JASCO-HPLC Operating Manual

(Analytical HPLC)

Index

A) Turning on Equipment and Starting ChromNav	3
B) For Manual Measurement	6
(1) Making Control Method	7
(2) Preparation for Measurement	9
(3) Measurement	
(4) After Measurement	13
C) For Automatic Measurement Using Auto-Sampler	14
(1) Making Control Method	15
(2) Preparation for Measurement	
(3) Measurement & After Measurement	21
D) For Overnight Measurement	24
E) Data Analysis	25
(1) Opening your Data	27
(2) Automatic Peak-Picking	
(3) Manual Peak-Picking	
(4) Save your data	
F) Preparation of Eluents	
(1) Eluent A: How to prepare it?	
(2) Eluent B: How to order it?	

A) Turning on Equipment and Starting ChromNav

When you want to use JASCO-HPLC, please turn on the following apparatus.

- ✓ UV detector
- ✓ Pump for Eluent A
- ✓ Pump for Eluent B
- ✓ Mixer
- ✓ Degassor (Sorry, the photo doesn't show the picture of it totally...)
- ✓ Mobile Phase Mixer
- ✓ Auto-sampler (when you want to carry out automatic measurement)



Then, please double-click "ChromNav" icon and start "ChromNav".

Log-in ID and password is same: "gousei".

There are 5 icons:

- ✓ 解析モードで起動: for Analysis Mode
- ✓ HPLC_E-L-AS-SYSTEM: use HPLC-E with auto-sampler (automatic measurement)
- ✓ HPLC_F-R-AS-SYSTEM: use HPLC-F with auto-sampler (automatic measurement)
- ✓ HPLC-E-L-MANUAL-SYSTEM: use HPLC-E (manual measurement)
- ✓ HPLC-F-R-MANUAL-SYSTEM: use HPLC-F (manual measurement)

Please double-click the suitable icon and choose the project you need.

Ciria n Date	x>>+>=-#	Call Ser.	-	_	
U	ー登録(ブラザ	Ontrol Center - gousei			
		… 操作(Q) 表示(V) ヘルプ(H)			
ChromNAV TTI_HE_D	ownL マイミーオ スペシ	ChromNAV	ChromNAV 起動		8
Enish Downloadin	906	ChromNAV 起動 う プロジェクトー覧	解析モードで起動 HPLC_E-L-A	I June June June June June June June June	
	<u>}</u>		- ン人丁ム泊牧		
EndMole oxemulghis	sekan		HPLC システム名	HPLC_E-L-AS-SYSTE	M
Prespicion			IP アドレス	192.168.0.11	
			MAC アドレス	00:C0:28:00:15:93	E
			⊟ HPLC 装置構成		
	<u>A</u>	1	スタートモード	LC-NetII/ADC (Start	On Injection)
iukakata ovenughti	sake		オートサンプラ	AS-2055	
			ポンプ #1	PU-2080	
			ポンプ #2	PU-2080	
		ChromNAV	UV 検出器 #1	UV-2075	
WIMAX		· 答理W_1.	ノジレブ/イベント	LC-NetII/ADC	
WIMAX #=== 1		V HEY IV	□ データの取込		
UPU		» *	データ取込間隔	500 msec	-
		レディ	ユーザー名:	gousei 前回ログオンした日時: 2	2013/12/06 12:09:39 JP
9-70-72 9-70-72 9-70-75					
📀 🚞 🔘	Control Center	Ar		Ø A 般 😂 ୭ 🤣 🕐 🖍	- 😼 🛱 🏹 🌭 0:10 2014/01/10

If it is your first time to use this apparatus, please create your own project newly as follows.



B) For Manual Measurement

For manual measurement, you first need to set the view mode as "マニュアル測定".



(1) Making Control Method

You can set the measurement details by setting "Control Method".

Following 3 boxes should be checked:

- ✓ ポンプ: **PU-2080**
- ✓ UV 検出器 #1: 指定しない
- ✔ バルブ/イベント*: 指定しない

*The reason this box should be checked is not clear; the supplier checked this box at explanatory meeting.



<u>" $\# > \mathcal{T}$ " tab</u> ... you can set the mobile phase gradient.

In following figure, standard gradient setting for measurement is shown.



(Eluent A: aqueous TFA (0.1%), Eluent B: MeCN)

You also need to set the washing method; please fill each box with following values.

- \checkmark initial condition \rightarrow A: 0%, B: 100%; other values should not be changed
- \checkmark eluent gradient details \rightarrow don't fill in anything
- ✓ analysis time \rightarrow 20.0 min

 $\underline{"UV \# 1" tab} \ ... \ you can set the wave length for measurement.$

You can set the wave length from 190nm.

Finally, please save your method with appropriate name and close this window. (ex. "0-100_40min_1mLmin_230nm" or "wash_MeCN_1mLmin")

<u>"バルブ/イベント" tab</u> ... you don't need to do anything.

(2) Preparation for Measurement

At first, you need to wash the column with MeCN. Washing takes 10 minutes usually. Please select washing method you set before and start washing as follows.

