

Amino シリーズ

取扱説明書

■はじめに

Shim-pack Amino シリーズは、強酸性カチオン交換樹脂を充てんしたカラムで、特にアミノ酸の分析に適しています。カラム充てん剤としては、粒子径 5 μm のスチレンージビニルベンゼン共重合体（ゲル型）粒子を基材とするスルホン酸型のイオン交換樹脂を充てんしているため、汎用カチオン交換カラムとしても使用できます。（ただし、条件を検討する必要があります。）

Shim-pack Amino シリーズには、スルホン酸基のカウンターイオンの違いによって以下のような種類があります。

カラム名称	カラムサイズ	対イオン	主な分析目的
Shim-pack Amino-Na	6 mmφ×100 mm	Na 型	たんぱく質加水分解物分析用
Shim-pack Amino-Li	6 mmφ×100 mm	Li 型	生体アミノ酸分析用

本製品の性能を十分に発揮させて効果的に使用していたくために、この取扱説明書をよく読んで正しく使用してください。

■製品に含まれるもの

まず、カラム本体のほか下記付属品が含まれていることを確認してください。

- カラム検査成績書 購入いただいたカラムの性能を保証するものです。
 - カラムコネクタキット メールナット 1.6 MN (2 個) とフェールール 1.6 F (2 個) です。Shim-pack Amino シリーズのカラムの接続に必要です。
 - カラム取扱説明書 この説明書です。
- なお、アミノ酸分析を行うときは、使用する装置に対応したアミノ酸分析システムマニュアルも参照してください。

〈島津アミノ酸分析キット〉

キット名称	P/N	ボトル名称	内容	容量	用途
アミノ酸移動相キット NA 型	228-21195-94	AA-MA (NA)	0.2N-クエン酸ナトリウム	1 L	A 液第 1 緩衝液
		AA-MB (NA)	0.6N-クエン酸ナトリウム	1 L	B 液第 2 緩衝液
		AA-MC (NA)	0.2N-水酸化ナトリウム	500 mL	C 液カラム再生液
アミノ酸移動相 NA 型 A 液 (3 本)	228-21195-96	AA-MA (NA)	0.2N-クエン酸ナトリウム	1 L×3 本	A 液第 1 緩衝液
		AA-MA (LI)	0.15N-クエン酸リチウム	1 L	A 液第 1 緩衝液
		AA-MB (LI)	0.3N-クエン酸リチウム	1 L	B 液第 2 緩衝液
アミノ酸移動相 LI 型	228-21195-95	AA-MC (LI)	0.2N-水酸化リチウム	500 mL	C 液カラム再生液
		AA-MA (LI)	0.15N-クエン酸リチウム	1 L×3 本	A 液第 1 緩衝液
		AA-RA	アルカリ緩衝液	500 mL	反応試薬 A
分析キット OPA 試薬	228-21195-93	AA-RB	O- フタルアルデヒド液	500 mL	反応試薬 B

- Shim-pack Amino-Li の場合

0.2 M 水酸化リチウム水溶液（または移動相 Li 型 C 液）でカラムを洗浄してください。（カラム充填剤の汚れの度合いにもよりますが、流量は 0.2 mL/min で 30 分以上は必要です。）洗浄後、0.15 M クエン酸リチウム水溶液（または移動相 Li 型 A 液）を 0.6 mL/min で 120 分以上送液して分析を開始してください。行わなければサルコシン (Sar) ピークの再現性が得られない傾向があります。

＜そのほかの洗浄法＞

- 酸による洗浄法
0.1 N の硝酸を 0.2 mL/min で 1～2 時間送液し、Amino-Na のときは 0.2 M 水酸化ナトリウムで、Amino-Li のときは 0.2 M 水酸化リチウムで 2～3 時間洗浄後、＜アミノ酸分析を行っていたとき＞に記載の通り、移動相 A を送液してから分析を開始してください。
- EDTA による洗浄法
0.2 M EDTA.2Na (エチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム) 水溶液を 0.2 mL/min で 1～2 時間送液し、水洗した後、Amino-Li のときはさらに 0.2 M 水酸化リチウムで 1 日間送液してから、＜アミノ酸分析を行っていたとき＞に記載の通り、移動相 A を送液してから分析を開始してください。

