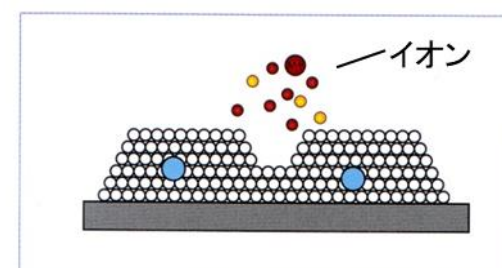
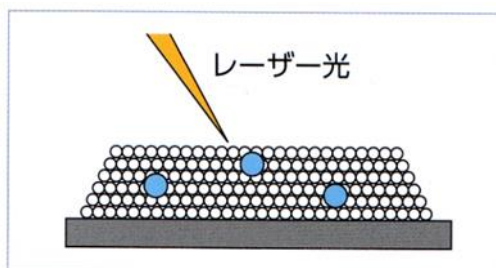
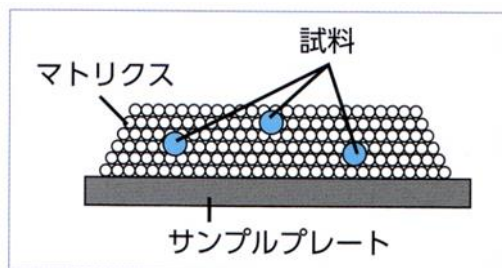


# MALDI-MSの基礎



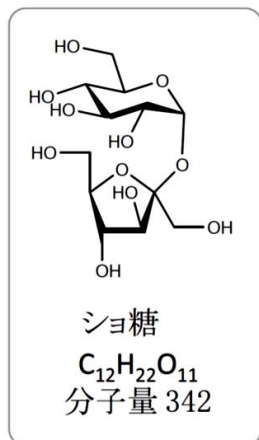
# Contents

- 質量分析
- MALDI/TOFMSの原理
- MALDI/TOFMSによるマススペクトル測定例
- 高分子試料のマススペクトル測定に影響する主因子
- 高分解能測定

# 質量分析



分子量を測定すること



質量

分子の数

電子天秤で秤量

1.00 g

$1.76 \times 10^{21}$  個



可能

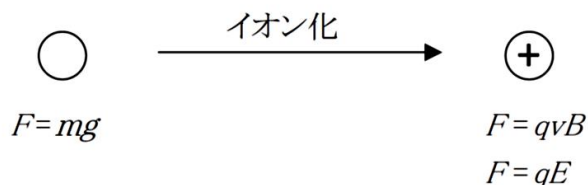


$5.7 \times 10^{-22}$  g

1 個



不可能



粒子にかかる力は大きくできない ( $m, g$  が一定)。

磁場や電場を大きくすることで粒子にかかる力を大きくできる。

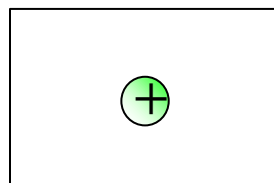
$F$ , 力;  $m$ , 質量;  $g$ , 重力加速度;  $q$ , 電荷;  $v$ , 速度;  $B$ , 磁場強度;  $E$ , 電場強度

分子(イオン)を独立させる ⇒ 真空中への気化・脱離

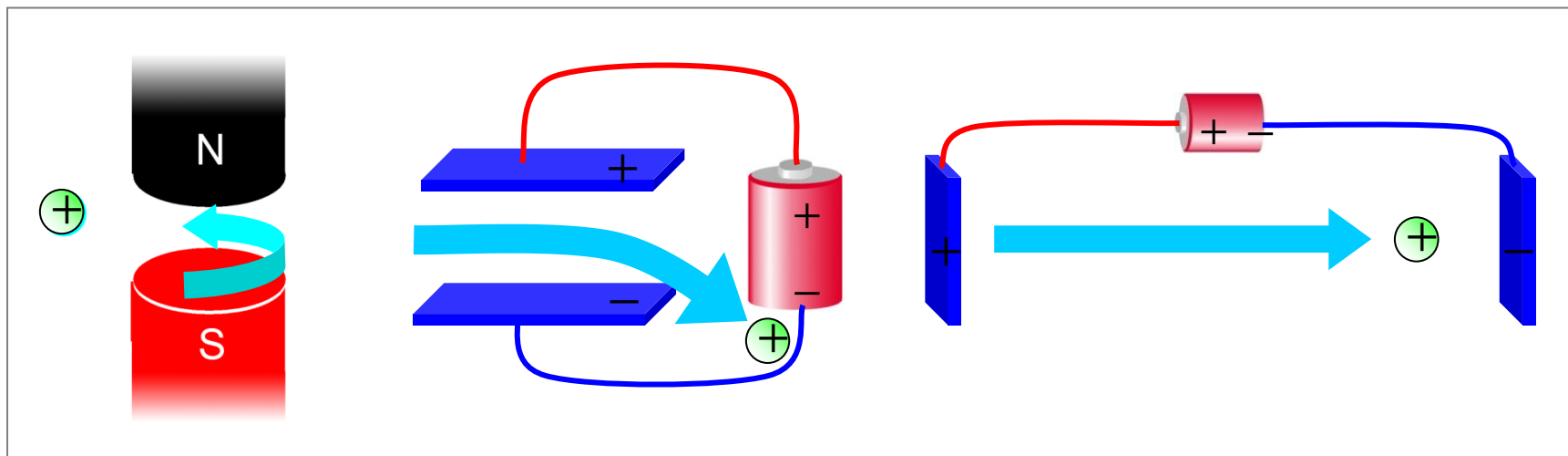
分子に印をつける ⇒ 分子への電荷付与(イオン化)

# 質量分析

真空中のイオン



磁場や電場



イオンの運動



イオンの電荷数あたりの質量 ( $m/z$ )

# イオン化と質量分離

## イオン化法

- ・ 電子イオン化 (EI) 法
- ・ 化学イオン化 (CI) 法
- ・ 電界脱離 (FD) 法
- ・ 高速原子衝撃 (FAB) 法
- ・ エレクトロスプレーイオン (ESI) 法
- ・ 大気圧化学イオン化 (APCI) 法
- ・ フォトスプレーイオン化 (PSI) 法



試料に合わせて選択

(沸点、極性、熱安定性、分子量など)

## 質量分離法 (質量分析法)

- ・ 磁場・電場 (セクター) 型  
二重収束型
- ・ 四重極 (Q) 型  
イオントラップ型
- ・ オービトラップ型
- ・ 飛行時間 (Time-Of-Flight: TOF) 型
- ・ イオンサイクロトロン共鳴 (ICR) 型



得られる結果の質に合わせて選択

(分解能、ダイナミックレンジなど)

# Contents

- 質量分析
- MALDI/TOFMSの原理
- MALDI/TOFMSによるマススペクトル測定例
- 高分子試料のマススペクトル測定に影響する主因子
- 高分解能測定

# MALDI/TOFMS

イオン化法 質量分離法

(Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry)

マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

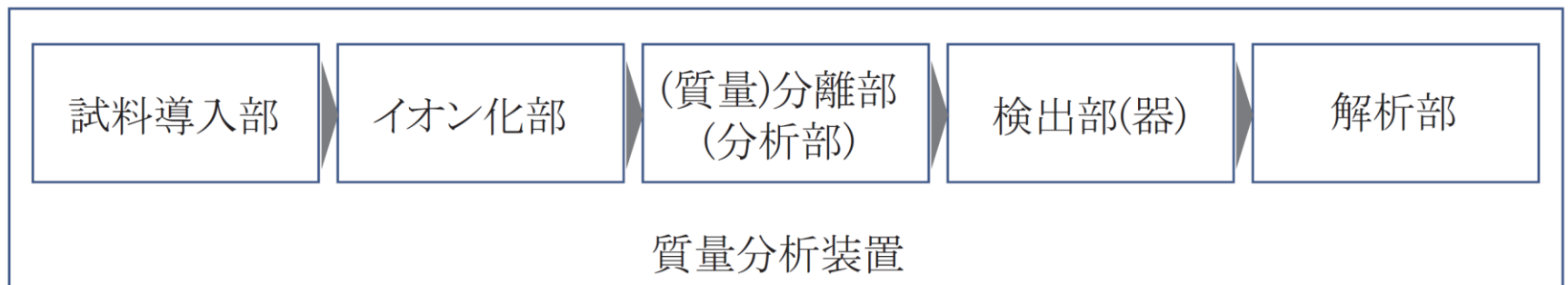
キーワード: マトリクス

レーザーイオン化

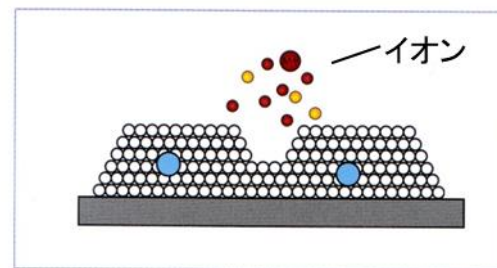
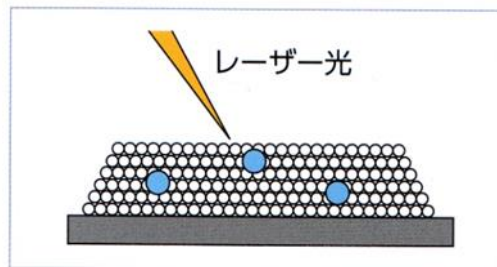
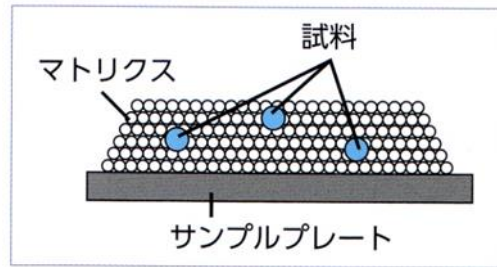
飛行時間型



測定のための重要因子



# MALDI (マトリクス支援レーザー脱離イオン化)



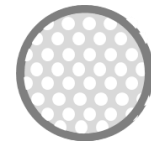
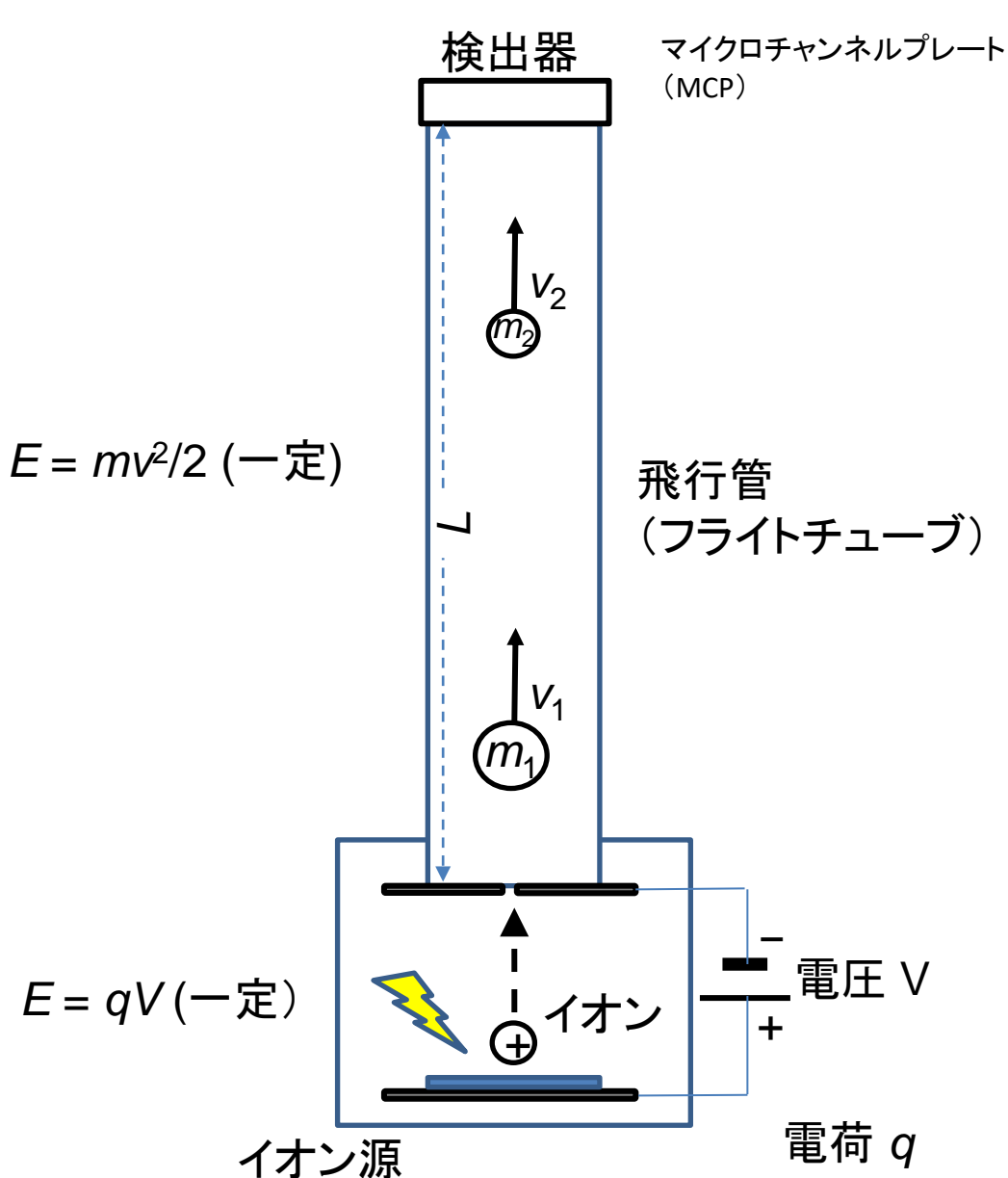
真空中

パルスレーザー光照射

アブレーション



# Time-Of-Flight (TOF, 飛行時間型)



1つ1つが光電子増倍管  
(フォトマルチプライヤー)

$$E = qV = mv^2/2$$

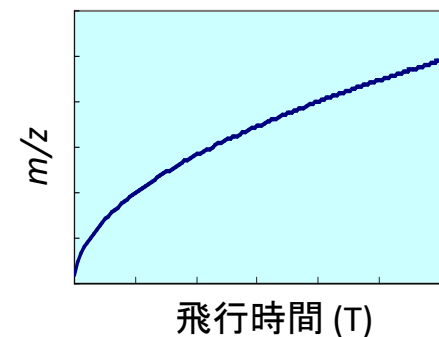
$$v^2 = 2V q/m$$

$$v^2 = \frac{2V}{m/z}$$

$v = L/T$ なので

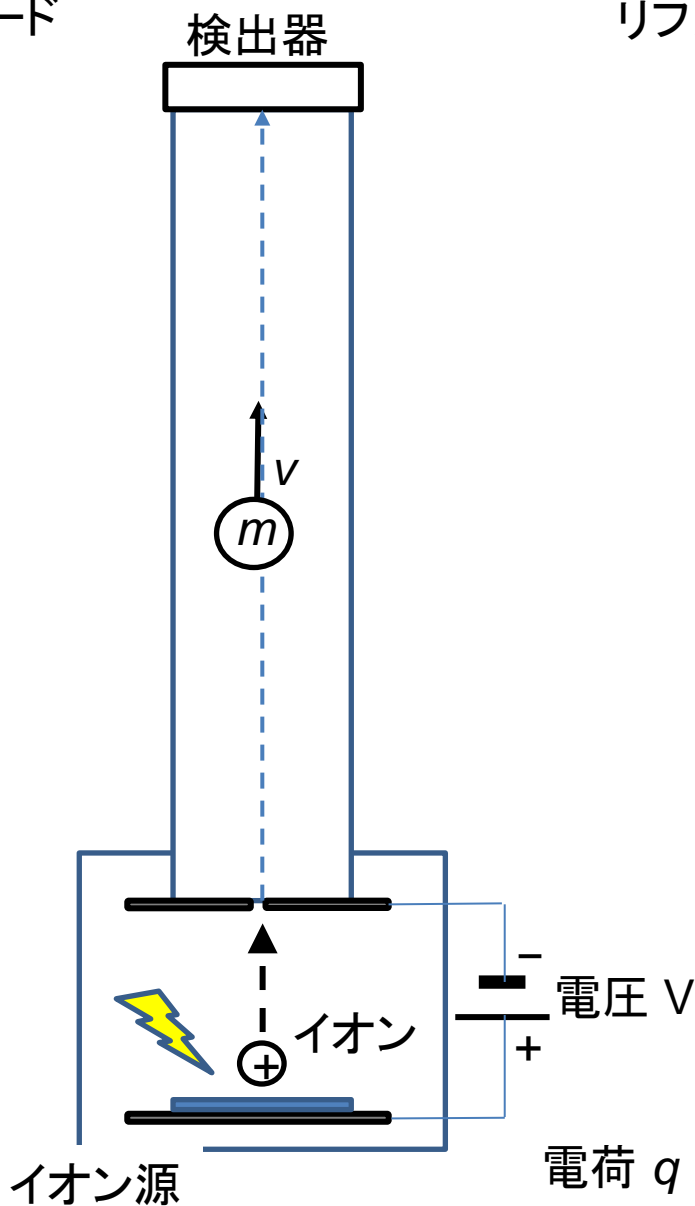
$$T = k L (m/z V)^{1/2}$$

( $k$ は定数)

