

(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
2010 年 9 月 10 日(10.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/100914 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/84 (2006.01) G01N 30/74 (2006.01)
G01N 30/32 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/001453
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 3 日(03.03.2010)
- (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 2009-050074 2009 年 3 月 4 日(04.03.2009) JP
PCT/JP2009/006210 2009 年 11 月 19 日(19.11.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 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): 佐々木翠 (SASAKI, Midori) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP).

- 石川昌子 (ISHIKAWA, Masako) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 中川裕章 (NAKAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 鈴木裕志 (SUZUKI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 伊藤正人 (ITO, Masahito) [JP/JP]; 〒3128504 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: ポレール特許業務法人 (Polaire I.P.C.); 〒1040032 東京都中央区八丁堀二丁目 7 番 1 号 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, JP, 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,

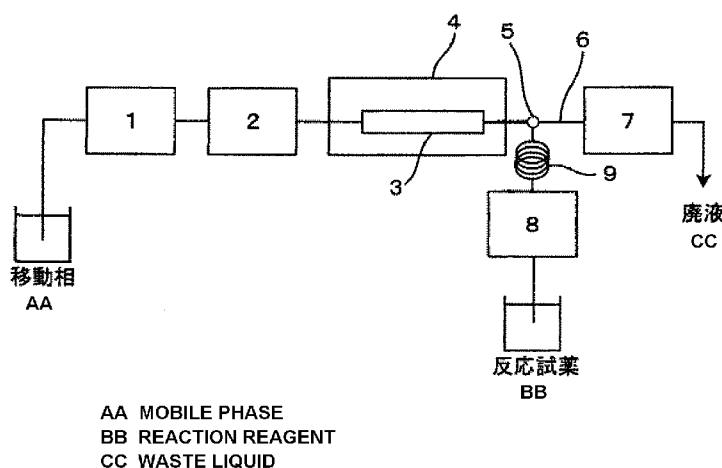
[続葉有]

(54) Title: LIQUID CHROMATOGRAPH AND ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 液体クロマトグラフ及び分析方法

[図1]

図 1



(57) Abstract: Disclosed is a liquid chromatograph whereby, in high-speed liquid chromatographic analysis using the post column method, measurement can be conducted at a high sensitivity while maintaining the mixing accuracy of a sample that is eluted from a column with a reaction reagent without using a special mixing reaction section and preventing the diffusion of a target component. Specifically disclosed is a liquid chromatograph wherein the pressure tolerance of a mobile phase-feed pump (1) is greater than 40 MPa; the particle diameter of a packing in a separation column (3) is smaller than 3 μm ; and a pressure buildup coil (9) is connected to a reaction reagent-feed pump (8) to elevate the pressure applied to the reaction reagent-feed pump (8).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/100914 A1



PL, PT, RO, RS, RU, 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.

NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, LS, MW, MZ, NA, 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 (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,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 補正された請求の範囲及び説明書 (条約第 19 条(1))

ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフ分析において、特別な混合反応部を備えずともカラムから溶出された試料と反応試薬との混合精度を保ち、かつ目的成分の拡散を防ぎ、高感度に測定することができる液体クロマトグラフを提供することを目的とする。本発明の液体クロマトグラフは、移動相送液ポンプ 1 の耐圧が 4 0 M P a より大きく、分離カラム 3 の充填剤の粒子径が 3 μ m より小さく、反応試薬送液ポンプ 8 には、反応試薬送液ポンプ 8 にかかる圧力を上げる加圧コイル 9 が接続されている。

明 細 書

発明の名称：液体クロマトグラフ及び分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポストカラム法を用いた液体クロマトグラフ及び分析方法に係るものである。

背景技術

[0002] ポストカラム法を用いた液体クロマトグラフは、分離カラムから溶出された試料に1つ以上の反応試薬を混合し、得られる反応物を検出する分析法であり、高い選択性を必要とする測定や、UV吸収を持たない物質の測定などに多く利用されている。

[0003] 図7は、ポストカラム法を用いた従来の高速液体クロマトグラフの構成図である。高速液体クロマトグラフは、移動相送液ポンプ1、試料を注入するためのインジェクタ2、試料を分離する分離カラム3、分離カラム3を恒温に保つカラムオーブン4、分離カラム3から溶出した試料と反応試薬を混合するための3方ジョイント構造のTジョイント5、分離カラム3から溶出した試料と反応試薬が混合されながら流れる配管6、試料中の目的成分を検出する検出器7、反応試薬を送液する反応試薬送液ポンプ8を備えている。試料はインジェクタ2から注入され、移動相送液ポンプ1から送液される移動相によって分離カラム3を通過し、分離する。分離した試料はTジョイント5で反応試薬送液ポンプ8から送液される反応試薬と混合されて反応し、配管6を通過して検出器7で検出される。

[0004] 液体クロマトグラフでは、分離カラム3中のカラム充填剤を2 μ m程度に細かくすることにより、分離能が向上するため、その分移動相の線流速を早くし分離カラム3を小さくすることで分離能を維持して分析時間を短縮できるが、ポンプにかかる圧力は上昇する。従来は、カラム充填剤の粒子径が3から5 μ mを想定し、ポンプの耐圧が40MPa程度の液体クロマトグラフ装置が普及していた。しかし、2004年以降、カラム充填剤の粒子径が3

μm より小さいものを想定し、ポンプの耐圧が40MPaより大きい液体クロマトグラフ装置（以下、「超高速クロマトグラフ」と称する）を各社ラインアップしてきた。なお、市販されている超高速クロマトグラフ用のカラムとしては、株式会社日立ハイテクノロジーズ製 LaChromUltra C18（充填剤の粒子径 $2\mu\text{m}$ ）、Agilent Technologies Inc. 製 ZORBAX SB-C18（充填剤の粒子径 $1.8\mu\text{m}$ ）、Sigma-Aldrich Inc. 製 Ascentis RP-Amide（充填剤の粒子径 $2.7\mu\text{m}$ ）などがあり、耐圧上限は前者が50MPa、後2者が60MPaである。なお、ポンプなど装置やカラムを日常用いるときに、耐圧上限値の半分、若しくはそれ以下で用いることが多い。現在、液体クロマトグラフは、耐圧40MPa以下の高速液体クロマトグラフと40MPaより大きい超高速液体クロマトグラフの2つに分類される。

[0005] 従来、上述の超高速液体クロマトグラフを用いたポストカラム法による分析例は公表されていない。以下のような問題によると考えられる。

[0006] 図7に示す分離カラム3から溶出された試料と反応試薬が混合するTジョイント5と検出器7までの配管6を含む流路を試薬混合反応部とよぶと、この試薬混合反応部の内部容量を大きくすると混合および反応は十分行われるが、目的成分の拡散が起こって、クロマトグラムの目的成分の検出ピークが広がってブロードになってしまう。これにより、分離性能や感度が低下してしまう。

[0007] 一方、試薬混合反応部の内部容量を小さくすると、混合および反応が十分に行われず、クロマトグラムのベースラインノイズが増大してしまい、感度が低下してしまう。

[0008] 特に、例えば $0.5\text{mL}/\text{min}$ 以下の低流量で混合反応を行う場合、前記問題の影響が大きく、特許文献1、特許文献2、特許文献3に記載された発明では混合効率を上げるための特別な構造を備える試薬混合反応部が提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：：特開2002-131326号公報

特許文献2：：特開2005-69818号公報

特許文献3：：特開平8-304373号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、特別な構造の試薬混合反応部を必要とせず、クロマトグラムの検出ピークがブロードになるのを防止し、かつ、感度の低下を防止したポストカラム法に利用できる超高速液体クロマトグラフ及びその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

