



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 Umweltschutzrichtlinien 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).

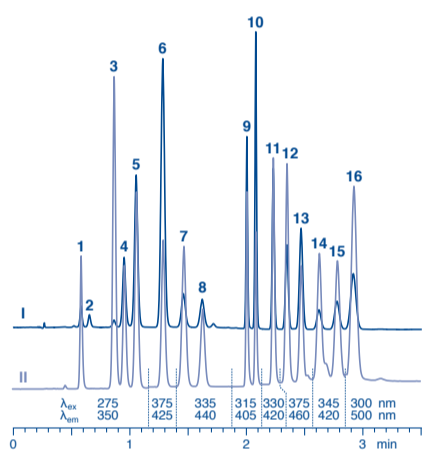
Analyse der 16 PAHs nach EPA

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]perylen

* 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: 0,2–2,5 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 Säulenthmostatierung
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 / 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
150		0,45	1,05	1,90
250		0,80	1,75	3,15

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.
 - Filtrieren 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 0,2–2,5 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!

... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Website mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: www.mn-net.com/apps