

NANOWIRE DI SILICIO.

PROMOTORI PER LDI-MS

Rosaria Anna Picca¹, Cosima Damiana Calvano¹, Maria Chiara Sportelli¹, Cristiano D'Andrea³, Maria Josè Lo Faro^{2,3}, Barbara Fazio², Alessia Irrera², Nicola Cioffi¹

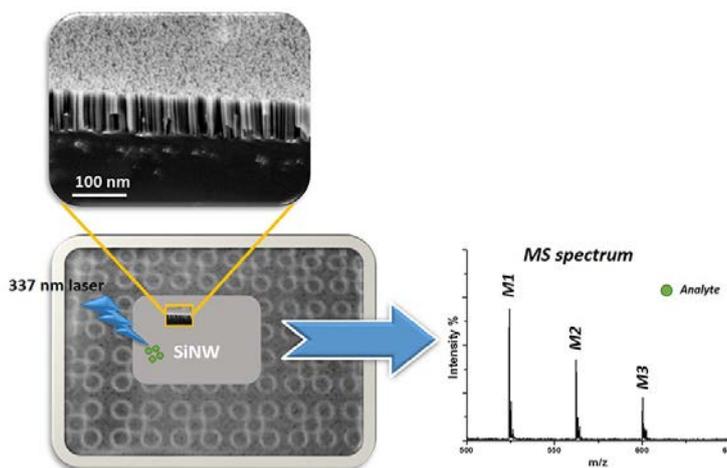
¹Dipartimento di Chimica, Università di Bari "Aldo Moro"

²IPCF-CNR - Messina

³MATIS IMM-CNR - Catania e Dipartimento di Fisica, Università di Catania

rosaria.picca@uniba.it

Nanowire di silicio sono stati ottenuti tramite etching chimico ed electron beam evaporation, caratterizzati e successivamente impiegati come promotori di desorbimento e ionizzazione per l'analisi di composti a bassa massa molecolare mediante spettrometria di massa LDI.



Silicon Nanowires as Promoters for LDI-MS

Silicon nanowires have been obtained by means of chemical etching and electron beam evaporation, spectroscopically characterized and then used as non-conventional promoters of desorption and ionization phenomena in the LDI-MS analysis of low-molecular weight species.

Sin dai primi studi ad opera di Karas e Hillenkamp¹, la spettrometria di massa (MS) MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) è stata utilizzata per l'analisi di macromolecole di varia natura. Matrici organiche come l'acido α -ciano-4-idrossi-cinnamico (CHCA) e l'acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB) sono tra le più comunemente impiegate in questa tecnica. Esse, però, non sono particolarmente indicate nell'analisi di specie a basso peso molecolare poiché danno origine ad una pletera di segnali interferenti con rapporti $m/z < 1.000$ e presentano a volte problemi di limitata riproducibilità di analisi². In risposta a questo approccio, negli ultimi anni è stata sviluppata una metodologia alternativa basata sull'uso di superfici nanostrutturate capaci di promuovere la ionizzazione - da cui la denominazione "surface assisted laser desorption/ionization" (SALDI) - che presenta alcuni vantaggi, quali la facilità di preparazione del campione ed assenza di interferenze spettrali per bassi valori m/z . Nanostrutture con diversa morfologia (nanoparticelle, nanorod, nanotubi, nanowire) sono state proposte in letteratura per applicazioni SALDI-MS^{3,4,5,6,7,8,9,10}. Tra esse, le nanostrutture a base di Au e Si rappresentano ad oggi le più adoperate^{4,5}. Dagli studi sul silicio poroso¹¹ alla successiva introduzione dei nanowire di silicio (SiNW) da parte del gruppo di Siuzdak¹², si è osservato come alcune proprietà fisiche (come l'elevata densità e area superficiale e le proprietà anti-riflettenti) dei SiNW assicurino elevate prestazioni in applicazioni SALDI-MS, sia in termini di minor fluenza del laser necessaria per il processo di desorbimento/ionizzazione che di efficienza analitica^{13,14}. In quest'ottica, il presente lavoro è rivolto all'impiego di substrati a base di SiNW in applicazioni SALDI-MS, senza l'ausilio di matrici convenzionali, per l'analisi di piccole molecole (amminoacidi, peptidi, terpeni). SiNW sono

stati preparati mediante *etching* chimico della superficie di Si cristallino^{15,16}. Tale metodica prevede la deposizione mediante *Electron Beam Evaporation* di un film sottile (qualche nm) di un metallo - Au o Ag - per catalizzare l'*etching* del Si con la conseguente crescita di SiNW.

