



NUCLEOSIL® CHIRAL-2 / CHIRAL-3

Bitte beachten:

Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit jeder NUCLEOSIL® CHIRAL-2 und NUCLEOSIL® CHIRAL-3 Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des bewährten, robusten Kieselgels NUCLEOSIL® erworben, an das als chiraler Selektor die D- bzw. L-Form von N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-phenylglycin kovalent gebunden wurde und das speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik für die Enantiomerenentrennung entwickelt wurde. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Dieses Produkt kann zur Trennung 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 Kapillerverbindungen. 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 Säulen NUCLEOSIL® CHIRAL-2 und CHIRAL-3 wurden zur Kontrolle der optischen Reinheit von Verbindungen unter Normalphasenbedingungen entwickelt. Sie finden vielfältigen Einsatz bei der Analyse von Stereoisomeren (Enantiomeren und Diastereomeren), zur Kontrolle der optischen Reinheit (z.B. Pflanzenschutzmittel, Pharmaka) und zur Prozess- und Produktkontrolle bei chiralen organischen Synthesen. Als chiraler Selektor wird N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-phenylglycin kovalent an NUCLEOSIL® Kieselgel gebunden. Die beiden Sorbentien unterscheiden sich nur in der Konfiguration des Chiralitätszentrums. CHIRAL-2 und CHIRAL-3 zeigen daher für ein Enantiomerenpaar gleiche Selektivität und chromatographische Auflösung, aber eine umgekehrte Elutionsreihenfolge der optischen Antipoden. Bei der Kontrolle der optischen Reinheit kann der Anwender somit durch entsprechende Wahl der Phase die Minderkomponente vor dem Produkt eluieren. Peaküberlagerungen werden dadurch vermieden.

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 Edelstahlfritten empfehlenswert, um mögliche Partikel aus dem Eluentenstrom zu entfernen. 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](http://www.mn-net.com) oder MN Chromatographie-Katalog). Ein Wechsel der Vorsäule ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendruckes und / oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

Probe

Die Probe wird in der Regel im Eluenten gelöst und vor der Aufgabe auf die Säule durch die Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters (z.B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) gereinigt. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst klein gewählt werden und 50 µL nicht überschreiten.

Eluent

Die Säulen werden im Normalphasen-Betrieb eingesetzt und daher mit einem Eluenten von n-Heptan – 2-Propanol – Trifluoressigsäure (100:0,05:0,05, v/v/v) ausgeliefert. Zur Trennung von Racematen werden unpolare organische Eluenten (n-Heptan, i-Octan) empfohlen. Die Retentionszeit kann durch Zusatz von polaren Verbindungen beeinflusst werden (z.B. Tetrahydrofuran, Alkohole, chlorierte Kohlenwasserstoffe u.ä.). Geringe Mengen einer starken Säure wie Trifluoressigsäure in dem Eluenten (bis 0,1 vol %) kann die Trennung der Enantiomeren wesentlich verbessern. Es sollte die pH-Stabilität von 2–8 beachtet werden. Auch Spuren von Wasser sollten vermieden werden. Es ist empfehlenswert die Eluenten durch eine 0,2–0,45 µm Membran zu filtrieren und zu entgasen.

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. 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

Temperaturen bis zu 60 °C sind für den Betrieb der Säulen geeignet. 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 und insbesondere die Peakform beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

Detektion

Mit den NUCLEOSIL® CHIRAL-2 und CHIRAL-3 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.