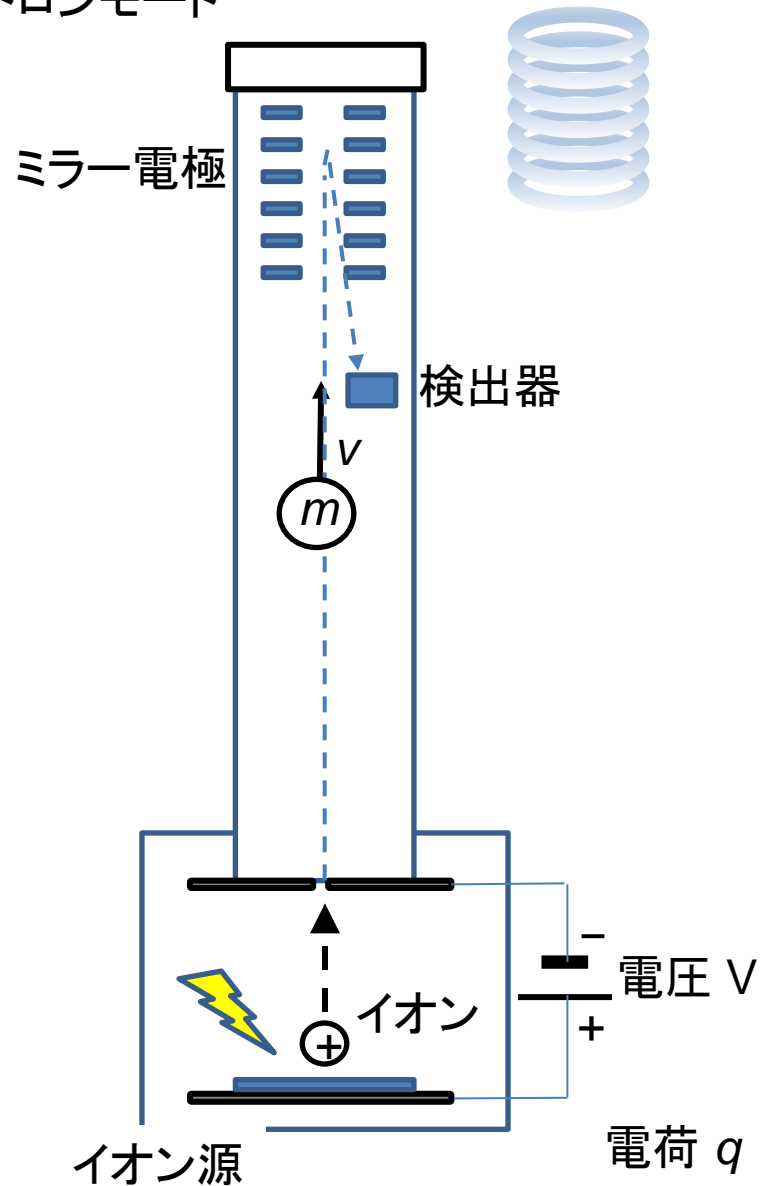


# Time-Of-Flight (TOF, 飛行時間型)

リニアモード

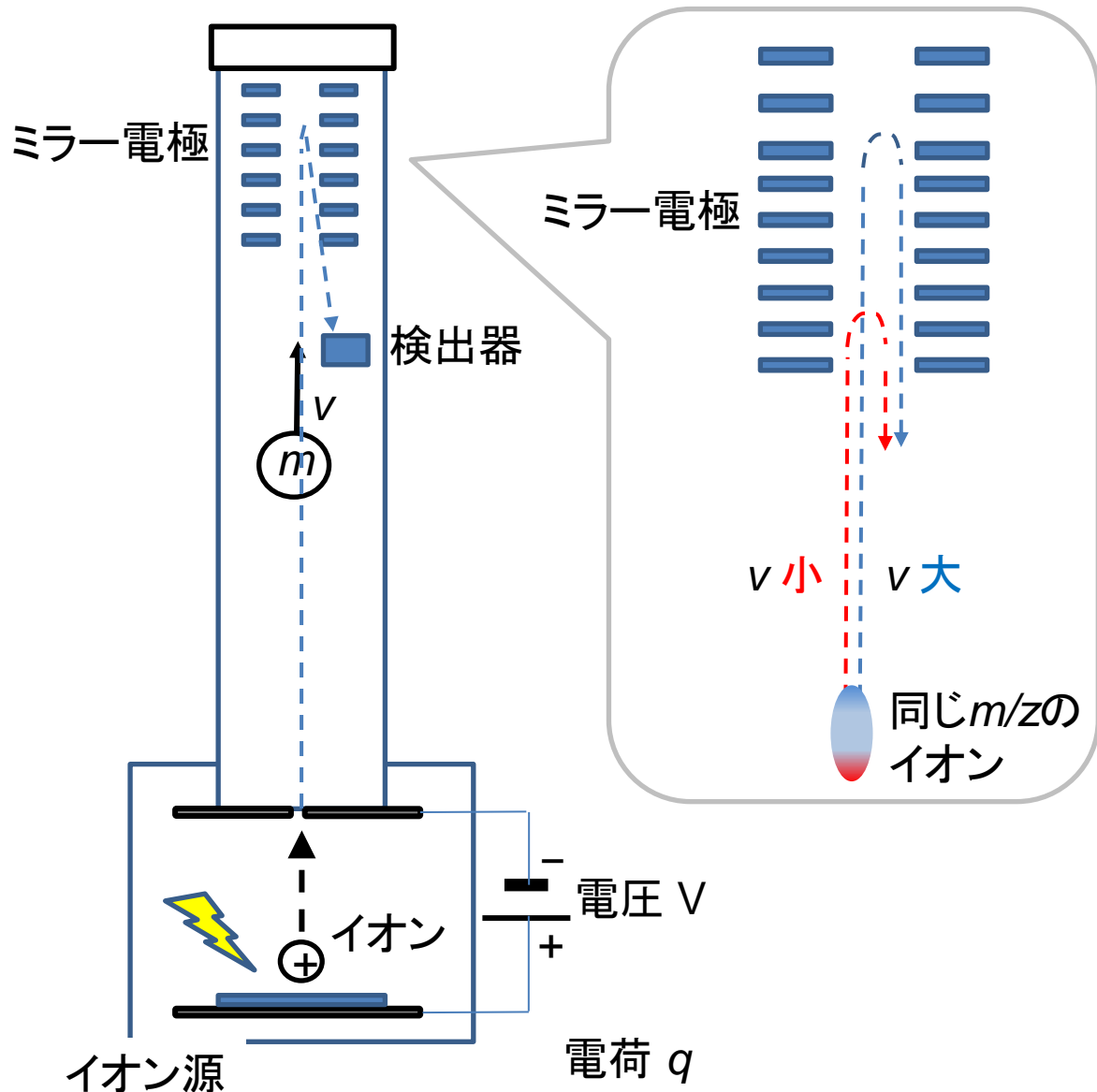


リフレクトロンモード



# Time-Of-Flight (TOF, 飛行時間型)

リフレクトロンモード



リニアモードに比べて  
分解能が大きく向上する

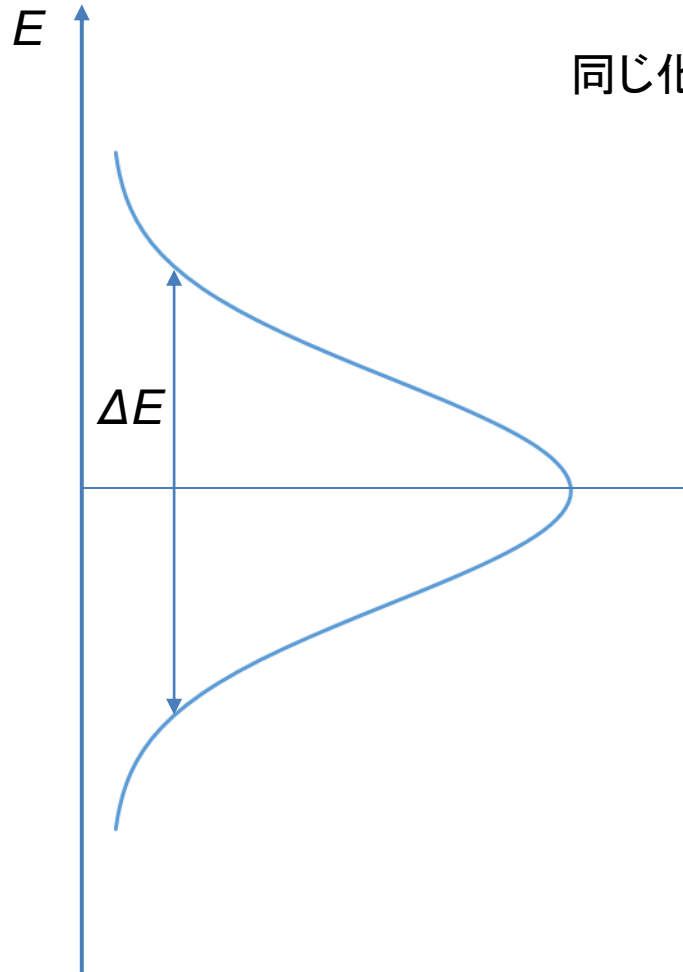


- ・ミラー電極（静電場電極）で同一  $m/z$  のイオンの速度 ( $v$ ) 分布を小さくできる
- ・3つのイオン運動で質量分離
- ・飛行距離が長くなる

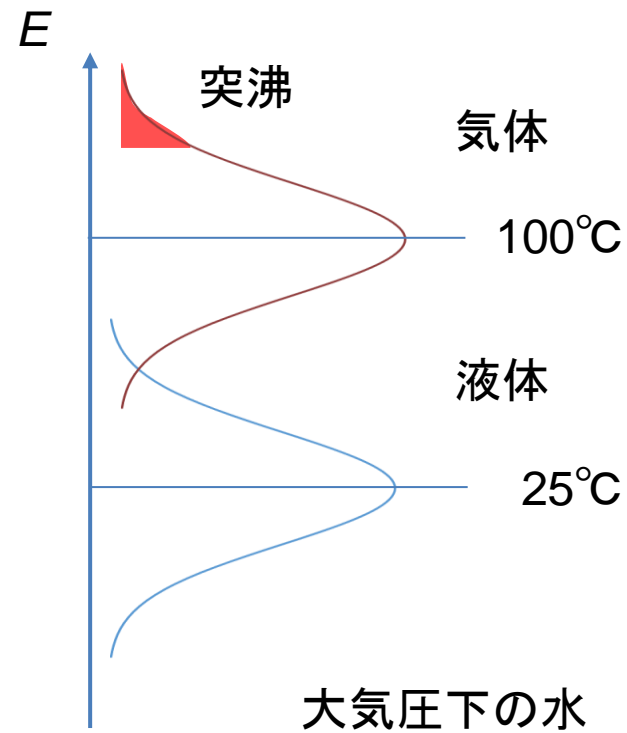
リニアモードに比べて  
感度が小さくなる

高分解能測定で使用

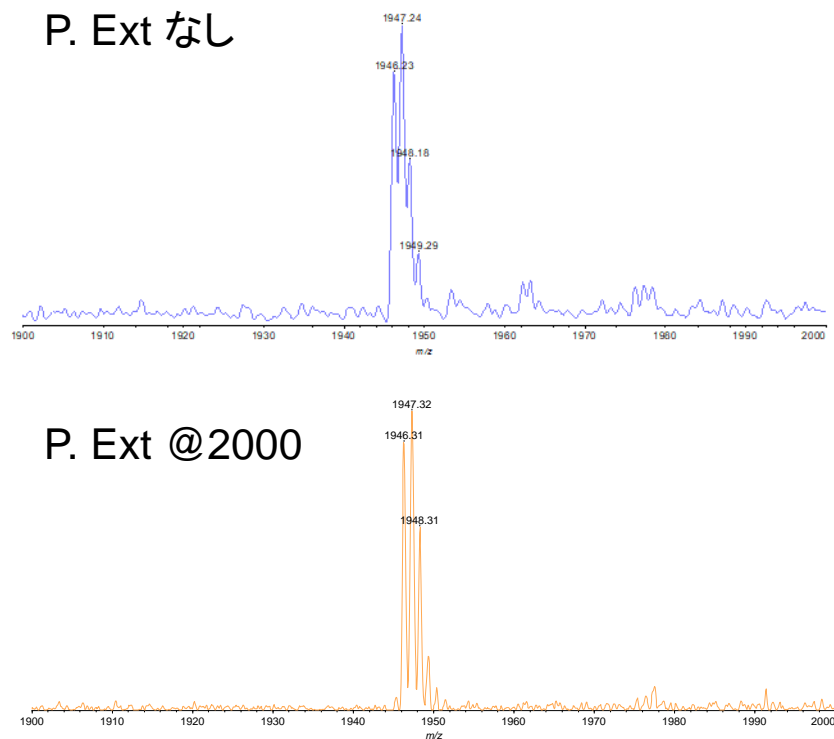
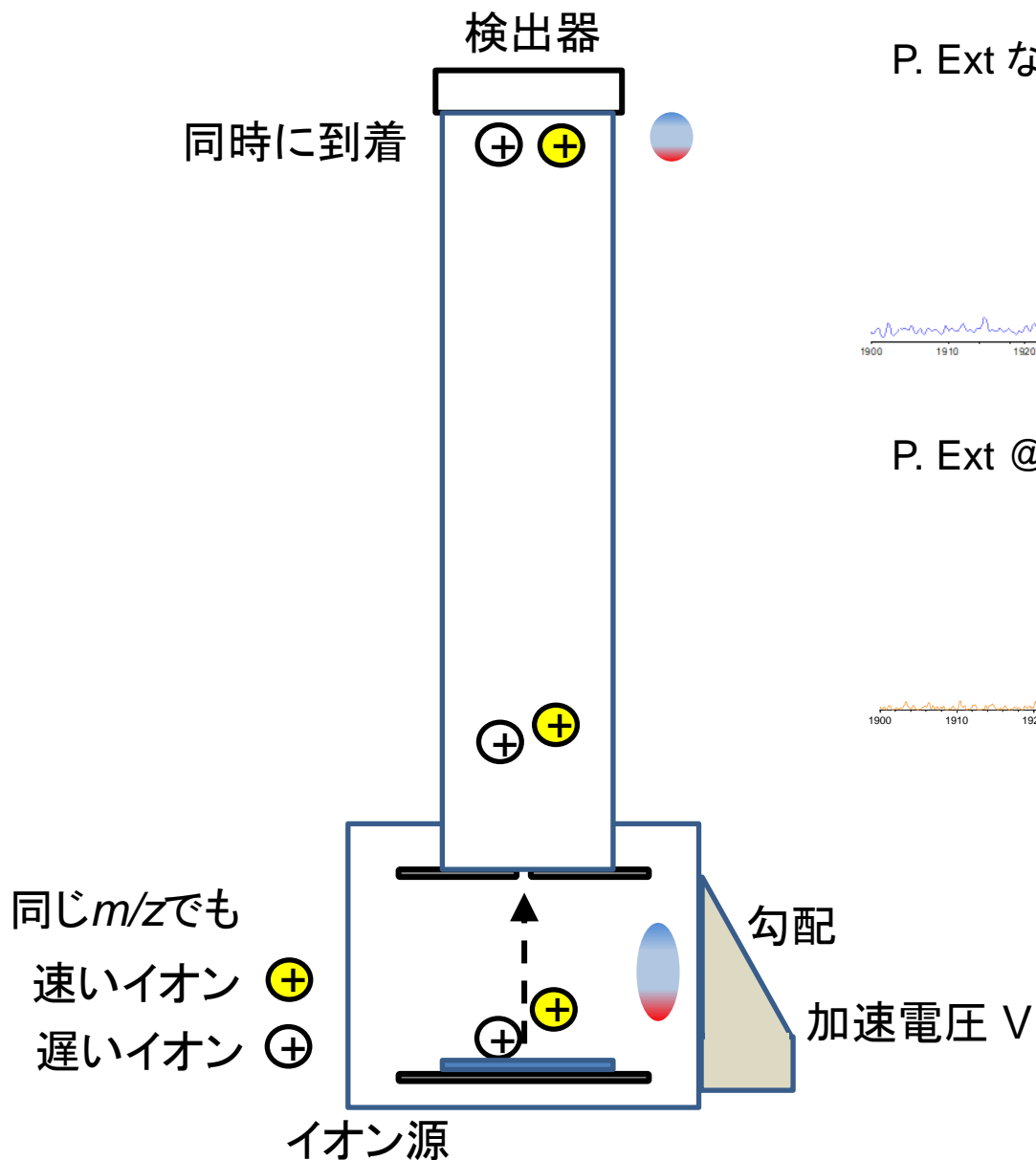
# エネルギー分布



同じ化合物であってもエネルギーには分布がある



# Pulsed Extraction



質量領域は限定されるが  
リニアモードでも

分解能が向上

# MALDI/TOF-MSでわかること、その利点

MALDI/TOFMSでわかること

試料成分の分子量

(試料成分の構造情報) → PSD測定 MS/MS測定

MALDI/TOFMSの利点(特徴)

試料調製が簡単

夾雑物の影響が小さい

イオン化に関わる因子が少ない

感度が高い

分解能が高い

測定範囲が広い



バイオ(食品・医薬品など)、合成ポリマー(プラスチック・添加剤など)、有機機能材料(有機EL材料、界面活性剤、分子認識材料など)幅広い分野で活用できる

# MALDI/TOFMS

イオン化法 質量分離法

(Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry)

マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

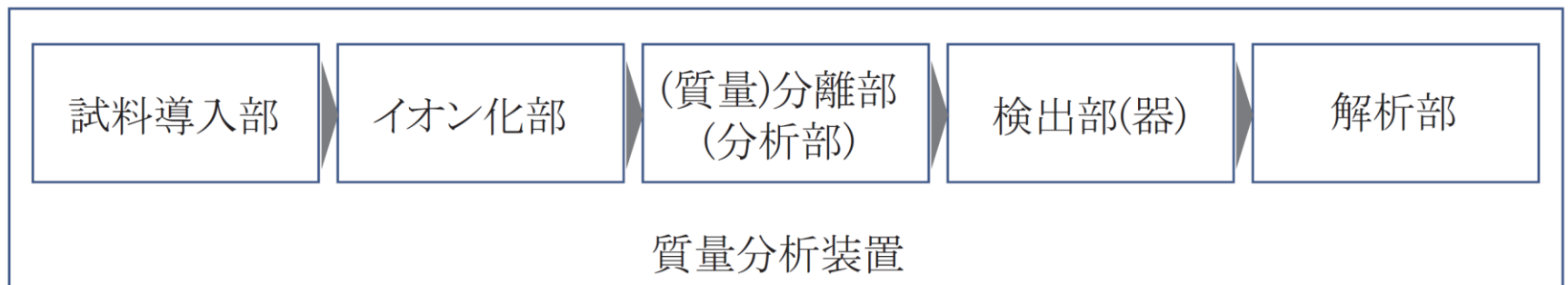
キーワード: マトリクス

レーザーイオン化

飛行時間型



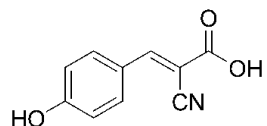
測定のための重要因子



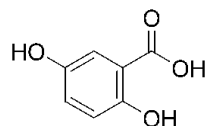
# MALDI/TOF-MSの重要な因子

## 1. マトリクスの選定

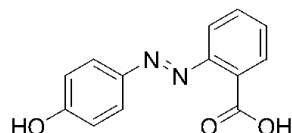
試料に適したマトリクスを探す必要



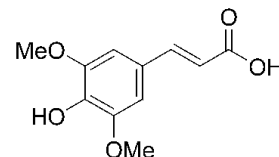
CHCA



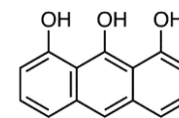
DHBA



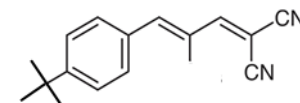
HABA



SA

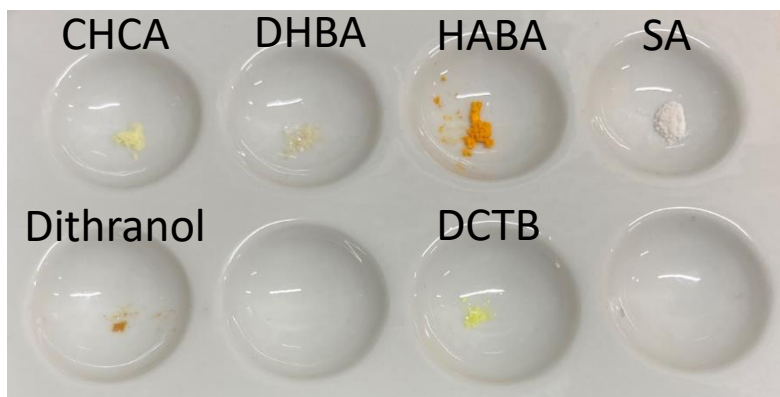


Dithranol

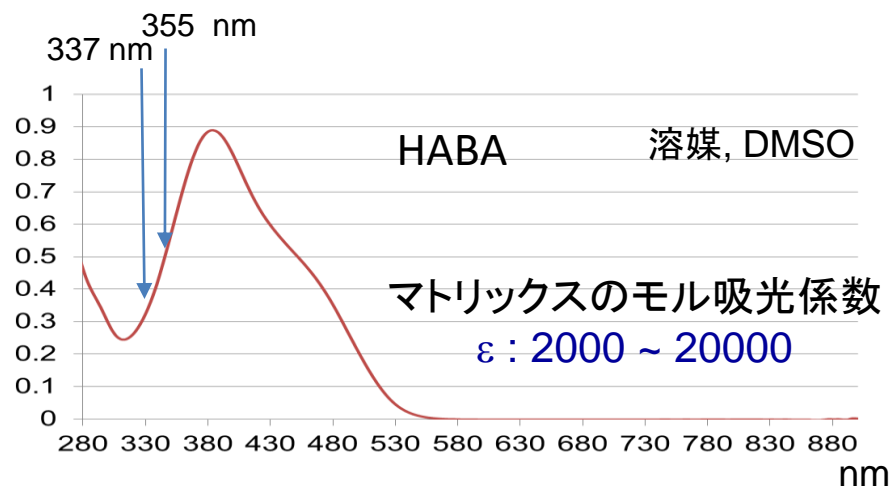


DCTB

よく用いられるマトリクス



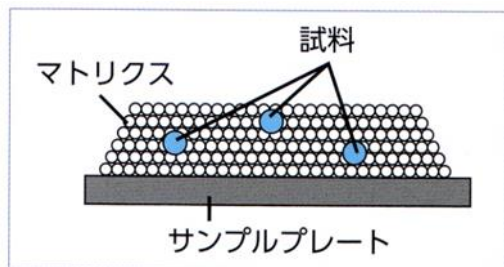
マトリクスの外観



マトリクスのUVスペクトル



## 2. プレート上でのマトリクス・サンプル混合物の塗布状態



均一な共晶



感度  
再現性  
分解能

向上

### 汎用なサンプル塗布方法

液滴乾燥法

サンプル溶液

マトリクス溶液

イオン化剤溶液



自然乾燥

真空乾燥

加熱乾燥

それ以外の方法も種々提案されている

### マトリクスの再結晶



溶媒  
加熱



溶解

放冷



析出

ろ取



結晶

粉碎



微細結晶

# MALDI/TOF-MSの重要な因子

## 3. レーザー照射位置

プレート上のマトリクス・サンプル混合物

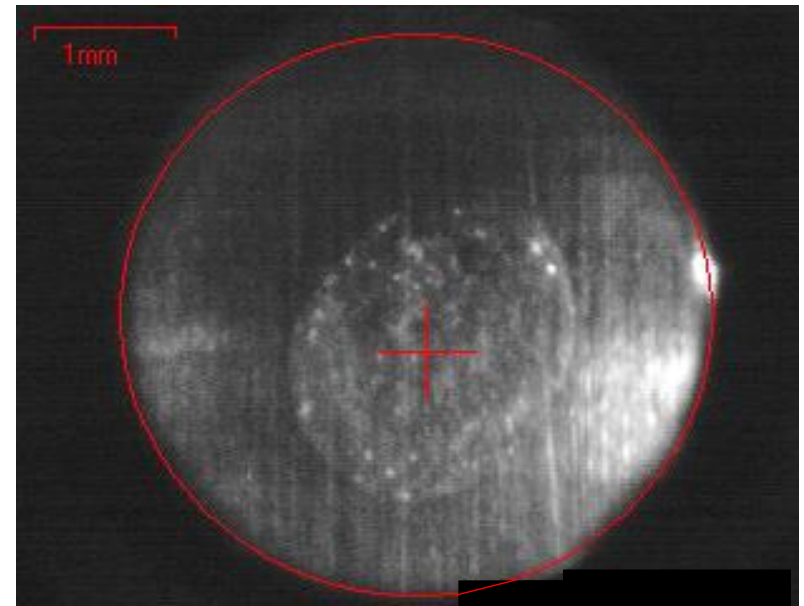
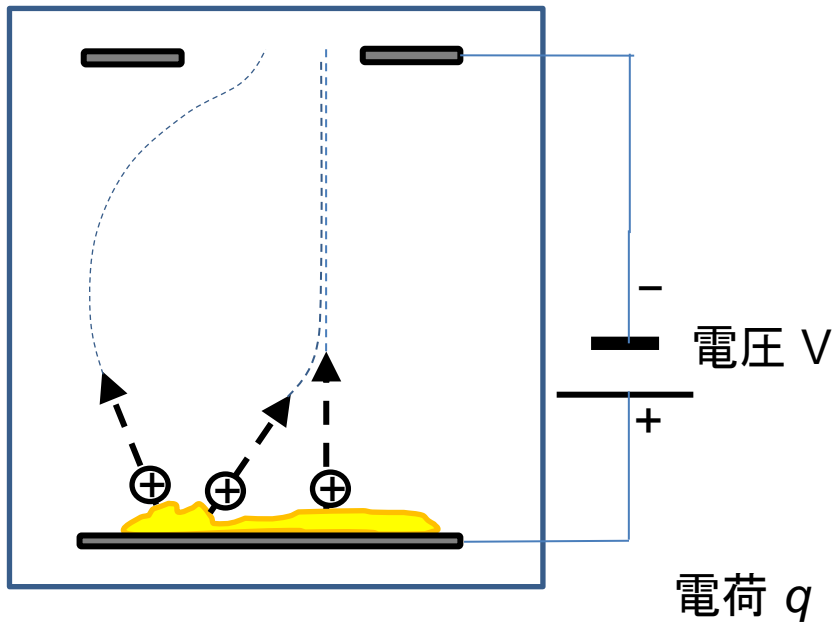


混合割合  
晶系  
表面形状

不均一



測定に最適な場所を探索する必要



# MALDI/TOF-MSの重要な因子

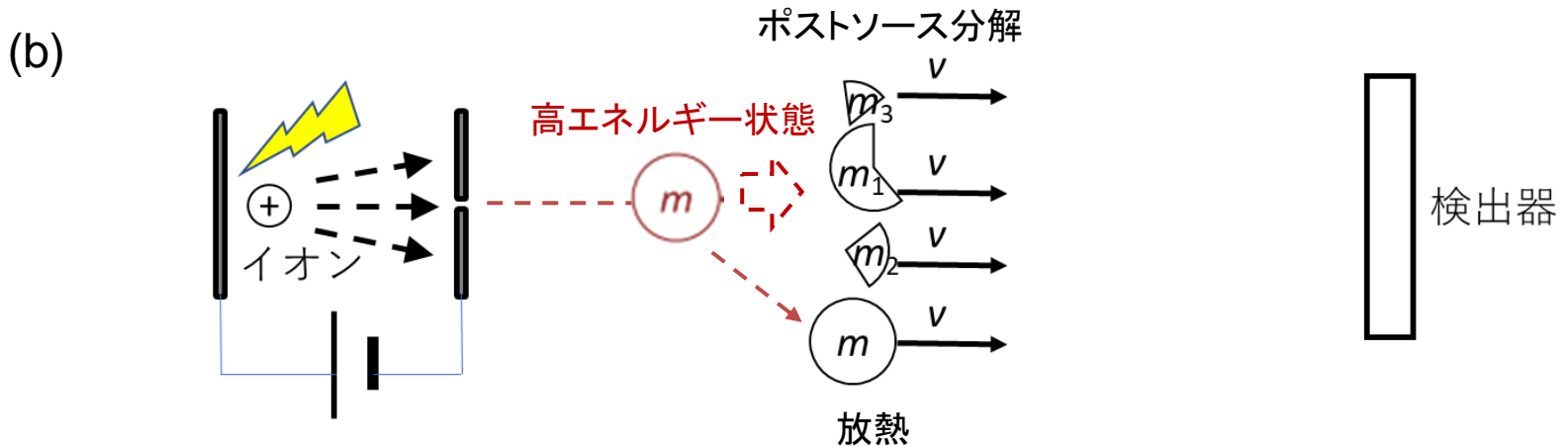
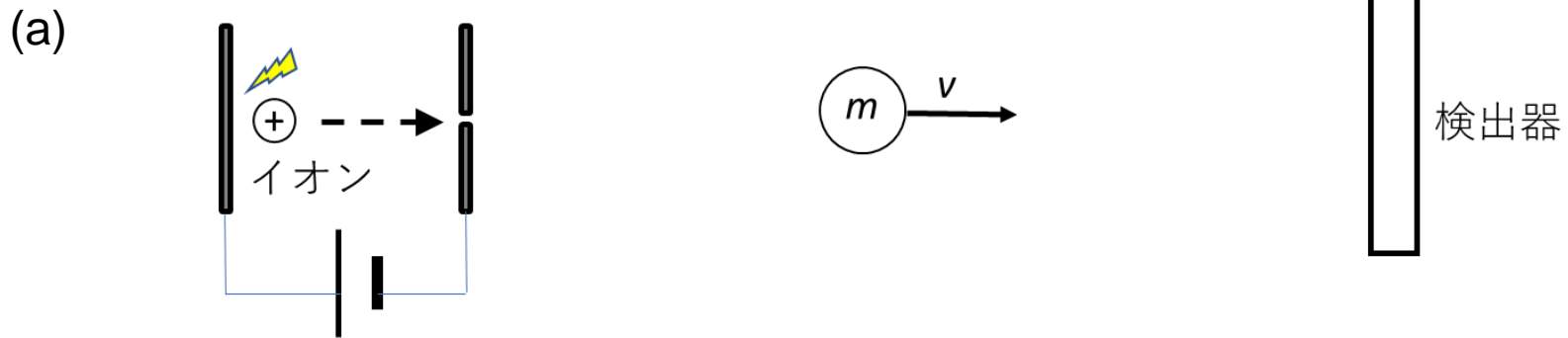
## 4. レーザー強度

小さすぎる場合

イオン化・気相への飛び出しができなくなる(ピークが出ない)

大きすぎる場合

分解能が低くなる

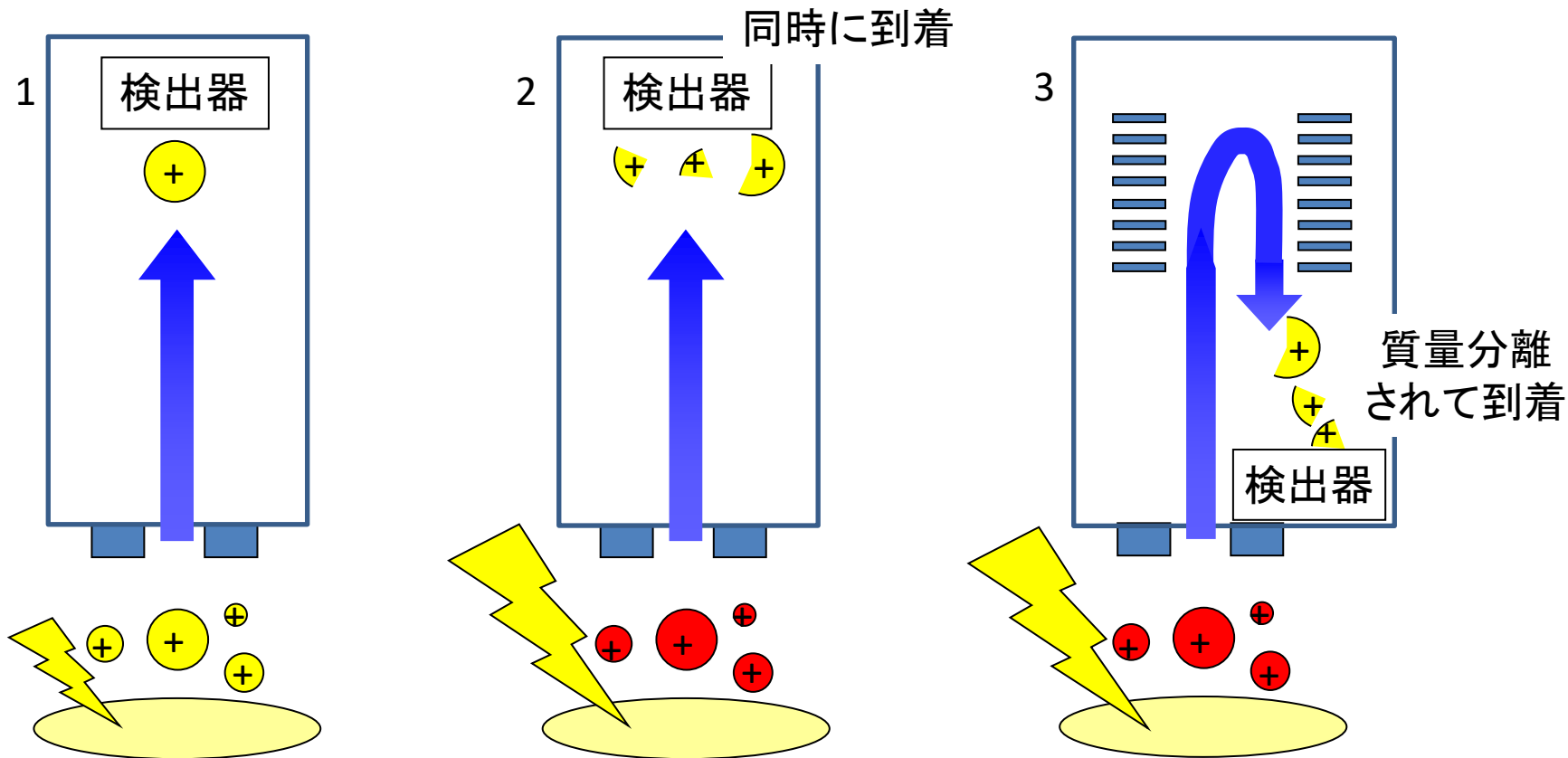


電圧  $V$ , 電荷  $q$ , 質量  $m$ , 速さ,  $v$

$$E = qV = mv^2/2 = (m_1 + m_2 + m_3 + \dots)v^2/2$$

# PSD測定 (MS/MS測定)

ポストソース分解測定 (Post-source decay)



$$E = (mv^2)/2$$

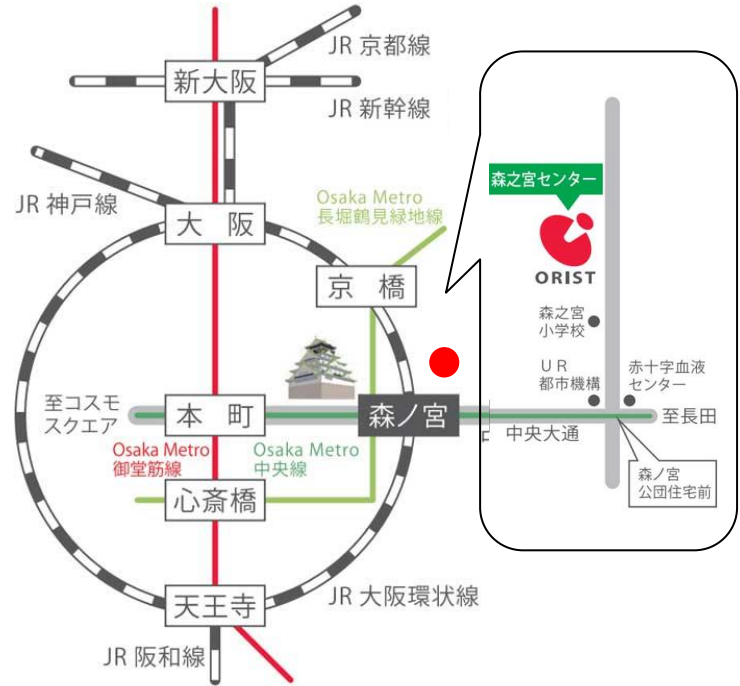
$$\begin{aligned} E &= [(m_1 + m_2 + m_3)V^2]/2 \\ &= (m_1v^2)/2 + (m_2v^2)/2 + (m_3v^2)/2 \\ &= E_1 + E_2 + E_3 \end{aligned}$$

PSD分解は無秩序に起こるのではなく、切れやすい結合部分で選択的に起こる

分子構造情報



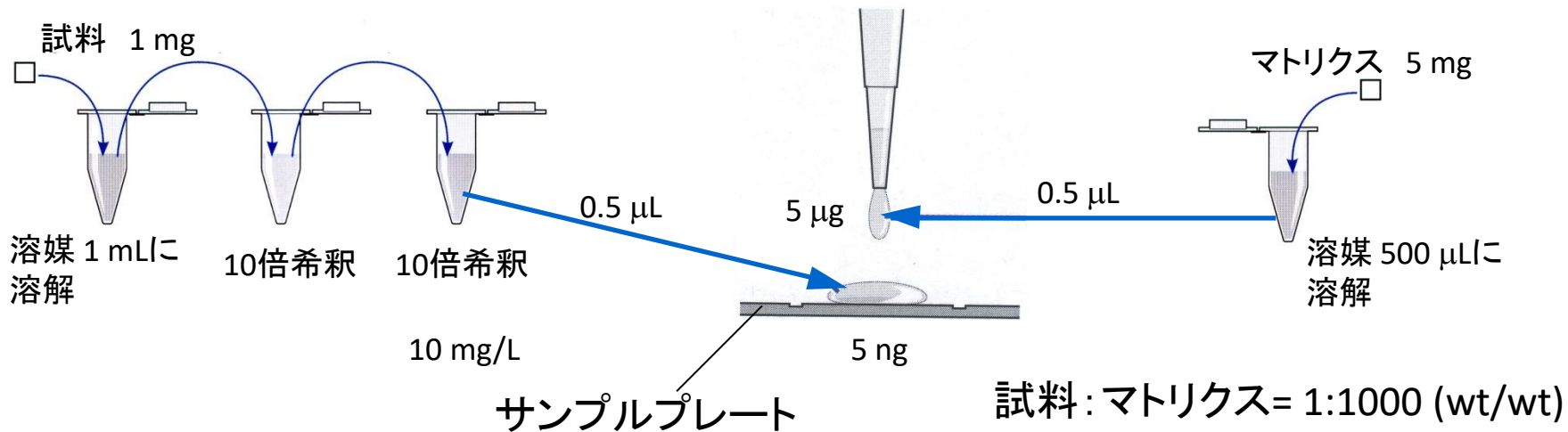
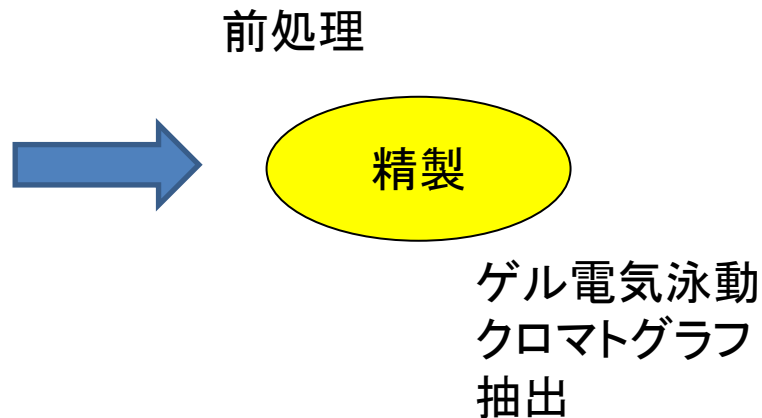
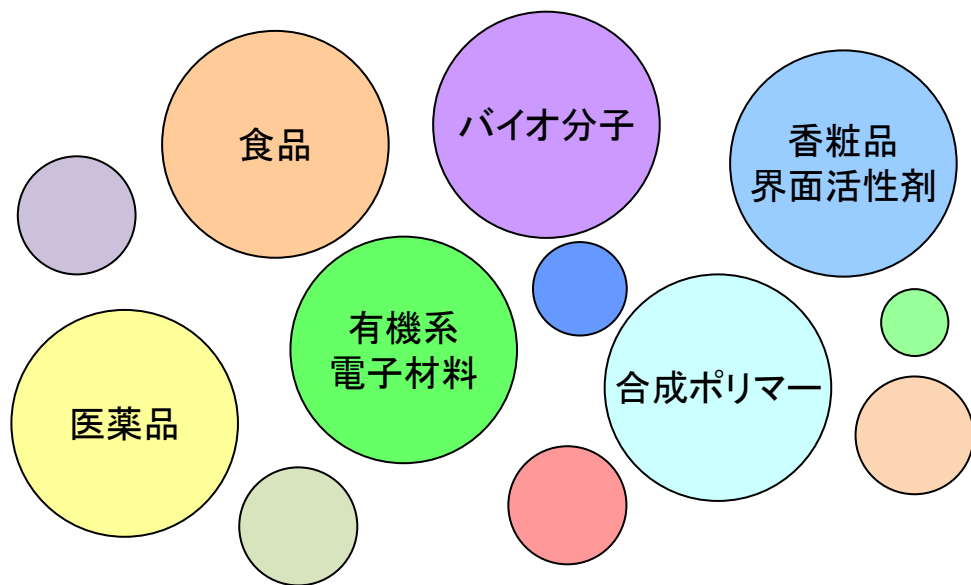
地方独立行政法人  
**大阪産業技術研究所**  
Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology



# Contents

- 質量分析
- MALDI/TOFMSの原理
- MALDI/TOFMSによるマススペクトル測定例
- 高分子試料のマススペクトル測定に影響する主因子
- 高分解能測定

