WILEY-VCH

Werner Röpke

Der HPLC-Schrauber

Werner Röpke

Der HPLC-Schrauber

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

Druck und Bindung:
Markono Print Media Pte Ltd, Singapore

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

Inhaltsverzeichnis

Der HPLC-Schrauber *IX*

Einleitung *XI*

1 Die Pumpe *1*
1.1 Die parallele Doppelkolbenpumpe *4*
1.2 Kompressibilität *6*
1.3 Die serielle Doppelkolbenpumpe *7*
1.4 Jetzt wollen wir unsere Pumpen zerlegen *8*
1.4.1 Ventile *10*
1.4.2 Kolben und Dichtungen *18*
1.4.2.1 Kolben *18*
1.4.2.2 Die Kolbendichtung *20*
1.5 Die Pumpe überprüfen *23*
1.6 Die Gradientenpumpe *26*
1.6.1 Binäre Hochdruckgradientenpumpe *27*
1.6.1.1 Zusammenfassung *30*
1.6.2 Wie überprüfe ich die Gradientengenauigkeit? *31*
1.6.3 Bauformen von Gradientenventilen *33*
1.7 Druckmessung und Anzeige *33*

2 Mehr Licht! UV- und Diodenarray-Detektor *37*
2.1 Der UV-Detektor *37*
2.1.1 Funktionsprinzip eines UV-Detektors *38*
2.1.2 Aufbau eines UV-Detektors mit variabler Wellenlänge *39*
2.2 Der Diodenarray-Detektor *49*
2.3 Fehlermöglichkeiten *52*
2.4 Reparaturmöglichkeiten *52*

Der HPLC-Schrauber, 1. Auflage. Werner Röpke.
© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2013 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

3 Fluoreszenzdetektor *53*
3.1 Ozon und ozonfrei *55*
3.2 Raman-Spektrum *58*
3.3 Quenching *59*
3.4 Entsorgung *59*

4 Der Lichtstrahl geht so lange zur Zelle, bis er bricht *61*
4.1 Funktionsweise eines RI-Detektors *62*
4.2 Aufbau eines modernen RI-Detektors *66*
4.2.1 Sturm im Wasserglas *67*
4.3 Prüfung und Kalibrierung *67*
4.4 Fehlermöglichkeiten *68*
4.5 Reparaturmöglichkeiten *68*

5 Die Luft muss raus! Degaser *69*
5.1 Wie können wir die gelöste Luft aus einer Flüssigkeit entfernen? *71*
5.1.1 Entgasen durch Ultraschall *71*
5.1.2 Membran-Entgasung *72*
5.2 Aufbau eines typischen Degasers für die HPLC *74*
5.3 Typische Installation eines Degasers in der HPLC *76*
5.4 Entgasungsleistung vs. Flowrate *77*
5.5 Erkennung von Problemen durch Luft im Eluenten *78*
5.6 Reparaturmöglichkeiten *78*

6 Verbindungen – nicht schlagend, aber dicht *79*
6.1 Wie funktioniert eine Fittingschraube? *82*
6.2 Wie schneide ich einen PTFE-Schlauch ab? *84*
6.3 Druck-Sachen *84*
6.4 Welche Leitung verwenden wir an welcher Stelle im System? *85*
6.5 Die Montage einer Kapillare am Injektor und an der Säule *86*
6.6 Der Einfluss der verwendeten Kapillaren und Verbindungen auf die Trennung der Peaks *92*
6.6.1 Praktische Beispiele *92*
6.7 Poiseuille'sche Flüssigkeiten *94*
6.8 Welche Kapillare an welche Stelle? *97*
6.9 Auflösungsverlust durch Hohlräume *97*

7 Heiß oder kalt? Säulenheizung *99*
7.1 Sonderfall Peltier-Öfen *104*
7.2 Der Gassensor *105*

8 Wie kommt die Probe ins System? *107*
8.1 Handbetriebenes Probenaufgabesystem *107*
8.1.1 Funktionsweise *107*
8.1.1.1 Der Weg der Probe in der Flüssigkeit *116*

8.1.1.2 Installation von Probenschleifen *118*
8.1.1.3 Vorwärts oder rückwärts? *118*
8.2 Der automatische Probengeber *119*
8.2.1 Fehlersuche und Reparatur *121*
8.2.2 Autosampler mit Schleifenfüllung durch Spritze (1) – die Probe wird in die Schleife gezogen *124*
8.2.2.1 Fehlermöglichkeiten *125*
8.2.3 Autosampler mit Schleifenfüllung (2) – die Probe wird in die Schleife gedrückt *126*
8.2.4 Autosampler mit Direktinjektion *129*

9 Der HPLC-Pulsationsdämpfer *133*

10 Gerührt, nicht geschüttelt: Die HPLC-Mischkammer für den Hochdruckgradientenbetrieb) *137*

11 Das Datenauswertesystem – Integratoren und Rechner *143*
11.1 Kommunikation des Datensystems mit den HPLC-Modulen *147*
11.1.1 Zusammenfassung *150*

12 Anhang *151*
12.1 Passivierung nichtrostender Stähle in der HPLC *151*
12.2 Materialkunde *153*

Index *157*

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[1)] 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

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

Der HPLC-Schrauber, 1. Auflage. Werner Röpke.
© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2013 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

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.

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.

Der HPLC-Schrauber, 1. Auflage. Werner Röpke.
© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2013 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

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 „simples 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.

