

(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10月6日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号  
**WO 2016/158380 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*G01N 27/62* (2006.01) *H01J 49/04* (2006.01)  
*G01N 27/447* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/058131
- (22) 国際出願日: 2016年3月15日(15.03.2016)
- (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 2015-075494 2015年4月1日(01.04.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人 慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)  
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番  
45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 曾我 朋義(SOGA, Tomoyoshi); 〒9970035  
山形県鶴岡市馬場町14番1号 慶應義塾大学  
先端生命科学研究室内 Yamagata (JP). 平山 明由  
(HIRAYAMA, Akiyoshi); 〒9970035 山形県鶴岡市  
馬場町14番1号 慶應義塾大学先端生命科学

研究所内 Yamagata (JP). 阿部 弘(ABE, Hiroshi);  
〒9970035 山形県鶴岡市馬場町14番1号 慶  
應義塾大学先端生命科学研究室内 Yamagata (JP).

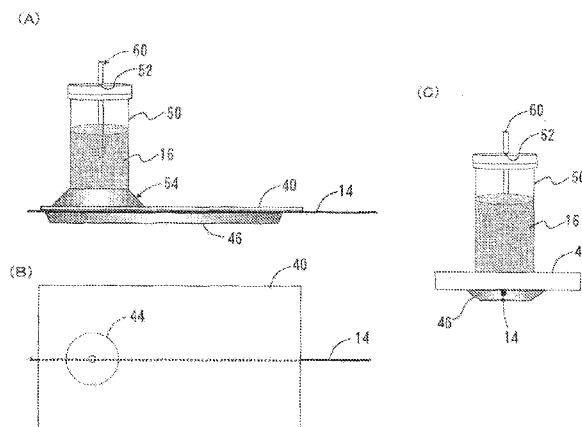
- (74) 代理人: 高矢 諭, 外(TAKAYA, Satoshi et al.); 〒  
1510051 東京都渋谷区千駄ヶ谷五丁目21番7  
号 第5瑞穂ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, 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,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CREATING SPRAY DEVICE FOR SHEATHLESS CE-MS, SPRAY DEVICE FOR SHEATHLESS CE-MS, AND SHEATHLESS CE-MS DEVICE

(54) 発明の名称: シースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法、シースレスCE-MS用スプレーデバイス、及び、シースレスCE-MS装置

[図8]



(57) Abstract: While processing a distal end of a capillary 14 into an acute angle: an electrophoresis liquid passing hole 42 through which an electrophoresis liquid 16 can pass is opened in a flexible insulating plate 40; an electrodialysis membrane 44 is bonded in such a way as to cover the electrophoresis liquid passing hole 42; the capillary 14 is bonded, without any gaps, securely to the insulating plate 40, except the part on the electrodialysis membrane 44 in which the electrophoresis liquid passing hole 42 exists; a crack 48 is formed in a part of the capillary 14 above the electrophoresis liquid passing hole 42, the parts of said capillary 14 except for the part thereof above the electrophoresis liquid passing hole 42 having been completely secured to the insulating plate 40; the entire capillary 14 is bonded securely to the insulating plate 40; a reservoir 50 into which the electrophoresis liquid 16 is to be introduced is placed on the surface of the insulating plate 40 on the side thereof to which the capillary is not secured; an electrode insertion hole 52 for inserting an electrode 60 is opened in an upper portion of the reservoir 50; and the electrode 60 is inserted into the electrode insertion hole 52 and is secured. By this means, high-sensitivity measurement is possible using a spray device for sheathless CE-MS having a simple configuration.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/158380 A1



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:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

キャピラリー 14 の先端を鋭角に加工する一方、可撓性を有する絶縁板 40 に、泳動液 16 が通過可能な泳動液通過孔 42 を開け、泳動液通過孔 42 を覆うように電気透析膜 44 を接着し、電気透析膜 44 の上側の泳動液通過孔 42 以外の部分の絶縁板 40 に、キャピラリー 14 を隙間のないように接着固定し、泳動液通過孔 42 以外の部分が絶縁板 40 に完全に固定されたキャピラリー 14 の泳動液通過孔 42 の部分にクラック 48 を形成し、キャピラリー 14 を絶縁板 40 に完全に接着固定し、絶縁板 40 のキャピラリー非固定側面に、泳動液 16 を入れるためのリザーバー 50 を設置し、リザーバー 50 の上部に、電極 60 を挿入するための電極挿入孔 52 を開け、電極挿入孔 52 に電極 60 を挿入して固定する。これによって、簡単な構成のシーレス CE-MS 用スプレーデバイスにより、高感度測定を可能にする。

## 明 細 書

発明の名称：

シースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法、シースレスCE-MS用スプレーデバイス、及び、シースレスCE-MS装置

### 技術分野

[0001] 本発明は、シースレスCE（キャピラリー電気泳動）-MS（質量分析）用スプレーデバイスの作成方法、シースレスCE-MS用スプレーデバイス、及び、シースレスCE-MS装置に係り、特に、化合物を高感度に測定することが可能なシースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法、例えば該作成方法によって作成されたシースレスCE-MS用スプレーデバイス、及び、これを備えたシースレスCE-MS装置に関する。

### 背景技術

[0002] メタボローム測定法の一つである、キャピラリー電気泳動-質量分析（CE-MS）法は、様々な生体試料中のイオン性代謝物の測定に非常に有効であり、ガスクロマトグラフィー-質量分析（GC-MS）法や、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）法とは大部分の測定対象が重複しないため、非常に特異性の高い分析法である。

[0003] 通常、CE-MSにおいては、図1に示す如く、ネブライザーと呼ばれるエレクトロスプレーインターフェース（ESI）スプレー（以下、単にスプレーと称する）10に内蔵された、例えばステンレス製のニードル12の先端で、キャピラリー14の中から出てくる緩衝泳動液（以下、単に泳動液又はバッファと称する）16にシース液18と呼ばれる有機溶媒を含む溶液を混合し、更にその外側より、細かい液滴を生成してイオン化を促進するための、例えば窒素ガスでなるネブライザーガスを噴霧することによって、電気泳動のための電圧印加と泳動液16中の代謝物のイオン化を行っている（特許文献1～3参照）。このシース液18によって安定した測定が可能になった。

