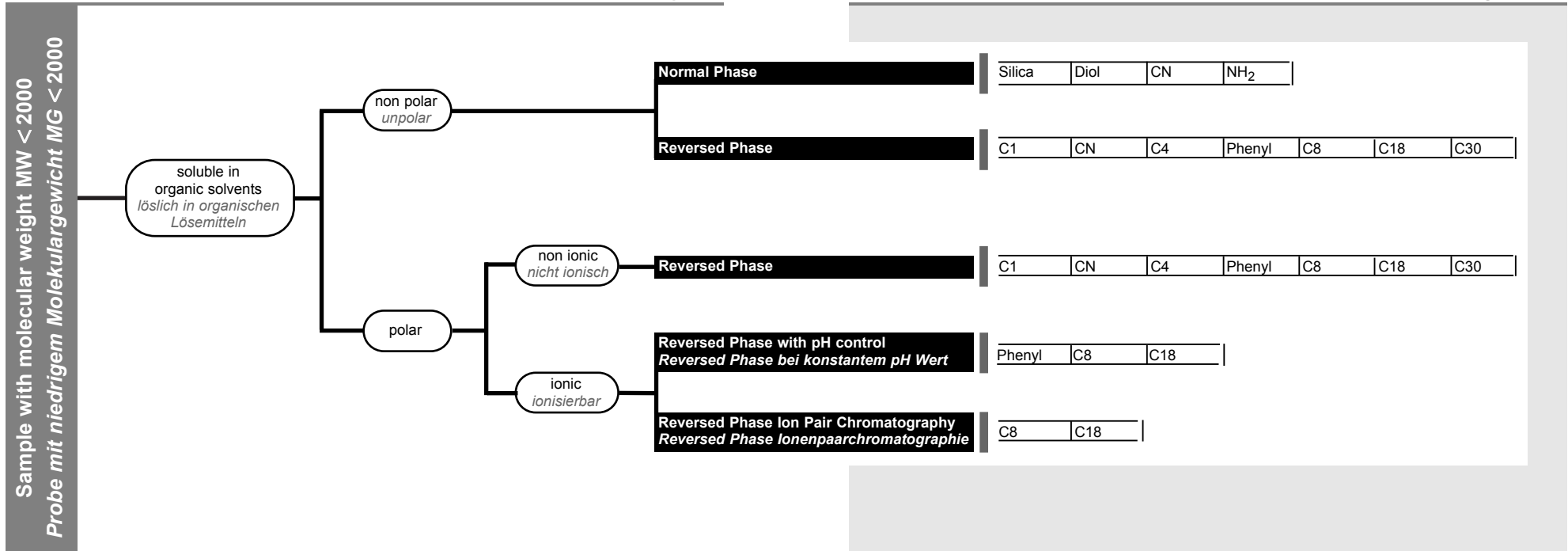


1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

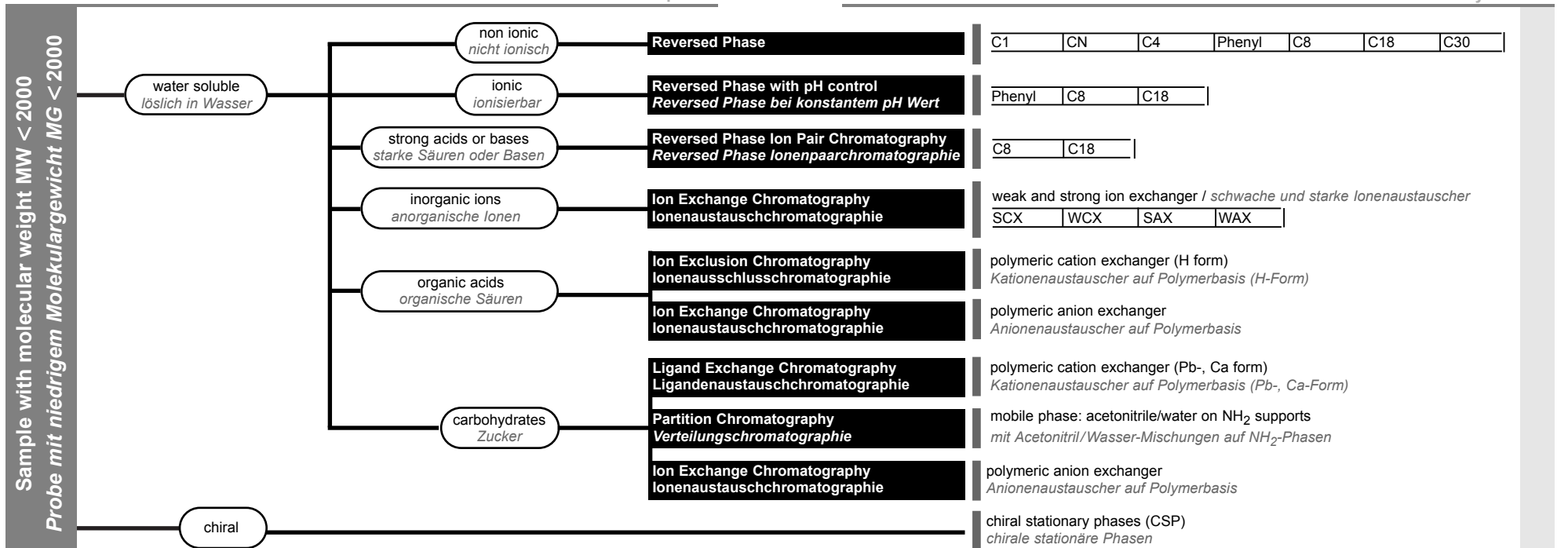
1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der
Laborpraxis



