

HPLC für Einsteiger

Autoren: Dr. Christine Mladek, Dr. Stavros Kromidas

<http://www.kromidas.de>

Zum Dokument

Dieses Dokument ist für Anwender konzipiert, die das erste Mal mit einer HPLC-Anlage „konfrontiert“ werden.

Auf den folgenden Seiten finden Sie einen bewusst einfach gehaltenen Leitfaden für Ihre ersten Schritte mit der HPLC. Er kann nicht das Erlernen der Methodik aus den Lehrbüchern ersetzen, vor allem kann er nicht die Handhabung der Geräte einzelner Hersteller erläutern. Er soll Ihnen einfach einen ersten Überblick über die Arbeit mit einer HPLC-Anlage geben und den Einstieg erleichtern.

Inhaltsangabe		
Abschnitt	Thema	Seite
01	Was ist überhaupt HPLC	4
02	Aus welchen Teilen besteht eine HPLC-Anlage?	3
03	Wie funktionieren die einzelnen Teile einer HPLC-Anlage?	3
04	Aufbau einer Gesamtanlage	6
05	Notwendige Arbeiten vor den Messungen	8
06	Die erste Messung	10
07	Verlassen einer HPLC-Anlage	11
08	Checkliste für die RP-HPLC	12
09	Checkliste: Das muss ich immer machen	13
10	Checkliste: Das darf ich nie tun	14
11	Fließschema: Wie wird eine HPLC-Anlage in Betrieb genommen?	14
12	Bezeichnung von HPLC Materialien	15
13	Abkürzungen aus dem Bereich der Chromatographie (Auswahl)	17

14	Von IUPAC empfohlene Symbole für die Chromatographie (Auswahl)	19
15	Lösungsmittelgemische gleicher Elutionsstärke für die RP-Chromatographie (nach L. Synder)	20
16	Lehrbücher über die HPLC	20
17	Wie komme ich an Adressen von HPLC-Firmen?	21

Was ist überhaupt HPLC?

HPLC

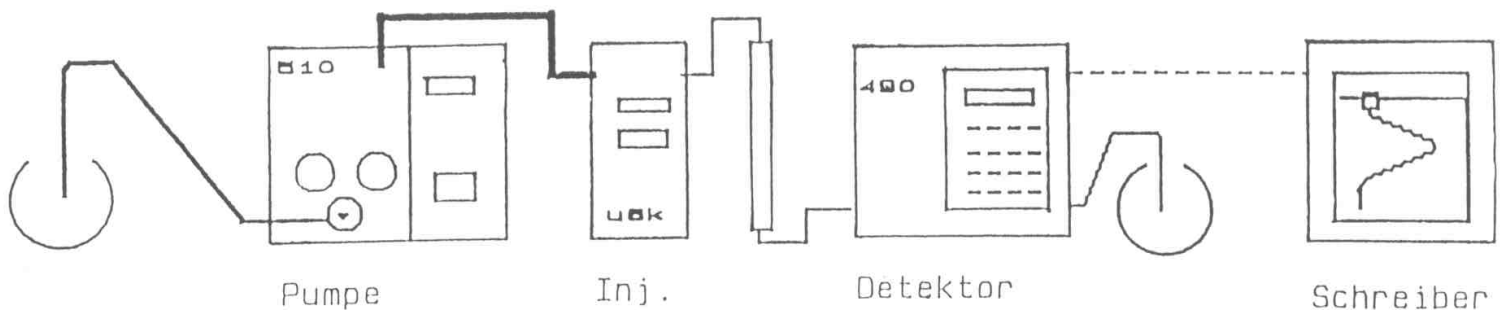
Trennungsprinzip mobile Phase, stationäre Phase

In den 1960er Jahren datieren die Anfänge der HPLC, **High Pressure Liquid Chromatography** (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie). Dank der verbesserten Säulenmaterialien und Geräten ist seit Ende der 1970er Jahre die Rede von High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie). Den Boom erlebte diese Trenntechnik Anfang-Mitte der 1980er Jahre. Seit Mitte der 2000er Jahre gibt es die interessante Variante der UHPLC („Ultra High Performance Liquid Chromatography“): Mit diesen Geräten sind Drücke bis 1.500 bar möglich. Die HPLC ist eine schnelle Trenntechnik. Dabei wird das zu trennende Gemisch mit Hilfe eines Lösungsmittels oder häufiger eines Lösungsmittelgemisches (**Eluent** oder **mobile Phase**) zur Säule gebracht. Das ist ein Rohr, meist aus rostfreiem Stahl, das mit der so genannten stationären Phase gefüllt ist. Die **stationäre Phase** (sie wandert im Gegensatz zur mobilen Phase nicht, deswegen „stationär“) besteht meist aus Kieselgel an dessen Oberfläche bestimmte Gruppen chemisch gebunden sind (**funktionelle Gruppen**, „Borsten“). Diese Gruppen fungieren als „Rastplätze“ für die zu trennenden Substanzen. Je nach Art der Substanz wird sie dort unterschiedlich lang festgehalten. Durch verschiedene Trennmechanismen, bedingt durch die auf dem Kieselgel gebundenen Gruppen, findet so die Trennung der Substanzen des zu untersuchenden Gemisches statt. Abhängig von der Probe kommt als Mechanismus z. B. Adsorption durch Van der Waals-Kräfte, Ionenaustausch, Verteilung usw. in Frage. Die Probensubstanzen werden (hoffentlich) unterschiedlich lang am Säulenmaterial festgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Die Trennung kann durch den Einsatz verschiedener **stationärer Phasen** (Säulenmaterialien siehe Abschnitt 12), **Lösungsmittelgemische** sowie **Temperatur** beeinflusst werden. Die einzelnen Probekomponenten werden anschließend vom Detektor registriert, er gibt diese Informationen an die Auswerteeinheit weiter, das Ergebnis ist ein Chromatogramm. Die Anzahl der Peaks entspricht der Anzahl der *aufgetrennten(!)* Probekomponenten, die Fläche ist deren Menge proportional.

Aus welchen Teilen besteht eine HPLC-Anlage?

Aufbau einer HPLC-Anlage

- Sie besteht aus (mindestens) 5 Modulen:
- Eine oder mehrere Pumpen zur Förderung des Eluenten durch die Anlage
 - Injektor (Hand- oder heute eher Autoinjektor) mit Hilfe dessen die Probe in die Anlage gelangt
 - Säule an der die Trennung stattfindet
 - Detektor zur Registrierung der Probenkomponenten
 - Rechner zum Steuern der Anlage und als Auswerteeinheit



Wie funktionieren die einzelnen Teile einer HPLC-Anlage?

Pumpe

Der Eluent (mobile Phase, Laufmittel) wird aus einem Vorratsgefäß angesaugt und gelangt durch ein Einlassventil in den Kolbenraum der Pumpe. Der Kolben komprimiert den Eluenten und drückt ihn durch das Auslassventil in den Teil der HPLC-Anlage, die den Injektor, die Säule und den Detektor enthält. Eine Pumpe enthält oft zwei Kolben (Doppelkolbenpumpe). Während der eine das Laufmittel ansaugt, drückt der zweite Kolben das zuvor angesaugte Laufmittel durch das Auslassventil in die HPLC-Anlage. Dieser Vorgang wird mittels modernster Mechanik und Elektronik exakt gesteuert, sodass ein konstanter Fluss möglichst ohne Druckschwankungen gewährleistet wird. Vor Verlassen der Pumpe wird das Laufmittel noch durch einen Druckaufnehmer geleitet. Dort wird der Druck gemessen. Der Druckbereich variiert je nach Säule und eingesetztem Laufmittel von ca. 50 bis ca. 350 bar (70 bar = 1000 PSI, bei der UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography – sind Drücke bis ca. 1.500 bar möglich). Dieser Druck sollte bei Betrieb im Auge behalten/aufgezeichnet werden, da durch ihn indirekt Verstopfungen, Flussschwankungen oder Leckagen erkannt werden können.

