

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6979576号
(P6979576)

(45) 発行日 **令和3年12月15日(2021. 12. 15)**

(24) 登録日 令和3年11月18日(2021. 11. 18)

(51) Int. Cl.	F 1		
GO 1 N 30/26 (2006. 01)	GO 1 N 30/26	M	
GO 1 N 30/86 (2006. 01)	GO 1 N 30/86	R	
GO 1 N 30/46 (2006. 01)	GO 1 N 30/46	A	
GO 1 N 30/88 (2006. 01)	GO 1 N 30/88	C	

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2017-65874 (P2017-65874)	(73) 特許権者	309015019 地方独立行政法人青森県産業技術センター 青森県黒石市田中8 2 番地 9
(22) 出願日	平成29年3月29日 (2017. 3. 29)	(73) 特許権者	501168814 国立研究開発法人水産研究・教育機構 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目 1 番地 2 5
(65) 公開番号	特開2018-169257 (P2018-169257A)	(74) 代理人	100108914 弁理士 鈴木 壯兵衛
(43) 公開日	平成30年11月1日 (2018. 11. 1)	(72) 発明者	▲高▼坂 祐樹 青森県東津軽郡平内町大字茂浦字月泊 1 0 地方独立行政法人青森県産業技術センタ ー 水産総合研究所内
審査請求日	令和2年3月18日 (2020. 3. 18)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 移動相となる液体を第 1 流量で吐出する第 1 ポンプと、
 第 1 固定相となる物質を保持し、前記第 1 ポンプによって吐出される前記第 1 移動相により、第 1 分析種及び第 2 分析種を含む試料溶液が導入される前処理カラムと、
 第 2 移動相となる液体を前記第 1 流量より大きい第 2 流量で吐出する第 2 ポンプと、
 前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種の吸着力が前記第 1 固定相より強く、前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を吸着した場合、前記第 1 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させず、前記第 2 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させる第 2 固定相となる物質を保持する分析カラムと、
 前記第 2 ポンプと前記分析カラムとの間を接続し、前記分析カラムには前記第 2 移動相が流れる第 1 ポジション、又は、前記前処理カラムと前記分析カラムとの間を接続し、前記分析カラムには前記前処理カラムを介して前記第 1 移動相が流れる第 2 ポジションに流路を切り替えるスイッチングバルブと、
 前記第 1 分析種が前記前処理カラムからの溶出を開始するタイミングで前記第 2 ポジションに切り替え、前記第 1 分析種が前記前処理カラムからの溶出を終了するタイミングで前記第 1 ポジションに切り替え、前記第 2 分析種が前記前処理カラムからの溶出を開始するタイミングで前記第 2 ポジションに切り替え、前記第 2 分析種が前記前処理カラムからの溶出を終了するタイミングで前記第 1 ポジションに切り替えるように前記スイッチングバルブを自動制御するコントローラと、

を備え、前記第 1 及び第 2 分析種を含む複数成分を連続的に分離分析することを特徴とする複数成分連続分離分析装置。

【請求項 2】

前記第 2 ポジションが規定する前記第 2 ポンプの流路の下流側に含まれるように、前記スイッチングバルブに接続された抵抗管を更に備えることを特徴とする請求項 1 に記載の複数成分連続分離分析装置。

【請求項 3】

前記第 1 分析種がオカダ酸であり、前記第 2 分析種がジノフィシストキシン - 1 であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の複数成分連続分離分析装置。

【請求項 4】

前記第 1 固定相は、シアノプロピル基を有し、前記第 2 固定相は、トリアコンチル基を有することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の複数成分連続分離分析装置。

【請求項 5】

前記第 2 移動相が 100% アセトニトリルであることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の複数成分連続分離分析装置。

【請求項 6】

第 1 固定相となる物質が保持された前処理カラムに、第 1 分析種及び第 2 分析種を含む試料溶液を、第 1 流量の第 1 移動相を介して導入するステップと、

前記第 1 分析種が溶出するタイミングで、前記第 1 移動相を、前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種の吸着力が前記第 1 固定相より強く、前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を吸着した場合、前記第 1 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させず、前記第 2 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させる第 2 固定相となる物質を保持する分析カラムに前記前処理カラムから導入し、前記分析カラムの入り口で前記第 1 分析種を濃縮するステップと、

前記第 1 分析種が溶出を終了するタイミングで、前記前処理カラムからの前記第 1 移動相の導入を停止し、第 2 移動相となる液体を前記第 1 流量より大きい第 2 流量で前記分析カラムに導入し、前記第 2 移動相により前記第 1 分析種の画分を進行させるステップと、

前記第 2 分析種が溶出を開始するタイミングで、前記第 1 移動相を前記分析カラムに前記前処理カラムから導入し、前記分析カラムの入り口で前記第 2 分析種を濃縮するステップと、

前記第 2 分析種が溶出を終了するタイミングで、前記前処理カラムからの前記第 1 移動相の導入を停止し、前記第 2 移動相となる液体を前記第 2 流量で前記分析カラムに導入し、前記第 2 移動相により前記第 2 分析種の画分を進行させるステップと、

を含み、前記第 1 及び第 2 分析種を含む複数成分を連続的に分離分析することを特徴とする複数成分連続分離分析方法。

【請求項 7】

第 1 固定相となる物質が保持された前処理カラムに、第 1 分析種及び第 2 分析種を含む試料溶液を、第 1 流量の第 1 移動相を介して導入させる命令と、

前記第 1 分析種が溶出するタイミングで、前記第 1 移動相を、前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種の吸着力が前記第 1 固定相より強く、前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を吸着した場合、前記第 1 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させず、前記第 2 移動相では前記第 1 分析種及び前記第 2 分析種を脱離させる第 2 固定相となる物質を保持する分析カラムに前記前処理カラムから導入させ、前記分析カラムの入り口で前記第 1 分析種を濃縮させる命令と、

前記第 1 分析種が溶出を終了するタイミングで、前記前処理カラムからの前記第 1 移動相の導入を停止し、第 2 移動相となる液体を前記第 1 流量より大きい第 2 流量で前記分析カラムに導入し、前記第 2 移動相により前記第 1 分析種の画分を進行させる命令と、

前記第 2 分析種が溶出を開始するタイミングで、前記第 1 移動相を前記分析カラムに前記前処理カラムから導入させ、前記分析カラムの入り口で前記第 2 分析種を濃縮させる命

10

20

30

40

50

令と、

前記第2分析種が溶出を終了するタイミングで、前記前処理カラムからの前記第1移動相の導入を停止し、前記第2移動相となる液体を前記第2流量で前記分析カラムに導入し、前記第2移動相により前記第2分析種の画分を進行させる命令と、

を含む一連の命令による処理をコンピュータに実行させ、前記前処理カラムと前記分析カラムとの間の流路を切り替えるスイッチングバルブを自動制御して、前記第1及び第2分析種を含む複数成分を連続的に分離分析することを特徴とする複数成分連続分離分析プログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラムに関する。

【背景技術】

【0002】

貝毒とは、貝類が特定の有毒プランクトンを捕食して毒素を蓄積し、その貝類を食べることによる食中毒である。これに対して、貝類の毒量のモニタリングが定期的に行われており、食の安全が確保されている。下痢性貝毒(DSP)は、貝毒の一種であり、日本では主に東日本から北海道の範囲で、世界ではEU、米国、韓国、オーストラリア等の多くの地域で発生する。毒の蓄積する種は、ホタテガイ、マガキ、アサリ、イガイ類(ムール貝)、アカザラガイ、イタヤガイ、コタマガイ、チョウセンハマグリ、マボヤ、カニ類など多種多様である。

20

【0003】

非特許文献1は、DSP毒素として、9-アントリルジアゾメタン(ADAM)により誘導体化されたオカダ酸(OA)類似体を検出する高速液体クロマトグラム(HPLC)法を開示する。非特許文献1に記載の方法によれば、自動的にカラムの接続を切り替えることにより、カラムの洗浄を単純化することができる。分析対象成分となるOA類似体は、少なくともOA及びジノフィシストキシン-1(DTX1)を含む。しかしながら、非特許文献1に記載の方法では、一度の試料注入で複数の分析種を分離分析する場合、クロマトグラムのピーク等が重なる箇所が発生する。

30

【0004】

クロマトグラムのピーク等が重なる場合は、1回目の分析でサンプル注入 第1分析種を含む成分の切り取り 第1分析種の定量した後、2回目の分析でサンプル注入 第2分析種を含む成分の切り取り 第2分析種の定量を行わなければならない。このように、非特許文献1に記載の発明によっては、一度の試料注入に対して単一の分析種しか分析できない場合が発生する。即ち、非特許文献1に記載の発明によっては、複数種類の分析種を分離分析する場合、例えば、DSP毒素の測定の場合に問題となるように、サンプルの種類によっては、分析種の種類の数だけ分析過程を繰り返す必要があるので測定に長時間を要する。

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】内田肇他8名、「カラムスイッチングによる自動試料洗浄を用いた9-アントリルメチルエステルとしてのオカダ酸類似体検出のための簡便なHPLC法(A Convenient HPLC Method for Detection of Okadaic Acid Analogs as 9 Anthrylmethyl Esters with Automated Sample Cleanup by Column Switching)」、AOAC International Journal of AOAC International、第97巻、第2号、2014年、p.391-397

