



NUCLEOSIL® SA
NUCLEOSIL® SB

www.mn-net.com

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit den Säulen NUCLEOSIL® SA und NUCLEOSIL® SB haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL® erworben. 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
 - 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. Zusätze von Methanol, Acetonitril oder Säuren) 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 NUCLEOSIL® SA Säulen einen stark sauren Kationenaustauscher (SCX), bei dem sphärisches Kieselgel mit Benzolsulfonsäure modifiziert wurde. Die NUCLEOSIL® SB Säulen sind mit einem stark basischen Anionenaustauscher (SAX), einer quaternären Ammoniummodifizierung, gepackt. Beide Phasen weisen eine Ionenaustauscherkapazität von ca. 1 meq/g auf. Typische Applikationen des Kationenaustauschers NUCLEOSIL® SA sind Trennungen von basischen, wasserlöslichen Substanzen. Die Retention der basischen Analyten wird durch den pH-Wert und der Ionenstärke der mobilen Phase bestimmt (siehe Eluent). Der Anionenaustauscher NUCLEOSIL® SB wird zur Trennung von Substanzen angewendet, die in wässrigen Lösungen Anionen bilden. Solche Substanzen finden sich v.a. bei organischen Säuren (aromatischen und aliphatischen Carbon- und Sulfonsäuren), aber auch bei Pestiziden und Pharmazeutika.

Installation

Der Einbau der HPLC-Säulen sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Sie werden mit gerädetypischen 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 Ionenaustauschersäulen NUCLEOSIL® SA und SB werden mit einer Lösung von 0,15 mol/L Diammoniumhydrogenphosphat, pH 5 ausgeliefert. Als mobile Phasen werden wässrige Puffer (z.B. Phosphat-, Acetat-, Citratpuffer) eingesetzt. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden. Der pH-Wert kann, entsprechend dem pK_s-Wert der Analyten, mit korrespondierenden Säuren (z.B. Phosphor-, Essig-, Citronensäure) eingestellt werden, sollte aber im Bereich 2–8 liegen. 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 (max. Pufferkonzentration: 0,15 mol/L). Organische Zusätze (z.B. Methanol, Acetonitril) können zur Verbesserung der Probenlöslichkeit oder der Trennung verwendet werden. Beachten Sie bei der Zugabe des organischen Zusatzes, dass es nicht zur Ausfällung von Puffersalzen und schließlich zur Verstopfung der Säule kommt.

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 400 bar nicht überschreiten sollte. 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, insbesondere unter basischen Bedingungen, 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. 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 0,15 mol/L Diammoniumhydrogenphosphat, pH 5 empfohlen. Um ein mögliches Bakterienwachstum auszuschließen, sollte die Säule im Kühlschrank aufbewahrt 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 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 Säulenthmostatisierung
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)
Doppelpicks (Totvolumen): · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Auflösung des Kieselgels durch zu hohen pH-Wert des Eluenten	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 oder REF 718778 / Austausch der Verschraubungen pH-Stabilität der Säule beachten / Säulenaustausch

Säulenregenerierung

In einigen Fällen kann die Trennleistung der Säule wiederhergestellt werden, indem man die Verunreinigungen vom Sorbensbett entfernt bzw. die Phase regeneriert. Allerdings ist es wichtig, die Ursache der Verunreinigung zu lokalisieren, bevor die Säule wieder für die Analyse von Proben verwendet wird.

- Frischen Eluenten zubereiten:** 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.
- 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.
 - 100 % Wasser zur Entfernung des Puffers und ionischer Verunreinigungen (Kationische Verunreinigungen können bei der SA-Phase auch mit 1 mol/L Natriumperchlorat, pH <4 entfernt werden.)
 - 100 % Methanol um nicht-ionische organische Verbindungen zu entfernen (zuvor Puffer entfernen)
 - Ggf. mit 100 % Methanol in umgekehrter Flussrichtung bei 1/5 der ursprünglichen Flussrate
 - Säule in ursprünglicher Flussrichtung mit 10 Säulenvolumina 100 % Wasser umspülen
 - Schließlich mit 0,15 mol/L Diammoniumhydrogenphosphat, pH 5 auf Lagerbedingung umstellenEin 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.
- 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.

