

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4603203号  
(P4603203)

(45) 発行日 平成22年12月22日 (2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日 (2010.10.8)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 30/34 (2006.01)	GO 1 N 30/34 A
GO 1 N 30/26 (2006.01)	GO 1 N 30/26 L
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/26 M
	GO 1 N 30/88 Q

請求項の数 4 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2001-201120 (P2001-201120)	(73) 特許権者	000002174
(22) 出願日	平成13年7月2日 (2001.7.2)		積水化学工業株式会社
(65) 公開番号	特開2003-14719 (P2003-14719A)		大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(43) 公開日	平成15年1月15日 (2003.1.15)	(72) 発明者	川辺 俊樹
審査請求日	平成20年3月4日 (2008.3.4)		大阪市北区西天満2-4-4 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	嶋田 一彦
			山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	瀬戸口 雄二
			山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業株式会社内
		審査官	赤坂 祐樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも2種類の溶離液A, Bを用いた液体クロマトグラフ装置であって、  
 カラムと、  
 前記カラムの下流に配置されており、測定対象成分を検出するための検出器と、  
 前記カラムの上流に配置された流路切換え部材と、  
 試料もしくは洗浄液または溶離液Aを一時的に保持するための第1の保持流路と、溶離液Aまたは溶離液Bを一時的に保持するための第2の保持流路とを備え、  
 前記流路切換え部材が、  
 溶離液Aを導入するための溶離液A導入ポートと、溶離液Bを導入するための溶離液B導入ポートと、試料または洗浄液を導入するための試料等導入ポートと、試料もしくは洗浄液を排出する試料等排出ポートと、溶離液Aまたは溶離液Bを排出する溶離液排出ポートと、前記溶離液A, Bまたは試料をカラムに流出させるカラム接続ポートと、前記第1の保持流路の一端に接続されており、第1の保持流路に試料もしくは洗浄液または溶離液Aを流出する第1の流出ポートと、第1の保持流路の他端に接続されており、第1の保持流路から試料もしくは洗浄液または溶離液Aが流入される第1の流入ポートと、前記第2の保持流路の一端に接続されており、第2の保持流路に溶離液Aまたは溶離液Bを流出する第2の流出ポートと、前記第2の保持流路の他端に接続されており、第2の保持流路から溶離液Aまたは溶離液Bが流入される第2の流入ポートとを有し、  
 前記流路切換え部材は、第2の保持流路が、カラム接続ポートに接続される第1の状態と

10

20

、第1の保持流路がカラム接続ポートに接続される第2の状態との間で切換えられるように構成されている液体クロマトグラフ装置。

【請求項2】

前記流路切換え部材が十方バルブである請求項1に記載の液体クロマトグラフ装置。

【請求項3】

前記試料が測定対象成分としてのヘモグロビン類を含有する試料である請求項1または2に記載の液体クロマトグラフ装置。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の液体クロマトグラフ装置を用いた測定方法であって、前記溶離液Bの溶出力が溶離液Aの溶出力よりも大きく、前記流路切換え部材を第2の状態として前記カラム接続ポートに溶離液Aを送液しつつ、試料をカラムに導入した後、前記流路切換え部材を第1の状態に切換えてカラムに溶離液Bを導入することを特徴とする、液体クロマトグラフ装置を用いた測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、液体クロマトグラフ装置及び該液体クロマトグラフ装置を用いた測定方法に関し、より詳細には、例えばヘモグロビン類などの測定に好適に用いられる、ステップグラジュエント方式を用いた液体クロマトグラフ装置及び測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、液体クロマトグラフィーにおいて、複数の移動相を使用して測定する方法として、移動相を所定のタイミングで切換えるステップグラジュエント方式（段階溶出法）が広く用いられている。

【0003】

上記ステップグラジュエント方式で測定するための液体クロマトグラフ装置としては、低圧グラジュエント方式のもの及び高圧グラジュエント方式のものが知られている。

【0004】

しかしながら、低圧グラジュエント方式では、送液ポンプが一台でよいものの、移動相の切換えをステップ的に速やかに行うことができないという問題があった。

【0005】

他方、高圧グラジュエント方式では、移動相を速やかにステップ的に切換えることができるものの、移動相の種類に応じた送液ポンプを用意しなければならなかった。従って、クロマトグラフ装置の小型化及び低価格化を進めることができないという問題があった。

【0006】

そこで、特開平7-280789号公報には、グラジュエント式の液体クロマトグラフ装置であって、測定時間の短縮化、測定器の小型化及び低価格化を図り得る構造が開示されている。