Injektor

Mittels des Injektors wird die Probe in die HPLC-Anlage eingebracht. Er befindet sich im Eluentenstrom direkt hinter der Pumpe. Die Probe muss dabei mit „Normaldruck“ in den Druckbereich der Anlage gebracht werden. Der am häufigsten eingesetzte Handinjektor ist das so genannte Rheodyneventil. Es ist im Prinzip ein Sechswegventil. An zwei Einlässen ist eine Schleife

angebracht. Sie kann zum einen eine fest definierte Menge (meist 10 oder 20 µl) fassen und wird mit der Probe überfüllt, oder man gibt mit einer exakten Spritze definierte Probenvolumina in die Schleife. Durch umlegen eines Hebels wird der Eluentenstrom durch die Aufgabeschleife geleitet und spült so die Probe auf die Säule. Manuelle Injektoren sind heutzutage sehr selten geworden. Bei einem Autoinjektor (Autosampler, Probengeber) ist dieser Vorgang automatisiert. Wie das genau geschieht, unterscheidet sich recht häufig von Hersteller zu Hersteller.

UV-Detektor

Der am häufigsten in der HPLC eingesetzte Detektor ist der UV-Detektor. Die Einsatzgebiete reichen von Applikationen in der Pharmaindustrie, über die klinische Chemie, Lebensmittelchemie, Umweltanalytik bis hin zur Biochemie.

Arbeitsweise:

UV Licht einer bestimmten Wellenlänge wird in eine Durchflussküvette eingestrahlt und dahinter auf einer Photodiode wieder aufgefangen und als elektrisches Signal ausgegeben. Der Lichtstrahl wird mithilfe eines Spiegels durch die Messküvette und eine Vergleichsküvette gelenkt. Eluent und Probe absorbieren das Licht unterschiedlich, das ergibt ein sich veränderndes elektrisches Signal. Diese Differenz wird als Peak angezeigt. Aus diesen Peaks setzt sich das entstehende Chromatogramm zusammen. Je nach UV-Absorptionsverhalten (verantwortlich ist die entsprechende chromophore Gruppe im Molekül) der Probe wird die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ausgewählt.

Den UV-Detektor gibt es in vielen Ausführungen:

Festwellen-detektor

- **Festwellendetektor:**
Als Lichtquelle wird meist eine Quecksilberlampe, seltener auch eine Zink- oder Kadmiumlampe eingesetzt. Die für die jeweilige Applikation benötigte Wellenlänge wird mittels geeigneter Filter eingestellt. Die gebräuchlichste Wellenlänge ist hierbei 254 nm, da die Quecksilberlampe hier ein sehr intensives Maximum hat, was eine sehr gute Nachweisgrenze bedingt. Dank seiner hohen Empfindlichkeit bei dieser Standardwellenlänge eignet sich diese Form des Detektors besonders für Arbeiten im Spurenbereich. Leider gibt es diese empfindlichen Detektoren kaum mehr auf dem Markt.

Variabler Detektor

- **Variabler Detektor:**
Die Lichtquelle hierbei ist eine Deuteriumlampe. Nur wird hier die gewünschte Wellenlänge mit einem optischen Gitter aus dem Licht-Kontinuum gefiltert. Der variable UV-Detektor kann als Standarddetektor für einen Großteil der HPLC-Anwendungen angesehen werden. Eine interessante Variante stellt der Mehrwellenlängendetektor („MWD“) dar: Es wird gleichzeitig bei mehreren Wellenlängen – bis zu 4 – gemessen.

PDA/DAD

- **Photodiodenarraydetektor (PDA oder DAD)**
Die Lichtquelle ist auch hierbei eine Deuteriumlampe. Hier wird jedoch keine einzelne Wellenlänge herausgefiltert, sondern Licht des gesamten Wellenlängenbereiches (oder eines vom

Anwender zu bestimmenden Bereiches) wird durch die Messküvette geschickt. Im Gegensatz zu den „normalen“ UV-Detektoren wird das gesamte aus der Küvette austretende Licht nicht durch eine einzelne Diode aufgefangen, sondern von einer ganzen Reihe von Photodioden („Dioden-Array“, die Anzahl unterscheidet sich bei den verschiedenen Herstellern). Das Licht wird nach Verlassen der Durchflussküvette mit Hilfe eines Gitters so aufgespalten, dass nur ein oder genau definierte Wellenlängenbereiche auf eine Photodiode fallen. Nach wiederum fest definierter Zeit (meist einstellbar, im Millisekundenbereich) werden die Dioden ausgelesen und die Daten gespeichert. Es entsteht so über einen Wellenlängenbereich ein dreidimensionales Chromatogramm.

**Brechungs-
indexdetektor
(RI)**

Für Substanzen, die keine UV-Absorption zeigen, wie z. B. für aliphatische Polymere, wird dieser Detektor eingesetzt. Er misst den Unterschied des Brechungsindexes zwischen reinem Eluenten und mit Probe vermischem Eluenten. Die Lichtquelle ist auch hier eine Halogenlampe. In eine Vergleichsküvette wird reines Laufmittel (Eluent) gespült. Durch die Messküvette wird der Eluentenstrom geleitet. Mit Hilfe eines Spiegelsystems wird der Lichtstrahl abwechselnd durch die Vergleichsküvette und die Messküvette geleitet. Befindet sich Probe im Eluentenstrom, ändert sich der Brechungsindex des Laufmittel/Probegemischs. Dieses wird registriert. So entsteht das Chromatogramm. Das Haupteinsatzgebiet dieses Detektors ist in der Polymer- und Mineralölchemie, sowie Zuckeranalytik zu finden. Er ist um einiges unempfindlicher als der UV-Detektor.

**Fluoreszenz-
detektor**

Dieser Detektor nützt die Fähigkeit bestimmter Substanzen aus, Fluoreszenzsignale auszusenden. Abhängig von der zu detektierenden Verbindung wird mit einer bestimmten Wellenlänge eingestrahlt, die die Verbindung zur Fluoreszenz anregt. Die eingestrahlte Wellenlänge wird mit Hilfe von Filtern oder einem Gitter aus einem Lichtkontinuum (welche Lampe eingesetzt wird ist abhängig von der benötigten Wellenlänge) herausgefiltert. Ein bekanntes Einsatzgebiet des Fluoreszenzdetektors ist die Bestimmung von PAK's. Er wird auch oft nach Nachsäulenreaktionen (z. B. Aminosäuren-Bestimmung) eingesetzt. Der Fluoreszenzdetektor ist um Faktor 100-1.000 empfindlicher als der variable UV-Detektor.

**Elektro-
chemischer
Detektor
(ECD)**

Bei dieser Variante von Detektor handelt es sich um eine Rarität: Durch Anlegen eines bestimmten Potentials werden hierbei bestimmte (polare) Probenkomponenten oxidiert oder in Ausnahmefällen auch reduziert. Es wird die Spannungsdifferenz zwischen Mess- und Hilfselektrode gemessen. Das Einsatzgebiet dieses Detektors findet sich hauptsächlich in der klinischen Chemie, z. B. zur Bestimmung von Katecholaminen aber auch zunehmend zur Detektion von Zuckern.

