(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2005-292093
(P2005-292093A)
(43)公開日　平成17年10月20日(2005.10.20)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 27/62	G01N 27/62	V	
	G01N 27/62	D	

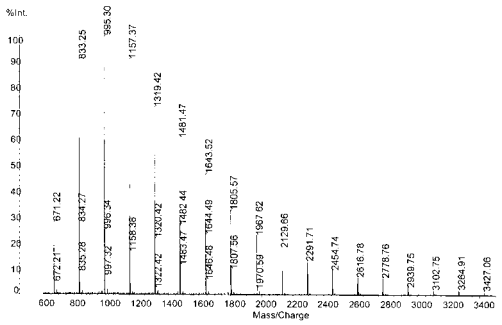
審査請求 未請求　請求項の数 9　ＯＬ　（全 9 頁）

(21)出願番号　特願2004-111619(P2004-111619)
(22)出願日　平成16年4月5日(2004.4.5)

(71)出願人　000001993
株式会社島津製作所
京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地
(74)代理人　100100561
弁理士　岡田　正広
(72)発明者　福山　裕子
京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地
株式会社島津製作所内
(72)発明者　岩本　慎一
京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地
株式会社島津製作所内

(54)【発明の名称】質量分析装置の質量較正法

(57)【要約】
【課題】　正確な質量較正を簡便に行うことができ、且つ、適応範囲も広い質量較正法を提供する。より詳しくは、標準物質の調製が簡便で、標準物質として用いる化合物の種類の数に制約されることなく正確な質量較正ができ、MSモード（リニア、リフレクトロン）及びMS/MS(MS^n, PSD)モードのすべてに対応することができ、かつポジティブモード、ネガティブモードの両モードに対応することができる質量較正方法を提供する。
【解決手段】質量較正のための標準物質として、同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて用いる、質量分析装置の質量較正方法。好ましくは、前記複数種の糖鎖を混合物として用い、前記糖鎖が環状糖鎖であり、前記複数種の糖鎖それぞれの間で前記構成糖の数が１ずつ異なり、前記糖鎖の構成糖の全てが同種の単糖である。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
質量較正のための標準物質として、同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて用いる、質量分析装置の質量較正方法。
【請求項２】
前記複数種の糖鎖を混合物として用いる、請求項１に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項３】
前記糖鎖が直鎖状糖鎖である、請求項１又は２に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項４】
前記糖鎖が環状糖鎖である、請求項１又は２に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項５】
前記複数種の糖鎖それぞれの間で、前記構成糖の数が１ずつ異なる、請求項１～４のいずれか１項に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項６】
前記糖鎖の構成糖の全てが同種の単糖である、請求項１～５のいずれか１項に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項７】
前記単糖がグルコースである、請求項１～６のいずれか１項に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項８】
同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を用意する工程と、
前記複数種の糖鎖を質量分析し、前記複数種の糖鎖それぞれのイオンピークの質量の実測値を得る工程と、
前記複数種の糖鎖それぞれの、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値を算出する工程と、
前記実測値と前記理論値とを比較することによって質量較正曲線を作成する工程とを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【請求項９】
同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて質量較正に用いた場合に、
前記複数種の糖鎖を質量分析し、前記複数種の糖鎖それぞれのイオンピークの質量の実測値を得る工程と、
前記複数種の糖鎖それぞれの、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値の理論値を算出する工程と、
前記実測値と前記理論値とを比較することによって質量較正曲線を作成する工程とを実行するプログラムを有する質量分析装置。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、質量分析装置の較正方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
従来の質量分析装置の質量較正方法においては、測定したい質量範囲をカバーする適当な大きさの分子量を有する、複数種の異なる化合物を較正用標準物質として用いる。そして、較正用標準物質の質量の実測値を、対応する理論値と比較して較正曲線を作成し、それに基づいて目的試料の較正を行う。

