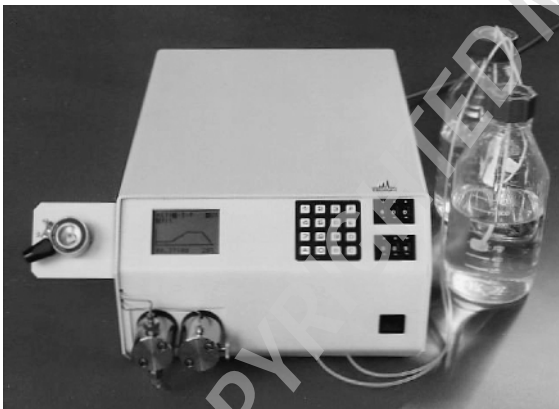


1

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.

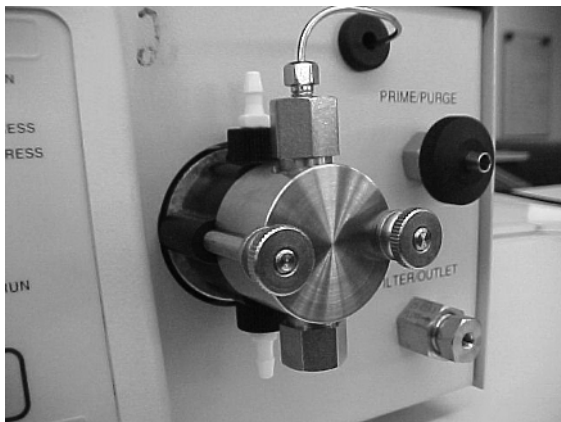


Copyright Techlab GmbH

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.



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.

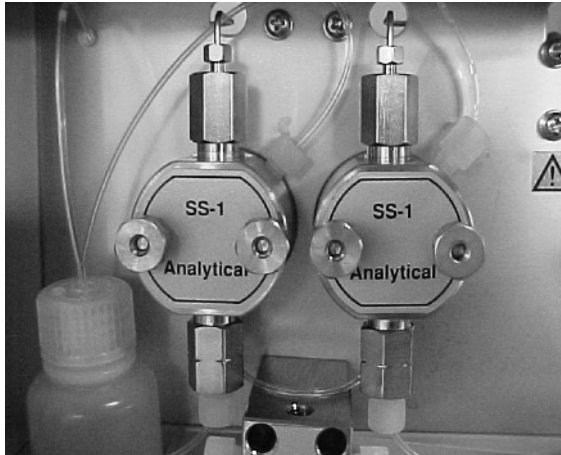
Für *Zweikolbenpumpen* benötigt man alles doppelt: Die Nocke, den Saphirkolben, den Pumpenkopf. Das verteuert die Sache schon mal erheblich, man erhält allerdings sehr ruhig laufende Pumpen. Ein Reservoir wie bei der Einkolbenpumpe wird nicht benötigt, was das „Totvolumen“ erheblich verringert. Dieser 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



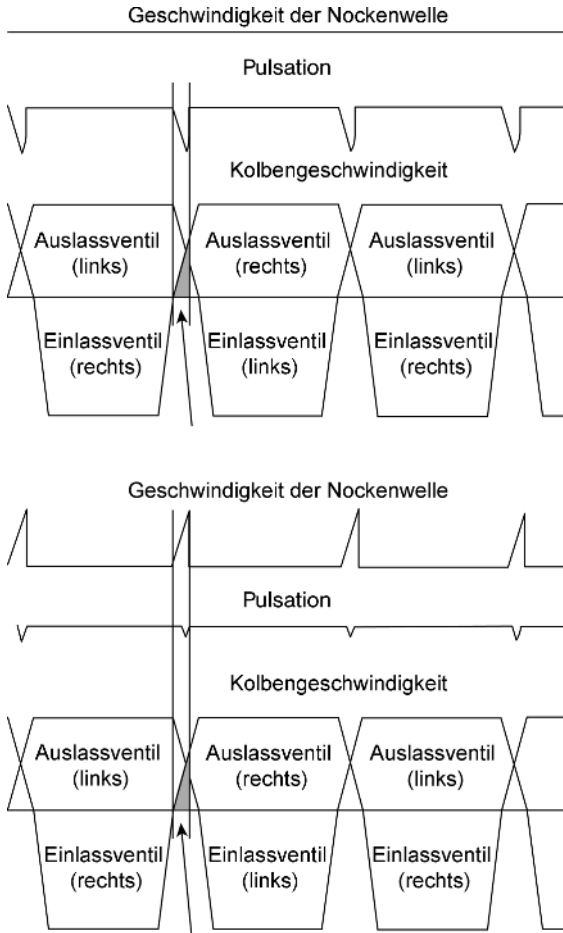
Copyright Techlab GmbH

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.



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 discimus³⁾

Wenn schon Wasser komprimierbar ist, sind es andere Flüssigkeiten natürlich auch, dummerweise jede unterschiedlich. Für eine korrekte Kompressibilitäts-Kompensation 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

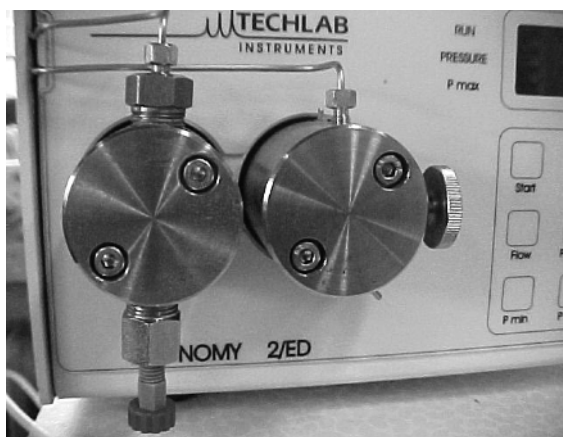
3) Seneca, epistula morales ad Lucilium.

gibt Pumpen⁴⁾, 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.



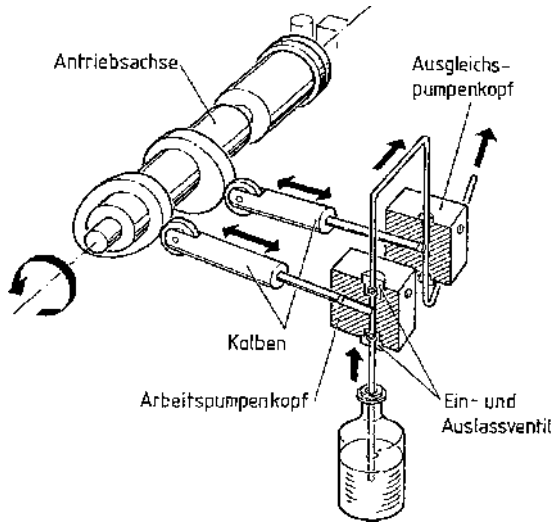
Copyright Techlab GmbH

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.

4) u.a. Pumpen der Firma Agilent.

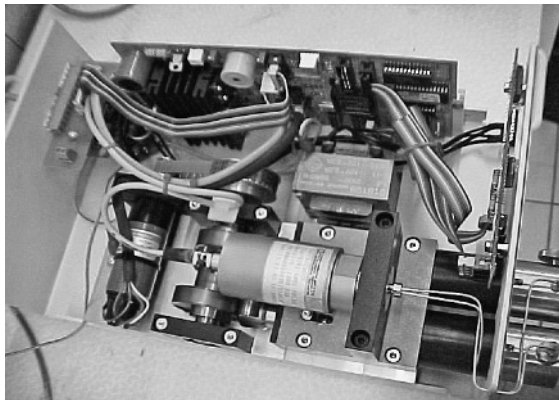


Copyright Gynkotek Ltd.

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

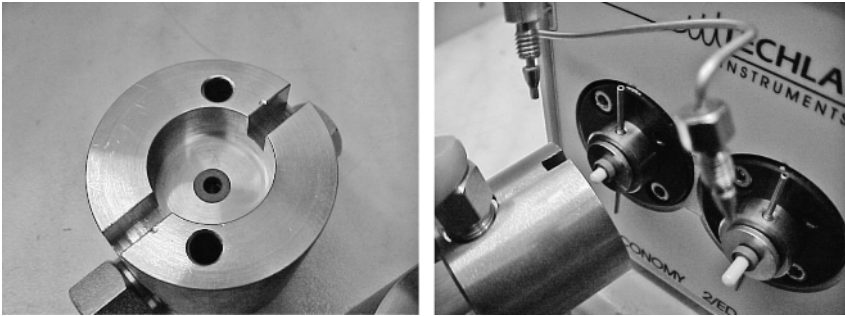
Links ist der Motor, der über einen Zahnriemen die Nockenwelle antreibt. Unter dem Druckaufnehmer befinden sich Metallstangen, an denen die Kolben befestigt sind, ganz außen die Köpfe zur leichteren Demontage.

Interessanterweise verbauen die deutschen Hersteller traditionell Gleichstrommotoren, die amerikanischen und japanischen dagegen Schrittmotoren.

Gleichstrom- oder DC-Motoren laufen praktisch lautlos und sind sehr einfach in der Regelung, Schrittmotoren geben ein summendes Geräusch von sich und benötigen eine etwas aufwendigere Steuerung.

An den Teilen innen ist kundenseitig eigentlich nichts zu reparieren, beschränken wir uns also auf das, was draußen ist.

Wie ist so ein *Pumpenkopf* aufgebaut?

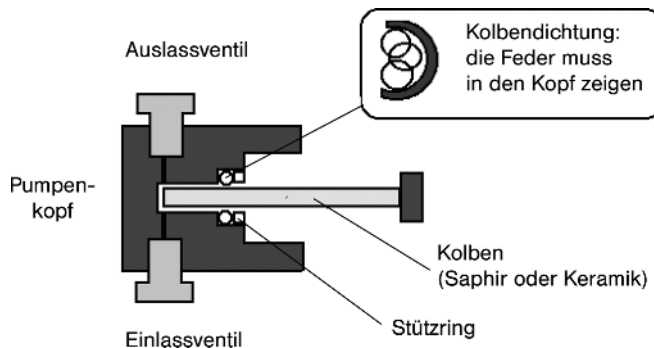


Copyright Techlab GmbH

Ein runder Metallkörper, bei manchen Herstellern auch eckig, gelegentlich sind zwei Köpfe zusammengefasst aus einem Stück gefertigt. Das Material ist Edelstahl 1.4571⁵⁾ (oder sollte es jedenfalls sein) oder Kunststoff, vorzugsweise PEEK⁶⁾.

