

Shimadzu Packed Column for HPLC

Shim-pack™ DIOL Series

Instruction Manual

■ INTRODUCTION

Shim-pack DIOL columns are specifically designed for gel filtration chromatography of biological macromolecules. The columns are packed with chemically bonded hydrophilic silica particles having controlled pore size distribution. Surface silanol groups of these materials are chemically modified with a hydrophilic polymer to eliminate the irreversible adsorption of proteins caused by acidic silanol groups, and consequently, a mixture of proteins is separated with high recovery. Since the packing materials are spherical, having an average particle diameter of 5 μm, these columns exhibit high efficiency.

■ OPERATING CARE

- Use the supplied tubing connectors for column connection. (See the section on Column Connection)
- Excessive tubing dead volume results in an apparent reduction in column efficiency. An appropriate length of tubing (1.6 mm O.D. × 0.3 mm I.D.) is from 50 to 100 mm.
- Observe the flow direction indicated on the column.
- Before attaching the column inlet to the appropriate part of the injector system, wash the flow line thoroughly with distilled water and water-miscible organic solvent, e.g. methanol or 2-propanol. It is recommended that a pre-column (P/N 228-16367-91) be placed between the HPLC pumping system and the sample injector in order to protect the analytical column from clogging.
- Maximum usable pressure is 20 MPa. Lower pressures result in longer lifetime at high efficiency.
- To protect the chemically modified silica surface, do not use solutions of lower than pH 2 or higher than pH 8.
- Do not subject to shock such as form dropping, etc.
- Do not exceed an operating temperature of 50 °C.

■ COLUMN CONNECTION

● The column is connected with the following parts. Endure that the fittings are connected properly to avoid creating dead volume between the tubing and the column interface.

Item Name	P/N	Comments
Ferrule 1.6F 316L	228-16000-10	1/pkg
Male nut 1.6MN	228-16001	1/pkg

- Observe the appropriate connection method as illustrated in the Figure.

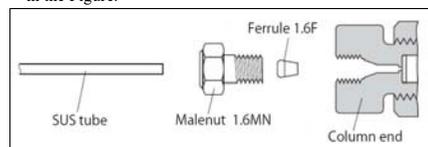


Fig.1 column connection

- Do not overtighten as this will result in damage to the fittings.

■ COLUMN TYPES

The following types of DIOL columns are available.

Select the type appropriate to your application.

Column	Dimension	Part No.
DIOL-150	7.9 mm I.D. × 250 mm	228-14775-91
	7.9 mm I.D. × 500 mm	228-14775-92
DIOL-300	7.9 mm I.D. × 250 mm	228-14776-91
	7.9 mm I.D. × 500 mm	228-14776-92

If you need a preparative column, contact your Shimadzu sales representative.

■ COLUMN PERFORMANCE

To check the batch-to-batch reproducibility, each batch of DIOL materials is tested for protein separation.

Typical chromatograms are shown in Figures 2 and 3.



Fig.2 Typical chromatogram of a mixture of proteins on DIOL-150

OPERATING CONDITIONS

Column: Shim-pack DIOL-150, 7.9 mm I.D. × 250 mm
Mobile Phase: 0.2 M sodium sulfate in 0.01 M phosphate buffer, pH7.0

Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: 22 °C

Detector: UV 280 nm

PEAK IDENTITY

1. Albumin; bovine serum
2. β-Lactoglobulin; cow's milk extract
3. Myoglobin; equine skeletal muscle extract
4. Glycyl-L-tyrosine

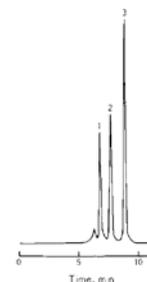


Fig.3 Typical chromatogram of a mixture of proteins on DIOL-300

OPERATING CONDITIONS

Column: Shim-pack DIOL-300, 7.9 mm I.D. × 250 mm
Mobile Phase: 0.2 M sodium sulfate in 0.01 M phosphate buffer, pH7.0

Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: 22 °C

Detector: UV 280 nm

PEAK IDENTITY

1. Albumin; bovine serum
2. Myoglobin; equine skeletal muscle extract
3. Glycyl-L-tyrosine

■ SELECTION OF MOBILE PHASE

- Typical buffers used for classical gel filtration chromatography are acceptable for the DIOL columns, and the packing material is compatible with buffers, detergents and organic solvents. A typical buffer used is 0.1 ~ 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0.
- Filter the mobile phase through a membrane filter of 0.2 ~ 0.45 μm pore size.
- Samples should be filtered through a membrane filter. Careful handling of the mobile phase and sample solutions increases the lifetime of the column.

