****

**ICS-6000 – HPAEC-PAD**

**Método para separação, determinação e quantificação de Monossacarídeos.**

Neste método, monossacarídeos são separados e quantificados por cromatografia de troca iônica (HPAEC). Os açúcares são eluídos isocráticamente em uma fase móvel de 30 mM NaOH. Após a separação os açúcares são detectados usando Amperometria Pulsada (PAD).

*Este método não foi idealizado para servir de um passo por passo de como analisar suas amostras e como operar o equipamento, uma vez que o usuário não terá contato com o mesmo sem treinamento prévio.*

**Equipamento**

Bomba Analítica: ICS-6000 Dionex Dual Pump, SP-6 module, de Thermo Scientific.

Amostrador: Dionex AS-AP, de Thermo Scientific. Temperatura de Operação: 10.

Detector: Dionex DC, Detector Chromatography Module com controle de temperatura de coluna e detector, Thermo Scientific.

Software: Chromeleon7, version 7.2.5.9507, Thermo Fisher Scientific.

**Separação**

Coluna: Dionex Analytical Column, CarboPac PA1, 2 x 250mm, from Thermo Scientific

Pré-coluna: Dionex Guard column, CarboPac PA1, 2 x 50mm, from Thermo Scientific.

Material: Anion exchange.

Temperatura da coluna: 30°C.

pH: 11/12.

**Solventes**

**Sistema 2 - Bomba A-Solvente: 200 mM NaOH**

Receita para 2L

*Pese 32 g de 50% NaOH Sigma em um béquer de vidro 2L. Aspire o conteúdo do frasco de NaOH usando uma pipeta de plástico descartável posicionando a pipeta no meio do frasco para evitar carbonatação do NaOH. Use a balança disponível para pesar. Complete o béquer com Água Mili-Q até 2 kg. Deixe agitar no agitador magnético por 5 minutos usando um peixinho. Transfira o conteúdo para os frascos de plástico do Dionex e, deaere em banho de ultrassom por 20 minutos antes do uso.*

**Sistema 2 - Bomba B-Solvente: Água Mili-Q**

*Preencha o conteúdo do frasco de plástico do Dionex com 2L de Água Mili-Q e deaere por 20 minutos antes de uso.*

**Eluição Isocrática**

Método: Monossacarídeos 30 mM NaOH

Tempo (min): 30

Flow (ml/min): 0.25

% A – 15% NaOH 200 mM

% B – 85% Água Mili-Q



**Preparação das Amostras**

A concentração máxima de açucares nas suas amostras não deve ultrapassar 0.015 g/L. Realize uma análise prévia usando método do DNS\* (Miller, G.L. 1959). Faça suas diluições conforme necessário. Filtre suas amostras usando filtro de 0.45 μm ou 0.22 µm (Thermo Scientific™ Titan3™ Nylon Syringe Filters 4 mm) e coloque nos vials plásticos do tipo: VIAL KIT, 1,5 ML POLYPROPYLENE WITH CAPS ANS SEPTA, PKG OF 100. P/N 079812

O volume máximo de injeção é de 5 µL.

*\*Em um tubo ou placa de 96 poços pipete 10 µL de sua amostra e complete com 90 µL de Água Mili-Q. Adicione 100 µL da solução de DNS e aqueça a solução a 100 ºC por 5 minutos. Leia a absorbância a 595 nm. Use uma solução de glicose a 0.012 g/L como referência. Se sua amostra apresentar uma absorbância maior que a da sua referência, aumente a diluição da sua amostra.*

**Calibração com curva padrão**

Padrões de Arabinose, Glicose, Xilose e Celobiose Sigma.

Concentração da solução mestre: 4 g/L. Usar essa solução de 4 g/L para fazer uma solução de 1 g/L contendo os 4 açucares juntos. Usar essa solução de 1 g/L para pipetar as diluições da sua curva padrão. Sugestão de concentrações: Max 0.015 g/L – level 6; 0.0125 g/L – level 5; 0.010 g/L – level 4; 0.008 g/L – level 4; 0.006 g/L – level 3; 0.004 g/L – level 2; 0.002 g/L – level 1.

**Detecção**

Amperometria Pulsada usando eletrodo de ouro. Modo de potencial positivo para carboidratos: Carbo, Quad, Gold.