

(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
2020年5月7日(07.05.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/090887 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 27/62 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/042574

(22) 国際出願日: 2019年10月30日(30.10.2019)

(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 2018-207620 2018年11月2日(02.11.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP). 株式会社島津製作所(SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 藤戸 由佳(FUJITO, Yuka); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株

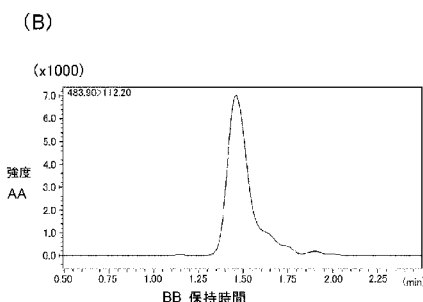
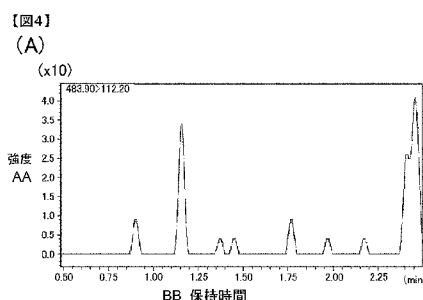
式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 服部 考成(HATTORI, Takanari); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 蓮沼 誠久(HASUNUMA, Tomohisa); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 永井 冬紀, 外(NAGAI, Fuyuki et al.); 〒1080075 東京都港区港南一丁目6番41号 品川クリスタルスクエア 901 永井特許事務所 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) Title: ANALYSIS METHOD, ADSORPTION PREVENTION AGENT, AND ANALYSIS KIT

(54) 発明の名称: 分析方法、吸着防止剤および分析用キット



AA Intensity
BB Retention time

(57) Abstract: This analysis method comprises performing liquid chromatography using a mobile phase containing an adsorption prevention agent for preventing adsorption of a sample containing a compound having a phosphate group on a metal, and performing mass spectrometry on the eluate from the liquid chromatography, the adsorption prevention agent containing an oxalate or a salt thereof.

(57) 要約: 分析方法は、リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤を含む移動相を用いて液体クロマトグラフィーを行うことと、液体クロマトグラフィーの溶出液を質量分析することとを備え、吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含む。

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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：分析方法、吸着防止剤および分析用キット

技術分野

[0001] 本発明は、分析方法、吸着防止剤および分析用キットに関する。

背景技術

[0002] リン酸基を有する化合物は、細胞内等において重要な役割を果たしている。例えば、リン酸基を介したホスフォジエステル結合により核酸塩基が連結されてなる核酸は、遺伝情報をコードする。ヌクレオチドのアデノシン三リン酸（ATP）は、リン酸基同士の結合に蓄えられたエネルギーを利用して、様々な反応に関与する。

[0003] リン酸基を有する化合物の分析は、生体等の機能や疾患の原因となる異常の解析等に重要である。例えば、細胞の代謝物を定量することにより、細胞における物質の生成や分解についての情報を得ることができる。

[0004] 細胞の代謝物の分析のような、複数の化合物を含む試料の分析では、液体クロマトグラフィ／質量分析（以下、適宜LC／MSと呼ぶ）により複数の化合物を分離して分析することが行われている。しかし、試料に含まれる一部の化合物が、液体クロマトグラフの配管等に金属吸着を起こし、このために検出の感度が低下する問題があった。例えば、非特許文献1には、テトラサイクリン系抗生物質が金属吸着により液体クロマトグラフィにおいてテーリングを引き起こすのを防ぐため、シュウ酸を移動相に加える点が記載されている。非特許文献1の方法では、大気圧化学イオン化によりシュウ酸を分解して質量分析計の汚染や目詰まりを防いでいる。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：岡、外2名、「LC／MSによる食品分析」、HPCニュース、林純薬工業株式会社、平成14年1月13日、第28巻、p. 1-11

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 液体クロマトグラフにおいて、従来のギ酸を含む移動相では、ヌクレオチド等のリン酸基を有する化合物が配管等で金属吸着を起こすことがあった。そのため、これらの化合物が分析カラムまで到達せず感度が低下したり、信号対雑音比（S／N比）が悪化して精度が低下する問題があった。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の第1の態様によると、分析方法は、リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤を含む移動相を用いて液体クロマトグラフィを行うことと、前記液体クロマトグラフィの溶出液を質量分析することとを備え、前記吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含む。

本発明の第2の態様によると、第1の態様の分析方法において、前記リン酸基を有する化合物は、核酸、ヌクレオチドおよびこれらの誘導体の少なくとも一つであることが好ましい。

本発明の第3の態様によると、第1または第2の態様の分析方法において、前記試料は、細胞からの抽出物を含むことが好ましい。

本発明の第4の態様によると、第1から第3までのいずれかの態様の分析方法において、前記シュウ酸またはその塩の濃度は、0.1 mM以上50 mM以下であることが好ましい。

本発明の第5の態様によると、第1から第4までのいずれかの態様の分析方法において、前記質量分析では、エレクトロスプレー法により前記試料がイオン化されることが好ましい。

本発明の第6の態様によると、吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含み、液体クロマトグラフィ／質量分析の移動相に添加され、リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐためのものである。

本発明の第7の態様によると、分析用キットは、第6の態様の吸着防止剤を含む。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、液体クロマトグラフィで分離されたヌクレオチド等のリ

ン酸基を有する化合物を、質量分析において感度よく、または精度よく検出することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、一実施形態に係る分析装置を説明するための概念図である。

[図2]図2は、一実施形態に係る分析用キットを模式的に示す概念図である。

[図3]図3は、一実施形態の分析方法の流れを示すフローチャートである。

[図4]図4（A）は、シチジン三リン酸（CTP）を含む試料に対し、ギ酸を含む移動相を用いて液体クロマトグラフィ／タンデム質量分析（LC／MS／MS）を行った際に得られたマススペクトルであり、図4（B）は、CTPを含む試料に対し、シュウ酸を含む移動相を用いてLC／MS／MSを行った際に得られたマススペクトルである。

