



NUCLEODEX®-Säulen

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit jeder NUCLEODEX® Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis unseres bewährten NUCLEOSIL® Kieselgels erworben, das besondere Sorgfalt erfordert. An dieses Kieselgel werden Cyclodextrinderivate kovalent gebunden. Diese gegen Hydrolyse unempfindlichen Sorbentien sind recht stabil. Dennoch sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanleitung vertraut machen. Durch falsche Handhabung erlischt die Produktgarantie. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Dieses Produkt kann zur Enantionentrennung zahlreicher Gemische und zur quantitativen Bestimmung der darin enthaltenen Komponenten 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 Säulen
- Installation
- Vorsäulenfilter und Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Anwendungsbeispiel
- 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 Kapillarenverbindungen. 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 Säulen

Die NUCLEODEX® Säulen enthalten gebundene Cyclodextrine mit freien (NUCLEODEX® β-OH) oder per-methylierten (NUCLEODEX® α-PM, β-PM, γ-PM) Hydroxygruppen. Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus Glucosemolekülen aufgebaut sind. Die räumliche Anordnung kann vereinfacht als Kegelstumpf beschrieben werden. α-, β- und γ-Cyclodextrin unterscheiden sich durch die Zahl der Glucosebausteine (6, 7 und 8) und somit in dem Durchmesser des Kegelstumpfes. Die beiden Öffnungen des Kegelstumpfes sind durch primäre und sekundäre Hydroxygruppen hydrophil, während der Innenraum lipophil ist. Unpolare Gruppen eines Analyten mit geeigneter Größe (z. B.: Phenyl- oder Naphthylsubstituenten) können in den Cyclodextrinkäfig eindringen und Inklusionskomplexe bilden. Weitere Wechselwirkungen (Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) des Analyten sind mit den Hydroxygruppen an den Öffnungen des Kegelstumpfes möglich. Die chiralen Zuckerbausteine der Cyclodextrine erlauben enantioselektive Wechselwirkungen und damit Racemattrennungen zahlreicher Substanzen.

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

Vorsäulenfilter und Vorsäulen

Zwischen Probeninjektor und Säule ist ein Vorsäulenfilter mit 0,5–2,0 µm porösen Edelmetallfritten empfehlenswert, um mögliche Partikel aus dem Eluentenstrom zu entfernen. Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule sollten NUCLEODEX® Säulen immer mit Vorsäulen verwendet werden. Die Filterelemente und das Sorbens der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Die entsprechenden Vorsäulen sind mit dem gleichen Sorbens gepackt. 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 Anfangseluenten 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 und 50 µL nicht überschreiten.

Eluent

Die Säulen werden mit Methanol – 0,1% Triethylammoniumacetat (TEAA) in Wasser, pH 4 (65/35, v/v) (NUCLEODEX® β- und γ-PM), Methanol – 0,1% TEAA in Wasser, pH 4 (55/45, v/v) (NUCLEODEX® β-OH) bzw. Methanol – 50 mmol/L Phosphat in Wasser, pH 3 (70/30, v/v) (NUCLEODEX® α-PM) ausgeliefert. Da sie üblicherweise unter Reversed Phase Bedingungen eingesetzt werden, eignen sich Methanol wie auch Acetonitril in Kombination mit Wasser oder Pufferlösungen. Die Wahl des organischen Anteils beeinflusst die Selektivität der Phase. Zur Pufferung des Eluenten empfehlen wir Phosphat- oder Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA; Triethylamin in Wasser vorlegen und den pH-Wert mit Eisessig einstellen). Bei der Pufferung des Eluenten ist die Löslichkeit der Salze bei der jeweiligen Zusammensetzung sicherzustellen. Der pH-Wert des Eluenten sollte zwischen 3 und 8 liegen. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.

Flussrate und Druck

Die Flussrate (empfohlen: 0,5–1,0 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den Rückdruck begrenzt, der einen Wert von 400 bar nicht überschreiten sollte. Bei Methanol – Wasser Eluenten hängt die Viskosität und damit der Rückdruck von der Zusammensetzung des Eluenten ab. Bei ca. 40% Methanol wird ein Viskositätsmaximum durchlaufen. Änderungen in der Eluentenzusammensetzung sollten daher bei einer niedrigen Flussrate (0,7 mL/min) durchgeführt werden. 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 müssen empirisch ermittelt werden, sollten aber zwischen 0 und 50 °C liegen. Sie sollten allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen, damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist. Mit steigender Temperatur sinkt die Retentionszeit; tiefe Temperaturen erhöhen in der Regel die Selektivität.

