

# 液体クロマトグラフ装置の 操作と活用方法

資料



和歌山県教育センター学びの丘

# 1 クロマトグラフィー

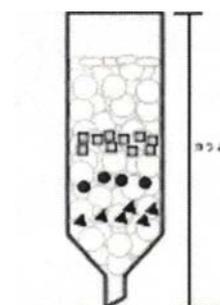
## (1) クロマトグラフィーの歴史

1906年にロシアの植物学者ミハイル・ツヴェット(Tswett)が植物色素を分離させる方法として発見(発明)した。

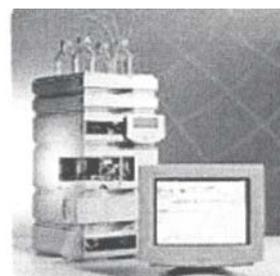
抽出した色素を、立てたカラム(ガラス管の中に炭酸カルシウムを詰めたもの)の上に置き、上から石油エーテルを流したところ、色の異なる吸着帯として分離された。このことから“色の記録”という意味で、ギリシャ語の Chroma(色)と Graphos(記録)より Chromatography(クロマトグラフィー)と呼ばれるようになった。

## (2) クロマトグラフィー、クロマトグラフ、クロマトグラム

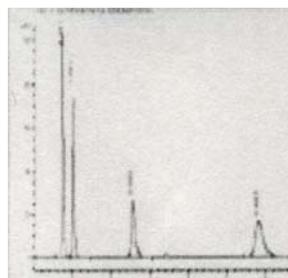
① 分離分析の方法を総称して、クロマトグラフィー(Chromatography)という。



② クロマトグラフ(Chromatograph)とは、化学的・物理的な性質や相互作用を利用して物質を分離させる装置のことをいう。



③ クロマトグラフを用いてクロマトグラフィーの結果を記録したもの(測定データ)をクロマトグラム(Chromatogram)という。



## (3) クロマトグラフィーの仕組み

クロマトグラフィーは、固定相 (Stationary phase) と移動相 (Mobile phase) と呼ばれる二つの相が平衡状態にあり、そこを試料が移動する。試料は移動相に乗って流れるが、試料中の各成分がこの二つの相とそれぞれ相互作用し、このときに起こる相互作用の差に応じてそれぞれの成分が分離する。

クロマトグラフィー分離の相互作用には、分配、吸着、分子排斥、イオン交換及び抗原抗体反応や酵素または受容体の基質特異性がある。

#### (4) クロマトグラフィーの種類と分類

・移動相による分類
○ガスクロマトグラフィー(移動相は気体)Gas chromatography(GC)
○液体クロマトグラフィー(移動相は液体)Liquid chromatography(LC)
・固定相支持体による分類
○カラムクロマトグラフィー Column chromatography 固定相をカラム(管状容器)に充填して用いる方法。 大量の試料を扱えるため、主に化合物の分離・精製や前処理に使われる。
○薄層クロマトグラフィー Thin layer chromatography 固定相を平板上に塗布して用いる方法。 シリカゲルなどの吸着剤の粉末をガラス板に塗りつけて乾かしたのを用い、端を溶媒に浸すと溶媒が表面を進んでいく。このとき試料とシリカゲルとの吸着度合いに応じて、徐々に分離していく。
・分離手法による分類、様々なクロマトグラフィー
○サイズ排除クロマトグラフィー Size exclusion chromatography(SEC) ふるいの原理で、分子の大きさにより分けていく。広義では GPC と同じ意味。
○ゲル浸透クロマトグラフィー Gel permeation chromatography(GPC) 移動相(溶離液)に有機溶媒を用いるため、有機系 GPC と呼ばれている。
○ゲル濾過クロマトグラフィー Gel filtration chromatography(GFC) 移動相(溶離液)に水溶液を用いるため、水系 GPC と呼ばれている。
○分配クロマトグラフィー Partition chromatography 移動相には液体、固定相には液相(固体表面を液膜で覆ったもの)が用いられる。二つの液相に対する試料成分の分配係数の差を利用して分離する。
○吸着クロマトグラフィー Adsorption chromatography 移動相に液体(有機溶媒)、固定相には吸着機能を持った個体(吸着剤)が用いられる。脱着、吸着の差を利用して分離する。通常は、非イオン性の有機化合物の分離に利用される。
○イオン交換クロマトグラフィー Ion exchange chromatography イオン交換樹脂を固定相として用いる。イオンに電離する物質をイオン交換体に対する静電的な吸着力の差を利用して相互に分離させる。

<引用文献> <http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/chromatography.htm>

## 2 液体クロマトグラフ

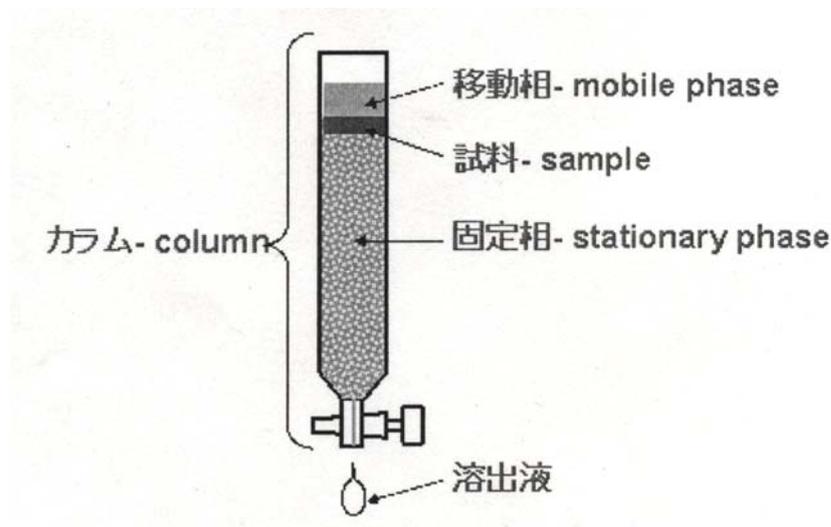
### (1) 液体クロマトグラフの原理

移動相に液体を用いるクロマトグラフ法である。

クロマトグラフィーの歴史の項で説明したミハイル・ツヴェットの場合、色素成分を分離させるために使った炭酸カルシウムに相当するものを固定相（充填剤）、石油エーテルに相当するものを移動相という。色素（試料）は、石油エーテル（移動相）の流れに、より、炭酸カルシウム（固定相）の隙間を流れる。

この場合、固定相の隙間に入り込める色素（試料）は、固定相の穴（隙間）に寄り道をしながら移動する。そのため隙間に入ることができず、寄り道をしなかった色素（試料）より、遅れて移動する。このように試料が寄り道をするを試料が固定相に保持されるという。寄り道の度合いにより試料が分離されることになる。このように、分離には試料と固定相、試料と移動相、移動相と固定相の相互作用が影響する。

液体クロマトグラフィーでは吸着、分配、イオン交換、サイズ排除など様々な機構により分離を行うことが出来る。そのため、揮発性物質だけでなく、不揮発性物質も分離することが出来る。



### (2) 高速液体クロマトグラフ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ミハイル・ツヴェットの例でいうと、移動相の石油エーテルは自然落下だったので、分離には非常に時間がかかった。これを一般性、実用性を持たせるために、移動相をポンプにより高圧で送液し、分離時間を短縮させたものを高速液体クロマトグラフ（High Performance Liquid Chromatography）という。

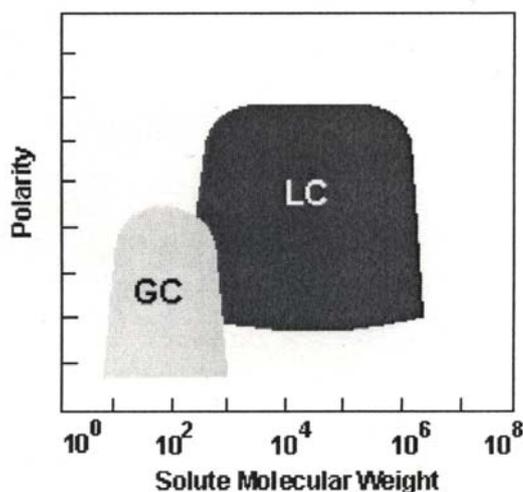
<引用文献> [http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC\\_Basic.htm](http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC_Basic.htm)

### (3) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) の特徴

ガスクロマトグラフ (GC) に比べて分解能では劣るが、サンプルへの制限が GC ほどはない。よって GC では分析困難な揮発性が不十分な化合物、熱的に不安定な化合物でも分析可能である。一般的に GC では既知有機化合物の 20%程度が分析可能といわれているが、HPLC ではより多くの有機化合物に対して対応可能と考えられている。(図1参照)

HPLC では一般的に移動相に溶解する試料は分離可能で、固定相 (充填剤) の開発により、分離できる対象試料が金属イオンから生体高分子まで広がっている。HPLC では目的対象によって移動相、カラムの選択が重要となる。

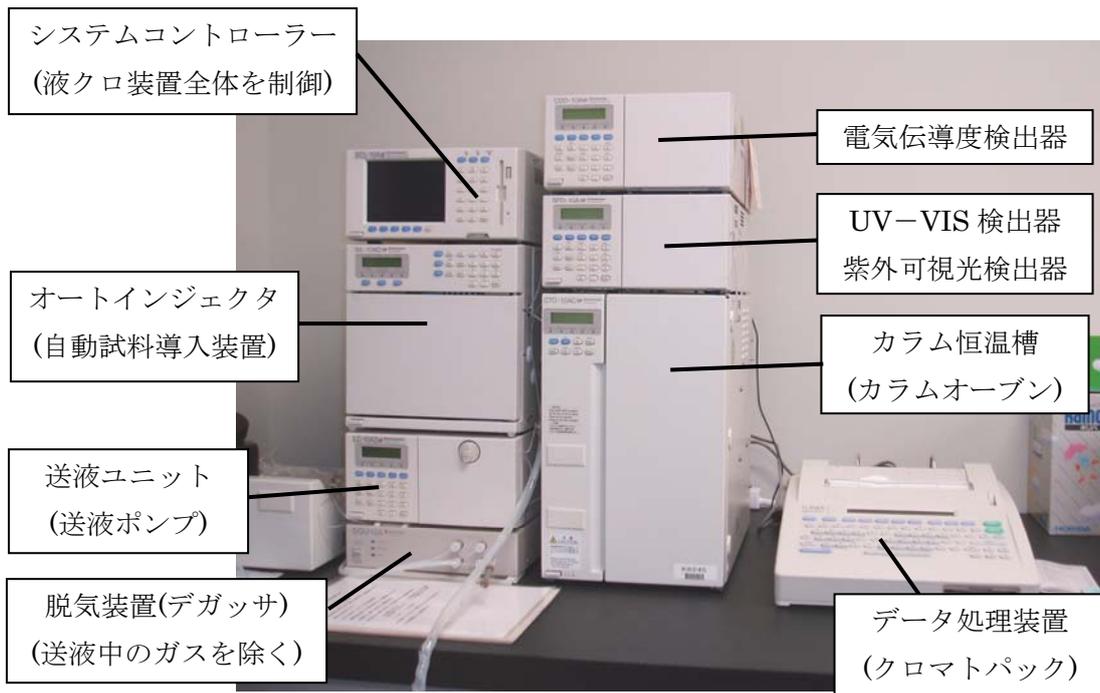
使用するカラムとしては一般的に微小粒径、2~10 $\mu$ m 程度の固定相を充填したものを使う。微小粒径のカラムを使用することにより分離度が高く、分析時間が短くなる。



