NUCLEOSIL® Carbohydrate

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 NUCLEOSIL® Carbohydrate haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL® erworben. Diese Säule ist speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Aufgrund der chemischen Natur der Phase ist die Standzeit von den durchgeführten Messungen und der Behandlung der Säule nach abgeschlossener Messung bestimmt. Hierzu sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanweisung vertraut machen. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Dieses Produkt kann zur Trennung von Mono-, Di- und Trisacchariden und ihrer quantitativen Bestimmung 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 Mobilphasensysteme (z. B. Acetonitril oder Methanol) 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.

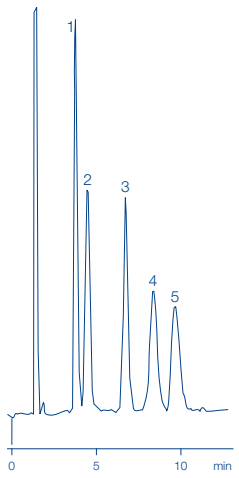
Beschreibung der Säule
Als stationäre Phase enthält die NUCLEOSIL® Carbohydrate Säule eine nach einem speziellen Verfahren modifizierte Aminophase auf Basis von sphärischem Kieselgel. Diese Säule wird fast ausschließlich unter wässrig-organischen Eluentenbedingungen eingesetzt. Die Auftrennung erfolgt durch polare Wechselwirkungen mit der stationären Phase, wahrscheinlich unter Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen. Speziell für Reversed-Phase Anwendungen wie der Bestimmung von Zuckern wird die Säule mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (79:21, v/v) ausgeliefert.

Applikation
Die schnelle Auftrennung von Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose und Lactose zeigt die untere Abbildung. Derartige Trennungen werden häufig bei der Qualitätskontrolle von Honig, Schokolade oder Eiscreme benötigt.

Trennung von Zuckern

Säule: EC 250/4 NUCLEOSIL® Carbohydrate
REF 720905.40
Eluent: Acetonitril – Wasser (79:21, v/v)
Flussrate: 2 mL/min
Temperatur: 25 °C
Detektion: RI
Injektion: 10 µL

Peaks:
1. Fructose
2. Glucose
3. Saccharose
4. Maltose
5. Lactose



MN Appl. Nr. 102480

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*** 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 und vor der Aufgabe auf die Säule durch die Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters (z. B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) gereinigt. 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.

Eluent
Die NUCLEOSIL® Carbohydrate Säulen werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (79:21, v/v) ausgeliefert. Mit dieser Eluentenzusammensetzung können wichtige Zucker isokratisch bestimmt werden (siehe Applikation). Für weitere Anwendungen kann die Zusammensetzung des organisch-wässrigen Eluenten verändert werden. Auch sind Anwendungen im Gradientenmodus möglich. So lassen sich beispielsweise längerkettige Oligosaccaride durch einen Eluenten mit steigendem wässrigen Anteil auftrennen. In bestimmten Fällen verbessert die Verwendung eines Puffers (z. B. 10 mmol/L Tris-Phosphat, Na-Citrat, Na-Acetat) durch Einstellung eines optimalen pH-Wertes die Auftrennung. Auch die Verwendung von geringen Konzentrationen organischer Amine (0,01 – 0,1 %) kann zur Verbesserung der Auftrennung führen. Ein pH-Wert unter 2 oder über 9 sollte stets vermieden werden. Stark saure oder basische Bedingungen können zur Auflösung des Säulenbettes oder zur Abtrennung der organischen Modifizierung führen. Der Gehalt an Puffersalzen sollte so niedrig wie möglich sein. Beachten Sie die Löslichkeitsgrenze des Puffers im Eluenten. Die Steigerung des organischen Anteils kann zur Ausfällung von Puffersalzen und Verstopfung der Säule führen. Vor Inbetriebnahme mit pufferhaltigem Eluent sollte zunächst mit mind. 10 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser (25:75, v/v) vorkonditioniert werden. In Abhängigkeit des pH-Wertes des Eluents kann die NH_2-Gruppe protoniert werden und als schwacher Anionentauscher wirken, der das Retentionsverhalten verändert. Puffersalze mit voluminöser Molekülstruktur wie bei Phosphat können ionische Wechselwirkungen ausbilden, die die polare NH_2-Gruppe abschirmen und zu einer Retentionsverschiebung führen. Stets nach Abschluss von Messungen mit pufferhaltigen Eluenten und beim möglichen Auftreten von Retentionsverschiebungen nach dieser Anwendung sollte die Säule regeneriert werden (siehe Säulenregenierung). Ein Umspülen auf Normalphasen-Modus wird nicht empfohlen und sollte, wenn überhaupt, nur über Zwischenspülung mit THF erfolgen. Die Eluenten sollten stets durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden.

