

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5837273号
(P5837273)

(45) 発行日 平成27年12月24日(2015.12.24)

(24) 登録日 平成27年11月13日(2015.11.13)

(51) Int.Cl. F 1
GO 1 N 27/62 (2006.01)
 GO 1 N 27/62 V
 GO 1 N 27/62 F

請求項の数 11 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2009-49917(P2009-49917)	(73) 特許権者	000173924
(22) 出願日	平成21年3月3日(2009.3.3)		公益財団法人野口研究所
(65) 公開番号	特開2010-203925(P2010-203925A)		東京都板橋区加賀一丁目8番1号
(43) 公開日	平成22年9月16日(2010.9.16)	(74) 代理人	100125748
審査請求日	平成24年2月21日(2012.2.21)		弁理士 高橋 徳明
審判番号	不服2014-9197(P2014-9197/J1)	(72) 発明者	西風 隆司
審判請求日	平成26年5月19日(2014.5.19)		東京都板橋区加賀一丁目8番1号 財団法人野口研究所内
(出願人による申告)平成20年度、独立行政法人科学技術振興機構、先端計測分析技術・機器開発事業に係る委託研究契約、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	天野 純子
			東京都板橋区加賀一丁目8番1号 財団法人野口研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 質量分析法用測定試料及びその調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

測定対象分子を含む試料とマトリックスから質量分析法用測定試料を調製する方法であって、

(A) 測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後に、

(B) マトリックスのみを「該測定対象分子と該マトリックスの何れをも溶解できる溶媒a」に溶解した溶液を、上記プレートに滴下して乾燥する工程とを含み、

該測定対象分子が、糖、糖ペプチド又は糖タンパク質であり、

該「測定対象分子とマトリックスとの何れをも溶解できる溶媒a」が、アルコール類若しくはフェノール類又は20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒であって、実質的に水を含有しない溶媒であることを特徴とする質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項2】

工程(A)と工程(B)の間に、

(C) 測定対象分子と反応することによってイオン化効率を高める誘導体化剤の溶液を、上記プレートに滴下して乾燥する工程

を含む請求項1に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項3】

上記誘導体化剤が、その分子内に縮合多環を有する縮合多環化合物である請求項2に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

10

20

【請求項 4】

上記誘導体化剤が、ピレン環化合物である請求項 3 に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 5】

測定対象分子を含む試料とマトリックスから質量分析法用測定試料を調製する方法であって、

(D) 測定対象分子を含む試料とマトリックスとを「該測定対象分子と該マトリックスの何れをも溶解できる溶媒 a」中で混合して溶液を調製する工程と、

(E) (D) で調製した溶液をプレートに滴下して乾燥する工程と

を含み、

該測定対象分子が、糖、糖ペプチド又は糖タンパク質であり、

該「測定対象分子とマトリックスとの何れをも溶解できる溶媒 a」が、アルコール類若しくはフェノール類又は 20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒であって、実質的に水を含有しない溶媒であることを特徴とする質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 6】

「測定対象分子とマトリックスとの何れをも溶解できる溶媒 a」が、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール及びアセトニトリルからなる群より選ばれた 1 種の溶媒又は 2 種以上の混合溶媒であって、実質的に水を含有しない溶媒である請求項 1 ないし請求項 5 の何れかの請求項に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 7】

測定対象分子を含む試料とマトリックスから調製される質量分析法用測定試料が、表面の少なくとも一部に平均周期 1 nm～300 nm の波状構造を有することを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 の何れかの請求項に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 8】

上記波状構造の平均振幅の 2 倍が 1 nm～40 nm である請求項 7 に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 9】

上記波状構造を有する波状構造体の少なくとも 1 つが、測定試料を上から見た時の面積として $4 \mu\text{m}^2$ 以上である請求項 7 又は請求項 8 に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 10】

少なくとも一部分の厚みが 10 μm 以下である請求項 7 ないし請求項 9 の何れかの請求項に記載の質量分析法用測定試料の調製方法。

【請求項 11】

請求項 1 ないし請求項 10 の何れかの請求項に記載の質量分析法用測定試料の調製方法を用いて調製された質量分析法用測定試料に対し、フラグメント化を n 回繰り返す MSⁿ 法 ($2 \leq n$) を適用することを特徴とする質量分析法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は質量分析法用測定試料の調製方法に関し、更に詳しくは、特定の構造の測定試料表面を有する質量分析法用測定試料の調製方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

「質量分析法 (mass spectrometry)」(以下、「MS」と略記することがある) とは、測定対象分子を含む試料をイオン化し、測定対象分子由来のイオンを質量電荷比 (質量/電荷 (m/z)) によって分離し検出することによって、その測定対象分子の化学構造に関する情報を得る方法である。

【0003】

MS において、試料のイオン化は、分析の可否や得られるスペクトルの質を左右する重

10

20

30

40

50

要な過程であり、試料を効率よくイオンにするためにこれまで多くのイオン化法が開発されてきた。現在のところ、生体高分子のイオン化には、ソフトイオン化であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization) (以下、「MALDI」と略記することがある) 法やエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization) (以下、「ESI」と略記することがある) 法が主に用いられている。これらのイオン化法を用いた質量分析計は、NMR等に比べて測定試料量が少なくても測定が可能であることから、バイオ分野でも広く用いられている。

【0004】

MALDI-MSを用いた糖類の分析は、ペプチドやタンパク質に比べて困難であると考えられている。その根本的な理由のひとつに、糖類のイオン化の効率がペプチド等

10

【0005】

MALDI-MSでの糖類等のイオン化効率は、ペプチド等に比較して著しく悪く、例えば生体から抽出した微量糖鎖を分析する際は、感度を向上させるために、糖鎖の水酸基をメチル化する手法や、糖鎖の還元末端を誘導体化する手法が一般的に用いられている。例として、非特許文献1、2及び3や、特許文献1及び2がある。これらの誘導体化による感度向上のメカニズムは完全に解明されていないが、一般に感度向上のために、芳香環等の疎水性の官能基やイオン性の官能基を導入している。また、誘導体化とは別のアプローチとして、親水性である糖鎖を感度良く測定するために特殊なマトリックスが開発されている。例として、非特許文献4及び5や、特許文献3及び4がある。

20

【0006】

このように、いまだ、MALDIのイオン化メカニズムは完全に解明されていないため、測定に用いるマトリックスの選択、試料の調製方法等は、経験的な知見に基づく場合が多い。一般に、マトリックスと試料は良く混ざり、混合結晶となる必要があると考えられている。しかし、固体結晶となるため不均一で、更に、結晶が生成した場所すべてから測定対象分子由来のイオンが得られるわけでもなく、生成した結晶のごく一部分にレーザーを照射した場合のみ測定対象分子由来のイオンが得られる。

30

【0007】

この部分は、「スイートスポット (sweet spot)」と呼ばれ、MALDIにおける測定の際は、まずスイートスポットを探すことが質の高いマススペクトルを得るために必要となるが、スイートスポットが結晶のどの部分であるかは経験によって探す他ない。また、スイートスポットを特定し、そこにレーザー照射を行ったとしても、従来の試料の調製方法で調製したサンプルでは、イオン生成量が低く、結局は上記のような誘導体化を行うか、特殊なマトリックスを用いて測定するしかなかった。

【0008】

かかる誘導体化は、質量分析に先立って行われるが、反応操作や過剰の試薬除去の操作が多工程含まれ、それによって測定対象分子を含む試料の質量が減少してしまうのが現状であった。

40

【0009】

一方、分子量及び組成が同一の異性体が複数存在する糖鎖等の場合、測定対象分子由来のイオンをプリカーサイオンとして選択し断片化し、更に生じたイオンをプリカーサイオンとして選択し断片化することを繰り返す MS^n ($2 \leq n$) 解析が必須である。一般に、 MS/MS (MS^2) 測定により得られるイオンのシグナル強度は前段階のイオンの約1/10に減少する。従って、多段階 MS (MS^n ($2 \leq n$)) 測定を行うことによって化学構造に関する情報は極めて多くはなるが、検出感度は低下していくので、ますますイオン化効率の向上の必要性が増すこととなる。

50

【0010】

このように、極めて微量の測定対象分子を含む試料に対し、高感度で効率よく測定対象分子を質量分析する方法は強く望まれているが、いまだ十分な方法はなかった。また、優れたスイートスポットを得るために、マトリックスを有する測定試料表面の微細形状・表面構造に着目したものは殆どなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2008-051790号公報

【特許文献2】WO2006/109485号公報

【特許文献3】特開2008-261824号公報

【特許文献4】特開2008-261825号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Harvey,D.J., Mass Spectrom.Rev. 18 (1999) 349-451.

【非特許文献2】Sugahara,D. et al., Anal.Sci. 19 (2003) 167-169.

【非特許文献3】Kameyama,A. et al., Anal.Chem. 76 (2004) 4537-4542.

【非特許文献4】Snovida,S.I. et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3711-3715.

【非特許文献5】Snovida,S.I. et al., J.Am.Soc. Mass spectrom. 19 (2008) 1138-1146.

【非特許文献6】Fukuyama,Y. et al., Anal.Chem. 80 (2008) 2172-2179.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は上記背景技術に鑑みてなされたものであり、その課題は、一般に用いられているMALDI法用マトリックスにも適用可能で、レーザー照射時の糖類や糖ペプチド類等の測定対象分子を含む試料のイオン生成量やイオン化効率を、従来法と比べて劇的に増強できる質量分析法用測定試料及びその調製方法を提供することにある。

【0014】

更に、具体的には、スイートスポットを現出させ易い、又はスイートスポットを多く若しくは広く現出させる質量分析法用測定試料及びその調製方法を提供することにより、それによって、測定対象分子を含む試料が極めて微量であっても、イオン化効率や測定の再現性を向上させることによって、信頼性の高い化学構造についての情報を得ることができる質量分析法を提供することにある。

【0015】

また、特に、糖、糖タンパク質、糖ペプチド等の微量な「生体由来の分子又は生体試料中の分子」に適用して、その機能解明や病態の解明に有用な情報を得ることができる質量分析法用測定試料、その調製方法及び質量分析法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、測定プレート上に測定試料を調製するときに、少なくともマトリックスが溶解された溶液の溶媒の種類や該溶媒の蒸発方法（乾燥方法）等を工夫することによって、測定試料の表面に特定の構造を現出でき、その特定の構造が、イオン化効率に極めて優れたスイートスポットとなり得ることを見いだして本発明を完成するに至った。

【0017】

また、測定プレート上に測定試料を調製するときに、少なくともマトリックスが溶解された溶液の溶媒の種類や該溶媒の蒸発方法（乾燥方法）等を工夫することによって、かかる「イオン化効率に極めて優れたスイートスポットとなり得る特定の構造」を、多く及び

10

20

30

40

50

／又は広く測定試料の表面に現出できることも見いだして本発明を完成するに至った。

【0018】

すなわち、本発明は、測定対象分子を含む試料とマトリックスから調製される質量分析法用測定試料であって、表面の少なくとも一部に平均周期1 nm～300 nmの波状構造を有することを特徴とする質量分析法用測定試料を提供するものである。

【0019】

また、本発明は、
(A) 測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後に、
(B) マトリックスのみを溶媒aに溶解した溶液を、上記プレートに滴下して乾燥する工程と
を含む、上記の質量分析法用測定試料の調製方法を提供するものである。

10

【0020】

また、本発明は、
(D) 測定対象分子を含む試料とマトリックスとを溶媒a中で混合して溶液を調製する工程と、
(E) (D) で調製した溶液をプレートに滴下して乾燥する工程と
を含む、上記の質量分析法用測定試料の調製方法を提供するものである。

