

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6916734号
(P6916734)

(45) 発行日 令和3年8月11日 (2021.8.11)

(24) 登録日 令和3年7月20日 (2021.7.20)

(51) Int. Cl.

G 0 1 N 27/62 (2021.01)

F I

G 0 1 N 27/62

G

請求項の数 20 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2017-519888 (P2017-519888)	(73) 特許権者	507301040
(86) (22) 出願日	平成27年10月19日 (2015.10.19)		ラブサイト インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-532558 (P2017-532558A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 951
(43) 公表日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		34, サン ノゼ, ローズ オーチャ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/056288		ード ウェイ 170
(87) 国際公開番号	W02016/061592	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成30年10月5日 (2018.10.5)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/065,600		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成26年10月17日 (2014.10.17)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流体試料中の分析物の濃度を決定するための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要な非分析物の初期成分をさらに含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、前記方法が、前記試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出されるイオン化分析物の量に強度において比例する信号を提供するイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含み、

ここで、前記改善が、

前記流体試料がナノリットルサイズの液滴の形態で前記イオン分析物検出デバイスに導入されるように、揮発およびイオン化の前に前記流体試料のナノリットルサイズの液滴を音響的に生成すること、ならびに

(a) 前記流体試料中の前記初期成分として機能し、

(b) 前記流体試料を揮発させると、前記必要な初期成分、前記分析物、または前記必要な初期成分および前記分析物の両方よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす分解反応を受け、かつ

(c) 前記初期成分を使用して得られた分析物信号強度または信号対雑音比のいずれかよりも分析物信号強度における増大および/またはより大きい信号対雑音比をもたらす、代替成分で、前記必要な非分析物の初期成分を代替することを含む、改善された方法。

【請求項 2】

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 5 n l 未満の平均液滴サイズを有する

、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 50 p l 未満の平均液滴サイズを有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 1 p l 未満の平均液滴サイズを有する、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記改善が、前記流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴を生成するための音響排出を使用することをさらに含む、請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記音響排出が、前記流体試料の表面から一貫したサイズの流体液滴の急速排出をもたらす方式で、前記流体試料を含むリザーバーに集中された音響エネルギーを向ける音響排出装置を使用して行われる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記イオン分析物検出デバイスが、質量分析計を含む、請求項 1、2、3、4、5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記イオン化するステップが、化学イオン化、電界脱離イオン化、エレクトロスプレーイオン化、大気圧化学イオン化、マトリックス支援レーザー脱離イオン化、および誘導結合型プラズマイオン化から選択される方法を含む、請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記分析物が、薬物、代謝産物、阻害剤、リガンド、受容体、触媒、合成ポリマー、およびアロステリックエフェクターから選択される、請求項 1、2、3、4、5、6、7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記必要な非分析物の初期成分が、初期塩を含み、前記代替成分が、代替塩を含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

30

前記初期塩および前記代替塩が前記流体試料のための緩衝塩として機能することで、前記流体試料の揮発が前記代替緩衝塩の気相抽出をもたらす、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記分解反応が、分子内反応を含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記反応が、揮発中に生じて、前記流体試料中の少なくとも 1 種の非分析物成分の気相抽出を提供する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記代替成分が、双性イオン化合物を含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記双性イオン化合物が、前記流体試料のための緩衝塩として機能する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記双性イオン化合物が、部分的に不飽和のプレ芳香族化合物を含み、そして前記反応生成物が、揮発性芳香族化合物を含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

質量分析計、流体試料の液滴を生成するための音響排出装置、および前記質量分析計に導入する前に前記液滴を揮発およびイオン化するための手段を使用して、必要な非分析物

50

の初期成分をさらに含む流体試料中の分析物の濃度を決定するための改善されたシステムであって、改善が、前記流体試料中の前記必要な非分析物の初期成分を、前記初期成分と同じ機能を推進するが、それぞれ前記初期成分を使用して得られた分析物信号の強度および/または信号対雑音比に対して、分析物信号の強度における増大および/または信号対雑音比における増大をもたらす代替成分で置き換えることを含み、そして、

ここで、前記流体試料を揮発させると、前記代替成分が、前記必要な初期成分、前記分析物、または前記必要な初期成分および前記分析物の両方よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす分解反応を受ける、システム。

【請求項18】

10

前記初期成分が、初期緩衝塩であり、前記代替成分が、代替緩衝塩であり、前記代替緩衝塩が、前記初期緩衝塩よりも揮発性であり、前記流体試料の揮発が前記代替緩衝塩の気相抽出をもたらす、請求項17に記載の改善されたシステム。

【請求項19】

前記反応生成物が、揮発性芳香族化合物を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項20】

前記反応生成物が、前記代替成分よりも揮発性である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般に、流体試料中の分析物の存在または量を検出するための改善された方法に関し、より具体的には、ナノリットルサイズの流体液滴を生成し、試料を正確に分析するような方法の改善に関する。本発明は、分析化学、生物学的研究、医薬品、および医薬の分野に実用的である。

【背景技術】

【0002】

(背景)

試料中のイオン化種の存在、識別、濃度、および/または量の正確な決定は、多くの分野で極めて重要である。このような分析で使用されるほとんどの技術は、採用される分析機器に導入する前に、流体試料中の種をイオン化することを含む。イオン化方法の選択は、試料の性質および使用される分析技術に応じて決まり、それらに限定されるものではないが、化学イオン化、電子衝撃イオン化、脱離化学イオン化、ならびにエレクトロスプレーイオン化および大気圧化学イオン化を含む大気圧イオン化を含む、多くのイオン化方法が利用可能である。

30

【0003】

分析される生物学的試料中の汚染物質の存在は、多くの理由で明らかに問題がある。汚染物質は、分析手順を妨害し、試料または分析物自体を化学的または物理的に変えるおそれがある。また汚染物質は、測定された分析物濃度が、実際の濃度よりも著しく高くなるか、または低くなる場合があるように、分析物と間違えられるおそれがあり、または分析物が汚染物質と間違えられるおそれがある。同じ問題が、流体試料の必要な成分、例えば緩衝塩、界面活性剤、および分析前の生化学的ステップに必要な不可欠となり得る他の種によって引き起こされるおそれがある。

40

【0004】

質量分析は、分析物をイオン化形態で検出する、十分に確立された技術である。この技術では、試料分子は、イオン化され、得られたイオンは、質量電荷比によって分類される。流体試料に含まれる分析物のために、試料は、典型的にエアロゾルに変換され、そのエアロゾルは、流体イオンを形成するために脱溶媒和、気化、およびイオン化される。

【0005】

50

非分析物種の存在は、分析物濃度が非常に低い場合があり、汚染物質および妨害成分の数および濃度が相対的に高い場合がある質量分析においては、特に問題となり得る。ある研究では、質量分析される生物学的試料において頻繁に見出される汚染物質および妨害成分は650種を超えると記録されている。B. O. Kellerら(2008年)、「Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry」、Anal. Chim. Acta 627巻(1号):71~81頁。これらには、塩、緩衝剤、内因性化合物、界面活性剤、薬物、代謝産物、およびタンパク質が含まれる。これらの種が、信号対雑音比の低下によって検出感度を低減し、分析に欠陥を生じる場合、その問題は、「イオン抑制」として特徴付けられている。Weaverら(2006年) Rapid Communications in Mass Spectrometry 20巻:2559~64頁参照。

10

【0006】

「イオン抑制の主原因は、不揮発性溶質または揮発性が低い溶質(すなわち不揮発性であるか、または分析物よりも揮発性が低い溶質)の存在によって引き起こされるスプレー液滴溶液の特性の変化である」と想定されている。Kingら(2000年) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11巻:942~50頁を引用している Annesley(2003年)「Ion Suppression in Mass Spectrometry」、Clinical Chemistry 49巻(7号):1041~1044頁参照。この参考文献は、不揮発性のまたは揮発性が低い汚染物質および成分が、液滴の形成または液滴の揮発の効率を変化させ、それによって、最終的に検出器に到達する気相中に荷電した分析物の量に影響を及ぼすと説明している。Annesleyは、より高い質量の分子が、より小さい分子の信号を抑制する傾向があり、より極性の分析物が、イオン抑制を受けやすいことを示す研究を引用している。Annesleyは1042頁で、Sternnerら(2000年) J. Mass Spectrom. 35巻:385~91号、およびBonfiglioliら(1999年) Rapid Commun. Mass Spectrom. 13巻:1175~85頁を引用している。Weaverらは、イオン抑制の根本にある、以下のいくつかの起こり得る機序を引用している。(1)分析物とイオン抑制物質の間で電荷を競合し、分析物のイオン化が低減に至ること、(2)表面張力の増大および液滴粘度の増大を引き起こすイオン抑制物質の濃度が高いと、蒸発効率が低下すること、ならびに(3)試料中のイオン化分析物と他の種の間の気相反応の結果、分析物イオンからの電荷が全体的に喪失すること。Weaverら、2562頁。

20

30

【0007】

エレクトロスプレーイオン化(ESI)は、過剰の液滴電荷にかなり依存して、比較的複雑なイオン化機序を有するので、イオン抑制の原因および潜在的な解決法を模索する場合には考慮する追加の因子がある。高濃度の多くの分析物について、ESIは、おそらく液滴表面の分析物の飽和によって引き起こされる電荷過剰の低減に起因して、検出器の応答線形性の喪失を呈し、その後、液滴のさらに内側から気相イオンが排出されるのを阻害することが広く観測されている。したがって、空間および/または電荷の競合は、ESIのイオン抑制源とみなされ得る。分析物の物理的および化学的特性の両方(例えば塩基性度および表面活性)によって、それらの固有のイオン化効率が決定される。生物学的試料マトリックスは、自然に、高い塩基性度および表面活性を有する多くの内因性種を含む傾向があり、したがって、試料中のこれらの種の総濃度は、イオン抑制が予測され得るレベルにまで急速に達する。

40

【0008】

ESIにおけるイオン抑制の別の説明は、存在する種よりも液滴自体の物理的特性を考慮するものである。前述の通り、高濃度の妨害成分は、表面張力および粘度を増大し、それによって蒸発効率が低下し、このことが、イオン化効率に著しい作用を及ぼすことが知られている。

50

【 0 0 0 9 】

E S Iにおけるイオン抑制を説明するさらなる理論は、不揮発性種の存在に関するものであり、この不揮発性種は、液滴中の分析物の共沈殿を引き起こすおそれがあり（したがってイオン化を防止する）、または気相イオンを効率的に形成するためにイオン蒸発および/もしくは電荷残留機序に必要な臨界半径まで液滴サイズが縮小するのを防止するおそれがある。イオン抑制は、モニタされる分析物の濃度に依存する場合があります、より低い検出閾値への絶えず増大する需要と共に、イオン抑制は、より深刻な問題になるおそれがあることも指摘されるべきである。

【 0 0 1 0 】

イオン抑制は、主に、透析、液体クロマトグラフィー、固相抽出、またはイオン交換を使用して流体試料を脱塩することによって対処されてきた。これらのプロセスは、時間、材料および機器を必要とし、既に少ない試料の利用可能な量を減少するおそれがある。さらに、緩衝系などの特定のイオン性のまたはイオン化できる種は、試料中に維持されることが必要不可欠であり得る。

10

【 0 0 1 1 】

イオン抑制に対処する理想的な方法は、以下のものとなり得る。

【 0 0 1 2 】

浄化および脱塩を含む追加のプロセスステップおよび材料の必要性を排除すること。

【 0 0 1 3 】

追加の処理時間の必要性を排除すること。

20

【 0 0 1 4 】

非常に小さい試料サイズを伴う使用に適合することができ、小さい試料サイズのごく一部を消費し、低い分析物濃度でも検出することができ、非常に小さい液滴から構成されること。

【 0 0 1 5 】

ハイスループット質量分析などの高速分析システムにおいて実施することができ、1日最大少なくとも50,000種またはそれを超える試料の分析を最適に行うことができること。

汚染物質および妨害成分を除去するために、試料を分析前に「浄化する」必要性を排除すること。

30

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 非特許文献 1 】 B . O . K e l l e r ら (2 0 0 8 年) 、 A n a l . C h i m . A c t a 6 2 7 巻 (1 号) : 7 1 ~ 8 1 頁

【 非特許文献 2 】 W e a v e r ら (2 0 0 6 年) R a p i d C o m m u n i c a t i o n s i n M a s s S p e c t r o m e t r y 2 0 巻 : 2 5 5 9 ~ 6 4 頁