🔠 ChromNAV - shinoda - HPLC-F-R-N	MANUL-SYSTEM	o x
···ファイル(E) 表示(V) 測定(R) へ	ヽレブ(圧)	
	a 🕰 🗖 🗾 🗶 🔹 🕐 change from "Stop" to "Pump"	
データ測定	>λ7_AT=29~	無題
 潮走ビュー システムモニター クロマトグラムモニター マニュアル潮定 システムモニター 	システムステーウス: 知マドウラム名: ユーザー名: gousei Stop 分析時間: ・・・・ コンロールジンド: ・・・ 送り返しNo: ・・・・ ロンロールジンド: ・・・ START EOT MONIT ・・・ STERT EOT FUDE UV 検出器 #1 SPC ・ AZERO UV 検出器 #1 ▼	
HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM □ PU #1: PU-2080 送液モト ¹ Iso1 流量 0.000 [m./min] 圧力 0.0 (0.0 - 25.0) [MPa] ハ ¹ ル ⁷ 1 イヘ ² ト Off Off Off □ PU #2: PU-2080 流量 0.000 [m./min] 圧力 -0.1 (0.0 - 25.0) [MPa] □ VV #1: UV-2075 波長 350 [m] レスポッス STD □ LCNet: LC-NetTI/ADC	PU #1: PU-2080 没 送液モード Iso1 流量 0.000 [mL/min] 圧力 0.0 (0.0 - 25.0) [t]Pal パルフ 1 イントロールメンッド wash レトロールメンッド wash ×組スケール 20.0 min キャンセル	
//ႃ/J ² 111 {^∿}} Off Off off off	PU #2: PU-2080 设 流量 0.000 [mL/min] 压力 -0.1 (0.0 - 25.0) [HPa] UV #1: UV-2075 设 波長 350 [mn] 1/25/2 STD	
○ データ測定 □ データ解析 ・ ・ ・		
	参照:なし なし 準備中 Stop 準備中 HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM Start Or	Injection JP
🚱 📙 マニュアル作成用	🕐 Control Center 🥂 ChiromNAV - sh 🧭 🏣 - ペイント 🛛 🐼 🕺 🕺 😵 🖉 🔮 🕬 👘 💈 🗤	11:04 014/06/16

During washing, it is recommended to set the measurement information as follows.

- ✓ シーケンス名 → today's date
- ✓ クロマトグラム名 → experiment number
- ✓ 取込時間(min) → -0.5 min from the analysis time of the selected control method
- ✓ 注入量(μ L) → injection volume

🛞 ChromNAV - shinoda - HPLC-F-R-M	ANUL-SYSTEM
·· ファイル(E) 表示(V) 測定(R) へ	ルプ(比)
データ測定	マニュアル測定
測定ビュー	0.751 75-057, http://doi.org/10.1011/151/00.000
🗮 システムモニター	2/44// ハ. カモリンはつ・・・ ユンション gyuage D
<u>クロマトグラムモ</u> ニター	Pump @0/2010:
🖀 🛛 マニュアル測定	
システムモニター	START EDIT MONIT STOP FLUSH SPEC UV 検出器 #1 SPC ・ A-ZERO
HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM	
□ PU #1: PU-2080 送海モード HPG2	
流量 1.000 [mL/min]	シーケンス名 20140616 ・ ・ クロマトグラム名 コメント サンプル名
圧力 3.8 (0.0 - 25.0) [MPa] パルフ [*] 1	測定日を付与する フォーマット 1814 -
イベント Off Off Off 細式出 のの100000001%1	
■ PU #2: PU-2080	サンプル#: 1 増分: 0 二注入しない
送液モート* Slave Pump	
波長 254 [nm]	
LCNet: LC-NetII/ADC	
パルフ [*] 111 イム [*] ル のffのffのff	コントロールメンタド aminoscids(0-100_40min) 214nm
	取込4時間(min): 51.5 注注入量化山(): 10.0
	检查结查
	モード 917: UNK ▼ 定量7799: 1.00000
📉 データ測定	データ処理メリッド
▲ データ解析	
»	לאבאבאלאקער איז
·	
	U Control Center ChromNAV - sh 🥙 無題 - ペイント 🕼 A 股 🎽 🥬 💞 🖉 👬 🗸 - 🏴 管 ሌ 🖏 2014/06/16

After 10 minutes, please start pre-run as follows. Pre-run takes 10 minutes usually.

W ChromNAV - shinoda - H ^P LC-F F1	(F2/L-SYSTEM F3 F4 F5/F6 F7 F8 F9 F10
データ測定	علم المراح ال 20140616
測定ビュー	システムステータス: 2ロマドグラム名: ユーザー名: gousei
システムモニター	Pump 分析時間: 卫/扣一步パット: aminoacids(0-100_40min) 214nm
クロマトグラムモニター	
 マーユアル測定 システムモニター 	Control Contro Control Control Control Control Control Control Control Control
HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM	change from "Pump to "Run/Wait"
送液干卡 HPG2	
近望 1.000 [mc/min] 圧力 2.3 (0.0 - 25.0) [MPa]	
パルフ ^ッ 1 イヘツト Off off off	□ 測定日を付与する 28~29 28 0314 ●
組成比 100.0 0.0 0.0 0.0 [%] PU #2: PU-2080 送びモード Slave Pump	サンブル#: 1 増分: 0 注入しない
UV #1: UV-2075	/ ይገኛ እማይረት KS140616-(1) 0h 👘
波長 214 [nm] レスホックス STD I LCNet: LC-NetII/ADC	連番: 1 連番桁数: 3 繰り返し回数: 1
パルフ [*] 111 イベント Off off off	コントロールメンタド: aminoacids(0-100_40min) 214nm 👦
	取这時間(min): 51.5 注入量(μL): 10.0
	検量線ケーブル・
	モード - タイプ UNK - 定量ファクター: 100000
🔯 データ測定	デーク処理メリッド
「「「」 データ解析	
» *	
レディ	/ ● 一部はしなし 20140616 準備中 Pump 準備中 HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM Start On Injection JP
	○ Control Center ChromNAV - sh

(3) Measurement

After 10 minutes, please inject your sample with 50 μ L syringe from injection port as follows. The measurement starts automatically when the following process is carried out.