【0021】

また、本発明は、上記溶媒aが、「『アルコール類若しくはフェノール類』又は20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」であって、実質的に水を含有しないか又は水を10質量%以下で含有する溶媒である上記の質量分析法用測定試料の調製方法を提供するものである。

20

【0022】

また、本発明は、溶媒aとして水を10質量%より多く含有する溶媒を用い、溶媒aに溶解された溶液をプレートに滴下して乾燥する際、加熱下及び／又は減圧下で乾燥を完遂させるように調製する上記の質量分析法用測定試料の調製方法を提供するものである。

【0023】

また、本発明は、上記の質量分析法用測定試料の調製方法で調製されたものであることを特徴とする質量分析法用測定試料を提供するものである。

【0024】

また、本発明は、測定試料表面の少なくとも一部に、平均周期が1 nm～300 nmであり、かつ平均振幅の2倍が1 nm～40 nmである波状構造を有することを特徴とする質量分析法用測定試料を提供するものである。

30

【0025】

また、本発明は、上記の質量分析法用測定試料に対し、フラグメント化をn回繰り返すMSⁿ法(2 ≤ n)を適用することを特徴とする質量分析法を提供するものである。

【発明の効果】

【0026】

本発明によれば、前記問題点を解消し上記課題を解決し、MALDI法用に一般に用いられているマトリックスにも適用可能で、測定対象分子を含む試料のイオン生成量やイオン化効率を向上できる質量分析法用測定試料及びその調製方法を提供することができる。すなわち、優れたスイートスポットが存在する質量分析法用測定試料及びその調製方法を提供することができる。

40

【0027】

更に、具体的には、測定プレート上でイオン化効率が極めて良好なスイートスポットがどのような表面構造の部分に多く存在するかが本発明によって初めて判明したため、かかる良好なスイートスポットを現出させ易い、又は良好なスイートスポットを多く若しくは広く現出させる質量分析法用測定試料の調製方法をも提供することができる。その結果、通常の測定試料の調製方法では、分析可能な量未満になってしまうような微量試料しかない場合でも、質量分析が可能となり、また、量が十分あったときでも、より信頼性の高い

50

化学構造情報を容易に又は確実に得ることができるようになる。

【0028】

また、本発明は微量な生体試料由来の分子や生体試料中の分子に適用できるので、例えば、糖、タンパク質（ペプチドを含む）、糖タンパク質（糖ペプチドを含む）、核酸、脂質等の分子の、化学構造解析はもちろん機能解明や病態の解明にも有用な情報を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】実施例1において、100 fmol の中性糖鎖NA2Fを測定したときの正イオンマススペクトルである。

10

【図2】実施例1において、(a) DHBAマトリックスの共焦点レーザー顕微鏡写真と、(b) NA2Fのナトリウム付加分子が検出された位置とその相対強度を示す図である。

【図3】実施例1において、5 fmol の中性糖鎖NA2Fを測定したときの正イオンマススペクトルである。

【図4】実施例1において、走査型共焦点レーザー顕微鏡で撮影した、本法を用いメタノールで調製したDHBAマトリックスの写真（倍率1000倍）とその断面での高さを示す図である。

【図5】実施例1において、ナノサーチ顕微鏡SFT-3500（OLYMPUS社製）のプローブ顕微鏡（SPM）モードを用いて観察した、溶媒aとしてメタノールを用いたDHBAマトリックスの表面形状であり、波状構造を示す写真である。

20

【図6】比較例1において、(a) 従来法で調製したDHBAマトリックス結晶の共焦点レーザー顕微鏡写真と、(b) NA2Fのナトリウム付加分子が検出された位置とその相対強度を示す図である。

【図7】比較例1において、100 fmol の中性糖鎖NA2Fを従来法で測定した場合の正イオンマススペクトルである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

以下、本発明について説明するが、本発明は以下の実施の具体的形態に限定されるものではなく、任意に変形して実施することができる。

30

【0031】

本発明は、測定対象分子を含む試料とマトリックスから調製される質量分析法用測定試料であって、表面の少なくとも一部に平均周期1 nm～300 nmの波状構造を有することを特徴とする質量分析法用測定試料である。

【0032】

[質量分析法用測定試料]

<波状構造及び波状構造体>

本発明において、測定試料の表面の少なくとも一部に存在する「波状構造」は、平均周期1 nm～300 nmを有するものである。ここで「波状構造」とは、例えば図5に示すように、直線状の凹凸部分が周期的に存在する構造をいい、「平均周期」とは、ナノサーチ顕微鏡（例えば、OLYMPUS社製、SFT-3500）のプローブ顕微鏡（SPM）モードを用いて観察し、隣接する波の最上部間、すなわち隣接する凸部間の距離の平均値である。

40

【0033】

平均周期は、1 nm～300 nmの範囲であることが必須であるが、5 nm～200 nmの範囲であることが好ましく、20 nm～150 nmの範囲であることがより好ましく、50 nm～100 nmの範囲であることが特に好ましい。平均周期がこれ以上短い波状構造は実際に現出することはない、一方、波状構造でなかったり平均周期が長すぎたりする場合は、そこにレーザー光を照射しても、測定対象分子を含む試料のイオン生成量が十分に得られない場合がある。すなわち、周囲よりイオン化効率が相対的に良いスイートス

50

ポットとなり得なかったり、たとえスイートスポットであっても、イオン化効率が極めて高い優れたスイートスポットとはなり得なかったりする場合がある。

【0034】

波状構造を有さない構造の場合（波状構造でない場合）とは、限定されるわけではないが例えば、図6（a）に示したように、マトリックス分子が大きな結晶を形成している場合、また、たとえ極めて小さい構造体（例えば1 μm 以下）であっても、マトリックス分子特有の結晶の外観を有している場合等である。試料表面が波状構造を有さない場合、その結晶はマトリックス分子固有の安定な結晶構造を有していることが多い。

【0035】

本発明における「波状構造」は、以下に限定されるわけではないが、マトリックス分子固有の、すなわちマトリックス分子において最も安定な結晶構造を有していないと考えられる。また、無定形であってもよい。また、波状構造を形成する凸部は直線状又は棒状であれば、その長手方向の長さは特に限定はなく、例えば図5に示したように途中で消滅し、また現れるようなものであってもよい。

【0036】

本発明における「波状構造」とは、上記した通り、凹凸部分が周期的に存在する構造をいう。従って、略正弦波状の構造、略矩形の波状の構造、蒲鉾状のものが並列した構造等、凹凸部分が周期的に存在するような構造ならば全て含まれる。本発明における波状構造の「平均振幅の2倍」は、1 nm～40 nmであることが好ましく、2 nm～20 nmであることがより好ましく、5 nm～10 nmであることが特に好ましい。この範囲外だと、その点に例えばレーザー光を照射したときイオン化効率が十分に高くない場合がある。ここで、「平均振幅の2倍」とは、「凹凸部分が周期的に存在する構造」が正弦波状の構造であり、その構造を正弦波で近似できる場合には、その正弦波の振幅の2倍の平均値をいうが、その構造を正弦波で近似できない場合には、「平均振幅の2倍」とは、凹凸部分の最上点と最下点との間の長さの平均をいう。後記する具体的測定試料の調製方法によれば、このような波状構造を測定試料表面に現出させることができる。

【0037】

上記波状構造は、質量分析法用のプレート等の上に乗った測定試料表面の全面に現出しているとしてもよく、測定試料表面の一部に現出しているもよい。上記波状構造を有する部分を「波状構造体」と定義すると、該波状構造体は、測定試料表面の一部にのみ存在すれば、そこにレーザー光を照射する（測定スポットとする）ことによって、測定対象分子のイオン化効率を高くした質量分析が可能である。

【0038】

上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料表面に1個以上存在することが必須であるが、数の多少に関わらず面積の合計が広いほどよい。面積の合計は、好ましくは4 μm^2 ～3 mm^2 、特に好ましくは1 mm^2 ～3 mm^2 である。このように調製することによって、イオン化効率が極めて高い優れたスイートスポットの存在確率が上がり、優れたスイートスポットを見出し易くなり、本発明の前記効果がより得られる。

【0039】

上記波状構造を有する波状構造体の少なくとも1つが、測定試料を上から見た時の面積として4 μm^2 以上になるように調製することによって、イオン化効率が極めて高い優れたスイートスポットがその面積内に存在する確率が上がり、本発明の前記効果がより奏せられる。また、上記のようになるように調製することによって、測定試料全体として優れたスイートスポットが、プレートの何処かに存在し易いようになる。上記面積は、より好ましくは10 μm^2 以上、特に好ましくは100 μm^2 以上、更に好ましくは1000 μm^2 以上である。下記するレーザー照射面積より波状構造体の面積の方がたとえ小さくても、そこに極めて優れたスイートスポットがあることがあり、その場合は本発明の前記効果を奏し得る。

【0040】

用いる質量分析装置やその調整具合によっても異なるが、通常、イオン化のために照射

10

20

30

40

50

されるレーザー光のビーム直径は約 $200\text{ }\mu\text{m}$ である。しかしながら、その照射面積がすべて脱離しているわけではなく、我々が通常観察している限りではレーザー照射によって脱離される面積は直径 $50\text{ }\mu\text{m}$ 程度であり、面積は約 $2000\text{ }\mu\text{m}^2$ となる。従って、その観点から、波状構造体の面積として $2000\text{ }\mu\text{m}^2$ 以上が好ましく、少なくともこのような部分が1つは存在するように測定試料を調製することが好ましい。更に、レーザー照射面積を上回る面積に波状構造体が存在することがより好ましいため、少なくとも1つの波状構造体が $10000\text{ }\mu\text{m}^2$ 以上であることがより好ましく、 $30000\text{ }\mu\text{m}^2$ 以上であることが特に好ましく、従って、そのような面積の波状構造体が現出するように調製することが好ましい。

【0041】

1つの波状構造体の面積は、大きければ大きい程、そこに優れたスイートスポットを見出し易くなるが、実際の測定試料調製の可能性（現実性）をも勘案して、より好ましくは $2000\text{ }\mu\text{m}^2 \sim 3\text{ mm}^2$ 、特に好ましくは $1\text{ mm}^2 \sim 3\text{ mm}^2$ である。波状構造体のプレートに占める割合は特に限定はないが、 $1/1000 \sim 1/1$ （プレート上の試料表面が全て波状構造体の場合）が好ましく、 $1/100 \sim 1$ がより好ましく、 $1/10 \sim 1$ が特に好ましい。

【0042】

測定試料の少なくとも一部分の厚みが $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下となるように調製することによって、上記波状構造を測定試料表面に現出させ易くできるため好ましい。表面に波状構造体を持つ測定試料の厚みは、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下がより好ましく、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 以下が特に好ましい。厚みが、上記範囲であると、そこが、イオン化効率が高いスイートスポットとなり易いのみならず、厚みを上記範囲になるように試料を調製すると、波状構造を試料表面に現出させ易く、イオン化効率が高いスイートスポットが得られるようになる。表面が波状構造を有しており波状構造体であれば、その内側（下側）は別物でもよい。上記の厚みは測定試料全体の厚みを示す。

【0043】

本発明においては、上記した波状構造が現出されれば、マトリックスの化学構造は特に限定はなく、質量分析法に用いられるマトリックスならば、本発明においても用いられ得る。

【0044】

用いるプレートにも特に限定はなく、通常、MALDI-MSに用いられているものならば使用可能であるが、電気伝導性を有するものが好ましい。具体的には、ミラープレート、ステンレスプレート、金表面を有するプレート等が好ましい。

【0045】

[質量分析法用測定試料の調製方法]