(図1)

<引用文献> [http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC\\_Feature.htm](http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC_Feature.htm)

#### (4) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) の装置



高速液体クロマトグラフシステムは、主に移動相を送液するためのポンプ、試料を導入するためのインジェクタ、成分を分離するためのカラム、成分を検出するための検出器、クロマトグラムを記録・解析するためのデータ処理装置から構成されている。

##### ①ポンプ

送液ポンプにはプランジャー型、シリンジ型、ガス圧型等があるが、プランジャー型が最も一般的である。移動相をポンプで試料注入口を通して分離カラムに供給する。この時、ポンプから生じる脈流を抑えるため、ダンパーをポンプと圧力計の間に入れ、脈流をより押さえて送液を安定化することがなされる。また、試料の分離を改善するために移動相の組成を時間で変化させるグラジエント法なども使用される。

分析精度を向上させるためには、より流量の精度、混合精度（グラジエントの場合）の高いポンプを選択する必要がある。また、移動相中の溶存ガスは流量精度を悪化させるので、ポンプの前段に脱気装置（デガッサ）を接続し、脱気することが一般的に行われている。

ベースラインノイズを低減させるためには、より低脈流なポンプを選択する必要がある。

##### ②インジェクタ

シリンジを用いて溶液試料を注入する方法や、系内に組み込まれたループインジェクターのループ内に試料溶液を満たし、流路を切り替えて導入する方法のいずれかが用いられる。

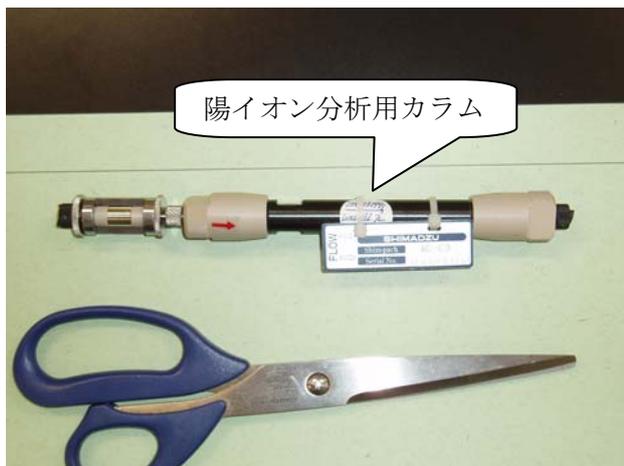
いずれにせよ、注入量の精度が分析精度に直結する。

### ③カラム

分離させる目的に応じてカラムを選択する。

分離カラムの固定相（充填剤）としては、シリカゲルなどの無機系充填剤とポリマービーンズなどの樹脂系充填剤に大別される。

分離モードには、分配クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどがある。



分配やイオン交換クロマトグラフィーでは温度の影響を大きく受ける。一般的にはカラム温度が上がればカラム効率が高くなる。そのため分離度を高くするため、カラム恒温槽を使用することが望まれる。

### ④検出器

HPLC ではカラムで分離した試料の組成変化を、光の吸収や屈折率の変化、電気化学的な現象などを利用して測定している。

HPLC で主に用いられる検出器としては、以下にあげるようなものがある。またそれ以外のものとして、化学発光検出器、エバポレイティブ光散乱検出器 (ELSD)、質量分析計 (LC/MS) などもある。

#### ○紫外可視吸光検出器(VWD、DAD)

有機化合物一般に用いられ、紫外可視吸収のある化合物が対象となる。測定波長固定のもの、全波長のスペクトルを測定できるもの（フォトダイオードアレイなどを利用）がある。適用範囲が広いので、HPLC 用検出器として最も広く利用されている。

#### ○蛍光検出器(FLD)

多環芳香族など蛍光性のある化合物が対象となる。蛍光性のある成分は高感度で選択的に検出することができる。

○示差屈折率検出器(RID)

移動相の溶媒と異なる屈折率を持つ全ての試料成分が対象となり広範囲な化合物に適応できる。しかし移動相の温度変化や組成変動には著しく敏感であり、紫外可視吸光検出器ほど感度は高くない。

○電気化学検出器(ECD)

カテコールアミンや糖などの電気化学活性な化合物が対象となる。電気伝導度や、酸化・還元などの電気化学的現象を利用した検出器である。

⑤データ処理装置

検出器から出力された信号はインテグレータ、コンピュータ等により記録、解析を行う。最近では扱うデータ量の増大、三次元解析の必要性等からコンピュータを使用することが一般的である。

<引用文献> [http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC\\_System.htm](http://www.nskw.co.jp/chem/chromatobasic/LC/text/LC_System.htm)

(5) 液体（ガス）クロマトグラフでの各成分の分析

①純物質の同定

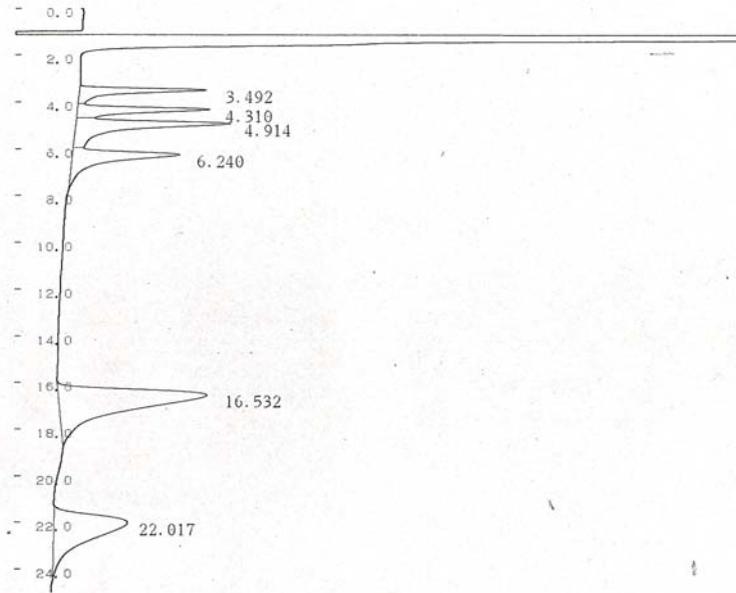
未知試料が注入されてから検出器にピークが検出されるまでの時間（**保持時間**）を、既知試料の**保持時間**と比較することにより同定を行う。同種の純物質の**保持時間**は等しくなるので、未知試料の同定を行うことができる。

②純物質の定量

各成分の**ピーク面積**（各成分ピークとベースラインとの間の面積）は成分量に比例する。よって、既知試料で**ピーク面積**による検量線を作成しておいて、それと比較することで未知試料の定量を行う。

10/18 標準試料 C40~C42

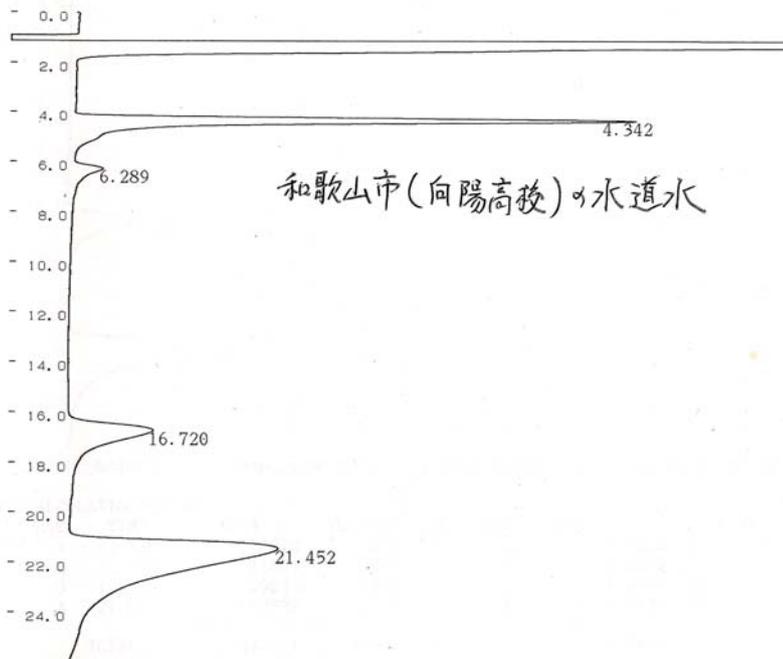
C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=1 DATA=1:CHRM1.C40 06/10/18 14:36:40



\*\* CALCULATION REPORT \*\* Calibration with Standard No. 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.492	45860	3078		1		Li
	2	4.31	52773	3215	V	2		Na
	3	4.914	89126	3749	V	3		NH4
	4	6.24	72498	2613	V	4		K
	5	16.532	209160	3604		5		Mg
	6	22.017	128822	1804		6		Ca
TOTAL			598238	18064			0	

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:CHRM1.C60 ATTEN= 4 SPEED= 5.0



C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=14 DATA=1:CHRM1.C60 06/10/19 11:22:30

\*\* CALCULATION REPORT \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.342	230908	12663		2	8.9199	Na
	2	6.289	16370	637		4	1.2212	K
	3	16.72	91799	1869		5	2.1944	Mg
	4	21.452	398630	4662		6	16.1856	Ca
TOTAL			737707	19830			28.5211	