[0004] しかしながら、現在のシース液 18 を用いた CE-MS 法の大きな問題点は、他のメタボローム解析手法と比べて濃度感度（同じ濃度のサンプルを測定した際の検出感度）が劣ることである。CE-MS 法で感度が低下する原因は、前述したネブライザー（10）の先端でキャピラリー 14 中から出てくる泳動液 16 が、シース液 18 と混合することによって、試料中の測定対象物が希釈されてしまうためである。例えば、発明者らが通常行っている測定条件において、その希釈率を計算したところ、泳動液 16 の流速は  $50 \text{ nL/min}$  であるのに対し、シース液 18 の流速は  $10 \mu\text{L/min}$  であることから、約 200 倍希釈されていることがわかった。

[0005] 従って、ネブライザー（10）先端でのシース液 18 による代謝物の希釈を低減させる、もしくは、シース液 18 を使わないシースレス測定法が可能になれば、CE-MS での濃度感度が最大で 200 倍に上昇することが期待できる。

[0006] シースレス法はキャピラリー 14 出口での希釈が無いために感度の上昇が見込める一方、シース液 18 が無いために安定的な CE-MS 測定を行うことが難しい。これまでに大きく分けると次の 3 つのシースレス CE-MS 法が報告されている。

（1）図 2 に示す如く、キャピラリー 14 に微小な穴を開けてキャピラリー 14 に電極 22 を直接埋め込み、接着剤 24 で固定して電気泳動を行う方法（非特許文献 1）。

（2）図 3 に示す如く、キャピラリー 14 の出口に導電性金属（例えば金など）26 を蒸着させて電気泳動を行う方法（非特許文献 2）。

（3）キャピラリーの途中に泳動液リザーバーを設けて通常の電気泳動を行いながら、泳動液中の化合物を電気浸透流（電圧を印加した際に自然発生する液流）EOF を利用してオフラインで泳動させる方法（非特許文献 3）。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0007] 特許文献 1：特開 2001-83119 号公報

特許文献2：特許第3 3 4 1 7 6 5号公報

特許文献3：特許第4 3 8 5 1 7 1号公報

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Cao, P and Moini M, “A Novel Sheathless Interface for Capillary Electrophoresis / Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using an In-capillary Electrode”, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 561-564, 1997.

非特許文献2：Kele Z., Ferenc G., Klement E., Toth GK., Janaky T., “Design and performance of a sheathless capillary electrophoresis/mass spectrometry interface by combining fused-silica capillaries with gold-coated nanoelectrospray tips”, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 881-885, 2005.

非特許文献3：Shi LH., Jin YX., Moon DC., Kim SK. and Park SR. “A sheathless CE/ESI-MS interface with an ionophore membrane-packed electroconduction channel”, Electrophoresis 30, 1661-1669, 2009.

非特許文献4：Faserl K., Sarg B., Kremser L. and Lindner H. “Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry”, Anal. Chem. 83, 7297-7305, 2011.

非特許文献5：Whang C-W and Chen I-C. Cellulose acetate-coated porous polymer joint for capillary zone electrophoresis. Anal. Chem., 64 (1992), 2461-2464.

非特許文献6：Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T., “Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry”, J. Proteome Res. 2, 488-494, 2003.

非特許文献7：Soga, T., Baran, R., Suematsu M., Ueno, Y., Ikeda, S., S

akurakawa T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., Tomita, M., "Differential Metabolomics Reveals Ophthalmic Acid As An Oxidative Stress Biomarker Indicating Hepatic Glutathione Consumption", J. Biol. Chem. 281, 16768-16776, 2006.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0009] しかしながら、(1)や(2)の方法は、電極における電気分解により発生する酸素や水素によってスプレーが安定せず、うまく測定が行うことができない。
- [0010] 一方、(3)の方法については、エービーサイエックス社でCESI-MSという製品名称で市販されているものが存在する。
- [0011] このインターフェイスは、図4に示す如く、内径30 $\mu$ m、外径150 $\mu$ mのキャピラリー14の先端約3cmをフッ酸により化学処理し、ガラス厚を約5 $\mu$ mまで薄くすることにより多孔質の先端15として、泳動液16中のイオンの透過を可能とし、電気泳動を達成している。図4において、20は導電性液体でなる泳動液供給用の泳動液キャピラリーである。多孔質の先端15を透過できるのは水素イオンや水酸化物イオンに限定され、試料中の代謝物イオンなどは透過せずにそのままキャピラリー14出口まで運ばれ検出される。これによって、シースレスCE-MSを可能にしている（非特許文献4）。
- [0012] しかしながら、この装置は非常に高価であり、また使用できるキャピラリーのラインアップも現在のところは内径30 $\mu$ mのみであるという問題点を有していた。
- [0013] 一方、非特許文献5には、CZE（キャピラリー電気泳動）用キャピラリーにクラックを作成して、CEにおける電気化学検出を行うことが記載されているが、CE-MSへの適用は考えられていなかった。
- [0014] 本発明は、前記従来の問題点を解決するべくなされたもので、より安価且つ簡便な手順で作成でき、様々な内径のキャピラリーに対応可能なスプレー

デバイスを提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0015] 本発明は、シースレスCE-M S用スプレーデバイスの作成方法において、キャピラリーの先端を鋭角に加工するステップと、可撓性を有する絶縁板に、泳動液が通過可能な泳動液通過孔を開けるステップと、前記泳動液通過孔を覆うように電気透析膜を接着するステップと、該電気透析膜の上側の前記泳動液通過孔以外の部分の絶縁板に、キャピラリーを隙間のないように接着固定するステップと、前記泳動液通過孔以外の部分が絶縁板に完全に固定されたキャピラリーの前記泳動液通過孔の部分にクラックを形成するステップと、キャピラリーを絶縁板に完全に接着固定するステップと、絶縁板のキャピラリー非固定側面に、泳動液を入れるためのリザーバーを設置するステップと、該リザーバーの上部に、電極を挿入するための電極挿入孔を開けるステップと、前記電極挿入孔に電極を挿入して固定するステップと、を有することにより、前記課題を解決したものである。
- [0016] ここで、前記クラックを形成するステップは、キャピラリーの前記泳動液通過孔の部分の表面にカッターで傷を付けるステップと、絶縁板を撓ませることによりキャピラリーを曲げて、前記泳動液通過孔の部分にクラックを形成するステップと、を有することができる。
- [0017] 又、前記絶縁板を、プラスチックプレート又はガラスプレートとすることができる。
- [0018] 又、前記電気透析膜をイオン変換膜とすることができる。
- [0019] 又、前記リザーバーを絶縁体製とすることができる。
- [0020] 又、前記カッターをセラミックカッターとすることができる。
- [0021] 本発明は、又、先端が鋭角に加工され、中間部にクラックが形成されたキャピラリーと、該キャピラリーが接着固定される、前記クラックが形成された部分に、泳動液が通過可能な泳動液通過孔が形成された絶縁板と、該絶縁板の泳動液通過孔上に接着された電気透析膜と、前記絶縁板のキャピラリー非固定側面に設置された、泳動液を入れるためのリザーバーと、該リザーバ

