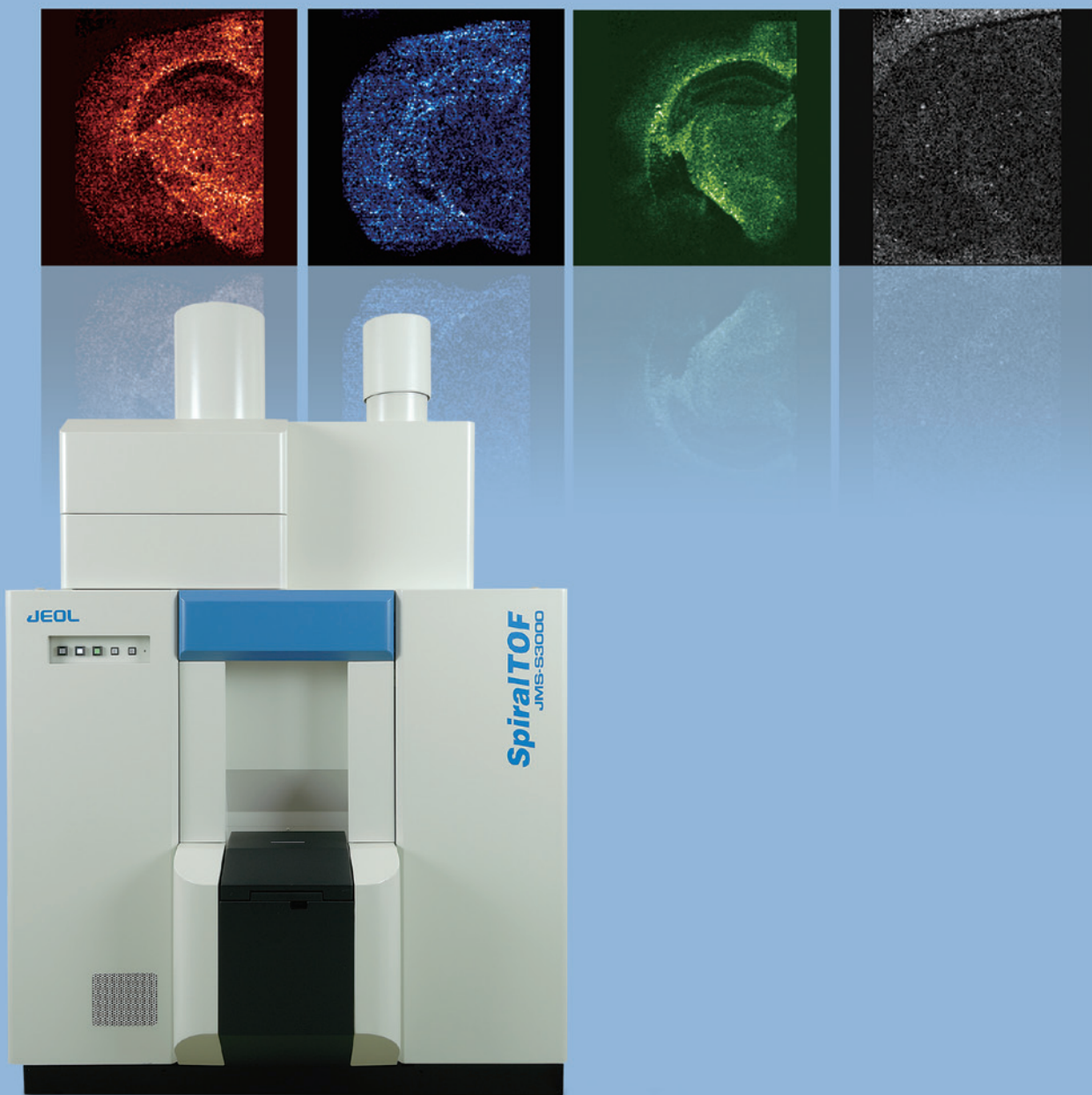


Solutions for Innovation

JMS-S3000 SpiralTOF

イメージングアプリケーションノートブック

2016年8月版



JMS-S3000 SpiralTOF

イメージングアプリケーションノートブック

2016年8月版

目次

装置紹介	1
らせん状のイオン軌道を利用した MALDI-TOF/TOF の開発 （佐藤 貴弥, 日本電子ニュース 42, 27 – 30, 2010）	1
JMS-S3000 “SpiralTOF” を用いた MALDI-Imaging 測定における m/z の安定性	5
イメージング	7
高質量分解能 MALDI-TOFMS による薬剤のイメージング質量分析	7
JMS-S3000 “SpiralTOF” Negative モードを用いた マウス脳組織切片上の脂質のマスイメージング	11
JMS-S3000 “SpiralTOF” と msMicroImager による高質量分解能マスイメージ解析	15
イメージング質量分析法と走査型電子顕微鏡による指紋分析	19
紙表面のボールペンインクの分析 ～JMS-S3000 によるマスイメージングと SEM/EDS による元素分析～	23
表面分析・深さ方向解析	27
JMS-S3000 “SpiralTOF” を用いたレーザー脱離イオン化法による有機薄膜分析 （佐藤貴弥, 日本電子 news, 46, 53 – 58）	27
JMS-S3000 “SpiralTOF” による有機 EL 材料測定例 ～既存の表面分析手法との比較～	33
JMS-S3000 SpiralTOF による論文一覧（2016年5月現在）	37

- 本冊子内のマスイメージングデータは、P. 15 – 18 に掲載されている物を除いて全て BioMap で処理されたものです。
- BioMap は Novaltis Institutes for BioMedical Research（バーゼル、スイス）が開発し、著作権を保有しているマスイメージングデータ解析ソフトウェアです。
- BioMap は MALDI Mass Spectrometry Imaging Interest Group (MALDI MSI IG) の web サイト <http://www.imzml.org/> で無償で配布されています。

らせん状のイオン軌道を利用した MALDI-TOF/TOFの開発

佐藤 貴弥

日本電子(株) MS事業ユニット

我々は、らせん状のイオン軌道をもつイオン光学系の開発を行った。これは、現在多くの市販装置に利用されているリフレクトロン型イオン光学系の基本性能を超える、新規のイオン光学系である。また、らせん軌道型イオン光学系を第1TOFMSに、オフセットパラボリックイオンミラーを利用したリフレクトロン型イオン光学系を第2TOFMSにした、MALDI-TOF/TOFを開発した。この装置は、らせん軌道型イオン光学系由来の特長を有し、従来装置にはない高質量分解能や高プリカーサイオン選択能を実現できる。マススペクトルでは、 m/z 2093にて質量分解能 60,000 (FWHM) 以上を観測すると同時に幅広い質量範囲にて高質量分解能を達成できることを示した。また、高プリカーサイオン選択能により、プリカーサイオンのモノアイソトピックイオンのみを選択可能であり、各開裂経路を示すピークを、プロダクトイオンスペクトル上でそれぞれ1つのピークとして観測することができる。その結果、プロダクトイオンスペクトルの解析がより明確となることを示した。

はじめに

飛行時間質量分析法 (TOFMS) は、四重極型質量分析法、磁場型質量分析法、イオントラップ型質量分析法、フーリエ変換型質量分析法などと並び、質量分析計におけるイオンの質量分析技術の1つである。TOFMSでは、イオン加速部に存在する様々な m/z 値を含むイオン群を、ある時間始点から印加されるパルス電圧で加速し、検出面までの一定距離を飛行させる。検出面までの飛行時間は、イオンの m/z 値の平方根に比例するため、 m/z 値の小さいイオンから順次検出面に到達し、イオン群を m/z 値で分離することができる。TOFMSの特長は、マススペクトルを得るためにスキャンする必要がなく、高速な測定が可能であることである。現在TOFMSは、単独の質量分析法として、あるいは四重極型質量分析法と接続したタイプ (Q/TOF)、TOFMSを2つ直列に接続したタイプ (TOF/TOF) のタンデム質量分析法としても普及している。

TOFMSの質量分解能は、同一の m/z 値をもつイオン群 (イオンパケット) の検出面での飛行時間分布 ΔT (すなわち検出面での飛行方向

のイオンパケットの空間的な広がり)、およびその飛行時間分布の重心値 T を用いて $T/2\Delta T$ で表現することができる。TOFMSは1964年に発明されて以来 [1]、 T を大きくすること、 ΔT を小さくすることにより質量分解能の向上が図られてきた。1955年にはイオン源での初期条件の分布を飛行軸方向に収束させる加速方法が開発され、 ΔT を小さくすることが可能となり質量分解能が向上した [2]。また1970年初頭には、その加速方法による収束位置を始点とし、イオンミラー [3] や扇形電場 [4] で構成されるイオン光学系を後段に配する方法が発明された。これにより ΔT を増加させることなく、飛行距離すなわち飛行時間 T を増加させることが可能となり、質量分解能が向上した。現在の市販装置のほとんどはイオンミラーを利用しており、その飛行距離は1~3mである (リフレクトロン型イオン光学系)。さらなる質量分解能の向上のために、同一軌道を複数回飛行するマルチフレクティング型 (多重反射型) [5] やマルチターン型 (多重周回型) [6, 7] のイオン光学系も提案され、製作評価されている。マルチフレクティング型やマルチターン型のイオン光学系は、コンパクトな空間内

に理論上無限大の飛行距離を実現できる点で優れている。その反面、同一軌道を複数回飛行させるため、速度の大きいイオン (m/z 値の小さいイオン) が、速度の小さいイオン (m/z 値の大きいイオン) を追いつくので、質量範囲が限定されてしまう問題点がある。

我々は、独自にらせん軌道を利用したイオン光学系 (らせん軌道型イオン光学系) の開発をおこなった。このイオン光学系は、マルチフレクティング型やマルチターン型イオン光学系の「追いつき」の問題を解決でき、かつ現在主流のリフレクトロン型イオン光学系に比べて高質量分解能、高質量精度を実現することができる。本稿では、まずらせん軌道型イオン光学系の設計について述べる。さらに、らせん軌道イオン光学系を利用した第1TOFMSと、オフセットパラボリックリフレクトロンを利用したリフレクトロン型イオン光学系を直列につないだTOF/TOFを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) と組み合わせ合わせたMALDI-TOF/TOFの開発を行ったので、その動作や基本性能について紹介する。この装置は、第1TOFMSのらせん軌道型イオン光学系を利用することで、高質量分解能、

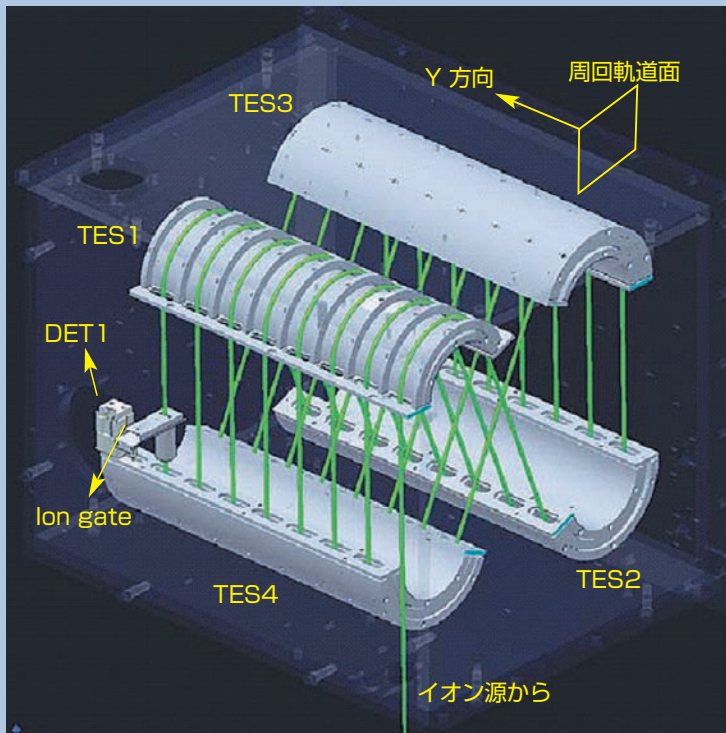


Fig. 1 らせん軌道型イオン光学系。

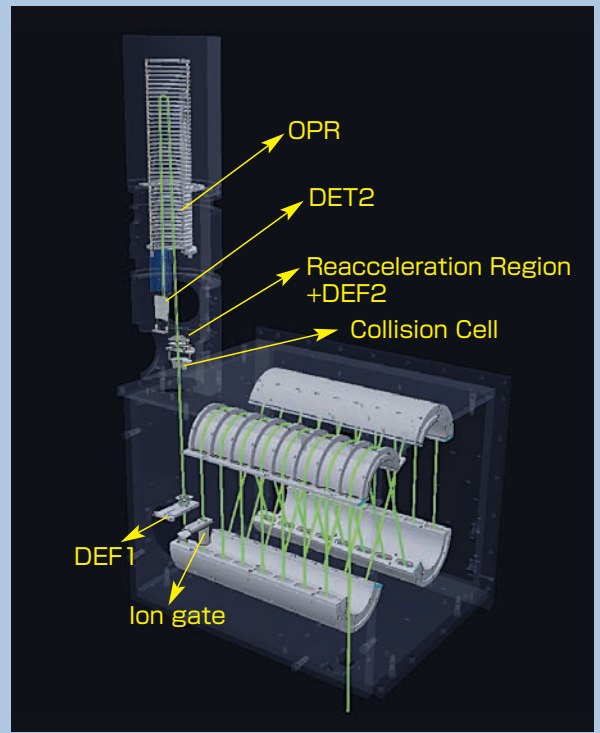


Fig. 2 らせん軌道型イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOF。

高質量精度、高ブリカーサイオン選択能を実現することができ、より明確な分析を可能とする。

らせん軌道型イオン光学系の設計

らせん軌道型イオン光学系を開発するに当たっては、マルチターン型イオン光学系の技術を応用した。特に、大阪大学で発明された“Perfect Focusing”と“マルチターン” [12]の組み合わせは、TOFMSとして世界最高質量分解能を実現しており、らせん軌道イオン光学系への展開には最適と考えた。マルチターン型イオン光学系を、らせん軌道状に展開するためには、イオン軌道を周回軌道面と垂直方向に移動させていく必要がある。我々は、これを実現するために周回軌道面に対して、イオンを数度傾けて入射させる方法をとった。この方法の最大の利点は、各階層にイオン軌道を移動させるための構造物が不要なことである。その反面、斜め入射によるマルチターン型イオン光学系からのずれによる質量分解能の悪化も懸念されるが、進入角度を数度と浅く保つことでその影響を小さくすることができると思われた。

さて実際には、円筒電場と2枚のマツダプレートを組み合わせたトロイダル電場4つで構成されたMULTUM II [7]の構造を基本として、らせん軌道型イオン光学系を設計した。イオン光学系の概略図をFig. 1に示す。らせん軌道への展開は、円筒電場中に(周回数+1)枚のマツダプレートを組み込み、トロイダル電場を階層状にした構造物(階層状トロイダル電場: TES)を利用することで実現した。各TESは、

内側電極と外側電極の間隔 L_x に、等しい空間 L_y を設けて並べられた(周回数+1)枚のマツダプレートで構成されている。TES1~4への印加電圧は、内側電極電圧、外側電極電圧、マツダプレート電圧の3種類であり、それぞれTES1~4の全てのマツダプレート、TES1~4の各内側電極および各外側電極に供給されている。

そして4つのTESを周回軌道面からみればMULTUM IIと同じになるように配置した。Y方向は周回軌道面に対して垂直方向な方向、すなわち1周回ごとにイオン軌道が移動していく方向であり、後述のMALDI-TOF/TOFの開発では水平方向に設定した。Fig. 1のTES1は外側電極を外した状態を示しており、マツダプレートが等間隔に並んでいる様子がわかる。イオンは L_x と L_y とで形成される空間の中心を飛行する。同階層のTES1~4を順次通過し、TES4通過後、TES1の次階層へ入射する。それを周回数分繰り返すことで、らせん状のイオン軌道を描き検出器(DET1)に到達する(Fig. 1中、緑線がイオン軌道)。マツダプレートの厚さを L_m 、周回軌道長を L_c とすると、同一階層トロイダル電場の階層間の中心軌道距離(すなわち1周回ごとにY方向にずれる距離)は、 $L_y + L_m$ であり、階層状トロイダル電場への入射角 θ は、1周回の軌道長 L_c を用いて、

$$\tan \theta = (L_y + L_m) / L_c \cdots \cdots (1)$$

とあらわすことができる。以上のように、イオン光学系は同一の4つのTES1~4で構成することにより、複雑なイオン軌道を、シンプルな構造物で実現できている。

らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOFの製作

我々は、第1TOFMSにらせん軌道型イオン光学系と第2TOFMSにリフレクトロン型イオン光学系を直列に配置し、MALDIイオン源と接続したMALDI-TOF/TOFを開発した。以下では、第1TOFMSでのマススペクトル測定をスパイラルモード、第2TOFMSでのプロダクトイオンスペクトル測定をTOF-TOFモードと呼ぶ。

装置の概略図をFig. 2に示す(ただしイオン源と第1TOFMS用検出器DET1は省略されている)。らせん軌道は、1周回2.093mの8周回に設定した。同一TESの隣り合う階層の中心軌道間の距離は、58mmであるので、式(1)からTESへの入射角度は1.6度となる。Y方向は水平方向に設定しており、イオン源からの引き出し方向を水平より1.6度傾けることで入射角度を実現している。

スパイラルモードでは、イオンはらせん軌道を描き、スパイラルモード用検出器(Fig. 2に記載はしていないが、Fig. 1のDET1と同じ位置にある)で検出される。7周目にはイオンゲートが配置され、データ取得範囲外のマトリックスに由来する高強度のイオンを排除することができる。

TOF-TOFモードでは、このイオンゲートによる選択幅を小さくし、ブリカーサイオンのモノアイソトピックイオンを選択する。また、コリジョンセルへブリカーサイオンが導入されるように、スパイラルモード用検出器を機械的に軌道外に外すことができる。コリジョンセルに入射したイオンは、およそ20 keVの

運動エネルギーでコリジョンセル中の希ガスと衝突、解離し、フラグメントイオンを生成する。プリカーサイオンおよびフラグメントイオンは、オフセットパラボリックリフレクトロン(OPR) [13]と再加速機構を組み合わせたリフレクトロン型イオン光学系にて質量分離される。OPRは、直線電場と放物線電場をつなげたリフレクトロンであり、 m/z 値の小さなフラグメントイオンからプリカーサイオンまでを同時に質量分離可能である。また、イオンの透過率を向上させるため、コリジョンセル前後に配置した2つのデフレクタDEF1とDEF2によりイオン軌道の微調整が可能である。

らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOFの評価

Fig. 3にスパイラルモードで測定した6種類の標準ペプチド混合物(分子量が小さいほうからBradykinin fragment 1-7, Angiotensin II, Angiotensin I, P14R, ACTH fragment 1-17, ACTH fragment 18-39)のマススペクトルを示す。AngiotensinIIおよびACTH fragment 1-17については、拡大図も示した。それぞれの質量分解能は、58,000 (FWHM) と73,000 (FWHM) である。また、ACTH fragment 1-17以外の5つのペプチドで内部キャリブレーションを行った場合の、ACTH fragment 1-17の質量誤差は0.16 ppmである。以上から、らせん軌道型イ

オン光学系の飛行距離17mは、従来のリフレクトロン型イオン光学系のそれよりも5倍以上長く、質量分解能・質量精度を向上させることができることが分かった。

Fig. 4には、ACTH fragment 1-17で質量分解能を調整した場合の、 m/z 値と質量分解能の関係を示した。Fig. 4から幅広い m/z 領域で同時に高質量分解能を達成できることがわかる。これは高質量分解能が局所的にしか達成できなかった従来のリフレクトロン型イオン光学系を利用したMALDI-TOFMSの課題を解決するものである。

Fig. 5aにTOF/TOFモードで測定したPoly(oxypropylene) のプロダクトイオンスペクトルの全体図を示す。選択したプリカーサイオンは、 $[M+Na]^+$ シリーズ中の m/z 1027のモノアイソトピックイオンである。Fig. 5aからプロダクトイオンとしてのナトリウムイオンからプリカーサイオンイオンまで、多くの開裂情報が得られていることが分かる。さらに m/z 780付近を拡大したFig. 5bを示す。本装置では、プリカーサイオンのモノアイソトピックイオンを選択が可能のため、プロダクトイオンも同位体ピークを含まない形で観測できる。つまり、Fig. 5bの2本のピークは異なる開裂経路を示すものであり、2u異なる開裂経路も明確に分離することができる。Fig. 5cに、従来TOF/TOFで測定した場合に、観測されるFig. 5bの m/z 領域のイメージ図を示した。従

来のTOF/TOFの選択能では、プリカーサイオンの同位体ピークも含まれた形で、フラグメントイオンを生成するため、プロダクトイオンスペクトルの各開裂経路についても同位体ピークが観測される。その結果、2u程度しか離れていない場合、各開裂経路の同位体ピークが重なってしまうため、明確に分離することは難しい。以上の結果から、本装置のらせん軌道イオン光学系由来の高いプリカーサイオン選択能を活かすことで、対象となる化合物の分析が容易となることが分かる。

結論(まとめ、おわりに)

本稿では、らせん軌道型イオン光学系の開発について報告した。また、らせん軌道型イオン光学系とオフセットパラボリックイオンミラーを用いたリフレクトロン型イオン光学系を接続し、MALDI-TOF/TOFを開発し、その性能評価を行った。新奇なイオン光学系の採用により、これまでのMALDI-TOF、MALDI-TOF/TOFの課題を克服し、様々な分野での分析に役立つものと思われる。

参考文献

- [1] W. E. Stephens. *Phys. Rev.*, **69**, 691 (1946)
- [2] W.C.Wiley and I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.*, **26**, 1150 (1955).