# サンプル調製 (液滴乾燥法)



# マトリクスとイオン化剤、マトリクス/試料混合比を探す

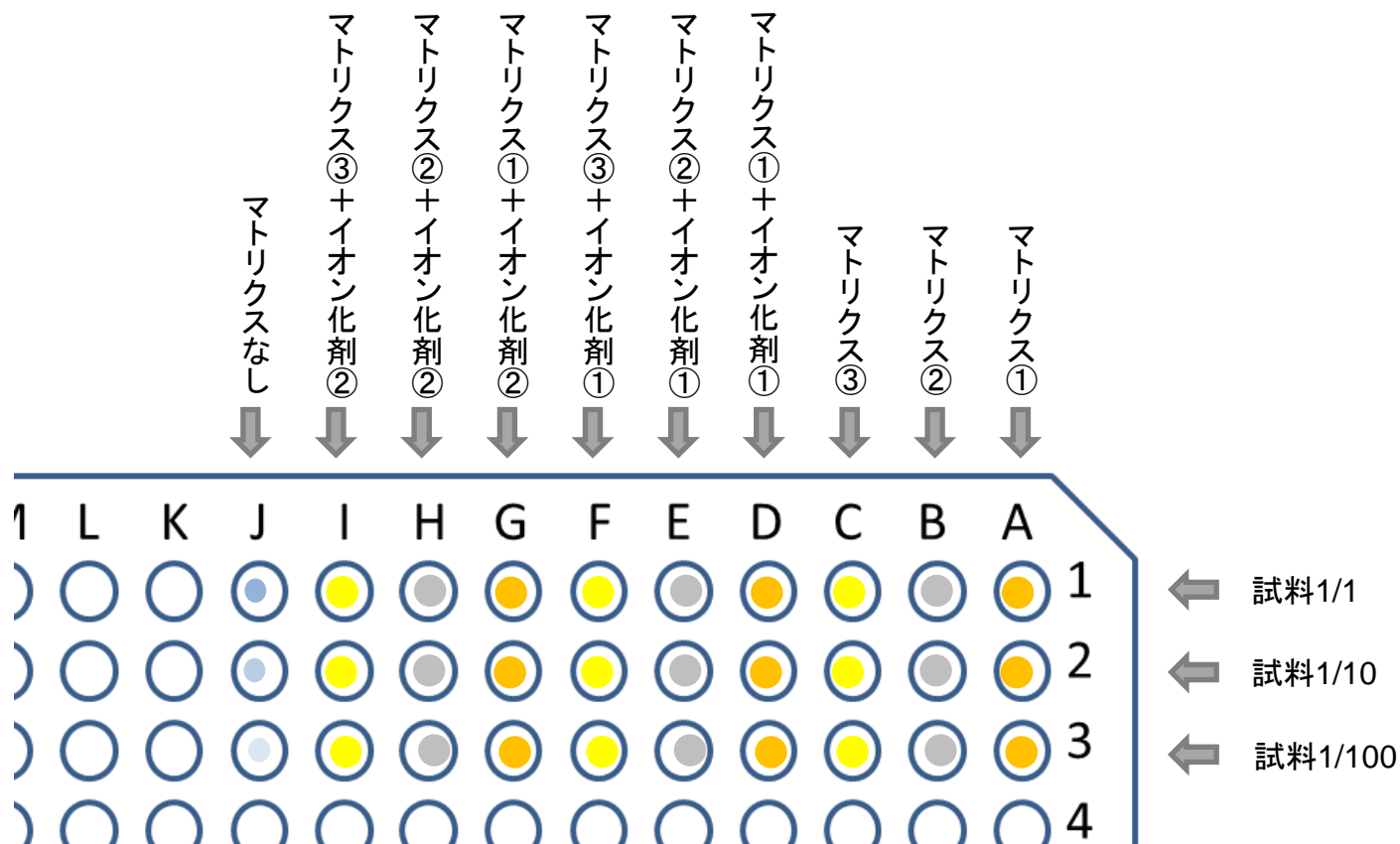
1. 試料

2. マトリクス①、マトリクス②、マトリクス③

3. イオン化剤①、イオン化剤②

× レーザー強度

の組合せ





# 測定に使用した装置



## AXIMA Confidence

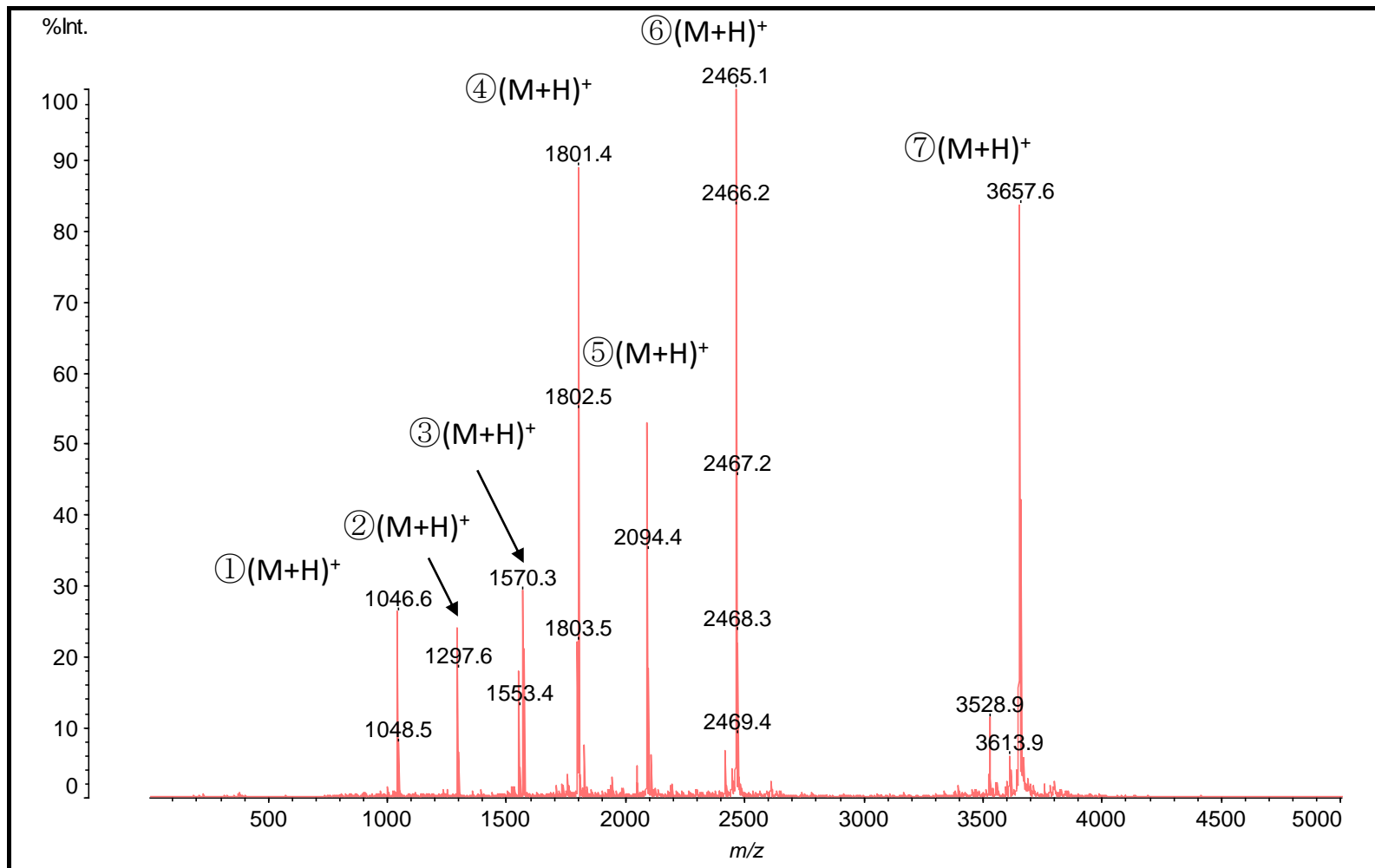
リニアモード	質量範囲	$m/z$ 1~500,000
	質量分解能	5,000
	質量精度	30 ppm
	飛行距離	1,200 mm
リフレクトロンモード	質量範囲	$m/z$ 1~80,000
	質量分解能	15,000
	質量精度	10 ppm
	飛行距離	2,000 mm
	質量精度 (MS/MSモード)	200 ppm
レーザー波長		337 nm

SHIMADZU  BIOTECH  
bringing analysis to life

経産省の事業で2009年に設置  
N2レーザー交換数回  
真空系交換数回  
(ターボポンプ、ロータリーポンプ)  
電源交換1回

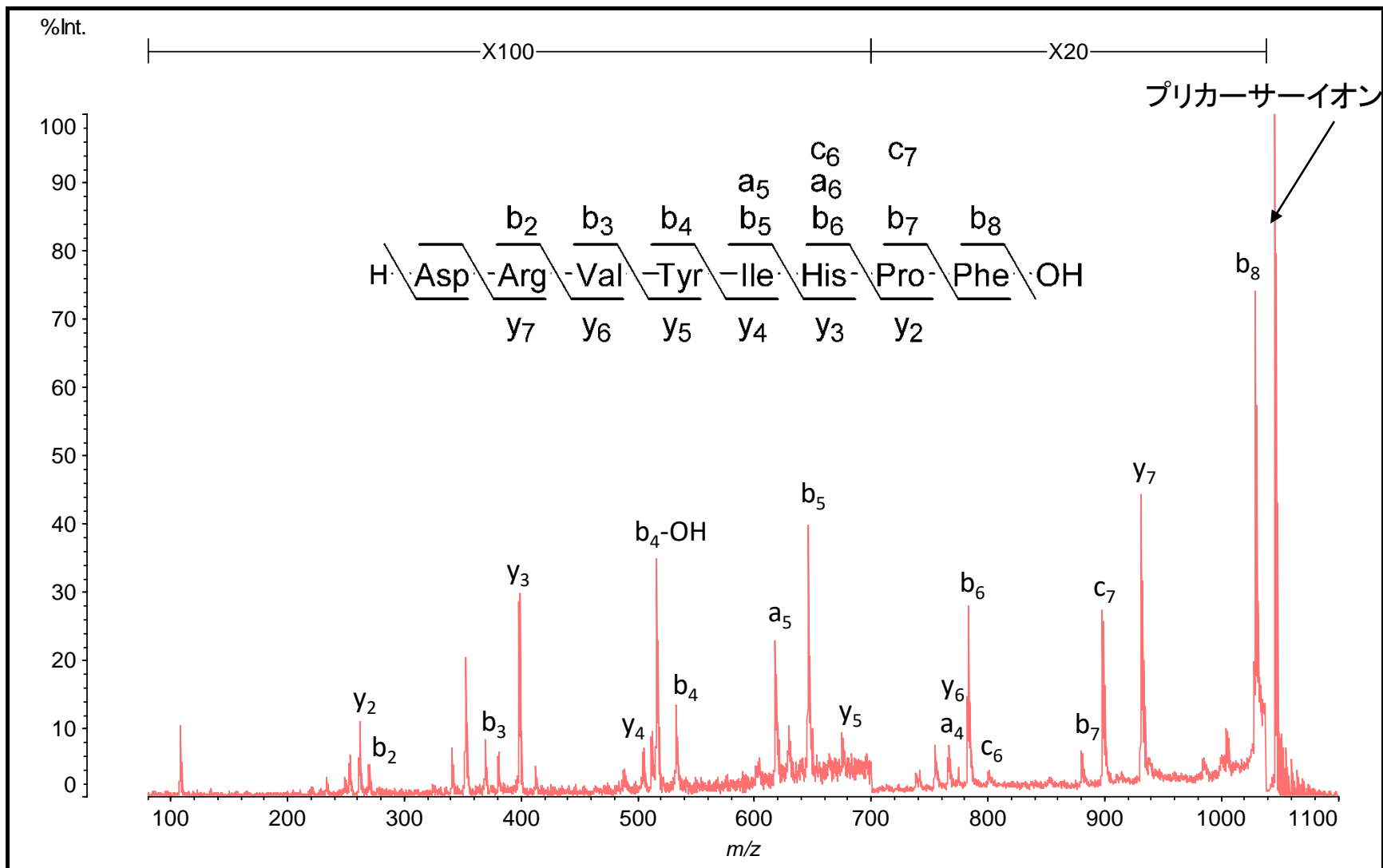
# ○ ペプチド

マトリクス: CHCA



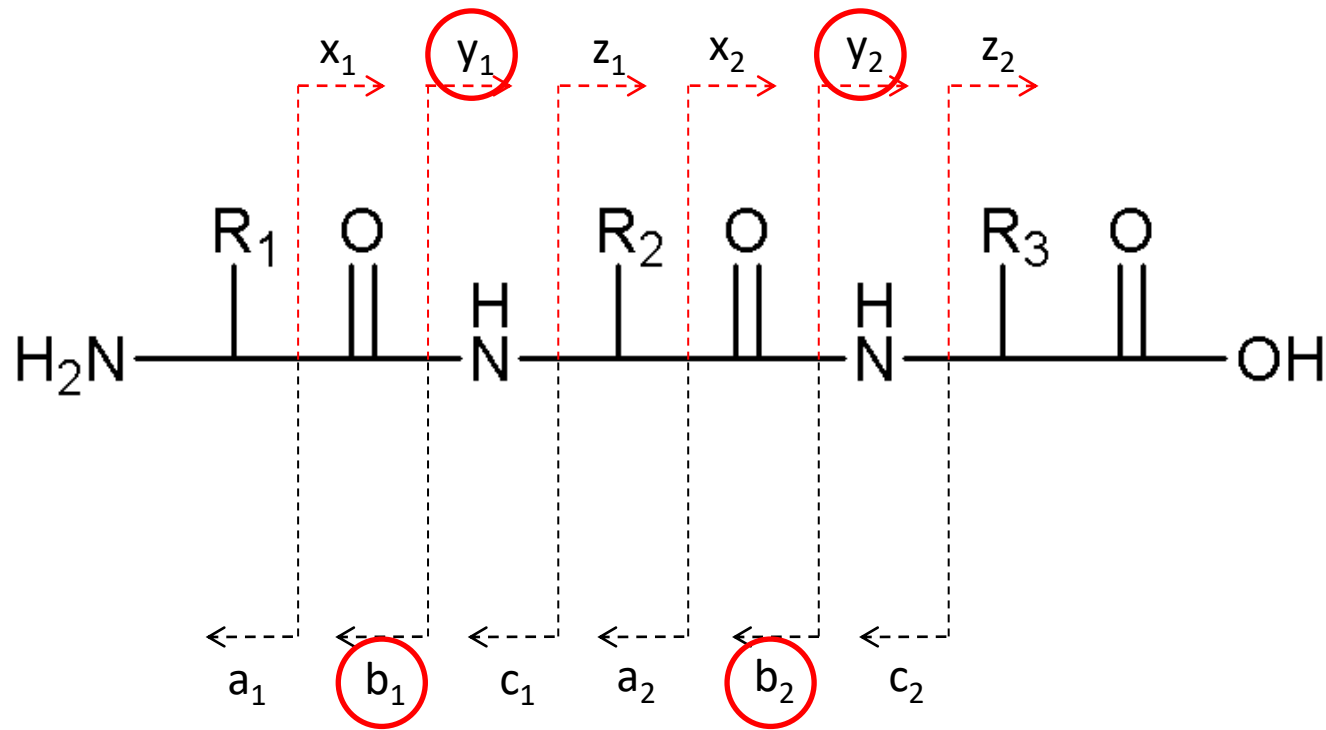
① Angiotensin II, ② Angiotensine I, ③ [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptide B, ④ *N*-Acetyl-Renin Substrate Tetradecapeptide Precine, ⑤ ACTH fragment 1-17, ⑥ ACTH fragment 18-39, ⑦ ACTH fragment 7-38

# ○ ペプチド ～PSD測定～



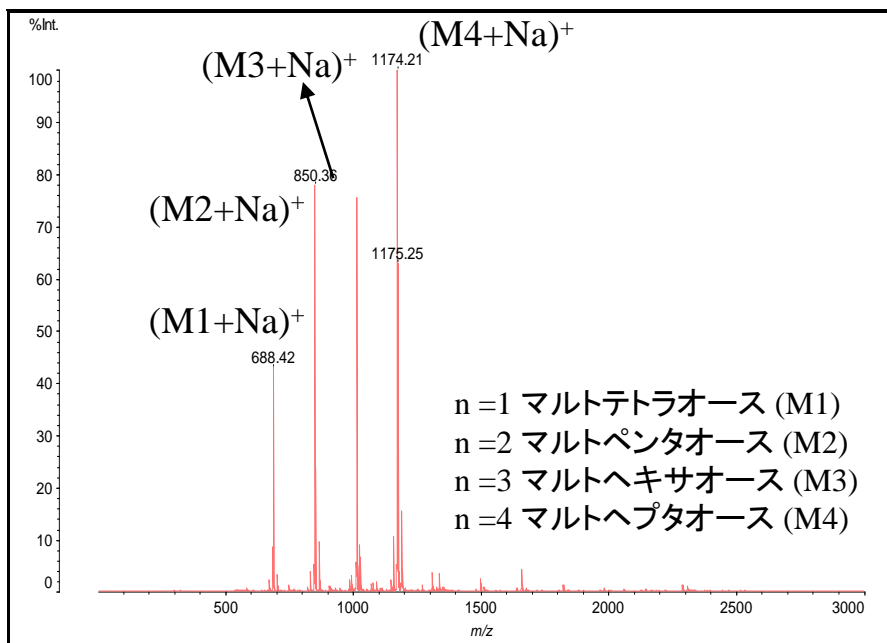
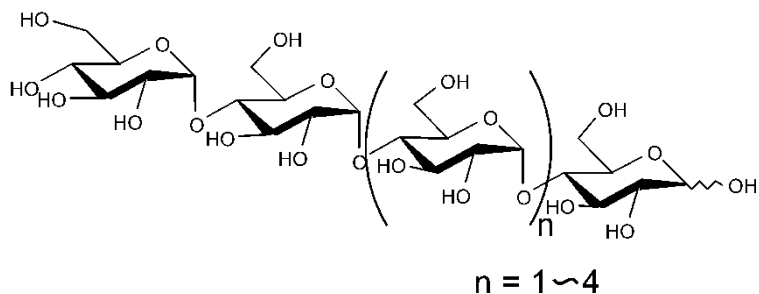
# ○ ペプチドのフラグメントパターン

MALDI/PSD

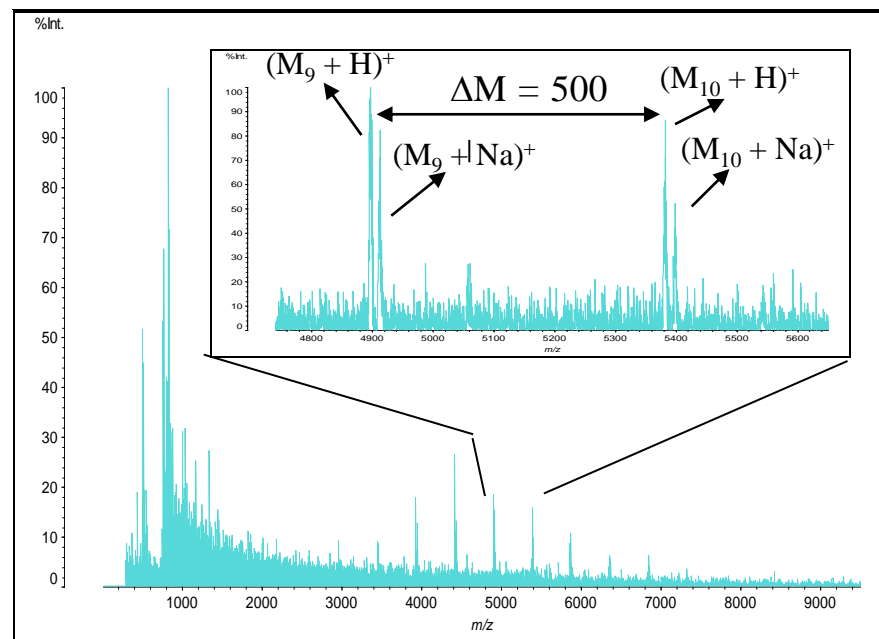
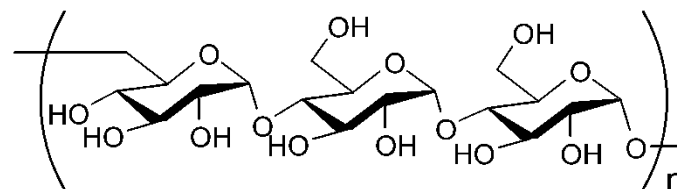


