



# NUCLEOGEL® RP-Säulen

**Bitte beachten:** Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit jeder NUCLEOGEL® RP Säule haben Sie ein mit einem Polymer-Harz gepacktes Qualitätsprodukt erworben, das besondere Sorgfalt erfordert. Die Aufgabe von organischen Lösungsmitteln auf die Säule (außer wie später beschrieben) verursacht ein Quellen des Polymers, und daraus resultierend einen Überdruck in der Säule. Deshalb sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanleitung vertraut machen. Durch falsche Handhabung erlischt die Produktgarantie. 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 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
- Vorsäulenfilter und Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Anwendungsbeispiel
- 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

Die NUCLEOGEL® RP Säulen enthalten ein stark quervernetztes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer. Je nach vorliegender Porengröße ist ein Einsatz zur Trennung von organischen Molekülen bis hin zu biologischen Makromolekülen möglich.

### Vorsäulenfilter und Vorsäulen

Zwischen Probeninjektor und Säule ist ein Vorsäulenfilter mit 0,5–2,0 µm porösen Edelstahlfritten empfehlenswert, um mögliche Partikel aus dem Eluentenstrom zu entfernen. Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säule sollten NUCLEOGEL® RP Säulen immer mit Vorsäulen verwendet werden. Die Filterelemente und das Sorbenz der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Die entsprechende Vorsäule (REF 719542) wurde mit dem gleichen Polymer gepackt. Der Anschluss der Vorsäule an die Trennsäule erfolgt mit dem Vorsäulenhalter B (REF 719539). Ein Wechsel der Kartusche ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendruckes und/oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

### Probe

Probenlösungen sollten vor der Aufgabe auf die Säule durch die Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters (z.B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) gereinigt werden. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Wenn möglich, sollten die Proben bei isokratischem Betrieb im Eluenten und bei Gradientenbetrieb im Puffer der Komponente mit der geringsten Elutionskraft gelöst werden, um eine maximale Wechselwirkung zu erzielen. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst gering gewählt werden.

### Eluent

Aufgrund der chemischen und physikalischen Beständigkeit dieser Säulenpackungen können gepufferte mobile Phasen im pH-Bereich von 1 bis 13 und Salzkonzentrationen bis 0,5 M ohne nachteiligen Einfluss auf die Säule eingesetzt werden. Der Gehalt an organischen Lösungsmittelzusätzen (Modifizier) kann zwischen 1 und 100 % liegen. Alle in der Reversed Phase Chromatographie üblichen organischen Modifizier wie z.B. Acetonitril und Tetrahydrofuran können verwendet werden. Falls als Eluent Methanol – Wasser erforderlich ist, kann der Zusatz von 10 % THF oder Acetonitril die Peaksymmetrie und Trennleistung verbessern.

### Flussrate und Druck

Der maximale Betriebsdruck für die NUCLEOGEL® RP Säulen ist 180 bar. Mobile Phasen von niedriger Viskosität lassen Flussraten bis 4,0 mL/min für 4,6 mm ID Säulen zu. Optimale Auflösung und Lebensdauer der Säulen wird jedoch bei Flussraten zwischen 1,0 und 2,0 mL/min erzielt. Eine Erhöhung der Betriebstemperatur bis auf maximal 80 °C zur Erniedrigung der Eluentenviskosität oder zur Steuerung der Retention ist zulässig. 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

Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen empirisch ermittelt werden, liegen aber meist zwischen 20 und 80 °C. Bitte beachten Sie, dass der Rückdruck nicht über 180 bar ansteigt.

### Detektion

Mit den NUCLEOGEL® RP-Säulen können refraktometrische, spektralphotometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Bei der Verwendung elektrochemischer Detektoren muss berücksichtigt werden, dass einige Arbeitselektroden keine erhöhten Temperaturen erlauben. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können 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.

### Säulenaufbewahrung

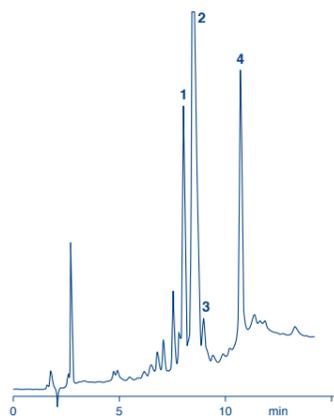
NUCLEOGEL® RP Säulen werden mit Acetonitril – Wasser (9:1, v/v) ausgeliefert. Auch für die Aufbewahrung wird dieser Eluent empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann.

