

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-164552
(P2016-164552A)

(43) 公開日 平成28年9月8日(2016.9.8)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01) GO 1 N 27/62 D 2 GO 4 1

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2016-23941 (P2016-23941)
(22) 出願日 平成28年2月10日 (2016.2.10)
(31) 優先権主張番号 特願2015-36501 (P2015-36501)
(32) 優先日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504258527
国立大学法人 鹿児島大学
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(74) 代理人 100095407
弁理士 木村 満
(74) 代理人 100168114
弁理士 山中 生太
(74) 代理人 100133592
弁理士 山口 浩一
(74) 代理人 100162259
弁理士 末富 孝典
(72) 発明者 高梨 啓和
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
国立大学法人 鹿児島大学内

最終頁に続く

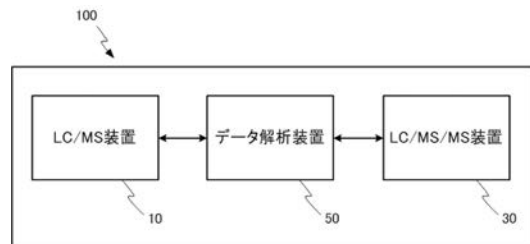
(54) 【発明の名称】 濃度推定方法、データ解析装置およびプログラム

(57) 【要約】

【課題】クロマトグラフィー - タンデム質量分析法において、標準物質を使用せずに測定対象物質の試料中濃度を推定することができる濃度推定方法等を提供する。

【解決手段】イオン化された測定対象物質をLC/MS装置10で検出する。LC/MS/MS装置30でプロダクトイオンを検出する。データ解析装置50は、測定対象物質のイオン化における平衡定数を量子化学計算に基づいて算出し、平衡定数及びLC/MS/MS装置30で得られたピーク面積から測定対象物質の濃度とプリカーサーイオンの量との関係式を決定する。データ解析装置50は、LC/MS装置10で得られた測定対象物質のピーク面積とプロダクトイオンのピーク面積との比で、前記関係式を、濃度とプロダクトイオンのピーク面積との関係式に補正し、濃度とプロダクトイオンのピーク面積との関係式及びプロダクトイオンのピーク面積から試料における濃度を推定する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クロマトグラフィーにより時間方向に分離された試料中の測定対象物質をイオン化し、イオン化された測定対象物質を検出する第 1 の分析ステップと、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離された前記試料中の測定対象物質をイオン化し、イオン化された該測定対象物質を解離させたプロダクトイオンを検出する第 2 の分析ステップと、

前記測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出ステップと、

前記イオン化効率に関する値及び前記第 2 の分析ステップで得られたクロマトグラムにおける前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定ステップと、

前記第 1 の分析ステップで得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正ステップと、

前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定ステップと、

を含む、濃度推定方法。

【請求項 2】

前記イオン化効率に関する値は、

前記測定対象物質のイオン化における平衡定数である、

請求項 1 に記載の濃度推定方法。

【請求項 3】

前記決定ステップでは、

前記試料の希釈倍率に対する前記プロダクトイオンのシグナル強度から最小二乗法によって、前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式に規定された定数を演算する、

請求項 1 又は 2 に記載の濃度推定方法。

【請求項 4】

前記クロマトグラフィーは、前記試料中の物質をカラムで分離し、

前記第 2 の分析ステップでは、

前記第 1 の分析ステップにおける前記測定対象物質のカラム保持時間に基づいて設定されたカラム保持時間で特定される前記プロダクトイオンを検出する、

請求項 1 から 3 のいずれ一項に記載の濃度推定方法。

【請求項 5】

前記第 2 の分析ステップでは、

前記第 1 の分析ステップで特定されたイオン化された前記測定対象物質の質量に基づいて特定される前記プロダクトイオンを検出する、

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の濃度推定方法。

【請求項 6】

前記第 1 の分析ステップ及び前記第 2 の分析ステップにおける前記クロマトグラフィーは、移動相が複数種の溶媒を含み、前記溶媒の混合比を経時的に変化させる液体クロマトグラフィーであって、

前記第 1 の分析ステップ及び前記第 2 の分析ステップのイオン化の際には、前記溶媒の混合比が一定に維持される、

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の濃度推定方法。

【請求項 7】

測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出部と、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質を解離させたプロダクトイオンの検出で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定部と、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質の検出で得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正部と、

前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定部と、
を備える、データ解析装置。

10

【請求項 8】

コンピュータを、

測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出部、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質を解離させたプロダクトイオンの検出で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定部、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質の検出で得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正部、

20

前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定部、
として機能させる、プログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、濃度推定方法、データ解析装置およびプログラムに関する。

30

【背景技術】

【0002】

固定相を移動相が通過する過程で物質を時間方向に分離することができるクロマトグラフィーと、分離された物質をイオン化して質量を分析する質量分析法とを組み合わせたクロマトグラフィー - 質量分析法が各種物質の分析に広く用いられている。例えば、特許文献 1 には、クロマトグラフィー - 質量分析法による生体分子パターンのアノテーション法及びシステムが開示されている。また、特許文献 2 には、ガスクロマトグラフィーと質量分析装置とを組み合わせた分析装置が記載されている。

【0003】

40

さらにイオン化された物質から所定の質量の物質をプリカーサーイオンとして選択し、プリカーサーイオンにエネルギーを与えて解離させたプロダクトイオンを選択して質量を分析するクロマトグラフィー - タンデム質量分析法が知られている。例えば、特許文献 3 には、生物の組織または細胞に存在する物質の化学構造を直接同定するための方法に関し、特に液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析（以下、単に「LC/MS/MS」ともいう）法で分析する段階についての記載がある。

【0004】

LC/MS/MS はノイズを低減させて高感度に物質を分析することができる。このため、試料中の測定対象物質の濃度の定量に、LC/MS/MS が利用される。LC/MS/MS で試料中の測定対象物質の濃度を定量する場合、測定対象物質ごとにイオン化効率

50

が異なるため、イオン化効率を補正するための測定対象物質の標準物質が必要である。また、特定のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを連続的にモニタリングするための選択反応モニタリング条件を定めるためにも測定対象物質の標準物質が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2006-528339号公報

【特許文献2】特開2006-322842号公報

【特許文献3】特開2001-249125号公報

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、農薬の環境変化体に代表される環境中の汚染物質、あるいは生体内の代謝物等の中には、標準物質が市販されていない物質が少なくない。標準物質が入手できない場合、測定対象物質のイオン化効率を補正できず、選択反応モニタリング条件を定めることができない。したがって、標準物質が入手できない場合、現状では、測定対象物質の定量を断念せざるを得ない。

【0007】

本発明は、上記実情に鑑みてなされたものであり、クロマトグラフィー-タンデム質量分析法において、標準物質を使用せずに測定対象物質の試料中濃度を推定することができる濃度推定方法、データ解析装置およびプログラムを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の第1の観点に係る濃度推定方法は、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離された試料中の測定対象物質をイオン化し、イオン化された測定対象物質を検出する第1の分析ステップと、

クロマトグラフィーにより時間方向に分離された前記試料中の測定対象物質をイオン化し、イオン化された該測定対象物質を解離させたプロダクトイオンを検出する第2の分析ステップと、

前記測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出ステップと、

30

前記イオン化効率に関する値及び前記第2の分析ステップで得られたクロマトグラムにおける前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定ステップと、

前記第1の分析ステップで得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正ステップと、

前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定ステップと、

40

を含む。

【0009】

この場合、前記イオン化効率に関する値は、

前記測定対象物質のイオン化における平衡定数である、

こととしてもよい。

【0010】

また、前記決定ステップでは、

前記試料の希釈倍率に対する前記プロダクトイオンのシグナル強度から最小二乗法によって、前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式に規定