[0011] 上記課題を解決するために、本発明の実施態様は、移動相を送液する移動相送液部と、移動相に試料を注入するインジェクタと、試料を分離する分離カラムと、分離カラム通過後の移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、分離カラム通過後の移動相と反応試薬とが混合するジョイント部と、試料が反応試薬と反応して通過する配管と、反応試薬と反応した試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を移動相の圧力まで高めるように検出器の上流側に加圧手段を設けたことを特徴とする。ここで上流側とは、移動相及び移動相送液ポンプ側であり、下流側とは検出器側である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、クロマトグラムの検出ピークがブロードになるのを防止し、かつ、感度の低下を防止したポストカラム法に利用できる液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ分析方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明の第一の実施例を示し、液体クロマトグラフの主な構成を示す構

成図である。

[図2]従来の液体クロマトグラフで得られたクロマトグラムの図である。

[図3]本発明による液体クロマトグラフで得られたクロマトグラムの図である。

[図4]反応試薬送液ポンプにかける圧力を変化させたときのベースラインクロマトグラムの図である。

[図5]Tジョイントの内部ボリュームを変えたときのベースラインクロマトグラムの図である。

[図6]ポストカラム法を適応した有機酸分析のクロマトグラムの図である。

[図7]従来のポストカラム法を行う液体クロマトグラフの主な構成を示す構成図である。

[図8]本発明の第二の実施例を示し、ポストカラム法を行う液体クロマトグラフの主な構成を示す構成図である。

[図9]図8に示した超高速液体クロマトグラフを用いて、比較的長時間相対蛍光強度を測定したクロマトグラムの図である。

[図10]配管の内径の違いによる検出ピークの違いを示すクロマトグラムの図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、図面を参照して本発明の実施例を説明する。

実施例

[0015] 図1は、本発明の第一の実施例を示し、液体クロマトグラフの主な構成を示す構成図である。図中の参照符号は、図7に示すものと同様であるが、Tジョイント5と配管6とを構成とする試薬混合反応部と反応試薬送液ポンプ8との間に加圧部即ち加圧コイル9を設けた点が、図7と異なる。加圧部はその内部に反応試薬が流通しうる配管である。

[0016] 本実施例の液体クロマトグラフは、ポストカラム法を用いた超高速液体クロマトグラフであり、移動相送液ポンプ1の耐圧が40MPaより大きく、分離カラム3の充填剤の粒子径が2 μ m等の3 μ mより小さいものである。

つまり、超高速液体クロマトグラフにおいてポストカラム法を実現することを提案する。

[0017] このために、本実施例では、Tジョイント5の容積を $1\mu\text{L}$ 以下とした。
、反応試薬送液ポンプ8にかかる圧力を上げるための加圧コイル9をTジョイント5と反応試薬送液ポンプ8の間に接続する。加圧コイル9は、配管の内部抵抗を上げるために長さを長くし、装置に収納するためにコイル状にコンパクトにしている。これにより、反応試薬送液ポンプ8の送液の脈動を抑えて安定化させ、検出感度を上げることができる。

[0018] 図2および図3は、液体クロマトグラフで得られたクロマトグラムの図であり、図2は、比較例として従来の方法により得られたクロマトグラム、図3は、本実施例の方法により得られたクロマトグラムである。これらのクロマトグラムを得たときの分析条件を、以下に示す。

[0019] 移動相：3mM過塩素酸溶液
移動相流量：0.4mL/min
カラム温度：25℃
注入量： $1\mu\text{L}$
反応試薬：プロモチモールブルー（BTB）溶液
反応試薬流量：0.5mL/min
検出器：可視光検出器（検出波長440nm）

図7に示した従来の液体クロマトグラフを用いた場合、反応試薬を送液する反応試薬送液ポンプ8にかかる圧力は3MPa以下であり、分離カラム3から溶出された試料と反応試薬とが混合するTジョイント5は内部ボリュームが $2.1\mu\text{L}$ のものをを用い、配管6は従来のポストカラム法で用いられている内径0.25mmの配管を使用し、上記分析条件で測定し、図2に示すクロマトグラムを得た。

[0020] 図7に示すTジョイント5と配管6を構成する従来の試薬混合反応部を用いた場合、図2に示すようにクロマトグラムの目的成分の検出ピークがすそ広がりになり、分離度が悪くなっている。これは、試薬

混合反応部の内部ボリューム容量が大きいために、目的成分の拡散が起ってしまうことが原因と考えられる。

[0021] 一方、図1に示す本発明による液体クロマトグラフでは、分離カラム3や配管を含むシステム全体の耐圧を40MPaより大きくし、反応試薬を送液する反応試薬送液部すなわち、反応試薬送液ポンプ8にかかる圧力を、移動相を送液する移動相送液ポンプ1と同等の圧力になるように加圧コイル9を接続している。これにより、反応試薬送液ポンプ8の送液の脈動を押さえ安定化させることができる。分離カラム3で溶出された試料と反応試薬とが混合するジョイント部すなわち、Tジョイント5には、内部ボリュームが0.57 μ Lのものをを用いている。Tジョイント5と検出器7とを接続する配管6は、内部ボリュームを最小限とするために、内径0.13mm以下の内径0.1mmの検出器のインレットチューブを直接接続している。検出器7は、フローセルが低容量のもので、検出の収集間隔が200ms以下、応答速度が50ms以下の速度でデータを収集することが望ましい。

[0022] 図3に示すクロマトグラムは、図2と比較すると、目的成分の検出ピークの立ち上がりが急になり、広がりを抑えることができ、分離度を改善することができた。このように、本実施例によるポストカラム法の液体クロマトグラフに内部ボリュームが1 μ LのTジョイントと内径0.13mm以下の配管を用いることにより、クロマトグラムの検出ピークがブロードになるのを防止し、かつ、感度の低下を防止することができる。

[0023] 図4は、反応試薬送液ポンプ8にかける圧力を変化させたときのベースラインクロマトグラムの図である。反応試薬送液ポンプ8にかける圧力を、ケースaが34MPa、ケースbが9.4MPa、ケースcが0MPaとし、ベースラインを測定した。以上の3ケースを比較すると、ケースaの圧力が高い方がノイズが低減されている。すなわち、移動相送液ポンプ1と同等の圧力に近づけるほどノイズが低減できることがわかる。図1に示すように反応試薬送液ポンプ8の下流側に加圧コイル9を設けることにより、反応試薬送液ポンプ8にかける圧力を高くすることができる。加圧コイル9の内径は

、0.13 mm以下の配管を用いることが望ましい。あるいは、内径が0.13 mm以上の場合、加圧コイル9の長さをより長くすることにより、反応試薬送液ポンプ8にかかる圧力を高くすることができる。

[0024] 図5は、Tジョイント5の内部ボリュームを変えたときのベースラインクロマトグラムの図である。分離カラム3から溶出した試料と反応試薬とを混合するTジョイント5の内部ボリュームの大小が、混合効率に影響するため、Tジョイント5の内部ボリュームは、1 μ L以下とすることが望ましい。図では、Tジョイント5の内部ボリュームとして、ケースaは0.57 μ L、ケースbは2.06 μ Lを用いて測定を行った。ケースaの方が、ベースラインのノイズが低減されており、Tジョイント5の内部ボリュームが小さいほど、分離カラム3から溶出した試料と反応液との混合が均一になることがわかる。

[0025] 図6は、図1に示した本発明による超高速液体クロマトグラフを用いて、ブロモチモールブルー（BTB）溶液を反応試薬として用いたBTB法ポストカラム法を適応した有機酸分析のクロマトグラムの図である。図に示されるように、検出ピークの広がり抑制されており、試薬混合反応部における目的成分の拡散を抑え、目的成分を測定することが可能となっている。

