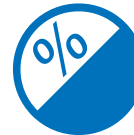
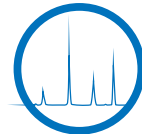


**(U)HPLC
TROUBLE
SHOOTING**



INHALT

- 1. GENERELLES VORGEHEN BEIM (U)HPLC TROUBLESHOOTING**
- 2. PROBLEME IN DER (U)HPLC UND IHRE URSACHEN / BEHEBUNG**
 - 2.1. Rückdruckveränderung
 - 2.2. Peakform / -Symmetrie
 - 2.3. Retentionszeit und Auflösung
 - 2.4. Basislinie und Peakwiederfindung
- 3. SÄULENREGENERATION**
- 4. PRÄVENTIVE MASSNAHMEN ZUR PROBLEMVERMEIDUNG**



1. GENERELLES VORGEHEN BEIM (U)HPLC TROUBESHOOTING

Wer kennt das nicht?

Auf einmal sind die erhaltenen chromatographischen Ergebnisse nicht mehr wie zuvor.

Es treten z.B. Peakveränderungen, wie Splitting oder Tailing auf, es kommt zu Retentionszeitverschiebungen oder es wird sogar nichts mehr detektiert.

Dann heißt es die Ursache für die Anomalie zu finden und zu beheben. Da die Chromatographie von vielen, sehr unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird, sollte man alle involvierten Komponenten bzw. Variablen systematisch überprüfen.

Als Workflow bietet sich das systematische Überprüfen folgender Parameter an; das jeweilige Vorgehen wird im Laufe dieses Dokuments genauer beschrieben:

System

- **Pumpe** (*Konstanter Fluss? Druckschwankungen?*)
- **Autosampler** (*Kontamination in der Injektionsnadel? Korrekte Injektion?*)
- **Detektor** (*UV-Lampe beschädigt?*)
- **Säulenofen** (*Korrekte Temperatur?*)
- **Kapillare** (*Einwandfreie Verbindung? Passende Fittinge? Totvolumen?*)

Eluenten

- **Eluenten Lösungsmittel und Puffersalze**
(*Herstellerwechsel? Unterschiedliche Produktionslots?*)
- **pH-Wert, pH-Wert-Einstellung**
(*Veränderter pH-Wert? Tatsächlicher pH? Wie wird der pH-Wert eingestellt?*)

Probe

- **Probe Veränderte Probe**
(*Produktionsänderung? Zusammensetzung? Konzentration?*)
- **Lösungsmittel der Proben**
(*Einfluss der Elutionsstärke auf die LC?*)

(Vor)-Säule

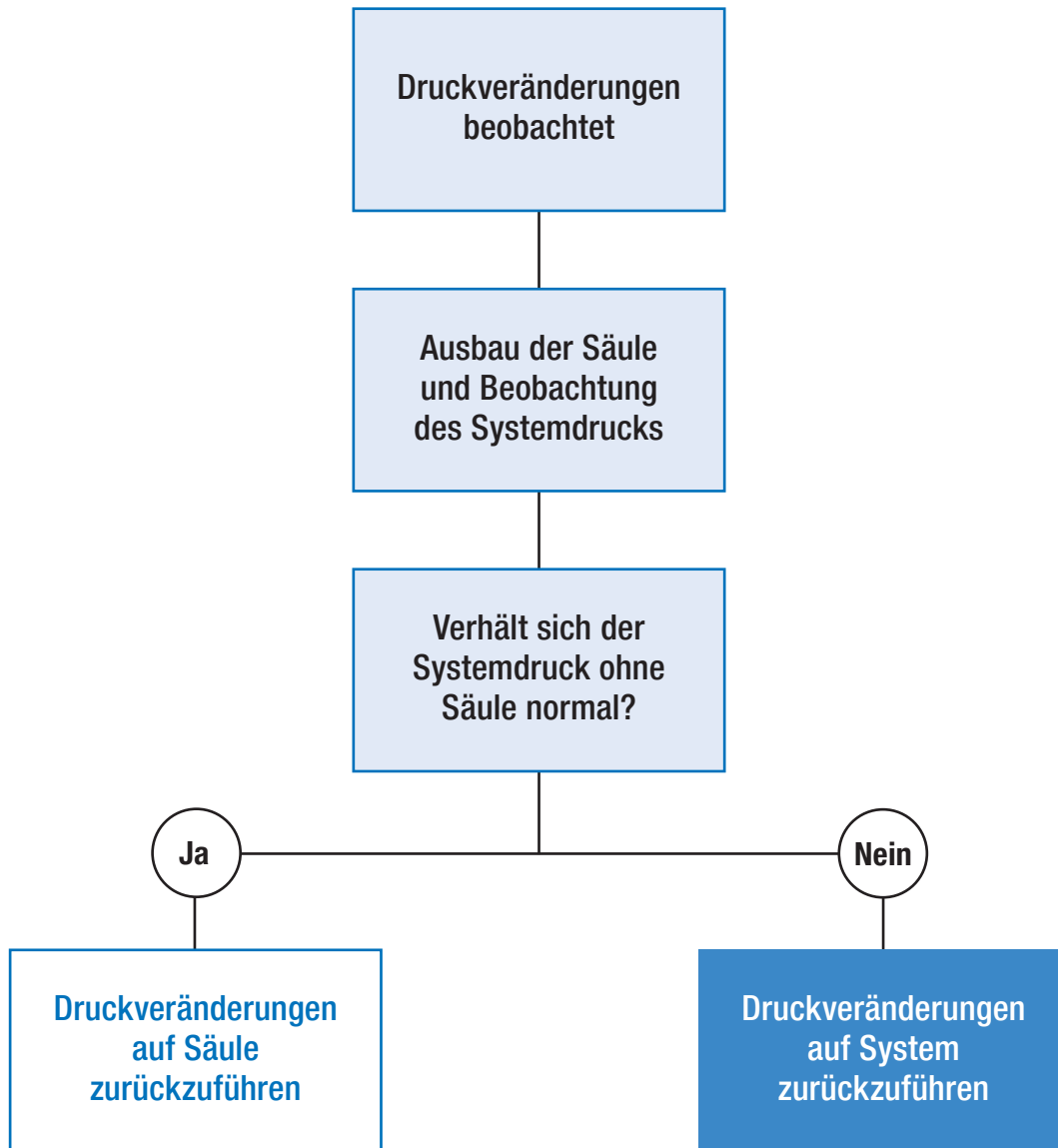
- **Vorsäule** (*Alterung? Austausch notwendig?*)
- **Säule geeignet für die Methode** (*pH? Temperatur? Eluent?*)
- **Säulenverbindung** (*Inlet und Outlet einwandfrei verbunden? Passende Ferrule?*)
- **Säulenhistorie** (*Injektionen? Vorkonditionierung der Säule?*)



2. PROBLEME IN DER (U)HPLC UND IHRE URSACHEN / BEHEBUNG

2.1. Rückdruckveränderung

Die Ursachen für eine Änderungen im Rückdruck sind häufig auf einen fehlerhaften Umgang mit den Proben und Lösungsmitteln zurückzuführen, der letztendlich in einer Blockierung oder Kontamination von Systemkomponenten und Säule resultiert.