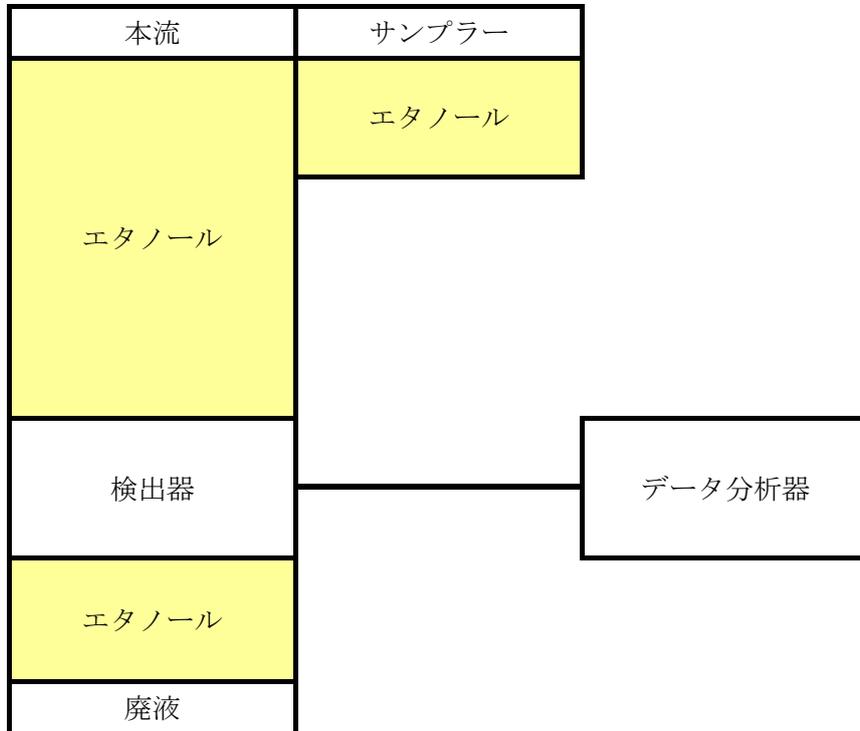
*mg/L (ppm)*

### 3 液体クロマトグラフの操作方法

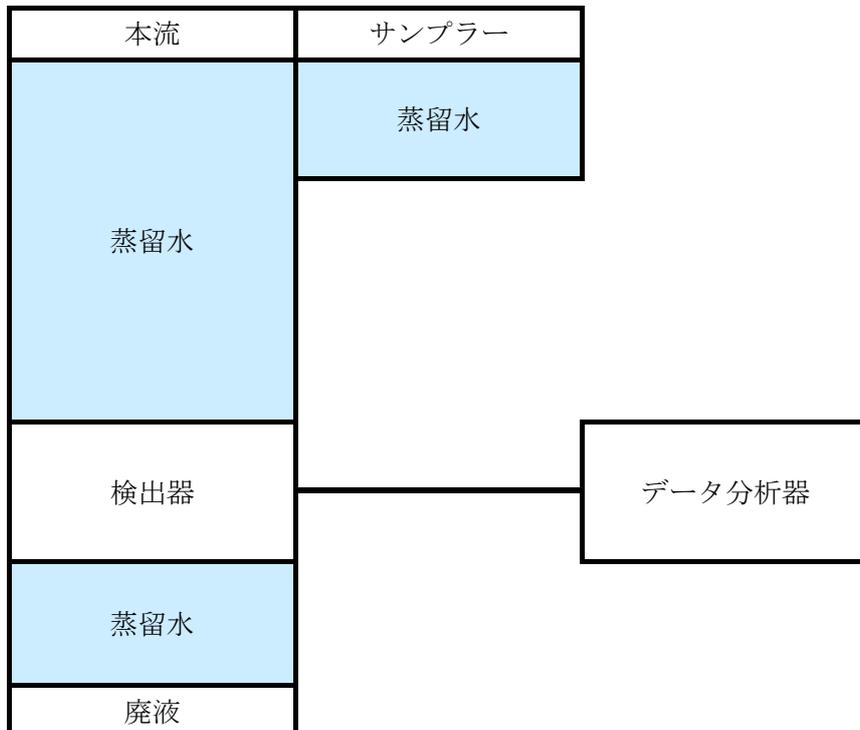
(SHIMADZU 製液体クロマトグラフ (学びの丘に設置されている装置) について)

