

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 1월 23일 (23.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/014279 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 27/26 (2006.01) H01J 49/26 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006406
- (22) 국제출원일: 2013년 7월 17일 (17.07.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0077986 2012년 7월 17일 (17.07.2012) KR
10-2013-0000816 2013년 1월 3일 (03.01.2013) KR
10-2013-0000817 2013년 1월 3일 (03.01.2013) 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 B동 708호, Seoul (KR). 배용진 (BAE, Yong Jin); 151-866 서울시 관악구 서림동 408-21, Seoul (KR). 박경만 (PARK, Kyung Man); 132-844 서울시 도봉구 방학2동 643-26 202호, Seoul (KR). 안성희 (AHN, Sung Hee); 426-768 경기도 안산시 상록구 성포동 예술인 아파트 12동 1501호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 서근복 (SEO, Keun Bok) 등; 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-6 성지하이츠 3차 빌딩 18층 9호, 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, KR, 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.

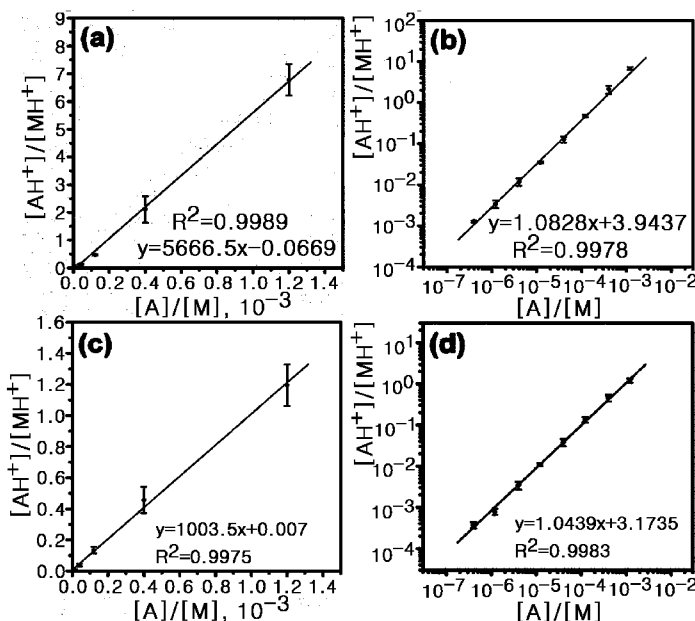
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, 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))

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING MASS SPECTRUM REPRODUCIBILITY AND QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법 및 이를 이용한 정량 분석 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for improving mass spectrum reproducibility and a quantitative analysis method using same. More particularly, regarding a mass spectrum of chemical substances, the present invention relates to a method for improving the reproducibility of the mass spectrum of chemical substances by adjusting the temperatures for ion generating reactions to the same temperature or by selecting spectrums having the same ion generating reaction temperature. Also, the present invention relates to a method for measuring an equilibrium constant of a proton exchange reaction between a matrix and a sample at a certain temperature, a method for obtaining a calibration curve for quantitative analysis, and a quantitative analysis method using the mass spectrum.

(57) 요약서: 본 발명은 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법 및 이를 이용한 정량 분석 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 화학물질의 질량 스펙트럼에 있어서, 이온 생성 반응의 온도를 서로 동일하게 조정하거나 이온 생성 반응 온도가 동일한 스펙트럼을 선택함으로써 상기 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성을 향상시키는 방법에 대한 것이다. 또한, 본 발명은 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의

양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법, 정량분석용 검정선(calibration curve)을 구하는 방법, 및 질량 스펙트럼을 이용한 시료 정량 분석 방법에 대한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법 및 이를 이용한 정량 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법 및 이를 이용한 정량 분석 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 화학물질의 질량 스펙트럼에 있어서, 이온 생성 반응의 온도를 서로 동일하게 조정하거나 이온 생성 반응 온도가 동일한 스펙트럼을 선택함으로써 상기 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성을 향상시키는 방법에 대한 것이다. 또한, 본 발명은 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법, 정량분석용 검정선(calibration curve)을 구하는 방법, 및 질량 스펙트럼을 이용한 시료 정량 분석 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)) 방법은 화학물질을 이온화시키는 방법으로서, 주로 비행시간(time-of-flight (TOF)) 질량 분석관과 함께 사용되며 화학물질의 질량 분석에 활용되고 있다. MALDI-TOF 질량 분석 방법은 분석가능한 시료의 선택 범위가 넓고, 분석에 소요되는 시간이 짧아서 여러 가지 고체 물질, 특히 생물 분자 구조 분석에 널리 사용된다.
- [3] 그러나 MALDI 질량 스펙트럼 패턴의 재현성이 매우 나쁘기 때문에, MALDI 질량분석법을 시료의 정량분석에 사용하기 어렵다. 이러한 점 때문에, MALDI 질량분석법의 산업적 또는 과학적 응용범위가 매우 제한을 받고 있다.
- [4] 그럼에도 불구하고, MALDI 질량 스펙트럼을 이용하여 시료의 정량분석을 위하여, 내부 표준물질을 사용하지 아니하는 상대적 정량법, 내부 표준물질을 사용하는 상대적 정량법, 내부 표준물질을 사용하는 절대적 정량법, 분석물질 첨가에 의한 절대적 정량법 등과 같은 다양한 MALDI 질량 스펙트럼을 활용한 방법들이 개발되었다.
- [5] 내부 표준물질을 사용하지 아니하는 상대적 정량법(또는 프로파일 분석법(profile analysis))은 MALDI 질량 스펙트럼 내에서 각 성분들의 상대적인 신호 세기가 일정하다는 사실에 기초하여 MALDI 질량 스펙트럼을 재현성있게 분석하기 위하여 분류 알고리즘(classification algorithm)을 이용하는 MALDI 질량 분석법이다. 그러나 프로파일 분석법은 실험의 설계 및 수행이 어렵다는 단점이 있다.
- [6] 또한, 내부 표준물질을 사용하는 상대적 정량법은 일정량의 내부 표준물질을 첨가한 시편들에 대한 MALDI 질량 스펙트럼에서 각 시료의 피크 높이 또는 면적을 상기 내부 표준물질의 피크 높이 또는 면적에 대한 상대적인 값으로

측정함으로써, 시료를 정량하는 MALDI 질량분석법이다. 그러나 내부 표준물질을 사용하는 상대적 정량법을 통해서도 시료의 절대적인 양을 측정할 수 없다.

- [7] 또한, 내부 표준물질을 사용하는 절대적 정량법은, 측정하고자 하는 시료의 양을 변화시키면서 일정량의 내부 표준물질을 섞은 여러 개의 시편으로부터 검정선을 구한 후, 상기 내부 표준물질을 사용하는 상대적 정량법을 사용하여 미지의 시편에 대해 얻은 상기 시료의 상대적인 측정값을 상기 검정선에 대입하여 상기 시료의 절대적인 양을 구하는 MALDI 질량분석법이다. 그러나 내부 표준물질을 사용하는 절대적 정량법을 이용하여 다수의 성분이 함유된 시편을 분석하려면, 각 성분마다 검정선을 구해야 하는 단점이 있다.
- [8] 또한, 분석물질 첨가에 의한 절대적 정량법은, 측정하고자 하는 시료를 함유한 샘플을 두 개 이상으로 분할하고, 분할된 샘플에 상기 시료의 양을 변화시키면서 첨가한 각 샘플에 대해 얻은 MALDI 질량 스펙트럼으로부터 검정점들(calibration points)을 구한 후, 상기 검정 점들로부터 본래 측정하고자 했던 시료의 절대적인 양을 구하는 MALDI 질량분석법이다. 그러나 분석물질 첨가에 의한 절대적 정량법을 이용하여 시료를 정량분석하기 위해서는, 분석하고자 하는 시료를 추가로 준비해야 하고, 한 가지 시료를 분석하기 위해 여러 개의 시편을 준비해야 하는 단점이 존재한다.
- [9] 지금까지 공지된 방법으로서, MALDI 질량 스펙트럼을 이용하여 정량 분석을 하기 위해서는, 내부 표준물질, 특히 시료와 동일한 화합물로서 동위원소로 치환된 물질을 사용하고 있다. 그러나 단백질, 핵산 등 분자량이 큰 물질은 물론이고, 펩타이드처럼 분자량이 크지 않은 물질들도 동위원소로 치환된 것과 그렇지 아니한 것을 질량 스펙트럼에서 구분하기 위해서 동위원소 치환 정도를 높이다 보면 시료의 가격이 매우 비싸진다. 더욱이, 시료의 사전 처리가 간단하지 아니한 점도, 내부 표준물질을 사용하는 MALDI 질량분석법을 통하여 정량분석하는 방법의 단점 중 하나이다.
- [10] MALDI 질량 분석의 시편은 통상 시료와 매트릭스의 혼합물이므로, MALDI 질량 스펙트럼에는 분석할 시료 이온(analyte ion, AH^+)과 그 분해 생성물, 그리고 매트릭스 이온(matrix ion, MH^+)과 그 분해 생성물이 나타난다. 따라서 MALDI 스펙트럼의 패턴은 AH^+ 와 MH^+ 의 분해 패턴과 AH^+ 와 MH^+ 의 세기 비율에 의해 결정된다.
- [11] 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.
- [12] MALDI 질량 분석에서 시편에 레이저를 조사할 때 생성되는 이온들과

중성분자들을 포함하고 있는 기체인 플룸(plume)의 온도를 알아내기 위한 많은 과학적 연구가 이루어진 바 있다(*J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 1904-1909; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18, 607-616; *J Phys. Chem. A* **2004**, 108, 2405-2410).

- [13] 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.
- [14] 본 발명자들은, 우선 MALDI 스펙트럼에서 펩타이드 이온의 ISD, PSD 등에 의해 만들어지는 분해 이온 생성물들의 세기를 측정하였다. 이 자료로부터 이온원 출구에서 펩타이드 이온의 생존 확률(S_m)을 계산하였다. 실험 조건을 고려하여 펩타이드 이온이 이온원 출구에서 생존할 수 있는 최고 속도상수를 구하고, 펩타이드 이온의 분해 속도상수로부터 그에 해당하는 최고 내부 에너지를 결정하였다. 온도를 바꾸어 가면서 펩타이드 이온의 내부 에너지 분포를 구하고 최고 내부 에너지보다 작은 영역의 확률이 S_m 과 같아지는 온도를 취함으로써 T_{early} 를 결정하였다.
- [15] 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). 이 논문 내용의 전부를 본 명세서의 내용으로 인용한다.
- [16] 이러한 연구를 통하여, 본 발명자들은, MALDI 실험 조건을 변화시키면 초기 플룸 온도(T_{early})가 달라지지만, 다양한 실험 조건 하에서 얻은 스펙트럼 중 T_{early} 가 동일한 질량 스펙트럼만을 선택하여 살펴보면, 각 질량 스펙트럼 패턴이 서로 동일하다는 놀라운 사실을 발견하였다.
- [17] 또한, 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 스펙트럼에서의 전체 이온 개수(total ion count, TIC)가 서로 동일하다는 놀라운 사실을 발견함으로써 본 발명을 착상하게 되었다.
- [18] 더욱이, 본 발명자들은 T_{early} 가 동일한 경우 질량 스펙트럼 패턴뿐만 아니라, 생성된 전체 이온 개수(total ion count, TIC)가 동일하다는 사실로부터, 시편에 조사되는 레이저 펄스의 에너지 세기를 조절하여 T_{early} 를 일정하게 유지하면 동일한 T_{early} 에서의 질량 스펙트럼을 얻을 수 있다는 사실도 추가로 발견하였다.
- [19] 따라서 본 발명자들은 질량 스펙트럼에 나타난 이온들의 분해 패턴이나 전체

이온 개수와 같이 T_{early} 를 측정할 수 있는 인자들을 활용하여, T_{early} 가 일정한 질량 스펙트럼을 선별하거나 구할 수 있다면, 질량분석기를 사용하여 정량분석이 가능하다는 점을 발명하게 되었다.

[20] 더 나아가, 본 발명자들은 T_{early} 가 같은 스펙트럼들로부터 플룸의 양성자 교환 반응의 반응지수($Q = [M][AH^+]/([MH^+][A])$)를 구하면, 상기 반응지수는 고체 시편에서 시료의 농도의 변화와는 무관하게 변하지 아니하고 일정하다는 사실도 발견하였다.

[21] 즉, 본 발명자들은 MALDI-TOF 질량 분석에서 초기 플룸은 거의 열적 평형 상태에 있으며, 상기 반응지수(Q)는 매트릭스 물질과 시료 물질들 간의 양성자 교환 반응의 평형상수(K)에 해당한다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 MALDI-TOF 질량 스펙트럼에서 일정 온도 조건에서 생성된 시료-대-매트릭스 이온 세기의 비율은 고체 시편에서의 시료-대-매트릭스 몰비율에 정비례하고, 이를 통하여 정량분석이 가능하다는 사실에 주목하게 되었다.

[22] 본 발명자들은 MALDI 실험 조건을 바꾸면서 MALDI 질량 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 선별한 후, 선택된 MALDI 스펙트럼들에서 매트릭스 이온 신호 세기와 시료 이온 신호 세기의 비율을 측정함으로써, 매트릭스와 시료의 이온화 반응의 평형상수를 측정하는 방법을 발명하게 되었다.

[23] 아울러, 본 발명자들은 이상에서 측정한 매트릭스와 각 시료 간의 평형상수를 활용하여 일정한 온도에서 매트릭스와 각 시료 간의 각 농도 비율 변화에 따른 검정선을 구하는 방법을 발명하였다.

[24] 또한, 본 발명자들은 일정량의 매트릭스에 미지량의 시료를 혼합하여 제작한 시편의 MALDI 질량 스펙트럼으로부터 측정한 시료 이온 신호 세기와 매트릭스 이온 신호 세기 간의 비율과 매트릭스의 농도를 상기 검정선에 대입하여 상기 미지량의 시료의 몰수를 산출하여 시편에 함유된 시료의 양을 측정하는 정량 분석 방법을 발명하였다.

[25] 또한, 본 발명자들은 시편 내에 시료가 높은 농도로 존재하면 매트릭스 이온 신호 및 시편 내의 다른 시료(들)의 이온 신호를 감소시켜 정교한 정량분석을 어렵게 하는 오차원인이 되는 점을 해결하기 위하여, 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에 시료를 수배 내지 수백배 또는 그 이상으로 희석함으로써 상기 매트릭스 신호 감쇄 효과를 억제하여 질량 스펙트럼을 활용한 정량 분석의 정확도를 향상시키는 방법을 발명하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[26] 따라서, 본 발명의 첫번째 목적은, 화학물질의 질량 스펙트럼에 있어서, 이온

생성 반응의 온도를 서로 동일하게 조정하거나 이온 생성 반응의 온도가 동일한 스펙트럼을 선택함으로써 상기 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

- [27] 본 발명의 두번째 목적은, 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편, 또는 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3 물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온, 매트릭스 이온 또는 제3 물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고 (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

- [28] 본 발명의 세번째 목적은, 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편, 또는 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3 물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온, 매트릭스 이온 또는 제3 물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 (ii) 단계의 이온 신호 비율을, 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법을 제공하는 것이다.

- [29] 본 발명의 네번째 목적은, 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편, 또는 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3 물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온, 매트릭스 이온 또는 제3 물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii) 단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

[30]
$$[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K \quad (9)$$

- [31] 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [32] 본 발명의 첫번째 목적은 화학물질의 질량 스펙트럼에 있어서, 이온 생성 반응의 온도를 서로 동일하게 조정하거나 이온 생성 반응의 온도가 동일한

스펙트럼을 선택함으로써 상기 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성을 향상시키는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

- [33] 본 발명의 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법은, 매트릭스, 시료 또는 제3 물질로부터 선택되는 어느 하나의 화학물질의 상기 질량 스펙트럼에서의 이온화 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼을 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명의 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법은, 상기 질량 스펙트럼에서, 전체 이온 개수(total ion count)가 동일한 질량 스펙트럼을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.
- [35] 본 발명의 두번째 목적은 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고 (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [36] 또한, 본 발명의 두번째 목적은 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고 (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [37] 또한, 본 발명의 두번째 목적은 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3 물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 제3 물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고 (ii) 상기 (i) 단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [38] 본 발명의 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는

수단이 레이저이거나 입자선, 기타 방사선 등을 포함하는 다양한 종류의 전자기파일 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 얻을 수 있다.

