



NUCLEODUR® HILIC  
NUCLEOSHELL® HILIC

**Bitte beachten:** Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit der NUCLEODUR® HILIC Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben; NUCLEOSHELL® HILIC basiert auf hocheffizienten Core-Shell-Kieselgel. Sie sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. 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
- Methodenentwicklung
- 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 enthält die NUCLEODUR® HILIC Säule voll synthetisches, sphärisches Kieselgel (Typ B), das mit Ammonium-Sulfonsäure-Liganden modifiziert wurde; die NUCLEOSHELL® HILIC Säule enthält entsprechend modifiziertes Core-Shell-Kieselgel. HILIC-Säulen lassen sich speziell für die Trennung von hydrophilen, polaren und ionischen Analyten unter Reversed Phase-Bedingungen anwenden. Diese Analyten werden auf RP-Säulen nur wenig retardiert. Das Verhalten auf HILIC-Phasen ist genau umgekehrt (siehe Abbildung auf englischer Seite), was sie zu einem wichtigen Instrument zur Verbesserung chromatographischer Trennungen macht. Die Modifizierung mit starken Kationen- und Anionenaustauschern führt zu einer zwitterionischen Funktionalität, die verantwortlich für den hydrophilen Charakter ist. Aufgrund eines speziellen Modifizierungsschrittes bieten NUCLEODUR®/NUCLEOSHELL® HILIC Phasen einen vollständigen Ladungsausgleich. Der hydrophile Charakter und die Möglichkeit der Ausbildung von nur schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen sind Eigenschaften, welche entscheidend für eine breite Anwendbarkeit in der „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“ sind.

**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**

Das Retentionsverhalten für HILIC ist umgekehrt zur RP Chromatographie. Daher ist auch die relative Lösemittelstärke für HILIC umgekehrt zur RP Chromatographie:

Wasser > Methanol > Ethanol > 2-Propanol > Acetonitril > Tetrahydrofuran > Aceton

Die Säule wird mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (80:20, v/v) ausgeliefert. Die mobile Phase für HILIC sollte Acetonitril (40–98 %) und Wasser (60–2 %) enthalten. Weitere mit Wasser mischbare Lösemittel wie Aceton, THF, 2-Propanol oder Ethanol können auch für die HILIC Säulen verwendet werden. Da eine Wasserschicht auf der Oberfläche der stationären Phase unbedingt notwendig ist, sollten mindestens 2 % Wasser in der mobilen Phase verbleiben. Flüchtige Puffer, wie Ammoniumacetat und Ammoniumformiat werden gewöhnlich für die Einstellung der Ionenstärke und des pH-Wertes der mobilen Phase verwendet (pH-Bereich: 2–8,5). Eine Pufferkonzentration von 0–25 mM wird für mittelpolare und polare Verbindungen, wie Uracil, Melamin, Adrenalin, Kreatin oder Mepiquat empfohlen. Für extrem polare Verbindungen, wie Adenosintriphosphat, Citronensäure oder Aminoglykoside werden höhere Pufferkonzentrationen (100–200 mM) notwendig. Ionenpaarreagenzien wie TFA sollten vermieden werden, da sie das MS-Signal unterdrücken. Niemals sollte Phosphatpuffer als Teil der mobilen Phase oder als Lösemittel für Proben verwendet werden! Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.

**Flussrate und Druck**

Die Flussrate beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Die Flussrate für eine optimale Trennung, Auflösung und Lebensdauer ist u.a. abhängig von der Partikelgröße, dem Innendurchmesser der Säule und des verwendeten Eluenten. Hierbei sollten die in der Tabelle dargestellten Grenzwerte nicht überschritten werden:

Säulen ID [mm]	Maximaler Rückdruck [bar]	
	NUCLEODUR®	NUCLEOSHELL®
2	900	900
3	800	800
4	600	600
4,6	600	600

**Temperatur**

Säulentemperaturen zwischen 0 und 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, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Bei der Verwendung elektrochemischer Detektoren muss berücksichtigt werden, dass einige Arbeitselektroden keine erhöhten Temperaturen erlauben. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können Nachsäulenderivatierungen 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).

