

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：32629

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05908

研究課題名(和文)マトリックス効果を考慮した二次イオン質量分析イメージングの開発

研究課題名(英文)Chemical imaging using secondary ion mass spectrometry considering matrix effects

研究代表者

青柳 里果 (AOYAGI, Satoka)

成蹊大学・理工学部・教授

研究者番号：20339683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：飛行時間型二次イオン質量分析(TOF-SIMS)における主な課題の一つであるマトリックス効果(共存物質によって二次イオン強度が変化し、定量性が損なわれることがある現象)について、ペプチドと脂質、酸化防止剤、有機エレクトロルミネッセンス材料などの混合試料をTOF-SIMSで測定して得られた正二次イオン・負二次イオンスペクトルについて検討した結果、dynamic-SIMS分野などで用いられてきた相対感度因子に基づく補正がTOF-SIMSデータに対しても有効であることが示され、イメージングデータにも応用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物質ごとに分布情報が得られる質量イメージング分野の中でも空間分解能が高いことから注目されているTOF-SIMSについて、マトリックス効果が補正できることを示した。物質のイメージングは、測定単位ごとの定量分析に基づいて得られる情報であるため、マトリックス効果が補正可能であることを示した学術的および社会的意義は大きい。有機物および生体試料の2次元および3次元イメージングにおいて、より正確な計測結果が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) is one of the most powerful methods to obtain detailed chemical information and molecular mappings with a high spatial resolution approximately 100 nm, quantitative analysis is still often challenging because the intensity change of a secondary ion can be suppressed or enhanced due to matrix effects by co-existing materials. Matrix effects are also important issues in dynamic-SIMS, and sensitivity factors (RSFs), which are obtained from reference samples in a narrow concentration range, are used to correct the measured secondary ion intensities influenced by matrix effects. In this study, matrix effects in positive and negative secondary ion spectra for biomolecules, antioxidants, and organic electroluminescence materials were investigated. As a result, it was suggested that correction methods based on RSF are also useful for TOF-SIMS spectra and images of organic samples.

研究分野：表面科学

キーワード：TOF-SIMS マトリックス効果 有機EL材料 ペプチド 脂質 有機物 定量分析

### 1. 研究開始当初の背景

飛行時間型二次イオン質量分析(TOF-SIMS)は 100nm 程度の高い面分解能と数 nm の深さ分解能で 2 次元及び 3 次元化学イメージングが得られる手法で、生体試料から高機能デバイスまで多様な分野への応用が期待されている。ただし、共存物質の影響によって実濃度よりも極端に低くまたは高く二次イオンが検出されるマトリックス効果によって正確な定量分析が難しい場合があることが課題の一つである。イメージングは、一種の定量であり、存在するか否かだけでなく、特定の場所にどれだけの量存在するのか示すことが求められる。複雑な多成分系試料の TOF-SIMS データでは、マトリックス効果が無視できない場合もあり、標的物質の存在量が二次イオン強度と必ずしも対応しないこともある。マトリックス効果は質量分析分野でも大きな課題の一つであり、有機物を対象とした TOF-SIMS データについてマトリックス効果補正が実現すれば、同様の手法が MALDI などの質量分析にも応用できる可能性が期待できる。

### 2. 研究の目的

TOF-SIMS による混合試料の分析では共存物質による影響（マトリックス効果）のため、正確な定量が難しい場合もある。そこで、特に生体試料で問題となるタンパク質やペプチド由来の二次イオン強度への脂質の影響を調べ、その補正方法を検討することにより、マトリックス効果を抑えた計測や補正を試み、生体組織を始めとする複雑な試料について、より正確な TOF-SIMS イメージングを可能とすることを旨とする。さらに様々な有機物試料への応用を考え、酸化防止剤として用いられる Irganox 1010 などの混合試料および有機エレクトロロミネッセンス (OEL) 試料におけるマトリックス効果についても基礎検討し、補正方法の適用を目指す。

### 3. 研究の方法

マトリックス効果の機構解明と補正の有効性確認のためペプチドと脂質、2 種類の OEL 材料および Irganox 1010 などの混在モデル試料を複数用意した。図 1 にモデル試料の例として、Irganox 1010 & Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine の混合試料[K. Takahashi, S. Aoyagi, T. Kawashima, Surf. Interface Anal. 72, 49(8), 721-727 (2017) (DOI: 10.1002/sia.6214)]を示す。混合比率、成膜方法などを変えた試料について、正二次イオンおよび負二次イオンスペクトルおよび分布イメージを TOF-SIMS で測定し、マトリックス効果の程度が試料の組み合わせや二次イオンの極性でどのように変化するか、補正が有効か評価した。