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 6 】

本発明は、上記問題点を鑑み、クロマトグラムのピーク等が重なる分析種が含まれている場合であっても、1回の分析過程で複数種類の分析種を連続的に分離分析することができる複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラム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 】

【 0 0 0 7 】

本発明の第1の態様は、(a)第1移動相となる液体を第1流量で吐出する第1ポンプと、(b)第1固定相となる物質を保持し、第1ポンプによって吐出される第1移動相により、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を導入する前処理カラムと、(c)第2移動相となる液体を第1流量より大きい第2流量で吐出する第2ポンプと、(d)第2固定相となる物質を保持する分析カラムと、(e)第2ポンプと分析カラムとの間を接続する第1ポジション、又は、前処理カラムと分析カラムとの間を接続する第2ポジションに流路を切り替えるスイッチングバルブと、(f)第1分析種及び第2分析種のそれぞれが、前処理カラムからの溶出を開始するタイミングで第2ポジションに切り替え、前処理カラムからの溶出を終了するタイミングで第1ポジションに切り替えるようにスイッチングバルブを自動制御するコントローラを備える複数成分連続分離分析装置であることを要旨とする。第1の態様に係る複数成分連続分離分析装置は、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を一度注入すれば、第1及び第2分析種を含む複数成分を、1回の分析過程で連続的に分離分析する。

【 0 0 0 8 】

本発明の第2の態様は、(a)第1固定相となる物質が保持された前処理カラムに、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を、第1流量の第1移動相を介して導入するステップと、(b)第1分析種が溶出するタイミングで、第1移動相を、第2固定相となる物質を保持する分析カラムに前処理カラムから導入するステップと、(c)第1分析種が溶出を終了するタイミングで、前処理カラムからの導入を停止し、第2移動相となる液体を第1流量より大きい第2流量で分析カラムに導入し、第2移動相により第1分析種の画分を進行させるステップと、(d)第2分析種が溶出を開始するタイミングで、第1移動相を分析カラムに前処理カラムから導入するステップと、(e)第2分析種が溶出を終了するタイミングで、前処理カラムからの導入を停止し、第2移動相となる液体を第2流量で分析カラムに導入し、第2移動相により第2分析種の画分を進行させるステップを含む複数成分連続分離分析方法であることを要旨とする。第2の態様に係る複数成分連続分離分析装置は、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を一度注入すれば、第1及び第2分析種を含む複数成分を、1回の分析過程で連続的に分離分析することができる。

【 0 0 0 9 】

本発明の第2の態様で述べた複数成分連続分離分析方法を実現するためのプログラムは、コンピュータ読取り可能な記録媒体に保存し、この記録媒体をコンピュータシステムによって読み込ませることにより、本発明の複数成分連続分離分析方法を実行することができる。すなわち、本発明の第3の態様は、(a)第1固定相となる物質が保持された前処理カラムに、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を、第1流量の第1移動相を介して導入させる命令と、(b)第1分析種が溶出するタイミングで、第1移動相を、第2固定相となる物質を保持する分析カラムに前処理カラムから導入させる命令と、(c)第1分析種が溶出を終了するタイミングで、前処理カラムからの導入を停止し、第2移動相となる液体を第1流量より大きい第2流量で分析カラムに導入し、第2移動相により第1分析種の画分を進行させる命令と、(d)第2分析種が溶出を開始するタイミングで、第1移動相を分析カラムに前処理カラムから導入させる命令と、(e)第2分析種が溶出を終了するタイミングで、前処理カラムからの導入を停止し、第2移動相となる液体を第2流量で分析カラムに導入し、第2移動相により第2分析種の画分を進行させる命令を含む一連の命令による処理をコンピュータに実行させる複数成分連続分離分析プログラムであることを要旨とする。第3の態様に係る複数成分連続分離分析プログラムは、前処理カラムと分析カラム

との間の流路を切り替えるスイッチングバルブを自動制御して、第1分析種及び第2分析種を含む試料溶液を一度注入すれば、第1及び第2分析種を含む複数成分を、1回の分析過程で連続的に分離分析することができる。第3の態様に係る複数成分連続分離分析プログラムを記録する「記録媒体」とは、例えばコンピュータの外部メモリ装置、半導体メモリ、磁気ディスク、光ディスク、光磁気ディスク、磁気テープなどのプログラムを記録することができるような媒体などを意味する。具体的には、フレキシブルディスク、CD-ROM、MOディスク、カセットテープ、オープンリールテープなどが「記録媒体」に含まれる。

【発明の効果】

【0010】

本発明の複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラムによれば、クロマトグラムのピーク等が重なる分析種が含まれている場合であっても、1回の分析過程で複数種類の分析種を連続的に分離分析することができるので、簡単且つ短時間の高効率測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の基本的な構成を説明する模式的なブロック図である。

【図2】本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置のスイッチングバルブが第1ポジションの場合の流路を説明する図である。

【図3】本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置のスイッチングバルブが第2ポジションの場合の流路を説明する図である。

【図4】本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の動作の一例を説明するフローチャートである。

【図5】前処理カラムに検出器を接続して得られる、溶出時間を決定するためのクロマトグラムの成功例である。

【図6】前処理カラムに検出器を接続して得られる、溶出時間を決定するためのクロマトグラムの失敗例である。

【図7】カラムスイッチングにより得られる、分析種の定量のためのクロマトグラムの成功例である。

【図8】カラムスイッチングにより得られる、分析種の定量のためのクロマトグラムの失敗例である。

【図9】カラムスイッチングにより得られる、分析種の定量のためのクロマトグラムの失敗例である。

【図10】カラムスイッチングにより得られる、分析種の定量のためのクロマトグラムの失敗例である。

【図11】従来法における分析条件及び本発明の実施の形態における分析条件を示す表である。

【図12】本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析カラムとして2本のカラムを使用する場合の液体クロマトグラフィーの構成を説明する図である。

【図13】毒素が0.063 mg/kgで添加されたホタテガイの毒量を分析した結果を示すクロマトグラムである。

【図14】毒素が0.032 mg/kgで添加されたホタテガイの毒量を分析した結果を示すクロマトグラムである。

【図15】毒素が0.006 mg/kgで添加されたホタテガイの毒量を分析した結果を示すクロマトグラムである。

【図16】毒素が0.101 mg/kgで添加されたムラサキイガイの毒量を分析した結果を示すクロマトグラムである。

【図17】毒素が1.00 mg/kgで添加されたアサリの毒量を分析した結果を示すクロマトグラムである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、図面を参照して、本発明の実施の形態を説明する。図面の記載において、同一又は類似の部分には同一又は類似の符号を付し、重複する説明を省略する。但し、以下に示す実施の形態は、本発明の技術的思想を具体化するための装置、この装置を用いた方法やプログラムを、代表的な分析対象成分を用いて例示するものであって、本発明の技術的思想は、下記の実施の形態に例示した分析対象成分、装置、方法及びプログラムに特定するものでない。本発明の技術的思想は、特許請求の範囲に記載された技術的範囲内において、種々の変更を加えることができる。

【0013】

(分離分析装置)

本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、図1に示すように、分析種を固定相及び移動相との相互作用の差を利用して分離する分析種分離部10と、分析種分離部10に接続され分析種分離部10の溶出液に含まれる分析種を検出する検出器20と、分析種分離部10及び検出器20を制御するコントローラ30とを備える液体クロマトグラフィー(LC)分析装置である。以下の本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、例えば、オカダ酸(OA)類似体等の遊離脂肪酸を分析対象成分とするLC分析装置について例示的に記載するが、遊離脂肪酸を分析対象成分とする場合に限定されるものではない。なお、OA類似体は、OA、ジノフィシストキシン-1(DTX1)及びジノフィシストキシン-2(DTX2)を含む。

【0014】

分析種分離部10は、ミキサー11と、第1ポンプ12と、インジェクタ13と、前処理カラム14と、第2ポンプ15と、スイッチングバルブ16と、分析カラム17と、抵抗管18を収納する機器本体である。分析種分離部10に内蔵される前処理カラム14及び分析カラム17は、それぞれの固定相として、粒子径が約1~3 μ m程度の充填剤を使用し、超高压に耐えうる耐圧を有するカラムである。実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析カラム17は、非特許文献1に記載された「濃縮カラム」と「分析カラム」を一体化した構造となっている。即ち、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析カラム17は、非特許文献1に記載された「濃縮カラム」の位置に接続され、非特許文献1に記載された「分析カラム」の位置にはカラムが存在しない。

【0015】

即ち、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析種分離部10は、超高速液体クロマトグラム(UHPLC)に用いることのできる超高耐圧カラムを備えている。UHPLCは、超高耐圧カラムを備えることにより、カラムにおける圧力が高速液体クロマトグラム(HPLC)の数倍になり、HPLCより高速の分析が可能であり、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の高速性、測定時間の短縮性能をより有効に発揮できる。

【0016】

ミキサー11は、第1溶媒s1及び第2溶媒s2を所定の割合で混合して第1移動相m1を生成し、ミキサー11に接続された第1ポンプ12に供給する。第1溶媒s1は、例えば純水であり、第2溶媒s2は、例えば100%のアセトニトリルを採用可能である。第1溶媒s1及び第2溶媒s2は、ギ酸、ギ酸アンモニウム等の塩の添加が不要である。