【0007】

この先行技術に記載の液体クロマトグラフ装置では、第1の移動相を送液する送液ポンプと分離カラムとを連結してなる流路において、送液ポンプと分離カラムとの間に試料及び第2の移動相を上記流路に導くためのインジェクターが接続されている。このインジェクターは、試料または第2の移動相を吸引するサンプリングノズルと、サンプリングノズルに連結された切換え弁と、試料または第2の移動相を保持する液体保持流路とを有する。切換え弁を切換えることにより、第1の移動相が流路に流され、試料または第2の移動相が上記液体保持流路に導かれる第1の切換え状態と、第1の移動相を液体保持流路に導入し、かつ試料または第2の移動相を液体保持流路から流路に導く第2の切換え状態とが実現される。

【0008】

従って、高圧グラジュエント方式を用いているため、複数の移動相をステップ的に速やか

10

20

30

40

50

に切換えることができ、測定時間の短縮が果たされるとされている。また、上記液体保持流路を用いることにより、送液ポンプの台数を少なくすることができ、装置の小型化及び低価格化が図られるとされている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特開平7-280789号公報に記載の液体クロマトグラフ装置では、液体保持流路に試料や第2の移動相を交互に導く動作、並びに試料導入後の洗浄動作を順に実施する必要があった。従って、総動作時間が測定時間内に収まるように測定条件を設定する必要があった。よって、測定時間を短縮しようとした場合、測定条件に制約があった。

10

【0010】

また、上記先行技術に記載の液体クロマトグラフ装置では、上記液体保持流路に試料や第2の移動相が交互に導かれるため、液体保持流路に至る流路部分に存在していた移動相が、次の洗浄工程において洗浄液に置換される。すなわち、置換される移動相が測定に使用されないことになる。従って、移動相の無駄が多かった。

【0011】

加えて、注入される試料の量と第2の移動相の量が異なる場合には、注入量の多い方を満たすように上記液体保持流路が構成されていなければならない。上記先行技術の実施例の欄では、試料が10 $\mu$ L、第2の移動相が150 $\mu$ Lとされているが、この場合には液体保持流路の容量は最低でも150 $\mu$ Lとしなければならない。他方、試料の注入に際し、気泡が注入されてはならない。従って、試料の先端部が洗浄液で希釈されることになるので、上記のような小さな容量の液体保持流路の該容量よりも少ない量の試料を高精度に注入することは非常に困難であった。そのため、試料の注入量のばらつきが大きくならざるを得なかった。

20

【0012】

本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、移動相をステップ的に速やかに切換えることができ、装置の小型化及び低コスト化を果たし得るだけでなく、測定時間の短縮に際しての測定条件の制限が少なく、移動相の無駄が少なく、かつ試料を高精度に注入することができ、従って高精度に測定を行うことを可能とする液体クロマトグラフ装置及び該液体クロマトグラフ装置を用いた測定方法を提供することにある。

30

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明の広い局面によれば、少なくとも2種類の溶離液A、Bを用いた液体クロマトグラフ装置であって、カラムと、前記カラムの下流に配置されており、測定対象成分を検出するための検出器と、前記カラムの上流に配置された流路切換え部材と、試料もしくは洗浄液または溶離液Aを一時的に保持するための第1の保持流路と、溶離液Aまたは溶離液Bを一時的に保持するための第2の保持流路とを備え、前記流路切換え部材が、溶離液Aを導入するための溶離液A導入ポートと、溶離液Bを導入するための溶離液B導入ポートと、試料または洗浄液を導入するための試料等導入ポートと、試料もしくは洗浄液を排出する試料等排出ポートと、溶離液Aまたは溶離液Bを排出する溶離液排出ポートと、前記溶離液A、Bまたは試料をカラムに流出させるカラム接続ポートと、前記第1の保持流路の一端に接続されており、第1の保持流路に試料もしくは洗浄液または溶離液Aを流出する第1の流出ポートと、第1の保持流路の他端に接続されており、第1の保持流路から試料もしくは洗浄液または溶離液Aが流入される第1の流入ポートと、前記第2の保持流路の一端に接続されており、第2の保持流路に溶離液Aまたは溶離液Bを流出する第2の流出ポートと、前記第2の保持流路の他端に接続されており、第2の保持流路から溶離液Aまたは溶離液Bが流入される第2の流入ポートとを有し、前記流路切換え部材は、第2の保持流路が、カラム接続ポートに接続される第1の状態と、第1の保持流路がカラム接続ポートに接続される第2の状態との間で切換えられるように構成されている液体クロマトグラフ装置が提供される。

