

HPLC 装置(資生堂 NANOSPACE SI-2)操作マニュアル

(2015 年 8 月 17 日改訂)

< I . 分析装置概略図 >

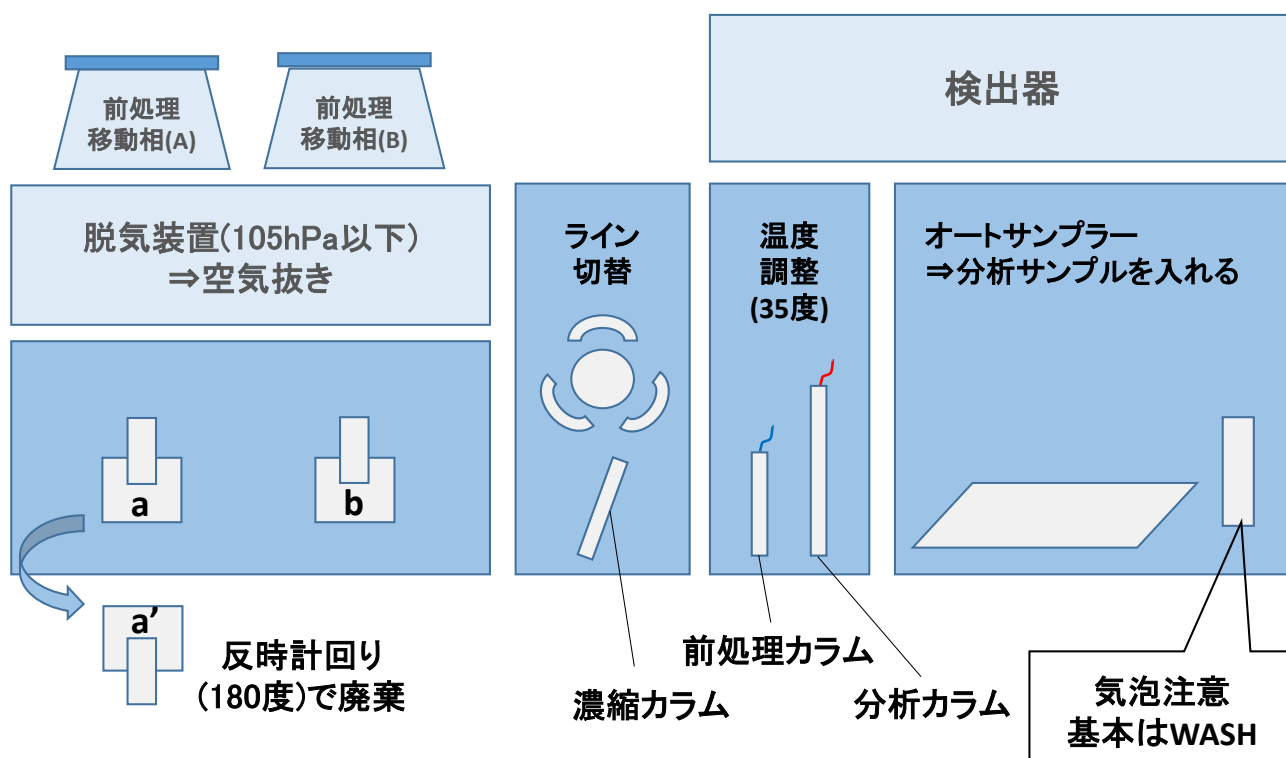


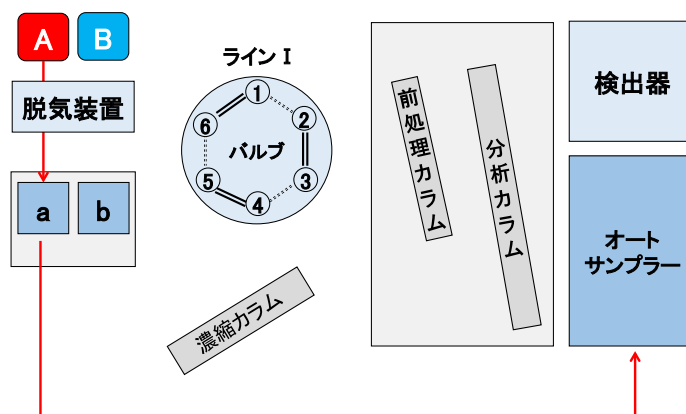
図1 分析装置概略図

- 移動相(A).....前処理移動相 (ポンプ A と接続)
- 移動相(B).....分析移動相 (ポンプ B と接続)
- 脱気装置.....空気抜き
- ポンプのパージバルブ.....反時計回りに 180 度回すとエア抜き
- オートサンプラー.....分析サンプルを入れる場所
- 検出器.....中のランプによって、成分分析をする場所

