



NUCLEODUR® C₁₈ PAH
NUCLEOSIL® C₁₈ PAH

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® C₁₈ PAH haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis des hochreinen und sehr druckstabilen Kieselgels NUCLEODUR® erworben; NUCLEOSIL® C₁₈ PAH basiert auf dem bewährten, robusten Kieselgel NUCLEOSIL®. Diese Säulen sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Die Säulen können zur Trennung von Gemischen polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK oder engl. PAH) und zu ihrer quantitativen Bestimmung 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.

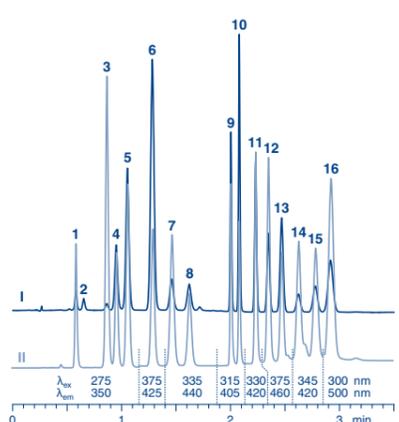
Beschreibung der Säulen

Als stationäre Phase enthalten die NUCLEODUR® C₁₈ PAH-Säulen eine spezielle Octadecylphase für die effiziente PAH-Analytik auf Basis von voll synthetischem, sphärischem Kieselgel (Typ B); die NUCLEOSIL® C₁₈ PAH-Säulen auf Basis von sphärischem Kieselgel (Typ A). Die Säulen werden für eine Gradiententrennung der 16 PAHs nach EPA empfohlen. Darüber hinaus können auch Trennungen weiterer PAH-Substanzen wie beispielsweise PAHs nach EFSA durchgeführt werden. Eine umfangreiche Sammlung von PAH-Applikationen finden Sie in der MN Applikationsdatenbank (www.mn-net.com/apps).

Analyse der 16 PAHs nach EPA

- Säule:** EC 100/4 NUCLEODUR® C₁₈ PAH, 3 µm
Eluent: A) Methanol – Wasser (80:20, v/v)
B) Acetonitril
Gradient: 2–20% B in 1,2 min, 20–100% B in 0,5 min,
100% B für 2,5 min, 100–2% B in 0,4 min
Flussrate: 2,5 mL/min
Temp.: 35 °C
Detektion: UV, 254 nm (I), Fluoreszenz (II)

- Peaks:**
- 1. Naphthalin
 - 2. Acenaphthylen*
 - 3. Acenaphthen
 - 4. Fluoren
 - 5. Phenantren
 - 6. Anthracen
 - 7. Fluoranthen
 - 8. Pyren
 - 9. Benz[a]anthracen
 - 10. Chrysen
 - 11. Benzo[b]fluoranthen
 - 12. Benzo[k]fluoranthen
 - 13. Benzo[a]pyren
 - 14. Dibenz[ah]anthracen
 - 15. Benzo[ghi]perylen
 - 16. Indeno[1,2,3-cd]pyren
- * mit Fluoreszenz nicht nachweisbar



MN Appl. Nr. 123820

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, insbesondere bei matrixbelasteten Proben (z.B. Boden, Öl, Lebensmittel), sollten 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

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe müssen in den verschiedensten Matrices (z.B. Wasser, Boden, Öl) bestimmt werden. Daher ist eine effektive Probenvorbereitung notwendig. Hier hat sich in den letzten Jahren die Festphasenextraktion (SPE) durchgesetzt (SPE-Applikationen, siehe www.mn-net.com/apps). Die vorbereitete Probe wird in Acetonitril oder Methanol aufgenommen. Apolare Lösemittelreste in der Probe sollten entfernt werden, da sie sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten auswirken. Vor der Injektion sollte die Probe durch 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. Das Probenvolumen sollte für eine optimale Auflösung möglichst klein gewählt werden.