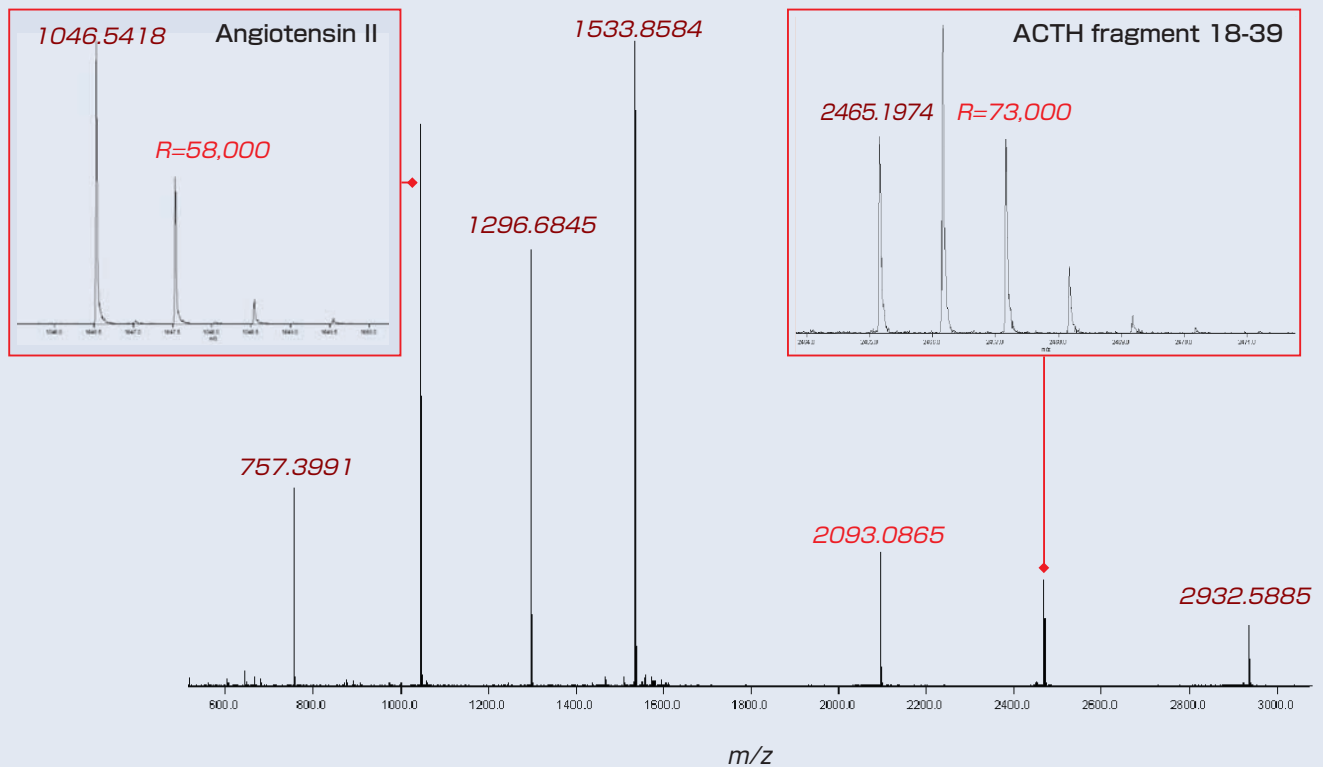


Fig. 3 標準ペプチド混合物のマススペクトル。

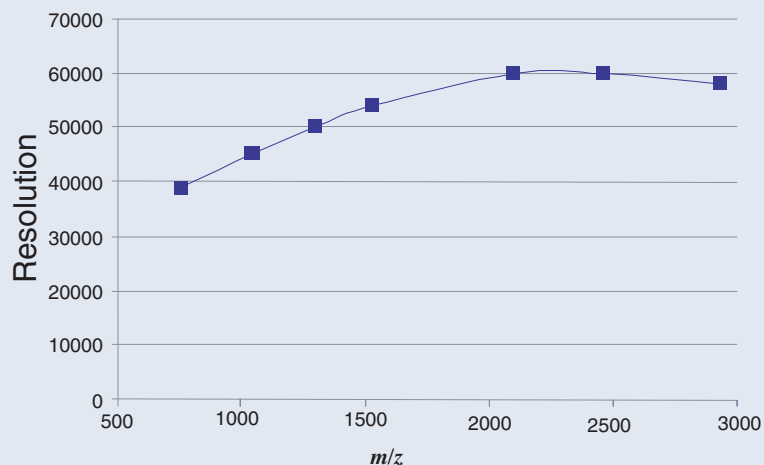


Fig. 4 m/z 値と質量分解能の相関。

a. プロダクトイオンスペクトル全体

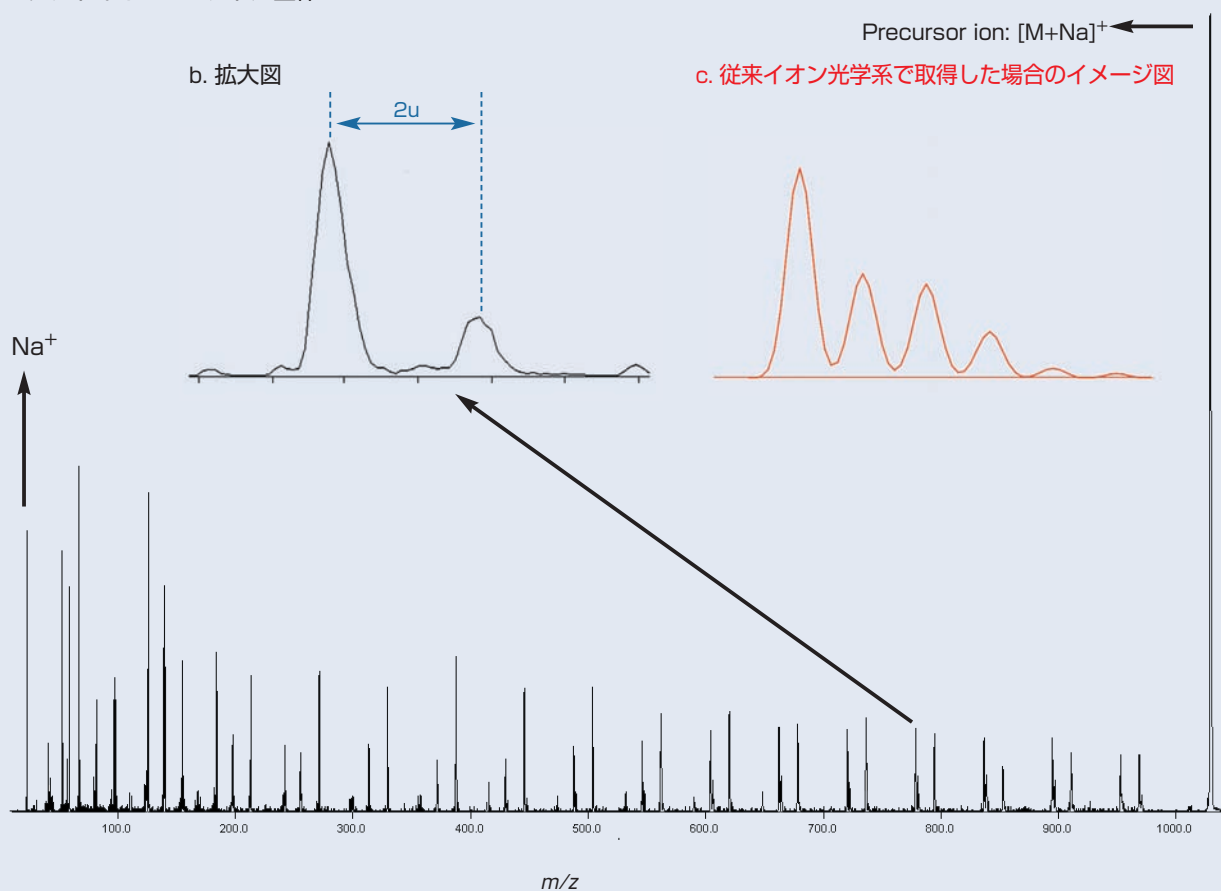


Fig. 5 Poly (oxypropylene) のプロダクトイオンスペクトル。

- [3] B. A. Mamyurin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk and V. A. Zagulin, *So. Phys. JETP*, **37**, 45 (1973).
- [4] W. P. Poschenrieder, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Phys.*, **6**, 357 (1972).
- [5] H. Wollnik and A. Casares, *Int. J. Mass Spectrometry*, **227**, 217 (2003).
- [6] M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Reinhard and H. Rosenbauer, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 163 (2000).
- [7] D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 349 (2003).
- [8] M. Yavor, A. Verentchikov, J. Hasin, B. Kozlov, M. Gavrik and A. Trufanov, *Physics Procedia* **1** 391 (2008)
- [9] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, Y. Kammei, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1969 (2005).
- [10] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, and Y. Kammei, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 11 (2006).
- [11] T. Satoh, T. Sato, and J. Tamura, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1318 (2007).
- [12] M. Ishihara, M. Toyoda and T. Matsuo, *Int. J. Mass Spectrom.*, **197**, 179 (2000).
- [13] E. N. Nikolaev, A. Somogyi, D. L. Smith, C. Gu, V. H. Wysocki, C. D. Martin and G. L. Samuelson, *Int. J. Mass Spectrom.*, **212**, 535 (2001)

JMS-S3000 Application Data

JMS-S3000“SpiralTOF”を用いた MALDI-Imaging 測定における m/z の安定性

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) イオン源と飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を組み合わせた MALDI-TOFMS では、試料を載せるターゲットプレート上のレーザー照射位置が飛行時間の始点となる。そのため、試料表面上の微細な構造や、試料表面の凹凸などにより飛行時間が変動し、観測されるピークの m/z の変動につながる。そのため、リフレクトロン型 TOFMS によるマスイメージングでは 1 u 以下の質量分離は難しい。JMS-S3000 “SpiralTOF™” は、らせん状のイオン軌道をもち、限られた空間内に 17m と長い飛行距離を実現した。その飛行距離は、リフレクトロン型 TOFMS と比べて 5~10 倍程度あり、試料表面上の微細な凹凸による観測されるピークの m/z の変動が十分に小さく、高い質量分解能を達成できる。今回はマウス脳組織切片の脂質についてマスイメージング測定を行い、質量安定性の検証を行った。

ITO スライドガラス上に配置したマウス脳組織切片に DHB を噴霧したのち、マスイメージング測定を行った。5x7 mm の測定範囲を、40 μ m 四方のピクセルに分割し、各ピクセルでマススペクトルを取得した。もっともイオン強度が強く観測されたピークは m/z 798 であり、Phosphatidylcholine (PC) (34:1) [M+K]⁺ と推定された。このピークのマスイメージを Fig.1 に示す。Fig. 1 から PC (34:1) は組織切片表面上に均一に分布していることがわかる。得られたマスイメージ上で、上下左右の 4 点を ROI (Region Of Interest) 1 - 4 として指定し、マススペクトルを作成した。ROI 1 - 4 の PC (34:1) [M+K]⁺ のピーク位置の変動が非常に小さいことが分かる (Fig.2)。

MALDI 法をもちいたマウス脳組織切片の脂質の測定では、そこに含まれる脂質の多様性に由来する多くのピークが観測される。中には 0.1 u 程度の質量の差異しかなく、マススペクトル上で非常に近接した位置にピークが観測されることもしばしばである。これらを明確に分離して観測するためには、高い質量分解能が必要と同時に、高い質量安定性が要求される。Fig.3 は、各 ROI 1 - 4 のマススペクトルを m/z 822 - 823 の 1u 幅で拡大したマススペクトルである。0.1u 程度の違いをもつ 3 本のピークが観測されている。これらのピークはプリカーサイオン選択能の不足により、現在市販されている質量分析計では MS/MS 測定による構造解析は困難である。そのため、同定には精密質量測定が重要となる。SpiralTOF では、高い質量安定性により、1つの既知ピークをもちいた質量補正を行えば、精密質量による組成推定も可能となる [1]。

【謝辞】

本分析は、大阪大学大学院理学研究科附属基礎理学プロジェクト研究センター学際理学部門との共同研究の成果です。組織切片は、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 粟津研究室より提供いただきました。

[1] Takaya Satoh et al., Mass Spectrometry Vol. 1 (2012), A0013

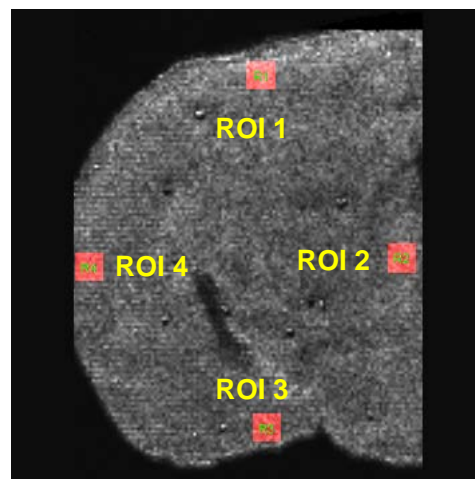
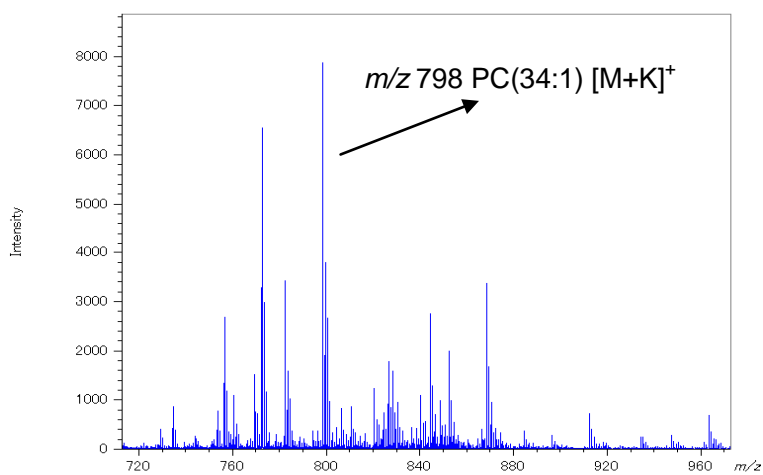


Fig.1 Averaged mass spectrum and mass image of m/z 798

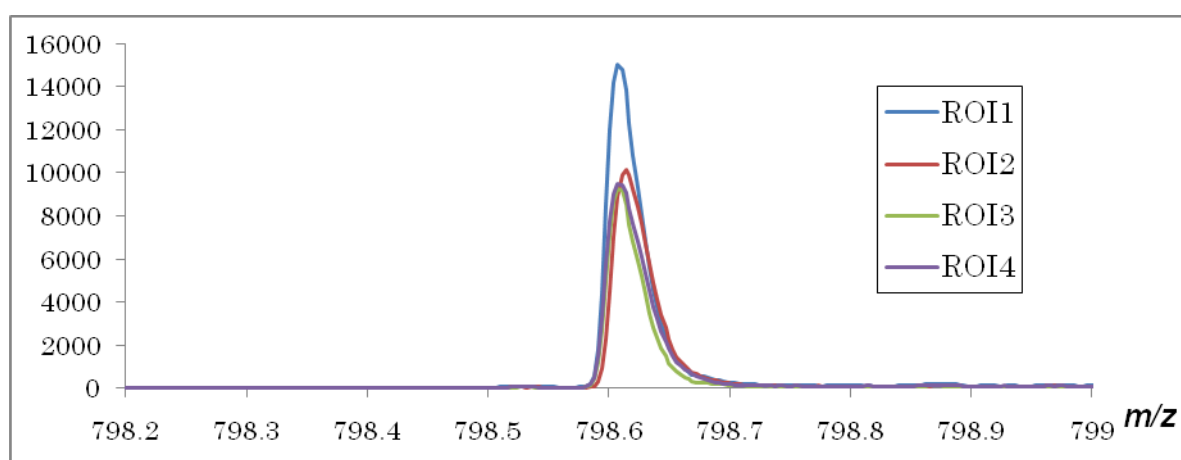


Fig.2 Mass spectra of ROI 1 – 4 at m/z 798

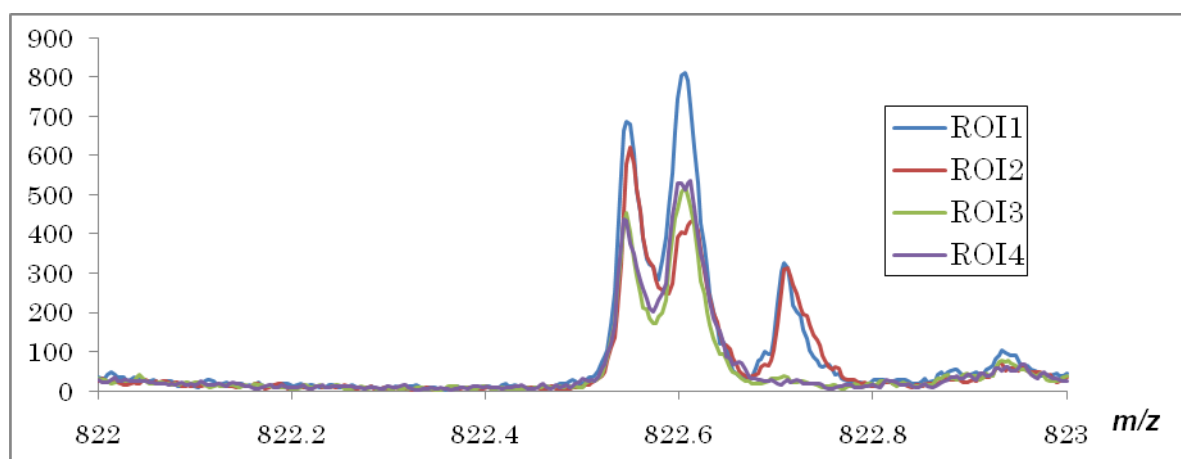


Fig.3 Mass spectra of ROI 1 – 4 at m/z 822

高質量分解能MALDI-TOFMSによる薬剤のイメージング質量分析

関連製品: 質量分析計(MS)

お問い合わせ先: 日本電子株式会社 グローバル営業本部 TEL: 03-6262-3568

【はじめに】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いたイメージング質量分析法(MALDI-IMS)は、サンプル表面の有機化合物の分布を可視化できる最先端の質量分析法である。主に凍結組織切片表面の脂質・ペプチド・薬剤とその代謝物などを中心にアプリケーションを拡大している。MALDI-IMSの薬物動態への応用は、whole body autoradiographyに対して、放射性同位元素では判別不可能な薬剤と代謝物の識別が可能といった点で有利である。MALDI-IMSでは、レーザーをサンプル表面上で2次元に走査し、各レーザー照射位置におけるマススペクトルを取得する。この2次元の位置情報を持つマススペクトル群を解析することで、特定の分子量をもつ有機化合物の分布を、マスマイージとして示すことができる。JMS-S3000 *SpiralTOF* は、JEOL特許技術のらせん軌道型イオン光学系を採用し、従来のリフレクトロン型イオン光学系より5-10倍長い17mの飛行距離を有しており、世界最高の質量分解能と質量精度を誇るMALDI-TOFMSシステムである。*SpiralTOF*を用いたMALDI-IMSでは、その高い質量分解能により整数質量は同じであるが、小数点以下の質量が異なる化合物の分離(アイソバリックな分離)が可能であり、低質量域においても定性分析および夾雑物の影響をほとんど受けない化合物分布の取得を行うことができる。今回は、マウスに経口投与したterfenadine およびその代謝物(fexofenadine)が本装置により肝臓組織切片から検出できるかMALDI-IMSおよびMS/MS測定により調べた。

【実験条件】

Table1にサンプルおよび前処理条件をまとめる。

Table 1 Sample and sample preparation conditions.

薬剤	Terfenadine
マウス	Male SD rat (7 weeks)
肝臓摘出	Terfenadineを50 mg/kg経口投与後 1 時間
切片作成	凍結した肝臓をクライオスタットでITOスライドガラス上に、10 μ m厚の切片を作成
マトリックス	50 mg/mL DHB (50% メタノール/0.1% トリフルオロ酢酸)を、エアブラシでスプレー

MALDI-IMS測定は、*SpiralTOF*モード(正イオンモード)、空間分解能50 μ m、ピクセル数156 \times 184 pixelsで行った。また構造推定のためMS/MS測定(TOF-TOFモード、正イオンモード)にて高エネルギー衝突有機解離(HE-CID)によるプロダクトイオンスペクトルの測定を行った。

【結果】

まず全ピクセルの平均マススペクトルには m/z 472.3425にピークを確認できたので、後述のMS/MS測定とあわせてterfenadine ($C_{32}H_{41}NO_2$) の[M+H]⁺ (m/z 472.3210)と同定した。次にterfenadineで質量軸補正を行った。Fig. 1は、質量補正後の平均マススペクトルと m/z 472, 502付近の拡大図である。 m/z 502付近の拡大図(右上)には m/z 502.2944のピークが観測されており、やはり後述のMS/MS測定結果とあわせて代謝物であるfexofenadine ($C_{32}H_{39}NO_4$)の[M+H]⁺ (m/z 502.2952)と同定した。アイソバリックなピーク分離が可能な*SpiralTOF*では、0.2~0.3u差で近接するピークとの明確な分離ができ、目的化合物のマスマイージを高い選択性で描画することができる。Fig.2に組織切片光学画像と m/z 472.3と502.3のマスマイージ(選択幅0.1u)を示す。terfenadineおよびfexofenadineが、ともに組織切片上に広く分布していることが分かる。

最後に組織切片上でMS/MS測定を行った結果を示す。Fig. 3には、それぞれ(a)標準品のterfenadine(m/z 472.3)、(b)組織切片上の m/z 472.3、(c) 組織切片上の m/z 502.3のプロダクトイオンスペクトルを示した。(a)、(b)を比較するとほぼ同一のパターンが得られており、確かにterfenadineと同定できる。また、(a)、(c)を比較すると、類似パターンの中に質量差30uのピークがいくつか観測されていることから(図中赤字)、fexofenadineと推定できる。 m/z 216, 270, 288の想定される開裂位置についても合わせて図示した。メチル基の1つがカルボキシル基に変化することで30uの差が生じる。

【まとめ】

SpiralTOFモードのアイソバリックな分離によるMALDI-IMSや、TOF-TOFモードを用いたHE-CIDによる構造解析が、薬剤および代謝物の分析に有効であることを示した。

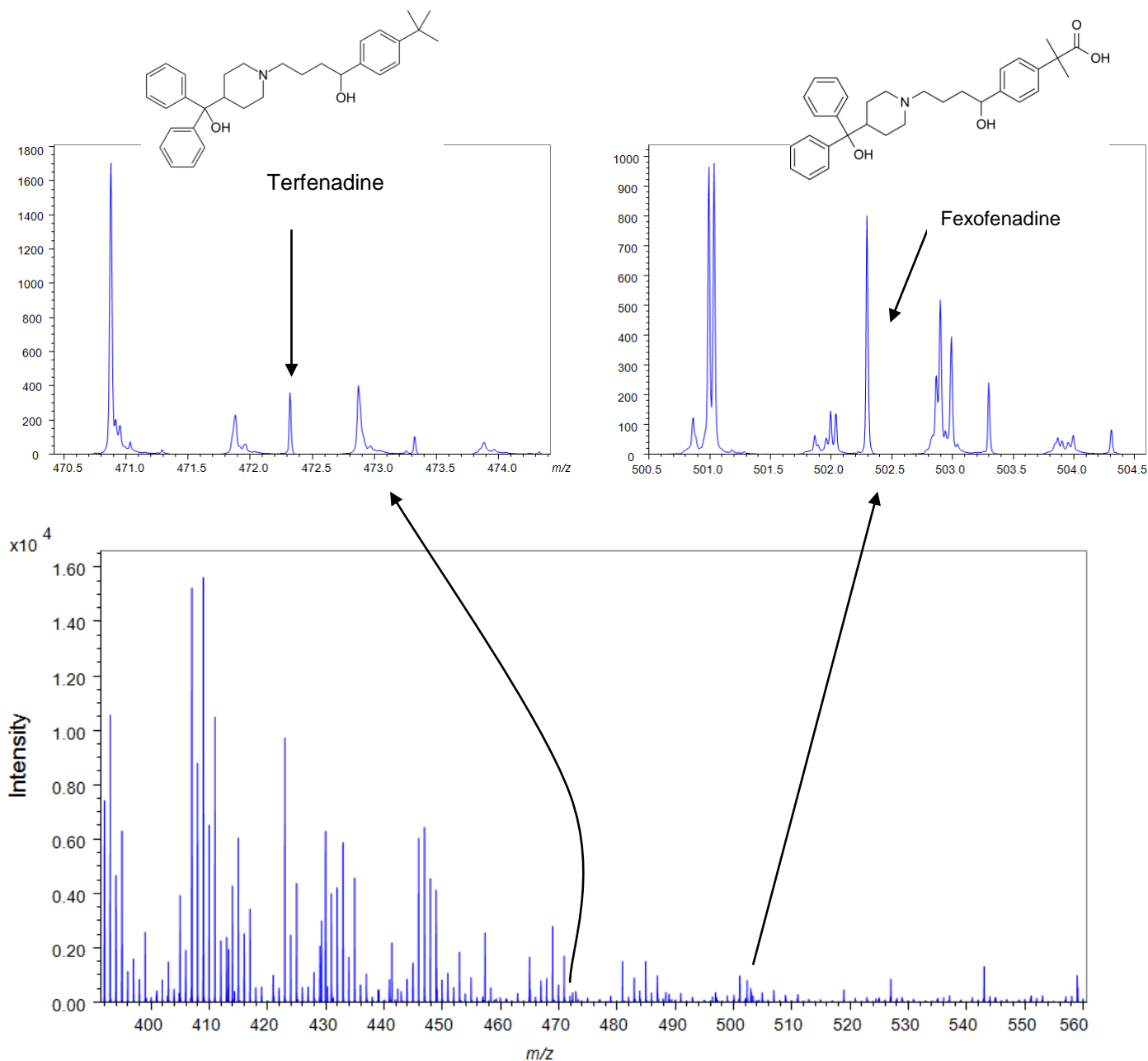


Fig. 1 Averaged mass spectrum of all pixels acquired in IMS measurement.