#### (1) 装置内の液体管理

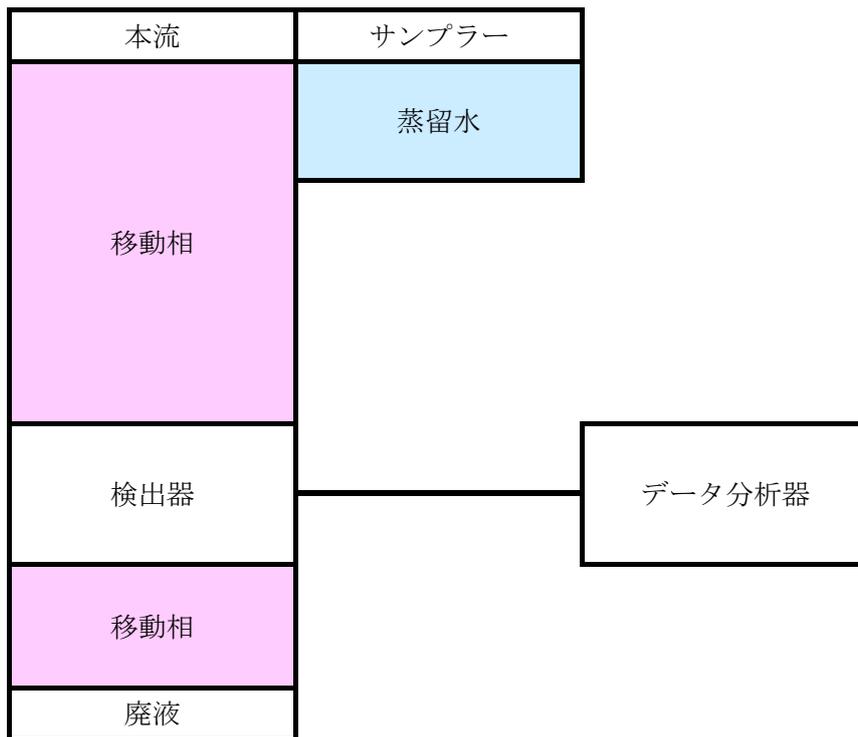
##### ① 機器長期保管状態



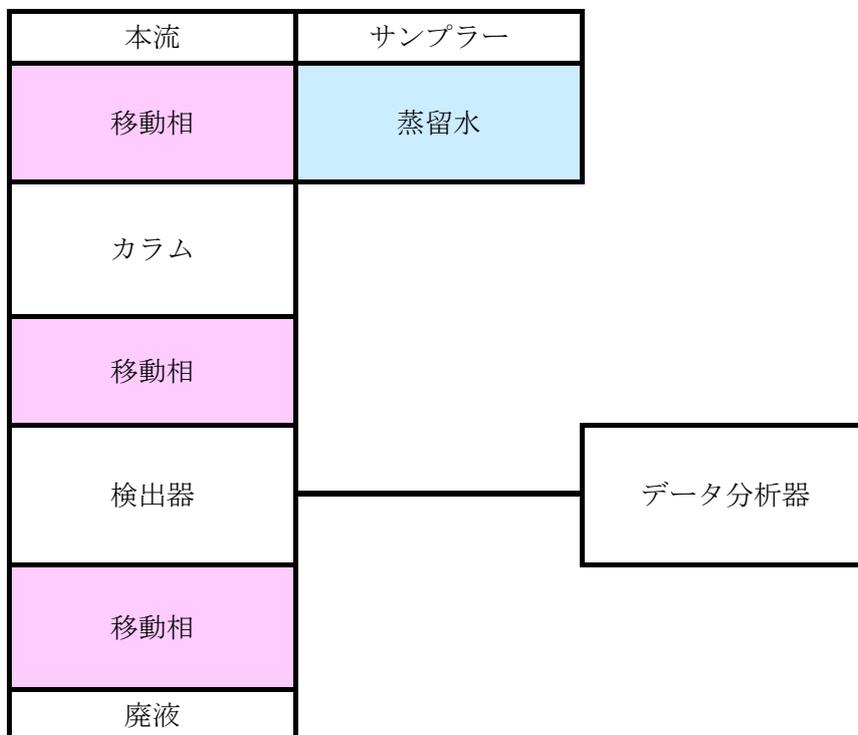
##### ② 蒸留水への置換



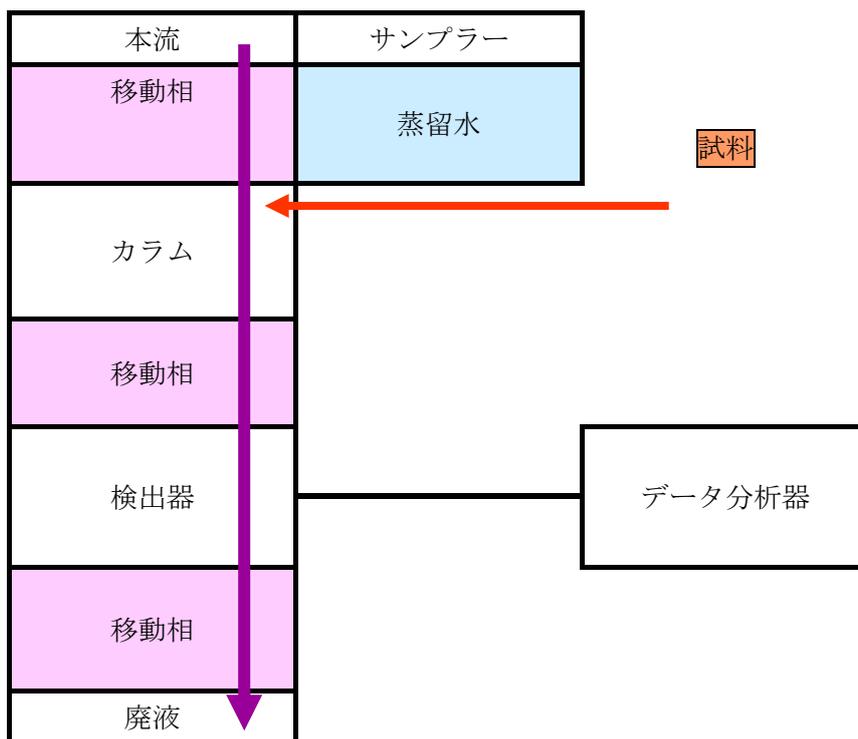
③分析用移動相への置換



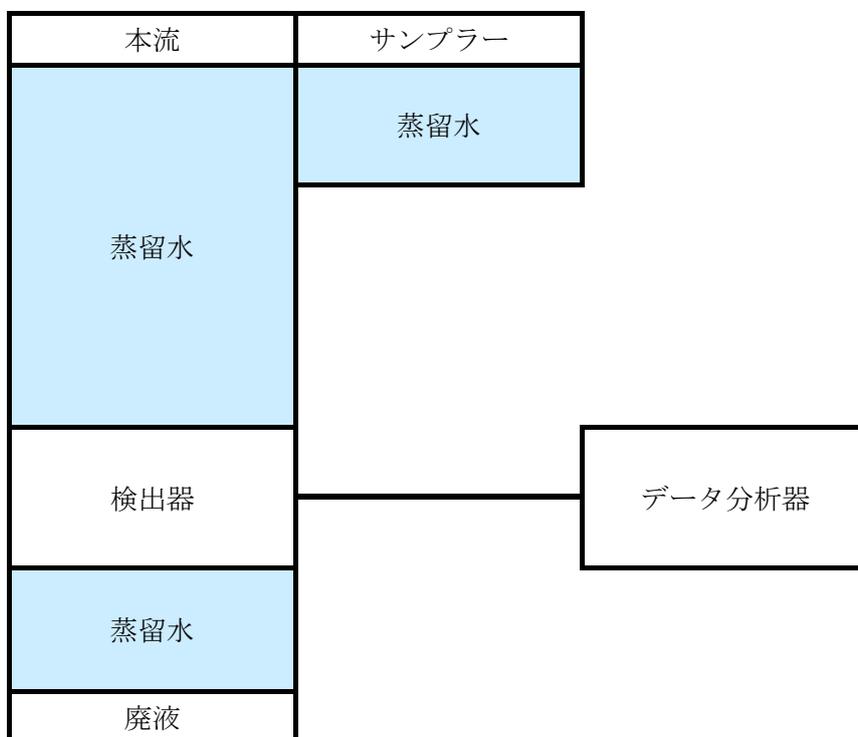
④カラムの装填



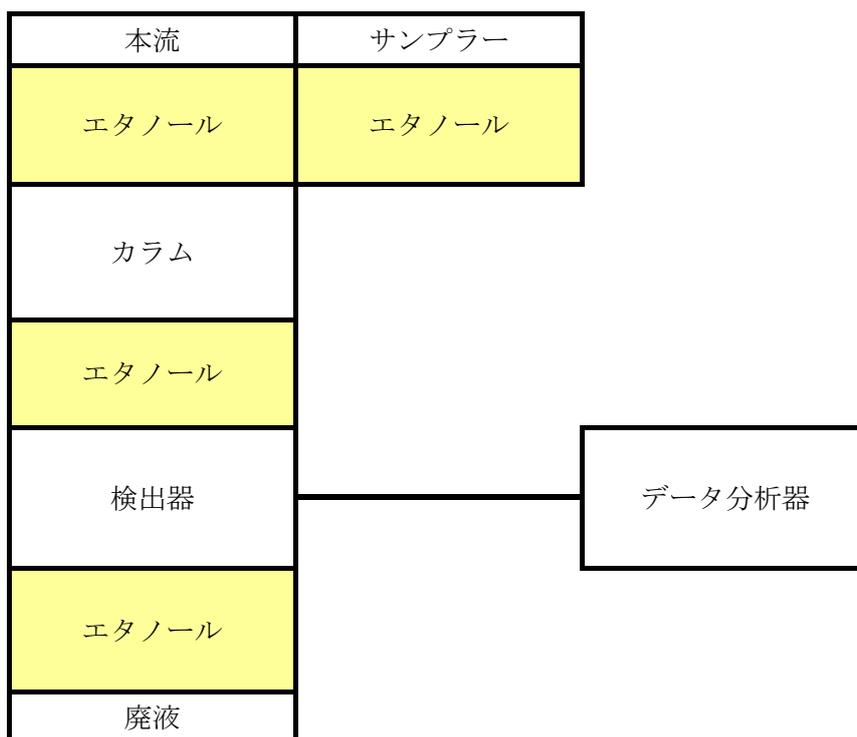
⑤試料の分析（運転状態）



⑥蒸留水への置換（長期保管状態への移行）← カラムをはずしてから



⑦エタノールへの置換（長期保管状態）



(2) 移動相の調整

①陰イオン分離カラム (Shim-pack IC-A3) 用

〔組成〕

{	8mM p-ヒドロキシ安息香酸
	3.2mM Bis-Tris
	50mM ホウ酸

の混合水溶液

〔用意する試薬〕

a) p-ヒドロキシ安息香酸 p-Hydroxybenzoic Acid

※ ((1,4)-ヒドロキシ安息香酸 4-Hydroxybenzoic acid と表記されている場合もある。)

HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH ; MW=138.12

\*注 ; o-, m-, 1,2-ヒドロキシ安息香酸などは異なる試薬なので使用できない。

また、試薬メーカーによっては、硫酸イオンの位置にゴーストピークが出る場合がある。

b) ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン

(アミノトリス)の表記の場合もある。東京化成工業

Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane ; MW=209.24

※ (Bis-Tris(ビストリス)と省略している場合もあります。)

c) ホウ酸(Boric Acid) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; MW=61.83

〔調製手順〕

p-ヒドロキシ安息香酸 1.105g

ビストリス 0.670g

ホウ酸 3.092g

をそれぞれ秤量し、1 Lメスフラスコに入れ、イオン交換水を加え1 Lとする。

スターラーで攪拌し、試薬を完全に溶解させたあと、0.2  $\mu$  m のフィルターで減圧濾過をする。

(ウィットろ過瓶等を用いると移動相ボトルに直接移動相ろ液を受けることができる。)

※p-ヒドロキシ安息香酸は塩基性条件下(ビストリスを入れた状態)では溶けやすいが、粉末状であるため固まりになりやすく、この状態ではなかなか溶解できない。あらかじめ粉砕してから溶解するのが望ましい。薬包紙で挟んで、指で押さえる程度で簡単に崩れる。

②陽イオン分離カラム (Shim-pack IC-C3) 用

〔組成〕 2.5mM シュウ酸水溶液

〔用意する試薬〕

シュウ酸 2 水和物 Oxalic Acid Dihydrate

(COOH)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ; MW=126.07

〔調製手順〕

シュウ酸 2 水和物 0.315g を秤量し、1 Lメスフラスコに入れ、イオン交換水を加え1 Lとする。

スターラーで攪拌し、試薬を完全に溶解させたあと、0.2  $\mu$  m のフィルターで減圧濾過をする。

(ウィットろ過瓶等を用いると移動相ボトルに直接移動相ろ液を受けることができる。)

③カフェイン検出 (ODS) 用

〔組成〕 水：メタノール (液体クロマト用) = 6 : 4

〔用意する試薬〕

イオン交換水

メタノール (液体クロマトグラフ用)

〔調製手順〕

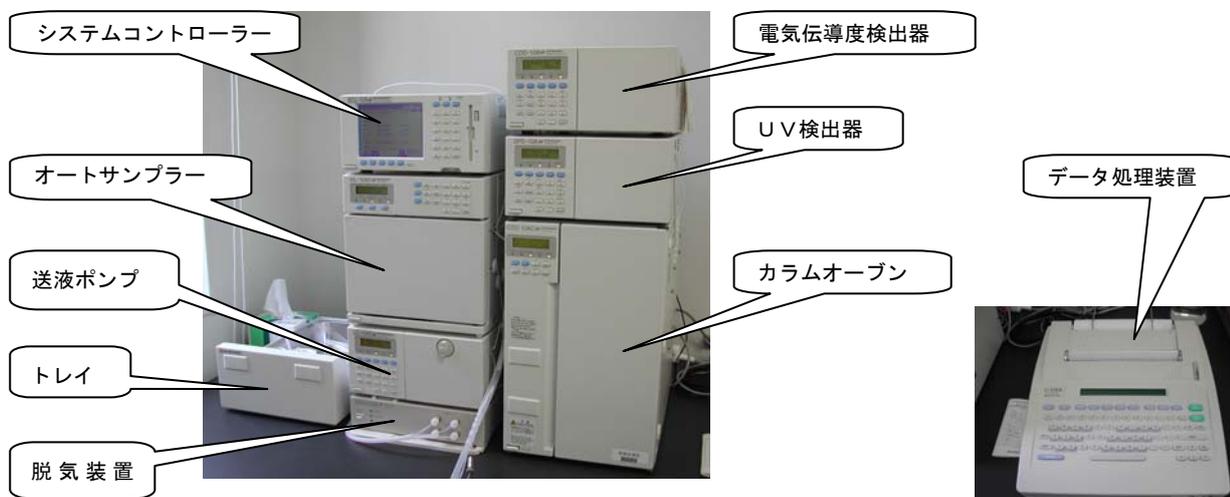
メスシリンダーで 水：メタノール=6 : 4になるように計量し、よく攪拌する。

攪拌にはスターラーを用いてもよいが、超音波洗浄器に水を張り、その中へ水とメタノールを適量入れた三角フラスコをつけて攪拌してもよい。

容器は、メタノールが有機溶媒であるため、樹脂製よりガラス製のものの方がよい。

### (3) 操作手順

#### ①各装置の名称



- トレイ : 移動相、洗浄液等をセットする。
- 脱気装置 : 移動相に含まれる溶存酸素を取り除く。
- 送液ポンプ : 移動相を吸い上げて送り出す。
- オートサンプラー : 自動でサンプルを吸い上げる。
- システムコントローラー : 装置全体の制御。オートサンプラーで打つスケジュールを設定。
- カラムオーブン (恒温槽) : カラムに温度をかける。(温度によってデータが異なる)
- UV検出器 : 紫外線を当てて、吸収があるかどうかで検出する。
- 電気伝導度検出器 : イオンの電気伝導率をみて物質を検出する。
- データ処理装置 : UV検出器や電気伝導度検出器で出たデータをクロマト (グラフ) の形に変換して表示する。

#### 移動相の流れ

トレイ中の移動相がポンプによって吸い出される → 脱気装置によって含まれる溶存気体が取り除かれる → 送液ポンプ内を流れる → オートサンプラーに向かう → カラムオーブン内のカラムを通る (サンプルは、ここで純物質に分離される) → 電気伝導率検出器の中を通過 (サンプルは、ここで存在量が測定される) → 廃液パイプを通過して、廃液槽に溜められる

## ② 操作の概要

### I 全ての装置の電源を入れる。全部で8箇所ある。[P16]

検出器< A ; UV-VIS 検出器、 B ; 電気伝導度検出器 >は、必要な方の電源だけで良い。

### II 装置内の液体変換。[P16~17]

### III システムコントローラーの分析条件設定 (FILE のナンバー入力) [P20、P17~18]

・FILE 0 (陰イオン分析用)、 1 (陽イオン分析用)、 19 (カフェイン分析用)

FILE NO.(0, 1, 19)を入力したとき、各条件が下表のようになっていることを確認する。

FILE NO.	A.FLOW(送液量)	P.MAX(最大圧)	P.MIN(最小圧)	VOL(注入量)	RUN.T(分析時間)
0(陰イオン)	1.200 ml/min	120 kgf	0 kgf	10 $\mu$ l	22 分
1(陽イオン)	1.000 ml/min	120 kgf	0 kgf	30 $\mu$ l	26 分
19(カフェイン)	1.000 ml/min	250 kgf	0 kgf	10 $\mu$ l	6 分

### IV カラムの装着と安定化 [P19]

### V データ処理機 (クロマトパック) の分析条件設定 (FILE として保存されている) [P19~22]

・FILE 0 (陰イオン分析用)、 1 (陽イオン分析用)、 9 (カフェイン分析用)

FILE NO.(0, 1, 9)を入力したとき、[PALAM] の条件が下表のようになっていることを確認する。

FILE NO.	SLOPE	STOP.TM	ATTEN	SPEED	METHOD	MIN.AREA
0(陰イオン)	1000	21	5	5	4	1000
1(陽イオン)	500	25	4	5	4	1000
9(カフェイン)	1000	5	8	5	4	100000

