

Werner Röpke

# Der HPLC-Schrauber



# Inhaltsverzeichnis

## Der HPLC-Schrauber

### Einleitung

### 1 Die Pumpe

1.1 Die parallele Doppelkolbenpumpe

1.2 Kompressibilität

1.3 Die serielle Doppelkolbenpumpe

1.4 Jetzt wollen wir unsere Pumpen zerlegen

1.5 Die Pumpe überprüfen

1.6 Die Gradientenpumpe

1.7 Druckmessung und Anzeige

### 2 Mehr Licht! UV- und Diodenarray-Detektor

2.1 Der UV-Detektor

2.2 Der Diodenarray-Detektor

2.3 Fehlermöglichkeiten

2.4 Reparaturmöglichkeiten

### 3 Fluoreszenzdetektor

3.1 Ozon und ozonfrei

3.2 Raman-Spektrum

3.3 Quenching

3.4 Entsorgung

## 4 Der Lichtstrahl geht so lange zur Zelle, bis er bricht

4.1 Funktionsweise eines RI-Detektors

4.2 Aufbau eines modernen RI-Detektors

4.3 Prüfung und Kalibrierung

4.4 Fehlermöglichkeiten

4.5 Reparaturmöglichkeiten

## 5 Die Luft muss raus! Degaser

5.1 Wie können wir die gelöste Luft aus einer Flüssigkeit entfernen?

5.2 Aufbau eines typischen Degasers für die HPLC

5.3 Typische Installation eines Degasers in der HPLC

5.4 Entgasungsleistung vs. Flowrate

5.5 Erkennung von Problemen durch Luft im Eluenten

5.6 Reparaturmöglichkeiten

## 6 Verbindungen – nicht schlagend, aber dicht

6.1 Wie funktioniert eine Fittingschraube?

6.2 Wie schneide ich einen PTFE-Schlauch ab?

6.3 Druck-Sachen

6.4 Welche Leitung verwenden wir an welcher Stelle im System?

6.5 Die Montage einer Kapillare am Injektor und an der Säule

6.6 Der Einfluss der verwendeten Kapillaren und Verbindungen auf die Trennung der Peaks

6.7 Poiseuille'sche Flüssigkeiten

6.8 Welche Kapillare an welche Stelle?

6.9 Auflösungsverlust durch Hohlräume

## 7 Heiß oder kalt? Säulenheizung

7.1 Sonderfall Peltier-Öfen

7.2 Der Gassensor

## 8 Wie kommt die Probe ins System?

8.1 Handbetriebenes Probenaufgabesystem

8.2 Der automatische Probengeber

## 9 Der HPLC-Pulsationsdämpfer

## 10 Gerührt, nicht geschüttelt: Die HPLC-Mischkammer für den Hochdruckgradientenbetrieb

## 11 Das Datenauswertesystem – Integratoren und Rechner

11.1 Kommunikation des Datensystems mit den HPLC-Modulen

## 12 Anhang

12.1 Passivierung nichtrostender Stähle in der HPLC

12.2 Materialkunde

[Index](#)

***Beachten Sie bitte auch weitere interessante  
Titel zu diesem Thema***

Meyer, Veronika R.

**Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures**

2013

ISBN 978-3-527-33293-9

Mascher, Hermann

**HPLC Methods for Clinical Pharmaceutical Analysis**

2012

ISBN 978-3-527-33129-1

Snyder, Lloyd R./Kirkland, Joseph J./Dolan, John W.

**Introduction to Modern Liquid Chromatography**

2010

ISBN 978-0-470-16754-0

Meyer, Veronika R.

**Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie**

2009

ISBN 978-3-527-32046-2

Kromidas, Stavros/Kuss, Hans -Joachim (eds.)

**Chromatogramme richtig integrieren und bewerten**

2008

ISBN 978-3-527-31774-5

Kaltenböck, Karl

**Chromatographie für Einsteiger**

2008

ISBN 978-3-527-32119-3

Kromidas, Stavros

**More Practical Problem Solving in HPLC**

2004

ISBN 978-3-527-31113-2

*Werner Röpke*

## **Der HPLC-Schrauber**

**WILEY-VCH**  
Verlag GmbH & Co. KGaA

# Autor

***Werner Röpke***

Techlab GmbH

Büchnerstrasse 5

38118 Braunschweig

**Mit Illustrationen von Ulrike Harzer**

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

© 2014 Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

**Umschlaggestaltung:** Grafik-Design Schulz, Fußgönheim

**Satz:** Beltz Bad Langensalza GmbH, Bad Langensalza, Germany

**Print ISBN:** 978-3-527-31817-9

# Der HPLC-Schrauber

„You press the button - we do the rest“. Mit diesem Spruch warb Mister Eastman im Jahre 1934 für seine neue Kamera. Der Benutzer musste nur noch das Motiv anvisieren und abdrücken, dann konnte er die Kamera abgeben und erhielt nach ein paar Tagen die fertigen Bilder zusammen mit der frisch geladenen Kamera.