【 非特許文献 3 】 K i n g ら (2 0 0 0 年) J . A m . S o c . M a s s S p e c t r o m . 1 1 巻 : 9 4 2 ~ 5 0 頁

【 非特許文献 4 】 A n n e s l e y (2 0 0 3 年) 、 C l i n i c a l C h e m i s t r y 4 9 巻 (7 号) : 1 0 4 1 ~ 1 0 4 4 頁

40

【 非特許文献 5 】 S t e r n e r ら (2 0 0 0 年) J . M a s s S p e c t r o m . 3 5 巻 : 3 8 5 ~ 9 1 号

【 非特許文献 6 】 B o n f i g l i o ら (1 9 9 9 年) R a p i d C o m m u n . M a s s S p e c t r o m . 1 3 巻 : 1 1 7 5 ~ 8 5 頁

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 7 】

(発明の要旨)

したがって、本発明は、流体試料中の分析物の濃度を正確に決定するための改善された

50

方法を提供することによって、当技術分野における前述の必要性に対処する。

【0018】

一実施形態では、必要な非分析物成分も含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、この方法は、流体試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出される分析物の量に強度において比例する分析物信号を提供するイオン分析物検出デバイス、例えば質量分析計に導入するステップとを含み、改善が、必要な非分析物の初期成分を、(a) 流体試料中の必要な非分析物成分として機能し、すなわち流体試料に対して同じ目的を推進し、(b) 初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性であり、ならびに/または初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす化学反応を受け、(c) 初期成分を使用して得られた信号強度または信号対雑音比のいずれかよりも大きい分析物信号の強度および/または信号対雑音比をもたらす代替成分で置き換えることを含む、方法が提供される。

10

【0019】

別の実施形態では、音響排出は、ナノリットルサイズの液滴を生成し、次にその液滴を揮発させ、イオン化し、分析するために使用され、ここで「ナノリットルサイズ」の液滴は、本明細書では5 n lまたはそれ未満の液滴と定義される。音響排出では、音響排出装置は、流体試料の表面から流体液滴の排出をもたらす方式で、流体試料を含むリザーバーに集中された音響エネルギーを向ける。音響排出は、他の液滴生成法よりも多くの利点を提供する。例えば、音響流体排出デバイスは、目詰まりさせる誤った流体または不適切なサイズの液滴の影響を受けず、音響技術には、管または任意の侵襲的な機械作用を使用する必要がない。例えばE l l s o nらの米国特許第6, 802, 593号に記載の音響排出技術では、迅速な試料処理およびナノリットルまたはさらにはピコリットル範囲の液滴の生成が可能である。さらに、音響排出は、液滴サイズを調節することができ、一貫したサイズの液滴を反復して生成することができる。本明細書に参照によって組み込まれるS t e a r n sらの米国特許第6, 416, 164 B 1号参照。その特許文書で説明されている通り、流体表面から音響的に排出された液滴のサイズは、音響出力、音響周波数、トーンバースト期間、および/または集束レンズのF数を変えることによって注意深く調節することができる。

20

【0020】

さらなる一実施形態では、双性イオン化合物は、本発明の方法において代替の非分析物成分として使用される。双性イオン化合物は、揮発すると、初期の非分析物成分および/または分析物よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす化学反応を受ける。

30

【0021】

別の実施形態では、必要な非分析物成分も含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、方法が、流体試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出される分析物の量に強度において比例する分析物の信号を提供するイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含み、代替成分が、必要な非分析物成分を置き換えるように選択され、流体試料を揮発させると、必要な初期成分および/または分析物よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす反応を受ける、改善された方法が提供される。

40

【0022】

別の実施形態では、前述の反応が分解反応である、前述の方法が提供される。

【0023】

さらなる一実施形態では、反応が、いかなる著しいイオン抑制も引き起こさず、かつ/または初期成分よりも揮発性である、より低い分子量の反応生成物を提供する代替成分の連結を、化学的に、光分解により、または熱により開裂する、前述の方法が提供される。

【0024】

またさらなる一実施形態では、質量分析計、流体試料の液滴を生成するための音響排出

50

装置、および液滴を質量分析計に導入する前に揮発およびイオン化するための手段を含む、流体試料中の分析物の濃度を決定するためのシステムであって、改善が、流体試料中の少なくとも１種の必要な成分を、初期成分と同じ機能を推進するが、それぞれ初期成分を使用して得られた分析物信号の強度および／または信号対雑音比に対して、分析物信号および／または信号対雑音比の強度の増大をもたらす代替成分で置き換えることを含む、システムが提供される。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、システムの代替成分は、化学的に、熱により、または光分解により開裂されて、いかなる著しいイオン抑制も引き起こさず、かつ／または初期成分よりも揮発性である、より低い分子量の反応生成物をもたらすことができる連結を含む。代替成分が、光分解によりより開裂可能な連結を含む場合、システムは、連結を開裂するのに有効な放射線源をさらに含む。

10

【 0 0 2 6 】

本発明の方法およびシステムは、一般に、代替成分を用いずに得られた分析物の信号強度および信号対雑音比に対して、分析物の信号強度および／または信号対雑音比を、少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２５％増大する。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

必要な非分析物の初期成分をさらに含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、前記方法が、前記試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出されるイオン化分析物の量に強度において比例する信号を提供するイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含み、改善が、前記必要な非分析物の初期成分として、

20

(a) 前記流体試料中の前記初期成分として機能し、

(b) (i) 前記必要な初期成分および／もしくは前記分析物の両方よりも揮発性であり、または (i i) 前記流体試料を揮発させると、前記必要な初期成分および／もしくは前記分析物よりも揮発性である少なくとも１種の反応生成物をもたらす反応を受け、

(c) 前記初期成分を使用して得られた信号強度または信号対雑音比のいずれかよりも信号強度における増大および／またはより大きい信号対雑音比をもたらす、代替成分を用いることを含む、改善された方法。

30

(項目 2)

前記改善が、揮発およびイオン化の前に、流体試料のナノリットルサイズの液滴を生成することをさらに含み、前記流体試料が、ナノリットルサイズの液滴の形態で前記イオン分析物検出デバイスに導入される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 5 n l 未満の平均液滴サイズを有する、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 2 . 5 n l 未満の平均液滴サイズを有する、項目 3 に記載の方法。

40

(項目 5)

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 5 0 p l 未満の平均液滴サイズを有する、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴が、約 1 p l 未満の平均液滴サイズを有する、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記改善が、前記流体試料の前記ナノリットルサイズの液滴を生成するための音響排出を使用することをさらに含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 8)

50

前記音響排出が、前記流体試料の表面から一貫したサイズの流体液滴の急速排出をもたらす方式で、前記流体試料を含むリザーバーに集中された音響エネルギーを向ける音響排出装置を使用して行われる、項目 6 に記載の方法。

(項目 9)

前記イオン分析物検出デバイスが、質量分析計を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記イオン化するステップが、化学イオン化、電界脱離イオン化、エレクトロスプレーイオン化、大気圧化学イオン化、マトリックス支援レーザー脱離イオン化、および誘導結合型プラズマイオン化から選択される方法を含む、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

前記分析物が、薬物、代謝産物、阻害剤、リガンド、受容体、触媒、合成ポリマー、およびアロステリックエフェクターから選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

前記分析物が、生体分子である、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

前記生体分子が、ヌクレオチド分析物、ペプチド分析物、およびサッカライド分析物から選択される、項目 13 に記載の方法。

(項目 14)

前記必要な非分析物の初期成分が、初期塩を含み、前記代替成分が、代替塩を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 15)

前記初期塩および前記代替塩が、前記流体試料のための緩衝塩として機能する、項目 14 に記載の方法。

(項目 16)

前記代替塩が、弱酸または弱塩基から形成された一価のイオンを含む、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

前記代替塩が、炭酸水素アンモニウム、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、酢酸ピリジニウム、ギ酸ピリジニウム、酢酸エチルモルホリニウム、酢酸トリメチルアミノ、およびギ酸トリメチルアミノから選択される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記代替塩が、炭酸水素アンモニウム、ギ酸アンモニウム、および酢酸アンモニウムから選択される、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記代替成分が、前記必要な初期成分および / または前記分析物の両方よりも揮発性である、項目 1 に記載の方法。

(項目 20)

前記代替成分が、前記流体試料を揮発させると、前記必要な初期成分および / または前記分析物よりも揮発性である少なくとも 1 種の反応生成物をもたらす反応を受けるように選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 21)

前記反応が、分解反応である、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記少なくとも 1 種の反応生成物が、芳香族化合物を含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記反応が、揮発中に生じて、前記流体試料中の少なくとも 1 種の非分析物成分の気相抽出を提供する、項目 20 に記載の方法。

(項目 24)

前記代替成分が、双性イオン化合物を含む、項目 20 に記載の方法。

(項目 25)

10

20

30

40

50

前記双性イオン化合物が、前記流体試料のための緩衝塩として機能する、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記双性イオン化合物が、部分的に不飽和のプレ芳香族化合物を含む、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記反応が、前記代替成分中の連結の化学的開裂を含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記連結を化学的に開裂するのに有効な試薬が、揮発の前に前記流体試料に添加される、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記反応が、前記代替成分の連結の光分解開裂を含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記流体試料が、揮発中に照射される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記反応が、前記代替成分中の熱に不安定な連結の熱開裂を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 2)

必要な非分析物の初期成分をさらに含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、前記方法が、前記流体試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出されるイオン化分析物の量に強度において比例する分析物の信号を提供するイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含み、改善が、

前記必要な非分析物の初期成分を、前記流体試料の揮発中に、前記流体試料中の前記初期成分として機能する反応生成物をもたらす反応を受け、前記初期成分、前記分析物、またはその両方、および前記分析物よりも揮発性であり、前記初期成分を使用して得られた分析物信号の強度および信号対雑音比に対して、前記分析物の信号強度における増大および/または信号対雑音比における増大をもたらす、双性イオン化合物で置換することを含む、方法。

(項目 3 3)

必要な非分析物の初期成分をさらに含む流体試料中の、分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、前記方法が、前記流体試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出されるイオン化分析物の量に強度において比例する分析物信号を提供するイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含み、改善が、

前記必要な非分析物の初期成分を、前記流体試料の揮発中に、揮発性芳香族化合物をもたらす、二酸化炭素を発生させ、アンモニア、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミンまたは窒素ガスから選択される窒素群、および揮発性芳香族化合物を放出する分解反応を受ける、部分的に不飽和のプレ芳香族双性イオン化合物で置換することを含む、方法。

(項目 3 4)

質量分析計、流体試料の液滴を生成するための音響排出装置、および前記質量分析計に導入する前に前記液滴を揮発およびイオン化するための手段を使用して、流体試料中の分析物の濃度を決定するための改善されたシステムであって、改善が、前記流体試料中の少なくとも 1 種の必要な成分を、前記初期成分と同じ機能を推進するが、それぞれ前記初期成分を使用して得られた分析物信号の強度および/または信号対雑音比に対して、分析物信号の強度における増大および/または信号対雑音比における増大をもたらす代替成分で置き換えることを含む、システム。

(項目 3 5)

前記初期成分が、初期緩衝塩であり、前記代替成分が、代替緩衝塩であり、前記代替緩衝塩が、前記初期緩衝塩よりも揮発性であり、前記流体試料の揮発が前記代替緩衝塩の気

10

20

30

40

50

相抽出をもたらす、項目 3 4 に記載の改善されたシステム。

(項目 3 6)

前記代替成分が、化学的に、熱により、または光分解により開裂されて、より低い分子量の反応生成物をもたらすことができる連結を含む、項目 3 4 に記載の改善されたシステム。

(項目 3 7)

前記代替成分が、光分解により開裂され得る連結を含み、デバイスが、前記連結を開裂するのに有効な放射線源をさらに含む、項目 3 6 に記載の改善されたシステム。

(項目 3 8)

前記放射線源が、紫外線源である、項目 3 7 に記載の改善されたシステム。

10

(項目 3 9)

分析物信号強度および / または信号対雑音比の前記増大が、少なくとも 1 0 % である、項目 3 4 に記載の改善されたシステム。

(項目 4 0)

分析物信号強度および / または信号対雑音比の前記増大が、2 5 % である、項目 3 9 に記載の改善されたシステム。

(項目 4 1)

分析物信号強度および / または信号対雑音比の前記増大が、少なくとも 1 0 % である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4 2)

