

平成 28 年 9 月

関西大学審査学位論文

白金薄膜を利用した表面支援レーザー脱離イオン化法の開発と  
質量分析イメージングへの応用

Development of surface-assisted laser desorption/ionization  
with sputter-deposited platinum film and its application to  
mass spectrometry imaging

理工学研究科 総合理工学専攻

無機・物理化学研究領域

12D6010 小澤智行

# 目次

はじめに	1
第1章	
低分子化合物のイメージング質量分析のためのプラチナ スパッタ蒸着表面支援レーザー脱離イオン化法の開発	5
第2章	
スパッタリング法で生成したプラチナフィルムを用いた マトリックスエンハンス表面支援レーザー脱離イオン化 質量分析法によるホスファチジルコリンとグリセロ脂質の同時検出	37
第3章	
スパッタリング法で生成したプラチナフィルムを用いた 表面支援レーザー脱離イオン化法による植物の葉の ダイレクトイメージング質量分析	58
まとめ	75

## はじめに

マトリックスレーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)法は、タンパク質などの不揮発性化合物を分解することなくイオン化して質量分析することできるため、生物・医学・薬学分野の研究において広く用いられている。高分子量のタンパク質をイオン化できる MALDI を開発した島津製作所の田中耕一氏は、2002 年にノーベル化学賞を受賞した。MALDI ではマトリックスと呼ばれているイオン化支援剤の UV 吸収性有機化合物が用いられている。マトリックスと試料の混晶を調製し、その混晶に UV パルスレーザー光を照射することで、試料がイオン化される。MALDI のイオン化特性は、マトリックスの物性やその結晶状態に依存する。そのため、マトリックスの選択とその試料調製方法は、MALDI において重要なファクターであることが知られている。MALDI では、微量の試料を検出するために大量のマトリックスを用いるが、そのマトリックスに関連する様々なイオンが低質量領域に強いシグナルとして検出される。そのため、MALDI マススペクトルにおいては、これらのマトリックス由来のイオンのピークによって、低分子量の目的物質のイオンのピークを観測することが妨害されることがある。また、目的試料以外の分子が大量にイオン化することで、目的試料のイオン化が抑制される現象(イオン化抑制)が生じる問題もある。これらの問題を解決するために、金属ナノ粒子をマトリックスとして利用した表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)法が研究されている。金属ナノ粒子は、UV を吸収することができるためマトリックスとして機能し、かつ金属ナノ粒子自身がイオン化しないため、低分子量領域のピークの観測やイオン化抑制を低減できる可能性がある。MALDI や SALDI のための新規マトリックスの探索は現在も行われているが、未だに検出感度が低い化合物、または検出が困難な化合物が多数ある。SALDI では、利用するナノ粒子マトリックスの金属の種類やその表面修飾基によって、様々なイオン化特性が得

られる。そのため、MALDI ではイオン化が困難な物質の分析のために、SALDI が用いられるようになってきている。

近年、動物細胞切片上の薬物やその代謝物の同定と局在分析を同時に行うことができる質量イメージング法が開発されてから、その重要性は高まってきている。質量イメージングのイオン化法には主に MALDI や SALDI 法が適用されている。質量イメージング法とは、試料切片にマトリックスを噴霧して、その切片に 10~400  $\mu\text{m}$  間隔で UV パルスレーザーを照射して得られた多数のマスペクトルから、標的物質のシグナルのみを抽出して二次元画像を得る手法である。(図 1)

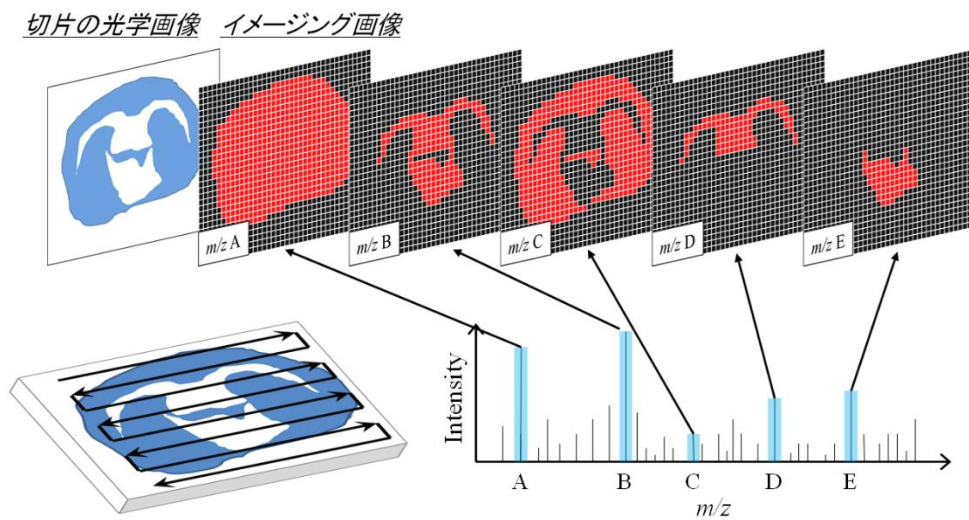


図 1 MALDI 質量イメージング法

質量イメージングの試料調製では、MALDI のためのマトリックス溶液または SALDI のためのマトリックス分散溶液を試料切片上に可能な限り均一に噴霧して乾燥させる。しかし、調製されるマトリックスの結晶状態は均一でないために、MALDI 質量

イメージングでは定量分析が困難である。また、噴霧された溶媒によって、切片上の試料成分が滲んでしまうことで、成分の位置が移動してしまう場合がある。MALDI 質量イメージングの根本的な問題としては、試料が工業材料などの非導電性の厚い切片の場合は、イオン化の際に切片上でチャージアップが起こるため、成分の検出が困難なことである。当然ながら従来の MALDI や SALDI でイオン化できない物質の検出は困難である。これらの問題を解決するために、質量イメージングのための新しいイオン化法の開発が求められている。上記の問題を解決するために、本研究では白金薄膜をマトリックスとして用いる SALDI (Pt-SALDI)法を開発した。本手法は、工業材料の質量イメージングや、MALDI では検出感度の低い糖類の検出、これまでイオン化できなかったグリセロ脂質の検出、浸透性農薬を散布した植物の直接イメージングに成功した。

以下に本研究の各章の要旨を示す。

## 第 1 章

第 1 章は、スパッタリング法を用いて調製した白金薄膜をマトリックスとして利用した Pt-SALDI 法を開発した。SALDI のための白金薄膜の最適条件を検討し、Pt-SALDI のイオン化特性を示した。非導電性のインクジェットプリント紙とその紙に UV を照射した際の成分の劣化を質量イメージングで分析した。また、薄層クロマトグラフィーのプレート上の成分の質量イメージングが可能であることが示された。

## 第 2 章

ラット脳の脂質の質量イメージングを行った。MALDI ではリン脂質が検出されて、グリセロ脂質は検出されなかった。Pt-SALDI 質量イメージングを行うと、リン脂質の検出はできなかったが、グリセロ脂質を高感度に検出してその局在を明らかにする

ことができた。さらに、試料切片に MALDI マトリックスを噴霧してから白金薄膜を調製して、有機マトリックスと金属薄膜マトリックスのハイブリッドの SALDI(matrix enhanced(ME)-Pt-SALDI)を行うと、リン脂質とグリセロ脂質の両方を高感度に同時に検出することができた。

### 第3章

浸透性農薬を投与した植物の葉を試料として、植物内における農薬の分散の経時変化を質量イメージングによって明らかにした。植物の葉は切片にするには薄すぎて、MALDI で分析するには非導電性で厚すぎる試料である。従来はラジオアイソトープを用いた農薬で分析が行われてきたが、本研究により Pt-SALDI を用いることで葉の農薬の直接質量イメージングが可能であることが示された。

## 第 1 章

# 低分子化合物のイメージング質量分析のためのプラチナスパッタ蒸着表面支援レーザー脱離イオン化法の開発

### Abstract

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)イメージング質量分析法(IMS)は試料中の様々な化合物を同時に検出して、その局在分析が可能である手法である。しかしながら、MALDI-IMSにおいて試料のイオン化のために用いる低分子化合物の有機マトリックスは、その結晶が不均一である場合マススペクトルの再現性が低く、またその結晶を制御することは困難である。我々は、溶媒フリーでかつ有機マトリックスフリー、均一なプラチナ(Pt)フィルムを用いたイオン化法を開発した。

本研究で提案するプラチナスパッタ蒸着表面支援レーザー脱離イオン化(Pt-SALDI)-IMSは、低分子化合物の検出に適している。市販の magnetron sputtering device を用いて、スパッタリング法によって SALDI マトリックスとしての Pt フィルムを作成した。Pt フィルムは試料の上にスパッタリングによって Pt ナノ粒子の積層によって形成される。その表面は均一性の構造を示した。

Pt-SALDI の効果は、インクジェットプリンターで印刷された紙のインク成分を直接 IMS 分析できた。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)によって分離された糖類や色素、また薬物などを、抽出や濃縮することなく分析することが可能であった。本手

法は、合成高分子や生体分子、また様々な絶縁体化合物のイメージング分析に有用であることが示された。

## Introduction

有機マトリックスをイオン化支援剤として用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)は、ソフトなイオン化法であり、試料のフラグメンテーションが起こりにくい手法である。[1] 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA)や $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)のようなUV吸収性の有機酸のマトリックスが合成高分子やタンパク質、ペプチド、脂質の分析のためのMALDIマトリックスとして用いられている。[1, 2] 近年、MALDI-MSはイメージング質量分析(IMS)に用いられており、細胞切片のMALDI-IMS分析は様々な化合物を同時に検出でき、かつその局在分析が可能なることから、生物分野で大変注目されている。[3] しかしながら、MALDI-IMSにおける空間分解能(UVレーザーの照射間隔)や再現性は、UVレーザーの照射径やマトリックスの結晶サイズ、またマトリックスと試料が結晶化する際の試料位置の再配置過程に依存する。結晶化過程の制御は困難であるため、MALDI-IMSは再現性が低いことが指摘されている。さらに、多種多様なマトリックス関連イオンのピークが多く検出されてしまうため、低分子化合物(<500 Da)の検出や解析を妨害する。マトリックスの結晶はマススペクトルの質に影響する。従って、MALDI-IMSに適したマトリックスの結晶を得ることができるマトリックス調製法が求められている。MALDI-IMSは生態試料の分析のために広く用いられているが、合成高分子などの工業材料の分析に応用した例はない。その理由は、工業製品は非導電性で、かつ薄くスライスできないことが多いためであると考えられる。



MALDI-IMS における有機マトリックスの問題を回避するために、ナノ粒子(NPs) やナノ構造体基盤表面をマトリックスとして用いた有機マトリックスフリーの表面支援レーザー脱離イオン化法の研究が行われてきた。[4-17] SALDI-IMS では、グラフアイト[13-14]や、Ag, [16-17] Au, [18] Fe のナノ粒子[19]が用いられた。有機マトリックスを試料に噴霧する MALDI-IMS と同様の手法で、NPs の分散液を試料に噴霧・乾燥してから IMS 分析が行われている。しかしながら、この工程ではナノ粒子の分散液を噴霧するため、SALDI-IMS には 有機マトリックスと同様に表面の均一性による再現性の問題がある。安定して再現性よく均一に噴霧する手法は確立されていないため、再現性が低い。さらに、溶媒を用いることでマイグレーション(滲み)によって試料成分が移動する可能性がある。従って、SALDI-IMS 分析のためには、NPs を用いた SALDI に類似しておりかつ溶媒フリーの手法が求められる。このため、マトリックスとして Au を蒸着する手法が報告された。[20]

本研究では、溶媒フリーでかつ Pt ナノ粒子[21]を均一に積層して形成したフィルムを用いる Pt スパッタ蒸着表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法(Pt-SALDI-MS)の研究を行った。マグネトロンスパッタリングによって Pt ナノ粒子で形成したフィルムを用いた溶媒フリーな手法は、SALDI-IMS において次の利点があると考えられる。：  
(i) マススペクトルの Pt 関連のクラスターイオンが観測されない， [22-23] (ii) Pt は試料表面上に均一に積層されてナノ構造体フィルムを形成するため、理論的には走査型電子顕微鏡と同様の高分解能が得られる可能性がある， [24] (iii) Pt ナノ粒子による SALDI は他の金属を用いた場合よりもイオン化効率が高い。 [25-26] しかしながら、これらの利点が考えられるにもかかわらず、Pt を用いた SALDI-IMS の報告はされていない。

本研究では、低分子化合物の分析のために溶媒フリーで有機マトリックスフリーな Pt スパッタ蒸着表面支援レーザー脱離イオン化(Pt-SALDI)-IMS 法の研究を行った。印刷された紙の表面にある低分子化合物のインク成分を抽出・濃縮することなく直接分析するために、Pt-SALDI 法を用いた。また薄層クロマトグラフィー(TLC)によって分離した様々な化合物(糖類, 色素, 薬物)の直接検出を試みた。Pt-SALDI の有効性を評価するために、Au 蒸着表面支援レーザー脱離イオン化法(Au-SALDI)やマトリックスフリーのレーザー脱離イオン化法(LDI)と比較した。

## **Experimental**

### **Reagents and chemicals**

D-(+)-グルコース, マルトース, マルトトリオース, クリスタルバイオレット, ローダミン 123, ローダミン B, ベラパミル塩酸塩, クロロホルム, メタノールは Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から購入した。全ての試薬は analytical grade を用いて、精製することなく使用した。Acid Red 52, 1-aminoundecane and tetraethylene glycol の標準試料は、TCI (Tokyo, Japan)から購入した。インク成分と印刷用紙は、水とメタノールの混合物 (1 対 1) で抽出された。抽出された溶液と水溶性サンプルは、高分解能 LC/MS により分析された。

### **Imaging mass spectrometry**

IMS 実験は Nd:YAG laser (355 nm)が搭載された AutoFlex III mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany)を用いて、イオン化法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法を用いた。全てのマススペクトルは、ポジティブイオンモード、リフレクトロンモー

ドで得られた。加速と反射の電圧は、それぞれ 19 と 21 kV に設定した。レーザーの照射径は 100  $\mu\text{m}$  だった。Bruker flex Control and flex Analysis software (version 3.3)を用いて装置を制御して、基本データを得た。IMS 測定は Bruker flex Imaging software (version 2.1)を用いて行った。TLC プレート上に置いてある糖類混合試料の SALDI-IMS 分析においては、照射するレーザーの間隔を 300  $\mu\text{m}$  に設定した。その他の全ての IMS 実験は、照射するレーザーの間隔を 200  $\mu\text{m}$  に設定した。スパッタリング実験はマグネトロンスパッタリングデバイス(E-1030, HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて、4°C, 5 Pa で、20 mA の条件でターゲットイメージングサンプル上に Pt を蒸着した。スパッタリングタイムを変えることで、1 と 5, 10 や 20 nm の異なる厚さの Pt 薄膜を試料上に形成した。企業が公開しているスパッタリングのレートを参考にすると、20 秒スパッタリングをした時は 20 nm の厚さの Pt 薄膜ができたことになる。Pt 蒸着薄膜の試料は、ホルダー(#221598 MTP PAC Frame, Bruker)にとり付けられて、導電性のカーボンテープ(STR Tape, Shinto Paint, Tokyo, Japan)で固定された。サンプルとホルダーの間の距離は、テープを重ねることで調整された。マグネトロンスパッタリングデバイス (MSP-1S, Vacuum Device Inc., Ibaragi, Japan)を用いて、45 mA でサンプル上に 15 nm の厚さの Au フィルムを蒸着した。スキャン 200 回のアベレージで、SALDI マススペクトルを得た。

## **Measurement procedures**

### **Imaging of distribution of printed ink on paper**

印刷紙の試料は、市販のインクジェットプリンター(HP Business Inkjet 2800, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA)を用いて印刷して作成した。印刷パターンは、それぞれ 1 cm に分けられた 2 cm $\times$ 2 cm の正方形にした。研究で用いたインク

のモデルナンバー（マゼンタ）は，C4837AA#007 / C4837A だった．インクジェットプリンターは，インクジェットプリンターに付属されているソフトウェアの最適条件で使用した．20 nm の厚さの Pt は，印刷された紙の上に蒸着された．以下の SALDI-IMS のピークの強度分布は，上記のソフトウェアを用いて解析された．

### **Imaging of distribution of analytes separated by TLC**

TLC 分分離は市販の glass-backed silica gel plates (TLC silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行った．10 mM の糖類の混合物 (d-(+)-glucose, maltose, and maltotriose) の水溶性溶液は，gel plate にスポットされた．TLC で分離された糖類は，クロロホルムとメタノール，水の移動相に浸されている 1.5 cm × 5 cm glass chambers を用いて分析された．TLC プレーートの表面は厚さ 20 nm の Pt 薄膜を用いた Pt-SALDI-IMS によって分析された．同様に，1mM 薬物混合物 (propranolol hydrochloride and verapamil hydrochloride) と、1 mM 色素混合物 (crystal violet, Rhodamine 123, and Rhodamine B) を用いて行われた．薬物混合物と色素混合物の TLC 分離のために用いた移動相は，ethyl acetate/methanol/formic acid/water (40 /20 /6 /3) 溶液と、ethyl acetate/methanol/acetic acid/water (17 /6 /0.1 /1.5) 溶液だった．

### **LC/MS/MS**

Prominence HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) を結合させた高分解能質量分析計 orbitrap mass spectrometer (LTQ Orbitrap, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) を用いて，インクジェットプリントされた紙のインク成分や添加剤の分析を行った．HPLC

では KINETEX C18 octadecylsilane column (2.6  $\mu\text{m}$ , 2.1mm  $\times$  50 mm; Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA)を用いた。移動相は、A: 0.1%酢酸アンモニウム水溶液と B: アセトニトリルを用いた。A:B=10:90 (0分)から 100:0 (9–20分)へのプログラムを用いてグラジエントモードで分離を行った。流速は 0.4 mL/min でカラム温度は 50°C, エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いてポジティブイオンモードで分析を行った。N<sub>2</sub> シースガス流速は 50 (indicated scale), N<sub>2</sub> 噴霧ガス流速は 5, ソース電圧は 3.0 kV, キャピラリー電圧は 20 V, チューブ電圧は 90 V, スキャンレンジは  $m/z$  105–2000 で, MS/MS のためのコリジョンエネルギーは 45 eV で行った。

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

カーボンコーティング Cu の TEM グリッド上に Pt スパッタ蒸着を行い, TEM イメージは H-8000 transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)を用いて加速電圧 200 kV で分析した。

### **Results and discussion**

Pt スパッタ蒸着 SALDI-IMS 法を用いた 2次元イメージング分析の図を Fig. 1a に示した。均一な厚さ 20 nm の Pt 薄膜は試料の上にスパッタ蒸着された。Pt 薄膜の TEM 画像を Fig. 1b に示した。TEM の拡大画像を確認すると, スパッタ蒸着された Pt 薄膜は Pt ナノ粒子が凝集したものであることがわかった。(Fig. 1c) その TEM 画像の赤矢印で示した部分は, Pt 薄膜上に存在する多数の穴を指し示している。