- [39] 본 명세서에서 "매트릭스(matrix)"란 레이저와 같은 에너지원으로부터 에너지를 흡수하여 그 에너지를 분석시료에 전달함으로써, 분석시료를 가열하고 이온화시키는 물질이다. MALDI 질량 분석에서 사용되는 매트릭스로서 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), DHB(2,5-dihydroxybenzoic acid), 시나편산(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.
- [40] 본 발명의 방법에서 시편에 에너지를 가하는 수단은 일반적으로 레이저 광선이겠으나 입자선이나 방사선 등을 포함하는 다양한 종류의 전자기파가 사용될 수 있다.
- [41] 전형적인 MALDI 질량 분석에서는, 매트릭스(M)와 미량의 분석시료(A)로 이루어진 고체 시편에 레이저 펄스를 조사한다. 매트릭스는 상기 레이저를 흡수하여 상기 분석 시료(A)를 가열하고 분석 시료(A)가 이온화하는 것을 돕는다. MALDI 질량 스펙트럼은 매트릭스와 시료들로 구성된 혼합물에 대한 질량 스펙트럼이다.
- [42] 본 명세서에서 "전체 이온 개수(total ion count, TIC)"란 질량분석기 내부의 검출기에서 검출되는 전체 입자의 개수(total number of particles)를 의미한다. 질량분석기 내부에서 MALDI에 의해 생성된 이온들의 일부가 분해되어 손실되기 때문에 MALDI에 의해 생성되는 이온의 전체 개수를 쉽게 측정하기 어렵다. 따라서 MALDI에 의해 생성되는 이온의 전체 개수에 준하는 값으로서 검출기에서 검출되는 전체 입자의 개수(total number of particles)를 전체 이온 개수로 정의한 것이다.
- [43] 본 명세서에서 "플룸(plume)"이란, 시편에 조사된 레이저 펄스의 에너지에 의해 상기 시편으로부터 생성된 증기이다. 플룸은 기상 매트릭스 분자, 시료 분자, 매트릭스 이온 및 시료 이온을 포함하고, 이들 물질 중 기상 매트릭스 분자가 플룸의 대부분을 형성한다.
- [44] 본 명세서에서 "반응지수(reaction quotient)"란, $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$ 반응에서 $Q = ([C]^c[D]^d)/([A]^a[B]^b)$ 으로 정의된다. 화학반응이 평형 상태인 경우, 반응지수는 평형상수와 같다.
- [45] 본 명세서에서 "검정선(calibration curve)" 또는 "검정식(calibration equation)"이란, 어떤 성분의 농도와 상기 성분의 특정한 성질(예를 들면, 전기적 성질, 발색 등) 간의 관계를 미리 실험적으로 구한 곡선이다. 검정선은 농도를 모르는 성분을 정량 분석하기 위해 사용된다.

- [46] 본 명세서에서 "이온 신호 비율"이란 시료 이온의 신호 세기(I_{AH+}) 값을 매트릭스 이온 신호 세기(I_{MH+}) 값으로 나눈 값(I_{AH+}/I_{MH+})으로 정의한다. 또한, 본 명세서에서 "농도 비율"이란 시편에 함유된 시료의 몰수를 시편에 함유된 매트릭스의 몰수로 나눈 값($[A]/[M]$)으로 정의한다.
- [47] MALDI 질량 스펙트럼에 나타나는 이온들은 양성자화된 분석시료(AH^+), 양성자화된 매트릭스(MH^+), 및 이온원 내부에서 생성된 이들의 토막 생성물(fragmented products)들이다. 따라서 MALDI 질량 스펙트럼의 패턴은 AH^+ 와 MH^+ 의 토막 패턴(fragmentation pattern) 및 시료 대 매트릭스 이온 비율에 의해 결정된다.
- [48] 본 발명자들은 MALDI에 의해 생성되는 초기 플룸 온도(T_{early})를 결정하는 방법을 발명하여 논문으로 발표한 바 있다(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). 또한, 본 발명자들은 T_{early} 가 특정되면 상기 세 가지 인자 모두가 결정된다는 사실을 밝혀냈다. 이러한 선행 논문 내용 전부를 본 명세서에 인용한다.
- [49] 더 나아가 본 발명자들은, MALDI 질량 분석에서 실험 조건을 변화시키면 초기 플룸의 온도(T_{early})는 달라지지만, 다양한 실험 조건 하에서 얻은 스펙트럼 중 T_{early} 가 동일한 질량 스펙트럼만을 선별하여 살펴보면, 각 질량 스펙트럼 패턴이 각각 서로 동일하다는 사실도 발견하였다. 이러한 현상은 분석시료는 물론, 매트릭스와 제3물질을 포함하는 경우에도 동일하게 나타난다.
- [50] 따라서, 실험 조건을 바꾸면서 MALDI 질량 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 초기 플룸 온도가 일정한 질량 스펙트럼만을 선별함으로써, MALDI 질량 스펙트럼에서의 이온 분해 패턴의 재현성을 확보하였다.
- [51] 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 스펙트럼만을 선택하여 살펴보면, 각 스펙트럼에서 전체 이온 개수(TIC)가 서로 동일하다는 사실도 발견하였다. 이러한 현상은 분석시료는 물론, 매트릭스와 제3물질을 포함하는 경우에도 동일하게 나타난다.
- [52] 즉, MALDI 스펙트럼은 시료 이온과 매트릭스 이온 그리고 이들의 분해 생성물들로 구성되며, 특정한 T_{early} 를 갖는 MALDI 스펙트럼들을 선택하면 실험 조건에 무관하게 각 이온들의 상대적 세기뿐만 아니라 절대적 세기도 동일한, 재현성 있는 MALDI 스펙트럼을 얻을 수 있다. 또한, T_{early} 가 같으면 시편에 함유되어 있는 시료의 종류, 농도 및 개수에 상관없이 생성되는 전체 이온의 개수는 동일하다는 사실을 발견한 것이다.

- [53] 따라서, 본 발명자들은 MALDI 이온화 반응 조건을 바꾸면서 MALDI 질량 스펙트럼을 수차례 측정하고, 각 스펙트럼에서 전체 이온 개수(TIC)가 동일한 MALDI 질량 스펙트럼을 선별함으로써, MALDI 질량 스펙트럼의 재현성을 확보하였다.
- [54] 모든 실험 조건을 고정시키고 시편에 레이저 펄스를 조사하여 얻은 MALDI스펙트럼의 T_{early} 는 점점 감소한다. 이것은 시료의 두께가 얇아지면서 시편을 올려 놓은 판으로의 열 전도가 더욱 효율적으로 일어나기 때문이다(Anal. Chem. **2012**, 84, 7107-7111). 이러한 T_{early} 의 감소는 MALDI 스펙트럼의 조사-대-조사(shot-to-shot) 재현성이 떨어지게 되는 원인 중 하나이다.
- [55] 본 발명의 바람직한 실시 태양에 따라 TIC, 즉 T_{early} 가 일정한 MALDI 스펙트럼을 얻기 위해서는, 시료의 두께가 얇아짐에 따라 T_{early} 가 감소할 때 레이저 펄스 에너지를 증가시킴으로써 항상 일정한 T_{early} 를 갖는 MALDI 스펙트럼을 얻는 것이다. 상세하게는, 레이저 펄스 에너지를 조절하기 위해서, 예를 들면, 원형 중성밀도 필터(circular neutral density filter)를 사용한다. 상기 원형 중성밀도 필터를 스텝 모터(step motor)에 장착하여 원하는 각도만큼 상기 필터를 회전시킴으로써 레이저 펄스 에너지를 조절한다.
- [56] 상기 레이저 펄스 에너지의 피드백 컨트롤은 다음과 같이 실행할 수 있다. 먼저 역치(threshold) 에너지의 2배에 해당하는 레이저 펄스 에너지를 사용할 때 TIC를 기준값으로 설정할 수 있다. 레이저 펄스를 조사하여 MALDI 스펙트럼을 얻으면 상기 스펙트럼에 해당하는 TIC를 구하고, 이 값이 기준 TIC에서 얼마나 벗어난 값인지를 계산하여 상기 원형 중성밀도 필터를 회전시키는 방향과 각도를 결정한다. 이러한 피드백 컨트롤은 레이저 펄스 에너지가 역치 에너지의 3배에 해당하는 값을 초과하면 종료된다. 각 조사 지점에서 이러한 과정을 반복하며 MALDI 스펙트럼을 얻게 된다.
- [57] MALDI 플룸에서는, 매트릭스와 시료 간에 다음 반응식 (1)의 양성자 교환 반응이 일어난다:
- [58] $MH^+ + A \rightarrow M + AH^+ \quad (1)$
- [59] 상기 반응식 (1)의 반응지수는 다음 수학식 (2)와 같이 정의된다.
- [60] $Q = [M][AH^+]/([MH^+][A]) = ([M]/[A])/([MH^+]/[AH^+]) \quad (2)$
- [61] 상기 수학식 (2)에서, $[M]/[A]$ 값은 시편 제작 시 사용한 매트릭스와 시료의 농도로부터 바로 구할 수 있다.
- [62] 또한, 상기 수학식 (2)에서, $[AH^+]/[MH^+]$ 는 상기 시료 유래 이온들의 농도를 상기 매트릭스 유래 이온들의 농도로 나눈 값이고, 본 발명의 양성자 교환 반응의 반응지수를 측정하는 방법의 (ii)단계에서 구한, 상기 시료 유래 이온들의 신호 세기를 상기 매트릭스 유래 이온들의 신호 세기로 나눈 값(이온 신호 비율), 즉 I_{AH^+}/I_{MH^+} 와 같다. 그러면 상기 수학식 (2)는 다음과 같이 쓸 수 있다.
- [63] $Q = ([M]/[A])(I_{AH^+}/I_{MH^+}) \quad (3)$
- [64] 즉, 상기 수학식 (3)의 $[M]/[A]$ 값과 I_{AH^+}/I_{MH^+} 값을 모두 구할 수 있으므로,

매트릭스와 시료 간의 양성자 교환 반응에 대한 반응지수를 구할 수 있으며, 이 반응은 평형 상태에 있으므로 반응지수는 평형상수와 같다.

- [65] 대부분의 생물학적 시료(A)에 대한 MALDI에서, 시료 이온($[A + H]^+$)은 매트릭스 이온($[M + H]^+$)으로부터의 양성자 전이에 의해 생성된다(반응식 (1)). 따라서 펩타이드와 같은 시편 내에 시료가 매우 높은 농도로 존재하면 매트릭스 이온 신호를 감소시키고 시편 내의 다른 시료(들)의 이온 신호도 감소시킨다.
- [66] 본 명세서에서 "매트릭스 신호 감쇄 효과(matrix signal suppression effect)"란 시편 내에 시료가 매우 높은 농도로 존재할 때 매트릭스 이온 신호가 감소하는 현상을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 "시료 신호 감쇄 효과(analyte signal suppression effect)"란 시편 내에 시료가 매우 높은 농도로 존재할 때 시편 내의 다른 시료 이온 신호가 감소하는 현상을 의미한다.
- [67] 반응지수에 관한 수학식 (3)에 따르면, 시료 이온의 수가 증가함에 따라 매트릭스 이온의 수가 감소하는데, 이러한 현상을 본 명세서에서는 "정상 신호 감쇄(normal signal suppression)"라 한다. 또한, 시료의 농도가 매우 클 때, 즉 매트릭스 신호 감쇄 효과가 매우 클 때, (I_{AH^+}/I_{MH^+}) 대 $[A]$ 곡선이 선형성으로부터 벗어나는데, 이러한 현상을 본 명세서에서는 "비정상 신호 감쇄(anomalous signal suppression)"라 지칭한다.
- [68] MH^+ 중 일부는 이온원 내부 붕괴를 거쳐 $MH-H_2O^+$, $MH-CO_2^+$ 등이 된다. 따라서 MALDI에 의해 생성된 매트릭스 유래 이온들의 총 수는 이들의 합이 된다. 그리고, MALDI에 의해 생성된 매트릭스 이온들의 수는 MALDI 스펙트럼에 나타나는 MH^+ 의 수에 비례한다. 따라서 본 발명에서는 매트릭스 유래 이온들의 총 수 대신에 MALDI 스펙트럼에 나타나는 MH^+ 의 수를 사용한다.
- [69] I_0 를 순수한 매트릭스의 MALDI 스펙트럼에서의 MH^+ 의 이온 신호 세기로 정의하고, I 를 매트릭스-시료 혼합물에서의 MH^+ 의 이온 신호 세기로 정의하면, 상기 혼합물의 매트릭스 신호 감쇄 효과(S)는 다음 수학식 (4)와 같이 정의된다:
- [70] $S = 1 - I/I_0$ (4)
- [71] 많은 시료들에 대한 측정 결과, 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70% 보다 더 큰 경우에 선형성으로부터의 편차가 발생하였다. 이러한 사실을 시편의 정량분석에서 가이드라인으로서 사용할 수 있다. 즉, 본 발명자들은 시편의 MALDI 스펙트럼을 얻고 매트릭스 신호 감쇄 효과를 계산하였다. 상기 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70% 이하일 때, 상기 질량 스펙트럼을 시료의 정량분석에 사용할 수 있다.
- [72] 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70% 보다 더 큰 시편은, 다음의 수학식 (5)를 사용하여 회석시킴으로써 매트릭스 신호 감쇄를 줄일 수 있다.
- [73] $c_2/c_1 = (S_1^{-1} - 1)/(S_2^{-1} - 1)$ (5)
- [74] 위 식에서 S_1 및 S_2 는 각각 시료 1 및 시료 2의 농도가 c_1 및 c_2 일 때의 매트릭스 신호 감쇄 효과를 나타낸다.
- [75] 따라서 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄

효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상, 바람직하게는 수배 내지 수백배 희석하여 사용할 수 있다.

- [76] 본 발명의 세번째 목적은 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 (ii)단계의 이온 신호 비율을, 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [77] 또한, 본 발명의 세번째 목적은 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 (ii)단계의 이온 신호 비율을 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [78] 또한, 본 발명의 세번째 목적은 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을, 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [79] 본 발명의 MALDI 정량분석용 검정선을 구하는 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저뿐만 아니라 임의의 입자선이나 각종 방사선일 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 얻을 수 있다.
- [80] 또한, 본 발명의 MALDI 정량분석용 검정선을 구하는 방법에 있어서, 상기 매트릭스의 농도를 일정하게 한 채 상기 시료의 농도를 변화시키면서 상기 (i)단계 내지 상기 (iii)단계를 다수회 반복하여 얻은 상기 이온 신호 비율의 변화를 상기 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 선형 회귀분석함으로써, MALDI 정량분석용 검정선을 구할 수 있다.
- [81] 전술한 바와 같이, 시료 대 매트릭스 이온 신호 비율이 온도(T_{early})에 의해

결정된다는 사실은 양성자 교환 반응이 열평형에 있다는 것을 의미한다. 상기 반응식 (1)의 반응이 열적 평형 상태에 있는지 여부는, 시료의 농도가 다른 시편에 대해 동일한 T_{early} 에서의 반응지수(reaction quotient, Q)가 상기 시료의 농도에 따라 변하는지 여부로 확인할 수 있다.

[82] 본 발명자들은 시료의 농도가 다른 다수의 시편에 반복적으로 레이저 펄스를 조사하여 MALDI 질량 스펙트럼들을 얻은 후, 특정한 T_{early} 를 갖는 스펙트럼만을 선별함으로써 T_{early} 는 동일하지만 시편의 조성이 다른 스펙트럼들을 얻었다. 또한, 본 발명자들은 이렇게 얻은 스펙트럼들에 대해서 매트릭스와 시료로부터 유래하는 이온의 세기를 측정하였다.

[83] 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값(이온 신호 비율)과 시편의 매트릭스 농도와 시료의 농도를 상기 수학식 (3)에 대입하여 반응지수를 구한 결과, 본 발명자들은 T_{early} 가 동일하면 시편에 함유된 시료의 농도가 달라도 상기 반응지수가 일정하다는 사실을 발견하였다. 이러한 결과는 상기 반응식 (1)이 열평형 상태에 있다는 사실을 의미한다.

[84] 매트릭스와 시료 간의 양성자 교환 반응이 평형상태에 있기 때문에, 상기 수학식 (2) 및 (3)의 반응지수(Q)를 평형상수(K)로 대체할 수 있고, 이 경우에 상기 수학식 (2) 및 (3)은 하기 수학식 (6)이 된다.

[85] $K = [M][AH^+]/([MH^+][A]) = ([AH^+]/[MH^+])/([A]/[M]) = (I_{AH^+}/I_{MH^+})/([A]/[M])$ (6)

[86] MALDI 플룸에서 이온들의 양은 중성분자들의 양보다 훨씬 더 적기 때문에, 고체 시편에서 $[A]/[M]$ 을 MALDI 플룸에서 상응하는 비율로 설정하였다. 상기 수학식 (6)을 변형하면 하기 수학식 (7) 및 (8)의 검정선을 얻는다.

[87] $[AH^+]/[MH^+] = K([A]/[M])$ (7)

[88] 즉, $I_{AH^+}/I_{MH^+} = K([A]/[M])$ (8)

[89] 하나의 I_{AH^+}/I_{MH^+} 측정값과 하나의 $[A]/[M]$ 값만으로도, 상기 수학식 (8)로부터 검정선의 기울기, 즉 평형상수를 구할 수 있다.

[90] 또한, 다수개의 I_{AH^+}/I_{MH^+} 측정값과 다수개의 $[A]/[M]$ 값을 통계처리, 즉 회귀분석함으로써 상기 수학식 (8)의 기울기인 평형상수를 구할 수도 있다. 이 경우, 하나의 I_{AH^+}/I_{MH^+} 측정값과 하나의 $[A]/[M]$ 값을 이용할 때보다 더 정확한 평형상수를 구할 수 있다.

[91] 본 발명의 하나의 실시 태양에서, I_{AH^+}/I_{MH^+} (즉, $[AH^+]/[MH^+]$)를 세로축으로 하고 $[A]/[M]$ 를 가로축으로 하면, 기울기가 K 인 직선을 얻을 수 있고, 이 직선이 MALDI 정량분석용 검정선(또는 검정식)이다.

[92] 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상, 바람직하게는 수배 내지 수백배 희석하여 정량분석용 검정선을 구하는 데 사용할 수 있다.

[93] 본 발명의 네번째 목적은 일정량의 매트릭스와 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을

선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

[94] $[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K$ (9)

[95] 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[96] 또한, 본 발명의 네번째 목적은 일정량의 매트릭스와 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

[97] $[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K$ (9)

[98] 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[99] 또한, 본 발명의 네번째 목적은 일정량의 매트릭스와 제3물질에 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서, (i) 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값(이온 신호 비율)을 측정하는 단계; 그리고 (iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

[100] $[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K$ (9)

[101] 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[102] 본 발명의 MALDI 질량분석법을 이용한 시료의 정량 분석 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저이거나 입자선, 기타 방사선 등을 포함하는 다양한 종류의 전자기파일 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 얻을 수 있다.

