

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-134102

(P2013-134102A)

(43) 公開日 平成25年7月8日(2013.7.8)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
**GO 1 N 27/62 (2006.01)** GO 1 N 27/62 V 2 GO 4 1

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2011-283406 (P2011-283406)	(71) 出願人	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(22) 出願日	平成23年12月26日 (2011.12.26)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
		(74) 代理人	100100561 弁理士 岡田 正広
		(72) 発明者	福山 裕子 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
		(72) 発明者	泉 俊輔 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 広島 大学大学院理学研究科内
		Fターム(参考)	2G041 CA01 DA04 FA12 JA07 JA08 JA20

(54) 【発明の名称】 質量分析用マトリックスの添加剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】測定対象分子の修飾を行うことなく、容易に且つ効率よく、質量分析におけるイオン化効率を向上させることができる物質を提供する。

【解決手段】炭素数4～14のアルキルアルコールである質量分析用マトリックスの添加剤。好ましくは、-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、及びシナピン酸からなる群から選ばれる質量分析用マトリックスに添加され、疎水性ペプチドの質量分析に用いられる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

炭素数 4 ~ 14 のアルキルアルコールである質量分析用マトリックスの添加剤。

## 【請求項 2】

- シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸、2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸、及びシナピン酸からなる群から選ばれる質量分析用マトリックスに添加される、請求項 1 に記載の添加剤。

## 【請求項 3】

疎水性ペプチドの質量分析に用いられる、請求項 1 又は 2 に記載の添加剤。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の質量分析用マトリックスの添加剤を用いた質量分析法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、医療及び創薬分野において応用されうる MALDI - MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析) アプリケーションに関する。より具体的には、本発明は、質量分析用マトリックスの添加剤であるアルコールに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 質量分析法において、測定対象分子の効率的なイオン化を実現する条件が探索されている。

例えば、特開 2005 - 326391 号公報 (特許文献 1) に、疎水性ペプチドを予め 2 - ニトロベンゼンスルフェニル基によって修飾し、- シアノ - 3 - ヒドロキシケイ皮酸 (3-CHCA)、3 - ヒドロキシ - 4 - ニトロ安息香酸 (3H4NBA)、又はそれらの混合物をマトリックスとして用いた質量分析を行うことで、一般的マトリックスである - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸 (4-CHCA) や 2, 5 - ジヒドロ安息香酸 (DHB) に比べ、疎水性ペプチドを効率よくイオン化する方法が記載されている。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

【特許文献 1】特開 2005 - 326391 号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

上記の MALDI 質量分析法においては、測定対象分子の修飾が行われる場合にはある程度のイオン化促進効果が得られるが、修飾が行われない場合には、イオン化効率は十分でない。

このように、特に疎水性ペプチドのような MALDI イオン化が難しい分子種は、従来の方法によってもイオン化効率が低いという問題がある。

本発明の目的は、測定対象分子の修飾を行うことなく、容易に且つ効率よく、質量分析におけるイオン化効率を向上させることができる物質を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本発明者らは鋭意検討の結果、特定のアルコールが、マトリックスとしては機能しないが、マトリックスの添加剤として用いられることによって本発明の目的を達成することができるものであることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】

本発明は、以下の発明を含む。

(1)

10

20

30

40

50

炭素数 4 ~ 14 のアルキルアルコールである質量分析用マトリックスの添加剤。

好ましくは、前記アルキルアルコールの炭素は、8 ~ 14、より好ましくは 8 ~ 10 である。

好ましくは、前記アルキルアルコールは、直鎖アルコールである。

好ましくは、前記アルキルアルコールは、第一級アルコールである。

(2)

- シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸、2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸、及びシナピン酸からなる群から選ばれる質量分析用マトリックスに添加される、(1)に記載の添加剤。

(3)

疎水性ペプチドの質量分析に用いられる、(1)又は(2)に記載の添加剤。

(4)

(1) ~ (3)のいずれかに記載の質量分析用マトリックスの添加剤を用いた質量分析法。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、測定対象分子(特に疎水性ペプチド)のイオン化効率を向上させることができるマトリックス添加剤を提供することができる。

本発明により、測定対象分子(特に疎水性ペプチド)の質量分析測定による検出感度向上を達成することができる。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明は、質量分析用マトリックスの添加剤として用いられるアルキルアルコールである。アルキルアルコールの炭素数は4以上、好ましくは4 ~ 14、より好ましくは8 ~ 14、さらにより好ましくは8 ~ 10である。アルキルアルコールのアルキル基部分は、直鎖及び分岐鎖であることを問わない。アルキルアルコールは、第一級アルコールであることが好ましいが、第二級アルコール及び第三級アルコールであってもよい。本発明においては、例えば質量分析対象が疎水性化合物である場合、アルキルアルコールは、疎水性度がより高いものがより好ましい傾向にある。

【0009】

本発明のアルコールは、単独では測定対象のイオン化能力はないため、マトリックスとしては機能しない。しかしながら、マトリックスと混合して使用されることによって、マトリックスによる測定対象のイオン化能力を増強し、検出限界の向上を図ることができる。

【0010】

本発明の添加剤と共に使用されるマトリックスとしては特に限定されない。一般的なマトリックスから当業者によって適宜選択されてよいが、例えば、-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、2, 5-ジヒドロ安息香酸、及びシナピン酸からなる群から選ばれることができる。

