

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6933343号
(P6933343)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月23日(2021.8.23)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 30/46	(2006.01)	GO 1 N 30/46		A
GO 1 N 30/72	(2006.01)	GO 1 N 30/72		C
GO 1 N 30/26	(2006.01)	GO 1 N 30/26		M

請求項の数 5 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2019-512135 (P2019-512135)	(73) 特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(86) (22) 出願日	平成29年4月13日(2017.4.13)	(73) 特許権者	501273886 国立研究開発法人国立環境研究所 茨城県つくば市小野川16-2
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/015184	(74) 代理人	110001069 特許業務法人京都国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02018/189871	(72) 発明者	箕畑 俊和 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
(87) 国際公開日	平成30年10月18日(2018.10.18)	(72) 発明者	渡邊 淳 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
審査請求日	令和1年8月23日(2019.8.23)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

トラップカラムに試料を注入する試料注入ステップと、

前記試料注入ステップで前記トラップカラムに捕集された前記試料中の分析対象成分の一部を該トラップカラムから溶出させて、前記トラップカラムとは異なる種類の充填剤が充填された分離カラムに導入する第1の溶出ステップと、

前記トラップカラムを前記分離カラムから切り離した状態で、前記分離カラムに対して、アイソクラティック送液又はグラジエント送液のいずれかである第1の送液を行うことにより、該分離カラム中で、前記分析対象成分の一部を分離し、前記分離カラムから順次溶出させて質量分析装置で分析する第1の分析ステップと、

前記試料注入ステップで前記トラップカラムに捕集された前記分析対象成分のうち、前記第1の溶出ステップで溶出しなかった残りの成分の少なくとも一部を該トラップカラムから溶出させて、前記分離カラムに導入する第2の溶出ステップと、

前記分離カラムに対して、アイソクラティック送液又はグラジエント送液のいずれかであって前記第1の送液とは分離特性の異なる第2の送液を行うことにより、該分離カラム中で、前記残りの成分の少なくとも一部を分離し、前記分離カラムから順次溶出させて前記質量分析装置で分析する第2の分析ステップと、

を有することを特徴とする液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法。

【請求項2】

前記異なる種類の充填剤が、少なくとも、イオン交換モードに対応した充填剤と、逆相

モードに対応した充填剤を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法。

【請求項 3】

前記液体クロマトグラフが複数のトラップカラムを備え、流路の切替によって前記複数のトラップカラムの中から前記分離カラムに接続するトラップカラムを選択可能なものであって、前記複数のトラップカラムのいずれか一つが前記分離カラムに接続されている間に、残りのトラップカラムのうち少なくとも 1 つの洗浄を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法。

【請求項 4】

前記第 1 の分析ステップにおける第 1 の送液又は前記第 2 の分析ステップにおける前記第 2 の送液の少なくとも一方がグラジエント送液であることを特徴とする請求項 1 に記載の液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法。

【請求項 5】

液体クロマトグラフに設けられた、複数種類の充填剤の混合物が充填されたカラムへと至る流路中に試料を注入する試料注入ステップと、

前記カラムに対してアイソクラティック送液又はグラジエント送液のいずれかである第 1 の送液を行うことにより、該カラム中で前記試料中の分析対象成分の一部を分離し、該カラムから溶出させて質量分析装置で分析する第 1 の分析ステップと、

前記カラムに対して、アイソクラティック送液又はグラジエント送液のいずれかである前記第 1 の送液とは分離特性の異なる第 2 の送液を行うことにより、該カラム中で、前記分析対象成分のうち前記第 1 の分析ステップでは溶出しなかった成分の少なくとも一部を分離し、該カラムから溶出させて前記質量分析装置で分析する第 2 の分析ステップと、
を有し、

前記第 1 の送液と前記第 2 の送液が、いずれもグラジエント送液である場合には、前記第 1 の送液と前記第 2 の送液とで、使用する溶媒の組み合わせを変えることを特徴とする液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS 分析又は LC/MS/MS 分析）による試料の分析方法に関し、特に、幅広い化学的又は物理的性質の分析対象成分を含んだ試料の分析に好適な分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

LC/MS/MS 分析では、試料中の夾雑成分が、液体クロマトグラフィー（LC）において分析対象成分と同じ保持時間で溶出することにより、質量分析（MS）における分析対象成分のイオン化抑制（イオンサプレッション）又はイオン化促進（イオンエンハンスメント）が生じる場合がある（例えば、特許文献 1 を参照）。イオンサプレッションやイオンエンハンスメントは、定量の再現性低下の要因となるため、LC において試料に含まれる各種分析対象成分と夾雑成分とを適切に分離する必要がある。

