Mein Persönliches Handbuch
My Personal Handbook

Inhaltsverzeichnis

1. HPLC in der Laborpraxis
1.1 Grundlagen der HPLC
1.1.1 IUPAC-Nomenklatur (Auszug)
1.1.2 Umrechnungstabellen
1.1.3 Nützliche Informationen
1.1.3.1 Lösemitteltabelle
1.1.3.2 Lösemittelmischbarkeitstabelle
1.1.4 Nützliche Formeln
1.1.4.1 Allgemeine Mischungsformeln für Flüssigkeiten
1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase/Säule
1.2.1 HPLC-Phasen und ihre Anwendung
1.2.2 USP-"L" Säulenspezifikation
1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule
1.2.4 Säulendimension
1.2.4.1 Narrowbore- und Microbore-HPLC
1.2.4.2 Schnelle HPLC
1.2.4.3 Präparative HPLC
1.2.4.4 Die Trennsäule und ihre Hardware
1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule
1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien
1.3.2 Polymer basierende Phasenmaterialien
1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen
1.5 Modifikationstabellen

Contents

1. HPLC in Laboratory Practice
1.1 Basic Principles of HPLC
1.1.1 IUPAC-Nomenclature (Excerpt)
1.1.2 Conversion Tables
1.1.3 Useful Information
1.1.3.1 Solvent Table
1.1.3.2 Solvent Miscibility Table
1.1.4 Useful Formulas
1.1.4.1 Mixing Formulas for Liquids
1.2 Selection of a Stationary Phase/Column
1.2.1 HPLC-Phases and Application areas
1.2.2 Corresponding to USP-"L" Phase Listing
1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column
1.2.4 Column Dimensions
1.2.4.1 Narrow-bore- and Micro-bore HPLC
1.2.4.2 High-Speed HPLC
1.2.4.3 Preparative HPLC
1.2.4.4 The Column and its Hardware
1.3 Column Usage and Column Care
1.3.1 Silica based Stationary Phases
1.3.2 Polymer based Stationary Phases
1.4 Troubleshooting for HPLC Columns
1.5 Modification Tables

Inhalt

Allgemeine Terminologie

Klassifizierung nach Retentionsmechanismen

Chromatographische Parameter

Das Chromatogramm

Die Mobile Phase

Retentionsparameter in der Säulenchromatographie

Relative Retentionswerte

Peakauflösung und Trennvermögen

Charakterisierung der Detektion

Rauschen, Drift und Nachweisgrenze

⋮ = für Auslassungen

Contents

General Terminology

Classification According to Retention Mechanism

Chromatographic Parameters

The Chromatogram

The Mobile Phase

Retention Parameters in Column Chromatography

Relative Retention Values

Peak Resolution and Peak Enrichment

Characterization and Detection

Noise, Drift and Detection Limit

⋮ = omitted passages

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur

Herausgegeben vom Arbeitskreis Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Bearbeitet von H. Engelhardt (Univ. Saarbrücken) und L. Rohrschneider (Münster).

Die vorliegende Zusammenstellung enthält die deutschsprachigen Ausdrücke, die grundlegenden Beziehungen und die Symbole für die chromatographischen Grundbegriffe entsprechend der IUPAC-Empfehlung „Nomenclature for Chromatography“ (Pure & Appl. Chem. Vol 65, 819-872, 1993). Ziel dieser Aufstellung ist eine Vereinheitlichung der verwendeten Ausdrücke für die chromatographischen Grundbegriffe und Symbole entsprechend der vorliegenden IUPAC-Nomenklatur für die Chromatographie.

Hier werden nur die wichtigsten Grundbegriffe aufgelistet. Die komplette Darstellung finden Sie auf den Internetseiten:

in Deutsch: http://www.bischoff-chrom.de
http://www.knauer.net
http://www.vdsoptilab.de
http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/pdf/CHROBEGR97.pdf
in Englisch: http://www.iupac.org/publications/pac/2001/pdf/7306x0969.pdf

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

IUPAC Nomenclature for Basic Terms and Definitions in Chromatography

The German translation of the IUPAC nomenclature was published by the chromatography workgroup of the Analytical Chemistry Division of the Society of German Chemists and was edited by H. Engelhardt (Univ. Saarbrücken) and L. Rohrschneider (Münster).

This collection of fundamental terms, basic ideas, and symbols for chromatographic terminology has been adapted from the IUPAC recommendations "Nomenclature for Chromatography" (Pure & Appl. Chem., Vol. 65, 819-872, 1993).

Only the most important basic terms are listed here. The complete list of terms can be found on these websites:

In German: http://www.bischoff-chrom.de
http://knauer.net
http://vdsoptilab.de
http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/pdf/CHROBEGR97.pdf
In English: http://www.iupac.org/publications/pac/2001/pdf/7306x0969.pdf

Allgemeine Terminologie

Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Substanzen zwischen zwei Phasen verteilt werden, von denen eine, die stationäre Phase, festliegt, während die andere, die mobile Phase, sich in einer bestimmten Richtung bewegt.

Ein ***Chromatogramm*** ist die Aufzeichnung eines Detektorsignals, in Abhängigkeit vom Ausflussvolumen der mobilen Phase oder der Zeit. Das Signal ist der Konzentration des Analyten in der mobilen Phase am Säulenausgang proportional. In der Dünnschichtchromatographie kann unter dem Begriff Chromatogramm auch die Abbildung der auf der DC-Schicht detektierten getrennten Zonen verstanden werden.

Ein ***Chromatograph*** ist die Zusammenstellung von Geräteteilen, mit denen eine chromatographische Trennung durchgeführt wird.

Die ***stationäre Phase*** ist eine der beiden Phasen, aus denen das chromatographische System besteht. Dabei kann es sich um eine feste Phase (Sorbens), eine flüssige Phase (Trennflüssigkeit) oder um ein Gel handeln. Die flüssige Phase ist auf einen Festkörper (Träger) aufgezogen, der auch am Trennprozess mitbeteiligt sein kann. Bei einer gebundenen Phase ist die trennwirksame Schicht chemisch an einen Träger oder an die Innenseite einer Kapillare gebunden.

General Terminology

Chromatography is a physical and chemical method of separation in which the components to be separated are distributed between two phases, one of which is stationary (the stationary phase) while the other (the mobile phase) moves in a definite direction.

A ***chromatogram*** is the graphical representation of a detector signal, dependent on the outflow volume of the mobile phase or the time. The signal is proportional to the concentration of analytes in the effluent at the column outlet. In planar chromatography, chromatogram may also refer to the paper or layer with the separated zones.

A ***chromatograph*** is the assembly of apparatus for carrying out chromatographic separations.

The ***stationary phase*** is one of the two phases forming a chromatographic system. It may be a solid (sorbent), a gel or a liquid. If a liquid, it may be distributed on a solid which might or might not contribute to the separation process. The liquid may also be chemically bonded to the solid (bonded phase) or immobilized onto it (immobilized phase). A bonded phase may also be chemically bonded to the inner surface of a capillary.

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Anmerkung: Die stationäre Phase kann auch als Packung der Säule, als Sorbens oder als chromatographisches Bett (Dünnschichtchromatographie) bezeichnet werden.

In der Gaschromatographie wird häufig eine Flüssigkeit als stationäre Phase verwendet, die manchmal missverständlich als "Flüssigphase" bezeichnet wird. Um Verwechslungen mit der flüssigen mobilen Phase zu vermeiden, sollte die Bezeichnung "Flüssige Stationäre Phase" verwendet werden.

Die ***mobile Phase*** durchströmt das Bett der stationären Phase in einer definierten Richtung. Sie kann flüssig (Flüssigchromatographie, LC), gasförmig (Gaschromatographie, GC) oder ein überkritisches Fluid (überkritische Fluidchromatographie, Supercritical fluid chromatograpy, SFC) sein. In der GC spricht man auch vom Trägergas, in der LC vom Eluenten, und in der DC vom Fließmittel.

Die ***Probe*** besteht aus einem Gemisch verschiedener Analyten (Komponenten), die durch Chromatographie getrennt (chromatographiert) werden sollen. Dabei werden sie von der mobilen Phase transportiert und aus der Säule eluiert, oder sie verbleiben bei der Dünnschichtchromatographie im chromatographischen Bett. Diesen Prozess bezeichnet man in der DC als "Entwicklung".

Als ***Zone*** versteht man einen Abschnitt im chromatographischen Bett, in dem sich eine oder mehrere Substanzen befinden können.

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

Note: The expression stationary phase is a general term which can be used to denote any of the different forms in which the stationary phase is used (the packing material of the column, a sorbent or a chromatographic bed in thin-layer chromatography).

Particularly in gas chromatography where the stationary phase is most often a liquid, the term liquid phase is used for it as compared to the gas phase, i.e. the mobile phase. However, the term liquid phase had also been used to distinguish the mobile phase from the solid phase, i.e. the stationary phase. Due to this ambiguity, the use of the term liquid phase is discouraged and the term liquid stationary phase is recommended.

The ***mobile phase*** flows through the stationary phase bed in a defined direction. The mobile phase can flow as a liquid (liquid chromatography, LC), as a gas (gas chromatography, GC), or as a supercritical fluid (supercritical fluid chromatography, SFC). The mobile phase is termed as the carrier gas in GC and as the eluents in LC.

The ***sample*** mixture consists of a number of analytes (components) that are to be separated by means of chromatography. These analytes are carried by the mobile phase and either eluted from the column (in LC) or deposited on the chromatographic bed (in TLC). In TLC this process is termed as development.

A ***zone*** is a region in the chromatographic bed where one or more components of the sample are located.

⋮

Klassifizierung nach Retentionsmechanismen

⋮

Von ***Normalphasenchromatographie*** (NPC) spricht man, wenn die stationäre Phase (z.B. Kieselgel oder Aluminiumoxid) polarer als der Eluent ist. Bei der ***Umkehrphasenchromatographie*** (Reversed-Phase Chromatography, RPC) ist dagegen die mobile Phase wesentlich polarer als die stationäre (z.B. mit Alkylgruppen modifiziertes Kieselgel).

Bei der ***isokratischen Analyse*** bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während des gesamten Elutionsvorgangs konstant. Im Gegensatz dazu wird bei der ***Gradientelution*** die Zusammensetzung der mobilen Phase kontinuierlich oder auch stufenweise (Stufengradient) verändert.

⋮

Chromatographische Parameter

In der Trennsäule befindet sich das ***Packungsmaterial***. Es ist ein adsorptions-aktiver oder modifizierter Festkörper, ein mit Trennflüssigkeit beschichtetes (imprägniertes) Trägermaterial oder ein gequollenes Gel. Der Festkörper kann vollständig porös

⋮

Classification According to Retention Mechanism

⋮

Normal-Phase Chromatography (NPC) is an elution procedure in which the stationary phase (e.g. silica gel or aluminum oxide) is more polar than the mobile phase. This term is used in liquid chromatography to emphasize the contrast to ***Reversed-Phase Chromatography*** (RPC) in which the mobile phase is substantially more polar than the stationary phase (e.g. silica gel modified with alkyl groups).

In isocratic analysis, the composition of the mobile phase remains constant during the elution process. In contrast, gradient elution varies the composition of the mobile phase either continuously or stepwise (step-gradient) during the elution process.

⋮

Chromatographic Parameters

The ***packing material*** with which the separation column is filled can be an adsorption-active or modified solid-state material, a liquid-coated (impregnable) carrier material or a swollen gel. The packing material can be completely porous (totally

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

sein (totally porous support) oder aus einem unporösen Kern und einer dünnen porösen Außen-Schicht bestehen (PLB: porous layer beads; pellicular packing; Dünnschichtteilchen). In der DC wird das Packungsmaterial durch Zusatz eines Binders auf der ebenen Unterlage fixiert.

Das Packungsmaterial ist charakterisiert durch den ***mittleren Teilchendurchmesser*** d_p und seinen ***mittleren Porenradius*** r_P. Für die chromatographische Wirksamkeit sind daneben die Teilchengrößenverteilung, die spezifische Oberfläche, das spezifische Porenvolumen und die chemische Zusammensetzung der Oberfläche von Bedeutung. In der Verteilungschromatographie ist die innere Oberfläche mit der flüssigen stationären Phase bedeckt. Die Beladung gibt man als den Massenprozentsatz (%) der Flüssigkeit bezogen auf die gesamte stationäre Phase (Flüssigkeit plus Träger) an.

Die ***Trennsäule*** (column) ist das Rohr mit der stationären Phase. Man unterscheidet zwischen gepackten Säulen, gefüllt mit Packungsmaterialien, und offenen Kapillarsäulen (open tubular columns), bei denen die innere Wand selbst als stationäre Phase wirkt oder ein dünner Flüssigkeitsfilm bzw. eine dünne Schicht eines Festkörpers als stationäre Phase dienen. Die mobile Phase kann hier ungehindert und ohne Umwege durch die Säule strömen.

⋮

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

porous support) or it may be composed of an impermeable core with a thin porous outer layer (PLB: porous layer beads; pellicular packing). In TLC, the packing material is fixed onto a base through the addition of a binder.

The packing material is characterized by its ***average particle diameter*** (d_p) and its ***average pore radius*** (r_P). Also of importance to the chromatographic efficiency are the particle size distribution, the specific surface, the specific pore volume, and the chemical composition of the particle surface. In distribution chromatography, the inner surface is coated with the liquid stationary phase. The load is given as the mass percentage (%) of the liquid in relation to the total stationary phase (liquid + carrier).

The ***separation column*** is the tube in which the stationary phase is packed. Packed columns (filled with packing material) are different from open tubular columns in which the inner surface itself or a thin liquid film on the solid material acts as the stationary phase. The mobile phase flows unimpeded and without diversion through the packed column.

⋮

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Das ***Säulenvolumen*** V_C ist das geometrische Volumen der Trennsäule, das mit der Packung gefüllt ist

$$V_C = A_C \cdot L = r_C^2 \pi \cdot L = \frac{d_C^2}{4} \cdot L$$

wobei A_C der innere ***Säulenquerschnitt*** und L die mit stationärer Phase gepackte bzw. beschichtete ***Säulenlänge*** ist. Der Säulendurchmesser ist d_C, der Radius r_C.

Das ***Durchflussvolumen*** V_M einer Trennsäule bestimmt man über die ***Durchflusszeit*** t_M einer nicht zurückgehaltenen und nicht ausgeschlossenen Probe, einer Inertsubstanz. In der Flüssigchromatographie entspricht das Durchflussvolumen dem Volumen der mobilen Phase in der Trennsäule. Volumina außerhalb der Trennsäule werden dabei vernachlässigt. Das Volumen der mobilen Phase in der Säule setzt sich zusammen aus dem Anteil, der sich zwischen den Teilchen befindet, dem Zwischenkornvolumen V_O (interparticle volume) und dem Porenvolumen V_P, der Säulenpackung (GC: Trägermaterial).

$$V_M = V_O + V_P$$

⋮

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

The ***column volume*** V_C is the geometric volume of the column which is filled with packing material:

$$V_C = A_C \cdot L = r_C^2 \pi \cdot L = \frac{d_C^2}{4} \cdot L$$

whereby A_C is the ***column cross-sectional area*** and L is the length of the ***column bed*** (the length of the column which is packed or coated with the stationary phase). The column diameter is d_C and the radius is r_C.

The ***hold-up volume*** V_M of a column is determined through the ***hold-up time*** t_M of an unretained analyte, an inert substance. In liquid chromatography the hold-up volume is the volume of the mobile phase in the separation column. Any volume outside of the separation column is not considered. The volume of the mobile phase in the column is made up of the portion which is in between the particles (the interparticle volume, V_O) and the pore volume (V_P) of the packing material.

$$V_M = V_O + V_P$$

⋮

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Chromatographische Parameter

In der Flüssigchromatographie unterscheiden sich die porösen stationären Phasen stark in ihrem Porenvolumen. Daher spielen hier die verschiedenen Volumenanteile in der Trennsäule eine wichtigere Rolle und sind im Gegensatz zur Gaschromatographie experimentell zu bestimmen. Das ***Zwischenkornvolumen*** V_o zwischen den Teilchen kann man aus der Durchflusszeit eines Polymers bestimmen, dessen Molekulargewicht so groß ist, daß es nicht mehr in die Poren der stationären Phase eindringen kann.
Das Porenvolumen (intraparticle volume; V_P) läßt sich in der LC bei bekanntem Volumenstrom F der flüssigen mobilen Phase aus der Differenz der Durchflusszeiten der Inertsubstanz (t_M) und der des Polymers (t_o) ermitteln:

$$V_P = (t_M - t_o) \cdot F$$

$$V_P = V_M - V_o$$

Die Differenz zwischen V_c und V_M entspricht dem Volumenteil des Gerüstes der stationären Phase in der Trennsäule.

Anmerkung: In der IUPAC Empfehlung wird das Zwischenkornvolumen V_o mit dem Durchflussvolumen V_M gleichgesetzt. Für poröse stationäre Phasen bedeutet dies, dass der in den Poren befindliche Volumenanteil V_P beim Volumen V_M der mobilen Phase in der Säule nicht mit berücksichtigt wird.

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

Chromatographic Parameters

In liquid chromatography the porous stationary phases vary widely in their pore volumes. Therefore the variety of these pore volumes play a more important role in LC and can also be more readily experimentally determined than in other types of chromatography. The ***interparticle volume*** V_o can be determined from the hold-up time of a polymer whose molecular weight is so large that it cannot penetrate the pores of the stationary phase.

The pore volume (intraparticle volume, V_P) can be calculated in LC at a known mobile phase flow rate F from the difference of the hold-up times of the inert substance (t_M) and that of the polymer (t_o):

$$V_P = (t_M - t_o) \cdot F$$

$$V_P = V_M - V_o$$

The difference between V_c and V_M corresponds to the volume portion of the stationary phase material in the separation column.

Note: In the IUPAC recommendations, the interparticle volume V_o is considered equal to the hold-up volume V_M. This means that for porous stationary phases the volume situated in the pores V_P at a volume of V_M in the column is not taken into consideration.

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Bei der speziellen Nomenklatur zur Ausschlusschromatographie wird dagegen zwischen dem Zwischenkornvolumen und dem Porenvolumen (dort Intraparticle Volume V_i) unterschieden.

Als totale ***Porosität*** ε_t bezeichnet man das Verhältnis des Volumens der mobilen Phase in der Säule (V_M bzw. V_G) bezogen auf das Säulenvolumen V_c:

$$\varepsilon_t = V_M / V_c$$

Entsprechend kann man eine ***Zwischenkornporosität*** ε_o, bezogen auf das ***Zwischenkornvolumen*** (nach IUPAC ε) und eine ***Porenporosität*** ε_p aus dem Porenvolumen definieren:

$$\varepsilon_o = V_o / V_c$$

$$\varepsilon_P = V_P / V_c$$

Die totale Porosität ist die Summe beider Porositäten

$$\varepsilon_t = \varepsilon_o + \varepsilon_P$$

Alle Volumina außerhalb der Säule, zwischen der Probenaufgabe und der Trennsäule, sowie zwischen Trennsäule und Detektor bezeichnet man als ***Extrasäulenvolumen*** (extra column volume). Der Begriff Totvolumen sollte vermieden werden, da er missverständlich ist.

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

In the special nomenclature for exclusion chromatography, the interparticle volume and the intraparticle volume V_i (the pore volume) are distinguished from each other.

The ratio of the volume of the mobile phase in the column (V_M or V_G) to the column volume V_c is termed as the ***total porosity*** ε_t :

$$\varepsilon_t = V_M / V_c$$

According to this an ***interstitial porosity*** ε_o referring to the ***interstitial volume*** (according to IUPAC ε) and a ***pore porosity*** ε_p stemming from the pore volume can be defined:

$$\varepsilon_o = V_o / V_c$$

$$\varepsilon_P = V_P / V_c$$

The total porosity is the sum of both porosities

$$\varepsilon_t = \varepsilon_o + \varepsilon_P$$

All volumes outside of the column, between the sample injector and the separation column, as well as between the separation column and the detector, are termed as ***extra column volume.*** The term *dead volume* should be avoided as it is often misunderstood.

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

⋮

Als ***Phasenverhältnis*** β bezeichnet man das Volumenverhältnis der mobilen zur stationären Phase in der Säule:

$$\beta = V_M / V_S$$

Das Chromatogramm

In Abhängigkeit von der Art des Detektors erhält man das Chromatogramm differentiell oder integral (äußerst selten). Beide Aufzeichnungsarten sind in Abbildung 1 dargestellt.

Den Teil des Chromatogramms, der vom Detektor aufgezeichnet wird, wenn nur die mobile Phase eluiert wird, bezeichnet man als ***Basis- oder Grundlinie*** des Chromatogramms. Als ***Peak*** bezeichnet man den Detektorausschlag für einen Analyten in einem differentiellen Chromatogramm. Bei unvollständiger Trennung können sich unter dem Peak auch mehrere Substanzen verbergen. Die Interpolation der Grundlinie zwischen Anfang und Ende des Peaks bezeichnet man als die ***Basis des Peaks*** (CD in Abb.1). Die ***Peakfläche*** wird vom gesamten Peaksignal umschlossen (CHFEGJD in Abb.1). Das ***Peakmaximum*** (E in Abb.1) stellt den Extremwert des Detektorsignals dar, die ***Peakhöhe*** gibt den Abstand des Maximums von

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

⋮

The ratio of the mobile phase volume to the stationary phase volume in the column is termed as the phase ratio β:

$$\beta = V_M / V_S$$

The Chromatogram

Depending on the type of detector used, the chromatogram is obtained either as a differential or integral plot (the latter is rather seldom). Both types of plots are shown in Figure 1.

The part of the chromatogram which is recorded by the detector when only the mobile phase is being eluted is termed as the ***baseline*** of the chromatogram. A deflection in the baseline of a differential chromatogram that corresponds to an analyte eluting is termed as a ***peak***. It is possible that one peak can correspond to more than one substance when the separation is incomplete. The interpolation of the baseline between the beginning and ending points of the peak is termed as the ***peak base*** (CD in Fig. 1). The ***peak area*** is calculated from the total ***peak signal*** (CHFEGJD in Fig. 1). The ***peak maximum*** (E in Fig. 1) represents the most extreme value of the detector signal. The ***peak height*** gives the distance of this maximum from the

der Grundlinie des Peaks wieder (EB in Abb.1).
Einem Peak bei der differentiellen Aufzeichnung entspricht eine Stufe im integralen Chromatogramm. Die Stufenhöhe entspricht dabei der Peakfläche.

baseline of the peak (EB in Fig. 1).
One peak in the differential plot corresponds to one step in the integral chromatogram. The step height corresponds to the peak area.

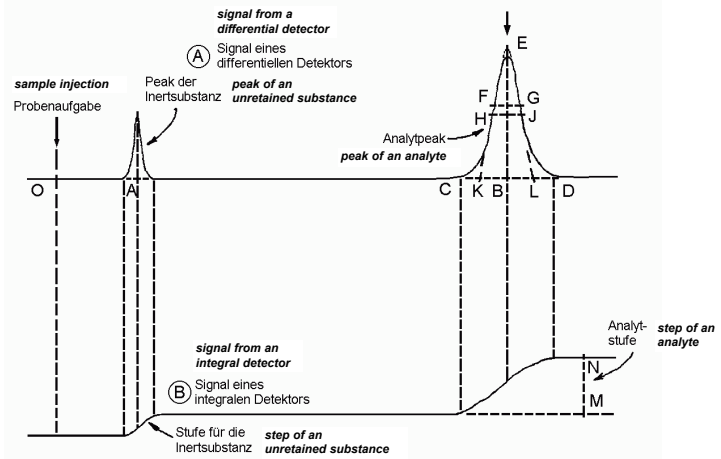


Abb./Fig.1

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Die mobile Phase

⋮

Die ***Lineargeschwindigkeit*** *u* der mobilen Phase bestimmt man aus der Länge der Säule und der Durchflusszeit einer nicht zurückgehaltenen Verbindung:

$$u = L / t_M$$

Sie lässt sich auch aus dem ***Volumenstrom*** F_c und dem freien Querschnitt der Säule, sowie der totalen Porosität der Packung berechnen:

$$u_o = F_c / (\varepsilon_t A_c)$$

⋮

Zur Beschreibung des chromatographischen Prozesses werden auch dimensionslose reduzierte Größen verwendet. Die ***reduzierte Lineargeschwindigkeit*** υ, bezieht die Geschwindigkeit der mobilen Phase auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Analyten in den Poren der stationären Phase:

$$\upsilon = \bar{u} / u_D = \bar{u} \cdot d_p / D_M$$

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

The Mobile Phase

⋮

The ***linear velocity*** (*u*) of the mobile phase is calculated from the length of the column and the hold-up time of an unretained substance:

$$u = L / t_M$$

The linear velocity can also be calculated from the ***flow rate*** F_c , the cross-sectional area of the column and the total porosity of the packing material:

$$u_o = F_c / (\varepsilon_t A_c)$$

⋮

Dimensionless reduced sizes are also used to describe chromatographic processes. The ***reduced linear velocity*** υ correlates the velocity of the mobile phase to the diffusion velocity of the analytes in the pores of the stationary phase:

$$\upsilon = \bar{u} / u_D = \bar{u} \cdot d_p / D_M$$

Retentionsparameter in der Säulenchromatographie

⋮

Das ***Durchflussvolumen (zeit)*** V_M , t_M (hold-up volume, time) gibt das Volumen der mobilen Phase (bzw. die entsprechende Zeit) an, das benötigt wird, um eine nicht zurückgehaltene Inertsubstanz zu eluieren. Eine Inertsubstanz ist dadurch gekennzeichnet, dass ihre Konzentration in der stationären Phase vernachlässigbar gering ist, verglichen mit ihrer Konzentration in der mobilen Phase. Das Durchflussvolumen entspricht dem Abstand OA in Abb.1 und schließt alle Volumina ein, die von der Probenaufgabe, dem Detektor und den Verbindungsröhren herrühren können. Der Zusammenhang zwischen Durchflusszeit und dem Durchflussvolumen ergibt sich aus:

$$t_M = V_M / F_c$$

⋮

Das Volumen der mobilen Phase, das in der Zeitspanne zwischen der Aufgabe der Probe und der Elution des Peakmaximums durch die Säule strömt, bezeichnet man als das ***Gesamtretentionsvolumen*** V_R bzw. die ***Gesamtretentionszeit*** t_R. Es entspricht dem Abschnitt OB in Abb. 1 und schließt das Durchflussvolumen der mobilen Phase ein. Analog ergibt sich:

$$t_R = V_R / F_c$$

Retention Parameters in Column Chromatography

⋮

The ***hold-up volume*** (V_M) or ***hold-up time*** (t_M) is the volume of the mobile phase (or the corresponding time) that is required for a unretained inert substance to elute. An inert substance is thereby identified as a substance whose concentration in the stationary phase is negligible compared to its concentration in the mobile phase. The hold-up volume corresponds to the distance OA in Fig. 1 and includes all additional volumes that may arise from the sample injector, the detector, and the capillary connections. The relationship between the hold-up time and the hold-up volume is given by:

$$t_M = V_M / F_c$$

⋮

The volume of mobile phase which flows through the column in the time span between the introduction of the sample and the elution of the peak maximum is termed as the ***total retention volume*** V_R or the ***total retention time*** t_R. It corresponds to segment OB in Fig. 1 and includes the hold-up volume of the mobile phase. The relationship between the total retention time and the total retention volume is given by:

$$t_R = V_R / F_c$$

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

⋮

Der ***Retentionsfaktor*** *k* ist ein Maß für die Zeit, die sich die Probe an/in der stationären Phase aufhält, bezogen auf die Aufenthaltszeit in der mobilen Phase: er gibt an, um wieviel länger sich die Probe an der stationären Phase aufhält als in der mobilen Phase. Mathematisch erhält man den Retentionsfaktor aus dem reduzierten Retentionsvolumen VR' und dem Durchflussvolumen des Eluenten bzw. den entsprechenden Zeiten:

$$k = \frac{(V_R - V_M)}{V_M} = \frac{V_R'}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Ist die Verteilungskonstante unabhängig von der Probenmenge, so gibt der Retentionsfaktor das Verhältnis der Masse der Probe in der stationären und mobilen Phase unter Gleichgewichtsbedingungen wieder.

$$k = \frac{\text{Masse der Probe in der stationären Phase}}{\text{Masse der Probe in der mobilen Phase}}$$

⋮

Im Falle der Gradientelution bzw. Temperaturprogrammierung kann man auch ***relative Gesamtretentionszeiten RRT*** zur Charakterisierung der Auftrennung

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

⋮

The ***retention factor*** *k* is a measure for the time which a sample spends held up in the stationary phase in relation to the time it spends in the mobile phase. In other words, k describes how much longer the sample resides in/on the stationary phase than in the mobile phase. Mathematically, the retention factor is obtained from the reduced retention volume VR' and the hold-up volume (or time) of the eluent:

$$k = \frac{(V_R - V_M)}{V_M} = \frac{V_R'}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

When the distribution constant is independent of the sample amount, the retention factor gives the relationship of the mass of the sample in the stationary and mobile phase at equilibrium.

$$k = \frac{\text{mass of the sample in the stationary phase}}{\text{mass of the sample in the mobile phase}}$$

⋮

In the case of gradient elution and/or temperature programming, one can also use the ***relative total retention time RRT*** to characterize the separation of two components.

zweier Komponenten verwenden. Hierzu werden keine reduzierten Retentionsangaben verwendet.