Kein Druck / zu niedriger Druck

Mögliche Ursachen	Lösung
Unterdruckbildung im Eluentenvorratsgefäß	<ul style="list-style-type: none">• Unterdruckbildung beim Vorratsgefäß vermeiden, Verwendung von Ausgleichsventilen im Deckel der Eluentenflaschen, Puffer tagesfrisch ansetzen
Undichtigkeiten an Kolbendichtungen oder Ventilen der Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Dichtigkeit überprüfen, ggf. austauschen
Luft oder Partikel im Pumpenkopf oder Ventilen der Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Spülen (Purgen) der Pumpe mit Wasser oder IPA; Wasser oder IPA mithilfe einer Spritze durch die abgestellte Pumpe fördern
Leckage	<ul style="list-style-type: none">• Verschraubungen und Kapillaren überprüfen und ggf. austauschen

Druckanstieg / zu hoher Druck

Mögliche Ursachen	Lösung
Verstopfung von Injektor oder Kapillarwegen	<ul style="list-style-type: none">• Injektor reinigen, verstopfte Zuleitungen reinigen oder ggf. austauschen
Verunreinigung von Wasser / Puffer durch Algen / Bakterien	<ul style="list-style-type: none">• Puffer tagesfrisch ansetzen
Blockierte Vorsäule oder Einlassfritte der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen
Kontamination der stationären Phase	<ul style="list-style-type: none">• Säule mit starkem Lösungsmittel waschen• Säulenregenerierungsvorschläge des Herstellers zu Rate ziehen• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen

Druckschwankungen

Mögliche Ursachen	Lösung
Undichtigkeiten an Kolbendichtungen oder Ventilen der Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Dichtigkeit überprüfen, ggf. austauschen
Luft oder Partikel im Pumpenkopf oder Ventilen der Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Spülen (Purgen) der Pumpe mit Wasser oder IPA; Wasser oder IPA mithilfe einer Spritze durch die abgestellte Pumpe fördern, überprüfen und ggf. austauschen



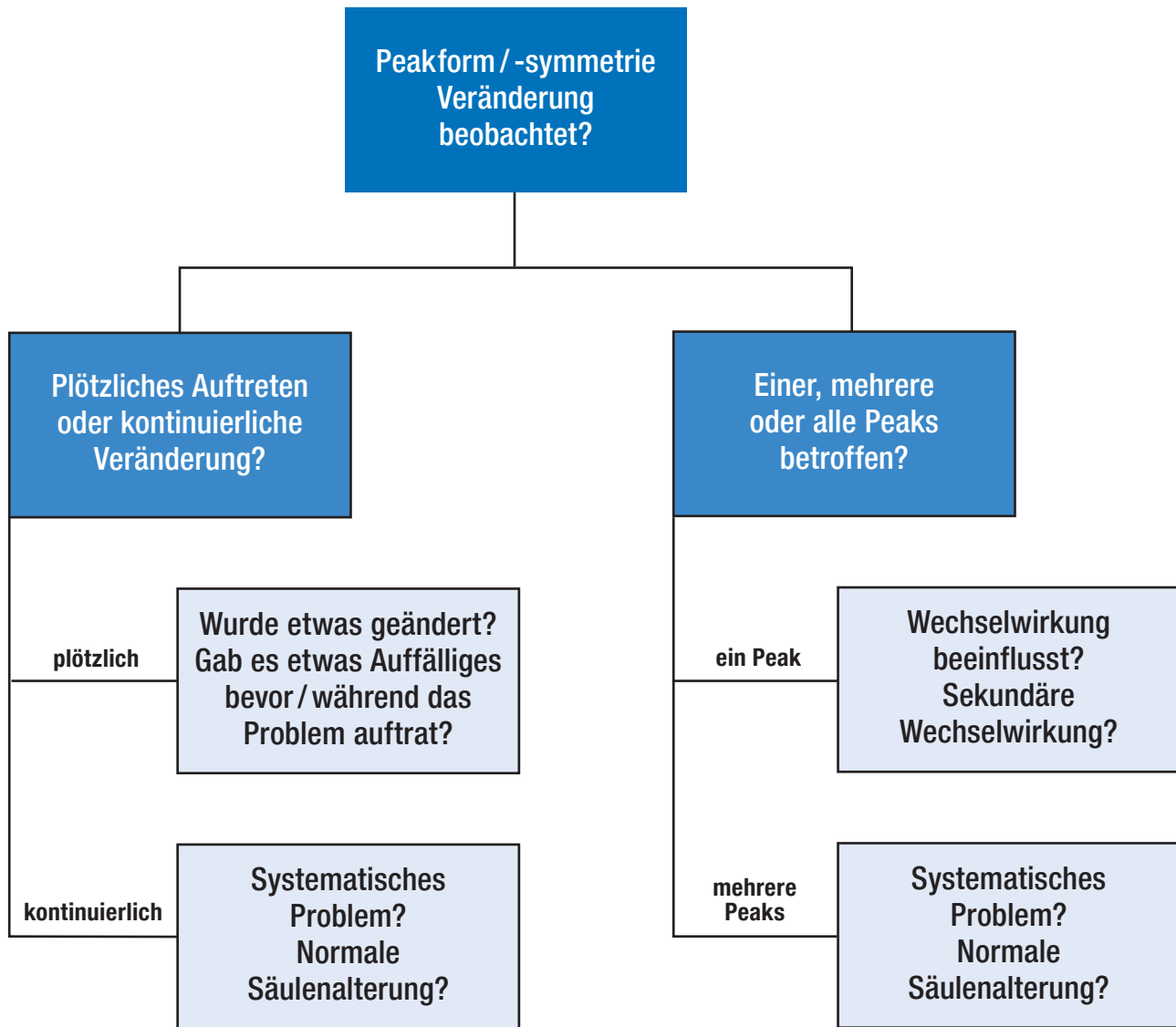
2. PROBLEME IN DER (U)HPLC UND IHRE URSACHEN / BEHEBUNG

2.2. Peakform und -Symmetrie

In den meisten Fällen sind systematische Fehler in den Methodenbedingungen, unpassende Auswahl der Trennsäule oder des Lösungsmittels oder normale Säulenalterung für die Veränderung der Peakform verantwortlich.