Die eigentliche *Pumpkammer* ist zur Rückseite hin mit einer Dichtung abgeschlossen, in der sich der Kolben bewegt. Das Bild rechts verdeutlicht die Funktion: Der Kolben drückt nach links in den Kopf hinein, dadurch schließt das Einlassventil, über das Auslassventil kann die der Eluent ins System fließen. Ein ganz wichtiges Detail ist die Dichtung, die den Druckraum nach hinten abschließt und in welcher der Kolben gleitet.

So sieht das im Schnitt von der Seite aus:



Copyright Sykam GmbH

5) genormte Bezeichnung für einen rostfreien, mit Chrom, Nickel, Molybdän und Titan legierten Stahl. Dieser Stahl ist rela-

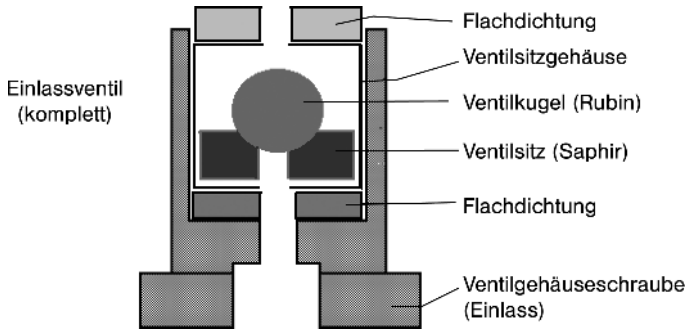
tiv weich, sehr zäh, dabei aber beständig gegen fast alles, außer chlorierte Säuren.
6) PolyEtherEtherKeton, ein sehr hochwertiger Kunststoff.

Oben und unten sind Gewinde, in die die Ventile eingeschraubt werden. Beginnen wir mit den *Ventilen*.

1.4.1

Ventile

Kugelventile in HPLC-Pumpen sind etwas ganz anderes als Kugelventile in der Installationstechnik und werden auf Englisch als „check valves“ bezeichnet. Sie bestehen aus einer Kugel, wie der Name schon erahnen lässt, und einem Gegenstück, dem Sitz. Wenn man ein Ventil zerlegt hat, macht sich die allgegenwärtige Gravitation bemerkbar und lässt die Kugel vom Tisch rollen, was für eine optimale Kugelform⁷⁾ spricht. Ist es auch, denn diese Kugel ist aus einem synthetischen Saphir gefertigt und perfekt geschliffen. Die rote Farbe stammt von Cr^{3+} -Ionen, ein synthetischer Saphir ist eigentlich farblos. Einen technischen Grund hat das nicht, aber man findet die Kugel besser, wenn sie vom Tisch gerollt ist.



Copyright Sykam GmbH

Das Gegenstück, der Sitz, ist farblos und ebenfalls aus Saphir. Die durchströmende Flüssigkeit hebt die Kugel vom Sitz, in der Gegenrichtung wird die Kugel auf den Sitz gepresst. Das Bild zeigt beispielhaft ein Einlassventil, der Eluent tritt von unten ein und kann nicht zurückfließen, wenn die Kugel wieder auf den Sitz gedrückt wird.

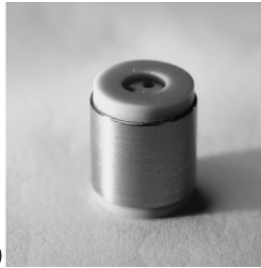
Sowohl Kugel als auch Sitz sind, wie erwähnt, mit außerordentlich hoher Präzision gefertigt. Die auf dem Sitz aufliegende Kugel muss ja dem Pumpendruck standhalten und dichten. Die so genannte Dichtkante ist die Fasse im Sitz, und zwar auf der polierten Seite. Damit man weiß, wie Kugel und Sitz eingebaut werden müssen, ist eine Seite poliert und eine Seite ist matt. Grundsätzlich liegt die Kugel immer auf der polierten Seite auf, bei einer Auflagefläche von weniger als einem Quadratmillimeter.

7) Die Abweichung von der idealen Kugel-

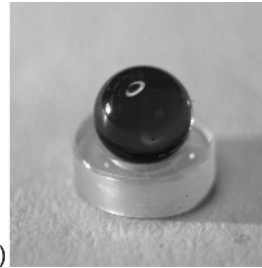
form wird vom Hersteller mit $t = 0,08 \mu\text{m}$ angegeben.



Ventilkugel und Sitz im Gehäuse – einfach zu zerlegen und zu reinigen.



Geschlossene Kartusche – einfacher Austausch, Reinigung schwierig



Kugel und Sitz einzeln, so sie in Gehäuse und Kartusche enthalten sind.

Copyright Techlab GmbH

Wer gerne rechnet, mag die Kräfte kalkulieren, die hier herrschen: 400 bar Druck (oder 800 bar bei der UHPLC).

Die Kugel und der Sitz halten das problemlos aus. Aber warum funktionieren die Ventile denn manchmal nicht?

Problem Nr. 1:

Das Einlassventil ist normalerweise baugleich mit dem Auslassventil, nur eben kopfstehend. Die Versorgung des Einlassventils erfolgt meist mit einem Schlauch aus PTFE⁸⁾, womit wir bei der ersten Fehlerquelle wären.

Puristen sagen, nur eine geschweißte Edelstahlverbindung ist dicht. Dem am nächsten kommt eine saubere Klemmringverschraubung. Ganz unten auf der Dichtigkeitsskala kommt eine Quetschverbindung.

PTFE fließt unter Druck und ein dünner Schlauch bricht an scharfen Kanten. Je nach Ausführung der Verbindung *Ansaugschlauch–Einlassventil* kann es also hier zu Undichtigkeiten kommen. Diese sind sehr klein und haben zur Folge, dass hier winzige Mengen Luft angesaugt werden.

Eben diese Luft verursacht im System große Probleme. Ist die Undichtigkeit sehr groß, tropft es heraus. Das ist nicht schlimm, denn dann weiß der Anwender wenigstens, dass hier etwas nicht in Ordnung ist. Eine winzige, nicht tropfende Undichtigkeit bleibt dagegen fast immer unentdeckt.

Was tun?

Die Verwendung von Teflonband an HPLC-Pumpen ist strengstens verboten!

Abgesehen davon, dass es ein ästhetisches Problem ist, führt die Verwendung von PTFE-Band garantiert zu Ventilproblemen: Beim Drehen der Ventilschraube oder des Anschlusses fallen ganz winzige Schnipsel ab, die in den Ventilen landen, sodass diese dann nicht mehr schließen. Liegt einmal solch ein Partikel auf dem Sitz und wird durch die Kugel angepresst, ist er nur noch grobmechanisch wieder zu lösen.

8) PolyTetraFluorEthylen, der Name Teflon, ist ein Markenzeichen der Firma DuPont.

Also: Schrauben Sie den Ansaugschlauch heraus und suchen Sie mit der Lupe nach Fehlstellen. Sieht es auch nur irgendwie verdächtig aus, tauschen Sie einfach den Schlauch aus. Das ist billiger als stundenlange Fehlersuche.

Weitere Probleme:

Am anderen Ende des Schlauches sitzt normalerweise eine Fritte. Die soll verhindern, dass Partikel aus dem Laufmittel in die Pumpe geraten.

- a) Sie ist korrodiert durch das Laufmittel und sondert Dreck ab, statt ihn zurückzuhalten.
- b) Sie ist durch Mikroorganismen zugewachsen, was bei Wasser häufig der Fall ist.

Fall b) hat einem Kunden mal eine größere Servicerechnung beschert: „Die neue Pumpe pumpt nicht mehr, der Kundendienst muss unbedingt kommen. Sie läuft zwar, aber es kommt kaum etwas heraus!“

Der genannte Kunde bezog sein Wasser aus einer der üblichen Patronen und ließ die Vorratsflasche einfach so lange stehen, bis sie leer war. Kurzes Schwelgen, offenbarte Wunderwelten von Mikroorganismen, die sich natürlich auch in der Fritte festgesetzt hatten.

Eine HPLC-Pumpe kann nicht funktionieren, wenn sie nicht genug Laufmittel erhält, was der Schlauchtest einfach beweist:

Schlauch am Einlassventil herausdrehen und deutlich tiefer als die Flasche halten. Die Physik verlangt, dass es jetzt aus dem Schlauch herausläuft, und zwar recht flott. Tropft es ganz mühsam oder gar nicht (immer bei einem 1/8" Zoll Schlauch⁹⁾, versteht sich), ist mit Sicherheit die Fritte zugewachsen oder völlig verdeckt. Die Gegenprobe: Fritte abmachen und den Versuch wiederholen.

Bei Verwendung von Wasser als Laufmittel dieses oft genug frisch ansetzen und dafür sorgen, dass es nicht zum unkontrollierten Wachstum von Mikroorganismen kommt.

Kurz vor Drucklegung kam eine UV-Tauchlampe für die Vorratsflasche auf den Markt. UV-Strahlung würde das Wachstum von Mikroorganismen effektiv hemmen, es bleibt abzuwarten, wie gut das in der Praxis funktioniert.

Wird die Pumpe nun endlich mit sauberem Wasser versorgt, könnte der Pumpvorgang beginnen: Der Kolben fährt zurück und zieht die Kammer voll. Dann drückt er den Inhalt durch das obere Ventil hinaus, was sich einfach durch den analytischen Daumen prüfen lässt: Drücken Sie fest auf die Öffnung des Auslassventils, nachdem Sie die Kapillare dort entfernt haben. Es muss ein deutlicher Druck zu spüren sein, spätestens beim zweiten Kolbenhub muss es herausspritzen, wenn die Ventile korrekt arbeiten. Es empfiehlt sich, diese Versuche immer mit Wasser durchzuführen, nicht mit Acetonitril oder ähnlichen Laufmitteln.

Ist kaum Druck zu spüren, schließt eines der Ventile nicht. Ist wohl etwas Druck zu spüren, der aber in der *Saugphase deutlich nachlässt*, ist mit Sicherheit das Auslassventil defekt. Soweit die erste Prüfung mittels unserer angeborenen Werkzeuge.

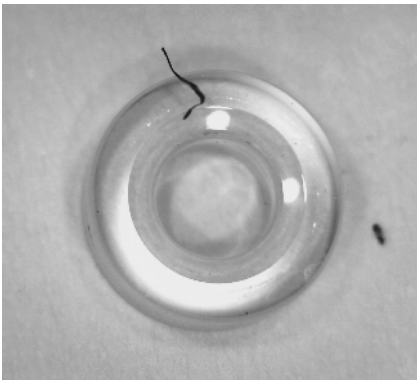
9) Zu den zölligen Abmessungen siehe Kapitel 6, Verbindungen.

Die Prüfung des Einlassventils erfolgt auf Sicht: Heben Sie bei laufender Pumpe den Schlauch aus der Flüssigkeit, bis eine Luftblase angesaugt wird. Diese muss sich jetzt ruckartig in Richtung Pumpe bewegen. Tut sie das nicht, sondern bewegt sich immer wieder ein Stück zurück, ist das Einlassventil defekt.