**Massensensiti-
ver Detektor
(LC-MS-**

Die LC-MS-Kopplung hat sich in der Zwischenzeit als eine wichtige Detektionsmöglichkeit etabliert – ihre Bedeutung nimmt stets zu,

- Kopplung)** zumal die einfache („single-mode“) MS-Geräte kompakter, robuster und billiger geworden sind. Dabei wird die Probe nach der Säule mithilfe eines Interfaces (Elektrospray, chemische Ionisation usw.) ionisiert und die Fragmente anschließend im Massendetektor registriert. Anhand der Masse(n) der erzeugten Fragmente kann auf die chemische Struktur der ursprünglichen Substanz in der Probe geschlussfolgert werden.
- Viele spezielle Detektoren erhältlich** Selbstverständlich sind eine Reihe weiterer Detektoren im Einsatz. Hier seien nur einige Namen erwähnt: Polarimeter, Leitfähigkeitsdetektor, Stickstoffdetektor, Lichtstreuendetektor, Viskositätsdetektor, usw. Insbesondere die sogenannten Aerosoldetektoren (Lichtstreuendetektor, Corona CAD („**Charged Aerosol Detektor**“)) erfreuen sich bei der Detektion UV-inaktiver Komponenten im Gradientenmodus wachsender Beliebtheit.

Der Aufbau einer Gesamtanlage

- modulare Anlage** Herstellerabhängig sind die HPLC-Anlagen unterschiedlich aufgebaut. Zu Beginn der HPLC gab es meist **modulare Anlagen**. Bei dieser Bauweise sind Pumpe, Injektor, Detektor als einzelne Geräte hintereinander angeordnet. Die einzelnen Module können auch von unterschiedlichen Herstellern stammen.
- Kompaktgerät** Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die einzelnen Bestandteile einer HPLC-Anlage in einem Gerät unterzubringen. Dann spricht man von einer **Kompaktanlage**. Diese sind in den letzten Jahren zweifelsohne beliebter geworden und werden mittlerweile fast ausschließlich verwendet. Neben den rein bautechnischen Unterschieden einer HPLC-Anlage muss man noch Unterschiede in der Arbeitsweise beachten.
- Isokratische HPLC-Anlage** Man unterscheidet hierbei zwischen **isokratischem** und **Gradienten-** Betrieb einer Anlage. Bei einer isokratischen Anlage wird während eines HPLC-Laufes mit einer gleichbleibenden Zusammensetzung des Eluenten gearbeitet. D. h. die Wechselwirkung zwischen Laufmittel und stationärer Phase ist über die gesamte Zeit der Trennung konstant. Man kann damit vor allem ähnliche Substanzen gut trennen. Diese Art der Durchführung ist besonders robust und sollte, so es möglich ist, für alle Trennaufgaben in der Routine angestrebt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass man für diese Arbeitsweise nur eine Pumpe zur Eluentenförderung benötigt (weniger Ärger mit Dichtungen und sonstigem Verschleiß...).
- Gradient** Bei einer **Gradiententrennung** wird die Zusammensetzung des Eluenten kontinuierlich über die Zeit geändert. Man erreicht so eine permanente Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Eluent und stationärer Phase. Die Probesubstanzen werden so schneller von den Austauschplätzen an der stationären Phase verdrängt. Man ist damit in der Lage, auch Substanzkomponenten sehr unterschiedlicher Polarität noch in akzeptabler Zeit zu trennen. Die Gradiententechnik ist grundsätzlich flexibler einsetzbar als die

isokratische. Da beim Gradienten am Anfang einer Trennung eine andere Zusammensetzung des Eluenten vorliegt als am Ende, muss man stets darauf achten, dass vor der nächsten Injektion die Säule ins Gleichgewicht kommt (**Equilibrierung**).

Die Mischung des Laufmittels kann gerätetechnisch auf verschiedene Arten durchgeführt werden.

Niederdruckgradient

a) Die Mischung der verschiedenen Eluenten wird durch ein Proportionsventil vor einer Pumpe durchgeführt, die Mischung mit einer Pumpe durch die Anlage gefördert. Man spricht dann von einem **Niederdruckgradienten**. (Die Mischung geschieht auf der Normaldruck- oder Niederdruckseite der Anlage, also vor der Pumpe.)

Hochdruckgradient

b) Jeder Eluent wird von einer Pumpe gefördert und die Mischung erfolgt *nach* der Pumpe auf der Hochdruckseite der Anlage. Eine Mischkammer steht dafür zur Verfügung. Eine solche Anlage wird als **Hochdruckgradient** bezeichnet.

Wieso „**Druck**“?

Bei der Förderung des Eluenten durch die HPLC-Anlage baut sich Druck auf. Den Hauptanteil bewirkt hierbei die Säule. Abhängig vom Säulenmaterial (Größe und Form der verwendeten Teilchen), der Säulenlänge, der Temperatur und des eingesetzten Eluenten (unterschiedliche Viskosität) ergeben sich Drücke von ca. 50 bis ca. 350 bar. Bei der UHPLC: üblicherweise bis ca. 1000 bar, selten auch darüber.

Probeaufgabesystem

Das Probeaufgabesystem kann entweder ein Handinjektor oder ein automatisches **manuelles** Ventil (oft von den Firmen Rheodyne oder Valco) oder ein automatischer **Probengeber** (Autosampler, Autoinjektor) sein.

Säule

In der Abfolge kommt dann die Säule, das Herzstück der Aufgabe, an der die Trennung nach verschiedenen Mechanismen stattfindet. Die Säulen können mit den unterschiedlichsten Materialien gefüllt sein. Die Art der stationären Phase wird nach dem von Ihnen zu bearbeitenden Trennproblem ausgesucht. Möglicherweise arbeiten Sie mit einer „C₁₈-Säule“. Die stationäre Phase ist in diesem Fall ein chemisch modifiziertes Kieselgel. Hierbei sind auf der Oberfläche des Kieselgels C₁₈-Ketten aufgebaut.

Es sollte immer eine konstante Temperatur gewährleistet sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Detektor

Als **Detektor** finden Sie oft einen UV Detektor, manchmal in der Variante eines Diodenarray Detektors (DAD oder PDA). In Abschnitt 2 finden Sie eine Auflistung der gebräuchlichsten Detektoren und die Grundsätze deren Arbeitsweise.

Auswertesystem

Als **Auswertesystem** steht heute meist ein Rechner mit entsprechender Software hinter der Anlage, Integratoren gehören zu der älteren Generation der Auswertesysteme und kaum mehr an zu treffen. Führen Sie eine **qualitative** Analyse durch, so müssen Sie „nur“ alle Peaks (=Substanzen), die in Ihrer Probe enthalten sind, trennen. Soll eine **quantitative** Analyse durchgeführt werden, muss mit Hilfe von Standards die genaue Konzentration bzw. Menge der einzelnen in der Probe vorliegenden Substanzen bestimmt werden.

quantitative Analyse

Die Auswertung wird meist über die Fläche (Merke: Bei nicht-aufgelösten Peaks mit großen Fehlern behaftet!), selten über die

Höhe der Peaks durchgeführt.

Neben seiner Aufgabe als Auswertegerät steuert der Rechner oft auch die gesamte Anlage, angefangen von den Pumpen, über den Probengeber bis zum Detektor und evtl. andere Peripheriegeräte wie Fraktionssammler, Säulenwechsler und Säulenöfen.