Die mit Abstand häufigste Ursache ist die Verwendung eines zu starken oder ungeeigneten Injektionslösungsmittels, sowie ein zu großes Injektionsvolumen.

Die typischen Symptome sowie mögliche Ursachen und Lösungen sind in folgender Tabelle aufgeführt und treten meist in Kombination mit anderen Auffälligkeiten im Chromatogramm auf (z.B. Veränderung von Druck oder Retentionszeit).





Peakverbreiterung

Mögliche Ursachen	Lösung
Zu großes Injektionsvolumen	<ul style="list-style-type: none">• Kleineres Volumen injizieren
Detektionsrate zu niedrig	<ul style="list-style-type: none">• Rate erhöhen
Zu lange Retentionszeiten	<ul style="list-style-type: none">• Gradientenelution• Verwendung eines anderen Lösungsmittels mit stärkerer Elutionskraft
Zu hohe Viskosität des Laufmittels	<ul style="list-style-type: none">• Verwendung eines anderen Lösungsmittels• Erhöhen der Temperatur, Verwendung von Lösungsmittel-Vorwärmer
Kontamination der stationären Phase	<ul style="list-style-type: none">• Säulentemperatur erhöhen• Säule mit starkem Lösungsmittel waschen• Säulenregenerierungsvorschläge des Herstellers zu Rate ziehen• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen

Fronting

Mögliche Ursachen	Lösung
Überladung der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Injektionsvolumen oder Probenkonzentration verringern• Verwendung einer Säule mit größerem ID• Verwendung einer stationären Phase mit größerer Oberfläche
Zu hohe Viskosität der Probe oder mobilen Phase	<ul style="list-style-type: none">• Erhöhen der Temperatur• Wechsel auf andere mobile Phase• Injektionsvolumen oder Probenkonzentration verringern
Kontamination der stationären Phase	<ul style="list-style-type: none">• Säule mit starkem Lösungsmittel waschen• Säulentemperatur erhöhen• Säulenregenerierungsvorschläge des Herstellers zu Rate ziehen• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen
Injektornadelspülung nicht kompatibel/zu stark	<ul style="list-style-type: none">• Lösungsmittelstärke reduzieren• Injektorschleife mit kleinerem Volumen verwenden



Tailing

Mögliche Ursachen	Lösung
Wechselwirkungen mit Silanolgruppen bei basischen Analyten	<ul style="list-style-type: none">• pH-Wert der mobilen Phase reduzieren (pH 2-3)• Erhöhen der Ionenstärke der Eluenten• Wechsel auf eine inerte Trennsäule• Verwenden von Ionenpaar-Reagenzien
Totvolumen	<ul style="list-style-type: none">• Säule neu packen, wenn möglich• Säule austauschen
Alterung des Packmaterials durch zu hohe Temperaturen	<ul style="list-style-type: none">• Säule austauschen
Blockierte Vorsäule oder Einlassfritte der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen
Falscher pH-Wert der mobilen Phase	<ul style="list-style-type: none">• pH-Wert an die stationäre Phase und Analyten anpassen
Koeluierender Analyt	<ul style="list-style-type: none">• Optimierung der Probenvorbereitung• Optimierung der Methodenparameter• Optimierung von mobiler oder stationärer Phase
Kontamination der stationären Phase	<ul style="list-style-type: none">• Verwenden einer längeren Säule• Säule mit starkem Lösungsmittel waschen• Säulenregenerierungsvorschläge des Herstellers zu Rate ziehen• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen

Doppelpeaks

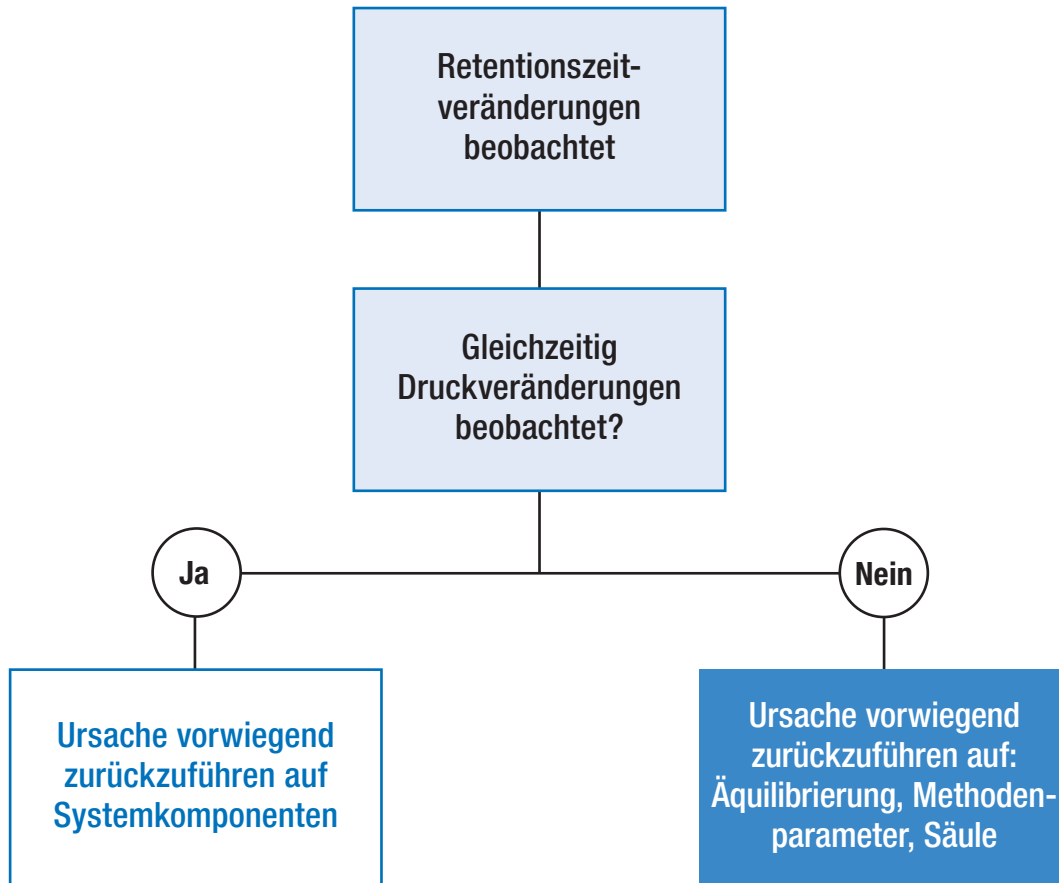
Mögliche Ursachen	Lösung
Blockierte Vorsäule oder Einlassfritte der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Säule rückspülen (wenn erlaubt)• Säule austauschen
Überladung der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Injektionsvolumen oder Probenkonzentration verringern• Verwendung einer Säule mit größerem ID
Ungeeignetes Injektions-Lösungsmittel	<ul style="list-style-type: none">• Injektion in schwächerem Lösungsmittel• pH des Lösungsmittels an den des Eluenten anpassen• Verwenden eines stärkeren Eluenten
Totvolumen	<ul style="list-style-type: none">• Säule neu packen, wenn möglich• Säule austauschen
Elution einer zweiten Probenkomponente	<ul style="list-style-type: none">• Optimierung der Probenvorbereitung• Optimierung der Methodenparameter• Optimierung von mobiler oder stationärer Phase• Verwenden einer längeren Säule
Carry-Over der letzten Analyse	<ul style="list-style-type: none">• Reinigung der Säule und des Systems• Verwendung von inerter stationärer Phase und inerter Säulenhardware