【0011】

本発明の添加剤を用いる質量分析対象は特に限定されない。例えば、分子量が500 ~ 30000、好ましくは1000 ~ 10000の分子でありうる。好ましくは、質量分析対象は疎水性物質である。疎水性物質の疎水性の程度としては特に限定されるものではなく、様々な公知の疎水性指標や疎水性度算出法に基づいて当業者によって適宜決定することができる。例えば、疎水性物質の疎水性の程度は、当業者がBBインデックス(Bull and Breese Index)によって疎水性と判断しうる程度であればよい。より具体的には、BBインデックスは例えば1000以下、好ましくは-1000以下でありうる。

【0012】

本発明においては、特に疎水性ペプチド(本発明においては、ペプチドにはタンパク質も含まれる)のイオン化能増強効果が高い。具体的には、ペプチドを構成するアミノ酸に

10

20

30

40

50

、より疎水性度の高いアミノ酸残基を、より多く含むものである。例えば疎水性アミノ酸としては、イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、トリプトファン、グリシンなどが挙げられる。また、システイン、チロシンなどを含むこともある。

#### 【0013】

本発明の添加剤とマトリックスとの組み合わせの比率は特に制限はないが、例えば以下のような量的関係で組み合わせることができる。

例えば、添加剤を質量分析用マトリックスの0.01~50倍、好ましくは0.01~1倍のモル比で組み合わせることができる。

#### 【0014】

本発明の添加剤は、通常、マトリックスとの混合溶液に調製される。マトリックスと添加剤との混合溶液は、通常、マトリックス溶液と添加剤溶液とをそれぞれ調製しておき、両溶液を混合することによって調製することができる。溶媒としては、例えば、アセトニトリル-TFA(トリフルオロ酢酸)水溶液、アセトニトリル水溶液、TFA水溶液などを用いることができる。アセトニトリル-TFA水溶液におけるアセトニトリルの濃度は例えば10~90体積%であり、トリフルオロ酢酸の濃度は例えば0.05~1体積%でありうる。

#### 【0015】

添加剤は、例えば、0.5~50mg/ml、好ましくは5~10mg/ml、例えば5mg/mlの溶液に調製することができる。マトリックスは、例えば、1mg/ml~飽和濃度、好ましくは1~10mg/ml、例えば10mg/mlの溶液に調製することができる。これら添加剤溶液及びマトリックス溶液は、例えば、10:1~1:10、10:1~1:1又は1:1~1:10、例えば1:10の体積比で混合することができる。

#### 【実施例】

#### 【0016】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

#### [実施例1]

本実施例においては、長鎖アルコールを、マトリックスである -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)の添加剤として用い、疎水性ペプチド(Humanin;BBインデックスは-5800)の測定を行った。長鎖アルコールとしては、1-オクタノール(C8-OH)、1-デカノール(C10-OH)、1-ドデカノール(C12-OH)及び1-テトラデカノール(C14-OH)を用いた。比較用として、従来のマトリックスCHCAを単独で用いた測定も行った。

#### 【0017】

(1)4-CHCA 10mg/mL (50%ACN/0.05%TFA water(%は体積を基準とする。以下において同様)と、長鎖アルコール(50%ACN/0.05%TFA water)とを1/10(v/v)で混合した。得られたマトリックス溶液を、それぞれ、C8-OH/CHCA(1/10)、C10-OH/CHCA(1/10)、C12-OH/CHCA(1/10)、及びC14-OH/CHCA(1/10)と記載する。

(2)疎水性ペプチドのHumanin 20a~2pmol/ $\mu$ L (50%ACN/0.05%TFA water)溶液を作成した。

(3)MALDIプレ-ト上に(2)の試料溶液と(1)のマトリックス溶液それぞれとを0.5 $\mu$ Lずつ滴下し混合した(on-target mix法)。

(4)AXIMA Performance (島津製作所)のリニアTOF、ポジティブ及びネガティブモードで計測した。

#### 【0018】

#### (比較用)

(1)CHCAの10 mg/mL (50%ACN/0.05%TFA water)溶液を作成した。

(2)疎水性ペプチドHumaninの20a~2pmol/ $\mu$ L 50%ACN/0.05%TFA waterを作成した。

(3)MALDIプレ-ト上に(2)の試料溶液と(1)のマトリックス溶液とを0.5 $\mu$ Lずつ滴下し混合した(on-target mix法)。

10

20

30

40

50

(4) AXIMA Performance (島津製作所)のリニアTOF、ポジティブ及びネガティブモードで計測した。

【0019】

CHCA単独で使用した場合に比べ、長鎖アルコールを添加剤として使用することにより、ポジティブ(pos)及びネガティブ(neg)の両モードで、感度向上が確認された。特に、C8-OH/CHCA(1/10)及びC10-OH/CHCA(1/10)を用いた場合は検出限界(fmol/well)が1/10となり、すなわち10倍の感度向上効果が確認された(表1)。

【0020】

【表1】

	検出限界(fmol/well)	
	Humanin	
	pos	neg
C14-OH/CHCA (1/10)	1	10
C12-OH/CHCA (1/10)	1	10
C10-OH/CHCA (1/10)	0.1	10
C8-OH/CHCA (1/10)	0.1	10
CHCA	1	10

10

20