【0017】

第1ポンプ12は、ミキサー11から供給された第1移動相m1を第1流量で吐出する。インジェクタ13は、第1ポンプ12と前処理カラム14との間に接続され、第1流量で流れる第1移動相m1に試料溶液を注入する。試料溶液は、OA及びDTX1のように、少なくとも第1分析種及び第1分析種と異なる第2分析種を含む。

【0018】

インジェクタ13に接続された前処理カラム14は、試料溶液中の分析種と相互作用する第1固定相を内部に保持する。第1固定相は、例えばシアノプロピル基を有する、粒子径が1~3 μ mのシリカゲル粒子からなる。前処理カラム14は、第1ポンプ12及びイ

10

20

30

40

50

ンジェクタ 13 の下流側に接続され、導入された試料溶液を各分析種の極性毎に分離して溶出する。

【0019】

スイッチングバルブ 16 は、円周状に配置された第 1 ポート p1 ~ 第 6 ポート p6 を有する 6 方自動スイッチングバルブである。スイッチングバルブ 16 は、第 1 ポート p1 ~ 第 6 ポート p6 間の接続が異なる第 1 ポジション及び第 2 ポジションを有し、第 1 ポジション又は第 2 ポジションに切り替えることにより分析種分離部 10 の流路を切り替える流路切り替え装置である。

【0020】

実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析カラム 17 が、非特許文献 1 に記載された「濃縮カラム」の位置に接続されているので、分析カラム 17 はスイッチングバルブ 16 の第 2 ポート p2 に直結される。

【0021】

第 2 ポンプ 15 は、スイッチングバルブ 16 の第 3 ポート p3 と第 2 溶媒 s2 の溶媒容器の間に接続されている。例えば、第 2 溶媒 s2 を第 2 移動相 m2 として、第 2 ポンプ 15 は第 1 ポンプ 12 の第 1 流量より大きい第 2 流量で吐出することが、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の一つの特徴である。即ち、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、第 2 移動相 m2 をなす第 2 溶媒 s2 を、第 1 移動相 m1 をなす第 1 溶媒 s1 よりも大きな流量で吐出する。分析カラム 17 は、スイッチングバルブ 16 の第 2 ポート p2 と検出器 20 との間に接続され、試料溶液中の分析種との相互作用が第 1 固定相より強い第 2 固定相を内部に保持する。第 2 固定相は、例えばトリアコンチル基を有する、粒子径が 1 ~ 3 μm のシリカゲル粒子からなる。

【0022】

上述したように、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析カラム 17 は、非特許文献 1 に記載された濃縮カラムと分析カラムを一体化した構造を一つの特徴としている。即ち、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、非特許文献 1 に記載された「分析カラム」の位置にはカラムが存在しない。非特許文献 1 に記載された分析カラムの位置に何もなくなるため、バルブ切り替え時に第 2 ポンプ 15 の圧力がゼロになってしまう。これによりバルブ復帰時の圧力回復が遅れ、結果に支障が出る場合もある。このため、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、スイッチングバルブ 16 の第 4 ポート p4 に抵抗管 18 が接続されている。第 4 ポート p4 に抵抗管 18 を接続することにより、液体の流れに抵抗を付与することにより流路の圧力を調整し、バルブ切り替え時に第 2 ポンプ 15 の圧力がゼロになってしまう問題を解決している。

【0023】

また、第 3 ポート p3 は第 2 ポンプ 15 の下流側に、第 4 ポート p4 は抵抗管 18 の上流側に、第 5 ポート p5 は抵抗管 18 の下流側に接続される。そして、スイッチングバルブ 16 の第 1 ポート p1 は、前処理カラム 14 の下流側に接続され、第 6 ポート p6 は、廃液容器 w に接続される。

【0024】

スイッチングバルブ 16 は、第 1 ポジションにおいて、図 2 に示すように、第 1 ポート p1 及び第 6 ポート p6、第 2 ポート p2 及び第 3 ポート p3、第 4 ポート p4 及び第 5 ポート p5 の各間を接続する。スイッチングバルブ 16 は、図 3 に示すように、第 2 ポジションにおいて、第 1 ポート p1 及び第 2 ポート p2、第 3 ポート p3 及び第 4 ポート p4、第 5 ポート p5 及び第 6 ポート p6 の各間を接続する。

【0025】

分析カラム 17 の下流側に接続された検出器 20 は、例えば蛍光分光光度計等の蛍光検出器 (FLD) からなる。検出器 20 は、分析種分離部 10 の溶出液に特定波長の励起光を照射して分析種の蛍光強度を測定することにより、試料溶液の成分を分析する。

【0026】

コントローラ 30 は、図 1 に示すように入力装置 31 と、出力装置 32 と、記憶装置 3

3と、処理装置40とを備えるコンピュータである。入力装置31は、例えば、キーボード、ポインティングデバイス、各種スイッチや入力コネクタ等含む入力インターフェースからなる。出力装置32は、液晶ディスプレイ等の表示装置、スピーカ、プリンタ等の出力インターフェースからなる。

【0027】

記憶装置33は、分析条件ファイル34と、溶出時間ファイル35を格納する。記憶装置33は、半導体メモリやディスクメディア等のコンピュータにより読み取り可能な媒体である記憶装置からなり、レジスタ、キャッシュメモリ、主記憶装置等を含み得る。例えば、図1に示すコンピュータシステムにおいて、記憶装置33は、複数のレジスタ、複数のキャッシュメモリ、主記憶装置、補助記憶装置を含む一群の内から適宜選択された任意の組み合わせとすることも可能である。又、キャッシュメモリは1次キャッシュメモリと2次キャッシュメモリの組み合わせとしてもよく、更に3次キャッシュメモリを備えるヒエラルキーを有しても構わない。その他、記憶装置33は、本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の動作に必要な一連の処理を示す制御プログラム(分離分析プログラム)や、分析種の検量に必要な標準物質のクロマトグラムに関するデータ等を格納する。

【0028】

分析条件ファイル34は、第1溶媒s1及び第2溶媒s2の種類、第1移動相m1の組成比、第1ポンプ12の第1流量、第2ポンプ15の第2流量、前処理カラム14及び分析カラム17の温度等、分析種分離部10による分析種の分離に必要な各種データを含むデータファイルである。分析条件ファイル34は、その他、検出器20の励起光波長、検出する蛍光波長等、検出器20による蛍光強度の測定に必要な各種データを含む。

【0029】

溶出時間ファイル35は、試料溶液に含まれる各分析種が、前処理カラム14から溶出する間の時間に関する情報を格納したデータファイルである。溶出時間ファイル35は、例えば、インジェクタ13により試料溶液が流路に注入された時刻を基準として、各分析種の前処理カラム14からの溶出が開始する溶出開始時刻と、溶出が終了する溶出終了時刻とを含むトランザクションファイルである。

【0030】

処理装置40のハードウェア資源の構成は、例えば図1のように、分析条件設定部41、溶出時間設定部42、LC制御部43、FLD制御部44等の論理演算回路を論理構造として有するブロック図として論理的に表現できる。例えば、図1に示した処理装置40を、マイクロチップとして実装されたマイクロプロセッサ(MPU)等を用いた中央演算処理装置(CPU)等として、コンピュータシステムを構成することが可能である。又、コンピュータシステムを構成する処理装置40として、算術演算機能を強化し信号処理に特化したデジタルシグナルプロセッサ(DSP)や、メモリや周辺回路を搭載し組み機器制御を目的としたマイクロコントローラ(マイコン)等を用いてもよい。或いは、現在の汎用コンピュータのメインCPUを処理装置40に用いてもよい。

【0031】

更に、処理装置40の一部の構成又はすべての構成をフィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ(FPGA)のようなプログラマブル・ロジック・デバイス(PLD)で構成してもよく、各機能を実行するようにアレンジされた特定用途向け集積回路(ASIC)や回路部品等の装置であってもよい。PLDによって、処理装置40の一部又はすべてを構成した場合は、記憶装置33は、PLDを構成する論理ブロックの一部に含まれるメモリブロック等のメモリ要素として構成することができる。更に、処理装置40は、CPUコア風のアレイとPLD風のプログラム可能なコアを同じチップに搭載した構造でもよい。このCPUコア風のアレイは、あらかじめPLD内部に搭載されたハードマクロCPUと、PLDの論理ブロックを用いて構成したソフトマクロCPUを含む。

【0032】

つまりPLDの内部においてソフトウェア処理とハードウェア処理を混在させた構成で

もよい。いずれにせよ、処理装置 40 は、コントローラ 30 にインストールされた制御プログラムを実行することにより、分析条件設定部 41、溶出時間設定部 42、LC 制御部 43 及び FLD 制御部 44 を実現する。

【0033】

分析条件設定部 41 は、入力装置 31 により入力された情報に応じて、分析条件ファイル 34 のデータを設定し、記憶装置 33 に格納する。例えば、分析条件設定部 41 は、ディスプレイ及び入力装置 31 を用いて、予め用意された複数の選択肢から各条件をユーザに選択させたり、条件となる各値を入力させたりすることにより分析条件ファイル 34 のデータを取得する。

