ノ ー ト

MALDI-TOFMS による合成有機成分のイメージング測定

佐藤 幸司^{®1}, 吉田 和之¹, 森永 浩子², 山口 亮², 小河 潔²

1 緒 言

高分子材料中に含まれる添加剤のような合成有機物は、材料の劣化抑制に寄与していることから、材料開発において、その量的並びに分散状態の把握が重要である。また、洗剤中の界面活性剤のような合成有機物については、その効果を計るためには、対象物への付着や浸透量の程度を評価することが重要となる。これらの分析、評価においては、一般的に溶媒抽出法等により添加剤を分離し機器分析することによって、添加剤の構造や含有量を解析する方法が確立されている¹⁾。これは、材料の平均的な組成を評価することが可能であり、材料全体の変化を捉えるという観点からは有効な方法である。しかし、材料中の合成有機物の偏在化、局在化の有無を評価することはできないため、次のような方法で行っている。例えば添加剤の偏析等、特定成分の位置情報を評価する方法として、材料を切削後にフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) で表面や断面の官能基情報をイメージング評価する方法や、飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) や X 線光電子分光 (XPS) で極表面や深さ方向の分子フラグメントや元素組成の分布をイメージング解析する方法等である²⁾。ただし、FT-IR では、官能基情報をイメージ化できたとしても、類似化合物があった場合、評価できない欠点があった。また、TOF-SIMS や XPS では、狭い範囲しか分析できない問題があった。この問題に対して、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 (MALDI-TOFMS) を用いれば、広範囲な測定面の質量スペクトルで評価できる利点がある。現状、MALDI-TOFMS によるイメージングは、主に生体材料中の代謝物の解析に用いられており³⁾、代謝物の分布状態解析や細胞由来タンパク質のトリプシン消化産物⁴⁾や脂質の分布解析等、生体切片の評価法として実用化されている⁵⁾⁶⁾。これは、MALDI がソフトなイオン化法であり、アミド結合やエーテル結合といった構成官能基がほぼ同じ生体材料に

おいては、一定条件で高分子量体をイオン化しやすいという特徴を活かしたものである。しかしながら、合成有機成分への適用報告はほとんど見当たらなかった。一方、MALDI-TOFMS は、材料系の合成有機成分の構造解析に活用されており、試料表面や切片中の合成有機成分もうまくイオン化することができれば⁷⁾、位置情報をイメージ化可能であり、材料評価法として重要な情報が得られる。

そこで著者らは、合成有機成分を含む試料切片について、マトリックスを蒸着させた MALDI-TOFMS によるイメージング法を検討した。その結果、本法で添加剤等の合成有機成分の分布状態解析において良好な結果が得られたので報告する。

2 実 験

2・1 装 置

試料の MALDI マススペクトルの取得及びイメージング解析には、光学顕微鏡と質量分析計を一体化し、形態画像と分子分布画像を重ね合わせることが可能な島津製作所製の質量顕微鏡 (iMScope) 試作機を用いた⁸⁾。レーザーは Nd:YAG THG (波長 355nm), 7.1 μm ピッチ, 400 Hz, 80 ショット/ピクセル, positive モードで測定を行った。また、マトリックスの蒸着は、島津製作所で試作した抵抗加熱式真空蒸着装置内のヒーターにマトリックスを置き、温度 160 $^{\circ}\text{C}$ で、加熱、減圧することで、対向の酸化インジウムスズ (Indium-Tin-Oxide: ITO) スライドガラス (ALDRICH 製) に固定した試料 (切片) に曝^{さら}して行った。蒸着時間は、イオンの感度が高くなる 2 分間とした (マトリックス想定厚み; 1.7 μm)。

なお、イメージング測定の際、評価対象とするイオンを明確にするため、後述の添加剤やヘアケア剤 (リンス) についてマトリックス溶液と混合し、島津製作所製の AXIMA-CFR plus [窒素レーザー (波長 337 nm), positive モード] で測定し、その MALDI マススペクトルを確認した。