ーの上部に挿入・固定された電極と、を備えたことを特徴とするシースレスCE-MS用スプレーデバイスを提供するものである。

[0022] 本発明は、又、前記のスプレーデバイスを備えたことを特徴とするシースレスCE-MS装置を提供するものである。

### 発明の効果

[0023] 本発明の特徴は、キャピラリーの微細孔作成技術と電気透析膜を組み合わせた新規なシースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法にある。基本原理は、[背景技術] (3) のキャピラリーの途中に泳動液リザーバーを設けて通常の電気泳動を行いながら、泳動液中の化合物を電気浸透流EOFを利用してオフラインで泳動させる方法を応用したものである。

[0024] 分析に用いるキャピラリーは内径が数十 $\mu\text{m}$ と非常に微細であり、これらを精度良く結合するには顕微鏡下で慎重に行う必要があり、非常に手間であったが、本発明ではキャピラリーを例えばプラスチックプレートでなる可撓性を有する絶縁板に固定した後、絶縁板を撓ませてクラック（きず）を入れることにより、特別な装置や工具を必要とすることなく、精度の高い結合を可能にしている。また、キャピラリー先端の形状もスプレーがしやすいように鋭角加工を施している。更に、分画分子量の非常に小さい（例えばカットオフ質量100Da）電気透析膜を用いることによって、測定対象物のクラックからの漏出を最小限に抑えている。この装置を用いることにより、電気分解をスプレーヤーの先端から手前で起こして、従来のシースレスCE-MSで問題となっていたガスの発生によるスプレーの乱れを防ぐことが可能になる。従って、本発明によれば、特に陽イオンのメタボローム測定において、従来法に比べ数倍～数百倍の高感度測定が可能になる。

[0025] 更に、クラックより先では、対象化合物は電気浸透流のみによって移動しており、クラックからキャピラリー出口までの距離が長くなるほどピーク形状が広がる恐れがあるため、例えばクラックからキャピラリー出口までの距離を2cm以下にして、ピークの格差を最小限に抑えることが可能である。また、本発明のスプレーデバイスで用いるキャピラリーは、どのような内径



のものにも適用可能であり、汎用性が高い。

### 図面の簡単な説明

- [0026] [図1]従来のシースフローC E－M S法で用いられているネブライザー（スプレー）の概略構成を示す断面図
- [図2]従来のシースレスインターフェイスの一例のキャピラリー先端を示す断面図
- [図3]同じく他の例のキャピラリー先端を示す断面図
- [図4]同じく更に他の例のキャピラリー先端周辺を示す断面図
- [図5]本発明の実施形態におけるスプレーデバイスの作成手順を示す流れ図
- [図6]同じくキャピラリー先端を鋭角加工している状態を示す斜視図
- [図7]同じく作成工程を示す斜視図
- [図8]完成したスプレーデバイスを示す（A）正面図、（B）底面図、（C）側面図
- [図9]本発明に係る実施形態が装着されたC E－M S装置の全体構成を示す概略図
- [図10]作成したシースレスC E－M Sデバイスを飛行時間型質量分析計（T O F M S）に接続し、従来のシースフローT O F M Sとの感度比較を行った結果を示す図
- [図11]同じく三連四重極型質量分析計（Q q Q M S）に接続し、従来のシースフローT O F M S及び図10に示したシースレスT O F M Sとの感度比較を行った結果を示す図

### 発明を実施するための形態

- [0027] 以下、図面を参照して、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本発明は以下の実施形態及び実施例に記載した内容により限定されるものではない。又、以下に記載した実施形態及び実施例における構成要件には、当業者が容易に想定できるもの、実質的に同一のもの、いわゆる均等の範囲のものが含まれる。更に、以下に記載した実施形態及び実施例で開示した構成要素は適宜組み合わせてもよいし、適宜選択して用いてもよい。

[0028] 以下、本発明に係るスプレーデバイスの作成方法を、図5を用いて説明する。

[0029] まず最初に、ステップ100で、キャピラリー14先端の例えばポリイミド被膜を、図6に例示する如く、例えばミニルーター（例えばPROXXON社製、MM30GC、砥石150番）等で鋭角に加工する。この工程は、スプレーを安定的に行うために必要である。ここで、キャピラリー14としては、一般的なフューズドシリカキャピラリーの他、例えば発明者が特許文献1で提案したコーティングキャピラリーなど、任意のキャピラリーを用いることができる。なお、キャピラリー先端を鋭角に加工する方法は、ミニルーターによる方法に限定されない。

[0030] 次いで、ステップ110で、可撓性を有する絶縁板（例えば厚さ約2mmのアクリル樹脂製のプラスチックプレート）40に、図7（A）に例示する如く、泳動液が通過可能な泳動液通過孔42を開ける。ここで、泳動液通過孔42の大きさは小さい方が好ましいが、小さすぎると表面張力で泳動液が入っていかなくなるので、直径2mm程度が望ましい。なお、ピペットで入れれば直径1mmでも可能である。

[0031] 前記絶縁板40の種類としては、アクリル樹脂製のプラスチックプレートその他、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、PET樹脂、AS樹脂、PVC（塩化ビニール）など、CE-MSで用いる泳動液によって変質せず、力を加えると僅かに曲がるプラスチックプレートや、超薄型フレキシブルガラス（例えばコーニング（登録商標）社のWillow Glass（登録商標））など曲げられるガラスプレートを用いることができる。

[0032] 次いで、ステップ120で、図7（B）に例示する如く、泳動液通過孔42を覆うように例えばイオン交換膜（例えばHARVARD apparatus製の酢酸セルロース膜、7427-CA100）でなる電気透析膜44を接着する。なお、電気透析膜44の種類はイオン交換膜に限定されない。