2. PROBLEME IN DER (U)HPLC UND IHRE URSACHEN / BEHEBUNG

2.3. Retentionszeit und Auflösung

Eine Veränderung der Retentionszeiten und Auflösung geht häufig mit einer Änderung der Peaksymmetrie und Effizienz einher. Diese Symptome gehören zu einer normalen Alterung der Trennsäule, können aber auch durch Leckagen im System, Probleme mit dem Injektor, instabiler Temperatur und Kontamination oder Beschädigung der stationären Phase durch ungeeignete Methodenparameter hervorgerufen werden.





Retentionszeit ist verkürzt

Mögliche Ursachen	Lösung
Überladung der Säule (einhergehend mit zu hohen / breiten Signalen)	<ul style="list-style-type: none">• Reduzierung des Injektionsvolumens• Oder stärkere Verdünnung der Probe• Größeren Innendurchmesser wählen
Alterung der Phase / Phase beschädigt durch harsche Bedingungen	<ul style="list-style-type: none">• Innerhalb der beschriebenen Spezifikationen arbeiten• Säule austauschen• Durchgängiges Arbeiten am Limit der Spezifikationen verkürzt die Lebensdauer Ihrer Säule
Kontamination der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Säule rückspülen (wenn erlaubt)
Erhöhte Flussrate	<ul style="list-style-type: none">• Flussregelung überprüfen
Bei nicht wasserstabilen Phasen in hochwässrigen Eluenten: Schlechte Hydratisierung der Phase	<ul style="list-style-type: none">• Spezielle wasserstabile Phasen verwenden• Lange Äquilibrierung konventioneller Phasen

Retentionszeit ist verlängert

Mögliche Ursachen	Lösung
Veränderung der Eluentenzusammensetzung	<ul style="list-style-type: none">• Mischsystem überprüfen• Vorratsgefäße abdecken um Verdampfen von Komponenten zu vermeiden
Reduzierte Flussrate	<ul style="list-style-type: none">• Flussregelung überprüfen

Verschiebung der Retentionszeit in eine Richtung

Mögliche Ursachen	Lösung
Leckage der Pumpendichtung	<ul style="list-style-type: none">• Pumpendichtung ersetzen
Überladung der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Geringere Konzentration / Menge aufgeben
Unzureichende Äquilibrierung	<ul style="list-style-type: none">• Äquilibrieren / mit 10 Säulenvolumina spülen



Retentionszeit schwankt / willkürliche Verschiebung

Mögliche Ursachen	Lösung
Schwankende Temperatur	<ul style="list-style-type: none">• Konstanz der Temperatur gewährleisten• Für optimale Ergebnisse auch mobile Phase vorheizen
Unzureichende Lösungsmittelvermischung	<ul style="list-style-type: none">• Gradientensystem überprüfen,• ggf. Preheater verwenden (Mischkammer)
Falsche Pufferkonzentration oder pH-Wert	<ul style="list-style-type: none">• pH-Wert überprüfen• ggf. Puffer neu ansetzen
Unzureichende Äquilibration	<ul style="list-style-type: none">• Äquilibrieren / mit 10 Säulenvolumina spülen
Von einem System zum anderen: Unterschied in der Verweilzeit	<ul style="list-style-type: none">• auf initialem System mit ursprünglichen Bedingungen wiederholen
Leckagen	<ul style="list-style-type: none">• nach Leckagen suchen und abdichten
Ventil an Pumpe defekt	<ul style="list-style-type: none">• Ventile überprüfen und ggf. austauschen
Luft in der Pumpe, Luft in der mobilen Phase	<ul style="list-style-type: none">• ggf. Dichtung tauschen
Gradient valve / proportioning valve / MCGV Leckage (mit Niederdruck-Mischern, ternären und quaternären Systemen)	<ul style="list-style-type: none">• alle Kanäle der mobilen Phase mit IPA für 1 Stunde spülen• ggf. Dichtungen tauschen

Verlust der Auflösung

Mögliche Ursachen	Lösung
Kontaminierte mobile Phase	<ul style="list-style-type: none">• Mobile Phase neu ansetzen (regelmäßig wechseln, um Kontamination zu vermeiden)
Blockierte Vorsäule	<ul style="list-style-type: none">• Vorsäule wechseln (bei Änderungen der Retention / Auflösung frühzeitig Vorsäule wechseln, um Kontamination der Hauptsäule zu vermeiden)
Alterung der Phase	<ul style="list-style-type: none">• Regelmäßiges Spülen und arbeiten innerhalb der Spezifikationen beugt verfrühter Alterung vor• Säule wechseln