Notwendige Arbeiten vor den Messungen

Verkabelung einer HPLC-Anlage

Bevor man nun eine erste Messung starten kann, müssen einige grundsätzliche Arbeiten durchgeführt werden. Das Gerät sollte an einem Ort aufgestellt sein, an dem es auch leicht von hinten zugänglich ist. Die elektrische Verkabelung der einzelnen Module untereinander sollte an beiden Enden der Kabel beschriftet werden, so dass bei späteren eventuell nötigen Umbauten ein problemloser Zusammenbau möglich ist. Ändern Sie vorerst nichts an diesen Verbindungen! Grundsätzlich sollten Sie die elektrische Verkabelung im Auge behalten, es können sich schon mal Verbindungen lockern und so zu Wackelkontakten oder Totalausfällen führen („Spikes“, selten auch Geisterpeaks).

Kapillaren

Der Eluent wird von **Kapillaren** von einem Modul zum nächsten geführt. Sie können aus Stahl oder PEEK (**Polyetheretherketon**) sein. Der Innendurchmesser dieser Kapillaren sollte zwischen Pumpe und Injektor 0,5 – 1 mm betragen (isokratische Anlage!), ab Ausgang Injektor ca. 0,17-0,13 mm. Manche Detektoren, wie z. B. Fluoreszenzdetektoren, benötigen zum problemlosen Arbeiten einen gewissen Rückdruck. Dieser wird durch eine dem Detektor nachgeschaltete Kapillare mit 0,1 oder 0,2 mm Innendurchmesser aufgebaut. Dadurch bleiben evtl. vorhandene Luftbläschen im Eluenten, das Chromatogramm erscheint ohne störende Luftpeaks. Das ist die so genannte **Restriktorkapillare** oder **Restriktor**.

Verbindungsstücke

Die Verbindungsstücke, Ferrules und Fittings, sollten alle von einem Hersteller stammen, da die verschiedenen Marken sich doch geringfügig in den Dimensionen unterscheiden können. Das führt zu kleinen Totvolumina, die die gewünschte Trennung unnötig verschlechtern (Peakverbreiterung). Es sei denn, Sie verfügen über (Totvolumen-freie) Universal-Verbindungsstücke, die natürlich die Flexibilität bei der Auswahl von Säulen und Geräten erhöhen. Grundsätzlich muss dazu betont werden, dass man nur mit „Gefühl“ Verschraubungen anziehen soll, da sonst das Gewinde abbrechen kann und dann nach Murphy's Gesetz im Detektor stecken bleibt. Wenn Sie schon Gewalt anwenden müssen, um ein Leck abzudichten, dann bitte nur sanfte Gewalt.

Jetzt kann's endlich losgehen ..., oder doch noch nicht?

Zustand einer HPLC-Anlage

Als erstes muss sichergestellt werden, dass die Anlage sauber ist. Folgende Fragen dazu: Hat jemand vor Ihnen mit der HPLC-Anlage gearbeitet, wenn ja, mit welchem Lösungsmitteln, hat er eine Säule im System gelassen oder sie ausgebaut?

Säubern/

Wenn Sie nicht wissen was vor Ihnen mit der Anlage geschehen ist,

Spülen sollten Sie diese mit einer 50/50 Mischung aus Isopropanol(IsoOH)/Wasser bei einem Fluss von 2 ml/min für ca. 15-20 min spülen. Dabei sollten Sie einige Male auch die Spüllösung injizieren, um sicherzustellen, dass auch kein alter Eluent mehr sich im Probeaufgabesystem befindet. Noch gründlicher: Zuerst die Anlage (ohne Säule!) mit ca. 30-50 ml heißem Wasser und anschließend mit ca. 30-50 ml Isopropanol spülen (alternativ im Falle von hartnäckigen organischen Verunreinigungen: Acetonitril oder Tetrahydrofuran). Damit ist gewährleistet, dass sowohl Salze als auch organischer „Dreck“ die Anlage verlassen. Jetzt können Sie den in Ihrer Methode vorgeschriebenen Eluenten in die Anlage bringen. Sicherlich als letzter Schritt sinnvoll: Eluent injizieren.

Nachfolgend werden die wichtigsten HPLC-Tätigkeiten etwas genauer beschrieben für den Fall, dass Sie keinerlei Beschreibung zur Hand haben. Ansonsten gilt generell folgende Prämisse: Wenn Sie nach einer existierenden Methode arbeiten müssen, halten Sie sich zunächst stur an der Beschreibung fest!!! Ihre Kreativität und Experimentierfreude können im HPLC-Labor von unschätzbarem Nutzen sein, aber bitte, alles zu seiner Zeit.

Welche Säule? Welche Säule muss ich in die HPLC-Anlage einbauen?

Die zu verwendende Säule steht sicherlich in der Beschreibung der von Ihnen zu bearbeitenden Methode. Steht Ihnen diese Hilfe nicht zur Verfügung, s. Kapitel „Bezeichnung von HPLC Materialien“. Das am häufigsten verwendete Säulenmaterial (stationäre Phase) ist mit **Reversed Phase** C₁₈ modifiziertes Kieselgel. Man spricht dann von **Reversed Phase-Chromatographie**. Die hierbei am meisten verwendeten Eluenten sind Mischungen aus Wasser und Methanol bzw. Acetonitril. Hinzu kommen oft Additiva (=Zusätze) oder Puffer.

Normal Phase Müssen Sie auf Grund Ihrer Probe nichtmodifiziertes Kieselgel als Säulenmaterial einsetzen, so arbeiten Sie mit „Normal Phase“. Das ist allerdings heute nur in ca. 5% der Routinemethoden der Fall. Die wichtigsten Eluenten sind hier Hexan und Heptan mit entsprechenden Mischungen und Additiva. Was andere Trennmechanismen betrifft, seien hier nur einige Namen erwähnt: Ionenaustauschchromatographie, HILIC, Affinitätschromatographie, Ausschlusschromatographie.

Herstellung des Laufmittels (Eluent) Wie stelle ich den Eluenten her?

Welche Eluenten Sie brauchen, steht in Ihrer Methode. Auch welche Chemikalien und welche hochreinen Lösungsmittel Sie zu seiner Herstellung verwenden müssen. Die Bezeichnung solcher Lösungsmittel ist meist „HPLC-grade“ oder „Gradient grade“. Sie sind von verschiedenen Firmen erhältlich, wie z. B. Baker, VWR, Promochem, FischerScientific, Riedel de Haen, Biosolv usw.

Elutionskraft In der HPLC werden verschiedene Eluenten eingesetzt, um die

(siehe Anhang) Stärke der Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase beeinflussen zu können. Ist die Elutionskraft eines Eluenten stärker, kommen die Peaks der zu trennenden Substanzen früher. In der Reversed Phase Chromatographie nimmt die Stärke eines Eluenten von Wasser über Methanol, Acetonitril, THF zu. Die Eluenten sollten Sie immer auf die gleiche Art und Weise herstellen. Wenn in Ihrer Vorschrift nicht genau steht, wie Sie den Eluenten herstellen müssen, dann achten Sie dabei bitte bei der Herstellung eines RP-Eluenten auf folgende Reihenfolge:

**Fließschema:
Puffer-
herstellung**

- Den Puffer (p. a. Qualität) in der gewünschten Konzentration herstellen (den Messkolben noch nicht auffüllen),
- den pH-Wert einstellen (Achtung: Nur zwischen pH 2 und 8, da bei höheren pH-Werten sich das Säulengrundmaterial auflöst – es sei denn Sie verwenden spezielle, Alkali-stabile Säulen – und im stark Säuren sich die Bindungen zwischen Basismaterial und funktioneller Gruppe lösen können).
- Messkolben genau auffüllen
- Puffer in einem Messzylinder in der gewünschten Menge abfüllen
- Methanol bzw. Acetonitril in einem anderen Messkolben abmessen
- erst dann mischen.

