

(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
2012 年 11 月 29 日(29.11.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/160884 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/059263
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 4 日(04.04.2012)
- (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 2011-118165 2011 年 5 月 26 日(26.05.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社資生堂(SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本山 晃 (MOTOYAMA, Akira) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 丁目 2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa

(JP). 金子 恒顕 (KANEKO, Tsuneaki) [JP/JP]; 〒6018037 京都府京都市南区東九条西河辺町 1 2 番 資生堂医理化学テクノロジー株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 伊東 忠重, 外(ITO H Tadashige et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番 1 号 丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル) 16 階 Tokyo (JP).

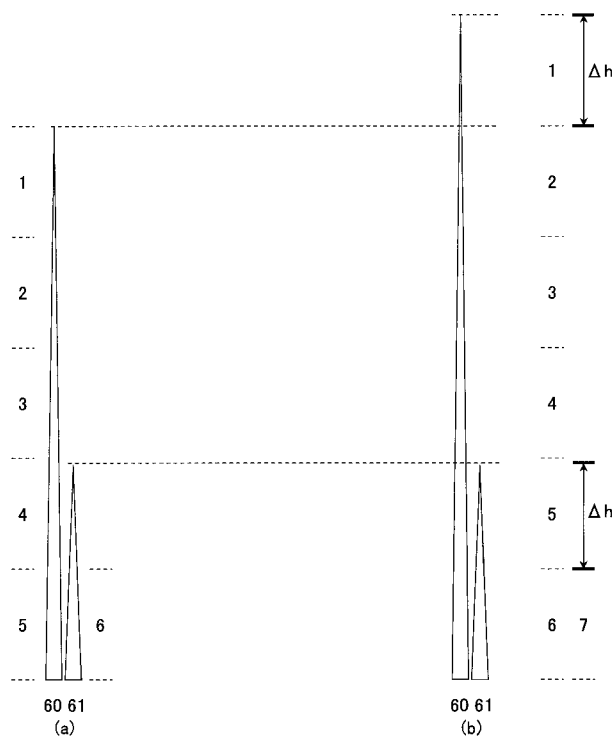
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

[続葉有]

(54) Title: ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 分析方法

[図5]



(57) Abstract: An analysis method which comprises: the step of analyzing by mass spectrometry a product ion generated from a first precursor ion, which has a mass-to-charge ratio larger by 1 than that of an ion formed by ionizing a first organic compound; the step of analyzing by mass spectrometry a product ion generated from a second precursor ion, which has a mass-to-charge ratio larger by 1 than that of an ion formed by ionizing a second organic compound, which is obtained by changing the number of the carbon atoms of the first organic compound; the step of determining the ratio of the peak height for a first fragment ion to the peak height for a second fragment ion, which has a mass-to-charge ratio smaller by 1 than that of the first fragment ion, the peak heights being obtained by the analysis by mass spectrometry of the product ion generated from the first precursor ion; and the step of determining the ratio of the peak height for a fragment ion corresponding to the first fragment ion to the peak height for a fragment ion corresponding to the second fragment ion, the peak heights being obtained by the analysis by mass spectrometry of the product ion generated from the second precursor ion.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/160884 A1



(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

分析方法は、第一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が 1 大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が 1 大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオン及び第一のフラグメントイオンよりも質量電荷比が 1 小さい第二のフラグメントイオンのピーク高さの比を求める工程と、第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び第二のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオンのピーク高さの比を求める工程を有する。

明 細 書

発明の名称：分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、分析方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、質量分析計を用いて質量分析する際に、フラグメントイオンを同定する方法としては、種々の方法が知られている。

[0003] 非特許文献1には、タンデム質量分析計を用いて、3-エチルアスコルビン酸にプロトンが付加したイオン ($[M+H]^+$) よりも質量電荷比 (m/z) が1大きいプリカーサーイオン ($[M+1+H]^+$) から生成するプロダクトイオンを質量分析し、フラグメントイオンとフラグメントイオンよりも m/z が1小さいフラグメントイオンのピークの高さの比から、フラグメントイオンの炭素原子数を推定する方法が開示されている。

[0004] しかしながら、アルギニン等の窒素原子の含有量が多い有機化合物のフラグメントイオンの炭素原子数を精度良く推定することができないという問題がある。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：質量分析総合討論会講演要旨集，2009，57th，506-507

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上記の従来技術が有する問題に鑑み、窒素原子の含有量が多い有機化合物のフラグメントイオンの炭素原子数を精度良く推定することが可能な分析方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一実施形態による分析方法は、タンデム質量分析計を用いて、第

一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、タンデム質量分析計を用いて、前記第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、前記第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオン及び該第一のフラグメントイオンよりも質量電荷比が1小さい第二のフラグメントイオンのピークの高さの比を求める工程と、前記第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、前記第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び前記第二のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオンのピークの高さの比を求める工程を有する。

[0008] 本発明の一実施形態による分析方法は、タンデム質量分析計を用いて、第一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、タンデム質量分析計を用いて、前記第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、前記第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオン及び該第一のフラグメントイオンよりも質量電荷比が1小さい第二のフラグメントイオンのピークの面積の比を求める工程と、前記第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、前記第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び前記第二のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオンのピークの面積の比を求める工程を有する。

発明の効果

[0009] 本発明の実施形態によれば、窒素原子の含有量が大きい有機化合物のフラグメントイオンの炭素原子数を精度良く推定することが可能な分析方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ピンドロールの質量分析結果を示す図である。

[図2]アルギニン及びアルギニンメチルエステルの質量分析結果（その1）を示す図である。

[図3]アルギニン及びアルギニンメチルエステルの質量分析結果（その2）を示す図である。

[図4]アルギニン及びアルギニンメチルエステルの質量分析結果（その3）を示す図である。

[図5]図4（a）及び（b）における質量電荷比が60及び61のフラグメントイオンのピークを模式的に示す図である。

[図6]タンデム質量分析計が、液体クロマトグラフと接続されている状態を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 次に、本発明を実施するための形態を図面と共に説明する。

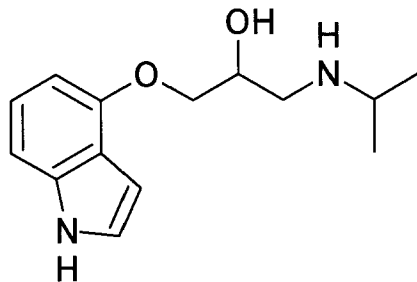
[0012] 本発明の実施形態に係る分析方法は、タンデム質量分析計を用いて、第一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比（ m/z ）が1大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程を有する。これにより、第一のフラグメントイオン及び第一のフラグメントイオンよりも m/z が1小さい第二のフラグメントイオンのピークの高さの比が求められる。