**Methodenentwicklung**

Wenn keine Applikationsvorschrift vorliegt, wird die folgende Prozedur zur Methodenentwicklung empfohlen:

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Isokratische Elution</b></p> <p>a) Acetonitril – 0 bis 25 mM Ammoniumacetat (75:25, v/v) für mittelpolare und polare Verbindungen, wie Uracil, Melamin, Adrenalin, Kreatin oder Mepiquat</p> <p>b) Acetonitril – 100 bis 200 mM Ammoniumacetat (70:30, v/v) für sehr polare Verbindungen, wie Adenosintriphosphat, Citronensäure oder Aminoglykosiden</p> | <p><b>Gradientenelution</b></p> <p>90 bis 50 % Acetonitril in 20 min (2 %/min); die Puffersalzkonzentration hängt von der Natur der zu analysierenden Substanzen ab, die bei der isokratischen Elution beschrieben sind</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- Retentionszeit zu kurz → den Gehalt an Acetonitril schrittweise um 5 bis 10 % erhöhen
- Retentionszeit zu lang → den Gehalt an Puffer schrittweise um 5 bis 10 % erhöhen

**Säulenaufbewahrung**

Die Säulen sollten mit Acetonitril – Wasser (80:20, v/v) oder mit Acetonitril – 5 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 5,3 (80:20, v/v) bei Raumtemperatur 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
<b>Basislinien-Drift</b> · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren  frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatisierung
<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 Säulenterperatur 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>Doppelpicks (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:** In einigen Fällen wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Reinigen des Sorbens:** Zur Entfernung von Verunreinigungen spülen Sie die Säule nach folgender Spülprozedur:  
**Polare Verunreinigungen:**  
· 20 Säulenvolumina deionisiertes Wasser  
· 30 Säulenvolumina 0.5 M Ammoniumacetat, pH 6  
· 30 Säulenvolumina deionisiertes Wasser  
**Unpolare Verunreinigungen:**  
· 20 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser (50:50, v/v)  
· 20 Säulenvolumina Acetonitril  
· 20 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser (50:50, v/v)  
Jedes andere Lösemittel, das mischbar mit Wasser ist (Aceton, Tetrahydrofuran, Methanol etc.), kann auch verwendet 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.

Länge [mm]	Innendurchmesser [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:

- Die mobile Phase sollte Acetonitril (40–98 %) und Wasser (60–2 %) enthalten. Weitere mit Wasser mischbare Lösemittel (Aceton, THF, 2-Propanol, Ethanol), sowie flüchtige Puffer (Ammoniumacetat, Ammoniumformiat) können verwendet werden. Die Eluenten sollten durch einen 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 beträgt 0,15–0,80 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der maximale Rückdruck Ihrer Säule nicht überschritten wird.
- Lagern Sie die Säule in Acetonitril – Wasser oder Acetonitril – 5 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 5,3 (80:20, 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](http://www.mn-net.com/chromatographie)

... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: [ChromaAppDB.mn-net.com](http://ChromaAppDB.mn-net.com) oder kontaktieren Sie uns unter: [support@mn-net.com](mailto:support@mn-net.com)



**NUCLEODUR® HILIC**  
**NUCLEOSHELL® HILIC**

**Note:** All HPLC columns from MACHERY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® HILIC columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®; NUCLEOSHELL® HILIC is based on highly efficient core-shell silica. They are especially developed for HPLC analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. HPLC columns are designed for qualitative and quantitative analysis of mixtures of substances and single components. They must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) has to be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) have to be adapted to the analytical problem. MACHERY-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
- Method development
- 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 laws. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHERY-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).

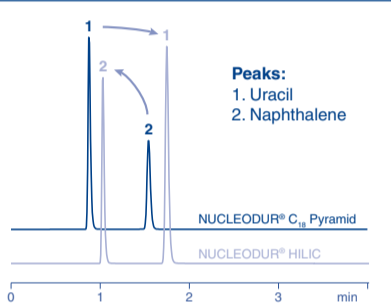
**Description of the column**

As stationary phase NUCLEODUR® HILIC columns contain fully synthetic spherical silica (type B) modified with ammonium – sulfonic acid ligands; NUCLEOSHELL® HILIC columns contain accordingly modified core-shell silica. HILIC columns are especially suited for the separation of hydrophilic, polar and ionic analytes under reversed phase conditions. These analytes are only poorly retained on reversed phase columns. The behavior is truly orthogonal on NUCLEODUR® HILIC (see figure below) which makes it an ideal tool to enhance chromatographic separations. The stationary phase is modified with a strong cationic and anionic ion exchanger. The zwitterionic functionality is responsible for the hydrophilic character. Due to a special modification step NUCLEODUR®/NUCLEOSHELL® HILIC provide a total charge balance. The hydrophilic character and the ability to exhibit only weak electrostatic interactions are properties which are vital for a broad applicability in "Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography".

