

CHROM. 14,654

HILFSMITTEL FÜR DIE PRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE

E. VON ARX*, P. RICHERT, R. STOLL, K. WAGNER und K. H. WUEST
Forschungslaboratorien der Division Pharma der Ciba-Geigy AG, Basel (Schweiz)
(Eingegangen am 15. Dezember 1981)

SUMMARY

New aids for preparative high-performance liquid chromatography

A new preparative separation system is described. It consists of a column, a splitting system which allows the controlled withdrawal of parts of the eluate for subsequent detection and a peak detector connected to a fraction collector.

EINLEITUNG

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie ist in den letzten Jahren zu einer sehr wirksamen analytischen Trennmethode entwickelt worden. In neuester Zeit ist auch wiederholt und erfolgreich versucht worden, diese Methode für präparative Zwecke einzusetzen. Die wichtigsten diesem Zwecke dienenden Massnahmen sind die Vergrösserung der Kolonnendimension und die Mehrfacheinspritzung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der automatischen Chromatographie im Mehrfachlaufverfahren, für die zwei in der Praxis bewährte Systeme im Detail beschrieben werden.

Das hauptsächlichste Problem im Zusammenhang mit der Automation von Mehrfachläufen ist das programmgesteuerte Schneiden der Peaks, das an die Stelle des sehr aufwendigen, ständige Präsenz erfordernden, manuellen Schneidens tritt. Weitere Probleme stellen sich bei der Aufteilung des Eluates in zwei Teile, einen zur Detektion und einen zum Sammeln sowie bei der Uebertragung der Messresultate des Detektors auf den Fraktionensammler.

Zur Lösung dieser Probleme hat sich bei uns das im folgenden beschriebene System bewährt.

Einer mit einer Mehrfacheinspritzautomatik versehenen Säule folgt ein splitting System, das die kontrollierte Abzweigung von Teilen des Eluates für (1) eine direkte Detektion (UV, sichtbar), (2) eine Derivatisierung mit anschliessender Detektion oder (3) eine Verdünnung mit anschliessender Detektion erlaubt, wobei der Detektor mit einem Fraktionensammler gekoppelt ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte und Materialien

