

# HPLC 操作マニュアル

2010.2 月作成

中村 好恵

## ■分析前に。

使用溶媒はフィルター濾過後、5 分程度 sonicate して脱気しておくこと。溶媒をセットしてから以下の作業を行う。

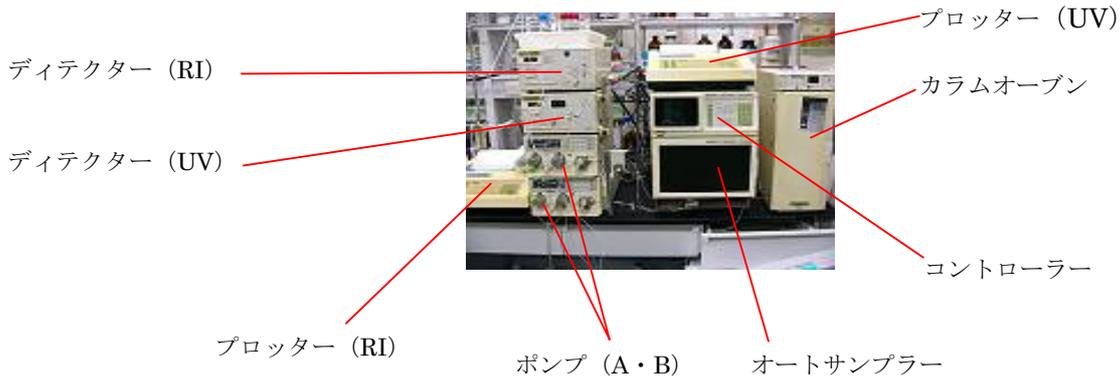


Figure 1. 各部分の名称

## ■操作手順

1. コントローラーの電源を入れる。その後数秒でクロマトパック、RI 以外の装置の電源が自動で入るので、RI の電源を入れる。(プロッターは電源を落とさなくてもよいが、もし落ちている場合はこちらを入れる。)

また、カラムオーブンについては電源が入っても加温はされないなので、自分で oven on / off キーを操作して加温をスタートさせる。

2. ポンプのドレインをそれぞれ開ける。

3. コントローラーの PARAM ボタンを押し、パラメータの画面を表示させる。カーソルを FILE に合わせ、7 を入力して ENTER。その後 yes か no を選択する画面が表示されるので no を選択。次に表示される画面が

T. FLOW 9mL、B. CONC 50% となっていることを確認し、再び FILE に 7 を入力、ENTER、yes を選択する。その後 START キーを押すとポンプが動き出す。

5 分ほどそのまま放置してから STOP キーを押し (ポンプ停止)、ドレインバルブを閉じる (purge 作業)。

※yes と no の違いは、選択したプログラムを実行するか否かである。実行したければ yes、プログラム内容を確認するだけであれば no を選択すればよい。



ドレイン

半時計周りで開く。  
90°くらい回せば十分。閉めるときはしっかり閉めること！

Figure 2. ドレインの写真

4. コントローラーに行いたい分析条件の FILE No. を入力し、yes、START キーでファイルのプログラムが実行されるので、プロッターでプロットしながら (SHIFT DOWN、PLOT、ENTER の順にキー操作) で平衡化を行う。



Figure 3. コントローラーの操作画面

**注意！** RIを使用する場合は、平衡化を行う時に必ず RI 機械の R FLOW ランプが点灯していることを確認してから放置すること！点灯していなかった場合は平衡化のやり直しになるので。

プログラムを実行しながら (溶媒を流しながら) カラムを取り付ける。カラムの矢印が上向きになるようにセットする。溶媒が流れ出ていることを確認してから先に下側を繋ぎ、もう片方の先端から溶媒が溢れてきたら上側も繋ぐ。カラムの劣化を防ぐためにも、空気を入れないよう十分注意すること。

5. ベースラインが安定したらプロットを止め (SHIFT DOWN、PLOT、ENTER の順にキー操作)、検出器の AUTO ZERO、プロッターの ZERO・ENTER 操作の後にサンプルをインジェクトする。インジェクターのハンドルを上押ししてから、マイクロシリンジを挿し、サンプルを注入。速やかにハンドルを押し下げ、素早くプロッターの START キーを押す。

