



NUCLEOCEL DELTA

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 NUCLEOCEL DELTA, DELTA S, DELTA-RP oder DELTA-RP S haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis eines robusten Kieselgels erworben. Das Kieselgel ist mit einem chiralen Selektor, einem Cellulose-Derivat, belegt. Einige in der HPLC oder SPE übliche Lösemittel können den chiralen Selektor auflösen und somit die Säule schädigen. Daher sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanweisung, insbesondere mit den zulässigen Eluenten, vertraut machen. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Säulen wurden speziell für die chromatographische Trennung optischer Isomere entwickelt und können erfolgreich sowohl für optische Auflösung als auch zur Bestimmung der optischen Reinheit eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der analytischen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Analysensystems, also Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Analysenbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Aufgabenstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service/technische Produktberatung.

Inhaltsübersicht

- Sicherheitshinweise
- Beschreibung der Säule
- Installation
- Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Eluentensysteme (z. B. *n*-Heptan, Propanol, Acetonitril) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z. B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (insbesondere das Öffnen der Säule und Freilegen des Säulenbettes) Folgeschäden auftreten.

Beschreibung der Säule

Die stationäre Phase der NUCLEOCEL DELTA Säulen besteht aus sphärischem Kieselgel, das mit Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbam)at belegt ist. Die chirale Erkennung beruht auf der selektiven Wechselwirkung zwischen dem Cellulose-Derivat und den Analyten. Auch haben hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wechselwirkungen von polaren Gruppen und sterische Effekte Einfluss auf den Trennmechanismus. Die Säule lässt sich gut zur chiralen Analyse von pharmazeutisch aktiven Verbindungen, chiralen Umweltgiften (z. B. Herbizide, PCBs), chiralen Verbindungen in Lebensmitteln (Farbstoffe, Konservierungsstoffe), chiralen Katalysatoren und bioorganischen Verbindungen anwenden. Anwendungsbeispiele finden Sie in unserer Applikationsdatenbank im Internet unter www.mn-net.com/apps.

Ein bedeutender Vorteil der NUCLEOCEL DELTA Säulen ist, dass viele chirale Verbindungen direkt ohne eine Derivatisierung injiziert werden können. Die S-Versionen mit 5 µm Partikelgröße erlauben eine höhere Auflösung. Die Normalphasen DELTA und DELTA S können unmittelbar nach der Equilibrierung für NP-Anwendungen, die Reversed-Phasen DELTA-RP und DELTA-RP S für RP-Anwendungen eingesetzt werden. Ein Umspülen ist möglich, jedoch müssen unbedingt die Hinweise zum Umspülen (siehe Eluent) beachtet werden.

Installation

Spülen Sie vor einer Installation der NP-Säulen die gesamte HPLC-Anlage, einschließlich der Spritze und Proben-schleife mit *n*-Heptan – 2-Propanol (90:10, v/v) bzw. der RP-Säulen mit Acetonitril – Wasser (50:50, v/v). 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. Auf keinen Fall sollten Lösemittel für die Probe verwendet werden, die die Säule schädigen (siehe Eluent)! Falls trotz Filtration noch trübe Proben 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

Bitte beachten Sie, dass die folgenden Lösemittel niemals als mobile Phase oder als Probenlösemittel verwendet werden: Ether einschließlich Tetrahydrofuran und Dioxan, halogenierte Kohlenwasserstoffe (u. a. Dichlormethan, Chloroform), Keton (z. B. Aceton, Propanon, 2-Butanon), Ethylacetat, aromatische Kohlenwasserstoffe einschließlich Toluol und Xylol, Dimethylsulfid, Dimethylformamid, Dimethylacetamid

NP-Säulen: Eluent in der Säule ist *n*-Heptan – 2-Propanol (90:10, v/v). Als mobile Phasen im Normalphasen-Modus (NP) werden *n*-Heptan – 2-Propanol oder *n*-Heptan – Ethanol Mischungen eingesetzt. Statt *n*-Heptan kann auch *n*-Hexan verwendet werden. Bei der Analyse von basischen Verbindungen kann ein mögliches Tailing durch die Zugabe von 0,1 % Diethylamin, bei sauren Verbindungen durch 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) oder Essigsäure, verringert werden. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden.

