

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 24 日(24.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/185807 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/06 (2006.01) *G01N 30/32* (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01) *G01N 27/62* (2006.01)
G01N 30/30 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/060579
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 30 日(30.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-102037 2015 年 5 月 19 日(19.05.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 長谷川 英樹(HASEGAWA Hideki); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 熊野 峻(KU-MANO Shun); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 橋本 雄一郎(HASHIMOTO Yuichiro); 〒

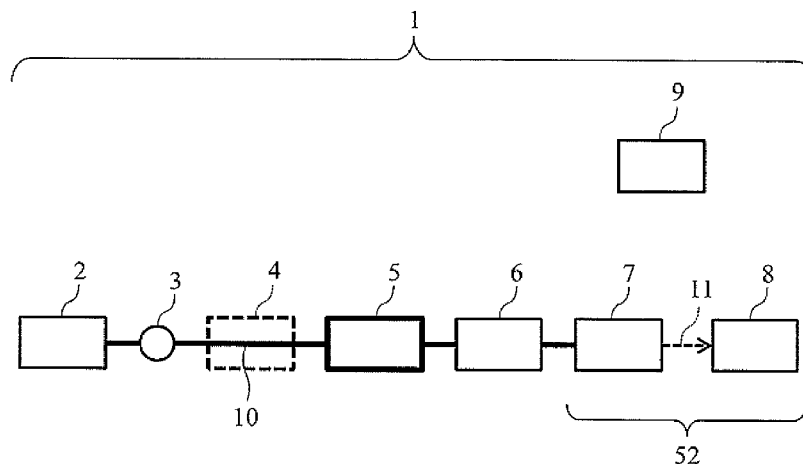
- 1008280 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 3 2 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: DEVICE FOR FRAGMENTING SAMPLE

(54) 発明の名称: 試料断片化装置

図 1



(57) Abstract: A device for fragmenting a sample, said device comprising a liquid feeding pump 2, a sample injection section 3 and a separation column 6 that are connected to each other by a pipeline for speeding up the fragmentation of the sample such as a protein or peptide and improving the introduction efficiency thereof into a detector such as a mass spectrometer. The device further comprises: a heating section 4 that heats the pipeline between the sample injection section 3 and the separation column 6; and a pressure regulating section 5 that is disposed between the heating section 4 and the separation column 6 and regulates the internal pressure in the pipeline heated by the heating section 4.

(57) 要約: タンパク質やペプチド等の試料の断片化を高速化し、質量分析計などの検出器への導入効率を向上させるために、それぞれが配管により接続された送液ポンプ 2、試料注入部 3 及び分離カラム 6 を有し、更に、試料注入部 3 と分離カラム 6 の間の配管を加熱する加熱部 4 と、加熱部 4 と分離カラム 6 の間に設けられ、加熱部 4 により加熱される配管の内部圧力を調節する圧力調節部 5 と、を有する。



WO 2016/185807 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 試料断片化装置

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質やペプチド等の試料をオンラインで断片化して検出器に導入する試料断片化装置に関する。

背景技術

[0002] 分子量の大きなタンパク質やペプチドを質量分析計で分析する場合、前処理としてトリプシンなどの消化酵素でペプチドに断片化してからイオン化する方法が一般的に用いられる。トリプシン消化は加水分解により、リジンやアルギニンなどの特定のアミノ酸のペプチド結合を選択的に切断するため、非常に重宝されるが、一方で反応時間が半日以上かかる場合があるなどの課題もある。

[0003] この課題を解決すべく、非特許文献1の方式が知られている。非特許文献1では、ガラス基板上のタンパク質などの試料を加熱して熱分解させ、その後、脱離エレクトロスプレーイオン化法（DESI）でイオン化している。この方式により、220～250℃の条件で10秒程度の短時間でタンパク質を分解可能としている。

[0004] 熱による分解の別方式として、非特許文献2の方式が知られている。非特許文献2では、高圧かつ高温に保持されたイオン化部にサンプル溶液を導入し、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）でイオン化している（高圧ESI）。高圧下では液体の沸点が上昇するので、例えば水の場合では100℃を超えても沸騰しない。よって、水分が無くならないため加水分解による断片化が可能となる。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Zhang S et al., J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2007;80:353-359; On-probe pyrolysis desorption electrospray ionization (DESI) mass

spectrometry for the analysis of non-volatile pyrolysis products.

非特許文献2: Chen et al., J. AM. Soc. Mass Spectrom. (2014); High pressure super-heated electrospray ionization mass spectrometry for sub-critical aqueous solution.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 非特許文献1の方法では、加熱により水分も気化するため、トリプシン消化のような加水分解ではなく熱に弱い部分からランダムに壊れていくため、分解の再現性が低下する可能性があるので分解物の同定が困難になる。

[0007] 一方、非特許文献2の方法では、質量分析計の導入口となる第一細孔電極の一次側（イオン化部）が高圧であるため、第一細孔電極の穴径を小さくしないと質量分析計内部の圧力を最適値に維持できなくなる。穴径が小さいためイオン導入量が減少し、結果的に感度低下を招くことになる。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明による試料断片化装置は、配管により接続された送液ポンプ、試料注入部及び分離カラムと、試料注入部と分離カラムの間の配管を加熱する加熱部と、加熱部と分離カラムの間に設けられ、加熱部により加熱される配管の内部圧力を調節する圧力調節部と、を有する。

発明の効果

[0009] 本発明により、質量分析計などの検出器への導入効率を低下させることなく、オンラインかつ短時間でタンパク質やペプチド等の試料を断片化することが可能となる。

[0010] 上記した以外の、課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]試料断片化装置の構成例を示す模式図。

[図2]加熱部の構造例を示す断面模式図。

- [図3]溶液の圧力と沸点の関係を示した図。
- [図4]カラム種類による流量とカラム上流側圧力の関係を示す図。
- [図5]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図6]冷却部の構造例を示す断面模式図。
- [図7]サブスタンスPの分析結果を示す図。
- [図8]ユビキチンの分析結果を示す図。
- [図9]構造式を用いてタンパク質の加水分解を説明した図。
- [図10]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図11]分析のタイムシーケンスを示した図。
- [図12]液体クロマトグラフィーで用いられる実験条件の一例を示す図。
- [図13]加熱配管の温度とイオン強度の安定性の関係を示す図。
- [図14]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図15]分析のタイムシーケンスを示した図。
- [図16]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図17]加熱部に冷却部を併設した構造例を示す断面模式図。
- [図18]分析のタイムシーケンスを示した図。
- [図19]分析のタイムシーケンスを示した図。
- [図20]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図21]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図22]分析のタイムシーケンスを示した図。
- [図23]試料断片化装置の構成例を示す模式図。
- [図24]試料断片化装置の構成例を示す模式図。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

[0013] [実施例 1]

図1は、実施例1の試料断片化装置の構成例を示す模式図である。本実施例では、試料断片化装置の流路系内で、加熱配管と分離カラムの間に圧力調節部を有する構成について説明する。ここでは、検出器に質量分析計を用い

た例を示す。

[0014] 試料断片化装置 1 は、送液ポンプ 2、試料注入部 3、加熱部 4、圧力調節部 5、分離カラム 6、検出器 5 2 を有し、これらは配管により接続されている。試料注入部 3 から導入された試料は送液ポンプ 2 によって分離カラム 6 の内部に通され、分離カラム 6 で分離された試料は検出器 5 2 で分析される。本実施例の検出器 5 2 はイオン源 7 と質量分析計 8 で構成され、イオン源 7 によって試料をイオン化し、生成したイオン 1 1 を質量分析計 8 で検出し、イオンの質量を分析する。分離カラム 6 に充填された充填剤による液体クロマトグラフィーにより試料が時間的に分離され、その後、イオン 1 1 を質量分析することで、夾雑物の除去や高精度かつ高 S / N 分析が可能となる。液体クロマトグラフィーでは、分離カラム 6 の充填剤を固定相と呼び、分離カラム 6 の中に流す溶液を移動相と呼ぶのが一般的である。移動相に含まれた試料と固定相の疎水性相互作用の違いにより、試料を分離することができる。

[0015] 液体クロマトグラフィーの方式の中から、逆相クロマトグラフィーという方式を例に、試料分離の原理について説明する。逆相クロマトグラフィーでは、移動相の方が固定相より極性が高いことが特徴である。例を挙げると、移動相には水、メタノール、アセトニトリルなどの高極性溶媒が用いられ、固定相にはシリカにオクタデシル基を化学結合した疎水性の充填剤（ODS 又は C 1 8 と呼ぶ）などが使用される。ODS などの疎水性固定相への試料の吸着は主に水など溶出力が弱い溶液から成る移動相を送液することで行い、固定相からの試料の溶出は主に有機溶媒など溶出力が強い溶液から成る移動相を送液することで行う。また、溶出時に溶出力の高い有機溶媒の濃度を徐々に変化させることで、高極性の試料成分から先に溶出させるグラジエント分析という手法もある。これら吸着や溶出の工程における試料内成分の疎水性相互作用により、成分ごとに分離カラムでの保持時間が異なるため、試料を時間的に分離することが可能になる。

[0016] 図 1 に示した試料断片化装置 1 は、試料注入部 3 と分離カラム 6 の間に加

熱部４で加熱される加熱配管１０を有し、さらに、加熱部４と分離カラム６の間に圧力調節部５を有することが特徴である。

[0017] また、試料断片化装置１は制御部９を有しており、制御部９では質量分析計８で得られた結果の分析や解析が行われる。実際には、検出したイオンの質量を元に、試料構造の同定や試料内の成分量の定量などを行う。また制御部９は、送液ポンプ２、試料注入部３、加熱部４、圧力調節部５、イオン源７、質量分析計８の動作制御や条件設定なども行っている。また制御部９は、分析に使用した分離カラム６の特性データを保存する機能などを有することも可能である。分離カラム６の特性データを有することで、分離カラム６の保持時間や送液圧力の条件を次回分析やデータ解析に反映することができる。

[0018] 図２は、加熱部４の構造例を示す断面模式図である。加熱配管１０の周りに加熱ブロック５４が配置されている。加熱ブロック５４はヒータ５５で加熱され、熱電対５６で温度測定される。制御部９で、熱電対５６の測定温度を元にヒータ５５の出力を制御することで、加熱ブロック５４の温度制御が可能となる。なお、加熱ブロック５４以外にも、温度調節した液体の中に加熱配管１０を通したウォータージャケットのような構成や、加熱配管１０の周囲に直接電熱線を巻き付ける構成など、加熱配管１０に温度を伝えられる手段であれば、同様の効果を得ることが可能である。ヒータ５５には、カートリッジヒータやプレート状ヒータなど、様々なヒータを用いることが可能である。また、温度測定には、熱電対以外に測温抵抗体などを用いることも可能である。

[0019] イオン源７には、エレクトロスプレーイオン化方式（ＥＳＩ）、大気圧化学イオン化方式（ＡＰＣＩ）など、様々な方式のイオン源を用いることが可能である。

[0020] 質量分析計８には、三連四重極質量分析計（ＱＱＱ）、飛行時間型質量分析計（ＴＯＦ）など、様々な方式の質量分析計を用いることができる。

[0021] 図１に示した試料断片化装置１においては、送液ポンプ２により、高密度

な充填剤が充填された分離カラム 6 の中に移動相を通過させるため、分離カラム 6 の上流側は高圧となる。高圧下では液体の沸点が上昇するので、大気圧下での沸点温度（水の場合 100℃）でも沸騰しない。つまり、分離カラム 6 の上流側の移動相の沸点が上昇する。溶液の蒸気圧は式 1 で示される。

[0022] [式 1]

$$\text{Log}_{10}P = A - \frac{B}{T+C} \quad (1)$$

[0023] 式 1 はアントワンの式といい、P は蒸気圧 (mmHg)、T は温度 (℃)、A、B、C はアントワン定数である。ここで、液体クロマトグラフ質量分析計で一般的に使用されることが多い移動相として、0.1%酢酸水と 0.1%酢酸入りメタノールを例に説明する。アントワン定数 A、B、C は物質に依存し、水では A = 8.028、B = 1706、C = 231.4 であり、メタノールでは A = 8.079、B = 1581、C = 239.7 であり、酢酸では A = 7.560、B = 1644、C = 233.5 である。混合溶液の蒸気圧は式 2 で示される。

