



NUCLEODUR® NP-Säulen
NUCLEOSIL® NP-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 NUCLEODUR® NP-Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben; die NUCLEOSIL® NP-Säulen basieren auf dem bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL®. Diese Säulen sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Produkte können 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
 - Vorsäulen
 - Probe
- Eluent
 - Flussrate und Druck
 - Temperatur
 - Detektion
 - Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
 - Behebung möglicher Fehler
 - Säulenregenerierung
 - Zusammenfassung

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Mobilphasensysteme (z.B. *n*-Heptan) 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 Säulen

Als stationäre Phase enthält die Normalphasen-(NP)-Säule NUCLEODUR® SiOH unmodifiziertes, voll synthetisches, sphärisches Kieselgel (Typ B). Die NUCLEOSIL® NP-Säulen enthalten unmodifiziertes oder modifiziertes, sphärisches Kieselgel (Typ A).

NP-Phase	Modifizierung	Eigenschaft / Stabilität
NUCLEODUR®		
SiOH	unmodifiziert	polar, ionisch, pH 2–8
NUCLEOSIL®		
SiOH	unmodifiziert	polar, ionisch, pH 2–8
NO ₂	Nitrophenyl	polar, hydrophob, Selektivität für Aromaten (π-π-Wechselwirkungen), pH 2–8
OH	Diol	polar (Wasserstoffbrücken), pH 2–8
N(CH ₃) ₂	Dimethylamino	polar, hydrophob, schwacher Ionenaustausch, pH 2–8

Installation

Der Einbau der HPLC-Säulen sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Sie werden mit gerädetypischen 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. 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.

Eluent

Die NP-Säulen werden mit dem Eluenten *n*-Heptan ausgeliefert. Als mobile Phasen im Normalphasen-Modus (NP) werden *n*-Heptan, Hexan, Dichlormethan oder 2-Propanol eingesetzt. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden. Polare Additive (z.B. Wasser) im Eluenten sollten bei unmodifizierten NP-Phasen vermieden werden, da sie zu einer Veränderung der chromatographischen Trenneigenschaften führen können, die nicht oder nur schwer rückgängig gemacht werden können.

Sollte eine Anwendung der modifizierten NP-Phasen im Reversed-Phase-Modus (RP) notwendig werden, so muss zuvor mit 10 Säulenvolumina Tetrahydrofuran (THF) umgespült werden. Wird für den RP-Eluenten ein Pufferzusatz verwendet, so muss die Säule stets nach Abschluss der Messungen regeneriert werden (siehe Regenerierung). Auch die pH-Stabilität der jeweiligen Säule sollte berücksichtigt werden. Stark saure oder basische Bedingungen können zur Auflösung des Säulenbettes und zur Abtrennung der organischen Modifizierung führen.

Flussrate und Druck

Die Flussrate (empfohlen für analytische Säulen mit 2–4,6 mm ID: 0,2–2,0 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den maximalen Säulenrückdruck begrenzt, der die in der Tabelle dargestellten Grenzwerte nicht überschreiten sollte.

Maximaler Druck [bar]												
Kieselgel	ID [mm]:	2	3	4	4,6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1,8 µm		900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7 und ≥ 10 µm		600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 3, 5, 7 und ≥ 10 µm*		400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
* bei den Porenweiten 300 Å (300 bar), 500 Å (250 bar), 1000 Å und 4000 Å (200 bar) verringert sich der maximale Druck												

Beim Umspülen auf Eluenten mit einer höheren Viskosität als *n*-Heptan ist zu beachten, dass der Rückdruck ansteigen kann. Änderungen der Eluentenzusammensetzung sollten daher bei niedriger Flussrate durchgeführt werden (10–50% der normalen Flussrate in Abhängigkeit der Viskosität). 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 bis zu 60 °C sind geeignet; für eine lange Lebensdauer werden 30–40 °C 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. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

