

大阪大学 御中



インハウスセミナー

2022年4月18日

株式会社 大阪ソーダ

| 本日の内容

1. 大阪ソーダのクロマト事業の紹介
2. HPLCシステム基礎概論
3. NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

1. 大阪ソーダのクロマト事業の紹介
2. HPLCシステム基礎概論
3. NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

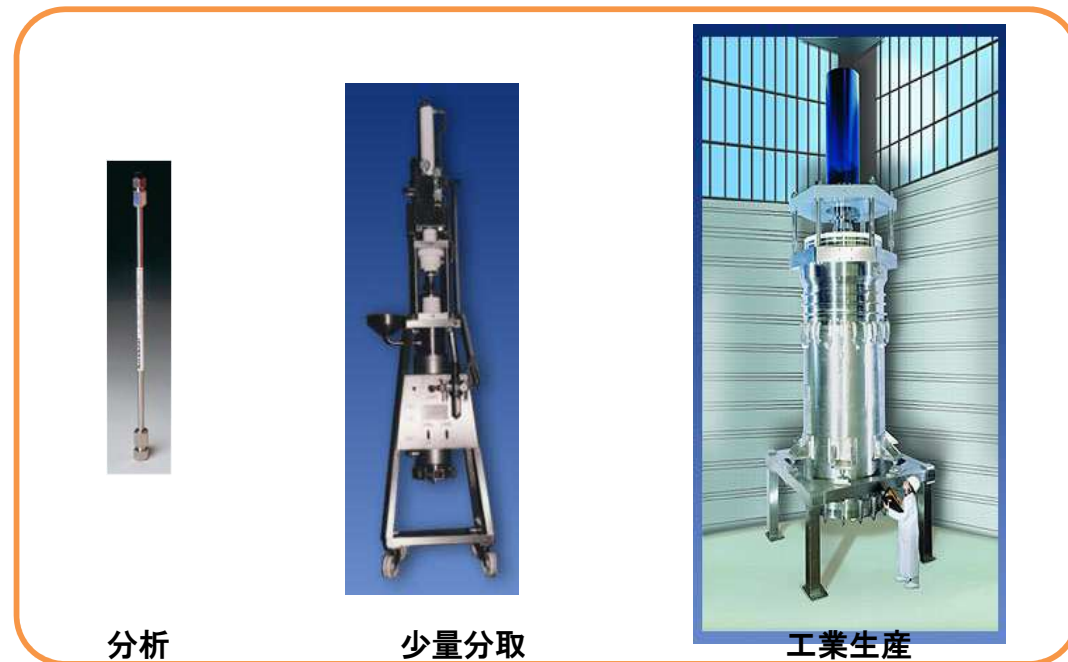
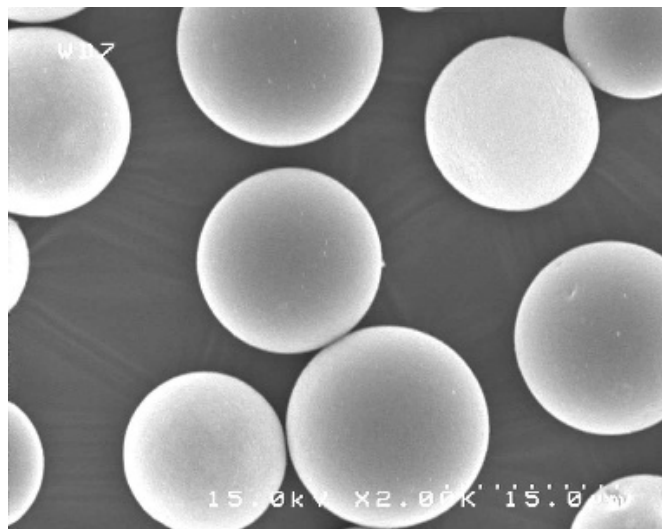
大阪ソーダとは？ ～ものづくり100年の歴史～



大阪ソーダのクロマト事業

取扱い製品

1. シリカゲル ⇒ HPLC用シリカゲル ～ダイソーゲル～



2. HPLC用カラム ～CAPCELL PAK～

3. HPLC装置

(2017/12資生堂より事業譲渡)

～NANOSPACE～



1. 大阪ソーダのクロマト事業の紹介
- 2. HPLC基礎概論**
3. NANOSPACE(電源ON～分析開始)

HPLCとは何？

HPLC(High Performance Liquid Chromatography): 高速液体クロマトグラフィー

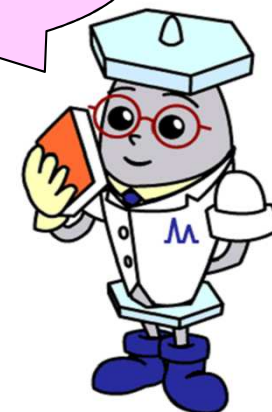
分析対象物に対して…

- ・何が含まれているか？(定性分析)
- ・どれだけ含まれているか？(定量分析)
- ・どのような構造なのか？(構造決定、構造解析)
- ・どのような状態で含まれているのか？(状態分析)