1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in
Laboratory Practice

Säulen- und Phasenauswahl

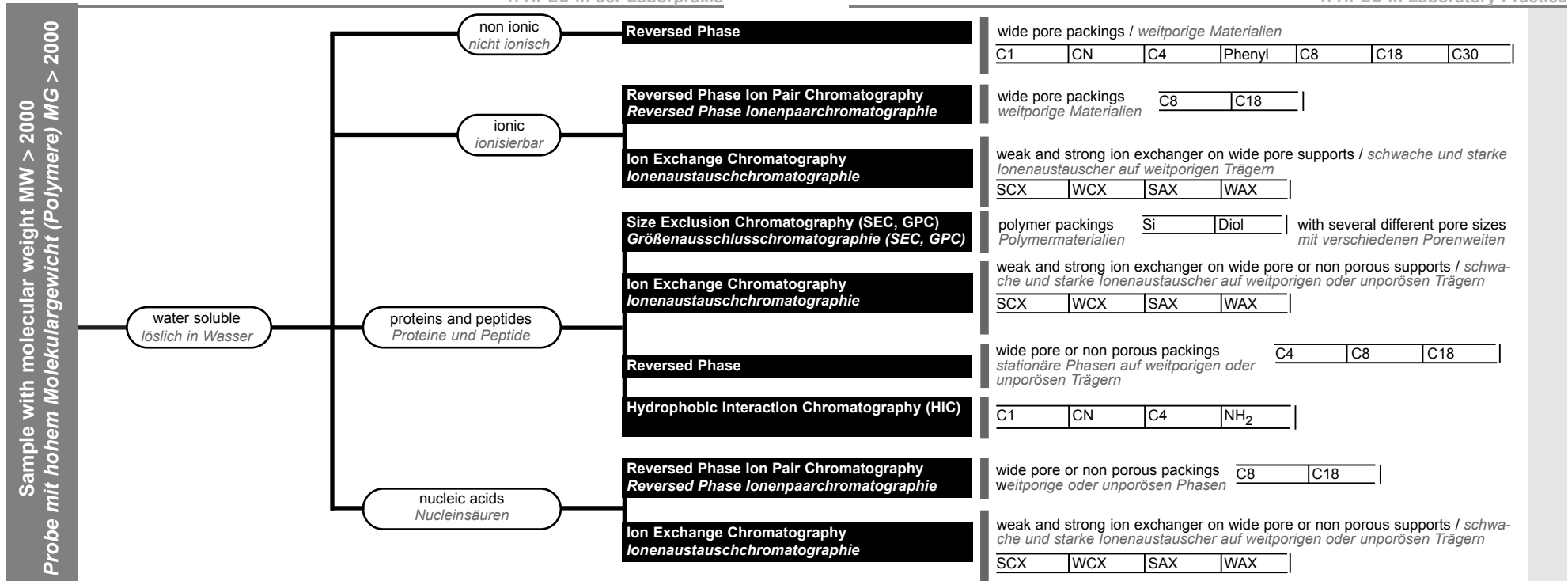
Column and Phase Selection

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

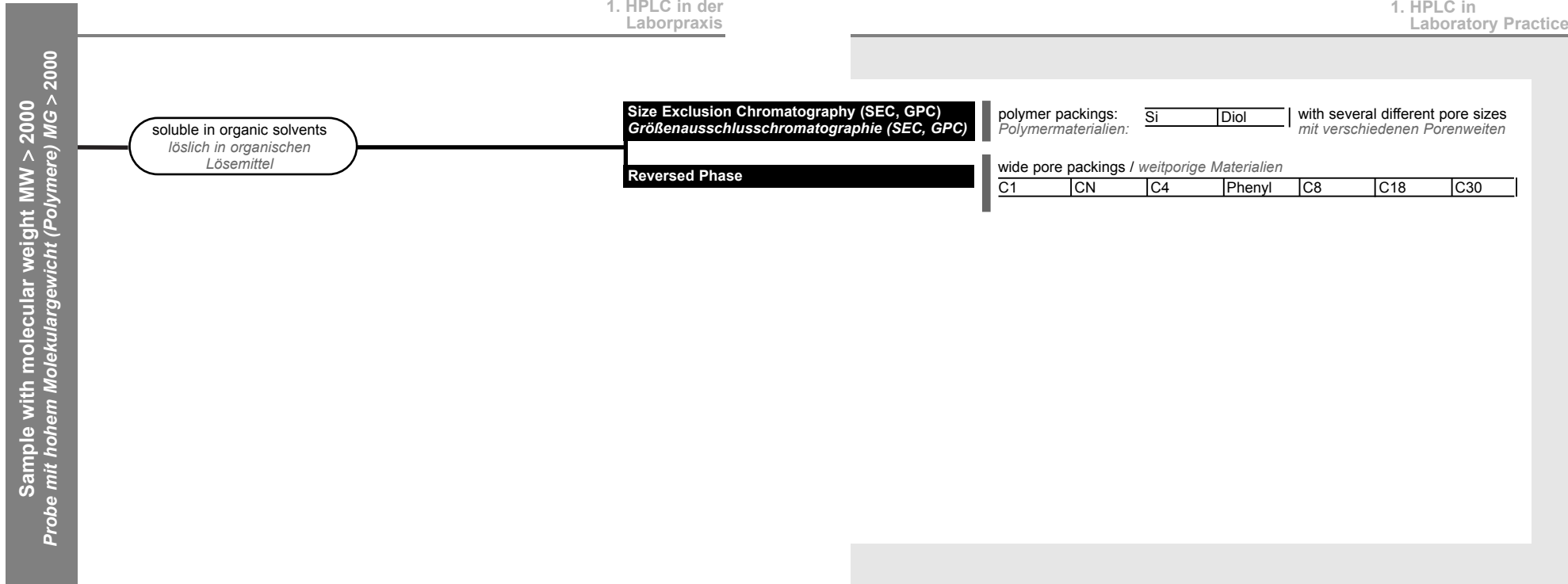
1. HPLC in der Laborpraxis

1. HPLC in Laboratory Practice



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der
Laborpraxis



1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in
Laboratory Practice

Säulen- und Phasenauswahl

Column and Phase Selection

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.1 HPLC-Phasen und ihre Anwendung

1. HPLC in der
Laborpraxis

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.

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.1 HPLC Phases and Application areas

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.1 HPLC-Phasen und ihre Anwendung

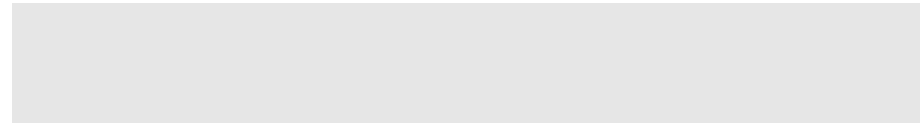
1. HPLC in der
Laborpraxis

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.1 HPLC Phases and Application areas

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.



HPLC-Phasen

HPLC Phases

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

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

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.

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.