Das funktionierte hervorragend und hat die Firma Kodak<sup>1)</sup> groß gemacht. Es funktionierte, solange der Film nicht klemmte, der Fotograf die Sonne im Rücken hatte und auch nicht versuchte, bei Mondschein zu knipsen. Klemmte der frisch erfundenen Rollfilm oder riss er womöglich, konnte man wohl den Knopf drücken bei jedem schönen Motiv, aber keine Bilder abholen.

Heute gibt es HPLC-Geräte, da ist es ähnlich. Die Anlage wird vom Kundendienst aufgestellt, der Benutzer stellt eine kleine Flasche mit der Probe hinein und drückt einen Knopf. Der Computer spuckt ein Ergebnis aus, dessen Richtigkeit selten angezweifelt wird, schließlich hat die Maschine mehr gekostet als ein Mittelklassewagen.

Das Ergebnis ist auch meistens richtig, innerhalb gewisser Grenzen. Und wenn es erkennbar von allen vorherigen Ergebnissen abweicht, kommt der Kundendienst und alles ist wieder in bester Ordnung.

Wenn der Anwender nun wüsste, was eigentlich in der teuren Maschine alles passieren muss, um ein zumindest sachlich richtiges Messergebnis zu produzieren, wäre er in der gleichen Lage wie ein Knipser um 1934, der einen verklemmten Film selbst austauschen könnte.

Ich habe dieses Buch geschrieben für alle, die verstehen wollen, was in ihrer Maschine passiert und selbst Hand anlegen wollen, wenn es mal nicht so funktioniert, wie es

soll. Es fließen 25 Jahre Erfahrung in diese Anleitung, es ist ein reines Praxisbuch ohne jeden theoretischen Ballast.

Der Leser wird kaum mathematische Formeln finden, aber manchmal geht es halt nicht ohne, zum Beispiel bei der Berechnung der relativen Standardabweichung für den Autosampler-Test.

Ich gehe davon aus, dass dem Leser und der Leserin die Grundlagen der HPLC zumindest ansatzweise geläufig sind. Sollte das nicht der Fall sein, empfehle ich das Studium entsprechender Literatur meiner geschätzten Kollegen, die ich auch für die Theorie der Trennung an dieser Stelle empfehlen möchte.

Die folgenden Kapitel befassen sich nacheinander mit den einzelnen Komponenten einer HPLC-Anlage. Es wird deren grundsätzlicher Aufbau besprochen, die Funktion und die möglichen Fehlerquellen sowie deren Behebung.

1) Den Wechsel zur Digitalfotografie hat die Firma leider nicht überlebt.

# Einleitung

Der HPLC-Schrauber: gendermäßig völlig unkorrekt, denn natürlich sind auch die Schrauberinnen gemeint. Aber der Verlag meinte, das wäre schon in Ordnung so.

Dieses Büchlein wendet sich an alle, die gern an der HPLC herumschrauben, um die Anlage in Schuss zu halten. Die Handbücher geben wohl genaue Anweisung, was zu tun ist, aber selten warum.

Dieses Büchlein soll einige Grundlagen der „Hardware“ vermitteln: wie funktioniert eigentlich eine Pumpe, ein Detektor, ein Injektor, und an welchen Teilen darf ich schrauben und an welchen nicht.

## **Sicherheitshinweise**

Dieses Buch soll kein Servicehandbuch mit genau auf ein bestimmtes Gerät zugeschnittenen Arbeitsanweisungen ersetzen.

Alle Hinweise erfolgen nach bestem Wissen und aus langer Erfahrung, aber ohne Gewähr, dass es auch wirklich immer so funktioniert wie beschrieben.

Der Autor übernimmt keine Verantwortung für eventuelle Beschädigungen an Geräten durch Befolgen dieser Hinweise.

Die einschlägigen Sicherheitsbestimmungen sind unbedingt zu beachten. Arbeiten an mit Netzspannung betriebenen Geräten dürfen ausschließlich von qualifiziertem Fachpersonal ausgeführt werden.

