

(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
2018年10月18日(18.10.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/189871 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 30/46 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/015184

(22) 国際出願日: 2017年4月13日(13.04.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 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). 国立研究開発法人国立環境研究所 (NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRON-

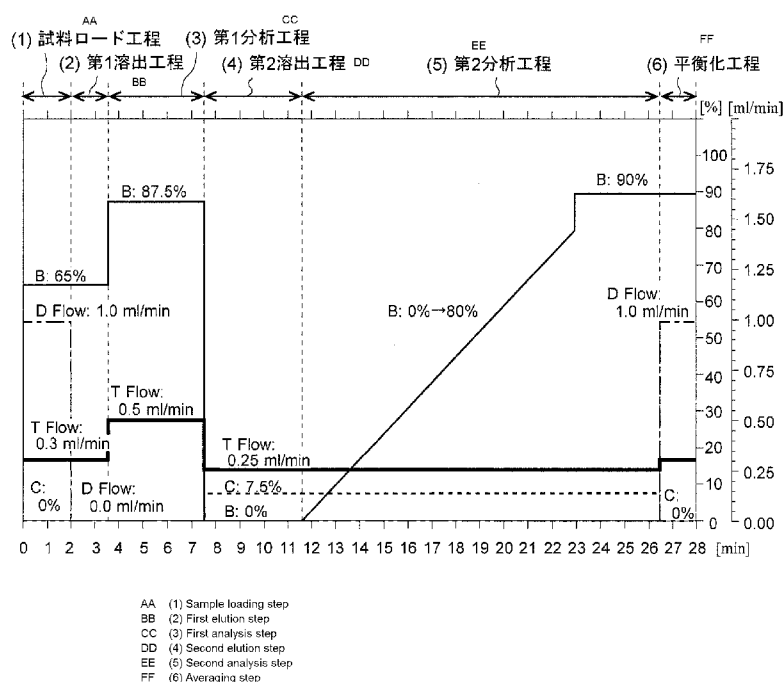
MENTAL STUDIES) [JP/JP]; 〒3050053 茨城県つくば市小野川16-2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 箕畑 俊和 (MINOHATA, Toshikazu); 〒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). 渡邊 淳 (WATANABE, Jun); 〒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). 中山 祥嗣 (NAKAYAMA, Shoji); 〒3050053 茨城県つくば市小野川16-2 国立研究開発法人国立環境研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人京都国際特許事務所 (KYOTO INTERNATIONAL PATENT LAW OFFICE); 〒6008091 京都府京都市下京区東

(54) Title: SAMPLE ANALYSIS METHOD USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

(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) Abstract: In the present invention, the following steps are carried out in LC/MS/MS analysis: a sample injection step for injecting a sample into a flow path leading to a column group that is provided in a liquid chromatograph and comprises a plurality of columns that are connected in series and are each filled with a different type of filler; a first analysis step for feeding an eluent to one or a plurality of columns within the column group, including the most downstream column, and thereby separating a portion of the analyte components in the sample within the one or plurality of columns, eluting



洞院通四条下ル元悪王子町 3 7 番地 豊
元四条烏丸ビル Kyoto (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, 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, 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))

the components sequentially from the most downstream column, and subjecting the components to mass spectrometry; and a second analysis step for feeding an eluent having a different composition from the aforementioned eluent to the one or plurality of columns within the column group including the most downstream column and thereby, within the one or plurality of columns, separating at least a portion of the components from among the analyte components that were not eluted in the first analysis step, eluting the components sequentially from the most downstream column, and subjecting the components to mass spectrometry. As a result, it is possible to quantify a large number of analyte components having a wide range of characteristics in a single analysis.