L1

L2

L3

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

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.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

L7

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurosphere 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“- Phasenspezifikation

USP „L“ Phase Listing

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L12

A strong anion-exchange packing made by chemically bonding a quaternary 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.

USP „L“- Phasenspezifikation

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

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

BRAND NAME	MANUFACTURER
ProntoSIL Spheribond C6	Bischoff Chromatography

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

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.

USP „L“ Phase Listing

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

1.2.2 Entsprechend USP „L“- Phasenspezifikation

L18

Amino and cyano groups chemically bonded to porous silica particles, 3 to 10 µm 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. HPLC in Laboratory Practice

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 quaternary ammonium groups, about 10 µm in size.

* USP listing in preparation.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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.

USP „L“- Phasenspezifikation

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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 particles 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.

USP „L“ Phase Listing

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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 aminopropyl 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. HPLC in Laboratory Practice

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing

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

L38

A hydrophilic polyhydroxymethacrylate gel of totally porous spherical resin.

L39

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

L40

BRAND NAME	MANUFACTURER
Eurocel 01 *	KNAUER

Immobilized α₁-acid glycoprotein on spherical silica particles, 5 µm in diameter.

L41

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

L42

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

L43

* USP listing in preparation.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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

Polystyrene/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 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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 m² per g. Substrate is coated with quaternary ammonium functionalized latex particles consisting of styrene cross-linked with divinylbenzene.

Amylose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate-coated, porous, spherical, silica particles, 5 to 10 µm in diameter.

A strong cation exchange resin made of porous silica with sulfopropyl groups, 5 to 10 µm in diameter.

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.

A size exclusion medium made of covalent bonding of dextran to highly cross-linked porous agarose beads, about 13 µm in diameter.

A strong cation exchange resin made of porous silica coated with polybutadiene-maleic acid copolymer, about 5 µm in diameter.

USP „L“- Phasenspezifikation

USP „L“ Phase Listing

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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

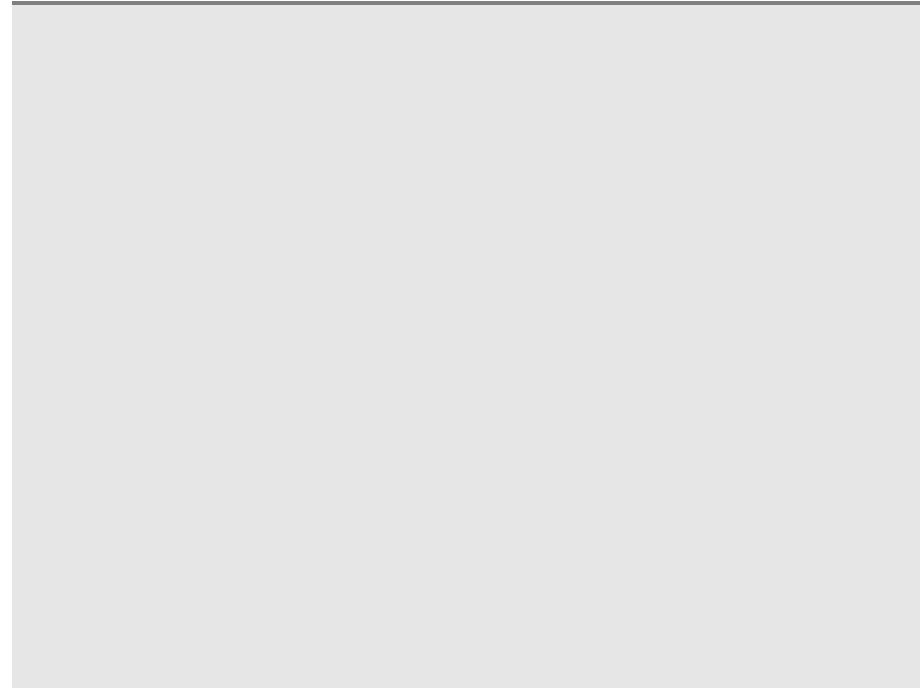
ProntoSIL C30

Bischoff Chromatography

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

1.2.2 Corresponding to USP „L“ Phase Listing



1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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.

Auswahlkriterien von Säulen

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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.