上記の洗浄法でカラム性能が回復しないときは、新しいカラムに交換してください。

■カラムの性能

Shim-pack Amino シリーズは、カラム 1 本 1 本について、厳正な検査でカラムの性能をチェックし、検査に合格したものだけを製品として出荷しています。カラム検査条件およびカラムの性能については付属の検査成績書を参照してください。なお、出荷時にカラム内に封入されている液は、Shim-pack Amino-Na では 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液 Shim-pack Amino-Li では 0.2 M 水酸化リチウム水溶液です。

■カラムの取り付け

＜カラムの接続について＞
カラムの接続は付属のカラムコネクタキットを使用して図 1 のように取り付けてください。

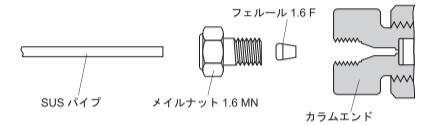


図 1：カラムの接続

このとき、インジェクタからカラムまで、またはカラムから検出器までの配管を、必要以上に長くするとカラム外での試料の拡がりが大きくなり本来のカラム性能が得られないことがあるので注意してください。目安としては、いずれの配管も 0.2～0.3 mmφ、長さ 5～25 cm のパイプが適当です。（アミノ酸分析のときはアミノ酸分析システムマニュアルをご覧ください）なお、メールナットを締め付けすぎないでください。無理な締め付けはジョイント部の破損につながります。

＜カラムの通液方向＞

カラムには、移動相の流れの方向が表示してあります。逆方向には流さないでください。

■カラムの保存

＜Shim-pack Amino-Na の場合＞

6 ヶ月以上使用しないときは、以下の手順でカラム封入液を置換し、保管してください。
 1) 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液（または移動相 Na 型 C 液）で十分洗浄する。
 2) 0.01 % n- カプリル酸を含む 10 % エタノール水溶液でカラム内の液を置換する。
 3) 密栓して冷蔵所に保存する。
 次に使用する際は、移動相 Na 型 A 液の流量を 0.1 mL/min に変更し、一晚通液したあと、分析に使用してください。

＜Shim-pack Amino-Li の場合＞

6 ヶ月以上使用しないときは、以下の手順でカラム封入液を置換し、保管してください。
 1) 0.2 M 水酸化リチウム水溶液（または移動相 Li 型 C 液）で十分洗浄する。
 2) 0.01 % n- カプリル酸を含む 10 % エタノール水溶液でカラム内の液を置換する。
 3) 密栓して冷蔵所に保存する。
 次に使用する際は、移動相 Li 型 A 液の流量を 0.1 mL/min に変更し、一晚通液したあと、分析に使用してください。

■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。

<p style="text-align: center;">島津分析コールセンター</p> <p style="text-align: center;">フリーダイヤル ☎ 0120-131691 e-mail : analytic@group.shimadzu.co.jp</p>

＜移動相の流量＞

分析時の最適流量は 0.3～0.8 mL/min です。ただし、移動相の粘性によってカラムにかかる圧力が 130 kgf/cm² を超えないように流量を設定してください。

＜カラム使用圧力＞

カラムの最高使用圧力は次のとおりです。
 Shim-pack Amino-Na..... 130 kgf/cm²
 Shim-pack Amino-Li..... 130 kgf/cm²

＜カラム使用温度＞

カラム温度は 95 °C 以下で使用してください。

＜その他諸注意＞

- 分析終了時には移動相流量を 0.1～0.3 mL/min にし、カラム温度を室温まで下げた後、移動相の送液を止めてください。
- ポンプのドレインバルブを開くときは、移動相の送液を止めてカラム圧力が十分下がったことを確認してから行ってください。
- カラムには床に落とすなどの衝撃を与えないようにしてください。

＜アミノ酸分析を行うときの分析条件について＞

分析条件の詳細につきましては、アミノ酸分析システムマニュアルを参照してください。

■移動相溶媒

＜アミノ酸分析を行うとき＞

アミノ酸分析では、移動相調製を正確に行わないと再現性良いデータが得られません。カラム寿命を長く保ち、しかも再現性良いデータを得るために、弊社製アミノ酸分析キットを使用してください。