Detektion

Mit den NUCLEODEX® Säulen können spektralphotometrische, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Bei der Verwendung elektrochemischer Detektoren muss berücksichtigt werden, dass einige Arbeitselektroden keine erhöhten Temperaturen erlauben. 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.

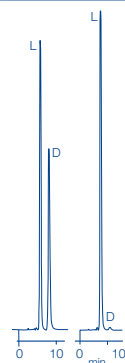
Säulenaufbewahrung

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent (s. Eluent) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit dem Lagereluenten und einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min.

Anwendungsbeispiel

Enantiotrennung von Dansyl-D,L-leucin

- Probe:** links: Racemat
rechts: 1% D- neben 99% L-Form
- Säule:** EC 200/4 NUCLEODEX® β-OH
REF 720124.40
- Eluent:** Methanol – 1% TEAA, pH 4,0
(65:35, v/v)
- Flussrate:** 0,7 mL/min
- Detektion:** UV, 254 nm



MN Appl. Nr. 115120

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
Basislinien-Drift · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatierung
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 · Elutionskraft des Eluenten zu hoch	entsprechenden Parameter optimieren 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 · Ausfall von Puffersalzen	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens 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)
Doppelpicks (Totvolumen): · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 oder REF 718778 / 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:** Ein Leistungsabfall wird nicht selten 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:** Zur Entfernung von Verunreinigungen spülen Sie die Säule mit mind. 10 Säulenvolumina 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 Methanol - Puffer (siehe Eluent) 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.
Nach der Anwendung von Puffern insbesondere bei anorganischen Salzen spülen Sie unmittelbar nach dem Abschluss der Messreihe und stets vor einer Lagerung der Säule mit mind. 10 Säulenvolumina bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt:
 - Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers
 - schrittweise um 20% den organischen Anteil auf die Bedingungen der neuen Messreihe erhöhen
 - oder schrittweise um 20% den Anteil an organischem Anteil auf die Lagerbedingungen erhöhen
- 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.

Zusammenfassung

- Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:
- Empfohlene Eluenten sind Gemische aus entmineralisiertem Wasser oder wässrigen Puffern (Phosphat- oder Triethylammoniumacetatpuffer, pH 3–8) mit organischem Modifiern (Methanol, Acetonitril). Diese 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 zum Schutz vor Verschmutzungen einen In-Line-Filter und/oder eine Vorsäule.
 - Die empfohlene Flussrate beträgt 0,5–1,0 mL/min.
 - Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck immer unter 400 bar bleibt.
 - Lagern Sie die Säule nach dem Entfernen von Puffersalzen in Methanol – 0,1% Triethylammoniumacetat in Wasser, pH 4 bzw. Methanol - 50 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat in Wasser, pH 4.
 - 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



NUCLEODEX® columns

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODEX® columns for enantiomeric separations are quality products packed with the established silica NUCLEOSIL®. To this, cyclodextrin derivatives are covalently bonded. Such bonded phases are hydrolytically stable. Nevertheless, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this manual. Improper use will invalidate the warranty. The columns are specifically developed for HPLC analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. HPLC columns are designed for qualitative and quantitative analysis of mixtures of substances and single components. They 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 manual, please call our service/technical support.

Table of contents

- Safety indication
- Description of the column
- Installation
- Precolumn filter and guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Application note
- 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

NUCLEODEX® columns contain bonded cyclodextrins with free (NUCLEODEX® β-OH) or permethylated (NUCLEODEX® α-PM, β-PM, γ-PM) hydroxy groups. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides, consisting of several glucose molecules. The cyclic structure of the cyclodextrin ring can be described as a truncated cone. α-, β- and γ-cyclodextrins contain an increasing number of glucose units (6, 7 and 8) and, therefore, the diameters of the truncated cones are different. Both open ends of the truncated cone are hydrophilic, due to the primary and secondary hydroxy groups, in contrast to the lipophilic inner surface of the cone. Therefore, non-polar analyte groups of a suitable size (e.g., phenyl or naphthyl substituents) can penetrate the cyclodextrin ring and form inclusion complexes. Furthermore, analytes can form hydrogen bonds and dipole interactions with the hydroxy groups at the edge of the truncated cone. The chiral glucose units of cyclodextrins allow enantioselective interactions and thus also racemate separations of numerous compounds.

Installation

Columns should be installed in the flow direction indicated on the column label. They are connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments.