[103] 전술한 바와 같이, 상기 수학식 (8)에 따르면, I_{AH+}/I_{MH+} 는 $[A]/[M]$ 에 비례하는데, 이는 MALDI 질량 스펙트럼에서 I_{AH+}/I_{MH+} 를 측정함으로써 고체 시편 내의 시료의 양을 측정할 수 있다는 것을 의미한다. 상기 수학식 (8)을 변형하면 다음과 같은 수학식 (9)를 얻는다.

[104] $[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/Q$ (9)

[105] 즉, MALDI 질량분석법을 이용한 정량분석에서, 상기 수학적식 (9)를 시료의 절대적인 양을 구하기 위한 검정선(또는 검정식)으로서 이용할 수 있다.

[106] 보다 상세하게는, 본 발명의 MALDI 질량분석법을 이용한 시료의 정량 분석 방법의 (iii)단계에서 얻은 시료 이온 신호 세기와 매트릭스 이온 신호 세기의 비율, 즉 I_{AH+}/I_{MH+} 값과 이미 알고 있는 매트릭스의 농도 $[M]$ 값을, 본 발명의 MALDI 정량분석용 검정선을 구하는 방법에 의해 구한 검정선(수학적식 (9))을 이용하여, 시료의 농도 $[A]$ 값을 계산할 수 있다.

[107] 화학반응에 대한 평형 상태는 다른 화학반응이 동시에 평형일 경우에도 유지되므로, 상기 수학적식 (9)는 상기 매트릭스 풀룸 내의 각 성분들에 대해서도 성립한다. 즉, MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 활용하는 본 발명의 방법을 통해서는 시료 또는 시편이 심하게 오염된 경우에도 특정 시료의 정량분석이 가능하다. 따라서 본 발명의 방법에 의해서 다양한 물질이 섞인 혼합물 내의 다양한 성분 각각에 대한 정량분석이 동시에 가능하다.

[108] 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상, 바람직하게는 수배 내지 수백배 또는 그 이상으로 희석하여 질량 스펙트럼을 이용한 시료 정량 분석 방법에 사용할 수 있다.

발명의 효과

[109] 본 발명의 방법에 따르면, MALDI 질량 스펙트럼으로부터 시료-대-매트릭스 이온 비율을 구하고, 이로부터 정량분석용 검정선을 작성함으로써, 저비용으로 정확하고 신속하게 극미량의 시료를 MALDI 질량 스펙트럼을 이용하여 정교하게 정량분석할 수 있다.

[110] 또한, 본 발명의 방법에 따르면, 분석할 시료가 혼합물 중의 한 성분이거나, 시료가 심하게 오염되었더라도 신속하고 간단하게 MALDI 질량 스펙트럼을 이용하여 정교하고 재현성 있게 정량분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

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

[112] 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.

[113] 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.

[114] 도 4는, 본 발명의 실시예 2에서, 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 엔지오텐신 II(DRVYIHPF)가 함유된 고체 시편 위의 한 점에 337 nm의 레이저 펄스를

반복적으로 조사하여 얻은 MALDI 스펙트럼이다.

- [115] 도 5는, 본 발명의 실시예 3에서, 시편 두께에 따른 초기 플룸의 온도(T_{early})의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [116] 도 6은 본 발명의 실시예 4의 $[\text{CHCA} + \text{H}]^+$ 의 PSD 스펙트럼이다.
- [117] 도 7은 본 발명의 실시예 5의 $\text{Y}_5\text{R}:\text{CHCA} = 1:8300$ 인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.
- [118] 도 8은 본 발명의 실시예 5의 $\text{Y}_5\text{K}:\text{CHCA} = 1:8300$ 인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.
- [119] 도 9는 본 발명의 실시예 5의 엔지오텐신 II(DRVYIHPF):CHCA = 1:8300인 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼들 중 T_{early} 가 968 K 근처인 스펙트럼들이다.
- [120] 도 10은 본 발명의 실시예 6에서 구한 Y_5R 과 Y_5K 의 매트릭스와의 양성자 교환 반응지수를 나타낸다.
- [121] 도 11은 본 발명의 실시예 7에서 구한 Y_5R 과 Y_5K 에 대한 MALDI 정량분석용 검정선이다.
- [122] 도 12는 본 발명의 실시예 8에서 9 가지 펩타이드, 타목시펜 및 매트릭스의 혼합 시편에 대하여 얻은 MALDI 스펙트럼이다.
- [123] 도 13은 본 발명의 실시예 10에서 (a) 31-40회째 조사, (b) 81-90회째 조사 및 (c) 291-300회째 조사 범위에 걸쳐 평균하여 얻은, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 시편 상의 한 지점에서 얻은 MALDI 스펙트럼이다.
- [124] 도 14는 본 발명의 실시예 10에서 레이저 펄스 에너지 역치의 (a) 두 배, (b) 세 배 및 (c) 네 배에서 얻은, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 진공건조된 시편에 대하여 TIC를 사용하여 선택된 MALDI 스펙트럼이다.
- [125] 도 15는 본 발명의 실시예 10에서 TIC에 의한 선택(900 ± 180 ions/pulse)에 의해 얻은 Y_5K 의 CHCA-MALDI에서의 검정선이다.
- [126] 도 16은 본 발명의 실시예 11에서 900 ions/pulse로 미리설정된 TIC를 사용하여 (a) 31-40회째 조사, (b) 81-90회째 조사, (c) 131-140회째 조사 및 (d) 291-300회째 조사 범위에 걸쳐 평균하여 얻은, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 시편 상의 한 지점에서 TIC 제어에 의해 얻은 MALDI 스펙트럼이다.
- [127] 도 17은 본 발명의 실시예 11에서 2500 ions/pulse로 미리설정된 TIC를 사용하여 (a) 31-40회째 조사 및 (b) 61-70회째 조사 범위에 걸쳐 평균하여 얻은, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 시편 상의 한 지점에서 TIC 제어에 의해 얻은 MALDI 스펙트럼이다.
- [128] 도 18은 본 발명의 실시예 11에서 (a) 진공건조 및 (b) 공기건조에 의해 제조된, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 시편들, 그리고 (c) 100 nmol의 DHB에 20 pmol의 Y_6 를 함유하는 시편에 대한 사진이다(스케일 바 = 300 μm).
- [129] 도 19(a) 및 19(b)는 본 발명의 실시예 11에서 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 을 함유하는 공기건조된 시편에 대하여, TIC 제어를 하지 아니한 채로 얻은 MALDI 스펙트럼이고, 도 19(c) 및 19(d)는 동일한 시편에 대해 900 ions/pulse의

미리설정된 값을 사용한 TIC 제어에 의해 얻은 MALDI 스펙트럼이다.

- [130] 도 20은 본 발명의 실시예 12에서 구한 펩타이드 DLGEEHFK에 대한 검정선을 보여 준다. 매트릭스 신호 감쇄는 속이 빈 원으로 나타나 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [131] 이하, 다음의 실시예 또는 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 또는 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리 범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[132]

[133] 실험

- [134] 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).
- [135] 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.
- [136] 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).
- [137] 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.

- [138] 시료로서 펩타이드 Y_5X (Y = 티로신, X = K(리신) 또는 R(아르기닌); Pepton, 대전, 대한민국), 엔지오텐신 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 μ L를 타겟에 올린 후 진공 건조하였다. 시편은 25 nmol의 CHCA와 1 또는 3 pmol의 펩타이드로 구성되었다.
- [139]
- [140] 실시예 1. T_{early} 를 구하는 방법
- [141] 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).
- [142] 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.
- [143] 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.
- [144] 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.

[145]

[146] 실시예 2. 조사수(shot number)에 따른 전체 스펙트럼 패턴의 변화

[147] 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 Y₅R이 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([Y₅R + H]⁺)와 매트릭스([CHCA + H]⁺) 이온들뿐 아니라, 이들의 ISD 생성물들, 예를 들면, 펩타이드 이온에서 만들어지는 임모니움 이온 Y와 매트릭스 이온에서 만들어지는 [CHCA + H - H₂O]⁺와 [CHCA + H - CO₂]⁺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.

[148] 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 - CO₂]⁺ 이온이 약해졌다. 셋째, 펩타이드에서 유래한 이온들이 CHCA에서 유래한 이온들에 대해 상대적으로 더 많아졌다.

[149] Y₅K(도 3)와 엔지오텐신(angiotensin) II(도 4)에 대해서도 비슷한 경향이 관찰되었다. 도 3에는 25 nmol의 CHCA에 3 pmol의 Y₅K가 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 [Y₅K + H]⁺의 주된 ISD 생성물이고, [CHCA + H - H₂O]⁺와 [CHCA + H - CO₂]⁺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 $[\text{DRVYIHPF} + \text{H}]^+$ 의 주된 ISD 생성물이고, $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 와 $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{CO}_2]^+$ 가 $[\text{CHCA} + \text{H}]^+$ 의 ISD 생성물이다(PSD 피크들은 *로 표시하였다).

[150]

[151] 실시예 3. 조사수에 따른 유효 온도의 변화

[152] 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 때문인지 확인하기 위하여, 조성이 같고($\text{Y}_5\text{R}:\text{CHCA} = 1:25000$) 두께가 다른($0.9\text{-}2.1\ \mu\text{m}$) 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.

[153]

[154] 실시예 4. 조사수에 따른 $[\text{CHCA} + \text{H}]^+$ 분해 패턴의 변화

[155] 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. $[\text{CHCA} + \text{H}]^+$ 의 PSD 스펙트럼(도 6)에서, $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 이온이 가장 큰 생성물이었으며, $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{CO}_2]^+$ 이온은 $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 의 10%에 불과하였다. 이것은 물의 손실 반응이 이산화탄소의 손실 반응보다 더 저에너지 반응임을 의미한다. 도 2에 있는 MALDI 스펙트럼에서, 조사가 계속됨에 따라, $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 에 비하여 ISD에 의해 생성된 $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{CO}_2]^+$ 이온이 감소하였다. 이는 조사가 계속됨에 따라 T_{early} 가 낮아진다는 의미이다. 즉, CHCA 질량 스펙트럼의 패턴 역시 온도에

의해 결정된다.

[156]

[157] 실시예 5. 펩타이드-대-매트릭스의 이온 신호 비율

[158] $Y_5R:CHCA$ (펩타이드-대-매트릭스의 비율)가 1:8300인 시편들에 대해 네 가지 조건하에서 실험을 수행하였다. 실험 조건을 (Y_5R 의 pmol, $CHCA$ 의 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.

[159] 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(DRVYIHPF): $CHCA$ (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.

[160] 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 신호 비율만이 달랐다.

[161]

[162] 실시예 6. 양성자 교환 반응의 평형

[163] MALDI 질량분석법에서 매트릭스(M)로부터 펩타이드(P)로 양성자가 이동하는 반응, 즉 $MH^+ + P \rightarrow M + PH^+$ 가 일어난다. 상기 MH^+ 는 양성자 제공자로서, 본 실시예의 경우에는 $[CHCA + H]^+$, $[CHCA + H - H_2O]^+$, 또는 $[CHCA + H - CO_2]^+$ 이다. 펩타이드-대-매트릭스 이온 신호 비율이 온도에 의해 결정된다는 사실은 양성자 교환 반응이 거의 열평형에 있다는 것을 의미한다. 이를 확인하기 위하여, 하나는 농도가 다른 시편에 대해 같은 T_{early} 에서 반응지수(reaction quotient), $Q = ([M]/[P])([PH^+]/[MH^+])$ 을 구하고, 이것이 농도에 따라 변하는지를 조사하였다. $CHCA$ 25 nmol에 Y_5R 또는 Y_5K 가 0.3 pmol 내지 20 pmol 함유된 시편에 반복적으로 레이저를 조사하여 MALDI 스펙트럼 세트를 얻은 후, 각 스펙트럼에 대해 T_{early} 를 계산하였다. 그리고 정해진 T_{early} 를 갖는

스펙트럼만을 선별함으로써, T_{early} 는 같지만 시편의 조성이 다른 스펙트럼 세트를 얻었다. 상기 세트에 있는 스펙트럼에 대해서 매트릭스와 펩타이드에서 유래하는 이온의 세기를 측정하였다. Q 를 계산하기 위해서는 MH^+ 가 무엇인지를 알아야 하지만, Q 가 일정한지를 아는 것만이 목적이려면, 양성자 제공자가 될 수 있는 어떤 이온의 세기를 사용하여도 문제될 것이 없다. 왜냐하면 T_{early} 가 정해지면 매트릭스에서 유래하는 모든 이온들의 상대 세기는 정해지기 때문이다. 매트릭스 이온의 분해 패턴이 농도에 무관하다는 것은 $[CHCA + H - H_2O]^+$ 같은 조각 이온들이 주된 양성자 제공자가 아니라는 것을 의미한다. 만약 조각 이온 하나가 주된 양성자 제공자라면, 펩타이드의 양이 증가함에 따라 $[CHCA + H]^+$ 보다 그 조각 이온이 더 빨리 줄어들 것이기 때문이다. 따라서, 주된 양성자 제공자는 $[CHCA + H]^+$ 이온일 가능성이 크다. 양성자를 잃지 아니한 매트릭스 이온 중 일부는 분해할 것이라는 가정하에, 매트릭스에서 유래하는 모든 이온들의 세기의 합, 즉 $\Sigma[\text{matrix-derived ion}]$ 을 Q 의 계산에 있어서 $[MH^+]$ 로 놓았다. 마찬가지로, $\Sigma[\text{peptide-derived ion}]$ 을 $[PH^+]$ 로 놓았다. 기체 상태 중성 분자의 비율, 즉 $([M]/[P])$ 의 계산을 위해서, 고체 시편에서의 매트릭스-대-펩타이드 비율을 사용하였다. 도 10에는 950 K의 T_{early} 에서 얻은 Q 값들을 고체 시편에 함유된 펩타이드(●: Y_5R , ○: Y_5K)의 양에 대한 함수로 나타내었다. 도 10으로부터 Q 값들이 펩타이드 양에 무관함을 분명히 볼 수 있으며, 이것은 양성자 교환 반응이 거의 열평형에 있음을 의미한다. 즉, 그림에 있는 Q 값들은 사실상 평형상수 K 에 해당한다. 매트릭스에서 펩타이드로 양성자가 이동하는 반응의 평형상수 K 는 Y_5R 의 경우가 Y_5K 의 경우보다 크다. 이것은 아르기닌(R)이 리신(K)보다 강한 염기라는 사실과 부합한다.

[164]

[165] 실시예 7. 검정선

[166] 25 nmol의 CHCA에 10 fmol 내지 30 pmol의 Y_5R 또는 Y_5K 가 함유된 시편의 한 지점에 레이저 펄스를 조사하였다. 이온 신호가 사라질 때까지 상기 지점에 레이저 펄스를 조사하여 MALDI 질량 스펙트럼을 얻었다. 각 스펙트럼에 대하여, 펩타이드 이온의 토막 패턴을 분석하여 T_{early} 를 결정하였다. 이후, 각 스펙트럼 세트로부터 동일한 T_{early} 를 갖는 스펙트럼, 즉 T_{early} 가 870 K 내지 900 K인 스펙트럼을 선택하였다. 상기 매트릭스 이온의 토막 패턴이 T_{early} 에 따라 변하기 때문에, 상기 토막 패턴을 T_{early} 의 측정수단으로서 사용하였다. $[CHCA + H - H_2O]^+/[CHCA + H]^+$ 의 세기 비율이 3 내지 4.5인 스펙트럼을 선택하였다. 도 11의 검정선에서 볼 수 있듯이, Y_5R (도 11(a) 및 11(b))과 Y_5K (도 11(c) 및 11(d))에서 $[AH^+]/[MH^+]$ 와 $[A]/[M]$ 간에 명백하게 정비례 관계가 성립한다.

[167]

[168] 실시예 8. 정량 분석 - 검정선의 사용

[169] 25 nmol의 CHCA에 9가지 펩타이드(각각 0.3 pmol) 및 1.0 pmol의 타목시펜(tamoxifen)을 함유한 시편을 준비하였다. 상기 시편의 MALDI

스펙트럼이 도 12에 나타나 있다. 도 12에서, $[\text{CHCA} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+ / [\text{CHCA} + \text{H}]^+$ 가 3 내지 4.5, 즉 T_{early} 가 870 K 내지 900 K에 해당하도록 온도를 선택하였다. 상기 시료에 함유된 펩타이드 중 Y_3R 와 Y_3K 를 도 11의 검정선을 사용하여 정량분석한 결과가 표 1에 나타나 있다.

[170]

[171] 표 1

[Table 1]

	Y_3R	Y_3K
함유량(pmol)	0.30	0.30
측정량(pmol)	0.25	0.26

[172]

[173] 도 11에서 볼 수 있듯이, $[\text{AH}^+] / [\text{MH}^+]$ 는 $[\text{A}] / [\text{M}]$ 에 거의 정비례한다. 따라서 하나의 농도에서 얻은 데이터만으로도 정비례 관계를 이용하여 미지 시료의 양을 결정할 수 있다. 상기 시편의 각 성분에 대한 한 지점 검정(one-point calibration) 결과가 표 2에 나타나 있다.