(57) 要約: LC/MS/MS 分析において、試料を、液体クロマトグラフに設けられた、互いに直列に接続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に至る流路に注入する試料注入ステップと、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複数のカラムに対して、溶離液を送給することにより、該一つ又は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、最も下流側のカラムから順次溶出させて質量分析する第1の分析ステップと、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複数のカラムに対して、前記溶離液とは組成の異なる溶離液を送給することにより、該一つ又は複数のカラム中で、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質量分析する第2の分析ステップと、を実行する。これにより幅広い特性を有する多数の分析対象成分を1回の分析で定量することが可能となる。

明 細 書

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 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（PFCAAs、PFASs、FOSA、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-MeFOSA-M、N-EtFOSA-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

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。

[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、

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、

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は複数のカラム」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ことができる。

[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、

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の少なくとも1つの洗浄を行うものとすることが望ましい。

[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、

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、

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。

[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

[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。

[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。

[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のほか、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。

[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 1 2 から試料を導入し、その後、組成の異なる溶離液を用いてカラム 1 3、カラム 1 4、又はカラム 1 6 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 1 4 又はカラム 1 6 から順次溶出する分析対象成分を MS 部 1 5 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 に示するような構成の LC-MS を用いることもできる。図 3 の構成では、流路切替部 1 8 ~ 2 3 により、カラム 1 3 とカラム 1 4 を互いに接続しない状態（第 1 状態）と、これらのカラム 1 3、1 4 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 1 8 ~ 2 3 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 1 8 ~ 2 3 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 1 1 から送給される溶離液は、直接カラム 1 4 に送られ、第 2 送液部 1 7 から送給される溶離液はカラム 1 3 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 1 1 から送給される溶離液はカラム 1 3 を経てカラム 1 4 に送られ、第 2 送液部 1 7 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 1 3 にトラップカラムを使用し、カラム 1 4 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13a又は13b）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13aとカラム13b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13a又はカラム13b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13a及びカラム13b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

[0029] 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PFASs及

びそれらの類縁物質のLC/MS/MS分析について説明する。

[0030] 本実施例における試料分析に使用したLC-MSの構成を図5及び図6に示す。このLC-MS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130、140を互いに接続しない状態（第1状態）と、該二つのカラム130、140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。

[0031] このLC-MSは、分析用溶媒を送給する第1送液部110と、試料導入用溶媒を送給する第2送液部170、オートサンプラ120、第1カラム130、第2カラム140、第1流路切替バルブ300、第2流路切替バルブ400、及びMS部150を備えている。第1送液部110には、それぞれ異なる溶媒が収容された溶媒容器111、112、113、これらの溶媒容器111、112、113から溶媒を吸引するためのポンプA、B、C、溶媒容器111、112、113とポンプA、B、Cの間の流路に設けられたデガッサ114、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115、及び溶媒混合部115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116が設けられている。また、第2送液部170には、溶媒容器171、溶媒容器171から溶媒を吸引するためのポンプD、及び溶媒容器171とポンプDの間の流路に設けられたデガッサ172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116及び第2カラム140を介してMS部150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115で合流した上で、第2流路切替バルブ400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120を介して第1流路切替バルブ300に接続されている。

[0032] 第1流路切替バルブ300及び第2流路切替バルブ400は、いずれも六方バルブであり、第1流路切替バルブ300は、ポートa～fを有し、第2流路切替バルブ400はポートg～lを備えている。これらの流路切替バルブ300、400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300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120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300のポートcは第2流路切替バルブ400のポートhに接続されており、第1流路切替バルブ300のポートd、e、fは閉鎖されている。第2流路切替バルブ400のポートgは第1カラム130を介して第2流路切替バルブ400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400のポートkはポンプAから第2カラム140に至る流路の途中に設けられた溶媒混合部116に接続されている。また、第2流路切替バルブ400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115に接続されている。

[0033] 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（MS部150）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130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140として分離カラムであるTriart C18（株式会社ワイエムシィ製）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111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 $\text{NH}_4\text{Ac}_\text{H}_2\text{O}$ ）とし、ポンプBにより送給される溶媒（溶媒容器112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 $\text{NH}_4\text{Ac}_\text{95\%MeOH}$ ）とし、ポンプCにより送給される溶媒（溶媒容器113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% NH_3_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-MeF0SA-MとN-EtF0SA-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-MeF0SA-MとN-EtF0SA-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）。

[0039] （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。

[0040] （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。

[0041] 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。

[0042] [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、PFODA、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
120…オートサンブラ
13、13a、13b、14、16…カラム
130…第1カラム
140…第2カラム
15、150…MS部
18、24…流路切替部
300…第1流路切替バルブ
400…第2流路切替バルブ

請求の範囲

[請求項1]

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、

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、

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]

前記複数のカラムのうち、前記最も下流側のカラムを除くカラムの少なくとも1つのカラムがトラップカラムであって、その他のカラムが分離カラム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4]