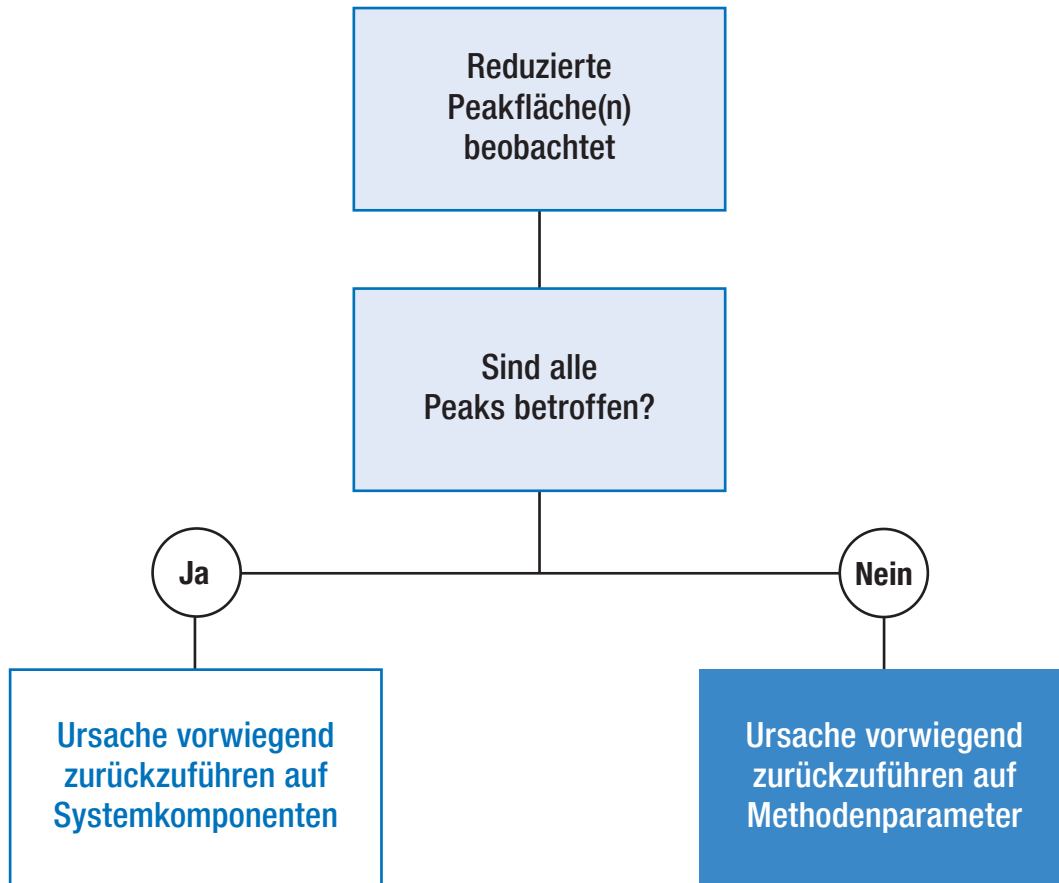
2. PROBLEME IN DER (U)HPLC UND IHRE URSACHEN / BEHEBUNG

2.4. Basislinienveränderungen und Peakwiederfindung

Driftende oder rauschende Basislinien können eine Integration der Peaks erschweren und verringern das Signal-zu-Rauschen Verhältnis und damit die Sensitivität der Methode.

Die häufigsten Ursachen hierfür sind in den Komponenten und Einstellungen der verwendeten Detektoren oder in einer Veränderung der Eluenten zu finden und sind damit relativ leicht behoben.

Aber auch eine ungeeignete stationäre Phase oder Säulenhardware kann zum Verlust der Signale oder zu Geisterpeaks und Carry-Over führen.





Spikes

Mögliche Ursachen	Lösung
Luftblasen in mobiler Phase	<ul style="list-style-type: none">• Entgasung der mobilen Phase• Degaser im System überprüfen• Dichtigkeit der Anschlüsse überprüfen
Luft in der Säule	<ul style="list-style-type: none">• Säulen immer verschlossen lagern

Drift zu höherem Signal

Mögliche Ursachen	Lösung
Anreicherung und Elution von Verunreinigungen	<ul style="list-style-type: none">• Probenvorbereitung optimieren• Lösungsmittel mit HPLC-Qualität verwenden• Reinigung der Säule• ggf. Dichtungen tauschen
Viskosität der mobilen Phase zu hoch	<ul style="list-style-type: none">• Lösungsmittel mit niedriger Viskosität verwenden• Säulentemperatur erhöhen
Bei Gradienten: zunehmende Komponente B zeigt starke UV-Absorption	<ul style="list-style-type: none">• Nicht / niedrig UV-absorbierende Lösungsmittel verwenden

Drift zu geringerem Signal

Mögliche Ursachen	Lösung
Bei Gradienten: abnehmende Komponente A zeigt starke UV-Absorption	<ul style="list-style-type: none">• Nicht / niedrig UV-absorbierende Lösungsmittel verwenden

Rauschen

Mögliche Ursachen	Lösung
Wellenartig: Temperaturschwankungen im Raum	<ul style="list-style-type: none">• Konstanz der Umgebungstemperatur gewährleisten (Säulenofen, Isolation der Säule)
Dauerrauschen: Detektorlampe defekt oder Detektorzelle verschmutzt	<ul style="list-style-type: none">• Lampe austauschen• Zelle reinigen
Regelmäßiges Rauschen: Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Pumpe reinigen• Luft aus Pumpe entfernen
Willkürliches Rauschen: Verunreinigungen	<ul style="list-style-type: none">• Probenvorbereitung optimieren• Reinigung der Säule• Lösungsmittel mit (U)HPLC-Qualität verwenden
Spikes: Luft im Detektor, Eluenten oder der Pumpe	<ul style="list-style-type: none">• Auf Luftblasenfreiheit achten• Luft entfernen



Negativpeak

Mögliche Ursachen

RI-Detektor:
Brechungsindex der Analyten ist geringer
als von mobiler Phase

UV-Detektor: Absorption der mobilen Phase
ist höher als die vom Analyten

Lösung

- Umkehr der Polarität des Detektors
- Anpassung der mobilen Phase

Peakflächen sind reduziert

Mögliche Ursachen

**Probenverlust durch Leckage
am Injektor, an Kapillaren
oder Verschraubungen**

**Verringerte Messintensität des Detektors
durch kontaminierte oder beschädigte
Flusszelle / gealterte UV-Lampe**

Zu geringes Injektionsvolumen

Eluent zeigt zu hohe Absorption

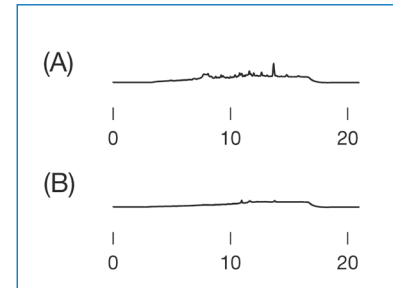
Verschmutzungen am Detektor

**Fluoreszenz-Detektor:
Unzureichende Lösungsmittel-Entgasung**

Lösung

- Injektorbauteile prüfen (Ventil und Nadel)
Verschraubungen und Kapillaren überprüfen
und ggf. austauschen
- Flusszelle reinigen
- Lampe überprüfen und austauschen
- Injektionsvolumen anpassen
- Lösungsmittel mit (U)HPLC Qualität verwenden
- Detektor reinigen
- Entgaser reinigen
- Flussrate reduzieren