20

分析物信号強度および / または信号対雑音比の前記増大が、2 5 % である、項目 4 1 に記載の改善されたデバイス。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】図 1 は、実施例 1 に記載のカフェインの質量分析検出と関連して記載される、 $m/z = 195$ における正規化信号対酢酸アンモニウム () または塩化ナトリウム (■) 濃度 (m M) のプロットである。

【 0 0 2 8 】

【図 2】図 2 は、実施例 2 に記載の 6 つの異なる緩衝塩について、検出されたカフェイン分析物に関する信号強度対塩濃度のプロットである。

30

【 0 0 2 9 】

【図 3】図 3 は、揮発性マグネシウム塩 (酢酸マグネシウム) と、比較目的で不揮発性マグネシウム塩 (塩化マグネシウム) を使用して実施した、実施例 3 において行ったキナーゼアッセイのルミネッセンス対時間のプロットである。

【 0 0 3 0 】

【図 4】図 4 は、開裂可能な緩衝液化合物 (3 0) の合成の模式図である。

【 0 0 3 1 】

【図 5】図 5 は、2 つの代替経路を使用する、開裂可能な緩衝液化合物 (3 1) の合成の模式図である。

【発明を実施するための形態】

40

【 0 0 3 2 】

(発明の詳細な説明)

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が関与する技術分野の技術者によって一般に理解される意味を有する。本発明の説明において特に重要な特定の用語法を、以下に定義する。

【 0 0 3 3 】

本明細書および添付の特許請求の範囲では、単数形「1 種の (a)」、「1 種の (a n)」および「その (t h e)」は、文脈によって別段明示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば「1 種の分析物」は、単一分析物だけでなく、2 種またはそれを超える異なる分析物の組合せも指し、「1 種の代替成分」は、このような単一成分ま

50

たは複数の成分（例えば混合物）等を指す。

【0034】

本明細書で使用される用語「イオン化できる」は、イオン化され得る種を指す。したがって、本明細書において「イオン化できる」種は、電子的に中性の形態またはイオン化（または「イオンの」）形態で、個々のイオンとしてまたは塩の成分として存在し得る。イオン化できる種は、緩衝系における場合のように、電気的に中性の形態と、イオン化形態の両方で存在することもできる。一例として、酢酸（ CH_3COOH ）は、プロトン化カルボキシル基と共に電子的に中性の形態で存在し得るイオン化できる化合物であり、または酢酸イオン（ CH_3COO^- ）をもたらすために除去されるプロトンと共にイオン化形態で存在することができるか、または電子的に中性の形態とイオン化形態の組合せとして存在することができる。別の例として、カルボン酸基およびアミノ基を含む双性イオンは、カルボン酸基がカルボキシレートにイオン化され、アミノ基がプロトン化されて、カチオン性窒素含有置換基をもたらす、電気的に中性の形態またはイオン化形態であり得る。

10

【0035】

用語「揮発性」は、本明細書では、イオン、塩、または化合物が、流体液滴の表面から離れ、気化条件下で、本明細書に論じられる気化方法を使用して気相に入る相対的傾向を指すために使用される。この用語は、本明細書では相対的な意味で使用され、したがって、代替種は、記載の方法と関連して用いられる揮発条件下で、初期の非分析物成分または分析物のいずれかよりも揮発する可能性が高い限り、「揮発性」である。

20

【0036】

用語「汚染物質」および「成分」は、イオン抑制を引き起こす流体試料中の種を指すために使用される。しかし、用語「汚染物質」は、非意図的または偶発的に試料に導入され、溶媒、試薬、界面活性剤等中に存在していたおそれがある種を指すのに対して、用語「成分」は、必要な所期の目的を推進する種を指し、例えば、分析前に生化学的処理に必要な種、および/または流体試料の化学的もしくは物理的パラメータを維持するのに必要な種、例えばpHを維持するための緩衝系を指す。

【0037】

用語「音響放射」および「音響エネルギー」は、本明細書では交換可能に使用され、音波形態のエネルギーの放出および伝播を指す。音響放射は、以下に論じる通り、他の波形と同様に集束手段を使用して集束され得る。

30

【0038】

用語「集束手段」および「音響集束手段」は、レンズのように作用する音響エネルギー源とは別のデバイスによって、または強め合う干渉および弱め合う干渉によって焦点に音響エネルギーを収束するための音響エネルギー源の空間配置によって、音波を焦点に収束させる手段を指す。集束手段は、湾曲表面を有する固体部材と同様に簡単なものであってよく、または音響放射を方向付けるために回折を用いる Fresnel レンズに見出される構造などの複雑な構造を含み得る。また、適切な集束手段には、当技術分野で公知であり、そして、例えば、Nakayasura の米国特許第 5,798,779 号および Amemiya ら (1997 年) Proceedings of the 1997 IS & T NIP13 International Conference on Digital Printing Technologies、698~702 頁に記載のフェーズドアレイ方法が含まれる。

40

【0039】

本明細書で使用される用語「音響カップリング」および「音響的にカップリングされた」は、音響エネルギーの実質的な喪失なしに、物体間で音響放射を伝送可能にするために、ある物体が別の物体と直接的または間接的に接触して置かれる状態を指す。2つのアイテムが間接的に音響的にカップリングされる場合、音響放射が伝達し得る中間体を提供するための「音響カップリング媒体」が必要とされる。したがって、排出装置は、例えば流体に排出装置を浸漬させることによって、または排出装置と流体の間に音響カップリング媒体を介在させて、排出装置によって発生させた音響放射を、音響カップリング媒体を介

50

して流体に伝送することによって、流体と音響的にカップリングすることができる。

【0040】

本明細書で使用される用語「リザーバー」は、流体を保持または含むためのレセプタクルまたはチャンバーを指す。したがって、リザーバー内の流体は、必然的に自由表面を有し、すなわち液滴をリザーバーから排出可能にする表面を有する。その最も簡単な形態の1つでは、リザーバーは、単に流体と固体表面の間の接触に起因して流体を保持するのに十分な濡れ特性を有する固体表面からなる。

【0041】

本明細書で使用される用語「流体」は、固体ではなく、または少なくとも部分的に気体および/もしくは液体である物質を指す。流体は、最小限に、部分的にまたは完全に溶媒和され、分散または懸濁している固体を含み得る。流体の例として、水性の液体（水自体および塩水を含む）および非水性の液体、例えば有機溶媒等が挙げられるが、それらに限定されない。

【0042】

したがって、本発明は、流体試料中の分析物の濃度を決定するための改善された方法であって、流体試料が、分析物に加えて、必要な非分析物成分、例えばpHを維持するための緩衝塩、またはイオン強度を維持するための塩を含む緩衝系を含み、この方法は、流体試料を揮発およびイオン化するステップと、揮発およびイオン化された試料を、検出されるイオン化分析物の量に強度において比例する分析物信号を生成する、質量分析計などのイオン分析物検出デバイスに導入するステップとを含む、改善された方法を提供する。本発明によって提供される改善は、初期の非分析物成分に代わって、初期成分と同じ目的を推進するが、初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性であるか、または揮発すると、初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性である反応生成物をもたらす化学反応を受ける代替成分を採用することを含む。代替成分は、初期の非分析物成分を用いて得られた分析物の信号および信号対雑音比と比較して、より強力な分析物信号および/または高い信号対雑音比をもたらす。好ましい代替成分は、揮発性の考察により、少なくとも部分的に、信号対雑音比を少なくとも20%増大し、このような特に好ましい成分は、信号対雑音比を50%またはそれを超えて増大する。必要な非分析物成分の目的は、前述の通り、所定のpHまたは必要なイオン強度を維持することであり得る。

【0043】

流体試料中の分析物は、目的のいかなる分析物であってもよい。分析物の例として、薬物、代謝産物、阻害剤、リガンド、受容体、触媒、合成ポリマー、およびアロステリックエフェクターが挙げられるが、それらに限定されない。しばしば分析物は、「生体分子」であり、すなわち天然に存在しようと、組換えで生成されようと、全体的もしくは部分的に化学的に合成されようと、または化学的もしくは生物学的に修飾されようと、生物の一部であるか、生物の一部であったか、または生物の一部であり得る任意の有機分子である。この用語は、例えば、ヌクレオチド分析物、ペプチド分析物、およびサッカライド(saccharidic)分析物を包含する。

【0044】

ヌクレオチド分析物は、ヌクレオシドまたはヌクレオチド自体であってよいが、従来のプリンおよびピリミジン塩基、すなわち、アデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、グアニン(G)およびウラシル(U)だけでなく、それらの保護形態も含むヌクレオシドおよびヌクレオチドを含むこともでき、例えば、塩基が、アセチル、ジフルオロアセチル、トリフルオロアセチル、イソブチリルまたはベンゾイル、ならびにプリン類似体およびピリミジン類似体などの保護基で保護されたものを含むことができる。適切な類似体は、当業者に公知であり、関連文書および文献に記載されている。一般的な類似体には、1-メチルアデニン、2-メチルアデニン、N⁶-メチルアデニン、N⁶-イソペンチル-アデニン、2-メチルチオ-N⁶-イソペンチルアデニン、N,N-ジメチルアデニン、8-プロモアデニン、2-チオシトシン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、5-エチルシトシン、4-アセチルシトシン、1-メチルグアニン、2-メチルグアニ

10

20

30

40

50

ン、7 - メチルグアニン、2 , 2 - ジメチルグアニン、8 - ブロモ - グアニン、8 - クロログアニン、8 - アミノグアニン、8 - メチルグアニン、8 - チオグアニン、5 - フルオロ - ウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、5 - エチルウラシル、5 - プロピルウラシル、5 - メトキシウラシル、5 - ヒドロキシメチルウラシル、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - (メチル - アミノメチル)ウラシル、5 - (カルボキシメチルアミノメチル) - ウラシル、2 - チオウラシル、5 - メチル - 2 - チオウラシル、5 - (2 - ブロモビニル)ウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、プソイドウラシル、1 - メチルプソイドウラシル、キューオシン (queosine)、イノシン、1 - メチルイノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、2 - アミノプリン、6 - ヒドロキシアミノプリン、6 - チオプリンおよび2 , 6 - ジアミノプリンが含まれるが、それらに限定されない。さらに、用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオチド」は、従来のリボースおよびデオキシリボース糖だけでなく、他の糖も同様に含む部分を含む。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、糖部分上の修飾も含み、例えばヒドロキシル基の1つまたは複数は、ハロゲン原子もしくは脂肪族基で置き換えられ、またはエーテル、アミン等として官能化される。

【0045】

またヌクレオチド分析物は、オリゴヌクレオチドを含み、ここで用語「オリゴヌクレオチド」は、本発明の目的では、ポリデオキシリボ - ヌクレオチド (2 - デオキシ - D - リボースを含む)、ポリリボヌクレオチド (D - リボースを含む)、プリンまたはピリミジン塩基のN - グリコシドである任意の他のタイプのポリヌクレオチド、および非ヌクレオチド骨格を含む他のポリマーの総称である。したがって、本明細書のオリゴヌクレオチド分析物は、オリゴヌクレオチド修飾を含むことができ、例えば、天然に存在するヌクレオチドの1つまたは複数の類似体による置換、ヌクレオチド間修飾 (internucleotide modifications)、例えば無電荷連結 (例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメート等) を有するもの、負電荷連結 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等) を有するもの、および正電荷連結 (例えば、アミノアルキルホスホロアミデート、アミノアルキルホスホトリエステル) を有するものなど、ペンダント部分を含むもの、例えばタンパク質など (ヌクレアーゼ、毒素、抗体、信号ペプチド、ポリ - L - リシン等を含む)、挿入剤を有するもの (例えば、アクリジン、ソラレン等)、キレート剤を含むもの (例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等) を含む得る。用語「ポリヌクレオチド」と「オリゴヌクレオチド」の長さには区別が企図されず、これらの用語は、交換可能に使用される。これらの用語は、分子の主な構造だけを指す。本明細書で使用されるヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの記号は、IUPAC - IUB Commission of Biochemical Nomenclature recommendations (Biochemistry 9巻: 4022頁、1970年) によるものである。

【0046】

「ペプチド」分析物は、1つまたは複数のアミノ酸から構成された任意の構造を含むことを企図され、したがって、ペプチド、ジペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を含む。ペプチド分析物のすべてまたは一部を形成するアミノ酸は、20種の従来の天然に存在するアミノ酸、すなわちアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リシン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、スレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、およびチロシン (Y)、ならびに従来にないアミノ酸、例えば従来のアミノ酸の異性体および修飾物、例えばD - アミノ酸、非タンパク質アミノ酸、翻訳後に修飾されたアミノ酸、酵素的に修飾されたアミノ酸、β - アミノ酸、アミノ酸を模倣するように設計された構築物または構造 (例えば、α , α - 二置換アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸、β - アラニン、ナフチルアラニン、3 - ピリジルアラニン、4 - ヒドロキシプロリン、O - ホスホセリン、N -

