



**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 nur von 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. Typische Flussraten für HILIC-Säulen sind:

Säulen ID [mm]	Optimale Flussrate [mL/min]		Maximaler Rückdruck [bar]	
	NUCLEODUR	NUCLEOSHELL	NUCLEODUR	NUCLEOSHELL
2	0,15	0,15	900	600
3	0,34	0,34	800	600
4	0,60	0,60	600	600
4,6	0,80	0,80	600	600

Deutlich höhere Flussraten können angewendet werden, wenn eine gute Auflösung erzielt wird. 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 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, massenspektrometrische, 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 to 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 Pufferkonzentration 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
- MS-Empfindlichkeit zu gering → die Pufferkonzentration schrittweise verringern

**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 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 / 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.
  - Filtern 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!**

HPLC

GC

DC

SPE & Flash

Spritzenfilter

Probengläser

Reversed Phase HPLC Application Guide

... für applikative Hilfestellungen fragen Sie nach unserem HPLC Application Guide (engl.) oder besuchen Sie unsere Website mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: [www.mn-net.com/apps](http://www.mn-net.com/apps)