[0026] BTB法ポストカラム法を用いた有機酸の分析には、イオン排除モードとイオン交換モードの充填剤を用いた分離カラムを使用することが一般的である。有機酸の分離のために、逆相モードを用いた分離も可能であるが、分離カラムへの保持を強くするために水系の移動相の割合が大きくなり、通常の逆相モードのカラムでは安定性の観点より好ましくない。しかし、親水性のアミド基と逆相のC18（オクタデシル）の両方の官能基を持つ親水性を兼ね備えた逆相モードの分離カラムを使用することで、水系の移動相のみでも安定して高い分離性能が得られるので、図6に示した本実施例では、親水性を兼ね備えた逆相モードの分離カラムを用い、BTB法ポストカラム法によるブロモチモールブルー溶液反応を可能とする方法を用いている。この分析を、カラム充填剤の粒子径が2 μ mである小型の分離カラムを用い、移動相

送液ポンプ 1 の耐圧を 40 MPa より大きくした超高速の液体クロマトグラフを用いて行うので、移動相の線流速が早くなり、分離性能を低下させずに従来のイオン排除モードとイオン交換モードの充填剤を用いた分離カラムで、BTB法ポストカラム法を用いた有機酸の分析に比べ、従来法の 10 分の 1 程度にまで測定時間の短縮が可能となる。また、移動相、試薬の使用量が減るので、これらが節約できるという効果がある。

[0027] 図 8 は本発明の第二の実施例を示し、ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフの別の構成図である。高速液体クロマトグラフは、移動相送液ポンプ 1、試料を注入するためのインジェクタ 2、試料を分離する分離カラム 3、分離カラム 3 を恒温に保つカラムオーブン 4、分離カラム 3 から溶出した試料と反応試薬を混合するための 3 方ジョイント構造の T ジョイント 5、分離カラム 3 から溶出した試料と反応試薬が混合されながら流れる配管 6、試料中の目的成分を検出する検出器 7、反応試薬を送液する反応試薬送液ポンプ 8 を備えている。試料はインジェクタ 2 から注入され、移動相送液ポンプ 1 から送液される移動相によって分離カラム 3 を通過し、分離する。分離した試料は T ジョイント 5 で反応試薬送液ポンプ 8 から送液される反応試薬と混合されて、配管 10 内で反応しながら通り検出器 7 で検出される。

[0028] 図 8 において、T ジョイント 5 の内部ボリュームは、第一の実施例と同じく $1\ \mu\text{L}$ 以下の $0.57\ \mu\text{L}$ のものを使用し、T ジョイント 5 と検出器 7 とを接続する配管は、第一の実施例で用いた配管 6 に加え、内径 $0.1\ \text{mm}$ 、長さ $1\ \text{m}$ の配管 10 を用いる。長さが $1\ \text{m}$ あるので、装置に収納する際には、図に示すように例えばコイル状にしてコンパクトにする。配管 10 の長さを長くすることで、反応試薬送液ポンプ 8 からの送液の圧力を高くすることができる。

[0029] この配管は実施例 1 における加圧コイル 9 と同様な加圧機能を有し、配管 10 の長さは、好ましくは、移動相送液ポンプ 1 にかかる圧力と同程度の圧力を T ジョイント 5 に与えるのに必要な長さで、たとえば $0.8\ \text{m}$ 程度もしくはそれ以上である。また、T ジョイントにおける圧力が高すぎるもののな

いように、配管の長さを設定する。

[0030] 図9は、図8に示した超高速液体クロマトグラフを用いて、比較的長時間相対蛍光強度を測定したクロマトグラムの図であり、反応試薬にオルトフタルアルデヒド（OPA）溶液を用い、アミノ酸などアミノ基を有する化合物の分析のために、OPA法ポストカラム法を適応したクロマトグラムの一例を示している。縦軸は相対蛍光強度を、横軸は溶出時間を表す。

[0031] 図9に示したクロマトグラムを得るときの分析条件を以下に示す。

[0032] 分離カラム：内径2.1mm、長さ100mm

充填剤：粒子径2 μ m シリカODS（オキシデンタルシリル基で表面が修飾された化学結合型多孔性球状シリカゲル充填剤）

移動相：20mモル/L リン酸緩衝液、ヘキサンスルホン酸ナトリウム／アセトニトリル＝92／8（モル比）

移動相流量：0.4mL/min

カラム温度：25℃

注入量：1 μ L

反応試薬：オルトフタルアルデヒド（OPA）溶液

反応試薬流量：0.4mL/min

検出器：蛍光検出器（励起波長345nm、蛍光波長450nm）

このように、OPA法ポストカラム法においても、低容量のジョイントと内径0.13mm以下の配管を用いる本発明の構成を採用することにより、クロマトグラムの目的成分の検出ピークの広がりを抑えることができる。

[0033] ここで、分離カラム内での目的成分の検出ピークの広がりを、既知の算出式を用いて求め、本発明の効果を検証する。文献「高速液体クロマトグラフィーハンドブック」日本分析化学会関東支部編、丸善（2000年3月）を参考にして、分離カラム内での目的成分の検出ピークの広がりを分散 σ_c で表すと、次式で表される。

$$\sigma_c = 0.6 \pi d_c^2 h d_p (N)^{1/2} (1+k) / 4 \quad \cdots \text{数 1}$$

但し、 d_c は分離カラムの直径、 h は換算理論高さ、 d_p は充填剤の粒子

径、 N は理論段数、 k は保持係数である。 $d_c = 2\text{ mm}$ 、 $h = 4$ 、 $d_p = 2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $N = 10000$ 、 $k = 0$ とすると、 σ_c は $1.5\text{ }\mu\text{L}$ となる。

[0034] 分離カラム外での広がりを分散 σ_{ex} とし、この標準偏差を a とすると、両者の関係は次式で表される。

$$((1+a)\sigma_c)^2 = \sigma_c^2 + \sigma_{ex}^2 \quad \cdots\text{数}2$$

目的成分の検出ピークの広がりを20%まで許容すると、 $a = 0.2$ として、 $\sigma_{ex} = 1\text{ }\mu\text{L}$ となる。さらに、試薬混合反応部と検出器とを接続する配管が設けられており、この配管の内径は 0.13 mm 以下である。配管内での試料の広がり(σ_p)は、日本国特許出願公開公報、特開2002-243715号公報の記載によれば、次式で表される。

$$\sigma_p^2 = r^4 \cdot v L_p / 24 D_m \quad \cdots\text{数}3$$

但し r は配管内径の半径、 v は流速、 L_p は配管の長さ、 D_m は溶質の拡散係数である。 $v = 1.2\text{ ml/min}$ 、 $L_p = 100\text{ cm}$ 、 $D_m = 1.2 \times 10^{-9}\text{ (m}^2/\text{s)}$ として、一般に高速液体クロマトグラフ用に販売されている内径 0.25 mm と 0.13 mm の配管で比較すると、内径 0.25 mm では $0.53\text{ }\mu\text{L}$ 、内径 0.13 mm では $0.04\text{ }\mu\text{L}$ となる。接続部において既に検出ピークが広がっており、内径 0.25 mm の配管を用いれば接続部と同様に広がりが大きくなるが、内径 0.13 mm 以下の配管を用いることにより接続部より1桁以上影響が少なくなり、広がりが事実上無視できる。これらのいずれかまたは組み合わせの構成により、目的成分の検出ピークが広がってブロードになるのを防止し、かつ、感度の低下を防止した超高速液体クロマトグラフを提供することができる。