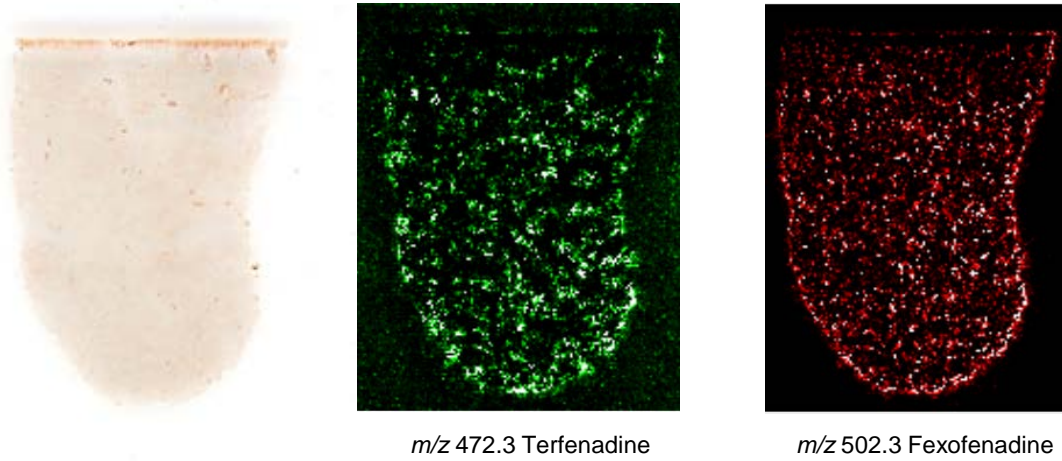


Fig.2 Pictures of tissue section and extracted mass image at m/z 472.3 and 502.3

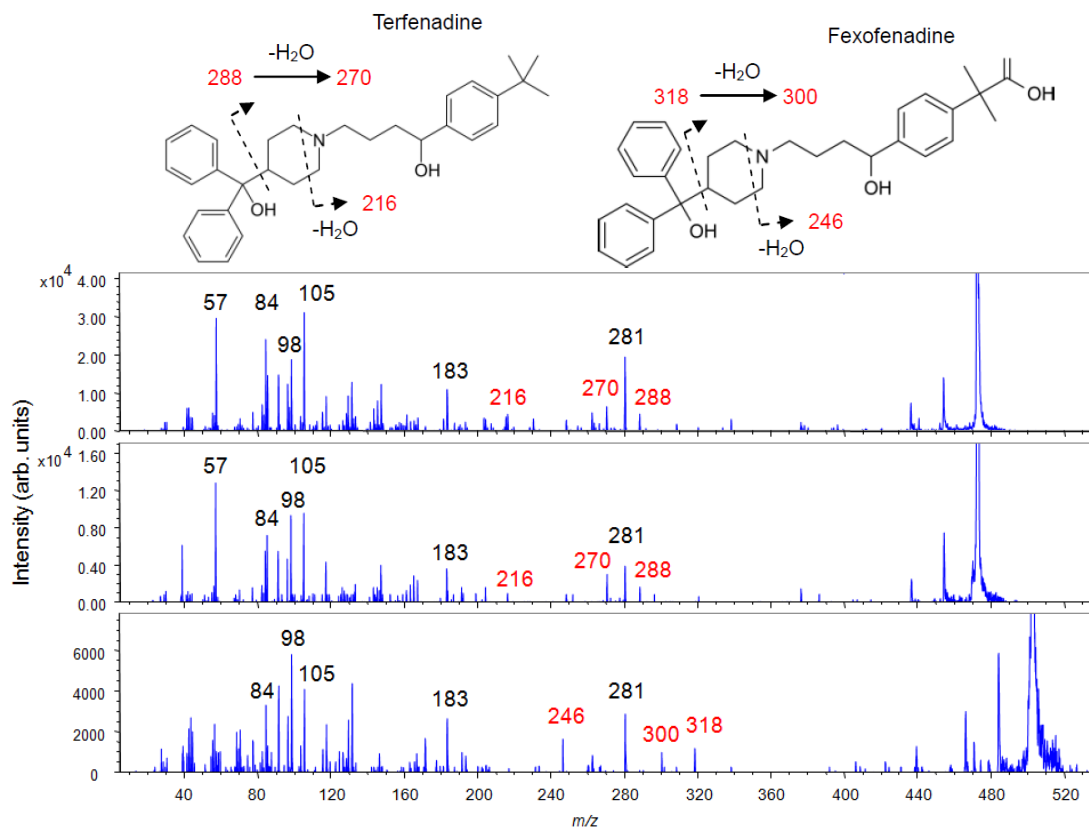


Fig.3 The product ion spectrum of m/z 472.3 from standard terfenadine(a). The product ion spectra from the liver tissue section, m/z 472.3(b) and m/z 502.3 of fexofenadine (c).

【謝辞】

本実験に使用したサンプルは、第一三共株式会社薬物動態研究所より提供いただきました。

<T4111-TY>

本誌の記載内容は予告なしに変更することがあります。

Copyright(C)2015 JEOL Ltd. All Rights Reserved.

このカタログに掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせ下さい。



本社・昭島製作所
〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL: (042) 543-1111(大代表) FAX: (042) 546-3353
www.jeol.co.jp ISO 9001・ISO 14001 認証取得

東京事務所 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル13階

営業企画室 TEL: 03-6262-3560 FAX: 03-6262-3577

電子光学機器営業推進室 TEL: 03-6262-3567 分析機器営業推進室 TEL: 03-6262-3568

産業機器営業部 TEL: 03-6262-3570 医用機器ソリューション販売部 TEL: 03-6262-3571

東京支店 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル18階 TEL: 03-6262-3580 FAX: 03-6262-3588

電子光学機器営業グループ TEL: 03-6262-3581 分析機器営業グループ TEL: 03-6262-3582

医用機器営業グループ TEL: 03-6262-3583

東京第二事務所 〒190-0012 東京都立川市曙町2丁目8番3号 新鈴舎ビル9階

半導体機器営業室 TEL: 042-528-3491 ソリューションビジネス部 TEL: 042-526-5098

横浜事務所 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目6番4号 新横浜1歳ビル6階 TEL: 045-474-2181 FAX: 045-474-2180

海外事業所・営業所 Boston, Paris, London, Amsterdam, Stockholm, Sydney, Milan, Singapore, Munich, Beijing, Moscow, Sao Paulo ほか

札幌支店 〒060-0809 北海道札幌市北区北9条西3丁目19番地 ノルテプラザ5階

TEL: 011-726-9680 FAX: 011-717-7305

仙台支店 〒980-0021 宮城県仙台市青葉区中央2丁目2番1号 仙台三菱ビル6階

TEL: 022-222-3324 FAX: 022-265-0202

筑波支店 〒305-0033 茨城県つくば市東新井19番1号

TEL: 029-856-3220 FAX: 029-856-1639

名古屋支店 〒450-0001 愛知県名古屋市中村区那古野1丁目47番1号 名古屋国際センタービル14階

TEL: 052-581-1406 FAX: 052-581-2887

大阪支店 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階

TEL: 06-6304-3941 FAX: 06-6304-7377

西日本ソリューションセンター

〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階

TEL: 06-6305-0121 FAX: 06-6305-0105

広島支店 〒730-0015 広島県広島市中区横本町10番6号 広島NSビル5階

TEL: 082-221-2500 FAX: 082-221-3611

高松支店 〒760-0023 香川県高松市寿町1-1-12 パシフィックシティ高松5階

TEL: 087-821-0053 FAX: 087-822-0709

福岡支店 〒812-0011 福岡県博多区博多駅前2丁目1番1号 福岡朝日ビル5階

TEL: 092-411-2381 FAX: 092-473-1649

JMS-S3000 Application Data

JMS-S3000“SpiralTOF” Negative モードを用いた マウス脳組織切片上の脂質のマスイメージング

生体内で情報伝達やエネルギー貯蔵などの様々な役割を果たす脂質に関して、その組成や構造情報だけでなく、生体内での分布を知ることは、生化学上重要なことと言える。脂質は、構造により極性が異なり、Positive と Negative モードでそれぞれ測定できる種類が異なる。マウス脳組織切片の脂質分布を JMS-S3000 SpiralTOF Positive モードで測定した例では、リン脂質の 1 種であるフォスファチジルコリンが主に観測された[1]、今回は、Negative モードにてマウスの脳組織切片上の脂質のマスイメージング測定を行った。

ITO スライドガラス上に配置したマウス脳組織切片(図 1)に 9-Aminoacridine を噴霧したのち、Negative モードでマスイメージング測定を行った。6.3 × 9.24 mm の測定範囲を、60 μm 四方のピクセルに分割し、各ピクセルで 500 shots ずつ積算し、計 16170 のマススペクトルを測定した。測定した全マススペクトルを平均したマススペクトルを図 2 に示す。m/z 888.6 に Sulfatide C24:1 の [M - H]⁻ と推定されるシグナルが強く観測されている。このイオンの構造解析を行うため、TOF-TOF モードでプロダクトイオンスペクトルの測定を行った(図 3)。観測されたピークは、図 4 のようにアサインすることができ、確かに Sulfatide C24:1 の構造を反映している[2]。

図 2 の平均したマススペクトルで観測された m/z 888.6 を Sulfatide C24:1 の [M - H]⁻ の計算質量を用いて m/z 軸の 1 点補正を行った。こうして得られた精密質量から、いくつかのピークについて同定した結果を表 1 に示す。それぞれの計算質量と精密質量の誤差は 10 ppm 以内であった。

図 5 に表 1 で同定したピークのマスイメージを示す。m/z 885.5 である Phosphatidylinositol (PI) (38:4) は、組織切片全体に分布していることがマスイメージから分かる。対して、スルファチドは、組織切片の特定部位に局在している。

以上のように、Negative モードでのマスイメージング測定により、Positive モードとは異なる脂質の分布情報を得ることができ、両者の組み合わせにより解析を行うことは非常に有用である。更に TOF-TOF オプションを使用することで、切片上の物質の同定が可能となり、それを内標とすることで精密質量測定が可能となる。

【謝辞】

本分析は、大阪大学 大学院理学研究科 附属基礎理学プロジェクト研究センター 学際理学部門との共同研究の成果です。組織切片は、大阪大学 大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 粟津研究室より提供いただきました。

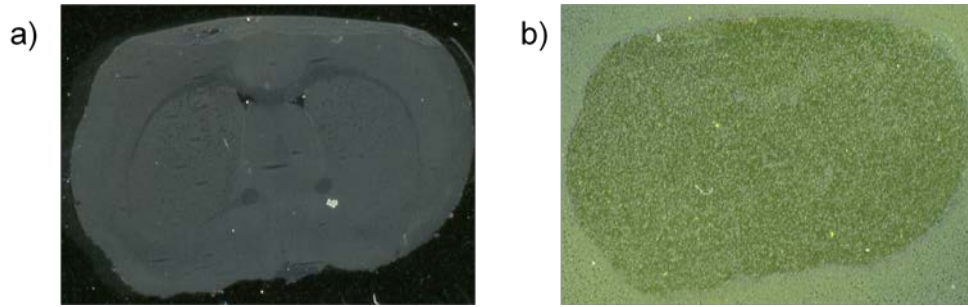


Fig.1 A mouse brain tissue on ITO coated glass Plate.
a) before matrix coating, b) after matrix coating

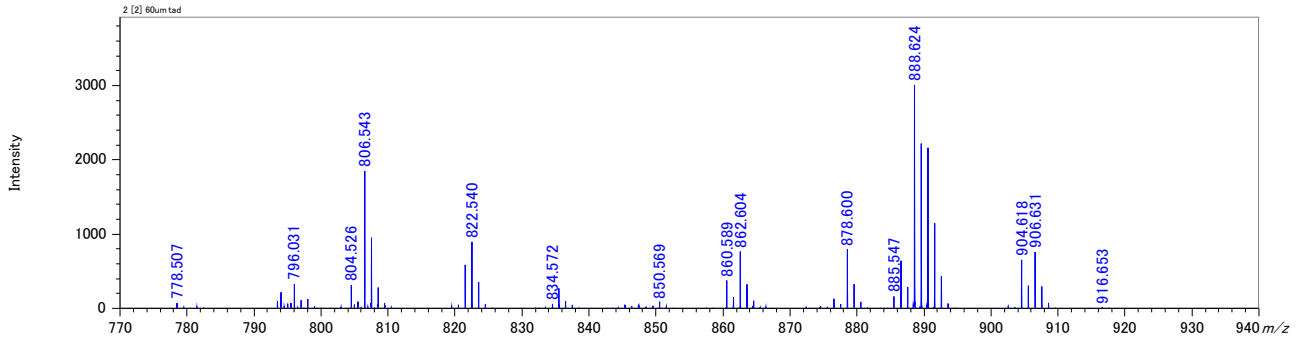


Fig.2 Averaged mass spectrum of mouse brain tissue.

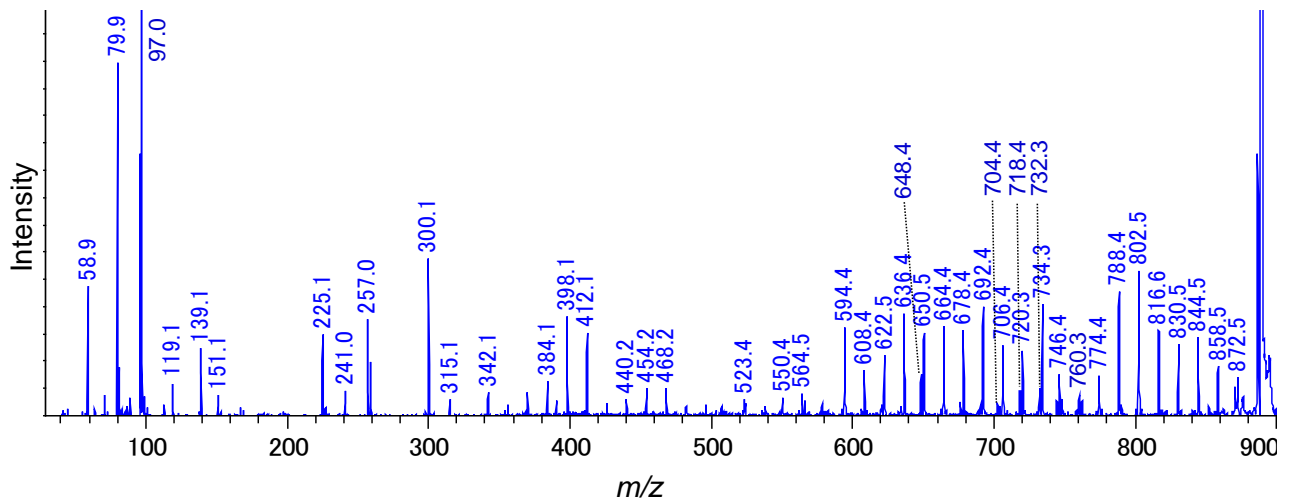


Fig.3 Product ion mass spectrum of the ions at m/z 888.6.

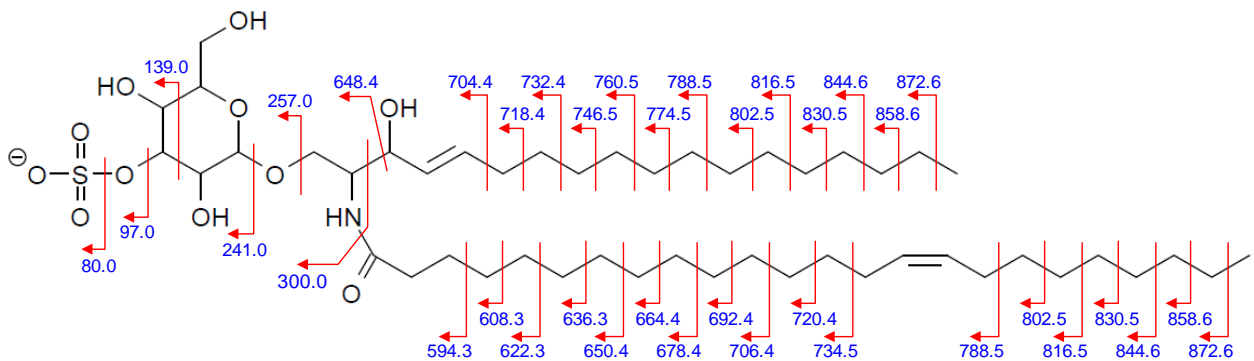


Fig.4 Structure and peak assignments of Sulfatide C24:1.

Number	Compound	Formula	<i>m/z</i> value (Observed)	<i>m/z</i> value (Calculated)	Error [mu]	Error [ppm]
1	C16 Sulfatide	C ₄₀ H ₇₆ NO ₁₁ S	778.5070	778.5145	-7.5	-9.6
2	C18 Sulfatide	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ S	806.5426	806.5458	-3.2	-3.9
3	C18-OH Sulfatide	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₂ S	822.5398	822.5407	-0.9	-1.1
4	C20 Sulfatide	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₁ S	834.5718	834.5771	-5.3	-6.3
5	C20-OH Sulfatide	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₂ S	850.5694	850.5720	-2.6	-3.0
6	C22 Sulfatide	C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₁ S	862.6037	862.6084	-4.7	-5.4
7	C22-OH Sulfatide	C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₂ S	878.6003	878.6033	-3.0	-3.4
8	PI(38:4)	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.5466	885.5499	-3.2	-3.7
9	C24:1 Sulfatide	C ₄₈ H ₉₀ NO ₁₁ S	888.6240	888.6240	—	—
10	C24:1-OH Sulfatide	C ₄₈ H ₉₀ NO ₁₂ S	904.6179	904.6189	-1.0	-1.1
11	C24-OH Sulfatide	C ₄₈ H ₉₂ NO ₁₂ S	906.6308	906.6346	-3.8	-4.2
12	C26:1 Sulfatide	C ₅₀ H ₉₄ NO ₁₁ S	916.6529	916.6553	-2.4	-2.6

Fig.1 Differences between calculated and observed *m/z* values for peaks observed in the averaged mass spectra after mass-correction using the peak confirmed as Sulfatide C24:1.

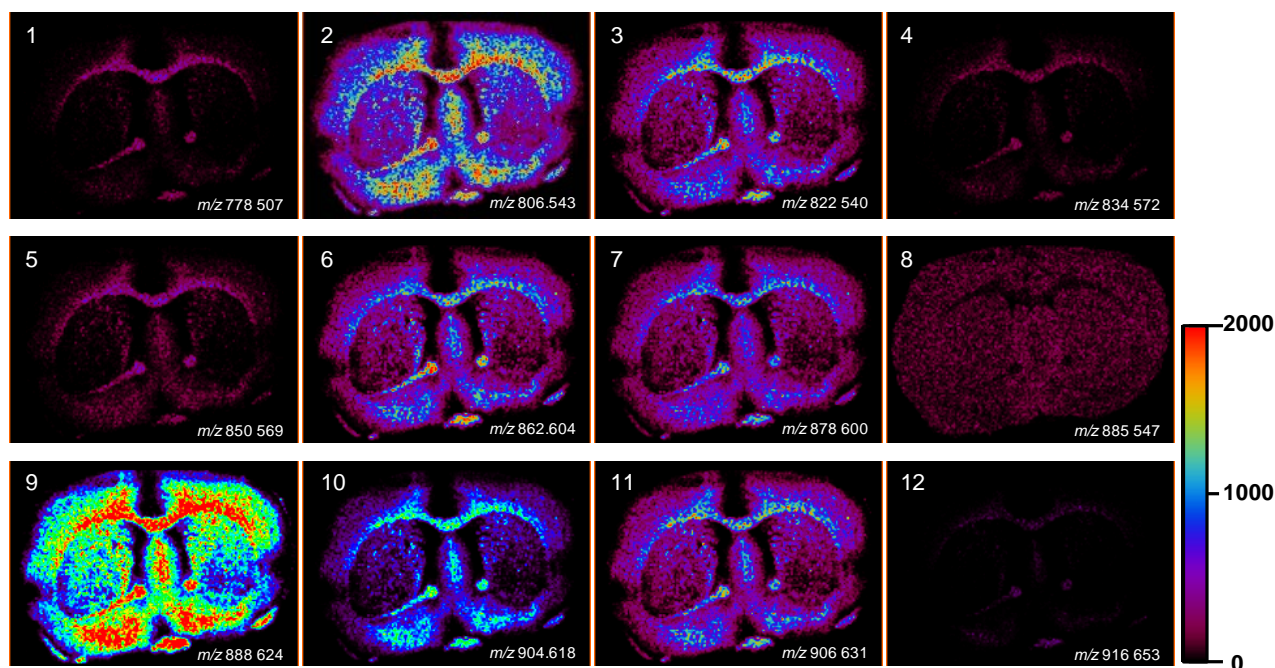


Fig.5 Mass Images of compounds from mouse brain tissue.

[1] T. Satoh, A. Kubo, S. Shimma, M. Toyoda, M, Mass Spectrometry 1 (2012) A0013.