【０００３】
較正用標準物質には、ペプチド、タンパク質、糖類、合成ポリマーなどの化合物が一般的に用いられるが、この他にフラーレンが用いられることも多い。これらの化合物は、計測中の試料プレートの移動が容易であることから、一の試料プレート上の異なる位置に、異なる分子量を持つ標準物質をそれぞれ搭載して用いられることが多い。この場合、プレートを移動させながら１回の計測中に複数種の化合物の分子量関連イオンピークを検出することにより質量の実測値を得て、得られた実測値と理論値とから較正曲線を得る。また、上述の化合物のうちペプチド、タンパク質、糖類はそれぞれ、構造及び分子量が異なる１つ又は複数の化合物の混合物として用いられる。
【０００４】
糖鎖が用いられる場合、較正標準物質として使用される複数の物質のひとつとして、タンパク質やペプチドなどと共に使用されることが多い。糖鎖を較正用標準物質として用いた技術については、標準物質の１つとして多糖類Dextran 1000 (Fluka)使用し、サンプルをポジティブモードで計測している例がAnalytical Chemistry, 246, 195-204 (1997)に記載されている。
【０００５】
【非特許文献１】バーント・シュタール（Bernd Stahl）、アレクサンドロス・ライノス（Alexandros linos）、ミヒャエル・カラス（Michael Karas）、フランツ・ヒレンカンプ（Franz Hillenkamp）及びマーティン・セットアップ（Martin Steup）著、「アナリティカル・ケミストリー（Analytical Chemistry）」、（米国）、１９９７年、第２４６巻、ｐ．１９５－２０４
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
精密な較正を行うためには多くの較正点数が必要となる。化合物の質量に偏りがあると正しい較正を行うことが難しくなるため、較正したい質量範囲を均等にカバーできる化合物を選ぶことが望ましい。複数種の多種多様の化合物を要する従来法では、より多くの較正点数を獲得するためにより多種多様の化合物を調製することが必要となるため、標準物質の準備に手間がかかる。
【０００７】
複数種の異なる標準物質をそれぞれ、一の試料プレート上の複数の位置に搭載する場合、搭載する位置や数によっては、標準物質が複数の搭載位置にまたがり、適切なピークを得ることができなくなることがある。このような場合、標準物質の質量の誤差が生じ、目的試料の計測に影響を及ぼしてしまう。従って、自ずと使用する標準物質の種類が制限される。
【０００８】
そして、標準物質を多種多様な複数種の化合物の混合物として用いる場合は、標準物質の混合溶液として調製されるが、この場合、化合物ごとにイオン化効率が異なるため、それらの混合比を最適化する必要が生じ煩雑である。
【０００９】
また、従来のMS/MS(MS^n, PSD)モードの質量較正プログラムでは、目的試料に合わせて選択したそれぞれの標準物質のプリカーサイオンから得られるプロダクトイオンに対して異なるマスリストを作成し、使用する必要があった。MALDI-TOFに関しては、特にネガティブモード及びMS/MS(MS^n, PSD)モードの標準物質が不足している。さらに、ポジティブ及びネガティブの両モード、MSモード（リニア、リフレクトロン）及びMS/MS(MS^n, PSD)モードのすべてに対して共通して用いることができる標準物質が不足している。例えば標準物質として頻繁に用いられるフラーレンは、試料プレートを汚染するためイオン源の汚れの原因となり、またＰＳＤやＣＩＤによる開裂を極めて起こし難いためMS/MS(MS^n, PSD)モードの質量較正には不向きである。
【課題を解決するための手段】

