

Solutions for Innovation

JMS-S3000 SpiralTOF

**生体分子**

**アプリケーションノートブック**

2016年8月版





# JMS-S3000 SpiralTOF

## 生体分子アプリケーションノートブック

2016年8月版

### 目次

|  |    |
|--|----|
| 装置紹介 .....   | 1  |
| らせん状のイオン軌道を利用した MALDI-TOF/TOF の開発<br>（佐藤 貴弥, 日本電子ニュース 42, 27 – 30, 2010） .....   | 1  |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” らせん軌道イオン光学系によるマトリックス結晶状態の影響低減 .....  | 5  |
| 脂質 .....   | 11 |
| Structural Analysis of Triacylglycerols by Using a MALDI-TOF/TOF System with<br>Monoisotopic Precursor Selection (Kubo, A., et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 24, 684-689,<br>2013; open access article © The Authors, 2012) ..... | 11 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたトリステアリンの解析例 .....   | 17 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたトリオレインの解析例 .....  | 19 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたトリアシルグリセロールの解析例 ....  | 21 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた酸化トリオレインの解析例 .....  | 23 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたフォスファチジルコリンの解析例 ....  | 25 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた卵黄中のリン脂質の構造解析例 .....  | 27 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた側鎖の付いたリン脂質の解析例 .....  | 29 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた糖脂質の解析例 .....   | 31 |
| 「JMS-S3000 SprialTOF イメージングアプリケーションノートブック」内の以下のアプリケーション<br>ノートもご参照ください：  |    |
| ▶ JMS-S3000 “SpiralTOF” Negative モードを用いたマウス脳組織切片上の脂質のマスイメー<br>ジング  |    |
| ▶ イメージング質量分析法と走査型電子顕微鏡による指紋分析  |    |
| ペプチド・タンパク質 .....   | 33 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” の紹介 ～Bovine Serum Albumin の分析～ .....   | 33 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF モードを用いた Bovine Serum Albumin の定性分析例 ....   | 35 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” を用いたペプチドの MS/MS 測定例 .....  | 37 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたペプチドの解析例 2 .....  | 39 |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いたペプチドの解析例 3<br>（リン酸化ペプチド） .....  | 41 |

|  |           |
|--|-----------|
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションと<br>4 セクタータンデム二重収束質量分析計との比較① ..... | 43        |
| <b>天然物.....</b>  | <b>45</b> |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた天然有機化合物の測定例 .....               | 45        |
| JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた天然有機化合物の測定例 2.....              | 47        |
| <b>JMS-S3000 SpiralTOF による論文一覧（2016年5月現在） .....</b>                    | <b>49</b> |

➤ MASCOT は Matrix Science, Ltd. の商標です。

# らせん状のイオン軌道を利用した MALDI-TOF/TOFの開発

佐藤 貴弥

日本電子(株) MS事業ユニット

我々は、らせん状のイオン軌道をもつイオン光学系の開発を行った。これは、現在多くの市販装置に利用されているリフレクトロン型イオン光学系の基本性能を超える、新規のイオン光学系である。また、らせん軌道型イオン光学系を第1TOFMSに、オフセットパラボリックイオンミラーを利用したリフレクトロン型イオン光学系を第2TOFMSにした、MALDI-TOF/TOFを開発した。この装置は、らせん軌道型イオン光学系由来の特長を有し、従来装置にはない高質量分解能や高プリカーサイオン選択能を実現できる。マススペクトルでは、 $m/z$  2093にて質量分解能 60,000 (FWHM) 以上を観測すると同時に幅広い質量範囲にて高質量分解能を達成できることを示した。また、高プリカーサイオン選択能により、プリカーサイオンのモノアイソトピックイオンのみを選択可能であり、各開裂経路を示すピークを、プロダクトイオンスペクトル上でそれぞれ1つのピークとして観測することができる。その結果、プロダクトイオンスペクトルの解析がより明確となることを示した。

## はじめに

飛行時間質量分析法 (TOFMS) は、四重極型質量分析法、磁場型質量分析法、イオントラップ型質量分析法、フーリエ変換型質量分析法などと並び、質量分析計におけるイオンの質量分析技術の1つである。TOFMSでは、イオン加速部に存在する様々な $m/z$  値を含むイオン群を、ある時間始点から印加されるパルス電圧で加速し、検出面までの一定距離を飛行させる。検出面までの飛行時間は、イオンの $m/z$  値の平方根に比例するため、 $m/z$  値の小さいイオンから順次検出面に到達し、イオン群を $m/z$  値で分離することができる。TOFMSの特長は、マススペクトルを得るためにスキャンする必要がなく、高速な測定が可能であることである。現在TOFMSは、単独の質量分析法として、あるいは四重極型質量分析法と接続したタイプ (Q/TOF)、TOFMSを2つ直列に接続したタイプ (TOF/TOF) のタンデム質量分析法としても普及している。

TOFMSの質量分解能は、同一の $m/z$  値をもつイオン群 (イオンパケット) の検出面での飛行時間分布  $\Delta T$  (すなわち検出面での飛行方向

のイオンパケットの空間的な広がり)、およびその飛行時間分布の重心値  $T$  を用いて  $T/2\Delta T$  で表現することができる。TOFMSは1964年に発明されて以来 [1]、 $T$  を大きくすること、 $\Delta T$  を小さくすることにより質量分解能の向上が図られてきた。1955年にはイオン源での初期条件の分布を飛行軸方向に収束させる加速方法が開発され、 $\Delta T$  を小さくすることが可能となり質量分解能が向上した [2]。また1970年初頭には、その加速方法による収束位置を始点とし、イオンミラー [3] や扇形電場 [4] で構成されるイオン光学系を後段に配する方法が発明された。これにより  $\Delta T$  を増加させることなく、飛行距離すなわち飛行時間  $T$  を増加させることが可能となり、質量分解能が向上した。現在の市販装置のほとんどはイオンミラーを利用しており、その飛行距離は1~3mである (リフレクトロン型イオン光学系)。さらなる質量分解能の向上のために、同一軌道を複数回飛行するマルチフレクティング型 (多重反射型) [5] やマルチターン型 (多重周回型) [6、7] のイオン光学系も提案され、製作評価されている。マルチフレクティング型やマルチターン型のイオン光学系は、コンパクトな空間内

に理論上無限大の飛行距離を実現できる点で優れている。その反面、同一軌道を複数回飛行させるため、速度の大きいイオン ( $m/z$  値の小さいイオン) が、速度の小さいイオン ( $m/z$  値の大きいイオン) を追いつくので、質量範囲が限定されてしまう問題点がある。

我々は、独自にらせん軌道を利用したイオン光学系 (らせん軌道型イオン光学系) の開発をおこなった。このイオン光学系は、マルチフレクティング型やマルチターン型イオン光学系の「追いつき」の問題を解決でき、かつ現在主流のリフレクトロン型イオン光学系に比べて高質量分解能、高質量精度を実現することができる。本稿では、まずらせん軌道型イオン光学系の設計について述べる。さらに、らせん軌道イオン光学系を利用した第1TOFMSと、オフセットパラボリックリフレクトロンを利用したリフレクトロン型イオン光学系を直列につないだTOF/TOFを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) と組み合わせたMALDI-TOF/TOFの開発を行ったので、その動作や基本性能について紹介する。この装置は、第1TOFMSのらせん軌道型イオン光学系を利用することで、高質量分解能、



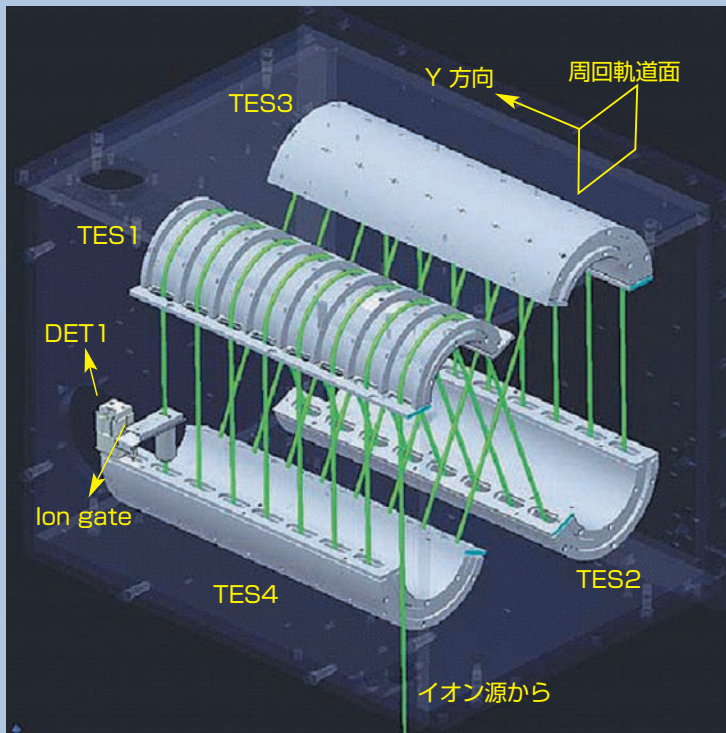


Fig. 1 らせん軌道型イオン光学系。

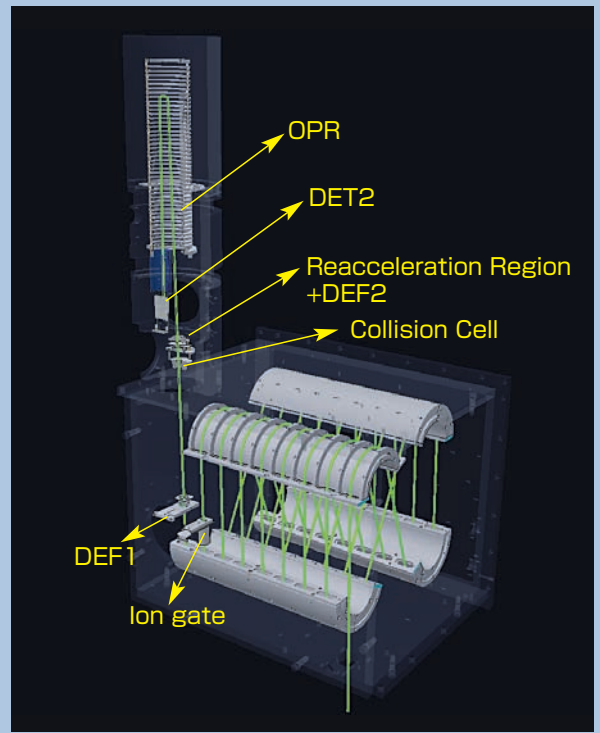


Fig. 2 らせん軌道型イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOF。

高質量精度、高ブリカーサイオン選択能を実現することができ、より明確な分析を可能とする。

## らせん軌道型イオン光学系の設計

らせん軌道型イオン光学系を開発するに当たっては、マルチターン型イオン光学系の技術を応用した。特に、大阪大学で開発された“Perfect Focusing”と“マルチターン” [12]の組み合わせは、TOFMSとして世界最高質量分解能を実現しており、らせん軌道イオン光学系への展開には最適と考えた。マルチターン型イオン光学系を、らせん軌道状に展開するためには、イオン軌道を周回軌道面と垂直方向に移動させていく必要がある。我々は、これを実現するために周回軌道面に対して、イオンを数度傾けて入射させる方法をとった。この方法の最大の利点は、各階層にイオン軌道を移動させるための構造物が不要なことである。その反面、斜め入射によるマルチターン型イオン光学系からのずれによる質量分解能の悪化も懸念されるが、進入角度を数度と浅く保つことでその影響を小さくすることができると思われた。

さて実際には、円筒電場と2枚のマツダプレートを組み合わせたトロイダル電場4つで構成されたMULTUM II [7]の構造を基本として、らせん軌道型イオン光学系を設計した。イオン光学系の概略図をFig. 1に示す。らせん軌道への展開は、円筒電場中に(周回数+1)枚のマツダプレートを組み込み、トロイダル電場を階層状にした構造物(階層状トロイダル電場: TES)を利用することで実現した。各TESは、

内側電極と外側電極の間隔 $L_x$ に、等しい空間 $L_y$ を設けて並べられた(周回数+1)枚のマツダプレートで構成されている。TES1~4への印加電圧は、内側電極電圧、外側電極電圧、マツダプレート電圧の3種類であり、それぞれTES1~4の全てのマツダプレート、TES1~4の各内側電極および各外側電極に供給されている。

そして4つのTESを周回軌道面からみればMULTUM IIと同じになるように配置した。Y方向は周回軌道面に対して垂直方向な方向、すなわち1周回ごとにイオン軌道が移動していく方向であり、後述のMALDI-TOF/TOFの開発では水平方向に設定した。Fig. 1のTES1は外側電極を外した状態を示しており、マツダプレートが等間隔に並んでいる様子がわかる。イオンは $L_x$ と $L_y$ とで形成される空間の中心を飛行する。同階層のTES1~4を順次通過し、TES4通過後、TES1の次階層へ入射する。それを周回数分繰り返すことで、らせん状のイオン軌道を描き検出器(DET1)に到達する(Fig. 1中、緑線がイオン軌道)。マツダプレートの厚さを $L_m$ 、周回軌道長を $L_c$ とすると、同一階層トロイダル電場の階層間の中心軌道距離(すなわち1周回ごとにY方向にずれる距離)は、 $L_y + L_m$ であり、階層状トロイダル電場への入射角 $\theta$ は、1周回の軌道長 $L_c$ を用いて、

$$\tan \theta = (L_y + L_m) / L_c \cdots \cdots (1)$$

とあらわすことができる。以上のように、イオン光学系は同一の4つのTES1~4で構成することにより、複雑なイオン軌道を、シンプルな構造物で実現できている。

## らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOFの製作

我々は、第1TOFMSにらせん軌道型イオン光学系と第2TOFMSにリフレクトロン型イオン光学系を直列に配置し、MALDIイオン源と接続したMALDI-TOF/TOFを開発した。以下では、第1TOFMSでのマススペクトル測定をスパイラルモード、第2TOFMSでのプロダクトイオンスペクトル測定をTOF-TOFモードと呼ぶ。

装置の概略図をFig. 2に示す(ただしイオン源と第1TOFMS用検出器DET1は省略されている)。らせん軌道は、1周回2.093mの8周回に設定した。同一TESの隣り合う階層の中心軌道間の距離は、58mmであるので、式(1)からTESへの入射角度は1.6度となる。Y方向は水平方向に設定しており、イオン源からの引き出し方向を水平より1.6度傾けることで入射角度を実現している。

スパイラルモードでは、イオンはらせん軌道を描き、スパイラルモード用検出器(Fig. 2に記載はしていないが、Fig. 1のDET1と同じ位置にある)で検出される。7周目にはイオンゲートが配置され、データ取得範囲外のマトリックスに由来する高強度のイオンを排除することができる。

TOF-TOFモードでは、このイオンゲートによる選択幅を小さくし、ブリカーサイオンのモノアイソトピックイオンを選択する。また、コリジョンセルへブリカーサイオンが導入されるように、スパイラルモード用検出器を機械的に軌道外に外すことができる。コリジョンセルに入射したイオンは、およそ20 keVの

運動エネルギーでコリジョンセル中の希ガスと衝突、解離し、フラグメントイオンを生成する。プリカーサイオンおよびフラグメントイオンは、オフセットパラボリックリフレクトロン(OPR) [13]と再加速機構を組み合わせたリフレクトロン型イオン光学系にて質量分離される。OPRは、直線電場と放物線電場をつなげたリフレクトロンであり、 $m/z$  値の小さなフラグメントイオンからプリカーサイオンまでを同時に質量分離可能である。また、イオンの透過率を向上させるため、コリジョンセル前後に配置した2つのデフレクタDEF1とDEF2によりイオン軌道の微調整が可能である。

## らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF/TOFの評価

Fig. 3にスパイラルモードで測定した6種類の標準ペプチド混合物(分子量が小さいほうからBradykinin fragment 1-7, Angiotensin II, Angiotensin I, P14R, ACTH fragment 1-17, ACTH fragment 18-39)のマススペクトルを示す。Angiotensin IIおよびACTH fragment 1-17については、拡大図も示した。それぞれの質量分解能は、58,000 (FWHM) と73,000 (FWHM) である。また、ACTH fragment 1-17以外の5つのペプチドで内部キャリブレーションを行った場合の、ACTH fragment 1-17の質量誤差は0.16 ppmである。以上から、らせん軌道型イ

オン光学系の飛行距離17mは、従来のリフレクトロン型イオン光学系のそれよりも5倍以上長く、質量分解能・質量精度を向上させることができることが分かった。

Fig. 4には、ACTH fragment 1-17で質量分解能を調整した場合の、 $m/z$  値と質量分解能の関係を示した。Fig. 4から幅広い $m/z$  領域で同時に高質量分解能を達成できることがわかる。これは高質量分解能が局所的にしか達成できなかった従来のリフレクトロン型イオン光学系を利用したMALDI-TOFMSの課題を解決するものである。

Fig. 5aにTOF/TOFモードで測定したPoly(oxypropylene) のプロダクトイオンスペクトルの全体図を示す。選択したプリカーサイオンは、 $[M+Na]^+$  シリーズ中の $m/z$  1027のモノアイソトピックイオンである。Fig. 5aからプロダクトイオンとしてのナトリウムイオンからプリカーサイオンイオンまで、多くの開裂情報が得られていることが分かる。さらに $m/z$  780付近を拡大したFig. 5bを示す。本装置では、プリカーサイオンのモノアイソトピックイオンを選択が可能のため、プロダクトイオンも同位体ピークを含まない形で観測できる。つまり、Fig. 5bの2本のピークは異なる開裂経路を示すものであり、2u異なる開裂経路も明確に分離することができる。Fig. 5cに、従来TOF/TOFで測定した場合に、観測されるFig. 5bの $m/z$  領域のイメージ図を示した。従

来のTOF/TOFの選択能では、プリカーサイオンの同位体ピークも含まれた形で、フラグメントイオンを生成するため、プロダクトイオンスペクトルの各開裂経路についても同位体ピークが観測される。その結果、2u程度しか離れていない場合、各開裂経路の同位体ピークが重なってしまうため、明確に分離することは難しい。以上の結果から、本装置のらせん軌道イオン光学系由来の高いプリカーサイオン選択能を活かすことで、対象となる化合物の分析が容易となることが分かる。

## 結論(まとめ、おわりに)

本稿では、らせん軌道型イオン光学系の開発について報告した。また、らせん軌道型イオン光学系とオフセットパラボリックイオンミラーを用いたリフレクトロン型イオン光学系を接続し、MALDI-TOF/TOFを開発し、その性能評価を行った。新奇なイオン光学系の採用により、これまでのMALDI-TOF、MALDI-TOF/TOFの課題を克服し、様々な分野での分析に役立つものと思われる。

## 参考文献

- [1] W. E. Stephens. *Phys. Rev.*, **69**, 691 (1946)
- [2] W.C.Wiley and I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.*, **26**, 1150 (1955).

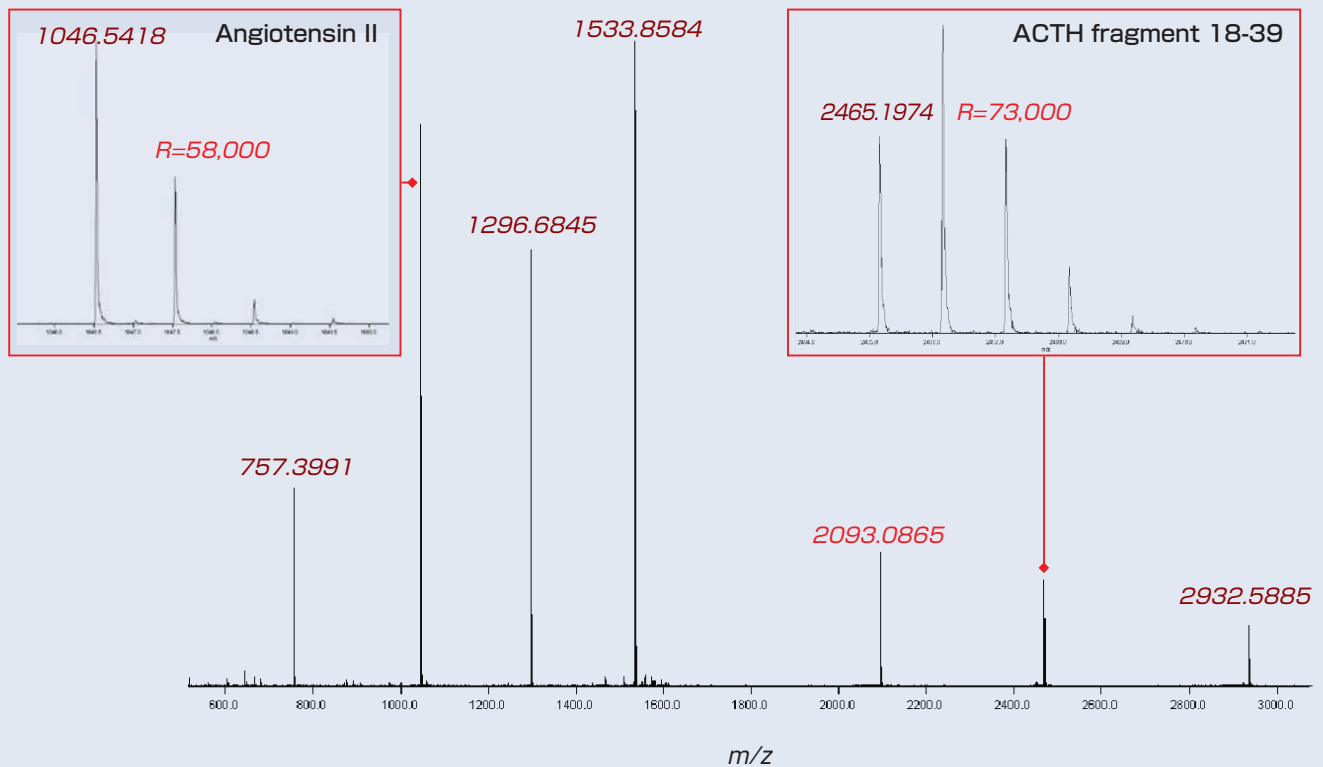


Fig. 3 標準ペプチド混合物のマススペクトル。

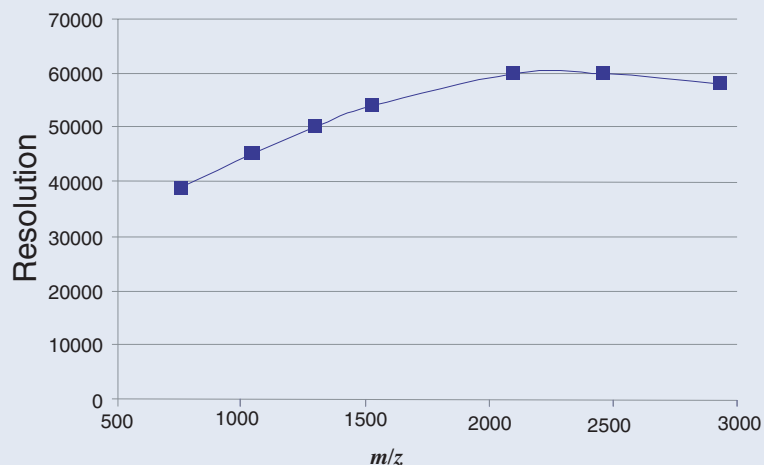


Fig. 4  $m/z$ 値と質量分解能の相関。

a. プロダクトイオンスペクトル全体

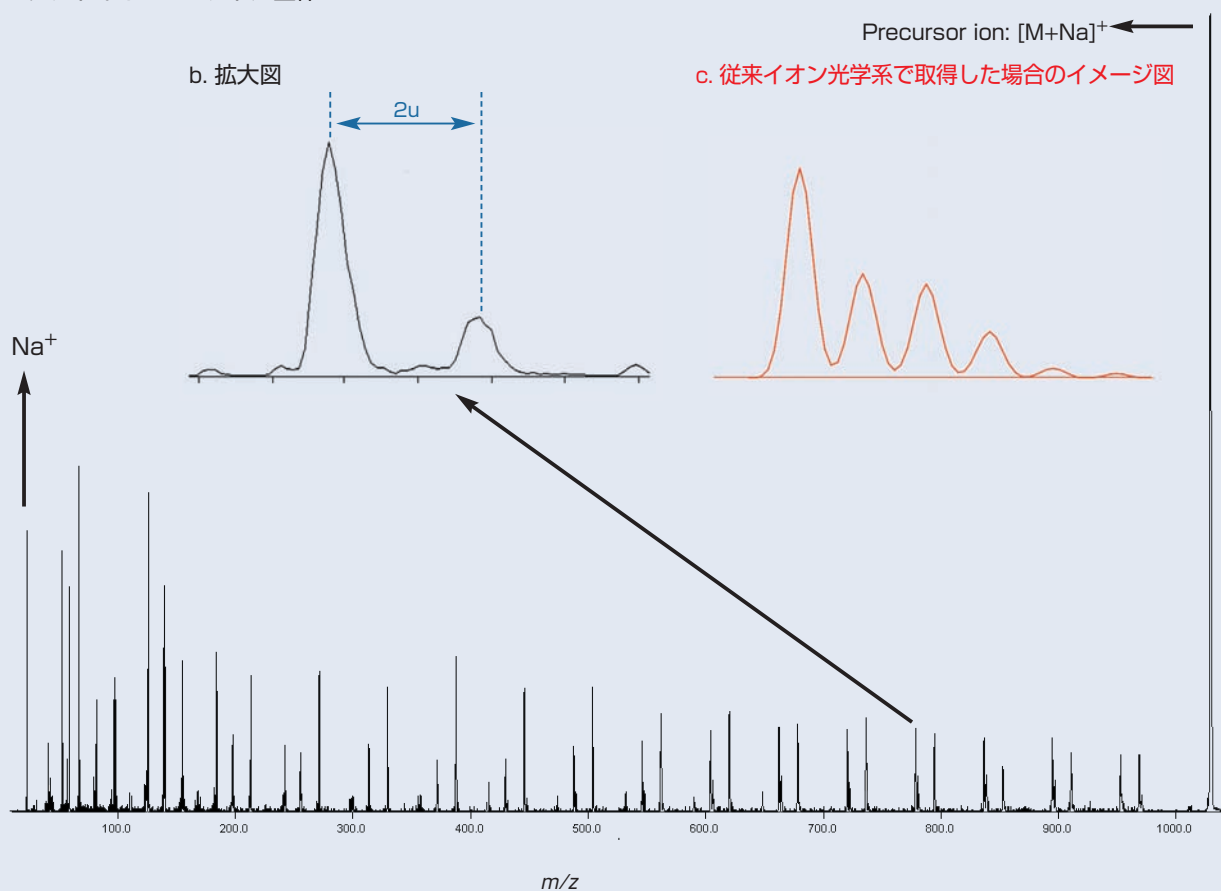


Fig. 5 Poly (oxypropylene) のプロダクトイオンスペクトル。

- [3] B. A. Mamyurin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk and V. A. Zagulin, *So. Phys. JETP*, **37**, 45 (1973).
- [4] W. P. Poschenrieder, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Phys.*, **6**, 357 (1972).
- [5] H. Wollnik and A. Casares, *Int. J. Mass Spectrometry*, **227**, 217 (2003).
- [6] M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Reinhard and H. Rosenbauer, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 163 (2000).
- [7] D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 349 (2003).
- [8] M. Yavor, A. Verentchikov, J. Hasin, B. Kozlov, M. Gavrik and A. Trufanov, *Physics Procedia* **1** 391 (2008)
- [9] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, Y. Kammei, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1969 (2005).
- [10] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, and Y. Kammei, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 11 (2006).
- [11] T. Satoh, T. Sato, and J. Tamura, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1318 (2007).
- [12] M. Ishihara, M. Toyoda and T. Matsuo, *Int. J. Mass Spectrom.*, **197**, 179 (2000).
- [13] E. N. Nikolaev, A. Somogyi, D. L. Smith, C. Gu, V. H. Wysocki, C. D. Martin and G. L. Samuelson, *Int. J. Mass Spectrom.*, **212**, 535 (2001)



## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000 “SpiralTOF” らせん軌道イオン光学系による マトリックス結晶状態の影響低減

## 【はじめに】

JMS-S3000 SpiralTOF™ は、弊社独自のらせん軌道イオン光学系を採用し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析計(MALDI-TOFMS)としては、類をみない 17 m という飛行距離を実現した(一般的なリフレクトロン TOFMS は数 m)。この長い飛行距離によって、市販されている MALDI-TOFMS の中で世界最高の質量分解能および質量精度を実現している。さらに飛行距離の延長により、従来リフレクトロン TOFMS では問題となっていた、マトリックス結晶の凹凸の質量軸への影響を軽減し、外部標準法による質量校正においても、再現性の高い質量分解能と高い質量精度を達成できる。

本報告では、合成高分子ポリマーの標準試薬を、代表的な 4 種類のマトリックス化合物を利用して測定した結果を示す。また、JEOL JSM-7600F サーマル電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)を用い、それぞれの結晶状態も観測した。

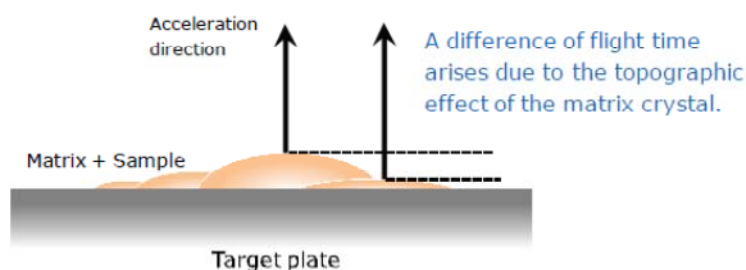


Fig. 1 Reduced topographic effect of matrix crystal.

