



NUCLEOGEL® SUGAR 810 Ca · SUGAR Ca SUGAR Pb · SUGAR Na

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit jeder NUCLEOGEL® SUGAR Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis eines Polymers erworben, das besondere Sorgfalt erfordert. Die Aufgabe von organischen Lösemitteln auf die Säule (außer wie später beschrieben) verursacht ein Quellen des Polymers, und daraus resultierend einen Überdruck in der Säule. Deshalb sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanleitung vertraut machen. Diese Säulen sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Produkte können je nach Modifizierung zur Trennung und zur quantitativen Bestimmung von Mono-, Di-, und Oligosacchariden sowie Zuckeralkoholen aus Lebensmitteln, biologischen Proben und Stärkehydrolysaten eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Trennsystems, also Trennsäule und Chromatographie-Anlage sowie die Anpassung der Trennbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Aufgabenstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service / technische Produktberatung.

Inhaltsübersicht

- Sicherheitshinweise
- Beschreibung der Säulen
- Installation
- Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Anwendungsbeispiele
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Eluenten zur Säulenregenerierung (z. B. Acetonitril) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z. B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillerverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (insbesondere das Öffnen der Säule und Freilegen des Säulenbettes) Folgeschäden auftreten.

Beschreibung der Säulen

Als stationäre Phase enthalten die NUCLEOGEL® SUGAR Säulen sulfonierte sphärische Polystyrol/Divinylbenzol-Harze (PS/DVB) in verschiedenen ionischen Formen (Ca²⁺, Pb²⁺, Na⁺). Je nach ionischer Form zeigen die Säulen unterschiedliche Selektivitäten und lassen sich so gezielt in der Zuckeranalytik anwenden. NUCLEOGEL® SUGAR 810 Ca eignet sich besonders für die Trennung von Mono-, Di- und Oligosacchariden sowie für Zuckeralkohole und Alkohole, NUCLEOGEL® SUGAR Ca für Mono- und Oligosaccharide sowie Zuckeralkohole, NUCLEOGEL® SUGAR Pb für Mono- und Disaccharide aus Lebensmitteln und biologischen Proben und NUCLEOGEL® SUGAR Na für Oligosaccharide aus Stärkehydrolysaten und Lebensmitteln. Die SUGAR 810 Ca Phase unterscheidet sich von der SUGAR Ca durch ein anderes Selektivitätsmuster, durch das sich der Anwendungsbereich deutlich erweitert. Die Trennmechanismen beruhen auf hydrophoben Wechselwirkungen und sterischem Ausschluss durch das Polystyrolgerüst, Ligandenaustausch und Verteilungseffekten, wobei meist der Ligandenaustausch die dominierende Kraft ist, da die hydratisierten Metallionen intensiv mit den Hydroxygruppen der Probenmoleküle wechselwirken. Bei höheren Oligomeren spielen Größenausschlussphänomene eine verstärkte Rolle.

Installation

Der Einbau der HPLC-Säulen sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Sie werden mit gerätetypischen 1/16" Kapillaren und Verschraubungen angeschlossen, die zur Vermeidung von Totvolumen möglichst kurz sein sollten.

Vorsäulen

Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säulen, insbesondere bei stark matrixbelasteten Proben, sind Vorsäulen empfehlenswert. Die Filterelemente und das Sorbens der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Der Anschluss der Vorsäule an die Trennsäule erfolgt mittels Vorsäulenhalter (siehe hierzu www.mn-net.com oder MN Chromatographie-Katalog). Ein Wechsel der Vorsäule ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendruckes und/oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

Probe

Die in der Regel wässrige Probe sollte vor der Aufgabe auf die Säule durch einen Spritzenvorsatzfilters (z. B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) filtriert werden. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Vermeiden Sie die Aufgabe von Fetten, Ölen, eiweißartigen Materialien und Partikeln auf die Säule. Diese Substanzen erzeugen auf Dauer einen erhöhten Rückdruck, und sind oft schwierig, oder überhaupt nicht zu entfernen. Darüber hinaus enthalten Proben in der Lebensmittelindustrie oftmals organische Substanzen, die in der Probenlösung löslich sind, nicht aber im Eluenten. Eine Ansammlung dieser Verbindungen kann ein Verstopfen und damit einen Überdruck in der Säule hervorrufen. Nur in wenigen Fällen kann dann eine Regenerierung (siehe Säulenregenerierung) die ursprüngliche Säuleneffizienz wieder herstellen. Verunreinigungen wie Salze und Proteine ändern das Retentionsverhalten der Säule, und müssen deshalb durch eine entsprechende Probenvorbereitung (z. B. Proteinfällung) noch vor der Injektion aus den Proben entfernt werden. In der Literatur sind zahlreiche Methoden für die Probenaufreinigung beschrieben. Auch Probenvorbereitungsmethoden mittels Festphasenextraktion, z. B. mit CHROMABOND® SPE-Säulen, lassen sich zur Entfernung von Störkomponenten und Matrixbestandteilen anwenden.