[174]

[175] 표 2

[Table 2]

시료	함유량(pmol)	측정량(pmol)	검정선
YLYEIAR	0.30	0.31	$y = 2510.3x$
Y_3K	0.30	0.24	$y = 954.0x$
DLGEEHFK	0.30	0.32	$y = 1226.6x$
Y_3R	0.30	0.27	$y = 3162.6x$
DRVYIHPF	0.30	0.24	$y = 3098.1x$
FKDLGEEHFK	0.30	0.37	$y = 859.3x$
DRVYIHPFHL	0.30	0.33	$y = 544.1x$
HLVDEPQNLIK	0.30	0.40	$y = 521.5x$
RPKPQQFFGLM-N	0.30	0.31	$y = 1945.2x$
H_2			
타목시펜	1.0	0.74	$y = 886.0x$

[176]

[177] 표 2의 타목시펜에 대한 결과로부터 알 수 있듯이, MALDI에 의해 이온화되는 모든 시료에 대해 본 발명의 방법이 적용될 수 있다.

[178]

[179] 실시예 9. 스펙트럼 온도(spectral temperature)의 척도 - 전체 이온 개수(TIC)

[180] 시료로서 펩타이드 Y₆, Y₅K 및 엔지오텐신 II(angiotensin II (DRVYIHPF))을 펩트론사(대전, 대한민국)로부터 구매하였다. 매트릭스 CHCA 및 DHB를 시그마사(St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. CHCA 또는 DHB의 1:1 물/아세트니트릴 용액과 시료 수용액을 혼합하였다. CHCA-MALDI에서, 0 pmol 내지 250 pmol의 시료와 25 nmol의 CHCA를 함유하는 용액 1 µL를 타겟에 올린 후 진공건조 또는 공기건조하였다. Y₆의 DHB-MALDI 시편을 두 단계로 제작하였다. 각 단계에서, 0.5 pmol 내지 320 pmol의 Y₆ 및 50 nmol의 DHB를 함유하는 용액 1 µL를 타겟에 올린 후 진공건조하였다.

[181] MALDI스펙트럼의 T_{early}를 측정하기 위해서 시료 이온의 분해에 대한 반응속도론적 분석이 필요한 것은 아니다. 매트릭스 이온의 분해 패턴 혹은 생성되는 전체 이온 개수 역시 T_{early}의 척도(indicator)로서 사용할 수 있다. 그러나 이러한 방법들에서는 시료들의 종류, 농도 및 개수가 달라질 때, T_{early}를 쉽게 계산하기 어렵다. 따라서 실질적인 정량 분석을 위해서 시료들의 종류, 농도 및 개수에 무관하게 T_{early}를 용이하고 신속하게 계산할 수 있는 좋은 T_{early}의 척도가 필요하다. 좋은 T_{early}의 척도로는 다음의 조건들이 요구된다.

[182] 첫째, T_{early}의 척도는 T_{early}에 대하여 민감한 함수이어야 한다. 둘째, T_{early}의 척도는 시료들의 종류, 고체 시편 내에서의 시료들의 농도 및 이들의 개수에 무관하여야 한다. 셋째, T_{early}의 척도는 스펙트럼으로부터 상기 특성을 신속하고 용이하게 계산할 수 있어야 한다.

[183] 시료 이온 분해를 이용한 T_{early}의 측정은 둘째, 셋째 조건을 만족시키지 못한다. 매트릭스 이온 분해 패턴을 이용하는 경우에도 매트릭스 이온 신호가 다른 것들에 의해 오염되면 T_{early}의 측정이 어렵다. MALDI에서 생성되는 전체 이온의 개수를 T_{early}의 척도로 사용하게 되면 첫째, 둘째 조건을 만족시킬 수 있다.

[184] 그러나 리플렉트론 내부에서 발생하는 이온들의 분해 생성물의 손실로 인해 MALDI에 의해 생성되는 전체 이온의 개수를 쉽게 측정하기 어렵기 때문에, 본 발명자들은 이것에 준하는 값으로 검출기에 검출되는 전체 입자의 개수(total number of particles)를 전체 이온 개수(total ion count, TIC)라 하고, 이를 T_{early}의 척도로서 사용하였다. TIC가 T_{early}의 함수임을 확인하기 위하여, 25 nmol의 CHCA를 매트릭스로 사용한 경우에 시료의 종류, 농도 및 개수를 변화시키며 레이저 펄스당 생성되는 전체 입자 개수와 TIC를 표 3에 나타냈다.

[185]

[186] 표 3

[Table 3]

CHCA-MALDI에서 TIC와 시료의 농도

시료	시료의 양(pmol) ^a	레이저 펄스당 TIC ^b	
		T _{early} = 875±5K	T _{early} = 900±5K
- ^c	0	600±60	1250±130
Y ₅ K	0.10	540±90	1300±80
	1.0	450±50	1100±110
	10	460±50	1070±70
Y ₅ R	0.10	540±50	1220±40
	1.0	530±160	1250±130
	10	520±100	1050±120
혼합물 ^d	각각 1.0	580±50	1220±30

[187] ^a 고체 시편에서 25 nmol의 CHCA에 함유된 시료의 몰수(pmol)

[188] ^b 하나의 표준편차를 갖는 세 개 이상의 측정치들의 평균

[189] ^c 순수한 CHCA

[190] ^d 25 nmol의 CHCA에 Y₅K, Y₅R, YLYEIAR, YGGFL, 크레아티닌(creatinine) 및 히스타민(histamine) 각각 1.0 pmol

[191]

[192] 표 3에서 보는 바와 같이, 전체 이온 개수(TIC)는 T_{early}의 변화 (875 K → 900 K)에 매우 민감하며, 시료의 종류, 농도 및 개수에 상관없이 T_{early}에 따라 결정되는 값이므로, 전술한 세 가지 조건을 모두 잘 만족시키는 T_{early}의 척도로서 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[193] 또한, CHCA-MALDI에서와 같이, DHB-MALDI에서 레이저 펄스에 의해 생성된 이온들의 총 개수도, T_{early}가 동일하면, 고체 시편 내에서의 시료의 종류, 농도 및 개수와 무관하게 실질적으로 동일하였다. 상기 동일한 스펙트럼들로부터 계산한 TIC 데이터가 표 4에 나타나 있고, 표 4의 내용으로부터 DHB-MALDI에서도 TIC가 의 척도로서 사용될 수 있다는 점을 알 수 있다.

[194]

[195] 표 4

[Table 4]

DHB-MALDI에서 TIC와 시료의 농도

시료	시료의 양(pmol) ^a	레이저 펄스당 TIC ^b	
		T _{early} = 780±5K	T _{early} = 800±5K
- ^c	0	480±40	1510±150
Y ₆	2.0	430±70	1310±60
	20	460±60	1400±130
혼합물 ^d	각각 2.0	500±100	1300±110

[196] ^a 고체 시편에서 100 nmol의 DHB에 함유된 시료의 몰수(pmol)

[197] ^b 하나의 표준편차를 갖는 세 개 이상의 측정치들의 평균

[198] ^c 순수한 DHB

[199] ^d 100 nmol의 DHB에 Y₅K, Y₅R, YLYEIAR, YGGFL, 크레아티닌(creatinine) 및 히스타민(histamine) 각각 1.0 pmol

[200]

[201] 실시예 10. TIC에 의해 선택된 스펙트럼의 정량적 재현성

[202] 먼저, 반복적인 레이저 펄스 조사에 의한 스펙트럼의 변화를 살펴 보았다. 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y₅K를 첨가한 시편을 진공건조한 후 역치 펄스 에너지(threshold pulse energy)의 두 배인 레이저 펄스를 사용하여 상기 시편의 한 지점(spot)으로부터 MALDI 스펙트럼 세트를 얻었다.

[203] 상기 스펙트럼 세트로부터 31-40번째 조사, 81-90번째 조사 및 291-300번째 조사 범위에서 얻은 스펙트럼을 각각 평균하여 얻은 스펙트럼이 도 13에 나타나 있다. 처음 30개의 스펙트럼들을 사용하지 아니하였는데, 이는 알칼리 첨가생성 이온들(alkali adduct ions)에 의한 오염이 심각하였기 때문이다. 상기 조사 범위에서 얻은 스펙트럼들에 대하여 총합을 구한 TIC는 각각 12000(12000), 7300(58000) 및 110(106000)이었다(괄호 안의 수는 각각 31-40번째 조사, 81-90번째 조사 및 291-300번째 조사 사이에서 축적된 TIC를 의미한다). 온도 선택을 하지 아니하였기 때문에, 레이저 조사가 진행됨에 따라 스펙트럼 패턴 및 각 이온의 수가 변하였다. 291-300번째 조사 범위에서 [Y₅K + H]⁺는 다른 것들보다 더 두드러졌다. 그러나 291-300번째 조사 범위에서의 절대 수치는 31-40번째 조사 및 81-90번째 조사에서의 절대 수치보다 훨씬 더 작다. 실제로, 이온 생성은 300번째 조사 이후 거의 정지하였다. 이러한 사실이 300번째 조사 이후 레이저 펄스가 조사되는 지점에서 시편이 고갈되었음을 의미하는 것은 아닌데, 이는 레이저 펄스 에너지를 증가시켰을 때 이온 생성이 다시 시작되었기 때문이다. 이러한 현상이 일어나는 이유는, 레이저 펄스가 조사되는 지점이 점점 얇아질수록 상기 지점의 온도가 점점 낮아지기 때문에, 300번째 조사에서의 용제(ablation)에 대한 역치보다 더 낮아졌기 때문이다. 이후에, 레이저 펄스

에너지를 증가시킴으로써 온도를 상기 용제 역치 이상으로 상승시켰고 이온 생성이 재개되었다.

- [204] 본 발명자들의 이전 연구에 따르면, 동일한 T_{early} 에서의 스펙트럼을 선택한 경우에는, 주어진 조성의 시편으로부터 얻은 MALDI 스펙트럼이 실험 조건에 무관하게 정량적으로 재현가능하다. 상기 연구에서는 $I([M + H - H_2O]^+)/I([M + H]^+)$ 비율이 T_{early} 의 척도로서 사용되었다.
- [205] 본 발명에서, 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 를 함유한 진공건조된 시편에 대해 유사한 측정을 수행하였고, TIC가 1100 ± 200 ions/pulse인 스펙트럼을 선택하였다. 도 14에 나타나 있듯이, 이렇게 얻은 스펙트럼들은 실질적으로 동일하였다. 또한, CHCA에 엔지오텐신 II가 함유된 시편에 대해서도 유사한 결과를 얻었다. 상기 결과들에 의하면 TIC는 T_{early} 에 대한 뛰어난 척도이다. 또한, 지점-대-지점(spot-to-spot) 및 시편-대-시편(sample-to-sample) 재현성을 확인한 결과, TIC를 이용한 스펙트럼 획득 온도 선택(spectral acquisition-temperature selection)에 대한 상기 전략이 잘 맞는다는 것을 발견하였다.
- [206] 25 nmol의 CHCA에 0.01 pmol 내지 250 pmol의 Y_5K 를 함유하는 진공건조된 시편에 대한 MALDI 스펙트럼을 얻은 후, TIC가 900 ± 180 ions/pulse인 스펙트럼을 선택하였고, 상기 선택된 스펙트럼으로부터 $[AH^+]/[MH^+]$ 대 $[A]/[M]$ 데이터를 계산하였다. 상기 계산 결과가 도 15(a)에 나타나 있다. 상기 검정선(calibration curve)의 뛰어난 선형성(linearity)은 온도 선택을 위한 TIC의 유용성을 입증한다.
- [207]
- [208] 실시예 11. TIC 제어에 의한 재현성 있는 스펙트럼의 획득
- [209] MALDI 스펙트럼에서 TIC를 제어하기 위하여 레이저 펄스 에너지를 변화시켰다. 레이저 후단에 설치한 원형 가변 중성밀도 필터(circular variable neutral density filter)(Model CNDQ-4-100.OM, CVI Melles Griot, Albuquerque, NM, USA)를 회전시켜 레이저 펄스 에너지를 수동으로 조절하였다. 상기 원형 가변 중성밀도 필터를 스텝 모터 위에 설치하였고 데이터 시스템으로부터의 명령에 의해 상기 필터를 회전시킴으로써 상기 레이저 펄스 에너지를 시스템적으로 조정하였다.
- [210] 상기 레이저 펄스 에너지를 제어하기 위해 네거티브 피드백(negative feedback) 방식을 채택하였다. 조사 지점으로부터 데이터를 얻기 시작하는 시점에서, 상기 레이저 펄스 에너지를 역치의 두 배로 설정하였고, 10개의 단일 조사 스펙트럼들(ten single shot spectra)을 얻어서 이들을 평균하였다. 이렇게 얻은 스펙트럼으로부터, TIC를 계산하였고 상기 계산된 TIC 값을 미리설정된 값과 비교하여 다음 레이저 펄스 에너지에 필요한 조정값을 계산하였다. 상기 계산된 조정값을 사용하여 상기 필터의 회전 방향 및 각도를 결정하였다. 상기 필터의 각도 조정이 끝난 후에, 스펙트럼을 다시 얻었다. 반복된 레이저 조사에 의해 상기 지점에서 시편이 고갈되었을 때 스펙트럼 획득을 종료하였다.

CHCA-MALDI에 대하여, 상기 레이저 펄스 에너지가 역치의 세 배가 되었을 때 종료하였다.

- [211] 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_5K 를 함유하는 진공건조된 시편에 대한 실험을 반복하였고, 미리설정된 값으로서 900 ions/pulse의 TIC를 사용하여 레이저 펄스 에너지를 피드백 조정하였다. 31-40회째 조사, 81-90회째 조사, 131-140회째 조사 및 241-250회째 조사 범위에서 평균한 스펙트럼들이 도 16에 나타나 있다. 상기 조사 범위에서의 총 TIC는 각각 9000 (9000), 8600 (53000), 9000 (103000), 및 8100 (188000)이었고, 괄호 안의 수는 31-40회째 조사, 81-90회째 조사, 131-140회째 조사 및 241-250회째 조사 사이에서 축적된 TIC를 나타낸다. 상기 레이저 펄스 에너지가 역치의 세 배가 된 250회째 조사에서 스펙트럼 획득을 종료하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, 스펙트럼 패턴 및 이온 수 모두 상기 지점에서의 측정 동안에 유사하게 나타났고, 이는 TIC 제어에 의해 재현성 있는 스펙트럼을 성공적으로 얻었다는 점을 입증한다.
- [212] TIC를 제어하지 아니한 채로 얻은 스펙트럼 세트(도 13)로부터, TIC가 900 ± 180 ions/pulse인 스펙트럼을 선별하였다. 상기 선별된 스펙트럼에 대한 TIC 합은 19000 ions/pulse이었다. 즉, TIC-제어 스펙트럼에서 축적된 TIC, 188000 ions/pulse는 TIC에 의해 선별된 스펙트럼에서 축적된 TIC 보다 훨씬 더 컸고, 이는 정량적으로 재현성 있는 MALDI 스펙트럼을 얻기 위해서는, TIC를 제어하여 스펙트럼을 얻는 것이 TIC에 의해 스펙트럼을 선별하는 것보다 더 효율적이라는 점을 시사한다. 상기 방법에서 질소 레이저의 출력을 고정된 후 상기 필터의 투과율을 변화시킴으로써, 시편이 받는 펄스 에너지를 조절하였다.
- [213] 전술한 방법을 대체할 수 있는 방법으로서 레이저의 출력 자체를 직접 조절하는 방법의 적합 여부를 조사하기 위해, 질소 레이저 대신에 355 nm 파장의 Nd:YAG (Surelite III-10, Continuum, Santa Clara, CA, USA) 레이저를 사용하였다. 상기 파장에서 펄스 에너지의 역치는 $0.25 \mu J/pulse$ 이었다. 2500 ions/pulse를 TIC의 기준값으로 사용하였으며, 펄스 에너지 역치의 두 배에 해당하는 레이저 출력을 사용하여 스펙트럼을 얻기 시작하였다. 10개의 스펙트럼을 얻은 후 TIC를 계산하여 기준값과 비교하였다. TIC가 기준값을 회복하도록 하기 위하여 펄스 에너지를 조절하였다. 이때 레이저의 Q 스위칭(Q-switching)의 지연시간을 조절하여 펄스 에너지를 조절하였는데, 레이저의 출력을 바꾸는 방법은 레이저마다 다를 수 있다. 도 17(a)의 스펙트럼은 펄스 에너지를 역치의 두 배로 고정시켜 얻었다(31-40회째 조사). 그 후, TIC 제어를 통해 레이저 출력을 조절하였다. 이렇게 얻은 61-70회째 조사의 결과가 도 17(b)의 스펙트럼이다. 상기 두 스펙트럼은 매우 유사하며, 레이저 출력 조절을 통한 TIC 제어에 의해 성공적으로 스펙트럼을 재현하였음을 보여준다. 비교를 위해, 레이저 출력을 역치의 두 배로 고정하여 얻은 61-70회째 조사의 스펙트럼이 도 17(c)에 나타나 있다. 레이저의 출력을 고정시킨 후 필터를 사용하여 시편에서의 펄스 에너지를 조절한 경우와 마찬가지로, 레이저의 출력을 직접 조절한 경우에도 성공적으로