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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)

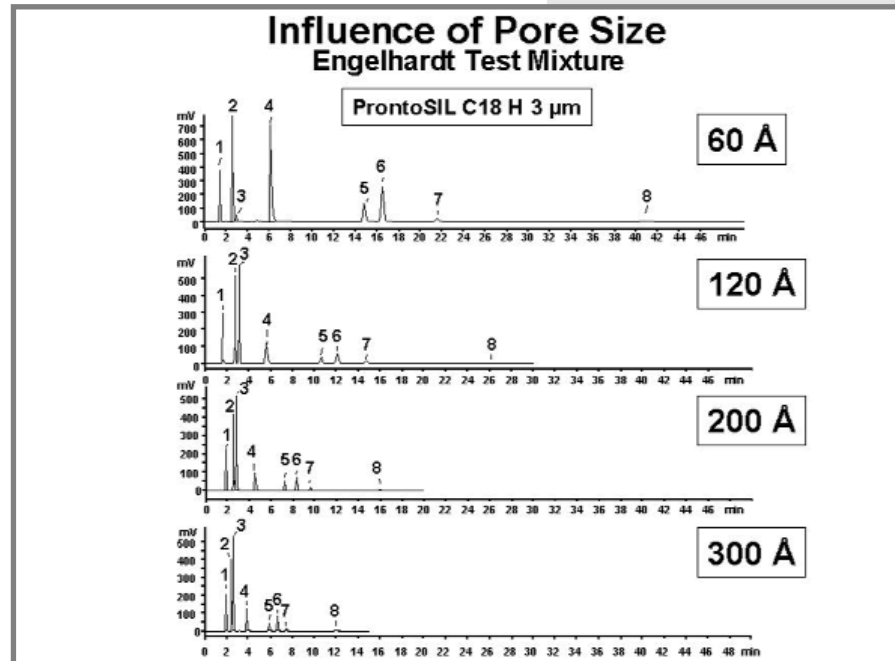


Fig.1 shows the influence of the porosity with the same bonding (C18H)

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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.