[0024] [式 2]

$$P_{\text{Total}} = \sum_i P_i \cdot x_i \quad (2)$$

[0025] 式 2 はラウールの法則により成り立ち、 P_{Total} は混合溶液の蒸気圧、 P_i は各成分の純液体での蒸気圧、 x_i はモル分率である。図 3 は、式 1 と式 2 から得られた、0.1%酢酸水と 0.1%酢酸入りメタノールの、圧力と沸点の関係を示す図である。0.1%酢酸水の理論値を実線で示し、0.1%酢酸入りメタノールの理論値を破線で示している。図 3 から、溶液の圧力を高くすることで沸点が上昇することが理解できる。

[0026] 従って、本実施例では加熱配管 10 を大気圧下での移動相の沸点以上の温度に加熱しても沸騰しない。つまり、沸騰による気化が起きず水分がなくならないため、大気圧下での移動相の沸点以上の高温下でも、タンパク質などの試料の加水分解が可能な条件になりうる。加水分解が可能になることで、再現性の高い試料の断片化が実現できる。また、図 1 に示した装置構成では

分離カラム 6 の下流側は大気圧下になるので、質量分析計 8 のイオン導入口を小さくしなくても質量分析計 8 の内部圧力を最適値に維持でき、イオン導入口の低下がない。

[0027] 図 4 は、2 種類の分離カラムに、水 100% を流したときの流量と分離カラムの上流側の圧力の関係の実験結果を示した図である。カラム A の実験値を四角マーカで示し、カラム B の実験値をバツ印マーカで示している。カラム A とカラム B は、各々、長さや充填剤の粒径などの違いでコンダクタンスが異なる。従って、同じ流量の水を流しても、図 4 のように上流側の圧力が大幅に異なる。例えば、加熱配管 10 の内径を 0.5 mm とし、長さを 0.85 m とした場合、分解に十分な加熱時間が 30 秒程度と仮定すると、0.4 mL/min 程度の流量にする必要がある。0.4 mL/min の流量条件ではカラム A とカラム B の上流側圧力は、各々、30 MPa と 2.5 MPa 程度になる。試料により温度条件を 250℃ 程度まで上げることがあると想定すると、図 4 の結果に対して余裕を見て 5 MPa 以上に設定した場合、図 3 と図 4 からカラム B では 0.8 mL/min の流量が必要となり、加熱配管 10 の通過時間が 10 秒程度になってしまい加熱が不十分になる。加熱配管 10 の内径を太くしたり加熱配管 10 を長くしたりすることで、溶液の滞在時間を長くすることも可能であるが、吸着などの問題が生じてくる。

[0028] 従って、図 1 に示すようなバルブなどの圧力調節部 5 を流路に設置し、カラム B のような分離カラム 6 を使用したときでも、加熱配管 10 の内部の圧力を十分に高くすることが必須となる。使用する分離カラム 6 に応じて流路のコンダクタンスを可変に調節することで、加熱配管 10 の内部の圧力を最適（加水分解可能条件）に保つことができる。なお、圧力調節部 5 にはニードルバルブなどのバルブ類や分離カラムやキャピラリーなど流路抵抗の高い配管上の部材などを用いることができる。

[0029] [実施例 2]

図 5 は、実施例 2 による試料断片化装置の構成例を示す模式図である。本

実施例では、試料断片化装置の流路系内で、加熱部 4 と分離カラム 6 の間に冷却部 18 を有する構成について説明する。

[0030] 図 1 に示した装置構成で、加熱配管 10 で加熱された移動相をそのまま分離カラム 6 に導入するのは、分離カラム内の充填剤に悪影響を与えるだけでなく、分離カラム 6 の出口で大気圧に開放された瞬間に一気に沸騰してしまい、その後のイオン化の安定化に悪影響を与える恐れもある。従って、図 5 のように加熱部 4 で加熱される加熱配管 10 の下流側の配管 57 を冷却する冷却部 18 があることが望ましい。

[0031] 図 6 は、冷却部 18 の構造例を示す断面模式図である。冷却部 18 は、配管 57 の周りに水などの液体 58 を満たすことが可能な容器 59 を有している。容器 59 の中に冷却用の液体 58 を循環させるための入口 60 と出口 61 を有することで、ウォータージャケットのように配管 57 を冷却する。液体 58 の温度は熱電対 62 で測定される。また、液体 58 の温度が下がりすぎるのを防ぐために、ヒータ 63 を配置しても良い。制御部 9 で、熱電対 62 による測定温度を元にヒータ 63 の出力を制御することで、液体 58 の温度制御が可能となる。なお、図示した構造以外にも、冷却ブロック、ペルチェ素子、ファンなど配管 57 を冷却できる手段であれば、他の手段を用いても同様の効果を得ることが可能である。ヒータ 63 には、カートリッジヒータやプレート状ヒータなど、様々なヒータを用いることが可能である。また、温度測定には、熱電対以外に測温抵抗体などを用いることも可能である。

[0032] 液体クロマトグラフィーでは、分離カラムを室温から数十度の温度範囲で使用するのが一般的であるので、冷却部 18 の設定温度も、室温から数十度に設定することが望ましい。但し、分離カラムの設定温度は、分析用途や測定対象により異なることがあるので、各種分析に応じて冷却部 18 の設定温度を変更することも可能である。

[0033] 次に、図 5 に示した試料断片化装置を用いて実際にタンパク質を分解により断片化した結果について説明する。

[0034] 図 7 は、サブスタンス P（分子量 1347）の分析結果を示す図である。

図 7 (A) はサブスタンス P の分解前のマスペクトルを示し、図 7 (B) はサブスタンス P の分解後のマスペクトルを示している。図 7 (A) は加熱配管 10 を 80℃ に温度調節したときの分析結果であり、図 7 (B) は 220℃ に温度調節したときの分析結果である。実験条件は、分離カラム 6 の上流側圧力が 3.5 MPa、加熱配管 10 の移動相通過時間が 30 秒である。また、分離カラム 6 への試料吸着時は移動相に 0.1% 酢酸水を用い、試料溶出時には 0.1% 酢酸入りメタノールを用いた。本実施例の試料断片化装置を用いることにより、サブスタンス P 由来の y6 と y7 のフラグメントイオンが検出できた。加熱による分解部位はサブスタンス P のアミノ酸配列 21 に示した。

[0035] 図 8 は、ユビキチン（分子量 8560）の分析結果を示す図である。図 8 (A) はユビキチンの分解前のマスペクトルを示し、図 8 (B) はユビキチンの分解後のマスペクトルを示している。図 8 (A) は加熱配管 10 を 80℃ に温度調節したときの分析結果であり、図 8 (B) は 180℃ に温度調節したときの分析結果である。実験条件は、分離カラム 6 の上流側圧力が 1.6 MPa、加熱配管 10 の移動相通過時間が 30 秒である。また、分離カラム 6 への試料吸着時は移動相に 0.1% 酢酸水を用い、試料溶出時には 0.1% 酢酸入りメタノールを用いた。本実施例の試料断片化装置を用いることにより、ユビキチン由来の y18 と y24 と y37 のフラグメントイオンが検出できた。加熱による分解部位はユビキチンのアミノ酸配列 24 に示した。

[0036] 図 9 は、構造式を用いてタンパク質の加水分解を説明した図である。加水分解前のタンパク質 64 は、水 (H_2O) を取り込むことで、ペプチド結合部が切れて、加水分解後のタンパク質 65 のように分解される。ペプチド結合部が切れて生成する断片由来の y 系列イオンが、サブスタンス P とユビキチンの何れの分析結果でも検出されているので、本実施例により、短時間での加水分解が可能であることが分かった。

[0037] これらの結果から、本実施例により再現性の高い加水分解が起こり、特定

のアミノ酸配列を切断できることがわかった。また、加熱部 4 により加熱される加熱配管 10 の下流側に冷却部 18 を有することで、安定した分析が可能となった。

[0038] [実施例 3]

図 10 は、実施例 3 の試料断片化装置 1 の構成例を示す模式図である。本実施例では、試料断片化装置の流路系内で、加熱部 4 と分離カラム 6 の間の流路を分岐し、圧力調節を行う構成について説明する。

[0039] 図 10 に示した装置構成は図 1 や図 5 とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。図 10 の構成は、圧力調節部 5 に流路切替バルブ 25 と流路コンダクタンス調節部 26 を有することが特徴である。分離カラム 6 の手前に流路切替バルブ 25 を設置することで、加熱部 4 の後段に接続される流路を分離カラム 6 側あるいはコンダクタンス調節部 26 側に切替えることができる。図 4 に示したコンダクタンスの異なるカラムを使用する時のように、加熱配管 10 の内部圧力を変更する必要がある場合、図 11 に示したタイムシーケンスのように制御することが可能になる。領域 A（加熱配管 10 の内部）を試料が通過するタイミングでは、流路切替バルブ 25 はコンダクタンス調節部 26 側のポートを開状態にし、矢印 31 の方向に移動相を流す。このとき、コンダクタンス調節部 26 により加熱配管 10 の内部圧力を調節することで、タンパク質などの加水分解に最適な条件に設定できる。矢印 31 方向に流れた移動相は、コンダクタンス調節部 26 を通過し、廃棄部 27 へ廃棄される。

[0040] その後、試料が領域 B（加熱配管 10 と圧力調節部 5 の間の流路）を通過するタイミングでは、流路切替バルブ 25 は分離カラム 6 側のポートを開状態にし、矢印 30 の方向に移動相を流す。矢印 30 の方向に流れる移動相の中には、加水分解で断片化されたタンパク質などの試料成分が含まれており、これら試料成分は分離カラム 6 の固定相に吸着される。吸着した試料成分は、その後の溶出工程で溶出され、イオン源 7 でイオン化され、生成したイオン 11 は質量分析計 8 で検出される。

[0041] このように送液ポンプ 2 で試料を送り始めてからの経過時間に依存して加熱部 4 に接続される流路、すなわち流路切替バルブ 2 5 の開ポートを分離カラム 6 とコンダクタンス調整部 2 6 との間に切り替えることにより、領域 A（加熱配管 1 0 の内部）を試料が通過するタイミングのみ、加水分解に最適な圧力条件に制御することが可能となる。この方式により、加熱配管 1 0 で加水分解を行う時の圧力は分離カラム 6 にはかからないため、分離カラム 6 に対して試料分離に必要な圧力以外の不要な圧力がかからない。そのため、分離カラム 6 の寿命が長くなる。

[0042] [実施例 4]

実施例 4 では、試料断片化装置の流路系内で、加熱配管と分離カラムの間の流路を切替えて、吸着と溶出の工程で異なる流路から移動相を供給する構成について説明する。

[0043] 図 1 2 は、液体クロマトグラフィーで用いられる実験条件の一例を示す図である。図 1 2 に示した実験条件は、吸着工程では移動相 A（0. 1 %酢酸水）を 1 0 0 %流し、溶出工程では移動相 B（0. 1 %酢酸入りメタノール）を 1 0 0 %流し、洗浄工程では移動相 A を 1 0 0 %流す。分析対象となる試料や分離カラムの種類により、移動相 A と移動相 B の比率は適宜変更されるのが一般的である。また、使用する溶媒も同様に、用途によりアセトニトリルなどの別の溶媒を使用したり、酢酸の他、蟻酸など別の物質を添加したりすることもある。

[0044] 次に、図 1 2 に示した実験条件の例のように、0. 1 %酢酸入りメタノールで分離カラム 6 から試料を溶出する際の問題について説明する。図 3 に示した通り、0. 1 %酢酸水と 0. 1 %酢酸入りメタノールでは、同一圧力条件において大幅に沸点が異なる。例えば、0. 8 MP a では各々の沸点は 1 7 0 °C と 1 3 0 °C 程度であることが図 3 から分かる。これは、同一の圧力と温度条件で、吸着工程と溶出工程を行った場合、図 1 2 の実験条件では、移動相 B を使用する溶出工程の方が沸騰しやすいということになる。本実施例による加水分解は分離カラム 6 への吸着工程の前に起こるので、吸着工程ま

での移動相の沸騰防止は必須である。一方、溶出工程についての必要性について、以下説明する。

[0045] 図5に示した装置構成で、メタノール溶媒で溶解したレセルピン（濃度1 ppb）の試料を、連続送液（インフュージョン）で分離カラム6に100 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液し、イオン源7（ESI方式）でイオン化し、生成したイオン11を質量分析計8で分析した。分析結果を図13に示す。使用した質量分析計8は三連四重極質量分析計（QQQ）であり、マルチリアクションモニタリング（MRM）モードを使用した。図13は、MRMの設定を $m/z\ 609 \rightarrow m/z\ 195$ とした時の実験結果であり、図13（A）は加熱配管10の温度が室温のときの実験結果、図13（B）は90℃のときの実験結果、図13（C）は100℃のときの実験結果を示している。