[2] S. Shimma, A. Kubo, T. Satoh, M. Toyoda, PLoS One 7 (2012) e37107

JMS-S3000 "SpiralTOF" とmsMicroImagerによる高質量分解能マスイメージ解析

関連製品: 質量分析計(MS)

お問い合わせ先: 日本電子株式会社 グローバル営業本部 TEL: 03-6262-3568

【はじめに】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いたイメージング質量分析法(MALDI-Imaging)は、サンプル表面の有機化合物の分布を可視化できる最先端の質量分析法である。主に凍結組織切片表面のタンパク質・ペプチド・薬剤とその代謝物などを中心にアプリケーションを拡大している。MALDI-Imagingでは、レーザー照射位置をサンプル表面上で2次元に走査し、各レーザー照射位置においてマススペクトルを取得する。この2次元の位置情報を持つマススペクトル群を解析することで、サンプル表面の任意の分子量をもつ有機化合物の分布を、マスイメージとして描画することができる。JMS-S3000 *SpiralTOF* は、弊社特許技術であるらせん軌道型イオン光学系を採用している(Fig. 1)。従来のリフレクトロン型イオン光学系より5-10倍長い17mの飛行距離を有しており、世界最高の質量分解能と質量精度を誇るMALDI-TOFMSシステムである。*SpiralTOF*を用いたMALDI-Imagingでは、高質量分解能により同じ整数質量をもつが小数点以下の質量が異なる化合物(アイソバリックな化合物)の分離により明瞭な化合物の分布を描画することができる。一方で高質量分解能のMALDI-Imaging解析を行う上では一般的なソフトウェア(たとえばBiomap)では、いくつかの課題がある。

- 1) マスイメージのデータサイズが増加し、データのハンドリングが難しくなる。
- 2) 高質量分離能によりアイソバリックな化合物の分離が可能となり、有効なピーク数が増加し、手作業ではマスイメージの抽出が困難となる。
- 3) 2)で分離したピークがサンプル由来かマトリックスや試料表面の夾雑物由来かはマスイメージを描画するまで判別できない。
- 4) 3)の識別のため、多数のマスイメージを俯瞰できる機能がない。

msMicroImager (JEOL)は、これらの問題を解決する高質量分解能に特化したソフトウェアである。

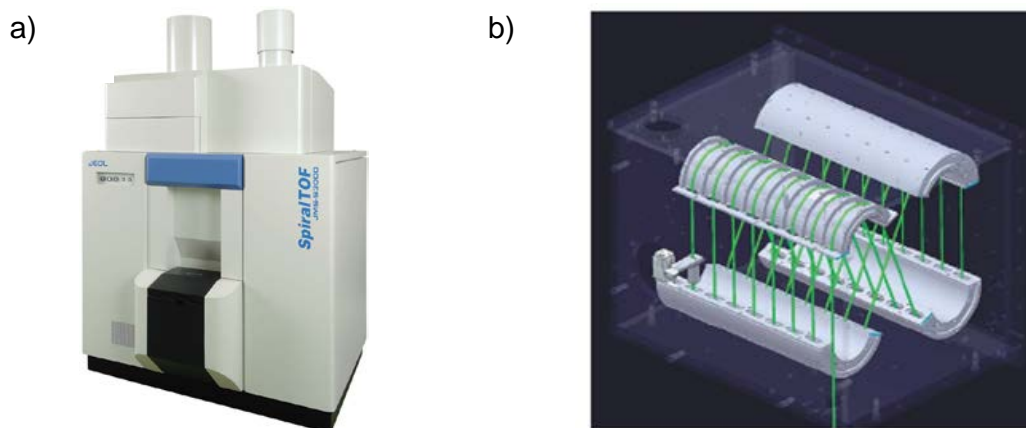


Fig. 1 a) Appearance of JMS-S3000 *SpiralTOF* and b) its spiral type ion optics

【使用したデータ】

使用したデータのサンプル情報と測定条件を以下に示す。導電性のITOスライドガラス(HST社製、厚さ0.7mm、Typell)にマウス脳組織切片を配置し、マトリックス化合物DHBをエアブラシでスプレーした。測定領域は、マウス脳切片の左半分5×7mmの領域とした。1ピクセル0.04mm角とし、データ取得した結果ピクセル数は21125、 m/z 軸のポイント数は約170000ポイント、データサイズは14GBであった。得られたデータは、msMicroImager 1.0で解析を行った。

【結果と考察】

大容量データの操作

高質量分解能・高解像度のデータは、必然的にデータサイズが大きくなる。本報告に使用しているマスイメージングデータは14GBであり、外部記憶媒体(HDDなど)にアクセスして、1つのマスイメージを作成するには10秒程度の時間を要する場合もある。msMicroImagerは、マスレンジの限定、マススペクトルのビンニング処理、ピクセルのビンニング処理を行うことができる。ビンニング処理とは、マスイメージやマススペクトルの連続する複数点を1点にまとめる処理である。このようにデータサイズを小さくした上で、RAM上に展開することで高速化を実現している。以下ではRAM上への展開も含めてビンニング

処理と呼ぶ。たとえば、マススペクトル上の3点、マスイメージ上の $2 \times 2 = 4$ ピクセルを1つの点にまとめるビニング処理を行えば、14GBのデータを1/12に圧縮してRAM上に展開することができる。 Fig. 2は m/z 868のマスイメージについて、ビニング処理なしと 2×2 ピクセルのピクセルビニングを実施した時との比較である。RAM上にデータを展開すると、ストレスなくマスイメージを描くことができる。この機能は、次項の多数のマスイメージの一括作成で威力を発揮する。

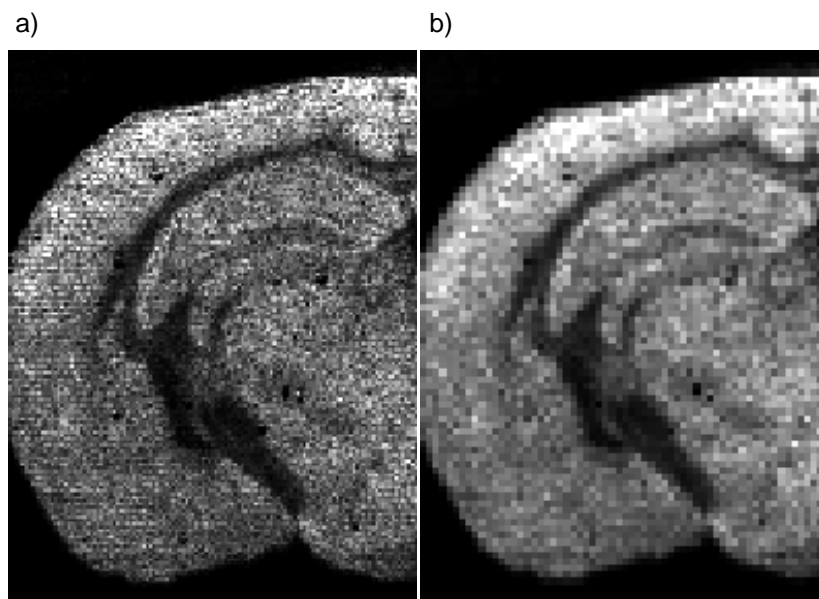


Fig. 2 a) The mass images at m/z 866 without binning process and b) after 2×2 pixels binning process.

多数ピークの一括マスイメージ作成

マスイメージングデータの全ピクセルの平均マススペクトルを、Fig. 3aに示す。また、このマスイメージングデータを質量範囲 m/z 700-1000、マススペクトルビニングなし、ピクセルビニング 2×2 点でビニング処理を行った。Fig. 3bビニング処理後の m/z 820~825の拡大図である。Fig. 3bから分かるように、*SpiralTOF*の高質量分解能によりマイナー成分においても、アイソバリックな化合物の分離を実現している。MALDI-Imagingでは、試料表面にマトリックスを塗布するので、目的とする化合物だけでなく、マトリックスや試料表面の夾雑物を含むマススペクトルとなる。しかも、それぞれのピークがユーザーの注目したい化合物由来であるかは、マスイメージを描画するまでは判別することができない。一般的なマスイメージングソフトは、マスイメージを描く際に、1つ1つのピークを複数回の拡大操作により選択しなければならず、数10以上の情報を取り出すのは困難である。これを解決するために、

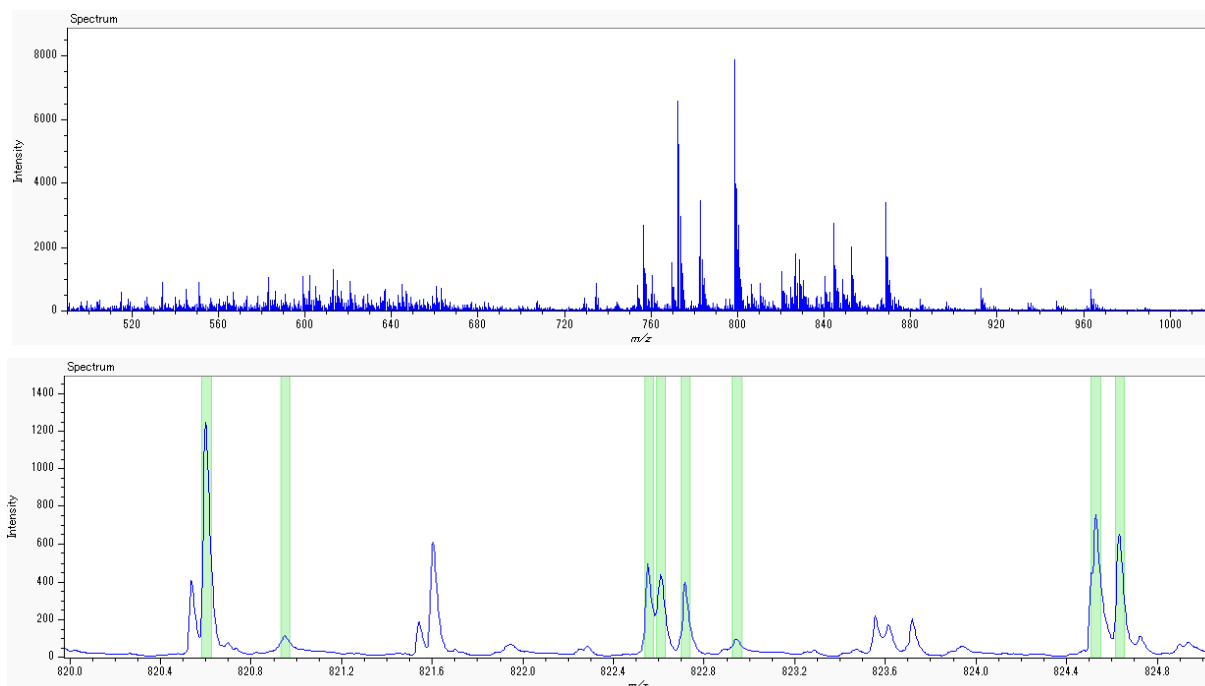


Fig. 3. a) Averaged mass spectrum of all measured pixel of rawdata and b) an enlarged spectrum at m/z 820-825 after binning process.

msMicroImagerには、3つのピーク選択手段が実現されている。①手動選択する方法(従来法)、②既知化合物のピークリストを入力する方法、③ *SpiralTOF*データ解析用ソフトウェアmsTornado Analysisと連携し、ピークピックしたピークリストを入力する方法である。Fig.3bの緑の帯は、方法③によりピーク選択した事例である。このデータでは、 m/z 700-1000の間においても200本のピークを検出することができた。ビンニング処理を行っていない場合、200本全てのマスマイメージの描画には1時間程度の時間を要するが、処理後は数秒でマスマイメージの描画が可能となる。

抽出したマスマイメージの俯瞰

またmsMicroImagerでは、エクスポートした多数のマスマイメージを一覧表示することができる。Fig. 4は前項でエクスポートした200枚のマスマイメージの一部を一覧表示したものである。このように多数のマスマイメージを俯瞰することで、高質量分解能マスマイメージングデータから必要な情報を抽出し、より詳細な解析の目安とすることも可能となる。

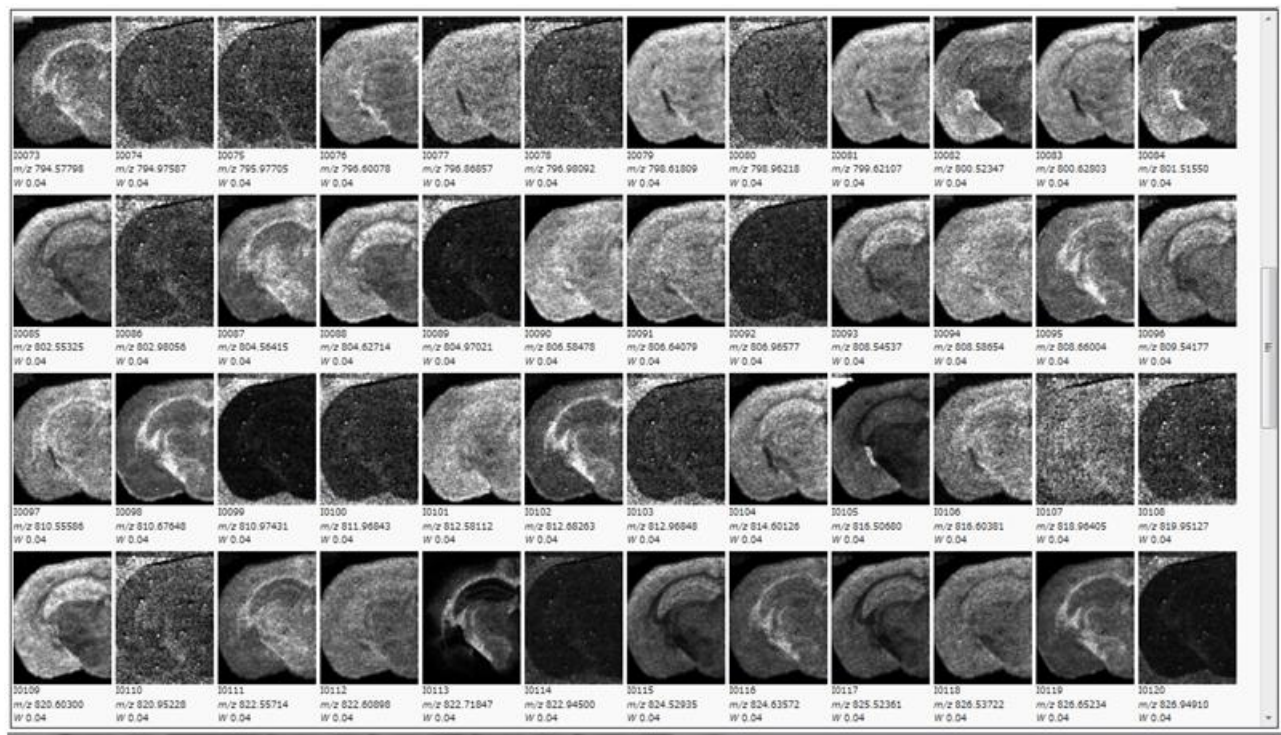


Fig. 4 Display a list of mass images extracted from high mass resolution imaging data

【まとめ】

*SpiralTOF*とmsMicroImagerを組み合わせることで、これまで困難であった大容量の高質量分解能マスマイメージングデータから情報を引き出すことが容易となった。これにより、情報を見落とすことなくマスマイメージング解析を行うことができると期待される。

【謝辞】

本分析に使用しました組織切片は、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 粟津研究室より提供いただきました。

<T4111-TY>

本誌の記載内容は予告なしに変更することがあります。

Copyright(C)2015 JEOL Ltd. All Rights Reserved.

このカタログに掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせ下さい。



本社・昭島製作所
〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL: (042) 543-1111(大代表) FAX: (042) 546-3353
www.jeol.co.jp ISO 9001・ISO 14001 認証取得

東京事務所 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル13階
営業企画室 TEL: 03-6262-3560 FAX: 03-6262-3577
電子光学機器営業推進室 TEL: 03-6262-3567 分析機器営業推進室 TEL: 03-6262-3568
産業機器営業部 TEL: 03-6262-3570 医用機器ソリューション販売部 TEL: 03-6262-3571
東京支店 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル18階 TEL: 03-6262-3580 FAX: 03-6262-3588
電子光学機器営業グループ TEL: 03-6262-3581 分析機器営業グループ TEL: 03-6262-3582
医用機器営業グループ TEL: 03-6262-3583
東京第二事務所 〒190-0012 東京都立川市曙町2丁目8番3号 新鈴青ビル9階
半導体機器営業室 TEL: 042-528-3491 ソリューションビジネス部 TEL: 042-526-5098
横浜事務所 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目6番4号 新横浜千歳ビル6階 TEL: 045-474-2181 FAX: 045-474-2180
海外事業所・営業所 Boston, Paris, London, Amsterdam, Stockholm, Sydney, Milan, Singapore, Munich, Beijing, Moscow, Sao Paulo ほか

札幌支店 〒060-0809 北海道札幌市北区北9条西3丁目19番地 ノルテプラザ5階 TEL: 011-726-9680 FAX: 011-717-7305
仙台支店 〒980-0021 宮城県仙台市青葉区中央2丁目2番1号 仙台三菱ビル6階 TEL: 022-222-3324 FAX: 022-265-0202
筑波支店 〒305-0033 茨城県つくば市東新井19番1号 TEL: 029-856-3220 FAX: 029-856-1639
名古屋支店 〒450-0001 愛知県名古屋市中村区那古野1丁目47番1号 名古屋国際センタービル14階 TEL: 052-581-1406 FAX: 052-581-2887
大阪支店 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階 TEL: 06-6304-3941 FAX: 06-6304-7377
西日本ソリューションセンター
〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階 TEL: 06-6305-0121 FAX: 06-6305-0105
広島支店 〒730-0015 広島県広島市中区横本町10番6号 広島NSビル5階 TEL: 082-221-2500 FAX: 082-221-3611
高松支店 〒760-0023 香川県高松市寿町1-1-12 パシフィックシティ高松5階 TEL: 087-821-0053 FAX: 087-822-0709
福岡支店 〒812-0011 福岡県博多区博多駅前2丁目1番1号 福岡朝日ビル5階 TEL: 092-411-2381 FAX: 092-473-1649

イメージング質量分析法と走査型電子顕微鏡による指紋分析

【はじめに】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いたイメージング質量分析法(MALDI-Imaging)は、サンプル表面の有機化合物の分布を可視化できる最先端の質量分析法である。主に凍結組織切片表面の脂質・ペプチド・薬剤とその代謝物などを中心にアプリケーションを拡大している。MALDI-Imagingでは、レーザーをサンプル表面上で2次元に走査し、各レーザー照射位置におけるマススペクトルを取得する。この2次元の位置情報を持つマススペクトル群を解析することで、特定の分子量をもつ有機化合物のサンプル表面の分布を、マスイメージとして示すことができる。

JMS-S3000 *SpiralTOF* (Fig. 1) は、JEOL独自のらせん軌道型イオン光学系を採用している。従来のリフレクトロン型イオン光学系より5-10倍長い17mの飛行距離を有しており、世界最高の質量分解能と質量精度を誇るMALDI-TOFMSシステムである。*SpiralTOF*を用いたMALDI-Imagingでは、高質量分解能の定性分析および夾雑物の影響をほとんど受けない化合物分布の取得を同時に行うことができる。本調査では、*SpiralTOF*を用いた喫煙者・非喫煙者の指紋のMALDI-Imaging分析結果を報告する。また、JEOL JSM-7800Fサーマル電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM) (Fig. 2)によって、喫煙者の指紋も観察した。



Fig. 1 JMS-S3000 *SpiralTOF*.



Fig. 2 JSM-7800F Thermal FE SEM.

【実験】

サンプルの情報と測定条件を以下に示す。サンプルには、非喫煙者および喫煙者の指紋を用いた。導電性のITOスライドガラス(HST社製, 厚さ0.7mm, TypeII)に右手の人差し指を押し付け、測定試料をとした(Fig. 3)。質量校正用標準物質としてPPG400とPPG1000の混合物をそのそばに滴下した。マトリックス化合物にはDHBを用い、30mg/mLの70%メタノール溶液とした。このDHBマトリックス溶液2mLを、エアブラシを用いてスライドガラス上の指紋に噴霧した。サンプルは乾燥させた後SpiralTOFに導入した。データ取得は、SpiralTOF Positive ionモードで、測定領域7.2mm×10.0mmを、1ピクセルの大きさ0.08mm角に設定し(測定領域全体で11125ピクセル)、実施した。得られたデータは、imzML形式に変換し、Biomap3.8で解析を行った。

また、JSM-7800Fで喫煙者の指紋の二次電子像(SEM像)も取得した。サンプルは、前処理としてコーティングは行っていない。加速電圧は1kVとし、倍率50倍と5000倍で試料を観察した。

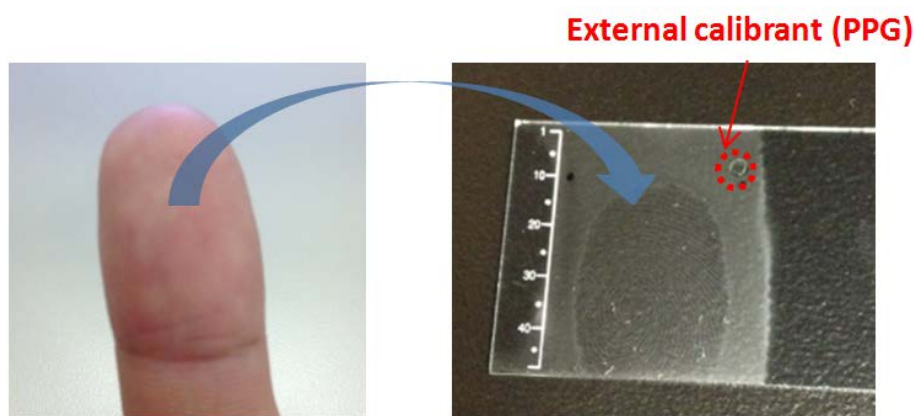


Fig. 3 Fingerprint sample.

【結果及び考察】

指紋上の脂質分析

全ピクセルの平均マススペクトルを、Fig. 4に示す。 m/z 700~900の範囲に、脂質由来のピークを観測することができた。そこで3種類の脂質(m/z 771.7, 827.8, 907.8)の指紋表面のマスイメージをFig. 5に示す。各画像の右側に表示したスケールバーは、すべてのマスイメージが同じ強度範囲で表示されていることを示している。Fig. 5a~cを観察すると、3つの脂質の分布は指紋の形をそのまま反映しているだけであり、大きな差は見られなかった。

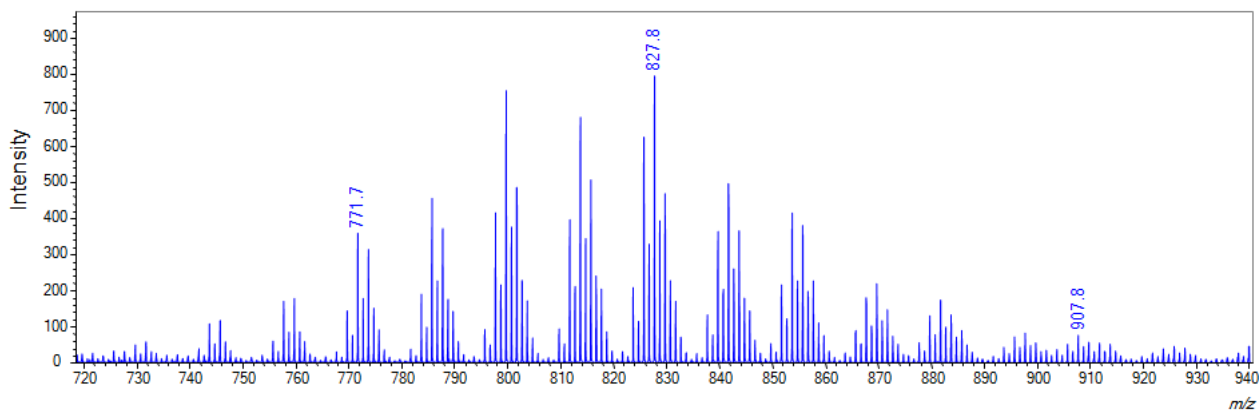


Fig. 4 Averaged mass spectrum of all measured region.