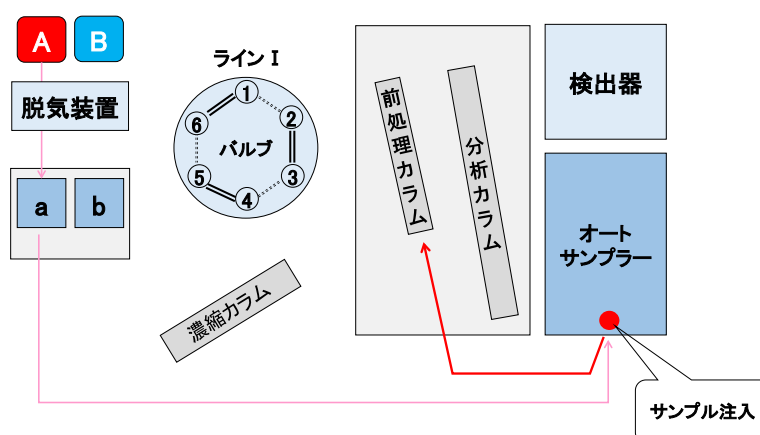
< II. 分析の流れ・概略 >

1. 前処理

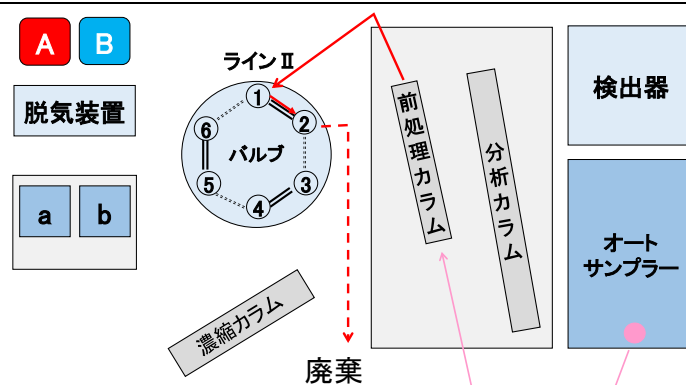
① 前処理移動相(A)が脱気処理を経てポンプ a によりオートサンプラーへ運ばれる。