Wenn Sie unter RP-Bedingungen arbeiten wollen empfehlen wir die DELTA-RP Säulen anzuwenden, die bereits einen RP-Eluenten enthalten (siehe RP-Säulen). Auch wenn ein Umspülen über eine Zwischenspülung mit 2-Propanol oder Ethanol möglich ist, wird die Lebensdauer und Trennqualität beeinflusst. MACHEREY-NAGEL schließt alle Garantiesprüche durch diese Behandlung aus.

RP-Säulen: Sie werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (40:60, v/v) ausgeliefert. Bei der Auswahl eines RP-Eluenten aus Acetonitril oder Methanol oder Ethanol mit reinem Wasser (filtriert und entgast) können Mischungsverhältnisse von 10:90 bis 100:0 (v/v) gewählt werden. Wenn ein Puffer verwendet werden soll, darf der organische Anteil nicht über 50 % eingestellt werden! Für basische Anayten können chaotrope Salze, wie 1 mol/L Natriumperchlorat zugegeben werden. Ein pH-Wert unter 1 oder über 9 sollte stets vermieden werden. Stark saure oder basische Bedingungen können zur Auflösung des Säulenbettes oder zur Abtrennung des chiralen Selektors führen. Der Gehalt an Puffersalzen sollte so niedrig wie möglich sein. Beachten Sie die Löslichkeitsgrenze des Puffers im Eluenten. Stets nach Abschluss von Messungen mit pufferhaltigen Eluenten sollte die Säule regeneriert werden (siehe Säulenregenerierung). Ein Umspülen auf NP-Modus wird nicht empfohlen und sollte, wenn überhaupt, nur über Zwischenspülung mit 2-Propanol oder Ethanol erfolgen. Da aber durch diese Behandlung alle Garantiesprüche ausgeschlossen sind, empfiehlt sich die Anwendung der NUCLEOCEL DELTA Normalphasen.

Flussrate und Druck

Die Flussrate (empfohlen: 0,1–1,0 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den Rückdruck begrenzt, der den Maximalwert von 150 bar nicht überschreiten sollte. Wir empfehlen den Rückdruck regelmäßig zu überprüfen. Wenn bei der Benutzung der Säule unter normalen Flussraten ein erhöhter Rückdruck resultiert, deutet dieses im Allgemeinen auf eine Verunreinigung des Packungsmaterials hin, die entfernt werden muss (siehe Behebung möglicher Fehler).

Temperatur

Säulentemperaturen von 0–40 °C werden empfohlen. Sie sollten allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen, damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist. Durch Variation dieser Größe wird die Retentionszeit, der Rückdruck und insbesondere die Peakform beeinflusst. Niedrige Temperaturen sind für Enantiomerentrennungen vorteilhaft.

Detektion

Mit den Säulen können UV-, Fluoreszenz-, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können Nachsäulenderivatisierungen mit einem geeigneten Detektor für die Reaktionsprodukte eingesetzt werden.

Equilibrierung

Bevor Proben gemessen werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden. Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

Säulenaufbewahrung

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent (siehe Eluent) bei Raumtemperatur empfohlen. Nach der Verwendung von Puffern und Zusätzen (z. B. Amine, TFA oder Perchlorate) müssen diese entfernt werden um Korrosionen an Edelstahlteilen zu vermeiden (siehe Säulenregenerierung). Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit ca. 10 Säulenvolumina des Lagereluenten und einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min.

Behebung möglicher Fehler

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

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
Basislinien-Drift • nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten • verunreinigter Eluent • Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatisierung
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 • Ablösung des Selektors	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens stets zulässige Eluenten verwenden / Säulenaustausch
Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck Verunreinigung durch: • Belegung der Sorbensoberfläche mit organischen Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Proben • Ablösung des Selektors	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung) stets zulässige Eluenten verwenden / Säulenaustausch
Doppelpeaks (Totvolumen): • fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) • Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / Austausch der Verschraubungen pH-Stabilität der Säule beachten / Säulenaustausch

Säulenregenerierung

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

- Frischen Eluenten zubereiten:** Manchmal wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Reinigen des Sorbens:** Zur Entfernung von Verunreinigungen bzw. von Pufferzusätzen bei RP-Säulen spülen Sie die Säule mit mind. 10 Säulenvolumina (siehe Tabelle unten) bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt.