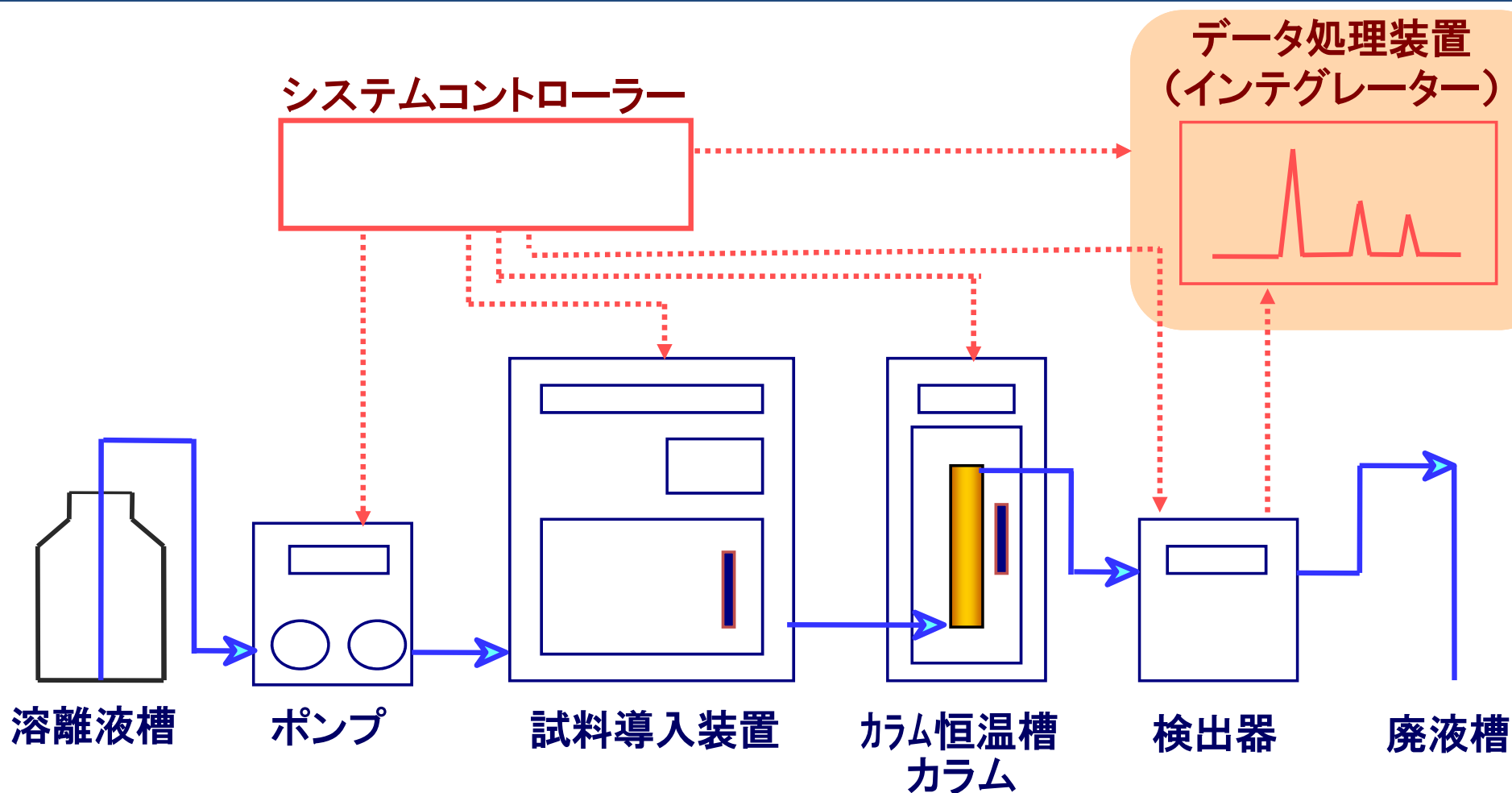
を測定することです！！

分析の目的

液体に溶けない物質は
測定できません

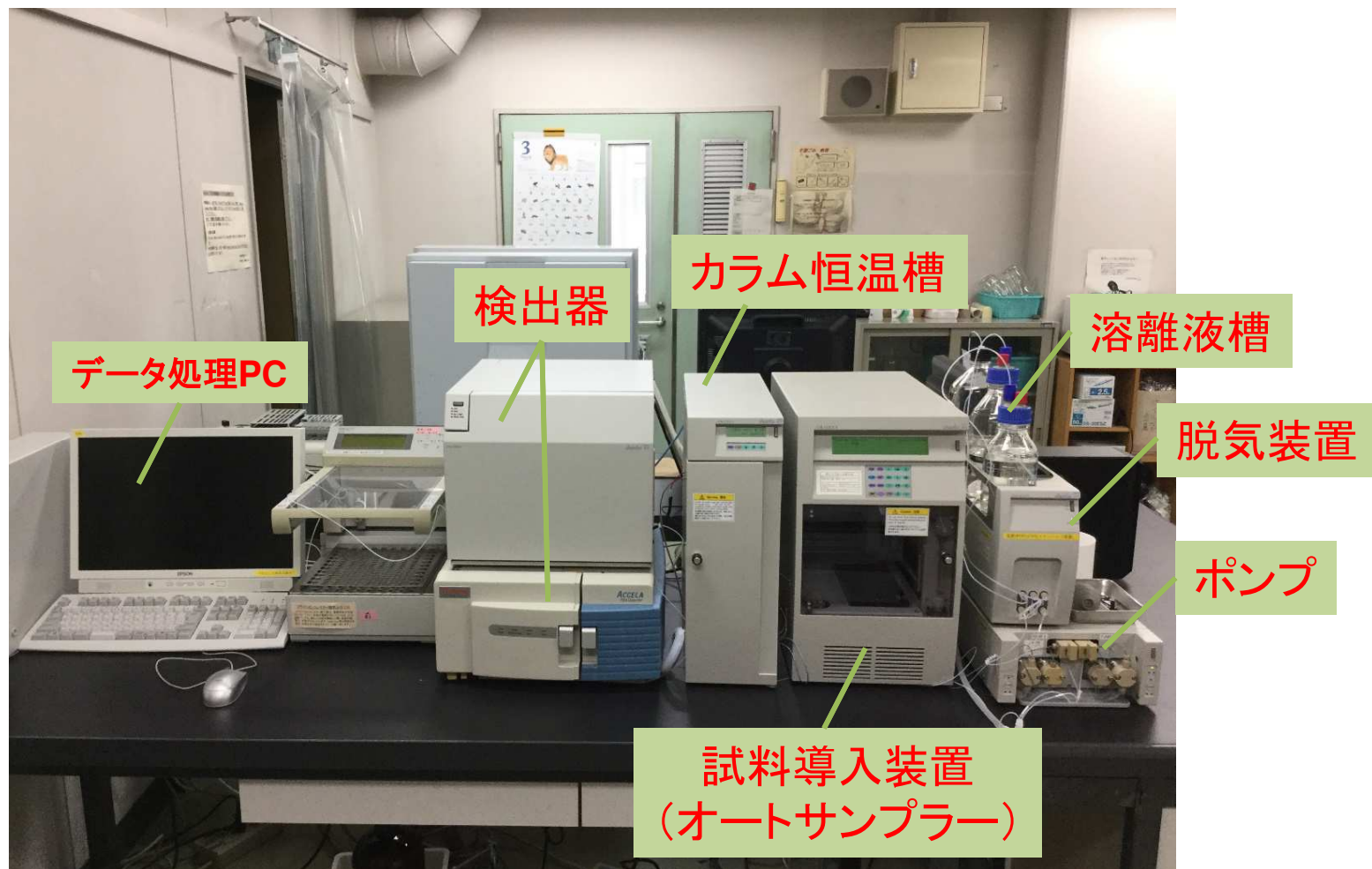


HPLCの全体構成



高速**液体**クロマトグラフィーに用いられる装置には常に**液体**(溶離液≒移動相)が流れています。これが「**液体**」と名の付くゆえんです。

大阪大学さまのHPLCシステムの場合

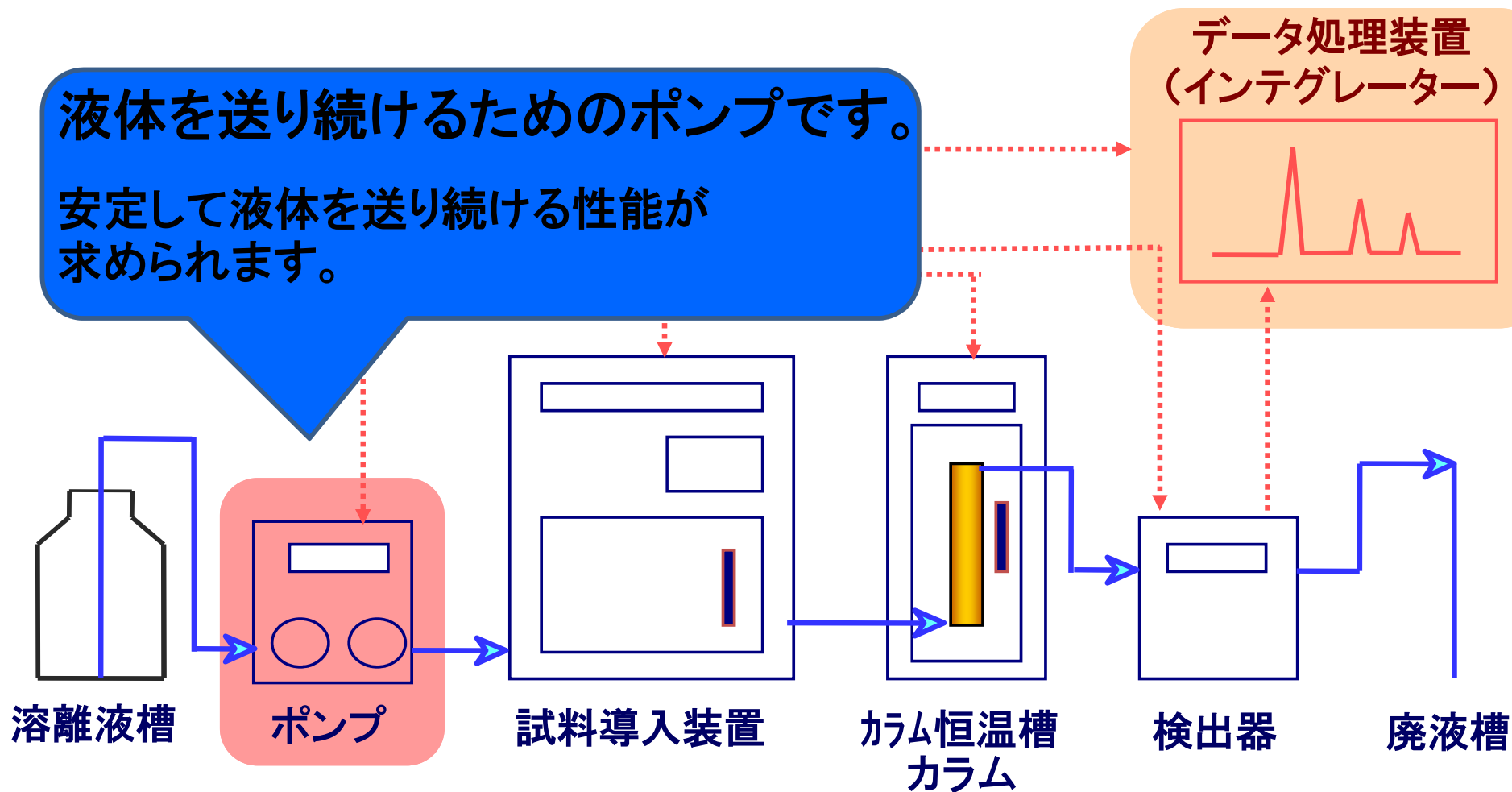


※予約システム対象機器(有償)

HPLCの全体構成(ポンプ)

