



- (51) 국제특허분류:
G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006108
- (22) 국제출원일: 2013년 7월 9일 (09.07.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0075891 2012년 7월 12일 (12.07.2012) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 신림동 산 56-1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김명수 (KIM, Myung Soo); 150-795 서울시 영등포구 여의도동 미성 아파트 B 동 708 호, Seoul (KR). 배용진 (BAE, Yong Jin); 151-866 서울시 관악구 서림동 408-21, Seoul (KR). 박경만 (PARK, Kyung Man); 132-844 서울시 도봉구 방학 2 동 643-26 202 호, Seoul (KR). 안성희 (AHN, Sung Hee); 426-768 경기도 안산시 상록구 성포동 예술인 아파트 12 동 1501 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 서근복 (SEO, Keun Bok) 등; 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-6 성지하이츠 3 차 빌딩 18 층 9 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

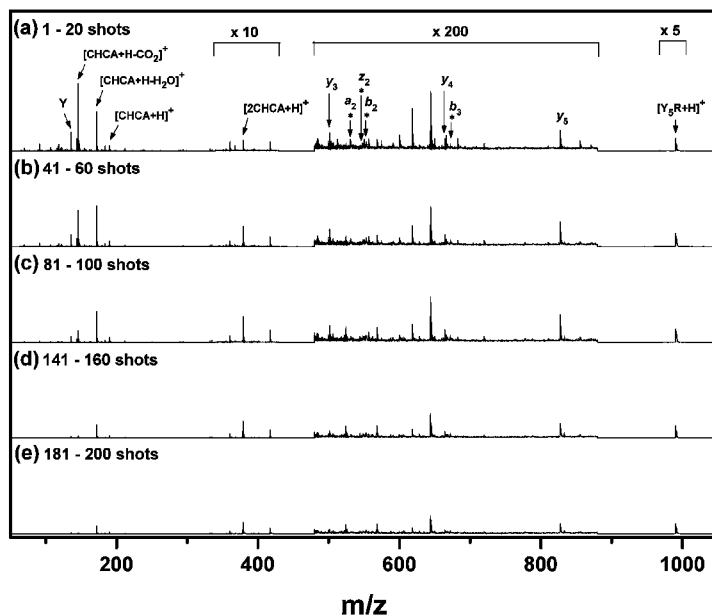
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: METHOD OF MEASURING MASS SPECTRUM OF IONS GENERATED AT CONSTANT TEMPERATURE

(54) 발명의 명칭 : 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method of measuring a mass spectrum of ions generated at a constant temperature. More particularly, the present invention relates to a method of measuring a mass spectrum of ions generated at a constant temperature, the method including selecting only spectrums having the same decomposition pattern of ions of a sample, a matrix, or a third material from among a plurality of mass spectrums obtained from ions formed by applying energy to a specimen formed by mixing the matrix and the sample or a specimen formed by mixing the matrix, the sample, and the third material.

(57) 요약서: 본 발명은 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편, 또는 매트릭스와 시료 및 제 3 물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 시료 이온이나 상기 매트릭스 이온, 또는 상기 제 3 물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 대한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편, 또는 매트릭스와 시료 및 제3물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 시료 이온이나 상기 매트릭스 이온, 또는 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI))는 다양한 고체 시료를 이온화시킬 수 있는 방법이다. 대개 비행시간형(time-of-flight (TOF)) 질량 분석관에 연결되어 MALDI-TOF 형태로 사용된다. MALDI-TOF는 감도가 좋고, 적용 범위가 넓으며, 분석 시간이 짧아 여러 가지 고체 물질, 특히 생물 분자 구조 분석에 널리 사용된다.
- [3] 그러나 MALDI의 단점은 스펙트럼의 패턴의 재현성이 매우 나쁘다는 점이다. 시편의 동일한 위치를 레이저로 반복적으로 조사하여 스펙트럼을 얻는 경우에도 스펙트럼의 패턴은 계속 달라진다. 이렇게 MALDI 질량 스펙트럼 패턴의 재현성이 나쁘기 때문에, MALDI 스펙트럼의 산업적 또는 과학적 응용범위가 매우 제한을 받고 있다. 따라서 본 발명은 MALDI 질량 스펙트럼 패턴의 재현성을 개선하기 위한 것을 기본적인 목적으로 한다.
- [4] 동일한 MALDI 질량분석기를 사용하여 동일한 시편에 대한 질량 스펙트럼을 얻는다 하더라도, 시편을 준비하는 방법, 시편에 레이저가 도달하는 위치, 사용된 레이저의 파장, 레이저의 펄스 에너지, 레이저가 도달하는 지점(spot) 크기, 동일한 지점에 레이저를 조사한 횟수, 등에 따라 얻어지는 질량 스펙트럼 패턴이 동일하지 아니함이 널리 알려져 있다.
- [5] 이러한 스펙트럼 패턴의 재현성의 결여는 MALDI 질량분석법을 이용한 기초 연구, 정밀 분석, 표준화 등에 있어서 심각한 문제가 되고 있다. MALDI 질량분석법이 감도가 매우 감도가 높고, 사용이 편리하며, 다양한 분석시료에 대해 신속히 적용할 수 있는 기술이라는 점을 감안할 때, MALDI의 스펙트럼 패턴의 재현성을 개선할 수 있다면 그 응용성은 대폭 확대될 것으로 예상된다.
- [6] MALDI의 시편은 통상 시료와 매트릭스의 혼합물이므로, MALDI 질량 스펙트럼에는 분석시료 이온(analyte, AH^+)과 그 분해 생성물, 그리고 매트릭스 이온(matrix, MH^+)과 그 분해 생성물이 나타난다. 따라서 MALDI 스펙트럼의

- 패턴은 AH^+ 와 MH^+ 의 분해 패턴과 AH^+ 와 MH^+ 의 세기 비율에 의해 결정된다.
- [7] MALDI에 의해 형성된 이온은 이온원 내부(in-source decay, ISD) 또는 외부에서 깨질 수 있다(post-source decay, PSD). ISD는 반응속도가 빠르며 빨리 종결되는 반면 PSD는 반응속도가 느리다. 이러한 분석시료 이온의 분해 반응속도와 수율은 반응속도 상수와 이온의 내부 에너지에 의해 결정된다. 따라서 MALDI에서 레이저 펄스에 의해 생성되는 플룸(plume)의 유효 온도를 알면 내부 에너지를 알 수 있게 되고, 이것을 사용해 반응 속도를 구할 수 있다.
- [8] MALDI에서 시편에 레이저를 조사할 때 생성되는 이온들을 포함하고 있는 기체인 플룸(plume)의 온도를 알아내기 위한 많은 과학적 연구가 이루어진 바 있다. Mowry 등은 레이저에 의해 탈착된 중성 분자의 광이온화에 의해 온도를 추정해보았으며(*J. Phys. Chem.***1994**, 98, 1904-1909), Yergey 등은 in-source decay (ISD) 수율로부터 온도를 추정해보았고(*J. Am. Soc. Mass Spectrom.***2007**, 18, 607-616), Zenobi 등은 레이저 펄스를 흡수한 시료가 방출하는 빛을 측정하여 온도를 추정하였다(*J Phys. Chem. A***2004**, 108, 2405-2410).
- [9] 그러나 플룸의 온도를 측정하는 가장 체계적인 방법은 본 발명자들의 연구에 의하여 최초로 제시되었다(*J. Phys. Chem. B***2009**, 113, 2071-2076). 본 발명자들은 시간 분별 광분해 스펙트럼과 PSD 스펙트럼을 반응속도론적으로 분석하여, 이온의 분해 반응 속도와 유효 온도를 얻는 데 성공하였다. 또한, 이렇게 얻어지는 온도는 말기 플룸의 온도(T_{late})임을 인지하였다. 본 발명자들은 이렇게 얻은 반응 속도 함수를 사용하여 ISD 수율을 분석함으로써 초기 플룸 온도(T_{early})도 결정할 수 있었다(도 1).
- [10] 본 발명자들은, 우선 MALDI 질량 스펙트럼에서 펩타이드 이온의 ISD, PSD 등에 의해 만들어지는 분해 이온 생성물들의 세기를 측정한다. 이 자료로부터 이온원 출구에서 펩타이드 이온의 생존 확률(S_{in})을 계산한다. 실험 조건을 고려하여 펩타이드 이온이 이온원 출구에서 생존할 수 있는 최고 속도상수를 구하고, 펩타이드 이온의 분해 속도상수로부터 그에 해당하는 최고 내부 에너지를 결정한다. 온도를 바꾸어 가면서 펩타이드 이온의 내부 에너지 분포를 구하고 최고 내부 에너지보다 작은 영역의 확률이 S_{in} 과 같아지는 온도를 취함으로써 T_{early} 를 결정한다.
- [11] 본 발명자들이 고안한 방법에 의해 결정된 이온 함유 기체(플룸)의 초기 및 말기의 온도는 선행 연구자들이 보고한 결과와 대체로 일치하였다. 그러나 다른 연구자들에 의해 고안된 방법들에 비해 방법론적으로 훨씬 더 체계적이며 임의성이 없어서 보편적 적용이 가능하다는 장점이 있다(*Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2011, vol. 22, pp1070-1078).
- [12] 본 발명자들은, MALDI 질량 스펙트럼의 이온 분해 패턴의 재현성을 달성하기 위하여 다양한 방법을 시도한 결과, 이온 생성 반응의 온도를 일정하게 유지함으로써 이온 분해 패턴의 재현성이 향상된다는 사실을 발견하였다. 예를 들면, 펄스 에너지가 비교적 낮은 레이저 광선을 조사하여 생성되는 이온들을

포함한 플룸(plume)의 온도를 비교적 일정하게 유지함으로써, 시편에 함유된 물질들로부터 생성되는 이온들의 분해 패턴이 비교적 일정하게 재현되는 질량 스펙트럼을 측정할 수 있었다.