＜キットの構成＞

島津アミノ酸分析キットには、表のような種類があります。

＜アミノ酸分析以外に使用するときの注意＞

汎用カチオン交換カラムとして Shim-pack Amino シリーズをアミノ酸分析以外に使用するときは、次のことに注意してください。

- 使用可能な溶媒
通常用いられる緩衝液系で安定して使用できますが、移動相に有機溶媒を添加する場合は、水と混じり合う溶媒（例えばメタノール、アセトニトリル）を使い、その濃度は水に対して 10 % 以下で使用してください。それ以上の濃度では、ゲルの収縮を引き起こす可能性があります。
- pH 範囲
移動相の pH 範囲は 2～14 で使用してください。
- 移動相のろ過
カラムを長時間安定に使用するために、移動相はあらかじめメンブランフィルタ（孔径 0.2～0.45 μm）を使ってろ過したものを使用してください。

■試料

カラムの目詰まりを防ぐため、試料溶液はできる限り、メンブランフィルタ（0.2～0.45 μm）でろ過してください。

■カラムの取り扱い

カラムを長期間にわたって使用していただくために次のことに注意してください。

- カラムを接続する前に LC システムの流路を十分洗浄してください。
LC システムの流路に蓄積している汚れが、カラムに流れ込みカラム性能を低下させることがあります。カラムを接続する前に、ポンプ、インジェクタなどの流路系、および配管系を十分洗浄してください。LC システム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有機溶媒や蒸留水で十分洗浄してください。

＜アミノ酸分析を行うとき＞

弊社発行のアミノ酸分析システムマニュアルを参照のうえ、装置の配管をしてください。配管後は、まず流路を洗浄してください。

■カラムの目詰まり

分析を行っているうちにカラム圧が上昇したときは、次のような原因が考えられます。

- カラム入口までの流路系の目詰まり
 - カラム入口の焼結フィルタの目詰まり
 - カラム充てん剤の目詰まり
 - カラム出口以降の目詰まり
- カラム圧が上昇した場合は、まず、カラム入口側の配管を外して、(1) の現象が起こっていないか確認してください。(1) が原因でないときは、カラム入口の配管を取り付け、カラム出口側の配管を外して、(4) が原因でないか確認してください。
 カラム本体の目詰まりが原因のときは、(2) か(3) がカラム圧上昇の原因です。
 (3) のときは、「■カラムの洗浄」で示している洗浄方法で回復することがあります。
 (2) のときは、カラムエンドを外してカラムエンドに埋め込まれているフィルタを超音波洗浄することによって、回復することがあります。ただし、カラムエンドを取り外すときに充てん剤を乱してしまうと、カラムの性能自体が低下するので注意してください。（なお、フィルタはカラムエンドに埋め込まれているので、フィルタを超音波洗浄するときは、カラムエンドごと超音波洗浄してください。）

■カラムの洗浄

試料成分がカラム充填剤に不可逆的に吸着すると、保持時間が変化したり、分離が悪くなったりします。このようなときは、以下のカラム洗浄方法が有効ことがあります。

＜アミノ酸分析を行っていたとき＞

- Shim-pack Amino-Na の場合
0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液（または移動相 Na 型 C 液）でカラムを洗浄してください。（カラム充填剤の汚れの度合いにもよりますが、流量は 0.2 mL/min で 30 分以上は必要です。）洗浄後、移動相の A 液を 0.5 mL/min で 20 分間送液して分析を開始してください。

Test Kit for High-performance Affinity Chromatography

Shim-pack

Amino Series

Instruction Manual

■ Introduction

The Shim-pack Amino Series columns are packed with a strong acid cation exchange resin and suitable for use in the separation of amino acids. Since the column packing is a sulfonic acid ion exchange resin of a styrene-divinyl benzene copolymer (gel type) of 5 μm particle size as a base, this column can be used as a general purpose cation exchange column (if analytical conditions are properly selected).

The Shim-pack Amino Series is classified as follows according to the counter ion of the sulfonic acid group:

Name of Column	Column Size	Counter Ion	Primary Application
Shim-pack Amino-Na	6 mmφ×100 mm	Na type	For analyzing amino acids in protein hydrolysates
Shim-pack Amino-Li	6 mmφ×100 mm	Li type	For separation of amino acids of biological origin

To ensure the best performance and effective use of these columns, please read this operation manual carefully prior to use.