Entgasen

Diese Vorgehensweise garantiert, dass Sie Ihre Eluenten immer reproduzierbar herstellen und keine Probleme mit der Volumenkontraktion bekommen. Eluenten sollten immer in genügender Menge (mindestens 1 Liter) hergestellt und entgast werden. Das **Entgasen** ist mit Helium möglich (heute eher selten) oder durch den in die HPLC-Anlage eingebauten Degasser. Wenn Sie Puffer einsetzen, sollten Sie diese membranfiltrieren (unter ca. 20 mMol Pufferstärke unter uns nicht notwendig...). Das Vorratsgefäß sollte gut abgedeckt sein, um nicht als Falle für den in der Laborluft vorhandenen „Dreck“ zu fungieren.

Die erste Messung

Equilibrieren

Nachdem Sie Ihre Anlage, wie beschrieben, vorbereitet haben, kann Ihr Eluent an Ihre Anlage angeschlossen werden. Jetzt müssen Sie Ihrer Anlage etwas Zeit lassen, ins Gleichgewicht zu kommen (equilibrieren). Dabei werden noch von der Herstellung der Säule vorhandene Verunreinigungen ausgespült, auch sonstiger „Dreck“ verlässt die Anlage. Vergessen Sie nicht, den Eluenten ein paar Mal zu injizieren, damit evtl. Verunreinigungen aus der Oberfläche der Injektionsnadel entfernt werden. Während dieser Zeit können Sie Ihre Proben vorbereiten. Wenn Sie Glück haben, müssen Sie diese nur in den Eluenten auflösen und filtrieren, ansonsten müssen Sie die in Ihrer Methode beschriebene Prozedur verwenden.

**Probenvor-
bereitung**

**Standard-
chromato-
gramm**

In der Zwischenzeit ist Ihr System equilibriert. Die hierfür benötigte Zeit bewegt sich zwischen einigen Minuten (einfacher Eluent wie z. B. ACN/Wasser) und einigen Stunden (organisches

Lösungsmittel und als stationäre Phase „nacktes“ Kieselgel). Um zu testen, ob die gesamte Anlage voll funktionsfähig ist, injizieren Sie am besten eine Standardlösung. Diese ist in der Regel vorgegeben, falls nicht, nehmen Sie eine Mischung aus Nitromethan, Crysen, Perylen. (Säule: C₁₈, Eluent: MeOH/H₂O). Betrachten Sie nun das Chromatogramm. Ist die Basislinie ruhig, zeigt sich keine Drift, sind die Peaks symmetrisch und sieht das Chromatogramm nach der nochmaligen Injektion genauso wie bei der ersten aus, dann können Sie davon ausgehen, dass Ihr Gesamtsystem in Ordnung ist.

Aber jetzt geht's los.

Sequenz

Gemäß der vorliegenden Vorschrift injizieren Sie jetzt nach einer bestimmten Reihenfolge („Sequenz“), Vergleichsproblem, Proben und Standards und werten die sich ergebenden Chromatogramme aus. Nehmen Sie sich Zeit, wenn Ihre Methode einen Gradientenlauf enthält. Ein neuer Lauf sollte – abhängig von dem Säulenvolumen – frühestens erst nach 5 – 10 min gestartet werden. Sie sichern so, dass Ihr System bei jeder Injektion im Gleichgewicht ist.

Müssen Sie eine neue RP-Säule einsetzen, so spülen Sie diese vor dem ersten Einsatz mit Methanol oder Acetonitril. Beachten Sie bitte dabei, dass Ihre Anlage pufferfrei ist. Am Besten, Sie spülen die Anlage erst mit einem Lösungsmittel/Wassergemisch und stellen dann auf Methanol bzw. Acetonitril um. Genauso verfahren Sie, wenn Sie wieder zu Ihren Originalbedingungen zurückkehren wollen.

Verlassen einer HPLC Anlage

Ende einer Messserie

Zum Schluss geben wir Ihnen noch einige Tipps für das richtige Verlassen einer Anlage:

Eluenten Kreislauf

1. Wenn Sie wissen, dass Sie am nächsten Tag weiterarbeiten, ist es am sinnvollsten, wenn Sie alle Geräte bis auf die Pumpe ausstellen, evtl. muss der PC auch eingeschaltet bleiben. Die Pumpe lassen Sie bei einem kleinen Fluss von 0,1 bis 0,3 ml/min weiterlaufen. Dabei sollten Sie für genügend Eluent sorgen, damit die Anlage nicht trockenläuft, oder noch besser den Eluenten im **Kreislauf** pumpen. D. h. Sie führen die Auslasskapillare des Detektors in das Vorratsgefäß zurück. Am nächsten Morgen müssen Sie nur Ihren Fluss einstellen und können mit der Arbeit beginnen.

Stilllegen einer HPLC-Anlage

2. Möchten Sie Ihre Anlage für längere Zeit stilllegen, so spülen Sie – bei Bedarf – zuerst mit Wasser Ihren Puffer aus der gesamten Anlage, anschließend spülen Sie mit ca. 20-30 ml Methanol oder Acetonitril. Jetzt können Sie die Säule ausbauen, mit Endstücken verschließen, damit sie nicht austrocknet, und unter diesem Lösungsmittel längere Zeit lagern (im Falle von ACN, lieber eine Mischung verwenden, z. B. 70/30 ACN/Wasser).

Damit Sie das Wichtigste auf einen Blick haben, folgt eine Checkliste „Was muss ich vor Beginn der Messung beachten?“ und ein Fließschema „Wie fange ich die Arbeit mit einem HPLC-Gerät an?“ Vielleicht sind bei Ihnen zusätzliche Schritte notwendig. Fügen Sie diese in die zwei Schemata ein oder modifizieren Sie diese einfach. Vielleicht hat Ihr(e) Vorgänger(in) diese Schritte irgendwo schriftlich festgehalten. Entwickeln Sie Ihre eigenen Arbeitshilfen, mit denen Sie sich sicher fühlen. Bereits nach kurzer Zeit werden diese Schritte für Sie zur Selbstverständlichkeit.

Checkliste für die RP-HPLC

Was muss ich vor Beginn der Messung beachten?