[0035] 図10は、配管の内径の違いによる検出ピークの違いを示すクロマトグラムの図である。配管10の長さは 1 m で一定とし、配管の内径が 0.1 mm 、 0.13 mm 、 0.25 mm 、 0.3 mm の4種類の市販品を用いて分析を行った。また、比較のために、図中のTジョイント5、反応試薬送液ポンプ8、配管10を外し、カラム3と検出器7との間を内径 0.13 mm 以下の 0.1 mm の配管で最短距離で接続した配管を用いた場合も分析を行った。

ところ、0.033分であった。図10の縦軸は、クロマトグラムの検出ピークの半値幅（単位分）である。配管10の内径が0.1mmと0.13mmのときのピーク半値幅は0.036分と0.037分で、内径が0.25mmや0.3mmのときの0.047分や0.050分よりも大幅に小さい。配管での広がり、は、上述の数3の式で示されるように、配管の内径の2乗に比例する。ここで内径0.1mmの配管での広がりを1とすれば、0.13mm、0.25mm、0.3mmではそれぞれ1.7、6.3、9.0となり、本データと一致する。配管10の内径が0.1mmと0.13mmのときのピーク半値幅は、図1に示した例の場合に近い値となっており、配管10の内径が0.13mm以下であれば、クロマトグラムの検出ピークの広がりを抑えてブロードになるのを防止できることがわかる。

産業上の利用可能性

[0036] 本発明は、クロマトグラムの検出ピークがブロードになるのを防止でき、かつ、感度の低下を防止したポストカラム法に利用できる液体クロマトグラフに適用することができる。

符号の説明

- [0037] 1 移動相送液ポンプ
2 インジェクタ
3 分離カラム
4 カラムオープン
5 Tジョイント
6 配管
7 検出器
8 反応試薬送液ポンプ
9 加圧コイル
10 配管

請求の範囲

[請求項1]

分離カラムと、
移動相を該分離カラムに送液する移動相送液部と、
前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、
前記分離カラムから通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、
ジョイント部内の試料中の成分を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、
前記移動相送液部の耐圧が40MPaより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、
前記反応試薬送液部と前記ジョイント部の間に、該反応試薬送液部にかかる圧力を上げる加圧部が接続され、
前記ジョイント部の容積は1 μ L以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項2]

分離カラムと、
移動相を分離カラムに送液する移動相送液部と、
前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、
前記分離カラム通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、
ジョイント部内の試料中の成分を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、
前記移動相送液部の耐圧が40MPaより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、
前記反応試薬送液部と前記ジョイント部の間には、該反応試薬送液部にかかる圧力を上げる加圧部が接続され、
前記ジョイント部と前記検出部とを接続する接続配管が設けられて

おり、該接続配管の内径が0.13 mm以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項3] 前記加圧部は、コイル状のものであることを特徴とする請求項1または2に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項4] 前記加圧部は、内径が0.13 mm以下の配管であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項5] 前記加圧部は、前記反応試薬送液部にかかる圧力を前記移動相送液部にかかる圧力とほぼ同じ圧力まで上げることを特徴とする請求項1から4のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項6] 前記ジョイント部と前記検出部とを接続する接続配管が設けられており、該接続配管の内径が0.13 mm以下であることを特徴とする請求項1に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項7] 前記ジョイント部の容積は1 μ L以下であることを特徴とする請求項2に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項8] 前記反応試薬としてブロモチモールブルー溶液を用いたことを特徴とする請求項1から7のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項9] 前記反応試薬としてオルトフタルアルデヒド溶液を用いたことを特徴とする請求項1から7のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項10] 前記分離カラムは、親水性を備えた逆相モードのカラムであることを特徴とする請求項1から9のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

分離カラムと、

該分離カラムに移動相を送液する移動相送液部と、

前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、

前記ジョイント部内の試料を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記移動相送液部の耐圧が40MPaより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、

前記ジョイント部の容積は1 μ L以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項11]

試料を分離する分離カラムと、

移動相を前記分離カラムに送液する移動相送液部と、

前記移動相に試料を注入するインジェクタと、

前記

前記分離カラム通過後の前記移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の前記移動相と前記反応試薬とが混合するジョイント部と、

前記試料が前記反応試薬と反応して通過する配管と、

前記反応試薬と反応した前記試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を前記移動相の圧力まで高めるように前記検出器の上流側の配管を長くしたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項12]

試料を分離する分離カラムと、

前記分離カラムに移動相を送液する移動相送液部と、

前記移動相に試料を注入するインジェクタと、

前記

前記分離カラム通過後の前記移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の前記移動相と前記反応試薬とが混合するジョイント部と、

前記試料が前記反応試薬と反応して通過する配管と、

前記反応試薬と反応した前記試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記反応試薬送液部と前記ジョイント部との間に、前記反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を前記移動相の圧力まで高める加圧コイルを設けたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項13]

移動相を送液する移動相送液部と、

前記移動相に試料を注入するインジェクタと、

前記試料を分離する分離カラムと、

前記分離カラム通過後の前記移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の前記移動相と前記反応試薬とが混合するジョイント部と、

前記試料が前記反応試薬と反応して通過する配管と、

前記反応試薬と反応した前記試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記ジョイント部と前記検出器との間の前記配管の長さを、前記反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を前記移動相の圧力まで高めるように長くしたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項14]

移動相を送液する移動相送液部と、

分離カラムと、

前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラムから溶出された液体と前記反応試薬が混ざるジョイント部と、

検出部とを備えた液体クロマトグラフを用いた分析方法であって、

前記移動相送液部の耐圧が40MPaより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3μmより小さく、前記ジョイント部の容積は1

μL 以下にして、反応試薬送液部にかかる圧力を上げることを特徴とする分析方法。

[請求項15]

移動相を送液する移動相送液部と、

分離カラムと、

前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラムから溶出された液体と前記反応試薬が混ざるジョイント部と、

検出部とを備えた液体クロマトグラフを用いた分析方法であって、

前記移動相送液部の耐圧が40MPaより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が $3\mu\text{m}$ より小さく、前記ジョイント部と前記検出部とを接続する接続配管の内径を0.13mm以下にして、反応試薬送液部にかかる圧力を上げることを特徴とする分析方法。

[請求項16]

前記反応試薬送液部にかかる圧力を前記移動相送液部にかかる圧力とほぼ同じ圧力まで上げることを特徴とする請求項11または12に記載の分析方法。

補正された請求の範囲

[2010年7月22日(22.07.2010)国際事務局受理]

[請求項1]

分離カラムと、
移動相を該分離カラムに送液する移動相送液部と、
前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、
前記分離カラムから通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、
ジョイント部内の試料中の成分を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、
前記移動相送液部の耐圧が4 0 M P aより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、
前記反応試薬送液部と前記ジョイント部の間に、該反応試薬送液部にかかる圧力を上げる加圧部が接続され、
前記ジョイント部の容積は1 μ L以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項2]

分離カラムと、
移動相を分離カラムに送液する移動相送液部と、
前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、
前記分離カラム通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、
ジョイント部内の試料中の成分を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、
前記移動相送液部の耐圧が4 0 M P aより大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、
前記反応試薬送液部と前記ジョイント部の間には、該反応試薬送液部にかかる圧力を上げる加圧部が接続され、
前記ジョイント部と前記検出部とを接続する接続配管が設けられて