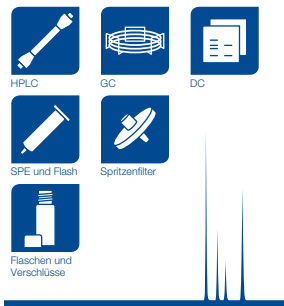
		Säulenvolumen [mL]			
Länge [mm]	Innendurchmesser [mm]:	2	3	4	4,6
100		0,30	0,70	1,25	1,65
150		0,45	1,05	1,90	2,50
250		0,80	1,75	3,15	4,15

Zusammenfassung

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

- Als Eluenten werden wässrige Puffer (z.B. Phosphat-, Acetat-, Citratpuffer) empfohlen. Bei der Verwendung von organischen Zusätzen (z.B. Methanol) ist ein Ausfällen von Puffersalzen zu vermeiden. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate für analytische Säulen (ID 2–4.6 mm) beträgt 0,2–2,0 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck unter 400 bar bleibt.
- Lagern Sie die Säule in 0,15 mol/L Diammoniumhydrogenphosphat, pH 5.
- 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** oder kontaktieren Sie uns unter: support@mn-net.com



NUCLEOSIL® SA
NUCLEOSIL® SB

www.mn-net.com

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. The columns NUCLEOSIL® SA and NUCLEOSIL® SB are quality products 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
 - Description of the column
 - 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., additives of methanol, acetonitrile or acids) 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 NUCLEOSIL® SA columns contain a strongly acidic cation exchanger (SCX), made of spherical silica modified with benzenesulfonic acid. NUCLEOSIL® SB columns are packed with a strongly basic anion exchanger (SAX), a quaternary ammonium modification. Both phases have an ion exchange capacity of ~ 1 meq/g.

Typical applications of the cation exchanger NUCLEOSIL® SA are separations of basic, water soluble substances. The retention of basic analytes is governed by pH value and ion strength of the mobile phase (see eluent). The anion exchanger NUCLEOSIL® SB is used for the separation of substances, which form anions in aqueous solutions. Such substances are mainly organic acids (aromatic and aliphatic carboxylic and sulfonic acids) as well as pesticides and pharmaceuticals.

Installation

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

Guard columns

For protection and an extension of column lifetime columns 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

The ion exchanger columns NUCLEOSIL® SA and SB are supplied with a solution of 0.15 mol/L diammonium hydrogen phosphate, pH 5. As mobile phase aqueous buffers (e.g., phosphate, acetate, citrate) are used. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed. The pH value can be adjusted in relation to the pK_s value of the analyte with the correspondent acid (e.g., phosphoric, acetic, citric acid). The pH should be in the range of 2–8. Strongly 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 (max. buffer concentration: 0.15 mol/L). Organic additives (e.g., methanol, acetonitrile) can be used to improve sample solubility or the separation. Take care of a possible precipitation of buffer salts and plugging of the column when adding an organic additive.

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 400 bar. 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, especially under basic conditions, 30–40 °C is recommended. However, they should be at least 30 °C below the boiling temperature of the eluent, in order to ensure proper detection. Variation of the temperature influences retention times and especially the peak shape. Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically.

Detection

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. If 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 0.15 mol/L diammonium hydrogen phosphate, pH 5 is recommended for storage. To avoid bacterial growth, store the column in a refrigerator. 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 equilibration with the eluent • contaminated eluent • temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
Broad peaks • mixing and /or diffusion before / behind the column • too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
Peak interference; too fast elution 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
Increasing back pressure; degradation of the separation performance 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)
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) • dissolution of silica by too high pH value of eluent	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings consider pH range of column / replace column

Column regeneration

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

- 1. Prepare fresh eluent:** 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:
 - 100 % water for removal of the buffer and of ionic impurities (Cationic impurities on the SA phase can be also removed with 1 mol/L sodium perchlorate, pH <4)
 - 100 % methanol to remove nonionic organic compounds (remove buffer before)
 - if necessary, 100 % methanol with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
 - rinse the column with 10 column volumes 100 % water at original flow direction
 - convert column to storage condition with 0.15 mol/L diammonium hydrogen phosphate, pH 5 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. 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:

- As eluents aqueous buffers (e.g., phosphate, acetate, citrate) are recommended. Avoid a precipitation of buffer salts when using of organic additives (e.g., methanol). Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
- Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
- Use a guard column for contaminated samples.
- The recommended flow rate for analytical columns (ID 2–4.6 mm) is 0.2–2.0 mL/min.
- Adjust flow rate to keep column pressure below 400 bar.
- Store the column in 0.15 mol/L diammonium hydrogen phosphate, pH 5 in a refrigerator.
- 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



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