

Schnell-Start Anleitung PSS PROTEEMA Säulen

1. Einleitung

Vielen Dank, dass Sie sich für den Kauf einer PSS PROTEEMA Säule entschieden haben. Diese Schnell-Start Anleitung soll Ihnen helfen schnell unter typischen Bedingungen messbereit zu sein. Ausführliche Informationen finden Sie in der Benutzerdokumentation, die Sie hier erhalten:

www.pss-polymer.com/Resources/manuals/FullUsersGuide_PROTEEMA_D.pdf

1.1 Spezifikationen

PSS PROTEEMA Säulen sind mit hochporösen modifizierten Silikapartikeln gefüllt. Sie werden in Wasser, welchem zur Verhinderung mikrobakteriellen Wachstums 0.75mmol/L Natriumazid zugefügt wurde, ausgeliefert und bezüglich der Bodenzahl mit Ethylenglykol (EG) getestet.

Säulentyp	Maximaler Gebrauchsdruck pro Säule bar / psi	Maximaler Gebrauchsdruck für Säulenkombinationen (3 Säulen) bar / psi	Maximale Anwendungs- temperatur	Theoretische Böden/m EG in Wasser 0.75mmol NaN ₃
PROTEEMA 3 μ	75 / 1090	150 / 2180	70°C	>75.000
PROTEEMA 5 μ	60 / 870	120 / 1740	70°C	>50.000
PROTEEMA PREP	40 / 580	80 / 1160	70°C	>30.000

1.2 Lösungsmittelkompatibilität

PSS PROTEEMA Säulen sind gut verträglich mit vielen wässrigen Eluenten. Sie zeigen optimale Performance bei der Analyse natürlicher und synthetischer Peptide, Proteine und Enzyme in wässrigen Eluenten im pH-Bereich von 2.0 bis 7.5. Ein Wechsel verträglicher Eluenten ist problemlos möglich, wenn man den Anweisungen dieser Benutzerdokumentation folgt. Für Eluenten außerhalb des genannten pH-Bereiches sind andere PSS Säulenmaterialien in der Regel besser geeignet, da sie eine bessere Balance zwischen dem ionischen Charakter der Probe, dem pH des Eluenten und der Polarität der stationären Phase gewährleisten. Diese Balance ist die Voraussetzung für eine rein größenbasierte Trennung. Weitere Informationen finden Sie unter dem Stichwort „Magisches Dreieck“ auf der PSS Webseite.

Parameter	Bereich	Anmerkung
pH Stabilität	2-8	Chemisch stabil
Optimaler pH Bereich	2.5-7.5	Aufgrund der kürzeren Haltbarkeit bei höherem pH
Temperatur	<70°C	Optimale Lebensdauer bei 10°-35°C
Organische Modifier	<100% v/v	z.B. Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran
Salzzusatz	< 0.5M	z.B. NaN ₃ , NaCl, NaNO ₃
Puffer		Verträglich mit den meisten gängigen Puffersystemen

2. Säuleneinbau

Beim erstmaligen Einbau der Säule sollte diese im Eluenten betrieben werden, in dem sie geliefert wurde, um Bodenzahl und Rückdruck zu bestimmen. Dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich.

2.1 Vorbereitung des GPC/SEC-Systems

Entfernen Sie eventuell vorhandene Säulen und lagern Sie diese gemäß Herstellerangaben. Falls erforderlich, spülen Sie das GPC/SEC-System auf das benötigte Lösemittel um. Achten Sie dabei darauf, dass beide Lösemittel mischbar sind und das neue Lösemittel mit den Gerätekomponten kompatibel ist (vergleiche Gerätedokumentation).

2.2 Flussrate

Vermeiden Sie plötzliche Belastungen, wie z.B. drastische Veränderungen der Flussrate. Zur Inbetriebnahme wählen Sie zunächst einen Pumpenfluss von 0.0 ml/min und schalten Sie die Pumpe ein. Steigern Sie die Flussrate in kleinen Schritten, z.B. nach jeweils 15 sec. um $\frac{1}{4}$ der optimalen Flussrate, bis Sie die gewünschte Flussrate erreichen.