- Solvents, salts and buffers should be of HPLC or analytical grade.
- Recommended flow rates are from 0.5 ~ 1.2 mL/min for best resolution.

■ COLUMN WASHING

An DIOL column can be washed with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and 2-propanol in case increased back pressure or loss of resolution is observed.

- For washing the column, flow rates up to 0.5 mL/min are recommended.
- If an increased back pressure is observed, check the back pressure without the column and make sure than the flow line of the HPLC system is not clogged. In case of a clogged flow line, take appropriate actions (such as replacing the line filter or connecting tubes).
- If an increased pressure across the column itself is observed, wash the column according to the wash procedure above.

■ COLUMN STORAGE

- Do not store the column in a mobile phase which contains halides.
- Be careful to avoid potential bacterial growth. It is recommended that the storage liquid having antimicrobial action.
- Column should be stored at 4 to 35 °C.
- Prefill solvent in the column when shipped; same as described in the column performance report.

■ TECHNICAL SUPPORT

Shim-pack DIOL columns are manufactured, inspected, packaged and shipped under strict standards of quality control. Should you find any defect in performance, please contact your local Shimadzu representative, who will ensure your complete satisfaction.

We regret that we cannot guarantee the lifetime of columns, also that we cannot accept any claim when performance has deteriorated due to noncompliance with the operation procedures elucidated above, or as a result of normal aging.

※ The contents of this instruction sheet are subject to change without notice.

島津高速液体クロマトグラフィー用
高性能充てんカラム

Shim-pack™ DIOL シリーズ

取扱説明書

■ はじめに

Shim-pack DIOL は、水酸基を有する固定相が化学結合された全多孔性球状シリカゲルを充てんしたカラムです。Shim-pack DIOL は、シリカゲル表面が親水性の水酸基で覆われているため、水系 SEC 用カラムとして、たんぱく質、酵素などの生化学物質の分離分析に適しており、また、担体として粒子径 5 μm の球状シリカゲルを用いていますので、従来の水系 SEC 用カラムに比べて、極めて高いカラム効率が得られます。

■ 御使用にあたって

- カラムの接続には、専用の接続部品をご使用下さい。(「カラム接続について」の項参照)
なお、一定組成の移動相による分析を行なう場合は、カラム外拡散に留意して、インジェクタからカラムまで、及びカラムから検出器までの配管を必要以上に長くしないで下さい。およその目安としては、いずれも内径 0.3 mm、長さ 50~100 mm 程度の配管が適当です。
- カラムには移動相の流れの方向(Flow)が表示してありますので逆方向には流さないで下さい。
- カラムを接続する前に、ポンプ、インジェクタなど流路系、及び配管系の洗浄を十分におこなって下さい。送液系の使用状況に応じてメタノール、イソプロピルアルコールなどの水溶性有機溶媒や、蒸留水で十分洗浄して下さい。
- なお、送液系に蓄積された汚染物、移動相中の微量の浮遊物などによる分析カラムの目づまり防止のためプレカラム(P/N:228-16367-91)を、送液ポンプとインジェクタの間に接続されることをおすすめします。
- カラムの最高使用圧は 20 MPa ですが、長時間安定にご使用いただくには、できるだけ低い圧力(10 MPa 以下)でご使用下さい。
- 移動相の pH 範囲は 2~8 で使用してください。
- カラムには床に落とすなどの衝撃を与えないようご注意ください。
- カラム温度は 50 °C 以下でご使用下さい。

■ カラムの接続について

- この充てんカラムには、以下の様なカラム接続ジョイント類が必要です。

品名	P/N	備考
フェール 1.6F 316L	228-16000-10	1 個入り
メイルナット 1.6 MN	228-16001	1 個入り

- 充てんカラムを装置に取り付ける前に、接続ジョイントをカラムの両端に接続して下さい。

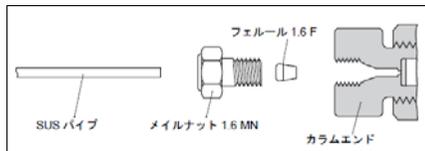


図 1 カラムの接続

この場合、必要以上に強く締めないで下さい。無理な締めつけはジョイント部の破損につながります。

■ カラムの種類について

Shim-pack DIOL シリーズには、充てん剤の平均細孔径が異なる次の 2 種類があります。目的に応じてお選び下さい。

名称	カラムサイズ	部品番号
DIOL-150	7.9 mm I.D. × 250 mm	228-14775-91
	7.9 mm I.D. × 500 mm	228-14775-92
DIOL-300	7.9 mm I.D. × 250 mm	228-14776-91
	7.9 mm I.D. × 500 mm	228-14776-92

