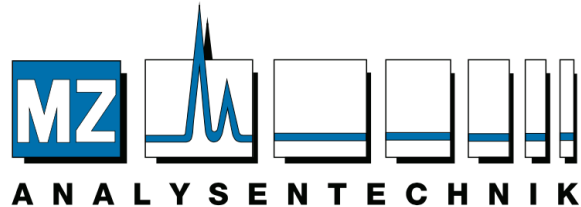


## Technical Note

Barcelona-Allee 17  
D-55129 Mainz  
www.mz-at.de

Tel. 06131/880 96-0  
Fax 06131/880 96-20  
info@mz-at.de

USt.-IdNr.: DE 149057837  
Steuer-Nr.: 26/662/01682



# Allgemeine Tipps für die präparative HPLC

## 1. Allgemeine Informationen

Ziel der präparativen Chromatographie ist es, Substanzen in ausreichender Quantität und Reinheit zur weiteren Verwendung zu isolieren, zu reinigen und zu sammeln. Typische Anwendungsfelder sind unter anderem die Reinigung von Peptiden an Reversed-Phasen, die Trennung von Enantiomeren an chiralen Phasen oder präparative SFC Applikationen in der pharmazeutischen Industrie bis hin zu kleinen Forschungsgruppen für Naturprodukte. Der prinzipielle Aufbau einer Anlage für die präparative HPLC ist identisch der einer analytischen HPLC mit dem Zusatz eines Fraktionssammlers.

## 2. Zielsetzung

Bei der präparativen HPLC geht es hauptsächlich um die zu optimierenden Parameter Reinheit, Durchsatz und Ausbeute. Da diese einander bedingen, sollte vor der Reinigung klar sein, welches Ziel hauptsächlich verfolgt werden soll. Ein maximaler Durchsatz ist nur mit Einbußen bei Reinheit und Ausbeute zu erreichen. Eine maximale Reinheit wird mitunter nur mit langen Trennungszeiten und somit geringeren Durchsatz erreicht. Maximale Ausbeuten gehen auf Kosten von Durchsatz und Reinheit.

Im Idealfall soll möglichst viel Substanz pro Injektion in bestmöglicher Auflösung und Zeit gereinigt werden. Dabei ist die Peakform des Zielanalyten von untergeordneter Bedeutung. Bei der präparativen HPLC geht es primär um die Auflösung zwischen dem interessierenden Peak und den Peaks, die diesem am nächsten sind.

## 3. Vorversuche und Up-Scaling

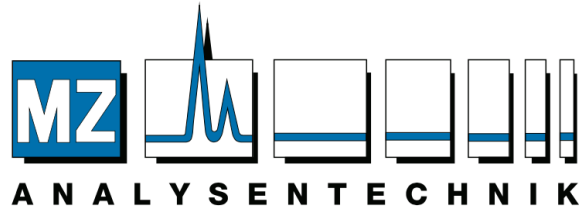
Um Kosten zu sparen wird empfohlen zunächst eine geeignete Methode für das jeweilige Substanzgemisch auf einer analytischen Säule zu entwickeln. Um ein reibungsloses Up-Scaling zu gewährleisten, sollten folgende Punkte beachtet werden:

- Die analytische und die präparative Säule sollten mit der gleichen stationären Phase gepackt sein
- Die Partikelgröße als auch die Säulenlänge sollten für beide Säulen idealerweise identisch sein
- Wenn die Partikelgröße der präparativen Säule abweicht, sollte darauf geachtet werden, dass das Verhältnis von Partikelgröße zu Säulenlänge der analytischen Säule beibehalten wird
- Die verwendete mobile Phase, sollte für beide Trennungen identisch sein
- Die Proben sollten für beide Trennungen im gleichen Lösungsmittel gelöst sein und in derselben Konzentration vorliegen





Barcelona-Allee 17    Tel. 06131/880 96-0    USt.-IdNr.: DE 149057837  
 D-55129 Mainz    Fax 06131/880 96-20    Steuer-Nr.: 26/662/01682  
 www.mz-at.de    info@mz-at.de



### 3.1 Anpassen der Flussrate F

Für das Up-Scaling ist darauf zu achten, dass die linearen Fließgeschwindigkeiten möglichst konstant bleiben. Die lineare Fließgeschwindigkeit ist proportional zur Querschnittsfläche der Säule und kann für präparative Säulen mit untenstehender Formel berechnet werden.

