



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 Zuckerkohlensäuren 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 Umweltschutzrichtlinien 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 Zuckermanalytik anwenden. NUCLEOGEL® SUGAR 810 Ca eignet sich besonders für die Trennung von Mono-, Di- und Oligosacchariden sowie für Zuckerkohlensäuren und Alkohole, NUCLEOGEL® SUGAR Ca für Mono- und Oligosaccharide sowie Zuckerkohlensäuren, 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 Spritzenvorsatzfilter (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 Modifier, 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 Säulenzheizung 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 Zuckermanalytik 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 ChromaAppDB.mn-net.com.

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 Säulenthermostatisierung
Breite Peaks · Mischung und/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)
Doppelpeaks (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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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:

- Der empfohlene Eluent ist entmineralisiertes Wasser. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate beträgt 0,1–0,7 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulenrückdruck von 70 bar nicht überschritten wird.
- Wenn die Säule längere Zeit nicht benutzt wird, lagern Sie sie equilibriert mit entmineralisiertem Wasser.
- 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: www.mn-net.com/chromatographie



... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: ChromaAppDB.mn-net.com



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

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column.

NUCLEOGEL® SUGAR columns are quality products based on a polymer that requires special care. Introduction of organic solvents into the column except as described below will cause the polymer to swell resulting in column overpressure. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this manual. The columns are specifically developed for chromatographic high performance analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. Depending on modification these products can be used for separation and for a quantitative determination of mono-, di-, and oligosaccharides as well as sugar alcohols from food, biological samples and starch hydrolyzates. All HPLC separation columns must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and working methods of high performance liquid chromatography. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) must be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) have to 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 manual, please call our service / technical support.

Table of contents

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

Safety indication

Follow the general safety instructions for handling of the eluents used for column regeneration (e.g., acetonitrile) 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 NUCLEOGEL® SUGAR columns contains a sulfonated, spherical polystyrene/divinylbenzene polymer matrix (PS/DVB) in different forms (Ca²⁺, Pb²⁺, Na⁺). Depending on the ionic form the columns show different selectivities. Thus, they can be specifically used for sugar analysis. NUCLEOGEL® SUGAR 810 Ca is particularly suitable for separation of mono-, di- and oligosaccharides as well as for sugar alcohols and alcohols, NUCLEOGEL® SUGAR Ca for mono- and oligosaccharides as well as sugar alcohols, NUCLEOGEL® SUGAR Pb for mono- and disaccharides from food and biological samples and NUCLEOGEL® SUGAR Na for oligosaccharides from starch hydrolyzates and food. The SUGAR 810 Ca phase differs from SUGAR Ca by a different selectivity. Thus, the range of application is considerably enlarged. Separation mechanisms include hydrophobic interaction and steric exclusion from the polystyrene matrix, ligand exchange and partition effects, the ligand exchange being mostly the predominant force, since the hydrated metal ions form strong interactions with the hydroxyl groups of the sample molecules. Size exclusion phenomena are more important for higher oligomers.

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. They should be as short as possible to avoid dead volume.

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

The usually aqueous sample 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. Avoid introduction of fats, oils, proteinaceous materials and particulates into the column. These substances will ultimately cause an increase in operating pressure and may be difficult or impossible to remove. Furthermore, certain samples found in the food industry may contain organic matter that is soluble in the food sample, but not in the eluent. Build-up of these compounds can lead to a plugging and a column overpressure. Only in a few cases a regeneration (see column regeneration) can recreate the primary column efficiency. Impurities like salts and proteins change the retention behavior of the column. Hence, they must be removed from the samples before injection by an adequate sample preparation (e.g., protein precipitation). Numerous methods of sample purification can be found in the literature. Also a sample preparation by solid phase extraction with the SPE columns CHROMABOND® for example is usable for a removal of interfering compounds and matrix components.

The maximum injection volume, which can be applied on the column, must be empirically determined for a particular sample. Generally smaller sample volumes cause higher separation efficiencies. If the injection volume is too large, peaks can broaden or merge with nearby peaks. Thus, we recommend sample volumes in the 10 to 50 µL range.

Eluent

Bacteria-free, demineralized water is used as eluent, filtered with a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use. In order to avoid a loss of metal ions by ion exchange, you may add up to 10 mmol/L of the relevant metal salt (e.g., for SUGAR 810 Ca / SUGAR Ca: calcium chloride, SUGAR Pb: lead nitrate, SUGAR Na: sodium chloride). Other salts as well as acids, bases and organic modifiers, especially methanol and tetrahydrofuran are to be avoided. The eluents should always be prepared with demineralized water and analytical grade reagents, free of external metal ions.