⋮

Relative Retentionswerte

⋮

Der ***Retentionsindex***, ***Kováts (Retentions)Index*** *I* ist eine relative Retentionsangabe, die durch Interpolation (üblicherweise in einer logarithmischen Skala) zwischen den reduzierten Retentionszeiten oder den Retentionsfaktoren einer Substanz (*i*) und den entsprechenden Werten zweier Standards (*z; z+1*) erhalten wird, die vor und hinter der Substanz eluieren. Der Kováts Retentionsindex kann nur unter isothermen Bedingungen gemessen werden. Im Retentionsindexsystem der Gaschromatographie verwendet man n-Alkane als Standards und eine logarithmische Interpolation:

$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{(z+1)} - \log X_z} + z \right]$$

X bezeichnet die entsprechenden reduzierten Retentionsparameter (t'_R, V'_R, V_N, k), *z* ist die C-Zahl des entsprechenden Alkans, das vor der Probe eluiert, (*z + 1*) die Kohlenstoffatom-Zahl des Alkans, das nach der Probe eluiert:

$$z < i < z + 1$$

Reduced retention times and volumes would not be used in this case.

⋮

Relative Retention Values

⋮

The ***retention index*** (Kováts index, *I*) is a relative retention parameter which is obtained through interpolation (usually in logarithmic scale) of the reduced retention times or the retention factors of a substance (*i*) and the corresponding values of two standards (*z; z+1*) that elute before and after the substance. The Kováts retention index can only be measured under isothermal conditions. In the retention index system for GC, one uses n-alkane standards and a logarithmic interpolation:

$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{(z+1)} - \log X_z} + z \right]$$

X stands for the corresponding reduced parameters (t'_R, V'_R, V_N, k); *z* is the C-number of the corresponding alkane which is eluted from the sample; (*z+1*) is the number of carbon atoms of the alkane which elutes after the sample:

$$z < i < z + 1$$

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

Der Kováts Index gibt die mit 100 multiplizierte Kohlenstoffzahl eines hypothetischen n-Alkans wieder, das die gleiche Retention wie die untersuchte Substanz hat.

Im Falle der temperaturprogrammierten GC kann ein ähnlicher Wert berechnet werden, wobei hier die gemessenen Werte anstelle ihrer Logarithmen verwendet werden. Da sowohl Zähler wie auch Nenner die Differenz zweier Zahlen enthalten, können die totalen Retentionsvolumina (-zeiten) verwendet werden. Man bezeichnet dies als den linearen Retentionsindex $I^{(T)}$

$$I^{(T)} = 100 \left[\frac{t^{(T)}_{Ri} - t^{(T)}_{Rz}}{t^{(T)}_{R(2+1)} - t^{(T)}_{R2}} + z \right]$$

wobei t_R die Gesamtretentionszeiten (Abstände auf dem Chromatogramm) bezeichnet, die unter den Bedingungen der programmierten GC erhalten wurden. Der Index $I^{(T)}$ ist selbstverständlich von den Indexwerten verschieden, die für die gleichen Komponenten unter isothermen Bedingungen an der gleichen Phase ermittelt werden.

⋮

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

The Kováts index gives the carbon number multiplied by 100 of a hypothetical n-alkane that has the same retention as the substance investigated.

In the case of temperature-programmed GC, a similar value can be calculated whereby the measured values instead of their logarithms can be used. Since the numerator as well as the denominator contain the difference of two numbers, the total retention volumes (or retention times) can be used. This is termed as the linear retention index $I^{(T)}$

$$I^{(T)} = 100 \left[\frac{t^{(T)}_{Ri} - t^{(T)}_{Rz}}{t^{(T)}_{R(2+1)} - t^{(T)}_{R2}} + z \right]$$

whereby t_R is the total retention times (distances on the chromatogram) which would be achieved under the conditions of programmed GC. The index $I^{(T)}$ is obviously distinct from the index value that would be obtained for the same components under isothermal conditions at the same phase.

⋮

Peakauflösung und Trennvermögen

Die Peak-***Auflösung*** (peak resolution) R_S berechnet sich aus dem Abstand der Peakmaxima und dem Mittelwert der Peakbreiten zwischen den Tangenten an der Basislinie w_b (Abstand KL in Abb.1).

$$R_S = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} - w_{b2})\,2} = \frac{2\,(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Bei nahe beieinander liegenden schmalen Peaks kann man annehmen, dass *wb1 ≈ wb2 ist* und kann dann die Breite des 2. Peaks durch die mittlere Peakbreite ersetzen:

$$R_S \approx (t_{R2} - t_{R1}) / w_{b2}$$

⋮

Die ***Bodenhöhe*** *H* erhält man durch Division der Säulenlänge mit der Bodenzahl:

$$H = L / N$$

Die Bodenhöhe wurde früher auch als Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (HETP) bezeichnet.

Peak Resolution and Peak Enrichment

The ***peak resolution*** R_S is calculated from the distance between two peak maxima and the average peak width between the tangents on the baseline w_b (distance KL in Fig. 1).

$$R_S = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} - w_{b2})\,2} = \frac{2\,(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

If the two peaks are narrow and lie very close to each other, one can assume that *wb1 ≈ wb2* and the width of the two peaks can be replaced by the average peak width:

$$R_S \approx (t_{R2} - t_{R1}) / w_{b2}$$

⋮

The ***plate height*** *H* is obtained by dividing the column length by the plate number:

$$H = L / N$$

The plate height was also known previously as the height equivalent of a theoretical plate.

⋮

Für die Verwendung von *H* und *h* gilt das gleiche wie bei der Bodenzahl ausgeführt wurde.

Man verwendet auch den Begriff der ***reduzierten Bodenhöhe*** *h*. Man erhält sie, indem man die Bodenhöhe mit dem mittleren Teilchendurchmesser dividiert:

$$h = H / d_p$$

⋮

Charakterisierung der Detektion

Ein ***differentieller Detektor*** misst jede Veränderung der Zusammensetzung des Eluats, während ***integrale Detektoren*** die Menge, die den Detektor erreicht, akkumulieren. Man unterscheidet ***konzentrationsempfindliche Detektoren***, deren Signal der Konzentration der Probe im Eluenten proportional ist, und ***massenstromempfindliche Detektoren***, deren Signal dem ***Massenstrom***, d.h. der Stoffmenge proportional ist, die in der Zeiteinheit den Detektor erreicht. Darauf beruht auch die einfachste Unterscheidung zwischen beiden Detektoren: Stoppt man bei

⋮

The same conditions as were implemented for plate numbers apply when using *H* and *h*.

The term ***reduced plate height*** *h* is obtained by dividing the plate height with the average particle diameter.

$$h = H / d_p$$

⋮

Characterization and Detection

A ***differential detector*** measures every change in the chemical composition of the eluent while an ***integral detector*** measures the quantity which accumulates at the detector. One differentiates amongst ***concentration-sensitive detectors*** whose signal is proportional to the sample concentration in the eluent and ***mass flow detectors*** which signal the mass flow, that is, the amount of substance which reaches the detector in the specified time unit is proportional. Thereby emerges the most obvious distinction between detectors: if one stops the eluent flow to a concentration-

einem konzentrationsempfindlichen Detektor den Eluentenstrom, so bleibt das Signal erhalten, die Probe befindet sich noch in der Detektorzelle. Bei einem massenempfindlichen Detektor fällt das Signal beim Abstellen des Flusses auf Null zurück.

Bei ***universellen Detektoren*** erhält man für jeden Analyten im Eluenten ein der Masse proportionales Signal. ***Selektive Detektoren*** zeigen die verschiedenen Gruppen der Analyten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit an. ***Spezifische Detektoren*** zeigen nur einzelne Analyten oder definierte Gruppen von Analyten an.

Die ***Detektorempfindlichkeit*** (sensitivity) *S* gibt die Signalgröße an, die man erhält, wenn eine Konzentrations- oder Masseneinheit den Detektor erreicht. Zur Berechnung der Detektorempfindlichkeit wird das erzeugte Signal als Peakfläche in mV·min, A·min oder AU·min angegeben. Diese Werte erhält man durch Integration der Peakfläche und Umwandlung in die entsprechenden Werte. Die Peakfläche kann man auch näherungsweise erhalten, wenn man die Peakhöhe (in mV, A oder AU) mit der Peakbreite in halber Höhe (in Zeiteinheiten) multipliziert. Die so erhaltene Fläche ist etwa 6% kleiner als die durch vollständige Integration erhaltene Fläche. Eine Gaußkurve ist dabei allerdings vorausgesetzt.
Bei konzentrationsempfindlichen Detektoren wird die Empfindlichkeit auf die Konzentration in der mobilen Phase bezogen:

$$S = A_i F_c / W_i = E_i / C_i$$

sensitive detector, the signal remains constant since the sample will still be present in the detector cell. With a mass flow detector, the signal falls back to zero when the eluent flow is cut off.

With ***universal detectors*** one obtains a signal proportional to the mass for every analyte in the eluent. ***Selective detectors*** indicate the various groups of analytes with variable sensitivity. ***Specific detectors*** identify only individual analytes or defined groups of analytes.

The ***detector sensitivity*** *S* indicates the signal output per unit concentration or unit mass of a substance in the mobile phase entering the detector. To calculate the detector sensitivity, the generated signal is converted to a peak area in mV·min, A·min or AU·min (AU = absorbance unit). This value is obtained by integration of the peak area and conversion into the corresponding value. The peak area can also be approximated by multiplying the peak height (in mV, A or AU) with the peak width at half height (in time units). The peak area calculated in this way will be 6 % less than the true integrated peak area, assuming that the peak is Gaussian.

In the case of concentration-sensitive detectors, sensitivity is calculated per unit concentration in the mobile phase:

$$S = A_i F_c / W_i = E_i / C_i$$

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenklatur (Auszug)

wobei A_i das Integral der Peakfläche (in mV min bzw. AU min), E_i die Peakhöhe (in mV oder AU), C_i die Konzentration der Substanz in der mobilen Phase am Detektor, F_c der für die Säulentemperatur korrigierte Volumenstrom ($cm^3 \cdot min^{-1}$) und W_i die Masse der vorhanden Substanz (in mg) darstellt. Die Dimensionen der Detektorempfindlichkeit sind ($mV \cdot cm^3$) mg bzw. ($AU \cdot cm^3$) mg.

Im Falle massenstromempfindlicher Detektoren wird die Empfindlichkeit für die Einheitsmasse einer Substanz, die den Detektor erreicht, angegeben:

$$S = A_i / W_i = E_i / M_i$$

wobei A_i die integrierte Peakfläche (in A·s), E_i die Peakhöhe (in A), W_i die Menge der vorhanden Probe (in g) darstellt. M_i stellt den Massenstrom (in g/s) dar, mit der die Probe den Detektor erreicht. Die Dimensionen der Detektorempfindlichkeit sind As/g oder C/g.

Die ***relative Anzeigeempfindlichkeit*** eines Detektors (relative detector response factor) *f* bezieht die Empfindlichkeit eines Detektors für eine Substanz (Subskript *i*) auf die einer Standardsubstanz (Subskript *st*). Man kann dabei gleiche Molzahl, gleiches Volumen oder gleiche Masse verwenden:

$$f_i = (A_i / A_{st}) f_{st}$$

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.1 IUPAC Nomenclature (Excerpt)

whereby A_i is the integral of the peak area (in mV·min or Au·min), E_i is the peak height (in mV or AU), C_i is the concentration of the substance in the mobile phase at the detector, F_c is the flow rate corrected for the column temperature (cm^3 min^{-1}) and W_i is the mass (in mg) of the detected substance. The dimensions for detector sensitivity are ($mV \cdot cm^3$) mg or ($AU \cdot cm^3$) mg.

In the case of mass flow detectors, the sensitivity for the unit mass of one substance which reaches the detector is given as:

$$S = A_i / W_i = E_i / M_i$$

whereby A_i is the integrated peak area (in A·s), E_i is the peak height (in A), and W_i is the amount (in g) of the detected sample. M_i indicates the mass flow (in g/s) with which the sample reaches the detector. The dimensions of the detector sensitivity are As/g or C/g.

The ***relative detector response factor*** (*f*) expresses the sensitivity of a detector for a substance (subscript *i*) relative to a standard substance (subscript *st*). It can be expressed on an equal mole, equal volume or equal mass (weight) basis:

$$f_i = (A_i / A_{st}) f_{st}$$

wobei A die entsprechenden Peakflächen und f_{st} den Anzeigefaktor des entsprechenden Standards darstellt. Üblicherweise wird für f_{st} ein willkürlich festgesetzter Wert (1 oder 100) gewählt.
Verwendet man relative molare Empfindlichkeiten und n-Alkane als Standards, wird für *fst* die mit 100 multiplizierte C-Zahl als Standard (z.B. 600 für Hexan) eingesetzt. Wird der Anzeigefaktor in Masse bzw. Gewicht ausgedrückt, können die bestimmten Empfindlichkeiten durch die Peakflächen ersetzt werden.

Auch der ***relative Kalibrierfaktor*** wird nach DIN 51405 (Gaschromatographische Analyse, Allgemeine Arbeitsgrundlagen, Beuth Verlag, Berlin, 1987) mit f_i bezeichet. Der Kalibrierfaktor wird zur quantitativen Auswertung von Chromatogrammen verwendet, wobei die Peakflächen mit den jeweiligen stoffspezifischen relativen Kalibrierfaktoren multipliziert werden. Zur eindeutigen Unterscheidung der beiden Faktoren wird empfohlen, den relativen Anzeigefaktor eines Detektors mit $f_{d(i)}$ zu bezeichnen und für den relativen Kalibrierfaktor das $f_{K(i)}$ zu verwenden. Beide Faktoren sind einander umgekehrt proportional, wenn sie auf die gleiche Standardsubstanz bezogen sind:

$$f_{k(i)} = 1 / f_{d(i)}$$

Der Ausdruck Responsefaktor, der gelegentlich für beide Faktoren verwendet wird, sollte wegen der Verwechslungsgefahr vermieden werden.

whereby A refers to the peak area of the compound of interest (subscript *i*) and standard (subscript *st*) respectively, and f_{st} is the response factor of the standard compound.
Usually an arbitrary value (e.g. 1 or 100) is assigned to f_{st}. Expressing the relative molar responses and using n-alkanes as the standards, the assigned value of f_{st} is usually the number of carbon atoms of the n-alkanes multiplied by 100 (e.g. 600 for n-hexane). If the relative detector response factor is expressed on an equal mass (weight) basis, the determined sensitivity values can be substituted for the peak area.

The ***relative calibration factor*** is designated as f_i according to DIN 51405 (Gas Chromatography Analysis, General Work Fundamentals, Beuth Verlag, Berlin, 1987). The calibration factor is used for quantitative analysis of chromatograms whereby the peak areas are multiplied with their respective substance-specific calibration factors. To clearly differentiate between the two factors it is recommended that the relative response factor of a detector be denoted as $f_{d(i)}$ and the relative calibration factor be denoted as $f_{K(i)}$. Both factors are inversely proportional to each other when they relate to the same standard substance:

$$f_{k(i)} = 1 / f_{d(i)}$$

The term response factor, occasionally used for both of the above factors, should be avoided in order to prevent possible confusion.

Rauschen, Drift und Nachweisgrenze

⋮

Der ***lineare Bereich*** (linear range) eines Detektors gibt den Konzentrationsbereich wieder, in dem die Empfindlichkeit des Detektors konstant ist. Üblicherweise werden Abweichungen von ± 5 % toleriert.
Den besten Weg, um die Linearität eines Detektors zu ermitteln, stellt die Auftragung der Detektorempfindlichkeit gegen die aufgegebene Probemenge, Konzentration oder Massengeschwindigkeit dar. Die obere Grenze des Linearitätsbereichs kann graphisch ermittelt werden. Sie wird überschritten, wenn die Messwerte aus einem vorgegebenen Bereich (± x % Abweichung) herausfallen (vgl. Abb.3). Die untere Grenze des Linearitätsbereichs ist immer die Nachweisgrenze für die Substanz.

Alternativ kann der lineare Bereich durch die Auftragung der Peakfläche (-höhe) gegen die Konzentration oder den Massenstrom der Probe im Detektor bestimmt werden. Man verwendet entweder eine lineare oder eine doppel-logarithmische Auftragung. Die obere Grenze der Linearität ist der Bereich, in dem die Kurve mit einem vorgegebenen Prozentsatz (± x % Abweichung) von einer Geraden abweicht. Numerisch kann der lineare Bereich durch das Verhältnis der oberen Grenze des Linearitätsbereichs und der Nachweisgrenze ausgedrückt werden. Wenn der lineare Bereich eines Detektors beschrieben werden soll (sowohl als Kurve als auch mit einem Zahlenwert), müssen die Testsubstanz, die Nachweisgrenze und die vorgegebene tolerierte Abweichung jeweils mit angegeben werden.

Noise, Drift and Detection Limit

⋮

The ***linear range*** of a detector gives the concentration range in which the sensitivity of the detector remains constant. Generally deviations of ±5% are tolerated.

The best way to determine the linearity of a detector is to graph the detector sensitivity against the injected sample amount, concentration, or bulk velocity. The upper limit of the linear range can be graphically ascertained. The limit is reached (± x% deviation) when the measurement values fall outside of one default area (see Fig.3 below). The lower limit of the linear range is always the detection limit of the substance.

Alternatively, the linear range can be determined by depicting the peak area (or peak height) against the concentration or the mass flow of the sample in the detector. One can use either a linear or a double-logarithmic scale. The upper limit of the linear range is the area in which the curve deviates from a straight line by a certain default percentage (± x% deviation). The linear range can be numerically stated as the ratio of the upper limit of the linear range to the detection limit of the substance. If the linear range of a detector should be described (by using a curve or a numerical value), the test substance, the detection limit and the default tolerated deviation must each be specified.

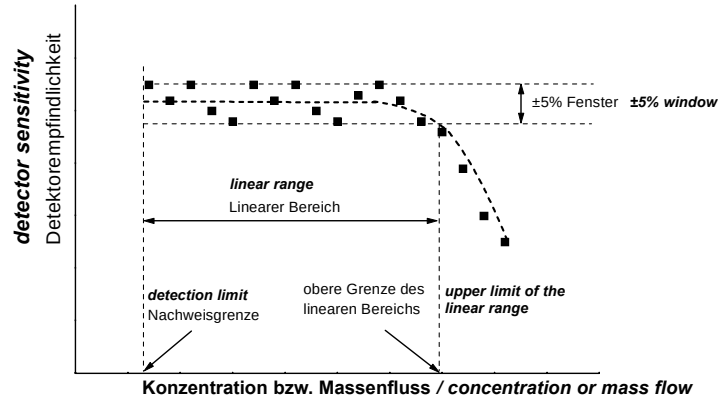


Abb./ *Fig. 3:* Linearitätsbereicheines chromatographischen Detektors / *linear range of a detector*

Der ***dynamische Bereich*** eines Detektors ist immer größer als der lineare Bereich. Er beschreibt den eichfähigen Bereich des Detektors über den linearen Bereich hinaus, wo eine Erhöhung der Probekonzentration noch eine signifikante Änderung des Detektorsignals ergibt. Auch hier ist es unerlässlich, die genauen analytischen Bedingungen mit anzugeben.

The ***dynamic range*** of a detector is always greater than the linear range. It describes the part of the linear range over which it is possible to calibrate, where an increase in the sample concentration still gives a significant change in the detector signal. Also here, it is essential to give the exact analytical conditions.

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.2 Umrechnungstabellen

Temperature: Celcius - Fahrenheit

Celsius (°C)	Fahrenheit (°F)	Celsius (°C)	Fahrenheit (°F)	Celsius (°C)	Fahrenheit (°F)
0	32	75	167	155	311
1	34	80	176	160	320
5	41	85	185	165	329
10	50	90	194	170	338
15	59	95	203	175	347
20	68	100	212	180	356
25	77	105	221	185	365
30	86	110	230	190	374
35	95	115	239	195	383
40	104	120	248	200	392
45	113	125	257	205	401
50	122	130	266	210	410
55	131	135	275		
60	140	140	284		
65	149	145	293		
70	158	150	302		

a = °C

$$\frac{a \times 18}{10} + 32$$

c = °F

$$\frac{(c - 32) \times 10}{18}$$

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.2 Conversion Tables

Dimensions: U.S. to Metric

U.S. Fractional Inches	U.S. Decimal Inches	Metric
1/32"	0.031"	0.79 mm
1/16"	0.062"	1.57 mm
1/8"	0.125"	3.18 mm
3/16"	0.188"	4.78 mm
1/4"	0.250"	6.35 mm
5/16"	0.313"	7.95 mm
3/8"	0.375"	9.53 mm
7/16"	0.438"	11.13 mm
1/2"	0.500"	12.70 mm
9/16"	0.563"	14.30 mm
5/8"	0.625"	15.88 mm
11/16"	0.688"	17.48 mm
3/4"	0.750"	19.05 mm
13/16"	0.813"	20.65 mm
7/8"	0.875"	22.23 mm
15/16"	0.938"	23.83 mm
1"	1"	2.54 cm
2"	2"	5.08 cm
3"	3"	7.62 cm
4"	4"	10.16 cm
5"	5"	12.70 cm
6"	6"	15.24 cm
7"	7"	17.78 cm
10"	10"	25.40 cm

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.2 Umrechnungstabellen

Längenumrechnung / Conversion of length units

mm		inch			mm		inch	
0.4		1/64"	0.016		7.0			0.276
0.8		1/32"	0.031		7.9		5/16"	0.313
1.0			0.039		8.0			0.320
1.6		1/16"	0.063		9.0			0.354
2.0			0.079		10.0			0.394
3.0			0.118		12.7		1/2"	0.500
3.2		1/8"	0.125		20.0			0.787
4.0			0.157		25.4		1"	1.000
4.8		3/16"	0.188		30.0			1.181
5.0			0.197		40.0			1.575
6.0			0.236		50.0			1.969
6.4		1/4"	0.250		50.4		2"	2.000

Druckumrechnung / Pressure Conversion

Die Formel dient zur Berechnung des theoretischen Druckabfalls einer Kapillaren. / To calculate the theoretical pressure drop along a length of tubing, use the following formula:

$$\Delta P = ((F \times 8 \times L \times V) / (\pi \times r^4)) \times 2\,417\,296 \times 10^{-6}$$

Where: F = flow rate in ml / min V = viscosity in centipoise
L = tubing length in mm r = tubing inside radius in mm

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.2 Conversion Tables

Druckumrechnung / Pressure Conversion

bar	psi	MPa	Torr	atm
6.9	100	0.7	5.172	6.8
34.5	500	3.4	25.858	34.0
68.9	1.000	6.9	51.715	68.0
103.4	1.500	10.3	77.573	102.1
137.9	2.000	13.8	103.430	136.1
172.4	2.500	17.2	129.288	170.1
206.8	3.000	20.7	155.145	204.1
241.3	3.500	24.1	181.003	238.2
275.8	4.000	27.6	206.860	272.2
310.3	4.500	31.0	232.718	306.2
344.7	5.000	34.5	258.575	340.2
379.2	5.500	37.9	284.433	374.3
413.7	6.000	41.4	310.290	408.3
448.2	6.500	44.8	336.148	442.3
482.6	7.000	48.3	362.006	476.3
517.1	7.500	51.7	387.863	510.3
551.6	8.000	55.2	413.721	544.4
586.1	8.500	58.6	439.578	578.4
620.5	9.000	62.1	465.436	612.4
689.5	10.000	68.9	517.151	680.5

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.2 Umrechnungstabellen

Innendurchmesser und Volumen / Internal Diameters and Volumes

Millimeters	Inches	Wire Gauge	Microns	Volume µl/cm	Volume µl/in
0.025	0.001		25	0.005	0.013
0.051	0.002	-	51	0.020	0.051
0.064	0.0025	-	64	0.032	0.081
0.076	0.003	-	76	0.046	0.116
0.102	0.004	36	102	0.081	0.206
0.127	0.005	35	127	0.127	0.322
0.152	0.006	-	152	0.182	0.463
0.178	0.007	34	178	0.248	0.631
0.203	0.008	33	203	0.324	0.824
0.229	0.009	32	229	0.410	1.042
0.254	0.010	31	254	0.507	1.287
0.279	0.011	-	279	0.613	1.557
0.305	0.012	30	305	0.730	1.853
0.330	0.013	29	330	0.856	2.175
0.356	0.014	28	356	0.993	2.523
0.381	0.015	-	381	1.140	2.896
0.406	0.016	27	406	1.297	3.295
0.432	0.017	-	432	1.464	3.720
0.457	0.018	26	457	1.642	4.170
0.483	0.019	-	483	1.829	4.646
0.508	0.020	25	508	2.027	5.148
0.711	0.028	22	711	3.973	10.090
0.762	0.030	-	762	4.560	11.583
0.813	0.032	21	813	5.189	13.179
1.016	0.040	-	1016	8.107	20.593
1.067	0.042	19	1067	8.938	22.703
1.397	0.055	-	1397	15.328	38.933
1.575	0.062	-	1575	19.478	49.474

1.1 Basic Principles od HPLC

1.1.2 Conversion Tables

Gewinde / Threads

U.S. Customary Threads

	1:1	6x32
	1:1	10x32
	1:1	1/4x28
	1:1	5/16x24
	1:1	1/2x20

Metric Threads

	1:1	M6
	1:1	M8x1

Halten Sie zur Identifizierung eines Gewindes dieses über die obigen Gewindesilhouetten. / Hold your fitting over the thread silhouettes above to identify the threads.