🛞 ChromNAV - shinoda - HPLC-FF1/	F2USYSTEM F3 F4 F5/F6 F7 F8 F9 F10 💌 🖂 🖂 🖂
· ファイル(E) 表示(Y) 測定(E	
データ測定	< <u>- 17 ル利に</u> 2014061
測定ビュー	、 パテルフテーカフ・ カロフレバラム名: VS140616-/111h 002 フーザー名・ anusai
🔜 システムモニター	
── クロマトグラムモニター	#DiaLNo: 1/1
マニュアル測定	
システムモニター	START EDIT MONIT STOP FLUSH SPEC A AZERO
HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM PU #1: PU-2080	🛛 🖄 🖬 🖬 🔪 change from "Run/Wait" to "Run"
送液モード HPG2 法量 1.000 [ml /min]	シードン2-2, 20140616 ・ ・ グロマトグラム名 コメント サンプル名
圧力 6.4 (0.0 - 25.0) [MPa]	1 KS140616-(1) 0h_001
パルア 1 イベツト Off off off	
組成比 100.0 0.0 0.0 0.0 [%] 回 PU #2: PU-2080 送流れ、い Claus Dump	サンブル#: 1 増分: 0 注入しない
UV #1: UV-2075	クロマトグラム名 KS140616-(1) lh
波長 214 [nm] レスホ [®] ノス STD 同 LCNet: LC-NetII/ADC	連番: 2 · 連番桁数: 3 編7返U回数: 1
パルフ [*] 111 (4) [*] 小 OffOffOffOff	コントローノレダンタド aminoacids(0-100_40min) 214nm
	取这些希腊(min): 51.5 注入量(µL): 10.0
	ピークロテーブル
	モード 947: UNK 7 定量ブアクラー: 100000
データ測定	データ処理メソッド
「へ」 データ解析	
» *	
レディ	参照:なし なし (1/1) 20140616 実行中 Run/Wait 準備中 HPLC-F-R-MANUL-SYSTEM Start On Injection
マニュアル作成用	🔘 Control Center 🥁 ChromNAV - sh 🧭 無題 - ペイント 🛛 A 般 🧐 知 🖉 🔊 🥔 🖗 👘 👘 😒 👘 👘 14:54 2014/06/16

(4) After Measurement

When the measurement is finished, the display changes from "Run" to "Run/Wait" and Eluent A is flowed. As acidic solution has bad effect on column, you are recommended to fill column with MeCN.

Please click the "STOP" icon and click the "MONIT" icon and select wash method. Solvent changing will take 10 minutes.

After 10 minutes, you can stop the washing.

C) For Automatic Measurement Using Auto-Sampler

For manual measurement, you first need to set the view mode as "測定シーケンス".



(1) Making Control Method

You can set the measurement details by setting "Control Method".

Following 4 boxes should be checked:

- ✓ オートサンプラー: auto-sampler
- ✓ ポンプ: pump
- ✓ UV 検出器 #1: UV detector No. 1
- ✔ バルブ/イベント*

*The reason this box should be checked is not clear; the supplier checked this box at explanatory meeting.



<u>"オートサンプラー" tab</u> ... you don't need to do anything.

<u>" $\# > \mathcal{T}$ " tab</u> ... you can set the mobile phase gradient.

In following figure, standard gradient setting for measurement is shown.



(Eluent A: aqueous TFA (0.1%), Eluent B: MeCN)

In order to carry out a measurement sequentially, initializing time (8 min, eluent A 100%) is set.

Also, you are recommended to set pre- and post-sequence washing method.

🛞 ChromNAV - shinoda - HPLC ጣ" -Ò-炋 - 0 23 \Box/\Box z z ്രി Z Z ファイル(E) 表示(⊻) 潟 X 🕥 wash-start_20min_AS - コントロールメソッド × 😼 🖏 🗙 😓 🖬 🕰 👧 1 찯 📙 🛃 🛃 🌌 😓 😢 😣 データ測定 無額 測定ビュー 分析時間: 20.0 min 📩 システムモニター 一般 オートサンプラ ボンプ UV #1 バルブ/イベント 🕅 クロマトグラムモニター ポンプ1 ポンプ2 ポンプ3 ポンプ4 バルブ/イベント 🧱 測定シーケンスモニター • システムモニター 初期条件 タイムプログラム #1 HPLC_F-R-AS-SYSTEM 回 AS: AS-2055 ステータス Ready 注入量 ---- [µL サンフ?ル# ---送液モード: HPG2 👻 # 時間 機能 値 #1 値 #2 値 #3 値 #4 組成比 100.0 0.0 0.0 0.0 2 10.50 1.000 mL/mir 流量: コメント サンブル名 定量ファクター 重: 4 ---- (µĹ) 3 4 5 6 7 8 9 25.0 MPa 压力上限**:** 0.0 MPa PU #1: PU-2080 压力下限**:** 送液モード 流量 圧力 パルフ Iso1 A: 0.0 % B: 100.0 % u.u00 [mL/min] 0.0 (0.0 - 25.0) [MPa] 1 C: % 10 11 12 イペント --- --- --D: % PU #2: PU-2080 流量 圧力 0.000 [mL/min] 0.0 (0.0 - 25.0) [MPa] C% D% A% **B%** F 圧/J UV UV #1: UV-2075 波長 2 レスポンス S 100 214 [nm] 1.000 レスホシス STD | LCNet: LC-NetII/ADC 75 バルブ イベント 111 off off off off 50 25 🐼 データ測定 0.000 📶 データ解析 » ディ F-R-AS-SYSTEM Start On Injection JP 🗷 A 般 🐸 勁 🥪 🕐 🛤 🖗 🔺 🎼 🕼 🞲 Ch entry3~... entry1~. 7-126_b... **?** 🔗 毎題 - ぺ..

