

Der HPLC-Tipp im September

Geisterpeaks durch Rückstände in der Mischkammer

Von Werner Röpke, Braunschweig

Der Fall

In einer von mehreren Benutzern abwechselnd gefahrenen HPLC-Gradientenanlage treten immer wieder unerklärliche Störungen im Chromatogramm auf, die auch durch intensives Spülen nicht zu beseitigen sind. Die Störungen halten sich hartnäckig, auch bei mehrfachem Durchlauf von Leergradienten ohne Säule.

Probleme mit dem Injektionsventil können insoweit ausgeschlossen werden, als dass das Ventil *nicht* betätigt wird und die Störungen trotzdem auftreten.

Die Lösung

Die wenigsten Laboratorien sind in der Lage, für eine bestimmte HPLC-Analytik eine einzige Anlage vorzuhalten. Ein Laufmittelwechsel, auch mit sorgfältigstem Spülen unter Verwendung intermediärer Phasen, hinterlässt immer Spuren. Isokratische HPLC-Systeme sind etwas unempfindlicher, denn Gradienten-HPLC-Anlagen haben ein Bauteil, das der Anwender bei der Fehlersuche gern übersieht:

die Mischkammer!

Das Problem betrifft Hoch- und Niederdruckgradientensysteme gleichermaßen. Ob nun ein sich über die Zeit änderndes Laufmittelgemisch über unterschiedlich fördernde Pumpen bereitgestellt, oder ob es durch zwei, drei oder vier Magnetventile erzeugt wird, spielt keine Rolle.

Die Laufmittel – von den Pumpen oder von den Ventilen – treffen sich an einer zentralen Stelle im System, eben der Mischkammer. Es gibt statische und dynamische Mischkammern, beide sind etwa gleich verbreitet. Am bekanntesten sind die dynamischen Mischkammern, entweder als externe Geräte oder eingebaut in einer Gradientenpumpe.

Bei der dynamischen Mischkammer rotiert ein Rührfisch mit Teflonmantel in einem druckfesten Gehäuse aus Edelstahl, statische Mischkammern werden entweder als mäandernde Ausfräsungen in einem Druckkörper gefertigt oder, das sind die ältesten Bauformen, als einfache Zylinder mit Glaskugeln darin.



Dynamische Mischkammer mit Rührer

Allen diesen Mischern ist eines gemeinsam:

Irgendwo liegt eine Edelstahlfritte, die Schmutz abfangen soll, bevor er in das Injektionsventil gerät. Das ist durchaus vernünftig, aber leider gerät der Einbauort der Fritte oder des Siebes mit den Jahren in Vergessenheit. Als Wartungsarbeiten werden Dichtungs- und Ventilwechsel von den Herstellern empfohlen, selten aber ein Austausch der Fritten.

Jeder Praktiker weiß, dass dort, wo etwas gemischt wird, auch etwas ausfallen kann. Oft ist das erwünscht, in der HPLC natürlich überhaupt nicht. Auch bei saubersten Eluenten und bei Beachtung aller Regeln bildet sich im Laufe der Benutzung eine bemerkenswerte



Stark verschmutzte Fritte

Schicht (Foto), von der immer ein kleines bisschen abgelöst wird, wenn sich die Laufmittelzusammensetzung ändert. Sehr wenig, aber immer genug, um Störungen im Chromatogramm zu erzeugen.

Abhilfe ist einfach: Bei Auftreten solcher Störungen im Leerlauf

eines Gradienten immer auch die Mischkammer verdächtigen. Externe Mischkammern machen es dem Anwender besonders einfach, sie sind mit wenigen Handgriffen zerlegt. Wird die HPLC-Anlage mit häufig wechselnden Aufgabenstellungen gefahren, ist eine jährliche Inspektion auf jeden Fall sinnvoll, um Problemen vorzubeugen.