50

された定数を演算する、
こととしてもよい。

【0011】

また、前記クロマトグラフィーは、前記試料中の物質をカラムで分離し、
前記第2の分析ステップでは、
前記第1の分析ステップにおける前記測定対象物質のカラム保持時間に基づいて設定されたカラム保持時間で特定される前記プロダクトイオンを検出する、
こととしてもよい。

【0012】

また、前記第2の分析ステップでは、
前記第1の分析ステップで特定されたイオン化された前記測定対象物質の質量に基づいて特定される前記プロダクトイオンを検出する、
こととしてもよい。

10

【0013】

また、前記第1の分析ステップ及び前記第2の分析ステップにおける前記クロマトグラフィーは、移動相が複数種の溶媒を含み、前記溶媒の混合比を経時的に変化させる液体クロマトグラフィーであって、
前記第1の分析ステップ及び前記第2の分析ステップのイオン化の際には、前記溶媒の混合比が一定に維持される、
こととしてもよい。

20

【0014】

本発明の第2の観点に係るデータ解析装置は、
測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出部と、
クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質を解離させたプロダクトイオンの検出で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定部と、
クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質の検出で得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正部と、
前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定部と、
を備える。

30

【0015】

本発明の第3の観点に係るプログラムは、
コンピュータを、
測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する算出部、
クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質を解離させたプロダクトイオンの検出で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのシグナル強度から前記測定対象物質の濃度と前記イオン化された測定対象物質の量との関係式を決定する決定部、
クロマトグラフィーにより時間方向に分離され、イオン化された試料中の測定対象物質の検出で得られたクロマトグラムにおける前記測定対象物質のシグナル強度と前記プロダクトイオンのシグナル強度との比で、前記測定対象物質の濃度とイオン化された測定対象物質の量との関係式を、前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式に補正する補正部、
前記測定対象物質の濃度と前記プロダクトイオンの量との関係式及び前記プロダクトイオンのシグナル強度から前記試料における前記測定対象物質の濃度を推定する推定部、

40

50

として機能させる。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、クロマトグラフィー・タンデム質量分析法において、標準物質を使用せずに測定対象物質の試料中濃度を推定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】実施の形態1に係る濃度推定システムの構成を示す図である。

【図2】図1に示すLC/MS装置の構成を示す図である。

【図3】図1に示すデータ解析装置の構成を示す図である。

10

【図4】図1に示すLC/MS/MS装置の構成を示す図である。

【図5】エレクトロスプレーイオン化モデルを示す図である。

【図6】ピーク面積と試料希釈倍率との関係を示す図である。

【図7】濃度推定処理のフローチャートを示す図である。

【図8】実施の形態2に係るLC部の構成を示す図である。

【図9】ギブスの自由エネルギーが最も低かった立体配座を示す図である。aはイミダクロプリドである。bはイミダクロプリドのプロトン付加体である。

【図10】推定した濃度と推定したピーク面積との間の検量線及び実測した濃度と実測したピーク面積との間の検量線を示す図である。

【図11】実施例においてLC/MS装置で測定されたPTPW-a~dの抽出イオンクロマトグラム(EIC)を示す図である。

20

【図12】実施例においてLC/MS/MS装置でSIM(Selected Ion Monitoring)法により測定されたPTPW-a~dのクロマトグラムを示す図である。

【図13】実施例においてLC/MS/MS装置でSRM(Selected Reaction Monitoring)法により測定されたPTPW-a~dのクロマトグラムを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明に係る実施の形態について図面を参照して説明する。なお、本発明は下記の実施の形態および図面によって限定されるものではない。

30

【0019】

(実施の形態1)

実施の形態1について詳細に説明する。図1は、本実施の形態に係る濃度推定方法に使用される濃度推定システム100の構成を示す。濃度推定システム100は、液体クロマトグラフィー・質量分析装置(LC/MS装置)10と、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置(LC/MS/MS装置)30と、データ解析装置50と、を備える。

【0020】

まず、LC/MS装置10について図2を参照して詳細に説明する。LC/MS装置10は、イオン源としてエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いる四重極質量分析を行う。図2は、LC/MS装置10の構成を示すブロック図である。LC/MS装置10は、液体クロマトグラフ(LC)部11と、質量分析(MS)部12と、A/D変換器13と、を備える。

40

【0021】

LC部11は、移動相容器14と、移送ポンプ15と、インジェクタ16と、カラム17と、を備える。移動相容器14は、移動相を貯留する。移送ポンプ15は、移動相容器14に貯留された移動相を吸引し、インジェクタ16を通して、一定の流量で移動相をカラム17に供給する。インジェクタ16はオートサンプラを備え、あらかじめ調製された所定量の試料を移動相中に注入する。インジェクタ16によって移動相中に試料が注入されると、移動相とともに、試料はカラム17に導入される。

50

【0022】

試料には、測定対象物質等の各種物質が含まれている。試料がカラム17を通過する間に、カラム17に充填された固定相及び移動相と試料中の物質との相互作用の差によって物質が分離される。分離された物質は、時間方向にずれてカラム17の出口から溶出する。すなわち、分離された物質ごとに、インジェクタ16によって試料が移動相中に注入されてからカラム17から溶出するまでの時間であるカラム保持時間が定まる。溶出液はMS部12に導入される。

【0023】

MS部12は、ESIノズル18と、イオン化室19と、イオン光学系20と、分析室21と、を備える。LC部11から供給された溶出液がESIノズル18に達すると、高圧電源から印加されている直流高電圧により、溶出液に電荷が付与される。ESIノズル18は、溶出液を帯電した微小液滴としてイオン化室19内に噴霧する。

10

【0024】

イオン化室19は、大気圧雰囲気中に維持されている。帯電した微小液滴は大気由来のガス分子と衝突してさらに微細な液滴に粉碎され、速やかに脱溶媒化されて、試料分子が気化する。気化した試料分子はイオン蒸発反応によってイオン化される。イオンはRFレンズ等を備えるイオン光学系20で収束されて分析室21へ送られる。

【0025】

分析室21は、ポンプにより高真空雰囲気中に維持されている。分析室21は、四重極質量フィルタ22と、検出器23と、を備える。分析室21に送られたイオンは、四重極質量フィルタ22の長軸方向の空間に導入される。四重極質量フィルタ22には直流電圧と高周波電圧とを重畳した電圧が印加されている。これにより、印加電圧に応じた質量数(質量/電荷、 m/z)を有するイオンのみが四重極質量フィルタ22の長軸方向の空間を通過する。検出器23は、四重極質量フィルタ22を通過したイオンを検出する。検出器23による検出信号はA/D変換器13によりデータに変換されて、データ解析装置50に入力される。

20

【0026】

次に、データ解析装置50について図3を参照して詳細に説明する。データ解析装置50は、コンピュータ51と、操作部52と、表示部53と、を備える。コンピュータ51は、CPU(Central Processing Unit)と、外部記憶装置と、RAM(Random Access Memory)と、を備える。データ解析装置50では、CPUが外部記憶装置に記憶されたソフトウェアプログラムをRAMに読み出して、ソフトウェアプログラムを実行制御することにより、通信可能に接続されたLC/MS装置10及びLC/MS/MS装置30の動作を制御し、以下に説明する機能を実現する。

30

【0027】

コンピュータ51は、LC/MS装置10及びLC/MS/MS装置30に指示コマンド、測定条件及び各種パラメータ等に対応するデータを送信することで、LC/MS装置10及びLC/MS/MS装置30を制御する。また、コンピュータ51は、LC/MS装置10及びLC/MS/MS装置30からデータを受信し、データを解析する。