## Inkjet printing

インクジェットプリント法は、高品質な画像を低コストで得ることができるため、広く用いられている。一般的なインクジェットのインクは染料や色素顔料、溶媒、水溶性溶剤、界面活性剤、また殺生物剤や pH 緩衝剤、可溶化剤、キレート剤のような添加剤で構成されている。インクジェットプリント過程を最適化することは、インクの顔料やその他の成分の局在を理解するために重要である。これまで、インクジェットのインク成分の質量イメージング分析は飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOFSIMS) を用いて行われていた。 [27-29]

インク成分の局在分析を行うために、既知のインク成分(マゼンタ)を含むインクで印刷された紙を試料として用いて、Pt スパッタ蒸着 SALDI-MS 分析を行った。SALDI-MS におけるスパッタ蒸着された Pt 薄膜の厚さの影響を評価した。スパッタリングの時間を変更することで、厚さ 1, 5, 10, 20 nm の Pt 薄膜を得た。プリント紙のマゼンタインクの SALDI スペクトルでは、マゼンタインク色素のピーク ( $m/z$  603) が観測された (Fig. 4a) Fig. 2 は SALDI-MS で用いたレーザーの強度や Pt 薄膜の厚さに対する  $m/z$  603 のピークのイオン強度のプロットである。1 nm の厚さの Pt 薄膜の場合、レーザー強度を 100% にしてもマゼンタインクのピークは低かった。Pt 薄膜の厚さが厚いほど、イオン強度は低かった。この結果は、Pt 薄膜は SALDI のイオン化効率に影響することを示唆した。しかしながら、この結果から一つの疑問が得られる。Pt の量が少ない場合は LDI によって検出できるように思えるが、なぜ UV 吸収性のプリント紙のインク成分は検出されなかったのかということである。一つの理由としては、絶縁体としての紙の性質である。生成イオンの脱離や MS への導入のためには、試料の導電性が必要である。試料に導電性がない場合は、極めて薄い試料を導電性ターゲットプレート上に置かなければならない。適切な量の Pt は試料に導電性を付与

して、かつ十分な SALDI 効果が得られるため、検出感度が高かったことが考えられる。

次に、インクジェットプリントされた紙のインク成分やその他の成分の局在分析のために、SALDI-IMS 分析を行った。さらに、UV によって分解したインク成分の評価も行った。プリントされた紙のインクジェットインクの色は太陽光によって色あせてしまう。太陽光によるインク成分の分解物をすることは重要であると考えている。Fig. 3a はインクジェットのマゼンタのインクが印刷された紙のイメージ画像である。Fig. 3a のプリント紙中の円で囲われた部分に、30 分間 UV 光を照射した。UV 光を照射されたマゼンタインクの色は変化した。このことは、インク成分が分解されたことを示している。20 nm の Pt をスパッタ蒸着すると、プリント紙の色はグレーになった。(Fig. 3b) Pt スパッタされたプリント紙の SALDI マススペクトルを Fig. 4 に示した。マゼンタインク色素( $m/z$  603)やそれ以外の未知のインク成分( $m/z$  172 and 217)が多数検出された。(Fig. 4a) 紙上の印刷されていない領域から検出された未知成分は  $m/z$  393 であった。(Fig. 4c)

未知成分やマゼンタインク色紙の構造を決定するために、水：メタノール(1:1)溶媒を用いてそれらの成分をプリント紙から抽出した。高分解能の LC/MS を用いて、マゼンタインク成分の  $m/z$  603 や、未知成分の  $m/z$  172 と 217 の同定を行った。(Fig. 5 と 6)。プリント紙から抽出した成分のリテンションタイムと精密質量を評価した。標準試料には Acid Red 52, 1-aminoundecane と tetraethylene glycol を用いた。 $m/z$  603 のイオンは、LC-MS で得られたリテンションタイム 3.4 分にピークが得られた。(Fig. 5(b)) LC/MS の結果では、リテンションタイム 3.4 分では  $m/z$  559 のイオンが検出されていた。(Fig. 6(a))。マゼンタインク色素のリテンションタイムと精密質量は (Fig. 5(b)と 6(a)) 両方とも標準試料の Acid Red 52 に一致することがわかった。(Fig. 5(c)と 6(b))。

精密質量分析によって、質量誤差 ppm 以下で  $m/z$  559.16 イオンの組成は  $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2$  であり、それはプロトン化 Acid Red 52 ( $[M+H]^+$ )であることがわかった。したがって、Pt-SALDI-MS で検出された  $m/z$  603 のイオンは おそらく Acid Red 52 の  $[M-2H+2Na]^+$ イオンであることが考えられる。

同様に  $m/z$  172 と 217 の二つの未知成分のリテンションタイムと精密質量を評価した。標準試料には 1-aminoundecan と tetraethylene glycol を用いた。リテンションタイム 3.8 分の  $m/z$  172 の成分は (Fig. 5(d)と 6(c)), 1-aminoundecane の結果(Fig. 5(e)と 6(d))に一致して、その  $m/z$  172 は 1-aminoundecane の  $[M+H]^+$ イオンであることがわかった。リテンションタイム 0.6 分の  $m/z$  195 成分は(Fig. 5(f)と 6(e)), tetraethylene glycol の結果(Fig. 5(g)と 6(f))と一致して、  $m/z$  217 は tetraethylene glycol の  $[M+Na]^+$  イオンであることがわかった。さらに、インク成分や標準試料の LC/MS/MS によって、上記の、質量 559.16 の成分は Acid Red 52 の  $[M+H]^+$ であることが確認された。

インクジェットプリントされた紙の SALDI-IMS の結果は、インク染料や他の成分の局在を示した。(Fig. 7) Acid Red 52 の色素( $m/z$  603)や 1-aminoundecane ( $m/z$  172), tetraethylene glycol( $m/z$  217)やマゼンタインクの局在を示す SALDI-IMS イメージ画像はインクジェット印刷された紙のスキャン画像と重ねて示した。(7(a-c) これらの画像では、マゼンタインクの印刷パターンが示されている。イメージ画像から未知成分 ( $m/z$  393)は、印刷されていない領域で検出されていることがわかった。(Fig. 7d) 印刷紙に UV 光を照射することで、マゼンタ色素( $m/z$  603) のイオン強度が減少して(Fig. 7a, 円でマークした部分), 色素の分解が示唆された。さらに、UV 光の照射によって SALDI マススペクトルにおける 1-aminoundecane ( $m/z$  172)や tetraethylene glycol ( $m/z$  217) のピークのイオン強度減少した。(Fig. 4(b)).この理由は、UV 光によってこれらの添加剤が分解したためであると考えられる。UV 光の照射前は、1-aminoundecane の  $m/z$  172



のピーク面積は 3874 (任意の単位) であり, UV 光照射後は 2864 であった. tetraethylene glycol の  $m/z$  217 のピーク面積は, UV 光照射前は 1075 で UV 光照射後は 547 であった. しかし, UV 光照射後には  $m/z$  186 と 188 の新しいピークが検出された. (Fig. 4(b)). これらのピークは, それぞれ UV 光が照射された領域で観測された. (Figs. 7(e)- (f)) これらのピークは UV 光によって分解したインク成分であることが考えられる. これらは 1-aminoundecane の UV 光による酸化体の  $[M+H]^+$  であることが考えられる.

これらの結果は Pt-SALDI-IMS が, インクジェットインクの成分の局在分析だけでなく, その UV 光による分解物の局在分析とその構造解析のための手法の一つとなることを示唆している.

## TLC/MS

TLC はシンプルで安価, かつ簡単な分離技術であるため, 化学や生化学の化合物の分離のために広く用いられている. しかし, TLC だけでは TLC 分離された化合物の同定は困難である. 近年, TLC と質量分析を組み合わせた TLC/MS 法が開発されて, TLC 分離された成分を直接質量分析と構造解析する手法が報告された. [30-35] TLC は特に低分子量化合物の分離に利用されているため, TLC/SALDI-IMS は TLC で分離された低分子量化合物の分析に用いられた. [30a] TLC によって分離された低分子量化合物は Pt-SALDI-IMS によって, 成分の抽出プロセスを経ることなく直接的に分析できる可能性がある. MALDI ではマトリックスとして用いる UV 吸収性の有機化合物の溶液を試料に噴霧するため, 試料が滲んで正しい局在情報が得られない場合があると考えられる. しかし, Pt-SALDI のような溶媒フリーの手法は, TLC プレート上で分離された化合物が滲むことなくその場に留まったまま分析が可能であるため, 有効であることが考えられる.

Pt-SALDI と Au-SALDI, また LDI-MS を比較して評価した. Crystal Violet と Rhodamine 123, Rhodamine B をモデル色素として用いて, 背面側は絶縁体のガラスの TLC プレート上の色素をイオン化して検出する実験を行った. ガラス背面の TLC プレートは TLC 分析においてよく用いられているが, TLC/MALDI-MS で用いることはできない. その理由は, MALDI は試料表面上が導電性であるか, 薄い絶縁体でなければならぬためである. したがって, 特殊なアルミニウム背面の導電性 TLC プレートを用いて TLC/MALDI-MS が行われている. この問題は, Pt-や Au-SALDI で導電性金属薄膜マトリックスを用いることで解消できる. 蒸着される金属薄膜は導電性を寄与するだけでなく SALDI のマトリックスとしても機能する. Figure 8 はガラス背面 TLC プレート上の Crystal Violet, や Rhodamine B, Rhodamine 123 色素の Pt-や Au-SALDI また LDI マススペクトルを示している. 色素のピークのイオン強度を Fig. 9 に示した. これらのイオンはスペクトルで検出された: Crystal Violet の  $m/z$  372 のピーク ( $[M-Cl]^+$ ) や, Rhodamine B の  $m/z$  443 のピーク ( $[M-Cl]^+$ ), また Rhodamine 123 の  $m/z$  345 のピーク ( $[M-Cl]^+$ ) が観測された. (Fig. 8) しかしながら, 約 60% のレーザー強度で得られた色素の平均ピーク強度は Au-SALDI よりも Pt-SALDI の場合の方が高かった. (Fig. 9) LDI の場合の色素のピーク強度は, これらの結果よりもさらに低かった. この結果は, Pt-SALDI は Au-SALDI や LDI よりも TLC 上の色素を検出するための手法として最も効果的であることを示唆した. Pt 薄膜の穴のある構造は TEM によって確認することができた. (Fig. 1c), SALDI-MS の Pt 薄膜下にある試料のイオンはその穴を通過して MS に導入されることが考えられる. さらに Au よりも Pt は熱伝導性が低いため, 局所的な急速加熱が起こり, Au よりも Pt の方が目的試料のソフトなイオン化と脱離が実現されたことが考えられる. [25] このように金属の性質がそれぞれことなるため, Pt や Au ベースの SALDI-MS のための最適条件は, それぞれ異なることもわかった.

Pt-SALDI は TLC プレート上の混合された色素(Crystal Violet や Rhodamine B, Rhodamine 123)の局在分析に用いることが出来る. Pt 蒸着された TLC の写真からは, 青色スポットで Crystal Violet, 赤色スポットで Rhodamine B を示されたが, Rhodamine 123 のスポットを確認することはできなかった. (Fig. 10a) 一方, Pt-SALDI-IMS イメージ画像は分離した 3 種類の試料スポットを示した. (Fig. 10b) A スポットの成分は Crystal Violet の  $m/z$  372 ( $[M-Cl]^+$ )の特徴的な同位体パターンを示した. 同様に, スポット B と C も, Rhodamine B の  $m/z$  443 ( $[M-Cl]^+$ )や Rhodamine 123 の  $m/z$  345 ( $[M-Cl]^+$ )であり, それぞれ同定された. これらの色素のマススペクトルを Fig. 10c-e に示した.

TLC で分離した糖類の混合物試料( d-(+)-glucose, maltose, maltotriose)の分析に, Pt-SALDI-IMS を応用した. TLC 分離した後のシリカプレートの写真を Fig. 11a に示した. 写真からは分離された糖類の局在を確認することは困難であった. Fig. 11b では, 分離された糖類の局在がそれぞれ A-C で示されている. TLC プレート上で分離された糖類を簡単に同定することができた. 青色スポットの A は d-(+)-glucose のナトリウム付加体( $[M+Na]^+$ )で, その質量は  $m/z$  203 であった. (Fig. 11c) 同様に, スポット B と C はそれぞれ, maltose のナトリウム付加体( $m/z$  365)と maltotriose のナトリウム付加体( $m/z$  527)であった. (Fig. 11d-e) Pt-SALDI-IMS は TLC で分離した薬物の混合物(propranolol と verapamil)の分析にも, Pt-SALDI-IMS を適用したところ, 糖類の場合と同様にそれらの局在を確認することができ, 同定もできた. 以上より, Pt-SALDI-IMS は TLC プレート上で分離できたもの, または分離しきれずに重なってしまったスポットの試料をそれぞれ可視化して, 同定することが可能であった. TLC/Pt-SALDI-IMS は試料の同定に有用であることが示された.

## Conclusions

一般的な MALDI-IMS は紙のような厚い絶縁体の分析は困難である。しかし、Pt ナノ粒子が積層された Pt 薄膜を用いた溶媒フリーの SALDI-IMS (Pt-SALDI)は、インクジェットプリントされた紙のインク成分の分析が可能であった。TLC と Pt-SALDI を組み合わせた手法は、分離された試料の同定と構造評価が可能であることが示された。またこの手法は、溶媒による試料の抽出過程を必要としないため、シンプルで簡便かつ直接的な分析法である。本手法は生体関連材料だけでなくポリマー等の工業材料の分析に広く応用できることがわかった。

## References

- [1] M. Karas, F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299.
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151.
- [3] D. S. Cornett, M.L. Reyzer, P. Chaurand, R. M. Caprioli. MALDI imaging mass spectrometry: Molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods*, **2007**, 4, 828.
- [4] Y. Sugiura, S. Shimma, M. Setou. Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 8227.
- [5] T.R. Northen, O. Yanes, M.T. Northen, D. Marrinucci, W. Uritboonthai, J. Apon, S. L. Golledge, A. Nordström, G. Siuzdak. Clathrate nanostructures for mass spectrometry. *Nature*, **2007**, 449, 1033.
- [6] W. Reindl, T. R. Northen. Rapid screening of fatty acids using nanostructure-initiator mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 3751.
- [7] M. P. Greving, G. J. Patti, G. Siuzdak. Nanostructure-initiator mass spectrometry metabolite analysis and imaging. *Anal. Chem.* 2011, 83, 2.
- [8] G. J. Patti, H. K. Woo, O. Yanes, L. Shriver, D. Thomas, W. Uritboonthai, J. V. Apon, R. Steenwyk, M. Manchester, G. Siuzdak. Detection of carbohydrates and steroids by cation-enhanced nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) for biofluid analysis and tissue imaging. *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 121.

- [9] Q. Liu, Y. Xiao, C. Pagan-Miranda, Y. M. Chiu, L. He. Metabolite imaging using matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (ME-SALDI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, 20, 80.
- [10] Q. Liu, L. He. Ionic matrix for matrix-enhanced surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (ME-SALDI-MSI). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, 20, 2229.
- [11] A. Svatos. Mass spectrometric imaging of small molecules. *Trends Biotechnol.*, **2010**, 28, 425.
- [12] Y. Sugiura, M. Setou. Imaging mass spectrometry for visualization of drug and endogenous metabolite distribution: Toward in situ pharmacometabolomes. *J Neuroimmune Pharmacol.*, **2010**, 5, 31.
- [13] S. Cha, E. S. Yeung. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and MS<sub>n</sub> of small molecules. 1. Imaging of cerebroside directly from rat brain tissue. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 2373.
- [14] H. Zhang, S. Cha, E. S. Yeung. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MS<sub>n</sub> of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits. *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 6575.
- [15] S. Cha, H. Zhang, H. I. Ilarslan, E. S. Wurtele, L. Brachova, B. J. Nikolau, E. S. Yeung. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Plant J.*, **2008**, 55, 348.
- [16] T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, M. Setou. Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 1446.

- [17] S. Cha, Z. Song, B. J. Nikolau, E.S. Yeung. Direct profiling and imaging of epicuticular waxes on *Arabidopsis thaliana* by laser desorption/ionization mass spectrometry using silver colloid as a matrix. *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 2991.
- [18] G. Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, M. Setou. The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 1940.
- [19] S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichiyanagi, M. Setou. Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 4761.
- [20] H. W. Tang, W. Lu, C. M. Che, K. M. Ng. Gold Nanoparticles and imaging mass spectrometry: double imaging of latent fingerprints. *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 1589.
- [21] H. Kawasaki, T. Yonezawa, T. Watanabe, R. Arakawa. Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 16278.
- [22] A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, T. Yonezawa, R. Arakawa. Gold-nanoparticle-supported silicon plate with polymer micelles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides. *J. Nanosci. Nanotech.*, **2009**, 9, 159.
- [23] R. Liu, J. -F. Liu, X. -X. Zhou, G. -B. Jiang. Cysteine modified small ligament Au nanoporous film: An easy fabricating and highly efficient surface-assisted laser desorption/ionization substrate. *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 3668.
- [24] I. Stokroos, D. Kalicharan, J. J. L. Van der Want, W. L. Jongbloed. Comparative study of thin coating of Au/Pd. Pt and Cr produced by magnetron sputtering for FE-SEM. *J. Microsc.*, **1998**, 189, 79.
- [25] T. Yonezawa, H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada, F. Mafune.

- Detailed investigation on the possibility of nanoparticles of various metal elements for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **2009**, 25, 339.
- [26] C. -K. Chiang, N. -C. Chiang, Z.-H. Lin, G. -Y. Lan, Y.-W. Lin, H. -T. Chang. Nanomaterial-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of Peptides and Proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 1204.
- [27] J. S. Dalton, J. S. Preston, P. J. Heard, G. C. Allen, N. J. Elton, J. C. Husband. Investigation into the distribution of ink components throughout printed coated paper: Part 2: Utilising XPS and SIMS. *Colloids Surf. A*, **2002**, 205, 199-213.
- [28] P. J. Heard, J. S. Preston, D. J. Parsons, J. Cox, G. C. A. Husband. Visualisation of the distribution of ink components in printed coated paper using focused ion beam techniques. *Colloids Surf. A*, **2004**, 244, 67.
- [29] A. Filenkova, E. Acosta, P.M. Brodersen, R. N. S. Sodhi, R. Farnood. Distribution of inkjet ink components via ToF-SIMS imaging. *Surf. Interface Anal.*, **2011**, 43, 576.
- [30] Y. -C. Chen, J. Shiea, J. Sunner. Thin-layer chromatography–mass spectrometry using activated carbon, surface-assisted laser desorption/ionization. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826, 77.
- [31] A. I. Gusev, O. J. Vasseur, A. Proctor, A. G. Sharkey, D.M. Hercules. Imaging of thin-layer chromatograms using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 4565.
- [32] T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Kimoto, R. Arakawa. Characterization of polyether mixtures using thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, 787.
- [33] B. Fuchs, R. Süß, A. Nimptsch, J. Schiller. MALDI-TOF-MS directly combined with TLC: A review of the current state. *Chromatographia Supplement* 2009, 69, 95.



- [34] S. C. Cheng, M. Z. Huang, J. Shiea. Thin layer chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 2700.
- [35] T. Tuzimski. Application of different modes of thin-layer chromatography and mass spectrometry for the separation and detection of large and small biomolecules. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 8799.