[0046] 図13（A）（室温）、図13（B）（90℃）では時間経過に対し安定したイオン強度（変動係数CV＝数％以下）を示すが、図13（C）（100℃）ではイオン強度の変動が非常に大きい。これはメタノール溶液が沸騰しているのが原因であり、図5の構成で同一の圧力と温度条件で吸着工程と溶出工程を行うことは、測定の安定性を損なう可能性がある。

[0047] この問題は、試料断片化装置を例えば図14に示すような構成とすることで解決できる。図14に示した試料断片化装置1の構成は図1や図5とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。図14の構成は、圧力調節部5に流路切替バルブ25とコンダクタンス調節部26を有することが特徴であり、流路切替バルブ25により、吸着と溶出の工程で異なる流路から移動相を供給する。すなわち、流路切替バルブ25は、分離カラム6の流入側に接続される流路を加熱部4を通る流路と加熱部4を通らない流路との間で切り替える。

[0048] 図15のタイムシーケンスに示すように、吸着工程では移動相Aが矢印37の方向から加熱部4を経て分離カラム6側へ流れるように流路切替バルブ25を制御し、溶出工程では移動相Bが矢印38の方向から加熱部4を通らずに分離カラム6側へ流れるように流路切替バルブ25を制御する。このよ

うに送液ポンプ 2 で試料を送り始めてからの経過時間に依存して流路切替バルブ 25 を切り替え制御することにより、沸点の低い移動相 B を加熱されていない流路から導入できるので、溶出時の動作不安定を防止できる。

[0049] なお、図 14 には流路切替バルブ 25 がコンダクタンス調節部 26 の前段にある構成を示したが、流路切替バルブ 25 はコンダクタンス調節部 26 の後段にあっても同様の効果が得られる。

[0050] [実施例 5]

図 16 は、実施例 5 の試料断片化装置 1 の構成例を示す模式図である。本実施例では、試料断片化装置の流路系内で、加熱配管を冷却する冷却部を有する構成について説明する。

[0051] 図 16 の装置構成は図 1 や図 5 とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。図 16 に示した構成は、加熱部 4 に加熱配管 10 を冷却する冷却部 40 を併設したことが特徴である。

[0052] 図 17 は、加熱部 4 に冷却部 40 を併設した構造例を示す断面模式図である。加熱部 4 の加熱機構に関しては図 2 とほぼ同様なので説明を省略する。加熱ブロック 54 を急冷し、加熱ブロック 54 によって加熱された加熱配管 10 を冷却するために、ペルチェ素子 67 を配置した。ペルチェ素子 67 を放熱するためにヒートシンク 68 とファン 69 を設けるのが好ましい。なお、ペルチェ素子 67 以外にも、ウォータージャケットのような構成や、冷却ファンで直接冷却する構成など、加熱配管 10 を冷却できる構成であれば、他の構成を用いても同様の効果を得ることが可能である。

[0053] 本実施例によっても実施例 4 と同様の効果を得ることができる。図 18 のタイムシーケンスに示すように、分離カラムに試料を吸着させる吸着工程と分離カラムに吸着した試料を溶出用溶媒により溶出させる溶出工程の間に、加熱部 4 によって加熱された加熱配管 10 の温度を冷却部 40 により溶出用溶媒の沸点以下の温度に急冷することで、溶出工程で移動相（溶出用溶媒）が沸騰することを防止できる。

[0054] [実施例 6]

実施例 6 では、試料断片化装置の流路系内で、吸着と溶出の工程の間に、圧力調節部により加熱配管圧力を制御する構成について説明する。装置構成については、これまで述べてきた実施例の全てにおいて適用可能であるので、本実施例の特徴のみを説明する。

[0055] 図 19 は、本実施例のタイムシーケンスを示す図である。移動相 A による分離カラムへの試料の吸着工程が終了し、移動相 A よりも沸点が低い溶出用溶媒、すなわち移動相 B によって分離カラムに吸着した試料を溶出させる溶出工程を開始する前に、制御部 9 により圧力調節部 5 を制御して加熱配管 10 の内部圧力を上昇させる。

[0056] 本実施例によっても実施例 4 や実施例 5 と同様の効果を得ることができる。図 19 のタイムシーケンスに示すように、吸着工程と溶出工程の間に加熱配管 10 の内部圧力を圧力調節部 5 により増加することで、溶出工程での移動相の沸点を上昇させ、移動相が沸騰することを防止できる。

[0057] [実施例 7]

図 20、図 21 は、実施例 7 の試料断片化装置 1 の構成例を示す模式図である。本実施例では、試料断片化装置の流路系内に複数の加熱配管を設け、加水分解による試料の断片化を並列で行う構成例について説明する。

[0058] 本実施例の動作原理は図 10 に示した動作原理とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。本実施例の構成は、圧力調節部 5 に六方バルブ 45 とコンダクタンス調節部 26 を有することが特徴である。図 20 と図 21 は、六方バルブ 45 を切替えたときの各々の流路の接続状態を表している。六方バルブ 45 は、流路を切替えるという機能面では図 10 の流路切替バルブ 25 と同様であるが、六方バルブ 45 を使用することで、複数の加熱配管（加熱配管 A と加熱配管 B）に対応可能になる。

[0059] 図 20 と図 21 及び図 22 のタイムシーケンスを用いて、本実施例の動作について説明する。

[0060] 2 系列の加熱配管 A と加熱配管 B には、各々、送液ポンプ 2 と試料注入部 3 により試料が導入される。図 20 は、六方バルブ 45 によって加熱配管 A

が分離カラム 6 側に接続され、加熱配管 A 側の移動相が矢印 A のように流れる状態を示している。一方、加熱配管 B は六方バルブ 4 5 によってコンダクタンス調節部 2 6 側に接続され、加熱配管 B 側の移動相は矢印 B のように流れる。この時、コンダクタンス調節部 2 6 によって加熱配管 B は最適な圧力条件に制御され、圧力制御された加熱部の加熱配管 B で試料の加水分解が行われる。

[0061] 試料が加熱配管 B を過ぎた後に、六方バルブ 4 5 を切替える。六方バルブ 4 5 の切替えにより、図 2 1 のように加熱配管 B は分離カラム 6 側に接続され、加熱配管 B 側の移動相は矢印 A のように分離カラム 6 に流れる。一方、今度は加熱配管 A がコンダクタンス調節部 2 6 側に接続され、加熱配管 A 側の移動相は矢印 B のように流れる。この時、コンダクタンス調節部 2 6 によって加熱配管 A は最適な圧力条件に制御され、圧力制御された加熱部の加熱配管 A で試料の加水分解が行われる。

[0062] つまり、試料が加熱配管 A を通過しているときは加熱配管 A からの移動相は矢印 B のようにコンダクタンス調節部 2 6 へ流れ、加熱配管 B からの移動相は矢印 A のように分離カラム 6 へ流れる。一方、試料が加熱配管 B を通過しているときは加熱配管 B からの移動相は矢印 B のようにコンダクタンス調節部 2 6 へ流れ、加熱配管 A からの移動相は矢印 A のように分離カラム 6 へ流れる（図 2 2）。この六方バルブ 4 5 によって複数の加熱部 4 に接続される流路を分離カラム 6 とコンダクタンス調節部 2 6 に順次切り替える操作により、試料の断片化処理を複数の加熱配管によって並列的に行うことが可能となる。

[0063] なお、本実施例では複数の送液ポンプ 2 と複数の試料注入部 3 を用いる例で説明したが、1 つの送液ポンプ 2 と 1 つの試料注入部 3 を複数の流路系統で共用し、試料注入部から流路を分岐して、加熱配管 A と加熱配管 B に試料を導入するようにしても良い。

[0064] [実施例 8]

図 2 3 は、実施例 8 の試料断片化装置 1 の構成例を示す模式図である。本

実施例では、試料断片化装置の流路系内で、分離カラムの前にフィルタを有する構成について説明する。

[0065] 図23の装置構成は図1とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。図23の構成は、分離カラム6の前にフィルタ51を設けたことが特徴である。

[0066] タンパク質やペプチドの断片化においては、変性により不溶性物質が生成される場合がある。不溶性物質は移動相に溶解されにくいため、分離カラム6の充填剤を通過できずに目詰まりを起こす恐れがある。分離カラム6の目詰まりは流路圧力を異常に上昇させるだけでなく、分離カラム6の寿命を早めてしまう恐れもある。

[0067] 本実施例では、フィルタ51を分離カラム6の前段に配置することで、加熱配管10で生成する可能性がある不溶性物質が分離カラム6に導入されるのを抑止できる。フィルタ51には、ガードカラムやプレカラムフィルタなどを用いることができる。また、フィルタ51は、圧力調節部5やコンダクタンス調節部26と兼用することも可能である。

[0068] [実施例9]

図24は、実施例9の試料断片化装置1の構成例を示す模式図である。本実施例では、試料断片化装置において、検出器に紫外可視光検出器を用いた構成について説明する。

[0069] 図24の構成は図1とほぼ同様であるので、相違点のみについて説明する。図24の構成は、検出器に紫外可視光検出器53を用いていることが特徴である。

[0070] 紫外可視光検出器53を使用することで、質量分析方式での分析においてイオンサプレッションが大きい試料やイオン化効率が低い試料などにも対応可能である。

[0071] なお、本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上記した実施例は本発明を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備えるものに

限定されるものではない。また、ある実施例の構成の一部を他の実施例の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることも可能である。また、各実施例の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。また、検出器には、質量分析方式や紫外可視光検出方式の他、フォトダイオードアレイ検出器、蛍光検出器など、様々な検出方式を用いることが可能である。

符号の説明

- [0072] 1 試料断片化装置
2 送液ポンプ
3 試料注入部
4 加熱部
5 圧力調節部
6 分離カラム
7 イオン源
8 質量分析計
9 制御部
10 加熱配管
11 イオン
18 冷却部
25 流路切替バルブ
26 コンダクタンス調節部
27 廃棄部
40 冷却部
45 六方バルブ
51 フィルタ
52 検出器
53 紫外可視光検出器
54 加熱ブロック

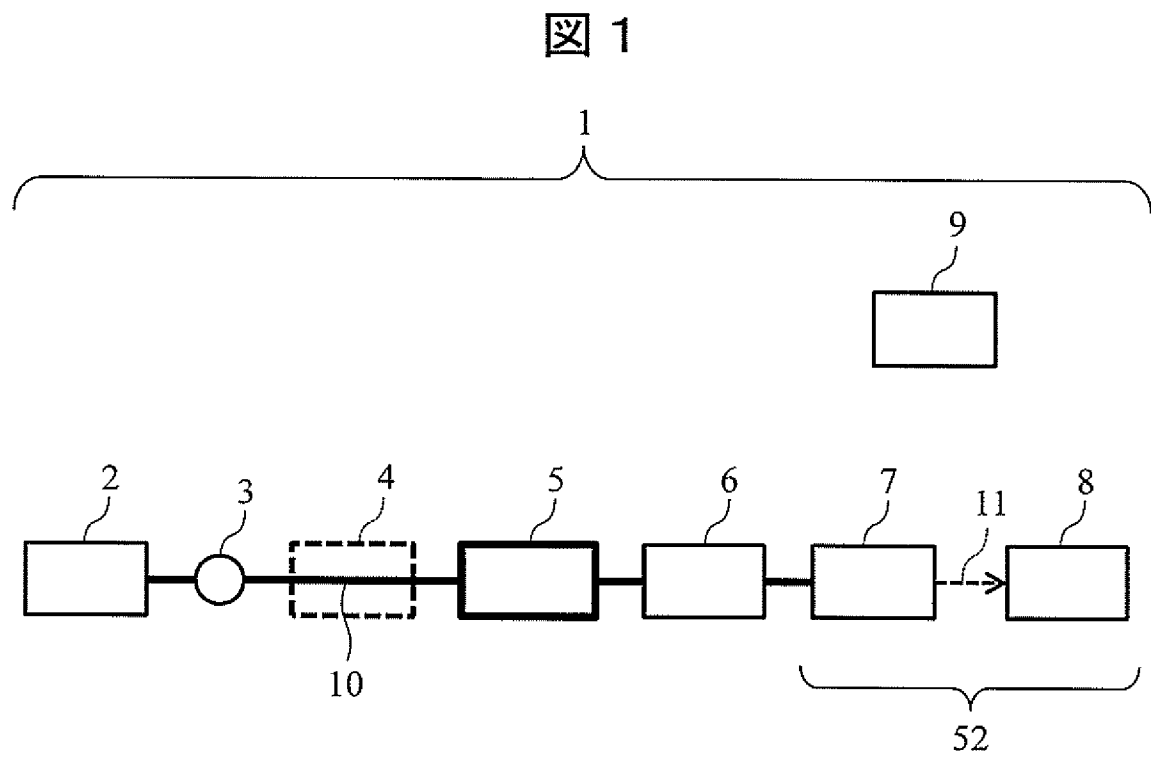
- 5 5 ヒータ
- 5 6 熱電対
- 5 7 配管
- 5 8 液体
- 5 9 容器
- 6 2 熱電対
- 6 3 ヒータ
- 6 7 ペルチェ素子
- 6 8 ヒートシンク
- 6 9 ファン