【0003】

ところで、近年、環境汚染物質の人体への影響を調査するため、LC/MS/MS 分析による生体試料（例えば血漿）中の環境汚染物質の定量分析が広く行われている。環境汚染物質のうち、残留性有機汚染化学物質である有機フッ素化合物（perfluoroalkyl acids：PFAAs）やそれらの類縁物質（PFCA、PFAS、FOA、FTS、PAP など）は、炭素鎖の長短で化合物の特性（水溶性、脂溶性など）に大きな差異が生じる。そのため、単一条件による LC では、これらの成分を MS/MS に適した状態、すなわち、各分析対象成分が他の分析対象成分及び夾雑成分と十分に分離された状態にするのは困難であり、PFAAs やそれらの類縁物質のうちの低分子化合物（PFBA、PFPeA、PFHxA、4:2FTS）のイオン化抑制や、N MeFOA M、N EtFOA M のイオン化抑制、6:2FTS、8:2FTS のイオン化促進などの問題が避け

10

20

30

40

50

られない。

【0004】

そのため、従来、血漿中のPFAAs及びそれらの類縁物質をLC/MS/MS分析する場合には、一つの血漿試料について、LC条件を変えた複数回（例えば3回）の分析を行っていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開W02009/123297公報（[0002]）

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、このような方法では、当然ながら、一つの試料について複数回の分析を行うために分析のスループットが低下する。更に、複数回の分析のために試料を分割する必要があるという問題や、複数回のLC/MS/MS分析で得られたデータが同一試料のものであることを担保する必要がある、という問題もある。

【0007】

なお、こうした問題は、上記のようなPFAAsやそれらの類縁物質の分析に限らず、化学的性質又は物理的性質の異なる多数の分析対象成分を含む試料を、LC/MS分析又はLC/MS/MS分析しようとする場合に共通する問題である。

20

【0008】

本発明は、上記の点に鑑みて成されたものであり、その目的とするところは、化学的又は物理的性質の異なる多数の分析対象成分を含む試料を1回のLC/MS分析又はLC/MS/MS分析によって一斉分析可能な方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために成された本発明に係る液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法は、

a)液体クロマトグラフに設けられた、互いに直列に接続可能に構成され且つそれぞれ異なる種類の充填剤が充填された複数のカラムから成るカラム群のうち、最も上流側のカラムに試料を注入する試料注入ステップと、

30

b)前記カラム群のうち、最も下流側のカラムを含む一つ又は直列に接続された複数のカラムに対して、第1の溶離液を送液することにより、該一つ又は直列に接続された複数のカラム中で、前記試料中の分析対象成分の一部を分離し、前記最も下流側のカラムから順次溶出させて質量分析装置で分析する第1の分析ステップと、

c)前記カラム群のうち、最も下流側のカラムを含む一つ又は直列に接続された複数のカラムに対して、前記第1の溶離液とは組成の異なる第2の溶離液を送液することにより、該一つ又は直列に接続された複数のカラム中で、前記分析対象成分のうち前記第1の分析ステップで溶出しなかった成分の少なくとも一部を分離し、前記最も下流側のカラムから順次溶出させて前記質量分析装置で分析する第2の分析ステップと、

40

を有することを特徴としている。

【0010】

ここで、第1の分析ステップ及び第2の分析ステップにおける「最も下流側のカラムを含む一つ又は直列に接続された複数のカラム」は、前記カラム群を構成する複数のカラムの一部であっても全てであってもよい。また、第2の分析ステップにおける「一つ又は直列に接続された複数のカラム」は、第1の分析ステップにおける「一つ又直列に接続された複数のカラム」と一致していても一致していなくてもよい。

【0011】

上記本発明によれば、1回の試料注入に伴う液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS分析又はLC/MS/MS分析）において、分離特性の異なる複数回のLC分離を行うこ

50

とができる。そのため、幅広い特性の分析対象成分を含む試料の分析において、各分析対象成分を他の分析対象成分及び夾雑成分と適切に分離することが可能となり、その結果、イオンエンハンスメントやイオンサプレッションの影響を抑えた再現性の高い質量分析が可能となる。

【0012】

また、本発明に係る試料分析方法は、前記異なる種類の充填剤が、少なくとも、イオン交換モードに対応した充填剤と、逆相モードに対応した充填剤を含むものとするのが望ましい。