【0034】

溶出時間設定部 42 は、入力装置 31 により入力された情報に応じて、溶出時間ファイル 35 のデータを設定し、記憶装置 33 に格納する。溶出時間ファイル 35 のデータは、前処理カラム 14 までの流路を試料溶液の分析と同一の条件として、標準物質の前処理カラム 14 からの溶出時間を取得することにより決定される。溶出時間ファイル 35 のデータは、検出器 20 から自動的に取得されてもよく、ユーザの入力操作により取得されてもよい。

【0035】

LC 制御部 43 は、記憶装置 33 に格納された分析条件ファイル 34 のデータ、溶出時間ファイル 35 のデータ及び制御プログラムに基づいて、分析種分離部 10 の動作を制御する。即ち、LC 制御部 43 は、ミキサー 11、第 1 ポンプ 12、インジェクタ 13、第 2 ポンプ 15 及びスイッチングバルブ 16 に加えて、前処理カラム 14 及び分析カラム 17 の温度を調節するカラムオープンの動作を制御する。

【0036】

FLD 制御部 44 は、記憶装置 33 に格納された分析条件ファイル 34 のデータ及び制御プログラムに基づいて、検出器 20 の動作を制御する。具体的には、FLD 制御部 44 は、励起光の波長、検出する蛍光波長を含む分析条件ファイル 34 のデータを記憶装置 33 から読み出し、検出器 20 に設定することにより、分析カラム 17 からの溶出液の蛍光強度を検出器 20 に測定させる。

【0037】

(分離分析方法)

図 4 のフローチャートを参照して、本発明の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の動作の一例を説明する。初期状態において、スイッチングバルブ 16 は、LC 制御部 43 の制御により第 1 ポジションに切り替えられる。分析カラム 17 は、スイッチングバルブ 16 が第 1 ポジションである間、第 2 ポンプ 15 により第 2 移動相 m2 が流され続けることにより、非特許文献 1 に記載された「濃縮カラム」と「分析カラム」の両方の機能をなして、安定した平衡状態を維持する。

【0038】

まず、図 4 のステップ S1 において、LC 制御部 43 は、予め設定された分析条件ファイル 34 のデータ及び溶出時間ファイル 35 のデータを記憶装置 33 から読み込む。また、ミキサー 11 は、LC 制御部 43 の制御に応じて、分析条件ファイル 34 に格納された初期状態のデータにおける組成比となるように、第 1 溶媒 s1 及び第 2 溶媒 s2 を混合して第 1 移動相 m1 を生成する。

【0039】

ステップ S2 において、LC 制御部 43 は、第 1 ポンプ 12、第 2 ポンプ 15 及びインジェクタ 13 の駆動を開始する。第 1 ポンプ 12 は、ミキサー 11 から供給される第 1 移動相 m1 を第 1 流量で吐出する。第 2 ポンプ 15 は、第 2 溶媒 s2 を第 2 移動相 m2 として、第 1 流量より大きい第 2 流量で吐出する。

【0040】

ステップ S3 において、LC 制御部 43 は、第 1 流量で流れる第 1 移動相 m1 に予め調整された試料溶液を所定量注入するようにインジェクタ 13 を制御する。LC 制御部 43

10

20

30

40

50

は、第1流量で流れる第1移動相m1にインジェクタ13により試料が注入された時刻からの経過時間をカウントする。試料溶液は、第1ポンプ12から吐出される第1移動相m1と共に前処理カラム14に向かって流れる。

【0041】

ステップS4において、前処理カラム14は、第1ポンプ12から吐出される第1移動相m1により試料溶液を導入する。前処理カラム14は、試料溶液に含まれる各成分と第1固定相との相互作用により、試料溶液の各成分を極性に依りて分離して試料溶液を展開する。このとき、スイッチングバルブ16は第1ポジション(図2参照)であるため、前処理カラム14からの溶出液は、第6ポートp6に接続された廃液容器wに流出する。

【0042】

ステップS5において、LC制御部43は、ステップS3でカウントを開始した経過時間が、ステップS1で読み込んだ溶出開始時刻に一致するタイミングで、スイッチングバルブ16を第2ポジション(図3参照)に切り替える。即ち、スイッチングバルブ16は、分析種が前処理カラム14からの溶出を開始する時刻で、前処理カラム14と分析カラム17との間を接続する。

【0043】

ステップS6において、分析カラム17は、第1ポンプ12から吐出される第1移動相m1により、前処理カラム14からの溶出液に含まれる分析種を導入する。分析カラム17の第2固定相は、前処理カラムの第1固定相より分析種との相互作用(吸着力)が強いいため、第2移動相m2より濃度の低い第1移動相m1では、分析種は分析カラム17の入口付近で止まってしまう。

【0044】

ステップS7において、LC制御部43は、ステップS3でカウントを開始した経過時間が、ステップS1で読み込んだ溶出終了時刻に一致するタイミングで、スイッチングバルブ16を第1ポジション(図2参照)に切り替える。即ち、スイッチングバルブ16は、分析種が前処理カラム14からの溶出を終了する時刻で、前処理カラム14と分析カラム17との間の接続を解除し、第2ポンプ15と分析カラム17との間を接続する。

【0045】

ステップS8において、第2ポンプ15は、第1流量より大きい第2流量で吐出され、第1移動相m1より濃度が高い第2移動相m2により、分析カラム17において分析種の画分を進行させながら分離する。このように、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、スイッチングバルブ16のバルブ切り替え操作により分画するハートカット(粗分離)法により分析種の画分(フラクション)を選択的に分析カラム17に導入する。

【0046】

ステップS9において、LC制御部43は、ステップS1で読み込んだ溶出時間ファイル35のデータから、全ての分析種の前処理カラム14からの溶出が終了したか否かを判定する。全ての分析種の溶出が終了していない場合、ステップS5に処理を戻す。

【0047】

全ての分析種の前処理カラム14からの溶出が終了している場合、引き続き第1ポジションにおいて取り分けられた各分析種の画分は、第2ポンプ15から第2流量で吐出される第2移動相m2により、分析カラム17を通過し、検出器20に導入される。

【0048】

上述したとおり、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、非特許文献1に記載された「分析カラム」の位置にはカラムが存在しない。このため、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、抵抗管18を備えることにより、液体の流れに抵抗を付与することにより流路の圧力を調整し、バルブ切り替え時に第2ポンプ15の圧力がゼロになってしまう問題が解決されているので、各分析種の画分が効率良く検出器20に導入される。

【0049】

なお、全ての分析種が前処理カラム14から溶出した後、前処理カラム14は、ミキサ

10

20

30

40

50

ー 1 1 により洗浄用の組成比とされた第 1 移動相 m 1 が第 1 ポンプ 1 2 から流されることにより洗浄される。前処理カラム 1 4 が洗浄される間、LC 制御部 4 3 は、第 2 溶媒 s 2 の組成比を 1 0 0 % に増加させるようにミキサー 1 1 を制御する。

【 0 0 5 0 】

検出器 2 0 は、分画操作によって取り分けられたカラム流出分である各分析種の画分を含む溶出液の時々刻々の蛍光強度を測定する。コントローラ 3 0 は、検出器 2 0 により測定された蛍光強度を入力し、時間に対してプロットすることにより、分析種の溶出状態を示すクロマトグラムを作成する。コントローラ 3 0 は、作成したクロマトグラムから、分析種のピーク高さ、ピーク面積等を取得して試料溶液を分析する。

【 0 0 5 1 】

実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置においては、極性の互いに異なる第 1 分析種及び第 2 分析種を少なくとも含む試料溶液を対象とするため、ステップ S 5 ~ S 8 の一連の処理は、少なくとも 2 回実行される。

【 0 0 5 2 】

即ち、初回のステップ S 5 では、LC 制御部 4 3 は、前処理カラム 1 4 から最も早く溶出される分析種である第 1 分析種が、前処理カラム 1 4 からの溶出を開始するタイミングで、スイッチングバルブ 1 6 を第 2 ポジションに切り替える。これにより、前処理カラム 1 4 と分析カラム 1 7 との間が接続され、続くステップ S 6 において、第 1 ポンプ 1 2 から第 1 流量で吐出される第 1 移動相 m 1 により、前処理カラム 1 4 から分析カラム 1 7 に第 1 分析種の画分が導入される。

【 0 0 5 3 】

そして、続くステップ S 7 において、LC 制御部 4 3 は、第 1 分析種が前処理カラム 1 4 の溶出を終了するタイミングで、スイッチングバルブ 1 6 を第 1 ポジションに切り替える。これにより、第 2 ポンプ 1 5 と分析カラム 1 7 との間が接続され、続くステップ S 8 において、第 2 ポンプ 1 5 から第 2 流量で吐出される第 2 移動相 m 2 により、分析カラム 1 7 内を第 1 分析種の画分が進行する。

【 0 0 5 4 】

続くステップ S 9 では、LC 制御部 4 3 は、第 1 分析種の画分のみしか分析カラム 1 7 に導入されていないため、他の第 2 分析種の画分を分析カラム 1 7 に導入するために、2 回目のステップ S 5 に処理を進める。