10

20

30

40

50

アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリシン、およびノルロイシン)、ならびに例えばRosenbergらの米国特許第5,679,782号に記載の他の従来にないアミノ酸のいずれかであり得る。またペプチド分析物は、非ペプチド骨格連結を含むことができ、天然に存在するアミド - CONH - 連結は、ペプチド骨格内の1つまたは複数の部位において、従来にない連結、例えばN置換アミド、エステル、チオアミド、レトロペプチド(-NHCO-)、レトロチオアミド(-NHCS-)、スルホンアミド(-SO₂NH-)、および/またはペプチド(N置換グリシン)連結で置き換えられる。したがって、ペプチド分析物には、疑似ペプチドおよびペプチド模倣薬が含まれ得る。ペプチド分析物は、(a)天然に存在し、(b)化学合成によって生成され、(c)組換えDNA技術によって生成され、(d)より大きい分子の生化学的もしくは酵素的断片化によって生成され、(e)先に列挙した方法(a)~(d)の組合せから得られた方法によって生成され、または(f)ペプチドを生成するための任意の他の手段によって生成され得る。

10

【0047】

サッカライド分析物には、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、ムコ多糖またはペプチドグリカン(ペプチド-多糖)等が含まれるが、それらに限定されない。

【0048】

本発明の例示的な一実施形態は、標準緩衝塩よりも揮発性であり、分析物の大きい信号および/または高い信号対雑音比から明らかな通り、イオン抑制を低減する代替緩衝塩によって、イオン抑制と関連する標準的な相対的に不揮発性の緩衝塩を置き換えることを含む。流体試料中の相対的に不揮発性の塩は、イオン抑制を引き起こすおそれがあり、したがって不明確または不正確な結果を引き起こすおそれがある、よく見られる汚染物質となることが確立されている。

20

【0049】

この実施形態では、必要な非分析物成分は、標準緩衝系の塩成分であり、代替成分は、同じ目的を推進し、すなわち同じpHを維持し、標準緩衝塩に見られるイオン抑制を低減または排除する、より揮発性である塩である。一般に、強酸または塩基の塩は、本発明の目的には揮発性が十分ではない。例えば、ナトリウムカチオン、カリウムカチオン、カルシウムカチオン、およびテトラブチルアンモニウムカチオンは、硫酸イオンおよび硝酸イオンなどのアニオンと同様に回避されるべきである。注目に値する例外が塩酸であり、塩酸は、水中で強酸であるが、気相中では相対的に弱酸である。さらに、硫酸イオン、クエン酸イオンおよびリン酸イオンなどの複数の電荷を担持しているイオンは、揮発性である可能性が低い。最後に、脂肪酸塩などのより高い分子量の塩は、非常に高温の場合を除いて、揮発性である可能性が低い。

30

【0050】

従来の緩衝塩または初期の非分析物成分を置き換えることができる相対的に揮発性の緩衝塩の例として、以下が挙げられるが、それらに限定されない。

【0051】

炭酸水素アンモニウム

【0052】

ギ酸アンモニウム

【0053】

酢酸アンモニウム

【0054】

プロピオン酸アンモニウム

【0055】

酪酸アンモニウム

【0056】

ギ酸ピリジニウム

【0057】

40

50

酢酸ピリジニウム	
【 0 0 5 8 】	
プロピオン酸ピリジニウム	
【 0 0 5 9 】	
酪酸ピリジニウム	
【 0 0 6 0 】	
酢酸エチルモルホリニウム	
【 0 0 6 1 】	
ギ酸ジメチルアミノ	
【 0 0 6 2 】	10
酢酸ジメチルアミノ	
【 0 0 6 3 】	
プロピオン酸ジメチルアミノ	
【 0 0 6 4 】	
酪酸ジメチルアミノ	
【 0 0 6 5 】	
ギ酸メチルエチルアミノ	
【 0 0 6 6 】	
酢酸メチルエチルアミノ	
【 0 0 6 7 】	20
プロピオン酸メチルエチルアミノ	
【 0 0 6 8 】	
酪酸メチルエチルアミノ	
【 0 0 6 9 】	
ギ酸ジエチルアミノ	
【 0 0 7 0 】	
酢酸ジエチルアミノ	
【 0 0 7 1 】	
プロピオン酸ジエチルアミノ	
【 0 0 7 2 】	30
酪酸ジエチルアミノ	
【 0 0 7 3 】	
前述の群の中でも、好ましい揮発性緩衝塩には、以下が含まれる。	
【 0 0 7 4 】	
炭酸水素アンモニウム	
【 0 0 7 5 】	
ギ酸アンモニウム	
【 0 0 7 6 】	
酢酸アンモニウム	
【 0 0 7 7 】	40
酢酸ピリジニウム	
【 0 0 7 8 】	
ギ酸ピリジニウム	
【 0 0 7 9 】	
酢酸エチルモルホリニウム	
【 0 0 8 0 】	
酢酸トリメチルアミノ	
【 0 0 8 1 】	
ギ酸トリメチルアミノ	
【 0 0 8 2 】	50

前述の塩は、単に代表的なものであり、置き換える塩と同じ目的を推進し、本明細書に記載の揮発性および増強された信号対雑音の基準を満たす限り、他の塩を使用してもよいことを理解されたい。

【0083】

候補の塩は、当業者に周知の方法を使用して、揮発性について容易に試験され得る。このような方法には、例えば、候補の塩または緩衝液組成物を揮発性溶媒に入れ、次に加熱乾燥させる乾燥残留物分析が含まれる。任意の乾燥残留物の存在は、その塩が、本発明の目的で使用するのに十分な揮発性がないことを示唆している。次に、十分に揮発性であるとして確立されている候補の塩を、候補の塩と、候補の塩を置き換えることを企図される必要な非分析物成分とを比較することによって、イオン抑制を低減するそれらの能力について試験する。揮発性は、当業者によって理解される通り、相対的蒸発速度の尺度である酢酸ブチル数を使用して評価することもできる。

10

【0084】

一般に、イオン検出デバイスは、質量分析計であるが、そうである必要はない。熱的方法およびエレクトロスプレーを含む様々な揮発技術が、質量分析と併せて利用可能であり、任意の有効な揮発技術を、本発明の方法と併用できることを理解されよう。化学イオン化、電界脱離イオン化、エレクトロスプレーイオン化、大気圧化学イオン化、マトリックス支援レーザー脱離イオン化、および誘導結合型プラズマイオン化を含む、いくつかの公知のイオン化手段のいずれかを使用することもできるが、やはり本明細書では任意の有効なイオン化技術を有利に用いることができる。質量分析測定は、分析物の性質に応じて陰性または陽性モードで実施することができ、酸性分析物は、優先的に陰性モードでイオン化され、塩基性分析物は、優先的に陽性モードでイオン化される。

20

【0085】

好ましい一実施形態では、本発明の改善された方法は、音響排出を用いて非常に小さい液滴を生成し、次にその液滴を揮発させ、イオン化し、分析する。これらの小さい液滴は、本明細書において、最大約5 n lの流体試料、好ましくは約2 . 5 n l以下、より好ましくは1 n l未満、最も好ましくは約50 p lよりも小さく、最適には約1 p l未満の流体試料を含む液滴と定義される、ナノリットルサイズの液滴である。流体試料の表面からの液滴の音響排出は、以下に詳説される通り、音響排出装置を使用して行われる。音響排出技術は、ハイスループット質量分析(H T M S)が、容易に自動化される試料調製および装填の欠如、試料を保存する必要性、相互汚染を排除する必要性、流体リザーバーから分析デバイスに直接移動する能力のないこと、および適切なサイズの液滴を生成できる能力のないことによって妨げられている範囲で、特にH T M Sに適している。

30

【0086】

本発明の方法は、本明細書の実施例に見られる通り、ナノリットルサイズの液滴で予想外に有効となることが証明された。基本的な流体物理は、サイズスケールが低減するほど、すなわち流体液滴が小さくなればなるほど変化することが十分に理解される。適用できるその他の拡散および混合原理は、ナノリットルサイズの液滴にほとんど適用できず、例えば揮発目的でナノリットルサイズの液滴の内部から液滴表面に移動する要素、イオン、または化合物の流動力学を予測しようとする場合、従来の分析方法も実行不可能である。

40

【0087】

液滴を音響排出し、次に揮発させることは、数々の利点を提供する。例えば熱的揮発技術を使用するナノリットルサイズの液滴の揮発では、これらの小さい液滴の表面積が大きいので、相対的に揮発性である代替成分の気相抽出が容易になり、蒸発する液滴中に充填された分析物が残る。したがって音響排出は、代替成分、例えば代替緩衝塩等を気相抽出することによって、イオン抑制を引き起こす妨害成分を除去するために流体試料の液相または固相を「浄化」する必要がない。これにより、所与の期間で質量分析等を使用して分析できる試料数が著しく増大する。現在、商業的に利用可能な方法では、緩衝液、他の塩、洗浄剤、および任意の他の非分析物種を除去するための追加のステップが必要とされることにより、試料1種当たり7 ~ 20秒の範囲の処理時間を要するが、本発明では、試

50

料 1 種当たり 1 秒未満、試料 1 種当たり典型的に約 0 . 3 秒の処理時間で済む。この特徴と、本発明のプロセスがかなり小さい試料サイズを使用して行うことができること、および得られた分析物の信号が、気相抽出ステップを用いることによって増大することが組み合わせるといことは、本発明が、質量分析または他のイオン検出デバイスを使用して流体試料を分析するための、はるかにより急速で経済的で正確な方法を可能にすることを意味する。

【 0 0 8 8 】

音響排出は、前述の通り、迅速な試料処理、および所定の一貫したサイズのナノリットルサイズの液滴の生成を可能にする。本明細書で既に引用され、参照によって組み込まれる S t e a r n s らの米国特許第 6 , 4 1 6 , 1 6 4 号参照。前述の特許文書は、流体表面から音響的に排出された液滴のサイズを、音響出力、音響周波数、トーンバースト期間、および / または集束レンズの F 数を変えることによって注意深く調節することができる方法を記載している。音響排出を本発明と併用する追加の利点は、液滴が、およそ 5 μ l またはそれ未満の非常に小さい試料サイズから排出され得ることである。このことは、試料の利用性が制限され、必要に迫られて小さい流体試料を分析しなければならない場合、特に有利である。処理能に関して、M u t z らの米国特許第 6 , 9 3 8 , 9 9 5 号は、音響排出技術を、複数のリザーバーで流体試料の音響評価と併用すると、1 秒当たり 5 個、1 0 個、またはさらには 2 5 個を超えるリザーバーの分析を達成することができ、つまり 1 日 5 0 , 0 0 0 種を十分に超える流体試料の分析を達成することができると説明している。

【 0 0 8 9 】

次に一実施形態では、本発明の改善された方法は、音響排出装置を、流体試料の液滴生成デバイスとして使用し、このデバイスは、流体試料を含む少なくとも 1 つのリザーバーと、音響排出装置と、リザーバーと音響カップリング関係になるように音響排出装置を配置するための手段とを含む。典型的に、音響放射発生装置、およびその音響放射発生装置によって発生させた音響放射を集束させるための集束手段から構成された、単一の排出装置が使用される。しかし、複数の排出装置も同様に、有利に使用することができる。同様に、単一リザーバーを使用することができるが、デバイスは、典型的に複数のリザーバーを含む。