【0013】

また、本発明に係る試料分析方法は、前記カラム群を構成する複数のカラムのうち、最も下流側のカラムを除くカラムの少なくとも1つのカラムが試料を捕集するトラップカラムであって、その他のカラムが試料を分離する分離カラムであるものとするができる。

10

【0014】

この場合、前記試料注入ステップと第1の分析ステップの間、若しくは第1の分析ステップと第2の分析ステップの間、又はその両方において、前記トラップカラムに捕集されている分析対象成分の少なくとも一部を該トラップカラムから溶出させる溶出ステップを設けることが望ましい。

【0015】

また、本発明に係る試料分析方法は、

20

前記液体クロマトグラフが複数のトラップカラムを備え、流路の切替によって前記複数のトラップカラムの中から前記カラム群に含めるトラップカラムを選択可能なものであって、前記複数のトラップカラムのいずれかが一つが前記カラム群に含まれている間に、残りのトラップカラムのうち少なくとも1つの洗浄を行うものとするのが望ましい。

【0016】

また、本発明に係る試料分析方法は、前記第1の分析ステップにおける第1の溶離液の送液又は前記第2の分析ステップにおける前記第2の溶離液の送液の少なくとも一方をグラジエント送液とすることが望ましい。

【0017】

また、上記課題を解決するために成された本発明に係る液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法は、

30

a)液体クロマトグラフに設けられた、複数種類の充填剤の混合物が充填されたカラムへと至る流路中に試料を注入する試料注入ステップと、

b)前記カラムに対して第1の溶離液を送液することにより、該カラム中で前記試料中の分析対象成分の一部を分離し、該カラムから溶出させて質量分析装置で分析する第1の分析ステップと、

c)前記カラムに対して、前記第1の溶離液とは組成の異なる第2の溶離液を送液することにより、該カラム中で、前記分析対象成分のうち前記第1の分析ステップでは溶出しなかった成分の少なくとも一部を分離し、該カラムから溶出させて前記質量分析装置で分析する第2の分析ステップと、

40

を有することを特徴としている。

【発明の効果】

【0018】

以上の通り、本発明に係る液体クロマトグラフ質量分析による試料分析方法によれば、試料中に含まれる幅広い特性を有する多数の分析対象成分を1回のLC/MS分析又はLC/MS/MS分析によって分析することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の試料分析方法において複数のカラムを使用する場合におけるLC-MSの概略構成を示す図。

50

【図2】本発明の試料分析方法において単一のカラムを使用する場合におけるLC-MSの概略構成を示す図。

【図3】本発明の試料分析方法において複数のカラムを使用する場合におけるLC-MSの構成の別の例を示す図。

【図4】本発明の試料分析方法において複数のカラムを使用する場合におけるLC-MSの構成の更に別の例を示す図。

【図5】本発明の一実施例におけるLC-MSの第1状態を示す流路構成図。

【図6】同実施例におけるLC-MSの第2状態を示す流路構成図。

【図7】同実施例における送液プロファイルを示す図。

【発明を実施するための形態】

10

【0020】

本発明に係る試料分析方法は、複数種類の充填剤と、組成の異なる複数種類の溶離液とを使用して、分離特性の異なる複数回のLC分離を行うことにより、試料に含まれる各分析対象成分を他の分析対象成分及び夾雑成分と適切に分離した上で質量分析するものである。これにより、1回の試料導入に伴うLC/MS/MS分析又はLC/MS分析（以下これを「1回の分析」とよぶ）において、化学的性質又は物理的性質の大きく異なる多数の分析対象成分を再現性よく定量することが可能となる。

【0021】

なお、本発明において使用する質量分析装置は、液体クロマトグラフから溶出した試料成分の分析が可能なものであればいかなるものであってもよく、例えば、トリプル四重極型質量分析計、シングル四重極型質量分析計、MALDIイオン源を搭載した質量分析計などを用いることができる。

20

【0022】

また、本発明における試料分析方法は、イオンサプレッションやイオンエンハンスメントの原因となる夾雑成分を多数含む試料、例えば、生体試料（血液、尿等）、環境試料、食品試料等の分析に好適に用いることができるが、これらの試料の分析に限定されるものではない。

