

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

クロマトグラフィーは、平衡状態にある 2 つの相(固定相、移動相)において、溶解している物質の分配の差を利用して物質同士を分離・検出・定量する方法である。液体クロマトグラフィーは、移動相が液体であり、固定相の基剤が固体のものである。高圧に耐える充填剤と耐圧性の移動相送液用ポンプを装備したものが高速液体クロマトグラフィー(HPLC)である。

●島津 HPLC 操作マニュアル (簡易版)

(以下は、詳しい操作は掲載していません。詳しい操作は shimazu 社のマニュアルを参照してください。あくまでも簡易のマニュアルです)

島津HPLC (SPD-10A,LC-10AD) 操作方法

初期設定

1. 検出器.ポンプの電源を入れる。
2. UV が表示されるまで待つ。(検出器の設定をする。SPD-10AVP は Funk を押してから波長を入力→CE、SPD-20A は CE→Funk→enter→波長入力→CE→CE、次にポンプの設定をする。LC-10AD と LC-20AD は funk→流速入力→enter→CE)
3. ポンプのバルブを open の方向に回し、purge を押す。
4. 3分で purge が終わるので、終了後にバルブを元に戻し、pump を押す。
5. チューブから液が出ているかチェック。
6. 送液を確認後、pump を止め、圧力がゼロになるのを確認する。

レコーダーの設定

- 1.shift+list+width enter で前回の状態を確認する
- 2.atten number を押して enter
- 4.stop time (例として、15分) を押して enter
5. mini area (例として、50000) を押して enter

試料の挿入

1. メタノールを 0.1ml 吸い、0.2ml まで空気を入れ、上下に振り洗浄を 2 回行う。
2. 試料を 0.1ml 吸い、とも洗い後、再度吸って針を上向きにした後、指で注射を弾き、空気を除く。
3. 針を load 部位に十分奥まで差し込む。
4. オート zero ボタンを 2 回押す。
5. 試料入れる。
6. バルブを injection にまで回し、同時にレコーダーの start ボタンを押す。
7. injection にしてから 30 秒後バルブを元の load に戻し、注射器を抜く。
8. 注射器を 1.と同じ手順で洗浄。

使用后：サンプルループの洗浄

1. メタノールを注射筒に 1ml 吸い、容器中の空気を抜く。
2. HPLC に約 0.5ml メタノールを入れ、もう半分はバルブを inject にした後に入れる。
3. バルブを load に戻し、注射器を抜く。

溶媒 (メタノールから移動層) の交換

1. 洗浄液のメタノールの中からチューブを抜き、キムワイプでふいた後、移動層にチューブを移す。
2. バルブを半分 open に回し、purge を押す。
3. purge 終了(3分)後、バルブを元に戻し、pump を押し 20-30 分ぐらい移動相を流す。

測定終了後のメタノール洗浄

1. 50%メタノールの瓶にチューブの先端を入れる。
2. バルブを半分 open に回して purge(3分)
3. purge 終了後、バルブを元に戻し、pump で 15分 50%メタノールを流す。
4. 50%メタノール瓶からチューブの先端を取り出し、キムワイプで拭いたあと、100%メタノールにチューブを入れる。
5. 2と同様に 100%メタノールで purge。
6. purge 終了後バルブを閉じ、100%メタノールで 30 分間流す。

島津HPLC (SPD20A, DGU, LC20AD) 操作方法

[低圧グラジェント]

- 1) SPD20Aの操作
* FUNK→ENTER→波長入力→ENTER→CE→CE

2) LC20AD

*0分時の設定をする。(FUNK→流速を入力→ENTER、CONK→AとBの割合を入力)

