

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4148143号
(P4148143)

(45) 発行日 平成20年9月10日 (2008. 9. 10)

(24) 登録日 平成20年7月4日 (2008. 7. 4)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 30/80 (2006. 01)

GO 1 N 30/80 Z

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 30/80 C

GO 1 N 27/64 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 K

GO 1 N 30/84 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 V

GO 1 N 27/64 B

請求項の数 5 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-9927 (P2004-9927)
 (22) 出願日 平成16年1月19日 (2004. 1. 19)
 (65) 公開番号 特開2005-201828 (P2005-201828A)
 (43) 公開日 平成17年7月28日 (2005. 7. 28)
 審査請求日 平成18年5月8日 (2006. 5. 8)

(73) 特許権者 000001993
 株式会社島津製作所
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
 (74) 代理人 100085464
 弁理士 野口 繁雄
 (72) 発明者 岩田 庸助
 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
 株式会社島津製作所内
 (72) 発明者 福田 宏之
 神奈川県横浜市港北区太尾町 2002-1
 7 ヴェルピア大倉山 117 号

審査官 郡山 順

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ等の分画装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プレート上に液体クロマトグラフなどの送液機構から送液される試料液に添加剤溶液を添加して先端部から滴下させるプローブを備えた分画装置において、

前記プローブは前記添加剤溶液からの析出物を溶解する洗浄液を随時前記先端部に送ることのできる洗浄液流路を備えていることを特徴とする分画装置。

【請求項 2】

前記プローブの先端部は 3 重管構造であり、最内管を前記試料液が流れ、その外側の管を前記添加剤溶液が流れ、最外側の管が前記洗浄液流路となっている請求項 1 に記載の分画装置。

【請求項 3】

前記プローブは前記先端部に気体を随時供給して前記先端部を乾燥させる気体供給流路を備えている請求項 1 に記載の分画装置。

【請求項 4】

前記プローブの先端部は 3 重管構造であり、最内管を前記試料液が流れ、その外側の管を前記添加剤溶液が流れ、最外側の管が前記洗浄液流路と前記気体供給流路とを兼ねている請求項 3 に記載の分画装置。

【請求項 5】

前記添加剤溶液はマトリックス支援レーザ脱離イオン化による質量分析法で分析を行なうための試料作成用のマトリックス化合物の溶液であり、前記洗浄液は前記マトリックス

化合物を溶解する有機溶剤である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の分画装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HPLC（高速液体クロマトグラフ）などの送液機構から送液される試料液に添加剤溶液を添加して先端部からマイクロプレートやサンプルプレートなどのプレート上に滴下してサンプルを移動させるプローブを備えて、MALDI-TOF-MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析）などで分析するためのサンプルを調製するための分画装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

タンパク質やペプチドなどの構造や働きの解明を行なうプロテオーム解析の分野では、最近注目されているMALDI-TOF-MSなどを用いた分析が行なわれている。MALDI-TOF-MSは生体試料にマトリックス溶液を添加し乾燥させてサンプルとした後、レーザー光線を当てることによりイオン化して質量分析を行なう方法（非特許文献 1 参照。）であるが、その際使用される試料は数μLというような微量である。

質量分析に供する溶質種のイオン化を促進すべく、この溶質種を含有してなる試料溶液中にマトリックス試薬を大量に混入させ、このように作製した液体試料を所定のプレート上に滴下し、蒸発結晶化させることが知られている（特許文献 1 参照。）。マトリックス溶液の混入量に関して、（通常、その混入率はモル比で試料：マトリックス = 1：100～1：10000 程度であるとされている（特許文献 2 参照。）。

液体クロマトグラフィで分離した試料液を分取する際に添加剤溶液を添加してプローブ先端から滴下させる分画装置が知られている（特許文献 3 参照。）。

プローブの構造として複数の流路からなる多重管構造が知られている（特許文献 4 参照。）。

【0003】

マトリックス化合物として用いられるのは脂溶性物質であり、マトリックス溶液はマトリックス化合物を溶媒で高濃度に溶解した溶液である。マトリックス化合物はアセトニトリルなどの有機溶媒にはよく溶ける。しかし、液体クロマトグラフで生体試料を分離して溶出させマトリックス溶液を同時に添加して滴下させながら分画する場合、分画時間は通常 10 分以上である。プローブ先端部において高濃度のマトリックス溶液は常に大気と接しているために、経時的に溶媒は蒸発しており、結果として、プローブ先端でマトリックス化合物が析出する。

【0004】

マトリックス化合物がプローブ先端に析出するとプローブ先端とサンプルプレート間の距離が一定に保つことができないばかりでなく、滴下させる際の位置も定まらず、均一な液滴を作ることが困難になり不都合となる。

