

HPLC für Neueinsteiger

Autor: Dr. Stavros Kromidas (2000)

Novia
Chromatographie- und Messverfahren GmbH
Industriepark Höchst
Gebäude B 845
D-65926 Frankfurt am Main

Tel. +49 (0) 69 305-43843
Fax +49 (0) 69 30 9159

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 einfachen Leitfaden für Ihre ersten Schritte mit der HPLC. Er soll nicht das Studium der Theorie in 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	5
03	Wie funktionieren die einzelnen Teile einer HPLC-Anlage	6
04	Aufbau einer Gesamtanlage	9
05	Notwendige Arbeiten vor den Messungen	11
06	Die erste Messung	14
07	Verlassen einer HPLC-Anlage	15
08	Checkliste für die RP-HPLC	16
09	Checkliste: Das muss ich immer machen	18
10	Checkliste: Das darf ich nie tun	19
11	Fließschema: Wie wird eine HPLC-Anlage in Betrieb genommen?	20
12	Bezeichnung von HPLC Materialien	23
13	Abkürzungen aus dem Bereich der Chromatographie (Auswahl)	26
14	Von IUPAC empfohlene Symbole für die Chromatographie (Auswahl)	28
15	Lösungsmittelgemische gleicher Elutionsstärke für die RP-Chromatographie (nach L. Synder)	29
16	Lehrbücher über die HPLC	30
17	Adressen von HPLC-Firmen (Deutschland)	32

Was ist überhaupt HPLC?

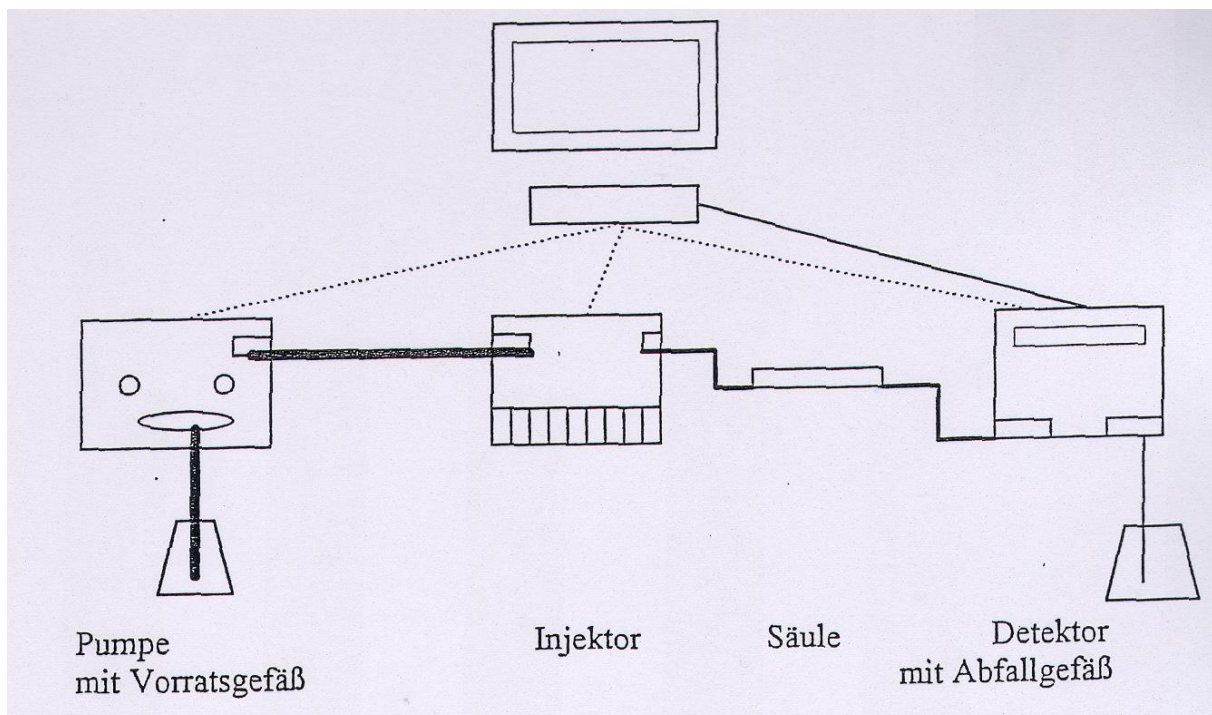
HPLC	In den 60er Jahren datieren die Anfänge der HPLC, H igh P ressure L iquid C hromatography (Hochdruck(flüssigkeits)chromatographie). Dank der verbesserten Säulenmaterialien und Geräten ist seit Ende der 70er Jahre die Rede von H igh P erformance L iquid C hromatography (Hochleistungs(flüssigkeits)chromatographie). Den Boom erlebte diese Trenntechnik Anfang der 80er Jahre.
Trennungs-; mobile Phase, stationäre Phase	Die HPLC ist eine schnelle Trenntechnik. Dabei wird das zu trennende Gemisch mit Hilfe eines Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches (Eluent/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 gebunden sein können. Diese Gruppen fungieren als „Austauschplätze“ für die zu trennenden Substanzen. Je nach Art der Substanz wird sie 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, Ausschluss in die 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) und Lösungsmittelgemische beeinflusst werden. Die einzelnen Probekomponenten werden anschließend vom Detektor registriert, er gibt diese Informationen an die Auswerteinhalte 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 5 Modulen:

- Eine oder mehrere Pumpen zur Förderung des Eluenten durch die Anlage,
- Injektor (Hand- oder 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** Das Lösungsmittel bzw. Laufmittelgemisch 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 Druckveränderungen 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 50 bis 350 bar (70 bar= 1000 PSI). In Spezialfällen (dünne Säulen, kleines Säulenmaterial) kann dieser Druckbereich aber auch überschritten werden. Dieser Druck sollte bei Betrieb im Auge behalten 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. Bei einem Autoinjektor ist dieser Vorgang automatisiert. Wie das genau geschieht unterscheidet sich allerdings 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 durch Spiegel 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 (chromophore Gruppe) 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. Ansonsten wird er kaum noch eingesetzt.
- Variabler Detektor**
- Variabler Detektor:
Die Lichtquelle hierbei ist eine Deuteriumlampe. Nur wird hier die gewünschte Wellenlänge mit einem optischen Gitter aus dem Kontinuum gefiltert. Der variable UV-Detektor kann als Standarddetektor für einen Großteil der HPLC-Anwendungen angesehen werden.
- PDA/DAD**
- Photodiodenarraydetektor (PDA oder DAD)
Die Lichtquelle ist auch hierbei eine Deuteriumlampe. Aber hier wird keine einzelne Wellenlänge herausgefiltert, sondern der gesamte Wellenlängenbereich (oder ein vom Anwender zu bestimmender Bereich) 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 (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 Brechungsindex zwischen reinem Laufmittel und mit Probe vermischem Laufmittel. Die Lichtquelle ist auch hier eine Halogenlampe. In eine Vergleichsküvette wird reines Laufmittel 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 hierbei das Chromatogramm. Das Haupteinsatzgebiet dieses Detektors ist in der Polymerchemie, Mineralöl- und Zuckeranalytik zu finden.

**Fluoreszenz-
detektor**

Dieser Detektor nützt die Fähigkeit bestimmter Substanzen und Verbindungen 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.

**Elektro-
chemischer
Detektor
(ECD)**

Bei dieser Variante von Detektor handelt es sich um eine Rarität. Durch Anlegen eines Potentials werden hierbei die Problemkomponenten oxidiert oder in Ausnahmefällen auch reduziert. Die Veränderung des Potentials zeigt dann die Anwesenheit einer Problemkomponente an. Das Einsatzgebiet dieses Detektors findet sich hauptsächlich in der klinischen Chemie, z. B. zur Bestimmung der Katecholamine.

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.
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 letzter Zeit etwas beliebter geworden. Neben den rein bautechnischen Unterschieden einer HPLC-Anlage muss man noch Unterschiede in der Arbeitsweise beachten.
Isokratische HPLC-Anlage	Man unterscheidet hierbei zwischen isokratischen und Gradienten Betrieb einer Anlage. Bei einer isokratischen Anlage wird während eines HPLC-Laufes nur mit einer 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 vor allem in der Routine besonders robust und sollte, so es möglich ist, für alle Trennaufgaben angestrebt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass man für diese Arbeitsweise nur eine Pumpe zur Eluentenförderung benötigt.
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. Da bei dieser Arbeitsweise am Anfang einer Trennung eine andere Zusammensetzung des Eluenten vorliegt als am Ende muss man stets darauf achten, dass am Anfang einer Trennung das System im Gleichgewicht ist (=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 auf der Druckseite 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, dessen Größe und Form, der Säulenlänge und des eingesetzten Eluenten (unterschiedliche Viskosität) ergeben sich

Drücke von 50 bis ca. 350 bar.

