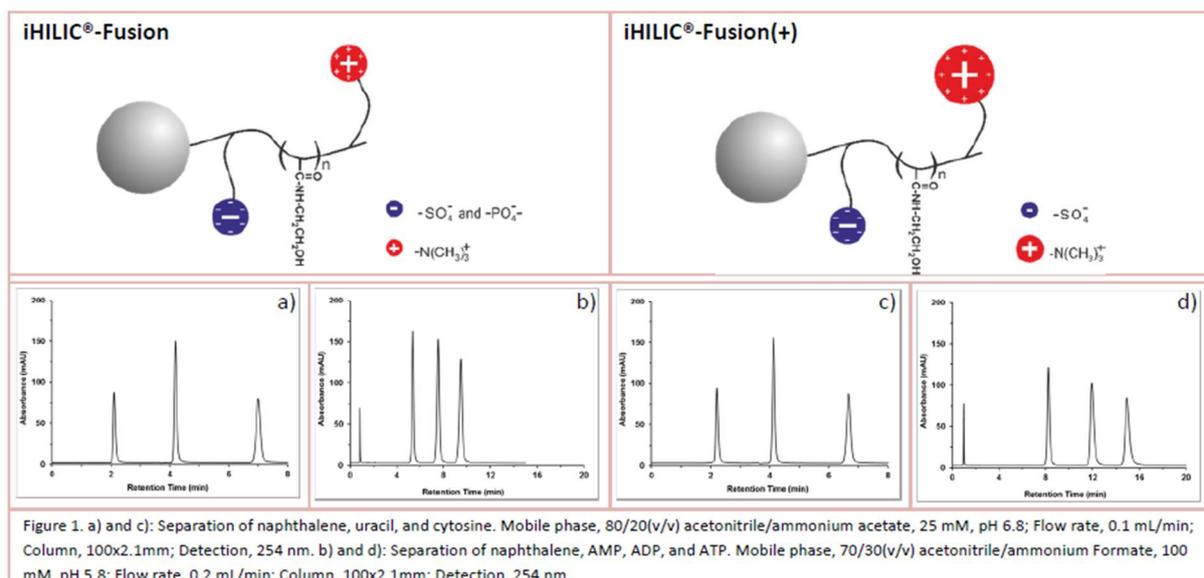


iHILIC®-Fusion and iHILIC®-Fusion(+)

Produktbeschreibung

iHILIC®-Säulen wurden für die Trennung und Aufreinigung von polaren oder hydrophilen Proben konzipiert. Zugrunde liegend ist die Methode der Hydrophilen Interaktions-Chromatografie (HILIC) wobei die stationäre Phase mit einer zwitterionischen Funktion derivatisiert ist.



Säulen

Die iHILIC®-Säulen sind sowohl in PEEK als auch in Edelstahl erhältlich. Die Endfitinge der Säulen haben Parker 10/32" UNF Gewinde.

PEEK ist besonders stabil gegenüber organischen Lösemitteln wie z.B. Acetonitril, außerdem gegenüber Ameisensäure oder Alkoholen, welche in der HILIC Chromatografie häufig verwendet werden. Hingegen sollten THF, Methylenchlorid und DMSO nicht mit PEEK-Säulen oder HPLC-Systemen mit PEEK Verbindungen eingesetzt werden, da diese dann aufquellen. Außerdem sollten keine Edelstahl Ferrule oder Fittings zusammen mit PEEK-Säulen verwendet werden, da das Metall gegebenenfalls in das PEEK einschneidet und damit deren Säuleneingangsgewinde beschädigt.

Die Silika-basierten iHILIC®-Säulen können in einem pH-Bereich von 2 bis 8 verwendet werden, wobei die maximale Einsatztemperatur beträgt 60°C beträgt.

Der maximale Rückdruck der Säulen ist:

- Bei PEEK-Säulen mit 3,5 und 5 µm Partikeln < 350 bar bei Raumtemperatur (RT)
- Bei Edelstahl HPLC-Säulen mit 3,5 µm Partikeln < 450 bar bei RT
- Bei Edelstahl UHPLC-Säulen mit 1,8 µm Partikeln < 650 bar bei RT

Lösemittel

Für Trennungen mit HILIC stellen Wasser und Pufferlösungen starke Eluenten und organische Lösungen schwächere dar. Das beste Lösemittel ist Acetonitril. Die relative Lösemittelstärke (solvent strength) ist wie folgt:

THF < Aceton < Acetonitril < Isopropanol < Ethanol < Methanol < Wasser

Ganz im Gegensatz zur Reversed Phase Chromatografie verlängert sich die Retention von polaren Substanzen bei Erhöhung des Anteils an organischem Lösemittel in der mobilen Phase.

Puffer und Lösungen

Lösungen von 2-50 mM Ammoniumformiat und Ammoniumacetat sind die besten Puffer für HILIC mit MS Detektion. Der pH-Wert der Lösungen kann durch Zugabe von Ameisensäure, Essigsäure oder Ammoniak angepasst werden. In mobilen HILIC-Phasen, die hohe Konzentrationen organischer Lösemittel enthalten, sollten Phosphatpuffer auf Grund der schlechteren Löslichkeit von Natrium, Kalium und Phosphat mit besonderer Vorsicht und in niedrigeren Konzentrationen verwendet werden. TFA und Ionenpaar-Reagenzien verändern die Selektivität einer Trennung mit HILIC und wirken oft störend bei der MS-Detektion. Daher gilt es diese eher zu vermeiden oder ganz bewusst einzusetzen, um die Polarität der Amine oder die Protonierung der Carboxylgruppen zu verringern (z.B. für die Isolierung von Glycopeptiden aus Peptidextrakten).