*FUNKを4回押し、FILEを選択→ENTER→0→ENTER (低圧グラジェントはプログラムを‘0’、アイソクラティックは‘1’のプログラムを使用する。FUNKを押して、Deleteを選択して、使用しないプログラムは消す。) →CE→CE→edit→enter→プログラムをくむ(例として10分後に2ml/minにするプログラムをくむには、①10→enter→funkを押してflowを表示させて2→enter→enter→次に20分後にB%を50にする方法は、①funkを押してBCNCを表示させる→enter→50→enter、最後のプログラムを90分後に終了する①funkを押してstopを表示させる→enter→enter→enter→CE(保存される) →インジェクションバルブを45度傾けて測定開始

注意：0分で1ml/min(A10%B90%)を10分後に2ml/min(A50%B50%)にしたい場合は、10分のプログラムを2つ組む。1つは流速の変更、もう1つはb%の変更プログラム。

[アイソクラティック]

1) SPD20Aの操作

*FUNK→ENTER→波長入力→ENTER→CE→CE

2) LC20AD

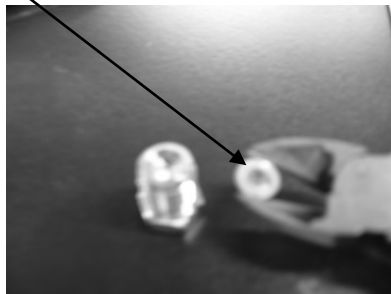
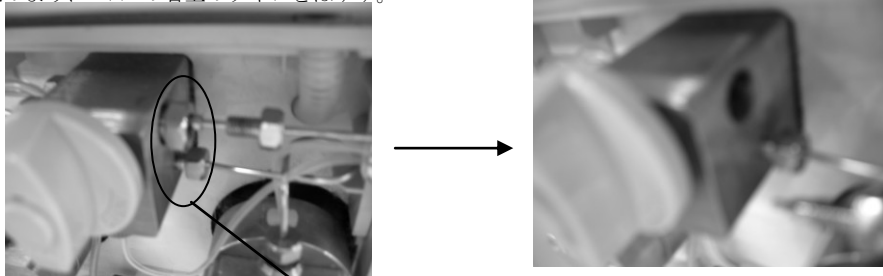
*FUNKを4回押し、FILEを選択→ENTER→1→ENTER→CE→CE→funkを押して流速を入力→Maxを入力(20.0MPa)→edit→enter→時間を0.01分と入力→funkを押してstopを表示させる→CE→インジェクションバルブを45度傾けて測定開始

島津HPLCの修理・交換

- 1) **サクセッションフィルターの交換：**下記のような銀色の器具をチューブの先につけて溶液から空気を機械に入れないようにする。サクセッションフィルターは手でさわらないこと。よごれたら、イソプロパノールで超音波洗浄を10分する。

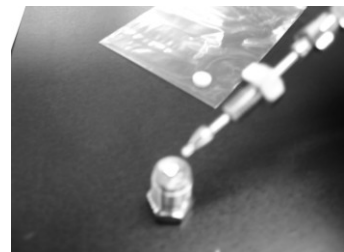


- 2) **インラインフィルターの交換(228-48607-91)：**溶液を流しているときに圧力が高い場合には交換する。
 - ① 圧力チェック：①ラインにメタノールを流し、ドレインバルブを緩める。ポンプの操作②funkを押して、zero ADJにする→enter→CE→ドレインバルブを絞める。③1ml/minでpumpを押し送液④このときに圧力が高いとインラインフィルターを交換しなくてはならない。下記のようにバルブの右上のラインをはずす。