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の少なくとも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5] 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。

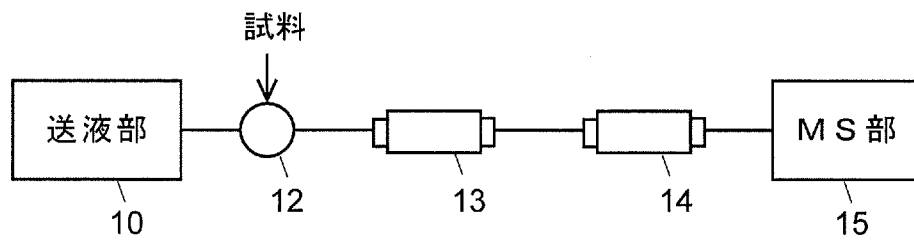
[請求項6] a)液体クロマトグラフに設けられた、複数種類の充填剤の混合物が充填されたカラムへと至る流路中に試料を注入する試料注入ステップと、

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、

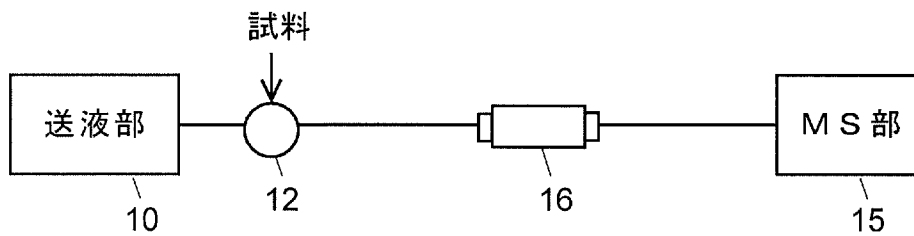
c)前記カラムに対して、前記第1の溶離液とは組成の異なる第2の溶離液を送液することにより、該カラム中で、前記分析対象成分のうち前記第1の分析ステップでは溶出しなかった成分の少なくとも一部を分離し、該カラムから溶出させて前記質量分析装置で分析する第2の分析ステップと、

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。

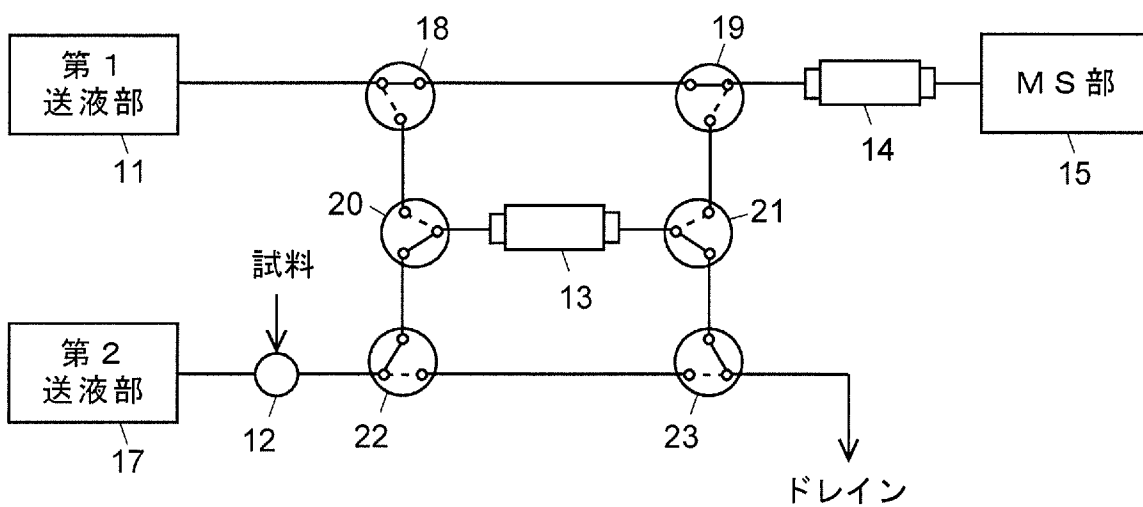
[図1]