【0023】

前記複数種類の充填剤としては、それぞれ異なる分離モードに対応した充填剤を用いることが望ましい。液体クロマトグラフィにおける分離モードには、例えば、逆相モード、順相モード、HILICモード、イオン交換モード、配位子交換モード、イオン排除モード、サイズ排除モード（GPCモード又はGFCモード）、及びアフィニティモードなどがあり、本発明における試料分析方法では、前記複数種類の充填剤として、例えばイオン交換モードに対応した充填剤と、逆相モードに対応した充填剤を使用することができる。なお、前記複数種類の充填剤として、同一の分離モードに対応したものであるが、充填剤を構成する基材の材質（シリカゲル、ポリマーゲルなど）、形状、粒度、細孔径、又は基剤に結合された官能基が異なるものを用いるようにしてもよい。

30

【0024】

本発明の試料分析方法は、例えば、図1に示すように、複数のカラム13、14（図中では2つであるが3つ以上でもよい）を直列に接続して成るカラム群を備えた液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MS）によって実現できるほか、図2に示すような、単一のカラム16を備えたLC-MSによっても実現可能である。前者の場合は、各カラム13、14にそれぞれ異なる種類の充填剤を充填し、後者の場合は、単一のカラム16に、複数種類の充填剤を混合したものを充填する。また、複数のカラムを用いる場合において、少なくとも一つのカラムを複数種類の充填剤の混合物を充填したものとしてもよい。なお、複数のカラムを用いる場合は、全てのカラムを分離カラムとしてもよく、少なくとも一つのカラムをトラップカラムとしてもよい。

40

【0025】

本発明に係る試料分析方法では、図1又は図2のような構成のLC-MSにおいて、送液部10からカラム13又はカラム16に至る溶離液の流路中に、試料注入部12から試

50

料を導入し、その後、組成の異なる溶離液を用いてカラム 13、カラム 14、又はカラム 16 による分析対象成分の分離（成分分離）を複数回行い、これに伴ってカラム 14 又はカラム 16 から順次溶出する分析対象成分を MS 部 15 で分析する。ここで、分析対象成分の分離のための送液は、一定組成の溶離液を送液するアイソクラティック送液であってもよく、複数種類の溶媒を混合して成る溶離液を、その混合比を連続的又は段階的に変化させつつ送液するグラジエント送液（段階的に変化させる場合はステップワイズ送液ともよばれる）であってもよい。なお、本発明では、複数回のアイソクラティック送液を行うようにしてもよく、複数回のグラジエント送液を行うようにしてもよい。複数回のアイソクラティック送液を行う場合は、溶離液の組成が各送液時で異なるようにする。また、複数回のグラジエント送液を行う場合は、使用する溶媒の組み合わせ、グラジエント開始時における各溶媒の混合比、グラジエント終了時における各溶媒の混合比の少なくともいずれかが、各送液時で異なるようにする。

【0026】

なお、複数のカラムを使用する場合には、例えば、図 3 又は図 4 に示すような構成の LC - MS を用いることもできる。図 3 の構成では、流路切替部 18 ~ 23 により、カラム 13 とカラム 14 を互いに接続しない状態（第 1 状態）と、これらのカラム 13、14 を直列に接続した状態（第 2 状態）とを切り替え可能となっている。なお、第 1 状態は、図 3 において、流路切替部 18 ~ 23 内部の流路を実線で示すように接続した状態であり、第 2 状態は、図 3 において、流路切替部 18 ~ 23 内部の流路を破線で示すように接続した状態である。第 1 状態では、第 1 送液部 11 から送給される溶離液は、直接カラム 14 に送られ、第 2 送液部 17 から送給される溶離液はカラム 13 を経てドレインに送られる。一方、第 2 状態では、第 1 送液部 11 から送給される溶離液はカラム 13 を経てカラム 14 に送られ、第 2 送液部 17 から供給される溶離液は、直接ドレインに送られる。

【0027】

図 3 のような構成の LC - MS では、例えば、カラム 13 にトラップカラムを使用し、カラム 14 に分離カラムを使用することにより、以下のような手順で本発明の試料分析方法を実施することができる。

- (1) 第 1 状態において、第 2 送液部 17 より供給される溶離液の流路中に、試料注入部 12 から試料を注入し、該試料に含まれる分析対象成分をカラム 13 に捕集させる。
- (2) 第 2 状態に切り替え、第 1 送液部 11 から所定の溶媒を送給することによりカラム 13 に捕集されている分析対象成分の一部を溶出させてカラム 14 に導入する。
- (3) 第 1 状態に切り替え、第 1 送液部 11 から所定の溶離液を送給することにより、カラム 14 で分析対象成分を分離させ、カラム 14 から順次溶出する分析対象成分を MS 部 15 で分析する（本発明における「第 1 の分析ステップ」に相当）。
- (4) 第 2 状態に切り替え、第 1 送液部 11 から前記所定の溶離液とは異なる溶離液を送給することにより、カラム 13 から残りの分析対象成分を溶出させると共に、該成分をカラム 14 で分離して MS 部 15 で分析する（本発明における「第 2 の分析ステップ」に相当）。