上記のねじをはずし、その上の輪の部分ペンチで取る。

ねじの部分にはメタノールを少量添加する。また、ラインフィルターはビニール袋にメタノールを入れた中に入れてフィルター内の空気を抜く。



フィルターは手で扱い、元のようにねじを締める。ねじは締めすぎるとフィルターがわれるのでほどほどにする。

3) プランジャーシール(228-35146)の交換

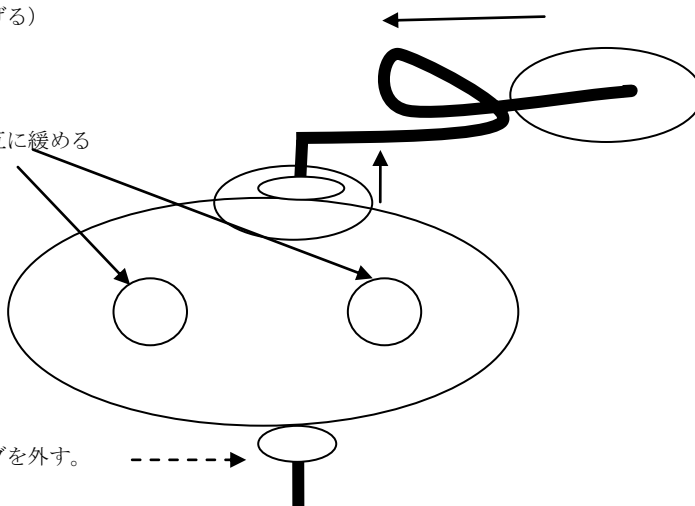
このシールは2つ一緒に交換する。

1) 移動相を機械の下に移動する。



2) funk で P-set を表示させる 1 をおすと左のプランジャが下がる、2 を押すと右のプランジャがさがる。(交換するプランジャをさげる)

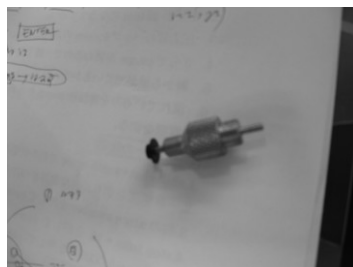
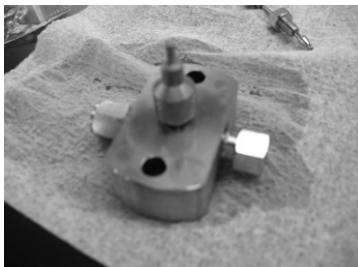
3) ここのねじを交互に緩める



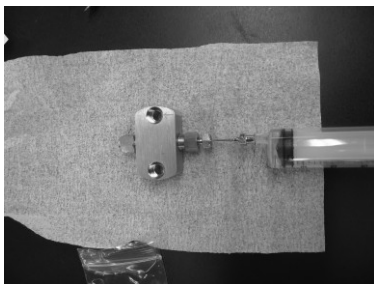
4) ポンプの下のチューブを外す。

5) ポンプの上のねじ2か所をはずす：曲がったチューブは変形させないように注意してやじるしの上の方向に抜き、左方向に抜く。

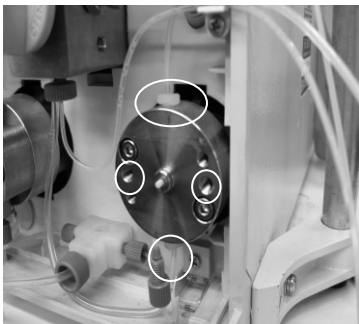
6) 金色の専用の器具で先にくぼみがある方で中央のプランジャーシールをひっかけて抜く。



7) 下記のようにメタノールを下から入れてプランジャーをはずした部分を洗浄し、新しいプランジャーシールを専用の器具の先が丸いほうで押し込む（カチッと入る）表が金属が見える方



8) さらに奥のプランジャを掃除するためにねじを交互に緩めて外す。左右の穴の部分に先ほどはずしたねじを入れてしめると輪がはずれる。上下の部分のチューブは手ではずしておく。絞めるときは、このねじはきつく締める。



9) 中央のガラス棒のプランジャはメタノールで注意してふく。

ラインの空気もれチェック

10) バルブを緩めてしてから注射筒で減圧してメタノールでラインを満たす。バージする。バルブを絞める。



11)



バルブの右上のねじをはずし、ねじをつけて栓をする。0.5ml/min で送液する (pump)。圧力が max を超えて、機械がとまる。圧力がさがらないことを確認する。もれたらたいいは青丸のねじをしめるととまる。