[図5]図5は、シチジン二リン酸（CDP）を含む試料、および、グアノシン二リン酸（GDP）を含む試料に対し、ギ酸を含む移動相、および、シュウ酸を含む移動相を用いてLC／MS／MSを行った際の試料の検出強度を示す表である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、図を参照して本発明を実施するための形態について説明する。

[0011] ー第1実施形態ー

従来、細胞内の代謝物の分析等、複数の化合物を含む試料をLC／MS（以下、「LC／MS」は2段階以上の質量分析を行う場合も含む）に供する際、イオン化を補助する目的でギ酸を含む移動相を用いていた。しかし、移動相にギ酸を用いる従来の方法では、上述のようにヌクレオチド等のリン酸基を有する化合物が配管等で金属吸着を起こす問題があった。本実施形態の分析方法では、シュウ酸を含む移動相を用いてLC／MSを行うことにより、リン酸基を有する化合物を感度よく分析するものである。

[0012] （試料について）

試料は、リン酸基を有する化合物を含む試料であれば特に限定されない。当該化合物がリン酸基をより多く有する程、金属への吸着性が高まるため本

実施形態の分析方法を好適に適用することができる。分析対象としての重要性から、試料に含まれるリン酸基を有する化合物としては、核酸、ヌクレオチドおよびこれらの誘導体の少なくとも一つが好ましい。当該誘導体は、リン酸基が存在すればその誘導体化の方法は特に限定されない。

[0013] 試料は、生物から採取されたものが、様々な物質を含みLC/MSによる分離分析が効果的に適用される点で好ましい。しかし、人工的に合成された核酸、ヌクレオチドまたはこれらの誘導体等、生物に由来しないものでもよい。試料は、細胞からの抽出物であることが、細胞に含まれる成分をLC/MSにより効果的に分離して分析できるためにより好ましい。試料は細胞の代謝物を含むことが、代謝反応に関わるリン酸基を有する化合物を好適に分析できるためにさらに好ましい。

[0014] (前処理について)

試料の前処理の方法は、分析対象の成分を含むように分析用試料が調製され、LC/MSが所望の精度で行われれば特に限定されない。前処理では、採取された試料から、分析対象の成分を含むように抽出や、濃縮等の精製が適宜行われる。試料が生物に由来する細胞や組織であって代謝物を分析する場合、例えば、破碎等により細胞質成分を分離した後、メタノール・クロロホルム抽出法等により親水性代謝物の抽出を行い、抽出された親水性代謝物の濃縮を行う。得られた溶液は適宜希釈されて液体クロマトグラフに導入される。

[0015] (分析装置について)

本実施形態の分析方法における液体クロマトグラフィおよび質量分析は、液体クロマトグラフー質量分析計を分析装置として行われることが好ましいが、別々に制御された液体クロマトグラフおよび質量分析計を用いた場合でも分析を行うことは可能である。

[0016] 図1は、本実施形態の分析方法に係る分析装置の構成を示す概念図である。分析装置1は、測定部100と、情報処理部40とを備える。測定部100は、液体クロマトグラフ10と、質量分析計20とを備える。

- [0017] 液体クロマトグラフ10は、移動相容器11a、11bと、送液ポンプ12a、12bと、試料導入部13と、分析カラム14とを備える。質量分析計20は、イオン化部211を備えるイオン化室21と、イオンレンズ221を備える第1真空室22aと、イオン化室21から第1真空室22aへイオンを導入する管212と、イオンガイド222を備える第2真空室22bと、第3真空室22cとを備える。第3真空室22cは、第1質量分離部23と、コリジョンセル24と、第2質量分離部25と、検出部30とを備える。コリジョンセル24は、イオンガイド240とCIDガス導入口241とを備える。
- [0018] 情報処理部40は、入力部41と、通信部42と、記憶部43と、出力部44と、制御部50とを備える。制御部50は、装置制御部51と、解析部52と、出力制御部53とを備える。
- [0019] 液体クロマトグラフ10は、導入された試料Sを液体クロマトグラフィにより分離する。液体クロマトグラフ10は、所望の精度で試料を分離することができれば特にその種類は限定されない。液体クロマトグラフ10として、ナノLC、マイクロLC、高速液体クロマトグラフ（HPLC）および超高速液体クロマトグラフ（UHPLC）等を用いることができる。
- [0020] 移動相容器11aおよび11bは、バイアルやボトル等の液体を格納可能な容器を備え、それぞれ異なる組成の移動相を格納する。移動相容器11aおよび11bに格納されている移動相をそれぞれ移動相Aおよび移動相Bと呼ぶ。
- [0021] 移動相Aおよび移動相Bの少なくとも一方は、シュウ酸を含む。移動相Aまたは移動相Bに含まれるシュウ酸の濃度は、0.1mM以上が好ましく、0.5mM以上がより好ましい。シュウ酸の濃度が高い程、リン酸基を有する化合物の金属吸着を大きく抑制することができる。言い換えれば、シュウ酸は、リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤として機能する。シュウ酸の濃度が高すぎると質量分析における感度が低下するため、移動相Aまたは移動相Bに含まれるシュウ酸の濃度は、5

0 mM以下が好ましく、10 mM以下がより好ましい。移動相Aおよび移動相Bのシュウ酸の濃度が略同一であることが好ましい。

なお、移動相は、シュウ酸の塩を含んでもよい。

[0022] 移動相Aおよび移動相Bの溶媒の種類は特に限定されず、水系溶媒と有機溶媒との比が移動相Aと移動相Bとで異なるように移動相の組成が定められる。例えば、移動相Aの溶媒を水とし、移動相Bの溶媒をアセトニトリルとすることができる。

[0023] 送液ポンプ12aおよび12bは、それぞれ移動相Aおよび移動相Bを所定の流量になるように送液する。送液ポンプ12aおよび12bからそれぞれ出力された移動相Aおよび移動相Bは、流路の途中で混合され、試料導入部13へと導入される。送液ポンプ12aおよび12bは、それぞれ移動相Aおよび移動相Bの流量を変化させることにより、時間によって分析カラム14に導入される移動相の組成を変化させる。