試料は分子クラスターによるイオン化手法 desorption/ionization induced by neutral cluster (DINeC) などでも測定し、DINeC の結果は未知物質の同定や TOF-SIMS でのマトリックス効果との比較に用いてより正確な補正手法を確立する。TOF-SIMS の二次イオンへのマトリックス効果を正確に検証するために高質量分解能のオービトラップおよび MSMS を搭載した TOF-SIMS での生物試料の測定も行った。

2 種有機混合多層膜試料について提案されているマトリックス効果補正[A. G. Shard, et al., J. Phys. Chem. B., 119(33), 10784 (2015) (DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b05625)]を本研究のペプチドと脂質混合試料に対して適用し、妥当性を検討した。2 成分混合系では、もう一方の成分には起因しない標的成分のみに由来する二次イオンでかつマトリックス効果が小さい二次イオンが両方の成分に関して検出できれば、それぞれの成分が 50% ずつ混合した試料の TOF-SIMS スペクトルにおけるイオン強度比からマトリックス効果が補正できることが報告されている。補正式を下記に示す。

$$\Phi_a = I_A / (I_A + k(A:B)I_B)$$

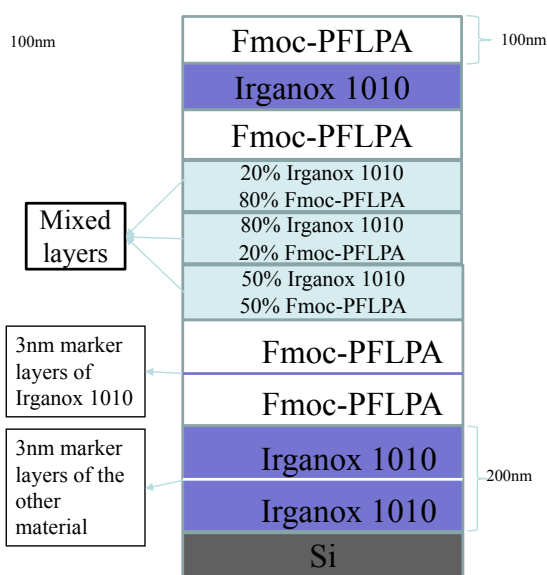


図 1 モデル試料の構造

A, B の 2 成分混合系とし、 $\phi$  は補正した二次イオン強度を表す。 $I$  は実測データにおける二次イオン強度であり、 $k(A:B)$  は、50%ずつ混合した試料の TOF-SIMS スペクトルにおけるイオン強度比である。

#### 4. 研究成果

##### ・マトリックス効果補正

ペプチドと脂質混合試料、酸化防止剤である Irganox1010 と他の有機物との混合試料及び CBP と Ir(ppy)<sub>3</sub> の混合試料について、相対感度因子および  $k(A:B)$  に基づく補正を実施することで、定量性が確保できることを示した。相対感度因子による定量は、2 成分系について調整した標準試料の測定結果から求めることができる。さらに、2 成分系の相対感度因子もしくは  $k(A:B)$  に基づいて、3 成分系においても 2 成分ずつ補正することによって、ある程度適用可能であることが示された。

相対感度因子の算出では複数の濃度の標準試料を調整することが望ましいが、Shard らによって 2015 年 (DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b05625.) に示された 50%ずつ 2 成分を混合した試料における各物質の二次イオン強度比  $k(A:B)$  を用いても、今回検討したどの試料においても、複数試料から求めた相対感度因子による定量と同等の結果となることが示された。相対感度因子による定量方法の概要を以下に示す。二つの物質 A と B のみが混合した試料を考える。測定部に対するそれぞれの体積比を  $N_A, N_B$  とする。

$$N_B = N_B / (N_A + N_B) \quad (1)$$

マトリックス効果が無視できて感度因子が濃度に依存せず一定とみなせる場合で、かつピークの干渉が無視できる場合は、下記式が成立する。

$$I_A = S_A * N_A \quad (2)$$

$$I_B = S_B * N_B \quad (3)$$

$I_A, I_B$  はそれぞれ物質 A, B に由来すると考えるイオン A, B の強度であり、 $S_A, S_B$  はそれぞれイオン A, B の感度因子である。したがって、 $N_A = (1/S_A) * I_A, N_B = (1/S_B) * I_B$  より、