請求の範囲

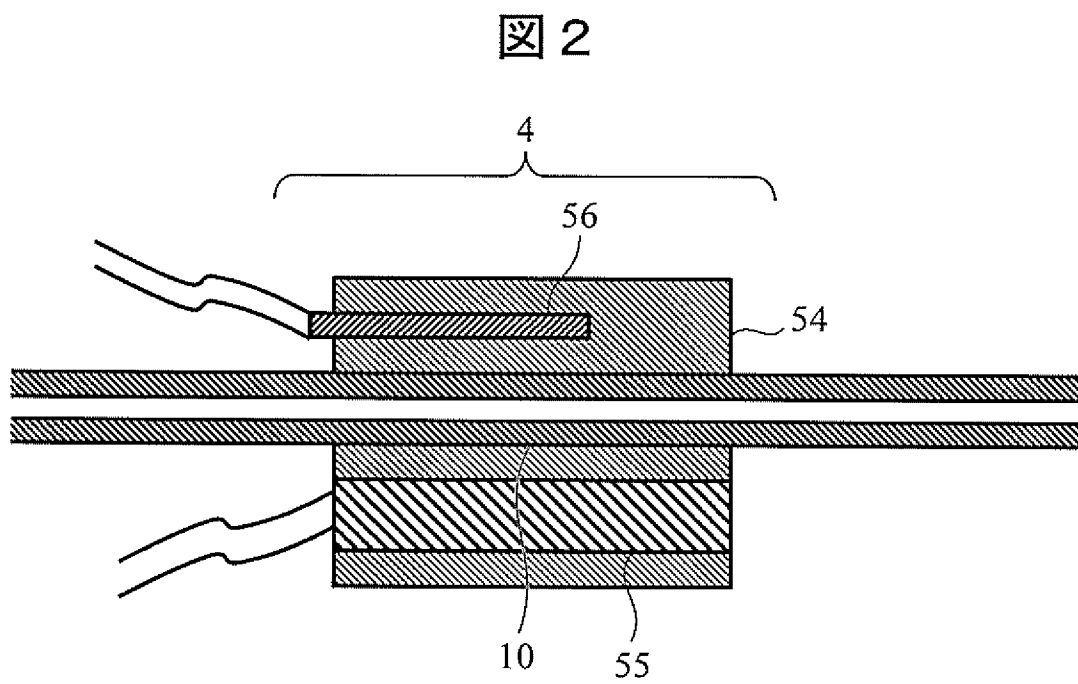
- [請求項1] 配管により接続された送液ポンプ、試料注入部及び分離カラムと、前記試料注入部と前記分離カラムの間の配管を加熱する加熱部と、前記加熱部と前記分離カラムの間に設けられ、前記加熱部により加熱される配管の内部圧力を調節する圧力調節部と、
を有する試料断片化装置。
- [請求項2] 前記加熱部と前記分離カラムの間の配管を冷却する冷却部を有する、請求項1記載の試料断片化装置。
- [請求項3] 前記加熱部は、当該加熱部により加熱された配管を冷却する冷却部を備える、請求項1記載の試料断片化装置。
- [請求項4] 前記冷却部は、溶出用溶媒により前記分離カラムに吸着した試料を溶出する際に、前記加熱部により加熱された配管を前記溶出用溶媒の沸点以下の温度に冷却する、請求項3記載の試料断片化装置。
- [請求項5] 前記圧力調節部は流路切替バルブとコンダクタンス調節部を備え、前記流路切替バルブは前記加熱部に接続される流路を前記分離カラムと前記コンダクタンス調節部との間で切り替える、請求項1記載の試料断片化装置。
- [請求項6] 前記送液ポンプで試料を送り始めてからの経過時間に依存して前記流路切替バルブを切り替える、請求項5記載の試料断片化装置。
- [請求項7] 前記加熱部を備える配管を複数有し、前記流路切替バルブは前記複数の加熱部に接続される流路を前記分離カラムと前記コンダクタンス調節部に順次切り替える、請求項5記載の試料断片化装置。
- [請求項8] 前記圧力調節部は流路切替バルブとコンダクタンス調節部を備え、前記流路切替バルブは前記分離カラムに接続される流路を前記加熱部を通る流路と前記加熱部を通らない流路との間で切り替える、請求項1記載の試料断片化装置。
- [請求項9] 前記送液ポンプで試料を送り始めてからの経過時間に依存して前記流路切替バルブを切り替える、請求項8記載の試料断片化装置。

[請求項10] 前記圧力調節部は、溶出用溶媒により前記分離カラムに吸着した試料を溶出する際に、前記加熱部により加熱された配管の内部圧力を増加させて前記溶出用溶媒の沸騰を防止する、請求項1記載の試料断片化装置。

[図1]

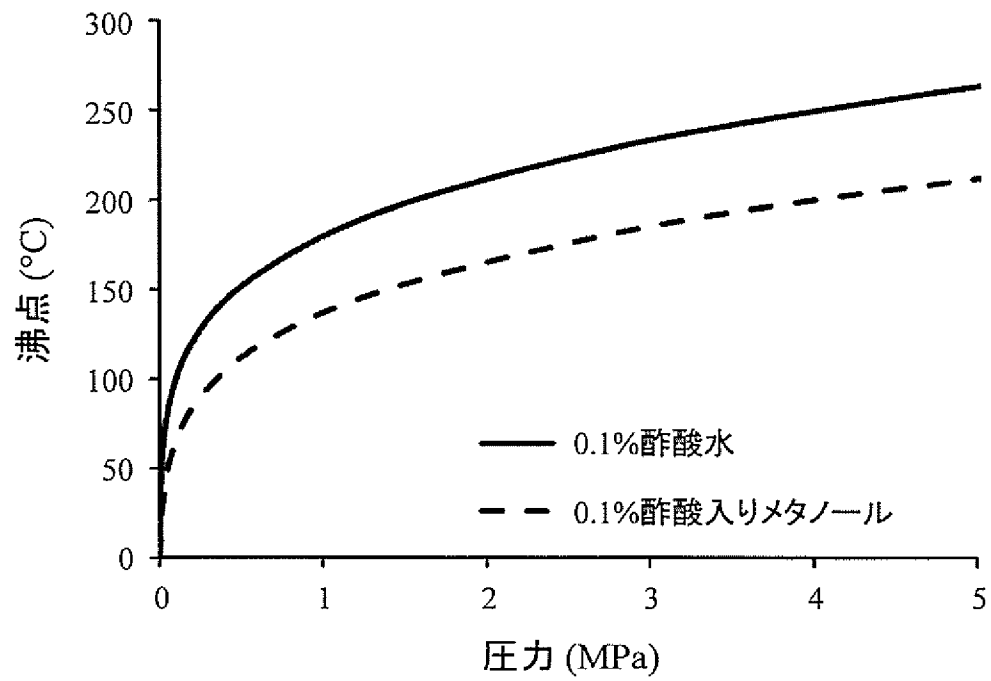


[図2]



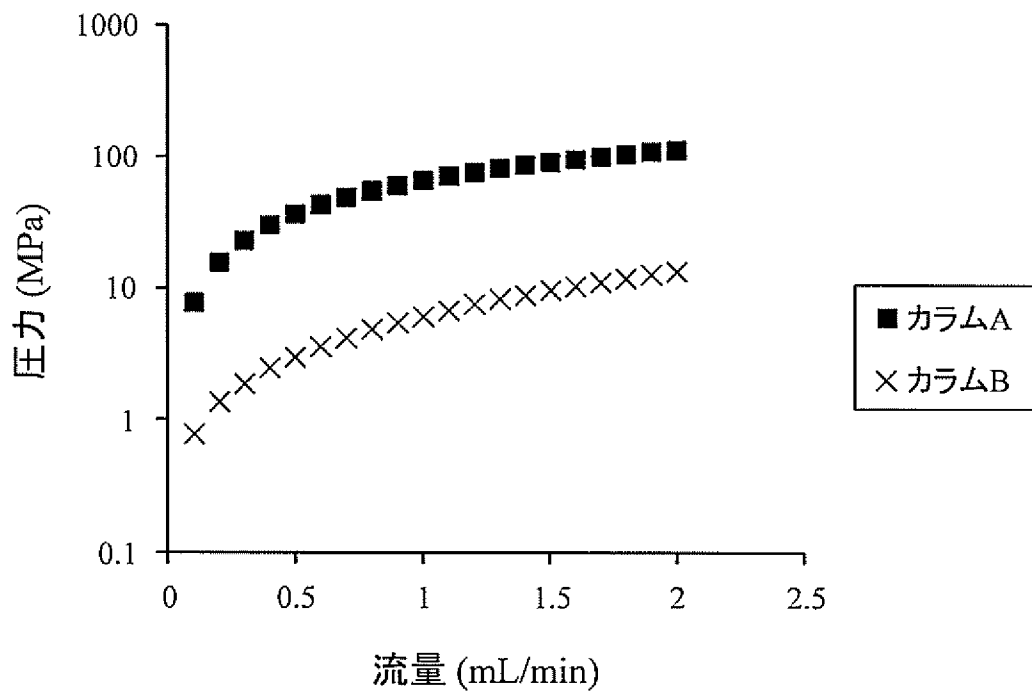
[図3]

図 3



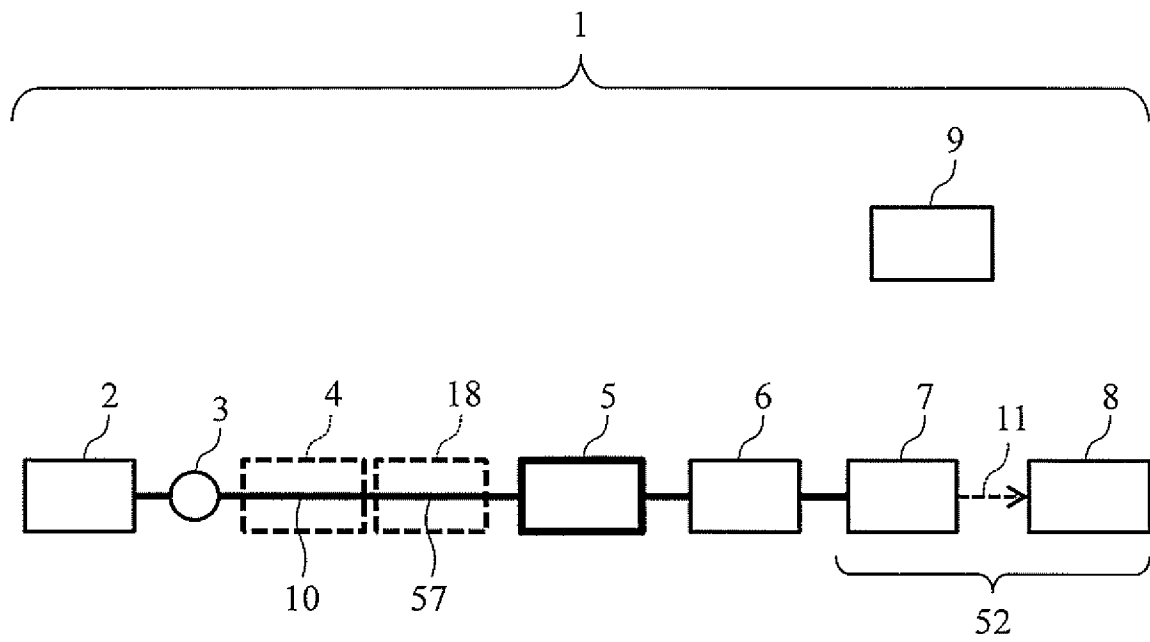
[図4]