- | | |
|------------------------------|--|
| Elektrische Verkabelung | <ul style="list-style-type: none"> • Hat sich nichts gelockert? |
| Kapillaren/Verbindungen | <ul style="list-style-type: none"> • Tropft es irgendwo? Hier helfen Kleenex, Löss-, Küchen-, Toilettenpapier |
| Schläuche und Eluentengefäße | <ul style="list-style-type: none"> • Luftblasen aus den Einlassschläuchen entfernen, indem man das Lösungsmittel mit einer Spritze ansaugt, dabei „Purgeventil“ öffnen. • Abdeckbares Eluentengefäß verwenden, damit nichts hineinfallen kann und die Verdunstung des Eluenten minimiert wird. |
| Pumpen | <ul style="list-style-type: none"> • Pumpe einschalten und einen Blick auf das Abfallgefäß werfen. Tropft es dort hinein? Wenn dies nicht der Fall ist, überprüfen Sie, ob der Eluent durch den Einlassschlauch fließt. Häufigste Ursache für fehlenden Fluss ist Luft in der Pumpe. • Tropft es irgendwo oder ist es feucht (Dichtstellen anfassen), sieht man Kristallablagerungen bei pufferhaltigen Eluenten? Sind die Pumpengeräusche die gewohnten? |
| Eluent | <ul style="list-style-type: none"> • Immer Lösungsmittel mindestens HPLC-Qualität ansetzen. • Genügende Menge vorbereiten. • Pufferkonzentrationen sollten in der Regel zwischen 10 und 20 mMol liegen. • Eluenten mit Puffer membranfiltrieren, mit Helium entgasen oder Degasser (evtl. + Ultraschallbad) verwenden. • Möglichst keine aggressiven Komponenten (z. B. Trichloressigsäure) dem Eluenten zusetzen. Und werfen Sie bevor es los geht einen Blick auf das Vorratsgefäß: Ist die Lösung klar oder „schwimmen“ dort interessante Gebilde herum, |

sehen Sie etwas Grünliches oder vielleicht aus künstlerischer Sicht imposante Schlieren...?

- | | |
|-----------------|--|
| Injektor | <ul style="list-style-type: none">• Beim manuellen Injektor sicherstellen, dass ein Gefäß unter dem Überlauf steht. Injektionsspritzen sauber halten, um Kontaminationen zu vermeiden, ggf. mit Iso-OH spülen.• Bei manchen Probengebern (Autosampler) muss eine Waschflüssigkeit angeschlossen sein. Bei RP-Trennungen mindestens ca. 50 % Methanol oder Acetonitril verwenden, um Pilzwachstum zu verhindern. |
| Säule | <ul style="list-style-type: none">• Immer nach einem konstanten Schema einfahren. |
| Detektor | <ul style="list-style-type: none">• Wenn Sie mit einem UV-Detektor arbeiten, kontrollieren Sie, ob die Lampe genügend Energie hat. Beachten Sie dabei die Herstellerangaben. |
| Abfall | <ul style="list-style-type: none">• Genügend großes Auffanggefäß bereitstellen. |
| Auswerteeinheit | <ul style="list-style-type: none">• Sind die eingestellten Integrations- (z. B. Threshold, Peakwidth) sowie Datenaufnahmeparameter (z. B. Sample-Rate, Response- oder Rise Time) OK? |

Checkliste:

Das muss ich immer machen:

- | | |
|------------------------------|---|
| Arbeitsweise konstant halten | <p>Vom Einschalten des Gerätes bis zum Ausschalten, immer alles gleich machen, bzw. Änderungen notieren. z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none">• Eluent gleich ansetzen (z. B. zuerst das Wasser, dann den organischen Anteil – oder umgekehrt).• Säule gleich anfahren, auch Reihenfolge der vials und Konzentration streng beachten.• „Gleiche“ Chemikalien verwenden (gleich heißt in diesem Fall: Hersteller, Qualität, Charge usw., auch auf eingesetztes Spülmittel, Wasser achten).• Bei etwaigen Änderungen alles notieren. |
| Puffer filtrieren | <p>Immer die gleichen Filter, z. B. 0,45 µm (von <i>diesem</i> Hersteller), verwenden (siehe Herstellung eines Eluenten)</p> |
| Eluent entgasen | <p>Siehe Herstellung eines Eluenten</p> |
| Diagnostik-Werte überprüfen | <p>In Geräte eingebaute Diagnosemöglichkeiten nutzen,</p> |

und überprüfen ob sie in Ordnung sind
(z. B. Lampenenergie)

Häufiges Überprüfen der Anlage auf Funktionstüchtigkeit Am einfachsten durch Vergleichschromatogramm

Checkliste:

Das darf ich nie tun:

Druck über 400 bar zulassen	Es können Leckagen entstehen, die Packungsqualität kann nachlassen (UHPLC-Säulen natürlich ausgenommen).
Puffer in der Anlage stehen lassen	Salze können ausfallen, Verstopfung der Anlage
Verschraubungen (Fittings) zu fest anziehen	Fittings können abbrechen oder mit der Zeit undicht werden
Zu schnell reagieren	Kein Aktionismus, erst mal Gleichgewicht einstellen lassen und sich folgende Frage stellen: <ul style="list-style-type: none">- Habe ich irgendetwas – auch eine winzige Kleinigkeit – anders gemacht?- Ist das Problem wiederholbar?- Was und warum kann ich etwas definitiv ausschließen? <p> n folgender Reihenfolge aktiv werden: Problem eingekreisen, finden, reagieren.</p> <p>-</p>
Reversed Phase Säulen in Wasser lagern	Bakterienwachstum!

Fließschema:

Wie wird eine HPLC-Anlage in Betrieb genommen?

Zuerst checken, in welchem Zustand das System sich befindet.

Ist der für Ihre Methode geeignete Eluent schon eingefahren (siehe weiter unten), muss das System auf die gewünschte Methode umgestellt werden? Oder ist Ihnen diesbezüglich nichts bekannt?

Spülen Sie im letztgenannten Fall die Anlage mit einem Gemisch aus Wasser und Isopropanol bei ausgebauter Säule, dabei machen Sie nichts Verkehrtes. Dann Wasser/Methanol- oder Acetonitrilgemisch (ca. 30-50 ml) einfahren, von dieser Mischung aus auf Ihren benötigten Eluenten übergehen. Sollten Sie mit 100 % organischen Lösungsmitteln arbeiten, ist ein Zwischenspülschritt mit Methanol und Methylenchlorid notwendig. Vorsicht: Bei Puffern nie direkt auf reines organisches Lösungsmittel umstellen – oder umgekehrt! Ansonsten kann das Puffersalz ausfallen und es kommt zu Verstopfungen in der Anlage.

Falls die Anlage umgefahren werden muss, zuerst den im System vorhandenen Eluenten ausspülen. Handelt es sich um einen Puffer, dann mit Wasser spülen, ansonsten Gemisch Wasser/Methanol oder Wasser/Acetonitril verwenden.

Benötigte Säule einbauen.

Bei einer RP-Säule erst mit einem Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitrilgemisch spülen, erst dann kommt der Eluent.

Falls Ihr System einsatzbereit war, können Sie hier weitermachen.

Benötigte Eluenten nach Vorschrift vorbereiten, bei Puffer (bei mehr als ca. 20 mMol) membranfiltrieren, entgasen, dann an den Einlassschlauch der Pumpe anschließen, evtl. vorhandene Luftblasen mit Spritze ansaugen oder „purgen“.

Kontrollieren, ob Abfallgefäß hinter dem Detektor vorhanden ist. Beim Injektor prüfen, ob Abfallgefäß unter dem Überlauf steht, bei automatischem Probengeber – falls erforderlich – Spülflüssigkeit anschließen.

Die Geräte in der Reihenfolge Pumpe, Injektor, Detektor, Auswerteeinheit einschalten.

Pumpe im Falle einer „trockenen“ Säule immer in 0,2 ml/min-Schritten auf gewünschten Fluss bringen, ansonsten kann man den gewünschten Fluss bei RP-Säulen direkt einstellen - nicht bei Ionenaustauschern oder Gelsäulen!