[0013] なお、第一のフラグメントイオン及び第二のフラグメントイオンのピークの高さは、タンデム質量分析計の解析ソフトを用いて測定してもよいし、定規を用いて測定してもよい。

[0014] このとき、ピークの高さとして、複数回質量分析することにより得られるピークの高さの平均値を用いてもよい。

- [0015] タンデム質量分析計としては、特に限定されないが、四重極イオントラップ質量分析計三連四重極型質量分析計、四重極－飛行時間型ハイブリッド質量分析計等が挙げられる。
- [0016] 第一の有機化合物をイオン化させる方法としては、特に限定されないが、電子イオン化（E I）法、化学イオン化（C I）法、電界脱離（F D）法、高速原子衝突（F A B）法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法、大気圧化学イオン化（APCI）法等が挙げられる。
- [0017] 第一の有機化合物をイオン化させたイオンとしては、特に限定されないが、分子イオン（ M^+ ）、プロトンが付加したイオン（ $[M+H]^+$ ）、ナトリウムイオンが付加したイオン（ $[M+Na]^+$ ）、アンモニウムイオンが付加したイオン（ $[M+NH_4]^+$ ）、ハイドライドが脱離したイオン（ $[M-H]^+$ ）、電子が付加したイオン（ M^- ）、ハロゲンイオンが付加したイオン（ $[M+X]^-$ ）、プロトンが脱離したイオン（ $[M-H]^-$ ）等の1価のイオン；プロトンが付加したイオン（ $[M+nH]^{n+}$ ）、プロトンが脱離したイオン（ $[M-nH]^{n-}$ ）等の2価以上のイオン等の分子量関連イオン；分子量関連イオンのフラグメントイオン等が挙げられる。
- [0018] 第一の有機化合物をイオン化させたイオンにおける分子量関連イオンのフラグメントイオンとしては、例えば、アルギニンにプロトンが付加したイオン（ $[M+H]^+$ ）から水が脱離したイオン等が挙げられる。
- [0019] 第一の有機化合物としては、炭素原子数を変化させることが可能であれば、特に限定されない。
- [0020] ここで、本発明の実施形態に係る分析方法と対比するために、非特許文献1に記載された方法を用いて、化学式
- [0021]

[化1]



で表される分子量が248.32のピンドロール ($C_{14}H_{20}N_2O_2$) を分析する場合について説明する。

[0022] 図1に、高速液体クロマトグラフNANOSPACE S1-2（資生堂社製）を接続したリニアイオントラップーフーリエ変換型ハイブリッド質量分析計LTQ-Orbitrap（サーモサイエンティフィック社製）を用いて、ピンドロールを質量分析した結果を示す。（a）は、MSスペクトルであり、（b）及び（c）は、それぞれピンドロールをイオン化させたイオン及びピンドロールをイオン化させたイオンよりも m/z が1大きい第一のイオンをプリカーサーイオンとしたときのMS/MSプロダクトイオンスペクトルである。なお、上記ハイブリッド質量分析計等のタンデム質量分析計2が、上記高速液体クロマトグラフ等の液体クロマトグラフ1と接続されている状態を図6に示している。

[0023] 図1（a）から、ピンドロールをイオン化させたイオンは、ピンドロールにプロトンが付加した m/z が249のイオン（ $[M+H]^+$ ）であり、第一のイオンは、ピンドロールにプロトンが付加した m/z が250のイオン（ $[M+1+H]^+$ ）であることがわかる。

[0024] 図1（b）から、 $[M+H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が116、146及び172のフラグメントイオンが存在することがわかる。

[0025] 図1（c）から、 $[M+1+H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が

117、147及び173のフラグメントイオン、これらのフラグメントイオンよりも m/z が1小さいフラグメントイオンとして、 m/z が116、146及び172のフラグメントイオンが存在することがわかる。これは、 $[M+1+H]^+$ から中性種が脱離してフラグメントイオンが生成するが、 $[M+1+H]^+$ に含まれる質量数が1大きい同位体が脱離した中性種に含まれる場合とフラグメントイオンに含まれる場合があるためである。

[0026] ここで、 ^{12}C の同位体存在度に対する ^{13}C の同位体存在度の比が1.108/98.892、 ^1H の同位体存在度に対する ^2H の同位体存在度の比が0.015/99.985、 ^{14}N の同位体存在度に対する ^{15}N の同位体存在度の比が0.365/99.635、 ^{16}O の同位体存在度に対する ^{17}O の同位体存在度の比が0.037/99.759である。

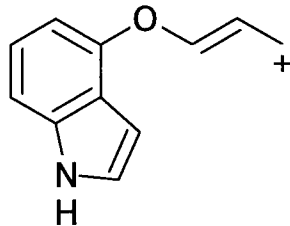
[0027] なお、 ^{12}C の同位体存在度に対する ^{13}C の同位体存在度の比、 ^1H の同位体存在度に対する ^2H の同位体存在度の比、 ^{14}N の同位体存在度に対する ^{15}N の同位体存在度の比及び ^{16}O の同位体存在度に対する ^{17}O の同位体存在度の比としては、種々のデータが存在する。

[0028] ^2H 、 ^{15}N 及び ^{17}O の同位体存在度が ^{13}C の同位体存在度よりも十分に小さいことから、非特許文献1に記載された方法では、質量数が1大きい同位体として、 ^{13}C のみが存在すると仮定して炭素原子数が推定される。具体的には、 m/z が173及び172のフラグメントイオンのピークの高さの比が約11:3であることから、 m/z が172及び173のフラグメントイオンの炭素原子数が11であると推定される。

[0029] なお、 m/z が172及び173のフラグメントイオンは、 $[M+1+H]^+$ から2-アミノプロパン($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$)及び水(H_2O)が脱離して生成する化学式

[0030]

[化2]



で表されるイオン ($C_{11}H_{10}NO^+$) である。

[0031] このとき、 m/z が 173 のフラグメントイオン ($C_{11}H_{10}NO$) に ^{13}C が含まれる場合と、2-アミノプロパン (C_3H_9N) に ^{13}C が含まれる場合の比は、それぞれの炭素原子数に比例するため、11 : 3となる。