Es ist völlig sinnlos, in dieser Testphase die Dichtung oder den Kolben als Fehlerquelle zu vermuten!

Bei den Ventilen handelt es sich technisch gesehen um Einbahnstraßen, die Flüssigkeit nur in einer Richtung durchlassen. Wie vorhin erwähnt, besteht so ein Ventil aus einer Kugel und einem Sitz.

Dieser ist im Reinraum mit höchster Präzision eingeschliffen und hat eine sogenannte Dichtkante. Diese allein ist für die Abdichtung verantwortlich. Die Kugel wird durch den Pumpendruck gegen diese Kante gepresst und lässt dann nichts mehr durch, jedenfalls keine Flüssigkeit.



Ventilsitz mit einem winzigen Schnipsel von der Kolbendichtung. Dieser wurde so fest gegen die Dichtkante gepresst, dass er nur noch grobmechanisch zu entfernen war.

Copyright Techlab GmbH

Bitte vergegenwärtigen Sie sich die hier wirkenden Kräfte: Ein Pumpendruck von 300 bar entspricht 300 kg/cm^2 , die auf die Kugel und damit auf den Sitz drücken.¹⁰⁾ Nur extrem harte Materialien wie Saphir oder Zirkonoxid halten diese Drücke aus und lassen sich auch entsprechend präzise fertigen.

Ein Ventil geht selten kaputt, es verdreht ganz einfach nur. Der Ventilsitz kann allerdings durchbrechen, wenn er verkantet eingebaut wird.

Haben Sie nun das Ein- oder Auslassventil als Fehlerquelle lokalisiert, müssen Sie es reparieren. Wie schon erwähnt, gehen Ventile nur selten wirklich kaputt, sie verschmutzen meist nur. Sie haben nun drei Möglichkeiten:

1. ein neues Ventil kaufen
2. das Ventil ausbauen und im Ultraschallbad reinigen
3. das Ventil drin lassen und reinigen

10) Natürlich darf es nicht bar und kg heißen, sondern nur MPa und kP. Da aber nach meiner Erfahrung die Hälfte aller Anwender den Unterschied zwischen Ki-

lopond und Kilogramm vergessen hat und dies auch ein Praxis- und kein Lehrbuch ist, habe ich diese anschaulichen Bezeichnungen gewählt.

Möglichkeit (1) hebt den Umsatz Ihres Lieferanten. Möglichkeit (2) hat selten Erfolg, solange Sie nicht das Ventil komplett zerlegen und dann ins Ultraschallbad werfen.

Möglichkeit (3) ist für faule Leute, ich gehöre dazu: Setzen Sie einen Topf mit ca. 1 L warmem Wasser an und geben Sie einen großzügigen Schuss Essigreiniger aus der Metro hinein. Pumpen Sie diese Flüssigkeit bei 1 mL/min über Nacht durch die Anlage (ohne Säule natürlich!).

Wenn Sie etwas Glück haben, werden damit alle Ablagerungen von den Ventilen gelöst und die Pumpe arbeitet wieder einwandfrei. Statt des oben erwähnten Produkts können Sie auch irgendeinen Haushaltsreiniger verwenden. Ich bekomme keine Schleichwerbungsprovision von der Metro!

Das funktioniert deswegen so gut, weil sich im Ventil der Strömungsquerschnitt verengt und damit die Geschwindigkeit des Wassers (mit Reinigungsmittel) zunimmt, die Kugel wird wie mit einem Hochdruckreiniger angeblasen. Man nennt das den Venturi-Effekt.¹¹⁾

Möglichkeit (2), Ventil ausbauen und im Ultraschallbad reinigen:

Wieso funktioniert das Ultraschallbad (und warum nicht so gut bei Ventilkartuschen)?

Das Wirkprinzip der Reinigung basiert auf Kavitation. Kavitation ist die Bildung und Auflösung von Hohlräumen in Flüssigkeiten durch Druckschwankungen.

Das in der Flüssigkeit vorhandene Ultraschallfeld erzeugt Wellen mit Über- und Unterdruck. Trifft eine solche Unterdruckwelle auf einen Gegenstand (das zu reinigende Objekt), bilden sich an kleinen, als Keimen fungierenden Luftbläschen mit Dampf gefüllte Hohlräume. Beim Auftreffen der darauf folgenden Hochdruckwelle auf den Hohlraum steigt der statische Druck im Hohlraum durch dessen Kompression wieder über den Sättigungsdampfdruck. Dadurch kondensieren die Dampfblasen schlagartig mit Schallgeschwindigkeit. Dabei entstehen Druckspitzen bis 100 000 bar. Diese zyklisch entstehenden und verschwindenden Hohlräume bearbeiten quasi die Oberfläche und reinigen sie damit. Schmutz und andere Anhaftungen werden dadurch mechanisch gelöst.¹²⁾

Wenn Sie ein Ventil unzerlegt ins Ultraschallbad werfen, haben die Schallwellen kaum eine Chance, ins Innere vorzudringen und ihr Werk zu verrichten. Selbst wenn es Ihnen doch gelingt, bleiben aber die gelösten Partikel im Gehäuse drin und werden nicht ausgeschwemmt.

Pumpen Sie dagegen den Reiniger durch die Ventile (die müssen natürlich wenigstens ein bisschen funktionieren), haben Sie einen dynamischen Reinigungseffekt: Es entstehen sehr hohe Geschwindigkeiten in den schmalen Gängen um die Ventilkugel, die die Reinigungswirkung unterstützen und den Schmutz mitreißen. Es braucht halt genügend Zeit. Es ist wie in der Geschirrspülmaschine, die ja auch durch lange Einwirkdauer reinigt. Mit der Bürste bekommt man einen Teller schneller sauber.

Hat nun die Reinigung doch keinen Erfolg gehabt, müssen Sie das Ventil komplett zerlegen, wenn das möglich ist.

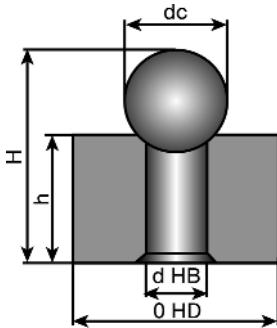
11) Der Italiener Giovanni Battista Venturi entdeckte, dass sich die Fließgeschwindigkeit eines durch ein Rohr strömenden inkompressiblen Fluids zu einem sich

verändernden Rohrquerschnitt umgekehrt proportional verhält.

12) Wikipedia, knapper und präziser kann man es nicht formulieren.

Legen Sie ein großes Blatt Papier oder besser eine weiße Schale unter, und versuchen Sie dann, die Dichtung mit einem Messer o.ä. vorsichtig zu entfernen. Nicht alle Ventilkonstruktionen lassen sich zerlegen, aber nehmen wir einmal an, es gelingt.

Wenn Sie behutsam zu Werke gegangen sind, lassen sich die Einzelteile vorsichtig herausklopfen und Sie finden einen kleinen Ring und eine Kugel. Die Kugel ist meist rot, damit man sie besser sieht, der Ring farblos. Material ist wie erwähnt Saphir, also Aluminiumoxid. Die rote Farbe erzeugt man durch Beimischungen von Chrom. Ist das Material undurchsichtig-weiß, handelt es sich um Zirkoniumoxid-Keramik.

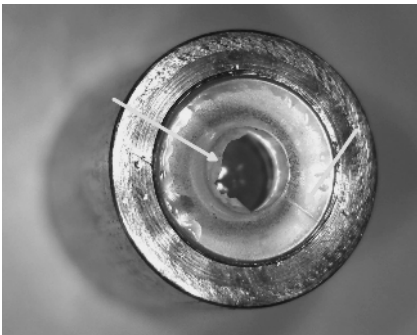


Nehmen Sie den Ring mit einer Pinzette auf und inspizieren Sie ihn mit der Lupe. Eine Seite ist matt, die andere blank poliert. Die polierte Seite nimmt die Kugel auf. Baut man den Sitz falsch herum ein, dichtet das Ventil überhaupt nicht.

Es darf besonders auf der erwähnten Dichtkante kein Fremdkörper zu sehen sein. Gelegentlich ist der Ring gebrochen, was eigentlich nur bei falschem Zusammenbau oder einem Konstruktionsfehler passieren darf. Dann muss beides, Ring und Kugel, ausgetauscht werden.

Ist weder an der Kugel noch am Sitz irgendwas zu sehen, müsste das Ventil eigentlich funktionieren. Meist sieht man aber einen winzigen Fussel auf dem Ring, der das Schließen verhindert. Sie können auf alle Fälle Kugel und Sitz im Ultraschallbad reinigen, effektiver ist verdünnte Salpetersäure. Nicht jeder mag aber damit hantieren, erste Wahl für mich ist daher der oben genannte Spezialreiniger.

Zwei Fehler in einem Ventil:



Gebrochener Ventilsitz. Das Ventil schließt nicht mehr korrekt, die Pumpe zeigt Druckschwankungen. Zusätzlich hat sich die Dichtung aufgelöst und das Ventil teilweise verklebt.

Manche Hersteller bauen doppelstöckige Ventile, d. h. in einem Gehäuse sind zwei Ventile übereinander, durch eine Dichtung separiert. Der Gedanke dahinter ist, dass eines immer funktioniert.

Bauen Sie nun die gereinigten oder ersetzten Teile wieder zusammen. Überlegen Sie einfach die logische Reihenfolge, damit es funktioniert: Die Flüssigkeit kommt immer von unten durch das Einlassventil und tritt oben aus dem Auslassventil aus.

Entweder funktioniert die Pumpe jetzt, oder nicht. Wenn nicht, bestellen Sie neue Ventile.

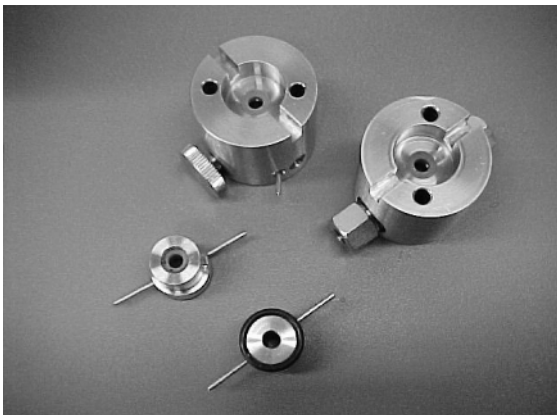
Sie haben die Pumpe jetzt korrekt zusammengebaut. Bei der Einkolbenpumpe ist weiter nichts zu tun, bei den Zweikolbenpumpen müssen Sie die Kapillaren wieder verbinden. Entweder vom linken Kopf auf den rechten oder den rechten und den linken Kopf in einem T-Stück zusammenführen.