おり、該接続配管の内径が0.13 mm以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項3] 前記加圧部は、コイル状のものであることを特徴とする請求項1または2に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項4] 前記加圧部は、内径が0.13 mm以下の配管であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項5] 前記加圧部は、前記反応試薬送液部にかかる圧力を前記移動相送液部にかかる圧力とほぼ同じ圧力まで上げることを特徴とする請求項1から4のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項6] 前記ジョイント部と前記検出部とを接続する接続配管が設けられており、該接続配管の内径が0.13 mm以下であることを特徴とする請求項1に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項7] 前記ジョイント部の容積は1 μ L以下であることを特徴とする請求項2に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項8] 前記反応試薬としてブロモチモールブルー溶液を用いたことを特徴とする請求項1から7のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項9] 前記反応試薬としてオルトフタルアルデヒド溶液を用いたことを特徴とする請求項1から7のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項10] (補正後)

前記分離カラムは、親水性を備えた逆相モードのカラムであることを特徴とする請求項1から9のいずれか1項に記載の液体クロマトグラフ。

[請求項11] (削除)

[請求項12] (補正後)

試料を分離する分離カラムと、
前記分離カラムに移動相を送液する移動相送液部と、
前記移動相に試料を注入するインジェクタと、

前記分離カラム通過後の前記移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の前記移動相と前記反応試薬とが混合するジョイント部と、

前記試料が前記反応試薬と反応して通過する配管と、

前記反応試薬と反応した前記試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記反応試薬送液部と前記ジョイント部との間に、前記反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を前記移動相の圧力まで高める加圧コイルを設けたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項13]

移動相を送液する移動相送液部と、

前記移動相に試料を注入するインジェクタと、

前記試料を分離する分離カラムと、

前記分離カラム通過後の前記移動相に反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラム通過後の前記移動相と前記反応試薬とが混合するジョイント部と、

前記試料が前記反応試薬と反応して通過する配管と、

前記反応試薬と反応した前記試料を検出する検出器とを備えた液体クロマトグラフであって、

前記ジョイント部と前記検出器との間の前記配管の長さを、前記反応試薬送液部から送液される反応試薬の圧力を前記移動相の圧力まで高めるように長くしたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

[請求項14]

移動相を送液する移動相送液部と、

分離カラムと、

前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、

前記分離カラムから溶出された液体と前記反応試薬が混ざるジョイ

ント部と、

検出部とを備えた液体クロマトグラフを用いた分析方法であって、
前記移動相送液部の耐圧が4 0 M P aより大きく、前記分離カラム
の充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、前記ジョイント部の容積は1
 μ L以下にして、反応試薬送液部にかかる圧力を上げることとを特徴とする
分析方法。

[請求項15]

移動相を送液する移動相送液部と、

分離カラムと、

前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬
送液部と、

前記分離カラムから溶出された液体と前記反応試薬が混ざるジョイ
ント部と、

検出部とを備えた液体クロマトグラフを用いた分析方法であって、
前記移動相送液部の耐圧が4 0 M P aより大きく、前記分離カラム
の充填剤の粒子径が3 μ mより小さく、前記ジョイント部と前記検出
部とを接続する接続配管の内径を0. 1 3 mm以下にして、反応試薬
送液部にかかる圧力を上げることとを特徴とする分析方法。

[請求項16]

(補正)

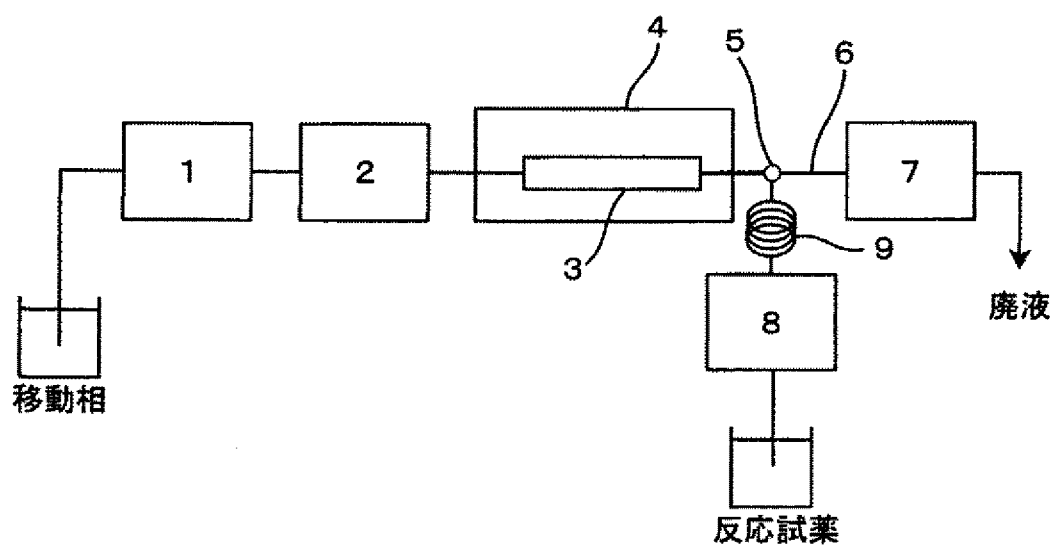
前記反応試薬送液部にかかる圧力を前記移動相送液部にかかる圧力
とほぼ同じ圧力まで上げることとを特徴とする請求項12に記載の分析
方法。

条約第 19 条（1）に基づく説明書

1. 請求の範囲第 10 項の第 4 行から第 15 行を削除した。
2. 請求の範囲第 11 項は、削除した。
3. 請求の範囲第 12 項の第 4 行の「前記」を削除した。
4. 請求の範囲第 16 項の第 2 行の「11 または」を削除した。

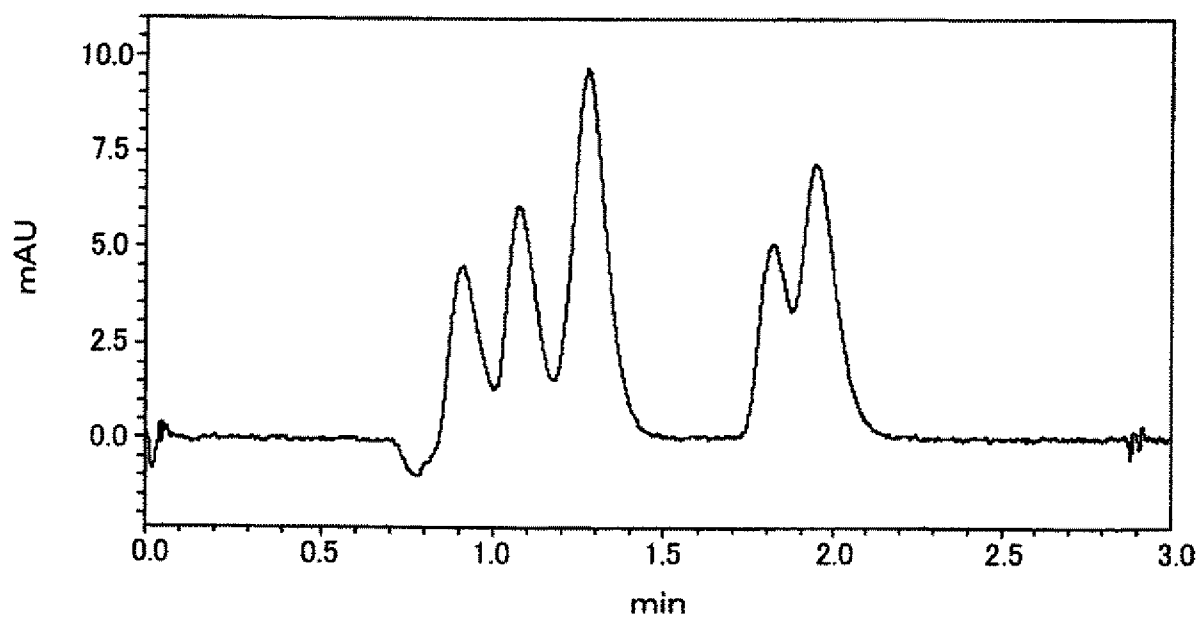
[図1]