<pre-sequence>

<post-sequence>



"UV #1" tab ... you can set the wave length for measurement.

You can set the wave length from 190nm.

Finally, please save your method with appropriate name and close this window. (ex. "AS_0-100_40min_1mLmin_230nm" or "AS_wash-start_1mLmin") or "AS_wash-end_1mLmin")

<u>"バルブ/イベント" tab</u> ... you don't need to do anything.

(2) Preparation for Measurement

You need to set batch table for automatic measurement.

Following 6 blanks should be filled as follows:

- ✓ タイプ: UNK
- ✓ サンプル#: vial port number you used
- ✓ 注入量: injection volume, µL order
- ✓ クロマトグラム名: experiment number
- ✔ 取込時間: -0.5 min from the analysis time of the selected control method
- ✓ コントロールメソッド: appropriate control method
- ✓ サンプル名: experiment number

🔛 C	hromNAV -	- shinoda ·	- HPLC	TEM	_		_						٥	x
1.0	アイル(E)	表示(⊻)	测定(<u>R</u>)) ヘルプ(圧)										
		a I 🏊 I I			a b									
: E	<u> </u>													
	-久測定	- North A		測定シーケンス1	t_9-								X	190
	2014061	2 - 測定シ	-522			Sector Provide Law		_						
	🔄 📂	- 🖬	2	🖕 🕐 😣										
	↓ ポンプ	STOP 7	1ラムオ-	-ブン: OFF 検出器ラン	ノブ: OFF		h 🖉 👌							
	+ b/3	#Y cful #	111 H		用D:185月月		***	検見迫テレゴル	L_k	データの通びしんと	TJN.L	#1.111-2	を思って	
	# 0419 1 UNK	55770#	50.0	wash-start	19.5	wash-start 20min AS	C-9403-970	1999年1987 - 2772	L I) - 9824£ X 2 911	J/J/F	wash-start	E - 2 - 2	1
	2 UNK	1	50.0	KS140616-(1) purified1-1	40.0	puritycheck_aminoacids(0-80 20min 214nm) AS						KS140616-(1) purified1-1		
	3 UNK	2	50.0	KS140616-(1) purified1-2	40.0	puritycheck_aminoacids(0-80 20min 214nm) AS						KS140616-(1) purified1-2		
	4 UNK	3	50.0	KS140616-(1) purified1-3	40.0	puritycheck_aminoacids(0-80 20min 214nm) AS						KS140616-(1) purified1-3	- 1	
	5 UNK		50.0	KS140616-(1) purified1-4	40.0	wash 20min AS						KS140616-(1) purified1-4		
	7		-	THE REAL PROPERTY AND A DECIMAL PROPERTY AND		index. Second 9 in								
	8													E
	9												=	
	10													
	12													
	13													
	14												_	
	15													
	17												_	1
	18													
	19													
	20													
	21													
	22													
	24													
	25													
	26													
	27													
	29													
	30													
	31													Ψ.
	32													
	33		1				0		_		_		_	JP
	9	7-126_b		Control	ChromN	. 🔐 ChromN 🧭 無題 - ペ	entry3~	entry1~.	🐼	A 般 🐸 🥩 😢	CAPS 🗗 KANA 🔻	- 😼 🛱 🌜 📆 20	15:47)14/06/1	7

You are recommended to add "wash-start" line before your first sample and add "wash-end" line after your last sample, as shown in above.

Please don't forget to set "end mode" as follows:

🔐 ChromNAV - shinoda - HPLC_ ファイル(E) 表示(Y) 測定(E —	ݤ᠄᠁᠐∕▣ ▓▖ Ψᢩ゜ ་ᠯᢆᡣ ᡬᠥ	3
🔁 🖏 🗙 😓 🖬 🙇 🖉		
データ測定	測定シーケンスモニター 2014061	7-2
測定ビュー	3/75/75-877, ///75/82, 7-45-27, anural	-1
システムモニター クロマトグラムモニター	Stop Arry Ads. Lynn-w/yn?: 37/02/ No:	
測定シーケンスモニター システムモニター		
HPIC F-R-AS-SYSTEM	STOP PAUSE CONT RESET MONTH POMP STOP FLUSH SPEC	_
AS: AS-2055	🛃 たンプ: STOP カラムオーブン: OFF 検出器ランプ: OFF 創 🦓 🛂 🌌 🌉 🖉	
ステータス Ready 注入量	1 いた 5 50.0 wash vash vash ビンドモード ビンドモード データ処理メンタド コ 2 UNK 1 50.0 Wash vash vash ビンドモード ビンドモード データ処理メンタド コ 3 UNK 2 50.0 Wash vash vash ビンドモード データ処理メンタド コ 3 UNK 2 50.0 KS140615(1) purf T.V.Kエード B00 in 214mm) AS B00 in 214mm) AS B00 in 214mm) AS 5 UNK 4 50.0 KS140615(1) purf ボーブ: Off T AD0 in 214mm) AS B00 i	
	22 23 24 25 26 27 1 1 1 1 ()参照:なし]パスト:]20140617-2]準備中. HPLC_F-R-AS-SYSTEM Start On Injection	n JP

When you finish setting the batch table, please save it. As for the filename, date will be suitable.