# ○ オリゴ糖類・多糖類

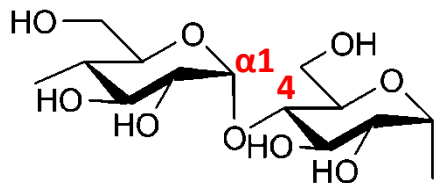
## ● マルトオリゴ糖類    マトリクス: DHBA



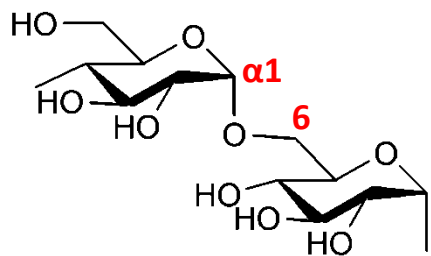
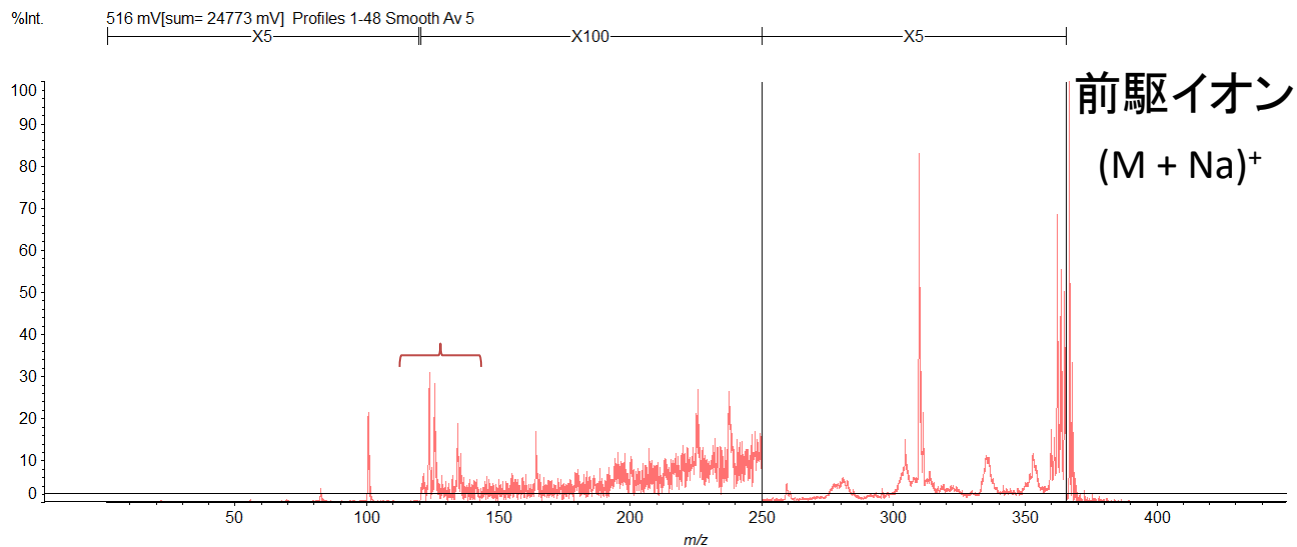
## ● プルラン    マトリクス: HABA



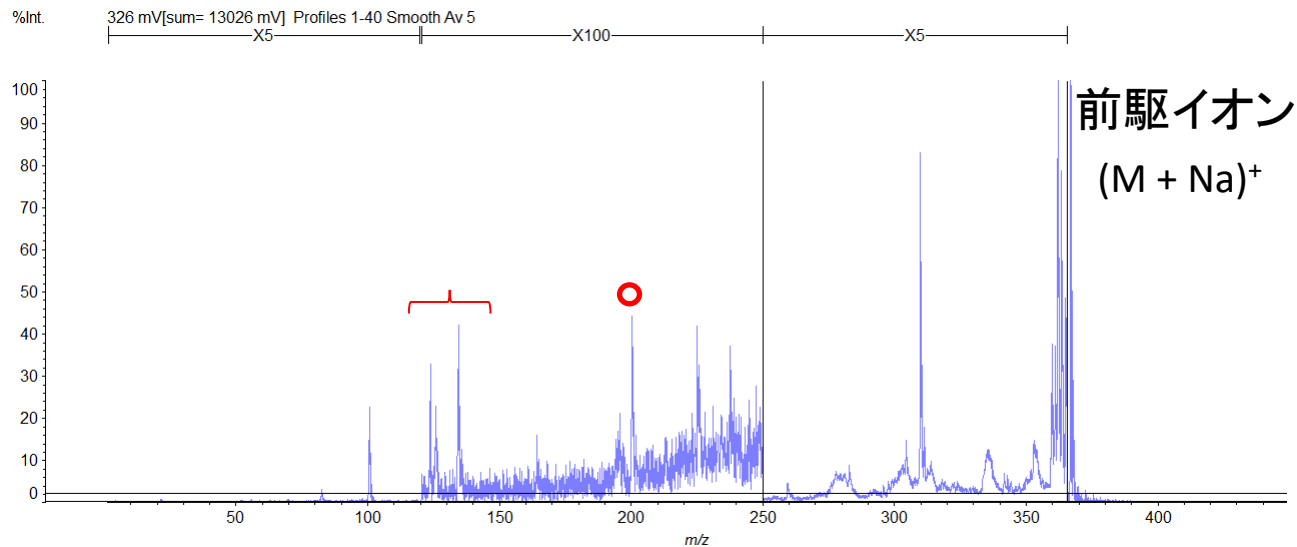
# ○ 糖鎖の結合様式～PSDの応用～



( $\alpha 1 \rightarrow 4$ )結合



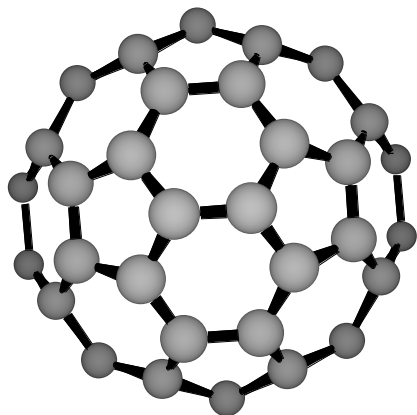
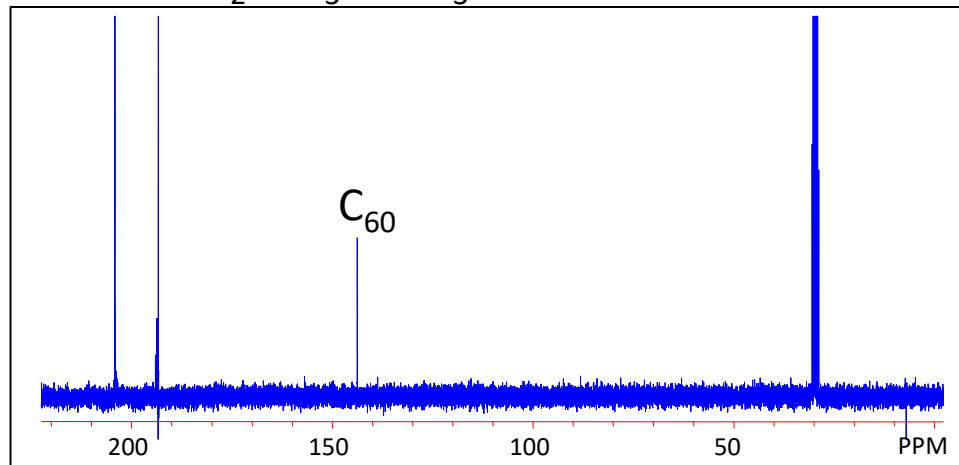
( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )結合



# ○ 機能性有機化合物 ～フラーレン～

●  $^{13}\text{C}$ -NMR

In  $\text{CS}_2$ ,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$

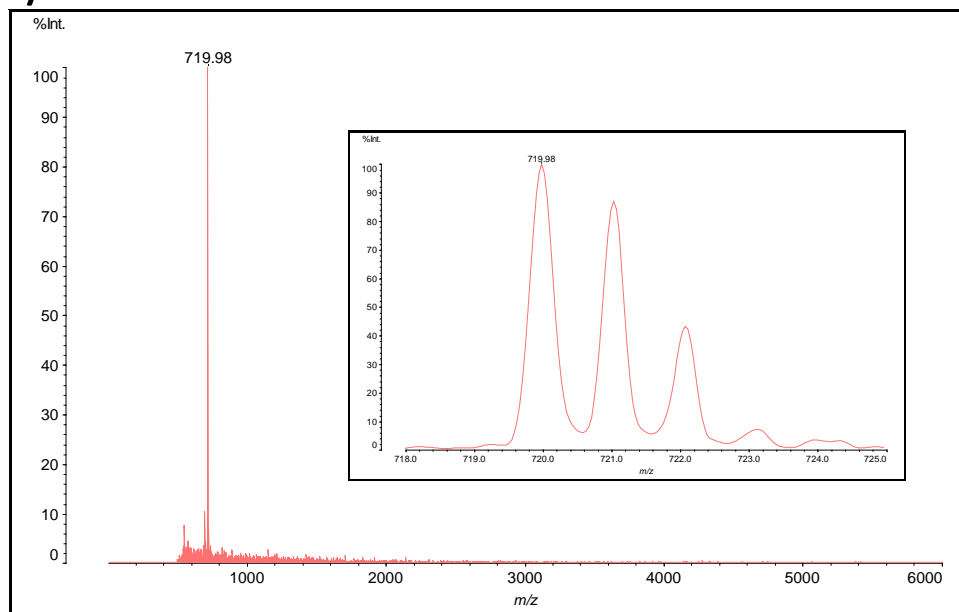


$\text{C}_{60}$

(Exact mass 720.00)

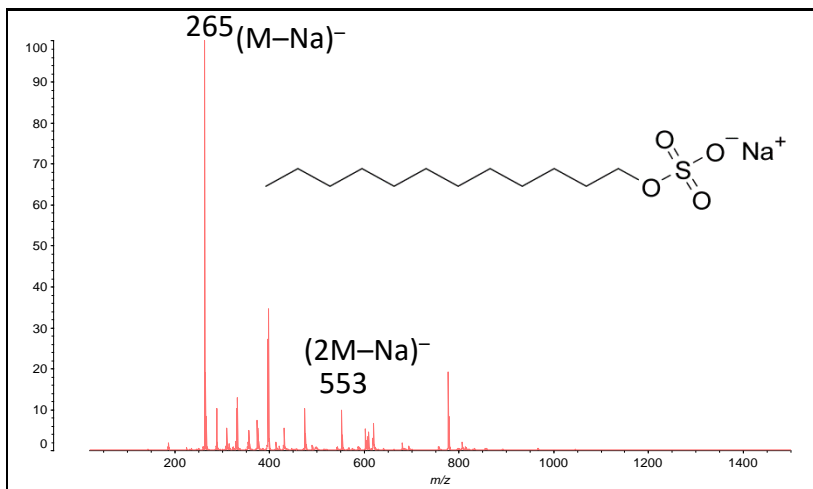
● MALDI/TOF-MS

マトリクス なし

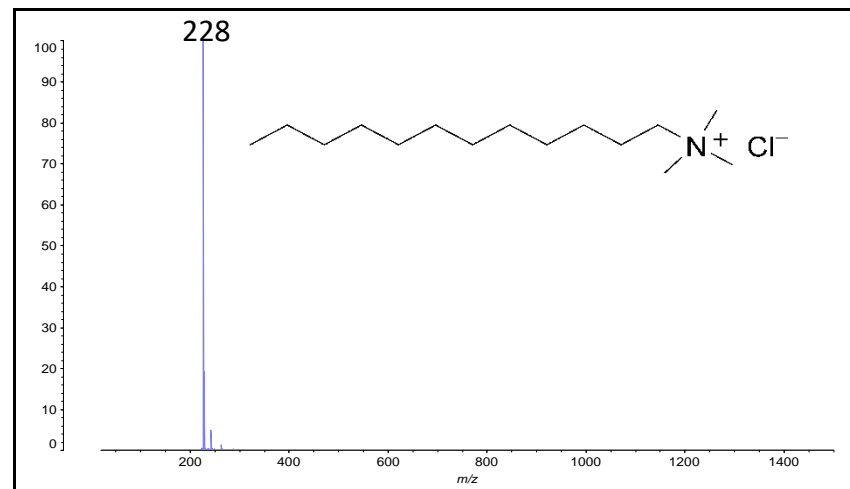


# ○ 界面活性剤

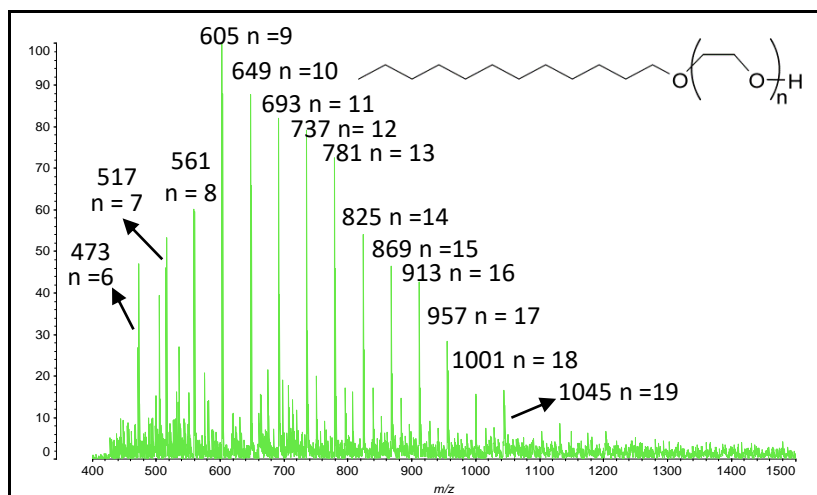
## ● アニオン界面活性剤 マトリクス: CHCA



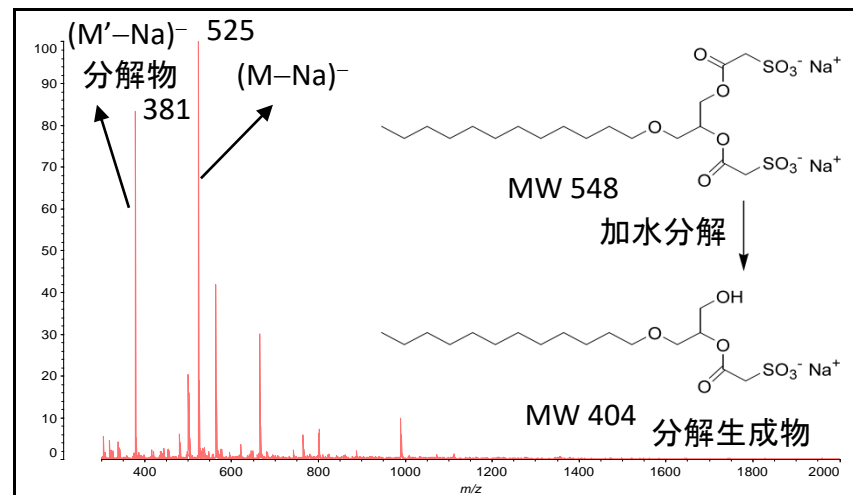
## ● カチオン界面活性剤 マトリクス: HABA



## ● ノニオン界面活性剤 マトリクス: DHBA



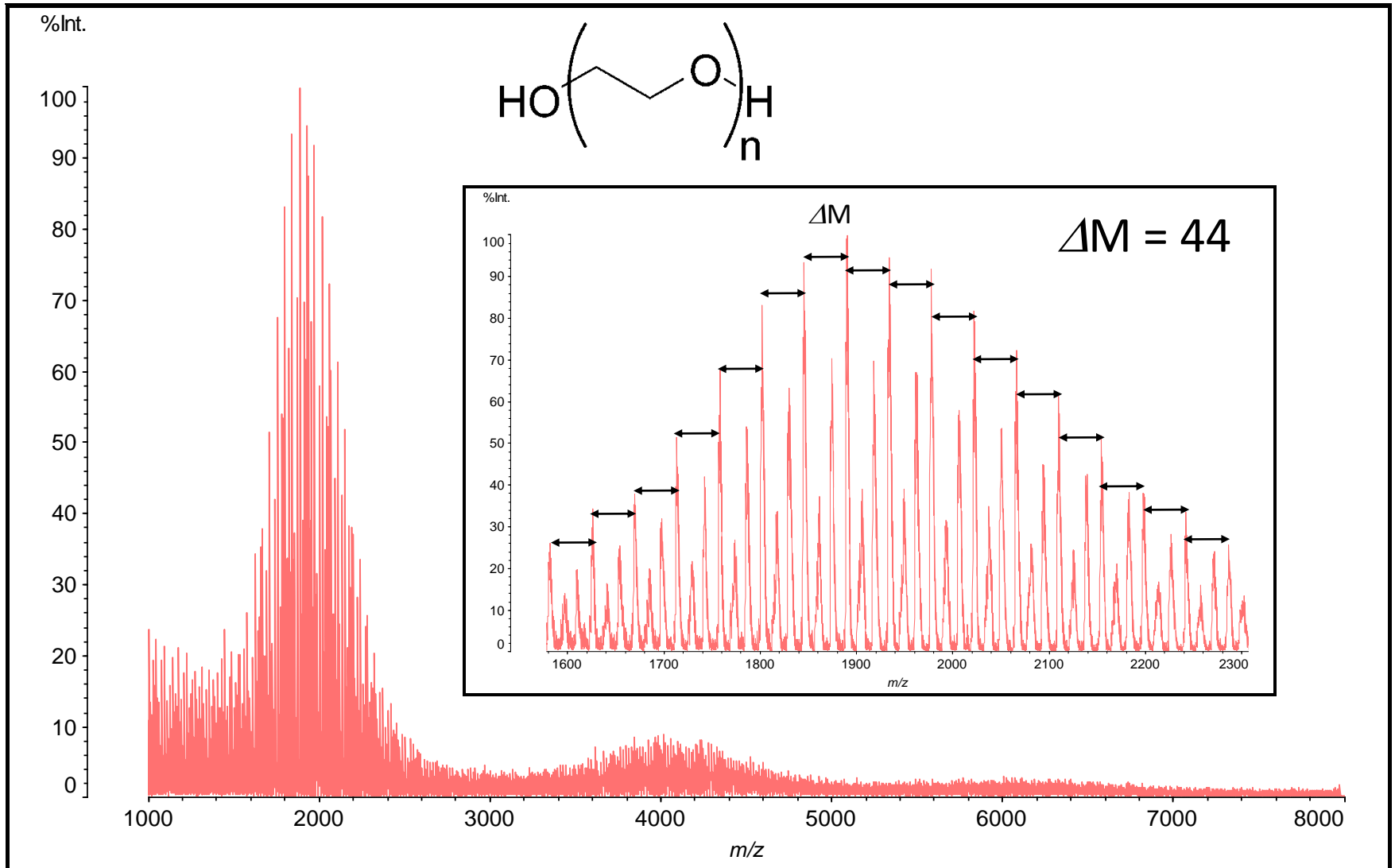
## ● 化学分解性界面活性剤 マトリクス: HABA





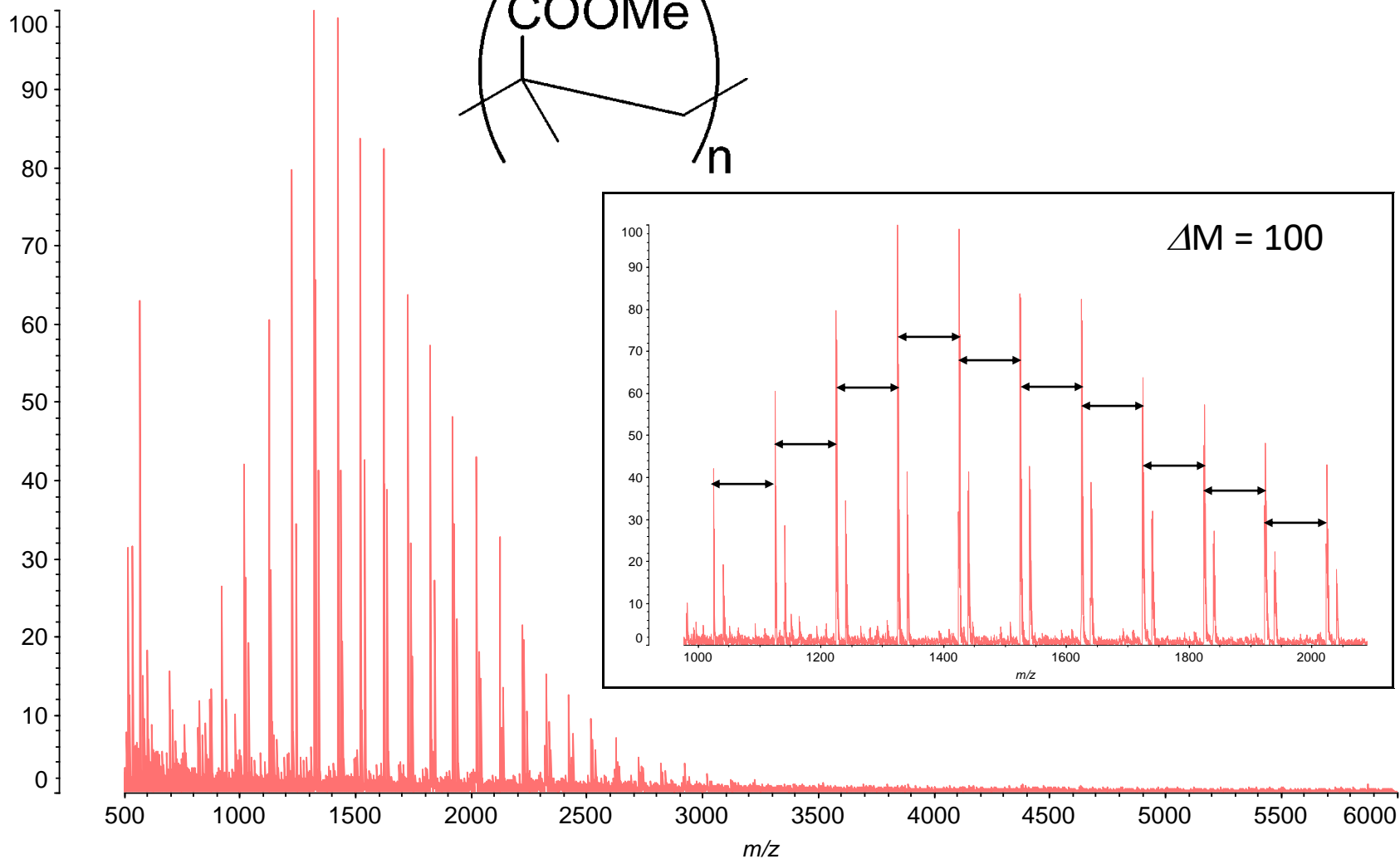
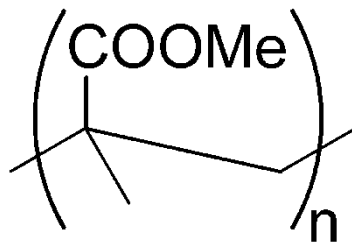
# ○ 合成ポリマー ～ポリエチレングリコール～