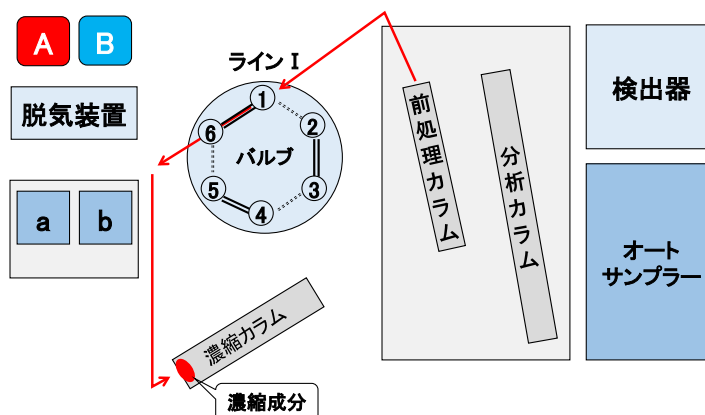
② 移動相にサンプル（唾液）が注入され、前処理カラムへ運ばれる。



③ サンプル中のタンパク質は、バルブ (1) からラインIIを通過してバルブ (2) へ運ばれ、廃棄される。

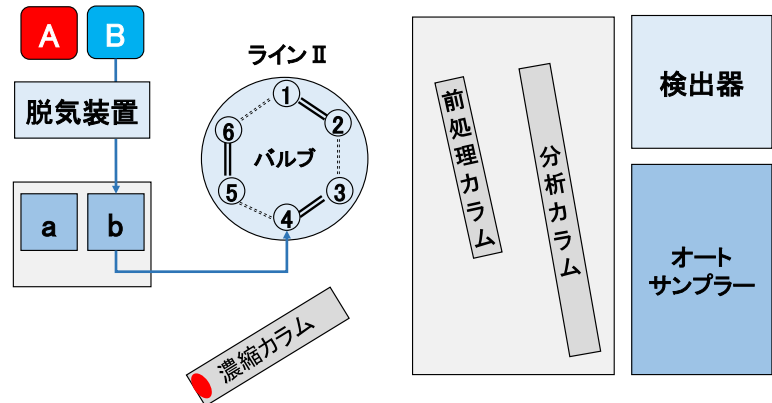


④ バルブが切換って、バルブ (1) へ運ばれたサンプル成分は、バルブ (6) へ運ばれ、濃縮カラムへ移動し濃縮される。

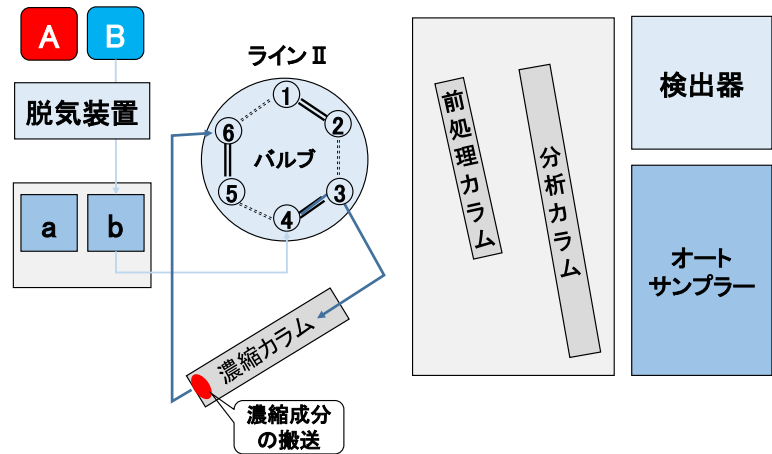


2. 分析

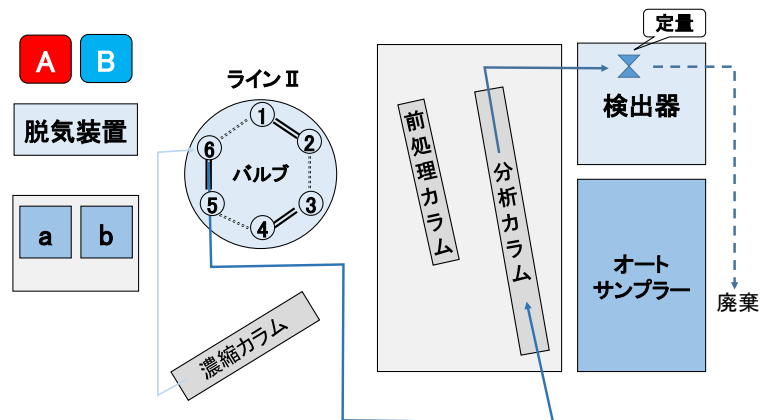
① 分析移動相(B)が脱気処理を経て、ポンプ b によりバルブ(4)へ運ばれる。



② ラインIIにより濃縮カラムへ運ばれた移動相(B)は、カラムに残ったサンプル成分をバルブ(6)へ運ぶ。



③ ラインIIを通り、分析カラムへ運ばれたサンプル成分は、諸成分が分離されて検出器に運ばれ検出される。分析後のサンプルは廃棄される。



<Ⅲ. 準備>

1. 基本確認事項 (来たらまずすること)

- ① 前処理移動相(A)と分析移動相(B)に溶媒が十分に入っているかを確認する。
量が少ない場合→随時足す。
溶媒がない場合→「4. 移動相の溶媒の作り方」の項目を参照して作成する。
しばらく装置を使用しなかった場合→溶媒が劣化している可能性があるため、
新しい溶媒に取り換える。
- ② (A)と(B)から伸びるチューブにエアが入っていないかを確認する。
エアが入っている場合→「3. エア抜き (1)ポンプのエアの抜き方」の項目を参照して**必ずエア抜きをする**。
- ③ オートサンプラーのシリンジ内にエアが入っていないかをオートサンプラーのパネルの WASH ボタンを押して確認する。
エアが入っている場合→「3. エア抜き (2)オートサンプラーのシリンジ内のエアの抜き方」の項目を参照して、**必ずエア抜きをする**。
- ④ 脱気装置の値が 105hPa 以下になっているかを確認する。基本的に内部の空気量が増加すると自動で起動して、脱気する。数値が 105 以上になっても、脱気装置が動かない場合は、装置の故障の可能性がある。電源を切って、再起動しても動かない場合は、業者に連絡をとること。

2. 基本操作

- ① 全ての装置の電源(6つ)を入れる(順番は関係なし)。
- ② パソコンの電源を入れ、ログインする。
- ③ ソフトウェア(EZChrom Elite)のアイコンをダブルクリックする。
- ④ ソフトウェア起動後、nanospace のアイコンをダブルクリックし、「コントロール」→「機器ステータス」で状態を確認する。Surveyor PDA Plus のタブで一番上の Status が **Ready** になっているかを確認する。Shiseido SI2 のタブで Status が Ready to Download になっているかを確認する。
- ⑤ 分析する場合はシングルラン、もしくはシーケンスの作成(V. 測定の「3. 分析シーケンスの作成」項目参照)。