- [13] 또 다른 방법으로서, 본 발명자들은 레이저 광선의 조사 횟수를 적게 하여 이온들이 생성되는 반응의 온도를 비교적 일정하게 유지함으로써, 시편에 존재하는 물질들로부터 생성되는 이온들의 분해 패턴이 비교적 일정하게 나타나는 질량 스펙트럼을 측정할 수도 있었다.
- [14] 본 발명자들은, 또 다른 방법으로서, 시편을 주변과 단열하여 온도 변화를 최소화함으로써 생성되는 이온들이 함유된 플룸의 온도를 비교적 일정하게 유지하면, MALDI 질량 스펙트럼의 패턴의 재현성이 크게 향상된다는 사실을 확인할 수 있었다.
- [15] 본 발명자들은 펩타이드 이온에 대한 광분해 반응의 선행 연구를 통하여, 이들 이온의 분해 반응의 속도 상수를 구했으며, 이를 이용하여 MALDI에 의해 생성되는 각종 이온을 포함하는 기체(소위, 플룸)의 초기 온도(T_{early})를 구할 수 있는 방법을 제시한 사실이 있다(Yong Jin Bae, Jeong Hee Moon, and Myung Soo Kim, Expansion Cooling in the Matrix Plume is Under-Recognized in MALDI Mass Spectrometry, Journal of The American Society for Mass Spectrometry, vol. 22, pp1070-1078, 2011). 또한, 본 발명자들은 다양한 조건에서 MALDI 질량 스펙트럼들을 얻고, 상기 Kim 등의 방법을 사용하여 MALDI 질량 스펙트럼에 나타나는 이온들이 생성될 당시의 온도(T_{early})를 측정하는 연구를 진행하였다.
- [16] 이러한 연구를 통하여, 본 발명자들은, MALDI에서 이온 생성 반응의 여러 가지 조건을 변화시키면 이온들이 생성될 당시의 온도(T_{early})가 달라지지만, 다양한 실험 조건 하에서 얻은 스펙트럼 중 이온 생성 반응 온도가 동일한 질량 스펙트럼 만을 선택하여 살펴보면, 각 이온들의 분해 패턴이 각각 서로 동일하다는 놀라운 사실을 발견함으로써 본 발명을 착안하게 되었다.
- [17] 특히, 펩타이드에 대한 MALDI 연구에서, 본 발명자들은 MALDI 스펙트럼 패턴의 재현성 문제의 큰 원인이 이온 생성 반응의 온도의 변화 때문임에 주목하여, 매트릭스와 펩타이드를 포함하는 시편으로부터 다양한 이온화 반응 조건에서 얻어낸 다수의 스펙트럼들 중 이온 생성 반응 온도가 일정한 것들만을 선별함으로써, MALDI 질량 분석 스펙트럼의 재현성을 확보할 수 있었다.
- [18] 본 발명자들은 MALDI 이온화 반응 조건을 바꾸면서 MALDI 질량 분석 스펙트럼을 수차례 측정하여, 각 스펙트럼에서 MALDI 질량 분석 시편에 함유된 매트릭스 이온 또는 시료 이온 또는 첨가된 물질 이온 각각의 분해 패턴을 서로 비교하고, 이들 물질의 이온 분해 패턴이 동일한 스펙트럼만을 선별함으로써, 본 발명의 방법, 즉 동일한 온도 조건에서 이온화된 물질들의 재현성 있는 질량 분석 스펙트럼을 측정하는 방법을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 따라서 본 발명의 기본적인 목적은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 매트릭스와 시료와 제3물질이 혼합된 시편에 에너지(레이저)를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [22] 본 발명의 기본적인 목적은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [23] 본 명세서에서 "매트릭스"란 레이저와 같은 에너지원으로부터 에너지를 흡수하여 그 에너지를 분석시료에 전달함으로써, 분석시료를 가열하고 이온화시키는 물질이다. MALDI 질량분석에서 사용되는 매트릭스로서 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), DHB(2,5-dihydroxybenzoic acid), 시나핀산(sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)), 4-하이드록시-3-메톡시시나민산(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), 피콜린산(picolinic acid), 3-하이드록시피콜린산(3-hydroxy picolinic acid) 외에 다양한 물질들이 알려져 있다.
- [24] 전형적인 MALDI 질량분석에서는, 매트릭스(M)와 극미량의 분석시료(A)로 이루어진 고체 시편에 레이저 펄스를 조사한다. 매트릭스는 상기 레이저를 흡수하여 상기 분석할 시료를 가열하고 이온화하는 것을 돕는다. MALDI 질량 스펙트럼은 매트릭스 이온과 시료 이온의 분해 혼합물의 스펙트럼이다.
- [25] 본 명세서에서 "일정한 온도"란 시편에 에너지를 가하여 생성되는 플룸의 초기 온도(T_{early})가 서로 동일한 경우, 즉 이온 생성 반응 온도가 동일한 경우를 의미한다.

- [26] 대개, MALDI 질량 스펙트럼에 나타나는 이온들은 양성자화된 분석시료(AH⁺), 양성자화된 매트릭스(MH⁺), 및 이온원 내부에서 생성된 이들의 토막(fragmented) 생성물들이다. 따라서 MALDI 질량 스펙트럼의 패턴은 AH⁺와 MH⁺의 토막 패턴(fragmentation pattern) 및 시료 대 매트릭스 이온 비율에 의해 결정된다.
- [27] 본 발명자들은 MALDI의 초기 단계에서 T_{early}가 특정되면 상기 세 가지 인자 모두가 결정된다는 점을 밝혔다(Bae, Y. J.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22, 1070-1078; Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, 21, 1876-1883). 보다 상세하게는, 상기 매트릭스와 분석시료 간의 양성자 교환 반응인 $MH^+ + A \rightarrow M + AH^+$ 이 거의 열적 평형에 있다는 사실을 발견하였다.
- [28] 더욱이, MALDI에서 이온 생성 반응의 여러 가지 조건을 변화시키면 이온들이 생성될 당시의 온도(T_{early})가 달라지지만, 다양한 실험 조건 하에서 얻은 스펙트럼 중 이온 생성 반응 온도가 동일한 질량 스펙트럼 만을 선택하여 살펴보면, 각 이온들의 분해 패턴이 각각 서로 동일하다. 이러한 현상은 분석시료는 물론, 매트릭스와 제3물질을 포함하는 경우에도 동일하게 나타난다.
- [29] 따라서, MALDI 이온화 반응 조건을 바꾸면서 MALDI 질량 분석 스펙트럼을 수차례 측정하고, 각 스펙트럼에서 MALDI 질량 분석 시편에 함유된 매트릭스 이온 또는 시료 이온 또는 첨가된 제3물질 이온 각각의 분해 패턴을 서로 비교하여, 이들 물질 이온들 각각의 분해 패턴이 동일한, 즉 이들 이온화된 물질들의 생성온도가 일정한 질량 스펙트럼만을 선별함으로써, MALDI 질량 분석 스펙트럼에서의 이온 분해 패턴의 재현성을 확보하였다.
- [30] 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 본 발명의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저일 수 있다. 또한, 상기 레이저는 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저일 수 있다. 더욱이, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서, 상기 시편의 한 지점에 다수회 조사하여 다수개의 시료 이온 스펙트럼을 얻는 것이 바람직하다.
- [31] 본 발명의 또 다른 목적은 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [32] 본 발명의 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저일 수 있다. 또한, 상기 레이저는 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저일 수 있다.
- [33] 더욱이, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서, 상기 시편의 한 지점에 다수회 조사하여 다수개의 매트릭스 이온 스펙트럼을 얻는 것이 바람직하다.
- [34] 본 발명의 또 다른 목적은 매트릭스와 시료와 제3물질이 혼합된 시편에 에너지(레이저)를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량

스펙트럼들 중에서, 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법함으로써 달성될 수 있다.

[35] 본 발명의 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저일 수 있다. 또한, 상기 레이저는 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저일 수 있다.