【0028】

図 4 のような構成の LC - MS では、流路切替部 18、19 により、上流側のカラム（図中の 13 a 又は 13 b）と下流側のカラム 14 を互いに接続しない状態（第 1 状態）と、これらを直列に接続した状態（第 2 状態）とを切り替え可能であると共に、流路切替部 24、25 内部の流路を図中の実線で示す接続状態と点線で示す接続状態の間で切り替えることにより、互いに並列に接続されたカラム 13 a とカラム 13 b のいずれを分析に使用するかを選択することができる。このような構成により、図 3 と同様の LC - MS と同様の分析を行うことができると共に、カラム 13 a 又はカラム 13 b のうち、一方を分析に使用している間に、他方を洗浄することができるため、より効率的な試料分析が可能となる。なお、カラム 13 a 及びカラム 13 b としては、同一種類の充填剤が充填されたものを使用する。

【実施例】

【 0 0 2 9 】

以下、本発明に係る試料分析方法により実施した、血漿中の P F A A s 及びそれらの類縁物質の L C / M S / M S 分析について説明する。

【 0 0 3 0 】

本実施例における試料分析に使用した L C - M S の構成を図 5 及び図 6 に示す。この L C - M S は、上述した図 3 の構成を具現化したものであり、二つのカラム 1 3 0、1 4 0 を互いに接続しない状態（第 1 状態）と、該二つのカラム 1 3 0、1 4 0 を直列に接続した状態（第 2 状態）とを切り替え可能な構成を有している。

【 0 0 3 1 】

この L C - M S は、分析用溶媒を送給する第 1 送液部 1 1 0 と、試料導入用溶媒を送給する第 2 送液部 1 7 0、オートサンプラ 1 2 0、第 1 カラム 1 3 0、第 2 カラム 1 4 0、第 1 流路切替バルブ 3 0 0、第 2 流路切替バルブ 4 0 0、及び M S 部 1 5 0 を備えている。第 1 送液部 1 1 0 には、それぞれ異なる溶媒が収容された溶媒容器 1 1 1、1 1 2、1 1 3、これらの溶媒容器 1 1 1、1 1 2、1 1 3 から溶媒を吸引するためのポンプ A、B、C、溶媒容器 1 1 1、1 1 2、1 1 3 とポンプ A、B、C の間の流路に設けられたデガッサー 1 1 4、ポンプ B により吸引された溶媒とポンプ C により吸引された溶媒を混合するための溶媒混合部 1 1 5、及び溶媒混合部 1 1 5 で混合された溶媒とポンプ A により吸引された溶媒を混合するための溶媒混合部 1 1 6 が設けられている。また、第 2 送液部 1 7 0 には、溶媒容器 1 7 1、溶媒容器 1 7 1 から溶媒を吸引するためのポンプ D、及び溶媒容器 1 7 1 とポンプ D の間の流路に設けられたデガッサー 1 7 2 が設けられている。ポンプ A の下流側の流路は、溶媒混合部 1 1 6 及び第 2 カラム 1 4 0 を介して M S 部 1 5 0 に接続されており、ポンプ B 及びポンプ C の下流側の流路は溶媒混合部 1 1 5 で合流した上で、第 2 流路切替バルブ 4 0 0 に接続されている。ポンプ D の下流側の流路は、流路中に試料を自動的に導入するためのオートサンプラ 1 2 0 を介して第 1 流路切替バルブ 3 0 0 に接続されている。

【 0 0 3 2 】

第 1 流路切替バルブ 3 0 0 及び第 2 流路切替バルブ 4 0 0 は、いずれも六方バルブであり、第 1 流路切替バルブ 3 0 0 は、ポート a ~ f を有し、第 2 流路切替バルブ 4 0 0 はポート g ~ l を備えている。これらの流路切替バルブ 3 0 0、4 0 0 は、バルブの内部で各ポートが、図 5 中の実線で示すように接続された状態（第 1 状態）と、図 6 中の実線で示すように接続された状態（第 2 状態）とを切り替え可能となっている。第 1 流路切替バルブ 3 0 0 のポート a はドレインに接続され、ポート b はオートサンプラ 1 2 0 を介してポンプ D に接続されている。第 1 流路切替バルブ 3 0 0 のポート c は第 2 流路切替バルブ 4 0 0 のポート h に接続されており、第 1 流路切替バルブ 3 0 0 のポート d、e、f は閉鎖されている。第 2 流路切替バルブ 4 0 0 のポート g は第 1 カラム 1 3 0 を介して第 2 流路切替バルブ 4 0 0 のポート j に接続されており、ポート i はドレインに接続されている。第 2 流路切替バルブ 4 0 0 のポート k はポンプ A から第 2 カラム 1 4 0 に至る流路の途中に設けられた溶媒混合部 1 1 6 に接続されている。また、第 2 流路切替バルブ 4 0 0 のポート l は、ポンプ B 及びポンプ C の下流に設けられた溶媒混合部 1 1 5 に接続されている。