Der Säule Zeit lassen, damit sie ins Gleichgewicht kommen kann (pro Spülschritt ca. 10-15 Säulenvolumina). In der Zwischenzeit die Proben vorbereiten. Testen, ob beim Mischen von Eluent und gelöster Probe etwas ausfällt. Wenn ja, versuchen, die Probe anders zu lösen. Ist alles in Ordnung, können Sie jetzt einen Standard injizieren. Stimmt das sich ergebende Chromatogramm mit einem Vergleichschromatogramm überein, stimmen Peakhöhe, Peakfläche, Peakform und Retentionszeit, so ist Ihr System in Ordnung und Sie können mit Ihren Messungen beginnen.

Möchten Sie Ihre Arbeit für heute beenden, am nächsten Tag aber weiterarbeiten, lassen Sie den Eluenten bei niedrigem Fluss, ca. 0,2 ml/min, im Kreislauf laufen. Schalten Sie alle Geräte bis auf die Pumpe aus (beim Detektor gibt es unterschiedliche Auffassungen...). Möchten Sie die Anlage längere Zeit nicht verwenden, spülen Sie den verwendeten Eluenten aus dem System. Ist es Puffer, zuerst mit Wasser und dann mit Methanol oder Acetonitril, je ca. 20 – 30 ml. Bauen Sie die Säule aus und schreiben Sie die Bedingungen auf, wie sie behandelt wurde.

Schalten Sie die Geräte in der Reihenfolge Auswerteeinheit, Detektor, Injektor, Pumpe aus. Es sei denn, das Ausschalten erfolgt über den PC. Beim Ausschalten der Pumpe gehen Sie in 0,2 ml-Schritten nach unten - nur im Falle von empfindlichen Säulen wie Ionenaustauscher, Gelsäulen Affinitätsmedien usw. -, ansonsten ruhig gleich auf 1-1,5 ml/min.

Bezeichnung von HPLC-Materialien

Bei etlichen Säulenmaterialien kann man deren Eigenschaften schon den Bezeichnungen entnehmen. Dagegen gibt es auch pfiffige Namenskreationen, die nichts über Eigenschaften und Spezifikationen verraten.

Es gibt Materialbezeichnungen ohne jegliche Informationen, z. B. INTERCHROM, ASAHIPAK und andere, die doch etwas über sich aussagen: z. B. LiChrospher, Intertsil. Dieses Thema kann hier zwar nicht ausführlich behandelt werden aber nachfolgend finden Sie hoffentlich einige Hilfen für sich. Aufgeführt sind Zahlen, Buchstaben, Silben, Präfixe, Suffixes aus der Säulenbezeichnung, die einige Hinweise geben.

Zur Bezeichnung von HPLC-Materialien

Aus den Namen des Materials... | ...die Information

Natur des Füllmaterials

- Sil, Si, Silica, -spher, -sorb	Kieselgel
- Alox, A, Alumina	Aluminiumoxid
- HP, HA	Hydroxylaptit
- CEL	Cellulose
- GEL	Polymer
- Silica „B“	Kieselgel nach einem neueren Verfahren hergestellt und im Vergleich zu einem älteren Silica „A“ ohne Metallionenkontamination.

Physikalische Eigenschaften des Füllmaterials

- spher	rundes (sphärisches) Material
- sorb	irreguläres (gebrochenes, unregelmäßiges) Material
- WP	<u>Wide Pore</u> , z. B. 300 Å Porendurchmesser
- NPB, NPR	<u>Non porous beads</u> bzw. <u>resins</u> : Nicht poröses Material
100, 120, 300, 1000, 4000	Eine große Zahl: Porenweite (Durchmesser der Materialteilchen), wichtig bei der Trennung großer Moleküle
3, 5, 10	Eine kleine Zahl: Korngröße, z. B. 5µm mittlerer Teilchendurchmesser

Modifizierte Materialien

RP _x	<u>Reversed Phase</u> , x=4,8,18: Länge der Alkylkette
OD(S), C ₁₈ , RP ₁₈ , 18	Octadecylsilan: C ₁₈ -Alkylkette
ODS I, II, III (oder 1, 2, 3)	Wie bei den Autos sind das die „Nachfolgemodelle“ des Materials. Leider ist keine Systematik in der Bezeichnung zu finden: Manchmal ist „II“ endcapped und „I“ nicht, manchmal ist „II“ besser endcapped als „I“, ein anderes Mal doppelt endcapped und ein anderes Mal wiederum wurde das Verfahren für die Modifizierung des Kieselgels verbessert („endcapped“, s. HPLC-Bücher)
OS, C ₈	<u>Octasilan</u> , C ₈ -Alkylkette
APS, NH, NH ₂ , Amino	Aminopropylsilica, Modifizierung mit einer (CH ₂) ₃ NH ₂ -Gruppe

PH, φ
e, E

Phenylgruppe
„endcapped“: nachsilanisierendes RP-Material

Eignung für ein bestimmtes Trennproblem

- Sugarpac
- TSKgel DNA-NPR
- PepMAP C₁₈

für Zuckertrennungen
für DNA-Fragmente und Nucleinsäuren
für Peptide

Folgende Buchstabenreihenfolgen weisen auf Ionenaustauschersäulen hin:

AX, SAX, WAX, SCX, WCX, SC, CX,
IEC, IEX

strong anion exchanger,
weak cation exchanger,
ion exchange chromatography
ion exchanger usw.

Namen von besonders behandelten Materialien; geeignet zur Trennung von basischen Substanzen:

Beispiele:

Inertsil
Symmetry
Select B
deactivated phase

„Inert gegen Basen“,
„liefert symmetrische Peaks“,
„trennt Basen“,
„deaktivierte Phase“,
(„keine“ Metallionen vorhanden)
Besonders saubere Phase (auch hier
„keine“ Metallionen)
„geschützt“ („Schutzgruppe“ an der
Alkylkette, damit sind Rest-Silanol-
Gruppen geschützt)

-pur, purospher

„shield“

SB

Stable Bond (stabil gebunden)

SP

Sterically Protected (sterisch geschützt)

AB

Acid Bases (für Säulen und Basen
geeignet)

BDS

Based Deactivated Silica (Silanolgruppen
undissoziiert vorliegend und damit für
Basen nicht aktiv)

Sollten Sie tatsächlich mehr über Ihre Säule erfahren wollen, rufen Sie bei Ihrem Lieferanten an. Angenommen, Ihr Gesprächspartner kennt sich aus, versuchen Sie es nach dem HHH-Prinzip (**h**öfliche **H**artnäckigkeit **h**ilft), durch Ihren Charme, durch ein interessantes Gespräch auf wissenschaftlicher Basis, oder durch den direkten Hinweis auf Ihre bereits jetzt beträchtlichen und vor allem zukünftigen Umsätze. Viel Erfolg!