[0032] 同様にして、 m/z が 147 及び 146 のフラグメントイオンのピークの高さの比が約 9 : 5 であることから、 m/z が 146 及び 147 のフラグメントイオンの炭素原子数が 9 であると推定される。また、 m/z が 117 及び 116 のフラグメントイオンのピークの高さの比が約 6 : 8 であることから、 m/z が 116 及び 117 のフラグメントイオンの炭素原子数が 6 であると推定される。

[0033] しかしながら、窒素原子の含有量が大きい化合物は、フラグメントイオンのピークにおける ^{15}N の寄与が大きくなるため、非特許文献 1 に記載された方法を用いると、炭素原子数を精度良く推定することができない。

[0034] そこで、本発明の実施形態に係る分析方法は、タンデム質量分析計を用いて、第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも m/z が 1 大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程をさらに有する。これにより、第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び第一のフラグメントイオンよりも m/z が 1 小さい第二のフラグメント

イオンに対応するフラグメントイオンのピークの高さの比が得られる。その結果、窒素原子の含有量が大きい有機化合物のフラグメントイオンの炭素原子数を精度良く推定することができる。

[0035] 第二の有機化合物をイオン化させる方法としては、特に限定されないが、電子イオン化 (E I) 法、化学イオン化 (C I) 法、電界脱離 (F D) 法、高速原子衝突 (F A B) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (M A L D I) 法、エレクトロスプレーイオン化 (E S I) 法、大気圧化学イオン化 (A P C I) 法等が挙げられる。

[0036] 第二の有機化合物をイオン化させたイオンとしては、特に限定されないが、分子イオン (M^+)、プロトンが付加したイオン ($[M+H]^+$)、ナトリウムイオンが付加したイオン ($[M+Na]^+$)、アンモニウムイオンが付加したイオン ($[M+NH_4]^+$)、ハイドライドが脱離したイオン ($[M-H]^+$)、電子が付加したイオン (M^-)、ハロゲンイオンが付加したイオン ($[M+X]^-$)、プロトンが脱離したイオン ($[M-H]^-$) 等の1価のイオン；プロトンが付加したイオン ($[M+nH]^{n+}$)、プロトンが脱離したイオン ($[M-nH]^{n-}$) 等の2価以上のイオン等の分子量関連イオン；分子量関連イオンのフラグメントイオン等が挙げられる。

[0037] 第二の有機化合物をイオン化させたイオンにおける分子量関連イオンのフラグメントイオンとしては、例えば、アルギニンメチルエステルにプロトンが付加したイオン ($[M+H]^+$) から水が脱離したイオン等が挙げられる。

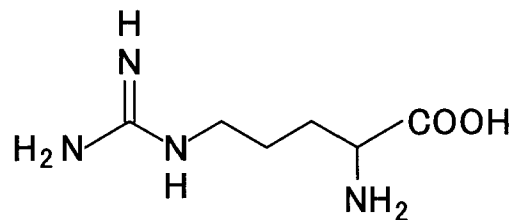
[0038] 第一の有機化合物の炭素原子数を変化させる方法としては、特に限定されないが、置換反応、付加反応、脱離反応、加水分解反応、縮合反応、酵素反応等の公知の反応が挙げられる。

[0039] なお、第一の有機化合物の炭素数を変化させて第二の有機化合物を合成してもよいし、予め合成されている第二の有機化合物の市販品等を用いてもよい。

[0040] 一例として、化学式

[0041]

[化3]



で表される分子量が 174.20 のアルギニン ($C_6H_{14}N_4O_2$) を質量分析する場合について説明する。このとき、アルギニンの炭素原子数を 1 増加させることにより得られる化合物として、アルギニンとメタノールを脱水縮合させることにより得られるアルギニンメチルエステルを用いる。

[0042] 図 2 に、高速液体クロマトグラフ NANOSPACE S1-2 (資生堂社製) を接続したリニアイオントラップフーリエ変換型ハイブリッド質量分析計 LTQ-Orbitrap (サーモサイエンティフィック社製) を用いて、アルギニン及びアルギニンメチルエステルを質量分析した結果 (その 1) を示す。なお、(a) 及び (b) は、それぞれアルギニン及びアルギニンメチルエステルの MS スペクトルである。

[0043] 図 2 (a) から、アルギニンをイオン化させたイオンは、アルギニンにプロトンが付加した m/z が 175 のイオン ($[M_1 + H]^+$) であることがわかる。また、アルギニンをイオン化させたイオンよりも m/z が 1 大きい第一のイオンは、アルギニンにプロトンが付加した m/z が 176 のイオン ($[M_1 + 1 + H]^+$) であることがわかる。

[0044] 図 2 (b) から、アルギニンメチルエステルをイオン化させたイオンは、アルギニンメチルエステルにプロトンが付加した m/z が 189 のイオン ($[M_2 + H]^+$) であることがわかる。また、アルギニンメチルエステルをイオン化させたイオンよりも m/z が 1 大きい第二のイオンは、 m/z が 19

Oのイオン ($[M_2 + 1 + H]^+$) であることがわかる。

[0045] 図3に、アルギニン及びアルギニンメチルエステルを質量分析した結果（その2）を示す。なお、（a）及び（b）は、それぞれ $[M_1 + H]^+$ 及び $[M_2 + H]^+$ をプリカーサーイオンとしたときのMS/MSプロダクトイオンスペクトルである。

[0046] 図3（a）から、 $[M_1 + H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が60、70、112、116及び140のフラグメントイオンが存在することがわかる。

[0047] 図3（b）から、 $[M_2 + H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が60、70、112、130及び140のフラグメントイオンが存在することがわかる。

[0048] このとき、アルギニンの炭素原子数を変化させても、 m/z が60、70、112及び140のフラグメントイオンの m/z が変化しないことがわかる。一方、アルギニンの炭素原子数を変化させたことにより、図3（a）における m/z が116のフラグメントイオンが、図3（b）における m/z が130のフラグメントイオンに変化したことがわかる。

[0049] 図4に、アルギニン及びアルギニンメチルエステルを質量分析した結果（その3）を示す。なお、（a）及び（b）は、それぞれ $[M_1 + 1 + H]^+$ 及び $[M_2 + 1 + H]^+$ をプリカーサーイオンとしたときのMS/MSプロダクトイオンスペクトルである。

[0050] 図4（a）から、 $[M_1 + 1 + H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が61、71、113、117、131及び141のフラグメントイオン、 $[M_1 + 1 + H]^+$ のフラグメントイオンよりも m/z が1小さいフラグメントイオンとして、 m/z が60、70、112、116、130及び140のフラグメントイオンが存在することがわかる。