【 0 0 9 0 】

本発明と併用するのに有用な音響排出デバイスの例は、本明細書に参照によって組み込まれる E l l s o n らの米国特許第 6 , 8 0 2 , 5 9 3 号、M u t z らの同第 7 , 2 7 0 , 9 8 6 号、M u t z らの同第 7 , 4 3 9 , 0 4 8 号、および E l l s o n らの同第 6 , 6 0 3 , 1 1 8 号に詳説されている。それらに記載されている通り、音響排出デバイスは、デバイスの統合されたまたは永久的に接続されている部品として、複数のリザーバーを含むように構築され得る。しかし、部品のモジュール方式および互換性を提供するために、デバイスは、取り外し可能なリザーバーを用いて構築されることが好ましい。一般に、リザーバーは、個々の系統的アドレス指定能を有する各リザーバーを提供するために、パターンまたは配列で配置される。さらに、リザーバーのそれぞれは、多数のリザーバーを必要とする環境では、別個のまたは独立型のアイテムとして提供され得るが、リザーバーは、互いに接続されているか、または単一リザーバーユニットの統合された部分であることが好ましい。例えば、リザーバーは、ウェルプレートの個々のウェルであり得る。デバイスと併用するのに適した多くのウェルプレートは、商業的に利用可能であり、例えば、フルスカート、ハーフスカートを有する、またはスカートなしのウェルプレート 1 つ当たり 9 6 個、3 8 4 個、1 5 3 6 個、または 3 4 5 6 個のウェルを含むことができる。ウェルプレートまたはマイクロタイタープレートは、一般に使用される実験室アイテムとなっている。The Society for Laboratory Automation and Screening (S L A S) は、米国規格協会と共に、フットプリントおよび寸法標準 A N S I / S L A S 1 - 2 0 0 4 を含むマイクロタイタープレートの標準を確立し、維持している。このようなウェルプレートのウェルは、典型的に、直線アレ

イを形成する。

【0091】

ただし、このような商業的に利用可能なウェルプレートが利用できても、少なくとも約10,000個のウェル、または100,000~500,000個ものウェル、またはそれを超えるウェルを含む他の幾何構造の特注のウェルプレートの製造および使用が除外されるわけではない。さらに、リザーバーの構築に使用される材料は、リザーバーに含まれる流体試料と適合性がなければならない。したがって、リザーバーまたはウェルが、アセトニトリルなどの有機溶媒を含むことが企図される場合、アセトニトリルに溶解するか、またはアセトニトリルで膨潤するポリマーは、リザーバーまたはウェルプレートの形成に使用するのに適していないはずである。同様に、DMSOを含むことを企図されたりリザーバーまたはウェルは、DMSOと適合性がなければならない。水ベースの流体では、多くの材料が、リザーバーの構築に適しており、その材料には、酸化ケイ素および酸化アルミニウムなどのセラミック、ステンレス鋼および白金などの金属、ならびにポリエステル、ポリプロピレン、環式オレフィンコポリマー（例えば、Nippon ZeonからZeonex（登録商標）として、およびTiconaからTopas（登録商標）として商業的に利用可能なもの）、ポリスチレン、およびポリテトラフルオロエチレンなどのポリマーが含まれるが、それらに限定されない。感光性の流体では、リザーバーは、実質的に正常なデバイス機能にとって十分な音響透明性を有する、光学的に不透明な材料から構築され得る。

10

【0092】

20

さらに、作動中、音響放射発生装置を各リザーバーまたはリザーバーウェルと整列させるのに必要な動作の量および時間を減らすために、各リザーバーの中心は、隣接するリザーバー中心から約1センチメートル以下、より好ましくは約1.5ミリメートル以下、さらにより好ましくは約1ミリメートル以下、最適には約0.5ミリメートル以下離して置かれることが好ましい。これらの寸法によって、リザーバーのサイズが最大体積に限定される傾向がある。リザーバーは、典型的に約1mL以下、好ましくは約1μL以下、最適には約1nL以下の流体を含むように構築される。複数のリザーバーの取扱いを容易にするために、リザーバーは、実質的に音響的に区別不能であることも好ましい。

【0093】

振動素子または変換器は、音響放射を発生させるために使用される。ある場合には、音響放射発生装置は、単一の変換器から構成される。さらに、変換器は、電気的エネルギーを、音響放射と関連する機械的エネルギーに変換するための圧電素子を使用することができる。あるいは、複数素子の音響放射発生装置、例えば変換器アセンブリを使用することができる。例えば直線配列音響、曲線配列音響、または位相配列音響は、複数のリザーバーに同時に伝達される音響放射を発生させるために、有利に使用され得る。

30

【0094】

気相抽出デバイスの形態の追加の素子は、前述の通り音響放射発生装置を使用して排出された液滴を熱的に揮発させ、例えば質量分析計を使用する分析の前に、液滴から望ましくない種を抽出する。従来使用されている成分を、より揮発性である代替物（例えば、緩衝塩）または揮発性種をもたらす化学反応を受ける代替物で置き換えると、これらの成分の即時気相抽出が容易になり、したがって、イオン抑制または従来の化合物に見られる他のタイプの妨害が排除され、または少なくとも実質的に低減する。

40

【0095】

本明細書で既に記載した通り、本発明の方法は、初期の非分析物成分の代わりに、初期成分と同じ目的を推進するが、（1）初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性であるか、または（2）揮発すると、初期成分および/もしくは分析物よりも揮発性である反応生成物をもたらす化学反応を受ける代替成分を用いる。実施形態（1）は、先に論じられている。ここで実施形態（2）について、代替成分は、この場合初期成分および/または分析物よりも必ずしも揮発性でありなが、それよりも、少なくとも1種の揮発性反応生成物をもたらす化学反応を受けるように選択される。代替成分は、以下に詳細に論じる

50

通り、分子内変換を受ける双性イオン化合物であってよく、または代替成分は、化学的に開裂されて揮発性反応生成物をもたらすことができる非双性イオン化合物であってよい。あるいは、代替成分は、少なくとも1種の揮発性反応生成物を生じる熱的に誘導された反応を受ける化合物であり得る。また化合物は、少なくとも1種の揮発性反応生成物をもたらす光触媒的反応を受けるように選択することができ、ここで用語「揮発性反応生成物」は、初期成分および/または分析物よりも揮発性である反応生成物を指すと理解されたい。

【0096】

代替成分としての双性イオン化合物

【0097】

双性イオン化合物が、代替成分として、例えば緩衝系を必要とする流体試料中の緩衝塩として使用される場合、双性イオン化合物は、揮発プロセス中に高温および/または減圧下で、初期の非分析物成分および/または分析物よりも揮発性である少なくとも1種の反応生成物をもたらす化学反応を受けるように選択される。下記の双性イオン化合物は、他の方法において、例えば緩衝化流体試料をイオン化し、揮発させた後、揮発およびイオン化された試料中の分析物を検出する任意の方法においても同様に有用である。

【0098】

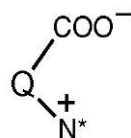
「双性イオン」または「双性イオン性」化合物は、これらの用語が本明細書で使用される場合、一方がイオン化されて正電荷の種を形成し、他方がイオン化されて負電荷の種を形成する、一対のイオン化できる基を含む化合物を意味する。前者は、典型的に、置換もしくは非置換アミンまたはジアゾ置換基などの窒素原子含有基であり、後者は、一般にカルボキシル(COOH)置換基であるが、必ずしもそうではない。より高いpH値では、窒素原子含有基だけが電荷を担持し、したがって化合物はカチオン性となるが、より低いpH値では、カルボキシル含有基だけがイオン化され、したがって化合物はアニオン性となることを理解されよう。一般に約5～約8の範囲の中程度のpH値では、両方の実体が電荷を担持し、この形態では、下記の反応が最適な方式で進行する。

【0099】

一実施形態では、双性イオン化合物は、部分的に不飽和の化合物、すなわち二重結合などの少なくとも1つの不飽和結合を含む化合物であり、分子内の分解によって揮発性芳香族化合物を生成するという意味で、「プレ芳香族(pre-aromatic)」である。例えば、部分的に不飽和のプレ芳香族双性イオン化合物は、カルボン酸基(-COOH)および窒素含有置換基が共有結合する、部分的に不飽和のプレ芳香族コアを含むことができ、ここで窒素含有置換基は、アミノ、第一級アミノ、第二級アミノ、第三級アミノ、およびジアゾから選択され得る。この例では、カルボン酸基および窒素含有置換基は、分子内の分解によって、揮発性芳香族化合物(すなわち、初期成分および/または分析物よりも揮発性である芳香族化合物)が生じ、二酸化炭素が放出され、アンモニア、置換もしくは非置換アミン(一般に気体)または窒素ガスなどの窒素含有化合物が生じるように、互いに対して位置する。プレ芳香族コアは、一般に環式であるが、前述の分子内の分解反応によって、二酸化炭素および窒素含有化合物が放出されることに加えて、揮発性化合物、好ましくは揮発性芳香族化合物が生じるならば、非環式コアが適している。プレ芳香族コアQおよび窒素含有置換基N^{*}を含む、このプレ芳香族双性イオン化合物は、構造(1)によって表すことができる。

【化1】

(1)



10

20

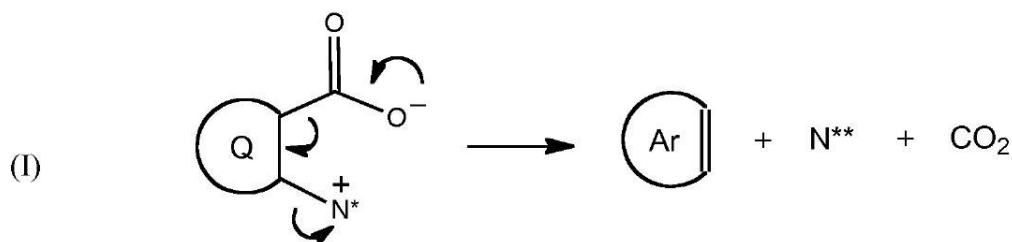
30

40

50

コアQが環式である場合、プレ芳香族化合物からの転換は、カルボキシレート基およびN^{*}置換基が、環中の隣接する炭素原子に結合している場合、以下のスキーム(I)に従って生じ得る。

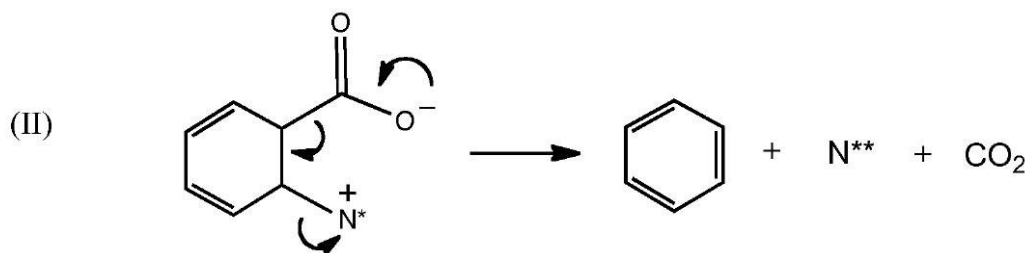
【化2】



10

スキーム(I)では、Arは、揮発性芳香族反応生成物を表し、各N^{*}反応生成物は、各N^{*}置換基に相当する。この反応は、単に例示目的でコアQがシクロヘキサ-1,3-ジエン環を含み、したがってスキーム(II)に示される通り、揮発性芳香族反応生成物がベンゼンであるより具体的な一例を使用して、例示することができる。

【化3】



20

【0100】

カチオン形態のN^{*}置換基は、例えば、-(NH₃)⁺、-(NHR¹)⁺、(NR²R³)⁺、(NR⁴R⁵R⁶)⁺、またはジアゾであってよく、したがって、N^{*}は、それぞれアンモニア(NH₃)、NH₂R¹、NHR²R³、NR⁴R⁵R⁶、または窒素ガス(N₂)となる。R¹~R⁶は、非水素置換基、例えば低級アルキル、すなわちC₁~C₆アルキル基、好ましくはC₁~C₃アルキル基であり、これらは、検出プロセスを妨害せず、または有害な方式で試料の成分のいずれとも相互作用しない置換基で置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい。したがって分解反応は、検出されない2種の生成物、すなわち揮発性芳香族化合物および二酸化炭素、ならびにイオン抑制を引き起こす可能性が低い窒素種N^{*}をもたらす。

30

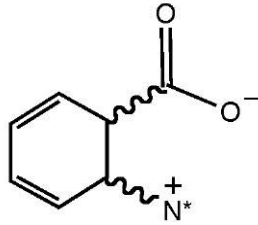
【0101】

スキーム(II)では、シクロヘキサ-1,3-ジエン反応物は、示されている化学反応を妨害せず、または存在するいかなる他の化合物も妨害せず、一般にR¹~R⁶と同じ置換基群から選択される1個または複数の環置換基で置換されていてもよく、または置換されていなくてもよく、互いにオルトとして示されているカルボキシレートおよびカチオン性窒素含有置換基は、シスまたはトランス関係のいずれかであってよいが(化合物(2))、

40

【化 4】

(2)