マトリクス:CHCA



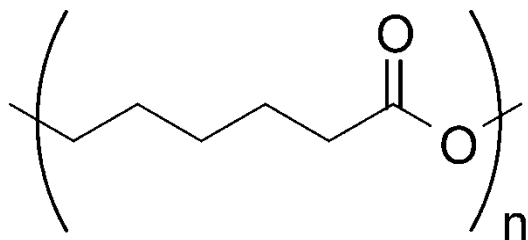
# ○合成ポリマー ～ポリメタクリル酸メチル～

マトリクス:CHCA

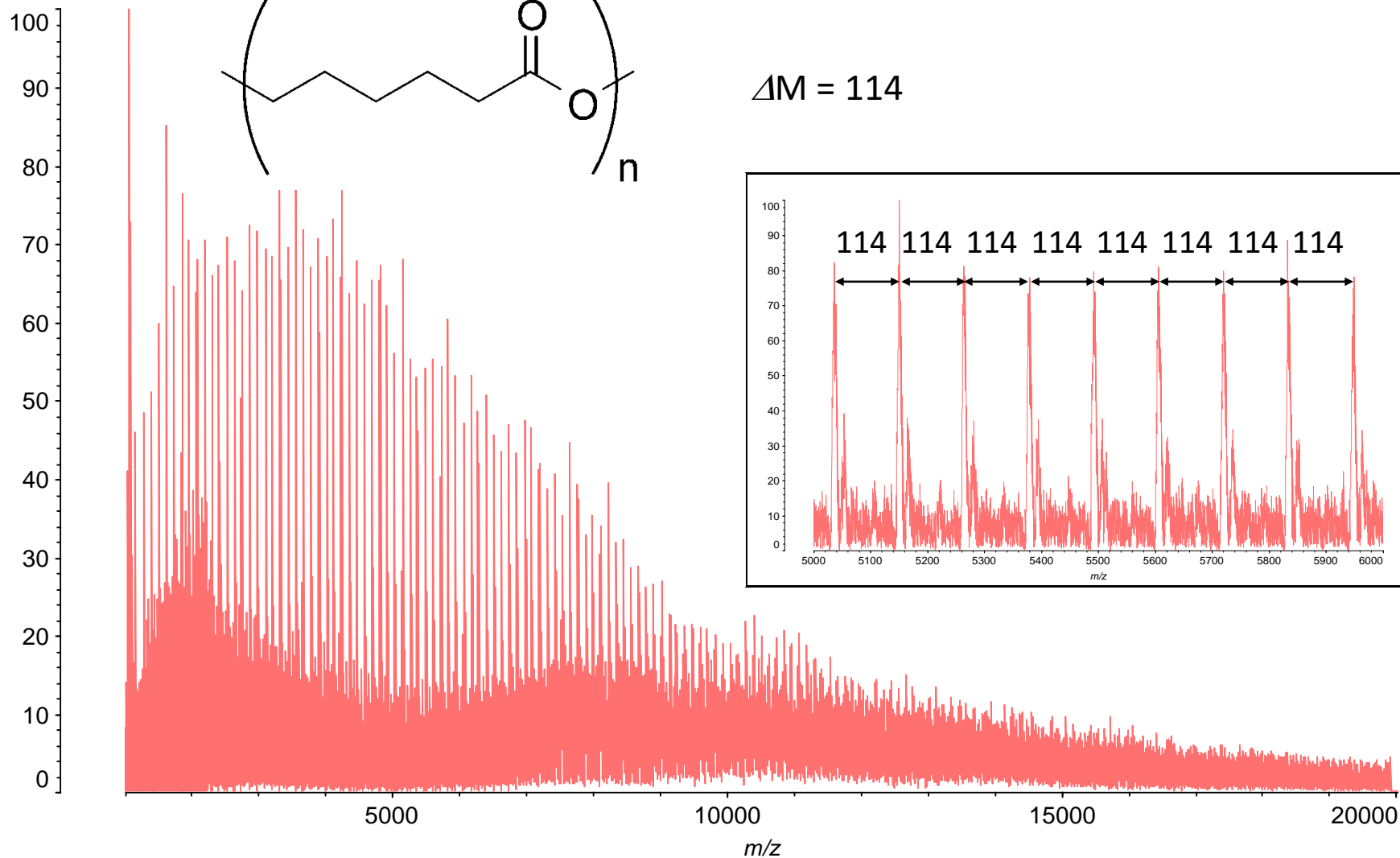


# ○ 合成ポリマー ～ポリカプロラクトン～

マトリクス:HABA



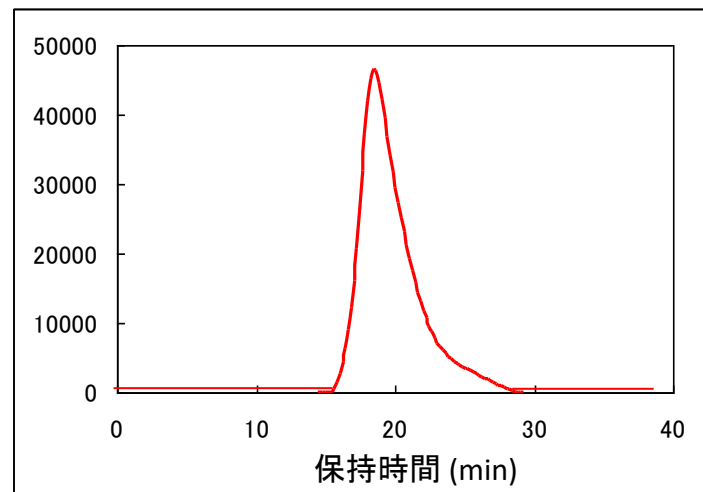
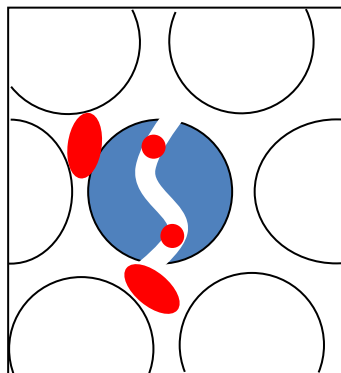
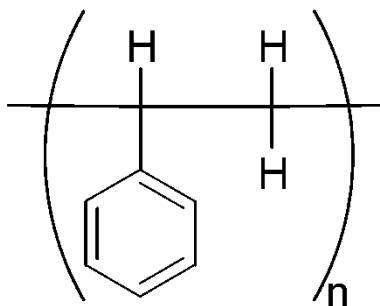
$$\Delta M = 114$$



# ○合成ポリマー ~GPCとの比較~

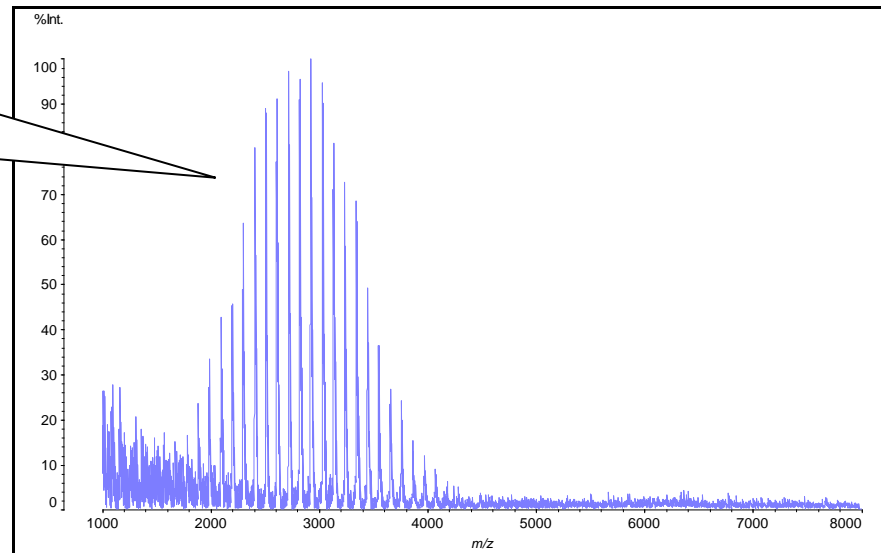
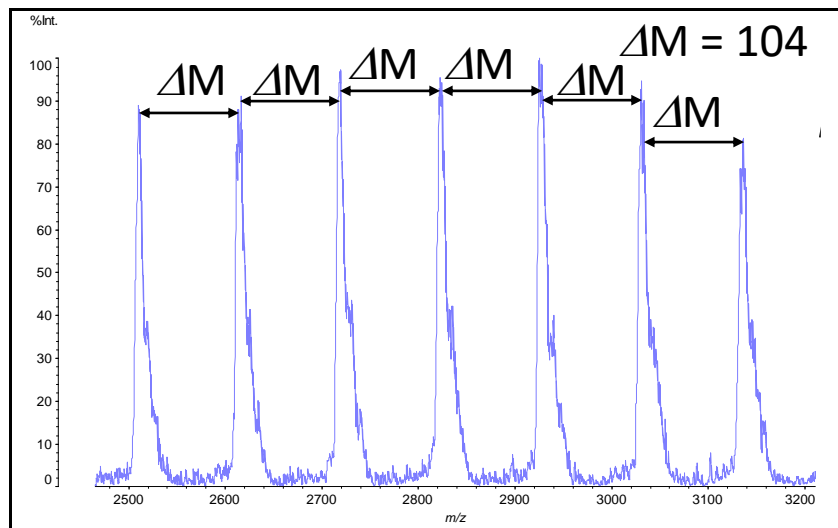
## ● GPC

試料: ポリスチレン



(大阪産業技術研究所 小野氏提供)

## ● MALDI/TOF-MS



# サンプルプレートの洗浄

1. 試料が可溶な溶媒で洗浄



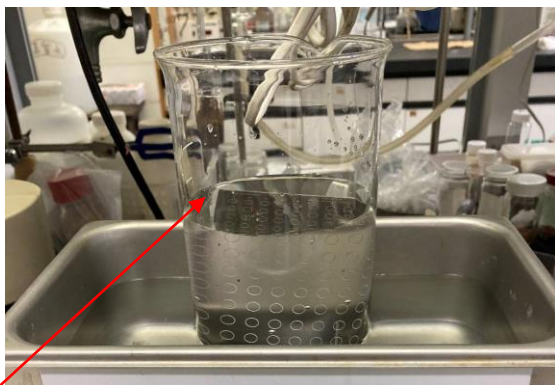
2. 超音波洗浄機で洗浄



3. その他

(注意) 洗浄溶媒のグレード

(注意) 乾燥



5%ギ酸THF/水(1:1)溶液 超音波洗浄



オゾン洗浄機

溶媒を換えて何度か洗浄  
試料が可溶な溶媒  
蒸留水

少なくとも目視で試料が残っていないことを確認

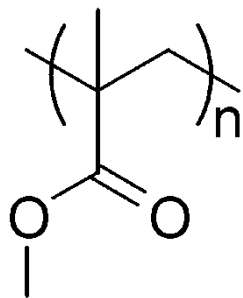
汚れが取れないときは  
擦り取ることもある

# Contents

- 質量分析
- MALDI/TOFMSの原理
- MALDI/TOFMSによるマススペクトル測定例
- 高分子試料のマススペクトル測定に影響する主因子
- 高分解能測定

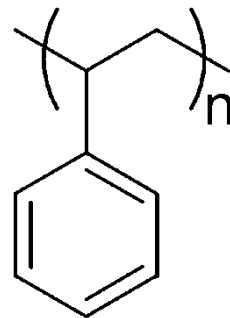
# 高分子試料のマスマスペクトル測定に 影響する主因子

- 試料/マトリクス混合量比
- レーザー強度
- 試料の性質(分子量, 構造...)
- マトリクスの種類
- イオン化剤の種類



PMMA

$C_5H_8O_2$   
Exact Mass: 100.05



PS

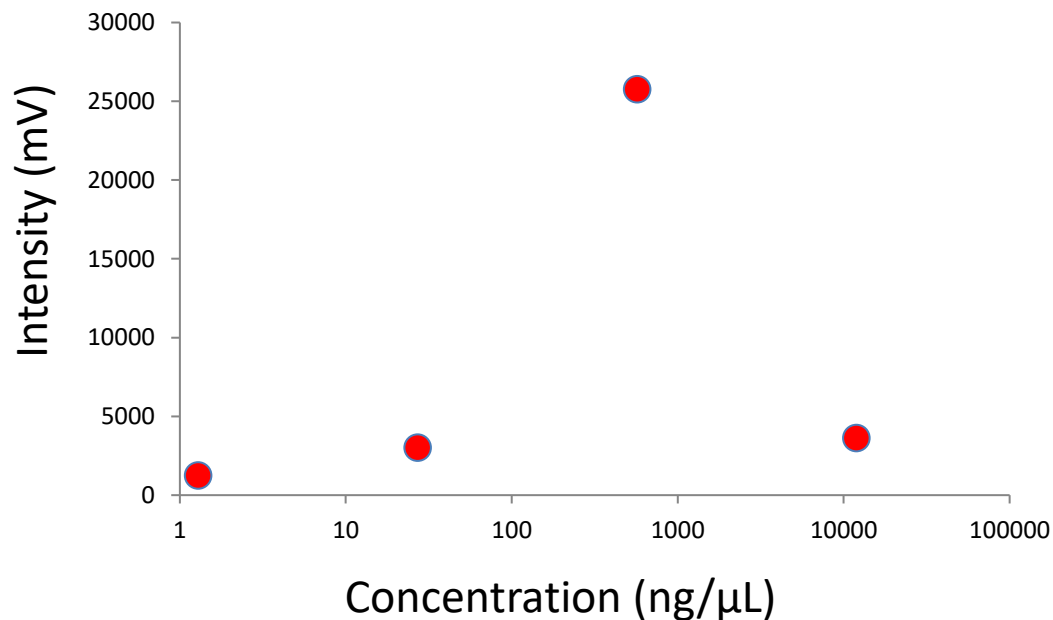
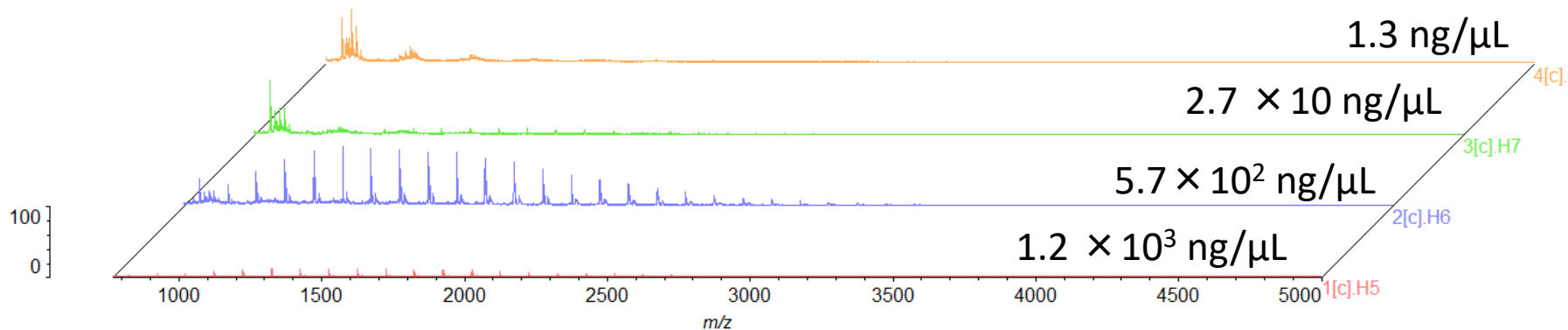
$C_8H_8$   
Exact Mass: 104.06

# 試料濃度とベースピーク強度値 (PMMA)

Sample : PMMA Mw  $1.62 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of various concentration solution in THF

Matrix: CHCA 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile

Laser power: 60

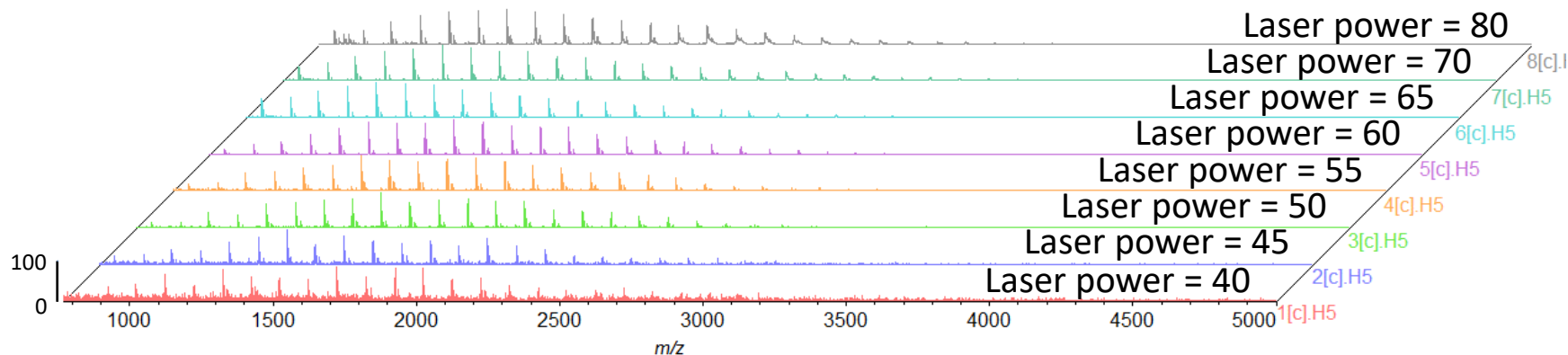




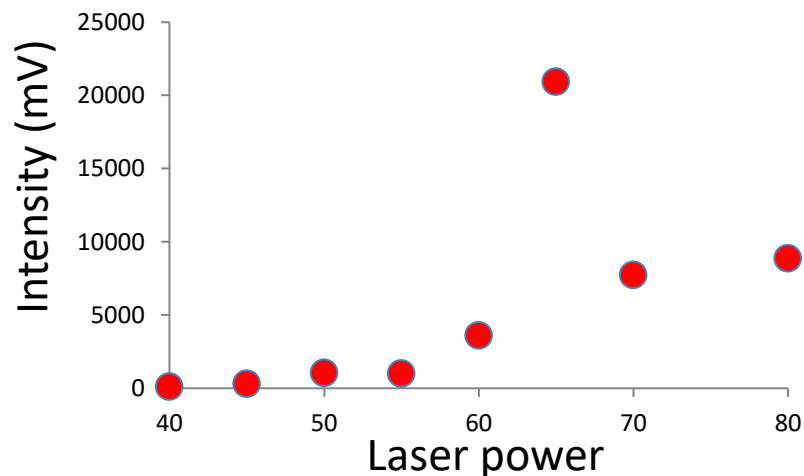
# レーザー強度とベースピーク強度値 (PMMA)