【 0 0 3 3 】

本実施例では、液体クロマトグラフとして Nexcera（株式会社島津製作所製）を使用し、質量分析装置（M S 部 1 5 0）として LCMS 8060（株式会社島津製作所製）を使用した。また、第 1 カラム 1 3 0 としてトラップカラムである Oasis WAX（Waters 社製）を使用し、第 2 カラム 1 4 0 として分離カラムである Triart C18（株式会社ワイエムシイ製）を使用した。更に、本実施例では、ポンプ A により送給される溶媒（すなわち溶媒容器 1 1 1 に収容される溶媒）を 2.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液（2.5 mM NH₄Ac H₂O）とし、ポンプ B により送給される溶媒（溶媒容器 1 1 2 に収容される溶媒）を 2.5 mM 酢酸アンモニウム含有 95%メタノール溶液（2.5 mM NH₄Ac 95%MeOH）とし、ポンプ C により送給される溶媒（溶媒容器 1 1 3 に収容される溶媒）を 0.1%アンモニア含有メタノール溶液（0.1%

NH₃ MeOH)とし、ポンプDにより送給される溶媒(溶媒容器171に収容される溶媒)を超純水とした。試料としては、血漿に有機フッ素化合物を添加したものを使用し、インジェクションボリュームは500 μL(水250 μL+試料250 μL)とした。

【0034】

本実施例における分析動作を図7の送液プロファイルを参照しつつ説明する。なお、同図において、太い実線はポンプA、B、Cの流量(mL/min)の合計(以下「合計流量T」とよぶ)を示し、細い実線は合計流量Tに占めるポンプBの流量の比率(%)を、破線は合計流量Tに占めるポンプCの流量の比率(%)を示している。なお、図7ではポンプAの流量の比率(%)を示していないが、該流量比率の値は、当然ながら、100%からポンプBの流量比率(%)とポンプCの流量比率(%)を減じた値となる。また、図中の一点鎖線はポンプDの流量(mL/min)を示している。

【0035】

(1) 試料ロード工程

まず、LC-MSが第1状態(図5)であり、且つポンプBの流量比率:65%、ポンプCの流量比率:0%、合計流量:0.3 mL/min、及びポンプDの流量:1.0 mL/minの状態、オートサンプラ120から試料の注入(インジェクション)を行い(この時点が送液プロファイルの0.00分となる)、該試料を第1カラム130に捕集させる。

【0036】

(2) 第1溶出工程

試料の注入後、2.00分の時点でポンプB及びポンプCの流量比率並びに合計流量Tを維持したままポンプDの流量を0とし、LC-MSを第2状態(図6)とする。これにより、ポンプAからの溶媒(2.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液)が35%と、ポンプBからの溶媒(2.5 mM 酢酸アンモニウム 95%メタノール)が65%の割合で混合された混合液が第1カラム130及び第2カラム140に流入する。その結果、第1カラム130に捕集されている分析対象成分のうち、第1カラム130中の充填剤との結合が弱い成分(具体的には、N MeFOSA MとN EtFOSA M)のみが第1カラム130から溶出して第2カラム140に流入する。

【0037】

(3) 第1分析工程

その後、試料注入後3.50分の時点で、LC-MSを第1状態(図5)とし、ポンプBの流量比率:87.5%、ポンプCの流量比率:0%、合計流量T:0.5 mL/minに変更する。これにより、ポンプAからの溶媒(2.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液)が12.5%、ポンプBからの溶媒(2.5 mM 酢酸アンモニウム 95%メタノール)が87.5%の割合で混合された混合液が第2カラム140に流入し、上記(2)で第1カラム130から溶出した成分(N MeFOSA MとN EtFOSA M)が第2カラム140によって時間的に分離され、該カラム140から順次溶出してMS部150で分析される。なお、このとき、第1カラム130は、前記混合液の流路から切り離された状態にあるため、第1カラム130中に捕集されている残りの分析対象成分が第1カラム130から溶出されることはない。

