

ΓΡΗΓΟΡΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ HPLC

Διδάσκουσα: Ε. ΑΡΧΟΝΤΑΚΗ
Επικ. Καθηγήτρια

ΓΡΗΓΟΡΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ HPLC

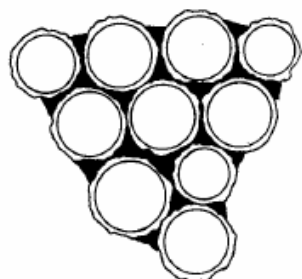
Ορισμός

Δεν υπάρχει ακριβής ορισμός της έννοιας γρήγορη ανάλυση με HPLC. Ο όρος είναι μάλλον σχετικός. Η αναφορά στη γρήγορη ανάλυση σημαίνει τεχνική με μειωμένο χρόνο ανάλυσης. Όμως, ο χρόνος ανάλυσης, αυτός καθ' εαυτό, δεν έχει μεγάλη σημασία. Η παράμετρος που είναι πράγματι σημαντική είναι ο αριθμός των ενώσεων που διαχωρίζονται στη μονάδα του χρόνου. Για παράδειγμα, η ανάλυση που διαχωρίζει 10 ενώσεις σε 15 λεπτά είναι πιο αποδοτική από εκείνη που διαχωρίζει 3 ενώσεις σε 15 λεπτά.

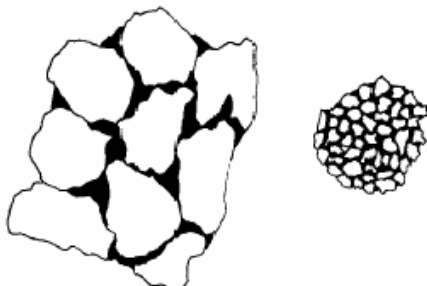
Συνεπώς, πρέπει να τονισθεί εδώ ότι οι όροι "*γρήγορη υγροχρωματογραφία*", "*HPLC υψηλής ταχύτητας*", "*γρήγορη HPLC*", και "*εξαιρετικά-γρήγορη HPLC*", αναφέρονται στη βιβλιογραφία χωρίς συγκεκριμένο ορισμό.

ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΛΗΡΩΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Σφαιρικά

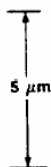
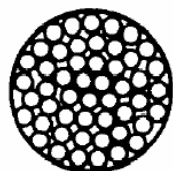
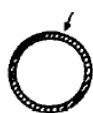


Ακανονίστου Σχήματος

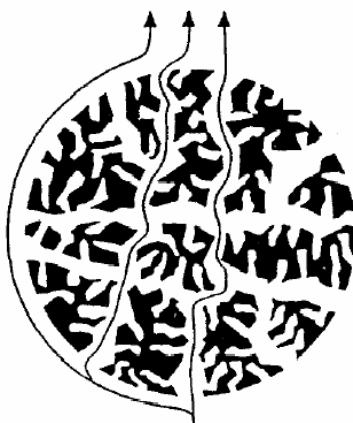


Σχήμα από το βιβλίο των E.L. Johnson and R. Stevenson, "Basic Liquid Chromatography" by Varian, 1978, Palo Alto, California, σελ. 28.

Μικροσωματίδια με συμπαγή πυρήνα και λεπτή επίστρωση πληρωτικού υλικού



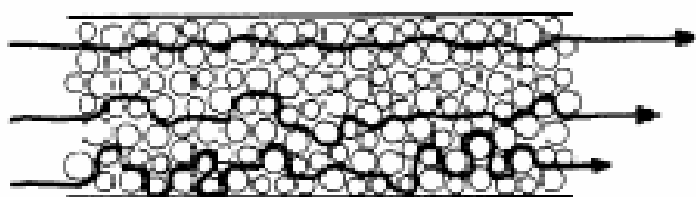
Πορώδη μικροσφαιρικά σωματίδια



Σχήμα από το βιβλίο του L.R. Snyder et al, "Practical HPLC Method Development", 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc. 1997, New York, USA p. 176.