* V P を押し、mentanance → funk → R - seal deliver 0 enter → L - seal 0 enter で機械にメンテナンスしたことで 0 時間を記録させる。

ゲルろ過 HPLC

サイズ排除クロマトグラフィーの分離パラメーターは、分子サイズである。充填剤の外の溶媒は、ある流速で流れており、充填剤の細孔中の溶媒は、静止に近い状態にあるとする。充填剤の細孔よりも大きい分子は細孔に入ることができず、カラム内の移動速度は大きい。一方、細孔よりも小さな分子は充填剤の細孔奥深くに拡散することができ、カラム内での移動速度は小さくなる。

【器具】

HPLC(shimadzu 社)、カラム(Inertsil WP300 Dial 5 μ m, 7.6ID \times 250mm)、マイクロシリンジ、移動相(0.1M リン酸ナトリウム緩衝液—0.2M 塩化ナトリウム;pH 6.7)

【試薬】

サンプル;Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis(GE Health care)(1vial/500 μ L 0.1M PB containing 0.5M NaCl pH 6.7)、洗浄用メタノール

【手順】

① 初期設定

- ① 検出器、ポンプの電源を入れる
- ② 平衡化させるため;移動相(0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 0.2M 塩化ナトリウム;pH 6.7)を流す
メタノールの中にある吸入チューブを抜き、キムワイプで拭いて移動相に移す。
※メタノール、移動相のふたは開けておくこと。
- ③ UVが表示されるまで待ち、検出器の設定で波長の入力・ポンプの設定で流速の入力を行う。
- ④ ポンプのコックを開け、**purge**を押す。
Purgeが終了(3分程度)したら、コックをしめる。
- ⑤ **Pump**を押して、チューブから廃液が出てくるのを確認する。20~30分流すことで平衡化が完了する。
同時に、吸光度が0.00と圧力が上がってくるのも確認する。

② レコーダーの設定

WIDTH;感度、SLORE;傾斜、MINAREA;入力した数値の感度以下は検出しない、STOP TIME;検出時間、ATTEN;入力した数値が2の何乗かを示す(ピークが大きかったら数値を上げ、小さかったら下げの必要がある)。

③ 試料の挿入

- ① シリンジの洗浄
メタノールを0.1mL吸い、空気を0.2mL吸い、上下に振り洗浄を2回行う。
できる限りシリンジ内の溶液と空気を出し切ること
- ② サンプルループの洗浄
メタノールを0.5mL吸い、針を上に向けて指でタッピングすることで空気を上部に追いやる。キムワイプを針先に添えて、シリンジ内の空気を抜く。
針をload部位に十分奥まで差し込み、loadのレバーが右上になっていることを確認して0.2mL程度のメタノールを入れる。その後、レバーを素早く右下に降ろして残りのメタノールを入れる。レバーを右上に戻したら、針を抜く。
※レバーの上げ下げの動きは素早く行うこと
- ③ 試料の挿入
サンプルを0.1mL吸い上げ、0.2mLの空気を吸い上げ、上下に振り洗いすることで共洗いを行う。
サンプルを0.04mL吸い上げ、レバーが右上になっている状態でサンプルをすべて挿入する。AUTO ZEROを2回押し、レバーを右下にしてレコーダーをスタートさせる。
15秒程度経ったらレバーを右上に戻し、針を抜く。

④ 測定終了後

- ① サンプルループをメタノールで洗浄する。
- ② 50%メタノールに吸入チューブの先端を入れる。
- ③ コックを開け、**purge**を押す(3分間程度)。
- ④ コックを閉め、**pump**を押して、15分間50%メタノールを流す。
- ⑤ 50%エタノールからチューブを抜き、キムワイプで拭いた後100%メタノールのチューブに入れる。
- ⑥ コックを開け③と同様、100%エタノールで**purge**
- ⑦ **Purge**終了後はコックを閉め、100%メタノールで30分間流す。