40

【0028】

操作部52は、ユーザによって入力された指示コマンド、測定条件及び各種パラメータ等に対応するデータをコンピュータ51へ出力する。コンピュータ51は、操作部52を介してユーザが入力したデータに基づいて、LC/MS装置10及びLC/MS/MS装置30を制御する。

【0029】

コンピュータ51は、A/D変換器13から入力されたデータを記憶する。コンピュータ51は、記憶したデータを演算処理し、例えば、横軸に m/z 、縦軸にシグナル強度を示したチャートであるマススペクトル、横軸に時間、縦軸にシグナル強度を示したチャートであるクロマトグラム、横軸に時間、縦軸にイオン源で生成した全てのイオンの総和を

50

示したチャートであるトータルイオンクロマトグラム、又は横軸に時間、縦軸に特定の m/z のシグナル強度を示したチャートであるマスクロマトグラム等を作成する。コンピュータ 51 は、作成したマススペクトル等に対応するデータを表示部 53 へ出力する。表示部 53 は、入力されたデータに対応するマススペクトル等を表示する。

【0030】

続いて、LC/MS/MS装置30について図4を参照して詳細に説明する。LC/MS/MS装置30は、イオン源としてのESIによってイオン化された測定対象物質(以下、「プリカーサーイオン」ともいう)を解離させたプロダクトイオンを検出する。LC/MS/MS装置30は、LC部31と、MS/MS部32と、A/D変換器33と、を備える。

10

【0031】

LC部31は、移動相容器34と、移送ポンプ35と、インジェクタ36と、カラム37と、を備える。移動相容器34に貯留される移動相及び移送ポンプ35によるカラム37への移動相の流量等は、LC部11と同じである。LC部31は、上述のLC部11と同様に、試料中の各種物質を時間方向に分離する。

【0032】

MS/MS部32は、ESIノズル38と、イオン化室39と、イオン光学系40と、分析室41と、を備える。ESIノズル38、イオン化室39及びイオン光学系40は、それぞれ上述のESIノズル18、イオン化室19及びイオン光学系20と同様である。以下、分析室41に関して、MS部12の分析室21と異なる点を中心に説明する。

20

【0033】

分析室41は、四重極質量フィルタ42と、コリジョンセル43と、イオン光学系44と、四重極質量フィルタ45と、検出器46と、を備える。四重極質量フィルタ42を通過したプリカーサーイオンは、コリジョンセル43に送られる。コリジョンセル43には、ヘリウム、窒素又はアルゴン等の不活性ガスが供給されている。コリジョンセル43では、印加した電圧によって加速されたプリカーサーイオンが真空中で高い運動エネルギーを持つように励起され、不活性ガス分子に衝突する。衝突により運動エネルギーの一部が変換されて化学結合が切断される。これを、衝突誘起解離(collision-induced dissociation、CID)という。CIDにより、最終的にプリカーサーイオンはプリカーサーイオンよりも小さなプロダクトイオンになる。

30

【0034】

CIDの態様はコリジョンエネルギーによって相違する。よって、コリジョンエネルギーに応じて、プリカーサーイオンから生じるプロダクトイオンが異なる。コリジョンエネルギーは、プリカーサーイオンに印加される電圧で決まるため、電圧を変化させることで、目的とするプロダクトイオンを生成させることができる。

【0035】

プロダクトイオンは、四重極質量フィルタ45の長軸方向の空間に導かれる。四重極質量フィルタ45には直流電圧と高周波電圧とを重畳した電圧が印加されている。これにより、印加電圧に応じた m/z を有するプロダクトイオンのみが四重極質量フィルタ45の長軸方向の空間を通過する。検出器46は、四重極質量フィルタ45を通過したイオンを検出する。検出器46による検出信号はA/D変換器33によりデータに変換されて、データ解析装置50に入力される。

40

【0036】

図3に戻って、コンピュータ51は、LC/MS装置10と同じく、操作部52を介してユーザが入力したデータに基づいて、LC/MS/MS装置30の動作を制御する。また、コンピュータ51は、A/D変換器33によって入力されたデータに対して、所定の演算処理を行う。例えば、コンピュータ51は、プリカーサーイオンの m/z 、プロダクトイオンの m/z 、該プロダクトイオンに対応するコリジョンエネルギー等の予め設定された選択反応モニタリング条件に基づいて、目的とするプロダクトイオンに関して、クロマトグラム等を作成する。コンピュータ51は、表示部53を介して、作成したクロマト

50

グラム等を表示する。

【0037】

通常、LC/MS/MS装置30における測定対象物質に関するカラム保持時間及び選択反応モニタリング条件等は、測定対象物質の標準物質を測定することで決定される。これに対し、コンピュータ51は、標準物質を測定しなくても、LC/MS装置10で測定された測定対象物質のマスペクトル等から決定されるカラム保持時間及び選択反応モニタリング条件に従って、LC/MS/MS装置30の動作を以下のように制御することで、試料中の測定対象物質の濃度を推定する。

【0038】

図4に戻って、MS/MS部32は、LC/MS装置10における測定対象物質のカラム保持時間に基づいて設定されたカラム保持時間で特定されるプロダクトイオンを検出する。より詳細には、特定の m/z のイオンについてのマスクマトグラム(EIC)からLC/MS装置10における測定対象物質のカラム保持時間が特定される。LC部31における移動相の組成及び流量並びに固定相を、LC/MS装置10のLC部11で用いた移動相の組成及び流量並びに固定相と同一にすることで、LC部11におけるカラム保持時間で、LC部31においても測定対象物質がカラム37から溶出される。MS/MS部32は、該カラム保持時間付近に溶出されたプリカーサーイオンから解離したプロダクトイオンを検出する。

【0039】

LC部11とLC部31との配管の長さ等が異なることでホールドアップ時間が異なることがある。ホールドアップ時間が異なる場合、カラム保持時間にずれが生じるため、MS/MS部32は、ホールドアップ時間のずれを補正して設定されたカラム保持時間付近に溶出されたプリカーサーイオンから解離したプロダクトイオンを検出すればよい。

【0040】

MS/MS部32は、LC/MS装置10で特定されたイオン化された測定対象物質の質量に基づいて特定されるプロダクトイオンを検出してもよい。この場合、LC/MS装置10によって特定された質量を有するプリカーサーイオンに対して、コンピュータ51は、イオン光学系40、44及び四重極質量フィルタ42、45への印加電圧、並びにコリジョンエネルギー等を設定する。

【0041】

また、標準物質を測定しない場合、LC/MS/MS装置30での測定対象物質の感度、具体的には測定対象物質の濃度と該測定対象物質を解離したプロダクトイオンのシグナル強度との関係式(検量線の勾配)が求められず、得られたシグナル強度から測定対象物質の濃度を算出できない。これに対し、コンピュータ51は、以下のように図3に示す算出部1、決定部2、補正部3及び推定部4として機能することで、シグナル強度としてのピーク面積から濃度を推定する。

【0042】

測定対象物質ごとに感度が異なるのは、測定対象物質のイオン化効率が異なるためである。イオン化効率は、測定対象物質の量子化学的な性質に基づく。そこで、算出部1は、測定対象物質のイオン化効率に関する値を量子化学計算に基づいて算出する。より具体的には、イオン化効率に関する値は、測定対象物質のイオン化における平衡定数である。測定対象物質の液相における平衡定数 K_l 及び真空中における平衡定数 K_g は、例えば、量子化学計算プログラムであるGaussian 09W及びGaussView 5.0.9等で得られる測定対象物質及びプロトン付加体(プリカーサーイオン)のエントロピー及びエンタルピーから推算されるギブスの自由エネルギーから求められる。