Sollte die Säule austrocknen, so zeigt sich unter den normalen Arbeitsbedingungen ein erhöhter Rückdruck. In diesem Fall spülen Sie die Säule mit Acetonitril – Wasser (9:1, v/v) bei 80 °C und einer Flussrate von 0,3 mL/min. Steigern Sie die Flussrate langsam auf 0,5 mL/min und achten darauf, dass der maximale Druck von 180 bar nicht überschritten wird.

### Anwendungsbeispiel

#### Analyse des synthetischen Acyl Carrier Proteins ACP(65–74)

- Säule:** VA 150/4.6 NUCLEOGEL® RP 100-8 REF 719456
- Eluent A:** 0,1 % TFA in Acetonitril – Wasser (1:99, v/v)
- Eluent B:** 0,1 % TFA in Acetonitril – Wasser (99:1, v/v)
- Flussrate:** 1 mL/min
- Temperatur:** RT
- Detektion:** UV, 220 nm
- Injektion:** 1 µL
- Peaks:**
  1. ACP(66–74)(H-Gln)
  2. ACP(65–74)
  3. ACP(66–74)(Glp)
  4. Thioanisol



MN Appl. Nr. 108500

### Behebung möglicher Fehler

Das folgende Schema beschreibt typische Symptome eines Leistungsverlustes und deren Ursache. Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. Polymersäulen 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 Polymerbettes zurückzuführen. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbereitung verhindern meist diese Probleme. Alle NUCLEOGEL® Säulen werden vor dem Versand sorgfältig getestet und mit einem Testchromatogramm ausgeliefert, das die Trennleistung der betreffenden Säule dokumentiert. 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	längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden
<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>Breite Peaks; 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 Polymers durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Polymerbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System	Proben und Eluenten vorher filtrieren, In-Line-Filter verwenden / LC-System spülen, reinigen des Polymers (s. Säulenregenerierung) Probe gekühlt lagern, Eluenten frisch zubereiten / reinigen des Polymers (s. Säulenregenerierung)
<b>Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck</b> Verunreinigung mit: · Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Polymeroberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices	organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Polymers (s. Säulenregenerierung)
<b>Doppelpeaks</b> · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben)  · Kompression des Säulenbettes (Totvolumen): durch zu hohe Flussraten für den Eluenten durch Verwendung eines nicht empfohlenen organischen Modifiers	„PEEK Fingertight Fittings“ verwenden, REF 718770 oder REF 718778 / Verschraubungen austauschen maximale Flussrate und zulässige Eluenten beachten / entspannen des Polymerbettes (s. Säulenregenerierung)

### Säulenregenerierung

In einigen Fällen kann die Trennleistung der Säule wiederhergestellt werden, indem man die Verunreinigungen vom Polymerbett entfernt. 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:** In einigen Fällen wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
2. **Entspannen des Polymerbettes:** Die Polymere bestehen aus kompressiblen kugelförmigen Partikeln. Durch einen Rückdruck von mehr als 180 bar werden die Partikel deformiert. Dies führt zu einer Verdichtung des Säulenbettes und zu einem weiteren Druckanstieg. Um das Säulenbett wieder zu dekomprimieren schalten Sie die Pumpe ab und lassen das Polymer etwa 30 min „entspannen“. Drehen Sie die Säule um und pumpen den Eluenten über Nacht mit einer Flussrate von 0,1 mL/min bei 80 °C durch die Säule. Dann kehren Sie zu den normalen Arbeitsbedingungen für die Säule zurück.
3. **Reinigen des Polymers:** Um hydrophobe Verunreinigungen zu entfernen, wird ein Eluent mit hoher Elutionskraft über Nacht mit 0,1 mL/min bei einer Temperatur von 80 °C durch die (umgedrehte) Säule gepumpt (z.B. 100 % des organischen Modifiers, der in der mobilen Phase verwendet wird). Am nächsten Tag ersetzen Sie diesen wieder und wenden die normalen Arbeitsbedingungen an. Durch ionisierbare Stoffe hervorgerufene Verunreinigungen können mit Säuren oder Basen ausgewaschen werden. Verunreinigungen durch Peptide und Proteine werden mit 0,1 % TFA in einem Acetonitril-Gradienten entfernt. Zur Vorbeugung von Verunreinigungen wird zwischen jedem Waschzyklus eine Zwischenspülung mit einem Eluenten mit einem höheren organischen Anteil empfohlen.
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, so dass die Säule ausgewechselt werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