Detektion

Mit den Säulen können spektralphotometrische, massenspektrometrische, 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 *n*-Heptan empfohlen (Lagertemperatur: 15–30 °C). Auch ein inertes Lösemittel, wie *n*-Hexan oder Toluol ist möglich. Vermieden werden sollten polare Lösemittel (z.B. Wasser oder Eluenten mit wässrigem Anteil) oder Lösemittel mit einem Siedepunkt nur knapp oberhalb der Lagertemperatur (z.B. Diethylether, Tetrahydrofuran, Dichlormethan). Ebenfalls sollten die Säulen ohne Pufferzusätze gelagert werden. 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 Säulenthermostatisierung
Breite Peaks · Mischung und / oder Diffusion vor / hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · 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 (bei RP-Anwendung)	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:** 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 spülen Sie die Säule mit mind. 10 Säulenvolumina (siehe Tabelle unten) bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt:
 - 100 % Tetrahydrofuran um un- oder mittelpolare organische Verbindungen zu entfernen
 - Ggf. mit 100 % Tetrahydrofuran in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
 - Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit *n*-Heptan auf Lagerbedingung umstellenEin 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.
- Regenerierung (nur modifizierte Phasen im RP-Modus):** Nach der Anwendung von Puffern im RP-Modus, spülen Sie unmittelbar nach 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 RP-Bedingungen der neuen Messreihe erhöhen
 - oder zur Lagerung schrittweise um 20 % auf Acetonitril – Wasser (70:30, v/v) erhöhen (Soll wieder im NP-Modus gearbeitet werden, dann muß wieder mit THF umgespült 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 ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

		Säulenvolumen [mL]			
Länge [mm]	ID [mm]:	2	3	4	4,6
100		0,30	0,70	1,25	1,65
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

Zusammenfassung

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

- Als Eluenten werden unpolare Eluentensysteme empfohlen (z.B. *n*-Heptan, Hexan, Dichlormethan oder 2-Propanol). Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden. Bitte bei einer möglichen Verwendung von Puffern (RP-Modus) die Umspülung mit THF und die anschließende Regenerierung beachten!
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate für analytische Säulen (ID 2–4,6 mm) beträgt 0,2–2,0 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der maximale Rückdruck Ihrer Säule nicht überschritten wird.
- Lagern Sie die Säule nach NP-Anwendung in *n*-Heptan, nach RP-Anwendung in Acetonitril – Wasser (70:30, 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](#) oder kontaktieren Sie uns unter: support@mn-net.com



NUCLEODUR® NP columns
NUCLEOSIL® NP columns

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® NP columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®; NUCLEOSIL® NP columns are based on the robust silica NUCLEOSIL®. 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) must be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) have to be adapted to the analytical task. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this manual, please call our service /technical support.

Table of contents

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

Safety indication

Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., *n*-heptane) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and / or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

Description of the column

As stationary phase normal phase (NP) column NUCLEODUR® SiOH contains unmodified, fully synthetical spherical silica (type B). NUCLEOSIL® NP columns contain unmodified or modified spherical silica (type A).

NP phase	Modification	Property / Stability
NUCLEODUR®		
SiOH	unmodified	polar, ionic, pH 2–8
NUCLEOSIL®		
SiOH	unmodified	polar, ionic, pH 2–8
NO ₂	nitrophenyl	polar, hydrophobic, selectivity for aromatic compounds (π-π interactions), pH 2–8
OH	diol	polar (hydrogen bonds), pH 2–8
N(CH ₃) ₂	dimethylamino	polar, hydrophobic, weak ion exchange, pH 2–8

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.

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

Sample solutions 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 to achieve an optimal resolution.

Eluent

NP columns are supplied with the eluent *n*-heptane. In normal phase mode (NP) *n*-heptane, hexane, dichloromethane or 2-propanol can be used as mobile phase. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed. Polar additives (e.g., water) in the eluent should be avoided for the unmodified NP phases, because they can result in a change of chromatographic separation properties, which is difficult or impossible to reset.