Als Pumpen dienten eine Altex 110 mit präp. Kopf und 28 ml Fluss pro Minute

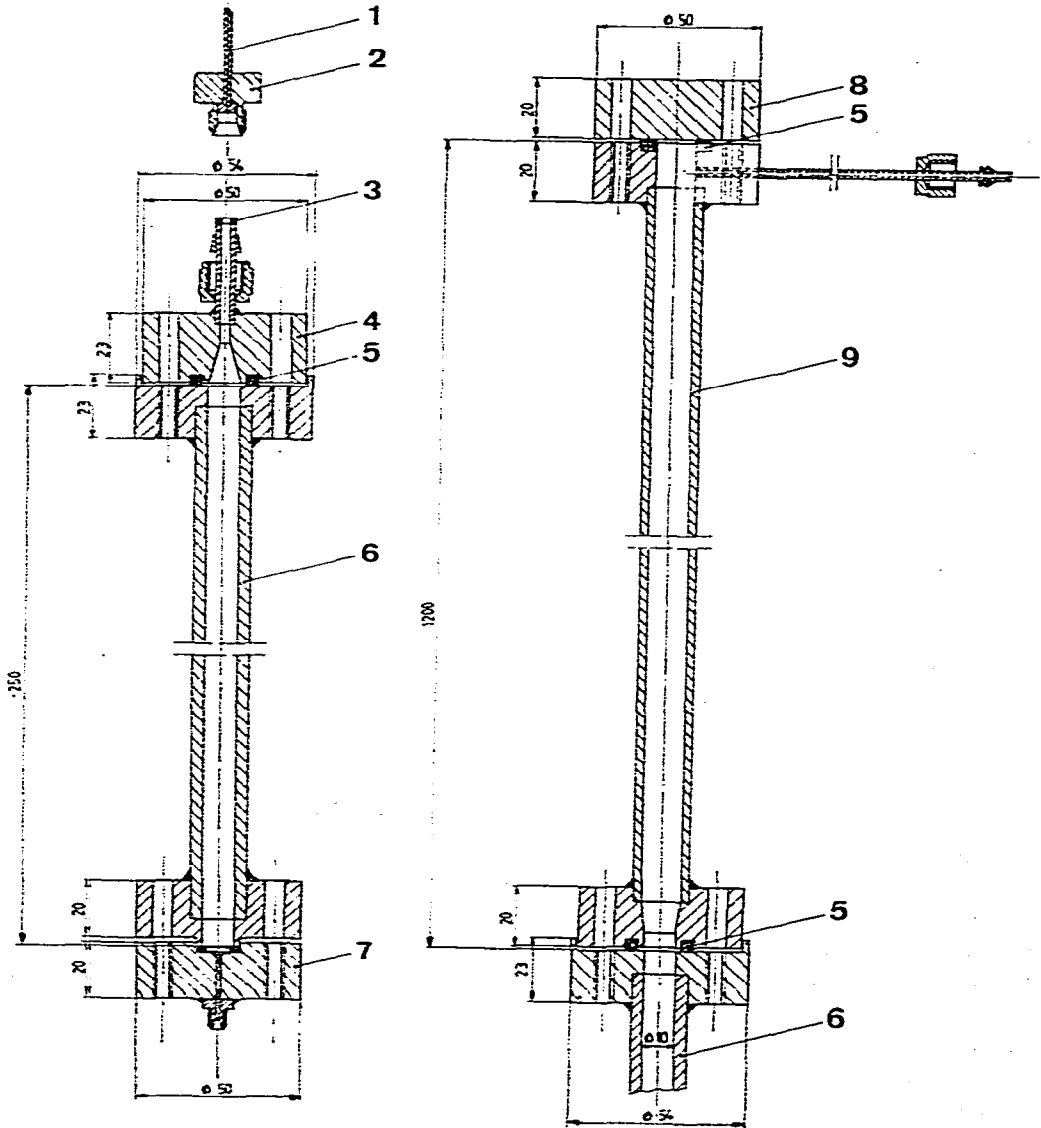


Fig. 1. 10-mm Trennsäule (a) und Füllvorrichtung (b). 1 = End-Fitting mit 1/16 in. Stahlrohr 0.25 mm I.D. (Argon Schweißung); 2 = Kappe mit einer Bohrung von 1.8 mm I.D. UNF 7/16; 3 = Altex AX 250-21 Fritte; 4 = Verteilerkopf mit 1/4-in. Anschluss und 1/4 Parker Nut und 1/4-in. Parker Ferrule (weitere Einzelheiten zu 1-4^(Lit. 2)); 5 = Teflon-Dichtung; 6 = Trennsäule bestehend aus dem Rohr einer 10-mm Altexsäule mit zwei an beiden Enden angeschweißten Flanschen und mit je 6 Bohrungen für Zylinderschrauben mit Innensechskant M 6 × 40 mm; 7 = Säulenabschluss mit einer Altex-Fritte AX 250-22 und einer eingeschweißten 1/16-in. Swagelok-Verschraubung; 8 = Verschlussdeckel; 9 = Füllrohr mit zwei Flanschen mit je 6 Bohrungen und einem Anschluss für die Pumpe.