2・2 試 料

2・2・1 光学用多層フィルム Fig. 1 に示すような約 200 μm のポリプロピレンコア層の両側に Table 1 に示す

[®] E-mail: satou.kc@om.asahi-kasei.co.jp

¹ 旭化成株式会社基盤技術研究所: 416-8501 静岡県富士市鯉島 2-1

² 株式会社島津製作所基盤技術研究所: 619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-9-4

Cross section of film

Fig. 1 Schematic drawing of multi-layer optical film structure

3種の光安定剤（商品名：Tinuvin1577F, Tinuvin 234, Tinuvin 850）を含む約20 μmのスキン層をラミネートした3層構造を有するフィルムで検討を行った。

2・2・2 ヘアケア剤（リンス）に浸漬した毛髪 精製水で約1000倍に希釈した市販のヘアケア剤（リンス）に、根元部分を束ねた長さ約20 cmの人間の毛髪束をそれぞれ1分、30分、24時間浸漬し、浸漬時間経過後、毛髪表面をキムワイプで軽く抑え水分を拭き取り、測定に用いた。また、参照試料として薬液に浸漬しない毛髪も一緒に評価した。

2・3 試薬

MALDIのマトリックスとして、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHB）（ARDRICH製、98%）を用いた。光学用多層フィルムに添加されている各光安定剤のMALDIマスペクトルを確認するため、市販品（BASF製）を用いた。ヘアケア剤（リンス）のMALDIマスペクトルの確認には、ヘアケア剤（リンス）を浸漬した毛髪表面の測定を行った。ヘアケア剤（リンス）に浸漬した毛髪は、電子顕微鏡用エポキシ樹脂Quentol 812（日新EM製）を用いて包埋を行った。

2・4 測定

2・4・1 光学用多層フィルム 液体窒素で冷却したクライオミクロトーム（LEICA製UCT EMFCS）に多層フィルムをセットし、ガラスナイフにて厚さ3 μmのフィルム切片を作製した。切片の四隅にメンディングテープを貼り付け、透明電動膜（ITO）スライドガラスに固定した後、前述の装置にてマトリックスを蒸着し、質量顕微鏡（iMScope）試作機でMALDI-TOFMSによるイメージング解析を行った。また、各光安定剤のTHF溶液を調製し、AXIMA-CFR plusにてMALDIマスペクトルを測定し、プロトン付加イオンとスペクトルパターンの確認を行った。

2・4・2 ヘアケア剤（リンス）に浸漬した毛髪 ヘアケア剤（リンス）浸漬後の毛髪は樹脂に40℃で3日間かけて包埋した後、トリミング処理し、ミクロトーム

Table 1 Chemical structure of light stabilizers

Tinuvin 1577F	
Tinuvin 234	
Tinuvin 850	High molecular weight compound with a hindered amine structure in its host framework

（LEICA製UCT）で厚さ5 μmの切片にした。切片の四隅にメンディングテープを貼り付け、ITOスライドガラスに固定した後、前述の装置にてマトリックスを蒸着し、質量顕微鏡（iMScope）試作機でMALDI-TOFMSによるイメージング解析を行った。併せて、ヘアケア剤（リンス）に浸漬した毛髪をITOスライドガラス上に貼り付けた導電性粘着テープ上に横に並べて固定し、切片と同じようにマトリックス（DHB）を蒸着後にMALDI積算スペクトルの測定を行った。

3 結果と考察

3・1 光学用多層フィルムのイメージング測定

3種類の光安定剤の分布状態をイメージ化するため、フィルム断面のMALDI積算マスペクトルを測定し、Tinuvin 1577F, Tinuvin 234及びTinuvin 850の各MALDIマスペクトル測定で確認された特徴的なプロトン付加イオンである m/z 426, 448, 512でイメージング評価した。検出されるイオンを確認するためにAXIMA-CFR plusで測定したオリゴマー構造を有するTinuvin 850のスペクトルをFig. 2に示した。Fig. 3に示すように、Tinuvin 1577FとTinuvin 234は表層のスキン層に多く含有するものの、コア層にも分布していることが確認された。一方、Tinuvin 850はスキン層よりもコア層に分布しており、フィルム全体に分散している様子が確認された。なお、両コア層から内部移行しているイメージング結果が得られたことから、切片作成時のナイフによる持ち込みでなく、正規な添加剤分布をモニタリングできていると判断した。