[36] 더욱이, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서, 상기 시편의 한 지점에 다수회 조사하여 다수개의 제3물질 이온 스펙트럼을 얻는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[37] 본 발명의 방법에 따라 일정한 온도에서 생성된 이온들의 MALDI 스펙트럼만을 선택함으로써, 종래의 MALDI 질량분석법의 단점인 재현성이 좋지 않다는 점을 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[38] 도 1은 본 발명의 실시예 1의 펩타이드 이온 $[Y_6 + H]^+$ 의 초기 플룸의 온도(T_{early})를 구하는 방법에 대한 개념도이다.

[39] 도 2는, 본 발명의 실시예 2에서, 25 nmol의 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)에 3 pmol의 Y_5R 이 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를 반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이다.

[40] 도 3은, 본 발명의 실시예 2에서, 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 Y_5K 가 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를 반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이다.

[41] 도 4는, 본 발명의 실시예 2에서, 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 앤지오텐신 II(DRVYIHPF)가 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를 반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이다.

[42] 도 5는, 본 발명의 실시예 3에서, 시편 두께에 따른 초기 플룸의 온도(T_{early})의 변화를 보여주는 그래프이다.

[43] 도 6은 본 발명의 실시예 4의 $[CHCA + H]^+$ 의 PSD 스펙트럼이다.

[44] 도 7은 본 발명의 실시예 5의 $Y_5R:CHCA = 1:8300$ 인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.

[45] 도 8은 본 발명의 실시예 5의 $Y_5K:CHCA = 1:8300$ 인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.

[46] 도 9는 본 발명의 실시예 5의 앤지오텐신 II(DRVYIHPF):CHCA = 1:8300인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[47] 이하, 다음의 실시예 또는 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 또는 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시

태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리 범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[48]

[49] 실험

[50] 본 발명자들이 자체 제작한 MALDI-TOF 기기를 사용하였다(Bae, Y. J.; Shin, Y. S.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* in press; Bae, Y. J.; Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 92-99; Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Choi, K. M.; Kim, M. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2201-2208). 상기 기기의 중요한 측면 중 하나는 내부 전압에 일차와 이차 성분이 있는 리플렉트론(reflectron)을 장착하고 있다는 점이다(Oh, J. Y.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1248-1259; Bae, Y. J.; Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 92-99). 따라서 프롬프트 이온(prompt ion)과 이들의 ISD와 PSD 생성물을 동시에 검출할 수 있다(Bae, Y. J.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1070-1078).

[51] 별도의 언급이 없으면, 질소 레이저(MNL100, Lasertechnik Berlin, Berlin, Germany)의 337 nm 출력을 초점 거리가 100 mm인 렌즈로 모아 MALDI에 사용하였다. 또한, Nd:YAG 레이저(SL III-10, Continuum, Santa Clara, CA, USA)의 355 nm 출력도 같은 렌즈로 모아 사용하였다.

[52] 신호 대 잡음 비를 개선하기 위하여, 20회의 레이저 조사로 얻은 스펙트럼을 합하였다. 그리고 20 개의 다른 지점들에서 얻은 스펙트럼 중 조사수가 같은 것들을 합하였다. 따라서 최종 스펙트럼의 각 점은 400회의 레이저 조사로 얻은 결과를 합한 것이다. 각 봉우리를 이루는 이온의 개수를 계산하는 방법은 문헌에 보고된 바를 따른다(Bae, Y. J.; Shin, Y. S.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* in press; Moon, J. H.; Shin, Y. S.; Bae, Y. J.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 162-170).

[53] 337 nm를 사용한 펩타이드 CHCA-MALDI에 있어서 역치 레이저 펄스 에너지, 즉 역치값은 0.50 $\mu\text{J/pulse}$ 였다. 레이저 빔의 모습이 개선되었기 때문에, 이 값은 종래 문헌에 보고된 값인 0.75 $\mu\text{J/pulse}$ (Bae, Y. J.; Shin, Y. S.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* in press; Moon, J. H.; Shin, Y. S.; Bae, Y. J.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 162-170) 보다 작았다. 355 nm에서 역치값은 0.40 $\mu\text{J/pulse}$ 였다.

[54] 시료로서 펩타이드 Y_5X (Y = 티로신, X = K(리신) 또는 R(아르기닌); Pepton, 대전, 대한민국), 앤지오텐신 II(DRVYIHPF; Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 CHCA(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 각 펩타이드의 저장 수용액을 희석하여 필요한 농도를 만든 후, 물과 아세트니트릴을 용매로 사용하여 만든 CHCA 용액과 혼합하였다. 각 혼합물 1 μL 를 타겟에 올린 후 진공 건조하였다. 시편은 25 nmol의 CHCA와 1 또는 3 pmol의 펩타이드로 구성되었다.

[55]

- [56] 실시예 1. T_{early} 를 구하는 방법
- [57] 본 발명자들의 초기 플룸(early plume)의 온도를 구하는 반응속도론적 방법을 따른다(Bae, Y. J.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***2011**, vol 22, 1070-1078; Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***2010**, vol 21, 1876-1883).
- [58] 먼저 ISD, PSD, 그리고 ISD의 PSD에 의해 만들어지는 생성물의 상대적 세기를 MALDI-TOF 스펙트럼에서 측정하였다. 이 자료로부터 이온원 출구에서 펩타이드 이온의 생존 확률(S_{in})과 검출기에서의 생존 확률(S_{post}) 계산하였다. $[Y_6 + H]^+$ 의 분해의 경우, 상기 이온의 총 분해 속도상수는, $k(E)$, 시간 분별 광분해 연구(Yoon, S. H.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***2009**, 20, 1522-1529)에서 이미 결정하였다. 반응속도론적 분석에서 50 ns를 ISD의 역치수명(threshold lifetime)으로 잡았으며, 이것은 반응속도상수로 $1.4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ 에 해당하고 내부 에너지로는 13.157 eV에 해당한다. 그 다음에, 내부에너지 분포 함수에서 13.157 eV보다 작은 부분이 S_{in} 이 되도록 함으로써 초기 플룸의 유효 온도를(T_{early}) 결정하였다. 말기 플룸(late plume) 온도 역시 유사한 방법으로 결정하였는데, 이때는 $5.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 를 속도상수의 역치값으로 사용하였다. 사용한 레이저 플루언스(fluence)가 문헌 1에서보다 컸으므로 이번에 결정한 T_{early} 값은 본 발명자들이 종래에 보고한 881 K(Bae, Y. J.; Moon, J. H.; Kim, M. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.***2011**, vol 22, 1070-1078)보다 다소 높았다.
- [59] 앞서 설명한 방법에서, 반응속도론적 방법에 의해 펩타이드의 온도를 구하려면 그것의 분해 반응 속도상수 $k(E)$ 를 알아야 한다. 본 발명자들의 방법을 역으로 사용함으로써 $k(E)$ 를 구할 수 있음을 보였으며, $[Y_5R + H]^+$ 의 분해 반응에 대해 파라미터 $E_0 = 0.660 \text{ eV}$ 와 $\Delta S^\ddagger = -27.2 \text{ eu}$ ($1 \text{ eu} = 4.184 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), 그리고 $[Y_5K + H]^+$ 의 분해 반응에 대해 파라미터 $E_0 = 0.630 \text{ eV}$ 와 $\Delta S^\ddagger = -27.6 \text{ eu}$ 를 보고하였다. 이 파라미터들을 사용하여 각 펩타이드 이온의 RRKM(Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus) 속도 함수($k(E)$)를 계산하였으며, 그 결과를 사용하여 다양한 실험 조건하에서의 T_{early} 를 구할 수 있다.
- [60] 펩타이드 이온 $[Y_6 + H]^+$ 에 대한 도 1을 참조하면, MALDI 스펙트럼에 나타나는 펩타이드 관련 이온들의 세기를 측정하고, 이로부터 이온원 내에서 펩타이드 이온이 생존할 확률을 구한다. MALDI 측정 조건을 고려하여 펩타이드 이온이 생존할 수 있는 최고 속도상수를 구한다. 이후, 온도를 변화시키면서 펩타이드 이온의 내부에너지 분포를 구하고 최고 속도상수보다 작은 영역의 확률이 생존 확률과 같아지는 온도를 취한다.
- [61]
- [62] 실시예 2. 조사수(shot number)에 따른 전체 스펙트럼 패턴의 변화
- [63] 시편 위의 한 지점(spot)을 337 nm 질소 레이저 펄스로 반복적으로 조사하면서 데이터를 수집함으로써 한 세트의 MALDI 스펙트럼을 얻었다. 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 Y_5R 이 함유된 시편을 역치값의 여섯배 펄스 에너지로 200회

조사하여 얻은 스펙트럼의 일부가 도 2에 나타나 있다. 도 2의 각 스펙트럼은 (a) 1회 내지 20회, (b) 41회 내지 60회, (c) 81회 내지 100회, (d) 141회 내지 160회 및 (e) 181회 내지 200회의 조사수(shot number)에 걸친 스펙트럼을 합한 것이다. 펩타이드($[Y_5R + H]^+$)와 매트릭스($[CHCA + H]^+$) 이온들뿐 아니라, 이들의 ISD 생성물들, 예를 들면, 펩타이드 이온에서 만들어지는 임모니움 이온 Y와 매트릭스 이온에서 만들어지는 $[CHCA + H - H_2O]^+$ 와 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 뿐만 아니라, 매트릭스 이량체 이온($[2CHCA + H]^+$)도 상기 스펙트럼에 나타나 있다(PSD 피크들은 *로 표시하였다). 상기 스펙트럼에는 펩타이드 이온의 분해 생성물인 *b*, *y*, 그리고 이들의 분해 생성물도 나타나 있는데, 그 세기는 임모니움 Y보다 매우 작다. 펩타이드 이온의 PSD 생성물 봉우리도 매우 작게 나타나 있다. 작지만 분명히 나타나는 봉우리들의 대부분은 매트릭스로부터 만들어진 것들이다. 도 2에 나타나는 이온들의 종류는 조사수와 관계없이 같지만, 조사수가 변함에 따라 그들의 상대 세기는 변함을 볼 수 있다. 놀랍게도, 조사수에 따른 스펙트럼 패턴의 변화 양상이 재현성 있음을 관측하였으며, 그 오차는 10-20 조사(shot)에 불과하였다.

