

Shodex[®]

充電式カラム取扱説明書

Standard Operation Procedure

SUGAR KS-800 シリ-7[®]

SUGAR KS-800 Series

[必ずお読み下さい]

この度は Shodex 製品をお買い上げいただき誠にありがとうございます。
カラムライフや性能を永く保持してご使用いただくために、この取扱説明書を
読んでからご使用ください。

Thank you for purchasing a Shodex product. Prior to use, be sure to
read this instruction manual so that the maximum service life and
performance of your column can be achieved.



**SHOWA
DENKO**

1. はじめに
 Shodex SUGAR KS-800 シリウスは、ヌチレンジニルベンゼン共重合体を基本としたイオン交換樹脂を充てんした高速・高性能液体クロマトグラフ用充てんカラムです。溶離液に水のみを使用して、単糖類、二糖類、オリゴ糖、多糖類および糖アルコールなどの炭水化物の分離や非イオン性の水溶性物質の分離に使用することができます。
 特に自然界に広く分布し、生体、食品、医薬品、工業排水等に含まれる糖類の迅速分析に威力を発揮します。

2. カラムの仕様
 1) 名称と仕様

名称	排除限界分子量*	理論段数/30cm**
SUGAR KS-801	1×10 ³	17,000 段以上
SUGAR KS-802	1×10 ⁴	17,000 段以上
SUGAR KS-803	5×10 ⁴	17,000 段以上
SUGAR KS-804	4×10 ⁵	17,000 段以上
SUGAR KS-805	5×10 ⁶	9,000 段以上
SUGAR KS-806	5×10 ⁷ (推定)	9,000 段以上
SUGAR KS-G	KS-800 シリウス	KS-800 シリウス

* Shodex STANDARD P-82 Pullulan による

** 溶離液：脱イオン水、流量：1.0ml/min、カラム温度：50℃

試料：エチレンジアミン (KS-801~803)

グルコース (KS-804~806)

2) カラムサイズ：内径 8mm、長さ 300mm (KS-G は 6φ×50mm)
 3) カラム末端接続ネジ：オシネジ型 No.10-32UNF

4) カラム材質：SUS 316

5) 充てん剤：強酸性陽イオン交換樹脂

6) 納入時の封入液：脱イオン水

7) 最大使用圧力：5 MPa

8) 最大使用流量：50~85℃の温度で使用した場合 1.5ml/min

9) 最高使用温度：85℃

3. 使用上の注意事項
- 1) 溶離液として使用する脱イオン水は、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルタでろ過し、 60°C 以上に加熱した後、超音波洗浄器に入れて、超音波をあてながらアスピレータで減圧にして十分脱気します。溶媒脱気装置を使用すると前述の脱気操作を省略でき便利です。
 - 2) カラム1本につき5MPa以下の圧力で使用します。

不用意にカラム圧を上げすぎますと性能が低下し、元に戻りませんのでご注意ください。
 - 3) 流量は $50\sim 85^\circ\text{C}$ の温度で、 $1.5\text{mL}/\text{min}$ 以下でご利用ください。 50°C 以下の温度で使用する場合は、カラム1本につき5MPa以下のカラム圧になるような流量でご利用ください。
 - 4) 急激な圧力変化や流量変化は避けてください。
 - 5) 糖類は、カラム温度 60°C 以上で行うと良い分離が得られます。カラムの加熱は 85°C までにしてください。
 - 6) 試料の親水性が高くなると吸着が起こり、保持容量が大きくなる場合があります。この場合は溶離液にエタノール、アセトニトリル等の極性有機溶媒を添加することにより、保持容量を小さくすることができます。添加する有機溶媒の濃度は、KS-801 \sim 803で20%以下、KS-804 \sim 806で50%以下にしてください。
 - 7) 溶離液として使用する脱イオン水に有機物や金属イオンが混入しているとき、糖類のピークがブロードになることがあります。
4. カラムの取付け
- 1) カラムを液体クロマトグラフに取付ける前に、流路内を測定に使用する溶離液で完全に置換します。
 - 2) カラムを取付ける前に、その装置を水に不溶な有機溶媒で使用していた場合には、まずアセトン、エタノール等の水に可溶な有機溶媒に完全に置換してから水に置換します。
 - 3) サンプル注入にサンプルリブを利用する場合は、ルーブ内の溶媒や空気を溶離液で置換することを忘れないでください。
 - 4) カラムについているフローワークの方向に溶離液が流れるように、カラムを液体クロマトグラフに接続します。
 - 5) カラムを加熱する場合には、カラムの両端の栓を外し、 $40^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$ に加熱してカラム内より液が溢出するのを確認してから装置に接続します。カラムが所定の温度になるまで充分時間をかけてからホ