## Figure Legend

Fig. 1. (a) Schematic of Pt vapor deposition SALDI-IMS for 2D imaging analysis. (b) TEM image of the Pt layer deposited on the TEM grid using the same procedure as that used in Pt vapor deposition SALDI-IMS. (c) Expanded TEM image of (b).

Fig. 2. Plot of intensity of the peak at  $m/z$  603 for the magenta ink pigment versus laser intensity (%) for SALDI-IMS using deposited Pt films of various thicknesses. By changing the sputtering time, we prepared Pt films with surface thicknesses of 1, 5, 10, and 20 nm.

Fig. 3. (a) Optical image of a paper printed with magenta inkjet ink. A portion of the printed paper, denoted by the circle, was exposed to UV light for 30 min (b) Optical image of the printed paper after deposition of the Pt layer.

Fig. 4. SALDI mass spectra of the inkjet-printed paper with the deposited Pt layer for the (a) printed region, (b) printed region after exposure to UV light, (c) unprinted region, and (d) unprinted region after exposure to UV light. Laser intensity is 70%.

Fig. 5. LC/MS chromatograms: (a) total ion chromatogram for extract of inkjet printing. Mass chromatograms for (b) extract of inkjet printing ( $m/z$  559.16), (c) Acid Red 52 (TCI) ( $m/z$  559.16), (d) extract of inkjet printing ( $m/z$  172.21), (e) 1-aminoundecane ( $m/z$  172.21), (f) extract of inkjet printing ( $m/z$  195.12), (g) tetraethylene glycol (TCI) ( $m/z$  195.12).

Fig. 6. LC/MS mass spectra of (a) extract of inkjet printing (RT = 3.4 min), (b) for Acid Red 52 (RT = 3.5 min), (c) extract of inkjet printing (RT = 3.8 min), (d) 1-aminoundecane (RT = 3.8 min), (e) extract of inkjet printing (RT = 0.6 min), and (f) tetraethylene glycol (RT = 0.5 min).

Fig. 7. SALDI-IMS images for (a) Acid Red 52 ( $m/z$  603), (b) 1-aminoundecane additive in the ink ( $m/z$  172), and (c) tetraethylene glycol additive ( $m/z$  217). (d) SALDI-IMS image of an unknown component ( $m/z$  393) in the unprinted paper. (e) and (f) SALDI-IMS images of the degradation products of 1-aminoundecane additive ( $m/z$  186 and 188). UV-irradiated regions are encircled by the dotted line. Laser intensity is 70%.

Fig. 8. SALDI mass spectra of the pigments (Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123) on glass-backed TLC plates using the following techniques: (a), (d), and (g) Pt deposition; (b), (e), and (h) Au deposition; (c), (f) and (i) LDI (i.e., no metal deposition). Laser intensity is 60%.

Fig. 9. Peak intensities of Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123 separated on glass-backed TLC plate, in Pt vapor deposition SALDI-IMS, Au vapor deposition SALDI-IMS, and LDI-MS (no metal deposition). The peak intensities are averaged over three independent experiments. Laser intensity is 60 %.

Fig. 10. Photograph of TLC silica plate after separation of Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123. (b) SALDI-IMS image showing the location of the separated pigments on the TLC plate. Spots A, B, and C are due to Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123, respectively. Pt vapor deposition SALDI mass spectra of (c) spot A, (d) spot B, and (e) spot C. Laser intensity is 40%.

Fig. 11. (a) Photograph of TLC silica plate after separation of a saccharide mixture ( d-(+)-glucose, maltose, and maltotriose). (b) SALDI-IMS image showing the location of the separated saccharides on the TLC plate. Spots A, B, and C are due to glucose, maltose, and maltotriose, respectively. Pt vapor deposition SALDI mass spectra of (c) spot A, (d) spot B, and (e) spot C. Laser intensity is 50%.

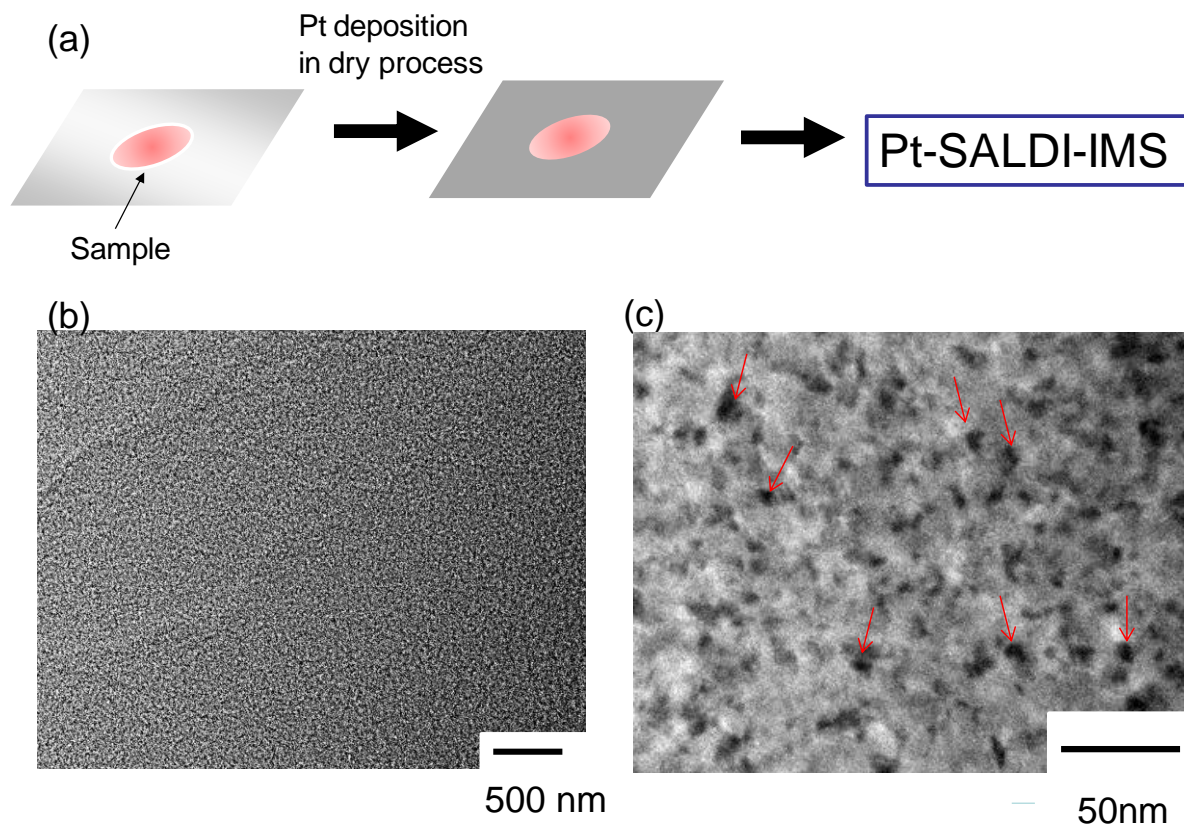


Fig. 1. (a) Schematic of Pt vapor deposition SALDI-IMS for 2D imaging analysis. (b) TEM image of the Pt layer deposited on the TEM grid using the same procedure as that used in Pt vapor deposition SALDI-IMS. (c) Expanded TEM image of (b).

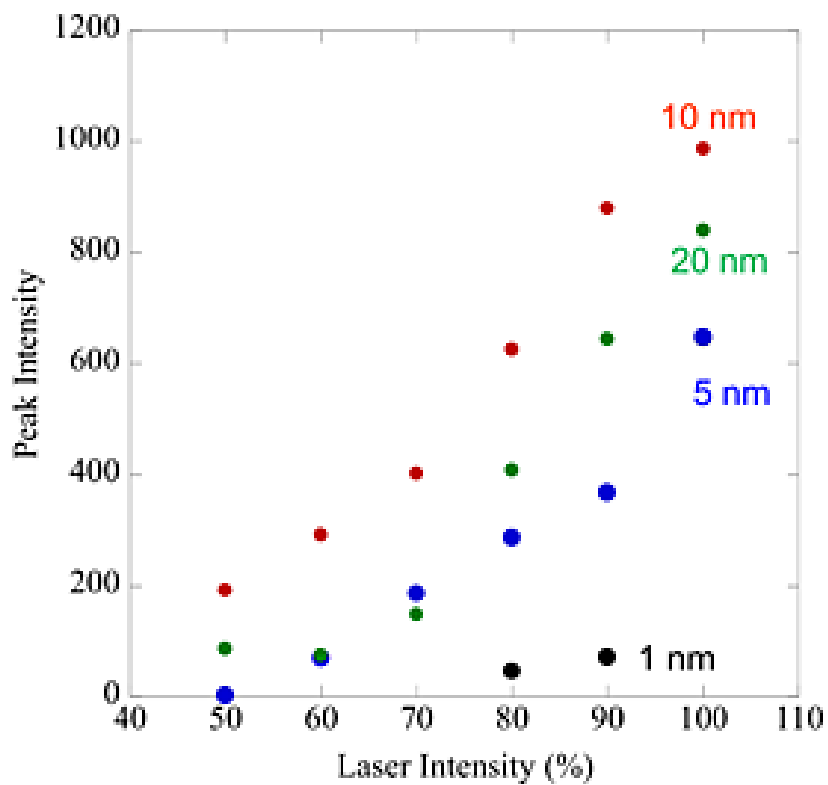


Fig. 2. Plot of intensity of the peak at  $m/z$  603 for the magenta ink pigment versus laser intensity (%) for SALDI-IMS using deposited Pt films of various thicknesses. By changing the sputtering time, we prepared Pt films with surface thicknesses of 1, 5, 10, and 20 nm.

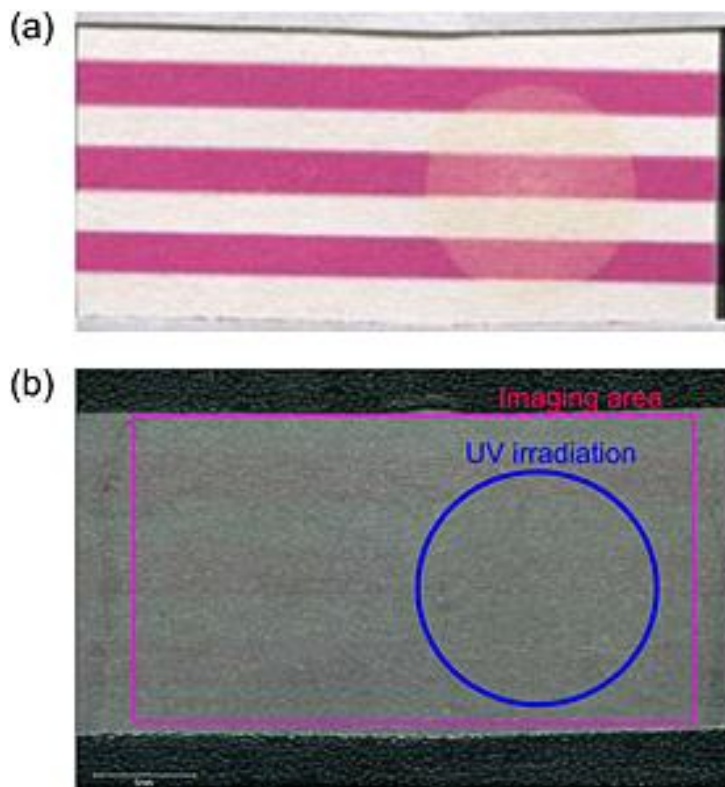


Fig. 3. (a) Optical image of a paper printed with magenta inkjet ink. A portion of the printed paper, denoted by the circle, was exposed to UV light for 30 min (b) Optical image of the printed paper after deposition of the Pt layer.

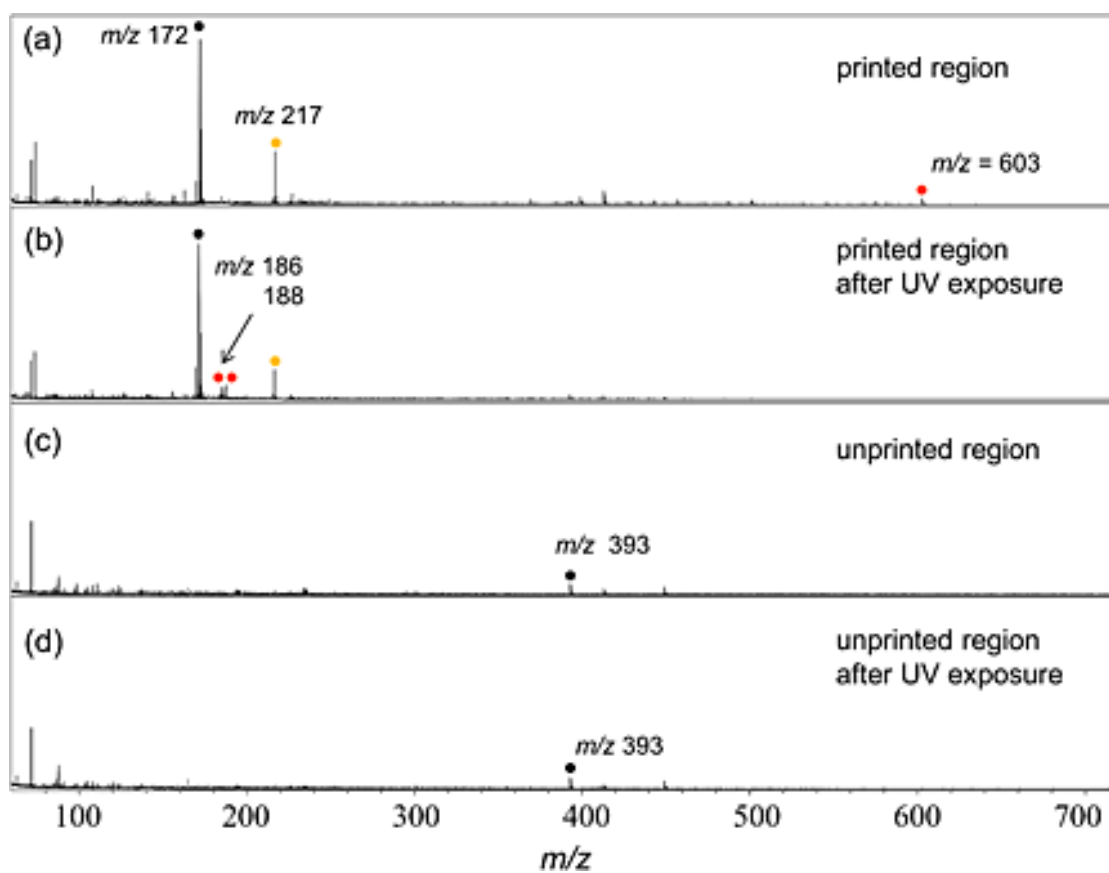


Fig. 4. SALDI mass spectra of the inkjet-printed paper with the deposited Pt layer for the (a) printed region, (b) printed region after exposure to UV light, (c) unprinted region, and (d) unprinted region after exposure to UV light. Laser intensity is 70%.

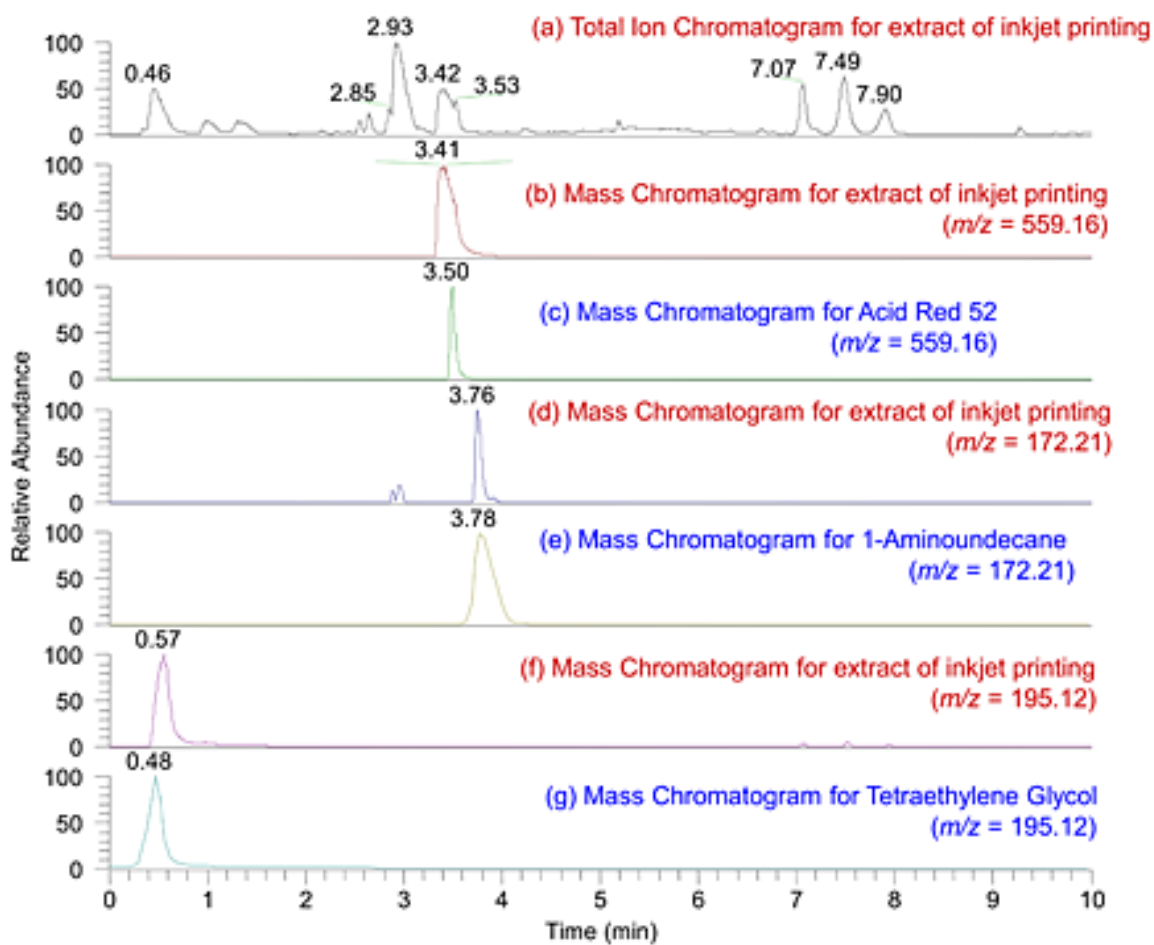


Fig. 5. LC/MS chromatograms: (a) total ion chromatogram for extract of inkjet printing. Mass chromatograms for (b) extract of inkjet printing ( $m/z$  559.16), (c) Acid Red 52 (TCI) ( $m/z$  559.16), (d) extract of inkjet printing ( $m/z$  172.21), (e) 1-aminoundecane ( $m/z$  172.21), (f) extract of inkjet printing ( $m/z$  195.12), (g) tetraethylene glycol (TCI) ( $m/z$  195.12).