Geisterpeaks



Mögliche Ursachen

**Stark adsorbierende
Verunreinigungen in Probe**

**Ungeeignete Qualität des Wassers
oder organischen Lösungsmittels**

Oxidation von Trifluoressigsäure

**Mikrobiologisches Wachstum
in Eluentenbehältern oder System**

Zusätzliche Analyten in Probe

Carry-Over der letzten Analyse

Luftblasen in mobiler Phase

Lösung

- Optimierung der Probenvorbereitung
- Reinigung der Säule
- Wasser / Lösungsmittel mit (U)HPLC-Qualität verwenden
- Reinigung der Säule
- Lösungen tagesaktuell ansetzen
- Lösungen tagesaktuell ansetzen
- Reinigung des Systems und der Säule
- Reinigung der Säule und des Systems
- Verwendung von inerter stationärer Phase und inerter Säulenhardware
- Entgasen der Lösungsmittel



3. SÄULENREGENERATION

Ablagerungen auf der stationären Phase sind ein häufiger Grund für eine Beeinträchtigung der Säulenleistung. Dies äußert sich vor allem durch:

- **einen erhöhten Rückdruck,**
- **verschobene Retentionszeiten**
- **deformierte Peaks**

Um Ablagerungen zu verhindern, werden der Einsatz von Vorsäulen und eine entsprechende Probenvorbereitung wie beispielsweise Filtration empfohlen.

Sowohl zur Vorbeugung als auch dann, wenn es bereits zu einer Adsorption von Material auf der stationären Phase gekommen ist, sind Spülschritte eine effektive Maßnahme zur Regeneration der Säule. Das Spülen sollte immer gegen die Flussrichtung durchgeführt werden, da sich die Verunreinigung meist noch am Säuleneingang befindet und so leichter herausgespült werden kann. Als ausreichende Spülmenge sind mindestens 20 Säulenvolumen mit einem geeigneten Lösungsmittel empfehlenswert.

Bei der Auswahl der Lösungsmittel sollten die Eigenschaften der Verunreinigung sowie die Beständigkeit der Säule beachtet werden. In folgender Übersicht sind geeignete Lösungsmittel in Abhängigkeit von verschiedenartigen Verunreinigungen aufgeführt.

Die Effizienz der Reinigung kann durch erhöhte Temperatur gesteigert werden.

Je nach eingesetztem Lösungsmittel und unter Berücksichtigung der Beständigkeit der stationären Phase sind 40 °C – 90 °C hierfür einsetzbar.

Weitere Empfehlungen können auch den Anweisungen der Säulenhersteller entnommen werden, zum Beispiel den „[Care and Use Instructions](#)“.

Verunreinigung durch verschiedene Substanzen

Salze

- Wasser und wässrige organische Lösungen

unpolare Substanzen

- Acetonitril
- Isopropanol
- Tetrahydrofuran
- Dichlormethan
- Chloroform

polare Substanzen

- Wasser und wässrige organische Lösungen
- Methanol
- Tetrahydrofuran

Proteine

- Injektion von Dimethylsulfoxid
- Gradient von 10% auf 90% B mit A = 0,1% TFA in Wasser und B = 0,1% TFA in Acetonitril



4. PRÄVENTIVE MASSNAHMEN ZUR PROBLEMBEREINIGUNG

Generell gilt:

- **Regelmäßig System, Säule, Injektor spülen**
- **Verschleißteile wie Filter, Fritten, Dichtungen regelmäßig wechseln**

um Kontamination zu vermeiden.

Zudem kann das Führen eines Säulenlogbuches die Fehlersuche stark erleichtern.

Wir empfehlen neben der Identität der verwendeten Säule, Anzahl der Injektionen und dem resultierenden Rückdruck auch die verwendeten Analyten und Methoden aufzuführen und regelmäßig durch eine Testmethode die Qualität der Trennsäule an den erhaltenen Ergebnissen zu bewerten.

Es sollten auch Notizen aufgeführt werden, die den Wechsel der Eluenten, Fehler im System oder andere Auffälligkeiten hervorheben. So kann nicht nur eine möglicherweise Tage oder Wochen andauernde Fehlersuche in wenigen Minuten abgeschlossen sein, sondern auch der Produktivitätsgewinn nach einer Optimierung Ihrer Methodenparameter verfolgt werden.

Verwendung einer Vorsäule

Die Verwendung einer Vorsäule oder eines Vorsäulensystems schützt die Hauptsäule vor Kontamination, indem diese schon auf der Vorsäule adsorbiert werden.

Dadurch wird vermieden:

- **Vorzeitige Alterung der Trennsäule**
- **Retentionszeitverschiebung**
- **Peakdeformation etc.**
- **Totvolumen in der stationären Phase durch Druckpulse**

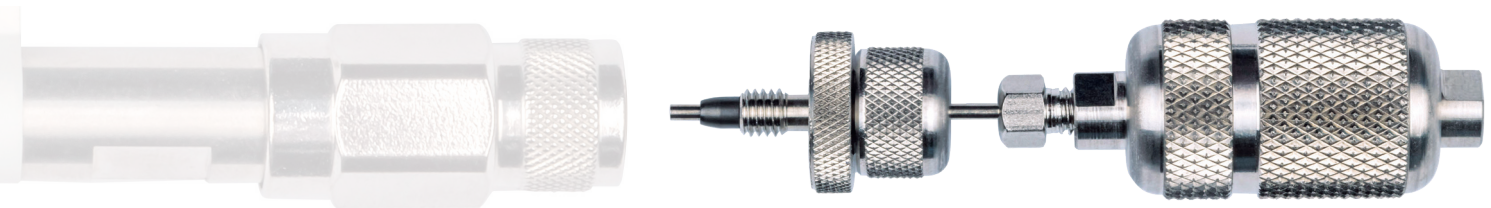


ABBILDUNG 1: UNIVERSELLER VORSÄULENHALTER MIT VORSÄULE.

Vorsäulen sollten regelmäßig gewechselt werden, bspw. wenn der Druck steigt.

Mit einer allgemeinen Testmethode können Auflösung, Peaksymmetrie und Rückdruck aufgezeichnet und der Status von Säule und Vorsäule kontrolliert werden.



Totvolumenfreies Verbinden

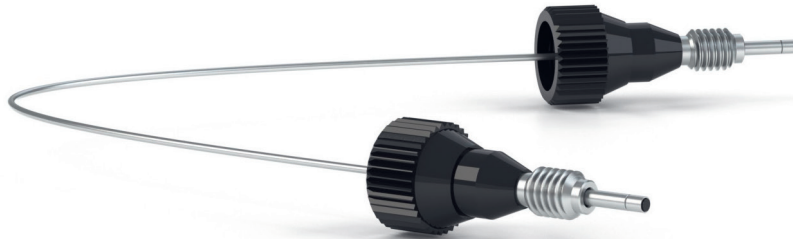


ABBILDUNG 2: MARVELXACT TOTVOLUMENFREIER UNIVERSSELLER (U)HPLC-VERBINDER.