[0051] 図4（b）から、 $[M_2 + 1 + H]^+$ のフラグメントイオンとして、 m/z が61、71、113、131及び141のフラグメントイオン、 $[M_2 + 1 + H]^+$ のフラグメントイオンよりも m/z が1小さいフラグメントイオンと

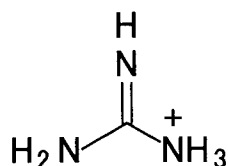
して、 m/z が 60、70、112、130 及び 140 のフラグメントイオンが存在することがわかる。

[0052] 図5に、図4(a)及び(b)における m/z が60及び61のフラグメントイオンのピークを模式的に示す。なお、(a)は、図4(a)における m/z が60及び61のフラグメントイオンのピークであり、(b)は、図4(b)における m/z が60及び61のフラグメントイオンのピークである。このとき、(a)及び(b)は、 m/z が61のフラグメントイオンのピークの高さが同一になるように調整されている。

[0053] 図5から、アルギニンメチルエステルとアルギニンの間の m/z が60のフラグメントイオンのピークの高さの差 Δh が炭素原子数1に相当し、 $[M_2 + 1 + H]^+$ 及び $[M_1 + 1 + H]^+$ から脱離した中性種の炭素原子数が、それぞれ6及び5であると推定される。また、アルギニンメチルエステル及びアルギニンの炭素原子数が、それぞれ7及び6であることから、 m/z が60及び61のフラグメントイオンの炭素原子数が1であると推定される。

[0054] なお、 m/z が60及び61のフラグメントイオンは、 $[M_1 + 1 + H]^+$ (又は $[M_2 + 1 + H]^+$) から中性種として、2-アミノペンタン酸 ($C_5H_{11}NO_2$) (又は2-アミノペンタン酸メチル ($C_6H_{13}NO_2$)) が脱離して生成する化学式

[0055] [化4]



で表されるイオン ($CH_6N_3^+$) である。

[0056] 一方、 m/z が61のフラグメントイオンのピークの高さと、 m/z が61のフラグメントイオンの炭素数と Δh の積、即ち、 Δh との差 $\Delta h'$ は、¹³

C以外の質量数が1大きい同位体の寄与であると推定される。

[0057] ここで、 ^2H 及び ^{17}O の同位体存在度が ^{13}C 及び ^{15}N の同位体存在度よりも十分に小さいことから、質量数が1大きい同位体として、 ^{13}C 及び ^{15}N のみが存在すると仮定すると、 ^{12}C の同位体存在度に対する ^{13}C の同位体存在度の比が1.108/98.892、 ^{14}N の同位体存在度に対する ^{15}N の同位体存在度の比が0.365/99.635であることから、 m/z が60及び61のフラグメントイオンの窒素原子数は、式

$$(1.108/98.892) / (0.365/99.635) \times (\Delta h' / \Delta h)$$

から推定することができる。

[0058] このとき、アルギニンは、 $\Delta h'$ が Δh と略同一である、即ち、 m/z が61のフラグメントイオンのピークにおける ^{15}N の寄与が大きいため、非特許文献1に記載された方法を用いて、 m/z が60及び61のフラグメントイオンのピークの高さの比から、アルギニンの炭素原子数を推定しても、精度良く推定することができない。

[0059] なお、上記と同様にして、図4(a)における m/z が70及び71のフラグメントイオン、 m/z が112及び113のフラグメントイオン、 m/z が116及び117のフラグメントイオン、 m/z が140及び141のフラグメントイオンの炭素原子数を推定することができる。

[0060] 一方、図4(b)における m/z が70及び71のフラグメントイオン、 m/z が112及び113のフラグメントイオン、 m/z が130及び131のフラグメントイオン、 m/z が140及び141のフラグメントイオンの炭素原子数を推定することができる。

[0061] このことから、第一の有機化合物の炭素原子数を増加させる代わりに、減少させてもよいことがわかる。

[0062] なお、第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物と第一の有機化合物の炭素原子数の差は、1以外であってもよく、通常、1～10である。

[0063] また、第二の有機化合物として、二種以上の有機化合物を用いてもよい。
これにより、フラグメントイオンのピークの重なりを検出することができる。

[0064] さらに、フラグメントイオンの炭素原子数を推定する際に、ピークの高さの比の代わりに、ピークの面積の比を用いてもよい。

[0065] なお、第一の有機化合物の炭素原子数が未知である場合、質量数が1大きい同位体として、 ^{13}C のみが存在すると仮定すると、 ^{12}C の同位体存在度に対する ^{13}C の同位体存在度の比が1.108/98.892であることから、 $[\text{M}_1 + \text{H}]^+$ 及び $[\text{M}_1 + 1 + \text{H}]^+$ のピークの高さを、それぞれ h_1 及び h_2 とすると、第一の有機化合物の炭素原子数は、式

$$(h_2 / h_1) / (1.108 / 98.892)$$

から推定することができる。

[0066] 以上、本発明の分析方法をLC/MS/MSに適用する場合について説明したが、本発明の分析方法は、GC/MS/MS、直接分析MS/MS、直接試料導入MS/MS、MS/MS/MS等に適用することができる。

[0067] 本国際出願は、2011年5月26日に提出された日本国特許出願第2011-118165号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願第2011-118165号の全内容を本国際出願に援用する。

請求の範囲

[請求項1]

タンデム質量分析計を用いて、第一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、

タンデム質量分析計を用いて、前記第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、

前記第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオン及び該第一のフラグメントイオンよりも質量電荷比が1小さい第二のフラグメントイオンのピークの高さの比を求める工程と、

前記第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、前記第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び前記第二のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオンのピークの高さの比を求める工程を有することを特徴とする分析方法。

[請求項2]

タンデム質量分析計を用いて、第一の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、

タンデム質量分析計を用いて、前記第一の有機化合物の炭素原子数を変化させることにより得られる第二の有機化合物をイオン化させたイオンよりも質量電荷比が1大きい第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析する工程と、

