



# RESOLVOSIL BSA-7

**Bitte beachten:** Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit der Säule RESOLVOSIL BSA-7 haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL<sup>®</sup> erworben. Das kovalent am Kieselgel gebundene Protein BSA ist naturgemäß empfindlich gegen Denaturierung. Die Standzeit ist somit von den durchgeführten Messungen und der Behandlung der Säule bestimmt. Daher sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanweisung vertraut machen. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Säule wurde speziell für die chromatographische Trennung optischer Isomere entwickelt und kann erfolgreich sowohl für optische Auflösung als auch zur Bestimmung der optischen Reinheit eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der analytischen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Analysensystems, also Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Analysenbedingungen 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 Säule
- Applikation
- Installation
- Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung

**Sicherheitshinweise**

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Eluentensysteme (z. B. Propanol) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z. B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. 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 Säule**

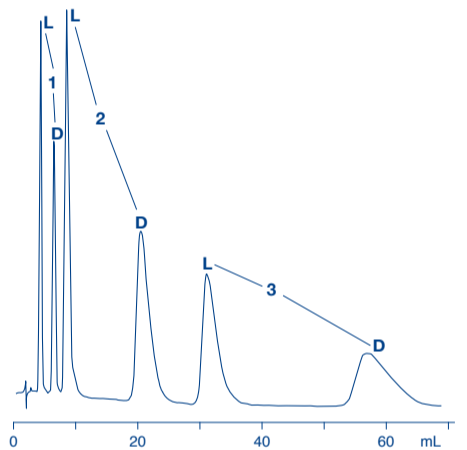
Die stationäre Phase der RESOLVOSIL BSA-7 Säule besteht aus weitporigem, sphärischen Kieselgel, an das Rinderserumalbumin (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA) kovalent gebunden ist. Die chirale Erkennung beruht auf der selektiven Wechselwirkung zwischen dem Protein BSA und niedermolekularen Verbindungen. Auch haben hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wechselwirkungen von polaren Gruppen und sterische Effekte Einfluss auf den Trennmechanismus. Die Säule lässt sich gut zur chiralen Analyse von Aminosäure-Derivaten, aromatischen Aminosäuren, aromatischen Sulfoxiden, Barbituraten, Benzodiazepinonen, Benzoin und Benzoin-Derivaten,  $\beta$ -Blockern sowie Cumarin-Derivaten und auch zur Untersuchung stereoselektiver mikrobieller und enzymatischer Reaktionen einsetzen. Die wichtigen Vorteile der RESOLVOSIL Säule sind ihre hohe Trennschärfe sowie die Leichtigkeit, mit der durch geringfügige Veränderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase die Retention beeinflusst werden kann. Dieses bewirkt eine hohe Flexibilität des chromatographischen Systems, da die optische Auflösung dem jeweiligen Trennproblem optimal angepasst werden kann.

**Applikation**

**Enantiomertrennung von N-Benzoyl-D,L-aminosäuren**

**Säule:** EC 150/4 RESOLVOSIL BSA-7  
**Eluent:** 50 mmol/L Phosphatpuffer, pH 6,5 + 1% 1-Propanol  
**Flussrate:** 0,70 mL/min  
**Detektion:** UV, 225 nm

**Peaks:**  
 1. Serin  
 2. Alanin  
 3. Phenylalanin



S. Allenmark et al. in „Affinity Chromatography and Biological Recognition“ (I. Chaiken, M. Wilchek and I. Parikh, eds.), Acad. Press New York (1983), 259–260

MN Appl. Nr. 105450

Weitere Anwendungsbeispiele für RESOLVOSIL Säulen finden Sie in unserer Applikationsdatenbank im Internet unter [www.mn-net.com/apps](http://www.mn-net.com/apps).

**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.

**Vorsäulen**

Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule sollten immer Vorsäulen verwendet werden. 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](http://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 Probe wird in der Regel im Eluenten gelöst. Wässrige Proben können direkt auf die Säule gegeben werden. Jedoch sollten sie vor der Aufgabe durch Verwendung eines Spritzenvorsatzfilter (z. B. CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PET, 0,45  $\mu$ m, 25 mm, REF 729220) gereinigt werden. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst klein gewählt werden. Eine gute Auflösung wird bei Probenkonzentrationen unter 0,2  $\mu$ mol pro Injektion erreicht.

**Eluent**

Die RESOLVOSIL BSA-7 Säule wird mit dem Eluenten 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol ausgeliefert. Sie kann mit wässrigen Puffersystemen im pH-Bereich von 5 bis 8 betrieben werden. Phosphat- und Boratpuffer sind besonders geeignet. Extreme pH-Werte (< 5 oder > 8) sollten vermieden werden. Retention und optische Auflösung können durch Änderung des pH-Wertes, der Pufferstärke (0,01–0,2 mol/L) und/oder der Oberflächenspannung durch kleine Mengen an 1-Propanol (0–5%) als Lösemittelzusatz beeinflusst werden. Bereits 1–2% 1-Propanol bewirken eine deutliche Reduzierung der Retention. Mehr als 5% sind nicht empfehlenswert. Der Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Retention lässt sich nicht allgemein vorhersagen. In gewissem Maße verhält sich die Säule wie eine RP-Phase, aber bitte beachten Sie, dass keine mobilen Phasen mit Acetonitril oder Methanol verwendet werden dürfen, da diese Lösemittel das Protein denaturieren. Die Eluenten sollten stets durch einen 0,2–0,45  $\mu$ m Membranfilter filtriert und entgast werden.

