Fra le più recenti modalità di utilizzo di nanostrutture d'oro in spettrometria di massa si ricorda la possibilità di rilevare tramite AuNP prive di agenti stabilizzanti organici piccoli carboidrati neutri (ribosio, glucosio, cellobiosio, maltosio [7] e ciclodestrine [8]) e amminotioli (cisteina, omocisteina, glutatione [7]), sebbene la fruibilità dell'approccio resti limitata dall'intrinseca instabilità delle nanostrutture proposte.

Molti lavori fin qui descritti tendono a mostrare un pattern di ionizzazione preferenziale, secondo cui l'analita compare nello spettro principalmente come addotto con metalli alcalini, soprattutto sodio, derivanti dalle condizioni di preparazione delle NP o da quelle di analisi. Castellana e Russell nel 2007 [9] hanno dimostrato che, funzionalizzando le nanoparticelle di oro con un agente protonante, quale il 4-amminotiofenolo, si ottengono spettri in cui la specie ionica principale dell'analita è il cosiddetto ione quasi-molecolare. In letteratura si è anche proposto l'impiego di film di AuNP [10, 11], dimostrando la possibilità di impiegare le nanostrutture anche come fasi per la (nano)estrazione e la preconcentrazione dell'analita [11].

Il campo d'indagine è stato allargato a nanostrutture con diversa composizione (argento [12-15], platino [16], titanio [17-19], zinco [20], ossido di ferro [21, 22]) e morfologia con il requisito comune di assorbire alla lunghezza di lavoro della sorgente laser e promuovere i meccanismi di desorbimento e ionizzazione degli analiti.

L'interesse scientifico ed il numero di pubblicazioni sulla tematica sono in crescita esponenziale e negli ultimi anni si contano diverse centinaia di lavori pubblicati sull'argomento. Evidenze raccolte da svariati laboratori sottolineano come la qualità e riproducibilità delle superfici delle nanostrutture siano parametri chiave nello sviluppo dell'applicazione.

In questo contributo sono descritti i risultati della caratterizzazione spettroscopica della superficie di nanostrutture di oro ed argento, sintetizzati con varie tecniche chimiche ed elettrochimiche, finalizzate alla realizzazione di diverse morfologie, fra cui sfere e frattali. L'analisi di superficie è stata condotta mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) ed i risultati ottenuti sulla qualità delle superfici dei nanomateriali sono stati impiegati per ottimizzare le prestazioni in spettrometria LDI-MS.

Nanoparticelle di oro

Nel presente studio si sono impiegate innanzitutto nanoparticelle di oro colloidali (AuNP), ottenute tramite riduzione chimica in soluzione acquosa secondo l'approccio proposto da Turkevich nel 1951 e successivamente rivisitato più volte [23, 24]. Tale approccio si basa

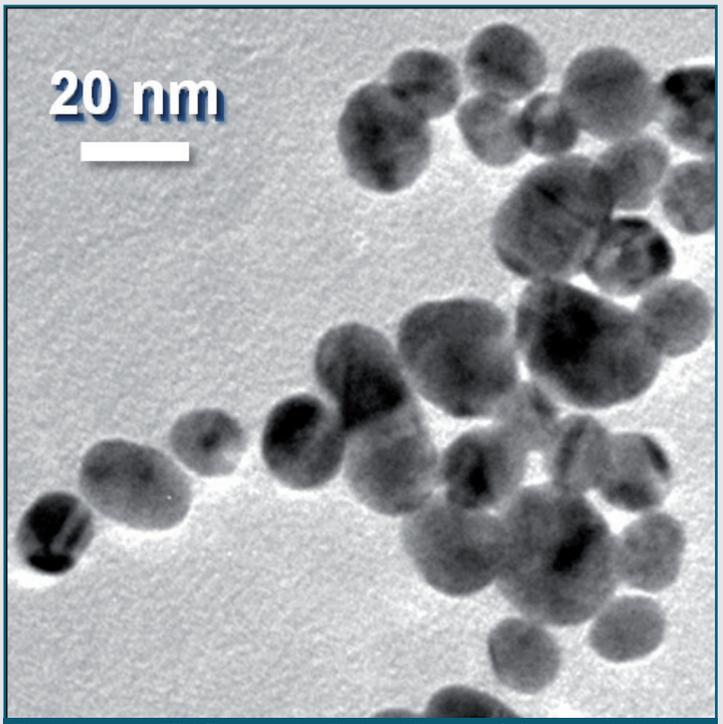

Fig. 1 - Immagini TEM (Transmission Electron Microscopy) di nanoparticelle di oro ottenute per riduzione chimica

su una reazione di ossidoriduzione fra acido tetracloroaurico ($HAuCl_4$) e citrato trisodico, impiegato contemporaneamente come riducente, agente di capping e regolatore del pH [25]; al variare del rapporto fra la concentrazione del citrato e la concentrazione di oro nella soluzione finale si ottengono nanoparticelle di dimensioni differenti e con diametro compreso nel range fra 10 e 150 nm [26-28].

