NUCLEODUR® CN / CN-RP
NUCLEOSIL® CN / CN-RP

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit der Säule NUCLEODUR® CN bzw. der Säule CN-RP haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben; NUCLEOSIL® CN bzw. CN-RP basiert auf dem bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL®. Sie sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennresultate und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Dieses Produkt kann zur Trennung von Gemischen und zur quantitativen Bestimmung der darin enthaltenen Komponenten eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der analytischen Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Analysensystems, also Trennsäule und HPLC-Anlage sowie die Anpassung der Analysenbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Aufgabenstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service / technische Produktberatung.

Inhaltsübersicht

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Mobilphasensysteme (z. B. *n*-Heptan oder Acetonitril) 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 Säulen ein nach einem speziellen Verfahren mit Cyanopropyl modifiziertes sphärisches Kieselgel. Hierbei weist die NUCLEODUR® Cyanophase durch eine vollständige Nachsilanisierung eine besonders hohe Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse auf.
Die Normalphasen-Säulen NUCLEODUR® CN und NUCLEOSIL® CN werden mit dem Eluenten *n*-Heptan ausgeliefert. Sie können für die Trennung von Verbindungen (z. B. Steroide) in der Normalphasen-Chromatographie (NP) mit unpolaren mobilen Phasen angewendet werden. Als sogenannte Multimodus-Säulen können sie aber auch für Reversed-Phase (RP) Anwendungen in wässrig-organischen mobilen Phasen eingesetzt werden. Jedoch wird dann ein Umspülen notwendig (siehe Eluent).
Eluent in den Reversed-Phase-Säulen NUCLEODUR® CN-RP and NUCLEOSIL® CN-RP ist Acetonitril – Wasser. Durch die ausgeprägte Selektivität für polare organische Verbindungen (z. B. organische Säuren) sowie für Moleküle mit π-Elektronensystemen (z. B. Analyten mit Doppelbindungen, tricyclische Antidepressiva) zeigt sie ein deutlich anderes Retentionsverhalten als C_{18}- oder C_8-modifizierte RP-Phasen. (Die Trennung von Erkältungsmittelinhaltsstoffen auf verschiedenen RP-Phasen zeigt die Applikation auf der englischsprachigen Seite.) Ein Umspülen auf NP-Bedingungen ist zwar möglich, wird aber nicht empfohlen (siehe Eluent).

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

NP-Säulen: Eluent in der Säule ist *n*-Heptan. Als mobile Phasen im Normalphasen-Modus (NP) werden *n*-Heptan, Hexan, Dichlormethan oder 2-Propanol eingesetzt. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden. Sollte ein Umspülen auf den Reversed-Phase-Modus (RP) notwendig werden, muss mit 10 Säulenvolumina Tetrahydrofuran (THF) zwischengespült werden!
RP-Säulen: Sie werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (je nach Typ 80:20, 70:30 oder 60:40, v/v; siehe Säulenzertifikat) ausgeliefert. Typische RP-Eluenten sind z. B. Acetonitril oder Methanol mit reinem Wasser oder Puffer. Diese sollten filtriert und entgast werden. Die pH-Stabilität der NUCLEODUR® CN-RP liegt zwischen 1 und 8, der NUCLEOSIL® CN-RP zwischen 2 und 8. Stark saure oder basische Bedingungen, vor allem bei Säulentemperaturen höher als 40 °C, können zur Auflösung des Säulenbettes oder 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 Säulenregenerierung). Ein Umspülen auf NP-Modus wird nicht empfohlen und sollte, wenn überhaupt, nur über Zwischenspülung mit THF erfolgen.

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 Rückdruck begrenzt, der den Maximalwert von 600 bar (NUCLEODUR®) / 400 bar (NUCLEOSIL®) nicht überschreiten sollte. 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 geeignet; für eine lange Lebensdauer werden 30–40 °C empfohlen. Bei Verwendung von Phosphatpuffern sollte die Temperatur nicht höher als 40 °C sein. 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. NUCLEODUR® CN und CN-RP 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 keinen 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	längeres bzw. besseres Equilibrieren
· verunreinigter Eluent	frische Lösemittel und Reagenzien verwenden
· Temperatur	Säulenthermostatisierung
Breite Peaks	
· Mischung und / oder Diffusion vor / hinter der Säule	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten
· zu großes Probenvolumen	geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution	
zu schnelle Elution und / oder unzureichende Trennung durch:	
· nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate	entsprechenden Parameter optimieren
· Elutionskraft des Eluenten zu hoch	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	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Sorbens
· Ausfall von Puffersalzen	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)	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 oder REF 718778 / Austausch der Verschraubungen
· Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	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.
   NP-Säulen:
   - 100 % Tetrahydrofuran um un- oder mittelpolare organische Verbindungen zu entfernen
   - Ggf. mit 100 % Tetrahydrofuran in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
   - Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit *n*-Heptan auf Lagerbedingung umstellen