Die Verwendung von gefährlichen Chemikalien ist ausschließlich kundigem Laborpersonal vorbehalten.

## **Über den Autor**

Werner Röpke, Jahrgang 1950, ist Mitbegründer und Geschäftsführer der Firma TECHLAB GmbH in Erkerode (jetzt Braunschweig).

Nach Technikerschule und diversen Fortbildungen hat er unter anderem an der Universität von Chiang Mai, Thailand, gearbeitet und dort die instrumentelle Analytik betreut.

Werner Röpke ist Inhaber verschiedener Patente auf dem Gebiet der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und hat sich während der Tätigkeit in seiner Firma umfassendes Wissen über Hochdruckpumpen und sonstige HPLC-Hardware angeeignet.

## **SI-Einheiten**

Das steht für **S**ystème **i**nternational d'unités, ein kohärentes, metrisches Einheitensystem.

Aber so lange noch Pumpen auf dem Markt sind, die den Druck in Pounds per Square Inch (psi) angeben, nehme ich mir die Freiheit, auch die anschaulichen alten Bar und Kilogramm zu verwenden.

Ja, es ist falsch, ich weiß. Aber wenn mir jemand sagt, draußen steht ein Topf mit  $3,7 \cdot 10^{10}$  Bq Cobalt-60, muss ich erst mal meinen Taschenrechner suchen. Wer er sagt, da steht ein Topf mit einem Curie Cobalt-60, laufe ich ganz schnell weg. (Die Strahlung nimmt mit dem Quadrat der Entfernung ab).

Tausend Bar sind schon gefühlsmäßig eine Menge, hundert Megapascal eher nicht.

# 1

## Die Pumpe

Im Gegensatz zur Gaschromatografie muss die mobile Phase bei der HPLC mittels geeigneter Vorrichtungen durch die Anlage gefördert werden. Nicht genug damit, es müssen auch die verschiedensten Flüssigkeiten gepumpt werden, von simplem Wasser bis zu leichtsiedenden Kohlenwasserstoffen. Der Begriff „simplem Wasser“ ist stark untertrieben, wie wir später noch sehen werden, denn gerade hierbei eröffnen sich diverse Fehlerquellen.

Copyright Techlab GmbH



Da es Hochdruckflüssigkeitschromatografie heißt, müssen die Pumpen einiges leisten. Böse Zungen übersetzen HPLC mit „High Price Liquid Chromatography“, aber das ist natürlich Unsinn.

Um eine Flüssigkeit zu fördern, gibt es mehrere Methoden: Schlauchpumpen, Kreiselpumpen, Zahnradpumpen und



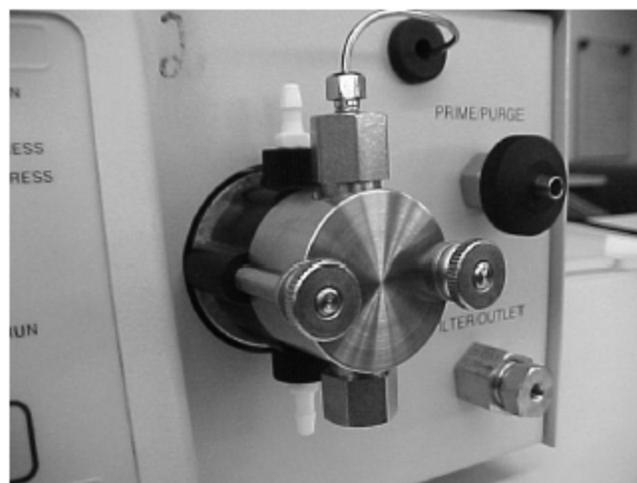
In der sehr schnellen Rückwärtsbewegung (deswegen die ungewöhnliche Nockenform) ist das obere Ventil geöffnet, das untere geschlossen. Durch den entstehenden Unterdruck wird Flüssigkeit angesaugt. Bei der nächsten Umdrehung der Nocke beginnt der Zyklus wieder von vorn.

Es leuchtet ein, dass die Förderung nicht sehr gleichmäßig erfolgt. Es erfolgt ja abwechselnd eine Saug- und eine Förderphase, was den Druck sehr stark schwanken lässt.