※ 新しく条件を設定したい場合は、パラメーター [PARAM] 画面で変更できる。

※ 標準溶液の検量線用データやオートサンプラーの条件も記録されている。

### VI 分析値保存 (波形記憶) の設定 データ処理機 (クロマトパック) で行う。[P23]

### VII 標準試料による検量線作成。[P24]

\*すでに作成したものを使用する場合はこの手順は必要ない。

### VIII 未知試料の分析 [P25]

ア 分析値保存 (波形記憶) を設定 (クロマトパック)

イ 未知試料分析

### IX 各分析データのフロッピーディスクへの保存 [P27] ファイルコピー

### X 終了操作 [P28~29]

ア カラムの冷却、取り外し。

イ 装置内の液体変換。

ウ 全スイッチ OFF

### ③装置の立ち上げ

現状では、パイプ内にエタノールが入った状態になっている。(パイプ内部の汚れを防ぐため)  
これをサンプラーのパイプには蒸留水が、装置内のパイプには移動相が入っている状態にする。

#### ア) **エタノールを蒸留水に置換する**

##### ○各機器の電源を入れる

(各機器を認識させるため、システムコントローラーの電源は最後に入れる。データ処理装置は本体の後にスイッチがある。)

##### ○蒸留水の容器にチューブをセットする

トレイのところに2本のチューブがある。

(Aと書いてあるものと、書いていないもの)

- ・ Aと書いているチューブが、送液ポンプとつながっている。
- ・ 書いていないチューブは、オートサンプラーの洗浄液用である。

蒸留水に置換するために、両方のチューブを蒸留水の入った容器に差し込む。

Aと書いているチューブ



##### ○送液ポンプの蒸留水置換

- ・ ポンプを置き換える。送液ポンプ前面の**バルブ** (ドレインバルブ) を反時計方向に **180度** 回す。

(ポンプから直接廃液の方へつなげる。)

- ・ 送液ポンプ前面の **purge** (パージ) ボタンを押す。

**purge** とは、ポンプを高速運転して液を置き換える操作のこと。

(しばらくするとポンプが動き出す。送液ポンプまでを蒸留水に置き換える。)

- ・ ポンプが停止する。(自動で停止する)

(ポンプ前面のふたを開け、チューブ内に空気がないか確認する。

空気があれば、再度 **purge** ボタンを押す。空気の確認は脱気装置から出ているチューブ[左上]でも確認できる。)

- ・ **purge** (パージ) が終われば、**バルブ** (ドレインバルブ) を元に戻す。



空気の確認



##### ○オートサンプラーの蒸留水置換

- ・ オートサンプラーのドアを開け、**バルブ** (ドレインバルブ) を 反時計方向に 180度 回す。

- ・ 装置横の**注射器**を使って、洗浄液をサンプラーの位置まで上げる。(注射器一本分 (25ml) ぐらいで上がる。)

- ・ 空気をかんでいないか、サンプラー下部のチューブを確認。空気が入っていなければ、つまみ (ドレインバルブ) を元に戻す。

オートサンプラーのバルブ



※ この段階では、蒸留水はバルブまでしか来ていない。オートサンプラー本体にはまだ蒸留水は入っていない。以後の操作はシステムコントローラーでおこなう。

### ○システムコントローラーの操作（サンプラー本体の蒸留水置換）

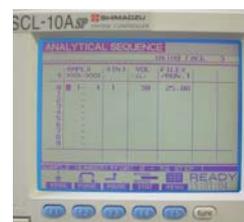
- ・ F 5（メニュー）ボタンを押す。（メニュー画面が立ち上がる。）  
使うボタンは、0：SEQUENCE と 1：ANALYSIS FILE  
の2つがメインとなる。



- ・ モニター横のテンキーの0を押し、ANALYTICAL SEQUENCE画面を立ち上げる。

- ・ F 2ボタン：purge（ページ）を押す。ドアを閉めて行うこと。  
(ドアが開いていると、センサーが働いて動かない)

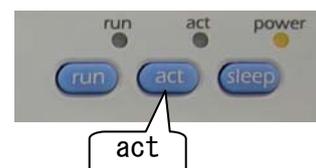
オートサンプラー本体が、蒸留水に置換される（約10分程度かかる）



### ○送液ポンプから廃液までの蒸留水置換

- ・ システムコントローラー上部の act(activate)ボタンを押す。  
ポンプが作動。（1,2分で置き換わる。）
- ・ 再度、act(activate)ボタンを押してポンプを止める。

機器内のエタノールを、蒸留水に置換完了



### イ) 分析条件の設定

- F 5を押して、メニュー画面に戻る。（ページは作動した状態）
- モニター横のテンキーの1を押し、ANALYTICAL FILE画面（分析画面）を立ち上げる。
- モニター左側の PUMP の項目を確認、設定する。

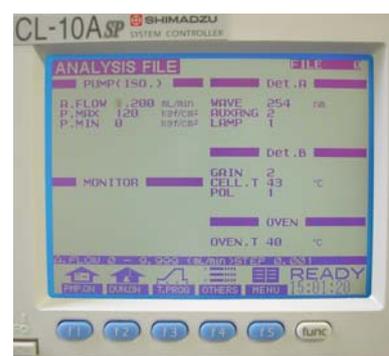
A. FLOW   ポンプで流す液の容量を表している。  
(例 1.200 ml/min )

P. MAX    上限 (例 120 kgf/cm<sup>2</sup>)

P. MIN    下限 (例 0 kgf/cm<sup>2</sup>)

(P はポンプの圧力の意味)

P.MAX、 P.MIN の設定値を超えるとポンプが停止する。



コラムによって最大圧力が異なるので、マニュアルで確認し設定する。

(例 P.MAX を 120 kgf/cm<sup>2</sup> に設定)

○モニター右側の Det. A、Det. B、OVEN の項目の確認と設定。

(Det は、Detector : 検出器の意味)

・ Det. A は UV 検出器、Det. B は電気伝導度検出器を示している。

・ Det. A の設定

WAVE (光源の波長) (カフェイン分析 272nm に設定。)

POL (極性) (カフェイン分析 1 (+) に設定。)

LAMP (ランプ点燈) (カフェイン分析 1 (点燈) に設定。) 0 は消灯

・ Det. B の設定

GAIN (増幅率) (陰イオン検出の場合は 2 (×0.1) に設定。)

(陽イオン検出の場合は 3 (×1.0) に設定。)

CELL. T (CELL Tmp. 温度) (陰、陽イオン検出とも 43°C に設定)

(CELL. T はオープン温度の +3°C に設定する。だから、CELL.T は 43°C にしている。)

POL (polarity 極性)

(陰イオンの場合、カラムのマニュアルには表示されていないので、1 に設定。

陽イオンは、マニュアルに ポラリティ : - と表示されているので、-1 に設定。

モニター下の青いバーに表示される。)

・ OVEN (オープン) の温度設定

40°C に設定 (マニュアルに書かれている。)

## 分析条件が整う

ウ) 蒸留水を移動相に置換する

○送液ポンプの移動相置換

・ A のチューブを移動相の容器に入れる。

・ 送液ポンプのドレインバルブを開ける。(反時計回りに 180 度回す。)

・ purge (パージ) ボタンを押す。

(約 3 分。自動的に停止する。A のチューブに少し空気をかませると流れが確認しやすい。)

・ ドレインバルブを閉める。

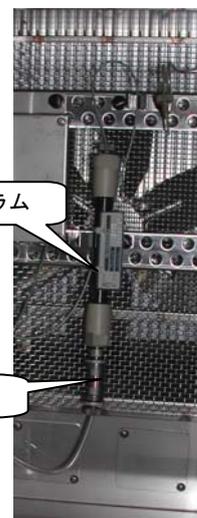
・ システムコントローラー上部の act (activate) ボタンを押す。

・ 2.3 分待つて、再度、act(activate)ボタンを押してポンプを止める。

機器内が移動相に置換された

## エ) カラムの装着と安定

- ・初期操作の場合：ガードカラムを装着。ポンプを動かして、移動相が流れるのを確認してカラムを装着。下を先に装着してから上をつける。  
(カラムには、エタノールは通さない。移動相のみ通す。)  
(以後の操作では、ガードカラムとカラムをつなげたまま、内部に移動相を充填して保管しておいてよい。)
- ・2回目以後の操作の場合：act を押し、下側の管から移動相が出るのを確認。  
act を押してポンプを止め、カラムの下側の密栓をはずし、  
空気が入らないように下側の管から先にカラム(ガードカラム)につなぐ。その後、上側をつなぐ。
- ・再度、act(activate)ボタンを押して、ポンプを動かす。  
(ポンプの圧力を確認。異なるものを流す場合どうしても圧力が上がり気味になる。送液ポンプの表示を見て、圧力が下がって「50kgf」になるまで A.FLOW を調節してポンプの流量を下げる。50kgf 程度でしばらく流す。)
- ・検出器での数値が安定するまで移動相を流す。  
(機器内が移動相に置換わる。移動相がカラム内を流れ、数値が安定する。  
安定とは、検出器のモニターの伝導度 (0.00  $\mu$  S の値) が変化しなくなることで判断する。数値の表示が OVER になると zero ボタンを押して 0 アジャスト をかける。)



検出器の数値が安定したら、分析準備完了。

## オ) データ処理機 (クロマトパック C-R8A) の設定

- 1) 背面のスイッチを ON にする。

<画面表示>

TESTING ROM . . . . . PASSED

TESTING RAM . . . . . PASSED

チェックが終了すると

C-R8A CHROMATOPAC V1.07

\*注；フロッピーディスクを挿入したまま電源を投入した場合には、この画面が表示されるまでディスクを抜かない。

2) 陰、陽イオン分析及びカフェイン分析の条件の設定

【クロマトパック C-R8A】

[COMMAND] キーを押し、[Z] キーを押す。

<画面表示>

Analysis FILE No. [0-9]

FILE (1) = [ ] ← 陰イオン分析 0、2、4 を入力

陽イオン分析 1、3、5 を入力

カフェイン分析 9 を入力

数字を入力後、[ENTER] キーを押す。

※FILE (1) = [ ] へ数値を入力して条件設定をする場合は、前もってその FILE ナンバーで標準試料による検量線 (ID テーブル) の作成やその他の分析条件 [PARAM] を入力しておく。(ID テーブルや分析条件 [PARAM] のことを分析ファイルという。)

新しい分析ファイルを作成する場合は、任意の数値 (0~9) を入力後、[PARAM] を設定し、標準資料から検量線を作成する。

前もって作成した検量線のデータや分析条件 [PARAM] は、その FILE ナンバーの条件として電源 OFF 後も保存される。電源 ON 後、FILE 番号を入力すればそのまま未知資料の分析に取り掛かることができる。(ドライブ 9 へ保存されるため)