   RP-Säulen:
   - 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.
   Nach der Anwendung von Puffern spülen Sie RP-Säulen 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
3. 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.

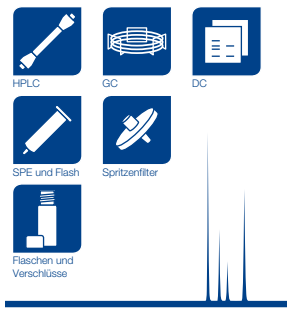
		Säulenvolumen [mL]			
Länge [mm]	**Innendurchmesser [mm]:**	2	3	4	4,6
100		0,30	0,70	1,25	1,65
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

Zusammenfassung

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

1. Als NP-Eluenten werden unpolare organische Lösemittel (z. B. *n*-Heptan, Dichlormethan, 2-Propanol) und als RP-Eluenten organisch-wässrige Eluentensysteme empfohlen (z. B. Acetonitril – Wasser oder Puffer). Beim Wechsel vom NP- auf den RP-Modus muss stets mit THF zwischengespült werden. Ein umgekehrter Wechsel wird nicht empfohlen. 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 Säulendruck unter 600 (für NUCLEODUR®) / 400 (für NUCLEOSIL®) bar bleibt.
6. Lagern Sie die NP-Säule in *n*-Heptan und die RP-Säule in Acetonitril – Wasser (70:30, 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: *www.mn-net.com/chromatographie*



… für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: ***ChromaAppDB.mn-net.com***

Deutschland und International:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Deutschland
Tel.: +49 24 21 969-0
info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

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

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

USA:
MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd., Suite 102 · Allentown, PA 18109 · USA
Tel.: +1 888 321 62 24 gebührenfrei
sales-us@mn-net.com

NUCLEODUR® / NUCLEOSIL® CN · A044655 / 0421

NUCLEODUR® CN / CN-RP
NUCLEOSIL® CN / CN-RP

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® CN and CN-RP columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®; NUCLEOSIL® CN and CN-RP are based on the robust silica NUCLEOSIL®. They are specifically developed for HPLC analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. HPLC columns are designed for qualitative and quantitative analysis of mixtures of substances and single components. They must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and HPLC working methods. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) has to be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) must 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 leaflet, please call our service / technical support.

Table of contents

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 phases the columns contain spherical silica modified with cyanopropyl by a special procedure. Due to an exhaustive endcapping of the NUCLEODUR® cyano phase, an exceptionally high reproducibility of analysis results is featured.

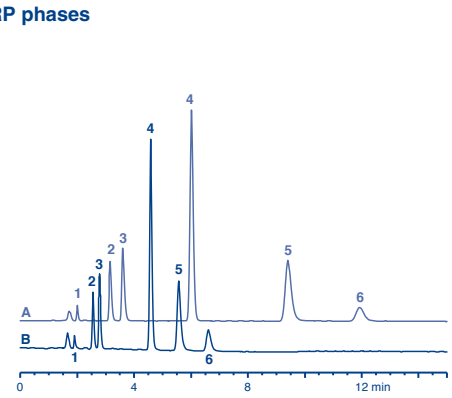
The normal phase columns NUCLEODUR® CN and NUCLEOSIL® CN are supplied with the eluent *n*-heptane. They can be applied for the separation of compounds (e.g., steroids) in normal phase chromatography (NP) with nonpolar mobile phases. As so-called multi-mode columns, they can also be used for reversed phase (RP) applications in aqueous-organic mobile phases. But then an intermediate flushing is necessary (see eluent).

Eluent in the reversed phase columns NUCLEODUR® CN-RP and NUCLEOSIL® CN-RP is acetonitrile – water. Due to a distinct selectivity for polar organic compounds (e.g., organic acids) as well as for molecules containing π electron systems (e.g., analytes with double bonds, tricyclic antidepressants), this phase clearly shows a different retention behavior compared to C_{18} or C_8 modified RP phases. A changing to NP conditions is possible, but is not recommended (see eluent).