### Zusammenfassung

- Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:
1. Empfohlene Eluenten sind Gemische aus entmineralisiertem Wasser oder wässrigen Puffern (bis 0,5 M, pH 1–13) mit organischen Modifiern (Acetonitril, Methanol, THF etc.). Diese sollten durch einen 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Spritzenvorsatzfilter filtriert und entgast werden.
  2. Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm Spritzenvorsatzfilter.
  3. Die empfohlene Flussrate beträgt 1,0–2,0 mL/min.
  4. Verwenden Sie einen In-Line-Filter und eine Vorsäule.
  5. Stellen Sie die Flussrate so ein, daß der Säulendruck unter 180 bar bleibt.
  6. Lagern Sie die Säule nach dem Entfernen von Puffersalzen in Acetonitril – Wasser (9:1, v/v).
  7. Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien mindestens von p.A. Qualität und Lösungsmittel in HPLC-Qualität. Werfen 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)



# NUCLEOGEL® RP columns

**Note:** All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEOGEL® RP columns are quality products packed with a polymeric material that requires special care. Application of organic solvents onto the column except as described below will cause the polymer to swell resulting in overpressure. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this manual. Improper use will invalidate the warranty. The columns 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 manual, please contact our service/technical support.

**Table of contents**

- Safety indication
- Description of the column
- Precolumn filter and guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Application note
- 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**

NUCLEOGEL® RP columns contain a highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene copolymer. Different pore sizes allow the use of these columns for the separation of organic molecules and biological macromolecules.

**Precolumn filter and guard columns**

A precolumn filter containing 0.5–2.0 µm porosity stainless steel frits is recommendable between sample injector and column to remove particulates from the eluent stream. For protection and an extension of column lifetime NUCLEOGEL® RP columns should always be used with guard columns. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. The corresponding guard column (REF 719542) is packed with the same polymer. Connection of the guard column with the separation column is made with guard column holder B (REF 719539). 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. When using isocratic systems the sample should be dissolved in the eluent. For gradient systems the sample should be dissolved in the buffer component with the lowest eluent strength, to receive maximum solute interaction. The sample volume should be as small as possible to achieve an optimal resolution.

**Eluent**

Due to the chemical and physical stability of this column packings, buffered mobile phases within the pH range 1 to 13 and of salt concentrations < 0.5 M can be used without detrimental effect to the column. Mobile phases with organic modifier contents between 1 and 100% can be used. The common reversed-phase organic modifiers, e.g., acetonitrile and tetrahydrofuran are all suitable for use. If an eluent of methanol – water is necessary, then 10% THF or acetonitrile may be added to improve peak symmetry and efficiency.

**Flow rate and pressure**

The maximum operating pressure for the NUCLEOGEL® RP columns is 180 bar. Low viscosity mobile phases will allow flow rates up to 4.0 mL/min for a 4.6 mm ID column. However, optimum resolution and lifetime is normally achieved with flow rates between 1.0 and 2.0 mL/min. An increase in the operating temperature to a maximum of 80 °C is permissible to reduce the eluent viscosity or to control the solute retention. 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 trouble shooting).

**Temperature**

Optimum temperatures for successful separations should be determined empirically, but usually are between 20 and 80 °C. Please take care, that the pressure does not exceed 180 bar.

**Detection**

Spectrophotometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the NUCLEOGEL® RP columns. If electrochemical detectors are used, please note that high temperatures may be incompatible with some working electrodes. 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.

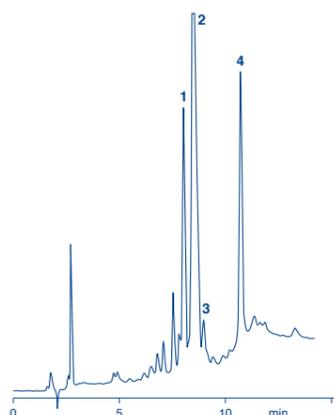
**Column storage**

NUCLEOGEL® RP columns are supplied with acetonitrile – water (9:1, v/v). This is also the recommended eluent for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended. 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. If the column is dried up, this results in an increased back pressure under general working conditions. Under these circumstances rinse the column with acetonitrile – water (9:1, v/v) at 80 °C and a flow rate of 0.3 mL/min. Gradually increase the flow rate to 0.5 mL/min and make sure that the maximum pressure of 180 bar will not be exceeded.