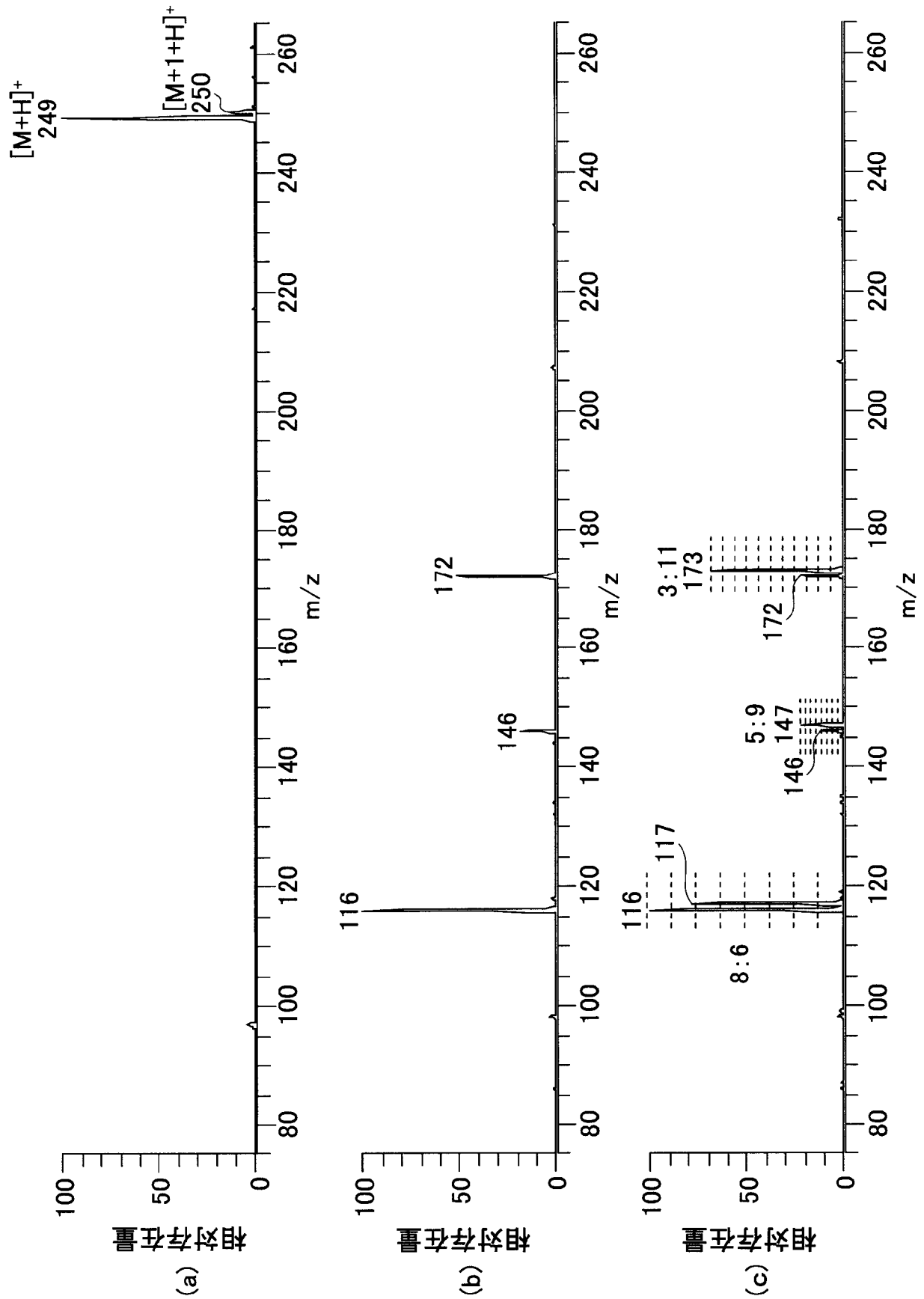
前記第一のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、第一のフラグメントイオン及び該第一のフラグメントイオンよりも質量電荷比が1小さい第二のフラグメントイオンのピークの面積の比を求める工程と、

前記第二のプリカーサーイオンから生成するプロダクトイオンを質量分析することにより得られる、前記第一のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオン及び前記第二のフラグメントイオンに対応するフラグメントイオンのピークの面積の比を求める工程を有することを特徴とする分析方法。

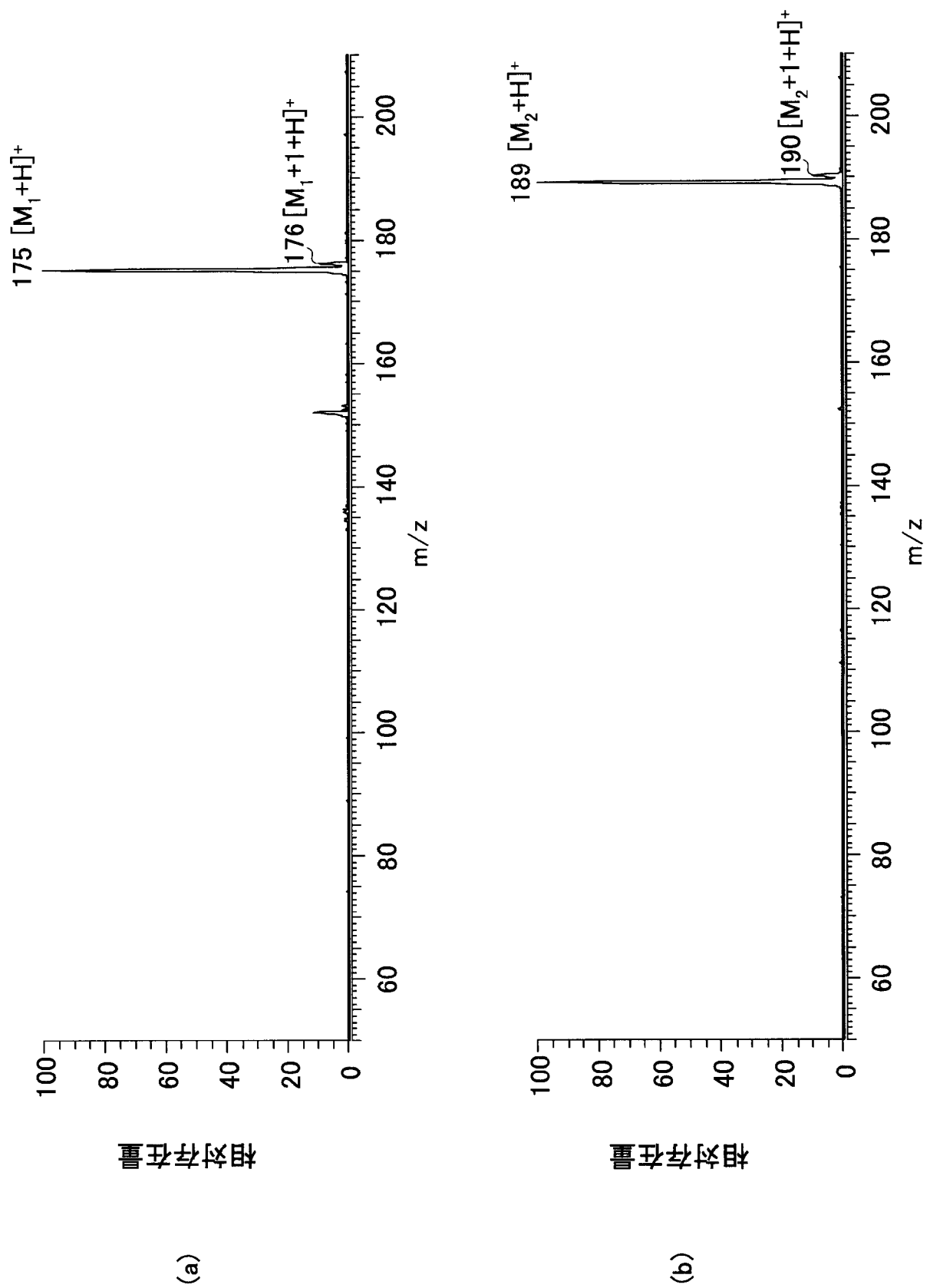
[請求項3] 前記第一の有機化合物の炭素原子数を変化させて前記第二の有機化合物を合成する工程をさらに有することを特徴とする請求項1又は2に記載の分析方法。