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.2 Umrechnungstabellen

Pressure Dimension	Dimension mit Umrechnungsfaktor (2) Converted Dimension with Conversion Factor (2)					
Einheit Unit	$N \cdot m^{-2}$ (Pa)	bar	atm (kp/cm^2)	dyn/cm^2	Torr (mm Hg)	lbs/sq.in. (psi)
1 $N \cdot m^{-2}$ 1 Pa (1)	1	10^{-5}	$9.8692 \cdot 10^{-6}$	10	$7.50062 \cdot 10^{-3}$	$1.45038 \cdot 10^{-4}$
1 bar (1)	10^5	1	0.98692	10^6	750.062	14.5038
1 atm (kp/cm^2)	101325	1.01325	1	$1.01325 \cdot 10^6$	759.9988	14.6960
1 dyn/cm^2	10^{-1}	10^{-6}	$0.98692 \cdot 10^{-6}$	1	$0.750062 \cdot 10^{-3}$	$1.45038 \cdot 10^{-5}$
1 Torr (1 mm Hg)	133.3224	$1.333224 \cdot 10^{-3}$	$1.31579 \cdot 10^{-3}$	$1.333224 \cdot 10^3$	1	$1.93368 \cdot 10^{-2}$
1 lbs/sq.in. (psi)	6894.8	0.068948	0.068046	$0.068948 \cdot 10^6$	51.7148	1

(1) Gesetzliche Maßeinheiten / Legal Units of Measurement

(2) Beispiele / Examples: 1 Pa = $7.50062 \cdot 10^{-3}$ Torr 10 psi = 0.68046 atm

1.1 Basic Principles od HPLC

1.1.2 Conversion Tables

		Zeichen Symbol
10^{-1}	Deci	d
10^{-2}	Centi	c
10^{-3}	Milli	m
10^{-6}	Mikro	µ
10^{-9}	Nano	n
10^{-12}	Piko	p
10^{-15}	Femto	f
10^{-18}	Atto	a

Verhältnis Ratio	Potenz Power	%	g / kg	ppm µg / g mg / kg	ppb µg / kg ng / mg
1: 100	1×10^{-2}	1	10	10 000	
1: 1 000	1×10^{-3}	0.1	1	1 000	
1: 10 000	1×10^{-4}	0.01	0.1	100	
1: 100 000	1×10^{-5}	0.001	0.01	10	
1: 1 000 000	1×10^{-6}	0.000 1	0.001	1	1000
1: 10 000 000	1×10^{-7}	0.000 01	0.000 1	0.1	100
1: 100 000 000	1×10^{-8}	0.000 001	0.000 01	0.01	10
1: 1 000 000 000	1×10^{-9}	0.000 000 1	0.000 001	0.001	1

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.3 Nützliche Informationen

1.1.3.1 Lösemitteltabelle / Solvent Table etc.

Lösemittel/ Solvent	Polaritäts-index/ Polarity Index at 20°C	Refractive Index at 20°C	UV (nm) Cutoff bei/at 1 AU	Siede-punkt/ Boiling Point (°C)	Viskosität/ Viscosity (cPoise)	Löslichkeit in Wasser Solubility in water (% w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butanol	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
Butyl Acetate	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane[1]	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane[2]	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl sulfoxide[3]	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.3 Useful Information

1.1.3.1 Lösemitteltabelle / Solvent Table etc.

Lösemittel/ Solvent	Polaritäts-index/ Polarity Index at 20°C	Refractive Index at 20°C	UV (nm) Cutoff bei/at 1 AU	Siede-punkt/ Boiling Point (°C)	Viskosität/ Viscosity (cPoise)	Löslichkeit in Wasser Solubility in water (% w/w)
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether[4]	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone[5]	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
iso-Propanol[6]	3.9	1.377	210	82	2.30	100
di-iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Trichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

Synonym Table:
1 Ethylene Chloride
2 Methylene Chloride
3 Methyl Sulfoxide
4 tert-Butyl Methyl Ether
5 2-Butanone
6 2-Propanol

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.3 Nützliche Informationen

1.1.3.2 Lösemittel Mischbarkeitstabelle

	Xylene	Water	Trichloroethylene	Toluene	Tetrahydrofuran	di-iso-Propyl Ether	iso-Propanol[6]	n-Propanol	Pentane	Methyl Ethyl Ketone[5]	Methyl-t-Butyl Ether[4]	Methanol	Hexane	Heptane	di-Ethyl Ether	Ethyl Acetate	Ethanol	Dioxane	Dimethyl Sulfoxide[3]	Dimethylformamide	Dichloromethane[2]	1,2-Dichloroethane[1]	Cyclohexane	Chloroform	Carbon tetrachloride	Butyl Acetate	n-Butanol	Benzene	Acetonitrile	Acetone	Acetic Acid
Acetic Acid									■				■																		
Acetone																															
Acetonitrile									■				■	■									■								
Benzene		■																													
n-Butanol		■																													
Butyl Acetate		■																													
Carbon tetrachloride		■																													
Chloroform		■																													
Cyclohexane		■										■							■	■											
1,2-Dichloroethane[1]		■																													
Dichloromethane[2]		■																													
Dimethylformamide	■					■			■				■	■																	
Dimethyl sulfoxide[3]	■								■				■	■	■																
Dioxane																															
Ethanol																															
Ethyl Acetate		■																													

Lösemittel Mischbarkeitstabelle

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.3 Useful Information

1.1.3.2 Solvent Miscibility Table

Synonym Table:

1 Ethylene Chloride
2 Methylene Chloride
3 Methyl Sulfoxide
4 tert-Butyl Methyl Ether
5 2-Butanone
6 2-Propanol

■ **Nicht mischbar / Immiscible**
(das heißt, dass bei einigen Konzentrationsverhältnissen zwei Phasen gebildet werden / that means that in some proportions two phases will be produced)

□ **Mischbar / Miscible**

Solvent Miscibility Table

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.3 Nützliche Informationen

1.1.3.2 Lösemittel Mischbarkeitstabelle

	Xylene	Water	Trichloroethylene	Toluene	Tetrahydrofuran	di-iso-Propyl Ether	iso-Propanol[6]	n-Propanol	Pentane	Methyl Ethyl Ketone[5]	Methyl-t-Butyl Ether[4]	Methanol	Hexane	Heptane	di-Ethyl Ether	Ethyl Acetate	Ethanol	Dioxane	Dimethyl Sulfoxide[3]	Dimethylformamide	Dichloromethane[2]	1,2-Dichloroethane[1]	Cyclohexane	Chloroform	Carbon tetrachloride	Butyl Acetate	n-Butanol	Benzene	Acetonitrile	Acetone	Acetic Acid
di-Ethyl Ether		■																													
Heptane		■										■																			
Hexane		■										■																			
Methanol									■																						
Methyl-t-Butyl Ether[4]		■																													
Methyl Ethyl Ketone[5]		■																													
Pentane		■																													
n-Propanol																															
iso-Propanol[6]																															
di-iso-Propyl Ether		■																													
Tetrahydrofuran																															
Toluene		■																													
Trichloroethylene	■	■																													
Water	■																														
Xylene																															

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.3 Useful Information

1.1.3.2 Solvent Miscibility Table

Synonym Table:

1 Ethylene Chloride
2 Methylene Chloride
3 Methyl Sulfoxide
4 tert-Butyl Methyl Ether
5 2-Butanone
6 2-Propanol

■ **Nicht mischbar / Immiscible**
(das heißt, dass bei einigen Konzentrationsverhältnissen zwei Phasen gebildet werden / that means that in some proportions two phases will be produced)

□ **Mischbar / Miscible**

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.4 Nützliche Formeln

1.1.4.1 Allgemeine Mischungsformeln für Flüssigkeiten

$$A = C - B \qquad B = \frac{C(a - c)}{a - b} \qquad C = B\,\frac{(a - b)}{a - c}$$

Hierbei ist:
A = Gewicht der Ausgangsflüssigkeit
B = Gewicht der Zusatzflüssigkeit
C = Gewicht der fertigen Mischung

a = Gehalt in Gew.- %
b = Gehalt in Gew.- %
c = Gehalt in Gew.- %
Für Wasser als Zusatzflüssigkeit gilt b = 0

Beispiel:
Benötigt werden 10 l einer Akkumulatoren-Schwefelsäure mit der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,28.
Zur Verfügung steht eine konzentrierte Schwefelsäure mit der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,84 = (97,5 Gew.-%).
Wieviel Schwefelsäure und wieviel Wasser werden für die Herstellung von 10 l (= 12,8 kg) Akkumulatoren-Schwefelsäure gebraucht?

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.4 Useful Formulas

1.1.4.1 Mixing Formulas for Liquids

whereby:
A = mass of the initial solution
B = mass of the solution being added
C = mass of the resulting solution

a = content in mass %
b = content in mass %
c = content in mass %
When water is the liquid being added, b = 0

Example:
10 l of a sulfuric acid solution for a rechargeable battery with a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.28 is to be prepared.
A concentrated solution of sulfuric acid with a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.84 (= 97.5 mass %) is available.
How much concentrated sulfuric acid and how much water should be used to produce 10 l (= 12.8 kg) of battery fluid?

1.1 Grundlagen der HPLC

1.1.4 Nützliche Formeln

1.1.4.1 Allgemeine Mischungsformeln für Flüssigkeiten

Berechnung:

Aus der Tabelle „Schwefelsäure“ entnehmen wir:
$D^{20°}_{4°}$ = 1,28 entspricht 37,36 Gew.-%

$$B = \frac{C(a - c)}{a - b} = \frac{12{,}80\ (97{,}50 - 37{,}36)}{97{,}50 - 0} = \textbf{7,895 kg Zusatzflüssigkeit (Wasser)}$$

A = C - B = 12,8 - 7,895 = **4,905 kg konzentrierte Schwefelsäure**

Es müssen also 4,905 kg (=2,666 l) konzentrierte Schwefelsäure der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,84 in 7,895 kg (= l) Wasser gegeben werden, um 10 l Akkumulatorensäure der Dichte $D^{20°}_{4°}$ =1,28 zu erhalten.

Mischungsregel

Beispiel: Aus einer Schwefelsäure der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,435 und einer der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,824 soll eine Schwefelsäure der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,520 bereitet werden

1,435 ⟶
1,824 ⟶ 1,520

1.1 Basic Principles of HPLC

1.1.4 Useful Formulas

1.1.4.1 Mixing Formulas for Liquids

Calculation:

According to the entry for "sulfuric acid" in the table:
$D^{20°}_{4°}$ = 1.28 corresponds to 37.36 mass %

$$B = \frac{C(a - c)}{a - b} = \frac{12.80\ (97.50 - 37.36)}{97.50 - 0} = \textbf{7.895 kg of liquid added (water)}$$

A = C - B = 12.8 - 7.895 = **4.905 kg concentrated sulfuric acid**

Therefore, 4.905 kg (=2.666 l) concentrated sulfuric acid is to be added to water in order to produce 10 l of battery fluid with a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.28.

Mixing rule

Example: A sulfuric acid solution with a density $D^{20°}_{4°}$ = 1.435 is to be mixed with a sulfuric acid solution with a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.824 to yield a sulfuric acid solution with a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.520.

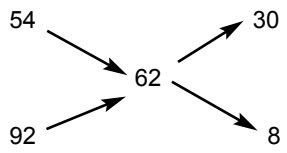
1.435 ⟶
1.824 ⟶ 1.520

1.1.4 Nützliche Formeln

1.1.4.1 Allgemeine Mischungsformeln für Flüssigkeiten

Aus der Tabelle „Schwefelsäure“ ergibt sich, dass Schwefelsäure der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,435 = 54,00 Gew.-% H_2SO_4, die der Dichte $D^{20°}_{4°}$ = 1,824 = 92,00 Gew.-% H_2SO_4 und jene der Dichte $D^{20°}_{4°}$ =1,520 = 62,00 Gew.-% H_2SO_4 enthält.

Man bildet jetzt das **Mischungskreuz**:



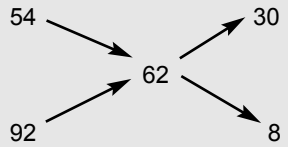
d.h. es müssen 30 Gewichtsteile 54,00%iger Schwefelsäure mit 8 Gewichtsteilen 92,00%iger Schwefelsäure vermischt werden, um eine Schwefelsäure mit 62,00% Gew.-% H_2SO_4, entsprechend $D^{20°}_{4°}$ = 1,520, zu erhalten.

1.1.4 Useful Formulas

1.1.4.1 Mixing Formulas for Liquids

According to the entry for "sulfuric acid" in the table:
A solution of sulfuric acid with a $D^{20°}_{4°}$ = 1.435 corresponds to 54.00 mass % H_2SO_4, a solution of sulfuric acid with a $D^{20°}_{4°}$ = 1.824 corresponds to 92.00 mass % H_2SO_4, a solution of sulfuric acid with a $D^{20°}_{4°}$ = 1.520 corresponds to 62.00 mass % H_2SO_4.

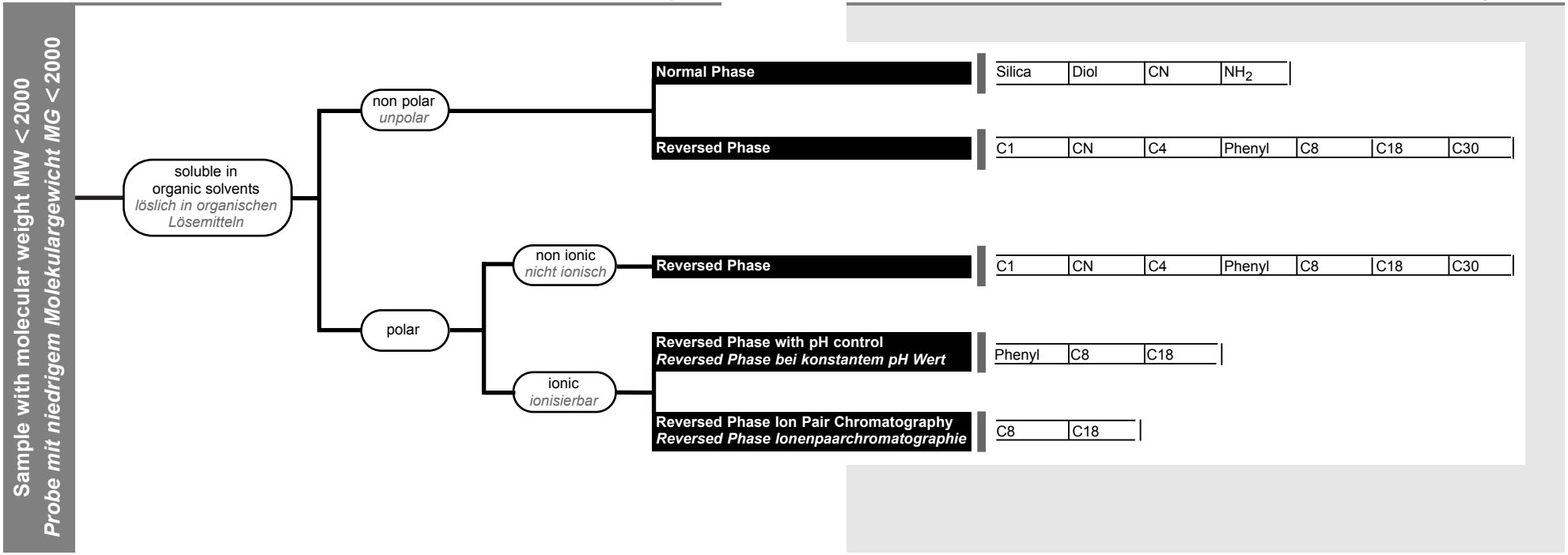
You can now use these values to set up the "**mixing cross**" equation:



This means that 30 parts of 54.00% H_2SO_4 are to be mixed with 8 parts of 92.00% H_2SO_4 in order to obtain a solution of sulfuric acid with 62.00% H_2SO_4, corresponding to a density of $D^{20°}_{4°}$ = 1.520.

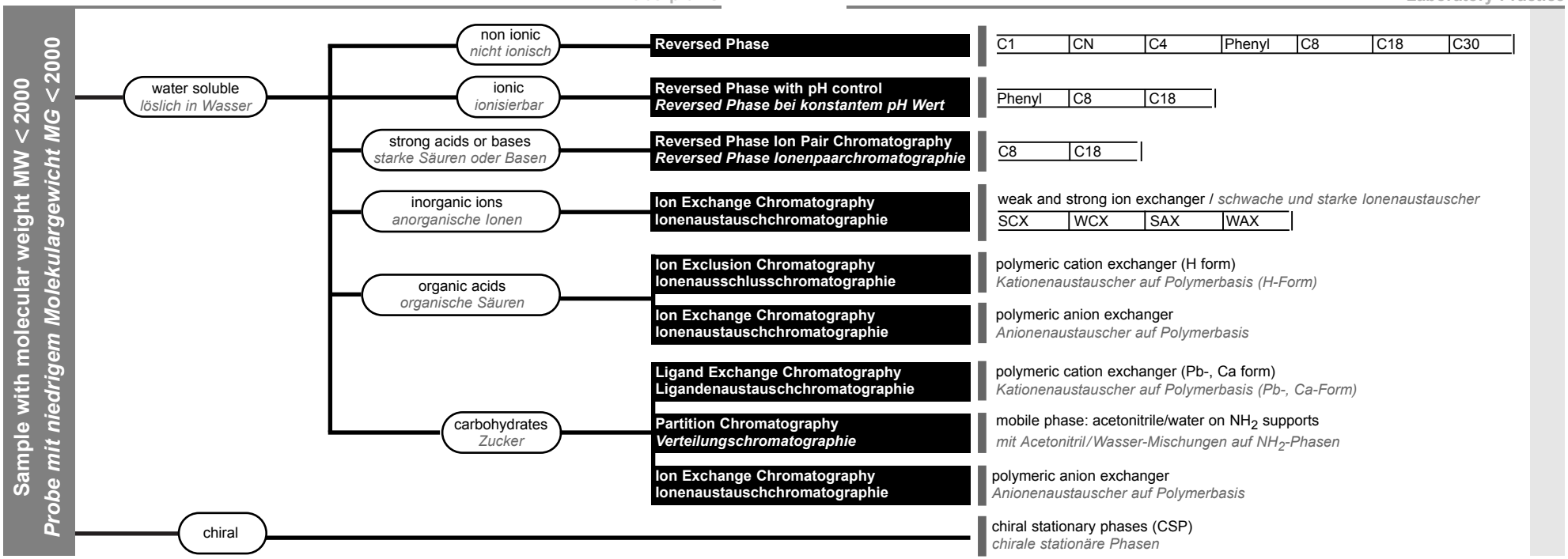
1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

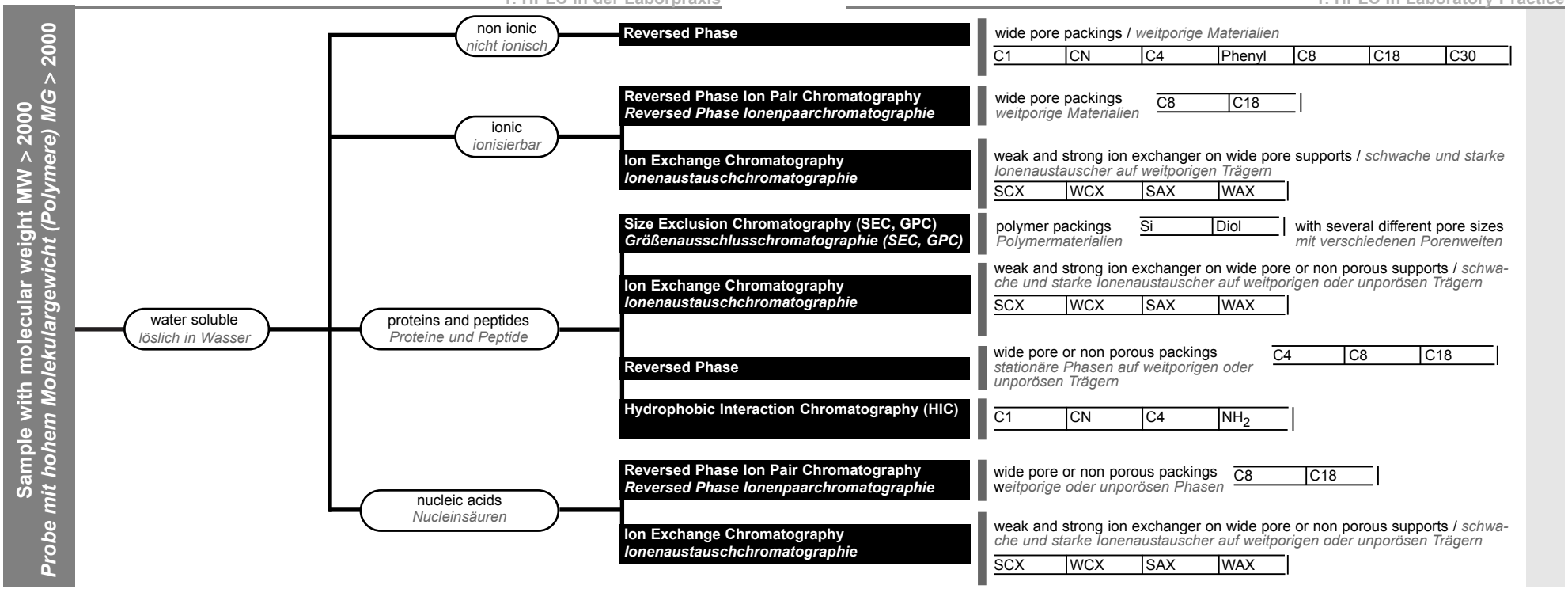


Säulen- und Phasenauswahl

Column and Phase Selection

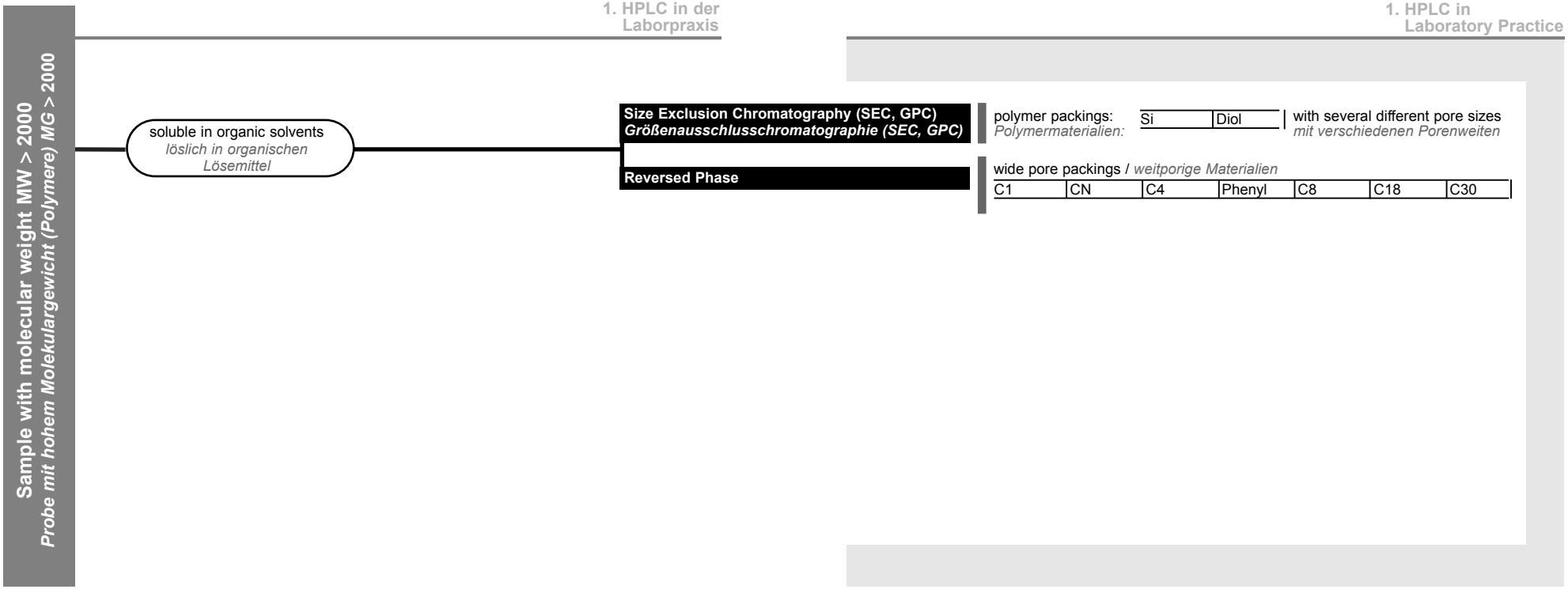
1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column



Säulen- und Phasenauswahl

Column and Phase Selection

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.1 HPLC-Phasen und ihre Anwendung

Tipps zur Phasenauswahl
In der modernen HPLC stehen dem Anwender eine Vielzahl von Säulenfüllmaterialien zur Verfügung. Jedes ist für eine spezielle Selektivität bei bestimmten Trennproblemen entwickelt worden. Oft ist es schwierig, die richtige Phase für eine Anwendung auszuwählen. Die Eignung der diversen Packungsmaterialien hängt in erster Linie von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der zu bestimmenden Substanzen (Analyten) ab, also wie diese Analyten mit der Oberfläche der verschiedenen Packungsmaterialien in Wechselwirkung treten.
Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über gängige Bezeichnungen von Packungsmaterialien und deren Einsatzgebiete.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.1 HPLC Phases and Application areas

Phase selection guide
In modern HPLC there is a wide selection of different HPLC column materials available. Each one has been developed to provide a selectivity for a particular type of compound. It can often appear difficult to choose which material will be best for a particular application. The suitability of an HPLC material for an analysis is dependent upon the physical and chemical properties of the analytes and how they will interact with the particular packing.
The following table contains an explanation of the common terms and descriptions in use and an indication of suitable applications for the various chromatographic phases.

Name	Normal Phase	Reversed Phase	Ionpairing	Application
Silica	x			Non-polar, and moderately polar non-ionic organic compounds.
C1		x		Least retentive of all alkyl group bonded phases for non-polar solutes. Typically used for moderately polar and multi-functional compounds.
C4		x	x	Separation of peptides and proteins. Shorter retention than C8, C18.
C8, Octyl		x	x	Moderately to highly polar compounds, small peptides and proteins, polar pharmaceuticals, steroids, environmental samples.
C18		x	x	Most retentive of the alkyl-bonded phases for non-polar to moderately polar compounds. Used widely for pharmaceuticals, steroids, fatty acids, phthalates, environmental etc.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.1 HPLC-Phasen und ihre Anwendung

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.1 HPLC Phases and Application areas

Name	Normal Phase	Reversed Phase	Ionpairing	Application
CN, Cyano Propyl nitrile	x	x		Unique selectivity for polar compounds, more suitable than base silica for normal-phase gradient separations. When used in reverse-phase the selectivity is different to that of the C8, C18 phases. Useful for a wide range of pharmaceutical applications. Useful for mixtures of very different solutes.
NH_2 Amino propyl	x	x		RP, Carbohydrate analysis and other polar compounds. Weak anion exchanger, anions and organic acids using buffers and organic modifiers. NP, Alternative selectivity to silica. Good for aromatics.
Phenyl		x	x	Aromatic compounds.
Diol	x	x		RP, Proteins, peptides. NP, similar selectivity to silica, but less polar.
SCX Strong Cation Exchanger				Organic bases.
SAX Strong Anion Exchanger				Organic acids, nucleotides and nucleosides.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L1

Octadecyl silane chemically bonded to porous silica or ceramic micro-particles, 3 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurosil-Bioselect 300 C18 *	KNAUER
Eurospher 100 C18 *	KNAUER
Hipak ODS AB *	Bischoff Chromatography
Kromasil C18	EKA Nobel
LiChrosorb RP 18	Merck KGaA
LiChrospher 100 RP 18	Merck KGaA
LiChrospher 100 RP 18e	Merck KGaA
Nucleosil C18	Macherey-Nagel
Nucleosil C18 AB	Macherey-Nagel
Partisil ODS	Whatman Inc.
Partisil ODS2	Whatman Inc.
Partisil ODS3	Whatman Inc.
ProntoSIL C18 H	Bischoff Chromatography
ProntoSIL C18 SH	Bischoff Chromatography
ProntoSIL C18 AQ	Bischoff Chromatography
ProntoSIL C18 AQ Plus	Bischoff Chromatography
ProntoSIL C18 ace-EPS	Bischoff Chromatography
ProntoSIL EuroBond C18 *	Bischoff Chromatography

* USP-Listung in Vorbereitung.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L1

BRAND NAME	MANUFACTURER
ProntoSIL Hypersorb ODS *	Bischoff Chromatography
ProntoSIL Spheribond ODS1*	Bischoff Chromatography
ProntoSIL Spheribond ODS2*	Bischoff Chromatography
Sphere-Image ODS1 *	Phenomenex
Sphere-Image ODS2 *	Phenomenex
Superspher 100 RP 18	Merck KGaA
Superspher 100 RP 18e	Merck KGaA
Techsphere ODS *	Grace Vydac
Zorbax ODS	Agilent Technologies

L2

Octadecyl silane chemically bonded to silica gel of a controlled surface porosity that has been bonded to a solid spherical core, 30 to 50 µm in diameter.

L3

Porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 Si *	KNAUER
Kromasil Si	EKA Nobel
LiChrosorb Si 100	Merck KGaA
LiChrosorb Si 60	Merck KGaA
LiChrospher Si-60	Merck KGaA

* USP listing in preparation.

1.2.2 Entsprechend USP „L”- Phasenpezifikation

L3

BRAND NAME	MANUFACTURER
LiChrospher Si-100	Merck KGaA
Micra NPS-Silica *	Eprogen
Nucleosil Silica	Macherey-Nagel
Partisil Si	Whatman Inc.
ProntoSIL SI	Bischoff Chromatography
Superspher 60 Si	Merck KGaA
Superspher 100 Si *	Merck KGaA
Zorbax SIL	Agilent Technologies

L4 **Silica gel of controlled surface porosity bonded to a solid spherical core, 30 to 50 µm in diameter.**

L5 **Alumina of controlled surface porosity bonded to a solid spherical core, 30 to 50 µm in diameter.**

L6 **Strong cation-exchange packing-sulfonated fluorocarbon polymer coated on a solid spherical core, 30 to 50 µm in diameter.**

L7 **Octylsilane chemically bonded to totally porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

* USP-Listung in Vorbereitung.

USP „L“- Phasenspezifikation

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L7

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 C8	KNAUER
HiPak C8 AB *	Bischoff Chromatography
Kromasil C8	Eka Nobel
LiChrosorb RP 8	Merck KGaA
LiChrosorb RP Select B	Merck KGaA
LiChrospher 100 RP 8	Merck KGaA
LiChrospher 100 RP 8 e	Merck KGaA
LiChrospher 60 RP select B	Alltech Associates, Inc.
Nucleosil C8	Macherey-Nagel
Nucleosil C8 ec	Macherey-Nagel
Partisil CCS/C8	Whatman Inc.
ProntoSIL C8 SH	Bischoff Chromatography
ProntoSIL C8 ace-EPS	Bischoff Chromatography
Sphere-Image C8 *	Phenomenex
Supersher 60 RP 8	Merck KGaA
Supersher 60 RP 8e	Merck KGaA
Supersher 60 RP select B	Merck KGaA
Techsphere Octyl *	Grace Vydac
Zorbax C8	Agilent Technologies

* USP listing in preparation.

