



**NUCLEODUR® NH<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>-RP**  
**NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>-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® NH<sub>2</sub> bzw. der Säule NH<sub>2</sub>-RP haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben; NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub> bzw. NH<sub>2</sub>-RP basiert auf dem bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL®. Sie sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Aufgrund der chemischen Natur von Aminophasen ist die Standzeit von den durchgeführten Messungen und der Behandlung der Säule nach abgeschlossener Messung bestimmt. Hierzu sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanweisung vertraut machen. Denn bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse 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
- 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 Säulen eine nach einem speziellen Verfahren modifizierte Aminophase auf Basis von sphärischem Kieselgel. Die Normalphasen-Säulen NUCLEODUR® NH<sub>2</sub> und NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub> werden mit dem Eluenten *n*-Heptan ausgeliefert. Sie können für die Trennung von Verbindungen wie substituierte Amine, Ester und chlorierte Pestizide in der Normalphasen-Chromatographie (NP) mit unpolaren mobilen Phasen angewendet werden. Als sogenannte Multimodus-Säulen können sie aber auch für Reversed-Phase (RP) Anwendungen wie der Bestimmung von Zuckern in wässrig-organischen mobilen Phasen eingesetzt werden. Jedoch wird dann ein Umspülen notwendig (siehe Eluent).

Eluent in den Reversed-Phase-Säulen NUCLEODUR® NH<sub>2</sub>-RP and NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub>-RP ist bereits Acetonitril – Wasser. Diese können daher ohne vorheriges Umspülen für RP-Anwendungen verwendet werden. (Die Reversed-Phase-Trennung von Zuckern zeigt die Applikation auf der englischsprachigen Seite.)

**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**

**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. Bei einem Umspülen auf den Reversed-Phase-Modus (RP) muss mit 10 Säulenvolumina Tetrahydrofuran (THF) zwischengeschpült 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. Bei der Auswahl eines RP-Eluenten (z.B. Acetonitril oder Methanol mit reinem Wasser oder Puffer; filtriert und entgast) sollte Folgendes beachtet werden. Ein pH-Wert unter 2 oder über 9 sollte stets vermieden werden. Stark saure oder basische Bedingungen 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. In Abhängigkeit des pH-Wertes des Eluenten kann die NH<sub>2</sub>-Gruppe protoniert werden und als schwacher Anionenaustauscher wirken, der das Retentionsverhalten verändert. Puffersalze mit voluminöser Molekülstruktur wie bei Phosphat können ionische Wechselwirkungen ausbilden, die die polare NH<sub>2</sub>-Gruppe abschirmen und zu einer Retentionsverschiebung führen. Stets nach Abschluss von Messungen mit pufferhaltigen Eluenten und beim möglichen Auftreten von Retentionsverschiebungen nach dieser Anwendung 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. 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® NH<sub>2</sub> und NH<sub>2</sub>-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 keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

**Säulenaufbewahrung**

Für die Aufbewahrung wird der ursprüngliche Eluent (siehe Eluent) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten (siehe Regenerierung). Auch Methanol empfiehlt sich aufgrund möglicher Verunreinigung mit Metallionen (z.B. Eisen(III)) nicht für eine längere Lagerung. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. In diesem Fall spülen Sie zunächst mit ca. 10 Säulenvolumina des Lagereluenten und einer Flussrate von maximal 0,2 mL/min.

**Behebung möglicher Fehler**

Das folgende Schema beschreibt typische Symptome eines Leistungsverlustes und deren Ursache. Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. Säulen auf Kieselgelbasis sind naturgemäß sehr robust und halten bei korrekter Pflege und Behandlung ihre Trennleistung über lange Zeiträume aufrecht. Erfahrungsgemäß sind Säulenausfälle meist auf eine Verunreinigung des Sorbensbettes zurückzuführen. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbereitung verhindern meist diese Probleme.

Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
<b>Basislinien-Drift</b> · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren  frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatierung
<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 Protonierung der NH <sub>2</sub> -Gruppe durch: · Verwendung saurer Puffer als Eluent	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (siehe Säulenregenerierung)  Deprotonieren durch Spülen mit schwach basischen Lösungen (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.

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.

3. **Regenerierung (nur RP-Säulen):** Nach Abschluss einer Messreihe und bei einer möglichen Retentionsverschiebung nach der Anwendung von Puffern, spülen Sie wie folgt:

- Acetonitril – 20 mM Ammoniumacetat oder -formiat, pH 8–8,5 (95:5, v/v)
- Acetonitril – Wasser (10:90, v/v)

· schrittweise um 20 % den Anteil an Acetonitril auf die Lagerbedingungen erhöhen

Die notwendige Zeit für jeden Schritt hängt von den Messbedingungen wie Pufferkonzentration, pH-Wert, Flussrate, Säulenlänge und -durchmesser ab. Als Faustregel sollte jeder Schritt 30–50 Minuten für eine 250 x 4 mm Säule bei einer Flussrate von 1 mL/min liegen.

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.