Die Pumpe pulsiert immer noch sehr stark. Bei 300 bar fängt es nach einer Weile an zu tropfen unter den Köpfen. Jetzt endlich dürfen Sie an den Austausch einer Dichtung denken!

Nur wenn erhebliche Druckschwankungen gleichzeitig mit einer Leckage auftreten, ist die Kolbendichtung schuld, sonst nicht!

Nochmal zum grundsätzlichen Aufbau eines Kopfes:

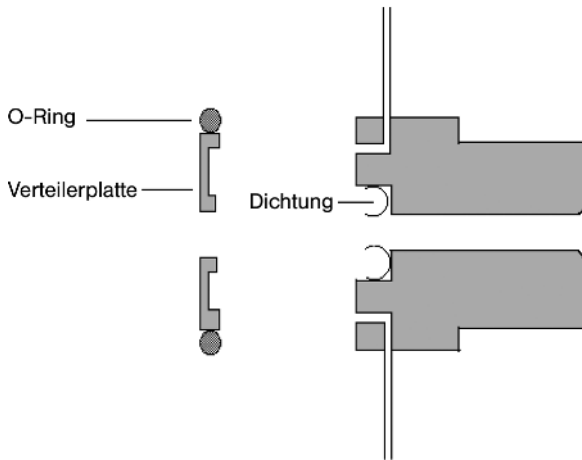
Im Kopf selbst sind die Dichtungen zu sehen, oder vielmehr die Stützringe über den Dichtungen (siehe auch Schemazeichnung oben). Daneben liegen die Einsatzstücke, die mit Hinterspüleinrichtung versehen sind.



Copyright Techlab GmbH

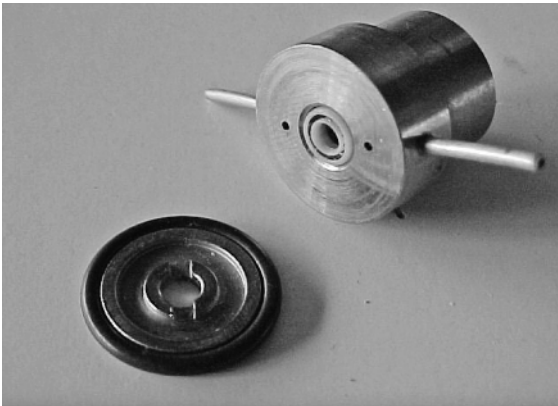
Wird nun eine salzhaltige Flüssigkeit gefördert, bleibt nach längerer Betriebszeit auf dem Kolben eine hauchdünne Kruste zurück, die die Dichtung zerreibt. Dagegen hilft nur Waschen, und zwar mit viel Wasser.

Kolbenhinterspülung



Copyright Sykam GmbH

Links wäre der Kopf mit der Hochdruckdichtung, dieser ist in der Zeichnung weggelassen. Der Kolben kommt von rechts, wird durch die Dichtung und den Waschraum geführt, um dann nach links in den Hochdruckraum einzutreten. Wird laufend eine kleine Menge Wasser durch den Waschraum gepumpt, wird der Kolben kontinuierlich gewaschen. Früher geschah das über die kurzen Kapillaren an den Einsatzstücke, bei modernen Pumpen sind die Spülleitungen fest eingeschraubt. Eine kleine Pumpe befördert das Spülwasser in regelmäßigen Abständen durch die Köpfe.



Pumpenkopfspüleinsatz

Copyright Techlab GmbH

1.4.2

Kolben und Dichtungen

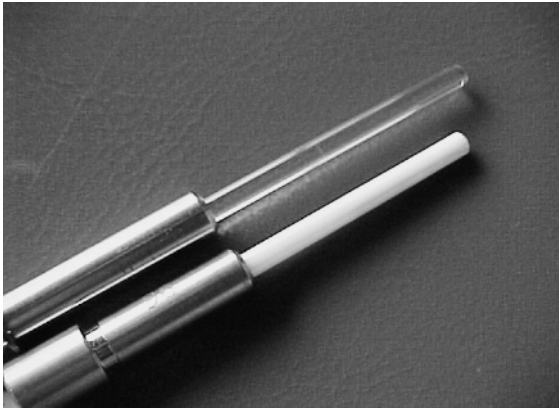
Nach den Ventilen sind die Kolben und deren Dichtungen die wichtigsten Verschleißteile in der Pumpe.

Beginnen wir mit den Kolben.

1.4.2.1 **Kolben**

Im englischen Handbuch werden sie entweder „plunger“ oder „piston“ genannt.

Der Kolben oder Pumpenstößel sieht aus wie ein Stück rundes Glas und bricht auch so leicht, ist aber wesentlich teurer.



Copyright Techlab GmbH

Manchmal sieht er aus wie ein Stück Porzellan, das ist gar nicht mal so falsch, dann besteht er nämlich aus Keramik. Die Meinungen, was nun besser ist, gehen darüber auseinander. Wichtig für den Anwender ist auf jeden Fall: Verwenden Sie zum Kolben aus Saphir oder Keramik immer die Dichtungen, die sich schon bewährt haben, also entweder gelbe, grau oder schwarze (zum Material kommen wir später), denn was mit dem einen dichtet, kann mit dem anderen undicht werden und umgekehrt.

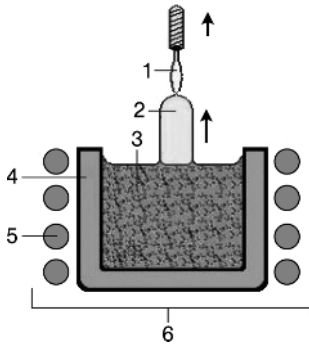
Was aussieht wie Glas, ist ein synthetischer Saphir, ein Material, das sich durch seine hohe Härte¹³⁾ auszeichnet.

Glas wäre völlig ungeeignet, weil es viel zu weich ist und eigentlich eine Flüssigkeit.

Czochralski-Verfahren

Hochwertige Saphire werden nach dem Verfahren von Czochralski hergestellt, wobei hochreines Aluminiumoxidpulver geschmolzen wird. Aus der Schmelze wird dann ein monolithischer Zylinder gezogen.

13) Härte 9 auf der nichtlinearen Skala nach Mohs, Diamant hat Härte 10.



Czochralski-Verfahren

- 1 Rotierender gekühlter Ziehstab (Zieh- und Rührvorrichtung)
 - 2 Kristall
 - 3 Schmelze (z. B. flüssiges Si)
 - 4 Tiegel (Pt, Rh, Ir mit Schutzhülle, Graphit)
 - 5 Heizelemente (RF, Hochfrequenz)
 - 6 Ofenraum
- Copyright Daniel Oriwol

In einem Tiegel (4) befindet sich die hochreine Aluminiumoxid-Schmelze. Von oben wird ein an einem langsam rotierenden Metallstab befestigter, orientierter Keim (1) in die Schmelze getaucht, langsam wieder nach oben gezogen (ohne dass der Kontakt zur Schmelze abreißt), während die Schmelze infolge Unterkühlung an der sich bildenden Grenzfläche erstarrt. Durch Variation von Ziehgeschwindigkeit und Temperatur wächst der Kristall. Mit der heutigen modernen Czochralski-Technik können Kristalle bis 40 cm Durchmesser und teilweise über 2 m Länge gezogen werden.

Preiswertere Kristalle für die Schmuckindustrie werden nach dem Verfahren von Verneuil aus Pulver in der Knallgasflamme erschmolzen. Die Kristallstruktur ist wesentlich schlechter als bei dem Czochralski-Verfahren. Das wirkt sich auf die Qualität der Kolben aus, wenn den solche daraus gefertigt werden sollen. Je nach Orientierung der Kristallstruktur haben die dann „weiche“ Stellen, wobei weich natürlich relativ ist bei einer Härte 9 nach Mohs. Der Abrieb ist aber unter der Lupe deutlich sichtbar.

Bei besonders preiswerten Saphirkolben ist also Vorsicht geboten. Das soll nicht heißen, dass Sie nur beim Original-Geräte Hersteller kaufen dürfen. HPLC-Ersatzteilhändler können über die Mengen günstig einkaufen und den Vorteil weitergeben, müssen aber auch Geld verdienen.

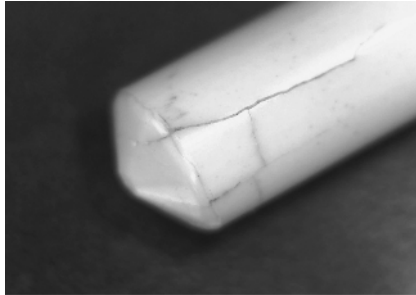
Die gezogenen Kristalle werden nach dem Abkühlen mit Diamantwerkzeugen geschnitten und in Form gebracht. Es gibt nur wenige Fabriken auf der Welt, die Saphirkolben und Ventile in der erforderlichen hohen Präzision herstellen können.

Die Saphirstäbe werden zum Schluss der Fertigung noch in die Halterungen aus Edelstahl eingeschrumpft. Einkleben ist wegen der hohen Belastungen nicht möglich, außerdem wäre die Zentrität nicht garantiert.

Ein Nachteil der Saphirkolben ist ihre hohe Zerbrechlichkeit bei Belastung in nicht-axialer Richtung, schon die geringste Knickbelastung lässt sie abbrechen.

Das alternative Material zu Saphir ist Sinterkeramik, genauer gesagt Zirkoniumoxid. Ein sehr feines Pulver aus diesem Material wird unter hohem Druck zu Stäben gepresst, die sehr homogen sind und sich ebenfalls nur mit Diamantwerkzeugen bearbeiten lassen. Zirkonoxid-Kolben sind nicht so empfindlich gegen Knickbelastung, sie zerbrechen nicht gleich wie Saphirkolben, wenn sie vom Tisch rollen.

Sind Keramikkolben nicht von höchster Qualität, sehen sie nach einer Weile so aus:



Copyright Techlab GmbH

Bei einigen hundert Bar dringt Flüssigkeit in feinste Risse ein, bei Druckentlastung sucht diese wieder den Weg hinaus und sprengt irgendwann den Kolben.

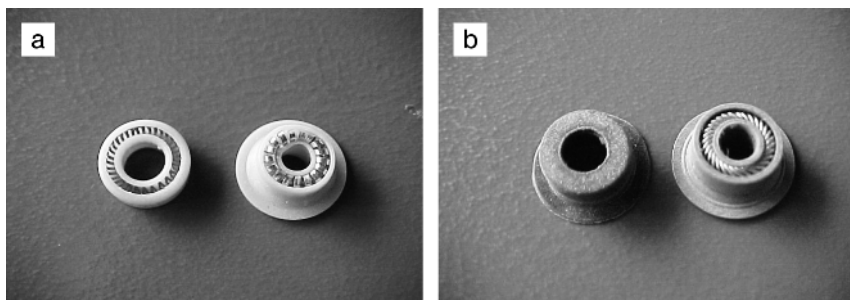
Keramikkolben sind nicht unbedingt der Weisheit letzter Schluss.