3. エア抜き(エアのない場合は不要)

(1) ポンプ(溶媒ボトルおよび脱気装置を含めて)のエアの抜き方

※ポンプのエア抜きは1つずつ行う。

- ① ポンプのパージバルブを反時計方向に 180 度回してパージバルブを開ける。
- ② 該当するポンプの「FLOW」ボタンを STATUS ランプが点灯するまで長押しする。3 分後に自動停止するが、エアが抜けたのを確認でき次第、「FLOW」ボタンを押して手動停

止が可能。

(2) オートサンプラーのシリンジ内のエアの抜き方(エアのない場合は不要)

- ① 基本は WASH ボタンを押して様子を見る。それでも抜けない場合は、②以下の作業を行う。
- ② オートサンプラーの扉を開け、シリンジのプランジャーを固定している白色のネジを反時計方向に回して、はずす。
- ③ オートサンプラーの液晶画面で、左上の FILE 番号に 10→# の順で入力し、FILE 10 を開く。
- ④ TEST NO. 16→# (SYR SUC) の順で入力するとシリンジ固定部が下がり、プランジャーの部分が離れる。TEST NO. 6→# (NEDL WASH) で WASH 位置にニードルが移動する。TEST NO. 13→# (VALV NEDL) でストップバルブがニードル方向に開放される。次に TEST NO. 9→# (PUMP ON)。
- ⑤ 人差し指等で、プランジャーの底部分を上に押し当てて、それをゆっくり数回繰り返し、シリンジ内のエアを抜く。
- ⑥ エアが抜けたのを確認できたら、10→# (PUMP OFF)、11→# (VALV OFF)、17→# (SYR UP) の順で入力し、シリンジ固定部を上げる。
- ⑦ 上げ終わったら、白色のネジを時計方向に回して、プランジャーを固定する。
- ⑧ オートサンプラーの扉を閉め、18→# (*TEST END) を入力し、FILE 10 の画面を閉じる。

4. 移動相の溶媒の作り方 (資生堂・神田さん監修)

- ① 前処理移動相(A)用 5 mmol/Lのりん酸緩衝液：りん酸二水素カリウム(KH_2PO_4)を 0.340g、りん酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)を 0.354g精密に量り、それぞれに水を加えて溶かし、1Lのメスフラスコに入れ、水で 1000mL にメスアップする。
分析移動相(B)用 10 mmol/Lのりん酸緩衝液：りん酸二水素カリウム(KH_2PO_4)を 0.680g、りん酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)を 0.709g精密に量り、それぞれに水を加えて溶かし、1Lのメスフラスコに入れ、水で 1000mL にメスアップする。
※ KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 は水に溶けるまで、超音波洗浄機にかける。
計量した KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 は、使用記録ノートに記録を残すこと。
→ ex. 10月20日A液作成: KH_2PO_4 0.340g、 Na_2HPO_4 0.354g
計量の際、 KH_2PO_4 は 0.3395 g 以上、0.3404 g 以下、 Na_2HPO_4 は 0.3535 g 以上、0.3544 g 以下となるように量る (小数点第 3 位を四捨五入する)。計量の仕方については、「6. 電子天秤の使用法」の項目を参照すること。
- ② 5 mmol/L のりん酸緩衝液 980mL 採取し (1000 mL のメスシリンダー使用)、これに、アセトニトリルを 20 mL を加え、前処理移動相(A)用の溶媒を作成する。

- ③ 10 mmol/L のりん酸緩衝液 780mL 採取し (1000 mL のメスシリンダー使用)、これに、アセトニトリルを 220 mL を加え、分析移動相(B)用の溶媒を作成する。
- ④ 溶媒作成後には、作成の日付をマジックペンでビンの容器に記入する。