[64] 전술한 바와 같이, MALDI 스펙트럼의 전체 패턴을 특징 지우는 세 가지 요소는 펩타이드 이온과 매트릭스 이온의 상대적 세기, 그리고 펩타이드 이온과 매트릭스 이온의 분해 패턴이다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 조사(shot)가 계속됨에 따라 이 세 가지 요소가 모두 변화하였다. 첫째, 펩타이드 이온에 대한 임모니움 이온 Y의 상대 세기는 서서히 감소하였다(다른 ISD 생성물도 역시 감소하였음). 둘째, 매트릭스의 질량 스펙트럼 패턴 역시 서서히 변화하였는데, 특히 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 이온이 약해졌다. 셋째, 펩타이드에서 유래한 이온들이 CHCA에서 유래한 이온들에 대해 상대적으로 더 많아졌다.

[65] Y_5K (도 3)와 엔지오텐신(angiotensin) II(도 4)에 대해서도 비슷한 경향이 관찰되었다. 도 3에는 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 Y_5K 가 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를 반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이 나타나 있는데, 사용된 레이저 펄스 에너지는 역치의 6배이었고, 각 스펙트럼은 (a) 1회 내지 20회, (b) 41회 내지 60회, (c) 81회 내지 100회, (d) 141회 내지 160회 및 (e) 181회 내지 200회의 조사수에 걸친 스펙트럼을 합한 것이다. 임모니움 Y 이온이 $[Y_5K + H]^+$ 의 주된 ISD 생성물이고, $[CHCA + H - H_2O]^+$ 와 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 가 $[CHCA + H]^+$ 의 ISD 생성물이다(PSD 피크들은 *로 표시하였다). 도 4에는 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 엔지오텐신 II(DRVYIHPF)가 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를 반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이 나타나 있는데, 사용된 레이저 펄스 에너지는 역치의 6배이었고, 각 스펙트럼은 (a) 1회 내지 20회, (b) 41회 내지 60회, (c) 81회 내지 100회, (d) 141회 내지 160회 및 (e) 181회 내지 200회의 조사수에 걸친 스펙트럼을 합한 것이다. 임모니움 이온, P, V, H, Y가 $[DRVYIHPF + H]^+$ 의 주된 ISD 생성물이고, $[CHCA + H - H_2O]^+$ 와 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 가 $[CHCA + H]^+$ 의 ISD 생성물이다(PSD 피크들은

*로 표시하였다).

[66]

[67] 실시예 3. 조사수에 따른 유효 온도의 변화

[68] 조사가 계속됨에 따라 생성물의 상대 세기가 감소한다는 것은 펩타이드의 평균 내부 에너지가 감소한다는 것을 의미한다. 초기 플룸에서 열평형이 이루어진다고 가정하면, 이것은 T_{early} 가 점점 낮아짐을 의미한다. 레이저를 계속 조사할 때 일어나는 일들 중의 하나는 레이저를 조사한 지점의 두께가 점점 얇아지는 것이다. 따라서 시편이 얇아짐에 따라 T_{early} 가 점점 낮아지게 된다. 시편이 얇아질수록 T_{early} 가 감소하는 것이 열전도 효율이 좋아지기 때문인지를 확인하기 위하여, 조성이 같고($Y_5R:CHCA = 1:25000$) 두께가 다른($0.9-2.1 \mu\text{m}$) 시편들을 준비하였다. 또한, 50 nm 두께의 플루오로카본(fluorocarbon) 층을 입힌 앵커 칩 플레이트(anchor chip plate)의 소수성 부분 위에 시편을 준비하였다. 레이저 펄스 에너지는 역치의 6 배를 사용했으며, 처음 20회 조사에서 얻은 스펙트럼을 더하였다. 각 스펙트럼에서 측정된 S_{in} 으로부터 T_{early} 를 계산하였다. 시편의 두께에 따른 T_{early} 의 변화가 도 5(스테인레스 스틸 표면: ●; 플루오로카본 층: ○)에 나타나 있으며, 이것은 시편이 얇아질수록 열전도가 효율적임을 의미한다. 플루오로카본 층 위의 시편에 대해 구한 T_{early} 는 노출된 금속판 위의 시편으로부터 얻은 값보다 높았으며, 이것은 플루오로카본 층이 열흐름에 대해 부도체로 작용하고 있음을 의미한다. 결론적으로, 펩타이드 이온의 분해 수율로부터 T_{early} 를 결정할 수 있고, 조사가 계속됨에 따라 온도가 내려간다.

[69]

[70] 실시예 4. 조사수에 따른 $[CHCA + H]^+$ 분해 패턴의 변화

[71] PSD가 일어나는 시간 영역(대략 $10 \mu\text{s}$)은 ISD가 일어나는 시간 영역(수십 nanosecond)보다 훨씬 길므로, 즉 PSD의 반응속도가 훨씬 느리므로, 저에너지 반응은 ISD에서보다는 PSD에서 더 유리하다. $[CHCA + H]^+$ 의 PSD 스펙트럼(도 6)에서, $[CHCA + H - H_2O]^+$ 이온이 가장 큰 생성물이었으며, $[CHCA + H - CO_2]^+$ 이온은 $[CHCA + H - H_2O]^+$ 의 10%에 불과하였다. 이것은 물의 손실 반응이 이산화탄소의 손실 반응보다 더 저에너지 반응임을 의미한다. 도 2에 있는 MALDI 스펙트럼에서, 조사가 계속됨에 따라, $[CHCA + H - H_2O]^+$ 에 비하여 ISD에 의해 생성된 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 이온이 감소하였다. 이는 조사가 계속됨에 따라 T_{early} 가 낮아진다는 의미이다. 즉, CHCA 질량 스펙트럼의 패턴 역시 온도에 의해 결정된다.

[72]

[73] 실시예 5. 펩타이드-대-매트릭스의 이온 세기 비율

[74] $Y_5R:CHCA$ (펩타이드-대-매트릭스의 비율)가 1:8300인 시편들에 대해 네 가지 조건하에서 실험을 수행하였다. 실험 조건을 (Y_5R 의 # pmol, CHCA의 # nmol, 역치값을 단위로 하는 레이저 펄스 에너지, 레이저 파장)로 표시할 때, 사용한 실험 조건은 (a) (3, 25, $\times 6$, 337)(71-90 조사수 범위), (b) (3, 25, $\times 4$, 337)(51-70

조사수 범위), (c) (4.2, 35, $\times 6$, 337)(101-120 조사수 범위), 그리고 (d) (3, 25, $\times 6$, 355)(31-50 조사수 범위) 이었다. 각 세트로부터 T_{early} 가 968 K인 스펙트럼을 하나씩 골라내어 네 개의 스펙트럼을 도 7(a)-(d)에 나타냈다. 상기 네 개의 스펙트럼은 사실상 같다. 다른 온도에서도 이러한 유사성이 관측되었다.

- [75] 또한, Y_5K (도 8)와 엔지오텐신 II(도 9)에서도 이러한 유사성이 관측되었다. 도 8에는 $Y_5K:CHCA$ (펩타이드-대-매트릭스의 비율)가 1:8300인 시편들에 대해 네 가지 조건, 즉 (a) (3, 25, $\times 6$, 337)(61-80 조사수 범위), (b) (3, 25, $\times 4$, 337)(41-60 조사수 범위), (c) (4.2, 35, $\times 6$, 337)(71-90 조사수 범위), 그리고 (d) (3, 25, $\times 6$, 355)(21-40 조사수 범위)에서 얻은 MALDI 스펙트럼 세트 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이 나타나 있다. 도 9에는 엔지오텐신 II(DRVYIHFP):CHCA(펩타이드-대-매트릭스의 비율)가 1:8300인 시편들에 대해 네 가지 조건, 즉 (a) (3, 25, $\times 6$, 337)(71-90 조사수 범위), (b) (3, 25, $\times 4$, 337)(31-50 조사수 범위), (c) (4.2, 35, $\times 6$, 337)(81-100 조사수 범위), 그리고 (d) (3, 25, $\times 6$, 355)(21-40 조사수 범위)에서 얻은 MALDI 스펙트럼 세트 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이 나타나 있다.