USP „L“ Phase Listing

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L8

An essentially monomolecular layer of aminopropylsilane chemically bonded to totally porous silica gel support, 3 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 NH2	KNAUER
Kromasil NH2	EKA Nobel
LiChrosorb NH2	Merck KGaA
LiChrospher NH2	Merck KGaA
Nucleosil NH2	Macherey-Nagel
ProntoSIL AMINO	Bischoff Chromatography
ProntoSIL AMINO H	Bischoff Chromatography
ProntoSIL AMINO E	Bischoff Chromatography
Sphere-Image Amino *	Phenomenex
Techsphere Amino *	Grace Vydac
Zorbax NH2	Agilent Technologies

L9

10 µm irregular or spherical, totally porous silica gel having a chemically bonded, strongly acidic cation-exchange coating, 3 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Nucleosil SA	Macherey-Nagel
Partisil SCX	Whatman Inc.
Sphere-Image SCX *	Phenomenex
Zorbax SCX	Agilent Technologies

* USP-Listung in Vorbereitung.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L10

Nitrile groups chemically bonded to porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 CN	KNAUER
Kromasil 60 CN	EKA Nobel
LiChrosorb CN	Merck KGaA
LiChrospher CN	Merck KGaA
Nucleosil CN	Macherey-Nagel
ProntoSIL CN	Bischoff Chromatography
Sphere-Image CN *	Phenomenex
Zorbax CN	Agilent Technologies

L11

Phenyl groups chemically bonded to porous silica particles, 5 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Kromasil Phenyl *	EKA CHEMICALS
Nucleosil Phenyl	Macherey-Nagel
ProntoSIL Phenyl	Bischoff Chromatography
Zorbax Phenyl	Agilent Technologies

* USP listing in preparation.

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L12 **A strong anion-exchange packing made by chemically bonding a quartenary amine to a solid silica spherical core, 30 to 50 µm in diameter.**

L13 **Trimethylsilane chemically bonded to porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Zorbax TMS	Agilent Technologies

L14 **Silica gel having a chemically bonded, strongly basic quaternary ammonium anion-exchange coating, 5 to 10 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Nucleosil SB	Macherey-Nagel
Partisil SAX	Whatman Inc.
Sphere-Image SAX *	Phenomenex
Zorbax SAX	Agilent Technologies

* USP-Listung in Vorbereitung.

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L15 **Hexylsilane chemically bonded to totally porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
ProntoSIL Spheribond C6	Bischoff Chromatography

L16 **Dimethylsilane chemically bonded to porous silica particles, 5 to 10 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 C1 *	KNAUER
Lichrosorb RP2	Merck KGaA
ProntoSIL C1	Bischoff Chromatography

L17 **Strong cation-exchange resin consisting of sulfonated cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer in the hydrogen form, 7 to 11 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Carbex II (H^+) *	VDS optilab
Hamilton HC-75H	Hamilton Co.
Hamilton PRP-X200	Hamilton Co.
Hamilton PRP-X300	Hamilton Co.
Eurokat H *	KNAUER

* USP listing in preparation.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L18

Amino and cyano groups chemically bonded to porous silica particles, 3 to 10 µ in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Partisil PAC	Whatman Inc..

L19

Strong cation-exchange resin consisting of sulfonated cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer in the calcium form, about 9 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Carbex II Ca *	VDS optilab
Hamilton HC 40 *	Hamilton Co.
Hamilton HC 75 Ca	Hamilton Co.
Eurokat Ca *	KNAUER

L20

Dihydroxypropane groups chemically bonded to porous silica particles, 5 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurospher 100 Diol *	KNAUER
Kromasil Diol *	EKA CHEMICALS

* USP-Listung in Vorbereitung.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L20

BRAND NAME	MANUFACTURER
LiChrosorb Diol	Merck KGaA
LiChrospher 100 Diol	Merck KGaA
Nucleosil Diol	Macherey-Nagel
ProntoSIL Diol	Bischoff Chromatography

L21

A rigid, spherical styrene-divinylbenzene copolymer, 5 to 10 µm in diameter.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Hamilton PRP-1	Hamilton Co.

L22

A cation-exchange resin made of porous polystyrene gel with sulfonic acid groups, about 10 µm in size.

BRAND NAME	MANUFACTURER
Hamilton PRP-X200	Hamilton Co.
Hamilton PRP-X300	Hamilton Co.

L23

An anion-exchange resin made of porous polymethacrylate or polyacrylate gel with quartenary ammonium groups, about 10 µm in size.

* USP listing in preparation.

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L24 **A semi-rigid hydrophilic gel consisting of vinyl polymers with numerous hydroxyl groups on the matrix surface, 32 to 63 µm in diameter.**

L25 **Packing having the capacity to separate compounds with a molecular weight range from 100-5000 (as determined by polyethylene oxide), applied to neutral, anionic, and cationic water-soluble polymers. A poly-methacrylate resin base, cross-linked with polyhydroxylated ether (surface contained some residual carboxyl functional groups) was found suitable.**

L26 **Butyl silane chemically bonded to totally porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurosil Bioselect 300 C4	KNAUER
Eurospher 100 C4 *	KNAUER
Kromasil C4	EKA Nobel
ProntoSIL C4	Bischoff Chromatography

L27 **Porous silica particles, 30 to 50 µm in diameter.**

*USP-Listung in Vorbereitung.

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L28 **A multifunctional support, which consists of a high purity, 100 Å, spherical silica substrate that has been bonded with anionic exchanger, amine functionatily in addition to a conventional reversed phase C8 functionality.**

L29 **Gamma alumina, reverse-phase, low carbon percentage by weight, alumina-based polybutadiene spherical particles, 5 µm in diameter with a pore volume of 80 Å.**

L30 **Ethyl silane chemically bonded to totally porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

L31 **A hydroxide-selective strong anion-exchange resin-quaternary amine bonded on latex particles attached to a core of 8.5 µm macroporous par ticles having a pore size of 2000 Å and consisting of ethylvinylbenzene cross-linked with 55% divinylbenzene.**

L32 **A chiral ligand-exchange resin packing-L-proline copper complex covalently bonded to irregularly shaped silica particles, 5 to 10 µm in diameter.**

* USP listing in preparation.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L33 **Packing having the capacity to separate dextrans by molecular size over a range of 4.000 to 500.000 daltons. It is spherical, silica-based, and processed to provide pH stability.**

L34 **Strong cation-exchange resin consisting of sulfonated cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer in the lead form, about 9 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Hamilton HC-75 Lead Form	Hamilton Co.
Eurokat Pb *	KNAUER

L35 **A zirconium-stabilized spherical silica packing with a hydrophilic (diol-type) molecular monolayer bonded phase having a pore size of 150 Å.**

L36 **A 3.5-dinitrobenzoyl derivatice of L-phenylglycine covalently bonded to 5 µm amminopropyl silica.**

L37 **Packing having the capacity to separate proteins by molecluar size over a range of 2.000 to 40.000 daltons. It is a polymethacrylate gel.**

* USP-Listung in Vorbereitung.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L38 **A methacrylate-based size-exclusion packing for water soluble samples.**

L39 **A hydrophilic polyhydroxymethacrylate gel of totally porous spherical resin.**

L40 **Cellulose tris-3.5-dimethylphenylcarbamate coated porous silica particles, 5 µm to 20 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurocel 01 *	KNAUER

L41 **Immobilized α_1-acid glycoprotein on spherical silica particles, 5 µm in diameter.**

L42 **Octylsilane and octadecylsilane groups chemically bonded to porous silica particles, 5 µm in diameter.**

L43 **Pentafluorophenyl groups chemically bonded to silica particles by a propyl spacer, 5 to 10 µm in diameter.**

* USP listing in preparation.

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L44	A multifunctional support, which consists of a high purity, 60 Å, spherical silica substrate that has been bonded with a cationic exchanger, sulfonic acid functionality in addition to a conventional reversed phase C8 functionality.
L45	Beta cyclodextrin bonded to porous silica particles, 5 to 10 µm in diameter.
L46	Polysterene/divinylbenzene substrate agglomerated with quaternary amine functionalized latex beads about 10 µm in diameter.
L47	High capacity anion-exchange microporous substrate, fully functionalized with a trimethylamine group, 8 µm in diameter.
L48	Sulfonated, cross-linked polystyrene with an outer layer of submicron, porous, anion-exchange micro beads, 15 µm in diameter.
L49	A reversed-phase packing made by coating a thin layer of polybutadiene on to spherical porous zirconia particles, 3 to 10 µm in diameter.

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

Multifunction resin with reverse-phase retention and strong anion-exchange functionalities. The resin consists of ethylvinylbenzene, 55% cross-linked with divinylbenzene copolymer, 3 to 15 µm in diameter, and a surface area not less than 350 m^2 per g. Substrate is coated with quartenary ammonium functionalized latex particles consisting of styrene cross-linked with divinylbenzene.	L50
Amylose tris-3.5-dimethylphenylcarbamate-coated, porous, spherical, silica particles, 5 to 10 µm in diameter.	L51
A strong cation exchange resin made of porous silica with sulfopropyl groups, 5 to 10 µm in diameter.	L52
Weak cation-exchange resin consisting of ethylvinylbenzene, 55% cross-linked with divinylbenzene copolymer, 3 to 15 µm diameter. Substrate is surface grafted with carboxylic acid and/or phosphoric acid functionalized monomers. Capacity not less than 500 µEq/column.	L53
A size exclusion medium made of covalent bonding of dextran to highly cross-linked porous agarose beads, about 13 µm in diameter.	L54
A strong cation exchange resin made of porous silica coated with polybutadiene-maleic acid copolymer, about 5 µm in diameter.	L55

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L56 **Propyl silane chemically bonded to totally porous silica particles, 3 to 10 µm in diameter.**

▪
▪
▪

L62 **C30 silane bonded phase on a fully porous spherical silica, 3 to 15 µm in diameter.**

BRAND NAME	MANUFACTURER
ProntoSIL C30	Bischoff Chromatography

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Einführung

In der modernen HPLC gibt es heute eine große Auswahl an Füllmaterialien. Alleine in der Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) gibt es mehr als 700 verschiedene stationäre Phasen. All diese Phasen wurden dazu entwickelt um für bestimmte Trennprobleme die optimale Selektivität zu bieten. Für den Anwender ist es nun sehr schwer, aus dieser Vielzahl von Materialien, das richtige für seine bestimmte Trennung zu finden.
Die Eigenschaften der verschiedenen stationären Phasen hängen im Wesentlichen von den physikochemischen und chemischen Eigenschaften ab. Wichtige Kenngrößen sind dabei Partikeldurchmesser, Metallgehalt, Porengröße, Oberfläche, Art der funktionellen Gruppe auf der Oberfläche, sowie Dichte der Oberflächenbelegung (bzw. Kohlenstoffgehalt). In Abhängigkeit von diesen Parametern unterscheiden sich die verschiedenen stationären Phasen deutlich in ihren chromatographischen Eigenschaften.
Die wichtigsten Eigenschaften von Umkehrphasen sind:

- Hydrophobie
- Silanophile Aktivität
- Shape Selectivity
- Polare Selektivität
- Metallgehalt

Im Folgenden werden diese Begriffe kurz beschrieben und anhand von Beispielen deren Einfluss auf die Chromatographie erklärt.

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Introduction

A large selection of packing materials have been developed over the years for use in modern HPLC. Just in the area of reversed-phase chromatography (RP-HPLC), more than 700 stationary phases are available. All of these phases were developed to provide optimal selectivity when dealing with specific separation problems. This however also makes it very difficult for the user to find the best material for his separation.

The characteristics of stationary phases are fundamentally dependent on their physicochemical and chemical properties. Important properties include particle diameter, metal content, pore size, surface, the type of functional group on the surface, and also the density of the surface modification (e.g. carbon load). In addition to these parameters, the various stationary phases available can also be differentiated based on their chromatographic properties.
The most important properties of reversed phases are:

- Hydrophobicity
- Silanophilic Activity
- Shape Selectivity
- Polar Selectivity
- Metal Content

These terms will be described briefly below. Each properties' influence on chromatography will be explained through appropriate examples.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Hydrophobie

Unter der Hydrophobie versteht man die Eigenschaft einer stationären Phase, eine hydrophobe Verbindung möglichst stark zu retardieren. Die Stärke der Retentionskapazität der einzelnen Phasen hängt im Wesentlichen von der Oberflächenmodifizierung und der spezifischen Oberfläche des chromatographischen Trägers ab. Die höchste Hydrophobie besitzen C18 Phasen. Wird die Kettenlänge größer, so kann aus sterischen Gründen lediglich eine geringere Belegungsdichte erreicht werden. Ist die Kettenlänge kleiner, so stehen den Analyten eine geringere Anzahl an Adsorptionsstellen zur Verfügung, was zu einer geringeren Hydrophobie führt.

Die spezifische Oberfläche des Trägers bestimmt, wie viele funktionelle Gruppen aufgebunden werden können. Daher gilt: Je höher die Oberfläche, umso höher der Kohlenstoffgehalt und damit die Hydrophobie der Phase.
Die Oberfläche eines Kieselgels ist von der Porengröße und dem Porenvolumen abhängig. Bei etwa gleichem Porenvolumen gilt: Je größer die Poren, umso kleiner die Oberfläche und die Hydrophobie der stationären Phase.
Die Zusammenhänge sind in Abb. 1 anhand der Trennung eines Testgemisches dargestellt. Bei den 4 Phasen handelt es sich um die gleiche Oberflächenmodifizierung auf Kieselgelen unterschiedlicher Porenweite.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

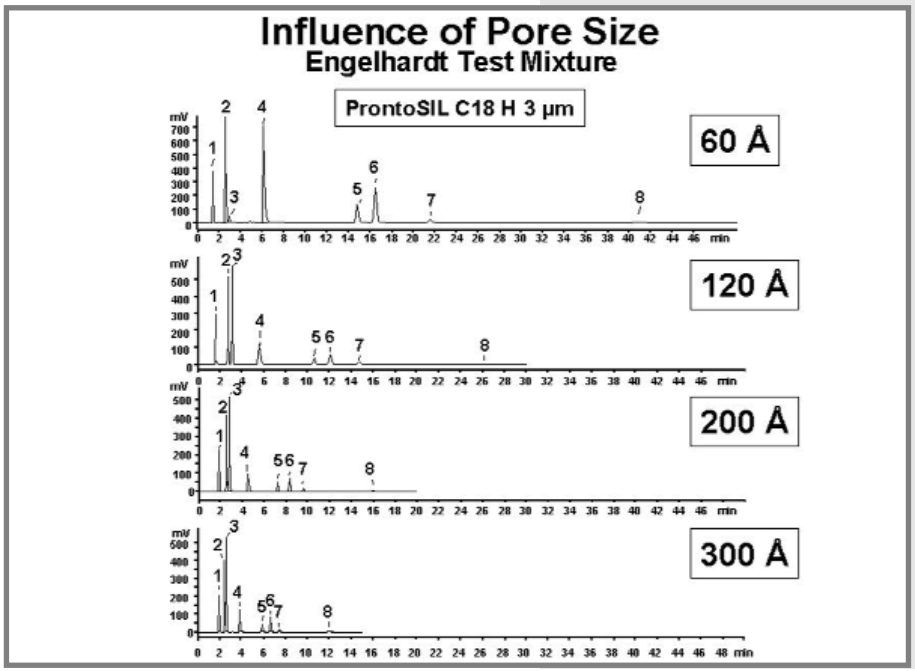
Hydrophobicity

Hydrophobicity refers to the property of a stationary phase to retain a hydrophobic compound as much as possible. The strength of the retention capacity of an individual phase depends substantially on the surface modification and the specific surface of the chromatographic support. C18 phases have the highest hydrophobicity. If the hydrocarbon chains are increased, the loading capacity becomes lower, solely due to steric hinderance. If the hydrocarbon chains are shorter, the analytes will have fewer positions to adsorb, leading to lower hydrophobicity.
The specific surface of the support determines how many functional groups will be bonded. Therefore it is said that the larger the surface, the higher the carbon load, and therefore, the hydrophobicity of the phase.

The surface of a silica gel is dependent on the pore size and pore volume. As long as the pore volume is kept constant, the larger the pores are, the less surface will be available and the lower the hydrophobicity of the stationary phase will be.
This relation is illustrated in Fig. 1 by means of a test mixture separation. The four phases presented are silica gels of different porosities with an identical surface modification.

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Abb.1 zeigt den Einfluss der Oberfläche in Abhängigkeit von der Porengröße bei gleicher Belegung (C18H)



1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Fig.1 shows the influence of the porosity with the same bonding (C18H)

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Silanophile Aktivität

Silanolgruppen haben einen großen Einfluss auf die Selektivität einer HPLC RP Phase. Einerseits sind Sekundärwechselwirkungen, die von Silanolgruppen stammen unerwünscht, da basische Verbindungen durch die Wechselwirkung mit den sauren Silanolgruppen ein ausgeprägtes Tailing aufweisen. Andererseits werden bei einigen Trennungen gerade diese Sekundärwechselwirkungen zur Erzielung der gewünschten Selektivität benötigt. Um die silanophile Aktivität zu minimieren, wurde bei vielen stationären Phasen ein so genanntes Endcapping durchgeführt. Dabei wird nach der Modifizierung der Oberfläche mit den funktionellen Gruppen (C18, C8, …) das Kieselgel mit einem kleineren Silan (meist Trimethylsilan) umgesetzt. Da dieses Silan wesentlich weniger sperrig ist als die entsprechenden C8- oder C18- Gruppen, können sehr viele noch nicht abreagierten Silanolgruppen damit reagieren und werden dadurch deaktiviert. Moderne Säulen auf Kieselgelbasis haben alle ein sehr gutes Endcapping und zeigen somit eine geringe silanophile Aktivität.

Shape Selectivity

Unter dem Begriff "Shape Selectivity" versteht man die Fähigkeit von stationären Phasen, zwischen planaren und nicht planaren Molekülen zu unterscheiden (molekulare Formerkennung). Besonders hoch belegte C18 Phasen und C30 Phasen weisen diese Eigenschaft auf. Der Effekt beruht darauf, dass nicht planare Moleküle einen größeren Platzbedarf haben und somit weniger Adsorptionsstellen der

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Silanophilic Activity

Silanol groups have a large influence on the selectivity of an RP-HPLC phase. On the one hand, undesired secondary interactions result from the silanol groups whereby basic substances will display pronounced tailing through interactions with the acidic silanol groups. On the other hand, such secondary interactions are actually required in some separations to get the desired selectivity. To minimize the silanophilic activity, many stationary phases are "endcapped". This is carried out as an additional treatment step on the already modified (C18, C8, …) silica surface by treating the silica gel with a smaller silane (usually trisilane). Since this silane is considerably less bulky than the respective C8 or C18 groups, many of the non-reacted silanol groups will react with the silane and therefore become deactivated. Modern columns based on silica gel have very good endcapping and display an exceedingly low silanophilic activity.

Shape Selectivity

The term "shape selectivity" refers to the ability of the stationary phase to differentiate between planar and non-planar molecules (molecular recognition). Highly loaded C18 and C30 phases, in particular, exhibit this property. The effect is based upon the fact that non-planar molecules have a greater space requirement and therefore fewer adsorption positions on the stationary phase as compared to planar analytes. Non-planar molecules are therefore less strongly adsorbed on stationary

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

stationären Phase sehen als planare Analyten. Dadurch werden nicht planare Moleküle auf stationären Phasen mit hoher Shape Selectivity weniger stark adsorbiert. In Abb. 2 ist der Einfluss der Shape Selectivity dreier stationärer Phasen auf die Trennung eines Testgemisches gezeigt. Die Shape Selectivity einer stationären Phase sollte daher bei der Auswahl der Trennsäulen unbedingt beachtet werden.

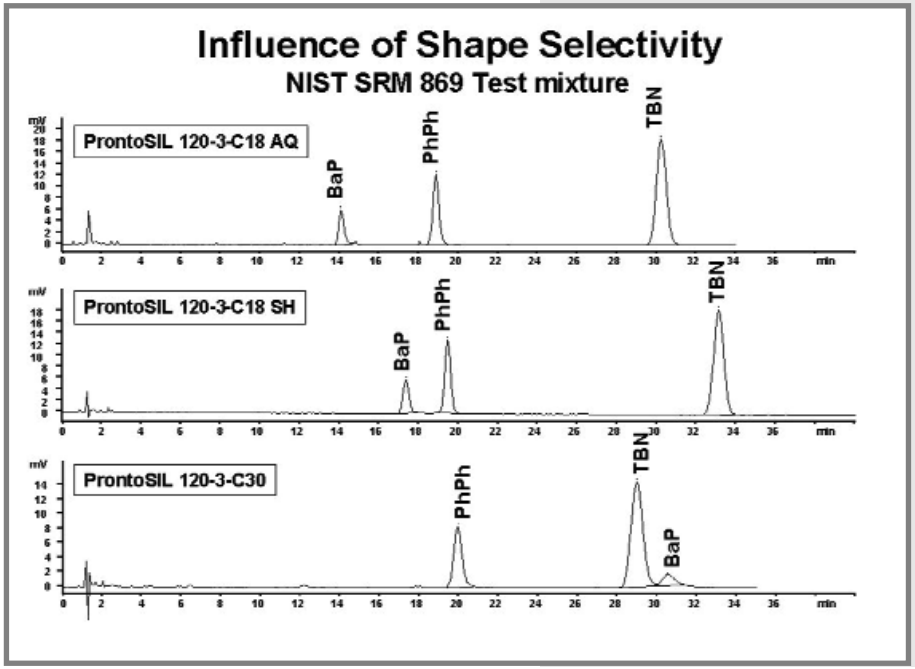


Abb. 2

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

phases with higher shape selectivity. The influence of shape selectivity on the separation of a test mixture is illustrated for three stationary phases in Fig. 2. The shape selectivity of a stationary phase should definitely be taken into consideration when selecting a column.

Fig. 2

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Polare Selektivität

Die polare Selektivität einer stationären Phase ist die Eigenschaft der Phase, polare Wechselwirkungen mit den Analyten einzugehen. Im Laufe der Entwicklung von modernen Umkehrphasen verloren die neuen stationären Phasen immer mehr ihre polare Selektivität. Durch die Synthese von hochreinen Kieselgelen als Trägermaterialien wurde die Oberfläche homogener, was eine bessere Abdeckung bei der Modifizierung der Oberfläche zur Folge hatte. Dadurch zeigen moderne mit Alkylgruppen modifizierte Umkehrphasen kaum polare Selektivität. Dem kann jedoch durch das gezielte Einbringen von polaren funktionellen Gruppen auf die Oberfläche oder in die Alkylketten entgegengewirkt werden.

Abb. 3 zeigt das Chromatogramm eines Testgemisches auf einer modernen C18 modifizierten Umkehrphase im Vergleich zu einer C18-Phase, bei der eine polare Amidgruppe in die Alkylgruppe eingebracht wurde.

Die polare Selektivität ist bei der Auswahl einer Säule für die Methodenentwicklung von entscheidender Bedeutung. Kann ein Trennproblem auf einer modernen Umkehrphase des einen Herstellers nicht gelöst werden, so ist es äußerst unwahrscheinlich, dass dasselbe Trennproblem auf einer vergleichbaren Säule eines anderen Herstellers gelöst werden kann. Hier sollte als nächster Schritt der Einsatz einer Säule mit ausgeprägter polarer Selektivität erfolgen.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Polar Selectivity

The polar selectivity of a stationary phase refers to the property of a phase to undergo polar interactions with analytes. During development of modern RP phases, the newer phases have lost their polar selectivity. Through the synthesis of highly pure silica gels as support materials the surface became more homogeneous, resulting in better coverage by the surface modifications. Modern RP phases with alkyl groups show therefore hardly any polar selectivity. This can be countered however through the targeted introduction of polar functional groups onto the surface of the material or into the alkyl chains.

Fig. 3 compares a chromatogram of a test mixture on a modern C18 reversed phase column with a C18 reversed phase column where an amide group has been introduced into the alkyl chains.

The polar selectivity is of critical importance when selecting a column for method development. If a separation problem cannot be solved on a modern reversed phase material from one manufacturer, it is very probable that the same separation will also not work on another column of the same type from another manufacturer. Therefore the next step should be the use of a column with pronounced polar selectivity.

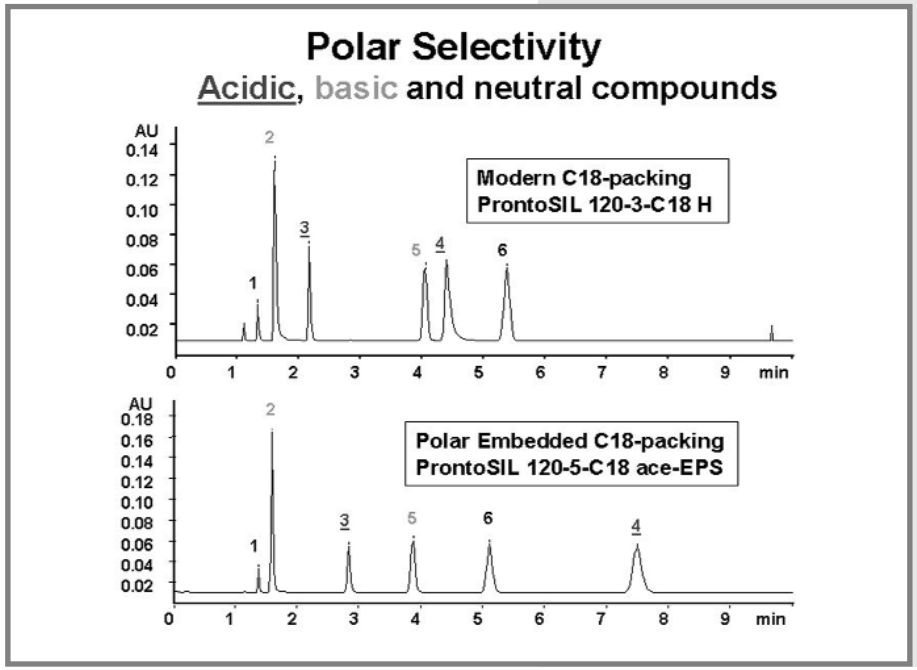

Polar Selectivity
Acidic, basic and neutral compounds
AU
Modern C18-packing
ProntoSIL 120-3-C18 H
Polar Embedded C18-packing
ProntoSIL 120-5-C18 ace-EPS
min

Abb. 3

Fig. 3

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Metallgehalt

Da Kieselgel früher aus Wasserglas hergestellt wurde, enthalten ältere Generationen von Kieselgel sehr hohe Metallgehalte (vornehmlich Eisen, bis zu 500 ppm). Metalle können bei manchen Analyten zu Problemen bei der Chromatographie führen. Es ist z.B. bekannt, dass einige Proteine bei älteren HPLC-Phasen nicht mehr eluiert werden können. Ferner gestaltet sich die Chromatographie von Komplexbildnern (wie z.B. EDTA) mit solchen stationären Phasen als schwierig. Die Analyten werden hier lediglich als breite, asymmetrische Peaks von der Phase eluiert.
Moderne Kieselgele werden aus Tetraethoxysilan hergestellt und besitzen daher Metallgehalte < 10 ppm und sind daher für die Chromatographie der oben genannten Beispiele besser geeignet. Abb. 4 zeigt die Trennung von Bipyridilen auf zwei stationären Phasen unterschiedlicher Generation und die dabei auftretenden Schwierigkeiten während der Chromatographie.
Metalle im Kieselgel haben auch einen unmittelbaren Einfluss auf die Acidität des Kieselgels. Je höher der Metallgehalt ist, umso acider sind die Silanolgruppen auf der Oberfläche des Kieselgels. Diese Acidität beeinflusst auch maßgeblich die Reaktivität des Kieselgels. Da bei älteren Generationen von Kieselgel der Metallgehalt schwankt und dadurch die Reaktivität beeinflusst wird, hat dies natürlich ebenfalls Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit der einzelnen Chargen von stationären Phasen. Daher empfiehlt es sich, soweit möglich, stationäre Phasen auf der Basis von ultra-reinen Kieselgelen zu verwenden.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

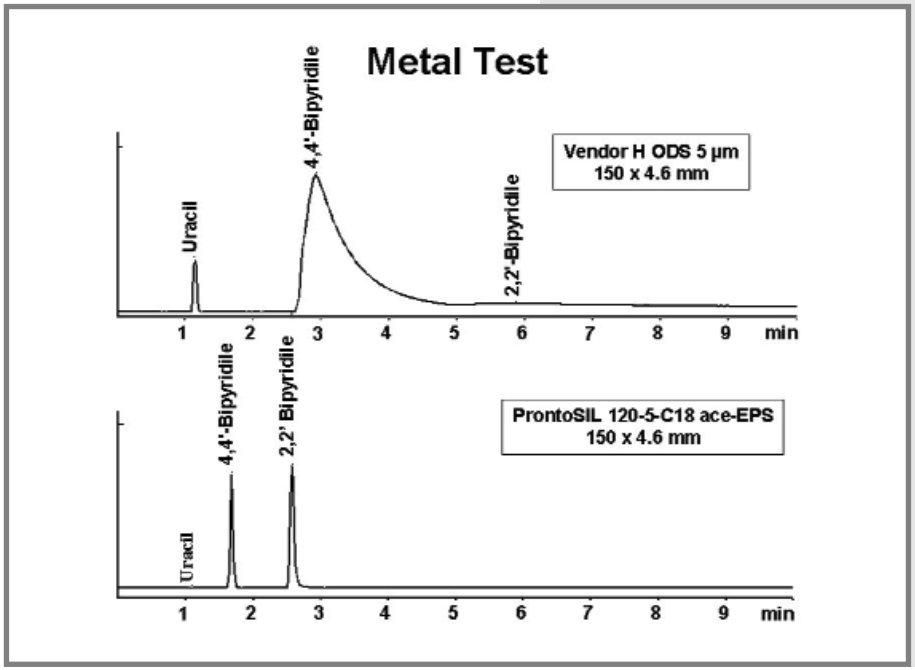
Metal Content

Due to the fact that silica gel was earlier produced from sodium silicate, older generations of silica gel possess a very high metal content (predominantly iron, up to 500 ppm). Metals can lead to problems during chromatography of certain analytes. It is known, for instance, that certain proteins cannot be eluted from older HPLC phases. Moreover, the chromatography of complexing agents (e.g. EDTA) with such stationary phases is quite difficult. Since the analytes can only be eluted from the phases as broad asymmetric peaks.
Modern silica gels are produced of tetraethoxysilane and consequently possess metal contents < 10 ppm, making them more suitable for the chromatography of the two examples named above. Fig. 4 shows the separation of bipyridines on two stationary phases of different generations and illustrates the difficulties during chromatography.