40

50

## 【 0 0 1 4 】

上記流路切換え部材としては、特に限定されるわけではないが、本発明の特定の局面では十方バルブが用いられ、すなわち市販されている十方バルブを上記流路切換え部材として用いることができる。

## 【 0 0 1 5 】

本発明に係る液体クロマトグラフ装置は様々な試料の分析に用いられ得るが、特に、測定対象成分としてのヘモグロビン類を含む試料の測定に好適に用いられる。

## 【 0 0 1 6 】

本発明に係る測定方法は、本発明に従って構成された液体クロマトグラフ装置を用いた測定方法であり、前記溶離液 B の溶出力が溶離液 A の溶出力よりも大きく、前記流路切換え部材を第 2 の状態として前記カラム接続ポートに溶離液 A を送液しつつ、試料をカラムに導入した後、前記流路切換え部材を第 1 の状態に切換えてカラムに溶離液 B を導入することを特徴とする。

10

## 【 0 0 1 7 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下、本発明の具体的な実施形態を説明することにより、本発明をより詳細に説明する。

## 【 0 0 1 8 】

図 1 は、本発明の一実施例に係る液体クロマトグラフ装置の概略構成図である。本実施例の液体クロマトグラフ装置では、分離カラム 1 の下流側に検出器 2 が配置されている。分離カラム 1 としては、試料及び測定目的成分に応じた充填剤が充填されたものが用いられる。また、検出器 2 としては、分離カラム 1 から流出してきた移動相中の目的成分を検出するための適宜の検出装置が用いられる。

20

## 【 0 0 1 9 】

分離カラム 1 の上流側には、流路切換え部材 3 が配置されている。流路切換え部材 3 は、本実施形態では、十方バルブを用いて構成されている。従って、流路切換え部材 3 は 1 0 個のポートを有する。1 0 個のポートの詳細は以下の通りである。

## 【 0 0 2 0 】

まず、洗浄液または試料が導入される試料等導入ポート a、後述の第 1 の保持流路 c 1 の一端に接続され、試料もしくは洗浄液または溶離液 A を第 1 の保持流路 c 1 に流出する第 1 の流出ポート b、溶離液 A を導入するための溶離液 A 導入ポート c、第 2 の保持流路 c 2 の一端に接続されており、第 2 の保持流路に溶離液を流出する第 2 の流出ポート d、溶離液 B を導入するための溶離液 B 導入ポート e、溶離液を排出するための溶離液排出ポート f、第 2 の保持流路 c 2 の端部に接続されており、第 2 の保持流路 c 2 から溶離液を流入させる第 2 の流入ポート g、前述した分離カラム 1 に接続されており、分離カラム 1 に移動相溶離液 A、B または試料を与えるカラム接続ポート h、第 1 の保持流路 c 1 の端部に接続されており、第 1 の保持流路 c 1 から試料もしくは洗浄液または溶離液 A が流入される第 1 の流入ポート i、洗浄液または試料を排出する試料等排出ポート j とを備える。

30

## 【 0 0 2 1 】

本実施形態の液体クロマトグラフ装置では、溶離液 A 導入ポート c に、送液部材 4 が接続されており、該送液部材 4 により、溶離液 A が溶離液 A 導入ポート c に送液されるように構成されている。送液部材 4 としては、例えば、プランジャー式ポンプなどの適宜の液体移送手段を用いることができる。

40

## 【 0 0 2 2 】

切換え部材 3 に溶離液 A を供給する流路と、切換え部材 3 から分離カラム 1 及び検出器 2 に至る流路とが、この液体クロマトグラフ装置の主流路を構成している。

## 【 0 0 2 3 】

他方、試料等排出ポート j には、試料等導入部材 5 が接続されている。試料等導入部材 5 は、ポンプなどの適宜の液体移送手段により構成されており、陰圧により、試料または洗浄液等を切換え部材 3 に導入し、かつ試料等排出ポート j から外部に排出し得るように構成されている。また、溶離液排出ポート f には、同様に、溶離液導入部材 6 が接続されて

50

いる。溶離液導入部材 6 は、同じくポンプなどにより構成されており、陰圧により、溶離液 B を切換え部材 3 に導入し、かつ溶離液 A または溶離液 B を外部に排出するように構成されている。

【 0 0 2 4 】

試料等導入ポート a には切換え弁 7 が接続されている。切換え弁 7 は、サンプリングノズル 8 に接続されており、サンプリングノズル 8 の先端が試料 X 内に浸漬した状態または洗浄液 Y 内に浸漬した状態とを切換え得るように構成されている。切換え弁 7 の上記切換えは、モータや電磁弁などを用いて行われ得る。