Allerdings ist die Saugphase sehr kurz, schaltet man ein Reservoir zwischen Pumpe und Anwendung, dessen Abfluss etwas kleiner ist als der Zufluss kann damit schon eine sehr gleichmäßige Förderung erreicht werden. Zusätzlich können die Lastwechsel noch über die Drehzahl des Motors „geglättet“ werden, das hört man an dem „unrunden“ Betriebsgeräusch. Dazu muss die Steuerung nur wissen, wo die Nocke gerade steht, um dann entsprechend zu beschleunigen oder abzubremesen. Diese Positionsanzeige wird normalerweise mit einer kleinen Lichtschranke abgegriffen.

Reine *Einkolbenpumpen* eignen sich aus Prinzip nicht für die saugseitige Gradientenformung, dazu später.

Copyright Techlab GmbH



Die Einkolbenpumpen mit schneller Saugphase sind einfach und robust aufgebaut und sehr betriebssicher. Durch die schnelle Saugphase werden etwaige Luftblasen einfach mitgerissen und setzen sich nicht im Ventil fest. Dass sie natürlich zu Störungen im Chromatogramm führen können, wird später ausführlich besprochen.

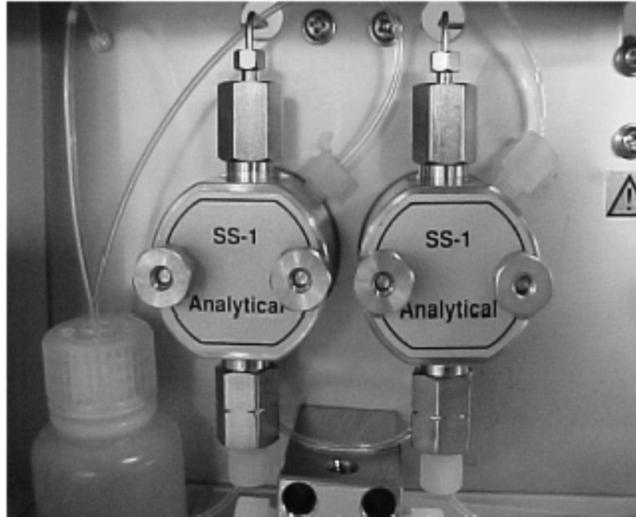
Für *Zweikolbenpumpen* benötigt man alles doppelt: Die Nocke, den Saphirkolben, den Pumpenkopf. Das verteuert die Sache schon mal erheblich, man erhält allerdings sehr ruhig laufende Pumpen. Ein Reservoir wie bei der Einkolbenpumpe wird nicht benötigt, was das „Totvolumen“ erheblich verringert. Dieser Begriff ist etwas irreführend, da die Flüssigkeit dort ja keinen „toten Raum“ bildet, der nicht durchströmt wird. Unter Totvolumen in der HPLC versteht man gemeinhin das gesamte innere Volumen eines Gerätes. Wenn eine Pumpe ein Totvolumen von 10 mL hat, so bedeutet dies lediglich, dass es bei einem Fluss von 1 mL/min zehn Minuten dauern würde, dieses Volumen einmal auszutauschen. Das ist ein sehr wichtiges Kriterium für Gradientenpumpen: Eine Veränderung der Laufmittel von A nach B über die Zeit  $t$  geht umso schneller vonstatten, je kleiner das Totvolumen der Pumpe ist. Mittlerweile hat sich aber der Begriff „Verweilvolumen“ durchgesetzt, der zusammen mit der „Verweilzeit“ die Problematik präziser beschreibt:

Je größer das Verweilvolumen einer Gradientenpumpe, desto länger braucht es, bis eine Änderung der Zusammensetzung auf der Säule ankommt. Deswegen sind Niederdruck-Gradientenpumpen für kleinste Flussraten schwierig zu konstruieren, weil eben die Volumina von Pumpenkopf und Dosierventilen eine gewisse Mindestgröße beanspruchen.

Aber nun habe ich mit dem Tot- oder Verweilvolumen weit vorgegriffen, denn unsere Pumpe pumpt ja noch nicht einmal!