さらには、析出したマトリックス内にHPLCにより分離溶出してきた測定対象成分が取り込まれて正確な分析ができなくなる。

そのため、従来は、分画のための滴下に入る前にシリンジなどを用いて手動でプローブ先端をアセトンなどの溶剤で洗浄してプローブ先端に析出したマトリックス化合物を取り除いている。

【特許文献 1】特開 2000 - 56799 号公報

【特許文献 2】特開平 9 - 320515 号公報

【特許文献 3】特公昭 43 - 015879 号公報

【特許文献 4】実願昭 62 - 098095 号（実開昭 64 - 0051639 号）のマイクロフィルム

【非特許文献 1】田中耕一「マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法」，ぶんせき，4，pp. 253 - 261（1996）

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0005】**

分画動作の前にプローブ先端を手動で洗浄する操作は煩わしく、作業性も悪い。

そこで、本発明は添加剤溶液を添加した場合のプローブ先端への析出物を自動で洗浄することができるようにすることを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明は、プレート上に液体クロマトグラフなどの送液機構から送液される試料液に添加剤溶液を添加して先端部から滴下させるプローブを備えた分画装置において、前記プローブは添加剤溶液からの析出物を溶解する洗浄液を随時前記先端部に送ることができる洗浄液流路を備えていることを特徴とするものである。

10

【0007】

好ましい形態ではプローブの先端部は3重管構造となっており、最内管を試料液が流れ、その外側の管を前記添加剤溶液が流れ、最外側の管が前記洗浄液流路となっている。

前記プローブは先端部に気体を随時供給して先端部を乾燥させる気体供給流路を備えていてもよい。

その場合の好ましい形態では、プローブの先端部は3重管構造であり、最内管を試料液が流れ、その外側の管を添加剤溶液が流れ、最外側の管が前記洗浄液流路と前記気体供給流路とを兼ねている。

20

【0008】

前記添加剤溶液の一例はマトリックス支援レーザー脱離イオン化による質量分析法で分析を行なうための試料作成用のマトリックス化合物の溶液であり、その場合の前記洗浄液はマトリックス化合物を溶解する有機溶剤である。

【発明の効果】**【0009】**

本発明では洗浄液流路を備えてプローブ先端部に洗浄液を送るようにしたので、プローブ先端部に析出したマトリックス化合物を自動で除去することができるようになる。

プローブに残留した洗浄液を布で取り除く方法では、その際に布がプローブに触れるためプローブ位置がずれてしまい、滴下位置が正確でなくなってしまうことがあるが、プローブ先端から気体を噴出させて、洗浄後にプローブ先端部に残った洗浄液をその気体により乾燥させて蒸発させるようにすれば、液滴の滴下位置がずれることがなく、引き続き行なわれる生体試料の分画を均一に行なうことができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】**【0010】**

以下に一実施例を説明する。

図1は分画装置の一実施例を液体クロマトグラフとともに示す概略構成図である。

溶離液を送るポンプ48、試料を注入するインジェクター46、試料成分を分離するカラム44、及び検出器42を溶離液の流路に沿って配置した高速液体クロマトグラフの検出器42の下流にキャピラリー2を介して液滴を滴下するプローブ1が接続されている。

【0011】

40

プローブ1はT型3方ジョイントJ1、J2を備え、上流側のジョイントJ1は溶離液を送液するキャピラリー2とマトリックス溶液を送液する管16とを接続させ、下流側のジョイントJ2は空気及び洗浄液としてのアセトンを供給する管18を接続させ、プローブ1の出口側の先端部は3重管構造を形成している。

【0012】

溶離液がポンプ48によって送られ、インジェクター46から試料が注入される。インジェクター46に注入された試料はカラム44で成分ごとに分離され検出器42で検出される。溶離液はキャピラリー2を通過してプローブ1よりサンプルプレートS上に滴下され捕集される。

【0013】

50

溶離液に添加する添加剤溶液としてはマトリックス溶液を使用する。マトリックス化合物としては、ニコチン酸、2 - ピラジンカルボン酸、シナピン酸 (3 , 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸)、2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸、5 - メトキシサリチル酸、痼 - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸 (C H C A)、3 - ヒドロキシピコリン酸、ジアミノナフタレン、2 - (4 - ヒドロキシフェニルアゾ) 安息香酸、ジスラノール、コハク酸、5 - (トリフルオロメチル) ウラシル、グリセリン等を使用することができる。