Metals in the silica gel also have a direct effect for the acidity of the silica gel. The higher metal content is, the more acidic the silanol groups on the surface of the silica gel will be. This acidity also substantially influences the reactivity of the silica gel. Since the metal content in older generations of silica gel fluctuates and consequently influences the reactivity, the reproducibility of individual batches of stationary phases is affected. Therefore it is recommended to use as much as possible, stationary phases produced from ultra-pure silica gels.

Hoher Metallgehalt

Niedriger Metallgehalt



high metal content

low metal content

Abb. 4

Fig. 4

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Auswahl der Säule nach Eigenschaft der Analyten

Die Auswahl der richtigen Trennsäule für Ihr Trennproblem hängt selbstverständlich von den Eigenschaften Ihrer Proben ab. Entscheidend für die Auswahl sind dabei folgende Eigenschaften der Analyten: Größe, funktionelle Gruppen, Polarität, räumliche Struktur und Matrix.

Keine besonderen Eigenschaften

Dies bedeutet hier: Der Analyt ist weder zu groß noch zu klein (MW zwischen 100 und 5000 g/mol). Er besitzt weder extrem saure noch extrem basische funktionelle Gruppen. Die Analyten besitzen keine sterisch anspruchsvolle Struktur und es müssen auch keine Isomere (z.B. cis/trans Isomere) getrennt werden. In einem solchen Fall wird normalerweise eine konventionelle C18 Säule verwendet. Wenn möglich sollte dabei immer eine moderne C18-Phase auf der Basis von hochreinem Kieselgel verwendet werden. Diese haben im Gegensatz zu älteren Materialien den Vorteil einer besseren Batch zu Batch Reproduzierbarkeit. Ferner besitzen neuere Materialien eine engere Korngrößenverteilung, was zur Folge hat, dass höhere Bodenzahlen bei geringerem Gegendruck erreicht werden können.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Selection of a column according to the properties of the analytes

The selection of the right column for your separation problem depends of course on the properties of your sample. The following properties of an analyte are important for selecting a column: size, functional groups, polarity, spatial structure and matrix.

No special properties

This means: the analyte is either too large or too small (MW between 100 and 5000 g/mol). It possesses neither extremely acidic or extremely basic functional groups. The analytes do not have any significant steric structure and no isomers (e.g. cis/trans isomers) are present. In such a case, a conventional C18 column can be normally used. If possible, a modern C18 phase manufactured from highly pure silica gel should be used. These have, in comparison to older materials, the advantage of better batch to batch reproducibility.
In addition, newer materials also have a better particle size distribution, allowing for higher plate numbers to be achieved at lower back pressure.

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Polare Verbindungen

Um sehr polare Analyten in der Umkehrphasenchromatographie (RP-) retardiert zu bekommen, benötigt man sehr polare mobile Phasen. Häufig ist es notwendig, mit rein wässrigen Eluenten oder dem Zusatz von Ionenpaarbildnern zur mobilen Phase zu arbeiten.
Konventionelle Umkehrphasen (RP-) können nicht mit rein wässrigen Eluenten betrieben werden. Da sie eine sehr hohe Dichte an C18 Borsten auf der Oberfläche des Kieselgels aufweisen, kollabieren bzw. fallen die C18 Borsten bei Eluenten mit weniger als 5% organischem Anteil zusammen. In der Analyse bricht meist die Retention für die Analyten völlig zusammen oder es kommt zu sehr breiten und asymmetrischen Elutionsbanden. Aus diesem Grunde wurden spezielle stationäre Phasen für wässrige Medien entwickelt. Die ProntoSIL C18 AQ Phasen zeigen die gleiche Selektivität wie konventionelle C18 Phasen. ProntoSIL C18 AQ plus besitzt zusätzlich ein polares (hydrophiles) Endcapping. Die polaren Gruppen an der Oberfläche ziehen das “polare” Wasser an und verhindern dadurch das Kollabieren der Alkylborsten. ProntoSIL C18 ace-EPS Phasen sind 100% wasser-benetzbar. Hier ist eine polare Gruppe in die Alkylborste eingebunden und führt somit zum analogen Verhalten wie bei ProntoSIL AQ plus. Im Gegensatz zur ProntoSIL AQ Phase besitzen die beiden anderen Phasen bedingt durch die Einführung der polaren Funktionalität eine polare Selektivität. Diese führt zu einem völlig unterschiedlichen Trennverhalten verglichen mit konventionellen C18 Phasen.

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Polar Compounds

In order to be able to retard very polar analytes in reversed phase chromatography, very polar mobile phases are required. Generally is it necessary to work with pure aqueous eluents or even to add ion pair reagents to the mobile phase. Conventional reversed phases cannot be used with pure aqueous eluents. Since the density of the C18 "brushes" on the surface of the silica gel is too high in these phases, the brushes will collapse as soon as the organic portion of the mobile phase is below 5%. In chromatograms, the retention of these analytes fall apart or very broad and asymmetric peaks will be eluted. For aqueous media special stationary phases have been developed. ProntoSIL C18 AQ phases exhibit the same selectivity as conventional C18 phases. ProntoSIL C18 AQ plus phase possesses a polar (hydrophilic) endcapping. The polar groups on the surface attract the polar water and therefore prevent the collapsing of the alkyl chains. ProntoSIL C18 ace-EPS phases are 100% wettable by aqueous eluents. A polar group is attached to the alkyl chains of this phase and therefore produces an analogous behavior as ProntoSIL AQ plus.
In comparison to ProntoSIL AQ, the two other possess a polar selectivity imparted by the introduction of a polar functionality, leading to a completely different separation behavior in comparison to conventional C18 phases.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Unpolare Verbindungen

Sehr unpolare Verbindungen zeigen auf konventionellen Umkehrphasen (RP-) eine sehr hohe Retention und können manchmal nur mit extrem starken Lösemitteln von der Trennsäule eluiert werden. Die Lösung bietet hier der Einsatz kurzkettiger Umkehrphasen (C8, C4, C1). Diese treten mit dem Analyten in wesentlich schwächere Wechselwirkungen. Zur Trennung dieser Verbindungen eignen sich stationäre Phasen mit großen Poren (200 Å und 300 Å), sowie Umkehrphasen (RP-) auf unporösem Kieselgel. Diese gehen mit dem Analyten, bedingt durch die geringere spezifische Oberfläche noch schwächere Wechselwirkungen mit den Analyten ein.

Eine weitere Möglichkeit ist der Wechsel zur Normalphase. Häufig sind unpolare Verbindungen sehr einfach in der Normalphasenchromatographie auf Silica- oder Diolphasen zu trennen. In der Normalphasenchromatographie ist jedoch immer mit schwankenden Retentionszeiten zu rechnen, da bereits kleinste Änderungen des Wassergehaltes im Eluenten starke Schwankungen der Retentionszeiten mit sich bringen. Wasser ist in der Normalphasenchromatographie der stärkste Eluent. Wasser ist in Spuren auch in allen unpolaren Lösemitteln enthalten, so dass sich selbst ein Wetterwechsel in Retentionszeitänderungen wiederspiegeln kann.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Non-polar Compounds

Non-polar compounds display a very high retention on conventional reversed phases and can only be eluted from the column with extremely strong eluents. The solution here is to use short-chain reversed phases (C8, C4, C1) which produce substantially weaker interactions with the analytes. Particularly suited to the separation of these compounds are materials with large pores (200 Å and 300 Å) and reversed phases from non-porous silica gel. Since they have less specific surface available they show weaker interactions with the analytes.

An additional possibility is to switch to normal phase mode. Non-polar compounds are often very easy to separate by normal phase chromatography on silica or diol phases. However, you must always deal with retention time shifts in normal phase chromatography since even the slightest change in the water content of the eluents result in an alteration of the retention times. Water is the strongest eluent in normal phase chromatography. Water is also present in all non-polar solvents in trace amounts, making retention time shifts nearly unavoidable.

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Hohe Molekulargewichte

Analyten mit hohen Molekulargewichten besitzen in der Regel wesentlich kleinere Diffusionskoeffizienten als kleinere Moleküle. Dadurch wird der Weg der Analyten in die Poren und aus den Poren im Vergleich zu kleineren Molekülen deutlich verlangsamt. Dies hat zur Folge, dass bei der Verwendung von Packungsmaterialien mit herkömmlichen Porendurchmessern von ca. 100 Å breite und asymmetrische Peaks im Chromatogramm erscheinen. Bei sehr großen Molekulargewichten kann es bei der Verwendung konventioneller Materialien sogar zu einem Größenausschluss kommen. Im Chromatogramm sieht man in einem solchen Fall ein Schlieren der Verbindung über die komplette Trennsäule.

Aus diesen Gründen werden für die Chromatographie solcher Verbindungen so genannte "Wide Pore" Materialien als stationäre Phase verwendet. Die gängigen Porengrößen dieser Träger liegen bei 200 Å und 300 Å. Alle Bondings, die auf kleineren Porengrößen verfügbar sind, sind auch als Wide Pore Materialien erhältlich. Eine Alternative hierzu bieten die unporösen Trägermaterialien. Hier findet die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der stationären Phase lediglich an der äußeren Oberfläche der Partikel statt. Dadurch entfällt die diffusionskontrollierte Wanderung der Analyten in den Poren. Trennsäulen, gefüllt mit unporösen Trägermaterialien, ergeben die effizientesten Trennungen von Makromolekülen.

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

High Molecular Weight

As a rule, analytes with high molecular weights have considerably lower diffusion coefficients compared to smaller molecules. Such an analyte's path in and out of the pores is clearly slower in comparison to smaller molecules. This results in broad and asymmetric peaks if the normal pore diameter of 100 Å is used. The use of conventional materials with very large molecular weights can even lead to size exclusion. In such cases, a streak of the compound over the complete separation column is observed in the chromatogram.

For this reason, such compounds are separated on "wide-pore" materials. The typical pore sizes of these supports are about 200 Å and 300 Å. All bondings which are available in smaller pore sizes, are also available in "wide-pore". As an alternative, non-porous materials can also be used. The interaction between the analytes and the stationary phase occur solely on the outer surface of the particle.
The diffusion-controlled migration of the analytes through the pores becomes thereby completely invalidated. Separation columns which have been filled with non-porous support materials offer the most efficient separations for macromolecules.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Isomere und Analyten die sich in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden

Isomere und Analyten, die sich in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden, sind in der Umkehrphasenchromatographie (RP-) nur sehr schwer zu trennen. Ihre Hydrophobie ist sehr ähnlich. Daher werden solche Trennungen häufig mit der Normalphasenchromatographie auf Silica-Phasen durchgeführt. In der Normalphasenchromatographie gibt es jedoch das grundsätzliche Problem, stabile Retentionszeiten zu erhalten. Damit dennoch im Umkehrphasenmodus (RP-) gearbeitet werden kann, benutzt man hoch belegte C18 Phasen und C30 Phasen. Der Abstand zwischen den einzelnen Alkylborsten ist bei diesen Phasen sehr eng, so dass es, bedingt durch die “shape selectivity” dieser Phasen, zur Trennung kommt.

Keine Trennung der Analyten auf konventionellen Säulen möglich

Ist keine Trennung der Analyten auf herkömmlichen Phasen möglich, so liegt das daran, dass die Analyten sich zu wenig in ihrer Polarität bzw. räumlichen Struktur unterscheiden. Daher müssen andere Wechselwirkungen aktiviert werden, um die gewünschte Selektivität zu erzielen. Die Verwendung von stationären Phasen mit eingebundenen polaren Gruppen, sowie Phenyl-, Cyanopropyl, oder Aminopropylgruppen aktivieren neben den hydrophoben Wechselwirkungen auch π-π-Wechselwirkungen. Diese resultieren bei vielen Trennungen in völlig anderen Selektivitäten und sollten als Alternativen stets Berücksichtigung finden.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Isomers and analytes which differ from each other primarily through their spatial structure

Isomers and analytes which differ from each other primarily through their spatial structure are very difficult to separate. Their hydrophobicity is very similar. Consequently, such separations are regularly carried out by normal phase chromatography on silica phases. The basic problem in normal phase chromatography however is that retention times are shifting. Highly loaded C18 and C30 phases are an alternative and offer an elegant solution to work in reversed phase mode. The distance between the individual alkyl chains on these phases is so minimal, that the separation takes place through the shape selectivity of the phases.

No separation of the analytes on conventional columns

If separation of the analytes is not possible on traditional phases, which is due to the fact that the analytes do not differ enough in terms of polarity and spatial structure, other interactions must be encouraged in order to achieve the desired selectivity. The use of stationary phases with attached polar groups, such as phenyl, cyanopropyl, or aminopropyl groups stimulate the hydrophobic interaction as well as π-π interaction. These modifications achieve completely different selectivities for many separations. Such kind of stationary phases should only be considered as alternatives than as primary choice.

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

Spezielle Applikationen

Für spezielle Anwendungen in der HPLC wurden Spezialphasen entwickelt, deren Selektivität gezielt auf die ausgewählte Applikation zugeschnitten wurde (siehe ENVIRO Säulen). So gibt es Säulen zur Bestimmung von PAH's, Phenolen, Pestiziden, usw. Für diese Anwendungen empfiehlt es sich, die entsprechenden Säulen zu verwenden.
Auch für chirale Trennungen stehen verschiedenste stationäre Phasen zur Verfügung. Gerade bei chiralen Trennungen ist es sehr schwierig, Vorhersagen über die Selektivität im Vorfeld zu treffen, da hier zur Erzielung der gewünschten Selektivität mehrere Wechselwirkungen parallel wirken müssen. Hier sollten Sie jedoch auf Applikationen der entsprechenden Hersteller zurückgreifen bzw. sich von den Herstellern bei der Auswahl beraten lassen.

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

Special Applications

Special phases have been developed for particular applications in HPLC which possess tailor-made selectivities (see ENVIRO columns). Columns are available for the determination of PAH's, phenols, pesticides, etc. It is recommended that the corresponding column be used for these applications.
A large variety of stationary phases are also available for chiral separations. Since in chiral separations the desired selectivity depends on several parallel interactions. It is very difficult to predict the selectivity in advance. In these cases one should fall back on the applications from the manufacturer or contact the manufacturer for the appropriate selection.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1.2.4.1 Narrowbore- und Microbore-HPLC

Wenn Säulen mit einem ID von 2 oder 3 mm verwendet werden, spricht man von “Narrowbore”-HPLC.
Ist der Durchmesser der Trennsäule kleiner als 2 mm, so spricht man von „Microbore-Säulen". Neuerdings werden auch extrem englumige Säulen mit Innendurchmessern zwischen 50 und 250 µm in der HPLC verwendet. Diese werden im allgemeinen als „Nano-LC- Säulen" oder „Kapillar-HPLC- Säulen" bezeichnet.
Da das Volumen der Trennsäule proportional zum Quadrat ihres Innendurchmessers ist, können englumige HPLC-Säulen bei gleicher linearer Flussgeschwindigkeit (d.h. bei gleicher Analysenzeit) mit wesentlich geringeren Volumenflüssen betrieben werden. Dies führt zu einer großen Lösemittelersparnis und senkt somit die Kosten pro HPLC-Analyse. Tabelle 1 vergleicht den Lösemittelverbrauch verschiedener Trennsäulen mit verschiedenen Innendurchmessern.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Verringerung des Innendurchmessers eine erhebliche Lösemittelersparnis mit sich bringt. Die Kostenersparnis liegt heute weniger in den Anschaffungskosten für hochreine Lösemittel als vielmehr in der Tatsache begründet, dass die Entsorgungskosten für die Lösemittel zunehmend ins Gewicht fallen.
Ein weiterer Vorteil des geringen Volumenflusses durch die Trennsäule liegt in der dadurch einfacheren Kopplung mit einem massenspektrometrischen Detektor. Da vor dem Einbringen der Probe in das Hochvakuum des Massenspektrometers der

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1.2.4.1 Narrow-bore and micro-bore HPLC

“Narrow-bore HPLC” involves separation columns with an inner diameter of 2 or 3 mm. If the inner diameter of the column is less than 2 mm, then the column is considered a "micro-bore" column. Recently extremely low volume columns with inner diameters between 50 and 250 µm have been used for HPLC. These columns are called "nano-LC" columns or "capillary HPLC" columns.
Since the volume of the column is proportional to the square of its inner diameter, such low volume HPLC columns can be run with the same linear velocity (i.e. with the same analysis time) with considerably lower flow rates. This results in less eluent consumption and therefore also lowers the cost per analysis. Table 1 compares the eluent consumption of various columns with different inner diameters.

It is clear that by decreasing the column inner diameter, a substantial reduction in eluent consumption can be achieved. The amount of money which is saved by decreasing the amount of high-quality solvents which are necessary, is further increased if the cost of properly disposed solvent waste is considered.
Due to the low volume flow which is given with such columns the coupling to a mass spectrometer is more easy. Given that the eluent must be removed from the sample before it enters the high vacuum of the mass spectrometer, micro-bore columns are particularly practical for such applications.

1.2.4 Säulendimension

Tabelle 1: Lösemittelverbrauch und Volumina bei verschiedenen Innendurchmessern

Innendurchmesser/ Inner diameter [mm]	Flussrate/ Flow rate [µl/min]	Eluentenverbrauch/ Eluent consumption [ml/h]	Säulenvolumen/ Column volume [µl]*
4.6	1500	90.0	2740
4.0	1000	60.0	1880
3.0	562.5	33.8	1060
2.0	250.0	15.0	471
1.0	62.5	3.8	118
0.25	3.9	0.2	7
0.1	0.6	0.04	1

*Säulenlänge: 250 mm, bei ε_T = 0.6

Eluent entfernt werden muß, bietet sich die Verwendung von Microbore-Säulen an. Englumige Trennsäulen besitzen im Vergleich zu konventionellen Trennsäulen auch einige Nachteile. So ist es mit herkömmlichen HPLC-Pumpen in der Regel nicht möglich, die geforderten kleinen Flussraten mit einer für die HPLC-Analyse ausreichenden Präzision zu fördern. Dies wird insbesondere bei Säulen mit einem Innendurchmesser ≤ 1 mm zu einem Problem. Aus diesen Gründen werden Flüsse im unteren mikroliter- und nanoliter-Bereich meist durch „Splitting" erzeugt, d.h. der Eluent wird mit einer normalen HPLC-Pumpe gefördert und vor der Probenaufgabe geteilt. Der Großteil des Eluenten fließt dabei über eine Restriktionskapillare in den Abfall, während ein kleiner konstanter Fluss über die Microbore-Säule fließt. Dabei geht der Vorteil der Lösemittelersparnis verloren.

1.2.4 Column Dimensions

Table 1: Eluent consumption and column volume as a function of inner diameter

* column length: 250 mm, ε_T = 0.6

Narrow-and micro-bore columns also have some disadvantages compared to conventional columns. Generally it is not possible to achieve enough precision at low flow rates when using average HPLC pumps. This is a problem particularly with columns of ≤ 1 mm ID. For this reason, flow rates in the lower microliter and nanoliter range are typically achieved through splitting-that is, the eluent is pumped with a normal HPLC pump and then split before the sample injector. The bulk of the eluent flows through a restriction capillary to waste, while a lower constant flow goes to the micro-bore column. In so doing, the advantage of lower eluent consumption is negated.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Narrowbore HPLC-Säulen haben den Vorteil, dass man mit ihnen noch auf konventionellen HPLC-Apparaturen problemlos arbeiten kann, jedoch sich bereits eine deutliche Lösemittelersparnis abzeichnet.
Im Gegensatz dazu reicht es im Microbore-Bereich nicht aus, einfach die analytische Säule (ID 4,6 mm) gegen einen kleineren Innendurchmesser (z.B. ID 2,0 mm) auszutauschen. Hier müssen spezielle Optimierungsschritte an der HPLC-Anlage durchgeführt werden.
Ein weiterer Vorteil der englumigeren Säulen besteht in der höheren Massenempfindlichkeit, d.h. kleine Probenmengen oder auch sehr kostbare Spezies können optimal analysiert werden. Eine hohe Massenempfindlichkeit ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit. Im Gegenteil: Narrowbore- und Microbore-Systeme sind meist unempfindlicher als konventionelle analytische Systeme. Dies liegt daran, dass mit der Reduzierung der Säulenvolumina auch die Probenaufgabemengen und die Detektorzellvolumina (Schichtdicke) reduziert werden müssen (siehe Kapitel “Schnelle HPLC”).
Eine häufig verbreitete These ist auch, dass Microbore-HPLC schnellere Analysenzeiten mit sich bringt. Das ist nicht der Fall, da mit der Verkleinerung der Säulenvolumina auch die Flussraten reduziert werden müssen, um die gleiche lineare Flussgeschwindigkeit in der Trennsäule zu erhalten. Dadurch verändern sich die Analysenzeiten nicht.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

Narrow-bore HPLC columns have the advantage that you can still use these with conventional HPLC equipment without problems, while still achieving a considerable saving in eluent consumption.
However, it is simply not enough to exchange an analytical column (ID 4.6 mm) against a micro-bore column (ID 2.0 mm). Special optimization procedures must be carried out at the HPLC system.
An additional advantage of low-volume columns is their increased mass sensitivity. This means that less sample is required, making analyses possible of very valuable samples. A high mass sensitivity is however not synonymous with higher detection sensitivity. In fact, the opposite is true: Narrow-bore and micro-bore systems are generally less sensitive than conventional analytical systems. Since the column volume has been reduced, the amount injected and the detector cell volume (path-length) has also to be reduced (see chapter on High-Speed HPLC).
A widely accepted thesis is that micro-bore HPLC also gives faster analysis times. This is not the case since by decreasing the column volume, the flow rate has also to be reduced to get the same linear velocity. Due to this fact, the analysis times are identical.

1.2.4.2 Schnelle HPLC

In diesem Katalog finden Sie eine Vielzahl von verschiedenen Adsorbentien, die wir Ihnen in verschiedenen Säulendimensionen anbieten. Gängige Säulenlängen sind 250, 150 und 125 mm, sowie Säuleninnendurchmesser von 4,6; 4,0; 3,0 und 2,0 mm für die analytische HPLC. Diese Trennsäulen werden üblicherweise mit Packungsmaterialien der Korngröße 5 µm und 10 µm gefüllt.
Für die schnelle HPLC verwendet man allgemein kurze Säulen, die stationäre Phasen mit kleineren Partikeldurchmessern (3 µm und kleiner) enthalten.
In der untenstehenden Tabelle sind die wichtigsten Kenngrößen für Adsorbentien verschiedener Partikelgrößen in diversen Säulenlängen aufgeführt.

Tabelle 1:
Kenngrößen verschiedener Säulenlängen

1	**dp [µm]**	10	5	3	1.5
2	**L [mm]**	250	125	60	33
3	**N**	8 100	8 100	6 500	7 000
4	**N/m**	32 300	64 600	107 700	213 400
5	**Δp [bar]***	11	23	30	66
6	**N/s**	36	142	406	1556
7	**N/bar**	1150	290	105	26

*Angaben für ID 4,6, 1 ml/min, ACN/H_2O 80:20 (v/v)

Schnelle HPLC

1.2.4.2 High-Speed HPLC

In this catalog you will find an assortment of different adsorbents which we offer in various column dimensions. We offer columns with a length of 250, 150 and 125 mm, as well as column inner diameters of 4.6, 4.0, 3.0 and 2.0 mm for analytical HPLC. These columns are usually packed with packing materials in particle sizes of 5 µm or 10 µm.

Shorter columns packed with smaller particles (3 µm or less) are generally used for High-Speed HPLC.
The most important column parameters due to particle sizes and column lengths are shown in the table below.

Table 1:
Characteristic column parameters

* for 4.6 ID, 1 ml/min, ACN/H_2O 80:20 (v/v)

High-Speed HPLC

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Wie Sie in Zeile 4 erkennen, steigt die normierte Bodenzahl mit abfallendem Partikeldurchmesser deutlich an. Für die Analysengeschwindigkeit ist jedoch die Säulenlänge von entscheidender Bedeutung. Halbiert man beispielsweise die Säulenlänge, so wird auch die Trenneffizienz, das heist die Bodenzahl N der Trennsäule, halbiert. Verkürzt man die Säulenlänge und reduziert entsprechend die Partikelgröße, so ist die resultierende Bodenzahl N pro Säule vergleichbar. Wie aus Zeile 3 deutlich hervorgeht, werden für eine typische HPLC-Trennung 5000 - 10000 Böden pro Säule benötigt.
Aus diesen Überlegungen heraus kann man mit kleinen Teilchen, die in kurze Säulen gefüllt sind, optimal arbeiten, da höchste Trenneffizienz bei kürzester Analysenzeit gewährleistet ist. Leider müssen jedoch auch andere Systemparameter bei der Auswahl der Säulenlänge und Partikelgröße berücksichtigt werden. So kann z.B. der Druckabfall über der HPLC-Säule nicht beliebig groß gewählt werden. Der Gegendruck einer Säule ist jedoch umgekehrt proportional zum Quadrat des Teilchendurchmessers (siehe auch Kapitel “Präparative HPLC”).
Werden also hohe Trenneffizienzen bei einer HPLC-Trennung benötigt, sollten lange Säulen, die mit Teilchen größerer Durchmesser gefüllt sind, verwendet werden (siehe Zeile 7 der Tabelle). Ist hingegen eine hohe Analysengeschwindigkeit von eminenter Bedeutung, so sollten kurze Säulen, gefüllt mit Teilchen kleinerer Durchmesser, verwendet werden (siehe Zeile 6).
Ein zusätzlicher Vorteil von Packungsmaterialien mit kleinen Teilchendurchmessern liegt darin, dass diese Säulen bei wesentlich höheren Durchflussraten ohne Verlust an Trenneffizienz betrieben werden können.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

The values in line 4 of the table shows that the normalized plate count increases significantly if the particle diameter decreases. The column length is the decisive factor in terms of analysis speed. By reducing the column length to 50% the separation efficiency N of the column is also reduced to 50%. By simultaneous reduction of the column length and particle size, the achiev plate count N remains comparable. As shown in line 3 of the table, a typical HPLC separation requires 5.000 - 10.000 plates/column.
With this in mind, you can be sure that short columns packed with small particles are giving the shortest analysis time and the highest separation efficiency. Unfortunately, other system parameters have also to be taken into consideration if column length and particle size are changed. For example, the pressure drop of the HPLC column cannot be chosen unlimited. The back pressure of a column is inverse proportional to the square of the particle diameter (see chapter preparative HPLC).

If a high plate count is required for a particular HPLC separation, a long column packed with larger particles should be used (see line 7 in the table). On the other hand, if analysis speed is of utmost importance, short columns and small particle sizes should be chosen (see line 6 of the table).