Eluent

Die PAH-Säulen werden mit dem Eluenten Acetonitril – Wasser (70:30, v/v) ausgeliefert. Als Eluenten werden in der Regel Acetonitril oder Methanol mit reinem Wasser verwendet. Auch kann Tetrahydrofuran als Eluentenzusatz verwendet werden. Puffer können, werden aber in der PAH-Analytik normalerweise nicht eingesetzt. Die pH-Stabilität der Säule von 2–8 sollte beachtet werden. Ein pufferhaltiger Eluent muss stets nach Abschluss von Messungen durch Spülen der Säule mit mind. 10 Säulenvolumina Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v) entfernt werden. Die Eluenten sollten durch einen 0,2–0,45 µm Membranfilter filtriert und entgast werden.

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 von 20 °C bis zu 35 °C sind für PAH-Trennungen üblich. Als maximale Temperatur für die Säulen sind 60 °C möglich. Jedoch verringern erhöhte Temperaturen die Lebensdauer. Damit eine einwandfreie Detektion gewährleistet ist, sollte sie allerdings mindestens 30 °C unter dem Siedepunkt des Eluenten liegen. Durch Variation der Temperatur wird die Retentionszeit, der Rückdruck und insbesondere die Peakform beeinflusst.

Detektion

Mit den Säulen können spektralphotometrische, massenspektrometrische, refraktometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Für die Detektion von PAHs werden UV- (250–280 nm), Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektion bei unterschiedlichen Wellenlängen für Anregung und Emission genutzt. (Der Fluoreszenznachweis von Acenaphthylen ist nicht möglich.)

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 Acetonitril – Wasser (70:30, v/v) empfohlen. Verwenden Sie für die Langzeitlagerung keine mobilen Phasen, die anorganische Salze enthalten. 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
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)
Doppelpicks (Totvolumen): · 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 von 2–8 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:
 - Bei der Anwendung eines Puffers zunächst mit Acetonitril – Wasser oder Methanol – Wasser (10:90, v/v)
 - 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 (70:30, 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 ausgetauscht werden muss. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

Länge [mm]	Säulenvolumen [mL]			
	ID [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 organisch-wässrige Eluentensysteme empfohlen (z.B. Acetonitril oder Methanol – Wasser). Bitte bei der Verwendung von Puffern die Regenerierung beachten. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
 - Filtern Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
 - Die Verwendung einer Vorsäule bei matrixbelasteten Proben (z.B. Boden, Öl, Lebensmittel) ist ratsam.
 - 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 (70:30, 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.

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



NUCLEODUR® C₁₈ PAH
NUCLEOSIL® C₁₈ PAH

Note: All HPLC columns from MACHERY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column. NUCLEODUR® C₁₈ PAH columns are quality products based on the high purity and very pressure stable silica NUCLEODUR®; NUCLEOSIL® C₁₈ PAH is 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. These HPLC columns can be used for the separation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their quantitative determination. 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. MACHERY-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
- 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. MACHERY-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

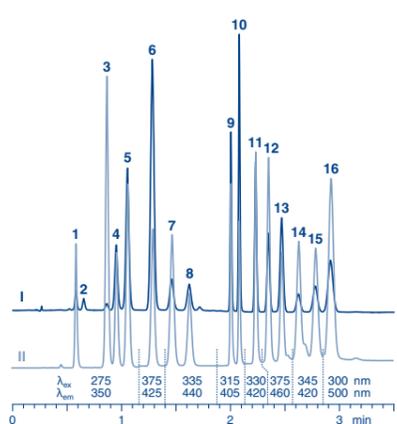
As stationary phase NUCLEODUR® C₁₈ PAH columns contain a special octadecyl phase based on fully synthetic spherical silica (type B); NUCLEOSIL® C₁₈ PAH columns are based on spherical silica (type A). The columns are recommended for a gradient separation of 16 PAHs in accordance with EPA. Moreover, separations of further PAH compounds such as PAHs according to EFSA can also be realized. A large assortment of PAH application notes can be found in the MN application database (www.mn-net.com/apps).