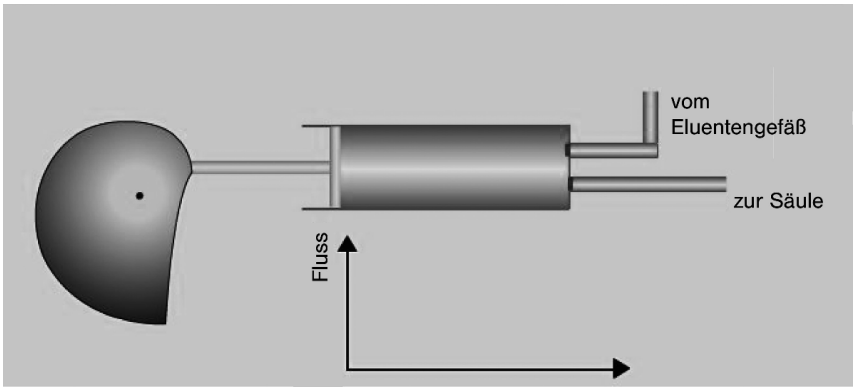
Um eine Flüssigkeit zu fördern, gibt es mehrere Methoden: Schlauchpumpen, Kreiselpumpen, Zahnradpumpen und Kolbenpumpen.

Schlauchpumpen werden gelegentlich in der Säulenchromatografie eingesetzt, bauen aber nur 2–3 bar Druck auf. Kreisel- und Zahnradpumpen haben Schlupf und können daher auch nicht verwendet werden. Schlupf bedeutet, dass die Förderung nie 100 % beträgt, sondern in Abhängigkeit von Druck und Drehzahl etwas von der Flüssigkeit „zurückschlüpft“, also in der Gesamtfördermenge fehlt.

Der HPLC-Schrauber, 1. Auflage. Werner Röpke.
© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2013 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Bleiben also nur Kolbenpumpen, im Prinzip wie die alten Feuerwehrpumpen, nur kleiner und mit Motor. Hier beträgt die Förderung 100 %, das heißt, der Kolbeninhalt, der angesaugt wurde, wird auch gefördert.

HPLC-Hochdruckpumpen sind prinzipiell immer gleich aufgebaut: Ein Motor bewegt über ein Getriebe oder eine Untersetzung eine Nocke, die wiederum einen Stößel betätigt.[1] Dieser, aus Saphir oder Keramik[2] gefertigt, bewirkt die eigentliche Pumparbeit. Das Prinzip zeigt diese Abbildung:



Copyright Chemgapedia, FIZ; Wiley Information Services GmbH

Die Nocke links dreht sich im Uhrzeigersinn und drückt den Stößel langsam nach rechts, der Inhalt des Zylinders wird durch das untere Ventil auf die Säule befördert.

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.

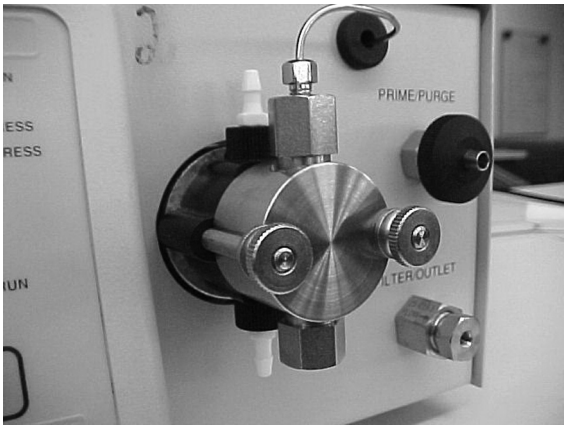
Es leuchtet ein, dass die Förderung nicht sehr gleichmäßig erfolgt. Es erfolgt ja abwechselnd eine Saug- und eine Förderphase, was den Druck sehr stark schwanken lässt.

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 abzubremsen. Diese Positionsanzeige wird normalerweise mit einer kleinen Lichtschranke abgegriffen.

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

1) Pumpen der Firma Agilent haben einen Spindelantrieb für die Kolbenbewegung, sonst ist das Prinzip das Gleiche.

2) Zu den Stößeln und den Materialien, aus denen sie gefertigt werden, kommen wir am Ende des Kapitels.



Copyright Techlab GmbH

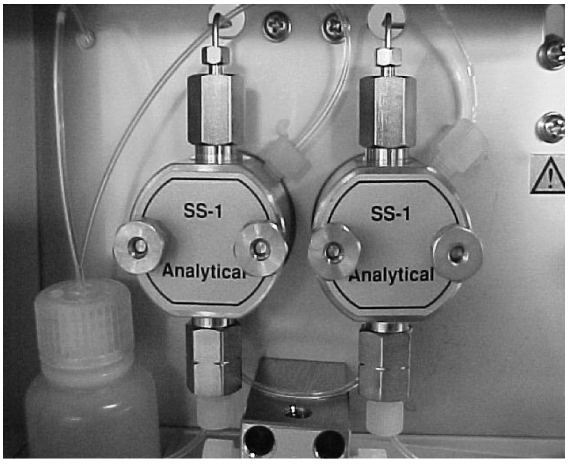
Die Einkolbenpumpen mit schneller Saugphase sind einfach und robust aufgebaut und sehr betriebssicher. Durch die schnelle Saugphase werden etwaige Luftblasen einfach mitgerissen und setzen sich nicht im Ventil fest. Dass sie natürlich zu Störungen im Chromatogramm führen können, wird später ausführlich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