【 0 0 1 4 】

このようなマトリックス化合物を溶解する洗浄液は、アセトン、アセトニトリルなどの有機溶剤である。

ここでは、マトリックス溶液として、例えば、C H C A (- シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸) を水とアセトニトリルの混合溶液で溶解した飽和溶液 (1 0 m g / m L) を使用し、洗浄液としてアセトンを使用する。

【 0 0 1 5 】

マトリックス溶液は、ポンプ 4 9 によって T 型 3 方ジョイント J 1 でキャピラリ 2 と接続されている管 1 6 中を送液され、キャピラリ 2 の外側を流れてプローブ 1 の先端部から試料成分を含む溶離液と同時に滴下される。

空気供給管 2 4 及び洗浄液供給管 2 6 は T 型 3 方ジョイント J 3 によって合流し、その共通の流路となっている配管 1 8 は 3 方 T 型ジョイント J 2 によって溶離液が流れるキャピラリ 2 及びマトリックス溶液が流れる管と接続され、空気及び洗浄液はマトリックス溶液が流れる管のさらに外側を流れるようになっている。洗浄液としては、ここでは例えばアセトンを使用する。

【 0 0 1 6 】

空気供給管 2 4 にはバルブ 2 8 が取り付けられており、バルブ 2 8 の開閉によって空気の供給が制御される。洗浄液供給管 2 6 にはポンプ 3 0 が設けられており、ポンプ 3 0 が動作することで洗浄液のアセトンが洗浄液供給管 2 6 を流れてプローブ 1 に供給される。

【 0 0 1 7 】

液体クロマトグラフからの溶離液を滴下する際は、サンプルプレート S に溶離液と同時にマトリックス溶液がプローブ 1 の先端より滴下される。液体の滴下後はマトリックス化合物がプローブ 1 の先端部に析出することがあるため、洗浄液供給管 2 6 より洗浄液のアセトンをプローブ 1 の先端部に供給し、プローブ 1 の先端部を洗浄する。プローブ 1 先端部の洗浄後、洗浄液がプローブ 1 の先端部に残留しないように、バルブ 2 8 を開いて空気をプローブ 1 先端部に供給し、プローブ 1 の先端部に残留した洗浄液を蒸発させる。

【 0 0 1 8 】

図 2 は一実施例のプローブを詳細に示す断面図である。

上流側の第 1 の T 型 3 方ジョイント J 1 の直交しないジョイント a , b の 2 つを高速液体クロマトグラフからの溶離液が送液される一番細いキャピラリ 2 が横断している。上流側のジョイント a はスリーブ 1 2 を介し、メイルナットなどの配管部品 1 0 a を用いて密封されている。

【 0 0 1 9 】

T 型 3 方ジョイント J 1 の直交するジョイント c にはマトリックス溶液が送液される配管 1 6 が接続され、メイルナットなどの配管部品 1 0 c で密封されている。一番細いキャピラリ 2 が出ているジョイント b では、キャピラリ 2 にキャピラリ 4 が被せられ、スリーブ 2 2 を介してメイルナットなどの配管部品 1 0 b を用いて密封されている。

【 0 0 2 0 】

下流側の T 型 3 方ジョイント J 2 には、上流側のジョイント a からキャピラリ 2 , 4 が挿入され、スリーブ 3 2 を介してメイルナットなどの配管部品 2 0 a を用いて密封されている。キャピラリ 2 , 4 と直交するジョイント c には空気及び洗浄液のアセトンを供給する管 1 8 が接続され、メイルナットなどの配管部品 2 0 c で密封されている。最も下流側のジョイント b では、キャピラリ 2 , 4 に配管 8 が被せられ、メイルナットなどの配管部品 2 0 b を用いて密封されている。

【 0 0 2 1 】

T型3方ジョイントJ2の側方に位置するT型3方ジョイントJ3には、ジョイントaから空気供給管24が挿入され、ジョイントbからT型3方ジョイントJ2と接続する配管18が挿入され、ジョイントcから洗浄液供給管26が挿入されて、それぞれの管24, 18, 26がメイルナットなどの配管部品30a, 30b, 30cを用いて密封されている。

【 0 0 2 2 】

空気供給管24にはバルブ28が設けられており、バルブ28が開閉することにより空気のプローブ1先端部への供給のオン/オフが切り換えられる。洗浄液供給管26にはポンプ29が設けられており、ポンプ29の動作のオン/オフによってアセトンが配管18

10

【 0 0 2 3 】

マトリックス溶液は脂溶性物質であるマトリックス化合物を溶媒で高濃度に溶解した溶液であるため、液体クロマトグラフで試料を分離して溶出させマトリックス溶液を同時に添加して滴下させながら分画を続けていると、プローブ先端部においてマトリックス溶液が大気と接して溶媒が蒸発し、プローブ先端でマトリックス化合物が析出する。