図 1



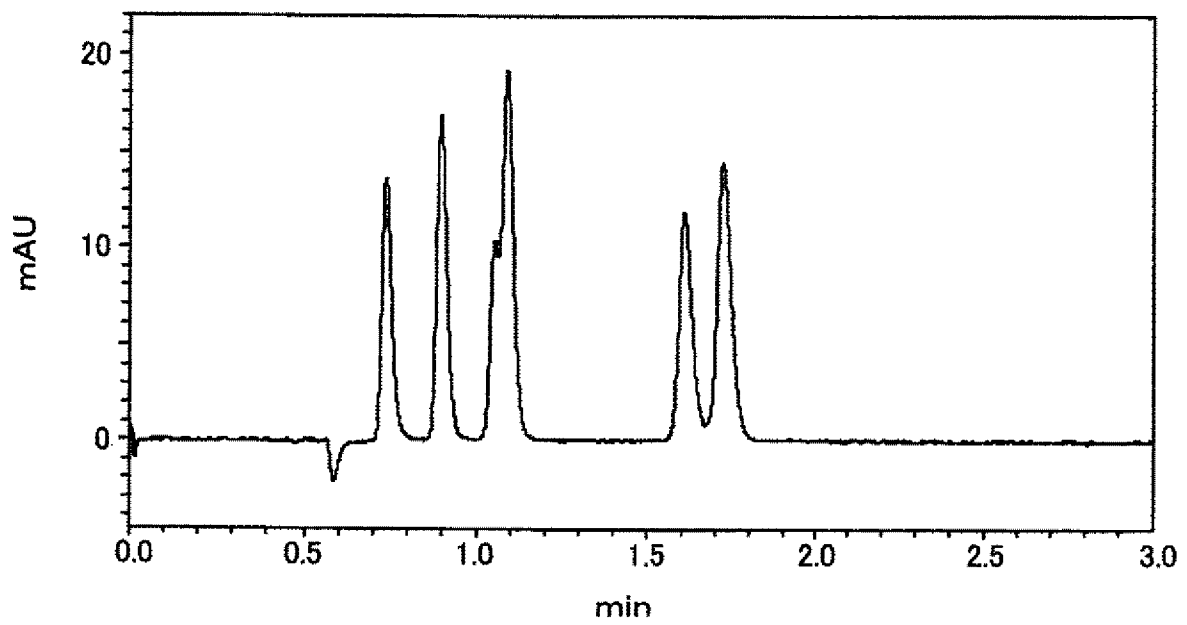
[図2]

図 2



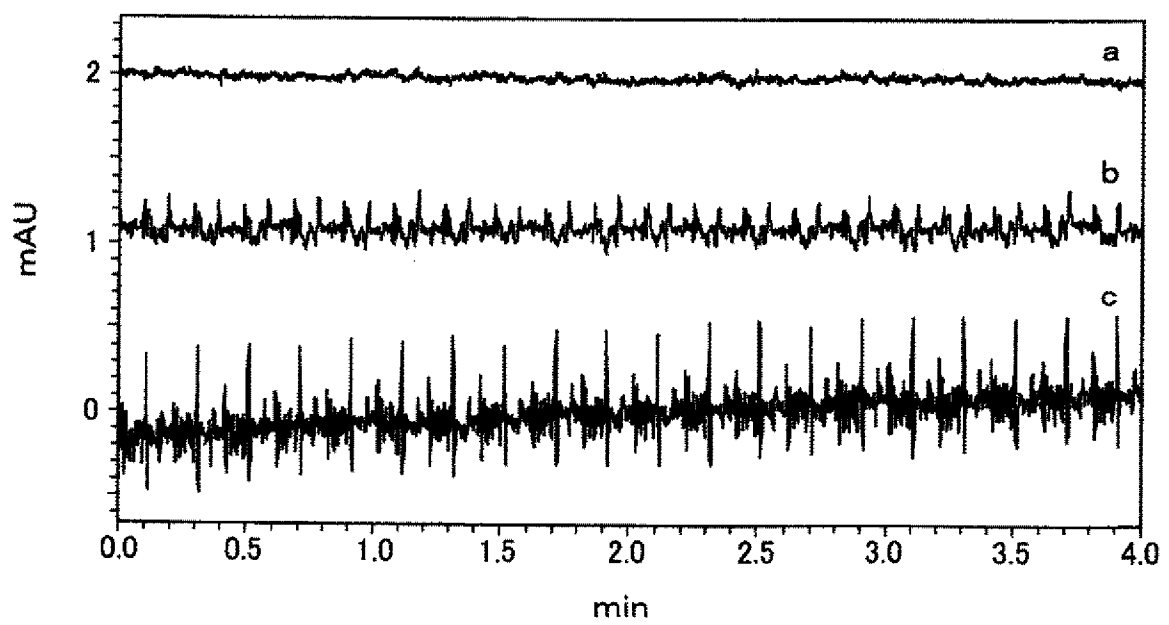
[図3]

図 3



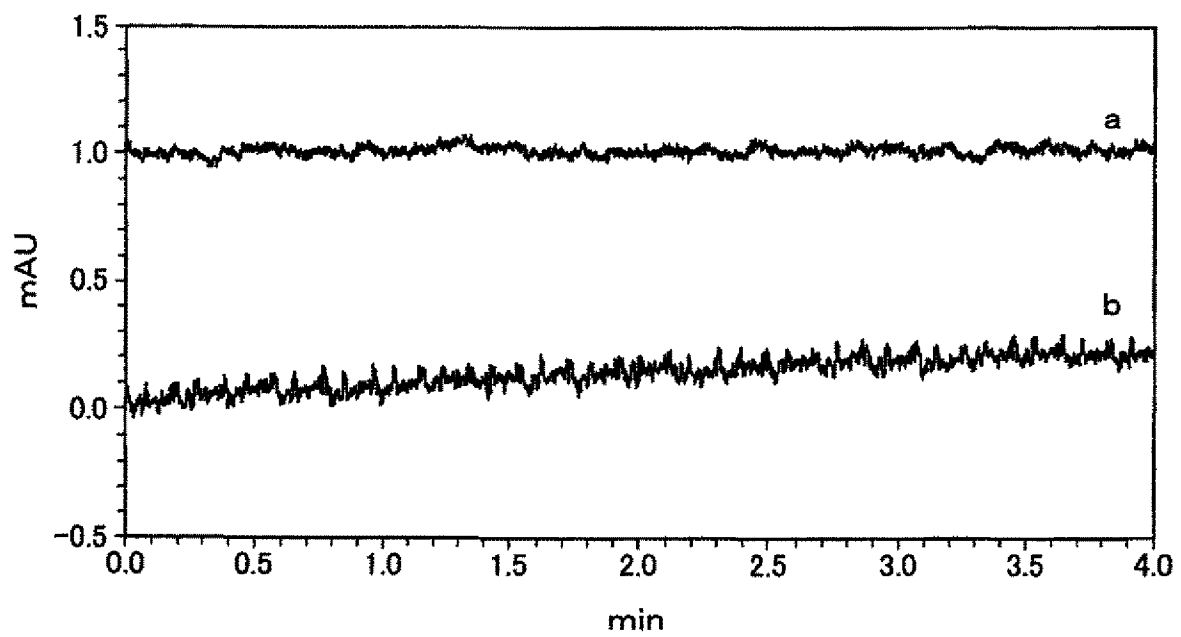
[図4]