[請求項4] 前記タンデム質量分析計は、液体クロマトグラフと接続されていることを特徴とする請求項1又は2に記載の分析方法。

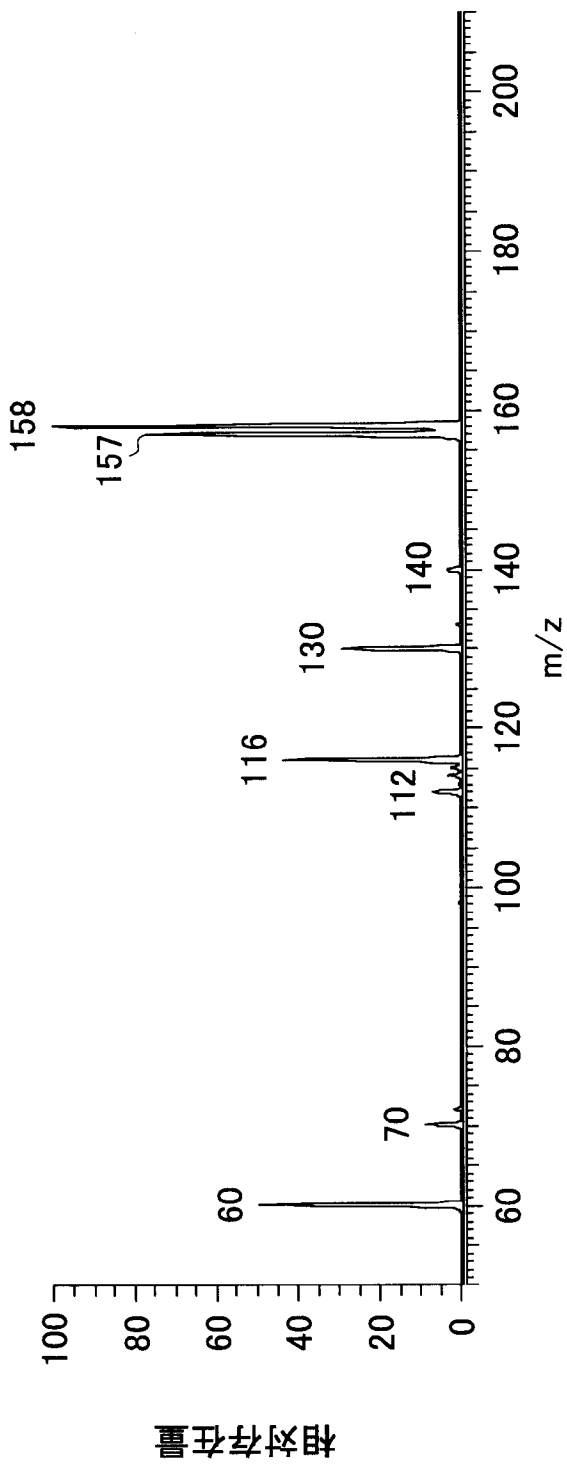
[図1]



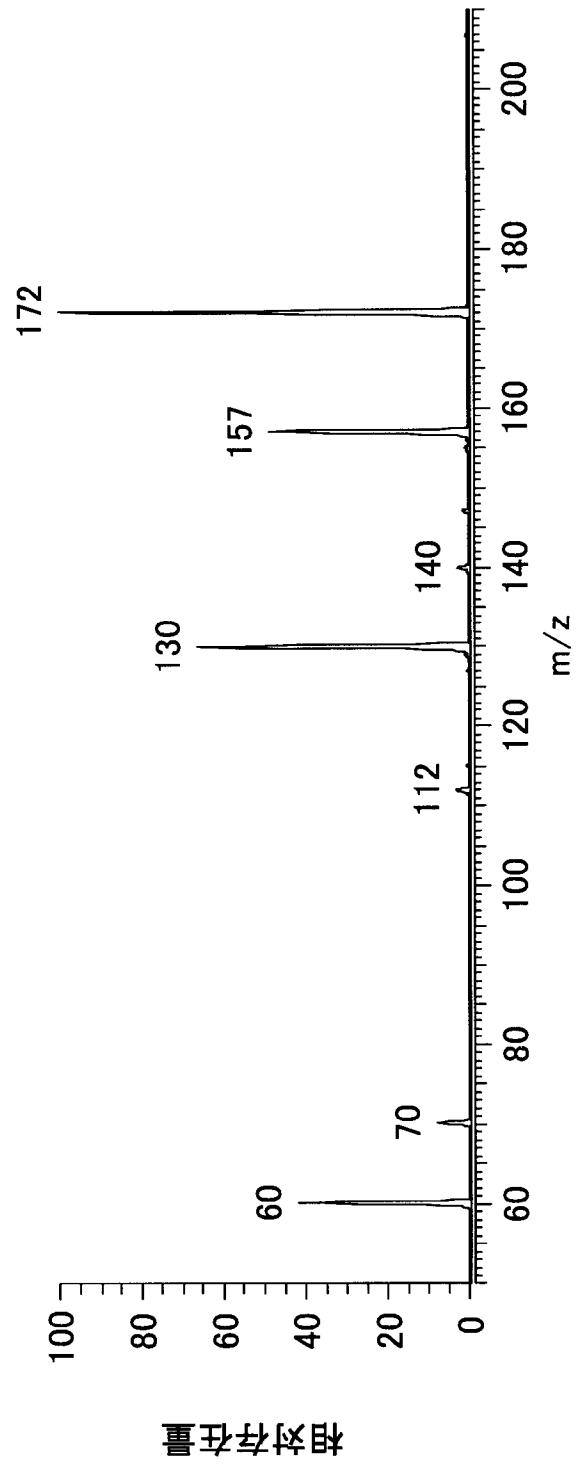
[図2]