図 4



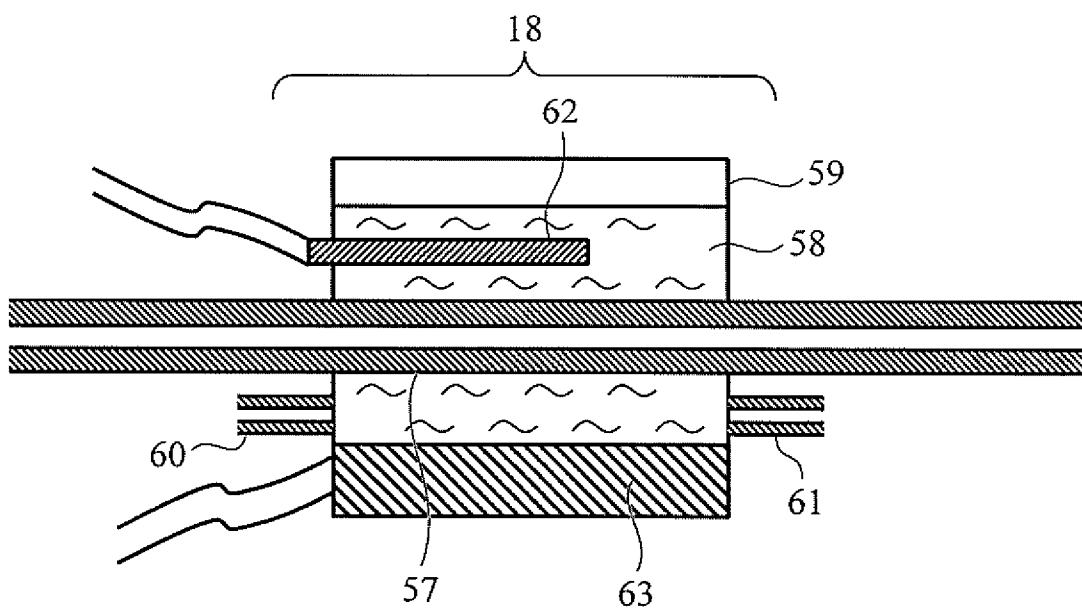
[図5]

図 5



[図6]

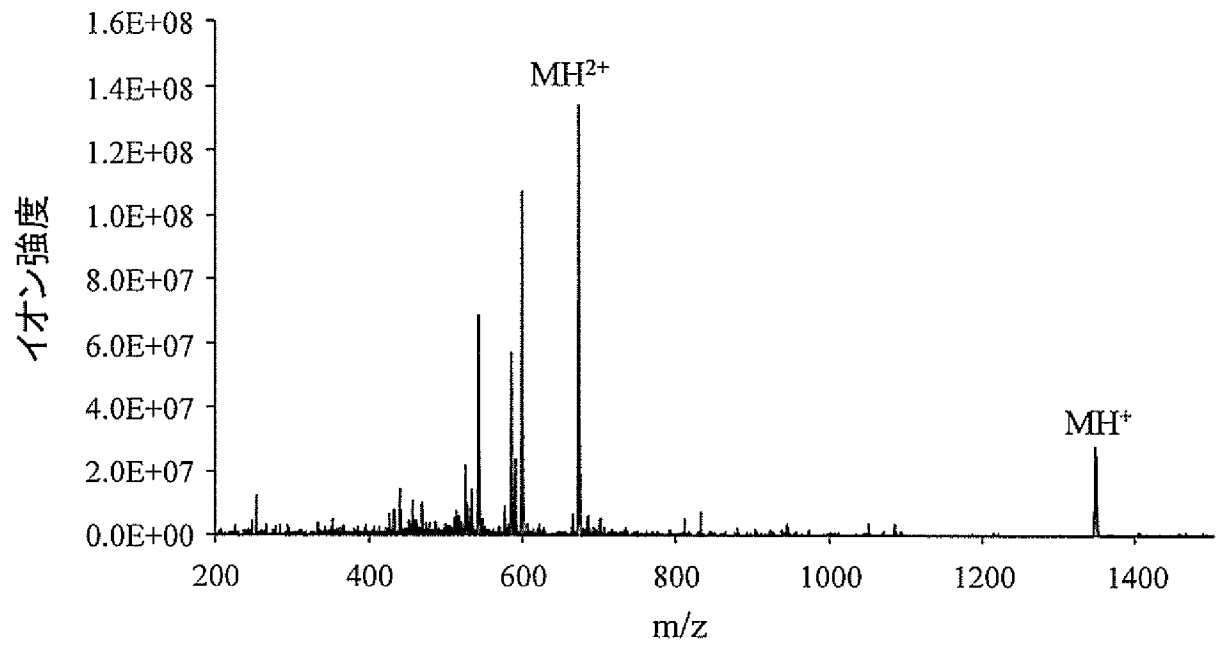
図 6



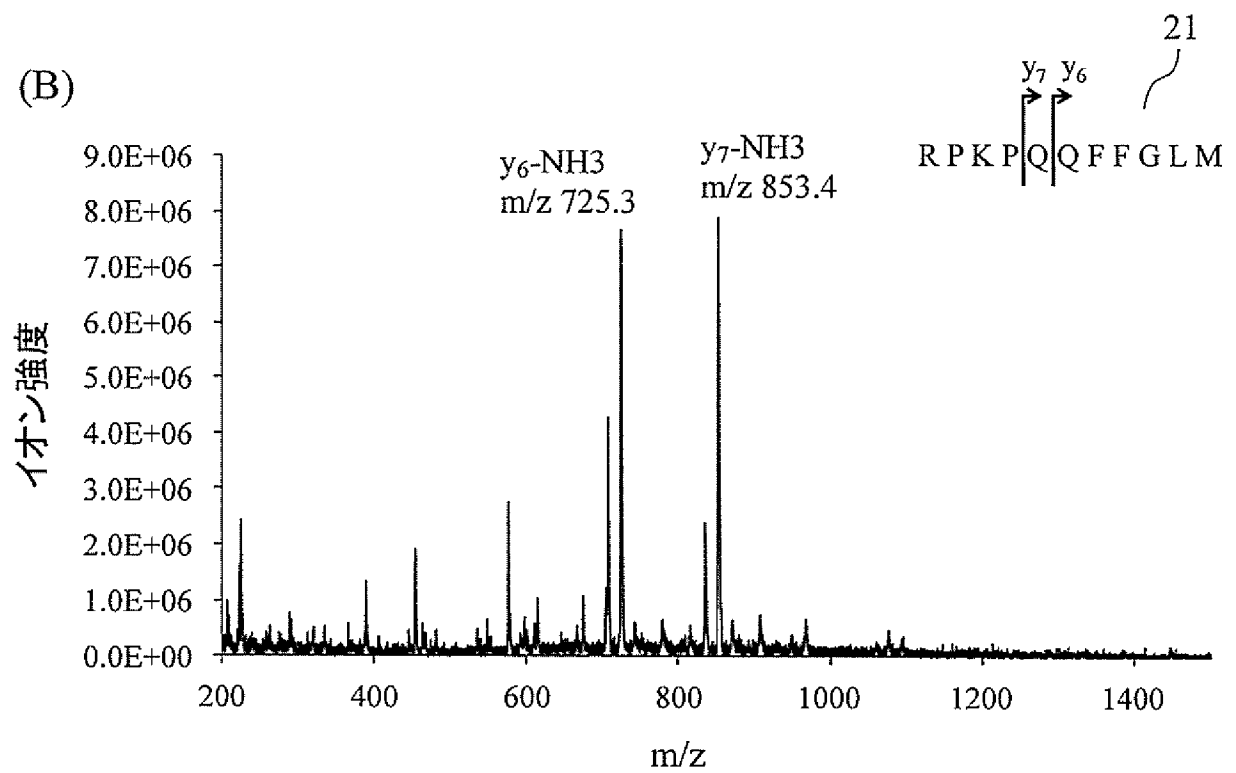
[図7]

図 7

(A)



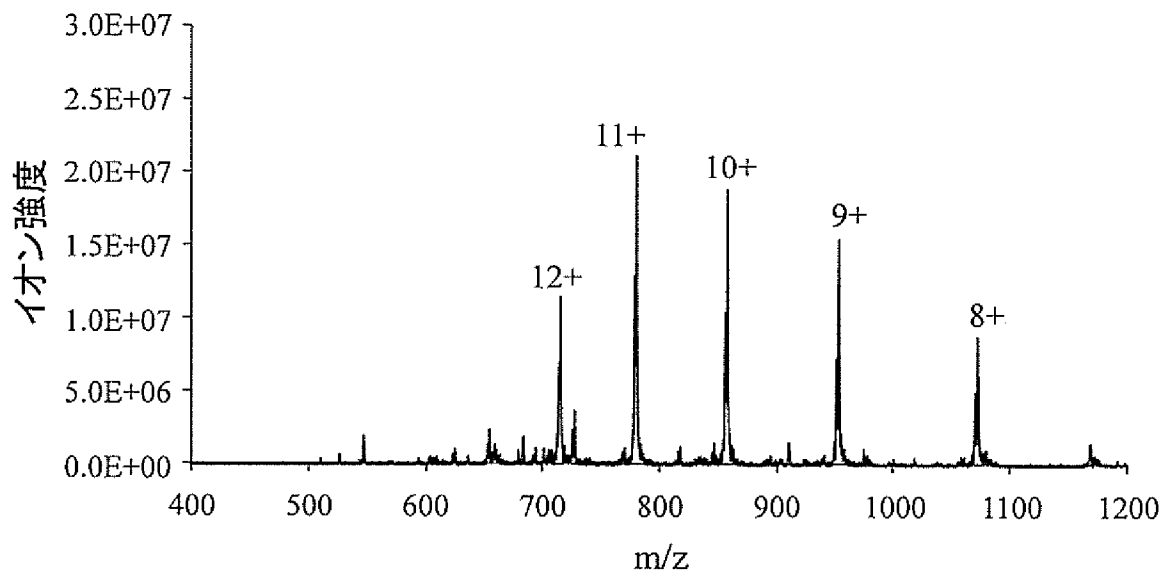
(B)



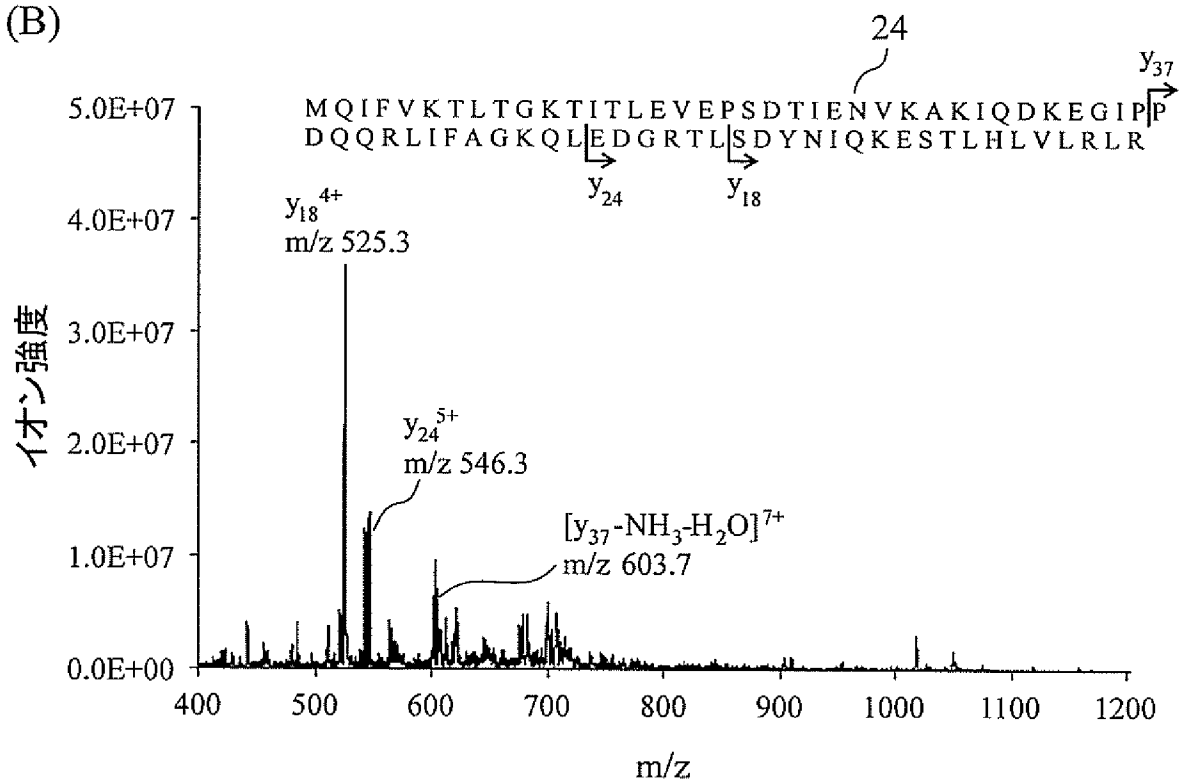
[図8]