Flussrate und Druck
Die Flussrate (empfohlen für analytische Säulen mit 2–4.6 mm ID: 0,2–2,0 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den Rückdruck begrenzt, der den Maximalwert von 400 bar nicht überschreiten sollte. Methanol – Wasser Gemische durchlaufen bei ca. 40 % Methanolanteil ein Viskositätsmaximum. Änderungen der Eluentenzusammensetzung sollten daher bei niedriger Flussrate 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
Säulentemperaturen bis zu 60 °C sind geeignet; für eine lange Lebensdauer werden 30–40 °C 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 spektralphotometrische, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt 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 Acetonitril – Wasser (79:21, v/v) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten (siehe Regenerierung). Auch Methanol empfiehlt sich aufgrund möglicher Verunreinigung mit Metallionen (z. B. Eisen(III)) nicht für eine längere Lagerung. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlussschrauben 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 Probenvorbehandlung 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	längeres bzw. besseres Equilibrieren
· verunreinigter Eluent	frische Lösemittel und Reagenzien verwenden
· Temperatur	Säulenthermostatisierung
Breite Peaks	
· Mischung und / oder Diffusion vor / hinter der Säule	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten
· zu großes Probenvolumen	geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution	
zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch:	
· nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate	entsprechenden Parameter optimieren
· Elutionskraft des Eluenten zu hoch	Eluentensystem optimieren
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	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens
· Ausfall von Puffersalzen	Löslichkeit der Puffersalze zuvor prüfen / Entfernen durch Spülung (siehe Säulenregenerierung)
Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck	
Verunreinigung mit:	
· Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Sorbensoberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung)
Protonierung der NH_2-Gruppe durch:	
· Verwendung saurer Puffer als Eluent	Deprotonieren durch Spülen mit schwach basischen Lösungen (siehe Säulenregenerierung)
Doppelpeaks (Totvolumen):	
· fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben)	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 oder REF 718778 / Austausch der Verschraubungen
· Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	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.
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: Zur Entfernung von Verunreinigungen spülen Sie die Säule mit mind. 10 Säulenvolumina (siehe Tabelle unten) bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt:
   · Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers
   · 100 % Methanol um polare organische Verbindungen zu entfernen
   · 100 % Acetonitril um mittelpolare organische Verbindungen zu entfernen (evtl. T= 40 °C)
   · 100 % Tetrahydrofuran um unpolare organische Verbindungen zu entfernen
   · Ggf. mit 100 % Tetrahydrofuran in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
   · Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit Acetonitril – Wasser (79:21, v/v) auf Lagerbedingung umstellen
   Ein entsprechender Hinweis für die erfolgreiche Reinigung ist die Konstanz der Basislinie. Beim isokratischen Lauf mit konstanter Temperatur sollte innerhalb einer Laufzeit von 5 Minuten nicht mehr als 2–3 mAU Drift beobachtet werden.
3. Regenerierung: Nach Abschluss einer Messreihe und bei einer möglichen Retentionsverschiebung nach der Anwendung von Puffern, spülen Sie wie folgt (30–50 min/Schritt, Flussrate von max. 1 mL/min):
   · Acetonitril – 20 mmol Ammoniumacetat oder -formiat, pH 8–8,5 (95:5, v/v)
   · Acetonitril – Wasser (10:90, v/v)
   · schrittweise um 20 % den Anteil an Acetonitril auf die Lagerbedingungen erhöhen
4. 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 lässt 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.

1 Säulenvolumen (250 mm Länge x 4 mm ID Säule) ≙ 3,15 mL

Zusammenfassung
Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:
1. Als Eluenten werden organisch-wässrige Eluentensysteme empfohlen (z. B. Acetonitril – Wasser oder Puffer). 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 Spritzenfilter.
3. Verwenden Sie bei matrixbelasteten Proben eine Vorsäule.
4. Die empfohlene Flussrate für analytische Säulen (ID 2–4.6 mm) beträgt 0,2–2,0 mL/min.
5. Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 400 bar bleibt.
6. Lagern Sie die Säule in Acetonitril – Wasser (79:21, v/v).
7. Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p. A. Qualität und Lösemittel in HPLC-Qualität.