※①～④の各段階では、**共洗い** (容器を振って、容器内部を対象となる液体を用いて洗浄) を十分に行うこと。

※アセトニトリルを廃棄する際は、測定装置の下にある廃液タンクに捨てること。

※水は、水道水ではなくミリポアの純水を使用する。

※マイクロピペットのチップは、異なる液を扱う際には必ず交換すること。

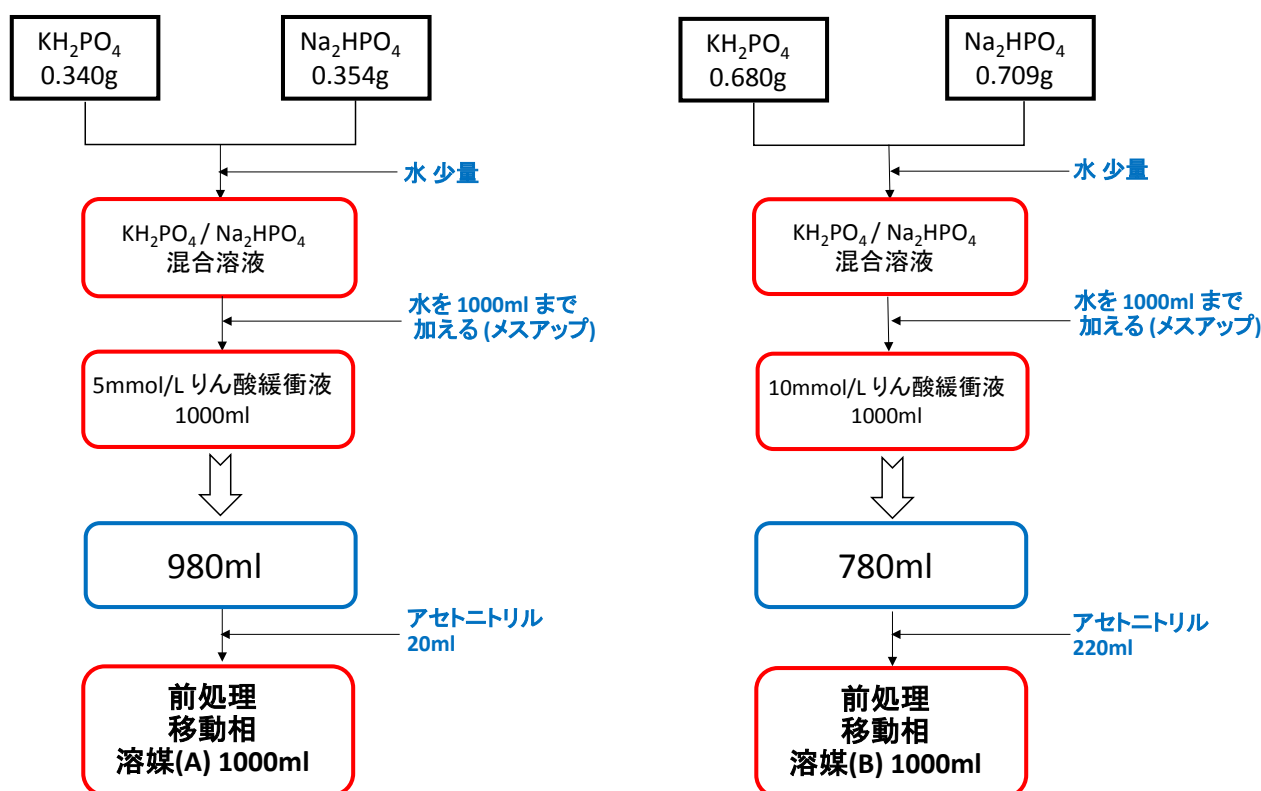


図 2 移動相溶媒精製法

5. オートサンプラー洗浄液の作り方

- アセトニトリル 10ml と、純水 490ml を混合 (2 週間ほどもつ)。

6. 電子天秤の使用法

- ① 天秤の左上の方にある気泡が円の中に入っていることを確認。もし入っていない場合は、後の方の調整で、円の中に気泡が入るように調整する。
- ② 震動が少なく水平な台の上に電子天秤を乗せ、電源を入れる。
- ③ 4つ折りにした薬包紙を秤の上に乗せ、重さを確認する(約 0.3g で正常)。
- ④ RE-ZERO のボタンを押し、ゼロ調節をする。

⑤ 薬匙を使い、薬包紙の上で薬品を取り出し、計測する。

※薬匙を使って薬品の入っている容器から一度取り出した薬品は、容器の中に戻さないこと(余った薬品は、廃棄用の薬包紙の上に置いておく)。

<Ⅳ. サンプル採取と標準液作成>

1. 唾液分離

(1) 唾液採取

- ① 唾液採取用の容器の2つのキャップのうち上のふたを開け、手を触れずに中の綿を口に含ませる。
- ② 綿を舌の裏にくっつけて3分ほど待ってから、綿を容器に戻す。口内ではあまり動かさないように指示する。