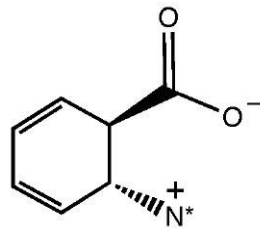


好ましくはトランス立体構造（化合物（3））である。

10

【化 5】

(3)

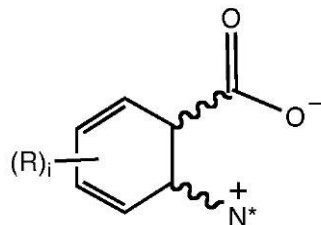


20

任意選択で存在する置換基は、構造（4）で例示される

【化 6】

(4)

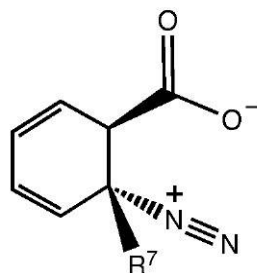


30

〔式中、示されている通り、 i 個の置換基が存在し（ i は両端を含み 0 ～ 6 の範囲である）、 R として表される置換基は、同じであっても、または異なってもよい〕。 N^+ がジアゾである、ある特定の場合、カルボキシレートおよびジアゾ置換基は、トランス位にあり、置換基はジアゾ基と同じ炭素に付着していることが好ましく、ここで、化合物（5）において R^7 として示される置換基は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、好ましくは $C_1 \sim C_3$ アルキルである（ R^7 がないと、本発明の目的には不安定すぎる化合物をもたらす）。

【化 7】

(5)



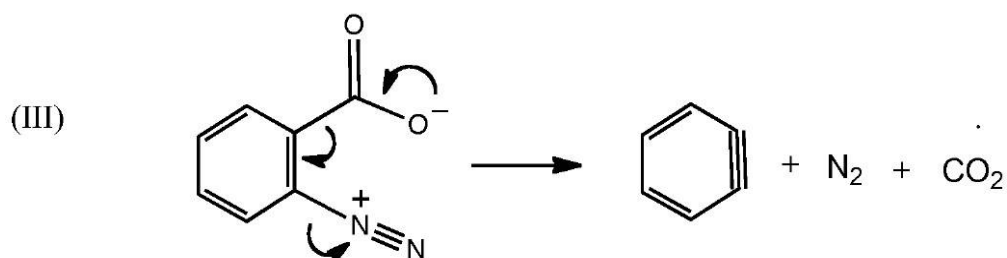
40

【0102】

関連の実施形態では、双性イオン化合物は、カルボキシレート基およびジアゾ基、例えばオルト - ジアゾ安息香酸で置換された芳香族化合物であり、その場合、分子内反応によって、 N^{+} 反応生成物であるベンザインが生じる（スキーム（III））：

50

【化 8】



ベンザインは、さらなる反応の中間体として働く、反応性がかなり高い化合物である。この場合、第 2 の反応物、例えば水またはジエンを試料に導入して、ベンザインと反応させる。水は、フェノールを生じる反応をもたらし、当業者に理解される通り、ジエンを適切に選択することによって、揮発性反応生成物が得られる。一例として、フランは、ジエンとして働くことができ、この場合、ベンザインとの反応によって、揮発性生成物である 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 1, 4 - エポキシナフタレンが生じる。別の例として、アントラセンがジエンとして働き、揮発性反応生成物であるトリプチセンを生じることができる。

【0103】

双性イオン化合物は、環式であってもよく、または非環式であってもよく、環式である場合、双性イオン化合物は、単環式、二環式、または多環式であってもよく、芳香環およびごく一部が不飽和である分子セグメントを含み得る。双性イオン化合物の化学反応によって、揮発性芳香族化合物が反応生成物として生じる場合、この反応は、必ずではないが、一般に二重結合を環構造に付加して $4n + 2$ の芳香族性を生じることによって行われる。その例として、二重結合を置換もしくは非置換シクロヘキシル - 1, 3 - ジエニル環に付加して、ベンゼン環を生じるもの、または二重結合を置換もしくは非置換ジヒドロフラン環に付加して、芳香族であるフランを生じるものが挙げられる。したがって、双性イオン化合物は、一例では、隣接する炭素原子において -COOH および -N^{*} 部分で置換されているシクロヘキシル - 1, 3 - ジエニルコアを含むことができ、したがって化合物は、5 - カルボキシル - 6 - N^{*} - シクロヘキサ - 1, 3 - ジエン、例えば 5 - カルボキシル - 6 - アミノ - シクロヘキサ - 1, 3 - ジエンを含み、これらは、先に示した通りさらに置換されていてもよく、反応後に置換または非置換ベンゼン環に変換される。さらなる双性イオン化合物は、パラ立体構造において -COOH および -N^{*} で置換されたシクロヘキサ - 1, 4 - ジエンコアを含むことができ、したがって化合物は、前述の通り置換されていないか、または置換されている 3 - カルボキシル - 6 - N^{*} - シクロヘキサ - 1, 4 - ジエンであるか、または 3 - カルボキシル - 6 - N^{*} - シクロヘキサ - 1, 4 - ジエンを含み、これは、分解反応を介して、置換または非置換ベンゼン環に変換される。別の双性イオン化合物は、例えば、2 位および 3 位において -COOH および -N^{*} 部分で置換されたジヒドロフランを含むことができ、したがって化合物は、本明細書で既に記載した通り置換されていないか、または置換されている 2 - カルボキシル - 3 - N^{*} - 2, 3 - ジヒドロフランまたは 2 - N^{*} - 3 - カルボキシル - 2, 3 - ジヒドロフランを含み、これは、反応すると芳香族分子である置換または非置換フランに変換される。

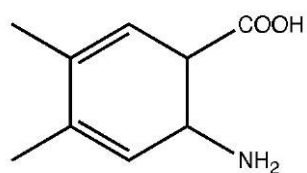
【0104】

これらの双性イオン化合物の具体例として、以下が挙げられるが、それらに限定されない（簡潔にするために、化合物は、無電荷形態で示されているが、各化合物は、中程度の pH 値では、アニオン種とカチオン種の両方、すなわちカルボキシレート基 -COO⁻ と正電荷の窒素原子を含むと理解されよう）。

6 - アミノ - 3, 4 - ジメチルシクロヘキサ - 2, 4 - ジエン - 1 - カルボン酸：

【化 9】

(6)

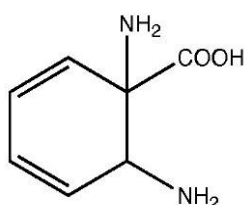


1,6 - ジアミノ - 2,4 - ジエン - 1 - カルボン酸 :

10

【化 10】

(7)

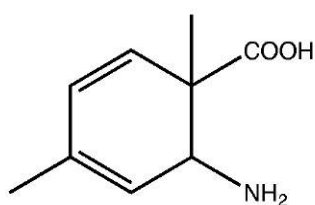


6 - アミノ - 1,4 - ジメチルシクロヘキサ - 2,4 - ジエン - 1 - カルボン酸 :

20

【化 11】

(8)

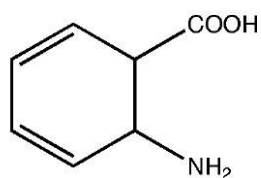


6 - アミノシクロヘキサ - 2,4 - ジエン - 1 - カルボン酸 :

30

【化 12】

(9)

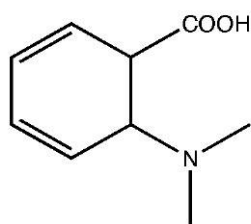


6 - (ジメチルアミノ)シクロヘキサ - 2,4 - ジエン - 1 - カルボン酸 :

40

【化 1 3】

(10)

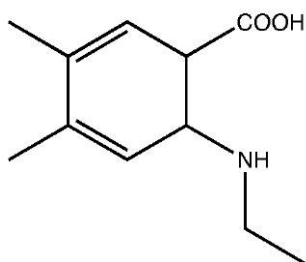


10

6 - (エチルアミノ)シクロヘキサ - 2 , 4 - ジエン - 1 - カルボン酸 :

【化 1 4】

(11)

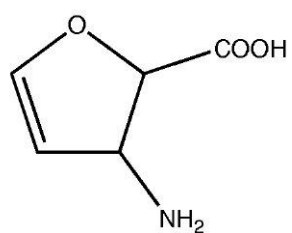


20

3 - アミノ - 2 , 3 - ジヒドロフラン - 2 - カルボン酸 :

【化 1 5】

(12)

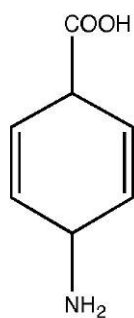


30

4 - アミノシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエンカルボン酸 :

【化 1 6】

(13)



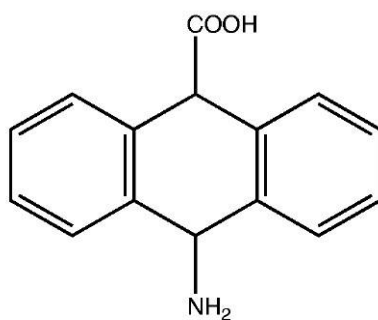
40

10 - アミノ - 9 , 10 - ジヒドロアントラセン - 9 - カルボン酸 :

50

【化 1 7】

(14)

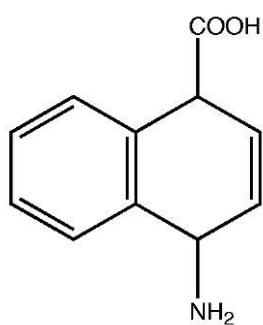


10

4 - アミノ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 1 - カルボン 酸 :

【化 1 8】

(15)

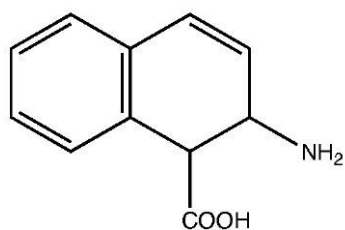


20

2 - アミノ - 1 , 2 - ジヒドロナフタレン - 1 - カルボン 酸 :

【化 1 9】

(16)

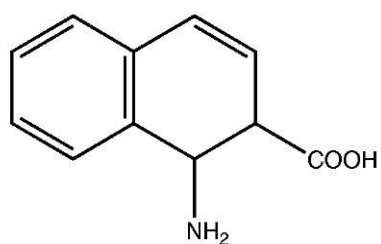


30

2 - アミノ - 1 , 2 - ジヒドロナフタレン - 1 - カルボン 酸 :

【化 2 0】

(17)



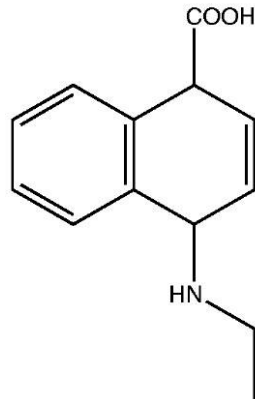
40

4 - (エチルアミノ) - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 1 - カルボン 酸 :

50

【化 2 1】

(18)



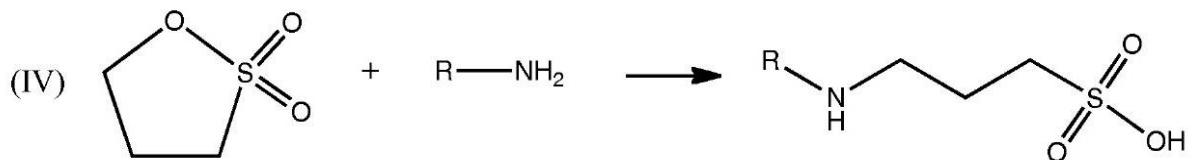
10

【 0 1 0 5 】

これらの双性イオン化合物は、商業的に得ることができ、または当技術分野で公知の方法および関連文献に記載の方法を使用して合成することができる。カルボキシレートを含む双性イオンは、カルボキシルを含む化合物を、アミンまたは他の窒素性化合物と組み合わせるための様々な技術のいずれかを使用して合成することができる。双性イオン性スルホン酸を含む化合物、例えば双性イオン性洗浄剤および緩衝液は、一般に、置換または非置換 1, 2 - オキサチオラン - 2, 2 - ジオキシドおよび置換または非置換アミンから、スキーム (I V) に従って合成され得る。