$$F_{Pr ep} = F_{Analy} \cdot \left( \frac{d_{Pr ep}}{d_{Analy}} \right)^2 \cdot \frac{p_{Analy}}{p_{Pr ep}}$$

- F<sub>Pr ep</sub>**    Flussrate für das präparative System
- F<sub>Analy</sub>**    Flussrate für das analytische System
- d<sub>Pr ep</sub>**    Durchmesser der präparativen Säule
- d<sub>Analy</sub>**    Durchmesser der analytischen Säule
- p<sub>Pr ep</sub>**    Partikelgröße der präparativen Säule
- p<sub>Analy</sub>**    Partikelgröße der analytischen Säule

Die folgende Tabelle enthält die berechneten Volumenströme (Flussraten) bei konstanten linearen Fließgeschwindigkeiten für Säulen unterschiedlicher Innendurchmesser aber identischer Partikelgröße.

Innendurchmesser der Säule in mm	4.6	8.0	10	20	30	40	50
Flussrate in mL/min	0.5	1.5	2.4	9.5	21	38	60
	1.0	3.0	4.7	19	43	76	120
	1.5	4.5	7.1	28	64	113	177
	2.0	6.0	9.5	38	85	150	236

### 3.2 Anpassen der Beladbarkeit bzw. des Injektionsvolumens v<sub>inj</sub>

Wenn eine Methode auf eine präparative Säule bzw. allg. auf eine Säule mit größeren Säulenvolumen übertragen wird, hilft die folgende Gleichung die Beladbarkeit bzw. das Injektionsvolumen v<sub>inj</sub> anzupassen. Auch die Beladbarkeit der Säule ist proportional zur Querschnittsfläche der Säule.

$$v_{inj,Pr ep} = v_{inj,Analy} \cdot \left( \frac{d_{Pr ep}}{d_{Analy}} \right)^2 \cdot \frac{L_{Pr ep}}{L_{Analy}}$$

- v<sub>inj,Pr ep</sub>**    Injektionsvolumen für das präparative System
- v<sub>inj,Analy</sub>**    Injektionsvolumen für das analytische System
- d<sub>Pr ep</sub>**    Durchmesser der präparativen Säule
- d<sub>Analy</sub>**    Durchmesser der analytischen Säule
- L<sub>Pr ep</sub>**    Länge der präparativen Säule
- L<sub>Analy</sub>**    Länge der analytischen Säule

### 3.3 Übertragung von Gradienten

Um ein möglichst genaues Up-Scaling durchzuführen, dürfen insbesondere für Gradiententrennungen die Verweilvolumina und die Säulentotvolumina beider Systeme nicht vernachlässigt werden. Um Unterschiede der Verweilvolumen zu kompensieren, können am Gradientenanfang kurze isokratische Schritte eingebaut werden. Folgende Gleichung sollte gelten, wenn Gradienten von ein System auf das andere übertragen werden soll:

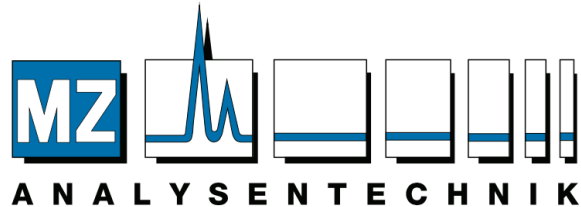




Barcelona-Allee 17  
D-55129 Mainz  
www.mz-at.de

Tel. 06131/880 96-0  
Fax 06131/880 96-20  
info@mz-at.de

USt.-IdNr.: DE 149057837  
Steuer-Nr.: 26/662/01682



$$\frac{t_{D,Analy} + t_{I,Analy}}{t_{c,Analy}} = \frac{t_{D,Prep} + t_{I,Prep}}{t_{c,Prep}}$$

$t_{D,Analy}$	Verweilzeit für das analytische System
$t_{I,Analy}$	Zeit des isokratischen Schrittes am Gradientenanfang für das analy. System
$t_{c,Analy}$	Totzeit für das analytische System
$t_{D,Prep}$	Verweilzeit für das präparative System
$t_{I,Prep}$	Zeit des isokratischen Schrittes am Gradientenanfang für das prep. System
$t_{c,Prep}$	Totzeit für das präparative System