図 8

(A)

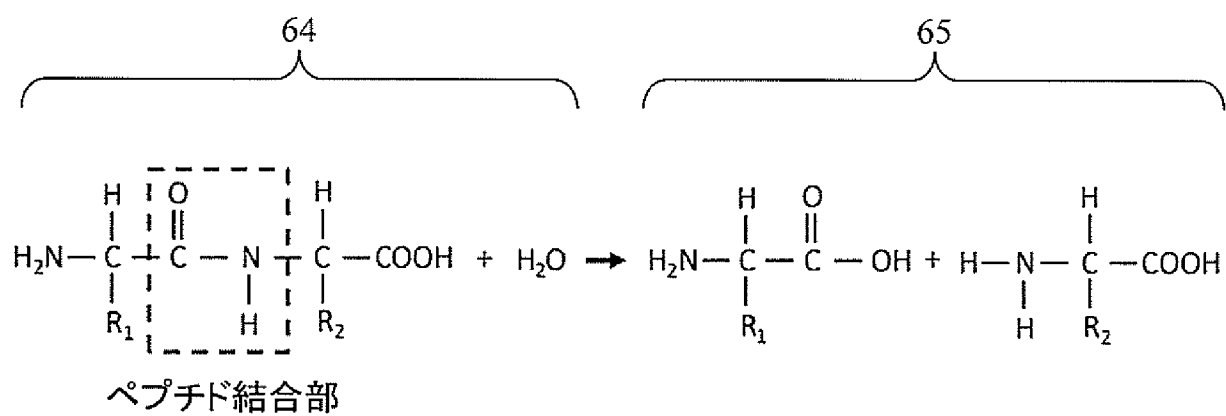


(B)



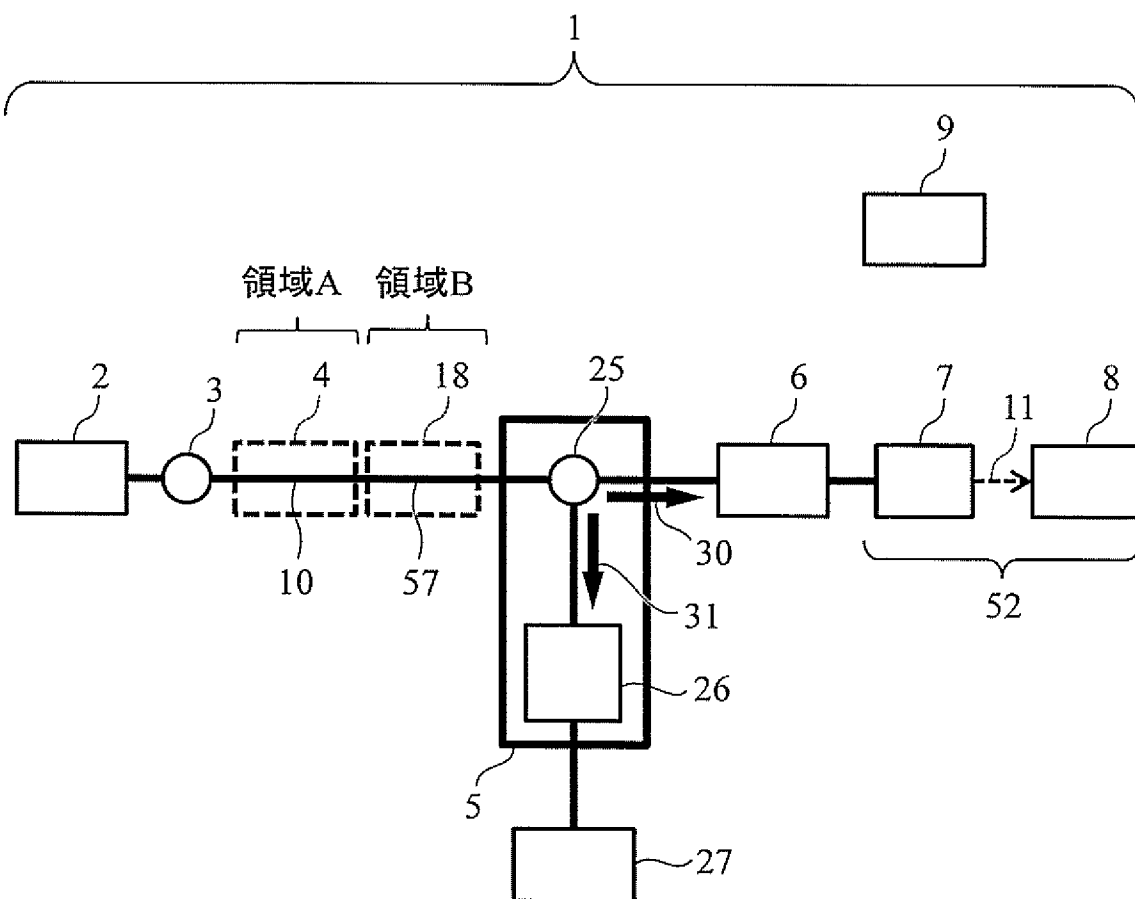
[図9]

図 9



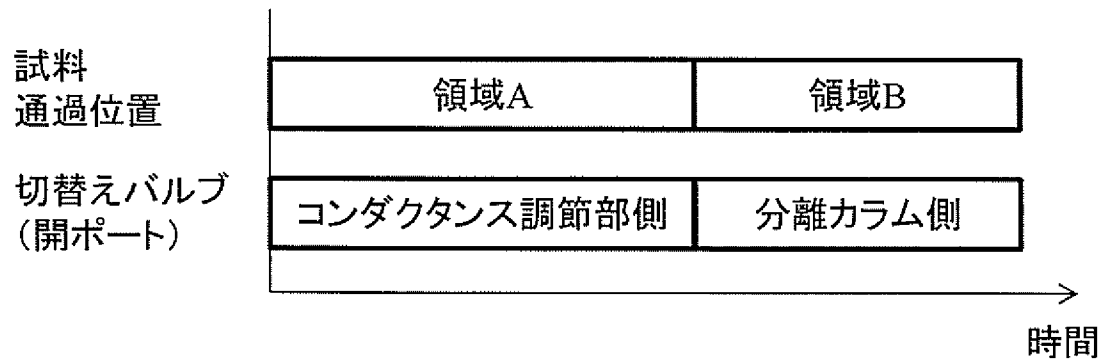
[図10]

図 10



[図11]

図 1 1



[図12]

図 1 2

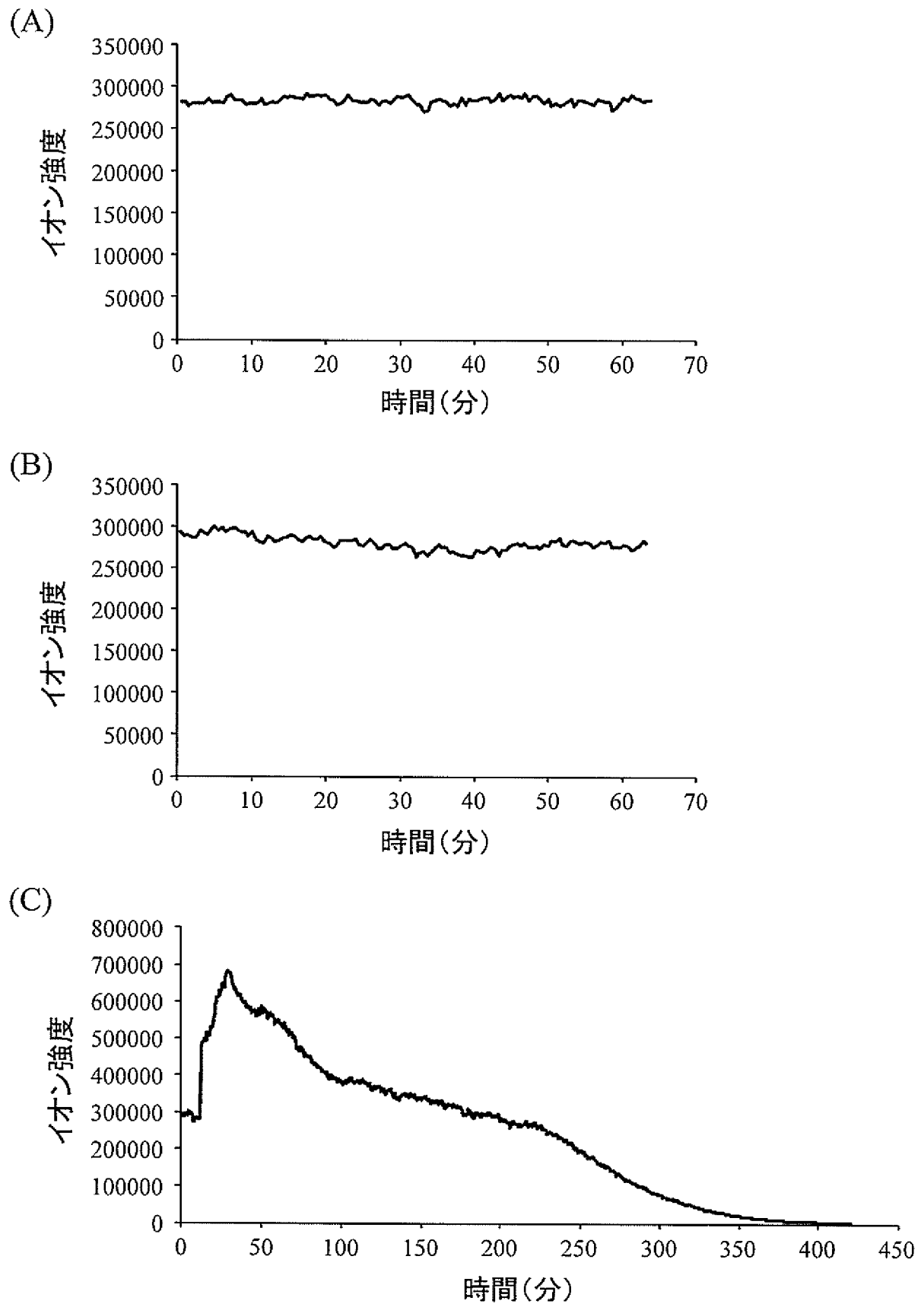
単位 (%)

	移動相A	移動相B
(1) 吸着工程	100	0
(2) 溶出工程	0	100
(3) 洗浄工程	100	0

※移動相A:0.1%酢酸水
 移動相B:0.1%酢酸入りメタノール

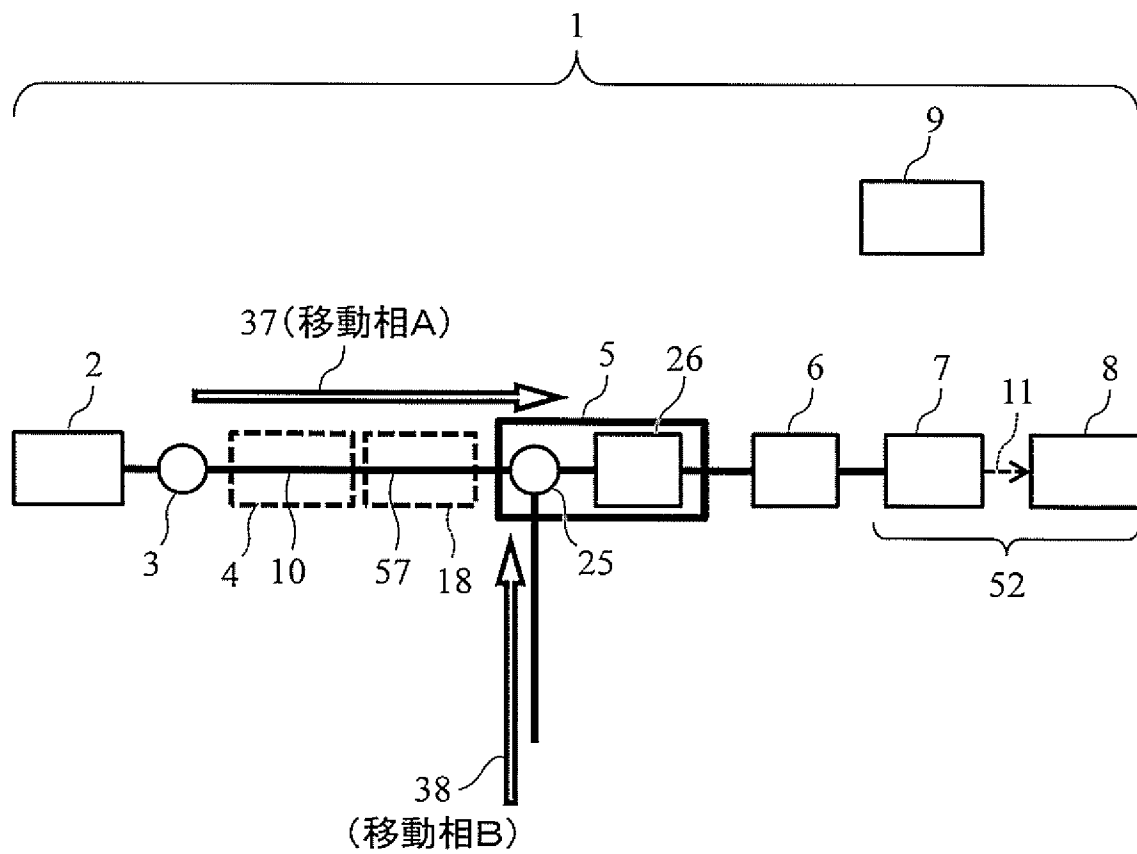
[図13]