[0024] 試料Sの導入等の分析の開始に対応する時点からの各時間における、移動相の組成を示す情報をグラジエントプログラムと呼ぶ。グラジエントプログラムに基づいて送液ポンプ12aおよび12bが制御され、設定された組成の移動相が分析カラム14に導入される。グラジエントプログラムに対応するデータは、記憶部43に記憶されており、装置制御部51が当該データを参照して送液ポンプ12aおよび12bを制御する。

[0025] 試料導入部13は、オートサンプラー等の試料導入装置を備え、前処理により調製された分析用の試料Sを移動相に導入する（矢印A1）。試料導入部13により導入された試料Sは、適宜不図示のガードカラムを通過して分析カラム14に導入される。

[0026] 分析カラム14は、固定相を備え、導入された試料Sに含まれる各成分を、当該成分の移動相と固定相とに対する親和性の違いを利用して異なる保持時間に溶出させる。分析カラム14の種類は、所望の精度で試料Sの各成分を分離することができれば特に限定されないが、PFPP（pentafluorophenylpropyl）カラムが塩基、窒素またはアミン等を好

適に分離する観点から好ましい。PFPFカラムは、固定相にペンタフルオロフェニルプロピル基を含むカラムである。分析カラム14は、充填剤に金属を含むものが試料の金属吸着を起こしやすく、本実施形態の分析方法が好適に適用されるため好ましい。

[0027] 分析カラム14から溶出された溶出液は、質量分析計20のイオン化部211に導入される。分析カラム14の溶出液は、分析装置1のユーザー（以下、単に「ユーザー」と呼ぶ）による分注等の操作を必要とせず、オンライン制御により質量分析計20に入力されることが好ましい。

[0028] 質量分析計20は、分析カラム14から導入された溶出試料に対してタンデム質量分析を行い試料の各成分、特にリン酸基を有する化合物に対応するイオンを分析対象として検出する。溶出試料がイオン化されて得られた試料イオンSiの経路を、一点鎖線の矢印A2により模式的に示した。ここで、試料イオンSiは、試料イオンSiの解離により生じたイオンも含んで指すこととする。

なお、質量分析計20の各部の構成は、試料イオンSiを所望の精度で検出可能であれば特に限定されない。

[0029] 質量分析計20のイオン化部211は、導入された溶出試料をイオン化する。イオン化の方法は、所望の精度で分析対象の成分が検出される程度に溶出試料がイオン化されれば特に限定されないが、本実施形態のようにLC/MS/MSを行う場合にはエレクトロスプレー法（ESI）が好ましく、以下の実施形態でもESIを行うものとして説明する。イオン化部211から出射され生成された試料イオンSiは、イオン化室21と第1真空室22aとの間の圧力差等により移動し、管212を通過して第1真空室22aに入射する。

[0030] 第1真空室22a、第2真空室22bおよび第3真空室22cは、不図示の真空ポンプによりそれぞれ排気され、この順に真空度が高くなっており、第3真空室22cでは例えば 10^{-2} Pa以下等の高真空まで排気されている。第1真空室22aに入射したイオンは、イオンレンズ221を通過して第

2 真空室 2 2 b に導入される。第 2 真空室 2 2 b に入射したイオンは、イオンガイド 2 2 2 の間を通過して第 3 真空室 2 2 c に導入される。第 3 真空室 2 2 c に導入されたイオンは、第 1 質量分離部 2 3 へと出射される。第 1 質量分離部 2 3 に入射するまでの間に、イオンレンズ 2 2 1 やイオンガイド 2 2 2 等は、通過するイオンを電磁気学的作用により収束させる。

[0031] 第 1 質量分離部 2 3 は、四重極マスフィルタを備え、四重極マスフィルタに印加される電圧に基づく電磁気学的作用により、設定された m/z （一定の係数の違いを除き質量電荷比に対応）を有するイオンをプリカーサーイオンとして選択的に通過させてコリジョンセル 2 4 に向けて出射する。第 1 質量分離部 2 3 は、分析対象の試料イオン S_i をプリカーサーイオンとして選択的に通過させる。

[0032] コリジョンセル 2 4 は、イオンガイド 2 4 0 によりイオンの移動を制御しながら、衝突誘起解離（Collision Induced Dissociation; CID）により分析対象の試料イオン S_i を解離させ、フラグメントイオンを生成する。CID の際にイオンが衝突させられるアルゴンや窒素等を含むガス（以下、CID ガスと呼ぶ）は、コリジョンセル内で所定の圧力になるように CID ガス導入口 2 4 1 から導入される（矢印 A 3）。生成されたフラグメントイオンを含む試料イオン S_i は、第 2 質量分離部 2 5 に向けて出射される。

[0033] 第 2 質量分離部 2 5 は、四重極マスフィルタを備え、四重極マスフィルタに印加される電圧に基づく電磁気学的作用により、設定された m/z を有するフラグメントイオンを選択的に通過させて検出部 3 0 に向けて出射する。

[0034] 検出部 3 0 は、二次電子増倍管や光電子増倍管等のイオン検出器を備え、入射したフラグメントイオンを検出する。検出モードは正イオンを検出する正イオンモードと、負イオンを検出する負イオンモードとのいずれでもよい。フラグメントイオンを検出して得た検出信号は不図示の A/D 変換器により A/D 変換され、デジタル信号となって情報処理部 4 0 の制御部 5 0 に測定データとして入力される（矢印 A 4）。

[0035] 情報処理部４０は、電子計算機等の情報処理装置を備え、適宜ユーザーとのインターフェースとなる他、様々なデータに関する通信、記憶、演算等の処理を行う。情報処理部４０は、測定部１００の制御や、解析、表示の処理を行う情報処理装置となる。

なお、情報処理部４０は、液体クロマトグラフ１０および質量分析計２０と一体になった一つの装置として構成してもよい。また、本実施形態の分析方法に用いるデータの一部は遠隔のサーバ等に保存してもよく、当該分析方法で行う演算処理の一部は遠隔のサーバ等で行ってもよい。測定部１００の各部の動作の制御は、情報処理部４０が行ってもよいし、各部を構成する装置がそれぞれ行ってもよい。

[0036] 情報処理部４０の入力部４１は、マウス、キーボード、各種ボタンおよび／またはタッチパネル等の入力装置を含んで構成される。入力部４１は、検出するイオンの m/z の値等の制御部５０が行う処理に必要な情報等を、ユーザーから受け付ける。

