



# NUCLEODUR® RP-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® RP-Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben, das speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt wurde. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse 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 Problemstellung 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. Acetonitril oder Methanol) 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 enthalten die NUCLEODUR® RP-Säulen eine nach einem speziellen Verfahren modifizierte C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> - oder spezielle RP-Phase auf Basis von voll synthetischem, sphärischem Kieselgel (Typ B).

NUCLEODUR® RP-Phase	Modifizierung	Eigenschaft / Stabilität
C <sub>18</sub> Gravity	Octadecyl, hohe Dichte, Multi-endcapping	stark hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> Gravity-SB	Octadecyl (monomer), extensives Endcapping	hydrophob, polar, pH 1–9, LC/MS
C <sub>8</sub> Gravity	Octyl, hohe Dichte, Multi-endcapping	schwach hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> Isis	Octadecyl, speziell quervernetzt, Multi-endcapping	hydrophob, schwach polar, sterische Selektivität, pH 1–10, LC/MS
C <sub>18</sub> Pyramid	Octadecyl, polares Endcapping	hydrophob, polar, stabil in 100 % wässrigen Eluenten, pH 1–9, LC/MS
PolarTec	RP-Phase mit eingebetteter polarer Gruppe, Endcapping	hydrophob, polar, sterische Selektivität, stabil in 100 % wässrigen Eluenten, pH 1–9, LC/MS
Phenyl-Hexyl	Phenyl-Hexyl, Multi-endcapping	hydrophob, aromatische Selektivität, pH 1–10, LC/MS
π <sup>2</sup>	Biphenylpropyl, Multi-endcapping	hydrophob, aromatische Selektivität, stabil in 100 % wässrigen Eluenten, pH 3–10
PFP	Pentafluorphenyl, Endcapping	hydrophob, polar, aromatische und sterische Selektivität, pH 1–9, LC/MS
Sphinx RP	bifunktionell Octadecyl / Phenyl, Endcapping	hydrophob, polar, Selektivität für Aromaten, pH 1–10, LC/MS
C <sub>18</sub> HTec	Octadecyl mit hoher Kapazität, hohe Dichte, Multi-endcapping	stark hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> ec	Octadecyl, mittlere Dichte, Endcapping	hydrophob, pH 1–9
C <sub>8</sub> ec	Octyl, mittlere Dichte, Endcapping	schwach hydrophob, schwach polar, pH 1–9
C <sub>4</sub> ec	Butyl, mittlere Dichte, Endcapping	schwach hydrophob, polar, pH 1–9
C <sub>4</sub> Gravity	Butyl, hohe Dichte, Multi-Endcapping	schwach hydrophob, pH 1–11, LC/MS

Hier nicht aufgeführte NUCLEODUR® RP-Säulen (z.B. neue Entwicklungen) können ebenfalls entsprechend dieser Gebrauchsanweisung angewendet und behandelt werden.

**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.

**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](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.

**Eluent**

Die RP-Säulen werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (je nach Typ 80:20, 70:30 oder 60:40, v/v; siehe Säulenzertifikat) ausgeliefert. Als Eluenten können typische RP-Eluenten (z.B. Acetonitril oder Methanol mit reinem Wasser oder Puffer; Phosphat- und Boratpuffer nur bis pH 9 und bei Raumtemperatur) verwendet werden. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden. 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. Der Gehalt an Puffersalzen sollte so niedrig wie möglich sein. Beachten Sie die Löslichkeitsgrenze des Puffers im Eluenten. Die Steigerung des organischen Anteils kann zur Ausfällung von Puffersalzen und Verstopfung der Säule führen. Vor Inbetriebnahme mit pufferhaltigem Eluent sollte zunächst mit mind. 10 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser (25:75, v/v) vorkonditioniert werden. Stets nach Abschluss von Messungen mit pufferhaltigen Eluenten sollte die Säule regeneriert werden (siehe Regenerierung). Die Anwendung von Ionenpaar-Reagenzien bei Phasen mit eingebetteter polarer Gruppe (z.B. NUCLEODUR® PolarTec) kann zu unspezifischen, nicht-reproduzierbaren Wechselwirkungen 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 Säulendruck begrenzt, der die in der Tabelle dargestellten Grenzwerte nicht überschreiten sollte.