Dal punto di vista sperimentale, la sintesi è assai semplice: si porta all'ebollizione una soluzione acquosa di $HAuCl_4$ e si aggiunge rapidamente la soluzione di citrato. La formazione delle nanoparticelle può essere seguita ad occhio nudo dalla variazione di colore della soluzione: nell'arco di due minuti la soluzione, inizialmente gialla, diviene incolore, nera e poi assume il caratteristico colore rosso vino, tipico di colloidi a base di oro.

La morfologia ed il range dimensionale delle nanoparticelle ottenute sono stati confermati tramite microscopia elettronica in trasmissione (TEM). Tipiche immagini TEM, riportate in Fig. 1, mostrano una morfologia sferica con diametro medio di 14±4 nm (stimato su 400 particelle).

Il nanomateriale è stato inoltre caratterizzato tramite le spettroscopie UV-Vis e XPS [29]. La prima è stata impiegata come tecnica di controllo per verificare che la sintesi fosse stata correttamente eseguita e, dallo studio di forma e posizione del picco di risonanza plasmonica dei core metallici, si è verificato che non vi fossero alterazioni morfologiche o chimiche delle NP. La seconda ha consentito di evidenziare e quantificare i vari gruppi funzionali presenti nello shell

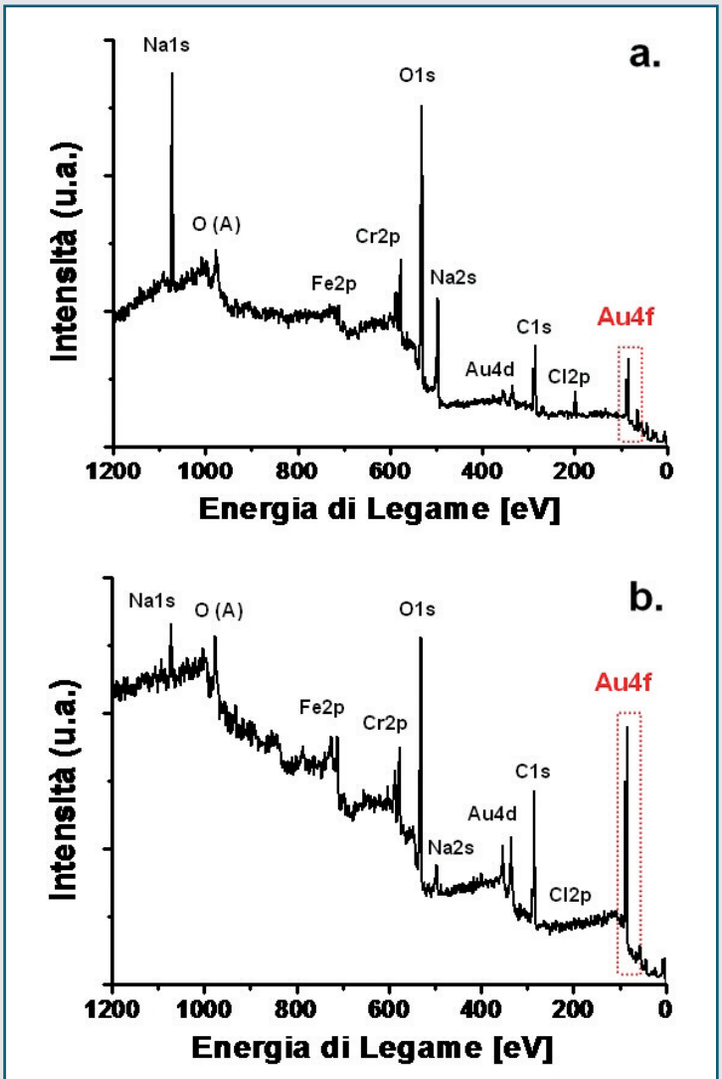

Fig. 2 - Grafico a: spettro XPS di insieme del colloide pristino depositato su target plate ed asciugato sotto azoto. Grafico b: spettro XPS di insieme del colloide depositato su target plate, sottoposto ad annealing termico di 1 h a 200 °C e successivo lavaggio con acqua HPLC *grade*

della nanoparticella. Si tratta di gruppi ossigenati (alcolici, carbonilici, carbossilici), tutti attribuiti al citrato (aggiunto in largo eccesso) e suoi derivati, risultanti dalla reazione di ossidoriduzione.