各光安定剤は、光劣化が開始される原因となる有害な紫外線を吸収する紫外線吸収剤としての効果があるため⁷⁾、スキン層への添加が行われているが、ラミネート時の加熱とフィルム成型後の経時によって、スキン層中の光安定剤がコア層に溶出、移行していることが確認された。

Fig. 2 MALDI-TOFMS spectrum of Tinuvin 850

AXIMA-CFR plus (Shimadzu Corporation) was used. Dithranol and NaI was used as the matrix and the auxiliary agent for ionization, respectively.

Fig. 3 MALDI-MS imaging results for a multi-layer optical film

(a) MS spectrum of the film, (b) micrograph transmission image of the cross section, (c) MS mapping images. m/z 426.2, 448.2 and 512.5 were used for the mapping of each stabilizer, Tinuvin 1577F, Tinuvin 234 and Tinuvin 850 respectively. The MS mapping area corresponds to the micrograph transmission image.

Fig. 4 Preparation of a hair sample for a MALDI-MS imaging measurement

(a) Micrograph image of the hair sample fixed with conductive adhesive tape ($\times 10$), (b) schematic drawing of the hair samples for the measurement. The hair samples were immersed in a hair-care conditioner, and the samples were attached in a parallel manner with conductive adhesive tape on an ITO glass slide. A DHB matrix was then deposited using a sublimation method.

Fig. 5 MALDI-TOFMS spectrum and micrograph of the hair sample

(a) MS spectrum, (b) micrograph (transmission CCD image) of the hair samples embedded in epoxy resin.

3・2 ヘアケア剤（リンス）に浸漬した毛髪のイメージング測定

Fig. 4に示すように、ITO スライドガラスにヘアケア剤（リンス）を浸漬した毛髪をセットして、毛髪表面のMALDI 積算マスペクトルを測定した。なお、Fig. 5に示す各浸漬時間における毛髪断面の積算マスペクトルで見られた特徴的なイオンと浸漬時間の経過に伴い増加していくイオンを合わせ、 m/z 791 と m/z 703, 721, 857 の計四つのイオンについてイメージング評価を行った。Fig. 6に示すように、 m/z 791 成分は時間経過と関係なく毛髪表面に留まっており、また、その他の成分は、時間経過とともに毛髪内部から強く検出されるようになっていくことが確認された。

m/z 791 成分は毛髪表面を被覆する成分、その他の成分は毛髪に浸透していく成分と考えられ、各成分の構造決定

には至らなかったが、ヘアケア剤（リンス）に含まれる薬液成分ごとの毛髪への作用を表しているものと推定された。

4 ま と め

これまで生体材料において行われていた MALDI-TOFMS によるイメージングを、合成有機物に適用できないか検討を行った。その結果、試料の薄膜断面にマトリックスとして DHB を均一に蒸着させることで、今回はフィルム中の添加剤として含まれる光安定剤の分布と、毛髪内部に浸透していく薬液成分の様子についてイメージ化することができた。このように、本イメージング解析は、一般的なバルクの分析法では確認できない材料中の化学構造の分布や偏析状態に関する情報を取得するのに有効な方法であることが確認された。製品開発においては、時間経過に

Fig. 6 MALDI-MS images of the hair cross-section samples

A series of the samples with different immersion times were measured for MALDI-MS imaging. (a) Blank sample (immersion: 0 min), (b) after 1 min immersion, (c) after 30 min immersion, (d) after 24 hour immersion. For each sample, a micrograph (CCD epi-illumination image, obtained after matrix sublimation) is shown in the upper left. Others are corresponding MALDI-MS images. m/z 703.1, 721.1, 791.5, and 857.0 were used for individual mappings.