재현성 있는 스펙트럼을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

- [214] 펩타이드/CHCA 용액을 진공건조하여 얻은 시편은 비교적 균질하다. 진공건조한 시편에 대한 사진이 도 18(a)에 나타나 있다. 시편의 지점-대-지점 재현성을 확인하기 위하여, 진공건조한 펩타이드/CHCA 시편 상의 많은 지점에서 TIC 제어에 의한 스펙트럼을 얻었다. 이렇게 얻은 스펙트럼은 레이저 조사 지점에 무관하게 유사하였다. TIC 제어를 하지 아니하는 경우에는, 동일한 지점에서 얻은 스펙트럼조차 재현성이 없기 때문에, 지점-대-지점 변화를 확인하는 것이 무의미하다.
- [215] 주어진 조성의 용액을 타겟에 올린 후에 건조하면, 고체 시편의 최초 두께는 용액의 부피 및 시편의 직경에 영향을 받을 것이고, 이는 T_{early} 에 영향을 줄 것이며, MALDI 스펙트럼에서 시편-대-시편(sample-to-sample)의 비재현성을 초래할 것이다. T_{early} 를 미리설정된 값 근처로 유지하는 것이 주요 전략이기 때문에, 상기 문제점이 용이하게 극복될 것이다. 이를 확인하기 위하여, 도 16의 스펙트럼을 얻기 위해 사용한 것과 동일한 용액을 사용하여 시편을 제조하였지만, 도 16에서 1.0 μL 를 사용한 것과 달리 2.0 μL 의 용액을 사용하였다. 상기 용액의 부피를 두 배로 증가시킨 경우에 시편의 두께가 약 40% 증가한 것으로 측정되었다. TIC 제어를 위해 동일하게 미리설정된 값, 즉 900 ions/pulse를 사용하여 상기 시편으로부터 TIC 제어에 의한 스펙트럼을 얻었다. 상기 스펙트럼의 패턴은 도 16의 스펙트럼과 유사하였고, 이는 TIC 제어에 의해 시편을 타겟에 올릴 때 발생한 오차를 줄일 수 있음을 의미한다.
- [216] 펩타이드/CHCA 용액을 공기건조하여 제조한 시편들은 균질하지 아니하였다. 공기건조된 시편에 대한 사진이 도 18(b)에 나타나 있다. 진공건조된 시편은 비교적 연속적인 필름을 형성한 반면에(도 18(a)), 공기건조된 시편에서 매트릭스 미소결정들(matrix crystallites)이 섬처럼 존재한다(도 18(b)). 시편의 불균질성에 의한 스펙트럼의 재현성에 대한 제한을 확인하기 위해서, 도 16의 스펙트럼을 얻기 위해 사용한 것과 동일한 용액을 사용하여 공기건조하여 25 nmol의 CHCA에 10 pmol의 Y_3K 를 함유하는 시편을 제조하였다. TIC 제어를 하지 아니한 채로 상기 공기건조된 시편들로부터 얻고 각 지점에 대해 평균한 MALDI 스펙트럼은, 도 19(a) 및 19(b)에 나타난 두 개의 전형적인 스펙트럼에 나타나 있듯이, 현저한 지점-대-지점 편차를 보였다. 이러한 현상은, 부분적으로는 상기 공기건조된 시편의 레이저 초점 상의 미소결정의 개수가 3개 내지 5개로 편차를 보이기 때문인 것으로 예상된다.
- [217] 다음으로, TIC 제어에 의해 유사한 실험을 하였다. 도 19(c) 및 19(d)에 나타난 두 개의 전형적인 스펙트럼에 나타나 있듯이, TIC 제어에 의해, 다른 지점들에서 얻은 MALDI 스펙트럼들이 정량적으로, 즉 패턴 및 각 이온의 절대적인 양이 모두 유사해졌다. 또한, 도 19(c) 및 19(d)에서 공기건조된 시편들에 대하여 TIC 제어에 의한 지점-평균 스펙트럼들(TIC-controlled spot-averaged spectra)이, 도 16의 진공건조된 시편에 대하여 TIC 제어에 의한 스펙트럼과 비교적 유사하다는

점이 주목할 만하다. 자세히 살펴 보면, 상기 두 경우에서 TIC에 대해 동일하게 미리설정된 값을 사용한 경우에도, 상기 공기건조된 시편들로부터 얻은 스펙트럼과 연관된 T_{early} 가 상기 진공건조된 시편으로부터 얻은 스펙트럼과 연관된 T_{early} 보다 약간 더 높은 경향이 있다. 예를 들면, $[CHCA + H - CO_2]^+$ 대 $[CHCA + H]^+$ 비율이 상기 진공건조된 시편에서 보다 상기 공기건조된 시편에서 약간 더 크다. 이러한 현상은 다음과 같이 설명될 수 있다. 두 개의 다른 시편들로부터 동일한 개수의 이온들을 생성하기 위해서, 상기 공기건조된 시편에 대한 T_{early} 는 상기 진공건조된 시편에 대한 T_{early} 보다 약간 더 높아야 하는데, 이는 레이저 조사에 노출된 시편의 면적이 공기건조된 시편에서 더 작기 때문이다. 현저히 다른 형태(morphology)를 갖는 상기 두 개의 시편들로부터 얻은 스펙트럼들이 TIC 제어에 의해 유사해졌다는 사실을 주목할 만하다.

- [218] 25 nmol의 CHCA에 0.01 pmol 내지 250 pmol의 Y_3K 를 함유하는 진공건조된 시편들에 대하여, 미리설정된 값으로서 900 ions/pulse의 TIC를 사용하는 TIC 제어에 의해 얻은 스펙트럼을 이용하여, $[AH^+]/[MH^+]$ 대 $[A]/[M]$ 플롯을 구하였다. 이렇게 얻은 검정선이 도 15(b)에 나타나 있다. 도 15(b)에서 나타난 검정선은 뛰어난 선형성을 보여 준다.
- [219] 또한, CHCA-MALDI에서와 같이, DHB-MALDI에서 레이저 펄스에 의해 생성된 이온들의 총 개수도, T_{early} 가 동일하면, 고체 시편 내에서의 시료의 종류, 농도 및 개수와 무관하게 실질적으로 동일하였다. 상기 동일한 스펙트럼들로부터 계산한 TIC 데이터가 표 4에 나타나 있고, 표 4의 내용으로부터 DHB-MALDI에서도 TIC가 의 척도로서 사용될 수 있다는 점을 알 수 있다.
- [220] 미리설정된 값으로서 1300 ions/pulse의 TIC를 사용하여, 100 nmol의 DHB에 20 pmol의 Y_6 을 함유하는 시편 상의 한 지점에 대해 반복적으로 조사하여 TIC 제어에 의한 MALDI 스펙트럼 세트를 구하였다. 상기 시편의 레이저 조사 지점에서의 측정 전체에 대하여 스펙트럼의 패턴 및 이온 개수 모두가 CHCA-MALDI의 경우에서와 유사하였다. 또한, 100 nmol의 DHB에 1.0 pmol 내지 640 pmol의 Y_6 을 함유하는 시편에 대한 검정선을 구하였다. 도 15(c)에 나타난 검정선의 선형성은 DHB-MALDI를 사용하는 정량분석에서도 TIC 제어의 유용성을 보여 준다.

[221]

[222] 실시예 12. 매트릭스 신호 감쇄 효과

[223] 50 pmol의 DLGEEHFK와, 25 nmol의 CHCA에 포함된 6.5 pmol의 시토크롬 C의 트립신 소화액을 함유하는 시편을 준비하였다. 실시예 11에 기재된 TIC 제어 방법에 따라, 1회 레이저 조사 당 TIC를 3000개로 설정하여 질량 스펙트럼을 얻었다. 이렇게 얻은 질량 스펙트럼으로부터 구한, 상기 시료 DLGEEHFK에 대한 검정선이 도 20에 나타나 있다. 상기 시편에 대한 매트릭스 신호 감쇄 효과는 94%이었다. 질량 스펙트럼을 사용하여 DLGEEHFK를 정량분석한 결과

9.7 pmol이었고, 정확한 값은 50 pmol이었다.

- [224] 상기 시편의 시료를 2.0배 희석하였을 때, 매트릭스 신호 감쇄 효과는 $78 \pm 7\%$ 이었고, 이 값은 상기 수학적 식 (4)로부터 예측된 84%와 잘 일치하였다. 그러나, 상기 시료에 대한 정량분석 결과는 19 ± 4 pmol이었고, 상기 시료의 정확한 값인 50 pmol과 대비하여 정량분석 결과가 여전히 좋지 아니하였다.

- [225] 상기 시편의 시료를 10배 희석하였을 때, 매트릭스 신호 감쇄 효과는 $55 \pm 4\%$ 이었고, 상기 수학적 식 (4)로부터 예측된 59%와 잘 일치하였다. 상기 시료에 대한 정량분석 결과는 51 ± 6 pmol이었고, 상기 시료의 정확한 값인 50 pmol과 대비하여 정량분석 결과가 잘 일치하였다.

청구범위

- [청구항 1] 화학물질의 질량 스펙트럼에 있어서, 이온 생성 반응의 온도를 서로 동일하게 조정하거나 이온 생성 반응의 온도가 동일한 스펙트럼을 선택함으로써 상기 화학물질의 질량 스펙트럼의 재현성을 향상시키는 방법.
- [청구항 2] 제1항의 방법에 있어서, 매트릭스, 시료 및 제3 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상기 질량 스펙트럼에서의 이온화 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화학물질 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법.
- [청구항 3] 제1항의 방법에 있어서, 상기 질량 스펙트럼에서, 전체 이온 개수(total ion count)가 동일한 질량 스펙트럼을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화학물질 질량 스펙트럼의 재현성 향상 방법.
- [청구항 4] 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,
 (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고
 (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 5] 제4항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 6] 제5항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 7] 제6항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 8] 제4항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를

초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 9]

제8항의 방법에 있어서, 상기 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 10]

일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,

(i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고

(ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 11]

제10항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 12]

제11항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 13]

제12항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 14]

제10항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

[청구항 15]

제14항의 방법에 있어서, 상기 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.

- [청구항 16] 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,
 (i) 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계; 그리고
 (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 이온 신호 비율을, 상기 시료 농도를 상기 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율로 나누어서, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 17] 제16항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 18] 제17항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 19] 제18항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 20] 제16항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 21] 제20항의 방법에 있어서, 상기 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 일정한 온도에서 상기 매트릭스와 상기 시료 간의 양성자 교환 반응의 평형상수를 측정하는 방법.
- [청구항 22] 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,
 (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;
 (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호

비율을 측정하는 단계; 그리고

(iii) 상기 (ii)단계의 이온 신호 비율을, 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 23] 제22항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 24] 제23항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 25] 제24항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 26] 제22항의 방법에 있어서, 상기 매트릭스의 농도를 일정하게 한 채 상기 시료의 농도를 변화시키면서 상기 (i)단계 내지 상기 (iii)단계를 다수회 반복하여 얻은 상기 이온 신호 비율의 변화를 상기 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 선형 회귀분석함으로써 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 27] 제22항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 28] 제27항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 29] 일정량의 매트릭스와 일정량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,

(i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;

(ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고

(iii) 상기 (ii)단계의 이온 신호 비율을 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 30] 제29항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.

[청구항 31] 제30항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을

- 구하는 방법.
- [청구항 32] 제31항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 33] 제29항의 방법에 있어서, 상기 매트릭스의 농도를 일정하게 한 채 상기 시료의 농도를 변화시키면서 상기 (i)단계 내지 상기 (iii)단계를 다수회 반복하여 얻은 상기 이온 신호 비율의 변화를 상기 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 선형 회귀분석함으로써 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 34] 제29항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 35] 제34항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 36] 일정량의 매트릭스, 일정량의 시료 및 제3물질이 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,
 (i) 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;
 (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 시료 이온 신호 세기를 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고
 (iii) 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을, 상기 시편의 시료 농도를 매트릭스의 농도로 나눈 값인 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 37] 제36항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 38] 제37항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 39] 제38항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 40] 제36항의 방법에 있어서, 상기 매트릭스의 농도를 일정하게 한 채 상기 시료의 농도를 변화시키면서 상기 (i)단계 내지 상기 (iii)단계를 다수회 반복하여 얻은 상기 이온 신호 비율의 변화를 상기 농도 비율의 변화에 따라 도시하여 선형 회귀분석함으로써

- 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 41] 제36항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 42] 제41항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 정량분석용 검정선을 구하는 방법.
- [청구항 43] 일정량의 매트릭스와 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,
- (i) 상기 시료 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;
 - (ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고
 - (iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학적 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,
- $$[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K \quad (9)$$
- 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 44] 제43항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 45] 제44항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 46] 제45항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 47] 제43항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 48] 제47항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.
- [청구항 49] 일정량의 매트릭스와 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들

중에서,

(i) 상기 매트릭스 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;

(ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값인 이온 신호 비율을 측정하는 단계; 그리고

(iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

$$[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K \quad (9)$$

질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 50]

제49항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 51]

제50항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 52]

제51항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 53]

제49항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 54]

제53항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수배 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 55]

일정량의 매트릭스와 제3물질에 미지량의 시료가 혼합된 시편에 에너지를 가하여 형성되는 이온들로부터 얻어지는 다수의 질량 스펙트럼들 중에서,

(i) 상기 제3물질 이온의 분해 패턴이 서로 동일한 질량 스펙트럼들만을 선별하는 단계;

(ii) 상기 (i)단계에서 선별된 질량 스펙트럼들에 나타난 상기 시료 이온 신호 세기를 상기 매트릭스 이온 신호 세기로 나눈 값(이온 신호 비율)을 측정하는 단계; 그리고

(iii) 상기 매트릭스의 몰농도와 상기 (ii)단계에서 측정한 이온 신호 비율을 하기 수학식 (9)의 정량분석용 검정선에 대입하여 상기 시료의 몰농도를 계산하는 단계를 포함하는,

$$[A] = (I_{AH+}/I_{MH+})[M]/K \quad (9)$$

질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 56]

제55항의 방법에 있어서, 상기 시편에 에너지를 가하는 수단이 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 57]

제56항의 방법에 있어서, 상기 레이저가 질소 레이저 또는 Nd:YAG 레이저인 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

[청구항 58]

제57항의 방법에 있어서, 상기 레이저를 시편에 조사함에 있어서 한 지점에 다수회 조사하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

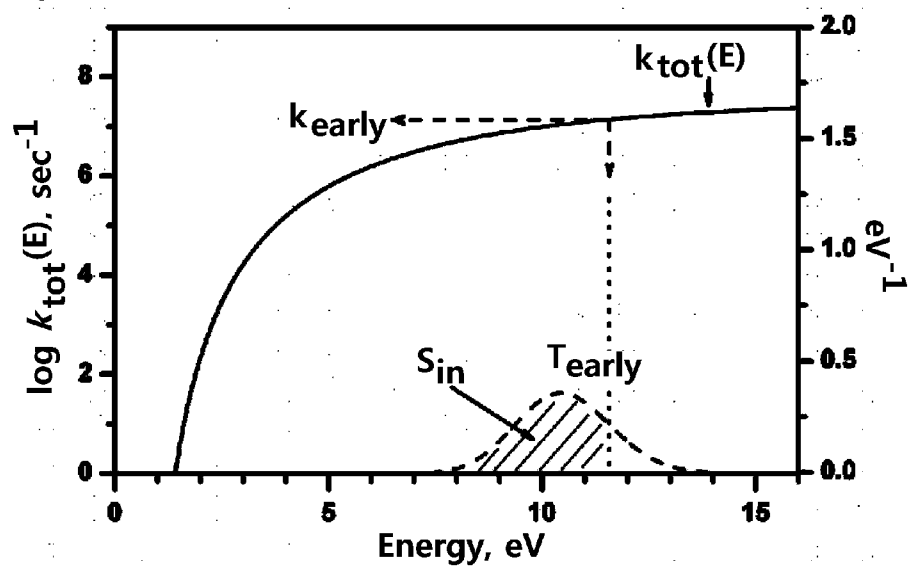
[청구항 59]

제55항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료의 양이 적정 범위를 초과하여 매트릭스 신호 감쇄 효과가 70%를 초과하는 경우에, 상기 시편의 시료를 2배 이상 희석하여 사용하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

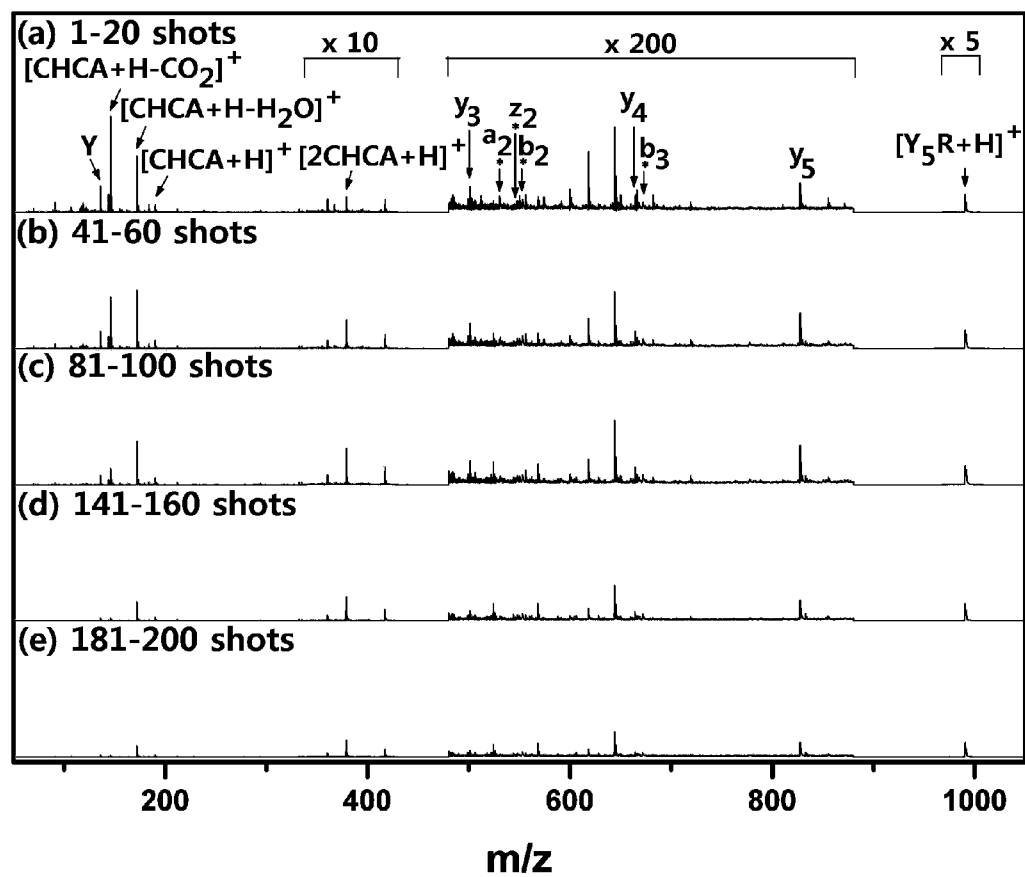
[청구항 60]

제59항의 방법에 있어서, 상기 시편의 시료를 수백 내지 수백배 희석하는 것을 특징으로 하는, 질량 스펙트럼을 이용한, 시료 정량 분석 방법.