液体を送り続けるためのポンプです。

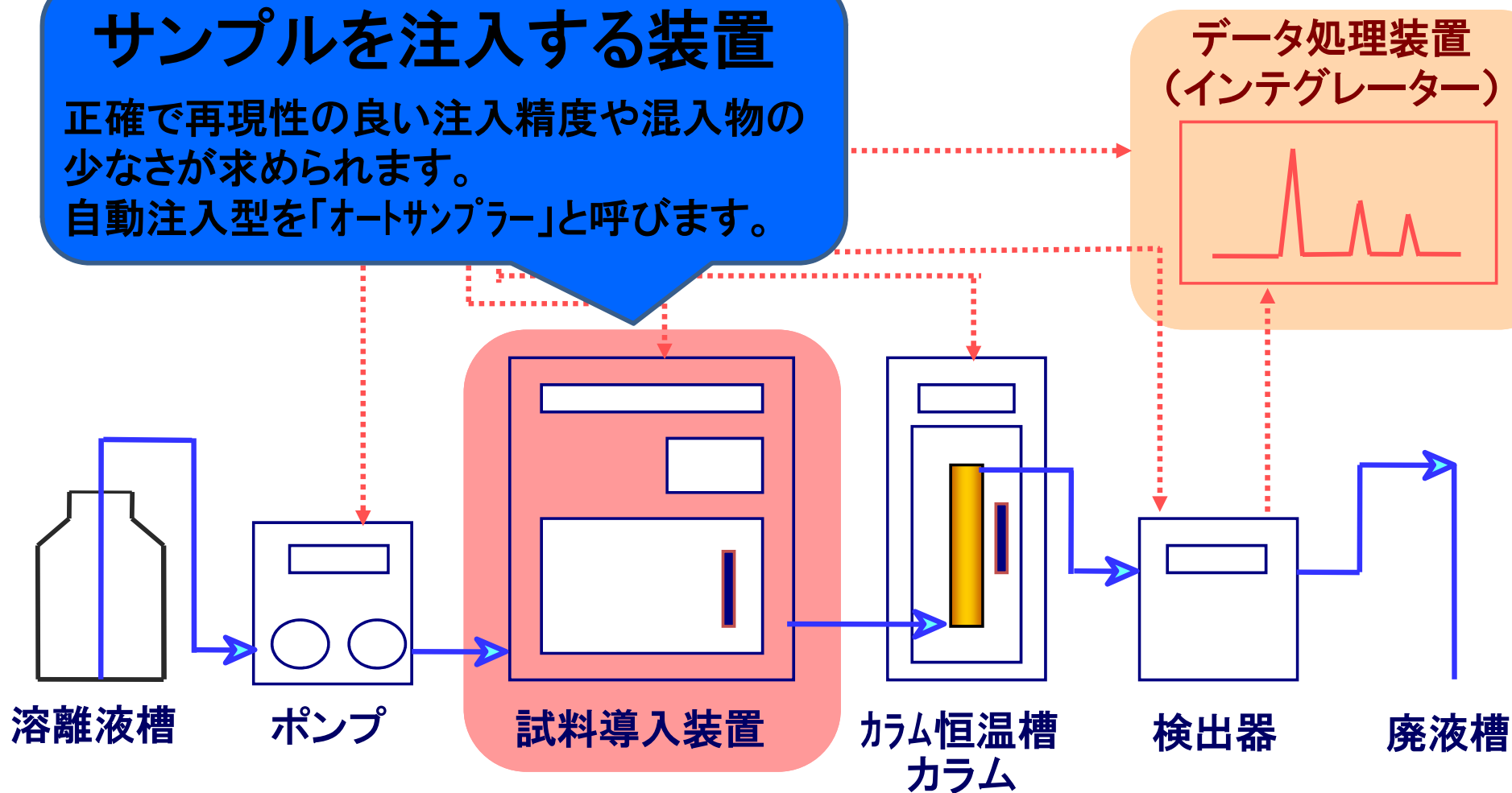
安定して液体を送り続ける性能が求められます。



HPLCの全体構成(オートサンプラー)

サンプルを注入する装置

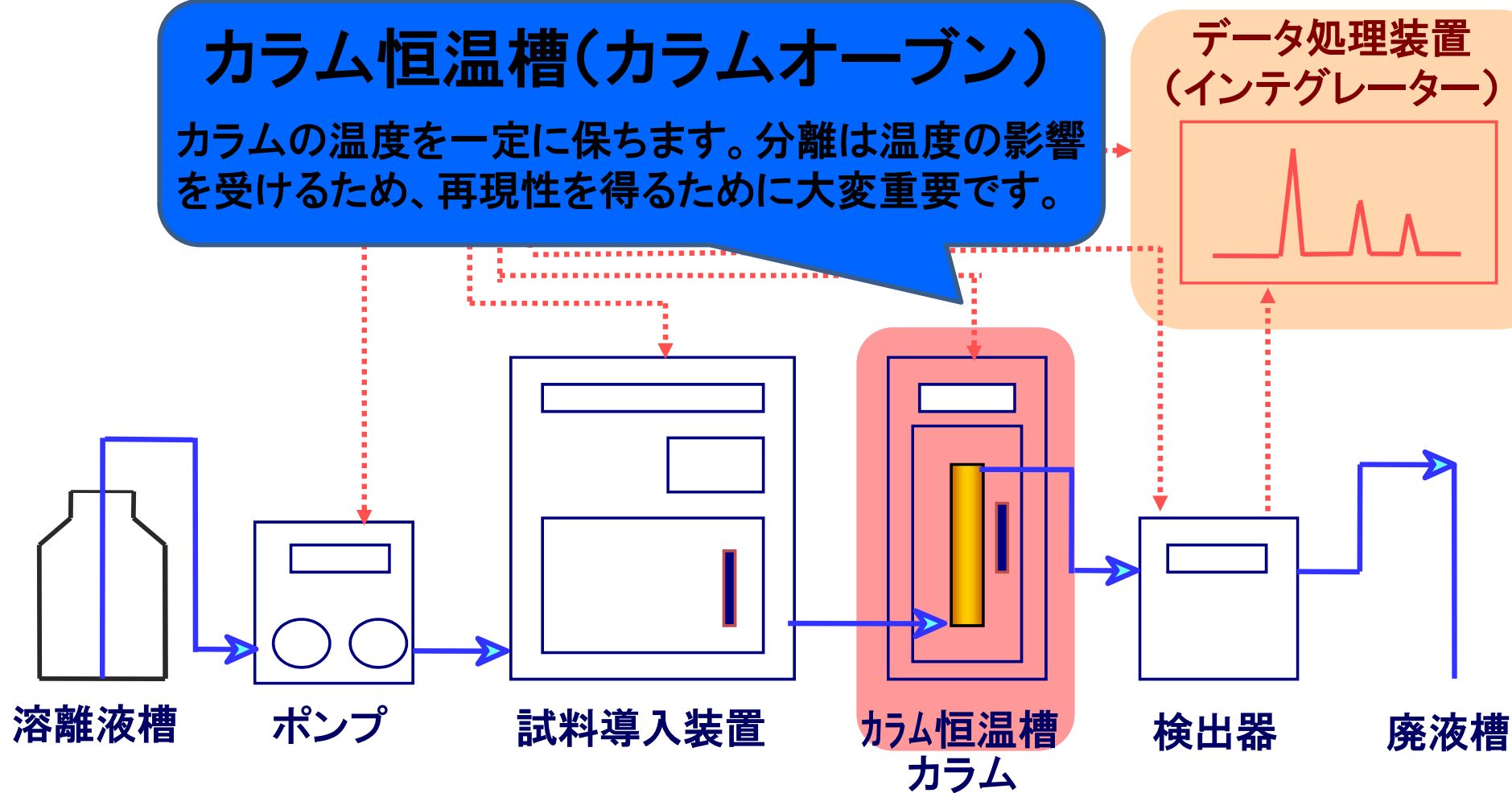
正確で再現性の良い注入精度や混入物の少なさが求められます。
自動注入型を「オートサンプラー」と呼びます。



HPLCの全体構成(カラム恒温槽)

カラム恒温槽(カラムオーブン)