$$N_B = I_B / ((S_B/S_A) * I_A + I_B) \quad (4)$$

が得られる。ただし、TOF-SIMS では有機物 2 種類が混在する場合、干渉のないピークを見つけるのは現実的に困難な場合が多いため、干渉ピークの影響があると考えると、 $I_A$  には物質 A 由来のイオンと物質 B 由来のイオンが含まれると考えられる。同様に  $I_B$  には物質 B 由来のイオンと物質 A 由来のイオンが含まれると考えられる。したがって、 $I_A, I_B$  は下記のように表される。

$$I_A = S_A * N_A + b * N_B = S_A * N_A + b * (1 - N_A) = b + (S_A - b) * N_A \quad (5)$$

$$I_B = S_B * N_B + a * N_A = S_B * N_B + a * (1 - N_B) = a + (S_B - a) * N_B \quad (6)$$

ここで、 $b$  はイオン A と同じ質量を示すピークで物質 B に由来するイオンの感度係数であり、 $a$  はイオン B と同じ質量を示すピークで物質 A に由来するイオンの感度係数である。これらの感度係数が一定とみなせる場合にこれらの式は有効である。式 (1), (5), および (6) より、次式が成り立つ。

$$N_B = N_B / (N_A + N_B) = (I_B - a) / (k(I_A - b) + (I_B - a)) \quad (7)$$

ただし、 $k = (S_B - a) / (S_A - b)$  である。小文字  $b, a$  は、それぞれ  $N_B = 1 (N_A = 0)$  のイオン B の強度、 $N_A = 1 (N_B = 0)$  のイオン A の強度として求められるため、 $I_A, I_B$  からそれぞれ物質 A, B の濃度が 0 の試料の強度 (バックグラウンド) を引いた値を用いれば良い。

この式を用いて定量する場合は、各有機物に由来する二次イオンの選択が重要である。マトリックス効果が大きすぎる二次イオンを用いた場合は定量性が確保できないため、多変量解析などで、マトリックス効果が小さい、もしくは無視できる二次イオンの組み合わせを探す必要がある。多変量解析による適切なピークの見つけ方については、以前に検討している [K. Takahashi, S. Aoyagi, T. Kawashima, Surf. Interface Anal., 49(8), 721-727 (2017) (DOI: 10.1002/sia.6214)]. 有機物の TOF-SIMS 測定においては、様々な二次イオンが検出され、大きくマトリックス効果を受けている二次イオンと、マトリックス効果が小さい二次イオンが混在している。また、異なる物質由来でも、全く同じ化学組成で同一の質量の二次イオンや、化学組成は異なっても極めて近い質量の二次イオンが発生する場合があります。それらの干渉ピークの影響によって定量性が損なわれる場合も多い。本研究では、マトリックス効果が小さい二次イオンを両有機物由来について見つけることができれば、干渉ピークの影響が無視できない場合でも、相対感度因子および  $k(A:B)$  による補正で定量が可能であることが示された。

例として、Irganox 1010 & Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine の混合試料 (図 1) を TOF-SIMS で測定したデータに対する補正結果を図 2 に示す。図 2 の 166.99 Da の二次イオンは Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine 由来であり、共存物質 Irganox 1010 によって増大される傾向がある。一方、Irganox 1010 由来である 231.17 Da の二次イオンは共存物質 Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine によって抑制される傾向が見られる。これらの二次イオンについて、 $k(A:B)$  を求めて、Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine の存在比  $N$  を求めた結果を図 2 に示す。(7)式から求めた存在比  $N$  と試料の濃度比は相関係数が 0.997 であり、高い直線性を示す結果が得られた。このように、測定結果の二次イオン強度をそのまま用いると定量が難しいが、2つの物質由来の二次イオン強度と式 (7) によって感度因子から求めた係数を用いることにより、定量性を高められることが示された。同様の結果はペプチドと脂質、2種類の OEL 材料を TOF-SIMS で測定したデータについても得られた。