なお、分取カラムを御希望の場合は弊社担当営業員に御相談下さい。

■ カラムの性能について

DIOL シリーズの製品カラムは、ロット差を少なくするために充てん剤ロット毎にたんぱく質の分離検査が行われています。典型的な分離クロマトグラムを図 2、及び図 3 に示しました。

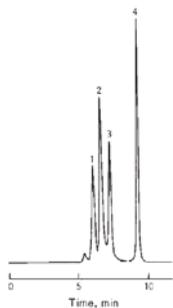


図 2 DIOL-150 カラムを用いたたんぱく質の分離例

■ 分析条件

カラム : Shim-pack DIOL-150, 7.9 mm I.D. × 250 mm
移動相 : 0.2 M 硫酸ナトリウムを含む 0.01 M
りん酸緩衝液 pH 7.0
流量 : 1.0 mL/min
温度 : 22 °C
検出 : UV 280 nm

■ ピーク成分

1. アルブミン、牛血清
2. β-ラクトグロブリン、牛乳
3. ミオグロビン、馬骨格筋製
4. グリシル L チロシン

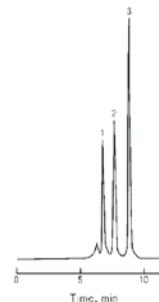


図 3 DIOL-300 カラムを用いたたんぱく質の分離例

■ 分析条件

カラム : Shim-pack DIOL-300, 7.9 mm I.D. × 250 mm
移動相 : 0.2 M 硫酸ナトリウムを含む 0.01 M
りん酸緩衝液 pH 7.0
流量 : 1.0 mL/min
温度 : 22 °C
検出 : 280 nm

■ ピーク成分

1. アルブミン、牛血清
2. β-ラクトグロブリン、牛乳
3. ミオグロビン、馬骨格筋製
4. グリシル L チロシン

■ 移動相について

従来までのゲルろ過クロマトグラフィーで用いられてきた移動相を DIOL カラムでも使用することができます。また、化学結合同型シリカを用いていますので、各種緩衝液や、界面活性剤及び有機溶媒なども移動相として用いることができます。たんぱく質分析の場合は 0.1~0.2 M のりん酸緩衝液(pH=7.0)がよく用いられます。

- 移動相はあらかじめメンブランフィルター(孔径 0.2~0.45 μm 程度)を用いてろ過したものを使用して下さい。なお、試料溶液についても同様なろ過をすることをおすすめします。
- 本カラムの一般的な移動相流量範囲は 0.5~1.2 mL/min です。但し、粘度の高い溶媒をカラムに流す場合は、20 MPa を超えないよう低流量で流して下さい。
- なお、分析条件によって、カラムに強く保持される成分もあります。カラムの洗浄については「カラム洗浄について」の項を参照して下さい。
- 移動相調整用溶媒としては、できるだけ純度の高いものをご使用下さい。

■ カラムの洗浄について

- たんぱく質などの分析による汚染では 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液及びイソプロピルアルコールによるカラムの洗浄が効果的です。
- カラムに強く吸着されている物質を取り除くためにカラムを洗浄する場合は流量を 0.5 mL/min 以下に行なって下さい。
- カラム圧が上昇した場合は、まずカラム入口まで圧力がかかっていないかどうかを調べて下さい。カラム入口までに圧力がかかっている時は、多くの場合、ラインフィルタの目づまりが原因です。ラインフィルタの目づまりは、フィルタの超音波洗浄によって取り除ける場合もありますが、新しいものと交換することをおすすめします。カラム入口までに圧力がかかっていない場合は、カラム本体の目づまりであるのか、あるいは、検出器セルの目づまりによるものかを確認して下さい。

■ カラムの保守について

- カラムを使用しない場合は、次の点に注意して保管して下さい。
- ハロゲンを含む移動相を封入したまま保存しないで下さい。
- カラムは直射日光があたらず、できるだけ温度差の小さい冷暗所に保管して下さい。また保管する場合のカラム内封入液は、ハロゲンを含まず、微生物が繁殖しないような液を使用して下さい。なお、カラム内が乾燥しないようにカラム出入口のストッププラグをきちんとして下さい。
- 出荷時の封入溶媒 : 検査溶媒と同じ

■ テクニカルサポート

本カラムの技術的なご質問やご相談については、以下の窓口で承ります。

島津分析コールセンター
フリーダイヤル ☎ 0120-131691
e-mail : analytic@group.shimadzu.co.jp

※ 本取扱説明書および製品の外観は、予告なく変更することがありますのでご了承ください。