## 【実験】

試料作製方法を Table 1 に示す。ポリエチレングリコール(PEG)1500 は 10 mg/mL の濃度の水溶液、マトリックスはそれぞれ 10 mg/mL の濃度のテトラヒドロフラン(THF)溶液、カチオン化剤としてヨウ化ナトリウム(NaI)を 1 mg/mL の濃度の水溶液とした。次に PEG1500、カチオン化剤、マトリックスの各溶液を、容量比 1:1:2 で混合した(ジスラノール(DIT)のみ 1:1:4)。その後、それぞれの混合溶液 0.75  $\mu$ L を、ヘアライン仕上げのステンレス製ターゲットプレートの 10 スポット(2 グループ分)に滴下した。ここでターゲットプレートは、MTP 形式の 384 サンプルスポットと、4 つのサンプルスポット毎にキャリブレーションスポットが配置されている。4 つのサンプルスポットと 1 つのキャリブレーションスポットを 1 グループと呼ぶ。滴下した溶液を乾燥させ結晶化させた後、SpiralTOF で測定した。また、各結晶状態の SEM 画像を、JSM-7600F で取得した。

Table 1. Sample information and preparation conditions.

JMS-S3000 の測定条件

|        |  | 濃度      | 溶媒                 |
|--------|--|---------|--------------------|
| サンプル   | ポリエチレングリコール(PEG) 1500  | 10mg/mL | 水                  |
| カチオン化剤 | ヨウ化ナトリウム(NaI)  | 1mg/mL  | 水                  |
| マトリックス | $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(CHCA)   | 10mg/mL | テトラヒドロフラン<br>(THF) |
|        | 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)   | 10mg/mL |                    |
|        | ジスラノール(DIT)  | 10mg/mL |                    |
|        | トランス-3-インドールアクリル酸(IAA)   | 10mg/mL |                    |
| 混合比    | サンプル:カチオン化剤:マトリックス = 1:1:2 (v/v)<br>ただし DIT のみ PEG1500:NaI:DIT = 1:1:4 (v/v) |         |                    |
| 滴下方法   | 各種マトリックスを含む混合溶液 0.75 $\mu$ L を, ステンレス製プレート 2 グループ分 10 スポットずつ滴下した。            |         |                    |

JSM-7600F 測定条件

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| サンプル前処理 | コーティングなし                  |
| 加速電圧    | 1kV                       |
| 倍率      | $\times 500, \times 2000$ |



Fig. 2 JMS-3000 SpiralTOF.



Fig. 3 JSM-7600F Thermal FE-SEM.

## 【結果及び考察】

各種マトリックスを用いた、PEG1500 のマススペクトルを Fig. 4 に示す。 $[\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{34}\text{H}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  1537.9) の質量分解能が最大となるように遅延時間を設定した。それぞれ約 70,000 と、同位体ピークの分離に必要な分解能を大幅に上回り、ほぼ同じ分子量分布を観測した。 $m/z$  1097.6,  $m/z$  1537.9, および  $m/z$  1978.2 での質量分解能の平均値(10 スポット分)を Fig. 5 に示す。マトリックス化合物によらず高い質量分解能を実現できていることが分かる。さらに外部標準法による質量精度についても調べた。ここでは、キャリブレーションスポットのマススペクトルで質量校正を行ったのち、同グループの 4 つのサンプルスポットを測定した。各種マトリックスで 2 グループ分 8 スポットの  $m/z$  1097.6,  $m/z$  1537.9, および  $m/z$  1978.2 の質量誤差を Fig. 6 に示す。やはりマトリックス化合物によらず、 $\pm 10$  ppm という外部標準法においても優れた質量精度で測定できることを確認した。

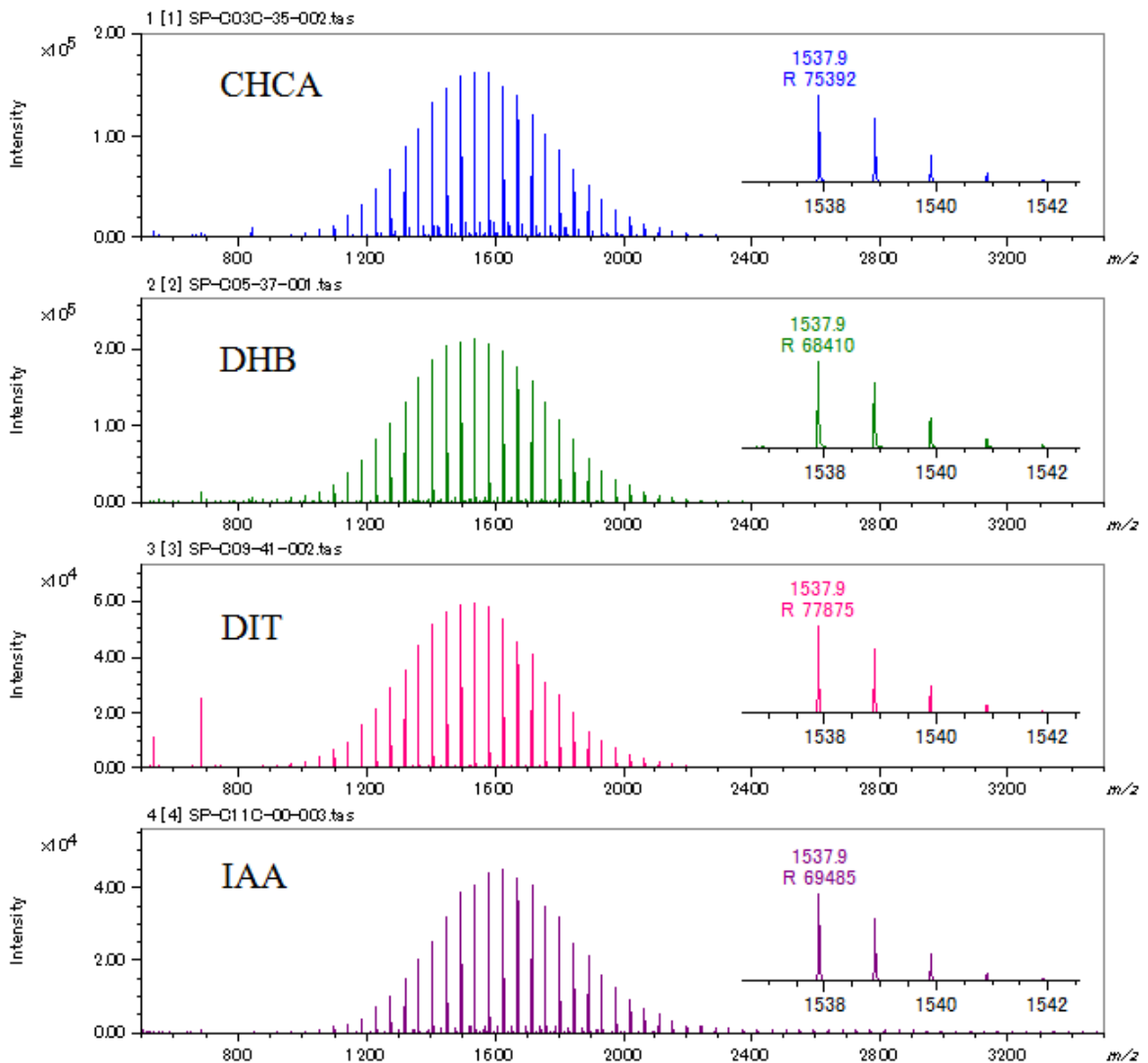


Fig. 4 MALDI mass spectra of PEG1500

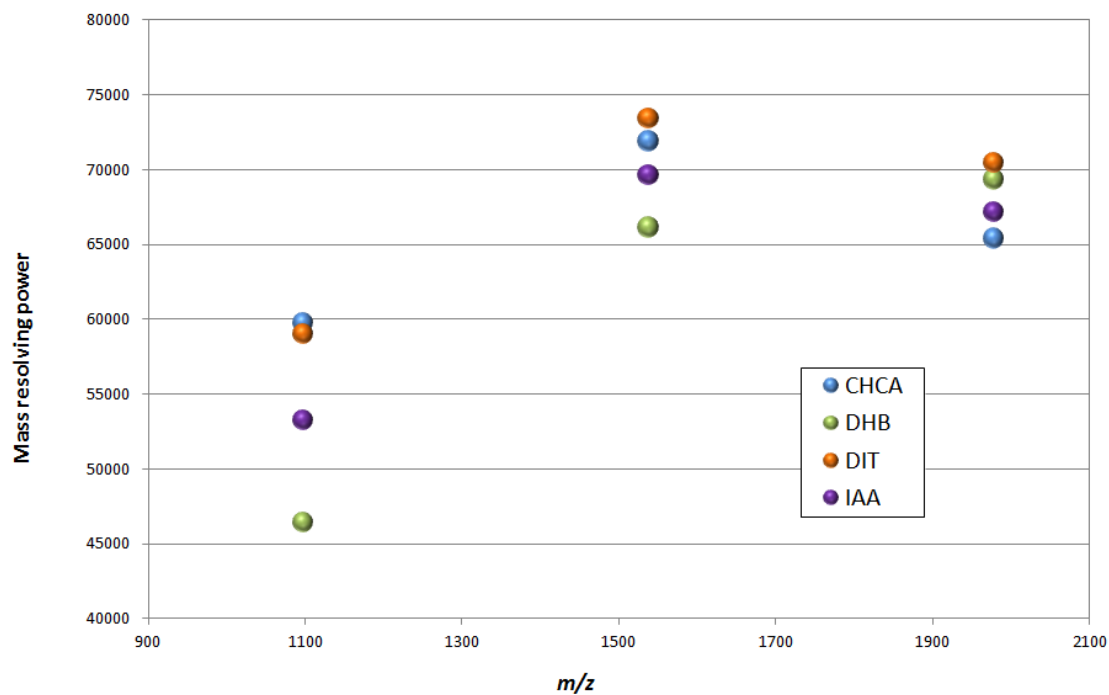


Fig. 5 Averaged mass resolving power (10 spots) for  $m/z$  1097.6,  $m/z$  1537.9 and  $m/z$  1978.2.

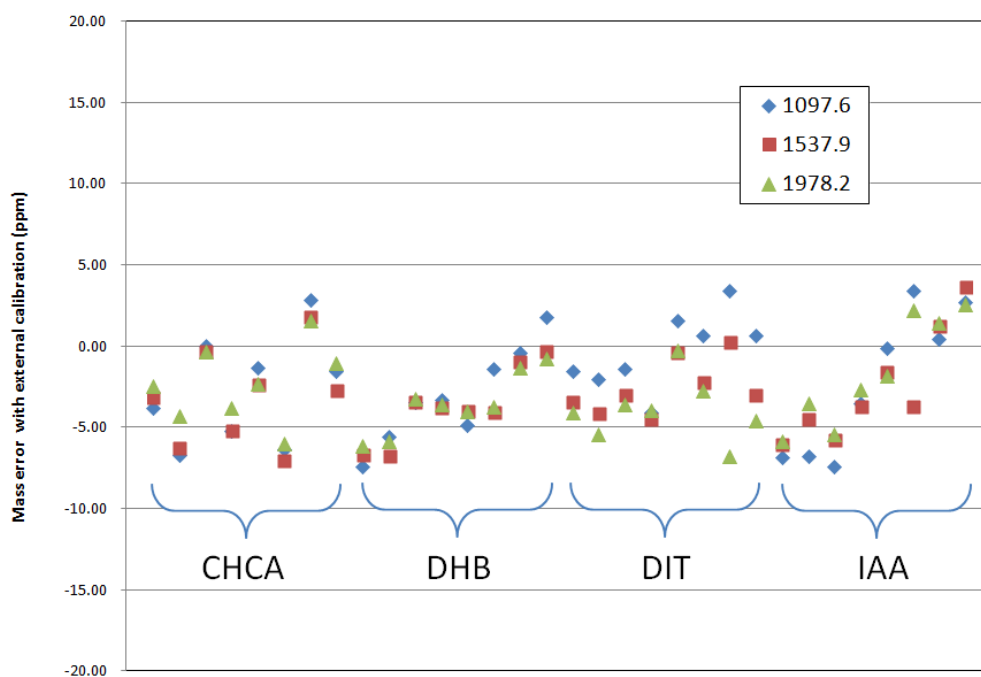


Fig. 6 Mass error with external calibration method at  $m/z$  1097.6,  $m/z$  1537.9 and  $m/z$  1978.2 in eight spots mass spectra using four typical matrix compounds.

次に JEOL JSM-7600F FE-SEM により結晶状態を調査した。その SEM 画像を Fig. 7 から Fig. 10 に示す。全て左図が×500、右図が×2000 である。結晶の形状、大きさ、分散状態は、各種マトリックスによって大きく異なるが、SpiralTOF の性能はその影響を受けなかった。

#### 【まとめ】

代表的な 4 つのマトリックス化合物を用いても SpiralTOF は高い質量分解能と同時に、外部標準法の質量校正においても高い質量精度を達成した。SEM 画像からは、それぞれの結晶状態は異なるものの、その凹凸による影響は飛行距離に比例するため、飛行距離 17m の SpiralTOF では、飛行距離数 m のリフレクトロン TOFMS と比較して小さくなる。これは、らせん軌道イオン光学系を採用している SpiralTOF の特長であり、より簡便に高精度の測定結果を得られることが期待できる。

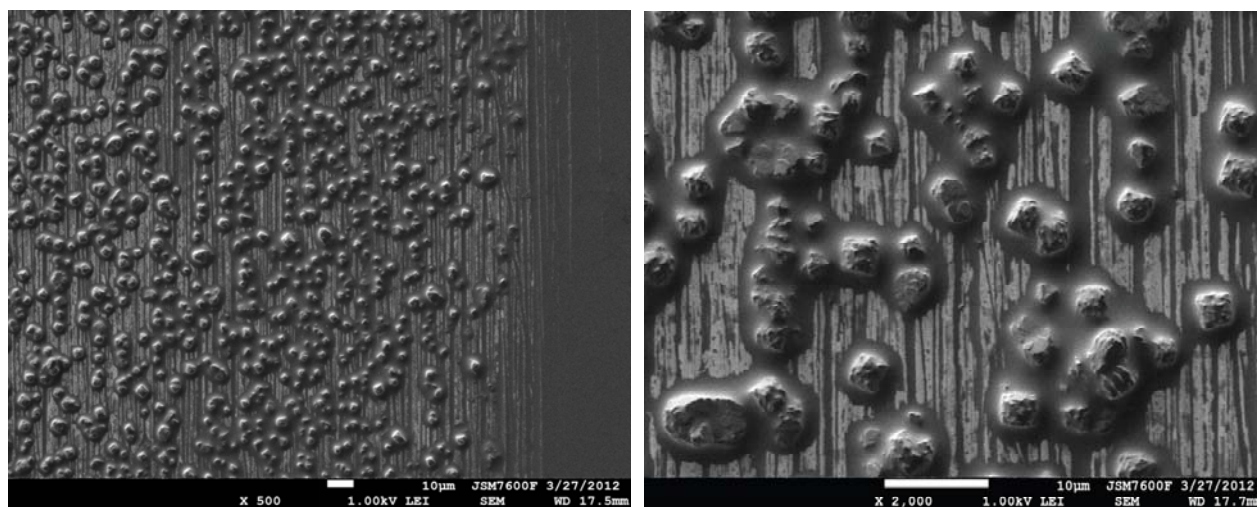


Fig. 7 SEM images of CHCA crystal with PEG1500: left: x500, right: x2,000.

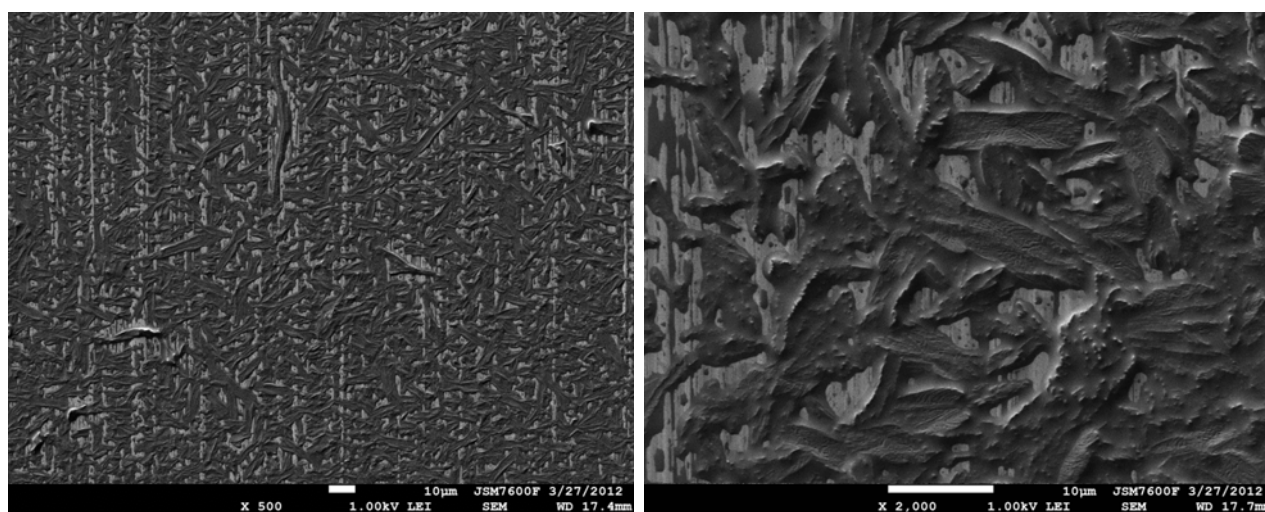


Fig. 8 SEM images of DHB crystal with PEG1500: left: x500, right: x2,000



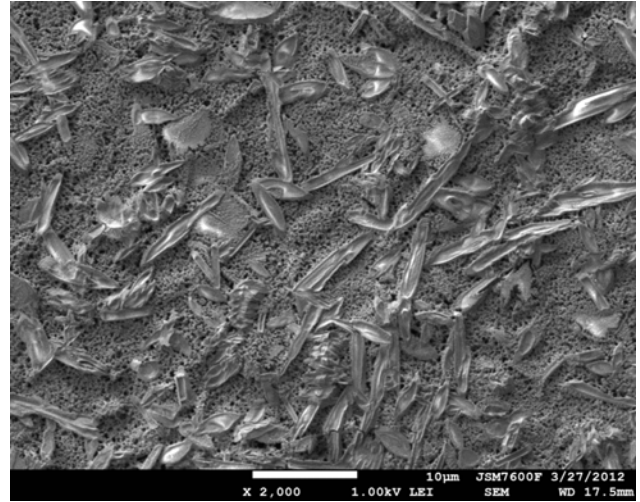
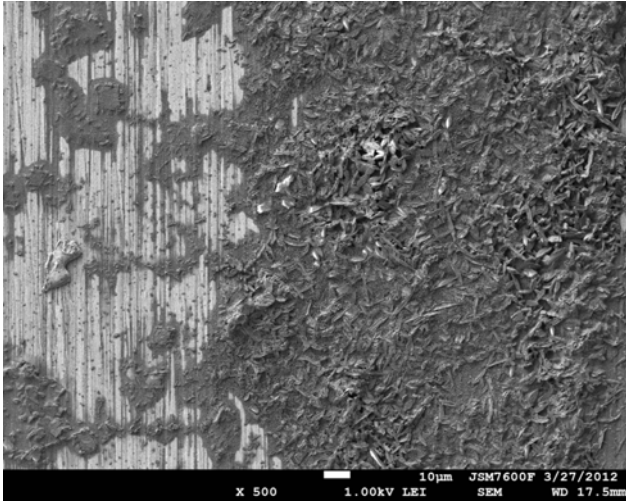


Fig. 9 SEM images of DIT crystal with PEG1500: left: x500, right: x2,000.

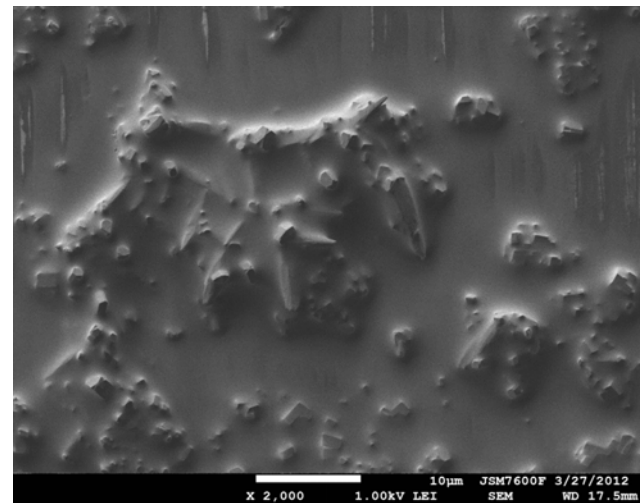
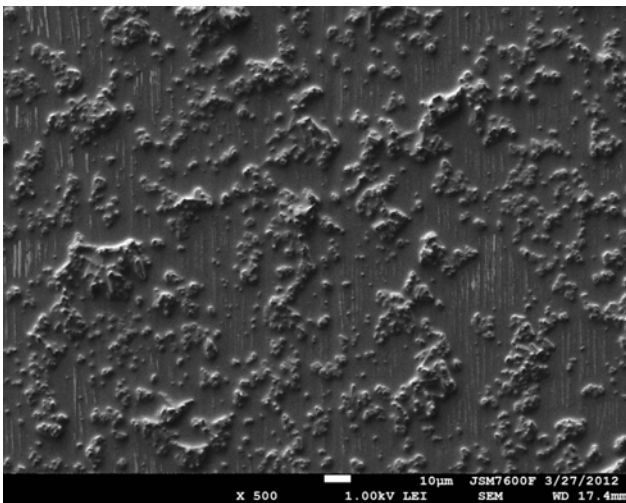


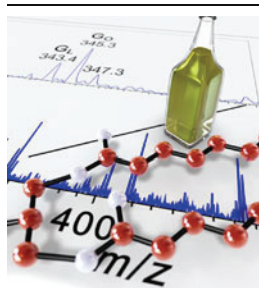
Fig. 10 SEM images of IAA crystal with PEG1500: left: x500, right: x2,000.

# Structural Analysis of Triacylglycerols by Using a MALDI-TOF/TOF System with Monoisotopic Precursor Selection

Ayumi Kubo,<sup>1</sup> Takaya Satoh,<sup>1</sup> Yoshiyuki Itoh,<sup>1</sup> Masahiro Hashimoto,<sup>1</sup> Jun Tamura,<sup>1</sup> Robert B. Cody<sup>2</sup>

<sup>1</sup>JEOL Ltd., Tokyo, Japan

<sup>2</sup>JEOL USA, Inc., Peabody, MA 01960, USA



**Abstract.** A new MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection was applied to the analysis of triacylglycerols in an olive oil sample. Monoisotopic precursor selection made it possible to obtain production mass spectra without interference from species that differed by a single double bond. Complete structure determination of all triacylglycerols, including structural isomers, was made possible by interpreting the charge-remote fragmentation resulting from high-energy collision-induced dissociation (CID) of the sodiated triacylglycerols.

**Key words:** MALDI, TOF/TOF, Charge-remote fragmentation, High-energy CID, Triacylglycerols, MS/MS, Lipids, Collision-induced dissociation

Received: 29 March 2012/Revised: 22 June 2012/Accepted: 22 June 2012/Published online: 18 December 2012

## Introduction

Triacylglycerols (TAGs or triglycerides) are comprised of three fatty acids esterified with glycerol. Because TAGs are the major components in animal fats and vegetable oils, the analysis of TAGs is biologically important and crucial for quality control of food products.

Recent mass spectrometric approaches to the analysis of TAGs have made use of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [1–5] or electrospray ionization (ESI) [6–10] and tandem mass spectrometry (MS/MS).

Using ESI and a triple quadrupole mass spectrometer, Hsu and Turk [6] reported that collisional activation of lithium adducts of TAGs can provide structural information about the acyl groups. Low-energy collision-induced dissociation (CID) of cationized TAGs does not provide information about the position of the double bonds. However, the CID fragments of unusual dilithiated species was shown to be dependent on double bond location. Byrdwell and Neff [7] reported a method based on dual parallel ESI and APCI combined with tandem mass spectrometry for the analysis of TAGs and their oxidation products. McAnoy et al. [8] used ESI with a linear ion trap to characterize TAG components within a complex mixture of neutral lipids from cell extracts.

High-energy CID is an especially attractive approach for TAG analysis because charge-remote fragmentation [11–22] provides a great deal of information about lipid structure. The complete structural characterization of TAGs was reported in 1998 by Cheng et al. using fast atom bombardment (FAB) and tandem magnetic sector mass spectrometry with high-energy CID fragmentation of the  $[M + Na]^+$  species [21]. All TAG structural features could be determined except stereochemistry.

However, large tandem magnetic sector mass spectrometers have fallen out of favor in recent years and high-energy CID appeared destined to become a “lost art” until the introduction of tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometers by Cotter and Cornish in 1993 [22]. Recently, Pittenauer and Allmaier showed that TOF/TOF mass spectrometers have the potential to provide the same complete structural information as a tandem magnetic sector mass spectrometer [23]. The principal limitation of this method was found to be the poor MS-I selectivity (a 4 to 6 u window) of the TOF/TOF system, making it impractical to select precursor ions for TAGs with compositions that differ by two hydrogens. The authors concluded that a LC/MALDI-MS/MS approach might be required to make use of charge-remote fragmentations to characterize TAGs in complex mixtures.

We have developed a tandem time-of-flight mass spectrometer featuring high precursor ion selectivity that resolves the problem of poor MS-I selectivity [24]. The mass

Correspondence to: Robert Cody; e-mail: cody@jeol.com

spectrometer uses multi-turn and “perfect focusing” ion optics [25] to fit a very long (17-m) flight path into a compact space [26]. In TOF/TOF mode, an ion gate positioned at the 15 m point in the spiral ion flight path is used to isolate and guide the precursor ion into a gas-filled collision chamber. The long flight path provides ample time separation prior to precursor ion selection, resulting in unit precursor selectivity. The precursor ions undergo 20 kV collisions with a target gas and are subjected to a 9 kV post-acceleration into an offset parabolic reflectron with wide energy acceptance.

Monoisotopic precursor selection combined with high-energy CID is the key to using TOF/TOF for structural analysis of triacylglycerols in complex mixtures. This paper describes the method for structural analysis with this system and reports the complete structural analysis of TAGs, including isomers, in a commercial olive oil sample.

## Experimental

### Materials and Chemicals

A triacylglycerol standard (1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol), matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid or DHB), and cationizing agent (sodium trifluoroacetate), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A trioleoyl-glycerol (triolein) standard was purchased from TCI. Tetrahydrofuran (THF) was purchased from Wako (Osaka, Japan) and olive oil was purchased from local stores. The triacylglycerol standard, including triolein, and the olive oil were dissolved in THF at respective concentrations of 100 pmol/uL and 10 ug/uL. A solution of sodium trifluoroacetate and DHB was dissolved in THF at respective concentrations of 1 ug/uL and 20 ug/uL, and added to the samples at a volume ratio of 1:1:2. The resulting mixture was loaded onto an MTP 96-hole hairline plate (JEOL Ltd., Akishima Japan) at a volume of 1 uL per spot.

### MALDI Mass Spectrometry

A JMS-S3000 Spiral TOF (JEOL Ltd., Akishima, Japan) equipped with the TOF/TOF option was used for all measurements. The laser was a Nd-YLF laser operated at

a wavelength of 349 nm. The laser intensity and the detector voltage were set to prevent triacylglycerol peaks from saturating. The extraction delay was optimized to 400 ns to provide a resolving power (FWHM) of approximately 50,000 for the TAG peaks in MS-I mode. For product-ion mass spectrum acquisition, helium collision gas was introduced to attenuate the precursor ion abundance to approximately 50 % of the initial value. The laser was operated at a repetition rate of 1000 Hz. Spectra were acquired at a rate of two spectra per s and 500 spectra were accumulated for each product-ion mass spectrum shown here.

## Results and Discussion

Figure 1 shows the structure of 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol. The structure shows (18:1) oleic acid, (16:0) palmitic acid, and (18:2) linoleic acid substituents at position *sn-2* (the site that determines the stereochemistry) and positions *sn-1* and *sn-3*, respectively. In this article, we have labeled the fatty acid substituents at positions *sn-1* and *sn-3* as “*sn-1/sn-3*.” The substituents at *sn-1* and *sn-3* are indistinguishable by mass spectrometry because the steric structure of triacylglycerol cannot be identified by mass spectrometry. Each fragmentation path is assigned as shown in Figure 1, and is labeled alphabetically. Each letter represents the initial letter of the fatty acid, and the accompanying number represents the bonding position in each fatty acid. The labeling for TAGs such as “TAG(54:3)” follows the convention where the numeral on the left in parentheses represents the total number of acyl carbon chains and the numeral on the right represents the total number of unsaturated bonds at fatty acid moieties.