**Separation of uracil and naphthalene**

Orthogonal retention between HILIC and RP column

**Columns:** EC 125/4 NUCLEODUR® HILIC, 3 µm REF 760531.40  
EC 125/4 NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Pyramid, 3 µm REF 760260.40  
**Eluent:** acetonitrile – water (90:10, v/v)  
**Flow rate:** 1.0 mL/min  
**Temperature:** 25 °C  
**Detection:** UV, 254 nm



MN Appl. Nos. 122911 / 122912

**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 guard columns. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made 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**

The retention behavior for HILIC is inverse to RP chromatography. Therefore, the relative solvent strength for HILIC is also inverse to RP chromatography:

water > methanol > ethanol > 2-propanol > acetonitrile > tetrahydrofuran > acetone

The columns are supplied with the eluent acetonitrile – water (80:20, v/v). A suitable mobile phase for HILIC includes acetonitrile (40–98%) and water (60–2%). Other solvents miscible with water, like acetone, THF, 2-propanol or ethanol can also be used for HILIC columns. In order to establish a water layer on the surface of the stationary phase it is vital that at least 2% water remains in the mobile phase. Volatile buffers, such as ammonium acetate and ammonium formate are commonly used to control the ionic strength and the pH of the mobile phase (pH range: 2–8.5). A buffer concentration of 0–25 mM is recommended for midpolar and polar compounds, like uracil, melamine, adrenaline, creatine or mepiquat. For extremely polar compounds, such as adenosine triphosphate, citric acid or aminoglycosides, higher concentrations of buffer (100–200 mM) are required. Ion pair reagents like TFA should be avoided since they suppress MS signals. Never use phosphate buffers as mobile phase component nor as solvent for your samples! Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.

**Flow rate and pressure**

Flow rate influences the time required, the resolution and the column lifetime. The flow rate for an optimal separation, resolution and lifetime is i. a. dependent on particle size, inner diameter and used eluents.

Thereby the maximum column back pressure should not exceed the limits listed in the table below:

Column ID [mm]	Maximum back pressure [bar]	
	NUCLEODUR®	NUCLEOSHELL®
2	900	900
3	800	800
4	600	600
4.6	600	600

**Temperature**

Column temperatures between 0 and 60 °C are possible; for a long lifetime 30–40 °C is recommended. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. Variation of the temperature influences retention times and especially the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

**Detection**

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. If electrochemical detectors are used, please note that high temperatures may be incompatible with some working electrodes. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

**Equilibration**

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

**Method development**

If no application note is available the following procedure is recommended for method development:

**Isocratic elution**

- a) acetonitrile – 0 to 25 mM ammonium acetate (75:25, v/v) for midpolar and polar compounds, like uracil, melamine, adrenaline, creatine or mepiquat
- b) acetonitrile – 100 to 200 mM ammonium acetate (70:30, v/v) for extremely polar compounds, such as adenosine triphosphate, citric acid or aminoglycosides

**Gradient elution**

90 to 50% acetonitrile in 20 min (2%/min); the buffer salt concentration depends on the nature of the compounds analyzed as described for the isocratic elution

- retention time to short → increase the amount of acetonitrile stepwise by 5 to 10%
- retention time to long → increase the amount of buffer stepwise by 5 to 10%

**Column storage**

The column should be stored at room temperature with acetonitrile – water (80:20, v/v) or with acetonitrile – 5 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 5.3 (80:20, v/v). 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 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 its 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 of 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 it 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 using the column for the analysis of samples again.

1. **Prepare fresh eluent:** In some cases the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
2. **Cleaning of sorbent:** To remove contamination rinse the column by using the following cleaning procedures.

**Polar impurities:**

- 20 column volumes of deionized water
- 30 column volumes 0.5 M ammonium acetate, pH 6
- 30 column volumes of deionized water

**Non polar impurities:**

- 20 column volumes of acetonitrile – water (50:50, v/v)
- 20 column volumes acetonitrile
- 20 column volumes of acetonitrile – water (50:50, v/v)

Any other solvent miscible with water (acetone, tetrahydrofuran, methanol etc.) can also be used.