図 1 3



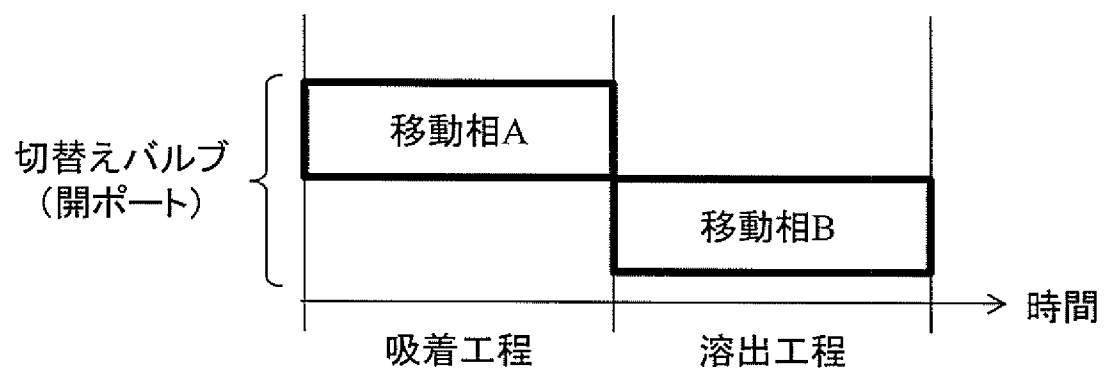
[図14]

図 1 4



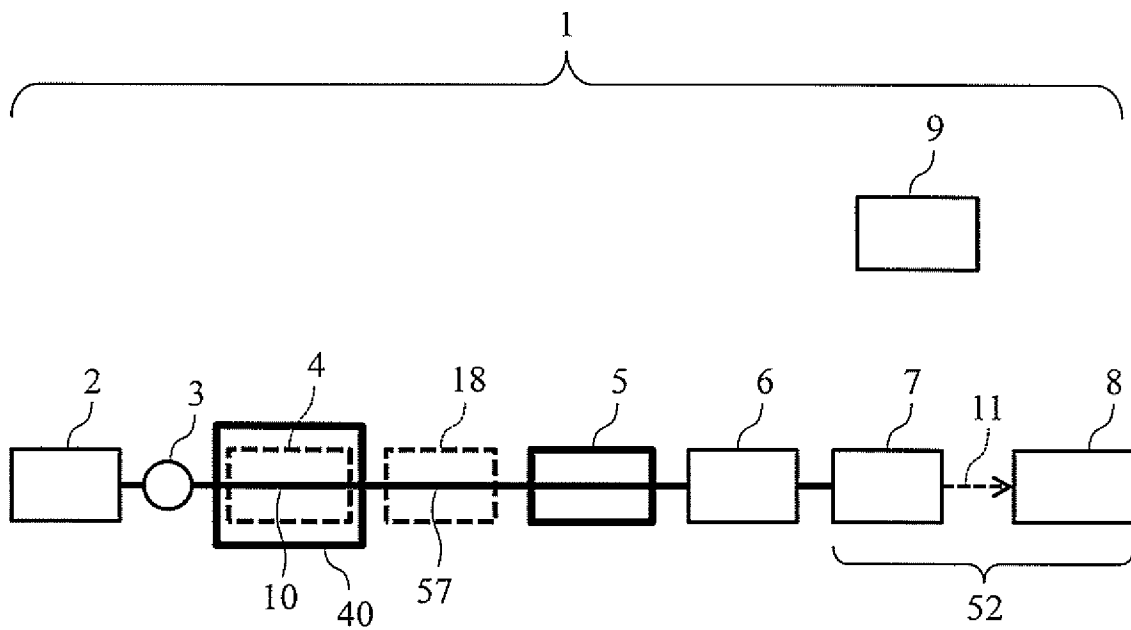
[図15]

図 1 5



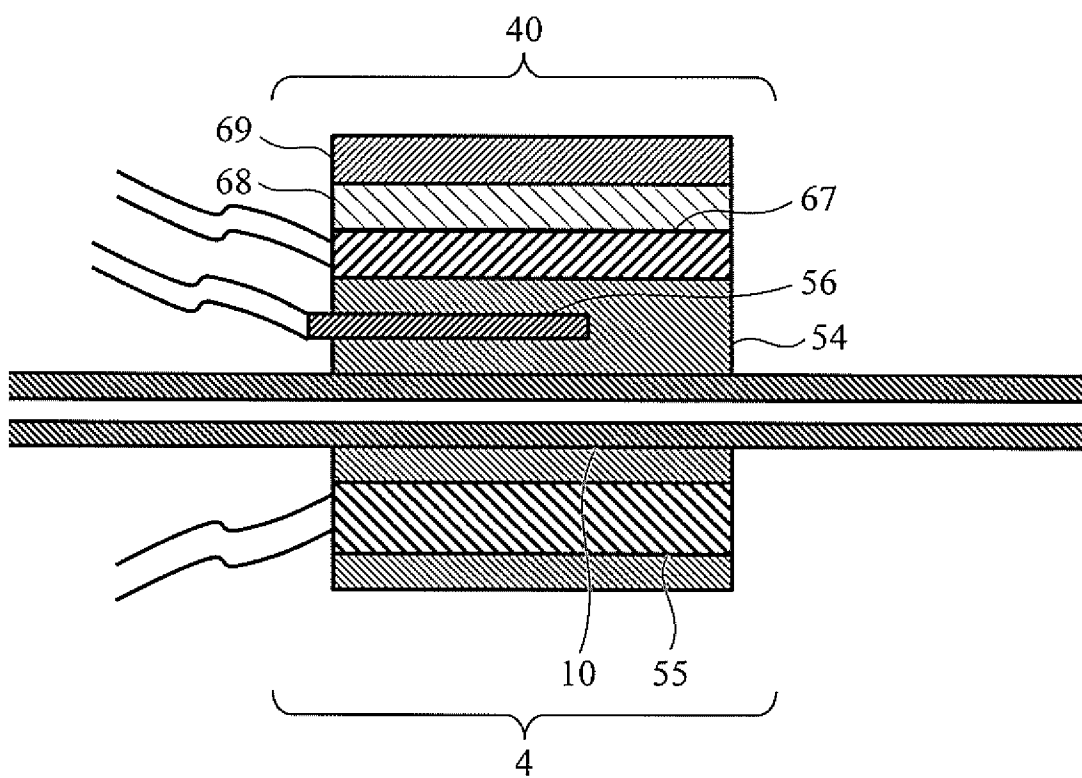
[図16]

図 1 6



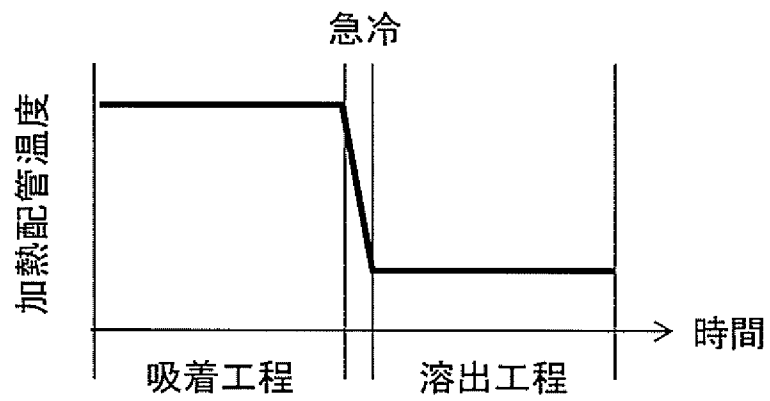
[図17]

図 1 7



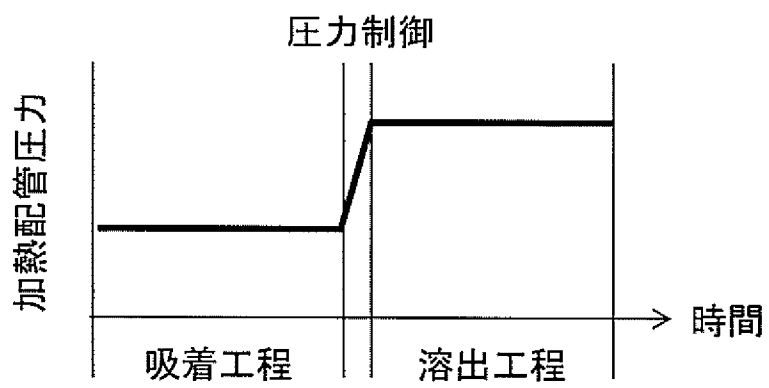
[図18]

図 1 8



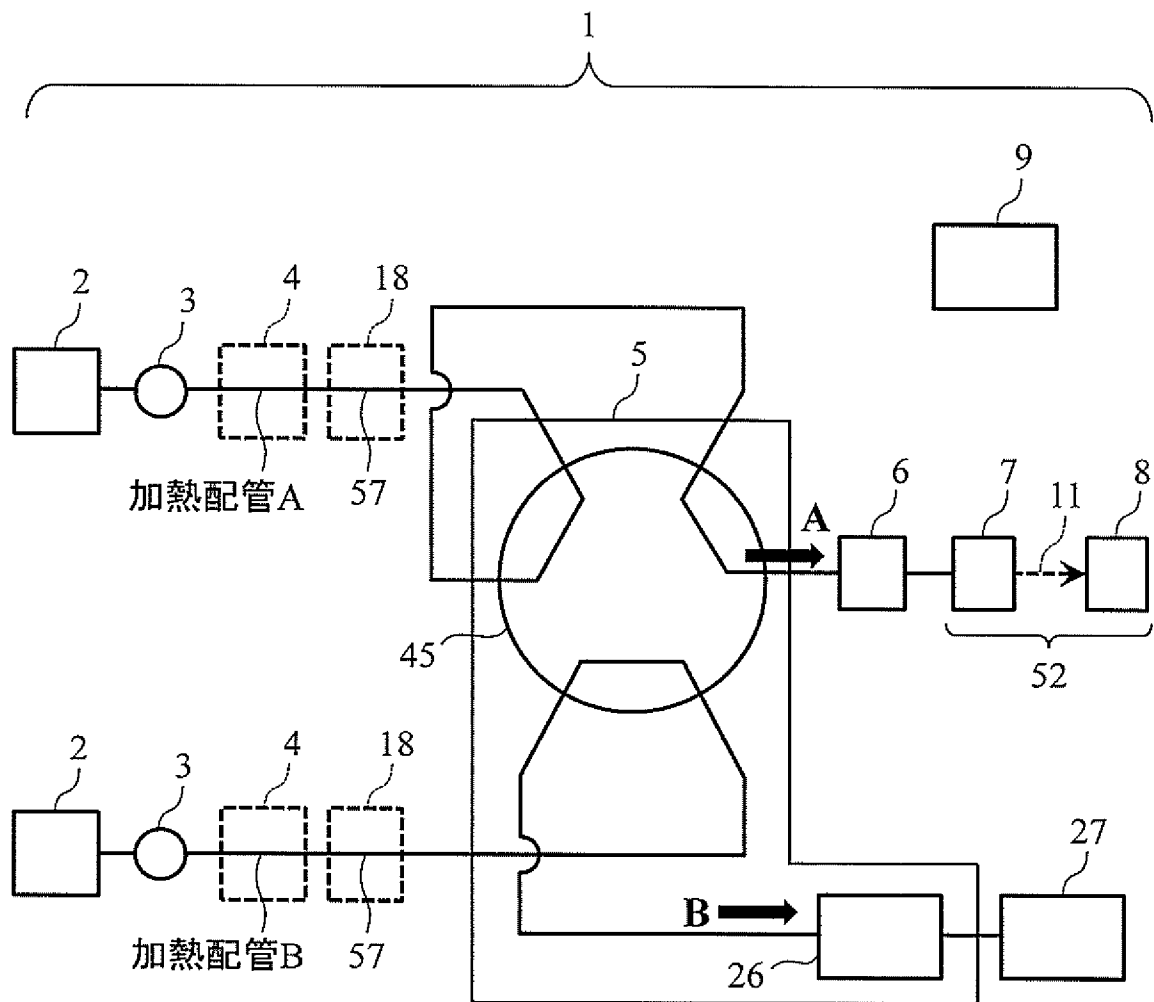
[図19]

