

Copyright YoungLin Instrument Co.

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

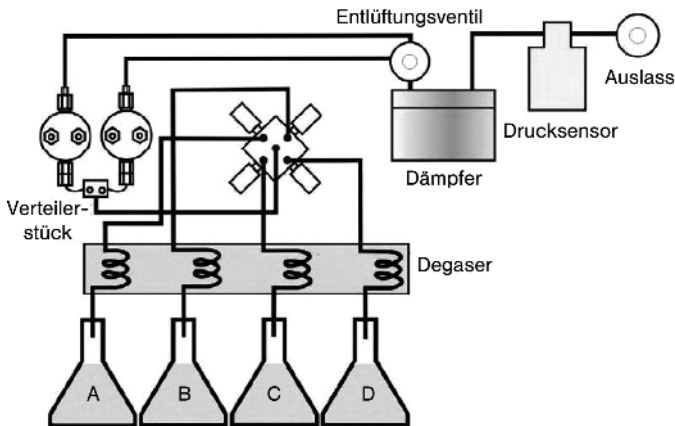


Copyright Techlab GmbH

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.



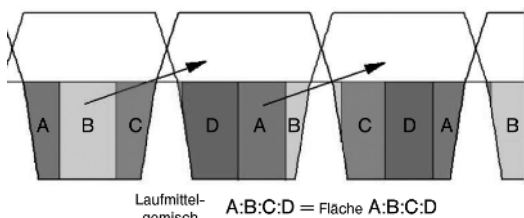
Copyright YoungLin Instrument Co.

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 Ventilsteuerzeiten 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:

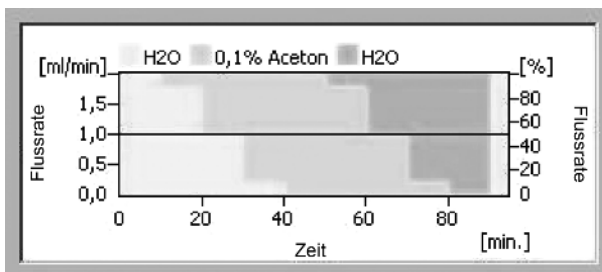
10 %, 50 %, 90 % und 100 % von A nach B und weiter von C nach D.

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 Coffeinelösung 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 un reproduzierbar verändern.

Die Schläuche werden verteilt auf die Flaschen:

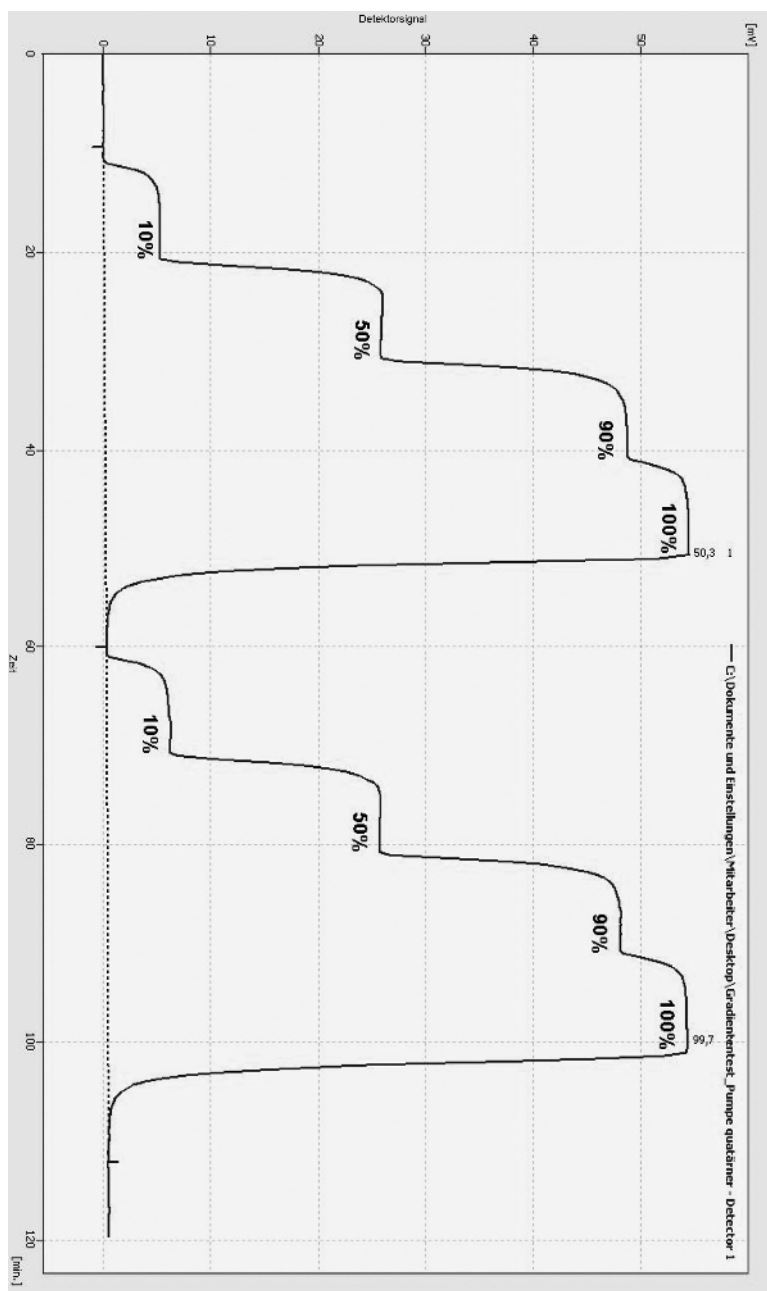
Wasser – Ansaugleitung A und C

Wasser + Coffein/Aceton – Ansaugleitung B und D



Copyright Techlab GmbH

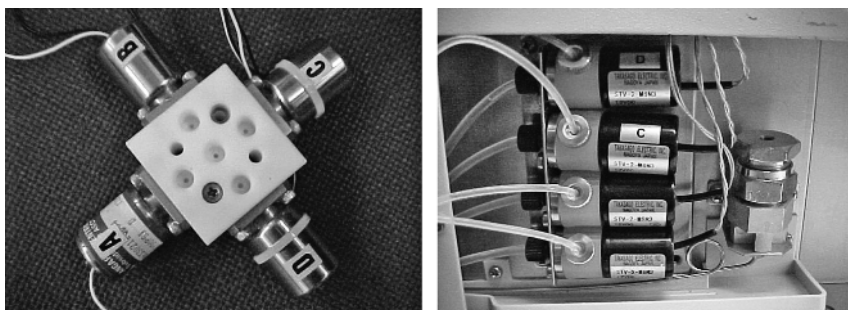
An den Ausgang der Pumpe wird eine Restriktion zum Druckaufbau angeschlossen und danach ein UV-Detektor. Die Absorption des Coffein/Aceton wird den Gradientenverlauf genau nachzeichnen, das sieht dann folgendermaßen aus:



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 eingeht. 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

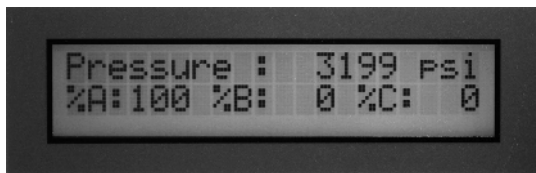
Wie schon erwähnt, ist für die Anwendung in der HPLC allein die Flussrate entscheidend, denn davon hängt die Peakidentifizierung ab. Die Trennsäule baut einen gewissen Gegendruck auf, in der normalen HPLC zwischen 100 und 300 bar (10–30 MPa) und in der UHPLC bis etwa 600 bar (60 MPa).

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 jahrzehntelang 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.