[0037] 情報処理部４０の通信部４２は、インターネット等のネットワークを介して無線や有線の接続により通信可能な通信装置を含んで構成される。通信部４２は、測定部１００の測定に必要なデータを受信したり、解析部５２の解析結果等の制御部５０が処理したデータを送信したり、適宜必要なデータを送受信する。

[0038] 情報処理部４０の記憶部４３は、不揮発性の記憶媒体を備える。記憶部４３は、測定部１００から出力された測定データ、および制御部５０が処理を実行するためのプログラム等を記憶する。

[0039] 情報処理部４０の出力部４４は、出力制御部５３により制御され、液晶モニタ等の表示装置およびプリンターの少なくとも一つを含んで構成され、測定部１００の測定に関する情報や、解析部５２の解析結果に対応する情報等を、表示装置に表示したり印刷媒体に印刷して出力する。

[0040] 情報処理部４０の制御部５０は、ＣＰＵ等のプロセッサを含んで構成される。制御部５０は、測定部１００の制御や、測定部１００から出力された測

定データを解析する等、記憶部 4 3 等に記憶されたプログラムを実行することにより各種処理を行う。

[0041] 処理部 5 0 の装置制御部 5 1 は、入力部 4 1 を介した入力等に応じて設定された分析条件等に基づいて、測定部 1 0 0 の測定動作を制御する。装置制御部 5 1 は、送液ポンプ 1 2 a および 1 2 b の流量を制御したり、コリジョンセル 2 4 での解離を制御したり、第 1 質量分離部 2 3 および第 2 質量分離部 2 5 で選択的に通過させるイオンの m/z 値を制御したり等する。

[0042] 解析部 5 2 は、測定部 1 0 0 から出力された測定データに基づいて試料における分析対象の成分の定量等の解析を行う。解析部 5 2 は、検出部 3 0 から出力された測定データから分析対象の成分に対応する検出強度を取得して記憶部 4 3 等に記憶させる。

[0043] 解析部 5 2 は、内部標準を測定した場合、分析対象の成分に対応する検出強度を、内部標準に対応する検出強度で割った比に、導入された当該内部標準の濃度を掛けた値を、各成分の量として算出する。内部標準を用いない場合は、基準となる物質または物質群の検出強度で規格化等した規格化強度を算出してもよい。また、解析部 5 2 は、保持時間と検出強度とを対応させたクロマトグラムに対応するデータを作成する。

なお、解析部 5 2 による解析の方法は特に限定されない。

[0044] 出力制御部 5 3 は、分析条件についての情報や、解析部 5 2 の解析により得られた情報等を含む出力画像を作成し、出力部 4 4 に出力させる。

[0045] (分析用キット)

図 2 は、本実施形態の分析方法に用いられる分析用キットを模式的に示す図である。分析用キット 9 は、リン酸基を有する化合物を含む試料 S の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤 9 0 を備え、吸着防止剤 9 0 は、シュウ酸またはその塩を含む。吸着防止剤 9 0 は、バイアル 9 1 に格納されているが、吸着防止剤 9 0 を格納する容器の種類、大きさおよび形状は特に限定されない。

なお、分析用キット 9 は、吸着防止剤 9 0 の他に液体クロマトグラフィや

質量分析に用いられる任意の消耗品等を含むことができる。

[0046] 図3は、本実施形態の分析方法の流れを示すフローチャートである。ステップS1001において、分析者やユーザー等により、試料Sが用意される。ステップS1001が終了したら、ステップS1003が開始される。ステップS1003において、分析者やユーザー等により、試料の前処理が行われる。ステップS1003が終了したら、ステップS1005が開始される。

[0047] ステップS1005において、液体クロマトグラフ10は、シュウ酸またはその塩を含む移動相を用いて、試料Sを液体クロマトグラフィにより分離する。ステップS1005が終了したら、ステップS1007が開始される。ステップS1007において、質量分析計20は、液体クロマトグラフィに供した試料Sを質量分析する。ステップS1007が終了したら、ステップS1009が開始される。

[0048] ステップS1009において、解析部52は、質量分析により得られた測定データの解析を行う。ステップS1009が終了したら、ステップS1011が開始される。ステップS1011において、出力部44は、解析により得られた情報を出力する。ステップS1011が終了したら、処理が終了される。

[0049] 上述の実施の形態によれば、次の作用効果が得られる。

(1) 本実施形態の分析方法は、リン酸基を有する化合物を含む試料Sの金属への吸着を防ぐための吸着防止剤を含む移動相を用いて液体クロマトグラフィを行うことと、液体クロマトグラフィの溶出液を質量分析することとを備え、吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含む。これにより、液体クロマトグラフィにおいてヌクレオチド等のリン酸基を有する化合物の金属吸着を抑制し、質量分析において感度よく、または精度よくこれらの化合物を検出することができる。

[0050] (2) 本実施形態の分析方法において、質量分析では、エレクトロスプレー法により試料Sがイオン化される。これにより、生体等に含まれる様々な分

子量の分子を、壊さずに好適にイオン化することができる。

[0051] (3) 本実施形態に係る吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含み、液体クロマトグラフィ／質量分析の移動相に添加され、リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐためのものである。これにより、液体クロマトグラフィにおいてヌクレオチド等のリン酸基を有する化合物の金属吸着を抑制し、質量分析において感度よくまたは精度よくこれらの化合物を検出することができる。

[0052] (4) 本実施形態に係る分析用キットは、吸着防止剤 90 を含む。これにより、上述の分析を迅速に行うことができる。

[0053] 次のような変形も本発明の範囲内であり、上述の実施形態と組み合わせることが可能である。以下の変形例において、上述の実施形態と同様の構造、機能を示す部位に関しては、同一の符号で参照し、適宜説明を省略する。

(変形例 1)

上述の実施形態の分析装置 1 はトリプル四重極質量分析計としたが、質量分析部 20 の構成は特に限定されない。質量分析部 20 は、1 つの質量分析器からなる質量分離部を備えてもよいし、上述の実施形態とは異なる組合せの 2 以上の質量分析器からなる質量分離部を備えてもよい。例えば、分析装置 1 は、イオントラップや飛行時間型の質量分離部を含んで構成することができる。

