

## Auswahl einer passenden HPLC-Säule

### Wahl einer geeigneten Säule je nach Trennproblem

Tanja Häfner, Altmann Analytik GmbH & Co. KG

Seit dem Beginn der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) in den 1960er Jahren wurde die Methode stetig weiter entwickelt und verfeinert. Dies gilt im gleichen Maße auch für die eingesetzten Materialien. So gibt es heute zehntausende verschiedene HPLC-Säulen von vielen verschiedenen Herstellern. Diese Auswahl bietet naturgemäß große Vorteile (u.a. gibt es sehr spezifische Trennsäulen für beinahe jedes Trennproblem), gleichzeitig steht der Anwender vor der Qual der Wahl. Der folgende Text bietet hier Orientierung und hilft bei der Auswahl der passenden HPLC-Säule.

#### Hardware der Säule

Die meisten HPLC-Säulen bestehen aus Stahl 316. Vorteil ist, dass der Stahl druckbeständig und auch relativ inert gegen Korrosion ist. Für eine gute Trennleistung ist es wichtig, dass die Innenseite einer Trennsäule keine Rauigkeiten, Riefen oder mikroporöse Strukturen aufweist [5].

#### Basismaterial

##### Silicagel:

Beliebtes Basismaterial bei HPLC-Säulen ist Silicagel; dieses besteht aus Si-Atomen, die durch Sauerstoffatome verbrückt sind [5]. Ein Nachteil von Silicagel ist, dass ein hoher pH-Wert zur Auflösung des Silica-Gerüsts führt. Silicagelsäulen können im pH-Bereich von pH 1 bis 8 verwendet werden [5]. Durch einen niedrigen Metallgehalt lässt sich die chemische Stabilität von hochreinen Silicagelen erhöhen [5]. An der Oberfläche trägt Silicagel OH-Gruppen (Silanolgruppen). Diese Silanolgruppen können chemisch verändert werden, so dass man stationäre Phasen mit spezifischen Eigenschaften erhält [5]. Kieselgel hat zusätzlich zur mechanischen Stabilität den Vorteil einer kostengünstigen und einfachen Synthese. Ebenso gestaltet sich die Oberflächenmodifizierung einfach, preiswert und flexibel. Die Porengröße lässt sich bei Kieselgel eng verteilen einstellen [3].

#### Polymersäulen:

Für die RP-HPLC (Reversed Phase HPLC) sind auch HPLC-Säulen auf Polymer-Basis erhältlich. Meist werden z.B. Polystyrol-Divinylbenzol-Säulen verwendet, die gegenüber den Silicagelsäulen eine höhere pH-Stabilität aufweisen (pH 1-13). Für stark saure oder basische Eluenten stellen sie daher eine interessante Alternative dar [2]. Speziell für die Gelpermeations-Chromatographie ist Styrol-Divinylbenzol eine wichtige stationäre Phase [5].

#### Form des Säulenmaterials

##### Vollporöse Partikel:

Neben den traditionellen vollporösen Phasen gibt es heutzutage auch Coreshell-Phasen, monolithische Phasen und Phasen für UH-

PLC mit kleinen Partikelgrößen.

Meistverwendete Partikel in der HPLC sind bis heute die vollporösen Partikel. Übliche Korngrößen sind 3, 5 oder selten auch 10 µm. Bei vollporösen Partikeln ist die gesamte innere Struktur porös und kann zum Beispiel mit einem Schwamm verglichen werden [5].

##### Coreshell-Partikel:

Coreshell-Partikel haben einen festen Kern und nur die äußere Hülle ist porös. Dieser feste Kern führt zu einer erhöhten Trennleistung. Die Partikel haben eine einheitlichere Partikelgrößenverteilung und lassen sich dadurch besser packen, der A-Term der Van-Deemter-Gleichung (Abb. 1) wird erniedrigt. Zusätzlich ist der Stoffaustausch der Moleküle in die Poren (C-Term der Van-Deemter Gleichung) beschleunigt. Ein Nachteil der