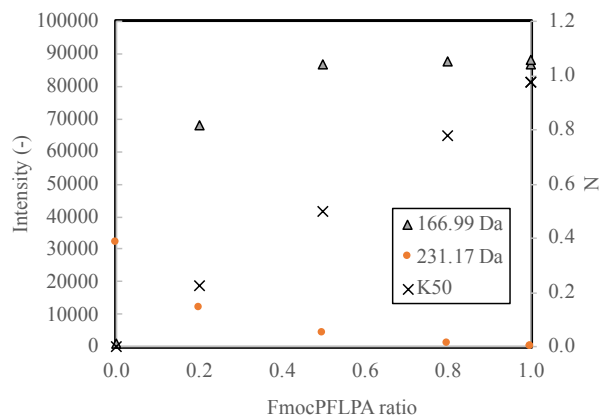


図 2 モデル試料の二次イオンと存在比の関係

・情報エントロピーの応用

試料の混合状態評価に、TOF-SIMS スペクトルの情報エントロピーが有効であることを示した。スペクトルの情報エントロピーは、各二次イオン強度を総二次イオンで割ることによって二次イオンのスペクトル上での検出確率として、情報エントロピーを算出した。

$$S_z = - \sum_{k=1}^n (p_{z,k} \log_2 p_{z,k})$$

ここで、 $S_z$  は深さ  $z$  におけるスペクトルの情報エントロピー、 $p_{z,k}$  は深さ  $z$  における二次イオン  $k$  の強度を深さ  $z$  におけるスペクトルの総二次イオン強度で割った値である。

その結果、マトリックス効果を受けた状態でも、混合状態の変化の概要を示すことが示唆された。Irganox 1010 & Fmoc-pentafluoro-L-phenylalanine の混合試料の TOF-SIMS スペクトルの情報エントロピーと深さの関係を図 3 に示す。図 3 下図で示す Irganox1010 に由来する二次イオンの深さプロファイルと対応する情報エントロピーの値 (図 3 上図) の変化が得られた。測定した試料について、注目すべき二次イオンの情報がない場合でも、スペクトル全体の情報エントロピーを計算することによって、混合状態や物質の違いによるデータの概要が理解できる可能性が示された (論文執筆中)。

また情報エントロピーによるスペクトルにおける混合状態評価は、物質分布のイメージングにも応用でき、より正確な質量イメージングが得られることが示唆された。

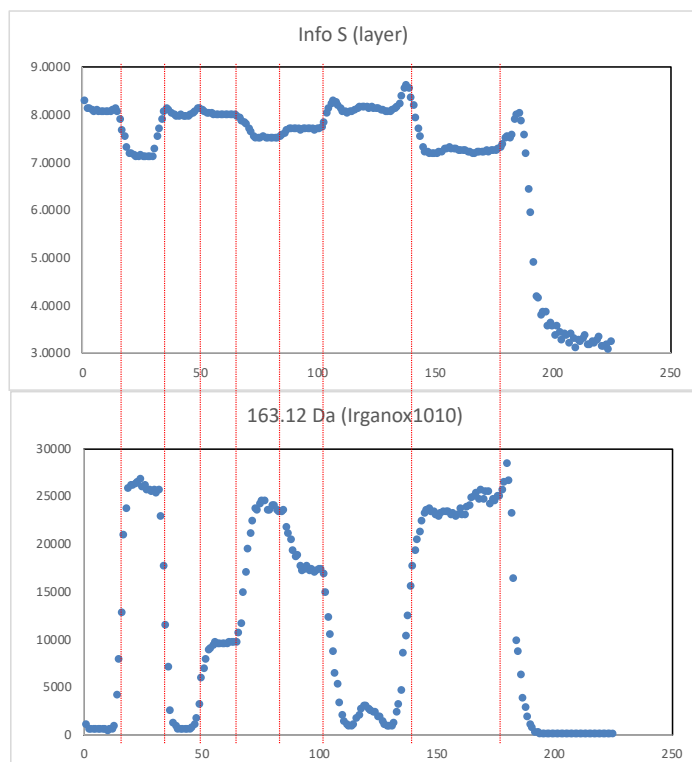


図 3 TOF-SIMS スペクトルの情報エントロピー(上図)と二次イオン強度(下図)の深さプロファイル

- スペクトルの機械学習による予測

ペプチドと脂質の混合系に関しては、脂質によって著しくペプチド由来の二次イオン強度が抑制された状態でもペプチドのスペクトルであると機械学習によって認識できることが示された。