If an application of the modified NP phases should be necessary in reversed phase mode (RP), they must be rinsed with 10 column volumes tetrahydrofuran (THF) before. If a buffer additive is used, the column must be always regenerated after use (see column regeneration). Please consider also the pH stability of the column used. Strong acidic or basic conditions can result in dissolution of the column bed or the organic modification.

Flow rate and pressure

Flow rate (recommended for analytical columns with 2–4.6 mm ID: 0.2–2.0 mL/min) influences the time required, the resolution and the column lifetime. It is limited by the maximum column back pressure, which should not exceed the limits listed in the table below.

Maximum pressure [bar]												
Silica	ID [mm]:	2	3	4	4.6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1.8 µm		900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7 and ≥ 10 µm		600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 3, 5, 7 und ≥ 10 µm*		400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
* for pore sizes of 300 Å (300 bar), 500 Å (250 bar), 1000 Å and 4000 Å (200 bar) maximum pressure is reduced												

Note, that for a changing to an eluent with higher viscosity than *n*-heptane, the back pressure can increase. Thus, a changing of the eluent composition should be performed at lower flow rate (10–50% of normal flow rate, in relation to the viscosity). 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 up to 60 °C are possible. For a long lifetime 30–40 °C is recommended. However, temperature 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, mass spectrometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

Equilibration

Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

Column storage

The original eluent (*n*-heptane) is recommended for storage (storage temperature: 15–30 °C). An inert solvent like *n*-hexane or toluene is also possible. Polar solvents (e.g., water or eluents containing water) or solvents with a boiling point only slightly above the storage temperature (e.g., diethyl ether, tetrahydrofuran, dichloromethane) should be avoided. The columns should be stored without buffer additives as well. 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 • precipitation of buffer salts (only for RP mode)	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent check solubility of buffer salts beforehand / 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 using the column for the analysis of samples again.

- Prepare fresh eluent:** Sometimes the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
- Cleaning of sorbent:** To remove contamination rinse the column with a minimum of 10 column volumes (see table below) at the original flow rate and temperature as follows:
 - 100 % tetrahydrofuran to remove non or medium polar organic compounds
 - if necessary, 100 % tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
 - convert column to storage condition with *n*-heptaneAn 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.
- Regeneration (only for modified phases in RP mode):** After the usage of buffer in RP mode, 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 for storage gradually increase the organic part in steps of 20 % to acetonitrile – water (70:30, v/v)(If the column is to be operated again in NP mode, then intermediate flushing with THF is necessary again!)
- 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.

Column volume [mL]					
Length [mm]	ID [mm]:	2	3	4	4.6
100		0.30	0.70	1.25	1.65
150		0.45	1.05	1.90	2.50
250		0.80	1.75	3.15	4.15

Abstract

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

- As eluents nonpolar eluent systems (e.g., *n*-heptane, hexane, dichloromethane or 2-propanol) are recommendable. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed. Please consider intermediate flushing with THF and subsequent regeneration after a possible usage of buffers (RP mode).
- 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 for analytical columns (ID 2–4.6 mm) is 0.2–2.0 mL/min.
- Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of your column.
- Store the column after NP application in *n*-heptane, after RP application in acetonitrile – water (70:30, 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 or contact us: support@mn-net.com