The major species observed for 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol was the sodiated molecule  $[M + Na]^+$ . Figure 2 shows the product ion spectrum acquired by selecting the monoisotopic ion of this species. The resulting fragment ions are solely monoisotopic ions as well because a monoisotopic precursor ion was selected. Thus, each fragmentation path is observed as a single peak on the product-ion mass spectrum. Figure 2a shows the entire mass range of the product-ion spectrum. The  $Na^+$  peak detected at  $m/z$  23.0 confirms that the precursor ion is indeed  $[M + Na]^+$ . Peaks characteristic of fatty acid fragmentation are predicted as A-, B-,

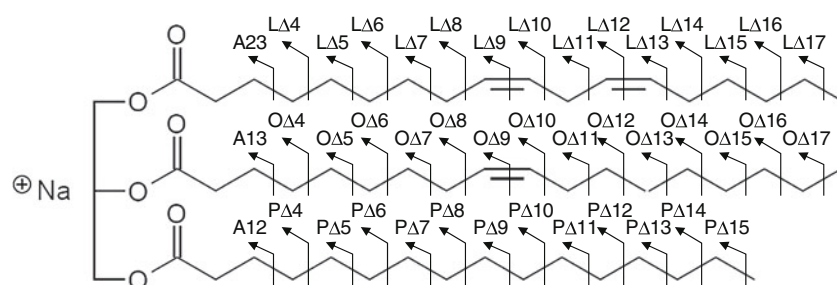


Figure 1. Structure and charge-remote fragmentation of sodiated 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol

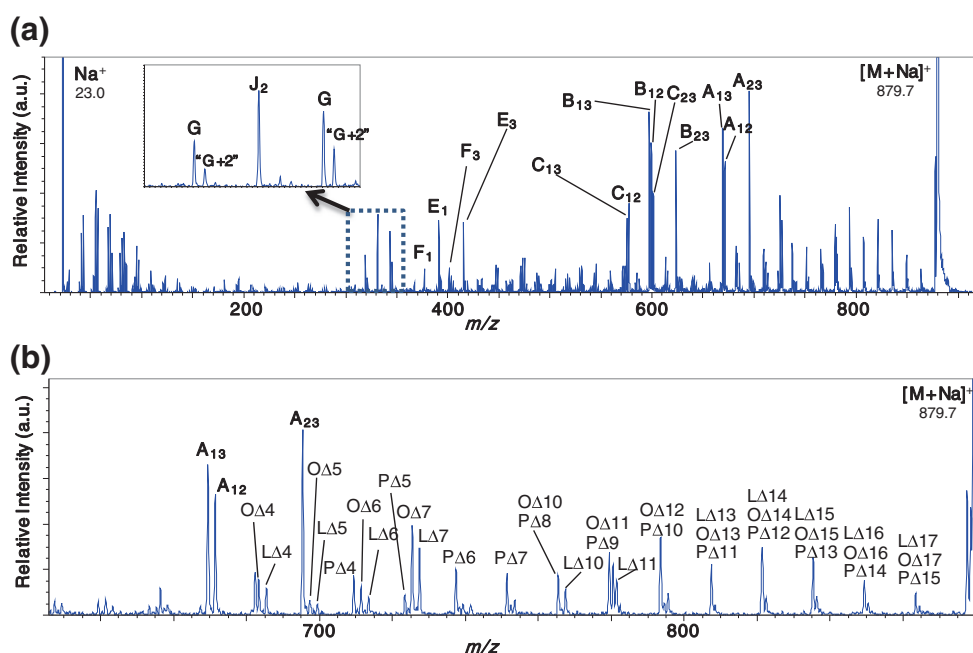


Figure 2. Product-ion mass spectrum for sodiated 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol, (a) entire mass range; (b)  $m/z$  650–890 magnified

C-, E-, G-, and J-type ions using the nomenclature defined in reference [21]. Figure 2a demonstrates that all of A-, B-, C-, E-, G-, and J-type ions predicted in reference [21] were observed for this example and “G+2” ions (mentioned in reference [21]) were observed. The structure of “G+2” ions and their fragmentation pathway are not clear, but “G+2” ions were also observed in the product ion spectrum of the of triolein standard (shown in Figure 5b) at a relatively lower intensity than that of the G-type ions. Figure 2b also shows that signals resulting from charge-remote fragmentation were detected in the high mass range above  $m/z$  650. When the fragment ion at each bonding position is defined as in Figure 1, the peaks can be assigned as shown in Figure 2b. The intensities of fragment ions corresponding to unsaturated bonding positions, such as L $\Delta$ 9, L $\Delta$ 12, and O $\Delta$ 9, are relatively weak or are not observed, resulting in a peak pattern that reflects the structure of 3 fatty acids.

In the analysis of triacylglycerols in the olive oil sample, particular attention was focused on the G- and J-type ions. These ions have the structure where two molecules of fatty acid are eliminated from the precursor ion [21]. These ions

help determine the numbers of carbon chains and unsaturated bonds in each fatty acid. In the G-type ion, fatty acids remain at *sn-1/sn-3*, while the J-type ion, where a fatty acid remains at *sn-2*, has one less CH<sub>2</sub> at the end. This makes it possible to estimate the bonding positions of three fatty acids because fatty acids having an odd acyl carbon number rarely exist in the natural world.

Figure 3 shows the mass spectrum of the olive oil. Sodiated triacylglycerols [M + Na]<sup>+</sup> were observed for this sample that included TAG (52:3) ( $m/z$  879.7), TAG (52:2) ( $m/z$  881.7), TAG (54:4) ( $m/z$  905.8), and TAG (54:3) ( $m/z$  907.8). The monoisotopic ions of these four TAGs were selected as the precursor ions, and their product-ion mass spectra were acquired. Figure 4 shows the spectra of ions at  $m/z$  905.8 acquired before and after the precursor ion selection. The figure demonstrates that only the ions at  $m/z$  905.8 were selected, completely eliminating ions at other mass values.

Figure 5 shows comparison between the product-ion mass spectra of TAG (54:3) [M + Na]<sup>+</sup> at  $m/z$  907.8 from olive oil and from triolein standard. Given that olive oil is

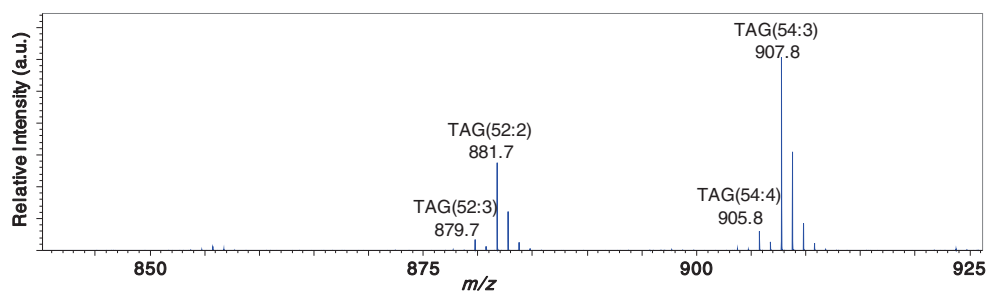


Figure 3. Mass spectrum of olive oil sample showing sodiated TAGs

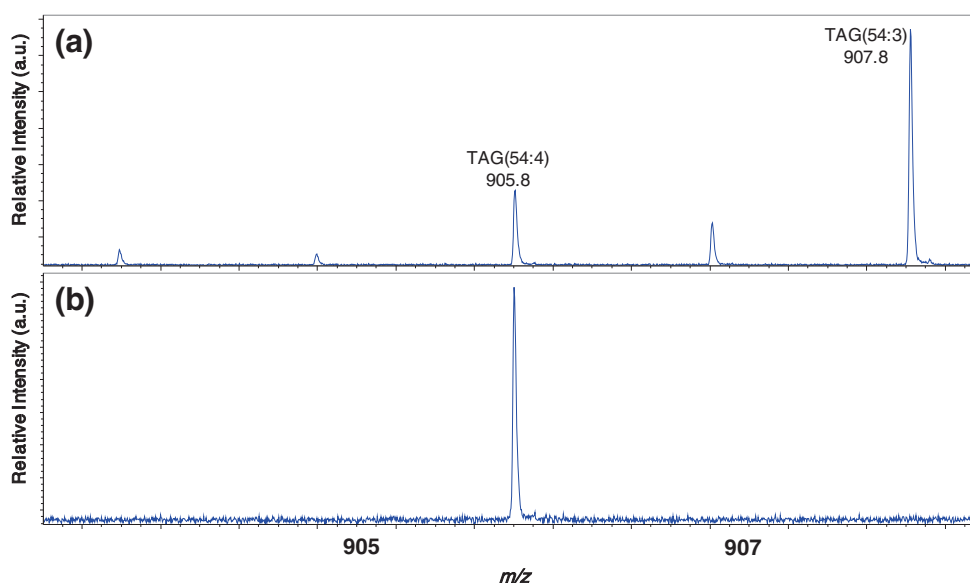


Figure 4. Precursor-ion selection for ions at  $m/z$  905.8 (a) before selection, (b) after selection

rich in oleic acid, the ion at  $m/z$  907.8 is expected to contain three oleic acids (18:1). Both of the product-ion mass spectra show a  $J_2$ -type ion at  $m/z$  331.3, indicating that an oleic acid is bonded at the *sn*-2 position, and a G-type ion at  $m/z$  345.3, indicating that an oleic acid is bonded at the *sn*-1/*sn*-3 positions. The spectra show only one peak that is considered

an A-, B-, and C-type ion, suggesting that TAG (54:3) is trioleoylglycerol, which contains three oleic acid molecules. The signals in high mass region resulting from charge-remote fragmentation were identical between the sample and standard, and the spectral patterns were consistent with structure of oleic acid.

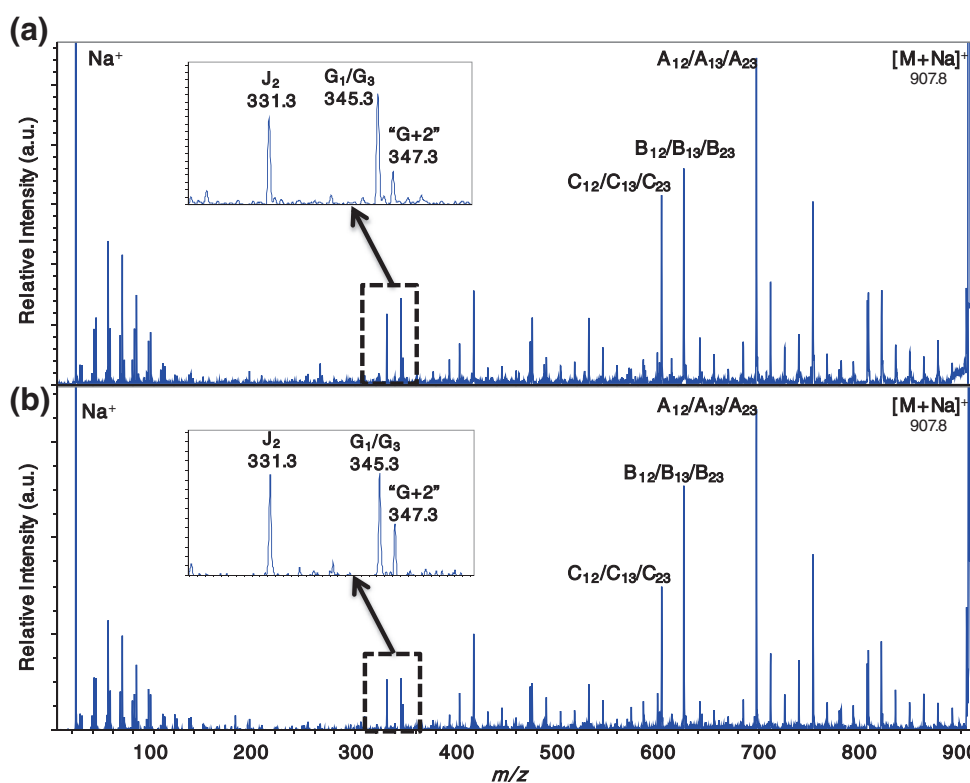


Figure 5. Comparison of product-ion mass spectra for the precursor at  $m/z$  907.8 with that of sodiated triolein standard, (a) the ions at  $m/z$  907.8 from olive oil, (b) triolein standard



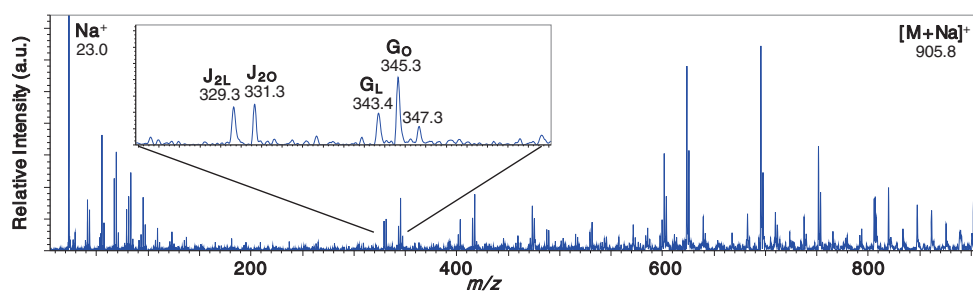


Figure 6. Product-ion mass spectrum for the precursor at  $m/z$  905.8

Next, the ion at  $m/z$  905.8 was selected as the precursor ion. The  $m/z$  value of this ion suggests that it is a monoisotopic  $[M + Na]^+$  ion of TAG (54:4). Figure 6 shows the product-ion mass spectrum. It is expected that this triacylglycerol is also composed of two (18:1) oleic acids and one (18:2) linoleic acid, given that the major component of olive oil is oleic acid. The product-ion mass spectrum shows fragment ions assigned as G-type ions, at  $m/z$  343.4 and  $m/z$  345.3. If the ion at  $m/z$  343.4 is a G-type ion, the fatty acid molecule at  $sn-1/sn-3$  is linoleic acid, and if the ion at  $m/z$  345.4 is a G-type ion, the fatty acid molecules at  $sn-1/sn-3$  are oleic acid. The ion at  $m/z$  347.3 is assigned as a “G+2” ion because in the product-ion mass spectrum “G+2” ions were observed at lower intensity than G-type ions as discussed above, and the intensity of the ion at  $m/z$  347.3 is relatively lower than that of the ion at  $m/z$  345.3. This is consistent with the assignment of G+2 ions by Cheng et al. in reference [21]. Since the G-type ion suggests that both oleic acid and linoleic acid are bonded, the remaining fatty acid is (18:1) oleic acid. Next, the product-ion spectrum shows J-type ions: a J-type ion containing oleic acid ( $J_{2O}$ ) and a J-type ion containing linoleic acid ( $J_{2L}$ ) at  $m/z$  331.3 and  $m/z$  329.3, respectively. In the high-mass region, the signals resulting from charge-remote fragmentation were consistent with the structures of oleic acid and linoleic acid. This demonstrates that  $m/z$  905.8 is triacylglycerol that contains two molecules of oleic acid and one molecule of linoleic acid and is a mixture of the structural isomers 1,3-dioleoyl-2-linoleoyl-glycerol and 1,2-dioleoyl-3-linoleoyl-glycerol. Table 1 summarizes the structures of triacylglycerols determined for the olive oil samples from the product-ion mass spectra. The ions associated with the peak at  $m/z$  879.7 are a mixture of the structural isomers 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-glycerol and 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-oleoyl-glycerol.

Table 1. Summary of TAGs Found in the Olive Oil Sample

| $m/z$ | Acyl carbon number and number of double bond | Composition of each fatty acid    |
|-------|--|-----------------------------------|
| 879.7 | 52:3   | (16:0,18:1,18:2) (16:0,18:2,18:1) |
| 881.7 | 52:2   | (16:0,18:1,18:1)                  |
| 905.8 | 54:4   | (18:1,18:1,18:2) (18:1,18:2,18:1) |
| 907.8 | 54:3   | (18:1,18:1,18:1)                  |

## Conclusion

Monoisotopic precursor selection was demonstrated for TOF/TOF analysis of a standard TAG and TAGs in an olive oil sample. This selectivity made it possible to use charge-remote fragmentation to determine the complete structure (except stereochemistry) for all of the TAGs, including structural isomers, present in the sample. Multiple structural isomers in the precursor ion were identified through the observation of G- and J-type ions. These results demonstrate that the MALDI-TOF-TOF system with high precursor ion selectivity can fully analyze the structure of triacylglycerols without prior chromatographic separation, and that the method is effective for the analysis of complex fat composites in food.

## Open Access

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- Byrdwell, W.C., Emken, E.A.: Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* **30**, 173–175 (1992)
- Neff, W.E., Byrdwell, W.C.: Soybean oil triacylglycerol analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, 1185–1191 (1995)
- Byrdwell, W.C., Emken, E.A., Neff, W.E., Adlof, R.O.: Quantitative analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* **31**, 919–935 (1996)
- Byrdwell, W.C.: Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the analysis of lipids. *Lipids* **36**, 327–346 (2001)
- Xu, Y., Brenna, J.T.: Atmospheric pressure covalent adduct chemical ionization tandem mass spectrometry for double bond location in monoene- and diene-containing triacylglycerols. *Anal. Chem.* **79**, 2525–2536 (2007)
- Hsu, F., Turk, J.: Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 587–599 (1999)
- Byrdwell, W.C., Neff, W.E.: Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 300–319 (2002)
- McAnoy, A., Wu, C., Murphy, R.: Direct qualitative analysis of triacylglycerols by electrospray mass spectrometry using a linear ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1498–1509 (2005)

9. Ham, B.M., Jacob, T.J., Keese, M.M., Cole, R.B.: Identification, quantification and comparison of major non-polar lipids in normal and dry eye tear lipidomes by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1321–1336 (2004)
10. Lévêque, N.L., Héron, S., Tchaplà, A.: Regioisomer characterization of triacylglycerols by non-aqueous reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a postcolumn reagent. *J. Mass Spectrom.* **45**, 284–296 (2010)
11. Gross, M.L.: Charge-remote fragmentations: method, mechanism and applications. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **118/119**, 137–165 (1992)
12. Griffiths, W.J., Yang, Y., Lindgren, J.Å.: Charge Remote Fragmentation of Fatty Acid Anions in 400 eV Collisions with Xenon Atoms. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 21–28 (1996)
13. Deterding, J.D., Gross, M.L.: Tandem mass spectrometry for identifying fatty acid derivatives that undergo charge-remote fragmentations. *Org. Mass Spectrom.* **23**, 169–177 (1988)
14. Deterding, J.D., Gross, M.L.: Fast-atom-bombardment and tandem mass spectrometry for determining structures of fatty acids as their picolinyl ester derivatives. *Anal. Chim. Acta* **200**, 431–455 (1987)
15. Cordero, M.M., Wesdemiotis, C.: Characterization of the Neutral Products Formed upon Charge-Remote Fragmentation of Fatty Acid Ions. *Anal. Chem.* **66**, 861–866 (1994)
16. Murphy, R.C., Fiedler, J., Hevko, J.: Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chem. Rev.* **101**(2), 479–526 (2001)
17. Ann, Q., Adams, J.: Structure determination of ceramides and neutral glycosphingolipids by collisional activation of  $[M + Li]^+$  ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 260–263 (1992)
18. Trimpin, S., Clemmer, D.E., McEwen, C.N.: Charge-remote fragmentation of lithiated fatty acids on a TOF-TOF instrument using matrix-ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1967–1972 (2007)
19. Jensen, N.J., Tomer, K.B., Gross, M.L.: FAB MS/MS for phosphatidylinositol, -glycerol, -ethanolamine, and other complex phospholipids. *Lipids* **22**, 480–489 (1987)
20. Shimma, S., Kubo, A., Satoh, T., Toyoda, M.: Detailed structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a MALDI-SpiralTOF-Reflectron TOF mass spectrometer. *PLoS One* **7**, 5 (2012)
21. Cheng, C., Gross, M.L., Pittenauer, E.: Complete structural elucidation of triacylglycerols by tandem sector mass spectrometry. *Anal. Chem.* **70**, 4417–4426 (1998)
22. Cornish, T.J., Cotter, R.J.: Collision-induced dissociation in a tandem time-of-flight mass spectrometer with two single-stage reflectrons. *Org. Mass Spectrom.* **28**(10), 1129–1134 (1993)
23. Pittenauer, E., Allmaier, G.: The renaissance of high-energy CID for structural elucidation of complex lipids: MALDI-TOF/RTOF-MS of alkali cationized triacylglycerols. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1037–1047 (2009)
24. Satoh, T., Sato, T., Kubo, A., Tamura, J.: Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometer with high precursor ion selectivity employing spiral ion trajectory and improved offset parabolic reflectron. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 797–803 (2011)
25. Ishihara, M., Toyoda, M., Matsuo, T.: Perfect Spatial and Isochronous Focusing Ion Optics for Multi-turn Time of Flight Mass Spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **197**, 179–189 (2000)
26. Satoh, T., Tsuno, H., Iwanaga, M., Kammei, Y.: The design and characteristic features of a new time-of-flight mass spectrometer with a spiral ion trajectory. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**(12), 1969–1975 (2005)

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた トリステアリンの解析例

トリステアリンは、トリアシルグリセロールの 3 つの脂肪酸が、全てステアリン酸となった構造を有する (Fig.1)。今回この物質を擬似試料とし、JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用い、プロダクトイオンスペクトルを測定することにより、High Energy CID (HE-CID)の有用性を評価した。

メタノールに溶解させた試料に NaI を加えて、Spiral モードで測定したところ (Fig.2),  $m/z$  913.8231 の位置にピークが観測された (外標として PEG 1000 を使用した)。これは、トリステアリンの Na 付加体のモノアイソトピックイオンと推定される (計算値:913.8194)。次に TOF-TOF モードに切り替え、このピークのプロダクトイオンスペクトルを測定した (Fig.3)。グリセリンに付加した Na 近傍にチャージが固定されるため、チャージリモートフラグメンテーション (CRF) 由来と思われる規則的なピークが観測されている。 $m/z$  650-920 付近を拡大すると (Fig.4), ステアリン酸の構造を反映した規則的な等間隔のピークが観測されており (Fig.5), この領域では 3 つのステアリン酸の内、1 つで開裂が起こったフラグメントイオンが観測されている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いることで、HE-CID でしばしば見られるチャージリモートフラグメンテーション由来のピークが明確に観測され、構造解析を容易に行うことが可能となる。

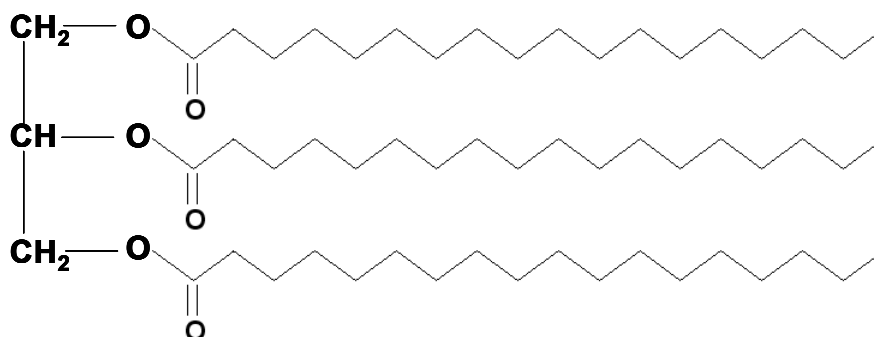


Fig.1 Structure of tristearin.

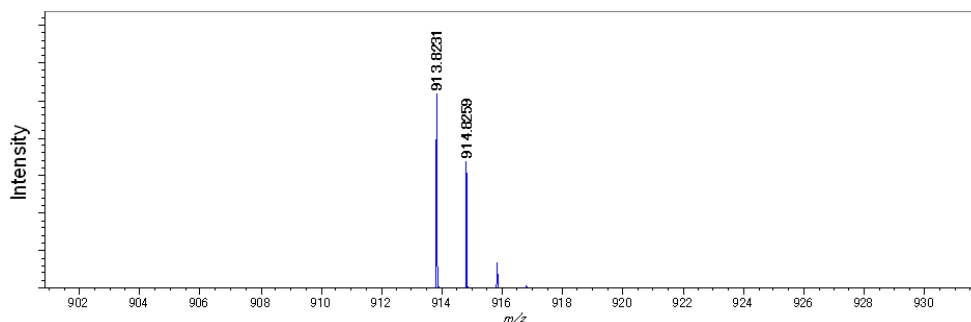


Fig.2 Mass spectrum of tristearin.

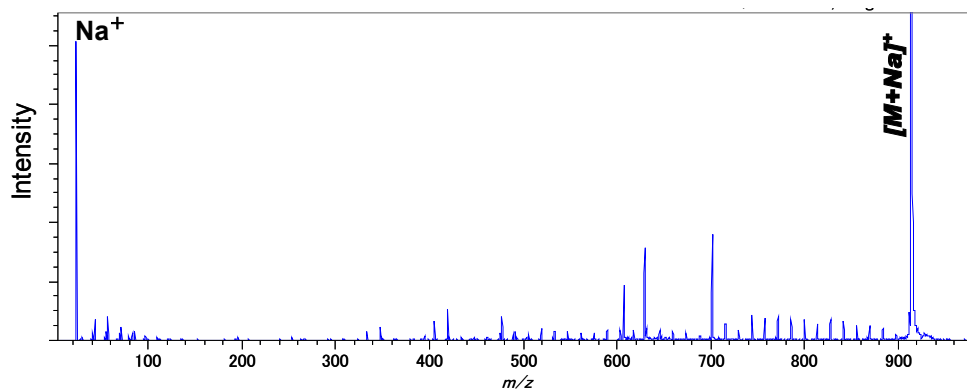


Fig.3 Product ion spectrum of sodium adducted tristearin.

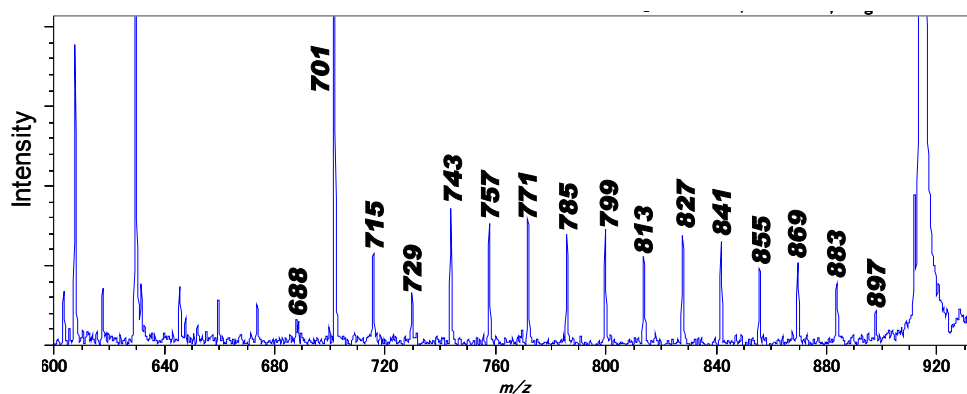


Fig.4 Product ion spectrum of sodium adducted tristearin(enlarged between  $m/z$  650 and  $m/z$  920).

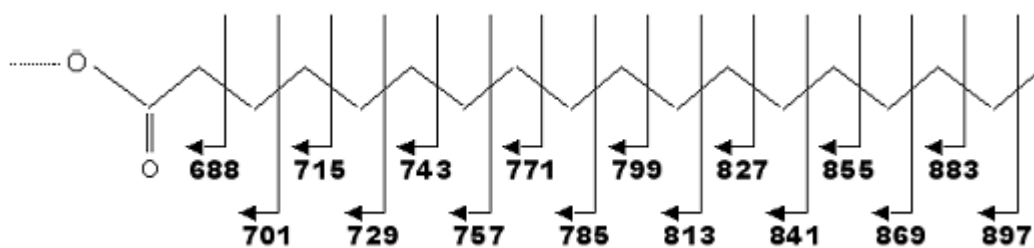


Fig.5 Peak assignment of obtained product ion spectrum.

## JMS-S3000 Application Data

JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた  
トリオレインの解析例

トリオレインは、トリアシルグリセロールの 3 つの脂肪酸が、全てオレイン酸となった構造を有する (Fig.1). 今回、この物質を JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いて、プロダクトイオンスペクトルを測定した。測定の結果、炭素鎖中に不飽和結合を 1 つ持つオレイン酸の構造を反映したチャージリモートフラグメンテーション (CRF) 由来ピークが観測できることを確認した。

メタノールに溶解させた試料に NaI を加えて、Spiralモードで測定したところ (Fig.2),  $m/z$  907.7782 の位置にピークが観測された (外標として PEG 1000 を使用した)。これは、トリオレインの Na 付加体のモノアイソトピックイオンと推定される (計算値: 907.7725)。次に TOF-TOF モードに切り替え、このピークのプロダクトイオンスペクトルを測定した (Fig.3)。グリセリンに付加した Na 近傍にチャージが固定されるため、CRF 由来と思われる規則的なピークが観測されている。 $m/z$  600-920 付近を拡大すると (Fig.4),  $m/z$  891 から  $m/z$  807 までは以前報告したトリステアリンと同様に<sup>[1]</sup>14 間隔のピークが観測されており、単結合で炭素が結合していることがわかる。 $m/z$  807 から  $m/z$  753 の間のピークは他に比べると強度が弱くなっており、ここに不飽和結合が存在することがわかる。また、 $m/z$  807 から +1 の位置にあたる  $m/z$  808 のピークも観測されており、これについても不飽和結合が存在するときに特有のピークとされている<sup>[2]</sup>。 $m/z$  753 から  $m/z$  697 までは 14 間隔のピークが再び観測されており、単結合で結合していることがわかる。各ピークをアサインすると Fig. 5 のようになり、トリステアリンと同様にこの領域では、3 つのオレイン酸のいずれか 1 つで結合の開裂が起こったフラグメントイオンが観測されている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギー CID 測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、炭素鎖中の不飽和結合位置を容易に同定することが可能となる。

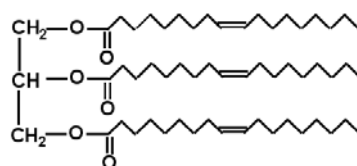


Fig.1 Structure of triolein.

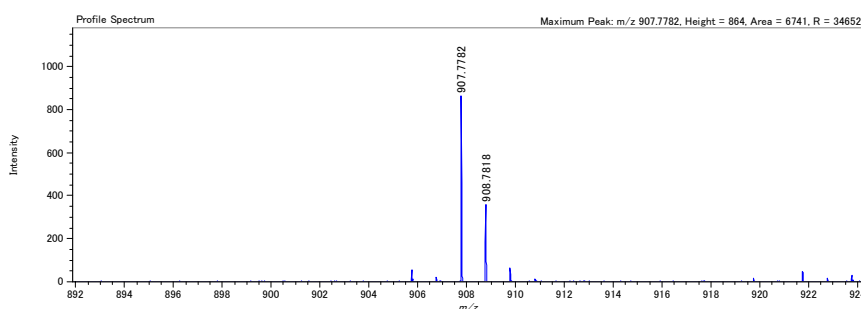


Fig.2 Mass spectrum of triolein.