[0033] 次いで、ステップ130で、図7（C）に例示する如く、絶縁板40の泳動液通過孔42以外の部分にキャピラリー14を隙間が無いように接着剤4

6で接着固定する。

[0034] 接着剤46が固化し、キャピラリー14が動かなくなるまで放置した後、ステップ140で、例えばセラミックカッターを用いてキャピラリー14の電気透析膜44の直上の泳動液通過孔42の所に傷をつける。そして、絶縁板40の両端を持ち、絶縁板40を僅かに撓ませることによって、キャピラリー14に、図7(D)に例示するようなクラック(ひび)48を形成する。

[0035] 次いで、ステップ150に進み、図7(E)に例示する如く、絶縁板40全体に接着剤46を塗り、キャピラリー14を完全に固定する。

[0036] 次いで、ステップ160に進み、図7(F)に例示する如く、絶縁板40を反転させ、絶縁板40の反対側(使用時の上側)に泳動液16を入れるためのリザーバー50を設置する。ここで、リザーバー50は、例えばポリプロピレンや他のプラスチック等、CE-MSで用いる泳動液で変質しない任意の絶縁体製とすることができる。又、泳動液16としては、ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸アンモニウムなどの揮発性のあるものであれば何でも使用可能である。

[0037] 次いで、ステップ170に進み、図7(G)に例示する如く、リザーバー50の上部に、電極を挿入するための電極挿入孔52を開ける。電極挿入孔52の直径は、電極のサイズに合わせて、例えば1mm程度とすることができる。

[0038] 次いで、ステップ180に進み、図8に示す如く、電極挿入孔52に電極(例えば白金電極)60を挿入してスプレーデバイスを完成する。図において、54は、リザーバー50を絶縁板40に固定するための接着剤である。

[0039] 前記接着剤46、54としては、例えばシリル化ウレタン樹脂、シアノアクリレート樹脂、ウレタン樹脂など、CE-MSで用いる泳動液で変質しないものを用いることができる。

[0040] 完成したスプレーデバイスを、CE70とMS80の間に接続してシーレスCE-MS装置を構成した状態を図9に示す。図において、56はペー

スプレートである。

[0041] 図9に示したシーレスCE-MS装置を用いて測定を行った。陽イオン性代謝物質測定条件は、次のとおりである（非特許文献6、7参照）。

(i) キャピラリー電気泳動（CE）の分析条件

キャピラリー14には、様々な内径のフューズドシリカキャピラリー（例えば内径50 $\mu$ m、外径360 $\mu$ mなど）を用いることが可能である。緩衝液16には、10%（v/v）酢酸（pH約2.2）を用いた。印加電圧は、+30kV、キャピラリー温度は20℃で測定した。試料は、加圧法を用いて50mbarで15秒間注入した。

(ii) 飛行時間型質量分析計（TOFMS）の分析条件

正イオンモードを用い、イオン化電圧は1.8kV、フラグメンター電圧は175V、スキマー電圧は50V、OctRF電圧は100Vに設定した。乾燥ガスには窒素を使用し、温度300℃に設定した。質量電荷比（m/z）50～1,000までの化合物を対象に、スキャン速度1.5サイクル/秒で測定を行った。

(iii) 三連四重極型質量分析計（QQMS）の分析条件

正イオンモードを用い、イオン化電圧は2.4kV、フラグメンター電圧は90Vに設定した。乾燥ガスには窒素を使用し、温度300℃に設定した。多重反応モニタリング（MRM）法によって、各化合物名に最適化されたプレカーサーm/z、プロダクトm/z、コリジョンエネルギーにて測定を行った。

[0042] 作成したシーレスCE-MS装置をTOFMSに接続し、従来のシーセルフローTOFMSとの感度比較を行った結果を図10に示す。

[0043] 53種の陽イオン性代謝物質標準溶液を測定した結果、83%（45/54）の化合物で2倍以上の感度上昇が見られ、平均3.8倍の感度上昇が達成された。なお、ヒポキサンチンとスペルミジンについては感度が低下したが、これは、泳動液によりバックグラウンドノイズが増えたためと考えられる。従って、泳動液の種類を変えることで容易に対応できる。

[0044] 又、このシーレスCE-MS装置をQQMSに接続し、従来のシースフローTOFMS及び図10に示したシーレスTOFMSとの感度比較を行った結果を図11に示す。この場合には、シースフローTOFMSに比べて全ての化合物で感度が上昇し、グルタミンで709倍、シスタチオニンで580倍、S-アデノシルメチオニンで561倍の高感度化が達成できた。

### 産業上の利用可能性

[0045] 化合物を高感度に測定可能なCE-MS装置を提供できる。

### 符号の説明

- [0046] 10…スプレー  
12…ニードル  
14…キャピラリー  
16…泳動（緩衝）液  
40…絶縁板  
42…泳動液通過孔  
44…電気透析膜  
46、54…接着剤  
48…クラック  
50…リザーバー  
52…電極挿入孔  
60…電極

## 請求の範囲

- [請求項1]           キャピラリーの先端を鋭角に加工するステップと、  
可撓性を有する絶縁板に、泳動液が通過可能な泳動液通過孔を開けるステップと、  
前記泳動液通過孔を覆うように電気透析膜を接着するステップと、  
該電気透析膜の上側の前記泳動液通過孔以外の部分の絶縁板に、キャピラリーを隙間のないように接着固定するステップと、  
前記泳動液通過孔以外の部分が絶縁板に完全に固定されたキャピラリーの前記泳動液通過孔の部分にクラックを形成するステップと、  
キャピラリーを絶縁板に完全に接着固定するステップと、  
絶縁板のキャピラリー非固定側面に、泳動液を入れるためのリザーバーを設置するステップと、  
該リザーバーの上部に、電極を挿入するための電極挿入孔を開けるステップと、  
前記電極挿入孔に電極を挿入して固定するステップと、  
を有することを特徴とするシースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法。
- [請求項2]           前記クラックを形成するステップが、  
キャピラリーの前記泳動液通過孔の部分の表面にカッターで傷を付けるステップと、  
絶縁板を撓ませることによりキャピラリーを曲げて、前記泳動液通過孔の部分にクラックを形成するステップと、  
を有することを特徴とする請求項1に記載のシースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法。
- [請求項3]           前記絶縁板が、プラスチックプレート又はガラスプレートである請求項1又は2に記載のシースレスCE-MS用スプレーデバイスの作成方法。
- [請求項4]           前記電気透析膜がイオン交換膜である請求項1に記載のシースレス