図 1 9



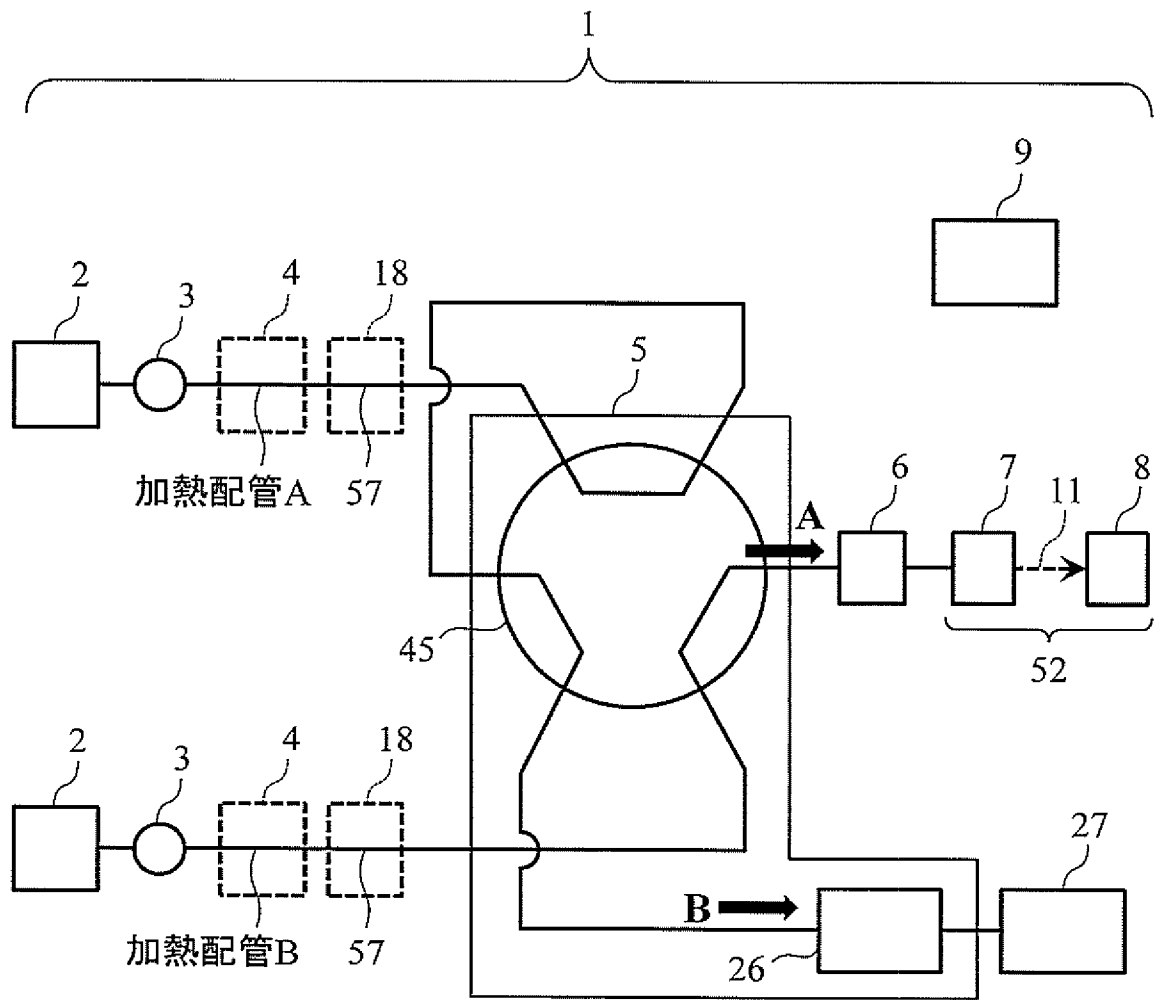
[図20]

図 20



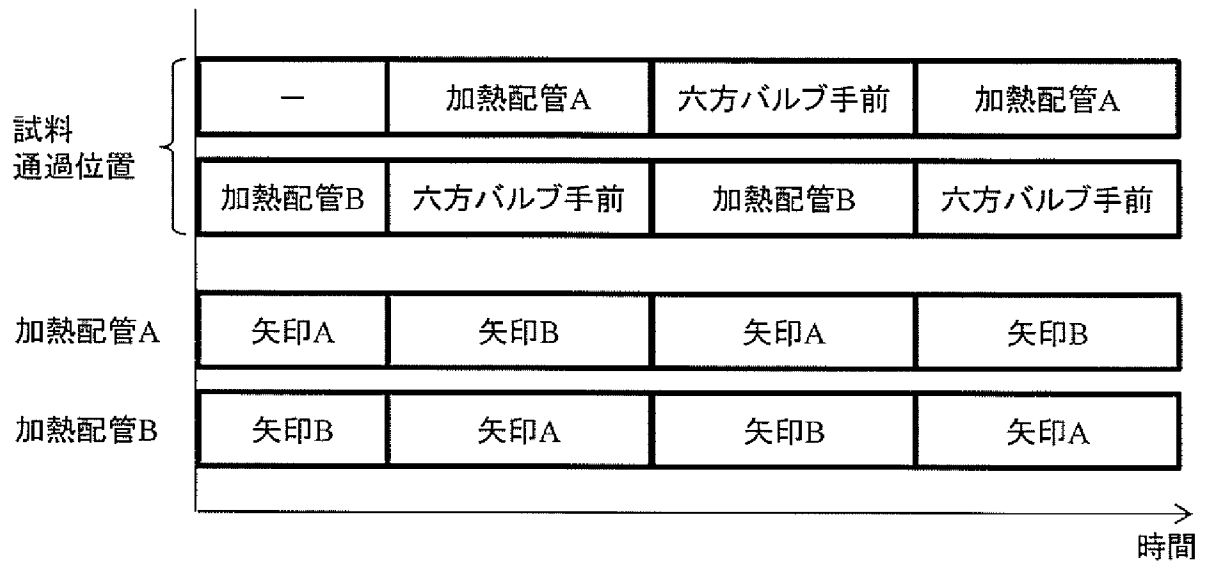
[図21]

図 2 1



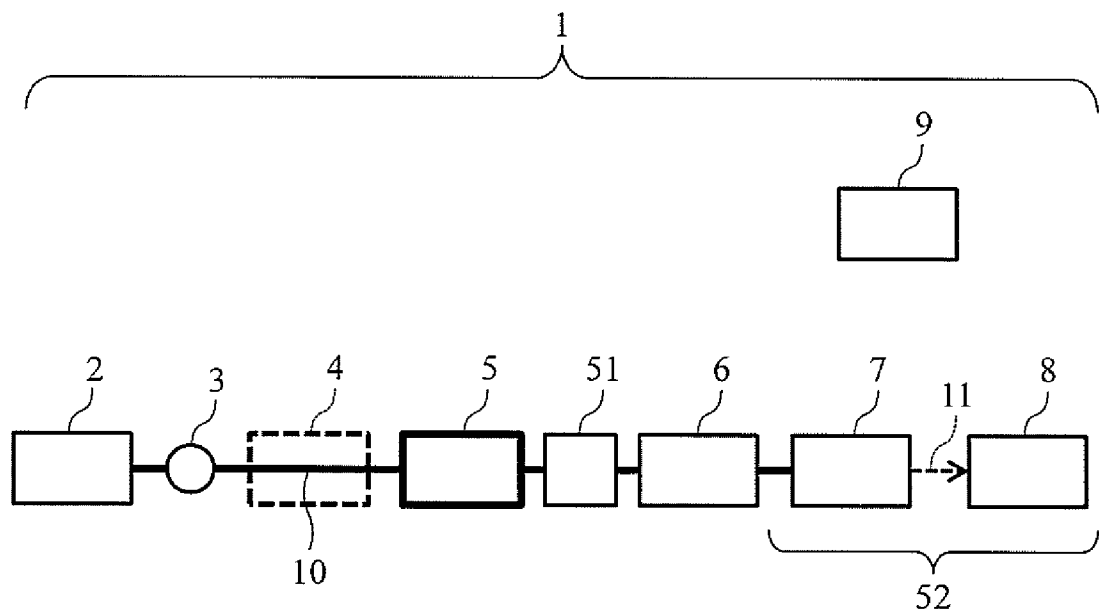
[図22]

図 2 2



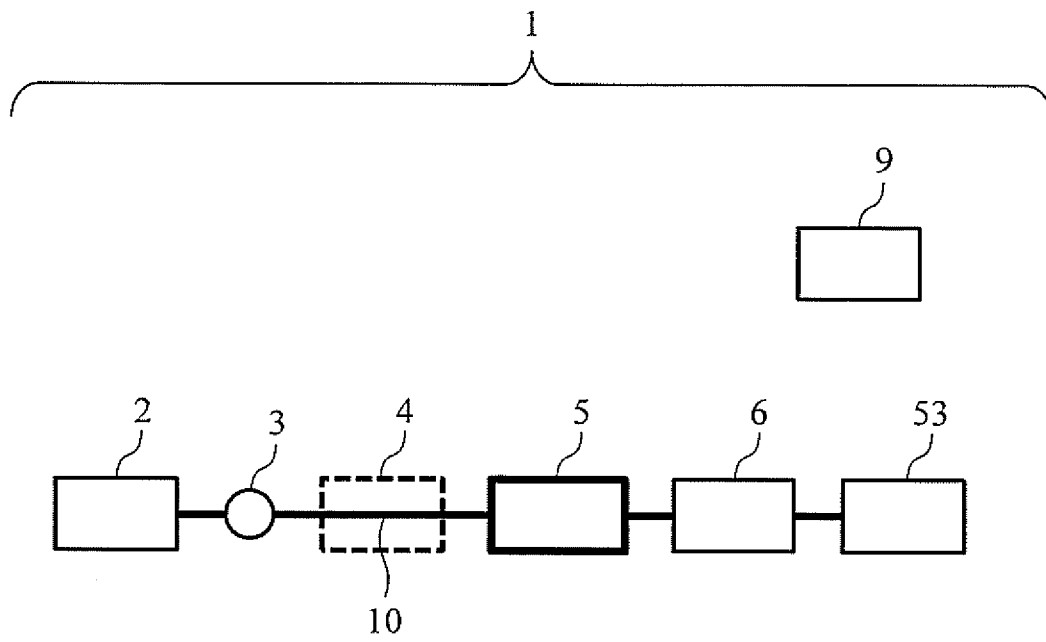
[図23]

図 2 3



[図24]

図 2 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/06(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/30(2006.01)i, G01N30/32(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)n, G01N30/88(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/06, G01N30/26, G01N30/30, G01N30/32, G01N27/62, G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-184068 A (Seiko Instruments Inc.), 05 July 1994 (05.07.1994), paragraphs [0015] to [0025]; fig. 2, 3 (Family: none)	1-10
A	JP 2002-139500 A (Asahi Techneion Co., Ltd.), 17 May 2002 (17.05.2002), paragraphs [0025] to [0026] (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 May 2016 (16.05.16)

Date of mailing of the international search report
24 May 2016 (24.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/06(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/30(2006.01)i, G01N30/32(2006.01)i,
G01N27/62(2006.01)n, G01N30/88(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/06, G01N30/26, G01N30/30, G01N30/32, G01N27/62, G01N30/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 6-184068 A (セイコー電子工業株式会社) 1994. 07. 05, [0015] - [0025]、図 2、3 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2002-139500 A (旭テクネイオン株式会社) 2002. 05. 17, [0025] - [0026] (ファミリーなし)	1-10

❏ C欄の続きにも文献が列挙されている。

❏ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 2016

国際調査報告の発送日

24. 05. 2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 秀直

2 J

5705

電話番号 03-3581-1101 内線 3252