(3) Measurement & After Measurement

Please open the batch table you have set.

🛞 ChromNAV - shinoda - HPLC_FF1/	F2YSTEM F3	F4	F5/F6	F7	F8	F9	F10	
· ファイル(E) 表示(⊻) 測定(E		1/						
			L 🔊 🚽	zz			2,9	
			× 2	- frrrd	لعا		9	
デー収測定	「枳」ビシーケンスモニタン							20140617-2
測定ヒュー		har and hold a state						
	システムステータス:	クロマトクラム名:		ユーザー名:	gousei			
	Stop	フボロサ間: フテロコ [®] No:						
M 004 09546-9-		7.177 1101						
測定シーケンスモニャー				101	111/ 按出明 #1 CDC		N/ +Ф-Ш 90 - # 1	
システムモニター	START STOP PAU	ISE CONT RESET MONI	T PUMP STOP	FLUSH SPEC	00 候山器 #1 5PC	A-ZERO	JV 1夾山器 #1 ▼	
HPLC_F-R-AS-SYSTEM	#5.7. CTOD	カニノナ ゴンル OFF 検出型						
□ AS: AS-2055		カラムオーノン:UFF 検山語:		📉 🦦 🜌 🗉	🗱 💭 📑			
スァータス Read 注入量 [u1]	# タイプ サンプル	# 注入量 クロマトグラム名	取込時間コン	ーールメソッド		ピークIDテーブル	検量線テーブル モード	データ処理メソッド コン 🔺
		5 50.0 wash-start 1 50.0 KS140616-(1) purified	19.5 wast I-1 40.0 purit	n-start_20min_AS wcbeck_aminoacids(0-80	20min 214nm) AS			
E PU #1: PU-2080	3 UNK	2 50.0 KS140616-(1) purified	L-2 40.0 purit	ycheck_aminoacids(0-80	20min 214nm) AS			
送波セート Iso1 法母 0.000 [m] /min]	4 UNK	3 50.0 KS140616-(1) purified	L-3 40.0 purit	ycheck_aminoacids(0-80	20min 214nm) AS			E
压力 0.0 (0.0 - 25.0)[MPa]	5 UNK	4 50.0 KS140616-(1) purified: 5 50.0 wash	L-4 40.0 punt 19.5 wash	ycheck_aminoacids(0-80 n 20min AS	20min 214nm) AS			
パルプ 1	7							
14'0F	8							
流量 0.000 [mL/min]	10							
压力 0.1(0.0-25.0)[MPa]	11							
□ UV #1: UV-2075 波長 214 [nm]	12 Sa	ve the batch tab	le					
レスホッンス STD	14							
LCNet: LC-NetII/ADC	15							
パルプ 111 イペット OffOffOffOff	16 4 open t	a batch table						
	1/ Open L							
	19							
	20							
	21							
データ測定	23							
	24							
一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一一	25							
»	27							
					7 h' 20140617	2 淮借山 Stop 淮		STEM Start On Injection 10
				1 Sec. 19 1	PDF	- <u>z ≄118</u> ++ 5t0p ⊈		15-51
7-126_b OC	ontrol 🏾 🔐 Chroi	nN 🔐 ChromN	🏏 無題 - ペ	kentry3~	entry1~	🗵 A 股 🐸 🖻 🕯	🖉 🕐 кана 👻 🔺 😽 🕻	2014/06/17

Further sample addition and sample delete can be done.

When the change is finished, please don't forget to save batch table.

<u>Please don't forget to set the injection port position as "LOAD".</u> When measurement is carried out with

"INJECT" position, data won't be saved.



Automatic measurement starts when you click "START" icon.

B ChromNAV - shinoda - HPLC_FFA-/	F2YSTEM	F3	F4		F5/F6	F 7	F8	F9	F10		. 0 . x
ファイル(E) 表示(⊻) 測定(E	±)		×/		-1 .						
🗄 💀 📉 📚 📷 💆 🖓		O/\Box			٣"	²			z 🔄		
データ測定	「黒モシーケン	イムモーダー									20140617-2
測定ビュー	Na5135	. ha.	hamildin 1.47.				Ø				
🗮 システムモニター	y XTAXT	-9.4:	903197543: 分析時間:	_		עריים ארומיעב ביייים	名: gousei 나가까?:				
🕅 クロマトグラムモニター	Stop		ステッフ [°] No:								
測定シーケンスモニター							M				
システムモニター	START	TOP PAUSE	CONT RESET	MONIT	PUMP S	TOP FLUSH	UV 検出器 #1 SPEC	SPC - A-ZERO	UV 検出器 #1	-	
HPLC_F-R-AS-SYSTEM		n ETOD THE	ルオーゴン:: OFF	接出题目的	7.055	wh i Maa maa t	7				
AS: AS-2055		BIOP	ДЛ-)). OFF	1米山台 ノン.	J. OFF		🛎 🛥 💴 🕒				
ステーダス Ready 注入量	# タイプ	サンブル# 注	入量 クロマトグラム:	2	取込時間	コントロールメソッド		ピークIDテーブル	検量線テーブルも	ード データ処理ン	いッド コン 🔺
サンフ [®] ル#	1 UNK	5	50.0 wash-start	munified 1 1	19.5	wash-start_20min_AS	de/0.90.20min.214mm) & C				
PU #1: PU-2080	3 UNK	2	50.0 KS140616-(1)	purified 1-2	40.0	puritycheck_aminoacio	ds(0-80 20min 214mm) AS				
送液モード Iso1	4 UNK	3	50.0 KS140616-(1	purified 1-3	40.0	puritycheck_aminoacio	ds(0-80 20min 214nm) AS	5			E
流量 0.000 [mL/min]	5 UNK	4	50.0 KS140616-(1	purified 1-4	40.0	puritycheck_aminoacio	ds(0-80 20min 214nm) AS	5			
上力 0.0 (0.0 - 25.0) [MPa]	6 UNK	5	50.0 wash		19.5	wash_20min_AS					
///// 1 /^%ik	7										
□ PU #2: PU-2080	8										
流量 0.000 [mL/min]	9										
圧力 0.0 (0.0 - 25.0) [MPa]	11										
UV #1: UV-2075	12										
波長 214 [nm]	13										
DARTYA STD	14										
NL7 ^s 111	15										
イベント off off off	16										
	18										
	19										
	20										
	21										
	22										
データ測定	23										
一一 デーク解析	25										
[7/0] 7 3 H+01	26										
*	177										
						参照・た	N ポスト: 20140	1617-2 准備中 Stop	准備中 HPIC F-R-AS	S-SVSTEM Start (n Injection IP
						200 - 200 -	POF			o o ronein jotare e	15:51
7-126_b OG	ontrol	ChromN	🔐 Chrom	···· 📝	無題 - ぺ	. 💦 entry3~	📐 entry1~	🗵 A 般 🐸 🦻	ジ 🥙 кана 👻 🔺	8 🕼 🕼 🕺	2014/06/17