CE－MS用スプレーデバイスの作成方法。

[請求項5] 前記リザーバーが絶縁体製である請求項1に記載のシースレスCE－MS用スプレーデバイスの作成方法。

[請求項6] 前記カッターがセラミックカッターである請求項2に記載のシースレスCE－MS用スプレーデバイスの作成方法。

[請求項7] 先端が鋭角に加工され、中間部にクラックが形成されたキャピラリーと、

該キャピラリーが接着固定される、前記クラックが形成された部分に、泳動液が通過可能な泳動液通過孔が形成された絶縁板と、

該絶縁板の泳動液通過孔上に接着された電気透析膜と、

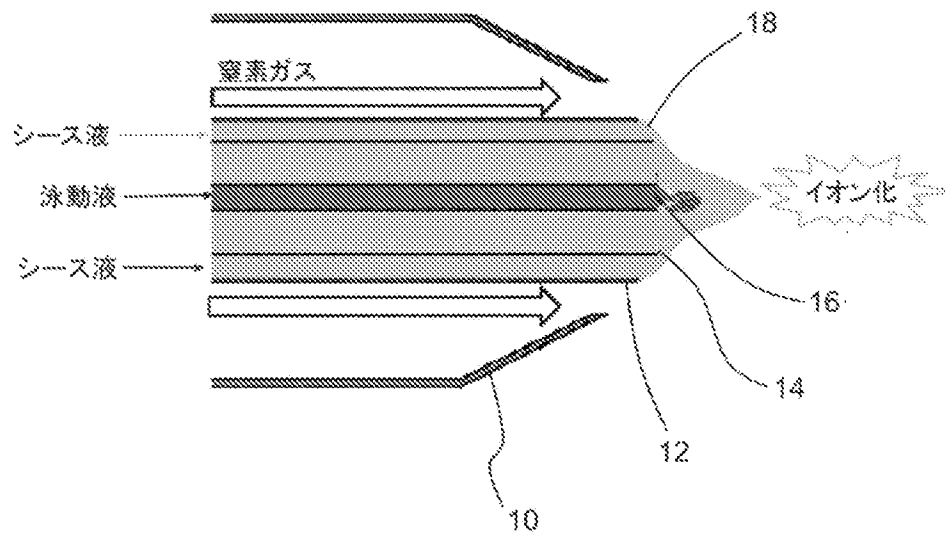
前記絶縁板のキャピラリー非固定側面に設置された、泳動液を入れるためのリザーバーと、

該リザーバーの上部に挿入・固定された電極と、

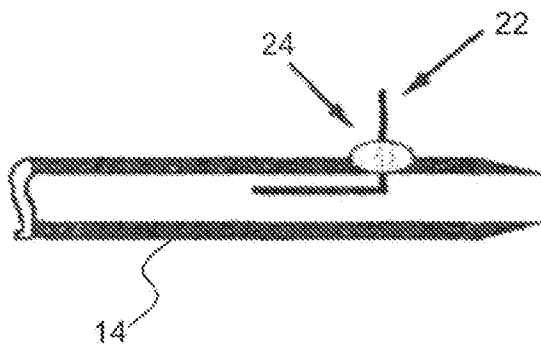
を備えたことを特徴とするシースレスCE－MS用スプレーデバイス。

[請求項8] 請求項7に記載のスプレーデバイスを備えたことを特徴とするシースレスCE－MS装置。

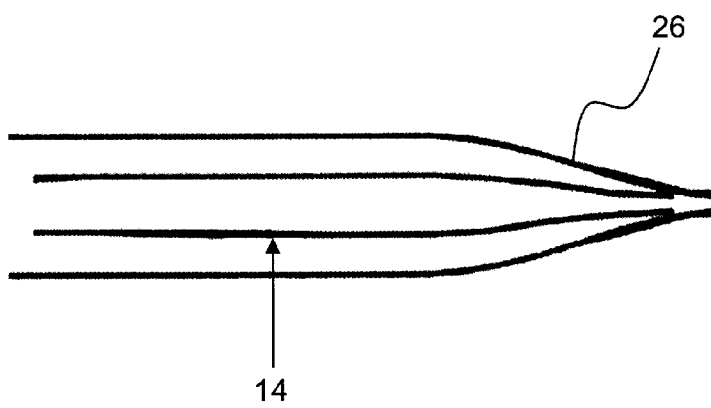
[図1]



[図2]

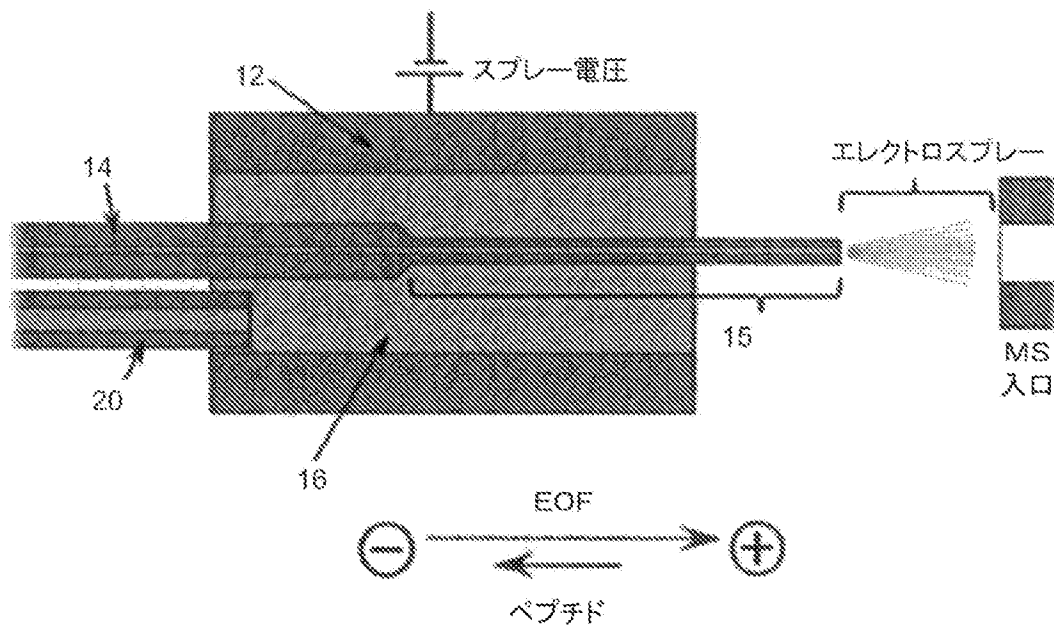


[図3]