[0054] 解離の方法も上述の C I D に限定されず、光誘起解離、電子捕獲解離、または電子移動解離等、分析装置 1 の種類や分析対象の分子の特性に合わせて適宜選択することができる。

[0055] 本発明は上記実施形態の内容に限定されるものではない。本発明の技術的思想の範囲内で考えられるその他の態様も本発明の範囲内に含まれる。

実施例

[0056] 以下の実施例では、既知の濃度のヌクレオチドを含む試料に対し、ギ酸を含む移動相およびシュウ酸を含む移動相をそれぞれ用いて LC/MS/MS を行った結果が説明される。

なお、本発明は、以下の実施例に示された数値、条件に限定されない。

[0057] (比較例 1)

比較例 1 では、0.1 体積%のギ酸が添加された移動相を用いて、0.1 μ M CTP 溶液を分析した。

[0058] 液体クロマトグラフィの条件

分析用試料を、以下の条件で液体クロマトグラフィで分離した。

システム：Nexera X2 (Shimadzu)

分析カラム：Discovery HS F5-3 (Sigma-Aldrich) (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μ m)

注入量：3 μ L

カラム温度：40 °C

移動相：

(A) 0.1 %ギ酸 (水に溶解)

(B) 0.1 %ギ酸 (アセトニトリルに溶解)

流速：0.25 mL/min

グラジエントプログラム：

時間 (分)	移動相 B の濃度 (%)
0	0
2	0
5	25
11	35
15	95
20	95
20.1	0
35	0

[0059] 質量分析の条件

上記液体クロマトグラフィにおいて溶出された溶出試料を、溶出口に直接接続したタンデム質量分析により検出した。

システム：LCMS-8050 (Shimadzu)

イオン化の方法：エレクトロスプレー法、正イオンモード

測定モード：多重反応モニタリング (MRM)

温度：

脱溶媒管 (Desolvation Line; DL) 温度：250℃

ヒートブロック温度：400℃

インターフェイス温度：300℃

ガス流量：

ネブライザーガス流量：3.0 L/min

ドラインガス流量：10.0 L/min

ヒーティングガス流量：10.0 L/min

[0060] CTPに対応するイオンとして、 m/z 483.90のプリカーサーイオンを分離し、CIDに供した後、 m/z 112.20のプロダクトイオンを分離して検出した。

[0061] 図4 (A) は、比較例1の質量分析により得られたマスキロマトグラムである。各ピークの強度は非常に小さく、実質的にCTPを検出することはできなかった。

[0062] (実施例1)

実施例1では、10 mMのシュウ酸が添加された移動相を用いて、0.1 μ M CTP溶液を分析した。

[0063] 液体クロマトグラフィーの条件

分析用試料を、以下の条件で液体クロマトグラフィーで分離した。

システム：Nexera X2 (Shimadzu)

分析カラム：Discovery HS F5-3 (Sigma-Aldrich) (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒径3 μ m)

注入量：3 μ L

カラム温度：40℃

移動相：

(A) 10 mM シュウ酸 (水に溶解)

(B) 10 mM シュウ酸 (アセトニトリルに溶解)

流速: 0.3 mL/min

グラジエントプログラム:

時間 (分)	移動相 B の濃度 (%)
0	0
3	0
9	100
13	100
13.01	0
17	0

[0064] 質量分析の条件

上記液体クロマトグラフィにおいて溶出された溶出試料を、溶出口に直接接続したタンデム質量分析により検出した。

システム: LCMS-8050 (Shimadzu)

イオン化の方法: エレクトロスプレー法、正イオンモード

測定モード: MRM

温度:

脱溶媒管 (DL) 温度: 250°C

ヒートブロック温度: 400°C

インターフェイス温度: 300°C

ガス流量:

ネブライザーガス流量: 3.0 L/min

ドラインガス流量: 10.0 L/min

ヒーティングガス流量: 10.0 L/min

[0065] CTP に対応するイオンとして、 m/z 483.90 のプリカーサーイオンを分離し、CID に供した後、 m/z 112.20 のプロダクトイオンを分離して検出した。

[0066] 図4（B）は、実施例1の質量分析により得られたマスキロマトグラムである。実施例1では、比較例1の各ピークに比べると非常に大きな、CTPに対応するピークを検出することができた。また、実施例1ではノイズの顕著な増加も観察されず、S/N比も上昇した。

[0067] （比較例2）

比較例2では、0.1体積%のギ酸が添加された移動相を用い、比較例1の場合と略同様の条件で、0.1 μ M シチジン二リン酸（CDP）溶液および0.1 μ M グアノシン二リン酸（GDP）溶液をそれぞれ分析した。質量分析ではCDPおよびGDPをそれぞれ検出するようにトランジションを設定した。

[0068] （実施例2）

実施例2では、10mMのシュウ酸が添加された移動相を用い、実施例1の場合と略同様の条件で、0.1 μ M CDP溶液および0.1 μ M GDP溶液をそれぞれ分析した。質量分析ではCDPおよびGDPをそれぞれ検出するようにトランジションを設定した。

[0069] 図5は、比較例2および実施例2の結果を示す表である。試料の検出強度として、バックグラウンドを除去した後の試料に対応するピークの面積を示した。CDPおよびGDPは、リン酸基の数がATPよりも少なく、金属吸着による悪影響もより少ないと考えられるが、これらの分子を試料とした場合でも、シュウ酸系移動相を用いることでギ酸系移動相を用いた場合よりも感度を高くすることができた。