伴う添加剤のマイグレーションやブリードアウト解析等のメカニズム解明にも活用できると考えられる。

MALDI 法は、マトリックスの付着状態等、前処理条件がイオン強度を大きく左右することが知られている。したがって、MALDI-TOFMS を用いて材料系の合成有機成分をイメージングする方法では、目的成分を効率的にイオン化させるためのマトリックス種の選択と、試料上でのマトリックス粒子径や均一性を保つための工夫が必要となり、蒸着法以外にも噴霧法等、種々の前処理方法が検討されている。また、切片試料の場合は、適正な切片作成法はもちろんのこと、その厚みや導電性の付与法等もイオン化効率に大きな影響を与え、これらは、合成有機成分の種類によってそれぞれ適正な方法が存在する^{9)~11)}。今後、応用できる対象材料、合成有機成分種を拡大していくことで、MALDI-TOFMS によるイメージング法のさらなる発展が期待される¹²⁾。

謝 辞

本研究にあたっては、質量顕微鏡 (iMScope) の試作機と蒸着装置を用いた測定にご快諾いただきました(株)島津製作所基盤技術研究所 藤分秀司様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 西岡利勝, 寶崎達也共編: “実用プラスチック分析”, p. 476 (2011), (オーム社).
- 2) 西岡利勝, 寶崎達也共編: “実用プラスチック分析”, p. 121 (2011), (オーム社).
- 3) 瀬藤光利: “質量顕微鏡法”, (2008), (シュプリンガー・ジャパン).
- 4) Y. Sugiura, S. Shimma, Y. Moriyama, M. Setou : *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 25 (2007).
- 5) 原田高宏, 竹内貞夫, 出水秀明, 古橋 治, 竹下建吾, 小河 潔, 吉田恵一, 星川 裕, 瀬藤光利: 島津評論, **64**, 139 (2008).
- 6) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, N. Zaima, M.

- Matsumoto, M. Setou : *Anal. Chem.*, **80**, 878 (2008).
- 7) S. M. Weidner, J. Falkenhagen : *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23**, 653 (2009).
- 8) T. Harada, A. Yuba-Kubo, Y. Sugiura, N. Zaima, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Wakui, M. Suematsu, K. Takeshita, K. Ogawa, Y. Yoshida, M. Setou : *Anal. Chem.*, **81**, 9153 (2009).
- 9) 平 修 : *ぶんせき (Bunseki)*, **2013**, 429.
- 10) 新聞秀一, 瀬藤光利 : *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **53**, 230 (2005).
- 11) 工藤寿治, 斐澤 崇 : *日本画像学会誌*, **50**, 448 (2011).
- 12) A. Walch, S. Rauser, S. O. Deininger, H. Höfler : *Histochemistry and Cell Biology*, **130**, 321 (2008).

MALDI-TOFMS Imaging Measurement of Synthesized Organic Components

Koji SATO^{®1}, Kazuyuki YOSHIDA¹, Hiroko MORINAGA², Ryo YAMAGUCHI² and Kiyoshi OGAWA²

[®] E-mail : satou.kc@om.asahi-kasei.co.jp

¹ ASAHI KASEI CORPORATION, Analysis & Simulation Center, 2-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka 416-8501

² SHIMADZU CORPORATION, Technology Research Laboratory, 3-9-4, Hikaridai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto 619-0237

(Received December 9, 2013; Accepted March 5, 2014)

We performed a study of MALDI-MS imaging that is a combination of an optical microscopy and MALDI mass spectroscopy. Mapping images of chemical materials were successfully obtained by applying 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) as a matrix with a sublimation method. In this paper, we present two results: (1) the distribution of light stabilizers in a multi-layer synthetic film, and (2) the state of the penetration phenomena of hair conditioner chemical components in the hair shaft. In either case, a careful selection of m/z ion enabled successful mapping for individual components; and a variation of the distribution according to the type of components was revealed. Further, important implications with regard to the development design of the materials structure and chemical components were deduced. These results indicated that the MALDI-MS imaging method, which has been extensively used only for biomaterials, is also a powerful tool for the analysis of chemical materials.

Keywords: MALDI imaging mass spectrometry; mass-microscope; light stabilizer; multi-layer optical film; hair strand; sublimation.