本発明の質量分析法用測定試料の調製方法は、

(1) 測定対象分子を含む試料とマトリックスを「溶媒a」に溶解した溶液を、試料プレート（以下、単に「プレート」と略記する）上で乾燥する工程、又は、

(2) 測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後にマトリックスのみを「溶媒a」に溶解した溶液を、プレート上で乾燥する工程、
を含む質量分析法用測定試料の調製方法であって、

該「溶媒aに溶解した溶液をプレート上で乾燥する工程」の後の測定試料表面の少なくとも一部に、平均周期 $1\text{ nm} \sim 300\text{ nm}$ の波状構造が現出するように調製することを特徴とする。

ここで、「溶媒a」とは、測定対象分子とマトリックスの何れをも溶解できる溶媒をいい、本発明においては同様である。

【0046】

上記(1)は、MALDI法において、一般にDried Droplet法と呼ばれているものであり、上記(2)は、本発明で開発された方法であり、測定対象分子を含む試料は別途試料支持体上に存在させ、実質的にマトリックスのみが溶媒aに溶解した溶液

10

20

30

40

50

を試料に重層し、試料を溶解しながらプレート上で乾燥する測定試料の調製方法である。上記（１）及び（２）の測定試料調製方法は、測定試料の表面に、イオン化効率がより優れたスイートスポットとなり得る特定の構造である「波状構造」を現出させることができる。

【００４７】

本発明では、レーザー光を照射することによる測定対象分子のイオン化効率が高い部分として、測定試料表面の波状構造を見出したが、更に、かかる波状構造を現出させる測定試料の調製方法をも見出した。その測定試料の調製方法は、以下の（１）又は（２）である。

（１）測定対象分子を含む試料とマトリックスとを溶媒 a に溶解した溶液を、プレート上で乾燥する工程を含む質量分析法用測定試料の調製方法

10

（２）測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後にマトリックスのみを溶媒 a に溶解した溶液を、プレート上で乾燥する工程を含む質量分析法用測定試料の調製方法

【００４８】

<波状構造を現出させる「（１）法」（Dried Droplet 法）>

上記（１）の測定試料の調製方法は、MALDI 法において、一般に「Dried Droplet 法」と呼ばれているものであり、より具体的には、以下の工程（D）と以下の工程（E）を必須の工程として含む測定試料の調製方法である。

（D）測定対象分子を含む試料とマトリックスとを溶媒 a 中で混合して溶液を調製する工程

20

（E）工程（D）で調製した溶液をプレートに滴下して乾燥する工程

【００４９】

上記（１）の測定試料の調製方法、すなわち工程（D）と工程（E）を含む「Dried Droplet 法」（以下、「（１）法」と略記する場合がある）が、本発明における波状構造を現出させるための１つの方法として用いられる。しかしながら、従来の溶媒を用い、従来の溶媒乾燥方法（溶媒蒸発方法）では、本発明における波状構造を測定試料表面に現出させ得ない。本発明者は、それは、マトリックス結晶が従来のように徐々に又は通常で成長する条件では、比較的大きなマトリックス結晶が生成され、結晶が成長する過程において、マトリックス結晶から測定対象分子が排除されるためと考えた。実際、マトリックスが結晶の外観を有する部分にレーザー光を照射してもイオン化効率が低く、優れたスイートスポットとならない。

30

【００５０】

そこで、本発明者は、マトリックスを急速に析出させる条件にすれば良いと考えた。そして、そのような条件にするためには、溶媒を急速に蒸発（乾燥）させること、すなわち溶媒として特定の有機溶媒を用いること及び／又は特定の溶媒乾燥方法（溶媒蒸発方法）を使用することを見出した。また、特定の溶液を特定の順番で滴下と乾燥を行うこと（後述する（２）法）がより好ましいことも見出した。

【００５１】

従来、「Dried Droplet 法」の溶媒としては、例えば、アセトニトリルの 50～70 質量％水溶液等が一般に用いられてきた。しかしながら、「アセトニトリルの 50～70 質量％水溶液」を溶媒とし、測定対象分子とマトリックス分子が溶解された溶液では、従来知られている通常の溶媒乾燥方法（溶媒蒸発方法）、すなわち、15～30℃、1 気圧及び無風の条件等では、ゆっくり溶媒が蒸発（乾燥）するため、本発明における波状構造を測定試料表面に現出させ得なかった。従って、上記波状構造及び上記波状構造を有する波状構造体は、質量分析法用測定試料の表面の構造としては新規なものである。従って、上記波状構造を有する波状構造体が、測定対象分子のイオン化効率が高い部分であることを初めて見出し、それを現出しようとして質量分析法用測定試料を調製する方法は、波状構造体自体が新規なので、なお更、新規な試料調製方法である。

40

【００５２】

50

工程（D）における溶液の測定対象分子の濃度及びマトリックスの濃度は特に限定はなく、Dried Droplet法で通常使用されている濃度が適用可能である。工程（E）終了後に（乾燥後に）、プレート上に存在する測定対象分子とマトリックスを含有する層の厚さは特に限定はないが、10 μ m以下が好ましく、5 μ m以下がより好ましく、3 μ m以下が特に好ましい。かかる層の厚さが薄すぎると、数回のレーザーの照射によりマトリックスが消費されつくしてしまいイオン生成量が低下する場合があります、厚すぎると、針状の結晶が成長し易くなりイオン生成量が低下する場合があります。

【0053】

<<「アルコール類若しくはフェノール類又は20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」であって、実質的に水を含有しないか又は水を10質量%以下で含有する溶媒a>>

10

上記工程（D）で用いられる溶媒aは、「アルコール類若しくはフェノール類」又は「20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」であって、実質的に水を含有しないか又は水を10質量%以下で含有する溶媒であることが、溶媒を急速に蒸発（乾燥）させ、測定試料の表面に、イオン化効率が高い波状構造を現出させ易いために好ましい。「溶媒a」とは、前記した通り、測定対象分子とマトリックスの何れをも溶解できる溶媒である。

【0054】

アルコール類若しくはフェノール類は、20℃で水と任意の割合では相溶しないようなものでも、上記の波状構造を現出させ易いために好ましい。ここで「フェノール類」とは、芳香族環に結合する水素原子が水酸基で置換された化合物類をいう。アルコール類若しくはフェノール類が有する水酸基の数は特に限定はないが、その蒸発速度の点から1個が好ましい。アルコール類若しくはフェノール類の1気圧における沸点は特に限定はないが、その蒸発速度の点から100℃以下が好ましく、90℃以下がより好ましく、80℃以下が特に好ましく、75℃以下が更に好ましい。また、20℃における蒸気圧は、4 mmHg以上が好ましく、10 mmHg以上がより好ましく、20 mmHg以上が特に好ましく、40 mmHg以上が更に好ましい。

20

【0055】

具体的には、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、シクロヘキサノール、ヘプタノール、フェノール、ナフトール等が好ましいものとして挙げられる。これらは1種又は2種以上混合して用いられる。特に好ましくは、メタノール又はメタノールを含有する混合溶媒である。

30

【0056】

「20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」としては、その条件を満たせば特に限定はない。かかる有機溶媒の1気圧における沸点は特に限定はないが、波状構造体は、溶媒を急速に蒸発（乾燥）させることによって、マトリックスを急速に析出させる条件で現出する点から、100℃以下が好ましく、95℃以下がより好ましく、90℃以下が特に好ましく、85℃以下が更に好ましい。また、20℃における蒸気圧は、20 mmHg以上が好ましく、40 mmHg以上がより好ましく、60 mmHg以上が特に好ましい。

【0057】

具体的には、アセトニトリル、アセトン等が挙げられる。これらは1種又は2種以上混合して用いられる。また、上記したアルコール類又はフェノール類と混合しても用いられる。

40

【0058】

溶媒aが、アルコール類若しくはフェノール類又は「20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」であると、特に、測定対象分子を含む試料が糖ペプチドとペプチドとの混合物であり、測定対象分子が糖ペプチドである場合、溶媒aは糖ペプチドを溶解しペプチドを溶解しないので、糖ペプチドとマトリックスの溶媒a溶液ができ、マトリックスの波状構造体中に、好適な（イオン化効率が大きくなるような）形態・状態で、糖ペプチド分子がマトリックス中に存在する測定試料が調製でき、その結果、測定対象分子である糖ペプチドの化学構造、特にそこに含まれる糖鎖の化学構造に関する情報が質量分析によって得られ易い。

50

【0059】

上記した溶媒 a は、実質的に水を含有しないか又は水を 10 質量%以下で含有する溶媒であることが、溶媒を急速に蒸発させる点から好ましい。水を 10 質量%より多く含有すると、加熱下及び／又は減圧下で乾燥を完遂させないと（又は下記する自然乾燥させると）、測定試料表面に波状構造が現出しない場合がある。上記した溶媒 a は、水を 5 質量%以下しか含有しないことがより好ましく、水を 2 質量%以下しか含有しないことが特に好ましく、水を実質的に含有しないことが更に好ましい。ここで、「実質的に」とは、一般に試薬に含有される程度の極めて少量の水の含有は排除しない（許容される）という意味である。ただし、水は全く含有しないことが最も好ましい。通常の乾燥条件、すなわち、15～30℃、1気圧及び無風の条件では、水が多すぎると、波状構造が現出しない場合がある。その理由は、乾燥速度が遅くなるため、また、マトリックスの結晶が徐々に針状に成長して行くためとも考えられる。

10

【0060】

溶媒 a は、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール及びアセトニトリルからなる群より選ばれた 1 種の溶媒又は 2 種以上の混合溶媒であって、実質的に水を含有しないか又は水を 10 質量%以下で含有する溶媒であることが、波状構造を前記した形態で現出させ易く、本発明の効果がより奏されるために特に好ましい。

【0061】

溶媒 a が、「『アルコール類若しくはフェノール類』又は『20℃で水と任意の割合で相溶する有機溶媒』」であって、実質的に水を含有しないか又は水を 10 質量%以下で含有する溶媒の場合には、通常の（例えば、15～30℃、1気圧及び無風の）条件で、溶媒の蒸発（乾燥）を完遂させればよいが、溶媒 a に溶解された溶液をプレートに滴下して乾燥する際、更に加熱下及び／又は減圧下で乾燥を完遂させることも特に好ましい。

20

【0062】

<<水を 10 質量%より多く含有する溶媒 a>>

溶媒 a は、急速に蒸発（乾燥）させられれば、水を 10 質量%より多く含有していてもよい。すなわち、溶媒 a として水を 10 質量%より多く含有する溶媒を用い、溶媒 a に溶解された溶液をプレートに滴下して乾燥する際、加熱下及び／又は減圧下で乾燥を完遂させるように調製する試料の調製方法も好ましい。溶媒 a に水が 10 質量%より多く含有されていても、加熱下及び／又は減圧下で通常より速く蒸発（乾燥）を終了（完遂）させれば、波状構造を前記した形態で現出させ、本発明の効果が奏される。

30

【0063】

溶媒 a に水が 10 質量%より多く含有されていれば、糖、糖ペプチド等の糖鎖の化学構造を特定する際、それらが水に溶解し易い、表面張力によりプレート上にマトリックスと試料の液滴が小さくまとまり易い等という良い点がある。この観点から、溶媒 a が水を 10 質量%より多く含有する場合は、加熱下及び／又は減圧下で乾燥を完遂させるように調製することを前提にすれば、水の含有量は溶媒 a 全体に対して、60 質量%以上がより好ましく、90 質量%以上が特に好ましい。

【0064】

通常の乾燥条件、すなわち、15～30℃、1気圧及び無風の条件では、波状構造を現出させられない溶媒 a であっても、加熱下及び／又は減圧下で乾燥を速く完遂させるようにすると波状構造を現出させられる。上記溶媒 a として水を 10 質量%より多く含有する溶媒を用い、溶媒 a に溶解された溶液をプレートに滴下して乾燥する際、自然乾燥より短時間で乾燥を完遂させるように調製する試料の調製方法が好ましい。ここで「自然乾燥」とは、20℃1気圧で実質的に無風の状態で行う乾燥をいう。