[0070] 次の優先権基礎出願の開示内容は引用文としてここに組み込まれる。

日本国特許出願2018年第207620号（2018年11月2日出願）

符号の説明

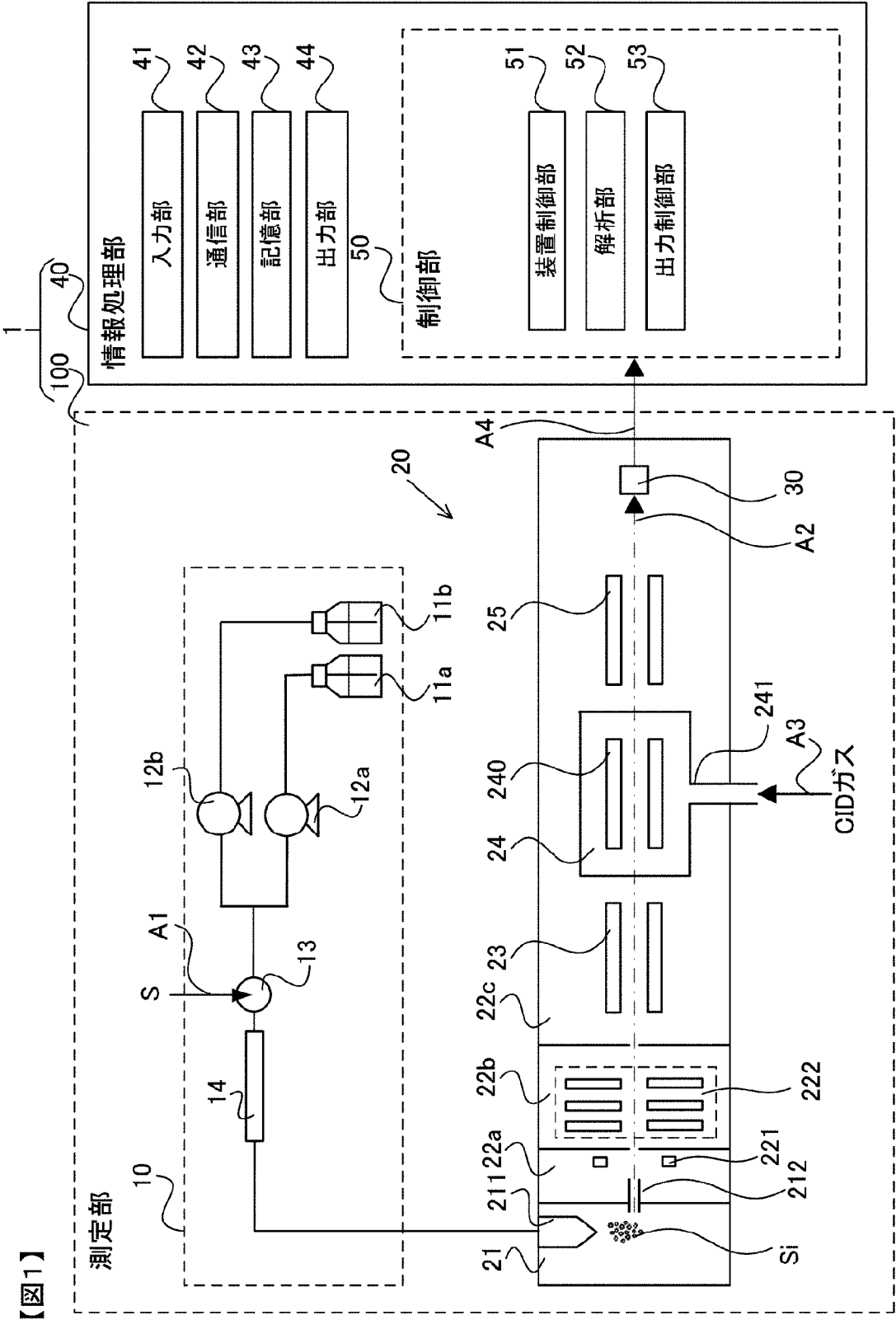
[0071] 1…分析装置、9…分析用キット、10…液体クロマトグラフ、11a, 11b…移動相容器、14…分析カラム、20…質量分析計、21…イオン化室、23…第1質量分離部、24…コリジョンセル、25…第2質量分離部

、 3 0 … 検出部、 4 0 … 情報処理部、 5 0 … 制御部、 5 1 … 装置制御部、 5 2 … 解析部、 5 3 … 出力制御部、 9 0 … 吸着防止剤、 1 0 0 … 測定部、 2 1 1 … イオン化部、 S … 試料、 S i … 試料イオン。

請求の範囲

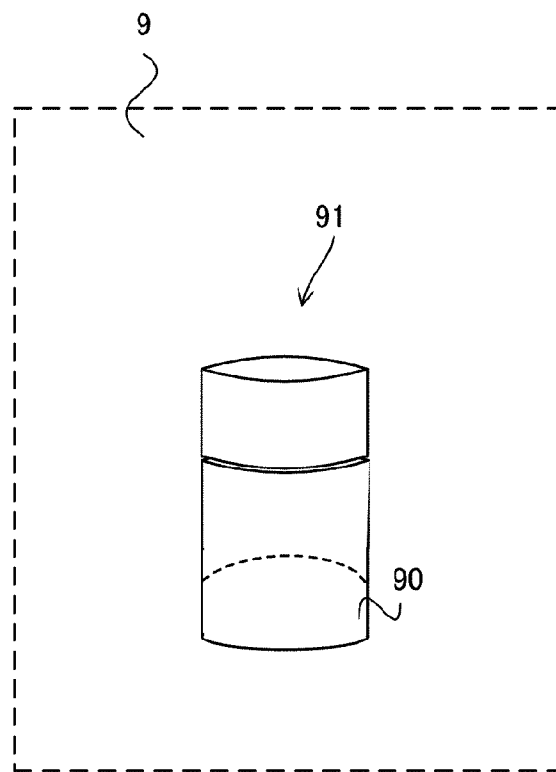
- [請求項1] リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤を含む移動相を用いて液体クロマトグラフィを行うことと、
前記液体クロマトグラフィの溶出液を質量分析することと
を備え、
前記吸着防止剤は、シュウ酸またはその塩を含む分析方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の分析方法において、
前記リン酸基を有する化合物は、核酸、ヌクレオチドおよびこれらの誘導体の少なくとも一つである分析方法。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の分析方法において、
前記試料は、細胞からの抽出物を含む分析方法。
- [請求項4] 請求項1または2に記載の分析方法において、
前記シュウ酸またはその塩の濃度は、0.1 mM以上50 mM以下である分析方法。
- [請求項5] 請求項1または2に記載の分析方法において、
前記質量分析では、エレクトロスプレー法により前記試料がイオン化される分析方法。
- [請求項6] シュウ酸またはその塩を含み、
液体クロマトグラフィ／質量分析の移動相に添加され、
リン酸基を有する化合物を含む試料の金属への吸着を防ぐための吸着防止剤。
- [請求項7] 請求項6に記載の吸着防止剤を含む分析用キット。