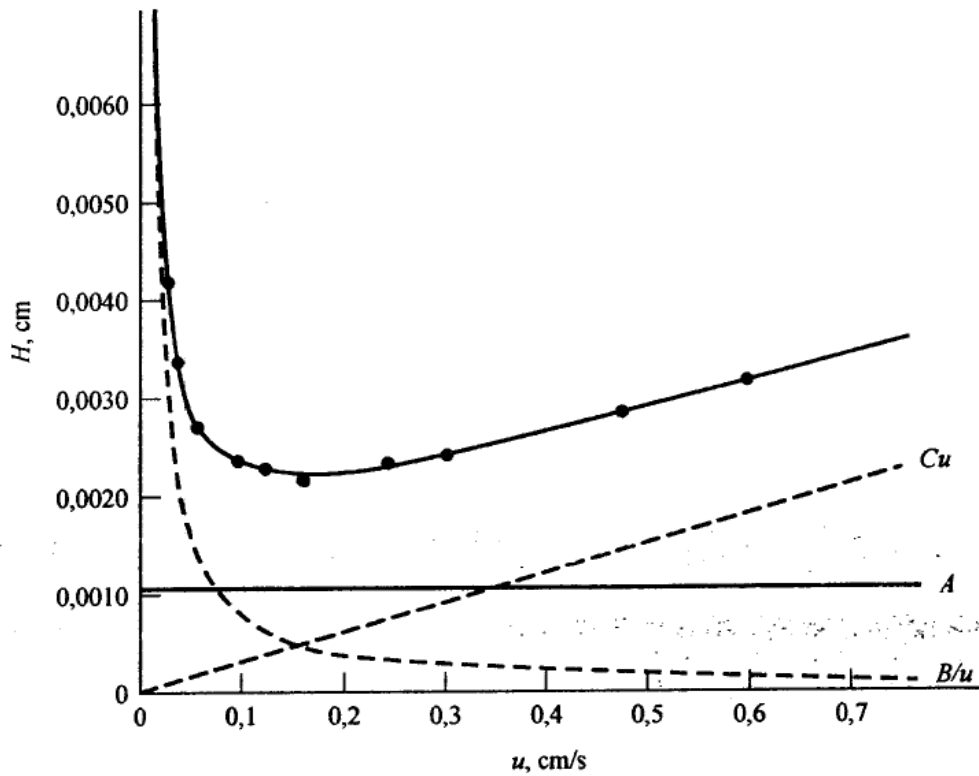


Σχήμα από το βιβλίο των E.L. Johnson and R. Stevenson, "Basic Liquid Chromatography" by Varian, 1978, Palo Alto, California p. 24. Στήλη πληρωμένη με ακανονίστου σχήματος μικροσωματίδια.

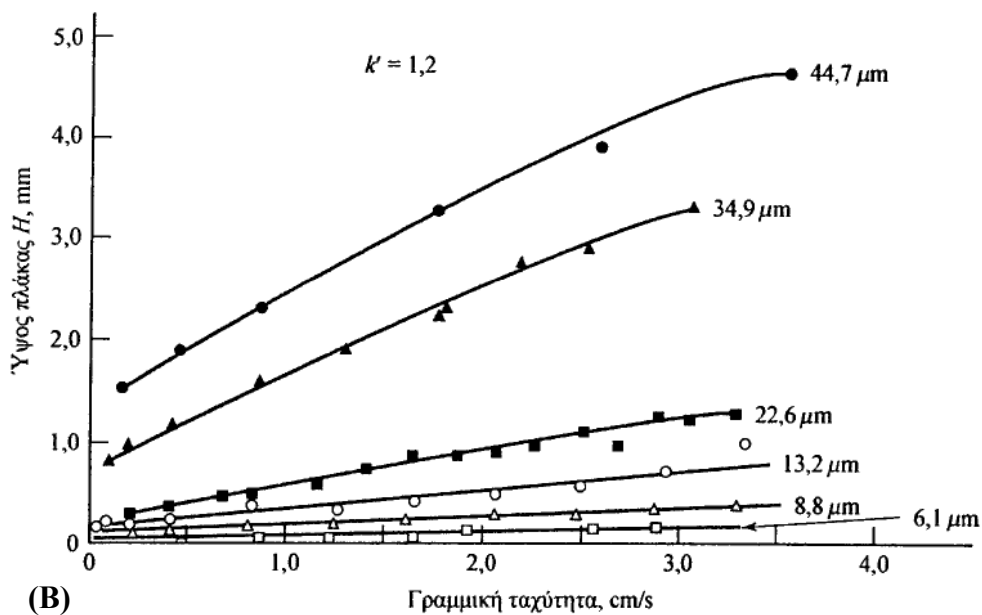


Σχήμα από το βιβλίο της V.R. Meyer, "Practical High-Performance Liquid Chromatography" 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, p.20. Στήλη πληρωμένη με σφαιρικά μικροσωματίδια.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ VAN DEEMTER ΣΤΗΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



(A)



(B)

Σχήμα από την ελληνική μετάφραση του βιβλίου των D.A. Skoog et al, «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2002, Αθήνα. (A) Διάγραμμα van Deemter για μια πληρωμένη στήλη, σελ. 800 και (B) Επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού και της ροής στο ύψος H μιας θεωρητικής πλάκας, σελ. 846.

Παράγοντες που επηρεάζουν τις γρήγορες τεχνικές HPLC

- Οι παράγοντες που επηρεάζουν μια ανάλυση με HPLC περιγράφονται συνοπτικά στον πίνακα που ακολουθεί.
- Διάφορες προσεγγίσεις για γρήγορη χρωματογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί την τελευταία δεκαετία. Γενικώς, σε γρήγορη υγροχρωματογραφική ανάλυση οδηγούν:
 - οι μικρού **μήκους στήλες**
 - η υψηλή **θερμοκρασία** και
 - οι μεγάλες **ταχύτητες ροής** της κινητής φάσης
- Κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους συσχετίζεται με:
 - το **χρόνο ανάλυσης**
 - την **πίεση** στα άκρα της στήλης
 - **την απόδοση** της στήλης
- Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο ανάλυσης και την απόδοση της στήλης μερικές φορές, είναι μεταβλητή και μη προβλέψιμη.