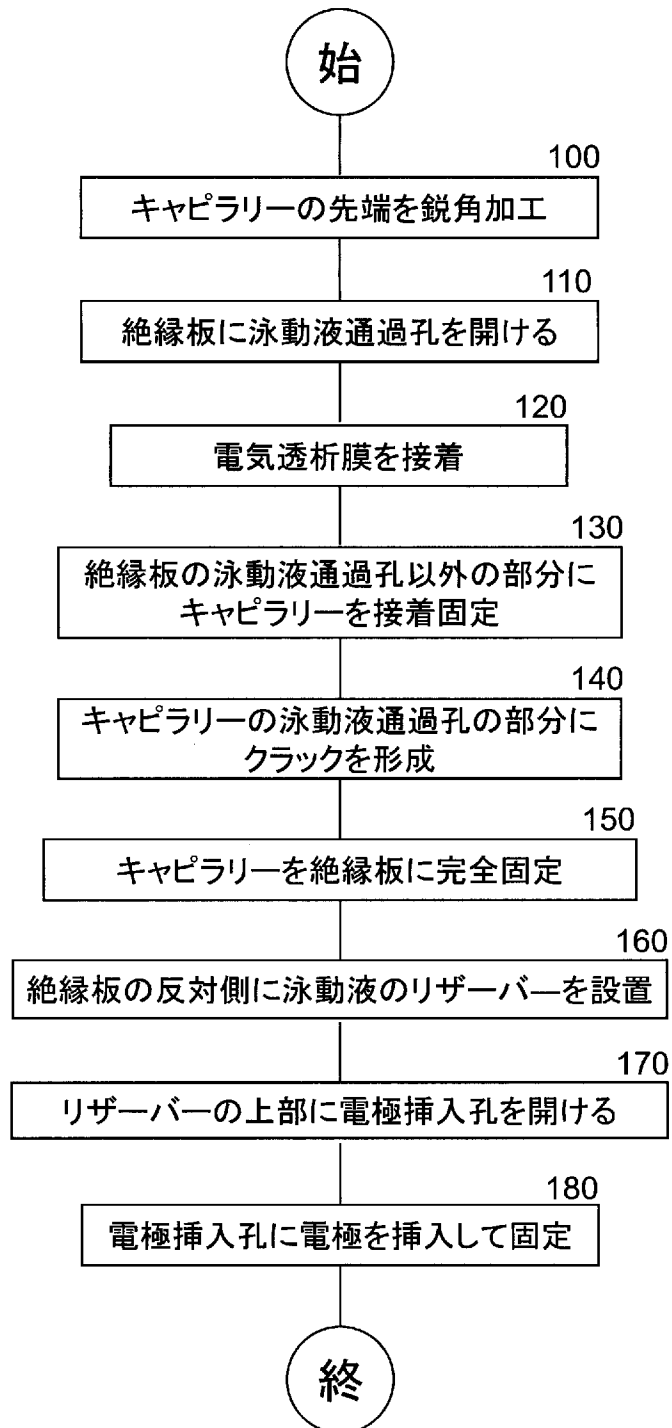




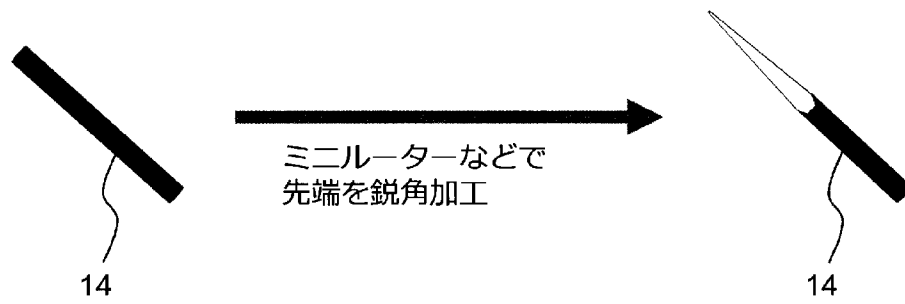
[図4]



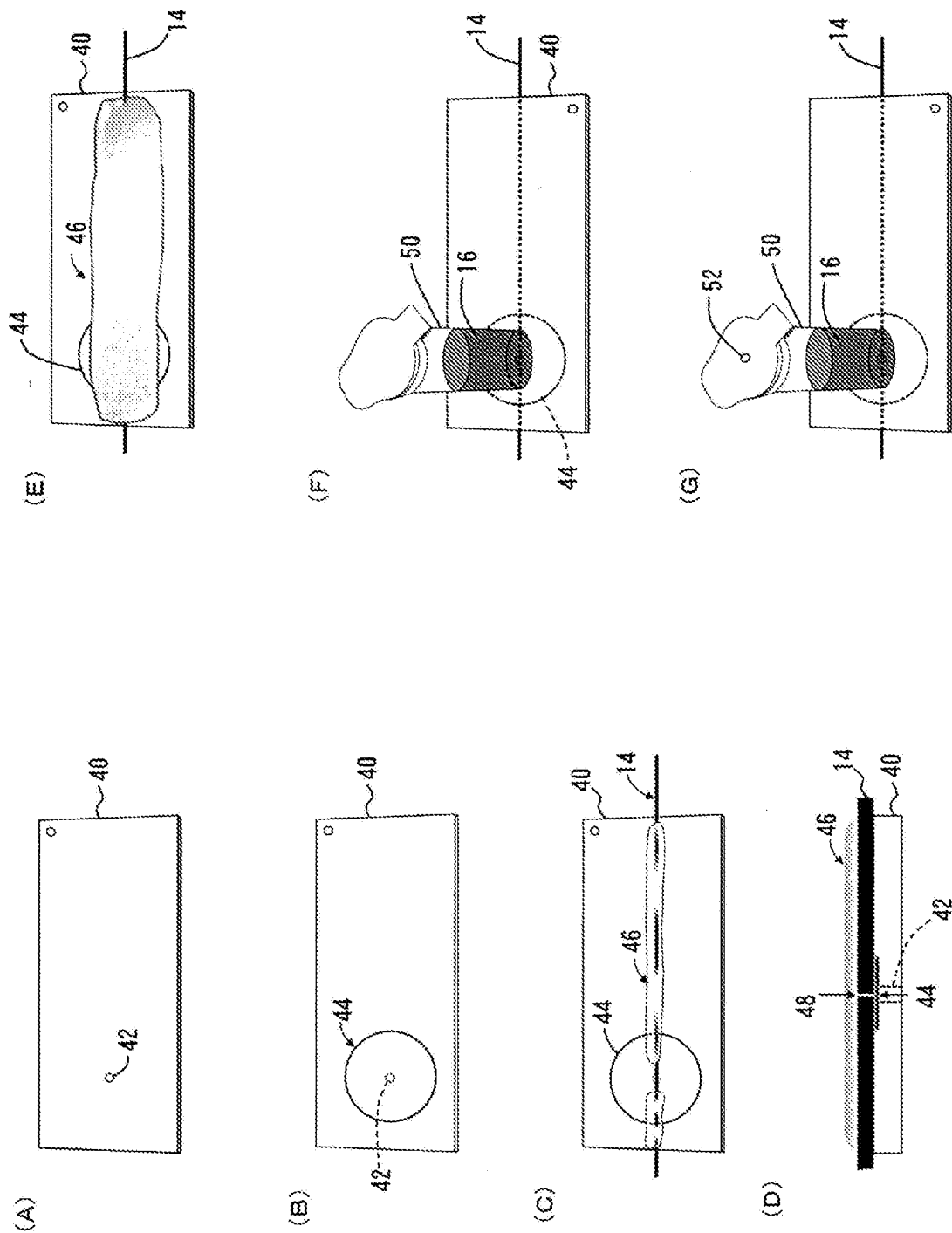
[図5]