Das maximale Injektionsvolumen, das auf die Säule gegeben werden kann, sollte für eine spezielle Probe empirisch bestimmt werden. In der Regel bewirken kleinere Probenvolumina höhere Trennleistungen. Je nach Konzentration der Probe können zu große Injektionsvolumen zu Peakverbreiterung oder Überlappung mit benachbarten Peaks führen. Wir empfehlen daher Probenvolumina im Bereich von 10 bis 50 µL.

Eluent

Als Eluent wird bakterienfreies, entmineralisiertes Wasser verwendet, das durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und vor Gebrauch entgast wurde. Um einem möglichen Verlust an Metallionen durch Ionenaustausch vorzubeugen, kann dem Eluenten bis zu 10 mmol/L des entsprechenden Metallsalzes (z. B. bei SUGAR 810 Ca/SUGAR Ca: Calciumchlorid, SUGAR Pb: Bleinitrat, SUGAR Na: Natriumchlorid) zugesetzt werden. Andere Salze sowie Säuren, Basen und organische Modifizier, insbesondere Methanol und Tetrahydrofuran sind zu vermeiden. Die Eluenten sollten stets mit entmineralisiertem Wasser und Reagenzien für die Analyse, frei von fremden Metallionen angesetzt werden.

Flussrate und Druck

Die Flussraten sollten so gewählt werden, dass der resultierende Druck 70 bar nicht überschreitet. Typische Flussraten liegen zwischen 0,1–0,7 mL/min. Änderungen der Flussrate sollten schrittweise durchgeführt werden. Wir empfehlen den Rückdruck regelmäßig zu überprüfen. Wenn bei der Benutzung der Säule unter normalen Flussraten ein erhöhter Rückdruck resultiert, deutet dieses im Allgemeinen auf eine Verunreinigung des Packungsmaterials hin, die entfernt werden muss (siehe Behebung möglicher Fehler).

Temperatur

Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen von Zuckern müssen empirisch ermittelt werden, liegen aber meist zwischen 50 und 90 °C. Daher ist eine Säuleneheizung notwendig. Allgemein gilt, dass höhere Säulentemperaturen die Retention der Probe verringern, die Trennleistung verbessern und den Säulendruck reduzieren. Temperaturen unter 50 °C können für einige Anwendungen sinnvoll sein. In diesem Fall muss die Flussrate jedoch so angepasst werden, dass der Druck 70 bar nicht überschreitet.

Detektion

In der Zuckeranalytik werden vorrangig refraktometrische Detektoren benutzt. Mit den Säulen können aber auch spektralphotometrische, massenspektrometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können Nachsäulenderivatisierungen mit einem geeigneten Detektor für die Reaktionsprodukte eingesetzt werden.

Equilibrierung

Bevor Proben gemessen werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden (siehe auch Eluent). Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

Säulenaufbewahrung

Die Säule wird mit entmineralisiertem Wasser ausgeliefert. Auch für die Aufbewahrung wird dieser Eluent empfohlen. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. Sollte die Säule austrocknen, so zeigt sich unter den normalen Arbeitsbedingungen ein erhöhter Rückdruck. In diesem Fall spülen Sie die Säule mit entmineralisiertem Wasser bei 90 °C und einer Flussrate von 0,3 mL/min. Steigern Sie die Flussrate langsam auf 0,5 mL/min und achten darauf, dass der maximale Druck von 70 bar nicht überschritten wird.

Anwendungsbeispiele

Verschiedene Anwendungsbeispiele finden Sie unter www.mn-net.com/apps. Wählen Sie hier Ihre NUCLEOGEL® SUGAR Phase mit „Search criteria: Phase“ im Pull-Down-Menü unter „Search word“ aus.

Behebung möglicher Fehler

Das folgende Schema beschreibt typische Symptome eines Leistungsverlustes und deren Ursache. Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. Polymersäulen halten bei korrekter Pflege und Behandlung ihre Trennleistung über lange Zeiträume aufrecht. Erfahrungsgemäß sind Säulenausfälle meist auf eine Verunreinigung des Sorbensbettes oder auf eine Verwendung falscher, ungeeigneter Lösemittel zurückzuführen. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbereitung und Anwendung der Säule verhindern meist diese Probleme. Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
Basislinien-Drift · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatierung
Breite Peaks · Mischung von / oder Diffusion vor / hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Anwesenheit von fremden Kationen im Eluenten (z. B. K ⁺ oder H ⁺)	entsprechenden Parameter optimieren Eluenten frei von fremden Kationen verwenden
Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Ansammlung von eiweißartigem Material durch Bakterienwachstum in Probe oder im Eluenten	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren / LC-System spülen, reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung) Probe gekühlt lagern, Eluenten frisch zubereiten / reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung)
Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck Verunreinigung mit: · Metallionen aus LC-System oder Probe · Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Sorbensoberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices	PEEK-Kapillaren, Metallionen aus Probe entfernen / Säule regenerieren (s. Säulenregenerierung) organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung)
Doppelpicks (Totvolumen): · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Kompression des Säulenbettes durch zu hohe Flussraten und durch Verwendung eines nicht empfohlenen organischen Modifiers	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / Austausch der Verschraubungen max. Flussrate und zulässigen Eluenten beachten / entspannen des Polymerbettes (s. Säulenregenerierung)