| Παράμετροι | Μήκος στήλης (L) | Ταχύτητα ροής (F) | Διάμετρος σωματιδίων (d _p) | Θερμοκρασία στήλης (T) |
|---------------------------|------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| Χρόνος ανάλυσης | $\propto L$ | $\propto 1/F$ | Έμμεσα συσχετίζονται | $\propto 1/T^x$ |
| Πίεση στα άκρα της στήλης | $\propto L$ | $\propto F$ | $\propto 1/(d_p)^2$ | $\propto 1/T$ |
| Απόδοση στήλης | $\propto L$ | Σύμφωνα με την εξίσωση van Deemter | $\propto 1/d_p$ | $\propto T$ |

ΣΤΗΛΕΣ ΜΙΚΡΟΥ ΜΗΚΟΥΣ

- Η χρήση μιας στήλης μικρού μήκους ελαττώνει το χρόνο διαχωρισμού. Ταυτόχρονα, η διαχωριστικότητα μειώνεται λόγω της μείωσης του αριθμού των θεωρητικών πλακών. Για παράδειγμα, υποδιπλασιασμός του μήκους της στήλης σημαίνει υποδιπλασιασμό του χρόνου έκλουσης και του αριθμού των θεωρητικών πλακών. Γενικά, το μήκος της στήλης είναι ανάλογο του χρόνου κατακράτησης του αναλύτη, της απόδοσης της στήλης και της πίεσης στα άκρα της.
- Μείωση του μήκους της στήλης είναι αποδεκτή μόνον εφ' όσον η απόδοση της στήλης παραμένει ικανοποιητική.
- Η χρήση μικροσωματιδίων πληρωτικού υλικού συνδυασμένη με μικρού μήκους στήλη εξουδετερώνει τη μείωση της απόδοσης της στήλης. Όμως, η αύξηση της πίεσης στα άκρα της στήλης περιορίζει την περαιτέρω μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού.

ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΡΟΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ

- Η αύξηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης είναι ένας ακόμη τρόπος μείωσης του χρόνου έκλυσης. Συγκεκριμένα, η ταχύτητα ροής είναι αντιστρόφως ανάλογη του χρόνου ανάλυσης, έτσι, ώστε διπλασιάζοντας την ταχύτητα, υποδιπλασιάζεται ο χρόνος έκλυσης.
 - Μια βέλτιστη τιμή ταχύτητας ροής έχει καθιερωθεί για τις συνήθεις στήλες, που ουσιαστικά αντιστοιχεί στη μέγιστη απόδοση της στήλης, σύμφωνα με το διάγραμμα Van Deemter.
 - Διπλασιάζοντας την ταχύτητα ροής, το κέρδος σε χρόνο ανάλυσης είναι τόσο όσο αν υποδιπλασιαζόταν το μήκος της στήλης.
 - Υπενθυμίζεται ότι, αυξάνοντας την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, το αποτέλεσμα είναι μικρότερη μείωση του αριθμού των θεωρητικών πλακών από ότι εάν μειωθεί το μήκος της στήλης.
- ☹ Δυστυχώς, η ταχύτητα ροής είναι ανάλογη της πίεσης στα άκρα της στήλης. Οι περισσότερες γρήγορες αναλύσεις λαμβάνουν χώρα σε ταχύτητες ροής υψηλότερες από τη βέλτιστη τιμή, συνήθως στη μέγιστη δυνατή τιμή ροής που επιτρέπει η πίεση στα άκρα της στήλης και του συστήματος.

ΜΙΚΡΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΛΗΡΩΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

- Στήλες με μικρό μέγεθος σωματιδίων (π.χ. 2 μm) οδηγούν σε γρήγορη ανάλυση λόγω της καλύτερης χρωματογραφικής τους απόδοσης.

Μειονεκτήματα

- ⊖ Υψηλή πίεση στα άκρα των στηλών
- ⊖ Πιθανότερη έμφραξη των στηλών

ΥΨΗΛΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

- Η υψηλή **θερμοκρασία** είναι ευνοϊκή για τους παρακάτω τρεις λόγους.
Αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης:
 - i. μειώνει το **ιξώδες** της κινητής φάσης και συνεπώς την πίεση στα άκρα της στήλης, επιτρέποντας έτσι μεγαλύτερες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης
 - ii. αυξάνει τη **διαχωριστικότητα** μεταξύ γειτονικών κορυφών
 - iii. αυξάνει τη **μεταφορά μάζας** του αναλύτη, αυξάνοντας την απόδοση της στήλης σε μεγαλύτερες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης
- Η χρήση υψηλότερης θερμοκρασίας στη στήλη περιορίζεται λόγω:
 - i. της πιθανής θερμικής διάσπασης του αναλύτη
 - ii. της πιθανής θερμικής διάσπασης της στατικής φάσης
 - iii. του σημείου ζέσης της κινητής φάσης
- Ακόμη όμως και με αύξηση της θερμοκρασίας, η πίεση στα άκρα της στήλης αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα. Έτσι, οι κλασικές προσεγγίσεις στις γρήγορες τεχνικές της HPLC περιορίζονται εκ των πραγμάτων από την αναπτυσσόμενη πίεση στα άκρα της χρωματογραφικής στήλης.