図 4



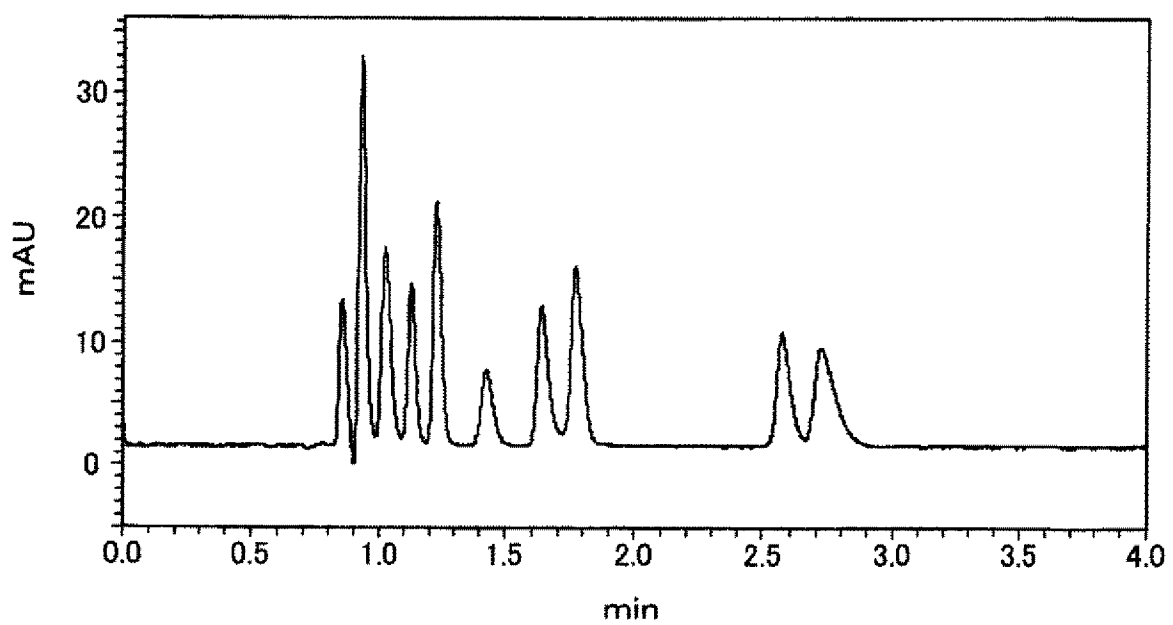
[図5]

図 5



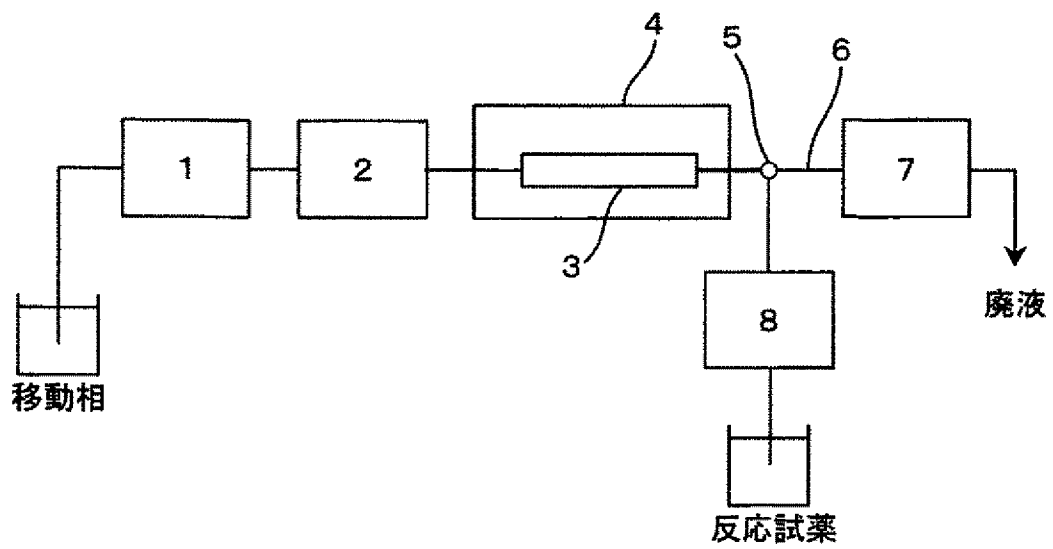
[図6]

図 6



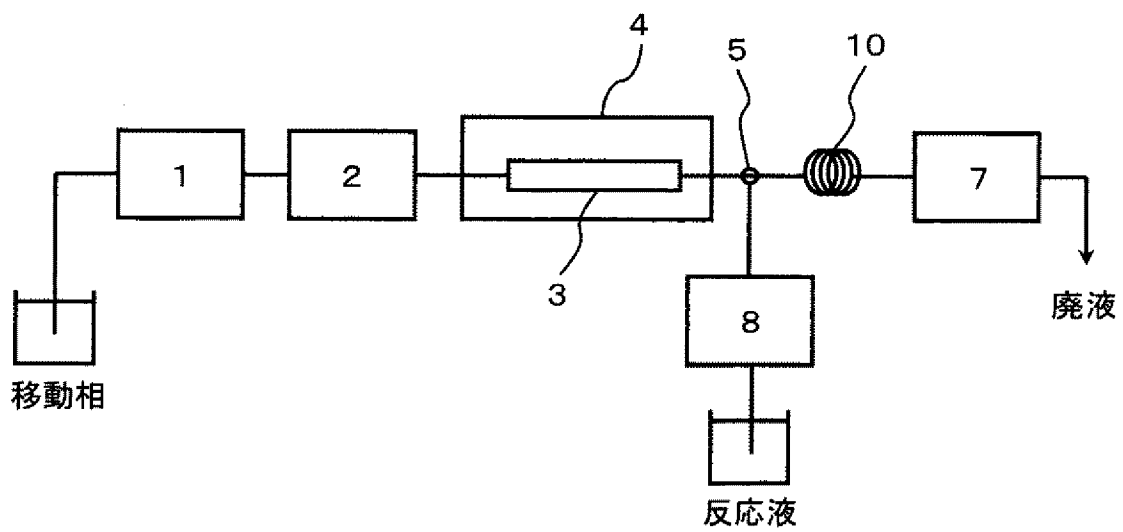
[図7]

図 7



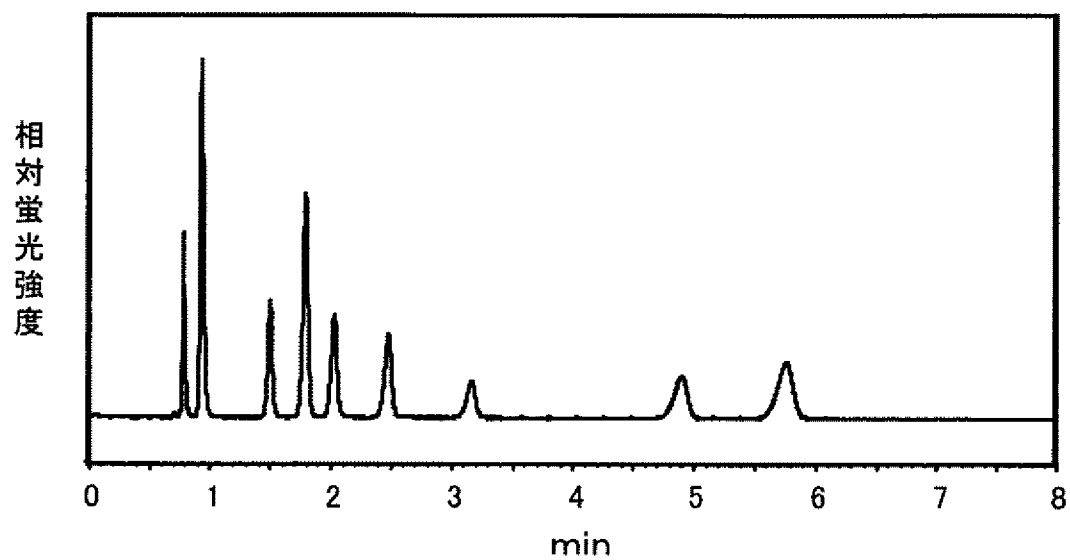
[図8]