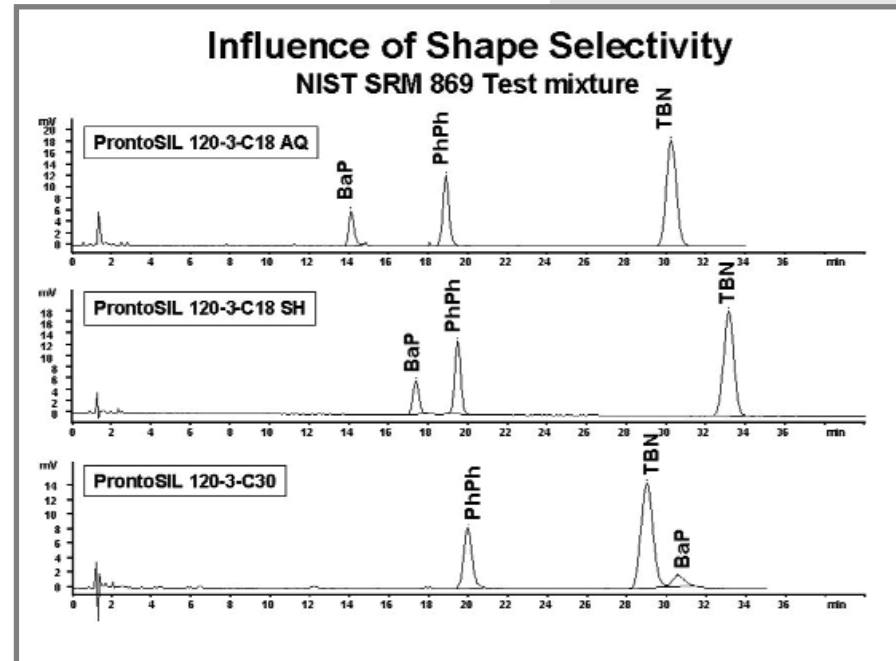


Fig. 2

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column

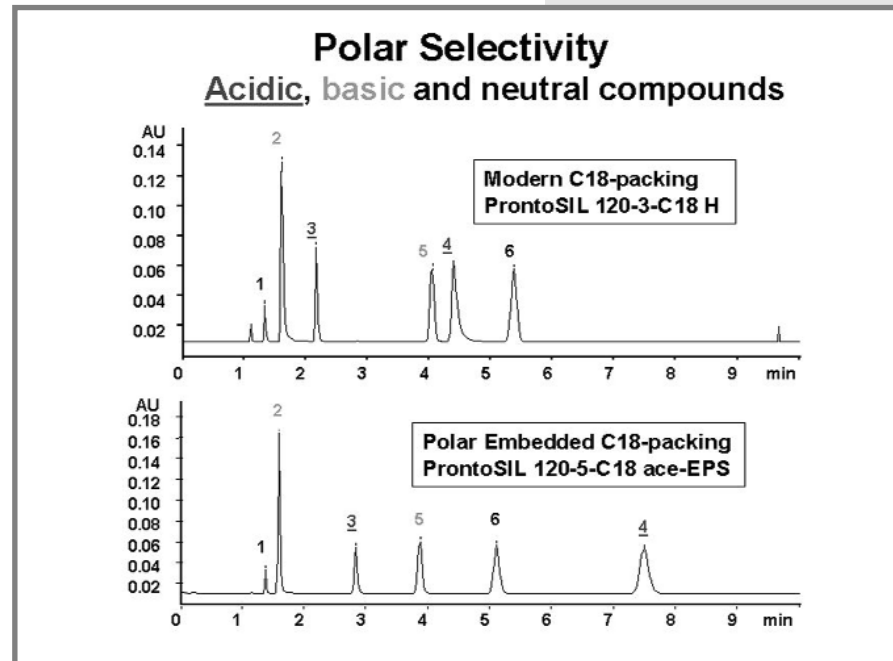


Abb. 3

Fig. 3

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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.

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

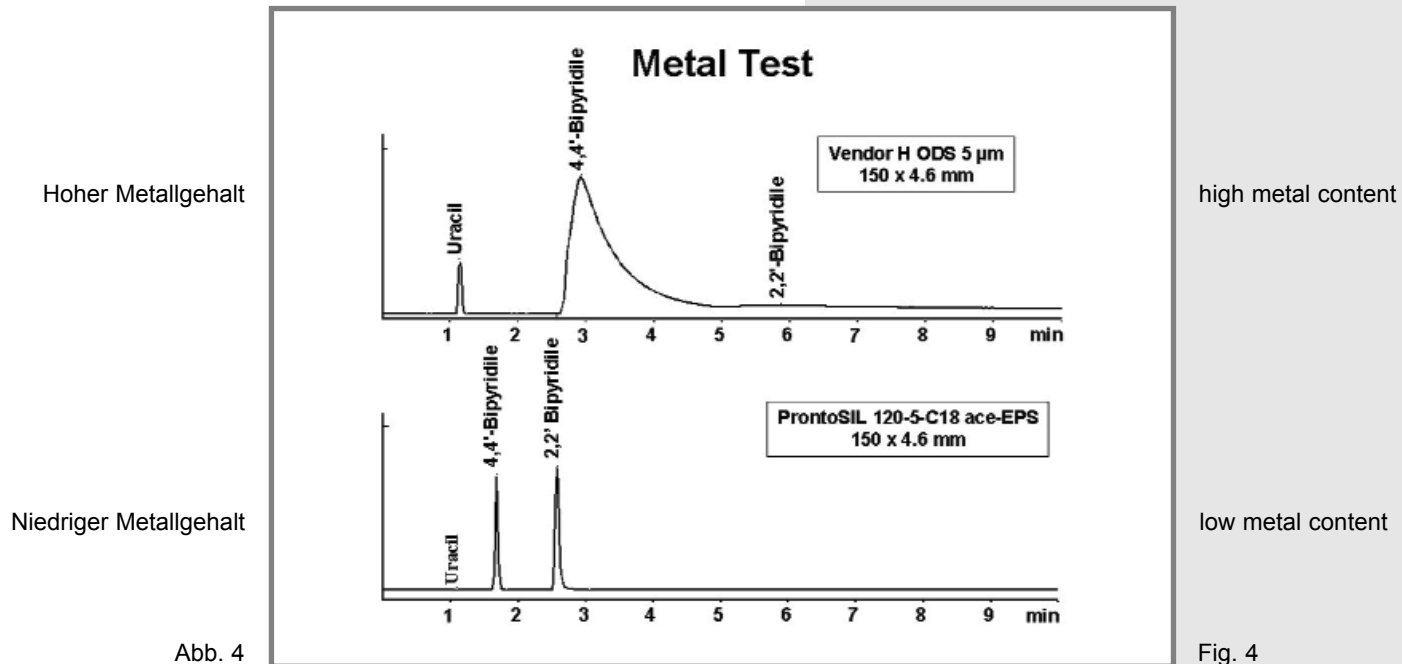
1. HPLC in der Laborpraxis

1.2.3 Auswahlkriterien für die richtige HPLC-Säule

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

1.2.3 Common Criteria to Select the Right Column



Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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 it is 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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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 widerspiegeln kann.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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. HPLC in Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der Laborpraxis