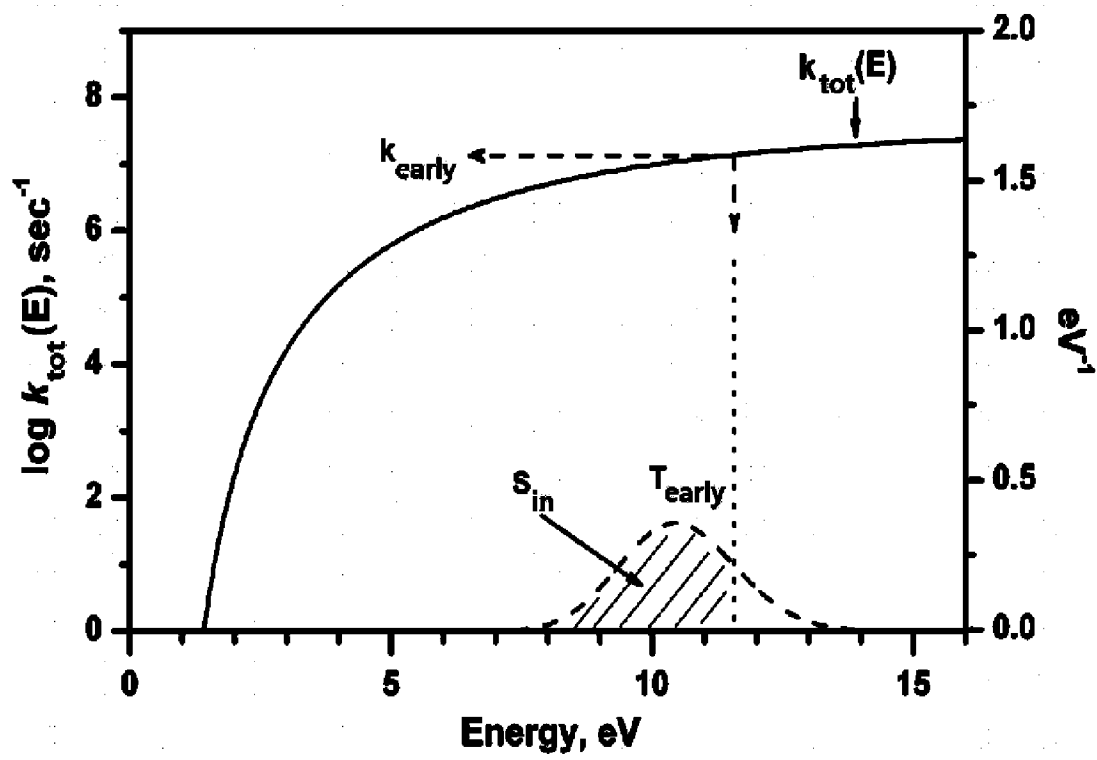
- [76] 즉, T_{early} 가 같은 스펙트럼들만을 비교한다면, 펩타이드의 MALDI 스펙트럼은 재현될 수 있다. 펩타이드-대-매트릭스 비율이 다른 시편들의 경우에 T_{early} 가 같은 스펙트럼을 선택하면 펩타이드 이온과 매트릭스 이온의 분해 패턴은 각각 같게 나타났고, 다만 펩타이드-대-매트릭스 이온 세기 비율만이 달랐다.

청구범위

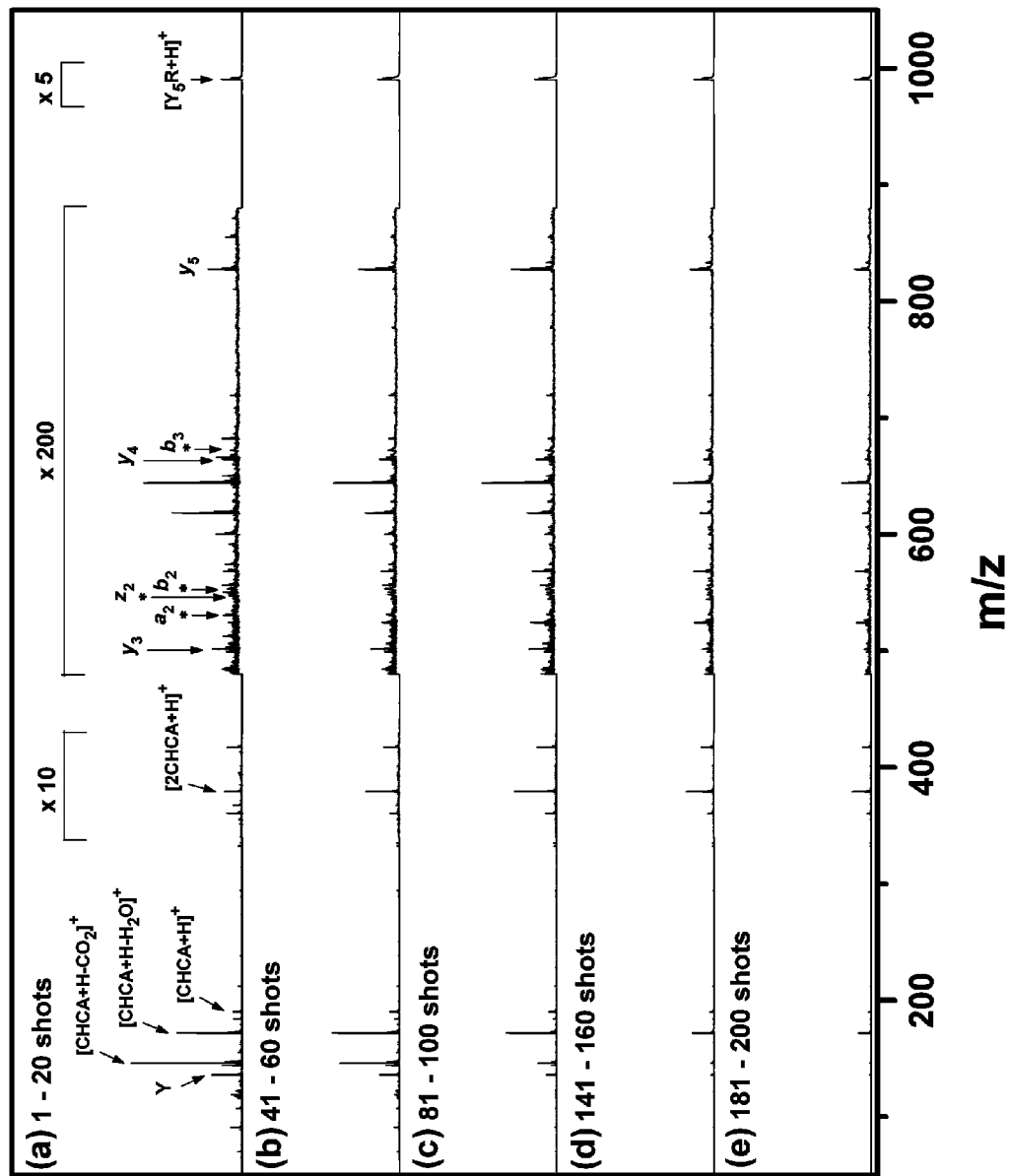
- [청구항 1] 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 2] 제1항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 3] 제2항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 4] 제3항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 5] 매트릭스와 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 6] 제5항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 7] 제6항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 8] 제7항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 9] 매트릭스와 시료와 제3물질이 혼합된 시편에 에너지(레이저)를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 스펙트럼들만을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.

- [청구항 10] 제9항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 11] 제10항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.
- [청구항 12] 제11항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 생성된 이온들의 질량 스펙트럼을 측정하는 방법.