ΝΕΕΣ ΤΑΣΕΙΣ

ΓΙΑ ΓΡΗΓΟΡΕΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Στις μέρες μας υπάρχει ένας συναγωνισμός μεταξύ δύο μέσων για την επίτευξη γρήγορων αναλύσεων με HPLC:
 1. **Μονολιθικές** στατικές φάσεις
 2. **Μικροσωματιδιακές στατικές φάσεις** που χρησιμοποιούνται στην εξαιρετικής απόδοσης υγροχρωματογραφία (ultra performance liquid chromatography, **UPLC**)
- Με αμφότερα τα παραπάνω πληρωτικά υλικά, μπορούν να επιτευχθούν:
 - σημαντικά υψηλότερη **απόδοση** στήλης
 - μεγάλη **ταχύτητα** ανάλυσης
 - μεγάλη **ευαισθησία** μεθόδου
- Με την **UPLC**, αυτά πραγματοποιούνται με τη χρήση μικρών σωματιδίων πληρωτικού υλικού στις στατικές φάσεις. Η χρήση όμως μικροσωματιδίων με διάμετρο μικρότερη από 2 μm , απαιτεί τη χρήση εξαιρετικά υψηλών πιέσεων (περίπου 1400 bar) και **οργανολογίας ειδικών προδιαγραφών** και υψηλής ποιότητας που θα αντιμετωπίζει τέτοιες μεγάλες πιέσεις.
- Ενώ για την UPLC υπάρχουν πολλά είδη πληρωτικών υλικών (φάσεων) εμπορικά διαθέσιμων, οι υπάρχουσες **μονολιθικές φάσεις** είναι ακόμη περιορισμένες. Όμως, οι τελευταίες έχουν πολύ μεγαλύτερη διαπερατότητα έτσι ώστε οι αναπτυσσόμενες πιέσεις στα άκρα των στηλών να είναι πολύ μικρότερες εκείνων της UPLC. Έτσι, οι μονολιθικές στήλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τη **συνήθη HPLC οργανολογία**.



Συμβατικό μικροσωματιδιακό SiO_2

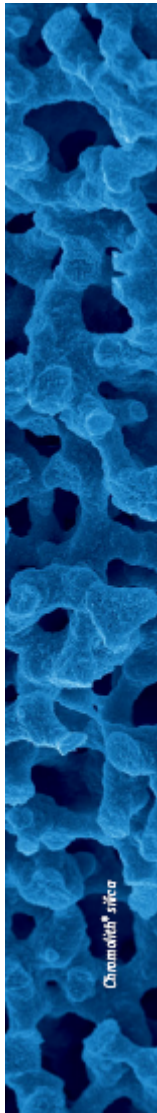


Πορώδης μονολιθική ράβδος SiO_2

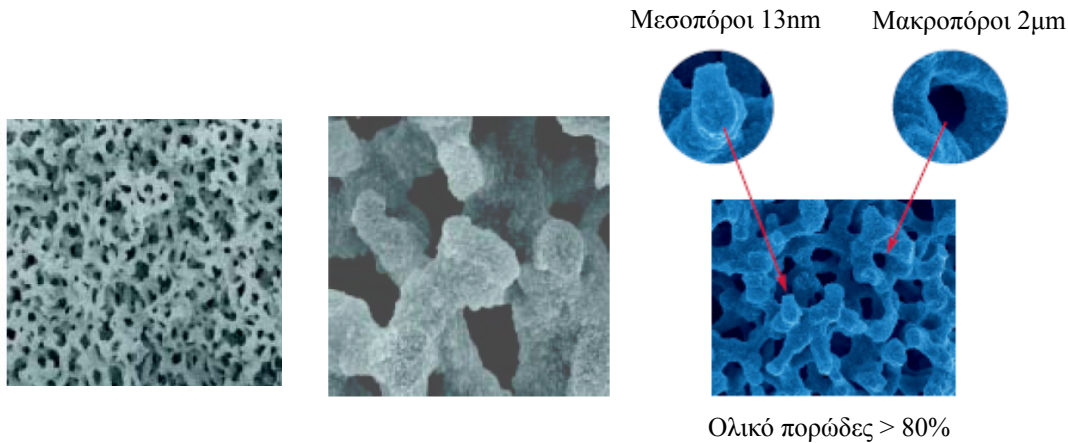
ΜΟΝΟΛΙΘΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

Chromolith (Merck)

Η στήλη δεν περιέχει πλέον μικροσωματίδια αλλά αποτελείται από ένα μόνο κομμάτι υψηλής καθαρότητας πολυμερικού SiO₂ !