(2) 遠心分離

- ① 電源を入れて、唾液の容器を分離機の外円側から対角線上になるように入れる。
- ② ふたを閉めてスタートボタンを押す(3000rpm×5分間)。

⇒分離後の唾液は冷凍保存

(3) 唾液分注

- ① 分離後、装置から容器を取り出したら、いったん上のふたごと中容器をはずし、上のふたを確保した後に中容器(脱脂綿入り)を捨てて、上のふたをする。
- ② マイクロピペットの先端にチップをつけ、目盛りを60 μ lにする。
- ③ 唾液をサンプルバイアルに移し替える。この際、マイクロピペットの先端をできるだけサンプルバイアルの底に近づけてから、少しずつ上にあげながら入れていくと、空気が入りにくい(※気泡が下にたまったら、容器を爪ではじくなどして取り除く)。
- ④ マイクロピペットの横のボタンを押して先端のチップをはずし、廃棄する。チップは毎回交換する。

2. コルチゾール標準液の作り方 (資生堂・神田さん監修)

- ① CS (ヒドロコルチゾン)、CZ (コルチゾン) 各5mgを5mLのメスフラスコに精密に量りとり、メタノールで溶かした後、メタノールで正確に5mLとする。(CS、CZ溶液として、1000 μ g/mLとなります。)

※計量したCSとCZは使用記録ノートに記録を残すこと。

→ ex. CS 5.0mg, CZ 5.0mg

- ② ①で調製した溶液をホールピペットで正確に1.0mLとり、100mLのメスフラスコに入れ、これにメタノールを加え、正確に100mLとする。

(CS、CZ溶液として10 μ g/mLとなります。)

- ③ ②で調製した溶液をホールピペットで正確に1.0mLとり、100mLのメスフラスコに入れ、これにメタノールを加え、正確に100mLとする。

(CS、CZ溶液として100ng/mLとなります。)

- ④ メタノール 60 mL に水 540 mL を加えて、10%メタノールを 600 mL 作成する。
10 mL のメスフラスコに③で調製した溶液を、それぞれ正確に（ホールピペットあるいはマイクロピペット）3 mL、1.0 mL 採取し、10%メタノール溶液を加え、正確に 10 mL とする。

（CS、CZ 溶液としてそれぞれ 30 ng/mL、10 ng/mL となります。）

- ⑤ ④で調製した 10 ng/mL 溶液を用いて、それぞれ正確に（ホールピペットあるいはマイクロピペット）3 mL、1.0 mL 採取し、10%メタノール溶液を加え、正確に 10 mL とする。

（CS、CZ 溶液としてそれぞれ 3 ng/mL、1 ng/mL となります。）

- ⑥ 上記の 5 種類（100 ng/mL、30 ng/mL、10 ng/mL、3 ng/mL、1 ng/mL）で、検量線を作成する。

※標準液は劣化するので、随時作り直すこと。冷凍保存も望ましい。

3ng/ml=3ppb, 1ng/ml=1ppb

- ⑦ 標準液作成後には、作成の日付をマジックペンでビンの容器に記入する。

※①～⑥の各段階では、共洗い(容器を振って、容器内部を対象となる液体を用いて洗浄)を十分に行うこと。

※①～⑤の各溶液(1, 3, 5, 10ml)採取の際は、目盛りを 1000 μ l にしたマイクロピペットを使用する(ex. 10ml 採取=マイクロピペット 10 回分)。