■ Package Content

After unpacking, check that the following accessories are supplied together with the column main body:

- Column Test Record
This record is evidence of the actual performance of the column you have purchased.
- Column connector kit
Containing two male nuts 1.6 MN and two ferrules 1.6 F which are needed for connecting the Shim-pack Amino series column.
- Instruction Manual This manual
(For amino acid analysis, refer to the AMINO ACID ANALYSIS SYSTEM INSTRUCTION MANUAL.)

■ Column Performance

Each Shim-pack Amino Series column is subjected to severe performance tests and only those passing these tests are shipped.

<Amino acid analysis kit>

Kit Name	P/N	Bottle Name	Content	Quantity	Application
Amino acid mobile phase kit NA type	228-21195-94	AA-MA (NA)	0.2N-sodium citrate	1 L	Liquid A, buffer solution No.1
		AA-MB (NA)	0.6N-sodium citrate	1 L	Liquid B, buffer solution No.2
		AA-MC (NA)	0.2N-sodium hydroxide	500 mL	Liquid C, column regenerating solution
Amino acid mobile phase NA type liquid A (3 bottles)	228-21195-96	AA-MA (NA)	0.2N-sodium citrate	1 L × 3 bottles	Liquid A, buffer solution No.1
		AA-MA (LI)	0.15N-lithium citrate	1 L	Liquid A, buffer solution No.1
		AA-MB (LI)	0.3N-lithium citrate	1 L	Liquid B, buffer solution No.2
Amino acid mobile phase kit LI type	228-21195-95	AA-MC (LI)	0.2N-lithium hydroxide	500 mL	Liquid C, column regenerating solution
		AA-MA (LI)	0.15N-lithium citrate	1 L × 3 bottles	Liquid A, buffer solution No.1
		AA-RA	Alkali buffer solution	500 mL	Reagent A
Analyzing kit OPA reagent	228-21195-93	AA-RB	o-Phthalaldehyde solution	500 mL	Reagent B

● Amino-Li type column

Flush the column with 0.2 M lithium hydroxide aqueous solution or mobile phase liquid C (Li type).
(Flush with the cleaning solution at 0.2 mL/min for at least 30 minutes, although these cleaning condition depends on the degree of contamination of the column.)
After the cleaning, run with 0.15 M lithium citrate aqueous solution or mobile phase liquid A (Li type) at 0.6 mL/min for 120 minutes. This cleaning process is necessary to obtain reproducibility of the peak area of sarcosine (Sar).

<Other cleaning method>

● Cleaning with acid

Allow 0.1 N nitric acid to flow through the column at 0.2 mL/min for 1 to 2 hours, substitute the Amino-Na type column with 0.2 M sodium hydroxide and the Amino-Li type column with 0.2 M lithium hydroxide for about few hours and then start analysis.

● Cleaning with EDTA

Allow 0.2 M EDTA-2Na (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) aqueous solution to flow through the column at 0.2 mL/min for 1 to 2 hours, flush with water, substitute the Amino-Li type column with 0.2 M lithium hydroxide for a day and then start analysis.

If column performance cannot be recovered by the above procedures, it is necessary to replace the column with a new one.

For the column test conditions and actual column performance, please refer to the supplied Test Record.

When shipped, the column is filled with the following solution:
0.2 M sodium hydroxide aqueous solution for the Shim-pack Amino-Na column
0.2 M lithium hydroxide aqueous solution for the Shim-pack Amino-Li column

■ Column Installation

<Precautions for column connection>

Connect the column as shown in Fig.1 using the supplied column connector kit.

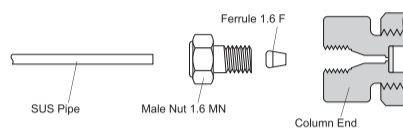


Fig.1 : Column Connection

At this time, do not use unnecessarily long pipes for connection between the injector and column and between the column and detector. Excessive pipe length will cause components to disperse widely outside the column (band broadening) so that the column will not appear to provide the expected performance. Standard sizes for pipes are 0.2 to 0.3 mmφ in diameter and 5 to 20 cm in length. (For pipe size for amino acid analysis, refer to the manual for the amino acid analysis system.) Do not tighten male nuts excessively. Excessive tightening could damage joints.

<Direction of mobile phase flow in the column>

Pass mobile phase through the column in the correct direction. Direction of mobile phase flow is marked on the column.