40

【0065】

<波状構造を現出させる「(2)法」(マトリックスのみを溶媒 a に溶解した溶液を用いる方法)>

質量分析法用として、プレート上に測定試料を調製する方法には、上述した「Dried Droplet 法」以外にも、「Crash Crystal 法」、「Thin L

50

ayer法（薄膜法）」、「Two Layer法（二層法）」等がある。しかしながら、溶媒の蒸発（乾燥）速度を通常にすると、すなわち、水を10質量%より多く含有した溶媒aを用い、加熱も減圧もしない自然乾燥では、上述したように通常乾燥速度の「Dried Droplet法」が波状構造を現出し得なかったと同様に、通常の溶媒の蒸発（乾燥）速度では、上記何れの方法も波状構造を現出させることはなかった。

【0066】

そこで、本発明者は、溶媒aを用い波状構造を極めて現出させ易い、上記公知の何れの方法にも属さない新規な試料調製方法を見出したので、それを以下に説明する。すなわち、測定試料表面に波状構造を現出させる「測定試料の調製方法」の他の1つは、

（2）測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後に、マトリックスのみを溶媒aに溶解した溶液をプレート上で乾燥する工程を含む質量分析法用測定試料の調製方法である。以下、この方法を、「（2）法」と略記することがある。

【0067】

（2）法においては、マトリックスのみを溶媒aに溶解した溶液をプレート上で乾燥する工程を、プレート上に物質を供給する工程の中では最終の工程とすることで、測定試料表面に波状構造を現出させる。一般に、高いイオン生成量を得るためには試料とマトリックスがよく混合されなければならないにもかかわらず、最終の工程でプレートに供給する溶液の中に測定対象分子が溶解（含有）されていなくてもよいことを本発明者は見出した。

【0068】

マトリックスのみを溶媒aに溶解した溶液を、プレート上に供給し乾燥する工程を実質的な最終工程として含めば、最終工程において測定対象分子が溶解した溶液を用いなくてもよい。溶媒aは、測定対象分子と該マトリックスの何れをも溶解できる溶媒であるため、下層に既にある測定対象分子を溶解して、マトリックスと混合させることができるからである。

【0069】

（2）法は、より具体的には、以下の、工程（A）、及び、工程（A）の後の工程（B）を必須の工程として含む測定試料の調製方法である。

（A）測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する工程と、その後に、

（B）マトリックスのみを溶媒aに溶解した溶液を、上記プレートに滴下して乾燥する工程

【0070】

工程（A）では、測定対象分子を含む試料の溶液をプレート上で乾燥する。このときの溶液は、測定対象分子を含有してさえいればよく、マトリックスは含有されていなくてもよい。ただし、測定対象分子を含む試料が極微量の場合、測定対象分子を含む試料の良溶媒がマトリックスの貧溶媒でありそのマトリックスや溶媒を用いたい場合、マトリックスが溶解した溶媒aに対して試料が不安定でありストック溶液として保管若しくは使用ができない又は取り扱いが難しくなる等の場合には、測定試料の調製が容易である点、溶媒の選択幅が広がる点、試料の分解や容器への吸着を抑制できる点等のため、このときの溶液中にはマトリックスが溶解されておらず、測定対象分子を含む試料のみが溶解されている方が好ましい。

【0071】

その際の溶媒としては、測定対象分子を含む試料を溶解しさえすれば特に限定はなく、マトリックスを溶解させる性質は有していなくてもよいし、常圧における沸点が高く、蒸発（乾燥）速度は遅くてもよい。測定対象分子又は測定対象分子を含む試料が水溶性であるならば、工程（A）で用いる溶媒は水単独が特に好ましい。測定対象分子を含む試料が糖であるならば、工程（A）で用いる溶媒は水単独が最も好ましい。マトリックスを溶解させないので、マトリックスに対する溶解度は低くてもよく、そのため測定対象分子又は測定対象分子を含む試料に最も好適な溶媒が選択できる。

【0072】

工程（Ａ）における上記溶液中における測定対象分子の濃度は特に限定はないが、 $1\text{amol}/\mu\text{L}\sim 1\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ が好ましく、 $100\text{amol}/\mu\text{L}\sim 1\text{nmol}/\mu\text{L}$ が特に好ましい。工程（Ａ）終了後に（乾燥後に）、プレート上に存在する測定対象分子を含有する層の厚さは特に限定はないが、 $5\mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $1\mu\text{m}$ 以下が特に好ましい。かかる層の厚さが厚すぎると、マトリックス溶液を滴下した場合にマトリックス分子とうまく混和しない可能性があり、シグナルが低下する場合がある。

【００７３】

（２）法は、「測定対象分子を含む試料」の溶液（好ましくは、「測定対象分子を含む試料」のみの溶液）をまず測定プレートに滴下するので、測定対象分子を含む試料が極めて微量である場合に、別の容器でマトリックス溶液と混合しその一部をプレートに滴下することなく、微量試料のほとんど全量を分析に供することができるため特に有用である。測定対象分子を含む試料が 1000fmol 以下の場合により有用であり、 300fmol 以下の場合に特に有用であり、 100fmol （例えば、 $100\text{fmol}/\mu\text{L}$ に溶解した水溶液を $1\mu\text{L}$ 滴下する等によりプレート上に 100fmol 載せる）以下の場合に更に有用である。

【００７４】

（２）法においては、工程（Ａ）の後に、（Ｂ）マトリックスのみを溶媒 a に溶解した溶液を上記プレートに滴下して乾燥する工程を有する。「工程（Ａ）の後に」の意味は、「工程（Ａ）の直後に」には限定されず、工程（Ａ）と工程（Ｂ）の間に他の工程が挿入されていてもよい。工程（Ｂ）では、実質的にマトリックスのみを溶媒 a に溶解した溶液を上記プレートに滴下するが、ここでも「溶媒 a」の定義は前記したものと同じで、測定対象分子と該マトリックスの何れをも溶解できる溶媒をいう。測定対象分子と該マトリックスの何れをも溶解できる溶媒 a を用いることによって、下層の測定対象分子がマトリックスの表面に移動し、そこが波状構造を有していれば、優れたスイートスポットになり得る。

【００７５】

（２）法における溶媒 a の種類及び溶媒 a の蒸発（乾燥）方法等は、（１）法（Dried Droplet 法）において、＜＜「アルコール類若しくはフェノール類又は 20°C で水と任意の割合で相溶する有機溶媒」であって、実質的に水を含有しないか又は水を 10 質量％以下で含有する溶媒 a＞＞の項、及び、＜＜水を 10 質量％より多く含有する溶媒 a＞＞の項で記載したものと、好ましい範囲を含めて同じである。

【００７６】

工程（Ｂ）における溶液のマトリックスの濃度は特に限定はないが、 $0.1\sim 1000\text{mg}/\text{mL}$ が好ましく、 $1\sim 100\text{mg}/\text{mL}$ が特に好ましい。工程（Ｂ）終了後に（乾燥後に）、プレート上に存在する測定対象分子を含む試料とマトリックスからなる層の厚さは特に限定はないが、 $1\text{nm}\sim 100\mu\text{m}$ が好ましく、 $1\text{nm}\sim 10\mu\text{m}$ が特に好ましい。かかる層の厚さが薄すぎると、波状構造が形成されない場合があり、厚すぎると、規則的な波状構造を取らない針状の結晶が形成される場合がある。

【００７７】

＜＜（２）法において工程（Ｃ）を有する場合＞＞

（２）法においては、工程（Ａ）と工程（Ｂ）の間に、（Ｃ）測定対象分子と反応することによってイオン化効率を高める誘導体化剤の溶液を、上記プレートに滴下して乾燥する工程を含むことが、イオン化効率を更に高めるために好ましい。

【００７８】

測定対象分子と反応することによってイオン化効率を高める誘導体化剤（以下、単に「誘導体化剤」と略記する）を、予め測定対象分子と反応させてから、プレートに供給すると、測定試料のロスに繋がる場合がある。従って、糖、糖タンパク質、糖ペプチド等の微量な「生体由来の分子又は生体試料中の分子」に質量分析法を適用する場合、工程（Ａ）と工程（Ｂ）の間に工程（Ｃ）を挿入することが特に好ましい。

【0079】

工程（C）を有する場合、工程（B）終了後に（乾燥後に）、プレート上に存在する測定対象分子を含む試料とマトリックスからなる層の厚さは特に限定はないが、1 nm～1 00 μmが好ましく、1 nm～10 μmが特に好ましい。かかる層の厚さが薄すぎると、波状構造が形成されない場合があり、厚すぎると、規則的な波状構造を取らない針状の結晶が形成される場合がある。

【0080】

誘導体化剤は、誘導体化された測定対象分子すなわち質量分析に供される分子のイオン化効率を高めるものであれば特に限定はない。レーザー脱離イオン化法においてイオン化効率を高めるものであっても、エレクトロスプレーイオン化法においてイオン化効率を高めるものであってもよい。質量分析法におけるマトリックスとしての効果を有する化合物、又はそれらに後記する反応性官能基やスペーサ部分を更に有する化合物も好ましい。

10

【0081】

かかる誘導体化剤の化学構造は上記効果を奏するものであれば特に限定はないが、その分子内にナフタレン、アントラセン、ピレン等の縮合多環を有する縮合多環化合物等が上記効果を好適に奏するので特に好ましい。ここで「縮合多環化合物」とは、窒素、硫黄又は酸素分子を含む複素環を一部に含んでいてもよい縮合多環部分と、測定対象分子とを結合することが可能である反応性官能基と、要すれば、該縮合多環部分と該反応性官能基とを連結するスペーサ部分とを有する化合物をいう。特に、芳香族環を有する化合物であることが更に好ましい。

20

【0082】

誘導体化剤は、測定対象分子に反応することによって、誘導体化された分子すなわち質量分析に供される分子の、イオン化切断位置を制御できるようにするものであることが特に好ましい。

【0083】

誘導体化剤は、アミノ基、ヒドラジド基、ジアゾメチル基、スクシニミジルエステル基、塩化スルホニル基、ヨード基（-I）等の反応性官能基を有することが好ましい。特に好ましい誘導体化剤としては、具体的には、ナフタレン環、アントラセン環、ピレン環等の縮合多環に、上記基が直接若しくは他の基（スペーサ部分）を介して結合した縮合多環誘導体化合物；ヨウ化メチル；ジアゾメタン；トリメチルシリルジアゾメタン等が挙げられる。

30

【0084】

このうち、誘導体化された分子すなわち質量分析に供される分子のイオン化効率を高めたり、イオン化切断位置を制御できるようにしたりする点等で、ピレン環化合物が特に好ましい。ここで「ピレン環化合物」とは、ピレン環と、「測定対象分子」に結合することが可能である反応性官能基と、要すれば該ピレン環と該反応性官能基とを連結するスペーサ部分とを有する化合物をいう。

【0085】

具体的には、1-ピレンブタン酸ヒドラジド（1-pyrenebutanoic acid, hydrazide）（以下、「PBH」と略記する）、1-ピレン酢酸ヒドラジド（1-pyreneacetic acid, hydrazide）、1-ピレンプロピオン酸ヒドラジド（1-pyrenepropionic acid, hydrazide）、1-ピレン酢酸スクシニミジルエステル（1-pyreneacetic acid, succinimidyl ester）、1-ピレンプロピオン酸スクシニミジルエステル（1-pyrenepropionic acid, succinimidyl ester）、1-ピレンブタン酸スクシニミジルエステル（1-pyrenebutanoic acid, succinimidyl ester）、N-（1-ピレンブタノイル）システイン酸スクシニミジルエステル（N-（1-pyrenebutanoyl）cysteic acid, succinimidyl ester）、N-（1-ピレン）ヨードアセトアミド（N-（1-pyrene）iodoacetamide）、N-（1-ピレン）ヨードマレイミド（N-（1-pyrene）maleimide）、N-（1-ピレンメチル）ヨードアセトアミド（N-（1-pyrenemethyl）iodoacetamide）、1-ピレンメチルヨードアセテート（1-pyrenemethyl iodoacetate）、アミノピレン（aminopyrene）、1-ピレンメチルアミン（1-pyrenem