カラムの温度を一定に保ちます。分離は温度の影響を受けるため、再現性を得るために大変重要です。

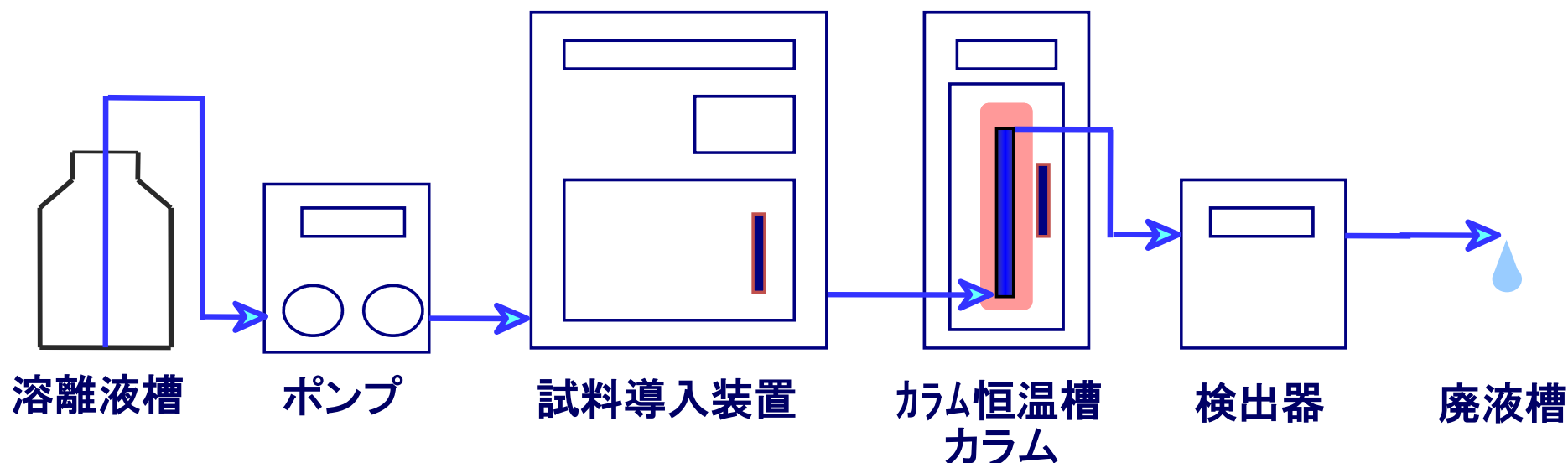


HPLCの全体構成(カラム)

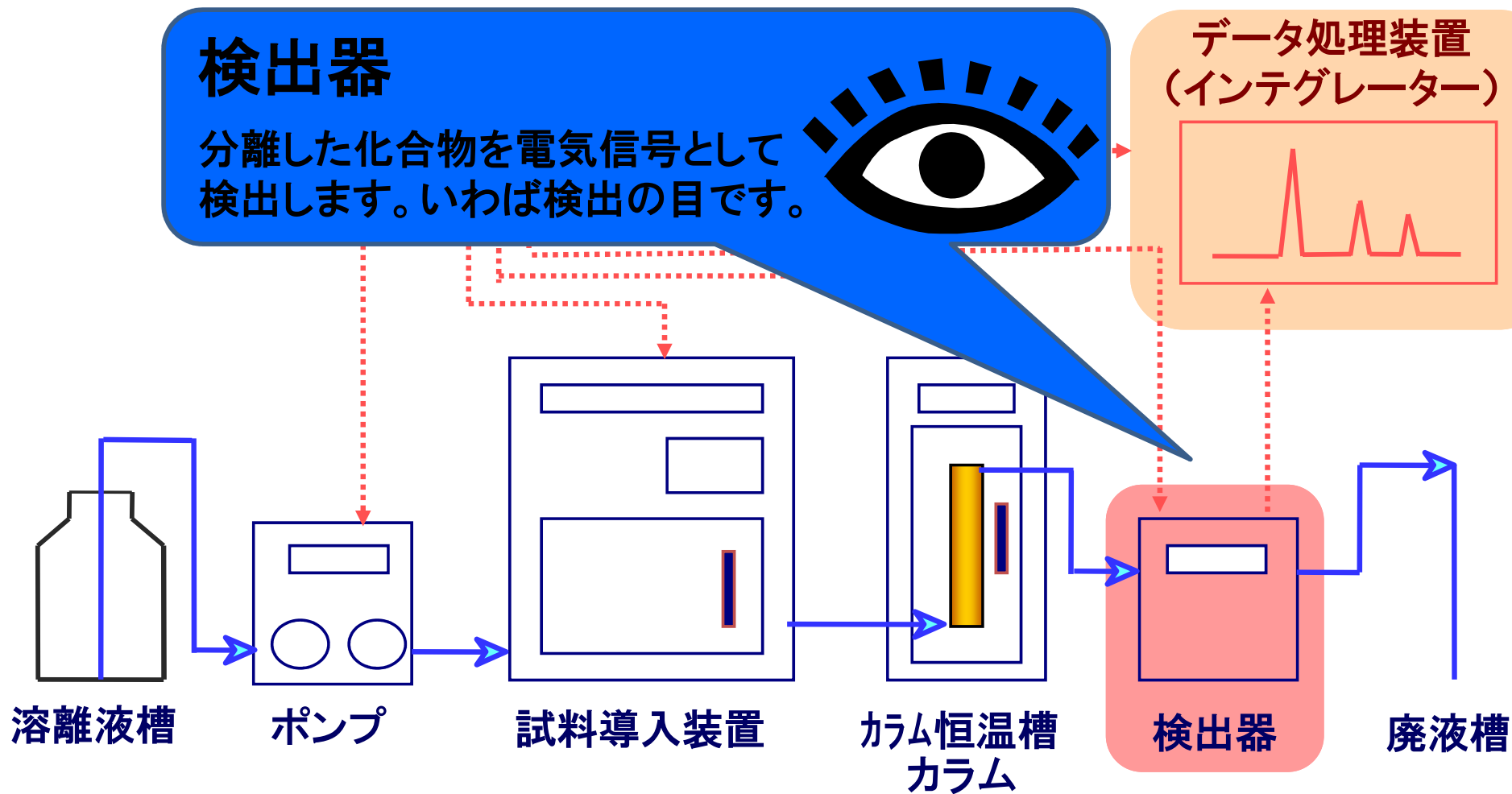
カラム

混合物を相互作用の強さの違いによって分離するツール(消耗品)です。

さまざまな種類があり、目的に合わせて使い分けます。



HPLCの全体構成(検出器)



検出器の種類に関して

～検出器の種類～

示差屈折計

紫外(可視)分光光度計

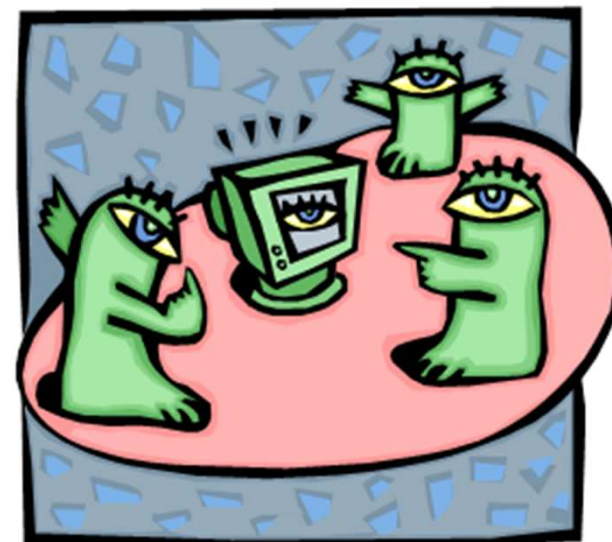
蛍光分光光度計

電気化学検出器

電気伝導度検出器

質量分析計

NMR, ICP, IR



検出器の種類に関して

～検出器の種類～

示差屈折計

紫外(可視)分光光度計

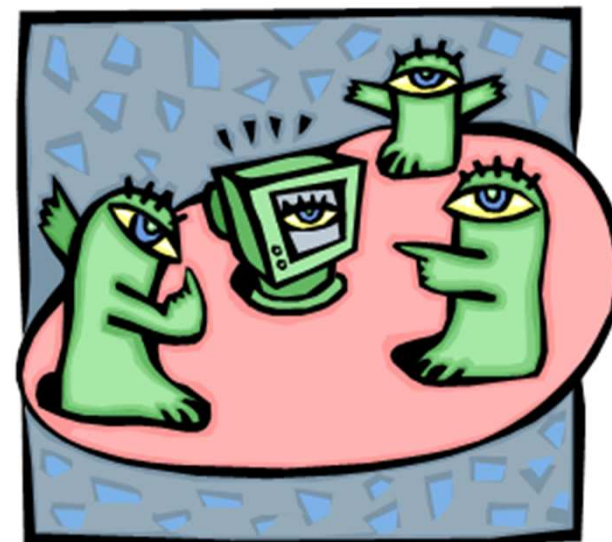
蛍光分光光度計

電気化学検出器

電気伝導度検出器

質量分析計

NMR, ICP, IR



検出器に関して



蛍光検出器

- ・検出対象物: 蛍光を発する化合物
- ・蛍光誘導体化を実施するケース。
- ・高選択性
- ・高感度

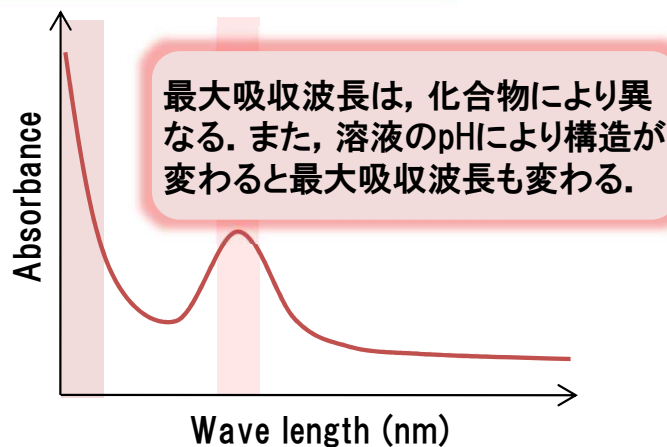
PDA(フォトダイオードアレイ検出器)