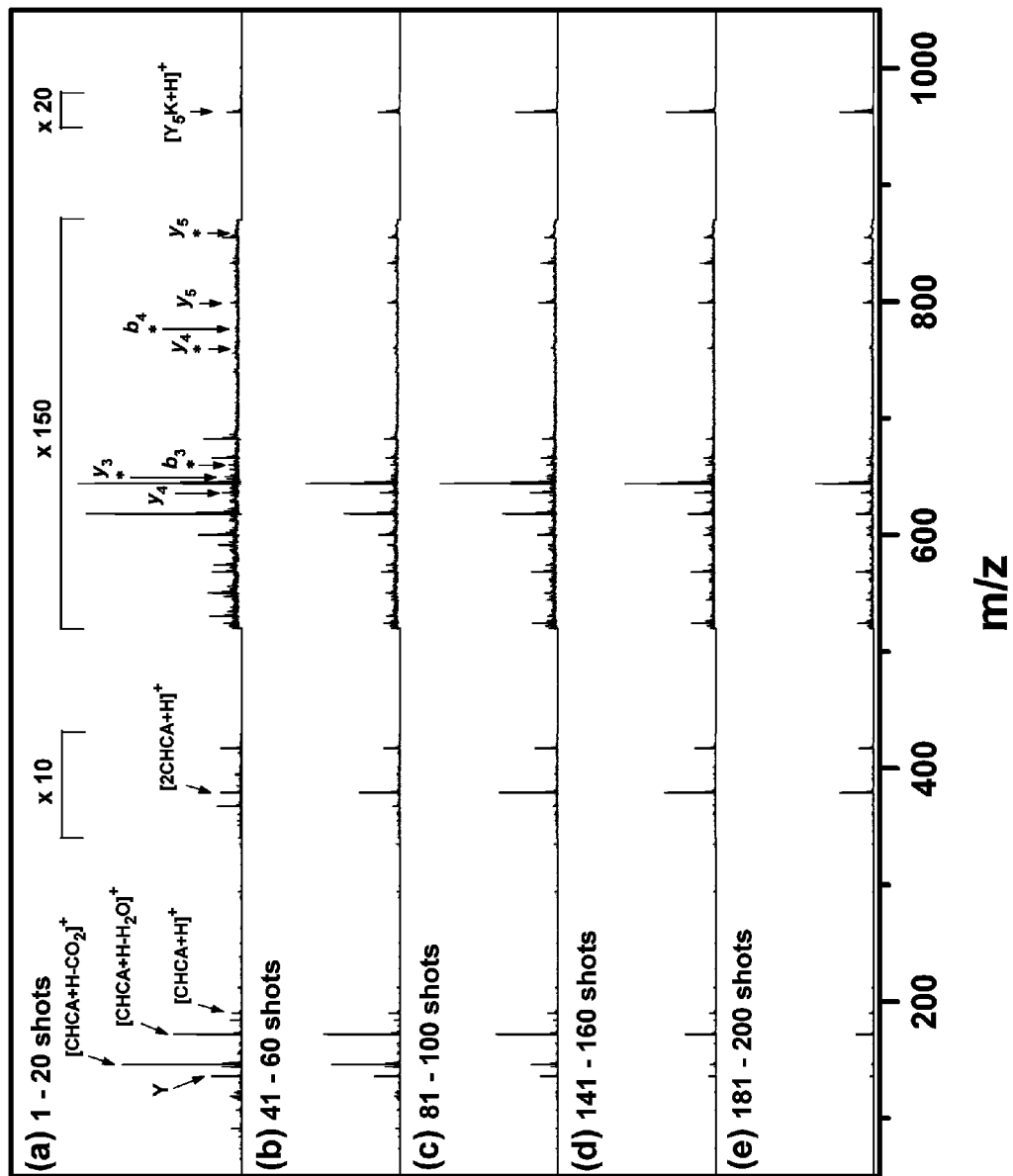
[Fig. 1]



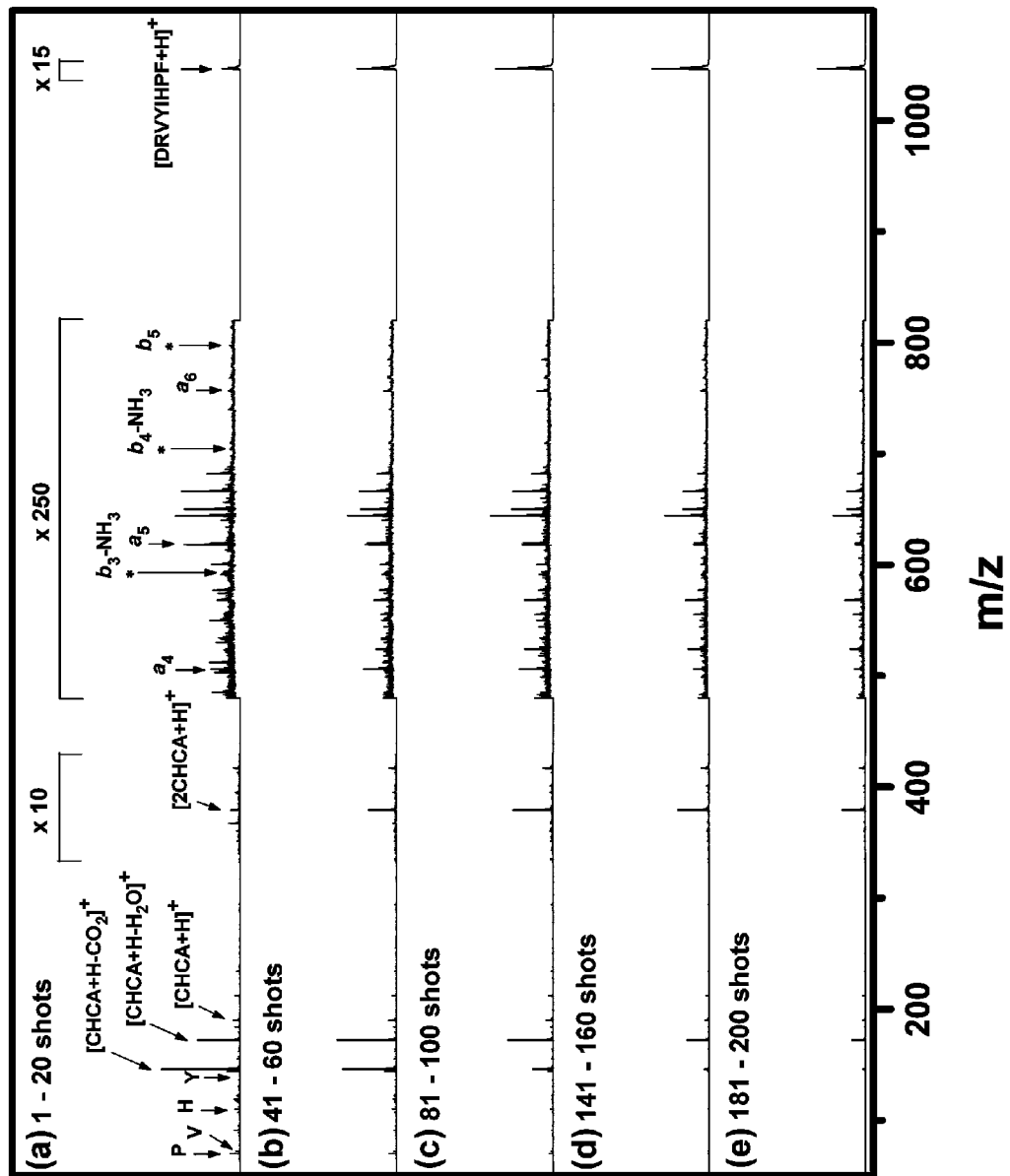
[Fig. 2]



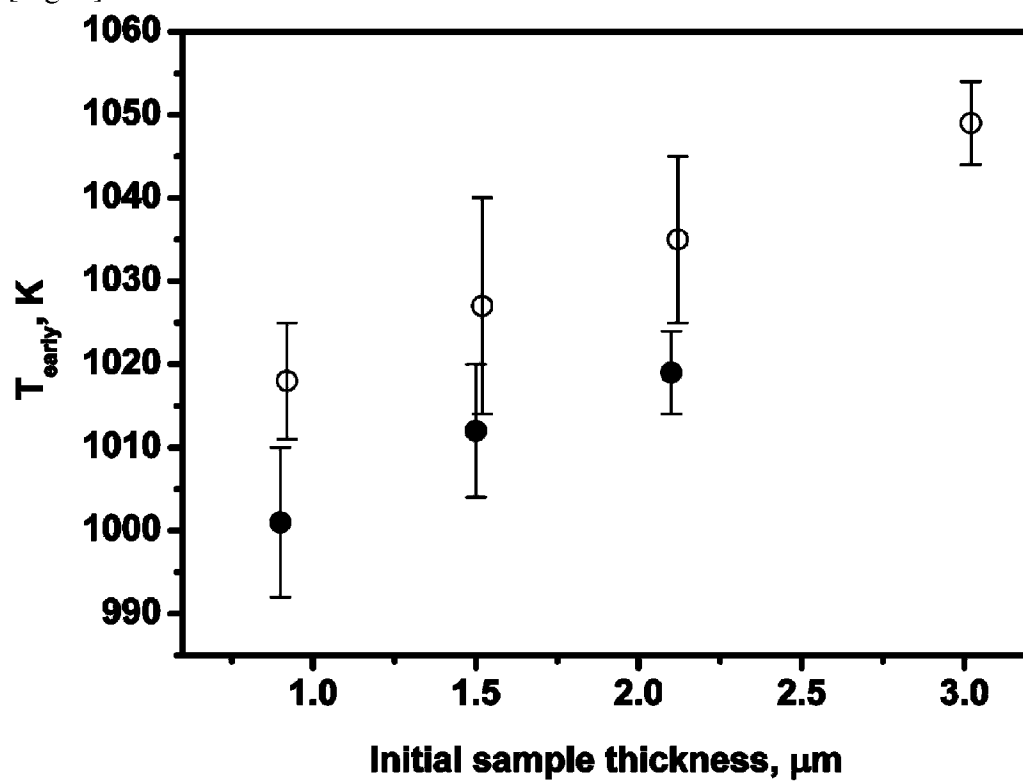
[Fig. 3]



