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 Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Dieses Produkt kann zur Trennung zahlreicher Gemische und zur quantitativen Bestimmung der darin enthaltenen Komponenten eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der analytischen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Analysensystems, also Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Analysenbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen 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_{18} -, C_8 - oder spezielle RP-Phase auf Basis von voll synthetischem, sphärischem Kieselgel (Typ B).

NUCLEODUR® RP-Phase	Modifizierung	Eigenschaft / Stabilität
C_{18} Gravity	Octadecyl, hohe Dichte, Multi-endcapping	stark hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C_{18} Gravity-SB	Octadecyl (monomer), extensives Endcapping	hydrophob, polar, pH 1–9, LC/MS
C_8 Gravity	Octyl, hohe Dichte, Multi-endcapping	schwach hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C_{18} Isis	Octadecyl, speziell quervernetzt, Multi-endcapping	hydrophob, schwach polar, sterische Selektivität, pH 1–10, LC/MS
C_{18} 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
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_{18} HTec	Octadecyl mit hoher Kapazität, hohe Dichte, Multi-endcapping	stark hydrophob, pH 1–11, LC/MS
C_{18} ec	Octadecyl, mittlere Dichte, Endcapping	hydrophob, pH 1–9
C_8 ec	Octyl, mittlere Dichte, Endcapping	schwach hydrophob, schwach polar, pH 1–9
C_4 ec	Butyl, mittlere Dichte, Endcapping	schwach hydrophob, polar, pH 1–9

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*** 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 Säulenrückdruck begrenzt, der die in der Tabelle dargestellten Grenzwerte nicht überschreiten sollte.

	Maximaler Druck [bar]										
Kieselgel ID [mm]:	2	3	4	4,6	8	10	16	21	32	40	50
NUCLEODUR® 1,8 µm (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® Gravity, Gravity-SB, Isis, Pyramid, PolarTec, Phenyl-Hexyl, PFP, Sphinx RP und 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 Verschlussschrauben 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 Probenvorbehandlung verhindern meist diese Probleme. Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
Basislinien-Drift · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	 längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthermostatisierung
Breite Peaks · Mischung und / oder Diffusion vor / hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	 Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Elutionskraft des Eluenten zu hoch	 entsprechenden Parameter optimieren Eluentensystem optimieren
Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Ausfall von Puffersalzen	 Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens Löslichkeit der Puffersalze zuvor prüfen / Entfernen durch Spülung (siehe Säulenregenerierung)
Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck Verunreinigung mit: · Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Sorbensoberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices	 organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung)
Doppelpeaks (Totvolumen): · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	 Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / 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.

1. 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.
2. 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.
3. 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
4. Säulenaustausch: Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Bestimmte organische Verunreinigungen lassen sich durch die beschriebenen Reinigungsmethoden nicht immer entfernen. Auch Totvolumen durch Kompression des Säulenbettes lässt sich i. d. R. nicht beheben, so dass die Säule ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

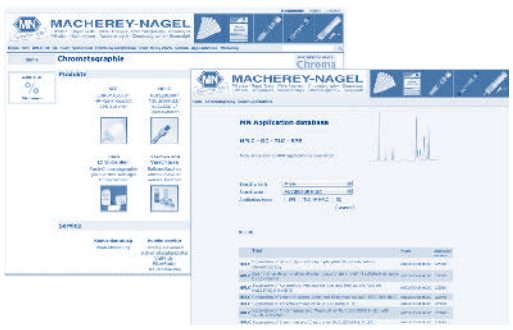
	Säulenvolumen [mL]			
Länge [mm] ID [mm]:	2	3	4	4,6
100	0,30	0,70	1,25	1,65
150	0,45	1,05	1,90	2,50
250	0,80	1,75	3,15	4,15

Zusammenfassung

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

1. 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.
2. Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
3. Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
4. Die empfohlene Flussrate für analytische Säulen (ID 2–4.6 mm) beträgt 0,2–2,0 mL/min.
5. Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der maximale Rückdruck Ihrer Säule nicht überschritten wird.
6. Lagern Sie die Säule nach Entfernen des Puffers in Acetonitril – Wasser (80:20, 70:30 oder 60:40, v/v).
7. 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!



… für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Website mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: ***www.mn-net.com/apps***

Deutschland und International:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Deutschland
Tel.: +49 24 21 969-0 · Fax: +49 24 21 969-199
info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

Schweiz:
MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Schweiz
Tel.: 062 388 55 00 · Fax: 062 388 55 05
sales-ch@mn-net.com

Frankreich:
MACHEREY-NAGEL EURL
1, rue Gutenberg · 67722 Hoerdt · France
Tel.: 03 88 68 22 68 · Fax: 03 88 51 76 88
sales-fr@mn-net.com

USA:
MACHEREY-NAGEL Inc.
2850 Emrick Boulevard · Bethlehem, PA 18020 · USA
Tel.: 484 821 0984 · Fax: 484 821 1272
sales-us@mn-net.com

NUCLEODUR RP 06510 PD · A041165