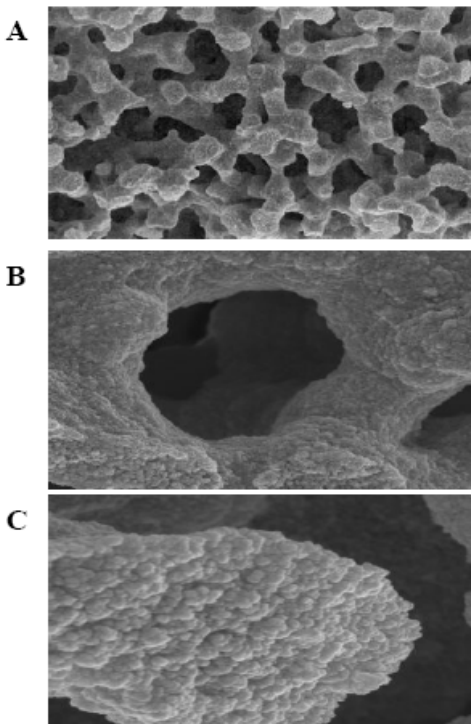


Διπλή δομή των πόρων



Φωτογραφίες από το Chrombook 06/07 της εταιρείας Merck

- Οι μακροπόροι ($\approx 2 \mu\text{m}$) ελαττώνουν δραστικά την πίεση της στήλης και επιτρέπουν τη χρήση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής της κινητής φάσης, μειώνοντας έτσι σημαντικά το χρόνο ανάλυσης.
- Οι μεσοπόροι ($\approx 13 \text{ nm}$) σχηματίζουν τη λεπτή πορώδη δομή και παρέχουν μεγάλη ενεργή επιφάνεια και αποτελεσματικούς διαχωρισμούς.



Φωτογραφίες από τη διδακτορική διατριβή του von S.K.H. Eldeeb, Druckjahr 2007. A) Μακροσκοπική θεώρηση του μονόλιθου του SiO₂ (Merck), B) Μακροπόροι και C) Μεσοπόροι.

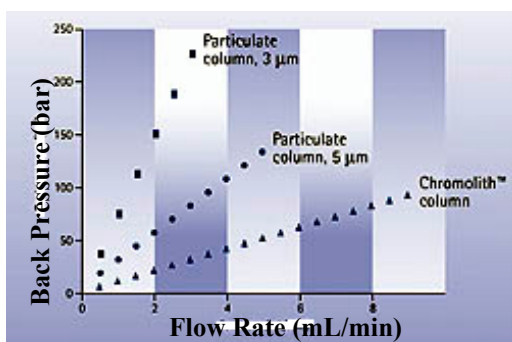
Πλεονεκτήματα των μονολιθικών Στήλων (Chromolith)

1. Ταχύτητα ανάλυσης

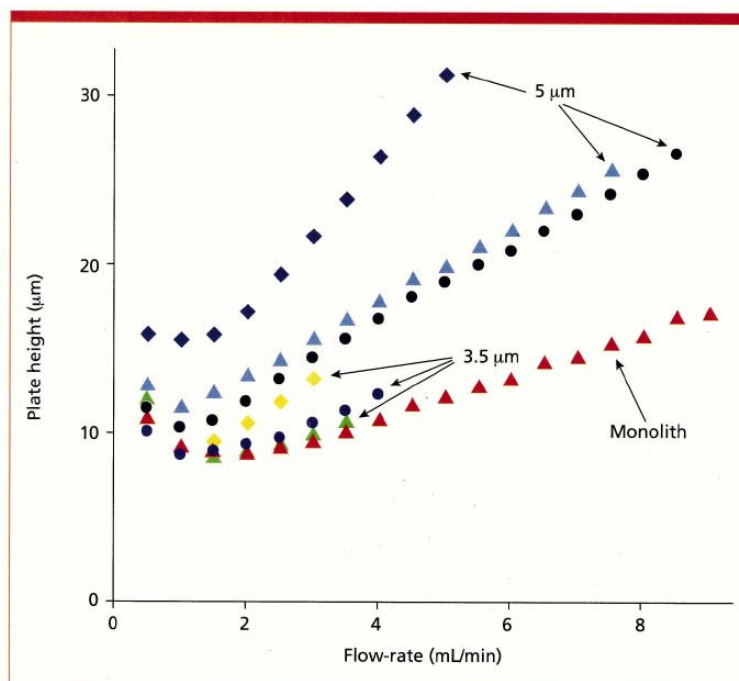
- Διαχωρισμοί δυο φορές γρηγορότερα με τη μισή πίεση στήλης, συγκρινόμενοι με αυτούς σε στήλες των 5 μm σωματιδίων.
- Μεγαλύτερη διέλευση δείγματος
- Γρήγορη εξισορρόπηση της στήλης μεταξύ των αναλύσεων

2. Βελτιωμένη συμπεριφορά του συστήματος της HPLC

- Σημαντικά αυξημένη η διάρκεια ζωής της στήλης
- Μειωμένη συντήρηση της αντλίας και του εγχυτή
- Μειωμένη ανάγκη προκατεργασίας των δειγμάτων, αφού οι στήλες είναι πολύ ανθεκτικές στην απόφραξη (ακόμη και με βιολογικά δείγματα)



Διαγράμματα από το ChromBook 06/07 της εταιρείας Merck. Εξάρτηση της πίεσης και του ύψους Η μίας θεωρητικής πλάκας από την ταχύτητα ροής (πάνω και δεξιά, αντίστοιχα) σε μικροσωματίδια και μονολιθικά πληρωτικά υλικά.