20

【化 2 2】



30

【 0 1 0 6 】

他の化学的に開裂可能な代替成分

【 0 1 0 7 】

あるいは、化学的に開裂可能な非双性イオン化合物は、代替成分として働くように選択することができ、ここで化学的に開裂可能な化合物は、酸、塩基、または他の試薬を用いて開裂され得る少なくとも 1 つの連結を含む。酸または塩基の存在下で、加水分解的に開裂可能な代表的な連結には、以下が含まれる。カルボン酸エステル (- (C O) - O -) ; エノールエーテル (- C H = C H - O -) ; アセタール (- O - C R ₂ - O -) ; ヘミアセタール (- C H (O H) - O -) ; 無水物 (- (C O) - O - (C O) -) ; カーボネート (- O - (C O) - O -) ; アミド (- (C O) - N H -) ; N 置換アミド (- (C O) - N R -) ; ウレタン (- O - (C O) - N H -) ; N 置換ウレタン (- O - (C O) - N R -) ; イミド (- C H = N -) ; N , N - 二置換ヒドラゾ (- N R - N R -) ; チオエステル (- (C O) - S -) ; ホスホン酸エステル (- P (O) (O R) - O -) ; スルホン酸エステル (- S O ₂ - O R -) ; オルトエステル (- C (O R) ₂ - O -) ; およびベタインエステル (R - O - (C O) - N (R ') ₄ ⁺ X ⁻ (式中、R ' は、同じまたは異なる非水素置換基であってよく、X ⁻ は、関連の対イオンである)) 。 他の化学的に開裂可能な連結には、ヒドロキシルアミンで開裂可能な連結 - (C O) - O - C H ₂ - C H ₂ - O - (C O) - ; チオールで開裂可能な連結 - S - S (トリフェニルホス

40

50

フィン (triphenylphosphine) などの三置換ホスフィンで処理しても、開裂可能である) ; 過ヨウ素酸で開裂可能な cis - ジオール - CH(OH) - CH(OH) - ; およびフッ化物で開裂可能な連結 - (O) - NH - (CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ - (NH) - (CO) - が含まれるが、それらに限定されない。化学的に開裂可能な連結を含んでいる界面活性剤は、それらの合成と共に説明されている。これらには、ProteaseMAX(V2071)(Promega); RapiGest SF(Waters); PPS Silent Surfactant(Agilent); MaSDeS(Changら(2015年1月)J. Proteome Res. 14巻(3号)参照); Invitrosol(Life Technologies, Inc.); Progenta AALS I(2, 2 - ジヘキソオキシプロピル硫酸ナトリウム、Protea Biosciences製); Progenta AALS II(2, 2 - ジヘプトキシプロピル硫酸ナトリウム、これもProtea Biosciences製); Progenta CALS I(2, 2 - ジヘキソオキシプロピル臭化アンモニウム、これもProtea Biosciences製); および Progenta CALS II(2, 2 - ジヘプトキシプロピル臭化アンモニウム、これもProtea Biosciences製)が含まれる。これらの界面活性剤およびそれらの類似体は、緩衝液ならびにこれらおよび他の化学的に開裂可能な連結を含む他の化合物と同様に、本組成物において有利に使用することができる。

10

【0108】

熱により開裂可能な代替成分

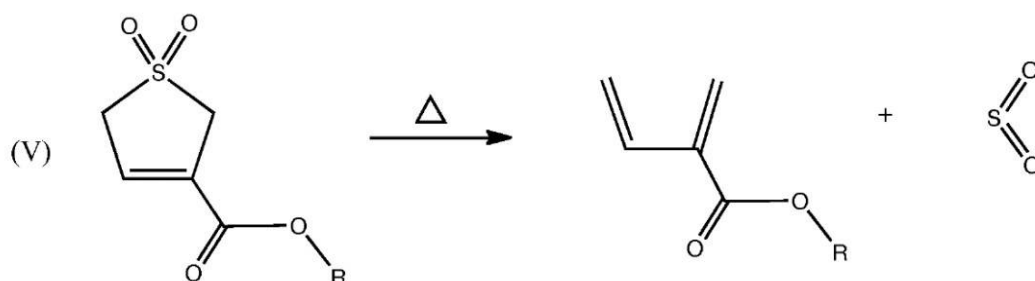
20

【0109】

また代替成分は、熱を用いて開裂可能である連結を含むことができ、したがって流体試料中の初期成分と同じ目的を推進するが、試料が揮発するとより小さい化合物に開裂し、それらのより小さい化合物は、揮発性であり、またはイオン抑制を引き起こす可能性が低い。熱的に開裂可能な連結には、エステル連結、カルバメート連結、カーボネート連結、ウレタンタイプの連結(-O-(CO)-NH-)およびN置換ウレタン連結(-O-(CO)-NR-)が含まれ、連結の窒素原子は、低級アルキルなどの非水素置換基で置換されている。他の熱的に開裂可能な連結には、フラン-マレイミドのディールス-アルダー付加物(Szallalら(2007年)Macromolecules 40巻(4号): 818~823頁参照)、オキシランおよびチイランベースの連結、ならびに以下のスキームに従ってエステルおよび気体SO₂に熱的に分解するエステル置換スルホンが含まれる

30

【化23】



40

[式中、Rは、非水素置換基、一般にアルキル基である(例えば、2015年10月19日にアクセスしたインターネットサイトwww.chbe.gatech.edu/ Eckert/pdf/-surfactant.pdfから印刷したEckertおよびLiottaによる「Designing Smart Surfactants」に記載のピペリレン)]。

【0110】

50

光分解により開裂可能な代替成分

【 0 1 1 1 】

1 つまたは複数の光分解により開裂可能な部位を代替成分に組み込むことによって、試料を質量分析計または他の分析デバイスに導入する前に、照射誘導的に開裂することが可能になる。1 種または複数の試料流体は、気相中で照射され、すなわち流体液滴排出の後、質量分析計に入る前に照射され得るか、または液相中で、例えばウェルプレートもしくは他の容器もしくは容器群内で照射され得る。気相中の照射は、リアルタイムで開裂生成物に変換することが可能であるが、試料流体が多数の容器またはウェル中に存在する液相中の照射は、そうではない。

【 0 1 1 2 】

光分解により開裂可能な部位は、当業者に公知の、かつ / または関連文書および文献に記載の有機合成技術を使用して、代替成分、例えば緩衝液、界面活性剤等に容易に組み込むことができる。あるタイプの光分解により開裂可能な連結は、以下の代表的な構造のように、オルト - ニトロベンジル基から構成される

【 化 2 4 】



(式中、 R^* は、一般に、分子の残部に結合している窒素原子または酸素原子である)。
したがって、このような構造には、

【 化 2 5 】



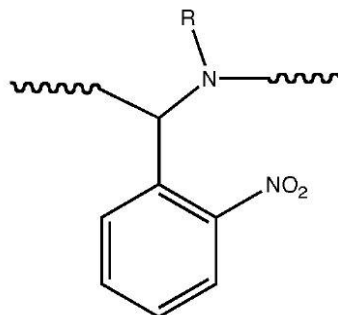
および



ならびに N 置換類似体が含まれる

【化 2 6】

(22)

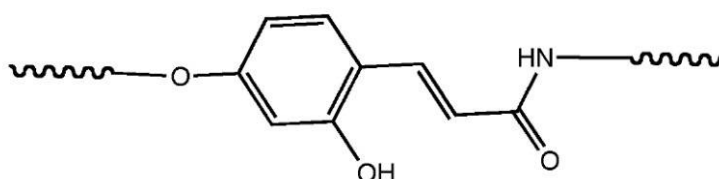


10

(式中、R は、やはり低級アルキルなどの非水素置換基であり、記号

【化 2 7】

(23)



20

は、分子の残りとの付着を表す)。別の光分解により開裂可能な連結には、例えば、ケイ皮酸タイプの連結が含まれ、

【数 1】

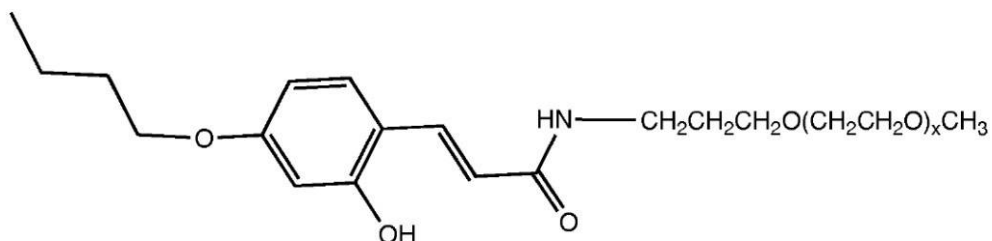


これは、例えば光開裂可能な界面活性剤に関する Sakai ら (2012 年 6 月 15 日) J. Colloid and Interface Sci. 376 巻 (1 号) : 160 ~ 164 頁に記載されている。

30

【化 2 8】

(24)



40

他の光分解により開裂可能な連結には、ベンジルエーテル (開裂してアルコールを形成する)、カルバメート連結 (開裂してアミンを形成する)、1,3-ジチアン連結 (開裂してカルボニル基を形成する); オルト-ニトロアニリド連結 (開裂してカルボキシル基を形成する)、ベンゾインタイプの連結 (開裂してリン酸基を形成する) 等が含まれる。例えば、Pellliccioli ら (2002 年) Photochem. Photobiol. Sci. 1 巻 : 441 ~ 458 頁、および Greene ら、Protective Groups in Organic Synthesis、第 3 版、John Wiley & Sons (New York、NY : 1999 年) 参照。

50

【 0 1 1 3 】

当業者は、本明細書において代替成分として使用できる適切な双性イオン性および／または開裂可能な化合物を合成するために、公知の有機合成方法および／または文献に記載の方法を使用することができる。さらに、公知の緩衝液（例えば、G o o dの緩衝液；G o o dら（1966年）B i o c h e m i s t r y 5巻（2号）：467～477頁参照）、界面活性剤等は、このような開裂可能なリンカーを組み込むために修飾することができる。

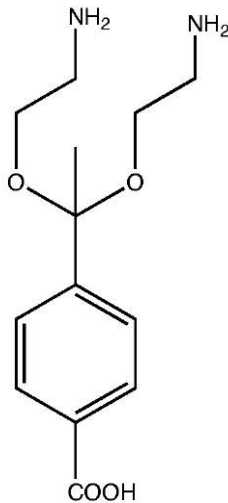
【 0 1 1 4 】

目的の代表的な緩衝液の1つは、アセタールを含む化合物（25）であり、

【 化 2 9 】

10

(25)



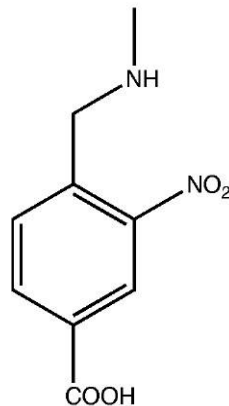
20

これは、以下の通り光分解により、かつ／または酸の存在下で分解して、2 - アミノエタノールおよび2 - ホルミル安息香酸をもたらす。目的の別の緩衝液は、化合物（26）であり、

【 化 3 0 】

30

(26)



40

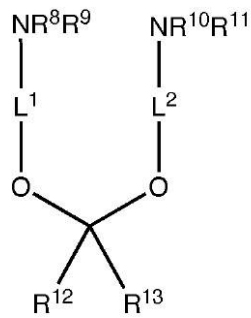
これは、光分解により開裂して、メタミン（C H ₃ - N H ₂）および4 - ホルミル - 3 - ニトロソ安息香酸を生じることができる。

【 0 1 1 5 】

一般構造

【化 3 1】

(27)



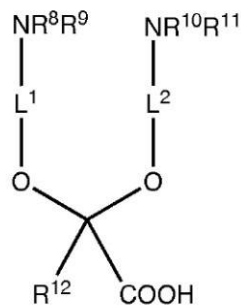
10

を有する化合物は、本明細書において、特に酸で開裂可能な緩衝液として適した代替成分である。(27)では、 L^1 および L^2 は、 $C_1 \sim C_6$ ヒドロカルビル連結、一般に $C_2 \sim C_4$ ヒドロカルビル連結であり、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、および R^{11} は、独立に、Hおよび $C_1 \sim C_{16}$ ヒドロカルビル(例えば、アルキル、シクロアルキル、アルケニル等、特に低級アルキル)から選択され、 R^{12} は、低級アルキルであり、 R^{13} は、 $-\text{COOH}$ または $-\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{H}$ のいずれかである。 R^{13} が $-\text{COOH}$ である場合、化合物は、(28)として表すことができ、 R^{13} が $-\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{H}$ である場合、化合物は、(29)として表すことができる。