40

50

ethyl amine)、1-ピレンプロピルアミン (3-(1-pyrenyl)propylamine)、1-ピレンブチルアミン (4-(1-pyrenyl)butylamine)、1-ピレンスルホン酸クロリド (1-pyrenesulfonyl chloride)、1-ピレニルジアゾメタン (1-pyrenyldiazomethane) (以下、「PDAM」と略記する)、1-ピレンカルバルデヒド ヒドラゾン (1-pyrenecarbaldehyde hydrazone)、1-ピレニルチオシアネート (1-pyrenylthiocyanate)、1-ピレニルイソチオシアネート (1-pyrenylisothiocyanate) 等が好ましいものとして挙げられる。このうち最も好ましくはPBH又はPDAMである。

【0086】

誘導体化剤としては、上記具体的化合物において、ピレン環を、ナフタレン環又はアントラセン環に代えたものも好ましいものとして挙げられる。また、ヨウ化メチル、ジアゾメタン又はトリメチルシリルジアゾメタンも好ましい。

10

【0087】

好ましい「測定対象分子と誘導体化剤との組み合わせ」としては、測定対象分子がアルデヒド基を含有する糖鎖を有する分子であり、誘導体化剤がアミノ基又はヒドラジド基等を有するものである場合が挙げられる。また、好ましい組み合わせとしては、測定対象分子が、カルボキシル基、アミノ基又はメルカプト基を有するタンパク質若しくは糖タンパク質であり、誘導体化剤が、アミノ基、ヒドラジド基又はジアゾメチル基等を有するものである場合が挙げられ、更に、測定対象分子が、カルボキシル基を有するタンパク質若しくは糖タンパク質であり、誘導体化剤がヨウ化メチル又はトリメチルシリルジアゾメタンである場合が挙げられる。これらの組み合わせは、測定対象分子及び誘導体化剤を、容易にプレート上で反応させることができる点、イオン化を阻害しない点、反応が選択的である点、一般に微量での分析の必要性が高いので、前記効果を奏し易い点等から好ましい。

20

【0088】

<測定対象分子>

「測定対象分子」は特に限定はないが、生体由来の分子又は生体試料中の分子であることが好ましく、具体的には、糖、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、核酸、糖脂質等であることが、本発明の効果をより発揮できるので好ましい。「測定対象分子」としては、天然物から調製されるもの、天然物を化学的又は酵素学的に一部改変して調製されるものの他、化学的又は酵素学的に調製されるものも好ましい。また、生体に含まれる分子の部分構造を有するものや生体に含まれる分子を模倣して作製されたものも好ましい。また、質量分析法に用いるプレート上に載せる試料、すなわち、測定対象分子を含む試料としては、「測定対象分子」そのものだけでもよいし、「測定対象分子」を含むもの、例えば、生体の組織、細胞、体液や分泌物（例えば、血液、血清、尿、精液、唾液、涙液、汗、糞便等）等でもよい。すなわち、直接生体試料を用いてもよい。また、試料をプレート上に載せ、酵素処理等を行なって、測定対象分子を調製してもよい。

30

【0089】

上記した分子は、分析に供される試料が少量である場合が多く、また特に、糖、糖タンパク質、糖脂質等の複合糖質等又はそれらから化学的若しくは酵素学的に遊離させて得たものは、分子量や組成が同一の異性体が複数存在するので、本発明の質量分析法は、それら分子の化学構造解析に対して特に上記効果を奏するので好ましい。

40

【0090】

<質量分析法用測定試料>

上記した本発明の質量分析法用測定試料の調製方法を使用して調製された質量分析法用測定試料は前記した本発明の効果を奏する。すなわち、かかる測定試料を質量分析法に供すれば、測定対象分子を含む試料のイオン生成量やイオン化効率を向上させることができる。すなわち、かかる測定試料には優れたスイートスポットが存在するので、質量分析法における感度、精度、再現性等が向上する。本発明の一の形態は、測定試料表面の少なくとも一部に、平均周期が1 nm～300 nmであり、かつ平均振幅の2倍が1 nm～40 nmである波状構造が現出されていることを特徴とする質量分析法用測定試料である。

【0091】

50

<質量分析法>

イオン化に用いられるレーザーとしては、窒素レーザー（337 nm）、YAGレーザー3倍波（355 nm）、NdYAGレーザー（256 nm）、炭酸ガスレーザー（2940 nm）等が挙げられるが、窒素レーザーが好ましい。イオンの分離検出方法は特に限定はなく、二重収束法、四重極集束法（四重極（Q）フィルター法）、タンデム型四重極（QQ）法、イオントラップ法、飛行時間（TOF）法等を用いて、イオン化した分子を質量／電荷比（ m/z ）に従って分離し検出する。好ましくは、QIT-TOFである。

【0092】

糖、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、核酸、糖脂質等の分子は、分子量や組成が同じ異性体を多く含むので、イオンの生成効率を向上させ、分子のフラグメント化を n 回繰り返す方法（以下、「 MS^n 法」と略記することがある）が好ましい。本発明は、前記した質量分析法用測定試料の調製方法を使用して調製された試料に対し、フラグメント化を n 回繰り返す MS^n 法（ $2 \leq n$ ）を適用することが好ましい。 MS^n 法により、選択した標識を含むイオンを解析することで、分子中の結合位置等を決定できる。

【0093】

<作用・原理>

マトリックスと測定対象分子を含む試料が、プレート上で析出する過程において、溶媒の迅速な蒸発乾燥によって波状構造が現出され、その結果イオン生成量（イオン化効率）が劇的に改善され、更に波状構造のほぼあらゆる位置が、優れたスイートスポットとなり、特に測定対象分子が糖の場合、ほぼ、どの場所にレーザーを照射しても糖類由来のシグナルが得られるという驚くべき知見を見出した。

【0094】

この作用・原理は明確には明らかではないが、以下のようにも考えられる。ただし、本発明は、以下の作用・原理の及ぶ範囲に限定されるものではない。溶媒を瞬時に取り除くことによりマトリックス結晶を急速に成長させ、試料を強制的にマトリックス結晶に取り込ませることでイオン生成量が向上したと考えられる。波状構造はマトリックス結晶が急速に成長した結果として生成したものと考えられる。そして、それがレーザー光の吸収に有利になっていたり、表面からの脱離に有利になっている可能性がある。測定試料の厚さを厚くしようとすると必然的にマトリックス溶液の濃度を上げることになるが、そうすると針状結晶が成長するようになり、スイートスポットができずイオン生成量が減少してしまう。

【0095】

マトリックスの表面が波状構造をしているとレーザーを吸収し易かったり、マトリックス分子が波状構造体内では安定な結晶構造を形成しておらず測定対象分子にエネルギー移動が起こり易かったり、また、体積に対する表面積比が増大することで測定対象分子の効率的な脱離とそれに伴うイオン化が効果的に起こり、その結果、測定対象分子のイオン生成量が劇的に増大したと考えられる。

【実施例】

【0096】

以下に、実施例及び比較例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。

また、実施例及び比較例の中で、中性糖鎖NA2FとDHBAマトリックスを用いた結果について、溶媒aの種類、溶媒aを蒸発させた（実験を行った）温度、圧力、溶媒aが乾燥してマトリックスが析出するまでに要した時間、及びそのサンプルから得られたMALDIマススペクトルにおける測定対象分子由来のシグナルの信号対雑音比（ S/N ）を表1にまとめて示した。

【0097】

実施例1

<（2）法における工程（A）>

まず、鏡面仕上げのMALDI用試料プレート（ミラープレート）上の直径約2 mmの

10

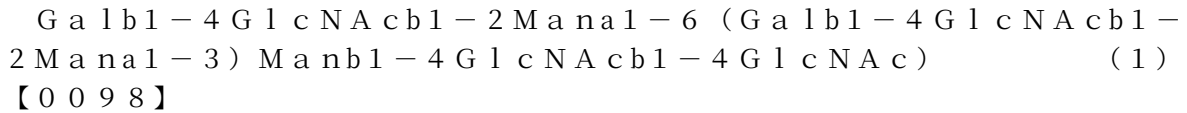
20

30

40

50

スポット内に、測定対象分子として下記式（１）で表される市販の中性糖鎖（以下、「NA2F」と略記する）を水に溶解して $100\text{ fmol}/\mu\text{L}$ にした水溶液を $1\mu\text{L}$ 滴下し、室温（ 23°C ）大気圧下で放置し乾燥させた。



<（２）法における工程（Ｂ）>

次に、マトリックスとして、市販の2, 5-dihydroxybenzoic acid（以下、「DHBA」と略記する）をメタノールに溶解し $40\text{ mg}/\text{mL}$ にした溶液を、その上に $0.25\mu\text{L}$ 滴下した。室温（ 23°C ）、大気圧下、無風状態に放置したところ、溶媒であるメタノールは8～10秒程度で蒸発し、スポット内に一様に広がり、マトリックス及び試料が析出した測定試料を得た。

【0099】

得られた測定試料の結晶の厚さは、 $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ であり、更にその大部分は厚さ $1\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ であった。

【0100】

質量分析計としてMALDI-QIT-TOF型質量分析計（AXIMA-QIT、Shimadzu Biotech社製）を用いて測定を行った。測定は正イオンモードで行った。レーザーパワーを測定対象分子のイオンのシグナルがではじめる閾値に最適化した後、 2 mm スポット内の一検体の測定試料析出物の全領域からマススペクトルを得るために、 $100\mu\text{m}$ 間隔でレーザー照射を行い、自動で測定した。

【0101】

得られた正イオンマススペクトルを図1に示す。結果として、中性糖鎖NA2Fは、ナトリウム付加体 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ として非常に強く検出された。このときの信号対雑音比（ S/N ）は220（表1のNo.（a）を参照）であり、比較例1に示す従来法に比べて50倍程度改善されていた。測定試料全体で S/N が大きいということは、優れたスイートスポットが多くあるということを意味し、本発明の前記溶媒の蒸発方法を用いた場合には、測定試料表面に波状構造が現出していることを示している。このことは、以下の実施例でも同様である。

【0102】

図2に、このときの測定試料析出物の共焦点レーザー顕微鏡写真（図2（a））と、測定試料析出物において中性糖鎖NA2Fが検出された位置（図2（b））をそれぞれ示す。測定試料析出物全体にわたり、ほぼ均一に高いシグナルが得られ、測定試料析出物全体にわたりイオン化効率が高いことが確認された。また、図2（b）において最も黒い部分は、極めてイオン化効率が高い優れたスイートスポットであり、さらにこの部分は、下記する波状構造を有していた。

【0103】

上記したNA2F濃度 $100\text{ fmol}/\mu\text{L}$ 水溶液から、NA2Fを段階希釈して、上記と同様の手順で測定試料を調製し、同様に測定した結果、図3に示すように、 $5\text{ fmol}/\mu\text{L}$ という極めて希薄な溶液であっても $1\mu\text{L}$ でシグナルを得ることができた。