Columnas NUCLEODUR® NP
Columnas NUCLEOSIL® NP

Nota: Todas las columnas de HPLC de MACHEREY-NAGEL se suministran con un certificado que incluye las especificaciones y los resultados de prueba de la columna. Las columnas NUCLEODUR® NP son productos de alta calidad fabricados con sílice NUCLEODUR® de gran pureza y muy resistente a la presión; las columnas NUCLEOSIL® NP se fabrican con sílice NUCLEOSIL® muy resistente. Están especialmente diseñadas para el análisis por HPLC. Si se utiliza con cuidado y de forma adecuada, se pueden obtener excelentes resultados cromatográficos y una larga vida útil de la columna. Las columnas de HPLC están diseñadas para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de sustancias y de componentes individuales. Se deben utilizar exclusivamente de conformidad con las normas de laboratorio y los métodos de trabajo de HPLC universalmente aceptados. Antes de utilizar la columna, el operador debe revisar minuciosamente todo el sistema analítico (columna y equipo). Las condiciones cromatográficas (fase móvil, caudal, temperatura, etc.) se deben adaptar a la tarea analítica. MACHEREY-NAGEL no ofrece garantía alguna y no se responsabiliza del éxito de una separación o aplicación. Si tiene dudas tras leer este manual, llame a nuestro servicio técnico / de asistencia técnica.

Índice

- Indicación de seguridad
 - Descripción de la columna
 - Instalación
 - Columnas de protección
 - Muestra
- Eluyente
 - Caudal y presión
 - Temperatura
 - Detección
 - Equilibrado
- Almacenamiento de la columna
 - Resolución de problemas
 - Regeneración de la columna
 - Resumen

Indicación de seguridad

Observe las instrucciones de seguridad generales para la manipulación de disolventes de HPLC utilizados como fases móviles (p. ej., *n*-heptano) y tome las precauciones necesarias para evitar cualquier tipo de lesión o daño a la salud (p. ej., protección de la piel y los ojos en caso de rotura de los capilares). La eliminación de las columnas de HPLC usadas se debe realizar de conformidad con la normativa de protección medioambiental internacional, nacional y local. El uso de columnas de HPLC solo está permitido al personal cualificado en su ámbito de especialización. Mantenga las columnas de HPLC fuera del alcance de los niños. MACHEREY-NAGEL rechaza y excluye toda garantía de cualquier tipo o naturaleza, y MN no se responsabilizará de ningún daño (ya sea directo, indirecto, previsible, incidental, compensatorio, consecuente o especial), ya sea por garantía, contrato, responsabilidad civil extracontractual o responsabilidad objetiva, si se producen daños o pérdidas causados por un uso, mantenimiento, negligencia o tratamiento inadecuados (especialmente la apertura de la columna y la exposición del lecho de la columna).

Descripción de la columna

Como columna de fase normal (NP) NUCLEODUR® SiOH contiene sílice esférica sin modificar totalmente sintética (tipo B). Las columnas NUCLEOSIL® NP contienen sílice esférica sin modificar o modificada (tipo A).

Fase NP	Modificación	Propiedad / estabilidad
NUCLEODUR®		
SiOH	sin modificar	polar, iónico, pH 2–8
NUCLEOSIL®		
SiOH	sin modificar	polar, iónico, pH 2–8
NO ₂	nitrofenilo	polar, hidrófobo, selectividad por compuestos aromáticos (interacciones π-π), pH 2–8
OH	diol	polar (enlaces de hidrógeno), pH 2–8
N(CH ₃) ₂	dimetilamino	polar, hidrófobo, intercambio iónico débil, pH 2–8

Instalación

La columna se debe instalar en la dirección de flujo indicada en la etiqueta de la columna. Se conecta mediante capilares y racores de 1/16", típicos en los instrumentos de HPLC.

Columnas de protección

Para garantizar la protección y prolongar la vida útil de la columna, esta se debe utilizar siempre junto con una columna de protección. Los elementos de filtro y el adsorbente de la columna de protección retienen los contaminantes de la muestra o del eluyente. La conexión de la columna de protección con la columna de separación se establece mediante un soporte adecuado para la columna de protección (ver www.mn-net.com o el catálogo de cromatografía MN). Es necesario sustituir el cartucho cuando se observe un aumento de la presión de la columna o una pérdida de rendimiento.

Muestra

Las soluciones de muestra se deben hacer pasar a través de un filtro de jeringa (p. ej., CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) antes de introducirlas en la columna. Si las soluciones de muestra inyectadas siguen estando turbias incluso después de la filtración, la vida útil de la columna puede verse reducida de forma significativa. El volumen de la muestra debe ser lo más reducido posible para lograr una resolución óptima.