Tab. 1: Übersicht gebundene Phasen [2]

| Phasenname                           | Formel   | Aufbau | Anwendung   | USP Nummer | Mögliche Materialien                                    |
|--------------------------------------|--|--------|---|------------|---|
| Octylsilan (C8), non endcapped       | -(CH <sub>2</sub> )<br>7-CH <sub>3</sub>               |        | Mittelpolare Verbindungen   | L7         | Waters<br>Symmetry C8                                   |
| Octylsilan (C8), endcapped           | -(CH <sub>2</sub> )<br>7-CH <sub>3</sub>               |        | Mittelpolare Verbindungen   | L7         | Merck<br>Chromolith<br>Performance<br>RP-8<br>endcapped |
| Octadecylsilan (ODS, C18), endcapped | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -<br>CH              |        | Apolare und mittelpolare Verbindungen                                     | L1         | Altmann<br>Reposil Pur<br>C18-AQ                        |
| Phenyl                               | -(CH <sub>2</sub> )<br>3-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> |        | Mittelpolare Verbindungen, ungesättigte Verbindungen                      | L11        | Altmann<br>Reposil 100<br>Phenyl                        |
| Phenyl-Hexyl                         | -(CH <sub>2</sub> )<br>6-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> |        | Ungesättigte Verbindungen, mittelpolare Verbindungen                      | L11        | Waters XTerra<br>Phenyl                                 |
| Pentafluorphenyl (PFP)               | -(CH <sub>2</sub> )<br>3-C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> |        | Ungesättigte Verbindungen, halogenierte Verbindungen, polare Verbindungen | L43        | Altmann<br>Reposil Fluosil<br>PFP                       |

Coreshell-Partikel ist die geringere Beladbarkeit gegenüber vollporösen Materialien.

### Monolithische Phasen:

Monolithische Säulen bestehen aus einem einzigen Stück porösen Materials, zum Beispiel Silicagel oder organisches Polymer. Somit besteht das chromatographische Bett nicht aus einzelnen Partikeln, sondern aus einem porösen Stab. Monolithen haben eine Trennleistung, die mit 3 µm gepackter Partikelsäulen vergleichbar ist [5]. Ein Nachteil ist, dass bei monolithischen Phasen bisher die Verfügbarkeit an Selektivitäten im Vergleich zu total porösen Materialien noch eingeschränkt ist [3].

### Gebundene Phase:

Die Vielfalt an verfügbaren stationären Phasen (Reversed Phase, Normal Phase, Phenylphasen...) diverser Hersteller trägt dazu bei, dass es nicht immer ganz einfach ist, schnell die passende HPLC Säule zu finden.

Für viele Analysen kann eine gängige Reversed Phase C18 Säule eingesetzt werden. Um zu entscheiden, welche stationäre Phase geeignet ist, sollte im ersten Schritt das zu untersuchende Molekül betrachtet werden. Will man ein sehr polares Molekül analysieren, dann besteht die Möglichkeit, dass es nicht mit dem C18 Material wechselwirkt und somit in der Totzeit eluiert. Für diesen Fall sind dann zum Beispiel C4-, CN-, Diol- oder Phenylphasen geeignet. Wenn der Analyt hingegen zu unpolar ist, kann er irreversibel an dem Material haften und somit nicht mehr von der Säule eluiert werden. Um dies zu vermeiden, kann man eine Silica-, CN- oder NH<sub>2</sub>-Phase ausprobieren. Dies passiert meistens wenn der Analyt nur in Heptan oder Hexan löslich ist [4].

Ist die Entscheidung für die Phase getroffen, ist die erste Hürde genommen. Nun wird es jedoch noch komplizierter, da man sich zwischen verschiedenen Dimensionen und Spezifikationen für die zu verwendende Säule wie Partikelgröße, Porengröße, Innendurchmesser, Durchmesser und Kohlenstoffgehalt entscheiden muss.

### Partikelgröße

Kleinere Partikelgrößen ergeben eine bessere Auflösung als größere Partikel. Größere Partikel erzeugen hingegen einen geringeren Rückdruck im HPLC-System. Eine einheitliche Partikelgrößenverteilung ist neben der Größe des Partikels besonders wichtig. Durch einen erhöhten Anteil an kleinen Partikeln wird der Gegendruck erhöht; wenn zu viele größere Partikel enthalten sind verliert das Material Trennleistung durch eine geringere Bodenzahl. Hat man eine breite Partikelgrößenverteilung lässt sich das Material

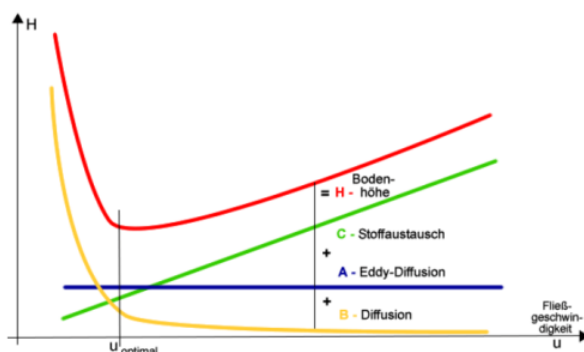


Abb. 1: Terme der Van-Deemter-Gleichung [1]

### Van-Deemter-Gleichung:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \times v$$

außerdem schlechter packen [3]. Die Größe des Teilchens hat Einfluss auf die Güte der Auflösung, da die Größe der Teilchen den A- und den C-Term der Van-Deemter-Gleichung beeinflusst.