[図3]

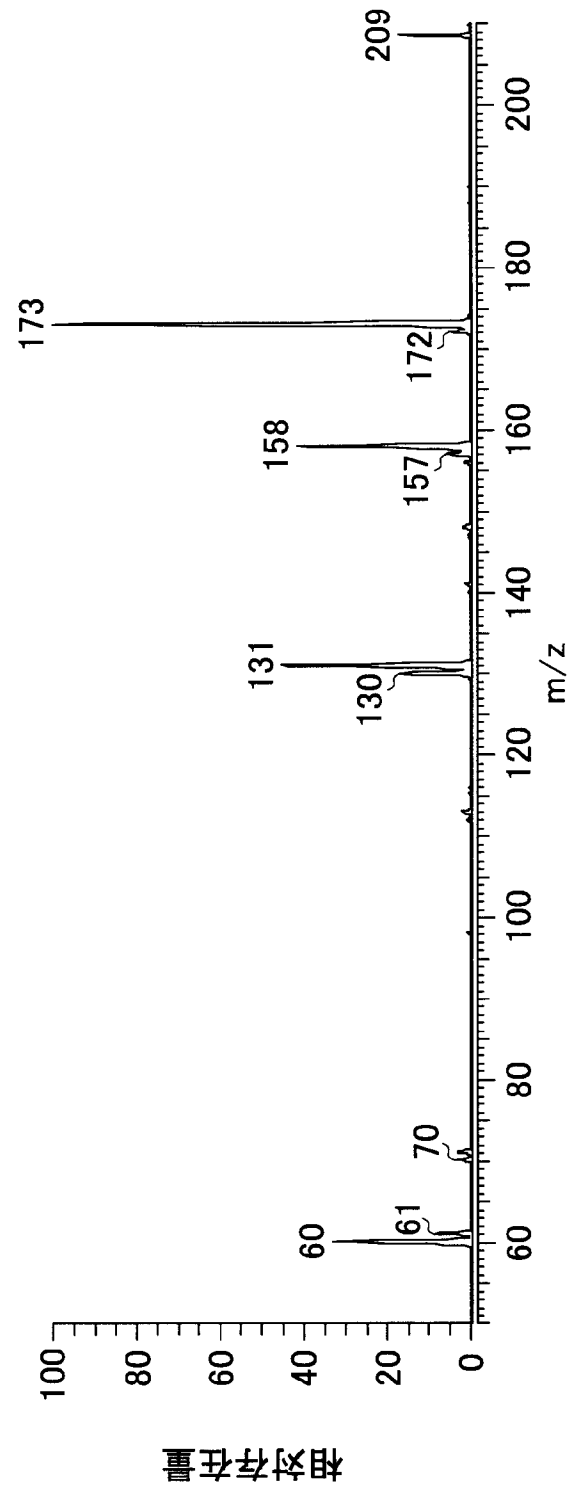
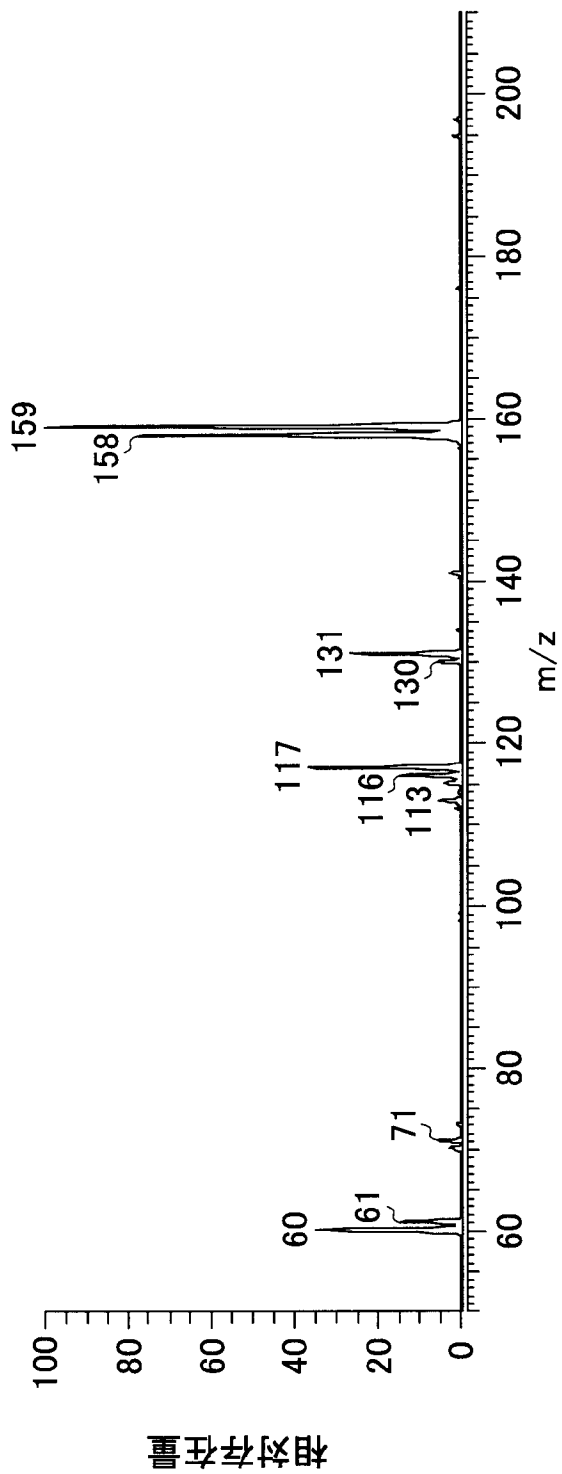


(a)