RI、UV いずれの検出器結果もプロットする場合は、二台同時に START を押す。

6. 分析が終了したらプロッターの STOP キーを押す。自動的にチャートの解析結果がプリントされる。ただし STOP TIME が入力されている場合は、その時間が来ると自動的にプロットが止まり、分析終了となる。

7. 分析終了後は使用カラムの説明書に書かれた溶媒で洗浄し (この時カラムオープンをオフにしておくことと取り外した後のカラムに気泡が出来にくくなる)、ポンプを止めてから (コントローラーの STOP キー) カラムを外す。

なお、長期間 HPLC を使用しない場合は器械のラインを Methanol : H<sub>2</sub>O = 70 : 30 もしくは 50 : 50 で置換しておく。

8. コントローラーの電源、RI の電源を落とす。プロッターの電源は落とさなくてもよい。

## ■プロッターの操作について

はじめに設定の確認を行う (SHIFT DOWN、LIST、WIDTH、ENTER)。現在の設定がプロットされるので、変更したい項目があれば変更する (詳しくはクロマトパック説明書を参照のこと)。

だいたい 1 つのキーには 2 つのコマンドが書かれており、下半分に書かれたコマンドを選択したいときは SHIFT DOWN キーを押した後にそのキーを押す。キーの左側に書かれているコマンド (例えば A. SAVE) を入力するときは、CTRL キーを押しながらそのキーを押す。

よく変更するパラメータを次に記す。

**Minimum area** : 読み取るピークの高さを設定する。この値が小さいほど極小のピークがひらわれる。

**STOP TIME** : 分析時間を設定できる。設定時間になると自動的に分析結果がプリントされ分析が終了する。ただしポンプは止まらないので注意する。

**Attention** : ピーク書き出しの高さを変更する。この値が小さいほど小さいピークが大きく描かれる。

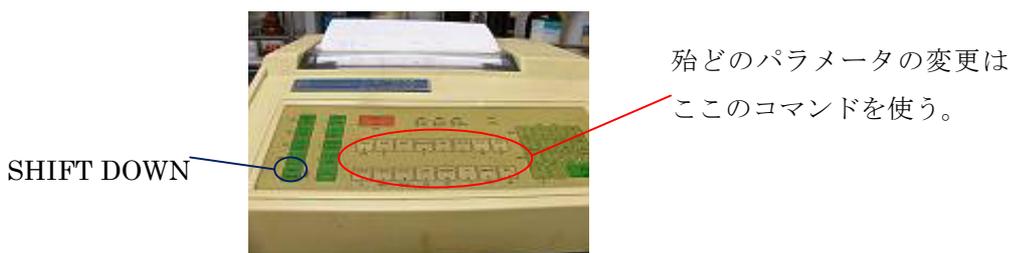


Figure 4. プロッターのキー位置

## ■Auto Injector

この装置を使う前に、コントローラーの A. INJ キーを押し、purge にカーソルを合わせ ENTER キーを押してオートインジェクターの purge を行う。HPLC の裏にアセトニトリルの入ったフラスコが用意してあり、そこから溶媒を吸って purge を行うのでアセトニトリルを枯らさないようにする。もし枯れてしまった場合はアセトニトリルを継ぎ足し、purge を三回程度行うこと。

## ◆プログラムについて

タイムプログラムを 10 種組むことができる。これはパラメータと連動しており、どちらも自分で調節する必要がある。現在設定してあるパラメータ、タイムプログラムを以下に示す。もし変更した場合は記入しておくこと。

#### PARAMETER FILE

FILE 0 ; A : B = 8 : 2, FLOW 1mL / min

FILE 1 ; A : B = 1 : 1, FLOW 1mL / min

FILE 2 ; A : B = 3 : 7, FLOW 1mL / min

FILE 3 ;

FILE 4 ;

FILE 5 ;

FILE 6 ;

FILE 7 ; A : B = 1 : 1, FLOW 9mL / min (purge 用パラメータ)

FILE 8 ; A : B = 0 : 10, FLOW 2mL / min (洗浄用パラメータ)

FILE 9 ; 電源 OFF (EVENT 9)