Probeaufgabesystem	Das Probeaufgabesystem kann entweder ein Handinjektor oder ein manuelles Ventil (meist von der Firma Rheodyne) oder ein automatischer Probengeber (Autosampler) 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 „C ₁₈ -Säule“. Die stationäre Phase ist in diesem Fall ein chemisch modifiziertes Kieselgel. Hierbei sind auf der Oberfläche des Kieselgels C ₁₈ -Ketten aufgebaut. Es sollte immer eine konstante Temperatur gewährleistet sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.
Detektor	Als Detektor finden Sie meist einen UV Detektor vor, 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. Führen Sie eine
qualitative Analyse	qualitative Analyse durch, so müssen Sie „nur“ alle Peaks (=Substanzen), die in Ihrer Probe enthalten sind, trennen. Soll eine
quantitative Analyse	quantitative Analyse durchgeführt werden, muss mit Hilfe von Standards die genaue Konzentration bzw. Menge der einzelnen in der Probe vorliegenden Substanzen bestimmt werden. Die Auswertung wird meist über die Fläche, 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 und Säulenofen. Für weitergehende Informationen und Übungen bieten wir Ihnen gerne unsere Seminare „HPLC-Basiskurs“ und „HPLC-Fortgeschrittenenkurs“ an.

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“ oder 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, ab Ausgang Injektor nur noch maximal 0,2 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, die Chromatographie bleibt 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. 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/Spülen** Wenn Sie nicht wissen was vor Ihnen mit der Anlage geschehen ist, sollten Sie diese ohne Säule mit einer 50/50 Mischung aus Isopropanol(IsoOH)/Wasser bei einem Fluss von 1 ml/min für ca. 10 min spülen. Dabei sollten Sie einige Male auch den Eluenten injizieren, um sicherzustellen, dass auch kein alter Eluent mehr im Probeaufgabesystem ist. Jetzt können Sie den in Ihrer Methode vorgeschriebenen Eluenten in die Anlage bringen.

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 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 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.

Reversed Phase

Normal Phase Müssen Sie auf Grund Ihrer Probe nichtmodifiziertes Kieselgel als Säulenmaterial einsetzen, so arbeiten Sie mit „Normal Phase“. Das ist allerdings nur in ca. 5 – 10% 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, 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“. Sie sind von verschiedenen Firmen erhältlich, wie z. B. Baker, Merck, Promochem, Riedel de Haen, usw.

Elutionskraft (siehe Anhang) In der HPLC werden verschiedene Eluenten eingesetzt, um die 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: Pufferherstellung

- 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 und im stark Säuren sich die Bindungen zwischen Basismaterial und C₁₈ Kette lösen.
- 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 (ca. 1 Liter) hergestellt und entgast werden. Das **Entgasen** ist mit Helium möglich oder durch den in die HPLC-Anlage eingebauten Degasser. Wenn Sie Puffer einsetzen, sollten Sie diese membranfiltrieren. Das Vorratsgefäß sollte gut abgedeckt sein, um nicht als Falle für im Raum 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. Während dieser Zeit können Sie Ihre Proben vorbereiten. Wenn Sie Glück haben, müssen Sie diese nur im Eluenten lösen, ansonsten müssen Sie die in Ihrer Methode beschriebene Prozedur möglicherweise im Eluenten wieder ausfällt. Sollte das nämlich in der Anlage passieren, dann haben Sie eine Weile mit deren Reinigung zu tun oder müssen sogar teure Teile auswechseln.
- Probenvorbereitung** In der Zwischenzeit ist Ihr System equilibriert. Die hierfür benötigte Zeit bewegt sich zwischen einigen Minuten (einfache Analyse, z. B. UV-Detektion) und einigen Stunden (Spurenanalyse, z. B. elektrochemischer Detektor). 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, 50/50 v/v). 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.
- Standardchromatogramm** Aber jetzt geht's los. 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 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 Isopropanol/Wassergemisch und stellen dann auf Methanol um. Genauso verfahren Sie, wenn Sie wieder zu Ihren Originalbedingungen zurückkehren wollen.
- Sequenz**

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, dass 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.