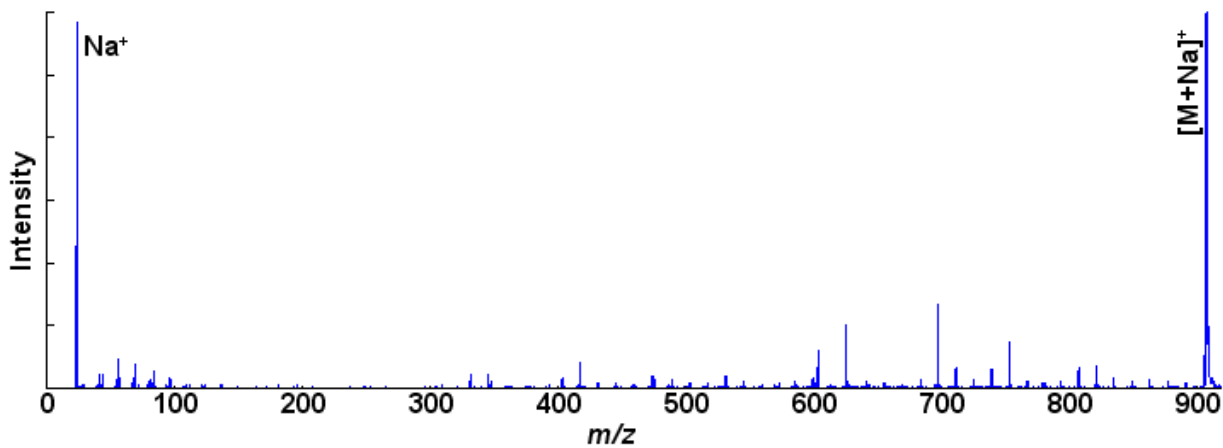


Fig.3 Product ion spectrum of sodium adducted trierein.

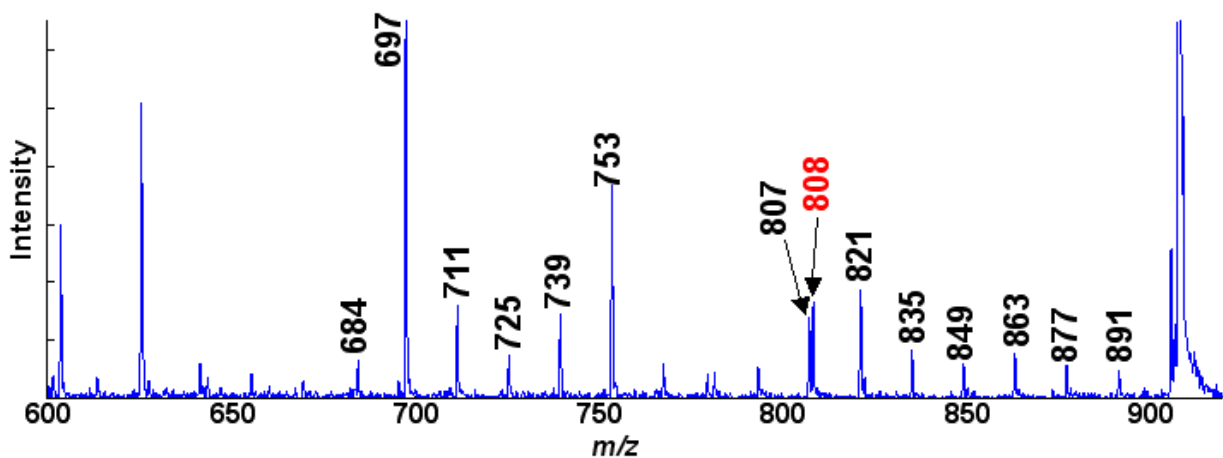


Fig.4 Product ion spectrum of sodium adducted trierein(enlarged between  $m/z$  600 and  $m/z$  920).

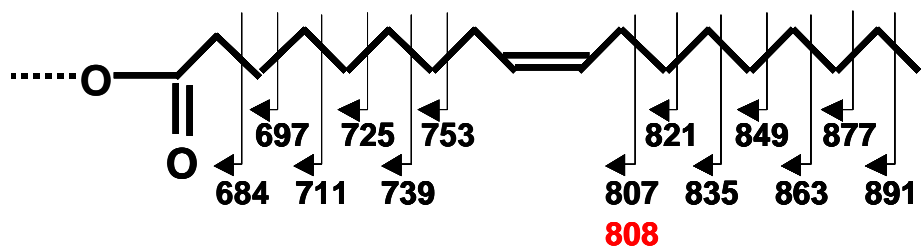


Fig.5 Peak assignment of obtained product ion spectrum.

[1] MS Tips No.178

[2] N. Akimoto, Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan 46 (1998) 228

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた トリアシルグリセロールの解析例

トリアシルグリセロールはグリセリン骨格に 3 つの脂肪酸が結合した構造を有する。これまでに 3 つの脂肪酸が全て同じであるトリストアリン<sup>[1]</sup>, トリオレイン<sup>[2]</sup>については, JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いることで構造解析が可能であることは確認している。そこで今回はより構造が複雑な, トリアシルグリセロールの脂肪酸の種類が全て異なる試料 (1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-*rac*-glycerol) のプロダクトイオンスペクトルを測定した。このトリアシルグリセロールには, パルミチン酸・オレイン酸・リノール酸という 3 つの脂肪酸が結合している。

THF に溶解させた試料に NaI を加えて, Spiral モードで測定したところ, 試料の  $[M+Na]^+$  が観測されたため, TOF-TOF モードに切り替え, このイオンのモノアイソトピックイオンをプリカーサーイオンとして選択し, プロダクトイオンスペクトルを測定した(Fig.2)。なお, スペクトル中の A や B, C 等の表記は, 文献[2]を参考にしている。プロダクトイオンスペクトル全体を見ると, 結合している脂肪酸の種類を表す A や B, C 等のイオンが観測されている<sup>[3]</sup>。中でも J2 のイオン (Fig.3) は, 2 位と 1 位または 3 位の位置の脂肪酸を区別できるイオンであり, 実際に測定したスペクトルにおいてもオレイン酸が 2 位に結合している場合に相当する  $m/z$  331.2 のピークが観測されている。また, 3 つの脂肪酸内の結合が開裂したフラグメントイオンについてはパルミチン酸とオレイン酸という同じ脂肪酸が結合しているリン脂質である PC (16:0, 18:1)の結果<sup>[4]</sup>, 及びリノール酸について過去の磁場型質量分析計の結果<sup>[5]</sup>から考えると Fig.1 のようになると考えられる。Fig.2 の  $m/z$  640-900 を拡大すると (Fig.4), 確かにそれぞれのフラグメントイオンが観測されている。特に  $m/z$  780 の近傍については,  $m/z$  779・780・781 の 1 u 刻みのピークが観測されており, プリカーサーイオンとしてモノアイソトピックイオンを選択することによりこれらのプロダクトイオンを明確に観測することが可能となる。

以上のように, TOF-TOF オプションを用いてモノアイソトピックイオンのみを選択し, 高エネルギーCID 測定を行うことで, 3 つの脂肪酸全ての構造を反映した CRF 由来のピークが明確に観測され, トリアシルグリセロールの脂肪酸部の詳細な構造解析を行うことが可能となる。

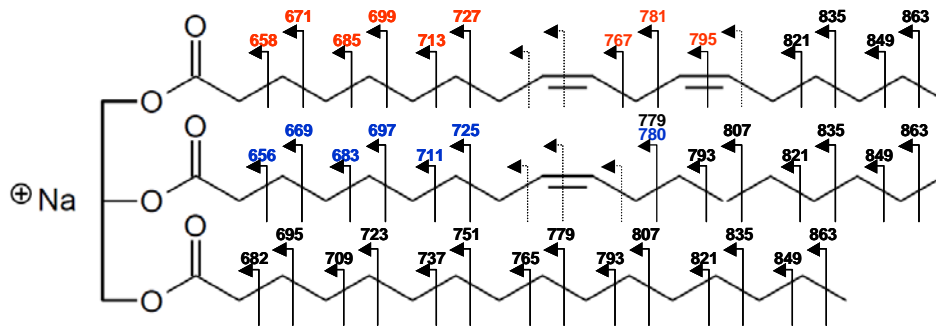


Fig.1 Structure of 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-*rac*-glycerol and peak assignment of obtained product ion spectra.

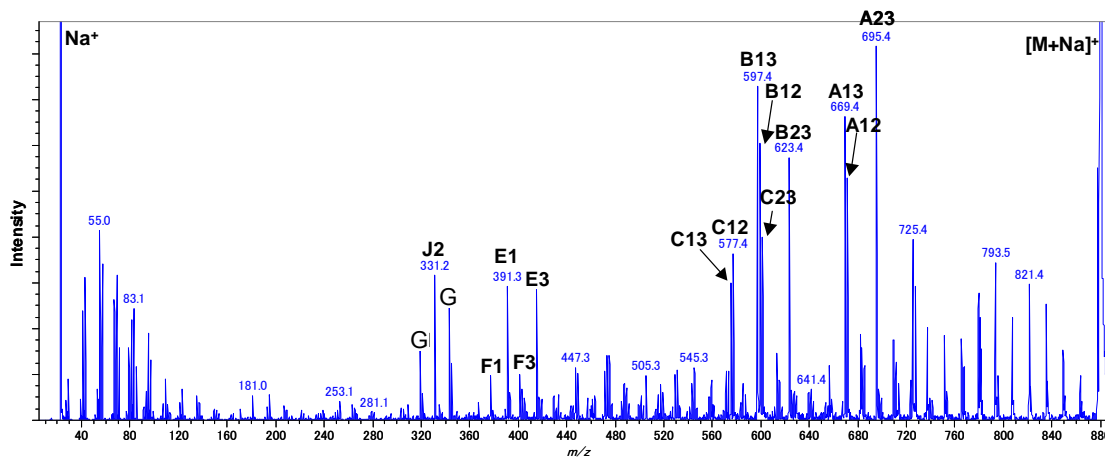


Fig.2 Product ion spectrum of sodium adducted triacylglycerol.

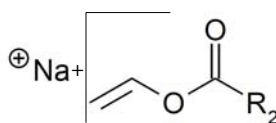


Fig.3 Structure of J2 ion [3].

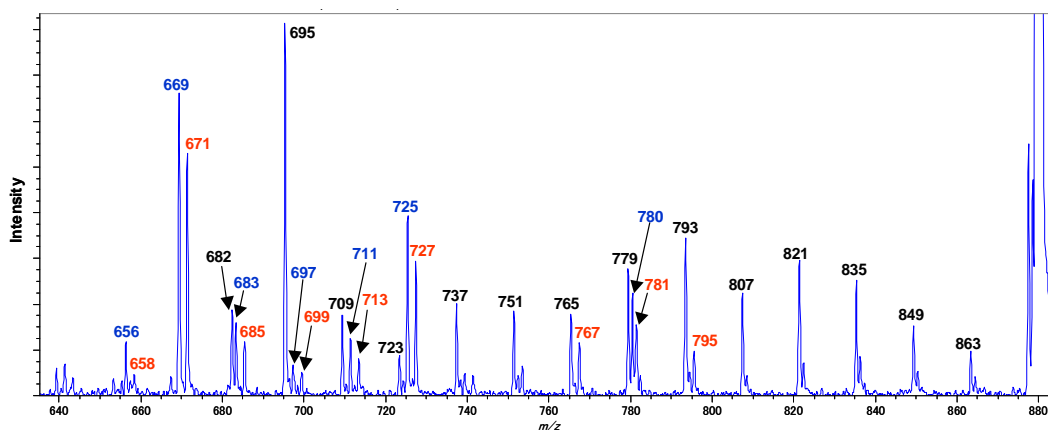


Fig.4 Product ion spectrum of sodium adducted triacylglycerol (enlarged between  $m/z$  600 and  $m/z$  920).

[1] MS Tips No.178 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリステアリンの解析例

[2] MS Tips No.182 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリオレインの解析例

[3] E. Pittenauer and G. Allmaier, Journal of The American Society for Mass Spectrometry 20 (2009) 1037

[4] MS Tips No.186 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたフォスファチジルコリンの解析例

[5] M. L. Gross, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 118/119 (1992) 137

## JMS-S3000 Application Data

JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた  
酸化トリオレインの解析例

食用油として用いられるオリーブ油、サラダ油などの植物性油は、長時間空気中にさらされることで酸化されることが知られている。植物性油の主成分は、脂質の中でも不飽和脂肪酸を有する不飽和トリアシルグリセロールであるので、酸化は不飽和脂肪酸の二重結合部位で生じると予想される。

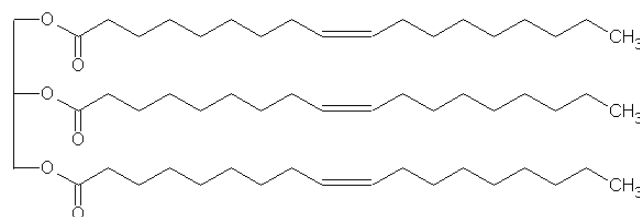


Figure.1. Structure of triolein

すでに、3つの脂肪酸部位がすべてオレイン酸であるトリオレイン (Figure.1) の解析例は MSTips No.182 で示している。今回はこのトリオレインを試料とし、熱酸化されたときの構造を JMS-S3000 SpiralTOF を用いたプロダクトイオン測定により確認した。なお、短時間で熱酸化させるため、トリオレインをバイアルに入れ、160°Cで60分間加熱し、これを試料とした。

Spiral モードでの測定の結果、Figure.2 に示すように  $m/z$ 907.7724 のイオンのほかに、 $m/z$ 923.7679、 $m/z$ 939.7635、 $m/z$ 955.7594 のイオンが検出された (PEG1000 を外部標準として使用)。これらのイオンに対して組成推定の結果、3ppm 以内の質量誤差で  $m/z$ 907.7724 は未酸化体トリオレインの  $[M+Na]^+$ 、 $m/z$ 923.7679 は  $[M+O+Na]^+$ 、 $m/z$ 939.7635 は  $[M+2O+Na]^+$ 、 $m/z$ 955.7594 は  $[M+3O+Na]^+$  と推定された。

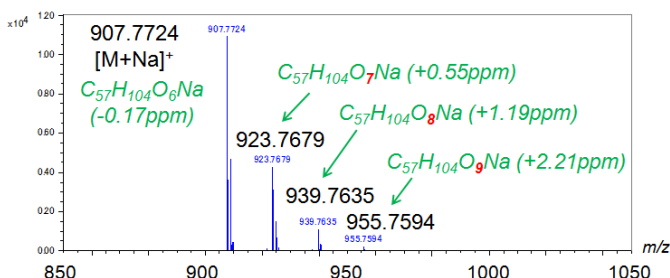


Figure.2. Mass spectrum of triolein after heating at 160C, 60min.

次に TOF-TOF モードにより得られた  $[M+Na]^+$  と  $[M+O+Na]^+$  のプロダクトイオンスペクトルを相互に比較した (Figure.3)。いずれの場合もグリセリンに付加した Na 近傍に電荷が固定されるためにチャージリモートフラグメンテーション (CRF) が起こり、A、B、J2、G イオン [1] が検出されている。  $[M+O+Na]^+$  のプロダクトイオンスペクトル上に見られる A、B、J2、G イオンは、  $[M+Na]^+$  のプロダクトイオンスペクトル上に見られるそれぞれのイオンに比べ、16u シフトしている事が見出された。さらに、  $m/z$ 680~920 の領域のプロダクトイオン (Figure.4) を解析することにより、いずれかのオレイン酸の二重結合が酸化されていることは確認できた。16u シフトした J2 と G が両方とも検出されているため、すべてのオレイン酸部の二重結合が酸化されうるという結果であった (Figure.5)。

以上のように、酸化した不飽和トリアシルグリセロールの分析に TOF/TOF オプションを用いることで、高エネルギー衝突解離 (HE-CID) でしばしば見られるチャージリモートフラグメンテーション由来のピークが明確に観

測され、構造解析の一助になることが確認された。

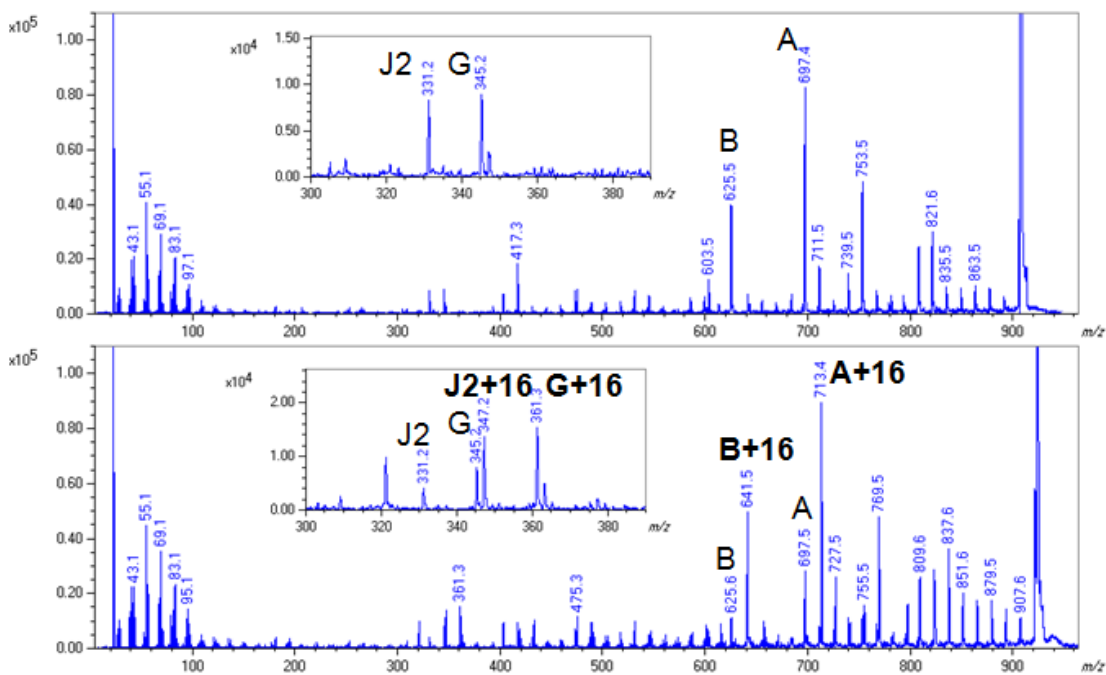


Figure 3. Product ion spectrum at  $m/z$  907 (top) and  $m/z$  923 (bottom)

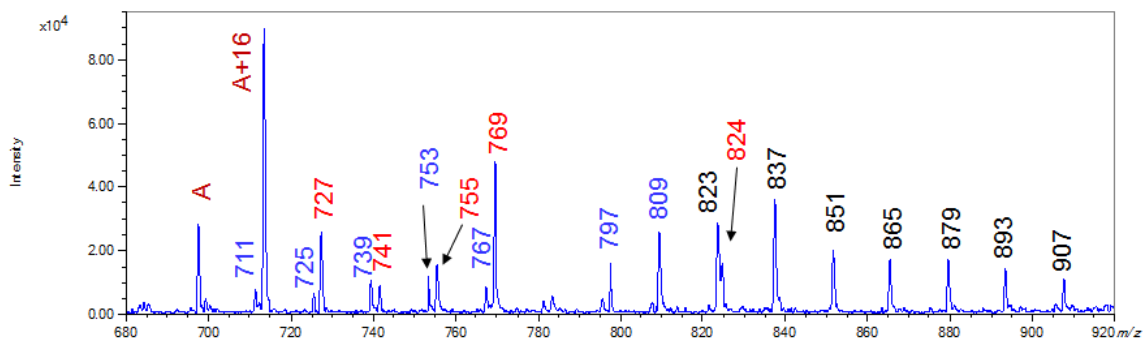


Figure.4. Product ion spectrum at  $m/z$  923 (enlarged between  $m/z$  680 and  $m/z$  920).

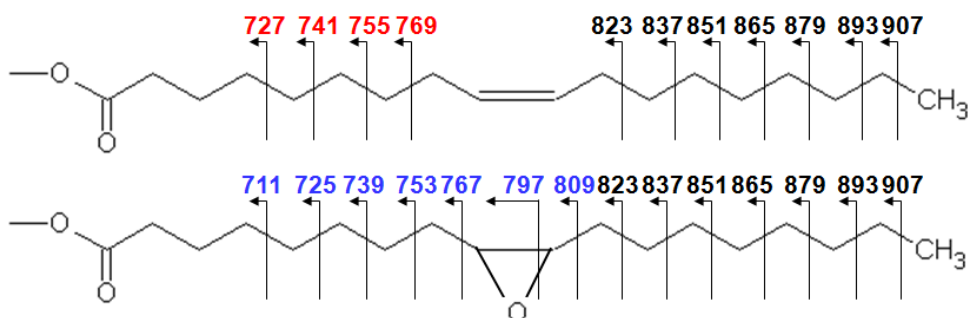


Figure.5. Assignment of product ions at  $m/z$  923

[1] Cheng, C., Gross, M. L.; Pittenauer, E. Complete structural elucidation of triacylglycerols by tandem sector mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4417-4426

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた フォスファチジルコリンの解析例

フォスファチジルコリン (PC) は、リン脂質の一種であり脂肪酸を 2 つ持つ。末端のトリメチルアミン近傍にポジティブのチャージが固定されるために、高エネルギーCID で特徴的に観測することができるチャージリモートフラグメンテーション (CRF) により脂肪酸部分の開裂を 14 u (CH<sub>2</sub>) 間隔のピークとして観測できる<sup>[1]</sup>。今回は、JMS-S3000 の高プリカーサーイオン選択能を活かし、グリセリン骨格に異なる構造を持つ脂肪酸が結合した 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC (16:0, 18:1) (Fig.1) を構成する、2 つの脂肪酸それぞれの構造推定を行った。

試料をメタノールに 100 pmol/uL の濃度で溶解させ、Spiral モードで測定を行ったところ、[M+H]<sup>+</sup> (モノアイソトピックイオンの  $m/z$  760.5901) 及び[M+Na]<sup>+</sup> (モノアイソトピックイオンの  $m/z$  782.5712) と推定されるピークが観測された (Fig. 2)。次に、TOF-TOF モードに切り替え、[M+H]<sup>+</sup> のモノアイソトピックイオンをプリカーサーイオンとして選択して、プロダクトイオンスペクトルを測定した (Fig.3)。低質量域には、フォスフォコリンやグリセリンの構造を反映したピークが観測されている。  $m/z$  450-770 付近を拡大すると (Fig.4), Fig.1 で各ピークをアサインしているように  $m/z$  744 から  $m/z$  576 まではトリステアリン<sup>[1]</sup>と同様に 14 間隔のピークが観測されており、1 位の脂肪酸である (16:0) の構造を反映したピークが得られている。また、 $m/z$  660 から、+1 の位置 ( $m/z$  661) 及び-54 の位置 ( $m/z$  606) にピークが観測されており、そこから  $m/z$  550 まで 14 間隔のピークが観測されている。これは、トリオレイン<sup>[2]</sup>と同様のパターンであり、2 位の脂肪酸である (18:1) の構造を反映したピークが得られている。なお、プリカーサーイオンとしてモノアイソトピックイオンを選択しているため、フラグメントイオンも同位体イオンを持たずモノアイソトピックイオンのみとなっている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID 測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、脂肪酸が 2 つ結合している複雑なリン脂質においても、炭素鎖中の不飽和結合位置を同定することが可能となる。

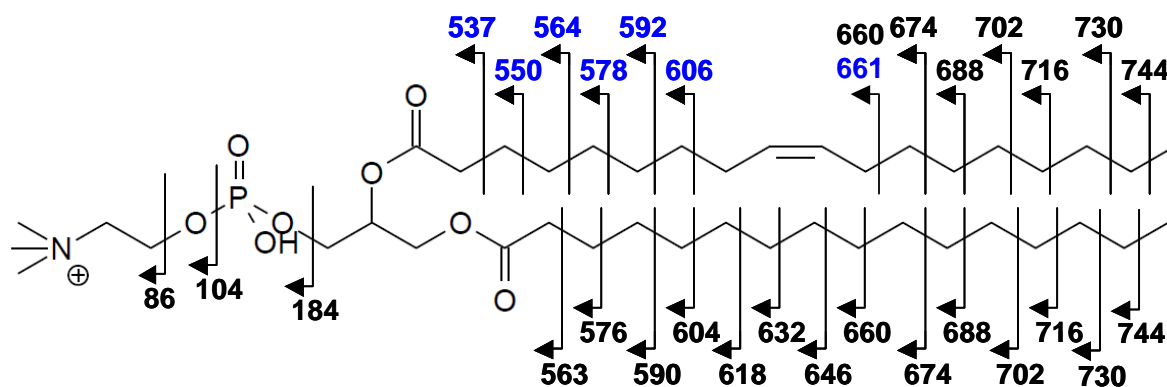


Fig.1 Chemical structure of phosphatidylcholine and peak assignment of obtained product ion spectra.



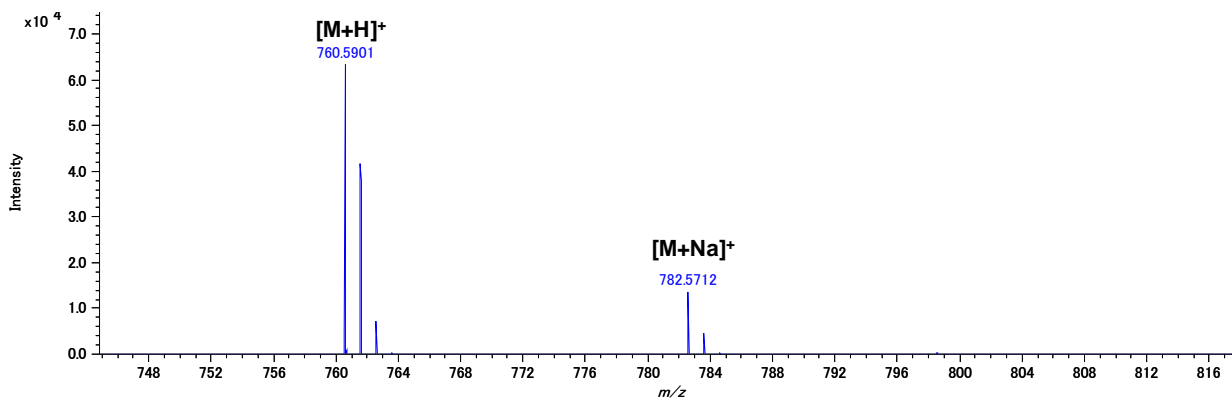


Fig.2 Mass spectrum of PC(16:0,18:1).

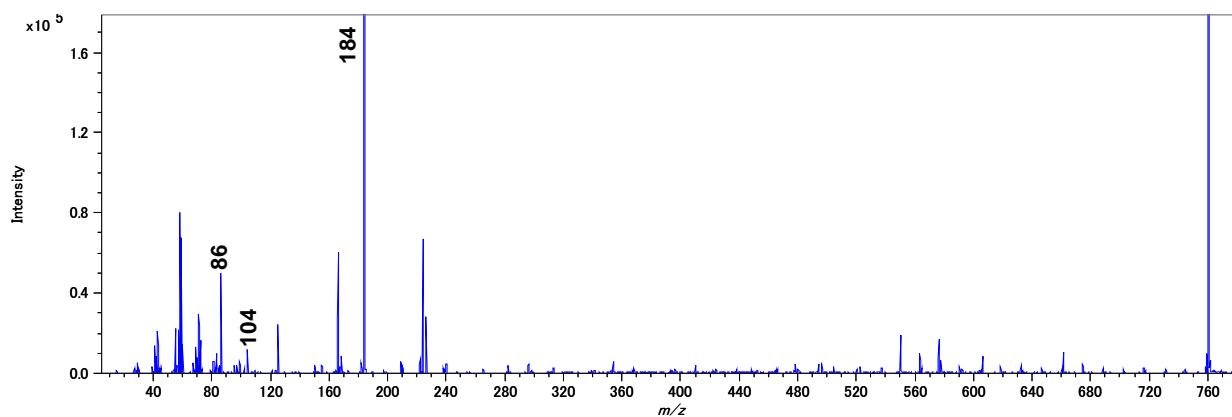


Fig.3 Product ion spectrum of PC(16:0,18:1) ( $[M+H]^+$ ).

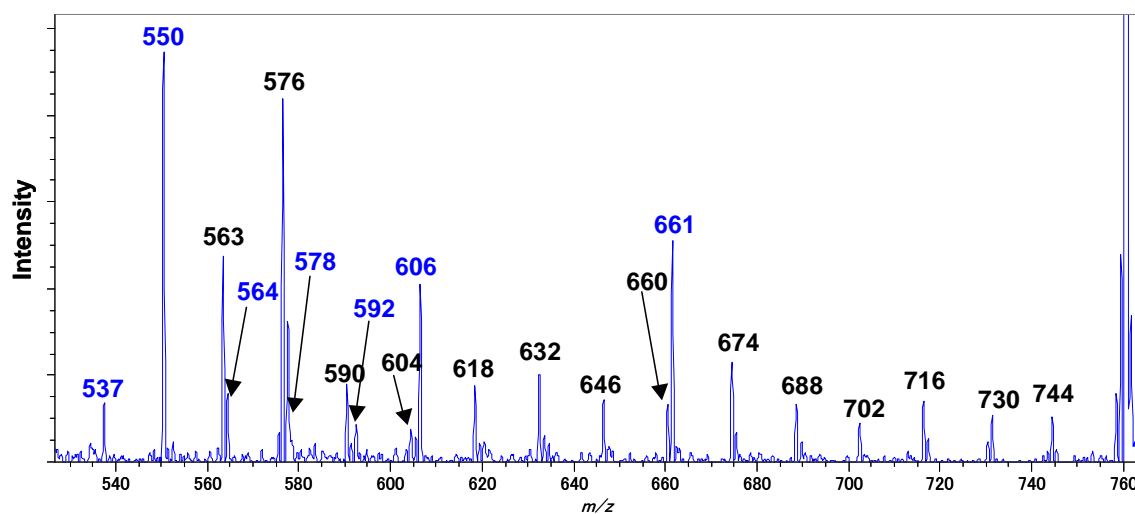


Fig.4 Product ion spectrum of PC(16:0,18:1) (enlarged between  $m/z$  600 and  $m/z$  920).