3. Το μήκος της στήλης δεν περιορίζεται πλέον λόγω πίεσης

- Πολύ υψηλή χρωματογραφική απόδοση με σύνδεση σε σειρά



Merck



| Column length (mm) | Back pressure (bar) | Plate Number N (anthracene) |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| 200 | 22 | 19000 |
| 300 | 33 | 27000 |
| 400 | 44 | 35000 |
| 500 | 54 | 41000 |

Chromolith® column length and plate count at 2 mL/min.

Από το Chrombook 06/07 της Merck

ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ***(Ultra High Performance Liquid Chromatography, Ultra-HPLC)***

- Η *Ultra-HPLC* χρησιμοποιεί την ίδια μεθοδολογία διαχωρισμού, όπως η συμβατική HPLC, αλλά συνήθως χρησιμοποιεί στήλες, πληρωμένες με **μικροσωματίδια διαμέτρου μικρότερης από 2 μm** . Αυτού του μικρού μεγέθους τα σωματίδια αυξάνουν δραματικά την **απόδοση** της στήλης, την **ευαισθησία** ως προς τη μάζα του αναλύτη, τη **διαχωριστική ικανότητα** και την **ταχύτητα**.
- Ενώ η οργανολογία για Ultra-HPLC απαιτεί μονάδες παρόμοιες με της συμβατικής HPLC, το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων πληρώσεως της στήλης δημιουργεί πολύ αυξημένες πιέσεις στα άκρα της στήλης, με αποτέλεσμα να απαιτούνται **αντλίες πολύ υψηλών πιέσεων**. Ταυτόχρονα, οι ιδανικές αντλίες πρέπει να παρέχουν ταχύτητες ροής της κινητής φάσης, που να είναι μη παλμικές και σταθερές.

ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ULTRA-HPLC

Θεωρία ταχύτητας, σύμφωνα με την εξίσωση του *Van Deemter*:

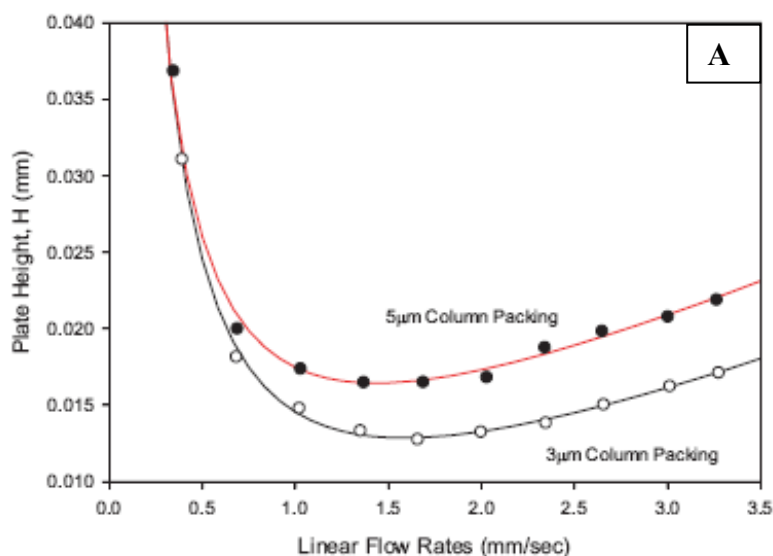
$$H = A + B/u + Cu$$

Όπου,

H είναι το ισοδύναμο ύψος μιας θεωρητικής πλάκας

U είναι η γραμμική ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και

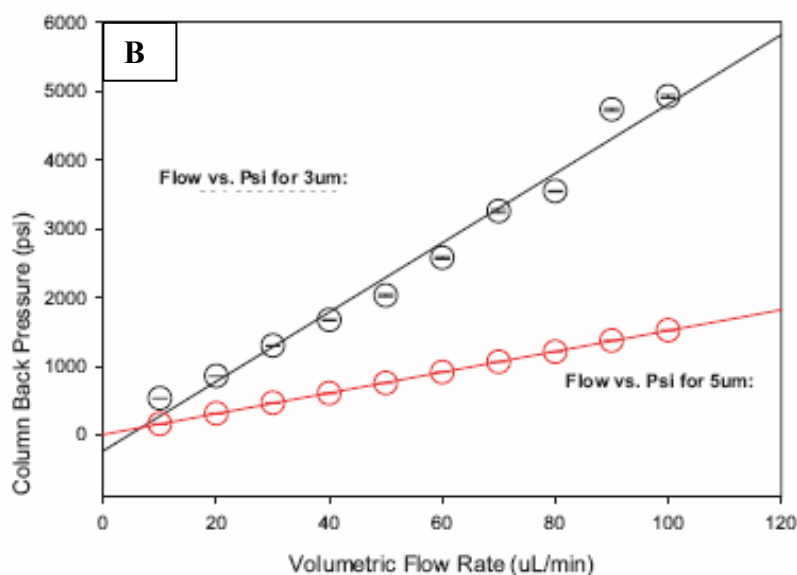
A, B και C σταθερές που σχετίζονται με τη στροβιλώδη διάχυση, τη διαμήκη διάχυση και τη μεταφορά μάζας, αντίστοιχα



Διαγράμματα από Syringe Pump
Application Note AN4 by TELEDY-
NE ISCO Nebraska, USA

(Last modified June 5, 2007)

A) Διαγράμματα van Deemter για
μικροσωματίδια πληρωτικού υλικού
5µm και 3µm.