Sulla base dei responsi in LDI-MS, si è constatata una certa influenza del metallo utilizzato durante la sintesi di SiNW nonché della loro lunghezza degli stessi NW (tra 100 e 2.000 nm). In particolare, SiNW di lunghezza inferiore al micrometro sembrano substrati più promettenti. Inoltre, tali superfici sono state caratterizzate sia mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) che spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) per studiarne la composizione elementare e la speciazione chimica di superficie.

Preparazione di SiNW

La crescita di SiNW con elevato *aspect ratio* è realizzata con un approccio relativamente economico e "pulito". Infatti, la deposizione di film di metallo evita l'utilizzo di sali che potrebbero formare dendriti e causare l'inclusione del metallo nei *nanowire*. Superfici di Si <1 0 0> drogato *p* sono trattate con una soluzione acquosa di HF (5 M) e H₂O₂ (0,44 M). La parte di silicio che è ricoperta dal metallo si ossida localmente per cui viene continuamente erosa da HF formando i SiNW. Tutto il processo avviene a temperatura ambiente e risulta particolarmente semplice, considerando che si possono ottenere NW a diversa lunghezza variando il tempo di *etching*, come apprezzabile nelle immagini SEM in Fig. 1. La densità dei NW è elevata (10¹¹ NW/cm²) ed il loro diametro medio è pari a 10±2 nm.

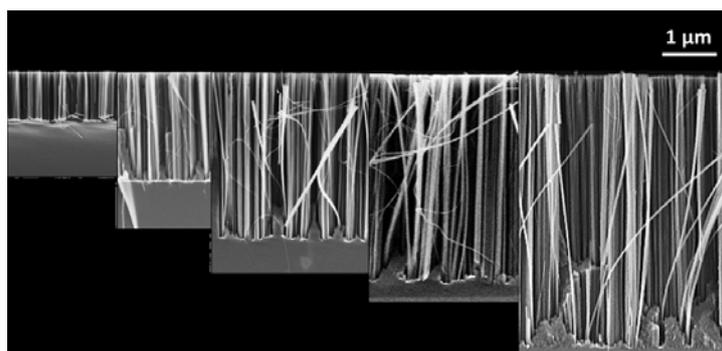


Fig. 1 - Immagini SEM di SiNW di differente lunghezza

Caratterizzazione spettroscopica di SiNW e loro impiego in esperimenti SALDI-MS

I *nanowire* di silicio sono stati caratterizzati mediante spettroscopia XPS per valutare la presenza del metallo utilizzato per la crescita nonché l'intorno chimico delle nanostrutture. Tale analisi è stata condotta con uno spettrometro *Theta Probe Thermo VG Scientific* impiegando una sorgente a raggi X monocromatica AlK α con spot di 300 μ m. Oltre allo spettro *wide scan*, sono state acquisite le regioni ad alta risoluzione HR degli elementi identificati. Gli spettri sono stati registrati in modalità *constant analyzer energy* (CAE), con energia di passo di 150 eV per il *wide scan* e di 100 eV per le regioni HR. A titolo di esempio, in Tab. 1 sono riportate le tipiche composizioni chimiche di superficie relative a campioni di SiNW con lunghezza nominale di 100 nm, preparati con Au ed indicati come SiNW-Au-100.

Tab. 1 - Tipica composizione elementare di superficie per campioni SiNW-Au-100	
Elemento	% _{at}
C	12,3±0,7
Au	0,5±0,2
Si	37,9±0,5
O	49,3±0,5

Il carbonio è essenzialmente associato alla contaminazione tipica della camera di analisi. Inoltre, come era facile aspettarsi per uno strato non del tutto compatto di NW di lunghezza contenuta, lo strato di metallo sottostante i *wire* è campionabile. D'altro canto, ciò non accade per NW sensibilmente più lunghi (>1 μm). Infine, dalla deconvoluzione dei picchi per il segnale principale del silicio, $\text{Si}2p_{3/2}$, si nota la presenza di diverse componenti in cui prevalgono quelle relative a $\text{Si}(0)$ e $\text{Si}(\text{IV})$ rispetto agli ossidi sub-stechiometrici¹⁷ (Fig. 2).

