

HPLC 簡易マニュアル

HPLC Getting Started Guide for beginners

東ソー製

2003/02/14, Merii Kato

(原理)

-はじめに-

高圧送液ポンプと高性能充填剤の使用により分離を高速で行う LC を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)という。

-何が分かる？-

- 1) 既知物質のピーク位置を基準にして、未知物質の同定、確認ができる。
- 2) 多成分の同時定量ができる。
- 3) 混合物の分離精製ができる。
- 4) 物理化学的定数の測定ができる。

~HPLC 溶離液の作り方~

各カラムに対して最適な溶離液がある。それをうまく選択することもよいスペクトルを得るための方法の一つである。

*ここでは一般的な溶離液の処理法について述べる。

溶離液を調整したら。。。

1, ろ過する。

調整した溶離液には微量の付着物等が含まれるので、大きいメンブレンフィルターを用いてろ過する。

2, 脱気する。(使用する前夜に行うのが望ましい。)

溶離液中に気泡が入ると分離に影響する。よって、5~10 分程度超音波にかけながらアスピレーターでひく。この際、有機溶媒が含まれている場合は溶離液の状態が変わってしまうため長時間行わない。

3, 設置する。

溶離液はパラフィルムを巻いた状態で用いるが、この際にパラフィルムには少し穴を開けておく。(減圧されると、脱気の意味がなくなる。)

~サンプルの作り方~

・試料は必ず移動相に溶解させる。

・カラムの寿命を維持するために、サンプルの汚れを取り除くことが重要である。

従って、サンプルが綺麗ではない場合にはシリンジフィルターを用いて汚れを取り除いておく。

～装置について～

(検出器)

- ・UV (紫外線) 検出器
- ・RI (屈折) 検出器 ; UV に比べ, 感度が悪い。グラジェントモードは使えない。

～装置の使用方法～

(停電もしくは長時間使用していなかった後)

1, PA1—PA2 の色が赤く光っていない。

2, mode を二回押す。

3, 0 enter

4, dual 1 enter

5, F-set 流量を決める。

Display 3 状態を見る。

(通常始める場合)

0, heater を ON する。

1, Pomp A を ON

2, 右のネジを緩める。

3, F-set 5 enter (流量を 5cc にする。)

4, A1 flow を押す。

5, このまま 5 分程待つ。(この際に, エアーが入らないようにする。

Ex, 空気を抜くために溶離液の瓶を机の下にして, 空気を追い出す。)

6, stop を押す。

7, F-set 1 enter (用いる流量を入れる。)

8, 右ネジを締める。

9, Display 3 enter

—画面—

A1 STP(stop), TST(flow), flew(ポンプ安定) 1(流量) PRES(圧力限界)L(低)-P-H(高)

10, flow を押す。(A1, A2 が赤く光る。)

11, ここで溶離液の状態, 圧力, 流量及び温度をノートに書く。

(通常の圧力は, 57 ± 1 。

大きい場合 ; (70)ガードカラムを交換。エアーを抜く。

小さい場合 ; 液もれがないかを確認する。)

12, MX をかける。(グラジエントでない場合も, 混合溶媒の時は用いた方がよい。)

13, RI の電源を入れる。

14, charge を押す。→このまま液を流しながら一時間待つ。

15, 必要があれば Temp を変更。但し, 変更した場合はその時間から 30~40 分待つ。
(heater の温度が 45 度の場合でも, RI までの経路が長いので設定温度は 35 度でよい。)

16, 時に, error over の表示とともに, ピーという警告音になるが(屈折率が高すぎる時), この時は clear を押し, 放置する。

それでもとまらない場合は, charge を ON して, 液を流す。

17, Balance の値が-(マイナス)になっている場合は, Auto Balance を押して, ベースを 0 にする。

18, Recorder は取扱い説明書に従う。

- ・Record を押して, RI のベースを引く。(RI が安定したと思ったらスイッチを入れる。紙を節約するため。)

- ・振り切れている時(きれいな直線)は, Auto Balance を押して, ベースをあわせる。

- ・様子が安定しているようだったら, charge を off する。

- ・安定していない時は, charge を行う。

19, 固定ループに溶液をうつ。

- ・ 20ul のときは 50ul 以上のシリンジ(2 倍以上のもの。)を用いる。

- ・ シリンジに空気が入らないように溶液をとって, バルブが下の状態で針を奥までさす。

- ・ バルブを上にする。

- ・ 素早く注入。

- ・ バルブを下にする。

- ・ シリンジをはずす。→洗う→シリンジに溶離液を入れ, バルブを下にしたまま差し込み, 注入して洗浄を行う。

20, (終了方法)

- ・ heat off

↓

- ・ 5 分後くらいに pomp stop

↓

- ・ 圧力が 0~2 になったことを確認して, power off

↓

Recorder, mixture, RI を OFF

(その他)

カラムの流量は, 1 以上に絶対にしない。

使用後は, MeOH 20: H₂O 80 の溶液で, カラム内を置換。

違う溶離液にする時, 洗う時には, Pump の流量は 0.5 にする。

検量線を作った後は, 必ず List をだす。

ガードカラムを交換する時は, 本カラムにはふたをする。

はずしたガードカラムの中身は捨てる。

液を流し、もれてからつなぐ。

ESI-TOF-MS をうつ時は, はじめから RI に接合しているテフロンチューブをはずしておく。(途中ではずすと, RI の安定性が欠ける。)