



NUCLEODUR® PFAS

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

Inhaltsübersicht

- Sicherheitshinweise
- Beschreibung der Säulen
- Installation
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Schematisches Schaltbild
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung
- Chromatogramm

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Mobilphasensysteme (z.B. Acetonitril oder Methanol) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z.B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (insbesondere das Öffnen der Säule und Freilegen des Säulenbettes) Folgeschäden auftreten.

Beschreibung der Säulen

Als stationäre Phase enthalten die NUCLEODUR® PFAS-Säulen eine speziell modifizierte RP-Phase auf Basis eines vollsynthetischen, sphärischen Kieselgels (Typ B). Bei NUCLEODUR® PFAS handelt es sich um eine hydrophobe Phasemodifizierung mit ausgeprägter polarer Selektivität. Die pH Stabilität liegt bei 1–9 und die Säulen sind LC/MS tauglich.

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.

Probe

Die Probe wird in der Regel im Eluenten gelöst. Falls noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst klein gewählt werden.

Eluent

Die RP-Säulen werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (je nach Typ 80:20, 70:30 oder 60:40, v/v; siehe Säulenzertifikat) ausgeliefert. Als Eluenten können typische RP-Eluenten (z.B. Acetonitril oder Methanol mit reinem Wasser oder Puffer; Phosphat- und Boratpuffer nur bis pH 9 und bei Raumtemperatur) verwendet werden. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden. Die pH-Stabilität der jeweiligen Säule sollte berücksichtigt werden. Stark saure oder basische Bedingungen können zur Auflösung des Säulenbettes und zur Abtrennung der organischen Modifizierung führen. Der Gehalt an Puffersalzen sollte so niedrig wie möglich sein. Beachten Sie die Löslichkeitsgrenze des Puffers im Eluenten. Die Steigerung des organischen Anteils kann zur Ausfällung von Puffersalzen und Verstopfung der Säule führen. Vor Inbetriebnahme mit pufferhaltigem Eluent sollte zunächst mit mind. 10 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser (25:75, v/v) vorkonditioniert werden. Stets nach Abschluss von Messungen mit pufferhaltigen Eluenten sollte die Säule regeneriert werden (siehe Regenerierung).

Flussrate und Druck

Die Flussrate (empfohlen für analytische Säulen mit 2–4,6 mm ID: 0,2–2,0 mL/min) beeinflusst den Zeitaufwand der Trennung, die Auflösung und die Lebensdauer der Säule. Sie ist durch den maximalen Säulenrückdruck begrenzt, der 600 bar 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 für Methanol – Wasser bzw. Acetonitril – Wasser geeignet. Bei Verwendung von Phosphatpuffern sollte die Temperatur nicht höher als 40 °C sein. Für eine lange Lebensdauer werden 30–40 °C empfohlen. Damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist, sollte sie allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen. Durch Variation dieser Größe wird die Retentionszeit, der Rückdruck und insbesondere die Peakform beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen daher empirisch ermittelt werden.

Detektion

Mit den Säulen können spektralphotometrische, refraktometrische, elektrochemische Detektoren, sowie LC/MS Detektion benutzt werden.

Equilibrierung

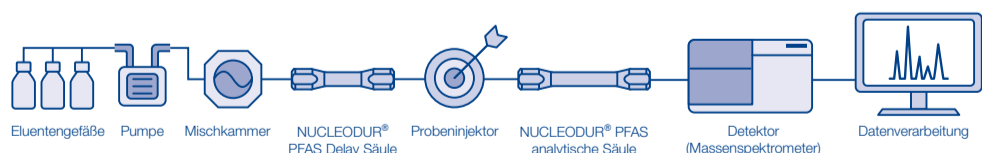
Bevor Proben gemessen werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden. Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

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.

Schematisches Schaltbild

Die NUCLEODUR® PFAS Delay Säule retardiert PFAS Verbindungen stark und wird zum Zurückhalten von PFAS Verunreinigungen aus dem HPLC System verwendet, welche ansonsten die zu analysierenden Probe verfälschen könnten. Hierfür wird die NUCLEODUR® PFAS Delay Säule in Flussrichtung zwischen dem Mischgefäß und dem Probeninjektor geschaltet (siehe Abbildung).