You can see measurement proceeding in "particular proceeding in "pa

🔛 ChromNAV - shinoda - HPLC_FF1/	F2YSTEM	F3	F <u>4</u>	F5/ <u>F6</u>	F7	F8	F9	F10	_ 0 ×
· ファイル(E) 表示(Y) 測定(E	<u></u> 1)		M/	-1-					
🔁 🐼 🛪 🕹 👩 z 🖄		0/0			۲ ۲		•••••	z 🗐	
データ測定	シロマトグラ	4t_2-							20140617-2
測定ビュー		- he	hand bits of the state		- 44 -				
⇒ステムモニター クロマトグラムモニター	Run	7-9A:	クロマドクラム名: wasr 分析時間: 0.0 / ステッフ [°] No: 1/6	20.0	בייין כאבי באת-אגיי ביאת-אגיי	gousei ७ो [:] wash-start_2।	0min_AS		
測定シーケンスモニター システムモニター						UV 検出器 #1 SP	C V A-ZERO	UV 検出器 #1 ·	•
HPLC F-R-AS-SYSTEM							The second second		
🗆 AS: AS-2055 🦰		<u>A</u> 7722	ネル:	- I SA					
ステータス Flush 注入量 50.0.[u]	5000								CH-1 UV-2075 351 [µV]
サンプ ⁰ μ# 5									
■ PU #1: PU-2080									
法報告 HPG2 法量 1.000 [mL/min]									
压力 1.6 (0.0 - 25.0) [MPa]									
バルブ 1									
イベント									
組成比 0.0 100.0 0.0 0.0 [%]									
■ PU #2: PU-2080 送初モード Slave Pump	_	-							
UV #1: UV-2075	Ξ.								
波長 230 [nm]	sity								
レスホッンス STD	Ę								
LCNet: LC-NetII/ADC	5								
ハルフ 111									
14:21 0# 0# 0# 0#									
データ測定									
	-5000 -								
144 テータ解析									
»		0.0	2.0	4.0 6.0	8.0 Re	10.0 etention Time [min]	12.0	14.0 16.0	18.0
レディ					参照:なし ポス	、ト: (1/6) 201406	17-2 実行中 Run 2	售備中 HPLC_F-R-AS-SY	STEM Start On Injection JP
🚱 📙 7-126_b 🔘 C	ontrol	ChromN	🔐 ChromN	🗳 🎫 - ぺ.	👥 entry3~	entry1~	☑ A般警鄄	🥔 🕐 CAPS 🗗 🔺 😽 🤅	15:55

When the measurement is finished, you will see the following view.



Please go to the analysis mode (p. 25~).

D) For Overnight Measurement

For overnight measurement, you need to use auto-sampler.

However, if you carry out overnight measurement in your own account, other person who also wants to carry out overnight measurement can't add his/her sample and conduct his/her measurement.

Therefore, for overnight measurement, please use the common account named "overnight".

In account named "overnight", there are following 4 common control methods:

- ✓ 0-100_40min_230nm (flow: 1 mL/min)
- ✓ 0-100_40min_301nm (flow: 1 mL/min)
- ✓ 0-100_40min_254nm (flow: 1 mL/min)
- ✓ wash_230nm (flow: 1 mL/min, MeCN 100%)

Please use these methods as much as you can in order not to increase unnecessary methods.



Other setting details are the same as shown in section C (automatic measurement using auto-sampler).

E) Data Analysis

You can analyze your data by opening the analysis mode.

Please double-click the icon named "解析モードで起動".



During measurement, you can also analyze your data.

Please click "デ-タ解析" to change the analysis mode.



(1) Opening your Data

You can open the list of your data files as follows.