【図1】



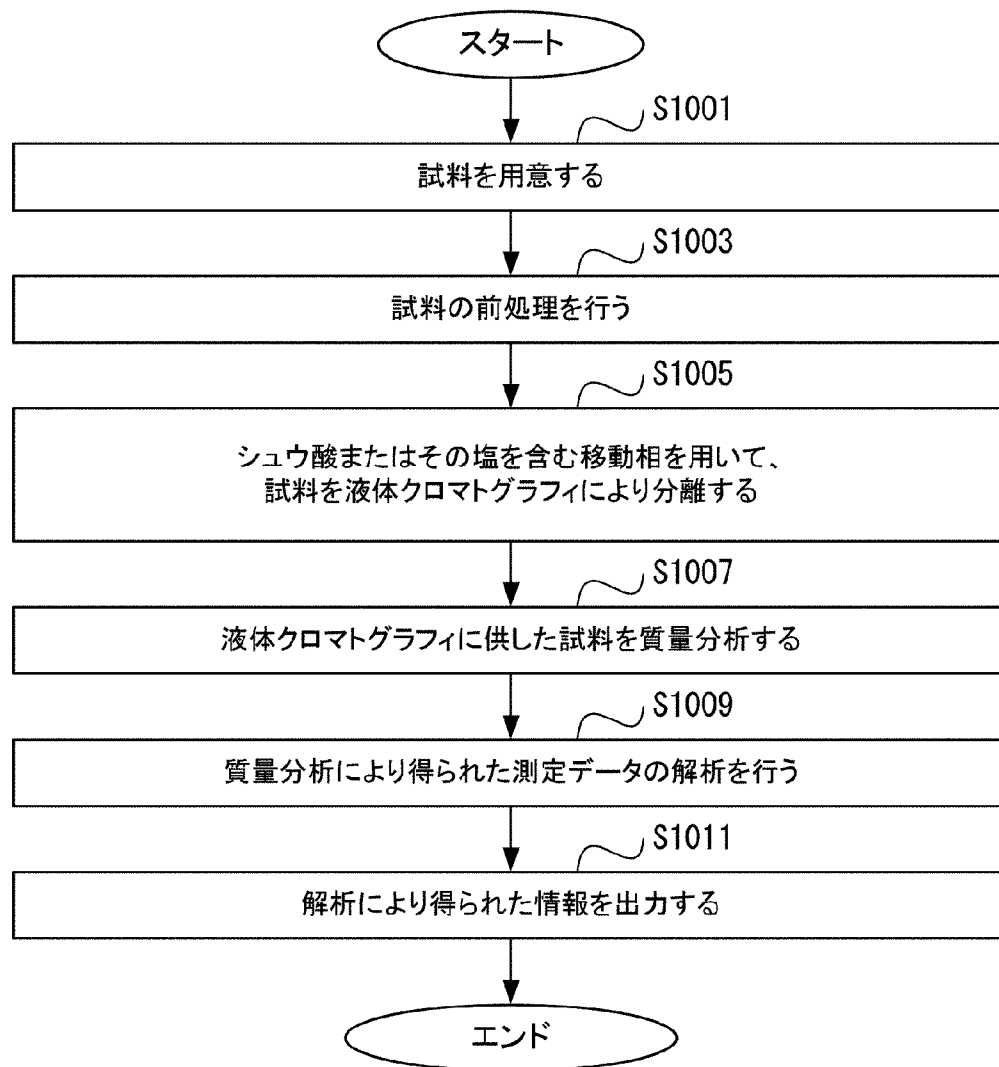
【図2】

【図2】



【図3】

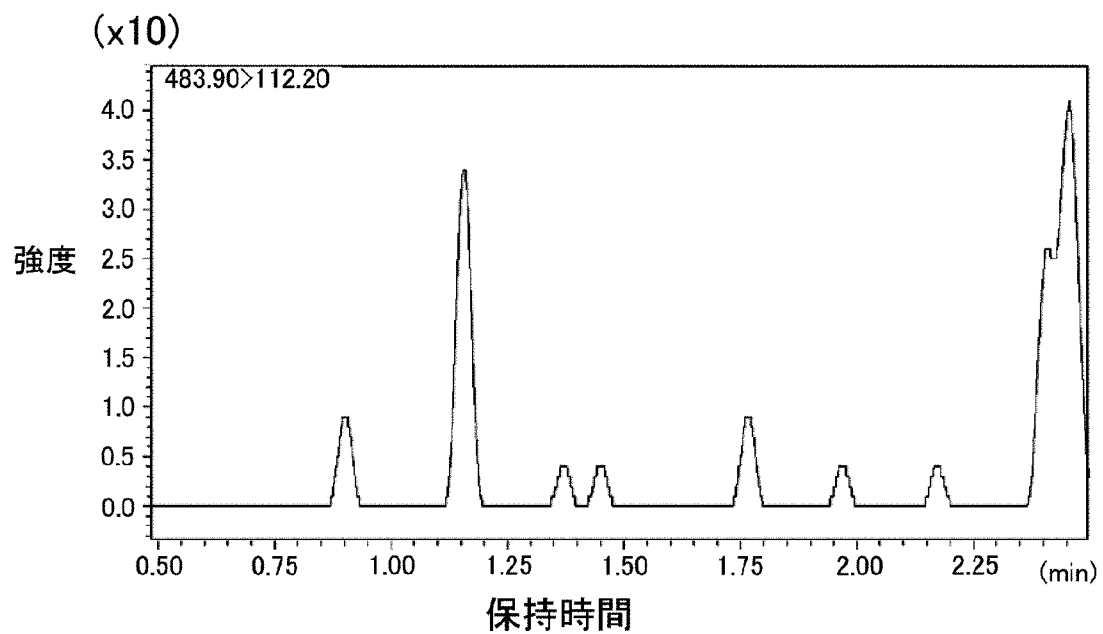
【図3】



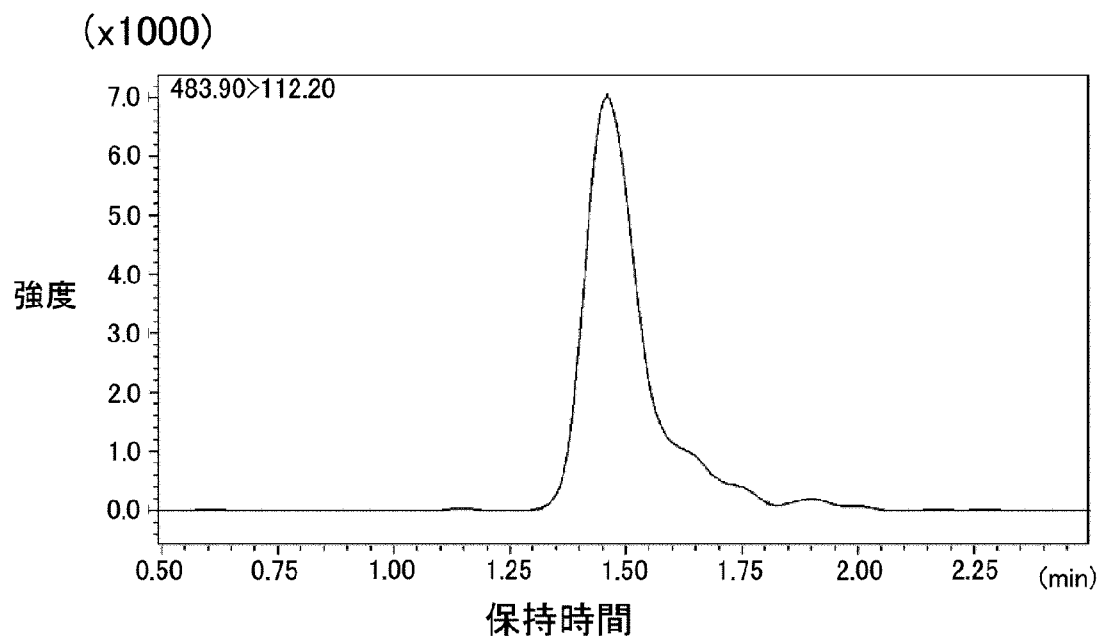
[図4]

【図4】

(A)



(B)



[図5]

【図5】

試料	比較例2(ギ酸系移動相)での試料の検出強度(A.U.)	実施例2(シュウ酸系移動相)での試料の検出強度(A.U.)
0.1 μ M CDP	53,108	128,524
0.1 μ M GDP	53,108	187,367

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/62(2006. 01)i; G01N 30/26(2006.01)i; G01N 30/72(2006. 01)i; G01N 30/88(2006. 01)i
FI: G01N30/26 A; G01N30/72 C; G01N30/88 D; G01N27/62 V; G01N27/62 X

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/62; G01N30/26; G01N30/72; G01N30/88

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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.
Y	JP 2009-528544 A (PERKINELMER LAS, INC.) 06.08.2009 (2009-08-06) paragraphs [0058]-[0062], [0079], claims 124-127	1-7
Y	JP 61-47560 A (SHIMADZU CORPORATION) 08.03.1986 (1986-03-08) page 2, upper left column, line 2 to upper right column, line 4	1-7
A	JP 2008-309778 A (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 25.12.2008 (2008-12-25) entire text	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☒ See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 10 January 2020 (10.01.2020)	Date of mailing of the international search report 28 January 2020 (28.01.2020)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042574

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/0199848 A1 (MEDIZINISCHE FAKULTAT DER OTTO-VON-GUERISCHE-UNIVERSITAT) 21.08.2008 (2008-08-21) entire text	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/042574

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
---	------------------	---------------	------------------

JP 2009-528544 A	06 Aug. 2009		
------------------	--------------	--	--

US 2008/0073500 A1	
[0062]-[0066],	
[0081], claims	
124-127	

EP 1996923 A2	
---------------	--

CA 2644499 A1	
---------------	--

CN 101438148 A	