Precolumn filter and guard columns

A precolumn filter containing 0.5–2.0 µm porosity stainless steel frits is recommended between sample injector and column to remove particulates from the eluent stream. For protection and an extension of column lifetime the columns should always be used with guard columns. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. The corresponding guard column is packed with the same sorbent. Connection of the guard column with the separation column is made using a suitable guard column holder (see www.mn-net.com or MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and / or loss of performance is observed.

Sample

Samples, generally dissolved in the starting eluent 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 and not exceed 50 µL to achieve an optimal resolution.

Eluent

Columns are supplied with methanol – 0.1% triethylammonium acetate (TEAA) in water, pH 4 (65/35, v/v) (NUCLEODEX® β- and γ-PM), with methanol – 0.1% TEAA in water, pH 4 (55/45, v/v) (NUCLEODEX® β-OH) and with methanol – 50 mmol/L phosphate in water, pH 3 (70/30, v/v) (NUCLEODEX® α-PM) respectively. They are normally operated under RP conditions. Both methanol and acetonitrile, in combination with water or buffer solutions are suitable mobile phases. The choice of organic modifiers will influence the selectivity. We recommend phosphate or triethylammonium acetate buffer (TEAA; triethylamine in water, pH value adjusted with acetic acid). When buffering the mobile phase, first establish the solubility of the salt in the mobile phase. The pH value should be between pH 3 and 8. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.

Flow rate and pressure

The flow rate (recommended: 0.5–1.0 mL/min) obviously defines the total time required for the separation, the resolution, and the shelf life of the column. The maximum permissible flow rate is dictated by the back pressure, which must not exceed 400 bar. In the case of a methanol – water eluent the viscosity and, therefore, the back pressure, depend on the composition of the eluent. With about 40% methanol maximum viscosity is reached. Thus, changes in the composition of the mobile phases should be carried out at a lower flow rate such as 0.7 mL/min. If a high pressure results from the use of the column at regular flow rates, this usually indicates contamination of the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

Temperature

Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically, but usually are between 0 and 50 °C. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. As the temperature increases, retention times decrease. Generally speaking lower temperatures increase the selectivity.

Detection

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the NUCLEODEX® columns. If electrochemical detectors are used, please note that high temperatures may be incompatible with some working electrodes. 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.

Column storage

The original eluent (s. eluent) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended. 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. In this case, first rinse the column with original eluent at a flow rate of max. 0.2 mL/min.

Application note

Enantiomer separation of dansyl-D,L-leucine

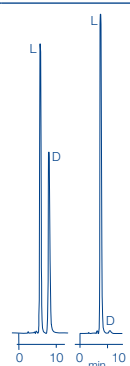
Sample: left: racemate
right: 1% D- besides 99% L-isomer

Column: EC 200/4 NUCLEODEX® β-OH
REF 720124.40

Eluent: methanol – 1% TEAA, pH 4.0
(65:35, v/v)

Flow rate: 0.7 mL/min

Detection: UV, 254 nm



MN Appl. No. 115120

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 / Repair
Baseline drift · 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 · 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: · improper column temperature or flow rate · elution power of eluent is too high	optimize concerned parameter 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 · precipitation of buffer salts	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent check solubility of buffer salts before / remove them by rinsing (see column regeneration)
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)
Double peaks (dead volume) · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts) · dissolution of silica by too high pH value of eluent	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings 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 again using the column for the analysis of samples.

1. **Prepare fresh eluent:** A performance loss is not seldom 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 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 using methanol – buffer (see eluent) 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.

After the usage of buffer, directly after finishing a measurement and always before storage of the column rinse with a minimum of 10 column volumes at the original flow rate and temperature as follows:

- acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
- increase the organic part in steps of 20% to the conditions of a new measurement run
- or gradually increase the organic part in steps of 20% to the storage conditions

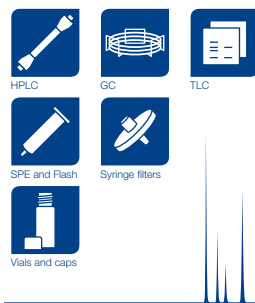
3. **Column replacement:** The above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

Abstract

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

1. Recommended eluents are mixtures of deionized water or aqueous buffers (phosphate or triethylammonium acetate buffer, pH 3–8) with organic modifiers (methanol, acetonitrile). They should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
2. Filter samples through a 0.2–0.45 µm syringe filter before injection.
3. Use an in-line filter and / or a guard column for protection against impurities.
4. The recommended flow rate is 0.5–1.0 mL/min.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below 400 bar.
6. Store the column in methanol – 0.1% triethylammonium acetate in water, pH 4 or methanol - 50 mmol/L sodium dihydrogenphosphate in water, pH 4, respectively, after removal of buffer salts.
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