Flow rate and pressure

It is good practice to limit flow rates such that the pressure does not exceed 70 bar. Typical flow rates are between 0.1–0.7 mL/min. Changes of the flow rate should be performed in small steps. 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 contaminants have become deposited on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

Temperature

Optimum temperatures for successful separations of sugars should be determined empirically. The temperature range is mostly between 50 and 90 °C. Thus, a column heating device is necessary. In general, higher column temperatures result in reduced sample retention, higher separation efficiency, and lower column pressure. Temperatures below 50 °C can be useful for some applications. In this case the flow rate should be adjusted such that the pressure does not exceed 70 bar.

Detection

Refractometric detectors are preferentially used in sugar analysis. But spectrophotometers, mass spectrometers and electrochemical detectors can be also used with the columns. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

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 column is supplied with demineralized water. This is also the recommended eluent for storage. When the column is stored, 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. If the column should be dried up, it results an increased back pressure under the general working conditions. Under these circumstances rinse the column with demineralized water at 90 °C with a flow rate of 0.3 mL/min. Gradually increase flow rate to 0.5 mL/min and observe that the maximum pressure of 70 bar will be not exceeded.

Application notes

Diverse application notes can be found under ChromaAppDB.mn-net.com.

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. Polymer columns 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 or usage of wrong, improper solvents. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment and application of the column 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 <ul style="list-style-type: none"> · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent · temperature 	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
Broad peaks <ul style="list-style-type: none"> · mixing and/or diffusion before/behind the column · too large sample volume 	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
Peak interference; too fast elution too fast elution and/or insufficient separation by: <ul style="list-style-type: none"> · improper column temperature or flow rate · presence of external cations in the eluent (e.g., K⁺ or H⁺) 	optimize concerned parameter use eluent free of external cations
Increasing back pressure; degradation of the separation performance contamination of sorbent by: <ul style="list-style-type: none"> · particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system · accumulation of proteinaceous material from microbial growth in sample or in eluent 	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent / rinse LC system, clean the sorbent (see column regeneration) keep sample cool, prepare fresh eluent / clean the sorbent (see column regeneration)
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure contamination with: <ul style="list-style-type: none"> · metal ion from LC system or sample · fats, oils, lipids from sample (coating of polymer surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices 	PEEK capillaries, remove metal ion from sample / regenerate column (see column regeneration) remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)
Double peaks (dead volume) <ul style="list-style-type: none"> · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts) · compression of column bed by too high flow rates and by usage of an improper organic modifier 	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 / replace fittings consider maximum flow rate and allowed eluent / expand the polymer bed (see column regeneration)

Column regeneration

In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by decompression of the polymer bed. It is important, however, to locate the source of contamination before again using the column for the analysis of samples.

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:** Set column temperature at 65 °C and pump a solution of water with max. 30 % acetonitrile with 0.1 mL/min through (inverted) column overnight. The pressure must not exceed 70 bar. Under circumstances a dark-colored eluate coming from the column can be observed at the column end. The next day, replace the mixture acetonitrile – water by water and continue pumping with 0.1 mL/min to determine if pressure has subsided. If pressure is lower, return column temperature to 90 °C and gradually increase eluent flow rate to 0.4 mL/min. Test the column under normal operating conditions. If the pressure has returned to normal status, but the performance remains inadequate, attempt to regenerate the column.
3. **Column regeneration:** Prepare the following solutions in reference to the column type:
 - SUGAR 810 Ca: saturated calcium chloride solution
 - SUGAR Ca: saturated calcium chloride solution
 - SUGAR Pb: 1 % aqueous solution of lead nitrate with 0.25 % EDTA
 - SUGAR Na: saturated sodium chloride solution
 Pump these through the (inverted) column at 90 °C with 0.1 mL/min. The pressure must not exceed 70 bar. Subsequently rinse with 10 column volumes water. Then operate the column in normal fashion. An initial minimal baseline drift should be rapidly stabilized by the equilibration step. If excessive drift is observed, operate column at 85 °C with deionized and degassed water until the baseline stabilizes.
4. **Decompression of polymer bed:** The polymer consists of compressible spherical particles. The particles are deformed by a back pressure above 70 bar. Thus, a compression of the column bed and a further increase of pressure results. To decompress the column bed, shut off the pump and allow the polymer to "relax" for about 30 min. Invert the column and pump the eluent through the column with 0.1 mL/min at 90 °C overnight. Then return the column to normal operating conditions.
5. **Column replacement:** The above procedures will restore performance only in certain cases. Under circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

1 column volume (300 mm length x 7.8 mm ID column) ≈ 14 mL

Abstract

To extend column lifetime, please keep in mind the following:

1. The recommended eluent is demineralized water. 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 contaminated samples.
4. The recommended flow rate is 0.1–0.7 mL/min.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of 70 bar.
6. When the column is not to be used for extended periods, store equilibrated in demineralized water.
7. Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Please check the full range of MACHEREY-NAGEL chromatography products: www.mn-net.com/chromatography



... for applicative support please visit our application database with more than 3000 chromatography applications: ChromaAppDB.mn-net.com