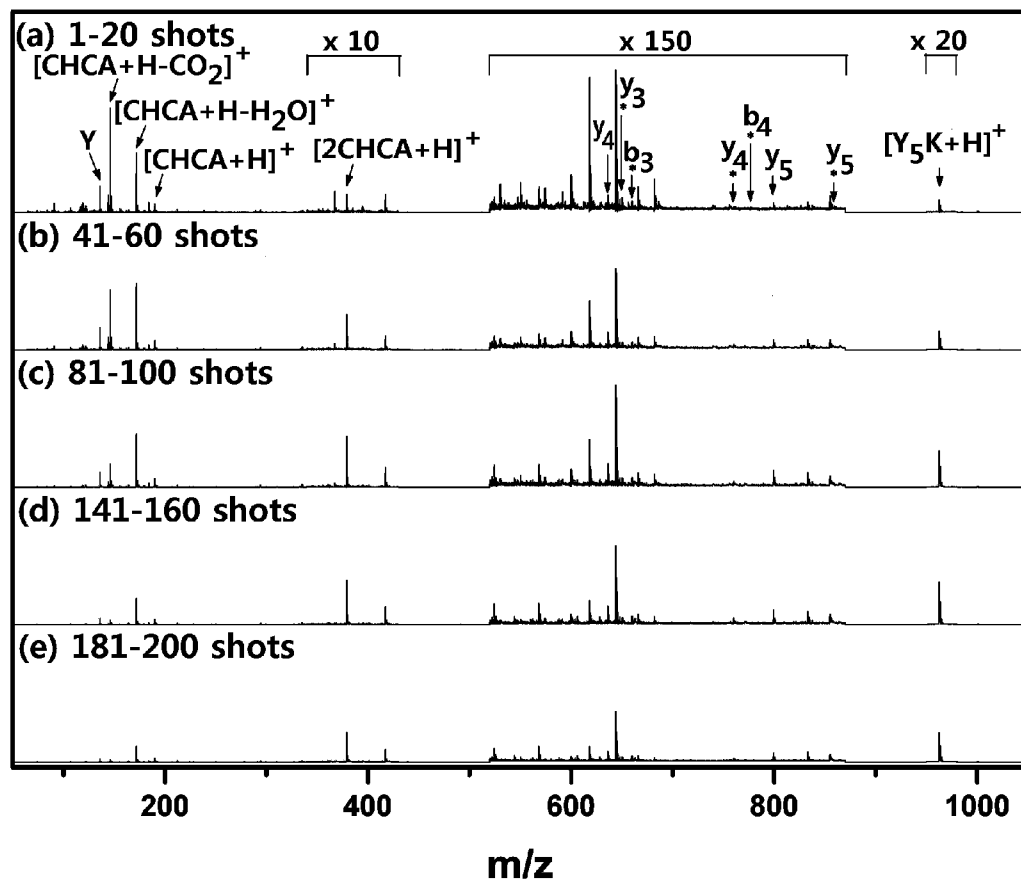
[Fig. 1]



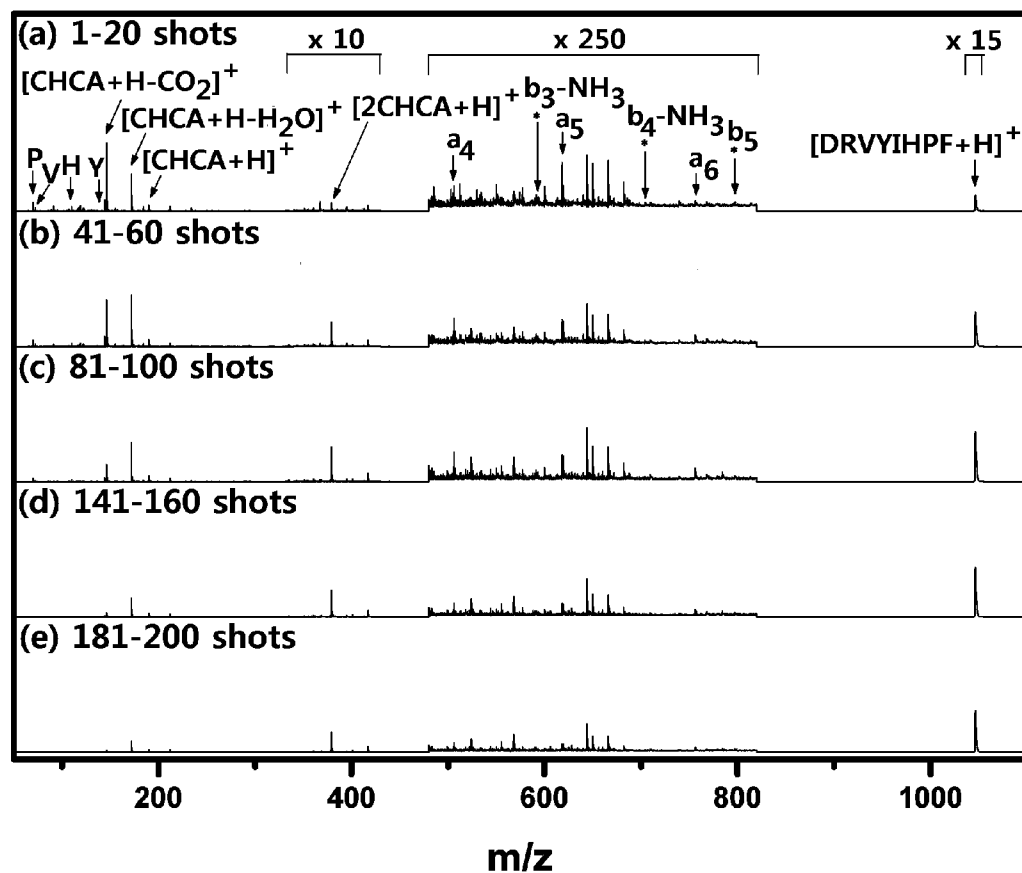
[Fig. 2]



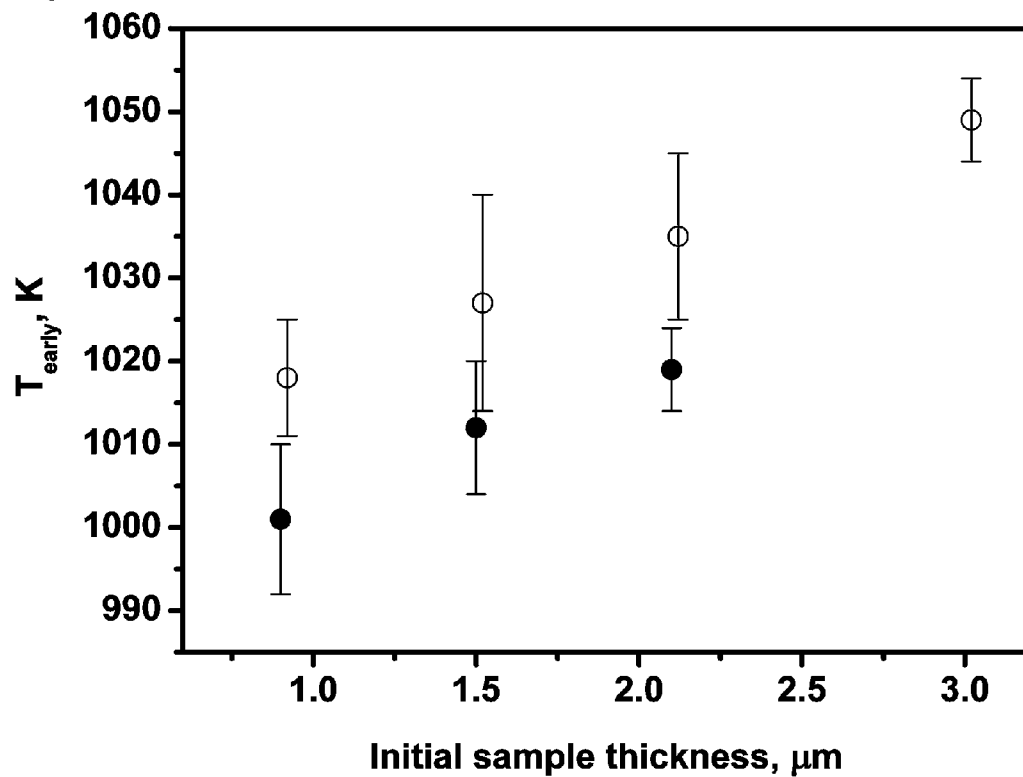
[Fig. 3]



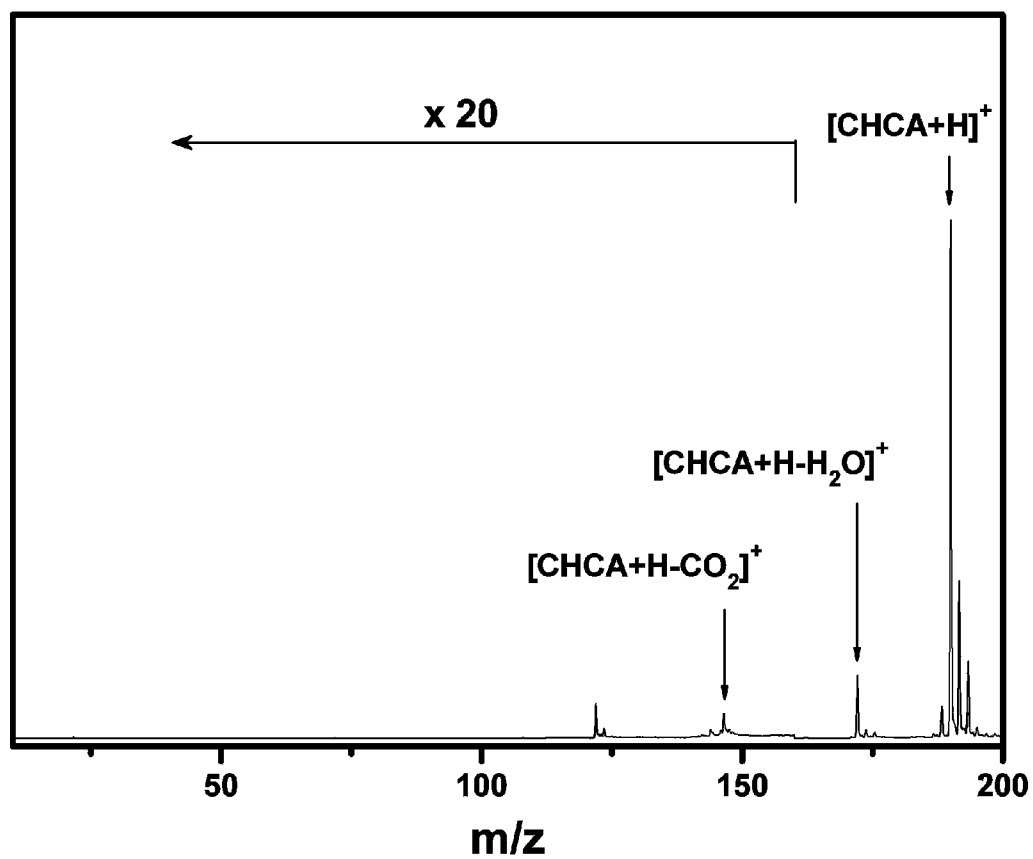
[Fig. 4]



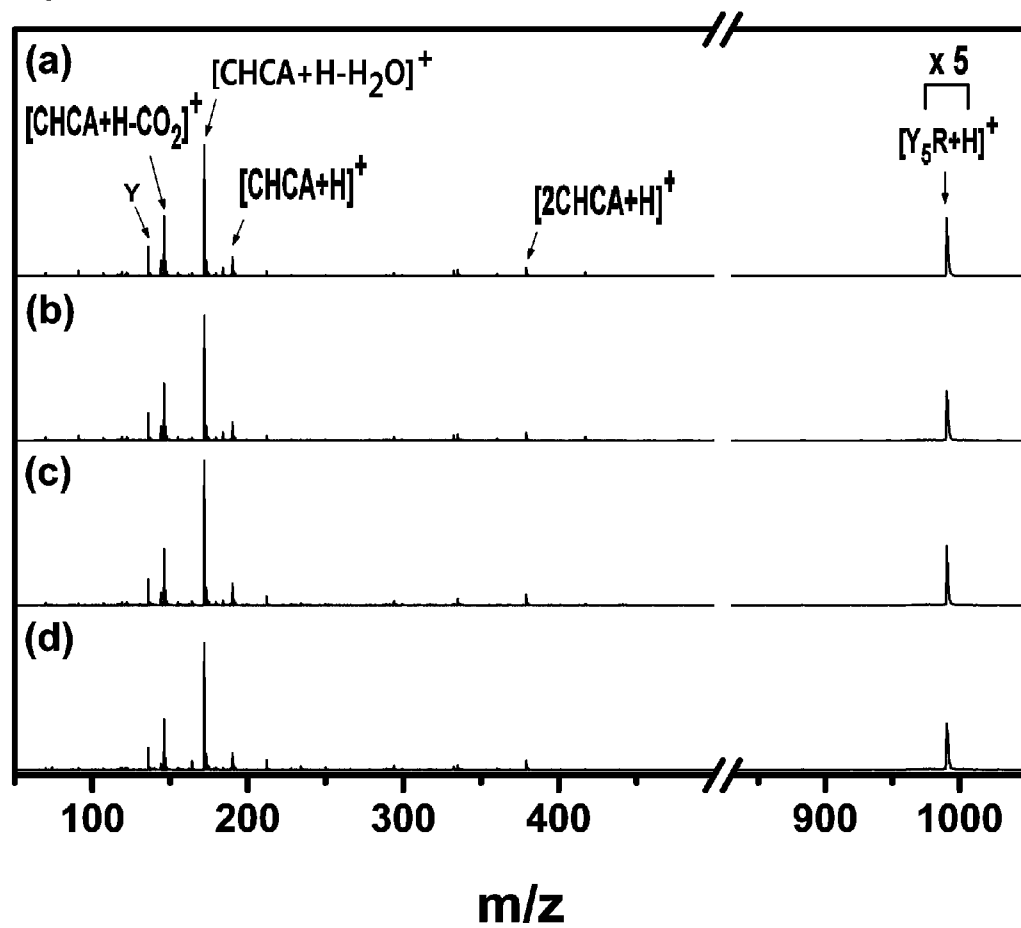
[Fig. 5]



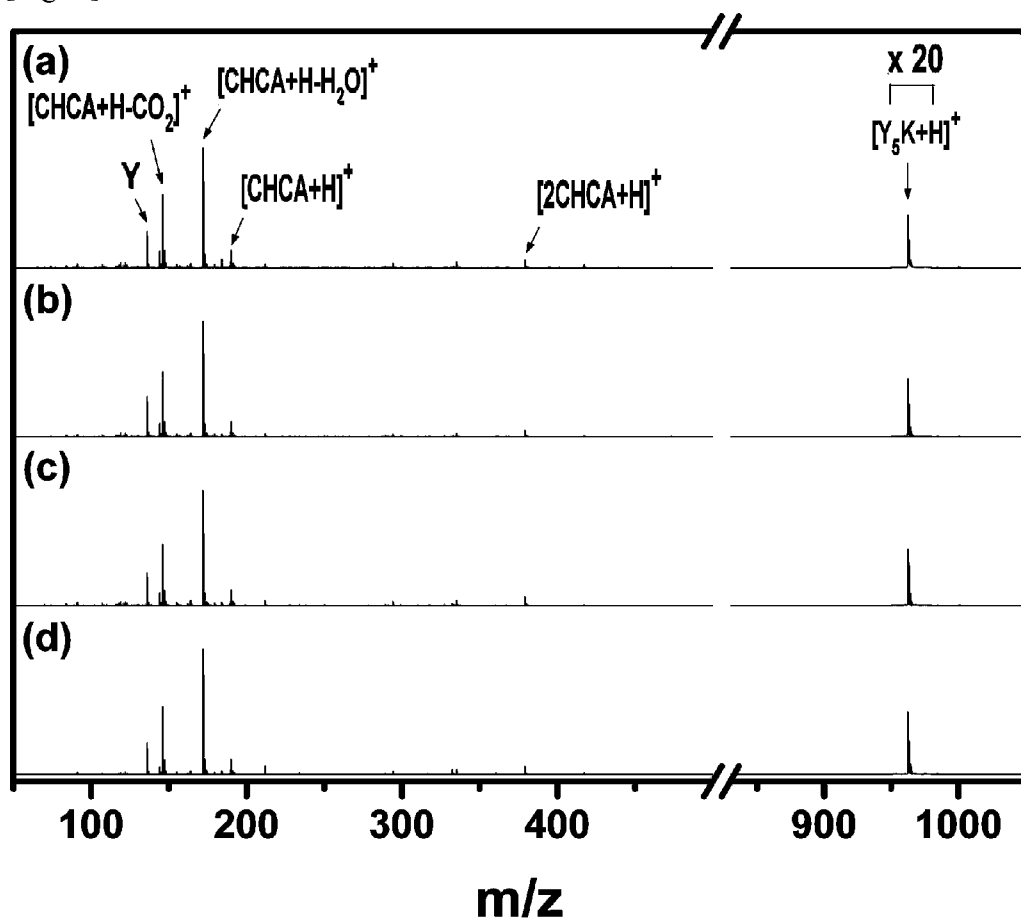
[Fig. 6]