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

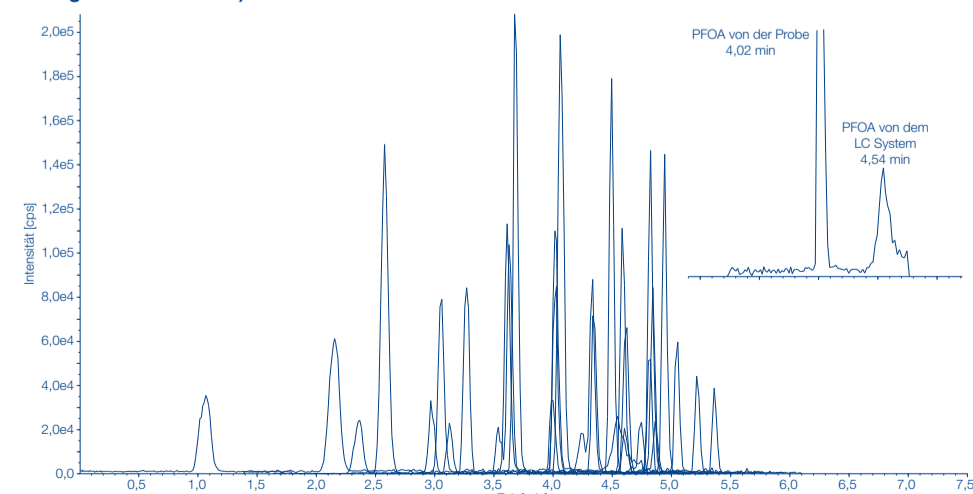
- Frischen Eluenten zubereiten:** Manchmal wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran 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:
 - 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.
- Regenerierung:** Nach der Anwendung von Puffern spülen Sie unmittelbar nach dem Abschluss der Messreihe und stets vor einer Lagerung der Säule mit mind. 10 Säulenvolumina bei der ursprünglichen Flussrate und Temperatur wie folgt:
 - Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) zur Entfernung des Puffers
 - schrittweise um 20 % den organischen Anteil auf die Bedingungen der neuen Messreihe erhöhen
 - oder schrittweise um 20 % den Anteil an Acetonitril auf die Lagerbedingungen erhöhen
- 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]	ID [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:
- Als Eluenten werden organisch-wässrige Eluentensysteme empfohlen (z.B. Acetonitril oder Methanol – Wasser oder Puffer). Bitte bei der Verwendung von Puffern die Regenerierung beachten. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
 - 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 maximale Rückdruck Ihrer Säule nicht überschritten wird.
 - Lagern Sie die Säule nach Entfernen des Puffers in Acetonitril – Wasser (80:20, 70:30 oder 60:40, v/v).
 - Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien von mindestens p.A. Qualität und Lösemittel in HPLC-Qualität. Verwerfen Sie alle Lösungen, die Anzeichen von Bakterienwachstum zeigen.

Chromatogramm von 30 PFAS Verbindungen auf einer 50 x 2 mm NUCLEODUR® PFAS 3 µm Säule mit vorgeschalteter 50 x 2 mm NUCLEODUR® PFAS Delay 5 µm Säule (Standardlösung PFAC30PAR von Wellington Laboratories)



Frankreich:

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 - 67720 Hoerdts - 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

Schweiz:

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



NUCLEODUR® PFAS

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® RP columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®. 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) must be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) has to 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 manual, please call our service / technical support.

Table of contents

- Safety indication
- Description of the column
- Installation
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Schematic diagram
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract
- Chromatogram

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 phase NUCLEODUR® PFAS columns contain a specially modified RP phase based on a fully synthetic spherical silica (type B). NUCLEODUR® PFAS is a hydrophobic phase modification with a distinct polar selectivity. The pH stability is 1–9 and the columns are suitable for LC/MS detection.

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.

Sample

Samples should be solved in the used eluent. If injected sample solutions are turbid, lifetime of the column may be significantly reduced. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution.

Eluent

RP columns 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). As mobile phase typical RP eluents (e.g., acetonitrile or methanol with pure water or buffer; phosphate and borate buffer only up to pH 9 and room temperature) can be used. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed. Please consider the pH stability of the used column. 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). Always after finishing measurements with buffer-containing eluents the column should be regenerated (see column regeneration).

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 maximum column back pressure, which should not exceed 600 bar.

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 methanol – water or acetonitrile – water. For use of phosphate buffer temperature should not be higher than 40 °C. For a long lifetime 30–40 °C is recommended. However, temperature 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, electrochemical detectors, as well as LC/MS detection can be used with the columns.

Equilibration

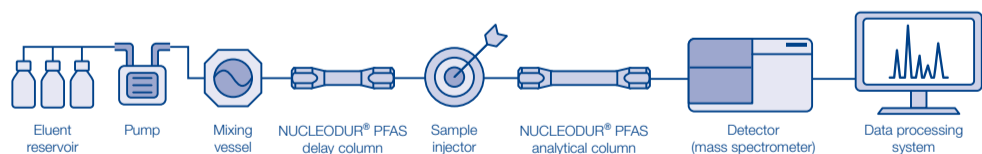
Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

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.

Schematic diagram

NUCLEODUR® PFAS Delay columns provide high retention for PFAS compounds and are used to retain PFAS contaminants from the HPLC system, which could otherwise falsify the sample to be analyzed. For this purpose the NUCLEODUR® PFAS Delay column is connected in flow direction between the mixing vessel and the sample injector (see figure).



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 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) · 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 again using the column for the analysis of samples.

- 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.
- 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:
 - 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 nonpolar organic compounds
 - if necessary, 100% tetrahydrofuran with inverse flow direction at 1/5 of original flow rate
 - convert column to storage condition using 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.
- Regeneration:** After the usage of buffer, directly after finishing a measurement and always before storage of the column 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
- 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]	ID [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:

- As RP eluents organic-aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile or methanol – water or buffer) are recommendable. Please consider regeneration after usage of buffers. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
- 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 the maximum value of your column.
- Store the column in acetonitrile – water (80:20, 70:30 or 60:40, v/v) after removal of buffer salts.
- Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Chromatogram of 30 PFAS analytes on a 50 x 2 mm NUCLEODUR® PFAS 3 µm column preceded by a 50 x 2 mm NUCLEODUR® PFAS Delay 5 µm column (standard solution PFAC30PAR by Wellington Laboratories)