【 0 0 5 5 】

2 回目のステップ S 5 では、LC 制御部 4 3 は、第 1 分析種の溶出が終了した後に溶出される第 2 分析種が、前処理カラム 1 4 からの溶出を開始するタイミングで、スイッチングバルブ 1 6 を第 2 ポジションに切り替える。これにより、第 2 ポンプ 1 5 と分析カラム 1 7 との間の接続が解除され、前処理カラム 1 4 と分析カラム 1 7 との間が接続される。よって、続くステップ S 6 において、第 1 ポンプ 1 2 から第 1 流量で吐出される第 1 移動相 m 1 により、前処理カラム 1 4 から分析カラム 1 7 に第 2 分析種の画分が導入される。

【 0 0 5 6 】

そして、続くステップ S 7 において、LC 制御部 4 3 は、第 2 分析種が前処理カラム 1 4 からの溶出を終了するタイミングで、スイッチングバルブ 1 6 を第 1 ポジションに切り替える。これにより、第 2 ポンプ 1 5 と分析カラム 1 7 との間が接続され、続くステップ S 8 において、第 2 ポンプ 1 5 から第 2 流量で吐出される第 2 移動相 m 2 により、分析カラム 1 7 内を第 2 分析種の画分が進行する。

【 0 0 5 7 】

(分析条件の決定)

以下、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置の分析条件ファイル 3 4 のデータを用いた分析条件の決定方法の一例を説明する。

【 0 0 5 8 】

まず、検出器 2 0 を前処理カラム 1 4 の下流側に接続し、各分析種の標準物質を含む溶液を試料溶液として、分析時と同様に第 1 移動相 m 1 により前処理カラム 1 4 に導入する

10

20

30

40

50

。前処理カラム 14 からの溶出液の蛍光強度を検出器 20 において測定することにより、標準物質のクロマトグラムを取得する。

【0059】

分析条件ファイル 34 のデータは、図 5 に示すように、複数の分析種が分析画分においてそれぞれ単離するような条件とするデータであることが必要である。図 5 に示すクロマトグラムでは、OA、DTX1 及び DTX2 が、分析画分において単離されている。図 5 のようなクロマトグラムが得られる場合、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、1 回の分析過程で複数種類の分析種を連続的に分離分析することができる。即ち、一度の試料注入に対して、複数種類の分析種を連続的に分離分析することができる。

【0060】

なお、「分析画分」は、第 1 移動相 m1 の組成比が、試料溶液の展開及び溶出を行うための第 1 組成比である画分である。第 1 組成比は、例えば第 2 溶媒 s2 であるアセトニトリルが約 57% 程度の組成比である。第 1 組成比は、アセトニトリルが概ね 57% 以上 62% 以下の組成比であってもよい。「洗浄画分」は、第 1 移動相 m1 の組成比が、前処理カラム 14 の洗浄を行うための第 2 組成比である上清の画分である。第 2 組成比は、例えば第 2 溶媒 s2 であるアセトニトリルが 100% の組成比である。

【0061】

一方、図 6 に示すように、各分析種のピークが夾雑物として上清（洗浄画分）に入り込む場合、検出器 20 における正確な検出ができない。この場合、第 1 移動相 m1 の第 1 組成比、第 1 ポンプ 12 の流量、前処理カラム 14 を洗浄するタイミング及び前処理カラム 14 の種類等の分析条件を調整する必要がある。

【0062】

図 5 のように、各分析種が単離されたクロマトグラムが得られる場合、各分析種の溶出時間が決定される。例えば、図 5 のクロマトグラムにおいて、試料溶液の注入時刻を基準として、OA の溶出開始時刻は約 5.7 分、溶出終了時刻は約 6.0 分である。同様に、DTX1 及び DTX2 の溶出時間が決定することにより、溶出時間ファイル 35 のデータが設定される。

【0063】

溶出時間ファイル 35 のデータが決定されると、前処理カラム 14 の下流側がスイッチングバルブ 16 の第 1 ポート p1 に接続されている状態に分析種分離部 10 を戻す。そして、溶出時間ファイル 35 のデータのみでスイッチングバルブ 16 を第 2 ポジションに切り替えることにより、分析種分離部 10 は、各分析種の画分を分析カラム 17 に導入することが可能な状態となる。

【0064】

分析カラム 17 に導入された各分析種の画分は、分析カラム 17 において分離された後、検出器 20 に蛍光強度を測定される。これにより、コントローラ 30 においてクロマトグラムが作成され、作成されたクロマトグラムを用いて各分析種が定量される。

【0065】

但し、各分析種の定量は、図 7 に示すように、各分析種の画分が互いに重ならず各分析種が単離されることが必要である。図 7 のクロマトグラムでは、オカダ酸 (OA) のピークの裾がベースライン付近まで下がった後に次のジノフィシストキシン - 1 (DTX1) の画分が検出されている。これにより、OA のピーク面積が正確に定量可能であり、OA の毒量を正確に定量することができる。DTX1 のピークについても同様である。

【0066】

なお、図 7 に示す例では、ジノフィシストキシン - 2 (DTX2) 画分の分析カラム 17 への導入を省略している。下痢性貝毒 (DSP) の分析対象成分は、主に OA 及び DTX1 の 2 種類である。公定法では、DTX2 についてピークを確認できることと付されるが、DTX2 は、現状日本の貝から検出されていない。各分析種は、ホタテガイ等の貝の体内で代謝されて類似体になるため、貝に存在するのは数種類である。代謝物は、分析時において加水分解されて遊離脂肪酸に戻されるため、日本では OA 及び DTX1 を定量で

10

20

30

40

50

きることは実用性が高い。

【0067】

一方、図8に示すように、OAのピークの一部がDTX1の画分に重なる場合、OAの正確な定量ができない。この場合、第1ポンプ12及び第2ポンプ15の流量、第1移動相m1の組成比等の分析条件を調整する必要がある。

【0068】

また、図9に示すように、OAのピークがDTX1の画分に入り込む場合、OAのピークの両裾がベースライン近くまで下がっていたとしても、試料に含まれるOAを正確に定量することができない。図9のクロマトグラムは、分析条件の決定段階において、高純度に精製された各分析種の標準物質を含む溶液を分析した結果であり、実際の試料によるDTX1画分には、図9に示すように貝の夾雑物に由来する巨大なピークが現れる。よって、実際の試料によるOAピークは確認できない可能性が高いため、図8の例と同様に分析条件を調整する必要がある。

【0069】

また、図10に示すように、OAのピークがDTX1に比べて著しく太い場合、スイッチングバルブ16の切り替えによる影響から正確なピークとなっていない可能性がある。試料溶液は、第2ポンプ15により所定のスピードで検出器20に導入されて随時検出される。このため、OAが検出器20のフローセルに導入されたタイミングでスイッチングバルブ16により流路が切り替わると、溶出液の流れがフローセルにおいても一時的に遅くなり、結果としてOAのピークが過大評価となる。よって、図8及び図9の例と同様に分析条件を調整する必要がある。

【0070】

以上のように、分析条件ファイル34のデータ及び溶出時間ファイル35のデータが決定されることにより、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、一度の試料注入に対して、複数種類の分析種を連続的に分離分析できるので、簡単且つ短時間の高效率測定が可能となる。

【0071】

(実測)

以下、上述の方法により決定された分析条件に対応するように調節された分離分析装置による、標準物質の毒素を添加した各試料の実測について説明する。

【0072】

図11に示すように、第1溶媒s1は純水、第2溶媒s2は100%のアセトニトリルが採用され、何れも塩が無添加である。第1ポンプ12の第1流量は、0.25~0.3 mL/minである。第1ポンプ12により吐出される第1移動相m1は、試料の分析(展開及び溶出)時においてアセトニトリルが57%の第1組成比であり、前処理カラム14の洗浄時においてアセトニトリルが100%の第2組成比である。第2ポンプ15の第2流量は、0.4~0.6 mL/minである。第2ポンプ15により吐出される第2移動相m2は、100%のアセトニトリルである。また、カラムオープンの温度を35、検出器20の励起波長を365 nm、蛍光波長を412 nmに設定した。

【0073】

前処理カラム14としては、粒子径1.8 µm、内径2.1 mm×長さ150 mmのウォーターズ(Waters)社製アキュイティ(ACQUITY(登録商標)) UPLC HSS CYANOが採用された。前処理カラム14は、2 µm程度の粒子が充填されるため、高耐圧に設計されている。

【0074】

分析カラム17としては、図11に示すように、3つの組み合わせ(a)~(c)が採用可能であった。組み合わせ(a)~(c)のうち「濃縮カラム」の項目に記載されるカラムは、図1に示す分析カラム17の位置に接続され、「分析カラム」の項目に記載されるカラムは、図1に示す抵抗管18の位置に接続される。

【0075】

即ち、組み合わせ(a)の場合、図12に示すように、分析種分離部10は、第2ポ

10

20

30

40

50

ト p 2 と第 5 ポート p 5 との間に接続された第 1 分析カラム (濃縮カラム) 1 7 1 と、第 4 ポート p 4 と検出器 2 0 との間に接続された第 2 分析カラム (分析カラム) 1 7 2 とを備える。第 1 分析カラム 1 7 1 は、粒子径 3 μ m、内径 2 . 0 mm × 長さ 5 0 mm の野村化学製デベロシル (Develosil (登録商標)) HBC30 UG 3 であり、第 2 分析カラム 1 7 2 は、粒子径 3 μ m、内径 2 . 0 mm × 長さ 1 0 0 mm のデベロシル HB C30 UG 3 である。