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, andere 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 | <ul style="list-style-type: none"> • Tropft es irgendwo? |
| 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 Eluents 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 Eluents? Sind die Pumpengeräusche die gewohnten? |
| Eluent | <ul style="list-style-type: none"> • Immer mit HPLC-grade Lösungsmittel ansetzen. • Genügende Menge vorbereiten. • Pufferkonzentrationen sollten in der Regel zwischen 20 und 50 mMol liegen. • Eluents mit Puffer immer membranfiltrieren, mit Helium entgasen oder Degasser verwenden. • Möglichst keine aggressiven Komponenten (z. B. Trichloressigsäure) dem Eluents zusetzen. |
| 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 am besten 10 – 20 % Methanol in das Wasser zusetzen, 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

- Genügend großes Auffanggefäß bereitstellen.

Auswerteeinheit

- Sind die eingestellten Integrationsparameter sowie Datenaufnahmegerate (sample-rate) OK?

Checkliste:

Das muss ich immer machen

Arbeitsweise konstant halten	Vom Einschalten des Gerätes bis zum Ausschalten, immer alles gleich machen, bzw. Änderungen notieren. z. B.: <ul style="list-style-type: none">• Eluent gleich ansetzen (zuerst das Wasser, dann den organischen Anteil).• Säule gleich anfahren, auch Reihenfolge und Konzentration streng beachten.• „Gleiche“ Chemikalien verwenden (gleich heißt in diesem Fall: Hersteller, Qualität, Charge usw., auch auf eingesetztes Spülmittel, Wasser achten).• Bei Änderungen alles notieren.
Puffer filtrieren	immer die gleichen Filter verwenden (siehe Herstellung eines Eluenten)
Eluent entgasen	(siehe Herstellung eines Eluenten)
Diagnostik-Werte überprüfen	In Geräte eingebaute Diagnosemöglichkeiten nutzen, überprüfen ob sie in Ordnung sind (festgelegte Werte)
Häufiges Überprüfen der Anlage auf Funktionstüchtigkeit	Am einfachsten durch Vergleichschromatogramm

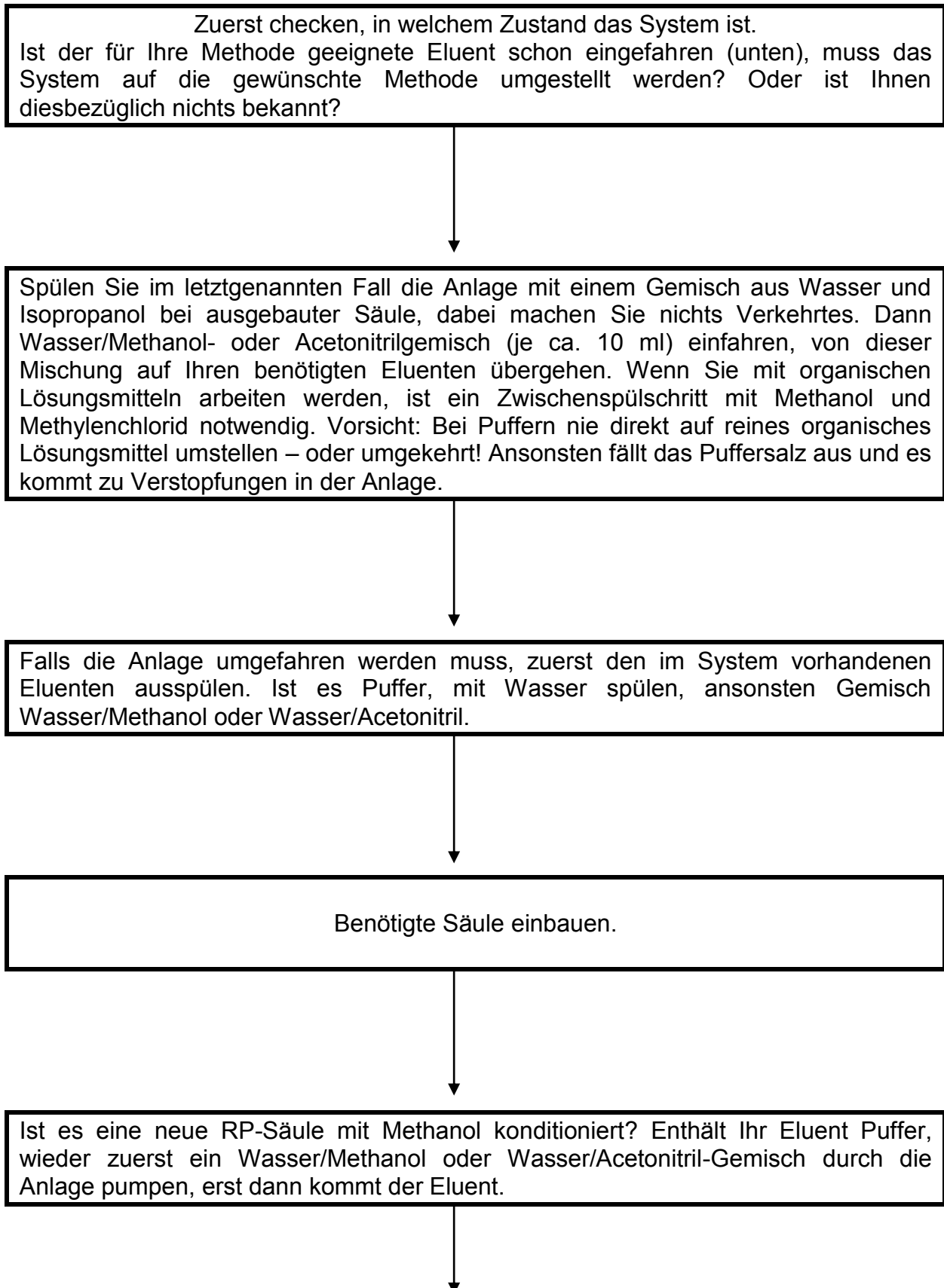
Checkliste:

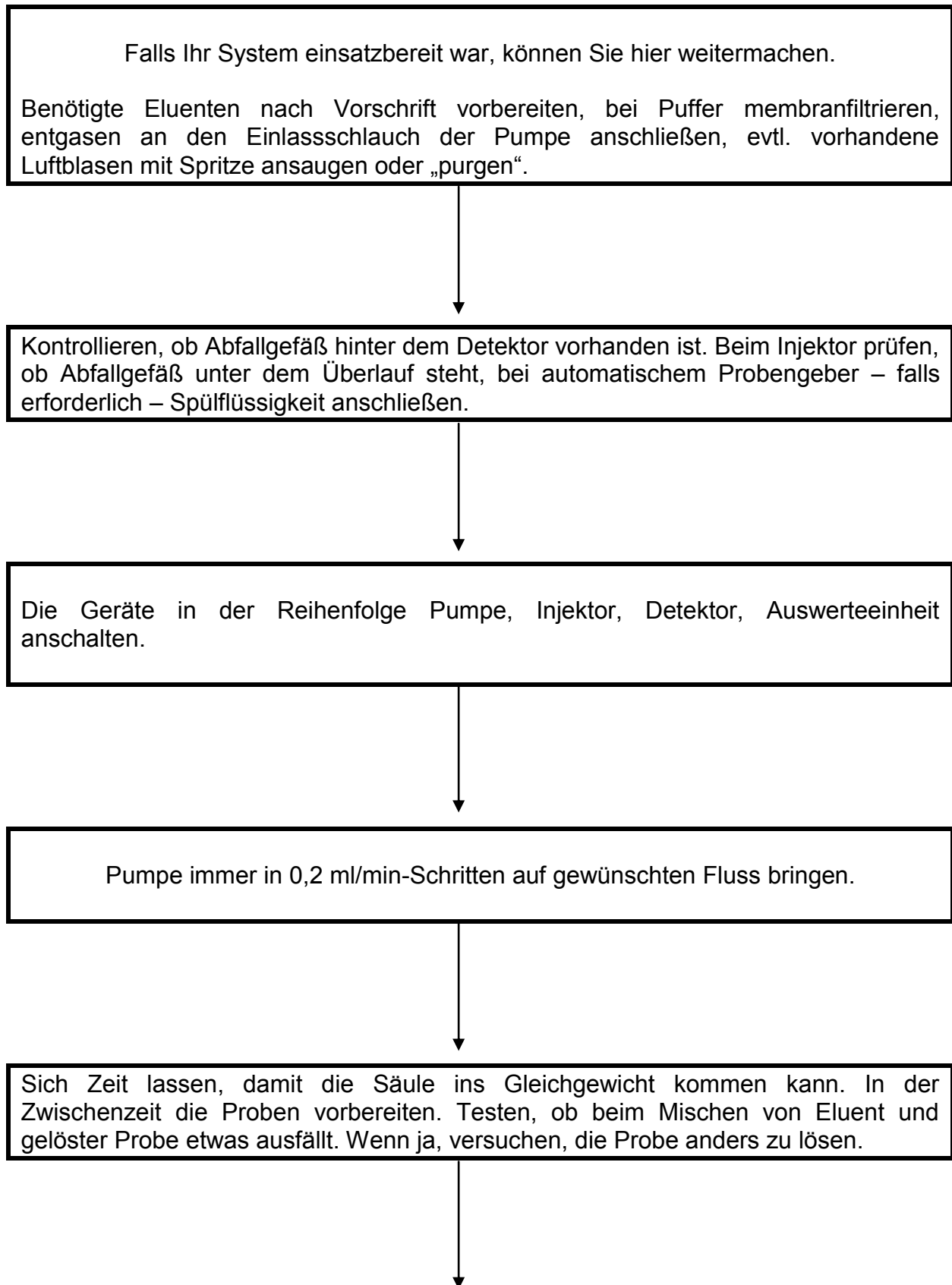
Das darf ich nie tun

Druck über 400 bar	Es können Leckagen entstehen, die Packungsqualität kann nachlassen.
Puffer in der Anlage stehen lassen	Salze können ausfallen, Verstopfung der Anlage
Verschraubungen (Fittings) zu fest anziehen	Fittings können abbrechen
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?
Reversed Phase Säulen in Wasser lagern	In folgender Reihenfolge aktiv werden: <ul style="list-style-type: none">- Problem einkreisen, fragen, reagieren.- Bakterienwachstum

Fließschema:

Wie wird eine HPLC-Anlage in Betrieb genommen?





Ist alles in Ordnung, können Sie jetzt einen Standard injizieren. Stimmt das sich ergebende Chromatogramm mit einem Vergleichschromatogramm überein, stimmen Peakhöhe 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.



Möchten Sie das System 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. Beim Ausschalten der Pumpe gehen Sie wieder in 0,2 ml-Schritten nach unten.

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, Intertil. 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 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 bzw. 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=2,8,18: 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

OS, C₈
APS, NH, NH₂, Amino

PH, φ
e, E