**Flussrate und Druck**

Die Flussrate (empfohlen: 0,5–1,5 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den Rückdruck begrenzt, der den Maximalwert von 300 bar nicht überschreiten sollte. 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**

Säulentemperaturen von 10–40 °C werden empfohlen. Sie sollten allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen, damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist. Durch Variation dieser Größe wird die Retentionszeit, der Rückdruck und insbesondere die Peakform beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

**Detektion**

Mit den Säulen können UV-, Fluoreszenz-, refraktometrische 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. Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

**Säulenaufbewahrung**

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol und die Kühlung im Kühlschrank empfohlen. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit ca. 10 Säulenvolumina des Lagereluenten und einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min.

**Behebung möglicher Fehler**

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

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
<b>Basislinien-Drift</b> · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren  frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthermostatisierung
<b>Breite Peaks</b> · Mischung und/oder Diffusion vor/hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
<b>Peaküberlagerung; zu schnelle Elution</b> zu schnelle Elution und/oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Elutionskraft des Eluenten zu hoch	entsprechenden Parameter optimieren  Eluentensystem optimieren
<b>Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung</b> Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Denaturierung des Proteins	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens niemals Acetonitril oder Methanol verwenden; Propanolzusatz unter 5% / Säulenaustausch
<b>Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck</b> Verunreinigung durch: · Belegung der Sorbensoberfläche mit organischen Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Proben · Denaturierung des Proteins	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung) niemals Acetonitril oder Methanol verwenden; Propanolzusatz unter 5% / Säulenaustausch
<b>Doppelpeaks (Totvolumen):</b> · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / Austausch der Verschraubungen pH-Stabilität der Säule beachten / Säulenaustausch

**Säulenregenerierung**

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

- 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  $\mu$ m Membran filtriert und entgast werden.
- Reinigen des Sorbens:** Zur Entfernung von Verunreinigungen und zur Regenerierung der Phase spülen Sie die Säule mit reinem Wasser bei einer Flussrate von 0,5 mL/min für ca. 4–5 h. Danach stellen Sie auf die ursprünglichen Arbeits- oder Lagerbedingungen um. Ein entsprechender Hinweis für die erfolgreiche Reinigung ist die Konstanz der Basislinie. Beim isokratischen Lauf mit konstanter Temperatur sollte innerhalb einer Laufzeit von 5 min nicht mehr als 2–3 mAU Drift beobachtet werden.
- Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Bestimmte organische Verunreinigungen lassen sich durch die beschriebenen Reinigungsmethoden nicht immer entfernen. Auch Totvolumen durch Kompression des Säulenbettes oder eine Denaturierung des Proteins lassen sich i. d. R. nicht beheben, so dass die Säule ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

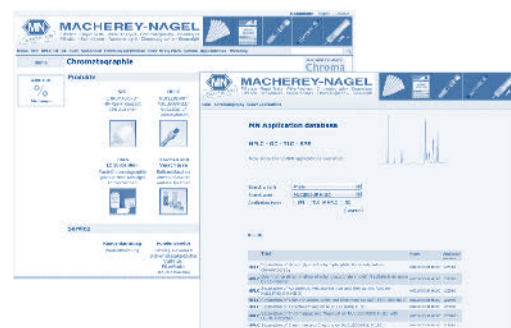
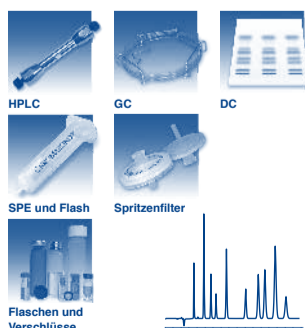
Länge [mm]	Innendurchmesser [mm]:	Säulenvolumen [mL]			
		2	3	4	4,6
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

**Zusammenfassung**

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

- Als Eluenten werden wässrige Puffersysteme im pH-Bereich von 5 bis 8 empfohlen (z. B. Phosphat- und Boratpuffer). Der Zusatz von bis zu 5% 1-Propanol ist möglich. Niemals dürfen Zusätze von Acetonitril oder Methanol verwendet werden! Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45  $\mu$ m Membran filtriert und entgast werden.
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45  $\mu$ m CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PET Spritzenfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate beträgt 0,5–1,5 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 300 bar bleibt.
- Lagern Sie die Säule in 0,1 mol/L Phosphatpuffer, pH 7,5 + 2% 1-Propanol in einem Kühlschrank.
- Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p. A. Qualität und Lösemittel 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](http://www.mn-net.com/apps)