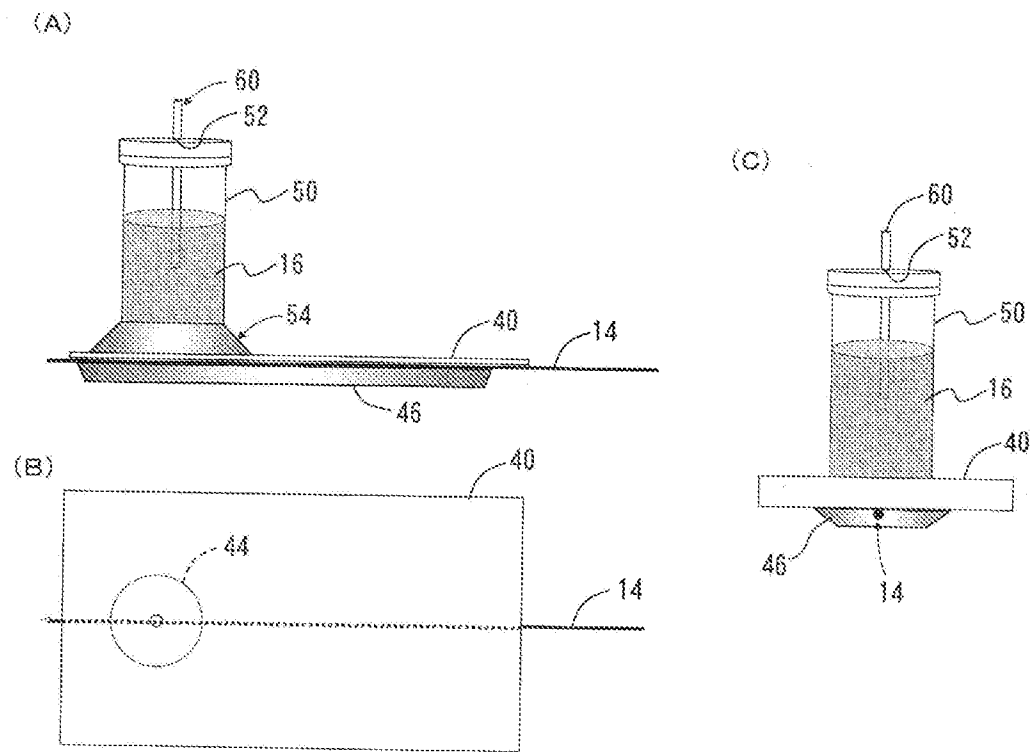
[図6]



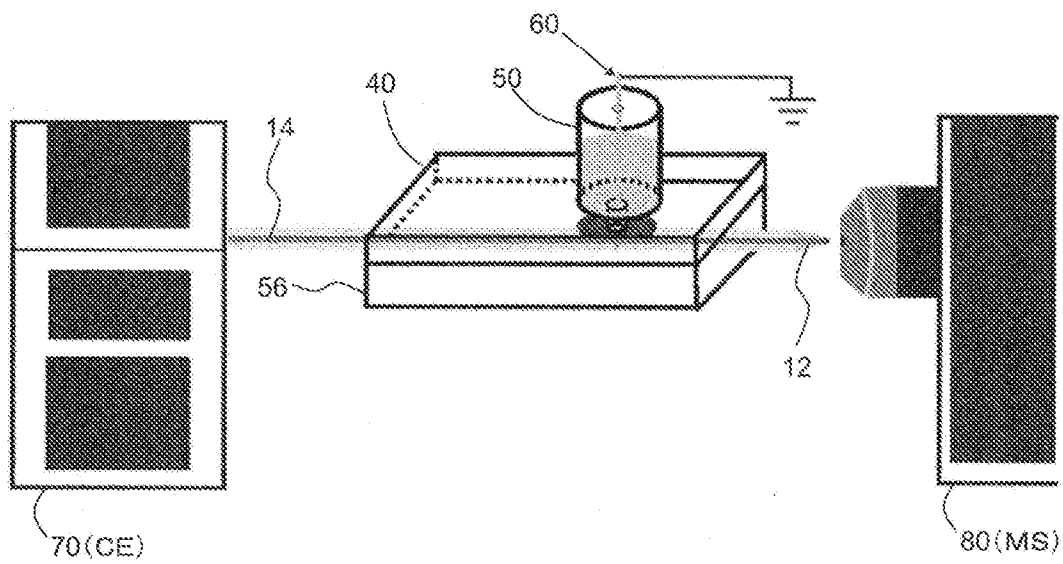
[図7]