----------------	--

(Family: none)	
----------------	--

(Family: none)	
----------------	--

JP 61-47560 A	08 Mar. 1986		
---------------	--------------	--	--

JP 2008-309778 A	25 Dec. 2008		
------------------	--------------	--	--

US 2008/0199848 A1	21 Aug. 2008		
--------------------	--------------	--	--

EP 1889070 A1	
---------------	--

DE 102005056408 A1	
--------------------	--

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 27/62(2006.01)i; G01N 30/26(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i; G01N 30/88(2006.01)i FI: G01N30/26 A; G01N30/72 C; G01N30/88 D; G01N27/62 V; G01N27/62 X														
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）） G01N27/62; G01N30/26; G01N30/72; 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020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												
Y	JP 2009-528544 A (パーキンエルマー エルエーエス、インコーポレイテッド) 06.08.2009 (2009 - 08 - 06) [0058]-[0062], [0079], 請求項124-127	1-7												
Y	JP 61-47560 A (株式会社島津製作所) 08.03.1986 (1986 - 03 - 08) P2 左上欄L2-右上欄L4	1-7												
A	JP 2008-309778 A (第一三共株式会社) 25.12.2008 (2008 - 12 - 25) 全文	1-7												
A	US 2008/0199848 A1 (MEDIZINISCHE FAKULTAT DER OTTO-VON-GUERICHKE-UNIVERSITAT) 21.08.2008 (2008 - 08 - 21) 全文	1-7												
☐ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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														
国際調査を完了した日 10.01.2020	国際調査報告の発送日 28.01.2020													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 高田 亜希 2J 5705 電話番号 03-3581-1101 内線 3252													

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/042574

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2009-528544	A	06.08.2009	US 2008/0073500 A1 [0062]-[0066], [0081], Claims 124-127 EP 1996923 A2 CA 2644499 A1 CN 101438148 A	
JP	61-47560	A	08.03.1986	(ファミリーなし)	
JP	2008-309778	A	25.12.2008	(ファミリーなし)	
US	2008/0199848	A1	21.08.2008	EP 1889070 A1 DE 102005056408 A1	