Kieselgel	ID [mm]:	Maximaler Druck [bar]									
		2	3	4	4,6	8	10	16	21	32	40
NUCLEODUR® 1,8 µm (110 Å)	900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7, ≥ 10 µm (110 Å)	600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEODUR® 5 µm (300 Å)	450	450	450	450	400	400	400	400	400	400	400

Methanol – Wasser Gemische durchlaufen bei ca. 40% Methanolanteil ein Viskositätsmaximum. Änderungen der Eluentenzusammensetzung sollten daher bei niedriger Flussrate durchgeführt werden. 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 für Methanol – Wasser bzw. Acetonitril – Wasser geeignet. Bei Verwendung von Phosphatpuffern sollte die Temperatur nicht höher als 40 °C sein. Für eine lange Lebensdauer werden 30–40 °C empfohlen. Damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist, sollte sie allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen. 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, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Gravity, C<sub>8</sub> Gravity, C<sub>4</sub> Gravity, C<sub>18</sub> Gravity-SB, C<sub>18</sub> Isis, C<sub>18</sub> Pyramid, PolarTec, Phenyl-Hexyl, PFP, Sphinx RP und C<sub>18</sub> HTec eignen sich ebenfalls für die LC/MS-Detektion. 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) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten (siehe Regenerierung). Auch Methanol empfiehlt sich aufgrund möglicher Verunreinigung mit Metallionen (z.B. Eisen(III)) nicht für eine längere Lagerung. 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
<b>Basislinien-Drift</b> · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren  frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthermostatisierung
<b>Breite Peaks</b> · Mischung und/oder Diffusion vor/hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
<b>Peaküberlagerung; zu schnelle Elution</b> zu schnelle Elution und/oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Elutionskraft des Eluenten zu hoch	entsprechenden Parameter optimieren  Eluentensystem optimieren
<b>Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung</b> Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Ausfall von Puffersalzen	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens Löslichkeit der Puffersalze zuvor prüfen / Entfernen durch Spülung (siehe Säulenregenerierung)
<b>Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck</b> 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)
<b>Doppelpeaks (Totvolumen):</b> · 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:
  - Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers
  - 100 % Methanol um polare organische Verbindungen zu entfernen
  - 100 % Acetonitril um mittelpolare organische Verbindungen zu entfernen (evtl. T= 40 °C)
  - 100 % Tetrahydrofuran um unpolare organische Verbindungen zu entfernen
  - Ggf. mit 100 % Tetrahydrofuran in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
  - Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit Acetonitril – Wasser (80:20, 70:30 bzw. 60:40, 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.
- Regenerierung:** Nach der Anwendung von Puffern spülen Sie unmittelbar nach dem Abschluss der Messreihe und stets vor einer Lagerung der Säule mit mind. 10 Säulenvolumina bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt:
  - Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers
  - schrittweise um 20 % den organischen Anteil auf die Bedingungen der neuen Messreihe erhöhen
  - oder schrittweise um 20 % den Anteil an Acetonitril auf die Lagerbedingungen erhöhen
- Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Bestimmte organische Verunreinigungen lassen sich durch die beschriebenen Reinigungsmethoden nicht immer entfernen. Auch Totvolumen durch Kompression des Säulenbettes lässt sich i. d. R. nicht beheben, so dass die Säule ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

Länge [mm]	ID [mm]:	Säulenvolumen [mL]			
		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 organisch-wässrige Eluentensysteme empfohlen (z.B. Acetonitril oder Methanol – Wasser oder Puffer). Bitte bei der Verwendung von Puffern die Regenerierung beachten. 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 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 Entfernen des Puffers in Acetonitril – Wasser (80:20, 70:30 oder 60:40, 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.



# NUCLEODUR® RP columns

**Note:** All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® RP columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®. 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.) has 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., 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**

As stationary phase NUCLEODUR® RP columns contain a C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> or special RP phase based on fully synthetical spherical silica (type B), modified with a special method.