[1] MS Tips No.178 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリステアリンの解析例

[2] MS Tips No.182 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリオレインの解析例

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた 卵黄中のリン脂質の構造解析例

リン脂質は卵黄の主成分の 1 つであり、豊富に含まれている。今回は、卵黄中からリン脂質を抽出し、JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションで構造解析を試みた。最初に卵黄を脂質とタンパク質等の水溶成分と分離するためにクロロホルムとメタノール、水の混合溶液に溶かした。遠心分離後、クロロホルムとメタノールの層のみを取り出し、メタノールで希釈後、マトリックスと 1:1 で混合し、プレートに滴下した。

Fig.1 に Spiral モードで測定して得られた Positive モードと Negative モードのマススペクトルを示す。マススペクトルの  $m/z$  値から判断すると、Positive モードでは Phosphatidylcholine (PC), Negative モードでは Phosphatidylinositol (PI) が主に観測されていると考えられる。次にそれを確認するために、TOF-TOF モードでのプロダクトイオンスペクトルの測定を行った。なお、MS Tips No.186 [1]では、PC (34:1) の組成を有する 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC(16:0, 18:1)) の標準試料の  $[M+H]^+$  のプロダクトイオンスペクトルを測定している。そのため、試料のマススペクトルで確認された同じ組成の PC(34:1) の  $[M+H]^+$  をプリカーサーイオンとして選択しプロダクトイオンスペクトルの測定を行い、スペクトルの比較することにより構造の類似性を検討した (Fig.2)。Negative モードでは強度の強い PI (38:4)  $[M-H]^-$  をプリカーサーイオンとして選択し、それぞれプロダクトイオンスペクトルを測定した (Fig. 3)。Fig.2 のスペクトルパターンを確認すると、多少の強度比の違いはあるものの標準品の測定結果と同じ結果が得られており、このピークは、PC(16:0,18:1) 由来であることがわかる。次に Fig. 3 のスペクトルパターンを確認すると、Fig.4 のように各ピークをアサインすることができ、PI(18:0,20:4)であると考えられる。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID 測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、リン脂質の構造解析を行うことが可能となる。

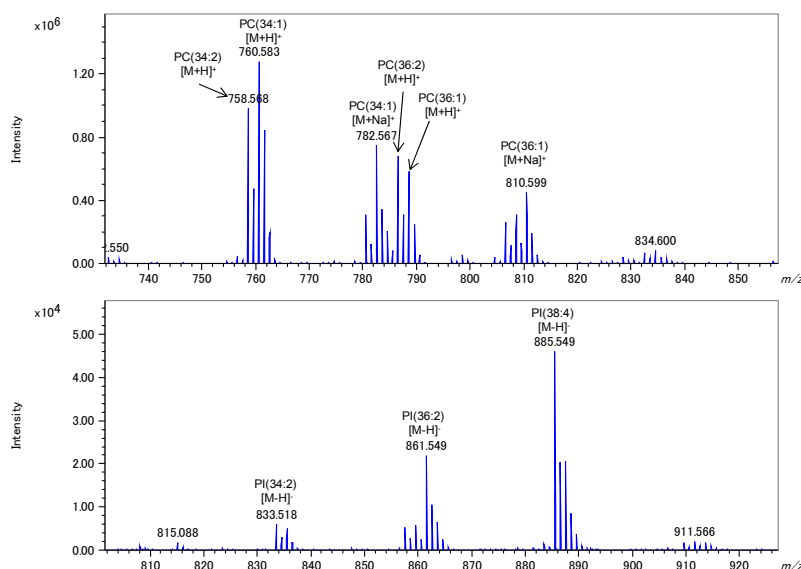


Fig.1 Mass spectra of phospholipids from egg yolk (top:positive ion mode, bottom negative ion mode).

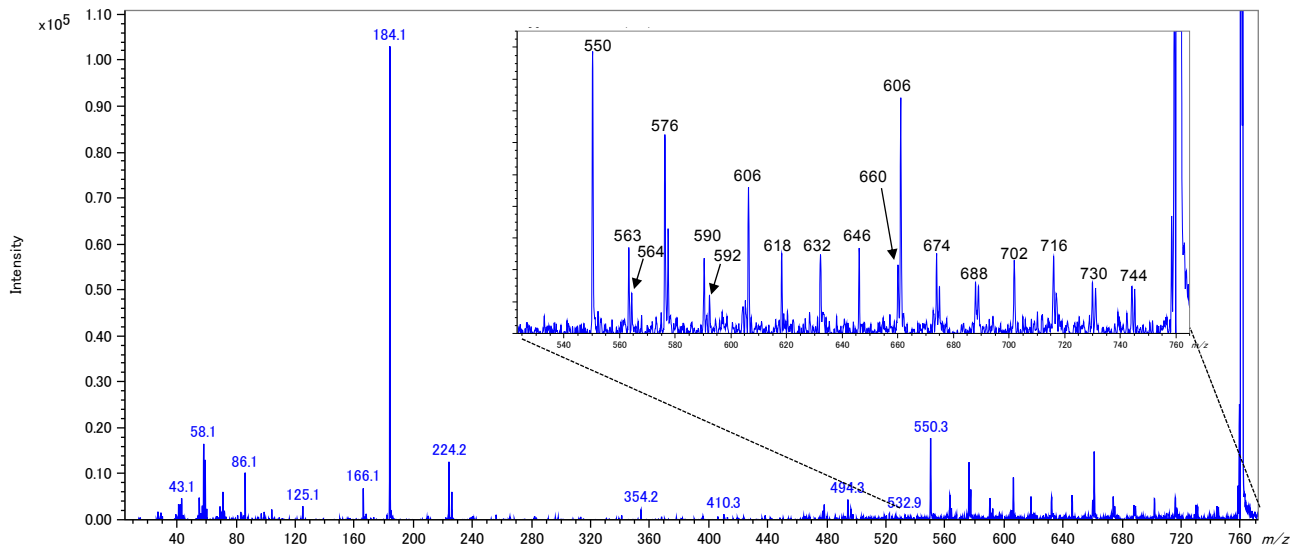


Fig.2 Product ion spectrum of PC(34:1) [M+H]<sup>+</sup>

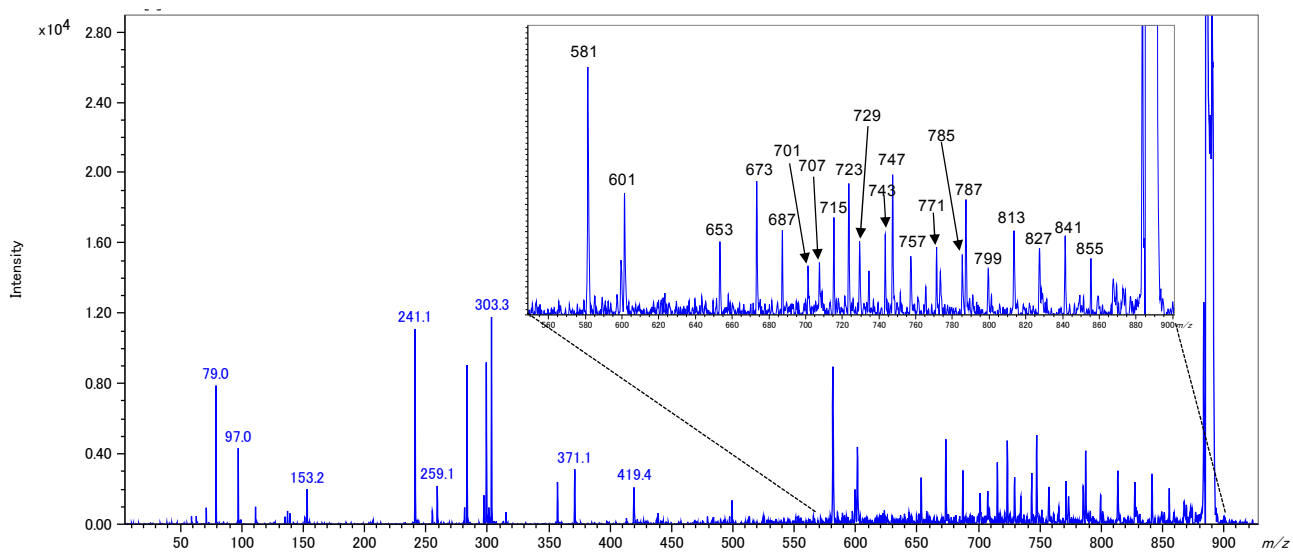


Fig.3 Product ion spectrum of PI(38:4) [M-H]<sup>-</sup>

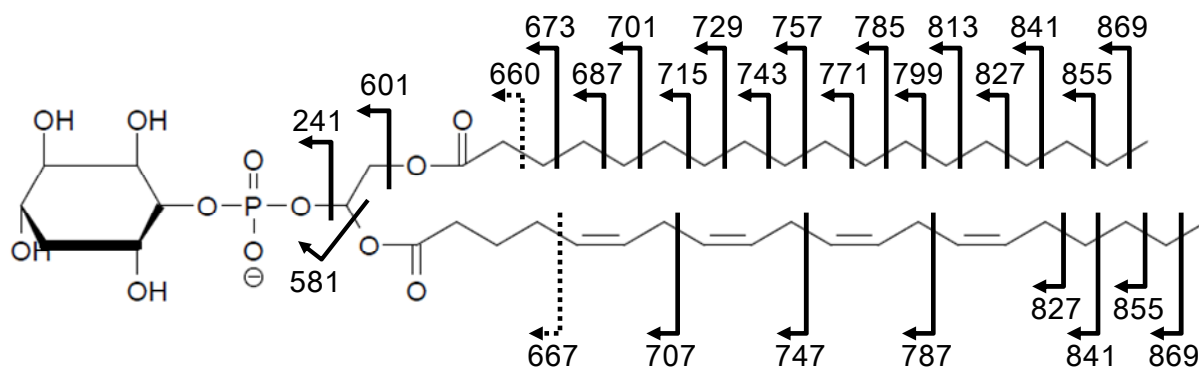


Fig.4 Peak assignment of product ion spectrum of PI(38:4) [M-H]<sup>-</sup>

[1] MS Tips No.186 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたフォスファチジルコリンの解析例

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた 側鎖の付いたリン脂質の解析例

フォスファチジルコリン (PC) は、リン脂質の一種であり脂肪酸を 2 つ持つ。末端のトリメチルアミン近傍にポジティブのチャージが固定されるために、高エネルギーCID でしばしば見られるチャージリモートフラグメンテーション由来の等間隔のピークが観測される[1]。今回は、PC の脂肪酸部にメチル基が 4 つ結合した 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (4ME 16:0 PC) を JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いて測定し、脂肪酸部のメチル基の位置を反映したプロダクトイオンスペクトルが得られるか確認した。

試料をメタノールに 100 pmol/uL の濃度で溶解させ、Spiral モードで測定を行ったところ(Fig.2),  $[M+H]^+$  (モノアイソトピックイオンの  $m/z$  856.709) 及び  $[M+Na]^+$  (モノアイソトピックイオンの  $m/z$  868.688) と推定されるピークが観測された。次に、TOF-TOF モードに切り替え、 $[M+H]^+$  のモノアイソトピックイオンをプリカーサーイオンとして選択して、プロダクトイオンスペクトルを測定した(Fig.3)。低質量域には、フォスフォコリンやグリセリンの構造を反映したピークが観測されている。 $m/z$  500-850 付近を拡大すると(Fig.4), Fig.1 で各ピークをアサインしているように炭素が単結合で結合している直鎖の構造を反映した 14 間隔のピークの中に、メチル基が結合している部分は 28 の間隔が観測されており、プロダクトイオンスペクトルからもここにメチル基が結合していることがわかる。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID 測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、炭素鎖中の側鎖位置を同定することが可能となる。

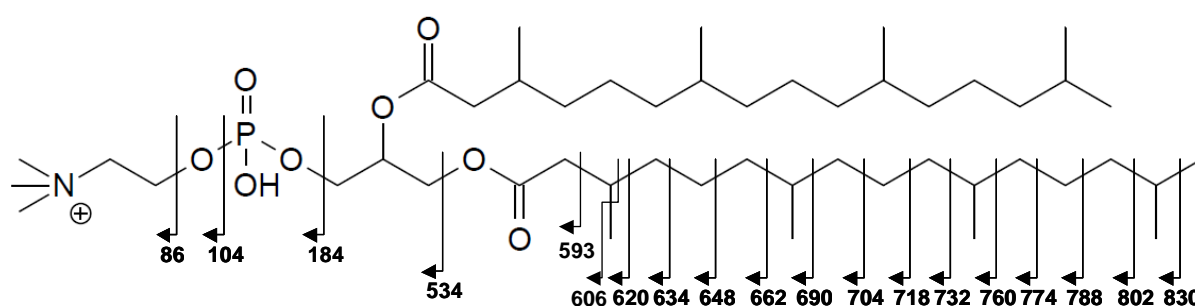


Fig.1 Structure of 4ME 16:0 PC and peak assignment of obtained product ion spectra.

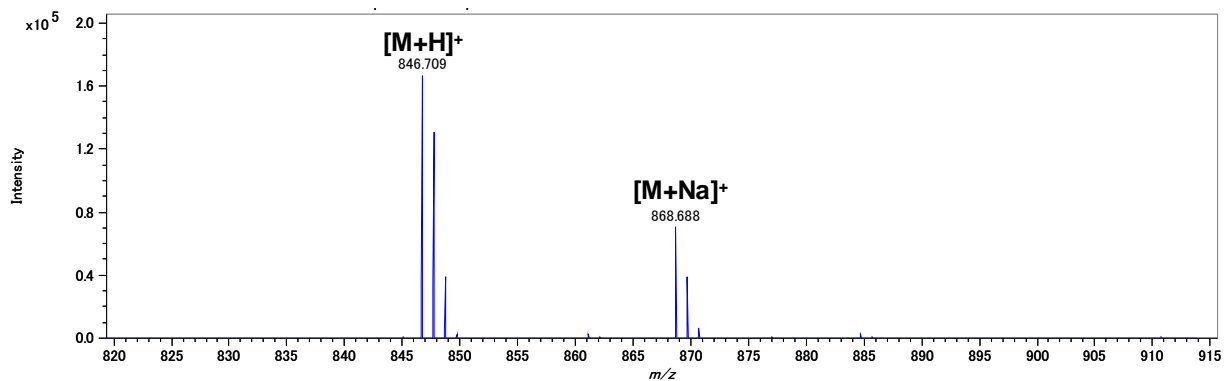


Fig.2 Mass spectrum of 4ME 16:0 PC.

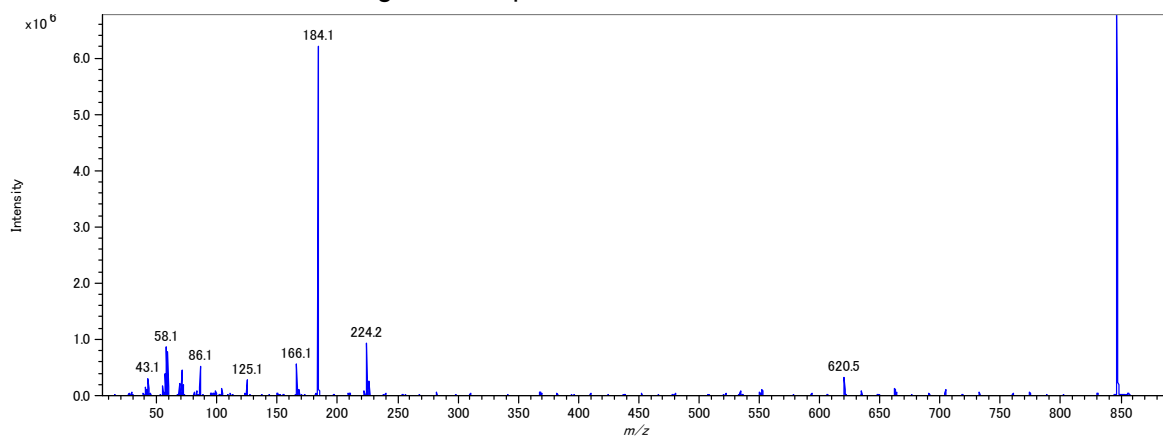


Fig.3 Product ion spectrum of 4ME 16:0 PC  $[M+H]^+$ .

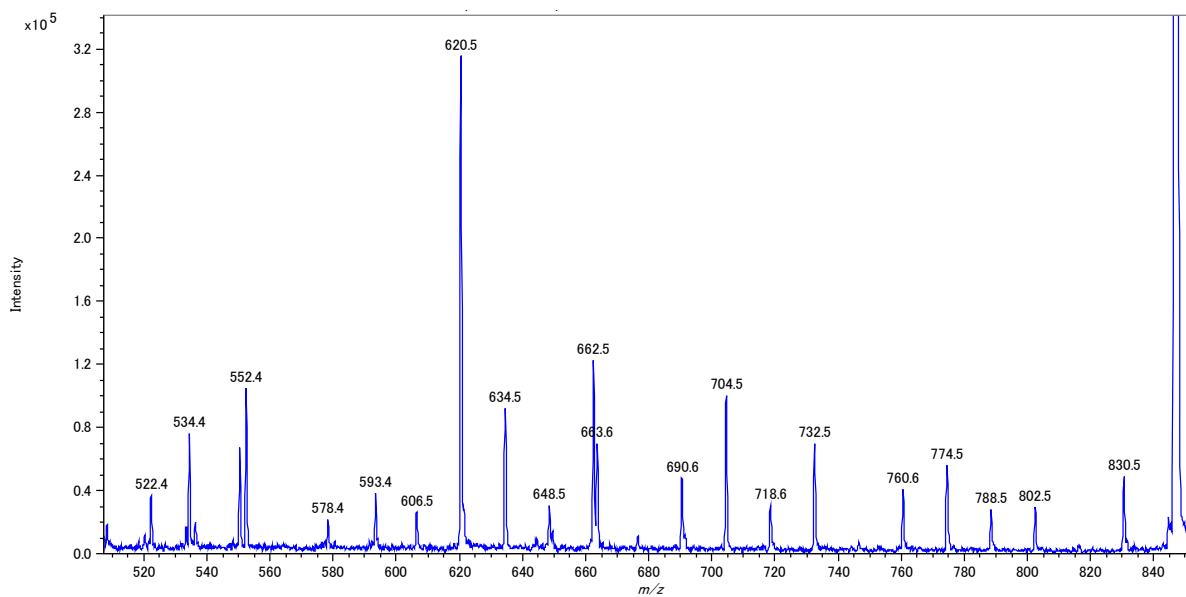


Fig.4 Product ion spectrum of 4ME 16:0 PC  $[M+H]^+$  (enlarged between  $m/z$  500 and  $m/z$  850).

[1] MS Tips No.178 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリステアリンの解析例

[2] MS Tips No.182 "SpiralTOF" TOF-TOF オプションを用いたトリオレインの解析例

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた 糖脂質の解析例

糖脂質は、糖と脂質が結合した構造を持ち、脳や神経細胞に多く含まれている。今回は、糖脂質の 1 種で Fig.1 の構造を持つ Ganglioside GM1 (Ovine Brain) を試料として JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いて測定し、複雑な構造を持つ脂質においても、構造を反映したプロダクトイオンスペクトルが観測できることを確認した。

試料をメタノールで希釈し、Negative モードで測定を行ったところ、Fig.2 に示したようなマススペクトルが得られた。 $m/z$  1544.90 に強くシグナルが観測され、このイオンは GM1 の  $[M-H]^-$  のイオンだと考えられる。1572.90 にもイオンが観測されているが、これは同じ GM1 でセラミド部分の脂肪酸のアシル炭素数が 2 つ多い物質のシグナルだと考えられる。次に TOF-TOF モードに切り替え、この  $m/z$  1544.90 のイオンをプリカーサーイオンとして選択しプロダクトイオンスペクトルを測定した結果を Fig.3 に示す。過去の 4 セクタータンデム質量分析計での測定結果<sup>[1]</sup>と同様にそれぞれの糖が脱離したシグナルだけでなく、糖内部で開裂した (Cross Ring Cleavage) シグナルも観測されている。Fig.1 のように各ピークをアサインすることができ、確かに GM1 の構造を反映したスペクトルが得られていると言える。また、高質量域 (Fig.4) を確認すると、セラミド部分の構造についても、Fig.5 のようにピークをアサインすることができ、この部分の構造を反映したピークが観測されていると考えられる。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID 測定を行うことで、糖と脂質が結合した構造を持つ糖脂質においても、構造解析を行うことが可能となる。

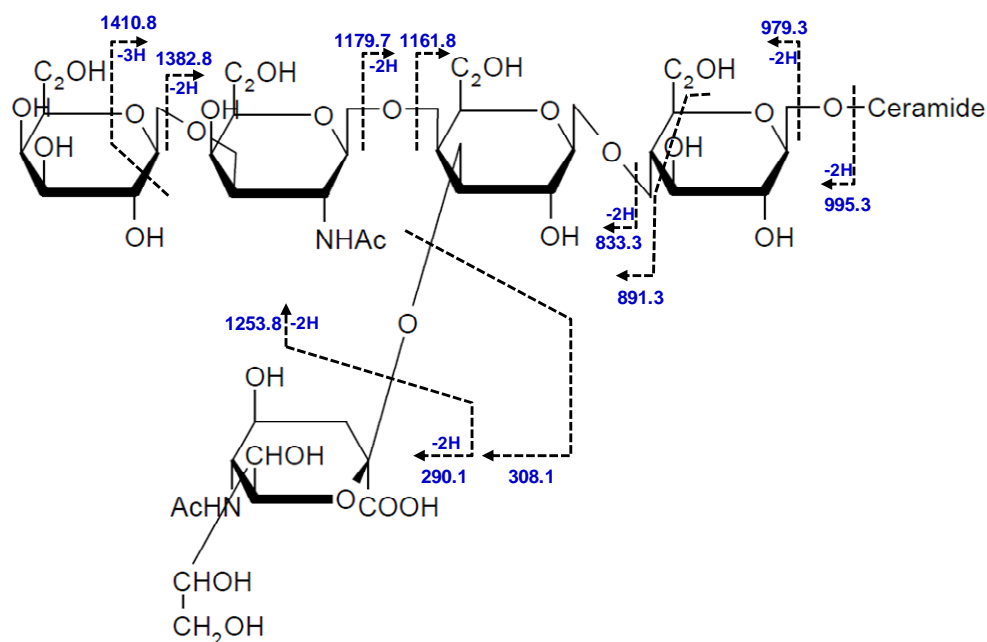


Fig.1 Structure of GM1 and peak assignment of obtained product ion spectra.



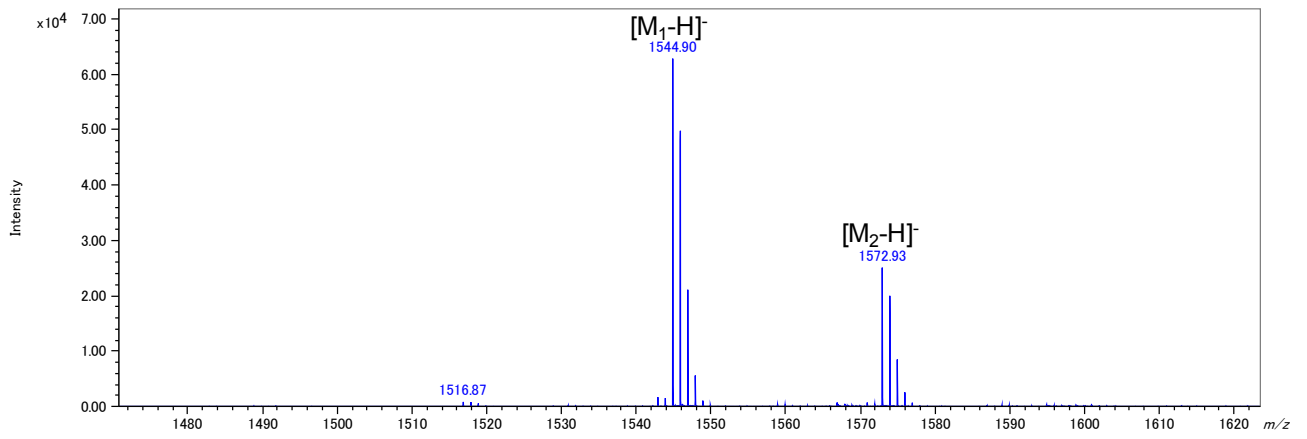


Fig.2 Mass spectrum of GM1.

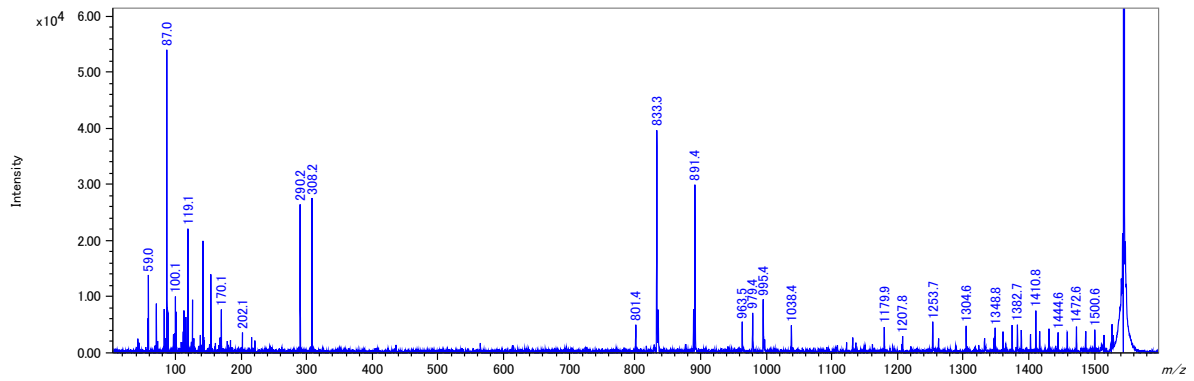


Fig.3 Product ion spectrum of  $[M_1-H]^-$ .

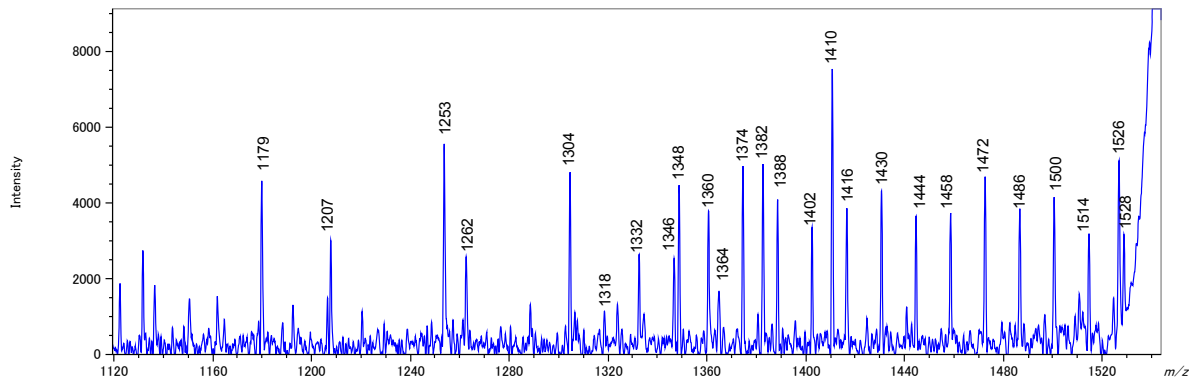


Fig.4 Product ion spectrum of  $[M_1-H]^-$  (enlarged between  $m/z$  1120 and  $m/z$  1540).

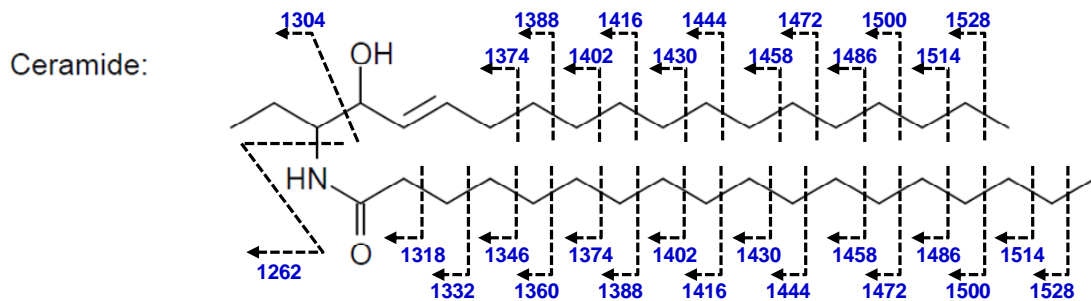


Fig.5 Structure of Ceramide moiety of GM1 and peak assignment of obtained product ion spectra.

[1] Bruno Domon and Catherine E. Costello, *Biochemistry* 27 (1988) 1534.