NP-Säulen:

- 100 % Ethanol um polarere organische Verbindungen zu entfernen
- Ggf. in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
- Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit *n*-Heptan – 2-Propanol (90:10, v/v) auf Lagerbedingung umstellen

RP-Säulen:

- Acetonitril – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers (auch nach Abschluss einer Messreihe)
- Acetonitril – Wasser (90:10, v/v) um unpolarere organische Verbindungen zu entfernen
- Ggf. in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
- Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit Acetonitril – Wasser (40:60, 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.

- 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 ausgetauscht werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

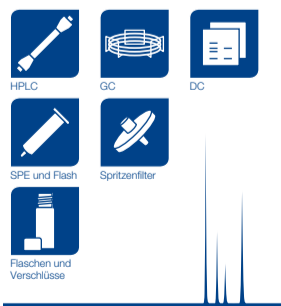
Länge [mm]	Innendurchmesser [mm]:	Säulenvolumen [mL]:
150	4,6	2,50
250	4,6	4,15

Zusammenfassung

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

- Als NP-Eluenten werden *n*-Heptan oder *n*-Hexan mit 2-Propanol oder Ethanol und als RP-Eluenten organisch-wässrige Eluentensysteme (z. B. Acetonitril – Wasser oder Puffer) empfohlen. 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 Spritzenfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate beträgt 0,1–1,0 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 150 bar bleibt.
- Lagern Sie die NP-Säule in *n*-Heptan – 2-Propanol (90:10, v/v) und die RP-Säule in Acetonitril – Wasser (40:60, v/v).
- Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p. A. Qualität und Lösemittel in HPLC-Qualität. Verwerfen Sie alle Lösungen, die Anzeichen von Bakterienwachstum zeigen.

Informieren Sie sich über alle MACHEREY-NAGEL Chromatographie-Produkte: www.mn-net.com/chromatographie



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

Frankreich:

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerd · Frankreich
Tel.: +33 388 68 22 68 · sales-fr@mn-net.com
MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée)
au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 ·
N° intracommunautaire FR04 379 859 531

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

Deutschland und International:

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner 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



NUCLEOCEL DELTA

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

NUCLEOCEL DELTA, DELTA S, DELTA-RP or DELTA-RP S columns are quality products based on robust silica. The silica is covered with a cellulose derivative as chiral selector. Several solvents which are common in HPLC or SPE may destroy the column by dissolving the chiral selector. 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 column has specifically been developed for the chromatographic separation of optical isomers and demonstrated to be a successful tool for optical resolution as well as for the determination of the enantiomeric purity. 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
- 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., n-heptane, propanol, 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

The stationary phase of the NUCLEOCEL DELTA columns is a spherical silica covered with cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate). Chiral recognition is based on the selective interaction between the cellulose derivative and the analytes. Also hydrophobic interaction as well as interaction from polar groups and sterical effects influence the separation mechanism. The column has proven useful for chiral analysis of pharmaceutically active compounds, chiral pollutants (e.g., herbicides, PCBs), chiral compounds in food (dyes, preservatives), chiral catalysts and bioorganic compounds. Application notes can be found in our application database on the internet under www.mn-net.com/apps.

Installation

Before an installation of NP columns, flush your whole HPLC system including syringe and sample loop with n-heptane – 2-propanol (90:10, v/v) or the RP columns with acetonitrile – water (50:50, v/v). The 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.

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

Generally, the sample is dissolved in the eluent. Before the injection of the sample onto the column the sample should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220). Never use solvents for samples, which damage the column (see eluent)! If injected samples 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

Please note! Never use the following solvents neither as mobile phase nor as solvent for your samples: Ethers including tetrahydrofuran and dioxane, halogenated hydrocarbons (e.g., dichloromethane, chloroform), ketones (e.g., acetone, propanone, 2-butanone), ethylacetate, aromatic hydrocarbons like toluene or xylene, dimethylsulfoxide, dimethylformamide, dimethylacetamide

NP columns: Eluent in the column is n-heptane – 2-propanol (90:10, v/v). As mobile phases in normal phase mode (NP) n-heptane – 2-propanol or n-heptane – ethanol mixtures are used. Instead of n-heptane, n-hexane can be used. For the analysis of basic compounds a possible tailing can be reduced by the addition of 0.1 % diethylamine and for acidic compounds by 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) or acetic acid. Eluents should always be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed.