Säulen-dimension	Typische Flussraten ml/min (Min. – Max.)	Optimale Flussrate ml/min	Säulenvolumen ml
50mm x 4.6mm	0.1 – 0.7	0.3	0.8
250mm x 4.6mm	0.1 – 0.7	0.3	4.2
50mm x 8.0mm	0.3 - 2.0	1.0	2.5
300mm x 8.0mm	0.3 - 2.0	1.0	15
50mm x 20mm	1.0 – 12	6.25	15
300mm x 20mm	1.0 – 12	6.25	90



Überschreiten Sie niemals den empfohlenen Maximaldruck.

2.3 Temperatur

Die maximale Arbeitstemperatur beträgt 70°C. Die Anwendungstemperatur sollte mindestens 10°C unterhalb des Lösemittelsiedepunktes liegen. Um die Säule auf höhere Arbeitstemperaturen zu bringen stellen Sie zunächst eine geringe Flussrate ein und heizen Sie die Säule mit einer Rate von weniger als 2°C/min bis die Temperatur erreicht ist. Danach kann die gewünschte Flussrate eingestellt werden. Zum Abkühlen der Säule wählt man eine geringe Flussrate und schaltet den Säulenofen ab.

2.4 Kapillarverbindungen

Zur Erzielung bestmöglicher Ergebnisse verwenden Sie bitte Kapillaren aus rostfreiem Stahl mit einem Außendurchmesser von 1/16". Der Innendurchmesser der Kapillaren sollte für Mikrosäulen 0.007", für analytische Säulen 0.010" und für HighSpeed und präparative Säulen 0.020" betragen. Für eine optimale Trennleistung sollten kurze, maschinengeschnittene Kapillaren verwendet werden.



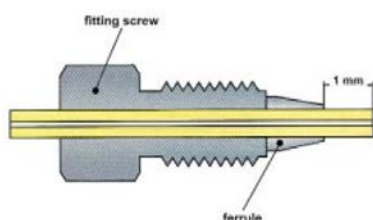
Kunststoffkapillaren, z.B. aus PEEK, müssen vorsichtig unter Berücksichtigung des anwendbaren Temperatur- und Druckbereichs verwendet werden.

2.5 Verschraubungen

Verschiedene Säulenhersteller verwenden ähnliche, aber dennoch leicht unterschiedliche Verschraubungen. Falsche Verschraubungen können die Trennleistung des Systems negativ beeinflussen und im schlimmsten Fall die Säule beschädigen. Beste Ergebnisse erzielt man bei Verwendung von 1/16" Verschraubungen in Verbindung mit einteiligen Schneidringen.



Hinweis und Warnung: Die Länge, der aus dem Schneidring hervorstehenden Kapillare, variiert in Abhängigkeit des Herstellers. Für PSS Säulen beträgt der korrekte Abstand 1mm.



Überprüfen Sie immer alle Verbindungen von und zur Säule. Wenn die Säulen anderer Hersteller durch PSS Säulen ersetzt werden müssen neue Kapillarverbindungen hergestellt werden. Kunststoffverschraubungen, z.B. aus PEEK, können unter Berücksichtigung des anwendbaren Temperatur- und Druckbereichs verwendet werden.

2.6 Herstellung der Verbindung zwischen dem Injektor und der Säule

Bitte lassen Sie bei der Installation und dem Test einer neuen Säule Vorsicht walten. Entfernen Sie die Säulenverschlüsse und bewahren Sie diese auf. Verwenden Sie zum Festziehen der Verschraubung zwei Gabelschlüssel, die Sie an der Kapillarverschraubung und dem sechseckigen Säulenkopf ansetzen. Verwenden Sie unter keinen Umständen die Einfräsungen am Säulenrohr.

Verbinden Sie, unter Beachtung der angegebenen Flussrichtung, den Säuleneingang mit dem Injektor oder der vorherigen Säule. Verwenden Sie geeignete Verschraubungen und neue Schneidringe.

Stellen Sie sicher, dass die Kapillare möglichst weit in den Säulenkopf ragt. Die Schraube sollte so fest angezogen sein, dass der Schneidring sich in die Kapillare eingeschnitten hat und keine Leckage auftritt. Übermäßiges Anziehen der Verschraubung ist zu vermeiden. Damit keine eingeschlossene Luft auf die Säule gelangt lösen Sie die Verschraubung am Säuleneingang leicht bevor Sie die Pumpe einschalten. Fördern Sie mit kleiner Flussrate bis etwas Lösemittel austritt, bevor Sie die Verschraubung erneut anziehen.