【００１０】
そこで本発明の目的は、正確な質量較正を簡便に行うことができ、且つ、適応範囲も広い質量較正法を提供することにある。すなわち本発明の目的は、標準物質の調製が簡便で、標準物質として用いる化合物の種類の数に制約されることなく正確な質量較正ができ、MSモード（リニア、リフレクトロン）及びMS/MS(MS^n, PSD)モードのすべてに対応することができ、かつポジティブモード、ネガティブモードの両モードに対応することができる質量較正方法を提供することにある。
【００１１】
（１）質量較正のための標準物質として、同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて用いる、質量分析装置の質量較正方法。
（２）前記複数種の糖鎖を混合物として用いる、（１）に記載の質量分析装置の質量較正方法。
【００１２】
（３）前記糖鎖が直鎖状糖鎖である、（１）又は（２）に記載の質量分析装置の質量較正方法。
（４）前記糖鎖が環状糖鎖である、（１）又は（２）に記載の質量分析装置の質量較正方法。
（５）前記複数種の糖鎖それぞれの間で、前記構成糖の数が１ずつ異なる、（１）～（４）のいずれかに記載の質量分析装置の質量較正方法。
【００１３】
（６）前記糖鎖の構成糖の全てが同種の単糖である、（１）～（５）のいずれかに記載の質量分析装置の質量較正方法。
（７）前記単糖がグルコースである、（１）～（６）のいずれかに記載の質量分析装置の質量較正方法。
【００１４】
（８）同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を用意する工程と、
前記複数種の糖鎖を質量分析し、前記複数種の糖鎖それぞれのイオンピークの質量の実測値を得る工程と、
前記複数種の糖鎖それぞれの、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値を算出する工程と、
前記実測値と前記理論値とを比較することによって質量較正曲線を作成する工程とを含む、（１）～（７）のいずれかに記載の質量分析装置の質量較正方法。
【００１５】
（９）同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて質量較正に用いた場合に、
前記複数種の糖鎖を質量分析し、前記複数種の糖鎖それぞれのイオンピークの質量の実測値を得る工程と、
前記複数種の糖鎖それぞれの、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値の理論値を算出する工程と、
前記実測値と前記理論値とを比較することによって質量較正曲線を作成する工程とを実行するプログラムを有する質量分析装置。
【発明の効果】
【００１６】
本発明によると、正確な質量較正を簡便に行うことができ、且つ、適応範囲も広い質量較正法が提供される。すなわち本発明によると、標準物質の調製が簡便で、標準物質として用いる化合物の種類の数に制約されることなく正確な質量較正ができ、MSモード（リニア、リフレクトロン）及びMS/MS(MS^n, PSD)モードのすべてに対応することができ、かつポジティブモード、ネガティブモードの両モードに対応することができる質量較正方法が

提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１７】

本発明においては、標準物質として、同一分子量の単糖を構成糖とする複数種の糖鎖を組み合わせて、MS、MS/MS及びMS^{n}分析の質量較正に使用する。以下、本発明を詳細に説明する。

【００１８】

質量較正のための標準物質としては、同一分子量の１種または複数種の単糖を構成糖とし且つ構成糖の数が互いに異なる、複数種の糖鎖が組み合わされて用いられる。すなわち、同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とする一つの糖鎖と、前記一つの糖鎖と構成糖の数が互いに異なる１種又は２種以上の糖鎖とが組み合わされて用いられる。同一分子量の構成糖とは基本的に異性体の関係にあるものをいう。またこのような複数種の糖鎖は、一の試料プレート上の異なる位置に異なる糖鎖をそれぞれ搭載して用いても良いし、混合物として用いても良い。本発明においては、複数種の糖鎖の混合物がより有用に用いられる。この場合、混合物は溶液として調製することができる。

【００１９】

糖鎖としては、直鎖状及び環状のものを用いることができる。本発明において通常、これらの糖鎖は単独重合体である。すなわち、同一分子量の単糖として単一の単糖からなる糖鎖が用いられる。一例としては、グルコースのみを構成糖とする糖鎖が挙げられる。このように本発明では、従来のように多種多様の化合物や複雑な組成の混合物を必要とせず、単純な組成の混合物を用いることができる。

【００２０】

標準物質である糖鎖の混合物においては、上述のように構成糖の数が互いに異なるが、さらに、構成糖の数が１つずつ異なる複数の糖鎖の混合物であることが好ましい。これによって、較正したい質量範囲を均等にカバーすることができる。さらに、本発明における標準物質は、低質量側から高質量側までの比較的広い質量範囲をカバーすることができる。従って、構成糖の数の範囲は、特に限定されることなく較正したい質量範囲に応じて適宜決定することが可能である。本発明は、このように標準物質として使用する化合物の種類の数に制約を受けることなく、質量較正を行うことが可能である。

【００２１】

上述のようにして用意した糖鎖混合物は、実際に質量分析を行うことによってイオンピークの質量の実測値を測定する。MS測定を行う場合は分子量関連イオンピークの質量の実測値、MS/MS(MS^n, PSD)測定を行う場合は分子量関連イオンピーク及びプロダクトイオンピークの質量の実測値を得る。

【００２２】

一方、上述の複数種の糖鎖それぞれについて、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値を算出する。例えば、上述のように構成糖の数が１つずつ異なる複数の糖鎖の混合物を標準物質として用いる場合には、質量分析における分子量関連イオンピークの質量の理論値を算出すると良い。算出された理論値はファイルに読み込んでデータ化し、マスリストとして用いることができる。