An additional advantage of packing materials with smaller particle sizes is that columns packed with such materials can be used at considerably higher flow rates without loosing separation efficiency.
Apart from the separation column, the chromatographic process is also influenced by

1.2.4 Säulendimension

Einflüsse auf den chromatographischen Prozess existieren auch außerhalb der Trennsäule. Durch Diffusionsprozesse in Kapillarzuleitungen zur Säule, sowie in der Injektionseinheit und der Detektorzelle kann es zu Bandenverbreiterungen („extra column effects") kommen. Beachten Sie daher, dass dieses Extra-Volumen der Apparatur 20% des Säulenvolumens nicht überschreitet. Da in der schnellen HPLC kurze Trennsäulen verwendet werden, wäre dieser Effekt hier besonders ausgeprägt. Deshalb empfehlen wir bei der schnellen HPLC die Verwendung von kurzen Säulen mit Innendurchmessern von 4,0 und 4,6 mm.

1.2.4 Column Dimensions

other factors. Band broadening can be caused by diffusion processes in the tubing to the column, as well as in the injector and the detector flow cell ("extra column effects"). It is important to be sure that the extra-column volume of the system does not exceed 20% of the column volume. Since short separation columns are used for High-Speed HPLC, this effect will be particularly effective. Therefore we recommend the use of short columns with inner diameters of 4.0 and 4.6 mm for High-Speed HPLC.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1.2.4.3. Präparative HPLC

Einleitung

Während in der analytischen HPLC die Zielsetzung qualitative und quantitative Bestimmungen im Vordergrund stehen, möchte man in der präparativen HPLC vornehmlich Substanzen aufreinigen.
Ein deutlicher Unterschied zwischen analytischer und präparativer HPLC besteht darin, dass man in der analytischen HPLC mit kleinen Konzentrationen arbeitet, während in der präparativen HPLC, im Interesse einer hohen Produktivität, möglichst große Mengen bis hin zur Überladung eingesetzt werden.
Zielsetzung in der präparativen HPLC ist ferner, möglichst viel Substanz in der mobilen Phase zu lösen. Ist dies möglich, können Säulen mit größeren Teilchendurchmessern (10 µm oder größer) verwendet werden.
Von präparativer HPLC spricht man, wenn mindestens 1 g Substanz pro Lauf aufgereinigt werden kann. Dies erfordert Säulen mit Innendurchmessern > 30 mm. Bei Säulen mit Innendurchmessern von 8 bis 30 mm spricht man von semipräparativer HPLC.
Prinzipiell unterscheidet man in der HPLC zwischen Massenüberladung und Volumenüberladung. Die Beladbarkeit einer HPLC-Säule hängt von der Masse an stationärer Phase, der Art des Analyten, sowie dessen Löslichkeit in der mobilen Phase ab.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1.2.4.3. Preparative HPLC

Introduction

While in analytical HPLC the objective is to identify substances qualitatively and quantitatively, in preparative HPLC the objective is to purify compounds.
In analytical HPLC you work with low concentrations while in preparative HPLC, the column will be overloaded as much as possible due to higher productivity.
Moreover, the objective in preparative HPLC is to dissolve a large amount of compounds in the mobile phase. This allows to use columns packed with larger particles (10 µm or bigger).
You can speak of preparative HPLC if a minimum of 1 g of pure substance can be isolated per run. This can be carried out using columns with an internal diameter > 30 mm. When using columns with an internal diameter from 8 to 30 mm, it is called semi-preparative HPLC.
In HPLC, you distinguishe between mass overloading and volume overloading. The loading capacity of an HPLC column depends on the mass of stationary phase, the type of analyte as well as the analyte's solubility in the mobile phase.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

In Abb. 1 sind die Elutionsprofile bei einer Massenüberladung und einer Volumenüberladung im Vergleich zu einer analytischen Trennung gegenübergestellt.

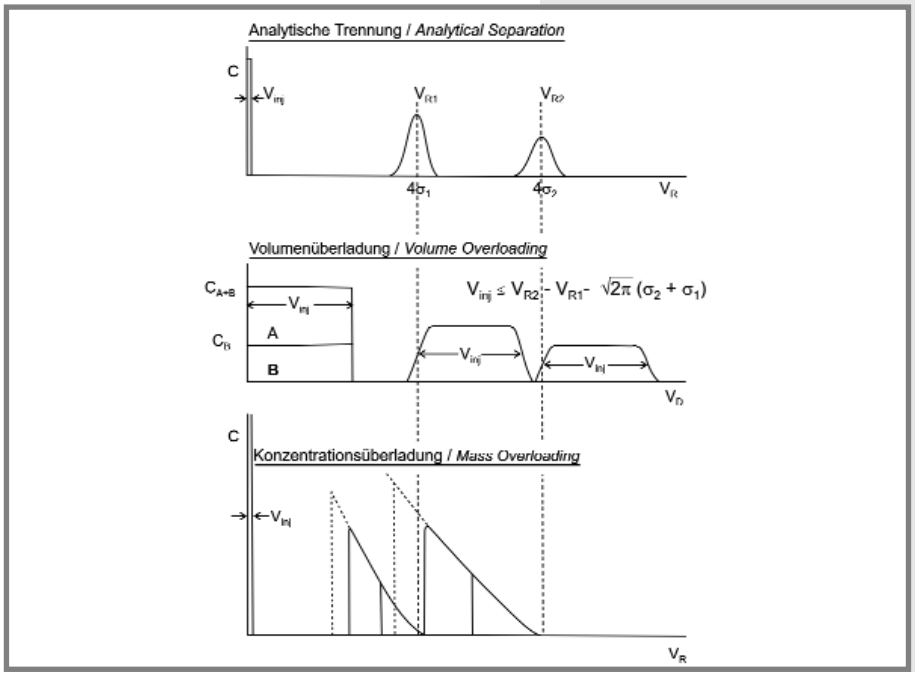


Abb.1: Vergleich Volumenüberladung zu Massenüberladung

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

In Fig. 1 the elution profiles resulting from mass overloading and volume overloading on a preparative column are compared with an analytical separation.

Fig.1: Comparison of volume overloading to mass overloading

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Volumenüberladung

Bei einer Volumenüberladung werden die Substanzen mangels Löslichkeit in der mobilen Phase als deutlich breitere Zone von der Säule eluiert. Dies hat zur Folge, dass die Komponenten später eluieren und als breitere peaks niedrigerer Konzentration von der Trennsäule eluiert werden. Die Volumenüberladungsgrenze liegt theoretisch bei ca. 50 µl/g stationärer Phase. In der Praxis wird dieser Wert jedoch meist um den Faktor 5 bis 10 überschritten. Dies gilt für Reversed Phase Chromatographie. In der Normalchromatographie werden dagegen nur 10% der angegebenen Werte erreicht.

Massenüberladung

Bei der Massenüberladung wird so viel Probe wie möglich in der mobilen Phase gelöst und möglichst konzentriert auf die Trennsäule aufgegeben. Da in diesem Fall mehr Probe in die Säule gelangt als Adsorptionszentren vorhanden sind, wird ein Teil der Probe meist früher eluiert. Die Elutionsbanden sind dreieckförmig. Die Massenbeladbarkeitsgrenze liegt bei theoretisch 100 µg/g stationärer Phase. In der Praxis wird dieser Wert in der Regel um den Faktor 5 bis 10 überschritten. Dies gilt für Reversed Phase Chromatographie. In der Normalchromatographie werden dagegen nur 10% der angegebenen Werte erreicht. Dieser Wert gilt für Umkehrphasen (RP-).
Beachten Sie, dass saure und basische Substanzen möglichst in ungeladener Form

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

Volume overloading

In volume overloading, substances with poor solubility in the mobile phase are injected and elute as a broad zone from the column. Volume overloading has the effect that components elute later in broader elution bands and at lower concentrations. The volume overloading limit is approximately 50 µl/g stationary phase. In practice however, this value is generally exceeded by a factor of 5 to 10. This is valid in Reversed Phase Chromatography. In Normal Phase Chromatography you only will get 10% of the RP-Chromatography values.

Mass overloading

In mass overloading, as much sample as possible is dissolved in the mobile phase and then loaded on the column as concentrated as possible. Since in this case more sample is present than there are adsorption centers available, a part of the sample elutes earlier. The eluting bands will be triangular. The mass overloading limit is about 100 µg/g stationary phase. In practice, this value is typically exceeded by a factor 5 to 10. This is valid in Reversed Phase Chromatography. In Normal Phase Chromatography you only will get 10% of the RP-Chromatography values.
Since the loading capacity for non-charged substances is a 100 times higher than for charged species, acidic and basic substances should be chromatographed as neutral species if possible. This means that preparative HPLC of basic substances should be performed at high pH values and acidic substances at low pH values.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

chromatographiert werden sollten, da die Beladbarkeit in diesem Fall ca. um das 100-fache höher ist. D.h. basische Substanzen sollten präparativ bei hohen pH-Werten und saure Substanzen bei niedrigen pH- Werten aufgereinigt werden.

Beim Arbeiten in der präparativen HPLC ist die Massenüberladung der Volumenüberladung stets vorzuziehen, weil die getrennten Produkte in einer höheren Konzentration vorliegen und früher von der Trennsäule eluiert werden. In diesem Falle können auch Säulen mit größeren Teilchendurchmessern ohne Verlust an Produktivität verwendet werden (siehe Abb. 2). Bei der Volumenüberladung einer Trennsäule ist der Teilchendurchmesser einer Trennsäule von entscheidender Bedeutung. Je kleiner die Partikelgröße, umso schmäler sind die Elutionsbanden.

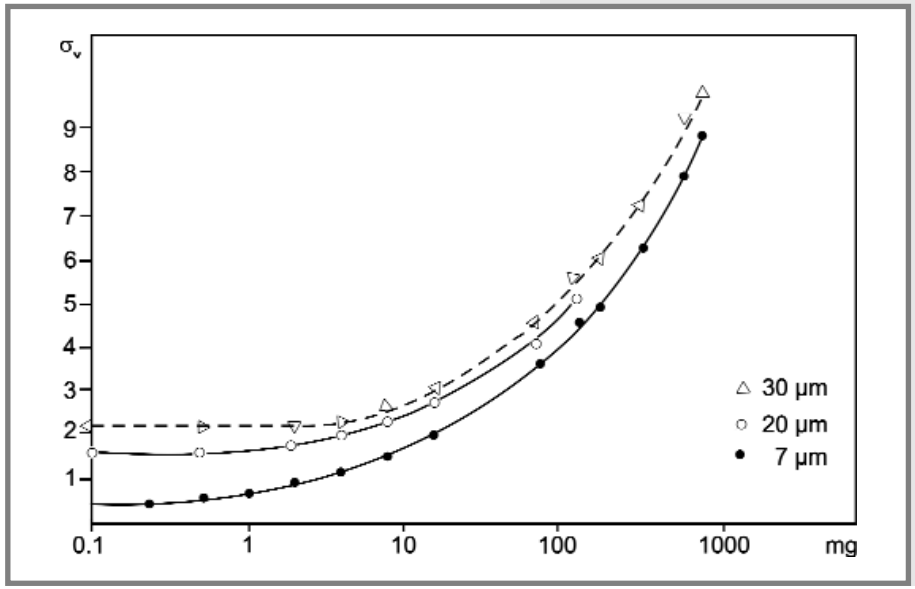


Abb. 2: Einfluss der Massenüberladung auf die Trenneffizienz

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

Mass overloading should be always preferred over volume overloading in preparative HPLC because the purified products are eluted in higher concentrations and elute earlier from the column. In this case, columns with larger particle diameters can be used without any loss of productivity (see Fig. 2).If a column is overloaded by volume the particle size is of crucial importance. If you use smaller particles you always will get more narrow elution bands.

Fig. 2: Influence of mass overloading on efficiency

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Der Einfluß der Partikelgröße in der präparativen HPLC

In der präperativen HPLC ist man bestrebt, das chromatographische System so kostengünstig wie möglich zu gestalten und gleichzeitig die größtmögliche Produktivität zu erreichen. Dies gilt auch für die Trennsäule. Stationäre Phasen mit größeren Teilchendurchmessern sind deutlich preiswerter als stationäre Phasen mit kleinen Teilchen. Größere Teilchen ergeben einen geringeren Druckabfall.

Es gilt das Darcy' sche Gesetz: $\Delta P = \frac{u \cdot \eta \cdot L \cdot \phi}{d_P^2}$

Der Gegendruck einer HPLC-Säule ist direkt proportional zur linearen Flussgeschwindigkeit *u*, der Viskosität des Eluenten η, der Säulenlänge *L* und dem spezifischen Säulenwiderstand ϕ (phi). Der Gegendruck ist umgekehrt proportional zum Quadrat des Teilchendurchmessers *dp*. D.h. eine Säule mit Partikeln der Korngröße 5 µm hat den vierfachen Gegendruck, verglichen mit einer Trennsäule der gleichen Dimension, die mit 10 µm Teilchen gefüllt ist. Ferner möchte man im Interesse eines hohen Durchsatzes im präparativen Bereich mit möglichst hohen Flussraten arbeiten. Dadurch wird der Gegendruck zusätzlich erhöht.
Aus technischen Gründen kann in der präparativen HPLC nur bis zu einem Gegendruck von 15 MPa gearbeitet werden. In der analytischen HPLC liegt die Druckgrenze bei 40 MPa oder höher. Da man bei präparativen Trennungen meist im Überladungsbereich der Säule arbeitet, spielt die Trenneffizienz eine geringere Rolle. Optimale Partikelgrößen liegen folglich im Bereich von 10 bis 15 µm.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

The influence of particle size in preparative HPLC

In preparative chromatography you should always try to have a cost-effective chromatographic system and to maximize productivity.This is also valid for the separation column. Stationary phases with larger particle diameters are substantially less expensive than those with smaller particle diameters. Larger particles also have a considerably lower pressure drop.

In this case, Darcy's Law is applicable: $\Delta P = \frac{u \cdot \eta \cdot L \cdot \phi}{d_P^2}$

The back pressure of an HPLC column is directly proportional to the linear flow velocity *u*, the viscosity of the eluent η , the column length *L* and the specific column resistance ϕ (phi). Inversely proportional to the square of the particle diameter *dp*. This means that a column packed with particles size 5 µm has a four-fold back pressure compared to a column packed with 10 µm particles. In addition, you would generally like to increase throughput in preparative HPLC by working with higher flow rates which results in additional back pressure. Due to technical reasons you can only work with a back pressure of up to 15 MPa in preparative HPLC. In analytical HPLC you can work with a back pressure up to 40 MPa or bigger.
Since the column is generally overloaded in preparative HPLC, the separation efficiency of the column plays a smaller role than in analytical HPLC. The optimal particle sizes therefore is in a range of 10 to 15 µm.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Upscaling

In der chemischen Produktion fallen in der Regel Rohprodukte an, die aufgereinigt werden müssen. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben Kristallisation und Destillation gewinnt die Chromatographie zunehmend an Bedeutung. Falls die kostengünstigeren Varianten der Aufreinigung nicht möglich sind, gibt es in vielen Fällen die Möglichkeit, chromatographische Methoden anzuwenden. Ganz besonders bewährt hat sich die Trennung von enantiomeren Gemischen in der pharmazeutischen Industrie.
In diesen Fällen optimiert man die Trennung zunächst im analytischen Bereich. Dabei ist das Ziel, das Säulenmaterial und die mobile Phase so zu wählen, dass sich möglichst eine schnelle und selektive isokratische Trennung ergibt. Verwenden Sie für Ihr Trennproblem eine möglichst selektive Phase. Je höher die Selektivität umso stärker kann die Trennsäule überladen werden und umso mehr Substanz können Sie pro Lauf aufreinigen. Beachten Sie hierbei, dass die verwendete stationäre Phase auch in größeren Teilchendurchmessern für das Upscaling erhältlich ist. Damit vermeiden Sie das meist schwierige Übertragen einer analytisch optimierten Methode auf ein anderes Packungsmaterial.
Die analytische Säule wird nun bezüglich ihrer Beladbarkeit untersucht. Hierbei gelten die oben erwähnten Faustregeln.

Auswahlkriterien von Säulen

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

Upscaling

In chemical production, you normally start with raw material which has to be purified. There are several possibilities. Beside crystallization and distillation, chromatography is gaining importance as the purification method. In case that the more profitable purification methods cannot be utilized, it is possible to use a chromatographic method. In pharmaceutical industry the separation of enantiomeric mixtures by chromatography is one of the best examples.
In those types of situations, the separation has to be first optimized by analytical HPLC. The goal hereby is to choose a packing material and mobile phase allowing the fastest and most selective isocratic separation. To solve your separation problem go for the most selective column. Increasing in selectivity means increase in overloading the column and therefore increase in purified substance per run. Make sure that the stationary phase used is also available in larger particle diameter. This keeps you away to transfer an optimized analytical method to a different packing material, which mostly is difficult.
The analytical column must then be investigated with respect to its loading capacity. The above-mentioned rules of thumb should be applied.

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

Die Auswahl der präparativen Säulendimension hängt ab von der Menge der Substanz, die pro Zeiteinheit aufgereinigt werden soll.
Die Masse (m) bzw. das Volumen (V) der aufzureinigenden Substanz ist ebenso wie die Flussrate (F) des Eluenten, mit der die Säule betrieben werden soll, abhängig vom Quadrat des Verhältnisses der Säuleninnendurchmesser (d) der präparativen (prep) und der analytischen (analytisch) Säule.

Es gilt folgender Zusammenhang:

$$\frac{F_{analytisch}}{F_{prep}} = \frac{m_{analytisch}}{m_{prep}} = \frac{d^2_{analytisch}}{d^2_{prep}}$$

In der unten stehenden Tabelle sind die Kenngrößen für die wichtigsten Säulendimensionen angegeben.

F = Flussrate
m = Masse
d = Innendurchmesser der Säule

Säulenabmessungen/ Column dimensions [mm]	u [mm/s]	Flussrate/ Flow rate [ml/min]	Masse der stationären Phase/ Mass of the stationary phase [g]	Vergrößerungsfaktor/ Upscaling factor
250 x 4.6	≈ 2	1.0	2.5	1.0
250 x 8.0	≈ 2	3.0	7.6	3.0
250 x 10.0	≈ 2	4.7	11.8	4.7
250 x 16.0	≈ 2	12.1	30.2	12.1
250 x 20.0	≈ 2	18.9	47.3	18.9
250 x 32.0	≈ 2	48.4	121.0	48.4
250 x 40.0	≈ 2	75.6	189.0	75.6
250 x 50.0	≈ 2	118.1	295.4	118.1
250 x 62.0	≈ 2	181.7	454.2	181.7

Tabelle 1: Upscaling Faktoren für die am häufigsten verwendeten Säulendimensionen. Lineare Flussgeschwindigkeit u ≈ 2 mm/s

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

The dimension of the preparative column depends on the amount of compound which should be purified per time unit.
The mass (m) or the volume (V) of the compound to purify, as well as the flow rate (F) of the eluent are depending on the ratio of the square of ID (d) from the preparative column (prep) to the square of ID (d) from the analytical column (analytical).

The following equation applies:

$$\frac{F_{analytical}}{F_{prep}} = \frac{m_{analytical}}{m_{prep}} = \frac{d^2_{analytical}}{d^2_{prep}}$$

The characteristics for the most common preparative column dimensions are given in the table below.

F = Flow rate
m = Mass
d = Column inner diameter

Table 1: Upscaling factors for the most common column dimensions. Linear velocity u ≈ 2 mm/s

1.2.4 Säulendimension

Beim Upscaling wird die Lineargeschwindigkeit konstant gehalten. Fluss, Injektionsmenge und Masse werden gemäß dem Upscaling Faktor angepasst (siehe Tabelle 1).
Natürlich müssen auch apparative Gegebenheiten beachtet werden. In der präparativen HPLC müssen die Kapillarinnendurchmesser den Flussraten angepasst werden (Upscaling Faktor). Der Detektor sollte im Gegensatz zur analytischen Trennung möglichst unempfindlich sein. Daher wird die Schichtdicke der Detektorzelle verkleinert bzw. bei Messungen im UV werden Wellenlängen gewählt, bei denen die Substanz einen kleineren Extinktionskoeffizienten hat.

Zusammenfassung

Ideale Prozessbedingungen in der präparativen HPLC sind:

- Vorzugsweise Massenüberladung
- Löslichkeit der Substanzen in der mobilen Phase >20 g/l
- Isokratischer Betrieb (im Interesse einer Lösemittelrückgewinnung)
- Partikelgröße der stationären Phase 10 bis 15 µm
- Möglichst hohe Durchflussraten

1.2.4 Column Dimensions

The linear velocity is kept constant during scale up. Flow rate, injection volume, and mass are modified according to the upscaling factor (see Table 1).
Of course, the instrumental conditions have also to be considered. If scaling up, the internal diameter of the capillaries have to be adapted to the used flow rate (upscaling factor). In contrary to analytical HPLC, the detector should be as insensitive as possible. This is accomplished either by reducing the pass length of the flow cell or by detecting at a wavelength where the compound has the lowest extinction coefficient.

Summary

Ideal process conditions for preparative HPLC :

- Mass overloading
- Solubility of the substances in the mobile phase >20 g/l
- Isocratic conditions (to recycle solvents)
- Particle size of stationary phase 10 to 15 µm
- Potential for high flow rates

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1.2.4.4 Die Trennsäule und ihre Hardware

Neben der Selektivität, ist die Güte der Trennsäule für Ihre tägliche Arbeit von entscheidender Bedeutung. Die wichtigsten Leistungskriterien für die Güte einer Trennsäule sind die Trenneffizienz und die Stabilität der Packung. Diese Parameter hängen neben dem Packungsmaterial von der verwendeten Säulenhardware ab.
Das funktionelle Säulenkonzept der HYPERCHROME Säulenhardware ist anderen Hardwarelösungen in vielen Belangen überlegen. Ihre, auf die Säulen abgestimmte Anschlusstechnik ermöglicht die Verwendung als Standardsäule, oder als Säulenkartusche. Beide Säulenarten können mit oder ohne Vorsäule bzw. Vorsäulenkartusche in direkter Kopplung betrieben werden. Das überlegene Design der HYPERCHROME-HPLC-Säule wirkt sich optimierend auf die chromatographische Trennung aus.
Die Anschlüsse der HYPERCHROME-Säulen können beliebig oft geöffnet bzw. verschlossen werden, ohne dass hierdurch ihre Funktion beeinträchtigt wird. Selbst die Säulenpackung ist im Gegensatz zu konventionellen Säulen durch ein strömungsoptimiertes Sieb-Sandwich am Säulenein- und -ausgang geschützt. Eine direkte Beeinträchtigung oder mechanische Zerstörung der Packung wird hierdurch verhindert. Der Filtereinsatz, der die sonst übliche Fritte ersetzt, wird mit einer PTFE-Ringdichtung im Säulenrohr gehalten. Er verhindert weitestgehend die bei Fritten häufig auftretenden Verstopfungen und starken Metallkontaminationen.
Ein weiterer Vorteil dieser Säulenhardware liegt darin, dass die Säulen beliebig oft wiederbefüllbar sind. Die Qualität und Güte der Trennleistung wird von bereits

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1.2.4.4 The Column and its Hardware

Besides the selectivity, the performance of the column is of critical importance for the daily work. The most important performance criteria for the quality of a packed column are separation efficiency and stability of the packing. These parameters will depend on the packing material as well as on the column hardware. The unique design of HYPERCHROME column hardware is superior to other hardware solutions in many ways. It's column nuts are perfectly adapted to the column tube, making it possible to use the hardware as a standard column or as a column cartridge. Both types of columns can be used with or without a directly coupled precolumn/precolumn-cartridge. The unique design of the HYPERCHROME HPLC column hardware takes part in the optimization of the chromatographic separation.
The nuts of HYPERCHROME columns may be opened and closed as often as needed. It will not affect the lifetime of the column. Compared to conventional columns, even the packing is protected by a mesh-sandwich at the column ends. Direct distortion or mechanical flow distribution of the packing is thereby eliminated. The mesh-sandwich which replaces typical frits is kept in the column tube by a PTFE seal ring. It also prevents blockages and additional metal contamination which are common for frits. An additional advantage of this column hardware is the unlimited refillability. Quality and performance of a separation will be not influenced by a column tube which has been under Refill. There is no difference in quality between a new column and a refilled column. Before going into the refill process the column tube will be inspected and cleaned like a brand new column tube.

1.2.4 Säulendimension

benutzten Rohren nicht beeinflusst. Zwischen einer Refill-Säule und einer Neu-Säule besteht für den Anwender kein Leistungsunterschied. Die Wiederbefüllung erfolgt nach eingehender Reinigung und Prüfung des Rohres nach den gleichen Anforderungen wie bei einer Neu-Säule.
Die sich daraus ergebende Mehrfachnutzung ist effektiv und wirtschaftlich. Sie haben keine Probleme mit der Entsorgung, sparen Geld gegenüber einer Neu-Säule und gemeinsam leisten wir einen wichtigen Beitrag zum Umweltschutz.
Jede einzelne Säule wird vor der Auslieferung einem chromatographischen Qualitätskontrolltest unterzogen. Das dabei erhaltene Testzertifikat wird der Säule beigelegt. So können sie sicher sein, dass Ihre Trennsäule stets höchsten Qualitätsansprüchen genügt.

1.2.4 Column Dimensions

Reusing column hardware is cost-effective and economical. There is no problem to dispose the used column and you save money compared to buy a new column. In addition you contribute to protect our environment.
Every single column undergoes a quality control test to check its chromatographic performance. This test report is attached to the column so you can be sure that the column meets highest quality criteria.

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

Die richtige Behandlung einer Säule ist von entscheidender Bedeutung für die Lebensdauer Ihrer Säule und somit für die Kosten Ihrer HPLC-Analytik. Die folgenden Punkte geben Ihnen Richtlinien für den Gebrauch, die Regenerierung und die Lagerung von HPLC-Säulen. Diese hängen im Wesentlichen vom verwendeten Trägermaterial (Kieselgel, Polymer, usw.), sowie von den Oberflächenmodifizierungen der einzelnen Materialien ab.

Allgemeine Hinweise
Kieselgel ist der ideale Träger für HPLC-Phasen. Mechanische Stabilität und physikochemische Oberflächeneigenschaften ermöglichen eine Vielzahl chemischer Oberflächenmodifizierungen. Kieselgel ist vor allem kompatibel mit einer großen Anzahl organischer Lösemittel.
Bei der Verwendung von Trennsäulen, basierend auf Kieselgel, sind aber einige wichtige Punkte zu beachten.

pH Stabilität
Allgemein sind alle auf Kieselgel basierenden Trennphasen zwischen pH 2 und pH 8 uneingeschränkt stabil. Dabei wird der pH-Wert der mobilen Phase stets im rein wässrigen Medium eingestellt und dann erst mit der organischen Phase gemischt.
Moderne stationäre Phasen erlauben auch eine Erweiterung dieses pH-Bereichs. Durch moderne Oberflächenmodifizierungen ist es bei einigen Phasen möglich, im

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

The proper care of a column is extremely important for the lifetime of the column and, consequently, for the quality of your HPLC analysis. The following remarks will give you some guidelines for the use, cleaning and storage of HPLC columns. These guidelines will depend on the nature of the chromatographic support (silica, polymer or others) and on the surface chemistry of the corresponding stationary phase.

General Guide lines
Silica is the ideal support for HPLC phases. It offers best mechanical stability, excellent physicochemical surface properties, leading to a wide range of bonding chemistry and is also compatible with a broad range of organic solvents. However, the following points are extremely important using silica based HPLC columns.

pH stability
In general silica based HPLC columns are stable within a range of pH 2 to pH 8. To measure pH, the measurement has to be done in the aqueous media before mixing with organic solvents. This will give a more accurate and consistent pH measurement than taking the pH in a mixed aqueous/organic media. Some modern HPLC columns can be used outside pH 2 to pH 8. New bonding

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

sauren Bereich bis zu pH 1 hinunter zu arbeiten. Prüfen Sie vor Gebrauch einer Säule die Produktinformation des jeweiligen Herstellers, ob sie außerhalb des pH-Bereiches 2 bis 8 verwendet werden kann.
Stationäre Phasen auf der Basis von ultra-reinem Kieselgel können im Alkalischen bis zu pH 11 eingesetzt werden. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn die im Eluenten verwendete Base sehr sperrig ist und die Oberfläche des Kieselgels nicht angreifen kann (z.B. Pyrolidin). Ansonsten empfehlen wir bei pH-Werten > 8 und der Verwendung “kleiner Basen”, wie z.B. Ammoniak, den Einsatz von Polymersäulen oder Phasen basierend auf Zirkoniumdioxid.