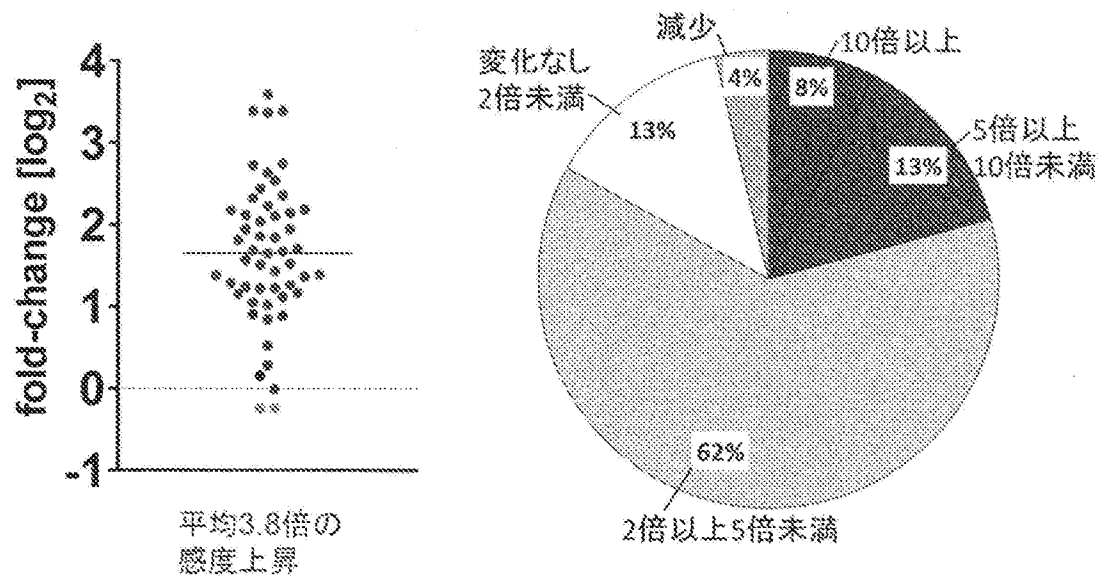
[図8]



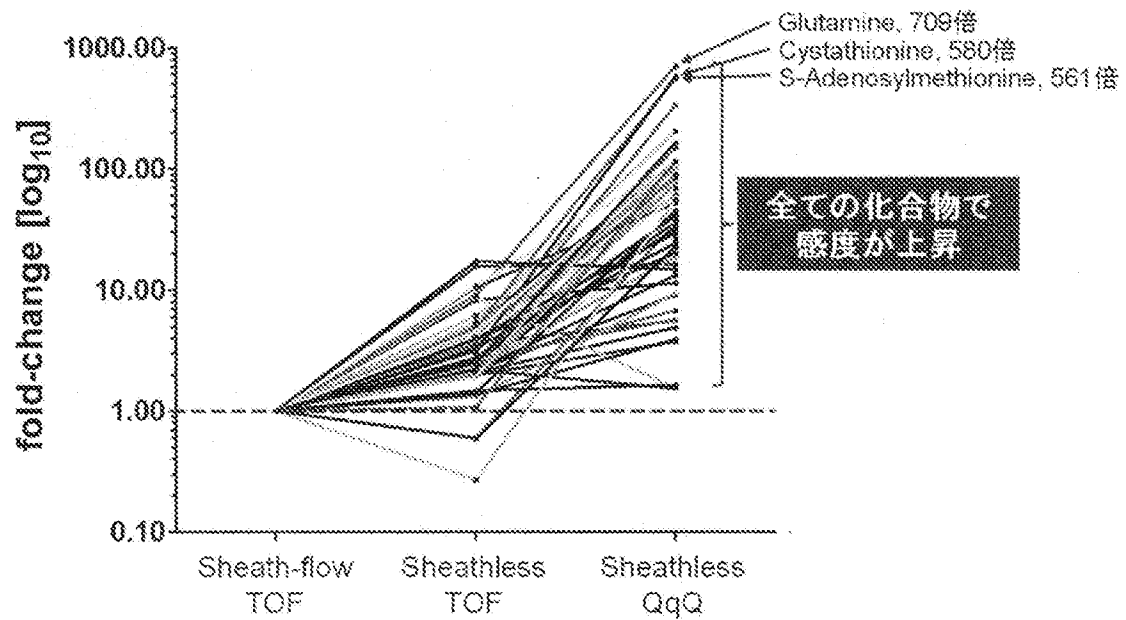
[図9]



[図10]



[図11]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/058131

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, H01J49/04(2006.01)i

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)

G01N27/62, G01N27/447, H01J49/04

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. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P, A      | WO 2015/197072 A1 (KØBENHAVNS UNIVERSITET),<br>30 December 2015 (30.12.2015),<br>(Family: none)                                                                                                                                                                                               | 1-8                   |
| A         | Shi LH., A sheathless CE/ESI-MS interface with<br>an ionophore membrane-packed electro-conduction<br>channel, Electrophoresis, 2009, 30, 1661-1669                                                                                                                                            | 1-8                   |
| A         | Faserl K., Optimization and Evaluation of a<br>Sheathless Capillary Electrophoresis-<br>Electrospray Ionization Mass Spectrometry<br>Platform for Peptide Analysis: Comparison to<br>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization<br>Mass Spectrometry, Anal. Chem., 2011, 83, 7297-<br>7305 | 1-8                   |

☒ 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  
19 May 2016 (19.05.16)

Date of mailing of the international search report  
31 May 2016 (31.05.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/058131

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | Wang J., Enhanced Neuropeptide Profiling via Capillary Electrophoresis Off-Line Coupled with MALDI FTMS, Anal. Chem., 2008, 80, 6168-6177 | 1-8                   |
| A         | US 5993633 A (Smith; Richard D.),<br>30 November 1999 (30.11.1999),<br>(Family: none)                                                     | 1-8                   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/62(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, H01J49/04(2006.01)i

## 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. G01N27/62, G01N27/447, H01J49/04

## 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<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| P, A            | WO 2015/197072 A1 (KØBENHAVNS UNIVERSITET) 2015.12.30,<br>(ファミリーなし)                                                                                | 1-8            |
| A               | Shi LH., A sheathless CE/ESI-MS interface with an ionophore<br>membrane-packed electro-conduction channel, Electrophoresis,<br>2009, 30, 1661-1669 | 1-8            |

☒ 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

19.05.2016

国際調査報告の発送日

31.05.2016

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)

伊藤 裕美

2W

9515

電話番号 03-3581-1101 内線 3258



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                           |                |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| A                     | Faserl K., Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem., 2011, 83, 7297-7305 | 1 - 8          |
| A                     | Wang J., Enhanced Neuropeptide Profiling via Capillary Electrophoresis Off-Line Coupled with MALDI FTMS, Anal. Chem., 2008, 80, 6168-6177                                                                                                                                 | 1 - 8          |
| A                     | US 5993633 A (Smith; Richard D.) 1999.11.30, (ファミリーなし)                                                                                                                                                                                                                    | 1 - 8          |