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in Laboratory Practice

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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. HPLC in
Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der
Laborpraxis

1.2.4 Säulendimension

Tabelle 1: Lösemittelverbrauch und Volumina bei verschiedenen Innendurchmessern

Innendurchmesser/ Inner diameter [mm]	Flussrate/ Flow rate [μ l/min]	Eluentenverbrauch/ Eluent consumption [ml/h]	Säulenvolumen/ Column volume [μ l]*
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 $\epsilon_T = 0.6$

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in
Laboratory Practice

1.2.4 Column Dimensions

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

Innendurchmesser/ Inner diameter [mm]	Flussrate/ Flow rate [μ l/min]	Eluentenverbrauch/ Eluent consumption [ml/h]	Säulenvolumen/ Column volume [μ l]*
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

* column length: 250 mm, $\epsilon_T = 0.6$

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

Narrowbore HPLC-Säulen haben den Vorteil, dass man mit ihnen noch auf konventionellen HPLC-Apparaturen problemlos arbeiten kann, jedoch sich bereits eine deutliche Lösemittlersparnis 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 Massensensitivität, d.h. kleine Probenmengen oder auch sehr kostbare Spezies können optimal analysiert werden. Eine hohe Massensensitivität 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

1. HPLC in
Laboratory Practice

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1. HPLC in der
Laborpraxis

1.2.4 Säulendimension

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/H₂O 80:20 (v/v)

Schnelle HPLC

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1. HPLC in
Laboratory Practice

1.2.4 Column Dimensions

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/H₂O 80:20 (v/v)

High-Speed HPLC

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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 heißt 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

1. HPLC in
Laboratory Practice

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 achieved 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 losing separation efficiency.

Apart from the separation column, the chromatographic process is also influenced by

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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.

Schnelle HPLC

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.

High-Speed HPLC

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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. HPLC in
Laboratory Practice

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 distinguish 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 Selection of a Stationary Phase / Column

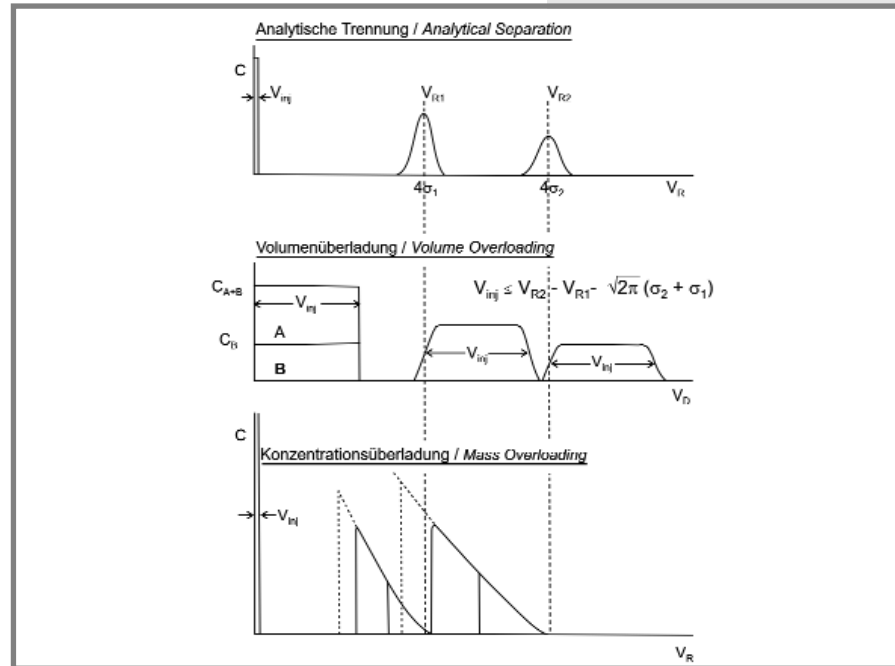
1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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



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

Abb.1: Vergleich Volumenüberladung zu Massenüberladung

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

1. HPLC in der
Laborpraxis

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

1. HPLC in
Laboratory Practice

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

1. HPLC in der
Laborpraxis

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 schmaler sind die Elutionsbanden.