【 0 0 2 4 】

そこで、分析終了後又は次の分析前にポンプ29を作動させてアセトンを例えば200μL送液し、プローブ1の先端部をアセトンで洗浄する。ポンプ29より送り出されたアセトンは乾燥蒸発用ガスラインと接続させるためのT型ジョイントJ3を経由してプローブ1の2重管と3重管の間を流れてプローブ1先端部に固着したマトリックス化合物を洗い流す。その後、乾燥蒸発用ガスバルブ28を開き、残留したアセトンを蒸発させる。

20

【 0 0 2 5 】

この実施例のように、空気供給管24と洗浄液供給管26とをT型ジョイントを用い手接続した場合には、アセトンなどの洗浄液がガスバルブ28側に逆流しないよう流路抵抗を調節するのが好ましい。例えば、空気供給管24として内径0.1mmで長さが100mm程度の配管を使用する。

T型ジョイントJ3の代わりに3方電磁弁を用いてもよく、その場合には洗浄液がガスバルブ28側に逆流を考慮しなくてもすむ。

【図面の簡単な説明】

30

【 0 0 2 6 】

【図1】分画装置の一実施例を液体クロマトグラフとともに示す概略構成図である。

【図2】一実施例のプローブを詳細に示す断面図である。

【符号の説明】

【 0 0 2 7 】

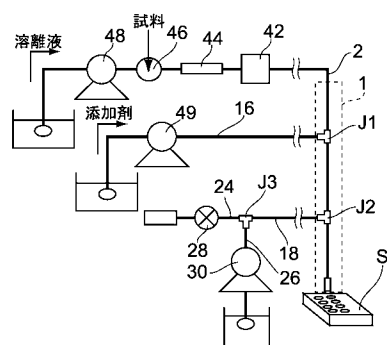
1	プローブ	
2, 4	キャピラリ	
8	配管	
10a, 10b, 10c, 20a, 20b, 20c, 30a, 30b, 30c	配管部品	
12, 22, 32	スリーブ	
16	添加剤供給管	
18	接続管	
24	空気供給管	
26	洗浄液供給管	
28	バルブ	
42	検出器	
44	カラム	
46	インジェクター	
30, 48, 49	ポンプ	
S	サンプル容器	

40

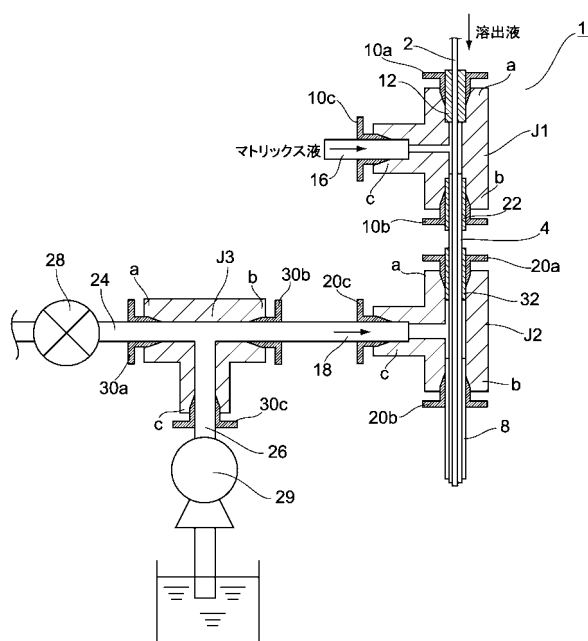
50

J 1 , J 2 , J 3 T 型 3 方ジョイント

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 30/84 A

(56)参考文献 特開平 0 7 - 2 1 8 5 1 3 (J P , A)
米国特許第 0 5 7 7 0 2 7 2 (U S , A)
米国特許第 0 5 7 7 2 9 6 4 (U S , A)
国際公開第 0 3 / 0 4 4 5 2 6 (W O , A 1)
特開 2 0 0 0 - 0 8 8 7 1 7 (J P , A)
米国特許第 0 4 9 7 7 7 8 5 (U S , A)
特開 2 0 0 4 - 3 5 4 2 2 2 (J P , A)
特開 2 0 0 5 - 0 3 0 9 6 9 (J P , A)
特開 2 0 0 5 - 1 9 5 4 1 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 0 / 8 0
G 0 1 N 2 7 / 6 2
G 0 1 N 2 7 / 6 4
G 0 1 N 3 0 / 8 4