- ・検出対象物: UV吸収を示す化合物。
- ・吸収波長: C=Oで約210nm, ベンゼン環で約254nm
- ・測定波長に幅をもたせて測定できる。

化合物と吸光度

- 化合物は構造に由来した固有吸収スペクトルを持つ
- 一般的に低波長領域(200 nm付近)では糖やアルコールを除いたほとんどの化合物が吸収を持つ(=選択性がない)

低波長領域では多くの化合物に吸収があるため選択性に欠ける



■吸収波長の傾向

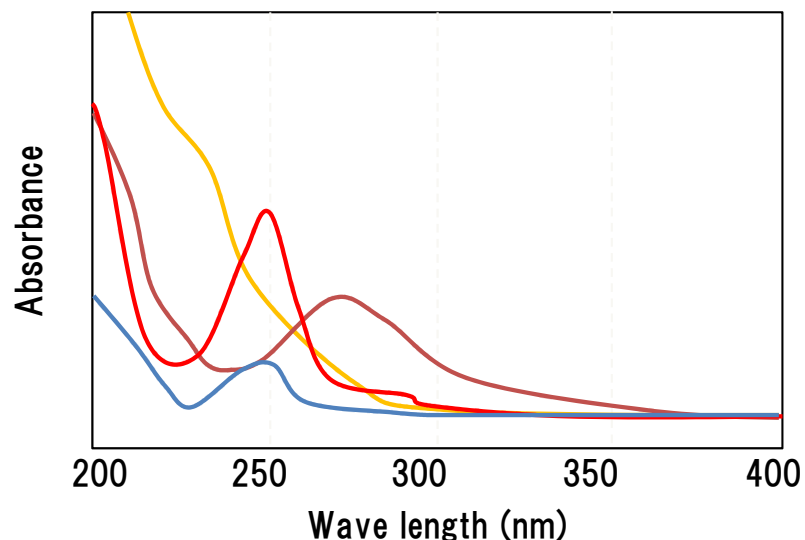
- ✓ 共役結合が伸びると一般的に長波長領域にシフトする。
- ✓ C=Oがおおよそ210 nm
- ✓ C=Oにひとつ共役結合が加わると220-230 nm付近。
- ✓ ベンゼン環が(結合する官能基が電子供与基か供給基かによっても異なる)おおよそ254nm付近。

PDA(フォトダイオードアレイ)検出器

UV検出器の特徴に加え、

測定波長に幅を持たせることが可能

例)200~400 nm



- 左図のような吸収スペクトルが得られる
- 得られた吸収スペクトルにより純度などの検証が可能
- UVと同じような単波長 検出器としての機能も搭載
- 波長可変型に比較して多少感度は低い

蛍光検出器に関して

- 蛍光を発する化合物のみ検出
- 特定波長の励起光によって励起された分子が発する特定波長の蛍光強度を測定
- 高選択性
- 高感度
- pHや溶媒によって蛍光波長がシフト、消失する
- 濃度消光がある(低濃度は非常に得意だが、高濃度では消光が起こる)

Step1:検出前

励起状態

定常状態

Step2:励起光を吸収

励起状態

励起光

励起

定常状態

過剰なエネルギーを持ち非常に不安定

Step3:蛍光の放出

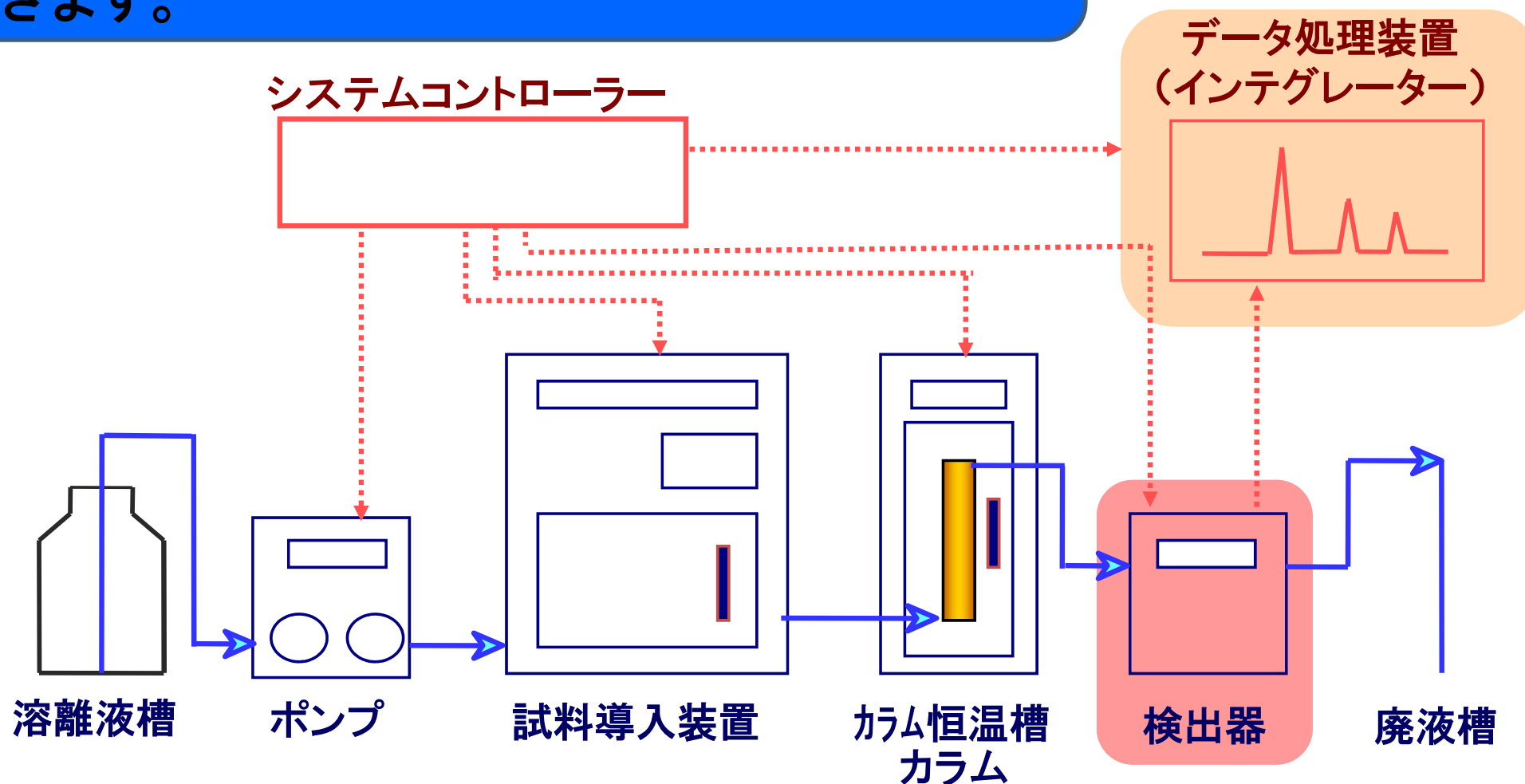
励起状態

蛍光

定常状態

HPLC全体の構成

さらに、各装置はシステムコントローラーによって遠隔・プログラム操作、データ処理ソフトで解析ができます。



| 本日の内容

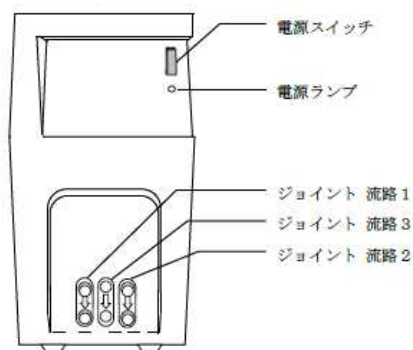
1. 大阪ソーダのクロマト事業の紹介
2. HPLCシステム基礎概論
3. **NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)**

NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

①各装置の電源を投入

初期動作終了まで待つ。

脱気装置に関しては脱気完了まで待つ。(5min程度)



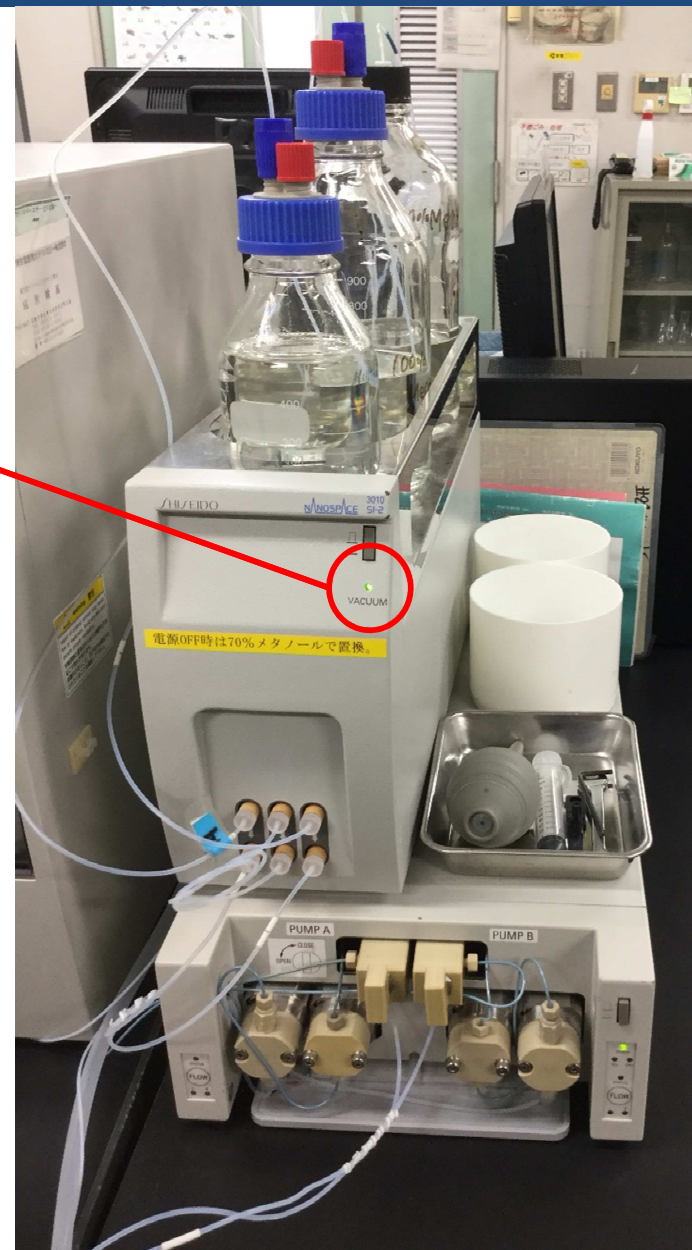
脱気装置の電源ランプが

- ・点滅: 初期動作中
- ・点灯: 脱気完了 使用可能

②移動相・Wash液を確認

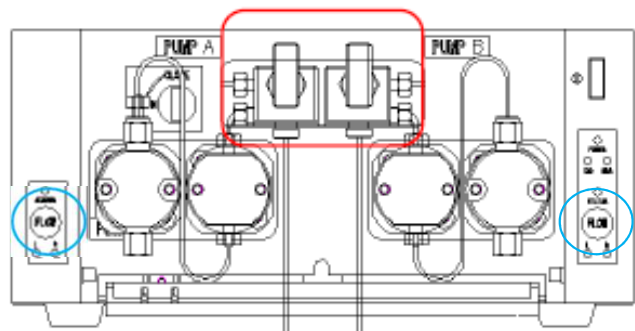
分析に使用する移動相に交換する。

塩を含む移動相の場合は必ず蒸留水に置換したのち作業する。



NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

③ポンプパージ動作を実施し、移動相を置換



ポンプパージ方法:

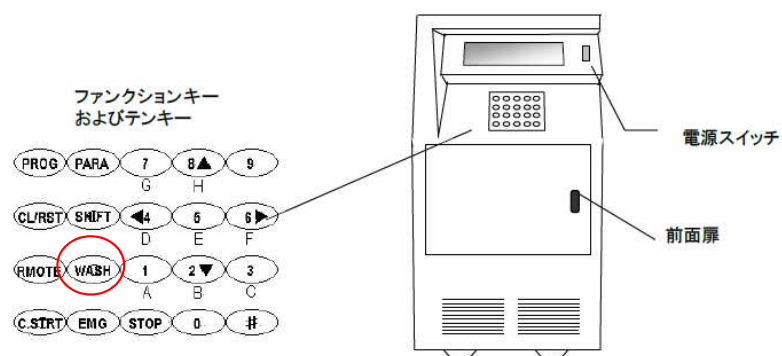
パージバルブをOPEN側に回す

FLOWボタンを3秒以上長押ししパージ動作実施

送液自動停止後、パージバルブをCLOSE側に回す

④オートサンプラーのWash動作を実施しシリンジ内に気泡が無い事を確認

Wash液を交換した場合は3回程度Wash動作を実施し、
内部を置換する。

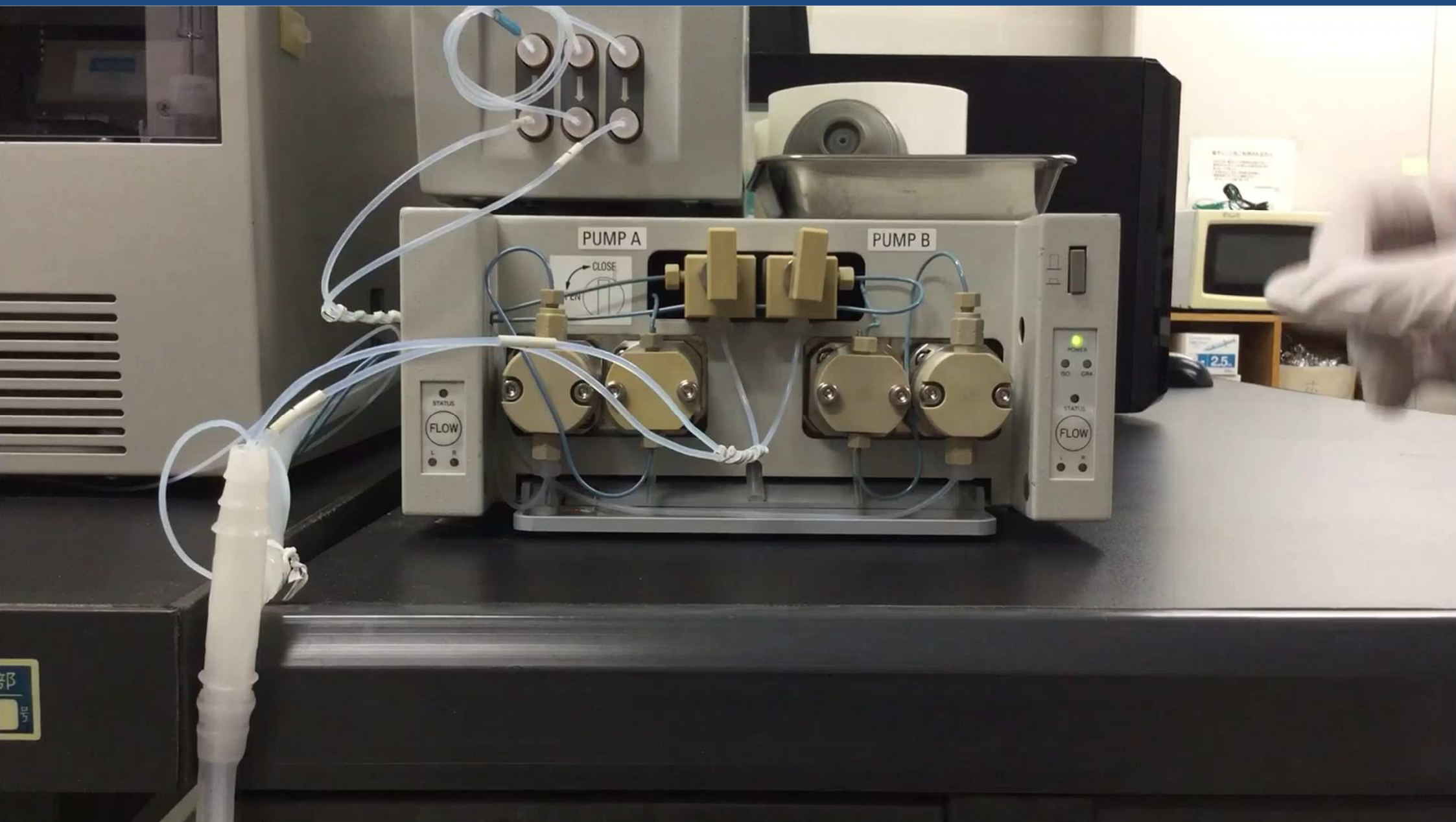


WASHボタン押下でWash動作開始



WASH動作中に
シリンジ筒内に気泡の混入が無い
事を確認

NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

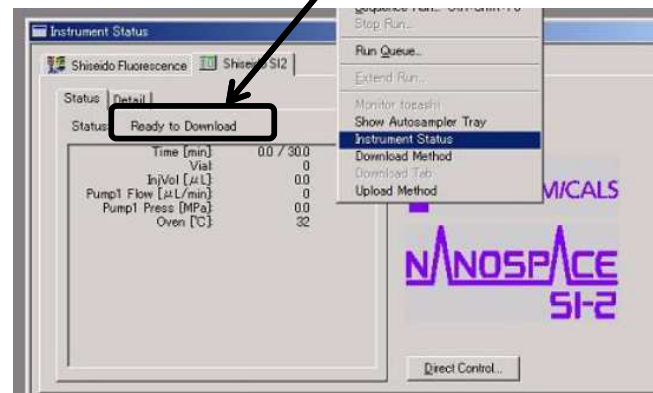
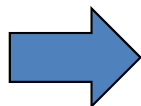


NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)



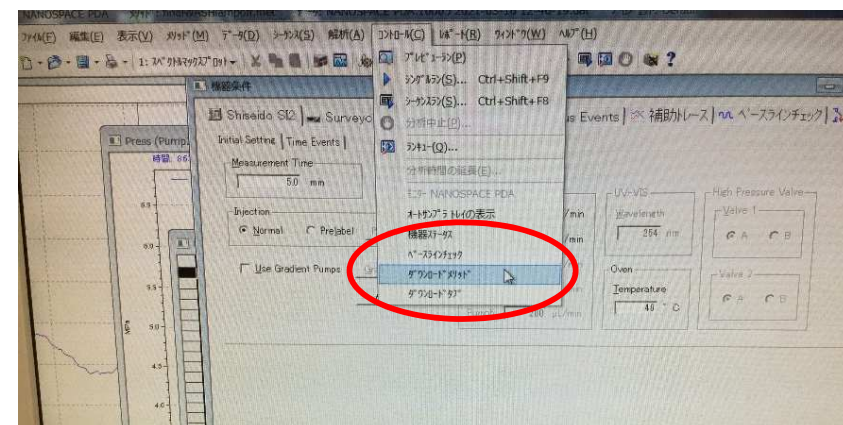
NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

- ⑤ EZChromを起動し、**Statusが”Ready to Download”**になっていることを確認。



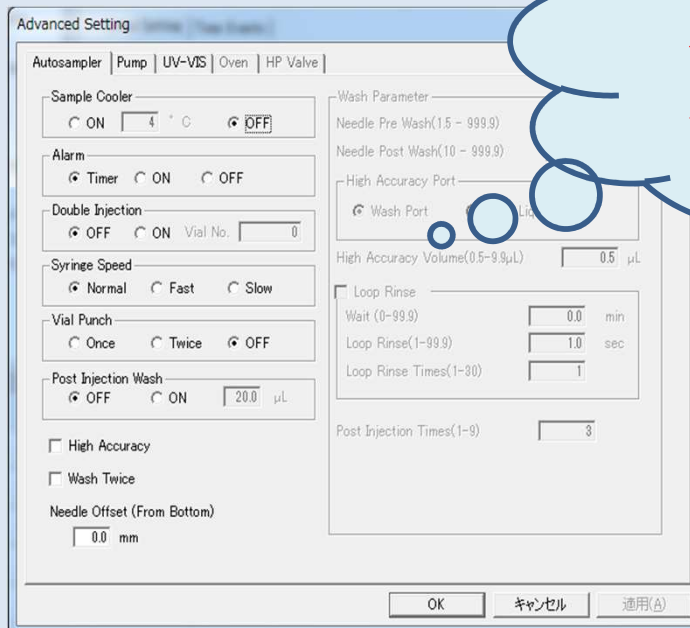
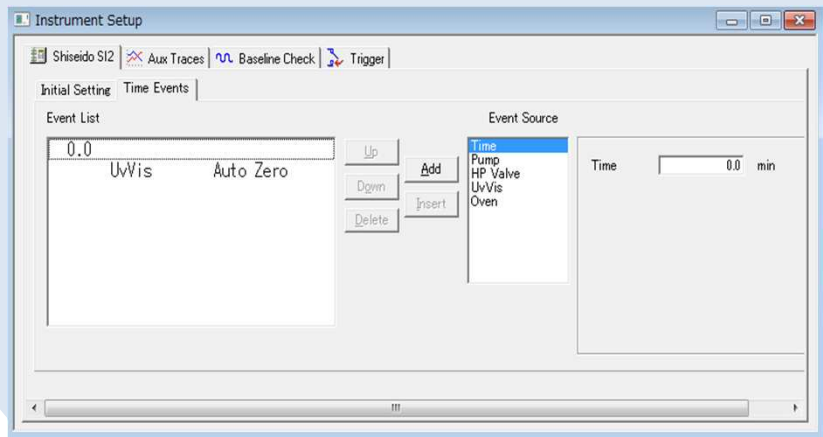
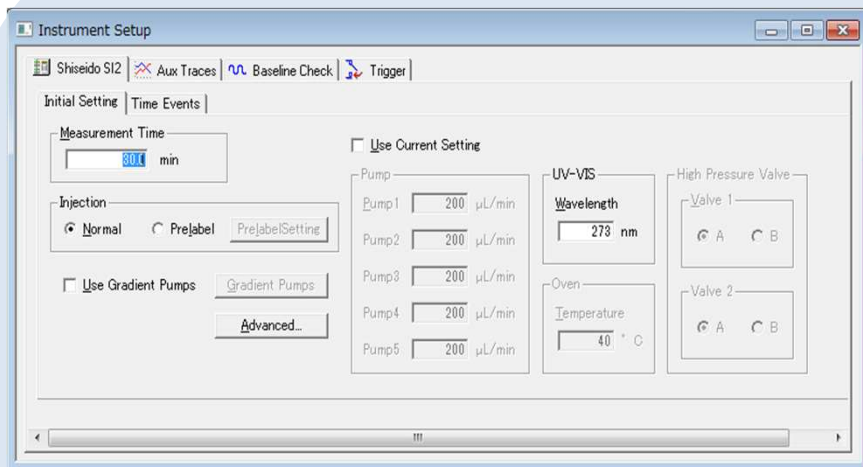
- ⑥ 機器条件を確認しポンプ送液を開始

分析条件(メソッドファイル)を開き、コントロール→**ダウンロードメソッド**を実行。
システム系内を分析に使用する移動相に置換する。



メソッドファイルって何？

分析条件



メソッドファイルとは...
分析条件+解析条件
等を定めたファイル

解析条件

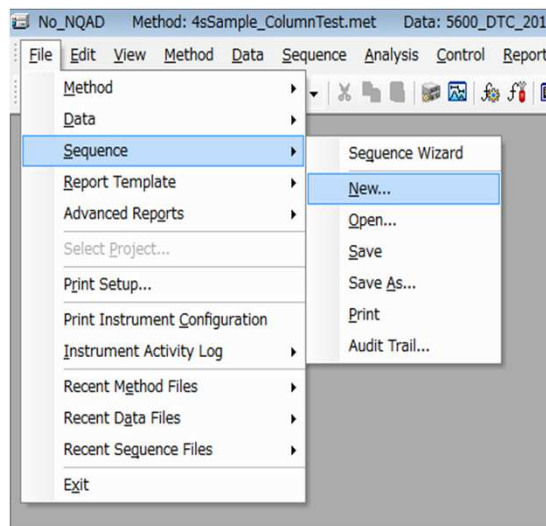
Integration Events

#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.2
2	Threshold	0.000	0.000	50
3	Minimum Area			10000
4	Integration Off	0	2	
5	Valley to Valley			