【0043】

ここで、構築したエレクトロスプレーイオン化モデルを図5に示す。本モデルでは、移動相とともにESIノズル38から噴霧された測定対象物質分子(M)は、液相中でmodifierとしての酢酸/酢酸アンモニウム緩衝液から供給されるプロトンでプロトン化されて平衡状態にあると仮定した。

10

20

30

40

50

【0044】

気相中の各成分の濃度は、Fennのモデル(John B. Fenn、「Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time」、Journal of the American Society for Mass Spectrometry、1993年、Volume 4、p. 524-535)に従ったfluxを採用した。さらに、気相でのプロトン化及び脱プロトン化過程の平衡を維持しながら、連続的に供給され、かつ排気により又は分析室41に送られて失われる各化学種の気相濃度が分析中に一定になるという定常状態近似を採用して、液相からのfluxとは別に、平衡反応を介して気相から供給されるプリカーサーイオンの寄与を算出した。分析室41に送られるプリカーサーイオンの総量は、液相から及び気相からの寄与の組み合わせにより表現した。気相における平衡反応は気相における自由エネルギー差に基づいてモデル化した。CIDによって分解されるプロダクトイオンの割合は、測定対象物質の種類によらず一定と仮定した。また、気相中の自由エネルギーは、真空中の自由エネルギーと同一と仮定した。

10

【0045】

上記の電ロスプレーイオン化モデルに係る計算式を以下に示す。

【数1】

$$I_{MH^+} = a \left[MH_s^+ \right] + b \lambda_{gas} \dots (式1)$$

20

【0046】

I_{MH^+} は、プリカーサーイオンである MH^+ イオンの総量を示す。a及びbはそれぞれ気化速度定数の関数、気相フラックス及び気相における平衡定数の関数を示す。 λ_{gas} は、気相平衡の寄与の理論値を示す。a、bはLC/MS/MS装置30の機械的構造及び測定条件で定まる。 $[MH_s^+]$ 及び λ_{gas} は測定対象物質の濃度 M_0 を変数とする関数である。したがって、上記式1は、測定対象物質の濃度とプリカーサーイオンの量との関係式である。ゆえに、上記式1におけるa、b及び M_0 を推定すれば、プリカーサーイオンの量に相関するピーク面積と測定対象物質の濃度との間の検量線の勾配を決定できる。

30

【0047】

決定部2は、平衡定数 K_s 、 K_g 及びLC/MS/MS装置30で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのピーク面積から式1を決定する。詳細には、決定部2は、試料の希釈倍率に対するプロダクトイオンのピーク面積から最小二乗法によって、式1に規定された定数a、b及び M_0 を演算する。例えば、決定部2は、図6に示すように、希釈倍率を3段階以上で変化させた試料をLC/MS/MS装置30で測定して得られたピーク面積と試料の希釈倍率との間の相対検量線を最小二乗法で求めることでa、b及び M_0 を演算する。

40

【0048】

上述のように、式1によれば測定対象物質のイオン化効率に基づいて、測定対象物質の濃度に対するプリカーサーイオンのピーク面積が推定される。しかし、LC/MS/MS装置30で測定されるピーク面積は、プロダクトイオンのピーク面積である。よって、補正部3は、LC/MS装置10で得られたクロマトグラムにおける測定対象物質のピーク面積とLC/MS/MS装置30で測定されるプロダクトイオンのピーク面積との比で式1を、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との関係式に補正する。例えば、補正部3は、プリカーサーイオンのピーク面積に、プロダクトイオンのピーク面積/測定対象物質のピーク面積を乗じることで、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピ

50

ーク面積との間の検量線の勾配を得る。

【0049】

推定部4は、補正部3によって得られた測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との関係式及びプロダクトイオンのピーク面積から試料における測定対象物質の濃度を推定する。具体的には、推定部4は、上記の測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との間の検量線の式に、LC/MS/MS装置30で測定されるプロダクトイオンのピーク面積を代入することで測定対象物質の濃度を推定する。

【0050】

次に、本実施の形態に係る濃度を推定するための処理を図7のフローチャートを参照して説明する。まず、LC/MS装置10は、イオン化された測定対象物質をMS部12で検出する(S1)。次に、LC/MS/MS装置30は、プロダクトイオンを検出する(S2)。続いて、算出部1は、測定対象物質のイオン化効率に関する値として平衡定数 K_s 、 K_g を量子化学計算に基づいて算出する(S3)。

10

【0051】

次に、決定部2は、平衡定数 K_s 、 K_g 及びS2で得られたクロマトグラムにおけるプロダクトイオンのピーク面積からa、b及び M_0 を演算し、測定対象物質の濃度とプリカーサーイオンのピーク面積との間の検量線の勾配を決定する(S4)。そして、補正部3は、S1で得られた測定対象物質のピーク面積とS2で得られたプロダクトイオンのピーク面積との比で、測定対象物質の濃度とプリカーサーイオンのピーク面積との間の検量線の勾配を、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との間の検量線の勾配に補正する(S5)。最後に、推定部4は、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との間の検量線の勾配から、実測したプロダクトイオンのピーク面積に対する測定対象物質の濃度を推定する(ステップS6)。

20

【0052】

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る濃度推定システム100によれば、測定対象物質の量子化学的な性質に基づくイオン化効率と、LC/MS/MS装置30の機械的構造および測定条件とに基づいて、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との間の検量線の勾配を決める。このため、標準物質を使用せずに測定対象物質の試料中濃度を推定することができる。これにより、例えば、標準物質を使用せずに環境汚染物質の濃度測定、あるいは創薬研究における代謝物等の濃度測定が可能となる。

30

【0053】

また、濃度推定システム100では、MS/MS部32が、LC/MS装置10における測定対象物質のカラム保持時間に基づいて設定されたカラム保持時間で特定されるプロダクトイオンを検出するようにした。また、濃度推定システム100では、MS/MS部32が、LC/MS装置10で特定されたイオン化された測定対象物質の質量に基づいて特定されるプロダクトイオンを検出してもよいこととした。これにより、標準物質を用いることができなくても、LC/MS/MS装置30における選択反応モニタリング条件を定めることができる。

【0054】

なお、決定部2は、最小二乗法によりa、b及び M_0 を演算したが、最尤法等の他の統計手法でa、b及び M_0 を求めてもよい。また、本実施の形態では、シグナル強度としてのピーク面積を用いたが、プロダクトイオンのピークの最大値等を用いてもよい。

40

【0055】

また、本実施の形態では、試料中の測定対象物質を時間方向に分離するために液体クロマトグラフィーを用いたがこれに限らない。例えば、固定相として紙を用いるペーパークロマトグラフィー、板状の固定相を用いる薄層クロマトグラフィー等で測定対象物質を分離してもよい。また、測定対象物質の分離は、液体クロマトグラフィーに限らず、ガスクロマトグラフィーでもよい。また、MS/MS部32は、四重極質量フィルタ45でプロダクトイオンを選択するようにしたが、磁場型、イオントラップ型、飛行時間、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴及びフーリエ変換型オービトラップでプロダクトイオンを

50

選択してもよい。

【 0 0 5 6 】

なお、本実施の形態では、LC / MS 装置 1 0 及び LC / MS / MS 装置 3 0 は、イオン源として ESI を用いたが、電子イオン化法、化学イオン化法、電界脱離法、高速原子衝撃法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法及び大気圧化学イオン化法等の公知のイオン源を用いてもよい。この場合、使用するイオン源について構築したイオン化モデルについて、算出部 1 はイオン化効率に関する値を算出すればよい。

【 0 0 5 7 】

(実施の形態 2)