【システムコントローラー SLC-10ASP】

※全ての機器の電源を投入した後に行う。

(イオン分析では UV 分析装置は必要ない。カフェイン分析では伝導率計は必要ない。)

i) [f5] (MENU) キーを押し、メニュー画面を表示する。

ii) 数字キーの [1] を押し、ANALYSYS FILE 画面にする。

iii) [FUNC] キーを押し、その後 [f1] (FILE) キーを押すと、下記のような画面になる。

CURRENT	FILE	No. [ ]	...	←	現在まで使用していたファイル番号
CHAGING	TO	FILE	No. [ ]	...	← これから変更するファイル番号

CHAGING TO FILE No. [ ] へ 陰イオン分析ならば 0 を入力

陽イオン分析ならば 1 を入力

カフェイン分析ならば 19 を入力

**OK** の場合 → [f2] キーを押す

**CANCEL** の場合 → [f5] キーを押す

3) パラメータの設定 (分析条件の設定) 【クロマトパック C-R8A】

i) [PARAM] キーを押す。

<画面表示>

Minimum Peak Width at Half-height [sec]

Width (1) = 5

← チャンネル番号 (学びの丘では、チャンネル 1 しか使っていない)

初期設定と異なるパラメータには\*をつけて示している。その数値を確認。

- \*Slope (1) = 陰イオン・カフェインは 1000、陽イオンは 500
- Drift (1) = 0
- T. DBL (1) = 1000
- \*STOP. TM (1) = 陰・陽イオン 25、カフェイン 5 (分析に掛かる時間を設定)
- \*ATTEN (1) = 陰イオンは 5、陽イオンは 4、カフェインは 8
- \*SPEED (1) = 陰、陽イオン、カフェインとも 5
- \*METHOD (1) = 0 計算なし No. Calculation
  - 4 絶対検量線法 External Standard  
(検量線 (ID TABLE) の作成や定量するときは 4 で行う。)
  - 1 百分率法 Normalization  
(標準試料のデータを初めてとる時は Method 0 でとる。)
- CURVE (1) = 0
- CAL. LEVEL (1) = 1
- \*MIN. AREA (1) = 陰、陽イオン 1000、カフェイン 100000
- WIN. BAND (1) = 0

○パラメータの説明と設定

- ・ WIDTH : ピーク高さの半分の位置の横幅 (探知幅)
- ・ SLOPE : ピークの立ち上がり立ち下がり部分の角度  
(上記では、1分間に 1000  $\mu$  V [マイクロボルト] の変化があるところから認識しなさいという意味)
- ・ STOP.TM (ストップタイム) : 1 分析 (1 回のサンプリング) の分析時間
- ・ ATTEN (アッテネーション) : プロッタ感度  
(チャート上 (プロッタ) のスケールを設定する。)

2 の n 乗の mV で、0~17 までの整数値が入る。

0=1、1=2、2=4、3=8、4=16・・・となる。

先に決めた、**GAIN** の数値と **ATTEN** の数値を掛けて、カラムの説明書に書いてある数値と同じにする。

《アニオン[陰イオン]の場合》

カラムの説明書の分析条件の検出器の欄: CDD-6A 3.2  $\mu$  S/cmFS と記載されている。

GAIN を 2 (×0.1)、ATTEN を 5 (2 の 5 乗 = 32) に設定すると、32×0.1=3.2となる。

このように、値を変えることで説明書の記載値になるよう調節する。

《カチオン[陽イオン]の場合》

説明書に「感度; 1  $\mu$  S/cm」と記載されている。

GAIN を 3 (×1.0)、ATTEN を 0 (2 の 0 乗 = 1) に設定すると、1×1.0=1.0となる。

ただし、陽イオンの場合 ATTEN 0 では、振り切れるので 4 に設定する必要がある。

《カフェイン分析の場合》

説明書に感度に関する記載はない。クロマトグラムが振り切れないよう ATTEN を 8 にしている。

- **SPEED** : 紙送りの速さ。(1 分間あたり何ミリ送るか)
- **METHOD** : 定量計算方法。  
(実際入力する数値は、**1** か **4** になる。**1** は面積百分率法、**4** は絶対検量線法。)
- **1** : 面積百分率法  
各ピークの面積の合計を 100 (100%) としたときの、各ピークの割合 (%) で示す方法。(割合なので、定量することはできない)
- **4** : 絶対検量線法  
標準試料で、原点を通る検量線を作成しておき、そのグラフから成分量を計算する。先ず、面積百分率法 (1) で割合を出しておいて、次に絶対検量線法 (4) を用いる。そこで、まず **METHOD** を **1** にする。

ii) ゴーストピークをデータとして取り込まないようにする。(データ処理しないようにする)

[SHIFT] [PARAM] キーを押す。

1 回 [↓] を押す。<画面表示> TIME. PRG [ENTER] 押す。

(例) 測定開始直後から 2.5 分までのデータをとるな。

0.01 [ENTER] [↓] [→] INTEG [ENTER] OFF [ENTER]

<画面表示> 0.01 | INTEG OFF (0.01 は開始直後から を意味する)

2.5 [ENTER] [↓] [→] INTEG [ENTER] ON [ENTER]

<画面表示> 2.50 | INTEG ON

[EXIT] を 2 回押す (TIME PRG から抜ける。)

※INTEG 命令を消すには その行を表示して [SIFT] [DEL]

#### ④標準試料から検量線を作成する。

##### ア) **波形記憶 (DATSAVE) を設定する**

クロマトグラム開始番号や、分析回数を指定して、データを保存させる。

(例) 標準試料を1回分析する

[OPER] <画面表示> Ch1:Data Processing  
D:DATASAVE C:CALIB P:rePROcess  
[D] <画面表示> Starting Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]  
DATASAVE 0 [0-99 0=next available]

保存開始クロマトグラム番号「10」を入力し [ENTER]

0~99までの任意の数字を入れる

(分析回数に応じ、データには自動的に10、11、12・・・と番号がついて保存される)

分析回数「1」を入力し、[ENTER]を押す。

<画面表示> No. of Chromatogram to Store  
DATASAVE 10, 1

##### イ) **サンプル瓶に標準試料をとり、オートサンプラーラックへ装てんする**

○サンプル瓶は、ガラスでなく**ポリ容器**の方がよい。

(ナトリウムイオンがガラスから溶出する  
可能性があり、正確な量が測れない。)

有機溶媒を使用するときは、ガラスびんの方が良い。

○標準試料(市販品)を注入。1/2程度入れればよい。

○口に栓をする。(テフロン面(茶色)とシリコン面(白色)の2面があり、**テフロン面(茶色)を液面に向けてセットする。**)

○サンプル瓶をサンプルラックにセットし、オートサンプラー内へセットする。

(ラックには60本のサンプルをセットできる。番号は0~59番まで。)



##### ウ) **オートサンプラーの設定**

○システムコントローラーのF5ボタンを押す。(メニュー画面が表示される。)

○テンキーの0を押す。

(ANALYTICAL SEQUENCE画面を立ち上げる。)

・SMPL# (ビン番号) の入力。

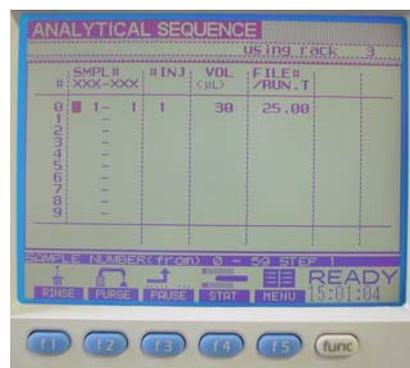
[開始ビン番号 - 終了ビン番号の順で入力]

入力したらENTERを押す。

(ENTERを押すと、カーソルが順次右へ移動。)

・# INJ (繰り返し回数) の入力。

(同じビンで何回繰り返し打つか。)



・VOL (吸い上げる量) の設定。 (何  $\mu$ L 吸い上げるか。 MAX は 50  $\mu$ L)

陰イオン分析 10  $\mu$ l 陽イオン分析 30  $\mu$ l カフェイン分析 10  $\mu$ l

・FILE# / RUN. T (分析時間 : 分析の一周期の時間帯) の設定。

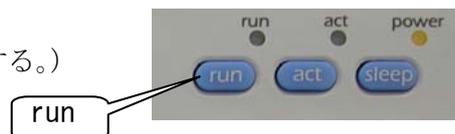
(データ処理機の STOP. TM より少し長め[1分位]に設定する。)

陰、陽イオン分析 25 分、カフェイン分析 5 分

設定終了

エ) run ボタンを押す

(一連の操作が作動。自動的にデータ処理機も印刷を開始する。)



オ) 検量線 (ID テーブル) を作成する

液クロが分析を終了するまで待つ。(データが分析器のHDに保存される)

[PARAM] [↓] 何度か押し METHOD (1) = に「4」(絶対検量線法) を入力

[↓] 何度か押し Edit ID table? = に「Y」(edit) を押す

Create new ID table? = と聞いてくるので、新規でつくる場合に「Y」(yes) を押す

Use retention time of last analysis? = (一番最後に分析した時間を使いますか?) と聞いてくる。使う場合は「Y」を押す。使わない場合は「N」を押す。

ID テーブル設定画面が表示される。物質名、retention time を入力する。

```
<画面表示>  [IDNO |NAME      |TIME |BAND]
              1  |H2PO4      |3.05 |
              [物質名] [時間] [入力の必要なし (カーソルもとぶ)]
```

[ENTER] [ENTER]

濃度 (conc) を入力 [ENTER]

```
<画面表示>  IDNO=1  CAL. LEVEL=1/1  [CONC |F1 |F2 ]
              30      | 0      |0
```

[ENTER] F1、F2 へは何も入れずに [ENTER] [ENTER]

2 行目へ移動するので IDNO 1 と同様に → **必要なピーク分だけ入力**

※不要な行の削除は [SHIFT] [DEL]

ID テーブル作成のための必要なデータ入力終了したら、[EXIT] を押す。

[OPER] を押す。

```
<画面表示>  Ch1:Data Processing
              D:DATASAVE      C:CALIB      P:rePROcess
```

[C] を押す。(C:CALIB [ENTER])

```
<画面表示>  ENTER # of Calib Stds then press <ENTER>
```

CALIB 「」 ← 数字 (1、2...) を入れて [ENTER]

平均分析回数の入力 「1」であれば1つのデータからIDテーブルを作成。

「2」ならば2つのデータの平均からIDテーブルをつくる。

[OPER] を押す。

<画面表示> Ch1:Data Processing  
D:DATASAVE C:CALIB P:rePROcEss

[P] を押す。(P:rePROcEss [ENTER])

<画面表示> Starting Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]  
=0

解析を開始するクロマトグラム番号「10」を入力し、[ENTER] を押す。

<画面表示> No. of Chromatograms for Reprocessing  
=「 」 ← 解析回数 (この場合は1) を入力し [ENTER] を押す。