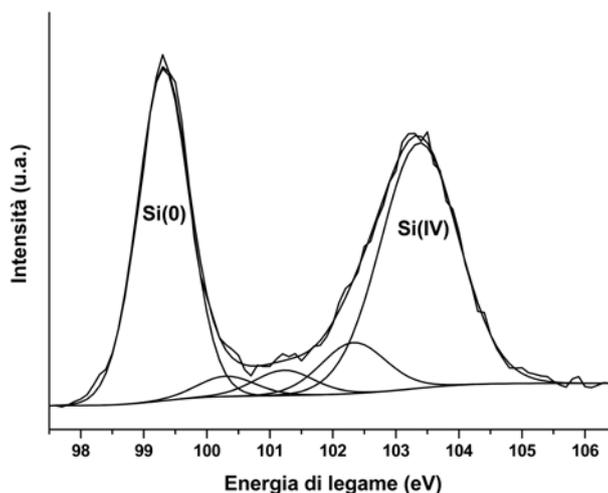


Fig. 2 - Tipico spettro XP del segnale $\text{Si}2p_{3/2}$ per SiNW

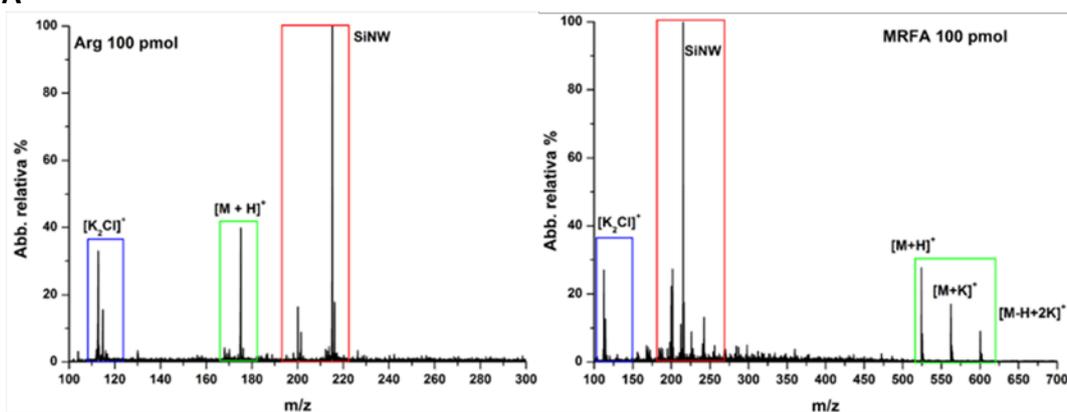
Le superfici con SiNW sono state fissate su target MALDI in acciaio ed utilizzate (senza ulteriori trattamenti) come promotori di desorbimento e ionizzazione in analisi LDI-MS. L'amminoacido L-arginina (Arg) ed il peptide Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) sono stati testati come analiti modello su SiNW-Au-100 preparando soluzioni acquose in presenza di KCl 1 mM, scelto come agente cationizzante. Inoltre, data l'affinità dell'argento per i legami insaturi, si è analizzato su SiNW-Ag-275 (NW lunghi 275 nm e preparati con Ag) un campione reale di olio extravergine di oliva, per valutare la presenza di squalene (un triterpene, SQ) ed eventuali acidi grassi tipicamente presenti nell'olio d'oliva. Il campione reale è stato dapprima pretrattato secondo un protocollo di letteratura¹⁸. In tutti i casi, spot da 1 o 2 μL (campione di olio) sono stati depositati sul substrato e sottoposti ad analisi. Gli esperimenti LDI-MS sono stati condotti in modalità positiva su uno spettrometro MS a tempo di volo Micromass M@LDI - LR (Waters MS Technologies) utilizzando una sorgente laser UV ad azoto ($\lambda=337$ nm, durata impulso=4 ns, *laser firing rate*=5 Hz) e dotato di ottica *reflectron* (lunghezza tubo=2,3 m). Sono state acquisite e mediate 30 scansioni per ogni spot, operando poi una sottrazione del background con una funzione polinomiale seguita da *smoothing* del segnale con un algoritmo Savitzky-Golay.

Gli spettri SALDI relativi ad Arg (174,10 m/z) e MRFA (523,23 m/z) sono riportati in Fig. 3a. Arg e MRFA sono rivelati come ioni $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 175,04 e 524,26, rispettivamente. Per MRFA sono osservabili anche i picchi associati agli addotti con K^+ . Inoltre, solo altri due picchi sono osservabili e associabili al substrato (SiNW), come determinato dall'analisi MS del solo substrato. Se si confrontano tali risultati con quelli ottenuti con la matrice convenzionale CHCA, questi dati sono confortanti poiché con i SiNW meno picchi interferenti sono presenti e, a parità di fluensa del laser, si raggiunge un rapporto S/N comparabile (124 vs. 130 per MRFA) o migliorato (67 vs. 33 per Arg). Quindi, per molecole di bassa massa, impiegando SiNW cresciuti con oro si ottengono prestazioni migliori in termini di un minore limite di rivelabilità e spettri con minor numero di picchi interferenti.