次に、実施の形態 2 について説明する。本実施の形態に係る濃度推定システム 2 0 0 は、上記実施の形態 1 に係る LC / MS 装置 1 0 の LC 部 1 1 及び LC / MS / MS 装置 3 0 の LC 部 3 1 が、それぞれ LC 部 6 1 及び LC 部 8 1 に置換される。以下、LC 部 6 1 及び LC 部 8 1 について、上記実施の形態 1 と異なる点について詳細に説明する。

10

【 0 0 5 8 】

LC 部 6 1 は、移動相に含まれる複数種の溶媒の混合比を経時的に変化させる。例えば、LC 部 6 1 は、移動相としての水に対する有機溶媒の体積比を経時的に増加させるグラジエント溶出を行う。グラジエント溶出によって、カラム保持時間に差がある多成分を一斉に分析できる。しかし、溶媒の混合比が経時的に変化するために、測定対象物質のイオン化効率がカラム保持時間に依りて変化してしまう。溶媒の混合比の変化による測定対象物質のイオン化効率に関する値 K_s 及び K_g への影響を除くために、LC 部 6 1 は、イオン化の際には、溶媒の混合比を一定に維持する。溶媒の混合比を一定に維持するために、LC 部 6 1 は、例えばグラジエント溶出に逆グラジエント溶出を組み合わせることで試料中の測定対象物質を分離する。

20

【 0 0 5 9 】

図 8 に示すように、LC 部 6 1 は、移動相容器 6 2 ~ 6 5 と、移送ポンプ 6 6 ~ 6 9 と、ミキサー 7 0、7 1 と、インジェクタ 7 2 と、カラム 7 3 と、を備える。移動相容器 6 2、6 4 は、水である移動相 A を貯留する。移動相容器 6 3、6 5 は、有機溶媒である移動相 B を貯留する。移送ポンプ 6 6 は、移動相容器 6 2 から移動相 A を吸引してミキサー 7 0 に送る。移送ポンプ 6 7 は、移動相容器 6 3 から移動相 B を吸引してミキサー 7 0 に送る。移送ポンプ 6 6、6 7 は、コンピュータ 5 1 によって、グラジエント溶出用の移動相を供給するように制御される。すなわち、コンピュータ 5 1 は、移送ポンプ 6 6 による移動相 A の吸引量を所定の勾配 g で経時的に減少させ、一方、移送ポンプ 6 7 による移動相 B の吸引量を移動相 A の吸引量の減少と同じ勾配 g で経時的に増加させる。ミキサー 7 0 において移動相 A と移動相 B とが混合されて生じた移動相は、インジェクタ 7 2 を通して、一定の流量でカラム 7 3 に供給される。

30

【 0 0 6 0 】

移送ポンプ 6 8 は、移動相容器 6 4 から移動相 A を吸引してミキサー 7 1 に送る。移送ポンプ 6 9 は、移動相容器 6 5 から移動相 B を吸引してミキサー 7 1 に送る。移送ポンプ 6 8、6 9 は、コンピュータ 5 1 によって、逆グラジエント溶出用の移動相を供給するように制御される。すなわち、コンピュータ 5 1 は、移送ポンプ 6 8 による移動相 A の吸引量を所定の勾配 g で経時的に増加させ、一方、移送ポンプ 6 9 による移動相 B の吸引量を勾配 g で経時的に減少させる。

40

【 0 0 6 1 】

逆グラジエント溶出用の移動相 A、B は、カラム 7 3 から溶出された移動相とミキサー 7 1 において混合される。ミキサー 7 1 は、混合された移動相を ESI ノズル 1 8 に供給する。

【 0 0 6 2 】

さらに具体的にグラジエント溶出と逆グラジエント溶出を説明すると、例えば、カラム 7 3 に供給される移動相 A と移動相 B との混合比 9 0 / 1 0 が、 t_1 秒後に 5 0 / 5 0、さらに t_2 秒後に 1 0 / 9 0 に変化する場合、コンピュータ 5 1 は、逆グラジエント溶出

50

用の移動相 A と移動相 B との混合比を、10 / 90 から t_1 秒後に 50 / 50、さらに t_2 秒後に 90 / 10 に変化させる。こうすることで、ESI ノズル 18 によるイオン化の際には、移動相 A と移動相 B との混合比が一定に維持される。

【0063】

LC 部 81 の構成は、上述の LC 部 61 と同様である。LC 部 81 もグラジエント溶出に逆グラジエント溶出を組み合わせることで、ESI ノズル 38 におけるイオン化の際の溶媒の混合比が一定に維持される。

【0064】

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る濃度推定システム 200 によれば、液体クロマトグラフィーにおいて複数種の溶媒を含む移動相において溶媒の混合比を経時的に変化させる場合でも、測定対象物質のイオン化効率がカラム保持時間に依存しない。これにより、算出部 1 は、量子化学計算において、イオン化効率の変化を考慮せずに K_s 及び K_g を算出できる。

10

【0065】

なお、本実施の形態では、溶媒の混合比を経時的に変化させる方法として、グラジエント溶出を採用したが、これに限らない。例えば、LC 部 61 は、ステップワイズ溶出で分離後のイオン化の際に、ステップワイズ溶出における移動相の溶媒の混合比を逆転させた混合比で溶媒が混合された移動相を、ステップワイズ溶出における移動相に加えてもよい。

【0066】

なお、上記各実施の形態において、実行されるソフトウェアプログラムは、フレキシブルディスク、CD-ROM (Compact Disc Read-only Memory)、DVD (Digital Versatile Disc)、MO (Magnetic Optical disc) などのコンピュータ 51 で読み取り可能な記録媒体に格納して配布し、そのプログラムをインストールすることにより、上述の動作を実行するシステムを構成することとしてもよい。

20

【0067】

また、上記各実施の形態では、データ解析装置 50 が LC / MS 装置 10 及び LC / MS / MS 装置 30 の動作を制御するようにしたがこれに限らない。例えば、LC / MS 装置 10 で測定された測定対象物質のマスペクトル等から決定されるカラム保持時間及び選択反応モニタリング条件を、ユーザが LC / MS / MS 装置 30 にカラム保持時間及び選択反応モニタリング条件を設定してもよい。

30

【0068】

なお、別の実施の形態に係る濃度推定方法では、液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化法 - 三連四重極質量分析において、量子化学計算により検量線の勾配を推算することによって、測定対象物質の試料中濃度を推定してもよい。

【実施例】

【0069】

以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

40

【0070】

(実施例 1 : 農薬の環境変化体の濃度推定)

モデル物質として、ネオニコチノイド系農薬であるイミダクロプリド及びその環境変化体 (Pesticide Transformation Products in Water environments, PTPWs) である 1 - ((6 - クロロピリジン - 3 - イル)メチル)イミダゾリジン - 2 - イミン及び 6 - クロロニコチンアルデヒドを購入した。

【0071】

また、E - 1 - ((6 - クロロピリジン - 3 - イル)メチル) - 2 - ニトログアニジン

50

を合成した。さらに、イミダクロプリドの 5%メタノール水溶液に、290 ~ 800 nm

の波長の光を透過させるロングパスフィルタ (WG295) を通した xenon short arc lamp 光を照射し、PTPWs を生成させた。これらの物質を高分解能・高質量精度 LC/MS 装置である Prominence (島津製作所製) - LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific 社製) 及び LC/MS/MS 装置である UltiMate 3000 - TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific 社製) で測定した。その際、逆グラジエントプログラムを使用し、ESI でイオン化される際の移動相の混合比を水 : メタノール = 1 : 1 (v/v) とした。固定相は、L-column 2 ODS (i.d. 2.1 x 1.75 mm、dp = 2 µm、一般財団法人化学物質評価研究機構製) を用い、移動相流量は 0.4 mL/分とした。