Totvolumina führen vor allem in UHPLC-Anwendungen zu Bandenverbreiterung. Um breite Peaks zu vermeiden, können totvolumenfreie Universalverbinder wie der MarvelXACT verwendet werden. Außerdem sollten alle Kapillaren im System so kurz wie möglich gehalten werden.

Probe und Eluenten filtern

Probe und Eluenten sollten vor der Verwendung durch einen Filter mit Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$ ($> 3\ \mu\text{m}$ Partikel) oder $0,2\ \mu\text{m}$ ($\leq 3\ \mu\text{m}$ Partikel) filtriert werden.

Schutz vor:

- **Blockieren der Fritte**
- **Kontamination der stationären Phase durch Partikel**
- **Peak Splitting**
- **Fronting**
- **Tailing**
- **Erhöhtem Rückdruck**

Eluenten regelmäßig wechseln

Durch die Alterung der Eluenten (Bsp.: Biowachstum in wässriger Phase, Polymerisation von reinem Acetonitril) kann das System kontaminiert werden.

Austauschen der mobilen Phase wird empfohlen nach:

HPLC: spätestens 1 Woche

UHPLC: spätestens 3 Tagen

Eluenten entgasen

In Eluenten kann Luft eingeschlossen sein, welche zu Schwankungen der Retentionszeit führen kann. Deshalb sollten Eluenten immer entgast werden:

- Durch Auswaschen der Luft mit Helium (einmal täglich)
- Online-Vakuum-Degasser

Probenlösungsmittel auf mobile Phase abstimmen

Das Probenlösungsmittel kann einen starken Einfluss auf die Trennung haben, deshalb sollte Folgendes beachtet werden:

- Schwache Lösungsmittel für die Probe verwenden → **ansonsten Fronting früher Peaks**
- Starke pH-Unterschiede zwischen Probe und Eluent vermeiden → **ansonsten Peak Splitting**



Ausreichendes Äquilibrieren

Beim Äquilibrieren und Spülen einer Säule kommt häufig folgende Frage auf:

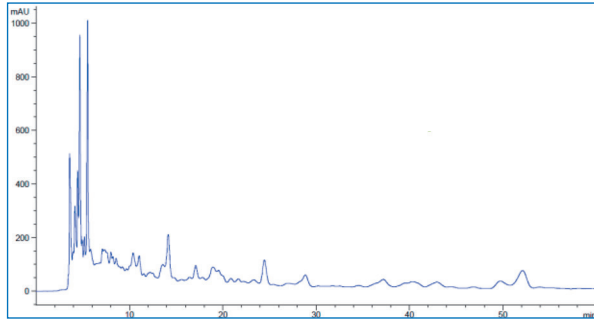
Wie lange muss die Säule gespült werden? Ist die (Re-)Äquilibrationsdauer zu kurz, riskiert man nicht reproduzierbare Ergebnisse z.B. durch Retentionszeitverschiebung. Im Zweifel gilt es bessere Spülzeiten anzuwenden.

Ein Praxisbeispiel:

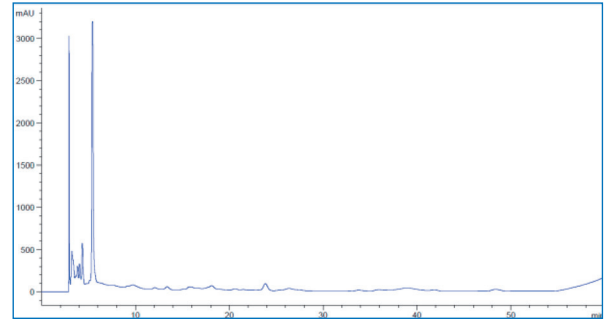
Eine YMC-Triart C8-Säule (Säulenvolumen 2,5 mL) wurde vor jedem Testzyklus mit 50 mL 100 % Acetonitril gespült. Ein Pflanzenextrakt wurde unter verschiedenen Bedingungen injiziert: Ohne vorherige Äquilibration, Äquilibration mit 1 Säulenvolumen, 5 Säulenvolumen (zu erwartenden Ergebnis) sowie mit 10 Säulenvolumina.

Die Äquilibration und isokratische Trennung erfolgte mit dem Eluenten: Wasser / Acetonitril (80 / 20).

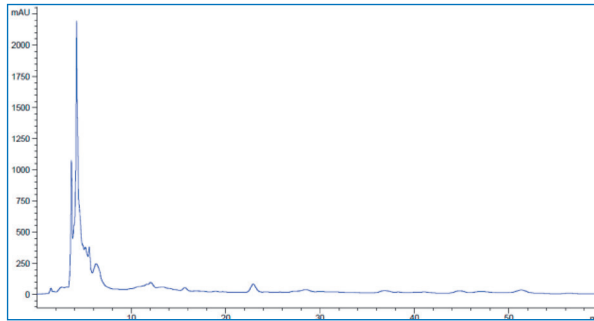
[Das Dwell Volumen der Anlage betrug 130 µL.]



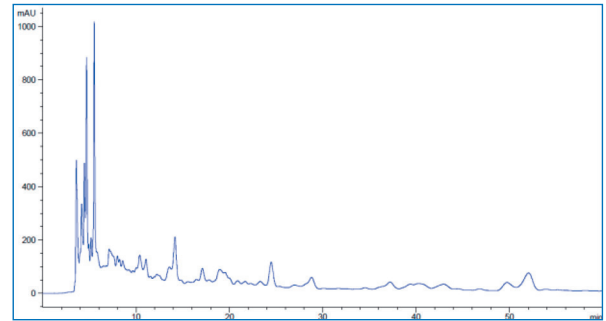
1. Zu erwartendes Trennergebnis.



2. Ohne vorherige Äquilibration.



3. Nach unzureichende Äquilibration.



4. Ausreichende Äquilibration.

Es ist gut zu erkennen, dass ohne ausreichende Äquilibration die Retentionszeiten deutlich nach vorne verschoben sind.

Äquilibriert man mit 5 Säulenvolumen (SV) oder 10 SV, sind die Ergebnisse dieser Applikation reproduzierbar.



Abschätzung der optimalen Einspülzeit

Wie kann die optimale Einspülzeit abgeschätzt werden?

→ Mit Hilfe des Säulenvolumens!