Application note

Separation of cold medicine ingredients on different RP phases

Columns: A) EC 250/4 NUCLEODUR® 100–5 C_{18} ec
B) EC 250/4 NUCLEODUR® 100–5 CN-RP
Eluent: acetonitrile – 100 mmol/L sodium citrate, pH 2.5 (15:85, v/v)
Flow rate: 1 mL/min
Temp.: 25 °C
Detection: UV, 270 nm
Inj. volume: 10 µL
Peaks:
1. Maleic acid
2. Norephedrine
3. Ephedrine
4. Acetaminophen
5. Chlorpheniramine
6. Brompheniramine



MN Appl. No. 119340

Installation

The column should be installed in the flow direction indicated on the column label. It is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments.

Guard columns

For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see ***www.mn-net.com*** or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and / or loss of performance is observed.

Sample

Sample solutions should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution.

Eluent

NP columns: Eluent in the column is *n*-heptane. As mobile phases in normal phase mode (NP) *n*-heptane, hexane, dichloromethane or 2-propanol are used. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed. For changing to the reversed phase mode (RP), columns must be rinsed with 10 column volumes tetrahydrofuran (THF).

RP columns: They 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). Typical RP eluents are e.g., acetonitrile or methanol with pure water or phosphate buffer. They should be filtered and degassed. pH stability of NUCLEODUR® CN-RP is between 1 and 8, for NUCLEOSIL® CN-RP between 2 and 8. Strongly acidic or basic conditions, especially for column temperatures higher than 40 °C, 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. An increase of the organic portion can result in precipitation of buffer salts and plugging of the column. Before start of operation with an 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). A changing to NP mode is not recommended. If necessary, it should only be made with an intermediate flushing step with THF.

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 back pressure, which should not exceed the maximum of 600 bar (NUCLEODUR®) / 400 bar (NUCLEOSIL®). 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 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. NUCLEODUR® CN and CN-RP 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
Baseline drift	
· insufficient period for equillibration with the eluent	longer or better equilibration
· contaminated eluent	use freshly prepared solvents and reagents
· temperature	column temperature control
Broad peaks	
· mixing and / or diffusion before / behind the column	keep length and ID of capillaries at a minimum
· too large sample volume	smaller injection volume
Peak interference; too fast elution	
too fast elution and / or insufficient separation by:	
· improper column temperature or flow rate	optimize concerned parameter
· elution power of eluent is too high	optimize eluent system
Increasing back pressure; degradation of the separation performance	
contamination of sorbent by:	
· particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent
· precipitation of buffer salts	check solubility of buffer salts before / remove them by rinsing (see column regeneration)
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure	
contamination with:	
· fats, oils, lipids from sample (coating of sorbent surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)
Double peaks (dead volume)	
· faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings
· dissolution of silica by too high pH value of eluent	consider pH range of column / replace column

Column regeneration

In some cases the perfomance 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: Sometimes the performance loss is caused by 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 with a minimum of 10 column volumes (see table below) at the original flow rate and temperature as follows:
   NP columns:
   · 100 % tetrahydrofuran to remove non or medium polar organic compounds
   · if necessary, 100 % tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
   · convert column to storage condition with *n*-heptane at original flow rate
   RP columns:
   · 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 non polar organic compounds
   · if necessary, 100 % tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
   · column is converted to storage condition with 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.
   After the usage of buffer, directly after finishing a measurement and always before storage RP columns 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
3. Column replacement: The above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Also dead volume, due to column compression can generally not be repaired. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

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

Abstract

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

1. As NP eluents nonpolar organic solvents (e.g., *n*-heptane, dichloromethane, 2-propanol) and as RP eluents organic-aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile – water or buffer) are recommendable. For a change from NP to RP mode the column must be always rinsed with THF between the steps. An inverse change is not recommended. 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 for analytical columns (ID 2-4.6 mm) is 0.2–2.0 mL/min.
5. Adjust flow rate to keep column pressure below 600 (for NUCLEODUR®) / 400 (for NUCLEOSIL®) bar.
6. Store the NP column in *n*-heptane and the RP column in acetonitrile – water (70:30, v/v).
7. Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Germany and international:
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

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

France:
MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt · France
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

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

NUCLEODUR® / NUCLEOSIL® CN · A044655 / 0421