10

【0072】

測定した物質の液相、真空中における Gibbs の自由エネルギーは、量子化学計算プログラム Gaussian 09W 及び GaussView 5.0.9 (Gaussian) を用いて推算した。プロトン付加体についても同様に検討した。構造最適化は b3lyp/6-311+G(2d,p)、opt=verytight、int=ultrafine、振動計算は b3lyp/6-311+G(2d,p)、int=ultrafine で行った。真空中における自由エネルギーを計算する際には、freq=hinderedrotor で行った。

【0073】

濃度推定の一例として、エレクトロスプレーイオン化モデルに係る上記式 1 に基づいて、測定対象物質としての PTPWs である 1 - ((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミンの濃度を推定した。

20

【0074】

上記で算出した 1 - ((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミンの Gibbs の自由エネルギーから平衡定数 K_s 、 K_g を求めた。

【0075】

続いて、平衡定数 K_s 、 K_g 及びプロダクトイオンのピーク面積から上記式 1 における a、b 及び M_0 を演算した。LC/MS 装置で得られた 1 - ((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミンのピーク面積と、LC/MS/MS 装置で得られたプロダクトイオンのピーク面積との比を、プリカーサーイオンのピーク面積に乗じて、測定対象物質の濃度とプロダクトイオンのピーク面積との間の検量線の勾配を求めた。

30

【0076】

(結果)

量子化学計算として、解析対象物質の結合を回転させながら構造最適化計算を行った。その結果、すべての立体配座で計算結果が収束し、イミダクロプリドで 6 個、1 - ((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミンで 8 個の立体配座が得られる等、1 物質につき複数の最適立体配座が得られた。

【0077】

得られた中性分子の立体配座のローンペアにプロトンを付加して構造最適化計算を行った。その結果、すべての立体配座で計算結果が収束した。得られた中性分子およびプロトン付加体に対して振動計算を行い、表 1 のようにエンタルピーおよびエントロピーを求め、Gibbs の自由エネルギーを算出した。

40

【0078】

【表 1】

配座異性体	ギブスの自由エネルギー		エンタルピー		エントロピー	
	[Hartrees/particle]		[Hartrees/particle]		[J/mol·K]	
	分子	プロトン付加体	分子	プロトン付加体	分子	プロトン付加体
イミダクロプリド_a	-1233.38	-1233.73	-1233.32	-1233.67	533.63	529.59
イミダクロプリド_b	-1233.38	-1233.72	-1233.32	-1233.66	530.63	532.59
6-クロロニコチンアルデヒド_a	-821.29	-821.62	-821.25	-821.58	362.16	365.25
6-クロロニコチンアルデヒド_b	-821.29	-821.60	-821.25	-821.56	362.16	364.32
7-クロロニコチンアルデヒド_c	-821.29	-821.59	-821.25	-821.55	362.16	365.76
7-クロロニコチンアルデヒド_d	-821.29	-821.62	-821.25	-821.58	363.07	365.37
8-クロロニコチンアルデヒド_e	-821.29	-821.60	-821.25	-821.56	363.07	365.02
8-クロロニコチンアルデヒド_f	-821.29	-821.59	-821.25	-821.55	363.07	366.58
1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン_a	-1028.82	-1029.20	-1028.76	-1029.14	480.54	497.78
1-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)イミダゾリジン-2-イミン_b	-1028.82	-1029.20	-1028.76	-1029.14	478.16	492.41

10

【0079】

ギブスの自由エネルギーが最も低かったイミダクロプリド及びイミダクロプリドのプロトン付加体の立体配座の例を、それぞれ図9のa)及びb)に示す。

【0080】

光照射によりイミダクロプリドから生成したPTPWsを高分解能・高質量精度LC/MS装置を用いて探索した。探索により発見されたPTPWsのうち、標準物質の市販が確認できない既知PTPWs及び報告例が発見できない新規PTPWsを対象に、LCカラムでのカラム保持時間及び付加イオンの種類を調査した。この際に用いたLCの条件と同一の条件でLC/MS/MS装置のシステムを構築し、同一サンプルを測定した。その結果、これらのPTPWsのコリジョンエネルギー、プロダクトイオンを定めることができ、プリカーサーイオンとプロダクトイオンとの組み合わせであるトランジションを定めることができた。

20

【0081】

図10は、推定した濃度と推定したピーク面積との関係及び実測した濃度と実測したピーク面積との関係を示す。本実施例により、標準物質を測定しなくても高精度で試料中の測定対象物質の濃度を推定できることが示された。

【0082】

(実施例2：カラム保持時間とトランジションの決定)

殺虫剤ジノテフランの水溶液から生成させた未知PTPWsを対象として、以下のようにトランジションを定めた。

30

【0083】

和光純薬工業社製の殺虫剤ジノテフラン標準品(残留農薬試験用)で、1mMの水溶液を調整した。調整した水溶液に、ロングパスフィルタ(WG295)を通過したxenon short arc lamp光を52時間照射し、経時的にサンプルを採取した。その際の光強度は、50.1~51.8W/m²とした。

【0084】

光照射したサンプルに含まれる未知PTPWsを高分解能・高質量精度LC/MS装置を用いて探索した。その際、LCの固定相にODSカラムであるL-column2 ODS(2.1×75mm、2µm)、移動相Aに0.05%(v/v)のギ酸を含む水、移動相Bに0.05%(v/v)のギ酸を含むメタノールを用いた。分析は、isocratic測定で実施され、2%B、総流速を0.4mL/分とした。分離された分析化学種が、設定質量分解能を10万、イオン化方法をESI法、イオン化モードを陽イオンモード、ロックマスをm/z391.28429(フタル酸ジイソオクチル)として探索された。

40

【0085】

探索により発見された未知PTPWsのトランジションを、LC/MS/MS装置を用いて検討した。コリジョンガスには、アルゴンを用いた。固定相、移動相A、移動相B及

50

び分離条件は上記本実施例の LC / MS 装置による探索と同一にすることで、測定対象物質のカラム保持時間を、LC / MS 装置での測定と LC / MS / MS 装置での測定とで一致するようにした。LC / MS 装置による分析で、各測定対象物質の付加イオンの種類とカラム保持時間が特定されているため、これらの付加イオンの m/z とカラム保持時間に基づいてトランジションを決定した。

【0086】

(結果)

光照射したサンプルに含まれる未知 PTPWs を LC / MS 装置で探索した結果、数多くの未知 PTPWs が発見された。発見された未知 PTPWs のうち、 $[M+H]^+ = 219.1088$ 、分子式 $C_7H_{14}N_4O_4$ の物質に着目して以下の検討を行った。当該物質については、異性体がさらに 3 物質 (以下、PTPW a ~ d とする) 発見された。光照射時間 16 時間のサンプルを例として、発見された PTPW a ~ d の EIC を図 11 に示す。PTPW a ~ d のカラム保持時間は、それぞれ 1.51 分、1.82 分、2.28 分、および 2.60 分であった。

10

【0087】

PTPW a ~ d について、LC / MS / MS 装置を用いた測定においても、同一の m/z と同一のカラム保持時間でクロマトグラムピークが得られるか否かを検討した。検討は、LC / MS / MS 装置を用いた SIM 法により実施した。実験に用いる機器が異なると、配管の長さなどが異なるためにホールドアップ時間が異なり、同一物質を同一条件で測定してもカラム保持時間が異なる。このため、機器によるホールドアップ時間の違いを補正する必要がある。本実施例では、0.8 分の補正を行った。補正を実施した結果、図 12 に示すクロマトグラムが得られた。これにより、LC / MS 装置を用いた測定とほぼ同じ結果が得られることが確認された。