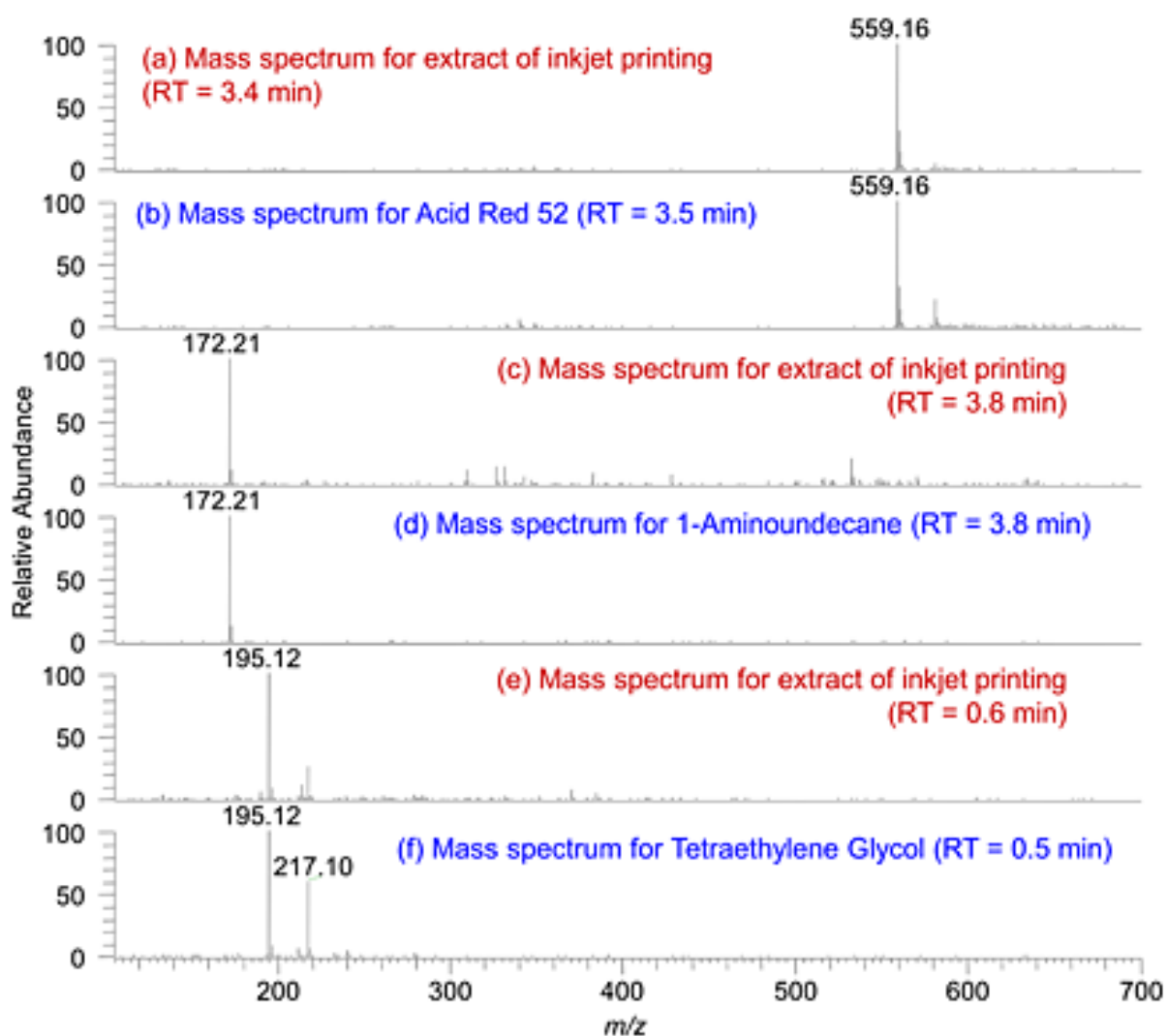


Fig. 6. LC/MS mass spectra of (a) extract of inkjet printing (RT=3.4 min), (b) for Acid Red 52 (RT=3.5 min), (c) extract of inkjet printing (RT=3.8 min), (d) 1-aminoundecane (RT=3.8 min), (e) extract of inkjet printing (RT=0.6 min), and (f) tetraethylene glycol (RT=0.5 min).

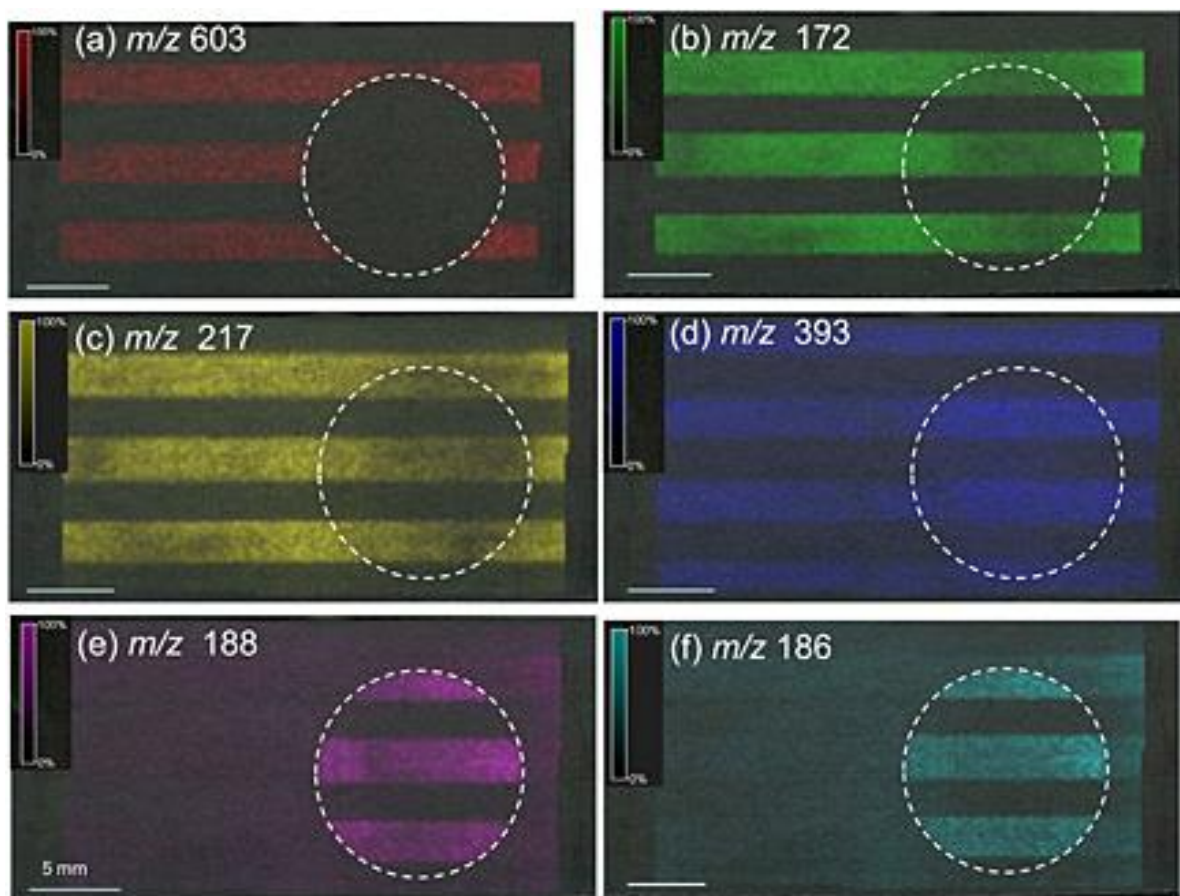


Fig. 7. SALDI-IMS images for (a) Acid Red 52 ( $m/z$  603), (b) 1-aminoundecane additive in the ink ( $m/z$  172), and (c) tetraethylene glycol additive ( $m/z$  217). (d) SALDI-IMS image of an unknown component ( $m/z$  393) in the unprinted paper. (e) and (f) SALDI-IMS images of the degradation products of 1-aminoundecane additive ( $m/z$  186 and 188). UV-irradiated regions are encircled by the dotted line. Laser intensity is 70%.

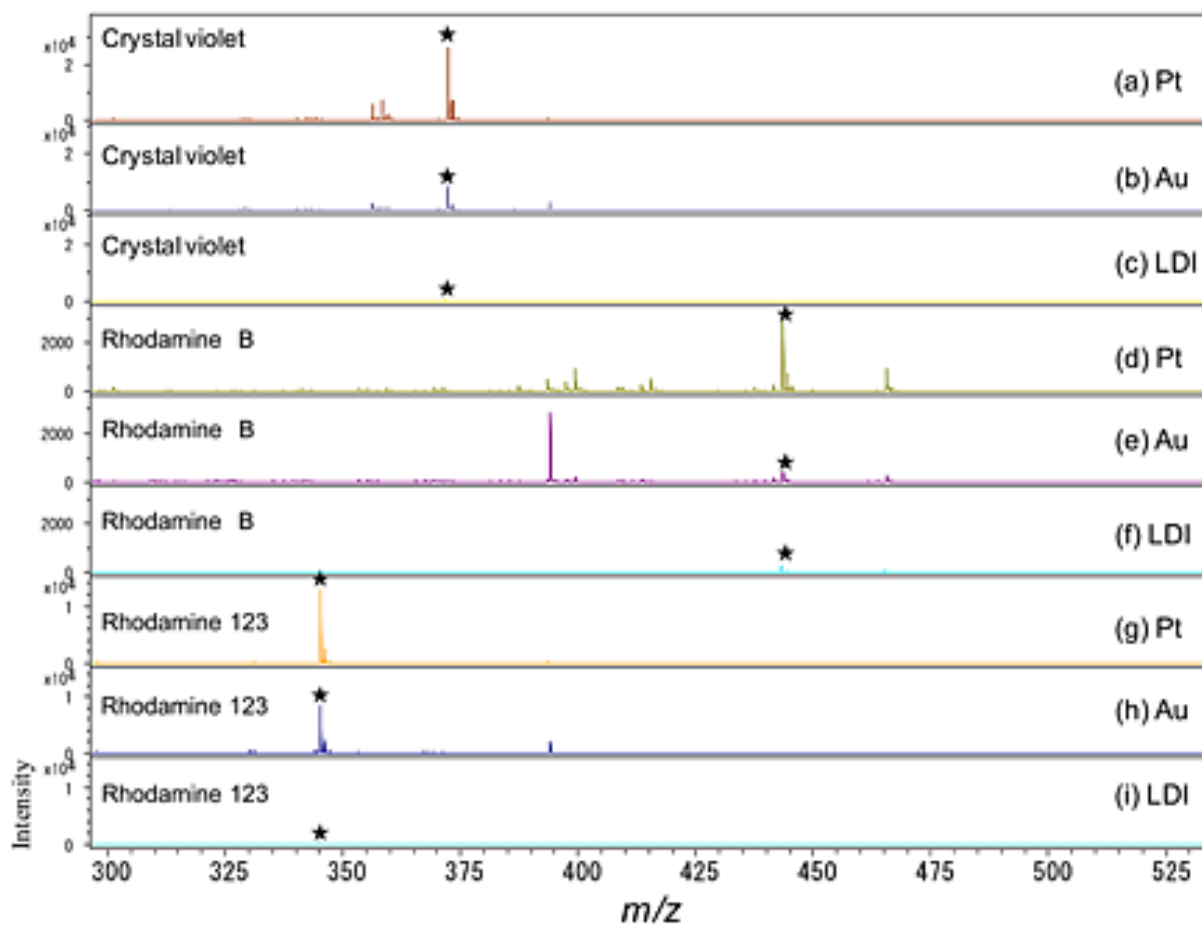


Fig. 8. SALDI mass spectra of the pigments (Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123) on glass-backed TLC plates using the following techniques: (a), (d), and (g) Pt deposition; (b), (e), and (h) Au deposition; (c), (f) and (i) LDI (i.e., no metal deposition). Laser intensity is 60%.

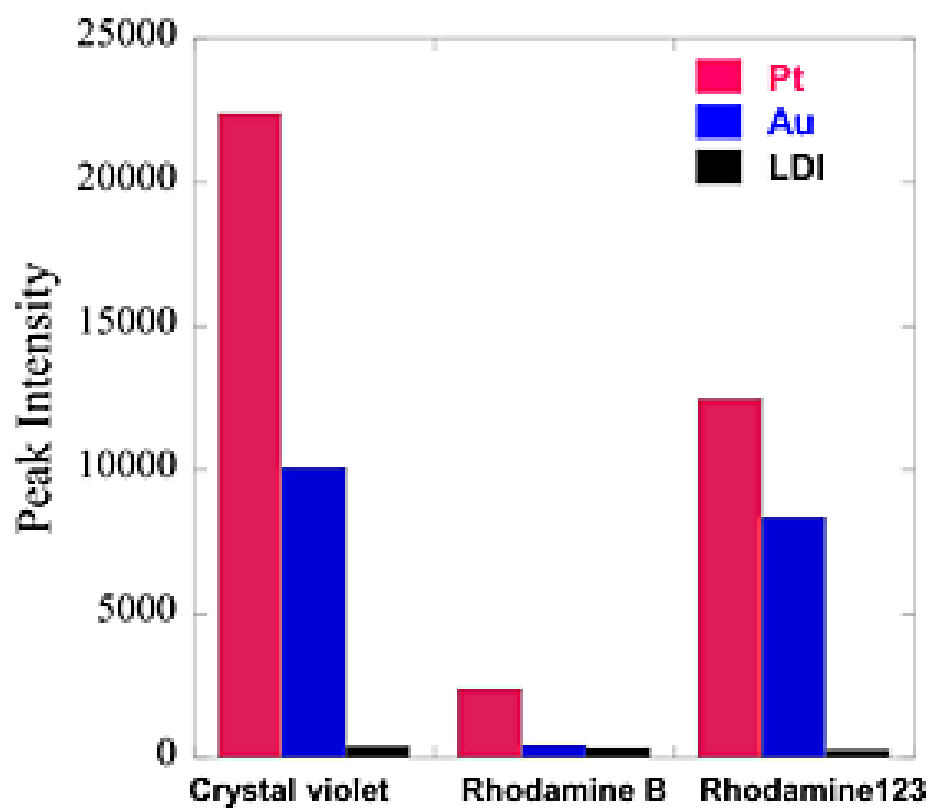


Fig. 9. Peak intensities of Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123 separated on glass-backed TLC plate, in Pt vapor deposition SALDI-IMS, Au vapor deposition SALDI-IMS, and LDI-MS (no metal deposition). The peak intensities are averaged over three independent experiments. Laser intensity is 60 %.

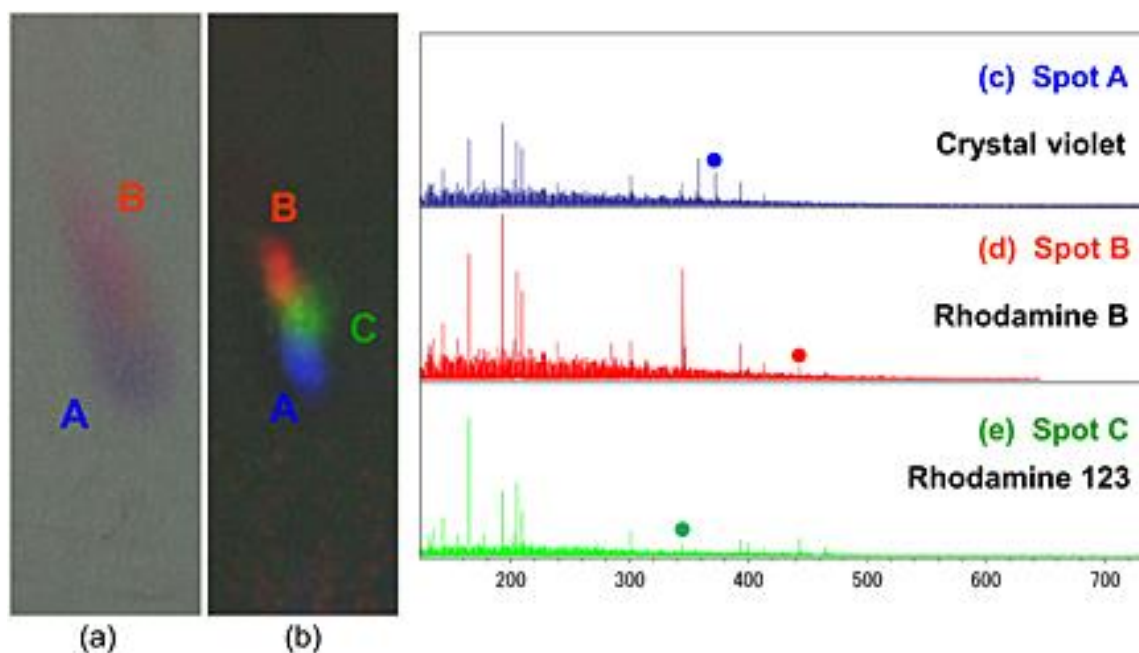


Fig. 10. Photograph of TLC silica plate after separation of Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123. (b) SALDI-IMS image showing the location of the separated pigments on the TLC plate. Spots A, B, and C are due to Crystal Violet, Rhodamine B, and Rhodamine 123, respectively. Pt vapor deposition SALDI mass spectra of (c) spot A, (d) spot B, and (e) spot C. Laser intensity is 40%.

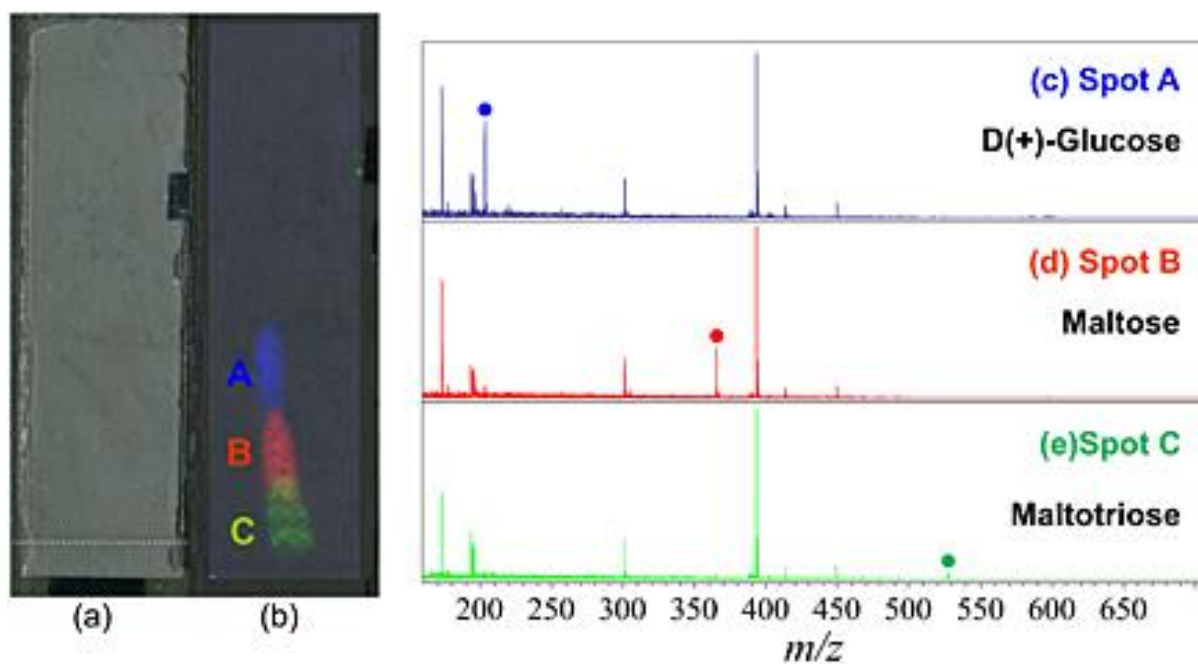


Fig. 11. (a) Photograph of TLC silica plate after separation of a saccharide mixture ( d-(+)-glucose, maltose, and maltotriose). (b) SALDI-IMS image showing the location of the separated saccharides on the TLC plate. Spots A, B, and C are due to glucose, maltose, and maltotriose, respectively. Pt vapor deposition SALDI mass spectra of (c) spot A, (d) spot B, and (e) spot C. Laser intensity is 50%.