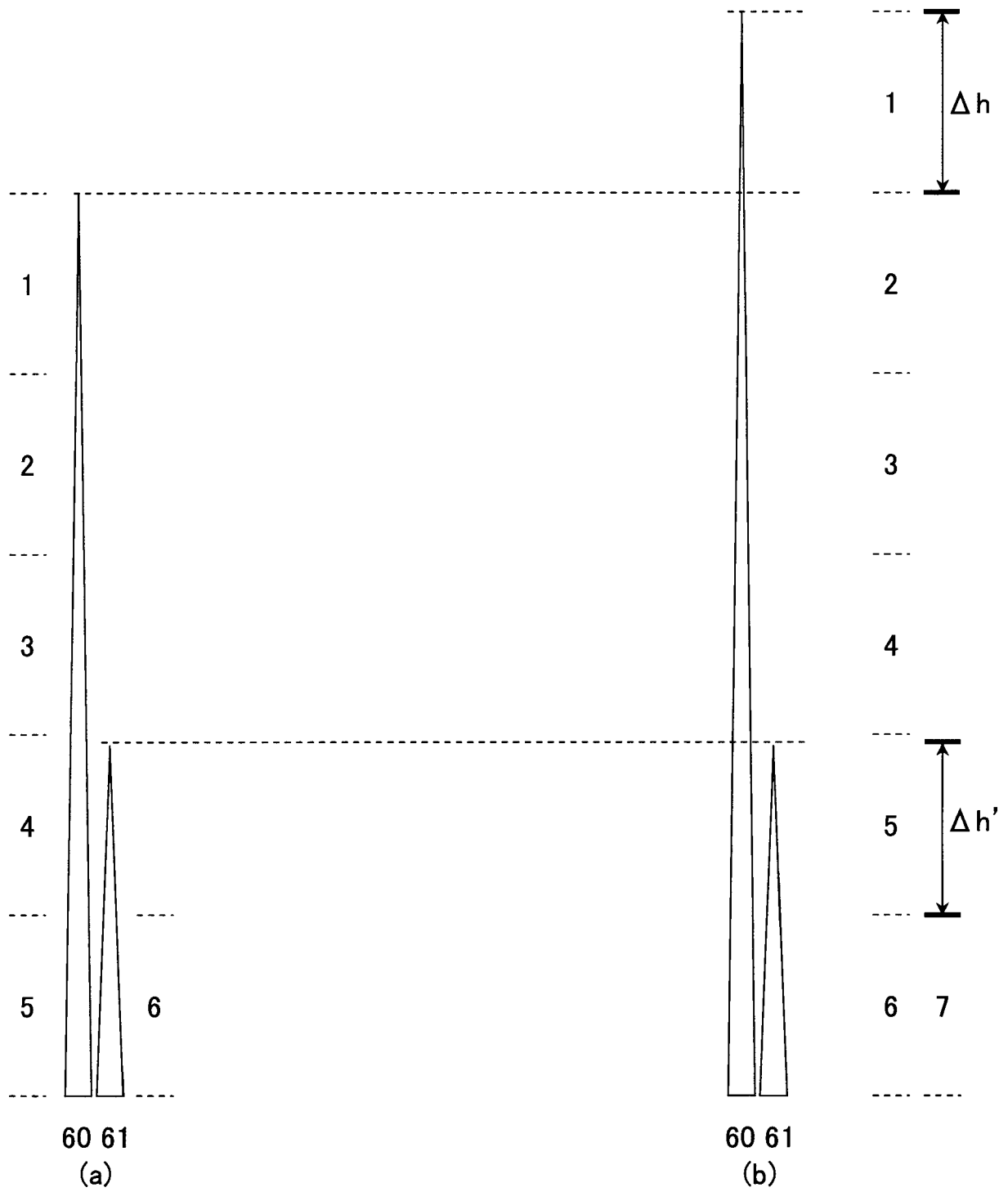


(b)

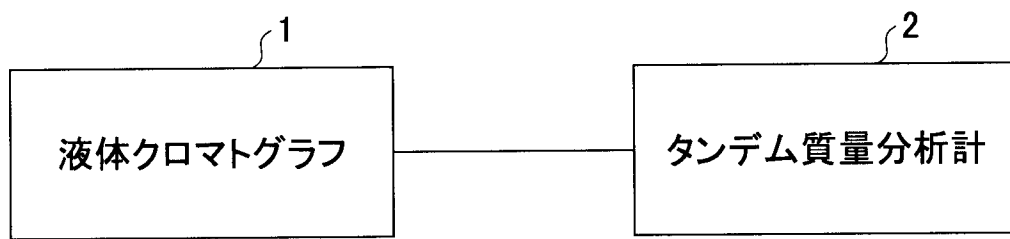
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/60-27/70 (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

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-274640 A (Hitachi, Ltd.), 13 October 1998 (13.10.1998), entire text; all drawings & US 6008490 A	1-4
A	JP 2005-283593 A (Hitachi, Ltd.), 13 October 2005 (13.10.2005), entire text; all drawings (Family: none)	1-4
A	JP 2011-28926 A (Hitachi High-Technologies Corp.), 10 February 2011 (10.02.2011), entire text; all drawings (Family: none)	1-4

☒ 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
25 April, 2012 (25.04.12)Date of mailing of the international search report
15 May, 2012 (15.05.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059263

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wolf D. Lehmann, Isotope-selective Tandem Mass Spectrometry: a New Tool for Elucidation of Fragmentation Pathways, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, 1998, 33, 164-172	1-4
A	Akira MOTOYAMA, "Doitai Sentaku MS/MS-ho o Katsuyo shita Fragmentation Kaiseki to sono Yuyosei", Dai 57 Kai Annual Conference on Mass Spectrometry, Book of Abstracts, 2009, 506-507	1-4

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

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. G01N27/60-27/70

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	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012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(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 10-274640 A (株式会社日立製作所) 1998.10.13, 全文全図 & US 6008490 A	1-4
A	JP 2005-283593 A (株式会社日立製作所) 2005.10.13, 全文全図 (ファミリーなし)	1-4
A	JP 2011-28926 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2011.02.10, 全文全図 (ファミリーなし)	1-4

☒ 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

25.04.2012

国際調査報告の発送日

15.05.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2W

9515

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
A	Wolf D. Lehmann, Isotope-selective Tandem Mass Spectrometry: a New Tool for Elucidation of Fragmentation Pathways, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, 1998, 33, 164-172	1 - 4
A	本山晃, 同位体選択MS/MS法を活用したフラグメンテーション解析とその有用性, 第57回質量分析総合討論会講演要旨集, 2009, 506-507	1 - 4