Der Drucksensor der HPLC-Pumpe befindet sich normalerweise am Ausgang des Systems, würde also einen durch Fritten davor verursachten Druckanstieg nicht anzeigen. Bei manchen Systemen befindet sich der Mischer aber außerhalb der Pumpe um leicht zugänglich zu sein, hier deutet ein Druckanstieg mit hoher Sicherheit auf eine verschmutzte Fritte im nachgeschalteten Teil hin. Nach Austausch der Fritten oder Siebe empfiehlt sich eine Komplettreinigung der Anlage, wenn sie ohnehin gerade außer Betrieb gestellt ist.

Da alle medienberührten Teile aus Edelstahl sind, könnte man die ganze Anlage – ohne Säule natürlich – mit Salpetersäure spülen, um sie zu reinigen und um alle Oberflächen zu passivieren. Die Korrosionsbeständigkeit von Edelstahl „rostfrei“ beruht ja auf einer komplexen, chromreichen Oxidschicht bzw. Oxidhydratschicht auf dem Stahl, die den normalen Oberflächenzustand nichtrostender Stähle darstellt. Die Oxidation läuft spontan ab, sofern genügend Sauerstoff an die Oberfläche gelangt. Edelstahl „rostfrei“ muss mindestens 11% Chrom enthalten, um diese Funktionalität zu bieten. Die in der HPLC verwendeten Stähle, meist mit der Bezeichnung 1.4571, sind noch zusätzlich mit Molybdän, Nickel und Titan legiert.

Mit der Zeit nimmt die Dicke der Oxidschicht zu. Es entsteht eine dauerhaft korrosionsbeständige Oberfläche, die selbst im Fall mechanischer Beschädigung erhalten bleibt. Wird Edelstahl bearbeitet, gelangt „frischer“ Stahl an die Oberfläche, der sofort wieder passiviert wird. Dieser Prozess kann mithilfe eines Oxidationsmittels beschleunigt werden, um eine gleichmäßige Oxidschicht aufzubauen.

Dieses Oxidationsmittel ist typischerweise eine etwa 6N Salpetersäure. Nun ist es nicht jedermanns Sache, mit einer derart konzentrierten Säure zu arbeiten, schon gar nicht an der HPLC, aber eine 10% oder 20%ige Säure hat leider nicht den gewünschten Passivierungseffekt. Aber der ist auch nicht unbedingt erforderlich, denn wir wollen ja in erster Linie reinigen. Der Autor empfiehlt daher aus jahrelanger Erfahrung im Service die „faule-Leute-über-Nacht“ Methode, gleichermaßen geeignet für Edelstahl und Kunststoffbauteile:

Anstelle von konzentrierter Säure kommt dabei ein einfacher Essig-Haushaltsreiniger zum Einsatz. Der genaue Wirkmechanismus ist sicher noch nicht ausreichend erforscht, aber es funktioniert und der Vorteil ist die einfache und ungefährliche Handhabung.

Gehen Sie so vor: Setzen Sie einen großen Becher mit heißem Wasser an und geben Sie

einen guten Schuss vom Reiniger hinein. Pumpen Sie bei 1 ml/min über Nacht im Kreis und spülen Sie am nächsten Tag mit ausreichendem Wasser und dann mit Ihrem Laufmittel. Selbst verklebte Ventile werden damit ohne Ausbau fast immer wieder funktionsfähig. Neben der chemischen Wirkung von Essigsäure und Tensiden kommt der mechanische Reinigungseffekt ins Spiel: Wo sich der Querschnitt verengt, nimmt die Strömungsgeschwindigkeit zu und hilft somit, Schmutzpartikel abzutragen.

Nach Reinigung und Spülen fahren Sie einen Leergradienten, um sicher zu gehen, dass alle Probleme beseitigt sind.

Gegenanzeige: Wo Tenside mit höchster Empfindlichkeit gemessen werden, eignet sich die Methode natürlich nicht.