3. **Column replacement:** Above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

Length [mm]	Inner diameter [mm]:	Column volume [mL]			
		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:

1. Suitable eluents for HILIC include acetonitrile (40–98%) and water (60–2%). Other solvents miscible with water (e.g., acetone, THF, 2-propanol, ethanol), as well as volatile buffers (ammonium acetate, ammonium formate) can be used. The eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
2. Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
3. Use a guard column for contaminated samples.
4. The recommended flow rate is 0.15–0.80 mL/min.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of your column.
6. Store the column in acetonitrile – water or acetonitrile – 5 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 5.3, (80:20, v/v).
7. Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Please check the full range of MACHERY-NAGEL chromatography products: [www.mn-net.com/chromatography](http://www.mn-net.com/chromatography)



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



**NUCLEODUR® HILIC**  
**NUCLEOSHELL® HILIC**

**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® HILIC son productos de calidad basados en sílice de alta pureza y muy resistentes a la presión. NUCLEODUR®, NUCLEOSHELL® HILIC se basa en sílice de estructura núcleo-corteza de alta eficiencia. 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 al problema analítico. 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
- Desarrollo de métodos
- 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 legislación 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, consecutivo 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).

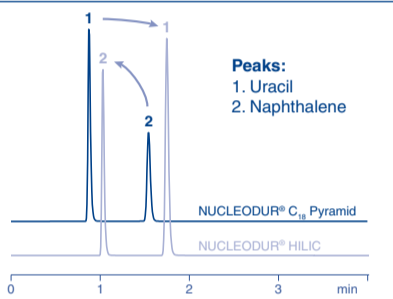
**Descripción de la columna**

Las columnas NUCLEODUR® HILIC de fase estacionaria contienen sílice esférica totalmente sintética (tipo B) modificada con ligandos de ácido amonio-sulfónico; las columnas NUCLEOSHELL® HILIC contienen en consecuencia sílice de estructura núcleo-corteza modificada en consecuencia. Las columnas HILIC son especialmente aptas para la separación de analitos hidrófilos, polares e iónicos en condiciones de fase inversa. Estos analitos se retienen muy poco en las columnas de fase inversa. El comportamiento es verdaderamente ortogonal en NUCLEODUR® HILIC (ver figura siguiente), lo que lo convierte en una herramienta ideal para mejorar las separaciones cromatográficas. La fase estacionaria se modifica con un intercambiador de iones catiónico y aniónico potente. La funcionalidad zwitteriónica es responsable de su carácter hidrófilo. Gracias a un proceso de modificación especial, NUCLEODUR®/NUCLEOSHELL® HILIC presentan un equilibrio de carga total. El carácter hidrófilo y la capacidad de presentar únicamente interacciones electrostáticas débiles son propiedades fundamentales para una amplia aplicabilidad en la Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (cromatografía de líquidos de interacción hidrófila).

**Separación de uracilo y naftaleno**

Retención ortogonal entre la columna HILIC y la columna RP

**Columnas:** EC 125/4 NUCLEODUR® HILIC, 3 µm REF 760531.40  
EC 125/4 NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Pyramid, 3 µm REF 760260.40  
**Eluyente:** acetonitrilo – agua (90:10, v/v)  
**Caudal:** 1,0 mL/min  
**Temperatura:** 25 °C  
**Detección:** UV, 254 nm



N.º apl. MN 122911 / 122912

**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 columnas 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 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**

El comportamiento de retención en la cromatografía HILIC es inverso al de la cromatografía RP. Por lo tanto, la potencia relativa del disolvente en cromatografía HILIC también es inversamente proporcional a la de la RP:

agua > metanol > etanol > 2-propanol > acetonitrilo > tetrahydrofurano > acetona

Las columnas se suministran con el eluyente acetonitrilo – agua (80:20, v/v). Una fase móvil adecuada para HILIC incluye acetonitrilo (40–98%) y agua (60–2%). También se pueden utilizar en las columnas HILIC otros disolventes miscibles con agua, como acetona, THF, 2-propanol o etanol. Para formar una capa de agua en la superficie de la fase estacionaria, es fundamental que quede al menos un 2% de agua en la fase móvil. Para controlar la fuerza iónica y el pH de la fase móvil (intervalo de pH: 2–8,5) se suelen utilizar tampones volátiles, como el acetato de amonio y el formiato de amonio. Se recomienda una concentración del tampón de 0–25 mM para compuestos semipolares y polares, como el uracilo, la melamina, la adrenalina, la creatina o el mepiquat. En el caso de compuestos extremadamente polares, como el trifosfato de adenosina, el ácido cítrico o los aminoglucósidos, se requieren concentraciones más elevadas de tampón (100–200 mM). Se deben evitar los reactivos de pares iónicos, como TFA, ya que atenúan las señales de MS. No utilice nunca tampones fosfato como componente de la fase móvil ni como disolvente para sus muestras. Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,2–0,45 µm y desgasificar.