Sample : PMMA Mw  $1.62 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.7 \times 10$  ng/ $\mu\text{L}$  in THF

Matrix: CHCA 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile

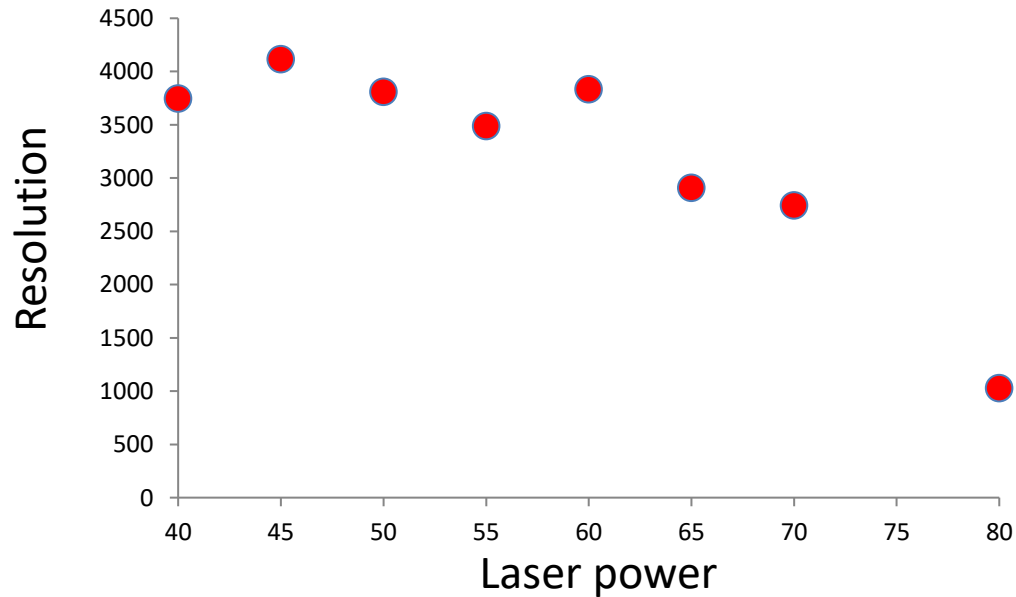
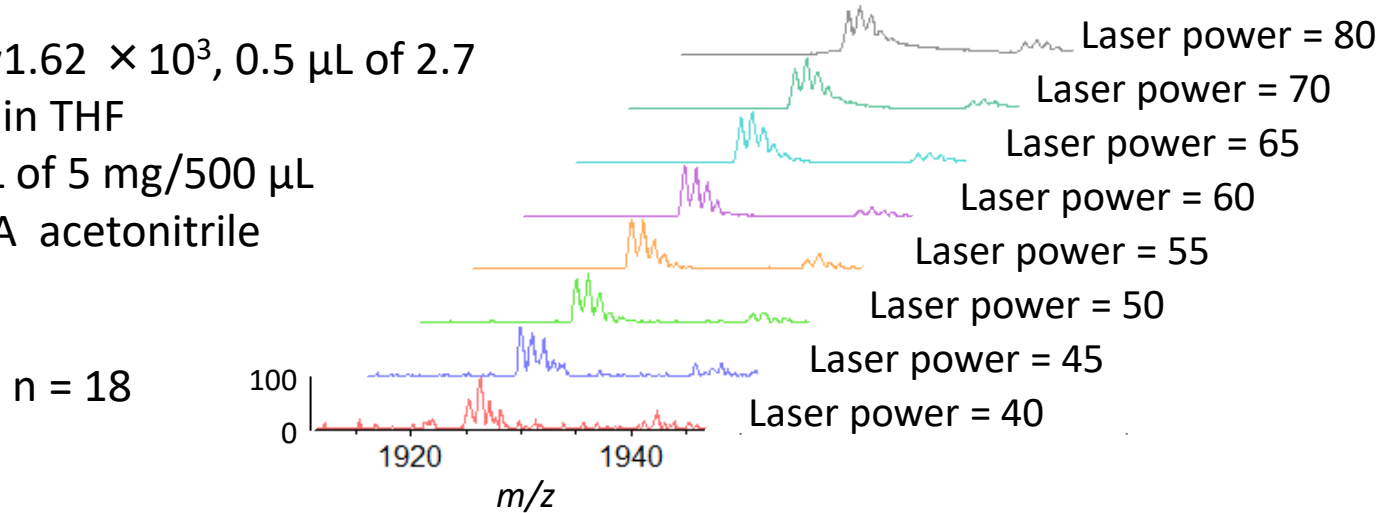


## ○ ベースピーク強度値



# レーザー強度と分解能 (PMMA)

Sample : PMMA Mw  $1.62 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.7 \times 10$  ng/ $\mu\text{L}$  in THF  
Matrix: CHCA 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile

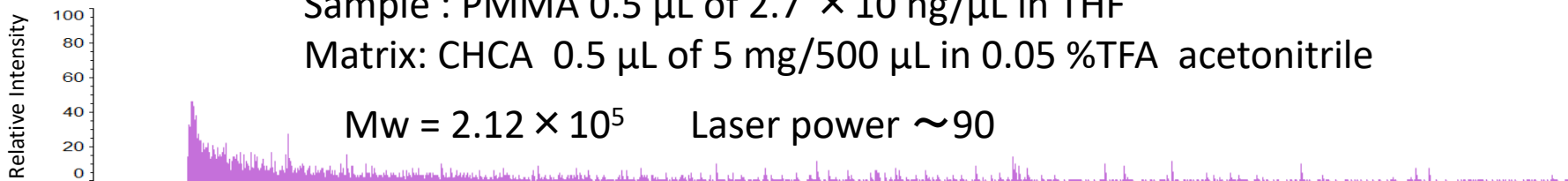


# 分子量(重合度)とマススペクトル(PMMA)

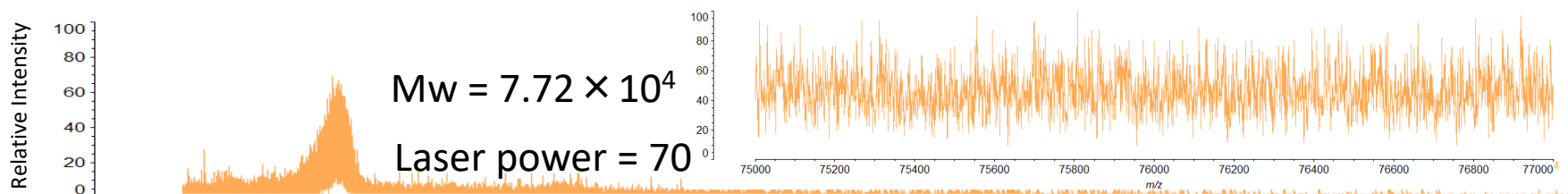
Sample : PMMA 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.7 \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  in THF

Matrix: CHCA 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile

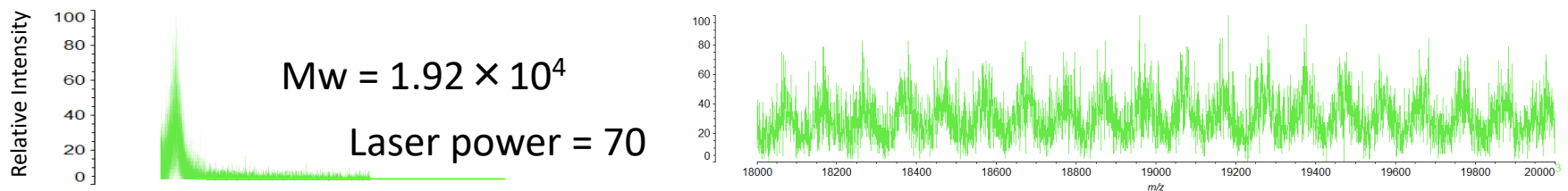
$M_w = 2.12 \times 10^5$  Laser power  $\sim 90$



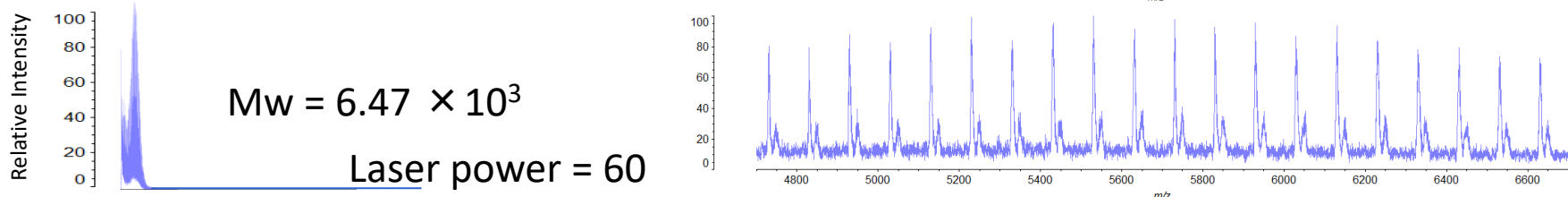
$M_w = 7.72 \times 10^4$   
Laser power = 70



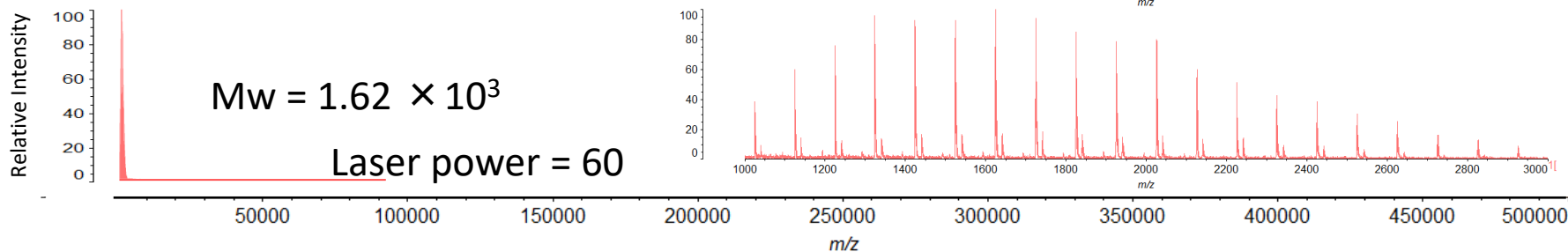
$M_w = 1.92 \times 10^4$   
Laser power = 70



$M_w = 6.47 \times 10^3$   
Laser power = 60



$M_w = 1.62 \times 10^3$   
Laser power = 60

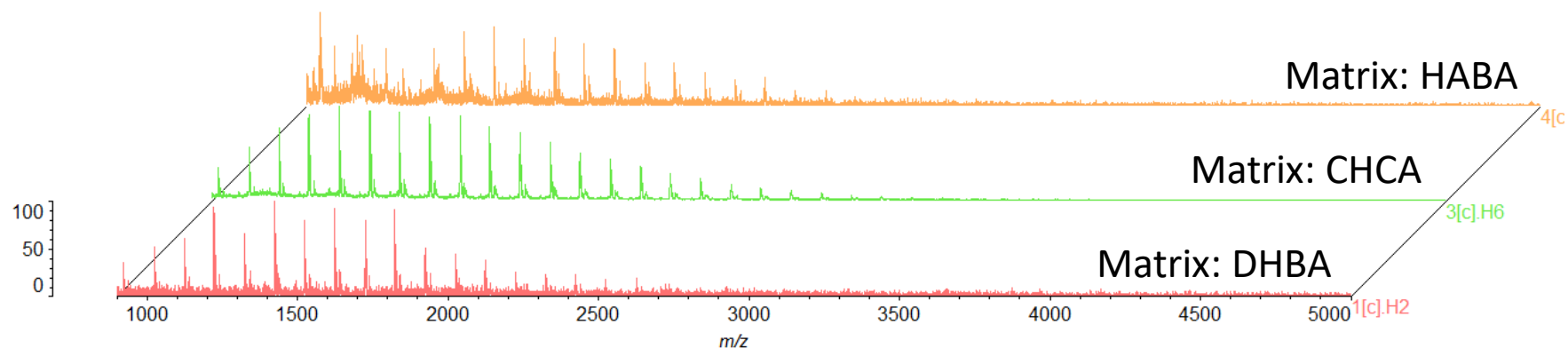


# マトリクスとマススペクトル (PMMA)

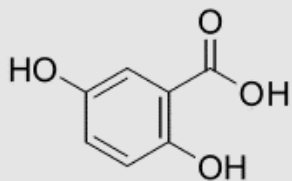
Sample : PMMA Mw  $1.62 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.7 \times 10$  ng/ $\mu\text{L}$  in THF

Matrix: 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile

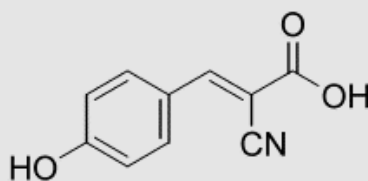
Laser power: 60



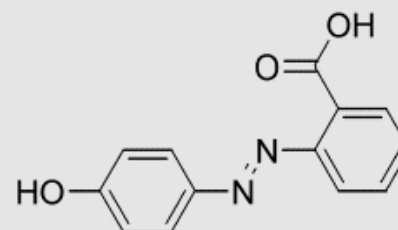
DHBA



CHCA



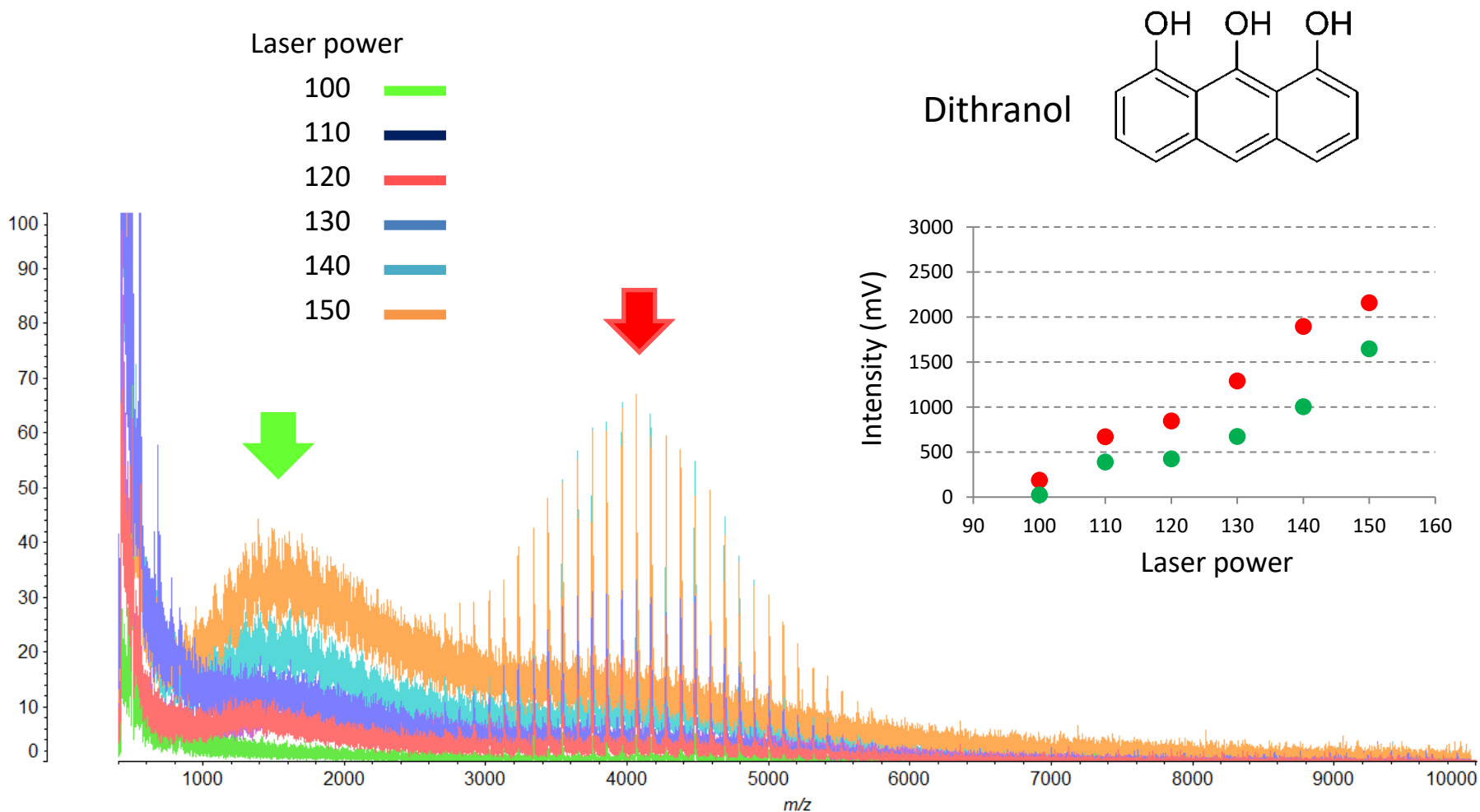
HABA



# カチオン化剤 (TFA) を用いたときのマススペクトル (PS)

Sample : PS Mw  $3.95 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.2 \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  in THF

Matrix: Dithranol 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in 0.05 %TFA acetonitrile/THF (1:1)

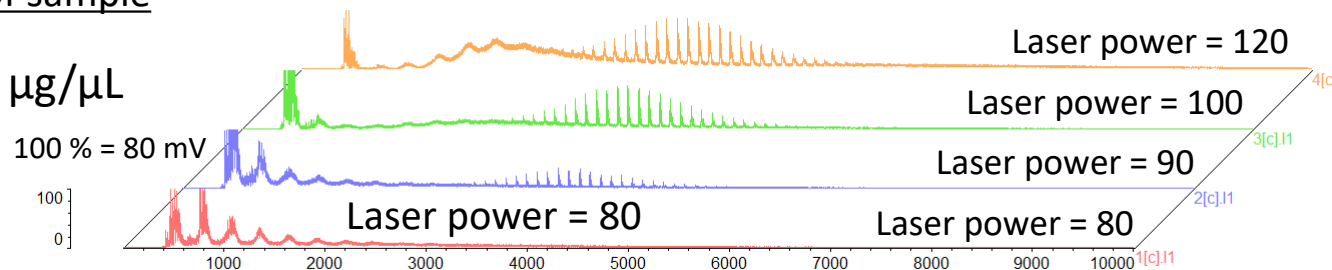


# カチオン化剤 (NaOTf) を用いたときのマススペクトル (PS)

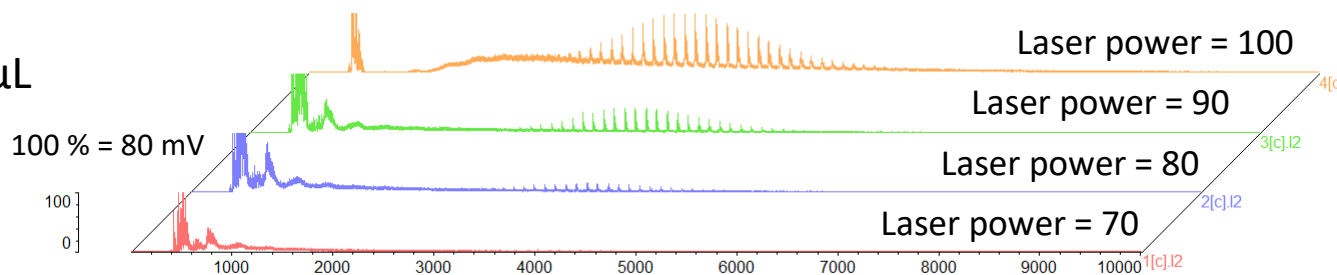
Sample : PS Mw  $3.95 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  in THF; Matrix: Dithranol, 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in acetonitrile/THF (1:1)  
Ion reagent: NaOTf, 0.5  $\mu\text{L}$  of 5 mg/500  $\mu\text{L}$  in acetonitrile