# 1.1 Die parallele Doppelkolbenpumpe

Copyright Techlab GmbH



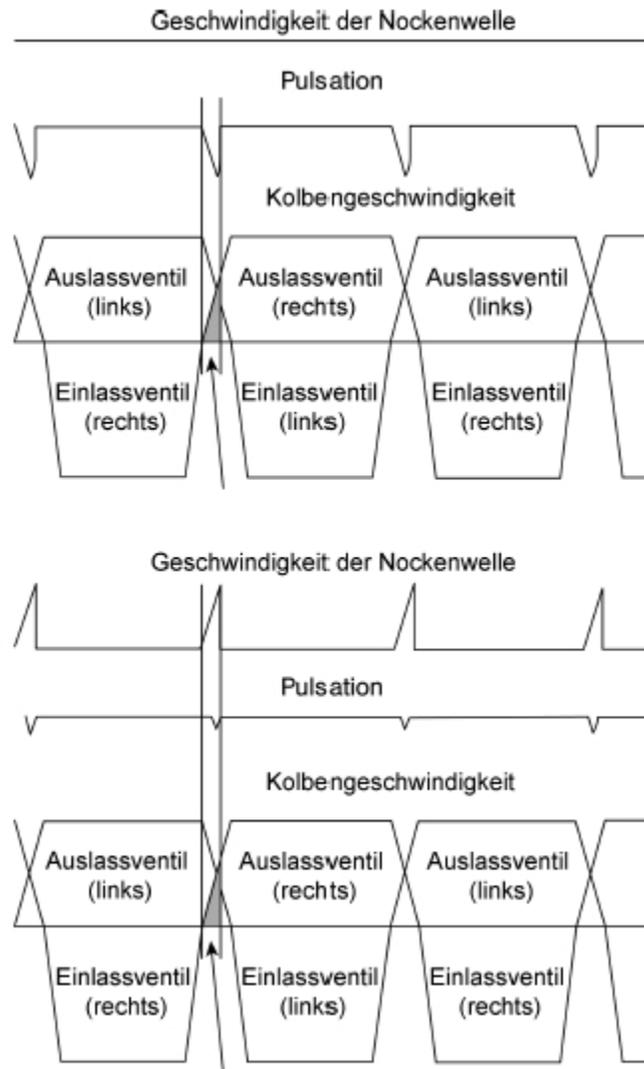
Bei der parallelen Doppelkolbenpumpe sind beide Köpfe gleich aufgebaut, die Nocken nur um etwa  $180^\circ$  versetzt. Während ein Kopf in der Saugphase ist, fördert der andere. Die Überschneidung ist so berechnet, dass sich ein sehr pulsationsarmer Fluss ergibt.

*Vorteile:* Sehr pulsationsarm, doppelte Fördermenge bei gleicher Drehzahl im Vergleich zur Einkolbenpumpe.

*Nachteile:* Wenn eine Fehlfunktion der Ventile vorliegen sollte, ist die Lokalisierung etwas schwierig, es gibt ja vier Stück.

Wie die nachfolgenden Diagramme zeigen, gibt es aber auch bei der Zweikolbenpumpe einen kleinen Druckeinbruch beim Lastwechsel.

Copyright YoungLin Instrument Co.



Die obere Linie zeigt die Umlaufgeschwindigkeit der Nocke, die zweite Linie den Druck. Erkennbar sind die Druckeinbrüche in dieser Linie bei konstanter Nockengeschwindigkeit.

Das zweite Diagramm zeigt die Lösung: Kurz vor dem Lastwechsel wird die Nocke beschleunigt, um den Druckeinbruch auszugleichen. Dazu muss die Steuerelektronik natürlich wissen, wo die Nocke gerade steht. Zu diesem Zweck ist außen an der Welle eine Scheibe mit einem Sensor befestigt, meistens ist das eine Lichtschranke. Diese gibt bei jeder Umdrehung einen Impuls ab, der in direkter Korrelation zum Stand der Nocke ist. Die

Steuerung regelt nun entsprechend die Geschwindigkeit des Motors auf und ab, was an dem „unrunden“ Laufgeräusch zu erkennen ist. Fällt die Lichtschranke aus, pulsiert die Pumpe und der resultierende Fluss ist zu niedrig gegenüber dem ausgeregelten.

Copyright Techlab GmbH



## 1.2 Kompressibilität

Flüssigkeiten sind kompressibel, auch wenn wir das in der Schule anders gelernt haben. In meinem Physikbuch stand:

„... lassen sich Flüssigkeiten nur bei sehr großen Drücken merklich zusammendrücken. Sie sind kaum volumenelastisch. ... Die Volumenänderung ist wegen ihrer Kleinheit in vielen Fällen zu vernachlässigen“, Kuchling: PHYSIK, Formeln und Gesetze, Köln 1972.

Das war in der Vor-HPLC-Zeit. Heute arbeiten wir täglich mit Drücken um 30–40 MPa, da macht sich die Volumenänderung schon bemerkbar.

*Non vitae, sed scholae discimus*<sup>3)</sup>.