【００２３】

得られた上記実測値と上記理論値とは、互いに比較されることによって、質量較正曲線の作成に供される。質量較正曲線は、質量較正プログラムによって作成することができる。質量較正プログラムにおいては、あらかじめ標準物質の質量の理論値リストを入力することにより、入力された理論値と、実測した該標準物質のスペクトルの各ピークのm/z値から、随時、較正曲線を新規に作成できる。較正曲線は、最小二乗法による直線回帰、スプライン補間やラグランジェ補間を用いた多次曲線により作成することができ、区間で区切って異なる補間方法を用いると、さらに精度の高い質量較正を実現することができる。

【００２４】

上述のようにして得られた質量較正曲線は、目的試料の質量分析において用いられる。

本発明においては質量分析装置として、AXIMA-QIT、AXIMA-CFR（いずれも島津製作所製）が好ましく用いられる。本発明の質量較正方法は簡便であり、標準試料のスペクトルにおいて検出される等間隔のピークが見やすいため、プログラムによる自動較正に対応しやすい。

【００２５】

従って本発明は、上述の工程を実行するプログラムが組み込まれた質量分析装置にも関する。すなわち、本発明の質量分析装置は、同一分子量の１種又は複数種の単糖を構成糖とし且つ前記構成糖の数が互いに異なる複数種の糖鎖を組み合わせて質量較正に用いた場合に、前記複数種の糖鎖を質量分析し、前記複数種の糖鎖それぞれのイオンピークの質量の実測値を得る工程と、前記複数種の糖鎖それぞれの、質量分析におけるイオンピークの質量の理論値の理論値を算出する工程と、前記実測値と前記理論値とを比較することによって質量較正曲線を作成する工程とを実行するプログラムを有する。プログラムの構成自体は、公知のものを使用することができる。

【実施例】

【００２６】

以下、MALDI-TOF-MS装置のポジティブモードにおけるMS及びMS/MS(MS^n, PSD)測定の質量値較正の例を挙げ、本発明についてさらに詳細に説明する。

【００２７】

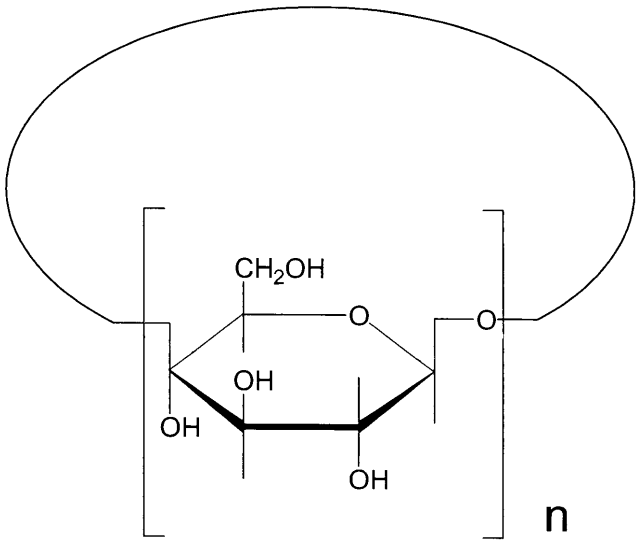
較正用標準物質としては、グルコースの環状重合体であるシクロアミロースを用い、グルコースの重合数が４から３７まで１ずつ連続して異なる、全３４種類の複数のシクロアミロースの混合物として用いた。