【謝辞】本分析は、大阪大学大学院理学研究科物理学専攻 質量分析グループとの共同研究の成果です。

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF”の紹介 ～Bovine Serum Albumin の分析～

### 【はじめに】

JMS-S3000“SpiralTOF”は、弊社独自の SpiralTOF 型イオン光学系を搭載した MALDI-TOFMS である (Fig.1)。弊社の卓越した特許技術 ※<sup>1</sup> により、限られた空間内に 17 m のらせん状のイオン軌道を実現した。らせん軌道は、円筒電場の中に 9 枚のマツダプレートを組み込んだ、階層状トロイダル電場 4 組により実現されている。イオン源で加速されたイオンは、4 組の階層状トロイダル電場の各階層を順次通過し、検出器まで到達する (Fig.2)。この長い飛行距離により、極めて高い分解能と質量確度を、広い質量範囲で同時に実現する事を可能とした。

しかし、SpiralTOF 光学系においても、飛行中に自発的に開裂してしまう、極めて寿命の短いイオン (例: 高分子量のタンパク質、多重にリン酸化されたペプチド、などのプロトン付加分子) が検出できない、という点に関しては、従来からのリフレクトロン型 TOFMS と同様である。MALDI 法の広い応用範囲を考えたとき、このような寿命の短いイオンを確実に検出する手段が必要である。このため、JMS-S3000 には「リニア TOF」オプションが用意されている。

今回は、Spiral モードを用いた分析の一例として、Bovine Serum Albumin (BSA) のトリプシン消化物の分析を、Linear モードを用いた分析の一例として、BSA (インタクト) の分析を紹介する。



Fig.1 JMS-S3000“SpiralTOF”

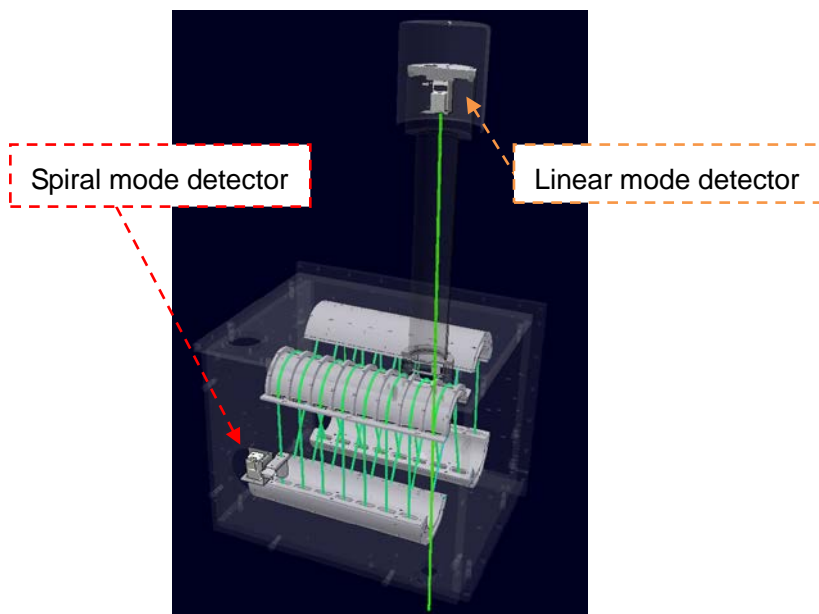


Fig.2 Ion trajectory of SpiralTOF

## 【測定と結果】

BSAトリプシン消化物は Spiral モードで測定した。測定は、SpiralTOF の制御・測定プログラムである msTornado Control の自動測定機能を用い、マスキャリブレーションは、外部標準法を用いた。得られた結果を MASCOT PMF 法にて検索を行い、BSA が 1 位でヒットして同定される事を確認した。検索に用いた BSAトリプシン消化物(消化前のタンパク質 25 fmol 相当)のマスペクトルを示す (Fig.3)。その際にマッチしたペプチドの質量誤差は、3 ppm(R.M.S.)であった (Fig.4)。

Linearモードを用いて BSA を測定した結果を Fig.5 に示す。BSA の一次構造から予想される  $m/z$  の 1 価イオンと 2 価イオンのシグナルが得られる事を確認した。

## 【まとめ】

Spiralモードによる測定では、高い質量精度のデータが得られる。ペプチド混合物の測定によりタンパク質をPMF法で同定する場合には、Peptide tolerance(許容誤差設定)の幅を $\pm 10$  ppmと狭く設定した上でも、タンパク質の同定が行える。これは、擬陽性が少ない、信頼性の高い同定結果が得られる事を意味する。

また、Linearモードを用いれば分子量の大きなタンパク質などの分子量を容易に決定する事が可能である。

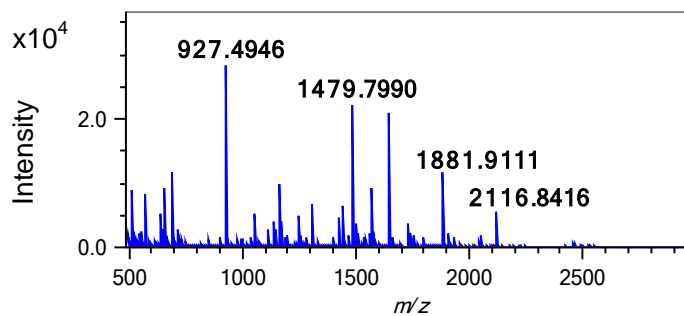


Fig.3 Mass Spectrum of tBSA (25 fmol)

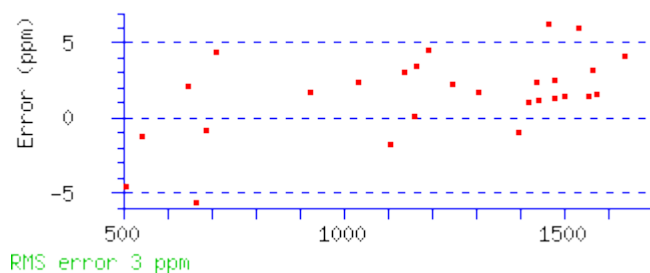


Fig.4 RMS error of MASCOT search results

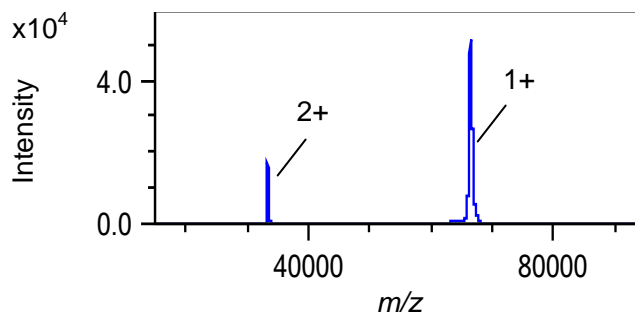


Fig.5 Mass Spectrum of BSA (2.5 pmol)

※1 日本国特許第 4980583 号 米国特許 US7504620

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF モードを用いた Bovine Serum Albumin の定性分析例

## 【はじめに】

JMS-S3000 “SpiralTOF”は、弊社独自の SpiralTOF 型イオン光学系を搭載した MALDI-TOFMS であるが (Fig.1 及び 2), これに TOF-TOF オプションを装着することで、高エネルギー衝突誘起解離 (高エネルギー CID)により生成したプロダクトイオンの観測が可能となる。TOF-TOF モードにおいてプリカーサーイオンを選択するために必要なイオンゲートは、イオン源から 15 m の位置にある。そのため JMS-S3000 “SpiralTOF”は、従来の MALDI-TOF-TOF に比べて高いプリカーサーイオン選択能を有している。

第二 TOF には、弊社独自の再加速機構とオフセットパラボリックリフレクトロンを採用しており、低質量のプロダクトイオンからプリカーサーイオンまで一度の測定で観測することが可能である。

また、SpiralTOF 型イオン光学系の扇形電場は MALDI-TOF 特有のポストソースディケイ由来のイオンを排除し、プロダクトイオンスペクトル上には高エネルギーCID 由来の開裂経路が優先的に観測される。

MSTips No.166<sup>1)</sup>では、Bovine Serum Albumin (BSA) の Spiral モード及び Linear モードでの定性分析について紹介した。本 MSTips では、従来装置には無い種々の優れた特長を有する TOF-TOF モードを用いた BSA の定性分析例について報告する。



Fig.1 JMS-S3000 “SpiralTOF” with TOF-TOF attachment.

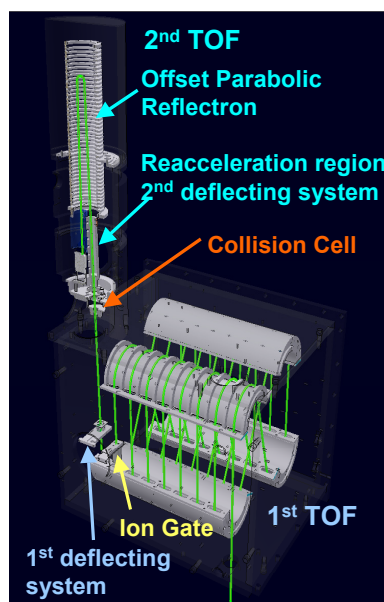


Fig.2 Ion trajectory of “SpiralTOF” and TOF-TOF attachment.

## 【測定と結果】

最初に BSA トリプシン消化物 (tBSA) を Spiral モードで測定した。測定は SpiralTOF の制御・測定プログラムである msTornado Control の自動測定機能を用いた。質量較正は Peptide 混合物による外部標準法を用いた。得られた MALDI マスペクトルにて MASCOT PMF 検索を行い、BSA が 1 位で同定される事を確認した。その際にマッチしたペプチドの質量誤差は 4 ppm (R.M.S.) と、極めて高い質量精度をもって PMF 検索が可能であった。

次に Spiral モードで得られた質量スペクトル中において、強度の高いイオン上位 10 本をプリカーサーイオンとして TOF-TOF 自動測定を実施した。得られた TOF-TOF スペクトルを用い、MASCOT MS/MS Ion Search 検索を行ったところ、Fig.3 に示すように BSA が 1 位で同定された。また Fig.4 には  $m/z$  927.5, 1439.8, 1567.7 のプロダクトイオンスペクトルを示しているが、高エネルギー CID に特有の Immonium イオンや, a イオンシリーズ, d イオンシリーズ, w イオンシリーズなどが観測された。

JMS-S3000 Spiral モードでは、極めて高い質量精度をもって測定が可能であるため、タンパク質の同定を PMF 法で行う場合には、Peptide tolerance (許容誤差設定) の幅を  $\pm 10$  ppm と狭く設定しても、タンパク質の同定が行える。加えて種々の優れた特長を有する TOF-TOF モードを用いることで、MS/MS Ion Search 法によるタンパク質同定もまた可能である。

高い質量精度を活かした Spiral モード測定及び TOF-TOF モード測定を組み合わせることで、擬陽性が少なく信頼性の高い同定結果が得られるため、JMS-S3000 はタンパク質定性分析に対して極めて有効なツールと成り得る。

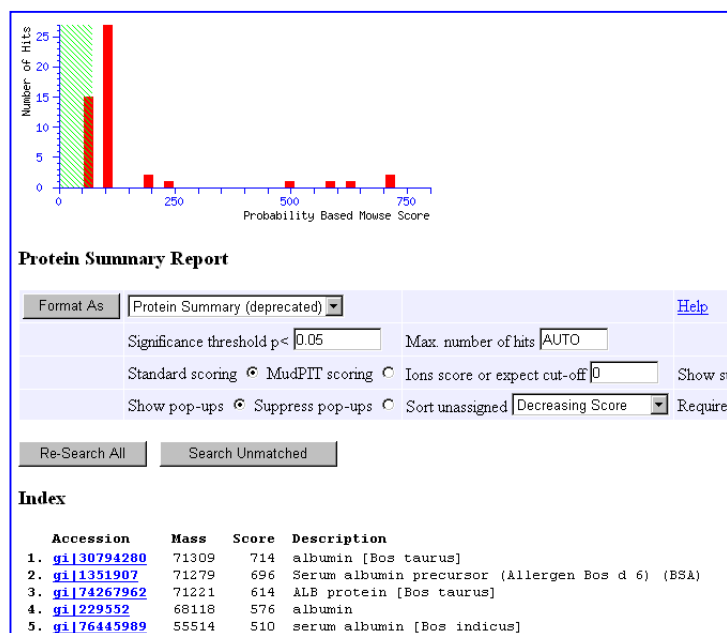


Fig.3 MASCOT MS/MS Ion search result of tBSA by TOF-TOF mode.

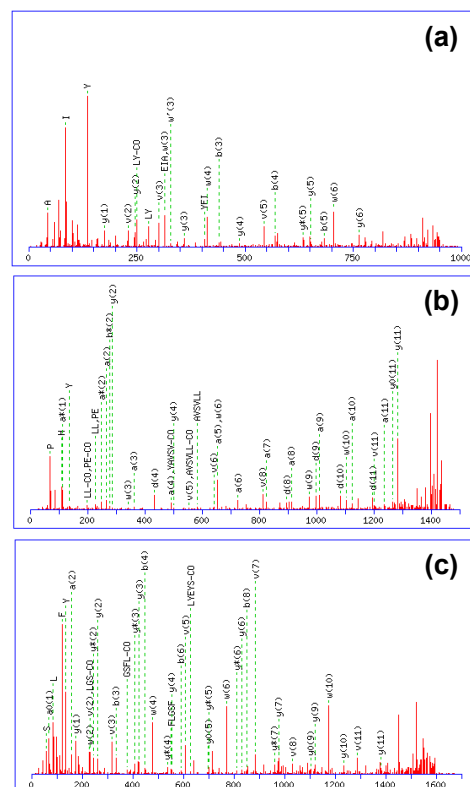


Fig.4 Product ion spectra of  $m/z$  927.5 (a), 1439.8 (b) and 1567.7 (c).

## 【関連情報】

1) MSTips No.166, <http://www.jeol.co.jp/>

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000 “SpiralTOF”を用いたペプチドの MS/MS 測定例

### 【はじめに】

ペプチドに対して、JMS-S3000 “SpiralTOF” の TOF-TOF モード測定を行ったところ、高エネルギー衝突誘起解離 (CID) に特有な a イオンシリーズなど、構造情報を反映したプロダクトイオンが観測された。

本 MS Tips では、ACTH18-39 の測定及び解析結果について報告する。

### 【試料】

試料 : ACTH18-39  
(Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe)  
マトリックス剤 :  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)

### 【測定と結果】

Fig.3に得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。プリカーサーイオン  $m/z$  2456.2 ( $[M+H]^+$ )から、種々のプロダクトイオンが観測されている。Fig.3中の各プロダクトイオンのラベルは全てBiemann標記による (Fig.1)。

ACTH18-39ではN末端側に塩基性アミノ酸であるArginineが存在しているため、Biemann標記におけるN末端側のフラグメントイオンに相当するaイオン、bイオン及びdイオンシリーズが主に観測されている。高エネルギーCIDに特有のaイオンシリーズは、a2~a21まで観測された。さらにaイオンが開裂することで生じるdイオンもまた、複数観測された。さらに  $m/z$  100付近では、高エネルギーCIDに特有のImmonium ion (Fig.2) も観測された。

JMS-S3000 “SpiralTOF”のTOF-TOFモードは、①高エネルギーCID、②高いプリカーサーイオン選択能、③扇形電場によるMALDI-TOF特有のポストソースディケイ由来のイオンを排除、という3つの特長を有している。有機化合物の定性分析においては、①の特長から構造に関する多くの情報を得ることが可能であり、②及び③の特長から、得られるプロダクトイオンスペクトルは解析が容易なシンプルなものとなる。以上からJMS-S3000 “SpiralTOF” は、有機化合物の構造解析に対して極めて有効なツールと成り得る。

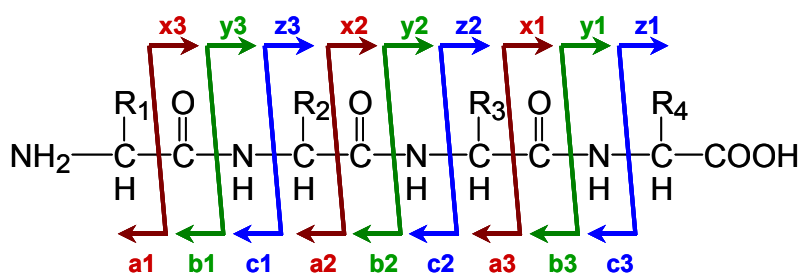


Fig.1 Fragment ion series.

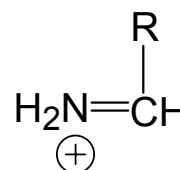


Fig.2 Immonium ion.



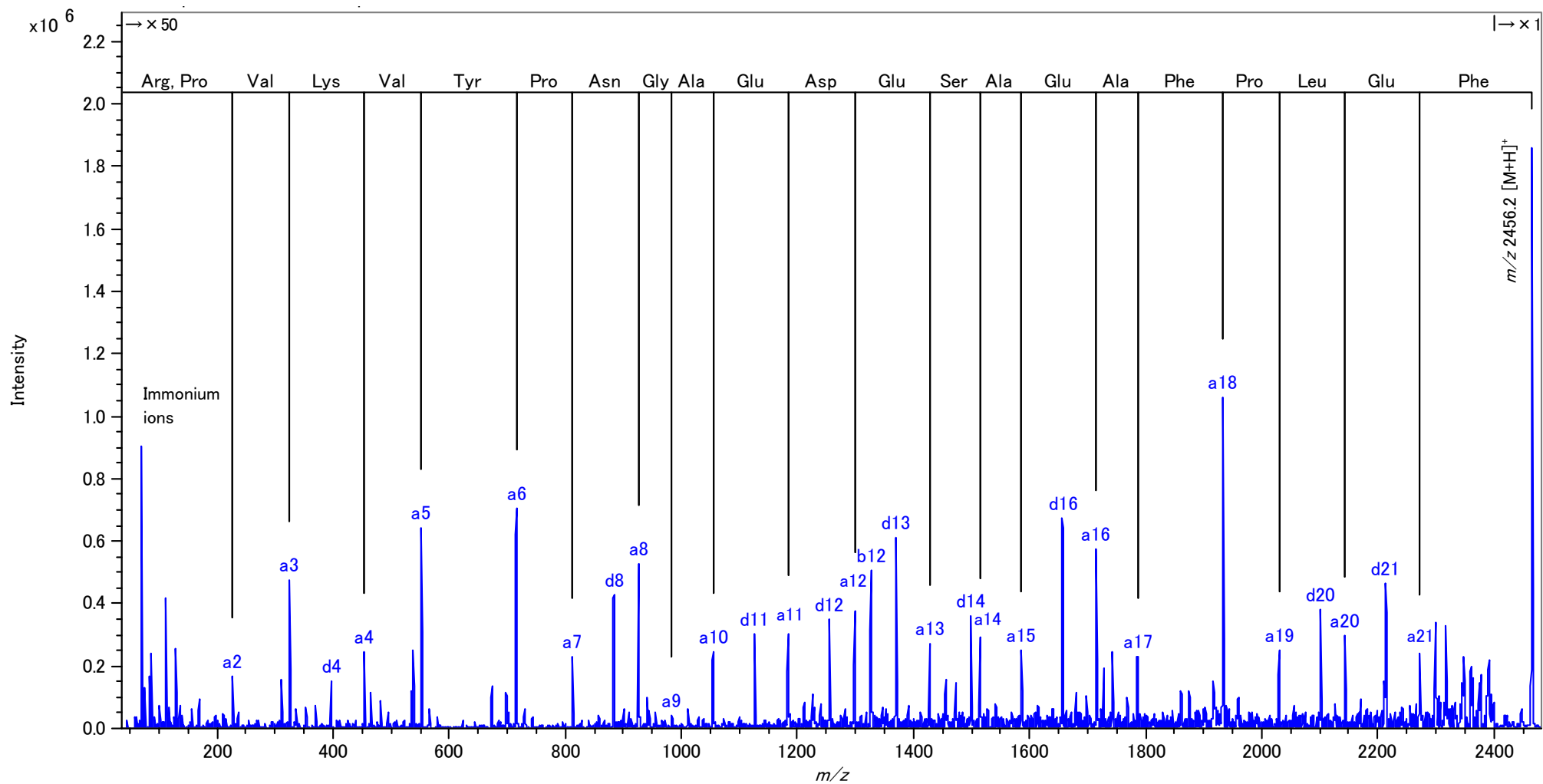


Fig.3 Product ion spectrum of ACTH18-39 ( $m/z$  2456.2,  $[M+H]^+$ ).

ACTH18-39: Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた ペプチドの解析例 2

Renin Substrate tetradecapeptide (*porcine*)の  $[M+H]^+$  ( $m/z$  1758.93)のプロダクトイオンスペクトルをJMS-S3000 SpiralTOFのTOF-TOFモードで測定した。Renin Substrate tetradecapeptideは、配列中にロイシン及びイソロイシンを持つが、ロイシンとイソロイシンは構造異性体であるため、aイオンやyイオンなどのペプチドの主鎖が開裂したイオン間の質量差からは識別できない。しかし、高エネルギーCIDでは主鎖が開裂した上で側鎖が脱離したイオン(dイオン)も観測されるため、識別することが可能となる。そこで、本実験では、JMS-S3000 “SpiralTOF” TOF-TOFオプションを用いて、高エネルギーCIDで特徴的に見られる、アミノ酸側鎖の構造を反映したフラグメントイオンによるロイシン・イソロイシンの判別が可能か確認した。併せて、ペプチド内に含まれるアミノ酸の種類を同定できるインモニウムイオンを明確に観測できるか確認した。

測定して得られたプロダクトイオンスペクトルをFig.1に示す。主鎖が開裂したaイオンが主に観測されており、Fig.1で帰属しているように配列を反映したスペクトルが得られている。イソロイシン及びロイシンの構造情報が得られる $m/z$  600及び1200前後の領域を拡大すると(Fig.2)、イソロイシンではa5イオンから-14及び-28の位置に側鎖が脱離したdイオンが観測されており、ロイシンではa10イオンから-42の位置にdイオンが観測されている。これは、イソロイシンとロイシンでは側鎖の構造が異なるためであり、Fig.2で示しているようにdイオンに違いが生じる。次に $m/z$  150以下の範囲を拡大すると(Fig.4)、Fig.3のような構造を持つインモニウムイオンが観測されている。このイオンは、Fig.3で示しているように各アミノ酸の残基(R)に $CH_3N$ が付いた構造となっており、このイオンから測定したペプチドに含まれているアミノ酸の種類を同定することができる。

以上のように、TOF-TOFオプションでは構造異性体であるロイシン・イソロイシンの判別が可能であり、ペプチドの一次構造解析(特に、*De Novo Sequencing*)において、極めて有効なツールといえる。

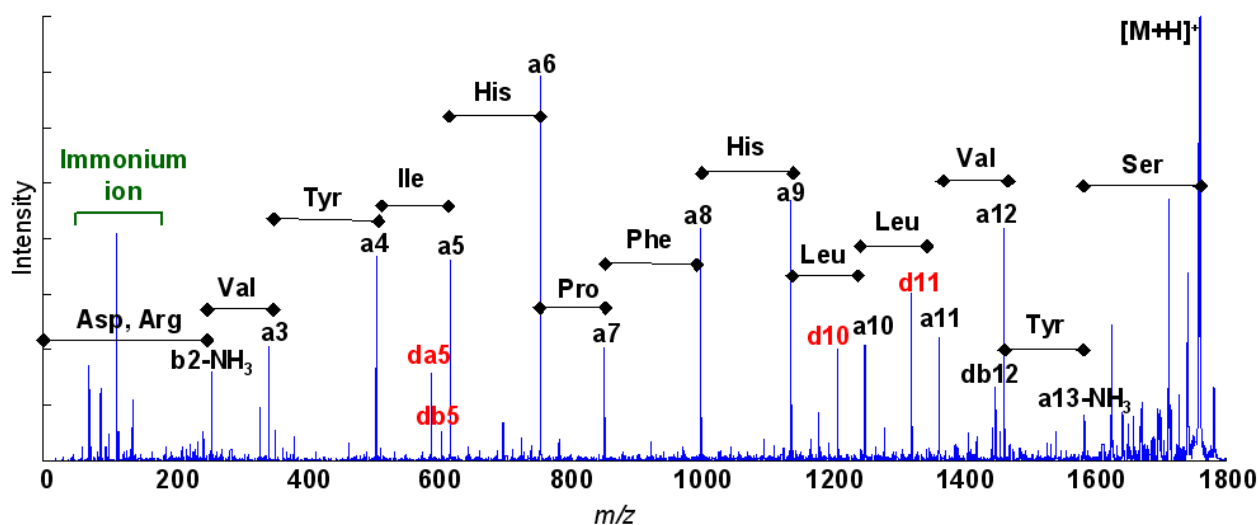


Fig.1 Product ion spectrum of renin substrate tetradecapeptide.

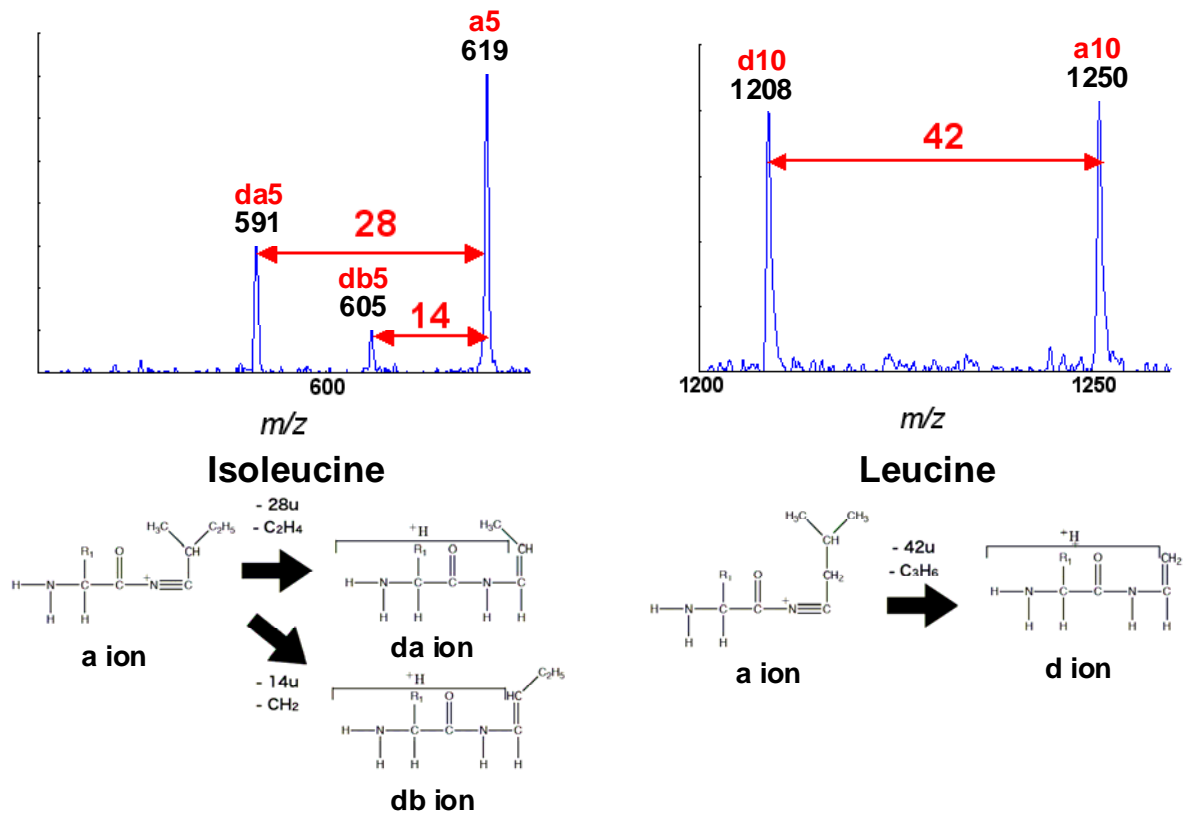


Fig.2 Product ion spectrum of renin substrate tetradecapeptide and Pathway for d ion (Left: Isoleucine, Right: Leucine).

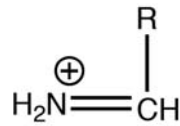


Fig.3 Structure of immonium ion (R: amino-acid residue)

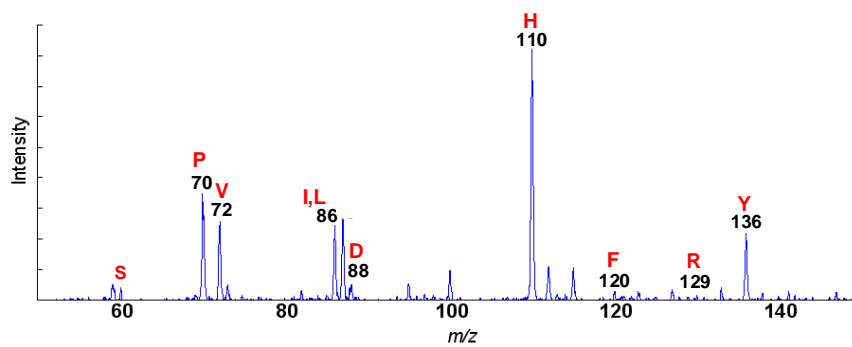


Fig.4 Product ion spectrum of renin substrate tetradecapeptide enlarged between  $m/z$  50 and 150.