Eluyente

Las columnas NP se suministran con el eluyente *n*-heptano. En el modo de fase normal (NP), se puede utilizar *n*-heptano, hexano, diclorometano o 2-propanol como fase móvil. Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,2–0,45 µm y desgasificar. Para las fases NP no modificadas se deben evitar los aditivos polares (p. ej., agua) en el eluyente, ya que pueden provocar un cambio en las propiedades de separación cromatográfica que resulta difícil o imposible de revertir.

Si fuera necesario utilizar las fases NP modificadas en modo de fase inversa (RP), se deberán enjuagar previamente con 10 volúmenes de columna de tetrahidrofurano (THF). Si se utiliza un aditivo tampón, la columna siempre se deberá regenerar después del uso (ver «Regeneración de la columna»). Tenga en cuenta también la estabilidad del pH de la columna utilizada. Las condiciones de acidez o alcalinidad intensa pueden provocar la disolución del lecho de la columna o de la modificación orgánica.

Caudal y presión

El caudal (recomendado para columnas analíticas con un DI de 2–4,6 mm: 0.2–2.0 mL/min) influye en el tiempo necesario, la resolución y la vida útil de la columna. Está limitado por la contrapresión máxima de la columna, que no debe superar los límites indicados en la tabla siguiente.

		Presión máxima [bar]										
Sílice	DI [mm]:	2	3	4	4,6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1,8 µm		900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7 y ≥ 10 µm		600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEOSIL® 3, 5, 7 y ≥ 10 µm*		400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
* para tamaños de poro de 300 Å (300 bares), 500 Å (250 bares), 1000 Å y 4000 Å (200 bares), la presión máxima se reduce												

Tenga en cuenta que, al cambiar a un eluyente con una viscosidad superior a la del *n*-heptano, la contrapresión puede aumentar. Por lo tanto, el cambio de la composición del eluyente se debe realizar a un caudal menor (entre el 10 y el 50 % del caudal normal, en función de la viscosidad). Recomendamos comprobar la contrapresión periódicamente. Si se produce una presión elevada al utilizar la columna a caudales nominales, esto suele indicar que se han depositado algunos contaminantes en el material de relleno, por lo que es necesario eliminarlos (ver «Resolución de problemas»).

Temperatura

Son posibles temperaturas de columna de hasta 60 °C. Para una larga vida útil, se recomienda una temperatura de entre 30 y 40 °C. No obstante, la temperatura debe ser al menos 30 °C inferior a la temperatura de ebullición del eluyente, a fin de garantizar una detección adecuada. Las variaciones de temperatura influyen en los tiempos de retención y, sobre todo, en la forma de los picos. Las temperaturas óptimas para lograr separaciones satisfactorias se deben determinar de forma empírica.

Detección

Con las columnas se pueden utilizar espectrofotómetros, espectrómetros de masas, refractómetros y detectores electroquímicos. Si se requiere una mayor sensibilidad, se pueden utilizar derivatizaciones poscolumna con un detector adecuado para el producto de la reacción.

Equilibrado

Antes de analizar las muestras, la columna se debe enjuagar con el eluyente a la misma velocidad de flujo y la misma temperatura que las del método que se vaya a aplicar. La columna se habrá equilibrado cuando los valores de referencia del detector ya no presenten desviaciones (por lo general, tras 10 volúmenes de columna).

Almacenamiento de la columna

Se recomienda utilizar el eluyente original (*n*-heptano) para el almacenamiento (temperatura de almacenamiento: 15–30 °C). También se puede utilizar un disolvente inerte, como el *n*-hexano o el tolueno. Se deben evitar los disolventes polares (p. ej., agua o eluyentes que contengan agua) o los disolventes cuyo punto de ebullición sea solo ligeramente superior a la temperatura de almacenamiento (p. ej., éter dietílico, tetrahidrofurano o diclorometano). Las columnas también se deben almacenar sin aditivos tampón. Para el almacenamiento de la columna, asegúrese de que los racores estén herméticamente sellados con tapones para columna, ya que el almacenamiento sin estos puede provocar que el material de relleno se seque. En estas circunstancias, lave la columna con aprox. 10 volúmenes de columna del eluyente de conservación a un caudal máximo de 0,2 mL/min.