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. Tipp Nr. 3)
Octasilan, C₈-Alkylkette
Aminopropylsilica, Modifizierung mit einer
(CH₂)₃NH₂-Gruppe
Phenylgruppe
„endcapped“: nachsilanisierendes RP-
Material

Eignung für ein bestimmtes Trennproblem

- Sugarpac für Zuckertrennungen
- TSKgel DNA-NPR für DNA-Fragmente und Nukleinsäuren
- PepMAP C₁₈ 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	„Inert gegen Basen“,
Symmetry	„liefert symmetrische Peaks“,
Select B	„trennt Basen“,
deactivated phase	„deaktivierte Phase“, (keine Metallionen vorhanden)
-pur, purospher	Besonders saubere Phase (auch hier keine Metallionen)
„shield“	„geschützt“ („Schutzgruppe“ an der Alkylkette, damit sind Rest-Silanol- Gruppen geschützt)
SB	<u>S</u> t <u>a</u> ble <u>B</u> ond (stabil gebunden)
SP	Sterically Protected (sterisch geschützt)
AB	Acid Bases (für Säulen und Basen geeignet)
BDS	Based Deactivated Silica (für Basen nicht aktiv, also geeignet)

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 (höfliche Hartnäckigkeit hilft), 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 Computergraphie)
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
(C)EC	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. könne 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. 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.