La possibilità di impiegare tali AuNP come alternativa alle matrici convenzionali in LDI-MS - già nota in letteratura - è stata confermata analizzando con successo diversi amminoacidi e peptidi. Tuttavia, la qualità degli spettri di massa in termini di numero di picchi interferenti non può ancora ritenersi sufficiente, a causa della presenza di picchi interferenti attribuiti agli ioni citrato ed a loro frammenti. Si è ritenuto opportuno approfondire l'impiego di tale materiale, mirando ad un'ulteriore riduzione del background spettrale. Con questo scopo le nanoparticelle di oro sono state depositate direttamente sui pozzetti del *target plate*, e sottoposte ad *annealing* termico per 1 h a 200 °C, seguito da fasi di lavaggio effettuate con acqua HPLC-*grade*; ad ogni stadio di questo processo si è effettuata un'analisi XPS di controllo per verificare le variazioni indotte nella sua composizione di superficie. In Fig. 2 e nella Tabella a fondo pagina sono riportati rispettivamente lo spettro d'insieme (*wide scan*) e la composizione elementare di superficie del colloide pristino e dopo *annealing* termico e lavaggio. Il trattamento impiegato, in effetti, modifica nettamente la composizione di superficie. La percentuale relativa del sodio diminuisce drasticamente da 16,8±0,3%$_{at}$ a 3,3±0,4%$_{at}$; per quanto riguarda il carbonio, pur rimanendo costante la quantità complessiva, le componenti attribuite ad intorni chimici caratteristici del citrato sono sensibilmente ridotte (complessivamente rappresentano il 43% del carbonio totale contro 93%). Parallelamente aumenta la percentuale relativa dell'oro (3,9±0,8%$_{at}$), ovvero incrementa la disponibilità superficiale di oro definita in termini di rapporto Au/C da 0,04 (AuNP pristine) a 0,09 (AuNP *post-annealing*/lavaggio). Inoltre, il picco fotoelettronico principale dell'oro rimane invariato a 83,8±0,1 eV, FWHM$_N$ = 0,79±0,13 (Full Width at Half Maximum Normalizzata, si veda riferimento [30]) - colloide pristino: BE$_{Au4f}$=83,8±0,1 eV, FWHM$_N$=0,77±0,14 - ad indicare che le dimensioni delle nanoparticelle non hanno risentito di variazioni morfologiche apprezzabili, cosa che lascia supporre che le capacità di funzionare da *carrier* energetico non siano state alterate.

La caratterizzazione spettroscopica ha quindi evidenziato una significativa rimozione del citrato in eccesso e le nanostrutture risultanti hanno fornito prestazioni incrementate in LDI-MS rispetto alle nanoparticelle pristine. Si veda a tal proposito la Fig. 3: nel pannello a e b si confrontano gli spettri di massa acquisiti per una soluzione di arginina 350 pmol/μl con NP pristine e sottoposte ad annealing termico/lavaggio, rispettivamente. I picchi principali attribuiti all'analita in forma protonata ([M+H]=175,1 Th) ed a suoi addotti con sodio ([M+Na]=197,1 Th, [M+2Na]=219,1 Th) dominano lo spettro b, in quanto sia il numero di interferenti che la loro intensità viene sensibilmente ridotta.

Si riportano i valori medi della composizione elementare di superficie, e le relative deviazioni standard (n=3) per nanoparticelle di oro

Elemento	% atomica AuNP pristine	% atomica AuNP dopo trattamento termico
Au	1,5±0,4	3,9±0,8
C	37±4	41±7
O	38±4	38±5
Cr	3,6±1,6	5,5±1,3
Fe	1,7±0,4	4,7±1,5
Na	12,3±1,1	3,3±0,4
N	1,1±0,2	2,4±0,5
Cl	4,3±0,6	0,8±0,1

Altre nanostrutture

Lo stesso approccio sistematico di caratterizzazione spettroscopica è stato applicato a nanostrutture differenti per composizione e morfologia.