Resolución de problemas

En el siguiente resumen se describen los síntomas de la pérdida de rendimiento y sus causas. Todas las columnas están sujetas a la estricta regulación y control de nuestro sistema de garantía de calidad. Las columnas a base de sílice son resistentes y mantienen su eficacia de separación durante largos periodos de tiempo si se les aplica un mantenimiento y un tratamiento adecuados. Según la experiencia, los fallos en las columnas se deben principalmente a la entrada de contaminantes en el lecho de adsorbente. El uso de una columna de protección, así como un pretratamiento adecuado de la muestra, ayudarán a minimizar estos riesgos.

Utilice el esquema siguiente para determinar la causa de una posible pérdida de rendimiento:

Síntoma / error / causa	Prevención / solución
Desviación de los valores de referencia - tiempo insuficiente para el equilibrado con el eluyente - eluyente contaminado - temperatura	equilibrado más prolongado u optimizado utilizar disolventes y reactivos recién preparados control de la temperatura de la columna
Picos anchos - mezclado o difusión delante/detrás de la columna - volumen de muestra excesivo	mantener la longitud y el diámetro de los capilares al mínimo volumen de inyección menor
Interferencia en el pico; elución demasiado rápida elución demasiado rápida o una separación insuficiente debido a: - temperatura o caudal inadecuados de la columna - potencia de elución del eluyente excesiva	optimizar el parámetro en cuestión optimizar el sistema de eluyente
Aumento de la contrapresión; deterioro del rendimiento de separación contaminación del adsorbente por: - acumulación de partículas en el lecho de frita o de adsorbente procedentes de la muestra, eluyente o el sistema - precipitación de sales tampón (solo en modo RP)	preparar un eluyente fresco; prefiltrar las muestras y el eluyente, utilizar un filtro en línea / enjuagar el sistema de LC, limpiar el adsorbente comprobar la solubilidad de las sales tampón previamente / eliminarlas mediante enjuague (ver «Regeneración de la columna»)
Separación insuficiente; degradación de la separación a presión de columna normal contaminación por: grasas, aceites y lípidos de la muestra (recubrimiento de la superficie del adsorbente) y otras sustancias orgánicas procedentes de un eluyente o matrices preparados de forma inadecuada	eliminar las sustancias orgánicas mediante la preparación de la muestra / limpiar el adsorbente (ver «Regeneración de la columna»)
Picos dobles (volumen muerto) accesorios defectuosos (capilares, casquillos, tuercas)	utilizar los «racores PEEK de apriete manual», REF 718770 o REF 718778 / sustituir los racores tener en cuenta el intervalo de pH de la columna / sustituir la columna
disolución de la sílice debido a un pH demasiado alto del eluyente	

Regeneración de la columna

En algunos casos, el rendimiento de la columna se puede restablecer eliminando los contaminantes del lecho del adsorbente o mediante la regeneración de la fase. Sin embargo, es importante localizar el origen de la contaminación antes de volver a utilizar la columna para el análisis de muestras.