NUCLEODUR® RP phase	Modification	Property / Stability
C <sub>18</sub> Gravity	octadecyl, high density, multi-encapsulation	strongly hydrophobic, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> Gravity-SB	octadecyl (monomeric), extensive endcapping	hydrophobic, polar, pH 1–9, LC/MS
C <sub>8</sub> Gravity	octyl, high density, multi-encapsulation	weakly hydrophobic, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> Isis	octadecyl, specially crosslinked, multi-encapsulation	hydrophobic, weakly polar, steric selectivity, pH 1–10, LC/MS
C <sub>18</sub> Pyramid	octadecyl, polar endcapping	hydrophobic, polar, stable in 100 % aqueous eluents, pH 1–9, LC/MS
PolarTec	RP phase with embedded polar group, endcapping	hydrophobic, polar, steric selectivity, stable in 100 % aqueous eluents, pH 1–9, LC/MS
Phenyl-Hexyl	phenyl-hexyl, multi-encapsulation	hydrophobic, aromatic selectivity, pH 1–10, LC/MS
π <sup>2</sup>	biphenylpropyl, multi-encapsulation	hydrophobic, aromatic selectivity, stable in 100 % aqueous eluent, pH 3–10
PFP	pentafluorophenyl, endcapping	hydrophobic, polar, aromatic and steric selectivity, pH 1–9, LC/MS
Sphinx RP	bifunctional octadecyl/phenyl, endcapping	hydrophobic, polar, selectivity for aromatic compounds, pH 1–10, LC/MS
C <sub>18</sub> HTec	octadecyl with high capacity, high density, multi-encapsulation	strongly hydrophobic, pH 1–11, LC/MS
C <sub>18</sub> ec	octadecyl, medium density, endcapping	hydrophobic, pH 1–9
C <sub>8</sub> ec	octyl, medium density, endcapping	weakly hydrophobic, weakly polar, pH 1–9
C <sub>4</sub> ec	butyl, medium density, endcapping	weakly hydrophobic, polar, pH 1–9
C <sub>4</sub> Gravity	butyl, high density, multi-encapsulation	weakly hydrophobic, pH 1–11, LC/MS

NUCLEODUR® RP columns not listed here (e.g., latest developments) can be used and treated in reference to this manual.

**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](http://www.mn-net.com) or 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**

RP columns are supplied with the eluent acetonitrile – water (depending on the type 80:20, 70:30 or 60:40, v/v; see column certificate for details). As mobile phase typical RP eluents (e.g., acetonitrile or methanol with pure water or buffer; phosphate and borate buffer only up to pH 9 and room temperature) can be used. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed. Please consider the pH stability of the used column. Strong acidic or basic conditions can result in dissolution of the column bed or the organic modification. The amount of buffer salts should be kept as low as possible. Note the solubility limit of the buffer in the eluent. The increase of the organic portion can result in precipitation of buffer salts and plugging of the column. Before start of operation with eluent containing a buffer the column should be first preconditioned with a minimum of 10 column volumes acetonitrile – water (25:75, v/v). Always after finishing measurements with buffer-containing eluents the column should be regenerated (see column regeneration). Use of ion pair reagents with phases with embedded polar groups (e.g., NUCLEODUR® PolarTec) can result in unspecific non-reproducible interactions.

**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.

Silica	ID [mm]:	Maximum pressure [bar]										
		2	3	4	4.6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1.8 µm (110 Å)	900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7 and ≥ 10 µm (110 Å)	600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEODUR® 5 µm (300 Å)	450	450	450	450	400	400	400	400	400	400	400	400

In mixtures of methanol and water viscosity reaches a maximum at about 40 % methanol. For this reason a reduced flow rate is recommended, when changing the eluent composition. 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 methanol – water or acetonitrile – water. For use of phosphate buffer temperature should not be higher than 40 °C. 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, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Gravity, C<sub>8</sub> Gravity, C<sub>4</sub> Gravity, C<sub>18</sub> Gravity-SB, C<sub>18</sub> Isis, C<sub>18</sub> Pyramid, PolarTec, Phenyl-Hexyl, PFP, Sphinx RP and C<sub>18</sub> HTec are also suitable for LC/MS detection. 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) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended (see regeneration). Methanol is also not recommended for a longer storage, because of a possible impurity with metal ions (e.g., iron(III)). 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
<b>Baseline drift</b> · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent · temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
<b>Broad peaks</b> · mixing and/or diffusion before/behind the column · too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
<b>Peak interference; too fast elution</b> 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
<b>Increasing back pressure; degradation of the separation performance</b> contamination of sorbent by: · particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system · precipitation of buffer salts	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent check solubility of buffer salts before / remove them by rinsing (see column regeneration)
<b>Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure</b> 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)
<b>Double peaks (dead volume)</b> · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)  · dissolution of silica by too high pH value of eluent	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings consider pH range of column / replace column

**Column regeneration**

In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by regeneration of the phase. It is important, however, to locate the source of contamination before again using the column for the analysis of samples.

- 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:
  - acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
  - 100 % methanol to remove polar organic compounds
  - 100 % acetonitrile to remove medium polar organic compounds (possibly T= 40 °C)
  - 100 % tetrahydrofuran to remove nonpolar organic compounds
  - if necessary, 100 % tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
  - convert column to storage condition using acetonitrile – water (80:20, 70:30 or 60:40, 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 minutes with an isocratic run.