Abb. 2: Einfluss der Massenüberladung auf die Trenneffizienz

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.

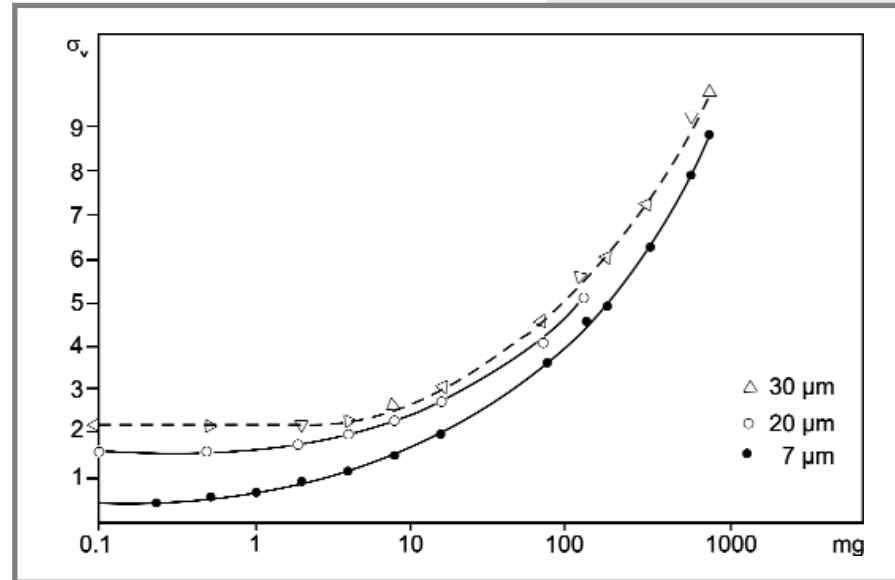


Fig. 2: Influence of mass overloading on efficiency

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

Der Einfluß der Partikelgröße in der präparativen HPLC

In der präparativen 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 Fließgeschwindigkeit u , der Viskosität des Eluenten η , der Säulenlänge L und dem spezifischen Säulenwiderstand ϕ (phi). Der Gegendruck ist umgekehrt proportional zum Quadrat des Teilchendurchmessers d_p . 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

1. HPLC in
Laboratory Practice

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 d_p . 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

1. HPLC in der
Laborpraxis

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.

1.2 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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:
$$\frac{F_{\text{analytisch}}}{F_{\text{prep}}} = \frac{m_{\text{analytisch}}}{m_{\text{prep}}} = \frac{d_{\text{analytisch}}^2}{d_{\text{prep}}^2}$$

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]	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
250 x 8.0	≈ 2	3.0	7.6
250 x 10.0	≈ 2	4.7	11.8
250 x 16.0	≈ 2	12.1	30.2
250 x 20.0	≈ 2	18.9	47.3
250 x 32.0	≈ 2	48.4	121.0
250 x 40.0	≈ 2	75.6	189.0
250 x 50.0	≈ 2	118.1	295.4
250 x 62.0	≈ 2	181.7	454.2

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

1. HPLC in
Laboratory Practice

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:
$$\frac{F_{\text{analytical}}}{F_{\text{prep}}} = \frac{m_{\text{analytical}}}{m_{\text{prep}}} = \frac{d_{\text{analytical}}^2}{d_{\text{prep}}^2}$$

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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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 Kapillarinne Durchmesser 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 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria

1.2 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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. HPLC in
Laboratory Practice

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/pre-column-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 Auswahl der richtigen stationären Phase / Säule

1.2.4 Säulendimension

1. HPLC in der
Laborpraxis

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 Selection of a Stationary Phase / Column

1.2.4 Column Dimensions

1. HPLC in
Laboratory Practice

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.

Auswahlkriterien von Säulen

Selection Criteria