8. カラムの組合せ
カラムを組み合わせて使用することにより測定できる分子量範囲を

7. ガードカラム
陽イオン交換樹脂を充てんしたカラムは、試料中に吸着しやすい物質（例えば金属イオンやアミン系物質）を含んだり、汚れた試料を扱う場合には急激に分離性能が低下することがあります。このような場合には、ガードカラム SUGAR KS-G のご使用をお勧めします。

4) カラムの末端を開けると性能が低下します。絶対に開けないでください。
3) カラムに過度の衝撃を与えないでください。

1) カラムを加温して使用していた時は、0.2mL/min で送液しながら室温になるまでカラムを冷却します。
2) カラムを装置から外したら、両端に栓をして納入時についているクーラーに入れて、温度変化の少ないところ（18～28℃）に保存します。カラム内の溶媒が凍結するような事は絶対に避けてください。

6. カラムの取外しと保存

5) 試料にタンパク質が含まれる場合は徐タンパクを行います。徐タンパクは、試料溶液約5mL にヌルホサリチル酸水溶液(20g/dL)数滴を加えて混和し、0.45μm のフイルタでろ過することによりできます。

4) 溶解した試料は、ゴミや不溶解分を除くため 0.45μm のフイルタでろ過します。
3) 試料が水溶性で、その中にアルコール等の有機溶媒を含んでいる時は、その濃度が20%以下になるように水で希釈します。

1) 試料は溶解液と同一溶媒で溶解します。
2) 試料溶液と溶解液が異なると注入後沈殿を生じ、カラムを詰まらせることがあります。溶媒ビークを小さくするために試料は溶解液と同一溶媒に溶解します。

5. 試料の前処理

6) カラム接続時にカラム内に空気が混入することは避けてください。
ソフを始動します。

- 2) 溶離液：脱イオン水
 3) 流量：1.0mL/min
 4) カラム温度：50°C
 5) 検出器：高感度示差屈折率検出器 (Shodex RI)

KS-801	1.0%	1.0%	5 μ L
KS-802	2.5%	1.0%	5 μ L
KS-803	0.5%	1.0%	15 μ L
KS-804	0.8%	0.8%	5 μ L
KS-805	0.4%	0.8%	5 μ L
KS-806	0.8%	0.8%	5 μ L

- 1) 試料および注入量
 下記に示す条件でカラムの理論段数を測定します。

10. カラムの理論段数の測定

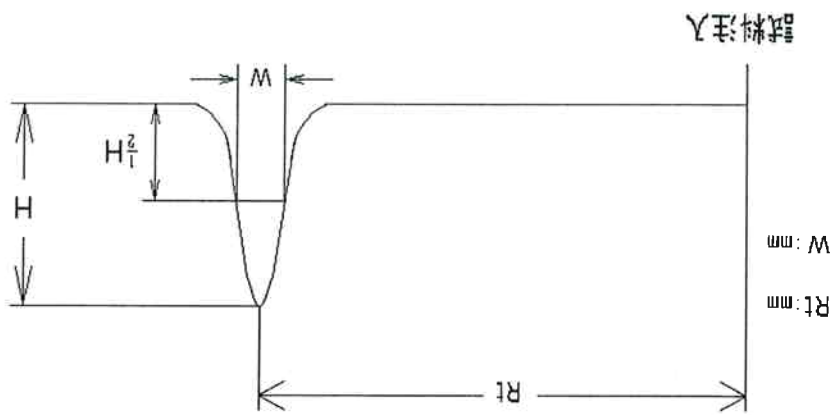
9. カラムの再生
 汚れによりカラムに不純物が吸着すると、クロマトスやゲルコー
 スのピークがブロードになる場合があります。このような場合、
 0.01N NaOH 水溶液を 0.5mL/min でカラムに流し、洗浄してくだ
 さい。洗浄後は脱イオン水で充分置換した後ご使用ください。
 (0.1N NaOH 水溶液 40 μ L を注入するだけで再生できる場合もあ
 ります。)

このような問題がありますので、同一細孔径のカラムを複数使用して
 測定を行うことをお勧めします。
 広げることができますが、疑似排除限界 (false exclusion limit) が現
 れることがありますので注意してください。疑似排除限界はゲルの細
 孔径の異なるカラムに接続して使用した時、小さい細孔径のカラムの
 排除限界分子量に相当する溶出容量の所に現れます。クロマトグラム
 上ではシヨルターピークとして観察されます。疑似排除限界が出ると
 実際の分離パターンと異なるため、分子量分布は正確なものとなり
 ます。