Das Auswechseln der Kolben ist sehr geräteabhängig und kann hier nicht weiter beschrieben werden. Die meisten Kolben gehen kaputt, weil sie vom Tisch rollen.

1.4.2.2 Die Kolbendichtung

Aufbau einer typischen HPLC-Dichtung:

Es gibt zwei Haupttypen, nämlich Flanschdichtungen und flanschlose Dichtungen. Bild (a) zeigt eine flanschlose Dichtung, (b) eine Flanschdichtung aus gleichem Material:



(a) Dichtung ohne Flansch/mit Flansch, (b) Dichtung mit abgedeckter/offener Feder

Copyright Techlab GmbH

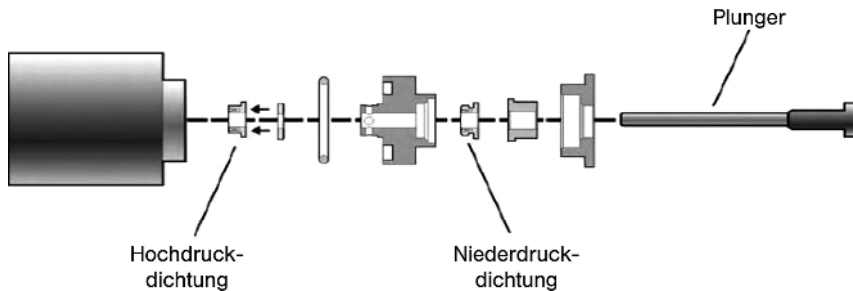
Die innere Lippe liegt am Kolben an und dichtet dort. Sie trägt die größere Belastung, da sich der Kolben axial zur Dichtung bewegt. Die äußere Lippe liegt an der Bohrung im Kolben an, da bewegt sich nichts.

Die Feder dient eigentlich nur dazu, die Dichtung im drucklosen Zustand stabil zu halten und auch den Einbau zu erleichtern. Versuche haben ergeben, dass auch eine Dichtung ohne Feder bei sorgfältigem Einbau ohne Weiteres 1000 bar aushält. Flanschdichtungen lassen sich einfacher einbauen als flanschlose.

Betrachten wir die Druckverhältnisse im Kopf, zeigt sich, dass die Dichtung immer dichter werden müsste, je höher der Druck ist, der die innere und äußere Lippe nach außen presst.

Der Flansch hat keine dichtende Wirkung, da die äußere Lippe ja schon fest an der Kopfinnenwand anliegt. Manche Flanschdichtungen haben eine abgedeckte Feder, was aber auch keinen praktischen Wert hat: Die Feder wird trotzdem vom Eluenten erreicht, ist aber sowieso korrosionsfest, da aus Edelstahl oder Hastelloy.

In den Ersatzteillisten ist oft von High Pressure Seal und Low Pressure Seal die Rede, auch als Primär- und Sekundärdichtung bezeichnet.



Copyright YoungLin Instrument Co.

High Pressure Seal oder Primärdichtung ist diejenige, welche den aktuellen Pumpendruck auszuhalten hat, also die Hauptdichtung.

Eine Sekundärdichtung dichtet nur den Hinterspülraum des Kolbens ab und muss überhaupt keinen Druck aushalten, sie ist deswegen billiger. Aus logistischen Gründen verwenden viele Hersteller die gleiche Dichtung für beide Zwecke. Bei flanschlosen Dichtungen gibt es immer noch einen Stützring, der die eigentliche Dichtung in Position hält. Dieser unterliegt keinem Verschleiß und muss nicht unbedingt mit der Dichtung ausgewechselt werden.

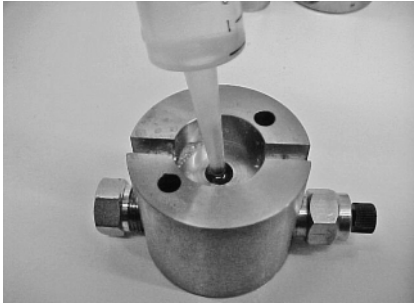
An Dichtungsmaterialien stehen zur Auswahl:

- reines PTFE (weiß)
- graphitgefülltes PTFE (grau)
- kohle-graphitgefülltes PTFE (schwarz)
- graphitfasergefülltes PTFE (schwarz)
- verstärktes, graphitfasergefülltes PTFE (schwarz)
- ultrahochmolekulares Polyethylen, speziell für wässrige Medien (gelb)

Das Auswechseln einer Dichtung muss mit besonderer Sorgfalt geschehen, um den Kolbenraum nicht zu beschädigen. Es hat sich folgende Vorgehensweise bewährt:

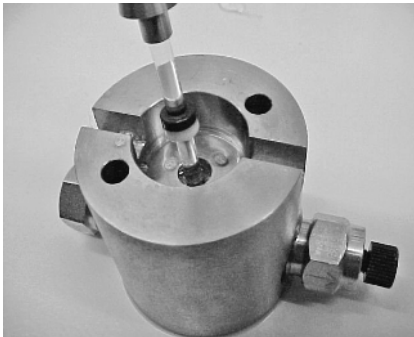


Verschließen Sie die Kapillaröffnungen mit Blindstopfen, bei den Ventilen reicht natürlich das Auslassventil, das Einlassventil macht ja selbst zu.



Copyright Techlab GmbH

Füllen Sie den Kopf durch die Dichtung mit Wasser. Nehmen Sie einen alten Kolben aus der Schublade und führen Sie ihn in die Dichtung ein. Drücken Sie den Kolben mit etwas Schwung ganz hinein.



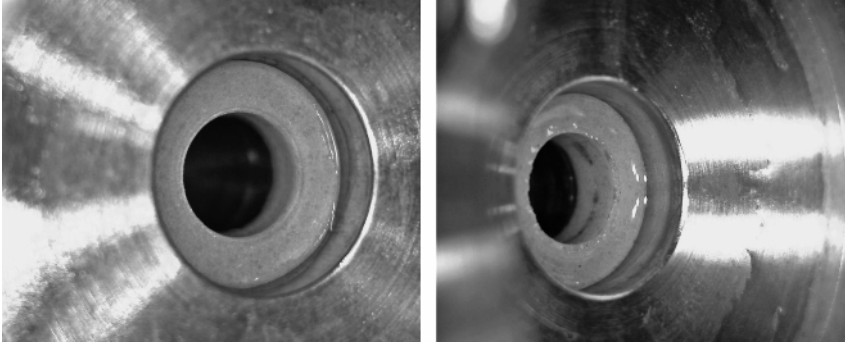
Die Dichtung wird am Kolben hochgedrückt und kann entnommen werden.

Vorteil dieser Methode: Die Dichtung bleibt unbeschädigt und kann bei Bedarf inspiziert werden. Viel wichtiger:

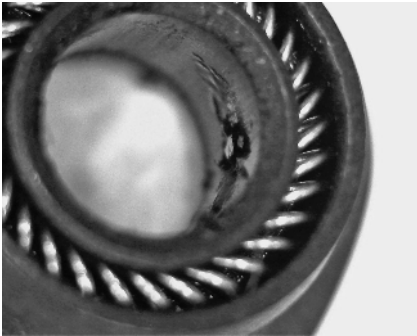
Es besteht keine Gefahr, die Bohrung zu zerkratzen.

Hebeln Sie niemals eine Dichtung mit einem metallischen Werkzeug (Schraubenzieher) heraus!

Wenn die Kolbenwand zerkratzt ist, wird der Kopf nie wieder dicht.



Links: Dichtung in sehr gutem Zustand, rechts: fehlerhafte Dichtung, Innenwand zu dünn
Copyright Techlab GmbH



Materialfehler: Innenwand ist herausgebröckelt

1.5

Die Pumpe überprüfen

Für eine isokratische Pumpe gibt es nur zwei Prüfparameter: Druck und Fluss.

Der Druck wird angezeigt, der Fluss auch. Aber: Der Druck wird intern gemessen, der Fluss nicht! Die Flussanzeige ist nichts weiter als eine modifizierte Drehzahlmessung, die besagt, bei Drehzahl X fördert die Pumpe Y Milliliter. Andernfalls müsste ein echter Massendurchflussmesser in der Pumpe installiert sein, der die tatsächliche Fördermenge ermittelt.

Wir wollen zuerst den Fluss überprüfen, das ist am einfachsten. Nehmen Sie eine alte Säule und ein Manometer und schließen Sie diese an den Ausgang der Pumpe an. Es muss sich nach einer Weile ein konstanter Druck einstellen, wobei die Manometernadel ganz still stehen sollte. Wenn der angezeigte Druck auf dem Manometer gleich dem an der Pumpe ist, stimmt Ihre Druckanzeige schon mal. Wenn die Nadel ganz still steht, ist auch die Pulsation in Ordnung.



Copyright Techlab GmbH

Weichen angezeigter und gemessener Druck wesentlich voneinander ab, ist vermutlich die Pumpenanzeige falsch justiert. Wenn Sie ein kalibriertes Manometer verwenden, sind Sie ganz sicher und können die Pumpe danach justieren. Wie das geht, sollte im Servicehandbuch stehen.

Die Verwendung von kalibrierten Instrumenten im Labor ist ohnehin empfehlenswert.

Zur Flussratenbestimmung können Sie die Anlage gleich stehen lassen. Sie benötigen jetzt nur noch eine Waage, wenn möglich mit serieller Schnittstelle. Leiten Sie den Schlauch von der Säule in das Auffanggefäß auf dem Wägeteller und beginnen Sie bei laufender Pumpe die Wägung. Die Gewichtszunahme (bei Wasser) entspricht der Fördermenge in Millilitern. Je länger die Messdauer, umso genauer die Messung.