(標準試料の 2 つのクロマトグラム (データ) の平均から、ID テーブルを作成する場合には 2 と入力する)

<画面表示> Background Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]  
=

バックグラウンドのクロマトグラムファイル番号を設定する画面が表示されるが、ここでは、バックグラウンド補正をしないので、そのまま [ENTER] を押す。

<画面表示> Print Report after Reproc ON/OFF  
0:No Report [0=OFF, 1=ON]

レポート出力をするかどうかを聞いてくるので、出力する「1」を入力 [ENTER]

これで、ID テーブルが作成される。

## ⑤未知試料を分析する。

(例) 未知試料 4 検体を分析するものとして示す。

i) 分析したクロマトグラムに番号をつけ、記憶させるようにする。

[OPER] <画面表示> Ch1:Data Processing  
D:DATASAVE C:CALIB P:rePROcEss

[D] <画面表示> Starting Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]  
DATASAVE 0 [0-99 0=next available]

保存開始クロマトグラム番号として例えば「20」を入力し [ENTER]  
0~99 までの任意の数字を入れる

(分析回数に応じ、データには自動的に 20、21、22... と番号がついて保存される)

分析回数「4」を入力し、[ENTER] を押す。

<画面表示> No. of Chromatogram to Store  
DATASAVE 20, 4

ii) ラックに試料をセットし、システムコントローラー [RUN] を押す。

自動的に分析が行われ、データ処理装置のHDへデータが保存されるとともに、分析結果をプリントアウトしてくれる。<終了>

iii) 保存されたデータを呼び出して、再分析させる。

[OPER] を押す。

<画面表示> Ch1:Data Processing

D:DATASAVE C:CALIB P:rePROcess

[P] を押す。(P:rePROcess [ENTER])

<画面表示> Starting Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]

=0

解析を開始するクロマトグラム番号「20」を入力し、[ENTER] を押す。

<画面表示> No. of Chromatograms for Reprocessing

= 「 」 ← 解析回数 (この場合は4) を入力し [ENTER] を押す。

<画面表示> Background Chrom No. [1:@CHRM1 .C??]

=

バックグラウンドのクロマトグラムファイル番号を設定する画面が表示されるが、ここでは、バックグラウンド補正をしないので、そのまま [ENTER] を押す。

<画面表示> Print Report after Reproc ON/OFF

0:No Report [0=OFF, 1=ON]

レポート出力をするかどうかを聞いてくるので、出力する「1」を入力 [ENTER]

4 検体分の試料を再解析し、プリントアウトしてくる。<終了>

## ⑥データの保存、呼び出し

i) データの保存される場所・・・4ヶ所ある (ドライブ 1, 2, 8, 9)

ドライブ番号	ドライブ名	備考
1	USER	クロマトグラムファイルや計算データファイルを格納 電源を切ると、消去される
2	フロッピーディスク	クロマトグラムファイルや計算データファイルのバックアップに使用
8	ROMDISK	プログラムファイルが格納されている 読み出し専用ドライブ (書き込みはできない)
9	SYSTEM	分析ファイル、BASIC ファイル、前処理プログラムファイル等を格納 電源を切っても保存されるが、バックアップバッテリー切れの際は消失

ii) ファイルのプリントアウト

・ドライブ 1 のファイルの一覧をプリントアウトする

DIR と入力後 [ENTER]

※プリントを途中で中断する [CTRL] + [ESC]

・フロッピーディスク中のファイルの一覧をプリントアウトする

DIR□ 2 [ENTER]

iii) フロッピーディスクの初期化 (フォーマット)

※使用できるフロッピーディスクは、**3.5 インチ 2HD** 及び **3.5 インチ 2DD**

IDISK□(スペース)2:DATA”と入力後 [ENTER]

Y/N と聞いてくるから、[Y] を入力後 [ENTER] → フォーマット開始

完了すると、フロッピーのランプが消える。

iv) ファイルをコピーする

全てのデータを USER ドライブ (ドライブ 1) からフロッピーディスクへコピーする

DCOPY□”1:\*.\*”□TO□”2:” [ENTER]

全てのデータをフロッピーディスクから USER ドライブ (ドライブ 1) へコピーする

DCOPY□”2:\*.\*”□TO□”1:” [ENTER]

SYSTEM ドライブ (ドライブ 9) の「@BAS01.BAS」をフロッピーディスク (ドライブ 2)

へ「ABC.BAS」という名前でコピーする

DCOPY□”9:@ BAS01.BAS”□TO□”2: ABC.BAS” [ENTER]

※同じ名前でコピーする場合

DCOPY□”9:@BAS01.BAS”□TO□”2:” [ENTER]

v) データの消去 KILL

※注意 ; 一文字目が「@」のファイルは消去してはいけない。システムが正常に動作しなくなる場合がある。

○ 1 個のファイルを消去する

(例) ABC.BAK を消去する場合

KILL□”ABC.BAK” [ENTER] と入力

<画面表示> KILL “ABC. BAK”

ABC. BAK killed

指定されたファイルが無い場合

KILL “ABC. BAK”

\*ERROR\*26:Disk(10:File does not exist)

○複数のファイルを一度に消去する

(例) 任意の拡張子を持つ ABC というファイルすべてを消去する場合

KILL□”ABC.\*” [ENTER] と入力

<画面表示> KILL “ABC.\*”

ABC. BAS killed

VI) データ分析器 (クロマトパック) のその他の命令

○記録用紙を送る [FEED] を押す。止めるにはもう一度 [FEED] を押す。

○クロマトパック内のデータ (ID テーブル) の確認 → LIST ID [ENTER]。

## ⑦停止方法

ア) **通常停止**：頻繁に使用する場合

- カラムオープンのドアをあけ、カラムを冷やす。(10分～15分程度)
- 冷えたら、**act(activate)**ボタンを押して止める。
- 各装置の電源を落とす。

イ) **エタノール置換**：長期間使用しない場合

現状では、パイプ内に移動相が入っている状態。

○カラムを外す

- ・カラムオープンのドアを開け、カラムを冷やす。
- ・**act(activate)**ボタンを押してポンプを止める。
- ・送液ポンプの圧力が下がっていることを確認。  
(送液ポンプのモニターで、**0 kgf** になっているか確認)
- ・カラムを外し、パイプどうしをジョイントでつなぐ。(カラムの両端に、栓をする。)  
(まず上をはずして栓をし、その後下をはずして栓をする。)

○蒸留水に置換

- ・移動相の容器から **A** のチューブを抜く。(チューブ先端を、キムワイプで拭う。)
- ・送液ポンプのドレインバルブ開けて、送液ポンプ前面の **purge** (パージ) ボタンを押す。  
(ポンプが作動)
- ・少し空気をかまして、**A** のチューブを蒸留水に浸す。  
(脱気装置前面のパイプの空気の流れで蒸留水の流れ具合を確認する。)
- ・約3分で **purge** が自動停止するので、ドレインバルブを閉める。
- ・システムコントローラーの **act(activate)** ボタンを押して、機器全体を蒸留水に置換する。  
(3分～5分ぐらい)
- ・**act(activate)** ボタンを押して、終了。

○エタノールに置換

※ 操作手順は、蒸留水置換と同じ。

- ・蒸留水の容器から **A** のチューブを抜く。(チューブ先端を、キムワイプで拭う。)
- ・送液ポンプのドレインバルブ開けて、送液ポンプ前面の **purge** (パージ) ボタンを押す。  
(ポンプが作動)
- ・少し空気をかまして、**A** のチューブをエタノールに浸す。  
(脱気装置前面のパイプの空気の流れでエタノールの流れ具合を確認できる。)
- ・約3分で **purge** が自動停止するので、ドレインバルブを閉める。
- ・システムコントローラーの **act(activate)** ボタンを押して、機器全体をエタノールに置換する。  
(3分～5分ぐらい)
- ・**act(activate)** ボタンを押して、終了。

### ○オートサンプラーのエタノール置換

(オートサンプラー内はもともと移動相が流れず、蒸留水で満たされているため、直接エタノール置換を行う。)

- ・オートサンプラーのドアを開け、**ドレインバルブ**を反時計方向に 180 度回す。
- ・装置横の注射器を少し引いて、**A と書いていないチューブ**に空気をかませる。
- ・**A と書いていないチューブ**をエタノールに浸す。
- ・注射器をいっぱいに引く。

(エタノールをオートサンプラーまで引っ張ってくる。エアーがオートサンプラー内のドレインバルブ内に入るのを確認する。)

- ・ドレインバルブを閉め、オートサンプラーのドアを閉める。
- ・システムコントローラーのメニュー画面 (F 5 を押す) から、テンキーの 0 を押し、**ANALYTICAL SEQUENCE** 画面を立ち上げる。
- ・**purge** (パージ) ボタン (F 2) を押す。
- ・オートサンプラー内が、蒸留水からエタノールに置換される。  
(10 分で自動的に停止する。オートサンプラーのモニターに時間が表示されている。)
- ・置換完了。



※ 送液ポンプの蒸留水置換をしている間に、同時進行でオートサンプラーのエタノール置換を行えば時間がはかどる。

### ○機器の電源を切る。

(チューブ先端は、そのままでもよいがエタノールに浸しておくのが望ましい。)

## 4 液体クロマトグラフ（イオンクロマトグラフ）の活用

### (1) 県立田辺高等学校 —第2学年自然科学科応用情報（理科）

「生物分野に関する探究活動」—

[使用設備・機器] 液体クロマトグラフ装置、電子顕微鏡、双眼実体顕微鏡など

当校の自然科学科においては、第2学年のカリキュラムとして選択履修による課題研究を実施している。本モデル授業は、会津川の環境をテーマにした探究的活動の一環として実施したものである。イオンクロマトグラフ装置を用いて、会津川の水に含まれる物質の分析を行う授業と、電子顕微鏡によって会津川中・下流の河床礫表面に付着したケイ藻を観察する授業を行った。生徒は10名ずつ2グループに分かれて、これら2つの学習活動に取り組んだ。また、プレゼンテーションソフトを用いて、本モデル授業を含めた課題研究の成果をまとめる授業を別日程で実施した。



生徒による電子顕微鏡観察

モデル授業では、生徒はそれぞれの機器の基本操作や原理についての説明を受けたあと、機器操作のようすを見学した。特に、電子顕微鏡については、生徒が操作を体験することができた。ケイ藻は一般に100 $\mu$ m以下のものが多く、生徒が電子顕微鏡で観察する対象としては難度が高いため、練習用として、容易に観察できる毛髪を題材に用いた。初めて目にした機器の原理や操作について、積極的に質問する生徒もおり、高度な機器に触れたことによる意欲の高まりがうかがえる。後日実施した、プレゼンテーションソフトを用いて学習のまとめを行う授業でも、整備された情報機器を用いて学習を進める姿がみられた。