【 0 0 2 5 】

試料 X 及び洗浄液 Y 内にそれぞれ浸漬された複数のサンプリングノズル 8 が設けられており、切換え弁 7 によって接続が切換えられるように構成されてもよい。

10

【 0 0 2 6 】

他方、溶離液 B 導入ポート e には、切換え弁 9 が接続されている。切換え弁 9 は、ノズル 10 に連結されている。図 1 では、ノズル 10 の先端は溶離液 B に浸漬されているが、切換え弁 9 を切換えることにより、溶離液 B を溶離液 B 導入ポート e に供給し得る図示の状態及び供給しない状態を実現することができる。

【 0 0 2 7 】

第 1 の保持流路 c 1 は、前述した第 1 の流出ポート b 及び第 1 の流入ポート i 間に接続されている。また、第 2 の保持流路 c 2 は、第 2 の流出ポート d 及び第 2 の流入ポート g に接続されている。

20

【 0 0 2 8 】

切換え部材 3 を構成する十方バルブは、第 1 の保持流路 c 1 を、前述した主流路に接続した第 2 の状態 I I と、第 2 の保持流路 c 2 が前述した主流路に接続される第 1 の状態 I とで切換えられるように構成されている。また、第 1 の状態 I では、溶離液 B 導入ポート e と、溶離液排出ポート f とを結ぶ流路 p 3 が切換え部材 3 内において構成され、溶離液 B は外部に排出されるように構成されている。また、第 2 の状態 I I では、試料等導入ポート a と、試料等排出ポート j とが後述の流路 p 1 により接続され、試料または洗浄液等が外部に排出されるように構成される。

【 0 0 2 9 】

第 1 の状態 I 及び第 2 の状態 I I における切換え部材 3 内での状態及び各ポート内で構成される内部の流路は後述の通りである。

30

また、第 1 の保持流路 c 1 への試料の導入は、第 2 の状態 I I において、切換え弁 7 を切換え、試料 X をサンプリングノズル 8 が吸入する状態とし、試料等導入部材 5 の陰圧を利用して行われる。また、第 1 の保持流路 c 1 の洗浄は、サンプリングノズル 8 から洗浄液 Y を吸入し得るように切換え弁 7 を切換え、同様に試料等導入部材 5 の陰圧を利用して洗浄液が第 1 の保持流路 c 1 に流される。

【 0 0 3 0 】

他方、第 2 の保持流路 c 2 への溶離液 B の導入は、上記第 1 の状態 I において、溶離液導入部材 6 の陰圧を利用して行われる。

なお、本実施例では、試料等導入部材 5 及び溶離液導入部材 6 は、切換え部材 3 の下流側に配置されており、上記のように陰圧を利用して試料等または溶離液が流されるように構成されているが、吸引及び吐出機能を有するピストンポンプなどを用いることにより、切換え部材 3 の上流側に、試料等導入部材 5 及び溶離液導入部材 6 を配置してもよい。すなわち、切換え弁 7 と試料等導入ポート a との間にピストンポンプなどからなる試料等導入部材 5 を接続してもよく、切換え弁 9 と溶離液 B 導入ポート e との間に同様にピストンポンプなどからなる溶離液導入部材 6 を配置してもよい。

40

【 0 0 3 1 】

なお、本実施形態の液体クロマトグラフ装置を構成する上記送液部材、試料等導入部材 5 及び溶離液導入部材 6 を構成するポンプなどは市販のポンプを用いて構成することができ、切換え部材 3 を構成する十方バルブ、切換え弁 7, 9 及び検出器 2 なども、市販されて

50

いる十方バルブ、切換え弁及び液体クロマトグラフ用検出器により構成され得る。

【0032】

また、自動測定を行うには、これらの各ユニットを制御するコントローラーにより、以下の測定方法における各切換え部材や切換え弁等の切換えのタイミングを制御すればよい。

【0033】

次に、図2～図10を参照して本実施形態の液体クロマトグラフ装置の測定方法を説明することにより、上記切換え部材3の構造の詳細も明らかにする。

なお、図2～図9は、この測定に際しての各動作ステップにおける切換え部材3の状態と試料X、洗浄液Y、溶離液A、Bの流れる状態を示す図であり、試料X、洗浄液Y、溶離液A及び溶離液Bは、それぞれ、細い破線、太い破線、実線及び二点鎖線で示されている。図10は、これらの各動作ステップにおける主流路における送液内容を、切換え部材3の切換え状態、及び検出器により得られるクロマトグラムの時間的变化を示す図である。

10

【0034】

まず、図2に示すステップS1では、切換え部材3は第1の状態Iとされている。図2においては、切換え部材3の中央に、第1の状態であることを示すIが記されているが、以下の図3～図9においても同様に切換え部材3の切換え状態を切換え部材3の中央に示すこととする。