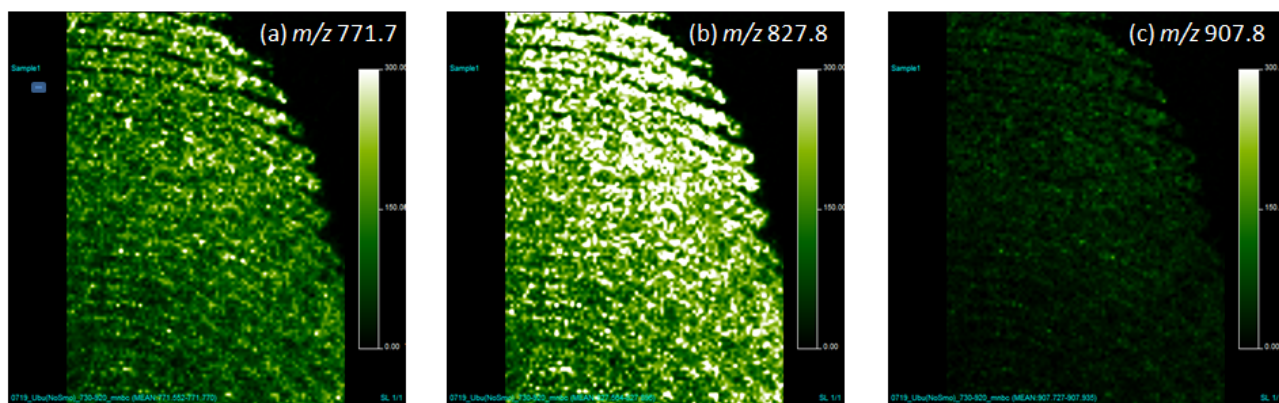


Fig. 5. Mass images of (a) m/z 771.7, (b) m/z 827.8, and (c) m/z 907.8

指紋上のニコチン分析

次に、同一のマスイメージデータから、指紋上のニコチンの分布を調べた。喫煙者と非喫煙者それぞれの全ピクセルの平均マススペクトルをFig. 6aと6bに示す。喫煙者と非喫煙者の平均スペクトルを比較すると、ニコチンのプロトン付加分子($C_{10}H_{15}N_2^+$, m/z 163.13)が、喫煙者の指紋表面に顕著に観測 (Fig. 6a) された。一方非喫煙者の平均マススペクトルには、 m/z 163.13にはピークは観測されず、近接する m/z 163.05 に夾雑物由来のピークのみを観測した。Fig. 6c, dにそれぞれの m/z 163.13のマスイメージを示す。各イメージの右側のスケールバーに示すように、両マスイメージは同じ強度範囲で表示している。喫煙者の指紋全体にニコチンが分布していることが観測されたのに対し、非喫煙者の指紋からは検出されなかった。喫煙者が喫煙時にニコチンにさらされることを考慮すれば、これは妥当な結果といえる。以上のことから、*SpiralTOF* によるMALDI-Imagingは高質量分解能により夾雑物の影響を低減し、サンプル表面の低分子化合物の分布を明確に可視化するための有効な分析ツールであることが示された。

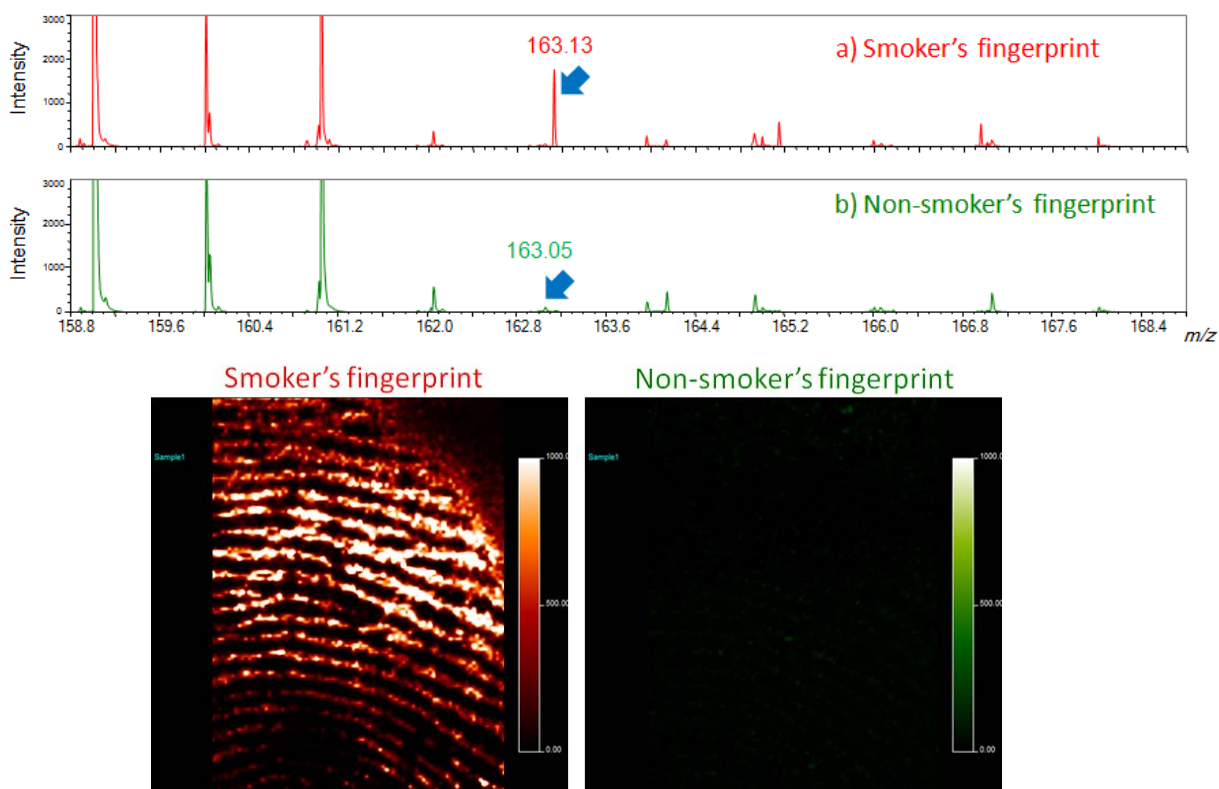


Fig. 6. Enlarged averaged mass spectra from (a) smoker's and (b) non-smoker's fingerprints, and their mass images at m/z 163.13 were shown in (c) and (d), respectively

指紋表面のSEM像

次に、JEOL JSM-7800Fサーマル電界放出形走査電子顕微鏡によって、喫煙者の指紋を調査した。SEM像をFig. 7に示す。指紋表面から多量の皮脂、粒子、その他の汚れが観察された。JSM-7800Fでは、より低い加速電圧に設定することで、有機物についての明確なSEM像の取得が可能である。

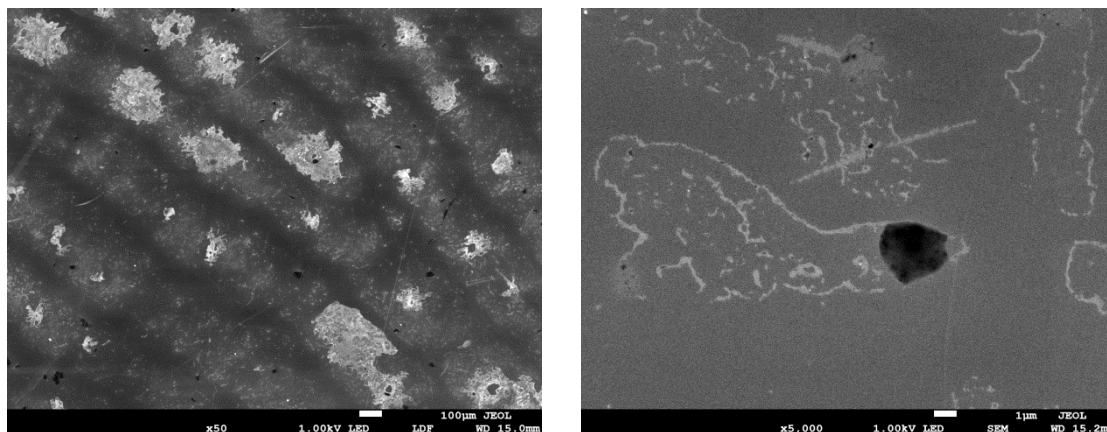


Fig. 7 SEM images of fingerprints × 50 (left) and × 5000 (right)

【まとめ】

MALDI-Imagingにより指紋表面の脂質とニコチンの分布を可視化することができた。高い質量分解能を有するJMS-S3000 *SpiralTOF* によるMALDI-Imagingは低分子領域において夾雑物と分離できるため、より鮮明なマスイメージを取得できることを示した。また、JSM-7800F FE-SEMでは、指紋表面に存在する有機物質を明確に観察することができる。今後、MALDI-ImagingとFE-SEMから得られる相補的な情報を利用し、より有用な知見を得ることができるようになると期待される。

日本電子株式会社

<http://www.jeol.co.jp>

お問い合わせ先: グローバル営業本部
(03)6262-3568

本誌に掲載するデータは、その作成にあたって万全を期しておりますが、記載内容の正確性に関して弊社が保証するものではありません。

弊社は、掲載データを直接的あるいは間接的に使用して生じた、いかなる損害に対しても一切の責任を負わないものとします。本紙の記載内容は将来予告なしに変更することがあります。

Copyright (C) 2015 JEOL Ltd. All Rights Reserved.

<T4111-TY>

JMS-S3000 Application Data

紙表面のボールペンインクの分析

～JMS-S3000 によるマスイメージングと SEM/EDS による元素分析～

近年、生体組織における種々の化合物の分布を評価する手法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) を用いた、マスイメージングが進歩してきている。特にこの手法は特定の有機化合物のサンプル表面での分布を可視化できる点で、他の表面分析手法に比べると有用な情報を与える。本報告では、科学捜査などに適用できるボールペンでの筆跡について、マトリックス化合物と呼ばれるイオン化促進剤を使用しない、レーザー脱離イオン化 (LDI) によるマスイメージングの検討を行った。これらの測定は、飛行距離 17m をもち、低質量領域においても高い質量分解能を発揮できる JMS-S3000 “SpiralTOF” を用いて実施した。また加えて、走査型電子顕微鏡 JSM-6510LV による観察および EDS による元素分析を行った。

実験には、黒ボールペンと黒油性マーカーペンを用いた。測定は SpiralTOF のポジティブイオンモードで行った。各ピクセルでは 1kHz で照射を行い、5000 回分のマススペクトルを積算した。解析は、rawdata を imzML に変換し、biomap 3.8 を用いて行った。

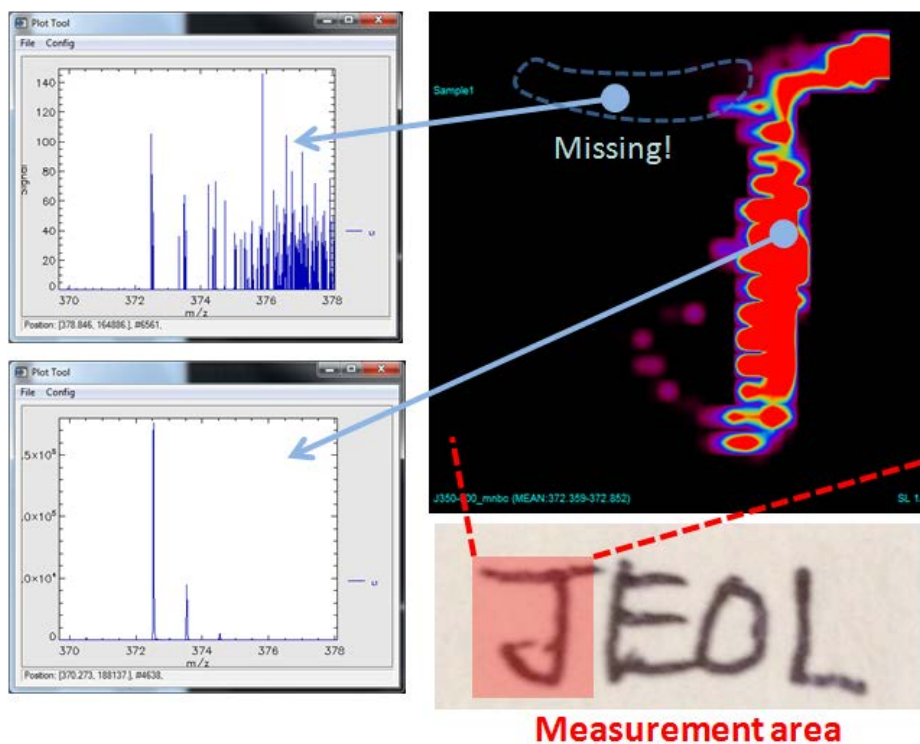


Fig.1 Crystal violet (m/z 372.2) LDI imaging of the handwriting letter “J” on a no-pretreatment paper.

はじめに、紙に書いた”J”という文字を、前処理することなく LDI のマスイメージングによる直接分析を行った。ボールペンのインクはクリスタルバイオレットを主成分としており、容易に検出することができ、 $100\ \mu\text{m}$ の空間分解能のマスイメージを描くことができた。しかしながら文字”J”の一部からはピークを検出することができず、マスイメージ上で文字が欠けてしまった (Fig. 1)。これは、紙の表面の非導電性やチャージアップなどが原因でないかと考えられる。そこで、導電性を高めるために紙表面に金蒸着を行い、検証を行った。その結果、クリスタルバイオレットが筆跡全体で観測された (Fig. 2)。このことから、非導電性のサンプル表面の分析を行う場合、金蒸着を行うことで分析対象物のイオン化量を増加させられることが分かった。

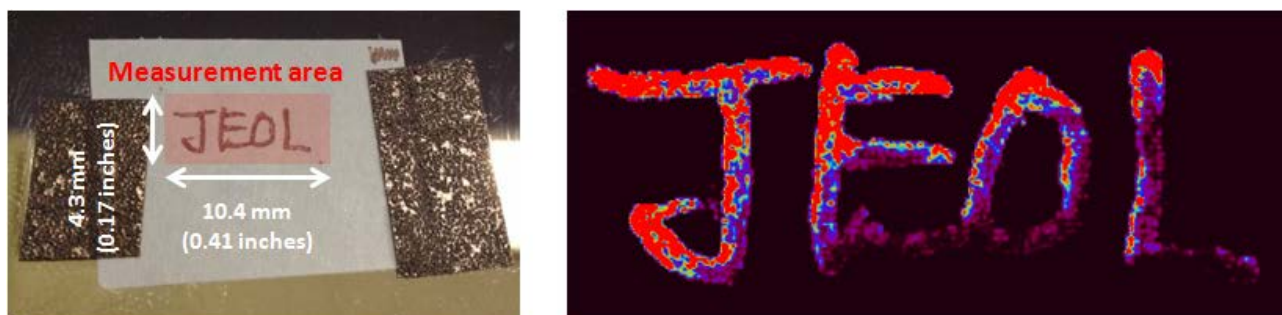


Fig.2 Crystal violet (m/z 372.2) LDI imaging of the handwriting letters “JEOL” with a gold vapor deposition.

次に、黒ボールペンで描いた”Spiral”を黒油性ボールペンで塗りつぶした。その上から金蒸着を行い、LDIによるマスイメージングを行った。その結果を Fig. 3 に示す。黒ボールペンの文字は、黒油性マーカーで塗りつぶされているにもかかわらず、クリスタルバイオレットを観測することができ、”Spiral”の文字も $50\ \mu\text{m}$ の空間分解能で描けることが分かった。また、黒ボールペン、黒油性マジック由来のピークがそれぞれマススペクトルに観測されており、両者に特徴的なマスイメージを描くことができた。

さらに、“Spiral”の”ral”の部分について、JMS-6510LA 走査電子顕微鏡を用いて観察及び EDS による元素分析を行った (Fig. 4, Fig. 5)。SEM/EDS では、ボールペンの文字の部分はカーボンの量が多く、反対にボールペンの文字がない部分は酸素が多く観測された。高空間分解能での形態観察や、イオン化という不確定要素がないために高い定量性が期待できる結果であった。一方、LDI でのマッピング結果と EDS の元素マッピングの結果を比較すると、LDI でのマッピングの方がより鮮明なマスイメージングを得ることができた。これは、LDI が有機化合物の形での局在情報を可視化できるためである。

以上の結果から、黒ボールペンで描いた筆跡を黒油性マーカーで塗りつぶしたサンプルに対して、LDIによるマスイメージングおよびSEM/EDSによる観察・分析が可能であることが分かった。LDIのマスイメージングでは、サンプル表面の有機化合物の情報を得ることができ、インクの分布を観測することができる。また走査型電子顕微鏡を用いることで表面の形態観察(凹凸や粗さ)や、元素構成の違いを定量的に得ることができる。JMS-S3000やJMS-6510LAのそれぞれの装置からは相補的な情報を得ることができるため、上手く組み合わせることで分析をおこなうことで多角的な検証が可能となる。

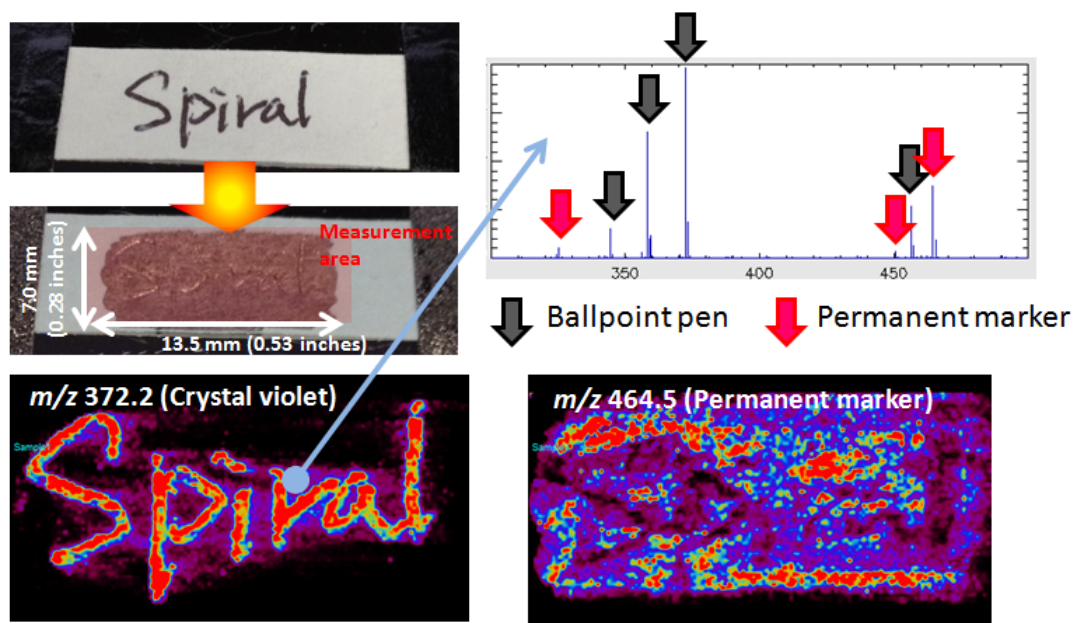


Fig.3 Crystal violet (m/z 372.2) LDI imaging of the handwriting letters “Spiral” covered up with a permanent marker ink.

004 [No letter (permanent marker)]

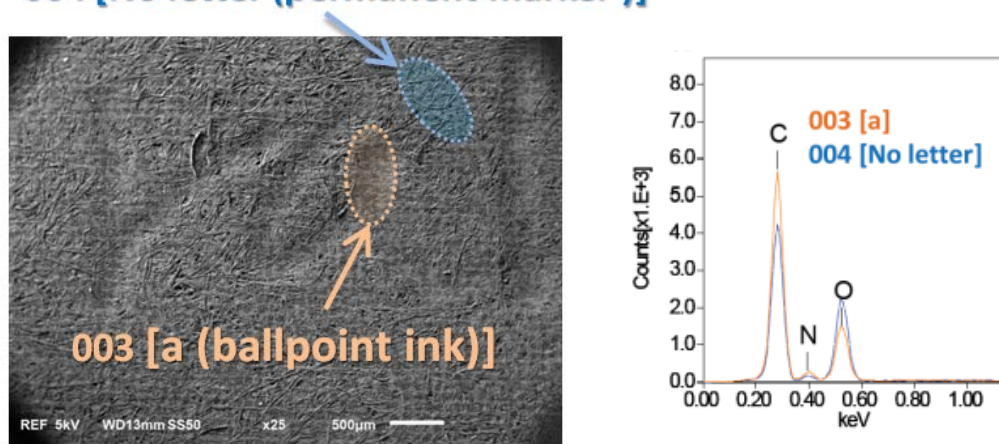


Fig.4 SEM image of the “ral” in “Spiral” handwriting on the paper (x25) and EDS spectrum.

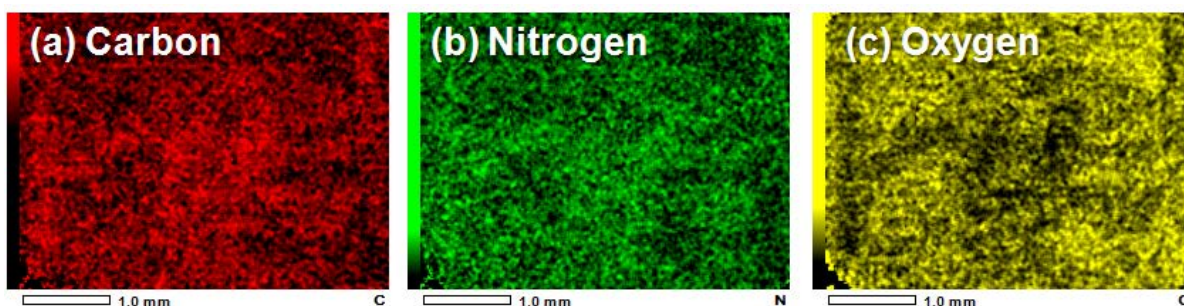


Fig.5 EDS images of the “ral” in “Spiral” handwriting on the paper and EDS spectrum, (a) Carbon, (b) Nitrogen and (c) Oxygen.

JMS-S3000 “SpiralTOF”を用いた レーザー脱離イオン化法による有機薄膜分析

佐藤 貴弥

日本電子(株)MS事業ユニット

レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析法(LDI-TOFMS)は、イオン化時の開裂が少なく、有機物の分子量、分子構造などの情報を得ることができる手法として有機質量分析法では一般的である。特にイオン化を促進するためのマトリックスを用いる手法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析法(MALDI-TOFMS)として、分子量数千~数十万までのタンパク質、ペプチドなどをイオン化できることからバイオ市場で広く普及している他、材料分析市場でも合成高分子ポリマーの解析などに利用されている。最近までLDI-TOFMS、MALDI-TOFMSは可溶試料の分子量確認を行うことがほとんどであったが、レーザー照射位置を2次元で走査しマススペクトルを取得することで特定の分子量をもつ化合物の局在を可視化できるイメージング質量分析法の技術向上が進み、その応用範囲が広がっている。イメージング質量分析法の技術向上は、バイオ市場において生体組織切片を対象として進んでいるが、今後は材料分析市場への展開が期待されている。ここで、材料分析市場にはすでに様々な表面分析手法が存在する。LDI-TOFMSを表面分析法の1つとして検討していくためには、既存の表面分析手法との比較を行い、有用性を示していくことが不可欠である。本報告では、有機EL材料の薄膜のLDI-TOFMSによる解析事例を、飛行時間二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)、X線光電子分光法(XPS)、走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型X線分析法(SEM/EDS)と比較しながら有効性について検討を行った。LDI-TOFMSは破壊分析であるので、サンプル表面に与える影響についてもあわせて検討を行った。

はじめに

表面分析手法は、試料表面に電子、イオン、光を照射し、試料表面に存在する物質との相互作用によりその形態や物性を調べる手法である。形態を観察するためには、光学顕微鏡、電子顕微鏡が主に用いられている。また、物性を調べる手法としては、入射粒子と検出信号により、電子線マイクロアナライザ(EPMA)、オージェ電子分光法(AES)、X線光電子分光法(XPS)、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)などの様々な手法が存在する。近年、有機半導体、有機EL、有機薄膜太陽電池など、電子部品中に有機化合物が構成されるケースが多くなっており、今後もその利用は拡大すると考えられる。それに伴い、製品の検査や不良品(劣化)の分析はますます重要となってくる。表面分析手法の中には、AESやXPSなど有機化合物の結合状態、官能基情報が得られる手法もあるが、有機化合物の構造解析までは難しい。表面分析手法に利用されている質量分析技術としてはTOF-SIMSがある。SIMSはイオン化時にフラグメンテーション(分子の開裂)が起こりやすいことから、有機物の分析への適用は困難であった。最近では、金属クラスターやガスクラスターを一次イオンビームとして用いる手法が実用化している。これらは、生成した二次イオンのフラグメンテーションを抑制する効果がある一次

イオン源を搭載したTOF-SIMSにより、解析対象が無機物から有機化合物へ展開することが期待されている。

本報告で紹介するのは、レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析法(Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry, LDI-TOFMS)である。レーザー脱離を用いた技術としては、サンプルとイオン化を支援する化合物(マトリックス)を適切に組み合わせることで、広範な化合物、特に分子量数千から数十万の有機化合物のイオン化が可能なマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析法(Matrix Assisted LDI-TOFMS, MALDI-TOFMS)がより一般的に知られており、タンパク質やペプチドの解析を目的として2000年頃に爆発的に普及した。また材料解析分野においても、合成高分子ポリマーの解析において利用されてきている。これら高分子有機化合物の測定では、マトリックスの利用が必要不可欠なため、レーザーを用いたイオン化といえばMALDIをさす場合が多い。しかし、マトリックスを使用せずに、レーザー照射のみでイオン化できる化合物も存在し、その場合は単にLDIと呼ばれている。

質量分析法の多くは、可溶試料を対象とする。MALDI-TOFMSもサンプル溶液とマトリックス溶液を混合し結晶化して分析を行う。この結晶にレーザーを照射することで、サンプル中に含まれる種々の有機化合物をイオン化し、質量分析を行う。最近では、試料表面の有機化合物の局在情報を得ることができるMALDI-TOFMSを用いたイメージング質量分析法[1,2]の技術が向上し、この普及が進んでいる。イメージング質量分析法では、サンプル上にマトリックス

〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2

E-mail: taksatoh@jeol.co.jp

を均一に噴霧し、このサンプルに対してレーザー照射位置を2次元に走査しながらマスペクトルを取得する。この結果、サンプルに含まれる特定化合物の2次元分布情報を取得することが可能となる。イメージング質量分析法は、黎明期よりタンパク質、ペプチド、脂質あるいは薬剤動態などバイオ市場でアプリケーションが拡大しており、現在もその対象のほとんどは生体組織切片である。一方で生体組織切片での手法確立に伴い、徐々に材料解析市場への適用が検討され始めており、薄膜や固体表面の有機化合物の局在情報の可視化が期待されている。材料解析市場においてイメージング質量分析法をより有効な手法としていくためには、従来利用されている表面分析法との有効性比較やクロスチェックが非常に重要である。本報告では、JMS-S3000 “SpiralTOF” を用いて、LDI-TOFMSを表面分析法の1つの手法として検討するための基礎実験を行ったので報告する。サンプルには有機EL部材の化合物の薄膜を用い、XPS、TOF-SIMSから得られる情報の比較、またレーザー照射が薄膜表面に与える影響についても検討を行った。