高等学校理科の学習指導においては、今後、液体クロマトグラフ装置等の化学分析機器や電子顕微鏡を活用できる場面の増加が予想される。当センター学びの丘の機器を有効活用していく必要がある。



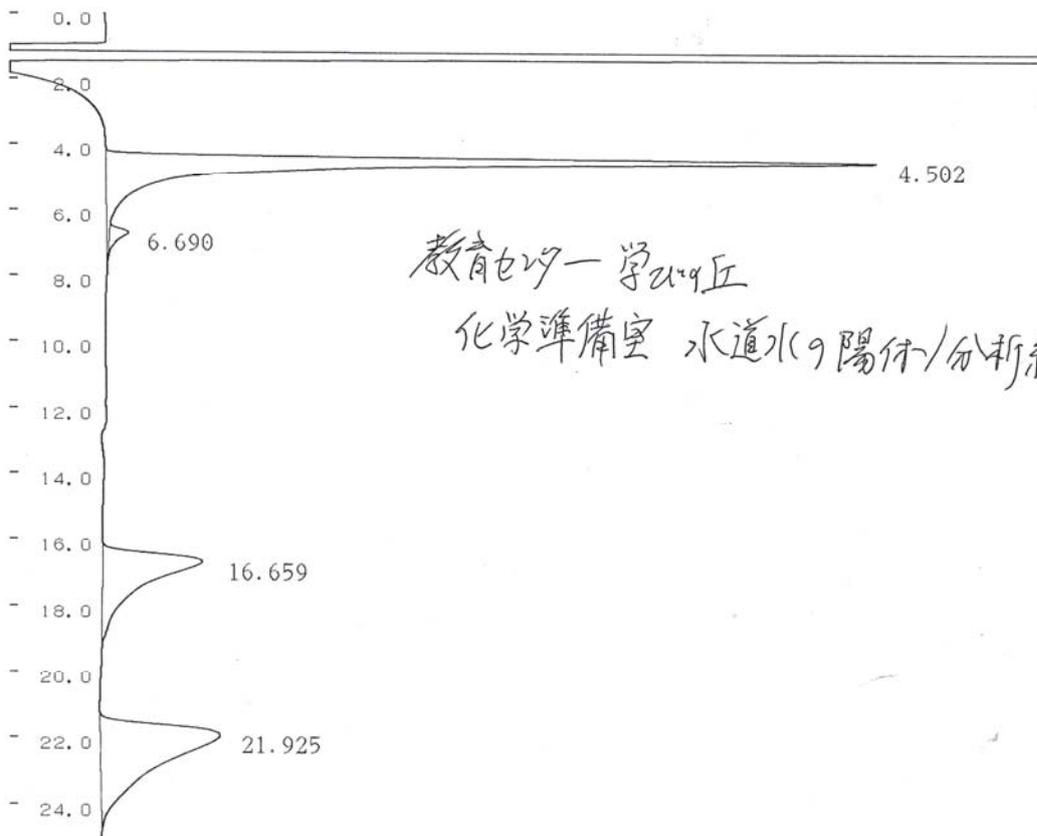
液体クロマトグラフ装置での分析

本モデル授業を実施するにあたって、機器操作に関して、指導者への事前研修を実施したが、機器を操作しながら授業を進めるのは容易ではなかった。指導者とセンター指導主事による、チームティーチング等の授業形態をとることで、より効果的に指導を行えるであろう。指導者がT1となって、生徒の学習状況を把握するとともに、機器操作等についてT2の指導主事に指示を行う。一方、T2の指導主事は、機器操作や原理説明等を中心に行いながら、T1を補助するという形態が考えられる。

<引用文献> 平成17年度 和歌山県教育センター学びの丘 研究紀要

(2) 水道水の陽イオン分析

C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=2 DATA=1:@CHRM1.C11 05/11/05 14:25:30



教育セー学丘  
化学準備室 水道水の陽イオン分析結果

\*\* CALCULATION REPORT \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.502	539412	26268	S	2	12.698	Na
	2	6.69	15121	650	T	4	1.1183	K
	3	16.659	207064	3418	S	5	4.0026	Mg
	5	21.925	337759	4107		6	10.3045	Ca
TOTAL			1099356	34443			28.1234	

ppm (mg/l)

流量 100ml/min.

@ 多く含まれる Na<sup>+</sup>は、塩化ナトリウム (NaCl) 由来のものと考えられる。また、Mg<sup>2+</sup>や Ca<sup>2+</sup>が含まれているが、アメリカ硬度による計算では硬度が 52.2 [mg/L] となり、軟水に分類される。

次ページ<硬度 (水)>参照

学びの丘の水道水は軟水であったが、県下各地の水道水や井戸水の硬度を調べてみるのは面白いと思われる。特に、酒造りに利用される水は、酵母菌を活発に活動させる上からミネラル豊富な硬水が良いとされている。実際に造り酒屋がどれくらいの硬度の水を使用しているか、調査してみるのも興味深い。

## ※ 硬度（水）

出典：フリー百科事典『ウィキペディア（Wikipedia）』

硬度（こうど）は、水に含まれるカルシウム（Ca）やマグネシウム（Mg）の量を表す数値。計算法によってアメリカ硬度（mg/L、ppm）、ドイツ硬度（° dH）、フランス硬度（° f）、イギリス硬度（クラーク硬度）（° E）等の種類がある。日本では戦前はドイツ硬度が広く用いられていたが、戦後はアメリカ硬度を用いることが多い。

### <計算法>

#### アメリカ硬度

水 1 リットル中に含まれるカルシウム・マグネシウムの量（ミリグラム）を、炭酸カルシウム（CaCO<sub>3</sub>）の量に換算する。それぞれの式量は Ca=40、Mg=24.3、CaCO<sub>3</sub>=100 なので、計算は以下のようになる。

$$\text{硬度 (mg/L)} \doteq \text{カルシウム量 (mg/L)} \times 2.5 + \text{マグネシウム量 (mg/L)} \times 4.1$$

#### ドイツ硬度

水 1 リットル中に含まれるカルシウム・マグネシウムの量（ミリグラム）を、酸化カルシウム（CaO）の量に換算し、10mg/L を 1 度（1° dH）とする。

### <分類>

硬度の値によって、硬水や軟水という名称で呼ばれる。世界保健機構（WHO）の基準では以下の通り。

#### 軟水

0～ 60 未満

中程度の軟水

60～120 未満

#### 硬水

120～180 未満

非常な硬水

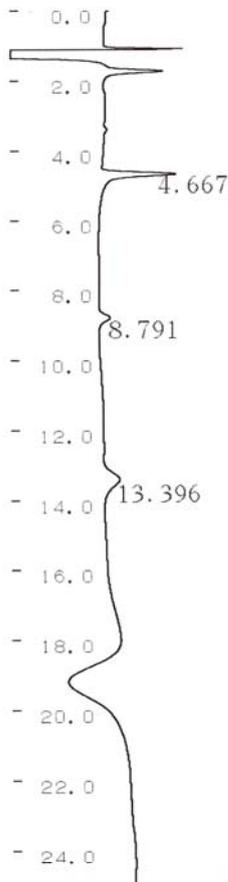
180 以上

ヨーロッパの水はほとんどが硬水である。フランスの有名なミネラルウォーターであるエビアン（Evian）やヴィittel（Vittel）の硬度は 300 を超え WHO の基準では「非常な硬水」に属する。ただし同じフランスのミネラルウォーターでも、ボルヴィック（Volvic）は例外である。一方、日本の水は軟水が多い。

軟水は赤ちゃんのミルク作り、お茶やだし汁などに適している。一方、硬水はミネラルウォーターの名の通り、ミネラル分の補給、また灰汁（あく）を析出しやすいため、灰汁の出る料理に適している。また、硬水は石鹼の泡立ちを抑えてしまう。特にアルカリ性の石鹼は成分が結合・凝固して増粘するため、すすぎで非常に苦勞する。

(3) 雨水の陰イオン分析 2006. 9. 12 (降り始めから 20ml 以内)

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C14 ATTEN= 5 SPEED= 5.0



pH=4.4 (HORIBA COMPACT pH METER B-211にて測定)

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=3 DATA=1:@CHRM1.C14 06/09/12 19:04:30

\*\* CALCULATION REPORT \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.667	24907	2424		3	1.9344	Cl
	2	8.791	4909	347		6	0.8059	No3
	3	13.396	13251	474		7	1.5043	SO4
		TOTAL	43066	3244			4.2447	

@ 雨水の Cl<sup>-</sup>は、塩化ナトリウム (NaCl) 由来のものと考えられる。

@ 酸性雨として定義される pH は 5.6 以下である。今回 pH メーターで測定した雨水の pH は 4.4 であり、定義より低いいため酸性雨となる。液体クロマトグラフで検出された硝酸イオン (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) と硫酸イオン (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) が全て硝酸(HNO<sub>3</sub>)、硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)由来であるとして pH を計算すると、イオン式量 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>=62、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=96 であるから

$$\text{NO}_3^- \text{のモル濃度} = 0.8059/62 \times 10^{-3} \approx 1.30 \times 10^{-5} \text{ [mol/l]}$$

$$\text{SO}_4^{2-} \text{の} \quad = 1.5043/96 \times 10^{-3} \approx 1.57 \times 10^{-5} \text{ [mol/l]}$$

電離度を 1 として NO<sub>3</sub><sup>-</sup>からの [H<sup>+</sup>]=1.30×10<sup>-5</sup> [mol/l]

$$\text{SO}_4^{2-} \text{からの} [\text{H}^+] = 1.57 \times 10^{-5} \times 2 = 3.14 \times 10^{-5} \text{ [mol/l]}$$

よってこの雨水の [H<sup>+</sup>]は [H<sup>+</sup>]=1.30×10<sup>-5</sup>+3.14×10<sup>-5</sup>=4.44×10<sup>-5</sup> [mol/l]

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = -\log(4.44 \times 10^{-5}) = 5 - \log 4.44 = 5 - 0.647 \approx \boxed{4.35} \text{ となる。}$$

この pH 値は、pH メーターで測定した値に近似するため、酸性雨の原因物質が硝酸及び硫酸であると結論付けられそうである。

しかし、確信を持つためにはもう少しデータを集める必要がある。硝酸や硫酸イオン濃度の季節変化を、年間を通し、風向や天気図と合わせて調査することにより、どこから運ばれてきたものか推測することも可能かもしれない。

#### (4) その他、イオン分析の活用について

- ・ペットボトル飲料のイオン分析
  - ・入浴剤の        "
  - ・温泉水の        "
  - ・井戸水の        "
  - ・工場排水の     "
- などが考えられる。

(例) 陰イオン分析結果 (pH は HORIBA COMPACT pH METER B-211 にて測定)

	富田の水	学びの丘水道水
pH	8.0	7.1
Cl <sup>-</sup>	5.8 (mg/l)	6.6 (mg/l)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	検出されず	2.2 (mg/l)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	16 (mg/l)	19 (mg/l)