【0035】

ステップS1においては、切換え部材3が第1の状態に切換えられており、第2の保持流路c2が溶離液A導入ポートcと、カラム接続ポートhに接続されている。すなわち、第1の状態Iでは、切換え部材3内において、第2の流出ポートdと溶離液A導入ポートcとが接続されており、第2の流入ポートgとカラム接続ポートhとが接続されている。従って、溶離液Aは、主流路の途中で第2の保持流路c2を流れ、カラム1に与えられる。従って、第2の保持流路c2には溶離液Aが満たされる。他方、ステップS1においては、第1の保持流路c1には、破線で示すように試料Xが満たされている。この第1の保持流路c1への試料Xの充填は後述のステップS6～8と同様にして行われるため、後ほど詳細に説明する。

20

【0036】

ステップS1においては、試料等導入ポートaと、第1の流出ポートbとが接続されており、第1の流入ポートiと試料等排出ポートjとが接続されている。そして、試料導入部材5を駆動することにより、試料Xまたは洗浄液Yが搬送されるが、ステップS1においては、上記のように第1の保持流路c1に試料Xが満たされており、試料Xの後ろに、洗浄液Yが配置されている。この場合、サンプリングノズル8は、洗浄液Yに浸漬されるように切換え弁7が切換えられている。従って、図2にYで示すように、試料Xの後ろから洗浄液Yが移送される。

30

【0037】

なお、第1の状態Iにおいては、溶離液B導入ポートeは、溶離液排出ポートfと接続されており、従って、溶離液Bは、溶離液導入部材6の陰圧により、第2の保持流路c2に満たされる。

【0038】

次に、ステップS2において、切換え部材3が第1の状態Iから第2の状態IIに切換えられる。図3に示すように、第2の状態IIでは、溶離液A導入ポートcが第1の流出ポートbに接続され、第1の流入ポートiがカラム接続ポートhに接続される。従って、溶離液Aが第1の保持流路c1側に向かって流れることになり、該溶離液Aに押されて、試料Xが分離カラム1側に移動する。

40

【0039】

他方、試料等導入ポートaと、試料等排出ポートjとが接続され、試料または洗浄液は、試料排出部材5の陰圧により外部に排出される。また、溶離液B導入ポートは、第2の流出ポートdに接続され、第2の流入ポートgが溶離液排出ポートfに接続される。従って、溶離液Bが、第2の保持流路c2内に導入される。

50

## 【 0 0 4 0 】

よって、ステップ S 3 において、試料 X が溶離液 A に押されることにより、分離カラム 1 側に押し出されていく。すなわち、図 4 に示すように、溶離液 A が第 1 の保持流路 c 1 内に侵入するにつれて、試料 X が分離カラム 1 側に流される。

## 【 0 0 4 1 】

また、第 2 の保持流路 c 2 には、溶離液 B が流されるが、第 2 の保持流路 c 2 には、前回の測定に際し溶離液 A が満たされていたため、溶離液 A と溶離液 B との混入を防止するために、空気を介在させて、溶離液 B が流される。

## 【 0 0 4 2 】

また、ステップ S 4 では、流路 p 1 の試料 X を置換して洗浄するために、切換え弁 7 が切  
10  
換えられ、サンプリングノズル 8 が洗浄液 8 に浸漬され、洗浄液 8 が流路 p 1 に向かって流される。この場合においても、空気を送った後に、洗浄液 Y が流される。動作が進行するにつれて、図 5 に示すように、ステップ 4 において、第 1 の保持流路 c 1 に溶離液 A が満たされ、さらに溶離液 A が分離カラム 1 に向かって流れる。他方、第 2 の保持流路 c 2 は溶離液 B で満たされる。なお、第 2 の保持流路 c 1 に溶離液 B が満たされた後に、溶離液 B の後に空気が位置するように、切換え弁 9 が切換えられ、サンプリングノズル 10 が溶離液 B に浸漬された状態から空気を吸引する状態に切換えられる。

## 【 0 0 4 3 】

このようにして、第 2 の保持流路 c 2 に溶離液 B が充填される。

## 【 0 0 4 4 】

次に、図 6 に示すように、ステップ S 5 において、切換え部材 3 が第 2 の状態 I I から、  
20  
第 1 の状態 I に切換えられる。ステップ S 5 においては、第 2 の保持流路 c 2 が、再度溶離液 A が供給されるように、第 2 の保持流路 c 2 が分離カラム 1 に接続される。従って、送液部材の駆動により溶離液 A が第 2 の保持流路 c 2 に向かって流されることになるため、溶離液 A により溶離液 B が押し出され、第 2 の保持流路 c 2 から分離カラム 1 側に向かって流れる。このステップ S 5 においては、溶離液導入部材 6 はその駆動が停止されている。