6) 理論段数計算

$$N = 5.54 \left(R t / W \right)^2$$

N : 理論段数、R t : 保持時間、W : 半幅幅



1.1. カラムの保証について

1) 性能保証

取扱説明書に従ってご使用いただいた場合、本製品が裏面の検査成績書 (Certificate of Analysis) に記載された性能に合致していることを保証いたします。本製品につきまして、その他の保証は一切いたしかねます。販売店や特約店が行います性能、品質等の説明に関しましても、上記以外の事項は、保証事項とはいたしかねます。また、お客様が意図されています用途に本製品が適合しているか否かは、お客様の責任にて、ご判断いただくようお願いいたします。

2) 交換

取扱説明書に従ってご使用いただいたにもかかわらず、万一、検査成績書に記載された規格値に合致しない場合には、お客様の検収日から起算して10日以内に販売店や特約店または昭光通商(株)にご連絡ください。良品と交換させていただきます。10日を超えた場合は、良品との交換はご容赦ください。当社の責任は以上の範囲に限定させていただきます。如何なる場合にも、逸失利益等の消極的損害、間接的損害、派生的損害の賠償には応じかねます。

3) 保証除外項目

以下の場合には、上記保証期間(10日間)以内であっても保証の対象外といたします。

- ①本製品が取扱説明書に適合しない方法で使用された場合。
- ②当社もしくは当社の指定する保守サービス会社以外の者により、本製品のエンドフィッティングを外す等の改造が行われた場合。
- ③本製品が廃棄された場合。
- ④本製品が、当社に事前の通知なく、転売された場合。
- ⑤本製品を日本国外で使用した場合。
- ⑥本製品を日本国外に持ち出した場合。
- ⑦検査成績書に記載された性能に達しない理由が、以下の原因による場合。
 - (a) コンピュータウイルス
 - (b) お客様が使用される試料、試薬、ガス、エア、冷却水に混入する不純物
 - (c) 本製品と組み合わせで使用される装置、器具、部品等の故障、動作不良等
 - (d) 火災、地震、洪水、その他の天変地異、犯罪、暴動、テロ行為、戦争、放射能汚染などの不可抗力または、本製品の使用に伴う労働災害、事故等につきましても、責任を負いかねます。

4) 分析結果および分取物
本製品を使用して得られた分析結果および分取物は、本製品の保証の対象ではありません。分析結果および分取物につきましては、その信頼性、有効性、安全性等一切保証しません。

5) 用途の範囲

本製品は試験・研究用のみ使用するものです。臨床診断等、その他の用途には使用することはできません。試験、研究用以外での使用による事故については、当社は一切の責任を負いません。

1. Introduction

Shodex SUGAR KS-800 series are packed with ionexchange resin gels of sulfonated styrene-divinylbenzene copolymer. They are Designed for High-speed and high-performance liquid chromatography. They are capable of separating carbohydrates such as monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides and sugaralcohols, as well as nonionic water-soluble substance, with distilled water or 0.001-Mol sodium hydroxide aqueous solution used as the mobile phase. The columns demonstrate an excellent performance, particularly, in high-speed analysis of saccharides present in living bodies, food, pharmaceuticals and industrial wastewater.

2. Specifications

1) Nomenclature, exclusion limit and number of theoretical plates

Nomenclature	Exclusion limit	Number of theoretical plate /30cm ¹⁾
SUGAR KS-801	1×10^3	17,000 minimum
SUGAR KS-802	1×10^4	17,000 minimum
SUGAR KS-803	5×10^4	17,000 minimum
SUGAR KS-804	4×10^5	17,000 minimum
SUGAR KS-805	5×10^6	9,000 minimum
SUGAR KS-806	5×10^7 (est)	9,000 minimum

NOTE 1) : Specimen, Ethylene glycol(KS-801~803), Glucose(KS-804~806); mobile phase distilled water; flow rate 1mL/min; column temperature 50°C.

- 2) Size: ID 8mm, length 300mm
(exclusive of KS-G of 6mm in ID and 50mm in length.)
- 3) End fitting: Internally-threaded type, No.10-32 UNF.
- 4) Material: SUS 316
- 5) Packing: Strong cation-exchange resin gels.
- 6) In-column mobile phase: Distilled water.

4 Heat the column to 40 – 50°C and start the pump.

Do not let the air into the column during the connection.

Cautions

arrow mark on the column will point to the direction of the flow.

3) Connect the column to the chromatograph in such a way that the

2) Set the flow rate at 1mL/min.

replace the water-soluble solvent with the mobile phase.

water-soluble organic solvent, such as acetone or ethanol, and then

In replacing a water-insoluble organic solvent, replace it first with a

Cautions

the solvent in the chromatograph with the mobile phase.