【 0 0 7 6 】

組み合わせ (b) の場合、分析カラム 1 7 は、粒子径 3 μ m、内径 2 . 0 mm × 長さ 1 5 0 mm のデベロシル HB C30 UG 3 であり、第 2 分析カラム 1 7 2 は不要である。組み合わせ (c) の場合、分析カラム 1 7 は、粒子径 1 . 8 μ m、内径 2 . 1 mm × 長さ 1 5 0 mm のウォーターズ社製 C18 T3 であり、第 2 分析カラム 1 7 2 は不要である。組み合わせ (b) 及び (c) の場合、図 1 に示すように、第 4 ポート p 4 と第 5 ポート p 5 との間に抵抗管 1 8 が接続される。

【 0 0 7 7 】

図 1 3 ~ 図 1 7 は、実際の試料に所定の濃度で毒素を添加し、上述の方法により決定された分析条件及び溶出時間に用いて、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置 (LC 分析装置) により試料溶液を分析した結果を示すクロマトグラムである。試料溶液は、貝の可食部又は中腸腺のホモジネートを抽出し、所定の濃度で O A 及び D T X 1 の標準物質を添加した後に加水分解し、O A 類似体が有するカルボキシル基と反応する蛍光試薬である 9 - アントリルジアゾメタン (A D A M) により誘導体化することにより調整される。

【 0 0 7 8 】

図 1 3 は、O A 及び D T X 1 が 0 . 0 6 3 mg/kg の濃度で添加されたホタテガイの試料溶液に対して、O A 及び D T X 1 の定量結果を示すクロマトグラムである。毒素の定量は、一点検量線法により行われた。O A の定量結果は 0 . 0 5 6 mg/kg となり、回収率は 8 9 % であった。D T X 1 の定量結果は 0 . 0 5 8 mg/kg となり、回収率は 9 2 % であった。

【 0 0 7 9 】

図 1 4 は、O A 及び D T X 1 が 0 . 0 3 2 mg/kg の濃度で添加されたホタテガイの試料溶液に対して、O A 及び D T X 1 の定量結果を示すクロマトグラムである。O A の定量結果は 0 . 0 2 9 mg/kg となり、回収率は 9 1 % であった。D T X 1 の定量結果は 0 . 0 3 0 mg/kg となり、回収率は 9 4 % であった。

【 0 0 8 0 】

図 1 5 は、O A 及び D T X 1 が 0 . 0 0 6 mg/kg の濃度で添加されたホタテガイの試料溶液に対して、O A 及び D T X 1 の定量結果を示すクロマトグラムである。O A の定量結果は 0 . 0 0 6 mg/kg となり、回収率は 1 0 0 % であった。D T X 1 の定量結果は 0 . 0 0 7 mg/kg となり、回収率は 1 1 7 % であった。

【 0 0 8 1 】

図 1 6 は、O A 及び D T X 1 が 0 . 1 0 1 mg/kg の濃度で添加されたムラサキイガイの試料溶液に対して、O A 及び D T X 1 の定量結果を示すクロマトグラムである。O A の定量結果は 0 . 1 0 1 mg/kg となり、回収率は 1 0 0 % であった。D T X 1 の定量結果は 0 . 1 1 9 mg/kg となり、回収率は 1 1 8 % であった。

【 0 0 8 2 】

図 1 7 は、O A 及び D T X 1 が 1 . 0 0 mg/kg の濃度で添加されたアサリの試料溶液に対して、O A 及び D T X 1 の定量結果を示すクロマトグラムである。O A の定量結果は 0 . 9 5 6 mg/kg となり、回収率は 9 6 % であった。D T X 1 の定量結果は 0 . 9 3 6 mg/kg となり、回収率は 9 4 % であった。

【 0 0 8 3 】

図 1 3 ~ 図 1 7 に示したとおり、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置によれば、良好な回収率が達成可能であり、高精度に分析種を定量可能であることが確認された。

【 0 0 8 4 】

特に、従来法によれば、前処理カラムから始めに溶出する分析種のピークと、次に溶出

する分析種の画分の夾雑物によるピークとが干渉することから、一回の試料注入毎に異なる分析種の画分をスイッチングバルブ16を用いて選択的にハートカット（粗分離）する必要がある、複数回の試料注入による複数回の測定が必要になっていた。

【0085】

これに対して、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置によれば、第1ポンプ12により前処理カラム14から分析カラム17に分析種を導入し、第1ポンプ12より流量の大きい第2ポンプ15により分析カラム17内の分析種の画分を進行させる。第2ポンプ15側の流量を大きくすることにより、分析種のピークと夾雑物によるピークとが干渉することを回避できるので、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、一度の試料注入に対して、複数種類の分析種を連続的に分離分析すること可能である。

10

【0086】

また、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置によれば、前処理カラム14から分画された画分の分離及び濃縮を行うカラムを1本の分析カラム17とすることができ、分析に必要なコストを低減することができる。従来法によれば、濃縮カラム及び分析カラムとして1本のカラムを採用すると、前処理カラムの内圧が高くなり前処理カラムが破損するため、2本のカラムが採用されていた。これに対して、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置によれば、UPLCに用いることが可能な高耐圧カラムを採用することにより、分析カラム17の耐圧が向上され、結果として1本のカラムによる分離及び濃縮が可能となった。

【0087】

実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、スイッチングバルブ16の第4ポートp4と第5ポートp5との間に接続された抵抗管18を備える。ここで、抵抗管18がない場合、第2ポジションにおいて、第2ポンプ15の圧力が0になるため、第1ポジションに切り替わった時に第2ポンプ15の圧力回復が遅れて分析結果に影響を及ぼす可能性がある。実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置は、抵抗管18を備えることにより流路の圧力低下による影響を抑制することができる。

20

【0088】

また、実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置によれば、第1溶媒s1として純水を採用し、第2溶媒s2として100%のアセトニトリルを採用しており、何れもギ酸アンモニウム等の塩が無添加である。よって、塩の調整、計量、混合等の作業が不要であるため、作業により誤差の発生を防止できる他、分析過程の簡略化、試薬の節減が可能である。

30

【0089】

（その他の実施の形態）

上記のように、本発明の実施の形態を記載したが、この開示の一部をなす論述及び図面は本発明を限定するものであると理解すべきではない。この開示から当業者には様々な代替実施の形態、実施例及び運用技術が明らかとなる。

【0090】

冒頭で述べたとおり、上記の実施の形態に係る複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラムの技術的説明は、OA類似体等の遊離脂肪酸を分析対象成分とする分離分析について着目し、例示的に記載した。しかし、複数成分連続分離分析装置、複数成分連続分離分析方法及び複数成分連続分離分析プログラムは、クロマトグラムのピーク等が重なる分析種が含まれている場合であれば、種々の場合において、複数成分連続分離分析を好適に適用できるものであり、遊離脂肪酸を分析対象成分とする場合に限定されるものではない。

40

【0091】

又、例えば、既に述べた実施の形態において、検出器20は、蛍光検出器に限るものではなく、質量分析計、タンデム質量分析計等の他の検出器であってもよい。

【0092】

上記の他、上記の実施の形態において説明される各構成を任意に応用した構成等、本発

50

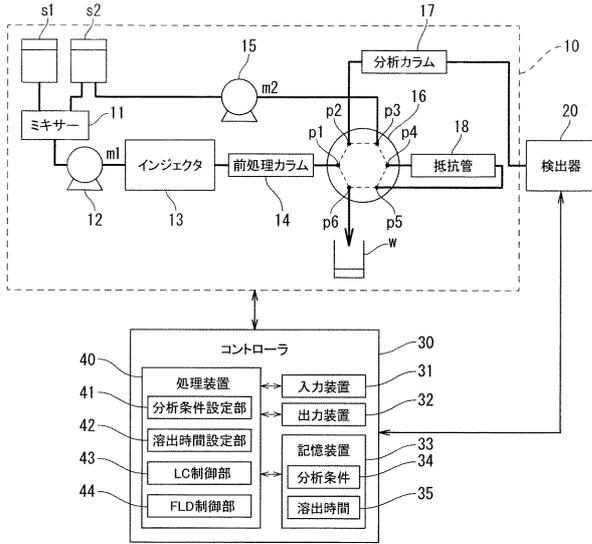
明はここでは記載していない様々な実施の形態等を含むことは勿論である。したがって、本発明の技術的範囲は上記の説明から妥当な特許請求の範囲に係る発明特定事項によってのみ定められるものである。