【0038】

(4) 第2溶出工程

続いて、試料注入後7.50分の時点で、LC-MSを第2状態(図6)とし、ポンプBの流量比率:0%、ポンプCの流量比率:7.5%、合計流量T:0.25 mL/minに変更する。これにより、ポンプAからの溶媒(2.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液)が92.5%、ポンプCからの溶媒(NH₃ MeOH)が7.5%の割合で混合された混合液が第1カラム130及び第2カラム140に流入する。このとき、前記混合液に含まれるNH₃の作用により、第1カラム130に捕集されていた残りの分析対象成分が溶出され、第2カラム140に流入する。但し、前記混合液は、第2カラム140においては溶出力の弱い溶離液として働くため、前記残りの分析対象成分は、第2カラム140の入口付近に留まって、一旦濃縮される。また、このとき第2カラム140内の液体が前記混合液により満たされた状態となる(すなわちカラムが平衡化される)。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

(5) 第 2 分析工程

その後、試料注入後11.50分から23.00分に掛けてポンプBの流量比率を0%から80%まで徐々に上げていく(グラジエント送液)。これにより、第2カラム140に流入する溶離液の溶出力が徐々に高くなり、第2カラム140の入口付近に吸着していた各成分がその極性に応じて分離され、第2カラム140から順次溶出してMS部150で分析される。続いて、試料注入後23.00分の時点でポンプBの流量比率が90%に変更され、これにより、第2カラム140が洗浄される。

【 0 0 4 0 】

(6) 平衡化工程

その後、試料注入後26.50分の時点で、LC-MSを第1状態(図5)とし、ポンプA~Cの流量比率を維持したまま、合計流量Tを0.3 mL/min、ポンプDの流量を1.0 mL/minとすることで、第1カラム130及び第2カラム140を平衡化する。

【 0 0 4 1 】

以上の分析により求められた内部標準の回収率を表1に示す。

【 0 0 4 2 】

【表 1】

No.	Compounds	IS Rec. (%)
01	PFBA	58.2
02	PFPeA	83.1
03	PFHxA	85.2
04	PFHpA	84.5
05	PFOA	96.8
06	PFNA	86.4
07	PFDA	94.1
08	PFUnA	89.5
09	PFDoA	82.3
10	PFtriDA	44.6
11	PFteDA	44.6
12	PFHxDA	46.8
13	PFODA	46.8
14	PFBS	96.0
15	PFHxS	73.7
16	PFHpS	92.3
17	PFOS	92.3
18	PFDS	92.3
19	N-MeFOSA-A	71.6
20	N-EtFOSA-A	81.1
21	N-MeFOSA-M	82.7
22	N-EtFOSA-M	70.9
23	4:2FTS	44.7
24	6:2FTS	173.6
25	8:2FTS	142.6
26	6:2diPAP	78.7
27	8:2diPAP	71.8
28	diSAmPAP	71.8

【0043】

表 1 に示すように、本実施例による測定によれば、PFtriDA、PFteDA、PFHxDA、PFODA、及び4:2FTSを除く全ての対象化合物について50%以上の回収率が得られた。これはイオン40
 サプレッションが改善された結果と考えられる。また、PFtriDA、PFteDA、PFHxDA、PFO
 DA、及び4:2FTSについても40%以上の比較的高い回収率が得られた。なお、6:2FTS及び
 8:2FTSについてはイオンエンハンスメントが改善されず100%を超える回収率を示した
 が、これはカラムの洗浄不足によるものと考えられる。

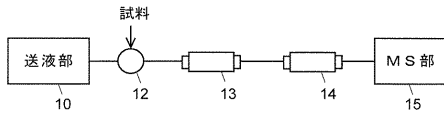
【符号の説明】

【0044】

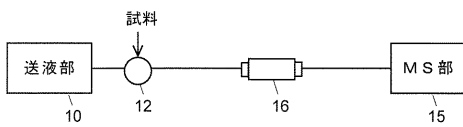
- 10 送液部
- 11、110 第1送液部
- 17、170 第2送液部
- 12 試料注入部

- 1 2 0 オートサンプラ
- 1 3、1 3 a、1 3 b、1 4、1 6 カラム
- 1 3 0 第1カラム
- 1 4 0 第2カラム
- 1 5、1 5 0 MS部
- 1 8、2 4 流路切替部
- 3 0 0 第1流路切替バルブ
- 4 0 0 第2流路切替バルブ