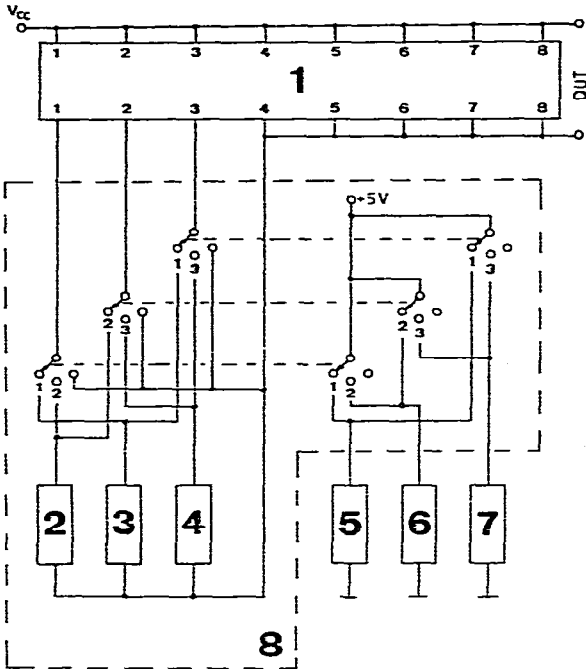


Fig. 2. Kanalwahlschalter. 1 = Mikroprozessor; 2-4 = Relais; 5-7 = Lichtschranken; 8 = Kanalschalter.

für isokratische Chromatographie, für binäre Gradienten zwei Waters M6000 Pumpen mit dem 660 Steuergerät, und für ternäre Gradienten ein Varian HPLC 5060. Für die Säulenfüllung wurde eine Haskel 26980.4 Pumpe verwendet.

Handeinspritzungen erfolgten mit einem Rheodyne 7125 Ventil mit 1-ml Probenschlaufe. Automatisch wurden bis 2 ml mit WISP 710 B Einspritz-Automaten (Waters) eingespritzt. Die Trennsäule und die Vorrichtung zum Packen der Säule wurden im Eigenbau hergestellt (Fig. 1).

Als Detektoren dienen ein Cecil CE 212 variabler UV-Monitor (Cecil, Cambridge, Grossbritannien) mit einer Helma-Küvette von 0.5-mm Schichtdicke, ein variabler UV-Monitor UVIKON 725 (Kontron) und für die Fluoreszenz-Registrierung ein Aminco 4-7439 und ein LC 1000 Detektor (Perkin-Elmer).

Registriert wurde mit WW 312 Zweikanal-Schreibern und einem WW 1100 Einkanal-Schreiber mit Aufbau für die Lichtschranken. Das Zumischen des Derivatisierungs-Reagenz, Fluram oder *o*-Phtaldialdehyd¹, erfolgte mit Metripumpen E 1A/ss3c mit 1-3 Pumpenköpfen (Metering Pumps, London, Grossbritannien).

Für die Aufspaltung des Eluats (splitting) wurde ein zeitgesteuertes Dreiwegventil verwendet (Labomatic, Allschwil, Schweiz).

Die Fraktionen wurden mit folgenden Geräten gesammelt: Büchi 660 für 8 Fraktionen, mit externer Ansteuerung (Büchi Flawil, Schweiz). Labomatic Circular I für 20 und 50 Fraktionen, beide ausgerüstet mit Zeitschaltung, Endabschaltung und externer Ansteuerung und ein Gilson Micro Fractionator für 80 Fraktionen mit Zeitsteuerung. Der Peak-Detektor wird durch einen Mikroprozessor Labtime 1788 (Port-