【００２８】

本明細書においてシクロアミロースとは、構成糖の数の大小に関わらず、グルコースがグリコシド結合した環状グルカンをいう。下記式（Ｉ）に、その構造を示す。

【００２９】

【化１】

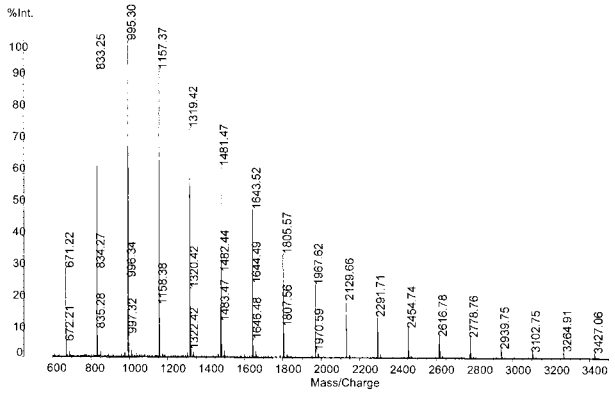


（Ｉ）

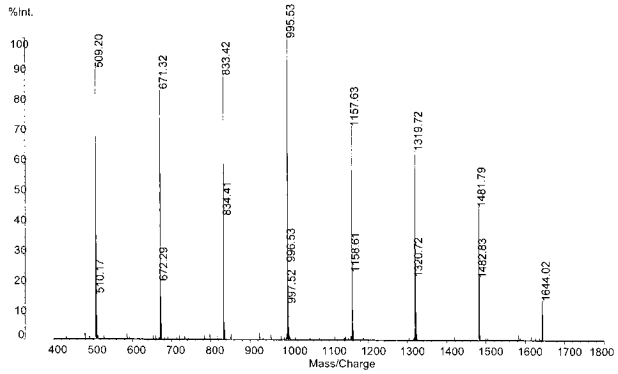
【００３０】
シクロアミロースは、重合数が１異なるごとに、構成糖であるグルコース１分子の分子量180からグリコシド結合によって失われた水１分子の分子量18を引いた162だけ分子量が異なる。上記シクロアミロース混合物のMSモードのマススペクトルでは、理論上、m/z 648～5994に亘り、162マスユニットのn倍のm/z値を有するピークが等間隔で現れる。実際に得られたMSモードのマススペクトルでは、m/z 671～6017までの広い質量範囲で162マスユニット毎の等間隔で、それぞれの分子のNa^+付加イオンピークとして検出された。
【００３１】
一方、質量分析装置付属の質量較正プログラムに、162マスユニットのn倍として算出したシクロアミロースの分子量の理論値を入力してマスリストを作成した。上記の得られたシクロアミロース混合物スペクトルの各実測値を、マスリスト中の相当する理論値と比較し、その誤差を補正することで、較正曲線を作成した。
【００３２】
続いて、MS/MS(MS^n, PSD)計測を行った。得られたMS/MS(MS^n, PSD)モードスペクトルにおいては、MSモードスペクトルで得られたどのピークをプリカーサとしても、それぞれのプリカーサイオンピークからは162マスユニット毎に等間隔でプロダクトイオンのピークが検出された。
【００３３】
これは、グルコースn個の重合体であるシクロアミロースに対して得られたMSモードのスペクトル中の、どのピークをプリカーサとしても、グリコシド結合が切断されることで、切断されたグルコシド結合に対応する数のグルコースがプリカーサから失われたフラグメントとして、それぞれのプロダクトイオンが観測されていることを示している。すなわち、MS計測で得られたスペクトルにおける分子イオン群と、MS/MS計測で得られたスペクトルにおけるプロダクトイオン群とは、質量の理論値において同じである。従って、MS/MS(MS^n, PSD)モードでも、MSモードの場合と同じマスリストを使用し、MSモードの場合と同様に、質量較正曲線を作成することができる。
【００３４】
また、このシクロアミロースの混合物は、ネガティブモードで質量分析を行っても、同様に、等間隔のプロダクトイオン（負電荷）が多数得られた。すなわち、本発明の較正標準物質は、ネガティブモードのMS及びMS/MS(MS^n, PSD)モードにおいても使用することが可能である。
【００３５】
上記シクロアミロースについて、実際に取得した測定結果を図１～６に示す。図１～図６においては、横軸に質量／電荷（Mass/Charge）、縦軸に相対イオン強度（% Int.）を表す。図１は、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるポジティブイオンモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。図２は、プリカーサイオンをm/z 1644としたときの、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるポジティブイオンモードでのシクロアミロースのMS/MSスペクトルである。図３は、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるネガティブイオンモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。図４は、プリカーサイオンをm/z 1175としたときの、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるネガティブイオンモードでのシクロアミロースのMS/MSスペクトルである。図５は、MALDI-TOF型質量分析装置によるリフレクトロンモード及びポジティブモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。図６は、MALDI-TOF型質量分析装置によるリフレクトロンモード及びネガティブモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。
【００３６】
以上のことから、本発明の質量較正方法は、以下の効果を有する。
１．MSモードにおいて、等間隔で（すなわち構成糖の分子量から水の分子量18を差し引いた量の質量数において一定の間隔で）大量のピークが幅広い質量範囲でポジティブ及びネガティブの両モードで得られるため、広範囲において高精度な較正ができ、さらに種々の較正法への適応や質量範囲に応じて異なる較正法を適用することも容易となる。