Das geometrische Säulenvolumen ist ein sehr hilfreiches Mittel zur Abschätzung des notwendigen Lösungsmittel-Volumens für Spül- und Äquilibrationsschritte in der HPLC- Eine wichtige Voraussetzung für reproduzierbare und valide Ergebnisse.

$$\text{Geometrisches Säulenvolumen [mL]} = \text{Länge [cm]} \times (\text{Radius [cm]})^2 \times \pi$$

Berechnung des Säulenvolumens

Beispiel:

Säule:	YMC-Triart C18
Säulendimension:	250 x 4.6 mm ID
Säulenvolumen [mL]	= 25 cm × (0,23 cm) ² × 3,14 = 4.2 cm ³

Tabelle 1: Übersicht über geometrische Säulenvolumina [mL] für ausgewählte Dimensionen

Ø [mm] \ L [mm]	50	75	100	150	250	300
2,0	0,2	0,2	0,3	0,5	0,8	0,9
3,0	0,4	0,5	0,7	1,1	1,8	2,1
4,6	0,8	1,2	1,7	2,5	4,2	5,0
6,0	1,4	2,1	2,8	4,2	7,1	8,5
8,0	2,5	3,8	5,0	7,5	12,6	15,1
10,0	3,9	5,9	7,9	11,8	19,6	23,6
20,0	15,7	23,6	31,4	47,1	78,5	94,2
30,0	35,3	53,0	70,7	106,0	176,7	212,1
50,0	98,2	147,3	196,3	294,5	490,9	589,0

Was ist sonst zu beachten?

Dwell Volumen

- Volumen des Systems bevor das Lösungsmittel die Säule erreicht
- Systemabhängig (Fragen Sie Ihren Hersteller)

Volumen der stationären Phase

- Korrekturfaktor (0,6–0,8) einrechnen
- Abhängig von stationärer Phase und Packdichte



Weiterbildungen und Seminare

Seit vielen Jahren vereint YMC theoretisches und praktisches Know-How in allen Bereichen der Flüssigchromatographie.

Nutzen Sie unser Seminarangebot und erweitern Sie Ihr Können!

Haben Sie spezifische Aufgabenstellungen, unterbreiten wir Ihnen gerne ein maßgeschneidertes Seminarpaket als anwenderspezifischen Workshop. Sie können unter anderem aus folgenden Themen auswählen:

- **HPLC Troubleshooting**
- **Grundlagen der HPLC**
- **Phasenauswahl**
- **Methodenentwicklung**

Ihr Gewinn:

Durch kleine Gruppengrößen und die Gestaltung durch zwei Referenten erwartet Sie ein interaktives Seminar in offener Atmosphäre. Dadurch können Ihre individuellen Fragestellungen gezielt diskutiert werden.

Weitere mögliche Themen sind gezielt auf praxisorientierte und aktuelle chromatographische Fragestellungen abgestimmt.

Wählen Sie Ihr Seminar aus:

- **Präparative Chromatographie – Methodenentwicklung und Scale-up**
- **Packen von Glassäulen – Labor- und Pilotmaßstab**
- **Methodenentwicklung in der chiralen Chromatographie**

Die Seminarunterlagen, ein Teilnahme-Zertifikat sowie die Verpflegung sind selbstverständlich inklusive!

Inhouse- und online Seminare – Den Ort bestimmen Sie!

Gerne heißen wir Sie zu einem Seminar bei uns im Haus oder online willkommen.
Wir kommen aber auch gern zu Ihnen!

Sie können nicht zu einem unserer Seminare anreisen?
Sie möchten, dass auch viele Ihrer Kolleginnen und Kollegen von unserem Angebot profitieren?
Sie erwarten ein speziell auf Sie zugeschnittenes Seminar?

Selbstverständlich können Sie alle unsere Angebote als Inhouse-Seminar oder online Kurs buchen.
Wählen Sie dabei aus unseren Seminarvorschlägen oder stellen Sie sich Ihre Themen selbst zusammen.

Termin, Ort und Teilnehmerzahlen können Sie mit uns flexibel abstimmen.
Wir beraten Sie gerne!

Ihre Vorteile:

- **Maßgeschneiderte Seminarinhalte und flexible Seminardauer**
- **Seminartermin und Ort nach Vereinbarung**
- **Teilnehmerzahl nach Vereinbarung**
- **Festpreis**

Was können wir für Sie tun? Sprechen Sie uns an.

Dr. Mathias Hehn
Head of Laboratories

Telefon +49 2064 280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail info@ymc.eu



Direkt Support

Sie haben eine dringende Fragestellung und benötigen sofortigen Support?

Unser Experten-Team steht Ihnen zur Verfügung!

Kontaktieren Sie uns per E-Mail (support@ymc.eu) oder rufen Sie uns an!

Dr. Friederike Becker

Director Marketing and Technology

Telefon +49 2064 427-280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail f.becker@ymc.eu

Dr. Kevin Brahm

Business Development Manager International

Telefon +49 2064 427-280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail k.brahm@ymc.eu

Dr. Mathias Hehn

Head of Laboratories

Telefon +49 2064 427-283

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail m.hehn@ymc.eu

Dr. Daniel Eßer

Product Manager Analytical Chromatography

Telefon +49 2064 427-280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail d.esser@ymc.eu

Ann Marie Rojahn

Product Specialist Analytical Chromatography

Telefon +49 2064 427-280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail a.rojahn@ymc.eu

Dr. Kirstin Arend

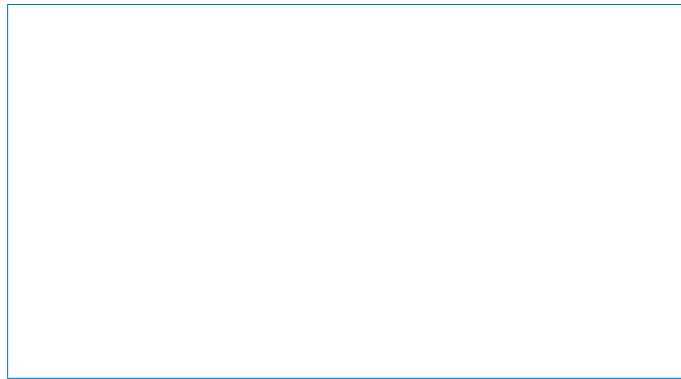
Product Specialist Analytical Chromatography

Telefon +49 2064 427-280

Telefax +49 2064 427-222

E-Mail k.arend@ymc.eu

Your local distributor:



YMC Europe GmbH

Schöttmannshof 19
D-46539 Dinslaken
Germany
Tel +49 2064 427-0, Fax +49 2064 427-222
www.ymc.eu

YMC Schweiz GmbH

Baslerstrasse 345
4123 Allschwil
Switzerland
Tel +41 6156180-50, Fax +41 6156180-59
www.ymc-schweiz.ch

YMC CO., LTD.

YMC Karasuma-Gojo Bld. 284 Daigo-cho,
Karasuma Nishiiru Gojo-dori Shimogyo-ku,
Kyoto 600-8106 Japan
Tel +81 75342 45-15, Fax +81 75342 45-50
www.ymc.co.jp