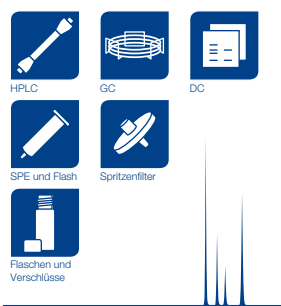
Länge [mm]	Innendurchmesser [mm]:	Säulenvolumen [mL]			
		2	3	4	4,6
100		0,30	0,70	1,25	1,65
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

**Zusammenfassung**

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

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 zwischengeschpült werden. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. Filtern 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 / 400 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](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)

**Frankreich:**

**MACHEREY-NAGEL SAS**  
1, rue Gutenberg – BP135 - 67720 Hoerdtsheim - 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

**Deutschland und International:**

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

**Schweiz:**

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





**NUCLEODUR® NH<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>-RP**  
**NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>-RP**

**Note:** All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® NH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-RP columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®; NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-RP are based on the robust silica NUCLEOSIL®. They are specifically developed for HPLC analysis. Due to the chemical nature of amino phases, the lifetime of the column highly depends on the measurement and the treatment after measurement. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this instruction leaflet. 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
- Description of the column
- Application note
- Installation
- Guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract

**Safety indication**

Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., acetonitrile, methanol) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and/or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

**Description of the column**

As stationary phases the columns contain amino phases, based on spherical silica and modified with a special procedure. The normal phase columns NUCLEODUR® NH<sub>2</sub> and NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub> are supplied with the eluent *n*-heptane. They can be applied for the separation of compounds like amines, esters and chlorinated pesticides 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 like the determination of sugars in aqueous-organic mobile phases. But then an intermediate flushing is necessary (see eluent).

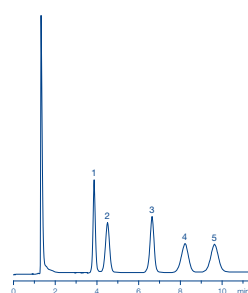
Eluent in the reversed phase columns NUCLEODUR® NH<sub>2</sub>-RP and NUCLEOSIL® NH<sub>2</sub>-RP is acetonitrile – water. Thus, they can be used for RP applications without prior intermediate flushing.

**Application note**

**Reversed phase separation of sugars**

**Column:** EC 250/4 NUCLEODUR® 100-5 NH<sub>2</sub>-RP  
REF 760732.40  
**Eluent:** acetonitrile – water (79:21, v/v)  
**Flow rate:** 2 mL/min  
**Detection:** RI

- Peaks:**
1. Fructose
  2. Glucose
  3. Saccharose
  4. Maltose
  5. Lactose



MN Appl. No. 122160

**Installation**

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

**Guard columns**

For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com) or 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 a changing to 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). For the choice of an RP eluent (e.g., acetonitrile or methanol with pure water or phosphate buffer; filtered and degassed) please keep in mind the following. A pH value below 2 and above 9 should be always avoided. Strong acidic or basic conditions can result in dissolution of the column bed or the organic modification. The amount of buffer salts should be kept as low as possible. Note the solubility limit of the buffer in the eluent. The increase of the organic portion can result in precipitation of buffer salts and plugging of the column. Before start of operation with eluent containing a buffer the column should be first preconditioned with a minimum of 10 column volumes acetonitrile – water (25:75, v/v). Furthermore, depending on the pH value of the eluent, the NH<sub>2</sub> group can be protonated. Therefore, it acts as a weak anion exchanger, which alters the retention behavior. Especially bulky buffer salts like phosphate can develop ionic interactions, thereby effectively shielding the polar NH<sub>2</sub> group. These phenomena lead to a retention time shift. Always after finishing measurements with buffer containing eluents, or if problems with a retention shift happen after this application, 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® NH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-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
<b>Baseline drift</b> · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent · temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
<b>Broad peaks</b> · mixing and/or diffusion before/behind the column · too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
<b>Peak interference; too fast elution</b> too fast elution and/or insufficient separation by: · improper column temperature or flow rate · elution power of eluent is too high	optimize concerned parameter optimize eluent system
<b>Increasing back pressure; degradation of the separation performance</b> contamination of sorbent by: · particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system · precipitation of buffer salts	prepare fresh eluent; prefilter samples and eluent, use in-line filter / rinse LC system, clean the sorbent check solubility of buffer salts beforehand / remove them by rinsing (see column regeneration)
<b>Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure</b> contamination with: · fats, oils, lipids from sample (coating of sorbent surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices protonation of NH <sub>2</sub> group by: · usage of acidic buffers as eluent	remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)  deprotonation by rinsing with weakly basic solutions (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 / replace fittings  consider pH range of column / replace column

**Column regeneration**

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

1. **Prepare fresh eluent:** Sometimes the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.

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
- column is converted 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, with 100% tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
- convert column 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.

3. **Regeneration (only for RP columns):** After finishing measurement and for a possible retention shift, after the usage of buffer, rinse as follows:

- acetonitrile – 20 mM ammonium acetate or formate, pH 8–8.5 (95:5, v/v)
- acetonitrile – water (10:90, v/v)
- gradually increase the part of acetonitrile in steps of 20% to the storage conditions

The necessary time frame for each step depends on the measurement conditions like buffer concentration, pH value, flow rate, column length and diameter. As a rule of thumb, each step should at least take 30–50 minutes for a 250 x 4 mm column with a flow of 1 mL/min.

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

Length [mm]	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. 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. 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 600/400 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.

Please check the full range of MACHEREY-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)