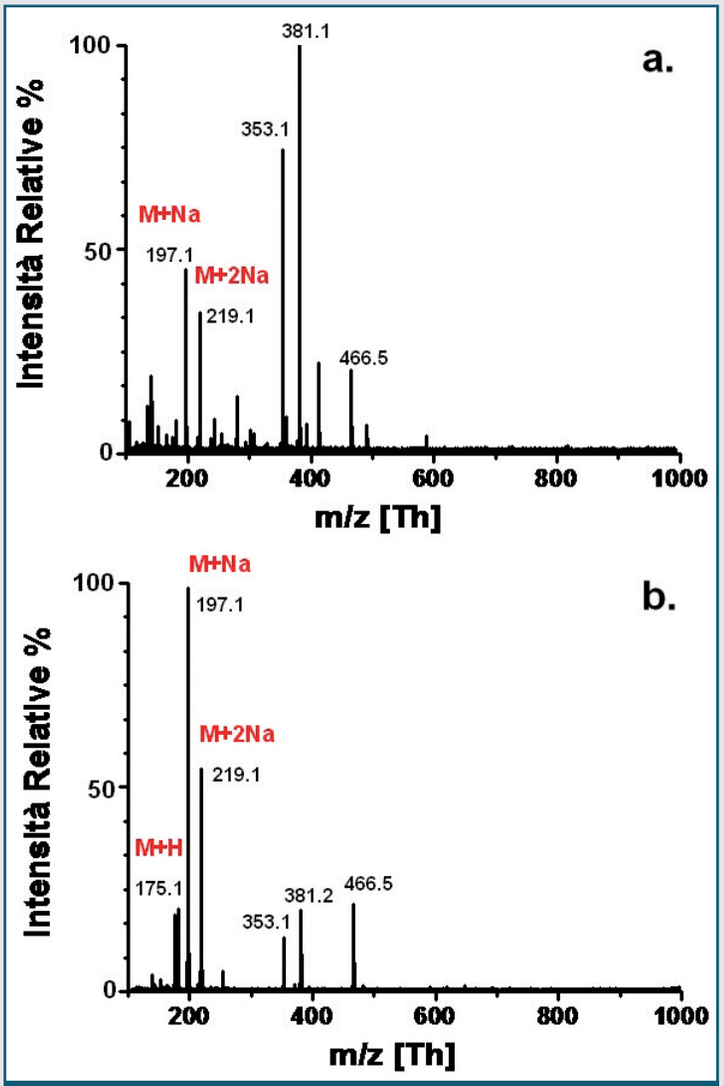

Fig. 3 - Grafico a: spettro di massa LDI-MS di arginina 350 pmol/µl + NaCl 50 mM con nanoparticelle di oro pristine. Grafico b: spettro di massa LDI-MS di arginina 350 pmol/µl + NaCl 50 mM con nanoparticelle di oro sottoposte ad annealing termico per 1h a 200 °C e successivo lavaggio con acqua HPLC-grade

Nel caso di nanofrattali di argento [31, 32], la caratterizzazione di superficie ha evidenziato una elevata disponibilità superficiale del metallo, cruciale per i processi di interazione/desorbimento di analiti. Per definire la speciazione chimica dell'argento sono state prese in considerazione le regioni ad alta risoluzione del picco fotoelettronico principale dell'argento $Ag3d_{5/2}$ e dei principali segnali Auger Ag_{MNN}. La posizione del picco fotoelettronico principale, la sua FWHM, i dati ottenuti dal *curve fitting* del segnale AgM_5NN ed il parametro Auger modificato calcolato sulla base del segnale AgM_4NN (α = $BE3d_{5/2}$ + KEM_4NN), hanno consentito di attribuire alle strutture frattaliche un carattere essenzialmente metallico. Il buon accordo fra i dati ottenuti sugli Ag-NF e quelli registrati nel caso del metallo macroscopico, suggerisce di escludere la presenza di shift spettrali indotti da effetti dimensionali, tipicamente osservati nel caso di nanoparticelle sferiche [31, 32]. È stata inoltre esclusa la presenza di specie ossidate dell'Ag in superficie, quali ossidi e sali [31, 32].