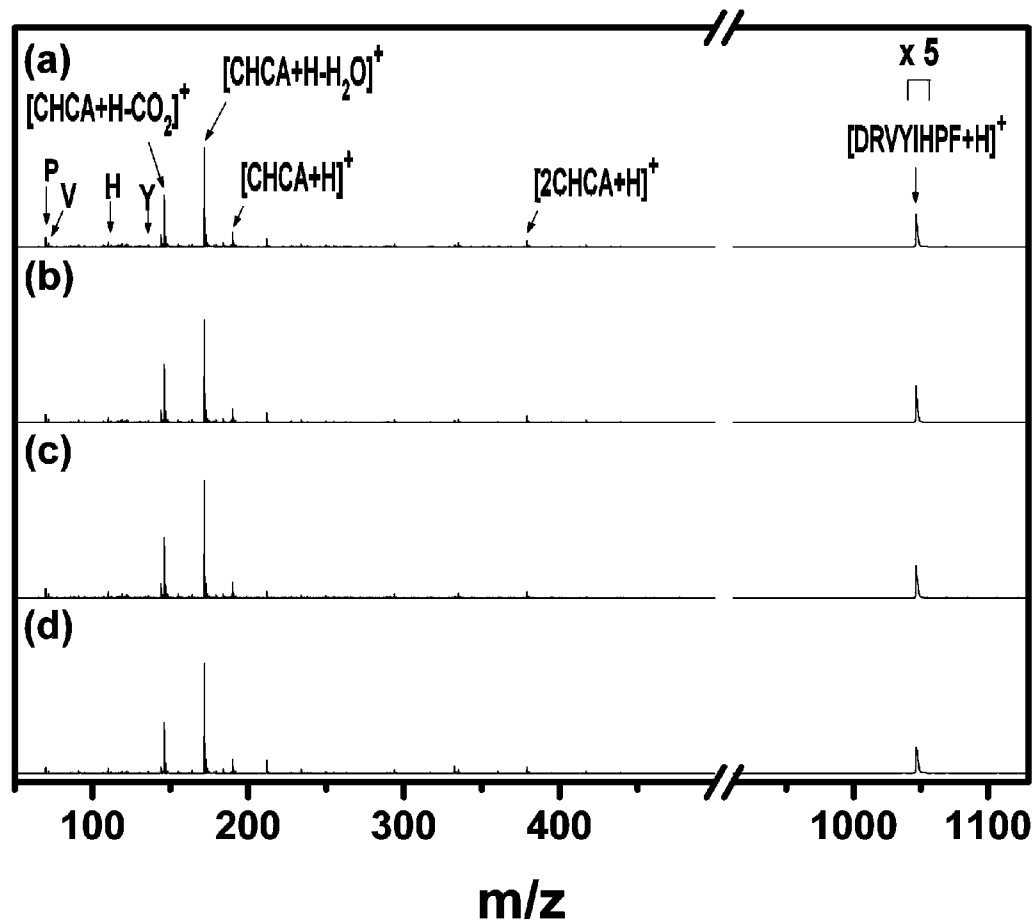
[Fig. 7]



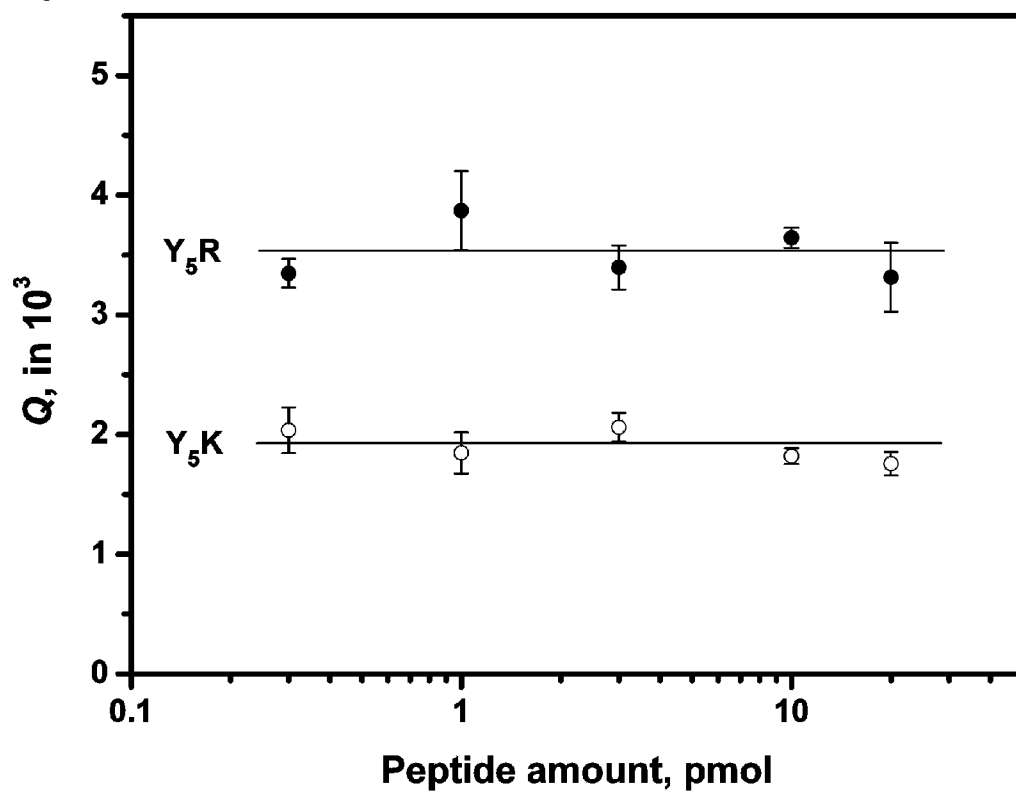
[Fig. 8]



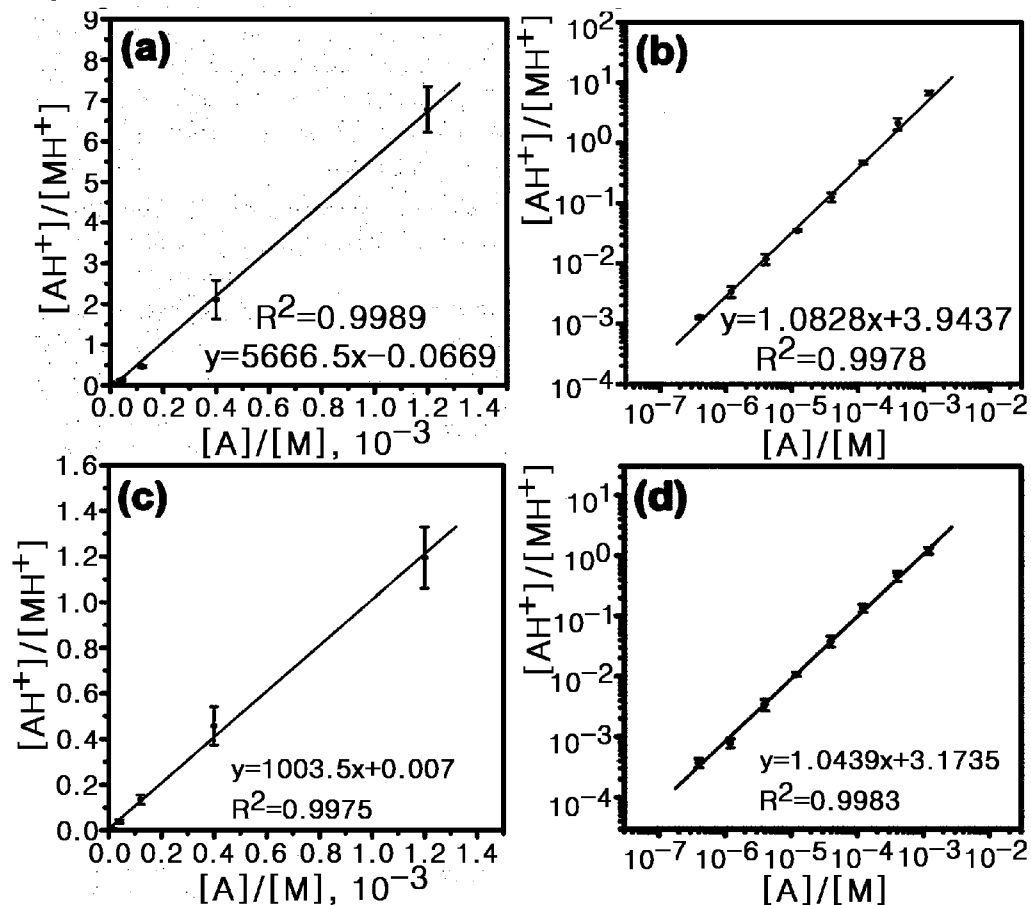
[Fig. 9]



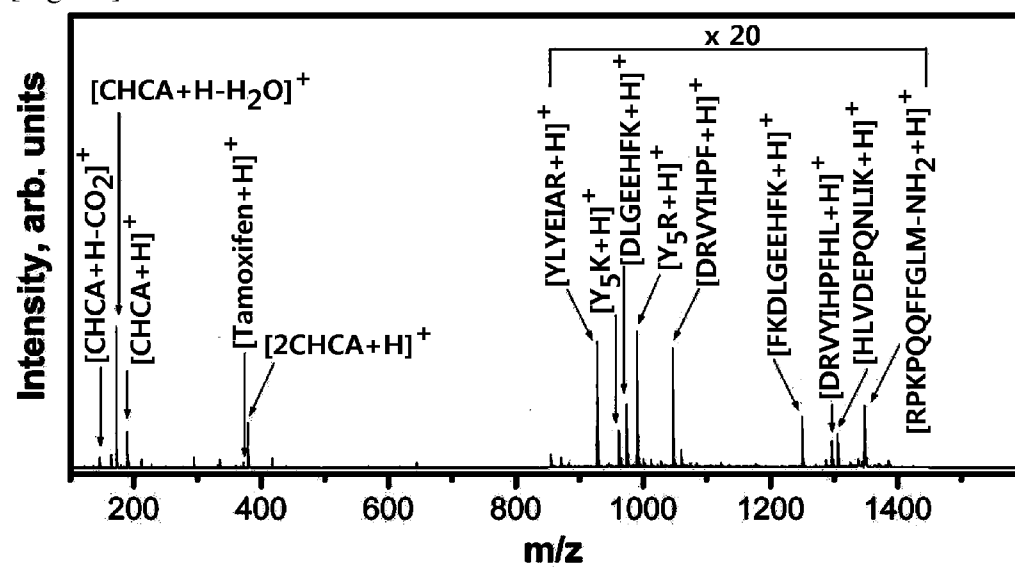
[Fig. 10]



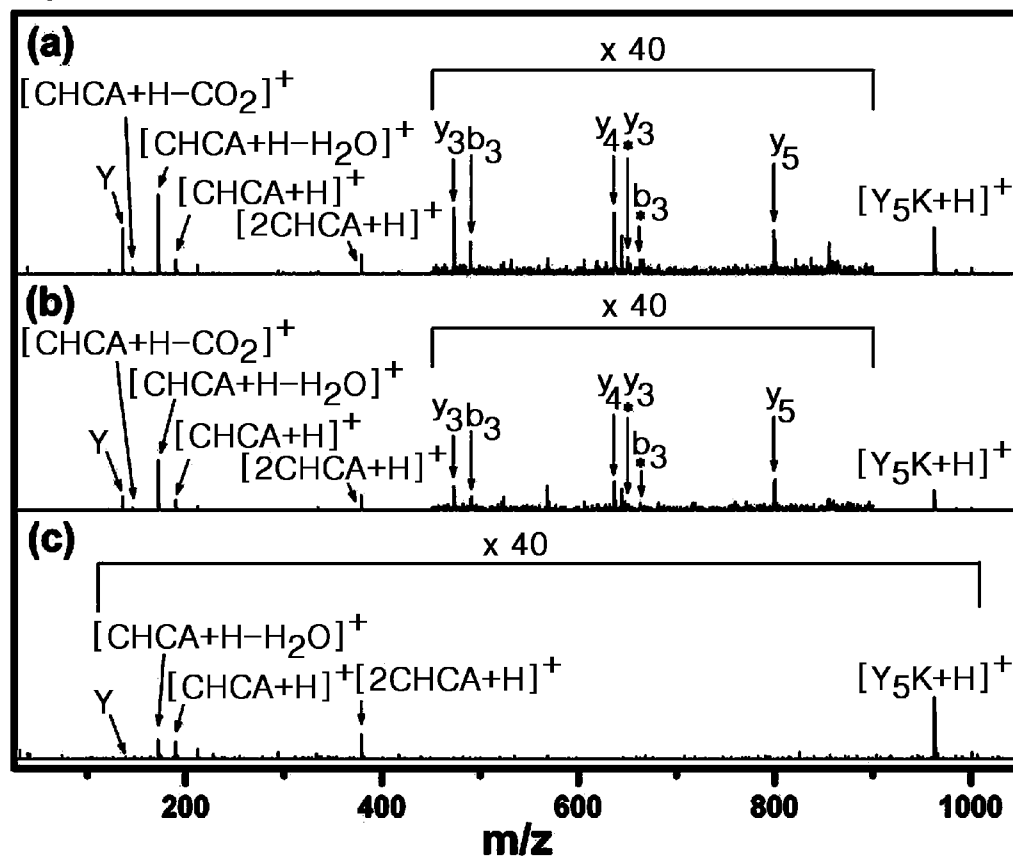
[Fig. 11]



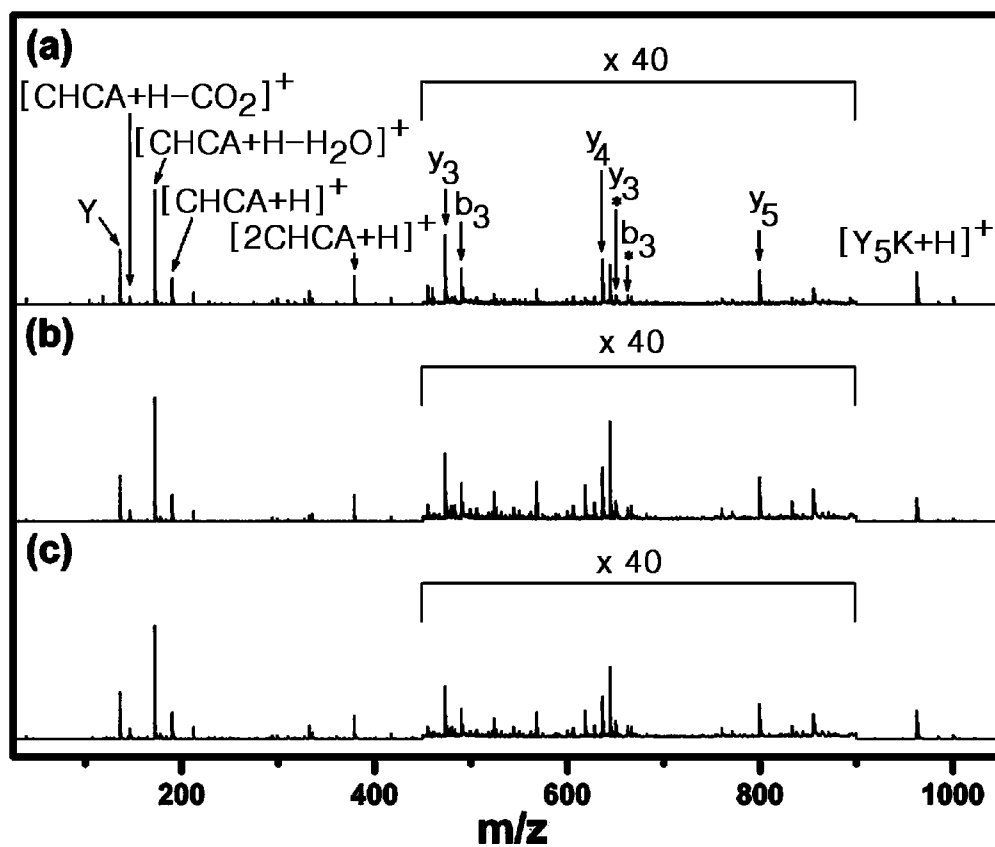
[Fig. 12]