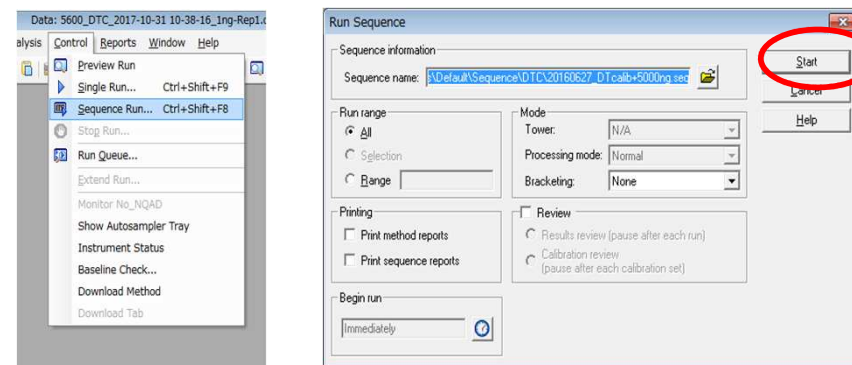
+α シーケンスファイルに関して

分析メソッドを組み合わせ、
シーケンス化することも可能です！

手順1 FileタブからSequence→Newを選択



手順3 ControlタブからSequence Runを選択



手順2 シーケンスを作成

Run #	Status	Run Type	_eve	Conc	Custom	Reps	Vial	Volume	Sample ID	Method	Filename
1		CAL CAB CCA	1		Unconfigured	2	1	1	5600_DTC_<D>	re_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_1ng.dat
2		Calibration	2		Unconfigured	2	1	5	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_5ng.dat
3		Calibration	3		Unconfigured	2	1	10	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_10ng.dat
4		Calibration	4		Unconfigured	2	2	5	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_50ng.dat
5		Calibration	5		Unconfigured	2	2	10	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_100ng.dat
6		Calibration	6		Unconfigured	2	3	2.5	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_250ng.dat
7		Calibration	7		Unconfigured	2	3	5.0	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_500ng.dat
8		Calibration	8		Unconfigured	2	3	7.5	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_750ng.dat
9		Calibration	9		Unconfigured	2	3	10.0	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_1000ng.dat
10		Calibration	10		Unconfigured	2	4	5	5600_DTC_<D>	dtime_201505Mainte.met	5600_DTC_<D>_2500ng.dat

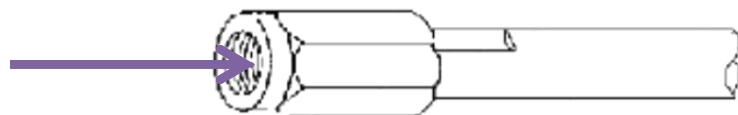
(詳細手順は簡易取扱説明書をご確認下さい)

NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

⑦ポンプを停止させ、カラムを接続

ポンプのFLOWボタンを押し送液停止。

配管固定時は配管-カラムの間に隙間ができないよう配管をカラムに押し付けながらオシネジで固定する。



⑧ポンプ送液を再開し圧力が安定していることを確認

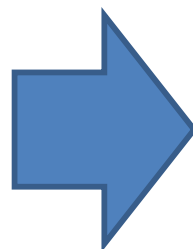
この状態の圧力を記録し、以前の圧力と異なる場合、詰まりや流路内の漏れなどを確認する。

⑨サンプルバイアルをオートサンプラーにセット

NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)



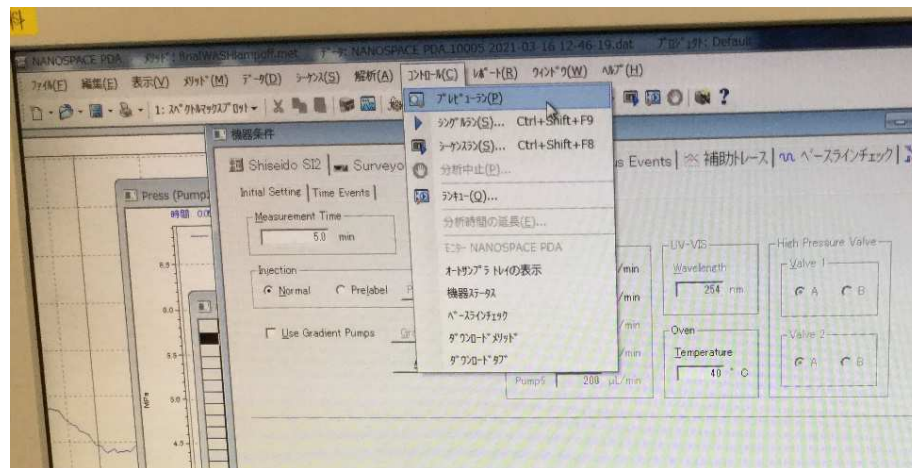
カラム接続前



カラム接続後

NANOSPACE操作(電源ON～分析開始)

- ⑩ 検出器のベースラインを取得し、安定していることを確認
EZChromのコントロール→プレビューランを実行。
ベースラインが安定している状態であれば分析中止を押し、停止させる。



- ⑪ 分析開始
EZChrom簡易取説に従い分析を開始する。

NANOSPACE操作

○分析終了後

NANOSPACEを設置している側面の壁に
分析終了後の対応方法を掲載して頂いております。(右図)



ご確認いただけると幸いです。
よろしくお願い申し上げます。

NANOSPACE 利用上の注意

・カラムの種類に関わらず、塩入 Sample/Buffer、10%以上の酸/アルカリ Buffer を使用した場合は、別途洗浄の手順がありますので共同研までご連絡下さい。

・共同研カラムをご利用の際は、ガードカラムを必ず使用して下さい。

・NANOSPACE 利用後は、メンテナンスの参考にしますので、利用記録簿の記入をお願いします。

共同実習研究センター
問合せ先：内線 3790

NANOSPACE 終了後は、必ず下記のwashを行って下さい。

* 共同研カラムをご利用でない場合もノズルやラインの洗浄のために行ってください。

wash seq. (PDA検出器用) wash_FL seq. (蛍光検出器用)

- ① Milli-Q: 200 uL/min, 10 min
- ② Milli-Q: 200 uL/min, 10 min
- ③ 100%MeOH: 200 uL/min, 10 min
- ④ 100%MeOH: 200 uL/min, 10 min
- ⑤ 100%MeOH: 200 uL/min, 10 min
- ⑥ 70%MeOH: 200 uL/min, 10 min
- ⑦ Shutdown (LampOff), 5 min

※オートサンプラーのNo.99と100に、200uLのMilli-Qをセットしてください。

共同研カラム使用の場合、⑥のカラム圧を記録簿に記入してください。

共同実習研究センター (内線:3790)

このseqを実行することにより、装置は70%MeOHで保存されている状態になります。

NanoSpace 利用時のお願い

最近ラインカートリッジやポンプヘッドが故障が頻発しております。その対策として以下の事項で装置を稼働いたします。

① 洗浄液の種類や濃度を必ず確認してください。濃度が低すぎると洗浄効果が低くなります。

② 22.23

③ 22.23

④ 22.23

⑤ 22.23

⑥ 22.23

⑦ 22.23

⑧ 22.23

⑨ 22.23

⑩ 22.23

⑪ 22.23

⑫ 22.23

・カラムの接続の方法

1. カラムの向きを確認する。
2. 通常より速い流速(内径2mmなら60uL/min程度)で、バッファを流す。
3. ラインはオシメタ(固定ネジ)より長めに出しておく(等長下)。



4. ラインからバッファが出てきたことを確認し、カラムに接続する。この時、ラインの先がカラムの口にしっかり入っていることを確認し(写真下)、ラインが口から外れないように、ネジを押し込み、締める。



5. カラムの逆の口からバッファが出てきたことを確認し、ラインに接続する。

注意: オシメタはPEEK製です。ラインが入っていない、ネジのみをカラム等につなごうとすると、ネジがつかれます!! また、締めるときは、手でお困りになります。

当社セミナーご紹介

セミナーテーマ例 / 時間 (目安)

1. HPLC基礎概論 (60分)
2. カラムの選択方法 (60分)
3. C18カラムのパラメータ評価 (50分)
4. 塩基性化合物の分析方法提案 (40分)
5. 親水性化合物～疎水性化合物の一斉分析 (50分)
6. タンパク・ペプチド分析におけるカラムの特性 (20分)
7. 充填剤と負荷量 (40分)
8. CAPCELL PAK SCXの有用性 (40分)
9. CAPCELL CORE(コアシェル)の特長 (40分)
10. トラブルシューティング (50分)
11. 高速分析への応用 (30分)
12. カラムのダウンサイジングについて (30分)
13. キャリーオーバー対策 (40分)
14. 電気化学検出器(ECD)の特長と応用例 (30分)

ご清聴ありがとうございました

お問い合わせ先
株式会社大阪ソーダ ヘルスケア事業部
営業部クロマト営業課
TEL:06-6110-1598
Email:silica@osaka-soda.co.jp
WEBSITE:<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/index.html>