**Caudal y presión**

El caudal influye en el tiempo necesario, la resolución y la vida útil de la columna. El caudal necesario para obtener una separación, resolución y vida útil óptimas depende, entre otras cosas, del tamaño de las partículas, del diámetro interior y de los eluyentes utilizados.

Por lo tanto, la contrapresión máxima de la columna no debe superar los límites indicados en la tabla siguiente:

DI columna [mm]	Contrapresión máxima [bar]	
	NUCLEODUR®	NUCLEOSHELL®
2	900	900
3	800	800
4	600	600
4,6	600	600

**Temperatura**

Las temperaturas de la columna pueden oscilar entre 0 y 60 °C; para una larga vida útil se recomiendan 30–40 °C. No obstante, su 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, refractómetros y detectores electroquímicos. Si se utilizan detectores electroquímicos, tenga en cuenta que las temperaturas elevadas pueden ser incompatibles con algunos electrodos de trabajo. 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).

**Desarrollo de métodos**

Si no hay ninguna nota de aplicación disponible, se recomienda seguir el siguiente procedimiento para el desarrollo del método:

**Elución isocrática**

- a) acetonitrilo - 0 a 25 mM de acetato de amonio (75:25, v/v) para compuestos de polaridad media y polares, como el uracilo, la melamina, la adrenalina, la creatina o el mepiquat
- b) acetonitrilo - 100 a 200 mM de acetato de amonio (70:30, v/v) para compuestos extremadamente polares, como el trifosfato de adenosina, el ácido cítrico o los aminoglucósidos

**Elución en gradiente**

90 al 50% de acetonitrilo en 20 minutos (2%/min); la concentración de la sal tampón depende de la naturaleza de los compuestos analizados, como se ha descrito para la elución isocrática

- tiempo de retención demasiado corto → aumente la cantidad de acetonitrilo gradualmente del 5 al 10%
- tiempo de retención demasiado largo → aumente la cantidad de tampón gradualmente del 5 al 10%

**Almacenamiento de la columna**

La columna se debe almacenar a temperatura ambiente en una solución de acetonitrilo-agua (80:20, v/v) o en una solución de acetonitrilo-5 mM de NH<sub>4</sub>Ac, pH 5,3 (80:20, v/v). 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 el 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
<b>Desviación de los valores de referencia</b> · tiempo insuficiente para el equilibrado del 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.

1. **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.
2. **Limpieza del adsorbente:** Para eliminar la contaminación, enjuague la columna según los procedimientos de limpieza siguientes.

**Impurezas polares:**

- 20 volúmenes de columna de agua desionizada
- 30 volúmenes de columna de acetato de amonio 0,5 M, pH 6
- 30 volúmenes de columna de agua desionizada

**Impurezas no polares:**

- 20 volúmenes de columna de acetonitrilo-agua (50:50, v/v)
- 20 volúmenes de columna de acetonitrilo
- 20 volúmenes de columna de acetonitrilo-agua (50:50, v/v)

También se puede utilizar cualquier otro disolvente miscible con agua (acetona, tetrahydrofurano, metanol, etc.).

3. **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]	Diámetro interno [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:

1. Los eluyentes adecuados para HILIC incluyen acetonitrilo (40–98%) y agua (60–2%). También se pueden utilizar otros disolventes miscibles con agua (p. ej., acetona, THF, 2-propanol, etanol), así como tampones volátiles (acetato de amonio, formiato de amonio). Los eluyentes se deben filtrar a través de una membrana de 0,2–0,45 µm y desgasificar.
2. Filtre las muestras a través de un filtro de jeringa CHROMAFIL® Xtra PET de 0,2–0,45 µm antes de la inyección.
3. Utilice una columna de protección para las muestras contaminadas.
4. El caudal recomendado es de 0,15–0,80 mL/min.
5. Ajuste el caudal para mantener la presión de la columna por debajo del valor máximo de la misma.
6. Almacene la columna en acetonitrilo-agua o acetonitrilo-5 mM de NH<sub>4</sub>Ac, pH 5,3, (80:20, v/v).
7. 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](http://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](http://ChromaAppDB.mn-net.com) o contáctenos: support@mn-net.com