Analysis of 16 PAHs in accordance with EPA

Column: EC 100/4 NUCLEODUR® C₁₈ PAH, 3 µm
Eluent: A) methanol – water (80:20, v/v)
B) acetonitrile
Gradient: 2–20% B in 1.2 min, 20–100% B in 0.5 min,
100% B for 2.5 min, 100–2% B in 0.4 min
Flow rate: 2.5 mL/min
Temp.: 35 °C
Detection: UV, 254 nm (I), Fluorescence (II)
Peaks:

- 1. Naphthalene
- 2. Acenaphthylene*
- 3. Acenaphthene
- 4. Fluorene
- 5. Phenanthrene
- 6. Anthracene
- 7. Fluoranthene
- 8. Pyrene
- 9. Benz[a]anthracene
- 10. Chrysene
- 11. Benzo[b]fluoranthene
- 12. Benzo[k]fluoranthene
- 13. Benzo[a]pyrene
- 14. Dibenzo[ah]anthracene
- 15. Benzo[ghi]perylene
- 16. Indeno[1,2,3-cd]pyrene

* not detectable by fluorescence



MN Appl. No. 123820

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, particularly for samples with difficult matrices (e.g., soil, oil, food), the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see www.mn-net.com or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and/or loss of performance is observed.

Sample

Polycyclic aromatic hydrocarbons have to be determined in diverse matrices (e.g., water, soil, oil). Thus, an effective sample preparation is necessary. Therefore solid phase extraction (SPE) has been established in the last years (for SPE applications see www.mn-net.com/apps). The prepared sample is reconstituted in acetonitrile or methanol. Residues of nonpolar solvents in the sample are detrimental to the reproducibility of retention times. 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

PAH columns are supplied with the eluent acetonitrile – water (70:30, v/v). As eluents acetonitrile or methanol with pure water are typically used. Tetrahydrofuran can also be applied as eluent additive. Buffers can be used – but they are generally not added. The pH stability of the column from 2–8 must be considered. An eluent containing buffer must always be removed by rinsing the column with at least 10 column volumes acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v) directly after finishing a measurement. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane filter and degassed.

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 from 20 °C up to 35 °C are common usage for PAH separations. 60 °C are possible as maximum temperature for the columns. But higher temperatures reduce the lifetime. However, the 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.

Detection

Spectrophotometers, mass spectrometers, refractometers and electrochemical detectors can be used with the columns. UV (250–280 nm), diode array or fluorescence detection at different wavelengths for excitation and emission are used for the detection of PAHs. (Acenaphthylene cannot be analyzed with fluorescence detection.)

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 acetonitrile – water (70:30, v/v) is recommended for storage. For long-term storage mobile phases containing inorganic salts are not recommended (see regeneration). Methanol is also not recommended for a longer storage, because of a possible impurity with metal ions (e.g., iron(III)). For column storage be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. Under these circumstances rinse the column with approx. 10 column volumes of the eluent of storage at a flow rate of max. 0.2 mL/min.

Troubleshooting

The following outline describes the symptoms of performance loss and their cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Columns based on silica are robust and hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment will help to minimize these risks.

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

Symptom / Error / Cause	Prevention / Remedy
Baseline drift · insufficient period for 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 beforehand check solubility of buffer / 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 / replace fittings consider pH range 2–8 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:
 - after usage of buffer first with acetonitrile – water or methanol – water (10:90, v/v)
 - 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 (70:30, 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]	Column volume [mL]			
	ID [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 organic-aqueous eluent systems (e.g., acetonitrile or methanol – water) are recommendable. Please consider regeneration after usage of buffers. 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.
- The usage of a guard column for samples with difficult matrices (e.g., soil, oil, food) is advisable.
- 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 (70:30, 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 MACHERY-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