図 8



[図9]

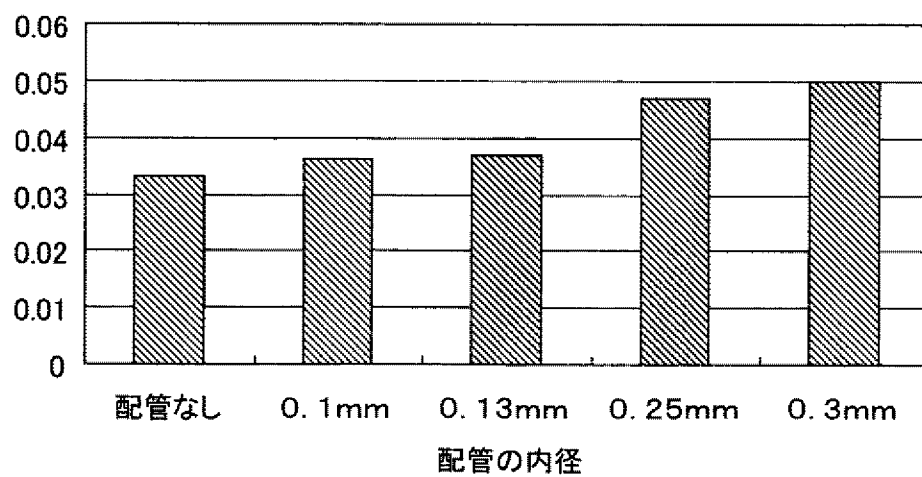
図 9



[図10]

図 10

ピーク半値幅 (min)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/001453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/84(2006.01)i, G01N30/32(2006.01)i, G01N30/74(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/84, G01N30/32, G01N30/74, G01N30/88

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lee-Sun New, Sudipta Saha, Michie M.K.Ong, Urs Alex Boelsterli, and Eric C.Y.Chan, "Pharmacokinetic study of intraperitoneally administered troglitazone in mice using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, Vol.21, No.6, P.982-988	1-9, 11-16
Y	JP 2008-051689 A (Tomoe Works Co., Ltd.), 06 March 2008 (06.03.2008), paragraph [0010] (Family: none)	1-9, 14-16

☒ 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
10 May, 2010 (10.05.10)

Date of mailing of the international search report
25 May, 2010 (25.05.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/001453

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 56-148057 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 17 November 1981 (17.11.1981), page 3, upper left column, lines 11 to 19; page 4, lower left column, lines 1 to 5; page 5, lower left column, line 8 to lower right column, line 5; fig. 1 & JP 3-183948 A	1-9, 12, 16
Y	Supervised by Hiroshi NAKAMURA, 'Ekikuro Toranomaki', 30 November 2003 (30.11.2003), pages 103 to 104	1, 3-9, 14, 16
Y	Supervised by Hiroshi NAKAMURA 'Ekikuro Toranomaki', 01 December 2005 (01.12.2005), pages 13 to 14, 85	2-9, 15-16
Y	JP 6-050953 A (Shimadzu Corp.), 25 February 1994 (25.02.1994), claims; fig. 1 (Family: none)	9, 11, 13
A	Masao BONOSHITA, Toshihiko MIYAJI, Keijin IWAYA, Sakae HIGASHIDATE, Takayuki YAMAGUCHI, Muneo SAITO, "Jisedai no HPLC-Cho Kosoku Ekitai Chromatography System- o Mochiita Iyakuhin Seibun no Kosoku Bunri", Chromatography, 2006, vol.27, no.3, pages 131 to 134	1-9, 11-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/001453

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/001453

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

In claim 10, it is stated that "a liquid chromatograph as claimed in any one of claims 1 to 9, characterized in that the separation column is a reversed phase mode column having hydrophilicity". Also, it is stated therein "a liquid chromatograph comprising a separation column, a mobile phase-feed section for feeding a mobile phase to the separation column, a reaction reagent-feed section for feeding a reaction reagent to a liquid having passed through the separation column, a joint section for mixing the liquid having passed through the separation column with the reaction reagent, and a detection section for detecting a sample in the joint section, characterized in that the pressure tolerance of the mobile phase-feed section is greater than 40 MPa; the particle diameter of a packing in a separation column is smaller than 3 μm ; and the capacity of the joint section is less than or equal to 1 μl ". Therefore, the invention in claim 10 cannot be specified as either the former or latter "liquid chromatograph", which makes the invention in claim 10 unclear.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N30/84(2006.01)i, G01N30/32(2006.01)i, G01N30/74(2006.01)i, G01N30/88(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（I P C））

Int.Cl. G01N30/84, G01N30/32, G01N30/74, G01N30/88

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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(JDreamII), 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
Y	Lee-Sun New, Sudipta Saha, Michie M. K. Ong, Urs Alex Boelsterli, and Eric C. Y. Chan, "Pharmacokinetic study of intraperitoneally administered troglitazone in mice using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, Vol.21, No.6, P. 982-988	1-9, 11-16

☒ 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

1 0 . 0 5 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 5 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

河野 隆一郎

2 J

3 7 0 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-051689 A (株式会社巴製作所) 2008. 03. 06, 段落【0010】 (ファミリーなし)	1-9, 14-16
Y	JP 56-148057 A (昭和電工株式会社) 1981. 11. 17, 第3ページ 左上欄11行目～19行目, 第4ページ左下欄1行目～5行目, 第5ページ左下欄8行目～右下欄5行目, 第1図 & JP 3-183948 A	1-9, 12, 16
Y	中村 洋 監修, 「液クロ彪の巻」, 2003. 11. 30, P. 103-104	1, 3-9, 14, 16
Y	中村 洋 監修, 「液クロ武の巻」, 2005. 12. 01, P. 13-14, 85	2-9, 15-16
Y	JP 6-050953 A (株式会社島津製作所) 1994. 02. 25, 【特許請求の 範囲】, 図1 (ファミリーなし)	9, 11, 13
A	坊之下 雅夫, 宮路 敏彦, 岩谷 敬仁, 東館 栄, 山口 高歩, 斎藤 宗雄, 「次世代の HPLC—超高速液体クロマトグラフィーシステム— を用いた医薬品成分の高速分離」, Chromatography, 2006, Vol. 27, No. 3, P. 131-134	1-9, 11-16

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求項 10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
“特別ページ”を参照のこと。
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 0 には「前記分離カラムは、親水性を備えた逆相モードのカラムであることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の液体クロマトグラフ」と記載されているとともに、「分離カラムと、該分離カラムに移動相を送液する移動相送液部と、前記分離カラム通過後の液体に対して反応試薬を送液する反応試薬送液部と、前記分離カラム通過後の液体と前記反応試薬を混合するジョイント部と、前記ジョイント部内の試料を検出する検出部とを備えた液体クロマトグラフであって、前記移動相送液部の耐圧が 4 0 M P a より大きく、前記分離カラムの充填剤の粒子径が 3 μ m より小さく、前記ジョイント部の容積は 1 μ L 以下であることを特徴とする液体クロマトグラフ」と記載されており、請求項 1 0 に係る発明は、どちらの「液体クロマトグラフ」であるのか特定できないことから、請求項 1 0 に係る発明は不明確である。