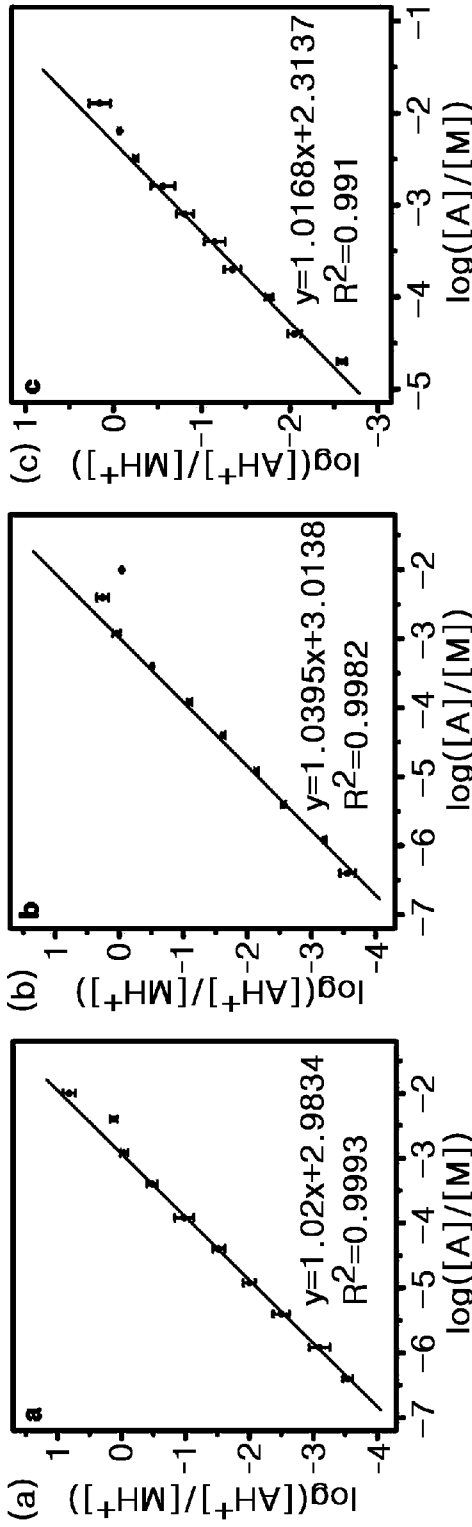
[Fig. 13]



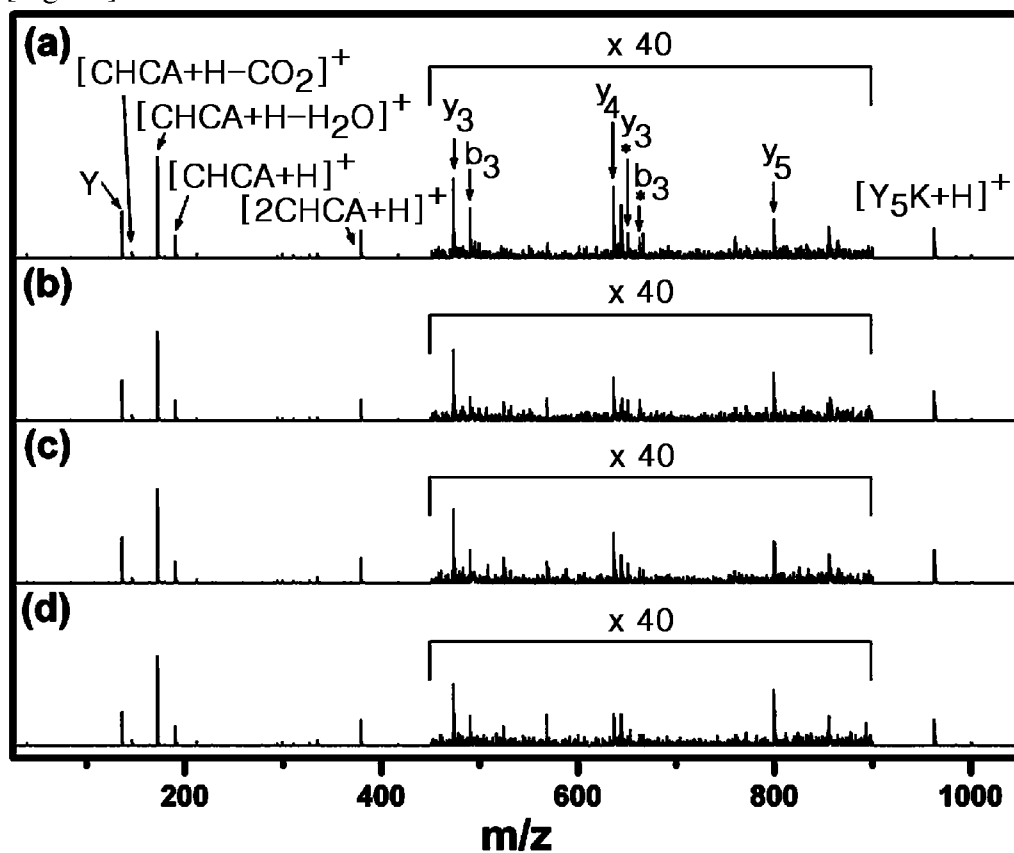
[Fig. 14]



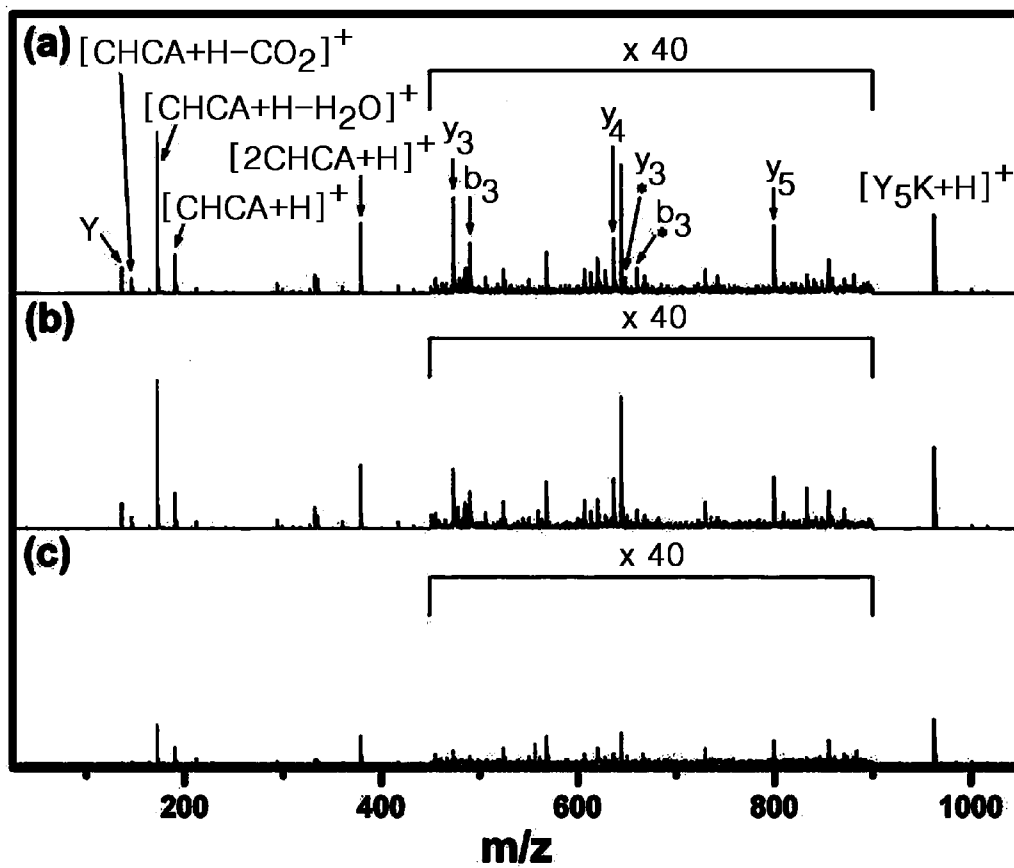
[Fig. 15]



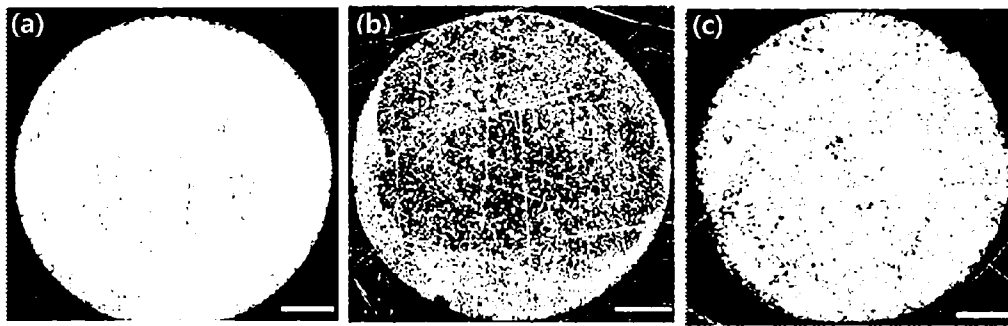
[Fig. 16]



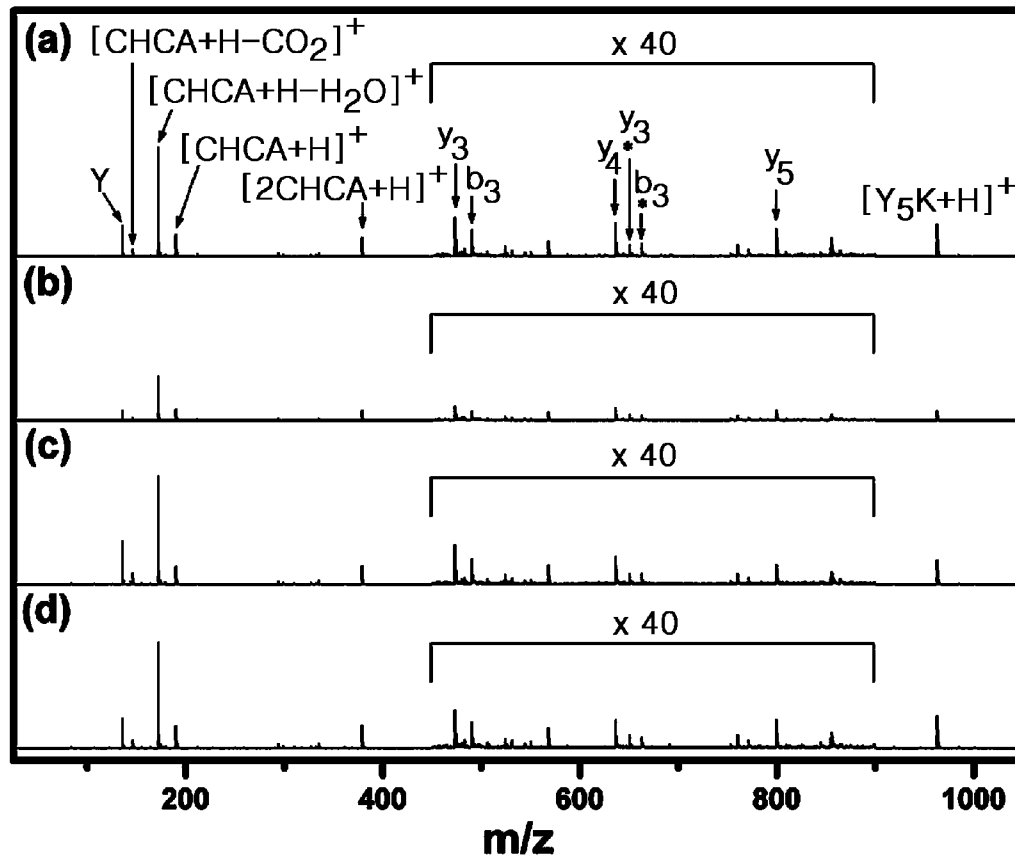
[Fig. 17]



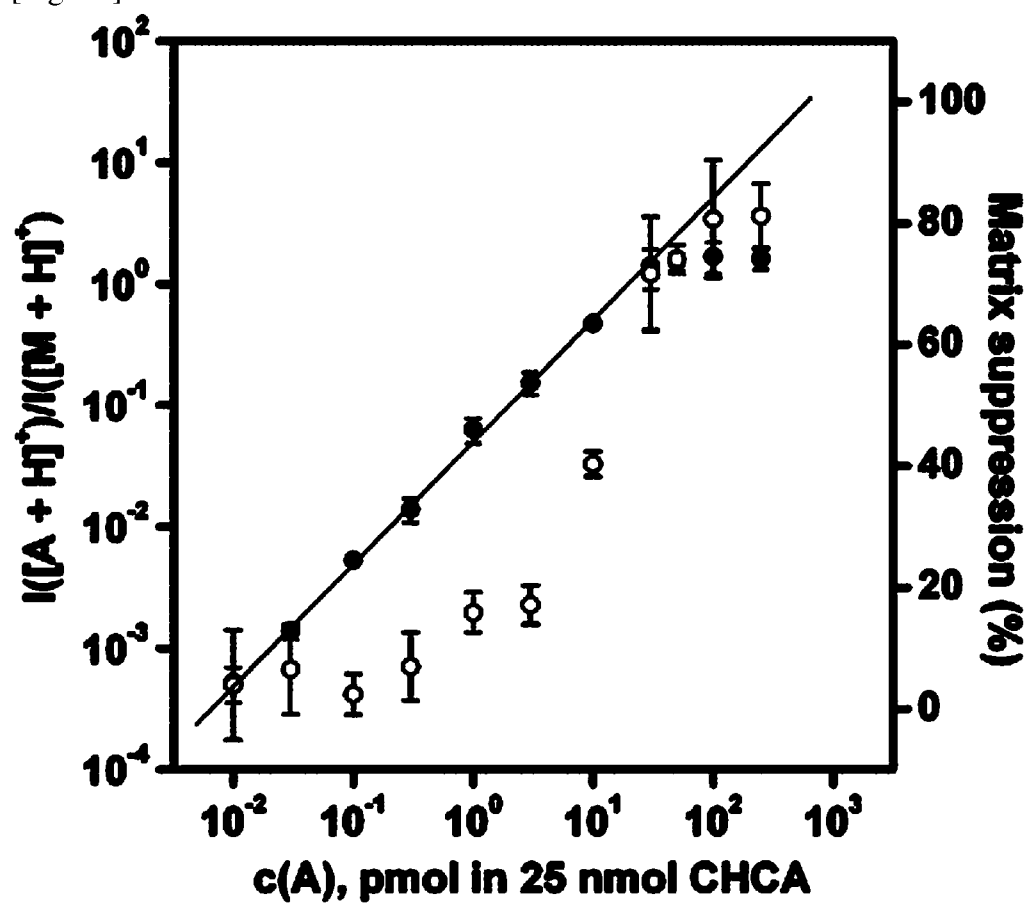
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006406**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 27/26(2006.01)i, H01J 49/26(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 27/26; G01N 30/72; H01J 49/40; G01N 27/62; 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: mass spectrum, ion, reaction temperature, matrix

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-140064 A (SHIMADZU CORP.) 01 June 2006 See abstract, paragraphs [0008]-[0019], claims 1-5 and figures 1-4.	1
A		2-60
A	US 2011-0272573 A1 (KOSTRZEWA et al.) 10 November 2011 See abstract, paragraphs [0035]-[0051], claims 1-17 and figures 1-5.	1-60
A	KR 10-2010-0108020 A (SNU R&DB FOUNDATION) 06 October 2010 See abstract, paragraphs [0011]-[0073], claims 1-16 and figures 1-4.	1-60
A	JP 2926773 B2 (SHIMADZU CORP.) 14 April 1999 See abstract, pages 2-4, claims 1-5 and figures 1-10.	1-60
A	CARDA-BROCH et al., "Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003, vol. 17, pp. 553-560. See abstract and pages 24-37.	1-60



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

06 NOVEMBER 2013 (06.11.2013)

Date of mailing of the international search report

06 NOVEMBER 2013 (06.11.2013)

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/KR2013/006406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2006-140064 A	01/06/2006	JP 4407486 B2	03/02/2010
US 2011-0272573 A1	10/11/2011	DE 102010019857 A1	10/11/2011
		DE 102010019857 B4	09/02/2012
		GB 201107433 D0	15/06/2011
		GB 2483322 A	07/03/2012
KR 10-2010-0108020 A	06/10/2010	NONE	
JP 2926773 B2	28/07/1999	JP 3078652 A	03/04/1991

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 27/26(2006.01)i, H01J 49/26(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/26; G01N 30/72; H01J 49/40; G01N 27/62; 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: 질량 스펙트럼, 이온, 반응 온도, 매트릭스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2006-140064 A (SHIMADZU CORP.) 2006.06.01 요약, 단락 [0008]-[0019], 청구항 1-5 및 도면 1-4 참조.	1
A		2-60
A	US 2011-0272573 A1 (KOSTRZEWA et al.) 2011.11.10 요약, 단락 [0035]-[0051], 청구항 1-17 및 도면 1-5 참조.	1-60
A	KR 10-2010-0108020 A (서울대학교산학협력단) 2010.10.06 요약, 단락 [0011]-[0073], 청구항 1-16 및 도면 1-4 참조.	1-60
A	JP 2926773 B2 (SHIMADZU CORP.) 1999.04.14 요약, 페이지 2-4, 청구항 1-5 및 도면 1-10 참조.	1-60
A	CARDA-BROCH et al., `Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers`, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003, Vol.17, PP.553-560. 요약 및 페이지 24-37 참조.	1-60

☐ 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 11월 06일 (06.11.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 11월 06일 (06.11.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

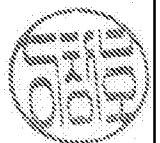
 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이창호

전화번호 +82-42-481-8398



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2006-140064 A	2006/06/01	JP 4407486 B2	2010/02/03
US 2011-0272573 A1	2011/11/10	DE 102010019857 A1	2011/11/10
		DE 102010019857 B4	2012/02/09
		GB 201107433 D0	2011/06/15
		GB 2483322 A	2012/03/07
KR 10-2010-0108020 A	2010/10/06	없음	
JP 2926773 B2	1999/07/28	JP 3078652 A	1991/04/03