20

【0088】

PTPW a ~ d 各々について、プリカーサーイオンの m/z とカラム保持時間が確認されたため、LC / MS / MS 装置を用いて、RF レンズの電圧、コリジョンエネルギー (CE)、プロダクトイオンを検討し、SRM トランジションを定めた。定められたトランジションを表 2 に示す。なお、表 2 中の「RT」はカラム保持時間を示す。

【0089】

【表 2】

30

PPTW	分子式	プリカーサー [m/z]	RT [分]	RF レンズ [V]	定量イオン [m/z]	定量イオンの CE [V]	確認イオン [m/z]	確認イオンの CE [V]
a	$C_7H_{14}N_4O_4$	219	0.9	34	188	17	142	20
b	$C_7H_{14}N_4O_4$	219	1.1	32	114	20	100	17
c	$C_7H_{14}N_4O_4$	219	1.4	28	114	15	-	-
d	$C_7H_{14}N_4O_4$	219	1.7	26	173	10	87	20

【0090】

40

決定したトランジションを用いて取得した SRM クロマトグラムを図 13 に示す。図 11 及び図 12 とほぼ同じカラム保持時間のクロマトグラムを得ることができた。

【0091】

上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内およびそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明は、環境調査等における標準物質が入手困難な農薬の環境変化体等の濃度推定に

50

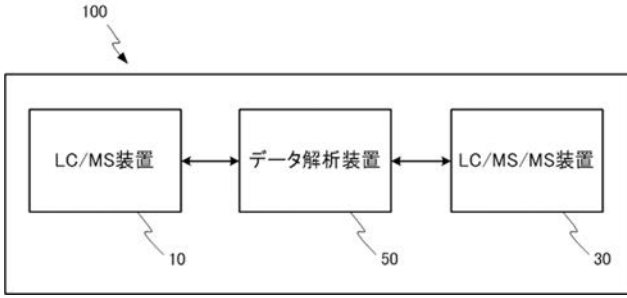
有用である。

【符号の説明】

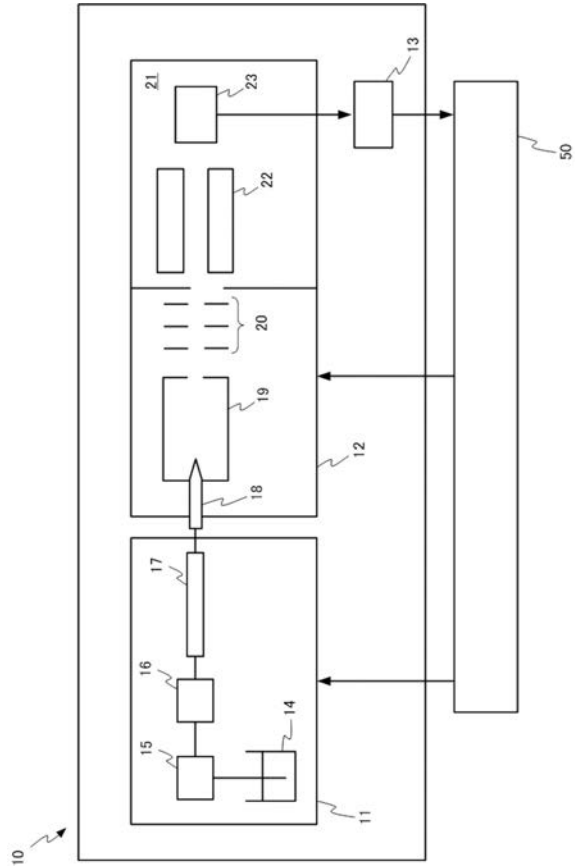
【0093】

1	算出部	
2	決定部	
3	補正部	
4	推定部	
10	LC/MS装置	
11、31、61、81	LC部	
12	MS部	10
13、33	A/D変換器	
14、34、62~65	移動相容器	
15、35、66~69	移送ポンプ	
16、36、72	インジェクタ	
17、37、73	カラム	
18、38	ESIノズル	
19、39	イオン化室	
20、40、44	イオン光学系	
21、41	分析室	
22、42、45	四重極質量フィルタ	20
23、46	検出器	
30	LC/MS/MS装置	
32	MS/MS部	
43	コリジョンセル	
50	データ解析装置	
51	コンピュータ	
52	操作部	
53	表示部	
70、71	ミキサー	
100、200	濃度推定システム	30