### 3.4 Kompensierung von unterschiedlichen Verweilvolumina beider Systeme

Um Unterschiede der Verweilvolumen zwischen analytischen und präparativen System zu kompensieren, können am Gradientenanfang kurze isokratische Schritte eingebaut werden. Um diesen kurzen isokratischen Schritt für das präparative System zu ermitteln ist es notwendig die Verweilvolumina sowie die Säulentotvolumen für beide Systeme zu kennen.

$$t_{I,Prep} = \left( \frac{t_{I,Analy} \cdot F_{Analy}}{V_{c,Analy}} + \frac{V_{D,Analy}}{V_{c,Analy}} - \frac{V_{D,Prep}}{V_{c,Prep}} \right) \cdot \frac{V_{c,Prep}}{F_{Prep}}$$

$t_{I,Prep}$	Zeit des isokratischen Schrittes am Gradientenanfang für das prep. System
$t_{I,Analy}$	Zeit des isokratischen Schrittes am Gradientenanfang für das analy. System
$F_{Prep}$	Flussrate für das präparative System
$F_{Analy}$	Flussrate für das analytische System
$V_{c,Prep}$	Säulentotvolumen für das präparative System
$V_{D,Prep}$	Verweilvolumen für das präparative System
$V_{c,Analy}$	Säulentotvolumen für das analytische System
$V_{D,Analy}$	Verweilvolumen für das analytische System

## 4. Beladbarkeit und Überladungseffekte

Oft treten bei präparativen Trennungen sogenannte Überladungseffekte auf. Insbesondere dann, wenn eine große Menge reiner Analyt pro Zeit gewonnen werden muss. Studien zur maximalen Beladbarkeit sollten zunächst auf der analytischen Säule erfolgen. Dafür gibt es zwei Vorgehensweisen:

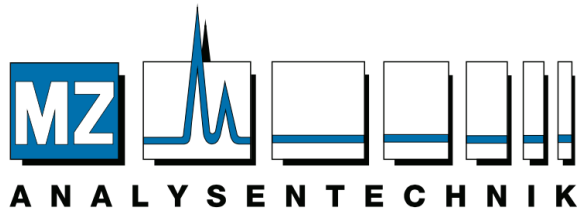
1. Eine Probe in hoher Konzentration wird hergestellt. Die Injektionsmenge wird in definierten Schritten erhöht.
2. Es werden mehrere Proben unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Das Injektionsvolumen bleibt konstant.

Die maximale Beladbarkeit ist von vielen Parametern abhängig und für jedes Trennproblem individuell. Die maximale Beladbarkeit für eine präparative Trennung wird meist empirisch bestimmt. Es wird so viel injiziert, bis sich die interessierenden Peaks gerade zu berühren beginnen bzw. bis sich der Analyt gerade noch in ausreichender Menge und Reinheit isolieren lässt. In dem Fall, dass die Peaks nicht genügend aufgelöst sind, besteht die Gefahr, dass die gesammelten Fraktionen an Reinheit verlieren. Es werden





Barcelona-Allee 17    Tel. 06131/880 96-0    USt.-IdNr.: DE 149057837  
D-55129 Mainz    Fax 06131/880 96-20    Steuer-Nr.: 26/662/01682  
www.mz-at.de    info@mz-at.de



dann zusätzlich definierte Zwischenfraktionen gewonnen, die anschließend bei Bedarf rezykliert werden können. Bei einer einfachen Trennung und einer guten Selektivität können z.B. auf einer 250x4.6 mm Säule bereits bis zu 10 mg pro Lauf gereinigt werden. Bei schwierigen Trennungen kann die maximale Beladbarkeit einer solchen Säule auch nur im sub mg Bereich liegen. Je besser die Auflösung der analytischen Trennung, desto stärker kann die präparative Säule beladen werden.