B) Συσχέτιση της πίεσης στα άκρα
της στήλης και της ταχύτητας ροής
της κινητής φάσης.

ULTRA-HPLC

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΞΙΣΩΣΗ Van Deemter

- Μικρότερα σωματίδια της στατικής φάσης οδηγούν σε μικρότερες τιμές A και C. Ο όρος A θα συνεισφέρει λιγότερο στο H και θα επιτρέψει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Όσο ο όρος C γίνεται λιγότερο σημαντικός για την τιμή του H, μια αύξηση στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης δε θα θυσιάζει τόσο πολύ την ποιότητα του διαχωρισμού. Έτσι, επιτρέπονται ταχύτεροι διαχωρισμοί με την ίδια διαχωριστική ικανότητα.
- Αν και μικρότερα τα σωματίδια, δεν επηρεάζουν ευθέως την τιμή B, οι μεγαλύτερες τιμές της ταχύτητας ροής μειώνουν αυτή τη συνεισφορά στην τιμή του H. Μικρότερα σωματίδια πληρωτικού υλικού επιτρέπουν ταχύτερους διαχωρισμούς με υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα.
- Μικρότερα σωματίδια "πακετάρονται" με μικρότερες αποστάσεις μεταξύ τους και δημιουργούν μεγαλύτερη αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης. Για βέλτιστες ταχύτητες ροής, η πίεση στα άκρα της στήλης αυξάνει αντιστρόφως ανάλογα του $(d_p)^2$. Έτσι, απαιτούνται πιέσεις 20.000 psi και πάνω, απ' όπου πήρε και το όνομα της η τεχνική ***ULTRA-HPLC*** ή ***UHPLC*** ή ***UPLC***.

ΣΤΗΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ULTRA-HPLC

- Τα μικροσωματίδια της στατικής φάσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πλήρωση:
 - i. τριχοειδών στηλών ή*
 - ii. στηλών από χάλυβα*
- Οι **τριχοειδείς** στήλες απαιτούν μικρότερη κατανάλωση κινητής φάσης και ελάχιστη ποσότητα δείγματος. Λόγω της πολύ χαμηλής κατανάλωσης κινητής φάσης, οι τριχοειδείς στήλες διασυνδέονται καλύτερα με τους ανιχνευτές φασματοφωτομετρίας μαζών.
- Με τις υψηλές τιμές ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και της πίεσης στα άκρα της στήλης, μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης κατά την UPLC ανάλυση. Η θερμότητα αυτή δίνεται από το γινόμενο της πίεσης και της ογκομετρικής ταχύτητας. Οι τριχοειδείς στήλες είναι καλύτερες στο να διαχέουν αυτή τη θερμότητα λόγω του μεγαλύτερου λόγου επιφανείας προς όγκο και της μικρότερης ογκομετρικής ταχύτητας ($\mu\text{L}/\text{min}$) για μια δεδομένη γραμμική ταχύτητα ροής (mm/sec).
- Ως αποτέλεσμα της θέρμανσης, **οι τύποι στηλών από χάλυβα**, τείνουν να περιορισθούν στις microbore (με εσωτερική διάμετρο $< 2 \text{ mm}$). Οι στήλες από χάλυβα έχουν το πλεονέκτημα να δέχονται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας άνθρακα που φέρουν, που βοηθά με τη σειρά του στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ιχνών συστατικών ενός μίγματος. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη φαρμακευτική ανάλυση.
- Η επιλογή τριχοειδών ή στηλών από χάλυβα δίνει στην **ULTRA-HPLC** μια επιπλέον ευκαμψία για πληθώρα εφαρμογών.

ΔΙΑΡΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΓΡΗΓΟΡΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ HPLC

- Επιστήμονες ερευνητές από το ερευνητικό ινστιτούτο της Schering-Plough ανέπτυξαν **μια γρήγορη μέθοδο HPLC** για τον αποδοτικό διαχωρισμό και ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών.
- Η μέθοδος χρησιμοποιεί μια μικρού μήκους στήλη με μικροσωματίδια πληρωτικού υλικού διαμέτρου 2.7 μm. Τα σωματίδια αυτά αποτελούνται από **συμπαγή σφαιρίδια SiO₂ επιστρωμένα με πορώδες SiO₂ πάχους 0,5 μm**. Αυτά τα σωματίδια επιτρέπουν πολύ γρήγορους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με σχετικά χαμηλή πίεση στα άκρα της στήλης.
- Η μέθοδος αυτή εκτιμάται ότι είναι **εφάμιλλη της UHPLC** από την άποψη της χρωματογραφικής απόδοσης, πλεονεκτεί όμως έναντι της UHPLC διότι **δεν απαιτεί την πολύ υψηλού κόστους οργανολογία** της τελευταίας.