サンプル

LDI-TOFMS、TOF-SIMS、XPSの結果を比較するため、有機ELの正孔輸送層の材料である*N,N'*-Di (1-naphthyl)-*N,N'*-diphenylbenzidine (*α*-NPD) を、600 nmの厚さでシリコン基板に蒸着したもの（以下 *α*-NPD/Siとする）をサンプルとして使用した。またLDIの試料表面への影響を検討するサンプルとして、シリコン基板上にやはり有機ELの正孔輸送層の材料である4,4',4'-Tris[2-naphthyl (phenyl) amino] triphenylamine (2-TNATA) を700 nm、さらにその上から *α*-NPDを1300 nm蒸着したサンプル（以下 *α*-NPD/2-TNATA/Siとする）を使用した。

LDI-TOFMS、TOF-SIMS、XPSによる有機薄膜分析

LDI-TOFMSには、JMS-S3000 “SpiralTOF” を使用した。Fig. 1(a)にSpiralTOFの外観図を示した。SpiralTOFの最大の特長は、JEOLオリジナルのらせん型のイオン軌道 (Fig. 1(b)) であり、それは4つの階層状の扇形電場により形成されている。1周回の飛行距離は2.093 mであり、実効飛行距離は8周回で17 mを実現している。ここで、TOFMSの質量分解能は飛行距離に比例する。一般的なリフレクトロンTOFMSの実効飛行距離は数m程度であるのに対して、17 mの実効飛行距離を有するSpiralTOFはMALDI-TOFMSの中では世界最高の質量分解能を実現できる。またイオン軌道を形成している扇形電場により、飛行中に開裂したイオンを排除することができるため、ノイズの少ないマスペクトルを得ることもできる。さらにTOF-TOFオプション[4]を装着することで、タンデム質量分析 (MS/MS) による構造解析も可能である。SpiralTOFのMS/MSは、高エネルギー衝突誘起解離法とよばれ、MS/MSの中でも構造情報を多く得られることで知られている。SpiralTOFは、Newport社 Nd:YLF 349 nm をイオン化用のレーザーとして搭載している。試料表面へのレーザー照射径はおおよそ20 μ mであり、レーザー100%で60 μ Jが照射される。*α*-NPDと2-TNATAはマトリックスを必要とせずイオン化するので、本報告での実験は、LDI-TOFMSとしてマスペクトルを取得した。*α*-NPD/Si上でレーザー照射位置を固定し、レーザー照射250回分を積算したマスペクトル (m/z 10 ~ 800) をFig. 2 (a) に示す。マスペクトルには *α*-NPDを示す分子イオンのみが観測され、イオン化時点でのフラグメンテーションが非常に少ないことが分かる。次に、TOF-TOFオプションを使用し、観測された分子イオン

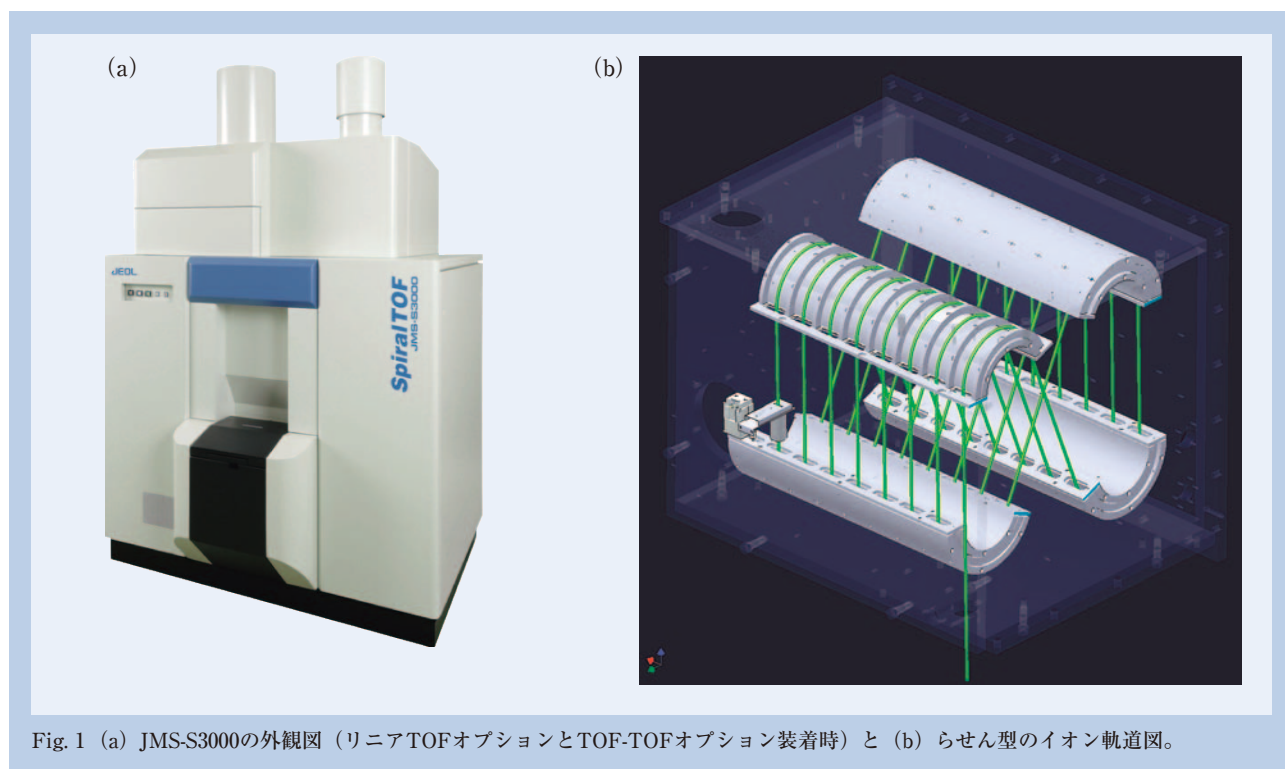


Fig. 1 (a) JMS-S3000の外観図 (リニアTOFオプションとTOF-TOFオプション装着時) と (b) らせん型のイオン軌道図。

を選択してプロダクトイオンスペクトルを取得した。開裂生成したフラグメントイオンを観測した結果と推定される開裂部位をFig. 2 (b) に示す。高エネルギー衝突誘起解離法により、多くの情報が得られており、構造推定に十分であることが分かる。

TOF-SIMSは、京都大学・松尾グループにてJMS-T100LP “AccuTOF LC-plus” をベースに改造・製作された装置を使用した[5]。装置外観図をFig. 3(a)に示した。加速電圧10 kVのアルゴンクラスターイオンを一次イオンとして、 α -NPD/Siに照射し、生成した二次イオンのマスペクトル (m/z 0 ~ 800) をFig. 3(b)に示す。TOF-SIMSのマスペクトルには、LDI-TOFMSと比較して低質量領域 (m/z 100 ~ 500) に多くのピークが観測されている。これらの由来は2つ考えられる。1つは α -NPDのイオン化時に生成したフラグメントイオンである。これは、Fig. 2(b)のプロダクトイオンスペクトルのパターンとTOF-SIMSのマスペクトルが比較的類似していることから推測できる。またもう1つは、TOF-SIMSは測定対象が表面から10 nm以下の最表面分析であるため、表面に付着した有機物由来のイオンの可能性である。一次イオンにアルゴンクラスターを用い

ているので、TOF-SIMSの中でも最もイオン化時の開裂の少ない手法ではあるが、LDI-TOFMSと比べるとフラグメンテーションの影響や表面汚染の影響が顕著にマスペクトル上に現れることを考える必要がある。TOF-SIMSは分子イオンあるいは主たるフラグメントイオンをモニタすることで、マッピング、深さ方向分析などが可能である。たとえばマッピングの空間分解能は $1\mu\text{m}$ 以下を達成でき、現在のMALDI-TOFMSを用いたイメージング質量分析法の性能(典型的には数 $10\mu\text{m}$)よりも高い。しかしながら、フラグメントや表面汚染由来のバックグラウンドが多く観測されることを考えると、イオン化した主成分のみへの適用に限定される。劣化解析など主成分から派生して生じる化合物は、その量が決して多くないことが予想されるので、フラグメントイオンや表面汚染との区別が困難になる可能性が高い。

XPSには、JPS-9010を使用した。その外観図はFig. 4 (a)に示した。分析領域は $1\text{mm}\phi$ とし、 α -NPD/Siを測定した結果をFig. 4(b), (c) に示す。Fig. 4(b)は、ワイドスペクトル (エネルギー分解能 $\text{Ag}3d_{5/2}$ 1.7eV) であり、 α -NPDの構成元素であるC、Nのピークが顕著に観測されている。TOF-SIMSと同じく最表面分析であるXPSでは、基

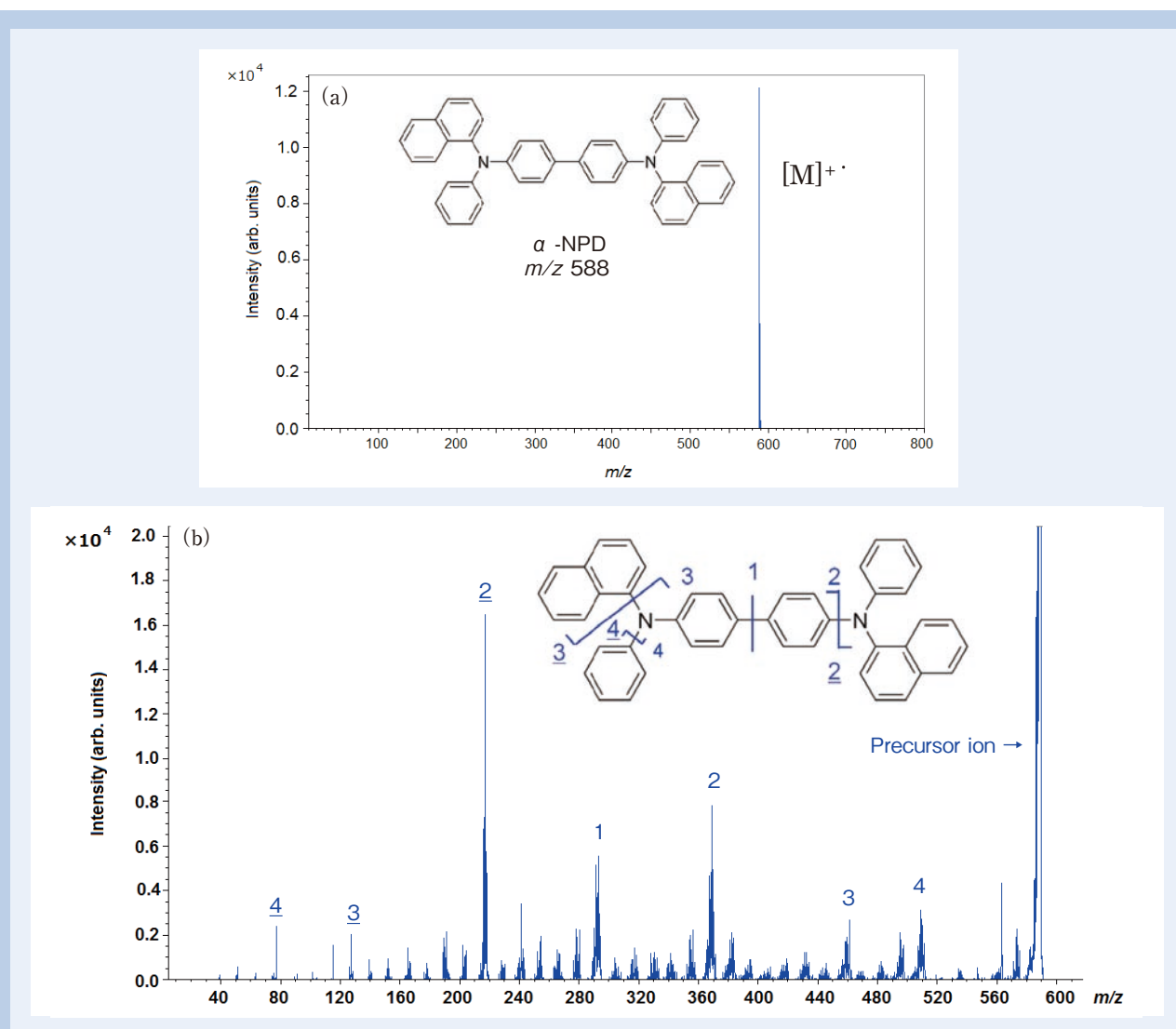


Fig. 2 (a) LDI-TOFMSによる α -NPDのマスペクトル。 α -NPDの分子情報を示すピークが明確に観測されている。(b) α -NPDのMS/MSスペクトル。 α -NPDの構造をよく反映したピークが観測されている。

板のシリコン由来のピークは観測されていない。さらにCのピーク周辺についてはナロースペクトル（エネルギー分解能Ag3d_{5/2} 0.5 eV）も取得した。その結果、C-C結合およびC-N結合由来のピークを混合した形で観測することができた。XPSでは元素情報とともに結合状態の情報も得ることができる。さらに、LDI-TOFMSやTOF-SIMSなど質量分析法と比較すると、XPSは非破壊分析であり、イオン化による不確定さが少ないため定量分析も可能である。しかし、限られた元素の組み合わせでできている有機化合物では、混合物の定量分析は容易ではない。特に劣化物などの組成が大きく変化しない形でマイナーな成分として混合すると、その分離はより難しくなると予想される。

以上のように、LDI-TOFMSと既存の表面分析法であるTOF-SIMS、XPSとを比較した。有機化合物分析におけるLDI-TOFMSの利点は、マススペクトルから分子イオンを主に確認できること、またMS/MSを行うことで構造解析が可能な点である。これらの特長は、試料表面に存在する有機混合物の分析において特に力を発揮し、劣化解析においては主成分からの劣化生成物であるマイナーな成分の分析を可能とすることが期待される。

レーザー照射による試料表面への影響

次に、レーザー照射による試料表面への影響について、走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型X線分析装置（SEM/EDS）を用いて確認した。使用した装置は、Fig. 5(a)に示したOXFORD Instruments社AZtec Energy Standard X-Max 50を搭載したSEM JSM-7001FTTLVである。レーザー強度40%で250回のレーザー照射を行った後の照射痕のSEM像をFig. 5(b)に示す。SEM像から、レーザー照射後は35 μm φで有機薄膜層が消失している様子が観測できた。さらにEDSで照射痕とその周辺の有機薄膜が残す領域を分析した結果を、Fig. 5(c)とFig. 5(d)に示す。前者からはSi、後者からはCが主に確認でき、レーザー照射によって有機層が貫通していることが確認できた。

次にレーザー照射位置固定、レーザー強度40%にて、*α*-NPD/2TNATA/Siのマススペクトルを取得した。レーザー照射回数と*α*-NPD、2-TNATAの分子イオンのレーザー照射回数に対するイオン強度推移をプロットしたものをFig. 6(a)に示す。上層の*α*-NPDはレーザー照射回数に従い、イオン強度が減衰しているのが分かる。また下層の

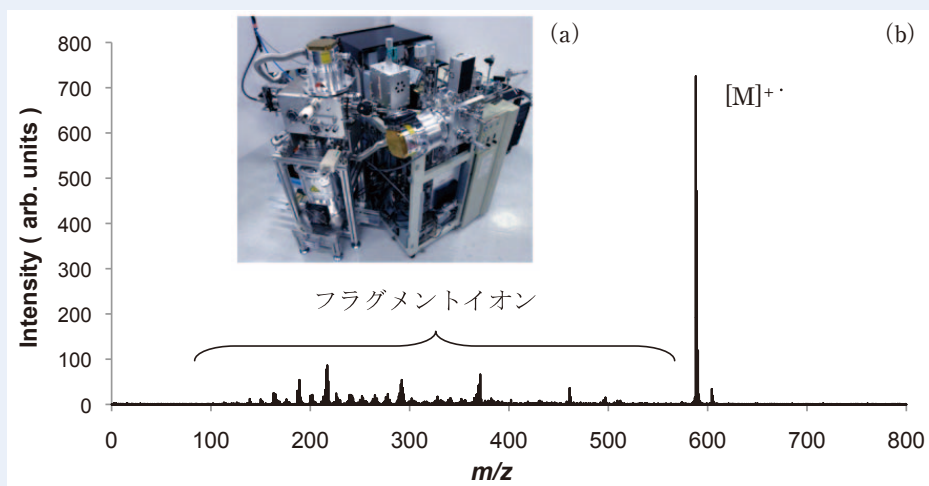


Fig. 3 (a) 京都大学松尾グループ所有のTOF-SIMSと (b) TOF-SIMSによる *α*-NPDのマススペクトル。 *α*-NPDの分子情報を示すピークのほかに *α*-NPDのフラグメントイオンや表面汚染由来と思われるピークが多数観測されている。

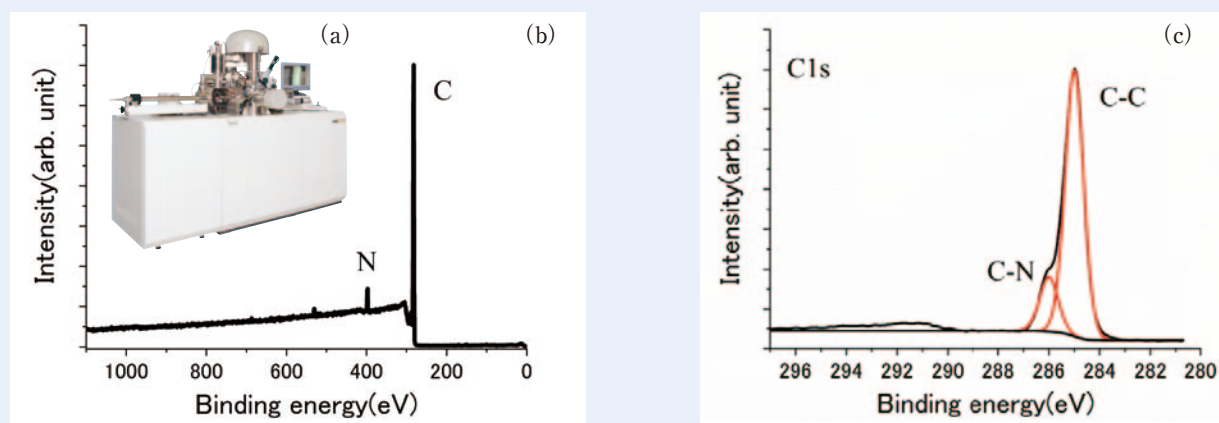


Fig. 4 (a) JPS-9010の外観図と (b) *α*-NPD/Siのワイドスペクトル。 *α*-NPDを構成する元素であるC、Nが顕著に観測された。(c) *α*-NPD/SiのナロースペクトルまたC近傍のナロースペクトルからはC-C、C-Nの結合状態を示すピークが観測された。

2-TNATAは、レーザー照射100回程度でマススペクトル上に観測され始めた。レーザー照射回数0-50回と100-150回の積算マススペクトルをFig. 6(b)、(c)にそれぞれ示した。両者を比較すると、それぞれのフラグメントイオンはほとんど観測されておらず、2-TNATAの出現が明確である。下層の2-TNATAが観測され始めたのちも上層の α -NPDが観測されていることを考えると、レーザー照射回数が増加するに従って、イオン化領域は深さ方向とともに平面方向へも広がっていることが示唆される。次にレーザー強度を変化させた時、2-TNATAが出現するレーザー照射回数をプロットした結果をFig. 7に示す。レーザー強度が強くなるに従い、少ないレーザー照射回数で2-TNATAが出現することが分かる。すなわち、深さ方向の影響は、レーザー照射回数とレーザー強度に影響されることが分かる。

これらの結果から、レーザー照射条件（レーザー強度、回数）により表面への影響は大きく変わることが分かった。深さ方向については概ね100 nm ~ 1 μ mの領域の総合した情報を得ていることになる。これはXPSやTOF-SIMSの最表面分析と比べると、かなり大きい。レーザー照射回数やレーザー強度を増加させると、深さ方向のみならず平面方向のイオン化領域も増えるため、マッピングを行う場合には注意が必要である。

まとめ

本報告では、LDI-TOFMSとXPS, TOF-SIMSを用いた有機薄膜分析の比較検討を行った。XPSは得られる情報が元素・結合状態のみであること、TOF-SIMSはフラグメントイオンによりマススペクトルが複雑化することから、多成

分系への適用は容易ではない。それに対して、LDI-TOFMSは分子イオンが主たる成分として観測できるため、多成分分析にも適していると考えられる。電子部品中の有機化合物の劣化解析では、全体の元素構成比自体は大きく変わらないと予想されるので、分子イオンの確認ができ、MS/MS測定による構造解析が可能なLDI-TOFMSは劣化成分を特定する重要な手段になりうる。また、劣化により生成する成分のイオン量は、主成分と比較して多くないことも考えられるので、イオン化時にフラグメントイオンがほとんど発生しないLDI-TOFMSを用いることにより、明確な解析が期待できる。

また、レーザー照射後の状態をSEMで観測した結果、有機EL部材の薄膜の深さ方向について100 nm以上の空間領域を総合した情報を得ていることが分かった。深さ方向への影響は、レーザー強度や照射回数に依存するが、XPSやTOF-SIMSといった10 nm以下の深さでの分析が主となる表面分析法に比べてかなり大きい。深さ方向に構造をもつ薄膜の分析において、最表面分析であるXPSやTOF-SIMSを用いる場合、イオンエッチングとの併用が必要であるが、深さ方向の情報を制御することは可能である。これに対してLDI-TOFMSは、XPS、TOF-SIMSなどと比べれば深さ方向の情報を明確に得られないと考えられるが、同じ階層に含まれる化合物を分類することは可能と考えられる。

(MA) LDI-TOFMSは、マスイメージング技術の進歩とともに、試料表面の二次元的な化合物の分布を取得することが可能となってきた。今後、薄膜状のサンプルに対するイオン化、表面に与える影響などの知見を深めていくことで、表面分析法の1つ技法として応用することができる。

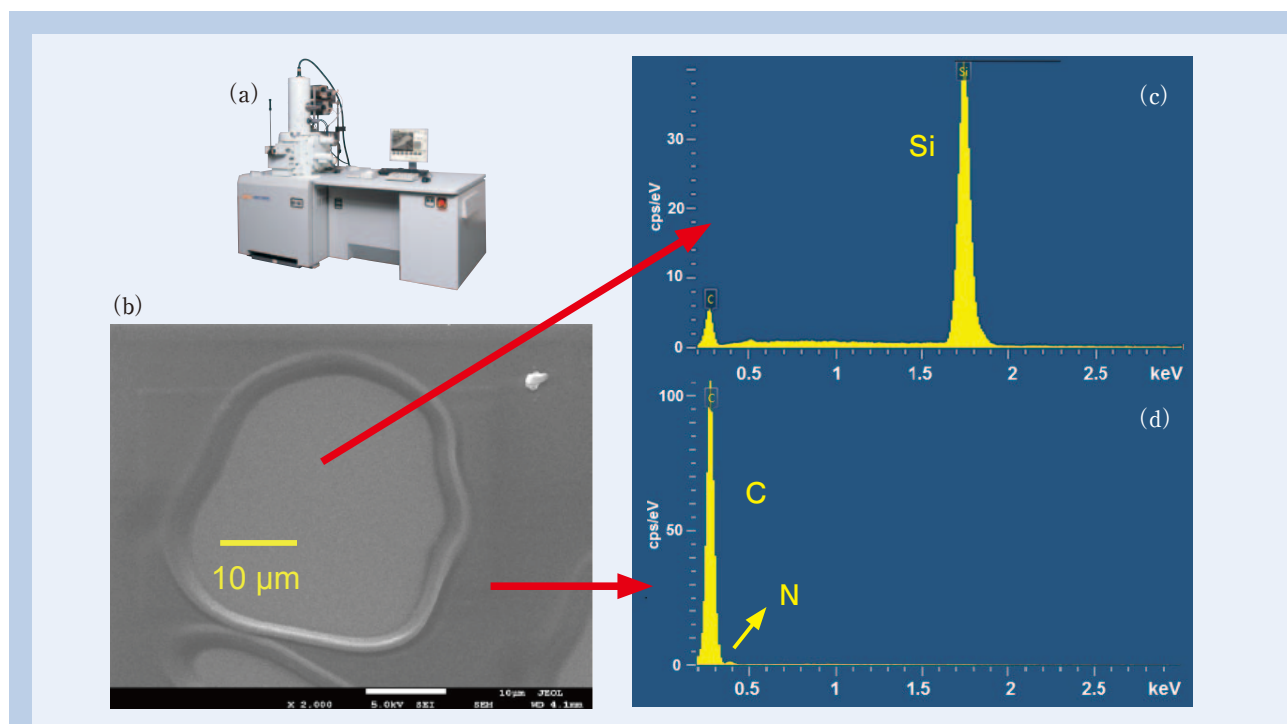


Fig. 5 (a) JSM-7001FTLLVの外観図。(b) レーザー強度40%で250回レーザー照射した後の照射痕を観察したSEM像。(c) レーザー照射痕の領域およびレーザー照射痕周辺のEDSによる分析結果。レーザー照射痕からはSiが、周辺部からはCが主に観測されていることから、レーザー照射により有機薄膜は貫通している。

謝辞

有機薄膜サンプルおよびTOF-SIMSのマスペクトルは、京都大学工学研究科附属量子理工学教育研究センター 松尾グループより提供いただきました。

参考文献

- [1] Caprioli, R.M., Farmer, T.B., Gile, J.: Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **69**, 4751-4760 (1997) .
- [2] Jungmann, J.H., Heeren, R.M.A.: Emerging technologies in mass spectrometry imaging. *J. Proteomics* **75**, 5077-5092 (2012) .
- [3] T. Satoh, T. Sato, J. Tamura, "Development of a high-Performance MALDI-TOF mass spectrometer utilizing a spiral ion trajectory" : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1318 -1323, (2007) .
- [4] T. Satoh, T. Sato, A. Kubo, J. Tamura, "Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometer with High Precursor Ion Selectivity Employing Spiral Ion Trajectory and Improved Offset Parabolic Reflectron" : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22**,797-803, (2011) .
- [5] K. Ichiki, J. Tamura, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, "Development of gas cluster ion beam irradiation system with an orthogonal acceleration TOF instrument" *Surface and Interface Analysis*, **45** (1) , 522-524 (2013) .