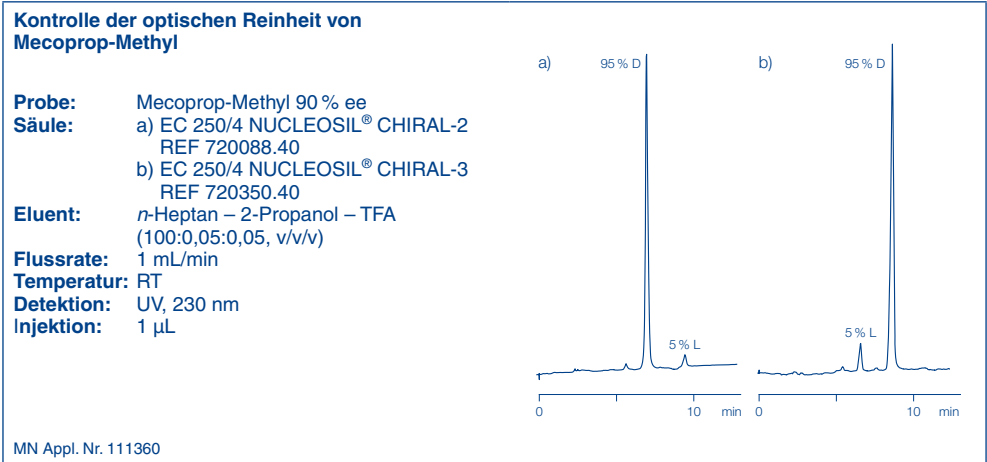
Equilibrierung

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 Verschluss-schrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann.

Anwendungsbeispiel



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. Alle NUCLEOSIL® CHIRAL-2 und alle NUCLEOSIL® CHIRAL-3 Säulen werden vor dem Versand sorgfältig getestet und mit einem Testchromatogramm ausgeliefert, das die Trennleistung der betreffenden Säule dokumentiert. Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

| Symptom / Fehler / Ursache                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Vorbeugung / Behebung                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Basislinien-Drift</b> <ul style="list-style-type: none"><li>· nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten</li><li>· verunreinigter Eluent</li><li>· Temperatur</li></ul>                                                                                                                    | <p>längeres bzw. besseres Equilibrieren</p> <p>frische Lösemittel und Reagenzien verwenden</p> <p>Säulenthermostatisierung</p>                                                                                                                   |
| <b>Breite Peaks</b> <ul style="list-style-type: none"><li>· Mischung und / oder Diffusion vor / hinter der Säule</li><li>· zu großes Probenvolumen</li></ul>                                                                                                                                                              | <p>Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten</p> <p>geringes Injektionsvolumen</p>                                                                                                                                                      |
| <b>Peaküberlagerung; zu schnelle Elution</b> <p>zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>· nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate</li><li>· Elutionskraft des Eluernten zu hoch</li></ul>                                                | <p>entsprechenden Parameter optimieren</p> <p>Eluentensystem optimieren</p>                                                                                                                                                                      |
| <b>Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung</b> <p>Verunreinigung des Sorbens durch:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>· Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System</li></ul>                                                             | <p>Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, Sorbens reinigen (s.Säulenregenerierung)</p>                                                                                  |
| <b>Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck</b> <p>Verunreinigung mit:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>· Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Sorbensoberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices</li></ul> | <p>organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / Sorbens reinigen (s.Säulenregenerierung)</p>                                                                                                                                       |
| <b>Doppelpicks (Totvolumen)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>· fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben)</li><li>· Kompression des Säulenbettes durch zu hohe Flussraten für den Eluenten</li><li>· Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten</li></ul>                   | <p>„PEEK Fingertight Fittings“ verwenden, REF 718770 oder REF 718778 / Verschraubungen austauschen</p> <p>maximale Flussrate und zulässige Eluenten beachten / Säule austauschen</p> <p>pH-Stabilität der Säule beachten / Säule austauschen</p> |

Säulenregenerierung

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

1. **Frischen Eluenten zubereiten:** In einigen Fällen wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. **Reinigen des Sorbens:** Zur Entfernung von Verunreinigungen werden 50 mL 2-Propanol mit einem Fluss von 0,1 mL/min durch die umgedrehte Säule gepumpt. Danach kehren Sie zum Ausgangseluenten mit der ursprünglichen Flussrichtung zurück.
3. **Regenerierung:** Durch Spülen der Säule mit n-Heptan – 2-Propanol – Trifluoressigsäure (100:0,05:0,05, v/v/v) bei einer Flussrate von 0,2 mL/min kann die Phase regeneriert werden.
4. **Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Bestimmte organische Verunreinigungen lassen sich durch die beschriebenen Reinigungsmethoden nicht immer entfernen, 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:

1. Als Eluenten werden unpolare organische Eluenten (n-Heptan, i-Octan) empfohlen. Polare Zusätze (z.B. Tetrahydrofuran, Alkohole, chlorierte Kohlenwasserstoffe u.ä.) und geringe Mengen an Säuren (z.B. Trifluoressigsäure) können beigegeben werden. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
3. Verwenden Sie zum Schutz von Verschmutzungen einen In-Line-Filter und / oder eine Vorsäule.
4. Die empfohlene Flussrate beträgt 0,5–1,0 mL/min.
5. Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 400 bar bleibt.
6. Lagern Sie die Säule in n-Heptan – 2-Propanol – Trifluoressigsäure (100:0,05:0,05, v/v/v).
7. 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](http://www.mn-net.com/chromatographie)



... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: [ChromaAppDB.mn-net.com](http://ChromaAppDB.mn-net.com)



NUCLEOSIL® CHIRAL-2 / CHIRAL-3

**Note:** All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEOSIL® CHIRAL-2 and CHIRAL-3 columns are quality products based on the robust silica NUCLEOSIL® with covalently bonded D or L configuration of N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-phenylglycine as chiral selector for enantiomeric separations. They 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

The columns NUCLEOSIL® CHIRAL-2 and CHIRAL-3 have been developed for control of optical purity of compounds under normal phase conditions. They are recommended for the analysis of stereoisomers (enantiomers and diastereomers), control of optical purity (e.g. plant protectives, pharmaceuticals) and for product control in chiral organic synthesis. As chiral selector *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-phenylglycine is covalently bonded to NUCLEOSIL® silica. Both adsorbents differ only in the configuration of the chiral selector. CHIRAL-2 and CHIRAL-3 thus feature, for any pair of enantiomers, equal selectivity and chromatographic resolution, but a reversed elution sequence of the optical antipodes. For control of optical purity the user now has the option to select conditions such that the minor component, which is present as an impurity, is eluted before the main peak. Thus, overlapping peaks are avoided.

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.

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. Connection of the guard column with the separation column is made using a suitable guard column holder (see [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) or MN chromatography catalog). Replacement of the guard column 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 used in Normal Phase mode. Therefore they are supplied with an eluent of n-heptane – 2-propanol – trifluoroacetic acid (100:0.05:0.05, v/v/v). For separation of enantiomers nonpolar organic eluents (n-heptane, *i*-octane) are recommended. Retention time can be influenced by adding polar organic compounds (e.g., tetrahydrofuran, alcohols, chlorinated hydrocarbons). Small amounts of a strong acid like trifluoroacetic acid in the eluent (up to 0.1 vol %) can considerably improve separation of enantiomers. Pay attention to the pH stability of 2–8 and avoid any traces of water. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.

Flow rate and pressure

Flow rate (recommended: 0.5–1.0 mL/min) influences the time needed, the resolution and the column lifetime. It is limited by the back pressure, which should not exceed 400 bar. 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

For operation of the columns temperatures up to 60 °C are possible. 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. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

Detection

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the NUCLEOSIL® CHIRAL-2 and CHIRAL-3 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.