1) Before mounting the column on the liquid chromatograph, replace

4. Mounting and start-up

the adsorptivity.

ethanol in an amount of 20% maximum to the mobile phase to reduce

specimens are too slow to flow out of the column. In such a case, add

Adsorbed sometimes by the packing, molecules of highly hydrophobic

Note

Use of solvent degassing device will facilitate the degassing work.

pressure being simultaneously reduce by an aspirator.

shaking in an ultrasonic washing vessel with the ambient air

degas it by, for instance, heating it about 60°C in a hot water bath and

by passing it through a 0.45 μm filter into a bottle and thoroughly

2) Remove extraneous substances and insolubles from the mobile phase

as the mobile phase.

1) Use distilled water or 0.001-Mol sodium hydroxide aqueous solution

3. Mobile phase

9) Maximum working temperature: 85°C.

1.5mL/min

8) Maximum working flow rate when column is heated to 50 – 85°C:

7) Maximum working pressure per column: 5MPa

6 . Dismounting and storage
 1) Set the flow rate at 0.2mL/min, turn off the heater and let the column stand as is until it cools down to room temperature.

4) When the specimen contains proteins, add 2 or 3 drops of distilled water in which sulfosalicylic acid is dissolved at the rate of 20g per deciliter, to 5mL of the specimen, stir and pass it through a 0.45 μm filter to remove the proteins.
 3) Pass the specimen through a 0.45 μm filter to remove extraneous substances and insolubles. Use of the disposable filter unit Shodex DT is recommended.
 2) When the specimen is liquid and contains an organic solvent such as alcohol, dilute it with the mobile phase so as to reduce concentration of the organic solvent to 20% maximum; otherwise, the column performance will deteriorate.
 Do not use any other solvent; otherwise, the solute sometimes settles in the mobile phase to plug the column.

5 . Pre-treatment of specimen
 1) When the specimen is solid, dissolve it, using some of the degassed mobile phase.
 Note

Working temperature	50 - 85°C	1.5mL/min
Maximum working flow rate	30 - 49°C	1.0mL/min
	29°C or below	0.5mL/min
	!!!) Do not abruptly change the column pressure or flow rate.	
	iv) Do not heat the column higher than 85°C.	

temperature, as follows:
 !!) The Maximum working flow rate depends on the working the column will be ruined.

!) Keep the column pressure below 5MPa per column; otherwise,
Caution

- 2) Stop the pump and dismount the column.
- 3) Cap both ends of the column, place it back in the same case in which it was delivered from the manufacturer, and store the case in a place where the temperature does not vary more than $\pm 5^{\circ}\text{C}$ from the ambient temperature.

Caution

!) Do not remove the end fittings of the column; otherwise, its performance will deteriorate or the column may be rendered unserviceable.

!!) Do not let the in-column solvent freeze during storage; otherwise, the column will swell and become unserviceable.

!!!) Storage at abnormally high temperatures will also cause the column to swell and become unserviceable.

7. Band broadening

Adsorption of organics and metal ions by the packing sometimes causes the bands of fructose and glucose to be broadened.

If such adsorption occurs, pass 0.2N NaOH aqueous solution through the column at a rate of 0.5mL/min to desorb them and completely replace the solution with distilled water. If, however, the band broadening is moderate, injection of 40 μL of 1N NaOH aqueous solution into the column will suffice to carry out the desorption.

8. Guard column and column jacket

Use of precolumn, SUGAR KS-G, is recommended immediately before the column to protect the packing from contamination with pollutants or readily adsorbable substances, such as metal ions and amino compounds.

9. Performance test

The performance of the column can be checked by calculating the number of theoretical plates under the following conditions.

- 1) Specimen and Injection amount

KS-801	1.0% ethylene glycol aqueous solution	5 μ L
KS-802	2.5% ethylene glycol aqueous solution	5 μ L
KS-803	0.5% ethylene glycol aqueous solution	15 μ L
KS-804	0.8% glucose aqueous solution	5 μ L
KS-805	0.4% glucose aqueous solution	5 μ L
KS-806	0.8% glucose aqueous solution	5 μ L
- 2) Mobile phase: Distilled water
- 3) Flow rate: 1.0mL/min
- 4) Column temperature: 50°C
- 5) Detector: High-sensitivity refractive index detector
such as Shodex RI

6) Calculation formula

$$NTP=5.54 \times (Rt/W)^2$$

where NTP: Number of theoretical plate
Rt: Retention time
W: Peak half width