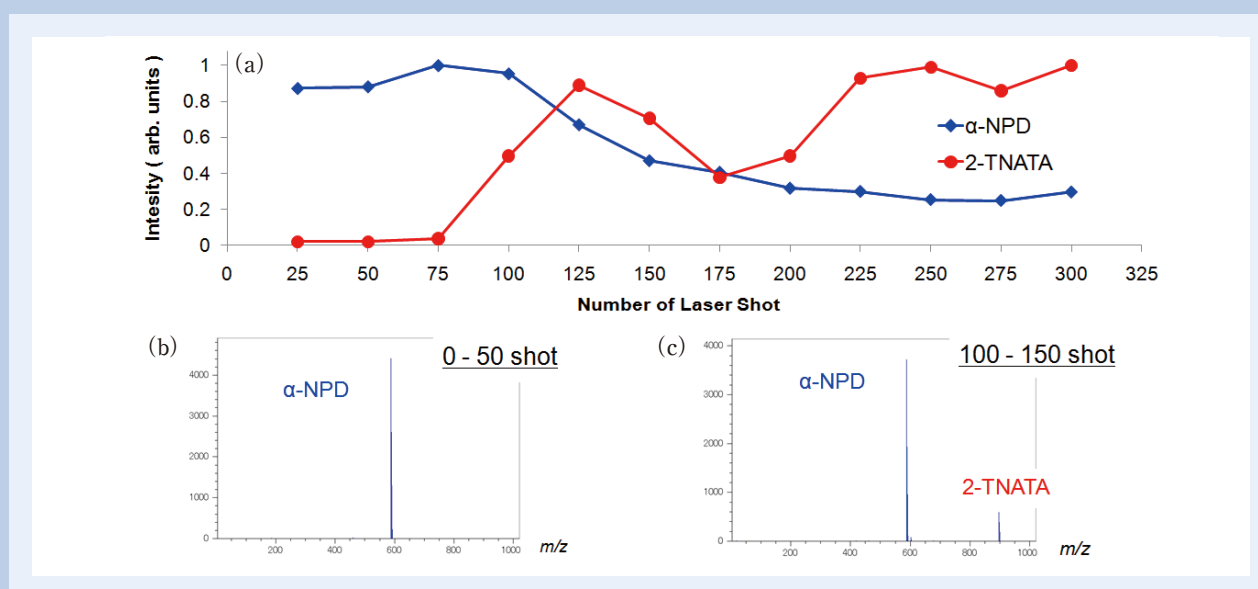


Fig. 6 (a) α -NPD/2-TNATA/Siをレーザー照射位置固定で測定した場合の、 α -NPDおよび2-TNATAのイオン強度推移。またレーザー照射回数 0-50回、100-150回のマスペクトルをそれぞれ (b)、(c) に示す。

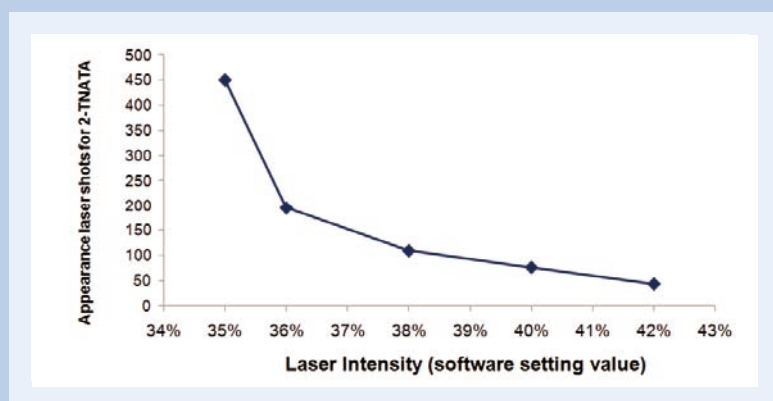


Fig. 7 レーザー強度を変化させた場合の2-TNATAが観測されはじめるレーザー照射回数。レーザー強度が増えると表面への影響は大きくなる。

Table 1 表面分析法とLDI-TOFMSの比較。

	プローブ	検出	空間分解能	深さ方向	化学情報
エネルギー分散型X分析(EDS)	電子	X線	1 μ m	< 1 μ m	元素
オージェ電子分光法(AES)	電子	オージェ電子	10 nm	< 10 nm	元素、結合状態
X線光電子分光法(XPS)	X線	電子	10 μ m	< 10 nm	元素、結合状態、官能基
飛行時間型2次イオン質量分析法(TOF-SIMS)	イオン	イオン	100 nm	< 10 nm	元素部分分子構造
レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析法(LDI-TOFMS)	紫外光	イオン	10 μ m	数100 nm	分子構造

JMS-S3000 Application Data

JMS-S3000“SpiralTOF”による有機 EL 材料測定例 ～既存の表面分析手法との比較～

近年、有機半導体、有機 EL、有機薄膜太陽電池など、電子部品中に有機化合物が構成されることが多くなっており、今後もその利用は拡大すると考えられる。製品の検査や不良品（劣化）の分析需要は増えると予想され、従来法による表面分析に加え、新規法の導入も検討されている。分析においては、従来法での多角的な解析はもちろん、新規法の導入においては従来法とのクロスチェックが重要である。

表面分析法は、試料表面に電子、イオン、光を照射し、試料表面に存在する物質との相互作用により、その形態や物性を調べる手法である。形態を観察するためには、光学顕微鏡、電子顕微鏡が主に用いられている。また、物性を調べる手法としては、X線光電子分光法（XPS）、オージェ電子分光法（AES）、飛行時間型二次イオン質量分析法（TOF-SIMS）などがある。表面分析法の中には、有機化合物の結合状態、官能基情報が得られる手法もあるが、有機化合物の構造解析は難しい。TOF-SIMS は、表面分析法として認知されている質量分析技術であるが、イオン化時にフラグメンテーションが起こり易いことから、有機物分析への適用は困難であった。しかし、最近は金属クラスターやガスクラスターを一次イオンビームとして用いることでフラグメントイオンの生成を抑制することが可能となり、解析対象が無機から有機分析へ展開しつつある。

本報告では、レーザー脱離/イオン化による分析法を従来法と比較し、新しい表面分析法の可能性の検討を行った。有機化合物のレーザー脱離/イオン化には、マトリックスと呼ばれるイオン化促進剤を使用することがほとんどのため、装置名もマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析計（MALDI-TOFMS）であるが、本報告ではマトリックスを用いていないため、以下では LDI-TOFMS と記述している。



Fig. 1 使用装置外観図。左から JMS-S3000, JPS-9010, JSM-7001FTLLV (EDS: OXFORD Instruments 社 AZtec Energy Standard X-Max50), TOF-SIMS (京都大学所有)

サンプルは、有機 EL の正孔輸送層の材料である *N,N'*-Di (1-naphthyl)-*N,N'*-diphenylbenzidine (α -NPD) を 600 nm の厚さで Si 基板に蒸着したものを使用した。測定装置には、LDI-TOFMS (JMS-S3000), SEM (JSM7001FTTLLV, EDS:OXFORD Instruments 社 AZtec Energy Standard X-Max50), XPS (JPS-9010), TOF-SIMS [1] (JEOL 製 JMS-T100LP AccuTOF LC-plus を京都大学・松尾グループが改造して製作。一次イオン:アルゴンクラスターイオン)を使用した。

まず、LDI-TOFMS (JMS-S3000) を用いて α -NPD 薄膜のマススペクトルを取得した。レーザー照射位置は固定し、250 回照射分を積算したマススペクトルを Fig. 2 に示す。比較のために、表面分析法としてよく利用されている TOF-SIMS のマススペクトルを Fig. 3 に示す。一次イオンは、10keV の Ar クラスターイオンである。LDI-TOFMS と比較して TOF-SIMS のマススペクトルには低質量領域に多くのピークが観測されている。これらは、 α -NPD のフラグメントイオンあるいは表面汚染と考えられる。LDI-TOFMS のマススペクトルはほぼ主成分のピークのみが観測されており、混合物の分析や劣化に伴うマイナーな成分の分析にも耐えることが期待できる。

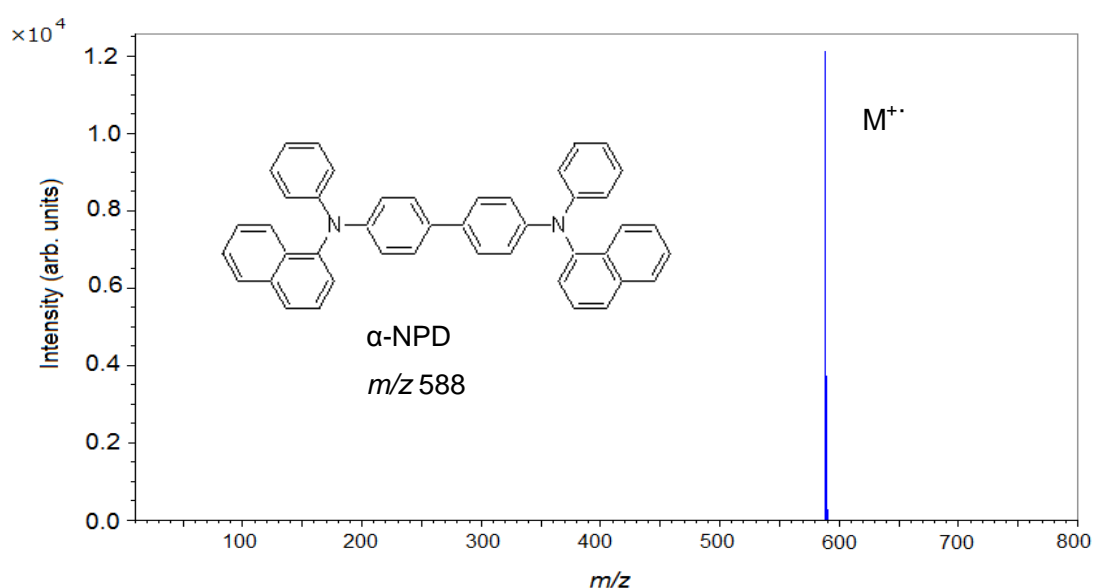


Fig. 2 LDI-TOFMS による α -NPD 薄膜の測定結果

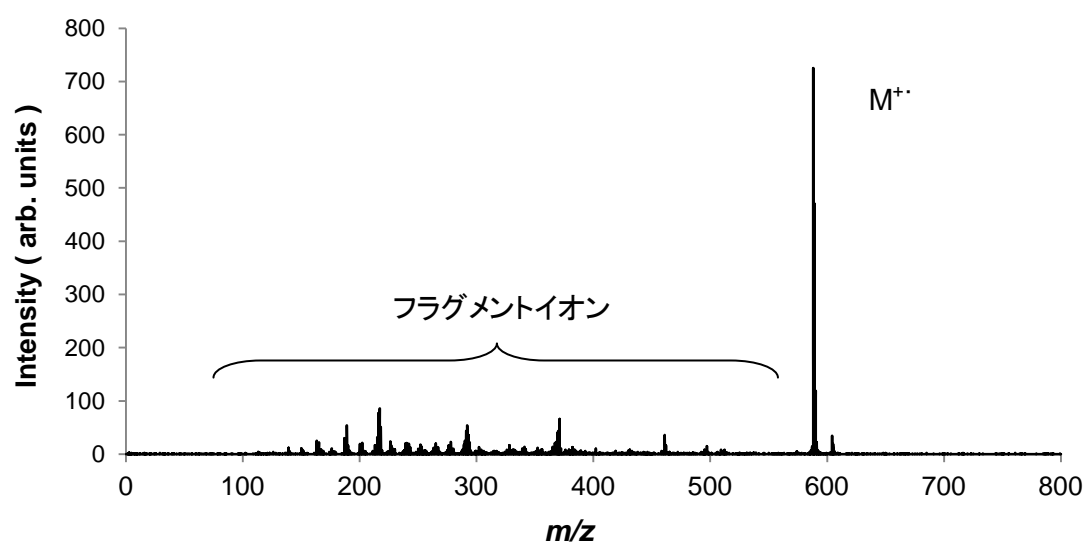


Fig. 3 TOF-SIMS による α -NPD 薄膜の測定結果

次にXPS (JPS-9010) で同サンプルを測定した結果を Fig. 4 に示す。分析領域は 1mmφ である。左図はワイドスペクトル(エネルギー分解能 $Ag3d_{5/2}$ 1.7eV)であり、 α -NPD の構成元素である C, N のピークが顕著に観測されている。XPS は最表面から 10 nm 以内が分析対象となるので、Si のピークは観測されていない。C のピーク周辺についてナロースペクトル(エネルギー分解能 $Ag3d_{5/2}$ 0.5 eV)を取得すると、C-C および C-N の結合を観測することができた。

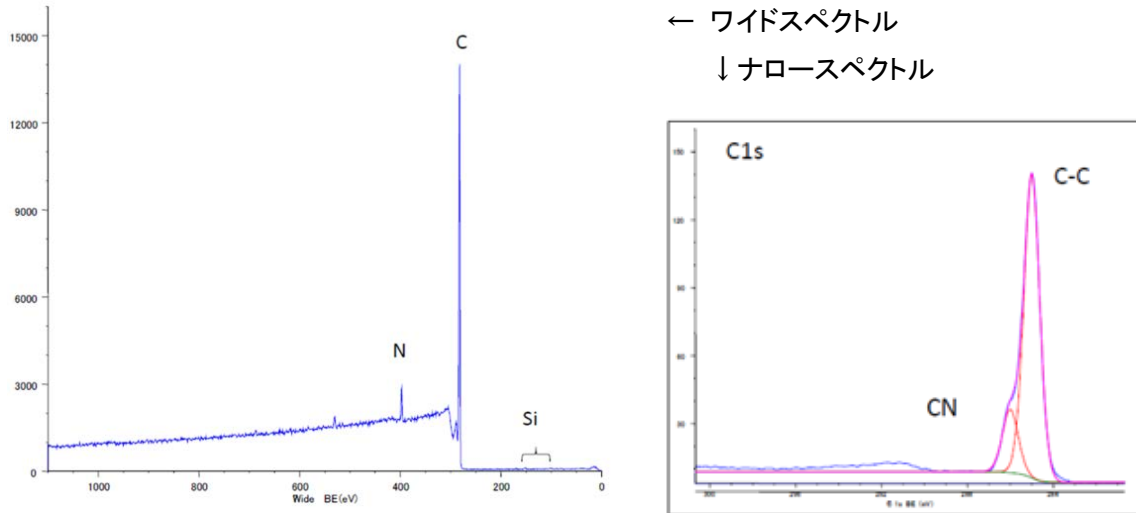


Fig. 4 XPS による α -NPD 薄膜の測定結果

最後に、レーザー照射による深さ方向の影響を確認した。レーザー照射を 250 回行った照射痕を SEM 像観察および EDS 分析を行った (Fig.5)。SEM 像から有機薄膜層が消失している様子が観測できた。EDS で照射痕とその周辺を分析すると、前者からは Si、後者からは C, N が確認できており、有機層を貫通していることが確認できた。LDI-TOFMS によるマスペクトル測定では、250 回照射後もまだイオンが観測され続けていた。このことから有機薄膜貫通後も周辺部分のイオン化が進んだと考えられる。

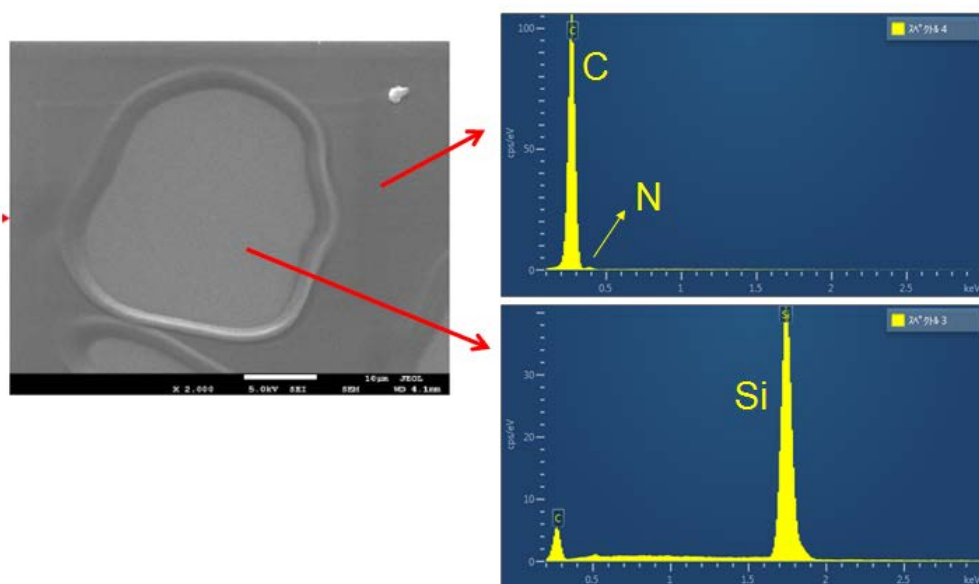


Fig. 5 SEM/EDS による α -NPD 薄膜の測定結果

以上の結果から、今回のレーザー照射条件の場合、深さ方向について 100 nm 以上の空間領域を総合した情報を得ていることになる。深さ方向への影響は、レーザー強度や照射回数に依存するが、XPS や TOF-SIMS といった 10 nm 以下の深さの分析が主となる表面分析法よりはかなり大きい。XPS や TOF-SIMS は、最表面分析ゆえにエッチングと併用することで深さ方向分析が可能なが特長である。一方で、XPS は得られる情報が元素・結合状態のみであること、TOF-SIMS はフラグメントイオンによりマススペクトルが複雑化することから、多成分系への適用は難しいかもしれない。それに対して、LDI-TOFMS は数 100 nm 程度の深さの有機薄膜中に含まれる複数化合物の情報を感度良く、明瞭に得られる手法である。電子部品中の有機化合物の劣化では、全体の元素構成比自体は大きく変わらないと予想されるので、分子量の確認ができる LDI-TOFMS は劣化成分を特定する重要な手段になりうる。また、劣化により生成する成分のイオン量は、主成分と比較して多くないことも考えられるので、フラグメントイオンがほとんど発生しない LDI-TOFMS により明確な解析も期待できる。

(MA)LDI-TOFMS は、マスマイメーキング技術の進歩とともに、試料表面の二次元的な化合物の分布を取得することが可能となってきている。今後、薄膜状のサンプルに対するイオン化、表面に与える影響などの知見を深めていくことで、表面分析法の 1 つ技法として応用することができる。

謝辞: 有機薄膜サンプルおよび TOF-SIMS のマススペクトルは、京都大学工学研究科 附属量子理工学教育研究センター松尾グループより提供いただきました。

[1] K. Ichiki, J. Tamura, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, “Development of gas cluster ion beam irradiation system with an orthogonal acceleration TOF instrument” Surface and Interface Analysis, Vol. 45, Issue: 1, pp. 522-524 (2013)

JMS-S3000 *SpiralTOF* による論文一覧

2016年5月現在

- 1 Satoh, T., Sato, T. & Tamura, J. Development of a high-performance MALDI-TOF mass spectrometer utilizing a spiral ion trajectory. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**, 1318-1323, doi:10.1016/j.jasms.2007.04.010 (2007).
- 2 Satoh, T. Analytical Capability of a High Performance Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer for Peptide Mass Fingerprinting 高性能マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計を利用したペプチドマスフィンガープリント法によるタンパク質解析能力の検討. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **55**, 173-181, doi:10.5702/massspec.55.173 (2007).
- 3 Satoh, T. Development of a Time-of-Flight Mass Spectrometer Utilizing a Spiral Ion Trajectory らせん状のイオン軌道を利用した飛行時間質量分析計の開発. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **57**, 363-369, doi:10.5702/massspec.57.363 (2009).
- 4 佐藤貴弥. らせん状のイオン軌道を利用した飛行時間質量分析計の開発. *ぶんせき*, 688-691 (2009).
- 5 Hitora, Y., Takada, K., Okada, S. & Matsunaga, S. Miyakosynes A-F, cytotoxic methyl branched acetylenes from a marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron* **67**, 4530-4534, doi:10.1016/j.tet.2011.04.085 (2011).
- 6 Ishii, Y., Sakashita, T., Kawasaki, S., Kato, H. & Takatori, M. Fusing Treatment of Pentacenes: Toward Giant Graphene-Like Molecule. *Materials Express* **1**, 36-42, doi:10.1166/mex.2011.1005 (2011).
- 7 Naka, T. *et al.* Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem* **286**, 44153-44161, doi:10.1074/jbc.M111.310037 (2011).
- 8 Satoh, T., Sato, T., Kubo, A. & Tamura, J. Tandem time-of-flight mass spectrometer with high precursor ion selectivity employing spiral ion trajectory and improved offset parabolic reflectron. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**, 797-803, doi:10.1007/s13361-011-0090-3 (2011).
- 9 Tsujita, T. *et al.* Purification and characterization of polyphenols from chestnut astringent skin. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**, 8646-8654, doi:10.1021/jf201679q (2011).
- 10 佐藤貴弥. らせん状のイオン軌道をもつタンデム飛行時間質量分析装置の開発と応用例. *ぶんせき*, 532-536 (2011).
- 11 Degawa, T., Shimma, S. & Toyoda, M. Rapid sequencing of a peptide containing a single disulfide bond using high-energy collision-induced dissociation. *European Journal of Mass Spectrometry* **18**, 345, doi:10.1255/ejms.1188 (2012).
- 12 Hamamoto, Y. *et al.* Brevisulcinal-F: A polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 4963-4968, doi:10.1021/ja212116q (2012).
- 13 Holland, P. T. *et al.* Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*. *Harmful Algae* **13**, 47-57, doi:10.1016/j.hal.2011.10.002 (2012).
- 14 Li, K. *et al.* A rheological and chemical investigation of canadian heavy oils from the McMurray Formation. *Energy & Fuels* **26**, 4445-4453, doi:10.1021/ef300608w (2012).
- 15 Moyori, T., Tang, T. & Takasu, A. Dehydration Polycondensation of Dicarboxylic Acids and Diols Using Sublimating Strong Brønsted Acids. *Biomacromolecules* **13**, 1240-1243, doi:10.1021/bm300231d (2012).