🛞 ChromNAV - shinoda - HPLC-F-	R-MANUL-SY	/STEM		
· ファイル(E) 表示(V) クロマト	グラム(<u>C</u>) ラ	データ処理(<u>P)</u> ヘルプ(<u>H</u>)		
🐼 🖧 🗖 🗖 📚 🍌	2	○ クロマトグラムを開く		
データ解析	クロマト	シーケンス名: 20140630 [2014/06/30 11:28:30]		無题
解析ビュー		クロマトグラム名: KS140630-(1) 0h_001	年ヤンセル 	
クロマトグラムビュー				
🛐 PDA ビュー		測定済みシーケンス/クロマトグラム		
📊 装置診断ビュー		▼ 絞り込み 🚺 全て表示 📝 絞り込み条件の編集…		
🔊 再解析シーケンス		20140701 20140624	ブレビュー	
クロマトグラム		20140630_SC 20140620	ファイル情報	
開いているクロマトグラム		20140630 20140619-1	クロマトグラム名 KS140630-(1) 0h_001	
		20140628 20140619_SC	更新日時 2014/06/30 12:34:56	
		20140625	ユーザー名 gousei	
	~	,	追加情報	
	ensit	KS140630-(1) 0h_001	4<×ב	
	Ē	KS140630-(1) 1h_002	□ クロマトグラム情報	
		MKS140630-(1) 2h centrifuged_003	测定者 gousei	
		KS140630-(1) 4h centrifuged_004	タイプ UNK	
		KS140030-(1) Sh centrildged_005	サンプル# 1	
			サンプル名	
XVIN B	_		サンプルコメント	
1×291			取込時間 51.5 [min]	
			測定日 2014/06/30 11:43:26	
			注入重 20.0 [pL]	
			CH-1	
				8.0 9.0 10.0
	ピーク		0.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0	
データ測定	# 2-			
一小 データ解析				,
	÷			
レディ			参照:なし なし 20140701 準備中 Pump 準備中 H	PLC-F-R-MANUL-SYSTEM Start On Injection JP
Contro	l Center	ChromNAV - wei ChromNAV - ov	ChromNAV - sh	▲ 10:26 ▲ 10:26 ▲ 10:26 ▲ 10:26 ▲ 2014/07/01

Please select the data and click " $\mathbb{H} \, \zeta$ ", and your data will be displayed.

You can also open your data file by double-click.

(2) Automatic Peak-Picking

Please click the icon named "波形処理メソッドの編集", and the new window will be opened as follows.



Please change the following values. These values are the criteria for automatic peak-picking.

- minimum area value
- minimum height value

In order to check whether those values are suitable for your data or not, please click the icon named " $\neg \land \land$ " and check the automatic peak-picking result.

🛞 ChromNAV - shinoda			
· ファイル(E) 表示(V) クロマトグラ	ラム(<u>C</u>) データ処理(<u>P</u>)	へレブ(圧)	
🐼 🗞 📙 🎜 😓 🍌			
データ解析	クロマトグラムビュー		KS140630-(1) on_001*
解析ビュー		M 無題* - 波形処理メソッド	
🔤 クロマトグラムビュー		🔁 😤 📮 🖶 💋 🏄 Fronkin CH-1 🔹 🛃 🖓 😓 😮 😣	
NDA ビュー	_ г		
📊 装置診断ビュー	1000000 -		
🟹 再解析シーケンス	1000000	1000000 -	
クロマトグラム			
聞いているクロマトグラム		<u>≩</u> soooo - 1 ()	
20140701 2014/07/01 10:15:52			
M *KS140630-(1) on_001	5		
20140630 2014/06/30 11:28:30	500000 - 	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
KS140630-(1) Sh centrifuged_(tensi		
KS140030-(1) 21 centinuged_(1 - 1		
		Retention Time[min]	
		検出条件 計算方法 4 № タイムプログラム	
	0 +	ファンクジョン スタート エント パラメータ スロープ感度: 10.00 [µV/sec] 1	
	1	スロープ幅: 0.100 [min]	
		最小面積: [1000000] [minimum area value	
aminoacids(0-100_40min) 214		最小高さ 1000000 La for peak-picking	
	0.0	ドリフト: 0.000 [µV/min]	45.0 50.0
		スロープ幅倍化時間: 0.0000 [min] minimum height value	1010
	ピーク情報: KS1406	tor peak-picking	🥾 🏧 🏧 🚣
	# ピーク名 CH tR		
4	1 Unknown 1 14		
- 「「」 データ解析			
»			
1 = 1	D		准備山 約城工 ドロワ
			<u>準備中</u> 月時初モート JP 14·57
Control	Chrom	Chrom 🔐 Chrom 🔐 Chrom 🦃 Bullzip 🜮 無題 🙋 A 般 🖉 🖉 🙆 🔮 🥡 🗸 🖕	8 🛱 🕼 📊 2014/07/01

When you feel that peak-picking is not good, please change the criteria above further.

When you can obtain the suitable criteria, please click the save icon and save these values.