- Regeneration:** After the usage of buffer, directly after finishing a measurement and always before storage of the column rinse with a minimum of 10 column volumes at the original flow rate and temperature as follows:
  - acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) for removal of the buffer
  - increase the organic part in steps of 20 % to the conditions of a new measurement run
  - or gradually increase the part of acetonitrile in steps of 20 % to the storage conditions
- 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]	ID [mm]:	Column volume [mL]			
		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 RP eluents organic-aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile or methanol – water or buffer) are recommendable. Please consider regeneration after usage of buffers. 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 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 in acetonitrile – water (80:20, 70:30 or 60:40, v/v) after removal of buffer salts.
- Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.



# Columnas NUCLEODUR® RP

**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® RP son productos de calidad basados en sílice de alta pureza y muy resistente a la presión NUCLEODUR®. 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., acetonitrilo, metanol) 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

Las columnas NUCLEODUR® RP de fase estacionaria contienen una fase C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> o RP especial, basada en sílice esférica totalmente sintética (tipo B), modificada mediante un método especial.

Fase NUCLEODUR® RP	Modificación	Propiedad / estabilidad
C <sub>18</sub> Gravity	octadecilo, alta densidad, terminación múltiple	intensamente hidrófoba, pH 1 – 11, LC/MS
C <sub>18</sub> Gravity-SB	octadecilo (monomérico), terminación amplia	hidrófoba, polar, pH 1 – 9, LC/MS
C <sub>8</sub> Gravity	octilo, alta densidad, terminación múltiple	débilmente hidrófoba, pH 1 – 11, LC/MS
C <sub>18</sub> Isis	octadecilo, especialmente reticulado, terminación múltiple	hidrófoba, débilmente polar, selectividad estérica, pH 1 – 10, LC/MS
C <sub>18</sub> Pyramid	octadecilo, terminación polar	hidrófoba, polar, estable en eluyentes 100 % acuosos, pH 1 – 9, LC/MS
PolarTec	Fase RP con grupo polar incorporado, terminación	hidrófoba, polar, selectividad estérica, estable en eluyentes 100 % acuosos, pH 1 – 9, LC/MS
Phenyl-Hexyl	fenilo-hexilo, terminación múltiple	hidrófoba, selectividad aromática, pH 1 – 10, LC/MS
π <sup>2</sup>	bifenilpropilo, terminación múltiple	hidrófoba, polar, selectividad aromática, estable en eluyentes 100 % acuosos, pH 3 – 10
PFP	pentafluorofenilo, terminación múltiple	hidrófoba, polar, selectividad aromática y estérica, pH 1 – 9, LC/MS
Sphinx RP	octadecilo/fenilo bifuncional, terminación	hidrófoba, polar, selectividad para compuestos aromáticos, pH 1 – 10, LC/MS
C <sub>18</sub> HTec	octadecilo de alta capacidad, alta densidad, terminación múltiple	intensamente hidrófoba, pH 1 – 11, LC/MS
C <sub>18</sub> ec	octadecilo, densidad media, terminación	hidrófoba, pH 1 – 9
C <sub>8</sub> ec	octilo, densidad media, terminación	débilmente hidrófoba, débilmente polar, pH 1 – 9
C <sub>4</sub> ec	butilo, densidad media, terminación	débilmente hidrófoba, polar, pH 1 – 9
C <sub>4</sub> Gravity	butilo, alta densidad, terminación múltiple	débilmente hidrófoba, pH 1 – 11, LC/MS

Las columnas NUCLEODUR® RP que no figuran en esta lista (p. ej., últimos modelos) se pueden utilizar y tratar según las instrucciones de este manual.

## 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](http://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 introducir las 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 de RP se suministran con el eluyente acetonitrilo-agua (en función del tipo 80:20, 70:30 o 60:40, v/v; ver certificado de la columna para más información). Como fase móvil se pueden utilizar los eluyentes típicos de la RP (p. ej., acetonitrilo o metanol con agua pura o tampón; los tampones de fosfato y borato solo hasta un pH de 9 y a temperatura ambiente). Los eluyentes se deben filtrar a través de un filtro de membrana de 0,2 – 0,45 µm y desgasificar. 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. La cantidad de sales tampón debe mantenerse lo más baja posible. Tenga en cuenta el límite de solubilidad del tampón en el eluyente. El aumento de la proporción de materia orgánica puede provocar la precipitación de sales tampón y la obstrucción de la columna. Antes de iniciar la operación con un eluyente que contenga un tampón, la columna se deberá acondicionar previamente con un mínimo de 10 volúmenes de columna de acetonitrilo-agua (25:75, v/v). Una vez finalizados los análisis con eluyentes que contengan tampón, siempre se debe regenerar la columna (ver «Regeneración de la columna»). El uso de reactivos de par iónico con fases que contienen grupos polares (p. ej., NUCLEODUR® PolarTec) puede dar lugar a interacciones inespecíficas y no reproducibles.