Le analisi condotte con SiNW-Ag-275 (Fig. 3b) mostrano la presenza di addotti con Ag^+ (con associato il suo caratteristico pattern isotopico) dello squalene (517,3 m/z) e della sua frazione

ossidata SQ_{ox} (533,3 m/z). Sono osservabili anche *cluster* dell'Ag (Ag_2^+ , Ag_3^+). Inoltre, altre componenti importanti dell'olio d'oliva sono state identificate come addotti con Ag^+ e/o Na^+ , indicando il contributo sinergico di SiNW e dell'argento. Ad esempio, i segnali a $m/z = 387,1, 389,1$ sono attribuibili rispettivamente a *cluster* di acido linoleico (L) ed oleico (O) con Ag^+ , probabilmente originati dalla frammentazione dei triacilgliceroli (TAG) e/o come acidi grassi liberi presenti. Sono anche apprezzabili i segnali relativi ai TAG con perdita di un acido carbossilico a $m/z = 601,6, 603,6$ ($[OL]^+$, $[OO]^+$) ed i corrispondenti diacilgliceroli (dg) in addotto con Na^+ a $m/z = 641,6, 643,6$ ($[dg(OL)+Na]^+$, $[dg(OO)+Na]^+$). Infine, a $m/z = 725,5, 727,5$ sono distinguibili i segnali relativi agli stessi digliceridi ma associati con Ag^+ . Siccome SiNW-Ag di lunghezza $>1 \mu m$ hanno dato risultati meno apprezzabili, è attualmente in corso una serie di esperimenti volta ad appurare su base quantitativa l'effetto della lunghezza dei SiNW sulle prestazioni LDI-MS.

A



B

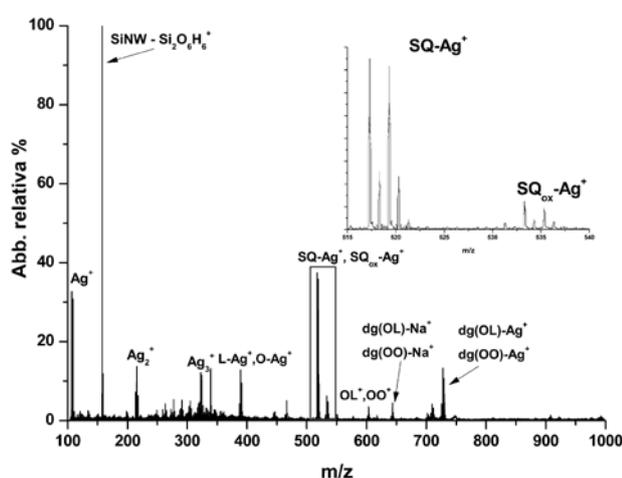


Fig. 3 - Spettri LDI-MS di Arg e MRFA (A) in alto e olio di oliva (B) in basso, ottenuti con SiNW

Conclusioni

Nuove superfici nanostrutturate a base di SiNW sono state impiegate in esperimenti preliminari per l'analisi di molecole a bassa massa molecolare di diverse classi. In particolare, si è notata una certa influenza del metallo impiegato durante la preparazione del materiale (Au o Ag) sulle proprietà di rivelazione in esperimenti LDI-MS. Tale approccio può aprire la strada per la loro applicazione sistematica come piattaforme analitiche alternative alle matrici MALDI di tipo convenzionale.

Ringraziamenti

Si ringrazia il MIUR per il finanziamento del progetto FIRB - FUTURO IN RICERCA 2008 - RBFRO88SW7 "Nanomateriali e Spettrometria di Massa a Ionizzazione Laser: un nuovo approccio Bioanalitico".

Bibliografia

- ¹M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- ²C.-K. Chiang, *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1269.
- ³Y.E. Silina, D.A. Volmer, *Analyst*, 2013, **138**, 7053.
- ⁴M. Dupré *et al.*, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 10637.
- ⁵R. Pilolli *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 601.
- ⁶D.S. Peterson, *Mass Spectrom. Rev.*, 2007, **26**, 19.
- ⁷K.P. Law, J. Larkin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2597.
- ⁸R. Arakawa, H. Kawasaki, *Anal. Sci.*, 2010, **26**, 1229.
- ⁹N. Cioffi, *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1375.
- ¹⁰R. Pilolli *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 1703.
- ¹¹J. Wei *et al.*, *Nature*, 1999, **399**, 243.
- ¹²E.P. Go *et al.*, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 1641.
- ¹³G. Luo *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 13381.
- ¹⁴W.Y. Chen *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **687**, 97.
- ¹⁵A. Irrera *et al.*, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 4879.
- ¹⁶A. Irrera *et al.*, *Nanotechnology*, 2012, **23**, 075204.
- ¹⁷M.L. Green *et al.*, *J. Appl. Phys.*, 2001, **90**, 2057.
- ¹⁸C.G. Zambonin *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 325.