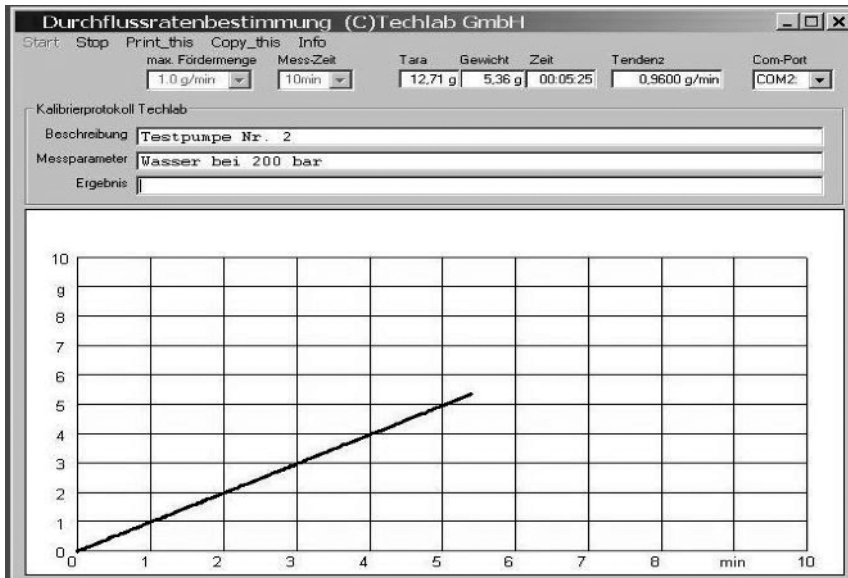


Copyright Techlab GmbH

Zeit stoppen und Waage ablesen erfordert Geduld, ein kleines Hilfsprogramm macht die Sache sehr komfortabel. Die Gewichtszunahme über die Zeit wird grafisch dargestellt, zum Ende der Messzeit erfolgt eine 4-stellige Ausgabe der Gewichtszunahme.

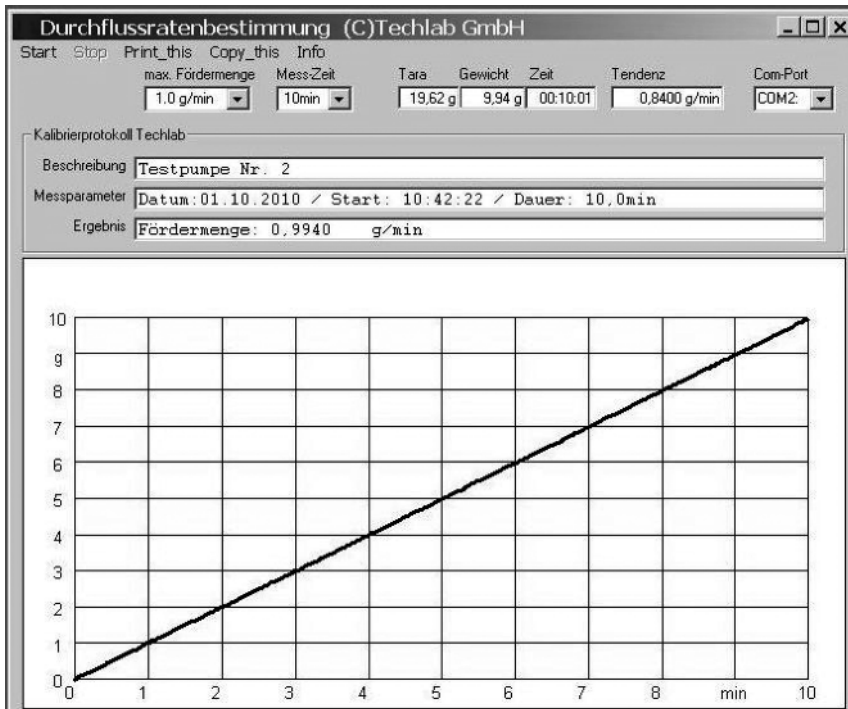
Bitte denken Sie daran: Die Flussrate hat einen direkten Einfluss auf die Retentionszeiten!

Während der Messung ist schon die Tendenz erkennbar:



Copyright Techlab GmbH

Die Messung ist abgeschlossen:



Noch eine Messung zur Leckratenbestimmung der Auslassventile:

Schließen Sie eine 10 m-Kapillare mit 0,75 ID an den Ausgang der Pumpe an.

Verschließen Sie das freie Ende mit einem Blindstopfen.

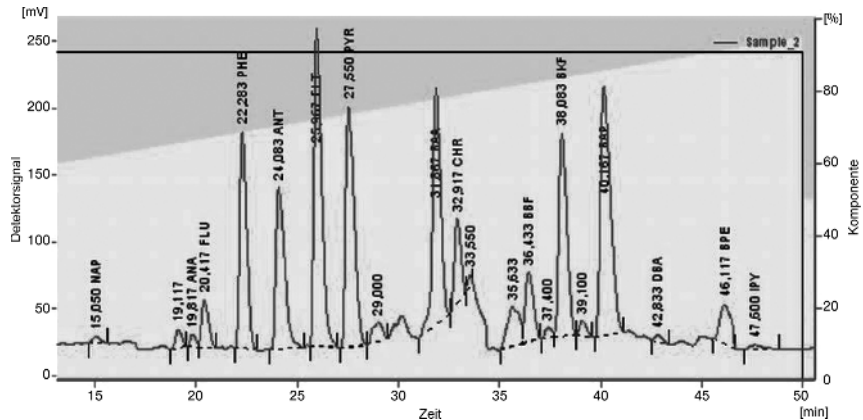
Pumpen Sie auf 300 bar und schalten Sie die Pumpe ab.

Der Druck darf nur sehr langsam abfallen, die Geschwindigkeit ist ein Maß für die Güte der (oder des) Auslassventils. Die genauen Daten für diese Messung finden Sie im Servicehandbuch.

1.6

Die Gradientenpumpe

Ein Gradient in der HPLC ist eine über die Zeit veränderte Mischung von Eluenten, zum Beispiel von polar nach unpolar, also von Wasser nach Acetonitril. In diesem Chromatogramm wird der Anteil „hellgrau“ linear über 50 Minuten von 60 auf 100 % erhöht.



Copyright Techlab GmbH

Ein binärer Gradient lässt sich einfach erzeugen, indem zwei Pumpen gekoppelt werden, von denen die eine mit der Zeit schneller wird und die andere langsamer. Der resultierende Fluss bleibt der gleiche, nur die Zusammensetzung ändert sich stetig.

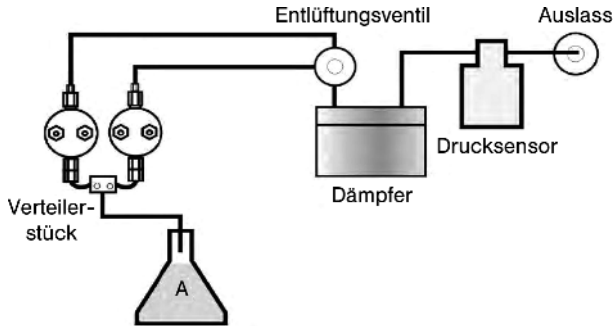
Weil hierbei auf der Hochdruckseite gemischt wird, hat sich die Bezeichnung Hochdruckgradient eingebürgert.

Vorteil: Pumpen lassen sich ganz exakt in der Geschwindigkeit steuern, was besonders im unteren Bereich < 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ wichtig ist.

Nachteil: Für jedes Laufmittel braucht man eine Pumpe, was die Sache gegenüber dem später beschriebenen Niederdruckgradienten erheblich verteuert.

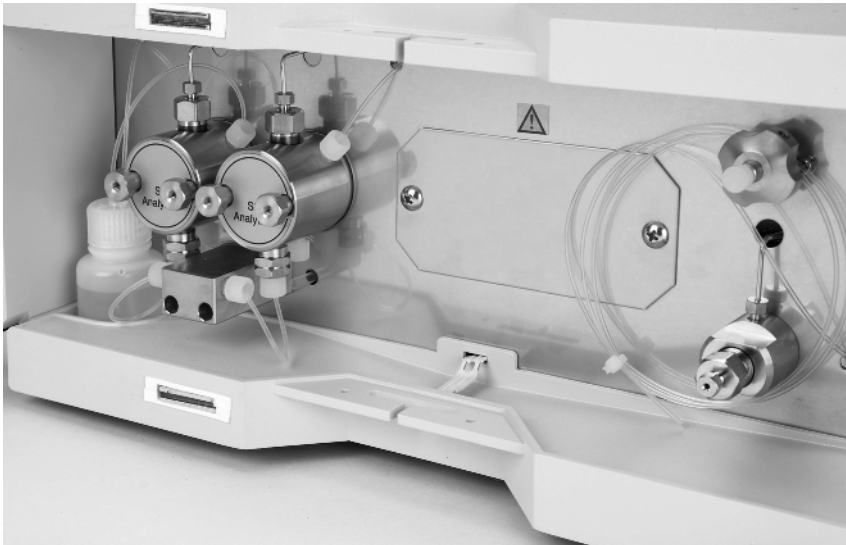
Etwas preiswerter wird es, wenn zwei einzelne Pumpenmodule in einem Gehäuse vereinigt werden.

Das Prinzip ist ganz einfach:



Copyright YoungLin Instrument Co.

Isokratische Pumpe: ein oder zwei Pumpenköpfe fördern aus einem Vorratsgefäß.



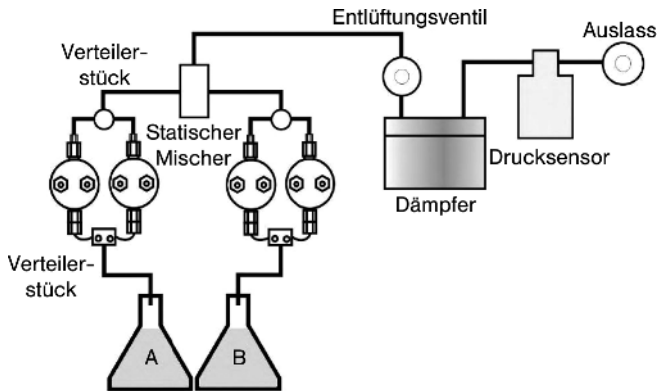
Copyright Techlab GmbH

1.6.1

Binäre Hochdruckgradientpumpe

Die Laufmittel A und B werden von zwei getrennten Pumpen angesaugt, im Mixer dann gut verquirlt und über Pulsdämpfer und Drucksensor der HPLC zugeführt.

Steht die Pumpe A, wird nur B gefördert und umgekehrt, dazwischen ist jede beliebige Mischung möglich.



Copyright YoungLin Instrument Co.

Anstelle von zwei einzelnen Pumpen werden oft auch zwei in einem Gehäuse vereinigte Pumpen verwendet.