## 第 2 章

# スパッタリング法で生成したプラチナフィルムを用いたマトリックスエンハンス表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法によるホスファチジルコリンとグリセロ脂質の同時検出

### Abstract

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-イメージング質量分析法(IMS)は脳細胞中の様々な画乳成分を検出して画像化することができる手法である。しかしながら、MALDI-IMS においてはホスファチジルコリン(PC)が大過剰に検出されることで起こるイオンサプレッション(イオン化抑制)効果により、ジアシルグリセロール(DAG)やトリアシルグリセロール(TAG)などのグリセロ脂質を検出することは困難であった。本研究では、脳細胞切片中のグリセロ脂質を検出するために、均一性の金属薄膜(フィルム)を用いて IMS を行った。スパッタリング法で生成したプラチナ(Pt)フィルムを用いた表面支援レーザー脱離イオン化(Pt-SALDI)-IMS を脂質分析に適用した。Pt-SALDI 法は MALDI とは異なり、溶媒フリーでかつマトリックスフリーな手法である。Pt-SALDI の Pt フィルムは、ラット脳細胞切片の表面上に生成された。MALDI は PC を検出できるが、グリセロ脂質を検出することはできなかった。一方、Pt-SALDI は DAG を検出できるが PC を検出することができなかった。MALDI や Pt-SALDI-IMS は脂質の分析において高い選択性の検出法であることが示された。我々はこれらの脂質を同時に検出するために、MALDI と Pt-SALDI のハイブリッド法(マトリックスエンハンス(ME)-Pt-SALDI)を開発した。ME-Pt-SALDI-IMS を用いることで、ラット脳細胞切片中の PC や PE, DAG などを同時検出することに成功した。検出されたこれら

の化合物のイオン収量は、それぞれMALDI-やPt-SALDI-IMS のときよりも高かった。

Pt フィルムと MALDI マトリックスの両方を用いる ME-Pt-SALDI は生体細胞切片のイメージング分析に有用であることが示唆された。

## Introduction

UV 吸収性の有機マトリックスを用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-IMS)は試料の分解が起こりにくいソフトなイオン化法であり、広く用いられている。[1-3] MALDI-MS においては、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) や 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB)をマトリックスとして用いてタンパク質やペプチドの分析が行われている。[4] 良好な MALDI-MS スペクトルを得るためには、適切なマトリックスの選択が最も重要なファクターである。近年、生体細胞切片の分析のために MALDI を用いたイメージング質量分析法(IMS)が注目されている。[5-7] MALDI-IMS は細胞切片中の様々な分子を同時にイオン化して、その局在分布を分析することができる手法である。

過去 10 年間で、多くの研究者によりリン脂質の MALDI-IMS 分析が報告された。[6-8] リン脂質は哺乳類の細胞を構成する基本的な成分であり、生体機能において次に示す様々な役割を担っている。：脂質 2 重層の形成[9-10]，エネルギー貯蔵[11]。生体情報伝達においてリン脂質は、次に示す様々なセカンドメッセンジャーの前駆体である重要な物質である。：アラキドン酸(ArAc)，ドコサヘキサエン酸(DHA)，セラミド，1,2-ジアシルグリセロール(DAG)，ホスファチジン酸(PA)，lyso-ホスファチジン酸。細胞は多種多様な脂質を含有している。[12] 細胞中において，DAG はホスファチジン酸ホスファターゼの酵素反応によって PA から生成されており，また，ホスファターゼ C の酵素反応によってホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスホスフェート(PIP2)か



らも生成されている。[13-15] 生成された DAG は、プロテインキナーゼ C のセカンドメッセンジャーとして、細胞分化[16]や細胞分裂[17]を制御している。DAG は CDP-エタノールアミンによってホスファチジルエタノールアミン(PE)や PS によって生成され、シチジン二リン酸コリン(CDP-コリン)によってホスファチジルコリン(PC)、アシル CoA チオエステルによってトリアシルグリセロール(TAG)が生成される。[13]

PC と DAG はアルツハイマー病[18]や癌[19-20]に関係しているため、リポドミクス分析において脳細胞中の PC と DAG の同時分析は重要である。Nitsch は死後の脳における PC の減少について報告した。[21] しかしながら、MALDI-IMS を用いた脳細胞切片の分析においては、PC の過剰なイオン収量が原因でイオンサプレッション効果が起こり、DAG の検出は達成されなかったと報告された。[22] 細胞切片上でマトリックスの均一な結晶を調製することが困難なため、MALDI-IMS はデータの再現性が低いことが指摘されている。従って、DAG を含む様々な脂質を検出するための手法の開発を行った。

リポドミクス研究の一つとしては、二次イオン質量分析法(SIMS)を用いてラット脳細胞切片中の DAG を含む脂質の分析が報告された。[23] SIMS は高エネルギーの一次イオンビームを用いる手法であるため、フラグメンテーションが起こりやすく分子イオンを観測することが難しい場合がある。近年、表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)-IMS 法が研究されており、SALDI マトリックスとして Ag ナノ粒子を用いることで腎臓中の DAG が検出された。2重結合を含んでいる DAG は、Na や K,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$  付加イオンや、フラグメントイオンを生成して検出された。[24] その研究において著者は、Ag ナノ粒子を用いた SALDI による DAG の脱離・イオン化効率の低さは、Ag ナノ粒子の UV 吸収波長が原因であると報告した。

以前我々は、薄層クロマトグラフィー(TLC)のプレート上で分離された糖類の分析のために、スパッタリング法によって生成されたプラチナ(Pt)フィルムを用いた

SALDI(Pt-SALDI)-IMS を用いた。[25] Pt-SALDI 法は試料表面にスパッタリング法によって Pt ナノ粒子を積層して作成した薄膜をマトリックスとして用いるイオン化法であり、溶媒フリーでかつマトリックスフリーの手法である。SALDI マトリックスとして金属ナノ粒子を用いたイオン化法は、糖類のイオン収量が高く、選択性も高いことが報告されている。[26-28] 本研究では、ラット脳細胞切片中の脂質のモデル化合物として PC と DAG を用いて、Pt-SALDI と MALDI の比較を行った。さらに、Pt-SALDI-IMS を用いてラット脳細胞切片中の DAG の局在分析を行った。その結果、PC のイオンサプレッション効果が起こることなく、DAG を検出することができ、またその局在部位を明らかにすることができた。様々な化合物を同時に分析するために、MALDI マトリックスとナノ粒子またはポーラス金属基盤を用いたマトリックスエンハンス(ME)-SALDI 法が報告されている。[29-30] 我々は MALDI マトリックスと Pt フィルムを用いた ME-Pt-SALDI 法を開発し、DAG と PC の同時検出を行った。IMS 分析における ME-Pt-SALDI 法の有効性と可能性を報告する。

## Experimental

### Materials

MALDI マトリックスの 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), PC のモデル化合物の oleyl-stearoyl-phosphatidylcholine (PC36:1) as PC, DAG のモデル化合物の 1,2-dipalmitoyl-glycerol (Di-C16:0-DAG)は Sigma (St. Louis, MO, USA)から購入した。DAG のもう一つのモデル化合物 12-Dioleoyl-glycerol (Di-C18:1-DAG)は Cayman Chemical Company (MI, US)から購入した。Pt-SALDI の最適化条件を決定するための標準試薬として用いた Mn 1500 の Polyethylene glycol (PEG)は、Polymer Laboratories (Shropshire, UK)から購入した。Trifluoroacetic acid (TFA)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)グレードのアセトニトリルとメタノールは、Wako Pure Chemical Industries

(Osaka, Japan)から購入した。スパッタリングの金属ターゲットは Pt disc (99.99% purity, diameter: 76.2 mm; Furuuchi Chemical Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。ラット脳細胞切片は、厚さ 5–10  $\mu\text{m}$  にスライスされた試料(日産化学工業株式会社)を用いた。実験で用いた超純粋は Barnstead SMART2PURE water purification system (Thermo Scientific, MA, USA)で生成された。

### Sample preparation

30 mg/mL DHB (0.2% TFA 含有の 50% メタノール水溶液) を調製した。PC はクロロホルムに溶解してから、10 pmol/ $\mu\text{L}$  (アセトニトリル/クロロホルム (v/v = 1:1))に調製した。DAG はアセトニトリル/クロロホルム (v/v = 1:1)に溶解してから、10 pmol/ $\mu\text{L}$  の濃度に調製した。PEG は濃度 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (50% アセトニトリル水溶液) に調製した。

細胞切片は DHB を用いた MALDI や Pt-SALDI, ME-Pt-SALDI-IMS で分析した。MALDI-IMS のために、自動噴霧器 Image Prep (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany) を用いて 5 mL の DHB 溶液(30 mg/mL, 50% メタノール水溶液)を細胞切片にスプレーした。Pt-SALDI の試料調製では、室温で自然乾燥した細胞切片の表面に、スパッタリングによって Pt フィルムを形成した。ME-Pt-SALDI の試料調製では、MALDI と同様に Image Prep (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany)を用いて 5 mL の DHB 溶液(30 mg/mL, 50% メタノール水溶液)を細胞切片にスプレーしてから、室温で自然乾燥した細胞切片の表面に、スパッタリングによって Pt フィルムを形成した。

### Instruments

標準試料のイオン収量を評価するために MALDI-time-of-flight (ToF) (Ultraflex extreme, Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany)を用いた。加速電圧は 20kV であった。マススペクトルは 1500 回のレーザーショットの積算によって得られた。UV 波長 355 nm

の smartbeam II laser (Nd:YAG)のエネルギーは、約 50  $\mu\text{J}$  であった。レーザー照射径は約 50  $\mu\text{m}$  とした。全てのスペクトルは positive-ion reflector モードで獲得された。

MALDI-IMS 実験は全て、FT-ICR MS using a SolariX 9.4T instrument (Bruker Daltonics Inc.)を用いて行われた。マススペクトルは 400 回のレーザーショットの積算で、1 mega-word time domain で獲得された。UV 波長 355 nm の smartbeam II laser (Nd:YAG)のエネルギーは、約 50  $\mu\text{J}$  であった。レーザー照射径は約 50  $\mu\text{m}$  とした。全てのスペクトルは positive-ion モードで得られた。イメージングの際にレーザーは、試料切片上で 125  $\mu\text{m}$  間隔で照射された。FT-ICR MS は、精密質量分析によってラット脳細胞切片上の成分を同定するために用いられた。

スパッタリングの実験では、DC magnetron sputtering instrument (SMR 2304E, ULVAC, Japan)を用いて 1.0 Pa の Ar ガス条件化で乾燥した試料に Pt ナノ粒子をスパッタして積層した。DC パワーは 40 W で、成膜レート換算で 3 nm の厚さの Pt フィルムを調製した。

## Results and discussion

### Evaluation of ion yields of PC and DAG

脂質の標準試料のイオン収量は MALDI-MS や Pt-SALDI-MS によって ToF/ToF 装置を用いて評価された。PC36:1 や Di-C16:0-DAG, Di-C18:1-DAG の MALDI マススペクトルを Figs. 1a-c に示す。DHB-MALDI による PC36:1 のイオン収量は CHCA-MALDI よりも高かった。したがって、本研究では DHB マトリックスを用いて実験を行った。MALDI マススペクトルにおいて、PC36:1 の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  789) や  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  811) イオンのシグナルが強く観測された。(Fig. 1a)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ のプロトンは酸性マトリックスの DHB 由来であると考えられる。MALDI マススペクトルにおいて、Di-C16:0-DAG や Di-C18:1-DAG は観測されなかった。(Figs. 1b and 1c) この結果は、DHB マトリックス

を用いた MALDI は DAG のイオン化に適していないことを示した。MALDI-MS では DAG を検出できないことが報告[22]されており、本研究においても同様の結果が得られた。

対照的に、Pt-SALDI-MS では DAG の Na イオン付加体の検出に成功した。DAG のイオン強度は Pt のスパッタリング条件に依存することがわかった。従って、我々は標準試料として PEG を用いて Pt スパッタリング条件の最適化を行った。様々な厚さの Pt フィルムを用いた際の、PEG(n=23) (n: エチレンオキサイドユニットの数)の Na イオン付加体のイオン強度を、Fig. 2 にまとめた。厚さ 30 nm の Pt フィルムの Pt-SALDI は PEG イオンを脱離することが困難であった。また厚さ 0.5 nm の Pt フィルムの Pt-SALDI でも、PEG(n=23)の Na イオン付加体のイオン強度は小さかった。厚さ 3 nm の Pt フィルムの Pt-SALDI では、PEG(n=23)の Na イオン付加体のイオン強度は最も大きかった。従って、厚さ 3 nm の Pt フィルムで Pt-SALDI を行うこと決定した。厚い Pt フィルムを用いた場合は Pt フィルムの下の試料が気相に脱離すること困難であり、薄い Pt フィルムの場合は SALDI マトリックスの量が少ないため、Pt フィルムから試料へのエネルギー伝達が不十分であり SALDI 効果が小さいことが原因であると考えられる。

PC36:1 や Di-C16:0-DAG, Di-C18:1-DAG の Pt-SALDI マススペクトルを Figs. 1d-f に示す。MALDI のときとは対照的に、PC36:1 のシグナルは観測されなかった。興味深いことに、Di-C16:0-DAG や Di-C18:1-DAG のシグナルが高いイオン強度で検出された。Pt-SALDI マススペクトルにおいては、Di-C16:0-DAG や Di-C18:1-DAG の Na イオンや K イオン付加体に一致する  $m/z$  値が検出された。

DHB-MALDI では PC を検出し、Pt-SALDI では DAG を検出できるため、上記の結果から、MALDI-IMS と Pt-SALDI-IMS は PC と DAG を高い選択性で検出できることがわかった。PC と DAG の両方を同時に検出するために、二つのマトリックス(DHB

と Pt フィルム, ME-Pt-SALDI)を用いて分析を行った。実験では,はじめに脂質試料溶液と DHB を混合した溶液をガラスプレートに滴下・乾燥して,その試料上に Pt をスパッタした。PC と DAG の ME-Pt-SALDI マススペクトルを Figs. 1g-i に示した。ME-Pt-SALDI によって, PC と DAG の両方とも検出することができた。Me-Pt-SALDI の PC36:1 や Di-C16:0-DAG, Di-C18:1-DAG のイオン収量を Fig. 3 にまとめた。Pt-SALDI は高いイオン強度の DAG を観測できたが, PC を観測できなかった。また対照的に, DHB-MALDI は高いイオン強度で PC のピークを観測したが, DAG を観測できなかった。ME-Pt-SALDI は 3 つの脂質の標準試薬全てにおいて,最も高いイオン強度が示された。この結果は, ME-Pt-SALDI は DHB-MALDI と Pt-SALDI の両方の効果が相補的に得られることを示した。

ME-Pt-SALDI マススペクトルは, MALDI マススペクトルのように低い質量範囲においてはマトリックス関連イオンが観測されるが,脂質の検出において DHB-MALDI と Pt-SALDI の両方の特徴を併せ持つ利点があることがわかった。このハイブリッドのイオン化法は生体イメージング[29-30]において高い検出感度で低質量の化学種を同時に観測できる可能性がある。本研究において,我々はさらに ME-Pt-SALDI を用いてラット脳細胞切片の IMS を行った。IMS における脂質のイオン収量を比較して評価するために, MALDI-IMS や Pt-SALDI-IMS についても測定を行った。

### **MALDI-IMS of rat brain tissue section**

MALDI-MS スペクトルの  $m/z$  500-900 において,様々な種類の PC やホスファチジルエタノールアミン(PE)のイオンが検出された。PC の分布は MALDI-IMS のイメージ画像として Fig. 4a に示した。PC36:1 は位置選択的に局在することなく,細胞切片上のレーザーが照射された脳梁以外の全ての部位から観測された。PC シリーズのいくつ

かの脂質は観測されたが, MALDI では切片から DAG を検出することができなかった. 検出されたイオンは  $m/z$  788.616 や 760.585, 746.608, 806.510 であった.  $[\text{PC}(36:1)+\text{H}]^+$  と  $[\text{PC}(34:1)+\text{H}]^+$ ,  $[\text{PC}(34:1e)+\text{H}]^+$ ,  $[\text{PE}(38:4)+\text{K}]^+$  の計算精密質量は 788.616 と 760.585, 746.606, 806.510 である. 精密質量が一致しているため, これらは  $\text{PC}(36:1)$  と  $\text{PC}(34:1)$ ,  $\text{PC}(34:1e)$ ,  $\text{PE}(38:4)$  であることが考えられる.

### **Pt-SALDI-IMS of rat brain tissue section**

Pt-SALDI イメージを Fig. 4 に示す. 細胞切片の Pt-SALDI-IMS では, 様々な種類の DAG のイオンを高い S/N 値で検出することができた. しかしながら, PC や PE シリーズの脂質を検出することはできなかった. 検出されたイオンは  $m/z$  659.500 と 683.502, 607.469 であり, これらは  $[\text{Di-C18:1-DAG}+\text{K}]^+$  と  $[\text{Di-C19:2-DAG}+\text{K}]^+$ ,  $[\text{Di-C16:0-DAG}+\text{K}]^+$  の精密質量に一致した. Di-C18:1-DAG はラット脳中の脳梁と神経節で強く観測された. この結果は, DAG の神経伝達についての報告と一致している. [31] 上記の結果は, Pt-SALDI-IMS は PC によるイオンサプレッション効果がなく, DAG を選択的にイオン化してその局在を分析する有効な手段であることが示唆された.

### **ME-Pt-SALDI-IMS of rat brain tissue section**

DHB と Pt フィルムをマトリックスとして用いた ME-Pt-SALDI を用いて, ラット脳細胞切片の分析を行った. その結果, PC と PE, DAG を全て同時に検出することに成功した. それらの化合物の ME-Pt-SALDI-IMS の画像を Fig. 5 に示す. 細胞切片の  $m/z$  810.598 イオンは PC36:1 であることがわかり, その局在は MADI-IMS の結果と一致し

た. ME-Pt-SALDI-IMS では, MALDI のように PC シリーズのイオンが多く検出された. DAG のイオンも検出されており, この結果は Pt-SALDI-IMS に一致した. そのイオンは  $m/z$  806.510 や 659.500, 607.469, 683.502 であり, これらは PE(38:4)や Di-C18:1-DAG, Di-C16:0-DAG, Di-C19:2-DAG であることが確認された. ME-Pt-SALDI-IMS では, Di-C18:1-DAG はラット脳の脳梁で観測されたが, Di-C16:0-DAG は視床下部と視床で観測された. これらの結果は, ME-Pt-SALDI-IMS は生体試料切片中の PC と DAG の局在分析を同時に行うことが可能であることを示した.