La particolare morfologia delle nanostrutture, associata alla buona efficienza dell'argento nel complessare molecole organiche insature, hanno suggerito la possibilità di impiegare gli AgNF, come materiali attivi per l'analisi LDI-MS di queste specie. I risultati ottenuti in questa direzione sono promettenti: lo spettro di massa ottenuto caricando una soluzione di squalene in acetonitrile sulla superficie dei AgNF è risultato particolarmente semplice. Il numero estremamente ridotto di segnali interferenti nel range di massa esplorato (100-1.000 Th) è stato attribuito a ioni e cluster dell'argento e betaina residua; l'analita si presenta sotto un'unica forma di $[Ag+squalene]^+$ con elevata intensità relativa [32].

In collaborazione con il gruppo del Prof. Reginald M. Penner, Department of Chemistry, University of California, Irvine, è in fase di studio la possibilità d'impiego di nanofili di oro (Au-NW), preparati mediante la tecnica LPNE (Lithographically Patterned Nanowire Electrodeposition) [33, 34].

La sistematica caratterizzazione XPS ha rivelato l'esigenza di curare con attenzione le fasi di trattamento post-sintetico dei AuNW, introducendo un procedimento di pulizia via plasma, atto ad eliminare la contaminazione da specie carboniose ascrivibili principalmente a residui di *photoresist*. Monitorando simultaneamente il rapporto Au/C ed Au/Si è stato possibile individuare le condizioni sperimentali di trattamento ottimali, in termini di intensità del plasma e tempo di esposizione, che garantissero un'elevata disponibilità superficiale di oro, pur non minando l'adesione del NW al substrato. Si sono infatti riscontrati fenomeni di *peeling-off* dei nanofili in condizioni di trattamento via plasma troppo spinte (alta intensità o tempi di esposizione eccessivi). La caratterizzazione di superficie ha, pertanto, anche in questo caso, consentito di ottimizzare il nanomateriale in prospettiva del loro impiego in LDI-MS.

Conclusioni

In questo contributo sono stati descritti i risultati della caratterizzazione spettroscopica della superficie di nanostrutture di oro ed argento, con diversa morfologia. L'analisi di superficie è stata condotta mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X e l'attribuzione dei singoli intorni chimici è stata in taluni casi assistita dallo studio dei parametri di posizione e forma di vari segnali Auger. La rigorosa applicazione di protocolli di trattamento del segnale ha consentito di attribuire univocamente gli stati chimici individuati sulla superficie delle nanofasi e di investigare l'occorrenza di effetti dimensionali nell'analisi di superficie.

I risultati ottenuti sulla qualità delle superfici dei nanomateriali hanno consentito e sono attualmente utilizzati per l'ottimizzazione delle loro prestazioni in spettrometria LDI-MS.