【0104】

また、上記と同様な手順に従って調製した測定試料析出物を、走査型共焦点レーザー顕微鏡OLS3100-LSSA（OLYMPUS社製）を用いて観察した。総合倍率約100～1000倍で観察した。高さを測定するため、結晶の一部を削り取りプレート表面を露出させたものを1000倍で観察した結果を図4に示す。結晶は薄く広がっており、図4の範囲内だけ見れば、 $1.6\mu\text{m}$ 以内であるが、その他の場所も総合して見ると、その大部分の厚さが $3\mu\text{m}$ 以内、一部結晶が厚い場所でも $10\mu\text{m}$ 以下であることが確認された。

【0105】

更に、より微細な構造を観察するため、ナノサーチ顕微鏡SFT-3500（OLYM

10

20

30

40

50

PUS社製)を用い、プローブ顕微鏡(SPM)モードで測定した。

上記と同様の手順で調製したDHBAマトリックスの試料の中で、上記共焦点レーザー顕微鏡写真でイオン化効率の高かった部分の表面形状を図5に示す。高さ(波状構造の平均振幅の2倍)が5nm~10nm、隣接する凸部間の間隔(平均周期)が50nm~100nmの規則的な凹凸すなわち波状構造が確認された。

【0106】

上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積として、少なくとも1つは約 $64\mu\text{m}^2$ 以上にわたり広がっていることを確認した。また、上記波状構造を有する波状構造体は、得られた測定試料表面に、少なくとも2箇所以上に見られたが、共焦点レーザー顕微鏡での観察結果から、このような波状構造体は一様に測定試料全体に広がっていると推察された。

10

【0107】

中性糖鎖NA2Fの代わりに、測定対象分子として下記式(2)で表される酸性糖鎖(以下、「A1F」と略記する)を水に溶解して100fmol/ μL にした水溶液を1 μL 滴下し、室温(23℃)大気圧下で放置し乾燥させた。

NeuNAca2-6Galb1-4GlcNAcb1-2Manal-6(Galbl-4GlcNAcb1-2Manal-3)Manbl-4GlcNAcb1-4GlcNAc
(2)

【0108】

上記したものと同様の手法で測定したところ、負イオンモードで脱プロトン化体[M-H]⁻として非常に強く検出された。S/Nは500であった。

20

【0109】

上記の測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、中性糖鎖NA2Fの場合と比較してほぼ同様な結果が得られた。

【0110】

<溶媒a蒸発時の温度の影響>

実施例2

次に、100fmol/ μL のNA2Fを用いた実施例1において、工程(B)での溶媒乾燥条件「室温(23℃)、大気圧下、無風状態、蓋なし」に代えて、「4℃、大気圧下、無風状態、蓋あり」とし、溶媒であるメタノールを蒸発させた。

30

【0111】

すなわち、実験を4℃のコールドルーム内で行った。NA2Fを実施例1と同様にスポット内に滴下し乾燥させたミラープレートと、市販の精製されたDHBAをメタノールに溶解し40mg/mLにしたマトリックス溶液を、4℃のコールドルーム内に1時間放置した。コールドルーム内で、NA2F上に冷やしたマトリックス溶液を0.25 μL 滴下し、滴下後は溶媒の蒸発を遅らせるためプレートにプラスチック製の蓋をかぶせた。

【0112】

溶媒であるメタノールは徐々に蒸発し、2~4分程度で完全に蒸発し、測定試料の析出物を得た。得られた測定試料の表面に波状構造体を持つ部分の厚みは9 μm 程度であった。

40

【0113】

このサンプルからは、S/Nが24で、NA2Fのナトリウム付加体[M+Na]⁺のピークが検出された(表1のNo.(b)を参照)。この結果は比較例1に示す従来法に比べて約5倍改善されたことを示す。このように、溶媒aとしてメタノールを使用すると、特に乾燥速度を速くする操作をしなくても、また、乾燥速度を遅くする操作をした場合ですら、従来法に比べて優れたS/Nが得られることが分かった。また、通常乾燥の実施例1の方が、乾燥速度を遅くした実施例2より、大きなS/Nが得られたことから、乾燥速度は、速い方がS/Nが大きい、すなわち測定対象分子NA2Fのイオン化効率が大き

50

いことが分かった。

【0114】

上記測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、23℃で乾燥した場合より、やや小さかったり少なかったりしたが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0115】

また、100 fmol/μLのNA2Fを用いた実施例1において、工程(B)での溶媒乾燥条件「室温(23℃)、大気圧下、無風状態」に代えて、「80℃、大気圧下、無風状態」とし、溶媒であるメタノールを蒸発させた。

10

【0116】

すなわち、実験を80℃のヒートブロック上に置いて加熱したプレート上で行った。NA2Fを実施例1と同様にスポット内に滴下し乾燥させたミラープレートを、80℃に熱したヒートブロック上に約5分間放置した。約5分後、80℃に達したプレート上のNA2Fに、40 mg/mLのDHBAメタノール溶液を0.25 μL滴下した。溶媒であるメタノールはほぼ瞬時(1秒以内)に蒸発し、測定試料を得た。

【0117】

このサンプルからは、S/Nが37で、NA2Fのナトリウム付加体[M+Na]⁺のピークが検出された(表1のNo. (c)を参照)。この結果は比較例1に示す従来法に比べて約7倍改善されたことを示す。

20

【0118】

上記測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、23℃で乾燥させた場合と比較してほぼ同様な結果が得られた。

【0119】

実施例1及び実施例2に示した実験結果は、ミラープレート以外の通常のステンレスMALDIプレートをを用いても同様に再現できたが、検出感度はミラープレートの方が優れていた。また、メタノールが表面加工によって2 mm以上に広がらなければ、金表面等でも良好な結果が得られた。

30

【0120】

比較例1

実施例1と同様に、ミラープレート上にNA2Fの100 fmol/μLを1 μL滴下して乾燥させた。次に、市販のDHBAマトリックスを、通常用いるように60質量%アセトニトリル水溶液に溶解し10 mg/mLとしたものを1 μL滴下した。実施例1と同様に乾燥条件(室温(23℃)、大気圧下、無風状態、蓋なし)に放置したところ、溶媒は徐々に蒸発し、2~4分かけて、図6(a)のような、マトリックスDHBAの針状結晶を含む測定試料が調製された。

【0121】

実施例1と同様の手法で測定した正イオンマススペクトルを図7に示す。中性糖鎖NA2Fは実施例1の場合と同じくナトリウム付加体[M+Na]⁺として検出されたが、そのピーク強度は低く、S/Nは5程度で(表1のNo. (d)を参照)、中性糖鎖NA2Fのイオンが十分に生成していないことが確認された。

40

【0122】

図6に、マススペクトル測定の前に観察した測定試料析出物の走査型共焦点レーザー顕微鏡写真(図6(a))と、中性糖鎖NA2Fイオンが検出された位置(図6(b))を示す。析出したマトリックスが比較的大きな針状結晶となっており、更に、糖鎖のシグナルが得られたスイートスポットが殆どなく、一部分に限定されていることが確認された。また、イオン効率の高い優れたスイートスポットはなかった。

【0123】

50

スイートスポットの部分を、実施例1と同様に、ナノサーチ顕微鏡SFT-3500 (OLYMPUS社製)を用い、プローブ顕微鏡 (SPM) モードで測定したが、そこには波状構造が観察されなかった。溶媒aが水を含む場合、(2)法で測定試料を調製しても、加熱下及び／又は減圧下で溶媒aの乾燥を完遂させないと、波状構造が観察されず、イオン化効率のよい優れたスイートスポットが得られないことが分かった。

【0124】

同様に、中性糖鎖NA2Fの代わりに酸性糖鎖A1Fの100 fmol/μLの水溶液を用いて、上記と同様に実験を行ったところ、負イオンモードで脱プロトン化体 [M-H]⁻として検出されたが、その強度は実施例1の場合と比較して非常に低かった。

【0125】

更にまた、Dried Droplet法を用いて測定試料を調製した。すなわち、60質量%アセトニトリル水溶液中に、NA2Fが100 fmol/μL、マトリックスとしてDHBAが10 mg/mLとなるように溶解し、それをミラープレート上に、1 μL滴下し、実施例1と同様の乾燥条件 (室温 (23℃)、大気圧下、無風状態、蓋なし) に放置したところ、溶媒は徐々に蒸発し、2～4分かけて乾燥が終了した。図示はしないが、ほぼ図6 (a) のような、マトリックスDHBAの針状結晶が多い測定試料が調製された。

【0126】

実施例1と同様の手法で測定した正イオンマススペクトルでは、中性糖鎖NA2Fは実施例1の場合と同じくナトリウム付加体 [M+Na]⁺として検出されたが、そのピーク強度は低く、中性糖鎖NA2Fのイオンが十分に生成していないことが確認された。

【0127】

糖鎖のシグナルが得られたスイートスポットが殆どなく、一部分に限定されていることが確認された。また、イオン効率の高い優れたスイートスポットはなかった。若干ながらもシグナルの検出されたスイートスポットの部分を、実施例1と同様に、ナノサーチ顕微鏡SFT-3500 (OLYMPUS社製)を用い、プローブ顕微鏡 (SPM) モードで測定したが、そこには波状構造が観察されなかった。

【0128】

<溶媒の種類の影響>

実施例3

実施例1と同様の手順で、溶媒aとして、メタノールの代わりに、エタノール、アセトニトリル、イソプロパノール、ブタノールを用いて測定試料を調製し、実施例1と同様に測定を行った。

【0129】

実施例1と同様の乾燥条件 (室温 (23℃)、大気圧下、無風状態、蓋なし) で、それぞれの溶媒が完全に蒸発するまでに要した時間は、エタノールが30秒程度、アセトニトリルが8～10秒程度、イソプロパノールが60秒程度、ブタノールが180秒程度であった。これらの溶媒を用いても実施例1と同様の結果、効果が得られ、100 fmol/μLのNA2Fを有意に検出することが出来た。その強度はエタノールが最も高く、次いでイソプロパノールとアセトニトリル、ブタノールの順であった (表1のNo. (d)～(h)を参照)。

【0130】

得られた測定試料の表面に波状構造体を持つ部分の厚みは1 μm～3 μm程度であった。

【0131】

上記全ての溶媒を用いた測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1のメタノールの場合より、やや小さかったり少なかったりしたが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0132】

これらの有機溶媒を混合したものでマトリックス溶液を調製しても同様の結果・効果が得られた。また、酸性糖鎖 A 1 F の $100 \text{ fmol} / \mu\text{L}$ の水溶液 $1 \mu\text{L}$ を用いても同様な結果・効果が得られた。

【0133】

＜溶媒 a 中の水の影響＞

実施例 4

実施例 1 と同様の手法で、メタノール溶媒に水を含有させて測定試料を調製し、実施例 1 と同様に測定を行った。溶媒 a として 98 質量%メタノール水溶液、95 質量%メタノール水溶液、90 質量%メタノール水溶液を用いた。

【0134】

実施例 1 と同様の乾燥条件下で、98 質量%メタノール水溶液、95 質量%メタノール水溶液の場合は、溶媒が完全に蒸発するまでに要した時間は、実施例 1 のメタノール 100 質量%の場合と大差なく、10 秒程度であったが、90 質量%メタノール水溶液が完全に蒸発するのに要した時間は 15～20 秒であった。

【0135】

98%メタノール、95%メタノールを用いた場合は、100%メタノールで調製した測定試料の場合と大差なく、比較的均一となったが、90%メタノールで調製したマトリックスは、やや針状結晶に近くなった。結晶形状を反映するように、98%メタノールと 95%メタノールで調製した場合は、 $100 \text{ fmol} / \mu\text{L}$ の場合の NA 2 F のシグナルが、実施例 1 のように強く検出されたが、90%メタノールで調製したマトリックスでは、実施例 1 の結果よりはシグナルが低下したが、比較例 1 より有意に優れた結果であった（表 1 の No. (i)～(k) を参照）。溶媒 a としては、メタノールに水が含まれていてもよいが、好ましくは 10 質量%以下、より好ましくは 5 質量%以下が望ましいことが確認された。