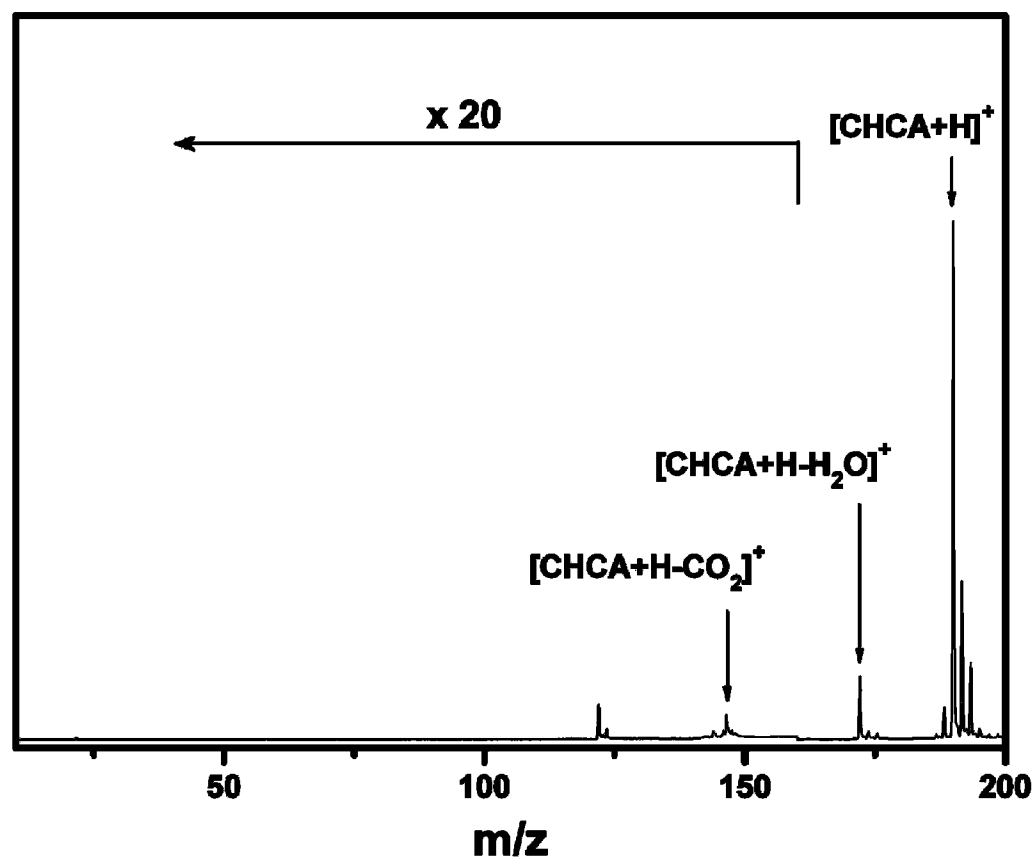
[Fig. 4]



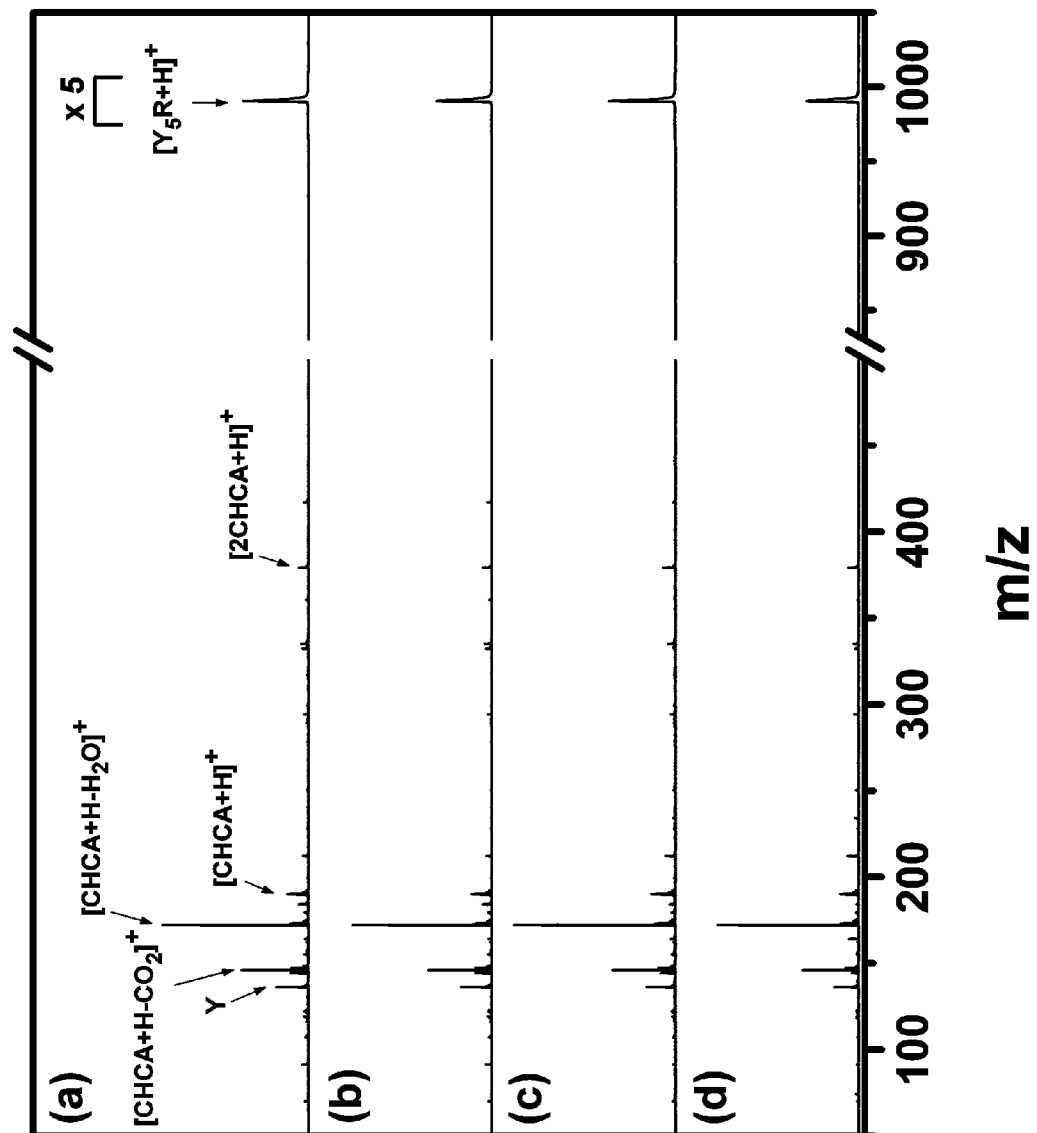
[Fig. 5]