【符号の説明】

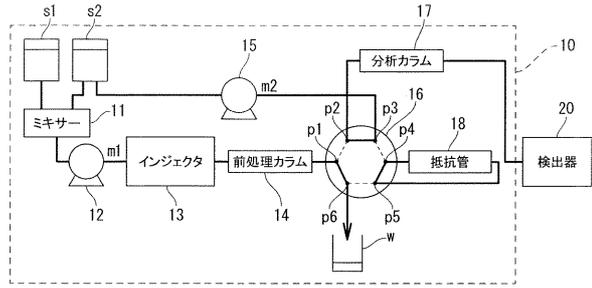
【0093】

10	分析種分離部（機器本体）	
11	ミキサー	
12	第1ポンプ	
13	インジェクタ	
14	前処理カラム	10
15	第2ポンプ	
16	スイッチングバルブ	
17	分析カラム	
18	抵抗管	
20	検出器	
30	コントローラ	
31	入力装置	
32	出力装置	
33	記憶装置	
34	分析条件ファイル	20
35	溶出時間ファイル	
40	処理装置	
41	分析条件設定部	
42	溶出時間設定部	
43	LC制御部	
44	FLD制御部	

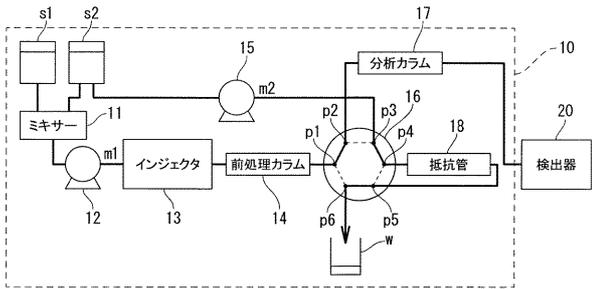
【図1】



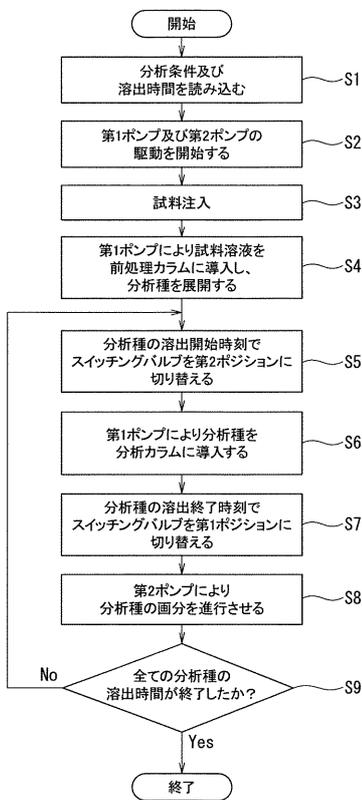
【図2】



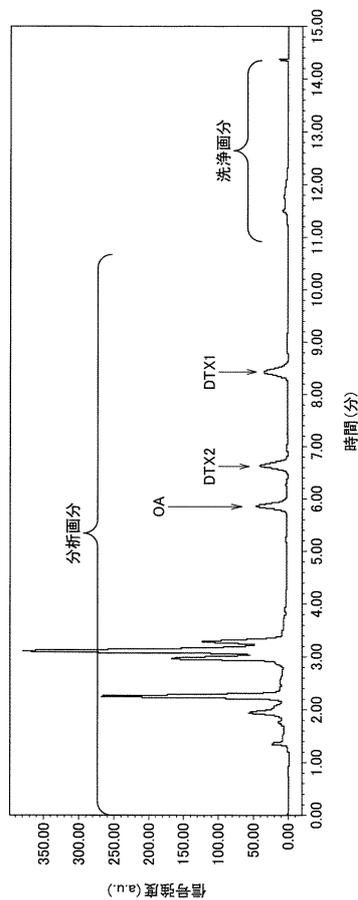
【図3】



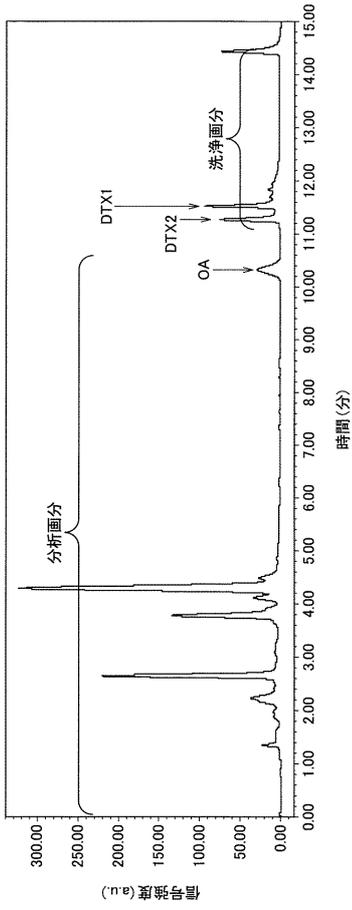
【図4】



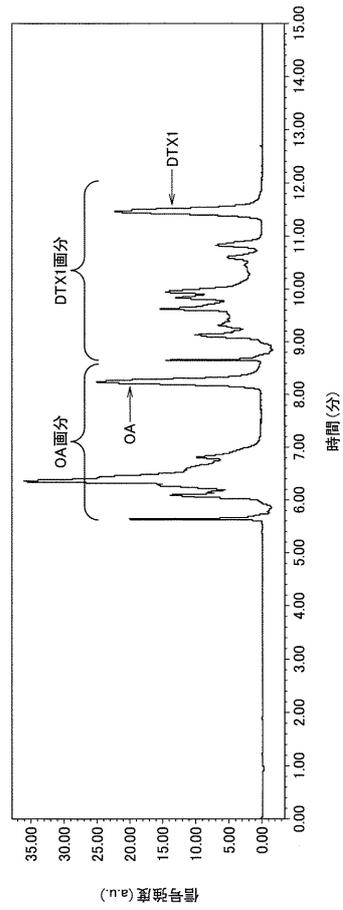
【図5】



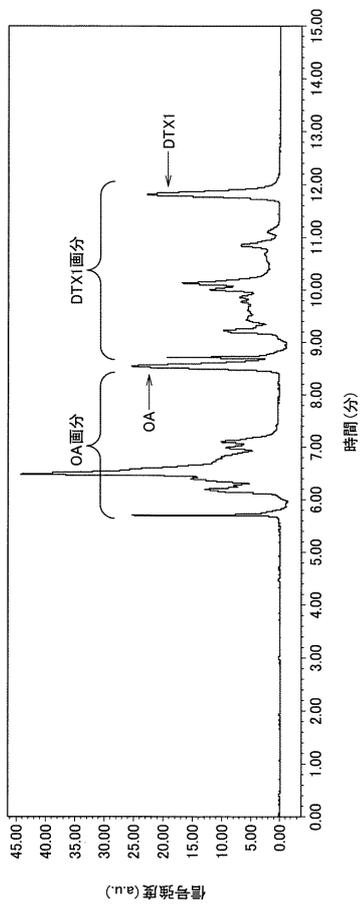
【 図 6 】



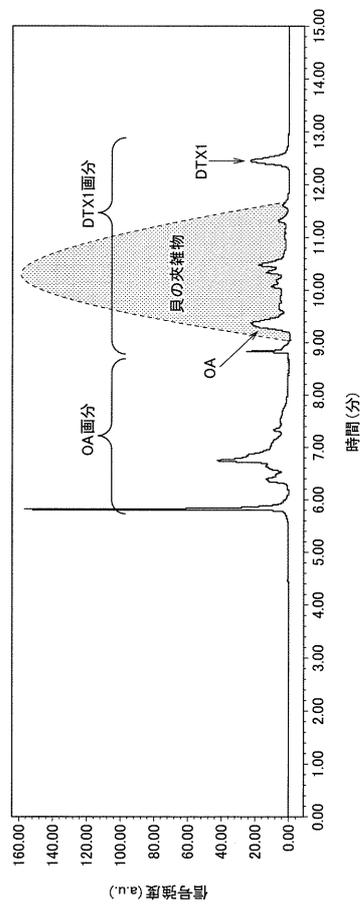
【 図 7 】



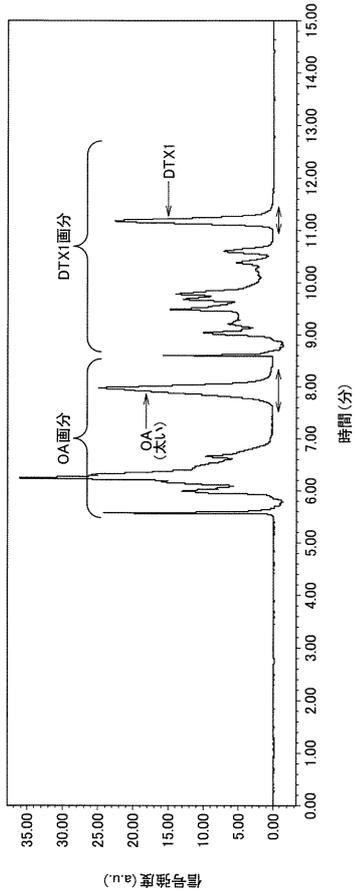
【 図 8 】



【 図 9 】



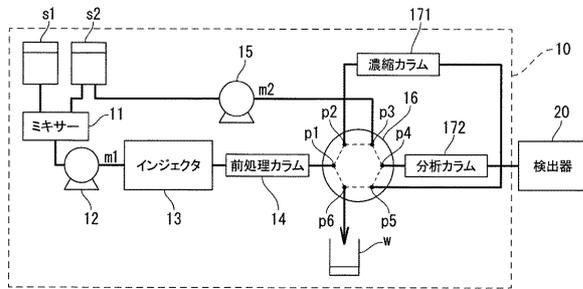
【図10】



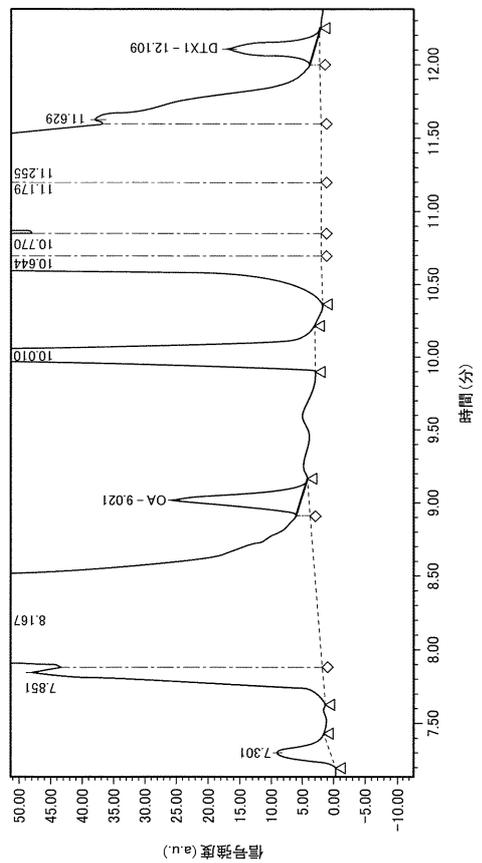
【図11】

項目	従来法	本実施形態
移動相	第1溶媒:水 第2溶媒:95%アセトニトリル ともに2mM HCOONH ₄ , 50mM HCOOH	第1溶媒:水 第2溶媒:100%アセトニトリル 塩は無添加
移動相流量	第1ポンプ 2mL/分 分析時第2溶媒60% 第2ポンプ 1mL/分 常に第2溶媒100%	第1ポンプ 0.25~0.3mL/分 分析時第2溶媒57% 第2ポンプ 0.4~0.6mL/分 常に第2溶媒100%
前処理カラム	Shiseido CAPCELLPACK SG120CN 4.6×250mm	Waters ACQUITY UPLC HSS CYANO 1.8μm 2.1×150mm
濃縮カラム	野村化学 Develosil C30 UG-5 4.6×50mm	(a) 野村化学 Develosil HB C30 UG-3 2.0×50mm (b) 野村化学 Develosil HB C30 UG-3 2.0×150mm (c) Waters C18 T3 1.8μm 2.1×150mm