## Conclusions

本研究では FT-ICR MS を用いたシンプルな IMS のアプローチとして, スパッタリング法で生成した Pt フィルムと DHB をマトリックスとして用いた ME-Pt-SALDI 法による PC や PE, DAG の同時検出の研究を行った. SALDI-IMS was achieved by sputter coating a Pt layer onto the tissue section. Pt-SALDI の Pt フィルムの最適化条件は厚さ 3 nm であった. 細胞切片上にスパッタリングによって Pt ナノ粒子を積層して生成した Pt フィルムをマトリックスとして用いることで Pt-SALDI-MS は達成された. 標準試薬として PC36:1 や Di-C16:0-DAG, Di-C18:1-DAG を用いて, これらのイオン収量を MALDI と Pt-SALDI, ME-PtSALDI でそれぞれ評価した. MALDI-MS は高いイオン強度で PC36:1 を検出でき, Pt-SALDI-MS は Di-C16:0-DAG や Di-C18:1-DAG を検出することができた. PC や DAG を同時に検出するために, DHB と Pt フィルムをマトリックスとして用いた ME-Pt-SALDI 法を行った. ME-Pt-SALDI スペクトルは, これらの両方の脂質を強いイオン強度で観測することが出来た.



ME-Pt-SALDI は MALDI と Pt-SALDI の効果の両方を併せ持ち、PC36:1 や Di-C16:0-DAG, Di-C18:1-DAG のイオン強度は MALDI や Pt-SALDI よりも大きいことが分かった。さらに、ME-Pt-SALDI はラット脳細胞切片中の PC や DAG を同時に検出することができ、その局在分布を分析することが可能であることがわかった。

ME-Pt-SALDI は細胞切片中の多種多様な脂質成分の同時検出の可能性を示し、リピドミクス分析において有効な手法であることが示された。

## References

- [1] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53.
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, T. Yoshida. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151.
- [3] M. Karas, F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299.
- [4] L. F. Marvin, M. A. Roberts, L. B. Fay. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **2003**, 337 Review, 11.
- [5] S. A. Schwartz, R. J. Weil, M. D. Johnson, S. A. Toms, R. M. Caprioli. Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression. *Clin Cancer Res.*, **2004**, 10, 981.
- [6] J. A. Hankin, R. M. Barkley, R.C. Murphy. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2007**, 18, 1646.
- [7] T. J. Garrett, M. C. Prieto-Conaway, V. Kovtoun, H. Bui, N. Izgarian, G. Stafford, R. A. Yost. Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure MALDI linear ion trap mass spectrometer. *Intl. J. Mass Spectrom.* **2007**, 260, 166.
- [8] C. H. Le, J. Han, C. H. Borchers. Dithranol as a MALDI matrix for tissue imaging of lipids by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 8391.
- [9] E. Gorter, F. Grendel. On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. Experimental Medicine* **1925**, 41, 439.

- [10] S. J. Singer, G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **1972**, 175, 720.
- [11] D. L. Brasaemle. Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* **2007**, 48, 2547.
- [12] R. M. Adibhatla, J. F. Hatcher. Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidol.* **2007**, 2, 403.
- [13] R. A. Coleman, D. P. Lee. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research* **2004**, 43 review, 134.
- [14] S. G. Rhee, Y. S. Bae. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C Isozymes. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 15045.
- [15] K. Fukami. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* **2002**, 131, 293–299.
- [16] L. M. Obeid, T. Okazaki, L. A. Karolak, Y. A. Hannun. Transcriptional regulation of protein kinase C by 1,2,5-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 2370.
- [17] J. Cerbon, R. del Carmen Lopez-Sanchez. Diacylglycerol generated during sphingomyelin synthesis is involved in protein kinase C activation and cell proliferation in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem. J.* 2003, 373, 917.
- [18] D. Mochly-Rosen, D. Kanad, K. V. Grimes. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. *Nat Rev Drug Discov.* **2012**, 11, 937.

- [19] E. M. Griner, M. G. Kazanietz. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 281.
- [20] L. Abalsamo, F. Spadaro, G. Bozzuto, L. Paris, S. Cecchetti, L. Lugini, E. Iorio, A. Molinari, C. Ramoni, F. Podo. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C results in loss of mesenchymal traits in metastatic breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **2012**, 14, R50.
- [21] R. M. Nitsch, J. K. Blusztajn, A. G. Pittas, B. E. Slack, J. H. Growdon, R. J. Wurtman. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1671.
- [22] L. J. Sparvero, A. A. Amoscato, C. E. Dixon, J. B. Long, P. M. Kochanek, B. R. Pitt, H. Bayir, V. E. Kagan. Mapping of phospholipids by MALDI imaging (MALDI-MSI): realities and expectations. *Chem. Phys. Lipids.* **2012**, 165(5), 545.
- [23] M. K. Passarelli, N. Winograd. Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochim Biophys Acta.* **2011**, 1811, 976.
- [24] L. Muller, A. Kailas, S. N. Jackson, A. Roux, D. C. Barbacci, J. A. Schultz, C. D. Balaban, A. S. Woods. Lipid imaging within the normal rat kidney using silver nanoparticles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int. Soc. Nephrology* **2015**, doi:10.1038/ki.2015.3
- [25] H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi, R. Arakawa. Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 1849.
- [26] M.-F. Huang, H.-T. Chang. Detection of Carbohydrates Using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with HgTe nanostructures. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 2147.

- [27] C.-W. Wang, W.-T. Chen, H.-T. Chang. Quantification of saccharides in honey samples through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using HgTe nanostructures. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2014**, 25(7), 1247.
- [28] C.-L. Su and W.-L. Tseng. Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (4), 1626.
- [29] Q. Liu, Y. Xiao, C. Pagan-Miranda, Y. M. Chiu, L. He. Metabolite imaging using matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (ME-SALDI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 80.
- [30] V. L. Brownm Q. Liu, L. He. Matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (ME-SALDI-MS) for mass spectrometry imaging of small molecules. *Methods in Molecular Biology* **2015**, 1203, 175.
- [31] M. E. Davis, R. L. Patrick. Diacylglycerol-induced stimulation of neurotransmitter release from rat brain striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* **1990**, 54(2), 662.

## Figure Legend

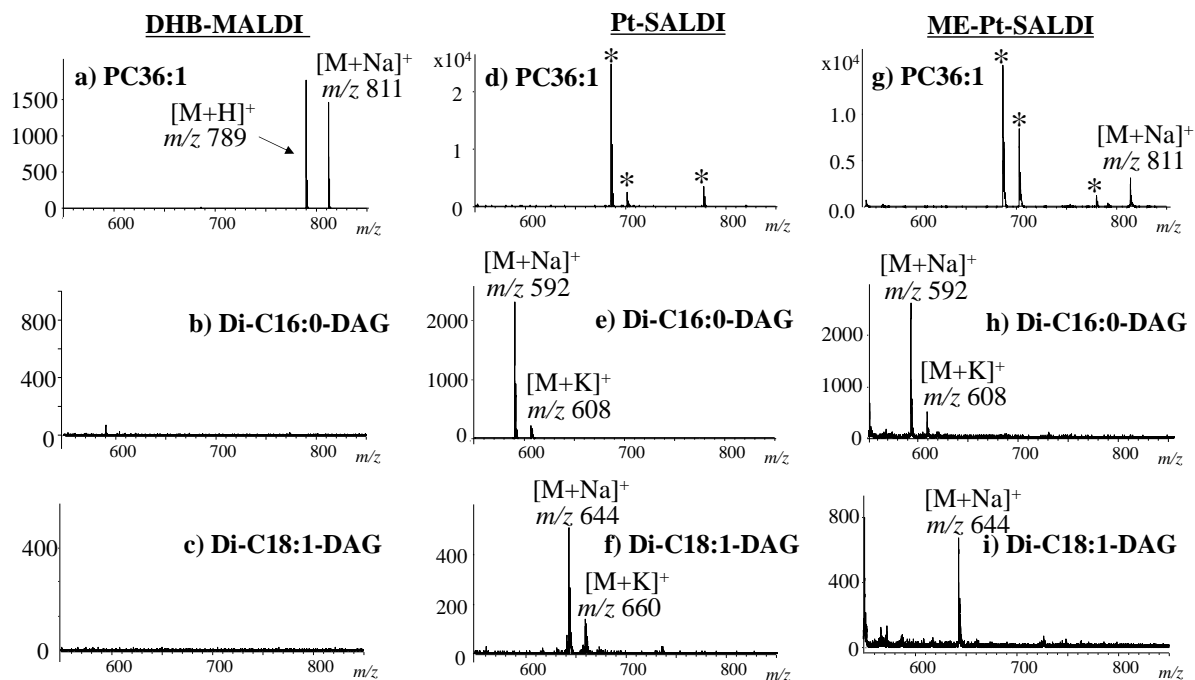
Figure 1. Mass spectra of (a, d, g) PC36:1, (b, e, h) Di-C16:0-DAG, and (c, f, i) Di-C18:1-DAG obtained by (a–c) DHB-MALDI, (d–f) Pt-SALDI, and (g–i) ME-Pt-SALDI. The peaks denoted by asterisks (\*) in (d) and (g) are unknown originated from PC36:1.

Figure 2. Ion yields of PEG in Pt-SALDI using Pt films of various thicknesses.

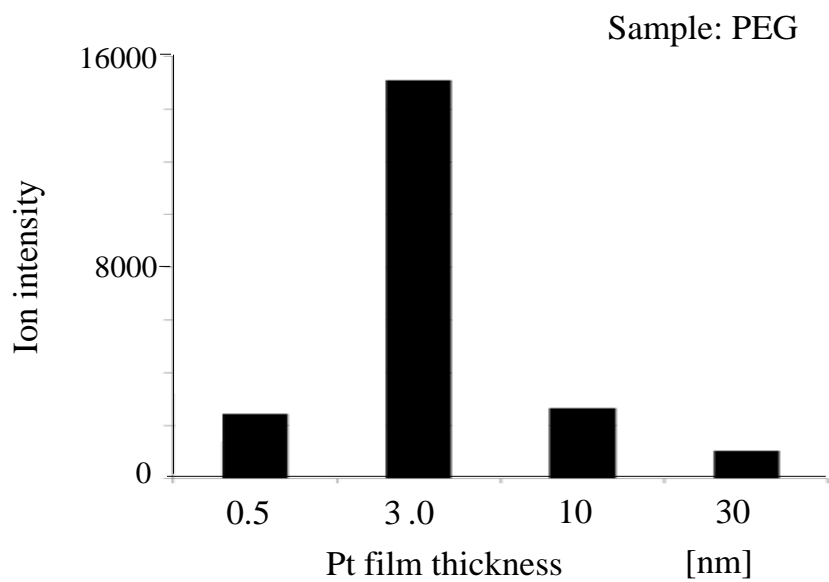
Figure 3. Ion yields of sodium-adducted PC36:1, Di-C16:0-DAG, and Di-C18:1-DAG.

Figure 4. Mass images of PC and DAG obtained by (a) MALDI and (b) Pt-SALDI in rat brain tissue sections.

Figure 5. Mass images of PC and DAG obtained by ME-Pt-SALDI in rat brain tissue sections.

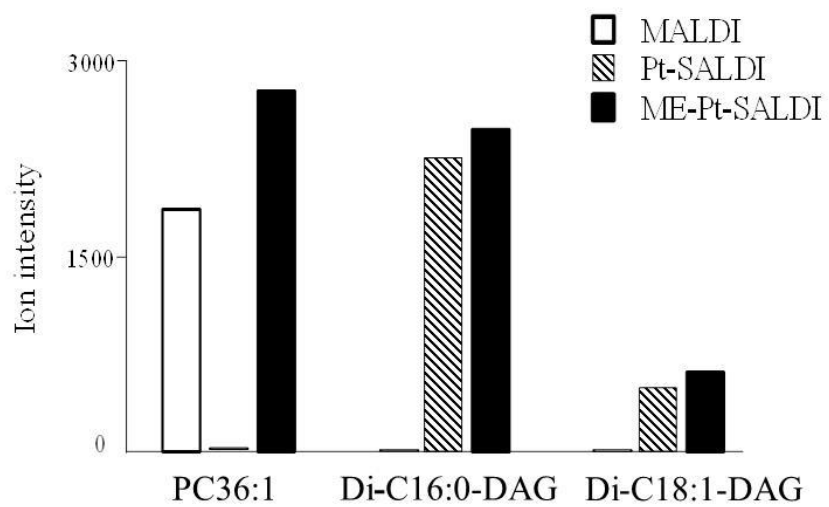


**Fig. 1.** Mass spectra of (a, d, g) PC36:1, (b, e, h) Di-C16:0-DAG, and (c, f, i) Di-C18:1-DAG obtained by (a–c) DHB-MALDI, (d–f) Pt-SALDI, and (g–i) ME-Pt-SALDI. The peaks denoted by asterisks (\*) in (d) and (g) are unknown originated from PC36:1.



**Fig. 2.** Ion yields of PEG in Pt-SALDI using Pt films of various thicknesses.

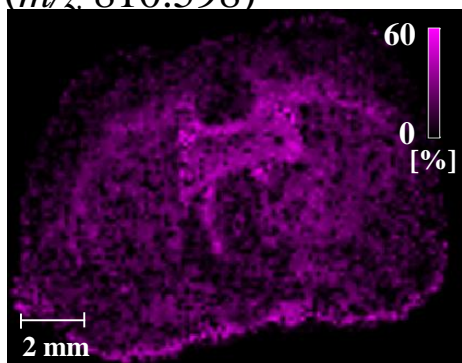




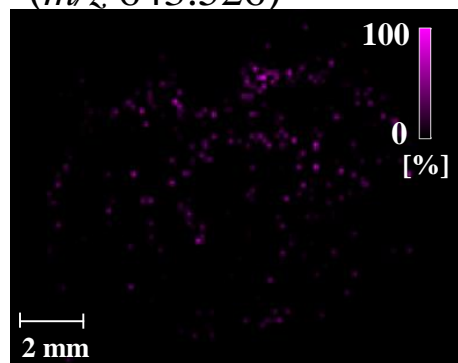
**Fig. 3.** Ion yields of sodium-adducted PC36:1, Di-C16:0-DAG, and Di-C18:1-DAG.

### a) Image of tissue in MALDI

[PC36:1+Na]<sup>+</sup>  
(*m/z* 810.598)

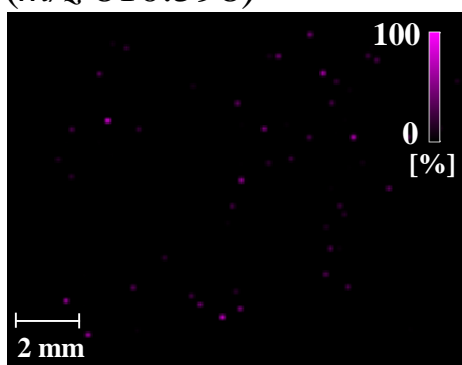


[Di-C18:1-DAG+Na]<sup>+</sup>  
(*m/z* 643.526)

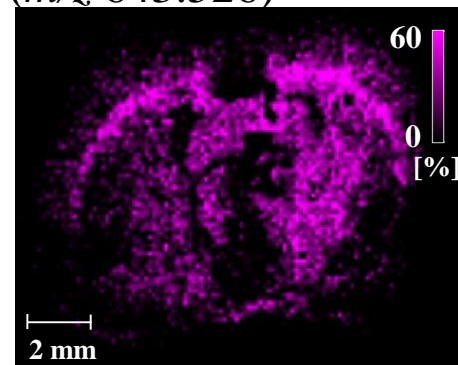


### b) Image of tissue in Pt-SALDI

[PC36:1+Na]<sup>+</sup>  
(*m/z* 810.598)



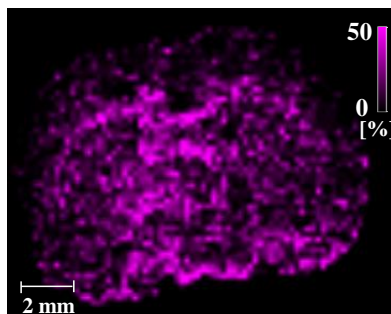
[Di-C18:1-DAG+Na]<sup>+</sup>  
(*m/z* 643.526)



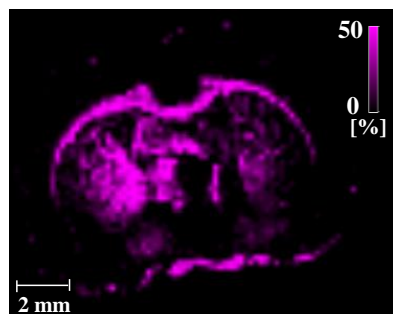
**Fig. 4.** Mass images of PC and DAG obtained by (a) MALDI and (b) Pt-SALDI in rat brain tissue sections.

## Image of tissue in ME-Pt-SALDI

[PC36:1+Na]<sup>+</sup>  
(*m/z* 810.598)



[Di-C18:1-DAG+K]<sup>+</sup>  
(*m/z* 659.500)



[Di-C16:0-DAG+K]<sup>+</sup>  
(*m/z* 607.469)

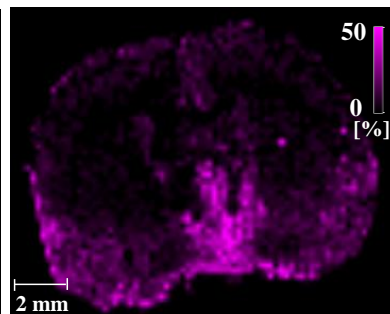


Fig. 5. Mass images of PC and DAG obtained by ME-Pt-SALDI in rat brain tissues sections.