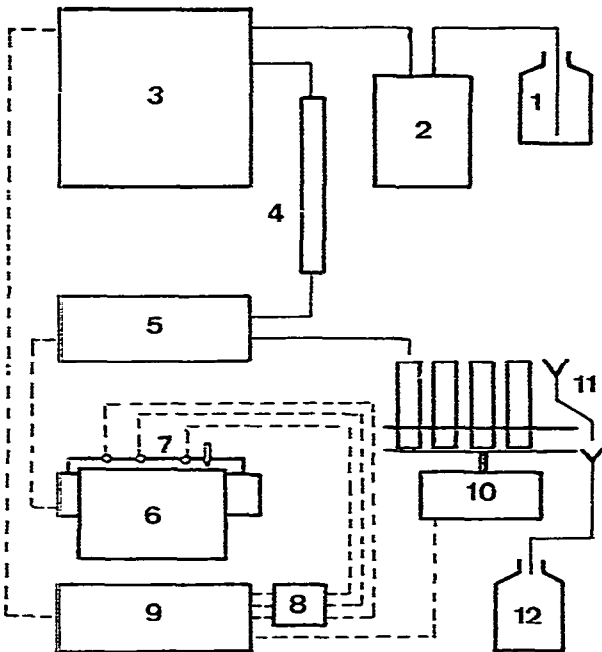


Fig. 3. Vollautomatisches isokratisches oder binäres Trennsystem mit Peak-Detektion. 1 = Lösungsmittel; 2 = präparative Pumpe (Kontron oder Waters) 2 × 600 mit Gradientensteuerggerät 660; 3 = WISP Auto-Probengeber; 4 = Trennsäule; 5 = Cecil UV-Monitor; 6 = Schreiber; 7 = Reflexions-Lichtschranken; 8 = Kanalwahlschalter; 9 = Mikroprozessor; 10 = Fraktionensammler mit 7 Probengläser; 11 = Trichter zum Abführen des nicht gebrauchten Eluats; 12 = Sammelflasche.

mann, Therwil, Schweiz) oder einen Labomat 100 (Labomatic) gesteuert. Als Reflexions-Lichtschranken dienten Reflectiv Transducer OBP 125 (Optron, Carrallton, TX, U.S.A.). Die Zuschaltung der Lichtschranken erfolgt über einen Kanalwahlschalter mit Relais (Eigenbau, Fig. 2). Zwei Beispiele für die gewählte Anordnung der Apparate, den Flusslauf sowie die elektrische Schaltung werden in Figs. 3 und 4 schematisch dargestellt.

Trennsäule und Füllvorrichtung

Die 10-mm I.D. Trennsäule (Fig. 1a) wurde am oberen Ende (Säuleneingang) mit einem trichterförmigen Verteiler ausgerüstet (4).

Die Packung der Säule erfolgt in zwei Etappen. In einer ersten Etappe wird mittels der Füllvorrichtung (Fig. 1b) bis zum oberen Ende der 10-mm Säule (6) gefüllt, dann wird in einer zweiten Etappe der Kopf (4) aufgesetzt und mit einem 1/4 in. Anschluss (zum Packen analytischer Säulen) weiteres Material bis zum Ende des 1/4 in. Rohres aufgefüllt. Das Rohr wird oben mit einer Fritte (3) abgeschlossen. Die Füllung erfolgt nach der Viskositätsmethode³ mit einer grossen Haskel-Pumpe, die über die nötige Kapazität (70 ml Kolben bei 450 bar) verfügt.