NUCLEOSIL Carbohydrate 0890.5 · A030803

Deutschland und International:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Deutschland
Tel.: +49 24 21 969-0
info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

Schweiz:
MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Schweiz
Tel.: +41 62 388 55 00
sales-ch@mn-net.com

Frankreich:
MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg · 67722 Hoerdt · Frankreich
Tel.: +33 388 68 22 68
sales-fr@mn-net.com

USA:
MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd., Suite 102 · Allentown, PA 18109 · USA
Tel.: +1 888 321 62 24 gebührenfrei
sales-us@mn-net.com

NUCLEOSIL® Carbohydrate

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column.
The NUCLEOSIL® Carbohydrate column is a quality product based on the robust silica NUCLEOSIL®. This column is specifically developed for HPLC analysis. Due to the chemical nature of the phase, the lifetime of the column highly depends on the measurement and the treatment after measurement. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this instruction leaflet. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. This product can be used for the separation of mono-, di- and trisaccharides and their quantitative determination. All HPLC columns must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) has to be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) must be adapted to the analytical task. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this leaflet, please call our service / technical support.

Table of contents

- Safety indication
- Description of the column
- Application note
- Installation
- Guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract

Safety indication
Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., acetonitrile, methanol) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and / or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

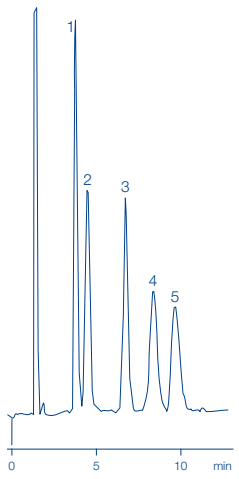
Description of the column
As stationary phase the NUCLEOSIL® Carbohydrate column contains an amino phase, based on spherical silica and modified by a special procedure. This column is almost exclusively operated under aqueous organic elution conditions. Separation is achieved by polar interactions with the stationary phase. Probably hydrogen bonding effects are involved. Especially for reversed phase applications like the determination of sugars the column is supplied with the eluent acetonitrile – water (79:21, v/v).

Application note
The figure below shows the rapid separation of fructose, glucose, saccharose, maltose and lactose. Such separations are often required for the quality control of honey, chocolate or ice cream.

Separation of sugars

Column: EC 250/4 NUCLEOSIL® Carbohydrate
REF 720905.40
Eluent: acetonitrile – water (79:21, v/v)
Flow rate: 2 mL/min
Temp.: 25 °C
Detection: RI
Injection: 10 µL

Peaks:
1. Fructose
2. Glucose
3. Saccharose
4. Maltose
5. Lactose



MN Appl. No. 102480

Installation
The column should be installed in the flow direction indicated on the column label. It is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments.

Guard columns
For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see ***www.mn-net.com*** or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and / or loss of performance is observed.

Sample
Sample solutions should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution.

Eluent
NUCLEOSIL® Carbohydrate columns are supplied with the eluent acetonitrile – water (79:21, v/v). Important sugars can be isocratically determined with this eluent composition (see application note). For further applications the composition of the organic aqueous eluent can be varied. A use in gradient mode is also possible. Thus, oligosaccarides with longer chains can be separated using a gradient with an increasing aqueous part. In certain cases addition of buffer (e.g., 10 mmol/L Tris-phosphate, Na citrate, Na acetate) improves the separation by adjustment to an optimum pH value. Also, small concentrations of organic amines (0.01 – 0.1 %) can enhance the separation. A pH value below 2 and above 9 should always be avoided. Strong acidic or basic conditions can result in dissolution of the column bed or the organic modification. The amount of buffer salts should be kept as low as possible. Note the solubility limit of the buffer in the eluent. An increase of the organic portion can result in precipitation of buffer salts and plugging of the column. Before start of operation with an eluent containing a buffer the column should be first preconditioned with a minimum of 10 column volumes acetonitrile – water (25:75, v/v). Furthermore, depending on the pH value of the eluent, the NH_2 group can be protonated. Therefore, it acts as a weak anion exchanger, which alters the retention behavior. Especially bulky buffer salts like phosphate can develop ionic interactions, thereby effectively shielding the polar NH_2 group. These phenomena lead to a retention time shift. After finishing measurements with buffer containing eluents, or if problems with a retention shift happen after this application, the column should be regenerated (see column regeneration). A changing to normal phase mode is not recommended. If necessary, it should only be made with an intermediate flushing step with THF. Eluents should be always filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed.