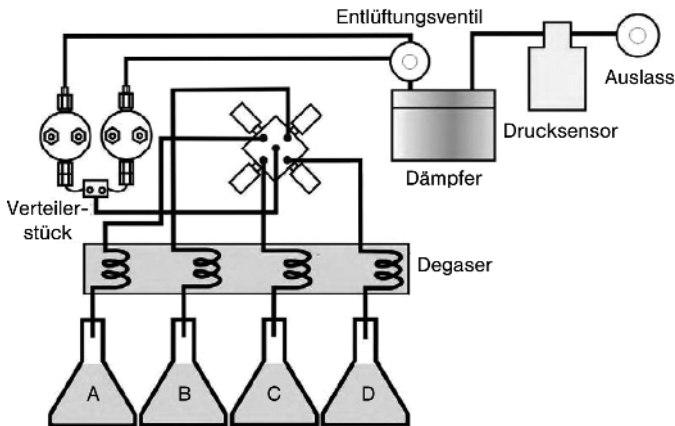


Copyright Techlab GmbH

Nimmt man eine isokratische Pumpe und baut in die Ansaugleitung ein Magnetventil ein, kann man dieses per Software von A nach B umschalten und das natürlich auch über die Zeit gesteuert.

Dafür hat sich der Name Niederdruckgradient eingebürgert, obwohl die Laufmittelveränderung natürlich auch wieder hochdruckseitig wirksam wird.

Magnetventile kennen nur die Stellungen offen oder geschlossen, wir können das mit der Digitaltechnik vergleichen, hier ist die kleinste Informationseinheit ein Bit, also 0 oder 1. Folglich muss sich eine Mischung aus zeitlich abfolgenden Schaltstellungen 0 und 1 zusammensetzen.



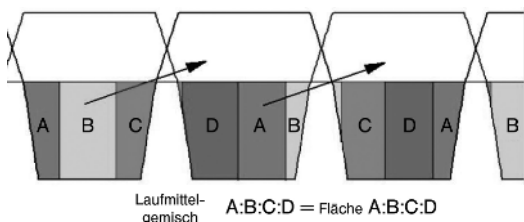
Copyright YoungLin Instrument Co.

Um beispielsweise ein Gemisch 80 : 20 aus A und B zu formen, muss man die Öffnungszeiten auf die Zeit der Saugphase verteilen. Das klingt schwieriger als es ist:

Angenommen, die Pumpe hätte einen dicken Kolben, der bei jedem Hub genau 1 mL fördern würde, und jeder Hub dauerte 1 Minute, dann müsste das Ventil also 80 % der Zeit = 48 Sekunden in Stellung A sein und 12 Sekunden in Stellung B. Der Kolbenraum wäre dann zwar noch nicht mit einem *Gemisch* 80 : 20 gefüllt, aber schon mit den entsprechenden Mengen, die nur noch verquirlt werden müssten. Das geschieht meistens in einem kleinen Mixer hinter der Pumpe, also hochdruckseitig.

Sinnvoller ist es allerdings, schon während der Saugphase von einer vollen Minute zu mischen, einfach, indem das Ventil nicht dauern geöffnet wird, sondern in Inkrementen von z. B. 10 % der Gesamtzeit. Das wären dann 4,8 Sekunden für A und 1,2 Sekunden für B, das Ganze zehnmal in der Minute und schon wäre die gewünschte Zusammensetzung in kleine Einheiten zerlegt, die sich noch besser vermischen lassen.

Synchronisation: Die Ventilsteuerung muss „wissen“, ob die Pumpe in der Saugphase ist, denn nur in dieser haben die Magnetventile eine Funktion. Werden die errechneten Ventilsteuerzeiten unsynchronisiert auf Saug- und Druckphase verteilt, stimmt der Gradient nicht mehr. Das wirkt sich besonders bei seriellen Zweikolbenpumpen aus. Parallele Zweikolbenpumpen sind bis auf den kleinen Moment des Lastwechsels immer in der Saugphase, entweder im linken oder im rechten Kolben, aber auch hier muss synchronisiert werden für eine hohe Genauigkeit.



Copyright YoungLin Instrument Co.

Das Bild zeigt die mit den Saugphasen synchronisierte Ventilschaltung: Passt eine errechnete Ventilöffnungszeit nicht mehr in den einen Hub, wird sie anteilig auf zwei Hübe verteilt. Im Beispiel wird im ersten Hub ein Anteil „C“ in den zweiten Hub geschaltet, dort Anteil „B“ in den dritten usw.

Reine Einkolbenpumpen – ohne Ausgleichskolben – eignen sich nicht für die Niederdruckgradientenformung, da die Saugphase extrem kurz ist. Da aber die Förderung gleichmäßig erfolgt, kann man daraus sehr gut ein Hochdruckgradientensystem bauen.

Bedingt durch unterschiedliche Viskosität und Kompressibilität der Laufmittel, die sich über die Zeit verändern, kommt es noch zur weiteren Abweichung vom Idealgradienten, je kleiner die Flussraten werden. Die genaue Beschreibung herstellerspezifischer Sonderlösungen wie z. B. massenstromabhängige Feedback-Regelung würden aber den Rahmen dieses Grundlagenbuches sprengen.

Typische HPLC-Kolben haben nur einen Hub von 80–100 Mikrolitern, da kann man wieder größere Öffnungszeiten auf einen vollen Hub legen: acht volle Hübe aus A und zwei Hübe aus B ergeben ein Gemisch 80 : 20 bei einem Fluss von 1 mL/min.

Bei einem Fluss von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ wird die Sache allerdings schon wieder schwierig, denn da müssten in einen angenommen Hub von 100 μL wieder die oben berechneten Ventilschaltzeiten eingehen. Bei einem Ventil für zwei Laufmittel mag das noch angehen, aber Niederdruckgradientenpumpen haben meistens vier Ventile für einen quaternären Gradienten. Weichen die Ventilschaltzeiten eines einzigen Ventils nur eine Kleinigkeit von den anderen ab, wird der Gradient falsch gemischt, was zu erheblichen Fehlern in den Endbereichen 1–9 % und 90–99 % führt.

Aus diesem Grunde werden für Gradienten bei sehr kleinen Flussraten < 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ vorzugsweise Hochdruckgradientenpumpen verwendet, wobei man jede Pumpe praktisch beliebig langsam fahren kann.

1.6.1.1 Zusammenfassung

Niederdruckgradientenpumpe:

Vorteile:

- Preiswerter als zwei einzelne Pumpen.
- Quaternäre Gradienten sind möglich.

Nachteil:

- Da die Ventilsteuerezeiten eingehen, sind Gradienten bei sehr kleinen Flussraten nicht mehr genau.

Hochdruckgradientenpumpe:

Vorteile:

- Sehr präzise über den gesamten Bereich, sowohl bei „normalen“ als auch sehr kleinen Flussraten.

Nachteile:

- Doppelter Aufwand, entweder zwei einzelne Pumpen oder zwei Pumpen in einem Gehäuse kombiniert.

- Nur binärer Gradient möglich, für einen ternären würde schon eine dritte Pumpe benötigt.

1.6.2

Wie überprüfe ich die Gradientengenauigkeit?

Es gibt hierfür Standardvorschriften, typischerweise wird ein Stufengradient programmiert mit folgenden Schritten:

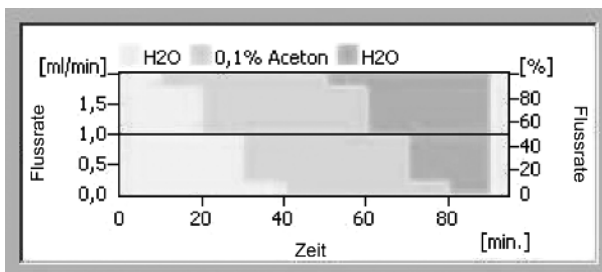
10 %, 50 %, 90 % und 100 % von A nach B und weiter von C nach D.

Als Laufmittel dient Wasser in zwei Flaschen, von denen eine mit reinem Wasser gefüllt ist und eine mit Wasser + 50 mg/L Coffein. Anstelle der Coffeinlösung kann auch eine Lösung von 0,1 % Aceton in Wasser verwendet werden, aber nur, wenn kein In-Line Degaser vorgeschaltet ist. Dieser würde die Acetonkonzentration in Abhängigkeit vom Vakuum unreproduzierbar verändern.

Die Schläuche werden verteilt auf die Flaschen:

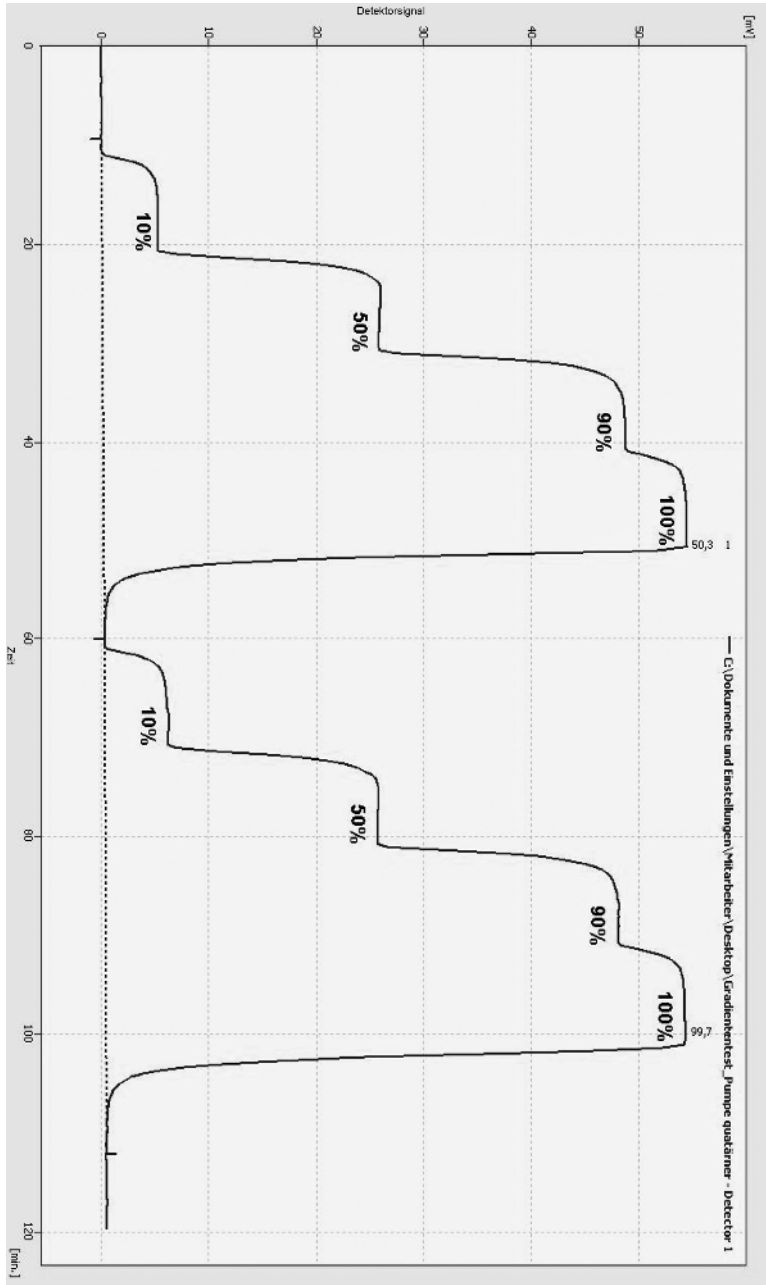
Wasser – Ansaugleitung A und C

Wasser + Coffein/Aceton – Ansaugleitung B und D



Copyright Techlab GmbH

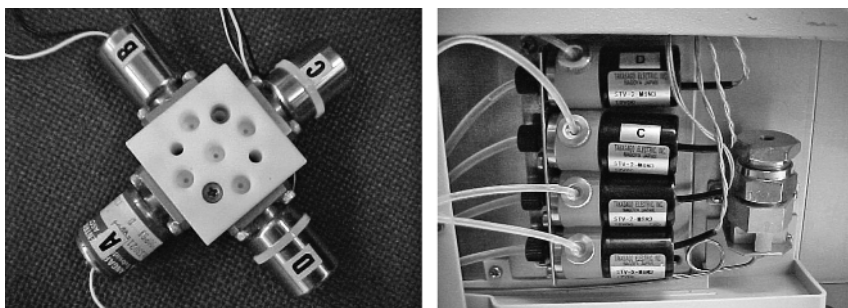
An den Ausgang der Pumpe wird eine Restriktion zum Druckaufbau angeschlossen und danach ein UV-Detektor. Die Absorption des Coffein/Aceton wird den Gradientenverlauf genau nachzeichnen, das sieht dann folgendermaßen aus:



Sieht das erzeugte Bild so aus und sind die Prozentwerte im Rahmen der Spezifikation, funktionieren die Dosierventile einwandfrei.

Copyright Techlab GmbH

1.6.3

Bauformen von Gradientenventilen

Copyright Techlab GmbH

Links ein 4-fach-Ventil als Block (auch Sternventil genannt). Wenn ein Ventil defekt ist, muss man den ganzen Block auswechseln. Dafür ist man sicher, dass dann alle vier Ventile wieder in Ordnung sind.

Rechts vier Einzelventile, hier kann jedes Ventil bei Bedarf einzeln ausgewechselt werden.

Dann gibt es noch externe Ventilkästen, die über Steuerkabel und Schläuche an die Pumpe angeschlossen werden können. Hierbei ist zu beachten, dass natürlich die Leitung von diesem Kasten zur Pumpe in das Mischergebnis geht. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass je dünner diese Leitung ist, desto schneller wirken sich Gradientenänderungen aus. Allerdings kann man Ansaugleitungen, wie schon erwähnt, auch nicht beliebig dünn machen.

Schwachstellen sind wieder die Schlauchanschlüsse. Die Ventilblöcke sind meistens aus PTFE, die Gewinde sind sehr empfindlich. Das Problem mit den Anschlüssen wird im nächsten Kapitel behandelt.

Nach Auswechseln eines Ventils muss die Gradientenprüfung nochmal gefahren werden.

1.7

Druckmessung und Anzeige

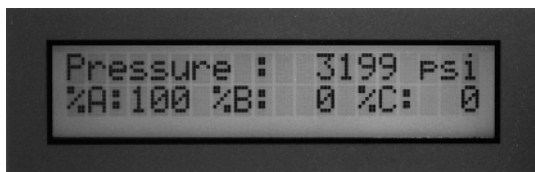
Wie schon erwähnt, ist für die Anwendung in der HPLC allein die Flussrate entscheidend, denn davon hängt die Peakidentifizierung ab. Die Trennsäule baut einen gewissen Gegendruck auf, in der normalen HPLC zwischen 100 und 300 bar (10–30 MPa) und in der UHPLC bis etwa 600 bar (60 MPa).

Es macht natürlich Sinn, immer den aktuellen Druck zu überwachen als Indikator für eine mögliche Fehlfunktion. Dabei ist zu beachten, dass der Druck bei gegebener Flussrate im isokratischen Betrieb recht konstant sein sollte, während im Gradientenbetrieb Änderungen durchaus erlaubt sind. Je nachdem, ob der polare

(Wasser-) Anteil gerade hoch ist oder der unpolare (Acetonitril), ändert sich der Druck entsprechend der Viskosität des gerade aktuellen Laufmittelanteils.

Bei den allerersten HPLC-Pumpen wurden mechanische Manometer zur Druckanzeige benutzt. Waren diese noch mit Kontakten versehen, konnte eine Abschaltswelle für die Pumpe definiert werden.

Sofern die Pumpe überhaupt noch eine Anzeige für den Druck hat, sieht das heute etwa so aus:



Copyright Techlab GmbH

Viele Pumpen haben weder Anzeige noch Bedienfeld, sondern sind nur über den Rechner steuerbar.

Druckanzeigen, auch wenn sie wie hier den aktuellen Druck in Pounds per Square Inch anzeigen, sind deswegen nützlich, weil man mit einem Blick sehen kann, ob die Pumpe überhaupt korrekt arbeitet. Ist der Druck im üblichen Bereich und schwankt nicht, sollte auch der Fluss wie eingestellt vorhanden sein.

Pumpen arbeiten im „constant flow“-Modus, bei langsamen Druckänderungen muss der Fluss konstant bleiben.

Hinter der Druckanzeige steckt natürlich auch eine Messeinrichtung. Es ist interessant, wie eine äußerst simple Vorrichtung jahrzehntlang hier gute Dienste geleistet hat: Das Bourdonrohr.

Eine Kapillare aus Edelstahl, Außendurchmesser 1/16", wird zu einer Feder gebogen wie auf dem Foto unten. Beaufschlagt man nun dieses Rohr mit einem gewissen Druck, biegt sich die Feder auf, um nach Druckabfall wieder in die ursprüngliche Stellung zurückzukehren.



Copyright Sykam GmbH

Im Jahre 1848 ließ sich der Pariser Instrumentenmacher Eugène Bourdon eine solche Feder patentieren, daher der Name.

Für die Druckmessung in HPLC-Pumpen wurde dieses alte Prinzip aufgegriffen, mit einer wichtigen Änderung: Anstelle des Zeigers, der bis dahin die Auslenkung sichtbar gemacht hatte, wurde eine Lichtschranke verwendet. Das Bourdonrohr befand sich zwischen einer Lampe und einem photoelektrischen Element, welches durch das Rohr mehr oder weniger beschattet wurde.

Entsprechend der Belichtung floss mehr oder weniger Strom, der dann auf einem Anzeigeelement sichtbar gemacht wurde.

Die Justage dieser Konstruktion war allerdings äußerst schwierig, so dass man nach einer besseren Konstruktion suchte. Grundlage blieb weiter die Bourdon-Feder, für die Messung der Auslenkung wurde aber ein Differentialtransformator verwendet.

Das klingt wesentlich komplizierter, als es ist. *Wikipedia* beschreibt wie immer kurz und präzise:

Ein Differentialtransformator ist eine Spezialform eines Transformators. Er besteht aus einer Primärspule und zwei Sekundärspulen. Letztere sind gegenphasig in Reihe geschaltet, dadurch subtrahieren sich die Spannungen an ihren Anschlüssen. Die resultierende Spannung ist genau dann null, wenn die beiden Spulen und die gesamte Konstruktion symmetrisch aufgebaut sind. Wird die Symmetrie gestört, so entsteht eine Ausgangsspannung, deren Phase in Bezug zur Erregung (Primärspannung) die Richtung und deren Wert die Größe der Asymmetrie angibt.

Alles klar?

Es gibt also drei Spulen: zwei sekundärseitige und eine primärseitige. Diese sind auf einen gemeinsamen Spulenkörper aufgewickelt.

Am Bourdonrohr ist ein Weicheisenkern befestigt, und zwar da, wo es sich am meisten ausbiegt unter Druck, und dieser Kern taucht nun in das Innere des Spulenkörpers ein.

Liegt kein Druck an, befindet er sich genau zwischen den beiden Sekundärspulen, das System ist also genau symmetrisch.

Unter Druck wird der Eisenkern etwas herausgehoben, es entsteht gemäß obigem Prinzip eine Spannung, die direkt proportional dem anliegenden Druck ist und mit einem Messinstrument angezeigt werden kann.

Einfach, billig und gut, keine medienberührenden Teile außer der Kapillare, die aber in gleicher Weise überall in der HPLC verwendet wird.

Mit dem Aufkommen preiswerter und genauer elektronischer Druckaufnehmer wurden diese dann verwendet. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen:

Der *piezoelektrische Druckaufnehmer* funktioniert nach dem piezoelektrischen Prinzip, das Jacques und Pierre Curie 1880 entdeckten. Sie stellten fest, dass sich die Oberflächen bestimmter Kristalle – unter anderem von Quarz – elektrisch aufladen, wenn sie mechanisch belastet werden. Diese elektrische Ladung ist exakt proportional zu der auf den Kristall wirkenden Kraft und wird in Picocoulomb ($1 \text{ pC} = 10^{-12} \text{ Coulomb}$) gemessen.



Copyright Techlab GmbH

Bei den *Dehnungsmessstreifen-Drucksensoren* ist ein mäanderförmiges Widerstandselement auf einem Träger aufgebracht, der sich bei Druck verformt. Damit einher geht eine Längenänderung des Leiters, die Widerstandsänderung wird über eine Brückenschaltung gemessen.

Beide Bauformen können sehr klein gebaut werden, sind vollständig in Edelstahl gekapselt und einfach zu verbauen bzw. im Reparaturfall einfach auszutauschen.

Elektronische Druckanzeigen sind geschönt. Soll heißen, sie sind immer ein wenig gedämpft. Der Grund ist einfach: Wegen der sehr geringen Masse der elektronischen Sensoren reagieren die Sensoren diese auf kleinste Druckschwankungen, was zu einem ständigen Zittern der letzten Anzeigestelle führen würde.

Hat man früher einfach einen dicken Kondensator parallel zum Signal gelegt, verwendet man in der modernen Signalverarbeitung einen „gleitenden Mittelwertfilter“. Dabei wird ein Fenster mit einer bestimmten Filterbreite über den Mittelwert der Signale geschoben, was das Rauschen (in unserem Fall die Pulsation) verringert, so dass die Anzeige nicht so sehr schwankt.

Einen gleitenden Mittelwertfilter kann man auch über das Signal eines Detektors legen, um das Basislinienrauschen zu minimieren, allerdings läuft man dann auch Gefahr, kleine Peaks zu verlieren.

Ein mechanisches Manometer sollte, wie schon früher erwähnt, in keinem HPLC-Labor fehlen. Ist es auch noch kalibriert, hat man ein unbestechliches, von keiner Elektronik beeinflusstes Instrument, um den tatsächlichen Systemdruck zu ermitteln und die echten Druckschwankungen zu sehen.