## 【 0 0 4 5 】

次に、図 7 に示すように、ステップ S 6 において、試料等導入部材 5 を駆動し、かつ切  
30  
換え弁 7 を切換え、サンプリングノズル 8 を洗浄液 Y を吸引する状態から試料 X を吸引する状態へ移動させる。この場合、洗浄液 Y から一旦引き出されたサンプリングノズル 8 は、空気を吸引し、しかる後試料 X に浸漬された後に、試料 X を吸引する。従って、図 7 に示すように、空気を介在させた後、試料 X が第 1 の保持流路 c 1 に供給される。

## 【 0 0 4 6 】

このようにして、第 1 の保持流路 c 1 に、試料 X が充填されていく。この間、第 2 の保持  
流路 c 2 には、溶離液 A が順次満たされていき、溶離液 B は第 2 の保持流路 c 2 から分離  
カラム 1 側に向かって押し出されていく。

## 【 0 0 4 7 】

次に、ステップ S 7 では、図 8 に示すように、上記のようにして試料 X が第 1 の保持流  
40  
路 c 1 に満たされている。しかる後、ステップ S 7 において、切換え弁 7 が切換えられ、サンプリングノズル 8 が洗浄液 Y に再度浸漬される。この切換えに際し、サンプリングノズル 8 は、試料 X から引き出された際に空気を吸入し、しかる後洗浄液 Y に浸漬される。従って、試料 X の後に空気が吸引される（図 8 参照）。

## 【 0 0 4 8 】

次に、図 9 に示すように、ステップ S 8 において、切換え部材 3 が第 1 の状態 I から第  
2  
の状態 I I に切換えられる。その結果、第 1 の保持流路 c 1 に溶離液 A が流れ、再度試料 X が分離カラム 1 側に流される。他方、洗浄液 Y が流路 p 1 を洗浄するように切換え部材 3 の試料等導入ポートに向かって流れる。

## 【 0 0 4 9 】

図 10 から明らかなように、上記ステップ S 1 ~ S 8 に従って液体クロマトグラフ装置を  
50

駆動することにより、試料 X を分離カラムに導いた後、溶離液 A 及び溶離液 B を順に用いて、目的成分の溶出を行うことができる。また、図 10 から明らかなように、本実施形態の液体クロマトグラフ装置では、上記のように第 1, 第 2 の保持流路 c 1, c 2 を用い、試料あるいは溶離液 A, B の分離カラム 1 への供給のタイミングが切換えられるので、図 10 から明らかなように、溶離液 A と溶離液 B とを高精度に階段状に供給することができ、溶離液 A 及び溶離液 B の溶出力を利用して目的とする成分を高精度に検出することができる。

【0050】

しかも、本実施形態では、2つの保持流路 c 1, c 2 を用いているため、第 2 の移動相を測定前に置換する必要のないことがわかる。加えて、試料と溶離液 B とが、異なる保持流路 c 1, c 2 を用いて供給されるので、試料の量が少ない場合であっても、試料注入を高精度に行うことができ、試料注入精度のばらつきを低減することができる。

10

【0051】

なお、上記実施形態では、溶離液 B の溶出力が溶離液 A の溶出力よりも高くされている。もっとも、本発明では、3種以上の溶離液を用いてもよく、その場合には、溶離液 A, 溶離液 B よりも溶出力の小さい溶離液を溶離液 A の前に流せばよく、溶離液 A, 溶離液 B よりも溶出の大きい溶離液は溶離液 B の後に流せばよい。

【0052】

さらに、上記実施形態では、ヘモグロビン類の分離及び測定に用いた例を示したが、他の様々な成分の分離及び測定に本発明に係る液体クロマトグラフ装置を用いることができる。

20

【0053】

【発明の効果】

以上のように、本発明に係る液体クロマトグラフ装置では、カラム及び検出器の上流に流路切換え部材が配置されており、該流路切換え部材を第 2 の状態 II とすることにより、第 1 の保持流路がカラムに接続され、第 1 の状態 I とすることにより、第 2 の保持流路をカラムに接続された状態とすることができる。従って、本発明の測定方法に従って、第 1 の保持流路により試料及び溶離液 A をカラムに与えるように、かつ第 2 の流路 c 2 により溶離液 A, B の供給を行うことにより、測定時間の短縮、測定前に溶離液を置き換える作業の省略、並びに試料の注入量のばらつきを低減を果たすことができる。よって、安価であり、かつ比較的短時間に、目的とする成分を高精度に測定することが可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施形態に係る液体クロマトグラフ装置の概略構成図。