Optimale Trennleistung erhält man bei möglichst kleiner Bodenzahl, dadurch wird die Gesamtzahl der Trennböden in der Säule erhöht. Vor allem wenn der A- und C-Term minimiert werden kann, besteht die Möglichkeit über einen großen Flussbereich eine gute Trennleistung zu erreichen.

Tab. 2: Säulenauswahltool Biomoleküle [7]

| MW     | Å   | C18 | C8  | C4  |
|--------|-----|-----|-----|-----|
|        | 120 | +++ | ++  | +   |
| >5000  | 200 | ++  | +++ | ++  |
| >20000 | 300 | +   | ++  | +++ |

(+++)= sehr gut, (++)= gut, (+)= mässig

### Porengröße

Die zu verwendende Porengröße hängt von der Größe des zu analysierenden Moleküls ab: je größer das Molekül, desto größer sollten die Poren sein. Porengrößen werden meist in Å angegeben, dabei entsprechen 10 Å = 1 nm. Für kleine Moleküle kann eine

Tab. 3: Klassifikation HPLC Säulen nach Dimension [6]

|                          | Innendurchmesser (mm) | Länge (mm)        | Flußrate (ml/min) | Probenmenge (µg) |
|--------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Präparativ               | >25                   | 300 oder größer   | >20               | >25000           |
| Semi-Präparativ          | 10                    | 250 oder größer   | 5-10              | 10000-20000      |
| Analytisch Konventionell | 3;4; 4.6              | 50; 100; 150; 250 | 0.5-2             | 50-200           |
| Analytisch Narrowbore    | 2;2.1                 | 50; 100; 150; 250 | 0.2-0.5           | 20-100           |

Säule bis zu 120 Å verwendet werden, für große Biomoleküle sind zum Beispiel Säulen mit Porengrößen von 300 Å geeignet [3]. Für Biomoleküle ist die Auswahl der richtigen Porengröße besonders wichtig, da es sie in einem breiten Größenbereich gibt. Je kleiner die Pore, desto mehr Oberfläche und Wechselwirkungsmöglichkeiten hat die Phase. Dadurch kann sie höher beladen werden [3].

### Innendurchmesser/Länge

Je nach Art der Analyse und Menge der zu analysierenden Substanz sollte die Dimension der HPLC-Säule gewählt werden. Auch die verwendete HPLC-Anlage limitiert die Vielfalt der zur Verfügung stehenden Dimensionen [6].

### Fazit

Es ist nun klar, dass bei der Auswahl einer passenden HPLC-Säule viele verschiedene Parameter zu beachten sind. Es gibt auch meist nicht die eine richtige Säule, sondern man hat oft eine Vielzahl an Optionen, die für die Analyse passend sein könnten. Werden die Säulenparameter gezielt für die Analyten ausgewählt und beachtet man dabei die instrumentelle Ausstattung, kann man davon ausgehen, eine geeignete chromatographische Trennung zu erhalten.

Sollten Sie dennoch einmal unsicher bei der Säulenauswahl sein, dann beraten unsere Produktspezialisten von Altmann Analytik sie sehr gerne. Wir machen Ihnen unverbindlich Säulenvorschläge diverser Hersteller je nach Trennproblem. Manchmal besteht auch die Möglichkeit eine kostenlose Testsäule zu bekommen, sprechen Sie uns einfach an.

**Literaturverzeichnis**

- [1] ChemgaPedia, 2016. Van Deemter. Available at: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie\\_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saulen\\_chr/deemter/van\\_deemterm57ht0500.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saulen_chr/deemter/van_deemterm57ht0500.vscml.html) [Accessed February 2, 2016].
- [2] HPLC-Säule, 2016. HPLC. Available at: <http://hplc-saeule.de/rp-hplc-mit-gebundenen-phasen/>.
- [3] Kromidas, S., 2014. *Der HPLC Experte*, Weinheim: Wiley-VDH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [4] Kromidas, S., 1997. *HPLC-Tipps*, Saarbrücken: Hoppstedt Publishing GmbH, Darmstadt.
- [5] Meyer, V.R., 2009. *Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* 10th ed., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [6] Moldoveanu, S.C. & David, V., 2013. *Essentials in Modern HPLC Separations* 1st ed., Elsevier.
- [7] YMC, 2015. YMC America. Available at: <http://www.ymcamerica.com/capillary-ic/capillary-ic-bioseparations.htm> [Accessed July 23, 2015].