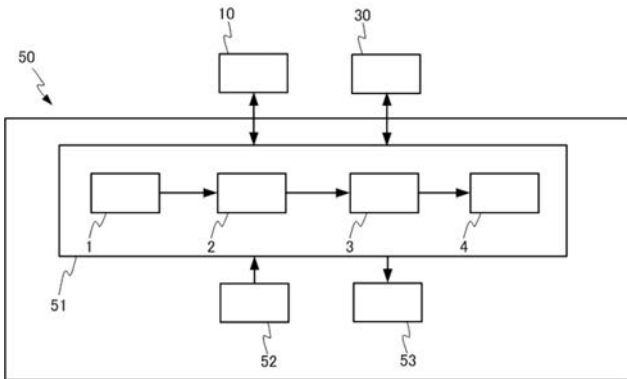
【 図 1 】



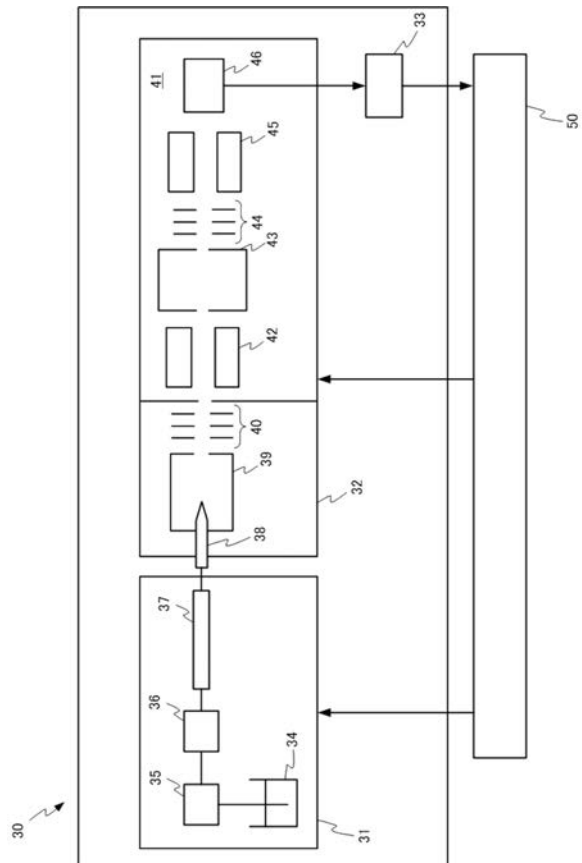
【 図 2 】



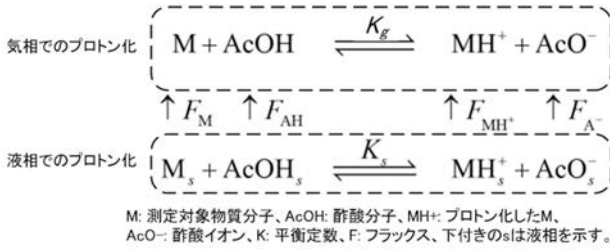
【 図 3 】



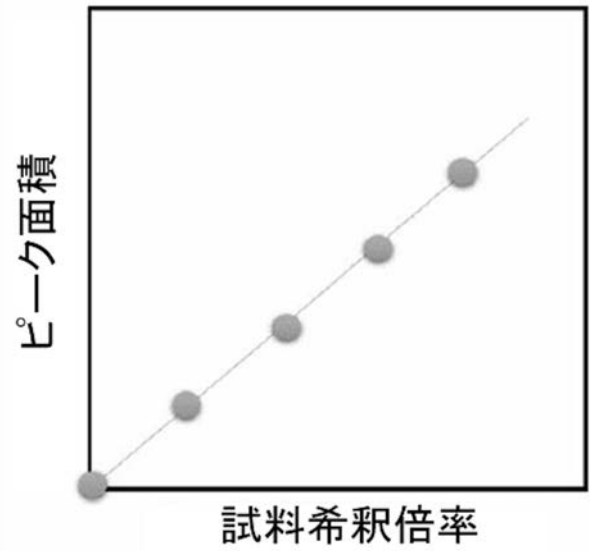
【 図 4 】



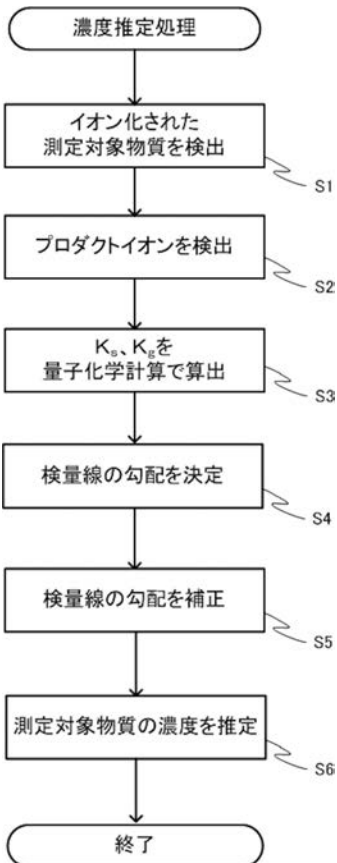
【 図 5 】



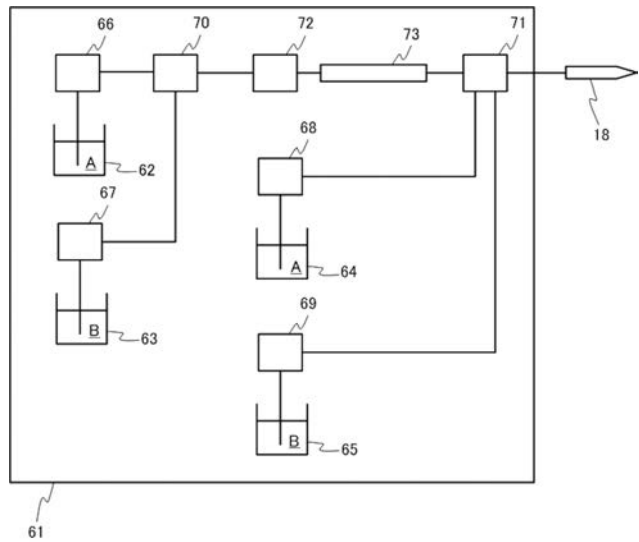
【 図 6 】



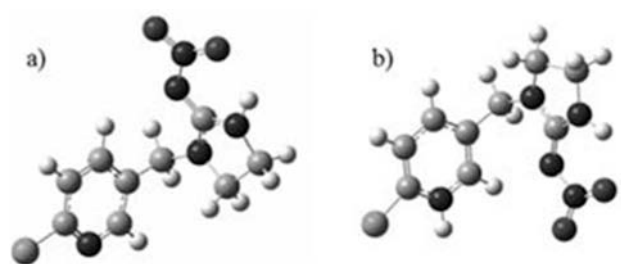
【 図 7 】



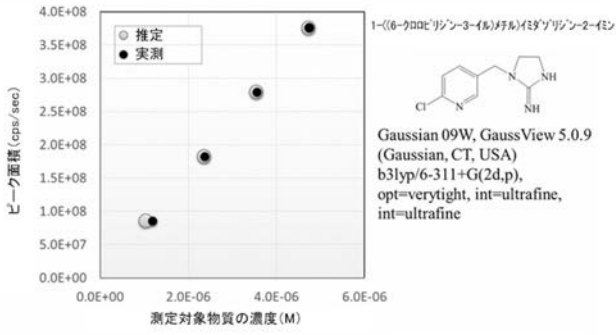
【 図 8 】



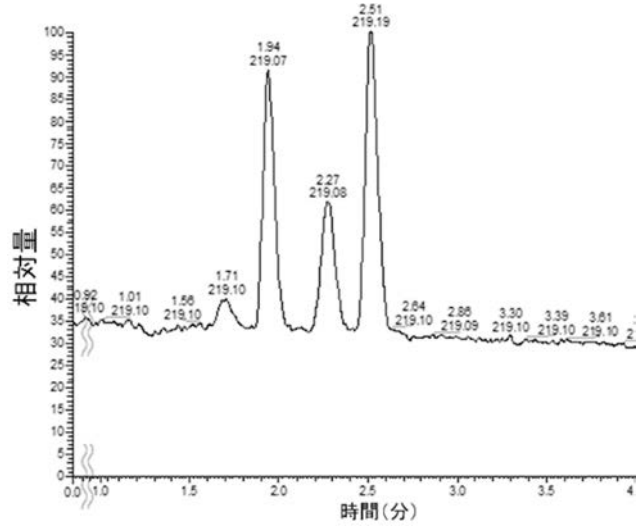
【 図 9 】



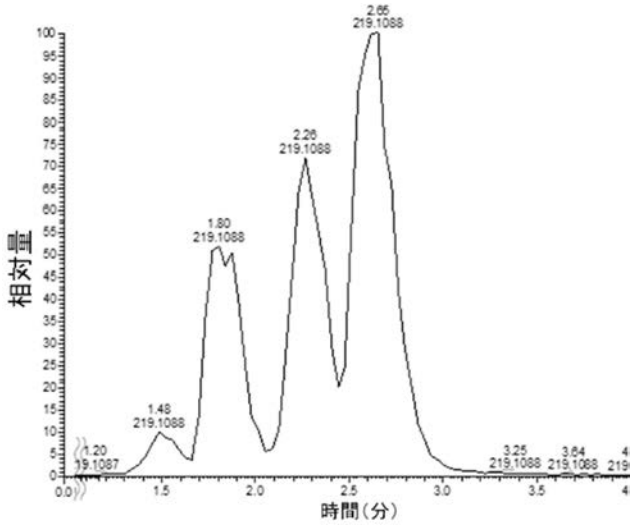
【 図 1 0 】



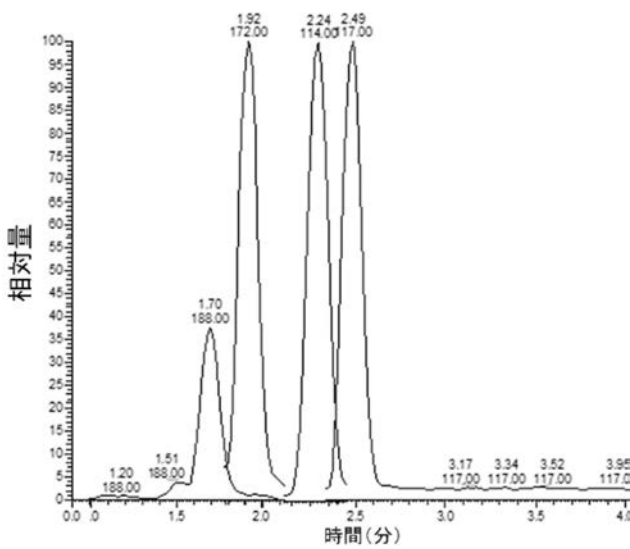
【 図 1 2 】



【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 上田 岳彦

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

(72)発明者 門川 淳一

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 GA09 HA01 LA09