Abkürzungen aus dem Bereich der Chromatographie

(Auswahl)

Abkürzung

Begriff (Englisch bzw. Deutsch)

AC

Affinity Chromatography
(Affinitätschromatographie)

CC	Computational Chromatography (Computerchromatographie oder Computographie)
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEC	Capillary Electrochromatography (Kapillarelektorchromatographie)
CIA	Capillary Ion Analysis (Kapillar-Ionen-Analyse)
CLC	Capillary Liquid Chromatography (Kapillar-LC) Chiral Liquid Chromatography (Chiral LC)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
FIA	Flow-Injection Analysis (Fließ-Injektions-Analyse)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography (Gaschromatographie)
GFC	Gel Filtration Chromatography (Gelfiltrationschromatographie)
GLC	Gas-Liquid Chromatography Gas-Flüssig-Chromatographie
GPC	Gel Permeation Chromatographie (Gelpermeationschromatographie)
I(L)C	Ion (Liquid) Chromatography (Ionenchromatographie)
IEC	Ion Exchange Chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
IPC	Ion Pair Chromatography (Ionen paar-Chromatographie)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LC-MS/LC-ESI-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry/ Liquid Chromatography Electrospray Interface Mass Spectrometry

	(HPLC-Massenspektrometrie-Kopplung mit einem Elektrospray Interface)
NPC	Normal Phase Chromatography (Normalphasen-Chromatographie oder Adsorptionschromatographie)
PIC	Paired Ion Chromatography (Ionenpaarchromatographie)
RPC	Reversed Phase Chromatography (Umkehrphasenchromatographie)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Ausschluss-Chromatographie)
SFC	Supercritical Fluid Chromatography (Überkritische Chromatographie)
SFE	Supercritical Fluid Extraction (Überkritische Extraktion)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPME	Solid Phase Micro Extraction (Mikrofestphasenextraktion)

Von IUPAC empfohlene Symbole für die Chromatographie (Auswahl)

Im Jahre 1993 erschienen in Pure & Appl. Chem., Vol 65, No. 4, pp. 819-872 Empfehlungen von der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) zur „Nomenklatur für die Chromatographie“. Der Artikel über 53 Seiten ist ebenfalls im „ChromBook“ der Fa. Merck, Darmstadt, nachzulesen. Dieser enthält Definitionen, Symbole, Begriffe und Erläuterungen zur Chromatographie. Nachfolgend sind die wichtigsten Größen mit dem entsprechenden Symbol zusammengestellt.

Größe	englische Bezeichnung	Symbol
Trennfaktor	separation factor	α
(Bis 1993: Selektivitätsfaktor)	selectivity factor	α)
Fläche	area	A
Durchmesser	diameter	d
Diffusionskoeffizient	diffusion coefficient	D
Flussrate	flow rate (volumetric)	F
Bodenhöhe	plate height	H
Viskosität	viscosity	η
Gleichgewichts (Verteilungs-) konstante (Koeffizient)	equilibrium (distribution) coefficient	K
Retentionsfaktor	retention factor	k
(Bis 1993: Kapazitätsfaktor)	capacity factor	k')

Länge	length	L
Bodenzahl	plate number	N
Dichte	density	ρ
Druck	pressure	p
relativer Druck	pressure, relative	P
Radius	radius	r
Temperatur	temperature (absolute)	T
Zeit	time	t
lineare Geschwindigkeit	velocity (linear)	u
(Retentions) Volumen	volume	V
Masse (Gewicht)	mass (weight)	W
Peakbreite	peak width	w

Lösungsmittelgemische gleicher Elutionsstärke für die RP-Chromatographie (nach L. Snyder)

Mit Hilfe folgender Tabelle können Sie Mischungen gleicher Elutionsstärke herstellen. Z. B. können Sie mit den Mischungen 50/50 MeOH/H₂O, 40/60 ACN/H₂O und 30/70 THF/H₂O ungefähr die gleiche Retentionszeit erwarten – wenn keine spezifischen Wechselwirkungen stattfinden. Es kann sich jedoch eine andere/bessere Selektivität ergeben. Weiterhin ist folgende Faustregel ersichtlich: Eine 10 %ige Änderung des organischen Anteils im Eluenten führt zu einer Veränderung der k-Werte – und der Retentionszeiten – um Faktor 2 – 3. Dies erlaubt einige Vorhersagen bei Optimierungsversuchen. Wichtig: Hier werden ausschließlich RP-Wechselwirkungen unterstellt, also ein optimaler, kaum realistischer Fall. **Betrachten Sie deswegen diese Mischverhältnisse bitte lediglich als grobe Hinweise!**

MeOH/H ₂ O	ACN/H ₂ O	THF/H ₂ O	k
0	0	0	100
10	6	4	40
20	14	10	16
30	22	17	6
40	32	23	2,5
50	40	30	1
60	50	37	0,4
70	60	45	0,2
80	73	53	0,06
90	8	63	0,03
100	100	72	0,01

Lehrbücher über HPLC, die seit 1995 in Deutsch erschienen und auch erhältlich sind

1. G.J. Eppert **Flüssigchromatographie - HPLC-Theorie und Praxis**
Vieweg Verlag, 1997, ISBN 3-528-06770-5
2. S. Lindsay **Einführung in die HPLC**
Vieweg Lehrbuch, 1996, ISBN 3-540-67016-5
3. V. Meyer **Praxis der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie**
Wiley-VCH Verlag, 10. Auflage, ISBN 3-527-32046-2

4. S. Kromidas (Hrsg.) **Der HPLC-Experte – Grenzen und Möglichkeiten der modernen HPLC**
Wiley-VCH Verlag, 2014, ISBN 978-3-527-33306-6
5. S. Kromidas (Hrsg.) **Der HPLC-Experte II – so nutze ich meine HPLC/UHPLC optimal!**
Wiley-VCH Verlag, ISBN 978-3-527-33838-2
6. J. Eppert **HPLC Troubleshooting, Sepserv**
Separation Service, 2003, ISBN 3-00-010808-4
7. V. Meyer **Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern**
Wiley-VCH Verlag, 1999, ISBN 3-527-29794-4
8. W. Röpke **Der HPLC-Schrauber**
Wiley-VCH Verlag, 2013, ISBN 978-3-527-31817-9
9. S. Kromidas (Hrsg.) **HPLC-Tipps Band 3: Allgemeine Tipps + „Special Topics“: SFC, HILIC, Gradient, Trends in der HPLC**
Pirrot Verlag, 2016, ISBN, 978-3-937436-58-6
10. S. Kromidas (Hrsg.) **HPLC richtig optimiert**
Wiley-VCH, 2006, ISBN 3-527-31470-9
11. S. Kromidas (Hrsg.) **LC-MS-Kopplung für Anwender**
Wiley-VCH Verlag, ISBN 3-527-34291-5
12. S. Kromidas (Hrsg.) **Der Gradient in der HPLC für Anwender**
Wiley-VCH Verlag, ISBN-13: 978-3527344048
13. S. Kromidas und **Chromatogramme richtig integrieren und bewerten**
H-J. Kuss (Hrsg.) Wiley-VCH Verlag, 2008, ISBN 978-3-527-31774-5
14. H.P. Angelé: **Dictionary of Chromatography**
(English, German, French; Russian),
Alfred Hüthig Verlag, 1984, ISBN 3-7785-0926-8

1.-5: Lehrbücher zur Methodik der HPLC/zu allgemeinen Themen

6.-7: Praxisbezogene Bücher, speziell zur Fehlersuche

8.-9: Praktische Ratgeber rund um die HPLC

10.-13: Bücher, in denen ein Themengebiet intensiv behandelt wird

14. Spezial-Wörterbuch von chromatographischen Begriffen

Adressen von HPLC-Firmen?

Am schnellsten finden Sie die aktuellen Daten der Firmen im Internet. Möglicherweise ist es hilfreich, wenn Sie sich relevante Informationen auf den Homepages folgender Internet-Dienstleister einholen. Dort finden Sie auch zahlreiche HPLC-Links.

www.chemie.de

www.analytik.de

www.analytik-news.de

Auf folgenden Webseiten finden Sie gute und umfangreiche Informationen zur HPLC:

- www.chromacademy.com
- www.chromedia.org
- www.chromatographyonline.com
- www.chromatographytoday.com
- www.sepscience.com
- www.separationsnow.com