Mechanische Stabilität·
Trennsäulen auf der Basis von Kieselgel sind mechanisch sehr stabil und unterliegen somit keiner Drucklimitierung. Sie können im Dauerbetrieb problemlos bei einem Druck > 400 bar (6000 psi) betrieben werden. Plötzliche Druckstöße sollten vermieden werden. Diese könnten zu Löchern im Packungsbett führen. Im Chromatogramm ist dies meist als Doppelpeaks zu erkennen.

Mobile Phasen (Eluenten)
Kieselgel basierende stationäre Phasen sind mit allen Lösemitteln im pH-Bereich 2-8 kompatibel. Verwenden Sie, wenn möglich, nur Lösemittel der höchsten Reinheit. Filtrieren Sie Pufferlösungen durch einen Filter der Porenweite < 0,5 µm, bevor Sie diese in der HPLC einsetzen. Bedenken Sie stets: Die HPLC-Säule ist der beste Filter!
Die Verwendung unreiner Lösemittel bedingt in der HPLC eine irreversible

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

chemistry allows for operating as low as pH 1 with some stationary phases. However, you should check vendors product information before using a silica based column outside the pH 2 to pH 8.
Stationary phases based on ultra pure silica gel can also be used at a pH as high as 11. It depends on the chemical nature of the modifier used in the mobile phase. Large bases (such as pyrolidine) are not able to attack the surface of the silica and, therefore, can be used as mobile phase modifiers when higher pH values are required. If you like to work at pH > 8 by using small bases as the modifier (e.g. ammonia), we recommend the using of stationary phases based on polymers or zirconium dioxide.

Mechanical stability
Stationary phases based on silica are mechanically very stable, and well-packed columns can be used at more than 40 MPa (6000 psi) without any problem. However, pressure shocks should be avoided. Pressure shocks can lead to channeling in the column bed, which may result in peak splitting.

Mobile phases (eluents)
Silica based stationary phases are compatible with all organic solvents in the above mentioned pH range 2-8. For best results, the highest quality solvents available, (e.g. such as HPLC grade) should be used. All buffers solutions should be filtered through a 0.5 µm filter before using in HPLC. Always keep in mind that your column will collect any particulate material that enters the flow stream.

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

Adsorption von Verunreinigungen an der Kieselgeloberfläche. Diese Verunreinigungen blockieren Adsorptionstellen, verändern damit die Selektivität der Trennsäule und können zu Störungen im Chromatogramm führen. Auch werden diese Verunreinigungen bei Gradientenläufen von der Trennsäule eluiert und führen dann im Chromatogramm zu so genannten “Geister- bzw. Ghostpeaks”. Ghostpeaks sind Peaks, die meist an der gleichen Stelle im Chromatogramm erscheinen, aber nicht auf die Probe zurückzuführen sind. Daher empfielt es sich bei Gradientenelution immer einen Blindgradienten (Gradient ohne Injektion) durchzuführen.
Um irreversible Adsorbtion am Einlaß der analytischen Säule zu vermeiden, sollte stets eine Vorsäule vorgeschaltet werden. Diese wird in regelmäßigen Abständen gewechselt (z.B. beim Überschreiten eines vorher festgesetzten Rückdrucks). Vorsäulen verlängern die Lebensdauer der Trennsäule erheblich. Zusätzlich hält die Vorsäule auch kleinere Partikel, wie Abrieb der Pumpendichtung, Abrieb aus dem Injektionsventil bzw. aus der Probe, zurück.
Alternativ zur Vorsäule können auch In-line-Filter verwendet werden. Diese In-line-Filter werden zwischen Injektor und Trennsäule eingebaut. Sie filtern feste Partikel aus dem Eluenten, verhindern jedoch nicht die Adsorption von Verunreinigungen am Säuleneinlaß.

Lagerung von Säulen

- Kurzfristig, d.h. über Nacht, im zuletzt verwendeten Eluenten.
- Mittelfristig, d.h. 2-7 Tage, Säule pufferfrei waschen um bakterielles Wachstum zu verhindern.

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

The use of non-pure solvents in HPLC causes irreversible adsorption of impurities at the column inlet. These impurities block adsorption sites, change the selectivity of the column and eventually lead to peak splitting in the chromatogram. In gradient elution, they cause so-called "ghost peaks". Ghost peaks are peaks that mostly appear at the same position in the chromatogram. Their origin is not the sample. Impurities in the solvents or solvent additives are in most cases the reason. Therefore, it is highly recommended to run a blank gradient (without injecting a sample at the beginning of each method). This is a way if ghost peaks will appear. To avoid irreversible adsorption at the column, you should use a guard column. The use of a guard column will increase the lifetime of a the separation column. In addition to avoiding the reversible adsoption, a guard column is filtering particulate material related to pump seals or rotor seals of injectors or coming from the sample itself. As an alternative an in-line filter can be used. These filters are placed between the column and the injector. Newer versions can be directly mounted on the column inlet. These filters are good for removing particulate material from the eluent. Removing in-line filters will not remove organic impurities from the eluent and therefore they dont stop irreversible adsorbtion.

Proper storage of silica based HPLC columns

- Short-term storage, e.g. overnight, columns can be stored in the eluent.
- Mid-term storage, e.g. 2-7, purge column with pure water and store in a 10% aqueous solution of isopropanol (IPA) to prevent bacterial growth.

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

- Längerfristige Lagerung, d.h. > 7 Tage, Säulen müssen umgestellt werden auf 100% Methanol oder Acetonitril, um eventuelle Hydrolyse der Liganden zu minimieren.
- Achtung! Beachten Sie bitte, dass Sie vor dem Umspülen der Säulen von wässrigen auf organische Lösemittel Pufferlösung aus der Säule ausgewaschen haben. Puffersalze können in organischen Lösemitteln ausfallen und können dann sowohl Säulen wie Kapillaren verstopfen.

Equilibrierungszeit
Die Equilibrierungszeit hängt von der Dimension der Trennsäule ab. Nach dem Durchsatz von 20 Säulenvolumina an Eluent, müßte im Allgemeinen eine Säule equilibriert sein.
Die Equilibrierungszeiten für die am häufigsten verwendeten Säulendimensionen sind in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt.

Säulenabmessungen/ Column Dimension	Säulenvolumen/ Column Volume [ml]*	Flussrate/ Flow Rate [ml/min]	Equilibrierungszeit/ Equilibration Time [min]
250 x 4.6 mm	2.91	1.00	58
150 x 4.6 mm	1.74	1.00	35
100 x 4.6 mm	1.16	1.00	23
50 x 4.6 mm	0.58	1.00	12
250 x 4.0 mm	2.20	1.00	44
125 x 4.0 mm	1.10	1.00	22
250 x 2.0 mm	0.55	0.25	44
150 x 2.0 mm	0.33	0.25	26
50 x 2.0 mm	0.11	0.25	9

* ε_T = 0,7 (totale Porosität der Trennsäule)

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

- Long-term storage, e.g. > 7 days, silica based columns should be converted to 100% Methanol or Acetonitrile to minimize hydrolyses.
- Caution! Make sure that all buffer salts are removed from the column before exchanging aqueous mobile phase to organic solvents. Buffer salts are not soluble in organic solvents e.g. Acetonitrile and may block capillary tubing and the column.

Equilibration time
The equilibration time of a column depends on the column dimensions. In general, a column is equilibrated after purging it with 20 column volumes.
The equilibration time for the most important column dimensions are summarized in the table beside:

* ε_T = 0.7 (total porosity of the column)

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

Die Umspülzeiten einer Säule können um die Hälfte verkürzt werden, wenn man den Fluss während der Umspülphase verdoppelt. Normalerweise ist dies kein Problem solange der Druckabfall über die Säule nicht zu hoch wird. 20 Säulenvolumina sind erforderlich, damit die Säule zu 100% equilibriert ist.

Regeneration von Säulen
Zeigt eine Säule Änderungen in der Selektivität oder weist eine Substanz nach einer gewissen Zeit einen Doppelpeak auf, so handelt es sich häufig um eine starke Adsorption von Matrixkomponenten. Häufig können derartig verschmutzte Säulen unter Anwendung der nachstehenden Prozeduren wieder regeneriert werden.

Regeneration von Umkehrphasen (RP-Säulen)
Umkehrphasen sind alle C18-, C8-, C4-, C1-, C30-, CN- und Phenylphasen. Zu ihrer Regeneration empfiehlt sich eine Waschprozedur mit Lösemitteln unterschiedlicher Polarität, die in folgender Reihenfolge durchzuführen ist:

- Spülen mit 20 Säulenvolumina Wasser (Auswaschen von Salzen)
- Spülen mit 20 Säulenvol. Acetonitril (Auswaschen hydrophiler Verunreinigungen)
- Spülen mit 5 Säulenvolumina Isopropanol (Auswaschen leicht hydrophober Verunreinigungen)
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Heptan bzw. Hexan bzw. Methylenchlorid (Auswaschen stark hydrophober Verunreinigungen)
- Spülen mit 5 Säulenvolumina Isopropanol
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Acetonitril
- Rückführung zu den Reversed Phase Bedingungen

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

You can reduce the equilibration time by simply increasing the flow rate to the double. However, make sure to purge the column with at least 20 column volumes. This guarantees 100% equilibration.

Regeneration of a column
Impurities from the sample or mobile phase can adsorb at the column inlet and may cause changes in selectivity or peak splitting. Often these "dirty columns" can be regenerated by applying the following procedures:

Regeneration of RP-packings
C18, C8, C4, C1, C30, CN and Phenyl are RP-packings. To regenerate RP-columns please run the following procedure with solvents of different polarity:

- Wash with 20 column volumes Water (to elute out salts)
- Wash with 20 column volumes Acetonitrile (to elute hydrophilic contaminants)
- Wash with 5 column volumes Isopropanol (to elute mildly hydrophobic contaminants)
- Wash with 20 column volumes Heptane or Hexane or Methylenchloride (to elute strongly hydrophobic contaminants)
- Wash with 5 column volumes Isopropanol
- Wash with 20 column volumes Acetonitrile
- Return the column to its original Reverse-Phase condition

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.1 Kieselgel basierende Phasenmaterialien

Regeneration von Normalphasen (NP-Säulen)
Normalphasen sind alle Silica-, Diol-, Nitro- und Aminophasen. Zur Regeneration empfiehlt sich die nachfolgende Waschprozedur:

- Spülen mit 20 Säulenvolumina Heptan oder Hexan
- Spülen mit 5 Säulenvolumina Isopropanol
- Spülen mit 4 Säulenvolumina Acetonitril
- Spülen mit 5 Säulenvolumina Isopropanol
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Heptan oder Hexan
- Rückführung zu den Normalphasen Bedingungen

Achtung: Benützen Sie kein Wasser!

Regeneration von Ionenaustauschern
Ionenaustauscher sind alle Anionen- und Kationenaustauscherphasen (WCX, SCX, WAX und SAX). Zur Regeneration empfiehlt sich die nachfolgende Waschprozedur:

- Spülen mit 20 Säulenvolumina des verwendeten Eluenten mit doppelter Konzentration an Puffer
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Wasser (Auswaschen von Salzen)
- Spülen mit 20 Säulenvol. Acetonitril (Auswaschen hydrophiler Verunreinigungen)
- Spülen mit 5 Säulenvol. Isopropanol (Auswaschen leicht hydrophober Verunreinig.)
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Heptan bzw. Hexan bzw. Methylenchlorid (Auswaschen stark hydrophober Verunreinigungen)
- Spülen mit 5 Säulenvolumina Isopropanol
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Acetonitril
- Spülen Sie die Säule wieder mit 20 Säulenvolumina Wasser
- Rückführung zu den Ionenaustausch Bedingungen

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.1 Silica based Stationary Phases

Regeneration of NP-packings
Silica, Diol-, Nitro- and Amino- are NP-packings:

- Wash column with 20 column volumes of Heptane or Hexane
- Wash with 5 column volumes Isopropanol
- Wash with 4 column volumes Acetonitrile
- Wash with 5 column volumes Isopropanol
- Wash with 20 column volumes Heptane or Hexane
- Return the column to its original Normal-Phase condition

Attention: Do not use Water!

Regeneration of Ion-Exchange packings
Anion- and Cation-Exchangers (WCX, SCX, WAX and SAX) are Ion-Exchange-Packings:

- Wash with 20 column volumes with the eluent, double the buffer concentration
- Wash with 20 column volumes Water (to elute out salts)
- Wash with 20 column volumes Acetonitrile (to elute hydrophilic contaminants)
- Wash with 5 column vol. Isopropanol (to elute mildly hydrophobic contaminants)
- Wash with 20 column volumes Heptane or Hexane or Methylenchloride (to elute strongly hydrophobic contaminants)
- Wash with 5 column volumes Isopropanol
- Wash with 20 column volumes Acetonitrile
- Wash with 20 column volumes Water
- Return the column to its original Ion-Exchange condition

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.2 Polymer basierende Phasenmaterialien

Allgemeine Hinweise

Im Gegensatz zu Säulen auf Kieselgelbasis sind polymerbasierende stationäre Phasen pH-stabil, jedoch mechanisch wesentlich empfindlicher. Polymermaterialien reagieren auf Lösemittelwechsel empfindlich. Sie quellen oder schrumpfen. Dies kann zu einem enormen Druckanstieg oder zu einem Totvolumen in der Säule führen. Da die Druckstabilität, wie auch die Lösemittelkompatibilität abhängig ist von dem jeweils verwendeten Polymermaterial, und damit auch von Hersteller zu Hersteller verschieden sein kann, kann im Gegensatz zu Kieselgelsäulen, keine allgemein gültige Aussage zur Handhabung der Trennsäule gemacht werden. Beachten Sie daher bei Trennsäulen auf Polymerbasis die jeweiligen Beipackzettel bzw. kontaktieren Sie bei Bedarf Ihren Lieferanten bzw. Hersteller der Säule.
Nachstehend finden Sie einige allgemein gültige Lagerungs- und Regenerationshinweise.

Lagerung von Polymersäulen

- *Hydrophobe unmodifizierte Polystyrol/Divinylbenzol Copolymere (z.B. Hamilton PRP-1):*

Diese Säulen können in aprotischen Lösemitteln auch langfristig gelagert werden. Am Besten eignet sich hierfür Acetonitril.

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.2 Polymer based Stationary Phases

General Guide lines

Compared to silica based columns polymer based stationary phases show a higher pH-stability but a lower mechanical strength. Polymer based packings are not compatible with all organic solvents. They may swell or shrink in organic solvents. Unfortunately, the pressure stability and solvent compatibility are not only different for the different types of polymers, they are also different from manufacturer to manufacturer. Therefore, no general rules for the care of polymer based materials can be given. Please read always the instructions for the use of those columns. In case of doubt, please contact your distributer or corresponding manufacturer.
Nevertheless, some general guide lines are existing for the storage and regeneration of the different types of polymer supports.

Storage Guide lines for polymer based columns

- *Hydrophobic non-modified polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) phases (e.g. Hamilton PRP-1):*

These types of columns can be stored for a long period in an aprotic solvent. Recommended solvent is Acetonitrile.

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.2 Polymer basierende Phasenmaterialien

- *Polymerbasierende Ionenaustauscher (z.B. Eurokat H-Form, CarbEx H-Form oder Hamilton PRP-X 100):*

Diese Säulen dürfen weder mit hohen Konzentrationen an organischen Lösemitteln betrieben, noch gelagert werden! Zur Lagerung empfehlen wir eine 0,01%ige wässrige Natriumazid-Lösung. Zur weiteren Vermeidung von bakteriellem Wachstum können diese Säulen im Kühlschrank bei +6 °C bis +8 °C gelagert werden.

Regeneration von Polymermaterialien

Zeigt eine Polymersäule Änderungen in der Selektivität oder weist eine Substanz nach einer gewissen Zeit einen Doppelpeak auf, so handelt es sich häufig um eine starke Adsorption von Matrixkomponenten. Häufig können derartig verschmutzte Säulen unter Anwendung der nachstehenden Prozeduren wieder regeneriert werden.

Bitte beachten Sie, dass unterschiedliche Polymersäulen auch unterschiedliche Regenerationsschritte erfordern.

Hamilton PRP-1, PRP-3, PRP-Infinity

- Spülen mit 20 Säulenvolumina Wasser
- Gradientenelution von 100% Wasser → 100% Acetonitril → 100% Wasser in 10-15 min, Flussrate 1 ml
- Schritt 2 bitte drei-mal wiederholen
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.2 Polymer based Stationary Phases

- *Polymer based ion exchangers (e.g. Eurokat H-form, CarbEx H-form or Hamilton PRP-X 100):*

These kind of columns cannot be treated with high concentrations of organic solvents. For storage we recommend a solution of 0.01% aqueous sodium azide. Storing at +4 °C to +8 °C prevents bacterial growth in addition.

Regeneration of polymer materials

When a column shows changes in selectivity or shows constantly double peaks at a particular retention time, it is often caused by strong adsorption of matrix components. In most cases those contaminated columns can be regenerated by one of the procedures given below.

Attention: Different types of polymer columns require specific regeneration procedures.

Hamilton PRP-1, PRP-3, PRP-Infinity

- Wash with 20 column volumes Water
- Run a linear gradient from 100% Water → 100% Acetonitrile → 100% Water in 10-15 min, flow rate 1 ml
- Repeat step two 3 times
- Return the column to its original condition

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.2 Polymer basierende Phasenmaterialien

Hamilton PRP X-100

- Spülen mit 20 Säulenvolumina Wasser
- Spülen mit 20 Säulenvolumina Methanol / 1% 6N Salpetersäure
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Hamilton PRP X-200, PRP X-300

- Spülen mit 20 Säulenvolumina Wasser
- 5 Injektionen in Folge, je 100 µl 1N Salpetersäure
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Hamilton RCX-10

- Spülen mit 20 Säulenvolumina 0,1N NaOH-Lösung
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Hamilton RCX-30

- Spülen mit 60 Säulenvolumina 0,1N NaOH-Lösung
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Eurokat H-Form, CarbEx H-Form, Hamilton HC-75 Hydrogen Form

- Spülen mit 0,01N Schwefelsäure bei 60 °C, Flussrate von 0,1 ml/min, min. 8-10 h
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.2 Polymer based Stationary Phases

Hamilton PRP X-100

- Wash with 20 column volumes Water
- Wash with 20 column volumes of Methanol / 1% 6N Nitric acid
- Return the column to its original condition

Hamilton PRP X-200, PRP X-300

- Wash with 20 column volumes Water
- Inject consecutively 5 times 100 µl of 1N Nitric acid
- Return the column to its original condition

Hamilton RCX-10

- Wash with 20 column volumes of 0.1N NaOH solution
- Return the column to its original condition

Hamilton RCX-30

- Wash with 60 column volumes of 0.1N NaOH solution
- Return the column to its original condition

Eurokat H-Form, CarbEx H-Form, Hamilton HC-75 Hydrogen Form

- Wash min. 8-10 h with 0.01N Sulphuric acid at 60 °C, flow rate 0.1 ml/min
- Return the column to its original condition

1.3 Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule

1.3.2 Polymer basierende Phasenmaterialien

Eurokat Ca-Form , CarbEx Ca-Form, Hamilton HC-75 Calcium Form, Hamilton HC-40 Calcium Form

- Spülen mit 1% iger Calciumnitratlösung bei 60 °C, Flussrate 0,1 ml/min, min. 8-10 h
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Eurokat Pb-Form, CarbEx Pb-Form, Hamilton HC-75 Lead Form

- Spülen mit 1% iger Bleinitratlösung bei 60 °C, Flussrate 0,1 ml/min, min. 8-10 h
- Rückführung zu den Ausgangsbedingungen

Betrieb und Lagerung

1.3 Column Usage and Column Care

1.3.2 Polymer based Stationary Phases

Eurokat Ca-form, CarbEx Ca-form, Hamilton HC-75 Calcium form, Hamilton HC-40 Calcium form

- Wash min. 8-10 h with 1% Calcium Nitrate solution at 60 °C, flow rate of 0.1 ml/min
- Return the column to its original condition

Eurokat Pb-form, CarbEx Pb-form, Hamilton HC-75 Lead form

- Wash min. 8-10 h with 1% Lead Nitrate solution at 60 °C, flow rate 0.1 ml/min
- Return the column to its original condition

Usage and Care

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

In diesem Kapitel finden Sie die häufigsten Probleme, die während des Betriebs einer Trennsäule auftreten können. Außerdem finden Sie Hinweise zu Problemlösungen.

Druckanstieg

Problem

· Der Gegendruck in Ihrer HPLC-Anlage erhöht sich kontinuierlich und übersteigt 10% des ursprünglichen Wertes.

Ursachen

· Zuleitungskapillaren verstopft, Trennsäule verstopft, Detektorzelle verstopft. Verstopfungen können entstehen durch:
  - Mechanische Verunreinigungen, Abrieb von Pumpendichtungen, Abrieb vom Rotorseal des Injektionsventils
  - Ausgefallene Puffersalze, ausgefallene Probe
  - Bakterielles Wachstum oder andere Verunreinigungen im Eluenten

Maßnahmen zur Behebung

· Versuchen Sie den Ort der Verstopfung zu lokalisieren. Hierzu öffnen Sie sämtliche Schraubverbindungen zwischen Pumpe und Detektor bei laufender Pumpe. Beginnen Sie am Detektor und gehen Sie schrittweise in Richtung zur Pumpe vor. Hierbei beobachten Sie an welcher Stelle der Druck deutlich abfällt. Tauschen Sie die eventuell verstopften Kapillarverbindungen aus. Sind Siebe oder Fritten der Trennsäule die Ursache, müssen diese erneuert bzw. gereinigt werden.

1.4 Troublshooting for HPLC-Columns

In this chapter the most common problems that occur during the use of an HPLC column are summarized. Guide lines to overcome these problems are given.

Increasing back pressure

Problems

· The backpressure of your HPLC instrument increases continuously and exceeds 10% of the original value.

Causes

· The capillary tubing, the column or the detector cell is blocked. A blockage can be caused by several things:
  - Mechanical contamination coming from pump seals or the rotor seal of the injection valve
  - Precipitation of buffer salts or precipitation of the sample
  - Bacterial growth or contaminations in the mobile phase

Solutions

· First of all, locate the exact position of the blockage. To do this systematically, open all connections starting from the detector and then back to the injector while the pump is running. This will allow you to identify clearly where the blockage is located by observing where the pressure drop occurs. Replace the blocked parts if frits or meshes are causing a blockage please clean or exchange them.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Vorbeugende Maßnahmen

- Filtration des Eluenten durch Einwegfilter der Filterfeinheit 0,45 µm.
- Überprüfung der Löslichkeit von Puffersalzen in den verwendeten organischen Lösemitteln und Lösemittelgemischen.
- Filtration der Probe.
- Verwendung von Vor- bzw. Schutzsäulen zum Schutz der Trennsäule.

Verlust an Auflösung bzw. schlechte Trenneffizienz

Problem

- Die Auflösung im Chromatogramm wird immer schlechter. Peaks werden immer breiter. Peaks werden unsymmetrisch. Es treten Schultern auf. Es treten Doppelpeaks auf.

.

Ursachen

- Die Säule ist mit einer stark retardierenden Substanz kontaminiert. Die Verunreinigung, die sowohl aus dem Eluenten bzw. aus der Probe stammen kann, tritt in starke Sekundärwechselwirkung mit der Probe.
- Es haben sich Kanäle in der Packung der Trennsäule gebildet (Ursachen hierfür sind mechanische Einflüsse auf das Packungsbett, bedingt durch starke Druckstöße, oder anderweitige mechanische Stoßbelastungen).
- Das Säulenbett ist nachgesackt.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

Precautions

- Filter all mobile phases through a 0.45 µm filter before using in HPLC.
- Always check the solubility of the buffer salts in the mobile phase you are using.
- If you have particulate material in your sample, filter it.
- Use pre- or guard column filters. On a long term basis, this is the most inexpensive way to go.

Decrease of Resolution or low efficiency

Problems

- The resolution is continuously decreasing, peaks are loosing efficiency and beginning to show tailing, a shoulder or even double peaks.

Causes

- The column is contaminated with strongly retained components. This contamination comes from either the mobile phase or the sample.
- A channelling inside the column has occurred. This may have been caused by a mechanical shock to the column bed.
- The column has a void at the inlet.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Maßnahmen zur Behebung

- Regenerieren Sie die Trennsäule gemäß der entsprechenden Vorschrift in Kapitel 1.3 “Betrieb und Lagerung einer HPLC-Säule”. Ist die Ursache Kanalbildung in der Packung der Säule, ist keine Reparatur möglich. Verwenden Sie eine neue Trennsäule.
  Ist die Ursache ein nachgesacktes Packungsbett, so kann wie folgt eine Reparatur versucht werden.
  Entfernen Sie vorsichtig ca. 5 mm der Packung am Säulenkopf. Ersetzen Sie das entfernte Füllmaterial durch einen möglichst zähen Brei aus Methanol und neuem Füllmaterial. Entfernen Sie das überschüssige Füllmaterial und verschließen Sie die Säule wieder mit neuen Sieben bzw. einer neuen Fritte. Bauen Sie die Säule in umgekehrter Betriebsrichtung wieder in die Apparatur ein. Stellen Sie sicher, dass kein Material in die Detektorzelle gespült werden kann.

Vorbeugende Maßnahmen

- Verwenden Sie nach Möglichkeit immer eine Vor- bzw. Schutzsäule. So können stark retardierende Verbindungen nicht in die analytische Säule gelangen. Sollte das Problem erneut auftreten, müssen Sie lediglich die Vor- bzw. Schutzsäule austauschen.
- Schützen Sie ihre Säulen vor Druckstößen, steigern Sie die Flussrate Ihrer HPLC-Pumpe schrittweise bis zum gewünschten Arbeitspunkt. Schützen Sie die Säule vor mechanischen Schlägen bzw. Stößen. Lagern Sie die Säule in der mitgelieferten Verpackung.

1.4 Troublshooting for HPLC-Columns

Solutions

- Regenerate the column according to the protocol in chapter 1.3 "Usage and Care". If there is channelling in the column, repair of the column is impossible. Please use a new column. If there is a void in the inlet in the column, you can try to repair in the column. To do so, you have to remove the sieve sandwich and about 5 mm of the packing at the column inlet.
  Replace the removed packing material with the paste of Methanol and new paking material of the same type. Take away the exceeding material and close the column with a new sieve sandwich. Install the column in reversed direction. Please check that no packing material can be flushed into the flow cell. Column repair is not always successful. The procedure is also time consuming.

Precautions

- Use always a pre- or guard column. Strongly retained compounds will stay in the guard column and the analytical column is therefore be protected.
- Avoid pressure shocks to the column. If you start running your HPLC equipment, start with a low flow rate and increase it slowly. After use, put the column back into the box to protect it of mechanical shocks.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Druckanstieg und Verlust an Trenneffizienz

Problem

- Nach wenigen Stunden steigt der Druck kontinuierlich an, obwohl Sie filtrierte mobile Phase verwenden.

Ursachen

- Sie arbeiten evtl. außerhalb des oberen pH-Bereiches der Trennsäule. Beachten Sie bitte, dass auf Kieselgel basierende Säulen nur bis zu pH 8 uneingeschränkt stabil sind. Oberhalb dieses pH-Wertes kann sich Kieselgel auflösen. Dabei entstehen zunächst kleinere Teilchen, die einen höheren Gegendruck generieren. Danach bildet sich ein Hohlraum am Einlass der Säule. Dieser verursacht eine Bandenverbreiterung, die sich als breite Peaks im Chromatogramm darstellt.

Maßnahmen zur Behebung

- Wenn Sie mit Eluenten bei hohen pH Werten arbeiten müssen, sollten Sie eine so genannte “Sättigungssäule” verwenden. Unter einer “Sättigungssäule” versteht man eine kurze HPLC-Säule (meist Vorsäule), die zwischen Pumpe und Injektor in das HPLC-System eingebaut wird. Der Eluent wird hier mit Kieselgel aus der Sättigungssäule angereichert und schont damit die Trennsäule. Die “Sättigungssäule” sollte mit dem gleichen Packungsmaterial gefüllt sein, das auch zur Trennung verwendet wird. Damit nicht noch ein zusätzlicher, größerer Druckanstieg erzielt wird, empfiehlt sich die Verwendung einer größeren Körnung des Füllmaterials in der “Sättigungssäule”.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

Increasing back pressure in combination with low efficiency

Problems

- After a few hours of use, the backpressure of the column increases continuously, even though you have filtered the eluent before usage.

Causes

- You may be working above the upper pH limit of the column. Silica based columns are only stable up to pH 8. Above pH 8 silica starts to dissolve. During the dissolution smaller particles are formed and these particles generate a higher backpressure. After a while a large void will develop at the column inlet. This void causes asymmetrical and broad peaks.

