

日立 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 使用法ノート

露本伊佐男

サポート：勝木太郎助商店 沼田氏 (076-268-2880)

機器立ち上げ：日立計測器サービス 西村氏 (富山 076-422-2637)

立ち上げ日：2006年3月31日

4台あるHPLCシステムのうち、

左の2台は有機溶媒系用 (GPC カラム、RI 検出器) 有機・高分子化学実験で使用。

右の2台が水系用 (逆相) 本実験 (分析化学実験) で使用。

カラム：イナートシル ODS (4.6mm × 150mm)

UV-VIS 検出器 (L-2420)

蛍光検出器 (L-2480)

右の2台は装置構成はまったく同じだが、溶離液を変えて

右側を L-アスコルビン酸 (ビタミン C) 分析用

左側をカフェイン分析用として使用する。

操作方法について

立ち上げと安定化

1. 電源スイッチを入れる (4箇所)

ポンプ (左側下) 検出器 (その上) カラムオープン (右側) 記録器 (手前の台上)

2. 溶離液の残量が十分にあるか確認し、管が溶離液の容器に入っていることを確認する
同様に排液の管が、排液タンクに入っていることを確認する

蒸留水を、新しい蒸留水に変える (重要)

3. 溶離液の流速を設定する (ポンプ前面パネル)

[MANUAL] (一番上の列、右から2番目 0のボタン) を押す

数字ボタンで B 液の割合 (%) を入力

[ENT]

~ と同様に C 液、D 液の割合、流速を入力する

(Aの量は自動的に引き算で設定される)

通常、C液、D液の割合は0と入力し、流速は1mL/minとする

例1 ビタミンCの分析

A(アセトニトリル) 10 (B, C, Dを下の通り入れれば自動的に10となる)

B(リン酸バッファ) 90

C 0

D 0

流量 1mL/min

リン酸バッファは0.2 w/v%リン酸+ 5mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム

例2 カフェインの分析

A(水) 80

B(メタノール) 20

C 0

D 0

流量 1mL/min

4. パージを行う(ポンプまでの流路をきれいにする)(重要)

ドレインバルブ(左下の白いつまみ)を反時計回り(OPEN側)に180°以上回転

(排液がドレインチューブに向かう)

[PUMP ON/OFF](一番左の緑のボタン)を押して、PUMPをONにする

(1mL/minで流れ出す)

[PURGE](左から2番目の緑のボタン)を押して、パージを始める

(音が激しくなり、9.9mL/minで流れる)

1~5分後 [PURGE] OFF

ドレインバルブ(左下の白いつまみ)を右にいっぱい回して強めに閉める

(PUMPはONのまま溶離液は流しておく)

5. 安定するのを待つ(30~60分くらい)

カラム(L-2350)の温度が設定温度(40)になっていることを確認

UV-VIS検出器(L-2420)の波長が所定の波長になっているか確認

例1 L-アスコルビン酸 WL 250 nm

例2 カフェイン WL 280 nm

UV-VIS検出器の μ RIUの数字がほぼ変わらないことを確認

(これが変わるときはしばらく待つ)

UV-VIS 検出器の AZ (オートゼロ、一番左の緑ボタン) を押して、ゼロにする
(記録計は - 0.1V ~ 1.0V の範囲しか受け付けないので AZ を押して 0 にする)

6 . 安定したかチェック

UV-VIS 検出器の AZ (オートゼロ、一番左の緑ボタン) を押して、ゼロにする
記録計 (D-2520) 左下の黒ボタン [TEST/RUN] を押す
1 分間動いて、ノイズの大きさなどを計測)
ノイズレベルが 1 桁なら分析可能。2 桁なら安定していないのでしばらく待つ

7 . 記録計のフルスケールの設定を確認

記録計右側の [PLOT ATT] ボタン (青い枠) を押す
適切な n の値 (10 以下) を入力する
フルスケールが 2^n mV となるので、濃い場合は n を大きめにする
例 1 L-アスコルビン酸 0.48mg/mL の濃度 ATT =8 (7 でも可)
例 2 カフェイン 0.225mg/mL の濃度 ATT =6

測 定

7 . 試料溶液のろ過

注射器の先端に 0.45 μ m 孔径のマイクロフィルター (水系用の青色) を装着
試料溶液を のフィルターを通して吸い上げる
注射器内のろ液を別の容器に取る

8 . サンプルをマイクロシリンジに取る

蒸留水をマイクロシリンジに出し入れして洗浄する
試料溶液で同様に共洗いする
試料溶液を必要量 (1 μ L) だけ採取する
(このとき泡が入らないよう、試料溶液中で勢いよく液を出して、ゆっくり吸い上げるの操作を繰り返す。見える部分だけでなく針の先端に泡が入ってもいけない)

9 . サンプルを打つ

インジェクションレバー (カラム下部の黒いレバー) の下向きを確認。
マイクロシリンジの針を奥まで挿入する
インジェクションレバーを上上げる (結構、力が必要)
試料溶液を注入する
針を入れたまま、インジェクションレバーを下に下げる
記録計が自動的にスタートする

10 . 測定の終了

記録計の [1 START/STOP] を押せば測定は終わる

カフェイン用は 15 分で自動的に終わるように設定されている。

補遺

- ・ L-アスコルビン酸は上述の測定条件で 1.89 分前後にピーク出現
- ・ カフェインは上述の測定条件で 11.22 分前後にピーク出現

- ・ 左のカフェイン用の条件で L-アスコルビン酸を測定すると 2.30min 前後に小ピーク出現
- ・ 右の L-アスコルビン酸用の条件でカフェインを測定すると 0.89min 前後に小ピーク出現
(標準液カフェインは出るが、なぜかキリン生茶のカフェインは右の条件で検出されない)
- ・ L-アスコルビン酸の検出はアセトニトリル 100%でも可能だが、カフェインとピークが重なる可能性がある。

- ・ 試料量は 20 μ L 以下にする。これを超えるとループカラムがあふれる。
- ・ 右の装置 (ビタミン C 用) が安定しないときは、まずアセトニトリルを 100%しばらく流すとよい。

高速液体クロマトグラフィー

ビタミンC分析用 リン酸バッファの調製法（溶離液B）

組成

0.2 w/v %リン酸（分子量 98.00）

+ 5 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム（分子量 188.22）

注 溶液 100mL に対して溶質 0.2g の濃度を 0.2 w/v %と表現する

調製法

1 リットルメスフラスコを使用する場合

・リン酸 2.0 g

・1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.941 g

に蒸留水を加えて、溶解し全容を 1 リットルとする

500 ミリリットルメスフラスコを使用する場合

・リン酸 1.0 g

・1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.471 g

に蒸留水を加えて、溶解し全容を 500 ミリリットルとする

調製後、必ずろ過する。

参考

キシダ化学に発注すると 1 リットル 2 万円。