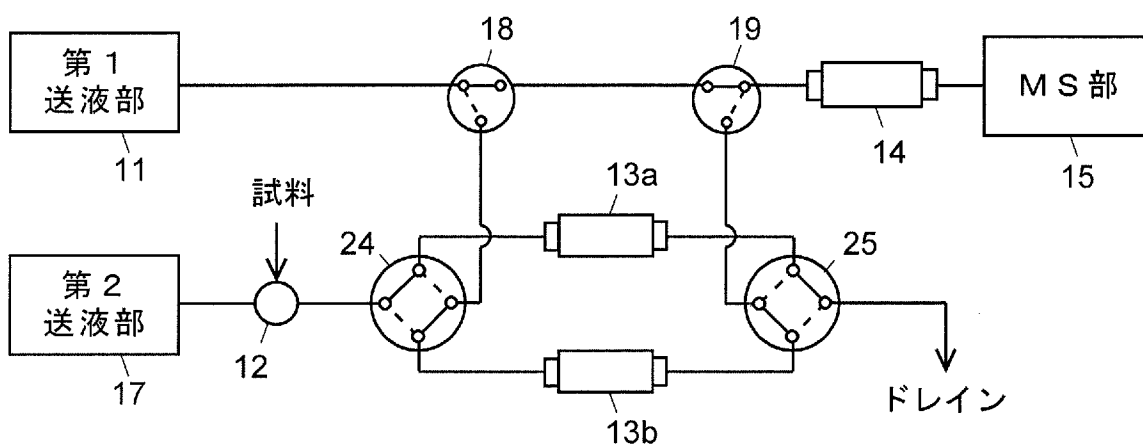
[図2]



[図3]