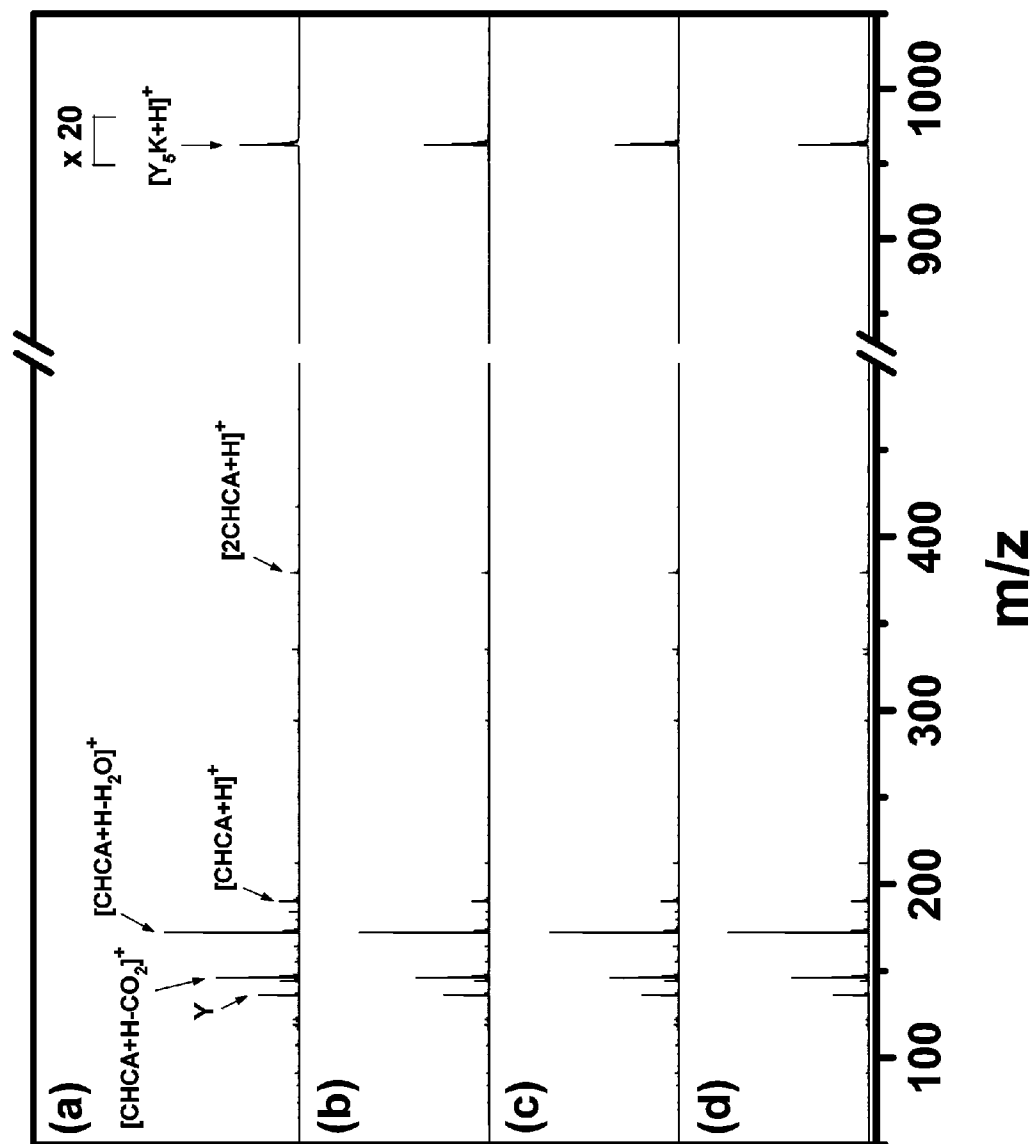
[Fig. 6]



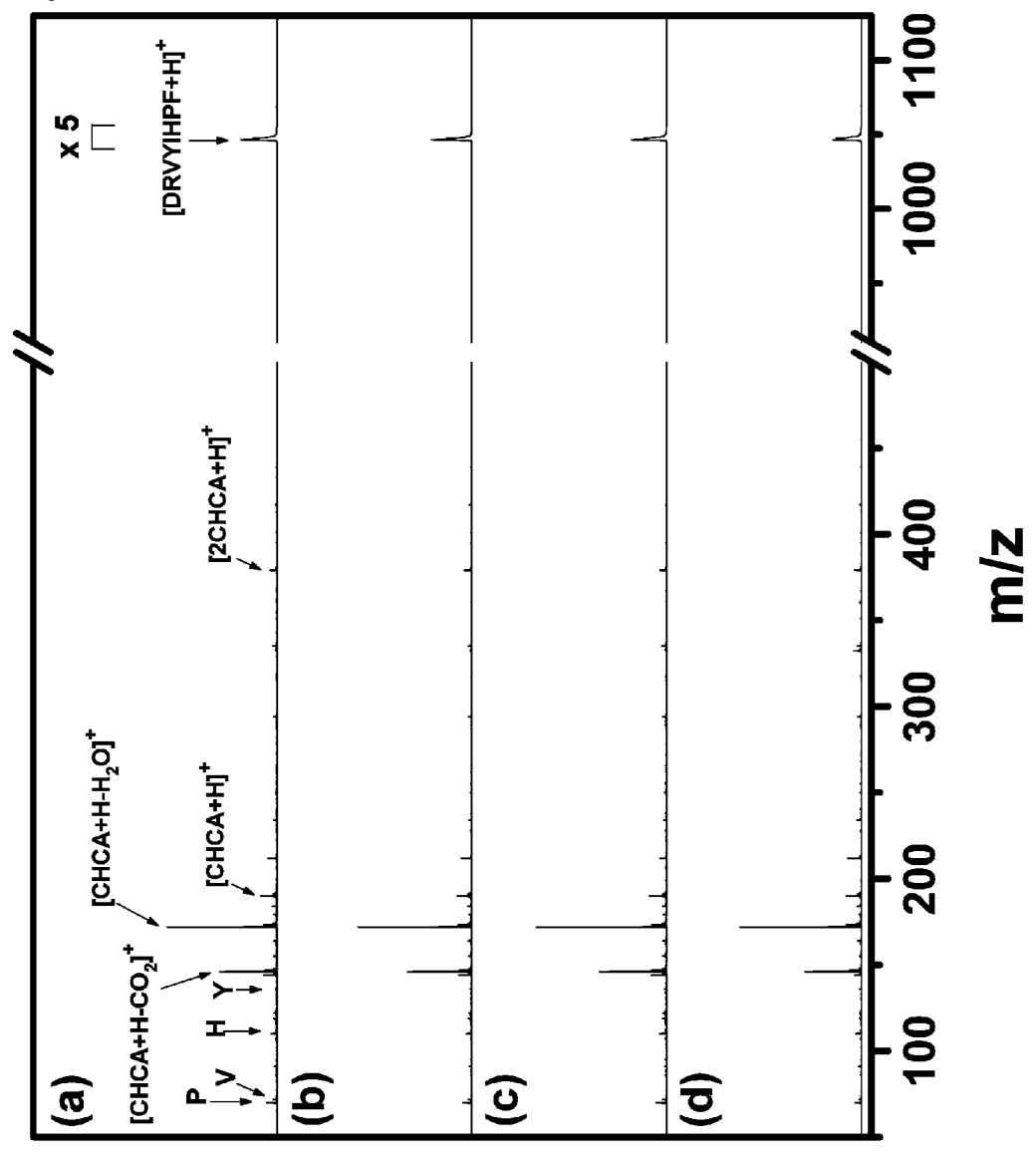
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006108**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 27/62(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/62; H01J 49/10; G01N 23/225; H01J 49/40; G01N 24/00; G01N 27/64; H01J 49/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: MALDI, mass spectrum, pattern, reproducibility, laser and temperature

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-205460 A (SHIMADZU CORP.) 16 September 2010 See paragraphs [0011]-[0019] and figures 1-3.	1-12
A	JP 4701720 B2 (SHIMADZU CORP.) 15 June 2011 See paragraphs [0017]-[0023] and figure 2.	1-12
A	JP 2004-037120 A (CANON INC.) 05 February 2004 See abstract, paragraphs [0019]-[0025] and claim 1.	1-12
A	US 7691643 B2 (YAMASHITA et al.) 06 April 2010 See abstract and column 1, line 28 - column 2, line 57.	1-12
A	JP 2009-158106 A (JEOL LTD.) 16 July 2009 See abstract and paragraphs [0038]-[0044].	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 OCTOBER 2013 (29.10.2013)

Date of mailing of the international search report

01 NOVEMBER 2013 (01.11.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/006108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2010-205460 A	16/09/2010	NONE	
JP 4701720 B2	15/06/2011	JP 2006-196190 A	27/07/2006
JP 2004-037120 A	05/02/2004	NONE	
US 7691643 B2	06/04/2010	US 2007-0059842 A1 WO 2004-113905 A1	15/03/2007 29/12/2004
JP 2009-158106 A	16/07/2009	JP 5226292 B2	03/07/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 27/62(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/62; H01J 49/10; G01N 23/225; H01J 49/40; G01N 24/00; G01N 27/64; H01J 49/26

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: MALDI, 질량 스펙트럼, 패턴, 재현성, 레이저 및 온도

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2010-205460 A (SHIMADZU CORP.) 2010.09.16 문단 [0011]-[0019] 및 도면 1-3 참조.	1-12
A	JP 4701720 B2 (SHIMADZU CORP.) 2011.06.15 문단 [0017]-[0023] 및 도면 2 참조.	1-12
A	JP 2004-037120 A (CANON INC.) 2004.02.05 요약, 문단 [0019]-[0025] 및 청구항 1 참조.	1-12
A	US 7691643 B2 (YAMASHITA et al.) 2010.04.06 요약 및 컬럼 1, 라인 28 - 컬럼 2, 라인 57 참조.	1-12
A	JP 2009-158106 A (JEOL LTD.) 2009.07.16 요약 및 문단 [0038]-[0044] 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 10월 29일 (29.10.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 11월 01일 (01.11.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김진호

전화번호 +82-42-481-8699



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2010-205460 A	2010/09/16	없음	
JP 4701720 B2	2011/06/15	JP 2006-196190 A	2006/07/27
JP 2004-037120 A	2004/02/05	없음	
US 7691643 B2	2010/04/06	US 2007-0059842 A1 WO 2004-113905 A1	2007/03/15 2004/12/29
JP 2009-158106 A	2009/07/16	JP 5226292 B2	2013/07/03