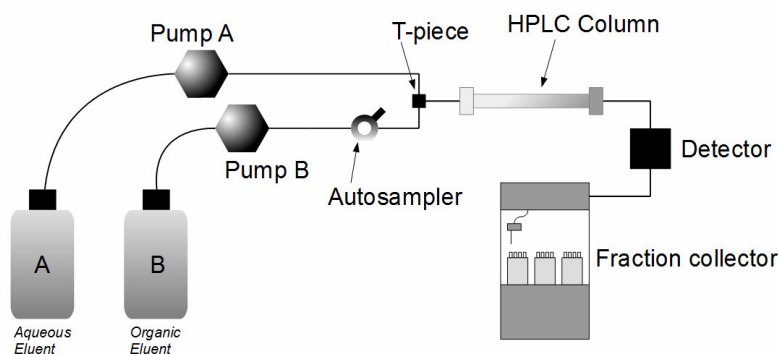
## 5. Injektion mit starken organischen Lösungsmitteln

Wenn die Analyten nur in starken organischen Lösungsmitteln wie DMF, DMSO oder NMP gelöst werden können, kann eine spezielle Injektionstechnik angewandt werden, die mitunter in der Literatur als "*At-Column-Dilution*" bezeichnet wird. Solche starken organischen Lösungsmittel besitzen eine sehr hohe Elutionsstärke, was die chromatographische Trennung bei Durchführung einer gewöhnlichen Injektion in vielen Fällen zerstört. Die Folge ist eine starke Peakverbreiterung und ein gewisser Substanzverlust. Dies tritt insbesondere dann auf, wenn bei der Reversed-Phase-Chromatographie die zu trennenden Verbindungen eine relativ hohe Polarität besitzen und somit nur schwach retardiert werden. Als Lösung für dieses Problem hat sich folgende Vorgehensweise als nützlich erwiesen:

1. Verbinden Sie den Injektor mit dem Pumpenkanal, welcher den organischen Eluenten liefert.
2. Injizieren Sie die Probe in reinem organischen Lösungsmittel und verdünnen Sie es mit dem wässrigen Eluenten direkt vor der Säule.

Dazu bauen Sie kurz vor den Eingang der Säule ein einfaches T-Stück ein. Dabei ist zu beachten, dass der Abstand zwischen dem T-Stück und der Säule so kurz wie möglich gehalten wird, um die Gefahr einer Ausfällung der Probe zu minimieren. Bei der Injektion sollte der Kanal B (organischer Eluent) mindestens 5% der Gesamtflussrate liefern. Der restliche Teil wässriger Eluent (Kanal A) wird durch das T-Stück dazu gemischt (siehe untenstehende Abbildung).

Vor dem eigentlichen Beginn des Gradienten wird dann ein kurzer definierter isokratischer Lauf geschaltet, um das starke organische Probelösungsmittel von der Säule zu spülen und die Probe am Säulenkopf zu konzentrieren.

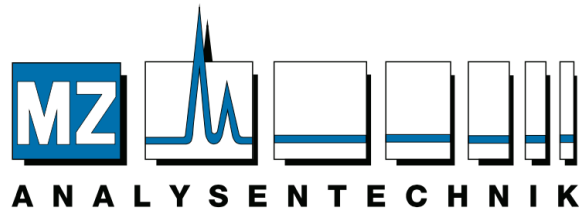




Barcelona-Allee 17  
D-55129 Mainz  
www.mz-at.de

Tel. 06131/880 96-0  
Fax 06131/880 96-20  
info@mz-at.de

USt.-IdNr.: DE 149057837  
Steuer-Nr.: 26/662/01682



## 6. Fraktionssammlung

Ist die zu trennende Probe noch unbekannt, von besonderen Wert oder handelt es sich nur um ein paar wenige Läufe, so wird oft eine manuelle Sammlung der Fraktionen bevorzugt. Ein Online-Signalplot auf dem Rechnerbildschirm ermöglicht es dem Analytiker, die Fraktionierung durch einfache Klicks zu steuern oder die Fraktionen einfach nach Detektordurchfluss händisch in Reagenzgläser oder Fläschchen zu sammeln. Werden häufig große Probenmengen per HPLC präparativ gereinigt, so kommen für die Sammlung der einzelnen Fraktionen oft vollautomatische Geräte zum Einsatz. Fraktionssammler können dabei entweder zeit- oder signalprogrammiert werden. Für die Fraktionssammlung nach Zeit werden entweder definierte Zeitfenster bestimmt, in denen das Eluat gesammelt wird oder die Probe wird kontinuierlich gesammelt und es wird die Zeit festgelegt, wie lang in ein Reagenzglas/Fläschchen gesammelt werden soll. Eine weitere Möglichkeit ist die Sammlung von Fraktionen nach dem Detektor-Signal, z.B. UV, ELSD oder auch MS. Um eine Probensammlung auszulösen, kann dabei entweder ein Signalschwellenwert (signal threshold) und/oder der Signalanstieg (signal slope) genutzt werden. Eine maximale Reinheit und Selektivität wird mit einer kombinierten Fraktionssammlung aus UV- und MS-Signal erreicht. Dadurch lässt sich zusätzlich die Anzahl an gesammelten Fraktionen drastisch reduzieren, wodurch einiges an Arbeitszeit in der Nachbehandlung der gesammelten Proben eingespart werden kann.