<Flow rate of mobile phase>

The optimum mobile phase flow rate for analysis is between 0.3 and 0.8 mL/min.

<Column operating pressure>

Set the flow rate, ensuring that pressure applied on the column, taking into account the viscosity of the mobile phase, does not exceed 130 kgf/cm².

<Column operating temperature>

Use the column at the temperature not higher than 95 °C.

<Other precautions>

- When analysis is over, drop the mobile phase flow rate to 0.1 to 0.3 mL/min and cool the column to room temperature prior to stopping mobile phase flow.
- Prior to opening the pump drain valve, stop supplying mobile phase and make sure that the column pressure has dropped sufficiently.
- Handle columns carefully so as to avoid shocks (such as from dropping on the floor).

<Analysis conditions for amino acids>

For specific analysis conditions for amino acids, refer to the instruction manual for the amino acid analysis system issued by us.

■ Mobile Phase Solvent

<For amino acid analysis>

In separating amino acids, accurate and proper preparation of mobile phase is essential to obtain reproducible data. To ensure long column life and highly reproducible data, use the appropriate amino acid analysis kit manufactured by us.

<Amino acid analysis kit>

Shimadzu can supply various amino acid analysis kits as shown in the table.

<For separation of substances other than amino acids>

When using the Shim-pack Amino series as a general-purpose cation exchange column to separate substances other than amino acids, take care of the following points.

- Applicable solvent
An ordinary buffer solution can be used without impairing stability. When an organic solvent is added to the mobile phase, select a solvent which is miscible with water. (EX. methanol or acetonitrile) The solvent concentration in the water must not exceed 10 %. Higher concentrations might cause contraction of the packing gel.
- pH range
pH of the mobile phase must be in the range between 2 and 14.
- Filtration of mobile phase
To ensure long, stable performance of the column, pass the mobile phase through a membrane filter (of 0.2 to 0.45 μm pore size) prior to use.

■ Sample

To prevent a clogged column, filtrate the sample solution through a membrane filter (0.2 - 0.45 μm), if possible.

■ Column Handling Precautions

Observe the following to assure long service life of the column:

- Rinse the flow line in the LC system sufficiently prior to connecting the column.
If soil accumulating in the flow line in the LC system flows in the column, it will deteriorate column performance. Therefore, be sure to rinse the flow path and piping system of the pump and injector sufficiently before connecting the column. For rinsing, use an organic solvent such as methanol, isopropyl alcohol or distilled water according to the operating conditions of the LC system.

<For amino acid analysis>

Arrange the system according to the applications guide for the amino acid analysis system issued by us. After connecting the piping, clean the flow line.

■ Clogging of Column

Increase in column pressure during analysis may be caused by any of the following:

- (1) Flow line before the column inlet is clogged.
- (2) Sintered filter in the column inlet is clogged.
- (3) Column packing bed is clogged.
- (4) Flow line after the column outlet is clogged.

If column pressure increases, disconnect the pipe from the column inlet and check for item (1).

If item (1) is not the cause, reconnect the pipe to the column inlet and disconnect the pipe from the column outlet to check for item (4). If a clogged flow line is not the cause, either item (2) or (3) is the cause of the column pressure rise.

When item (3) is the cause, the problem may be eliminated by cleaning the column in the procedure described in "■ Cleaning of the Column".

When item (2) is the cause, disconnect the column end and subject the filter embedded in the column end to ultrasonic cleaning. Then the problem may be eliminated. In disconnecting the column end, take care not to disturb the packing bed; if the bed is disturbed, column performance will deteriorate. (The filter is embedded in the column end. Therefore, perform ultrasonic cleaning of the filter as embedded in the column end.)

■ Flushing the Column

Irreversible adsorption of sample components on the column packing may result in retention time change and/or poor resolution. In such a case, the following column cleaning procedure may be effective.

<When amino acid analysis has been conducted:>

- Amino-Na type column
Flush the column with 0.2 M sodium hydroxide aqueous solution or mobile phase liquid C (Na type).
(Flush with the cleaning solution at 0.2 mL/min for at least 30 minutes, although these cleaning condition depends on the degree of contamination of the column.)
After the cleaning, run with mobile phase liquid A at 0.5 mL/min for 20 minutes.