- 16 Mukosaka, S., Teramoto, K. & Koike, H. in *Biological Data Visualization (BioVis), 2012 IEEE Symposium on*. 63-68 (IEEE).
- 17 Mukosaka, S., Teramoto, K. & Koike, H. Visual Analytics of Repeating Structures Using Mass Spectrometry. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **60**, 27-32, doi:10.5702/massspec.11-34 (2012).
- 18 Oda, M. *et al.* Stathmin is involved in the cooperative effect of Zoledronic acid and gefitinib on bone homing breast cancer cells in vitro. *J Bone Oncol* **1**, 40-46, doi:10.1016/j.jbo.2012.06.001 (2012).
- 19 Satoh, T., Kubo, A., Shimma, S. & Toyoda, M. Mass spectrometry imaging and structural analysis of lipids directly on tissue specimens by using a spiral orbit type tandem time-of-flight mass spectrometer, SpiralTOF-TOF. *Mass Spectrometry* **1**, A0013-A0013, doi:10.5702/massspectrometry.A0013 (2012).
- 20 Shimma, S., Kubo, A., Satoh, T. & Toyoda, M. Detailed structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a MALDI-SpiralTOF-Reflectron TOF mass spectrometer. *PLoS One* **7**, e37107, doi:10.1371/journal.pone.0037107 (2012).
- 21 Voorhees, K. J., McAlpin, C. R. & Cox, C. R. Lipid profiling using catalytic pyrolysis/metal oxide laser ionization-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **98**, 201-206, doi:10.1016/j.jaap.2012.07.004 (2012).
- 22 Wang, X., Nagata, K. & Higuchi, M. Formation and electrochemical investigation of ordered cobalt coordinated peptide monolayers on gold substrates. *Thin Solid Films* **520**, 2884-2891, doi:10.1016/j.tsf.2011.12.009 (2012).
- 23 Yamazaki, M. *et al.* Origins of oxygen atoms in a marine ladder-frame polyether: evidence of monooxygenation by ¹⁸O-labeling and using tandem mass spectrometry. *The Journal of organic chemistry* **77**, 4902-4906, doi:10.1021/jo300531t (2012).
- 24 佐藤崇文, 寺本華奈江, 佐藤貴弥 & 上田祥久. MALDI Spiral-TOF/TOF によるエチレンオキサイド-プロピレンオキサイドブロック共重合体の分析. *高分子論文集 KOBUNSHI RONBUNSHU* **69**, 502-502, doi:10.1295/koron.69.502 (2012).
- 25 Hari, Y. *et al.* Base-pair recognition ability of hydroxyphenyl nucleobases in parallel triplex DNA. *Tetrahedron* **69**, 6381-6391, doi:10.1016/j.tet.2013.05.107 (2013).
- 26 Hari, Y., Nakahara, M. & Obika, S. Triplex-forming ability of oligonucleotides containing 1-aryl-1, 2, 3-triazole nucleobases linked via a two atom-length spacer. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 5583-5588, doi:10.1016/j.bmc.2013.05.034 (2013).
- 27 Kubo, A. *et al.* Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *J Am Soc Mass Spectrom* **24**, 684-689, doi:10.1007/s13361-012-0513-9 (2013).
- 28 Matsumori, N. *et al.* A novel sperm-activating and attracting factor from the ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Organic letters* **15**, 294-297, doi:10.1021/ol303172n (2013).
- 29 Mizuta, Y., Takasu, A. & Higuchi, M. Synthesis of Cell - Penetrating S - Galactosyl-Oligoarginine Peptides as Inducers of Recombinant Protein Expression under the Control of lac Operator/Repressor Systems. *ChemPlusChem* **78**, 677-683, doi:10.1002/cplu.201300130 (2013).
- 30 Moyori, T., Hayashi, T. & Takasu, A. Aldol - type group - transfer polymerization of silyl vinyl ethers using silyl perfluoroalkaneimides as nonmetal catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 3516-3522, doi:10.1002/pola.26753 (2013).
- 31 Nomura, N., Shinoda, K., Takasu, A., Nagata, K. & Inomata, K. Emulsion polymerization of vinyl acetate using iodine - transfer and RAFT radical polymerizations. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 534-545, doi:10.1002/pola.26424 (2013).

- 32 Sato, H., Ishii, Y., Momose, H., Sato, T. & Teramoto, K. Application of High-Resolution MALDI-TOFMS with a Spiral Ion Trajectory for the Structural Characterization of Free Radical Polymerized Methacrylate Ester Copolymers. *Mass Spectrom (Tokyo)* **2**, A0014, doi:10.5702/massspectrometry.A0014 (2013).
- 33 Teramoto, K. *et al.* Simple and rapid characterization of mycolic acids from Dietzia strains by using MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power. *The Journal of antibiotics* **66**, 713-717, doi:10.1038/ja.2013.79 (2013).
- 34 Tsujita, T., Shintani, T. & Sato, H. α -Amylase inhibitory activity from nut seed skin polyphenols. 1. Purification and characterization of almond seed skin polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 4570-4576, doi:10.1021/jf400691q (2013).
- 35 Voorhees, K. J. *et al.* Modified MALDI MS fatty acid profiling for bacterial identification. *Journal of Mass Spectrometry* **48**, 850-855, doi:10.1002/jms.3215 (2013).
- 36 Wang, X., Fukuoka, S., Tsukigawara, R., Nagata, K. & Higuchi, M. Electric-field-enhanced oriented cobalt coordinated peptide monolayer and its electrochemical properties. *Journal of colloid and interface science* **390**, 54-61, doi:10.1016/j.jcis.2012.08.079 (2013).
- 37 Yamada, S., Takasu, A. & Kawamura, K. The effect of microwave irradiation on the kinetics and activation thermodynamics of ring - opening polymerization of ϵ - caprolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 3732-3739, doi:10.1002/pola.26776 (2013).
- 38 Akabane-Nakata, M., Obika, S. & Hari, Y. Synthesis of oligonucleotides containing N, N-disubstituted 3-deazacytosine nucleobases by post-elongation modification and their triplex-forming ability with double-stranded DNA. *Organic & biomolecular chemistry* **12**, 9011-9015, doi:10.1039/C4OB01760A (2014).
- 39 Chen, Y.-T., Hong, P.-F., Wen, L. & Lin, C.-T. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin from Taiwanofungus camphorata. *Botanical Studies* **55**, 1-8, doi:10.1186/s40529-014-0077-z (2014).
- 40 Ito, M., Shimasaki, T., Teramoto, N. & Shibata, M. Photo-cured organic-inorganic hybrid composites of methacrylate-terminated 4-arm star-shaped ϵ -caprolactone oligomer and methacrylate-or thiol-substituted polysilsesquioxane. *Journal of Polymer Research* **21**, 1-10, doi:10.1007/s10965-014-0507-3 (2014).
- 41 Kawasaki, T., Imai, T. & Tsukiyama, K. Use of a Mid-Infrared Free-Electron Laser (MIR-FEL) for Dissociation of the Amyloid Fibril Aggregates of a Peptide. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation* **04**, 9-18, doi:10.4236/jasmi.2014.41002 (2014).
- 42 Ken, C.-F., Chang, C.-C., Wen, L., Huang, J.-K. & Lin, C.-T. Biochemical characterization of a functional recombinant aryl-alcohol dehydrogenase from Taiwanofungus camphorata. *Botanical Studies* **55**, 14, doi:10.1186/1999-3110-55-14 (2014).
- 43 Kim, B.-J. *et al.* Preparation of carbon fibers with excellent mechanical properties from isotropic pitches. *Carbon* **77**, 747-755, doi:10.1016/j.carbon.2014.05.079 (2014).
- 44 Kurashige, W. *et al.* Au₂₅ Clusters Containing Unoxidized Tellurolates in the Ligand Shell. *The journal of physical chemistry letters* **5**, 2072-2076, doi:10.1021/jz500901f (2014).
- 45 Niihori, Y., Matsuzaki, M., Uchida, C. & Negishi, Y. Advanced use of high-performance liquid chromatography for synthesis of controlled metal clusters. *Nanoscale* **6**, 7889-7896, doi:10.1039/C4NR01144A (2014).
- 46 Nishikawa, K. *et al.* Detection of changes in the structure and distribution map of triacylglycerol in fatty liver model by MALDI - SpiralTOF. *FEBS open bio* **4**, 179-184, doi:10.1016/j.fob.2014.02.005 (2014).
- 47 Ohtani, H. & Iura, T. Complementary Characterization of End Groups in Radically Polymerized Poly(methyl methacrylate) by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*

- 3, S0041, doi:10.5702/massspectrometry.S0041 (2014).
- 48 Okabe, T., Kuzuhara, D., Aratani, N. & Yamada, H. Synthesis and electronic properties of acetylene-and butadiyne-linked 3, 3'-porphycene dimers. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **18**, 849-855, doi:10.1142/S1088424614500631 (2014).
- 49 Sanai, Y., Morita, Y., Asano, Y., Ishizaki, K. & Kubota, K. Chain - end lactonization of polyacrylates prepared by photopolymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **52**, 1161-1171, doi:10.1002/pola.27100 (2014).
- 50 Sato, H., Nakamura, S., Teramoto, K. & Sato, T. Structural characterization of polymers by MALDI spiral-TOF mass spectrometry combined with Kendrick mass defect analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 1346-1355, doi:10.1007/s13361-014-0915-y (2014).
- 51 Satoh, T., Kubo, A., Hazama, H., Awazu, K. & Toyoda, M. Separation of Isobaric Compounds Using a Spiral Orbit Type Time-of-Flight Mass Spectrometer, MALDI-SpiralTOF. *Mass Spectrom (Tokyo)* **3**, S0027, doi:10.5702/massspectrometry.S0027 (2014).
- 52 Shibata, T., Fujimoto, M. & Otani, T. Synthesis of macrocyclic heteroarylenes by consecutive inter-and intramolecular cycloadditions of thiophenylene-tethered triynes. *Tetrahedron* **70**, 8453-8461, doi:10.1016/j.tet.2014.09.077 (2014).
- 53 Shigeri, Y. *et al.* Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for MALDI - MS to detect gaseous aldehydes. *Journal of Mass Spectrometry* **49**, 742-749, doi:10.1002/jms.3408 (2014).
- 54 Suzuki, R. *et al.* Brevisulcatic acids, marine ladder-frame polyethers from the red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata* in New Zealand. *Org Lett* **16**, 5850-5853, doi:10.1021/ol502700h (2014).
- 55 Takagi, K., Kawagita, E. & Kouchi, R. Synthesis and characterization of polythiophene derivatives with nitrogen heterocycles on the side chain. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **52**, 2166-2174, doi:10.1002/pola.27228 (2014).
- 56 Tsujita, T., Shintani, T. & Sato, H. Preparation and characterisation of peanut seed skin polyphenols. *Food chemistry* **151**, 15-20, doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.072 (2014).
- 57 Wambua, D. M., Ubukata, M., Dane, J., Cody, R. B. & Chiu, N. H. Bottom-up mass spectrometric sequencing of microRNA. *Analytical Methods* **6**, 8829-8839, doi:10.1039/C4AY01519C (2014).
- 58 Yamaguchi, I. & Nagano, T. Synthesis, chemical, and thermoelectric properties of n - type π - conjugated polymer composed of 1, 2, 4 - triazole and pyridine rings and its metal complexes. *Journal of Applied Polymer Science* **131**, doi:10.1002/app.39928 (2014).
- 59 Yamakado, R. *et al.* Synthesis, reaction, and optical properties of cyclic oligomers bearing 9, 10-diphenylanthracene based on an aromatic tertiary amide unit. *RSC Advances* **4**, 6752-6760, doi:10.1039/C3RA46652C (2014).
- 60 Yamazoe, S., Kurashige, W., Nobusada, K., Negishi, Y. & Tsukuda, T. Preferential Location of Coinage Metal Dopants (M= Ag or Cu) in $[\text{Au}_{25-x}\text{M}_x(\text{SC}_2\text{H}_4\text{Ph})_{18}]^{-(x-1)}$ As Determined by Extended X-ray Absorption Fine Structure and Density Functional Theory Calculations. *The Journal of Physical Chemistry C* **118**, 25284-25290, doi:10.1021/jp5085372 (2014).
- 61 Yan, Y., Ubukata, M., Cody, R. B., Holy, T. E. & Gross, M. L. High-energy collision-induced dissociation by MALDI TOF/TOF causes charge-remote fragmentation of steroid sulfates. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 1404-1411, doi:10.1007/s13361-014-0901-4 (2014).
- 62 Yu, M., Tang, T., Takasu, A. & Higuchi, M. pH-and thermo-induced morphological changes of an amphiphilic peptide-grafted copolymer in solution. *Polymer journal* **46**, 52-58, doi:10.1038/pj.2013.61 (2014).
- 63 Abe, T., Matsuzaka, M., Isoda, K. & Tadokoro, M. Liquid-Crystalline and Electronic Properties

- of Racemic-Alkoxy Chains-Substituted Tetraazanaphthacene. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **615**, 70-77, doi:10.1080/15421406.2015.1066963 (2015).
- 64 Asamizu, S., Ozaki, T., Teramoto, K., Satoh, K. & Onaka, H. Killing of Mycolic Acid-Containing Bacteria Aborted Induction of Antibiotic Production by Streptomyces in Combined-Culture. *PLoS One* **10**, e0142372, doi:10.1371/journal.pone.0142372 (2015).
- 65 Hayakawa, T., Song, H., Ishii, Y. & Kawasaki, S. Facile Synthesis of Coronene Dimers Having Unique Optical Properties. *J. Chem* **9**, 442-447, doi:10.17265/1934-7375/2015.07.002 (2015).
- 66 Hayakawa, Y. *et al.* Complementary DNA display selection of high - affinity peptides binding the vacuolating toxin (VacA) of Helicobacter pylori. *Journal of Peptide Science* **21**, 710-716, doi:10.1002/psc.2795 (2015).
- 67 Hubin, E. A. *et al.* Structural, functional, and genetic analyses of the actinobacterial transcription factor RbpA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7171-7176, doi:10.1073/pnas.1504942112 (2015).
- 68 Ikawa, T. *et al.* 2 - [(Neopentyl glycolato) boryl] phenyl Triflates and Halides for Fluoride Ion - Mediated Generation of Functionalized Benzynes. *Advanced Synthesis & Catalysis* **357**, 2287-2300, doi:10.1002/adsc.201500315 (2015).
- 69 Itoh, Y. *et al.* Identification of SNAIL1 Peptide-Based Irreversible Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inactivators. *Journal of medicinal chemistry*, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01323 (2015).
- 70 Iura, T. & Ohtani, H. Fragmentation behavior of poly(methyl methacrylate) during matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **29**, 155-162, doi:10.1002/rm.7087 (2015).
- 71 Kano, H. *et al.* A novel analytical pyrolysis device applicable for measurements of less volatile pyrolyzates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **113**, 165-173, doi:10.1016/j.jaap.2014.12.008 (2015).
- 72 Kurimoto, K., Yamamura, H. & Miyagawa, A. Chemical approach for the syntheses of GM4 isomers with sialic acid to non-natural linkage positions on galactose. *Carbohydrate research* **401**, 39-50, doi:10.1016/j.carres.2014.10.018 (2015).
- 73 Miyagawa, A., Matsuda, T. & Yamamura, H. Synthesis of Branched Tetrasaccharide Derivatives of Schizophyllan-like β -Glucan. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **34**, 215-246, doi:10.1080/07328303.2015.1044754 (2015).
- 74 Mizukado, J. *et al.* High - resolution MALDI - TOF MS study on analysis of low - molecular - weight products from photo - oxidation of poly (3 - hexylthiophene). *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 1006-1012, doi:10.1002/jms.3614 (2015).
- 75 Mori, S., Morihiro, K., Kasahara, Y., Tsunoda, S.-i. & Obika, S. Synthesis and Properties of 2'-Deoxyuridine Analogues Bearing Various Azobenzene Derivatives at the C5 Position. *Chemosensors* **3**, 36-54, doi:10.3390/chemosensors3020036 (2015).
- 76 Negishi, Y. *et al.* A critical size for emergence of nonbulk electronic and geometric structures in dodecanethiolate-protected Au clusters. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 1206-1212, doi:10.1021/ja5109968 (2015).
- 77 Niihori, Y., Kikuchi, Y., Kato, A., Matsuzaki, M. & Negishi, Y. Understanding Ligand-Exchange Reactions on Thiolate-Protected Gold Clusters by Probing Isomer Distributions Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *ACS nano* **9**, 9347-9356, doi:10.1021/acsnano.5b03435 (2015).
- 78 Nishikawa, K. *et al.* Resveratrol increases CD68+ Kupffer cells colocalized with adipose differentiation - related protein and ameliorates high - fat - diet - induced fatty liver in mice. *Molecular nutrition & food research* **59**, 1155-1170, doi:10.1002/mnfr.201400564 (2015).

- 79 Ono, K. *et al.* Self-Assembly of Nanometer-Sized Boroxine Cages from Diboronic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 7015-7018, doi:10.1021/jacs.5b02716 (2015).
- 80 Sakano, T., Ohashi, T., Yamanaka, M. & Kobayashi, K. Photoresponsive self-assembled hexameric capsules based on calix [4] resorcinarenes bearing azobenzene dendron conjugates as side chains. *Organic & biomolecular chemistry* **13**, 8359-8364, doi:10.1039/C5OB00997A (2015).
- 81 Satoh, T. *et al.* Imaging Mass Spectrometry Using Ultra-high Mass Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer, SpiralTOF. *Microscopy and Microanalysis* **21**, 2059-2060, doi:10.1017/S1431927615011071 (2015).
- 82 Segawa, Y., Kuwabara, T., Matsui, K., Kawai, S. & Itami, K. Palladium-free synthesis of [10] cycloparaphenylene. *Tetrahedron* **71**, 4500-4503, doi:10.1016/j.tet.2015.02.066 (2015).
- 83 Sharma, S., Kurashige, W., Nobusada, K. & Negishi, Y. Effect of trimetallization in thiolate-protected Au(24-n)Cu(n)Pd clusters. *Nanoscale* **7**, 10606-10612, doi:10.1039/c5nr01491c (2015).
- 84 Shigeri, Y. *et al.* Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to detect steroids with carbonyl groups. *European Journal of Mass Spectrometry* **21**, 79-90, doi:10.1255/ejms.1336 (2015).
- 85 Spring, A. M. *et al.* An analysis of the structural, thermal and optical characteristics as well as the electrical resistivity of tert-butyldiphenylsilyl substituted poly (norbornene-dicarboximide)s. *Polymer* **56**, 189-198, doi:10.1016/j.polymer.2014.11.043 (2015).
- 86 Takanashi, E. *et al.* Cytotoxic linear acetylenes from a marine sponge Pleroma sp. *Tetrahedron* **71**, 9564-9570, doi:10.1016/j.tet.2015.10.062 (2015).
- 87 Teramoto, K. *et al.* Characterization of Mycolic Acids in Total Fatty Acid Methyl Ester Fractions from Mycobacterium Species by High Resolution MALDI-TOFMS. *Mass Spectrom (Tokyo)* **4**, A0035, doi:10.5702/massspectrometry.A0035 (2015).
- 88 Wang, C. *et al.* A novel D-π-A small molecule with N-heteroacene as acceptor moiety for photovoltaic application. *Dyes and Pigments* **122**, 231-237, doi:10.1016/j.dyepig.2015.06.029 (2015).
- 89 Wang, C. *et al.* Synthesis, Characterization, and Memory Performance of Two Phenazine/Triphenylamine - Based Organic Small Molecules through Donor - Acceptor Design. *Asian Journal of Organic Chemistry* **4**, 646-651, doi:10.1002/ajoc.201500087 (2015).
- 90 Yamanoi, T., Oda, Y., Katsuraya, K., Inazu, T. & Hattori, K. Synthesis, structure, and evaluation of a β-cyclodextrin-artificial carbohydrate conjugate for use as a doxorubicin-carrying molecule. *Bioorganic & medicinal chemistry*, doi:10.1016/j.bmc.2015.12.030 (2015).
- 91 Zheng, Q., Morimoto, M., Sato, H. & Takanohashi, T. Molecular composition of extracts obtained by hydrothermal extraction of brown coal. *Fuel* **159**, 751-758, doi:10.1016/j.fuel.2015.07.042 (2015).
- 92 橋詰峰雄 *et al.* 体液類似環境におけるアパタイト結合性ペプチド樹状オリゴマーによるミネラルイオン. *高分子論文集* **73**, 55-61, doi:10.1295/koron.2015-0050 (2015).
- 93 小林大祐 *et al.* 超音波を用いたポリピロール微粒子合成. *化学工学論文集* **41**, 153-156, doi:10.1252/kakoronbunshu.41.153 (2015).
- 94 Fouquet, T., Nakamura, S. & Sato, H. MALDI SpiralTOF high-resolution mass spectrometry and Kendrick mass defect analysis applied to the characterization of poly(ethylene-co-vinyl acetate) copolymers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **30**, 973-981, doi:10.1002/rcm.7525 (2016).
- 95 Hayakawa, T., Ishii, Y. & Kawasaki, S. Sodium ion battery anode properties of designed graphene-layers synthesized from polycyclic aromatic hydrocarbons. *RSC Advances* **6**,

22069-22073, doi:10.1039/C6RA00955G (2016).

- 96 Kakizawa, T. *et al.* Evaluation of phenylcyclopropylamine compounds by enzymatic assay of lysine-specific demethylase 2 in the presence of NPAC peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, doi:10.1016/j.bmcl.2016.01.036 (2016).
- 97 Katagiri, K., Takasu, A. & Higuchi, M. Synthesis of Glycopolymer Containing Cell-Penetrating Peptide as Inducers of Recombinant Protein Expression under the Control of Lac Operator/Repressor Systems. *Biomacromolecules*, doi:10.1021/acs.biomac.6b00368 (2016).
- 98 Kim, B.-J. *et al.* Enhancing the tensile strength of isotropic pitch-based carbon fibers by improving the stabilization and carbonization properties of precursor pitch. *Carbon* **99**, 649-657, doi:10.1016/j.carbon.2015.12.082 (2016).
- 99 Peršurić, Ž., Osuga, J., Grbac, T. G., Peter - Katalinić, J. & Pavelić, S. K. MALDI - SpiralTOF technology for assessment of triacylglycerols in Croatian olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, doi:10.1002/ejlt.201500375 (2016).
- 100 Shigeri, Y. *et al.* 2-hydrazinoquinoline: a reactive matrix for MALDI-MS to detect gaseous carbonyl compounds. *European Journal of Mass Spectrometry* **22**, 0-0, doi:10.1255/ejms.1413 (2016).
- 101 Takahira, Y., Murotani, E., Fukuda, K., Vohra, V. & Murata, H. Design, synthesis, and properties of a series of charged iridium (III) complexes with a neutral bidentate ligand for deep-blue phosphorescent emitter. *Journal of Fluorine Chemistry* **181**, 56-60, doi:10.1016/j.jfluchem.2015.10.016 (2016).
- 102 Yang, J., Nakabayashi, K., Miyawaki, J. & Yoon, S.-H. Preparation of isotropic pitch-based carbon fiber using hyper coal through co-carbonation with ethylene bottom oil. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **34**, 397-404, doi:10.1016/j.jiec.2015.11.026 (2016).