NANO Liquid Chromatography

(NANO LC)

- Δεν υπάρχει ακριβής ορισμός της *nano-LC*. Λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους των στηλών που χρησιμοποιούνται στην nano-LC (εσωτερικής διαμέτρου 10 - 150 μm), η μέθοδος δεν εμπίπτει στο πλαίσιο του συμβατικού ορισμού της νανοτεχνολογίας, που πραγματεύεται την ύλη σε κλίμακα μικρότερη από το 1 μm .
- Θεωρητικά, η ευαισθησία του αναλύτη αυξάνει με τη μείωση της εσωτερικής διαμέτρου της στήλης. Όμως, λόγω του πολύ μικρού όγκου του ενιόμενου δείγματος (20 - 60 nL), η nano-HPLC δε μπορεί να θεωρηθεί ως αναλυτική τεχνική υψηλής ευαισθησίας.
- Στήλες που χρησιμοποιούνται στη nano-HPLC είναι:
 1. Συνήθως, *πληρωμένες τριχοειδείς στήλες* με μικροσωματίδια (3 - 5 μm). Τελευταία, σωματίδια 1,5 - 1,8 μm χρησιμοποιούνται επιτυχώς στην UHPLC.
 2. *Μονολιθικές τριχοειδείς στήλες* που αποτελούνται από ένα ενιαίο σώμα υλικού, κατασκευασμένου από πολύ πορώδεις πολυμερικές ράβδους με δύο τύπους δομής πόρων (μικροπόρους και μεσοπόρους, διαφορετικών μεγεθών) που επιτρέπουν τη χρήση μεγάλων ταχυτήτων ροής και έτσι μειώνεται σημαντικά ο χρόνος ανάλυσης.
 3. *Ανοιχτές τριχοειδείς στήλες*, όπου το τοίχωμα του τριχοειδούς είναι επιστρωμένο με διαπερατό πορώδες υλικό, που παίζει το ρόλο της στατικής φάσης.

Κατάταξη Τεχνικών HPLC* με βάση την εσωτερική διάμετρο των χρησιμοποιούμενων στηλών και τις αντίστοιχες εφικτές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης

| Περιγραφή | Εσωτερική διάμετρος στήλης | Ταχύτητα ροής |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| <i>Νανο-HPLC</i> | 10 - 150 μm | 10 - 1000 nL/min |
| <i>Τριχοειδής HPLC</i> | 150 - 500 μm | 1 - 10 μL/min |
| <i>Μικρο HPLC</i> | 0,5 - 1,5 mm | 10 - 100 μL/min |
| <i>Microbore HPLC</i> | 1,5 - 3,2 mm | 100 - 500 μL/min |
| <i>Συμβατική HPLC</i> | 3,2 - 4,6 mm | 0,5 - 2,0 mL/min |
| <i>Παρασκευαστική HPLC</i> | >10 mm | > 20 mL/min |

* Η κατάταξη αυτή βρέθηκε στην ιστοσελίδα:

<http://www.justchromatography.com/nano-hplc/nano-lc-definition>, 14/9/2007

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L.R. Snyder, J.J. Kirkland and J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 1997, New York, USA, Chapter 5.
2. D.A. Skoog, F.J. Holler and T.A. Nieman "Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης" Πέμπτη Έκδοση, μετάφραση από τους Μ.Ι. Καραγιάννη, Κ.Η. Ευσταθίου και Ν. Χανιωτάκη, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2002, Αθήνα, κεφ. 26 και 28.
3. U.D. Neue, "HPLC Troubleshooting" by Waters Corporation, 2001.
4. "Ultra HPLC System Configuration" by Teledyne ISCO, Inc. Nebraska, USA, Syringe Pump Application Note AN4, Last modified June 5, 2007.
5. " New Developments in the Application of Monolithic HPLC Column", D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Schaefer, D. Cunningham, and R.E. Majors, *LC-GC Europe*, **14** (2001) 730-734.
6. Chrombook 06/07 της εταιρίας Merck.
7. "Fast" HPLC better than UHPLC, στην Ιστοσελίδα:
<http://www.justchromatography.com/hplc/hplc-fused-core>, 14/9/2007.
8. "Definition of Nano Liquid Chromatography" στην Ιστοσελίδα:
<http://www.justchromatography.com/nano-hplc/nano-lc-definition>, 14/9/2007.
9. "Nano LC Sensitivity", στην Ιστοσελίδα:
<http://www.justchromatography.com/nano-hplc/nano-lc-sensitivity>, 14/9/2007.
10. "Columns in Nano LC", στην Ιστοσελίδα:
<http://www.justchromatography.com/nano-hplc/columns-in-nano-lc>, 14/9/2007.
11. "High Efficiency Techniques: Fast HPLC Using Monolithic Silica Columns and Chiral Separation Using Capillary Zone Electrophoresis", Διδακτορική Διατριβή von S.K.H. Eldeeb, Druckjahr, 2007.