- Preparar un eluyente nuevo:** En algunos casos, la pérdida de rendimiento se debe a la contaminación del eluyente. Por lo tanto, prepare un eluyente nuevo y enjuague todos los conductos de líquido antes de volver a utilizar la columna. El eluyente se debe filtrar a través de una membrana de 0,2–0,45 µm y desgasificar antes del uso.
- Limpieza del adsorbente:** Para eliminar la contaminación, enjuague la columna con un mínimo de 10 volúmenes de columna (ver tabla siguiente) a la velocidad de flujo y la temperatura originales, de la siguiente manera:
 - Tetrahidrofurano al 100 % para eliminar compuestos orgánicos no polares o de polaridad media
 - En caso necesario, tetrahidrofurano al 100 % con sentido del flujo invertido a 1/5 del caudal original
 - Ajustar la columna a las condiciones de almacenamiento con *n*-heptanoUn indicador adecuado de que la columna está limpia es un valor de referencia constante. A temperatura constante, la deriva debería ser inferior a 2–3 MAU durante un tiempo de ejecución de 5 minutos con un ciclo isocrático.
- Regeneración (solo para fases modificadas en modo RP):** Tras el uso de tampón en modo RP, inmediatamente después de finalizar un análisis y siempre antes de guardar la columna, enjuáguela con un mínimo de 10 volúmenes de columna, con el caudal y la temperatura originales, de la siguiente manera:
 - acetonitrilo – agua o metanol – agua (10:90, v/v) para la eliminación del tampón
 - aumentar la proporción orgánica en pasos del 20 % hasta alcanzar las condiciones para una nueva serie de mediciones
 - o, para el almacenamiento, aumentar gradualmente la proporción de materia orgánica en pasos del 20 % a acetonitrilo-agua (70:30, v/v)(Si se va a volver a utilizar la columna en modo NP, ¡será necesario realizar de nuevo un lavado intermedio con THF!)
- Sustitución de la columna:** Los procedimientos anteriores solo permitirán restablecer el rendimiento en determinados casos. Algunos contaminantes orgánicos son especialmente resistentes y es posible que no respondan al tratamiento. Además, el volumen muerto, debido a la compresión de las columnas, no suele poder repararse. En estas circunstancias, es necesario sustituir la columna. Se recomienda encarecidamente localizar la causa del problema antes de instalar una nueva columna.

Volumen de columna [mL]					
Longitud [mm]	DI [mm]:	2	3	4	4,6
100		0,30	0,70	1,25	1,65
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

Resumen

Para prolongar la vida útil de la columna, tenga en cuenta lo siguiente:

- Como eluyentes, se recomiendan sistemas de eluyentes no polares (p. ej., *n*-heptano, hexano, diclorometano o 2-propanol). Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,2–0,45 µm y desgasificar. Plan téese realizar un lavado intermedio con THF y una regeneración posterior tras un posible uso de tampones (modo RP).
- Filtre las muestras a través de un filtro de jeringa CHROMAFIL® Xtra PET de 0,2–0,45 µm antes de la inyección.
- Utilice una columna de protección para las muestras contaminadas.
- El caudal recomendado para columnas analíticas (DI 2–4,6 mm) es de 0,2–2,0 mL/min.
- Ajuste el caudal para mantener la presión de la columna por debajo del valor máximo de la misma.
- Guarde la columna tras la aplicación de NP en *n*-heptano, y tras la aplicación de RP en acetonitrilo-agua (70:30, v/v).
- Utilice reactivos de calidad analítica y disolventes de calidad para HPLC en todos los trabajos. Elimine cualquier solución que presente signos de proliferación bacteriana.

Consulte la gama completa de productos de cromatografía de MACHEREY-NAGEL: www.mn-net.com/cromatografia



... para encontrar aplicaciones de referencia, visite nuestra base de datos de aplicaciones, que cuenta con más de 3000 aplicaciones de cromatografía: ChromaAppDB.mn-net.com o contáctenos: support@mn-net.com

Francia:
MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt · Francia
Tél.: +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

EE. UU.:
MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd., Suite 102 · Allentown, PA 18109 · EE. UU.
Tél.: +1 888 321 62 24 toll free
sales-us@mn-net.com

Alemania e internacional:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennr Str. 11 · 52355 Düren · Alemania
Tél.: +49 24 21 969-0
info@mn-net.com · www.mn-net.com

Suiza:
MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Suiza
Tél.: +41 62 388 55 00
sales-ch@mn-net.com