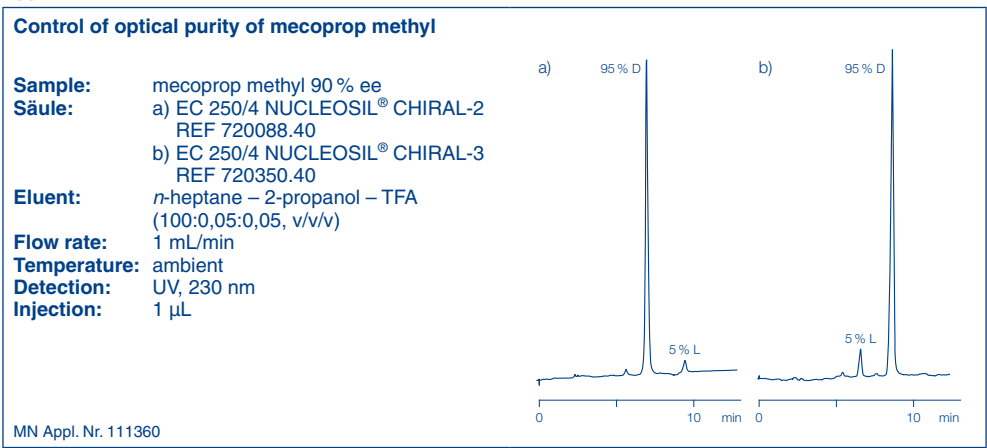
Equilibration

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 (see eluent) is recommended for storage. 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.

Application note



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. Use of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks. All NUCLEOSIL® CHIRAL-2 and NUCLEOSIL® CHIRAL-3 columns are thoroughly tested prior to shipment and are supplied with a sample chromatogram illustrating performance of that particular column.

Use the outline below to help determine the cause of a possible performance loss:

| Symptom / Error / Cause                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Prevention / Repair                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Baseline drift</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• insufficient period for equilibration with the eluent</li><li>• contaminated eluent</li><li>• temperature</li></ul>                                                                                                                               | longer or better equilibration<br>usage of freshly prepared solvents and buffers<br>column temperature control                                                                                    |
| <b>Broad peaks</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• mixing and /or diffusion before /behind the column</li><li>• too large sample volume</li></ul>                                                                                                                                                       | keep length and ID of capillaries at a minimum<br>smaller injection volume                                                                                                                        |
| <b>Peak interference; too fast elution</b><br>too fast elution and /or insufficient separation by: <ul style="list-style-type: none"><li>• improper column temperature or flow rate</li><li>• elution power of eluent is too high</li></ul>                                                                     | optimize concerned parameter<br>optimize eluent system                                                                                                                                            |
| <b>Increasing back pressure; degradation of the separation performance</b><br>contamination of sorbent by: <ul style="list-style-type: none"><li>• particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system</li></ul>                                                                      | prefilter of samples and eluent, use an in-line filter /<br>rinse LC system, clean the sorbent<br>(see column regeneration)                                                                       |
| <b>Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure</b><br>contamination with: <ul style="list-style-type: none"><li>• fats, oils, lipids from sample (coating of sorbent surface) and other organic substances from im-properly prepared eluent or matrices</li></ul>       | remove organic substances by sample preparation /<br>clean the sorbent (see column regeneration)                                                                                                  |
| <b>Double peaks (dead volume)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)</li></ul><br><ul style="list-style-type: none"><li>• compression of column bed by too high flow rate of eluent</li><li>• dissolution of silica by too high pH value of eluent</li></ul> | use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings<br>consider maximum flow rate and allowed eluent /<br>replace column<br>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. It is important, however, to locate the source of contamination before using the column for the analysis of samples again.

1. **Prepare fresh eluent:** In some cases the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
2. **Cleaning of sorbent:** To remove contamination 50 mL 2-propanol are pumped with a flow of 0.1 mL/min through the inverted column. Then return to the original eluent in the original flow direction.
3. **Regeneration:** By rinsing with n-heptane – 2-propanol – trifluoroacetic acid (100:0.05:0.05, v/v/v) at a flow rate of 0.2 mL/min the phase can be regenerated.
4. **Column replacement:** Above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. 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 nonpolar organic eluents (n-heptane, *i*-octane). Polar solvents (e.g., tetrahydrofuran, alcohols, chlorinated hydrocarbons) and small amounts of acids (e.g. trifluoroacetic acid) can be added. They 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 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 n-heptane – 2-propanol – trifluoroacetic acid (100:0.05:0.05, v/v/v).
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](http://www.mn-net.com/chromatography)



... for applicative support please visit our application database  
with more than 3000 chromatography applications: [ChromaAppDB.mn-net.com](http://ChromaAppDB.mn-net.com)