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

Reihenfolge nach Erscheinungsjahr

- R. E. Kaiser/E. Oeleich: **Optimierung in der HPLC**
Alfred-Hüthig-Verlag, 1979, ISBN 3-7785-0594-7
- C. Gertz: **HPLC-Tipps und Tricks**
LCD Analytical GmbH, 1989, zu beziehen bei dem Autor:
Dr. Christian Gertz, Schmalenbeckstr. 1 c, 58093 Hagen
- N. Vonk, B. G. I. Baars, H. Schnaller: **Troubleshooting in der HPLC – Fehlersuche in der HPLC**
Birkhäuser Verlag, 1990, ISBN 3-527-28195-9
- G. Aced, H. I. Möckel: **Liquidchromatography (Deutsch)**
VCH Weinheim, 1991, ISBN 3-527-28195-9
- V. Meyer: (1) **Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**
Diesterweg Salle Verlag, 7. Auflage, 1992,
ISBN 3-7935-5452-X
- W. Gottwald: (1) **RP-HPLC für Anwender**
VCH Weinheim, 1993, ISBN 3-527-28518-0
- K. K. Unger: **Handbuch der HPLC, Teil 1**
GIT Verlag, 2. Auflage, 1995, ISBN 3-92886519-6
- S. Lindsay: **Einführung in die HPLC**
Verlag Vieweg, 1996, ISBN 3-528-06759-4
(aus dem Englischen übersetzt von Stefan Lamotte und
Manfred Treitz)
- Merck KGaA **Chromatographie**
Chronologie einer Analysetechnik
GIT Verlag, 1996, ISBN 3-928865-21-8
- V. Meyer: (2) **Fallstricke und Fehlerquellen in der HPLC in Bildern**
Alfred Hüthig Verlag, 1996, ISBN: 3-7785-2417-8
- S. Kromidas (2) **HPLC Tipps**
Hoppenstedt Verlag, 1997, ISBN
- G. J. Eppert **Flüssigchromatographie**
HPLC – Theorie und Praxis
Verlag Vieweg, 1997, ISBN 3-528-06770-5
- (1) für Grundlagen
(2) Tipps für die Praxis

Empfehlenswertes Wörterbuch:

H. P. Angelé **Dictionary of Chromatography** (English, German, French, Russian), Alfred Hüthig Verlag, 1984, ISBN 3-7785-0926-8

Aus der Fülle der in Englisch erschienenen HPLC-Bücher seien folgende drei herausgegriffen:

L. R. Snyder, I. I. Kirkland: **Introduction to Modern Liquid Chromatography**
Wiley-Interscience, 1988

J. W. Dolan, L. R. Snyder: **Troubleshooting LC Systems**
Humana Press 1989

U. Neue: **“HPLC columns”**
Wiley-Interscience, 1997

Adressen von HPLC-Firmen (Deutschland)

Firma	Anschrift	Telefon	Fax
Abimed Analysentechnik GmbH	Postfach 88 11 11 40736 Lanenfeld	02173-8905-0	8905-77
Alltech GmbH	Münchner Str. 14 82008 Unterhachingen	089-615250-0	615250-19
Amicon GmbH	Königsholz 75 58453 Witten	02302-96060-0	800905
Applied Biosystems GmbH	Brunnenweg 13 64331 Weiterstadt	06150-1010	101-101
Axel Semrau GmbH & Co.	Stefansbeck 42 45549 Sprockhövel	02339-6037-0	6030
Industrievertretung Michael Baumann LC Tech-Chromatographie	Hochgernstr. 12 84403 Dorfen	08081-4920	4990
bai GmbH	Heimrodstr. 10 64625 Bensheim	06251-76076	76010
Beckmann Instruments GmbH	Frankfurter Ring 115 80807 München	089-3887-0	3887-490
Besta Technik für Chromatographie GmbH	Höhenstr. 35 69259 Wilhelmsfeld	06220-7017	7019
Bio-Rad GmbH	Heidemannstr. 164 80939 München	089-31884-0	31884100
Bischoff Analysentechnik GmbH	Höhenstr. 35 69259 Wilhelmsfeld	06220-7017	7017
Bodenseewerk Perkin-Elmer	Postfach 10 17 61 88647 Überlingen	07551-810	1612
Chrompack GmbH	Berner Str. 53 60437 Frankfurt	069-500019-0	500019-50
Chromtech GmbH	Buchwiese 3 65510 Idstein	06126-1686 oder – 1651	1686
Conchrom GmbH & Co. KG	Möckernstr. 10 28201 Bremen	0421-6440673	6440674
CS-Chromatographie Service GmbH	Am Wehebach 26 52379 Langwehe	02423-2001	2004
Deutsche Metrohm GmbH & Co.	In den Birken 3 70772 Filderstadt	0711-77088-0	77088-55
Dionex GmbH	Am Wörtzgarten 10 65510 Idstein	06126-991-0	991-277
ERC GmbH	Dahlienweg 6 93087 Alteglofsheim	09543-8277	8820
GAT Gamma Analysetechnik	Friedhofstr. 26 27576 Bremerhaven	0471-9089-0	890990
Grom GmbH	Herrenberger Str. 54 71083 Herrenberg	07032-73261	76115