【0136】

上記した全ての測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例 1 のメタノール 100 質量%の場合とほぼ同様の極めて優れた結果が得られた。

【0137】

比較例 2

実施例 3 と同様の手法で、メタノール溶媒に 20%水を含有させて（80 質量%メタノール水溶液で）、測定試料を調製し、同様に測定を行った。実施例 1 と同様の乾燥条件下で、80 質量%メタノール水溶液が完全に蒸発するのに要した時間は 15～20 秒であり、測定試料の析出物はほぼ針状結晶になり、波状構造が確認されなかった。

【0138】

得られたマスペクトルは、比較例 1 とほぼ同等で、中性糖鎖 NA 2 F は、ナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ イオンはピーク強度が低く、S/N は 7 であった（表 1 の No. (1) を参照）。

【0139】

＜減圧の影響＞

実施例 5

工程 (B) において、マトリックス溶液を滴下後、減圧条件下で溶媒 a を蒸発・乾燥させる実験を行った。

【0140】

実施例 1 と同様に、ミラープレート上に市販の NA 2 F、 $100 \text{ fmol} / \mu\text{L}$ を $1 \mu\text{L}$ 滴下させ乾燥させた。次に、マトリックスとして DHBA を水に溶解して $6.7 \text{ mg} / \text{mL}$ としたものを $1.5 \mu\text{L}$ 滴下した（実施例 1 の場合とマトリックスの質量は同じである）。ミラープレートを即座に直径約 25 cm のデシケータ内に入れ、排気能力 $10 \text{ L} / \text{min}$ の真空ポンプを用いて減圧した。測定試料は 60 秒で乾燥が終了した。

【0141】

このサンプルからは、S/Nが13で、NA2Fのナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ が検出された（表1のNo. (m)を参照）。これは比較例1に示した従来法に比べて、約5倍改善されたことを示す。

【0142】

上記した測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1のメタノール100質量%、通常乾燥の場合より、やや小さかったり少なかったりしたが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0143】

また別途、実施例1と同様にプレート上のスポットにNA2Fを滴下、乾燥後、上記と同じマトリックス溶液を同じ量だけ滴下し、プレートを質量分析計AXIMA-QIT-TOFMS内に挿入し、ロータリーポンプとターボ分子ポンプを用いて急速に減圧し測定試料を得た。

【0144】

このサンプルからは、S/Nが38で、NA2Fのナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ のピークが検出された（表1のNo. (n)を参照）。これは比較例1に示した従来法に比べて約7倍改善されたことを示す。

【0145】

上記した測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1のメタノール100質量%、通常乾燥の場合より、やや小さかったり少なかったりしたが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0146】

また、溶媒aとしての「水」を「60質量%アセトニトリル水溶液」に代えても、上記と同様の結果が得られた。

【0147】

これらのことから、水を含んだマトリックス溶液であっても、減圧下で溶媒aを蒸発させて測定試料を調製するとよいことが明らかになった。

【0148】

<加熱の影響>

実施例6

実施例1と同様な手順で、NA2Fを乾燥させたミラープレートを、80℃に熱したヒートブロック上に5分間放置した。5分後、80℃に達したプレート上のNA2Fに、DHBAを60質量%アセトニトリルに溶解し10mg/mLにしたマトリックス溶液を1μL滴下した。溶媒は8～10秒程度で蒸発し、測定試料が得られた。

【0149】

このサンプルからは、S/Nが30で、NA2Fのナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ のピークが検出された（表1のNo. (o)を参照）。これは比較例1に示した従来法に比べて約6倍改善されたことを示す。

【0150】

上記した測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1のメタノール100質量%、通常乾燥の場合より、やや小さかったり少なかったりしたが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0151】

以上のことから、水を含んだマトリックス溶液であっても、加熱して溶媒aを速く乾燥させると、良好な測定試料が得られることが明らかになった。

【0152】

10

20

30

40

【表 1】

測定試料 No.	マトリックス	試料	溶媒 a	温度	圧力	乾燥までに 要した時間	S/N
(a)	DHBA	NA2F 100fmol	メタノール	23℃	大気圧	8～10秒	220
(b)	DHBA	NA2F 100fmol	メタノール	4℃	大気圧	2～4分	24
(c)	DHBA	NA2F 100fmol	メタノール	80℃	大気圧	約1秒	37
(d)	DHBA	NA2F 100fmol	60%アセトニトリル	23℃	大気圧	2～4分	5
(e)	DHBA	NA2F 100fmol	エタノール	23℃	大気圧	約30秒	140
(f)	DHBA	NA2F 100fmol	アセトニトリル	23℃	大気圧	8～10秒	50
(g)	DHBA	NA2F 100fmol	イソプロパノール	23℃	大気圧	約60秒	44
(h)	DHBA	NA2F 100fmol	ブタノール	23℃	大気圧	約180秒	40
(i)	DHBA	NA2F 100fmol	98%メタノール	23℃	大気圧	8～10秒	202
(j)	DHBA	NA2F 100fmol	95%メタノール	23℃	大気圧	8～10秒	200
(k)	DHBA	NA2F 100fmol	90%メタノール	23℃	大気圧	15～20秒	80
(l)	DHBA	NA2F 100fmol	80%メタノール	23℃	大気圧	15～20秒	7
(m)	DHBA	NA2F 100fmol	水	23℃	減圧	約60秒	13
(n)	DHBA	NA2F 100fmol	水	23℃	急速に 減圧	不明	38
(o)	DHBA	NA2F 100fmol	60%アセトニトリル	80℃	大気圧	8～10秒	30

【0153】

<マトリックスの種類の影響>

実施例 7

実施例 1 と同様の手法で、DHBA 以外の他のマトリックスを用いて測定を行った。測定対象分子としては $100 \text{ fmol} / \mu\text{L}$ の NA2F 水溶液 $1 \mu\text{L}$ を用い、マトリックスは、ATT (6-az-2-thiothymine)、THAP (2, 4, 6-trihydroxyacetophenone monohydrate)、CHCA (acyano-hydroxycinnamic acid)、nor-harman (9H-pyrido [3, 4-b] indole) を用いた。マトリックスはすべてメタノール中に濃度 $40 \text{ mg} / \text{mL}$ で溶解させた。nor-harman のみ濃度 $4 \text{ mg} / \text{mL}$ で溶解させた。また、ATT と THAP は、ACDB (ammonium citrate dibasic) の飽和メタノール溶液に濃度 $40 \text{ mg} / \text{mL}$ で溶解させたものも同様に用いた。

【0154】

得られた測定試料の表面に波状構造体を持つ部分の測定試料の厚さは、何れも $9\text{ }\mu\text{m}$ 以下であった。

【0155】

どのマトリックスを用いても、DHBAを用いた実施例1と同様なマスペクトルが得られ、 100 fmol のNA2Fは、ナトリウム付加分子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ として強く観測され、シグナルの検出されるスイートスポットも従来法に比べて著しく増加した。

【0156】

上記した全てのマトリックスを用いた測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1のDHBAを用いた場合と同様な結果が得られた。

10

【0157】

本発明は、DHBAだけでなく他のマトリックスでも同様であることが確認された。また、特に従来法では微量糖鎖の測定に不向きであったCHCAにも適用が可能であることが確認された。

【0158】

<(1)法(Dried Droplet法)>

実施例8

まず、エッペンドルフチューブ内に保管していたNA2Fのストック水溶液を遠心濃縮機で乾固し、そこに直接 40 mg/mL のDHBAメタノール溶液を加え、NA2Fの濃度にして $400\text{ fmol}/\mu\text{L}$ とした(工程(D))。そのうち $0.25\text{ }\mu\text{L}$ をMALDIプレートに滴下し(工程(E))、測定試料を調製した。溶媒aの蒸発・乾燥は、すべて実施例1と同様の、室温($23\text{ }^{\circ}\text{C}$)、大気圧下で行った。MALDIマスペクトルの測定は実施例1と同様にMALDI-QIT-TOF型質量分析計を用いて行い、正イオンモードで行った。

20

【0159】

(1)法(Dried Droplet法)でも、溶媒aをメタノールとしたときは、実施例1の「(2)法」と同様の強いシグナル、高いS/Nを得ることができた。

【0160】

上記した全てのマトリックスを用いた測定試料で、イオン化効率が高いスイートスポットが多く観察され、その部分に波状構造が確認された。上記波状構造を有する波状構造体は、測定試料を上から見た時の面積や、波状構造体の個数は、実施例1の場合と比較してほぼ同様な結果が得られた。

30

【0161】

測定対象分子を含む試料が微量にしかない場合には、(2)法に従って、測定対象分子を含む試料を先にプレート上で乾燥させる方がより有用であるが、溶媒aとしてメタノールを用いると、プレート上で試料溶液を乾燥させなくてもよいことが確認された。

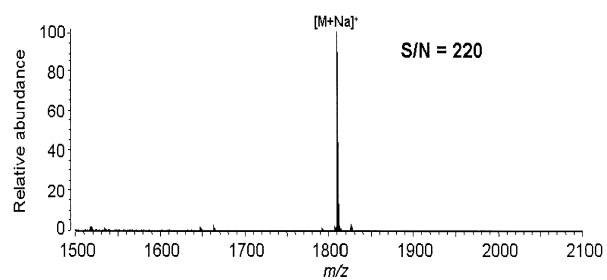
【産業上の利用可能性】

【0162】

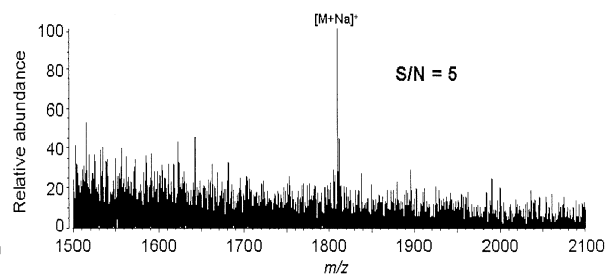
本発明の質量分析法用測定試料の調製方法は、イオン化効率の良いスイートスポットを多く含む測定試料を提供でき、それによって信頼性の高い化学構造についての情報を得ることができる質量分析法を提供できるので、微量な生体試料由来の分子や生体試料中の分子の化学構造解析はもちろん、機能解明や病態の解明の分野にも広く利用されるものである。