Solutions

- If you have to work at higher pH values, install a saturation column between the pump and the injection valve. This column should be a short HPLC column or a guard column packed with the same phase as the analytical column. If available, the particle size of this packing should be larger than the packing in the analytical column. If a saturation column is installed in the system, the eluent will become saturated by the silica of the saturation column and inhibits dissolution of the packing of the analytical column.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Variierende Retentionszeiten

Problem

· Die Retentionszeiten variieren von Injektion zu Injektion oder werden kontinuierlich kleiner. Die ursprüngliche Trennung ist nicht mehr erzielbar.

Ursachen

Normalphasen-Chromatographie (NP):

· Hier hat Wasser die höchste Elutionskraft. Der Wassergehalt der unpolaren Eluenten kann schwanken und ist u.a. abhängig von der Luftfeuchtigkeit im Labor. An regnerischen Tagen kann folglich der Eluent einen höheren Wassergehalt haben und damit können die Analyten früher von der Trennsäule eluieren.

Umkehrphasen-Chromatographie (RP):

· Meistens liegt hier der Fehler bei den HPLC-Pumpen (Ventilfehler). Bei kontinuierlicher Abnahme der Retentionszeiten ist ein Verlust an Adsorptionsstellen der stationären Phase anzunehmen. Bei Umkehrphasen auf Kieselgelbasis ist dies meist auf einen zu niedrigen pH-Wert (< 2) der mobilen Phase zurück zuführen. Hierbei werden die Bindungen der Alkylketten an der Kieselgeloberfläche zerstört und die Alkylketten können ausgewaschen werden.

Maßnahmen zur Behebung

Normalphasen-Chromatographie

· Halten Sie Ihre mobile Phase über Molekularsieb trocken. Setzen Sie der mobilen

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

Varying retention times

Problems

· The retention times of the peaks in the chromatogram are varying or decreasing continuously. The original separation can not be achieved.

Causes

Normal Phase (NP) mode:

· Varying retention times can be observed very often in normal phase chromatography. Water is the strongest solvent in NP mode. The water content of organic solvents will vary depending on the moisture in the air of the laboratories. Therefore, the retention time of some analytes is lower on a rainy day compared to a dry sunny day.

Reverse Phase (RP) mode:

· In RP HPLC the variation of retention times is mainly related to problems with the HPLC pump. Very often the check valves of the pump may not be closing properly. If the retention time is decreasing continuously, it is a hint that you may be loosing the bonded functional groups of your stationary phase. If you are working with silica based RP packings below pH 2, the bonding of the RP packing may be hydrolyzed and the alkyl chains can be washed out.

Phase ca. 1% eines polaren Modifiers (z.B. Methanol) zu.

Umkehrphasen-Chromatographie:

- Arbeiten Sie, wenn möglich, mit stationären Phasen auf Kieselgelbasis innerhalb des pH-Bereiches 2 bis 8.
  Müssen Sie bei pH-Werten < 2 chromatographieren, so verwenden Sie stationäre Phasen, die vom Hersteller ausdrücklich für diesen niedrigen pH-Bereich empfohlen werden (z.B. ProntoSIL C18 SH, ProntoSIL C18 ace-EPS).

Die Trennung funktioniert auf einer neuen Säule nicht mehr

Problem

- Sie haben auf einer bestimmten Phase eine neue HPLC-Methode entwickelt und erhalten auf einer anderen, neu gekauften Säule der gleichen Phase keine vergleichbare Trennung mehr.

Ursachen

- Während der Methodenentwicklung mit der “alten” Säule wurde vieles ausprobiert, verschiedenste Puffer bzw. Eluentenzusätze wurden verwendet. Dabei können Puffersalze und insbesondere Ionenpaar-Reagenzien irreversibel auf der Phase adsorbiert werden. Arbeiten bei extremen pH-Werten können dazu führen, dass Alkylketten der Phase ausgewaschen werden oder das Kieselgelgerüst aufgelöst wird.

Solutions

Normal Phase (NP) mode:

- To avoid varying retention times in the NP mode you should have add your mobile phase above your molecular sievesome molecular sieve to the mobile phase. Often the addition of 1% of a polar modifier like methanol helps to achieve stable retention times.

Reverse Phase (RP) mode:

- In the RP mode with silica based packings, you should take care not to work outside pH range of 2 to 8. Many RP packings are loosing their bonding below pH 2. If you have to work below pH 2, you should use only columns that are recommended to work in these pH ranges (e.g. ProntoSIL C18 SH, ProntoSIL C18 ace-EPS).

The separation can not be achieved with a new column

Problems

- You have developed a new HPLC method. After installing a new column you can no longer achieve the separation you had on the old column.

Causes

- During method development, you are using several different solvents, modifiers and buffers. Some buffers, especially ion pair reagents, may be irreversibly adsorbed on the column packing. If you work even for a short period of time, the silica or the bonded phase may be affected. This may influence the selectivity of the column dramatically.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Es können sich also die Eigenschaften der Trennsäule deutlich ändern.
Eventuell hatte die zur Methodenentwicklung verwendete Säule schon eine Vorgeschichte, die nicht bekannt ist, d.h. es wurden Eluenten verwendet, die die Oberflächeneigenschaften der Phase verändert haben oder die Säule kann durch bereits injizierte Probenbestandteile kontaminiert sein.
Die Säule wurde in ungeeignetem Lösemittel gelagert.
Bei stationären Phasen die auf “nicht-reinem” Kieselgel basieren ist im Allgemeinen eine schlechtere Batch zu Batch Reproduzierbarkeit zu erwarten. In solchen Fällen besteht die Möglichkeit, dass eine neue Charge dieser stationären Phase eine andere Selektivität ergibt.

Maßnahmen zur Behebung

- Führen Sie ein Logbuch für Ihre Säulen. Hierin protokollieren Sie die Betriebsdauer, die verwendeten Eluenten, die Lösemittel, in der die Säule gelagert wurde und die Anwender der Säule. Dadurch kann die Historie der Trennsäule stets nachvollzogen werden.
  Verwenden Sie für eine Methodenentwicklung immer eine neue Säule. Setzen Sie stationäre Phasen, basierend auf neuerem (ultrareinem) Kieselgel, ein. Diese haben normalerweise eine bessere Chargenreproduzierbarkeit.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

It also may occur that the column you use for method development already has a history that you are unaware of. You may have found it somewhere in your laboratory. There might be some contaminations on this column coming from the matrix of earlier injections, or this column may not have been stored in a proper solvent and its selectivity is therefore modified.
If you are using a column that is packed with a stationary phase based on an old generation type A silica, difficulties in batch to batch reproducibility of the column might also be the reason for the irreproducible result.

Solutions

- Keep a column file and record time of usage, solvents and buffers used, storage solvent used, and the persons who have used the column are recorded. If you have a file like that, you can always find out what happened with the column before. If possible you should always use a column with new generation based packing (high or ultra pure silica) to develop a new method. This type B silica based columns show a much higher batch to batch reproducibility.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Eine Trennung, die Jahre lang funktioniert hat, läßt sich nicht mehr reproduzieren

Problem

- Eine Trennung läuft über Jahre in der Qualitätskontrolle problemlos. Bei Verwendung einer neuen Säule treten Änderungen in der Selektivität und Retention der Substanzen auf, die deutlich außerhalb der üblichen Spezifikationen liegen.

Ursachen

- Das Problem liegt nicht unbedingt an der neuen Säule. Meist wird beim Wechsel zu einer neuen Säule gleichzeitig der Eluent gewechselt. Auch ein Chargenwechsel bei den Pufferadditiven (vor allem bei der Ionenpaarchromatographie) kann äußerst kritisch sein.

Maßnahmen zur Behebung

- Überprüfen Sie zunächst die HPLC-Anlage und den Eluenten, indem Sie einen Systemeignungstest (System Suitability Test) mit einer “alten” Vergleichssäule durchführen. Erfüllt diese Säule die Kriterien des Eignungstests, ersetzen Sie diese durch die neue Säule, und führen Sie den Eignungstest dann erneut durch. Sollte die neue Säule nicht die erforderlichen Trenneigenschaften zeigen, so empfiehlt es sich, den Säulenhersteller zu kontaktieren und ihm das Problem mitzuteilen.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

A HPLC method that has worked for years is no longer working when using a new column

Problems

- You have a HPLC method that runs for years in your QC laboratory without any problem. Suddenly, after installing a new column, the retention times and/or the selectivity changes and the results do not meet the specifications of the method.

Causes

- This problem is not necessarily related to the column. If you install a new column, a new mobile phase is also often used. A change in buffer additives (especially in ion pair HPLC) may cause the problem.

Solutions

- First of all, check the HPLC instrument and the mobile phases. This can be done by running the system suitability test with the old column. At the second step run the same test with the new column. Now compare the results of both columns. If the new column shows different results, please contact your column manufacturer.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Die Trennleistung der Säule variiert

Problem

- Die Trennleistung der Säule ist nicht konstant. Bei einer Injektion erhalten Sie eine gute Trennung, bei der nächsten Injektion erhalten Sie breite bzw. überlappende Peaks.

Ursache

- In den meisten Fällen handelt es sich bei diesem Problem um eine Überladung der Säule. Die Beladbarkeit einer Trennsäule hängt maßgeblich von der Masse stationärer Phase in der Trennsäule ab. Die Masse stationärer Phase wiederum ist abhängig von der spezifischen Oberfläche des verwendeten Kieselgels und der Art der Oberflächenmodifizierung (Alkylkettenlänge, Belegungsdichte), die sich im Kohlenstoffgehalt der Phase widerspiegelt. Sie ist direkt proportional zum Volumen der Säule. Zusätzlich ist die Beladbarkeit einer Trennsäule von der Adsorptionsenthalpie der Analyten abhängig.

Maßnahme zur Behebung

- Um festzustellen, ob es sich um eine Überladung der Trennsäule handelt, verdünnen Sie die Probe um einen Faktor 2. Injizieren Sie nur die Hälfte der ursprünglichen Injektionsmenge. Sollten die Peaks schmaler werden, handelt es sich eindeutig um Überladung. Als Faustregel für die Beladbarkeit einer Trennsäule gelten folgende Richtlinien:

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

The efficiency of the column varies

Problems

- The efficiency of the column is not constant. For one injection you achieve good efficiency for the next injection you get broad and unresolved peaks.

Causes

- This effect is mainly related to an overloading of the column. The loadability of an HPLC column depends on the mass of stationary phase inside the column and the physicochemical properties of the packing material (specific surface area and carbon content). The volume loadability depends on the volume of the column (column dimensions). In addition to that, the loadability depends also on the adsorption enthalpy of the analytes.

Solutions

- To determine if the varying efficiency is caused by the loadability of the column, dilute the sample by a factor 2 and inject only half of the normal amount of the injection. Observing now higher efficiency by using the diluted sample, the reason for the low efficiency was overloading. The rule of thumb for the loadability limit of a standard HPLC column is 100 µg/g of stationary phase for mass loadability and 50 µl/g of stationary phase for volume loadability.

Massenbeladbarkeitsgrenze: 100 µg/g stationärer Phase. Volumenbeladbarkeitsgrenze: 50 µl/g stationärer Phase.

Peak Fronting

Problem

- Die Peaks im Chromatogramm zeigen ein ausgeprägtes Fronting. Die Retention der Komponenten verschiebt sich zu kürzeren Retentionszeiten.

Ursachen

- Bei diesem Erscheinungsbild handelt es sich meist um einen Effekt der Lösemittelstärke, d.h. das Lösemittel, in dem die Probe gelöst wurde, ist stärker als die mobile Phase, in der die Chromatographie stattfindet. Beispiel: Sie chromatographieren in einem Eluenten Acetonitril/Wasser 20:80, die Probe ist aber in 100% Acetonitril gelöst. Bei einem Effekt der Lösemittelstärke wird das Fronting mit zunehmender Retention deutlich abnehmen.
  Eine weitere Ursache für Peaks mit Fronting könnte auch ein Totvolumen am Einlass der Säule sein. Dieses Totvolumen geht jedoch meist mit einem massiven Verlust an Trenneffizienz einher. Sollte dies die Ursache sein, so ist das Fronting bei allen Peaks des Chromatogramms gleich stark ausgeprägt.

Maßnahmen zur Behebung

- Lösen Sie die Probe nach Möglichkeit im Eluenten bzw. in einem Lösemittel, das

Peak Fronting

Problems

- The peaks in the chromatogram are fronting. Retention times are shifting to lower retention.

Causes

- In most of the cases, the origin of this phenomenon is a solvent strength effect. The solvent you are using to dissolve the sample has a higher solvent strength in comparison to the mobile phase you are using for the chromatography. (Example: Your chromatography runs in an eluent acetonitrile/water 20:80 but the sample is dissolved in 100% acetonitrile). If the origin of the fronting is a solvent strength effect, you should observe a decrease in fronting for peaks that are eluted later.

  Fronting peaks can also be caused by channelling of the column at the column inlet. In this case, the fronting for all peaks will be more or less the same.

Solutions

- Always use the eluent or a weaker solvent to dissolve the sample. If the fronting comes from channelling, you have to use a new column. If the fronting caused

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

eine vergleichbare oder schwächere Lösemittelstärke als der Eluent besitzt. Handelt es sich um ein Totvolumen, um ein Nachsacken bzw. Ausspülen der Packung, können Sie versuchen, die Säule wie unter “Verlust an Auflösung bzw. schlechte Trenneffizienz” beschrieben, zu reparieren. Dies kann Ihnen für einige wenige Injektionen helfen. Bedenken Sie jedoch, dass Sie in Kürze eine neue Säule benötigen.

Spikes im Chromatogramm

Problem

· Spikes im Chromatogramm stören die Auswertung. Die Spikes treten immer wieder und unregelmäßig auf.

Ursachen

· Spikes sind meist elektronischer bzw. elektrischer Natur. Sie entstehen meist durch Schaltspitzen bzw. Schalteinbrüche, verursacht durch Kühlschränke oder drastische Spannungsschwankungen im Stromnetz.
Schlecht entgaste Eluenten, d.h. Gasblasen im Eluenten, können Spikes verursachen.
Gasblasen, die durch eine ausgetrocknete Säule entstehen, können zu Spikes führen. Diese Spikes sind extrem hartnäckig. Bei einer gänzlich ausgetrockneten Säule wird sich ein solches Spikephänomen über Stunden hinziehen.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

by a void you can try to repair the column as described under “Decrease of Resolution or low efficiency”. This will help you for a few further injections but be aware that you have a need for a new column in a short time.

Spikes in the chromatogram

Problems

· Spikes in the chromatogram are disturbing the data processing. They appear aperiodic.

Causes

· There are several possible causes for spikes in the chromatogram. They may result from the electronic or from the column. If they come from the electronic, they mostly will occur if an electronic instrument in laboratory is switched on (e.g. refrigerator or oven). If they come from the column they are mostly bubbles out of the eluent because the eluent is not properly degased.
In addition, columns that have dried-out can also cause spikes. If a HPLC column is really dry, the spikes in the chromatogram can last for hours.

1.4 Fehlersuche für HPLC-Säulen

Maßnahmen zur Behebung

- Zur Verhinderung elektrischer Spikes wird die Verwendung eines Netzgleichrichters empfohlen. Ein Netzgleichrichter glättet kurzfristige Spannungsschwankungen. Installieren Sie den Netzgleichrichter zwischen Netzanschluss des Stromnetzes und Netzanschluss der HPLC-Apparatur.
  Um Luftblasen, verursacht durch den Eluenten, zu vermeiden, wird empfohlen Lösemittel und Lösemittelgemische vor dem Einsatz ausreichend zu entgasen. Optimal ist der Einbau eines Inline-Degasers oder das permanente Durchströmen des Eluenten mit Helium.
  Vehindern Sie das Austrocknen der Trennsäulen, indem die Säulen bei Nicht-Gebrauch stets gut mit den mitgelieferten Verschlussstopfen verschlossen werden, Austrocknen schadet einer gut gepackten Säule nicht, aber die durch Austrocknen entstehenden Spikes bei Wieder-Inbetriebnahme verhindern ein kurzfristiges Arbeiten mit der Säule.
  Ausgetrocknete Säulen werden am besten zuerst mit Isopropanol gespült. Isopropanol benetzt die Oberfläche der Packung gut und nimmt gleichzeitig die Gasblasen auf.

1.4 Troubleshooting for HPLC-Columns

Solutions

- To avoid electrically caused spikes use a mains or power rectifyer to connect your HPLC equipment to mains.

  To avoid air bubbles from the eluent, degas the mobile phase properly before using in HPLC. The most efficient way for degasing is the use of an inline degaser or the continuous purging of the eluent with Helium.
  Columns have to be closed properly for storage after use. Therefore use the supplied column end stoppers to avoid a column dry-out. Most of the columns do not loose performance by drying out. It takes a long time to get such a column back to work since air bubbles will occur as spikes in the chromatogram mostly for several hours. If you have a dry column please flush it with isopropanol. Isopropanol has a low surface tension and is therefore the best solvent to remove the air from the column.

Notizen

Notes

1.5.1 ProntoSIL Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre ProntoSIL-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size			
		60 Å	120 Å	200 Å	300 Å
Si (Silica)	3 µm	x	x	x	x
	5 µm	x	x	x	x
	10 µm	x	x	x	x
C30	3 µm		x	x	x
	5 µm			x	x
	10 µm			x	
C30 EC	3 µm				x
	5 µm				x
C 18 ace-EPS	3 µm		x	x	x
	5 µm		x	x	x
	10 µm		x	x	x
C18 AQ	3 µm		x	x	
	5 µm		x	x	
	10 µm		x		
C18 AQ Plus	5 µm		x		
C18 H	3 µm	x	x	x	x
	5 µm	x	x	x	x
	10 µm		x		x
C18 SH	3 µm		x		
	5 µm		x		
	10 µm		x		x

1.5.1 ProntoSIL Modification Table

You can order your ProntoSIL column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size			
		60 Å	120 Å	200 Å	300 Å
C18 EuroBOND	5 µm		x		
	10 µm		x		
C8 ace EPS	3 µm		x		
	5 µm		x		
	10 µm		x		
C8 SH	3 µm		x	x	x
	5 µm	x	x	x	x
	10 µm		x		
C4	3 µm		x		x
	5 µm	x	x	x	x
	10 µm		x		
C1	3 µm		x		
	5 µm		x		
Phenyl	3 µm		x		
	5 µm	x	x		
	10 µm		x		
Amino	3 µm		x		
	5 µm		x		
	10 µm		x		
Amino E	5 µm		x		

1.5.1 ProntoSIL Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre ProntoSIL-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size				
		60 Å	100 Å	120 Å	200 Å	300 Å
Amino H	5 µm			x		
CN	3 µm			x		
	5 µm			x		
	10 µm			x		
OH	3 µm			x		
	5 µm			x		
	10 µm			x		

Modification	Particle Size	Pore Size				
		60 Å	100 Å	120 Å	200 Å	300 Å
Enviro-PTL	5 µm	x				
Enviro-PHE	3 µm			x		
Enviro-PES	5 µm		x			
Enviro-PAH	6 µm		x			

1.5.2 ProntoPEARL Modification Table

You can order your ProntoPEARL column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size
		60 Å
ProntoPEARL $_{sub2}$ TPP C18 ace-EPS	1.8 µm	x
ProntoPEARL $_{sub2}$ TPP C8 ace-EPS	1.8 µm	x
ProntoPEARL $_{sub2}$ TPP APS	1.8 µm	x
ProntoPEARL $_{sub2}$ NPP C18	1.5 µm	-

1.5.3 Eurospher / Eurosil / Eurocel Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Eurospher-/Eurosil-/Eurocel-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size	
		100 Å	300 Å
Si (Silica)	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
	15 µm	x	
C18	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
	15 µm	x	
C8	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
	15 µm	x	
C4	7 µm	x	
C1	7 µm	x	

»

Modifikationstabelle Eurospher, Eurosil, Eurocel Phasen

1.5.3 Eurospher /Eurosil /Eurocel Modification Table

You can order your Eurospher/Eurosil/Eurocel column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size		
		100 Å	300 Å	1000 Å
NH_2	5 µm	x		
	7 µm	x		
Diol	5 µm	x		
	7 µm	x		
CN	5 µm	x		
	7 µm	x		
Eurosil Bioselect C18	5 µm		x	
Eurosil Bioselect C4	5 µm		x	
Eurocel 01	5 µm			x
	10 µm			x
	20 µm			x

Modification Table Eurospher, Eurosil, Eurocel Phases

1.5.4 Kromasil Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Kromasil-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size				
		60 Å	80 Å	100 Å	110 Å	300 Å
Si (Silica)	3.5 µm			x		
	5 µm	x		x		x
	7 µm	x		x		
	10 µm	x		x		x
	13 µm	x		x		
	16 µm	x		x		x
C18	3.5 µm			x		
	5 µm			x		x
	7 µm			x		
	10 µm			x		x
	13 µm			x		
	16 µm			x		x
C8	3.5 µm			x		
	5 µm			x		x
	7 µm			x		
	10 µm			x		x
	13 µm			x		
	16 µm			x		x
C4	3.5 µm			x		
	5 µm			x		x
	7 µm			x		
	10 µm			x		x
	13 µm			x		
	16 µm			x		x

»

1.5.4 Kromasil Modification Table

You can order your Kromasil column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size				
		60 Å	80 Å	100 Å	110 Å	300 Å
C1	5 µm			x		
	7 µm			x		
	10 µm			x		
	13 µm			x		
	16 µm			x		
C_6H_5	5 µm			x		
	10 µm			x		
	16 µm			x		
CN	5 µm	x				
	10 µm	x				
	16 µm	x				
NH_2	3.5 µm			x		
	5 µm			x		
	10 µm			x		
	13 µm			x		
	16 µm			x		
Diol	5 µm	x				
	10 µm	x				
	16 µm	x				
Chiral CHI-DMB	5 µm			x		
	10 µm			x		
	16 µm			x		
Chiral CHI-TBB	5 µm			x		
	10 µm			x		
	16 µm			x		

1.5.5 Lichrospher 5, 7, 10 µm / Superspher 4 µm Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Lichrospher-/Superspher-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size	
		60 Å	100 Å
Si (Silica)	4 µm	x	x
	5 µm	x	x
	7 µm	x	x
	10 µm	x	x
C18	4 µm		x
	5 µm		x
	10 µm		x
C18 e	4 µm		x
	5 µm		x
	10 µm		x
C8	4 µm	x	
	5 µm		x
	10 µm		x
C8 e	4 µm	x	
	5 µm		x
	10 µm		x
RP select B	4 µm	x	
	5 µm	x	
	10 µm	x	

»

1.5.5 Lichrospher Modification Table

You can order your Lichrospher/Superspher column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size	
		60 Å	100 Å
CN	5 µm		x
	10 µm		x
NH_2	5 µm		x
	10 µm		x
Diol	5 µm		x
	10 µm		x

1.5.6 Nucleosil Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Nucleosil-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size						
		50 Å	100 Å	120 Å	300 Å	500 Å	1000 Å	4000 Å
Si (Silica)	3 µm	x	x	x				
	5 µm	x	x	x	x	x	x	x
	7 µm	x	x	x	x	x	x	x
	10 µm	x	x	x	x	x	x	x
C2	7 µm		x					
C4	5 µm			x	x			
	7 µm				x	x	x	x
	10 µm				x			
C8	3 µm		x	x				
	5 µm		x	x	x			
	7 µm		x	x	x	x		
	10 µm		x	x	x			
C8 ec	5 µm	x	x					
C_6H_5	5 µm		x					
	7 µm		x	x	x	x	x	
C_6H_5 ec	5 µm		x					
C18	3 µm		x	x				
	5 µm	x	x	x	x			
	7 µm		x	x	x	x	x	x
	10 µm		x	x	x			
C18 AB	5 µm		x					

500 Å, 1000 Å, 4000 Å auf Anfrage.

1.5.6 Nucleosil Modification Table

You can order your Nucleosil column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size						
		50 Å	100 Å	120 Å	300 Å	500 Å	1000 Å	4000 Å
NH_2	5 µm		x					
	7 µm			x	x			
	10 µm		x					
$N(CH_3)_2$	5 µm		x					
	10 µm		x					
SB	5 µm		x					
	10 µm		x					
SA	5 µm		x					
	10 µm		x					
CN	5 µm		x					
	7 µm			x	x	x		
	10 µm		x					
OH	7 µm		x		x	x	x	x
NO_2	5 µm		x					
	10 µm		x					

500 Å, 1000 Å, 4000 Å upon request.

1.5.7 Lichrosorb Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Lichrosorb-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size	
		60 Å	100 Å
Si (Silica)	5 µm	x	x
	7 µm	x	x
	10 µm	x	x
C18	5 µm		x
	7 µm		x
	10 µm		x
C8	5 µm		x
	7 µm		x
	10 µm		x
RP select B	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
C1	7 µm		x
	10 µm		x

1.5.7 Lichrosorb Modification Table

You can order your Lichrosorb column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size	
		60 Å	100 Å
CN	5 µm		x
	7 µm		x
	10 µm		x
NH_2	5 µm		x
	7 µm		x
	10 µm		x
Diol	5 µm		x
	7 µm		x
	10 µm		x

1.5.8 Hipak Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Hipak-Säule bestellen. /
You can order your Hipak column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size
		130 Å
ODS AB (C18)	3 µm	x
	5 µm	x
C8 AB	3 µm	x
	5 µm	x

1.5.9 Partisil Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Partisil-Säule bestellen. /
You can order your Partisil column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size
		85 Å
Si	5 µm	x
	10 µm	x
ODS 3 (C18)	5 µm	x
	10 µm	x
ODS 2 (C18)	10 µm	x
ODS (C18)	10 µm	x
CCS/C8	5 µm	x
	10 µm	x
PAC (Amino-Cyano)	5 µm	x
	10 µm	x
SCX	10 µm	x
SAX	10 µm	x

1.5.10 PolyEncap Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre PolyEncap-Säule bestellen. /
You can order your PolyEncap column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size	
		120 Å	300 Å
B (C18)	3 µm	x	x
	5 µm	x	x
	7 µm	x	x
	10 µm	x	x
A (C4)	3 µm	x	x
	5 µm	x	x
	7 µm	x	x
	10 µm	x	x
WCX	5 µm	x	

1.5.11 Techsphere Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Techsphere-Säule bestellen. /
You can order your Techsphere column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size
		100 Å
C18	3 µm	x
	5 µm	x
C8	3 µm	x
	5 µm	x
NH_2	3 µm	x
	5 µm	x

1.5.12 Zorbax Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Zorbax-Säule bestellen. /
You can order your Zorbax column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size	
		70 Å	300 Å
Si	5 µm	x	
ODS (C18)	5 µm	x	
C8	5 µm	x	
TMS (C1)	5 µm	x	
Phenyl	5 µm	x	
CN	5 µm	x	
NH_2	5 µm	x	
SCX	5 µm		x
SAX	5 µm	x	

1.5.13 Eurokat Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen können Sie Ihre Eurokat-Säule bestellen. /
You can order your Eurokat column in the following modifications.

Modification	Particle Size
H	10 µm
	20 µm
Ca	10 µm
	20 µm
Pb	10 µm
	20 µm

1.5.14 CarbEx II Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen können Sie Ihre Eurokat-Säule bestellen. /
You can order your Eurokat column in the following modifications.

Modification	Particle Size
Ca^{++}	9 µm
H^{+}	9 µm

1.5.15 Sphere-Image Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Sphere-Image-Säule bestellen. /
You can order your Sphere-Image column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size
		80 Å
ODS 1 and 2 (C18)	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x
C8	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x
CN	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x
NH_2	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x
SAX	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x
SCX	3 µm	x
	5 µm	x
	10 µm	x

1.5.16 Micra *NPS* Modifikationstabelle / Modification Table

In den folgenden Modifikationen können Sie Ihre Micra *NPS*-Säule bestellen. /
You can order your Micra *NPS* column in the following modifications.

Modification	Particle Size
Si	1.5 µm
ODS 1	1.5 µm
	3.0 µm
ODS 2	1.5 µm
ODS 3e	1.5 µm
TAS (C30)	1.5 µm

1.5.17 Hamilton Modifikationstabelle

In den folgenden Modifikationen (x) können Sie Ihre Hamilton-Säule bestellen.

Modification	Particle Size	Pore Size	
		100 Å	300 Å
PRP-1	3 µm	x	
	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
	12-20 µm	x	
PRP-X100	3 µm	x	
	5 µm	x	
	7 µm	x	
	10 µm	x	
	12-20 µm	x	
PRP-X110	3 µm	x	
	7 µm	x	
PRP-X110S	3 µm	x	
	7 µm	x	
RCX-10	7 µm	x	
RCX-30	7 µm	x	

1.5.17 Hamilton Modification Table

You can order your Hamilton column in the following modifications (x).

Modification	Particle Size	Pore Size	
		100 Å	300 Å
PRP-X200	10 µm	x	
HC-40	10-15 µm	gel type	
HC-75	9 µm	gel type	
PRP-X300	3 µm	x	
	7 µm	x	