ペプチドの TOF-SIMS スペクトルの機械学習による予測は Random Forest を用いて実施[S. Aoyagi, et al., Anal. Chem. 2021, 93, 9, 4191–4197 (doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04577)]し、純粋なペプチド試料の TOF-SIMS データによる予測システムを混合試料系に適用した。脂質とペプチドの共存試料では、ペプチド由来のアミノ酸フラグメントイオンの多くは二次イオン強度が大きく抑制されたが、スペクトル全体の傾向を踏まえて予測する機械学習では、脂質混在ペプチド試料の TOF-SIMS スペクトルの予測が可能なが示された。したがって、脂質混在下で二次イオン強度が大きく抑制される状況でも、スペクトル全体で捉えると、ペプチド由来の二次イオンは解析に耐えうる強度で検出されていることが示唆された。したがって、定量に有用な二次イオンは、アミノ酸フラグメントなどの化学構造から容易に示される二次イオンだけではなく、スペクトル全体を考慮することにより、見つけることができる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keisuke Mizomichi, Takayuki Yamagishi, Tomoko Kawashima, Michael Durr, and Satoka Aoyagi	4. 巻 15
2. 論文標題 Investigating matrix effects of different combinations of lipids and peptides on TOF-SIMS data	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biointerphases	6. 最初と最後の頁 21008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1116/6.0000036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Satoka Aoyagi, Yukio Fujiwara, Akio Takano, Jean-Luc Vorng, Ian S. Gilmore, Yung-Chen Wang, et al.	4. 巻 93
2. 論文標題 Evaluation of Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Spectra of Peptides by Random Forest with Amino Acid Labels: Results from a Versailles Project on Advanced Materials and Standards Interlaboratory Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical chemistry	6. 最初と最後の頁 4191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c04577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Satoka Aoyagi, Yuuki Kodama, Melissa K. Passarelli, Jean-Luc Vorng, Tomoko Kawashima, Keisuke Yoshikiyo, Tatsuyuki Yamamoto and Ian S. Gilmore	4. 巻 91
2. 論文標題 OrbiSIMS imaging identifies molecular constituents of the perialgal vacuole membrane of <i>Paramecium bursaria</i> with symbiotic <i>Chlorella variabilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14545-14551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b03571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shusuke Nakano, Takayuki Yamagishi, and Satoka Aoyagi, Andre Portz, Michael Durr, Hideo Iwai, Tomoko Kawashima	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of matrix effects on TOF-SIMS data of leu-enkephalin and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine mixed samples	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biointerphases	6. 最初と最後の頁 03B403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1116/1.5013219.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Andre Portz, Satoka Aoyagi, Michael Durr	4. 巻 13
2. 論文標題 Soft depth-profiling of mixed peptide/lipid samples by means of cluster induced desorption/ionization mass spectrometry High depth resolution and low matrix effect	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biointerphases	6. 最初と最後の頁 03B405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1116/1.5013151.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 家持 圭佑, 溝道 桂介, 三井所 亜子, 山ぎし崇之, 青柳 里果
2. 発表標題 有機EL材料混合試料のTOF-SIMSスペクトルにおけるマトリックス効果の評価
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝道 桂介, 山ぎし崇之, 青柳 里果
2. 発表標題 二種類の有機物質積層試料のTOF-SIMSデプスプロファイルにおける情報エントロピーを利用した界面評価
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Mizomichi, Takayuki Yamagishi, Tomoko Kawashima, Michael Durr, and Satoka Aoyagi
2. 発表標題 Investigating Matrix Effects on Different Combinations of Lipids and Peptides
3. 学会等名 the 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS 22) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Ito, Yukari Kuga, Takayuki Yamagishi, Miya Fujita, and Satoka Aoyagi
2. 発表標題 Sparse Modeling Application to Image Fusion Data of Plant Tissues using TOF-SIMS and Light Microscope
3. 学会等名 the 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS 22) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shusuke Nakano, Takayuki Yamagishi <sup>1</sup> , Hideo Iwai, Satoka Aoyagi
2. 発表標題 Evaluation of matrix effects on ToF-SIMS data of peptide and lipid mixed samples
3. 学会等名 the 21st International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	研究機関名	研究者名	備考
ドイツ	Justus-Liebig Universitte Giessen	Institute of Applied Physics	
英国	National Physical Laboratory		