### 第3章

## スパッタリング法で生成したプラチナフィルムを用いた表面支援レーザー脱離イオン化法による植物の葉のダイレクトイメージング質量分析

### Abstract

イメージング質量分析法(IMS)を用いて農薬の浸透性殺虫剤を散布した植物の葉の分析を行った。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)は葉の表面の殺虫剤の検出には適していない。その理由は、葉の非導電性表面においてチャージアップが起こり、イオン化された成分が脱離されないため検出が困難になるためである。本研究では、植物の葉の表面成分のダイレクト分析のために、スパッタリング法で生成したプラチナ(Pt)フィルムを利用した表面支援レーザー脱離イオン化法(Pt-SALDI)を用いた。Ptフィルムは殺虫剤が散布された葉の表面の上で、スパッタリング法によって調製された。調製されたPtフィルムはUV吸収性を持つためであるため、Pt-SALDIのマトリックスとして利用できる。また、Ptフィルムは多孔性であるため、フィルムの下部に位置する試料がイオン化した際には、イオンはその穴から気相に脱離することができる。

葉にスプレーされた殺虫剤に含まれるアセフェートやアセタミプリド、チオファネートメチルはそれぞれPt-SALDI-MSで検出されたが、しかしMALDIではイオン化時に葉の表面でチャージアップが起こったため、これらの成分を十分に検出することはできなかった。Pt-SALDIを用いることで葉表面の殺虫剤成分のイオン収量を増加することができ、また導電性のPtフィルムがチャージアップ効果を抑制することができた。葉の表面上の浸透性殺虫剤成分の分布や挙動は、Pt-SALDI-IMSを用いることで観測す

ることに成功した。植物への殺虫剤の浸透を経時変化についても評価できることが示された。

## Introduction

UV吸収性の有機マトリックスを用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)は生体分子の分析のために広く利用されている。[1-3]  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)や2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)は、ペプチドや脂質などの様々な化合物をイオン化するために用いられているMALDIのためのマトリックスである。[4-6] しかしながら、マトリックス関連イオンが大過剰に検出されてイオン化抑制や検出器の飽和が生じるためにMALDI-MSでは低分子化合物の同定が困難な場合がある。従って、MALDI-MSを用いた環境物質や農薬のような低分子化合物の研究の例は少ない。[7-8] 低分子化合物の検出のために、MALDIの有機マトリックスフリーの手法として表面支援レーザー脱離イオン化法が研究されている。[9-10] SALDIでは主に、金属ナノ粒子やポーラスシリコンのような無機マトリックスが用いられる。

以前、我々のグループやいくつかの研究グループによって、試料表面に形成したPtやAgフィルムをマトリックスとして用いた新しいSALDI法について報告された。[11-13] 多孔性Ptフィルムはスパッタリング法によって乾燥した試料の表面に形成された。[11] Ptフィルムをマトリックスとして用いたSALDI法は、色素や糖類のイオン収量が高いことが示された。[14-16] 薬物や農薬におけるほとんどの定性・定量分析は、LC-MSを用いて行われている。[17-19] 植物中の農薬のイメージング技術は、浸透性殺虫剤や代謝物の挙動を観測するために重要である。しかしながら、LC-MSはイメージングを行うことが出来ない。植物中の農薬の挙動を分析するためには、一般的にラジオアイソトープイメージングが用いられている。[20] しかしその手法は、高価で危

険なラジオアイソトープを必要とするため、広く利用されていない。ラジオアイソトープを用いる実験は、放射線の被曝を防ぐために高価でかつ専用の施設で行われる必要がある。従って、医薬・農学分野では植物の浸透性薬物の分析のために、シンプルかつ安価な新しいイメージング法が求められている。

近年、生体細胞切片上の成分の分布を可視化するために、MALDIイメージング質量分析法が開発された。[21-22] MALDI-IMSでは、MALDIで生成されたイオンの電荷分離のために、ITO蒸着したターゲットプレートを用ることが多い。細胞切片は厚さ10–50  $\mu\text{m}$ 程度でスライスしてITOプレートの表面に設置する必要がある。厚い切片のMALDI-IMSではMALDIイオンソース内でチャージアップが起こるため、イオンを検出することができない。[23] イオンソース内におけるチャージアップは、検出感度の低下とマススペクトルのピーク分解能の低下の原因となる。従って、良好なMALDIマススペクトルを得るためには、導電性の試料表面であることが必要とされている。薄層クロマトグラフィー(TLC)プレートの表面も、Ptスパッタリングによって導電性にすることが可能である。そのため、スパッタリング法で生成したPtフィルムを用いたSALDI法はTLCで分離された成分をそれぞれ抽出することなく、TLCプレートのIMSで分析することができた。[11]

本研究において、我々は厚い非導電性の葉の農薬の分布の研究を行った。農薬を散布された葉はPt-SALDIを用いることでダイレクトにIMS分析することができた。さらに、農薬を混ぜた土壌で育成した植物から採取した葉のダイレクトIMS分析を行い、浸透性農薬の挙動を解析した。

## Experimental

### Reagents and chemicals

メタノールとアセトニトリル(AcCN)は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から購入し

た. MALDI-MS のマトリックスの 2,5-dihydroxybenzoic acid は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した. 試料は全て analytical grade のものを用いて, 精製することなく使用した. 農薬は Sumitomo Chemical Garden Products Inc. (Tokyo, Japan) から購入した.

### Sample preparation

農薬成分のアセフェートやアセタミプリドは標準試薬として用いた. それぞれ 3.1 や 12.5, 50 ng/mL の濃度の水溶液を調製した. 合成高分子のポリエチレングリコール (PEG) はメタノールで溶解して, 50 ng/mL に調製した. 各試料はパンジーの葉 (*Viola x wittrockiana*) に 1.0  $\mu$ L 滴下して乾燥した.

殺虫剤としてアセタミプリドや殺菌剤としてチオファネートメチルを含有する園芸用の農薬 (Mospiran Topjin M Spray) はアイビー (*Hedera*) の葉の表面に散布された. 農薬を散布した後の葉は一日室温で保存された. もう一つの農薬として鉍物中に殺虫剤のアセフェートを 5% 含んだ GF Orutoran を用いた. GF Orutoran (1 g) をの土壤に混合してアイビー (*Hedera*) を育成した. GF Orutoran の投与後 4, 8, 11, 14 日でそれぞれ土壤から 30 cm の茎の葉を採集した. 採集された葉はそれぞれ MALDI-または Pt-SALDI-IMS を用いて分析された.

### Imaging mass spectrometry

イメージング質量分析 (IMS) の実験は, Nd:YAG レーザー (355 nm) を搭載したマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計の AutoFlex III mass spectrometer (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany) を用いて行った. マススペクトルは全て positive-ion モードと reflectron モードで取得した. acceleration voltage と reflectron voltage は 21 kV であった. レーザーの照射径は約 100  $\mu$ m であった. Mospiran Topjin M Spray や GF Orutoran, その他の農薬や標準試薬が散布された葉のイメージン

グでは、レーザーを照射する間隔は 150  $\mu\text{m}$  で実験を行った。Pt-SALDI は、magnetron sputtering device (E-1030, HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて 4°C, 5 Pa の条件下で 20 mA でスパッタリングを行った。Pt フィルムは成膜レートの換算で厚さ 10 nm で試料の上に調製した。MALDI-IMS では、自動噴霧器(TM-sprayer; HTX Technologies, NC, USA)を用いて温度: 75 °C, ノズル速度: 1000 mm/min, 回流数: 16, 流速: 120  $\mu\text{l}/\text{min}$  の条件で、試料にマトリックス溶液を噴霧した。2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)溶液は 0.1% TFA 含有の  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  (1/1)溶媒で濃度 5 mg/mL に調製して使用された。Pt-SALDI で得られた試料のイオン収量は MALDI のものと比較して評価した。

## Results and Discussion

### Analysis of standard samples on leaves

近年、MALDI-IMS を用いて植物の代謝物の分布の研究が行われている。しかしながら、試料調製では植物を薄くスライスする技術や、細胞切片にマトリックス溶液を均一に塗布する技術が求められるため、試料調製は容易ではない。[23] MALDI-IMS 分析のためには、試料切片が 30  $\mu\text{m}$  以下の薄さであるか、試料表面が導電性である必要がある。従って、葉の表面は非導電性であり、また葉を水平にスライスすることが困難であるため、植物の葉のダイレクトイメージング分析は困難である。ラジオアイソトープを使うことなく植物への農薬の浸透の経時変化を直接評価するために、Pt-SALDI-IMS を用いて葉の表面における農薬の分布を分析した。

農薬のアセフェートやアセタミプリドや、合成高分子の PEG を標準試料として用いて、それらがスポットされたパンジーの葉を分析した。Pt-SALDI で得られた標準試料のイオン収量は MALDI と比較して、非導電性の葉の表面におけるチャージアップ効果について評価した。葉の表面上にける試料の MALDI または Pt-SALDI スペクトルを Fig. 1 に示した。Fig. 1a-b では、MALDI-と Pt-SALDI においてアセフェートの



ナトリウム付加体( $m/z$  206) やカリウム付加体( $m/z$  222)が観測されて、Fig. 1c-d では MALDI-と Pt-SALDIにおいてアセタミプリドのナトリウム付加体( $m/z$  245)がそれぞれ観測された。PEG のナトリウム付加体は Pt-SALDI のみで検出された。(Fig. 1e) Pt-SALDI においてアセフェートやアセタミプリドは高いイオン収量が得られたが、対照的に MALDI ではそれらのイオン収量が低かった。MALDI のイオン化過程において、これらのイオンは UV パルスレーザーによって葉の表面から脱離・イオン化される。レーザー照射時には、レーザー光を吸収した MALDI マトリックスがブルームを生じることが知られている。そのマトリックスのブルームは非導電性の葉の表面にある試料を僅かに脱離させることができるかと考えられる。しかしながら、葉の表面は非導電性であるため、これらの生成された多くのイオンは質量分析計に導入されずにロスしてしまったため、MALDI ではイオン収量が低かったと考えられる。Pt-SALDI では、葉の表面は Pt フィルムによって導電性が付与されたため、試料のイオンは効率的に脱離されて高いイオン強度で検出された。MALDI ではチャージアップ効果がイオン収量の低下の原因になったことが考えられる。これらの結果は、Pt-SALDI はチャージアップ効果を回避できるため、葉のダイレクト分析の可能性を示唆した。得られた標準試料のイオン収量を Fig. 2 にまとめた。Pt-SALDI におけるアセフェートとアセタミプリド、PEG イオンのピークのイオン強度は、MALDI のものよりもそれぞれ 3、8、100 倍高いことが示された。標準試料のイオン収量の増加とチャージアップ効果の回避は、導電性の Pt フィルムを用いた Pt-SALDI によって実現された。Pt-SALDI で用いる多孔性の Pt フィルムの最適な厚さは 10 nm 以下であり、Pt フィルムが厚い場合は分子イオンのイオン強度が減少する。[11] 第 1 章では白金の最適条件は 10 nm であったが、本スパッタリング装置を用いた場合は 3 nm が最適であった。スパッタリングの方法によっては白金薄膜の密度が異なるため、異なる結果が得られたことが考えられる。

Pt-SALDI を用いて、アセフェートやアセタミプリドがスポットされた葉のダイレクト IMS 分析を行った。(Fig. 3a) 葉の Pt-SALDI-IMS では、アセフェートやアセタミプリドのナトリウムイオン付加体( $m/z$  206,  $m/z$  245)が検出された。葉にスポットされた 50 ng のアセフェート、また 3.1, 13, 50 ng のアセタミプリドははっきりと観測することができた。3.1 や 13ng のアセフェートは僅かに検出された。MALDI-IMS では、チャージアップ効果が起こったため、アセフェートとアセタミプリドのイオン強度は、Pt-SALDI のときよりも非常に小さかった。さらに、MALDI-IMS は、試料調製の際に試料表面にマトリックス溶液を噴霧する工程を有するために、スポットされた試料がマイグレーション(滲むこと)することで広がってしまうデメリットがあることが確認された。噴霧過程におけるマトリックスと試料の不均一な混晶の生成は MALDI-IMS の再現性の低下の原因にもなっていた。マイグレーションを確認するために、MALDI と Pt-SALDI のハイブリッド法(ME-Pt-SALDI)を行った。ME-Pt-SALDI の試料は、標準試薬が塗布された葉に DHB マトリックスをスプレーして乾燥から、その表面にスパッタリングによって Pt フィルムを形成して調製した。ME-Pt-SALDI のイメージング画像を Fig. 3b に示す。マイグレーションによって葉の表面全体で試料イオンが観測された。この結果は、MALDI におけるマトリックスの噴霧過程は、葉の IMS 分析に適切ではないことを示唆した。溶媒フリーな Pt-SALDI はマトリックス噴霧が不要なく効率的なイオン化が可能であり、非導電性試料の表面に導電性を付与することができるため、葉のダイレクト分析に適していると考えられる。葉のダイレクト分析の評価のために、殺虫剤や殺菌剤のモデル化合物としてアセタミプリドとチオファネートメチルを用いた。葉に噴霧されたこれらの試料を Pt-SALDI-IMS で分析した。マススペクトルでは、アセタミプリドとチオファネートメチルのナトリウムイオン付加体( $m/z$  245,  $m/z$  365)が観測された。アセタミプリドとチオファネートメチルの分布の違いは明確に示された。(Fig. 4a-b) アセタミプリドの画像は葉の表面において広がった

スポットを示したが、チオファネートメチルの画像は凝集した小さいスポットを示した。この違いは葉の表面と試料の相互作用に依存するため、葉の表面や試料の性質によると考えられる。これらの結果より、Pt-SALDI-IMS は葉の表面に噴霧された殺虫剤の分布を観測することができることが示された。Pt-SALDI-IMS は効果的な農薬の開発のために重要な技術となると考えられる。

### **IMS Monitoring of absorption and migration of agricultural chemicals in plant**

市販の農薬は殺虫剤に加えて溶媒や界面活性剤、無機物を含有している。これらの物質は植物の吸収効率を促進させて、植物内の至るところに効果的に広げるために用いられている。本研究では、Pt-SALDI-IMS を用いて土壌に混合した浸透性薬物の植物中における挙動を分析した。農薬は市販の GF Orutoran を用いた。GF Orutoran は土壌に混合することで、その土壌から植物の根を通して植物中に吸収と浸透する。その植物の葉を Pt-SALDI-IMS で分析した。葉の試料は、農薬投与後 4, 8, 11, 14 日後に根から 30cm の茎から採取したものを用いた。葉は採集してすぐにスパッタリングによって Pt フィルムでコーティングしてから、Pt-SALDI-IMS で分析を行った。

Fig. 5 は、浸透性薬物の GF Orutoran を投与後 4, 8, 11, 14 日後の葉から検出されたアセフェートのナトリウムイオン付加体( $m/z$  206)の、Pt-SALDI-IMS イメージング画像を示している。殺虫剤の成分であるアセフェートはの投与後 4 日目の葉からは観測されなかった。(Fig. 5a) このことは、投与後 4 日ではアセフェートは植物の葉に浸透していないことを示唆している。しかしながら、投与後 8 日の葉からは、茎に近い部分においてアセフェートが観測された。(Fig. 5b) また、投与後 11 日の葉では、葉の至るところにアセフェートが広がっていることがわかった。(Fig. 5c) 投与後 14 日の葉のイメージング画像では、茎に近い部分においてアセフェートは減少しており、より葉の先に向かって広がっていた。(Fig. 5d) アセフェートのナトリウムやカリウム

イオン付加体は投与後 11 日後のものにおいても検出された。14 Da 差の質量のピークが複数観測されており，これらは葉の表面成分であると考えられる。植物中の農薬の分布はスパッタリング法で生成した Pt フィルムを用いた Pt-SALDI-IMS によって分析することが可能であることを示した。

## Conclusions

MALDI-や Pt-SALDI-IMS を用いて葉の表面の農薬成分の標準物質の分析を行った。これらの試料は MALDI-MS では非導電性の葉表面におけるチャージアップ効果により十分に検出することができなかったが，葉表面に導電性を付与できる Pt-SALDI では，高いイオン収量で検出することができた。農薬 Mospiran Topjin M Spray や GF Orutoran 中の成分の分布や浸透性の評価は，ラジオアイソトープを用いることなく Pt-SALDI-IMS によって直接分析することができた。植物中における農薬成分の浸透の経時変化も，Pt-SALDI-IMS によって評価することができることがわかった。Pt-SALDI-IMS は葉表面における農薬の分布を迅速に直接評価するための有用なツールであることが示された。

## References

- [1] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53.
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita and T. Yoshida. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151.
- [3] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299.
- [4] L. F. Marvin, M. A. Roberts and L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, **2003**, 337 Review, 11.
- [5] R. C. Murphy, J. A. Hankin and R. M. Barkley. Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J. Lipid Research*, **2009**, 50, S317.
- [6] J. A. Hankin, R. M. Barkley and R. C. Murphy. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **2007**, 18, 1646.
- [7] D. Cao, Z. Wang, C. Han, L. Cui, M. Hu, J. Wu, Y. Liu, Y. Cai, H. Wang and Y. Kang. Quantitative detection of trace perfluorinated compounds in environmental water samples by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry with 1,8-bis(tetramethylguanidino)-naphthalene as matrix. *Talanta*, 2011, 85, 345.
- [8] J. Sun and B. C. Lynn. Development of a MALDI-TOF-MS method to identify and quantify butyrylcholinesterase inhibition resulting from exposure to organophosphate and carbamate pesticides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2007**, 18, 698.
- [9] P. A. Kuzema. Small-molecule analysis by surface-assisted laser desorption/ionization

- mass spectrometry. *J. Anal. Chem.*, **2011**, 66, 1227.
- [10] C.-Y. Lo, J.-Y. Lin, W.-Y. Chen, C.-T. Chen and Y.-C. Chen. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on titania nanotube arrays. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **2008**, 19, 1014.
- [11] H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi and R. Arakawa. Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2012**, 26, 1849.
- [12] M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J. Masson and P. Chaurand. Silver-assisted laser desorption ionization for high spatial resolution imaging mass spectrometry of olefins from thin tissue sections. *Anal Chem.*, **2013**, 19, 3318.
- [13] L. Muller, A. Kailas, S. N. Jackson, A. Roux, D. C. Barbacci, J. A. Schultz, C. D. Balaban and A. S. Woods. Lipid imaging within the normal rat kidney using silver nanoparticles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int. Soc. Nephrology*, **2015**, doi:10.1038/ki.2015.3.
- [14] M.-F. Huang and H.-T. Chang. Detection of Carbohydrates using Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with HgTe Nanostructures. *Chem. Sci.*, **2012**, 3, 2147.
- [15] C.-W. Wang, W.-T. Chen and H.-T. Chang. Quantification of saccharides in honey samples through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using HgTe nanostructures. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **2014**, 25(7), 1247.
- [16] C.-L. Su and W.-L. Tseng. Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (4), 1626.
- [17] R. Romeo-Gonzalez, A. G. Frenich and J. L. M. Vidal. Multiresidue method for fast

- determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2008**, 76, 211.
- [18] K. Greulich and L. Alder. Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 183.
- [19] M. D. Gil-Garcia, D. Barranco-Martinez, M. Martinez-Galera and P. Parrilla-Vazquez., Simple, rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20, 2395.
- [20] K. Grossmann and T. Ehrhardt. On mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone:a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Pest Manag. Sci.*, **2007**, 63, 429.
- [21] T. J. Garrett, M. C. Prieto-Conaway, V. Kovtoun, H. Bui, N. Izgarian, G. Stafford and R. A. Yost. Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure maldi linear ion trap mass spectrometer. *Intl. J. Mass Spectrom.*, 2007, 260, 166.
- [22] C. H. Le, J. Han and C. H. Borchers. Dithranol as a MALDI matrix for tissue imaging of lipids by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 8391.
- [23] A. Scherl, C. G. Zimmermann-Ivol, J. Di Dio, A. R. Vaezzadeh, P. A. Binz, M. Amez-Droz, R. Cochard, J. C. Sanchez, M. Glückmann and D. F. Hochstrasser. Gold coating of non-conductive membranes before matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometric analysis prevents charging effect. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19, 605.

## Figure Legend

Figure 1. Mass spectra of a-b) acephate and c-d) acetamiprid, e-f) PEG on leaves of Pansy using a, c, e) Pt-SALDI and b, d, f) MALDI.