Säulenregenerierung

In einigen Fällen kann die Trennleistung der Säule wiederhergestellt werden, indem man die Verunreinigungen vom Sorbensbett entfernt oder das Polymerbett entspannt. Allerdings ist es wichtig, die Ursache zu lokalisieren, bevor die Säule wieder für die Analyse von Proben verwendet wird.

- 1. Frischen Eluenten zubereiten:** Manchmal wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- 2. Reinigen des Sorbens:** Stellen Sie die Säulentemperatur auf 65 °C, und pumpen über Nacht ein Gemisch von Wasser mit max. 30 % Acetonitril mit 0,1 mL/min durch die (umgedrehte) Säule. Der Druck sollte 70 bar nicht übersteigen. Unter Umständen kann ein dunkel gefärbtes Eluat, das aus der Säule kommt, am Kapillarenende beobachtet werden. Am nächsten Tag ersetzen Sie das Gemisch Acetonitril – Wasser wieder durch Wasser, und pumpen zunächst mit 0,1 mL/min, um festzustellen, ob der Druck nachgelassen hat. Wenn der Druck niedriger ist, erwärmen Sie die Säule wieder auf 90 °C und erhöhen die Flussrate nach und nach auf 0,4 mL/min. Testen Sie die Säule unter normalen Arbeitsbedingungen. Wenn der Druck wieder normal ist, aber die Trennleistung schlecht bleibt, versuchen Sie die Säule zu regenerieren.
- 3. Säulenregenerierung:** Bereiten Sie entsprechend dem Säulentyp folgende Lösungen vor:
· SUGAR 810 Ca: gesättigte Calciumchlorid-Lösung
· SUGAR Ca: gesättigte Calciumchlorid-Lösung
· SUGAR Pb: 1 % wässrige Lösung von Bleinitrat mit 0,25 % EDTA
· SUGAR Na: gesättigte Natriumchlorid-Lösung
Pumpen Sie diese bei 90 °C mit 0,1 mL/min durch die (umgedrehte) Säule. Der Druck sollte 70 bar nicht übersteigen. Anschließend spülen Sie mit 10 Säulenvolumina Wasser. Dann betreiben Sie die Säule wieder in der üblichen Art und Weise. Eine anfangs minimal driftende Basislinie sollte sich im Equilibrierungsschritt stabilisieren. Wird eine starke Drift beobachtet, so equilibrieren Sie die Säule bei 85 °C mit entionisiertem und entgastem Wasser bis die Basislinie stabil ist.
- 4. Entspannen des Polymerbettes:** Die Polymere bestehen aus kompressiblen kugelförmigen Partikeln. Durch einen Rückdruck von mehr als 70 bar werden die Partikel deformiert. Dies führt zu einer Verdichtung des Säulenbettes und zu einem weiteren Druckanstieg. Um das Säulenbett wieder zu dekomprimieren schalten Sie die Pumpe ab, und lassen das Polymer etwa 30 min „entspannen“. Drehen Sie die Säule um, und pumpen den Eluenten über Nacht mit einer Flussrate von 0,1 mL/min bei 90 °C durch die Säule. Dann kehren Sie zu den normalen Arbeitsbedingungen für die Säule zurück.
- 5. Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

1 Säulenvolumen (300 mm Länge x 7,8 mm ID Säule) ≈ 14 mL

Zusammenfassung

Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:

1. Der empfohlene Eluent ist entmineralisiertes Wasser. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
3. Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
4. Die empfohlene Flussrate beträgt 0,1–0,7 mL/min.
5. Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck von 70 bar nicht überschritten wird.
6. Wenn die Säule längere Zeit nicht benutzt wird, lagern Sie sie equilibriert mit entmineralisiertem Wasser.
7. Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien mindestens von p. A. Qualität und Lösungsmittel in HPLC-Qualität. Verwerfen Sie alle Lösungen, die Anzeichen von Bakterienwachstum zeigen.

Informieren Sie sich über alle MACHEREY-NAGEL Chromatographie-Produkte!

... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Website mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: www.mn-net.com/apps