Bibliografia

[1] R.J. Wenzel *et al., Anal. Chem.*, 2005, **77**, 4213.
[2] J. Wei *et al., Nature,* 1999, **399**, 243.
[3] K. Tanaka *et al., Rapid Comm. Mass. Spec.*, 1988, **2**, 151.
[4] J.A. McLean *et al., J. Am. Chem. Soc.,* 2005, **127**, 5304.
[5] Y.J. Chen *et al., ChemBioChem,* 2005, **6**, 1169.
[6] Y.F. Huang *et al., Anal. Chem.,* 2006, **78**, 1485.
[7] C.L. Su *et al., Anal. Chem.,* 2007, **79**, 1626.
[8] H.P. Wu *et al., Anal. Chem.,* 2007, **79**, 6215.
[9] E.T. Castellana *et al., Nano Lett.,* 2007, **10**, 3023.
[10] L.C. Chen *et al., J. Phys. Chem., C* 2007, **111**, 2409.
[11] N. Cioffi *et al., Sensor Letters*, 2008, **6**, 654.
[12] L. Hua *et al., J. Nanopart. Res.,* 2007, **9**, 1133.
[13] S.D. Sherrod *et al., Anal. Chem.,* 2008, **80**, 6796.
[14] K. Shrivas *et al., Rapid Commun Mass Spectrom.,* 2008, **22**, 2863.
[15] H. Yan *Int. J. Mass Spectrom.,* 2009, **281**, 1.
[16] H. Kawasaki *et al., J. Phys. Chem. C,* 2007, **111**, 16278.
[17] L. Qiao *et al., J. Prot. Res.,* 2007, **6**, 4763.
[18] K.H. Lee *et al., Rapid Commun. Mass Spectrom.,* 2007, **21**, 2023.
[19] C.Y. Lo *et al., J Am Soc Mass Spectrom.,* 2008, **19**, 1014.
[20] T. Watanabe *et al., J. Mass Spectrom.,* 2008, **43**, 1063.
[21] P.C. Lin *et al., Anal. Chem.,* 2007, **79**, 3401.
[22] Y.C. Chiu *et al., Anal. Lett.,* 2008, **41**, 260.
[23] J. Turkevich *et al., Discuss. Faraday Soc.,* 1951, **11**, 55.
[24] J. Turkevich *Gold Bull.,* 1985, **18**, 86.
[25] X. Ji *et al., J. Am. Chem., Soc.,* 2007, **129**, 13939.
[26] G. Frens, *Nature,* 1973, **241**, 20.
[27] P. Freund *et al., J. Phys. Chem.,* 1985, **89**, 1074.
[28] M. Chow *et al., J. Colloid Interface Sci.,* 1994, **165**, 97.
[29] La caratterizzazione XPS è stata condotta utilizzando uno spettrometro Thermo VG Theta Probe dotato di sorgente monocromatica AlKα con spot di 400 μm. Sia lo spettro di insieme che le regioni ad alta risoluzione sono state acquisite in modalità *Constant Analyser Energy* (CAE) con energia di passo rispettivamente di 150 e 100 eV.
[30] $FWHM_N$ = FWHM($Au4f_{7/2}$)/FWHM($C1s_{alchilico}$) si è scelto di normalizzare i dati di FWHM rispetto al valore della FWHM della componente alifatica del C1s per svincolare i dati sperimentali da artefatti legati al diverso stato di carica dei vari campioni.
[31] R. Pilolli *et al., Chimica e Industria,* 2008, **9**, 171.
[32] N. Cioffi *et al., Anal. and Bioanal. Chem.,* 2009, **394**,1375
[33] E. J. Menke *et al., Nature Materials,* 2006, **5**, 914.
[34] C. Xiang *et al., ACS Nano,* 2008, **2**, 1939.

La Società Chimica Italiana su Internet

Sito web della Sci: www.soc.chim.it

È anche attiva una mailing list all'indirizzo: SCI-list@list.cineca.it

Altri siti attivi sono:

Gruppo Giovani: www.scigiovani.it
Sezione Campania: www.scicampania.unina.it/index.htm
Sezione Lazio: www.soc.chim.it/sezioni/lazio
Sezione Liguria: www.chimica.unige.it/sci/
Sezione Lombardia: www.sci-lombardia.org/
Sezione Veneto: www.chimica.unipd.it/sci/pubblica/
Divisione di Chimica Ambientale e dei Beni Culturali: www.socchimdabc.it/
Divisione di Chimica Analitica: www.soc.chim.it/divisioni/chimica_analitica
Divisione di Chimica Fisica: www.soc.chim.it/divisioni/chimica_fisica
Divisione di Chimica Industriale: www.chimind.it/
Divisione di Chimica Inorganica: http://dci.mfn.unipmn.it/
Divisione di Chimica Organica: www.soc.chim.it/divisioni/chimica_organica
Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici: www.soc.chim.it/divisioni/chimbio
Divisione di Didattica Chimica: www.didichim.org/
Divisione di Elettrochimica: http://users.unimi.it/scielettrochimica/
Divisione di Chimica Farmaceutica: http://dcf.frm.uniroma1.it/cgi-bin/home.pl
Divisione di Spettrometria di Massa: www.soc.chim.it/divisioni/spettrometria_di_massa
Gruppo Interdivisionale Catalisi: www.soc.chim.it/it/gruppi_interdivisionali/catalisi
Gruppo Interdivisionale Chimica Computazionale: www.soc.chim.it/it/gruppi_interdivisionali/chimica_computazionale
Gruppo Interdivisionale di Chimica Strutturale: www.chim.unipr.it/chimica/link.htm
Gruppo Interdivisionale di Green Chemistry: http://www-2.unipv.it/photochem/greenchemistry/

ABSTRACT

Nanomaterials for LDI-MS: *Synthesis and Spectroscopic Characterization*

In the present work gold and silver nanostructures with different morphology, have been synthesized and characterized by means of morphological and spectroscopic analytical tools. In particular, X-ray photoelectron spectroscopy has been used to assess the nanomaterial surface chemical state. Both gold and silver nanomaterials showed interesting perspective in bioanalytical applications, as non-conventional desorption/ionization promoters in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.