**Application note**

**Analysis of the synthetic acyl carrier protein ACP(65–74)**

- Column:** VA 150/4.6 NUCLEOGEL® RP 100-8 REF 719456
- Eluent A:** 0.1% TFA in acetonitrile – water (1:99, v/v)
- Eluent B:** 0.1% TFA in acetonitrile – water (99:1, v/v)
- Flow rate:** 1 mL/min
- Detection:** UV, 220 nm
- Injektion:** 1 µL
- Peaks:**
  - 1. ACP(66–74)(H-Gln)
  - 2. ACP(65–74)
  - 3. ACP(66–74)(Glp)
  - 4. Thioanisole



MN Appl. Nr. 108500

**Troubleshooting**

The following outline describes the symptoms of performance loss and its cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Polymer columns are robust and keep 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 polymer bed. The usage of a guard column, as well as the appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks. All NUCLEOGEL® columns are thoroughly tested prior to shipment and are supplied with a sample chromatogram illustrating performance of that particular column.

Use the outline below to help determine the cause of a possible performance loss:

Symptom / Error / Cause	Prevention / Repair
<b>Baseline drift</b> · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent	longer or better equilibration usage of freshly prepared solvents and buffers
<b>Broad peaks</b> · mixing and/or diffusion before/behind the column · too large sample volume · elution power of eluent is too high	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume optimize eluent system
<b>Broad peaks; too fast elution</b> too fast elution and/or insufficient separation by: · improper column temperature or flow rate	optimize concerned parameter
<b>Increasing back pressure; degradation of the separation performance</b> contamination of polymer by: · particulate accumulation on frit or polymer bed from sample, eluent or system	prefiltration of samples and eluent, usage of in-line filter / rinse LC system, clean the polymer (see column regeneration) keep sample cool, prepare fresh eluent / clean the polymer (see column regeneration)
<b>Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure</b> contamination with: · fats, oils, lipids from sample (coating of polymer surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices	remove organic substances by sample preparation / clean the polymer (see column regeneration)
<b>Double peaks (dead volume)</b> · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts)  · compression of column bed by too high flow rates and by usage of an improper organic modifier	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 or REF 718778 / replace fittings consider maximum flow rate and allowed eluent / expand the polymer bed (see column regeneration)

**Column regeneration**

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

- Prepare fresh eluent:** In some cases 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.
- Decompression of polymer bed:** The polymer consist of compressible spherical particles. The particles are deformed by a back pressure above 180 bar. Thus, a compression of the column bed and a further increase of pressure results. To decompress the column bed, shut off the pump and allow the polymer to "relax" for about 30 min. Invert the column and pump the eluent through the column with 0.1 mL/min at 80 °C overnight. Return the column to normal operating conditions.
- Cleaning of polymer:** To remove hydrophobic contamination a high strength eluent is pumped at 80 °C with 0.1 mL/min through (inverted) column overnight (e.g., 100% of the organic modifier which is used in the mobile phase). Next day, replace the usual working conditions. Where the contamination may be due to ionizable species an acid or alkali wash may be advantageous. Peptide and protein contamination may be removed by using 0.1% TFA in an acetonitrile gradient. Between each wash cycle a high organic wash is recommended.
- Column replacement:** Above procedures will restore performance only in certain cases. Some organic contaminants are particularly refractory and may not respond to treatment. Under these circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

**Abstract**

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

- Recommended eluents are mixtures of deionized water or aqueous buffers (up to 0.5 M, pH 1–13) with organic modifiers (acetonitrile, methanol, THF etc.). They should be filtered through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® syringe filter and degassed.
- Filter samples through a 0.2–0.45 µm syringe filter before injection.
- The recommended flow rate is 0.2–0.6 mL/min.
- Use an in-line filter and a guard column.
- Adjust flow rate to keep column pressure below 180 bar.
- Store the column in acetonitrile – water (9:1, 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.

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)