## Amount of sample

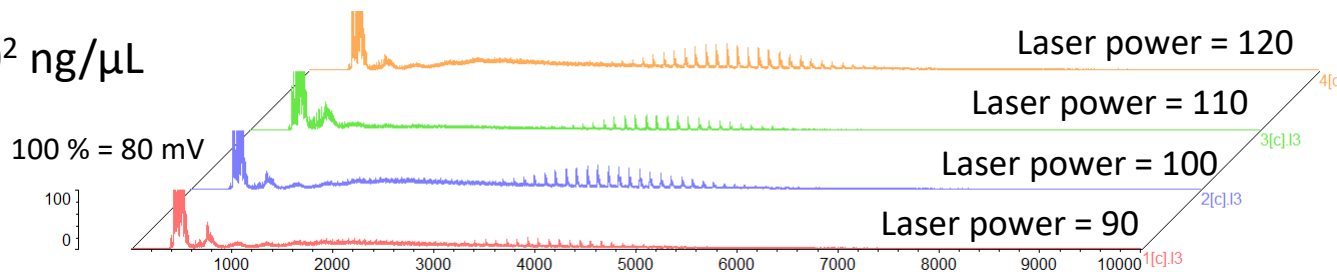
$2.2 \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



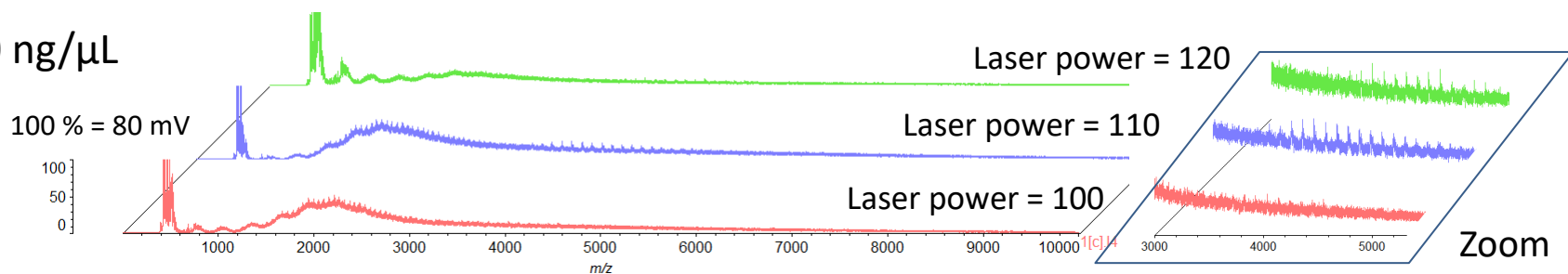
$2.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



$2.2 \times 10^2 \text{ ng}/\mu\text{L}$



$2.2 \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$

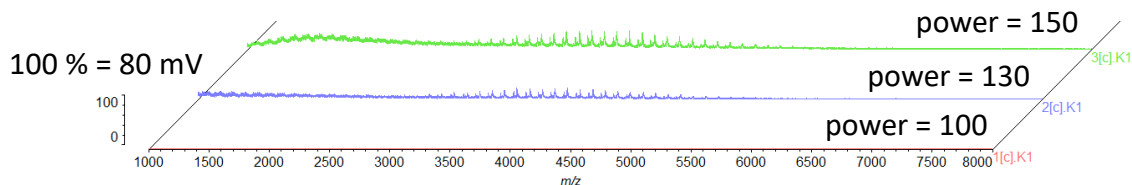


# マトリクス・カチオン化剤がないときのマススペクトル(PS)

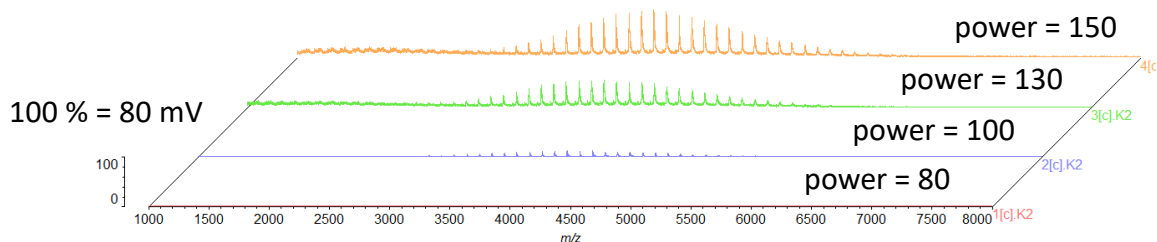
Sample : PS Mw  $3.95 \times 10^3$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of  $2.2 \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  in THF, Matrix: なし

Amount of sample

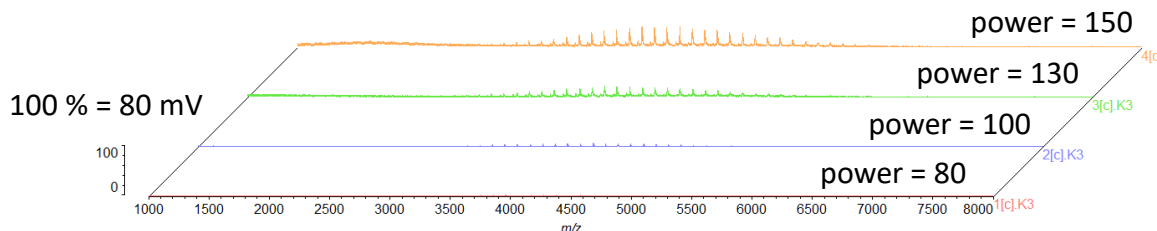
$2.2 \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



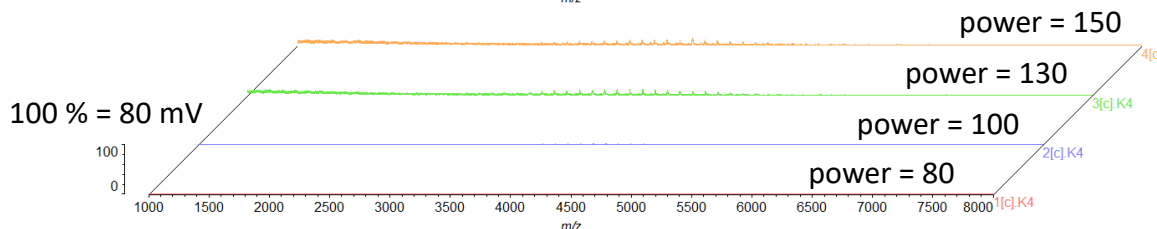
$2.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



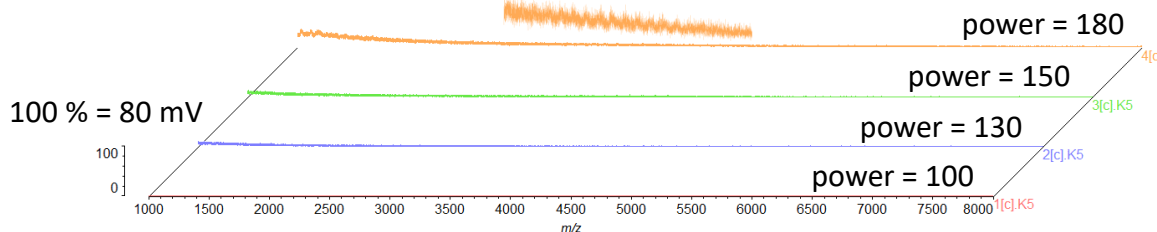
$2.2 \times 10^2 \text{ ng}/\mu\text{L}$



$2.2 \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$



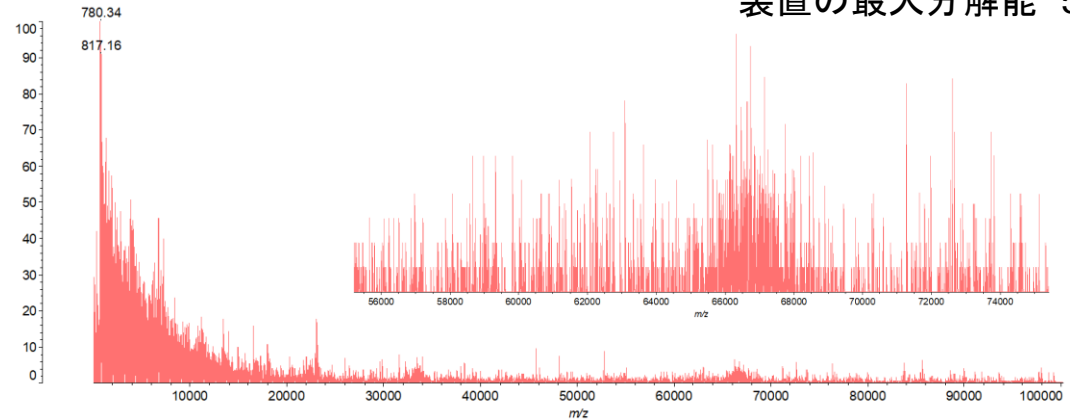
$2.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$



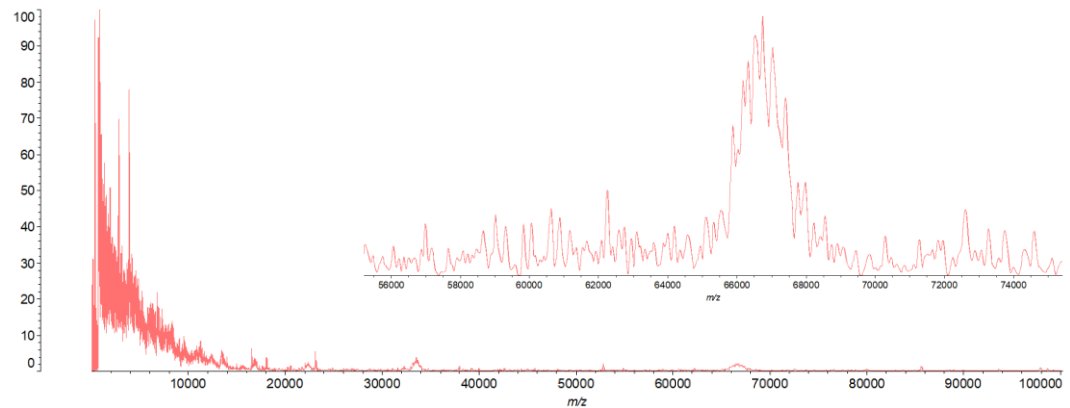
# 高分子測定とピーク波形処理

試料の分子量 約65,000  
装置の最大分解能 5,000

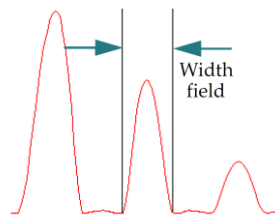
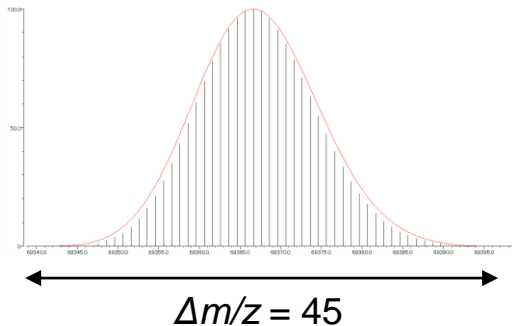
Peak width = 2  
Smoothing filter width = 5  
Baseline filter width = 5



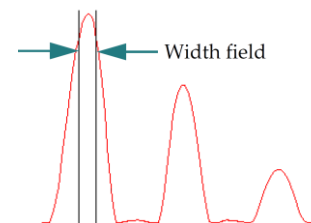
Peak width = 100  
Smoothing filter width = 400  
Baseline filter width = 100



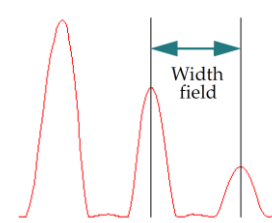
同位体分布(理論値)



Peak width



Smoothing filter width



Baseline filter width



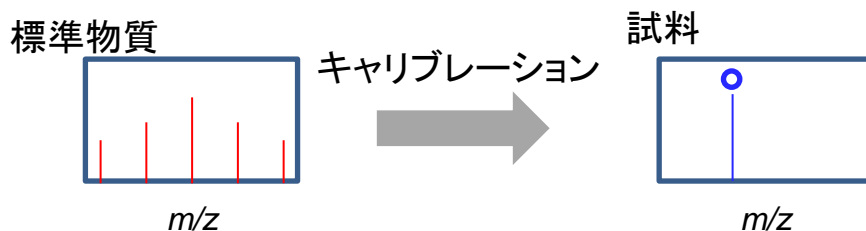
# Contents

- 質量分析
- MALDI/TOFMSの原理
- MALDI/TOFMSによるマススペクトル測定例
- 高分子試料のマススペクトル測定に影響する主因子
- 高分解能測定

# 高分解能測定－外部標準と内部標準－

## 外部標準

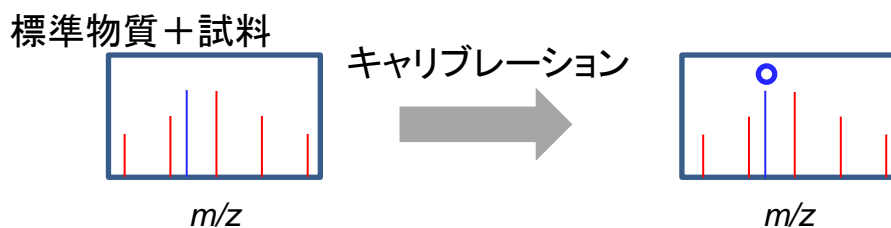
- ・ 標準物質のマスペクトルを測定してキャリブレーションファイルを作成
- ・ 試料のマスペクトルをそのキャリブレーション情報を使って測定



qTOF, IT-TOF

## 内部標準

- ・ 標準物質と試料とを一緒に測定  
(2つ以上の標準物質のシグナルが試料のシグナルを挟むことができるように)
- ・ そのマスペクトル上の標準物質でキャリブレーションしたときの試料の $m/z$ を読む



TOF

# 高分解能測定

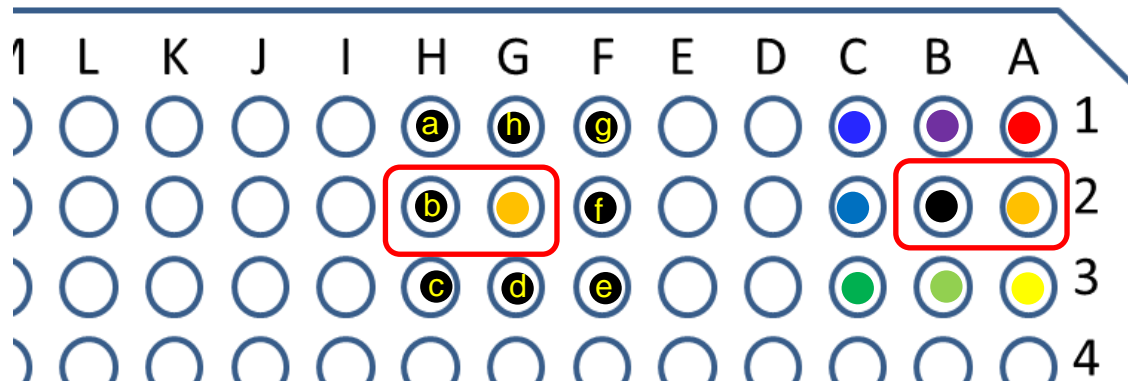
## 外部標準

同じウェルに添加

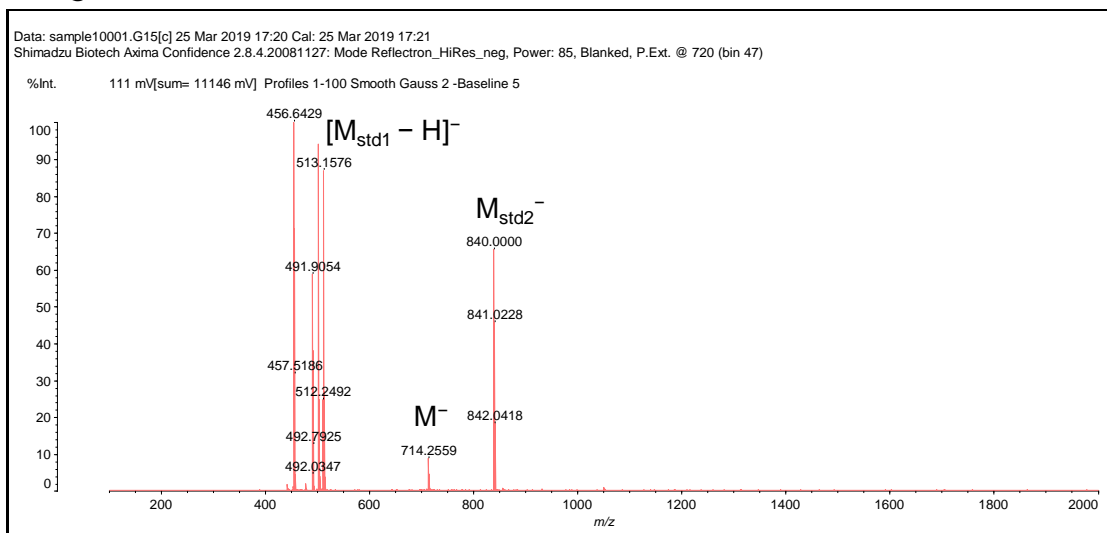
照射位置(ウェル)や塗布状態を試料と同じにできる  
試料のシグナルと標準物質のシグナルの強度が制御しにくい

隣のウェルに添加

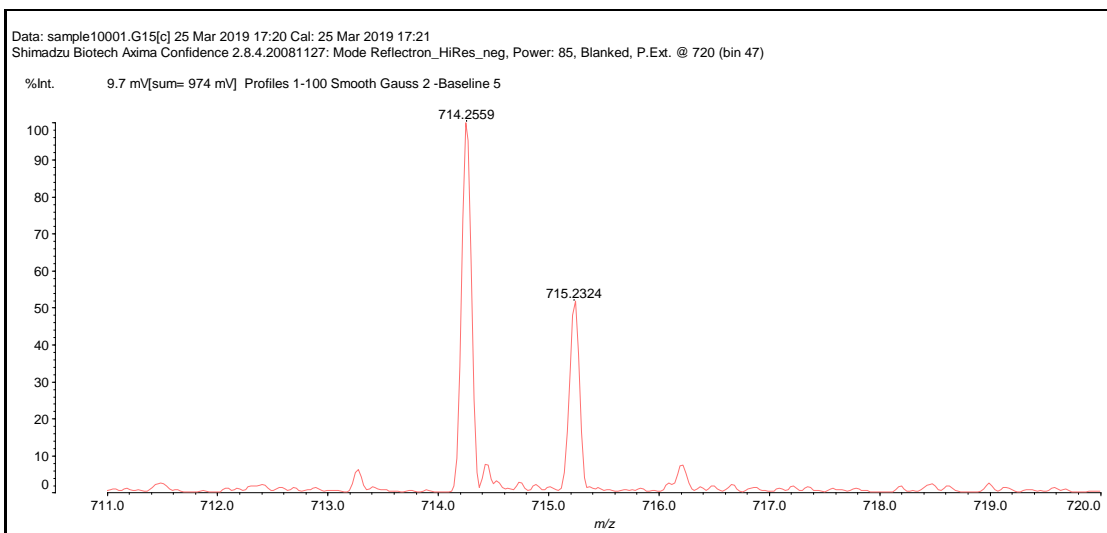
試料のシグナルと標準物質のシグナルの強度が制御しやすい  
照射位置(ウェル)や塗布状態が大きく異なる場合がある



## (a) Full range



## (b) Expanded range



Std1: phthalocyanine

Std2: Fullerene (C70)

Calcd.  $m/z$  714.2564 for  $M^-$  (M:  $C_{54}H_{34}O_2$ ); Found  $m/z$  714.2559 ( $\Delta m/z < 1$  ppm).

Fig. S1 Mass spectra of (*R*)-1-Py-2Substituted (LDI, negative mode)



ご清聴ありがとうございました