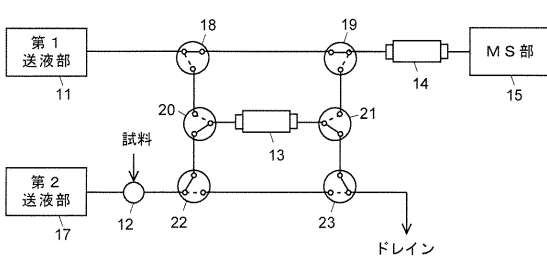
【図1】



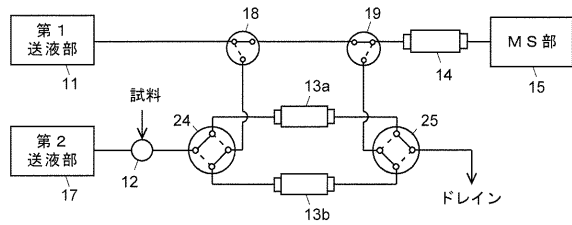
【図2】



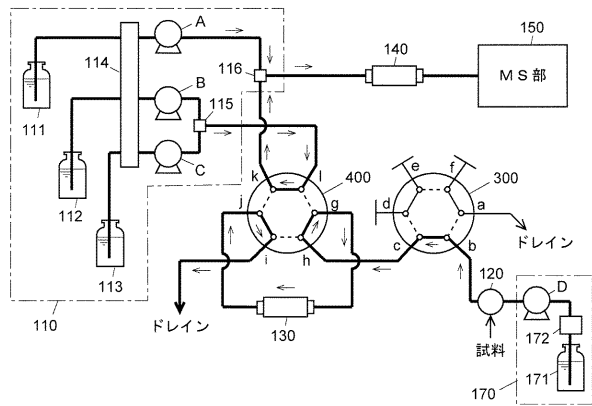
【図3】



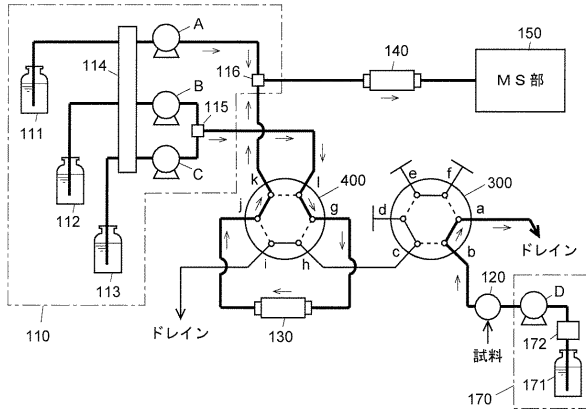
【図4】



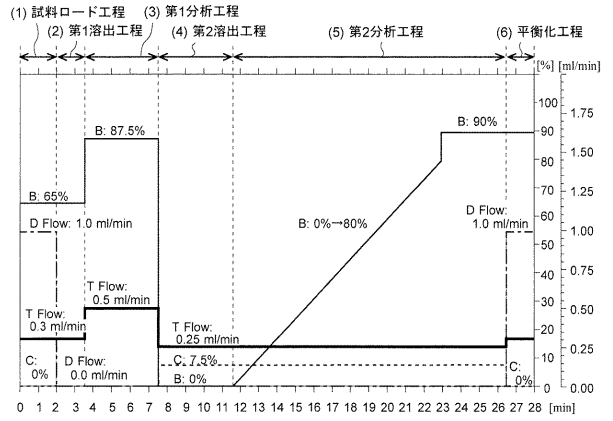
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 中山 祥嗣

茨城県つくば市小野川 1 6 - 2 国立研究開発法人国立環境研究所内

審査官 小澤 理

(56)参考文献 特開 2 0 0 8 - 3 0 4 4 3 5 (J P , A)

特開 2 0 0 2 - 3 7 2 5 2 2 (J P , A)

特開 2 0 0 2 - 2 5 7 8 0 6 (J P , A)

特開 2 0 1 0 - 2 7 6 3 5 8 (J P , A)

特開 2 0 0 8 - 0 9 6 4 5 5 (J P , A)

LINK, A. J. et al. , Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry , Nature Biotechnology , 1999年07月 日 , Vol. 17 , pp. 676 682

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 0 / 4 6

G 0 1 N 3 0 / 7 2

G 0 1 N 3 0 / 2 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)