## 7. Mobile Phase

Damit die getrennten Komponenten leicht in reiner Form isoliert werden können, muss die gesamte mobile Phase (auch alle Pufferzusätze) von höchster Reinheit und flüchtig sein. Flüchtige Pufferzusätze sind u.A. Essigsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Ammoniak oder Triethylamin. Präparative Trennungen sollten wenn möglich isokratisch gefahren werden, da Gradienten in vielerlei Hinsicht einen erheblichen Mehraufwand mit sich bringen. Trotzdem werden auch bei der präparativen HPLC oft Gradiententrennungen verwendet.

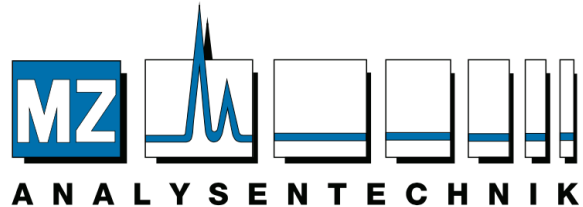
## 8. Detektoren

Damit bei präparativen Trennungen eine Detektorüberladung vermieden wird, sollten dafür unempfindliche Detektoren verwendet werden. Dafür haben sich Brechungsindex- oder spezielle UV-Detektoren bewährt. Auch ELSD oder MS Detektoren in Kombination mit einem Flow-Splitter kommen z.T. bei präparativen Trennungen zum Einsatz.





Barcelona-Allee 17      Tel. 06131/880 96-0      USt.-IdNr.: DE 149057837  
D-55129 Mainz      Fax 06131/880 96-20      Steuer-Nr.: 26/662/01682  
www.mz-at.de      info@mz-at.de



## 9. Säulen- und Systemschutz

Um die vergleichsweise teuren präparativen Säulen zu schonen, sollten nur partikelfreie Probenmischungen injiziert werden, die ausschließlich Komponenten enthalten, die auch eluiert werden können. Vorteilhaft ist, wenn die Probe im Vorfeld z.B. schon mittels Niederdruck-Säulenchromatographie vorgereinigt wird. Um die Hauptsäule vor schwer oder nicht zu eluierenden Substanzen zu schützen, ist es ratsam passende Vorsäulen und/oder Vorsäulenfilter zu verwenden. Vorsäulen schützen die Hauptsäule vor Verunreinigungen und schwer zu eluierenden Substanzen. Vorsäulenfilter halten kleine ungelöste Partikel zurück. Vorsäulen und Vorsäulenfilter sollten, in Abhängigkeit des Verschmutzungsgrades der Proben, in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden. Vorsäulen(-kartuschen) sind mit der gleichen stationären Phase wie die eigentliche Trennsäule gepackt. Mitunter werden Materialien mit größeren Partikeln in die Vorsäulen gepackt, um einerseits Kosten und ferner einen zusätzlichen Druckanstieg zu minimieren. Die Hersteller präparativer HPLC Säulen bieten unterschiedliche Arten von Vorsäulen an. Welche Möglichkeiten von Vorsäulen es für Ihre präparative HPLC Säule gibt, können Sie gern bei MZ-Analysentechnik GmbH erfragen.

Für die Lagerung von präparativen HPLC Säulen sollten die vom Hersteller empfohlenen Lösungsmittel verwendet werden. Im Allgemeinen sollte das Lösungsmittel zur Aufbewahrung nicht mehr als 50% Wasser enthalten, um das Wachstum von Bakterien, Algen und Pilzen zu vermeiden.

© MZ-Analysentechnik GmbH, 2021