【図 2】本発明の一実施形態において、ステップ S 1 において、試料 X が第 1 の液体保持流路に充填されている状態を示す概略構成図。

【図 3】本発明の一実施形態の測定方法のステップ S 2 において、試料が分離カラムに溶離液 A により押されて移動する状態を示す概略構成図。

【図 4】本発明の一実施形態に係る測定方法のステップ S 3 において、第 1 の保持流路 c 1 に洗浄液が注入される工程を説明するための概略構成図。

【図 5】本発明の一実施形態の測定方法のステップ S 4 において、第 2 の保持流路 c 2 が溶離液 B で満たされる工程及び第 1 の保持流路 c 1 が洗浄される工程を説明するための概略構成図。

40

【図 6】本発明の一実施形態の測定方法のステップ S 5 において、溶離液 B が分離カラムに与えられる工程を説明するための概略構成図。

【図 7】本発明の一実施形態に係る測定方法のステップ S 6 において、第 1 の保持流路 c 1 に試料を導入する工程及び第 2 の保持流路 c 2 に溶離液 A を供給する工程を示す概略構成図。

【図 8】本発明の一実施形態の測定方法のステップ S 7 において、第 1 の保持流路 c 1 が試料により満たされている状態及び第 2 の保持流路 c 2 が溶離液 A により満たされている状態を示す概略構成図。

50

【図 9】本発明の一実施形態の測定方法のステップ S 8 において、切換え部材が第 2 の状態に切換えられ、試料がカラムに与えられる工程、及び流路 p 3 から試料が排出される工程を説明するための概略構成図。

【図 10】本発明の一実施形態の測定方法における各動作ステップと、切換え部材切換え状態と、主流量における送液内容と、検出されたクロマトグラムとの各時間変化を示す図。