※水は、水道水ではなく純粋を使用する。

※マイクロピペットのチップは、異なる液を扱う際には必ず交換すること。

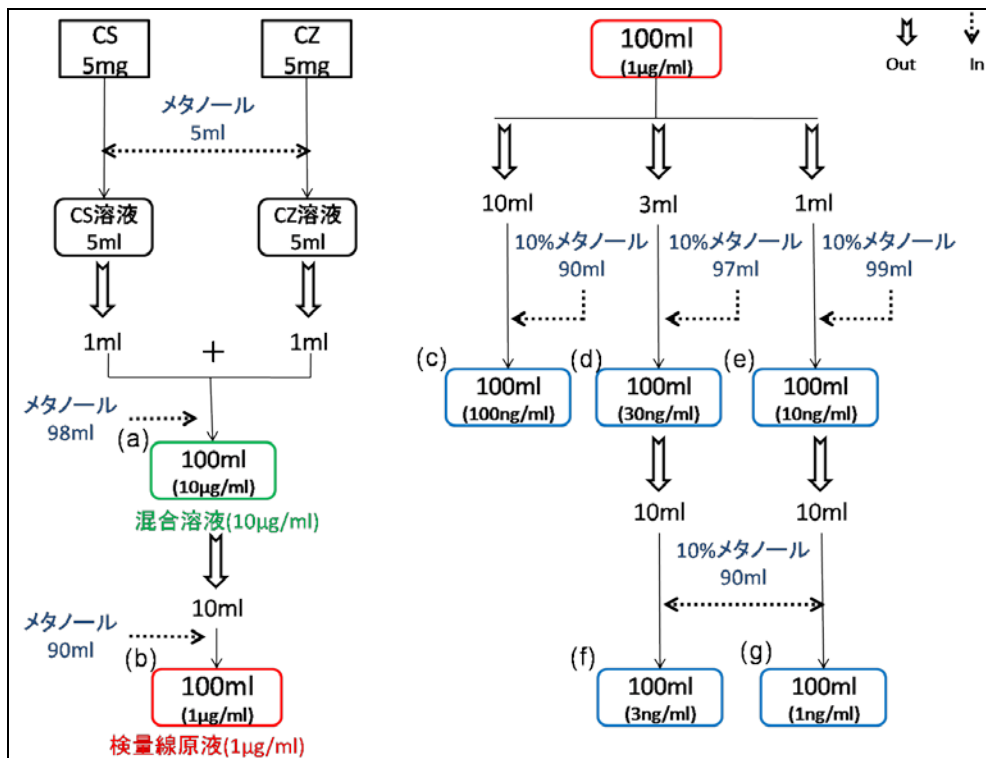


図3 標準液(検量線溶液)の精製法

< V. 測定 >

1. 分画法 → バルブの切替時間(前処理カラムの処理時間)の設定

- ① 分析カラム(長い方)上部の赤い配管を反時計回りに回し外す。
- ② 前処理カラム上部の青い配管を外し、赤い配管に付け替える。その際、右手で配管を押し込み、奥まで入っていることを確認しながら、左手でオシネジを回す。分析カラムの乾燥を防ぐため、同様に分析カラムの上部に青い配管を付け替える。
- ③ CUTOFF.met のメソッドを開く。つぎにカラム安定化のため、「コントロール」からダウンロードメソッドを実行し、前処理移動相を送液させる。カラム圧力の安定を確認した後、シングルランを実行。
- ④ クロマトグラムから2つのピーク(CS と CZ)が出てくる(2つのピークは完全には分離しない)。分析メソッド(ex. cscz.met)のバルブの切替時間を変更するために、1つ目のピークの始まりの時間と2つ目のピークの終わりの時間を読み取る。
※現在の装置は3.5~5分程度に出てくる。8~12分程度のものはノイズ。⑤ 「メソッド」→「機器条件」→ Shiseido SI2 → Time Events の順で開く。
- ⑥ Event List からピーク始まりの設定時間をクリックし、右側の Delete ボタンをクリックして時間を削除する。
- ⑦ 右側の Event Source から Time を選択し、右側に設定したい時間を入力した後、Insert ボタンをクリックする。ピーク終わりの設定時間も同様に入れ直す。
- ⑧ 分画作業終了後、前処理カラムから赤い配管を外し、青い配管を元の位置に付け替える。同様に分析カラムに赤い配管を付け替える。

2. 検量線の作成

ピークテーブルの作成

- ① 検量線に用いるデータを呼び出す。
- ② 画面下方にある「ピーク指定」(山が三つ重なっているアイコン)をクリックし、CS と CZ の二つの山の少し前と少し後をピークの始めと終わりに指定する。
- ③ 画面上方にある「ピーク/グループテーブル」(二つの山の上に線が引いてあるアイコン)をクリックし、名前の欄の一番目に「CS」、二番目に「CZ」と入力し、「検量線」の欄を「直線」にし(右クリックして「下にコピー」で下にコピーされる)、「ゼロ」を使用する場合はチェックを入れる。
- ④ その画面上で右クリックをしてプロパティを選択し、「行」のところのレベルを「レベル5」にする(レベルをダブルクリックして「レベルの最大値」に5を入力)。
- ⑤ 右にスクロールし、CS と CZ の行の各レベルにそれぞれ濃度を入れる(1,3,10,30,100ng)。
- ⑥ メソッドを上書き保存する。