20

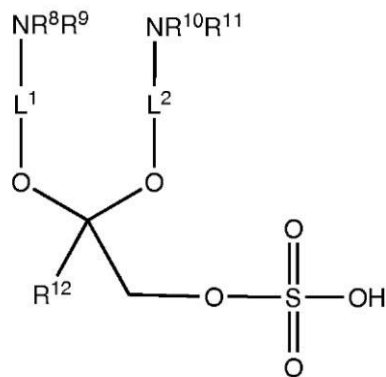
【化 3 2】

(28)



30

(29)

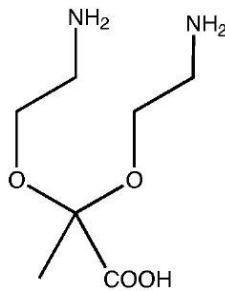


40

好ましい一実施形態では、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、および R^{11} は、Hであり、 L^1 および L^2 は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であり、 R^{12} は、メチルであり、したがって、一般化合物(28)および(29)は、それぞれ構造(30)および(31)を有する。

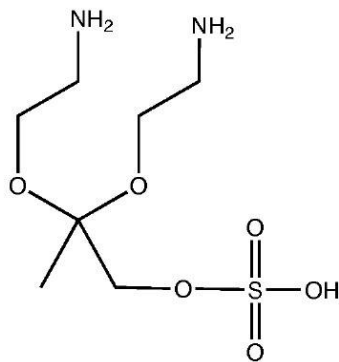
【化 3 3】

(30)



10

(31)



20

両方の化合物は、ピルビン酸メチルから合成することができる。化合物(30)は、およそ9.44のpIを有しており、およそ7.5~10.5の範囲のpHの緩衝液として最適に用いられる。化合物(31)は、およそ9.44のpIを有しており、およそ8.0~11.0の範囲のpHの緩衝液として最適に用いられる。図4は、化合物(30)の合成の模式図であり、図5は、化合物(31)の合成の模式図である。これらの図に示されている個々の反応ステップの実施は、当業者の専門内であり、かつ/または文書もしくは文献の類似の反応を参照すると明らかになる。

30

【実施例】

【0116】

(実施例1)

この実施例では、カフェインの質量分析の決定に対する緩衝液の揮発性の影響を、酢酸アンモニウムを揮発性緩衝塩として使用し、塩化ナトリウムを不揮発性緩衝塩として使用して評価した。流体試料を、1mM、2mM、5mM、10mM、25mM、50mM、100mM、250mM、および500mMの様々な濃度の酢酸アンモニウムまたは塩化ナトリウムを用いて調製した。試料液滴は、修正したEcho(登録商標)555リキッドハンドラー(Labcyte Inc.、Sunnyvale、CA)を使用して生成した。機器は、変換器アセンブリをノズル下の機器の外面に移動させて、液滴ストリームを195の熱に曝露し、したがって揮発性塩を気相抽出できるように修正し、SQ Detector II質量分析計(Waters Micromass)のベータバージョンに入れた。

40

【0117】

図1は、 $m/z = 195$ における正規化信号対酢酸アンモニウム

【数2】

(◆)

または塩化ナトリウム

【数 3】

(■)

濃度 (mM) のプロットである。わかる通り、検出されたカフェインの濃度は、低い塩化ナトリウム濃度でも急速に低下するが、この現象は、酢酸アンモニウムでは見られない。この結果は、より揮発性である緩衝塩では、緩衝塩濃度がより高くても分析物を検出することができるが、より揮発性が低い緩衝塩では検出できないことを示している。

実施例 2 および 3 のための実験

【0118】

すべての試料を、標準エレクトロスプレー源を取り付けた Waters SQ Detector 2 質量分析計で、供給源ブロック温度 80、脱溶媒和温度 250 およびガス流速 400 リットル/時間で運転して分析した。エレクトロスプレープローブ電圧を、3500 V に設定し、試料コーンを 25 V に設定した。すべての試料を、Hamilton 250 μ l シリンジを取り付けた Harvard 22 シリンジポンプを使用し、6 μ l /分で作動させて導入した。1 M 溶液として供給された HEPES (4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、双性イオン性緩衝液) を除いて、すべての試薬を、Sigma Aldrich から乾燥粉末として購入した。HPLC グレードの水、およびやはり HPLC グレードの水中 2 mg / ml のカフェイン原液を使用して、1 M 原液を、塩ごとに調製した。連続希釈を、塩の原液のそれぞれに対して実施して、1 mM、5 mM、25 mM および 50 mM の希釈標準溶液を生成した。分析のために、これらの希釈標準溶液のそれぞれ 1 ml にカフェイン原液 50 μ l を添加して、10 μ g / ml のカフェイン溶液を生成した。試料ごとに、シリンジ注入を実施し、カフェインの M + H および M + Na ピーク (195 Da および 217 Da) の絶対的イオン信号の高さを合計し、プロットした。試料ごとに、シリンジおよびプローブを水でフラッシュして、任意の残留塩を除去した。

(実施例 2)

【0119】

この実施例では、酢酸マグネシウムを揮発性緩衝塩として使用し、塩化マグネシウムを不揮発性緩衝塩として使用した、カフェインの質量分析の決定に対する緩衝液の揮発性の影響に関する追加の評価について記載する。カフェインおよびそのナトリウム付加物の信号強度を、4 つの濃度の 6 種の塩系で評価した。図 2 にプロットしたデータは、標準ESI システム感度が、不揮発性塩によってかなり影響を受け、類似の濃度の揮発性塩によってはそれほど影響を受けないことを示している。すなわち、プロットの最上部のデータ点は、カフェインおよび緩衝塩としての酢酸アンモニウムを含む流体試料で得られた信号に相当する。実験を反復して、他の分析物の質量分析の決定を行って、実質的に同じ結果を得ることができる。

(実施例 3)

【0120】

この実施例では、マグネシウムが使用酵素によって必要とされるキナーゼアッセイを実施し、そのアッセイにより、経時的なリン酸化ペプチド基質の濃度の増大を測定する。一組の試料を、相対的に不揮発性の化合物である塩化マグネシウムと共に配合し、第 2 の組の試料を、より揮発性である化合物である酢酸マグネシウムと共に配合した。各タイプのマグネシウム塩を使用したアッセイの結果は、図 3 に示されており、図では、時間 (分) を X 軸に示し、ルミネッセンスを Y 軸に示す。塩化マグネシウムを用いたアッセイで得られた結果

【数 4】

(◆)

を、酢酸マグネシウムを用いたアッセイで得られた結果

【数 5】

(■)

と比較するグラフは、アッセイが、マグネシウムイオン源によって妨害されず、または偏らなかったことを示している。

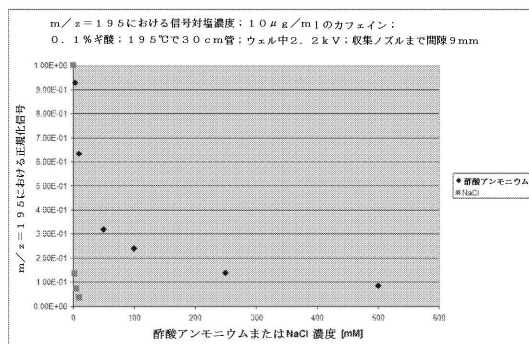
【0121】

多くのアッセイシステムでは、ある特定の不揮発性のおよび／または電気陰性の高い緩衝液成分が使用される。しかし、これらの成分は、所望のアッセイの生物学的または化学的結果を得るのに独特のものではない。このスイッチは、最大60の範囲では測定雑音内にあるので、結果の任意の著しい変化を示さない。不揮発性分析物が存在しない状態の分析物の測定に関する先の実施例から、このアッセイシステムでは、分析物のイオン抑制が低減することに起因して、MS負荷の前の気相抽出で結果が改善されるはずである。

10

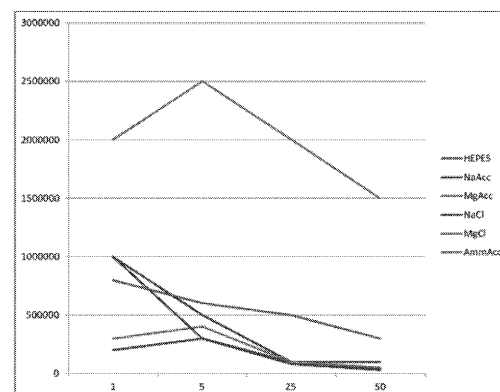
【図 1】

FIG. 1



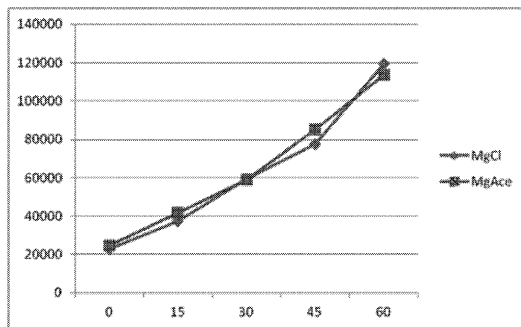
【図 2】

FIG. 2



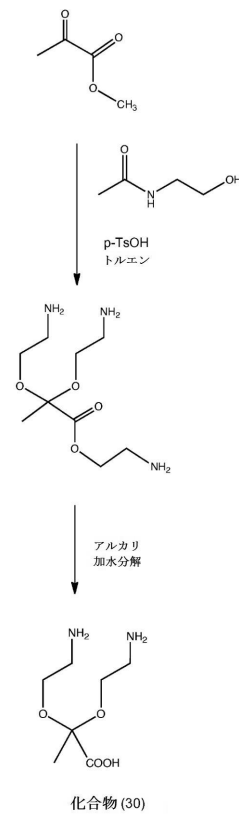
【 図 3 】

FIG. 3



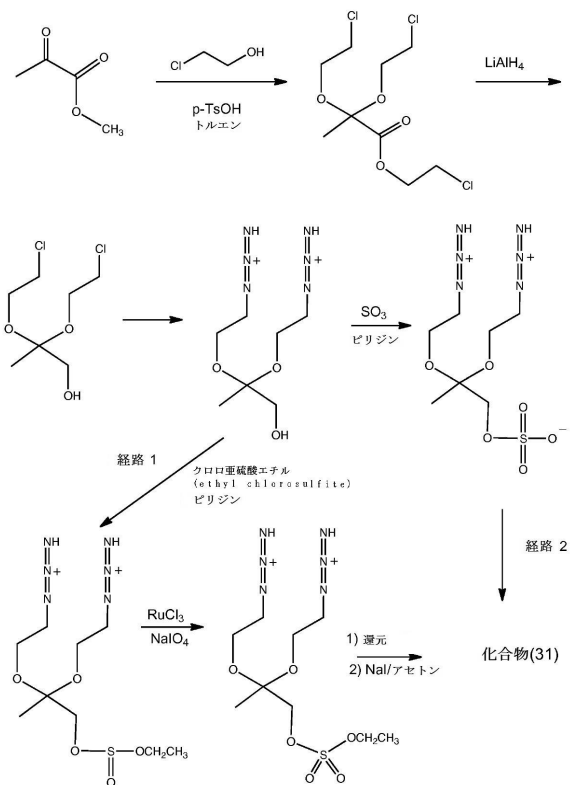
【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5



フロントページの続き

- (72)発明者 エルソン, リチャード エヌ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94089, サニーベール, ボレガス アベニュー 11
90
- (72)発明者 スターンズ, リチャード ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94089, サニーベール, ボレガス アベニュー 11
90
- (72)発明者 オレクノ, ジョセフ ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94089, サニーベール, ボレガス アベニュー 11
90
- (72)発明者 シンクレア, イアン
イギリス国 エスケー10 4ティーエフ チェシャー, マックルズフィールド, アルダリー
パーク, アストラゼネカ アルダリー ハウス
- (72)発明者 ウィングフィールド, ジョナサン
イギリス国 エスケー10 4ティーエフ チェシャー, マックルズフィールド, アルダリー
パーク, アストラゼネカ アルダリー ハウス

審査官 藤田 都志行

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0119193(US, A1)
特開2004-205510(JP, A)
米国特許出願公開第2012/0205592(US, A1)
米国特許出願公開第2014/0283628(US, A1)
米国特許出願公開第2005/0121537(US, A1)
特開2005-221263(JP, A)
特表2006-514299(JP, A)
特表2005-535303(JP, A)
米国特許出願公開第2014/0283627(US, A1)
米国特許出願公開第2006/0024660(US, A1)
米国特許出願公開第2012/0145890(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/62

H01J 49/26

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)