2.7 Herstellung der Verbindung zwischen den Säulen einer Säulenkombination

Für die Verbindungen zwischen den Säulen einer Säulenkombination verwenden Sie bitte die mitgelieferten, passend vorkonfektionierten Säulenverbinder. Die Vorsäule wird mit dem Injektor verbunden, die Trennsäulen werden in der Reihenfolge ansteigender Porengrößen eingebaut. Die letzte Säule vor dem Detektor weist somit die größte Porengröße auf. Bei jeder Verbindung zu einer weiteren Säule sollten Sie den Anweisungen unter 2.6 folgen.

2.8 Herstellung der Verbindung zwischen der Säule und dem Detektor

Verbinden Sie das Ende der Säule/Säulenkombination mit einer langen 1/16" Kapillare, um den Eluenten in ein Abfallgefäß zu leiten. Pumpen Sie mit der empfohlenen Flussrate ca. 3-4 Säulenvolumina in den Abfall. Kontrollieren Sie dabei alle Verbindungen auf Dichtigkeit. Stoppen Sie den Pumpenfluss, entfernen Sie die Kapillare am Säulenausgang und verbinden Sie, unter Verwendung geeigneter Verschraubungen und neuer Schneidringe, den Säulenausgang mit dem Detektor. Kontrollieren Sie erneut alle Verschraubungen auf Dichtigkeit.

2.9 Test der Säulenperformance

Der korrekte Säuleneinbau lässt sich durch Bestimmung von Bodenzahl und Auflösung und dem Vergleich mit dem mitgelieferten Säulenzertifikat überprüfen. Zur Überprüfung der Bodenzahl wird eine geeignete niedermolekulare Substanz injiziert. Die dazu notwendigen Testbedingungen entnehmen Sie bitte dem Säulenzertifikat. Ausführliche Hinweise finden Sie in der Benutzerdokumentation. Bitte notieren Sie auch den Gegendruck des Systems bei Inbetriebnahme.

3. Verwendungshinweise

3.1 Vorbereitung des Eluenten

Verwenden Sie ausschließlich qualitativ hochwertige, partikelfreie HPLC Lösemittel. Wenn nötig, filtrieren Sie das Lösemittel durch einen 0.45µm Filter. Entgasen Sie den Eluenten sorgfältig, wenn möglich mittels eines Online-Entgasers.

Tipp: Bei Verwendung von PSS PROTEEMA Säulen für Lichtstreuemessungen empfehlen wir die Beschaffung voräquibrierter Säulen (Lux-Version: Vorsäule P/N 299-2200, analytische Säule P/N 299-2201). Zusätzliche Maßnahmen zur Optimierung des Signal/Rauschverhältnisses müssen eventuell noch ergriffen werden. Eluentfiltration (z.B. 0.2 µm Filter) und Verzicht auf Salze und andere Additive im Eluenten können die Performance verbessern.

3.2 Umspülen auf andere kompatible Lösemittel

Verwenden Sie PSS PROTEEMA Säulen ausschließlich mit kompatiblen Eluenten.



Überschreiten Sie beim Lösemitteltausch nicht den maximal empfohlenen Säulendruck.

Spülen Sie die GPC/SEC-Anlage mit dem neuem Lösemittel. Verbinden Sie die Säule/Säulenkombination mit dem Injektor. Führen Sie vom Säulenausgang eine 1/16" Kapillare in ein Abfallgefäß. Pumpen Sie ca. zwei Säulenvolumina des neuen Lösemittels mit ca. 1/10 der empfohlenen Flussrate durch die Säule/Säulenkombination. Erhöhen Sie danach langsam den Fluss auf etwa 1/2 der empfohlenen Flussrate. Pumpen Sie dann weiter das etwa 8-fache Säulenvolumen durch die Säule. Für eine 300mm x 8.0mm Säule sollten Sie für ca. 30 Minuten einen Fluss von 0.1ml/min wählen und die Flussrate auf 0.5ml/min steigern. Stoppen Sie nun die Pumpe und verbinden Sie die Säule/Säulenkombination mit dem Detektor. Starten Sie die Pumpe mit einer Flussrate von 0.1 ml/min,

gehen Sie auf die gewünschte Temperatur und erhöhen Sie die Flussrate schrittweise. Stellen Sie sicher, dass alle Detektoren vollständig gespült und das System ausreichend äquilibriert ist, bevor Sie mit den Messungen beginnen.