🔐 ChromNAV - shinoda		
··· ファイル(E) 表示(⊻) クロマトグラム(<u>C</u>)) データ処理(P) ヘルプ(比)	
🐼 🐼 🕞 🍠 🕹 🍌 👌	■ M 無题* - 波形処理×ソッド	
データ解析 クロ	🕂 🞦 🚰 🛃 🛃 🗾 🜌 ३४७२३лл CH-1 🔹 🚮 🛐 😓 🕐 🔇	KS140630-(1) on_001*
解析ビュー		
PDA ビュー	1000000 - +	
1 再解析シーケンス		
開いているクロマトクラム		
*KS140630-(1) on 001		
■ 20140630 2014/06/30 11:28:30 Ξ		
KS140630-(1) 5h centrifuged_(Retention Time[min]	
MKS140630-(1) 2h centrifuged_(뵑	検出条件 計算方法 4 № タイムプログラム	
	ファングジョン スタート エンド パラメータ	
<	嵌小图语: 1000000 [µVsec]	
XVVF	最小高2: [1000000 [µV]	
📉 コントロールメソッド	[⁵]7 № 0.000 [µV/min]	
aminoacids(0-100_40min) 214	スロープ幅倍化時間: 0.0000 [min]	
		40.0 45.0 50.0
Ľ-	-pf	
#	<u>e-</u>	
データ解析		
»		
•		
		準備中 解析モード JP
🚱 📄 🔘 Control	Chrom 🔐 Chrom 🔐 Chrom 译了 Bullzip 🧭 無意 🧭 A 般 🐿 🕬 🧉 🔮	кана - 💦 🛱 🏷 📆 14:58

After that, the icon named "適用" will become active. Please click this icon.

🔀 ChromNAV - shinoda		
ファイル(E) 表示(⊻) クロマトグラム(<u>C</u>)	データ処理(P) ヘルプ(H)	
🐼 🐼 片 🖉 🍃 🍌 🔊	M K5140630-1 - 波形処理メソッド	
データ解析 クロマト	- 🎦 📂 🕞 🛃 🛃 チャンネル CH-1 🔹 🐴 🐻 🌭 🕖 🕴	KS140630-(1) 0h_001
解析ビュー		
○ クロマトグラムビュー ● PDA ビュー ● 装置診断ビュー 1000		KS140630-(1) 0h_001 - CH1
 再解析シーケンス クロマトグラム 開いているクロマトグラム 		
□ 20140630 2014/06/30 11:28:30 □ KS140630-(1) 5h centrifuged_() Σ root		
KS140630-(1) 2h centrifuged_(0.0 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0 30.0 35.0 40.0 45.0 50.0 Retention Time[min]	
۲ ۲ ۲ ۲ ۲	夜田条杆 訂算/3法 (1) ジャレンジン スタート エンド パラメータ スローブ感受 10.00 [µV/sec] スタート エンド パラメータ スローブ幅 0.000 [min] 最小面積 10000000 [µV/sec] 最小面積 10000000 [µV/sec]	
	1-97F 0.0000 [µ//mn] スローダ幅倍化時間: 0.0000 [min]	40.0 45.0 50.0
۲۵-۵ ۲۰ ۲۰		
○ データ解析		
		<u>準備中 解析モード JP</u> 15・10
	ontrol Center 🔛 JASCO Chrom 🦓 無題 - ペイント 🛛 🙆 A 般 🐸 ୭ 🥔 🖗	nna 🗸 🛧 🧒 🎼 🕼 📅 15:19 2014/07/01

Automatic peak-picking will be carried out and you will see the following view.



(3) Manual Peak-Picking

Please click the icon named "マニュアル波形処理", and the new window will be opened.





Please click the icon named " $\ell - 2$ 追加", and the mouse icon will be changed to the pen icon.

First, please select the beginning of the peak. Second, please select the end of the peak. After that, the new window will be opened as follows.



Please click OK, and the peak-picking will be finished.

When you want to enlarge the display, please drag and select the region you want to enlarge using left button.

You can finish peak-picking mode when you click the right button.

When you want to delete the picked peak, please click the icon named "l - 2 削除" as follows and select the peak you want to delete.



When you want to separate the picked peak in two, please click the icon named "ピーク分割" as follows and click the separation point.



In order to save the peak-picking data, please click close icon and choose " $l \ddagger \cup (Y)$ " in the newly opened window as follows.



(4) Save your data

Please click the icon named "クロマトグラムを保存" and save the peak-picking data.



When you click the adjacent right icon, you can save peak-picking data of all chromatograms.

F) Preparation of Eluents

(1) Eluent A: How to prepare it?

First, using Milli Q generator, please fill the empty 3L gallon bottle (previously used as Eluent A bottle) with 3 L of Milli Q.

Using plus button and minus button, please adjust liquid volume and push start button.



Then, please add 3 mL of TFA (HPLC grade) using measuring pipette (please don't use Pipetman as much as you can!!).

The HPLC-grade TFA is in refrigerator at Eisai 1F (If you open the last one, please order it!!).

At last, please put it around the analytical HPLC (JASCO).

(2) Eluent B: How to order it?

When you open the 2nd box of acetonitrile (LC/MS grade) and the number of remaining bottles becomes three, please order it.

In Gousei Reagent Ordering Sheet (Google), you can find the following past order:

Acetonitrile - Plus-, 3L*6, 01033-76, ¥19,000*6

Please copy that line and paste it to order new bottles.

分取 HPLC 使用の際の注意

● 圧力の上限について

分取 HPLC を使う際の圧力の上限は、製造者より以下のように指定されています。

	YMC	Mightysil	Cosmosil
圧力上限 (MPa)	10 程度	20	15

カラムの劣化を防ぐのに役に立つので、ぜひご検討いただきたいと思います。

可能であれば、コントロールメソッドを作成する段階において、最大圧力を「上記の値+5」に設定して いただきたく思います。

流速の目安は以下のとおりです。

	YMC	Mightysil	Cosmosil
10 mm	3~4 mL/min	4~6 mL/min	3~4.5 mL/min
20 mm	8~10 mL/min	10 mL/min	10 mL/min

なお、カラムの状態によっては、流速を落とさなければならないこともあると思います。

不明な点などありましたら、ご遠慮無く篠田までお知らせください。