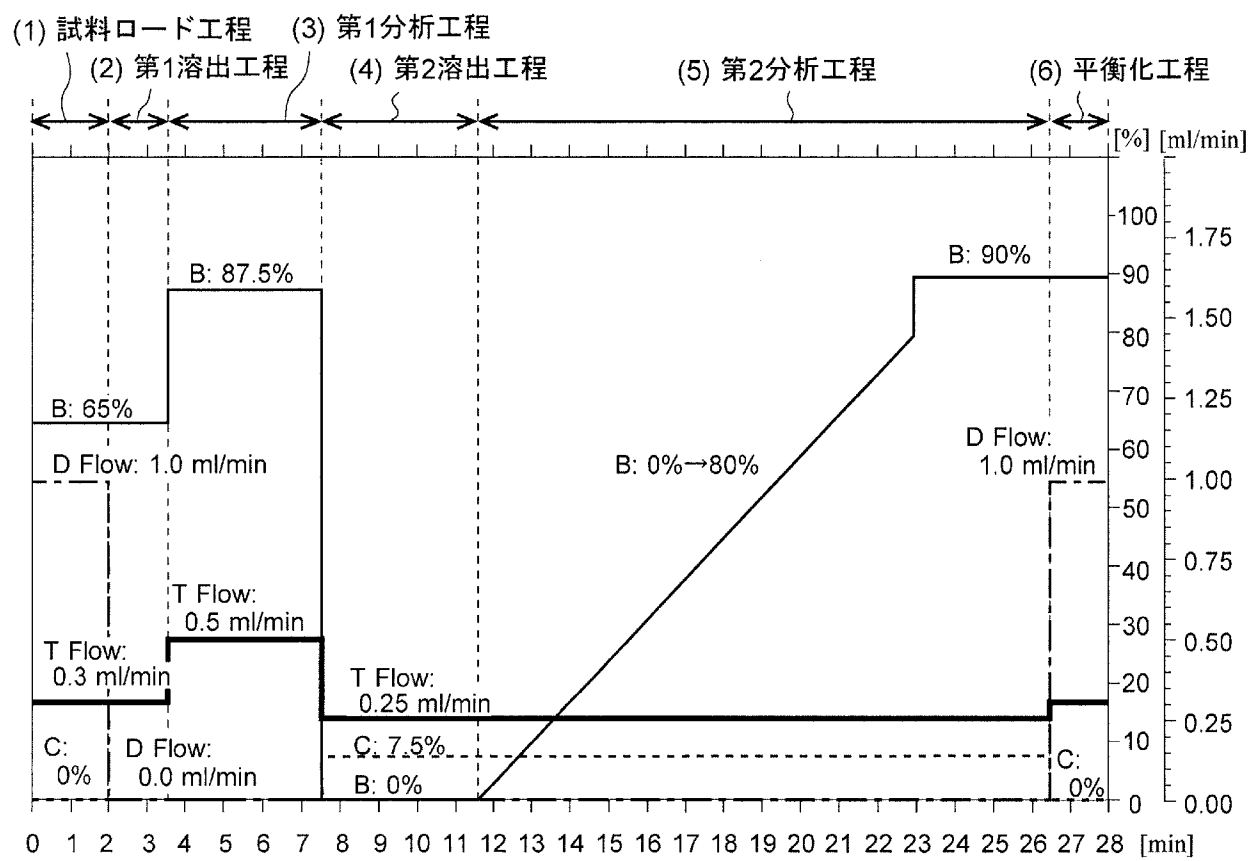


[図4]



[illegible]

[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/46(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)

G01N30/46

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-304435 A (Shimadzu Corp.), 18 December 2008 (18.12.2008), paragraphs [0023] to [0024], [0040] to [0049], [0066] to [0067], [0069] to [0079], [0082] (Family: none)	1-3, 5-6
X Y	LINK, A.J. et al., Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry, Nature Biotechnology, 1999.07, Vol. 17, pp. 676-682	1-3, 5-6 1-3, 5
Y	JP 2002-372522 A (Shimadzu Corp.), 26 December 2002 (26.12.2002), paragraphs [0008] to [0018]; fig. 1 to 3 (Family: none)	1-3, 5

☒ 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
01 June 2017 (01.06.17)

Date of mailing of the international search report
20 June 2017 (20.06.17)

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/JP2017/015184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-276358 A (Shimadzu Corp.), 09 December 2010 (09.12.2010), paragraphs [0009], [0025], [0029], [0032] to [0034]; fig. 1 to 4 (Family: none)	1-3, 5
A	JP 2008-096455 A (Shimadzu Corp.), 24 April 2008 (24.04.2008), paragraphs [0018] to [0030]; fig. 1 to 6 (Family: none)	1-6
A	JP 2008-309699 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 25 December 2008 (25.12.2008), claims; paragraphs [0014] to [0027]; fig. 3 to 5 (Family: none)	1-6
A	JP 11-090102 A (Koshu Eiseiincho), 06 April 1999 (06.04.1999), paragraphs [0020], [0032] to [0039]; fig. 1 (Family: none)	1-6
A	JP 2003-202332 A (Shimadzu Corp.), 18 July 2003 (18.07.2003), paragraph [0011] (Family: none)	1-6
A	JP 60-066161 A (Yokogawa Hokushin Denki Kabushiki Kaisha), 16 April 1985 (16.04.1985), entire text; all drawings (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/46 (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. G01N30/46

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

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
X	JP 2008-304435 A (株式会社島津製作所) 2008.12.18, [0023]-[0024], [0040]-[0049], [0066]-[0067], [0069]-[0079], [0082] (ファミリーなし)	1-3, 5-6
X	LINK, A.J. et al., Direct analysis of protein complexes using	1-3, 5-6
Y	mass spectrometry, Nature Biotechnology, 1999.07, Vol. 17, pp. 676-682	1-3, 5

☒ 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

01.06.2017

国際調査報告の発送日

20.06.2017

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)

大瀧 真理

2 J

6202

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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 2002-372522 A (株式会社島津製作所) 2002. 12. 26, [0008]-[0018] 及び図 1-3 (ファミリーなし)	1-3, 5
Y	JP 2010-276358 A (株式会社島津製作所) 2010. 12. 09, [0009], [0025], [0029], [0032]-[0034] 及び図 1-4 (ファミリーなし)	1-3, 5
A	JP 2008-096455 A (株式会社島津製作所) 2008. 04. 24, [0018]-[0030] 及び図 1-6 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2008-309699 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2008. 12. 25, 特許請求の範囲、[0014]-[0027] 及び図 3-5 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 11-090102 A (公衆衛生院長) 1999. 04. 06, [0020], [0032]-[0039] 及び図 1 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2003-202332 A (株式会社島津製作所) 2003. 07. 18, [0011] (フ ァミリーなし)	1-6
A	JP 60-066161 A (横川北辰電機株式会社) 1985. 04. 16, 全文全図 (フ ァミリーなし)	1-6