【００３７】
２．MSモードのどのピークをプリカーサイオンとしても、ポジティブ及びネガティブの両モードで、MS/MS(MS^n, PSD)モードにおけるプロダクトイオンが等間隔で得られるため、広範囲のMS/MS(MS^n, PSD)モードに対応する質量較正が、１つの単純な組成の混合試料によって１つのマスリストのみから行える。
【００３８】
３．MSモードの分子イオンピークとMS/MS(MS^n, PSD)モードのプロダクトイオンピークとが、マススペクトル上で同一m/z値におけるピークとして等間隔で（いずれも構成糖の分子量から水の分子量18を差し引いた量の質量数において一定の間隔で）検出されることで、これらの計測モードの違いによる質量較正のずれを防ぐことができる。
【００３９】
４．等間隔のピークは見やすく、プログラムによる自動較正にも対応しやすい。
５．較正用標準物質のために多種多様の化合物を調製する手間が省けるだけでなく、イオン化しやすさを考慮して較正用標準物質の溶液配合を最適化する過程も不要であるため複雑な組成の混合物を調製する必要もなく、試料調製が大幅に簡略化される。
【図面の簡単な説明】
【００４０】
【図１】MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるポジティブイオンモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。
【図２】プリカーサイオンをm/z 1644としたときの、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるポジティブイオンモードでのシクロアミロースのMS/MSスペクトルである。
【図３】MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるネガティブイオンモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。
【図４】プリカーサイオンをm/z 1175としたときの、MALDI-QIT-TOF型質量分析装置によるネガティブイオンモードでのシクロアミロースのMS/MSスペクトルである。
【図５】MALDI-TOF型質量分析装置によるリフレクトロンモード及びポジティブモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。
【図６】MALDI-TOF型質量分析装置によるリフレクトロンモード及びネガティブモードでのシクロアミロースのMSスペクトルである。

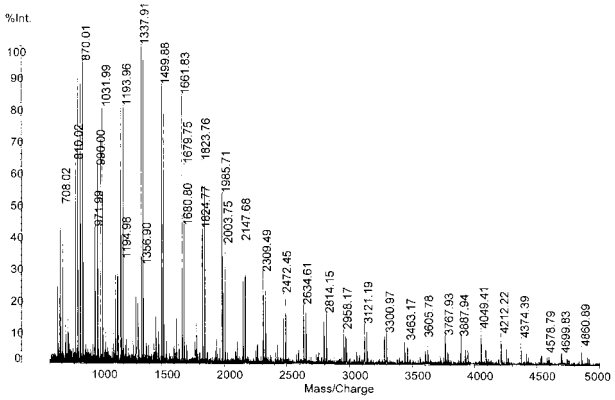
【図１】



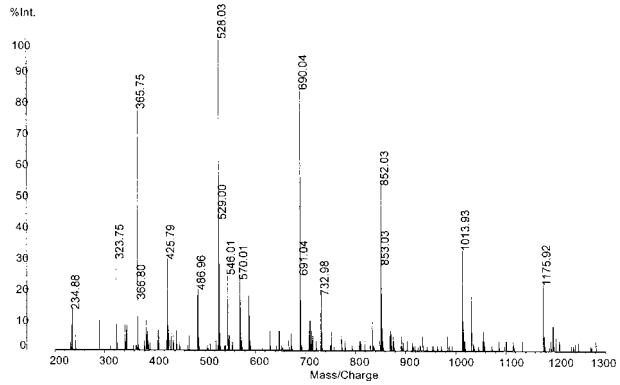
【図２】



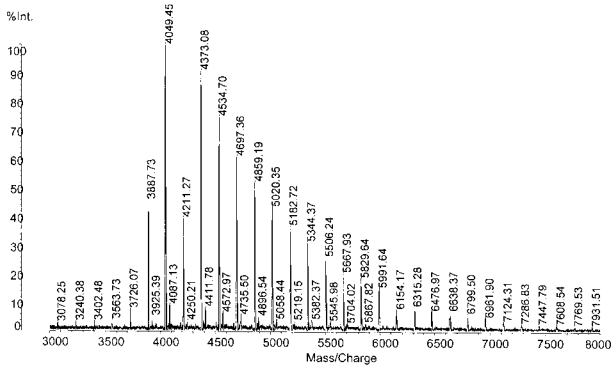
【図３】



【図４】



【図５】



【図６】