【符号の説明】

1 ... 分離カラム

2 ... 検出器

3 ... 切換え部材

4 ... 送液部材

5 ... 試料等導入部材

6 ... 溶離液導入部材

7 ... 切換え弁

8 ... サンプリングノズル

9 ... 切換え弁

10 ... ノズル

a ... 試料等導入ポート

b ... 第 1 の流出ポート

c ... 溶離液 A 導入ポート

c 1 ... 第 1 の保持流路

c 2 ... 第 2 の保持流路

d ... 第 2 の流出ポート

e ... 溶離液 B 導入ポート

f ... 溶離液排出ポート

g ... 第 2 の流入ポート

h ... カラム接続ポート

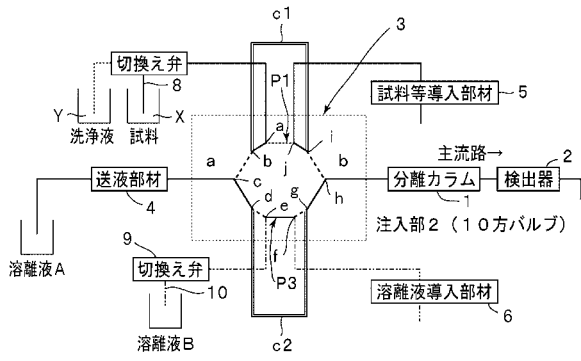
i ... 第 1 の流入ポート

j ... 試料等排出ポート

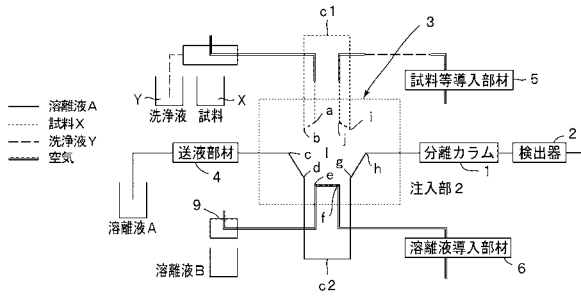
10

20

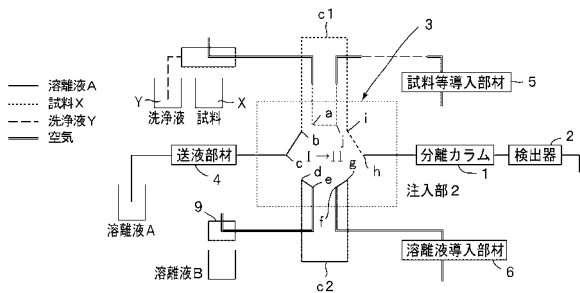
【図1】



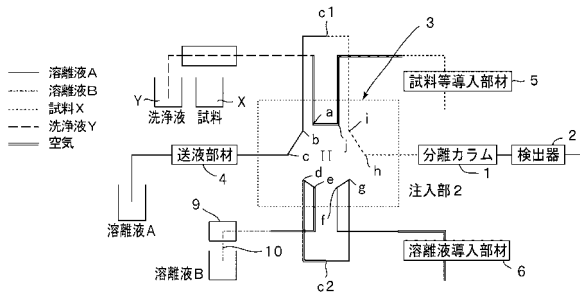
【図2】



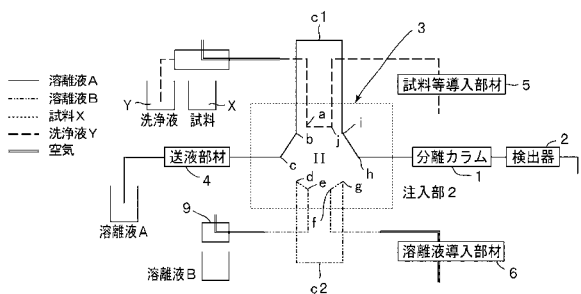
【図3】



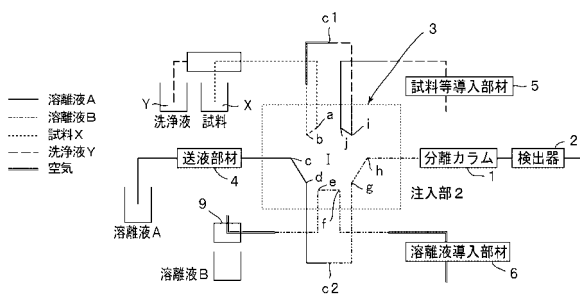
【図4】



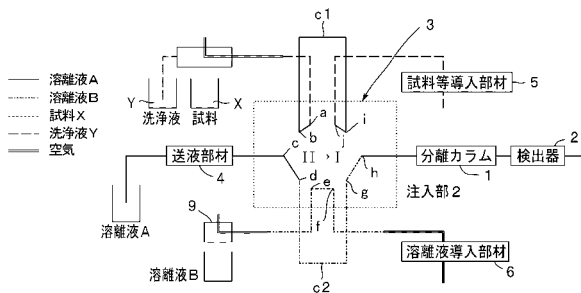
【図5】



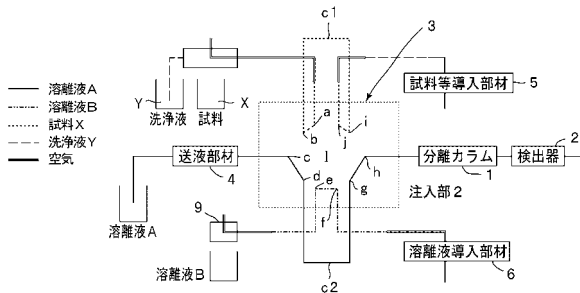
【図7】



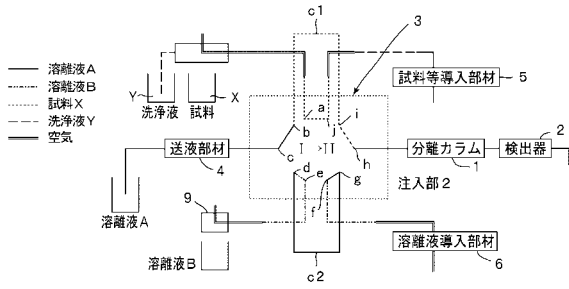
【図6】



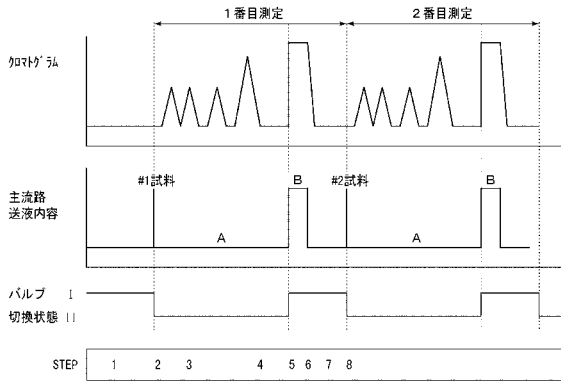
【図8】



【 図 9 】



【 図 10 】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 実開平02-048863(JP,U)  
特開平07-280789(JP,A)  
特開平02-130466(JP,A)  
国際公開第00/072001(WO,A1)  
特開平11-304781(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 30/26-30/34

35/00-35/08