Proben

Eine Probenvorbereitung mit der mobilen Phase oder mit Lösungen mit ähnlicher Ionenstärke und ähnlicher Konzentration an organischen Lösemitteln ist sehr zu empfehlen. Damit kann die Peak-Schärfe deutlich verbessert werden und ein Tailing oder ein Zerteilen der Peaks lässt sich deutlich verringern. Je mehr organische Lösemittel in der Probenlösung sind, desto schärfer werden die Peaks durch Komprimierungseffekte.

Komplexe Proben wie Plasma oder Urin sollten mit einem hohen Anteil an organischen Lösemitteln behandelt werden, um Proteine und Salze auszufällen. Zum Filtern werden Spritzenfilter mit 0,45 oder 0,22 µm empfohlen, die mit organischen Lösemitteln kompatibel sind.

Recommended Starting Conditions for Method Development

	Isocratic Elution		Gradient Elution	
Mobile phase:	80/20 (v/v) Acetonitrile/5-100 mM ammonium acetate, pH6.8		A: Acetonitrile B: 5-100 mM Ammonium acetate, pH6.8 Gradient profile: 90% to 50% Acetonitrile in 20 minutes (~2%/ min)	
Column equilibration	-		4-10 minutes	
Column I.D.	1 mm	2.1 mm	3 mm	4.6 mm
Flow rate (mL/min)	0.05-0.1	0.2-0.5	0.4-1.0	1.0-2.5
Injection (µL)	0.1-1	0.5-10	0.1-20	2-50
Detector cell	Nano	Nano, semi-micro	Semi-micro, analytical	Semi-micro, analytical

Optimization of Flow Rate

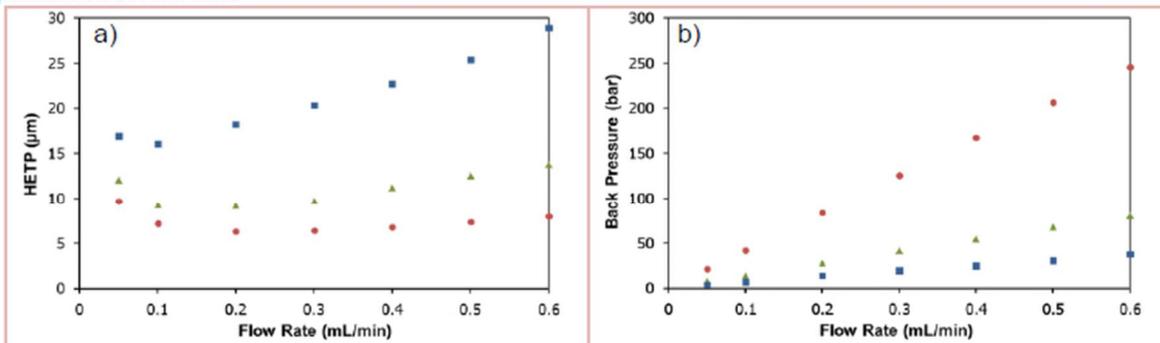


Figure 2. Flow rate versus column HETP a) and back pressure b). Mobile phase, 80/20(v/v) acetonitrile/ammonium Acetate, 25 mM, pH6.8; Sample, cytosine; Detection, 254 nm; iHILIC®-Fusion Columns, 50x2.1 mm with 1.8 µm (●), 3.5 µm (▲), and 5 µm (■) particles.

Column Protection

Um die Säulen zu schonen wird die Verwendung einer Vorsäule oder eines Filters empfohlen, falls mit sehr komplexen oder verschmutzten Proben wie Zelllysaten, Plasma oder Urin gearbeitet wird. Dadurch wird die analytische Säule vor Blockierungen durch Partikel geschützt und ihre Lebensdauer deutlich verlängert.

Säulenreinigung und –regeneration

Falls der Rückdruck der Säule ansteigt oder eine Verschiebung der Retentionszeiten zu erkennen ist, kann die folgende Methode zum Waschen der Säule helfen.

Die empfohlene Flussrate für die Reinigungsschritte liegt bei 0,1-0,4 ml/min für 2,1 mm Säulen und 0,5-2 ml/min für 4,6 mm Säulen. Während des Waschvorgangs sollte der maximale Rückdruck der Säule 150 bar nicht überschreiten.

1. 60 Minuten mit deionisiertem Wasser spülen
2. 60 Minuten mit 0,6 M Ammoniumacetat spülen
3. 60 Minuten mit deionisiertem Wasser spülen
4. 30 Minuten mit der mobilen Phase, die für die nächste Analyse benötigt wird, spülen

Falls diese Vorgehensweise nicht ausreicht um die Säule komplett wiederherzustellen, können die gleichen beschriebenen Waschschrte noch einmal mit der umgekehrt angeschlossenen Säule vorgenommen werden.

Aufbewahrung der Säule

Eine neue iHILIC[®] Säule wird in 80/20 (v/v) Acetonitril/25 mM Ammoniumacetat, pH=6,8 ausgeliefert. Diese Zusammensetzung wird auch für eine langfristige Aufbewahrung bei einer Temperatur niedriger als Raumtemperatur empfohlen. Die Verschlusskappen der Säule sollten fest angeschraubt werden.