Gynkotec HPLC	Landsberger Str. 65 82110 Germeringen	089-849370	849-3777
Hamilton Deutschland GmbH	Postfach 11 05 65 64220 Darmstadt	06151-9802-0	891733
Hewlett Packard GmbH	Hewlett-Packard-Str. 8 76337 Waldbronn	07243-602-0 0180-5326244	602-212 0180-316144
ICT Internationale Chemie Technik GmbH	Norsk-Data-Str. 3 61352 Bad Homburg	06172-94680	946899
Jasco GmbH	Robert-Borsch-Str. 11 64823 Groß-Umstadt	06078-74949	74006
Knauer GmbH	14163 Berlin	030-81608-0	8015010
Kontron Instruments GmbH	Werner-von-Siemens-Str. 1 85375 Neufahrn	08165-922-0	922-307
Kronlab Chromatographie	Dörntelsberg 5a 74889 Sinsheim	07261-64993	3387
Kupfer Chromatographie	An der Tuchleiche 19 64319 Pfungstadt	06157-7858	7858
LATEK Labortechnik	Lilienthalstr. 13 69214 Eppelheim	06221-760097	766479
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Postfach 10 13 25 52313 Düren	02421-969-0	969-199
Dr. A. Maisch / High Performance LC	Pfalzgrafenring 19 72119 Ammerbuch	07073-50357	4216
MedChrom	Im Breitspiel 11 69126 Heidelberg	06221-315577	357220
Merck GHaA	Frankfurter Str. 280 64293 Darmstadt	06151-781339	727495
Molnar Institut Chromatographie- technik GmbH	Schneeglöckchenstr. 47 10407 Berlin	030-4215590	421559-99
Muder & Wochele Chromatographie- technik GmbH	Wiesenweg 11 a 10365 Berlin	030-5577270	55772788
Chromatographie Handel Müller GmbH	Haag 5 83413 Fridolfing	08685-313	7407
MZ-Analysen- technik GmbH	Wöhlerstr. 2 – 6 55120 Mainz	06131-686619	625143
NOVIA GmbH	Industriepark Höchst Geb. B 845 65926 Frankfurt	069-305-43843	9754-15
OmniChrom	Alte Reisfelder Str. 6 46514 Schermbeck	02856-845	1008
Pharmacia Biotech Europe GmbH	Munzinger Str. 9 79111 Freiburg	0761-4903-308	4903-309
Polymer Standards Service GmbH	Wöhlerstr. 4 55120 Mainz	06131-96239-0	96239-11
Schambeck SFD GmbH	Rhöndorfer Str. 51 53604 Bad Honnef	02224-92396	923936

SEPSERV Seperaton Service Berlin	Helmholtzstr. 2 – 9 10587 Berlin	030-3930991	3934925
Shimadzu Europa GmbH	Albert-Hahn-Str. 6 47269 Duisburg	0203-7687	766625
Sigma Aldrich Chemie GmbH	Grünwalderweg 30 82041 Deisenhofen	089-6513-1350	6513-1398
SunChrom GmbH	Max-Planck-Str. 22 61381 Friedrichsdorf	06172-7004	5895
Supelco s. Sigma Alldrich			
Sykam GmbH	Talhofstr. 32 82203 Gilching	08105-8003	23262
TECHLAB GmbH	Ecessener Str. 2 38173 Erkerode	05305-930203	930208
Thermo Seperation Products GmbH	Boschring 12 63329 Egelsbach	06103-408-0	408-222
TosoHaas GmbH	Zettachring 6 70567 Stuttgart	0711-13257-0	13257-89
Varian GmbH	Alsfelder Str. 6 64229 Darmstadt	06151-703-0	703-237
VDS optilab Chromatographie- technik GmbH	Graf von Zeppelin Str. 5 56410 Montabaur	02602-917224	917225
Wicom	Bürstadt	06206-79970	79975
Waters GmbH	Hauptstr. 87 65760 Eschborn	06196-400600	482388
YMC Europe GmbH	Alte Raesfelder Str. 6 46514 Schermbeck	02856-845	1881
Ziemer Klaus GmbH	Pommernstr. 96 68309 Mannheim	0621-709034	709364
Zinsser Analytic GmbH	Eschborner Landstr. 135 60489 Frankfurt	069-789106-0	78910680