Flow rate and pressure
Flow rate (recommended for analytical columns with 2–4.6 mm ID: 0.2–2.0 mL/min) influences the required time, the resolution and the column lifetime. It is limited by the back pressure, which should not exceed the maximum of 400 bar. In mixtures of methanol and water viscosity reaches a maximum at about 40 % methanol. For this reason a reduced flow rate is recommended, when changing the eluent composition. We recommend controlling back pressure regularly. If a high pressure results from the use of the column at nominal flow rates, this usually indicates that some deposition of contaminants has occured on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

Temperature
Column temperatures up to 60 °C are possible; for a long lifetime 30–40 °C is recommended. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. Variation of the temperature influences retention times and the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

Detection
Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the column.

Equilibration
Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

Column storage
The original eluent acetonitrile – water (79:21, v/v) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended (see regeneration). Methanol is also not recommended for a longer storage, because of a possible impurity with metal ions (e.g., iron(III)). For column storage be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. Under these circumstances rinse the column with approx. 10 column volumes of the eluent of storage at a flow rate of max. 0.2 mL/min.

Troubleshooting
The following outline describes the symptoms of performance loss and their cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Columns based on silica are robust and hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks.
Use the outline below to help determine the cause of a possible performance loss:

Symptom / Error / Cause	Prevention / Remedy
Baseline drift	
· insufficient period for equilibration with the eluent	longer or better equilibration
· contaminated eluent	use freshly prepared solvents and reagents
· temperature	column temperature control
Broad peaks	
· mixing and / or diffusion before / behind the column	keep length and ID of capillaries at a minimum
· too large sample volume	smaller injection volume
Peak interference; too fast elution	
too fast elution and / or insufficient separation by:	
· improper column temperature or flow rate	optimize concerned parameter
· elution power of eluent is too high	optimize eluent system
Increasing back pressure; degradation of the separation performance	
contamination of sorbent by:	
· particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent beforehand check solubility of buffer salts / remove them by rinsing (see column regeneration)
· precipitation of buffer salts	
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure	
contamination with:	
· fats, oils, lipids from sample (coating of sorbent surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)
protonation of NH_2 group by:	
· usage of acidic buffers as eluent	deprotonation by rinsing with weakly basic solutions (see column regeneration)
Double peaks (dead volume)	
· faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)	use “PEEK Fingertight Fittings”, REF 718770 or REF 718778 / replace fittings
· dissolution of silica by too high pH value of eluent	consider pH range of column / replace column

Column regeneration
In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by regeneration of the phase. It is important, however, to locate the source of contamination before using the column for the analysis of samples again.
1. Prepare fresh eluent: Sometimes the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
2. Cleaning of sorbent: To remove contamination rinse the column with a minimum of 10 column volumes (see table below) at the original flow rate and temperature as follows:
   - acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
   - 100 % methanol to remove polar organic compounds
   - 100 % acetonitrile to remove medium polar organic compounds (possibly T= 40 °C)
   - 100 % tetrahydrofuran to remove nonpolar organic compounds
   - if necessary, 100 % tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
   - convert column to storage condition with acetonitrile – water (79:21, v/v) at original flow rate

   An adequate indicator for a clean column is a constant baseline. At constant temperature you should observe less than 2–3 mAU drift during a running time of 5 minutes with an isocratic run.
3. Regeneration: After finishing measurement and for a possible retention shift after the usage of buffer, rinse as follows (30–50 min/step, flow rate of max. 1 mL/min):
   - acetonitrile – 20 mmol/L ammonium acetate or formate, pH 8–8.5 (95:5, v/v)
   - acetonitrile – water (10:90, v/v)
   - gradually increase the part of acetonitrile in steps of 20 % to the storage conditions
4. Column replacement: The above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

1 column volume (250 mm length x 4 mm ID column) ≙ 3,15 mL

Abstract
To extend column lifetime, please keep in mind the following:
1. As eluents organic aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile – water or buffer) are recommended. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
2. Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
3. Use a guard column for samples with difficult matrices.
4. The recommended flow rate for analytical columns (ID 2–4.6 mm) is 0.2–2.0 mL/min.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below 400 bar.
6. Store the column in acetonitrile – water (79:21, v/v).
7. Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

NUCLEOSIL Carbohydrate 0890.5 · A030803

Germany and international:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

Switzerland:
MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
sales-ch@mn-net.com

France:
MACHEREY-NAGEL SARL à associé unique
1, rue Gutenberg · 67722 Hoerdt · France
Tel.: +33 388 68 22 68
sales-fr@mn-net.com

USA:
MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd., Suite 102 · Allentown, PA 18109 · USA
Tel.: +1 888 321 62 24
sales-us@mn-net.com