## 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.

SÍlice	DI [mm]:	Presión máxima [bar]										
		2	3	4	4,6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1,8 µm (110 Å)	900	800	600	600	-	-	-	-	-	-	-	-
NUCLEODUR® 3, 5, 7 y ≥ 10 µm (110 Å)	600	600	600	600	400	400	400	400	400	400	400	400
NUCLEODUR® 5 µm (300 Å)	450	450	450	450	400	400	400	400	400	400	400	400

En las mezclas de metanol y agua, la viscosidad alcanza su valor máximo cuando el porcentaje de metanol es de aproximadamente el 40%. Por este motivo, se recomienda reducir el caudal al cambiar la composición del eluyente. 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

Se pueden alcanzar temperaturas de columna de hasta 60 °C con mezclas de metanol-agua o acetonitrilo-agua. Para el uso del tampón fosfato, la temperatura no debe superar 40 °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.

**Alemania e internacional:**  
**MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG**  
 Valenciennr Str. 11 · 52355 Düren · Alemania  
 Tel.: +49 24 21 969-0  
 info@mn-net.com · [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

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

## Detección

Con las columnas se pueden utilizar espectrofotómetros, refractómetros y detectores electroquímicos. NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Gravity, C<sub>8</sub> Gravity, C<sub>4</sub> Gravity, C<sub>18</sub> Gravity-SB, C<sub>18</sub> Isis, C<sub>18</sub> Pyramid, PolarTec, Phenyl-Hexyl, PFP, Sphinx RP y C<sub>18</sub> HTec también son adecuados para la detección por LC/MS. 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 a 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 (ver «Eluyente») para el almacenamiento. Para el almacenamiento a largo plazo, no se recomienda el uso de fases móviles que contengan sales inorgánicas (ver «Regeneración»). Tampoco se recomienda metanol para un almacenamiento prolongado, debido a la posible presencia de impurezas en forma de iones metálicos (p. ej., hierro [III]). 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 herméticamente selladas 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.

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

Síntoma / error / causa	Prevención / solución
<b>Desviación de los valores de referencia</b> · 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
<b>Picos anchos</b> · 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
<b>Interferencia en el pico; elución demasiado rápida</b> 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
<b>Aumento de la contrapresión; deterioro del rendimiento de separación</b> 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	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»)
<b>Separación insuficiente; degradación de la separación a presión de columna normal</b> 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»)
<b>Picos dobles (volumen muerto)</b> · accesorios defectuosos (capilares, casquillos, tuercas) · disolución de la sílice debido a un pH demasiado alto del eluyente	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

## 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:
  - acetonitrilo – agua o metanol – agua (10:90, v/v) para la eliminación del tampón
  - Metanol al 100 % para eliminar compuestos orgánicos polares
  - Acetonitrilo al 100 % para eliminar compuestos orgánicos de polaridad media (posiblemente T = 40 °C)
  - Tetrahydrofurano al 100 % para eliminar compuestos orgánicos no polares
  - En caso necesario, tetrahydrofurano al 100 % con sentido del flujo invertido a 1/5 del caudal original
  - ajustar la columna a las condiciones de almacenamiento con una mezcla de acetonitrilo-agua (80:20, 70:30 o 60:40, v/v) al caudal original
 Un 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:** Tras el uso de tampón, 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 aumentar gradualmente la proporción de acetonitrilo en pasos del 20 % hasta alcanzar las condiciones de almacenamiento
- 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.

Longitud [mm]	DI [mm]:	Volumen de columna [mL]			
		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 de RP se recomiendan los sistemas de eluyentes orgánico-acuosos (p. ej., acetonitrilo o metanol – agua o tampón). Plántese una regeneración tras el uso de tampones. Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,2 – 0,45 µm y desgasificar.
- 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.
- Almacene la columna en una mezcla de acetonitrilo-agua (80:20, 70:30 o 60:40, v/v) tras eliminar las sales tampón.
- Utilice reactivos de calidad analítica y disolventes de calidad para HPLC en todos los trabajos. Elimine cualquier solución que presente signos de proliferación bacteriana.

**Francia:**  
**MACHEREY-NAGEL SAS**  
 1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerd · 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.  
 Tel.: +1 888 321 62 24 toll free  
 sales-us@mn-net.com