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた ペプチドの解析例 3 (リン酸化ペプチド)

リン酸化は、タンパク質の翻訳後修飾の一種であり、幅広い生物種において細胞内シグナル伝達等で行われている。そのため、タンパク質のどの部位 (アミノ酸) がリン酸化しているかは非常に重要な情報であると言える。そこで、今回は代表としてリン酸化タンパク質である  $\beta$ -casein (Bovine) のトリプシン消化して生成されたモノリン酸化ペプチド (FQ pS EEQQQTEDELQDK) を JMS-S3000 “SpiralTOF” の TOF-TOF オプションで測定した。

試料を 10 pmol/uL (0.1% TFA) の濃度で調製し、液体マトリックスと 1:1 で混合した後、プレートに滴下した。液体マトリックスは、CHCA を 30 mg/mL (100% MeOH) の濃度で調整し、その溶液 150 uL に対して 3-Aminoquinoline を 35 mg 溶解させ作成した。

測定して得られたマススペクトルを Fig.1 に示す。  $m/z$  2061.807 に試料の  $[M+H]^+$  が観測されている。このモノアイソトピックイオン (計算値 2061.828) をプリカーサーイオンとして選択して得られたプロダクトイオンスペクトルを Fig.2 に示す。C末端に塩基性アミノ酸であるリジンが存在しているため、ペプチドの主鎖が開裂して生成された  $y$  イオンがシリーズで観測されている。また、その  $y$  イオンから側鎖が脱離した形となる  $w$  イオンも観測されている。低エネルギーCIDでは、主鎖の開裂の前にリン酸基が脱離してしまうためにリン酸化位置の同定は困難である<sup>[1]</sup>とされているのに対して、高エネルギーCIDでは Fig.2 のように  $y$  や  $w$  イオンがリン酸基が付加した状態で観測されるため<sup>[2]</sup>、リン酸化位置を同定することが可能となる。 Fig.2 において、  $y_{13}$  イオンと  $y_{14}$  イオンの  $m/z$  の差が、リン酸化したセリンに相当する 167 となっており、セリンがリン酸化していることがわかる。

以上のように、TOF-TOF オプションではリン酸化ペプチドの修飾位置の同定が可能であり、ペプチドの一次構造解析 (特に、*De Novo Sequencing*) において、極めて有効なツールといえる。

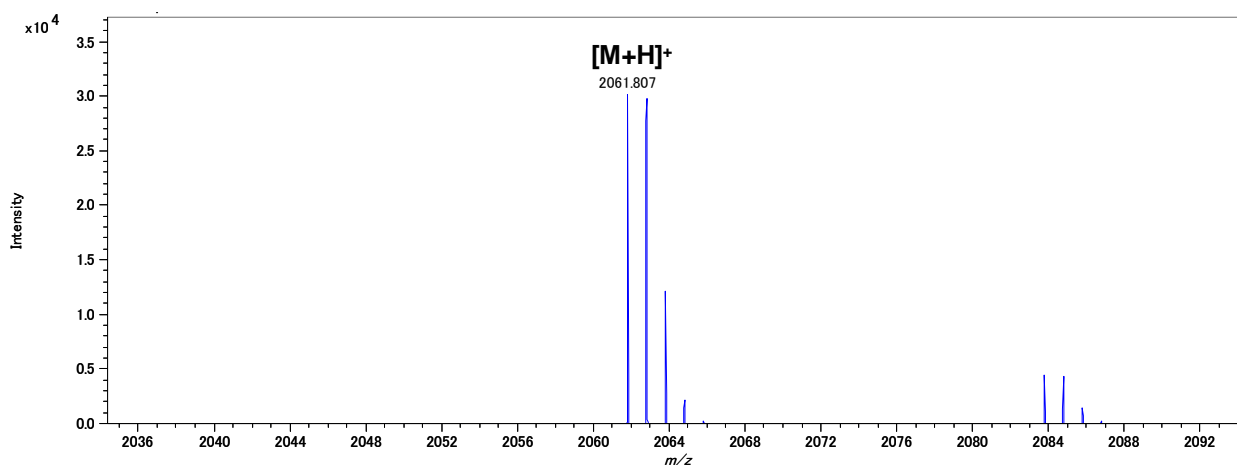


Fig.1 Mass spectrum of Monophosphopeptide.

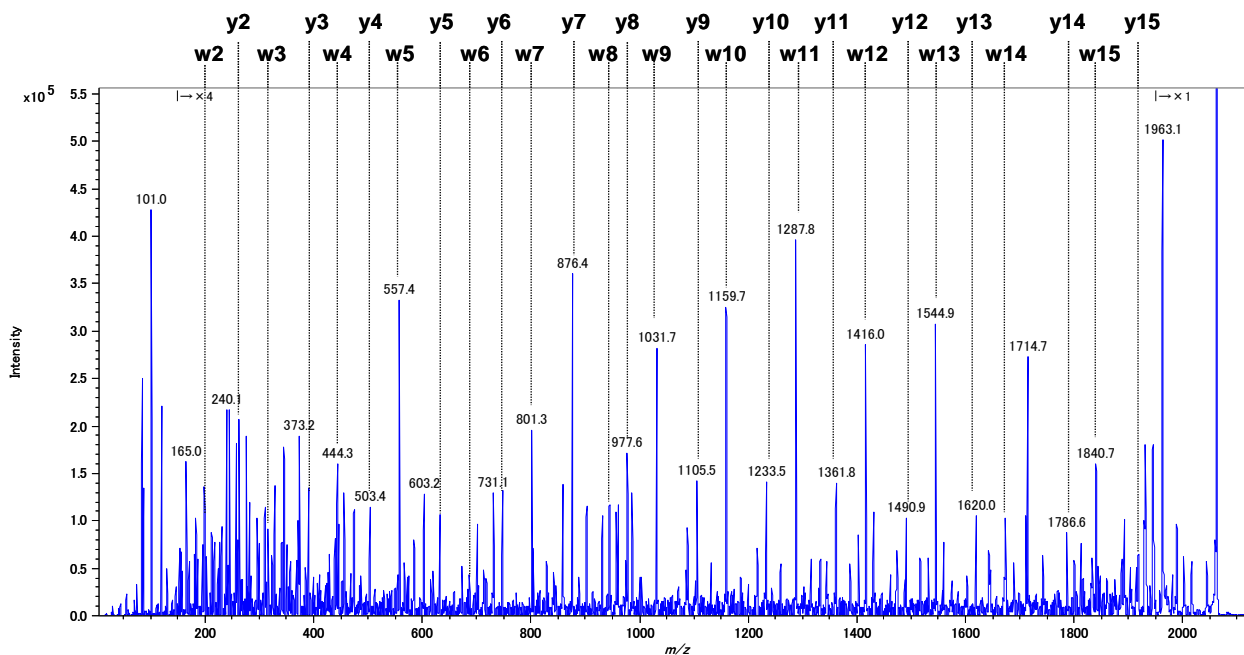


Fig.2 Product ion spectrum of Monophosphopeptide.

- [1] A. Stensballe, O.N. Jensen, J.V. Olsen, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, Rapid Communications in Mass Spectrometry 14 (2000) 1793.
- [2] S. Shimma, H. Nagao, A.E. Giannakopoulos, S. Hayakawa, K. Awazu, M. Toyoda, Journal of Mass Spectrometry 43 (2008) 535.

## JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションと 4 セクタータンデム二重収束質量分析計との比較①

JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションは、「高いプリカーサーイオン選択性」と「ポストソースディケイ(PSD)由来イオンの排除」、「高エネルギーCID」という特徴を持つ。弊社の旧製品である 4 セクタータンデム二重収束質量分析計もイオン化法や分析部の違いはあるが、同様の特徴を持ち、これまで複雑な生体分子の構造解析など、様々な分野で用いられてきた。そこで、今回は 4 セクタータンデム二重収束質量分析計である JMS-700T と S3000 を用いて、同一サンプルの MS/MS 測定を行う、それぞれの結果の比較を行った。

700T は Fig.1 右のようなイオン軌道を持ち、最初の磁場及び電場を用いて、特定の  $m/z$  を持つイオンを選択し、そのイオンを一定の電圧でフローティングさせた衝突室に導入する。イオンは、減速された後にターゲットガスと衝突・解離し、その後加速されるために質量の小さいプロダクトイオンも十分な運動エネルギーを持ち、2 番目の磁場及び電場で効率良く分析することが可能となる。

比較のための試料として、DRVYIHPFLLVYS のアミノ酸配列を持つペプチドである Renin Substrate tetradecapeptide (*porcine*) を使用した。2 つの装置で  $[M+H]^+$  ( $m/z$  1758.93) をプリカーサーイオンとして選択した場合のプロダクトイオンスペクトルを Fig.2 に示す。また、双方の装置における測定条件を Table 1 に示す。FAB(高速原子衝突)・MALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)というイオン化法の違いにより S3000 は 700T の 1/100 以下の量で十分な強度のプロダクトイオンスペクトルの取得が可能となっている。得られたピークとしては共に高エネルギーCIDで特徴的な a と d シリーズのイオンやインモニウムイオンが観測されており、同一のパターンが得られている。また、Fig.2 の 700T のプロダクトイオンスペクトルでは低質量域のイオンを効率良く観測するためにフローティング電圧を 5000 V と高めにしているが、結果として高質量域のイオンの分解能や透過率の低下を招いてしまっている。しかし、S3000 では 2 段目の質量分析計の再加速部及びオフセットパラボリックリフレクトロン (OPR) により、700T のように目標の質量域に合わせて電圧を設定する必要が無く、全質量域を効率良く測定することが可能となっている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いることで、4 セクタータンデム二重収束質量分析計と同等の構造情報をより少ないサンプル量で、しかもより簡便に測定することが可能であった。

Table1 Experimental conditions and specifications

|                   | JMS-S3000     | JMS-700T      |
|-------------------|---------------|---------------|
| Ionization method | MALDI         | FAB (Xe 6 kV) |
| Sample quantity   | 2.5 pmol      | 1 nmol        |
| Precursor ion     | mono isotopic | mono isotopic |
| Target gas        | He            | Ar            |
| Matrix            | CHCA          | Glycerin, NBA |
| Collision energy  | 20000 eV      | 5000 eV       |



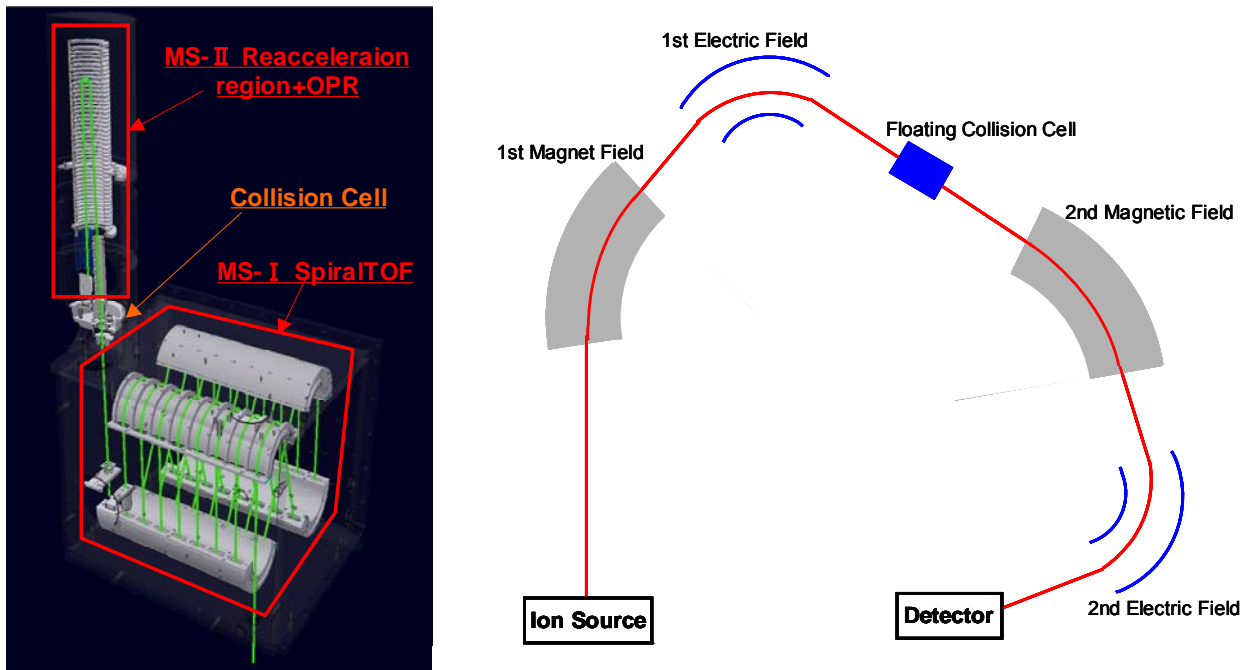


Fig.1 Ion trajectory Left: "JMS-S3000 SpiralfTOF", Right: "JMS-700T tandem MStation"

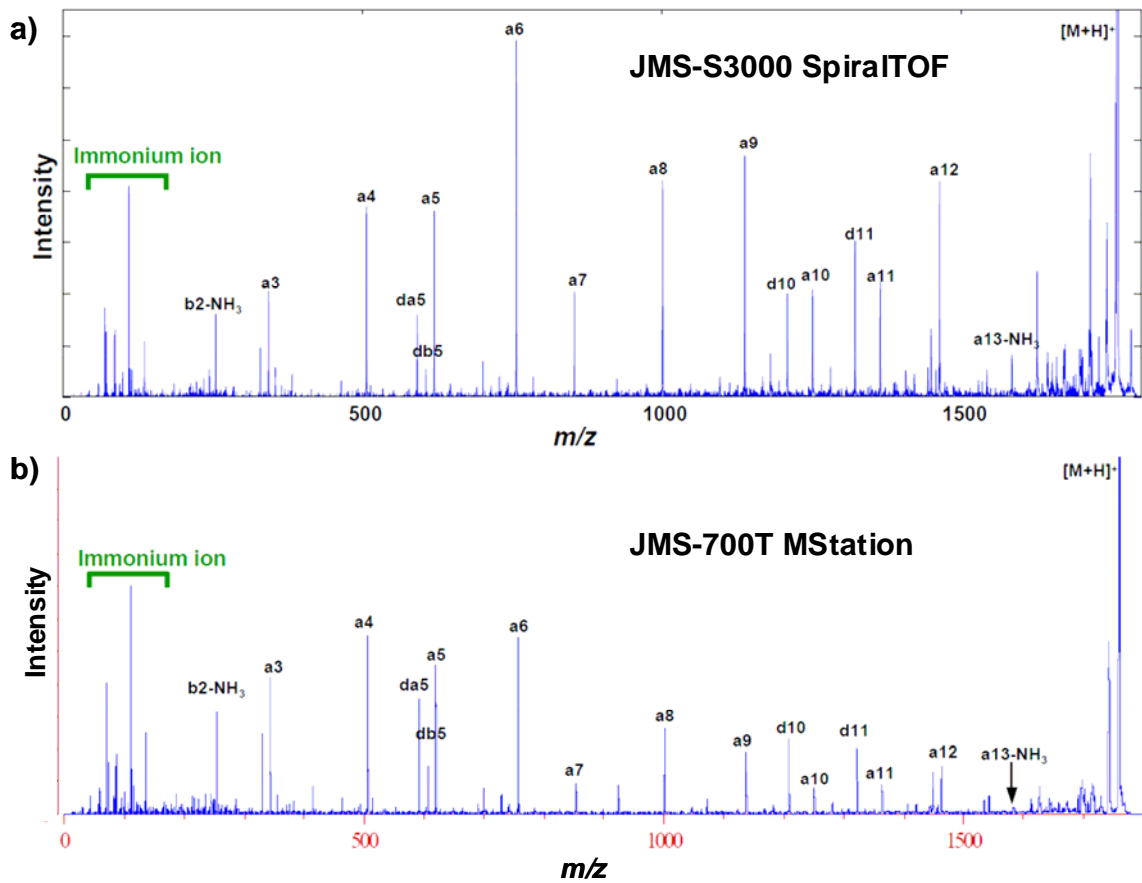


Fig.2 Product ion spectra of Renin-substrate tetradecapeptide by  
 a) JMS-S3000 SpiralfTOF-TOF and b) JMS-700T tandem MStation

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた 天然有機化合物の測定例

SAAF (sperm activating and attracting factor) は、ホヤの精子活性化誘引物質であり、これまでに高エネルギーCIDによる構造解析が行われている<sup>[1]</sup>。そこで、今回はカタユウレイボヤの SAAF を JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いて測定し、プロダクトイオンスペクトルを得た。

得られたマスペクトルを Fig. 1 に示す (外標として、PEG sulfate 600 を使用した)。 $m/z$  515.301 に  $[M-2Na-SO_3+H]^+$  のモノアイソトピックイオン (計算値 515.305) とと思われるピークが観測されており、それ以外にも  $m/z$  595.255 に  $[M-2Na+H]^+$  (計算値 595.261),  $m/z$  617.237 に  $[M-Na]^+$  (計算値 617.242) に SAAF 由来のピークが観測されている。この中から、既に報告のある  $[M-2Na-SO_3+H]^+$  についてプロダクトイオンスペクトルの測定を行った<sup>[1]</sup>。プロダクトイオンスペクトルを Fig. 2 に示す。末端にある硫酸エステルに負のチャージが固定されるためにチャージリモートフラグメンテーション (CRF) が起こり、Fig. 3 で示しているように SAAF の構造を反映したピークが得られている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、天然有機化合物などの複雑な構造を持つ試料でも解析を行うことが可能となる。

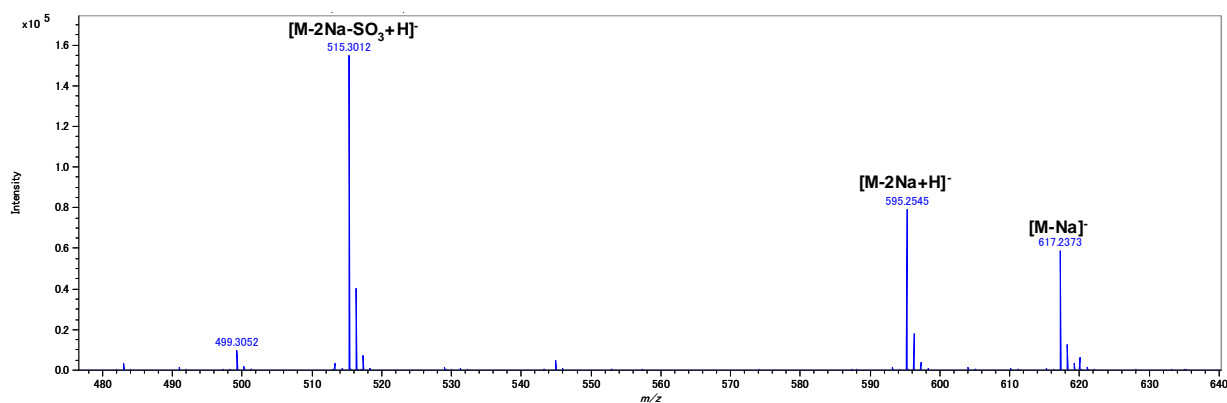


Fig.1 Mass spectrum of SAAF.

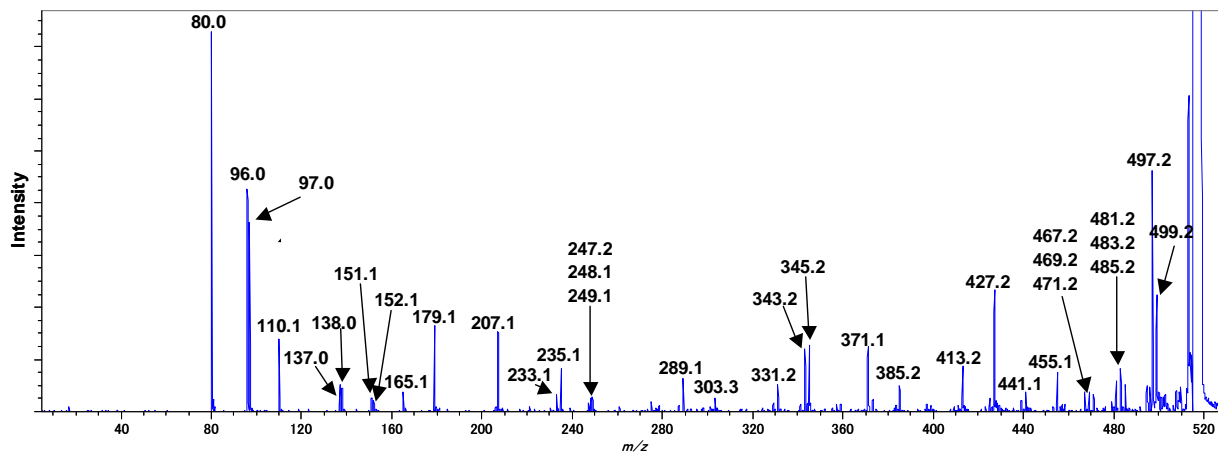


Fig.2 Product ion spectrum of  $[M-2Na-SO_3+H]^+$

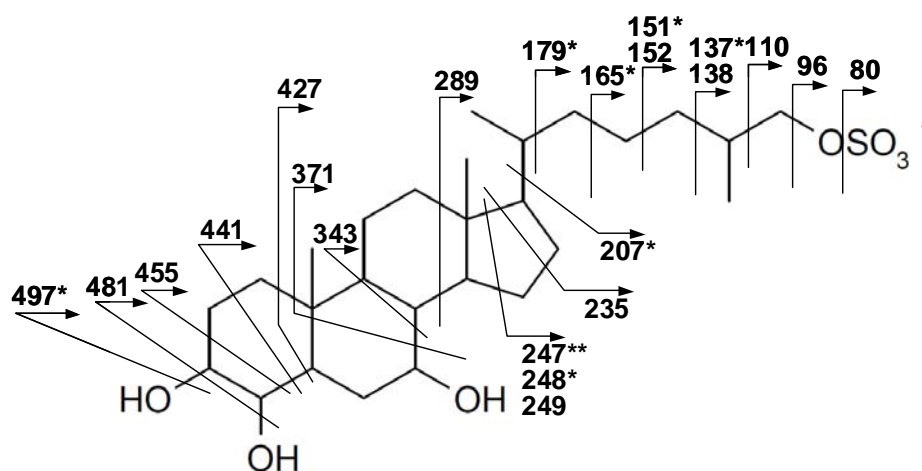


Fig.3 Structure of SAAF and fragmentation pattern (Asterisks show dehydrated ions.)

[1] M. Yoshida, M. Murata, K. Inaba, and M. Morisawa, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (2002) 14831

【謝辞】

本分析は、大阪大学大学院理学研究科物理学専攻 質量分析グループとの共同研究の成果です。  
SAAF の測定に際し、試料のご提供をいただきました大阪大学大学院理学研究科化学専攻  
生体分子科学研究室 村田 道雄様に深謝いたします。

JMS-S3000 Application Data

## JMS-S3000“SpiralTOF” TOF-TOF オプションを用いた 天然有機化合物の測定例 2

YTX (yessotoxin) は、ヒトが毒化した貝を摂食した場合に生じる食中毒の原因物質の1つであり、これまでに高エネルギーCIDによる構造解析が行われている<sup>[1]</sup>。そこで、この YTX を JMS-S3000 SpiralTOF の TOF-TOF オプションを用いて測定し、プロダクトイオンスペクトルを得た。

得られたマススペクトルを Fig. 1 に示す (外標として, PolyAlanine を使用した)。 $m/z$  1061.513 に  $[M-2Na-SO_3+H]^+$  のモノアイソトピックイオン(計算値 1061.609)と思われるピークが観測されており、それ以外にも  $m/z$  1163.450 に  $[M-Na]^+$  (計算値 1163.548) に SAAF 由来のピークが観測されている。この中から、既に報告のある  $[M-2Na-SO_3+H]^+$  についてプロダクトイオンスペクトルの測定を行った<sup>[1]</sup>。プロダクトイオンスペクトルを Fig. 2 に示す。末端にある硫酸エステルに負のチャージが固定されるためにチャージリモートフラグメンテーション (CRF) が起こり、Fig. 3 で示しているように YTX の構造を反映したピークが得られている。

以上のように、TOF-TOF オプションを用いた高エネルギーCID測定を行うことで、CRF 由来のピークが明確に観測され、天然有機化合物などの複雑な構造を持つ試料でも解析を行うことが可能となる。

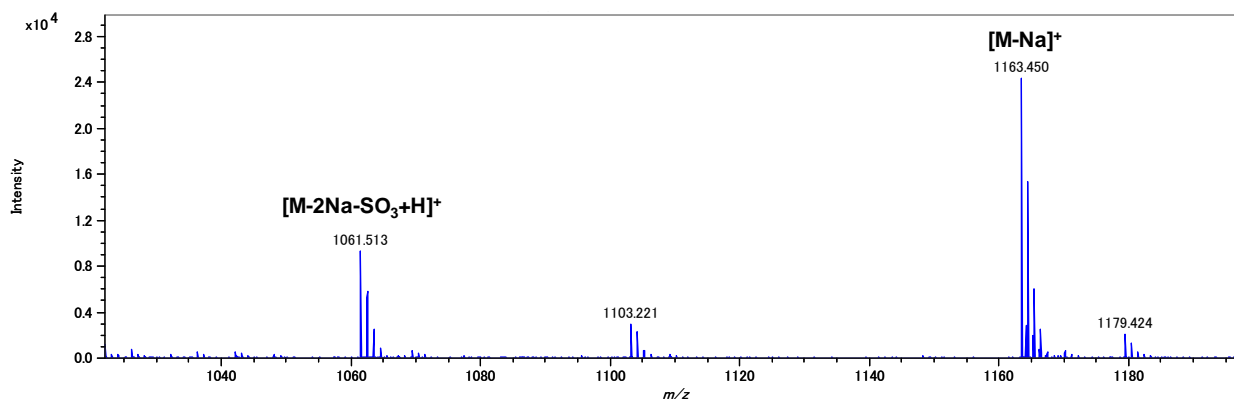


Fig.1 Mass spectrum of YTX.

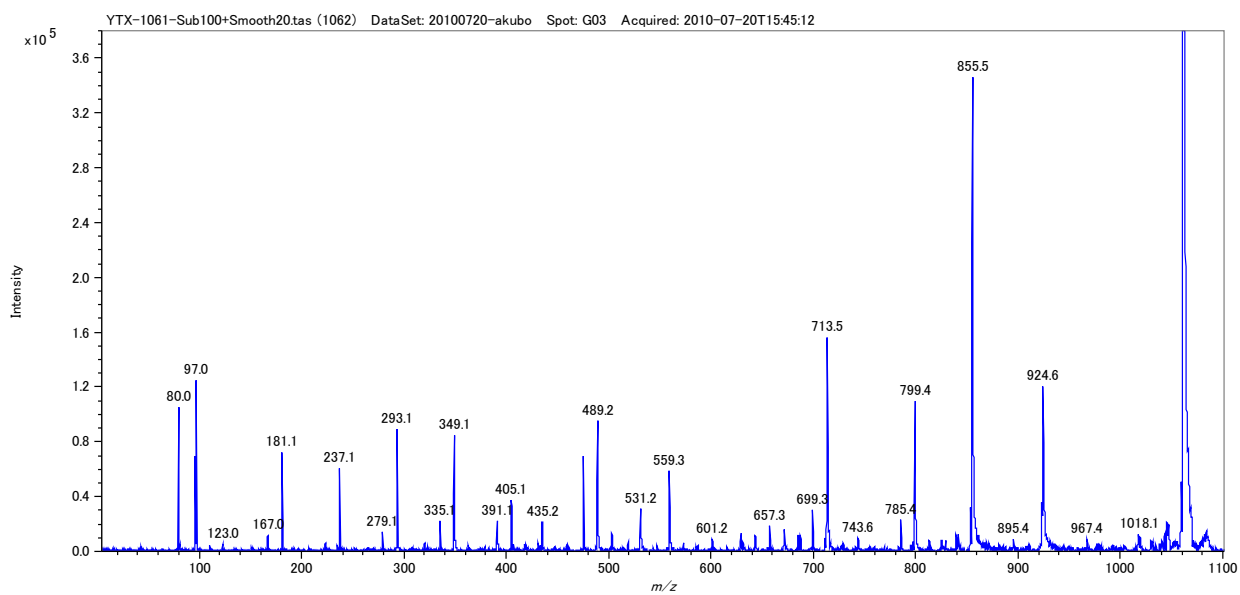


Fig.2 Product ion spectrum of  $[M-2Na-SO_3+H]^+$

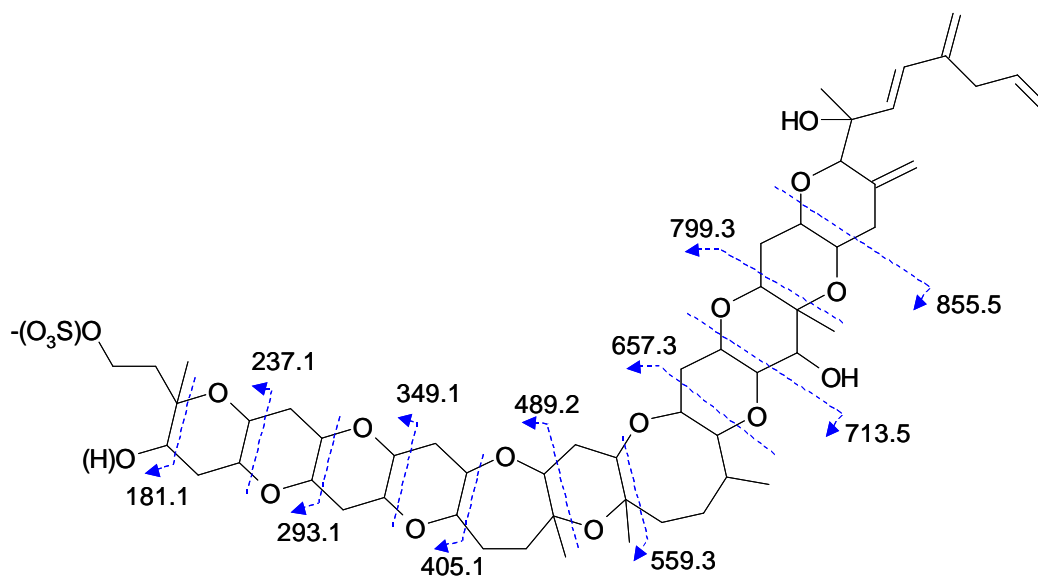


Fig.3 Structure of YTX and fragmentation pattern

[1] H. Naoki, M. Murata, T. Yasumoto, Rapid Communication of Mass Spectrometry 7 (1993) 179

【謝辞】

YTX の測定に際し、試料のご提供をいただきました大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子科学研究室 村田 道雄様に深謝いたします。

# JMS-S3000 *SpiralTOF* による論文一覧

2016年5月現在

- 1 Satoh, T., Sato, T. & Tamura, J. Development of a high-performance MALDI-TOF mass spectrometer utilizing a spiral ion trajectory. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**, 1318-1323, doi:10.1016/j.jasms.2007.04.010 (2007).
- 2 Satoh, T. Analytical Capability of a High Performance Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer for Peptide Mass Fingerprinting 高性能マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計を利用したペプチドマスフィンガープリント法によるタンパク質解析能力の検討. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **55**, 173-181, doi:10.5702/massspec.55.173 (2007).
- 3 Satoh, T. Development of a Time-of-Flight Mass Spectrometer Utilizing a Spiral Ion Trajectory らせん状のイオン軌道を利用した飛行時間質量分析計の開発. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **57**, 363-369, doi:10.5702/massspec.57.363 (2009).
- 4 佐藤貴弥. らせん状のイオン軌道を利用した飛行時間質量分析計の開発. *ぶんせき*, 688-691 (2009).
- 5 Hitora, Y., Takada, K., Okada, S. & Matsunaga, S. Miyakosynes A-F, cytotoxic methyl branched acetylenes from a marine sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron* **67**, 4530-4534, doi:10.1016/j.tet.2011.04.085 (2011).
- 6 Ishii, Y., Sakashita, T., Kawasaki, S., Kato, H. & Takatori, M. Fusing Treatment of Pentacenes: Toward Giant Graphene-Like Molecule. *Materials Express* **1**, 36-42, doi:10.1166/mex.2011.1005 (2011).
- 7 Naka, T. *et al.* Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem* **286**, 44153-44161, doi:10.1074/jbc.M111.310037 (2011).
- 8 Satoh, T., Sato, T., Kubo, A. & Tamura, J. Tandem time-of-flight mass spectrometer with high precursor ion selectivity employing spiral ion trajectory and improved offset parabolic reflectron. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**, 797-803, doi:10.1007/s13361-011-0090-3 (2011).
- 9 Tsujita, T. *et al.* Purification and characterization of polyphenols from chestnut astringent skin. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**, 8646-8654, doi:10.1021/jf201679q (2011).
- 10 佐藤貴弥. らせん状のイオン軌道をもつタンデム飛行時間質量分析装置の開発と応用例. *ぶんせき*, 532-536 (2011).
- 11 Degawa, T., Shimma, S. & Toyoda, M. Rapid sequencing of a peptide containing a single disulfide bond using high-energy collision-induced dissociation. *European Journal of Mass Spectrometry* **18**, 345, doi:10.1255/ejms.1188 (2012).
- 12 Hamamoto, Y. *et al.* Brevisulcinal-F: A polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 4963-4968, doi:10.1021/ja212116q (2012).
- 13 Holland, P. T. *et al.* Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*. *Harmful Algae* **13**, 47-57, doi:10.1016/j.hal.2011.10.002 (2012).
- 14 Li, K. *et al.* A rheological and chemical investigation of canadian heavy oils from the McMurray Formation. *Energy & Fuels* **26**, 4445-4453, doi:10.1021/ef300608w (2012).
- 15 Moyori, T., Tang, T. & Takasu, A. Dehydration Polycondensation of Dicarboxylic Acids and Diols Using Sublimating Strong Brønsted Acids. *Biomacromolecules* **13**, 1240-1243, doi:10.1021/bm300231d (2012).