分析カラム	野村化学 Develosil C30 UG-5 4.6×150mm	(a) 野村化学 Develosil HB C30 UG-3 100mm (b) なし (c) なし

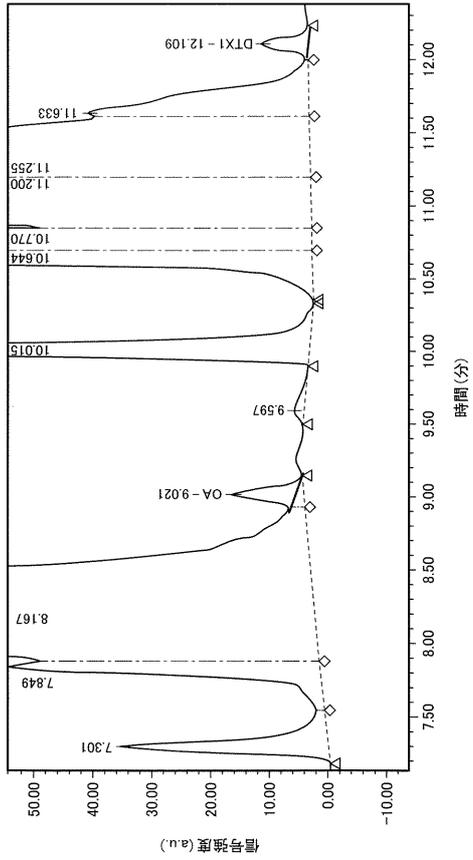
【図12】



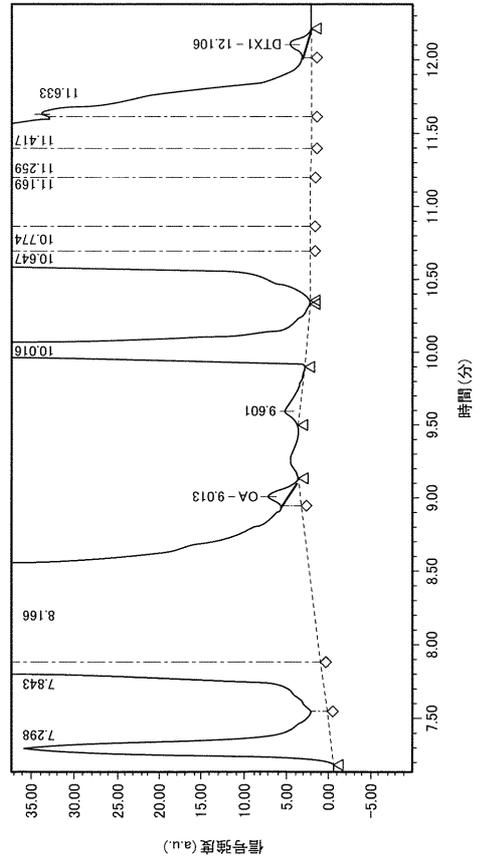
【図13】



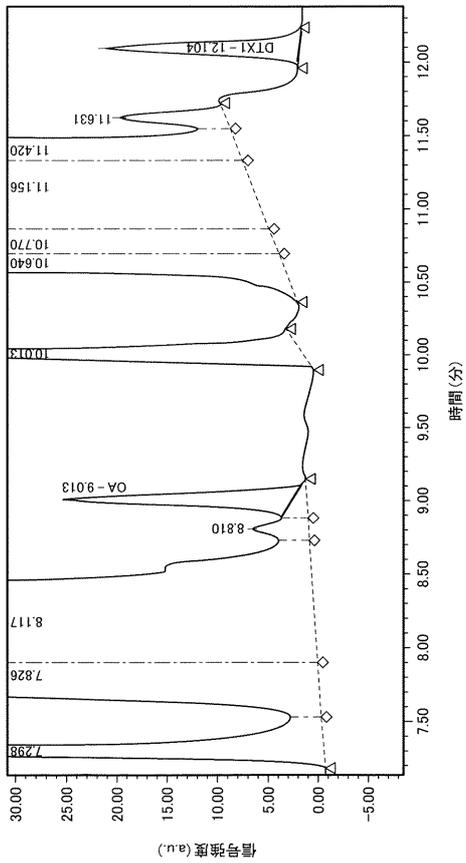
【 14 】



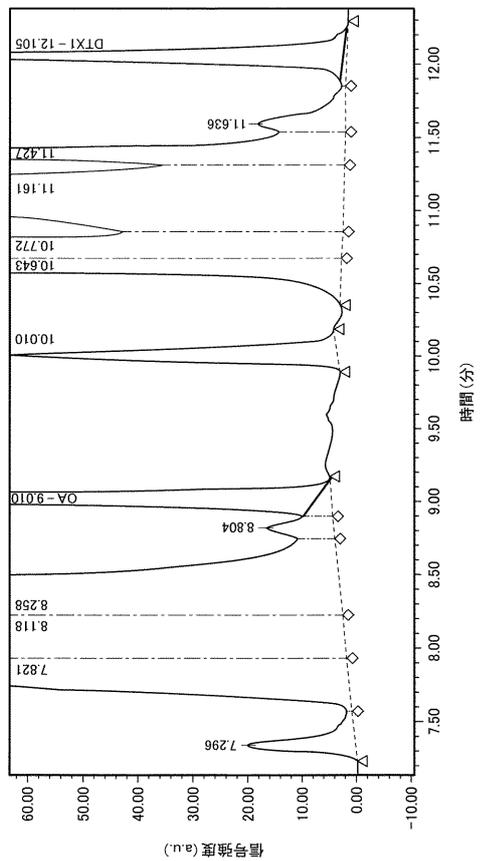
【 15 】



【 16 】



【 17 】



フロントページの続き

- (72)発明者 扇田 いずみ
青森県東津軽郡平内町大字茂浦字月泊10 地方独立行政法人青森県産業技術センター 水産総合
研究所内
- (72)発明者 鈴木 敏之
神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4 国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所内
- (72)発明者 内田 肇
神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4 国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所内

審査官 高田 亜希

- (56)参考文献 特開昭62-063859(JP,A)
特開2008-003082(JP,A)
特開平04-054452(JP,A)
特開昭62-017655(JP,A)
米国特許出願公開第2009/0246878(US,A1)
特開平09-311129(JP,A)
Ucida Hajime et al., A Convenient HPLC Method for Detection of Okadaic Acid Analogs as
9 Anthrylmethyl Esters with Automated Sample Cleanup by Column Switching, Journal of
AOAC International, 97・2, 2014年, 391-397

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 30/00 - 30/96
B01J 20/281-20/292
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Science Direct