40

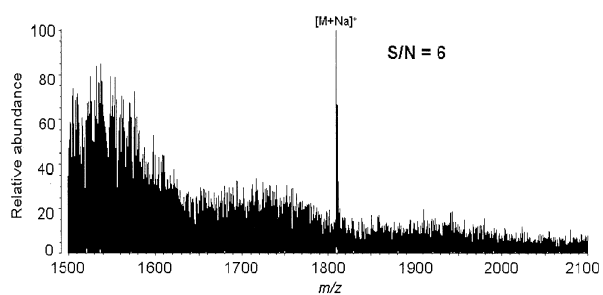
【図 1】



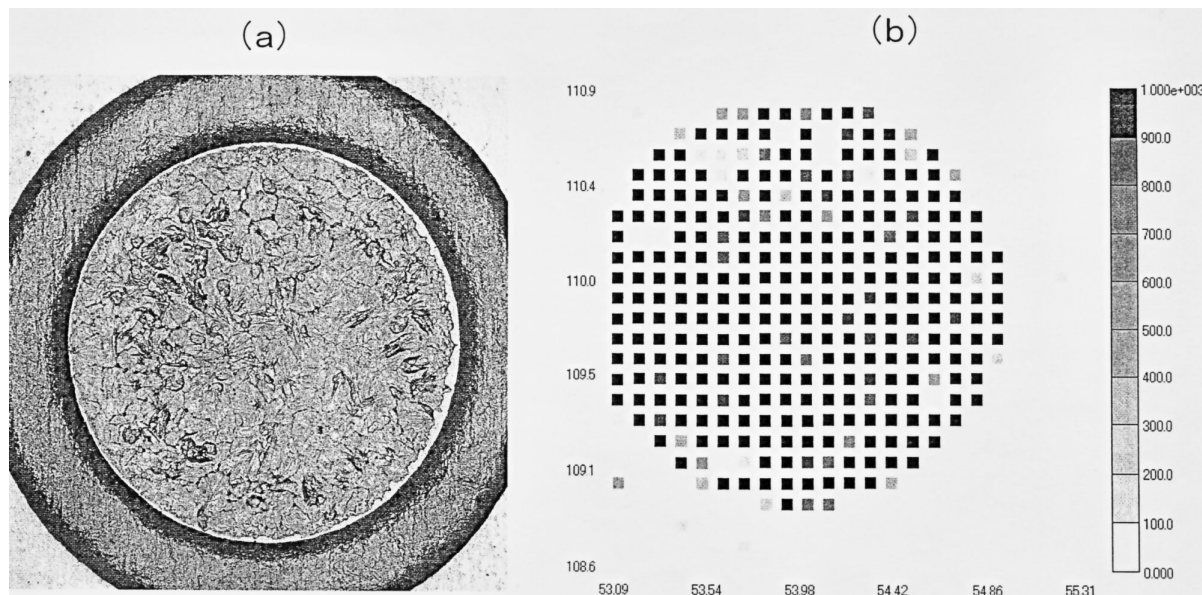
【図 7】



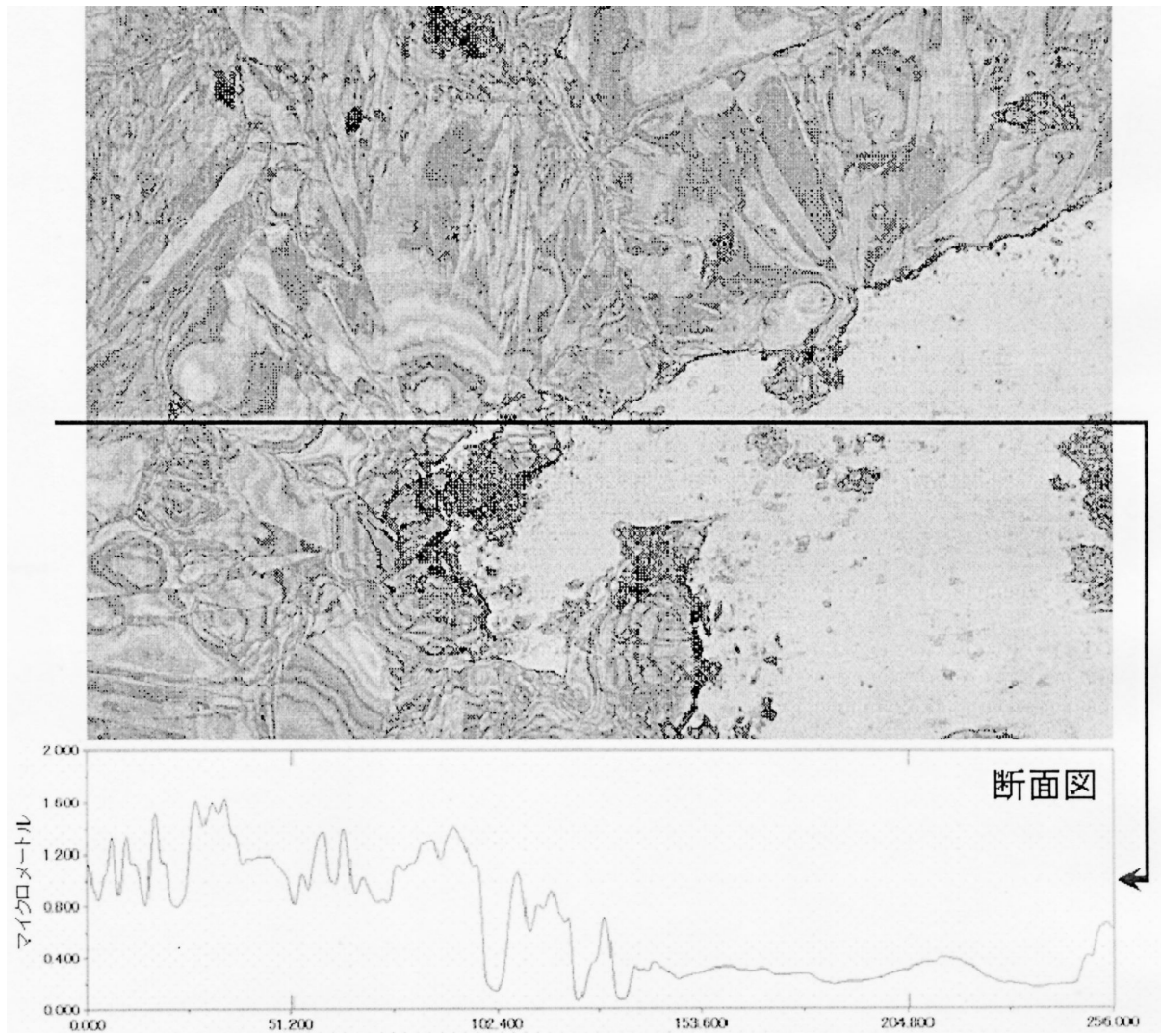
【図 3】



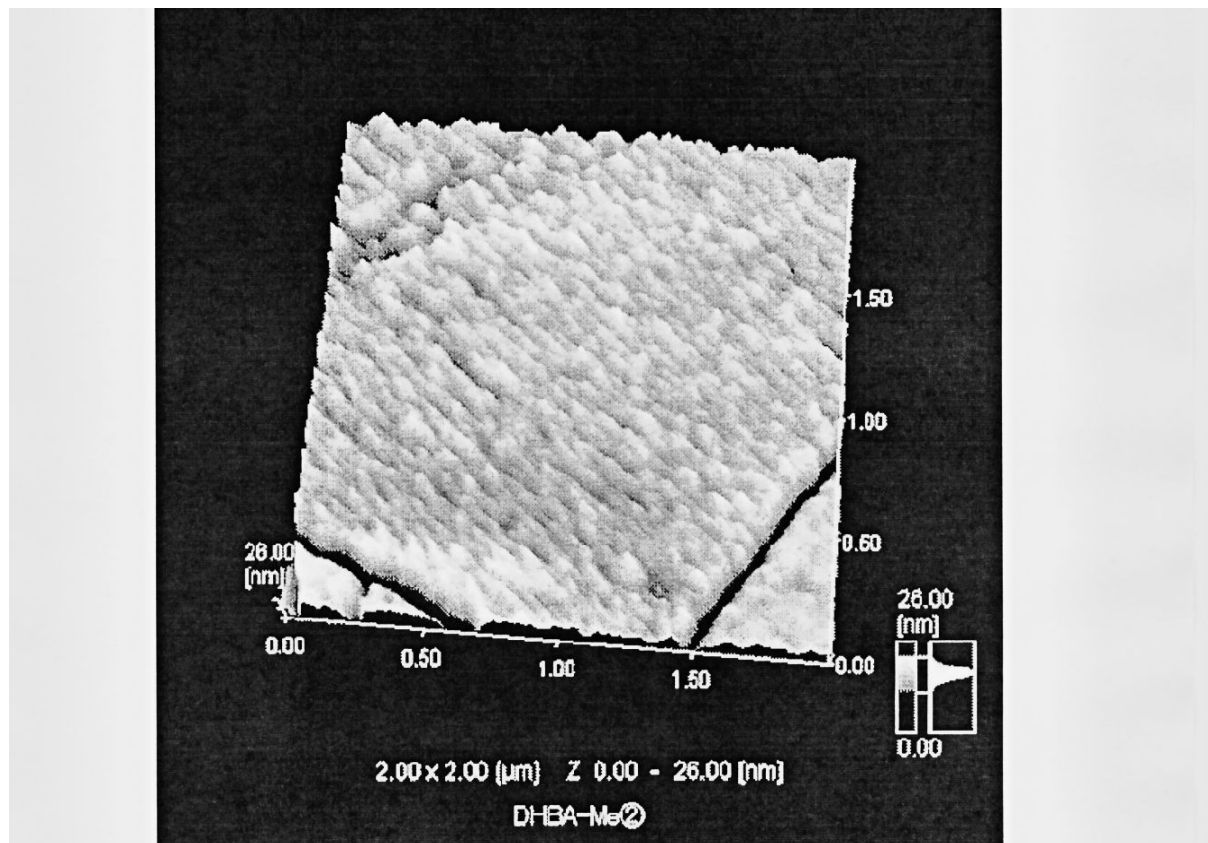
【図 2】



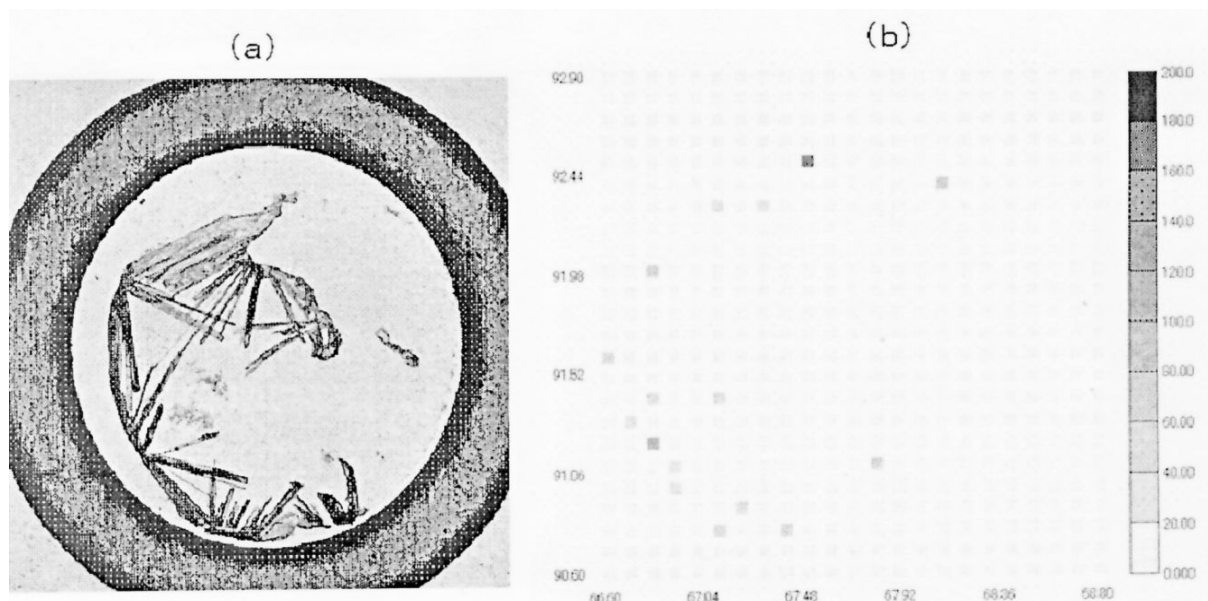
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

合議体

審判長 尾崎 淳史

審判官 麻生 哲朗

審判官 ▲高▼橋 祐介

- (56)参考文献 特表2002-502543 (JP, A)
国際公開第2008/133148 (WO, A1)
特表2006-504971 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N27/62-27/70
H01J49/00-49/48