If you want to work under RP conditions we recommend to use DELTA-RP columns which already contained an RP eluent (see RP columns). Although it is possible to switch the mobile phase via an intermediate flushing step with 2-propanol or ethanol the lifetime and separation performance will be affected. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties dealing with this kind of treatment.

RP columns: They are delivered with the eluent acetonitrile – water (40:60, v/v). For the selection of an RP eluent from acetonitrile or methanol or ethanol with pure water (filtered and degassed) can be adjusted a mixture ratio of 10:90 to 100:0 (v/v). If a buffer is used the organic part must not exceed about 50 %! For basic analytes chaotropic salts such as 1 mol/L sodium perchlorate may be used. Avoid always a pH value under 1 or about 9. Strong acidic or basic conditions can result in the dissolving of column bed or the removing of the chiral selector. The amount of buffer salts should be as low as possible. Note the solubility limit of the buffer in the eluent. Always after finishing measurements with buffer-containing eluents the column should be regenerated (see column regeneration). A changing to NP mode is not recommended. If necessary, it should only be made with an intermediate flushing step with 2-propanol or ethanol. Due to the exclusion of all warranties by this kind of treatment the use of NUCLEOCEL DELTA normal phases is recommended.

Flow rate and pressure

Flow rate (recommended: 0.1–1.0 mL/min) influences the time required, the resolution and the column lifetime. It is limited by the back pressure, which should not exceed the maximum of 150 bar. 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

Column temperatures from 0–40 °C are 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 especially the peak shape. Lower temperatures benefit enantiomer separations.

Detection

UV, fluorescence, refractometric and electrochemical detectors can be used with the column. 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 original eluent (see eluent) at room temperature is recommended for storage. After the use of buffers and additives (e.g., amines, TFA or perchlorates) remove these to prevent corrosive effects to the stainless steel parts (see column regeneration). 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 · 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 · removing of chiral selector	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent ever use allowed eluent / replace column
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure contamination by: · coating of sorbent surface with organic substances from improperly prepared eluent or samples · removing of chiral selector	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration) ever use allowed eluent / replace column
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 / 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 using the column for the analysis of samples again.

- Prepare fresh eluent:** Sometimes the performance loss is caused by 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.
- Cleaning of sorbent:** To remove contamination or buffer additives from RP columns rinse the column with a minimum of 10 column volumes (see table below) at the original flow rate and temperature as follows:

NP columns:

- 100 % ethanol to remove polar organic compounds
- if necessary, with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
- column is converted to storage condition with n-heptane – 2-propanol (90:10, v/v) at original flow rate

RP columns:

- acetonitrile – water (10:90, v/v) to remove the buffer (also after finish of measurement series)
- acetonitrile – water (90:10, v/v) to remove non polar organic compounds
- if necessary, with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
- column is converted to storage condition with acetonitrile – water (40:60, 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 min with an isocratic run.

- 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.

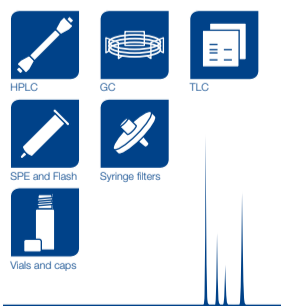
Length [mm]	Inner diameter [mm]:	Column volume [mL]:
150	4.6	2.50
250	4.6	4.15

Abstract

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

- As NP eluents n-heptane or n-hexane with 2-propanol or ethanol and as RP 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.
- Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
- Use a guard column for contaminated samples.
- The recommended flow rate is 0.1–1.0 mL/min.
- Adjust flow rate to keep column pressure below 150 bar.
- Store the NP column in n-heptane – 2-propanol (90:10, v/v) and the RP column in acetonitrile – water (40:60, v/v).
- 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