Wenn schon Wasser komprimierbar ist, sind es andere Flüssigkeiten natürlich auch, dummerweise jede unterschiedlich. Für eine korrekte Kompressibilitätskompensation müssen also in der Pumpe

verschiedene Korrekturfaktoren hinterlegt werden, das können nicht alle Pumpen.

Darüber hinaus ändert sich die Kompressibilität mit dem Druck, der Temperatur und der Menge des aufgelösten Gases. Um den Einfluss des letztgenannten Faktors zu reduzieren, ist zur hochpräzisen Förderung von Flüssigkeiten die Verwendung eines Vakuumentgasers erforderlich.

Der Einfluss der Temperatur auf die Kompressibilität ist nicht linear und kann nicht berechnet werden.

Grundsätzlich kann man natürlich auch mit einer Einfachpumpe ohne jede Kompensation ordentliche HPLC-Analysen fahren. Wenn die Ergebnisse allerdings beispielsweise beim Hersteller und Käufer eines Produktes exakt übereinstimmen müssen, kommt man um sehr hochwertige Maschinen nicht herum. Es gibt Pumpen<sup>4)</sup>, bei denen der Anwender die Kompressibilitäten seiner Lösungsmittels bei unterschiedlichen Drücken zwischen 0 und 600 bar ermitteln und in einer XML-Datei speichern kann. Diese Datei kann dann anderen Pumpen zur Verfügung gestellt werden, da die Lösungsmittelkompressibilität nicht von der Pumpe abhängig ist.

## **1.3 Die serielle Doppelkolbenpumpe**

Die serielle Doppelkolbenpumpe ist eigentlich eine Einkolbenpumpe mit Pulsdämpfer.

Copyright Techlab GmbH

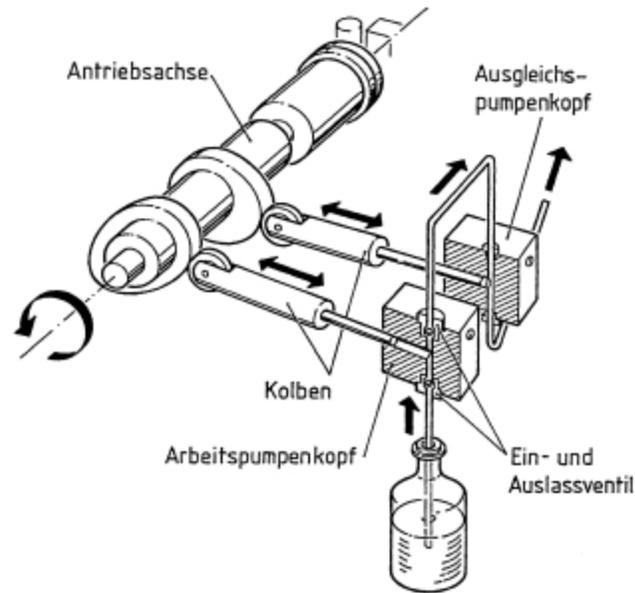


Sie sieht für den Laien auf den ersten Blick genauso aus wie die Zweikolbenpumpe. Auf den zweiten Blick ist allerdings zu erkennen, dass der Ansaugschlauch nur in einen Kopf hineinführt, nicht in beide. Dafür gibt es eine Kapillare vom Auslassventil des ersten Kopfes in den zweiten Kopf, also eine Hochdruckleitung.

Das Prinzip ist einfach und genial: Die beiden Nocken sind so berechnet, dass die geförderte Flüssigkeit vom ersten Kopf mit einer genau berechneten Vorkompression vom zweiten übernommen wird, um die Pulsation auszugleichen. Der zweite Kolben ist der sog. Ausgleichskolben, er hat nur die Funktion, den Druck gleichmäßig aufrecht zu halten.

*Vorteil:* bei richtiger Konstruktion sehr gleichmäßiger Fluss, nur zwei Ventile erforderlich. *Nachteil:* nur die halbe Fördermenge der „echten“ Zweikolbenpumpe, da es ja nur einen aktiven Kopf gibt.

Copyright Gynkotek Ltd.



Man erkennt diese Pumpenart daran, dass nur der eine Kopf Ventile hat, der andere nicht. Ein paar Hersteller wollen aber sparen und verbauen zwei gleiche Köpfe, der linke hat Ventile (sonst würde er nicht fördern), der rechte hat leere Ventilschrauben ohne Funktion.

## 1.4 Jetzt wollen wir unsere Pumpen zerlegen

Copyright Techlab GmbH