- 16 Mukosaka, S., Teramoto, K. & Koike, H. in *Biological Data Visualization (BioVis), 2012 IEEE Symposium on*. 63-68 (IEEE).
- 17 Mukosaka, S., Teramoto, K. & Koike, H. Visual Analytics of Repeating Structures Using Mass Spectrometry. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **60**, 27-32, doi:10.5702/massspec.11-34 (2012).
- 18 Oda, M. *et al.* Stathmin is involved in the cooperative effect of Zoledronic acid and gefitinib on bone homing breast cancer cells in vitro. *J Bone Oncol* **1**, 40-46, doi:10.1016/j.jbo.2012.06.001 (2012).
- 19 Satoh, T., Kubo, A., Shimma, S. & Toyoda, M. Mass spectrometry imaging and structural analysis of lipids directly on tissue specimens by using a spiral orbit type tandem time-of-flight mass spectrometer, SpiralTOF-TOF. *Mass Spectrometry* **1**, A0013-A0013, doi:10.5702/massspectrometry.A0013 (2012).
- 20 Shimma, S., Kubo, A., Satoh, T. & Toyoda, M. Detailed structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a MALDI-SpiralTOF-Reflectron TOF mass spectrometer. *PLoS One* **7**, e37107, doi:10.1371/journal.pone.0037107 (2012).
- 21 Voorhees, K. J., McAlpin, C. R. & Cox, C. R. Lipid profiling using catalytic pyrolysis/metal oxide laser ionization-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **98**, 201-206, doi:10.1016/j.jaap.2012.07.004 (2012).
- 22 Wang, X., Nagata, K. & Higuchi, M. Formation and electrochemical investigation of ordered cobalt coordinated peptide monolayers on gold substrates. *Thin Solid Films* **520**, 2884-2891, doi:10.1016/j.tsf.2011.12.009 (2012).
- 23 Yamazaki, M. *et al.* Origins of oxygen atoms in a marine ladder-frame polyether: evidence of monooxygenation by <sup>18</sup>O-labeling and using tandem mass spectrometry. *The Journal of organic chemistry* **77**, 4902-4906, doi:10.1021/jo300531t (2012).
- 24 佐藤崇文, 寺本華奈江, 佐藤貴弥 & 上田祥久. MALDI Spiral-TOF/TOF によるエチレンオキサイド-プロピレンオキサイドブロック共重合体の分析. *高分子論文集 KOBUNSHI RONBUNSHU* **69**, 502-502, doi:10.1295/koron.69.502 (2012).
- 25 Hari, Y. *et al.* Base-pair recognition ability of hydroxyphenyl nucleobases in parallel triplex DNA. *Tetrahedron* **69**, 6381-6391, doi:10.1016/j.tet.2013.05.107 (2013).
- 26 Hari, Y., Nakahara, M. & Obika, S. Triplex-forming ability of oligonucleotides containing 1-aryl-1, 2, 3-triazole nucleobases linked via a two atom-length spacer. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 5583-5588, doi:10.1016/j.bmc.2013.05.034 (2013).
- 27 Kubo, A. *et al.* Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *J Am Soc Mass Spectrom* **24**, 684-689, doi:10.1007/s13361-012-0513-9 (2013).
- 28 Matsumori, N. *et al.* A novel sperm-activating and attracting factor from the ascidian *Ascidia sydneiensis*. *Organic letters* **15**, 294-297, doi:10.1021/ol303172n (2013).
- 29 Mizuta, Y., Takasu, A. & Higuchi, M. Synthesis of Cell - Penetrating S - Galactosyl-Oligoarginine Peptides as Inducers of Recombinant Protein Expression under the Control of lac Operator/Repressor Systems. *ChemPlusChem* **78**, 677-683, doi:10.1002/cplu.201300130 (2013).
- 30 Moyori, T., Hayashi, T. & Takasu, A. Aldol - type group - transfer polymerization of silyl vinyl ethers using silyl perfluoroalkaneimides as nonmetal catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 3516-3522, doi:10.1002/pola.26753 (2013).
- 31 Nomura, N., Shinoda, K., Takasu, A., Nagata, K. & Inomata, K. Emulsion polymerization of vinyl acetate using iodine - transfer and RAFT radical polymerizations. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 534-545, doi:10.1002/pola.26424 (2013).

- 32 Sato, H., Ishii, Y., Momose, H., Sato, T. & Teramoto, K. Application of High-Resolution MALDI-TOFMS with a Spiral Ion Trajectory for the Structural Characterization of Free Radical Polymerized Methacrylate Ester Copolymers. *Mass Spectrom (Tokyo)* **2**, A0014, doi:10.5702/massspectrometry.A0014 (2013).
- 33 Teramoto, K. *et al.* Simple and rapid characterization of mycolic acids from Dietzia strains by using MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power. *The Journal of antibiotics* **66**, 713-717, doi:10.1038/ja.2013.79 (2013).
- 34 Tsujita, T., Shintani, T. & Sato, H.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity from nut seed skin polyphenols. 1. Purification and characterization of almond seed skin polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 4570-4576, doi:10.1021/jf400691q (2013).
- 35 Voorhees, K. J. *et al.* Modified MALDI MS fatty acid profiling for bacterial identification. *Journal of Mass Spectrometry* **48**, 850-855, doi:10.1002/jms.3215 (2013).
- 36 Wang, X., Fukuoka, S., Tsukigawara, R., Nagata, K. & Higuchi, M. Electric-field-enhanced oriented cobalt coordinated peptide monolayer and its electrochemical properties. *Journal of colloid and interface science* **390**, 54-61, doi:10.1016/j.jcis.2012.08.079 (2013).
- 37 Yamada, S., Takasu, A. & Kawamura, K. The effect of microwave irradiation on the kinetics and activation thermodynamics of ring - opening polymerization of  $\epsilon$  - caprolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 3732-3739, doi:10.1002/pola.26776 (2013).
- 38 Akabane-Nakata, M., Obika, S. & Hari, Y. Synthesis of oligonucleotides containing N, N-disubstituted 3-deazacytosine nucleobases by post-elongation modification and their triplex-forming ability with double-stranded DNA. *Organic & biomolecular chemistry* **12**, 9011-9015, doi:10.1039/C4OB01760A (2014).
- 39 Chen, Y.-T., Hong, P.-F., Wen, L. & Lin, C.-T. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin from Taiwanofungus camphorata. *Botanical Studies* **55**, 1-8, doi:10.1186/s40529-014-0077-z (2014).
- 40 Ito, M., Shimasaki, T., Teramoto, N. & Shibata, M. Photo-cured organic-inorganic hybrid composites of methacrylate-terminated 4-arm star-shaped  $\epsilon$ -caprolactone oligomer and methacrylate-or thiol-substituted polysilsesquioxane. *Journal of Polymer Research* **21**, 1-10, doi:10.1007/s10965-014-0507-3 (2014).
- 41 Kawasaki, T., Imai, T. & Tsukiyama, K. Use of a Mid-Infrared Free-Electron Laser (MIR-FEL) for Dissociation of the Amyloid Fibril Aggregates of a Peptide. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation* **04**, 9-18, doi:10.4236/jasmi.2014.41002 (2014).
- 42 Ken, C.-F., Chang, C.-C., Wen, L., Huang, J.-K. & Lin, C.-T. Biochemical characterization of a functional recombinant aryl-alcohol dehydrogenase from Taiwanofungus camphorata. *Botanical Studies* **55**, 14, doi:10.1186/1999-3110-55-14 (2014).
- 43 Kim, B.-J. *et al.* Preparation of carbon fibers with excellent mechanical properties from isotropic pitches. *Carbon* **77**, 747-755, doi:10.1016/j.carbon.2014.05.079 (2014).
- 44 Kurashige, W. *et al.* Au<sub>25</sub> Clusters Containing Unoxidized Tellurolates in the Ligand Shell. *The journal of physical chemistry letters* **5**, 2072-2076, doi:10.1021/jz500901f (2014).
- 45 Niihori, Y., Matsuzaki, M., Uchida, C. & Negishi, Y. Advanced use of high-performance liquid chromatography for synthesis of controlled metal clusters. *Nanoscale* **6**, 7889-7896, doi:10.1039/C4NR01144A (2014).
- 46 Nishikawa, K. *et al.* Detection of changes in the structure and distribution map of triacylglycerol in fatty liver model by MALDI - SpiralTOF. *FEBS open bio* **4**, 179-184, doi:10.1016/j.fob.2014.02.005 (2014).
- 47 Ohtani, H. & Iura, T. Complementary Characterization of End Groups in Radically Polymerized Poly(methyl methacrylate) by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*

- 3, S0041, doi:10.5702/massspectrometry.S0041 (2014).
- 48 Okabe, T., Kuzuhara, D., Aratani, N. & Yamada, H. Synthesis and electronic properties of acetylene-and butadiyne-linked 3, 3'-porphycene dimers. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **18**, 849-855, doi:10.1142/S1088424614500631 (2014).
- 49 Sanai, Y., Morita, Y., Asano, Y., Ishizaki, K. & Kubota, K. Chain - end lactonization of polyacrylates prepared by photopolymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **52**, 1161-1171, doi:10.1002/pola.27100 (2014).
- 50 Sato, H., Nakamura, S., Teramoto, K. & Sato, T. Structural characterization of polymers by MALDI spiral-TOF mass spectrometry combined with Kendrick mass defect analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 1346-1355, doi:10.1007/s13361-014-0915-y (2014).
- 51 Satoh, T., Kubo, A., Hazama, H., Awazu, K. & Toyoda, M. Separation of Isobaric Compounds Using a Spiral Orbit Type Time-of-Flight Mass Spectrometer, MALDI-SpiralTOF. *Mass Spectrom (Tokyo)* **3**, S0027, doi:10.5702/massspectrometry.S0027 (2014).
- 52 Shibata, T., Fujimoto, M. & Otani, T. Synthesis of macrocyclic heteroarylenes by consecutive inter-and intramolecular cycloadditions of thiophenylene-tethered triynes. *Tetrahedron* **70**, 8453-8461, doi:10.1016/j.tet.2014.09.077 (2014).
- 53 Shigeri, Y. *et al.* Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for MALDI - MS to detect gaseous aldehydes. *Journal of Mass Spectrometry* **49**, 742-749, doi:10.1002/jms.3408 (2014).
- 54 Suzuki, R. *et al.* Brevisulcatic acids, marine ladder-frame polyethers from the red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata* in New Zealand. *Org Lett* **16**, 5850-5853, doi:10.1021/ol502700h (2014).
- 55 Takagi, K., Kawagita, E. & Kouchi, R. Synthesis and characterization of polythiophene derivatives with nitrogen heterocycles on the side chain. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **52**, 2166-2174, doi:10.1002/pola.27228 (2014).
- 56 Tsujita, T., Shintani, T. & Sato, H. Preparation and characterisation of peanut seed skin polyphenols. *Food chemistry* **151**, 15-20, doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.072 (2014).
- 57 Wambua, D. M., Ubukata, M., Dane, J., Cody, R. B. & Chiu, N. H. Bottom-up mass spectrometric sequencing of microRNA. *Analytical Methods* **6**, 8829-8839, doi:10.1039/C4AY01519C (2014).
- 58 Yamaguchi, I. & Nagano, T. Synthesis, chemical, and thermoelectric properties of n - type  $\pi$  - conjugated polymer composed of 1, 2, 4 - triazole and pyridine rings and its metal complexes. *Journal of Applied Polymer Science* **131**, doi:10.1002/app.39928 (2014).
- 59 Yamakado, R. *et al.* Synthesis, reaction, and optical properties of cyclic oligomers bearing 9, 10-diphenylanthracene based on an aromatic tertiary amide unit. *RSC Advances* **4**, 6752-6760, doi:10.1039/C3RA46652C (2014).
- 60 Yamazoe, S., Kurashige, W., Nobusada, K., Negishi, Y. & Tsukuda, T. Preferential Location of Coinage Metal Dopants (M= Ag or Cu) in  $[\text{Au}_{25-x}\text{M}_x(\text{SC}_2\text{H}_4\text{Ph})_{18}]^{-(x-1)}$  As Determined by Extended X-ray Absorption Fine Structure and Density Functional Theory Calculations. *The Journal of Physical Chemistry C* **118**, 25284-25290, doi:10.1021/jp5085372 (2014).
- 61 Yan, Y., Ubukata, M., Cody, R. B., Holy, T. E. & Gross, M. L. High-energy collision-induced dissociation by MALDI TOF/TOF causes charge-remote fragmentation of steroid sulfates. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 1404-1411, doi:10.1007/s13361-014-0901-4 (2014).
- 62 Yu, M., Tang, T., Takasu, A. & Higuchi, M. pH-and thermo-induced morphological changes of an amphiphilic peptide-grafted copolymer in solution. *Polymer journal* **46**, 52-58, doi:10.1038/pj.2013.61 (2014).
- 63 Abe, T., Matsuzaka, M., Isoda, K. & Tadokoro, M. Liquid-Crystalline and Electronic Properties

- of Racemic-Alkoxy Chains-Substituted Tetraazanaphthacene. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **615**, 70-77, doi:10.1080/15421406.2015.1066963 (2015).
- 64 Asamizu, S., Ozaki, T., Teramoto, K., Satoh, K. & Onaka, H. Killing of Mycolic Acid-Containing Bacteria Aborted Induction of Antibiotic Production by Streptomyces in Combined-Culture. *PLoS One* **10**, e0142372, doi:10.1371/journal.pone.0142372 (2015).
- 65 Hayakawa, T., Song, H., Ishii, Y. & Kawasaki, S. Facile Synthesis of Coronene Dimers Having Unique Optical Properties. *J. Chem* **9**, 442-447, doi:10.17265/1934-7375/2015.07.002 (2015).
- 66 Hayakawa, Y. *et al.* Complementary DNA display selection of high - affinity peptides binding the vacuolating toxin (VacA) of Helicobacter pylori. *Journal of Peptide Science* **21**, 710-716, doi:10.1002/psc.2795 (2015).
- 67 Hubin, E. A. *et al.* Structural, functional, and genetic analyses of the actinobacterial transcription factor RbpA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7171-7176, doi:10.1073/pnas.1504942112 (2015).
- 68 Ikawa, T. *et al.* 2 - [(Neopentyl glycolato) boryl] phenyl Triflates and Halides for Fluoride Ion - Mediated Generation of Functionalized Benzynes. *Advanced Synthesis & Catalysis* **357**, 2287-2300, doi:10.1002/adsc.201500315 (2015).
- 69 Itoh, Y. *et al.* Identification of SNAIL1 Peptide-Based Irreversible Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inactivators. *Journal of medicinal chemistry*, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01323 (2015).
- 70 Iura, T. & Ohtani, H. Fragmentation behavior of poly(methyl methacrylate) during matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **29**, 155-162, doi:10.1002/rm.7087 (2015).
- 71 Kano, H. *et al.* A novel analytical pyrolysis device applicable for measurements of less volatile pyrolyzates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **113**, 165-173, doi:10.1016/j.jaap.2014.12.008 (2015).
- 72 Kurimoto, K., Yamamura, H. & Miyagawa, A. Chemical approach for the syntheses of GM4 isomers with sialic acid to non-natural linkage positions on galactose. *Carbohydrate research* **401**, 39-50, doi:10.1016/j.carres.2014.10.018 (2015).
- 73 Miyagawa, A., Matsuda, T. & Yamamura, H. Synthesis of Branched Tetrasaccharide Derivatives of Schizophyllan-like  $\beta$ -Glucan. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **34**, 215-246, doi:10.1080/07328303.2015.1044754 (2015).
- 74 Mizukado, J. *et al.* High - resolution MALDI - TOF MS study on analysis of low - molecular - weight products from photo - oxidation of poly (3 - hexylthiophene). *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 1006-1012, doi:10.1002/jms.3614 (2015).
- 75 Mori, S., Morihiro, K., Kasahara, Y., Tsunoda, S.-i. & Obika, S. Synthesis and Properties of 2'-Deoxyuridine Analogues Bearing Various Azobenzene Derivatives at the C5 Position. *Chemosensors* **3**, 36-54, doi:10.3390/chemosensors3020036 (2015).
- 76 Negishi, Y. *et al.* A critical size for emergence of nonbulk electronic and geometric structures in dodecanethiolate-protected Au clusters. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 1206-1212, doi:10.1021/ja5109968 (2015).
- 77 Niihori, Y., Kikuchi, Y., Kato, A., Matsuzaki, M. & Negishi, Y. Understanding Ligand-Exchange Reactions on Thiolate-Protected Gold Clusters by Probing Isomer Distributions Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *ACS nano* **9**, 9347-9356, doi:10.1021/acsnano.5b03435 (2015).
- 78 Nishikawa, K. *et al.* Resveratrol increases CD68+ Kupffer cells colocalized with adipose differentiation - related protein and ameliorates high - fat - diet - induced fatty liver in mice. *Molecular nutrition & food research* **59**, 1155-1170, doi:10.1002/mnfr.201400564 (2015).

- 79 Ono, K. *et al.* Self-Assembly of Nanometer-Sized Boroxine Cages from Diboronic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 7015-7018, doi:10.1021/jacs.5b02716 (2015).
- 80 Sakano, T., Ohashi, T., Yamanaka, M. & Kobayashi, K. Photoresponsive self-assembled hexameric capsules based on calix [4] resorcinarenes bearing azobenzene dendron conjugates as side chains. *Organic & biomolecular chemistry* **13**, 8359-8364, doi:10.1039/C5OB00997A (2015).
- 81 Satoh, T. *et al.* Imaging Mass Spectrometry Using Ultra-high Mass Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer, SpiralTOF. *Microscopy and Microanalysis* **21**, 2059-2060, doi:10.1017/S1431927615011071 (2015).
- 82 Segawa, Y., Kuwabara, T., Matsui, K., Kawai, S. & Itami, K. Palladium-free synthesis of [10] cycloparaphenylene. *Tetrahedron* **71**, 4500-4503, doi:10.1016/j.tet.2015.02.066 (2015).
- 83 Sharma, S., Kurashige, W., Nobusada, K. & Negishi, Y. Effect of trimetallization in thiolate-protected Au(24-n)Cu(n)Pd clusters. *Nanoscale* **7**, 10606-10612, doi:10.1039/c5nr01491c (2015).
- 84 Shigeri, Y. *et al.* Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to detect steroids with carbonyl groups. *European Journal of Mass Spectrometry* **21**, 79-90, doi:10.1255/ejms.1336 (2015).
- 85 Spring, A. M. *et al.* An analysis of the structural, thermal and optical characteristics as well as the electrical resistivity of tert-butyldiphenylsilyl substituted poly (norbornene-dicarboximide)s. *Polymer* **56**, 189-198, doi:10.1016/j.polymer.2014.11.043 (2015).
- 86 Takanashi, E. *et al.* Cytotoxic linear acetylenes from a marine sponge Pleroma sp. *Tetrahedron* **71**, 9564-9570, doi:10.1016/j.tet.2015.10.062 (2015).
- 87 Teramoto, K. *et al.* Characterization of Mycolic Acids in Total Fatty Acid Methyl Ester Fractions from Mycobacterium Species by High Resolution MALDI-TOFMS. *Mass Spectrom (Tokyo)* **4**, A0035, doi:10.5702/massspectrometry.A0035 (2015).
- 88 Wang, C. *et al.* A novel D-π-A small molecule with N-heteroacene as acceptor moiety for photovoltaic application. *Dyes and Pigments* **122**, 231-237, doi:10.1016/j.dyepig.2015.06.029 (2015).
- 89 Wang, C. *et al.* Synthesis, Characterization, and Memory Performance of Two Phenazine/Triphenylamine - Based Organic Small Molecules through Donor - Acceptor Design. *Asian Journal of Organic Chemistry* **4**, 646-651, doi:10.1002/ajoc.201500087 (2015).
- 90 Yamanoi, T., Oda, Y., Katsuraya, K., Inazu, T. & Hattori, K. Synthesis, structure, and evaluation of a β-cyclodextrin-artificial carbohydrate conjugate for use as a doxorubicin-carrying molecule. *Bioorganic & medicinal chemistry*, doi:10.1016/j.bmc.2015.12.030 (2015).
- 91 Zheng, Q., Morimoto, M., Sato, H. & Takanohashi, T. Molecular composition of extracts obtained by hydrothermal extraction of brown coal. *Fuel* **159**, 751-758, doi:10.1016/j.fuel.2015.07.042 (2015).
- 92 橋詰峰雄 *et al.* 体液類似環境におけるアパタイト結合性ペプチド樹状オリゴマーによるミネラルイオン. *高分子論文集* **73**, 55-61, doi:10.1295/koron.2015-0050 (2015).
- 93 小林大祐 *et al.* 超音波を用いたポリピロール微粒子合成. *化学工学論文集* **41**, 153-156, doi:10.1252/kakoronbunshu.41.153 (2015).
- 94 Fouquet, T., Nakamura, S. & Sato, H. MALDI SpiralTOF high-resolution mass spectrometry and Kendrick mass defect analysis applied to the characterization of poly(ethylene-co-vinyl acetate) copolymers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **30**, 973-981, doi:10.1002/rcm.7525 (2016).
- 95 Hayakawa, T., Ishii, Y. & Kawasaki, S. Sodium ion battery anode properties of designed graphene-layers synthesized from polycyclic aromatic hydrocarbons. *RSC Advances* **6**,

22069-22073, doi:10.1039/C6RA00955G (2016).

- 96 Kakizawa, T. *et al.* Evaluation of phenylcyclopropylamine compounds by enzymatic assay of lysine-specific demethylase 2 in the presence of NPAC peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, doi:10.1016/j.bmcl.2016.01.036 (2016).
- 97 Katagiri, K., Takasu, A. & Higuchi, M. Synthesis of Glycopolymer Containing Cell-Penetrating Peptide as Inducers of Recombinant Protein Expression under the Control of Lac Operator/Repressor Systems. *Biomacromolecules*, doi:10.1021/acs.biomac.6b00368 (2016).
- 98 Kim, B.-J. *et al.* Enhancing the tensile strength of isotropic pitch-based carbon fibers by improving the stabilization and carbonization properties of precursor pitch. *Carbon* **99**, 649-657, doi:10.1016/j.carbon.2015.12.082 (2016).
- 99 Peršurić, Ž., Osuga, J., Grbac, T. G., Peter - Katalinić, J. & Pavelić, S. K. MALDI - SpiralTOF technology for assessment of triacylglycerols in Croatian olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, doi:10.1002/ejlt.201500375 (2016).
- 100 Shigeri, Y. *et al.* 2-hydrazinoquinoline: a reactive matrix for MALDI-MS to detect gaseous carbonyl compounds. *European Journal of Mass Spectrometry* **22**, 0-0, doi:10.1255/ejms.1413 (2016).
- 101 Takahira, Y., Murotani, E., Fukuda, K., Vohra, V. & Murata, H. Design, synthesis, and properties of a series of charged iridium (III) complexes with a neutral bidentate ligand for deep-blue phosphorescent emitter. *Journal of Fluorine Chemistry* **181**, 56-60, doi:10.1016/j.jfluchem.2015.10.016 (2016).
- 102 Yang, J., Nakabayashi, K., Miyawaki, J. & Yoon, S.-H. Preparation of isotropic pitch-based carbon fiber using hyper coal through co-carbonation with ethylene bottom oil. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **34**, 397-404, doi:10.1016/j.jiec.2015.11.026 (2016).







本誌の記載内容は予告なしに変更することがあります。

Copyright(C)2016 JEOL Ltd. All Rights Reserved.

このカタログに掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせ下さい。



本社・昭島製作所

〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL: (042) 543-1111(大代表) FAX: (042) 546-3353  
www.jeol.co.jp ISO 9001・ISO 14001 認証取得

東京事務所 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル13階

営業企画室 TEL: 03-6262-3560 FAX: 03-6262-3577

EO営業推進室 TEL: 03-6262-3567 AI営業推進室 TEL: 03-6262-3568

産業機器営業部 TEL: 03-6262-3570 MEソリューション販促室 TEL: 03-6262-3571

東京支店 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル18階 TEL: 03-6262-3580 FAX: 03-6262-3588

東京 S11グループ TEL: 03-6262-3581 東京 S12グループ TEL: 03-6262-3582

東京 S13グループ TEL: 03-6262-5586 ME営業グループ TEL: 03-6262-3583

東京第二事務所 〒190-0012 東京都立川市曙町2丁目8番3号 新鈴春ビル9階

SE営業部 TEL: 042-528-3491 ソリューションビジネス部 TEL: 042-526-5098

横浜事務所 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目6番4号 新横浜千歳観光ビル6階 TEL: 045-474-2181 FAX: 045-474-2180

海外事業所・営業所 Boston, Paris, London, Amsterdam, Stockholm, Sydney, Milan, Singapore, Munich, Beijing, Moscow, Sao Paulo ほか

札幌支店 〒060-0809 北海道札幌市北区北9条西3丁目19番地 ノルテプラザ5階

TEL: 011-726-9680 FAX: 011-717-7305

仙台支店 〒980-0021 宮城県仙台市青葉区中央2丁目2番1号 仙台三菱ビル6階

TEL: 022-222-3324 FAX: 022-265-0202

筑波支店 〒305-0033 茨城県つくば市東新井18番1

TEL: 029-856-3220 FAX: 029-856-1639

名古屋支店 〒450-0001 愛知県名古屋市中村区那古野1丁目47番1号 名古屋国際センタービル14階

TEL: 052-581-1406 FAX: 052-581-2887

大阪支店 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階

TEL: 06-6304-3941 FAX: 06-6304-7377

西日本ソリューションセンター

〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階

TEL: 06-6305-0121 FAX: 06-6305-0105

広島支店 〒730-0015 広島県広島市中区橋本町10番6号 広島NSビル5階

TEL: 082-221-2500 FAX: 082-221-3611

高松支店 〒760-0023 香川県高松市南町1-1-12 パシフィックシティ高松5階

TEL: 087-821-0053 FAX: 087-822-0709

福岡支店 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前2丁目1番1号 福岡朝日ビル5階

TEL: 092-411-2381 FAX: 092-473-1649