シーケンス編集

- ① 「ファイル」→「シーケンス」→「シーケンス ウィザード」の順に選択する。
- ② 「メソッド」を指定し、「データ ファイルの種類」の「既存(解析用)」にチェックを入れ、「次へ」をクリックする。
- ③ データ ファイルを選択し、「完了」をクリックする(逆順で選択すると分析時に順序が揃う)。
- ④ シーケンスの表で「レベル」に序数(低い濃度順に1、2、3、4、5)を入力し、一番上の行の「分析タイプ」を「検量線をすべて削除(CCA)」に指定する(選択順が逆でも入力した序数が合っていればよい)。
- ⑤ 「ファイル」→「シーケンス」→「名前を付けて保存」の順に選択し、シーケンス名をつけて保存する(「The vial name is invalid」と出る場合は、「バイアル」に何でもよいので適当な数字を入れる。)
- ⑥ 「シーケンス解析」のアイコンをクリックし(シーケンス→解析でもよい)、「シーケンス名」で保存したシーケンスファイルが選択されているかを確認する。
- ⑦ 「実行範囲」で「すべて」または「範囲」を選択する。
- ⑧ 「モード」で、「処理モード」は「再解析」を、「ブラケットキャリブレーション」は「なし」を選択する。
- ⑨ 「印刷」で必要なレポートにチェックを入れ、「プレビュー」のチェックをはずす。
- ⑩ 「スタート」をクリックし、「検量線」のアイコンをクリックして検量線を表示する。
- ⑪ メソッドを上書き保存する。

3. 分析シーケンスの作成 (検量線スタンダードと未知試料測定)

- ① 「ファイル」→「シーケンス」→「シーケンス ウィザード」の順に選択する。
- ② 「メソッド」を cscz.met に指定し、「データ ファイルの種類」の「新規(分析用)」にチェックが入っているかを確認し、「次へ」をクリックする。
- ③ 「データ パス」でデータの保存場所を選択する。
- ④ 「サンプル ID」に入力する(ex. std○○ng)。
- ⑤ 「データ ファイル」で、「サンプル ID」_「繰上げ番号」_「日付と時間」の順番で選択する。
- ⑥ 「未知試料の数」で、サンプルの分析個数を入力する(※サンプルの最後にオートサンプラー洗浄液が入ったものを1つ入れるため、分析個数+1にする)。
- ⑦ 「未知試料ごとの繰り返し回数」で、1個のサンプルに対して分析する回数を入力し(通常は1)、「次へ」をクリックする。
- ⑧ 「シーケンス中の未知試料バイアル」の「最初のバイアル」の欄に、最初のサンプルを入れた場所の番号を入力する。
- ⑨ 「オートサンプラ注入量」を入力し(生唾液/スタンダードともに 100 μ L)、「完了」

をクリックする。

- ⑩ シーケンスの表の最終行で、「分析タイプ」を「**シャットダウン(SHD)**」に、「注入量」を 0.1 に、「メソッド」を stop.met に指定する。
- ⑪ 各「データファイル」の名前の「サンプル ID」部分を変更する (ex.100ng_001_<D>.dat)。
- ⑫ 「ファイル」→「シーケンス」→「名前を付けて保存」の順に選択し、シーケンス名をつけて保存する。
- ⑬ 分析する場合は、シーケンスランのアイコンをクリックし、「**実行範囲**」の「**すべて**」に**チェックが入っているかを確認**してから、「スタート」をクリックする。

4. 解析

ESTD濃度の出し方

- ① ESTD 濃度を出したいデータ呼び出す。
- ② 右クリック→ピーク情報→ESTD 濃度を選択して右側の欄に入れる。
- ③ 解析から解析をクリックして、ESTD 濃度を計算する。
- ④ レポート→表示→ESTD

印刷するとき

- ① 上記の操作をしてから、「ファイル」→「レポートテンプレート」→「開く」
- ② External Standard-horisz.rep を選択する。
- ③ 印刷のアイコンから印刷する。

自分でピークを引くとき

- ① 画面下方にある「マニュアルピーク」のアイコンをクリックする。
- ② ピークの始めと終わりを選択する。
- ③ 「解析実行」をクリックする。

※すでに引かれたピークを変更するときも、「マニュアルピーク」をクリックして現在のピークの上からもう一度ピークの始めと終わりを選択する。

分析実行中に解析するとき

- ① EZChrom Elite (最初のページ) の画面に戻る。
- ② ファイル→解析専用を開く
- ③ 解析したいデータを開く (分析画面でそのデータを出している場合は解析画面で開けないので、分析画面から消してから開く)。

<VI. データの確保・終了操作・その他>

1. データの確保

データおよびシーケンスファイルは実験ごとに作成したフォルダに分けてセーブする。
例えば「テレビゲーム実験@20100208」など。

2. 終了操作

- ① 「ファイル」→「終了」をクリックし、ソフトを終了する。
- ② パソコンの電源を落とす。
- ③ 分析装置のすべての電源を切る。

3. その他(廃液・廃棄物などについて)

廃液(アセトニトリルなど)は、測定装置の下にある廃液タンクに捨てる。
廃棄するマイクロピペットのチップは、ペットボトルのピペット捨てにまとめる。

以上