#### TIME PROGRAM FILE

FILE 0 ; B 20%  $\xrightarrow{10分}$  B 100% (2分保持)  $\xrightarrow{直後}$  B 20% (保持)  $\rightarrow$  STOP (分析開始から 20 分後)

FILE 1 ; B 50%  $\xrightarrow{15分}$  B 100%  $\xrightarrow{直後}$  B 50% (保持)  $\rightarrow$  STOP (分析開始から 25 分後)

FILE 2 ;

FILE 3 ;

FILE 4 ;

FILE 5 ;

FILE 6 ;

FILE 7 ;

FILE 8 ; B 100% (30分保持)  $\rightarrow$  STOP

FILE 9 ; 機械電源オフ

#### ◆パラメータの作成

まず作成したいファイルを確認状態で開く。その後カーソルを動かして変更したい部分を入力すればよい。

基本的に T. FLOW と B. CONC 以外は触らない。T. FLOW は溶媒の流速。B. CONC は B ポンプに流れている溶媒を全体の何割流すか (%) を決定する。A. CONC は B. CONC を入力することで自動的に設定される。

入力値は自動的に記憶されるので、入力後は再度 FILE No. を入れ yes を押すと実行される。手動でインジェクトする場合は、タイムプログラムを利用せずともこちらを利用すれば十分である。

#### ◆タイムプログラムの作成

開始の流速、B. CONC はパラメータのファイルと関連を持つ。例えばタイムプログラム FILE 3 の開始流速、B. CONC はパラメータ FILE 3 で設定されたものになる、という具合である。

新規のタイムプログラムを作成する場合は、まず TIME PROG キーを押し、保存したい FILE No. を入力し ENTER。すると TIME、FUNC、VALUE が一列に表示され、その下にカーソルが表示される。TIME は仕事を実行する時間、FUNC は仕事の内容を画面の右表の中から選択 (数字入力)、VALUE は選択した仕事の時に流す溶媒の量をそれぞれ入力する部分になっている。下に入力の例を示す。

**【B = 70% を 5 分保持後、10 分で B = 100% まで上げて 5 分保持、その後すぐに B = 70% へ戻し、開始から 25 分で分析終了のプログラムを作成】**

1. タイムプログラム FILE 2 を選択。
2. 一段目に TIME 5、FUNC 4、VALUE 70 と入力。
3. 二段目に TIME 15、FUNC 4、VALUE 100 と入力。
4. 三段目に TIME 20、FUNC 4、VALUE 100 と入力。
5. 四段目に TIME 20.1、FUNC 4、VALUE 70 と入力。
6. 五段目に TIME 25、FUNC 19 と入力。
7. PUMP CTRL キーを押すと B ポンプを流れる溶媒量の変化がグラフとなって表示されるので、間違いがないか確認する。
8. TIME PROG キーを押し、入力画面に戻してから FILE No. に 2 を入力して yes を選択するとプログラムが実行される。

#### ◆Auto Injector の使用

上記のパラメータ設定、プログラム設定が終わってからこちらへ進むこと。

コントローラーの A. INJ キーを押すと画面に〇〇が表示される。これは左から順に、バイヤルナンバーの分析スタート番号、バイヤルナンバーの分析ストップ番号、サンプルの注入量、1 サンプルにつき何度分析するか、使用プログラム番号、分析時間、アイソプラティック時の入力 (プログラム番号及びアイソプラティック時の入力はいずれかのみでの入力) を示す。なお、バイヤルナンバーはバイヤルをセットする容器に記載されている番号のことであり、0 ~ 99 を入力する。また分析時間はプログラム番号を入力すれば自動的に表示される。

例えば左から順に 0、24、5、1、2、× (入力なし) と入力すれば、バイヤルナンバー 0 ~ 24 の 25 サンプルを 5  $\mu$ L とりタイムプログラム FILE 2 で 1 回ずつ分析しろという指令になる。続いて下の列に 0、0、0、1、8、×で B ポンプの溶媒を 30 分流して洗浄し、更にその下にプログラム 9 を入力することで機械の電源オフまで行うことができる。

☆不明点に関しては、液クロカラムオープン右横に貼ってある大橋さんまで連絡。