Peak-Detektor

Der Peak-Detektor (Fig. 3) besteht aus einem Mikroprozessor (Labtime oder

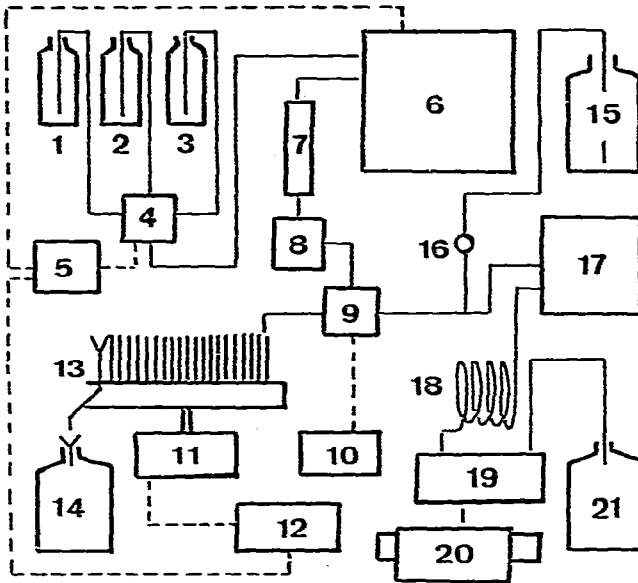


Fig. 4. Vollautomatisches ternäres Trennsystem mit Detektion nach Derivatisierung (ohne Peak-Detektor). 1-3 = Lösungsmittel; 4 = Pumpe mit Vierweg-Ventil (ternäres System, Varian); 5 = Mikroprozessor für die Steuerung des ternären Trennsystem und Start des Fraktionensammlers (Varian); 6 = WISP Auto-Probengeber; 7 = Trennsäule; 8 = UV-Detektor; 9 = Dreiweg-Ventil mit 10 = Zeitsteuerung; 11 = Fraktionensammler (für 20 oder 50 Fraktionen) mit Endabschaltung; 12 = Steuerung; 13 = Trichter (in Pos. 20 resp. 50) zum Abführen des nicht gebrauchten Eluats; 14 = Sammelflasche; 15 = Reagenz; 16 = Schliessventil; 17 = Pumpe; 18 = Reaktionsschlaufe; 19 = Fluoreszenz-Detektor; 20 = Schreiber; 21 = Sammelflasche.

Labomat) einer Schalterkombination (Fig. 2) (Eigenbau) und Reflexionslichtschranken, die verschiebbar auf dem Schreiber montiert sind (Eigenbau). Angeschlossen ist ein Fraktionen-Sammler (Büchi) mit 8, respektive 7 Probengläsern. Anstelle des 8. Glases befindet sich ein Trichter, über den das nichtgebrauchte Eluat abgeführt wird. Das Gerät ist mit einer zusätzlichen externen Ansteuerung ausgerüstet.

Der Mikroprozessor wird als Schaltuhr mit einfachen Schliesskontakten verwendet. Eingegeben werden auf die Ausgänge 1-8 je die No. des Ausganges, sowie die Start- und Stopzeiten des Kontakts. Das Gerät wird für jeden neuen Zyklus durch den Auto-Probengeber gestartet.

Im Beispiel (Fig. 5) werden die für die Ausgänge 4-8 des Mikroprozessors während je 1 sec geschlossen. Die Kontaktkreise der Ausgänge 1-3 werden über die Relais im Kanalwahlschalter (Fig. 2) geschlossen. Sie bleiben während der Passage einer Metallhülse vor den Lichtzellen aktiviert. Die Metallhülse, in der der Schreibstift steckt, ist am Registrierwagen des Schreibers montiert.

Um eventuelle Verschiebungen der Retentionszeit zu berücksichtigen, werden für die Ausgänge 1-3 Zeitfenster eingegeben. Während dieser Zeit bleiben die Reflexionslichtschranken eingeschaltet. Mit dem Kanalwahlschalter können die passenden Lichtschranken zugeschaltet werden.