3.3 Probenvorbereitung

Proben und Polymerstandards für die Kalibration sollten in der mobilen Phase angesetzt werden, in der das GPC/SEC-System betrieben wird. Um "Systempeaks" zu vermeiden entnimmt man das Lösemittel für die Probenvorbereitung direkt dem Lösemittelvorrat des GPC/SEC-Systems.

Probenkonzentration und Injektionsvolumen

Die empfohlene Aufgabemenge hängt von der gesamten Säulenlänge ab und berechnet sich aus dem Produkt der Probenkonzentration und dem Injektionsvolumen. Um die durch das Injektionsband selbst hervorgerufene Bandenverbreiterung gering zu halten sollte man das Injektionsvolumen klein wählen. Nur falls notwendig, z.B. um die Detektierbarkeit zu verbessern, sollte die Aufgabemenge variiert werden. Die nachfolgende Tabelle enthält hierzu Richtwerte. Durch die Injektion hervorgerufene Druckstöße sind zu vermeiden. Für sehr viskose Lösemittel oder Probenlösungen (z.B. bei sehr hochmolekularen Proben) sowie bei Säulenpackungen mit kleinen Partikeln sollten geeignete Schritte unternommen werden, um Druckstöße zu vermeiden. Zu diesen Maßnahmen gehören unter anderem die Verwendung niedrigerer Konzentrationen, größerer Injektionsvolumina, die Verringerung der Flussrate oder die Erhöhung der Säulentemperatur.

Probe, Molekulargewicht	Konz. g/l	Flussrate ml/min	Inj. Vol. (µl) Säulensatz		
			Säulendimensionen mm (L x ID)		
			250 x 4.6	300 x 8.0	300 x 20
			50 x 20		
Bodenzahl	1	Optimum	5	20	50
Engverteilte Stds < 1M Da	1	Optimum	5	20	<1000
Engverteilte Stds > 1M < 3M Da	< 0.5	Optimum	5	20	<1000
Engverteilte Stds > 3M Da	< 0.5	½ Optimum	5	20	<1000
Breitverteilte Stds, Proben < 1M Da	1-3	Optimum	10	50	<1000
Breitverteilte Stds, Proben > 1M Da	< 1	½ Optimum	10	50	<1000

Stellen Sie immer sicher, dass die Proben vollständig gelöst sind, bevor Sie diese injizieren. Hochmolekulare Proben benötigen für das vollständige Lösen mehrere Stunden und werden daher am besten über Nacht gelöst. Um Verstopfungen zu verhindern sollten die Proben nach dem Lösen filtriert werden (0.5µm; Proben mit Molmassen > 1M Da: 2.0µm). Bitte beachten Sie, dass potentiell auch Probenkomponenten durch Filtration entfernt werden können.



Um Beschädigungen der Trennsäulen durch adsorbierbare Probenverunreinigungen zu verhindern, empfehlen wir dringend die Verwendung einer Vorsäule.

4. Pflege und Wartung

4.1 Lagerung

Werden die Säulen innerhalb einer Woche erneut verwendet, ist es nicht notwendig diese einzulagern, vorausgesetzt es können keine Salze ausfallen. Wenn möglich sollte das GPC/SEC-System bei einer langsamen Flussrate oder im Rezykliermodus betrieben werden. Betreiben Sie Säulen nie ohne Fluss bei erhöhter Temperatur. Vor dem erneuten Einsatz sollte der alte Eluent gegen frisch angesetzten Eluenten ausgetauscht werden.

Lagern Sie die Säulen in Wasser mit wenig NaN₃, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.



Ersetzen Sie vor der Einlagerung andere salz- oder säurehaltige Lösemittel durch reines Lösemittel.

Verschließen Sie die Säulen mit den Verschlusschrauben, um ein Austrocknen zu verhindern. Lagern Sie die Säulen kühl aber lassen Sie niemals das Lösemittel in der Säule gefrieren.