Figure 2. Ion intensities of acephate at  $m/z$  206, acetamiprid at  $m/z$  245, and PEG at  $m/z$  393 on leaves using MALDI and Pt-SALDI.

Figure 3. IMS images of acephate at  $m/z$  206 and acetamiprid at  $m/z$  245 on leaves using a) Pt-SALDI and b) ME-Pt-SALDI.

Figure 4. Pt-SALDI-IMS images of leaves with acetamiprid at  $m/z$  245 and thiophanate-methyl at  $m/z$  365 treated with horticultural chemical agent Mospiran Topjin M Spray pesticide.

Figure 5. Pt-SALDI-IMS images of acephate sodium adduct ion at  $m/z$  206 on leaves containing systemic pesticide GF Orutoran after a) 4, b) 8, c) 11, and d) 14 days.



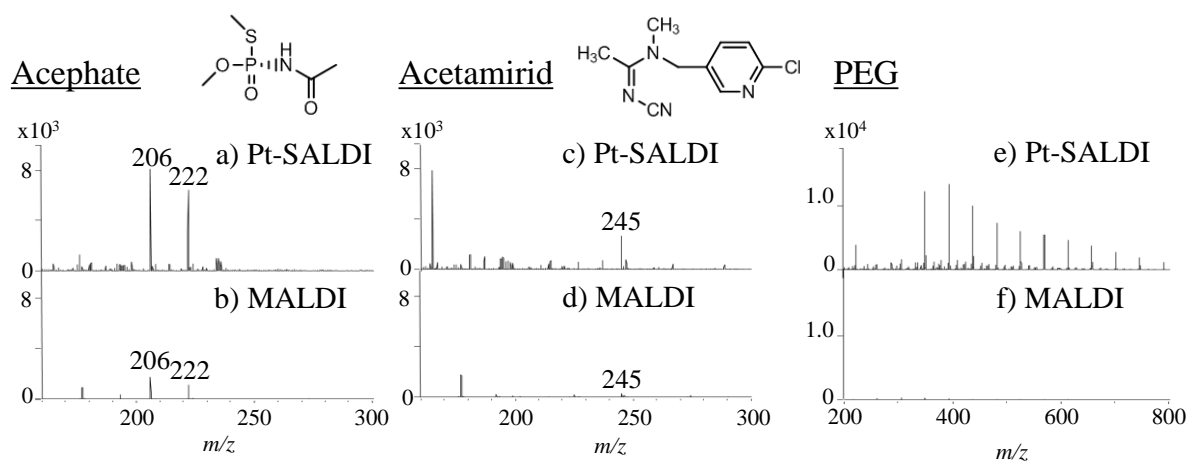


Fig. 1. Mass spectra of a-b) acephate and c-d) acetamiprid, e-f) PEG on leaves of Pansy using a, c, e) Pt-SALDI and b, d, f) MALDI.

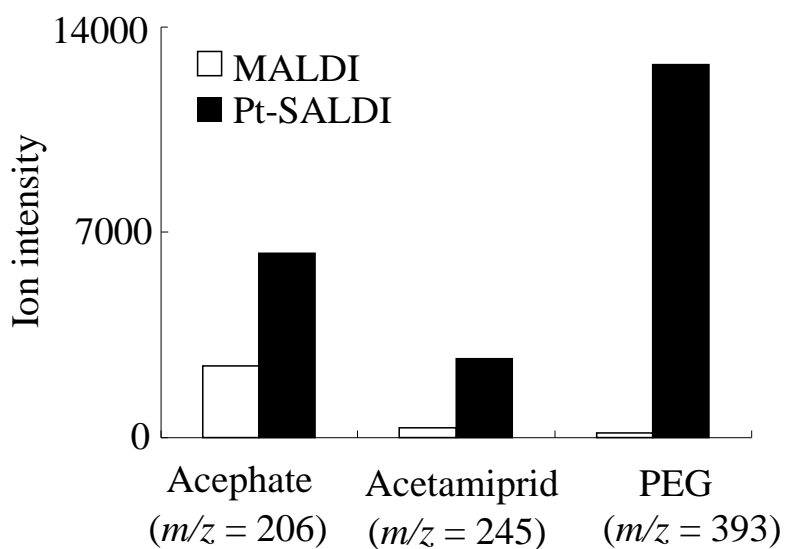


Fig. 2. Ion intensities of acephate at  $m/z$  206, acetamiprid at  $m/z$  245, and PEG at  $m/z$  393 on leaves using MALDI and Pt-SALDI.

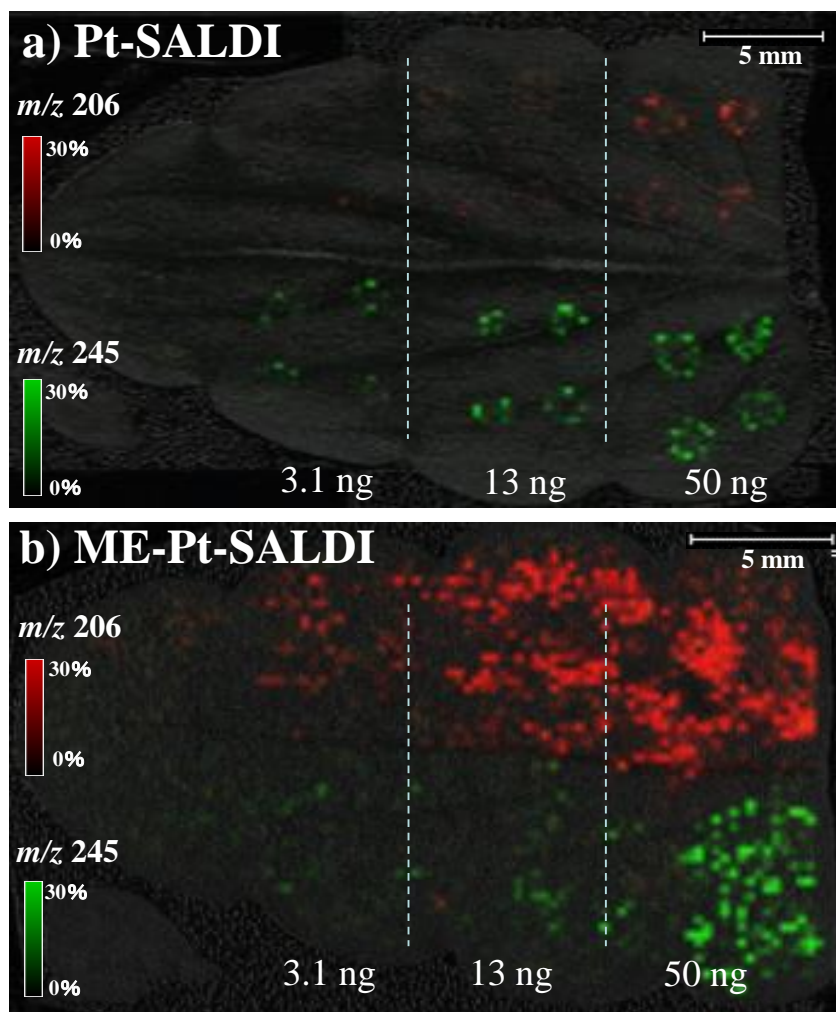
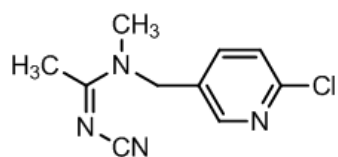


Fig. 3. IMS images of acephate at  $m/z$  206 and acetamiprid at  $m/z$  245 on leaves using a) Pt-SALDI and b) ME-Pt-SALDI.

### Acetamiprid



### Thiophanate-methy

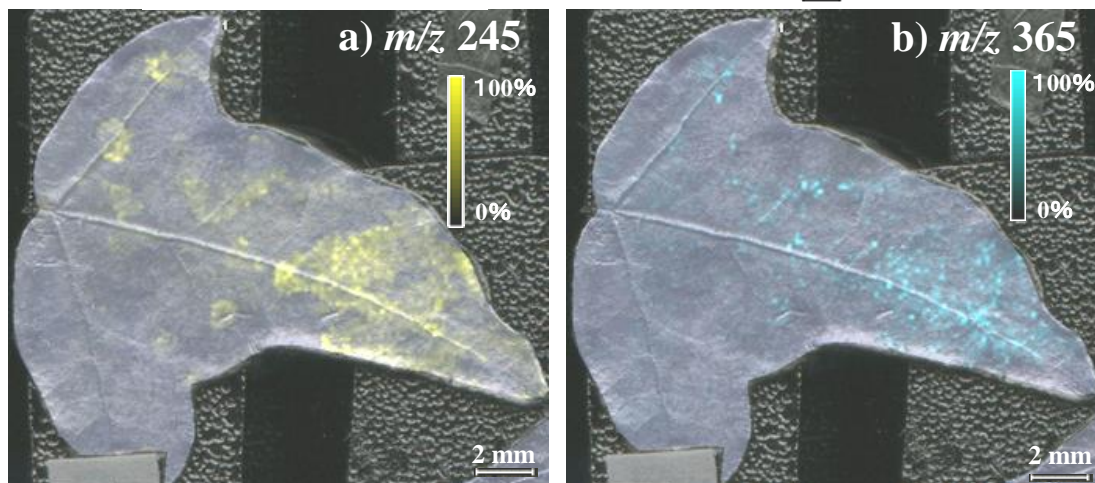
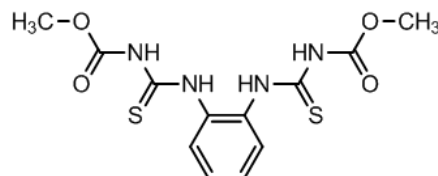


Fig. 4. Pt-SALDI-IMS images of leaves with acetamiprid at  $m/z$  245 and thiophanate-methyl at  $m/z$  365 treated with horticultural chemical agent Mospiran Topjin M Spray pesticide.

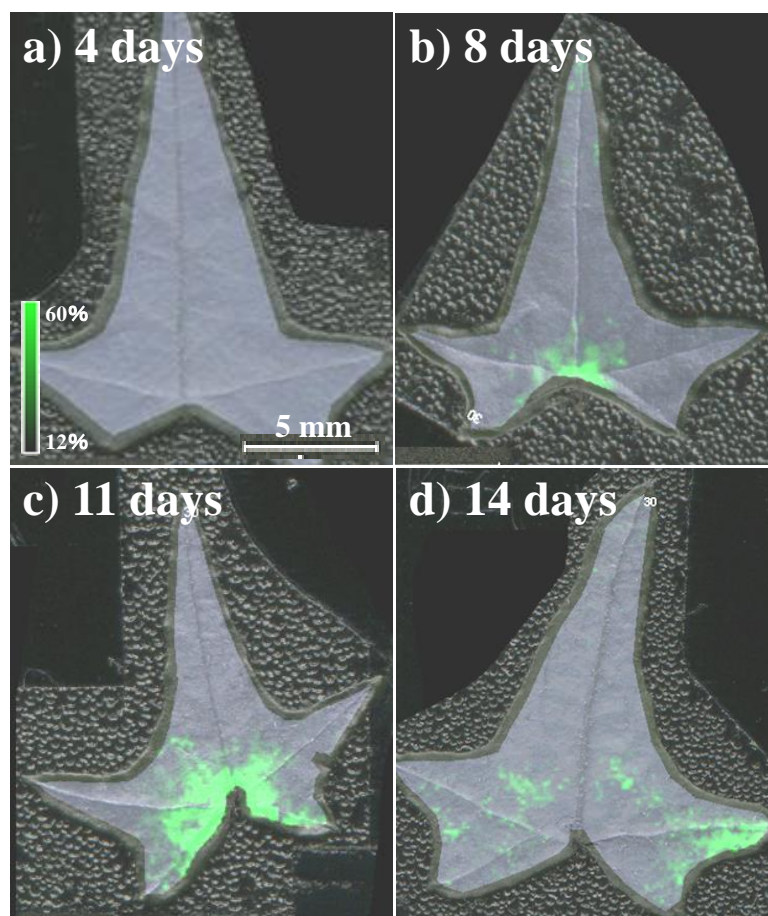


Fig. 5. Pt-SALDI-IMS images of acephate sodium adduct ion at  $m/z$  206 on leaves containing systemic pesticide GF Orutoran after a) 4, b) 8, c) 11, and d) 14 days.

## まとめ

本博士論文では、白金薄膜を利用した表面支援レーザー脱離イオン化質量分析 (Pt-SALDI-MS)法の開発とその応用研究を行った。マトリックスとしての白金薄膜は、MALDI の UV 吸収性有機化合物のマトリックスとは異なるイオン化特性を示した。Pt-SALDI は、TLC で分離された色素成分やインクジェットプリンターで印刷された紙上のインク成分の質量イメージングが可能であった。また、UV を照射したプリント紙のインク成分の劣化成分を画像化するとともに、その成分を同定することに成功した。

Pt-SALDI のイオン化特性を評価した。その結果、従来の MALDI 法では検出が困難であったグリセロ脂質の検出や、糖類の高感度な検出が可能であった。しかし、MALDI では特に高い検出感度が得られたリン脂質を検出することができなかった。この問題を解決するために、MALDI マトリックスと白金薄膜の両方を用いた ME-Pt-SALDI を行ったところ、リン脂質とグリセロ脂質の両方を高感度に検出して質量イメージングすることに成功した。

Pt-SALDI の応用研究として、農薬を投与した植物の葉の中における農薬の分布を Pt-SALDI 質量イメージングによって評価した。植物中の農薬の分布の研究は、これまでラジオアイソトープを含む農薬を用いて分析されてきた。MALDI で葉を直接質量イメージングすることはできない。その理由は、葉は非導電性でさらに薄い切片にすることが困難であるためである。Pt-SALDI はマトリックスの白金薄膜が葉に導電性を付与して、かつマトリックスの役割を果たすため、Pt-SALDI 質量イメージングによって農薬の分布を可視化することに成功した。

Pt-SALDI 法を用いることで、一般的な MALDI 質量イメージング法では分析が困難な工業材料や植物の直接質量イメージングに成功した。本手法は非導電性の厚い切片

などを含むあらゆる材料を質量イメージングできる可能性を持つため、医学・薬学・生物だけでなく化学・環境化学・デバイス関連の物理分野など多くの研究分野においてその有用性は高いことが考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くのご指導とご支援を賜りました指導教官の関西大学化学生命工学部教授 荒川隆一博士に深く感謝いたします。

本学位論文の研究において、貴重なご指導とご助言を頂きました関西大学化学生命工学部教授 石川正司博士， 同教授 川崎英也博士， 北陸先端科学技術大学院大学講師 大坂一生博士， 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所 渡辺健宏博士に心より感謝申し上げます。

実験において試料提供および機器使用の指導をして頂いた，北陸先端科学技術大学院大学 宮里朗夫博士，同 村上達也博士， 関西大学大学院 久富広隆氏，同 五百崎太輔氏， 日産化学工業（株） 濱田聡志氏，同 黒田雄介氏に心より感謝申し上げます。

博士課程在学中，研究を支援して頂いた上司の日産化学工業（株） 関達也博士，同 中山圭介氏，同 敷井和彰博士，ならびに同 物資科学研究所 物質解析研究部の同僚，同 富山工場 品質保証室の同僚の皆さんに，心より感謝申し上げます。

実験において学会を通じて助言を頂いた神東塗料（株） 土田好進氏，日本合成化学工業（株） 西本ゆかり氏に心より感謝申し上げます。

最後になりますが，いつも応援してくれた妻および息子に心から感謝します。

## 業績リスト

[学術論文 (審査あり) ]

1. **T. Ozawa**, I. Osaka, S. Hamada, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa, Direct imaging mass spectrometry of plant leaves using surface-assisted laser desorption/ionization with sputter-deposited platinum film, *Analytical Science*, **2016**, 32, 587-591. ○ 第三章
2. **T. Ozawa**, I. Osaka, T. Ihozaki, S. Hamada, Y. Kuroda, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa, Simultaneous detection of phosphatidylcholines and glycerolipids using matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry with sputter-deposited platinum film, *Journal of Mass Spectrometry*, **2015**, 50, 1264-1269. ○ 第二章
3. H. Kawasaki, **T. Ozawa**, H. Hisatomi, R. Arakawa, Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules., *Rapid Communication in Mass Spectrom.*, **2012**, 26, 1849-1858. ○ 第一章
4. H. Hisatomi, Y. Nishimoto, **T. Ozawa**, H. Kawasaki, K. Ute, R. Arakawa, Polymer analysis of psuedo 2D liquid chromatogram integrated with two LC-ESI-MS data using different columns, *Bunseki Kagaku* (Japanese), **2011**, 60, 245-251.
5. D. Kurokawa, H. Hisatomi, T. Watanabe, **T. Ozawa**, Y. Nishimoto, H. Kawasaki, N. Ikeda, and R. Arakawa, Mass spectrometry of femto-second laser photodegradation



products of synthetic polymers, *Bunseki Kagaku* (Japanese), **2011**, 60, 253-260.

6. T. Watanabe, K. Nakanishi, **T. Ozawa**, H. Kawasaki, K. Ute, R. Arakawa, Semi-online nanoflow liquid chromatography/matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of synthetic polymers using an octadecylsilyl-modified monolithic silica capillary column, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **2010**, 24, 1835–1841.
7. T. Watanabe, M. Okabayashi, D. Kurokawa, Y. Nishimoto, **T. Ozawa**, H. Kawasaki, R. Arakawa, Determination of primary bond scissions by mass spectrometric analysis of ultrasonic degradation products of poly(ethylene oxide-block-propylene oxide) copolymers, *J. Mass. Spectrom.*, **2010**, 45, 799-805.

〔国際会議〕

1. **T. Ozawa**, H. Kawasaki, R. Arakawa, Mass spectrometry imaging of leaf surface using platinum vapor deposition assisted laser desorption/ionization, *61th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. **2013**, WP 207, Minneapolis (US), ○ 第三章
2. **T. Ozawa**, H. Kawasaki, R. Arakawa, Mass Spectrometry of Industrial Materials using High Resolution LC/MS/MS, Multivariate Analysis and Imaging, *19th IMSC* . **2012**, ORAL(WORKSHOP), Kyoto (JP), ○ 第一章
3. **T. Ozawa**, H. Hisatomi, T. Higashiisokawa , H. Kawasaki, R. Arakawa, , Platinum Vapor Deposition Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization for Mass Spectrometry Imaging

of Small Molecules *19th IMSC* . **2012**, POSTER, Kyoto (JP), ○ 第一章

〔国内学会〕

1. 小澤智行, 川崎英也, 荒川隆一, Pt蒸着支援脱離イオン化を用いた葉およびポリマー表面のMSイメージング解析 *第18回質量分析討論会*, **2013** 大阪, ○ 第三章
2. 小澤智行, 久富広隆, 川崎英也, 荒川隆一, Pt蒸着によるSALDI/MSイメージングを用いた有機材料の分布解析 *第17回高分子分析討論会*, **2012**, 名古屋, ○ 第一章

〔特許〕

1. 荒川隆一, 川崎英也, 小澤智行, 白金ナノ粒子の物理蒸着を用いたイメージング質量分析方法, WO/2013/122225, ○ 第一章