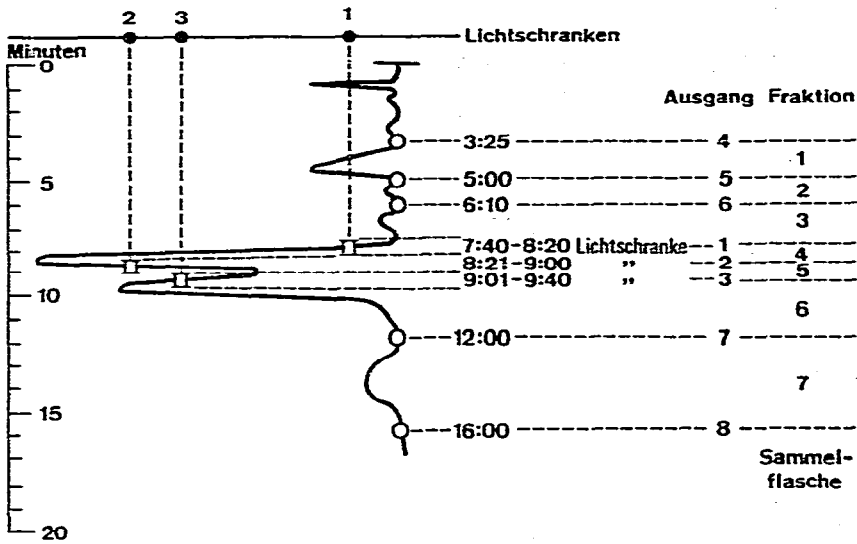


Fig. 5. Programmbeispiel für die Auftrennung eines Gemisches in 7 Fraktionen.

Splitting-System und Derivatisierung

Die Aufteilung (Splitten) des Eluates erfolgt mittels eines elektronisch gesteuerten magnetischen Dreiweg-Ventils. Das Strömungsverhältnis wird durch Zeiteinheiten, z.B. 1:10 bis 1:100 sec. gesteuert.

Bei präparativen Trennungen wird ein kleiner Teil des Eluates dem Detektorsystem zugeführt, während die Hauptmenge in den Fraktionensammler geleitet wird.

Der für die Derivatisierung bestimmte Teil des Eluats wird von einer Pumpe angesaugt (vgl. Fig. 4). In den Leitungsabschnitt zwischen Dreiwegventil und Pumpe wird das Reagenz (z.B. *o*-Phthaldialdehyd oder Fluram) über ein T-Stück zugegemischt. Durch diese Anordnung wird das Entstehen eines Vacuums beim Ansaugen durch die Pumpe (bei geschlossenem Ventil) verhindert. Beim Passieren der Pumpe wird das Eluat mit den Reagenz vermischt und über eine Reaktionsschleife (0.5 mm I.D. und 8.5 m Länge) dem Fluoreszenz-Detektor zugeführt.

Mit der gleichen Einrichtung kann bei Ueberladung des UV-Detektors ein Teil des Eluates abgetrennt werden. An Stelle des Reagenz wird Lösungsmittel angesaugt, über die Pumpe gemischt und das verdünnte Eluat in den UV-Detektor geleitet.

ERGEBNISSE

Die beschriebenen Trennsysteme sind seit mehr als 2 Jahren im Einsatz. Heute stehen 3 Apparaturen, eine dem Beispiel Fig. 3, eine andere dem Beispiel Fig. 4 und eine dritte, einer Kombination von beiden entsprechend, in Betrieb.

Die Automation, die auch einen Nachtbetrieb ermöglicht, führte zu einem ökonomischen Arbeitseinsatz.

Mit Erfolg wurden Trennungen von Peptiden, Leukotrienen, Interferonen und Isolierungen unbekannter natürlicher Wirkstoffe durchgeführt.

Seit einem Jahr sind auch Säulen mit weiterem innerem Durchmesser mit

Erfolg im Einsatz, nämlich 21 mm I.D. von Latek (Labortechnik-Geräte, Heidelberg) und 25-mm I.D. HIBAR-Fertigsäulen von Merck.

DANK

Für die wertvolle Hilfe beim Bau der beschriebenen Hilfsmittel danken wir den Herren E. Adam und F. Bruder. Herrn Dr. R. Andreatta danken wir für die Ueberarbeitung des Manuskripts.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein neues präparatives Trennsystem beschrieben, bestehend aus einer Kolonne und einem splitting System, das die kontrollierte Abzweigung von Teilen des Eluates für die Detektion gestattet. Zum System gehört ferner ein Peak-Detektor, der mit einem Fraktionensammler gekoppelt ist.

LITERATUR

- 1 E. von Arx und M. Faupel, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 68.
- 2 E. von Arx, *J. Chromatogr.*, 209 (1981) 310.
- 3 I. Halász, *Z. Anal. Chem.*, 277 (1975) 277.